บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญกับสุขภาพร่างกายมากขึ้น ดังนั้นจึงมีการคิดค้นอาหารชนิดใหม่จำนวนมากขึ้นมา เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ทั้งในด้านรสชาติ คุณค่าทางโภชนาการ และความปลอดภัยในการบริโภคอาหาร เต้าเจี้ยวเป็นอีกหนึ่งผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากวัตถุดิบหลักในการทำเต้าเจี้ยว คือถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารประเภทโปรตีน ขั้นตอนการผลิตเต้าเจี้ยวมีกระบวนการทางชีวเคมีค่อนข้างซับซ้อน เนื่องจากต้องเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของจุลินทรีย์หลายชนิด (สุทธิศักดิ์, 2520; พิมพาพร, 2521)

เต้าเจี้ยวที่จำหน่ายทั่วไปในท้องตลาดมีรสชาติที่เค็มมากเกินไป ซึ่งการแก้ไขปัญหาดังกล่าวของผู้ประกอบการส่วนใหญ่ ได้แก่การเติมน้ำตาลลงไปในผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งบางรายอาจสูงถึงร้อยละ 15 ทำให้รสชาติที่ดีของเต้าเจี้ยวลดลง และยังทำให้เต้าเจี้ยวมีสีคล้ำขึ้น

ดังนั้นจึงได้วางแนวทางการศึกษากลไกที่ทำให้เกิดอนุภาคสีขาวในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว เพื่อทำให้จำนวนและขนาดอนุภาคสีขาวลดลงในระดับที่ยอมรับได้ และทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวรสเค็มน้อย เพื่อให้ได้เต้าเจี้ยวที่มีปริมาณเกลือลดลงจากระดับทั่วไป แต่ยังคงมีรสชาติที่ยอมรับได้โดยที่ไม่ต้องเติมน้ำตาลทราย

เต้าเจี้ยว

เต้าเจี้ยว (มิโซะ) เป็นเครื่องปรุงรสอาหารชนิดหนึ่ง ที่ได้จากการหมักถั่วเหลือง และข้าวหรือแป้ง ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูง มีชื่อเรียกกันหลายอย่างตามแต่ละประเทศผลิตกันเช่น chiang (จีน), jang หรือ doenjang (เกาหลี), tauco (อินโดนีเซีย), tao-si (ฟิลิปปินส์), tao-chieo (ประเทศไทย) เป็นต้น (วราวุฒิและรุ่งนภา, 2532) ขั้นตอนการผลิตเต้าเจี้ยวมีความคล้ายคลึงกับกระบวนการผลิตซีอิ๊วเป็นส่วนใหญ่ และมีความเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งรายีสต์ และแบคทีเรีย ที่มีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงสารอาหารต่างๆ ในวัตถุดิบที่ใช้หมัก ให้กลายเป็นสารอาหารที่ร่างกายนำไปใช้ได้ง่าย และกลิ่นหอมที่มีลักษณะเฉพาะตัว (สุทธิศักดิ์, 2520; พิมพาพร, 2521)

การผลิตเต้าเจี้ยวและซีอิ๊วเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการหมักถั่วเหลืองและข้าวสาลีด้วยราในสกุล *Aspergillus* เรียกว่า โคจิ (koji) ซึ่งราจะเจริญและสร้างเอนไซม์หลายชนิดด้วยกันทำให้เกิดการย่อยสลายวัตถุดิบ ให้กลายเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง ขั้นตอนที่ 2 คือขั้นตอนการหมักโคจิที่ได้ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูง เรียกว่าโมโรมิ (moromi) โดยจุลินทรีย์อีก 2 ชนิด คือแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) และยีสต์ ควบคู่ไปกิจกรรมของเอนไซม์ที่ราสร้างขึ้นในขั้นตอนการหมักโคจิ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีกลิ่นหอมและรสชาติดี (Yokotsuka, 1986)

(a) (b)

ภาพ 1 เต้าเจี้ยวพร้อมบริโภค: เต้าเจี้ยวในบรรจุภัณฑ์ (a) ลักษณะเนื้อเต้าเจี้ยว (b)
ที่มา: lemonfarm, 2011

