

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อุตสาหกรรมน้ำตาล

น้ำตาลทรายเป็นผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมเกษตรที่มีความสำคัญมากทางด้านเศรษฐกิจ ทั้งในระดับชาติและนานาชาติ ประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกและจำหน่ายน้ำตาลทรายในแต่ละปีเป็นมูลค่าหลายล้านบาท โดยในปี พ.ศ. 2548 ประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกน้ำตาลทราย 2,556,439.11 ตัน มีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 23,730.4 ล้านบาท และในปี 2552 ประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกน้ำตาลทรายเพิ่มขึ้นเป็น 2,694,467 ตัน ซึ่งมีมูลค่าการส่งออก 35,503.4 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552) ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งหมดสี่ภาคคือ ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งหมด 6,837,025 ไร่ โดยภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกอ้อยมากที่สุดซึ่งมีพื้นที่การเพาะปลูกเท่ากับ 2,773,934 ไร่ รองมาคือภาคกลางโดยมีพื้นที่การเพาะปลูกเท่ากับ 2,259,673 ไร่ ภาคเหนือมีพื้นที่ปลูกอ้อยมากเป็นลำดับที่สามโดยมีพื้นที่การเพาะปลูกเท่ากับ 1,343,375 ไร่ และภาคตะวันออกมีพื้นที่การเพาะปลูกน้อยที่สุดเท่ากับ 460,043 ไร่ แต่ภาคเหนือมีผลผลิตต่อไร่เฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 11.20 ตันต่อไร่ เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตอ้อยเฉลี่ยกับภาคอื่นๆ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2552) กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยต้องผ่านกรรมวิธีหลายขั้นตอน (ภาพ 1) เริ่มจากการคัดเลือกวัตถุดิบ ทำการแยกส่วนที่ไม่ต้องการออกและทำความสะอาดเท่าที่จำเป็น ต่อจากนั้นเข้าสู่กระบวนการสกัดน้ำอ้อย (Juice Extraction) โดยทำการสกัดเอาน้ำหวานออกโดยใช้เครื่องรีดน้ำอ้อยหรือลูกหีบ (Mill Tandem) จากนั้นน้ำอ้อยที่ผลิตได้ทั้งหมดจะเข้าสู่กระบวนการทำความสะอาดหรือทำใส (Juice Purification) โดยการกรองเพื่อทำให้น้ำหวานที่ได้สะอาดขึ้น จากนั้นน้ำอ้อยที่ผ่านการทำใสแล้วจะผ่านกระบวนการต้มหรือเคี่ยวเพื่อระเหยเอาน้ำออก (Evaporation) ทำให้น้ำหวานมีความเข้มข้นมากขึ้นแล้วเข้าสู่ขั้นตอนการตกผลึก (Crystallization) หลังจากนั้นทำการปั่นแยกผลึกน้ำตาล (Centrifugaling) เพื่อรวมผลึกที่ได้โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการเหล่านี้แล้วจะได้น้ำตาลดิบซึ่งต้องนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ประกอบด้วย การปั่นละลาย (Affinated Centrifugaling) การทำความสะอาดและฟอกสี (Clarification) การเคี่ยว (Crystallization) การปั่นแยกผลึกน้ำตาล (Centrifugaling) และการอบ (Drying) เพื่อไล่ความชื้น

การตัดแล้วยังต้องใช้เวลาหลายวันก่อนถูกส่งเข้าหีบ การสูญเสียน้ำตาลเกิดขึ้นได้ทันทีหลังการเก็บเกี่ยวและมีแนวโน้มของปริมาณการสูญเสียที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากอุณหภูมิสูงซึ่งเป็นผลมาจากการเผาอ้อยก่อนการเก็บเกี่ยว (Solomon, 2000, p. 9) จากการศึกษาการสูญเสียซูโครสหลังการเก็บเกี่ยวโดยการสุ่มตัวอย่างจากเหง้าอ้อยที่ถูกเผา ทำการวิเคราะห์ปริมาณการสูญเสียน้ำตาลในอ้อยที่ผ่านการเผา ตัด และสกัด พบว่าอ้อยที่ถูกตัดแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีการสูญเสียซูโครสร้อยละ 0.2 - 6.4 และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 3.5 - 9.0 เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่ามี การสูญเสียซูโครสสูงถึง 1.2 หน่วย หลังจากการเผา การตัด และการสกัดเป็นเวลา 40 ชั่วโมง (Larrahondo, et al., 2006, p. 233) การเก็บรักษาอ้อยที่ไม่ได้คุณภาพในระหว่างการขนส่ง การรอเข้าหีบ เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยลดลง เนื่องจากอุณหภูมิสูงในระหว่างการขนส่งเป็นผลทำให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนเกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ปริมาณซูโครสลดลง จากการศึกษาคุณภาพของน้ำอ้อยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าน้ำอ้อยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (10 องศาเซลเซียส) มีอายุการเก็บรักษาได้นานถึง 9 วัน และน้ำอ้อยยังคงมีคุณภาพสูงสุดถึงวันที่ 11 ส่วนน้ำอ้อยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงกว่า 16 องศาเซลเซียส มีปริมาณซูโครสลดลงเมื่อเก็บไว้ เป็นเวลา 3 วัน โดยมีปริมาณกลูโคสและฟรุกโตสเพิ่มขึ้น และน้ำอ้อยที่เก็บที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส มีปริมาณซูโครสลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บไว้ เป็นเวลามากกว่า 4 วัน โดยสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าจากสีและกลิ่นรสที่เปลี่ยนแปลงไป รวมถึงความหนืดที่เพิ่มขึ้น (Yusof, 2000, p. 397)

