วัตถุประสงค์ของการวิจัย เพื่อศึกษาถึงสภาวะการเตรียมแป้งจากเศษมันสำปะหลัง เพื่อให้ได้ปริมาณแป้งที่พอเหมาะต่อการเลี้ยงรา ที่แยกจากของรับประทานได้ คือ Aspergillus niger และ Aspergillus oryzae ในอาหารเหลว และศึกษาความเป็นกรด ด่างของอาหารเหลวต่อการสร้างโปรตีนของรา ปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจน ปริมาณของธาตุคาร์บอน และสภาพของอุณหภูมิ เพื่อให้ได้สภาพของอาหารที่มีคุณภาพกระตุ้นให้ราทั้งสองชนิดสร้างโปรตีนได้สูงที่สุดในขวดเขย่า

การสำรวจเอกสารการวิจัย

ศึกษาการสร้างโปรตีนจากแบคทีเรีย

การทดลองเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อเป็นอาหารโปรตีนนั้น เพิ่งเริ่มเมื่อปี 1953 แต่การทดลองใช้ของเสียเพื่อนำมาให้จุลชีพสร้างโปรตีนนั้น เพิ่งทำมาไม่นานมานี้เอง

ค.ศ. 1953 Garibaldi และคณะ (29) เลี้ยง Bacillus megaterium (ATCC 13639) โดยใช้เครื่องเขย่า พบว่าเชื้อนี้มีการเจริญเติบโตเร็วและเซลค่อนข้างโต นอกจากนี้ยังสามารถให้วิตามิน บี 12 ได้ด้วย ถ้านำเซลมาล้างและทำให้แห้ง โดยวิธี drum dry พบว่า เซลแห้งที่ได้มีสีน้ำตาลอ่อนเป็นผงร่วน มีปริมาณกรดอะมิโน และวิตามินใกล้เคียงกับยีสต์ เมื่อทดลองใช้เป็นอาหาร พบว่าความเป็นพิษต่อหนูไม่เกิดขึ้น

ค.ศ. 1953 Lewis และคณะ (40) เลี้ยง Bacillus megaterium ในเครื่องกระตุ้นให้มีการแบ่งเซล (propagator) พบว่าได้ผลดี สามารถหวีจำนวนได้อย่างรวดเร็ว มี lag period 0-2 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลกิดเป็นน้ำหนักแห้งประมาณ 50 กรัม ต่อน้ำตาล 100 กรัม ภายในเวลา 7-9 ชั่วโมง

ค.ศ. 1953 Ambroseและ De Eds (10) รายงานว่าเชื้อ Bacillus megaterium มีคุณค่าที่จะใช้เป็นอาหารสัตว์ได้เหมาะกว่ายีสต์ และในเซลยังมีวิตามิน บี 12 อยู่มาก เมื่อทดลองให้เป็นอาหารหนู พบว่าไม่มีพิษ

ค.ศ. 1966 Tannenbaum และคณะ (64) ได้ใช้เชื้อสกุลเดียวกันนี้ ศึกษาคุณภาพทางอาหารของโปรตีนจากจุลินทรีย์ โดยทำให้เซลแตกด้วย homogenizer และวิเคราะห์หากรดอะมิโนในส่วนที่ละลายน้ำ และส่วนที่ยังเป็นเซล (whole cell) โดยเทียบกับนำนมวัว ถ้าที่ได้ใกล้เคียงกับน้ำนมวัว

ค.ศ. 1971 มีรายงานของคณะวิจัยแห่ง Louisiana State University โดยใช้ Cellulomonas sp. แยกได้จากขานอ้อยมาเลี้ยงในน้ำเสียจากเซลลูโลซ (12) แบคทีเรียตัวนี้ปกติไม่ย่อยลิกนิน (lignin) หรือ lignin cellulose complex ดังนั้นจึงมีการ predigest ก่อนที่จะให้มีการย่อยสลายด้วยรา predigest นี้โดยใช้ hot alkali วิธีนี้ไม่ได้เป็นการเพิ่ม reducing sugar แต่เพื่อให้น้ำเซลลูโลซไปใช้ได้ง่ายเข้า Bellamy (12) เสนอว่า ควรใช้เชื้อผสม (mixed culture) ระหว่าง Alcaligenes faecalis และ Cellulomonas sp. จะทำให้มีการเจริญเติบโตของ Cellulomonas มากขึ้น และได้โปรตีนมากขึ้น