ผู้บริโภคคนไทยมักนำเต้าเจี้ยว (ภาพ 1) มาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ปรุงรสสำหรับอาหารชนิด ต่างๆ เนื่องจากเต้าเจี้ยวช่วยเพิ่มรสชาติให้แก่อาหาร และยังมีคุณค่าทางโภชนาการอีกด้วย ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ โปรตีน (protein) ไขมัน (fat) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) และเถ้า (ash) ร้อยละ 19.4 9.4 13.2 และ 13.0 ตามลำดับ (Rehm and Reed, 1983)

วัตถุดิบสำหรับการผลิตเต้าเจี้ยว

ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L) Merr. เมล็ดถั่วเหลือง(ภาพ 2) แต่ละพันธุ์จะมีสีเปลือก (seed coat) สีจมูก (hilum) ปริมาณความชื้น โปรตีน และไขมันแตกต่างกัน ถั่วเหลืองของไทยจะมีสีเปลือกเป็นสีเหลืองอ่อน สีจมูกเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ มีปริมาณความชื้น โปรตีน และไขมันร้อยละ 10 17 และ 34 ตามลำดับ (กองโภชนาการ, 2530)

ภาพ 2 เมล็ดถั่วเหลือง
ที่มา: ประไพศรี, 2553

ถั่วเหลืองจากสหรัฐอเมริกาพันธุ์ต่างๆ มีเปลือกสีน้ำตาล ไม่มันเงา จมูกถั่วเหลืองมีสีเหลือง สีดำ หรือสีเนื้อ มีปริมาณความชื้น โปรตีน และไขมันอยู่ระหว่างร้อยละ 7.7-8.1 45.1 และ 17.9-18.9 ตามลำดับ ในขณะที่ถั่วเหลืองจากญี่ปุ่นพันธุ์ต่างๆ สีของเปลือกมีน้ำตาลอมเขียว จมูกของถั่วเหลืองมีสีน้ำตาลเข้ม สีเหลือง มีปริมาณความชื้น โปรตีน และไขมันอยู่ระหว่างร้อยละ 7.9-8.2 40.8-45.2 และ 17.3-19.4 ตามลำดับ (Wang et al., 1983) องค์ประกอบของถั่วเหลืองมีความแตกต่างกันตามสภาพของแหล่งเพาะปลูก (Smith et al., 1960) การใช้ประโยชน์จากถั่วเหลืองในการทำผลิตภัณฑ์อาหาร ในบางครั้งมีความจำเป็นที่จะต้องคัดเลือกใช้สายพันธุ์ให้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ เช่น การใช้ถั่วเหลืองสายพันธุ์ที่มีเปลือกสีเหลืองอ่อน และมีโปรตีนสูงมาทำเป็นเต้าหู้ เป็นต้น

Sakaki (1996) กล่าวว่า ซีอิ๊วที่มีกลิ่นหอมและรสชาติ ส่วนหนึ่งเกิดจากสารประกอบที่มีชื่อเรียกว่า HEMF (4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone) สารดังกล่าวเกิดจาก

สารตั้งต้น (precursor) ที่พบได้ในถั่วเหลืองและข้าวสาลีเท่านั้น และเกิดขึ้นในขั้นตอนการหมักโมโรมิ โดยอาศัยกิจกรรมของยีสต์

ข้าวและแป้ง

ข้าวและแป้ง จัดเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรทที่สำคัญ และมีความสำคัญเป็นอันดับสองรองจากถั่วเหลือง ในการนำมาหมักเต้าเจี้ยว เนื่องจากราสามารถใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรทได้จากทั้งเมล็ดข้าวบดหรือแป้งที่ใช้ในการคลุกกับถั่วเหลือง นอกเหนือจากคาร์โบไฮเดรทในถั่วเหลือง ในการหมักเต้าเจี้ยวทางอุตสาหกรรม นิยมใช้แป้งสาลี (wheat flour) หรือแป้งข้าวเจ้า (rice flour) หรืออาจใช้ในรูปของเมล็ดข้าวสาลีหรือเมล็ดข้าวเจ้าก็ได้

อรอนงค์ (2547) ได้กล่าวถึงองค์ประกอบทางเคมีของข้าวว่า มีผลมาจากสายพันธุ์ สภาวะการปลูก-การเก็บเกี่ยว และกระบวนการแปรรูปจากข้าวเปลือกเป็นข้าวกล้องและข้าวสาร