มีการรายงานสาเหตุหลักของการสูญเสียซูโครสในน้ำอ้อยมีสามประการได้แก่ การสูญเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ คิดเป็นร้อยละ 93.0 การสูญเสียเนื่องจากเอนไซม์ คิดเป็นร้อยละ 5.7 และการสูญเสียเนื่องจากกลไกทางเคมี คิดเป็นร้อยละ 1.3 จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการสูญเสียซูโครสในน้ำอ้อย (Eggleston, 2002, p. 100) เชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีแหล่งที่มาจากสภาพแวดล้อม เช่น ดินและแหล่งน้ำที่ใช้ในการเพาะปลูก โดยการปนเปื้อนพบมากในส่วนของรากและส่วนต่างๆของลำต้น เมื่ออ้อยได้รับบาดเจ็บระหว่างการเก็บเกี่ยวหรือถูกไฟไหม้ ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เข้าไปในลำต้นและใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เดกซ์แทรน แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ต่างๆ จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญจะอยู่ในกลุ่มยีสต์ รา และแบคทีเรียแลคติก (Eggleston, 2002, pp. 97-100; Solomon, 2000, pp. 3-9; Yusof Shian and Osman, 2002, pp. 399-400) โดยยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคสและฟรุกโตส จากนั้นก็จะเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นแอลกอฮอล์ มีราหลายชนิดที่

สังเคราะห์และขับเอนไซม์ออกจากเซลล์ เช่น เอนไซม์อินเวอร์เทสใช้ย่อยซูโครสให้เป็นกลูโคสกับฟรุกโตส และมีเชื้อราหลายชนิดที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นกรดซิตริกได้ เช่น *Aspergillus niger* แต่แบคทีเรียแลคติกจัดว่ามีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมน้ำตาลมากกว่า เพราะนอกจากจะมีผลต่อการสูญเสียซูโครสในปริมาณที่สูงกว่าแล้ว การย่อยสลายซูโครสโดยแบคทีเรียกลุ่มนี้ยังก่อให้เกิดสารเด็กซ์แทรน (Dextran) ที่ก่อให้เกิดความหนืดสูง ซึ่งมีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย โดยแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถเปลี่ยนซูโครสไปเป็นเด็กซ์แทรนได้จัดอยู่ในกลุ่ม Dextran-producing Lactic Acid Bacteria (DPLAB)

แบคทีเรียแลคติกกลุ่มของ Dextran-producing Lactic Acid Bacteria (DPLAB)

แบคทีเรียแลคติกที่สามารถเปลี่ยนซูโครสไปเป็นเด็กซ์แทรนได้จัดอยู่ในกลุ่ม Dextran-producing Lactic Acid Bacteria (DPLAB) ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* และ *Weissella* (Bounaix, et al., 2010, p. 18; Monsan, et al., 2001; Björkroth and Holzappel, 2006; van Hijum, et al., 2006)

Lactobacillus spp. เป็นแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตเอกซ์โซโพลีแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharides; EPS) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharides) ได้หลายชนิด โดยใช้ซูโครสเป็นสารตั้งต้นและมีเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glycosyltransferases) เป็นสารเร่งปฏิกิริยา โพลีแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharides) ที่ผลิตโดย *Lactobacillus* ที่แยกได้จากธัญพืช (cereal-associated *Lactobacilli*) มีหลายชนิด เช่น อะมัยโลส (amylose) เป็นโพลีแซ็กคาไรด์ที่สายหลักต่อกันด้วยพันธะ α -1, 4 มูแทน (mutan) เป็นโพลีแซ็กคาไรด์ที่สายหลักต่อกันด้วยพันธะ α -1,3 อัลเทอแรน (alternan) เป็นโพลีแซ็กคาไรด์ที่สายหลักต่อกันด้วยพันธะ α -1,3 และ α -1,6 และเด็กซ์แทรน (dextran) ซึ่งเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคสที่สายหลักต่อกันด้วยพันธะ α -1,6 กลูโคซิติก (Tiekling and Gänzle, 2005, p. 80) มีรายงานว่า *Lactobacillus confuses* สามารถผลิตเด็กซ์แทรนได้ในปริมาณสูงและเด็กซ์แทรนที่ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ในการเป็นสารเพิ่มปริมาณเลือด (blood volume expander) และใช้เพิ่มประสิทธิภาพการไหลเวียนของเลือด (Sharpe, et al., 1972, pp. 389-397)