ค.ศ. 1972 Bough และคณะ (14) ใช้คอลลาเจน (collagen) เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์เป็นอาหารเลี้ยง Bacillus megaterium เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารโปรตีน โดยเติมแร่ธาตุบางอย่างลงไป สามารถผลิตเซลได้ 15.3 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรใน 24 ชั่วโมง เมื่อใช้เลี้ยงหนูโดยเทียบกับคาซีอิน (casein) และ collagenous derived substrate พบว่าเซลของBacillus มีคุณค่าทางอาหารมากกว่า collagenous derived substrate

ค.ศ. 1975 Tannenbaum (63) ได้ทดลองเลี้ยง Hyphomicrobium sp. Methylococcus capsulatus ในมีเทน พบว่าสามารถใช้มีเทนเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนได้ นอกจากนี้พบว่า Pseudomonas oleovorans สามารถเจริญเติบโตและใช้ gas - oil ได้ทำนองเดียวกับ Imrie (34) พบว่า Pseudomonas methanica สามารถใช้มีเทนเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนได้ และ Tannenbaum (63) พบว่า Methylonas methanolica, Pseudomonas aeroginosa สามาถใช้เมธานอลในการเจริญเติบโต และทดลองใช้เป็นอาหารสัตว์

ค.ศ. 1976 Imrie(34) พบว่า Methanomonas sp. สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้มีเทน เป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นกัน และยังได้ศึกษาแหล่งโปรตีนที่ได้จาก Cellulomonas sp. ในการย่อยเซลลูโลช Escherichia coli จะมีการเจริญเติบโตเร็วมาก และเจริญได้แม้ในอาหารที่เป็นน้ำตาลเฮคโซส(hexose) และน้ำตาลเพนโตส (pentose)

พ.ศ. 2519 เพ็ญพันธุ์ (5) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตโปรตีน และวิตามิน โดย Bacillus megaterium (ATCC 136399) จากวัสดุเหลือทิ้งจากถั่วเหลือง โดยเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน พบว่า เชื้อนี้เจริญเติบโตได้เร็วมาก สารอนินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนดีที่สุด คือ ยูเรีย ปริมาณ 0.2-0.3% สารที่ใช้เป็นแหล่งธาตุคาร์บอนที่ดี คือ น้ำตาลทราย 4.5% ในเซลมีวิตามิน บี 12, crude protein 33.2799 - 35.2742% ของน้ำหนักแห้ง true protein 25.001 - 27.258% ของน้ำหนักแห้ง กรดนิวคลีอิค 7.8314-8.0162% ของน้ำหนักแห้ง คาร์โบไฮเดรต 7.125 - 8.50% ของน้ำหนักแห้ง และพบว่าสามารถลดค่า BOD ของน้ำทิ้งที่เติมสารต่าง ๆ ได้ถึง 77.30 %

2. ศึกษาการสร้างโปรตีนจากยีสต์

พ.ศ. 2514 พูนสุข และ มาลี (4) แห่งสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์ บางเขน ได้ทำการทดลองใช้น้ำเสียจากโรงกลั่นแอลกอฮอร์ อยุธยา มาทดลอง น้ำเสียนี้มียีสต์ ซึ่งปกติมักเป็นปัญหาอยู่เสมอ ถ้ามีการเติมเชื้อ Candida utilis ในน้ำทิ้งที่มี การเติมสารเพื่อการเจริญเติบโตบางอย่าง ผลที่ได้คือ สามารถใช้น้ำตาลที่มีในน้ำถึง 2 % ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นประโยชน์ในการผสมทำอาหารสัตว์ได้ ของแข็งที่ปนในน้ำ ทำให้แห้ง แล้วนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ นอกจากนั้นยังมีปริมาณโปตัสเซียมสูงพอผสมทำปุ๋ยใช้ภายในประเทศได้

ค.ศ. 1974 Sukimoto (62) ทดลองเลี้ยงยีสต์ในน้ำทิ้งจากการตกตะกอนโปรตีนของถั่วเหลือง พบว่า จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดี คือ Candida guilliermondii, Debaryomyces hansenii, D. kloeckeri, Torulopsis candida, Pichia scolyti อัตราการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดจะลดค่า BOD ได้โดยเฉพาะ D. kloeckeri (AHU 3932) สามารถลดได้ถึง 48 % เซลที่ได้สามารถใช้เป็นโปรตีนได้

