บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

เทคนิคการใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสลายมหโมเลกุล (Yokotsuka, T., 1986) เป็นที่รู้จักกันดีมาเป็นเวลานานแล้ว โดยเฉพาะการย่อยสลายโปรตีนในอาหารไปเป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สั้นๆ ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น การทำเนยแข็งของชาวตะวันตกตั้งแต่สมัยโบราณ นิยมเพิ่มกลิ่นให้กับเนยแข็งด้วยการนำไปหมักร่วมกับเชื้อรา Penicillium ส่วนชาวตะวันออกเพิ่มกลิ่นรสของปลา เนื้อสัตว์ โปรตีนจากถั่วเหลือง และธัญญพืชบางชนิดโดยนำไปหมักกับเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzyme) ที่ผลิตขึ้นโดยรา Aspergillus หรือ Rhizopus หรือนำไปหมักกับแบคทีเรียแลคโตบาซิลไล (lactobacilli) และยีสต์ ในกรณีสภาพแวดล้อมมีความเข้มข้นของเกลือสูง อาหารดังกล่าวมีชื่อเรียกดั้งเดิมในภาษาจีนว่า Chiang และในภาษาญี่ปุ่นว่า Sho, Soy หรือ Hishio ซึ่งหมายถึงน้ำซีอิ๊วในภาษาไทย นอกจากนั้นยังพบอาหารประเภทนี้ในประเทศทางเอเชียอีกหลายประเทศ

น้ำซีอิ๊วเป็นอาหารที่ชาวจีนคิดค้นผลิตขึ้นเป็นเวลากว่า 3 พันปีมาแล้ว (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) เริ่มจากพระสงฆ์ในพุทธศาสนาต้องการอาหารมังสวิรัตจึงได้ทดลองนำธัญญพืชที่มีโปรตีนสูง เช่น ข้าวสาลี และถั่วเหลือง มาผลิต Chiang แทนเนื้อสัตว์ ต่อมาพุทธศาสนาถูกเผยแพร่ไปยังประเทศญี่ปุ่นเมื่อประมาณ 2 พันปีก่อน พระสงฆ์ชาวจีนได้นำอาหารมังสวิรัตดังกล่าวเข้าไปเผยแพร่ด้วย จนกระทั่งปัจจุบันนี้ น้ำซีอิ๊วได้กลายเป็นเครื่องปรุงรสประจำครัวของชาวเอเชียแทบทุกประเทศ

ความเป็นมาของอาหารถั่วเหลืองหมักในในประเทศจีน เริ่มต้นบันทึกเมื่อ 700 ปีก่อนคริสต์ศักราช ในสมัย Shu-Ching มีการใช้เครื่องปรุงรสที่เรียกว่า Chu และ Chiang ซึ่งทำจากปลา นก หรือเนื้อสัตว์อื่นๆ ปี ค.ศ. 532 ซึ่งตรงกับสมัย Chi-Min-Yao-shu เครื่องปรุงรสที่เรียกว่า Chu ได้ปรับปรุงวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต โดยทำจากข้าวสาลี หรือแป้งข้าวสาลีที่ทำเป็นแผ่น หรือปั้นเป็นก้อนกลม หรือใช้ข้าวเจ้าที่คั่วแล้วแทน ส่วน Chiang ใช้ถั่วเหลืองและข้าวสาลีในการผลิต นอกจากนั้นยังมีการผลิตเครื่องปรุงรสขึ้นมาอีก 2 ชนิด คือ Shi และ Shi-tche ต่อมาในปี ค.ศ. 618 ซึ่งตรงกับสมัย Tang เครื่องปรุงรสแต่เดิม

ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น Chiang-yu และ Tao-yu

ปี ค.ศ. 1800 ผู้ผลิตชาวจีนพบว่าวัตถุดิบสำคัญที่ใช้ในการผลิตน้ำซีอิ๊วคือ ถั่วเหลือง และข้าวสาลี ปี ค.ศ. 1930 เริ่มนำกากซึ่งเหลือจากการผลิตผงชูรสใส่ลงในน้ำซีอิ๊ว และเริ่มมีการผลิตหัวเชื้อทำน้ำซีอิ๊วขึ้น ปี ค.ศ. 1940 ผู้ผลิตน้ำซีอิ๊วในประเทศจีนเริ่มใช้ถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออกแล้วเป็นวัตถุดิบ ปี ค.ศ. 1950 กระทรวงเศรษฐการของประเทศจีนประกาศใช้มาตรฐานของน้ำซีอิ๊วทั่วประเทศ ปี ค.ศ. 1960 โรงงานผลิตน้ำซีอิ๊วในประเทศจีนเริ่มนำเข้าเครื่องมือจากต่างประเทศเพื่อช่วยในกระบวนการผลิต และกระทรวงเศรษฐการกำหนดระดับของน้ำซีอิ๊วที่โรงงานผลิตขึ้นเป็น 3 ระดับ และในปี ค.ศ. 1970 รัฐบาลจีนกำหนดให้ผู้ผลิตน้ำซีอิ๊วแจ้งแก่ผู้บริโภคว่า น้ำซีอิ๊วนั้นเป็นประเภทหมักหรือเคมี

ความเป็นมาของอาหารถั่วเหลืองหมักในประเทศญี่ปุ่น เริ่มต้นเมื่อปี ค.ศ. 350 ในสมัย Manyo-Shu อาหารหมักในสมัยนั้นได้รับอิทธิพลโดยตรงจากจีน อาหารหมักที่เรียกว่า Koji ผลิตด้วยกรรมวิธีเดียวกับ Chu ส่วน Hishio ผลิตเช่นเดียวกับ Chiang แต่ใช้ปลาหรือถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ นอกจากนั้นยังมี Koma-hichio และ Miso ปี ค.ศ. 701 ในสมัย Taiho-Law อาหารหมักที่ได้รับอิทธิพลจากจีนได้วิวัฒนาการเป็นเครื่องปรุงรสหลายชนิดคือ Hishio ที่ทำจากถั่วเหลือง Miso, Kuki, Taremiso, Sudare, Misodamari ปี ค.ศ. 1598 ในสมัย Ekiribon-Setsuyoshu จึงได้เกิด Shoyu หรือน้ำซีอิ๊วญี่ปุ่นขึ้น อย่างไรก็ตาม Shoyu ในสมัยนั้นมีลักษณะคล้ายกับ Chiang-yu ของจีน ต่อมาในปี ค.ศ. 1962 สมัย Honcho-Shokukan น้ำซีอิ๊วญี่ปุ่นถูกจำแนกออกเป็น 5 ชนิด คือ Koikuchi, Usukuchi, Tamari, Shishimori และ Shiro

2.1 กรรมวิธีการผลิตน้ำซีอิ๊ว

"น้ำซีอิ๊ว" ตามที่สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2521) กำหนดไว้ในมอก. 252-2521 หมายถึง ผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองด้วยการหมักจะนำมาแต่งรสและ/หรือสี หรือไม่ก็ได้ตามชนิดของผลิตภัณฑ์นั้นๆ แล้วนำไปผ่านการพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) และตามมาตรฐานเดียวกันนี้ "น้ำซีอิ๊วขาว" หมายถึง น้ำซีอิ๊วที่ไม่ได้แต่งรสและสี ในรายงานเรื่องนี้ น้ำซีอิ๊วจะหมายถึง น้ำซีอิ๊วขาว

2.1.1 การผลิตและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตน้ำซีอิ๊ว

การผลิตน้ำซีอิ๊วของโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศไทยทั่วๆ ไป (วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, สถาบัน, 2527) ใช้วัตถุดิบหลักในการผลิต คือ ถั่วเหลืองทั้งเมล็ด แป้งข้าวสาลี หรือแป้งข้าวเจ้า เกลือ และน้ำ ส่วนอุปกรณ์ที่ใช้จะมีโอ่ง หม้อนึ่งความดัน กระด้งไม้ไผ่ ผ้ากรอง และอุปกรณ์อื่นๆ ขั้นตอนการผลิตน้ำซีอิ๊วอาจแตกต่างกันไปตามความเข้าใจของแต่ละโรงงาน อย่างไรก็ตามอาจแบ่งขั้นตอนการผลิตออกเป็น 3 ช่วง คือ

(1) ช่วงของการเตรียมเชื้อบนลูกแป้งและถั่ว ที่เรียกว่า โคจิ (koji) ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 สัปดาห์

(2) ช่วงของการหมักโคจิโดยหมักในโอ่งและเติมน้ำเกลือลงไป หรือที่เรียกกันว่า โมโรมิ (moromi) ซึ่งใช้เวลา 6-12 เดือนขึ้นกับสภาพอากาศ

(3) ช่วงของการกรองและบรรจุขวดเป็นผลิตภัณฑ์

กรรมวิธีการผลิตน้ำซีอิ๊วประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.1.1.1 การเตรียมถั่วเหลือง

การผลิตน้ำซีอิ๊วในช่วงแรกเป็นการเตรียมถั่วเหลือง โดยการนำถั่วเหลืองมาล้างให้สะอาด คัดเลือกเอาส่วนที่ไม่ต้องการออกไป จากนั้นนำไปแช่น้ำเพื่อให้ถั่วเหลืองนิ่มซึ่งอาจแช่ไว้ค้างคืน หรือ 2-3 ชั่วโมงก็ได้ เมื่อถั่วเหลืองนิ่มแล้ว จึงนำไปต้มหรือนึ่งให้สุกโดยใช้หม้อนึ่งความดัน ซึ่งการนึ่งอาจใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง นำถั่วเหลืองนึ่งมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำและปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง นอกจากจะใช้ถั่วเหลืองทั้งเมล็ดเป็นวัตถุดิบแล้ว ยังอาจใช้กากถั่วเหลืองจากโรงงานสกัดน้ำมันพืช แต่น้ำซีอิ๊วที่ได้จะมีกลิ่นรสด้อยกว่า

2.1.1.2 การคลุกกับแป้ง

แต่เดิมนั้นโรงงานผลิตน้ำซีอิ๊วใช้แป้งข้าวสาลีเป็นหลัก ต่อมาในระยะหลังได้พยายามลดต้นทุนการผลิตมากขึ้นจึงมีผู้นำแป้งข้าวเจ้ามาใช้ เนื่องจากราคาถูกและหาได้ง่ายกว่า อีกทั้งคุณภาพของน้ำซีอิ๊วก็ไม่แตกต่างกันมาก บางโรงงานนำข้าวเจ้าทั้ง

เมล็ดมานึ่งให้สุกก่อน แล้วจึงผสมกับถั่วเหลือง บางโรงงานใช้แป้งข้าวเหนียว การใช้งานในรูปของแป้งนั้น อาจนำมาคลุกกับถั่วเหลืองนึ่งโดยตรง หรือนำแป้งมาคั่วให้หอมก่อนจึงนำมาผสม อัตราส่วนระหว่างแป้งกับถั่วเหลืองส่วนใหญ่จะเป็น 1 ต่อ 1 ถั่วเหลืองและแป้งถูกนำมาคลุกเคล้าให้เข้ากันก่อนจะนำไปเลี้ยงเชื้อต่อไป

จุดประสงค์ของการใช้แป้งเป็นส่วนผสมในการผลิตน้ำซีอิ๊ว คือ

(1) เพื่อให้จุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อราเจริญเติบโตได้ แล้วสร้างสารที่ระเหยได้ออกมา เช่น กรด vanillic กรด ferulic เป็นต้น

(2) ลดความชื้นที่มีอยู่ในถั่วเหลืองให้ลงมาอยู่ในระดับที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

(3) เพิ่มความสมบูรณ์ของสารอาหารซึ่งจุลินทรีย์ต้องใช้สำหรับเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ เพื่อย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลือง

2.1.1.3 การเลี้ยงเชื้อบนลูกแป้งและถั่วเหลือง หรือ โคจิ

ตามปกติแล้วโรงงานผลิตน้ำซีอิ๊วจะมีโรงบ่มเชื้อ ซึ่งเป็นโรงเรือนเล็กๆ ไว้โดยเฉพาะ และมีการควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ด้วย ถั่วเหลืองนึ่งที่คลุกกับแป้งแล้วจะนำมาเกลี่ยลงบนกระด้งไม้ไผ่ให้มีความหนาประมาณ 1-1.5 นิ้ว แล้วนำไปเรียงบนชั้นภายในโรงบ่มเชื้อ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-7 วัน ระหว่างนี้จะมีความร้อนเกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเชื้อรา จึงควรพลิกกลับแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลือง 2-3 ครั้ง เพื่อระบายความร้อนออกไปบ้าง เชื้อราที่เจริญเติบโตบนแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลืองนี้ คือ Aspergillus oryzae และ/หรือ Aspergillus sojae เชื้อราประเภทนี้จะสร้างเอนไซม์ขึ้นมาหลายชนิด เช่น amylase ทำหน้าที่ย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาล protease ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลืองให้เป็นกรดอะมิโน นอกจากนั้นยังมีเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เช่น adenyl deaminases, purine nucleosidases, nucleases, sulfatases, phosphatases, transglycosidases, acylases, ribonucleases, peptidases, mononucleotide phosphatases ,และ depolymerases เป็นต้น เชื้อราที่เจริญเติบโตบนแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลืองนี้จะสร้างเส้นใยติดกันเป็นแผ่น ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อราควรจะพอเหมาะ คือ ระยะก่อนเชื้อราสร้างสปอร์ ซึ่งเป็นระยะที่เอนไซม์ถูกสร้างขึ้นมา

มากที่สุด โดยสามารถสังเกตว่า มีสีเหลืองแกมเขียวและสีเทาขึ้นปกคลุมบนแผ่นลูกแป้งกับถั่วเหลือง ไม่ควรมีราสีดำปะปน ในระยะการเลี้ยงเชื้อรานี้จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องระมัดระวังไม่ให้เชื้อราชนิดอื่นปนเปื้อนมาเจริญบนแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลือง ซึ่งได้แก่เชื้อราประเภท mucoraceous รวมทั้ง penicillia และ aspergilli เชื้อราพวกนี้มักสร้างสารพิษที่เรียกว่า mycotoxins ปะปนลงไปในน้ำซีอิ๊วได้

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของโคจิ (Yong and Wood, 1977a) ภายในระยะเวลา 100 ชั่วโมงของการหมักโดยเชื้อรา Aspergillus oryzae สารประกอบและเอนไซม์หลายชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้

(1) น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกแล้วลดลง จนกระทั่งช่วงสุดท้ายของการหมักจะเพิ่มขึ้นเป็นครั้งที่สองก่อนจะคงที่จนกระทั่งการหมักสิ้นสุด

(2) ระดับของ α-amylase เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วงเวลา 70-96 ชั่วโมงของการหมัก แม้ว่าระดับของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงเวลาดังกล่าวจะคงที่หรือลดลงบ้างเล็กน้อย เนื่องจากเชื้อราเริ่มสร้างสปอร์ เป็นที่น่าสังเกตว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 20 ชั่วโมงแรกของการหมัก แต่กลับตรวจพบแอคติวิตี (activity) ของ α-amylase หลังจาก 20 ชั่วโมงผ่านไป ทั้งนี้เนื่องจากในถั่วเหลืองมีปริมาณน้ำตาลอินเวอร์ต (invert sugar) ร้อยละ 15-19 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลซูโครส และในโคจิมีถั่วเหลืองประกอบอยู่ถึงร้อยละ 50 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่มากนี้ชักนำให้เชื้อราสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์

(3) ระดับของ sucrase เมื่อการหมักผ่านไป 18 ชั่วโมง มีแอคติวิตี 1-1.8 หน่วยต่อกรัมของโคจิ ซึ่งพอเพียงต่อการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสที่มีปริมาณมากได้

(4) การทำงานของ lipase ในช่วงที่มีแอคติวิตีสูงคือหลังจากการหมักผ่านไป 20-50 ชั่วโมง สามารถช่วยแก้ปัญหากลิ่นที่ไม่ต้องการซึ่งเกิดจากกรดไขมันอิสระและอันตรายจากการหืน อันเนื่องมาจากถั่วเหลืองนั้นเป็นเมล็ดพืชที่อุดมไปด้วยน้ำมันและกรดไขมัน

(5) tyrosinase มีความสำคัญต่อการเกิดสีน้ำตาลของน้ำซีอิ๊วแอคติวิตีของเอนไซม์นี้จะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุด หลังจากการหมักผ่านไป 45 ชั่วโมง

