บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

น้ำเวย์ (whey) คือ ของเหลวที่เหลือหลังจากแยกส่วนที่ตกตะกอนออกจากน้ำนม ครีม หรือ นมไขมันต่ำ ส่วนประกอบของน้ำเวย์จะแปรผันตามส่วนประกอบของน้ำนมที่นำมาใช้ทำเนยแข็ง น้ำเวย์ที่ได้จากการตกตะกอนน้ำนมโดยใช้เอนไซม์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 5.6 เรียกว่า sweet whey และถ้าตกตะกอนน้ำนมด้วยกระบวนการปรับให้เป็นกรด (acidification) มีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 5.1 หรือต่ำกว่า เรียกว่า acid whey (Zadow, 1992) โดยส่วนประกอบของสารอาหารในน้ำเวย์นมมีปริมาณโปรตีน 0.6-0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรปริมาณน้ำตาลแลคโตส 4.5-5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมีปริมาณไขมัน 0.2-0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Rosenthal, 1991)

2.1 กระบวนการผลิตเนยแข็ง

2.1.1 การผลิตเนยแข็ง Mozzarella cheese (เอกสารเผยแพร่บริษัท แดซีโซ่ จำกัด)

นำน้ำนมดิบ 50 เปอร์เซ็นต์ ผสมหางนม 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพิ่มอุณหภูมิน้ำนมให้เป็น 32 องศาเซลเซียส เติมกรด 1 เปอร์เซ็นต์ (กรดอะซีติกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมเอนไซม์เรนเนต 0.001 เปอร์เซ็นต์ คนนาน 5 นาที ทิ้งไว้ 45-60 นาที ตัดเคิร์ด ออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ คนทุก 5 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 36-38 องศาเซลเซียส คนนาน 30-40 นาที ปล่อยน้ำเวย์ทิ้งพักเคิร์ด นำเคิร์ดไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 76-78 องศาเซลเซียส นำเนยแข็งไปนวดใส่เกลือ แล้วนำไปใส่พิมพ์ นำเนยแข็งไปแช่เย็น 1 คืน รอการจำหน่าย

2.1.2 การผลิตเนยแข็งมอซซาเรลลา (Mozzarella cheese) (เรณู และคณะ, 2544)

น้ำนมดิบไขมัน 4.0-4.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เติมกรดอะซีติก 1 เปอร์เซ็นต์ (กรดอะซีติกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) กวนอย่างรวดเร็วนาน 2 นาที ปรับอุณหภูมิเป็น 30 องศาเซลเซียส เติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ เติมเอนไซม์เรนเนต 0.0025 เปอร์เซ็นต์ กวน 5 นาทีตั้งทิ้งไว้ 45 -60 นาที (อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส) ตัดเคิร์ด (ขนาดประมาณ 4 -6 มิลลิเมตร) นาน 2 -3 นาที กวนเคร็ดนาน 25 นาที (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) แยกน้ำเวย์ น้ำก้อนเคิร์ดล้างน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที แยกน้ำที่ใช้ล้างเคิร์ดทิ้ง จัดก้อนเคิร์ดที่กระจายให้เป็นก้อนเดียวกัน ตัดเคิร์ดให้เป็น 8 ส่วนเพื่อแยกน้ำเวย์ (แยกออกให้ได้มากที่สุด) นำเคิร์ดวางซ้อนทับกันเพื่อให้น้ำเวย์แยกออกได้มากที่สุด นำเคิร์ดมาต้มในน้ำเวย์อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส นำเคิร์ดมารีด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วพับสลับกัน 4 ครั้งในขณะร้อนอยู่โดยใช้ลูกกลิ้งเพื่อแยกน้ำเวย์ออกให้ได้มากที่สุด ม้วนเคิร์ดที่รีดกำจัดน้ำเวย์ออกแล้วให้เป็นก้อนแล้วบรรจุลงพิมพ์ นำเนยแข็งออกจากพิมพ์แช่น้ำเกลือความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 ชั่วโมง นำไปแช่เยือกแข็งอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเพื่อรอไว้ใช้งานต่อไป บรรจุใส่ถุงโพลิเอทธิลีนปิดให้สนิท

2.1.3 การผลิตเนยแข็ง Cheddar Cheese (เอกสารเผยแพร่บริษัท แคซีโซ่ จำกัด)

น้ำนมดิบ 90 เปอร์เซ็นต์ หางนม 10 เปอร์เซ็นต์ อุ่นให้ได้อุณหภูมิ 30–32 องศาเซลเซียส เติมกล้าเชื้อ 0.7 เปอร์เซ็นต์ คนให้เข้ากันประมาณ 10 นาที เติมเรนเนต 0.002 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งให้นมแข็งตัวเป็นเจลหรือเคิร์ด 30-40 นาที ตัดเคิร์ดเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ แช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ คนเบา ๆ ระบายน้ำเวย์ออกครึ่งหนึ่ง ค่อย ๆ คนเบา ๆ จนได้ เวลานานประมาณ 2-3 ชั่วโมง ระบายน้ำเวย์ออกให้หมด ตัดเคิร์ดวางเคิร์ดให้ซ้อนทับกัน 3 ครั้ง และปล่อยให้น้ำเวย์ระบายออกให้หมด ใช้เวลาอีก 1-2 ชั่วโมง ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ เติมเกลือ นวดใส่เกลือ แล้วนำไปใส่พิมพ์ นำบ่มที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส ประมาณ 1เดือน นำเนยแข็งที่ได้ไปแช่เย็น รอการจำหน่าย

2.1.4 การผลิตเนยแข็ง Cheddar Cheese (เรณู และคณะ, 2544)

น้ำนมดิบ 20 ลิตร พาสเจอร์ไรส์ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที ลดอุณหภูมิลงถึง 30–32 องศาเซลเซียส เติมเชื้อเติมกล้าเชื้อ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้นาน 15-30 นาที เติมเรนเนต 0.002 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์ 0.025เปอร์เซ็นต์ ทิ้งให้นมแข็งตัวเป็นเจลหรือเคิร์ด 30 นาที ตัดเคิร์ดเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ นำเคิร์ดไปแช่ในน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่อย ๆ คนเบา ๆ ให้อุณหภูมิเพิ่ม 1 องศาเซลเซียส ต่อ 5 นาที ระบายน้ำเวย์ออกครึ่งหนึ่ง ค่อย ๆ คนเบา ๆ จนได้ปริมาณกรด 0.5–0.6 เปอร์เซ็นต์ เวลานานประมาณ 2-3 ชั่วโมง ระบายน้ำเวย์ออกให้หมด ตัดเคิร์ดวางเคิร์ดให้ซ้อนทับกัน 3 ครั้ง และปล่อยให้น้ำเวย์ระบายออกให้หมดใช้เวลาอีก 30 นาที ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ เติมเกลือ นวดใส่เกลือ แล้วนำไปใส่พิมพ์ นำเนยแข็งไปแช่เย็น 1 คืนรอการจำหน่าย

น้ำเวย์ (Whey) เป็นของเหลวที่เป็นผลพลอยได้จากการทำเนยแข็ง ปกติเวย์จะเสียง่าย น้ำเวย์ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส (44 ถึง 52 กรัมต่อลิตร) โปรตีน (6 ถึง 8 กรัมต่อลิตร) และเกลือแร่ต่างๆ (4.3 ถึง 9.5 กรัมต่อลิตร) (Jelen, 1992) ประมาณ 47 เปอร์เซ็นต์ ของ 115 ล้านตันของเวย์ที่มีอยู่ทั่วโลก ในแต่ละปีจะเป็นน้ำเสียที่เป็นมลภาวะที่มีค่า บีโอดี (BOD, Biological oxygen demand) และ ซีโอดี (COD, Chemical oxygen demand) สูง โดยมีค่า บีโอดี ประมาณ 40,000 ถึง 60,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ มีค่า ซีโอดี ประมาณ 50,000 ถึง 80,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Ben and Ghaly, 1994) ที่มีค่าบีโอดี สูง เนื่องจากมีน้ำตาลแลคโตสอยู่