ประเทศไทยส่วนใหญ่นิยมใช้แป้งข้าวเจ้ามากกว่าแป้งสาลีเพราะราคาถูกกว่า แต่การใช้แป้งสาลีจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสดี เนื่องจากแป้งสาลีหรือข้าวสาลีมีปริมาณโปรตีนสูง คือประมาณ 8-14 เปอร์เซ็นต์ และประกอบด้วยปริมาณกรดกลูตามิกที่สูงกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่นๆ จึงก่อให้เกิดรสชาติที่ดี (ไพบูลย์, 2521) แต่ผลิตภัณฑ์จะมีสีเข้มกว่าการใช้แป้งข้าวเจ้า เพื่อชดเชยข้อเสียเปรียบของแป้งทั้ง 2 ชนิด จึงอาจมีการใช้แป้งสาลีผสมกับแป้งข้าวเจ้าในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

การใช้ประโยชน์จากข้าวเพื่อให้เป็นแหล่งอาหารของราในกระบวนการหมักโคจิ จึงมีรูปแบบที่หลากหลาย เช่น การใช้ข้าวเหนียวแทนข้าวเจ้าหรือแป้งข้าวเจ้า เช่น ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ซึ่งเป็นข้าวเหนียวสายพันธุ์ที่มีลำต้นสูง ในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศเกษตรกรได้รับการส่งเสริมให้ทำการปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ในลักษณะเดียวกับการปลูกข้าว

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้มาจากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยรังสีแกมม่า (gamma) ขนาด 20 KRad อาบเมล็ดข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ให้กลายพันธุ์เป็นข้าวเหนียว แล้วนำมาปลูกคัดเลือกที่สถานีทดลองข้าวบางแขน และสถานีทดลองข้าวพิมาย จากการคัดเลือกได้ข้าวเหนียวหลายสายพันธุ์ด้วยกัน ในต้นข้าวช่วงที่ 2 แต่สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตมากที่สุดคือ ข้าวดอกมะลิ 105 65-G2 U-68-254 เป็นข้าวเหนียวหอมที่มีคุณภาพดี พันธุ์แรกที่ได้จากการอาบรังสีปรับตัวได้ดี เป็นที่นิยมปลูกและรับประทานมาก (สถาบันวิจัยข้าวกรมวิชาการเกษตร, 2540)

เกลือ

เกลือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของการผลิตเต้าเจี้ยว สามารถป้องกันป้องกันการเสื่อมเสีย และเป็นแหล่งให้รสเค็ม นอกจากนี้เกลือยังเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารเคมีบางตัว เกลือมีอยู่ 2 ชนิด คือเกลือสินเธาว์ (rock salt) และเกลือทะเล (sea salt) โดยทั่วไปการผลิตเต้าเจี้ยวจะใช้เกลือทะเลซึ่งมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์มากกว่าร้อยละ 95 (Yokotsuka, 1986) โดยโซเดียมคลอไรด์มีหน้าที่เสมือนกับสารยับยั้ง และคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นการหมักโมโรมิ นอกจากนี้เกลือยังช่วยในการปรุงแต่งรสชาติให้กับเต้าเจี้ยวด้วย (Yong and Wood, 1974)

ความเข้มข้นของน้ำเกลือที่ใช้หมักเต้าเจี้ยวมักกำหนดให้อยู่ในช่วงร้อยละ 18-22 เพราะเป็นความเข้มข้นที่สูงพอที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย และจุลินทรีย์ที่ทำให้เต้าเจี้ยวเน่าเสียได้ ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria: LAB) และยีสต์ที่ทนเกลือได้จะเจริญได้ดี และผลิตสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีของซีอิ้ว (Bhumiratana et al., 1988) แต่สำหรับซีอิ๊ว ที่ผลิตในประเทศญี่ปุ่น จะผลิตจากเกลือประมาณร้อยละ 17-19 (Yong and Wood, 1974)

ภคธีรา (2550) ได้ศึกษาการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง โดยใช้น้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 20 และไม่มีการเติมน้ำตาลทรายลงไปในผลิตภัณฑ์สุดท้าย พบว่าซีอิ๊วที่หมักได้มีรสชาตที่เค็มมาก