(6) เป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่า ปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยสลายมีความสำคัญอย่างมากต่อคุณภาพของน้ำซีอิ๊ว ตั้งแต่กลิ่นรสไปจนถึงคุณค่าทางโภชนาการ แอคติวิตีของเอนไซม์ proteinase สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่เริ่มต้นหมักโคจิ ในขณะที่เอนไซม์ชนิดอื่นจะไม่ทำงานในช่วงนี้ แอคติวิตีจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 20-30 ชั่วโมง จนกระทั่งมีแอคติวิตีสูงสุดที่ 40-50 ชั่วโมงแล้วจึงลดลง

(7) ไนโตรเจนที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble nitrogen) เพิ่มขึ้นภายหลังการหมักผ่านไป 20 ชั่วโมง จากนั้นเริ่มคงที่เมื่อเวลา 70 ชั่วโมง ส่วนอะมิโนไนโตรเจน (amino nitrogen) ที่เพิ่มขึ้นและลดลงแสดงถึงความสัมพันธ์ที่ไม่ปกตินักกับปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ทั้งหมด และระดับของ proteinase ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรก มากกว่าการเพิ่มของไนโตรเจนที่ละลายได้ทั้งหมด แม้ว่าอะมิโนไนโตรเจนจะมีปริมาณน้อยกว่าในระยะแรกก็ตาม สำหรับแอมโมเนียไนโตรเจน (ammonia nitrogen) นั้น ไม่เป็นที่ต้องการของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภคน้ำซีอิ๊ว ในน้ำซีอิ๊วไม่ควรมีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนเกินร้อยละ 15 ของปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ทั้งหมด

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ระยะเวลาหมักโคจิที่เหมาะสมนั้น ควรมากกว่า 50 ชั่วโมง เพราะหลังจากเวลาผ่านไป 50 ชั่วโมง เอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีแอคติวิตีสูงสุด ความเข้มข้นของแอมโมเนียอยู่ในระดับต่ำ และปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ทั้งหมดเพิ่มมากขึ้น ถ้าหากหมักโคจินานเกินไป เชื้อราจะสร้างสปอร์ทำให้น้ำซีอิ๊วที่ได้มีกลิ่นที่ไม่ต้องการและมีปริมาณแอมโมเนียมาก ในทางการค้าจะใช้ระยะเวลาสำหรับหมักโคจิประมาณ 72 ชั่วโมง กลิ่นของน้ำซีอิ๊วที่ไม่ต้องการ ซึ่งเกิดจากหมักนานกว่า 72 ชั่วโมงจะเหม็นอับและมีกลิ่นของเชื้อราร่วมอยู่ด้วย

2.1.1.4 การนำแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลืองที่เลี้ยงเชื้อแล้วไปหมัก หรือโมโรมิ

ลูกแป้งและถั่วเหลืองที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อจนได้ที่แล้ว จะมีลักษณะเป็นแผ่นแห้งพอสมควร นำไปเรียงในโอ่งขนาดใหญ่ ประมาณ 3 ใน 4 ของโอ่ง หรือ

เกือบเต็มโอ่ง จากนั้นเติมน้ำเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 17-20 ลงไปในโอ่ง โดยมีอัตราส่วนระหว่างแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลือง กับน้ำเกลือเป็น 1 ต่อ 1-2 ปิดฝาโอ่งเพื่อป้องกันแมลงและน้ำฝนเข้าไป นำโอ่งดังกล่าวไปตั้งกลางแดดเพื่อให้เกิดกระบวนการหมัก ถ้าเป็นฤดูร้อนจะใช้เวลา 6-8 เดือนจึงจะได้ที่ แต่ถ้าเป็นฤดูฝนหรือฤดูหนาวจะใช้เวลานานขึ้นเป็น 8-12 เดือน ระหว่างการหมักโมโรมิอาจเปิดฝาโอ่งเพื่อกวนบ้างเป็นบางครั้ง

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการผลิตน้ำซีอิ๊ว ช่วงโมโรมินั้นประกอบด้วยจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ แบคทีเรียสร้างกรดแลคติค และยีสต์ จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดยังประกอบไปด้วยสายพันธุ์ต่างๆ ดังตัวอย่างของงานวิจัยต่อไปนี้

ปี ค.ศ. 1947 Lockwood (quote in Prescott and Dunn, 1959) ศึกษากระบวนการผลิตน้ำซีอิ๊วจีน โดยใช้จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเป็นเชื้อบริสุทธิ์ของ Aspergillus oryzae, Lactobacillus delbrueckii และยีสต์ Zygosaccharomyces soyae น้ำซีอิ๊วแบบจีนนั้นผลิตจากถั่วเหลืองทั้งหมด หรือถ้ามีแป้งก็มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงทำให้น้ำซีอิ๊วที่ได้มีความถ่วงจำเพาะและความหนืดสูง อีกทั้งมีปริมาณไนโตรเจนมากกว่าน้ำซีอิ๊วแบบญี่ปุ่น ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า กระบวนการหมักน้ำซีอิ๊วต้องอาศัยกิจกรรมร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ทั้งสามชนิด เพื่อให้เกิดน้ำซีอิ๊วที่มีกลิ่นรสน่ารับประทาน

ปี ค.ศ. 1965 Hesseltine แยกเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักของประเทศตะวันออก เช่น เต้าเจี้ยว น้ำซีอิ๊ว, tempeh, ang-kak, sufu, ragi เป็นต้น โดยเฉพาะน้ำซีอิ๊วนั้น เมื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกมา พบว่ามีแบคทีเรีย Lactobacillus delbrueckii ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง สร้างสปอร์ได้ และเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติคที่สำคัญในการผลิตน้ำซีอิ๊วช่วงโมโรมิ และยีสต์ Saccharomyces rouxii ซึ่งเป็น osmophilic yeast ที่มีบทบาทสูงสุด เพราะเป็นยีสต์ที่พบในช่วงสุดท้ายซึ่งเป็นการหมักเพื่อให้เกิดแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ ยังอาจพบ Zygosaccharomyces soyae และยีสต์ในสายพันธุ์ Hansenula และ Torulopsis ร่วมอยู่ด้วย

ปี ค.ศ. 1968 Fukushima ศึกษาองค์ประกอบของน้ำซีอิ๊วที่เกิดจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต และไขมัน โดยจุลินทรีย์ที่ทนเกลือ คือ Pediococcus halophilus ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในการหมักเพื่อให้เกิด

กรดแลคติคในโมโรมิ จากนั้น Saccharomyces rouxii และ Candida versatilis จะเจริญในลำดับต่อไปหลังจาก pH ลดลงจนถึง 4.5-5.0

ในประเทศไทย การศึกษากระบวนการหมักน้ำซีอิ๊วและบทบาทที่สำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งพบในน้ำซีอิ๊วหมักเป็นไปดังนี้ ปี พ.ศ. 2522 สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ รายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เข้ามามีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการหมักน้ำเกลือ คือ แบคทีเรียและยีสต์ที่สามารถเจริญในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆ ได้ แบคทีเรียดังกล่าวเป็นประเภทที่สร้างกรดแลคติคได้จากน้ำตาล โดยผ่านกระบวนการ glycolysis ซึ่งจะทำให้ pH ของน้ำซีอิ๊วลดลง แบคทีเรียประเภทนี้ ได้แก่ Pediococcus halophilus, Pediococcus soyae และ Lactobacillus delbrueckii สำหรับยีสต์มีหน้าที่สำคัญโดยใช้น้ำตาลในน้ำซีอิ๊วสร้างเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งรวมกับสารอื่นๆ เกิดเป็นสารให้กลิ่นรสในน้ำซีอิ๊ว ยีสต์ที่พบมาก ได้แก่ Saccharomyces rouxii ลำดับต่อมาคือ Torulopsis และที่พบบ้างเล็กน้อย คือ Pichia, Debaryomyces และ Candida ข้อเสนอแนะในการผลิตน้ำซีอิ๊วตามรายงานนี้ คือ ควรจะใช้สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพสูงแทนการใช้เชื้อธรรมดา

ปี พ.ศ. 2527 สถาบันวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ใช้วิธีการผลิตน้ำซีอิ๊วแบบธรรมชาติ โดยการหมักโมโรมิจะเติมน้ำเกลือลงไปในโคจิ ทำให้ความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นถึงร้อยละ 17-20 จุลินทรีย์บางชนิดถูกกำจัดออกไป และเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ Lactobacillus delbrueckii, Pediococcus halophilus, Saccharomyces rouxii และ Hansenula แบคทีเรียและยีสต์เหล่านี้จะสร้างกรดแลคติคและแอลกอฮอล์ ทำให้กลิ่นและรสชาติของน้ำซีอิ๊วดีขึ้น

ปี พ.ศ. 2531 นภา ไล่ห์ทอง รายงานถึงจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในระยะหมักน้ำเกลือ ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียสร้างกรดแลคติคที่ทนเกลือ เช่น Lactobacillus delbrueckii และ Pediococcus halophilus แบคทีเรียทั้งสองชนิดจะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติค ทำให้ภาวะภายในถังหมักเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ คือ Saccharomyces rouxii และ Torulopsis holmii ซึ่งจะหมักน้ำตาลให้ได้แอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นรสอื่นๆ แบคทีเรียและยีสต์ดังกล่าวมีอยู่ทั่วไปในบรรยากาศ แต่น้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้รุ่นแรกมีคุณภาพด้านกลิ่นรสไม่ดีนัก เนื่องจากจุลินทรีย์แพร่กระจายน้อย และในปี พ.ศ. 2532 วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล ศึกษาขั้นตอนการผลิตน้ำซีอิ๊วและบทบาทของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักน้ำซีอิ๊ว พบว่า แบคทีเรียสร้างกรดแลคติคที่แยกได้ และนำมาใช้ในกระบวนการผลิตน้ำซีอิ๊ว

ได้แก่ Pediococcus halophilus, Pediococcus soyae และ Lactobacillus delbrueckii ยีสต์ส่วนใหญ่ที่ทำหน้าที่หมักต่อจากแบคทีเรีย คือ Saccharomyces rouxii รองลงมาคือ Torulopsis แต่ยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญและนำมาใช้ในอุตสาหกรรมน้ำซีอิ๊ว คือ Saccharomyces rouxii

สำหรับขั้นตอนโมโรมิ ในประเทศญี่ปุ่นนั้นมีความแตกต่างจากประเทศอื่นๆ เพราะในประเทศญี่ปุ่น ผู้ผลิตซีอิ๊วคำนึงถึงวัฏจักรฤดูกาลเป็นอย่างมากระหว่างฤดูร้อนที่ร้อนและฤดูหนาวที่เย็น เพื่อให้ได้น้ำซีอิ๊วที่มีคุณภาพสูง นอกจากนั้นผู้ผลิตยังใช้เชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียสร้างกรดแลคติค แต่ยังคงมีผู้ผลิตบางส่วนใช้เชื้อตามธรรมชาติอยู่ ในประเทศไทยและประเทศมาเลเซียนั้น การหมักโมโรมิส่วนใหญ่ทำในโอ่งดินใบเล็กๆ ในขณะที่ผู้ผลิตในประเทศญี่ปุ่นใช้ภาชนะขนาดใหญ่ โอ่งดังกล่าวถูกตั้งให้ได้รับแสงแดด ซึ่งส่งผลให้อุณหภูมิในแต่ละวันสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการหมัก 6 เดือน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์จากการหมักครั้งก่อนที่ยังคงอยู่ในโอ่งดังกล่าว (Wood, 1982)

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของโมโรมิ (Yong and Wood, 1977b) ซึ่งเกิดจากการหมักของจุลินทรีย์ Lactobacillus delbrueckii และ Saccharomyces rouxii ในระยะเวลา 32 วัน ความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ คือ ร้อยละ 18 ยีสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตในภาวะเช่นนี้ได้ และจำนวนเซลล์ของยีสต์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนที่มีอยู่เดิม จนกระทั่ง pH ลดลงถึง 5.0 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว สำหรับการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบและเอนไซม์ชนิดต่างๆ เกิดขึ้นดังนี้

(1) ในบรรดาสารประกอบต่างๆ นั้น น้ำตาลรีดิวซ์มีร้อยละการเพิ่มมากที่สุดในระยะ 5-6 วันแรกของการหมัก น้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็วแล้วช้าลงในเวลาต่อมา อย่างไรก็ตาม ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ยังขึ้นอยู่กับปริมาณคาร์โบไฮเดรตและรูปแบบการย่อยสลายโอลิโกเมอร์ (oligomer)

(2) ระดับของ proteinase ลดลงมากในระยะ 2 วันวันแรก หลังจากเติมน้ำเกลือลงไป ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) หรือตกตะกอน ติดตามด้วยปฏิกิริยา resolubilization และ/หรือการปล่อยเอนไซม์ใหม่ออกมาจากเส้นใยของราที่ถูกย่อยสลาย ภาวะที่เหมาะสมในการหมักโมโรมิ

เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีสูงสุด คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 18 มี pH ในช่วงสุดท้าย 4.5 และใช้ระยะเวลาหมัก 30 วัน

(3) α-amylase ลดลงเพียงเล็กน้อยในช่วง 2 วันแรก แต่เสถียรภาพ (stability) ของเอนไซม์นี้ต่ำกว่า proteinase เพราะแอคติวิตีของ α-amylase ลดลงอย่างมากในช่วงวันที่ 12-20 เนื่องจากความเป็นกรดของโมโรมิเพิ่มขึ้น

(4) ในระยะเริ่มต้น 2 วันแรก ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เพราะแบคทีเรียสร้างกรดแลคติคเจริญเติบโต และไปเพิ่มอีกครั้งหนึ่งในช่วงวันที่ 10-14 เมื่อยีสต์เจริญเติบโต การที่ pH ลดลงถึง 4.5 ได้อย่างรวดเร็วมีผลดีต่อปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ทั้งหมด เพราะ pH 4.5 เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ acid proteinase ที่เชื้อราสร้างขึ้น ส่วนอะมิโนไนโตรเจนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้นๆ ถ้าหากพิจารณาเฉพาะปริมาณแล้ว อะมิโนไนโตรเจนเพิ่มขึ้นน้อยกว่าไนโตรเจนที่ละลายได้ทั้งหมด แต่เมื่อพิจารณาเป็นร้อยละแล้ว อะมิโนไนโตรเจนเพิ่มมากกว่า สำหรับแอมโมเนียไนโตรเจนเพิ่มเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดอะมิโนซึ่งเป็นกระบวนการเมตาบอลิสม (metabolism) ของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติค มากกว่าเกิดจากปฏิกิริยา deamination ในกระบวนการเมตาบอลิสมของเชื้อรา

การเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้น ในกระบวนการหมักน้ำซีอิ๊วช่วงโมโรมิ มีความสำคัญอย่างมากต่อกลิ่นรสของน้ำซีอิ๊ว ภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ pH ความเข้มข้นของเกลือ หรือแม้แต่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากเมตาบอลิสมของจุลินทรีย์หนึ่ง อาจมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งได้ ปี ค.ศ. 1976 Jose และคณะ (quote in Yokotsuka,1986) ศึกษาการหมักเพื่อให้เกิดกรดแลคติคและแอลกอฮอล์ พบว่า แบคทีเรียสร้างกรดแลคติคจะเจริญเติบโตจนมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดภายใน 3 เดือน ภายใต้อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จำนวนเซลล์จะลดลง และปริมาณกรดแลคติคที่แบคทีเรียสร้างขึ้นจะเริ่มคงที่ สำหรับยีสต์จะมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดภายใน 5 เดือน ที่อุณหภูมิประมาณ 23 องศาเซลเซียส หลังจากจำนวนเซลล์ยีสต์ลดลงในช่วงเดือนแรกของการหมัก