พ.ศ. 2519 เชิดชัย และ คณะ (2) ทดลองใช้ยีสต์ Schwanniomyces alluvius และ Candida utilis เลี้ยงในน้ำเสียจากโรงงานมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อที่มีอายุ 3 วัน มีขนาดที่ใส่ (inoculum size) ที่พอเหมาะในอาหารเหลวที่เป็น potato dextrose broth เข้าเครื่องเขย่าเป็นการเพิ่มออกซิเจนแก่ยีสต์ในการเมตะโบลิซึม นาน 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาใส่ในน้ำเสียจากโรงงานสำปะหลัง โดยใช้เศษมันสำปะหลัง 100 กรัม ผสมน้ำ 2000 มล. บดให้ละเอียด โดยใช้ครกไฟฟ้า ทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้สารพิษ HCN ระเหยไป เติม $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 % KH_2PO_4 0.2% pH 4.3-4.5 (ด้วยกรด H_3PO_4) แล้วนำไปหมักโดยการใส่เชื้อที่เลี้ยงใน potato dextrose broth ลงไปในขวด และเข้าเครื่องเขย่า นาน 36 ชั่วโมง ครบกำหนดแล้วแยกยีสต์โดยใช้เครื่องปั่นนาน 5 นาที อบให้แห้ง ผลที่ได้ ยีสต์สีครีม แห้ง กลิ่นหอม ปริมาณโปรตีน 40 - 45 % โดยน้ำหนัก

ค.ศ. 1975 Cooney และคณะ (25) ได้ศึกษาโปรตีนที่ได้จาก Hansenula polymorpha DL-1 (ATCC 26012 และ NRRL Y-7560) ในอาหารที่มีไบโอทิน (biotin) ไทอามิน (thiamine)และมี เมธานอล (methanol) เป็นแหล่งธาตุคาร์บอนใน continuous culture เมื่อมีการเปรียบเทียบผลผลิตโปรตีนและ[illegible]ของยีสต์ที่ใช้ เมธานอล พบว่า ยีสต์เหมาะที่ใช้ทำโปรตีนเซลเดียวมากกว่าแบคทีเรีย เพราะให้อัตราส่วนโปรตีน ต่อ กรดนิวคลีอิกสูงกว่าแบคทีเรีย

อัตราส่วนนี้ขึ้นกับการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ด้วย ถ้าทำ heat-shock technique จะทำให้กรดนิวคลีอิกลดลง 50% เป็นการเพิ่มอัตราส่วนของโปรตีน ต่อกรดนิวคลีอิก เมื่อนำมาวิเคราะห์หากรดอะมิโน พบว่า H. polymorpha ที่ศึกษานี้มี เมไธโอนิน (methionine) ค่อนข้างมาก แต่ตามปกติ ยีสต์จะมี เมไธโอนินต่ำ ส่วนกรดอะมิโนทุกชนิดจะมีปริมาณเกินมาตรฐาน F.A.O. เมื่อทดลองกับหนูก็ไม่พบความเป็นพิษเกิดขึ้น

ค.ศ. 1975 Nagy และคณะ (46) ทดลองกับ Torulopsis utilis (strain 82) ในของเสียที่เป็นเซลลูโลสที่บดผสมกับ กรดกำมะถันเจือจาง ส่วนของเสียที่เป็นลำต้นข้าวโพด ปอ หรือป่าน ก็ทำ pretreatment ด้วย 1.5 และ 2.5 % H_2SO_4 ตามลำดับ สิ่งที่ได้เรียก slurry แล้วจึงนำไปอบ การทำ pre-treatment แบบนี้ทำให้ได้การ์โบไฮเดรต ออกมาเป็นโพลีเซคคาไรด์ ประมาณ 80 % ช่วงแรกมีการเจริญเติบโตมากกว่าช่วงหลัง ๆ เพราะช่วงแรกของการเจริญเติบโตเป็นการใช้โมโนเซคคาไรด์ เขาจึงสรุปว่า pretreatment ของพวกเซลลูโลสที่เติมกรดกำมะถันที่เจือจางจะทำให้ได้สารละลายอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และโพลีเซคคาไรด์ เป็นน้ำตาลที่ถูกใช้ในอัตราเร็วต่างกันไป