ศิริพร (2538) ได้ศึกษาผลของปริมาณเกลือในน้ำเกลือต่อกิจกรรมโปรตีเอสในกระบวนการหมักซีอิ๊ว โดยใช้น้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 26 เติมลงในโคจิที่มีน้ำผสมอยู่ก่อนแล้ว เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือในน้ำเกลือเท่ากับร้อยละ 17.53-18.70

น้ำ

น้ำเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเต้าเจี้ยวมาก น้ำที่ใช้กับการผลิตเต้าเจี้ยวใช้มาตรฐานของน้ำดื่มทั่วๆไป ไม่มีสี กลิ่น รส และใส เช่น น้ำที่ผ่านการกรอง หรือน้ำที่ผ่านการต้ม แต่ถ้าใช้น้ำประปาจะมีผลทำให้ต้องใส่กล้าเชื้อเพิ่มเนื่องจากคลอรีนไปทำลายจุลินทรีย์บางส่วน น้ำที่ใช้ควรมีสภาพเป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย ดังนั้นจึงต้องควบคุมคุณภาพของน้ำเพราะจะมีผลต่อคุณภาพของเต้าเจี้ยว (วารุณี, 2545)

การผลิตเต้าเจี้ยว

การหมักโคจิ

โคจิ ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของเอนไซม์โปรตีเอส และอะไมเลส สามารถเตรียมได้จากถั่วเหลืองต้มสุก หรือจากข้าวสุก เช่น ข้าวเมล็ดสั้น หรือข้าวบาร์เล่ย์ (ดุษณี, 2546) ขั้นตอนการเตรียมโคจิจากข้าวหรือจากถั่วเหลืองจะมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งทำได้โดยการนำข้าวมาแช่น้ำข้ามคืนแล้วนึ่งให้นิ่ม ข้าวต้องสุกพอดี มีความชื้นประมาณร้อยละ 35-40 จากนั้นนำมาแผ่บนกระด้งหรือถาดที่รองด้วยผ้าขาวบาง แล้วเกลี่ยให้หนาประมาณ 3-5 เซนติเมตร จากนั้นนำสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* หรือ *A. sojae* ใส่ให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-5 วัน โคจิที่ดีต้องมีเส้นใยสีขาวคลุมรอบโคจิและต้องไม่มีการปนเปื้อนจากราชนิดอื่น เรียกว่าโคจิข้าว (rice koji)

สำหรับการเตรียมโคจิจากถั่วเหลือง สามารถทำได้โดยนำถั่วเหลืองมาแช่ในน้ำ เพื่อทำให้ถั่วเหลืองนิ่มขึ้น และช่วยลดเวลาในการทำให้สุก หลังจากแช่น้ำแล้วถั่วเหลืองจะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 2.1-2.15 เท่า (Yokotsuka, 1986; Yong and Wood.1974; Bhumiratana et al., 1988) หลังจากนั้นจึงต้มถั่วให้สุก แล้วรีบลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่ (Yong and Wood,1974)ทำการเติมผงสปอร์ของราเช่นเดียวกับการเตรียมโคจิจากข้าว

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบ่มโคจิจะอยู่ระหว่าง 28-35 องศาเซลเซียส และโคจิควรมีความชื้นประมาณร้อยละ 55-60 เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการเจริญของรา *A. oryzae* การปล่อยให้ความชื้นของโคจิสูงเกินไป จะทำให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียได้ (Beuchat, 1987) การควบคุมอุณหภูมิและความชื้น จัดเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการหมัก เพราะราจะเจริญและสร้างเส้นใยได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยมีปริมาณมากแล้ว จึงให้ทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส คือ ประมาณ 25 องศาเซลเซียส เพื่อให้ราสร้างโปรตีเอสให้มากขึ้น (Wood, 1998)

การหมัก โมโรมิ (moromi)

ดุษณี (2546) กล่าวถึงวิธีการหมักโมโรมิ ซึ่งทำได้โดยการนำถั่วเหลืองมาแช่น้ำเป็นเวลา 18-22 ชั่วโมงในระหว่างการแช่ต้องเปลี่ยนน้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย นำถั่วเหลืองไปต้มหรือนึ่งให้สุก หรือนึ่งที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อรอนำไปใช้ในการหมัก โดยอาจใช้อัตราส่วนระหว่างถั่วเหลืองต่อโคจิเท่ากับ 2:1 จากนั้นเติมน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 17-22 บ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยใส่น้ำเกลือต่อโคจิในอัตราส่วน