ปี ค.ศ. 1976 Yong และ Wood ได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ Lactobacillus delbrueckii และ Saccharomyces rouxii ในโมโรมิ พบว่า ช่วง pH ที่ Lactobacillus delbrueckii มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด คือ 5.0-5.5 และของ Saccharomyces rouxii คือ 5.0 pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด คือ pH 5.0 ในปีต่อมา Yong และ Wood (1977b) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของโมโรมีที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 18 พบว่าในโมโรมิที่ใส่เพียงยีสต์ Saccharomyces rouxii ชนิดเดียวจะมีปริมาณกลูโคสมากที่สุด แต่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ร้อยละ 7 ในขณะที่โมโรมิที่มีทั้ง Lactobacillus delbrueckii และ Saccharomyces rouxii จะมีปริมาณกลูโคสน้อยกว่ามาตรฐานเพียงเล็กน้อย คือ ร้อยละ 6.5 นอกจากนั้น แบคทีเรียสร้างกรดแลคติคหยุดการเจริญเติบโต เพราะผลิตภัณฑ์จากเมตาบอลิสมของแบคทีเรีย แต่สาเหตุที่ทำให้ยีสต์หยุดการเจริญเติบโตไม่ชัดเจนนัก

ในปี ค.ศ. 1980 Noda และคณะ พบว่า ปัจจัยสำคัญที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ Saccharomyces rouxii คือ ผลิตภัณฑ์จากเมตาบอลิสมของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติค เช่น กรดแลคติค กรดอะซิติค กรดฟอร์มิค เป็นต้น และในปี ค.ศ. 1982 Noda และคณะ ได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ Saccharomyces rouxii พบว่า กรดแลคติคซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักในเมตาบอลิสมของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติค เมื่อมีความเข้มข้นร้อยละ 1 จะทำให้ pH ของโมโรมิลดลงไป 1 หน่วย และไปเพิ่มความสามารถของกรดอะซิติคในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ ซึ่งกรดอะซิติคนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญ เพราะไปยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ถึงร้อยละ 25

ในระยะสุดท้ายของการหมักโมโรมิ แบคทีเรียสร้างกรดแลคติคจะถูกทำลายด้วยกรดที่สร้างขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิสม ส่วนยีสต์จะหยุดการเจริญเติบโตเนื่องจากสภาพความเป็นกรดและปริมาณเอธานอลที่เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยีสต์ยังถูกทำลายด้วย sterol ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา desaturation ของกรดไขมันอิ่มตัวในสภาพไร้อากาศ

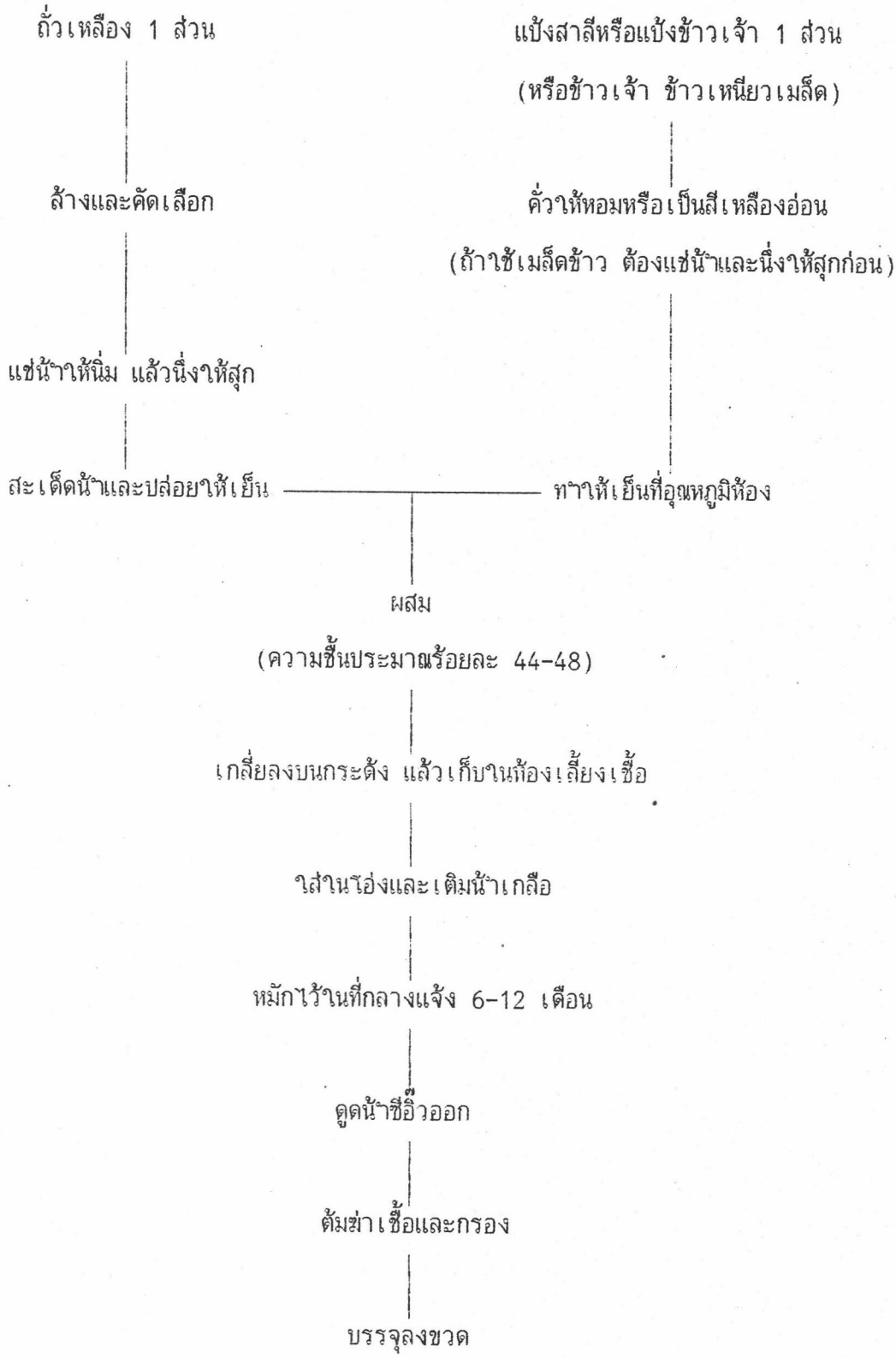
2.1.1.5 การกรองและการบรรจุขวด

ภายหลังการหมักที่สมบูรณ์เสร็จสิ้นลง จะได้น้ำซีอิ๊วที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลปนแดง กลิ่นหอม รสเค็มพอสมควร และมีรสชาติชวนรับประทาน น้ำซีอิ๊วจะถูกนำมาต้มฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 65-80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปกรอง เพื่อกำจัด

ตะกอนออกไปก่อนบรรจุขวดเพื่อจำหน่าย น้ำซีอิ๊วที่ได้นี้จะมีอายุการเก็บรักษานาน สำหรับเนื้อถั่วซึ่งแยกน้ำซีอิ๊วที่เรียกว่า ซีอิ๊วน้ำ 1 ออกไป จะเติมน้ำเกลือลงไปแล้วหมักต่อไปอีกระยะหนึ่งเพื่อให้ได้ซีอิ๊วน้ำ 2 และ น้ำ 3 ต่อไป จนกระทั่งน้ำซีอิ๊วที่ได้มีกลิ่นรสจางลง จึงนำเนื้อถั่วเหลืองนั้นมาปรุงแต่งกลิ่นรสด้วยเครื่องปรุงแต่งรสต่างๆ ผลิตเป็นเต้าเจี้ยวบรรจุขวดจำหน่ายต่อไป

ผู้ผลิตในประเทศญี่ปุ่นส่วนใหญ่เก็บเกี่ยวน้ำซีอิ๊ว โดยกดให้ไหลออกมาจากส่วนผสมที่ถูกหมัก แล้วเหลือกากแข็งเกือบแห้งไว้ แต่ผู้ผลิตบางรายใช้วิธีดูดของเหลวออกจากส่วนผสมที่ถูกหมัก จากนั้นเติมน้ำเกลือในปริมาตรเท่ากับของเหลวส่วนที่ดูดออก ปล่อยทิ้งไว้หลายวัน แล้วจึงดูดของเหลวออกอีก ทำเช่นนี้อีก 5 ครั้ง ภายหลังผสมของเหลวที่ดูดออกมาครั้งแรกกับครั้งที่สองจะได้น้ำซีอิ๊วคุณภาพชั้นที่ 1 ของเหลวที่ดูดได้ครั้งต่อๆ มาจะถูกผสมกับกากน้ำตาล และ/หรือคาราเมล (caramel) เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ประกอบอาหารประเภทอื่น (Wood, 1982)

สำหรับขั้นตอนการผลิตน้ำซีอิ๊วนั้นสามารถสรุปได้ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตน้ำซีอิ๊ว (วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, สถาบัน, 2527)

2.1.2 ลักษณะของน้ำซีอิ๊ว

ลักษณะที่ต้องการของน้ำซีอิ๊ว (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, สำนักงาน, 2521) ต้องเป็นไปดังนี้

(1) ความใส (clearness) กลิ่นรส และสี

(1.1) ความใส : ต้องใส ปราศจากตะกอนนอนก้น

(1.2) กลิ่นรส : น้ำซีอิ๊วต้องมีกลิ่นรสเฉพาะของน้ำซีอิ๊วตามส่วนประกอบที่ใช้เท่านั้น

(1.3) สี : สีน้ำตาลอมแดงไปจนถึงสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ

(2) ปราศจากสิ่งแปลกปลอมอื่นใดที่มิได้เกิดจากกรรมวิธีการผลิต

(3) ลักษณะทางเคมีให้เป็นไปตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางเคมีของน้ำซีอิ๊ว

ลักษณะทางเคมีของน้ำซีอิ๊ว	
1. โปรตีน (ไนโตรเจน x 6.25) ไม่น้อยกว่าร้อยละของน้ำหนัก	5.5
2. ปริมาณของแข็งที่ระเหยไม่ได้ ไม่น้อยกว่าร้อยละของน้ำหนัก	32.0
3. เกลือ (คิดเป็นโซเดียมคลอไรด์) ร้อยละของน้ำหนัก	17 ถึง 23
4. น้ำตาลทั้งหมด (คิดเป็นน้ำตาลอินเวอร์ต) ไม่เกินร้อยละของน้ำหนัก	7.0
5. ความเป็นกรด-ด่าง	4.5 ถึง 5.3
6. ความถ่วงจำเพาะที่อุณหภูมิ 27 ± 3 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า	1.20

ที่มา : มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, สำนักงาน (2521)

สุขลักษณะทางจุลินทรีย์ของน้ำซีอิ๊ว (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, สำนักงาน, 2521) ต้องเป็นไปดังนี้

(1) ต้องไม่มีลักษณะเป็นฝ้า ซึ่งเกิดจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ปรากฏให้เห็น

(2) ต้องไม่มีจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้

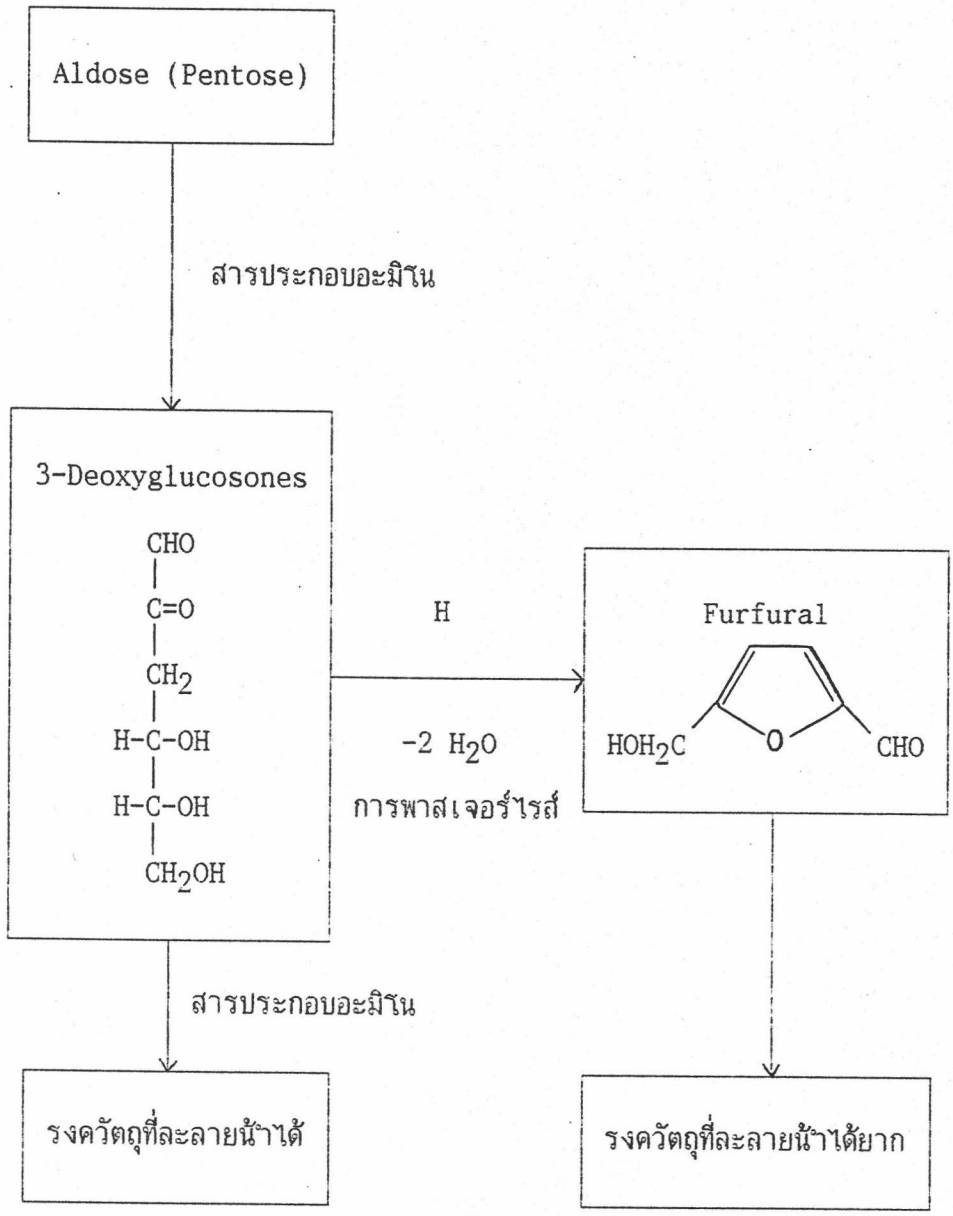
(2.1) ยีสต์และรา

(2.2) โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (coliform bacteria) และโคเอกลูเลส พอสิทีฟ สตาฟิโลคอคไค (coaglulase positive staphylococci)

(3) ต้องไม่มีอะฟลาทอกซิน (aflatoxin)

สีของน้ำซีอิ๊ว (Yokotsuka, 1986) มีความสำคัญต่อการยอมรับของผู้บริโภค โดยมีปัจจัยซึ่งมีผลต่อการเกิดสี คือ การหมักและการฆ่าเชื้อน้ำซีอิ๊วด้วยวิธีพาสเจอร์ไรซ์ ระหว่างกระบวนการหมักน้ำซีอิ๊ว สีเกิดจากปฏิกิริยา non-oxidative และ non-enzymatic browning เป็นหลัก และมีบ้างบางส่วนที่เกิดจากปฏิกิริยา enzymatic browning ระหว่างสารประกอบอะมิโนกับน้ำตาล สีของน้ำซีอิ๊วอาจเข้มขึ้นอีกครั้ง ภายหลังการบรรจุลงในภาชนะแล้วเนื่องจากภาชนะนั้นรั่ว ทำให้ปฏิกิริยา oxidative และ non-enzymatic browning เกิดขึ้น แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายหลังนี้จะทำให้คุณภาพของน้ำซีอิ๊วด้อยลง

เมื่อวิเคราะห์สารที่ทำให้เกิดสีระหว่างการหมักน้ำซีอิ๊ว พบรงควัตถุ melanoidins จำนวน 8 ชนิด แต่ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ $C_{27}H_{17}N_3O_{13}$ และ $C_{27}H_{15}N_3O_{12}$ รงควัตถุดังกล่าวสามารถเตรียมได้โดยให้ความร้อนแก่สารละลายผสมของกรดอะมิโน glycine กับ xylose ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สำหรับกระบวนการเกิดสีระหว่างการฆ่าเชื้อน้ำซีอิ๊ว เริ่มจาก aldose ทำปฏิกิริยากับสารประกอบอะมิโนโดยมีความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นรงควัตถุให้สีในที่สุดกระบวนการดังกล่าวแสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กระบวนการเกิดสีของน้ำซีอิ๊วระหว่างการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (Yokotsuka, 1986)

เมื่อวิเคราะห์น้ำซีอิ๊วด้วยแก๊สโครมโตกราฟี จะพบสารปรุงแต่งกลิ่นรส (flavor compounds) ประมาณ 300 ชนิด ประกอบด้วยเอสเทอร์ 41 ชนิด ไฮโดรคาร์บอน 37 ชนิด อัลดีไฮด์ 35 ชนิด แอลกอฮอล์ 32 ชนิด pyranzine 27 ชนิด กรด 24 ชนิด คีโตน 19 ชนิด สารประกอบฟีนอล 17 ชนิด สารประกอบที่มีกำมะถัน 16 ชนิด

furan 16 ชนิด lactone 8 ชนิด pyridine 7 ชนิด สารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ 6 ชนิด furanone 6 ชนิด pyrone 5 ชนิด thiazole 4 ชนิด acetal 4 ชนิด terpene 3 ชนิด และสารอื่น ๆ อีก 3 ชนิด สำหรับสารปรุงแต่งกลิ่นรสในน้ำซีอิ๊ว แสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ผลการวิเคราะห์ทางปริมาณของสารปรุงแต่งกลิ่นรสในน้ำซีอิ๊ว (หน่วยเป็นพีพีเอ็ม.)