Streptococci spp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) ในมนุษย์ โดยการอักเสบของเยื่อหุ้มหัวใจมีสาเหตุมาจาก *Streptococci* ที่มีความสามารถในการผลิตเด็กซ์แทรน (dextran-producing streptococci) โดย *Streptococcus sanguis* เป็น *Streptococcus* สายพันธุ์ดั้งเดิมที่เป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบและเป็น

สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเด็กซ์แทรนได้ (Parker and Ball, 1976, p. 279) นอกจากนี้ยังพบว่า *Streptococcus bovis* มีความสามารถในการผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตสเมื่อเจริญเติบโตในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (Bourne Hutson and Weigel, 1961, pp. 549-553)

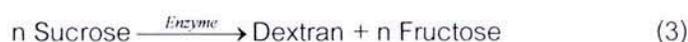
Weissella spp. เป็นแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการผลิตขนมปังแบ่งหมัก (wheat sourdough) จากการศึกษาของ Katina, et al. (2009, pp. 734-743) พบว่า *Weissella confusa* สามารถผลิตเด็กซ์แทรนและไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (isomaltooligosaccharides) ได้ในปริมาณสูงในขนมปังแบ่งหมัก (sourdough) โดยเด็กซ์แทรนและไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *W. confusa* มีบทบาทในการปรับปรุงคุณภาพของขนมปังและทำให้แบ่งโดมีความหนืดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการแยก *Weissella cibaria* และ *Weissella confusa* ได้จากแบ่งหมัก และพบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์ มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส ในปริมาณสูงและสามารถผลิตเด็กซ์แทรนสายตรงที่มีพันธะ α -1,6 (linear dextrans containing α -1,6 glucose) จากซูโครสได้ (Bounaix, et al., 2010, pp. 18-26)

Leuconostoc spp. จัดเป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมน้ำตาลมากที่สุด เนื่องจากมีผลกระทบต่อการสูญเสียซูโครสในปริมาณสูง และสามารถเปลี่ยนซูโครสไปเป็นเด็กซ์แทรนได้ (Eggleston, 2002, p. 95; Eggleston and Harper, 2006, p. 366; Solomon, 2000, p. 3; Yusof Shinan and Osman, 2000, p. 399) ซึ่งเด็กซ์แทรนส่งผลเสียมากมายต่อกระบวนการผลิตน้ำตาล

Leuconostoc spp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ปนเปื้อนอยู่ตามดิน พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน หญ้า น้ำนม อุ่น และพืชหลายชนิด เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก โดยใช้สารอินทรีย์ เช่น ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เซลล์มีรูปร่างกลม (cocci) ขนาด 0.9 - 1.2 ไมครอน มักอยู่รวมกันเป็นคู่ โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวเรียบเป็นมัน มีสีขาว เมื่อนำมาย้อมสีแกรมจะติดสีแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) สามารถเจริญได้ทั้งในที่ที่มีและไม่มียอกซิเจน (facultative bacteria) (Garvie, 1984, pp. 147-178) เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 5 - 30 องศาเซลเซียส แต่ช่วงที่เหมาะสมที่สุดคือระหว่าง 25 - 30 องศาเซลเซียส และช่วงพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ คือ 6.0 - 6.9 ลักษณะเด่นของจุลินทรีย์ชนิดนี้คือความสามารถในการสร้างเมือก (slime layer) เมื่อเจริญในอาหารที่มีซูโครสในปริมาณสูง เมือกที่พบเป็นโครงสร้างที่ห่อหุ้มผนังเซลล์ ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ ที่ยึดกันอย่างหลวมๆ สามารถแยกจากกันได้ง่ายด้วยกรดอ่อน เป็นโครงสร้างที่ช่วยให้แบคทีเรียทนทานต่อความแห้งแล้งและสารเคมีต่างๆ ได้ดี โพลีแซคคาไรด์ดังกล่าวประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดซึ่งจะแตกต่างกันไป