เท่ากับ 2:1 น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 16 จะช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่เน่าเสียเจริญได้ในถังหมัก (Yong and Wood, 1974)

ขั้นตอนการหมักโมโรมิ จะเป็นช่วงการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อราสร้างขึ้นควบคู่ไปกับกิจกรรมการหมักโดยจุลินทรีย์ อีก 2 ชนิด คือ แบคทีเรียกรดแลคติก และยีสต์ ทำให้เต้าเจี้ยวที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายมีกลิ่นและรสชาติที่ดี การใช้ปริมาณเกลือที่ความเข้มข้นที่สูงเช่นนี้ จะส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสเค็มจัด

Chioua (1999) รายงานว่าสามารถหมักมิโสะโดยการใช้เกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ คือมีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5 (low sodium chloride) พร้อมกับเติมเอธานอลลงไปร่วมด้วยร้อยละ 7.5 เพื่อป้องกันการเน่าเสียจากแบคทีเรีย

ช่วงของการหมักโมโรมิ ต้องทำการกวนผสมโมโรมิเป็นครั้งคราว เพื่อเป็นการเติมอากาศให้แก่เต้าเจี้ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงสัปดาห์แรกนับว่ามีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งนอกจากจะช่วยให้ส่วนผสมของวัตถุดิบเข้ากันดีแล้ว ยังช่วยทำให้ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเทรต เป็นไปได้ดี และยังช่วยทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ทนเกลือที่ติดมากับโคจิได้อีกด้วย (Wood, 1998)

การหมักโมโรมิจะใช้เวลานาน 1-3 เดือน สำหรับการหมักกลางแจ้ง (Bhumiratana et al., 1988) แต่เวลาจะยาวนานออกไปเป็น 3 เดือน-1 ปี ถ้าเป็นการหมักในที่ร่ม (Yong and Wood, 1974)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักเต้าเจี้ยว

รา

ราที่มีความสำคัญและนิยมใช้ในการผลิตซีอิ๊วและเต้าเจี้ยว คือ *A. oryzae*, *A. flavus* และ *A. soyae* (*sojae*) จัดเป็นราในสกุล Deuteromycetes (Oyashiki et al.,1980) ซึ่งนิยมใช้ในการทำผลิตภัณฑ์อาหารหมักทั้งในแถบประเทศตะวันตกและตะวันออก (Jones,1993) มีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส (protease) และอะไมเลส (amylase) โดยเอนไซม์โปรตีเอสจะย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองให้เป็นกรดอะมิโน (amino acids) ซึ่งบางส่วนจะกลายเป็นเกลือของกรดอะมิโน เช่น โซเดียมกลูตาเมท (sodium glutamate) แล้วทำให้เกิดผลดีต่อเต้าเจี้ยวในด้านรสชาติ ส่วนอะไมเลสจะย่อยคาร์โบไฮเดรตในถั่วเหลือง ให้เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดเล็กลง และสุดท้ายได้เป็นน้ำตาลมอลโทส (maltose) และกลูโคส (glucose) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตและการหมัก (Rehm and Reed, 1983)

A. oryzae และ *A. sojae* เป็นราสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญได้ง่าย และพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการสร้างเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญ และเหมาะสมในการทำโคจิ นอกจากนั้นรา

Aspergillus ยังมีส่วนร่วมในการก่อให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่ดีในซีอิ๊วอีกด้วย (Yokotsuka, 1960a; Yokotsuka, 1986; Yong and Wood, 1974)

Oyashiki *et al.* (1989) ทดลองใช้ราหลายสายพันธุ์ในการเตรียมโคจิจากข้าวที่นึ่งสุก และพบว่า *A. oryzae* สามารถให้เอนไซม์ อัลฟาอะไมเลส (α- amylase) และนิวทรัลโปรตีเอสที่สูงที่สุด (neutral protease)

