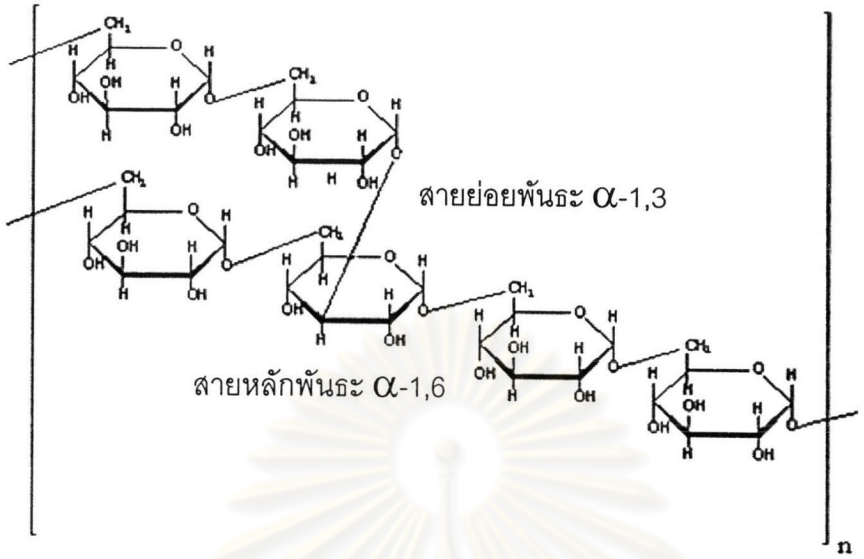
บทที่ 1

บทนำ

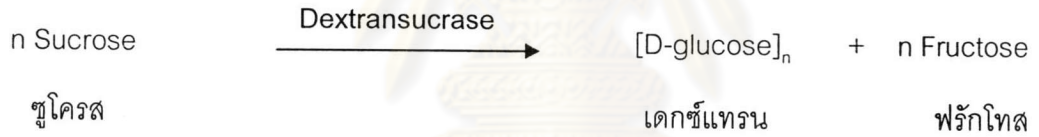
อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย เป็นอุตสาหกรรมสำคัญของประเทศไทยที่นำรายได้เข้าประเทศร้อยละ 15 ของมูลค่าการส่งออกสินค้าภาคเกษตรกรรมทั้งหมด (ฝ่ายนโยบายและเศรษฐกิจน้ำตาล, 2542) ในประเทศไทยใช้วัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลทรายเพียงแหล่งเดียวคือ อ้อย (*Saccharum officinarum*) เพราะเป็นพืชที่เหมาะสมต่อสภาพภูมิอากาศเขตร้อนชื้นปลูกได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย แต่พบปัญหาจากการใช้อ้อยมาผลิตเป็นน้ำตาลทรายหลายประการ หนึ่งในนั้นคือปัญหาจากจุลินทรีย์หลายชนิดซึ่งมีอยู่ในธรรมชาติ ปนเปื้อนมาจากดินที่ปลูกและบริเวณบาดแผลของอ้อย จุลินทรีย์เหล่านี้ใช้น้ำตาลชนิดต่างๆเป็นอาหาร และสร้างเมือกด้วย ในกระบวน การผลิตเมื่อมีการเผาอ้อยจะทำให้เชื้อบางส่วนตายไปกับความร้อน ในขณะที่เชื้อที่สามารถสร้างสปอร์ได้และใช้น้ำตาลได้ดียังคงอยู่ เมื่ออ้อยเย็นตัวลงจุลินทรีย์เหล่านี้จะยังคงเจริญได้ (กล้าณรงค์ ศรีรอด และ สิริวัฒนา จิตตรีพล, 2539)

จุลินทรีย์ที่ก่อปัญหาดังกล่าวพบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม *Leuconostoc* spp. ได้แก่ *L. dextranicum* และ *L. mersenteroides* (Tsuchiya และคณะ, 1952) ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาพอากาศแบบร้อนชื้นจึงเพิ่มปริมาณได้สูง เมื่อผ่านเข้ามาในกระบวนการจะสามารถใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญ และสร้างผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารมีความหนืดคือ เดกซ์แทรนโดยเอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส และเดกซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งส่งผลกระทบเสียหายหลายประการต่อประสิทธิภาพของการผลิตของโรงงาน เช่น การต้มเคี่ยวช้า ผลึกน้ำตาลเป็นเข็ม การกรองทำได้ยาก และ เดกซ์แทรนไปอุดตันท่อในกระบวนการผลิต เป็นต้น