Ethanol	31,501.10	Acetol	24.60
Lactic acid	14,346.55	2,6-Dimethoxyphenol	16.21
Glycerol	10,208.95	Methyl acetate	13.84
Acetic acid	2,107.74	Furfuryl alcohol	11.93
HMMF	256.36	HDMF	4.83
2,3-Butanediol	238.59	*n*-Propyl alcohol	3.96
Isovaleraldehyde	233.10	4-Ethylguaiacol	2.77
HEMF	232.04	4-Ethylphenol	Trace

HMMF คือ 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone

HEMF คือ 4-hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2H)-furanone

HDMF คือ 4-hydroxy-2,3-dimethyl-3(2H)-furanone

ที่มา : Yokosuka, T. (1986)

สารประกอบฟีนอล (phenolic compound) 2 ชนิด ที่มีส่วนสำคัญต่อกลิ่นรสของน้ำซีอิ๊ว คือ 4-ethylguaiacol และ 4-ethyphenol โดยปกติจะพบสารประกอบฟีนอลในข้าวสาลี เมื่อหมักโคจิ เชื้อราจะสร้างกรด ferulic และ vanillic จากสารประกอบฟีนอลดังกล่าว ต่อมาในช่วงการหมักโมโรมิ กระบวนการเมตาบอลิสมของยีสต์จะเปลี่ยนกรด ferulic ไปเป็น 4-ethylguaiacol ในการหมักน้ำซีอิ๊วมียีสต์อยู่หลายชนิด และยีสต์แต่ละชนิดมีความสามารถดังกล่าวต่างกัน ดังแสดงตามตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ชนิดของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำซีอิ๊วช่วงโมโรมิ และความสามารถในการเปลี่ยนกรด feruric เป็น 4-ethylguaiacol (4EG)

ช่วงของการหมักโมโรมิ	สายพันธุ์ของยีสต์	การสร้าง 4EG
ช่วงเริ่มต้น (Beginning)	Torulopsis famata E29a	-
	Pichia farinosa A6	-
	Trichosporon behrendii E-3A	-
	Candida porimorpha EK	-
ช่วงหมัก (Fermentative)	Saccharomyces rouxii E-7 No. 210	-
	Saccharomyces rouxii var. halomembranis J3	-
	Saccharomyces acidifaciens S9	-
	Saccharomyces acidifaciens var. halomembranis R6	-
ช่วงบ่ม (Aging)	Torulopsis halophylus N-24, 10A-40	+ , -
	Torulopsis noddensis N-21, 29B-45	+
	Torulopsis versatilis N552, 2C-5	+
	Torulopsis etchellsii 15A-26, 19C-7	+

ที่มา : Yokosuka, T. (1986)

2.2 น้ำซอสปรุงรส

น้ำซอสปรุงรส ตามที่สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2513) กำหนดไว้ใน มอก.8-2513 หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวอันผลิตขึ้นด้วยการไฮโดรไลซิสสารจำพวกโปรตีนด้วยกรด และมีกลิ่นและรสคล้ายซอสแมกกี้ที่ผลิตในต่างประเทศ

2.2.1 กรรมวิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลือง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลืองเพื่อจำหน่ายเป็นน้ำซอสปรุงรสในประเทศไทย (บริษัทไทยเทพรสผลิตภัณฑ์อาหารจำกัด, 2535) มีขั้นตอนต่อไปนี้

2.2.1.1 การเตรียมส่วนผสม ส่วนผสมประกอบด้วยกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดไขมัน โดยมีส่วนประกอบหลัก คือ โปรตีนร้อยละ 45 ความชื้นไม่เกินร้อยละ 10 และไขมันไม่เกินร้อยละ 2 และกรดเกลือความเข้มข้นร้อยละ 35 $\pm$ 0.5 นำไปเจือจางจนมีความเข้มข้นร้อยละ 20 ด้วยน้ำ

2.2.1.2 การย่อย (hydrolysis) ผสมกากถั่วเหลืองกับกรดเกลือในอัตราส่วน 1:1 แล้วย่อยส่วนผสมดังกล่าวภายใต้ไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในถังเหล็กกล้าเคลือบยาง (rubber lining)

2.2.1.3 การทำให้เป็นกลาง (neutralization) ป้อนส่วนผสมที่ถูกย่อยแล้วไปยังถังบรรจุสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีใบพัดกวนตลอดเวลา จนส่วนผสมมี pH เป็น 5.0 ใช้เวลา 1.5-2 ชั่วโมง โดยตรวจสอบปริมาณเกลือให้ได้ 195-260 กรัม/ลิตร เรียกส่วนผสมที่ได้ว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลือง ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีอุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 3-4 วัน จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 50 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปกรอง

2.2.1.4 การกรอง กรองโปรตีนไฮโดรไลเซตผ่าน filter press ที่ทำจากไนลอนและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูกรองประมาณ 10-15 ไมครอน บ่มโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการกรองครั้งแรกนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 เดือน แล้วนำมากรองอีกครั้งหนึ่ง

2.2.1.5 การปรับความเข้มข้น เจือจางโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีโปรตีนเข้มข้นร้อยละ 20 ให้เป็นร้อยละ 17 และที่มีโปรตีนเข้มข้นร้อยละ 17 ให้เป็นร้อยละ 15 และ 10

2.2.1.6 การฆ่าเชื้อ พาสเจอไรส์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที และทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

2.2.1.7 การบ่ม บ่มโปรตีนไฮโดรไลเซตนาน 1 เดือนและนำมากรองครั้งสุดท้ายก่อนบรรจุ

2.2.2 <u>ลักษณะของน้ำซอสปรุงรส</u>

ลักษณะที่ต้องการของน้ำซอสปรุงรสที่ผลิตในประเทศไทยเป็นไปตามตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ลักษณะที่ต้องการของน้ำซอสปรุงรส

ลักษณะของน้ำซอสปรุงรส	
1. ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) คิดเป็น กรัม/ลิตร ไม่น้อยกว่า	1.24
2. เกลือ (คิดเป็นโซเดียมคลอไรด์) คิดเป็น กรัม/ลิตร	200-230
3. ความเป็นกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิห้อง	5.0 ถึง 6.2
4. ความถ่วงจำเพาะที่อุณหภูมิห้อง ไม่น้อยกว่า	1.24
5. ยากันบูด	ต้องไม่มี

ที่มา : มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, สำนักงาน (2513)

2.3 การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์

เซลล์ตรึงรูป (Immobilized cells) (Chibata and Wingard, eds., 1983) หมายถึง เซลล์ซึ่งถูกกำหนดให้อยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ โดยยังคงแอคติวิตีไว้ได้เช่นเดิม อีกทั้งยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ และใช้ได้อย่างต่อเนื่อง นอกจากนั้นแล้วเซลล์ตรึงรูป ยังรวมไปถึง

(1) เซลล์ซึ่งสัมผัสกับผิวของแข็งหรือ microbial film

(2) เซลล์ซึ่งถูกห่อหุ้ม (entrapped cell)

(3) เซลล์อิสระที่ใช้ในเครื่องปฏิกรณ์มีเยื่อเลือกผ่าน (semipermeable membrane) ซึ่งปล่อยให้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาผ่านออกไปได้ แต่จะเก็บเซลล์อิสระเหล่านั้นไว้ภายในเครื่อง

(4) เซลล์ที่จับกันเป็นก้อน

เซลล์ตรึงรูปเหล่านี้สามารถนำไปใช้ได้อย่างต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์ประเภทคอลัมน์ หรือใช้ได้ง่ายในเครื่องปฏิกรณ์แบบธรรมดาโดยไม่ถูกทำลาย

ข้อดีของการใช้เซลล์ตรึงรูป (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533)

(1) เพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ที่เซลล์ผลิตขึ้น

(2) สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

(3) ไม่จำเป็นต้องทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ก่อน โดยเฉพาะการตรึงรูปเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์ประเภทอยู่ภายในเซลล์

(4) สามารถเปลี่ยนภาวะการทำปฏิกิริยาโดยเลือกชนิดของตัวพยุง

(5) กำหนดรูปร่างของเซลล์ตรึงรูปได้ตามชนิดของตัวพยุง เพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์และการนำไปใช้

(6) ทำให้เกิดระบบเอนไซม์หลายชนิด (multienzyme system) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

(7) แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นอาจเพิ่มขึ้น ถ้าตัวพยุงมีสารประกอบบางอย่างช่วยเสริมปฏิกิริยา

2.3.1 วิธีตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์

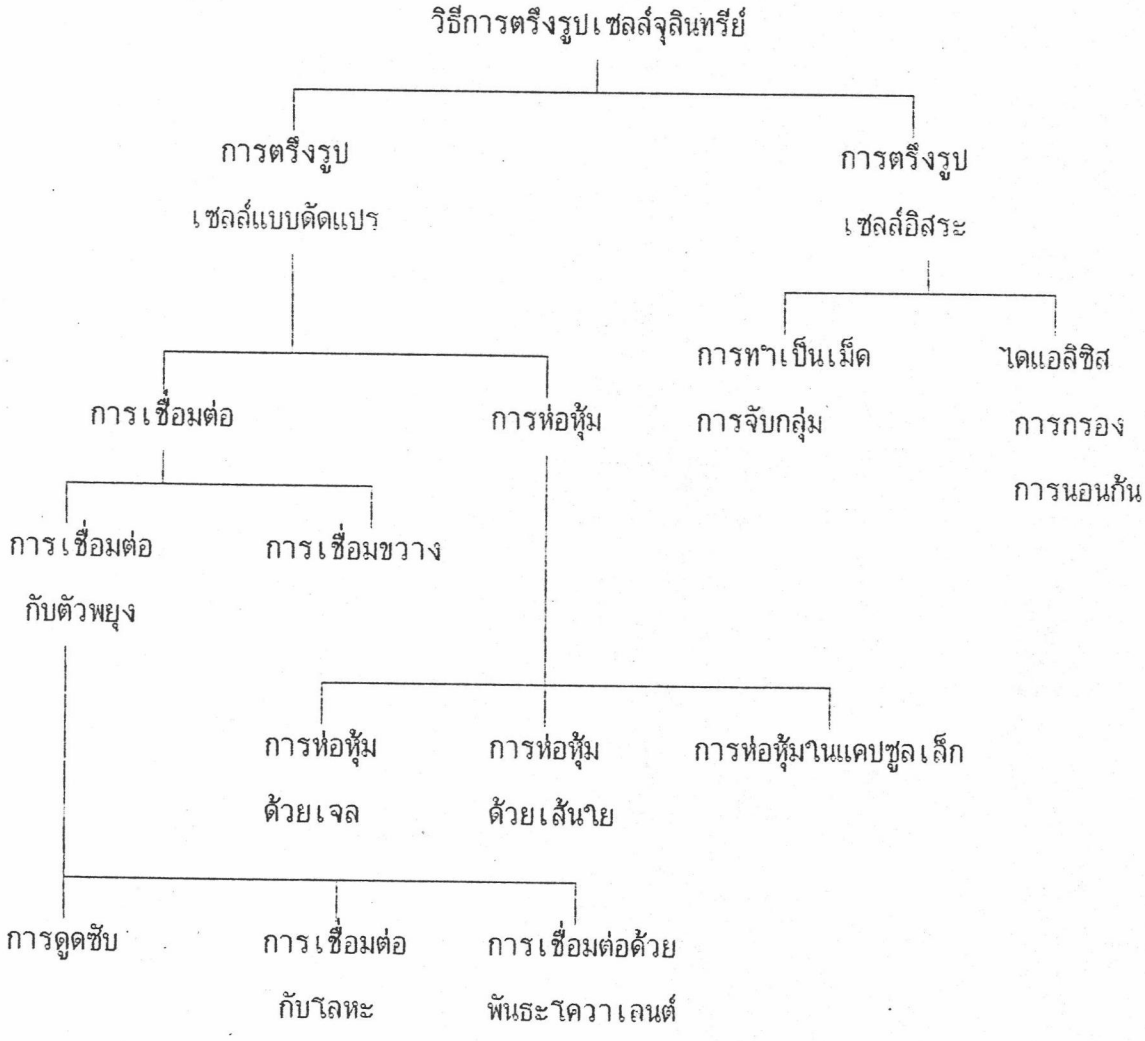
การจำแนกวิธีตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งแสดงในรูปที่ 2.3 นั้น กระทำได้โดยอาศัยชนิดของปฏิกิริยาระหว่างเซลล์กับตัวพยุง และธรรมชาติของตัวพยุงเอง ทำให้สามารถจำแนกวิธีตรึงรูปเซลล์ออกเป็น 4 วิธีคือ

(1) วิธีเชื่อมขวาง (cross-linking method)

(2) วิธีเชื่อมต่อกับตัวพยุง (carrier-binding method)

(3) วิธีห่อหุ้ม (entrapping method)

(4) วิธีตรึงรูปเซลล์อิสระ (immobilized - free cell method)



รูปที่ 2.3 การจำแนกวิธีตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ (Chibata and Wingard, eds., 1983)

2.3.1.1 การตรึงรูปเซลล์โดยวิธีเชื่อมขวาง

การตรึงรูปเซลล์ประเภทนี้ไม่ใช้ตัวพยุง เซลล์แต่ละเซลล์จะเชื่อมต่อกันโดยวิธีทางเคมี หรือวิธีทางกายภาพ วิธีเชื่อมขวางทางเคมีจะใช้พันธะโควาเลนต์ (covalent bond) เชื่อมต่อแต่ละเซลล์ โดยมีสารเชื่อมขวางที่ทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง 2 หรือหลายโมเลกุล (bi- หรือ multifuntional reagent) เป็นตัวสร้างพันธะ แต่ความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้สร้างพันธะ เป็นปัจจัยจำกัดการประยุกต์ใช้กับเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนวิธีเชื่อมขวางทางกายภาพนั้น มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้กับเซลล์สูงกว่า ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ที่มีชีวิตหรือไม่ก็ตาม

2.3.1.2 การตรึงรูปเซลล์โดยวิธีเชื่อมต่อกับตัวพยุง

วิธีนี้อาศัยการเชื่อมเซลล์ต่อกับตัวพยุงของแข็ง สามารถจำแนกออกเป็น 3 ประเภท โดยอาศัยหลักการเชื่อมต่อ คือ การดูดซับ การเชื่อมต่อกับโลหะ และการเชื่อมต่อด้วยพันธะโควาเลนต์ เมื่อตรึงรูปเซลล์ด้วยวิธีนี้ จำเป็นต้องระมัดระวังในการเลือกตัวพยุงและวิธีการเชื่อมต่อ สิ่งหนึ่งที่พึงระลึกอยู่เสมอ คือ ไม่มีตัวพยุงชนิดใดที่ให้ผลสำเร็จตามความประสงค์ แต่ลักษณะเฉพาะของวัตถุที่ใช้เป็นตัวพยุงเป็นสิ่งที่ควรจะพิจารณา ตัวพยุงที่เลือกนั้นควรมีเสถียรภาพสูงเมื่ออยู่ในสารละลาย และไม่ควรสูญเสียสภาพเนื่องจาก pH และองค์ประกอบของสารละลายที่ใช้ในการตรึงรูป เมื่อนำไปใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภท fixed bed ซึ่งทำงานอย่างต่อเนื่องและมีอัตราการไหลสูง ตัวพยุงควรจะแข็ง และสลายตัวเพียงเล็กน้อย ตัวพยุงที่ใช้ในการตรึงรูปเซลล์ประเภทนี้ ถ้าจำแนกตามองค์ประกอบแล้วจะแบ่งได้เป็นตัวพยุงอินทรีย์และตัวพยุงอนินทรีย์ แต่ตัวพยุงประเภทหลังมีความเหมาะสมต่อการใช้งานมากกว่า

