

การผลิตเอนไซม์ไลเปส จาก *Rhizopus oligosporus* ด้วยวิธีการหมักแบบแห้ง

Lipase Production from *Rhizopus oligosporus* in Solid-state Fermentation

คำนำ

นับตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2543 เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน ราคาน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมจะมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากปริมาณสำรองลดลง ซึ่งปริมาณน้ำมันดีเซลและเบนซินจะหมดจากโลกนี้ภายใน 20 ปีข้างหน้าอย่างแน่นอน ในปี พ.ศ. 2544 ประเทศไทยได้มีความสนใจในเรื่องของพลังงาน มีการหาแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันกันอย่างมากมาย อาทิ พลังงานแสงอาทิตย์ พลังงานชีวมวล (biomass) ไบโอดีเซล (biogas) และไบโอดีเซล (biodiesel) เป็นต้น (ป้วย, 2544)

น้ำมันไบโอดีเซล คือ น้ำมันเชื้อเพลิงที่ผลิตได้จากน้ำมันพืช หรือ ไขมันจากสัตว์ หรือน้ำมันที่เหลือใช้จากการปรุงอาหาร โดยผ่านกระบวนการทำให้โมเลกุลเล็กลงและอยู่ในรูปของเอทิลเอสเทอร์ (ethyl ester) หรือ เมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) โดยผลที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซล สามารถนำมาใช้แทนน้ำมันดีเซลได้ ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ของการผลิตเชื้อเพลิงในอนาคต (วรวิฑู, 2547)

การผลิตเชื้อเพลิงต้องผ่าน กระบวนการแปรรูปด้วยกระบวนการทางเคมีที่เรียกว่า ทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชัน (transesterification) เป็นปฏิกิริยาของไขมันกับแอลกอฮอล์เพื่อเปลี่ยนรูปสารประกอบเป็นสารประกอบเอสเทอร์ (ester) หรือ ไบโอดีเซล มีผลพลอยได้คือ กลิเซอรอล โดยตัวเร่งปฏิกิริยามีทั้ง สารละลายกรดที่ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยามากกว่า (3-4 ชั่วโมง) และอุณหภูมิสูงกว่า (100 องศาเซลเซียส) (Encinar et al., 2002) สารละลายเบสจะเร่งปฏิกิริยาได้เร็ว โดยมีรายงานว่าใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพียง 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (Encinar et al., 2002) แต่สารละลายเบสมีข้อเสียคือจะทำให้กรดไขมันอิสระในน้ำมันถูกเปลี่ยนเป็นสบู่โดยปฏิกิริยาสปอนิฟิเคชัน (saponification) ทำให้ได้เอสเตอร์น้อยลงและมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล (Ma and Hanna, 1999; Noureddini et al., 2004) และตัวเร่งที่เป็นสารละลายกรดหรือสารละลายเบสจะทำให้ผลผลิตที่ได้ นั้นอาจไม่บริสุทธิ์ ต้องนำมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น รวมทั้งก่อให้เกิดมลพิษในน้ำ ซึ่งจะต้องมีกระบวนการบำบัดน้ำเพิ่มขึ้น เสียทั้งค่าใช้จ่ายและเสียเวลา ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำไปใช้เร่งปฏิกิริยา และการผลิตไบโอดีเซลด้วยการใช้เอนไซม์ไลเปส ยังเป็นกระบวนการผลิตเชื้อเพลิง

วิธีทางหนึ่งที่น่าสนใจยิ่งในปัจจุบัน ซึ่งประโยชน์ที่จะได้จากการผลิตไบโอดีเซลด้วยการใช้เอนไซม์ไลเปส นั้นคือไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม (วรวิฑูรี, 2547)

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน โดยทำให้พันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลน้ำมันแตกออกอย่างสมบูรณ์ จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล ปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสที่ใช้กันจะนำเข้ามาจากต่างประเทศ ดังนั้นถ้าเราสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สภาวะที่เหมาะสม และนำไปขยายการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรม จะเป็นการช่วยลดการนำเข้าเอนไซม์ อีกทั้งถ้าเลือกวัตถุดิบทางการเกษตร อาทิ รำละเอียด กากถั่วเหลือง และรำข้าวสาลีมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ก็จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบทางการเกษตรอีกด้วย

โครงการวิจัยนี้จึงให้ความสนใจศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปส ด้วยจุลินทรีย์ประเภทรา เพราะการใช้จุลินทรีย์ประเภทรามักมีต้นทุนต่ำและให้ผลิตผลสูง (Wang et al., 2005) โดยเลือกใช้รา *Rhizopus Oligosporus* โดยวิธีการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation) ซึ่งเป็นวิธีการหมักที่ความเหมาะสมกับรา *R. Oligosporus* เนื่องจากวัสดุหมักไม่มีน้ำอิสระ (วรวิฑูรี และรุ่งนภา, 2532) หรือวัสดุหมักมีความชื้นต่ำในช่วง 40-50 เปอร์เซ็นต์ โดยการศึกษาทำในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปสู่การใช้งานจริงในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เลือกวัสดุหมักทางการเกษตรที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยวิธีการหมักแบบแห้งด้วยรา *Rhizopus Oligosporus* ในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory scale)
2. ศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสโดยวิธีการหมักแบบแห้งด้วยรา *Rhizopus Oligosporus* ในระดับห้องปฏิบัติการ (laboratory scale)

การตรวจเอกสาร

วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการหมัก

1. รำข้าว

รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากฝัวนอกของข้าวกล้องหรือเปลือกของเมล็ดข้าวจากกระบวนการขัดสีข้าวให้ได้ข้าวขาวหรือข้าวสารมีปริมาณ 5-9 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณข้าวเปลือกที่ผ่านการขัดสี โดยปกติรำหยาบที่ได้จะมีปริมาณสูงถึง 8-9 เปอร์เซ็นต์ สำหรับรำละเอียดมีปริมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณข้าวเปลือกทั้งหมด ดังนั้นรำหยาบและรำละเอียดมีปริมาณรวม 10 เปอร์เซ็นต์ ถือเป็น ส่วนที่เหลือทิ้งจากการขัดสีข้าว

คำจำกัดความของรำหยาบ (hull) โดย FAO คือ “ผลพลอยได้จากกระบวนการขัดสีข้าว ประกอบด้วยฝัวนอกของเมล็ดข้าวและส่วนของจมูกข้าว” สำหรับรำละเอียด (bran) คือ “ผลพลอยได้จากกระบวนการขัดสีข้าว ประกอบด้วยผิวในของเมล็ดข้าว บางส่วนของจมูกข้าวและส่วนที่เป็น แป้งเล็กน้อย” (Grist, 1959) รำละเอียดมีลักษณะเป็นฝุ่นหรือผงละเอียดสีขาว เป็นส่วนที่ขัดออกจาก ฝัวนอกของเมล็ดข้าว

1.1 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว

การขัดสีข้าวให้เป็นข้าวขาวนอกจากจะมีส่วนของรำข้าวแล้วยังมีส่วนของจมูกข้าวปน อยู่ด้วย ซึ่งคุณค่าทางโภชนาการส่วนใหญ่จึงอยู่ที่ส่วนนี้

1.1.1 โพรตีนและสารประกอบไนโตรเจน

โปรตีนในรำข้าวได้รับความสนใจจากนักวิจัยมากกว่าโปรตีนจากเมล็ดข้าว เนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่สามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่า และเนื่องจากพบว่าเยื่อชั้นในของเมล็ดข้าว (aleurone layer) และเยื่อชั้นนอกของเมล็ดข้าว (outer endosperm layer) มีโปรตีนอยู่ในปริมาณมาก ดังนั้นรำละเอียดจึงมีปริมาณโปรตีนถึง 25 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเมล็ดข้าว

1.1.2 คาร์โบไฮเดรตและลิกนิน

คาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่พบในเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสหรือเพนโตซาน ซึ่งพบว่าแป้งไม่มีอยู่ในส่วนประกอบของรำข้าว (Yampolsky, 1944) อย่างไรก็ตาม สำหรับการผลิตรำข้าวในอุตสาหกรรมพบว่าอาจมีปริมาณแป้งเล็กน้อย เนื่องจากมีบางส่วนของเมล็ดข้าวรวมอยู่ด้วย McCall *et al.* (1951) พบว่ามีปริมาณเมล็ดข้าวที่เจือปนอยู่ในรำข้าวประมาณ 11.2 เปอร์เซ็นต์

1.1.3 ไขมัน

ชนิดและปริมาณไขมันที่พบในรำข้าวมีปริมาณมากกว่าในเมล็ดข้าว ประเภทของไขมันหลัก ๆ ที่พบในข้าวคือ ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ในเมล็ดข้าวและโมโนเอซิลลิปิดซึ่งพบในแป้งข้าว สำหรับไขมันในรำข้าวจำแนกออกเป็นกลีเซอรอล (glycerolipids) สเตอรอล (sterol lipids) และสฟิงกอล (sphingalipids) รวมแล้วคิดเป็น 18-19 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดในรำข้าว ซึ่งไขมันในรำข้าวนี้ได้รับอิทธิพลจากองค์ประกอบของการขัดสีข้าว รวมทั้งการทำความสะอาดและการคัดแยกรำข้าวออกจากข้าวที่ขัดสีแล้ว (Fujino, 1978)

1.1.4 วิตามิน

รำข้าวเป็นแหล่งวิตามินบีและอีที่สำคัญ สำหรับวิตามินเอ วิตามินซี หรือวิตามินดี อาจพบในปริมาณน้อยหรือไม่พบ วิตามินช่วยให้ร่างกายเผาผลาญอาหารได้ดี ช่วยในการสร้างกระดูกและเนื้อเยื่อ ช่วยในขบวนการเผาผลาญไขมันและคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้พลังงานแก่ร่างกาย ร่างกายไม่สามารถสร้างวิตามินได้เอง ต้องรับประทานเข้าไปเท่านั้น วิตามินที่พบในส่วนของรำและจมูกข้าวได้แก่ วิตามินเอ (beta carotene) วิตามินบีหนึ่ง (thiamin) วิตามินบีสอง (riboflavin) วิตามินบีสาม (niacin) วิตามินบีห้า (pantothenic acid) วิตามินบีหก (pyridoxine) วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินดี และวิตามินอี

1.1.5 แร่ธาตุ

Juliano (1966) ได้จำแนกแร่ธาตุที่พบในรำข้าวกล่าวคือ ฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบที่พบมากในรำข้าว ส่วนที่พบมากเป็นอันดับต่อไปคือ โพแทสเซียม แมกนีเซียม และซิลิกา สำหรับ

โซเดียม แคลเซียม และเหล็กพบว่ามีปริมาณน้อยมาก นอกจากแร่ธาตุที่กล่าวมาแล้ว ยังมีรายงานการพบ ซัลเฟอร์ แมกนีเซียม โบรอน ตะกั่ว และสังกะสี (McCall *et al.*, 1953) ซึ่งองค์ประกอบหลักของรำข้าวสาลีและรำละเอียดได้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของรำข้าวสาลี และรำละเอียด

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)	
	รำข้าวสาลี	รำละเอียด
โปรตีน	15.5	14.3
คาร์โบไฮเดรต	52.0	62.5
ไขมัน	3.5	12.05
เถ้า	7.4	7.15

ที่มา: พัทกุล (2525)

2. เมล็ดทานตะวัน

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งมีพื้นที่ปลูกทานตะวันในปี 2540/41 ประมาณ 300,000 ไร่ โดยปลูกเป็นพืชที่ 2 หรือพืชปลายฤดูฝน ใช้พื้นที่ปลูกพืชหลังการปลูกข้าวโพดหรือพืชตระกูลถั่วในพื้นที่เป็นดินร่วน หรือดินเหนียว เพราะทานตะวันเป็นพืชที่มีรากลึกจึงช่วยให้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ค่อนข้างแห้งแล้ง นอกจากนี้ยังปลูกได้ดีในดินเกือบทุกสภาพยกเว้นดินที่มีสภาพเป็นกรดจัดและมีน้ำท่วมขัง (ปวีณา, 2547)

2.1 ลักษณะทั่วไปของทานตะวัน

ทานตะวันที่ใช้ปลูกสกัดน้ำมัน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus Annuus* L. อยู่ในวงศ์ *compositae* เป็นพืชล้มลุก (annual herbaceous) มีอายุประมาณ 100-120 วัน

ผลหรือเมล็ดของทานตะวันเป็นแบบ achene มีสีต่างๆ กันตั้งแต่สีขาว สีขาวลายดำ ดำ ลายขาวและสีดำ แล้วแต่พันธุ์ เมล็ดมีรูปร่างยาวรี ขนาด 1-2 เซนติเมตร