ค.ศ. 1975 Trevelyan (66) ได้ทดลองหา uric acid precursor ในยีสต์แห้ง และโปรตีนเซลเดียว พบว่า adenine และ guanine ของ purine ซึ่งมีมากในโมเลกุลของ RNA, DNA ในเซลของจุลินทรีย์ ยีสต์มี RNA ประมาณ 1/3 ของโปรตีน DNA 1 - 2 % ของ RNA เท่านั้น ทั้ง adenine และ guanine เป็น coenzyme ในยีสต์ ถ้าเกิด autolysis ขึ้น RNA จะถูกทำลายให้เป็นนิวคลีโอไทด์ เนื่องจาก purine จะมีการเปลี่ยนแปลงให้เป็นกรดยูริค มากไป จะทำให้มีการสะสมของกรดนี้ ทำให้เป็นโรคไขข้ออักเสบ ในยีสต์มีอัตราส่วนของโมลาร์ adenine ต่อ guanine เป็น 54 ต่อ 46 แสดงว่า adenine มีมากและเป็นองค์ประกอบของ coenzyme บางชนิดด้วย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ค.ศ. 1975 Vananuvat กับ Kinsella(69) ได้ทดลองเกี่ยวกับการเลี้ยงยีสต์ Saccharomyces fragilis และวิธีการสกัดโปรตีนเซลเดียวให้ได้ค่ากรดนิวคลีอิกต่ำ โดยการทำให้ผนังเซลแตก หรือย่อยให้เซลแตก เพื่อเอาโปรตีนภายในเซลออกมา โดยวิธีทางเคมี หรือ ฟิสิกส์ พบว่า ถ้าใช้สารละลาย 0.4 % NaOH เป็นสารละลายในการสกัด (extractant) สกัดนาน 1 - 2 ชั่วโมงใน water bath 40 °ซ พร้อมทั้งเขย่าด้วย จะทำให้ได้โปรตีนสูง และกรดนิวคลีอิกต่ำ หรือการทำให้ร้อนจะทำให้น้ำย่อยนิวคลีเอสทำงาน จึงทำให้ลดกรดนี้ได้ โดยมีการใช้วิธี ฮีท - ช็อค (heat-shock) แล้วตามด้วยขบวนการไดอะไลซิส ผ่านเยื่อ บาง ๆ หรือใช้สารละลายฟอสเฟตที่ pH เป็นด่างหรืออาจใช้วิธีเติมน้ำย่อย RNase ลงในน้ำเซลของยีสต์ที่เซลแตกแล้ว หรือการสกัดโดยทางเคมี โดยใช้ กรด ด่าง ฟีนอล เกลือ และดีเทอร์เจน ขบวนการเหล่านี้ทำให้สกัดโปรตีนได้สูง และมีปริมาณกรดนิวคลีอิกต่ำ

ค.ศ. 1976 Henry (33) ได้ทดลองใช้น้ำจากเส้าหมูเลี้ยง Candida ingens โดยเติมแอมโมเนียเป็นแหล่งของไนโตรเจน การหมักเกิดขึ้นได้ กรดอะซิติค (acetic acid) กรดโปรปิโอนิค (propionic acid) กรดบิวทีริค (butyric acid) กรดไอโซวาลีริค (isovaleric acid) กรดวาลีริค (valeric acid) และกรดคาโปรอิค (caproic acid) กรดเหล่านี้ล้วนแต่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีของยีสต์ตัวนี้ ปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นเรื่อยจนได้ 0.8 โมล่าร์ อุณหภูมิ 37 - 39 ° ซ ในเวลาหมักทั้งสิ้น 10 วัน แม้มี ยูรีน (urine) เล็กน้อยในน้ำเสียก็พอที่จะเกิดปฏิกริยาได้ จากการทดลองในสภาพที่เหมาะสมได้ เคดาวน์-โปรตีน 38 - 58% แต่ขาดเมไธโอนีน (methionine) และซิสตีน (cystine) เมื่อทดสอบคุณค่าทางอาหารกับหนูโดยเทียบกับ คาซีอิน ในเวลา 45 วัน ได้ผลไม่ต่างกัน จากความสามารถของมันที่จะใช้แหล่งอาหารไนโตรเจน และคาร์บอนจากอาหารได้ จึงเหมาะที่จะใช้เพาะเลี้ยงในของเสียได้ดี เป็นการลดมลภาวะ และเพิ่มโปรตีน

ขั้นแรกของปฏิกริยานี้จะได้ กรดและก๊าซมีเทน (methane) ก๊าซมีเทน ที่เกิดขึ้นใช้ทำเป็นเชื้อเพลิงได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงเป็นการลดค่า BOD และมีประโยชน์ทางอาหาร