เดกซ์แทรนเป็นสายของพอลิเมอร์ต่อกัน โดยมีหน่วยย่อยเป็นดี-กลูโคส (D-glucose) การเชื่อมต่อเข้าด้วยกันเป็นแบบพันธะ α–(1,6) กลูโคสิดิก (α-1,6-glucosidic bond) เป็นส่วนใหญ่ โดยมีแขนงย่อยออกไปอีกที่เชื่อมต่อกันแบบพันธะ α–(1,3) หรือ α–(1,4) (รูปที่ 1.1) การสังเคราะห์เดกซ์-แทรนของเชื้อในกลุ่ม *Leuconostoc* spp. เกิดโดยเดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) หรือกลูโคซิล-ทรานเฟอเรส (Glucosyltransferase, GTP) เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ซูโครสให้เป็นกลูโคส และฟรักโตส จากนั้นเชื่อมต่อโมเลกุลของกลูโคสเป็นพอลิเมอร์เดกซ์แทรน ขนาดต่างๆ (Imrie และ Tilbury, 1972) ดังแสดงในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของเดกซ์แทรน



รูปที่ 1.2 ปฏิกิริยาการเกิดเดกซ์แทรนจากเดกซ์แทรนซูเครส

จากสาเหตุดังกล่าว การควบคุมเดกซ์แทรนภายในระบบกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งอาจทำได้โดยการป้องกันการเกิดเดกซ์แทรนในน้ำอ้อยโดยกำจัดสาเหตุคือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน โดยวิธีการต่างๆ เช่นวิธีทางเคมี เช่นการใช้สารยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียบนต้นอ้อยหรือดินที่ปลูก ซึ่งวิธีนี้อาจเกิดการตกค้างสู่ผู้บริโภคได้ หรืออาจทำการกำจัดเดกซ์แทรนออกจากน้ำอ้อย เช่นการใช้กรดร่วมกับความร้อนสลายเดกซ์แทรนออกไป (Monsan และ Pual, 1991) แต่ข้อเสียที่เกิดขึ้นคือ เกิดการตัดโมเลกุลเดกซ์แทรนอย่างไม่สมบูรณ์และเป็นไปอย่างสุ่ม และอาจเกิดการแตกตัวของซูโครสทำให้ผลผลิตน้ำตาลทรายลดลง การกำจัดเดกซ์แทรนทางกายภาพ โดยการเก็บน้ำอ้อยที่อุณหภูมิต่ำ การใช้ความร้อน การควบคุมความเป็นกรดด่างของน้ำอ้อย และควบคุม water activity: A_w เป็นต้น มีข้อเสียคือปฏิบัติได้ยากในกระบวนการผลิตจริง อีกวิธีการที่เหมาะสมวิธีหนึ่งและเป็นไปได้ในปัจจุบัน คือการใช้เดกซ์แทรนเนส (Dextranase, E.C.3.2.11) ซึ่งมีข้อดีคือมี

ความจำเพาะต่อเดกซ์แทรนสูง ปฏิกิริยาเกิดในสภาวะไม่รุนแรง มีความเป็นพิษต่ำ และใช้ปริมาณน้อย แต่ได้ผลสูง (Imrie และ Tibury, 1972)

เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (E.C.3.2.11, α-1,6-D-glucan-6-glucanohydrolase) มีความจำเพาะต่อการสลายพันธะ α-1,6 ภายในสายพอลิเมอร์ของเดกซ์แทรน โดยเมื่อเดกซ์แทรนมีจำนวนโมเลกุลกลูโคสลดลง กล่าวคือความยาวของสายพอลิเมอร์ (degree of polymerization) ลดลง ระดับความหนืดก็จะลดลงด้วย และพบว่าเมื่อเดกซ์แทรนมีขนาดพอลิเมอร์ต่ำกว่า 8 หน่วยแล้ว จะทำให้สมบัติความหนืดหมดไป (Galvez-Mariscal และ Lopez-Mungia, 1991)

แหล่งที่สามารถพบเดกซ์แทรนเนส ได้แก่ เนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด และจากจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ทั้งรา ยีสต์ แอคติโนมัยซิส และแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รามีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงมากและเป็นแหล่งที่สำคัญที่สุดของการผลิตเอนไซม์นี้ โดยเดกซ์แทรน-เนสเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยอาศัยสารชักนำ (Inducible enzyme) ซึ่งก็คือ เดกซ์แทรน (Fukumoto และคณะ, 1971) ดังนั้นในการผลิตเดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา จึงต้องเติมเดกซ์แทรนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำหน้าที่เป็นสารชักนำ และ เอนไซม์ที่ได้จะเป็นเอนไซม์ที่มีการหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) โดยในงานวิจัยของอนันตพงษ์ สุขเกษ (2543) ได้ใช้ *Penicillium* sp. SMCU3-14 ซึ่งปรับปรุงสายพันธุ์โดยสุวรรณา นพพรพันธุ์ (2538) จากเชื้อ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 ที่คัดแยกโดยเอก แสงวิเชียร (2531) ในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เนื่องจากสามารถสร้างเดกซ์แทรนเนสได้แอคติวิตีที่สูง