2.2 องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเมล็ดทานตะวัน

น้ำมันเมล็ดทานตะวันเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพสูง ที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เช่น กรดลิโนเลนิก หรือกรดลิโนเลอิก ที่จะช่วยลดโคเลสเตอรอลที่เป็นสาเหตุของโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด มีความจำเป็นต่อร่างกายของมนุษย์ ทั้งยังประกอบด้วยวิตามินเอ ดี อี และเค จึงนิยมนำมาประกอบอาหารและใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ซึ่งองค์ประกอบของเมล็ดทานตะวัน โดยรวม ๆ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของเมล็ดทานตะวัน

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
ความชื้น	7
ไขมัน	40
โปรตีน	25

ที่มา: กองเกษตรเคมี (2528)

3. ถั่วลิสง

3.1 คุณสมบัติเฉพาะของถั่วลิสง

ถั่วลิสงเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็ก สูงประมาณ 40-50 เซนติเมตร อายุตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 3-5 เดือน ขึ้นอยู่กับพันธุ์และฤดูปลูก (อารีย์, 2533) ถั่วลิสงเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งได้แสดงในตารางที่ 3 จึงนิยมนำเมล็ดถั่วลิสงไปใช้ในอุตสาหกรรมสกัดน้ำมัน รวมทั้งมีการใช้บริโภคเป็นอาหารโดยตรง

3.2 องค์ประกอบที่สำคัญของถั่วลิสง

3.2.1 ความชื้น

ถั่วลิสงมีความชื้น 40 เปอร์เซ็นต์และจะลดลงเหลือ 8 เปอร์เซ็นต์หลังจากกะเทาะเปลือกแล้ว เมื่อนำไปคั่วหรือทอดจะมีความชื้นเหลือ 2 เปอร์เซ็นต์หากนำไปต้มจะมีความชื้นเพิ่มขึ้น 36 เปอร์เซ็นต์ (Woodroof, 1983)

3.2.2 โปรตีน

ถั่วลิสงมีโปรตีนในเมล็ดประมาณ 26 เปอร์เซ็นต์ และในเนื้อถั่ว (peanut meal) จะมีโปรตีนสูงเป็นสองเท่า และมีกรดอะมิโนที่จำเป็นอยู่มากโดยเฉพาะอาร์จินิน (arginine) (Woodroof, 1983)

3.2.3 คาร์โบไฮเดรต

ถั่วลิสงมีคาร์โบไฮเดรตอยู่ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแป้งสะสมในเมล็ดจะสูงสุดเมื่อเมล็ดแก่ปานกลาง และจะคงที่ต่อไปเช่นนั้น ชนิดน้ำตาลที่สำคัญในถั่วลิสงที่มากที่สุดคือ ซูโครส ซึ่งมีประมาณ 2.8-6.3 เปอร์เซ็นต์ชนิด รองลงมาคือ สตาซิโอส และ แรฟฟิโนส ส่วนกลูโคส นั้นมีน้อย การให้ความร้อนในการคั่วถั่วลิสงทำให้สูญเสียน้ำตาลในเมล็ด คือซูโครสและอิโนซิทอล สูญเสียไป 15 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสและฟรุคโตสสูญเสีย 33 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลสองชนิดหลังนี้ปกคิมิอยู่น้อย แต่ซูโครสสามารถแตกตัวออกเป็นกลูโคสและฟรุคโตสแล้วทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระ ทำให้มีกลิ่นหอมขณะคั่ว ถั่วลิสงที่สุกแล้วมีน้ำตาลลดลง (อารีย์, 2544)

3.2.4 ไขมัน

ถั่วลิสงมีไขมันประมาณ 44-56 เปอร์เซ็นต์ (อารีย์, 2544) ไขมันในถั่วลิสงมีคุณภาพค่อนข้างดี อุณหภูมิที่ใช้ในการอบหรือคั่วถั่วลิสงไม่ทำให้องค์ประกอบของน้ำมันเปลี่ยนแปลงไป แต่ปริมาณในเมล็ดแตกต่างกันด้วยอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่ปลูก และความแก่อ่อนของเมล็ดด้วย นอกจากนี้ไขมันที่สกัดได้จากถั่วลิสงยังมีกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกายสูง (อมรา, 2521)

3.2.5 แร่ธาตุ

ถั่วลันเตามีแร่ธาตุอยู่มากมาย โดยมีโพแทสเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส อยู่ในปริมาณมาก และไม่สูญเสียไปกับความร้อน ส่วนวิตามินที่สำคัญมีหลายชนิด โดยเฉพาะไรโบฟลาวิน ไทอามีน และกรดนิโคตินิก แต่ปริมาณวิตามินเอ ซี และดีมีน้อยมากและไม่มีเลย (Woodroof, 1983)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของถั่วลันเตา

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
ความชื้น	5.0
โปรตีน	28.5
ไขมัน	47.5
เยื่อใย	2.8
ไนโตรเจน	13.3
ถั่ว	2.9
แป้ง	4.0

ที่มา: Woodroof (1983)

4. ถั่วเหลือง

4.1 ลักษณะทั่วไปของถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองมีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคแถบเอเชีย ใช้เป็นอาหารกันมานานหลายศตวรรษ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามพื้นที่ที่ปลูก เช่น chinese pea, manjurian bean soya หรือ soy bean ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งได้แสดงองค์ประกอบของถั่วเหลืองในตารางที่ 4 ลักษณะของเมล็ดถั่วเหลืองมีรูปร่างเกือบจะเป็นทรงกลม น้ำหนักเมล็ดโดยเฉลี่ยเท่ากับ 120-180 มิลลิกรัม ซึ่งจะคิดเป็นเปลือกหุ้มเมล็ด 10 เปอร์เซ็นต์ (มณีรัตน์, 2542)

4.2 องค์ประกอบที่สำคัญของถั่วเหลือง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2525)

4.2.1 โปรตีน

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุดเมื่อเทียบกับในกลุ่มพืชตระกูลเดียวกัน มีปริมาณโปรตีนประมาณ 35-40 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนของถั่วเหลืองมีคุณภาพดีมากในแง่องค์ประกอบของกรดอะมิโน ยกเว้นกรดอะมิโนที่มีธาตุประกอบกำมะถัน คือเมไทโอนีน และซิสเตอีน ซึ่งมีค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดธัญพืชอื่นๆ แล้วโปรตีนจากถั่วเหลืองมี ไลซีนและ ทริปโตเฟนสูงกว่า กรดอะมิโนสองชนิดนี้มีความสำคัญยิ่งต่อการเจริญเติบโตของคนและสัตว์ที่กำลังเจริญเติบโต

4.2.2 ไขมัน

ถั่วเหลืองมีปริมาณไขมันโดยเฉลี่ย ในเมล็ดประมาณ 29.63 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีความแตกต่างไปตามสายพันธุ์และพื้นที่ที่ปลูก ไขมันในเมล็ดถั่วเหลืองมีกรดไขมันอิสระที่จำเป็นต่อร่างกาย ได้แก่ กรดลิโนเลอิก 43-56 เปอร์เซ็นต์และกรดโอเลอิก 15-33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรดไขมันอิ่มตัวมีเพียงประมาณ 11-26 เปอร์เซ็นต์

4.2.3 คาร์โบไฮเดรต

ถั่วเหลืองไม่ได้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต น้ำตาลในถั่วเหลืองมีหลายชนิดที่เป็น disaccharide เช่น ซูโครส และที่เป็น tetrasaccharide เช่น สตาซิโอส ส่วนพวก pentasaccharide เช่น เวอบาโตสนั้น พบบ้างเป็นจำนวนเล็กน้อย ในถั่วเหลืองมีซูโครสอยู่ 4.5 เปอร์เซ็นต์ แรฟฟิโนส 1.1 เปอร์เซ็นต์ สตาซิโอส 3.7 เปอร์เซ็นต์ อราบิโนส 0.002 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคสอีกเป็นจำนวนเล็กน้อย นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลแรฟฟิโนสซึ่งเป็นน้ำตาล nonreducing และไม่ให้คุณค่าทางอาหารโดยตรง นอกจากจะถูกย่อยจนได้กาแลคโตส กลูโคส และฟรุกโตส

4.2.4 แร่ธาตุ

แร่ธาตุที่พบส่วนใหญ่ในถั่วเหลืองเป็น โปแตสเซียม 1.83 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส 0.78 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียม 0.31 เปอร์เซ็นต์ โซเดียม แคลเซียม กำมะถัน อีกอย่างละ 0.24

เปอร์เซ็นต์สารประกอบที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบที่พบในถั่วเหลืองคือ ไฟติน (phytin) ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) และกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ซึ่งไฟตินเป็นแหล่งที่มีฟอสฟอรัสมากที่สุด มีความสำคัญต่อการละลายได้ของ โปรตีนและต่อคุณค่าทางอาหารของแคลเซียม

5. งาม

5.1 คุณสมบัติเฉพาะของงาม

เป็นพืชไร่ล้มลุกที่มีเมล็ดขนาดเล็กสีดำหรือสีขาวขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ปกติเราจะใช้เมล็ดงามเป็นส่วนปรุงแต่งอาหารพวกขนมหลายชนิด เช่น ขนมถั่วกระจก ถั่วตัด สลัดงา กระจายสารท ฯลฯ เนื่องจากเมื่อนำมาคั่วแล้วจะมีกลิ่นหอม นำรับประทาน (สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. 2548) จากการศึกษาพบว่าเมล็ดงาจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าน่าสนใจชนิดหนึ่ง เพราะในแต่ละเมล็ดเล็ก ๆ จะมีสารอาหารสำคัญ และแสดงองค์ประกอบของงาม และธาตุพืชอื่นๆ โดยรวมในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของงาม และธาตุพืชอื่นๆ

องค์ประกอบ ธาตุพืช	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	เยื่อใย	จีเอ็ม
งาคั่ว	17.62	48.10	21.25	6.01	7.04
ถั่วเหลือง	35.60	17.78	32.32	4.06	5.86
ลูกเดือย	13.60	6.10	58.50	8.40	2.60
ฟางข้าว	2.76	2.00	32.27	38.13	14.54
ข้าวฟ่าง	11.80	3.00	NA	2.50	1.50
เมล็ดข้าวโพด	8.00	4.50	4.50	2.50	NA

หมายเหตุ: (NA) = ไม่มีรายงาน

ที่มา: กรมส่งเสริมการเกษตร (2525)

5.2 องค์ประกอบที่สำคัญของงา

5.2.1 โปรตีน

มีโปรตีนอยู่ไม่น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ (นันทนา, 2546) เป็นโปรตีนที่มีคุณภาพสูง เพราะมีกรดอะมิโนที่จำเป็นอยู่ครบทุกชนิด โดยเฉพาะเมธิโอนิน ซึ่งมีอยู่น้อยในโปรตีนถั่วเหลือง แต่กลับมีมากในงา ดังนั้นผู้ที่บริโภคอาหารมังสวิรัต ซึ่งร่างกายจะได้รับโปรตีนจากรั้วพืชจึงต้องบริโภคเมล็ดงาร่วมกับเมล็ดถั่วด้วย จึงจะได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นอย่างเพียงพอ

5.2.2 ไขมัน

ในงาจะมีไขมันประมาณ 45-57 เปอร์เซ็นต์ (นันทนา, 2546) จัดเป็นไขมันที่มีคุณภาพดี เพราะมี กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง และไม่เกิดการเหม็นหืนง่าย เนื่องจากมีสารกันหืนตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังช่วยลดคอเลสเตอรอลในเลือดด้วย