ค.ศ. 1976 Pace และคณะ (48) ได้ทดลองหาและตรวจสอบคุณค่าของโปรตีนเซลเดียวที่ปนกับอาหารสัตว์ โปรตีนเซลเดียวนี้ได้มาจาก Candida lipolytica การทดลองนี้ทำที่ Instituto Superiore di Sanita (ISS) ในประเทศอิตาลี ตรวจคุณสมบัติของยีสต์โดยการใช้ลักษณะของ อีเล็คโตรโฟรีติค และ อิมมิวโนเคมีคัล (electrophoretic และ immunochemical characteristic) พบว่า อย่างน้อยต้องมีโปรตีนหนึ่งอย่าง หรือแอนติเจนเพียงชนิดเดียวที่มีความจำเพาะต่อยีสต์ จึงใช้โปรตีนชนิดนี้เป็นโมเลคิวล่าร์ มาร์คเกอร์ (molecular marker) ของยีสต์ในการผสมเป็นอาหารสัตว์ ได้ทำการทดลองหา และวัดความจำเพาะของมาร์คเคอร์ (specific marker) ในอาหารสัตว์ที่ผสมยีสต์ โดยทาง serology ของยีสต์ด้วย

พ.ศ. 2519 เชิดชัย และคณะ (1) ได้ทดลองกับน้ำเสียในการเลี้ยงยีสต์และราในการกำจัดของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อใช้เป็นอาหารที่มีโปรตีน ทดลองกับน้ำเสียจากโรงงานบรรจุสับปะรด จากโรงงานนมถั่วเหลือง โรงงานน้ำตาล และโรงงานเบียร์ โดยใช้ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ได้โปรตีนสูง 32 - 51 % จึงเหมาะที่จะใช้ดัดแปลงผสมเป็นอาหารสัตว์ หรือทำ yeast extract ได้

พ.ศ. 2519 พงษ์ และ คณะ (3) ได้ทำการทดลองใช้ยีสต์จากโรงงานเบียร์เป็นองค์ประกอบของอาหารไก่กระทง โดยนำมาใช้แทนปลาป่น และกากถั่วเหลืองที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของอาหารไก่กระทง ยีสต์ที่นำมาจากโรงงานเบียร์นำมาล้างด้วยน้ำก่อนอบแห้ง จากนั้น วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิค คาร์บอน แคลเซียม และฟอสฟอรัส ก่อนที่จะนำไปผสมเป็นอาหารของไก่กระทง ปรากฏว่า เมื่อใช้ยีสต์แทนปลาป่น หรือกากถั่วเหลือง ได้ผลที่เลี้ยงด้วยยีสต์ไม่ต่างจากไก่กระทงที่เลี้ยงด้วยอาหารปกติที่เป็นปลาป่น หรือกากถั่วเหลือง

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

3. ศึกษาการสร้างโปรตีนจากรา

เมื่อความสนใจในเรื่องโปรตีนเซลเดียวจากจุลินทรีย์ เพื่อนำไปเลี้ยงสัตว์เพิ่มขึ้น จึงทำให้มีการลงทุนสูง เช่น เครื่องมือที่จะเก็บยีสต์หรือแบคทีเรียจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยง มีราคาสูงมาก มีผู้ทดลองนำเอากากสายใยของ Streptomyces จากโรงงานผลิตยา Streptomycin มาเลี้ยงสัตว์ พบว่า ทำให้สัตว์เจริญได้ดี จึงมีผู้คิดว่า น่าจะมีการทดลองใช้ราบางชนิดมาทำเป็นอาหารโปรตีนบ้าง ความคิดนี้จึงเริ่มเกิดขึ้น

ค.ศ. 1959 Collard (24) พบว่า การิ (gari) เป็นอาหารของชาวอัฟริกาตะวันตก ทำมาจากรากมันสำปะหลังสด จะมี HCN ลดลงโดยวิธีการที่เรียกว่า two - stage fermentation ขั้นแรกมีการหมัก โดยใช้ Corynebacterium ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่ง เปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้กลายเป็นกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ขั้นที่ 2 ใช้รา Geotrichum ไปหมักต่อ โดยใช้กรดอินทรีย์เหล่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ได้ อัลดีไฮด์ (aldehyde) และเอสเตอร์ (ester) มากมาย การิ จึงมีรสและกลิ่นดี ทั้งยังมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นด้วย

ค.ศ. 1964 Akinrele (8) พบว่า Corynebacterium และ Geotrichum candidum ที่เลี้ยงแบบผสมในการิ จะทำให้มีผลผลิตโปรตีนเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับ Collard (24)

ค.ศ.1966 Gray (31) และคณะ มีการทดลองหาโปรตีนในราจากรากมันสำปะหลัง พบว่า โปรตีนที่ได้มีมากพอเหมาะที่จะเปลี่ยนคุณค่าอาหารในรากมันสำปะหลังให้เป็นโปรตีน