อนันตพงษ์ สุขเกษ (2543) ทำการวิจัยระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium* sp. SMCU3-14 และทดสอบแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสในระดับขวดเขย่าเพียงเท่านั้น ซึ่งเป็นแนวทางเบื้องต้นในการขยายระดับเพื่อการผลิตในระดับถังหมักจนถึงการผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย แต่ในการผลิตระดับเหนือกว่าระดับขวดเขย่านั้นไม่สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเดียวกับที่ใช้ในระดับขวดเขย่าได้ เนื่องจากในการผลิตขยายส่วนนั้นปริมาณการผลิตมีสูงกว่ามาก สูตรอาหารเดิมซึ่งปรับปรุงจากสูตรของ Fukumoto โดยเอก แสงวิเชียร (2531) นั้นใช้เดกซ์แทรนเป็นแหล่งคาร์บอนและสารชักนำทั้งหมด ฉะนั้นหากใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกับระดับขวดเขย่าจำเป็นต้องใช้เดกซ์แทรนปริมาณมาก ซึ่งในทางปฏิบัติทำไม่ได้เนื่องจากทุนการผลิตน้ำตาลทรายอาจสูงขึ้นจากขั้นตอนนี้ หรือใช้ปริมาณเดกซ์แทรนเท่าเดิม แต่สามารถทำให้มีแอคติวิตีของเดกซ์แทรนเนสในกระบวนการเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นกว่าเดิม

ดังนั้นการผลิตแบบขยายส่วนจำเป็นต้องมีการหาวัตถุดิบที่ *Penicillium* sp. SMCU3-14 สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตและผลิตเดกซ์แทรนเนสได้มากขึ้น เพื่อลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยมุ่งไปที่วัตถุดิบที่สามารถหาได้ง่ายจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล ได้แก่กากน้ำตาลจากอ้อย ซึ่งโดยปกติแล้ว ย่อมเกิดการปนเปื้อนของเดกซ์แทรนอยู่แล้ว มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและสารชักนำในการผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ โดยทำการหาปริมาณของเดกซ์แทรนที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบดังกล่าว แล้วเสริมปริมาณเดกซ์แทรนที่ขาดลงไปให้เท่ากับร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเดกซ์แทรนที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่าที่ได้เคยรายงานไว้โดยเอก แสงวิเชียร (2531) โดยคาดหวังว่า *Penicillium* sp. SMCU3-14 จะสามารถใช้และสร้างเดกซ์แทรนเนสในระดับขวดเขย่าออกมาได้มีแอคติทิวิตีสูงและมีปริมาณมาก หลังจากนั้นทำการเสริมแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกลงไปเพื่อให้เชื้อราใช้ในการผลิตโปรตีน และเอนไซม์เนื่องจากสูตรอาหารเดิม (เอก แสงวิเชียร, 2531) ใช้สารสกัดจากยีสต์ โดยทำการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนจนได้ค่าที่เหมาะสมที่ราสามารถผลิตเดกซ์แทรนเนสได้ดีที่สุด ขั้นตอนต่อไปจึงเป็นการเพิ่มปริมาณการผลิตในระดับถังหมัก

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปแล้วว่า ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ในระดับถังหมักส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับอัตราการปั่นกวนของใบพัด ค่าเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) และอัตราการให้อากาศ (Gomes และคณะ, 1993a, b, 1994; Hoq และ Deckwer 1995; Hoq และคณะ, 1994) โดยก่อให้เกิดปัญหาตามมาบางอย่างเช่นความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากเส้นใยของเชื้อรา แรงเฉือนอันเนื่องจากการปั่นกวนของใบพัด การเกิดการหักของเส้นใยเนื่องจากใบพัด (Li และคณะ, 2000; Li และคณะ, 2002 และ Nienow และคณะ, 1996) ดังนั้นในกระบวนการผลิตในถังหมักจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆเหล่านี้ที่อาจมีผลต่อการผลิตเดกซ์แทรนเนส โดยทำการแปรผันค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวเพื่อให้ได้เดกซ์แทรนเนสที่มีแอคติวิตีต่อหน่วยปริมาตรมากที่สุดที่เป็นได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการผลิตเดกซ์แทรนเนสในระดับถังหมักจาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ SMCU3-14 เพื่อให้ได้ปริมาณสูงสุดที่สามารถทำได้ โดยเริ่มต้นหาสูตรอาหารที่เหมาะสม และปริมาณเดกซ์แทรนที่ต้องเสริมลงไปเพื่อใช้ในการผลิตเดกซ์แทรนเนส โดย *Penicillium* sp. SMCU 3-14 ในระดับขวดเขย่า หลังจากนั้นจึงหาภาวะที่เหมาะสม สำหรับการผลิตเดกซ์แทรนเนสในระดับถังหมักต่อไป