จากองค์ประกอบที่มีอยู่ในน้ำเวย์ จึงมีการนำน้ำเวย์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆเช่น น้ำเวย์ที่ได้แยกแร่ธาตุออกแล้วมาทำให้เข้มข้น หรือทำเป็นเวย์ผงไปทำการย่อยแลคโตส (lactose hydrolysis) ทำให้ได้สารให้ความหวาน ซึ่งมีความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครสถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Marwaha and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Kennedy, 1988) นำแลคโตสที่ได้ไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆได้หลายชนิด เช่น การทำแลคโตส บริสุทธิ์ (purified lactose) แลคติทอล (lactitol) แลคทูโลส (lactulose) แลคโทซิลูเรีย (lactosilurea) เป็นต้น นำเวย์ไปผ่านระบบการกรองอุลตราฟิลเตรทชั่น (Ultrafiltration) จะได้เวย์โปรตีนเข้มข้นส่วนที่ผ่านการกรองได้จะนำไปใช้ในการย่อยแลคโตส ซึ่งจะนำไปใช้ในการหมัก หรือนำสารที่ผ่านการกรองนี้ไปหมักได้โดยตรง ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ในการผลิตสิ่งต่างๆได้เช่น เอธิลแอกอฮอล์ เครื่องดื่ม สารอินทรีย์ กลีเซอรอล สารมีกลิ่น คอลราตินอล หรือ นำเวย์ไปทำการผลิตไบโอแก๊สเป็นต้น (Gonzalez *et al.*, 1996)

เนื่องจากน้ำเวย์มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น น้ำตาลแลคโตสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ ดังนั้นจึงมีแนวความคิดว่าน่าที่จะสามารถไปใช้ผลิตแซนแทนกัมได้ ด้วยแนวความคิดที่ว่า แซนแทนกัมเป็นสารโพลีเมอร์มีคุณสมบัติหลายอย่างที่ดี เช่น ความสามารถละลายน้ำได้ดีทั้งน้ำร้อนและน้ำเย็น สารละลายที่ได้มีความหนืดสูงถึงแม้ใช้ความเข้มข้นต่ำ ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นต้น และมีราคาแพงเนื่องจากมีการนำเข้าเพียงอย่างเดียวเพื่อใช้ในการบริโภคภายในประเทศ ประกอบกับ มีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมประเภทอื่นๆ

2.2 การย่อยน้ำตาลแลคโตส

2.2.1 การย่อยน้ำตาลแลคโตสด้วยกรด

มีการใช้กรด 2 รูปแบบ คือ 1 ใช้กรดเติมในสารละลายได้โดยตรง เช่นกรดซัลฟูลริก หรือ 2 ใช้กรดที่เป็นของแข็ง (solid acid) เช่น cationic exchange resin (Douglas *et al.*, 1997) ได้ทำการทดลองโดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนัก เติมในสารละลายแลคโตสโดยตรง ในหลอดแก้วขนาดเล็กปิดปาก (sealed glass ampoules) และให้ความร้อนในกระบะทราย โดยใช้อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส พบว่าจะได้น้ำตาล 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคสและ น้ำตาลกาแลคโตส และไม่พบผลิตภัณฑ์อื่นๆร่วมด้วย (Douglas *et al.*, 2001) การใช้กรด ซัลฟูริกย่อยแลคโตส จะช้ากว่ากรดไฮโดรคลอริก (Vujicic *et al.*, 1997) มีการใช้ Sulfonic acid cation exchanger เป็นตัว ไฮโดรไลซ์แลคโตสจากสารละลายแลคโตส หรือ น้ำเวย์จากการผลิต cottage cheese ที่ผ่านการกรองแบบ Ultra filtration การไฮโดรไลซ์ จะทำได้มากกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส และได้แลคโตส ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (Mulherin *et al.*, 1979) แลกโตส ที่ผลิตได้ในทางการค้า ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อไฮโดรไลซ์ ด้วยกรดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.7 ในเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าจะไม่ถูก ไฮโดรไลซ์ แต่ถ้าเป็นแลกโตส จากเวย์ที่สภาวะเดียวกันนี้จะถูกไฮโดรไลซ์ได้ (Ney *et al.*, 1970)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 การย่อยน้ำตาลแลคโตสด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ แลคเตส มีชื่ออีกอย่างหนึ่งว่า β- galactosidase ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถเตรียมได้จากยีสต์และรา เช่น *Aspergillus. oryzae, Aspergillus niger* และ *Kluveromyces fragilis* โดย pH ที่เหมาะสม ในการใช้งาน คือ 4.5– 6.0 , 3.0 – 4.0 และ 6.5 – 7.0 ตามลำดับ β- galactosidase เมื่อมีการเติมลงไปในนม หรือ เวย์ (2000 หน่วยต่อกิโลกรัม) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แลคโตส จะถูกย่อยเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ เพราะเอนไซม์ เหล่านี้จะถูกยับยั้งการทำงานด้วยปริมาณ กาแลคโตสที่เพิ่มขึ้น (http:www.lsbu.ac.uk., 2004) ปัจจุบันมีการใช้ immobilized β-galactosidase ที่ตรึงบน polysaccharide micro sphere ในการไฮโดรไลซ์ แลกโตส ให้เป็น กลูโคส และ กาแลกโตส ซึ่งสามารถใช้ได้กับผลิตภัณฑ์นมที่มีปริมาณ แลกโตส ต่ำได้ (Hakki *et al.*, 2006)

2.3 คุณสมบัติต่างๆของแซนแทนกัม ดังนี้

2.3.1 ความสามารถในการละลาย

แซนแทนกัมมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น และสารละลายที่ได้จะมีความหนืดสูงถึงแม้ใช้ความเข้มข้นต่ำ นอกจากนี้แซนแทนกัมสามารถละลายได้ดีทั้งในกรด ด่าง และเกลือหลายชนิด เช่น โซเดียมคลอไรด์ 5 – 15 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งสามารถละลายได้กับตัวทำละลายอินทรีย์ หลายชนิดเช่น เอธิลแอลกอฮอล์ เมธานอล ไอโซโพรพิลแอกอฮอล์ และอะซิโตน เป็นต้น โดยการเติมตัวทำละลายอย่างช้าๆ และกวนอย่างสม่ำเสมอ แต่แซนแทนกัมจะตกตะกอนถ้ามีความเข้มข้นเกิน 50 เปอร์เซนต์ (Rock, 1971)

นอกจากนี้แซนแทนกัมยังสามารถใช้ร่วมกับ สารเพิ่มความหนืดชนิดอื่นๆได้ เช่น กัวกัม คารา-จีแนน โลคัสบีนกัม โดยจะขึ้นอยู่กับสัดส่วนที่เหมาะสม เช่น แซนแทนกัมต่อโลคัสบีมกัม 75: 25 ถึง 40: 60 จะทำให้เกิดเจลที่มีความคงตัวสูงสุด (Schuppner, 1997)

2.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของความหนืด

สารละลายแซนแทนกัม มีความสามารถที่จะรักษาความหนืดให้คงที่ได้ เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้าง (Betz, 1979) เช่น สารละลายแซนแทนกัม 1 เปอร์เซ็นต์ มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีความหนืดประมาณ 100 เซนติพอยต์ ที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 0 ถึง 95 องศาเซลเซียส พบว่าความหนืดจะเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 100 เซนติพอยต์ แม้อุณหภูมิขณะแปรรูปอาหารจะเปลี่ยนแปลง เมื่อนำสารละลายแซนแทนกัม มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ถึง 30 นาที ในระบบปิด หรือให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานๆ พบว่าความหนืดเปลี่ยนแปลงน้อยมากนอกจากนี้ เกลือในอาหารจะช่วยให้มีความต้านทานต่อการแตกตัวด้วยความร้อนได้สูงขึ้น (Betz, 1979)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.3 ผลของระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อความคงตัวของความหนืด