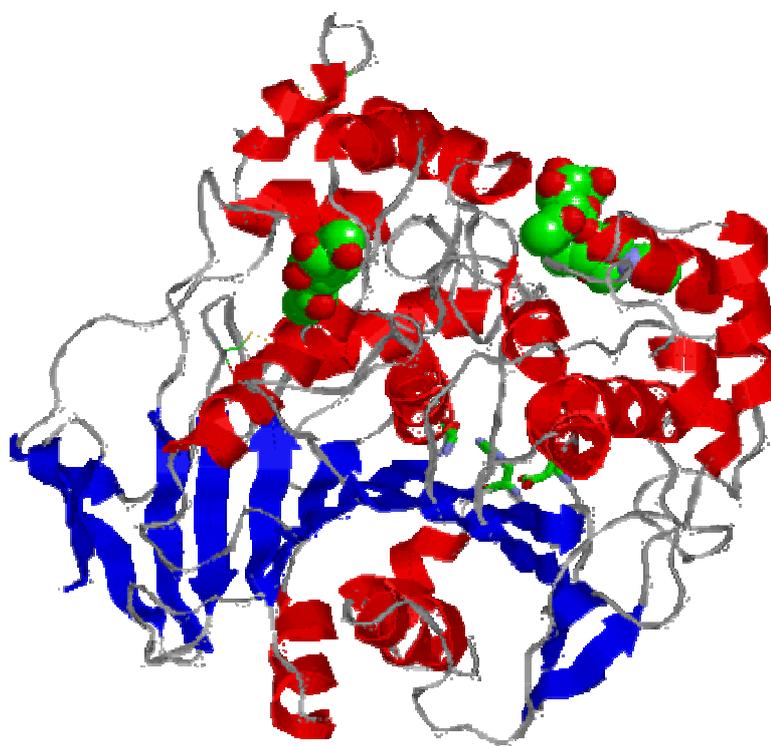
5.2.3 แร่ธาตุ

ในเมล็ดงาจะอุดมไปด้วยวิตามินบีทุกชนิด (ยกเว้นวิตามินบี 12) ซึ่งจะช่วยในการบำรุงสมอง ประสาท และป้องกันโรคเหน็บชา ส่วนเกลือแร่จะมีมากถึง 4.1-6.5 เปอร์เซ็นต์ (ชมรมเทคโนโลยีทางอาหารและชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์จุฬาฯ. 2541) ที่สำคัญ ก็คือ พวกธาตุเหล็ก ไอโอดีน สังกะสี แคลเซียม และฟอสฟอรัส โดยเฉพาะแคลเซียม และฟอสฟอรัสในงาจะมีอยู่มากกว่าผักชนิดอื่น ๆ ถึง 40 และ 20 เท่าตามลำดับ ดังนั้นงาจึงเป็นแหล่งของสารอาหารที่น่าสนใจอย่างหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาโรคบางชนิดได้ เช่น โรคเหน็บชา โรคปวดตามข้อกระดูก เป็นต้น

เอนไซม์ไลเปส

1. ความหมายของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolases) มีชื่อตามระบบ systematic name ว่า triacylglycerol acylhydrolase และมีชื่อเรียกตามรหัสหรือตามระบบตัวเลข (code or number system) คือ EC 3.1.1.3 ไลเปสสามารถพบได้โดยทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ไลเปสได้รับความสนใจในการศึกษาคุณสมบัติทั้งทางด้านสรีรวิทยา และการนำมาประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติมีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน โดยมีน้ำเข้าร่วมทำปฏิกิริยา (hydrolysis) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสจะช่วยย่อยสลายไขมันที่มีโครงสร้างทางเคมีจำเพาะเจาะจงแล้ว (reio and enantiomeraselective hydrolysis) เอนไซม์ไลเปสยังสามารถสังเคราะห์เอสเทอร์ได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับความต่างกันของสารตั้งต้น



ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : Derwenda (1994)

2. แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

2.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบในพืช

เอนไซม์ไลเปสมีในพืชจำพวก ข้าวสาลี ข้าวโอต ข้าวไรย์ ฟ้าย ถั่วเหลือง และ ละหุ่ง (Arnole *et al.*, 1975) Shahani (1975) ได้ศึกษาเอนไซม์ไลเปสจากเมล็ดละหุ่งพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์จะอยู่ในช่วงเป็นกรด และได้รายงานการใช้เอนไซม์ไลเปสจากข้าวสาลีในรูปสารละลายเข้มข้นแต่ไม่มีรายงานการใช้เอนไซม์จากข้าวสาลีในรูปสารละลายบริสุทธิ์

2.2 แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบในสัตว์

พบโดยทั่วไปในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ใน หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ ซีรัม (serum) และที่สำคัญคือตับอ่อน (pancreatic lipase) โดยเฉพาะจากตับอ่อนของสุกร เนื่องจากมีความเข้มข้นสูงและสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก (ณกัญภัทร, 2547) นอกจากนี้ยังมีการแยกเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของหนู โคน กระบือ เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากน้ำมันได้มีรายงานบ้างแต่การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ไม่ค่อยประสบความสำเร็จ เนื่องจากคุณสมบัติไม่คงตัว (Shahani, 1975)

2.3 แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบในจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีสมบัติในการทำงานแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของ จุลินทรีย์และกลุ่ม (ชนิด) ของไขมันที่พบในแหล่งที่คัดเลือกจุลินทรีย์ ซึ่งในที่นี้จะแบ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสไว้ 3 จำพวกใหญ่ๆ คือ

2.3.1 รา

ราถือว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ดี และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดี และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม (Macris *et al.*, 1996) Hatzinikolaou *et al.* (1996) พบว่า *A. niger* BTL สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เช่นเดียวกับ *A. niger* A116 (Pokormy *et al.*, 1994) *Aspergillus terreus* (Gulati *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีราอีกหลายยี่ห้อ (genus) ที่สามารถ

ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Rhizopus arrhizus* NRRL2286 (Elibol และ Özer, 2000), *R. oryzae* (Hiol *et al.*, 2000)

มีรายงานการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากกระบวนการหมักแบบแห้งโดยใช้รา 10 ชนิด พบว่า *Rhizopus oligosporus* GCBR-3 ให้ผลผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุด (48.0 ยูนิตต่อกรัม ซับสเตรท) จากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ดีที่สุด โดยคัดเลือกราที่แข็งแรงและมีประสิทธิภาพสูงสุด คัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักแบบแห้งที่สุดได้แก่ เมล็ดอัลมอนด์บด จากวัสดุหมักหลายชนิด ปริมาณราที่ใช้หมัก สารที่ใช้สกัดหรือใช้เป็นตัวละลาย และระยะเวลาในการหมัก โดยเราจะขับเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ และเนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้มีปริมาณสูงกว่า งานวิจัยที่ผ่านมา ดังนั้นอาจใช้ราที่ได้ในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม (UI-Haq *et al.*, 2002)

ในปี 1988 Nahas ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *R. oligosporus* โดยทำการศึกษาคาร์บอนอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น กาแลคโตส มอสโตส tween เป็นต้น แหล่งน้ำมัน เช่น น้ำมันรำข้าว น้ำมันจากเมล็ดฝ้าย tween เป็นต้น และแหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียในเตรด เคซีน กากถั่วเหลือง ยูเรีย เป็นต้น ซึ่งที่สภาวะการบ่มที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 9 วัน พบว่า ในอาหารที่มี tween และกากถั่วเหลือง ทำให้การเจริญของราและการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้น โดยสารพวกคาร์โบไฮเดรต น้ำมันพืช โปรตีน ไม่ช่วยในการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปส และพบว่าเชื้อมีการเจริญดีที่สุด 35-40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 4 วัน ส่วนการผลิตเอนไซม์ไลเปสมีสภาวะที่เหมาะสมคือที่ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่ม 3 วัน

Majda, Valérie และ Louis (1998) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *R. oryzae* พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 8.5 ทำการเลี้ยงในอาหาร 2 สูตร สูตรเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสและสูตรเพิ่มกิจกรรมไลเปส สารที่มีผลยับยั้งกิจกรรมไลเปสได้แก่ อัลเคน (alkane) อะซิโตน (acetone) อีเทอร์ (ether) และ คลอโรอัลเคน (chloroalkane) แต่รา *R. oryzae* สามารถทนต่อตัวทำละลายได้ดี

2.3.2 ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกประเภทหนึ่ง ที่มีผู้ศึกษาถึงคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์จนถึงระดับการค้า เนื่องจากยีสต์ที่ใช้ศึกษาไม่ก่อให้เกิดโรค และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ พบว่ายีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ *Candida rugosa* (Benjamin และ Pandey, 1996; Del Rio *et al.*, 1990) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Yarrowia lipolytica* 681 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่า *Y. lipolytica* 179 *C. rugosa* ATCC 14830 และ *C. utilis* CDBBC245 (Corzo และ Revah, 1999) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับกระบวนการหมักและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ พีเอช และสารเหนี่ยวนำ (inducer) เป็นต้น (Destain *et al.*, 1997)

2.3.3 แบคทีเรีย

การใช้แบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้น เนื่องจากสามารถปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสได้ง่ายให้เหมาะสมที่จะนำไปใช้ Lin *et al.* (1995) พบว่า *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F – 111 สามารถผลิต alkaline lipase ได้ในอาหารที่ประกอบด้วย น้ำมันมะกอก (olive oil) กากถั่วเหลือง (soy meal) triton X – 100 และ โซเดียมไอออน (sodium ion) เช่นเดียวกับ *P. fragi* CRDA 037 ที่สามารถผลิต alkaline lipase ได้ในอาหารที่มีหางนม (whey) (Schuepp *et al.*, 1997) แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงได้ เช่น *Flavobacterium odoratum* (Labuschagne *et al.*, 1997) *Streptomyces rimosus* R6-554W (Abramic *et al.*, 1999)

ปัจจุบันไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก และจุลินทรีย์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้สามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วย โดยวิธีการปรับปรุงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ทำให้ปัจจุบันมีการพบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสทางการค้าได้หลายชนิด ยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และการควบคุมสภาวะในการผลิต ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ *C. cylindracea* หรือ *C. rugosa* สำหรับราที่ผลิตไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* *Aspergillus* และ *Rhizopus* และแบคทีเรียที่นิยมนำมาผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* และ *Staphylococcus*

3. คุณสมบัติด้านเคมีและกายภาพของไลเปส

โดยทั่วไปแล้วไลเปสละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (Kwon *et al.*, 1996) ส่วนใหญ่แล้วไลเปสที่ได้จากสัตว์มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วงที่เป็นด่าง (พีเอช 8-9) แต่จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น ปริมาณเกลือและชนิดของอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เหมาะสมให้อยู่ในช่วงที่เป็นกรดได้ (Malcata *et al.*, 1992) ในส่วนไลเปสที่ทำงานได้ดีช่วงพีเอชเป็นกรด พบมากในไลโซโซมในส่วนของเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สำหรับไลเปสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.6-8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง ไลเปสส่วนใหญ่ทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ (Yamane, 1987) โดยเฉพาะไลเปสจากจุลินทรีย์ *Pseudomonas* สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส (Gilbert, 1993) ความคงตัวต่อความร้อนของไลเปสจะเพิ่มสูงขึ้นถ้าหากรวมอยู่กับสารตั้งต้น เป็นไปได้ว่าสารตั้งต้นทำหน้าที่ช่วยกำจัดน้ำส่วนเกินออกจากโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ได้ (Malcata *et al.*, 1992)

4. ประเภทของเอนไซม์ไลเปส

Kramer (1971) และ Macrae (1983) แบ่งเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะของกิจกรรมต่อตำแหน่ง บนไตรกลีเซอไรด์ ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง โมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (nonspecific lipase)

เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ไม่มีความจำเพาะในการย่อยกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ ได้อย่างสมบูรณ์ ได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล แต่จะพบ diglyceride หรือ monoglyceride เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ เอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้ผลิตโดย *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* แสดงดังสมการที่ 1

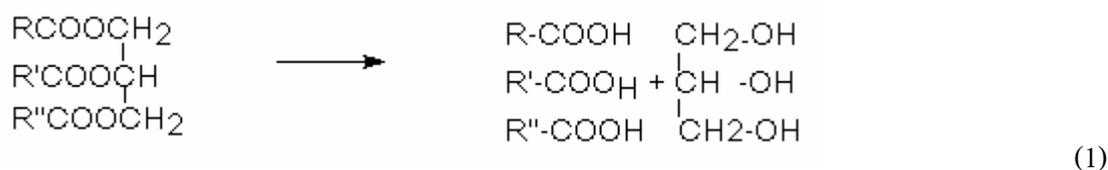
กลุ่มที่ 2 เอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (1, 3 – specific lipase)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อการย่อยกรดไขมันบนตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นผลิตภัณฑ์คือ 1, 2 (2, 3) – diglyceride และ 2 – monoglyceride นั้น เป็นไขมันที่ไม่คงตัว เมื่อถูกบ่มเป็นระยะเวลานานจะเกิด acyl migration ได้เป็น 1, 3 – diglyceride และ 1 (3) – monoglyceride ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเอนไซม์ดังกล่าวเข้าไปย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์จะได้กรดไขมัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้ผลิตโดยราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* *Mucor javanicus* และพวก *Rhizopus sp.* แสดงดังสมการที่ 2

