สำนักหอสมุด
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวรสเค็มน้อยโดยใช้โคจิจากข้าวเหนียว

Product Development of Less Salty Fermented Soy Bean Paste by Using Sticky Rice Koji

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2553

จำนวน 190,000 บาท

หัวหน้าโครงการ **สิทธิสิน บวรสมบัติ**

ผู้ร่วมโครงการ **สกุณี บวรสมบัติ**

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

กันยายน 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
บทคัดย่อ	(6)
ABSTRACT	(7)
บทที่ 1 ที่มาและความสำคัญ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย และวิจารณ์	24
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	51
เอกสารอ้างอิง	52

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	การใช้งานเอนไซม์โปรตีเอส	14
2	จำนวนสปอร์ของรา *A. oryzae* M-01 ที่เหลือรอดชีวิตบนรำข้าวเจ้าและข้าวเจ้าภายหลังการอบให้แห้ง เมื่อใช้ปริมาณสปอร์ซัสเพนชันแตกต่างกัน	25
3	จำนวนผู้ทดสอบที่เรียงลำดับความชอบในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวทั้ง 3 ตัวอย่าง	40
4	ผลสรุปของการเรียงลำดับความชอบผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว จำนวน 3 ตัวอย่าง	40
5	การเปลี่ยนแปลงของเต้าเจี้ยวระหว่างการเก็บรักษานาน 6 สัปดาห์	49
6	จำนวนผู้ทดสอบที่เรียงลำดับความชอบในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวทั้ง 3 ตัวอย่าง	50
7	ผลสรุปของการเรียงลำดับความชอบผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว จำนวน 3 ตัวอย่าง	50

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	เต้าเจี้ยวพร้อมบริโภค: เต้าเจี้ยวในบรรจุภัณฑ์ (a) ลักษณะเนื้อเต้าเจี้ยว (b)	4
2	เมล็ดถั่วเหลือง	5
3	การสร้างสปอร์ของรา *A. oryzae* M-01 บนสับสเตรท 2 ชนิด เมื่อหมักโคจินาน 72 ชั่วโมง: รำข้าวเจ้า (a) และข้าวเจ้า (b)	24
4	ผงสปอร์ที่ได้จากการเติมสปอร์ซัสเพนชั่นของรา *A. oryzae* M-01 ในปริมาณที่แตกต่างกันบนรำข้าวเจ้า: 0.5 มิลลิลิตร (a) 1.0 มิลลิลิตร (b) และ 1.5 มิลลิลิตร (c)	25
5	ผงสปอร์ที่ได้จากการเติมสปอร์ซัสเพนชั่นของรา *A. oryzae* M-01 ในปริมาณที่แตกต่างกันบนข้าวเจ้า: 0.5 มิลลิลิตร (a) 1.0 มิลลิลิตร (b) และ 1.5 มิลลิลิตร (c)	25
6	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในโคจิที่ใช้ข้าวเหนียวที่ผ่านการนึ่งในเวลาที่แตกต่างกัน	26
7	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโคจิที่ใช้ที่ใช้ข้าวเหนียวที่ผ่านการนึ่งในเวลาที่แตกต่างกัน: ค่าความเป็นกรด-เบส (a) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (b) กิจกรรมอะไมเลส (c) และ กิจกรรมโปรตีเอส (d)	27
8	การเจริญของรา *A. oryzae* M-01 ในโคจิข้าวเหนียวอายุ 72 ชั่วโมง ความหนา 5 เซนติเมตร (ภาพตัดขวาง)	29
9	การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเต้าเจี้ยวในระหว่างการหมักโมโรมิที่หมักด้วยโคจิข้าวเหนียวที่มีความหนาแตกต่างกัน: ค่าความเป็นกรด-เบส (a) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (b) กิจกรรมอะไมเลส (c) และกิจกรรมโปรตีเอส (d)	30
10	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน	31
11	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณอัลกอฮอล์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน	32
12	การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน: รา (a) และ ยีสต์ (b)	33

ภาพ		หน้า
13	การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-เบสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน	34
14	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแลคติกและปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน: ปริมาณกรดแลคติก (a) และปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก (b)	35
15	การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมอะไมเลสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน	36
16	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน	36
17	การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมโปรตีเอสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน	37
18	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน	38
19	การเปลี่ยนแปลงของค่า L* a* และ b* ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน (ร้อยละ): 30 (a) 40 (b) และ 50 (c)	39
20	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	41
21	การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน: ยีสต์ (a) และรา (b)	42
22	การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-เบสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	43
23	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณอัลกอฮอล์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	43
24	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแลคติกและปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน: ปริมาณกรดแลคติก (a) และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (b)	44
25	การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมอะไมเลสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	45

26	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	46
27	การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมโปรตีเอสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	46
28	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	47
29	การเปลี่ยนแปลงของค่าสี L* a* และ b* ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน (ร้อยละ): 10 (a) 13 (b) และ 16 (c)	48

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวรสเค็มน้อยโดยใช้โคจิจากข้าวเหนียว

Product Development of Less Salty Fermented Soy Bean Paste by Using Sticky Rice Koji

สิทธิสิน บวรสมบัติ [1] และ สกุณณี บวรสมบัติ [2]

Sittisin Bovonsombut [1] and Sakunnee Bovonsombut [2]

[1] คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50202

.....

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวเป็นเครื่องปรุงรสชนิดหนึ่งที่ผลิตจากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ การผลิตเต้าเจี้ยวกระทำได้โดยอาศัยการหมักด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด ปัญหาที่ประสบได้ในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวคือรสชาติที่เค็มจัดเกินไป การศึกษาวิจัยนี้ได้มีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตเต้าเจี้ยวรสเค็มน้อย โดยเริ่มต้นจากการผลิตสปอร์ของรา *Aspergillus oryzae* M-01 จำนวนมากบนวัสดุแข็งหลายชนิด เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักโคจิ ซึ่งพบว่าเมล็ดข้าวเจ้าสามารถให้สปอร์ที่ผ่านการทำแห้งและเหลือรอดชีวิตจำนวนมากถึง 10.15 log cfu/g การศึกษาเกี่ยวกับการหมักเต้าเจี้ยวรสเค็มน้อยโดยใช้โคจิข้าวเหนียว พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการนึ่งข้าวเหนียว และความหนาของโคจิมีผลต่อคุณภาพของโคจิที่ได้ โดยระยะเวลานึ่งนาน 40 นาที และความหนาของข้าวเหนียวในตะกร้าบ่มโคจิเท่ากับ 5 เซนติเมตร ให้กิจกรรมอะไมเลสและกิจกรรมโปรตีเอสสูงสุดเท่ากับ 58.01 และ 95.06 ยูนิตต่อกรัม ตามลำดับในระยะเวลา 60 ชั่วโมง การหมักเต้าเจี้ยวโดยใช้โคจิข้าวเหนียวปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่าโคจิข้าวเหนียวปริมาณร้อยละ 50 ในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 18 นาน 12 สัปดาห์ แล้วผ่านการต้มนาน 30 นาที จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่แตกต่างไปจากเดิม คือเต้าเจี้ยวมีรสเปรี้ยว มีกลิ่นอัลกอฮอล์ และมีรสเค็มน้อย แต่เป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบชิมในระดับชอบมากที่สุด และสามารถเก็บรักษาได้นานไม่น้อยกว่า 6 สัปดาห์การหมักเต้าเจี้ยวโดยใช้โคจิข้าวเหนียวร้อยละ 50 ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่ยังคงเป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบชิมและสามารถเก็บรักษาได้นานไม่น้อยกว่า 6 สัปดาห์

คำสำคัญ: โคจิ เต้าเจี้ยว เค็มน้อย กิจกรรมอะไมเลส กิจกรรมโปรตีเอส

Abstract

Fermented soybean (Tao Chieo) produet is a kind of condiment produced from soybean as the main raw material using many types of microorganisms. However, major problems concerned with product quality as observed in the market consisted of the salty taste of the product. This research aimed toward the study of the method of producing less salty product. The first part of the study was concerned with the massive spore production of *Aspergillus oryzae* M-01 on solid substrates used as starter in koji fermentation. It was shown that rice grains had a high yield of spore survival after drying at 10.15 log cfu/g. The study of producing less salty Tao Chieo by using glutinous rice koji revealed that the steaming time of glutinous rice and the thickness of koji exerted effects on the quality of koji obtained. The steaming time of 40 minutes accompanied with the thickness of 5 cm gave the maximum amylase and protease activities at 58.01 and 95.06 unit/g, respectively, at 60 hours of incubation. The use of different quantities of glutinous rice koji in Tao Chieo making was also investigated and results showed that the product of 50% of glutinous rice koji in 18% salt water as fermented in 12 weeks and then boiled for 30 minutes, caused some changes in their characteristics. The product had a sour taste, alcoholic smell and less salty. However, the product was accepted by taste panel and had a high storage period of at least 6 weeks. The variation of salt concentration for making Tao Chieo with 50% glutinous rice koji found that 16% salt concentration could still give an acceptable product which could have a shelf life of at least 6 weeks.

Key words: Koji Tao Chieo Less salty Amylase activity Protease activity

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

มิโส (miso) หรือ เต้าเจี้ยว เป็นสารปรุงรสที่ได้จากการหมักถั่วเหลืองและแป้งสาลีหรือแป้งข้าวจ้าว ด้วยเชื้อรา, แบคทีเรีย, ยีสต์ ซึ่งในกระบวนการหมัก จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนโดยในขั้นตอนแรกนำถั่วเหลืองที่แช่น้ำและต้มหรือนึ่งจนสุกแล้วมาผสมกับแป้งข้าวจ้าวหรือแป้งสาลีและหมักด้วยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ในขั้นตอนนี้เชื้อราจะผลิตน้ำย่อยที่สามารถย่อยสลายโปรตีนและแป้งในถั่วเหลืองได้เป็นกรดอะมิโน และน้ำตาลตามลำดับ วัสดุหมักนี้เรียกว่าโคจิ ขั้นตอนที่สองนำโคจิไปหมักในน้ำเกลือความเข้มข้น 17-22% การหมักในช่วงนี้น้ำย่อยในโคจิทำหน้าที่สลายโปรตีนและแป้งต่อและได้กรดอะมิโน และน้ำตาลในน้ำหมัก ในขั้นตอนนี้บทบาทของเชื้อราจะค่อยๆ ลดลงและตายไปและจะมีแบคทีเรียแลกติก ซึ่งชอบความเค็ม *(Pediococcus halophillus*) ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลบางส่วนไปเป็นกรดแลคติกทำให้น้ำหมักมีค่าความเป็นกรดเหมาะแก่การเจริญของยีสต์ ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นอีกหลาย เต้าเจี้ยวเป็นอีกผลิตภัณฑ์หนึ่งที่คุณค่าทางโภชนาการมาก แต่เนื่องด้วยเต้าเจี้ยวมีรสที่เค็มจัด ผู้บริโภคจะรับประทานได้แต่น้อย ในปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญกับสุขภาพมากขึ้น ดังนั้นจึงได้วางแนวทางในการวิจัยที่จะผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่มีรสเค็มน้อย จากวัตถุดิบในประเทศไทย คือ ข้าว เพื่อนำมาผลิตโคจิที่จะนำไปทำเต้าเจี้ยวรสเค็มน้อย โดยเต้าเจี้ยวที่ผลิตได้จะมีความรสเค็มน้อยกว่าเต้าเจี้ยวทั่วไปตามท้องตลาดและยังคงคุณค่าทางโภชนาการโดยปราศจากการเติมน้ำตาลหรือแอลกอฮอล์ที่มีความสามารถช่วยให้เต้าเจี้ยวมีรสเค็มน้อย เพื่อให้เหมาะต่อความต้องการของผู้บริโภคในด้านสุขภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการใช้ข้าวเหนียวในการผลิตโคจิ
2. เพื่อศึกษาการใช้โคจิข้าวเหนียวในการผลิตเต้าเจี้ยว
3. เพื่อศึกษากระบวนการผลิตเต้าเจี้ยวรสเค็มน้อย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่มีรสชาติเค็มน้อย
2. ได้ผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวชนิดใหม่ที่สามารถผลิตได้ในเชิงพาณิชย์

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 ในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ เกษตรกรได้รับการส่งเสริมให้ทำการปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ 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 และผลิตสารที่ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีของซีอิ๊ว (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) มีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์โปรดีเอส (protease) และอะไมเลส (amylase) โดยเอนไซม์โปรดีเอสจะย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองให้เป็นกรดอะมิโน (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 สามารถหมักน้ำตาลให้ได้กรดแลคติค 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) ได้แนะนำว่าในการคัดเลือกสายพันธุ์ของยีสต์เพื่อใช้ในการผลิตซีอิ้วแบบญี่ปุ่นควรจะใช้ *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 ตำแหน่งการย่อยในโมโลกุลของโปรดีนขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ (Reed, 1975 ; Yokotsuka, 1986; Yong and Wood, 1974)

โปรตีเอสสามารถสร้างขึ้นได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรีย เช่น รา ในสกุล *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)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 ถั่วเหลืองพันธุ์ เชียงใหม่ 60

1.2 ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

1.3 แป้งสาลี (ตราว่าว)

1.4 เกลือเม็ด

2. จุลินทรีย์

***A. oryzae* M-01** คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เก็บรักษาบน PDA slant ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

3. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

3.1 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CO 11, Japan)

3.2 กล้องจุลทรรศน์ 3 มิติ (SZ-ST Olympus, Japan)

3.3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Polyscience 8306, U.S.A)

3.4 ตู้บ่มเชื้อ (Heraeus B12, Germany)

3.5 ตู้อบลมร้อน (WTB Binder BD 115, Germany)

3.6 ตู้อบสุญญากาศ (WTB binder 78532 TUTTLINGEN/GERMANY)

3.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Sorvall RC 5C , U.S.A)

3.8 เครื่องย่อยบดอาหาร (Seward stomacher 400, England)

3.9 เครื่องวัดค่าสี (Juki Tri-Stimulus Colorimeter JC801, Japan)

3.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Bio-tek , U.S.A.)