2.3.1.2.1 วิธีเชื่อมต่อกับตัวพยุงโดยการดูดซับ (adsorption method) : การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนผิวและใบพัดของถังหมัก ทำให้เกิดหลักการที่ว่า พื้นผิวที่สัมผัสกับสารละลายของจุลินทรีย์จะแปรสภาพเป็นพื้นผิวที่ active ขึ้น การดูดซับของเซลล์ต่อตัวพยุงขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เพราะปรากฏการณ์การดูดซับ (adsorption phenomenon) แปรผันตาม electrostatic interaction ระหว่างผิวของเซลล์กับวัตถุที่เป็นตัวพยุง นอกจากนั้น การดูดซับยังขึ้นอยู่กับสมบัติขององค์ประกอบผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และลักษณะของตัวพยุงตัวพยุงที่มีผิวเป็นรูพรุนจะให้ผลดีต่อการตรึงรูป

ข้อดีของวิธีนี้ คือ การดูดซับไม่รุนแรงต่อเซลล์ กระทำได้ง่าย และกระบวนการไม่จำเพาะเจาะจง จึงทำให้เซลล์ยังคงมีชีวิตและแอคติวิตีไม่กระทบกระเทือน

2.3.1.2.2 วิธีเชื่อมต่อกับตัวพยุงโดยการเชื่อมต่อกับโลหะ (metal-binding method) : การตรึงรูปอาศัยการแทนที่กลุ่มไฮดรอกซี (hydroxy) ที่อยู่บนผิวของโลหะออกไซด์ (metal oxide) ด้วยลิแกนด์ (ligand) ที่เหมาะสมจากเซลล์ แต่เนื่องจากความซับซ้อนทางโครงสร้างของผนังเซลล์ ลิแกนด์ที่เหมาะสมจึงอาจเป็นโปรตีน หรือคาร์โบไฮเดรตก็ได้

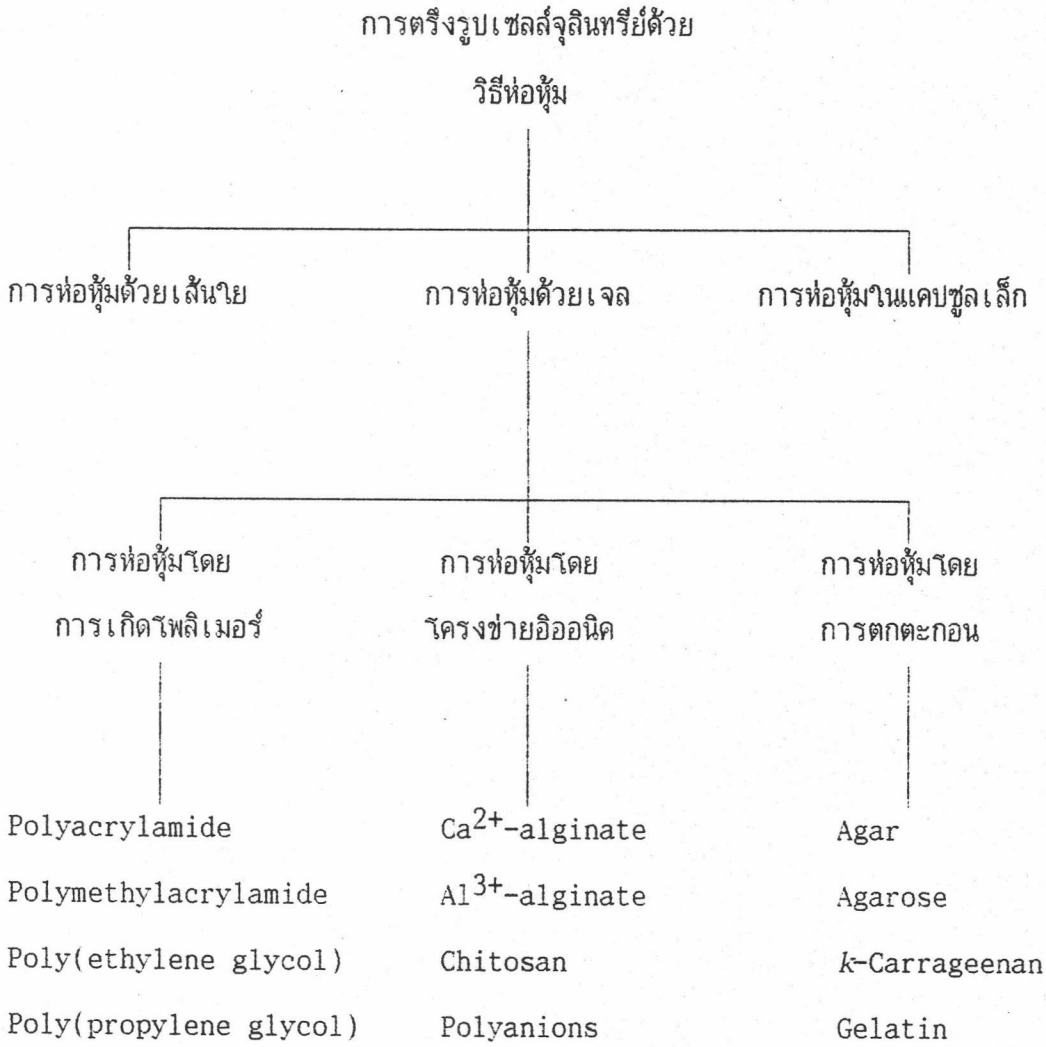
ข้อดีของวิธีนี้ คือ ต้นทุนต่ำ เตรียมได้ง่าย สามารถใช้ได้กับเซลล์ ณ pH ที่เป็นกลาง และยังคงแอคติวิตีของเซลล์และเอนไซม์ไว้ได้

2.3.1.2.3 วิธีเชื่อมต่อกับตัวพยุงโดยพันธะโควาเลนต์ (covalent-binding method): วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้ตรึงรูปเซลล์ที่มีชีวิต เนื่องจากความเป็นพิษของสารที่ใช้ซึ่งบางครั้งทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีและจุลินทรีย์ตาย นอกจากนั้นยังจำเป็นต้องปรับปรุงตัวพยุงก่อนนำมาตรึงรูปอีกด้วย

ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถทำให้เกิดระบบที่ไม่จำกัดการแพร่ผ่านดังที่เกิดขึ้นในการตรึงรูปแบบห่อหุ้มเซลล์ และเซลล์ที่เชื่อมต่อกับตัวพยุงแล้วจะมีเสถียรภาพเป็นเวลานาน ทำให้เซลล์แตกเพียงเล็กน้อย

2.3.1.3 การตรึงรูปเซลล์โดยวิธีห่อหุ้ม

การตรึงรูปเซลล์วิธีนี้ เป็นการห่อหุ้มเซลล์ไว้ในโครงสร้างที่แน่นอน เช่น โครงตาข่าย (lattice) ของโพลิเมอร์เมตริกซ์ (polymer matrix) หรือเยื่อโพลิเมอร์ (polymer membrane) เป็นต้น โครงสร้างดังกล่าวหนาแน่นเพียงพอที่จะป้องกันเซลล์ไม่ให้หลุดออกมา แต่ปล่อยให้สับสเตรต (substrate) แทรกผ่านเข้าไป และให้ผลิตภัณฑ์แพร่ผ่านออกมา การตรึงรูปวิธีนี้แตกต่างจากวิธีใช้สารเคมี เพราะเซลล์ไม่ต้องเชื่อมอยู่กับเมตริกซ์ของเจลหรือเยื่อบาง และแอคติวิตีของเซลล์ถูกทำลายเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การตรึงรูปเซลล์ด้วยวิธีห่อหุ้มนี้จำแนกได้เป็น การห่อหุ้มด้วยเจล การห่อหุ้มด้วยเส้นใย (fiber) และการห่อหุ้มไว้ภายในแคปซูลเล็ก ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การตรึงรูปเซลล์โดยวิธีห่อหุ้ม (Chibata and Wingard, eds., 1983)

2.3.1.3.1 วิธีห่อหุ้มด้วยเจล (gel-entrapment method): เป็นวิธีห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในที่ว่างของโพลิเมอร์เจล (polymer gel) ซึ่งไม่ละลายน้ำ เซลล์จะถูกห่อหุ้มไว้ภายหลังการเกิดโพลิเมอร์ การเกิดโครงข่ายอิออนิก หรือการตกตะกอนด้วย pH อุณหภูมิ หรือตัวทำละลาย วิธีใดวิธีหนึ่งต่อไปนี้

(1) การห่อหุ้มเซลล์ โดยการเกิดโพลีเมอร์ (entrapment by polymerization) : โพลิเมอร์จะเกิดขึ้น เมื่อเติมอนุภาคอิสระของ acrylamide ลงในสารละลายที่มีเซลล์ และสารทำให้เกิดการเชื่อมข้าม (cross-linking

agent) ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนและอุณหภูมิต่ำ ซึ่งช่วยเซลล์ไม่ถูกทำลายในระหว่างการตรึงรูปเจลของ polyacrylamide ที่เกิดขึ้นยินยอมให้เกิดการถ่ายเทสับสเตรตและผลิตภัณฑ์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก แต่ในขณะเดียวกันป้องกันไม่ให้เซลล์ รวมทั้งโมเลกุลของเอนไซม์และกรดนิวคลีอิคที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่หลุดออกไป

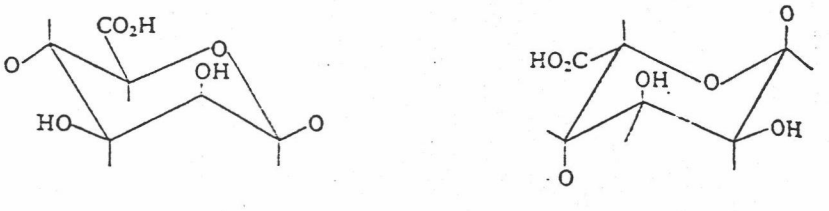
ข้อเสียของวิธีนี้ คือ ความเป็นพิษจากโมโนเมอร์ของ acrylamide สารทำให้เกิดการเชื่อมข้าม ซึ่งส่งผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

(2) การห่อหุ้มเซลล์ โดยโครงข่ายอิออนิก (entrapment by ionic-network formation) : เป็นวิธีที่นิยมกันมาก โดยเฉพาะการห่อหุ้มไว้ในแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate) ซึ่งจะทำให้เกิดเจลที่มีลักษณะสม่ำเสมอเป็นทรงกลมและมีโครงสร้างเป็นรูพรุนเล็กๆ มากมาย ภายในโครงสร้างของเจลดังกล่าวจะบรรจุเซลล์และเอนไซม์ที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนนั้นไว้

กรด alginic พบได้ในสาหร่ายสีน้ำตาลวงศ์ Phaeophycae (Bucke, 1987) เป็นโพลิเมอร์ร่วม (copolymer) ของอนุมูลน้ำตาล 2 ชนิด คือ กรด ะ-D-mannopyranosyluronic หรือ กรด D-manuronic และกรด ः-L-gulopyranosyluronic หรือกรด L-guluronic จึงทำให้สมบัติของเจลที่ได้มีส่วนสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล และการกระจายตัวของกรดทั้งสองชนิด กรดทั้งสองชนิดซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 2.5 อยู่ในสภาพวงแหวนทั้งสถานะของแข็งและสารละลาย อนุมูลน้ำตาลดังกล่าวเชื่อมต่อกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 แล้วจัดตัวเป็นสายโพลีเมอร์ซึ่งจำแนกได้ 3 ประเภท คือ สายโพลีเมอร์ของกรด D- mannuronic หรือ polymannuronate สายโพลีเมอร์ของกรด L-guluronic หรือ polyguluronate และสายโพลีเมอร์ร่วมระหว่างกรดทั้งสองชนิด หรือ polygalacturonate สำหรับกลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพนั้น polymannuronate ถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นอันดับแรก ส่วนหน่วยของ guluronate ถูกผลิตขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ epimerase สายโพลีเมอร์ของอัลจิเนตซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 2.6 มีลักษณะเป็นแถบยาวและวางซ้อนกันเป็นแผ่น มากกว่าจะหมุนรอบตัวเองเหมือนคาร์ราจีแนน (Rees, 1972)

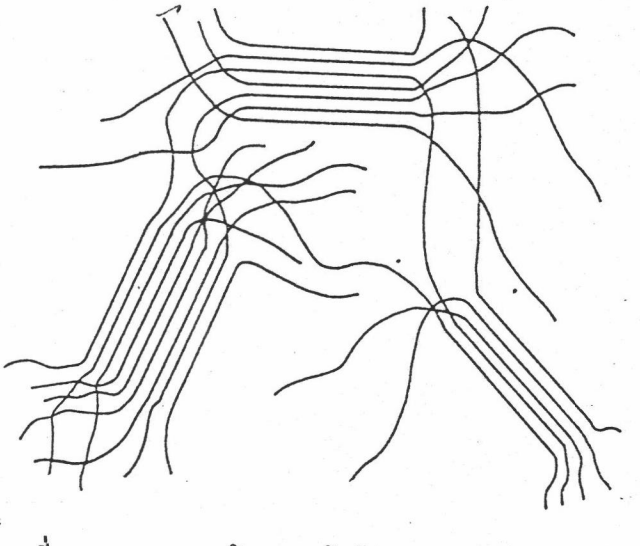
กรด alginic ตามธรรมชาติจะอยู่ในรูปผสมของเกลือโซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียม แต่ส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของเกลือ

โซเดียม โดยทั่วไป กรด alginic สามารถเกิดเจลอ่อนได้ แต่ด้วยความเป็นกรดแก่จึงไม่เหมาะต่อการใช้ห่อหุ้มเซลล์ เจลของอัลจิเนตสามารถคืนสู่สภาพเดิมได้ อีกทั้งยังสามารถสร้างเป็นรูปแบบตามต้องการโดยการจับยึดระหว่างสายโพลีเมอร์ทำให้เสถียรภาพเพิ่มขึ้น เมื่อเจลอัลจิเนตได้รับความร้อน เจลจะไม่หลอมเหลวหรือคืนสภาพ แต่เจลถูกสร้างโดยผสมกับเกลือของประจุบวกที่เหมาะสม การเกิดเจลและสารละลายหนืดเป็นปฏิกิริยาระหว่างอัลจิเนตกับประจุบวก เช่น Ca^{2+}, Sr^{2+} และ Ba^{2+} การจับกับประจุแคลเซียมของอัลจิเนตมี 2 ชนิด ชนิดแรกซึ่งมีส่วนสมดุลต่ำจะไม่มีผลต่อการเกิดเจล ส่วนชนิดที่ 2 ซึ่งมีส่วนสมดุลสูงจะมีความสำคัญต่อการเกิดเจลมากที่สุด ทั้งนี้เป็นผลกระทบจากการเชื่อมสายโพลีเมอร์ด้วยประจุแคลเซียม การเชื่อมสายโพลีเมอร์ต้องมีหน่วย guluronate ต่อกันหลายๆ หน่วย จึงจะเชื่อมได้ เจลแคลเซียมอัลจิเนตที่เกิดขึ้นเป็นโครงตาข่ายโพลีเมอร์ 3 มิติ ที่เฉื่อย และมีช่องว่างขนาดใหญ่อยู่ภายใน



(a) (b)