สารละลายแซนแทนกัม สามารถรักษาความหนืดให้คงที่ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อระดับความเป็นกรด-ด่าง เปลี่ยน จึงนิยมใช้แซนแทนกัมในอุตสาหกรรมค่อนข้างสูง เช่น แซนแทนกัมสามารถละลายได้ในในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) สูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์ และ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) สูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก (hydrochloric acid) 10 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอสฟอริก (phosphoric) 25 เปอร์เซ็นต์ โดยความหนืดของสารละลายเหล่านี้จะคงที่เป็นเวลานานหลายเดือน ถ้าอุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลงมาก (Kovacs and Kang, 1977)

2.3.4 คุณสมบัติการไหล (Pseudo plasticity)

เป็นคุณสมบัติของไหลที่เคลื่อนที่ได้ จะมีแรงที่พยายามต้านการเคลื่อนที่ของของไหลนั้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษของแซนแทนกัมที่ต่างออกไปจากสารพวกคอลลอยด์ในน้ำ (hydrocolloid) ชนิดอื่น คุณสมบัติของการไหลเป็นประเภท Non-Newtonian fluid ที่มีคุณสมบัติเป็น Pseudo plastic ซึ่งมีความสำคัญต่อกลิ่น ลักษณะปรากฏ และความรู้สึกโดยการชิมของผลิตภัณฑ์อาหารกล่าวคือ ถ้ามีแรงกระทำต่อสารละลายกัมต่ำ (shear rate ต่ำ) สารละลายจะมีแรงต้านทานสูง ในตรงกันข้าม เมื่อเพิ่มแรงกระทำมากขึ้น (shear rate สูง) ความหนืดค่อยๆลดลงอย่างรวดเร็ว (Betz, 1979) ซึ่งคุณสมบัตินี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายสูงขึ้น ลักษณะเป็น Pseudoplasticity ซึ่งจะช่วยป้องกันการตกตะกอนของสารขนาดใหญ่ ป้องกันหยดน้ำมันไม่ให้ลอยขึ้นข้างบน (Anonymous, 1974)

2.3.5 ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อความคงตัวของความหนืด

สารละลายที่มีแซนแทนกัมมากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ การเติมเกลือลงเพียงเล็กน้อยจะช่วยเพิ่มความหนืดได้ การเติมเกลือในสารละลายแซนแทนกัมที่มีความเข้มข้นต่ำ การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเพียงเล็กน้อยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความหนืด แต่เมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ลงในสารละลายแซนแทนกัมที่มีความเข้มข้นสูง 15 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ความหนืดของสารละลายลดลงเล็กน้อย (Kovacs, 1973) สารละลายแซนแทนกัม เมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 0.005 ถึง 0.01 โมลาร์ จะไม่ส่งผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิของแซนแทนกัม แต่หากความเข้มข้นเกลือสูงกว่านี้จะทำให้โมเลกุลของแซนแทนกัมบางส่วนเกิดการจับตัวเป็นก้อน (Gamini and Mandel, 1994) สรุปได้ว่าความหนืดของสารละลายแซนแทนกัม ขึ้นอยู่กับปริมาณกัม และปริมาณเกลือ (Betz, 1979)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ

ในปี 1971 Food and Drug Administration (FDA) ของประเทศสหรัฐอเมริกาได้ออกประกาศอนุญาตให้ใช้แซนแทนกัม เติมลงไปในอาหารและยาได้ ในปี 1980 FDA ประกาศยกเลิกการควบคุมปริมาณการใช้ในแต่ละวันต่อบุคคล (http:www.jungbunzlauer.com) และขึ้นทะเบียนภายใต้ชื่อ E415 ใน Annex I ของ European Parliament and Council Directive No. 95/2/EC ในวันที่ 20 กุมภาพันธ์ ค.ศ.

1995 (Betz, 1979) ปัจจุบันประเทศต่างๆ ยอมรับการใช้แซนแทนเป็นสารเจือปนในอาหารได้จึงทำให้มูลค่าการตลาดทั่วโลกรวม 303 ล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐ แซนแทนกัมมีปริมาณการใช้ประมาณ 40 – 50 ล้านตันต่อปี ขณะที่การใช้แซนแทนกัมทั่วโลกมีประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ จะใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง (http:www.foodqualitynew.com) มีการใช้แซนแทนกัมในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขาง ตัวอย่างเช่น น้ำสลัดมีวัตถุประสงค์เพื่อ เป็นอิมัลซิไฟเออร์ เนื่องจากแซนแทนกัมสามารถคงตัวต่อความร้อนในการพาสเจอร์ไรส์ และค่าความเป็นกรด - ด่างได้ดี ยังช่วยการกระจายตัวของเครื่องเทศในน้ำสลัดได้สม่ำเสมอ และ ให้เนื้อสาร (body) แก่น้ำสลัดด้วย มีบทบาทในการรักษาระดับความเข้มข้นซอสแต่งหน้าให้คงที่ แม้ผ่านกระบวนการให้ความร้อน ผลิตภัณฑ์นมและครีม เพื่อใช้เป็นสารที่ทำให้อยู่ตัว (Stabilizer) รักษาความหนืดให้คงสภาพอยู่ได้แม้ผสมกับส่วนผสมอื่นๆ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เพื่อใช้เป็นสารที่ทำให้อยู่ตัว (Stabilizer) มีคุณสมบัติอุ้มน้ำได้ดีจึงทำให้ลดการสูญเสียน้ำระหว่างการอบแรเก็บรักษาผลิตภัณฑ์, อาหารสัตว์ เป็นสารให้ความคงตัว ความข้นหนืดและเนื้อสัมผัสที่ดี ผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำอย่างรวดเร็วเช่น เครื่องดื่ม ซุปสำเร็จรูป และของหวาน ให้เกิดการกระจายตัวที่ดีทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น และให้เนื้อสัมผัสที่ดี

ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ตัวอย่างเช่น ด้านการเกษตร (Agriculture) เป็นสารป้องกันการตก ตะกอน (Suspending agent) ยากำจัดศัตรูพืชและยาฆ่าแมลง ช่วยให้การกระจายตัวดีขึ้น เครื่องปั้นดินเผา (Ceramics) ช่วยรักษาความเหนียวของดิน เป็นสารหล่อลื่นในการขึ้นรูป สารทำความสะอาด (Cleaner) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยึดเกาะบนพื้นผิว ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Cosmetic) เช่น ยาสีฟัน แชมพู โลชั่น เป็นสารช่วยรักษาความคงตัวและเป็น อิมัลซิไฟเออร์, สิ่งทอ (Textile) ช่วยป้องกันการตกตะกอนของสีย้อมผ้า (Industrial Grade KELZAN, 1976)

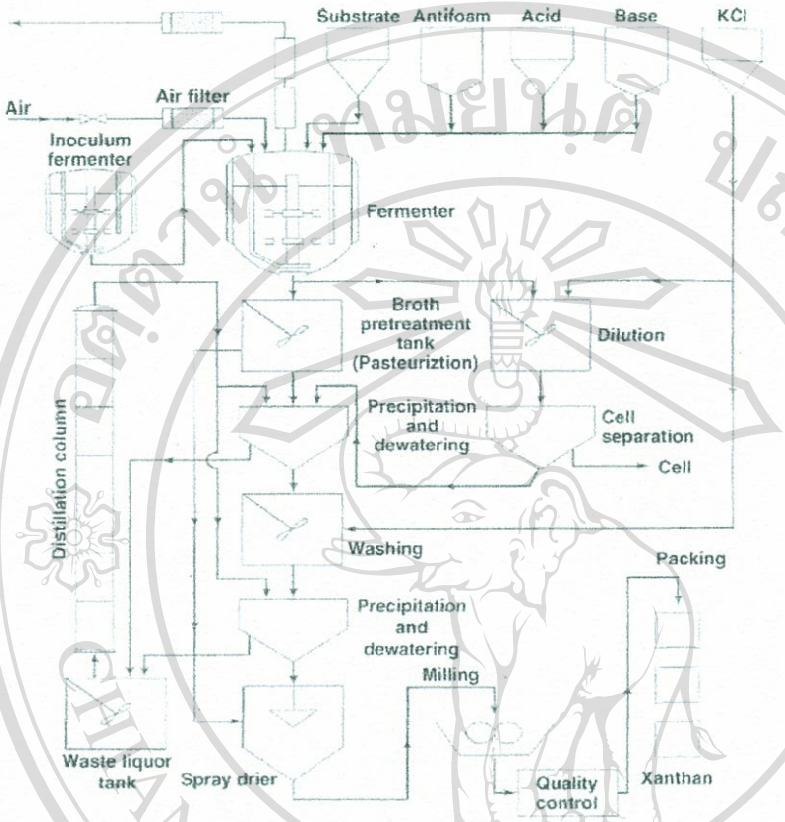
2.5 ระบบการผลิตในอุตสาหกรรม

ในการหมักเพื่อให้ได้แซนแทนกัมในระดับอุตสาหกรรม จะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลอินเวอร์สเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ขบวนการหมักแบบกะ มากกว่ากระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง เนื่องจากสามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้ง่าย

