หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ระบบการหมักในอาหารแข็ง (solid state fermentation)

1.1.1 ความหมายของระบบการหมักในอาหารแข็ง (solid state fermatation)

ได้มีผู้ให้คำจำกัดความไว้อย่างกว้างขวาง แต่มีความหมายตรงกันในแง่ที่ว่าการหมักในอาหารแข็งหมายถึงการเจริญของจุลินทรีย์บนวัตถุดิบหรืออาหารที่อยู่ในสภาวะของของแข็งไม่ใช่ของเหลว และอาหารแข็งนั้นไม่ได้แขวนลอยอยู่ในของเหลว (Ralph, 1976; Hesseltine, 1972; Cannel & Moo Young, 1980) ดังนั้นระบบการหมักนี้จึงไม่รวมถึงการหมักอาหารแข็งในอาหารเหลวหรือการหมักในรูปของเหลวข้น (slurry) ในระบบการหมักในอาหารแข็งน้ำเป็นปัจจัยที่สำคัญโดยจะอยู่ในรูปของความชื้นและซึมอยู่ในวัตถุดิบที่ใช้ ปริมาณความชื้นหรือน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ (available water) จึงค่อนข้างต่ำ ทำให้ไม่เหมาะที่จะใช้หมักด้วยแบคทีเรียหรือยีสต์ ส่วนใหญ่จะเหมาะสมกับการใช้เชื้อรา (Hesseltine, 1977) และอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ก็จะใช้เชื้อราในการหมักในอาหารแข็ง

1.1.2 การแบ่งประเภทของระบบการหมักในอาหารแข็ง แบ่งได้ 2 วิธีคือ

1.1.2.1 การแบ่งประเภทตามหน้าที่ของของแข็งในอาหาร Ralph (1976) แบ่งระบบการหมักในอาหารแข็งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1.1.2.1.1. ระบบการหมักในอาหารแข็งซึ่งอนุภาคของแข็งทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารหลักสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ ระบบการหมักนี้จะประกอบด้วยจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิดทำหน้าที่ร่วมกัน เปลี่ยนอาหารแข็งให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ในลักษณะที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน และแหล่งอาหารเสริมอื่น ๆ ตัวอย่างได้แก่ การผลิตอาหารหมักพื้นเมืองเพื่อประโยชน์ในการถนอมอาหารและปรับปรุงรสชาดของอาหาร ใช้ในการเตรียมสปอร์ของเชื้อราและผลิตภัณฑ์จากเชื้อรา เช่น กรดอินทรีย์ ยาปฏิชีวนะ สารพิษ (mycotoxin) นอกจากนี้ยังใช้ในการเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

1.1.2.1.2 ระบบการหมักในอาหารแข็งซึ่งตัวของแข็งในระบบไม่ได้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ แต่จะทำหน้าที่เป็นที่รวมของสารอาหารที่ผิวของของแข็ง และเป็นที่เกาะของจุลินทรีย์ที่จะใช้สารอาหารที่ผิวของของแข็ง ตัวอย่างของระบบการหมักในอาหารแข็งประเภทนี้ได้แก่ การผลิตสารพิษ T-2 toxin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไทรโคธีซีน (trichothecene) ซึ่งประสบปัญหาในการผลิตในอาหารแข็งจะให้ผลผลิตสูง แต่ทำให้บริสุทธิ์ยาก ส่วนการผลิตในอาหารเหลวจะทำให้บริสุทธิ์ง่ายกว่า แต่ได้ผลผลิตต่ำกว่าการหมักในอาหารแข็ง ปัจจุบันใช้เทคนิคใหม่เพื่อแก้ปัญหานี้คือ การหมัก Fusarium tricinctum T-340 บนเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) ที่ดูดซับอาหารเหลว (Cullen, Smalley & Caldwell, 1982)

นอกจากนี้ Larroche, Des farges และ Gros (1986) ยังรายงานถึงเทคนิคการใช้วัสดุแข็งพรุน เช่น pozolano ที่ดูดซับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในการเพาะเลี้ยง Penicillium rogueforti ในคอลัมน์ขนาดเล็ก (fixed-bed fermenter) เพื่อเตรียมสปอร์ที่มีการปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย ได้ปริมาณมากกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว และลดปัญหาในการแยกสปอร์ออกจากชั้นหมักเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง

1.1.2.2 การแบ่งประเภทตามการเคลื่อนที่ของชั้นหมัก Nagai (1979) แบ่งระบบการหมักในอาหารแข็งเป็น 2 แบบคือ

1.1.2.2.1 ระบบการหมักซึ่งชั้นหมักเคลื่อนที่ (dynamic fermentation) จะมีการพลิกกลับหรือกวนชั้นหมักตลอดเวลา มีข้อดีคือมีการถ่ายเทออกซิเจนอย่างสม่ำเสมอ และทั่วถึงตลอดชั้นหมัก อีกทั้งยังสามารถระบายความร้อนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากชั้นหมัก ในขณะที่มีข้อเสียคือทำให้เส้นใยของเชื้อราขาดและยับยั้งการเจริญเติบโตในที่สุด (Silman, 1980) ตัวอย่างของการหมักประเภทนี้ได้แก่ การผลิตโคจิ (Koji) ในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้เครื่องหมักแบบถังหมุน (rotary drum system) (Numokawa, 1972)

1.1.2.2.2 ระบบการหมักซึ่งชั้นหมักอยู่กับที่ (static fermentation) สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น

1.1.2.2.2.1 ระบบไม่มีการจ่ายอากาศให้กับชั้นหมักทำโดยบรรจุอาหารแข็งในถาดหรือภาชนะอื่น ๆ เติมเชื้อเริ่มต้นในรูปของสปอร์ ปล่อยให้

เกิดการหมักโดยไม่ต้องควบคุมมาก ทำให้ระบบการหมักแบบนี้เรียบง่ายและสามารถที่จะทำการหมักได้ในพื้นที่ชนบทของประเภทที่กำลังพัฒนา เนื่องจากไม่ต้องใช้เทคโนโลยีสูงมาก ตัวอย่าง เช่น อาหารหมักพื้นเมือง (traditional fermented food) (Stanton & Wallbridge, 1969)

1.1.2.2.2.2. ระบบที่มีการจ่ายอากาศให้กับชั้นหมัก ระบบนี้เป็นระบบการหมักซึ่งชั้นหมักไม่เคลื่อนที่ แต่มีการจ่ายอากาศให้ชั้นหมักเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการระบายความร้อน และคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ออกไปจากชั้นหมัก ยังผลให้ประสิทธิภาพของกระบวนการหมักสูงขึ้น ตัวอย่างได้แก่ กระบวนการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้เทคนิคของการผลิตโคจิ (Cannel & Moo Young, 1980)

1.1.3 <u>ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อระบบการหมักในอาหารแข็ง</u>

การที่จุลินทรีย์จะสามารถเจริญเติบโตเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์หรือย่อยสารอินทรีย์ในอาหารแข็งได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น จะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพของระบบ ซึ่งจำเป็นต้องควบคุมปัจจัยเหล่านี้ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมทั้งก่อนที่จะดำเนินการหมัก และในระหว่างที่การหมักดำเนินอยู่ ซึ่งปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญได้แก่

1.1.3.1 ความชื้นเริ่มต้นของวัตถุดิบที่จะทำการหมัก จะต้องอยู่ในระดับต่ำ เพื่อทำให้ชั้นหมักมีความพรุน (porosity) มากพอที่จะทำให้การถ่ายเทมวล และความร้อนดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังจะช่วยลดการปนเปื้อนจากยีสต์และแบคทีเรียซึ่งต้องการความชื้นเริ่มต้นสำหรับการเจริญสูง (Pirt, 1975) แต่อย่างไรก็ตามถ้าความชื้นเริ่มต้นต่ำเกินไปจะยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งนี้เนื่องจากมี water tension สูง และอัตราการพองตัวของวัตถุดิบต่ำ (Zadrazil & Brunnert, 1981) นอกจากนี้ยังทำให้กิจกรรมของเอนไซม์และการถ่ายเทมวลของสารอาหารไปยังจุลินทรีย์ดำเนินไปอย่างไม่มีประสิทธิภาพ (Laukevics, Apsite & Viesturs, 1984)

1.1.3.2 ขนาด รูปร่าง และความชื้นเริ่มต้นของวัตถุดิบจะต้องมีความสัมพันธ์กันในลักษณะที่ทำให้ชั้นหมักมีความพรุนสูงพอ

1.1.3.3 วัตถุดิบมีสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อหน่วยปริมาตรสูงพอที่จะไม่เกาะติดกันจนทำให้ชั้นหมักทึบ ในขณะที่ปรับความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมแก่ชั้นหมัก (Hesseltine, 1972)

1.1.3.4 วัตถุดิบควรอยู่ในรูปแบบที่พร้อมที่จะทำให้เชื้อเริ่มต้นแทรกซึมเข้าไปใช้ประโยชน์ได้