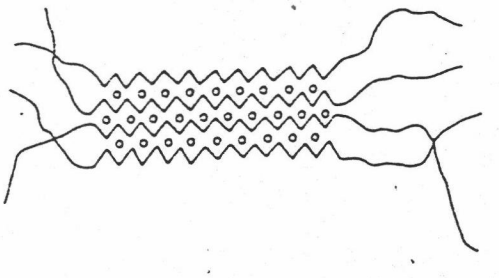
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของกรด D-mannuronic (a) และกรด L-guluronic (b) (Rees, 1972)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของอัลจิเนต (Rees, 1972)

ปัจจัยหลัก 3 ประการที่ต้องพิจารณาในการจับกับประจุบวกของ polygalacturonate, polyguluronate และ polymanuronate (Grant และคณะ, 1973) คือ ลักษณะทางเรขาคณิตของลิแกนด์ การแยกออกจากกันระหว่างประจุบนสายโพลีเมอร์ และเมื่อการรวมกลุ่มกันของโพลีเมอร์เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการจับซึ่งเกี่ยวข้องกับความสะดวกที่สายโพลีเมอร์จะมาร่วมกัน เสถียรภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของประจุแคลเซียมจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของสาย polygalacturonate, polyguluronate และ polymannuronate แต่ผลกระทบนี้จะเห็นได้ชัดสำหรับโพลีเมอร์ 2 ชนิดแรก

กลไกการจับกันของโพลีเมอร์ตั้งแต่ 2 สายขึ้นไปสามารถสรุปได้เป็นแบบจำลอง "กล่องไข่" (egg-box model) ดังรูปที่ 2.7 เส้นที่งอไปมาเป็นดัง "กล่องไข่" ลูกฟูกรูปทรง 2 มิติ ซึ่งเป็นช่องให้ประจุบวกบรรจุเข้าไป แล้วประสานสายโพลีเมอร์เข้าด้วยกัน สำหรับความแข็งแรง และความสามารถในการเลือกของการจับเข้าด้วยกันของสายโพลีเมอร์ ตัดสินจากความสะดวกของ "ไข่" ซึ่งมีขนาดปกติ ต่อการบรรจุลง "กล่อง" และชั้นของ "กล่อง" หนึ่งๆ สามารถรวมกลุ่มกับชั้นของ "กล่อง" อื่นๆ รอบๆ "ไข่" นั้น บริเวณที่เป็นโครงตาข่ายจะมีส่วนสัมพันธ์กับการจับประจุ



รูปที่ 2.7 แบบจำลอง "กล่องไข่" (Grant และคณะ, 1973)

ในการทำปฏิกิริยาระหว่างอัลจิเนต กับประจุชนิด polyvalent (ยกเว้นแมกนีเซียม) จะทำให้เกิดการเชื่อมข้ามขึ้น เมื่อปริมาณประจุชนิด polyvalent เพิ่มขึ้น สารละลายโซเดียมอัลจิเนตจะหนืดขึ้น แล้วกลายเป็นเจล และ

สุดท้ายตกตะกอน เจลที่มีลักษณะสม่ำเสมอสามารถผลิตได้โดยจัดระเบียบการกระจายตัวของประจุแคลเซียมในส่วนของเหลวอย่างสม่ำเสมอก่อนการเข้ารูปจะเริ่มขึ้น

สำหรับการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ด้วยเจลแคลเซียมอัลจิเนตนั้น สารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่มีความเข้มข้นสูงจะเกิดปัญหาด้านความหนืดเวลาใช้งาน ทำให้ผสมสารแขวนลอยเซลล์ลงไปได้ยาก และเม็ดเจลที่ได้มีประสิทธิภาพการแพร่ผ่านต่ำ เพราะรูพรุนของเม็ดเจลลดลง (Bucke, 1987) เมื่อเตรียมเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตจากร้อยละ 1 และ 2 โดยน้ำหนัก และใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ พบว่าความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มีผลกระทบต่อลักษณะเฉพาะในการแพร่ผ่านของเม็ดเจลค่อนข้างน้อย นอกจากนั้น ความต้องการปริมาณประจุ Ca^{2+} ในการเกิดเจลค่อนข้างน้อยเช่นกัน กล่าวคือ ภายใน 2 ชั่วโมงแรก ปริมาณ Ca^{2+} ถูกใช้ไป 8.90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของเม็ดเจล และเมื่อบ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง Ca^{2+} ถูกใช้ไป 10.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของเม็ดเจล (Ogbonna และคณะ, 1989)

ข้อดีของวิธีนี้ คือ วิธีการที่ใช้ไม่รุนแรง กระทำได้ง่าย และรวดเร็ว แต่มีข้อควรระวัง คือ ถ้าทิ้งเจลแคลเซียมอัลจิเนตไว้ในสารละลายที่มีสารจับแคลเซียม (calcium-chelating agent) เช่น ฟอสเฟต รวมทั้งอิออนที่มีประจุบวก เช่น อิออนของแมกนีเซียม หรืออิออนของโปแตสเซียม จะทำให้เจลถูกทำลายเนื่องจากอิออนของแคลเซียมละลายออกมา

(3) การห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายหลังการตกตะกอน (entrapment by precipitation): ด้วยวิธีการนี้สามารถสร้างเจลขึ้นมาจากการตกตะกอนโพลิเมอร์ธรรมชาติหรือโพลิเมอร์สังเคราะห์ เมื่อปรับเปลี่ยนบางปัจจัยหรือหลายๆ ปัจจัยในสารละลาย เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือ pH หรือตัวทำละลาย ในบรรดาสารหลายๆ ชนิดที่ใช้ตกตะกอนเพื่อให้เกิดเจลนั้น แคปปา-คาร์ราจีแนน (*K*-carrageenan) มีข้อดีมากกว่าหลายประการ คือ เสถียรในขณะตรึงรูป ไม่เป็นพิษ มีราคาถูก และที่สำคัญเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการตรึงรูปแบบห่อหุ้มด้วยเจล

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ ปัจจัยที่ทำให้เจลตกตะกอน เช่น ความร้อน หรือตัวทำละลายอินทรีย์ ถ้าหากเปลี่ยนแปลงไปสามารถทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ได้

2.3.1.3.2 วิธีห่อหุ้มด้วยเส้นใย (fiber-entrapment method): เป็นวิธีห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในโพรงเล็กๆ (microcavities) ของเส้นใยสังเคราะห์ เมื่อละลายโพลิเมอร์ที่ทำให้เกิดเส้นใย (fiber-forming polymer) ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีเซลล์อยู่ด้วย จะทำให้เกิดโพลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นเส้นใย ส่วนเซลล์ซึ่งเป็นหยดเล็กๆจะถูกห่อหุ้มไว้ภายใน

ข้อดีของวิธีนี้ คือ เส้นใยที่ได้มีความทนทานต่อกรด และด่างอ่อน รวมทั้งตัวทำละลายอินทรีย์ที่มี ionic strength สูง แต่มีข้อเสีย คือ การนำไปใช้งานถูกจำกัดด้วยน้ำหนักโมเลกุลที่ค่อนข้างต่ำ และสารเคมีที่ใช้อาจจะทำลายเซลล์ได้

2.3.1.3.3 วิธีห่อหุ้มไว้ภายในแคปซูลเล็ก (microencapsulation method) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533) : เป็นวิธีห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในเยื่อของโพลิเมอร์ ซึ่งมีสมบัติเลือกผ่าน แคปซูลเล็กที่ได้จะมีขนาด 1-100 ไมโครเมตร ข้อดีของการตรึงรูปด้วยวิธีนี้ คือ อาศัยสภาพทางธรรมชาติโดยไม่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมี และความสามารถในการนำกลับไปใช้ได้อีกการสร้างแคปซูลเล็กเพื่อห่อหุ้มเซลล์สามารถทำได้ 3 วิธี คือ

(1) Interfacial polymerization method เป็นวิธีห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในเยื่อเลือกผ่านของโพลิเมอร์ โดยการประยุกต์ใช้โมโนเมอร์ชนิด hydrophilic และชนิด hydrophobic เพื่อเกิดเป็นโพลิเมอร์ที่รอยต่อระหว่างชั้น (interface) ด้วยวิธีการแบบนี้ขนาดของแคปซูลเล็กสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามต้องการ และระยะเวลาที่ใช้เตรียมแคปซูลเล็กสั้นมาก แต่มีข้อเสียคือ เซลล์หรือเอนไซม์บางชนิดจะไม่เสถียรต่อโมโนเมอร์ที่ใช้ และจะไม่ active ในช่วงการเตรียมแคปซูลเล็ก

(2) Liquid drying method เป็นวิธีห่อหุ้มเซลล์หรือเอนไซม์ โดยผ่านการกระจายเซลล์ หรือเอนไซม์ในโพลิเมอร์ ซึ่งละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำไปกระจายตัวในส่วนของเหลว แล้วจึงทำให้แห้ง ด้วยวิธีการนี้เยื่อของโพลิเมอร์ที่เกิดขึ้นจะล้อมรอบเซลล์หรือเอนไซม์ไว้ภายใน ระหว่างการเตรียมแคปซูลเล็กทั้งเซลล์และเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีน้อยมาก แต่มีข้อเสีย คือ ไม่เหมาะจะใช้เตรียมแคปซูลเล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 30 ไมโครเมตร บางครั้งอิมัลชันลำดับที่ 2 จะไม่เกิด แคปซูลเล็กที่เตรียมได้มีปริมาณน้อย และต้องเสียเวลานานมากในการไล่ตัวทำละลายอินทรีย์ออกไป

(3) Phase separation method เป็นวิธีทำให้โพลิเมอร์บริสุทธิ์ โดยละลายโพลิเมอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วทำให้ตกตะกอนโดยเติมตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่ 2 ซึ่งละลายในตัวทำละลายชนิดแรก แต่ไม่ละลายโพลิเมอร์ เมื่ออุณหภูมิและปริมาณของตัวทำละลายแปรเปลี่ยนไป สารละลายโพลิเมอร์จะแยกออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นที่มีความเข้มข้นของโพลิเมอร์สูงกับชั้นที่มีความเข้มข้นต่ำ ปรากฏการณ์การแยกชั้นดังกล่าวเรียกว่า coacervation วิธีการห่อหุ้มเซลล์ไว้ในแคปซูลเล็กประเภทนี้ประยุกต์ปรากฏการณ์ดังกล่าวมาใช้ ข้อดีของวิธีนี้ คือ วิธีเตรียมแคปซูลเล็กไม่รุนแรง แต่การไล่ตัวทำละลายออกไปกระทำได้ยาก

2.3.1.4 การตรึงรูปเซลล์อิสระ

การตรึงรูปเซลล์ด้วยวิธีดังกล่าวมาแล้วข้างต้นเป็นวิธีปรับปรุงเซลล์หรือสภาพแวดล้อมของเซลล์ ซึ่งทำให้แอคติวิตีของเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ นอกจากนั้น เมื่อใช้งานเซลล์ตรึงรูปอย่างต่อเนื่องไปได้ระยะหนึ่ง จะต้องนำเซลล์มาเพิ่มแอคติวิตีให้สูงขึ้น ในขณะที่การตรึงรูปเซลล์อิสระ สามารถปล่อยให้เซลล์อยู่ในเครื่องปฏิกรณ์ได้นานมากกว่า

เมื่อเปรียบเทียบวิธีตรึงรูปเซลล์ทั้ง 4 วิธีดังกล่าวแล้วนั้น ไม่มีวิธีใดให้ผลตามต้องการอย่างสมบูรณ์ เนื่องจากแต่ละวิธีมีข้อเสียที่เฉพาะเจาะจง ในขณะที่การนำไปประยุกต์ใช้จำเป็นต้องหาวิธีที่ราคาถูกและง่าย แต่ให้ผลิตภัณฑ์ของการตรึงรูป แอคติวิตี และความมีเสถียรภาพสูง เมื่อพิจารณาลักษณะเฉพาะของวิธีตรึงรูปทั้งหมดแล้ว สามารถสรุปข้อดีข้อเสียของแต่ละวิธี (Chibata and Wingard, 1983) ได้ตามตารางที่ 2.4

อย่างไรก็ตาม การใช้เซลล์ตรึงรูปเพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ในระยะเวลาอันสั้นมีข้อบกพร่องตามที่ Fukui และ Tanaka (1982) ได้สรุปไว้ดังนี้

(1) เซลล์ของจุลินทรีย์มีเอนไซม์อยู่หลายชนิด เอนไซม์เหล่านี้สามารถเร่งปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการให้เกิดขึ้นได้ จำเป็นต้องหาวิธีมาปรับปรุงจุลินทรีย์ชนิดนั้น

(2) เซลล์ของจุลินทรีย์ที่ถูกตรึงรูปแล้วนั้นมักไม่ยินยอมให้สารตั้งต้นและ/หรือผลิตภัณฑ์ผ่านผนังเซลล์ ต้องทำลายผนังเซลล์ที่มีลักษณะดังกล่าวก่อน หรือหลังการตรึงรูป

(3) ในกรณีที่ตรึงรูปเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต ผลผลิตที่ได้อาจต่ำกว่าวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม เพราะแหล่งคาร์บอนและพลังงานบางส่วนถูกเซลล์นำไปใช้ในการเจริญเติบโต

(4) ในกรณีที่ตรึงรูปเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต เมื่อตรวจผลิตภัณฑ์จะพบเซลล์ของจุลินทรีย์ที่หลุดออกมาจากร่างแหของตัวพยุง เซลล์ที่หลุดออกมานั้นเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงมากที่สุด เพราะเซลล์ดังกล่าวยังคงมีแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ในระยะเวลานานพอสมควร

ตารางที่ 2.5 การเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ของการตรึงรูปเซลล์แต่ละวิธี

ลักษณะเฉพาะ	การเชื่อมขวาง	การดูดซับ	การเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์	การห่อหุ้ม
การเตรียม	ปานกลาง	ง่าย	ยาก	ปานกลาง
แรงจับยึด	แข็งแรง	อ่อนแอ	แข็งแรง	ปานกลาง
การคงอยู่ของแอคติวิตี	ต่ำ	สูง	ต่ำ	ปานกลาง
การคืนสภาพของตัวพยุง	ทำไม่ได้	ทำได้	อาจทำได้	ทำไม่ได้
ต้นทุนการตรึงรูป	ปานกลาง	ต่ำ	สูง	ต่ำ
เสถียรภาพ	สูง	ต่ำ	สูง	สูง

ที่มา : Chibata, I. และ Wingard, L.B. (1983)

2.3.2 การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ร่วมกัน

การตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ร่วมกันนั้น มีหลักการคล้ายคลึงกับระบบเอนไซม์หลายชนิด (multienzyme system) (Chibata, 1978) เนื่องจากจุลินทรีย์มีเอนไซม์ทั้งประเภทปล่อยออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) และอยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ดังนั้นเมื่อตรึงรูปเซลล์ร่วมกันเท่ากับนำเอนไซม์หลายชนิดมาตรึงรูปร่วมกัน ซึ่งมีส่วนช่วยในกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่องที่ต้องอาศัยระบบเอนไซม์หลายชนิด อย่างไรก็ตามภาวะดังกล่าวจะประสบผลสำเร็จต่อเมื่อ

(1) จุลินทรีย์ต้องไม่มีเอนไซม์อื่นที่อาจรบกวน และทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้

(2) เอนไซม์อื่นๆ ที่รบกวน ต้องถูกทำลายได้ง่ายด้วยการให้ความร้อนหรือการปรับ pH

(3) ทั้งสับสเตรตและผลิตภัณฑ์จะต้องผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ง่าย

การตรึงรูปเซลล์ร่วมกันไม่ว่าระหว่างเซลล์จุลินทรีย์ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปหรือระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับเอนไซม์สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (bioconversion) ตามที่ต้องการ และลดขั้นตอนการหมักลงดังตัวอย่างต่อไปนี้