โดยเริ่มต้นด้วยการเติมกล้าเชื้อ *Xanthomonas campestris* ลงในอาหารที่เหมาะสม มีการกวนตลอดเวลาพร้อมทั้งให้อากาศ โดยมีอัตราการให้อากาศอยู่ประมาณ 0.3 (v/v) อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7.0 และเวลาในการหมัก 100 ชั่วโมง สามารถผลิตแซนแทนกัมได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างขั้นตอนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม แสดงดังภาพที่ 2.1 คุณภาพแซนแทนกัมในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์ เริ่มต้นโดยการพาสเจอร์ไรส์ อาหารหมักเพื่อทำลายเซลล์เชื้อ และยับยั้งเอนไซม์ นำไปแยกเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยง จากนั้น ตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ หรืออาจจะไปผ่านขั้นตอนการละลายน้ำแล้วตกตะกอนใหม่ โดยใช้ แอลกอฮอล์ร่วมกับเกลือเพื่อเพิ่มคุณสมบัติในการตกตะกอน ซึ่งเกิดเนื่องจากผลของประจุไฟฟ้า จากนั้นดึงน้ำออกแล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ แอลกอฮอล์ที่ใช้ล้างสามารถนำกลับไปใช้ใหม่ได้อีก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แซนแทนกัมที่ได้ ผ่านการ Spray dry เพื่อให้ได้คุณภาพดีขึ้นและขนาดตามต้องการ (http: www. foodqualitynew. com., 2005)



ภาพที่ 2.1 แสดงกระบวนการผลิตแซนแทนกัมในระดับอุตสาหกรรม

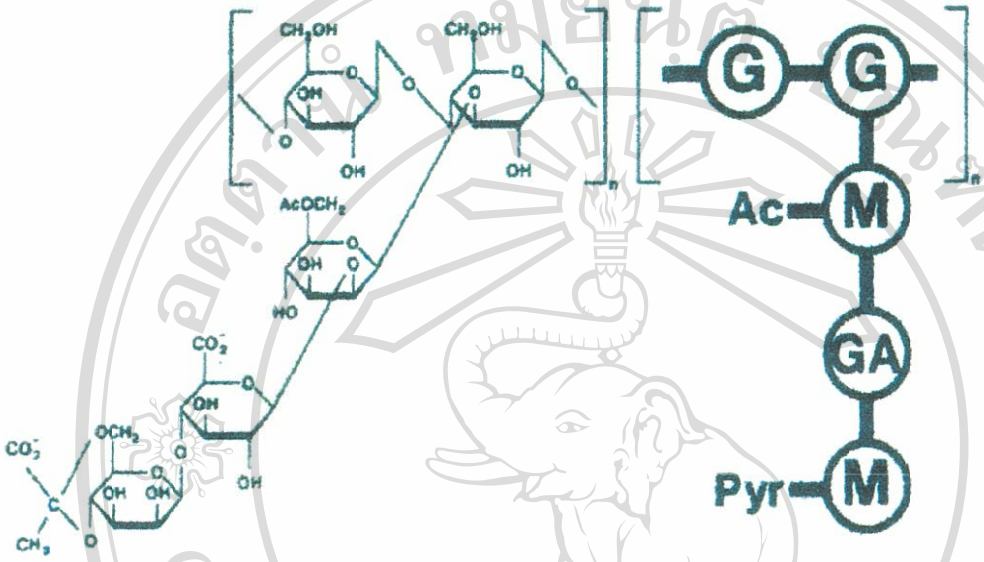
ที่มา: Rosalam and England (2005)

2.6 โครงสร้างแซนแทนกัม

แซนแทนกัมเป็นเฮเตอโรโพลีแซคคาไรด์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่างน้ำหนัก $2x10^6 - 20x10^6$ Da. (Garcia *et al*., 2000) มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียบริสุทธิ์ คือ *Xanthomonas campestris* ซึ่งโดยปกติจะเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในพืช เช่น ในกะหล่ำปลี มีชื่อทางการค้าว่า Keltrol โดย 1 หน่วยของแซนแทนกัมประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมสโนส และ กรดกลูโคโรนิค ในอัตราส่วน 2: 2: 1 และมีหมู่ไพรูวิก และอะซิติก ประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้ำตาลกลูโคส ซึ่งน้ำตาลกลูโคสทั้ง 2 หน่วยทำหน้าที่เป็นแกนหลักของโครงสร้าง โดยต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) glycoside ส่วนน้ำตาลแมนโนสและกรดกลูโคโรนิกทำหน้าที่เป็นกิ่งก้านของโครงสร้าง (side chain) โดยน้ำตาลกลูโคสต่อกับแมนโนสด้วยพันธะ α- (1,3) glycoside และที่ตำแหน่ง C-6 ของน้ำตาลแมนโนส จะมีหมู่แอเซติลเข้าเกาะอยู่ ส่วนกรดกลูคูโรนิกนั้นจะเข้าจับกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำตาลแมนโนสด้วย พันธะ β-(1,2) glycoside C-4 และ C-6 ของน้ำตาลแมนโนส จะมีหมู่ไพรูวิก เข้าเกาะอยู่ตอนปลาย และหมู่ไพรูวิก จะมีสัดส่วนประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักโมเลกุลทั้งหมด แสดงดังภาพที่ 2.2



G = glucose, M = mannose, GA = glucuronic, Ac = acetate, Pyr = pyruvate

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของแซนแทนกัม

ที่มา: Randal and Daniel, 1990

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. อนุกรมวิธานของเชื้อ *Xanthomonase* sp. สามารถจำแนกได้เป็นหมวดหมู่ ดังนี้

Division: *Protophyta*

Class: *Schzomycetes*

Order: *Pseudomonadalese*

Family: *Pseudomonadaceae*

Genus: *Xanthomonas*

ที่พบในปัจจุบันมี 8 ชนิด ได้แก่ *Xanthomonas albilneans, Xanthomonas axzonopodis Xanthomonas campestris, Xanthomonas citri, Xanthomonas fragariae, Xanthomonas maltophillia Xanthomonas phaseoli* และ *Xanthomonas populi*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* sp. เป็นจีนัสหนึ่งในแฟมีลี่ Pseudmonaceae สามารถสร้างกัม ซึ่งเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่เกิดพันธะโควาเลนท์กับผนังเซลล์ พบว่า *Xanthomonas campestris* เป็นสายพันธุ์ที่สามรถผลิตแซนแทนกัมซึ่งมีคุณภาพดี และได้มาตรฐานที่ดีที่สุด จุลินทรีย์ทั้งหมดในจีนัสนี้ก่อให้เกิดโรคได้ในพืชหลายชนิด รวมไปถึงพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ตัวอย่างเช่น กะหล่ำปลีAlfalfa และ ถั่ว ค้นพบครั้งแรกในปี 1950 โดยสถาบัน NRRL ของสหรัฐอเมริกา (Northern Religion Research Laboratory) (มนต์ศักดิ์ และ เผด็จ, 2543)