ค.ศ. 1967 รายงานจาก Tropical Products Institute (TPI) (27) ของอังกฤษ เกี่ยวกับวิธีการหมักรากมันสำปะหลังเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารด้วยวิธีแรก คือการเติมแร่ธาตุอาหารราคาถูกเป็นอาหารเสริม วิธีนี้เรียก TPI

vegetative cheese process ใส่เกลือและสปอร์ของรา Rhizopus stolonifer อีกวิธีโดยการใช้ของเหลวจากมันสำปะหลังเติมเกลือและสปอร์ราดังกล่าวข้างต้น กายใต้การหมักที่มีอากาศ ผลจาก 2 วิธีจะได้ จำนวนเซลของจุลชีพเพิ่มมากมาย

ค.ศ. 1968 Woolen (74) แห่ง The Tropical Products Institute ได้ค้นคว้าวิธีเพิ่มโปรตีนในน้ำมันสำปะหลัง Crude protein ที่ได้เพิ่มขึ้น 0.1 - 4.0 % ถ้ามีการนำมันสำปะหลังมารวมกับสารที่มีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และเกลืออื่น ๆ รวมทั้งใส่สปอร์รา Rhizopus stolonifer ลงไปในสภาพอุณหภูมิพอเหมาะความชื้น องค์ประกอบ และคุณสมบัติต่าง ๆ ทางฟิสิกส์ที่เหมาะสมทำให้ราเจริญได้ดี โปรตีนที่ได้อาจเก็บในรูปของแข่แข็งหรือทำให้แห้งก็ได้

ค.ศ. 1969 Brook และคณะ (15) ได้ทดลองวิธีหมักมันสำปะหลังเพื่อให้ได้โปรตีนสูง โดยใช้ Rhizopus oligosporus และ R. stolonifer ในอาหารแป้งเหล่านี้ เพื่อให้ได้ประโยชน์ในเรื่องคุณค่าทางอาหารสูง

ค.ศ. 1969 Stanton และ Wallbridge (58) ได้ทดลองใส่ราไปหมักกับมันสำปะหลัง ผลออกมาเหมือนเนยที่เรียก vegetative cheese ที่มีปริมาณโปรตีนเพิ่ม

ค.ศ. 1971 Spicer (55) ได้ผลิตโปรตีนจากไมโครฟังไจ (microfungi) โดยเปรียบเทียบกับยีสต์และแบคทีเรีย ปรากฏว่า ไมโครฟังไจเพิ่มคุณค่าโปรตีนได้มากกว่า การเพาะเลี้ยงก็ไม่ยาก อีกทั้งรามีเส้นใยสะดวกต่อการเก็บผล สายพันธุ์ที่ให้โปรตีนสูง จะให้โปรตีนสูงถึง 45 - 50 % ของน้ำหนักแห้ง โดยใช้วัตถุดิบเป็นมันสำปะหลัง หรือมันฝรั่ง หรือพวกน้ำตาลซูโครส กากอ้อย หรือ กากน้ำตาล หรือ จากเลคโทส เช่น ของเสียจากอุตสาหกรรมนม (milk whey) ดังนั้นจะใช้อะไรเป็นวัตถุดิบในการเพิ่มปริมาตรการผลิต (scale up) ขึ้นกับวัตถุดิบที่มีอยู่ในแต่ละสถานที่ และต้นทุนการผลิตไม่เหมือนกัน

ค.ศ. 1972 Codner (21) ทำการทดลองที่ TPI (London) โดยใช้ราที่เหมาะสมเจริญบนมันสำปะหลังที่ฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมทั้งเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นพวกเกลือแร่ ผลสุดท้ายจะได้สิ่งที่เรียกว่า ชีส (cheese) โปรตีนเพิ่มจาก 0.5 % เป็น 3.25 % ในชีสนั้น ถ้าเติมคาซีอินลงไปอีก โปรตีนจะเพิ่มเป็น 8.5 % เมื่อนำชีสไปเลี้ยงหนูโดยผสมกับอาหารสัตว์ช่วงแรกหนูเติบโตช้า แต่ในไม่ช้าก็ได้น้ำหนักลงที่แสดงว่า จะใช้ชีสเลี้ยงสัตว์เพิ่มโปรตีนในอาหารสัตว์ได้ เขายังเสนอว่า ควรลองใช้ยีสต์แทนรา อาจทำให้ผลดียิ่งขึ้น