Hough และ Lyons (1972) ตรึงรูปเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ Saccharomyces cerevisiae ร่วมกับเอนไซม์ amyloglucosidase โดยวิธีเชื่อมต่อกับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนท์ มี titanic chloride เป็นสารเชื่อมต่อ การตรึงรูปร่วมกันนี้ ใช้ผลิตเอธานอลจากเดกซ์ตริน (dextrin) แต่เมื่อจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น แอคติวิตีของเอนไซม์ที่จับอยู่บนแต่ละเซลล์จะลดลง เนื่องจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติและเซลล์ใหม่ไม่ได้รับเอนไซม์ที่คู่กัน อย่างไรก็ตาม ในระบบการหมักอย่างต่อเนื่อง เซลล์จะเพิ่มจำนวนค่อนข้างน้อย ดังนั้นแอคติวิตีโดยรวมของเอนไซม์จึงคงที่ การทำงานของยีสต์และเอนไซม์ที่ถูกตรึงรูปร่วมกันในระบบนี้จะเป็นไปอย่างต่อเนื่อง โดยเอนไซม์ amyloglucosidase จะย่อยสลายเดกซ์ตรินเป็นกลูโคส จากนั้นยีสต์จะหมักกลูโคสจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเอธานอล ดังนั้นการตรึงรูปเอนไซม์ชนิดนี้ร่วมกับเซลล์ยีสต์จึงเหมาะประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ วิสกี้ หรือเอธานอลทางอุตสาหกรรม (industrial ethanol)

Ghazali และ Cheetham (1982) ตรึงรูป Saccharomyces uvarum ATCC 26602 ร่วมกับเอนไซม์ glucoamylase โดยเอนไซม์ glucoamylase ตรึงรูปบนถ่านด้วยวิธีเชื่อมขวางมีสารละลายกลูตารัลดีไฮด์และอะซีโตนเป็นสารทำให้เกิดการเชื่อมข้าม จากนั้นนำถ่านที่มีเอนไซม์ตรึงรูปอยู่ไปตรึงรูปร่วมกับเซลล์ยีสต์ในเจลแคลเซียมอัลจิเนต ใช้ผลิตเอธานอลจากน้ำแป้งตัม ซึ่งการหมักที่ใช้สับสเตรตที่ขาดคุณค่าทางโภชนาการ ทำให้ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นน้อยลง ดังนั้นการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ต่างๆ ในการหมัก จึงไม่เข้มงวด เอธานอลที่ผลิตขึ้นจากระบบการตรึงรูปแบบผสมนี้ มีปริมาณสูงสุดที่ pH 4.5 ซึ่งเป็น pH ที่ยีสต์และเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่ใช้ในระบบถูกจำกัดไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์นี้ไม่ใช่พวกทนความร้อน (thermotolerant) อีกทั้งเซลล์ยีสต์ยังไวต่อเอธานอลที่มีความเข้มข้นสูงด้วย

Kurosawa และ Tanaka (1990) ตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ต้องการอากาศ (aerobe) ร่วมกับเซลล์จุลินทรีย์ไม่ต้องการอากาศ (anaerobe) ในเจลแคลเซียมอัลจิเนต เพื่อลดปัญหาออกซิเจนไม่เพียงพอในเม็ดเจล โดยจุลินทรีย์ต้องการอากาศ คือ Aspergillus awamori จะเจริญเติบโตบริเวณพื้นที่ใกล้ผิวเจล ซึ่งมีออกซิเจนเพียงพอ ส่วนจุลินทรีย์ไม่ต้องการอากาศ คือ Zymonas mobilis จะเจริญเติบโตบริเวณกลางเม็ดเจล ซึ่งมีออกซิเจนไม่เพียงพอ ระบบการตรึงรูปร่วมกันนี้ดำเนินไปภายใต้สภาพมีอากาศ โดย Aspergillus awamori จะเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคส และ Zymonas mobilis จะเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอธานอล

2.4 เครื่องปฏิกรณ์เซลล์ตรึงรูป

การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงรูปกับอุตสาหกรรมต่างๆ ให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด แนวทางหนึ่ง คือ การใช้เครื่องปฏิกรณ์ (reactor) ร่วมกับเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป (Chibata and Wingard, 1983) เครื่องปฏิกรณ์ที่นำมาใช้นั้นเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวเคมีมากกว่าปฏิกิริยาทางเคมี เนื่องจากตัวเร่งทางชีวภาพ (biocatalyst) ทำงานที่ความดันปกติ อีกทั้งในระหว่างปฏิกิริยาดำเนินไป ยังต้องการหรือปลดปล่อยความร้อนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

2.4.1 ประเภทของเครื่องปฏิกรณ์

เมื่อจำแนกตามลักษณะการใช้งาน และลักษณะการไหลของสับสเตรตและผลิตภัณฑ์ภายในเครื่องแล้ว เครื่องปฏิกรณ์มีอยู่หลายประเภทดังต่อไปนี้

(1) เครื่องปฏิกรณ์ประเภท packed-bed นิยมใช้กับเซลล์ตรึงรูปไม่ว่าจะมีรูปแบบใดก็สามารถบรรจุลงในคอลัมน์ได้ เช่น ก้อนกลม แผ่นกลม เม็ด เป็นต้น ภายในเครื่องปฏิกรณ์ประเภทนี้ สับสเตรตถูกปล่อยให้ไหลผ่าน bed ของเซลล์ตรึงรูปไปในทิศทางที่ต้องการ ถ้าหากความเร็วของของไหล ซึ่งไหลผ่านหน้าตัดของเครื่องปฏิกรณ์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว จะเรียกเครื่องปฏิกรณ์ประเภทนี้ว่า เครื่องปฏิกรณ์แบบ plug-flow ซึ่งเป็นเครื่องปฏิกรณ์ในอุดมคติข้อดีของเครื่องปฏิกรณ์ประเภทนี้ คือ ควบคุมการทำงานได้ง่าย มีอัตราการถ่ายเทมวลสารสูง และมีอัตราเร็วของปฏิกิริยาสูง (กรณีที่สับสเตรตไม่ถูกยับยั้ง) ในกรณีที่เซลล์ตรึงรูปยังคงมีชีวิตอยู่ จะต้องพิจารณาเกี่ยวกับการให้แก๊สออกซิเจน และการไล่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกไป ซึ่งเป็นปัญหาในการใช้งาน กล่าวคือ ภายในเครื่องปฏิกรณ์มีความหนาแน่นของเซลล์สูงมาก แก๊สออกซิเจนจะถูกใช้ตลอดความยาวของคอลัมน์ จึงหมดไปอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้น มีปัญหาเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหารภายในเครื่องปฏิกรณ์ด้วย

(2) เครื่องปฏิกรณ์ประเภท continuous-flow stirred-tank ในอุดมคติเครื่องปฏิกรณ์ประเภทนี้ ส่วนผสมภายในเครื่องปฏิกรณ์จะต้องถูกผสมอย่างสมบูรณ์ อัตราเร็วของปฏิกิริยาหาได้จากองค์ประกอบของไอน้ำที่ออกมาจากเครื่องปฏิกรณ์ ถ้าหากเปรียบเทียบกับเครื่องปฏิกรณ์แบบ plug-flow ซึ่งความเข้มข้นของสับสเตรตถูกทำให้สูงสุดทุกๆ ตำแหน่งภายในเครื่อง เครื่องปฏิกรณ์แบบ continuous-flow stirred-tank จะมีความเข้มข้นของสับสเตรตต่ำสุดทุกๆ ตำแหน่งภายในเครื่อง ดังนั้นอัตราเร็วเฉลี่ยของปฏิกิริยาย่อมต่ำกว่าด้วยทำให้เครื่องปฏิกรณ์แบบนี้เหมาะกับปฏิกิริยาที่ถูกยับยั้งโดยสับสเตรต (substrate-inhibited reaction) ซึ่งสามารถควบคุม pH และอุณหภูมิได้ง่าย ระบบเช่นนี้จะใช้เมื่อต้นทุนของสับสเตรตไม่ใช่สิ่งสำคัญ แต่ความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งที่จำเป็น

ข้อเสียของเครื่องปฏิกรณ์ประเภทนี้ คือ ความรุนแรงของแรงเฉือนภายในเครื่องปฏิกรณ์ อันเป็นข้อจำกัดต่อการใช้งานร่วมกับเซลล์ตรึงรูปที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งไวต่อแรงเฉือนมาก

(3) เครื่องปฏิกรณ์ประเภท fluidized-bed เป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่มีหลักการอยู่ระหว่างเครื่องปฏิกรณ์สองแบบแรก ภายในเครื่องปฏิกรณ์ประเภทนี้ เซลล์ตรึงรูปจะถูกทำให้เคลื่อนที่ด้วยการไหลอย่างต่อเนื่องของสับสเตรตและความดันตก (pressure drop) ของการไหลของสับสเตรตมีส่วนสัมพันธ์กับน้ำหนักของ bed สภาพ fluidization สามารถทำให้เกิดขึ้นได้จากการไหลของของเหลว หรือแก๊ส เช่น อากาศ ในกรณีที่ต้องใช้กาซออกซิเจน

ข้อดีของเครื่องปฏิกรณ์แบบนี้ คือ ของแข็งและของไหลผสมกันได้ดี และความดันตกมีค่าต่ำ การผสมระหว่างของแข็งกับของไหลมีความสำคัญในกรณีใช้เซลล์ตรึงรูปที่มีชีวิต เพราะช่วยให้เซลล์เพิ่มจำนวนอย่างสม่ำเสมอ กรณีเช่นนี้เกิดขึ้นได้ เนื่องจากอนุภาคซึ่งมีจำนวนเซลล์ต่ำสามารถเคลื่อนที่จากบริเวณที่มีสับสเตรตน้อยไปสู่บริเวณที่มีสับสเตรตมากได้ อีกทั้งยังมีผลต่อสมดุลไดนามิก (dynamic equilibrium) ทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นได้ สำหรับปัญหาของเครื่องปฏิกรณ์ประเภทนี้ คือ ความหนาแน่นของเซลล์ที่บรรจุอยู่ ทำให้ประสิทธิภาพของเครื่องต่ำกว่าเครื่องปฏิกรณ์แบบ plug-flow และปัญหาเรื่องความหนาแน่นที่แตกต่างกันระหว่างอนุภาคของเซลล์ตรึงรูปกับสับสเตรต ทั้งนี้เพื่อให้เกิดสภาพ fluidization ที่ดี ต้องทำความแตกต่างดังกล่าวให้สูงที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ เนื่องจากวิธีตรึงรูปเซลล์ที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน คือ การห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในเจลของคาร์ราจีแนน หรือ อัลจิเนต ซึ่งวิธีดังกล่าวทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ตรึงรูปไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความหนาแน่นของสับสเตรต

(4) เครื่องปฏิกรณ์ประเภท hollow-fiber เป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่บรรจุ hollow fiber หรือเส้นใยกลวงซึ่งมีสมบัติเลือกผ่าน คือ ยอมให้สับสเตรตและผลิตภัณฑ์ผ่านได้ แต่ไม่ยอมให้เซลล์ผ่านเส้นใยดังกล่าว ทำให้เกิดพื้นผิวซึ่งมีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับเป็นการเพิ่มปริมาตรของเครื่องปฏิกรณ์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเครื่องได้โดยใช้เส้นใยที่มีสมบัติในการเลือกผ่านต่างกัน

ข้อดีของเครื่องปฏิกรณ์ประเภทนี้ คือ ช่วยประหยัดต้นทุนการตรึงรูปเซลล์ สามารถรักษาสถานภาพของเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ และสะดวกต่อการเคลื่อนย้ายเซลล์ตรึงรูปเพื่อรักษาแอคติวิตีให้คงเดิม หรือเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ ส่วนข้อเสีย คือ ขาดการควบคุมอัตราการไหลเพื่อพิจารณาการกระจายตัวของเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญต่อเสถียรภาพของเครื่องปฏิกรณ์ เพราะการกระจายที่ไม่สม่ำเสมอของอัตราการไหล จะทำให้เกิดแรงต้านทานการแพร่ผ่านของสับสเตรตและผลิตภัณฑ์

2.4.2 <u>ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้เครื่องปฏิกรณ์</u>

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภทใดประเภทหนึ่งร่วมกับเซลล์ตรึงรูป ประกอบด้วย

(1) ความต้องการเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่ ถ้าการมีชีวิตหรือการเจริญเติบโตของเซลล์ ร่วมกับการใช้กาซออกซิเจนเป็นสิ่งที่ต้องพิจารณา ควรใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท fluidized-bed ที่ใช้อากาศ แต่ถ้าต้องไล่กาซคาร์บอนไดออกไซด์ออกไปปริมาณมากควรจะใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท packed-bed

(2) ประเภทของตัวพยุงและวิธีตรึงรูปเซลล์ ถ้าหากตัวเร่งชีวภาพมีลักษณะเป็นอนุภาคแล้ว สามารถนำไปใช้ได้กับเครื่องปฏิกรณ์ทุกประเภท ถ้าหากใช้ตัวพยุงเป็นเยื่อหรือเส้นใย ควรใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท packed-bed กรณีที่เป็นทรงกลมซึ่งมีความหนาแน่นเหมาะสม ก็อาจใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภท fluidized-bed ในขณะระบบซึ่งต้องการพื้นที่ผิวสูง ควรจะใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท hollow-fiber

(3) ธรรมชาติของสับสเตรต ถ้าสับสเตรตเป็นของเหลวสะอาดปราศจากอนุภาคอื่นเจือปน เครื่องปฏิกรณ์แบบ packed-bed จะมีประสิทธิภาพดีในกรณีเช่นนี้ ถ้าสับสเตรตเป็นอนุภาคแขวนลอย รวมทั้งกรณีที่ต้องการให้กาซและของเหลวผสมเข้ากันได้ดี เครื่องปฏิกรณ์ประเภท continuous-flow stirred-tank หรือประเภท fluidized-bed จะมีความเหมาะสมกว่า แต่สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ ความคงทนต่อแรงเฉือนของตัวเร่งทางชีวภาพ

(4) จลนพลศาสตร์ (kinetic) ของปฏิกิริยา ทั้งในกรณีปฏิกิริยาถูกยับยั้ง หรือไม่ถูกยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ ควรจะใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท plug-flow ในทางตรงกันข้าม ถ้าปฏิกิริยาถูกยับยั้งด้วยสับสเตรตก็ควรใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท continuous-flow stirred-tank สำหรับปฏิกิริยาที่เร่งด้วยตัวเอง (autocatalytic reaction) อาจจะใช้เครื่องปฏิกรณ์ทั้ง 2 แบบผสมผสานกัน หรือใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท fluidized-bed

(5) ความต้องการสำหรับระบบการทำงาน ถ้าต้องควบคุม pH หรืออุณหภูมิอย่างเคร่งครัดเพื่อให้เกิดผลผลิตสูงสุดควรใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท continuous-flow stirred-tank ส่วนระบบที่ต้องการอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวกับปริมาตรสูงๆ ควรใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท hollow-fiber ถ้าหากการถ่ายเทกาซออกซิเจนเป็นจุดวิกฤต อาจจะใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท fluidized-bed หรือ continuous-flow stirred-tank ก็ได้

(6) การแทนที่และการคืนสภาพของตัวเร่งปฏิกิริยา กรณีที่ตัวเร่งปฏิกิริยามีอายุสั้น จำเป็นต้องเปลี่ยนตัวเร่งใหม่ ควรจะใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท continuous-flow stirred-tank ถ้าใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปสามารถทำให้เซลล์ฟื้นคืนสภาพเดิม ด้วยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านไปในเครื่องปฏิกรณ์ประเภท packed-bedหรือ fluidized-bed

(7) ความดันไฮดรอลิค (hydraulic pressure) ความแน่นของ bed บรรจุเซลล์ตรึงรูปขึ้นอยู่กับความดันไฮดรอลิค ซึ่งทำให้ความดันตกเพิ่มขึ้น และลดแอคติวิตีของเซลล์เนื่องจากความสามารถในการเลือกผ่านลดลง ถ้าเลือกใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท packed-bed จะพิจารณาความดันไฮดรอลิคที่ทำให้เกิดความลึกของ bed ที่ยอมให้มีได้สูงสุด ในตรงกันข้ามถ้าใช้เครื่องปฏิกรณ์ประเภท fluidized-bed ตัวพยุงจะทำให้เกิด bed ที่อัดแน่นขึ้นได้

(8) การออกแบบ รูปแบบของเครื่องปฏิกรณ์ประเภท plug-flow และ continuous-flow stirred-tank จะง่ายกว่าประเภท fluidized-bed และเครื่องปฏิกรณ์ที่มิใช่แบบดั้งเดิมเพราะจะมีปัญหาเรื่องการขยายขนาด