Wood (1998) ได้กล่าวถึงสมบัติที่ดีของราสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการทำโคจิ ดังนี้ คือ มีความสามารถที่ดีในการให้รสชาติและสีแก่ผลิตภัณฑ์สุดท้าย มีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้มาก ซึ่งจะมีความสำคัญต่อการเตรียมเป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) หรือทาเนโคจิ (tane koji) ความสามารถในการเจริญได้อย่างรวดเร็วและให้กิจกรรมเอนไซม์ที่สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีน และเอนไซม์ย่อยสลายเนื้อเยื่อพืช มีอัตราการใช้สารอาหารในระหว่างการเจริญที่ต่ำ มีความคงตัวทางพันธุกรรมสูง มี conidiophore สั้น ซึ่งจะช่วยให้โคจิไม่จับตัวเป็นก้อนแน่นเกินไป ทำให้มีการถ่ายเทอากาศที่ดีกว่า และไม่สร้างสารพิษ

ในอุตสาหกรรมการผลิตเต้าเจี้ยวและซีอิ๊ว ราที่คัดเลือกแล้ว จะถูกนำมาเพาะบน สับเสตรท (substrate) ที่เหมาะสม เช่น ปลายข้าวบดหยาบๆ ผสมกับน้ำ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนที่จะเติมสปอร์ของราที่ต้องการลงไป เพื่อผลิตสปอร์จำนวนมากสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ทันที หรือนำไปเก็บรักษาไว้โดยวิธีการที่แตกต่างกัน เช่น การแช่เย็น การอบให้แห้งในที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หรืออาจนำไปผสมกับแป้งในอัตราส่วนแป้งต่อผงสปอร์เท่ากับ 20:1 (วิลาวัณย์, 2536)

แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่พบและมีความสำคัญในการหมักเต้าเจี้ยว ได้แก่ แบคทีเรียที่ผลิตกรดโดยเฉพาะพวกที่ทนเกลือได้สูง ได้แก่ *Pediococcus soyae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในช่วงการหมักโมโรมิ โดยแบคทีเรียจะใช้น้ำตาลกลูโคส และมอลโทส ที่ได้จากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรท เพื่อผลิตกรดอินทรีย์ (organic acids) เอสเทอร์ (esters) เอธานอล (ethanol) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) ทำให้กลิ่นและรสชาติของเต้าเจี้ยวดีขึ้น (Beuchat, 1987) ลักษณะที่สำคัญที่สุดของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ สามารถหมักน้ำตาลให้ได้กรดแลคติก ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำหมักลดลงจาก 6.0-7.0 เป็น 4.0-5.0 ซึ่งช่วงที่มีความสมต่อการเจริญของยีสต์ ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักช่วงต่อไป

ยีสต์

ยีสต์ มีความสำคัญต่อการให้กลิ่นรสในการหมักเต้าเจี้ยว โดยทำการเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำหมักให้เป็นเอธิลอัลกอฮอล์ (ethyl alcohol) บิวธิลอัลกอฮอล์ (butyl alcohol) และเอมิลอัลกอฮอร์ (amyl alcohol) และเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์จะได้เอสเทอร์ ซึ่งช่วยส่งเสริมให้เต้าเจี้ยวมีกลิ่นรสที่ดี (Beuchat, 1987) ยีสต์ที่พบ ได้แก่ *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces*, *Pichia* และ *Candida*

Sugiyama (1984) ได้แนะนำว่าในการคัดเลือกสายพันธุ์ของยีสต์เพื่อใช้ในการผลิตซีอิ๊วแบบญี่ปุ่นควรจะใช้ *Z. rouxii* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์และให้สารประกอบ ให้กลิ่นรสที่ดีในความเข้มข้นเกลือสูง

เอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการหมักเต้าเจี้ยว

กระบวนการหมักโมโรมิ ดำเนินไปภายใต้กิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด แต่บทบาทหลักขึ้นอยู่กับเอนไซม์ 2 กลุ่ม คือ อะไมเลส และโปรตีเอส ที่จะทำหน้าที่เปลี่ยนสารอาหารขนาดโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กลง

อะไมเลส

อะไมเลสเป็น extracellular enzyme ซึ่งประกอบด้วย exoamylase และ endomylase (Ingle and Erickson, 1978) สามารถย่อยสลายแป้งให้เป็นกลูโคส พบได้ในแบคทีเรียและราหลายสกุล เช่น *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Actinomyces* spp., *Thermomonospora* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. และ *Aspergillus* spp. (Upton and Forgaty, 1977)

อะไมเลสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียมักเป็นเอนไซม์ชนิด α-amylase ซึ่งเป็น endoamylase ย่อยแป้งได้น้ำตาลมอลโตส และกลูโคส เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ดี อะไมเลสอีกประเภทหนึ่งคือ exoamylase ได้แก่ β-amylase ซึ่งจะย่อยแป้งได้มอลโตส และ เด็กสทริน (dextrin) และถ้าทำงานร่วมกับ glucoamylase จะย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์ คือ ให้ผลกลูโคสเพียงอย่างเดียว(Medda and Chandra, 1980)

ประเภทของอะไมเลส

อะไมเลสซึ่งได้จากสิ่งที่มีชีวิตหลายชนิด สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายประเภท ดังนี้คือ

1. การแบ่งตามชนิดของพันธะที่ถูกย่อยสลาย สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ endoamylase และ exoamylase

1.1 Endoamylase

เป็นเอนไซม์ที่จะย่อยสลายพันธะชนิด α-1,4-glucosidic linkage ภายในโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์ dextrin ซึ่งเป็นลูกโซ่ของกลูโคสที่มีขนาดแตกต่างกัน เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ 1,4-dextrinase และ α-amylase ที่มีชื่อตามระบบสากลว่า α–1,4-glucanglucanohydrolase ชื่อสามัญว่า diastase และชื่อทางการค้าว่า termamyl α–amylase ซึ่งหมายถึง อะไมเลสที่สลายสับสเตรทที่เป็นแป้ง แล้วได้น้ำตาลรีดิวซ์ที่มี optical α–form และมีค่า mutarotation ต่ำลงกว่าเดิม

กิจกรรมของ α– amylase ต่อการย่อยสลายสับสเตรทที่ประกอบด้วยอะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเป็นแบบสุ่ม ถ้าเป็นการย่อยสลายอะไมโลส จะส่งผลทำให้ได้สารประกอบที่มีโมเลกุลเล็กลงกว่าเดิมได้แก่ dextrin ซึ่งให้สารสีม่วงแดงเมื่อทำปฏิกริยากับสารละลายไอโอดีน และถ้าปล่อยให้มีการย่อยสลายต่อไป จะทำให้ได้สารประกอบที่มีขนาดโมเลกุลลดลงไปอีกจนในที่สุดได้ maltotriose และ maltose เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งไม่ทำให้สารละลายไอโอดีนเปลี่ยนสีได้ ถ้าเป็นการย่อยสลายอะไมโลเพคติน เอนไซม์α– amylase จะไม่สามารถย่อยสลายพันธะ α– 1,6 glucosidic linkage ได้ทำให้ได้สารประกอบ limit dextrin ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กว่า dextrin

1.2 Exoamylase

เป็นเอนไซม์ที่จะย่อยสลายโมเลกุลของแป้งจากปลายด้าน non-reducing end การย่อยสลายอาจสลายทั้ง α-1,4-glucosidic linkage และ α-1,6-glucodidic linkage เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ β– amylase และ γ-amylase หรือ glucoamylase เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถย่อยสลายอะไมโลส และอะไมโลเปคตินในลักษณะที่คล้ายคลึงกันจะได้น้ำตาลรีดิวส์ที่เป็น β-form และมีค่า mutarotation ในทางที่สูงขึ้น การย่อยสลายจะกระทำที่พันธะ α–1, 4-glucosidic linkage จากปลายด้าน non-reducing อย่างเป็นลำดับขั้นทีละ 2 โมเลกุล ทำให้ได้น้ำตาล maltose เมื่อการย่อยสลายพันธะดำเนินไปจนกระทั่งถึงบริเวณแขนงโมเลกุล เอนไซม์จะหยุดปฏิกิริยาและไม่สลายอีกต่อไป ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ β-maltose กับ limit dextrin ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ซึ่ง γ-amylase จะย่อยสลาย α–1,4, α–1,6 และ α–1,3-glucosidic linkage โดยสลายพันธะ α–1,6 และสลายพันธะ α–1,3 ได้ร้อยละ 3-5 และ 5-10 ของอัตราการสลายพันธะ α–1,4 ได้ ตามลำดับ รูปแบบของการตัดพันธะจะเกิดขึ้นจากปลายด้าน non-reducing เช่นเดียวกับ β-amylase แต่จะตัดจากด้านปลายเข้าไปครั้งละ

