จุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้

Microbiology of Fermented Soya Bean Curd (Sufu)

ชาคริยา ฉลาด

Chakhriya Chalad

A
เลขหมู่ QR129.S6 ช62 2544 ฉ.2
Bib Key 210583
4 มิ.ย. 2544

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Microbiology

Prince of Songkla University

2544

วิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี ได้รับวาล ฝ่ายวิชาการ ... วันที่ ... เดือน ... พ.ศ. 2554

ชื่อวิทยานิพนธ์	จุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้
ผู้เขียน	นางสาวชาคริยา ฉลาด
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธินี ภูวนาถ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ จุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้

ผู้เขียน นางสาวชาคริยา ฉลาด

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การตรวจทางจุลชีววิทยาของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตั้งแต่เริ่มหมักจนเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป พบว่า มีปริมาณแบคทีเรีย รา และยีสต์อยู่ระหว่าง 1.6x10 ถึง $4.0x10^5$, 2.4x10 ถึง $3.9x10^5$ และ $4.4x10^3$ ถึง $8.0x10^5$ CFU/g ตามลำดับ จุลินทรีย์ที่เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นที่พบบนโคจิ คือ *Aspergillus*, *Syncephalastrum* และ *Bacillus* จุลินทรีย์ที่ตรวจพบตลอดการหมัก คือ *Bacillus*, *Pediococcus* และ *Saccharomyces* นอกจากนี้ยังตรวจพบจุลินทรีย์อื่น ๆ อีก ได้แก่ *Staphylococcus*, *Penicillium*, *Pichia* และ *Debaryomyces*

จุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้เป็นจุลินทรีย์ทนเกลือ (NaCl) ความเข้มข้นระหว่าง 5 ถึง 20% *Aspergillus* และ *Bacillus* สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน และแป้ง ส่วน *Pediococcus* สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งอย่างเดียว จุลินทรีย์ดังกล่าวจึงน่ามีบทบาทในการย่อยสลายเต้าหู้ในกระบวนการหมัก

จากการตรวจสอบคุณภาพทางอาหารของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิต พบว่า มีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 16.09 - 21.91% ปริมาณน้ำตาลอยู่ระหว่าง 4.23 – 9.14% ปริมาณไขมันอยู่ระหว่าง 7.20 – 12.76% ปริมาณเกลืออยู่ระหว่าง 10.06 – 11.26% ปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 47.55 – 57.97% ปริมาณเถ้าอยู่ระหว่าง 9.24 – 15.63 % ปริมาณเส้นใยอยู่ระหว่าง 0.10 – 0.16% ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 4.99 – 5.75 และอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 29 – 31°ซ ส่วนปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินซนิดบี 1 ที่ตรวจพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิตโดยวิธี ELISA อยู่ระหว่าง 10.8 – 22.8 ppb นอกจากนี้ยังตรวจพบอะฟลาทอกซินที่ผลิตจากเชื้อรา

ที่แยกได้สายพันธุ์ *Aspergillus, Penicillium* และ *Syncephalastrum* ในปริมาณ 176, 124 และ 44 ppb ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ

Thesis Title	Microbiology of Fermented Soya Bean Curd (Sufu)
Author	Miss Chakhriya Chalad
Major Program	Microbiology
Academic Year	2001

Abstract

Microorganisms in fermenting soya bean curd (Sufu) were quantitated. Total microbial populations of bacteria, molds and yeasts were 1.6x10 to $4.0x10^5$, 2.4x10 to $3.9x10^5$ and $4.4x10^3$ to $8.0x10^5$ CFU/g, respectively. *Aspergillus*, *Syncephalastrum* and *Bacillus* were dominantly found in koji inoculum. *Bacillus*, *Pediococcus* and *Saccharomyces* were mainly detected throughout the fermentation process. The other microorganisms were *Staphylococcus*, *Penicillium*, *Pichia* and *Debaryomyces*.

All isolated microorganisms were halotolerant at NaCl concentrations between 5 to 20%. *Aspergillus* and *Bacillus* could produce proteolytic and amylolytic enzymes whereas *Pediococcus* could hydrolyse only starch implying that these microorganisms may play significant roles in the fermentation of Tufu substrate.

The nutritional evaluation it was found that (fermenting Sufu) contains protein 16.09 - 21.91%, sugar 4.23 – 9.14%, lipid 7.20 – 12.76%, NaCl 10.06 – 11.26%, humidity 47.55 – 57.97%, ash 9.24 – 15.63%, fibre 0.10 – 0.16%, pH 4.99 – 5.75 and temperature at 29 – 31°C. Additionally, aflatoxin B_1 at the concentration of 10.8 – 22.8 ppb could be detected in the fermenting Sufu by ELISA methods. This aflatoxin was also found in a five days old culture

medium (30°C) of the isolated *Aspergillus*, *Penicillium* and *Syncephalastrum* at the concentrations of 176, 124 and 44 ppb, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณคณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วยรองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธินี ภูวนาถ รวมทั้งรองศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาแก้ไขปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน, นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือ ให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ขอขอบคุณสถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ๆ ที่ให้ความห่วงใยและสนับสนุนการศึกษาตลอดมา ขอบคุณคุณสุวรรณี แสงแก้ว ที่ให้ความช่วยเหลือและให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ พร้อมทั้งขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จ