3.11 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (Metrohm 744 , Switzerland)

3.12 เครื่องผสม (Vortex : Genie 2 ™ G-560E, U.S.A)

3.13 เครื่องชั่งขนาด 1 กิโลกรัม (Kitchen scale, Thailand)

3.14 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartoriius LA 230S, Germany)

3.15 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartoriius BP 610, Germany)

3.16 เทอร์โมคัปเปิล (Thermocouple: Yokogawa 2544 model, Japan)

3.17 หม้อนึ่งความดันไอชนิดใช้ไฟฟ้า (Hirayama HV 50. Japan)

3.18 หม้อนึ่งความดันไอ (All Americans)

3.19 Hand-Held refractomete (Brix 0-32%) (Atago)

3.20 Hand-Held refractometer (Salt 0-28%) (Atago)

3.21 แผ่นให้ความร้อนพร้อมระบบกวน (Morat M22/1)

3.22 ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 10 25 50 100 และ 500 มิลลิลิตร

3.23 บีกเกอร์ขนาด 50 100 250 600 และ 1000 มิลลิลิตร

3.24 กระบอกตวงขนาด 50 100 และ 500 มิลลิลิตร

3.25 ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.26 หลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิลิตร

3.27 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 0.2 ,1 และ 5 มิลลิลิตร

3.28 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.29 กระดาษกรอง (Whatman No.1)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 Agar (Union science, Thailand)

4.2 Yeast extract (Merck)

4.3 Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) (Merck)

4.4 Peptone (Difco)

4.5 Plate Count Agar (Merck)

5. สารเคมี

5.1 Calcium chloride (Ajax)

5.2 Casein from Bovine milk (Fluka)

5.3 Calcium carbonate (วิทยาศรม)

5.4 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Fluka)

5.5 D-Glucose (Merck)

5.6 Ethanol (Merck)

5.7 Ferrous sulphate (Merck)

5.8 Folin-Ciocalteu phenol reagent (Merck)

5.9 Glacial acetic (Lab-Scan)

5.10 Glycine (Ajax)

5.11 Hydrochloric acid (Merck)

5.12 Hydrindantin (Aldrich)

5.13 Maltose (Ajax)

5.14 Ninhydrin (Fluka)

5.15 O-phenanthroline (Fisher scientific)

5.16 Phenolphthalein (Ajax)

5.17 Potassium chloride (Ajax)

5.18 Potassium chromate (Fisher scientific)

5.19 Potassium dichromate (Fisher scientific)

5.20 Potassium dihydrogen phosphate (Merck)

5.21 Potassium hydrogenphthalate (Ajax)

5.22 Potassium persulphate (Ajax)

5.23 Potassium sodium tartrate (Ajax)

5.24 Silver nitrate (Merck)

5.25 Sodium carbonate (Merck)

5.26 Sodium chloride (Merck)

5.27 Sodium hydroxide (Merck)

5.28 Sodium hydrogen phosphate (Merck)

5.29 Sodium tartrate (Fluka)

5.30 Sodium acetate (Merck)

5.31 Starch soluble (BDH)

5.32 Sulfuric acid 98% (Merck)

5.33 Trichloroacetic acid (Merck)

5.34 Tyrosine (Fluka)

5.35 Tween 80 (Merck)

วิธีการวิจัย

1. ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสปอร์ของ *A. oryzae*

1.1 นำรำข้าวและข้าวเจ้าอย่างละ 20 กรัม ใส่ในฟลาส์ก ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงบนข้าวแล้วคลุกผสมให้ทั่วถึง อุดคอขวดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงใส่สปอร์ซัสเพนชัน (spores suspension) ของเชื้อ *A. oryzae* ที่มี tween 80 ผสมอยู่ร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 6 บดข้าวให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องปั่นผสม (Waring blender) ที่ปราศจากเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผงสปอร์ที่ได้ไปวิเคราะห์

1.1.1 ปริมาณสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
โดยการใช้ Counting Chamber (Neubauer)

1.1.2 ปริมาณสปอร์ที่รอดชีวิต (AOAC, 2005)
โดยวิธี spread plate บนอาหาร DRBC

2. การเตรียมโคจิข้าวเหนียว

2.1 ระยะเวลาในการนึ่งข้าวเหนียวที่มีผลต่อสมบัติโคจิ

ชั่งข้าวเหนียวหนัก 500 กรัม แช่น้ำประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปนึ่งให้สุกนาน 20 30 40 และ 50 นาที ล้างข้าวเหนียวและทิ้งให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที รอจนข้าวเหนียวมีอุณหภูมิลดลง แล้วจึงเติมแป้งข้าวเจ้า ปริมาณร้อยละ 3 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักข้าวเหนียวแห้ง ซึ่งในแป้งมีผงสปอร์ของรา *A. oryzae* ผสมอยู่ร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ถ่ายข้าวเหนียวลงในตะกร้าพลาสติกชนิดโปร่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 28 เซนติเมตร และมีผ้าขาวบางกรุอยู่ด้านใน โดยปรับให้กองข้าวเหนียวมีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และปิดคลุมผิวหน้าด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ดังนี้คือ

2.1.1 วัดอุณหภูมิของโคจิจำนวน 3 แห่ง ด้วยเทอร์โมคัปเปิล

2.1.2 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร กวนผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำของเหลวส่วนใสมาทำการวัดค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส

2.1.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

ชั่งตัวอย่างหนัก 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำของผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำของเหลวที่เป็นส่วนใสปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปิดปากหลอดแล้วนำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ที่ความยาวช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร

2.1.4 ค่ากิจกรรมอะไมเลส (S. Nahar *et al.*, 2008)

ชั่งตัวอย่างหนัก 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 0.1 M acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำของผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารสกัดเอนไซม์ที่เป็นส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปิดปากหลอดแล้วนำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ที่ความยาวช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานที่ใช้มอลโทสเป็นค่าอ้างอิง

2.1.5 ค่ากิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 และ Folin, 1929)

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 50 มิลลิโมล Potassuim Phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำของผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารสกัดเอนไซม์ที่เป็นส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย casein ร้อยละ 0.65 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม TCA 110 มิลลิโมล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มต่อไปที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แยกของเหลวที่เป็นส่วนใสปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่สารละลาย Na_2CO_3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย Folin ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้า

กันนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานที่ใช้ไทโรซีนเป็นค่าอ้างอิง

2.2 ความหนาของข้าวเหนียวที่มีผลต่อสมบัติโคจิ

ชั่งข้าวเหนียวหนัก 800 1100 และ 1400 กรัม แช่น้ำประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปนึ่งตามเวลาที่เหมาะสมในข้อ 2.1 ล้างข้าวเหนียวและทิ้งให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที รอจนข้าวเหนียวมีอุณหภูมิลดลง แล้วจึงเติมแป้งข้าวเจ้า ปริมาณร้อยละ 3 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักข้าวเหนียวแห้ง ซึ่งในแป้งมีผงสปอร์ของรา *A. oryzae* ผสมอยู่ร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ถ่ายข้าวเหนียวลงในตะกร้าพลาสติกชนิดโปร่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 28 เซนติเมตร และมีผ้าขาวบางกรุอยู่ด้านใน โดยปรับให้ชั้นข้าวเหนียวมีความหนาประมาณ 5 7 และ 9 เซนติเมตร และปิดคลุมผิวหน้าด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ดังนี้คือ

2.2.1 วัดอุณหภูมิของโคจิ จำนวน 3 แห่งด้วยเทอร์โมคัปเปิล

2.2.2 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2

2.2.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

2.2.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (S. Nahar *et al.*, 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.5

2.2.5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส (Anson, 1938 และ Folin, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.6

3. การหมักโมโรมิ

3.1 ปริมาณโคจิข้าวเหนียวที่เหมาะสมต่อการหมักโมโรมิ

ชั่งโคจิข้าวเหนียวที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดจากข้อ 2 ผสมกับถั่วเหลืองต้มสุกในปริมาณร้อยละ 30 40 และ 50 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในถังพลาสติกขนาด 14 ลิตร เติมน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 18 ในอัตราส่วน โคจิและถั่วเหลือง:น้ำเกลือ เท่ากับ 2:1 คลุกให้ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดฝาถังตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 สัปดาห์ โดยทำการคนเต้าเจี้ยวทุกวันใน 2 สัปดาห์แรก และคนวันเว้นวันในสัปดาห์ถัดไปจนสิ้นอายุการหมัก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สุ่มเก็บตัวอย่างเต้าเจี้ยวทุก ๆ สัปดาห์เพื่อทำการวิเคราะห์

3.1.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.

3.1.2 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (ดัดแปลงจาก Mohr, 1999)

ชั่งตัวอย่างในส่วนที่เป็นของเหลว 1 มิลลิลิตรใส่ลงมนขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำของเหลวส่วนใสมาปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย K_2CrO_4 เข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไตเตรทกับสารละลาย $AgNO_3$ (0.1 N) จนถึงจุดยุติ โดยสังเกตจากตะกอนสีแดงอิฐ คำนวณร้อยละของโซเดียมคลอไรด์

3.1.3 วิเคราะห์หาปริมาณกรดด้วยวิธีการ Titration (AOAC, 1995)

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร กวนผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำของเหลวส่วนใสมา ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอฟทาลีนประมาณ 3 หยด ไตรเตรทกับสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 N จนถึงจุดยุติ โดยสังเกตจากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู คำนวณหาปริมาณกรดในรูปของกรดแลคติก

3.1.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

3.1.5 ค่ากิจกรรมอะไมเลส (S. Nahar *et al.*, 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.5

3.1.6 ค่ากิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 และ Folin, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.6

3.1.7 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (โดยวิธี photometric ninhydrin)

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอทธานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำของผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารสกัดที่เป็นส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายนินไฮดริน (ninhydrin colour reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแล้วผสมให้เข้ากัน นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทิ้งให้เย็นต่อจากนั้นเติมสารละลาย stabilizing solvent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานที่ใช้ไกลซีนเป็นค่าอ้างอิง

3.1.8 ปริมาณอัลกอฮอล์ (Amerine and Ough, 1974; AOAC, 1990)

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ

กลั่นในขวดปรับปริมาตร ถ่ายตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วก้นกลมของชุดกลั่น เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วทำการกลั่นที่อุณหภูมิ80-85 องศาเซลเซียส เก็บของเหลวที่กลั่นได้ให้มีปริมาตร 40 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพูขนาด 125 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสก์ด้วยจุกยาง แล้วนำไปวางไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำตัวอย่างมาใส่สารละลาย 1,10-ฟีแนนโทรลีนเฟอรร์รัสซัลเฟต 1 มิลลิลิตร ไตเตรทด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตจนถึงจุดยุติ โดยสังเกตจากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว แล้วหยดสารละลาย 1,10-ฟีแนนโทรลีนเฟอรร์รัสซัลเฟตอีก 3 หยด ไตเตรทต่อจนถึงจุดยุติโดยสังเกตจากสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียว เป็นสีน้ำตาลม่วง แล้วคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์

3.1.9 ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) (AOAC, 2005)

ทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรม จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการ spread plate บนอาหาร DRBC

3.1.10 ปริมาณแลคติค โดยวิธี (AOAC, 1995)

ทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรม จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการ pour plate บนอาหาร GYP

3.1.11 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

นำตัวอย่างไปวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดค่าสี

3.1.12 การทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Ranking for preference

3.2 ความเข้มข้นน้ำเกลือที่เหมาะสมต่อการหมักโมโรมิ

เตรียมโคจิข้าวเหนียวที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดจากข้อ 2 มาผสมกับถั่วเหลืองต้มสุก ในอัตราส่วนที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดจากข้อ 1.1 ในถังพลาสติกขนาด 14 ลิตร เติมน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 13 และ 16 ในอัตราส่วนโคจิและถั่วเหลืองต้มสุก:น้ำเกลือ เท่ากับ 2:1 คลุกให้ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดฝาถังตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 สัปดาห์ โดยทำการคนเต้าเจี้ยวทุกวันใน 2 สัปดาห์แรก และคนวันเว้นวันในสัปดาห์ถัดไปจนสิ้นอายุการหมัก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สุ่มเก็บตัวอย่างเต้าเจี้ยวทุก ๆ สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์

3.2.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2

3.2.2 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (ดัดแปลงจาก Mohr, 1999)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.1.2

3.2.3 วิเคราะห์หาปริมาณกรดด้วยวิธีการ Titration (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.1.3

3.2.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

3.2.5 ค่ากิจกรรมอะไมเลส (S. Nahar *et al.*, 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.5

3.2.6 ค่ากิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 และ Folin, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.6

3.2.7 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด โดยวิธี photometric ninhydrin

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.7

3.2.8 ปริมาณอัลกอฮอล์ (Amerine and Ough, 1974; AOAC, 1990)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.8

3.2.9 ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) (AOAC, 2005)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.9

3.2.10 ปริมาณแบคทีเรียแลคติค โดยวิธี (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.10

3.2.11 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.11

3.3 ผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว

นำเต้าเจี้ยวที่มีครบอายุการหมัก 12 สัปดาห์ มาต้มให้เดือดนาน 30 นาที บรรจุใส่ขวดแก้ว เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 สัปดาห์ นาน 6 สัปดาห์ เพื่อทำการวิเคราะห์

3.3.1 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (AOAC, 1995) ทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรมจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการ pour plate บนอาหาร PCA

3.3.2 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.11

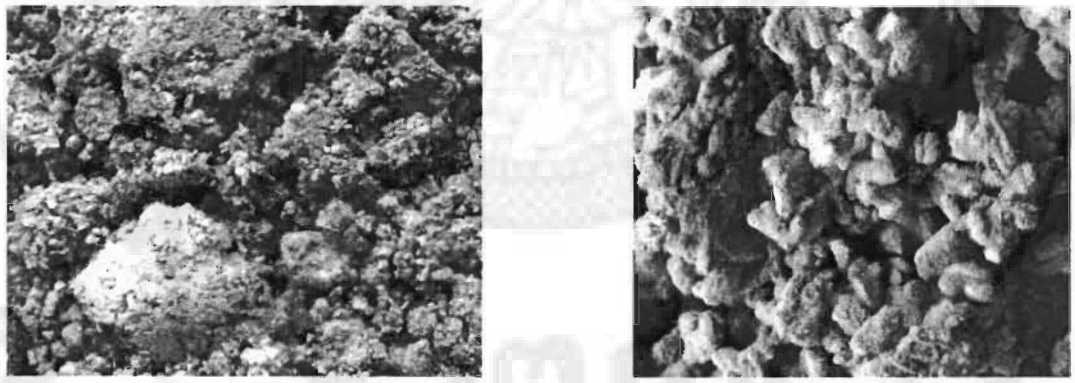
3.3.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส แบบ Ranking for preference

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือสัปดาห์ที่ 6 วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.12

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสปอร์ของ *A. oryzae*

การเติมสปอร์ซัสเพนชันของรา *A. oryzae* ปริมาณ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิลิตร ลงบนรำข้าวเจ้าและข้าวเจ้า พบว่า ทั้งรำข้าวและข้าวเจ้ามีความชื้นสูง เมื่อปล่อยทิ้งไว้นาน 12 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นการสร้างเส้นใยของราบนผิวของสับเสตรท (substrates) ได้ด้วยตาเปล่า เส้นใยจะแผ่กระจายเพิ่มขึ้น และราเริ่มมีการสร้างสปอร์สีเขียวอ่อนอมเหลืองเป็นบางบริเวณ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพ 3) ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว แผ่นโคจิจะมีลักษณะแห้งลงและมีความแข็งเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากรำข้าวเจ้าและข้าวเจ้าสูญเสียความชื้นออกสู่บรรยากาศอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wood (1998) ที่กล่าวว่าเชื้อราต้องการความชื้นในปริมาณที่ค่อนข้างสูงในช่วงแรกของการหมักโคจิถั่วเหลือง แต่หลังจากที่ราเริ่มสร้างสปอร์แล้ว ภายในระยะเวลาประมาณ 2-3 วัน ความชื้นของโคจิจะมีค่าลดต่ำลง

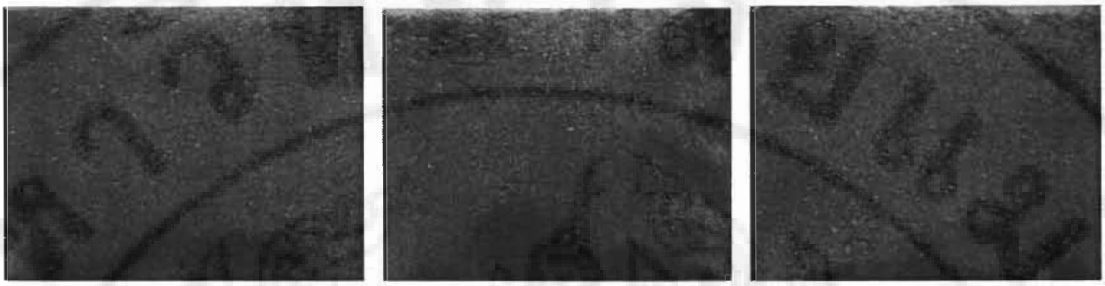


(a) (b)

ภาพ 3 การสร้างสปอร์ของรา *A. oryzae* บนสับสเตรท 2 ชนิด เมื่อหมักโคจินาน 72 ชั่วโมง: รำข้าวเจ้า (a) และข้าวเจ้า (b)

เมื่อนำรำข้าวเจ้าและข้าวเจ้าที่มีสปอร์เจริญอยู่ ไปอบให้แห้งภายใต้ความดันสุญญากาศและบดให้ละเอียด พบว่ารำข้าวเจ้าทุกทรีทเมนท์จะให้ผงสปอร์สีเขียวปนน้ำตาล (ภาพ 4) ในขณะที่ข้าวเจ้าทุกทรีทเมนท์จะให้ผงสปอร์ที่มีสีเขียวเข้ม (ภาพ 5) สปอร์ที่ยังมีชีวิตเหลือรอดอยู่บนรำข้าว

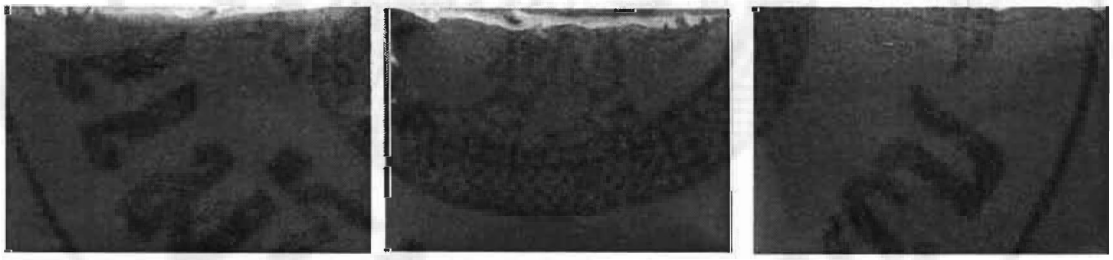
เจ้ามีปริมาณเท่ากับ 9.36 9.45 และ 9.26 log cfu/g ตามลำดับ และบนข้าวเจ้ามีปริมาณเท่ากับ 9.98 10.15 และ 9.98 log cfu/g ตามลำดับ (ตาราง 2) ปริมาณสปอร์ที่ได้จากสับเสตรททั้งสองชนิด มีค่า