น้ำตาลที่พบมากได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (glucose) กาแลคโตส (galactose) และลิวโลส (luculose) แบคทีเรียที่เหล่านี้จะสร้างโพลิแซ็กคาไรด์เมื่อเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลเท่านั้น แต่ในอาหารที่ไม่มีน้ำตาลแบคทีเรียเหล่านี้จะไม่สร้างสารดังกล่าวหรือสร้างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น *L. mesenteroides* สามารถผลิตโพลิแซ็กคาไรด์ได้ดีเมื่อเจริญในอาหารที่มีซูโครส โดยโพลิแซ็กคาไรด์ที่เกิดขึ้นมีความหนามากและไม่มีสี องค์ประกอบทางเคมีที่พบในโพลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดมีส่วนประกอบแตกต่างกันไป

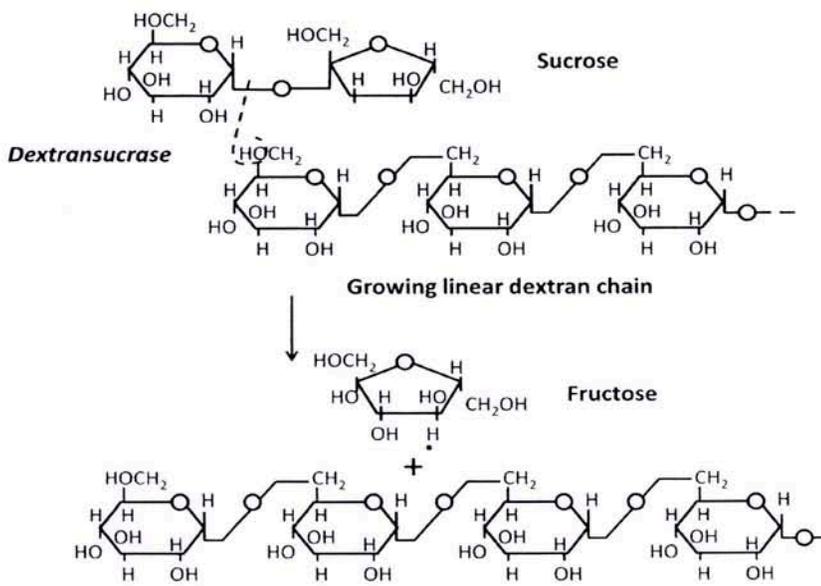
ในอาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อ *Leuconostoc* spp. จะใช้ซูโครสในการเจริญเติบโตและสร้างเด็กซ์แทรน โดยกลไกการเกิดเด็กซ์แทรนเกิดจากเมื่อ *Leuconostoc* spp. เจริญบนอาหารที่เต็มไปด้วยน้ำตาลซูโครส เชื้อแบคทีเรียจะใช้ซูโครสดังกล่าวในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ ในขณะที่เดียวกันในแต่ละเซลล์จะผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครสซิน ซึ่งซูโครสเป็นสารตั้งต้นเพียงชนิดเดียวที่ทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์นี้ เอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครสซินจะเข้าไปย่อยซูโครสที่เหลืออยู่ และก่อให้เกิดการผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตสออกมา จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักสามารถเขียนให้อยู่ในรูปสมการเคมีดังนี้



เด็กซ์แทรน (Dextran)

เด็กซ์แทรน ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)_n จัดอยู่ในกลุ่มของเอ็กซ์โซโพลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide) ที่สังเคราะห์และถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์โดยเชื้อแบคทีเรีย เด็กซ์แทรนเป็นสารประกอบพอลิไฮโมโพลิแซ็กคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 95 ของสายหลักต่อกันด้วยพันธะ α -1,6 กลูโคซิดิก (Santos, et al., 2000, p. 182; Brown and McAvoy, 1989, pp. 405–414) และอีกร้อยละ 5 เป็นสายย่อยที่ต่อกันด้วยพันธะชนิด α -1,3 ในบางชนิดสายย่อยอาจต่อกันด้วยพันธะชนิด α -1,2 หรือ α -1,4 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง (Galvez-Mariscal and Lopez-Munguia, 1991, pp. 327-331) ในปัจจุบันมีการนำเด็กซ์แทรนมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง เนื่องมาจากเด็กซ์แทรนมีลักษณะเป็น non-ionic และมีความคงตัวที่ดีภายใต้การดำเนินการที่สภาวะปกติ โดยทางการแพทย์มีการนำเด็กซ์แทรนมาทำให้มีมวลโมเลกุลที่เล็กลงเพื่อให้เหมาะสำหรับการใช้เพิ่มปริมาณเลือด (blood volume expander) ใช้ผลิสารที่ใช้