ประโยชน์ ผลสำเร็จ และส่วนดีทั้งหมดของงานวิจัยครั้งนี้ ขออุทิศให้ผู้ที่ข้าพเจ้ากล่าวมาทุกท่าน

ชาคริยา ฉลาด

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	33
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	34
วัสดุ	34
อุปกรณ์	34
วิธีการ	39
3. ผลการทดลอง	50
4. วิจารณ์	78
5. สรุป	83
เอกสารอ้างอิง	85
ภาคผนวก	98
ประวัติผู้เขียน	108

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	อุณหภูมิและปริมาณของสารตกตะกอนที่ใช้ในการทำเต้าหู้แข็ง	8
2.	อัตราการตาย 50% (LD_{50}) ที่เกิดกับสัตว์ต่าง ๆ เมื่อได้รับสารอะฟลาทอกซินชนิด B_1	23
3.	อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี และบริษัทผู้ผลิต	35
4.	จุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ที่ระยะต่าง ๆ	51
5.	จุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในโคจิ (Koji) ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	60
6.	จุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในเกลือ ซึ่งเป็นส่วนผสมในการหมักเต้าหู้ยี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	61
7.	จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบบนผ้าขาว ซึ่งใช้ปิดโคจิ (Koji) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	62
8.	ชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้	64
9.	จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุต่าง ๆ กัน	-65
10.	จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในโคจิ เกลือ และผ้าขาวที่ใช้ปิดโคจิ	69
11.	การเติบโตของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ กัน	71
12.	การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้	72
13.	คุณภาพทางอาหารของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการหมัก	74
14.	ปริมาณอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบในเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่อุณหภูมิ 30° ซ	77

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	ขั้นตอนการผลิตเต้าหู้ยี้วิธีที่ 4	12
2.	โคจิ (Koji) หัวเชื้อเริ่มต้น (a) การหมักเต้าหู้ยี้ในโอ่งหมักวันแรก (b)	13
3.	สัดส่วนแหล่งของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ	16
4.	สูตรโครงสร้างอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ	21
5.	หลักการ Direct Competitive ELISA	32
6.	การเติบโตของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	53
7.	การเติบโตของแบคทีเรียแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRSA ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	54
8.	การเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ THIO ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ที่อุณหภมิ 35 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	56
9.	การเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ NaCl ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	57
10.	การเติบโตของเชื้อยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	58
11.	ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Aspergillus* สายพันธุ์ PS915 (a) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (b)	66
12.	ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Penicillium* สายพันธุ์ PS916 (a) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (b)	67
13.	ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Syncephalastrum* สายพันธุ์ PS917 (a) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (b)	68
14.	ปริมาณอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุต่าง ๆ กัน	76

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เต้าหู้ยี้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้จากการหมักเต้าหู้ด้วยเชื้อรา ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมบริโภคกันโดยทั่วไป เนื่องจากเป็นอาหารหมักที่ให้กลิ่น สี และรสชาติที่ดีแล้ว ยังให้คุณค่าทางโภชนาการอีกด้วย โดยเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้จากการหมักถั่วเหลือง ซึ่งเป็นแหล่งของสารอาหารโปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และวิตามิน ปัจจุบันรายงานวิจัยเกี่ยวกับการหมักเต้าหู้ยี้ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก เนื่องจากเทคนิคการผลิตส่วนใหญ่ถ่ายทอดกันมาเป็นความลับอยู่ในระบบครอบครัว จึงทำให้การศึกษากระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้เป็นที่น่าสนใจ

จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการผลิตเต้าหู้ยี้ คือ เชื้อรา สายพันธุ์ *Actinomucor elegans* (Chou and Hwan,1994) และ *Actinomucor taiwanensis* (Lu *et al.*, 1996) เมื่อเร็ว ๆ นี้ สิริพร ภูมะธน (2540) ได้รายงานเชื้อทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้จากโอ่งหมักต่าง ๆ ที่มีอายุตั้งแต่ 1 – 8 เดือน พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักได้แก่ *Aspergillus*, *Bacillus* และ *Saccharomyces* ส่วนตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่มีขายตามท้องตลาดหาดใหญ่ พบว่ามีเชื้อรา *Mucor* (สุวรรณี แสงแก้ว, 2543) ซึ่งจะเห็นได้ว่ายังไม่มีการรายงานของข้อมูลทางจุลชีววิทยาของกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ทั้งระบบ ดังนั้น การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการตรวจหาปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด, การเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน, การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน ตลอดจนตรวจสอบคุณภาพของเต้าหู้ยี้ โดยการตรวจหาปริมาณโปรตีน น้ำตาล ไขมัน เกลือ ความชื้น เถ้า เส้นใย ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และสารพิษอะฟลาทอกซินในกระบวนการผลิตทั้งระบบ และผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาด้านเทคโนโลยีในการผลิตเต้าหู้ยี้ให้มีความรวดเร็ว และมีคุณภาพที่ดีขึ้น