เซลล์ของ *Xanthomonas campestris* เป็นเซลล์รูปแท่งยาวขนาดกว้าง 0.4 ถึง 0.7 ไมโครเมตร ยาว 0.7 ถึง 1 ไมโครเมตร เซลล์ของ *Xanthomonas campestris* เป็นเซลล์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้โดย ใช้ Polar flagella ติดแกรมลบ จุลินทรีย์ชนิดนี้จะเจริญในอาหารวุ้นโดยมีโคโลนี สีเหลือง เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 27 ถึง 30 องศาเซลเซียส และต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (Jacob and Genstein, 1960) ลักษณะของเชื้อ *Xanthomonas campestris* แสดงดังภาพที่ 2.3

ภาพที่ 2.3 ลักษณะของเชื้อ *Xanthomonas campestris* (X 12000)
ที่มี : Garcia, *et al.* 2000

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7 อายุและปริมาณกล้าเชื้อ

แซนแทนกัมเป็นสารทุติยภูมิซึ่ง *Xanthomonas campestris* สร้างขึ้นที่ปลาย log phase จนถึง stationary phase ของการเจริญเติบโต ดังนั้นกล้าเชื้อที่นำมาใช้ในการผลิตควรมีการเจริญอยู่ในช่วงกลาง log Phase ซึ่งมีอายุประมาณ 24-48 ชั่วโมง และปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมส่วนใหญ่นิยมใช้ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณกล้าเชื้อต่อปริมาตรการผลิต (Pinches and Pallent., 1986)

2.8 ชีวเคมี และ วิถีชีวเคมีของการผลิตแซนแทนกัมโดยเชื้อ *Xanthomonas* sp.

คุณสมบัติและลักษณะเฉพาะของ *Xanthomonas* sp. แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Xanthomonas* sp.

คุณสมบัติทางชีวเคมี	*Xanthomonas albilneans*	*Xanthomonas axzonopodis*	*Xanthomonas campestris*	*Xanthomonas fragariae*	*Xanthomonas populi*
Reduction of NO^-_3 to NO^-_2	-	-	-	-	-
Lysine decarboxylation	-	-	-	-	-
Mucoid growth on nutrient Ager +5 glucose	-	-	+	+	+
Xanthomonadins produced	+	+	+	+	+
Hydrolysis of :					
Gelatin	d	-	d	+	-
Esculin	+	+	+	-	
Starch	-	+	d	+	
Milk proteolysis	-	-	+	-	Slow
H_2S from peptone	-	+	+	-	-
Maximum growth Temperature, °C	37	35-37	35-39	33	27.5
Maximum NaCl tolerance %	0.5	1.0	2.0-5.0	0.5-1.0	0.4-0.6
Acid production within 21 days on dye's medium C from:					
Arabinose	-	-	+	-	-
Glucose, sucrose	+	+	+	+	+
Mannose	+	-	+	+	-
Galactose	d	-	+	-	+
Trehalose	-	+	+	-	+
Fructose	-	-	+	+	+
Lactose, maltose	-	-	d	-	
Xylose	+	-	d	-	
Ribose			d	-	
Melibiose	-		d	-	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Xanthomonas* sp. (ต่อ)

คุณสมบัติทางชีวเคมี	*Xanthomonas albilneans*	*Xanthomonas axzonopodis*	*Xanthomonas campestris*	*Xanthomonas fragariae*	*Xanthomonas populi*
Raffinose	-	-	d	-	
Melezitose		-	d	-	
Dextrin		-	d	-	
Glycogen			d	-	
Glycerol		-	d	-	
Adonitol, mannitol, sorbitol, dulcitol, rhamnose, salicin, meso-inositol, inulin, α-methylglucoside	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + หมายถึง เชื้อมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของสายพันธ์ ให้ผลบวก
- หมายถึง เชื้อมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของสายพันธ์ ให้ผลลบ
d หมายถึง เชื้อ11-89 เปอร์เซ็นต์ ของสายพันธ์ ให้ผลบวก

จากตารางที่ 2.1 พบว่า เชื้อ *Xathomonas campestris* ส่วนใหญ่สามาถสามารถใช้น้ำตาลโมลเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (Glucose), อะราบิโนส (Arabinose), แมนโนส (Mannose), กาแลคโตส (Galactose), และ ฟรุคโตส (Fructose) ได้ดี ส่วนน้ำตาลโมลเลกุลคู่ เช่น แลคโตส (Lactose), มอลโตส (maltose) และ พอลีแซ็กคาไรด์ เช่น เด็กตริน (Dextrin), ไกลโคเจน (Glycogen) ไม่สามารถนำไปใช้ได้ดีนัก ซึ่งสอดคล้องกับ Rosalam and England (2005) กล่าวว่า *Xathomonas campestris* โดยทั่วไปไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจาก เซลล์เชื้อ *Xanthomonas campestris* จะผลิต เอนไซม์ β-galactosidase ได้ต่ำมาก

การสร้างแซนแทนกัมของ *Xanthomonas campestris* จะเป็น extracellular polysaccharide ชนิดเป็นเมือก โดยจะสร้างแซนแทนกัมภายในเซลล์ แล้วขับออกมาสู่ภายนอกเซลล์ แซนแทนกัมที่ขับออกมาจะมีความชื้นสูง กลไกการสังเคราะห์แซนแทนกัม แบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน

การดูดซับสับเสตรท (Substrate uptake) การเกิดเมทาบอลิซึม (Intermediary metabolism) การสร้างโพลีแซคคาไรด์ (Formation of exopolysaccharide) และ การขับสารโพลีแซคคาไรด์ออกนอกเซลล์ (Modification and secretion)

ขั้นตอนเหล่านี้ สามารถอธิบายได้ว่า สับเสตรทเข้าสู่เซลล์โดยระบบการส่งผ่านแบบ Active Transport และ เกิดการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของกลุ่มต่างๆ ที่เกี่ยวกับ ฟอสฟอรีเลชั่น (phosphorelation)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสับเสตรท หลังจากสับเสตรทเข้าสู่เซลล์ก็จะเกิดกระบวนการย่อยสลาย (Catabolism) หรือกระบวนการที่นำไปสู่การสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์ จะเกี่ยวกับการเกิดน้ำตาลนิวคลีโอไทด์ (sugar nucleotide) หลายชนิด น้ำ ตาลฟอสเฟตและน้ำตาลที่แปรเปลี่ยนไป (interconversion of sugar) ซึ่งโมโนแซคคาไรด์ที่มีอยู่ใน น้ำตาลนิวคลีโอไทด์ จะเป็นตัวที่เติมลงไปในโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์เป็นตัวขับ (accepter) โมโนแซคคาไรด์เข้าไปใน การสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ ขั้นสุดท้าย เป็นขั้นที่เกิดการสังเคราะห์หมู่อะซิติล (acetyl) และคีตัล (ketal) โมเลกุลโพลีแซคคาไรด์ หลังจากนี้จึงถูกขับมายังผนังเซลล์ และปะปนอยู่ในอาหารเหลว Leigh and Coplin (1992) และ Harding and lelpi (1995) เสนอว่าการสังเคราะห์ แซนแทนกัมประกอบด้วย 4 ขั้นตอนด้วยกัน คือ

1. สารอาหารในรูปน้ำตาลผ่านเข้าสู่ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ จากนั้นจะเกิดการสังเคราะห์น้ำตาลไดฟอสเฟต (sugar nucleotide diphosphate) ผ่าน Pentose Phosphate Pathway และ Entner-Doudoroff Pathway