น้ำตาลรวมตัวกันแล้วตกตะกอนตามที่ควรจะเป็น ทำให้น้ำตาลมีความหนืดเพิ่มขึ้นส่งผลต่ออัตราการแลกเปลี่ยนความร้อน ทำให้ระบบการผลิตน้ำตาลทั้งระบบกินเวลานานมากขึ้น และทำให้เกิดผลึกของน้ำตาลที่ผิดปกติแบบไป โดยผลึกน้ำตาลเปลี่ยนเป็นรูปเข็มมากขึ้นซึ่งจะเข้าไปขัดขวางระบบการปั่นน้ำตาล ทำให้การปั่นน้ำตาลใช้เวลานานขึ้น และผลึกน้ำตาลหลุดปนไปกับโมลาสมากขึ้น ทำให้ปริมาณการสูญเสียน้ำตาลสูงขึ้น นอกจากนั้นระบบการหมุนเวียนของโมลาสผสมน้ำตาล (massecuite) ซึ่งจะต้องถูกบีบเข้ามาสร้างให้เป็นผลึกน้ำตาลใหม่อีกครั้งหนึ่งทำให้ได้น้ำตาลที่มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน ปริมาณการผลิตน้ำตาลต่อตันอ้อยของโรงงานน้อยลง และได้โมลาสที่มีน้ำตาลฟรุคโตส หรือน้ำตาลรูปอื่นและกรดอินทรีย์ต่าง ๆ มากขึ้น ปัญหาดังกล่าวส่งผลให้กระบวนการผลิตน้ำตาลทั้งระบบกินเวลานานมากขึ้น และเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายให้กับโรงงาน



ภาพ 2 การย่อยน้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครสเพื่อสังเคราะห์เด็กซ์แทรน

ที่มา: มธุรส จันทรศุภมงคล, 2543; Jame and Chung, 1993

การลดการสูญเสียซูโครสในกระบวนการผลิตน้ำตาล

การลดการสูญเสียซูโครสในกระบวนการผลิตอาจทำได้โดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของ DPLAB ระหว่างกระบวนการผลิตโดยใช้อนุหนุมิและสารชีวฆาต (biocides) มีการรายงานว่าอนุหนุมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และกิจกรรมของเอนไซม์



(Santos, et al., 2000, pp. 177–188) การเพิ่มอุณหภูมิมีผลทำให้อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของสับสเตรตมีพลังงานจลน์มากขึ้น ทำให้อัตราเร็วของการชนกันระหว่างเอนไซม์สูงขึ้น แต่จากการที่เอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน และกิจกรรมของการเร่งปฏิกิริยาเกิดจากโครงสร้างตติยภูมิเรียงต่อกันอย่างมีระเบียบในทิศทางที่ต้องจับกับสับสเตรตที่บริเวณจับและบริเวณเร่งของปฏิกิริยา การที่อุณหภูมิสูงมากเกินไปมีผลทำให้สับสเตรตมีพลังงานจลน์สูงเกินไป โครงรูปตติยภูมิของเอนไซม์ซึ่งยึดกันด้วยพันธะที่มีแรงอ่อนเกิดการเสียหาย ทำให้เอนไซม์เสียสภาพหรือสูญเสียกิจกรรมไป Santos, et al. (2000, pp. 177-188) ได้ทำการศึกษาสภาวะการหมักที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตสจากซูโครส โดยใช้ *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B 512(F) การออกแบบการทดลอง เป็นการดำเนินการศึกษาแบบเบ็ดเสร็จในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีปริมาตร 1.5 ลิตร โดยการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิ (20-40 องศาเซลเซียส) พีเอช (5.5 และ 6.7) และความเข้มข้นของซูโครส (10-120 กรัมต่อลิตร) พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์ และไม่พบการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และพบว่าที่พีเอช 6.7 เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ซึ่งตรงกับงานวิจัยอื่นๆ ที่สนับสนุนว่าพีเอช 6.7 เป็นค่าพีเอชที่เซลล์จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตสูงสุด ถึงแม้ว่าที่พีเอช 5.5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้สูงกว่าแต่น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่า และใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยกว่าพีเอช 6.7 ประมาณ 3 ชั่วโมง จากการศึกษาการให้อากาศพบว่าการให้อากาศไม่มีผลกระทบต่ออย่างมีนัยสำคัญในการหมัก โดยการให้อากาศมีผลเชิงบวกต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ แต่ส่งผลในเชิงลบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ การเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ไม่ถูกยับยั้งโดยปริมาณความเข้มข้นของซูโครสที่สูง แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของซูโครสที่สูงเกินกว่า 40 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้การแยกผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์ทำได้ยากขึ้น

สารชีวฆาต (Biocide)

สารชีวฆาตถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาลเพื่อลดการสูญเสียซูโครสในน้ำอ้อย เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ สารชีวฆาตมีความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียพวกที่ทนความร้อนสูง (thermophilic bacteria) ในน้ำอ้อยได้ภายในระยะเวลาอันสั้น (Solomon, 2000, p. 14) โดยจะควบคุมจุลินทรีย์และการสร้างกรดในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตน้ำตาล การศึกษาผลของการใช้สารชีวฆาตพบว่าการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ร้อยละ 0.08 ในน้ำอ้อยที่มีการปรับพีเอชเป็น 5.16 และบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 7 14 23 31 38 47 55 และ 71 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่เวลาต่างๆมาวิเคราะห์ค่าพีเอช องศาบริกซ์ (°Brix) ปริมาณเด็กซ์แทรน ปริมาณซูโครส

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ	
ห้องสมุดงานวิจัย	
วันที่.....0.5.....07.0.2555	249063
เลขทะเบียน.....	
เลขเรียกหนังสือ.....	

กลูโคสและฟรุกโตส พบว่า โซเดียมเอไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้ดี แต่ สารชนิดนี้มีความเป็นพิษสูงไม่เหมาะกับการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Eggleston, 2002, p. 97) มีสารชีวฆาตอีกหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งจุลินทรีย์ในสภาวะที่เป็นกรด สารชีวฆาตที่สามารถนำมาใช้โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ควรมีลักษณะทั่วไปคือ ควรยับยั้ง จุลินทรีย์ได้หลายชนิดที่พีเอชของน้ำอ้อยซึ่งอยู่ในช่วง pH 5.2 - 5.5 ควรมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ มีความเป็นพิษต่ำไม่มีฤทธิ์กัดกร่อนพื้นผิวสัมผัสง่ายต่อการเก็บและดูแลรักษา ควรก่อให้เกิด ปฏิกริยาน้อยที่สุดในวัตถุดิบหรือ ไม่ตกค้างในน้ำตาลหรือโมลาส และควรมีประสิทธิภาพในการ ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยสมบูรณ์โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม DPLAB และแบคทีเรียที่ทนความร้อน สูงในน้ำอ้อยได้ มีสารชีวฆาตที่สามารถนำมาใช้โดยมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งจุลินทรีย์ใน สภาวะที่เป็นกรดไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และมีราคาถูก ชนิดที่ได้รับความสนใจจากอุตสาหกรรม อาหาร เช่น Hexamethylenetetramine แต่ข้อมูลด้านการใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาลยังมีจำกัด

Hexamethylenetetramine มีชื่อทางการค้าคือ Hexamine ถูกเตรียมขึ้นจากปฏิกิริยา ของฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) และแอมโมเนีย (ammonia) โดย hexamine เป็นผลึกสีขาว มีกลิ่นของเอมีนเล็กน้อย สามารถละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์ม แต่ไม่ละลายใน อีเทอร์ โดย hexamine ใช้เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียในการรักษาการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะซึ่ง ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียภายใต้สภาวะความเป็นกรดอ่อนโดยจะปลดปล่อยฟอร์มัลดีไฮด์ใน ตัวกลางที่เป็นกรด (Greenwood and Slack, 1981, pp. 223-227) โดยฟอร์มัลดีไฮด์มีกลไกการ ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการทำให้โปรตีนตกตะกอนโดยวิธี alkyltion ซึ่งมีการนำ Hexamine มาใช้เป็น primary feed material ในอุตสาหกรรมยาและใช้เป็น intermediate material ใน อุตสาหกรรมเคมี (Alamdari and Tabkhi, 2004, p. 803)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

จากที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นการสูญเสียโครสเกิดจากการที่ DPLAB ที่มี *Leuconostoc* spp. เป็นแบคทีเรียต้นแบบ ได้ใช้โครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยแต่ละเซลล์จะมีการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครสขึ้น ซึ่งเอนไซม์นี้จะเข้าไปย่อยโครสที่ เหลืออยู่และทำให้เกิดการผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตสออกมา สามารถเขียนให้อยู่ในรูปสมการ เคมีดังสมการที่ (1) (2) และ (3) ดังนั้นจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก สามารถจำแนก ออกได้เป็นทั้งหมดสี่อัตรา การเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกันคือ อัตราการใช้โครสของ *Leuconostoc* spp. อัตราการเจริญเติบโตของ *Leuconostoc* spp. อัตราการผลิตเอนไซม์ เด็กซ์แทรนซูเครส และอัตราการเกิดเด็กซ์แทรนและฟรุกโตส ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการ

การหมักนี้สามารถใช้ระบบสมการเชิงอนุพันธ์เพื่อประมาณค่าของการสูญเสียโครสในกระบวนการหมักได้