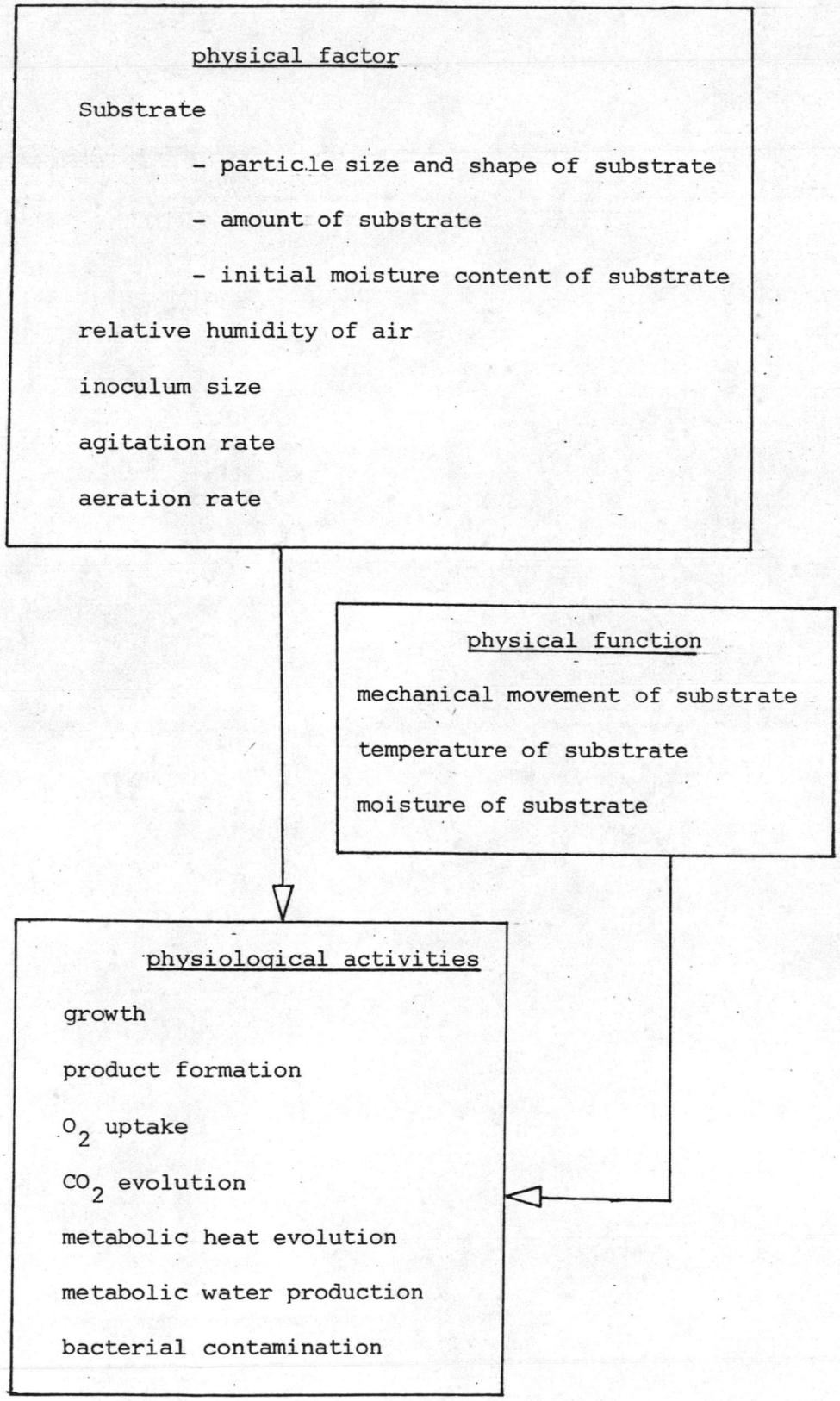
1.1.3.5 ปริมาณของวัตถุดิบที่จะทำการหมัก และความสูงของชั้นหมักจะต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการไหลเวียนของอากาศ

ส่วนปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ เช่น ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ อุณหภูมิ ปริมาณของอากาศที่จ่ายให้กับชั้นหมัก ปริมาณเชื้อเริ่มต้นนั้นเป็นปัจจัยที่จะต้องควบคุมในระหว่างการหมัก (control variable) โดยปัจจัยทางกายภาพต่าง ๆ ดังกล่าวจะมีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในการหมักในระบบอาหารแข็ง ดังแสดงในรูปที่ 1.1

1.1.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักในระบบอาหารแข็ง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักในระบบอาหารแข็งนั้นมีหลายชนิดด้วยกันได้แก่ ราสีสต์ และแบคทีเรีย การใช้สายพันธุ์ที่เหมาะสมต้องคำนึงถึงลักษณะการเจริญในอาหารที่มีส่วนประกอบง่าย ๆ มีความต้องการวิตะมินหรือสารเร่งการเจริญ (growth factor) ต่าง ๆ น้อยหรือไม่ต้องการเลย คงลักษณะทางพันธุกรรมได้ดีไม่กลายพันธุ์ง่ายเมื่อเลี้ยงติดต่อกันเป็นเวลานาน มีความต้านทานต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ทราบคุณสมบัติทางพันธุกรรมและสรีรวิทยา สามารถปรับปรุงทางด้านพันธุกรรมได้ สามารถใช้แหล่งพลังงานอย่างมีประสิทธิภาพ หลังจากผ่านกระบวนการหมักแล้วมีวัสดุเหลือทิ้งน้อยหรือไม่มีเลย ไม่เป็นพิษ และเกิดอาการภูมิแพ้ ให้ปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตสูง และสามารถเก็บรักษาได้ง่าย (Bhattacharjee, 1970)

รามีศักยภาพและความเหมาะสมในการหมักในอาหารแข็งมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากเจริญได้ดีบนผิวของแข็งและในสภาวะที่มีความชื้นต่ำ แต่ก็มีแบคทีเรียและยีสต์บางชนิดที่ใช้ในการหมักในอาหารแข็ง ดังแสดงในตารางที่ 1.1



รูปที่ 1.1 อิทธิพลของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อระบบการหมักในอาหารแข็ง

(Nagai, 1979)

ตารางที่ 1.1 จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ในการผลิตระบบอาหารแข็ง

	จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
รา	พวก Basidiomycetes		
	Trichoderma reesei	เพิ่มโปรตีนในฟางข้าวสาลีเป็นอาหารสัตว์	Laukevic, Apsite & Viesturs, 1984
	Sporotrichum pulverulentum	"	Prendergast, Booth & Colleran, 1982
	Chaetomium cellulolyticum	"	Rosen & Schugerl, 1982
	พวก Ascomycetes		
	Penicillium roqueforti	roquefort cheese	Miall, 1975
	P. camemberti	camembert cheese	Miall, 1975
	P. caseicolum	camembert cheese	Miall, 1975
	Aspergillus oryzae	โคจิและเอนไซม์อะมิเลส	Prescott & Dunn, 1949
	A. niger	โคจิและเอนไซม์อะมิเลส	Prescott & Dunn, 1949
	A. niger	กรดซิตริค	Hisanaga & Nakamura, 1975
	A. niger	เพิ่มโปรตีนให้กล้วยหอมใช้เป็นอาหารสัตว์	Baldensperger, Lemar, Hannibal, Quinto, 1985
	พวก Phycomycetes		
	Rhizopus oligosporus	เทมเป	Beauchat, 1976
	Neurospora sitophila	ontjom	Beauchat, 1976
	R. chinensis	lao-chao	Wang & Hesseltine, 1970
	Monascus purpureus	ang-kak	Miall, 1975
	Trichoderma harziaum	เพิ่มโปรตีนในมันสำปะหลัง	Muindi & Hanssen, 1981

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

	จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
ยีสต์	Candida utilis ร่วมกับรา Sporotrichum pulverulentum	เพิ่มโปรตีนในฟางข้าวสาลีเป็นอาหารสัตว์	Ulmer, 1982
	Candida utilis	เพิ่มโปรตีนใน ryegrass straw เป็นอาหารสัตว์	Aidoo et al., 1982
แบคทีเรีย	Corynbacterium sp. ร่วมกับรา Geotrichum sp.	gari (มันสำปะหลังหมัก)	Akinrele, 1964
	acid producing bacteria thermophillic bacteria และ thermophillic fungi	ปุ๋ยหมัก	Gray, 1971
	Lactobacillus bulgaricus	ensiling (หญ้าแห้งหมักเป็นอาหารสัตว์)	Prescott & Dunn, 1949
	Eerwinia carotovera ร่วมกับรา Pleurotus ostereatus	หมักฟางเป็นอาหารสัตว์	Streeter, Conway, Horn & Moder, 1982

1.1.5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักในอาหารแข็ง

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักในระบบอาหารแข็ง จำแนกออกได้เป็น 5 ประเภทใหญ่คือ ชีวมวล (biomass) เอนไซม์ (enzyme) กรดอินทรีย์ (organic acid) สารอินทรีย์บางประเภทที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น (secondary metabolite) เช่น สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) และอาหารหมักพื้นเมือง (traditional fermented food)

ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักที่เป็นชีวมวล พบว่ามีการใช้เทคนิคของกระบวนการหมักแบบนี้ในการเพิ่มคุณค่าทางอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนให้แก่พืชผลทางการเกษตรต่าง ๆ ตัวอย่างได้แก่ การหมัก A. niger เพื่อเพิ่มโปรตีนให้กับมันสำปะหลังได้โปรตีนสูงถึง 20% โดยอัตราการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นโปรตีนมีค่าประมาณ 20-25% (Raimbault & Alazard, 1980) การหมัก Chaetomium cellulolyticum เพื่อเพิ่มโปรตีนให้กับซังข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยด่าง พบว่าได้โปรตีนซึ่ง มีค่าประมาณ 20-24% (Chahal & Moo-Young, 1981) ในการเพิ่มปริมาณโปรตีนให้กับกากเส้นใยของมูลโค (cow manure fibre) โดยใช้เชื้อ Chaetomium cellulolyticum พบว่าได้ปริมาณโปรตีน 11-12% (Ulmer, Tengerdy & Murphy, 1981) ในการเพิ่มโปรตีนให้กับฟางข้าวสาลี โดยใช้ Coprinus cinereus ได้โปรตีน 12% (Zadrazil, 1977) ในการหมักผักแครอบ (Carob pod) โดยใช้ Rhizopus oligosporus และ Monascus ruber เพื่อลดปริมาณลิกนิน (lignin) ซึ่งยับยั้งการเจริญของสัตว์และเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีน (Kokke, 1971) การหมักเพื่อเพิ่มโปรตีนในกากหัวผักกาดหวานจากโรงงานน้ำตาล โดยใช้ Trichoderma album ได้โปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 18-20% ผลผลิตที่ได้ย่อยง่าย และมีปริมาณกรดอะมิโนที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงสัตว์ (Durand, Arnoux, Teilhard de Chardine, Chereau, Boquien & Larios de Andra, 1983) ในการเพาะเห็ดบนกองวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเช่นฟางนั้น เมื่อเชื้อเห็ดกำลังเจริญเส้นใยที่อยู่ภายในกองวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจะเปลี่ยนสารประกอบลิคโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นดอกเห็ดซึ่งมีคุณค่าทางอาหารต่อการบริโภคของมนุษย์ ในขณะเดียวกันเส้นใยส่วนที่แทรกอยู่ภายในกองวัสดุเพาะเห็ดนั้นจะมีโปรตีนสูง และสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ (Zadrazil, 1977)