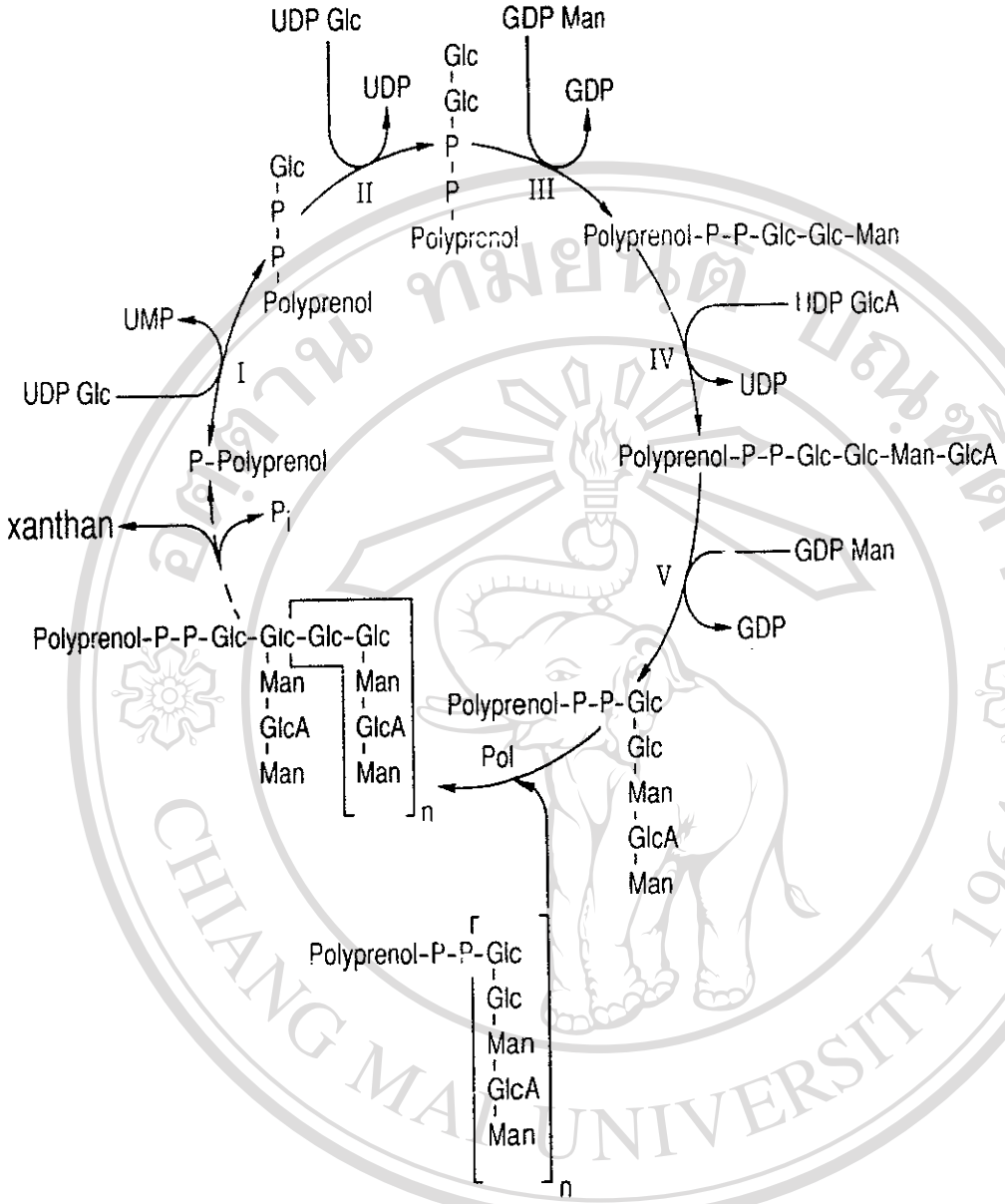
2. sugar nucleotide ถูกต่อเข้ากับสารตัวรับคือ polyphenol เพื่อสังเคราะห์ lipid intermediate โดยการต่อกันของ suger nucleotide ชนิดต่างๆในลำดับและตำแหน่งที่ถูกต้อง (แสดงดังภาพที่ 2.4)

3. หมู่ไพรูวิล และ หมู่อะซิติล ที่ได้จาก Phosphenolpyruvate และ Acetyl-CoA ถูกรวมเข้ากับโมเลกุลของแซนแทนกัม

4. แซนแทนกัมถูกเคลื่อนย้ายออกจากเซลล์ของเชื้อโดยอาศัยเอนไซม์พอลิเมอร์เรส (polymerase)

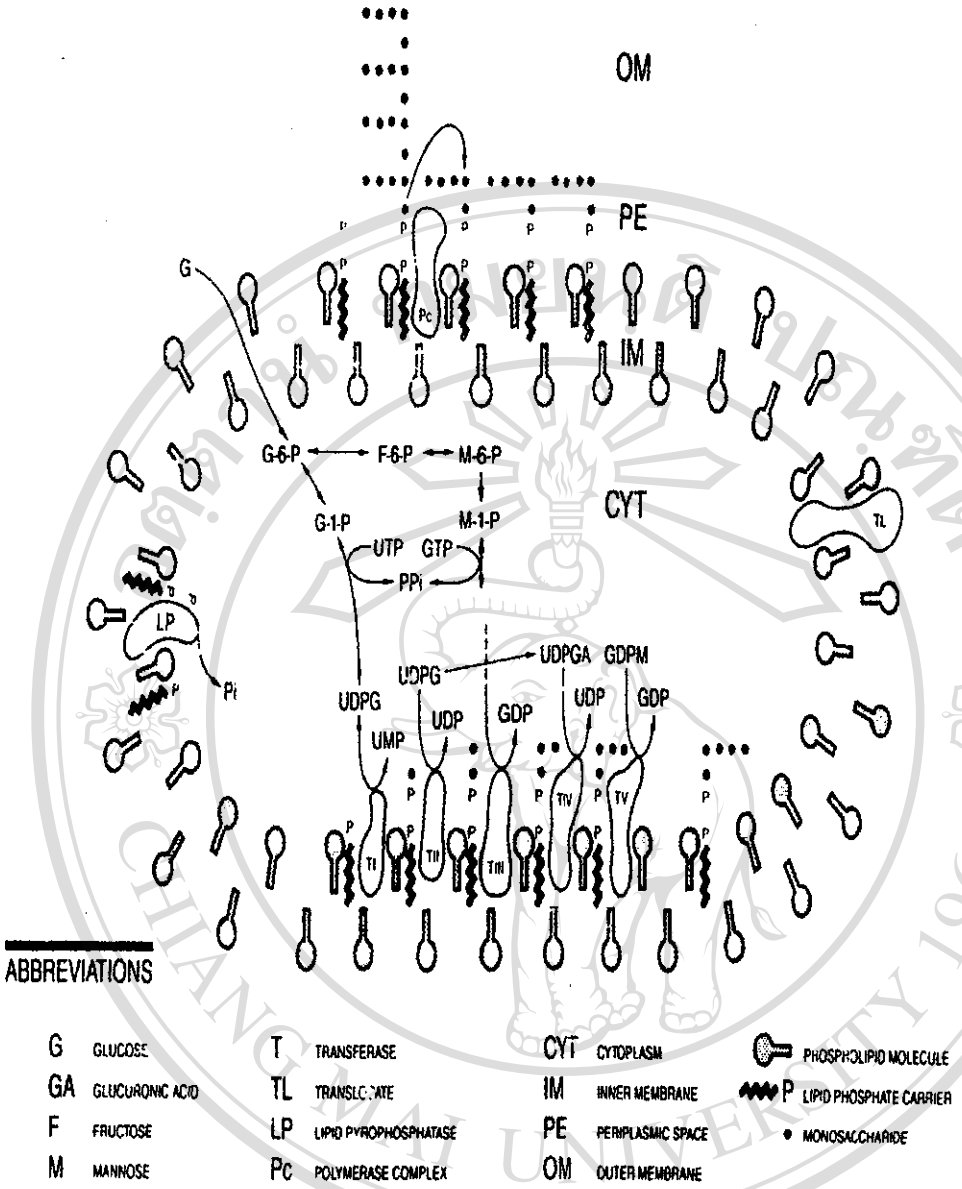
แผนผังการสังเคราะห์แซนแทนกัมภายในไซโตรพลาสซึม แสดงดังในภาพที่ 2.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.4 กลไกการสังเคราะห์ Lipid-intermediate ของแซนแทนกัม
ที่มา: Harding *et al.* (1995)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.5 แผนผังการสังเคราะห์แซนแทนกัมภายในไซโตรพลาสซึม
ที่มา: Harding *et al.* (1995)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.9 อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการผลิตแซนแทนกัม

2.9.1 แหล่งคาร์บอน

Moraine and Rogovin (1971) พบว่าในการเลี้ยง *Xanthomonas campestris* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมัก 36 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณแซนแทนกัม 1.4 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน และพบว่า อาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้เกือบหมด แต่ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ การใช้กลูโคสจะหยุดชะงัก เมื่อ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ใน

อาหารลดลงถึง 5.5 โดยพบว่ากลูโคสในอาหารเหลือมากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ (Rogovin *et al.*, 1961) รายงานว่า *Xanthomonas campestris* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้เพียง 2.5 เปอร์เซ็นต์ ถ้าความเข้มข้นมากกว่านี้จะไม่ส่งผลต่อการผลิตแซนแทนกัม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ (Souw and Demain, 1980, Vuyst *et al.*, 1987 and Funahashi *et al.*, 1987) ที่พบว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อปริมาณแซนแทนกัมที่ผลิตได้ พบว่าความเข้มข้น 2 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ ดีที่สุด แต่ถ้าความเข้มข้นมากกว่านี้จะยับยั้งการเจริญเติบโต นอกจากนี้แล้วยังมีการผลิตแซนแทนกัมจากของเสียที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตรต่างๆ (Lopez and Ramos, 1996) ได้ทำการผลิตแซนแทนกัมจากน้ำเสียที่ได้จากการโรงงานน้ำมันมะกอก (Oil Mill) พบว่าที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอก สามารถที่จะผลิตแซนแทนกัมได้ 4.4 กรัม/ลิตร และถ้าเพิ่มแหล่งไนโตรเจนและเกลือจะทำให้ได้แซนแทนกัมเพิ่มขึ้นเป็น 7.7 กรัมต่อลิตร ธันยาภรณ์ (2542) ได้ทำการศึกษาการผลิตแซนแทนกัมจาก กากมันสำปะหลัง โดยการย่อยกากมันสำปะหลัง ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อน พบว่าสามารถผลิตแซนแทนกัมได้ 9.26 กรัมต่อลิตร (Jana *et al.*, 1995) ได้ทดลองใช้กรดซิตริกเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนทำการผลิตแซนแทนกัม (Moreno *et al.*, 1998) ได้ทดลองผลิตแซนแทนกัมจากของเสียที่ได้จาก แตง Melon แตงโม แตงกวา และมะเขือเทศ พบว่าแตง Melon เป็นสับสเตรทที่สามารถผลิตแซนแทนกัมได้ 1.6 กรัมต่อลิตร

2.9.2 แหล่งไนโตรเจน

เป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นโดยตรงต่อการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ ของเชื้อ *Xanthomonas campestris* (Moraine and Rogovin, 1966) ถ้าอาหารมีไนโตรเจนมากเกินไป จะมีผลให้อัตราการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตเป็นโพลีแซคคาไรด์ลดลง (อรพิน, 2526) ไนโตรเจนเป็นอาหารที่จำเป็น สามารถใช้ในรูปสารประกอบประเภท สารอินทรีย์ได้ แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ได้แก่ เปปโตน หรือโซเดียมกลูตาเมท (Pinches and Pallent, 1986) จากการใช้แหล่งไนโตรเจนเช่น น้ำจากใบปอ เปปติน แป้ง และรำ soy peptone, corn steep liquor และyeast extract พบว่า corn steep liquor สามารถให้ผลผลิตมากที่สุด รองลงมาคือ เปปโตน (Kenedy *et al.*, 1984) การใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Xanthomonas* sp. จะให้ผลผลิตแซนแทนกัม ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (Meneely, 1969) น้ำตาลกลูโคสมีความสำคัญต่อการผลิตแซนแทนกัม ขณะที่ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ เพราะฉะนั้นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิต มีผลต่อทั้งการเจริญและการผลิตแซนแทนกัม (Moraine and Rogovin., 1966) ซึ่ง Vuyst, Loo and Vandamme (1987) เสนอว่าควรทำการผลิตแซนแทนกัมแบบ 2 ขั้นตอนโดยช่วงแรกของการหมักควรใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในระดับต่ำ เพื่อให้เกิดการเจริญของเชื้อสูง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงเพื่อกระตุ้นการสร้างแซนแทนกัม ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ ธันยาภรณ์ (2542) เมื่อปรับปรุงวิธีการผลิตโดยเลี้ยงเชื้อแบบ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนด้วยการแปรอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการกระตุ้นให้เชื้อเกิดการเจริญสูงเพื่อเข้าสู่ระบบผลิตไม่ได้มีประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมสูงขึ้น

2.9.3 แหล่งเกลือแร่

เป็นสารอาหารที่ใช้ในปริมาณน้อยแต่ก็ขาดไม่ได้ โดยจะทำหน้าที่เป็น Cofactor และเป็นองค์ประกอบของ Coenzymeในเมตาบอลิซึมของเชื้อ (Roseiro *et al.*, 1992) ซึ่ง Roseiro *et al.* (1993) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน การลดปริมาณแมกนีเซียมและซัลเฟอร์ในอาหารลงเหลือ 0.2 มิลลิโมลต่อลิตร และ 0.41 มิลลิโมลต่อลิตรตามลำดับ ทำให้เชื้อมีการเจริญสูงขึ้นแต่การสร้างแซนแทนกัมจะลดลง การศึกษาของ Slodki and Cadmus (1978), Kennedy *et al.* (1982) และ Pinches and Pallent (1986) แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตเจน ที่มีปริมาณการใช้ในอาหารจะทำให้การผลิตแซนแทนกัมดีขึ้น การศึกษาสารอาหารของ Garcia *et al.* (1992) แสดงให้เห็นว่าไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและแมกนีเซียม มีผลต่อการเจริญเติบโตขณะที่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟต มีผลต่อการผลิตแซนแทนกัม การเติมกรดซิตริกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานในการสร้างแซนแทนกัม โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อในระบบหมักแบบต่อเนื่องการเพิ่มความเข้มข้นของกรดซิตริกที่ใช้ทำให้การสร้างแซนแทนกัมเพิ่มจาก 3.4 กรัมต่อลิตรเป็น 7.6 กรัมต่อลิตร โดยไม่ทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น แต่ไม่ควรใช้กรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 5 กรัมต่อลิตรเมื่อทำการทดลองหมักแบบต่อเนื่อง และไม่ควรใช้กรดซิตริกมากกว่า 6 กรัมต่อลิตรในระบบหมักแบบกะ (Jana and Ghosh, 1995)

2.9.4 ความเป็นกรดด่าง

ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0–7.5 เป็นค่าความเป็นกรด-ด่าง เหมาะสมที่เชื้อ *Xanthomonas campestris* จะเจริญเติบโต ขณะที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0–8.0 เป็นระดับที่เหมาะสมต่อผลผลิตแซนแทนกัม (Eugenia *et al.*, 1994) ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการผลิตแซนแทนกัมอยู่ในช่วง 6.0 – 7.5 (Kang and Cottrell, 1979) ระหว่างการหมักค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 6.1 จะทำให้ผลผลิตแซนแทนกัมลดต่ำลง (Meneely, 1968) การที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำหมักมีค่าต่ำลงเนื่องมาจากจุลินทรีย์ผลิตกรดอินทรีย์ (ภาวิณี, 2524) การปรับ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ให้ต่ำกว่า 6.8 จะมีผลทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ ดีขึ้น สามารถใช้น้ำตาลได้หมด และมีการสร้างแซนแทนกัมได้มากขึ้น (Cadmu *et al.*, 1978) การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง แสดงให้เห็นว่าการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง จะไปยับยั้งการเจริญแต่ไม่มีผลต่อการผลิตแซนแทนกัม (Garcia *et al.*, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.9.5 อุณหภูมิ

มีการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตแซนแทนกัมอย่างกว้างขวาง อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตแซนแทนกัมอยู่ระหว่าง 25 ถึง 34 องศาเซลเซียส แต่อาหารที่หมักที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียสเป็นที่นิยมใช้ทั่วไป Moraine and Rogovin (1996) ชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตดีที่สุด Cadmus *et al.* (1978) แสดงให้เห็นว่า การใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเป็นการเพิ่มการผลิตแซนแทนกัมได้ แต่ปริมาณไพรูเวท (Pyruvate) จะลดลง Shu and Yang (1990) สรุปว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ด้วย สำหรับการผลิตแซนแทนกัมให้ได้ปริมาณสูงอุณหภูมิควรจะอยู่ที่ 31 ถึง 33 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 27 ถึง 31 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณไพรูเวทสูง สรุปว่าอุณหภูมิที่ผลิตขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ด้วย

2.9.6 การให้ออกซิเจน

ปริมาณอากาศหรือออกซิเจนมีความสัมพันธ์ ต่อประสิทธิภาพการผลิตแซนแทนกัมและการเจริญของเชื้อ เมื่อเชื้อสร้างแซนแทนกัมมากขึ้นทำให้น้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้น ความหนืดที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวขัดขวางการแพร่กระจายของอากาศเข้าสู่เซลล์ ส่งผลให้การสร้างแซนแทนกัม ลดลง สำหรับการเพิ่มอากาศให้แก่เชื้อนั้น ทำได้โดยการเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่าหรือการปรับปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงแบบเขย่า และเพิ่มอัตราการกวนของใบพัดอากาศเข้าสู่ระบบ เมื่อเลี้ยงในระดับถังหมัก Salam *et al.* (1994) รายงานว่าการเลี้ยง *Xanthomonas campestris* E-NRC- 3 ในระดับขวดเขย่าปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนอากาศต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3:2 จะให้ประสิทธิภาพในการผลิตแซนแทนกัมมากที่สุดโดยสามารถผลิตแซนแทนกัมได้เท่ากับ 70.5 กรัมต่อลิตร ขณะที่ Peters *et al.* (1989) ได้รายงานว่าเมื่อผลิตแซนแทนกัมในถังหมักขนาด 15 ลิตร โดยใช้อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที สามารถผลิตแซนแทนกัม ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8.6×10^6 กรัมต่อโมล ได้ 16.4 กรัมต่อลิตร และหากมีการกวนร่วมกับการให้อากาศเข้าสู่ระบบ จะสามารถช่วยลดอัตราการกวนที่ต้องใช้ลงได้ครึ่งหนึ่ง โดยเชื้อสามารถสร้างแซนแทนกัมได้ในปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลที่สูงขึ้น ซึ่งเมื่อใช้อัตราการกวนของใบพัดเท่ากับ 400 รอบต่อนาทีร่วมกับการให้อากาศ 0.33 (v/v) ทำให้เชื้อสามารถผลิตแซนแทนกัม ที่มีมวลโมเลกุลสูง 8.8×10^6 กรัมต่อโมล ได้ถึง 18.9 กรัมต่อลิตร Galindo *et al.* (1994) เสนอว่าอากาศมีผลต่อแซนแทนกัมในด้านคุณภาพมากกว่าปริมาณ โดยได้ทำการทดลองเลี้ยง *Xanthomonas campestris* ในขวดรูปชมพู่ 2 ชนิดคือ baffle Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร และ conventional Fern Bach flask ขนาด 2,800 มิลลิลิตร ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อและการสร้างแซนแทนกัมที่เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ชนิด baffle Erlenmeyer แซนแทนกัมจะมีความหนืดสูงกว่าแซนแทนกัมที่ได้จากการเลี้ยงใน conventional flask 3 เท่า Amanullah *et .al.* (1997) พบว่าจุดวิกฤติของปริมาณออกซิเจน ละลายอยู่ในอาหารหมักสำหรับการเจริญ และสร้างแซนแทนกัมมีช่วงอยู่ระหว่าง 6– 8 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.9.7 การสกัดแซนแทนกัมออกจากน้ำหมัก

การแยกแซนแทนกัมจากอาหารที่ใช้ในการหมักค่อนข้างยาก และค่าใช้จ่ายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของค่าใช้จ่ายทั้งหมดในการผลิตแซนแทนกัม จะเป็นการแยกแซนแทนกัมจากอาหารที่ใช้ในการหมัก (Gonzales *et al.*, 1989 and Albiter *et al.*, 1994) ขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตอาหารหมักจะ ได้แซนแทนกัมอยู่ 10 ถึง 30 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์ 1 ถึง 10 กรัมต่อลิตร และสารที่หลงเหลืออยู่ 3 ถึง 10 กรัมต่อลิตร และสารทุติยภูมิอย่างอื่น (Garcia *et al.*, 1993) โดยทำการแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักก่อนด้วยการเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1 ถึง 10 เท่าเพื่อลดความหนืด จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อเอาเซลล์ออก แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนแซนแทนกัมด้วยแอลกอฮอล์ เช่น เอธานอล เมธานอล และไอโซโพรพานอล ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้เอธานอลมากที่สุด เนื่องจากแซนแทนกัมที่ตกตะกอนด้วยเอธานอล มีความปลอดภัยในระดับที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ (Gonzales *et al.*, 1989) การใช้แอลกอฮอล์ในการตกตะกอนนิยมใช้ในอัตราส่วน 2 ถึง 3 เท่าต่อปริมาตรของน้ำหมักที่ผ่านการเจือจางและแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกแล้ว โดยทำการตกตะกอนแซนแทนกัมร่วมกับเกลือ โพแทสเซียมคลอไรด์หรือ เกลือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารอิเล็กโทรไลต์ การใช้อัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อปริมาตรน้ำหมักสูงแม้ให้ประสิทธิภาพในการตกตะกอนสูง แต่จะทำให้ต้นทุนการผลิตแซนแทนกัมสูงขึ้นตามไปด้วย Galindo and Albiter (1996) รายงานว่าหากปริมาณสารอิเล็กโทรไลต์ที่ใช้ในการตกตะกอนแซนแทนกัมมากขึ้น จะสามารถลดอัตราส่วนของแอลกอฮอล์ที่ใช้ลงได้ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์จาก 2 เป็น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดอัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อน้ำหมักจาก 2:1 เหลือ 1:1.4 โดยให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนใกล้เคียงกัน เมื่อการตกตะกอนมีประสิทธิภาพสูง นอกจาก จะทำให้การเก็บเกี่ยวผลผลิตได้สูงยังทำให้แซนแทนกัมที่ตกตะกอนได้มีความบริสุทธิ์ด้วย Albiter *et al.* (1994) รายงานว่าเมื่อทำการตกตะกอนแซนแทนกัมในระบบปฏิกรณ์โดยใช้ใบพัดแบบ Marine impeller และ Rushton tubine ในการกวนผสมแอลกอฮอล์และน้ำหมักและใช้อัตราส่วนแอลกอฮอล์ต่อน้ำหมัก 1:2 โดยปริมาตร ร่วมกับการใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์มากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นการใช้เกลือโพแทสเซียมคลอไรด์เพียง 3 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นปริมาตรที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนแล้ว ซึ่งการตกตะกอนแซนแทนกัมด้วยการกวนผสม Marine impeller นั้นให้ปริมาณแซนแทนกัมที่ต่ำกว่าการใช้ Rushton turbine แต่แซนแทนกัมที่ได้บริสุทธิ์ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และในการกวนผสมนั้นควร ใช้อัตราในการกวนต่ำเนื่องจาก จะทำให้แซนแทนกัมที่ตกตะกอนได้มีขนาดเส้นยาว จากการศึกษาการแยกแซนแทนกัมจากสารละลายน้ำหมัก พบว่า ชนิดของเกลือและความเข้มข้นของเอธานอล เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด อุณหภูมิมีผลน้อยมากต่อการแยกแซนแทนกัม และ ในสภาวะที่เหมาะสมแซนแทนกัมจะแยกได้สูงถึง 88–90 เปอร์เซ็นต์ (Gonzales *et al.*, 1989)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved