บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ความหมายของน้ำซีอิ๊ว

น้ำซีอิ๊ว (soy sauce) ตามบทนิยามของมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 252-2521 (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2530) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง (*Glycine max Merr.*) ด้วยการหมัก จะนำมาแต่งรส และ/หรือ สีหรือไม่ก็ได้ตามชนิดของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ แล้วนำไปผ่านการพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) ส่วนเครื่องปรุงแต่งกลิ่นรสซึ่งได้จากการย่อยสลายถั่วเหลืองด้วยวิธีการทางเคมีโดยการใช้กรดนั้น มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 8-2513 (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2513) กำหนดให้เรียกว่า น้ำซอสปรุงรส (flavour sauce)

น้ำซีอิ๊วที่ผลิตในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิด และมีลักษณะดังแสดงในตารางที่ 2.1 ได้แก่

(1) ซีอิ๊วขาว หมายถึง น้ำซีอิ๊วซึ่งมิได้แต่งรสและสี

(2) ซีอิ๊วดำเค็ม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำซีอิ๊วขาวมาเก็บต่อตามกรรมวิธีการผลิต (ageing) จนกระทั่งได้ความเข้มข้นและสีตามเกณฑ์ที่กำหนด

(3) ซีอิ๊วดำ หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากซีอิ๊วขาวผสมกับสารให้ความหวาน ในอัตราส่วนที่พอเหมาะ จนได้ความหวานและความเค็มตามที่กำหนด

(4) ซีอิ๊วหวาน หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากซีอิ๊วขาวในปริมาณน้อยผสมกับสารให้ความหวาน จนได้ความหวานตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ 2.1 ลักษณะของน้ำซีอิ๊วแต่ละชนิดที่ผลิตในประเทศไทย

ลักษณะ	ชนิด					
	ซีอิ๊วขาว		ซีอิ๊วดำเค็ม		ซีอิ๊วดำ	ซีอิ๊วหวาน
	ชั้นพิเศษ	ชั้นที่หนึ่ง	ชั้นพิเศษ	ชั้นที่หนึ่ง		
โปรตีน (Nx6.25) ไม่น้อยกว่า ร้อยละของน้ำหนัก	5.5	4.5	8.5	7.5	2.0	1.5
ปริมาณของแข็งที่ระเหยไม่ได้ ไม่น้อยกว่า ร้อยละของน้ำหนัก	32	30	17ถึง23	32	50.0	50.0
เกลือ (คิดเป็นโซเดียมคลอไรด์) ร้อยละของน้ำหนัก	17ถึง23	17ถึง23	17ถึง23	17ถึง23	8 ถึง16	ไม่เกิน 1
น้ำตาลทั้งหมด (คิดเป็นน้ำตาลอินเวิร์ต) ไม่เกิน ร้อยละของน้ำหนัก	7	6	10	10	25	80
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	4.5 ถึง 5.3	4.5 ถึง 5.3	4.5 ถึง 5.3	4.5 ถึง 5.3	4.5 ถึง 5.5	4.5 ถึง 5.5
ความถ่วงจำเพาะที่อุณหภูมิ 27±3 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า	1.20	1.20	1.23	1.23	1.33	ไม่กำหนด

ที่มา: มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 252-2521

2.2 ประวัติของน้ำซีอิ๊ว

การหมักน้ำซีอิ๊วในประเทศไทย ไม่มีหลักฐานยืนยันแน่นอนว่าได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีในสมัยใด แต่จากการบรรยายของชอไลซึ่งเขียนขึ้นเมื่อประมาณหนึ่งพันปีก่อนคริสต์ศตวรรษเป็นหลักฐานยืนยันว่า การหมักน้ำซีอิ๊วในประเทศจีนนั้นมีมาไม่ต่ำกว่าสามพันปีและได้แพร่หลายไปในประเทศญี่ปุ่นเมื่อประมาณปี ค.ศ.200 (นภา โล่ห์ทอง, 2531)

สำหรับประวัติความเป็นมาของน้ำซีอิ๊วพอจะสรุปจากรายงานของวิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ได้ดังต่อไปนี้คือ

ในปี ค.ศ.1800 (พ.ศ.2343) จีนค้นพบว่าวัตถุดิบสำคัญที่ใช้ในการทำน้ำซีอิ๊วได้แก่ ถั่วเหลือง และข้าวสาลี และญี่ปุ่นมีรายงานเผยแพร่เกี่ยวกับน้ำซีอิ๊ว จนกระทั่งมีผู้ผลิตหัวเชื้อในการทำน้ำซีอิ๊วออกจำหน่าย

ในปี ค.ศ.1930 (พ.ศ.2473) จีนเริ่มเติมของเสียจากกระบวนการผลิตผงชูรสในน้ำซีอิ๊วและเริ่มผลิตหัวเชื้อในการทำน้ำซีอิ๊ว ส่วนในญี่ปุ่นเริ่มค้นคว้าเกี่ยวกับเอนไซม์ในน้ำซีอิ๊วและค้นพบการผลิตสารละลายกรดอะมิโน (amino acid solution) ซึ่งต่อมาจีนก็เริ่มมีการผลิตเช่นเดียวกัน

ในปี ค.ศ.1940 (พ.ศ.2483) จีนเริ่มใช้ถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดไขมันแล้วในการหมักน้ำซีอิ๊ว ส่วนในญี่ปุ่นได้มีการค้นคว้าและพัฒนาการผลิตน้ำซีอิ๊วกันอย่างมากเช่น เริ่มใช้วิธีการหมักแบบเร็ว ใช้จุลินทรีย์ในการหมักน้ำซีอิ๊ว ใช้กากที่เหลือจากการหมักน้ำซีอิ๊วครั้งแรกมาหมักอีกครั้ง มีการทำน้ำซีอิ๊วแบบกึ่งหมักกึ่งเคมี และเริ่มใช้กระบวนการให้อากาศในการหมักน้ำซีอิ๊ว

ในปี ค.ศ.1950 (พ.ศ.2493) จีนเชิญผู้ชำนาญการจากญี่ปุ่นมาให้คำแนะนำในการผลิตน้ำซีอิ๊ว และประกาศใช้มาตรฐานซีอิ๊ว นอกจากนี้ยังเริ่มใช้ผงยีสต์และผงชูรสในการผลิตน้ำซีอิ๊ว และเริ่มมีปัญหาเกี่ยวกับวัตถุกันเสียที่ใช้ในน้ำซีอิ๊วคือ แนพธอล (β-naphthol)

ในปี ค.ศ.1960 (พ.ศ.2503) จีนเริ่มใช้เครื่องมือจากต่างประเทศในการผลิตน้ำซีอิ๊ว และกำหนดมาตรฐานของโรงงานผลิตน้ำซีอิ๊ว และมีรายงานว่าสามารถใช้น้ำมันเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำซีอิ๊วได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีสารพิษซึ่งทำให้เกิดโรคตับอักเสบและมีปรอทเจือปนในน้ำซีอิ๊วบางชนิด แต่ยืนยันว่าไม่มีอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ในน้ำซีอิ๊ว และมีการประกาศห้ามใช้แซคคะริน (saccharine) ในน้ำซีอิ๊ว (ปัจจุบันอนุญาตให้ใช้ได้อีก)

ในปี ค.ศ.1970 (พ.ศ.2513) จีนกำหนดให้โรงงานผลิตน้ำซีอิ๊วระบุประเภทของน้ำซีอิ๊วว่าเป็นน้ำซีอิ๊วประเภทหมักหรือเคมี

2.3 กรรมวิธีการผลิตน้ำซีอิ๊ว

2.3.1 วัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตน้ำซีอิ๊ว ได้แก่ ถั่วเหลืองหรือกากถั่วเหลือง ข้าวสาลี เกลือ และน้ำ

2.3.1.1 ถั่วเหลือง กลิ่นหอมของน้ำซีอิ๊วได้มาจากการย่อยสลายถั่วเหลือง โครงสร้างทั่วไปของเมล็ดถั่วเหลืองจะเป็นรูปกลมรี โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของเมล็ดด้านยาวประมาณ 0.6-0.9 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางด้านสั้นประมาณ 0.5-0.7 เซนติเมตร และมีน้ำหนักแตกต่างกันตามพันธุ์ เช่น พันธุ์ปา 100 เมล็ด หนักเพียง 2 กรัม ส่วนพันธุ์ที่มีเมล็ดใหญ่ 100 เมล็ด จะหนักถึง 40 กรัม แต่โดยทั่วไปถั่วเหลือง 100 เมล็ดจะหนักประมาณ 10-20 กรัม ส่วนประกอบของเมล็ดถั่วเหลืองมีดังนี้คือ เปลือก (seed coat) ร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ใบเลี้ยง (cotyledon) ร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก และยอดอ่อน (embryo) ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก โดยส่วนของใบเลี้ยงเป็นส่วนที่สะสมอาหารและนำมาใช้ประโยชน์ องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง (Smith and Circle, 1972) แสดงดังตารางที่ 2.2 ได้แก่

(1) โปรตีน ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญแหล่งหนึ่ง โดยโปรตีนในถั่วเหลืองประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.3

(2) น้ำมัน ถั่วเหลืองมีน้ำมันในปริมาณสูงประมาณร้อยละ 20

(3) คาร์โบไฮเดรต ถั่วเหลืองมีคาร์โบไฮเดรตอยู่ร้อยละ 25 โดยประกอบด้วยซูโครส (sucrose) กาแลคแตน (galactan) และแป้ง (starch) เป็นต้น

(4) วิตามิน ถั่วเหลืองมีวิตามินอยู่ในปริมาณมาก ยกเว้นวิตามินซี

(5) แร่ธาตุ ถั่วเหลืองประกอบด้วยแร่ธาตุประมาณร้อยละ 5 ปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ในถั่วเหลือง แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)

องค์ประกอบ	ร้อยละ	องค์ประกอบ	ร้อยละ
เถ้า (ash)	4.09	น้ำตาล (sugar)	7.97
ไขมัน (crude fat)	19.63	ฟอสฟอรัส (phosphorus)	0.659
เส้นใย (crude fiber)	5.52	โปแตสเซียม (potassium)	1.67
โปรตีน (crude protein)	42.78	แคลเซียม (calcium)	0.275

ตารางที่ 2.3 กรดอะมิโนในถั่วเหลือง

กรดอะมิโน	ร้อยละ	กรดอะมิโน	ร้อยละ
วาลีน (valine)	5.17-5.48	กรดกลูตามิก (glutamic acid)	17.90-19.20
อาร์จินีน (arginine)	7.22-8.30	ไอโซลิวซีน (isoleucine)	5.15-5.53
ลิวซีน (leucine)	7.59-8.45	ฟีนีลอะลานีน (phenylalanine)	4.80-5.31
อิสติดีน (histidine)	2.16-2.52	ทริปโตเฟน (tryptophan)	1.42-1.64
ไลซีน (lysine)	5.97-7.07	เมไธโอนีน (methionine)	1.28-1.53
ธรีโอนีน (threonine)	3.58-4.06		

ตารางที่ 2.4 ปริมาณแร่ธาตุในถั่วเหลือง

แร่ธาตุ	ร้อยละ	แร่ธาตุ	ร้อยละ
โปแตสเซียม	45.02	กำมะถัน (sulfur)	1.37
ฟอสฟอรัส	29.13	คลอรีน (chlorine)	0.75
แคลเซียม	8.92	โซเดียม (sodium) และเหล็ก	1.59
แมกนีเซียม (magnesium)	8.19	ของแข็งที่ละลายไม่ได้ (insoluble solid)	1.10

<u>การเตรียมถั่วเหลืองในการทำน้ำซีอิ๊ว</u> มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

(1) การล้างและแช่ถั่วเหลือง

ล้างถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วด้วยน้ำสะอาดและแช่ไว้ในน้ำเพื่อทำให้ถั่วเหลืองพองตัวขึ้นประมาณ 1 เท่าของน้ำหนักเดิม น้ำที่ใช้แช่ถั่วเหลืองอาจใช้น้ำเย็นหรือน้ำที่อุณหภูมิห้อง หรือน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส ซึ่งจะใช้เวลาในการแช่น้อยกว่าใช้น้ำเย็น หรืออาจใช้น้ำร้อนแช่ถั่วเหลือง ซึ่งจะใช้เวลาในการแช่น้อยที่สุด แต่ค่อนข้างยุ่งยากและทำให้ส่วนประกอบบางอย่างของถั่วเหลืองสูญเสียไปได้

(2) การนึ่งถั่วเหลือง

การนึ่งถั่วเหลืองทำได้ 2 วิธีคือ การนึ่งที่ความดันปกติจะใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง แต่สิ้นเปลืองไอน้ำมาก ส่วนการนึ่งโดยใช้ความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จัดเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ ใช้ไอน้ำน้อย ถั่วเหลืองสุกสม่ำเสมอ มีสีน้ำตาลเข้ม และมีความนุ่มมากกว่าการนึ่งที่ความดันปกติ นอกจากนี้ยังสามารถนึ่งได้คราวละมาก ๆ

จุดประสงค์ของการนึ่งถั่วเหลืองคือ ทำให้ถั่วเหลืองอ่อนนุ่ม และทำให้สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์เปลี่ยนแปลงไปเหมาะกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

การกำหนดความอ่อนนุ่มที่เหมาะสมของถั่วเหลืองนึ่งทำได้ยากมาก ต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญ โดยทั่วไปการใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้บี้ถั่วเหลืองที่นึ่งแล้วเบา ๆ ถ้าปรากฏว่าเนื้อถั่วเหลืองถูกบี้แบน แต่เปลือกยังดีอยู่ แสดงว่าใช้ได้ แต่ถ้าบี้แล้วเนื้อถั่วแตกเละออกมา แสดงว่าใช้เวลาในการนึ่งน้อยไป นอกจากนี้ถ้าเวลาในการแช่ไม่เพียงพอแล้วนำมานึ่ง จะทำให้หัวเชื้อโคจิเสียได้ง่าย และถ้าแช่ได้เหมาะสมและนึ่งได้สุกพอดี จะได้ถั่วเหลืองนึ่งที่มีปริมาณน้ำมาก ซึ่งอาจทำให้การทำหัวเชื้อยุ่งยากขึ้นและจุลินทรีย์อื่นปนเปื้อนได้ง่าย แต่จะทำให้การย่อยสลายในระหว่างการหมักง่ายขึ้นและการกรองแยกหรือสกัดน้ำซีอิ๊วทำให้ง่ายขึ้น ดังนั้นจึงต้องให้ความระมัดระวังในการแช่และนึ่งถั่วเหลือง

2.3.1.2 <u>ข้าวสาลี</u> กลิ่นและสีของน้ำซีอิ๊วขึ้นอยู่กับคุณภาพของข้าวสาลีเป็นสำคัญ องค์ประกอบทางเคมีของข้าวสาลี แสดงดังตารางที่ 2.5 ข้าวสาลีที่ใช้ในการทำน้ำซีอิ๊วต้องมีความชื้นหลังตากแห้งแล้วน้อยกว่าร้อยละ 12 มีเปลือกบาง สีสม่ำเสมอ และไม่มีเมล็ดที่ถูกทำลายจากแมลง

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวสาลี

องค์ประกอบ	ร้อยละ	องค์ประกอบ	ร้อยละ
โปรตีน	12.5	เถ้า	1.6-1.8
แป้ง	72.5	น้ำตาล	1.5-3.0
ไขมัน	1.9-2.1	ความชื้น (moisture)	15-16
เส้นใย	2.6-2.7		

การเตรียมข้าวสาลีในการทำน้ำซีอิ๊ว มีอยู่ด้วยกันหลายวิธีคือ

(1) คั่วข้าวสาลีก่อนแล้วจึงนำไปบด

(2) บดข้าวสาลีก่อนแล้วจึงนำไปนึ่ง

(3) บดข้าวสาลีอย่างเดียว

โดยทั่วไปจะใช้วิธีคั่วข้าวสาลีก่อนแล้วจึงนำไปบด ซึ่งมีข้อดีดังนี้คือ

(1) ทำให้แป้งในข้าวสาลีเกิดการ gelatinization และโปรตีนถูกย่อยได้ง่ายขึ้น ทำให้เชื้อราสร้างเอนไซม์ได้เร็วขึ้น

(2) ความชื้นในข้าวสาลีลดลง เหมาะที่จะนำไปปรับความชื้นของถั่วเหลืองนึ่ง

(3) ทำให้ได้น้ำซีอิ๊วที่มีกลิ่นหอมและมีสีที่เหมาะสม

(4) ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดอยู่ผิวของข้าวสาลี

(5) ข้าวสาลีหลังจากคั่วแล้วจะพองตัว ทำให้ง่ายต่อการบดและเพิ่มพื้นที่ผิวต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา นอกจากนี้ยังทำให้การดูดซึมน้ำเพิ่มมากขึ้น

จุดประสงค์ของการใช้ข้าวสาลีหรือแป้งข้าวสาลีในการทำน้ำซีอิ๊วคือ

(1) เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับการเจริญเติบโตของเชื้อรา

(2) ลดความชื้นของถั่วเหลืองนึ่งให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อรา

(3) เพิ่มความสมบูรณ์ของสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการ

2.3.1.3 เกลือ เกลือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของน้ำซีอิ๊วคือ เป็นแหล่งให้รสเค็ม และป้องกันการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์

เกลือที่ใช้ปรุงอาหาร (cooking salt หรือ table salt) มีชื่อทางเคมีว่า โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl) เกลือบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นของแข็งใส ไม่มีสี ผลึกเป็นรูปลูกบาศก์ (simple cubic) ละลายน้ำได้ดี จุดเดือดและจุดหลอมเหลวสูง และมีสมบัติในการดูดความชื้น (hygroscopic) ได้ดี (กล้าณรงค์ ศรีรอต, 2520) เกลือที่ใช้ในการทำน้ำซีอิ๊วควรมีความถ่วงจำเพาะประมาณ 2.1-2.3 และจุดหลอมเหลว 800-808 องศาเซลเซียส (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534)

เกลือที่มีจำหน่ายในท้องตลาด นอกจากจะประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์แล้ว ยังพบสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ อีก เช่น แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$) โปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) ทราย และอินทรียสารอื่น ๆ รวมทั้งน้ำด้วย นอกจากนี้อาจมีการจำหน่ายเกลือที่เป็นของเสียโรงงานผลิตผงชูรสหรือโรงงานผลิตปุ๋ยซึ่งจะมีสิ่งปนเปื้อนที่เป็นผลเสียต่อการทำน้ำซีอิ๊วได้

<u>การเตรียมน้ำเกลือในการทำน้ำซีอิ๊ว</u>

โดยทั่วไปจะใช้น้ำเย็นที่อุณหภูมิห้องละลายเกลือเพราะทำได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามบางโรงงานอาจเตรียมน้ำเกลือโดยใช้น้ำร้อน ซึ่งทำให้การเตรียมน้ำเกลือยุ่งยากขึ้นและสิ้นเปลืองเชื้อเพลิง แต่มีข้อดีคือ ทำให้เกลือละลายและใสเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเกลือหรือน้ำ

2.3.1.4 <u>น้ำ</u> น้ำซีอิ๊วจะมีน้ำเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 60-70 ดังนั้นน้ำจึงมีผลต่อคุณภาพของน้ำซีอิ๊วมาก น้ำที่ใช้ในการกระบวนการผลิตน้ำซีอิ๊วประกอบด้วยน้ำที่ใช้ในการละลายเกลือ น้ำที่ใช้แช่ถั่วเหลือง และน้ำที่ใช้ทั่ว ๆ ไป มาตรฐานของน้ำที่ใช้ในการผลิตน้ำซีอิ๊วใช้มาตรฐานเดียวกับน้ำดื่มทั่ว ๆ ไป

2.3.2 หลักการทั่วไปเกี่ยวกับการผลิตน้ำซีอิ๊ว

ปัจจุบันเทคโนโลยีการหมักน้ำซีอิ๊วแพร่หลายไปเกือบทั่วโลก โดยทั้งในสหรัฐอเมริกาและอังกฤษต่างก็มีโรงงานผลิตน้ำซีอิ๊วขนาดใหญ่ ซึ่งใช้การผลิตแบบญี่ปุ่นที่ได้พัฒนาไปจากการผลิตแบบดั้งเดิมของจีน ส่วนประเทศในแถบเอเชียรวมทั้งประเทศไทยนั้นส่วนใหญ่ยังคงใช้การผลิตแบบดั้งเดิมของจีน อย่างไรก็ตามการผลิตทั้งสองวิธีมีหลักการทั่ว ๆ ไปคล้ายกัน ดังคำอธิบายของ Beuchat (1984) Yokotsuka (1986) นภา โล่ห์ทอง (2531) และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้

2.3.2.1 การหมักโคจิ (*Koji*) หมายถึง การหมักถั่วเหลืองที่นึ่งหรือต้มแล้วผสมกับข้าวสาลี แป้งข้าวสาลี หรือแป้งชนิดอื่น ๆ ที่ผ่านการคั่ว ด้วยเชื้อรา เมื่อเชื้อราเจริญจะชอนไชประสานระหว่างเมล็ดถั่วและแป้งจนกลายเป็นก้อนถั่วที่มีเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราเจริญปกคลุมไปทั่ว ซึ่งเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า โคจิ ในขณะที่เชื้อราเจริญจะผลิตเอนไซม์หลายชนิดด้วยกัน เอนไซม์ที่สำคัญคือ โปรติเอส (protease) ซึ่งจะย่อยสลายโปรตีนในถั่วให้ได้กรดอะมิโน และส่วนอะไมเลส (amylase) จะย่อยสลายแป้งให้ได้น้ำตาล ดังนั้นโคจิจึงเป็นทั้งวัตถุดิบที่ถูกย่อยสลายแล้วบางส่วนและเป็นแหล่งของเอนไซม์เพื่อใช้ในการหมักในขั้นตอนต่อไป การหมักโคจิจัดเป็นการหมักในอาหารแห้งหรือการหมักในสภาพอาหารแข็ง (solid-state fermentation)

2.3.2.2 การหมักโมโรมิ (*Moromi*) หมายถึง การหมักโคจิกับน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 17-23 ในระยะนี้ทั้งโปรติเอสและอะไมเลสจะย่อยสลายถั่วและแป้งต่อควบคู่กันไปกับกิจกรรมการหมักโดยจุลินทรีย์อีกสองชนิดได้แก่ แบคทีเรียจะเปลี่ยนน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นกรดแลคติก ทำให้ภาวะในถังหมักมีความเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งเอื้ออำนวยให้ยีสต์ที่ทนเกลือได้บางชนิดเจริญได้ดี และหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ และสารอื่น ๆ ซึ่งจะกลายเป็นกลิ่นรสเฉพาะตัวของน้ำซีอิ๊ว การหมักโมโรมิจัดเป็นการหมักในอาหารเหลวหรือการหมักในสภาพของเหลว (submerged fermentation)

2.3.3 กรรมวิธีการผลิตน้ำซีอิ๊วของโรงงานในประเทศไทย โดยทั่วไปมีขั้นตอนสำคัญพอสรุปได้ดังนี้ (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527 นภา โล่ห์ทอง, 2531 และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534)

2.3.3.1 การเตรียมโคจิ โดยเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus oryzae* หรือ *A. sojae* บนข้าวนึ่งหรือรำข้าวสาลีผสมแป้งถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งเช่นกัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นผสมหัวเชื้อโคจิ (seed *Koji*) ที่ได้ประมาณร้อยละ 0.1-0.2 รวมกับถั่วเหลืองนึ่งหรือต้มและแป้งข้าวสาลีคั่วหรืออบ โดยใช้อัตราส่วนของถั่วต่อแป้ง 70-80 ต่อ 20-30 นำไปเกลี่ยบนกระด้งหรือถาดให้หนาประมาณ 1 นิ้ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน ถ้าเชื้อราเจริญดี จะเห็นเส้นใยของเชื้อรายึดถั่วและแป้งจับเป็นก้อนและมีสปอร์สีเหลืองแกมเขียวและขาว อย่างไรก็ตามโคจิที่เตรียมได้จะมีสีแตกต่างกันในแต่ละฤดูกาลเช่น ในฤดูฝนที่มีอากาศร้อนชื้นและอบอ้าว โคจิจะมีสีเทาหรือดำ ส่วนในฤดูที่อากาศแห้งและไม่ร้อนจัดเกินไป โคจิจะมีสีเหลืองอมเขียว และบางครั้งอาจพบทั้งสีเหลืองอมเขียวและสีเทา

2.3.3.2 การหมัก นำโคจิใส่ในโหลหรือภาชนะปากกว้างประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของภาชนะ เติมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 17-23 จนเต็มภาชนะ บ่มโมโรมิไว้กลางแดดเป็นเวลานาน 6 เดือนถึง 1 ปี หรือมากกว่า น้ำซีอิ๊วจะมีสีเข้มแตกต่างกันตามระยะเวลาหมัก โดยน้ำซีอิ๊วที่หมักเป็นเวลานานจะมีสีเข้มจัด โดยทั่วไปน้ำซีอิ๊วที่หมักเป็นเวลา 1-2 ปี จะมีกลิ่นรสดี ส่วนน้ำซีอิ๊วที่หมักเป็นเวลา 3 ปี จะมีสีดีกว่า ดังนั้นเพื่อให้ได้น้ำซีอิ๊วที่มีคุณภาพด้านสีและกลิ่นรสสม่ำเสมอ อาจมีการผสมน้ำซีอิ๊วที่ได้จากการหมักในระยะเวลาต่างกันเข้าด้วยกัน

2.3.3.3 การเก็บเกี่ยวน้ำซีอิ๊ว (soy sauce recovery) เมื่อการหมักได้ที่แล้วจะกรองแยกเอาส่วนของของเหลวออก เรียกน้ำซีอิ๊วที่ได้ว่าน้ำซีอิ๊วชั้นพิเศษหรือชั้นที่หนึ่ง จากนั้นจะมีการเติมน้ำเกลือเข้มข้นประมาณร้อยละ 15 ลงไปหมักต่ออีกประมาณ 15 วัน จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าเต้าเจี้ยว หรืออาจเพิ่มระยะเวลาหมักต่อไปอีก 15 วัน และกรองแยกเอาส่วนของเหลวออกจะได้น้ำซีอิ๊วชั้นที่สอง บางโรงงานมีการเติมน้ำเกลือถึงสามหรือสี่ครั้ง ซึ่งจะได้น้ำซีอิ๊วที่มีคุณภาพต่ำรองลงมาตามลำดับ และส่วนใหญ่จะมีการนำมาปรุงรสโดยนำน้ำซีอิ๊วชั้นพิเศษมา

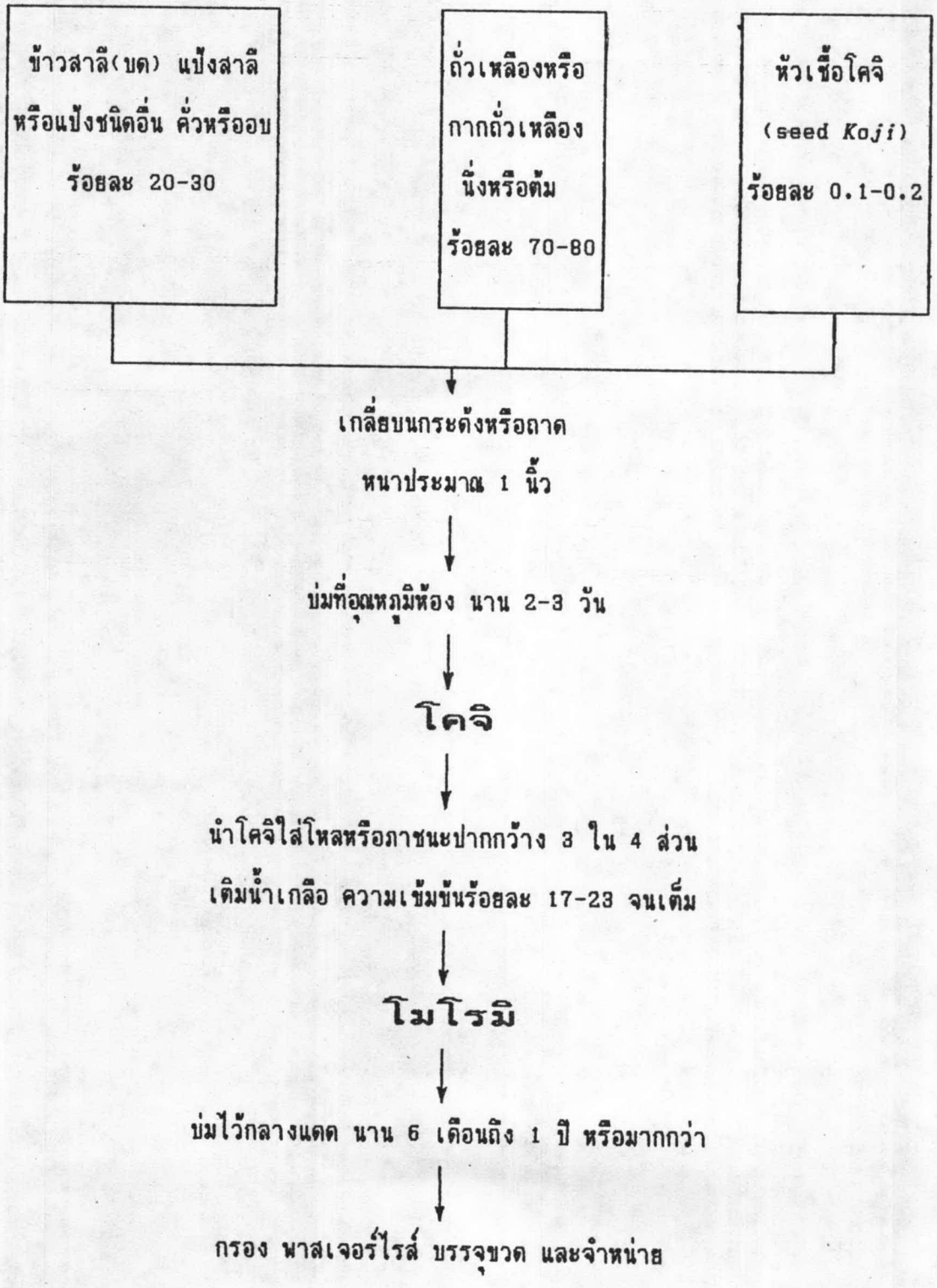
ผสม จากนั้นจึงนำไปพาสเจอร์ไรส์ บรรจุขวด และส่งจำหน่ายต่อไป

การกรองแยกน้ำซีอิ๊วไม่สามารถใช้การกรองโดยวิธีธรรมดาได้ จะต้องใช้เครื่องมือช่วยในการกรองแยกเช่น Screw หรือ Lever press ซึ่งจะใช้แรงงานคนช่วย และมีประสิทธิภาพน้อยกว่าการใช้ Water หรือ Oil press ซึ่งใช้ความดันช่วยแยก ทำให้มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้แรงงานมนุษย์ แต่ต้นทุนสูง

ในกรณีที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบในการทำน้ำซีอิ๊ว จะได้ของเหลือจากการกรองแยกน้ำซีอิ๊วที่เรียกว่า กากซีอิ๊ว ซึ่งในการกรองแยกที่มีประสิทธิภาพ จะมีกากซีอิ๊วเหลือเพียงร้อยละ 15 กากซีอิ๊วที่ได้จะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงมาก บางโรงงานอาจนำไปผลิตเป็นอาหารสำหรับสัตว์ หรืออาจนำไปทำปุ๋ยได้

การฆ่าเชื้อหรือการพาสเจอร์ไรส์น้ำซีอิ๊ว นอกจากจะช่วยทำลายจุลินทรีย์แล้ว ยังช่วยตกตะกอนโปรตีนที่ทำให้เกิดความขุ่นในน้ำซีอิ๊วได้ และนอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มกลิ่นหอม สี และความเข้มข้นของน้ำซีอิ๊ว โดยทั่วไปนิยมฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 80-85 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30 นาที

แผนภูมิแสดงกรรมวิธีการผลิตน้ำซีอิ๊วของโรงงานในประเทศไทยแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แผนภูมิกรรมวิธีการผลิตน้ำซีอิ๊วของโรงงานในประเทศไทย

2.4 สมบัติทางเคมีของน้ำซีอิ๊ว

สมบัติทางเคมีและองค์ประกอบของน้ำซีอิ๊วขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของถั่วเหลืองและข้าวสาลีที่ใช้ในการหมัก (วราวุฒิ ครุส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532) ซึ่ง Yong และ Wood (1976) พบว่า การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีระหว่างกระบวนการหมักเป็นการย่อยสลาย (degradation) ของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต โดยช่วงแรกแบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก (lactic acid fermentation) และช่วงหลังยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ (alcohol fermentation)

Beuchat (1984) รายงานว่า สารประกอบอินทรีย์ที่พบในน้ำซีอิ๊ว ได้แก่

(1) สารประกอบไนโตรเจน พบในรูปของกรดอะมิโน ร้อยละ 40-50 แอมโมเนีย ร้อยละ 10-15 เปปไตด์และเปปโตน ร้อยละ 40-50

(2) คาร์โบไฮเดรต พบในรูปของกลูโคส ร้อยละ 0.75 กาแลคโตส ร้อยละ 0.302-0.482 อะราบิโนส ร้อยละ 0.166-0.387 และไซโลส ร้อยละ 0.082-0.341 นอกจากนี้ยังพบมอลโตสและน้ำตาลแอลกอฮอล์ (alcoholic sugar) อีกด้วย

(3) กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติก (lactic acid) กรดแอซีติก (acetic acid) กรดซัคซินิก (succinic acid) กรดฟอร์มิก (formic acid) และกรดเลวูเลนิก (levulenic acid) เป็นต้น ทั้งนี้กรดแลคติกเป็นกรดที่มีปริมาณมากที่สุดและสำคัญกว่ากรดชนิดอื่น ๆ

(4) เบสอินทรีย์ (organic bases) ที่สำคัญได้แก่ อะดีนีน (adenine) กัวนีน (guanine) ไซโตซีน (cytosine) ยูราซิล (uracil) ไฮโปแซนธีน (hypoxanthine) และแซนธีน (xanthine) เป็นต้น

นอกจากนี้แล้วยังมีส่วนประกอบที่ให้กลิ่นรสและให้กลิ่นอื่น ๆ อีก ดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ส่วนประกอบที่ให้กลิ่นรสและให้กลิ่นในน้ำซีอิ๊ว

ส่วนประกอบที่ให้กลิ่นรส	
Acetaldehyde	Acetone
Proponal (propionaldehyde)	2-Hexanone
3-Methylbutanal (isovaleraldehyde)	Ethyl acetate
2-Methylpropanal (isobutyraldehyde)	2,3-Hexanedione
Ethanol	2-Propanol
2-Methyl-1-propanol (isobutyl alcohol)	3-Methylbutyl acetate
1-Butanol (n-butyl alcohol)	2,3-Dimethylpyrazine
2-Methyl-3-tetrahydrofuranone	2-Methylpyrazine
3-Hydroxy-2-butanone (acetoin)	2,6-Dimethylpyrazine
3-Methyl-1-butanol (isoamyl alcohol)	Benzoic acid
2-Acetyl furan	Benzaldehyde
Furfuryl acetate	2-Methyl propanoic acid
Bornyl acetate	4-Pentanolide
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine	Butanoic acid
Ethyl-2-hydroxy-propanoate (ethyl lactate)	Phenyl acetaldehyde
Furfuryl alcohol	Ethyl benzoate
3-Methylbutanoic acid	Diethyl succinate
3-Methylthio-1-propanol (methional)	Borneol
Ethyl phenylacetate	2-Phenylethyl acetate
2-Methoxyphenol (guaiacol)	Benzyl alcohol

(ต่อ)

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

ส่วนประกอบที่ให้กลิ่นรส	
2-Ethyl-6-methylpyrazine	Acetic acid
3-Hydroxy-2-methyl-4-pyrone (maltol)	2-Phenylethanol
4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone	Ethylphenol
2,6-Dimethoxyphenol	Ethyl myristate
4-Hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2H)-furanone	Furfural
4-Hydroxy-5-ethyl-2-methyl-3(2H)-furanone	2-Acetylpyrrole
2-Methoxy-4-ethylphenol (4-ethylguaiacol)	

ส่วนประกอบที่ให้กลิ่น	
Methanol	Acetaldehyde
Ethanol	Propanal
Acetone	Ethyl formate
Methyl acetate	1-Propanol
2-Methylpropanal	Ethyl acetate
2-Methyl-1-propanol	1-Butanol
3-Methylbutanal	2,3-Pentanedione
3-Methyl-1-butanol	

ที่มา: Beuchat (1984)

2.5 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักน้ำซีอิ๊ว

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักน้ำซีอิ๊ว พอจะจำแนกได้ตามรายงานของ Yong และ Wood (1976) และ Beuchat (1984) ได้ดังต่อไปนี้คือ

2.5.1 เชื้อรา

เชื้อราที่นิยมใช้ในการหมักน้ำซีอิ๊วคือ *Aspergillus oryzae* หรือ *A. sojae* ซึ่งใช้ในการเตรียมโคจิเพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ต่าง ๆ โดย *A. oryzae* จะสร้างเส้นใยที่ยาวและฟู และสามารถชอนไชไปตามความหนาของวัตถุดิบได้ดี จึงเหมาะกับการเตรียมโคจิตามวิธีดั้งเดิมคือ บ่มในกระด้งหรือถาดไม้ ส่วน *A. sojae* จะสร้างเส้นใยสั้น จึงเหมาะกับการเตรียมโคจิในห้องบ่มโคจิ (koji chamber) ซึ่งมีระบบการกวนวัตถุดิบในขณะบ่มด้วย

เอนไซม์สำคัญที่เชื้อราสร้างขึ้นได้แก่ เอนไซม์ย่อยโปรตีนหรือโปรติเอสและเอนไซม์ย่อยแป้ง โปรติเอสที่พบมีทั้ง acid protease, neutral protease และ alkaline protease ในบรรดาโปรติเอสทั้งสามชนิดนี้ neutral protease ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมประมาณ 5.6 ถึง 7.0 จัดเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไตด์มากที่สุด เปปไตด์จะถูกย่อยต่อไปเป็นกรดอะมิโนโดยคาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase) และอะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) กรดอะมิโนที่ถูกปลดปล่อยจากเปปไตด์จะมีกรดกลูตามิกรวมอยู่ด้วย นอกจากนั้นกรดกลูตามิกยังมีปริมาณสูงขึ้นได้โดยเชื้อราในโคจิอีกหลายสายพันธุ์ที่สามารถสร้างกลูตามิเนส (glutaminase) ซึ่งจะเปลี่ยนกลูตามีน (glutamine) เป็นกรดกลูตามิก เอนไซม์อีกกลุ่มที่พบในโคจิคือ แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะย่อยแป้งให้ได้กลูโคส นอกจากนี้ยังพบว่ามีเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของถั่วเหลืองเช่น เพคติเนส (pectinase) เซลลูเลส (cellulase) และไซลาเนส (xylanase) และในปี ค.ศ.1977 Yong และ Wood ยังรายงานว่าพบ ไลเปส (lipase) และซูเครส (sucrase) ในโคจิของน้ำซีอิ๊วอีกด้วย

เชื้อราที่มีอยู่ในโคจิจะหยุดการเจริญเติบโตในเมื่ออยู่ในโมโรมิซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือสูง และเมื่อเวลาหมักผ่านไปประมาณ 1-2 เดือน เชื้อราจะตาย แต่เอนไซม์ที่เชื้อราสร้างขึ้นยังคงมีแอคติวิตี (activity) อยู่

อย่างไรก็ตาม Yokotsuka (1960) รายงานว่า อาจพบเชื้อราชนิดอื่น ๆ อีก เช่น *Monilia* *Penicillium* หรือ *Rhizopus* เป็นต้น แต่เชื้อราเหล่านี้ไม่มีผลต่อกระบวนการหมักน้ำซีอิ๊ว

2.5.2 <u>แบคทีเรียและยีสต์</u>

แบคทีเรียที่พบในระยะการหมักในน้ำเกลือที่สำคัญได้แก่ แบคทีเรียแลคติกที่ทนเกลือได้สูงเช่น *Pediococcus halophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก ทำให้ภาวะในถังหมักเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ซึ่งได้แก่ *Zygosaccharomyces (Saccharomyces) rouxii* และ *Torulopsis* sp. โดยจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นรสอื่น ๆ

สำหรับแบคทีเรียและยีสต์นี้พบว่ามีอยู่ในบรรยากาศและอาจติดมากับเกลือ ซึ่งกรรมวิธีการหมักน้ำซีอิ๊วในประเทศไทยยังคงอาศัยแบคทีเรียและยีสต์จากธรรมชาติ โดยการหมักน้ำซีอิ๊วในรุ่นแรก ๆ จะใช้เวลานานและน้ำซีอิ๊วที่ได้จะมีกลิ่นรสไม่ดีมากนัก แต่การหมักในรุ่นต่อไปโดยใช้ภาชนะหมักใบเดิม และประกอบกับการที่มีจุลินทรีย์แพร่กระจายอยู่ในโรงงานมากขึ้น ก็จะทำให้ได้น้ำซีอิ๊วที่มีคุณภาพดีขึ้น ส่วนในประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และประเทศในทวีปยุโรปได้มีการเติมเชื้อบริสุทธิ์ลงในถังหมักเพื่อเร่งระยะเวลาการหมักและให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอทุกรุ่น

อย่างไรก็ตามอาจพบแบคทีเรียและยีสต์ที่ทำให้เกิดผลเสียต่อกลิ่นรสและลักษณะของน้ำซีอิ๊วได้เช่น *Micrococcus urease*, *M. caseolyticus*, *Staphylococcus epidermis* หรือ *Streptococcus faecalis* เป็นต้น และยีสต์ที่สร้างฝ้าที่ผิว (film forming yeast) เช่น *Zygosaccharomyces salsus*, *Z. japonicus* หรือ *Pichia* sp. เป็นต้น (วราวุฒิ ครุส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2531)

2.6 น้ำซอสปรุงรส

2.6.1 ความหมายของน้ำซอสปรุงรส

น้ำซอสปรุงรส ตามที่กำหนดไว้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 8-2513 (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2513) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวอันผลิตขึ้นด้วยการไฮโดรไลซิสสารจำพวกโปรตีนด้วยกรด และมีกลิ่นและรสคล้ายซอสแบบแมกกี้ที่ผลิตในต่างประเทศ

2.6.2 ลักษณะที่ต้องการสำหรับน้ำซอสปรุงรส

น้ำซอสปรุงรสที่ผลิตในประเทศไทยควรมีลักษณะตามตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ลักษณะที่ต้องการสำหรับน้ำซอสปรุงรส

ลักษณะ	ความต้องการ
ความถ่วงจำเพาะ ณ อุณหภูมิห้อง	ไม่น้อยกว่า 1.24
ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ณ อุณหภูมิห้อง	ไม่น้อยกว่า 5.0 ไม่มากกว่า 6.2
ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) คิดเป็นกรัม/ลิตร	ไม่น้อยกว่า 30.0
กรดอะมิโนไนโตรเจน (amino acid nitrogen) คิดเป็นกรัม/ลิตร	ไม่น้อยกว่า 20.0
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) คิดเป็นกรัม/ลิตร	ไม่น้อยกว่า 200 ไม่มากกว่า 230
ยากันบูด	ต้องไม่มี

ที่มา: กระทรวงอุตสาหกรรม (2513)

2.6.3 กรรมวิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลือง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลืองเพื่อจำหน่ายในลักษณะน้ำซอสปรุงรสของโรงงานในประเทศไทย (บริษัทไทยเทพรสผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด, 2535) มีกรรมวิธีพอสรุปได้เป็นขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.6.3.1 การเตรียมส่วนผสม ส่วนผสมประกอบด้วยกากถั่วเหลืองซึ่งผ่านการสกัดไขมัน โดยมีส่วนประกอบหลักคือ โปรตีน ร้อยละ 45 ความชื้น ไม่เกินร้อยละ 10 และไขมัน ไม่เกินร้อยละ 2 และกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 35±0.5 นำไปเจือจางจนมีความเข้มข้นร้อยละ 20 ด้วยน้ำ

2.6.3.2 การย่อยสลาย (Hydrolysis) ผสมกากถั่วเหลืองกับกรดไฮโดรคลอริกในอัตราส่วน 1:1 แล้วย่อยสลายส่วนผสมดังกล่าวภายใต้ไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในถังที่ทำด้วยไฟเบอร์กลาสส์ (fiber glass)

2.6.3.3 การทำให้เป็นกลาง (Neutralization) ป้อนส่วนผสมที่ถูกย่อยแล้วไปยังถังบรรจุสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่มีใบพัดกวนตลอดเวลา จนส่วนผสมมี pH เป็น 5.0 ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1.5-2 ชั่วโมง โดยตรวจสอบปริมาณเกลือให้ได้ 195-260 กรัมต่อลิตร เรียกส่วนผสมที่ได้ว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลือง ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จะมีอุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 3-4 วัน จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปกรอง

2.6.3.4 การกรอง กรองโปรตีนไฮโดรไลเซตผ่าน filter press ที่ทำจากไนลอนและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูกรองประมาณ 10-15 ไมครอน บ่มโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการกรองครั้งแรกนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 เดือน แล้วนำมากรองอีกครั้งหนึ่ง

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

2.6.3.6 การฆ่าเชื้อ พาสเจอร์ไรส์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที และทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

2.6.3.7 การบ่ม บ่มโปรตีนไฮโดรไลเซตนาน 1 เดือน และนำมากรองครั้งสุดท้ายก่อนบรรจุ

2.7 การตรึงรูปเซลล์ (Cell immobilization)

2.7.1 เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป (Immobilized microbial cells) หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ ซึ่งยังคงมีความสามารถในการย่อยสลาย (catalytic activity) อยู่และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่และใช้ได้อย่างต่อเนื่อง (Chibata and Wingard, 1983)

ระบบที่มีการใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป ควรมีลักษณะดังต่อไปนี้

(1) เมื่อเอนไซม์ที่จะใช้ประโยชน์เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ (intracellular enzyme)

(2) เมื่อเอนไซม์ที่สกัดจากเซลล์ไม่เสถียรในระหว่างและหลังการตรึงรูป

(3) เมื่อจุลินทรีย์ไม่ผลิตเอนไซม์อื่นที่จะรบกวนปฏิกิริยา หรือสามารถทำให้เอนไซม์ที่จะรบกวนปฏิกิริยานี้หมดเสถียรภาพหรือกำจัดออกได้โดยง่าย

(4) เมื่อซับสเตรตและผลิตภัณฑ์ ไม่เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก

ซึ่งในลักษณะดังกล่าวนี้ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปมีข้อได้เปรียบ คือ

(1) ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนในการสกัด หรือการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

(2) แอคติวิตีของเอนไซม์ต่อการตรึงรูปสูงขึ้น

(3) เสถียรภาพการทำงานสูงขึ้น

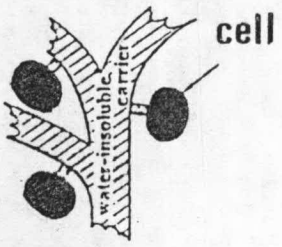
(4) ราคาของเอนไซม์ถูกลง

(5) สามารถที่จะใช้ประโยชน์จากระบบการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

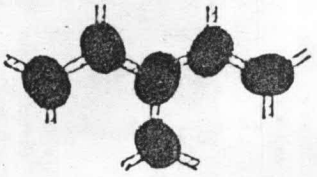
2.7.2 วิธีตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์

การตรึงรูปเซลล์ หมายถึง เทคนิคใด ๆ ที่ใช้จำกัดการแพร่อย่างอิสระของเซลล์ ดังนั้นจะทำให้ง่ายต่อการนำกลับมาใช้ใหม่ (Wiseman, 1980)

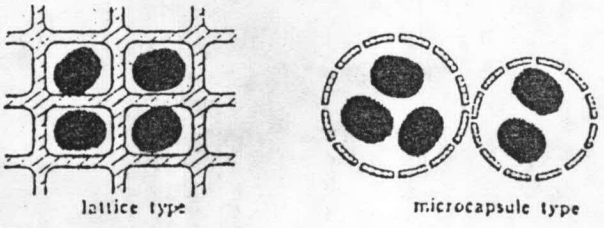
วิธีตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์จำแนกได้เป็น 3 วิธีใหญ่ ๆ (Chibata and Wingard, 1983) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



(1)



(2)



(3)

รูปที่ 2.2 วิธีตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ (1) การเชื่อมกับตัวพยุง (2) การเชื่อมขวาง (3) การห่อหุ้ม

2.7.2.1 การเชื่อมกับตัวพยุง (carrier-binding) อาศัยการเชื่อมโดยตรงของเซลล์จุลินทรีย์กับตัวพยุงของแข็ง แบ่งได้เป็น 3 วิธี ได้แก่ การดูดซับ (adsorption) การเชื่อมกับโลหะ (metal binding or chelation) และการเชื่อมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent binding)

2.7.2.2 การเชื่อมขวาง (cross-linking) การตรึงรูปเซลล์โดยวิธีนี้ไม่ต้องใช้ตัวพยุง แต่เซลล์จุลินทรีย์ถูกตรึงรูปโดยการเชื่อมกับหมู่ฟังก์ชันของตัวกลาง (bi- or multifunctional reagent)

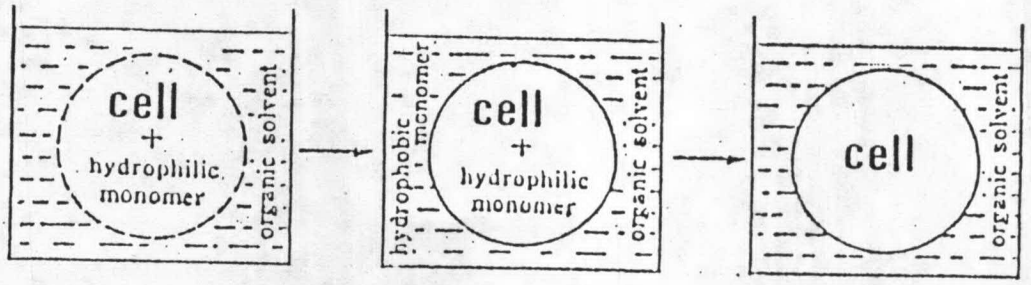
2.7.2.3 การห่อหุ้ม (entrapping) เป็นการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงเข้าไปในเมทริกซ์ของพอลิเมอร์ (polymer matrix) การตรึงรูปโดยวิธีนี้แตกต่างจากการเชื่อมกับตัวพยุงและการเชื่อมขวางคือ ตัวเร่งทางชีวภาพ (biocatalyst) ไม่เชื่อมกับเมทริกซ์ ดังนั้นจึงประยุกต์ใช้ได้กับตัวเร่งทางชีวภาพหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์ เซลล์ หรือองค์ประกอบของเซลล์ (organelles) ที่มีขนาดและสมบัติแตกต่างกัน การห่อหุ้มเซลล์แบ่งได้เป็น 3 วิธี ได้แก่ การห่อหุ้มด้วยเจล (gel entrapment) การห่อหุ้มด้วยเส้นใย (fiber entrapment) และการทำแคปซูลเล็ก (microencapsulation)

2.8 การทำแคปซูลเล็ก (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2533, 2535)

เทคนิคการทำแคปซูลเล็กได้เริ่มขึ้นมาจาก บริษัท National Cash Register ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้นำมาใช้ทำกระดาษกอปปี้ไร้คาร์บอน (carbonless copy paper) จากนั้นได้มีการนำมาพัฒนาดัดแปลงใช้ในอุตสาหกรรมประเภทอื่น ๆ เช่น ยา อาหาร เครื่องสำอาง สีย้อม และเชื้อเพลิง เป็นต้น

การทำแคปซูลเล็กของเซลล์ หมายถึง การล้อมรอบเซลล์ด้วยเยื่อบางของพอลิเมอร์ที่ซึมผ่านได้บางส่วน (semipermeable polymer membrane) กรรมวิธีการทำแคปซูลเล็กแบ่งตามลักษณะการเกิดพอลิเมอร์ได้เป็น 3 กรรมวิธีใหญ่ ๆ คือ interfacial polymerization, liquid drying และ phase separation

2.8.1 Interfacial polymerization method เป็นการห่อหุ้มเซลล์ด้วยเยื่อบางของพอลิเมอร์ที่ซึมผ่านได้บางส่วน การทำแคปซูลเล็กเกิดขึ้นพร้อมกับการเกิดพอลิเมอร์ที่เกิดจากมอนอเมอร์ต่างชนิดกันสองประเภทคือ มอนอเมอร์ชอบน้ำหรือมอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิก (hydrophilic monomers) และมอนอเมอร์ไม่ชอบน้ำหรือมอนอเมอร์ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic monomers) ซึ่งจะเกิดมอนอเมอร์ที่ระหว่างชั้น (interfacial polymerization) ขั้นตอนการทำแคปซูลเล็กห่อหุ้มเซลล์ทำได้โดยการกระจายหรือทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsion) ของสารแขวนลอยเซลล์และมอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิกในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ (water immiscible organic solvent) จากนั้นเติมสารละลายมอนอเมอร์ไฮโดรโฟบิกที่ละลายในตัวทำละลายเดียวกันนี้ลงในอิมัลชัน แล้วกวนอิมัลชันตลอดเวลาเพื่อทำให้เกิดพอลิเมอร์จากมอนอเมอร์ทั้งสองชนิดในชั้นระหว่างน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการแยกมอนอเมอร์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาการสร้างพอลิเมอร์รอบเซลล์ จะได้ส่วนที่เหลือคือ เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อบางของพอลิเมอร์แขวนลอยในตัวทำละลายอินทรีย์ ข้อดีของการทำแคปซูลเล็กโดยวิธีนี้คือ สามารถปรับขนาดของแคปซูลเล็กได้ และใช้เวลาในการทำแคปซูลเล็กสั้น ปฏิกิริยาการทำแคปซูลเล็กแบบ interfacial polymerization แสดงดังรูปที่ 2.3 และตัวอย่างมอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิกและไฮโดรโฟบิกแสดงดังตารางที่ 2.8



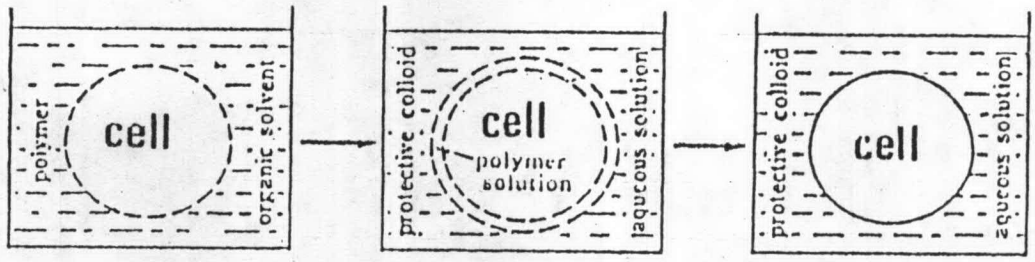
emulsification — interfacial polymerization — removal of unreacted monomer

รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาการทำแคปซูลเล็กแบบ interfacial polymerization

ตารางที่ 2.8 ตัวอย่างมอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิกและไฮโดรโฟบิก

มอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิก	มอนอเมอร์ไฮโดรโฟบิก	พอลิเมอร์
Polyamine	Polybasic acid chloride	Polyamide
	Bishaloformate	Polyurethane
	Polyisocyanate	Polyurea
Glycol, polyphenol	Polybasic acid chloride	Polyester
	Polyisocyanate	Polyurea

2.8.2 Liquid drying method เป็นการห่อหุ้มเซลล์โดยการกระจายสารแขวนลอยเซลล์ในพอลิเมอร์ซึ่งละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำ แล้วตามด้วยการกระจายในสารละลายน้ำ (aqueous solution) และทำให้แห้ง ปฏิกิริยาการทำแคปซูลเล็กแบบ liquid drying แสดงดังรูปที่ 2.4



1st dispersion	2nd dispersion	drying
(1st emulsion)	(2nd emulsion)	(warming,
(water in oil)	(oil in water)	vacuum)

รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาการทำแคปซูลเล็กแบบ liquid drying

กรรมวิธีนี้ เริ่มด้วยการละลายพอลิเมอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำและมีจุดเดือดต่ำกว่าน้ำ จนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นกระจายสารแขวนลอยเซลล์ลงในชั้นสารอินทรีย์เพื่อทำให้เกิดอิมัลชันในลักษณะของหยดน้ำกระจายในน้ำมัน (water in oil) เรียกว่า อิมัลชันครั้งที่ 1 หรือชั้นที่ 1 (1st emulsion) จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactants หรือ surface active agent) ได้แก่ เจลาติน (gelatin) หรือ polyvinylalcohol ที่ละลายได้ในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ จะช่วยรักษาการเกิดคอลลอยด์ (colloid) เพื่อให้เกิดอิมัลชันที่คงตัว และเกิดเป็นอิมัลชันในลักษณะของหยดน้ำมันกระจายในน้ำ (oil in water) เรียกว่า อิมัลชันครั้งที่ 2 หรือชั้นที่ 2 (2nd emulsion) เมื่อกวนไปเรื่อย ๆ จะทำให้ส่วนของ

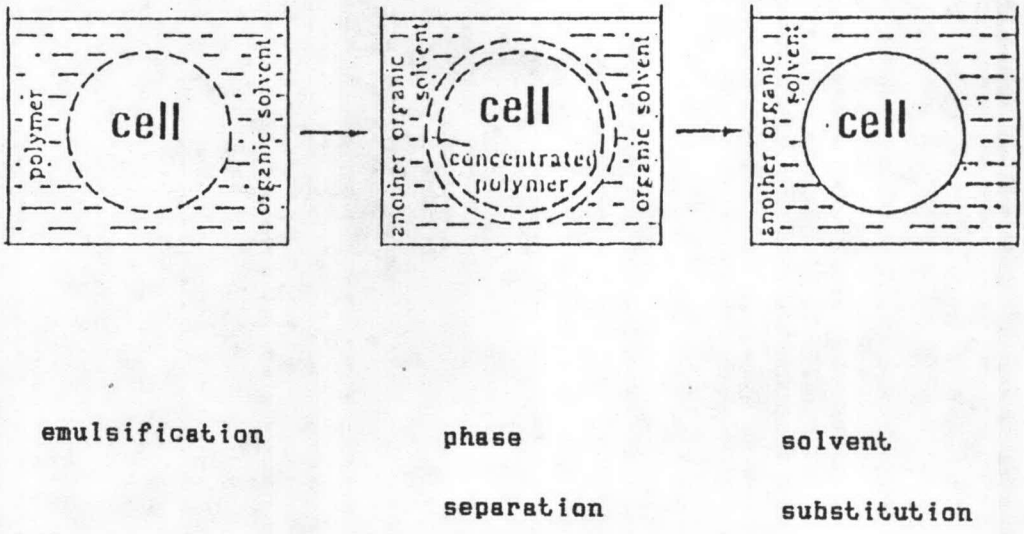
ชั้นพอลิเมอร์ในชั้นของผิวอิมัลชันครั้งที่ 2 (ชั้นที่ 2) เข้มข้นสูงขึ้นจนเกิดฟิล์มแข็งคงตัวขึ้น จะได้พอลิเมอร์หุ้มเซลล์ไว้ จากนั้นแยกตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกไปโดยการระเหยแห้งภายใต้ความดันสูญญากาศ จะช่วยรักษาสภาพธรรมชาติของพอลิเมอร์ให้คงตัว

ขนาดของแคปซูลเล็กขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนความเข้มข้นของพอลิเมอร์ อัตราเร็วของ mechanical emulsifier หรือชนิดของสารลดการเกิดคอลลอยด์ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่เหมาะสมกับการเตรียมแคปซูลเล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 30 ไมครอน ไม่เหมือนกับวิธี interfacial polymerization เนื่องจากใช้พอลิเมอร์สำเร็จ (performed polymer) และไม่ต้องใช้ reactive reagent ดังนั้นจะไม่เกิดการยับยั้งหรือเกิดการยับยั้งเพียงเล็กน้อยในระหว่างการเตรียมแคปซูลเล็ก วิธีนี้จึงดูเหมือนว่าให้ประโยชน์มาก อย่างไรก็ตามมีมีข้อควรพิจารณาคือ การควบคุมให้เกิดอิมัลชันครั้งที่ 2 หรือชั้นที่ 2 นั้น ปกติทำได้ยาก ดังนั้นจึงต้องเลือกสารลดแรงตึงผิวที่จะรักษาความคงตัวของคอลลอยด์ให้เหมาะสม และในขั้นตอนการแยกตัวทำละลายอินทรีย์ให้สมบูรณ์ต้องใช้เวลานานและทำได้ยาก เพราะอาจจะไปรวมกับสารลดแรงตึงผิวได้

ตัวอย่างพอลิเมอร์ได้แก่ ethyl cellulose, polystyrene และ polyethylene เป็นต้น และตัวอย่างตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เบนซีน (benzene) ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) และคลอโรฟอร์ม (chloroform) เป็นต้น

2.8.3 Phase separation method

ปฏิกิริยาการทำแคปซูลเล็กแบบ phase separation คล้ายกับวิธี liquid drying ซึ่งมีขั้นตอนการทำแคปซูลเล็กแสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาการทำแคปซูลเล็กแบบ phase separation

กรรมวิธีนี้มีขั้นตอนดังนี้คือ ต้องผ่านกระบวนการทำให้พอลิเมอร์บริสุทธิ์ โดยละลายพอลิเมอร์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 1 และทำให้สารแขวนลอยเซลล์กระจายเป็นอิมัลชันในตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 1 และพอลิเมอร์ โดยจะได้อิมัลชันในลักษณะของหยดน้ำกระจายในน้ำมัน จากนั้นทำให้สารละลายพอลิเมอร์แยกเป็น 2 ชั้น (phase) โดยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 2 ซึ่งรวมกับตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 1 ได้ดี แต่ไม่ละลายพอลิเมอร์ ดังนั้นถ้าเติมตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 2 ลงไปทีละน้อยพร้อมกับกวนตลอดเวลา ก็จะไปรวมกับตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 1 ซึ่งจะมีผลให้สารละลายพอลิเมอร์ถูกแยกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นในที่มีความเข้มข้นของพอลิเมอร์สูง ซึ่งก็คือส่วนของพอลิเมอร์ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ จะกลายเป็นเยื่อบางห่อหุ้มเซลล์ไปในที่สุด

ส่วนชั้นนอกที่อยู่ห่างหยดเซลล์ออกไปอีก จะมีสารพอลิเมอร์ความเข้มข้นต่ำ ไม่สามารถทำให้กลายเป็นเยื่อบางได้ ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการแทนที่ตัวทำละลาย (solvent substitution) เมื่อมีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 2 และกวนตลอดเวลา จนกระทั่งเกิดการแทนที่ของตัวทำละลายอย่างสมบูรณ์ ส่วนของฟิล์มพอลิเมอร์จะค่อย ๆ แข็งตัวขึ้น

การทำแคปซูลเล็กโดยวิธีนี้เรียกอีกนัยหนึ่งคือ การทำให้สารแขวนลอยเซลล์กระจายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่ละลายน้ำซึ่งมีพอลิเมอร์อยู่ จากนั้นค่อย ๆ เติมตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอื่นอย่างช้า ๆ ลงในชั้นสารละลายอินทรีย์ที่มีหยดน้ำเล็ก ๆ จนกระทั่งความเข้มข้นของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น และเยื่อบางถูกสร้างขึ้นเพื่อห่อหุ้มเซลล์เป็นหยดเล็ก ๆ ข้อควรพิจารณาในการทำแคปซูลเล็กวิธีนี้คือ ต้องควบคุมในช่วงของการทำแยกชั้นของพอลิเมอร์ และการแทนที่ตัวทำละลายอย่างสมบูรณ์ โดยระวังมิให้ส่วนของพอลิเมอร์ตกตะกอนแยกออกมา รวมทั้งต้องแยกตัวทำละลายที่เหลือในพอลิเมอร์ออกให้หมด จึงจะได้แคปซูลเล็กห่อหุ้มเซลล์ที่คงตัว ตัวอย่างวัสดุที่ทำให้เกิดการแยกชั้น แสดงดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 ตัวอย่างวัสดุที่ทำให้เกิดการแยกชั้น

พอลิเมอร์	ตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 1	ตัวทำละลายอินทรีย์ตัวที่ 2
Ethyl cellulose	Carbon tetrachloride	Petroleum ether
Nitrocellulose	Ether	Butyl benzoate
Polystyrene	Xylene	Petroleum ether
Polyethylene	Xylene	Amyl chloride
Polyvinyl acetate	Chloroform	Petroleum ether
Polymethylmethacrylate	Chloroform	Petroleum ether
Polyisobutylene	Chloroform	Ethyl acetate

2.9 การประยุกต์ใช้เทคนิคการห่อหุ้ม

ตัวอย่างรายงานการวิจัยที่นำเทคนิคการห่อหุ้มวิธีต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้กับทั้งเอนไซม์และเซลล์ มีดังต่อไปนี้

Chang (1964) รายงานการเตรียมแคปซูลเล็กที่ซึมผ่านได้บางส่วน (semipermeable microcapsules) สำหรับห่อหุ้มสารละลายโปรตีนพวก erythrocyte hemolysate ที่มีแอคติวิตีของคาร์บอนิกแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) ด้วยเยื่อบางของพอลิเมอร์โดยวิธี interfacial polymerization ซึ่งใช้มอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิกพวก 1,6-hexanediamine มอนอเมอร์ไฮโดรโฟบิกพวก sebacoylchloride และตัวทำละลายอินทรีย์ผสมของ cyclohexane-chloroform และใช้อิมัลซิไฟเออร์พวก Span 85 โดยมีขั้นตอนการเตรียมที่สำคัญ 3 ขั้นตอนดังนี้คือ ทำให้เกิดอิมัลชันของสารละลาย erythrocyte hemolysate กับ 1,6-hexanediamine ในตัวทำละลายอินทรีย์ผสมของ cyclohexane-chloroform และ Span 85 จากนั้นเติม sebacoylchloride ลงไปเพื่อให้เกิดเยื่อบางห่อหุ้ม erythrocyte hemolysate และขั้นตอนสุดท้ายคือ การแยกแคปซูลเล็กออกมา ซึ่งจะได้แคปซูลเล็กที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยน้อยกว่า 15 ไมครอน และเมื่อนำแคปซูลเล็กที่ได้ไปทดสอบสมบัติต่าง ๆ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อสับสเตรต (substrate) น้อยกว่าเอนไซม์อิสระ เนื่องจากการแพร่ของสับสเตรตหรือผลิตภัณฑ์ผ่านเยื่อบางจัดเป็นกระบวนการที่จำกัดอัตราเร็ว (rate-limiting process) อย่างไรก็ตามเอนไซม์อิสระจะไม่หลุดจากแคปซูลเล็ก และยังทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายของคาร์บอนไดออกไซด์ (hydration of CO_2) ได้เกือบเท่ากับเอนไซม์อิสระ นอกจากนี้เอนไซม์ยังคงมีเสถียรภาพหรือแอคติวิตีอยู่ได้เป็นเวลาหลายสัปดาห์ และมีความไว (sensitive) ต่อตัวยับยั้งพวก acetazolamide และเมื่อนำไปทดสอบในสัตว์ทดลอง (in vivo) เกี่ยวกับความเป็นพิษและแอคติวิตีของแคปซูลเล็กห่อหุ้มเอนไซม์โดยฉีดเข้าไปใต้ผิวหนัง (subcutaneous) หรือในกระเพาะอาหาร (intraperitoneal) พบว่า แคปซูลเล็กจะมีความเป็นพิษต่ำ และยังคงมีแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับการทดแทนทางอายุรเวท (therapeutic replacement) เกี่ยวกับการขาดเอนไซม์เนื่องจากสาเหตุทางพันธุกรรม (genetic accident)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1966 Chang, MacIntosh และ Mason ได้สรุปหลักการเตรียมแคปซูลเล็กที่ซึมผ่านได้บางส่วนสำหรับห่อหุ้มเอนไซม์ โปรตีนชนิดอื่น ๆ หรือส่วนของเซลล์ (cell fragments) โดยวิธี interfacial polymerization ซึ่งจะได้แคปซูลเล็กที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 ไมครอนหรือน้อยกว่า โดยมีหลักการที่สำคัญดังนี้คือ

(1) ทำให้เกิดอิมัลชันของสารละลายโปรตีนหรือสารแขวนลอยเซลล์กับมอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิกประเภท aliphatic diamine ที่เหมาะสมเช่น hexanediamine ในตัวทำละลายอินทรีย์ผสมเช่น cyclohexane-chloroform และมีอิมัลซิไฟเออร์ เช่น Span 85 อยู่ด้วย

(2) เติมมอนอเมอร์ไฮโดรโฟบิกประเภท dicarboxylic acid halide เช่น sebacoylchloride ลงไป เพื่อให้เกิดเยื่อบางของพอลิเมอร์ขึ้นรอบ ๆ หยดของสารละลายโปรตีนหรือสารแขวนลอยเซลล์

(3) กำจัดชั้นของสารอินทรีย์ (organic phase) ออกไป และแยกเอาแคปซูลเล็กออกมา

การเตรียมแคปซูลเล็กโดยวิธี interfacial polymerization นี้ มีข้อดีคือ จะได้เยื่อบางประเภท polyamide (nylon) ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วบริเวณรอยต่อของมอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิกและไฮโดรโฟบิก โดยปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิห้อง และเยื่อบางที่ได้จะมีเสถียรภาพดี

Chang และ Poznansky (1968) ประสบผลสำเร็จในการเตรียมแคปซูลเล็กห่อหุ้มคะตะเลส (catalase) สำหรับทดแทนการขาดเอนไซม์ในหนู (acatalasaemic mice) ซึ่งเตรียมโดยวิธี interfacial polymerization และใช้มอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิกและไฮโดรโฟบิกตัวทำละลายอินทรีย์ และอิมัลซิไฟเออร์ เหมือนกับวิธีของ Chang (1964) เมื่อทดลองฉีดแคปซูลเล็กห่อหุ้มคะตะเลสเข้าไปในหนูที่ขาดเอนไซม์ชนิดนี้ พบว่า เอนไซม์จะไม่หลุดออกจากแคปซูลเล็กและมีแอคติวิตีในปฏิกิริยาการต้านทานโรค (immunological reaction) ผลการทดลองดังกล่าวนี้ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มและความเป็นไปได้ที่จะประยุกต์ใช้แคปซูลเล็กห่อหุ้มเอนไซม์ในลักษณะเดียวกันนี้ในการบำบัดอาการขาดคะตะเลส (acatalasaemia) ในมนุษย์ได้

ต่อมาในปี ค.ศ.1971 Chang ได้รายงานเกี่ยวกับเสถียรภาพของแคปซูลเล็กห่อหุ้มเอนไซม์เช่น คะตะเลส แอสปาราจิเนส (asparaginase) และยูรีเอส (urease) ที่เตรียมโดยวิธี interfacial polymerization เหมือนวิธีของ Chang (1964) และ Chang, MacIntosh และ Mason (1966) ซึ่งพบว่า สามารถเพิ่มเสถียรภาพของแคปซูลเล็กได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ และเสถียรภาพจะเพิ่มมากขึ้นได้อีกโดยนำแคปซูลเล็กที่ได้มาเชื่อมขวาง (cross-link) กับกลูทารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)

Mori และคณะ (1972) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแคปซูลเล็กห่อหุ้มแอสปาราจิเนสจาก *Proteus vulgaris* โดยวิธี interfacial polymerization ซึ่งใช้มอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิกพวก 1,6-hexanediamine และมอนอเมอร์ไฮโดรโฟบิกพวก sebacoylchloride และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ผสมของ cyclohexane-chloroform ที่มี Span 85 เป็นอิมัลซิไฟเออร์ พบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแคปซูลเล็กคือ ใช้สารละลายเอนไซม์จำนวน 1 มิลลิลิตร ใช้ 1,6-hexanediamine จำนวน 800 ไมโครโมล ใช้ sebacoylchloride 450 ไมโครโมล และอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม cyclohexane-chloroform เป็น 5:1 โดยทำกับปฏิกิริยากับเคซีน (casein) และกรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) ที่ pH 8.4 เป็นเวลา 3 นาที นอกจากนี้ยังพบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแคปซูลเล็กขึ้นอยู่กับอัตราเร็วของการคน (stirring rate) และความเข้มข้นของ Span 85 สำหรับแอคติวิตีของแคปซูลเล็กที่ได้จากภาวะดังกล่าวจะน้อยกว่าเอนไซม์อิสระ แต่แคปซูลเล็กมีความทนทานต่อแรงสะเทือนทางกล (mechanical shock) หรือการทำลายจากไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และไม่มีเอนไซม์อิสระหลุดจากแคปซูลเล็ก ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวนี้จะมีการประยุกต์ใช้แคปซูลเล็กห่อหุ้มเอนไซม์นี้ในทางการแพทย์ เช่น ใช้เป็นยาสำหรับกำจัดเนื้องอก (antitumor drug) โดยแคปซูลเล็กห่อหุ้มแอสปาราจิเนสจะมีบทบาทในการกำจัด (suppression) เนื้อเยื่อพวก lymphosarcoma เป็นต้น

ต่อมาในปี ค.ศ.1973 Mori, Tosa และ Chibata (1973) ได้รายงานเกี่ยวกับลักษณะต่าง ๆ ของแคปซูลเล็กห่อหุ้มแอสปาราจิเนส (L-asparagine amidohydrolase, EC 3.5.1.1) ที่เตรียมโดยวิธี interfacial polymerization ซึ่งใช้มอนอเมอร์ไฮโดรฟิลิค มอนอเมอร์ไฮโดรโฟบิก และตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เหมือนกับวิธีของ Mori และคณะ (1972) เพื่อประยุกต์ใช้แคปซูลเล็กห่อหุ้มเอนไซม์ในการบำบัดโรคต่าง ๆ (enzyme therapy) พบว่า pH ที่เหมาะสมของแคปซูลเล็กห่อหุ้มเอนไซม์มีค่าเท่ากับ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์อิสระ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมของแคปซูลเล็กจะต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ แต่ค่าคงที่ไมคีลิส (Michaelis constant) มีค่าสูงกว่าเอนไซม์อิสระประมาณ 100 เท่า และไม่มีความแตกต่างของเสถียรภาพในการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าแอคติวิตีของแคปซูลเล็กจะต่ำกว่าเอนไซม์อิสระ แต่แคปซูลเล็กมีความทนทานต่อการใช้งานซ้ำ (repeated uses) และการทำลายจากเอนไซม์ย่อยโปรตีน