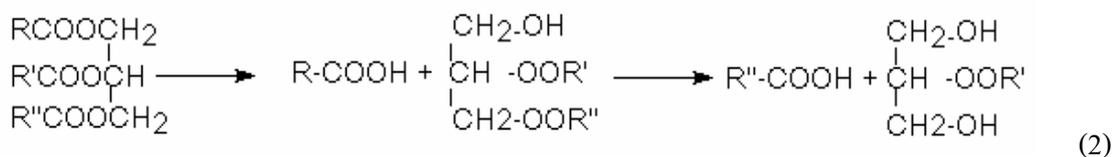
กลุ่มที่ 3 เอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (fatty acid specific lipase)

เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Geotrichum candidum* ที่จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดีแต่กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวที่ไม่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 9 นั้น จะเกิดการย่อยสลายได้ แสดงดังสมการที่ 3

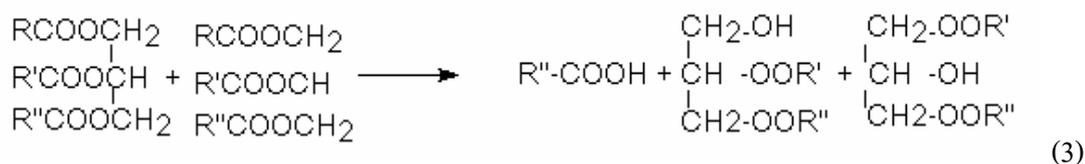
2.1 เอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



2.2 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



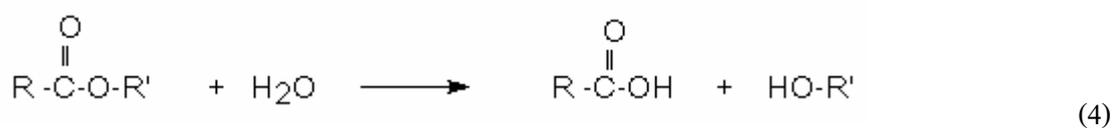
2.3 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



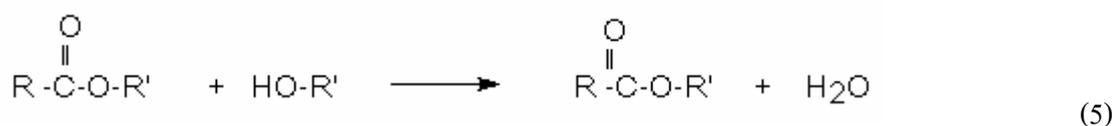
5. การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด คือ

5.1 ปฏิกิริยาสลายเอสเทอร์ (hydrolysis of ester) แสดงดังสมการที่ 4

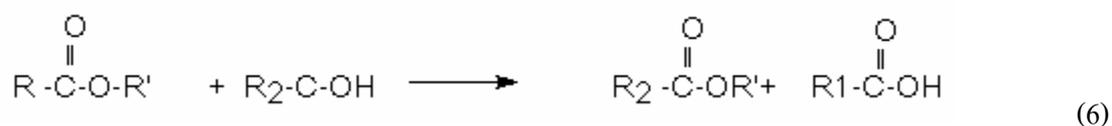


5.2 ปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ (synthesis of ester) แสดงดังสมการที่ 5



5.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (tranesterification reaction)

5.3.1 ปฏิกิริยาแอซิดโกลิซิส (acidolysis) แสดงดังสมการที่ 6



5.3.2 ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์โกลิซิส (alcoholysis) แสดงดังสมการที่ 7



5.3.3 ปฏิกิริยาอินเตอร์เอสเทอริฟิเคชัน (interesterification) แสดงดังสมการที่ 8



6. การสร้างเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 2 รูปแบบ คือ เอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วถูกขับออกมาทำงานภายนอกเซลล์ เรียกว่า extracellular enzyme กับเอนไซม์ไลเปสที่สร้างขึ้นและทำงานภายในเซลล์โดยทำปฏิกิริยากับสับสเตรตภายในเซลล์ เรียกว่า intracellular enzyme (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547) ซึ่งโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูปของ extracellular enzyme

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

7.1 อุณหภูมิ

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* จะลดลงอย่างรวดเร็ว ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์จะหายไปเกือบหมดที่ 50 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาที (Hiol *et al.*, 2000) Eitenmiller *et al.* (1970) รายงานว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium roqueforti* จะมีกิจกรรมลดลงถึง 65 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อราชนิดอื่น Fukumoto *et al.* (1963 ; 1964) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Aspergillus niger* และ *R. delemar* จะไม่ทำงานที่อุณหภูมิ 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Pseudomonas fragi* ลดลง 27.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Lu and Liska, 1969)

7.2 พีเอช (pH)

Hiol *et al.* (2000) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *R. oryzae* มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อบ่มไว้ที่พีเอช 8.5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วน Corzo and Revah (1999) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Yarrowia lipolytica* 681 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่ พีเอช 6.0 – 7.0 และจะ

ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพีเอชสูงกว่า 8.0 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ในปี 1977 Destain *et al.* พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Y. lipolytica* CBS6303 มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.0 จากรายงานของ Fodor and Chari (1949) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *P. roqueforti* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเท่ากับ 8.0 ซึ่งต่างจากรายงานของ Shipe (1951), Morris and Jezeski. (1953) ที่กล่าวว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเท่ากับ 5.0 – 5.5 และ 6.5 – 6.8 ตามลำดับ ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของวัสดุหมัก สภาวะที่ใช้วิเคราะห์ และสายพันธุ์ของเชื้อที่แตกต่างกัน

7.3 ตัวยับยั้ง (inhibitors)

Handelsman and Shoham (1994) พบว่าไอออนของโลหะหนักบางชนิด เช่น จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก Hg^{2+} , Al^{3+} และ Fe^{2+} จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* ส่วนสารซักฟอกยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ Hiol *et al.* (2000) พบว่า SDS (sodium dodecylsulfate) ที่ความเข้มข้น 1-7 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไลเปสจะถูกทำลายในตัวทำละลายที่ขบให้น้ำได้ เช่น อะซิโตน

7.4 ความเข้มข้นของวัสดุหมัก (substrate concentration)

Eitenmiller *et al.* (1970) พบว่าความเข้มข้นของเนยเหลว และน้ำมันมะกอกมากกว่า 5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จะลดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Khan *et al.* (1967) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Achromobacter lipolyticum* มีค่ากิจกรรมลดลง เมื่อใช้กลีเซอไรด์สังเคราะห์ความเข้มข้นมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์เป็นวัสดุหมัก

8. การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้านด้วยกัน ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมัก เพราะเอนไซม์ไลเปสจะเป็นตัวผลิตกลิ่น รส ให้แก่อาหารนั้นๆ ให้ มีกลิ่น รส เฉพาะตัวและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค รูปแบบการใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมอาหารหมักนั้น มีทั้งใจเติมไลเปสลงไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้แก่ โยเกิร์ต italian cheese blue cheese และ roquefort cheese (Arnol *et al.*, 1975) หรืออาจใช้ไลเปสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในอาหารเหล่านั้นเป็นตัวให้กลิ่น รส ก็ได้ เช่น lactic acid bacteria

จะผลิตไลเปสทำให้เกิดกลิ่น รส เฉพาะในอาหารหมัก พวกแตงกวาดอง กระหล่ำปลีดอง (Seitz, 1974)

Linfield *et al.* (1984) รายงานการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในกระบวนการผลิตกรดไขมัน แทนกระบวนการผลิตกรดไขมันทางเคมี เพราะการผลิตกรดไขมันทางเคมีใช้ความร้อนและความดันสูง ซึ่งมีผลให้กรดไขมันที่ผลิตได้มีสีคล้ำและมีการสลายของสารที่ไม่ต้องการ

การนำเอนไซม์ไลเปสประเภทอัลคาไลน์ไปใช้เป็นประโยชน์ได้ 2 ทางที่สำคัญ คือ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก และเพื่อใช้แทน pancreatic lipase ในทางการแพทย์ (Kokusho *et al.*, 1982 ; Tataru *et al.*, 1985; Fujii *et al.*, 1986)

Seitz (1974) ได้รวบรวมการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไลเปสที่มีการจดสิทธิบัตรแล้ว พบว่าเอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอก ยา เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เครื่องหนัง การผลิตหมากฝรั่ง และยาสีฟัน รวมทั้งยังใช้ในการกำจัด น้ำเสียและของเสีย เป็นต้น

การใช้ไลเปสในการสังเคราะห์สารประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับร่างกาย ไลเปสถูกนำมาใช้ในการผลิต isopropyl myristate, isopropyl palmitate และ 2-ethylhexyl palmitate ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับร่างกาย เช่น ครีมทาผิว และครีมกันแดด (อังคาร, 2544)

Jaeger and Reetz (1998) รายงานการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในโรงงานผลิตกระดาษ โดยใช้กำจัดยางไม้ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไตรกลีเซอไรด์และแวกซ์ เพราะเป็นปัญหาในการผลิตกระดาษ ในประเทศญี่ปุ่นได้ใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* เพื่อย่อยสลายยางไม้ดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์

Selmi and Thomas (1998) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันโดยใช้น้ำมันจากเมล็ดทานตะวัน และมีเอทานอลเข้าร่วมในปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Rhizomucor miehel* (Lipozyme) พบว่ามีร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 83

ไบโอดีเซล

ไบโอดีเซล คือ แอลคิลเอสเทอร์ (alkyl esters) ของกรดไขมันสายโซ่ยาวที่พบในน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์ โดยคุณสมบัติในการเป็นเชื้อเพลิงของไบโอดีเซล คือ มีความหนืดใกล้เคียงกับ น้ำมันดีเซลและมีความคงตัว ความหนืดเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยน จุดวาบไฟของไบโอดีเซลมีค่าสูงกว่าน้ำมันดีเซล ทำให้มีความปลอดภัยในการใช้และการขนส่ง นอกจากนั้นแล้วไบโอดีเซลยังมีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 10 -11 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นผลทำให้การเผาไหม้ในเครื่องยนต์สมบูรณ์กว่าน้ำมันดีเซล (ปวีณา, 2547)

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลที่นิยมในปัจจุบัน คือ การนำน้ำมันพืช หรือไขมันสัตว์รวมทั้งน้ำมันใช้แล้วจากการปรุงอาหาร มาเข้ากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (transesterification process) โดยการเติมแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล และตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิสูง เพื่อเปลี่ยนให้เป็น เมทิลเอสเทอร์ เอทิลเอสเทอร์ หรือ แอลคิลเอสเทอร์อื่น ๆ และได้กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้

1. กระบวนการผลิตไบโอดีเซล

ในปี 2002 Khan ได้เสนอวิธีการที่ใช้ผลิตไบโอดีเซล ซึ่งในปัจจุบันมีหลายวิธี ทั้งที่เป็นแบบง่าย เช่น การผสมโดยตรง และจากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน และแบบยากที่พัฒนาขึ้นในปัจจุบันคือ การทำปฏิกิริยากับเมทานอลที่สภาวะเหนือวิกฤต ดังนั้นกระบวนการผลิตไบโอดีเซล อาจแบ่งได้ดังนี้

1.1 การใช้โดยตรงและการผสม (direct use and blending)

เป็นการนำน้ำมันพืชบริสุทธิ์ไปใช้โดยตรงกับเครื่องยนต์ หรือการนำน้ำมันพืชผสมกับน้ำมันดีเซลในอัตราส่วนต่าง ๆ ก่อนนำไปใช้ ซึ่งอาจก่อปัญหาและผลกระทบกับเครื่องยนต์ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว แม้ว่าเครื่องยนต์ดีเซลบางประเภทจะสามารถใช้งานได้กับน้ำมันพืชบริสุทธิ์ก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันพืชมีความหนืดสูง มีปริมาณกรดไขมันอิสระและยางเหนียวที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและพอลิเมอร์เซชัน ในระหว่างการเก็บรักษา (Fukuda *et al.*, 2001) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการทดลองว่าการผสมน้ำมันพืชลงในน้ำมันดีเซลในอัตราส่วน ของน้ำมันพืช ต่อ น้ำมันดีเซล ในอัตราส่วน 1:10 ถึง 2:10 สามารถนำไปใช้งานได้

1.2 ไมโครอิมัลชัน (microemulsions)

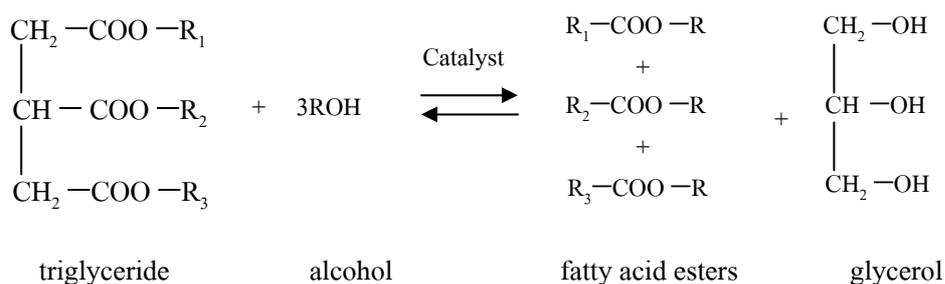
ไมโครอิมัลชัน คือ คอลลอยด์ที่กระจายตัวอยู่ในสถานะสมดุล ซึ่งเกิดจากการก่อรูปขึ้นเองจากของเหลวสองชนิดที่ไม่ละลายกัน เนื่องจากในน้ำมันพืชบริสุทธิ์จะมีความหนืดสูง ไมโครอิมัลชันจะช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับความหนืดได้ โดยการใช้ตัวทำละลาย เช่น แอลกอฮอล์ คุณสมบัติของน้ำมันที่ผ่านกระบวนการทำไมโครอิมัลชันจะคล้ายคลึงกับน้ำมันดีเซล แต่พบปัญหาเกี่ยวกับการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์

1.3 กระบวนการแตกสลายด้วยความร้อน (thermal cracking or pyrolysis)

ไพโรไลซิส เป็นการเปลี่ยนสารหนึ่งไปเป็นสารอื่น โดยอาศัยความร้อน เช่น ความร้อนที่ไม่ใช้ออกซิเจนหรือออกซิเจน ในช่วงอุณหภูมิ 450 – 850 องศาเซลเซียส ไขมันจะถูกไพโรไลซิสเพื่อเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กลง โดยตัวเร่งปฏิกิริยาที่ใช้ได้แก่ SiO_2 หรือ Al_2O_3 แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคาแพงมาก และเมื่อผ่านกระบวนการไพโรไลซิสจะทำให้ ออกซิเจนถูกดึงออกมาจากสิ่งแวดลอม ทำให้เกิดผลกระทบต่อสภาพแวดลอมได้ นอกจากนี้ กระบวนการนี้มักจะเป็นการผลิตเชื้อเพลิงที่มีคุณสมบัติเหมือนแก๊สโซลีนมากกว่าไบโอดีเซล

1.4 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification or alcoholysis)

ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาของไขมันกับแอลกอฮอล์เพื่อเปลี่ยนรูปให้เป็น สารประกอบเอสเทอร์ โดยมีผลพลอยได้คือ กลีเซอรอล ปฏิกิริยาทั่วไปแสดงดังภาพที่ 2 การเติม แอลกอฮอล์ที่มากเกินไปจะใช้เพื่อเป็นการบังคับปฏิกิริยาให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ โดยสัดส่วนโมลของปฏิกิริยาเป็นอัตราส่วนของ แอลกอฮอล์ ต่อ น้ำมัน คือ 3:1 หรือสามารถเพิ่มอัตราส่วนเป็น 6:1 เพื่อเพิ่มผลผลิต ตัวเร่งที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันนี้มีทั้งสารละลายกรด สารละลาย เบส และเอนไซม์ไลเปส แอลกอฮอล์ที่ใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพลทานอล บิวทานอล และเอมีลแอลกอฮอล์



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์

1.5 ผลิต โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาในรูปแบบอื่นๆ

1.5.1 ปฏิกิริยาที่ใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biocatalysts)

ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่ใช้ปกติ คือ ไลเปส แต่ต้องควบคุมสภาวะให้ดีเพื่อรักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์

1.5.2 ปฏิกิริยาเมทานอลเหนือวิกฤต (supercritical methanol)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถเกิดขึ้นได้โดยปราศจากตัวเร่งปฏิกิริยา และใช้เมทานอลในสภาวะเหนือวิกฤตโดยต้องกระทำที่อุณหภูมิ และความดันสูง

จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันเป็นวิธีที่นิยมนำมาผลิตไบโอดีเซล เนื่องจากมีกระบวนการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก อุณหภูมิและความดันที่ใช้ต่ำ ราคาต้นทุนต่ำเหมาะที่จะนำไปใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ (Schuchardt *et al.*, 1998)

2. การผลิตแอลคิลเอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส

การผลิตเมทิลเอสเทอร์จากปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชันสามารถเพิ่มอัตราเร็วด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา 3 ชนิดดังนี้

2.1 กรดอะตอม

กรดที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ กรดซัลฟูริก กรดฟอสฟอริก กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลโฟนิก การใช้กรดในการเร่งปฏิกิริยาจะใช้เวลานาน (3-4 ชั่วโมง) และอุณหภูมิสูง (100 องศาเซลเซียส) (Encinar *et al.*, 2002) แต่จะเหมาะสมกับกลีเซอไรด์ที่มีปริมาณกรดไขมันอิสระ และปริมาณน้ำสูง (Fukuda *et al.*, 2001)

2.2 เบสอะตอม

เบสที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น เบสอะตอมสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เร็วกว่ากรดอะตอม 4000 เท่า เมื่อใช้ในปริมาณที่เท่ากัน (Fukuda *et al.*, 2001) และมีรายงานว่า เบสอะตอมสามารถเร่งปฏิกิริยาได้สมบูรณ์โดยใช้เวลาเพียง 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (Encinar *et al.*, 2002) แต่อย่างไรก็ตาม เบสอะตอม มีข้อเสียคือ ในน้ำมันที่มีกรดไขมันอิสระสูงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสaponification ระหว่างกรดไขมันอิสระกับแอลกอฮอล์กลายเป็นสบู่ ทำให้มีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล

2.3 ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ

การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลโดยวิธีทางเคมีโดยใช้กรดหรือเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา มีข้อจำกัดดังนี้ มีการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูง และมีความยุ่งยากในการแยกกลีเซอรอล ปัจจุบันมีการศึกษาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา วิธีนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ปฏิกิริยาไม่รุนแรงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง ง่ายต่อการแยกกลีเซอรอล ไม่มีกระบวนการล้างที่ยุ่งยาก แต่การผลิตโดยใช้เอนไซม์ไลเปสต้องใช้ต้นทุนสูง ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบการใช้เบสคะตะลิสต์และเอนไซม์คะตะลิสต์ในการผลิตไบโอดีเซล

รายละเอียด	เบสคะตะลิสต์	เอนไซม์คะตะลิสต์
อุณหภูมิในปฏิกิริยา	60-70 องศาเซลเซียส	30-40 องศาเซลเซียส
กรดไขมันอิสระ	สบู่	เมทิลเอสเทอร์
น้ำในองค์ประกอบ	สบู่	เมทิลเอสเทอร์
ปริมาณเมทิลเอสเทอร์	ธรรมดา	สูงกว่า
การแยกกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
การทำเมทิลเอสเทอร์ให้บริสุทธิ์	ล้างซ้ำหลายครั้ง	ไม่ต้องล้าง
ต้นทุนในการผลิต	ราคาถูก	ราคาแพงกว่า

ที่มา: Fukuda *et al.* (2001)

กระบวนการหมัก

1. ความหมายและประเภทการหมัก

การหมัก (fermentation) คือ “ กระบวนการแปรสภาพทางชีวเคมี ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ ” (สมใจ, 2537) การหมักในอุตสาหกรรมจะมีจุดประสงค์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ หรือมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ทั้งนี้การหมักอาจเกิดขึ้นในสภาวะที่มีการให้อากาศเต็มที่หรือเพียงเล็กน้อยหรือปราศจากอากาศ

ปัจจุบันต้นเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในอุตสาหกรรมการหมักอาหารสำหรับสัตว์ อุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ อุตสาหกรรมการผลิตกรดอินทรีย์ เป็นต้น วิธีการเพาะเลี้ยงราให้ได้ชีวมวลปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มีวิธีการเพาะเลี้ยง 2 แบบ ซึ่งแบ่งตามลักษณะปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ (สมใจ, 2537)

1.1 การหมักโดยใช้อาหารเหลว (submerged fermentation; SF)

กระบวนการหมักที่ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเหลว เช่น การหมักแอลกอฮอล์ และน้ำส้มสายชู

1.2 การหมักโดยใช้อาหารแข็งหรือการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation; SSF)

เป็นกระบวนการหมักบนวัสดุที่เป็นของแข็ง ซึ่งไม่มีน้ำอิสระที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะฉะนั้นน้ำที่อยู่ในกระบวนการหมักนี้ จึงอยู่ในสภาพของความชื้นที่อยู่ในวัสดุหมัก โดยถ้าความชื้นในกระบวนการนี้ต่ำกว่า 12 เปอร์เซ็นต์แล้ว จุลินทรีย์จะหยุดการเจริญ การหมักแบบแห้งนี้ไม่รวมกระบวนการหมักในของเหลวที่มีของแข็งที่ไม่ละลายน้ำปน หรือการหมักของแข็งในอาหารเหลว การหมักแบบแห้งนี้วัตถุดิบส่วนใหญ่ ได้แก่ เมล็ดธัญพืช (เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และถั่วเหลือง) ไร่ข้าวสาลี วัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส (เช่น ไม้ ฟางข้าว) รวมทั้งของเสียจากกระบวนการผลิตอาหาร (Smith, 1985; Mudgett, 1986; Smith and Aidoo, 1988; คุณณี, 2537) วัตถุดิบจำพวกนี้ส่วนใหญ่โมเลกุลจะใหญ่จึงไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อย และมีปริมาณมาก หาง่าย ราคาถูก และมีสารอาหารในปริมาณมาก

การใช้วัสดุหมักที่เป็นแข็งในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์นี้เป็นกรรมวิธีที่เก่าแก่ที่สุด (Hesseltine, 1977a) กระบวนการหมักแบบแห้งนี้นิยมหมักในแถบตะวันออกไกลเป็นเวลานานหลายร้อยปี แต่เพิ่งเริ่มไม่นานในแถบตะวันตก กระบวนการหมักแบบแห้งได้แก่ การหมักเทมเป้ ซีอิ๊วขาว เต้าเจี้ยว อองจอม (ontjom) เนยแข็ง การเพาะเห็ด การผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ การทำปุ๋ยหมัก และการกำจัดน้ำเสีย แสดงได้ดังตารางที่ 6 เป็นต้น

การหมักแบบแห้งส่วนใหญ่จะใช้กับราที่สร้างเส้นใย ยีสต์บางชนิด แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Actinomycetes* และ *Bacillus* 1 สายพันธุ์ เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในอาหารเหลวหรืออย่างน้อยอาหารนั้นจะต้องมีน้ำอยู่ในรูปอิสระ เพราะเหตุนี้เองกระบวนการหมักของเชื้อแบคทีเรียทั่ว ๆ ไปจะใช้อาหารเหลวหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งต่างจากราที่สามารถเจริญได้ดีในของแข็งที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น ท่อนไม้ ราก ลำต้นใบและเมล็ดของพืช และบริเวณที่แห้งของสัตว์ เช่น หนัง กระดุก และมูลสัตว์ที่มีความชื้นต่ำ ตัวอย่างเช่น *Eurotium halophilicum* จะเจริญได้บนข้าวสาลีที่มีความชื้นเพียง 13-14 เปอร์เซ็นต์ (Hesseltine, 1977a) ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์หลายชนิดจะสามารถเจริญได้ดีในของแข็งแต่มีจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่นำมาใช้ในการผลิตเพื่อเป็นการค้า เช่น การหมักอาหารในตะวันออกไกล จะใช้ราพวก *Mucor*, *Rhizopus*, *Amylomyces*, *Aspergillus*, *Monascus* และ *Neurospora* การผลิตเนยแข็งจะใช้จุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่จะให้กลิ่นรสในระหว่างการบ่ม เนยแข็งการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้ปริมาณมากโดยการย่อยลิกโนเซลลูโลสของจุลินทรีย์ *Phanerochaete*, *Tricoderma* และ *Chaetomium* และการผลิตเห็ดโดยจุลินทรีย์ *Agaricus*, *Lentinus* และ *Volvariella* (Smith and Aidoo, 1988)

2. ลักษณะของการกระบวนการหมักแบบแห้ง

ลักษณะทั่วไปของการหมักแบบแห้ง ซึ่งพอจะแบ่งออกได้ตาม Hesseltine (1977b) ดังนี้ คือ

1.1 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการกระบวนการหมักแบบแห้งมักนิยมเป็นพวกวัตถุประสงค์ทางการเกษตร เช่น รัญพืช ถั่ว และผลิตภัณฑ์จากพืชและสัตว์ซึ่งมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสูง

1.2 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการกระบวนการหมักแบบแห้งต้องมีขนาดเหมาะสม เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างอนุภาคของวัตถุดิบเพียงพอให้อากาศถ่ายเทดี

1.3 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สำคัญได้แก่ น้ำ นอกจากนี้จำเป็นต้องเติมสารอาหารอื่น ๆ เช่นแหล่งไนโตรเจนหรือเกลือแร่ เป็นต้น

1.4 การปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรียเล็กน้อย เนื่องจากความชื้นต่ำไม่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรีย

1.5 จำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเพราะจะทำให้จุลินทรีย์ตาย อันเนื่องมาจากความร้อนสะสมอยู่มากในการกระบวนการหมักแบบแห้ง และอาจต้องควบคุมปริมาณออกซิเจนคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

ตารางที่ 6 ตัวอย่างของกระบวนการหมักแบบแห้ง

ตัวอย่าง	วัตถุดิบ	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง
การเพาะเห็ด	ฟางข้าว มูลสัตว์ ไม้	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Lentinus edodes</i> <i>Volvariella volvaceae</i>
ซีอิ๊ว	ข้าวสาลี และถั่วเหลือง	<i>Aspergillus oryzae</i>
เทมเป้ (tempeh)	ถั่วเหลือง	<i>Rhizopus sp.</i>
องจอม (ontjom)	กากถั่วลิสงที่สกัดน้ำมันออกแล้ว	<i>Neurospora sitophila</i>
เนยแข็ง	นม	<i>Penicillium roqueforti</i>
การชะล้างโลหะ	แร่เกรดต่ำ	<i>Thiobacillus spp.</i>
กรดอินทรีย์	น้ำตาลทราย กากน้ำตาล	<i>Aspergillus niger</i>
เอนไซม์	รำข้าวสาลี อื่น ๆ	<i>Aspergillus niger</i>
ปุ๋ยหมัก	อินทรีย์วัตถุต่าง ๆ	รา แบคทีเรีย <i>Actinomycetes</i>
การกำจัดของเสีย	ส่วนประกอบต่าง ๆ ของของเสีย	แบคทีเรีย รา และ โปรโตซัว

ที่มา : Smith and Aidoo (1988)

3. ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการหมักแบบแห้ง

เมื่อเปรียบเทียบการหมักบนแบบแห้งและอาหารเหลว พบว่ากระบวนการหมักแบบแห้งมีข้อดีและข้อเสีย ดังนี้ (Hesseltine, 1972; Mitchell *et al.*, 1992)

3.1 ข้อดีของการหมักแบบแห้ง

3.1.1 อาหารที่ใช้ในกระบวนการสามารถหาได้ง่าย เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี และผ่านขั้นตอนการเตรียมก่อนใช้งานน้อยกว่าอาหารเหลว

3.1.2 วัสดุหมักที่ใช้ในกระบวนการส่วนใหญ่จะต้องเติมเพียงน้ำเพียงเพื่อปรับความชื้นให้เหมาะสมลงไปเท่านั้น แต่อาจมีการเติมสารอาหารอื่น ๆ ลงไปด้วยก็ได้

3.1.3 ต้องการพื้นที่ในการติดตั้งเครื่องมือที่ใช้ในการหมักไม่มาก

3.1.4 เครื่องมือที่ใช้สำหรับการขยายสู่ระดับอุตสาหกรรมไม่ยุ่งยากและไม่แตกต่างจากที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.1.5 ปริมาตรของถังหมักที่ใช้มีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตที่ได้จากกระบวนการ เนื่องจากใช้น้ำในปริมาณน้อยและมีสารอาหารอยู่ในปริมาณเข้มข้น ทำให้ค่าใช้จ่ายในการลงทุนและปฏิบัติการน้อยลง

3.1.6 หัวเชื้อที่ใช้อยู่ในรูปของสปอร์ จึงไม่จำเป็นต้องมีถังหมักสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (seed tank) ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายลงได้

3.1.7 อาหารที่ใช้ในกระบวนการมีปริมาณความชื้นต่ำ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อ จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้โดยเฉพาะยีสต์และแบคทีเรีย ทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องเข้มงวดเรื่องการฆ่าเชื้อก่อนทำการหมัก

3.1.8 สภาพการเจริญของจุลินทรีย์เช่นรา มีลักษณะคล้ายกับที่อยู่ในธรรมชาติ จึงทำให้เชื้อต้องการระยะเวลาในการปรับตัว (lag phase) สั้น การหมักจึงเกิดขึ้นได้ดี

3.1.9 การเขย่าอาหารที่ใช้ในกระบวนการจะช่วยยับยั้งการสร้างสปอร์ของรา ภาวะเจริญในรูปของโยรา ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของราในห้องปฏิบัติการ

3.1.10 อากาศสามารถแพร่ไประหว่างช่องว่างของอนุภาคอาหารและอนุภาคจุลินทรีย์ได้อย่างสะดวก โดยแรงที่ใช้ในการเติมอากาศผ่านเข้าไปในถังหมักมีค่าน้อย เนื่องจากระหว่างอนุภาคของอาหารเป็นช่องว่างไม่ใช่ช่องเหลว นอกจากนี้แผ่นฟิล์มที่เคลือบอนุภาคบางมากทำให้ออกซิเจนผ่านเข้าสัมผัสกับอาหารเกิดปฏิกิริยาได้ง่าย

3.1.11 ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักแบบแห้งอาจมากกว่าผลผลิตที่ได้จากการหมักในอาหารเหลว ซึ่งผลผลิตที่ได้ค่อนข้างคงที่และมีสมบัติที่ไม่แตกต่างกันมากนัก

3.1.12 ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการสามารถนำมาสกัดออกจากวัสดุหมักได้ทันที โดยการเติมสารละลายลงไป หรืออาจนำมาเก็บแช่แข็งไว้ก่อนที่จะนำมาสกัด

3.1.13 ผลผลิตที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องแยกออกจากวัสดุหมักก่อน

3.2 ข้อเสียของการหมักแบบแห้ง

3.2.1 มีความจำกัดต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ ซึ่งจุลินทรีย์นั้นจะต้องสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความชื้นต่ำ ทำให้กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ในระบบการหมักบนแบบแห้งนี้อยู่ในช่วงที่แคบ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นรา นอกจากนี้ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และสเตรปโตมัยซิสบางสายพันธุ์เท่านั้น

3.2.2 การเขย่าหรือการกวนวัสดุหมักตลอดระยะเวลาการหมักต้องอาศัยพลังงานสูง

3.2.3 การเติมน้ำลงไปในช่วงแรกของการหมัก อาจมีผลทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้

3.2.4 ปริมาณเริ่มต้นของสปอร์ที่ใช้อาจต้องมีปริมาณมากจึงจะได้ผลที่ดี ดังนั้นต้องมีกรรมวิธีการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์ และการเก็บเกี่ยวสปอร์ต้องใช้เทคนิคที่ปลอดภัย

3.2.5 วัตถุดิบทางการเกษตรที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจต้องนำมาผ่านกระบวนการเพื่อเตรียมสภาพให้เหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อน เช่น การทำให้มีขนาดเล็ก ลง หรือการนำวัตถุดิบไปนึ่งก่อนแทนที่จะใช้วัตถุดิบนั้นในสภาพปกติ

3.2.6 มีปัญหาเกี่ยวกับการถ่ายเทความร้อนหรือมีความร้อนสะสมเกิดขึ้นในขณะที่ทำการหมัก โดยเฉพาะในระบบที่มีขนาดใหญ่

3.2.7 เนื่องจากระบบการหมักนี้เป็นการหมักแบบแห้ง จึงเป็นปัญหาในการวัดค่าตัวแปรของระบบ และเป็นการยากที่จะแน่ใจว่ามีการกระจายตัวของอาหารที่ให้เพิ่มเข้าไปใหม่ ดังนั้น การควบคุมและการติดตามผลการหมักเช่น พีเอช ความชื้น และความเข้มข้นของวัสดุหมักสามารถทำได้ยาก

3.2.8 การถ่ายเทในเฟสของแข็ง ถูกจำกัดด้วยการแพร่เท่านั้น ดังนั้นการแพร่จึงเป็นตัวกำหนดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์

3.2.9 ข้อมูลพื้นฐานทั้งทางด้านวิทยาศาสตร์และวิศวกรรมศาสตร์เกี่ยวกับการหมักชนิดนี้มีน้อย เช่น ข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของราที่สามารถเจริญบนวัสดุหมักที่สัมพันธ์กับรูปร่างของวัสดุหมักเพราะส่วนใหญ่มีแต่การทดลองบนผิวแบนราบ

3.2.10 สมการการเจริญของจุลินทรีย์ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ จึงไม่สามารถที่จะออกแบบหรือกำหนดสภาวะที่เหมาะสมได้

3.2.11 ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธีนี้จะนานกว่าแบบใช้อาหารเหลว เนื่องจากค่าอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าที่ต่ำกว่า โดยเฉพาะในการผลิตโปรตีนจากลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) จากเชื้อรา

3.2.12 การแยกผลิตภัณฑ์โดยการสกัด (leaching) จากวัสดุหมักที่มีลักษณะเหนียวโดยธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ที่ได้ เช่น เอนไซม์ มีความเหนียวเกินความต้องการของตลาด ทำให้ต้องผสมแคลเซียมคลอไรด์เพื่อลดความเหนียว

3.2.13 การหาค่ามวลของเส้นใย (mycelial mass) สามารถทำได้ยาก

3.2.14 อาจต้องมีการพัฒนากระบวนการหมักต่อไปในอนาคตเพื่อให้แน่ใจว่าผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ มีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก

4. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับห้องปฏิบัติการ

การพัฒนากระบวนการหมักจะต้องเริ่มจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติ ศึกษาและหาวิธีแก้ปัญหาพื้นฐานต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่จะสามารถนำไปปรับใช้ในการหมักในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งมีความแตกต่างกันหลายประการ เช่น ปริมาตร วัสดุคิบที่ใช้ในการหมัก อัตราส่วนของปริมาตรอาหารต่อปริมาตรถังหมัก

โดยทั่วไปการหมักในระดับห้องปฏิบัติการนิยมเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวปริมาตร 50-100 มิลลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250-500 มิลลิตร ซึ่งการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในฟลาสก์นี้สามารถทำเป็นจำนวนมากได้ และมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนน้อย จึงทำให้สามารถศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักได้ง่าย (สมใจ, 2537)

รา

1. ลักษณะทั่วไปของรา

รา เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต คือพืชที่ไม่สามารถจำแนกออกได้ว่าส่วนไหนเป็นลำต้น ราก หรือใบ ไม่มีระบบท่อน้ำ ท่ออาหารเหมือนพืชชั้นสูง ไม่มีคลอโรฟิลล์แต่มีผนังเซลล์ ปกติพบว่าเคลื่อนที่ไม่ได้ นอกจากพวกเซลล์ที่ทำหน้าที่สืบพันธุ์ มีการสืบพันธุ์โดยสปอร์ ส่วนมากเป็นเส้นใยแตกกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วยเซลล์หลายเซลล์มีนิวเคลียส

รา มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous) แต่ละเส้นเรียกว่า ไฮฟา (hypha) เมื่ออยู่รวมกับเส้นอื่นรวมเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) นอกจากนี้ยังมีรูปร่างแบบอื่นๆ คือ ในราชั้นต่ำมีรูปร่างเป็นก้อนกลม หรือ แดกแขนง มีไรโซอิด (rhizoid) เป็นตัวยึดกับอาหารและดูดอาหาร ส่วนในพวกราเมื่อจะมีรูปร่างไม่แน่นอนมีรูปร่างคล้ายอะมีบา ส่วนประกอบที่สำคัญอีกส่วนหนึ่งนอกจากไมซีเลียมคือ สปอร์ ซึ่งมีขนาด รูปร่าง สี แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของรา (บัญญัติ, 2539)

เส้นใยของรามีการเจริญได้สองทิศทาง ในตามขวางจะเจริญไปอย่างเต็มที่แล้วจึงหยุดเจริญ ส่วนการเจริญตามยาวของเส้นใยจะขยายยาวออกไปและแตกแขนงอย่างไม่จำกัดราบเท่าที่สภาวะแวดล้อมยังเหมาะสม ราวางชนิดจะมีการเจริญของเส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 15 เมตร เส้นใยที่มารวมกันเป็นไมซีเลียมจะประกอบด้วยสองส่วน ส่วนแรกเป็นไมซีเลียมที่ยึดเกาะกับอาหาร ทำหน้าที่ดูดสารอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ส่วนที่สองเป็นไมซีเลียมที่ยืนไปในอากาศ ทำหน้าที่สร้างสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์ (พิไลพรณ, 2525)

2. การสืบพันธุ์ของรา

ราส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ สปอร์ของราที่พบส่วนใหญ่เป็นสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ แต่มีบางชนิดที่สามารถสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศด้วย

2.1 การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ

ราสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเป็นจำนวนมาก มีขนาดเล็ก เบา และทนต่อความแห้ง สามารถแพร่กระจายไปโดยลม และเมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสมจะงอกและเติบโตต่อไป

2.2 สปอร์แบบอาศัยเพศ

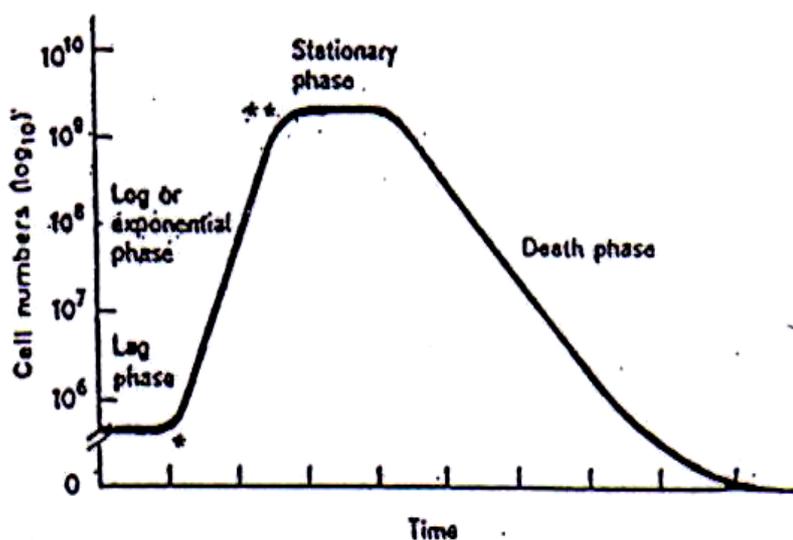
รบบางชนิดสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ แต่พบน้อยกว่าไม่อาศัยเพศ สปอร์แบบนี้เกิดจากการรวมตัวกันของนิวเคลียสของเซลล์สองเซลล์ การรวมตัวกันนี้แบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ พลาสโมแกมี (plasmogamy) เป็นการรวมตัวของไซโทพลาซึมเข้ามาอยู่ด้วยกัน ให้นิวเคลียส 2 อันอยู่ใกล้กัน เรียกเซลล์ที่มีนิวเคลียสทั้งสองรวมกัน ได้เป็นดิพลอยด์ ไซโกต ในราชันสูงระยะที่ 1 และ 2 ห่างกันมาก จึงมีช่วงไคคารีออนนาน ระยะที่ 3 ไมโอซิส ได้เฮพลอยด์นิวเคลียส 4 อัน

3. รูปแบบการเจริญของรา

การเจริญของจุลินทรีย์ หมายถึง ปฏิกริยาระหว่างจุลินทรีย์กับสิ่งแวดล้อมอันได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของสารอาหาร เป็นต้น ในอีกแง่หนึ่งการเจริญของจุลินทรีย์ อาจหมายถึง การเจริญหรือการให้สารอาหารแก่จุลินทรีย์แต่ละเซลล์ อันเป็นกระบวนการที่สลับซับซ้อน และได้มาจากผลรวมของเมทาบอลิซึมของเซลล์ โดยทั่วไปเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญ จะมีการเปลี่ยนแปลงของแต่ละเซลล์ โดยเซลล์จะเพิ่มขนาดขึ้นก่อน จากนั้นก็จะแบ่งตัวออกเป็นสองเซลล์ (binary division)

อัตราการเจริญของราโดยปกติจะเป็นรูป sigmoid curve (s-shape) เช่นเดียวกับจุลินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งอัตราการเจริญสูงสุดของจุลินทรีย์จะอยู่ที่จุดเมื่อเซลล์มีขนาดประมาณ $\frac{3}{4}$ ของเซลล์ที่โตเต็มที่ ในช่วงที่มีการแบ่งเซลล์ และอัตราการเจริญต่ำสุดจะอยู่ที่จุดก่อนและหลังการแบ่งเซลล์เล็กน้อย (วรารุณี, 2529)

ในการศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์มักจะแบ่งวงจรการเจริญออกเป็นระยะต่าง ๆ โดยดูจากการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญ (growth rate) โดยปกติแล้วแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ lag phase logarithm phase หรือ exponential phase stationary phase และ death phase ดังแสดงในภาพที่ 3 สำหรับรายละเอียดแต่ละระยะเป็นดังนี้



ภาพที่ 3 วงจรการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ที่มา : วราวุฒิ (2529)

3.1 ระยะเวลาปรับตัว (lag phase) เมื่อมีการย้ายเชื้อจุลินทรีย์ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่จำนวนจุลินทรีย์จะคงที่ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งอาจเป็นช่วงสั้น ๆ หรือบางครั้งอาจยาวนานเป็นชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ ในช่วงที่เซลล์ปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม จะมีการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ดังนี้

3.1.1. อัตราการขยายขนาด (rate of growth) ซึ่งได้แก่การเพิ่มขนาดหรือมวลของเซลล์ มีค่าสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ (rate of multiplication) ดังนั้นขนาดของเซลล์จะใหญ่กว่าเซลล์ในระยะอื่น ๆ ของวงจร กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์จะใกล้เคียงกับในช่วงระยะเติบโตทวีคูณ (log phase) เมื่อคิดต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง

3.1.2 ระยะเวลาของระยะปรับตัวขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ และอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

3.1.3 อายุของต้นเชื้อ (inoculum) หากต้นเชื้อที่ถ่ายลงในซบัสเตรทอยู่ใน ระยะเติบโตทวีคูณ (ประมาณ 12-24 ชม.) จุลินทรีย์เกือบไม่ต้องอยู่ในช่วงของระยะปรับตัวเลย แต่หากต้นเชื้ออยู่ในระยะคงที่ (stationary phase) จะต้องการช่วงระยะปรับตัวค่อนข้างนาน นอกจากนี้แล้วปริมาณของต้นเชื้อยังมีผลต่อช่วงของระยะปรับตัว ในทางปฏิบัตินิยมใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าต้นเชื้อมีอายุ

น้อยเกินไป (อยู่ในช่วงระยะปรับตัว) จะไม่ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะความร้อนและสารเคมี ทำให้ต้องการระยะปรับตัวยาวนานกว่าปกติ

3.2 ระยะเร่งตัว (acceleration phase) เป็นช่วงก่อนที่จุลินทรีย์จะเข้าสู่ช่วงระยะปรับตัว โดยหลังจากที่จุลินทรีย์เริ่มเจริญจะมีการแบ่งตัวประมาณ 4-5 ครั้ง จึงเข้าสู่ช่วงอัตราการเจริญสูงสุดต่อไป

3.3 ระยะเติบโตทวิคูณ (logarithmic phase) ในช่วงนี้มีค่าเฉลี่ยของ generation time คงที่ซึ่งจุลินทรีย์จะเจริญอยู่ในระยะที่เรียกว่า steady state period ซึ่งหมายถึงการเจริญของจุลินทรีย์อยู่ในสภาพสมดุล (balance growth) แต่ความเป็นจริงสถานะนี้เป็นแต่เพียงทฤษฎีนั้น ในทางปฏิบัติแล้วสภาพเช่นนี้จะไม่เกิดขึ้น เพราะส่วนประกอบของเซลล์และขนาดของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาของการหมัก ดังนั้นสภาพนี้จึงเป็นสมมติฐานที่เกิดขึ้นและสามารถรักษาให้คงที่ได้ในช่วงระยะปรับตัวเท่านั้น

3.4 ระยะถดถอย (deceleration and retardation phase) เป็นช่วงปลายของระยะปรับตัวก่อนที่จะเข้าสู่ระยะคงที่ เมื่อสารอาหารเลี้ยงเชื้อค่อย ๆ หมดลง หรือสภาพแวดล้อมอื่นไม่เหมาะสมอีกต่อไป รวมทั้งมีการสะสมสารพิษจากกระบวนการเมทาบอลิซึมมากขึ้น อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ก็จะต่ำลง ซึ่งในช่วงการเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญนี้อาจเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหรือค่อย ๆ เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ในระยะนี้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) จะเริ่มลดลง โดยที่จำนวนเซลล์ทั้งหมด (total count) จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

3.5 ระยะคงที่ (stationary phase) เป็นช่วงที่จำนวนเซลล์จะค่อนข้างคงที่ที่จุดสูงสุด ระยะนี้จะมีความสำคัญมากต่อกระบวนการหมักเพื่อผลิตสารต่าง ๆ เช่นการหมักแอลกอฮอล์ การหมักจะสิ้นสุดหลังจากที่ viable cell ถึงจุดสูงสุดเล็กน้อย แต่ในกรณีของการผลิตยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลิน การสังเคราะห์เพนนิซิลินจะเริ่มเกิดขึ้นหลังจากถึงระยะคงที่แล้ว สำหรับกรณีที่มีสารอาหารอย่างจำกัด รวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสะสมของสารพิษจะเป็นตัวยับยั้งการเจริญและทำให้วงจรของจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะนี้เช่นเดียวกัน

4. ลักษณะการเจริญของรา

ราแตกต่างไปจากพืชอื่นๆ ก็คือ มันต้องการอาหารสำเร็จรูปเพื่อยังชีพและเจริญ โดยที่ไม่สามารถทำอาหารขึ้นมาเองได้ ซึ่งส่วนมากราเจริญได้ดีในแหล่งอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง หรือ

แหล่งคาร์บอนมาก (พิบูลย์, 2541) เพื่อใช้ในการเจริญและสืบพันธุ์ ซึ่งการใช้สารอาหารของราทำได้ โดย ราปล่อยน้ำย่อยหรือพวกเอนไซม์ออกมาย่อยสารแล้วทำการดูดซึมมาให้ ซึ่งรามักสะสมอาหาร ไว้ในรูปของไกลโคเจน หรือน้ำมัน

ธาตุที่จำเป็นสำหรับการเจริญของรา มีทั้งธาตุที่ต้องการในปริมาณมาก เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และธาตุที่ต้องการในปริมาณ น้อย เช่น เหล็ก ทองแดง สังกะสี โมลิบดีนัม สารประกอบคาร์บอนมีหน้าที่ที่สำคัญ 2 ประการ คือ เป็นแหล่งของคาร์บอน ในการสังเคราะห์สารประกอบของเซลล์ และเป็นแหล่งพลังงาน เราสามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างกว้างขวาง ราเกือบทั้งหมดสามารถใช้กลูโคสและส่วน ใหญ่เจริญได้ดีในฟรักโทส แมนโนส ส่วนกาแล็กโทสใช้ได้ไม่ดีเท่ากลูโคส ส่วนน้ำตาลเพนโทสที่ ราใช้ได้มาก คือ ไซโลส สำหรับอะราบิโนส มีราเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ใช้ได้ อนุพันธ์ของน้ำตาล เช่น ซอร์บิทอล แมนนิทอล ราบางชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นกัน แต่ส่วนใหญ่ใช้ได้ ไม่ดีเท่าน้ำตาลกลูโคส

ไคแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นแหล่งของคาร์บอนที่สำคัญในธรรมชาติ ราที่ สามารถใช้พวกนี้ได้ต้องสามารถสลายสารเหล่านี้เป็นน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ และสามารถนำเข้า เซลล์ได้ มอลโทสและเซลโลไบโอส เราสามารถใช้ได้ ส่วนซูโครสและเล็กโทสมีรำนาน้อยที่ สามารถใช้ได้ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ราใช้ได้คือ แป้งและเซลลูโลส ส่วนเพกทิน ลิกนิน เฮมิเซลลูโลส มี รานานชนิดเท่านั้นที่ใช้ได้ แหล่งคาร์บอนนอกจากได้จากคาร์โบไฮเดรต อาจได้จากพวกไขมัน กรด อินทรีย์