1.1.6 การหมักมันสำปะหลังเพื่อเพิ่มโปรตีนโดยใช้ระบบการหมักในอาหารแข็ง

การหมักมันสำปะหลังโดยใช้เทคนิคการหมักในอาหารแข็งนอกจากจะเพิ่มโปรตีนในมันสำปะหลังแล้วยังจะช่วยลดสารพิษของมันสำปะหลังได้อีกด้วย Stanton & Wallbridge (1972) ใช้ R. stolonifer หรือ R. oligosporus หรือ R. oryzae หมักในมันสำปะหลังบดที่เติมแหล่งไนโตรเจนในรูปของเกลือแอมโมเนีย หรือยูเรียและถั่วบดเติมน้ำนวดผสมเป็นโด (dough) แล้วนำเป็นชิ้นรูปเป็นแท่งสั้น, เม็ดกลม หรือรีดเป็นแผ่นบาง ๆ ใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปสปอร์ 5×10^8 สปอร์/กิโลกรัมมันสำปะหลัง ความชื้นเริ่มต้นของอาหาร 45±3% หมักในถาดหมักอุณหภูมิ 20-37 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศประมาณ 95% การหมักใช้เวลา 45-80 ชั่วโมง สามารถเพิ่มโปรตีนจาก 0.01% เป็น 3-4%

Raimbault และคณะ (1977) รายงานการหมักมันสำปะหลังระบบอาหารแข็งในเครื่องผสมแป้งขนมปัง (trade-bread making blender) โดยใช้ชิ้นมันขนาดเล็ก ความชื้นเริ่มต้น 60% หมักที่อุณหภูมิ 35-40 °ซ จ่ายอากาศชื้นให้แก่ชั้นหมักอย่างต่อเนื่องผ่านทางด้านล่างของถังหมัก ใช้เวลา 30 ชั่วโมง ได้มันหมักมีปริมาณโปรตีน (true protein) ประมาณ 18% คาร์โบไฮเดรต 28% สามารถนำไปใช้ทำอาหารสัตว์ได้

Senez และคณะ (1982) หมักมันสำปะหลังโดยใช้ A. hennebergii ในเครื่องนวดแป้ง (commercial bakery kneader) ซึ่งปรับปรุงให้ควบคุมอุณหภูมิของชั้นหมักที่ 37 °ซ การเตรียมวัตถุดิบใช้ผงแป้งนึ่งในถังหมักด้วยไอน้ำผสมสารละลายธาตุอาหารและสปอร์ของเชื้อราเมื่อเย็นแล้วปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 65% และ pH ของอาหารเท่ากับ 4.5 หลังจากนั้นผสมโดยอาศัยการทำงานของถังหมัก ทำให้วัตถุดิบจับกันเป็นเม็ดเล็กขนาด 1-2 มิลลิเมตร หมักเป็นเวลา 24-26 ชั่วโมง โดยจ่ายอากาศแก่ชั้นหมักเป็นช่วง ๆ พบว่าจะได้มันหมักที่มีโปรตีน 20% และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเหลืออยู่ 25-30%

Smith และคณะ (1986) ใช้เชื้อรา Sporotrichum puliverulentum หมักมันสำปะหลังโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 67% และ pH ของอาหารเท่ากับ 6 จากนั้นหมักในถาดหมักในตู้ควบคุมการหมัก (laboratory scale solid state tray fermenter) ที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 2 วัน ได้มันหมักที่มีโปรตีน 30.4% และเมื่อหมักในคอลัมน์ (small column fermenter) โดยปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเป็น 54% และให้อากาศชื้นในอัตรา 4-6 ลิตรต่อชั่วโมง ได้มันหมักที่มีโปรตีน 14.9% ในเวลา 4.3 วัน

Ramos-Valdivia และคณะ (1983) ศึกษาการหมัก R. oligosporus NRRL 2710 เพื่อเพิ่มโปรตีนให้กับมันสำปะหลังในระบบอาหารแข็ง ทั้งในลักษณะที่เป็นคอลัมน์ขนาดเล็ก (packed column) ที่มีการจ่ายอากาศขึ้น และในลักษณะถาด โดยใช้หัวมันสำปะหลังนึ่งตากให้แห้งและบดเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาผสมกับแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ และยูเรีย (urea) ปริมาณความชื้นเริ่มต้น 60% ทำการเติมสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อกรัม หมักที่อุณหภูมิ 37 °ซ ผลการหมักพบว่าการหมักในคอลัมน์ขนาดเล็ก (packed column) ได้ค่าโปรตีน 22.8% ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่การหมักในถาดหมัก (tray) จะได้ค่าโปรตีน 16.8% ในเวลา 84 ชั่วโมง สรุปได้ว่าสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนให้กับมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

1.2 <u>การออกแบบระบบการหมักในอาหารแข็ง</u>

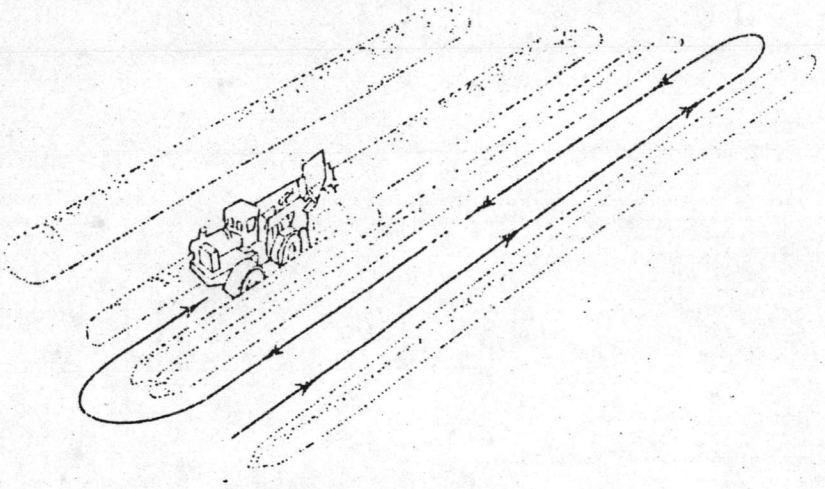
ในการที่จะให้ระบบการหมักในอาหารแข็งดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดมีปัจจัยต่าง ๆ ที่จะต้องพิจารณาคือ

1.2.1 <u>เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับอาหารแข็ง</u> (reactor)

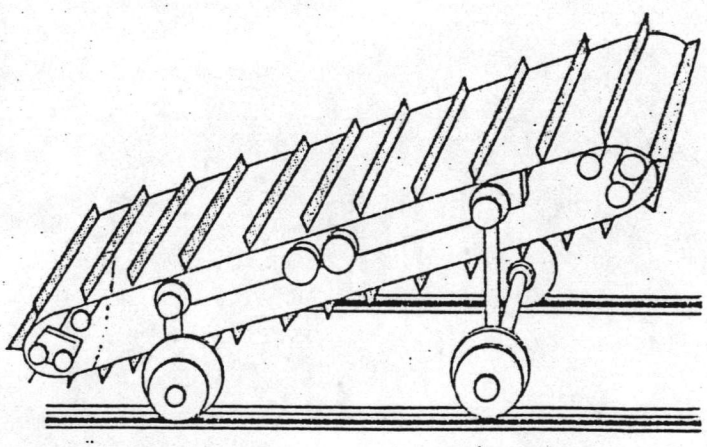
เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีใช้อยู่พอจะสรุปได้ว่า มีทั้งหมด 6 ชนิดด้วยกัน (Cannel and Moo-Young, 1980) คือ

1.2.1.1 Windrow เป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยหมักโดยกระบวนการที่เรียกว่า windrow process ซึ่งวัตถุดิบจะถูกกองเป็นแถวยาวกว้างประมาณ 3 ม. สูงประมาณ 2 ม. จะมีการให้อากาศแก่กองของวัตถุดิบระหว่างการหมักทุก ๆ 2 วัน โดยใช้แรงคนหรือเครื่องจักรที่ออกแบบเฉพาะ พลิกด้านล่างของวัตถุดิบให้ตั้งขึ้นเป็นแถวใหม่ ขนานกับแถวเดิม (Golueke, 1960) ดังแสดงรูปที่ 1.2 นอกจากนี้ยังใช้ถังปฏิกิริยาระบบนี้ในขบวนการ metro system ใช้กำจัดของเสียที่เป็นของแข็ง โดยมีการจ่ายอากาศและการผสมให้แก่ระบบอย่างต่อเนื่อง ในระบบจะประกอบด้วยถังยาว มีรางวางตลอดแนวยาวของพื้นถัง สำหรับให้รถที่มีสายพานลำเลียงเคลื่อนที่ไปตามความยาวของถัง ขณะที่รถเคลื่อนที่ไปสายพานจะตักของแข็งขึ้นมาและทิ้งไปข้างหลัง ทำให้เกิดการผสมและพลิกกลับของชั้นหมัก และในขณะเดียวกันจะมีการจ่ายอากาศให้แก่ชั้นหมักโดยผ่านพื้นถังที่มีลักษณะเป็นรูพรุน (Golueke, 1977) ดังแสดงในรูปที่ 1.3

1.2.1.2 bed with recycle conditioned air เป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตโคจิ (koji) ที่ควบคุมด้วยระบบอัตโนมัติภายในห้องหมักประกอบด้วยชั้น



รูปที่ 1.2 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ windrow (Golueke, 1960)



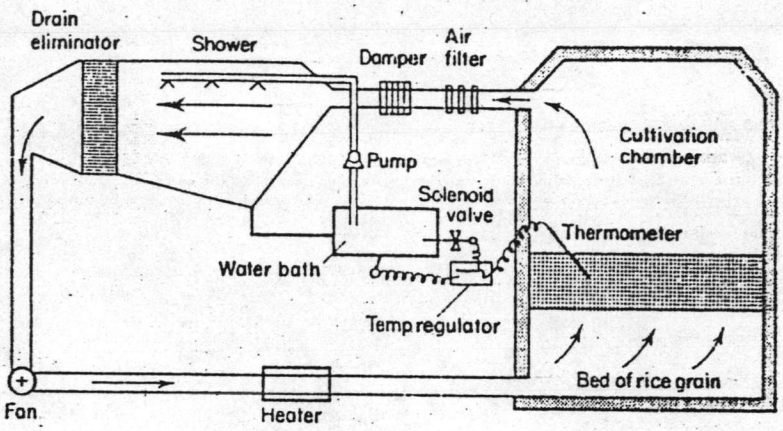
รูปที่ 1.3 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ windrow ในกระบวนการ metro system (Golueke, 1977)

หมัก (bed) ชั้นเดียวหรือหลายชั้นมีความหนาต่าง ๆ กัน การควบคุมสภาวะของชั้นหมักทำโดยการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นของอากาศก่อนจ่ายให้แก่ชั้นหมัก หลังจากนั้นอากาศจะถูกนำกลับไปปรับสภาวะใหม่ก่อนจะกลับเข้าสู่ห้องหมักต่อไป การจ่ายอากาศให้แก่ระบบมีหลายรูปแบบเช่น การจ่ายผ่านชั้นหมัก การจ่ายให้กับผิวหน้าของชั้นหมัก การจ่ายอากาศอย่างต่อเนื่องหรือการจ่ายเป็นเวลา (Nomukawa, 1972) เครื่องปฏิกรณ์ระบบนี้ดังแสดงในรูปที่ 1.4

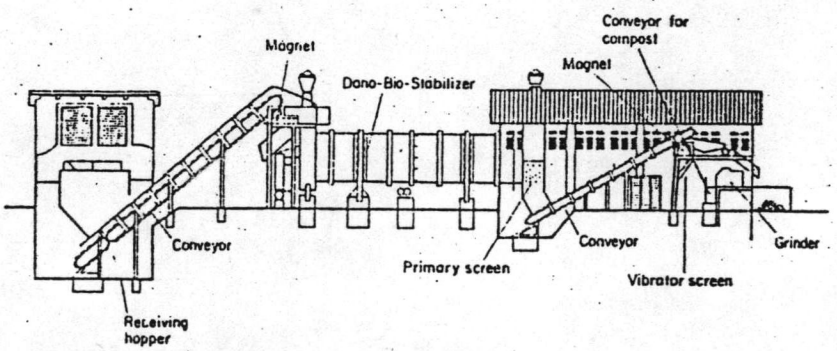
1.2.1.3 rotating drum เป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่หมุนรอบแนวแกน ทำให้เกิดการเคลื่อนที่และการพลิกกลับตลอดทั่วชั้นหมักโดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อช่วยในการถ่ายเทมวล โดยเฉพาะอย่างยิ่งออกซิเจนให้แก่ชั้นหมัก และเพื่อระบายความร้อนที่เกิดจากการเจริญของจุลินทรีย์ออกจากชั้นหมักอย่างทั่วถึง และทำให้ชั้นหมักมีสภาพเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) ตลอดเวลาของการหมักเครื่องปฏิกรณ์แบบนี้พบใน dano process โดยหมักวัตถุดิบในถังหมุน (rotating drum) มีการจ่ายอากาศแก่ชั้นหมักโดยการพลิกกลับพร้อม ๆ กับการอัดอากาศจากภายนอกให้แก่ถังหมุนเป็นเวลา 1-5 วัน หลังจากนั้นปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปภายนอกถังหมุนในลักษณะของ windrow อีก 14-30 วัน (Cannel & Moo-Young, 1980) รูปแบบของถังปฏิกิริยาแบบนี้แสดงในรูปที่ 1.5 และใช้หมัก ryegrass straw ซึ่งผ่านการย่อยแล้วกับ Candida utilis เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารก่อนนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ (Han & Anderson, 1975) นอกจากนี้ในการผลิต ochratoxin A โดยใช้ Aspergillus ochraceus ซึ่งเพาะเลี้ยงบนข้าวสาลีใช้ถังปฏิกิริยาแบบถังหมุนบัฟเฟิล (baffled rotary drum fermenter) เช่นกัน (Nagai, 1979)

1.2.1.4 tower digester เป็นเครื่องปฏิกรณ์ ที่ตัวถังเป็นหอสูง (tower digester) ประกอบด้วยชั้นที่รองรับวัตถุดิบที่จะทำการหมักมีตั้งแต่ 2-6 ชั้น ในขณะที่การหมักดำเนินไปนั้นวัตถุดิบจะถูกทำให้เคลื่อนที่ลงมาทีละชั้นจากชั้นบนลงมาจนถึงชั้นล่างสุด ซึ่งจะเป็นระยะเวลาที่การหมักดำเนินถึงขั้นสุดท้ายได้เป็นผลผลิตของการหมักออกมา ตัวอย่างของเครื่องปฏิกรณ์แบบนี้ได้แก่ Earp-Thomas tower digester (Spohn, 1977) ดังแสดงในรูปที่ 1.6

1.2.1.5 stirred tank เป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่พบในการหมักเพื่อเพิ่มโปรตีนให้กับมันสำปะหลัง (Raimbault et al., 1977; Senez et al., 1982) และกล้วยหอมคุณค่าต่ำ (Baldensperger et al., 1985) โดยถังปฏิกิริยาแบบนี้ออกแบบมาเพื่อแก้ปัญหา



รูปที่ 1.4 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ bed with recycle conditioned air ในการผลิตโคจิ (Numokawa, 1972)



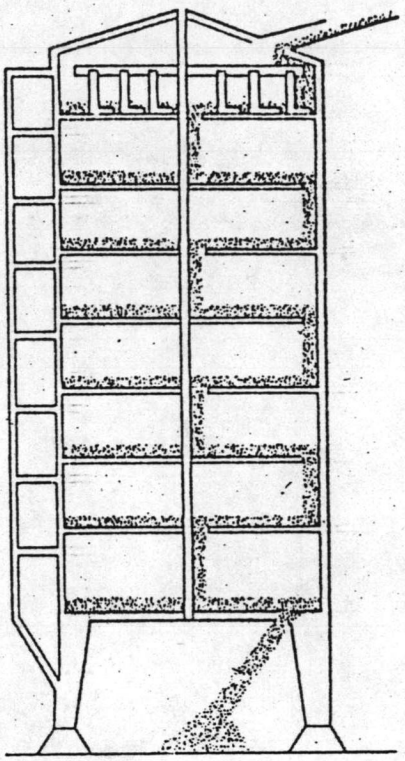
รูปที่ 1.5 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ rotating drum ในกระบวนการ dano process (Cannel & Moo-Young, 1980)

การถ่ายเทความร้อนโดยอาศัยการกวนชั้นหมักเพื่อระบายความร้อนโดยดัดแปลงมาจากเครื่องผสมแป้งขนมปัง (commercial bread-making blender) ซึ่งปรับปรุงให้จ่ายไอน้ำเพื่อนึ่งวัตถุดิบในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก และสามารถจ่ายอากาศให้ถังหมักโดยผ่านพื้นของถังหมัก ซึ่งเป็นรูพรุนในขณะทำการหมัก ภายในถังหมักจะมีใบกวนขับเคลื่อนด้วยมอเตอร์ติดตั้งอยู่ จะมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม (38 °ซ) โดยการกวนชั้นหมักเพื่อระบายความร้อนออกจากชั้นหมัก พร้อมกับพ่นน้ำให้กับชั้นหมักเพื่อลดอุณหภูมิให้ถึงตามที่กำหนดไว้ระบบการกวนจึงหยุดทำงาน นอกจากนี้ยังมีระบบควบคุม pH จะทำงานควบคู่ไปกับการกวนโดยหัววัด pH ซึ่งติดตั้งในชั้นหมักจะยกตัวขึ้นก่อนที่จะเริ่มกวน จากนั้นจะปรับ pH โดยการจ่ายสารละลายยูเรียออกมา ส่วนการจ่ายอากาศจะถูกควบคุมโดยระบบควบคุมอุณหภูมิให้มีการจ่ายอากาศให้กับชั้นหมักเฉพาะในช่วงที่ระบบกวนทำงานเช่นกัน ในชั้นสุดท้ายของการกวนแต่ละครั้งจะมีการอัดลมแรงดันสูงเข้าสู่รูพรุนทางตอนล่างของถังหมักเพื่อป้องกันการอุดตัน ลักษณะของถังปฏิกิริยาแบบ stirred tank แสดงไว้ในรูปที่ 1.7

นอกจากนี้เครื่องปฏิกรณ์แบบ stirred tank ยังทำเป็นถังกลม ซึ่งตรงกลางจะเป็นแกนที่หมุนได้ ส่วนบนของแกนหมุนจะมีแขนกวาด (horizontal rotating arm) ซึ่งประกอบด้วยแท่งเจาะ (auger) แขวนอยู่ตลอดความยาวของแขนกวาด วัตถุดิบจะถูกจ่ายเข้าบริเวณรอบ ๆ ถัง หลังจากนั้นจะเคลื่อนตัวเข้าสู่จุดศูนย์กลางของถังโดยการทำงานของแขนกวาดและแท่งเจาะก่อนที่จะออกจากถังไป ในขณะที่วัตถุดิบอยู่ภายในถังนั้นจะมีการจ่ายอากาศตลอดเวลา โดยผ่านทางพื้นล่างของถัง และผ่านออกตามรูพรุนของแท่งเจาะซึ่งกลวง ตัวอย่างของระบบถังปฏิกิริยานี้ได้แก่ Fairfield-Hardy system (shultze, 1965) ดังแสดงในรูปที่ 1.8

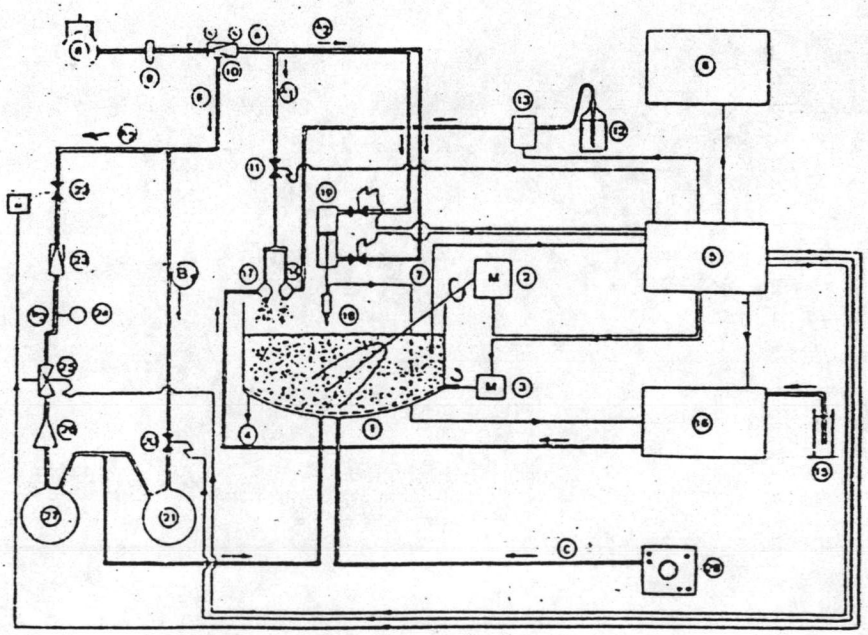
1.2.1.6 tray เครื่องปฏิกรณ์แบบนี้พบในการผลิตโคจิ กรดซิตริคและเอนไซม์เซลลูเลสในระดับอุตสาหกรรม (Cannel & Moo-Young, 1980) Pathak และ Ghose (1973) รายงานการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากรำข้าวโดยใช้ T. viride ในระดับอุตสาหกรรมมีกำลังผลิต 45 ตันต่อปี โดยอาศัยเทคนิคการหมักอาหารแข็งในถาดเช่นเดียวกับการผลิตโคจิ แต่ในการผลิตเซลลูเลสจะใช้ระบบอัตโนมัติควบคุมการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 1.9

ในการที่จะเลือกชนิดของเครื่องปฏิกรณ์นั้นมีปัจจัยต่าง ๆ ที่จะต้องพิจารณาดังนี้คือ วัตถุประสงค์และกำลังของการผลิต เมื่อเลือกระบบของเครื่องปฏิกรณ์แล้วควรจะได้มีการทดลอง



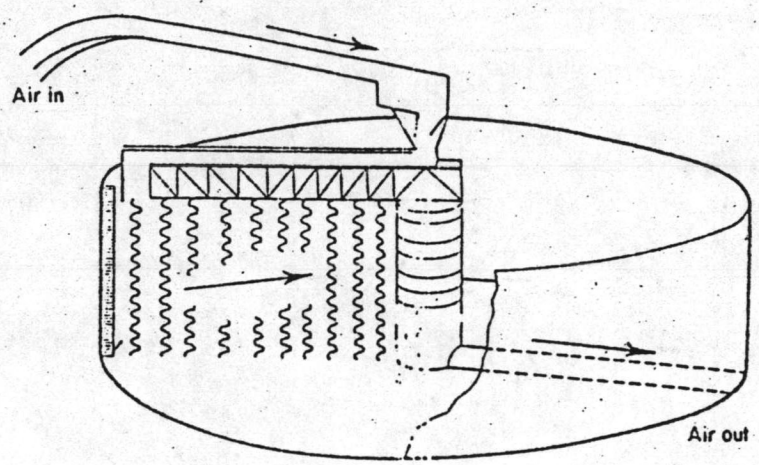
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1.6 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ tower digester ชนิด earp-Thomas tower digester (Spohn, 1965)

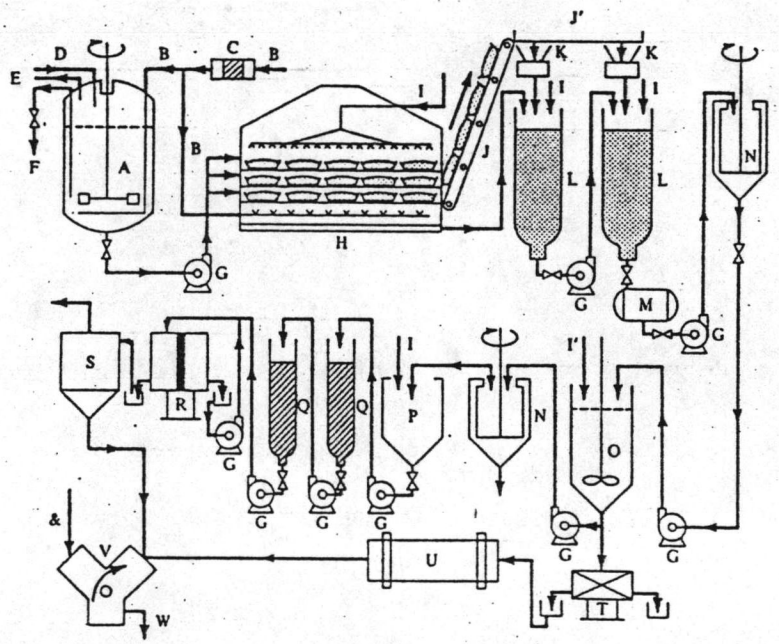


รูปที่ 1.7 เครื่องปฏิกิรณ์ชีวภาพแบบ stirred tank ในการหมักมันสำปะหลัง (Raimbault et al., 1977 และ Senez et al., 1982) และกล้วยหอมคุณภาพต่ำ (Baldensperger et al., 1985)

013060



รูปที่ 1.8 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ stirred tank ในระบบ Fairfield-Hardy system (Shultze, 1965)



รูปที่ 1.9 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ tray ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cannel & Moo-Young, 1980)

ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อทดสอบความเหมาะสมของเครื่องปฏิกรณ์ที่เลือกขึ้นมา และความเหมาะสมของจุลินทรีย์ที่จะทำการหมัก หลังจากนั้นควรจะประเมินความเป็นไปได้ในเชิงการค้าทั้งในแง่ของการลงทุนและค่าใช้จ่ายในระหว่างดำเนินการหมัก ประเมินถึงความจำเป็นในการควบคุม และความต้องการของระบบควบคุมสภาวะแวดล้อมของการหมัก ประเมินความต้องการของวัตถุดิบที่จะใช้ในการหมักเพื่อกำหนดขนาดของเครื่องปฏิกรณ์ที่จะสร้างขึ้นโดยอาศัยกำลังการผลิตเป็นเกณฑ์ พร้อมทั้งประเมินความต้องการของพลังงานต่าง ๆ ที่จะต้องใช้ระหว่างดำเนินการหมัก เช่น พลังงานสำหรับจ่ายอากาศให้กับชั้นหมัก พลังงานที่ใช้ในการกวนผสมหรือพลิกกลับชั้นหมัก เป็นต้น

1.2.2 <u>การเตรียมวัตถุดิบ</u> (media preparation)

การเตรียมวัตถุดิบในระบบอาหารแข็งนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อเปลี่ยนคุณสมบัติของวัตถุดิบให้อยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์จะย่อยและใช้ประโยชน์ได้ง่ายทั้งทางกายภาพและเคมี สำหรับคุณสมบัติทางด้านกายภาพนั้น ขนาดของวัตถุดิบต้องพอดี ถ้าเล็กเกินไปจะทำให้ชั้นหมักไม่มีความพรุนเพียงพอแก่การถ่ายเทมวลและความร้อนของชั้นหมัก แต่ถ้าใหญ่เกินไปทำให้ยากต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ และทำให้ประสิทธิภาพของการใช้วัตถุดิบต่ำ ส่วนการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีนั้นเกิดขึ้นจากการให้ความร้อน (cooking) เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบ และเปลี่ยนสภาพวัตถุดิบให้เหมาะสมที่จุลินทรีย์จะใช้ได้ เช่น การทำให้แป้งเกิดเจลาติไนซ์ (gelatinization) เมื่อหมักจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถย่อยแป้งดิบได้

1.2.3 <u>การเติมเชื้อเริ่มต้น</u>(culture inoculation)

การเติมจุลินทรีย์เข้าสู่ระบบก่อนเริ่มต้นการหมักจะใช้สปอร์ แต่ในบางครั้งอาจใช้เส้นใยที่งอกจากสปอร์มาแล้วประมาณ 8-12 ชั่วโมง เพื่อลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลง (Kronenberg & Hanaya,1984) ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (inoculum size) ที่ใช้ขึ้นกับขีดความสามารถของการเตรียมสปอร์เป็นหลักว่ากรรมวิธีที่ใช้มีประสิทธิภาพแค่ไหน นอกจากนี้ในการเติมเชื้อเริ่มต้นนั้นส่วนใหญ่จะใช้คู่กับการปรับความชื้นในขั้นสุดท้ายก่อนที่วัตถุดิบจะถูกเข้าสู่ห้องหมัก ซึ่งปริมาณความชื้นจะมีผลอย่างยิ่งต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และปริมาณผลิตภัณฑ์

1.3 การพัฒนาทางทฤษฎีในการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการหมักอาหารแข็ง

1.3.1 การถ่ายเทมวล (mass transfer)

การถ่ายเทมวลจะเกิดขึ้นทั้งในรูปของการถ่ายเทมวลระหว่างอนุภาค (interparticle mass transfer) และการถ่ายเทมวลภายในอนุภาค (intraparticle mass transfer) ในระบบอาหารแข็งนั้นการถ่ายเทมวลระหว่างอนุภาคที่มีความสำคัญมากคือการถ่ายเทมวลออกซิเจนให้แก่ตัวจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่ที่ผิวของแข็งนั้น ปัจจัยหลักคือ ช่องว่างระหว่างอนุภาคของวัตถุดิบ (void fraction) ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอนุภาคของแข็ง และปริมาณความชื้นของของแข็งนั้น ถ้าความชื้นของวัตถุดิบสูงเกินไปจะทำให้ช่องว่างระหว่างอนุภาคเล็กลง และปริมาณอากาศในช่องว่างจะลดลงตามไปด้วย ในทางตรงข้ามถ้าความชื้นของวัตถุดิบต่ำเกินไปจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลง

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งได้แก่ การผสม (mixing) และปริมาณอากาศที่ให้แก่ชั้นหมัก (aeration rate) ในกรณีที่ช่องว่างระหว่างอนุภาคมีขนาดใหญ่นั้นไม่จำเป็นต้องทำการผสมหรือจ่ายอากาศให้กับชั้นหมักอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีอากาศเพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในระยะเวลาหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตาม จากคุณสมบัติเฉพาะของระบบการหมักแบบอาหารแข็งนี้ ชั้นหมักไม่สม่ำเสมอและไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้การผสมหรือจ่ายอากาศจะกระทำอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้การถ่ายเทมวลออกซิเจนเข้าสู่ชั้นหมักดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพ และยังเป็นการระบายกาซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นออกไปอีกด้วย ทั้งนี้เพราะสัดส่วนของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ภายในชั้นหมักเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยพบว่าคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูงจะยับยั้งการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ แม้จะมีปริมาณออกซิเจนเพียงพอ การเจริญและการผลิตชีวมวลของ Chaetomium cellulolyticum ที่เจริญบนกากมูลสัตว์ (manure fiber) จะถูกยับยั้งเมื่อมีการสะสมของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นหมักปริมาณสูง (Ulmer, Tengerdy & Murphy, 1981; Bajracharya & Mudgett, 1980)

ส่วนการถ่ายเทมวลภายในอนุภาคจะเกี่ยวข้องกับการถ่ายเทสารอาหาร (nutrient) จากอนุภาคของวัตถุดิบไปยังจุลินทรีย์ ประสิทธิภาพการลำเลียงเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกนอกเซลเพื่อย่อยวัตถุดิบ และประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัตถุดิบ ถ้าวัตถุดิบอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ที่จะเข้าไปทำปฏิกิริยา เช่นที่ผิวมีรูพรุนจะทำให้การย่อยสลายดีกว่าวัตถุดิบที่มีความพรุนน้อย เพราะการย่อยจะเกิดขึ้นเฉพาะที่ผิวนอกเท่านั้น Suga, Van Dedem และ

Moo-Young (1975) พบว่าการถ่ายเทมวลของธาตุอาหารจะเกิดขึ้นได้ดีเมื่อเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนที่ผิวของอนุภาควัตถุดิบมีขนาดใหญ่ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่ค่าของเส้นผ่านศูนย์-กลางของรูพรุนค่าใดค่าหนึ่ง ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารอาหารจะลดลงเมื่ออนุภาคของวัตถุดิบมีขนาดใหญ่ขึ้น

Tasakorn, Yoshida และ Taguchi (1979) ได้เสนอสมการที่แสดงการถ่ายเทมวลผ่านผิวสัมผัสระหว่างชั้นของจุลินทรีย์และอากาศดังนี้

$$F = \frac{C_{A_o}}{C_{A_i}} = \exp\ k_s a_s . V_s / Q$$

เมื่อ F เป็นอัตราส่วนของความเข้มข้นของออกซิเจนที่ออก (C_{A_o}) กับความเข้มข้นของออกซิเจนที่เข้า (C_{A_i})

V_s เป็นปริมาตรของชั้นหมัก

Q เป็นอัตราการไหลของอากาศผ่านชั้นหมัก

$k_s a_s$ เป็นผลคูณระหว่างสัมประสิทธิ์ของอัตราการเกิดปฏิกิริยา และพื้นที่ผิวสัมผัส เรียกว่า "ความถี่ในการถ่ายเทมวล" ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของชั้นหมักและชนิดของจุลินทรีย์มีหน่วยเป็น หน่วย/วินาที

1.3.2 <u>การถ่ายเทความร้อน</u> (heat transfer)

ในการหมักระบบอาหารแข็งนั้น การถ่ายเทความร้อนเข้าหรือออกจากระบบมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการจ่ายอากาศให้กับชั้นหมัก เนื่องจากไม่มีการออกแบบติดตั้งอุปกรณ์ถ่ายเทความร้อนจากถังปฏิกิริยาเช่นในอาหารเหลว นอกจากนี้ระบบอาหารแข็งยังมีปริมาณน้ำต่ำ การถ่ายเทความร้อนออกจากชั้นหมักค่อนข้างลำบาก ในการหมักขนาดใหญ่ที่มีความร้อนเกิดขึ้นระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะในช่วงที่มีการเพิ่มจำนวนเซลเป็นทวีคูณ (log phase) เป็นปัญหาต่อการหมักในอาหารแข็ง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องลดอุณหภูมิระหว่างการหมักลงโดยเพิ่มอัตราการให้อากาศแก่ชั้นหมักหรือเพิ่มความถี่ของการเติมอากาศถ้าไม่ได้จ่ายอากาศอย่างต่อเนื่อง แต่ถ้าให้อากาศมากเกินไปในระบบที่ความชื้นอากาศต่ำ จะเกิดการสูญเสียความชื้นของอาหารแข็งมากเกินไปจนกิจกรรมของจุลินทรีย์ลดลงได้ Stanton และ Wallbridge (1972) รายงานว่าการหมักมันสำปะหลังในระบบอาหารแข็ง โดยใช้ <u>R. stolonifer</u>, <u>R.</u>

oligosporus หรือ R. chinensis นั้นจะต้องควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศให้สูงกว่า 95% ราจะเจริญได้ดี และถ้าความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศต่ำกว่า 93% และ 83% อาจเกิดสปอร์และยับยั้งการเจริญ ตามลำดับ

ในทางตรงกันข้ามถ้าอุณหภูมิของชั้นหมักต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญจำเป็นต้องลดอัตราการจ่ายอากาศแก่ชั้นหมักลงเพื่อให้อุณหภูมิสูงขึ้น โดยได้ความร้อนจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ แต่การลดอัตราการให้อากาศนี้จะต้องไม่ทำให้ปริมาณออกซิจนเในชั้นหมักต่ำกว่าจุดวิกฤต ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจึงต้องพิจารณาปัญหาอุณหภูมิต่ำกว่าระดับที่เหมาะสม และปัญหาการขาดแคลนออกซิเจนควบคู่กันไป นอกจากนี้ความสามารถในการถ่ายเทความร้อนยังขึ้นกับความพรุน (porosity) ของชั้นหมักอีกด้วย

ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิในชั้นหมักกับการผลิตความร้อนของจุลินทรีย์ในเครื่องปฏิกรณ์อาจแสดงได้ดังนี้ (Tasakorn et al., 1979)

$$Q\ C_p\ dT/dV_s = -S_B + H_w$$

เมื่อ S_B คือ อัตราการผลิตความร้อนต่อหน่วยปริมาตร

H_w เป็นค่าความร้อนต่อหน่วยปริมาตรที่น้ำระเหยพาออกไป

C_p เป็นความจุความร้อนของอากาศ

Q เป็นอัตราการไหลของอากาศ

V_s เป็นปริมาตรของชั้นหมัก

T, T_i และ T_o เป็นอุณหภูมิภายในเครื่องปฏิกรณ์ : อุณหภูมิอากาศเข้า อุณหภูมิอากาศออก ซึ่งถอดสมการได้ดังนี้

$$T - T_i = T_o + V_s(S_B - H_w)\ C_pQ$$

1.4 ข้อดี ข้อเสีย และปัญหาต่าง ๆ ของระบบการหมักในอาหารแข็ง

Hesseltine (1972) ได้ชี้ถึงข้อดีและข้อเสียของการหมักในอาหารแข็งเมื่อเปรียบเทียบกับระบบการหมักในอาหารเหลวในถังกวนที่มีการให้อากาศ ดังแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ข้อดีและข้อเสียของระบบการหมักในอาหารแข็งเมื่อเทียบกับระบบการหมักในอาหารเหลว (Hesseltine, 1972)

ข้อดี	ข้อเสีย
1. วัตถุดิบประกอบด้วยธาตุอาหารที่มีส่วนประกอบง่ายกว่า และไม่ซับซ้อน	1. ระบบนี้มีปริมาณน้ำอิสระ หรือความชื้นต่ำ จึงจำกัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ได้จะต้องเจริญได้ที่ความชื้นต่ำ
2. ถังปฏิกิริยามีขนาดเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยปริมาตร เนื่องจากมีความสามารถจุวัตถุดิบแข็ง (solid content) สูงกว่า	2. ต้องใช้เชื้อเริ่มต้นในปริมาณสูง
3. ถังปฏิกิริยาไม่ต้องใช้เครื่องมือและระบบควบคุมซับซ้อน ลดความยุ่งยากในการออกแบบก่อสร้างและติดตั้ง	3. วัตถุดิบที่จะใช้จำเป็นต้องทำให้อยู่ในรูปที่เหมาะสม เช่น ปอกเปลือกหรือบดให้มีขนาดเหมาะสมต่อการหมัก
4. ใช้สปอร์หรือเซลของจุลินทรีย์ผสมกับวัตถุดิบโดยตรง ไม่ต้องผ่านการเตรียมเชื้อเริ่มต้น (seed tank or preformed inoculum) เหมือนกับระบบอาหารเหลว	4. การควบคุมสภาวะแวดล้อมการหมักกระทำได้ยากกว่า ในอาหารเหลว
5. การควบคุมการปนเปื้อนจากแบคทีเรียทำได้ง่าย เนื่องจากระบบนี้ใช้ความชื้นต่ำ	5. การถ่ายเทมวลและความร้อนออกจากชั้นหมักทำได้ยากกว่า โดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม
6. การให้อากาศแก่ชั้นหมักทำได้ง่าย เนื่องจากชั้นหมักมีความพรุน (porosity) พอเพียง	6. ในการหมักแบบชั้นหมักเคลื่อนที่นั้นใช้พลังงานในการพลิกกลับอาหารสูงกว่าการกวนในระบบอาหารเหลว
7. ผลิตภัณฑ์ที่ได้แยกออกจากชั้นหมักและทำให้เข้มข้นได้ง่ายกว่าผลิตภัณฑ์จากการหมักในอาหารเหลว	

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

ข้อดี	ข้อเสีย
8. การหมักระบบนี้สามารถให้ผลิตภัณฑ์บางชนิดที่ไม่สามารถจะผลิตได้ในระบบอาหารเหลว 9. ลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการหมักลงได้ดีกว่าการหมักระบบอาหารเหลว	

โดยทั่วไปจะเห็นว่าระบบการหมักในอาหารแข็งเป็นระบบที่ง่ายไม่ซับซ้อน แต่ทางปฏิบัติแล้วไม่เป็นเช่นนั้น เนื่องจากการที่องค์ประกอบของชั้นหมักไม่เป็นเนื้อเดียวกันรวมทั้งปริมาณน้ำภายในระบบค่อนข้างต่ำ จึงทำให้มีปัญหาในกระบวนการหมัก ดังนี้คือ

1.4.1 ปัญหาในการควบคุมสภาวะของการหมัก การขาดแคลนเครื่องมือควบคุมและประสิทธิภาพของเครื่องมือควบคุมที่ใช้ ทำให้ควบคุมสภาวะแวดล้อมได้ยากกว่าการควบคุมของระบบการหมักในอาหารเหลว

1.4.2 ปัญหาและความลำบากอันเนื่องมาจากการติดตามการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก เช่น การเจริญเติบโต วัตถุดิบที่ถูกใช้ไปและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

1.4.3 ปัญหาเนื่องจากการผลิตเชื้อเริ่มต้นของจุลินทรีย์ (inoculum) ที่บริสุทธิ์ในปริมาณที่มากพอกับความต้องการของระบบการหมัก

1.4.4 ปัญหาเนื่องจากความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมที่แตกต่างกันไปสำหรับแต่ละระบบซึ่งจะต้องเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด วัตถุดิบแต่ละชนิด และจะต้องเหมาะสมในฐานะที่เป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญของระบบอีกด้วย ในการหมักสารประกอบลิกโนเซลลูโลสได้แก่ ฟาง ซังข้าวโพด ขี้เลื่อย และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรอื่น ๆ ใช้ความชื้นเริ่มต้นแตกต่างกันออกไปตั้งแต่ 70-85% (Grant et al, 1978; Ulmer et al., 1981; Viesturs et al., 1981; Han & Anderson, 1975; Zadrazil & Brunnert, 1981; Wissler, Tengerdy & Murphy, 1983) ในการหมักมันสำปะหลังใช้ความชื้นเริ่มต้นตั้งแต่ 45-65%

โดยใช้ 45% สำหรับ R. stonolifer (Stanton and Wallbridge, 1972) Sporotrichum pulverulentum ใช้ 67% (Smith, Osothsilp, Bicho & Gregory, 1986) และ 60-65% สำหรับ A. niger (Raimbault, Deschamps, Meyer & Senez, 1977; Senez, Raimbault & Deschamps, 1982)

1.5 มันสำปะหลัง (cassava)

มันสำปะหลังเป็นพืชเขตร้อนมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Manihot esculenta Crantz สามารถทนต่อความแห้งแล้งและดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ มีชื่อเรียกต่าง ๆ กันตามแหล่งปลูก เช่น cassava, manioc , tapioca, mandioca, yuca เป็นต้น มันสำปะหลังจัดเป็นพืชหัวซึ่งมีปริมาณแป้งในหัว 15-40% (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2519)

1.5.1 การแบ่งชนิดของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังแบ่งชนิดออกตามปริมาณสารพิษในมันสำปะหลัง คือ กรดไฮโดรไซยานิค (hydrocyanic acid) หรือกรดปรัสซิค (prussic acid) ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ดังนี้ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2519)

1.5.1.1 ชนิดขม (bitter variety) บางทีเรียก "มันแป้ง" หรือ "มันโรงงาน" เป็นชนิดที่ใช้ทำผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง หัวมีปริมาณแป้งสูง ใบใหญ่ เนื้อหยาบค่อนข้างขมไม่เหนียว

1.5.1.2 ชนิดหวาน (sweet variety) บางทีเรียก "มันห้านาที" หัวมีปริมาณแป้งน้อยกว่า เนื้อละเอียด รสค่อนข้างหวาน มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิคน้อยกว่าชนิดขม ใช้บริโภคโดยตรง เช่น ทำขนม มันสำปะหลังชนิดนี้ไม่นิยมปลูก

1.5.2 คุณค่าทางอาหารของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชหัว โดยเฉลี่ยแล้วหัวมันสดจะประกอบด้วยน้ำ 60-65% คาร์โบไฮเดรท 30-35% โปรตีน (crude protein) เพียง 1-2% เท่านั้น มีปริมาณแคลเซียมและวิตามินสูงมาก (Johnes, 1959)

คาร์โบไฮเดรทประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่ (ร้อยละ 70-80) น้ำตาล เฮมมิเซลลูโลส (hemicellulose) และเซลลูโลส (cellulose) เป็นส่วนย่อย (Ketiku & Oyenuga, 1970) แป้งประกอบด้วย อะไมโลส (amylose) 16-18% ที่เหลือเป็นอะไม-

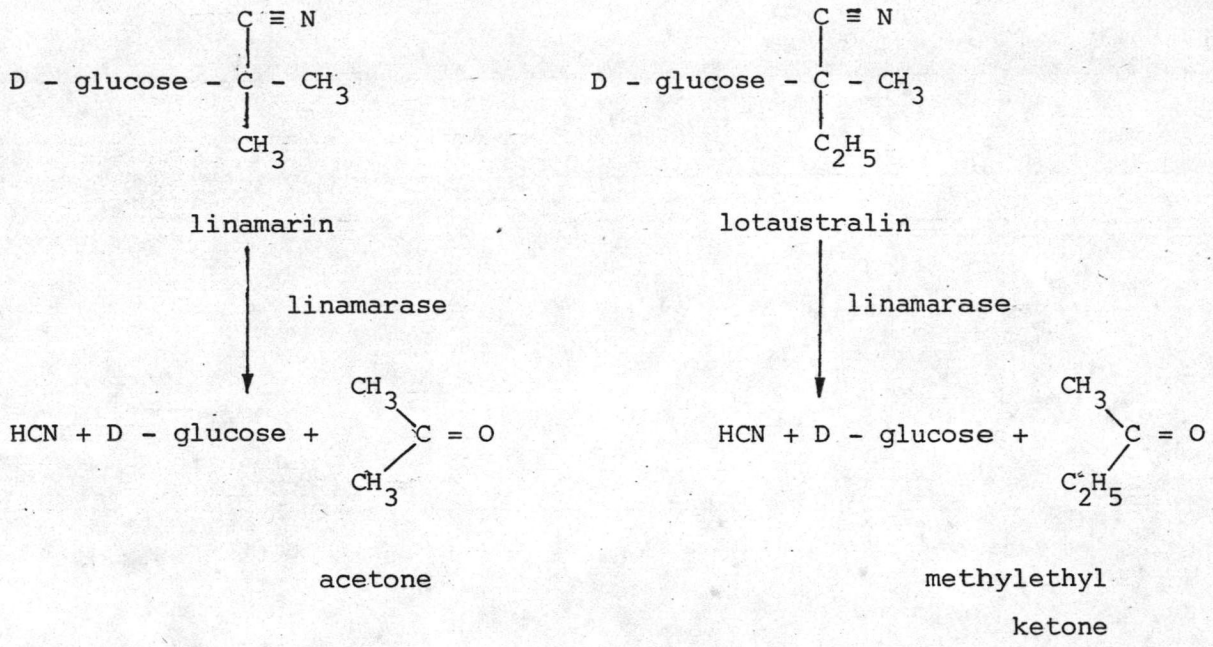
โลเพคติน (amylopectin) (Johnson & Raymond, 1965) ปริมาณน้ำตาลมี 2-5% ประกอบด้วยซูโครส 71.03% กลูโคส 12.84% มอลโทส 2.98% และฟรุคโทส 7.89% (Ketiku & Oyenuga, 1970)