Chang (1973) ศึกษาการเตรียมแคปซูลเล็กห่อหุ้มแอสปาราจิเนส (L-asparaginase) จาก *Escherichia coli* โดยวิธี phase separation ซึ่งใช้ tris (hydroxymethyl amino methane base) และจะได้เยื่อบางประเภทเซลลูโลสไนเตรต (cellulose nitrate จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับกลูทารัลดีไฮด์เพื่อเพิ่มเสถียรภาพพบว่า เยื่อบางของแคปซูลเล็กยอมให้สับสเตรตพวกแอสปาราจีน (asparagine) เข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในแคปซูลเล็กได้ และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 100 วัน แอคติวิตีของเอนไซม์ยังคงมีถึงร้อยละ 90 และแคปซูลเล็กยังคงมีเสถียรภาพมากกว่าเอนไซม์อิสระ นอกจากนี้เมื่อทดลองฉีดแคปซูลเล็กเข้าไปในกระเพาะอาหารของหนูพบว่า แคปซูลเล็กสามารถลดระดับของแอสปาราจีนจากพลาสมา (plasma asparagine) จนถึงระดับศูนย์ได้ และยังคงรักษาระดับนี้ได้เป็นระยะเวลานานหลายเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อิสระ

Mohan และ Li (1974) ศึกษาการเตรียมแคปซูลเล็กห่อหุ้มรีดักเทส (reductase) จาก *Micrococcus denitrifican* โดยวิธี liquid drying ซึ่งใช้สารเคมีที่ประกอบด้วย Sorbitan monooleate (Span 80) ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก สารประกอบเอมีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight amine) พวก Enjay 3029 ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon solvent) พวก isoparaffin S100N ร้อยละ 88 โดยน้ำหนัก เพื่อใช้กำจัดไนเตรตหรือไนไตร์ตในน้ำทิ้ง (waste water) โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ของแคปซูลเล็กห่อหุ้มเอนไซม์แบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า แคปซูลเล็กสามารถทำปฏิกิริยากับสับสเตรตที่ผ่านเยื่อบางของแคปซูลเล็กเข้ามาได้และไม่มีเอนไซม์อิสระหลุดจากแคปซูลเล็ก ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ.1975 Mohan และ Li ได้ศึกษาการเตรียมแคปซูลเล็กห่อหุ้มเซลล์ *M. denitrifican* โดยวิธี liquid drying ซึ่งใช้สารเคมีเช่นเดียวกับ Mohan และ Li (1974) และเพิ่มการใช้สารที่ช่วยขนย้ายไอออนบวก (anion transport facilitator) พวก Amberlite LA-2 ซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อใช้กำจัดไนเตรตและไนไตร์ตในน้ำทิ้งเช่นเดียวกัน โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กชนิดไม่ต่อเนื่องและต่อเนื่องแบบกวน (stirred reactor) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อทดลองใช้เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กเป็นเวลา 5 วัน เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กนี้สามารถมีชีวิตต่อไปได้ในช่วงเวลาหนึ่ง โดยที่ไม่มีเซลล์แตก (lysis) หรือเสียสภาพใด ๆ นอกจากนี้ Mohan และ Li ยังชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะรักษาความสามารถในการทำปฏิกิริยา (reactivity) ของเซลล์ได้เป็นเวลานาน ถ้ามีการห่อหุ้มสารอาหารที่จำเป็นพร้อมกับเซลล์ด้วย

Campbell และ Chang (1975) ศึกษาการเตรียมแคปซูลเล็กห่อหุ้มเอนไซม์ 2 ชนิด คือ hexokinase (ATP:D-glucose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.2) และ pyruvate kinase (ATP:pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC 2.7.1.40) โดยวิธี phase separation พบว่า แคปซูลเล็กที่ได้จะแสดงแอคติวิตีที่ดีของเอนไซม์ทั้งสองชนิด และเมื่อใช้ทดสอบเกี่ยวกับความสามารถในการหมุนเวียน (recyling) ของ ATP และ ADP ก็จะให้ผลเป็นที่น่าพอใจเช่นเดียวกัน ต่อมาในปี ค.ศ.1976 Campbell และ Chang ได้ทดลองเตรียมแคปซูลเล็กห่อหุ้มเอนไซม์ 2 ชนิดคือ alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) และ malic dehydrogenase (EC 1.1.1.37) โดยวิธี phase separation ซึ่งพบว่า แคปซูลเล็กที่ได้จะแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ดีที่สุดเมื่ออัตราส่วนของ alcohol dehydrogenase ต่อ malic dehydrogenase เท่ากับ 1:3 และเมื่อใช้ทดสอบเกี่ยวกับความสามารถในการหมุนเวียนของ NAD^+ และ NADH ก็จะให้ผลเป็นที่น่าพอใจเช่นเดียวกัน

Tipayang และ Kozaki (1972) ศึกษาการห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus vaccinostercus* ด้วยแคลเซียมแอลจิเนตเจล (calcium alginate gel) แล้วทดลองผลิตกรดแลคติกจากสารละลายปฏิกิริยา (reaction medium) ที่ประกอบด้วยไซโลส (xylose) ร้อยละ 2 เปปโตน (peptone) ร้อยละ 1 และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ร้อยละ 0.5 โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบไม่ต่อเนื่องพบว่า เซลล์ตริงรูปที่เตรียมได้จะเสถียร และไม่มีเซลล์อิสระหลุดเข้าไปในสารละลายปฏิกิริยา นอกจากนี้เซลล์ตริงรูปสามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าเซลล์อิสระเมื่อเลี้ยงในสารละลายชนิดเดียวกันและเซลล์ทั้งหมดในเจลสามารถมีชีวิตรอดในสารละลายปฏิกิริยาได้เป็นเวลา 1 เดือน

2.10 การประยุกต์ใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปในการผลิตน้ำซีอิ๊ว

เนื่องจากน้ำซีอิ๊วที่ผ่านกระบวนการหมักแบบดั้งเดิมนั้นต้องใช้เวลาในการผลิตค่อนข้างนานคือ 6 เดือนหรือมากกว่า และใช้พื้นที่ในการผลิตมาก ซึ่งนอกจากจะทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตเพิ่มขึ้นตามแล้ว ยังเกิดปัญหาในการควบคุมด้านสุขาภิบาล ดังนั้นจึงสมควรที่จะนำเทคโนโลยีการตรึงรูปเซลล์มาประยุกต์ใช้กับกระบวนการหมักน้ำซีอิ๊ว ซึ่งมีข้อได้เปรียบที่สำคัญคือ ช่วยลดระยะเวลาในการผลิต นอกจากนี้ยังมีข้อได้เปรียบทั้งในแง่ของประสิทธิภาพของการใช้งาน ความประหยัด และความสะดวกต่อการควบคุมด้านสุขาภิบาล จึงมีการประยุกต์ใช้เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปในการผลิตน้ำซีอิ๊ว ดังตัวอย่างงานวิจัยต่อไปนี้

Osaki และคณะ (1985) ทดลองผลิตน้ำซีอิ๊วแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิไดซ์ และใช้เซลล์จุลินทรีย์ 3 ชนิดคือ *Pediococcus halophilus*, *Saccharomyces rouxii* และ *Torulopsis versatilis* ที่ห่อหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนตเจล โดยใช้สารละลายสำหรับหมักที่ประกอบด้วยโคจิเปียก (wet *koji*) กากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออกไปแล้ว เกลือ และน้ำ ซึ่งผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือน้อยกว่าร้อยละ 10 และอุณหภูมิน้อยกว่า 55 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเซลล์ห่อหุ้มของจุลินทรีย์แต่ละชนิดไปทดลองหมักน้ำซีอิ๊ว โดยทดลองหมักในเครื่องปฏิกรณ์ที่บรรจุเซลล์ห่อหุ้มของ *P. halophilus* ก่อน จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปหมักต่อในเครื่องปฏิกรณ์ที่บรรจุเซลล์ห่อหุ้มของ *S. rouxii* เปรียบเทียบกับการหมักต่อโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ที่บรรจุเซลล์ *T. versatilis* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำซีอิ๊วที่ได้ผ่านกระบวนการหมักโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ดังกล่าวจะมีส่วนประกอบที่คล้ายคลึงกัน ยกเว้นรูปแบบของกรดอินทรีย์และส่วนประกอบที่ให้กลิ่น (aroma component) ซึ่งจะแตกต่างกันในด้านปริมาณ ส่วนเวลาที่ใช้ในการผลิตน้ำซีอิ๊วตลอดทั้งกระบวนการลดเหลือเพียง 80 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตแบบดั้งเดิมซึ่งใช้เวลาถึง 6 เดือนหรือมากกว่า โดยที่น้ำซีอิ๊วที่ได้นี้จะมีกลิ่นรสใกล้เคียงกับน้ำซีอิ๊วที่ได้จากการผลิตแบบดั้งเดิม

Hamada, Ishiyama และ Motai (1989) ทดลองใช้เซลล์ *Zygosaccharomyces rouxii* ที่ห่อหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนต สำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ในน้ำซีอิ๊วแบบต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์แอร์ลิฟท์ (airlift reactor) โดยใช้สารละลายสำหรับหมักที่มีส่วนประกอบและวิธีเตรียมเช่นเดียวกับของ Osaki และคณะ (1985) ผลการทดลองพบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ในน้ำซีอิ๊วคือ ใช้สารละลายสำหรับหมักที่มี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4.5-5.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 25-27.5 องศาเซลเซียส โดยที่ปริมาณของแอลกอฮอล์ในน้ำซีอิ๊วจะเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราส่วนของความสูงต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของเครื่องปฏิกรณ์และอัตราส่วนของอากาศต่อแก๊สไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์และส่วนประกอบที่ให้กลิ่นในน้ำซีอิ๊วจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อป้อนแก๊สไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามน้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้นี้จะมีส่วนประกอบที่ให้กลิ่นใกล้เคียงกับในน้ำซีอิ๊วที่ได้จากการผลิตแบบดั้งเดิมและใช้เวลาในการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ประมาณ 50 วัน ซึ่งน้อยกว่าการผลิตน้ำซีอิ๊วแบบดั้งเดิม และไม่มีปัญหาใด ๆ เกิดขึ้น ถึงแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเวลา (residence time) หรือการให้อากาศ

Horitsu, Maseda และ Kawai (1990) รายงานกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ในน้ำซีอิ๊วแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบคอลัมน์และใช้เซลล์จุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ *Zygosaccharomyces rouxii* และ *Candida versatilis* ที่ตรึงรูปโดยการดูดซับ (adsorption) กับตัวพยุงพวกเซรามิกส์ (ceramic carrier) ที่ประกอบด้วยอะลูมินา (alumina) ร้อยละ 95 และซิลิกา (silica) ร้อยละ 5 ซึ่งมีโครงสร้างเป็นเส้นใย (filament) โดยมีขนาดของรูพรุนเฉลี่ยเท่ากับ 60 ไมครอน และมีความพรุน (porosity) ร้อยละ 90 ส่วนสารละลายสำหรับหมักประกอบด้วยโคจิ ถั่วเหลืองนึ่ง (steam-boiled soybean) และน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 10 จากนั้นนำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และนำสารละลายที่ได้นี้ไปหมักโดยใช้แบคทีเรียแลคติกพวก *Pediococcus halophilus* ก่อนที่จะนำไปป้อนผ่านเครื่องปฏิกรณ์ที่บรรจุเซลล์ตรึงรูปของ *Z. rouxii* และ *C. versatilis* ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การหมักน้ำซีอิ๊วโดยผ่านเครื่องปฏิกรณ์ทั้งสองเครื่องนี้จะเวลาเพียง 8 วันเท่านั้น ซึ่งน้อยกว่าการหมักน้ำซีอิ๊วแบบดั้งเดิมที่ใช้เวลานานถึง 6 เดือน โดยที่น้ำซีอิ๊วที่ได้นี้จะมีคุณภาพที่ดีเช่นเดียวกัน

2.11 เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์ (Fluidized reactor)

(พล สาเกทอง, 2526; สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2528)