ค.ศ. 1972 Strasser(61) ได้รับความสำเร็จจากการใช้ราพวก mucoraceous สกุล Rhizopus Mucor Actinomucor และ Monilia หมักในอาหารดิบที่มีโปรตีนต่ำ เช่น มันสำปะหลังที่เป็นของแข็งหรือครึ่งแข็งครึ่งเหลวปนอยู่กับแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ได้อยู่ในรูปของโปรตีน ราจะใช้ไนโตรเจนที่มีในอาหารทำให้เกิดเป็นโปรตีนแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ทดลอง คือ NH_4 NO_3 และ KH_2PO_4 เป็นแหล่งโปตัสเซียม และ ฟอสฟอรัส pH 4.5-6.7 มันสำปะหลังที่ทดลองทำเป็นก้อนหมักที่ 30° ซ. 72 ชั่วโมง ได้โปรตีนสูงจากเดิม 0.2 % เป็น 4.0 % สารพิษในมันสำปะหลังจะลดลงด้วย

ค.ศ. 1973 Imrie และ Vlitos(36) ได้ศึกษาโปรตีนจากราที่เจริญบนฝักเคร็อบ (carob)(Ceratonia siliqua L.)รายงานว่า ถ้าสกัดน้ำตาลจากฝักเคร็อบออกมาเติมสารอนินทรีย์ลงไป จะใช้เลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้มีการเจริญเติบโตน้ำหนักแห้งและโปรตีนในตัวจุลชีพมีปริมาณมากได้ โดยทดลองกับ Aspergillus niger (M1) เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากเคร็อบที่เปื่อยตามธรรมชาติ ในประเทศกรีก ใส่ในอาหารที่สกัดออกมาได้ และเพิ่มแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ให้ได้ชาตุคาร์บอนต่อชาตุไนโตรเจนเป็นอัตราส่วน 20 ต่อ 1 และ 0.1 % KH_2PO_4 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า อุณหภูมิไม่มีผลต่อการสร้างโปรตีน กลับพบว่า ระหว่างอุณหภูมิ 30 - 36° ซ. ปริมาณของโปรตีนขึ้นกับแหล่งคาร์บอน และปริมาณอาหารที่พอเหมาะที่จะให้มีการเจริญ

เติบโตได้ดี โดยไม่มีการสะสมของคาร์โบไฮเดรต และไขมันในรามากเกินไป มีผู้พบว่ายีสต์ให้โปรตีนสูงกว่าราที่มีสายใยนั่นไม่ได้หมายความว่า ราที่มีสายใยจะนำมาใช้เป็นโปรตีนเซลเดียวไม่ได้ ในทางการค้าต้องคำนึงถึงต้นทุนของการผลิตโปรตีนก่อน ใน 1 หน่วย น้ำหนักราให้โปรตีน 35 % ยีสต์ให้โปรตีน 42 - 47 % แต่ต้นทุนการผลิตโปรตีนของราถูกกว่า เมื่อเอาโปรตีนที่ได้ไปทดลองกับหนู ปรากฏว่าไม่เกิดพิษต่อหนู และมีคุณค่าทางอาหารด้วย โปรตีนจากราตัวนี้จะมีทั้ง ซิสตีน (cystine) และเมไธโอนีน (methionine) ครบตามมาตรฐาน F.A.O.

ค.ศ. 1973 Morris Imrie และPhillips (45) ได้นำของทิ้งจากเกษตรกรรมมาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงสัตว์ ในการทดลองนี้ใช้อาหารที่สกัดได้จากผักเคร็อบ และเติมแหล่งไนโตรเจนลงไป ปรับ pH อุณหภูมิให้ได้สภาพอาหารที่เหมาะสม ราที่ใช้ คือ Aspergillus niger (M1) ได้โปรตีนจากราเหมาะที่จะใช้เป็นอาหารสัตว์โดยมีการทดลองกับหนูและไก่ ในประเทศฮอร์แลนด์ ดูความผิดปกติของหนูที่บริโภค มีการตรวจเม็ดเลือดแดง และอวัยวะต่าง ๆ ภายใน ปรากฏว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเลย ปกติทุกส่วน

ค.ศ. 1974 Griffin และคณะ (32) ค้นพบน้ำย่อย เซลลูเลซ (cellulase) จากเชื้อ Trichoderma virede ราชนิดนี้ใช้คาร์โบไฮเดรตได้ถึง 2 ใน 3 โดยการปล่อยเซลลูเลซมาย่อยเซลลูโลซ ทำให้ได้กาซมีเทนเกิดขึ้น ถ้าใช้เชื้อผสมของ T. viredeและ Gliocladium deliquescens จะลดค่า BOD และมี crude proteinสูงถึง 50 % โปรตีนนี้ใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