(a) (b) (c)

ภาพ 4 ผงสปอร์ที่ได้จากการเติมสปอร์ซัสเพนชั่นของรา *A. oryzae* ในปริมาณที่แตกต่างกันบนรำข้าวเจ้า: 0.5 มิลลิลิตร (a) 1.0 มิลลิลิตร (b) และ 1.5 มิลลิลิตร (c)

ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสปอร์ซัสเพนชัน 1 มิลลิลิตร จะให้ปริมาณสปอร์ที่เหลือรอดชีวิตสูงที่สุด จึงมีความเหมาะสมในการนำไปผลิตสปอร์ เพื่อการทดลองในขั้นตอนต่อไป



(a) (b) (c)

ภาพ 5 ผงสปอร์ที่ได้จากการเติมสปอร์ซัสเพนชั่นของรา *A. oryzae* ในปริมาณที่แตกต่างกันบนข้าวเจ้า: 0.5 มิลลิลิตร (a) 1.0 มิลลิลิตร (b) และ 1.5 มิลลิลิตร (c)

ตาราง 2 จำนวนสปอร์ของรา *A. oryzae* ที่เหลือรอดชีวิตบนรำข้าวเจ้าและข้าวเจ้า ภายหลังการอบให้แห้ง เมื่อใช้ปริมาณสปอร์ซัสเพนชันแตกต่างกัน

สปอร์ซัสเพนชั่น	ปริมาณสปอร์ที่เหลือรอดชีวิต (log cfu/g)	
(มิลลิลิตร)	รำข้าวเจ้า	ข้าวเจ้า
0.5	9.36 ± 0.17	9.98 ± 0.15
1.0	9.45 ± 0.4	10.15 ± 0.07
1.5	9.26 ± 0.53	9.98 ± 0.2

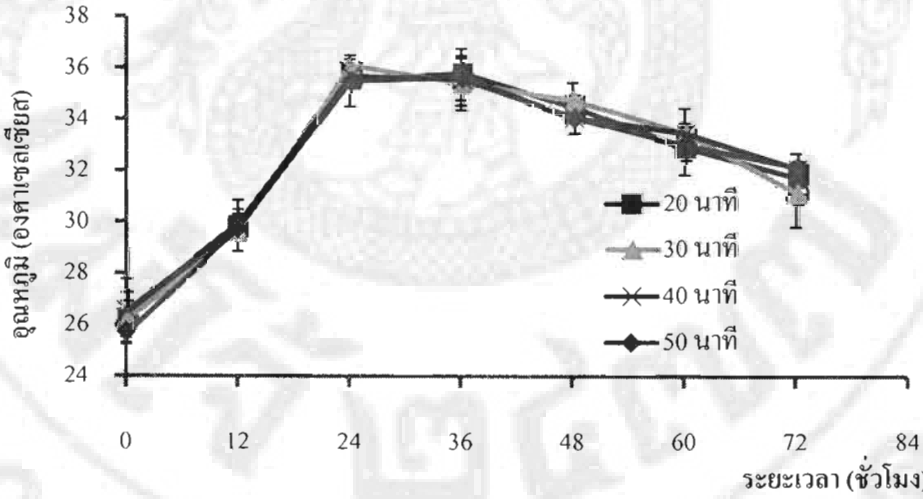
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2. การผลิตเต้าเจี้ยวรสเค็มน้อย

2.1 **การเตรียมโคจิข้าวเหนียว**

2.1.1 ระยะเวลาในการนึ่งข้าวเหนียวที่มีผลต่อสมบัติโคจิ

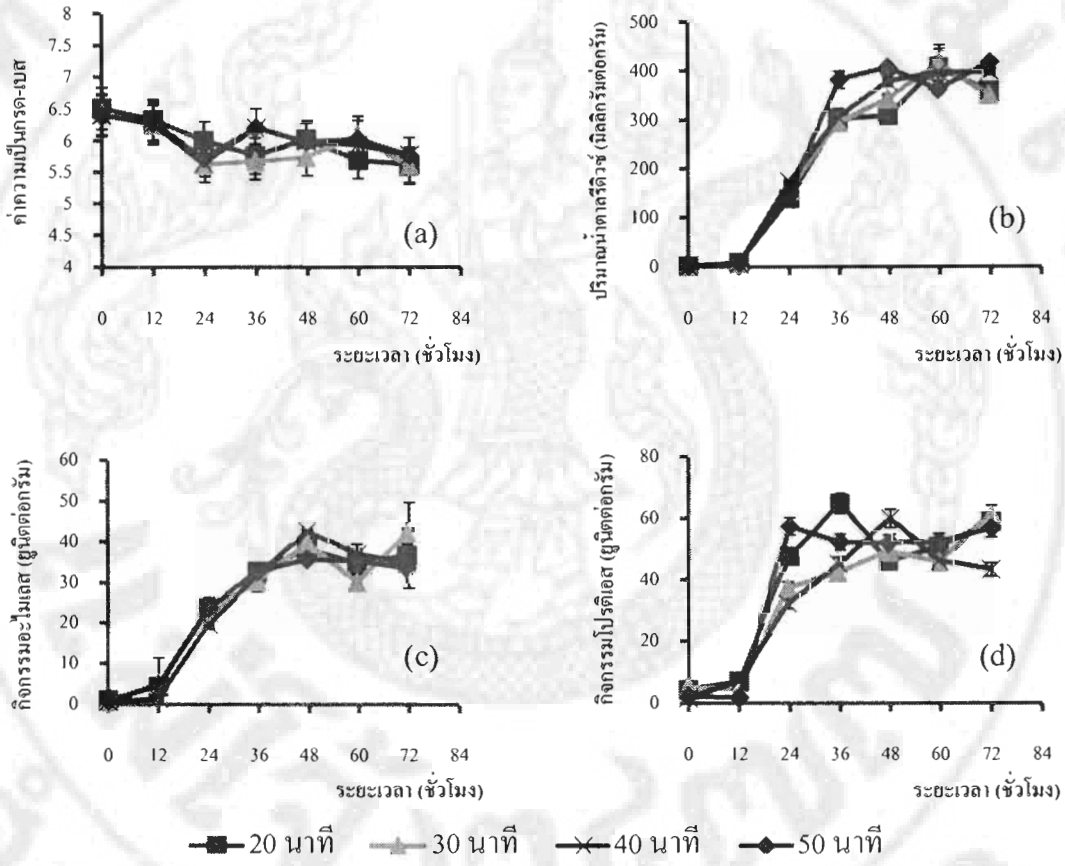
จากการนำข้าวเหนียวไปนึ่งให้สุกนาน 20 30 40 และ 50 นาที รวม 4 ทรีทเมนท์ แล้วคลุกผงสปอร์ของรา *A. oryzae* M-01 ปริมาณร้อยละ 0.1 ของน้ำหนักข้าวเหนียวแห้ง พบว่ารามีรูปแบบการเจริญที่คล้ายคลึงกันในทุกทรีทเมนท์ โดยที่สปอร์ราเริ่มงอกเส้นใยจนมีขนาดที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใน 12 ชั่วโมง และดำเนินกิจกรรมการเจริญอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24 เส้นใยของราจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนเห็นเป็นปุยสีขาวปกคลุมเมล็ดข้าวเกือบจะทั้งหมด เส้นใยจะเจริญและเริ่มมีอายุมากขึ้นจนสร้างสปอร์ใหม่ขึ้นมา ทำให้มองเห็นเป็นหย่อมสีเหลือง กระจายตัวอยู่ในกองโคจิในชั่วโมงที่ 36 หลังจากนี้การสร้างสปอร์ยังคงดำเนินต่อไปจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก ในช่วงเวลาดังกล่าว สปอร์บางส่วนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง และเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มทั้งหมดในที่สุด ซึ่งหมายถึงรามีอายุแก่เต็มที่แล้ว การเจริญของราส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโคจิ



ภาพ 6 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในโคจิที่ใช้ข้าวเหนียวที่ผ่านการนึ่งในเวลาที่แตกต่างกัน

ซึ่งมีผลจากการทดลอง (ภาพ 6) พบว่า โคจิทุกทรีทเมนท์มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นแปรผันตามระยะเวลาการบ่มโคจิในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และมีค่าใกล้เคียงกัน ค่าอุณหภูมิสูงสุดที่วัดได้ประมาณ 36.03 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นอุณหภูมิในกองโคจิจึงเริ่มลดลง การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในกองโคจิเกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมการเจริญของรา *A. oryzae* M-01 ดังที่กล่าวมาแล้วในตอนต้น ในช่วงเวลาที่รากำลังเจริญ จะมีการผลิตความร้อนออกมา อันสืบเนื่องมาจากกระบวนการหายใจแบบใช้อากาศ

อุณหภูมิตรงบริเวณผิวหน้าแผ่นโคจิจะมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง เนื่องจากความร้อนสามารถถ่ายเทให้แก่บรรยากาศภายนอกได้โดยตรง แต่ในทางตรงกันข้ามอุณหภูมิภายในแผ่น โคจิกลับมีค่าสูงขึ้นกว่าสภาพแวดล้อมภายนอก เนื่องจากความร้อนภายในแผ่นโคจิเคลื่อนที่ออกสู่บริเวณพื้นผิวได้ลำบากกว่า ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้อุณหภูมิภายในแผ่นโคจิสูงขึ้นโดยลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของรา



ภาพ 7 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโคจิที่ใช้ที่ใช้ข้าวเหนียวที่ผ่านการนึ่งในเวลาที่แตกต่างกัน: ค่าความเป็นกรด-เบส (a) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (b) กิจกรรมอะไมเลส (c) และ กิจกรรมโปรตีเอส (d)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโคจิ ผลดังภาพ 1 พบว่าค่าความเป็นกรด-เบสของโคจิที่หมักจากข้าวเหนียวนึ่งสุกนานตั้งแต่ 30 นาที เป็นต้นไป ลดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.62 5.64 และ 5.72 ตามลำดับ ในขณะที่ข้าวเหนียวนึ่งนาน 20 นาที ค่าต่ำสุดที่พบเท่ากับ 5.76 จะเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 36 ชั่วโมง (ภาพ 7a) การ

ลดลงของค่าความเป็นกรด-เบสดังกล่าว อาจเป็นผลเนื่องมาจากกรดโคจิก (kojic acid) ที่รา *A. oryzae* M-01 ผลิตขึ้นในระหว่างการเจริญ

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของโคจิ จะเกิดขึ้นในช่วงแรกของการหมักที่ 0-12 ชั่วโมง สำหรับการทดลองทุกทรีทเมนท์ เนื่องจากราเริ่มมีการเจริญและสร้างเอนไซม์ อะไมเลส ออกมาย่อยแป้งให้กลายเป็นคาร์โบไฮเดรทที่มีโมเลกุลเล็กลง และน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงค่าสูงสุดที่ 408.2 416.85 และ 398.39 มิลลิกรัมต่อกรัม ในช่วงโมงที่ 60 ของการบ่มโคจิ สำหรับระยะเวลาการนึ่งข้าวเหนียวนาน 20 30 และ 40 นาที ตามลำดับ ส่วนระยะเวลาการนึ่งข้าวเหนียวนาน 50 นาที จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 417.38 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อสิ้นสุดการหมักโคจินาน 72 ชั่วโมง(ภาพ 7b)

กิจกรรมอะไมเลสของโคจิมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบ เนื่องจากราสร้างอะไมเลสเพื่อย่อยสลายแป้งที่เป็นสับสเตรท ให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์เพื่อใช้ในกิจกรรมการเจริญ โดยกิจกรรมอะไมเลสมีค่าสูงสุดเท่ากับ 38.59 42.64 และ 36.49 ยูนิตต่อกรัม ในระยะเวลาการบ่มโคจินาน 48 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับข้าวเหนียวที่นึ่งนาน 20 40 และ 50 นาที และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 40.89 ยูนิตต่อกรัม สำหรับข้าวเหนียวที่นึ่งนาน 30 นาที (ภาพ 7c) ผลลัพธ์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Paranthaman (2009) ที่จากการคัดเลือกราที่เหมาะสมในการทำโคจิข้าว พบว่ารา *A. oryzae* มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสสูงถึง 33.47 ยูนิตต่อกรัม เมื่อเทียบกับราสายพันธุ์อื่น นอกจากนี้อุณหภูมิของโคจิประมาณ 36 องศาเซลเซียส ยังเหมาะสมต่อการผลิตอะไมเลสอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wood (1998) ที่อ้างว่าอุณหภูมิที่สูงกว่า 35 องศาเซลเซียส จะทำให้รา *A. oryzae* ผลิตอะไมเลสได้ดี

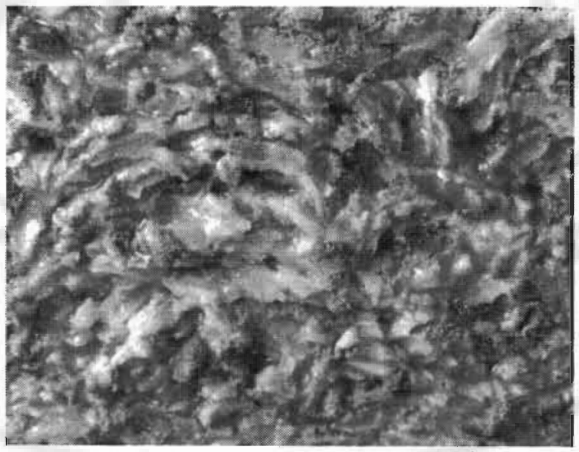
กิจกรรมโปรตีเอสของโคจิมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกับกิจกรรมอะไมเลส โดยกิจกรรมอะไมเลสมีค่าสูงสุดเท่ากับ 64.74 61.11 59.79 และ 57.27 หน่วยต่อกรัม ในระยะเวลาการบ่มโคจินาน 36 72 48 และ 24 ชั่วโมง สำหรับข้าวเหนียวที่นึ่งนาน 20 30 40 และ 50 นาที ตามลำดับ (ภาพ 7d) อุณหภูมิของโคจิยังมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิสูงสุดที่รา ยังคงสามารถสร้างโปรตีเอสได้ดี จากการศึกษาของ Wood (1998) ระบุว่าอุณหภูมิช่วง 20-35 องศาเซลเซียส จะส่งเสริมให้รา *A. oryzae* เกิดการสร้างโปรตีเอสได้ดี กิจกรรมโปรตีเอสที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Paranthaman (2009) ที่กล่าวว่ารา *A. oryzae* ให้กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุดเท่ากับ 67.7 ยูนิตต่อกรัม ภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ที่การบ่ม ณ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

นำผลการนึ่งข้าวเหนียวที่เวลานาน 40 นาที ไปทดลองในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากเป็นสภาวะที่อะไมเลสและโปรตีเอสมีค่าสูงที่สุด และภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

2.1.2 ความหนาของข้าวเหนียวที่มีผลต่อสมบัติโคจิ

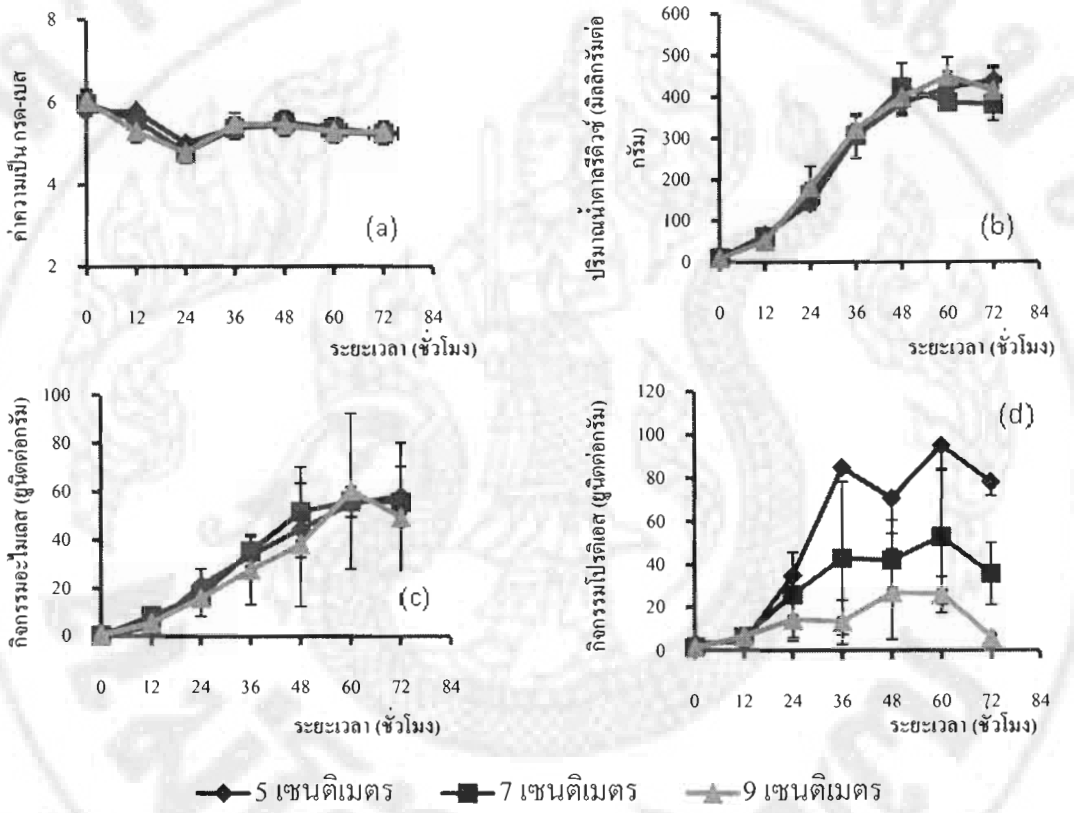
การหมักโคจิที่มีความหนาของข้าวเหนียวที่ระดับ 5 7 และ 9 เซนติเมตร พบว่า การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในโคจิเป็นไปในลักษณะคล้ายกันทุกทรีทเมนท์ คือ อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นแปรผันตามระยะเวลาการบ่มโคจิในช่วง 24-48 ชั่วโมงแรก อุณหภูมิสูงสุดที่วัดได้เมื่อ 36 ชั่วโมง มีค่าประมาณ 37.25 40.33 และ 41.98 องศาเซลเซียส ตามลำดับ หลังจากนั้นอุณหภูมิในกองโคจิจึงเริ่มลดลง (ภาพ 8) การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในกองโคจิ เกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมการเจริญของรา *A. oryzae* M-01 ดังที่กล่าวมาแล้วในตอนต้น ความหนาของโคจิตั้งแต่ 7 เซนติเมตรขึ้นไปจะเป็น อุปสรรคต่อการถ่ายเทความร้อนที่สะสมอยู่ภายใน ทำให้อุณหภูมิของโคจิสูงประมาณ 40-41 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจส่งผลต่อโอกาสการเกิดการปนเปื้อนของราและแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง สำหรับโคจิที่มีความหนา 5 เซนติเมตร การถ่ายเทอุณหภูมิจะเป็นไปอย่างรวดเร็วกว่า เนื่องจากระยะทางการเคลื่อนที่ของความร้อนสั้นกว่าความหนาที่ระดับอื่น นอกจากนี้ยังปล่อยให้อากาศได้แทรกตัวอยู่ในบริเวณช่องว่างของข้าวเหนียว ทำให้รา *A. oryzae* M-01 เจริญได้อย่างทั่วถึง

จากรายงาน (Ghildyal et al, 1994; Sangsurasak and Mitchell, 1995; Mitchell et al.,1999) เนื่องจากปฏิกิริยาส่วนใหญ่เป็นปฏิกิริยาคายความร้อน การจัดเรียงตัวของของแข็งภายในเบดค่อนข้างหนาแน่น จึงส่งผลต่อการถ่ายเทความร้อนเป็นไปได้ยาก บางครั้งอุณหภูมิในถังแพคเบดตรงส่วนบนอาจสูงกว่าอุณหภูมิของอากาศมากกว่า 20 องศาเซลเซียส (Ashley V.M. et al., 1999) ทำให้การทำงานของจุลินทรีย์ลดลงหรือตายได้ (มณีรัตน์, 2541) เช่น รา *A.oryzae*ต้องการอุณหภูมิในการเจริญประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส (Biesebede R.T. et al., 2002)



ภาพ 8 การเจริญของรา *A. oryzae* M-01 ในโคจิข้าวเหนียวอายุ 72 ชั่วโมง ความหนา 5 เซนติเมตร (ภาพตัดขวาง)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโคจิ พบว่าค่าความเป็นกรด-เบสของโคจิที่หมักจากข้าวเหนียวลดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก โดยมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.00 4.77 และ 4.77 ตามลำดับ (ภาพ 9a) แล้วมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังจากนั้น แต่ยังมีค่าต่ำกว่าช่วงเริ่มต้น โดยมีค่าเท่ากับ 5.20 5.23 และ 5.27 ตามลำดับ



ภาพ 9 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของเต้าเจี้ยวในระหว่างการหมักโมโรมิที่หมักด้วยโคจิข้าวเหนียวที่มีความหนาแตกต่างกัน: ค่าความเป็นกรด-เบส (a) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (b) กิจกรรมอะไมเลส (c) และกิจกรรมโปรตีเอส (d)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของโคจิ จะเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก อัตราการเกิดน้ำตาลรีดิวซ์จะเป็นไปอย่างรวดเร็วจนกระทั่งชั่วโมงที่ 36 แล้วจึงค่อย ๆ มีค่าลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมักที่ชั่วโมงที่ 72 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ได้จะมีค่าเท่ากับ 438.53 421.15 และ 448.57 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อเวลาการหมักผ่านไป 72 48 และ 60 ชั่วโมง สำหรับความหนาของโคจิ เท่ากับ 5 7 และ 9 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพ 9b) การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมอะไมเลสของโคจิทุกทรีทเมนท์เกิดขึ้นใน 12 ชั่วโมงแรก และดำเนินต่อไปจน

มีค่าสูงสุดเท่ากับ 58.01 55.47 และ 60.29 หน่วยต่อกรัม เมื่อโคจิมีอายุได้ 72 60 และ 60 ชั่วโมง สำหรับโคจิหนา 5 7 และ 9 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพ 9c) ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากอุณหภูมิของโคจิทั้งสองทรีทเมนท์หลังที่สูงกว่า 35 องศาเซลเซียส คือมีค่าเท่ากับ 38.08 และ 39.73 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมต่อการสร้างอะไมเลสของรา *A. oryzae* (Wood, 1998)

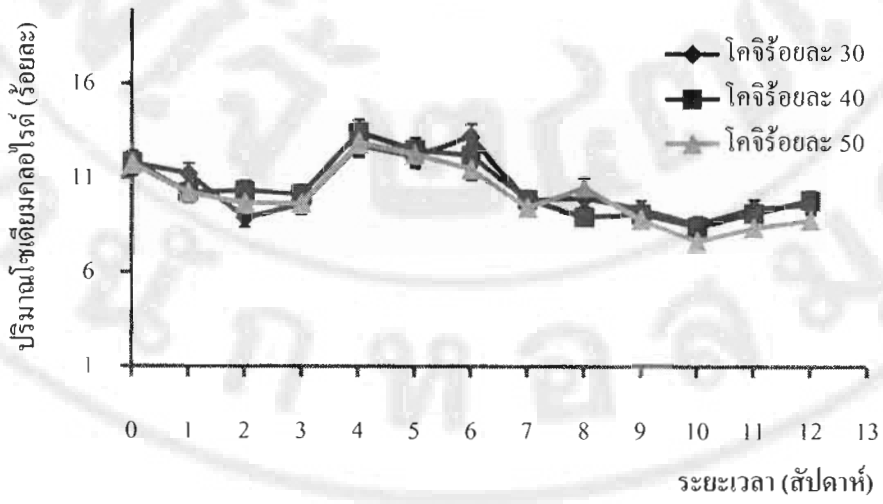
การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมโปรตีเอสของโคจิทุกทรีทเมนท์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก และดำเนินต่อไปจนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 95.06 52.80 และ 26.22 หน่วยต่อกรัม เมื่อโคจิมีอายุได้ 60 60 และ 48 ชั่วโมง สำหรับโคจิหนา 5 7 และ 9 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพ 9d) การที่โคจิหนา 5 เซนติเมตร ให้ค่ากิจกรรมโปรตีเอสสูงมากกว่าความหนาที่ระดับอื่น อาจเป็นผลเนื่องมาจากอุณหภูมิของโคจิที่ต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส คือมีค่าเท่ากับ 33.27 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมต่อการสร้างโปรตีเอสของรา *A. oryzae* (Wood, 1998)

จากผลการทดลองที่กล่าวมาได้คัดเลือกวิธีการเตรียมโคจิโดยการใช้ความหนาของชั้นข้าวเหนียว 5 เซนติเมตร และทำการหมักนาน 60 ชั่วโมง เพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

3. การหมักโมโรมิ

3.1 ปริมาณโคจิที่เหมาะสมต่อการหมักโมโรมิ

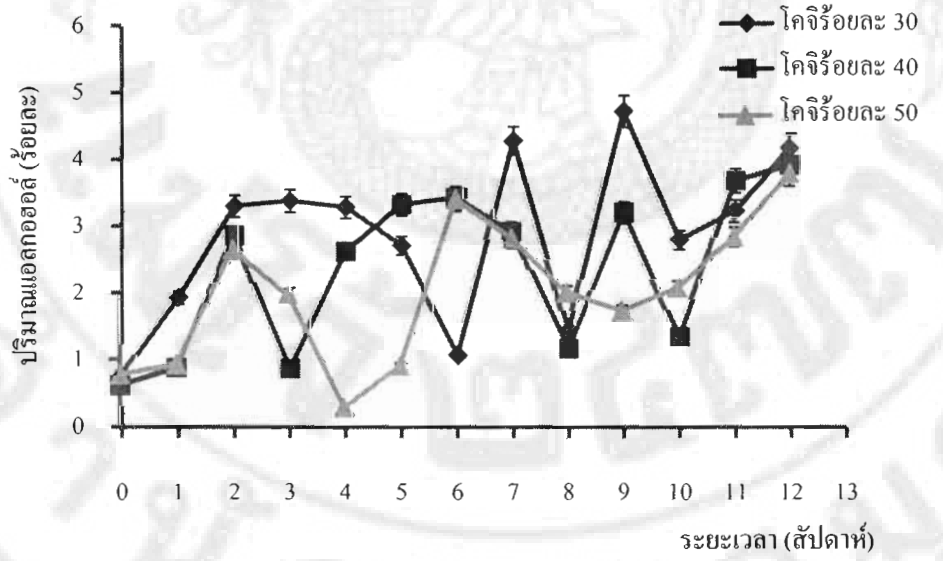
การหมักโคจิผสมกับถั่วเหลืองต้มสุกในสัดส่วนร้อยละ 30 40 และ 50 โดยน้ำหนักในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 18 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในช่วงระยะเวลา 1-3 สัปดาห์แรก มีค่าลดลงจากร้อยละ 11 เหลือประมาณร้อยละ 9-10 (ภาพ10)



ภาพ 10 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน

เนื่องจากถั่วเหลืองต้มสุกและโคจิได้สูญเสียความชื้นบางส่วนให้กับน้ำเกลือเนื่องจากแรงดันออสโมซิส (osmotic pressure) ที่ต่ำกว่า น้ำส่วนที่ถูกดูดซึมออกมาจะทำให้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในน้ำเกลือลดลงในช่วงระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้นโซเดียมคลอไรด์กลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นร้อยละ 12 ในสัปดาห์ที่ 4-6 ก่อนที่จะมีค่าลดลงอีกครั้งหนึ่งในช่วงสุดท้ายของการหมักโดยมีค่าเท่ากับ 9.55 9.81 และ 8.74 ตามลำดับ เนื่องจากน้ำบางส่วนในระบบให้ระเหยออกสู่บรรยากาศภายนอก ทำให้โซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (ภาพ 10) หลังจากนั้นโซเดียมคลอไรด์จำนวนหนึ่งในน้ำเกลือจะถูกดูดซึมเข้าสู่ภายในเมล็ดถั่วเหลืองเป็นส่วนใหญ่ และมีส่วนน้อยที่เข้าซึมเข้าสู่เมล็ดข้าวเหนียวที่ในขณะนี้กลายสภาพเป็นของกึ่งแข็งกึ่งเหลว

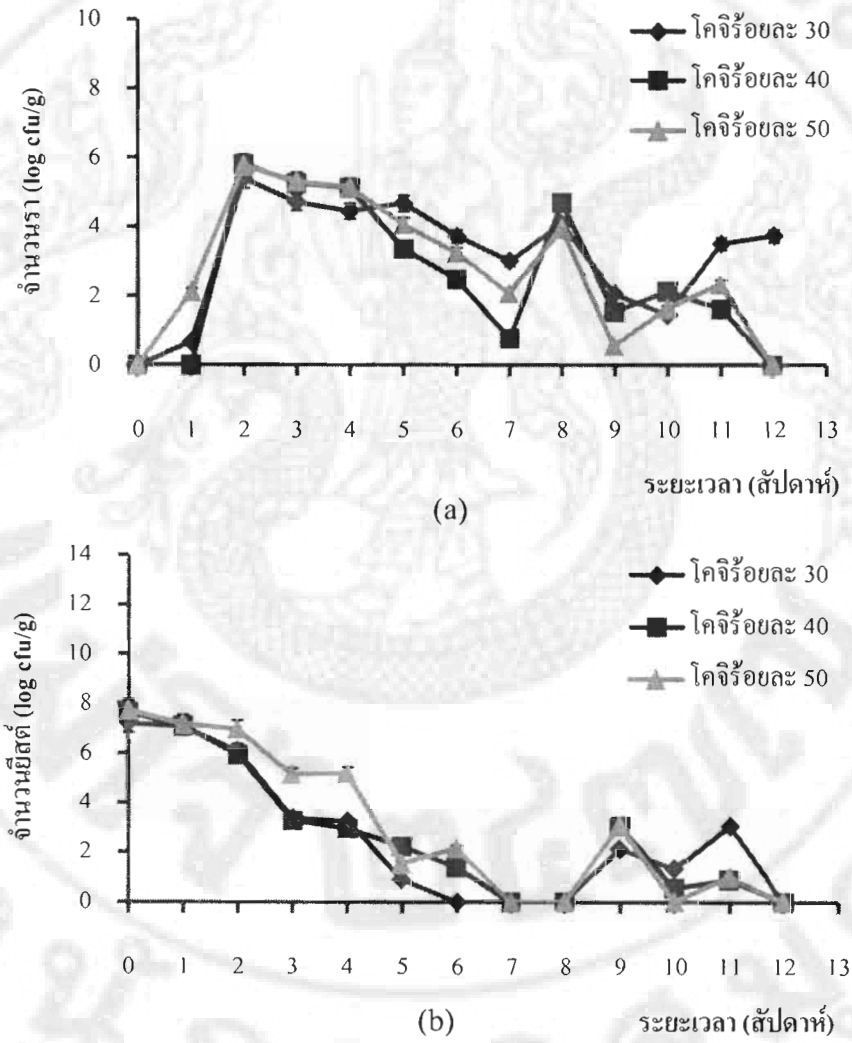
น้ำส่วนหนึ่งที่ระเหยออกจากระบบการหมักโมโรมิ อาจเนื่องมาจากปริมาณความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักของยีสต์ ซึ่งสังเกตได้จาปริมาณอัลกอฮอล์ในโมโรมิมีค่าเพิ่มขึ้นนับตั้งแต่เริ่มการหมัก (ภาพ 11) การเกิดอัลกอฮอล์สอดคล้องกับปริมาณยีสต์จำนวนมากที่ตรวจพบ ภาพ 12a)