ข้อมูลจากการทดลองจริงของการทดลองที่สภาวะใดสภาวะหนึ่ง สามารถให้ค่าจำเพาะต่อสภาวะนั้นๆ การที่จะทำได้ข้อมูลจริงสำหรับทุกสภาวะมีความเป็นไปได้ยาก เนื่องจากข้อจำกัดของการทดลอง ทั้งค่าใช้จ่าย อุปกรณ์ที่เหมาะสม และระยะเวลาที่ใช้ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่อาศัยความเข้าใจจากสภาวะที่เกิดขึ้นจริง มักได้คำตอบที่มีแนวทางเป็นไปได้สูง จึงเป็นเครื่องมือที่มีบทบาทมากขึ้นในการใช้ควบคุมไปกับการทดลอง เพื่อลดระยะเวลาและโอกาสเกิดความผิดพลาด

จากการศึกษาของ Santos, et al. (2000, pp. 182-188) ได้มีการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อหาสภาวะการหมักที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตของเด็กซ์แทรนและฟรุกโตส โดยทำการพิจารณาระบบสมการเชิงอนุพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการใช้โครส ทั้งจากอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและจากอัตราการผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตส ซึ่งในขณะเดียวกันอัตราการผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตสก็ขึ้นอยู่กับอัตราการผลิตเอโนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครสด้วย แบบจำลองคณิตศาสตร์ของกระบวนการหมักดังกล่าว ยังเป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยในการติดตามผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น อีกทั้งยังช่วยในการวางแผนเพื่อกำหนดสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตอีกด้วย

สำหรับแบบจำลองการเจริญเติบโต ซึ่งจากสมการเคมีที่ (1) เขียนสมการอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดังนี้

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu X = \mu_m \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) X \quad (5)$$

เมื่อ	r_x	คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (g/l/h)
	X	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ (g/l)
	t	คือ เวลา (h)
	μ	คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเซลล์ (h^{-1})
	X_{max}	คือ ความเข้มข้นสูงสุดของเซลล์ (g/l)
	μ_m	คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (h^{-1})

สำหรับแบบจำลองการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูโครส อัตราการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูโครสจะพิจารณาเฉพาะเทอมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตได้สมการดังนี้

$$r_E = \frac{dE}{dt} = Y_{E/X} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

เมื่อ

r_E	คือ อัตราการผลิตเอนไซม์ (DSU/ml/h)
E	คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ผลิตได้ (DSU/ml)
$Y_{E/X}$	คือ ผลได้ของเอนไซม์จากเซลล์ โดยถือว่าเซลล์ที่ไม่สามารถทำงานได้จะไม่สร้างเอนไซม์ มีเฉพาะเซลล์ที่ทำงานได้เท่านั้นที่มีการผลิตเอนไซม์ (DSU/mg cell)

สำหรับแบบจำลองการผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตส เด็กซ์แทรนและฟรุกโตสเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูโครสกับซูโครส ดังนั้นอัตราการผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตสสามารถเขียนในรูปสมการดังนี้

$$r'_F = \frac{dF'}{dt} = k' \frac{M_F}{M_S} E(t) S'(t) - \frac{1}{Y_{X/F}} \frac{dX}{dt} \quad (7)$$

$$r'_D = \frac{dD'}{dt} = k' \frac{(M_G - M_W)}{M_S} E(t) S'(t) \quad (8)$$

เมื่อ

r'_F	คือ อัตราการผลิตฟรุกโตส (mol/l/h)
r'_D	คือ อัตราการผลิตเด็กซ์แทรน (mol/l/h)
D'	คือ ความเข้มข้นของเด็กซ์แทรน (g/l)
F'	คือ ความเข้มข้นของฟรุกโตส (g/l)
S'	คือ ความเข้มข้นของซูโครส (mol/l)
E	คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ผลิตได้ (DSU/ml)
$M_D M_F$ และ M_S	คือ มวลโมเลกุลของเด็กซ์แทรน ฟรุกโตส และ ซูโครส ตามลำดับ
k'	คือ ค่าคงที่ (ml/DSU/h)
$Y_{X/F}$	คือ ผลได้ของเซลล์จากฟรุกโตส (g cells/g fructose)

สำหรับแบบจำลองการใช้ซูโครส จากการพิจารณาค่าความเข้มข้นของซูโครสที่ใช้ไปทั้งหมดจะคำนวณจากซูโครสที่ถูกใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ร่วมกับซูโครสที่ถูกใช้เพื่อการผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตส

$$\Delta S = \Delta S_{\text{Assimilated in to biomass}} + \Delta S_{\text{Used by extracellular enzyme produce dextran and fructose}}$$

ดังนั้นสามารถเขียนอัตราการการใช้ซูโครสให้อยู่ในรูปสมมูลมวลได้ดังนี้

$$r' = \frac{dS'}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + nkE(t)S'(t) \quad (9)$$