1 หน่วยกลูโคส และตัดพันธะ α–1,6 อย่างช้าๆ และได้กลูโคสอย่างสมบูรณ์ในที่สุด ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่ได้จะเป็น β-configuration เช่น β-D-glucose และ limit dextrin ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง

2. การแบ่งโดยอาศัยปรากฏการณ์เปลี่ยนแปลงของสับสเตรท

สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ dextrinizing amylase และ saccharifying amylase โดยที่ dextrinizing amylase สามารถลดความหนืดของแป้งได้อย่างรวดเร็ว ลดสมบัติการเกิดสีน้ำเงินของอะไมโลเพคตินได้อย่างรวดเร็วจนกระทั่งสีจางหายไป และลดความขุ่นของไกลโคเจนได้อย่างรวดเร็ว ส่วน saccharifying amylase สามารถลดความหนืดของแป้งและลดความขุ่นของไกลโคเจนได้อย่างช้าๆ สามารถทำให้สีน้ำเงินของอะไมโลเพคติน กับไอโอดีนเปลี่ยนแปลงเป็นสีม่วงอย่างช้าๆ แต่ไม่จางหายไป

โปรตีเอส

โปรตีเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ของโปรตีน จึงถูกเรียกว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยจะย่อยโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ให้กลายเป็นสารโมเลกุลเล็กๆ ตำแหน่งการย่อยในโมโลกุลของโปรตีนขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ (Reed, 1975 ; Yokotsuka, 1986; Yong and Wood, 1974)

โปรตีเอสสามารถสร้างขึ้นได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรีย เช่น ราในสกุล *Aspergillus* ได้แก่ *A. niger*, *A. parasiticus* และ *A. oryzae* เอนไซม์โปรตีเอสจากรา *A. oryzae* มีอยู่ด้วยกัน 3 ประเภท คือ แอซิดโปรตีเอส (acid protease) นิวทรัล (neutral protease) และอัลคาไลน์โปรตีเอส (alkaline protease)

ราสกุล *Rhizopus* เช่น *R. oryzae* และ *R. oligosporous* หรือจากยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* เช่น *S. cerevisiae*, *S. italicus* และ *S. carlsbergensis* หรือจาก *Candida* เช่น *C. pseudotropiclas* หรือจาก *Bacillus subtilis* ที่สามารถผลิตเอนไซม์กลุ่มโปรตีเอสได้ เช่น โปรตีเอส และเปปติเดส (peptidase) เป็นต้น

โปรตีเอสได้ถูกนำมาใช้งานกันอย่างกว้างขวาง ในงานอุตสาหกรรมหลายชนิดโดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร (ตาราง 1)

Wood (1998) รายงานว่าโปรตีเอสร้อยละ 80 ที่ผลิตจากราที่ใช้ทำโคจิ จะเป็น อัลคาไลน์โปรตีเอส ซึ่งทำงานได้ดีที่ช่วงค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 9-10 และที่เหลือจะเป็นส่วนของแอซิดโปรตีเอส (acid proteases) 3 ชนิด ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3 นิวทรอลโปรตีเอส(neutral proteases) 2 ชนิด ทำงานได้ดีที่ช่วงค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6-7 และ เซมิอัลคาไลน์ โปรตีเอส (semi-alkaline protease) อีกหนึ่งชนิด

ตาราง 1 การใช้งานเอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์	อุตสาหกรรม	การประยุกต์ใช้
โปรตีเอส	ขนมอบและแป้ง	ปรับปรุงเนื้อสัมผัสของแป้งหมัก
	เบียร์	Chillproofing
	ผลิตภัณฑ์นม	ผลิตโปรตีนสกัด ทำให้นมระเหยมีค่าคงตัว
	อาหารสัตว์	Pig starter rations
	เครื่องหนัง	การย่อยขนและการซักฟอก
	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	การทำให้เนื้อนุ่ม การเตรียมโปรตีนจากปลาชนิดเข้มข้น
	เภสัชกรรม	Digestive aids
	การสกัดโปรตีน	การเตรียมโปรตีนเข้มข้น

ที่มา: สาโรจน์ และประวิทย์ (2538)