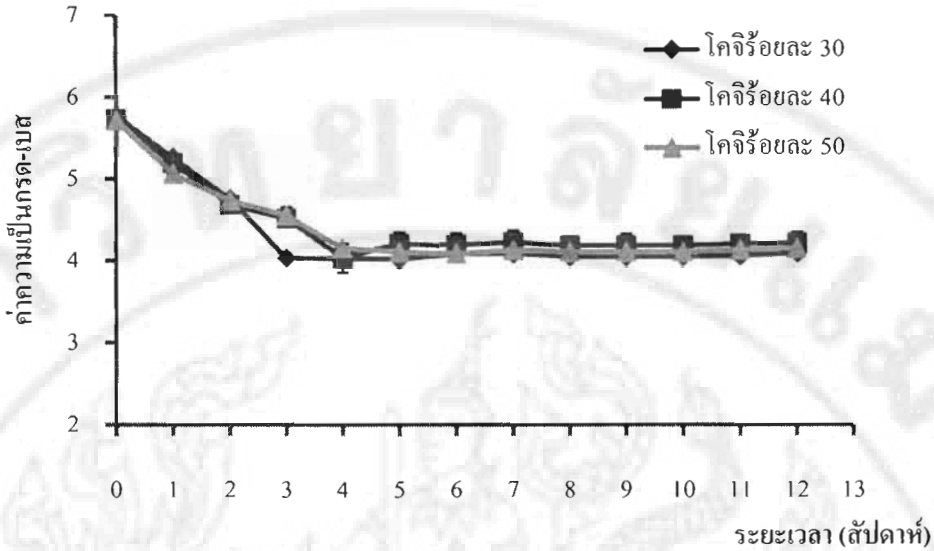
ภาพ 11 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณอัลกอฮอล์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน

สำหรับรา พบว่ามีการเจริญที่ลดลงตามลำดับ เนื่องจากสปอร์ราจำนวนมากไม่สามารถทนความเข้มข้นของน้ำเกลือที่สูงได้ ปริมาณราเริ่มลดลงในช่วงสัปดาห์ที่ 3 (ภาพ 12b) เนื่องจากโคจิและถั่วเหลืองต้มสุกทั้งหมดได้ซึมซับน้ำเกลือ และเริ่มจมลงจนเสมอผิวน้ำเกลือ ทำให้

ราเจริญได้ลำบาก ราเจริญได้อย่างลำบากในสภาพแวดล้อมที่เป็นของเหลว โดยเฉพาะของเหลวที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง ซึ่งแตกต่างจากยีสต์ที่ทนเกลือที่มีการเจริญที่ดีกว่า เนื่องจากเต้าเจี้ยวมีค่าความเป็นกรด-เบสที่ลดลง (ภาพ 13) จึงทำให้มีสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

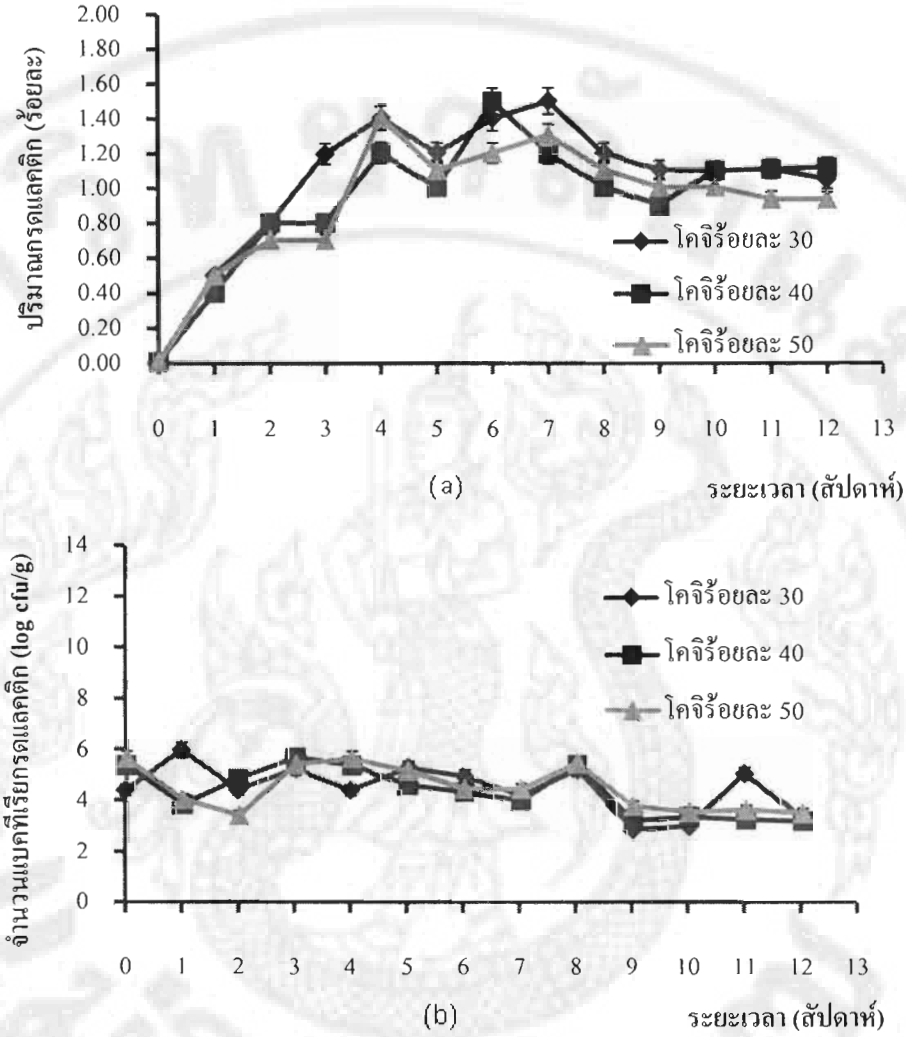


ภาพ 12 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน: รา (a) และยีสต์(b)



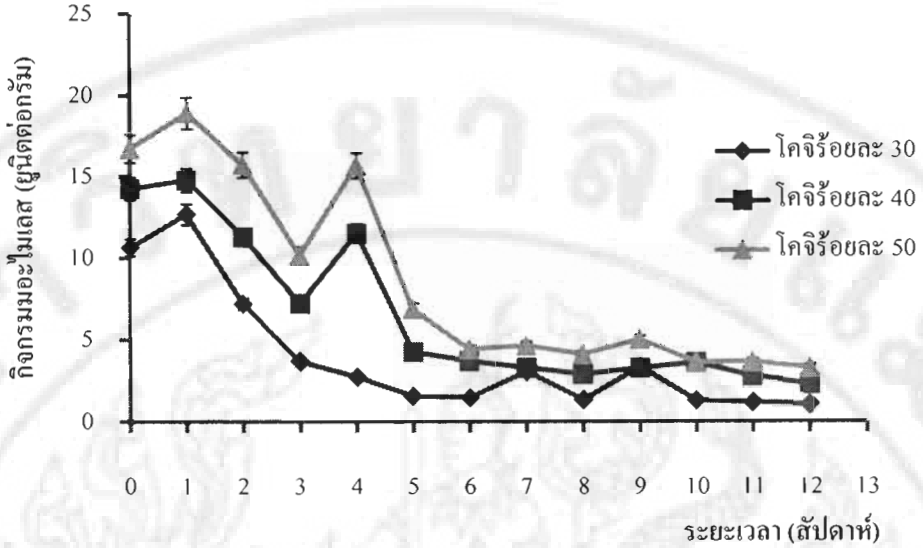
ภาพ 13 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-เบสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน

ค่าความเป็นกรด-เบสที่ลดลงนี้ เป็นผลเนื่องมาจากกรดแลคติกจำนวนมากที่ถูกผลิตขึ้นมา (ภาพ 14a) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างมากโดยเฉพาะในช่วง 1-8 สัปดาห์แรกของการหมักโมโรมิ (ภาพ 14b)



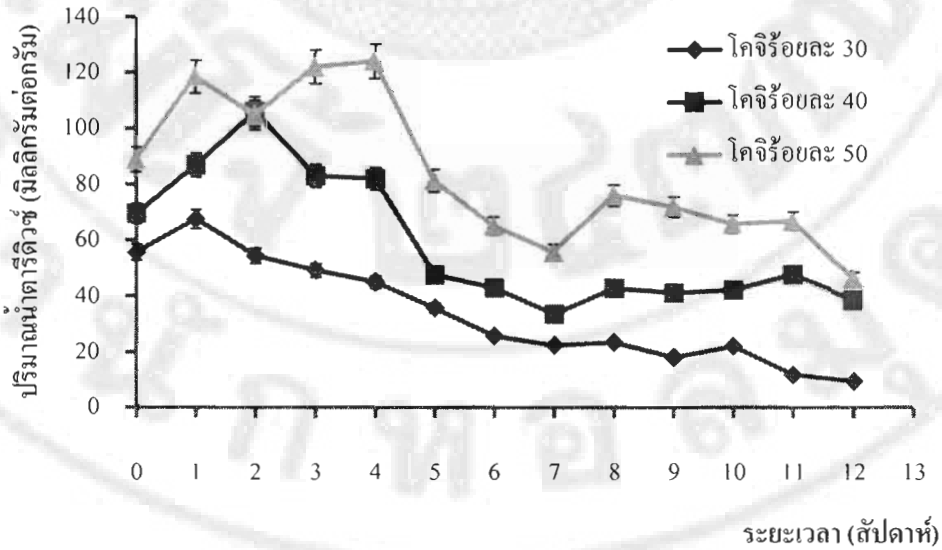
ภาพ 14 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแลคติกและปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน: ปริมาณกรดแลคติก (a) และปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก (b)

กิจกรรมอะไมเลสเกิดการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาของกาหมักโมโรมิ พบว่าอะไมเลสที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการหมักโคจิ ยังคงหลงเหลืออยู่ในขั้นตอนการหมักโมโรมิ ทำให้สามารถตรวจพบกิจกรรมดังกล่าวได้นับตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 แล้วมีแนวโน้มลดต่ำลงตลอดช่วงระยะเวลาของการหมัก (ภาพ 15) เนื่องจากความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในเต้าเจี้ยวมีค่าสูงมาก



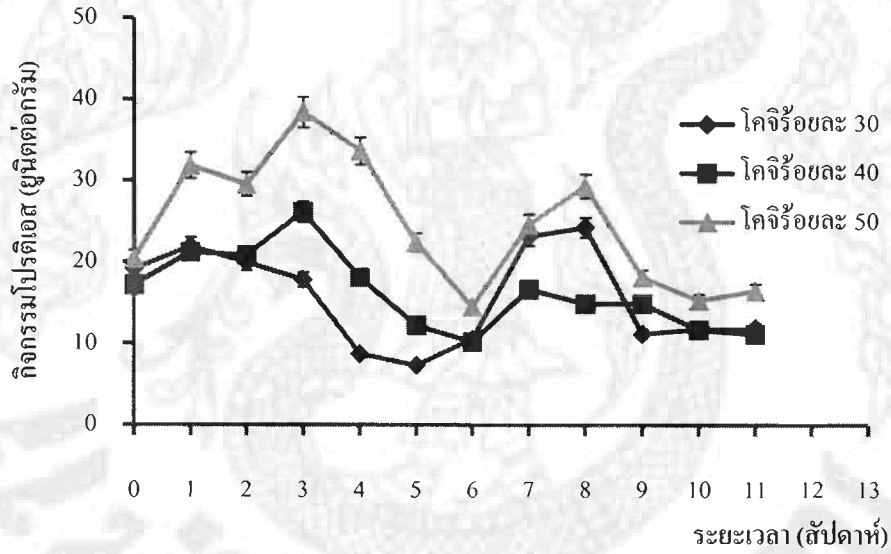
ภาพ 15 การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมอะไมเลสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน

อะไมเลสที่ยังคงมีกิจกรรมอยู่จะทำการย่อยแป้งในถั่วเหลืองและในข้าวเหนียวให้กลายเป็นคาร์โบไฮเดรทที่มีโมเลกุลสั้นลง และน้ำตาลรีดิวซ์จำนวนหนึ่ง (ภาพ 16) น้ำตาลรีดิวซ์ส่วนหนึ่งจะถูกใช้ไปในการเจริญของจุลินทรีย์ในเต้าเจี้ยว ทำให้มีค่าลดลงโดยลำดับจนสิ้นสุดอายุการหมัก

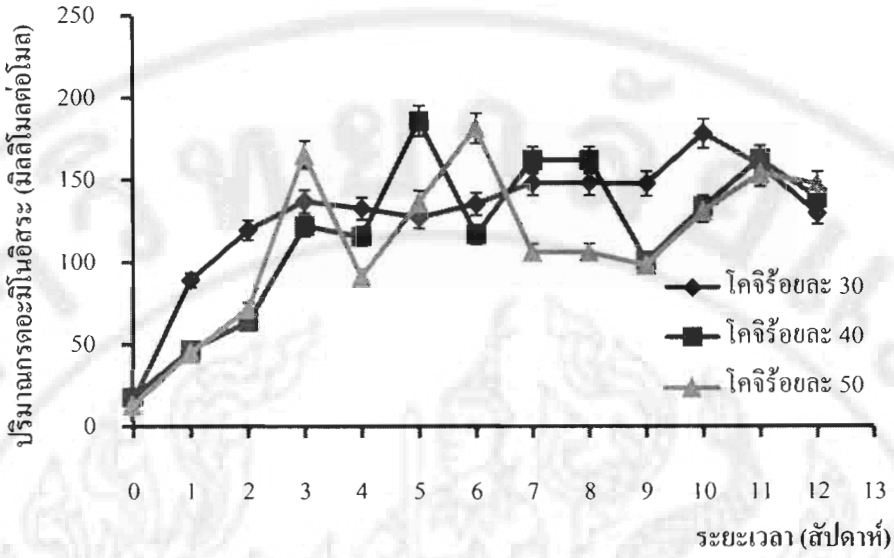


ภาพ 16 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน

กิจกรรมโปรตีเอส มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายคลึงกับกิจกรรมอะไมเลส พบว่า โปรตีเอสที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการหมักโคจิ ยังคงหลงเหลืออยู่ในขั้นตอนการหมักโมโรมิ ทำให้สามารถตรวจพบกิจกรรมดังกล่าวได้นับตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 แล้วมีแนวโน้มลดต่ำลงตลอดช่วงระยะเวลาของการหมัก (ภาพ 17) เนื่องจากความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในเต้าเจี้ยวมีค่าสูงมาก โปรตีเอสในขั้นตอนการหมักโมโรมิจะย่อยโมเลกุลของโปรตีนในถั่วเหลือง ให้กลายเป็นเปปไทด์ที่มีสายสั้นลง (short chain prpyides) และกรดอะมิโนจำนวนหนึ่งที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในเต้าเจี้ยวตลอดอายุการหมัก (ภาพ 18) การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดสอดคล้องกับกิจกรรมโปรตีเอส

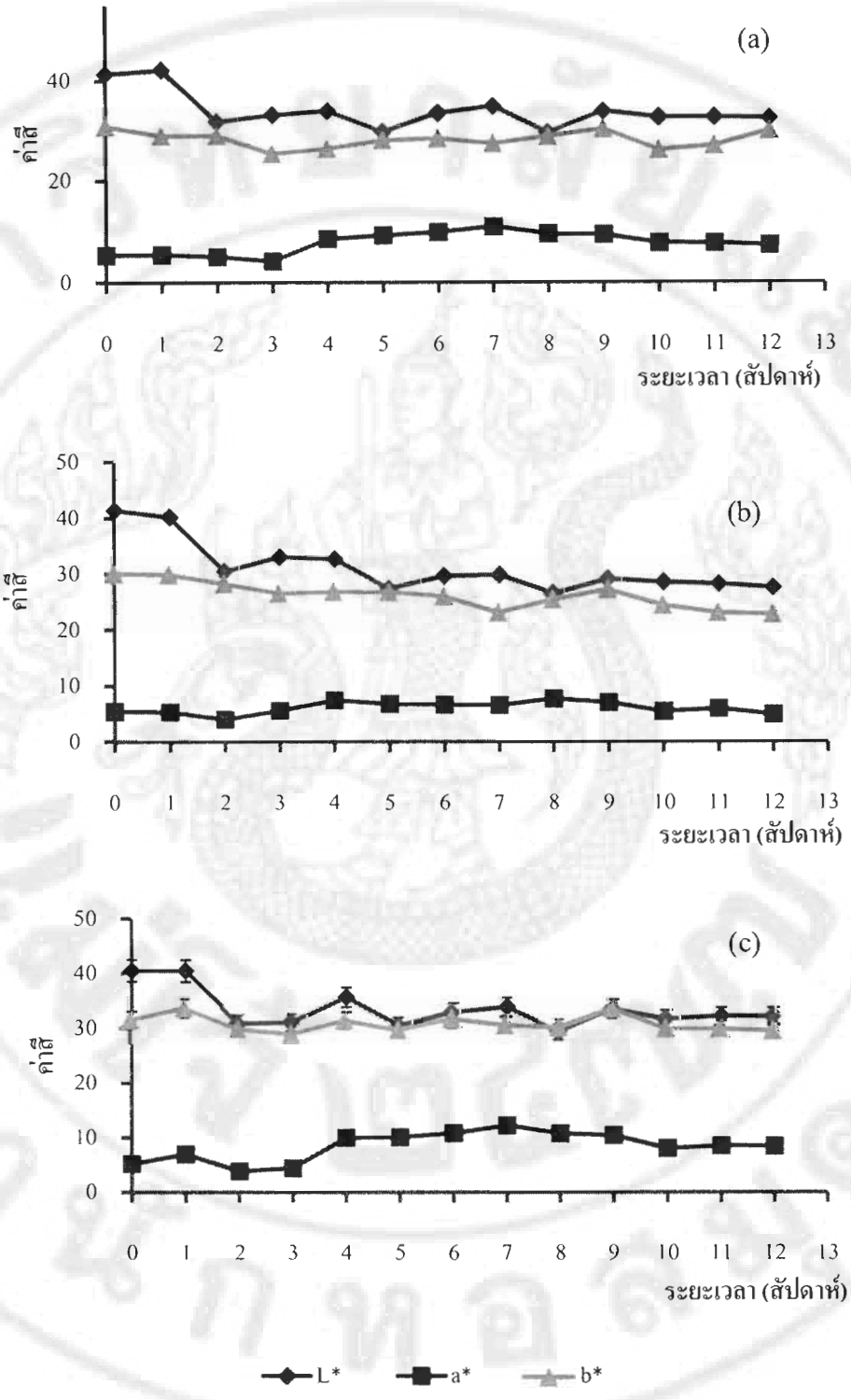


ภาพ 17 การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมโปรตีเอสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน



ภาพ 18 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน

การเปลี่ยนแปลงสีของเต้าเจี้ยวในระหว่างการหมักโมโรมิ ของเต้าเจี้ยวที่ใช้โคจิร้อยละ 30 พบว่า ค่า L* อยู่ในช่วง 41.29-29.78 ค่า a* อยู่ในช่วง 5.39-7.33 และ ค่า b* อยู่ในช่วง 30.91-29.96 (ภาพ 19 a) โคจิร้อยละ 40 พบว่า ค่า L* อยู่ในช่วง 41.35-27.46 ค่า a* อยู่ในช่วง 5.39-4.88 และ ค่า b* อยู่ในช่วง 30.04-22.72 (ภาพ 19b) และโคจิร้อยละ 50 พบว่า ค่า L* อยู่ในช่วง 40.51-32.16 ค่า a* อยู่ในช่วง 5.16-8.43 และ ค่า b* อยู่ในช่วง 31.49-29.53 (ภาพ 19c) การเปลี่ยนแปลงค่าสีดังกล่าว เนื่องมาจากชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ และปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลแบบเมลลาร์ด (maillard reaction) (Yokotsuka, 1986)



ภาพ 19 การเปลี่ยนแปลงของค่า L* a* และ b* ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้โคจิข้าวเหนียวในปริมาณที่แตกต่างกัน (ร้อยละ): 30 (a) 40 (b) และ 50 (c)

การทดสอบทางประสาทสัมผัสของเต้าเจี้ยวที่ผลิตได้ โดยผู้บริโภคจำนวน 100 คน ใช้วิธีการทดสอบแบบ Ranking for preference พบว่า ผลของการยอมรับของผู้ทดสอบต่อเต้าเจี้ยวทั้ง 3 สูตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) พบว่า โคจิปริมาณร้อยละ 50 ได้รับการยอมรับมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ปริมาณโคจิร้อยละ 30 และ 40 ตามลำดับ (ตาราง 3-4)

ตาราง 3 จำนวนผู้ทดสอบที่ให้คะแนนเรียงตามลำดับความชอบสำหรับเต้าเจี้ยวจำนวน 3 ตัวอย่าง

ปริมาณโคจิที่ใช้ (ร้อยละ)	ระดับความชอบ สเกล 3 ระดับ		
	1	2	3
30	30	38	32
40	8	36	48
50	62	26	20

หมายเหตุ : สเกลระดับ 1 = ชอบมากที่สุด 2 = ปานกลาง 3 = ไม่ชอบ

ตาราง 4 ผลสรุปของการเรียงลำดับความชอบผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว จำนวน 3 ตัวอย่าง

ปริมาณโคจิ (ร้อยละ)	สเกล 3 ระดับ	
	ผลรวม	ลำดับ
50	62^{a}	1
30	30^{b}	2
40	8^{c}	3

หมายเหตุ : ^{ns} คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในแนวสดมภ์

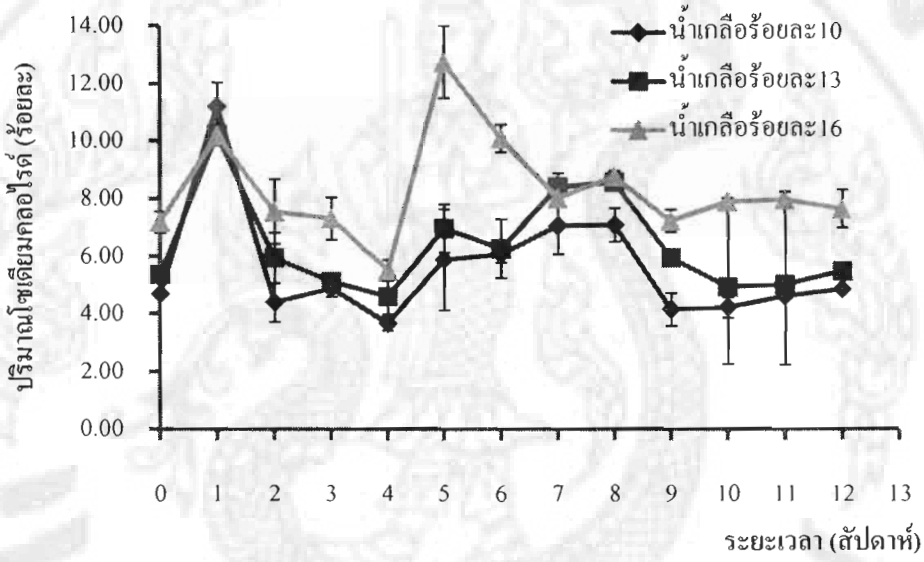
สเกลระดับ 1 = ชอบมากที่สุด 2 = ปานกลาง 3 = ไม่ชอบ

ผู้ทดสอบชิมให้การยอมรับผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่ใช้โคจิร้อยละ 50 ของน้ำหนักรวมทั้งหมดมากที่สุด และระบุว่าเต้าเจี้ยวมีรสชาติที่เค็มน้อยกว่าผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาด

3.2 ความเข้มข้นน้ำเกลือที่เหมาะสมต่อการหมักโมโรมิ

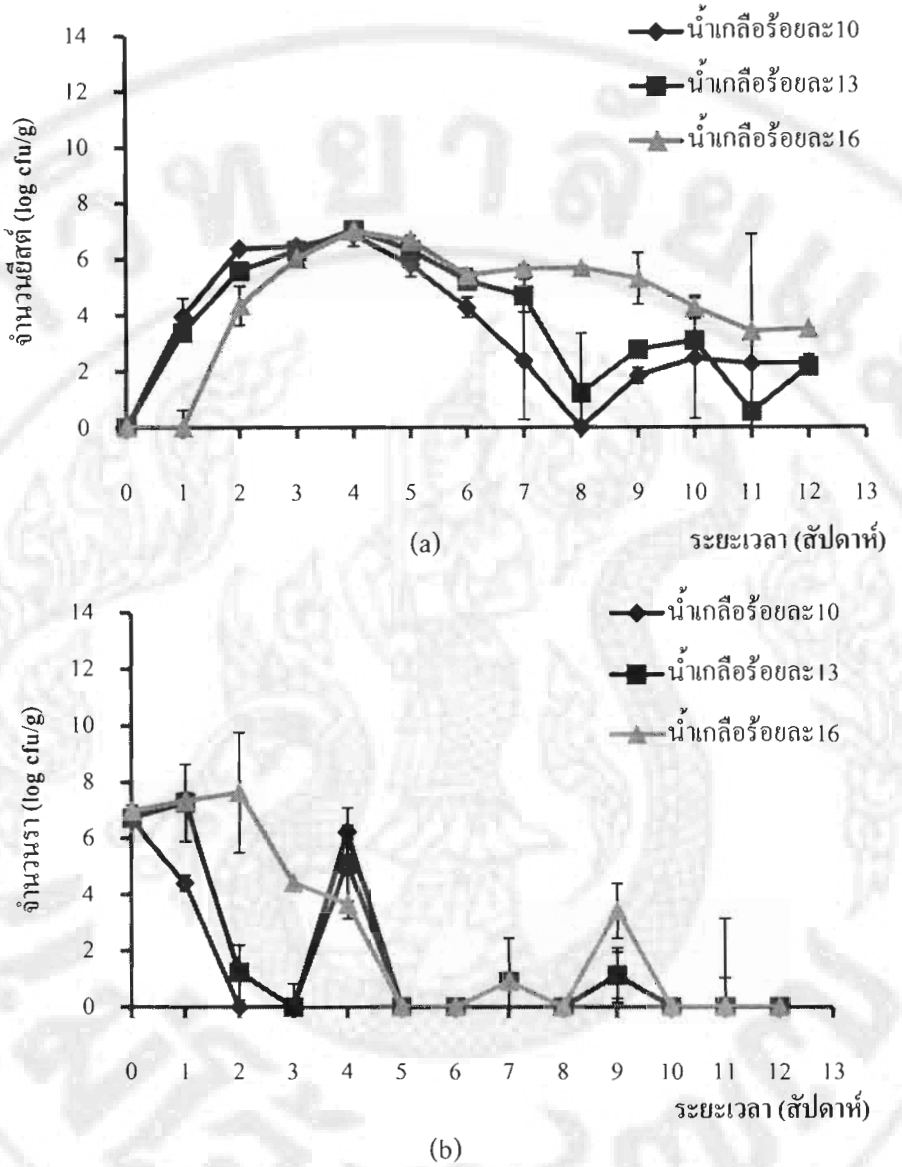
การหมักเต้าเจี้ยวโดยใช้โคจิร้อยละ 50 ของน้ำหนักรวมทั้งหมด ในที่น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 13 และ 16 บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในช่วงระยะเวลา 0-1 สัปดาห์แรก มีค่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4.68 5.36 และ7.18 ตามลำดับ เป็น

ประมาณร้อยละ 11.2 10.2 และ 10.18 ตามลำดับ หลังจากนั้นโซเดียมคลอไรด์จึงมีปริมาณลดลงในสัปดาห์ที่ 2-4 ก่อนที่จะมีค่าเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในช่วงสัปดาห์ที่ 5-8 แล้วค่อยลดลงอีกเล็กน้อยจนเกือบจะคงที่โดยมีค่าเท่ากับ 4.14 5.94 และ7.23 ตามลำดับ (ภาพ 20) ปริมาณเกลือที่เพิ่มขึ้นในช่วงแรก อาจ เนื่องมาจากเต้าเจี้ยวได้สูญเสียความชื้นไปบางส่วน ในระหว่างสัปดาห์แรกของการหมัก เนื่องจากต้องทำการกวนผสมทุกวัน ประกอบกับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในน้ำเกลือมีค่าไม่สูงพอที่จะดึงโมเลกุลของน้ำได้ดีเหมือนกับการทดลองที่ผ่านมา



ภาพ 20 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

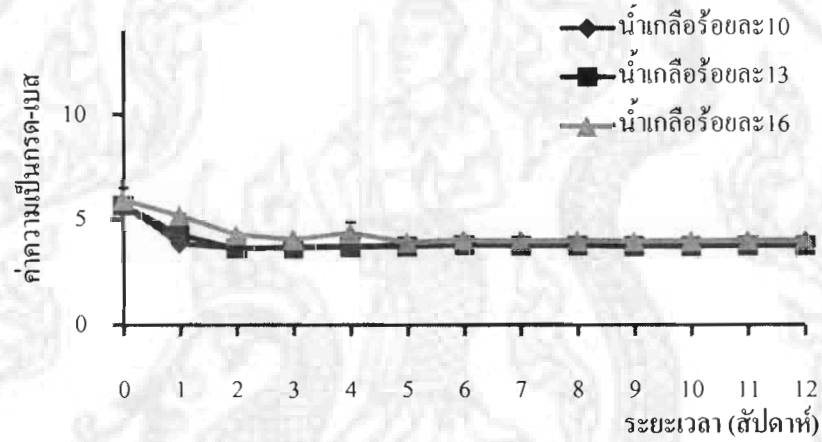
ภายหลังจากนั้นเมื่อโซเดียมคลอไรด์มีปริมาณเพิ่มขึ้นในน้ำเกลือ จะก่อให้เกิดแรงดันออสโมซิสสูงขึ้น ทำให้ถั่วเหลืองและโคจิสูญเสียน้ำจำนวนหนึ่งออกสู่น้ำเกลือที่ใช้หมัก ในขณะเดียวกันโซเดียมคลอไรด์จะค่อยๆ ถูกดูดซึมเข้าสู่ภายในเมล็ดถั่วเหลืองและเข้าสู่โคจิ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในตัวอย่างเต้าเจี้ยวจึงลดลง และเมื่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ยังคงดำเนินต่อไป โดยเฉพาะยีสต์ (ภาพ 21a) ที่ก่อให้เกิดการหมักอัลกอฮอล์ พบว่าปริมาณอัลกอฮอล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นนับตั้งแต่สัปดาห์แรกของการหมัก (ภาพ 21b) การลดลงของโซเดียมคลอไรด์ในเต้าเจี้ยวได้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ (พิมพาพร และ กนิษฐา, 2522)



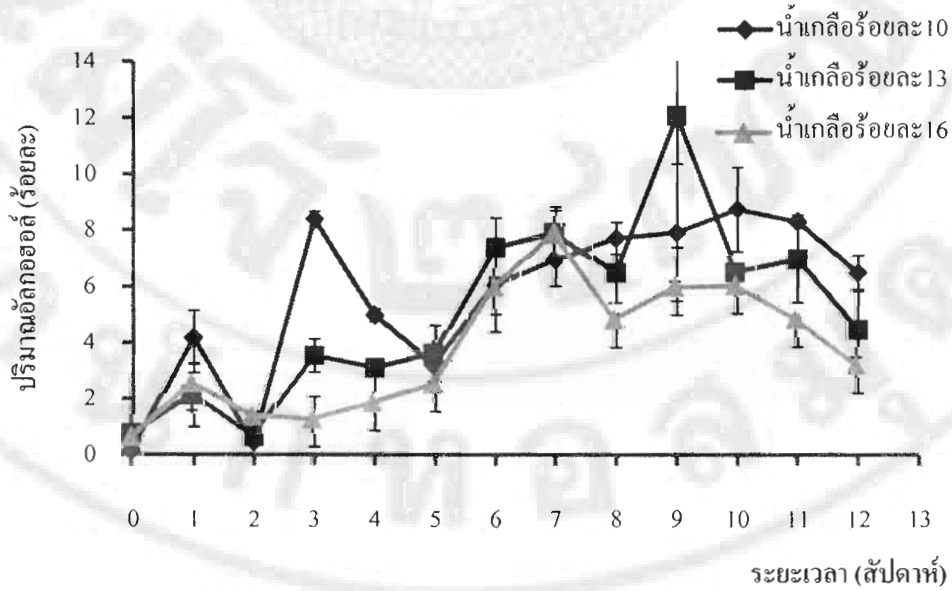
ภาพ 21 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน: ยีสต์ (a) และรา (b)

ยีสต์ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และความร้อนจำนวนมาก ซึ่งเพียงพอต่อการผลักดันน้ำบางส่วนในระบบให้ระเหยออกสู่บรรยากาศภายนอก ทำให้โซเดียมคลอไรด์ในตัวอย่างเต้าเจี้ยวมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น การดูดซึมโซเดียมคลอไรด์เข้าสู่เมล็ดถั่วเหลืองและข้าวเหนียวยังคงดำเนินต่อไป แต่การระเหยของน้ำกลับมีค่าลดลงเพราะกิจกรรมการหมักของยีสต์ก็ลดลงเป็นอย่างมาก ทำให้โซเดียมคลอไรด์ในตัวอย่างเต้าเจี้ยวมีค่าลดลงเล็กน้อยและมีระดับเกือบคงที่ในช่วงสุดท้ายของการหมัก

สำหรับรา พบว่ามีการเจริญที่ลดลงตามลำดับ เนื่องจากสปอร์ราจำนวนมากไม่สามารถทนความเข้มข้นของน้ำเกลือที่สูงได้ และเจริญได้อย่างลำบากในสภาพแวดล้อมที่เป็นของเหลว โดยเฉพาะของเหลวที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง ซึ่งแตกต่างจากยีสต์ที่ทนเกลือที่มีการเจริญที่ดีกว่า (ภาพ 20) เนื่องจากเต้าเจี้ยวมีค่าความเป็นกรด-เบสที่ 5.64 5.66 และ 5.94 ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 1 ค่าความเป็นกรด-เบส ลดลงอยู่ที่ 3.84 4.26 และ 5.17 ตามลำดับ หลังจาก 1 สัปดาห์ มีค่าความเป็นกรด-เบส เกือบคงที่ตลอดอายุการหมัก (ภาพ 22) จึงทำให้มีสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

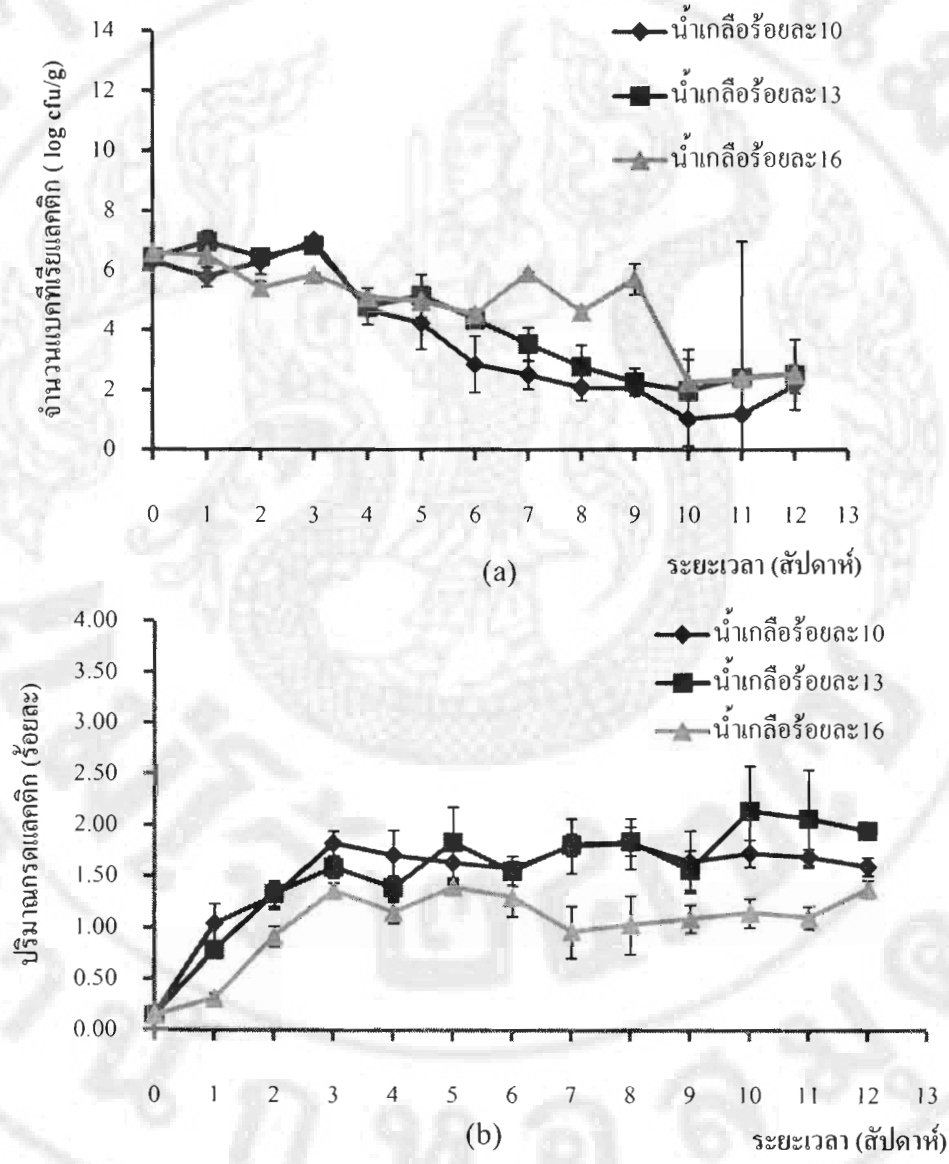


ภาพ 22 การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-เบสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน



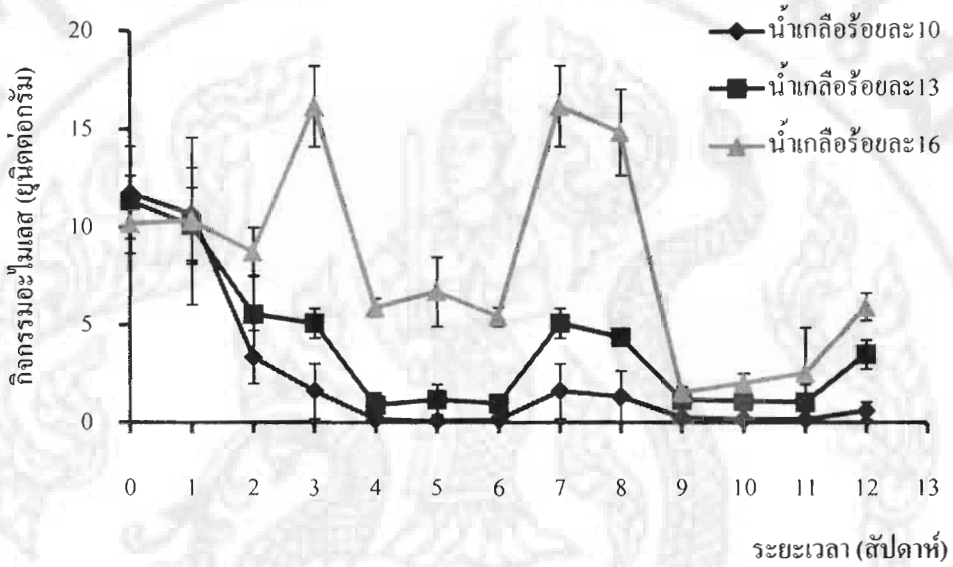
ภาพ 23 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณอัลกอฮอล์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

ค่าความเป็นกรด-เบสที่ลดลงนี้ เป็นผลเนื่องมาจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างมากโดยเฉพาะในช่วง 0-2 สัปดาห์แรกของการหมักโมโรมิ (ภาพ 24a) ทำให้เกิดการผลิตกรดแลคติกออกมาในเต้าเจี้ยว (ภาพ 24b) ปริมาณกรดแลคติกที่สะสมมีค่าสูงสุดประมาณร้อยละ 1.82 1.83 และ 1.39ในสัปดาห์ที่ 8 5 และ5 ตามลำดับ



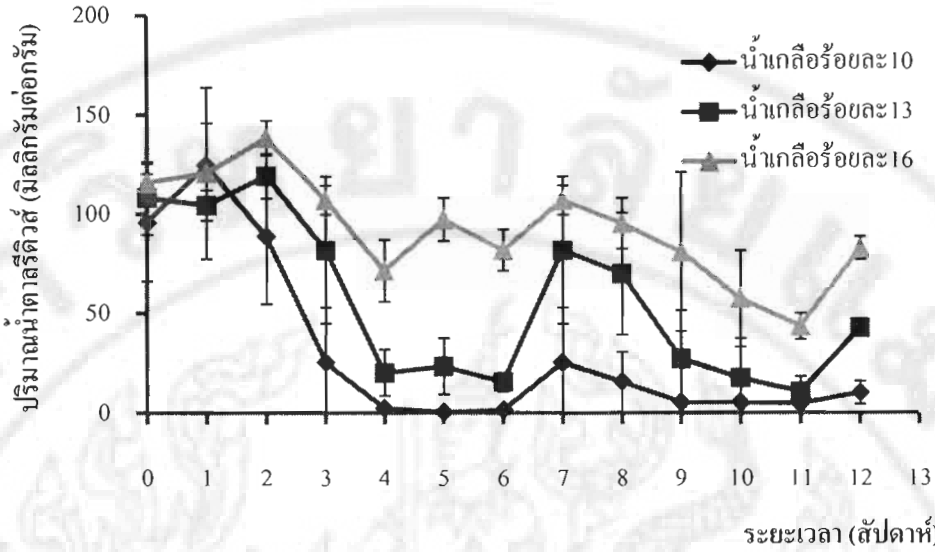
ภาพ 24 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแลคติกและปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน: ปริมาณกรดแลคติก (a) และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (b)

กิจกรรมอะไมเลสเกิดการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาของกาหมักโมโรมิ พบว่าอะไมเลสที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการหมักโคจิ ยังคงหลงเหลืออยู่ในขั้นตอนการหมักโมโรมิ ทำให้สามารถตรวจพบกิจกรรมดังกล่าวได้นับตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 แล้วมีแนวโน้มลดต่ำลงตลอดช่วงระยะเวลาของการหมัก กิจกรรมอะไมเลสลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0-4 สัปดาห์แรก และมีค่ากิจกรรมที่ระดับต่ำเกือบคงที่ตลอดสิ้นอายุของการหมัก (ภาพ 25)



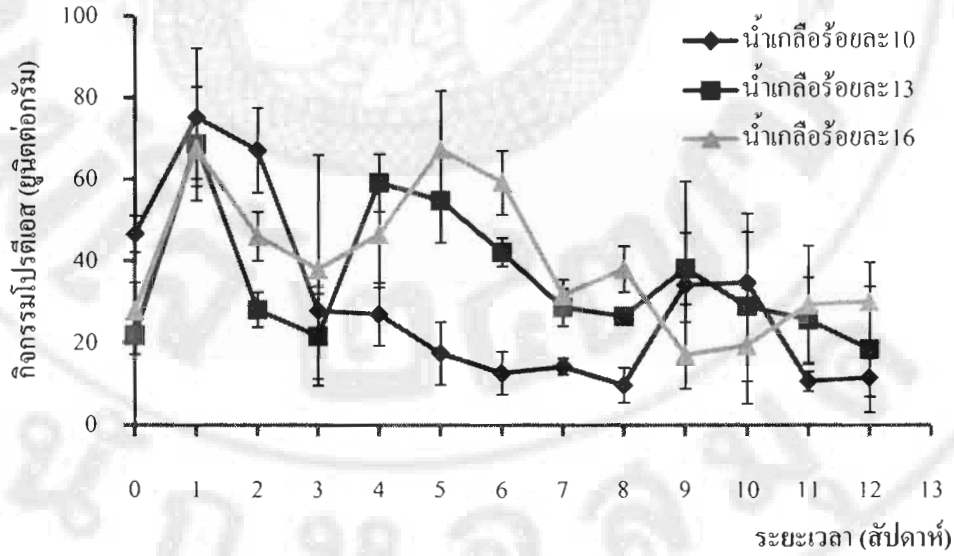
ภาพ 25 การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมอะไมเลสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

เนื่องจากความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในเต้าเจี้ยวมีค่าสูงมาก อะไมเลสที่ยังคงมีกิจกรรมอยู่จะทำการย่อยแป้งในถั่วเหลืองและในข้าวเหนียวให้กลายเป็นคาร์โบไฮเดรทที่มีโมเลกุลสั้นลง และน้ำตาลรีดิวซ์จำนวนหนึ่ง (ภาพ 26)



ภาพ 26 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

น้ำตาลรีดิวซ์ส่วนหนึ่งจะถูกใช้ไปในการเจริญของจุลินทรีย์ในเต้าเจี้ยว ทำให้มีค่าลดลงโดยลำดับจนสิ้นสุดอายุการหมัก Yong; Wood (1976) รายงานว่าน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 5-6 วันแรกของการหมักในน้ำเกลือ และมีปริมาณลดลงในเวลาต่อมา

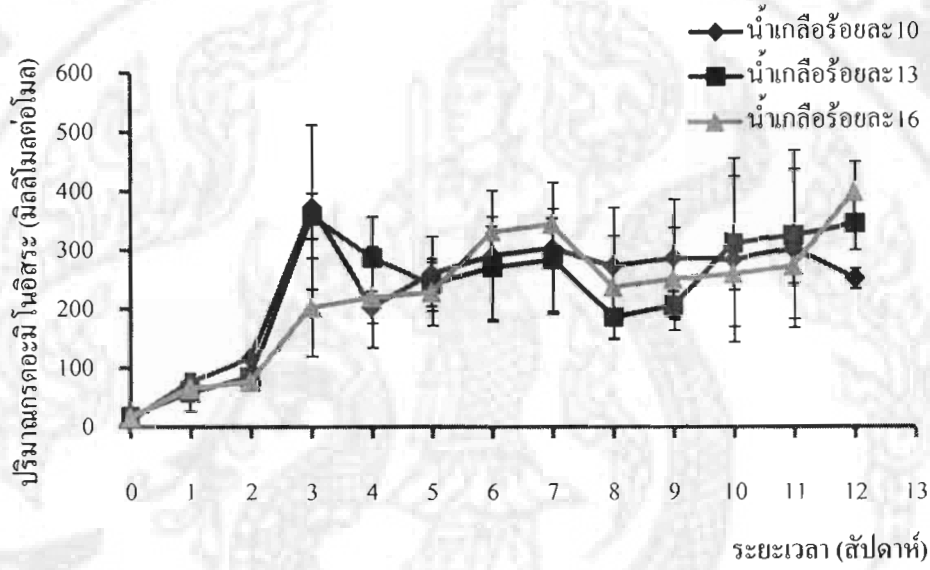


ภาพ 27 การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมโปรตีเอสในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

กิจกรรมโปรตีเอส มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายคลึงกับกิจกรรมอะไมเลส พบว่า โปรตีเอสที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการหมักโคจิ ยังคงหลงเหลืออยู่ในขั้นตอนการหมักโมโรมิ ทำ

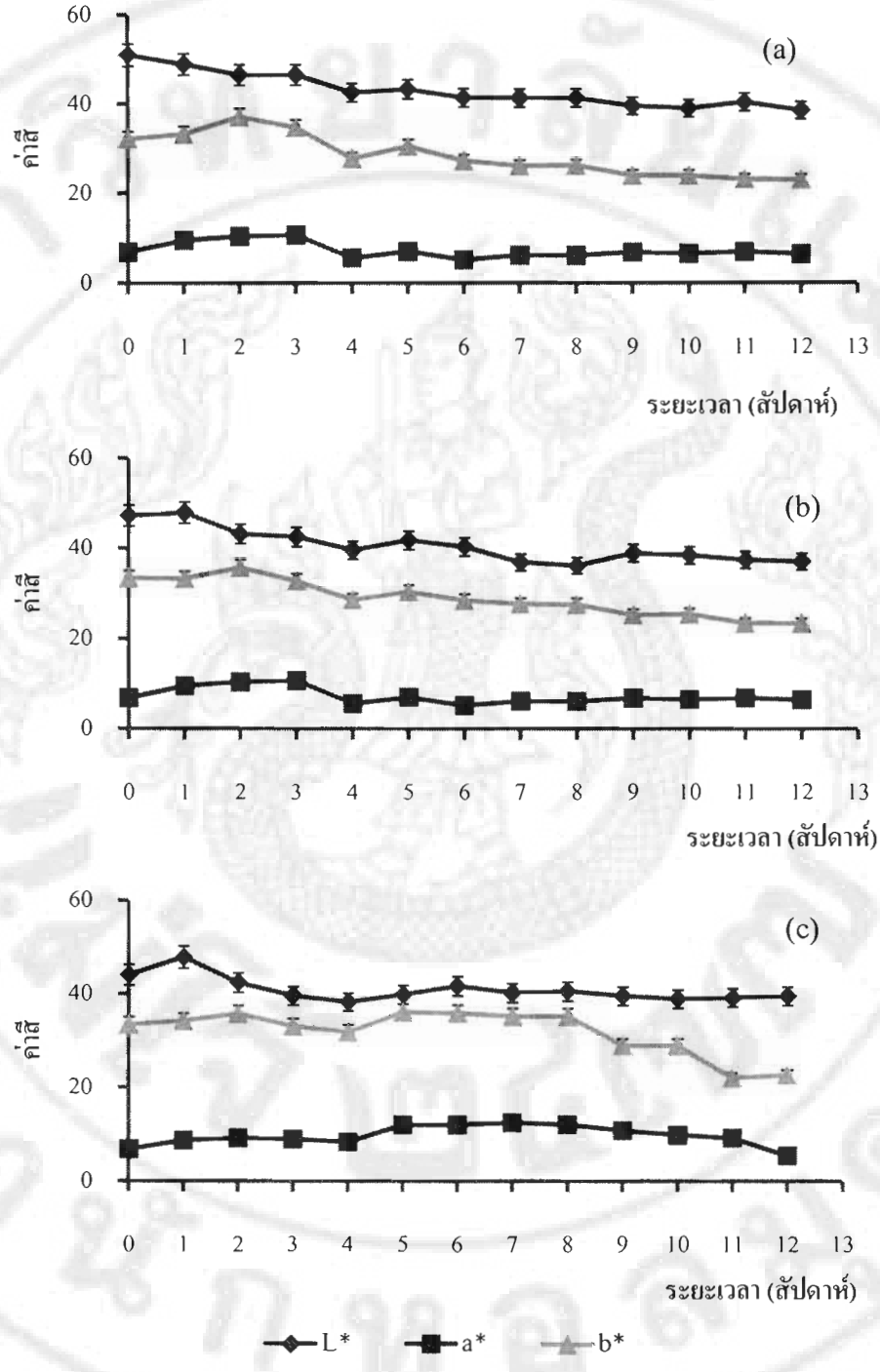
ให้สามารถตรวจพบกิจกรรมดังกล่าวได้นับตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 กิจกรรมโปรตีเอสมีค่าสูงขึ้นในช่วง 0-1 สัปดาห์ แล้วมีแนวโน้มลดต่ำลงตลอดช่วงระยะเวลาของการหมัก (ภาพ 27)