เมื่อ

r' คือ อัตราการใช้ซูโครส (g/l/h)

$Y_{X/S}$ คือ ผลได้ของเซลล์จากซูโครส (g cells/g sucrose)

เทอมของ $\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt}$ คือ ซูโครสที่ถูกใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์

เทอมของ $nkE(t)S'(t)$ คือ ซูโครสที่ถูกใช้เพื่อการผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตส

เนื่องจากในงานวิจัยครั้งนี้มีการศึกษาผลของอุณหภูมิและสารชีวฆาตต่อการสูญเสียซูโครสเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกในน้ำอ้อย โดยอุณหภูมิและสารชีวฆาตเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งอุณหภูมิเป็นตัวแปรทางกายภาพตัวแปรหนึ่งที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ ในกรณีของจุลินทรีย์ อุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ โดยการใช้อุณหภูมิที่ไม่สูงมากเชื้อจุลินทรีย์จะสามารถเจริญเติบโตได้ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกินช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (optimum temperature) จะส่งผลทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายได้ เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงจะทำให้โปรตีน (เอนไซม์) ในเซลล์ของจุลินทรีย์เสียสภาพทำให้ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เพราะโปรตีนและเอนไซม์เป็นองค์ประกอบสำคัญของกลไกการทำงานต่าง ๆ ในเซลล์ ซึ่งสมการที่อธิบายการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ สามารถอธิบายได้โดย square root model จากการศึกษาของ Cayré, et al. (2003, pp. 562-564) ได้นำ square root model มาอธิบายถึงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก ที่อุณหภูมิ 0 8 และ 15 องศาเซลเซียส พบว่า square root model ที่นำมาใช้สามารถยอมรับได้ทางสถิติและมีความยืดหยุ่นเพียงพอที่จะใช้กับข้อมูลจากการทดลองจริง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงจะนำ square root model มาอธิบายผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกดังนี้

$$\sqrt{\mu_{max}} = b \cdot (T - T_{min}) \cdot (1 - \exp(c(T - T_{max}))) \quad (10)$$

เมื่อ	μ_{max}	คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (h^{-1})
	T	คือ อุณหภูมิ ($^{\circ}C$)
	T_{min}	คือ อุณหภูมิต่ำสุดที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ ($^{\circ}C$)
	T_{max}	คือ อุณหภูมิสูงสุดที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ ($^{\circ}C$)
	b	คือ ค่าคงที่ ($(h^{-1})^{-1/2}/^{\circ}C^{-1}$)
	c	คือ ค่าคงที่ ($^{\circ}C$)

สารชีวฆาต (biocide) เป็นสารยับยั้งที่มีผลต่ออัตราการเติบโตของจุลินทรีย์ จากการศึกษาของ Medawar, et al. (2003, pp. 527-532) ได้เสนอแบบจำลองอย่างง่ายเพื่อหาช่วงระยะปรับตัว (lag phase) ก่อนการเจริญเติบโตของยีสต์ที่เป็นฟังก์ชันของความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีเอทานอลเป็นตัวยับยั้ง (inhibitor) การเจริญเติบโตของยีสต์ที่สำคัญในไวน์ ซึ่งสมการที่สามารถอธิบายถึงผลของตัวยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในรูปแบบของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีดังนี้

$$\mu = \mu_0 \left(1 - \frac{[I]}{I_{max}}\right) \quad (11)$$

เมื่อ	μ	คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (h^{-1})
	I	คือ ความเข้มข้นของสารยับยั้ง (g/l)
	I_{max}	คือ ความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงสุด (g/l)

ดังนั้นผลของอุณหภูมิและสารชีวฆาตต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกสามารถเขียนให้อยู่ในรูปของสมการได้ดังนี้

$$\sqrt{\mu_{max}} = b \cdot (T - T_{min}) \cdot (1 - \exp(c(T - T_{max}))) \cdot \sqrt{\left(1 - \frac{[I]}{I_{max}}\right)} \quad (12)$$

ในการศึกษาครั้งนี้จึงจะประยุกต์ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่กล่าวมาข้างต้น คือแบบจำลองการเจริญเติบโต สมการที่ (5) แบบจำลองการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส สมการที่

(6) แบบจำลองการผลิตฟรุกโตส สมการที่ (7) แบบจำลองการผลิตเด็กซ์แทรน สมการที่ (8) และแบบจำลองการใช้ซูโครสสมการที่ (9) มาใช้เพื่อทำนายการสูญเสียซูโครสจากน้ำอ้อยอันเนื่องมาจากแบคทีเรียแลคติกที่มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารชีวฆาตต่อไป