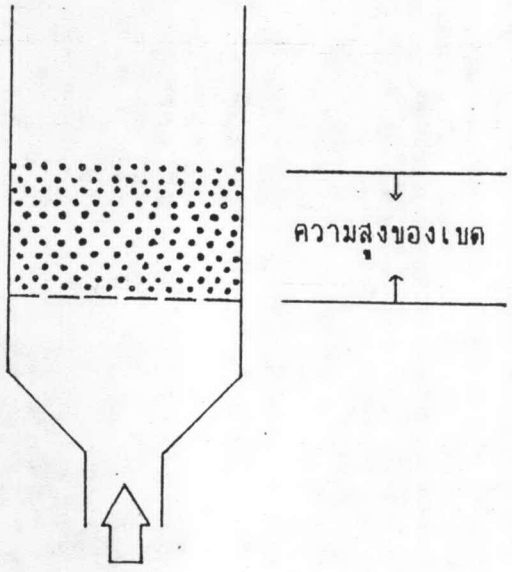
การเลือกชนิดของเครื่องปฏิกรณ์เซลล์ตริงรูปนั้นไม่มีกฎเกณฑ์แน่นอน ต้องมีการพิจารณาปัจจัยอื่น ๆ ประกอบกับลักษณะงานที่ต้องการเป็นสำคัญ เช่น เมื่อใช้เซลล์ตริงรูปที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก ๆ ในเครื่องปฏิกรณ์เบดบรรจุ (packed-bed) จะพบปัญหาเรื่องการอุดตัน (plugging) และการลดลงของความดัน (pressure drop) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีการใช้เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์ ซึ่งยังมีข้อดีในกรณีที่ต้องการควบคุมการผสมแก๊ส การควบคุม pH หรืออุณหภูมิ หรือการใช้อัตราการไหลสูง ๆ (Chibata and Wingard, 1983)

2.11.1 ฟลูอิไดเซชัน (fluidization) ฟลูอิไดเซชัน หมายถึง กระบวนการที่ของแข็งซึ่งมีรูปร่างลักษณะเป็นเม็ดหรือชิ้นสัมผัสกับของไหลแล้วเม็ดของของแข็งเหล่านี้มีคุณสมบัติคล้ายของไหล หรืออาจกล่าวได้ว่า ฟลูอิไดเซชัน หมายถึง การที่อนุภาคหรือกลุ่มของอนุภาคลอยตัวอยู่ในของไหลที่ไหลผ่านได้โดยไม่หลุดลอยไปกับของไหลและไม่กองอยู่เหนือแผ่นตะแกรง (distributor) ฟลูอิไดเซชันแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

2.11.1.1 ฟลูอิไดเซชันสองสถานะ (two-phase fluidization) หมายความว่า ในเบด (bed) หรือหอทดลองประกอบด้วยของสองสถานะคือ ของแข็งกับของไหล ซึ่งของไหลนี้จะเป็นของเหลวหรือแก๊สก็ได้

2.11.1.2 ฟลูอิไดเซชันสามสถานะ (three-phase fluidization) หมายความว่า ในเบดประกอบด้วยของสามสถานะอยู่พร้อมกันคือ ของแข็ง ของเหลว และแก๊ส

2.11.2 ลักษณะของฟลูอิไดซ์เบด เบด หมายถึง อาณาเขตในหอทดลองที่มีปริมาณเม็ดของแข็งอยู่นิ่ง ไม่ว่าเม็ดของแข็งนั้นจะอยู่นิ่งหรือเคลื่อนที่ด้วยของไหลในหอทดลองจะมีตั้งแต่ระดับของแผ่นโลหะที่ทำเป็นแผ่นตะแกรงจนถึงระดับสูงสุดคือ ผิวหน้าของเม็ดของแข็งที่อยู่ในหอทดลองดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ระดับของเบดในหอทดลอง

เมื่อบรรจุเม็ดของแข็งในหอทดลองแล้ว ให้เริ่มปล่อยของไหลเข้าทางด้านล่างของหอทดลองอย่างช้า ๆ ขณะที่ความเร็วของของไหลยังต่ำอยู่ เม็ดของแข็งจะไม่ขยับตัวเลย ลักษณะของเบดเช่นนี้เรียกว่า เบดนิ่ง (fixed bed) เมื่อเพิ่มความเร็วของของไหลขึ้นจนถึงความเร็วระดับหนึ่ง เม็ดของแข็งจะเริ่มขยับตัวและจัดตัวอย่างเป็นระเบียบ และเมื่อความเร็วของของไหลเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อย เม็ดของแข็งจะหลุดออกจากกันและลอยตัวเป็นอิสระ เรียกจุดนี้ว่า จุดเริ่มฟลูอิไดเซชัน (bed at minimum fluidization หรือ fluidizing point) เมื่อผ่านจุดนี้ไปแล้ว ความเร็วของของไหลที่เพิ่มขึ้นจะไปทำให้เบดขยายตัวขึ้น เม็ดของแข็งยังอยู่ชิดกันมากทำให้ดูเหมือนว่าเม็ดของแข็งยังจับกันเป็นกลุ่มก้อน เรียกเบดลักษณะนี้ว่า ฟลูอิไดซ์เบดแบบหนาแน่น (dense-phase fluidized bed) ถ้าความเร็วของของไหลมากขึ้นอีก ของไหลก็เกือบจะพาเอาเม็ดของแข็งออกไปจากหอทดลอง เรียกเบดลักษณะนี้ว่า ฟลูอิไดซ์เบดเจือจาง (diluted-phase fluidized bed) หลังจากนั้นถ้าเพิ่มความเร็วของของไหลอีกเล็กน้อย เม็ดของแข็งก็จะหลุดลอยออกจากหอทดลองไป

ลักษณะของฟลูอิไดซ์เบดที่ของไหลเป็นของเหลว การขยายตัวของเบดจะเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ การลอยตัวและหมุนรอบตัวเองของเม็ดของแข็งเป็นไปอย่างช้า ๆ เรียกว่า ฟลูอิไดซ์เบดสม่ำเสมอ (smoothly fluidized bed) ส่วนลักษณะของฟลูอิไดซ์เบดที่ของไหลเป็นแก๊สนั้นแตกต่างจากที่เป็นของเหลวมาก กล่าวคือ ถ้าความเร็วของแก๊สสูงกว่าความเร็วที่ทำให้เกิดฟลูอิไดเซชันแล้ว แก๊สส่วนหนึ่งยังทำให้เกิดการลอยตัวของเม็ดของแข็งเหมือนเดิม แต่มีอีกส่วนหนึ่งที่รวมตัวกันเป็นฟองแก๊สขึ้น ฟองแก๊สจะแทรกตัวเองขึ้นมายังบนผิวหน้าของเบดและแตกตัวเองในที่สุด ขณะที่ฟองแก๊สลอยขึ้นมานี้จะทำให้เม็ดของแข็งไหลจากส่วนบนของฟองแก๊สลงมายังส่วนล่าง พร้อมกันนั้นยังมีบางส่วนของเม็ดของแข็งลอยติดตามฟองแก๊สขึ้นไปด้วย ทำให้การเคลื่อนที่ของเม็ดของแข็งเป็นไปอย่างชุลมุน เรียกเบดลักษณะนี้ว่า ฟลูอิดไดซ์เบดชุลมุน (turbulently fluidized bed)

2.11.3 ข้อดีและข้อเสียของฟลูอิไดเซชัน

2.11.3.1 ข้อดี

2.11.3.1.1 เกิดการผสมกันอย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอ เนื่องจากเม็ดของแข็งมีการเคลื่อนที่ตลอดเวลา ดังนั้นอุณหภูมิจะเท่ากันตลอดทั้งเบด ซึ่งแตกต่างจากเบดนิ่งหรือเบดบรรจุที่อุณหภูมิจะไม่เท่ากันตลอดทั้งเบด

2.11.3.1.2 มีการจัดเรียงตัวของเม็ดของแข็งโดยเม็ดที่มีน้ำหนักน้อยจะอยู่ส่วนบนและเม็ดที่มีน้ำหนักมากจะอยู่ส่วนล่าง จึงสามารถนำไปใช้แยกขนาดของเม็ดของแข็งได้

2.11.3.1.3 ทำงานแบบต่อเนื่องได้เนื่องจากสามารถควบคุมการเคลื่อนที่ของเม็ดของแข็งออกและเข้าไปในเบดได้

2.11.3.1.4 เหมาะสมกับกระบวนการที่มีปฏิกิริยาคายความร้อนหรือดูดความร้อนจำนวนมากเพราะเม็ดของแข็งจะเป็นตัวนำความร้อนจากผนังแหล่งความร้อนไปให้กับของไหลได้มากกว่า เนื่องจากมีสัมประสิทธิ์การถ่ายเทความร้อนสูงกว่า

2.11.3.1.5 พื้นที่สัมผัสระหว่างเม็ดของแข็งกับของไหลมีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเบดนิ่งที่ใช้เม็ดของแข็งปริมาณเท่ากัน

2.11.3.1.6 ประหยัดพลังงานเนื่องจากแรงเสียดทานและความดันตกของฟลูอิไดซ์เบดน้อยกว่าในเบดบรรจุมาก

2.11.3.1.7 ใช้ในการขนส่งเม็ดของแข็ง

2.11.3.2 ข้อเสีย

2.11.3.2.1 ต้องใช้เบดสูงหรือเบดหลายชั้นเนื่องจากเวลาที่ของไหลสัมผัสกับเม็ดของแข็งสั้นมาก

2.11.3.2.2 เกิดฟองแก๊สขนาดใหญ่ขึ้นในเบดเมื่อใช้ของไหลที่เป็นแก๊ส ทำให้การสัมผัสไม่ดีเท่าที่ควร และถ้าเป็นกระบวนการที่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและต้องใช้ตัวเร่งช่วยแล้ว จะทำให้ร้อยละการเปลี่ยนแปลงลดลง

2.11.3.2.3 การทำงานมีข้อจำกัดคือ ถ้าความเร็วของของไหลสูงเกินไปเม็ดของแข็งจะออกจากเบดไปพร้อมกับของไหล

2.11.3.2.4 ต้องคอยปรับความเร็วของแก๊ส ในกรณีที่ใช้ในกระบวนการที่ทำให้ตัวเร่งมีขนาดลดลง เพื่อไม่ให้ตัวเร่งหลุดออกไป ซึ่งจะทำให้ผลผลิตลดลง

2.11.3.2.5 เกิดการสั่นสะเทือนหรือกัดกร่อนของหอทดลองเนื่องจากเม็ดของแข็งกระทบกับผนังของหอทดลอง

2.11.3.2.6 ใช้กับเม็ดของแข็งที่เปียกหรือเป็นยางไม่ได้เพราะเกิดการเกาะเป็นก้อนใหญ่และตกตะกอนมายังส่วนล่างของเบด

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า น้ำซีอิ๊วที่คนไทยนิยมบริโภคเป็นน้ำซีอิ๊วที่ผ่านกรรมวิธีการหมักแบบดั้งเดิม และโรงงานผลิตน้ำซีอิ๊วส่วนใหญ่เป็นโรงงานขนาดเล็กที่ต้องใช้แรงงานคนและพื้นที่ในการผลิตมาก ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ซึ่งเป็นลักษณะของภาชนะบรรจุแบบดินเผา (earthen container) ในขั้นตอนการหมักโมโรมิเพื่อผลิตน้ำซีอิ๊วในระดับครัวเรือน (domestic level) และรูปที่ 2.8 จะเป็นลักษณะของภาชนะใหญ่ (vat) ในขั้นตอนการหมักโมโรมิเพื่อผลิตน้ำซีอิ๊วเพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ (commercial scale) โดยน้ำซีอิ๊วที่ผ่านกระบวนการหมักแบบดั้งเดิมนี้ต้องใช้เวลาในการผลิตค่อนข้างนานคือ 6 เดือนหรือมากกว่า ซึ่งนอกจากจะทำให้ค่าใช้จ่ายในการผลิตเพิ่มขึ้นตามแล้ว ยังเกิดปัญหาในการควบคุมด้านสุขาภิบาล ดังนั้นจึงสมควรที่จะนำเทคโนโลยีการตรึงรูปเซลล์มาประยุกต์ใช้กับกระบวนการหมักน้ำซีอิ๊ว โดยงานวิจัยที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้ได้แนะนำเทคโนโลยีการตรึงรูปมาประยุกต์ใช้กับกระบวนการหมักน้ำซีอิ๊ว ซึ่งมีสาระสำคัญที่จะกล่าวคือ การศึกษาการตรึงรูปเซลล์โดยการห่อหุ้มด้วยแคปซูลเล็ก พร้อมกับแสดงการใช้เซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กในการหมักโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลืองอย่างต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปแบบฟลูอิไดซ์ โดยมีเป้าหมายที่จะหาแนวทางใหม่สำหรับการผลิตน้ำซีอิ๊วที่มีกลิ่นรสใกล้เคียงกับน้ำซีอิ๊วจากการหมักแบบดั้งเดิมและพยายามลดระยะเวลาในการผลิตให้สั้นที่สุด

รูปที่ 2.7 ภาชนะบรรจุในขั้นตอนการหมักโมโรมิเพื่อผลิตน้ำซีอิ๊วในระดับครัวเรือน

ที่มา: Beuchat (1984)

รูปที่ 2.8 ภาชนะบรรจุในขั้นตอนการหมักโมโรมิเพื่อผลิตน้ำซีอิ๊วในเชิงพาณิชย์

ที่มา: Beuchat (1984)