โปรตีเอสในขั้นตอนการหมักโมโรมิจะย่อยโมเลกุลของโปรตีนในถั่วเหลือง ให้กลายเป็นเปปไทด์ที่มีสายสั้นลง (short chain prpyides) และกรดอะมิโนจำนวนหนึ่งที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในเต้าเจี้ยวตลอดอายุการหมัก (ภาพ 28) การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดสอดคล้องกับกิจกรรมโปรตีเอส



ภาพ 28 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนอิสระในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่ มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

การเปลี่ยนแปลงค่าสี L* a* และ b* ในช่วงเวลาต่างๆของการหมักโมโรมิในน้ำเกลือร้อยละ 10 (ภาพ 29a) พบว่า ค่า L* อยู่ในช่วง 50.98-38.44 ค่า a* อยู่ในช่วง 6.89-6.48 และ ค่า b* อยู่ในช่วง 32.19-23.09 น้ำเกลือร้อยละ 13 (ภาพ 29b) พบว่า ค่าสี L* อยู่ในช่วง 47.20-36.98 ค่า a* อยู่ในช่วง 7.20-6.53 และค่า b* อยู่ในช่วง 33.38-23.34 น้ำเกลือร้อยละ 16 (ภาพ 29c) พบว่าค่าสี L* อยู่ในช่วง 44.07-39.56 ค่า a* อยู่ในช่วง 6.86-5.45 และค่า b* อยู่ในช่วง 33.40-22.73



ภาพ 29 การเปลี่ยนแปลงของค่าสี L* a* และ b* ในระหว่างการหมักโมโรมิที่ใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน (ร้อยละ) : 10 (a) 13 (b) และ 16 (c)

สีของเต้าเจี้ยวเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยจะมีสีเหลืองอมน้ำตาล จนกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มปานกลาง ค่า L* และ a* มีค่าลดลงเล็กน้อย

3.3 ผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว

เต้าเจี้ยวที่หมักได้เมื่อนำมาต้มให้เดือดนาน 30 นาที แล้วบรรจุในขวดแก้วที่สะอาด แล้วปิดฝาให้สนิท สามารถเก็บรักษาได้นานถึง 6 สัปดาห์โดยไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด (ตาราง 5) ทั้งนี้เนื่องมาจากค่าความเป็นกรด-เบสที่ต่ำ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ และความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อสามารถทำลายแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และรา ที่อาจหลงเหลืออยู่ในเต้าเจี้ยว ประกอบการบรรจุแบบร้อน (hot fill) ทำให้ที่ว่างเหนืออาหาร (head space) เป็นสุญญากาศ ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของรา

ตาราง 5 การเปลี่ยนแปลงของเต้าเจี้ยวระหว่างการเก็บรักษานาน 6 สัปดาห์

อายุการเก็บรักษา (สัปดาห์)	น้ำเกลือ (ร้อยละ)	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g)	ค่าสี		
			L*	a*	b*
0	10	ND	37.66 ± 0.02	10.63± 0.18	24.66 ± 0.57
	13	ND	37.48 ± 1.02	11.64 ± 0.43	26.53 ± 0.5
	16	ND	36.12 ± 0.44	12.16 ± 0.93	29.57 ± 0.27
2	10	ND	37.53 ± 0.46	10.46 ± 0.16	25.46 ± 0.16
	13	ND	39.29 ± 0.66	11.67 ± 0.50	26.34 ± 0.33
	16	ND	35.43 ± 0.44	11.89 ± 0.51	29.28 ± 0.04
4	10	ND	38.32 ± 0.37	10.61± 0.33	24.81 ± 0.26
	13	ND	37.53 ± 0.65	11.12 ± 0.08	26.29 ± 0.81
	16	ND	35.55 ± 0.12	11.81 ± 0.62	29.57 ± 0.33
6	10	ND	38.51 ± 1.36	11.14 ± 0.35	25.28 ± 0.76
	13	ND	38.22 ± 0.88	11.36 ± 0.06	26.88 ± 0.49
	16	ND	35.82 ± 0.20	12.61 ± 0.22	29.64 ± 0.49

หมายเหตุ : ค่าของข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ND = ไม่พบ

เต้าเจี้ยวที่มีอายุการเก็บรักษานาน 6 สัปดาห์ เมื่อนำมาทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยผู้บริโภคจำนวน 100 คน ใช้วิธีการทดสอบแบบ Ranking for preference พบว่า ผลของการยอมรับของผู้ทดสอบต่อเต้าเจี้ยวทั้ง 3 สูตร ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) (ตาราง 6-7)

ตาราง 6 จำนวนผู้ทดสอบที่ให้คะแนนเรียงตามลำดับความชอบสำหรับเต้าเจี้ยวจำนวน 3 ตัวอย่าง

ความเข้มข้นของน้ำเกลือ (ร้อยละ)	จำนวนผู้ทดสอบ (คน)		
	สเกล 3 ระดับ		
	1	2	3
10	36	46	18
13	48	34	18
16	64	20	16

หมายเหตุ : สเกลระดับ 1 = ชอบมากที่สุด 2 = ปานกลาง 3 =ไม่ชอบ

ตาราง 7 ผลการทดสอบความชอบผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวจำนวน 3 ตัวอย่าง

ความเข้มข้นของน้ำเกลือ (ร้อยละ)	สเกล 3 ระดับ	
	ผลรวม^{ns}	ลำดับ
16	64	1
13	48	2
10	36	3

หมายเหตุ : ^{ns} คือไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในแนวสดมภ์

สเกลระดับ 1 = ชอบมากที่สุด 2 = ปานกลาง 3 =ไม่ชอบ

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลงานวิจัย

ข้าวเจ้าเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการผลิตสปอร์ของรา *Aspergillus oryzae* M-01 ผงสปอร์ที่ได้จากการอบแห้งภายใต้ความดันสุญญากาศจะมีชีวิตเหลือรอดสูงสุดถึง 10.15 log cfu/g

การศึกษาเกี่ยวกับการหมักเต้าเจี้ยวรสเค็มน้อยโดยใช้โคจิข้าวเหนียว พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการนึ่งข้าวเหนียวนาน 40 นาที และความหนาของข้าวเหนียวในตะกร้าบ่มโคจิเท่ากับ 5 เซนติเมตร จะให้กิจกรรมอะไมเลสสูงสุด 58.01 ยูนิตต่อกรัม ในขณะที่กิจกรรมโปรตีเอสสูงสุด 95.06 ยูนิตต่อกรัม ในระยะเวลา 60 ชั่วโมง

การหมักเต้าเจี้ยวโดยใช้โคจิข้าวเหนียวปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่าโคจิปริมาณร้อยละ 50 ในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 18 นาน 12 สัปดาห์ แล้วผ่านการต้มนาน 30 นาที จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่มีรสเปรี้ยว มีกลิ่นอัลกอฮอล์ แต่เป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบชิมในระดับชอบมากที่สุด มีรสเค็มน้อย และสามารถเก็บรักษาได้นานไม่น้อยกว่า 6 สัปดาห์

การหมักเต้าเจี้ยวโดยใช้โคจิข้าวเหนียวร้อยละ 50 ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 16 นาน 12 สัปดาห์ แล้วผ่านการต้มนาน 30 นาที จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่มีรสเปรี้ยว มีกลิ่นอัลกอฮอล์แต่เป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบชิมในระดับชอบมากที่สุด และสามารถเก็บรักษาได้นานไม่น้อยกว่า 6 สัปดาห์

ข้อเสนอแนะ

การหมักเต้าเจี้ยวรสเค็มน้อยที่มีสามารถนำไปดัดแปลงทำเป็นน้ำจิ้มข้าวมันไก่ได้เนื่องจากมีความเปรี้ยว

เอกสารอ้างอิง

กนิษฐา สุวรรณเมนะ. 2522. **การศึกษาเชื้อราในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กองโภชนาการ กรมอนามัย. 2530. **ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม.** กรุงเทพฯ: กองโภชนาการกรมอนามัย.

กุลวดี ตรองพาณิชย์. 2517. น้ำปลาถั่วเหลือง. **วารสารอาหาร** 6(4): 11-13.

โครงสร้างทางเคมีของไทโรซีน. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine_sulfation#Function (6 August 2011).

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. **จุลชีวอุตสาหกรรม.** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. น. 6-28 – 6-40.

ประไพศรี ศิริจักรวาล. 2553. ถั่วเหลือง. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา http://www.thaihealth.in.th (26 August 2011).

ผลึกไทโรซีน. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา http://www.lemonfarm.com (6 August 2011).

พิมพาพร เทวาหุดี. 2521. **การศึกษายีสต์ในซีอิ๊วและเต้าเจี้ยว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุลชีววิทยา.กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2545. **การประเมินทางประสาทสัมผัส.** เชียงใหม่: ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 411 น.

ภคธีรา อุปจักร์. 2550. **การศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง.** สารนิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

มณีรัตน์ ดิรนันทกุล. 2542. **การศึกษาทดลองหมักถั่วเหลืองแบบอาหารแข็งในระบบแพคเบด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุทธนา เขาสุเมรุ และจารุณี มีจุ้ย. 2541. ใน **เอกสารการประชุมสัมมนาทางวิชาการ** สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 15: เล่มที่ 3 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร และคหกรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 165-177 (271 หน้า)

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.** กรุงเทพมหานคร:สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์

วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล. 2545. ซีอิ๊ว. **อาหาร.** 19: 58-62.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2526. กลิ่นหอมซีอิ๊วมาจากไหน. **วิทยาศาสตร์การอาหาร.** 14(2): 40-45, (3): 33-46.

วิลาวัณย์ เจริญจีรตระกูล. 2536. **จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร.** กรุงเทพ: โอเอสพริ้นติ้ง เฮ้าส์.

ศิริพร เอื้ออังกูร. 2538. **การปรับปรุงกระบวนการหมักซีอิ๊วในขั้นตอนการหมักน้ำเกลือ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันวิจัยข้าวกรมวิชาการเกษตร กระทรวงพาณิชย์. 2540. **มาตราฐานข้าวไทย.** รายงานประจำปี 2540. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงพาณิชย์. 10 น.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2538. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1.** กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,. 251 หน้า.

สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์. 2520. **การศึกษาเชื้อแบคทีเรียในขบวนการหมักซีอิ๊ว.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. **ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 366 น.

Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. ***J. Gen. Physio.*** 22: 79-89.

Ashley V, Mitchell D, Howes T .1999. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-statefermentation in packed-bed bioreactors. **Biochem Eng J**.3:141–150.

Assocciation of Official Analytical Chemistry (A.O.A.C). 1995. **Official Method of Analysis 16th ed. Washington**. D.C.: Geotage Banto.

Beuchat, 1987 lr Beuchat, **Food and Beverage Mycology**, Van Nostrand Reinhold, New York 1987. De La Torre et al., 1999 mj De La Torre, mc Millan, linkinghub.elsevier.com/ retrieve/ pii/ S0168160505002710

Biesebeke R.T. et al. 2002. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations progress report on a multi-disciplinary project. **FEMS Yeast Research.** 2: 245-248.

Bhumiratana, A., Flegel, T.W., Glinsukon, T. and Somporan, W. 1988. Isolation and analysis of molds from soy sauce koji in Thailand. **Applied and Environmental Microbiology.** 39(2): 430-435

Chiou R.Y.-Y., Ferng S. and Beuchat L.R. 1999. Fermentation of low-salt miso as affected by supplementation with ethanol. **International Journal of Food Microbiology**.11-20

Folin, O. and Ciocalteau, V .1929. **J. Biol. Chem**. 73, 627-715

Ghildyal NP, Gowthaman MK, Raghava Rao KSMS, Karenth NG. 1994. Interaction between transport resistances withbiochemical reaction in paeked-bed solid state fermentors:effect of temperature gradients. **Enzyme Microb Technol**. 16:253–257

Ingle, M. B., and R. J. Erickson. 1978. Bacterial a-amylase.Advan. Appl. **Microbiol.** 24:257-278.

Jones. N.R. 1993. Browing reaction in dries fish products. Rec.Adv. food sci. 2:74-80

Medda, G.L. and A.K. Chandra. 1980. New strains of Bacillus lincheniformis and Bacillus coagulans producing thermostable α-amylase active at alkaline pH. **J. Appl. Bacteriol**. 48, 48-58.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid for es timation of reducing sugar. **Analytical Chemistry.** 31: 426-428.

Mitchell DA, Pandey A, Sangsurasak P, Krieger N .1999. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solidstate fermentation. **Process Biochem** 35:167–178

Mohr V. 1980. Enzymes technology in meat and fish industries. **Process Biochem** 80:18-23.

Nahar.S, F. Hossain, B. Feroza and M. A. Halim. 2008. Production of glucoamylase *Rhizopus* SP. In liquid culture. **Pak. J. Bot.**, 40(4): 1693-1698,

Nakadai, T. & Nasuno, S. 1976. Enzymatic hydrolysis of protein by various enyzyme preparation. **J. Ferment. Technol**. 54: 872-884.

Okazaki, N., S. Sugama and T. Tanaka. 1980. Mathematical model for surface culture of koji mold. **J.Ferment. Technol.** 58 (5) : 471-476

Oyashiki, H., M. Uchida. A. Obayashi and S. Oka. 1989. Evaluation of *koji* prepared with various molds for *mirin*making. **J. Ferment. Bioeng.** 67:163-168

Paranthaman, R., K. Alagusundaram and J. Indhumathi. Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. **World Journal of Agricultural Science**. 5 (3): 308-312, 2009

Raimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnologi.** 1(3) 174-188.

Rehm HJ. and Reed G. 1983. Baked goods. **In Biotechnology**: food and feed production with

microorganism. 5:1-80.

Sangsurasak P, Mitchell DA. 1995. Incorporation of deathkinetics into a 2-D dynamic heat transfer model for solid state fermentation. **J Chem Technol Biotechnol.** 64:253–260

Sasaki, M. 1996. Isolation and identifieation of preeursor of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2 H)- furanone from isolated soybean protein and shoyu. **J. Agric. Food Chem.** 44: 230-235.

Smith, I. D., W. G. Hoekstra, R. H. Grummer and P. H. Phillips. 1960. Studies on serum proteins of normal and parakeratotic pigs. **J. Animal Sci.**19:580.

Sugiyama, S. 1984. Selection of mieroorganisms for use in the fermentation of soy sauce. **Food Microbiol.** 1: 339-347.

Upton, M.F. and W.M. Fogarty, 1977. Production and purifieation of thermostable amylase and protease of thermomonospora vridis. **Appl.Environ.** Mierobiol., 33: 59–64.

Wood, B. J. B. 1998. Soy sauee and miso. In Rose, A. H. (ed.), **Fermented Food**., pp. 39-85. London:Academic Press, Inc.

Yokotsuka, T. 1986. Shoyu conversion and manufacture of Foodstuffs by Micro organisms, proeessing of the sixth. **Int.Symp**. 117-125.

Yokotsuka T. 1960. Aroma and flavor of Japanese soy sauce. **Advanced Food Resource.** 10: 75-134.

Yong, F.M. & Wood, B. J. B. 1974. Mierobiology and bioehemistry of soy sauce fermentation. Adv. Appli. **Microbiol**. 17: 157-194.