(9) ต้นทุนการผลิตเครื่องปฏิกรณ์ ถ้าต้นทุนในการตรึงรูปเซลล์ต่ำ ต้นทุนการผลิตเครื่องปฏิกรณ์จะกลายเป็นส่วนที่สำคัญเครื่องปฏิกรณ์ประเภท continuous-flow จะมีราคาต่อหน่วยปริมาตร ต่ำที่สุดเพราะใช้วัสดุอุปกรณ์อย่างง่าย แต่อย่างไรก็ตาม ตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ในเครื่องปฏิกรณ์ประเภทนี้จะมีอายุครึ่งชีวิต (half-life) สั้นกว่าตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดเดียวกันที่ใช้ในเครื่องปฏิกรณ์ประเภทอื่น ซึ่งถูกออกแบบมาให้ใช้งานเฉพาะแตกต่างกัน

2.5 การใช้ประโยชน์จากเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป

เหตุผลสำคัญในการตรึงรูปเซลล์ของจุลินทรีย์ คือ เพื่อให้สามารถใช้งานเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นได้ในระยะเวลานาน ทั้งนี้เพราะไม่จำเป็นต้องใช้กระบวนการสกัด และ/หรือทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เอนไซม์มีแอคติวิตีสูง มีเสถียรภาพในการใช้งานสูง ทั้งยังสามารถประยุกต์เป็นปฏิกิริยาหลายขั้นตอน (multistep reaction) ได้อีกด้วย และเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปสามารถดำเนินเมตาบอลิสมได้อย่างต่อเนื่อง เมื่อนำเซลล์ตรึงรูปมาใช้กับอุตสาหกรรมที่เหมาะสมจะเกิดผลดีขึ้นหลายประการคือ

(1) ต้นทุนการผลิตต่ำ

(2) สภาวะในการผลิตไม่ถูกจำกัดด้วยสถานที่และฤดูกาล

(3) ระยะเวลาในการผลิตสั้น

(4) ผลผลิตอยู่ในระดับที่น่าพึงพอใจ

เซลล์ตรึงรูปสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานประเภทต่างๆ ได้มากมาย ไม่ว่าด้านการวิเคราะห์ อุตสาหกรรม หรือสิ่งแวดล้อม การใช้งานด้านอุตสาหกรรมจะครอบคลุมไปถึงการสังเคราะห์กรดอะมิโนและยาปฏิชีวนะ การผลิตกลูโคสไซรัป (glucose syrup) และผลิตภัณฑ์จากนม ส่วนการประยุกต์ใช้ทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การบำบัดน้ำเสีย และการย่อยสลายของเสียที่มีเซลล์ลูโลส (cellulose) จากแหล่งชุมชนและอุตสาหกรรม เป็นต้น นอกจากนั้น การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงรูปยังสามารถตอบสนองความต้องการทางสังคม ได้ด้วยกระบวนการบางอย่าง เช่น ทำให้เกิดพลังงานที่สามารถนำไปใช้ได้ในรูปของมีเธน (methane) หรือ เอธานอล เป็นต้น ถึงแม้ว่าการติดตามแอคติวิตีของเซลล์ตรึงรูปจะยากกว่าเซลล์อิสระ แต่เซลล์ตรึงรูปมีความเหมาะสมมากกว่า ที่จะนำไปใช้ในเครื่องปฏิกรณ์ประเภทคอลัมน์ หรือประเภทมีการไหลอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งยังสามารถนำกลับไปใช้ใหม่ได้อีก

ถึงแม้ว่าเซลล์ตรึงรูปสามารถใช้ได้กับงานหลายประเภท แต่ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำซีอิ๊วจะพิจารณาเพียง 3 ประการที่สำคัญ คือ

2.5.1 <u>การผลิตกรดแลคติค</u>

กรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลาย lactonitrile ในทางเคมี แต่ในขณะเดียวกันก็สามารถผลิตได้จากกระบวนการเมตาบอลิสมของจุลินทรีย์ประเภท <u>Lactobacillus</u> โดยมีกลูโคสเป็นสับสเตรต Tipayang และ Kozaki (1982) ตรึงรูปเซลล์ของ <u>Lactobacillus vaccinostercus</u> Kozaki and Okada sp. nov. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์สร้างกรดแลคติคสายพันธุ์ใหม่ โดยมีเจลแคลเซียมอัลจิเนตเป็นตัวห่อหุ้ม เตรียมขึ้นจากสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) ร้อยละ 1 ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 3 เมื่อหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 จะได้

เม็ดเจล (gel bead) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร จากการศึกษาผลความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตต่อจำนวนเซลล์ที่หลุดออกจากเม็ดเจล พบว่าเมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้นร้อยละ 3 ไม่มีเซลล์หลุดออกมาปะปนในตัวกลางที่ใช้ทำปฏิกิริยา (reaction medium) ซึ่งประกอบด้วย xylose ร้อยละ 2 เปปโตน ร้อยละ 1 และยีสต์สกัด ร้อยละ 0.5 ส่วนความเข้มข้นของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 2-3 เพราะทำให้เม็ดเจลมีเสถียรภาพสูงสุด

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยน xylose เป็นกรดแลคติคระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ L. vaccinostercus ตรึงรูป ที่อุณหภูมิคงที่ 30 องศาเซลเซียส โดยการนำเซลล์ตรึงรูปออกจากตัวกลางที่ใช้ทำปฏิกิริยา พบว่าปฏิกิริยาหยุดชะงักลง แต่เมื่อใส่เซลล์ตรึงรูปกลับลงไปใหม่กรดแลคติคจะถูกสร้างขึ้นอีกครั้ง แสดงให้เห็นว่า เซลล์ถูกตรึงรูปไว้ภายในเม็ดเจลอย่างสมบูรณ์ตลอดระยะเวลาการศึกษา ปริมาณกรดแลคติคที่เซลล์ตรึงรูปผลิตขึ้นและจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในเม็ดเจลเพิ่มขึ้นในลักษณะที่คล้ายๆกัน สำหรับเซลล์อิสระ ปริมาณกรดแลคติคที่สร้างขึ้นจะลดลงในวันที่ 4 เช่นเดียวกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์จะมีชีวิตอยู่ต่ำกว่า 10 วัน ในขณะที่เซลล์ตรึงรูปสามารถมีชีวิตอยู่ในเม็ดเจลภายใต้ภาวะที่ไม่เหมาะสมได้นานกว่า 30 วัน ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการดำรงชีวิตของเซลล์จะยาวนานขึ้นถ้าเซลล์อยู่ในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนต

ข้อได้เปรียบของการห่อหุ้มเซลล์ของ L. vaccinostercus ในเจลแคลเซียมอัลจิเนตคือ ตัวกลางที่ใช้ทำปฏิกิริยาจะไม่มีเซลล์ปนเปื้อน เซลล์สามารถคงความมีชีวิตได้นานขึ้นเมื่ออยู่ภายในเม็ดเจล และเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้หมักเพื่อเกิดกรดแลคติค สำหรับการมีอิออนของแคลเซียมอยู่ในโครงข่ายเจล (gel matrix) ของเซลล์ตรึงรูป ไม่เพียงจะช่วยคงความแข็งแรงของเม็ดเจลเท่านั้น หากยังช่วยลดอิทธิพลอันเนื่องมาจากความเข้มข้นของ lactate ที่เพิ่มขึ้นในตัวกลางที่ใช้ทำปฏิกิริยา ซึ่งไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ นอกจากนั้น การใช้เซลล์ตรึงรูปเพื่อผลิตกรดแลคติคมีข้อดีกว่าการใช้เซลล์อิสระ คือ ประหยัดและผลิตกรดแลคติคได้มากกว่า

2.5.2 การผลิตเอธานอล

เมื่ออยู่ในสภาพไร้อากาศกระบวนการเมตาบอลิสมของยีสต์ส่วนใหญ่จะผลิตเอธานอลจากกลูโคส การผลิตเอธานอลอย่างต่อเนื่องโดยการหมักกลูโคสของยีสต์ เป็นวิธีที่ให้ผลดีต่อคุณภาพและปริมาณของเอธานอล แต่เมื่อความเข้มข้นของเอธานอลสูงขึ้น เซลล์ยีสต์อิสระที่มีชีวิตกลับมีจำนวนลดลง ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขโดยการตรึงรูปเซลล์ยีสต์นั้น Kierstan และ Bucke (1977) ศึกษาความสามารถในการผลิตเอธานอลของเซลล์ยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ที่ถูกห่อหุ้มไว้ภายในเจลแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งเตรียมขึ้นจากเซลล์ยีสต์เปียก 5 กรัม นำมากระจายตัวในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (molar) จากการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของเซลล์ยีสต์ตรึงรูปต่อการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอธานอล มีค่าสูงสุดที่ร้อยละ 90 ของผลผลิตที่มีค่าสูงสุดทางทฤษฎี (theoretical maximum yield) คือร้อยละ 100 ส่วนประสิทธิภาพต่ำสุด คือ ร้อยละ 65 นอกจากนั้นเซลล์ยีสต์ตรึงรูปยังสามารถผลิตเอธานอลในปริมาณที่มีนัยสำคัญได้นานมากกว่า 10 วัน และมีอายุครึ่งชีวิต 250 ชั่วโมง

2.5.3 การผลิตน้ำซีอิ๊ว

Osaki และคณะ (1985) ได้ตรึงรูปเซลล์ของจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ Pediococcus halophilus IAM 1693, Saccharomyces rouxii ATCC 13356 และ Torulopsis versatilis ATCC 20191 ด้วยวิธีห่อหุ้มในเจลของแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งเป็นทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร จากนั้นนำเซลล์ตรึงรูปแต่ละชนิดไปบรรจุในเครื่องปฏิกรณ์ เพื่อให้เหมาะสมกับกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่อง การหมักน้ำซีอิ๊วเริ่มต้นด้วยการใส่สารละลายป้อนเครื่องปฏิกรณ์ (feed solution) ซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 13 และมีไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 2.1 สารละลายดังกล่าวถูกป้อนผ่านเครื่องปฏิกรณ์ที่บรรจุเซลล์ตรึงรูปของ P. halophilus ก่อนจะถูกแยกเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อให้เกิดเป็นแอลกอฮอล์ในเครื่องปฏิกรณ์ซึ่งบรรจุเซลล์ยีสต์ตรึงรูป เครื่องปฏิกรณ์ดังกล่าวถูกตั้งขนานกันเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของสารประกอบให้กลิ่น (aroma compound) ที่ถูกสร้างโดยยีสต์ทั้ง 2 ชนิด

จากการวิเคราะห์ของเหลวที่ออกมาจากเครื่องปฏิกรณ์แต่ละเครื่อง บ่งชี้ว่ากระบวนการหมัก ซึ่งมีสมดุลระหว่างกรดแลคติคและเอธานอลจะแล้วเสร็จภายใน 10 สัปดาห์ และมีความแตกต่างในด้านปริมาณของกรดอินทรีย์และสารประกอบให้กลิ่น

Hamada, Ishiyama และ Motai (1989) หมักน้ำซีอิ๊วในช่วงการเกิดแอลกอฮอล์ด้วยการห่อหุ้มเซลล์ Zygosaccharomyces rouxii no.13 ในเจลของแคลเซียมอัลจิเนต จากนั้นบรรจุเซลล์ตรึงรูปลงในเครื่องปฏิกรณ์แบบ airlift จำนวน 3 เครื่อง เมื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักอย่างต่อเนื่องเพื่อให้เกิดเอธานอล pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4.5-5.5 ส่วนความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ทำให้ผลผลิตเอธานอลสูงนั้น ต่ำกว่าร้อยละ 10 แต่เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จำเป็นต้องใช้โซเดียมคลอไรด์ที่เข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 10 อุณหภูมิการหมักที่เหมาะสม คือ 25-27.5 องศาเซลเซียส เมื่อเดินเครื่องปฏิกรณ์ติดต่อกันเป็นเวลา 50 วัน แล้ววัดปริมาณสารปรุงแต่งกลิ่นรส พบว่า น้ำซีอิ๊วจากเครื่องปฏิกรณ์ และน้ำซีอิ๊วที่ผ่านการหมักแบบดั้งเดิมให้ค่าที่ต่างกัน สำหรับการตรวจสอบสถานะของเซลล์ตรึงรูป Z. rouxii ในเม็ดเจลระหว่างการหมักด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่า ภายหลังการตรึงรูปเซลล์ผ่านไป 40 ชั่วโมงมีจำนวนเซลล์บนผิวของเม็ดเจลเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไป 7 วันจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตบนผิวเจลจะเพิ่มขึ้น

Horitsu, Maseda และ Kawai (1990) ศึกษาการผลิตน้ำซีอิ๊วในช่วงโมโรมิอย่างต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบคอลัมน์บรรจุเซลล์จุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ Zygosaccharomyces rouxii และ Candida versatilis ที่ผ่านการตรึงรูปด้วยวิธีดูดซับกับตัวพยุงเซรามิกส์ (ceramic carrier) ซึ่งประกอบด้วยอลูมินา (alumina) และซิลิกา (silica) โดยมีขนาดของรูพรุนเฉลี่ย 60 ไมครอน และมีความพรุน (porosity) ร้อยละ 90 ส่วนสารละลายสำหรับหมักเตรียมจากถั่วเหลืองนึ่ง และน้ำเกลือร้อยละ 10 จากนั้นนำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วนำสารละลายที่ได้ไปหมักโดยแบคทีเรียสร้างกรดแลคติค Pediococcus halophilus จากนั้นนำไปป้อนผ่านเครื่องปฏิกรณ์บรรจุเซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปของ Zygosaccharomyces rouxii และ Candida versatilis ตามลำดับ น้ำซีอิ๊วที่ผ่านการหมักโดยเครื่องปฏิกรณ์เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปดังกล่าว มีคุณภาพดีเช่นเดียวกับน้ำซีอิ๊วที่ผ่านการหมักแบบดั้งเดิม แต่ใช้เวลาในการหมักเพียง 8 วัน ซึ่งน้อยกว่าการหมักแบบดั้งเดิม

เพ็ญศิริ ศรีบุรี และปราณี อ่านเปรื่อง (2536) ทดลองหมักน้ำซีอิ๊วโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของ Lactobacillus delbrueckii TISTR 108 และ Zygosaccharomyces rouxii NRRL Y-2547 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของแบคทีเรียแลคติคผลิตกรดแลคติคได้ 0.98 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP (กลูโคส ร้อยละ 1 สารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 0.5 เปปโตน ร้อยละ 1) ในขณะที่เซลล์อิสระผลิตกรดแลคติคได้ 2.85 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กของยีสต์ผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 0.68 โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (กลูโคสร้อยละ 1 สารสกัดจากยีสต์ ร้อยละ 0.3 เปปโตน ร้อยละ 0.3) ซึ่งมากกว่าเซลล์อิสระที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 0.58 โดยปริมาตร

จากรายงานการวิจัยดังกล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นแนวทางในการนำเซลล์ตรึงรูปมาประยุกต์ใช้กับงานในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการผลิตน้ำซีอิ๊ว ซึ่งมีแนวโน้มจะช่วยลดระยะเวลาในการผลิตลงได้ แต่เนื่องจากงานวิจัยของ Osaki และคณะ และ Hamada และคณะ เป็นการศึกษาการหมักน้ำซีอิ๊วที่แยกกระบวนการหมักกรดแลคติค และกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ออกจากกัน จึงทำให้มีความสิ้นเปลืองสารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ในการผลิตเซลล์ตรึงรูป และการสร้างเครื่องปฏิกรณ์ ดังนั้นงานวิจัยที่ดำเนินอยู่นี้จึงศึกษาการตรึงรูปร่วมกันระหว่างเซลล์จุลินทรีย์สองชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักน้ำซีอิ๊ว คือ Lactobacillus delbrueckii และ Saccharomyces rouxii ด้วยวิธีห่อหุ้มไว้ในช่องตาข่าย โดยใช้โพลีเมอร์ธรรมชาติ คือ แคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เพราะอัลจิเนตเป็นสารที่สกัดจากสาหร่ายทะเล จากนั้นจึงใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปร่วมกันร่วมกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ packed bed เพื่อใช้ผลิตน้ำซีอิ๊วอย่างต่อเนื่อง