แหล่งไนโตรเจน ราต้องการเพื่อนำไปใช้ในการสร้างกรดอะมิโน เราอาจใช้ในโตรเจนใน รูปสารอินทรีย์ เช่น ไนเตรต แอมโมเนีย หรือใช้ในรูปสารอินทรีย์ แหล่งซัลเฟอร์มักใช้ในรูปซัลเฟต ราบางพวกไม่สามารถใช้ซัลเฟตได้ ต้องใช้ในรูปกรดอะมิโนซิสเตอีน ซิสทีน เมธิโอนีน แหล่ง ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ราใช้ในรูปสารอินทรีย์ ส่วนธาตุที่ต้องการในปริมาณน้อย ส่วนใหญ่ ต้องการในปริมาณ 0.001-0.5 ส่วนในล้านส่วน สำหรับโมลิบดีนัมต้องการน้อยมากคือ 0.1-10 ส่วน ในล้านล้านส่วน ถ้ามีธาตุเหล่านี้มากเกินไปจะเป็นพิษต่อเซลล์

สำหรับวิตามิน ราบางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินที่ต้องการได้เอง แต่บางชนิด สังเคราะห์เองไม่ได้ ราไม่ต้องการวิตามิน เอ ดี อี แต่ต้องการวิตามิน บี

การเจริญของราจะเจริญบริเวณปลายไฮฟา (hypha tip) และมักมีการแตกแขนง โดยแขนงอันแรกทำให้เกิดแขนงที่ 2 3 ต่อไป แขนงเหล่านี้เจริญไปด้านหน้าทางขอบของโคโลนี และแยกห่างจากอันอื่นๆ การเจริญจะหยุดลงเมื่อไม่ซีเลียมใช้อาหารรอบๆ บริเวณนั้นหมดไปและแตกแขนงเจริญไปอย่างรวดเร็วกระจายทุกทิศทุกทาง การเจริญลักษณะนี้จึงทำให้โคโลนีมีลักษณะเป็นวงกลมบนวัสดุหมัก เส้นใยของราบนวัสดุหมักบางส่วนลงลึกลงไปในการเพื่อดูดอาหารส่งไปให้ส่วนที่ไม่ได้สัมผัสกับอาหาร โคโลนีของราแตกต่างกัน บางชนิดเส้นใยอัดแน่น บางชนิดอยู่กันอย่างหลวมๆ มีลักษณะฟู ผิวหน้าโคโลนีบางชนิดแห้ง บางชนิดเปียกหรือเหนียว สีเส้นใยอาจมีสีดำ เทา น้ำตาล แดง หรือเหลือง ส่วนสปอร์ที่อาจเป็นสีเขียว น้ำตาลแกมเขียว ส้ม ชมพู น้ำตาล ดำ หรือเทา เป็นต้น ส่วนการเจริญของราบนอาหารเหลว มักเจริญเป็นแผ่นอยู่บนผิวหน้าอาหาร แต่ถ้าให้อากาศโดยการเขย่า เส้นใยจะรวมกันเป็นกระจุก ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆ

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของรา

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมักแบบแห้งควรพิจารณาสถานะที่เหมาะสมซึ่งได้แก่ ความชื้น พีเอช อุณหภูมิ การให้อากาศและปริมาณต้นเชื้อเริ่มต้นที่ต้องการ (วารวูตติ, 2529) เพื่อที่จะผลิตชีวมวลของราที่มีคุณภาพดีและสม่ำเสมอ (Reid, 1989) โดยตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของราได้แก่

5.1 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนแต่บางชนิดจะต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมัก ได้แก่ แก๊สแอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท เป็นต้น สำหรับแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปแบบกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งในกรณีที่ต้องเติมสารพวกกรดอะมิโนบางตัวลงไปในการเลี้ยงเชื้อเพราะจุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ ได้แก่ ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง คาเซอีน ไฮโดรไลเซท กากปลา และยีสต์สกัด (yeast extract) เป็นต้น (สมใจ, 2537)

5.2 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ในการสังเคราะห์เซลล์

กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณมากและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งจากธัญพืชชนิดต่าง ๆ แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ เมล็ดข้าวบาร์เลย์ กากน้ำตาล (กลูโคส) หางนม (แลคโตส) กากถั่วเหลือง น้ำมันพืช สารอื่น ๆ ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และอัลเคน ก็สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมการหมักได้ด้วย แม้ว่าสารเหล่านี้จะมีราคาแพงกว่าคาร์โบไฮเดรต แต่สามารถผลิตได้ในรูปที่บริสุทธิ์ และเมื่อใช้เป็นวัสดุหมักในกระบวนการหมัก จะทำให้กระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตและการทำให้บริสุทธิ์ง่ายขึ้น (สมาใจ, 2537)

5.3 แหล่งพลังงาน

เนื่องจากการเจริญเป็นกระบวนการที่จำเป็นต้องใช้พลังงานเพื่อนำมาสังเคราะห์ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ จุลินทรีย์อาจใช้พลังงานจากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้

5.3.1. แสงแดด พบในพวก autotrophic microorganism เช่น สาหร่ายเซลล์เดียวและแบคทีเรียบางชนิด ทั้งนี้เพราะมีความสามารถที่จะสังเคราะห์แสงได้

5.3.2 ออกซิไดซ์สารประกอบบางชนิด พบในจุลินทรีย์พวก chemo-autotrophic microorganism เช่น แบคทีเรียในตระกูล *Thiobacillus sp.*, *Nitrosomonas sp.*, *Nitrobacter sp.*

5.3.3 กระบวนการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์โดยเฉพาะพวกแป้งน้ำตาล พบใน heterotrophic microorganism ได้แก่จุลินทรีย์เกือบทั้งหมดที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก

5.4 แหล่งแร่ธาตุ

จุลินทรีย์ต้องการเกลือแร่บางชนิดในปริมาณเล็กน้อย แต่ถ้าไม่มีจะเป็นผลเสียต่อเซลล์ จุลินทรีย์มาก เพราะเกลือแร่บางชนิดเป็นตัวเร่งในปฏิกิริยาชีวเคมีหลายอย่าง และเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์และองค์ประกอบบางอย่างของเซลล์

แร่ธาตุที่มีความสำคัญตามปกติที่จะต้องเติม (major elements) ได้แก่แร่ธาตุที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณพอสมควร ได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แคลเซียม โบแทสเซียม และ โซเดียม ส่วนพวกที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งมักไม่จำเป็นต้องเติมลงไป ในอาหาร เนื่องจากมีปะปนมากับวัตถุดิบหลายชนิดที่นำมาใช้อยู่แล้ว (trace elements) โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส โมลิบดีนัม และสังกะสี แร่ธาตุที่จำเป็นมากที่จะต้องอยู่ในสารอาหาร ได้แก่ แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส เพราะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการสร้างและถ่ายเทพลังงานสำหรับจุลินทรีย์

5.5 แหล่งวิตามิน

วิตามินเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต จุลินทรีย์บางชนิดจะสังเคราะห์วิตามินที่ต้องการได้เอง แต่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมวิตามินลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาทิ ไทอะมิน ไรโบเฟลวิน ไบโอติน กรดนิโคตินิก เป็นต้น แหล่งวิตามินที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากธรรมชาติ ในกรณีที่แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนที่เลือกใช้นั้นขาดวิตามินบางชนิดที่จุลินทรีย์ต้องการ อาจแก้ปัญหาได้โดยการใช้แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนหลายชนิดผสมกันเพื่อให้ได้วิตามินครบถ้วน

6. ๖1 Rhizopus oligosporus

6.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Rhizopus oligosporus*

เส้นใยไม่มีผนังกันตามขวาง มีทั้งสโตลอนและไรซอยด์ สปอร์แรงจิโอฟอร์ยื่นชูออกไปตรงข้อบริเวณไรซอยด์ ไม่แตกแขนง ส่วนปลายมีคอกูลูเมลลา และสปอร์แรงจิอูรูปกลม ภายในมีสปอร์แรงจิโอสปอร์ รูปกลม หรือรี ผิวเรียบ มักมีสีดำ โคลนีฟูเติบโตได้เร็วกว่า *Mucor*

Rhizopus มีลักษณะคล้าย *Mucor* ต่างกันที่ *Rhizopus* มีสโตนและไรซอยด์ขณะที่ *Mucor* ไม่มี (วิลาวณีย์, 2539) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Rhizopus* spp.

ที่มา: BioImages (1976)

เซลล์ของ *R. oligosporus* มีลักษณะทั่วไปเหมือนเซลล์พืช ประกอบด้วยโครงสร้างที่สำคัญ ดังนี้ (ทรงศักดิ์, 2543)

6.1.1 ผนังเซลล์

ผนังเซลล์ของ *R. oligosporus* ทำหน้าที่เช่นเดียวกับพืชชั้นสูง โดยจะทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้ ในราส่วนใหญ่รวมทั้ง *R. oligosporus* ด้วยจะมีผนังเซลล์ที่ประกอบไปด้วยสารพวกเซลลูโลสกับไคติน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine ส่วนโปรตีนและไขมันที่ผนังเซลล์พบน้อยมาก แต่ที่ผนังเซลล์ของก้านชูสปอร์ (sporangiophore) จะมีไขมันมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังพบลิกนินที่ผนังเซลล์อีกด้วย ทำให้ผนังเซลล์ทนต่อการถูกทำลายด้วยกรดได้ดี

6.1.2 เซลล์เมมเบรน (cell membrane)

เซลล์เมมเบรนของ *R. oligosporus* ทำหน้าที่ห่อหุ้มโปรโตพลาสซึมและควบคุมการนำสารเข้าสู่ภายในเซลล์ ประกอบด้วยไขมันและโปรตีนที่จัดเรียงตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ lipoprotein ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าประกอบด้วยโปรตีนชนิดใดบ้าง แต่พบว่ามีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการนำน้ำตาลและกรดอะมิโนเข้าสู่ภายในเซลล์ ไขมันและโปรตีนเหล่านี้จะมาจัดเรียง

ตัวเป็น unit membrane ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์เมมเบรนนั่นเอง (Bilgrami and Verma, 1978)

6.1.3 ออแกเนลล์ (organelle) ออแกเนลล์ที่พบใน *R. oligosporus* ก็เหมือนกับที่พบในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Bilgrami and Verma, 1978) ดังนี้

ก. ไมโทคอนเดรีย ทำหน้าที่สร้างพลังงานในกระบวนการ oxidative phosphorylation มีรูปร่างและจำนวนที่แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับช่วงระยะการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายนอก

ข. เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม มีความสำคัญเกี่ยวกับการเจริญในด้านขยายขนาดและความยาวของไฮฟา เนื่องจากการเจริญของไฮฟาดังกล่าวต้องการลิปิดและโปรตีนที่สังเคราะห์จากเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดขรุขระไปใช้ในการสร้างส่วนประกอบอื่น ๆ ของเซลล์

ค. ไรโบโซม พบทั้งที่เป็นอิสระในไซโตพลาสซึมและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดขรุขระ ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมที่เป็นอิสระในไซโตพลาสซึมจะสังเคราะห์โปรตีนที่นำไปใช้ควบคุมกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ ส่วนไรโบโซมที่เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดขรุขระจะสังเคราะห์โปรตีนเพื่อนำไปใช้กับกิจกรรมภายนอกเซลล์

ง. กอลจิแอปพาราเรตัส ทำหน้าที่สังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่และสารประกอบเชิงซ้อนให้กับเซลล์ เช่น lipoprotein ในเซลล์ปลายไฮฟานั้นจะมีกอลจิแอปพาราเรตัสทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์เซลล์เมมเบรน

6.1.4 cell inclusion ที่สำคัญในเซลล์ของ *R. oligosporus* ได้แก่อาหารสะสม ซึ่งมีสองชนิดคือ ไกลโคเจนและลิปิด ไกลโคเจนจะพบมากที่สุดที่เซลล์ทั่วไปและเซลล์ของโครงสร้างที่ใช้สืบพันธุ์ ส่วนลิปิดจะพบมากในสปอร์และเป็นอาหารที่นำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ดี โดยทั่วไปแล้วไกลโคเจนและลิปิดจะพบมากในเซลล์ที่เจริญเต็มที่มากกว่าเซลล์ที่อายุน้อย ๆ (Bilgrami and Verma, 1978)

6.1.5 นิวเคลียส เซลล์ของ *R. oligosporus* จะมีนิวเคลียสกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งตามปกติเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะมองไม่เห็นนิวเคลียสเนื่องจากมีขนาดเล็กและโปร่งแสง ต้องใช้วิธีการย้อมสีจึงจะเห็นได้ชัดเจน (Bilgrami and Verma, 1978)