โปรตีนในหัวมันสำปะหลังมีปริมาณต่ำ และปริมาณกรดอะมิโนไม่สมดุล โดย Maner (1973) พบว่าหัวมันสำปะหลังพันธุ์ Llanera มีปริมาณกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) และทริบโตเฟน (tryptophane) สูง แต่มีเมทไทโอนีน (methionine) และซิสทีน (cystine) ต่ำ CIAT (1972) รายงานว่า 60% ของไนโตรเจนทั้งหมดอยู่ในรูปสารประกอบกรดอะมิโน และปริมาณร้อยละ 1 อยู่ในรูปไนเตรท (nitrate) ไนไตรท์ (nitrite) และกรดไฮโดรไซยานิค

1.5.3 สารพิษในหัวมันสำปะหลัง

ในมันสำปะหลังจะมีสารพิษคือ กรดไฮโดรไซยานิค ซึ่งจะรวมตัวกับกลูโคส เป็นสารประกอบไซยาโนจีนิคกลูโคไซด์ (cyanogenic glucoside) 2 ชนิดคือ ลินามาริน (linamarin) และโลเทาสแตรลิน (lotaustralin) ซึ่งไม่มีพิษแต่อย่างใด (Bolhius, 1954; Chadha, 1961; Johnson & Raymond, 1965)

ความเป็นพิษเกิดจากเอนไซม์ลินามาเรส (linamarase) ซึ่งเซลของพืชแตกตัวออก ปล่อยเอนไซม์ลินามาเรสออกมาย่อยลินามารินและโลเทาสแตรลิน ได้กรดไซยานิคในรูปอิสระ ดังแสดงในรูปที่ 1.10 Bolhius (1954) และ Hatagalung (1972) สรุปผลพิษของไซยาไนด์ในมันสำปะหลังว่า ไซยาไนด์ในมันสำปะหลังถ้ามีปริมาณน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถือว่าปลอดภัย ถ้ามีปริมาณอยู่ระหว่าง 50-100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถือว่าอันตรายปานกลาง และถ้ามากกว่า 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ถือว่าเป็นอันตราย



รูปที่ 1.10 การไฮโดรไลซ์สารประกอบไซยาโนจีนิคกลูโคไซด์ ได้กรดไฮโดร-ไซยานิคอิสระเกิดขึ้น

1.5.4 การลดปริมาณสารพิษในมันสำปะหลัง

ถึงแม้ว่าปริมาณกรดไฮโดรไซยานิคในมันสำปะหลังจะมีปริมาณสูง แต่ก็สามารถลดปริมาณลงจนไม่เป็นอันตรายได้โดยวิธีต่าง ๆ ดังนี้ (Coursey, 1973)

1.5.4.1 การปอกเปลือก ทั้งนี้เพราะสารพิษจะสะสมที่เปลือกมากกว่าในเนื้อมันสำปะหลัง

1.5.4.2 การล้างหรือแช่น้ำ จะทำให้สารพิษที่อยู่ในเนื้อมันสำปะหลังออกไปกับน้ำ ช่วยลดปริมาณสารพิษลงได้มาก

1.5.4.3 การหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ หรือทำเป็นเส้น ๆ แล้วตากให้แห้ง เช่น การทำมันเส้นจะช่วยลดปริมาณสารพิษได้

1.5.4.4 การผ่านความร้อนจะทำให้สารพิษสลายตัว เช่น การทำมันอัดเม็ดหรือการตากแดดให้แห้ง

1.5.4.5 การทำเป็นแป้ง โดยการนำหัวมันสำปะหลังมาหั่นบดและผ่านความร้อน

1.5.4.6 การหมัก เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะลดปริมาณสารพิษลงได้ ดังนั้นการแปรรูปมันสำปะหลังในประเทศที่บริโภคมันสำปะหลังเป็นอาหารหลักจึงใช้วิธีการหมัก เพื่อลดปริมาณสารพิษ

1.5.5 ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังที่ผลิตเป็นการค้าเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์

การผลิตผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังจะต้องผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ ซึ่งมีส่วนทำให้ปริมาณสารพิษมีค่าลดลง (Coursey, 1973) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรูปแบบต่าง ๆ ดังนี้

1.5.5.1 มันเส้น (cassava chip) ทำจากหัวมันหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วทำให้แห้งโดยการตากแดดบนลานซีเมนต์ หรือเข้าเครื่องอบจนความชื้นลดเหลือประมาณร้อยละ 15

1.5.5.2 มันอัดเม็ด (cassava pellet) ทำจากมันเส้นฉีดไอน้ำอุณหภูมิสูงกว่า 70 °ซ แล้วเข้าเครื่องอัดเม็ด บดย่อยเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อน บีบอัดผ่านรูตะแกรงเป็นท่อนกลม แล้วจึงลดความชื้นให้ต่ำลง มันอัดเม็ดเป็นที่นิยมในตลาดต่างประเทศ เพราะขนส่งสะดวกและมีคุณภาพสม่ำเสมอ

1.5.5.3 มันป่น (cassava meal) ทำจากมันเส้นมาบดด้วยเครื่องบด (hammer mill) ปัจจุบันไม่นิยมมันป่นเพราะไม่สะดวกในการขนส่ง

1.5.5.4 กากมันสำปะหลัง (cassava waste) หรือกากมัน หรือขี้แป้ง เป็นผลพลอยได้จากการผลิตแป้งมันสำปะหลังหลังจากแยกเอาน้ำแป้งออกแล้ว กากที่ได้นำไปตากแดดให้แห้ง เพื่อผสมกับมันเส้นทำมันอัดเม็ด หรือใช้เป็นอาหารสัตว์

1.6 เหตุจูงใจในการทำวิจัย

เนื่องจากมันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในประเทศไทย นิยมปลูกกันมากทางภาคตะวันออกและตะวันออกเฉียงเหนือ เพราะทนต่อความแห้งแล้ง ไม่ต้องการดูแลมากนักและต้นทุนการผลิตต่ำ ผลผลิตของมันสำปะหลังส่วนมากใช้เป็นอาหารสัตว์ ส่วนใหญ่ส่งไปขายต่างประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มประเทศประชาคมเศรษฐกิจยุโรป ในรูปมันเส้นและมันอัดเม็ด (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2526) เนื่องจากผลผลิตมันสำปะหลังต่อปีมีปริมาณมาก แต่กลุ่มประชาคมเศรษฐกิจยุโรปกลับจำกัดการนำเข้า ทำให้มีผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังตกค้างอยู่เป็นจำนวนมาก เป็นปัญหาสำคัญสำหรับเศรษฐกิจของประเทศไทย จึงมีการพยายามนำ

มันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำผลิตภัณฑ์ภายในประเทศให้มากขึ้น และการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเป็นอาหารสัตว์ก็เป็นวิธีการพยายามใช้มันสำปะหลังภายในประเทศอีกวิธีหนึ่ง

แต่เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่มีคาร์โบไฮเดรทสูง แต่ปริมาณโปรตีนต่ำ การนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์แทนเมล็ดธัญพืชเพียงอย่างเดียว จะทำให้สัตว์เลี้ยงขาดโปรตีน ซึ่งเป็นผลให้สัตว์โตช้าหรือมีอาการผิดปกติได้ ดังนั้นจึงต้องเพิ่มปริมาณโปรตีนให้สูงขึ้น ซึ่งอาจทำได้โดยผสมวัตถุดิบที่มีโปรตีนสูง เช่น กากถั่วเหลืองหรือปลาป่น ซึ่งจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูง และคุณภาพอาหารไม่แน่นอน

วิธีการเพิ่มโปรตีนให้กับมันสำปะหลังอาจทำได้อีกวิธีหนึ่ง โดยใช้เทคนิคของกระบวนการหมักในอาหารแข็ง (solid state fermentation) โดยใช้จุลินทรีย์ที่เจริญบนมันสำปะหลังและใช้คาร์โบไฮเดรทของมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พร้อมกับเปลี่ยนไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เติมให้กับมันสำปะหลังเป็นโปรตีน เป็นการเพิ่มโปรตีนให้กับมันสำปะหลัง

1.7 วัตถุประสงค์การทำวิจัย

1.7.1 เพื่อศึกษาการเพิ่มโปรตีนในมันสำปะหลังจากการหมักในรูปอาหารแข็งโดยใช้เชื้อรา Rhizopus oligosporus TISTR 3001 (NRRL 2710) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญเติบโตบนมันสำปะหลัง ให้โปรตีนสูง และไม่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์

1.7.2 เพื่อศึกษาชนิดสารอาหาร และปริมาณความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา R. oligosporus TISTR 3001 (NRRL 2710) เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

1.7.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักในเครื่องปฏิกรณ์แบบตรึงชั้นในลักษณะถาดหมักในระดับย่อส่วนและขยายส่วน

1.7.4 เพื่อศึกษาผลของขนาดมันเม็ด ความหนาของชั้นหมัก ความชื้นเริ่มต้น ปริมาณสปอร์เริ่มต้น และอัตราการให้อากาศที่มีผลต่อการเพิ่มโปรตีน โดยเน้นการแก้ปัญหาทางด้านการถ่ายเทมวลระหว่างอนุภาค (interparticle mass transfer) และการถ่ายเทมวลในอนุภาค (intraparticle mass transfer) รวมทั้งการถ่ายเทความร้อน (heat transfer) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ประกอบขึ้นมา