ค.ศ. 1974 Lin Khor (38) เลี้ยงเชื้อแบบผสมของยีสต์ และราที่มีสายใย ในมันสำปะหลังที่มีแร่ธาตุอยู่ โปรตีนที่ได้จากจุลชีพนี้นำไปเลี้ยงหนู ปรากฏว่าหนูสมบูรณ์ดี เมื่อนำโปรตีนจากจุลินทรีย์นั้นมาตรวจปริมาณกรดอะมิโน พบว่า โปรตีนเหล่านี้จะขาดกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ จึงใช้วิธีการใหม่ หาซิสตีน และเมไธโอนีน ในโปรตีนนั้นใหม่ด้วยวิธีออกซิเดชั่น ผลคือได้กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์

เป็นองค์ประกอบเพิ่มขึ้น เอาโปรตีนที่ได้ไปเลี้ยงหนู ทำให้หนูมีการเจริญเติบโตเทียบได้กับหนูที่ให้เคซีอิน เมื่อตรวจเนื้อเยื่อและน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูที่บริโภคโปรตีน เหล่านี้ไม่พบที่ผิดปกติเลย แสดงว่าภายในระยะเวลาที่บริโภคไม่พบความผิดปกติภายในของหนูทดลอง

ค.ศ. 1974 Sprung (56) ได้เพิ่มคุณค่าทางอาหารของมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อรา Rhizopus oligosporus หมักในมันสำปะหลัง โปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 3 % และ 4 % ในสภาพที่หมักในที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ ตามลำดับ

ค.ศ. 1974 Weiner และ Rhodes (72) แห่ง Northern Regional Research Laboratory ได้แยกเชื้อกอกวัว ควาย 2 เชื้อด้วยกัน คือ Streptomyces กับรา โดยใช้อาหารเป็นมูลสัตว์ (เป็นของแข็งเสีย 21 - 40% ก่อนจะทดลอง ต้องเอามาทำเจือจางก่อน) อาหารที่เติมคือ กลูโคส เปปโตน (peptone) และอื่น ๆ ทำการทดลองที่ 28° ซ ผล คือ Streptomycetes พยายามปรับตัวเพื่ออยู่รอดเป็นการลดมลภาวะ ส่วนราที่เจริญในกลูโคส มีสายใยเพิ่มมาก และราที่ปรับตัวเข้ากับสภาพต่าง ๆไม่ได้จะมีน้ำหนักราน้อย แสดงว่าความสามารถของราที่ใช้ของเสียขึ้นกับกลูโคส

ค.ศ. 1975 Christiasและคณะ (19) ได้ทดลองหาโปรตีนจากรา Aspergillus niger Fusarium oxysporum F. moniliforme และ Candida tropicalis โดยแยกเชื้อ Aspergillus niger จากอากาศ แล้วนำมาทำให้กลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต ทำให้ไม่สร้างรงควัตถุ และสปอร์ (conidia) ภายใต้สภาพที่เหมาะสม มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 20 หลังจากใส่เชื้อเมื่อตรวจโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี Lowry Biuret และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด พบว่าปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกัน ระหว่าง mid-log และ early stationary phase เมื่อทดลองหาปริมาณกรดอะมิโน พบว่าใน A. niger ทั้งพันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์ใหม่ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ไม่มีผลต่างกันเลย ต่างกันที่ ราพันธุ์ใหม่ที่กลาย-

พันธุ์ (mutant) มี ซิสทีน และเมไธโอนินสูงกว่า รวมทั้งมี อาจินิน และอะลานินสูงด้วย ส่วนการเก็บผลของ Fusarium ในช่วงต้น ๆ ของ stationary phase ให้กรดอะมิโนมากกว่า A. niger ถึง 30 % และมีกรดอะมิโนที่จำเป็นสูงกว่าด้วย

ค.ศ. 1975 Volesky และคณะ (71) เลี้ยงรา Graphium sp. ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นกาซ ทำให้ได้โปรตีนมีปริมาณ 50 % มาเลี้ยงหนู ตรวจความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากการบริโภคในช่วงเวลาสั้น ๆ และการบริโภคนาน ๆ ดูว่ามีความเรื้อรังหรือเปล่า ผลปรากฏว่า ไม่มีความผิดปกติเกิดขึ้นกับหนูทดลอง ทั้งที่บริโภคในเวลาสั้น ๆ และในเวลานาน ๆ แสดงว่า สามารถนำโปรตีนนี้มาใช้ในการผสมกับอาหารใช้เพิ่มโปรตีนได้

002457