การตรวจเอกสาร

1. เต้าหู้ยี้ (Sufu)

เต้าหู้ยี้เป็นอาหารหมักพื้นเมืองของชาวจีนที่เปรียบได้กับเนยแข็งของชาวตะวันตก ทำจากถั่วเหลืองแทนน้ำนมวัวนิยมบริโภคกันแพร่หลายในประเทศจีนและยุโรปมาตั้งแต่สมัยโบราณ ใช้ปรุงอาหารร่วมกับผัก เนื้อสัตว์หรือทาขนมปัง เต้าหู้ยี้ หรือ sufu เป็นการออกเสียงเรียกตามภาษาจีน บางครั้งชาวจีนเรียก fu-ju หรือ tou-fu-ju พ่อค้าขายของชำชาวจีนเรียกว่า bean cake สำหรับนักวิทยาศาสตร์บางครั้งเรียกว่า chinese cheese (Wang and Hesseltine, 1970) นอกจากนี้มีการเรียกชื่อต่าง ๆ กันตามภาษาของประเทศที่ผลิต เช่น chao (เวียดนาม) tahuri (ฟิลิปปินส์) taokoan (อินโดนีเซีย) และ tao-hu-yi (ไทย) (ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536)

เต้าหู้ยี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำกันในครอบครัว ซึ่งนิยมบริโภคกันทั่วไปโดยใช้เป็นเครื่องปรุงรสในอาหารประเภทสุกี้ เย็นตาโฟ หรือนำมาบริโภคร่วมกับข้าวต้ม ลักษณะเต้าหู้ยี้ในบ้านเรามีอยู่ 2 ชนิด คือ เต้าหู้ยี้ชนิดสีเหลืองและเต้าหู้ยี้ชนิดสีแดง โดยมีจำหน่ายในท้องตลาดในลักษณะแบ่งจำหน่ายและบรรจุกระป๋อง ส่วนประกอบของเต้าหู้ยี้มีดังต่อไปนี้ ความชื้น 70.36% โปรตีน 10.04% เถ้า 9.47% เกลือ 6.72% ไขมัน 3.51% เส้นใย 0.35% (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2527) การผลิตเต้าหู้ยี้สมัยก่อนเป็นการผลิตแบบธรรมชาติ และตรวจพบเชื้อรา *Mucor sufu* (Wai, 1929) และประมาณ 40 ปีต่อมา ได้ตรวจพบเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ *Actinomucor elegans, M. hiemalis, M. silvaticus* และ *M. subtilissimus* (Wai, 1968) *A. elegans* เป็นเชื้อราที่ดีที่สุดในการผลิตเต้าหู้ยี้ซึ่งได้นำไปใช้ระดับอุตสาหกรรม โดยเชื้อราที่ดีจะต้องมีเส้นใยสีขาวออกเหลืองเพื่อจะให้ได้เต้าหู้ยี้ที่มีคุณภาพดี และควรเป็นเส้นใยที่หนาทึบเพื่อให้เกิดเป็นฟิลม์ที่แน่นอยู่ที่ผิวของเต้าหู้จะได้ไม่ทำให้รูปร่างเปลี่ยนไป และข้อสำคัญการเจริญของเชื้อราต้องไม่ทำให้เกิดกลิ่นหรือรสชาติไม่ดีหรือผลิตไมโคทอกซิน ก้อนเต้าหู้ที่มีเชื้อราเจริญขึ้นใหม่ ๆ จะมีรสจืดชืด เนื่องจากกลิ่นรสของเต้าหู้ยี้จะเกิดภายหลัง คือ ในระยะของการแช่น้ำเกลือและระยะ

ปม อย่างไรก็ตาม สี กลิ่น หรือรสชาติอาจดีขึ้น หากเติมข้าวแดง หรือถั่วเหลืองบด เพราะเมื่อใส่ในน้ำเกลือจะให้สีแดงแก่ผลิตภัณฑ์เกิดเป็นเต้าหู้ยี้แดง หรือเติมไวน์ในน้ำเกลือจะได้เต้าหู้ยี้ที่มีกลิ่นของแอลกอฮอล์ หรือใส่กลิ่นกุหลาบลงไปในระหว่างการบ่มจะมีกลิ่นหอมกุหลาบได้ผลิตภัณฑ์เป็นเต้าหู้ยี้กลิ่นกุหลาบ หัวเชื้อเริ่มต้นเต้าหู้ยี้ที่ใช้มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนและไขมันสูงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่มีความสำคัญต่อกลิ่นและรสชาติของเต้าหู้ยี้ ในกรณีเติมแอลกอฮอล์เข้าไปในน้ำเกลือ แอลกอฮอล์ที่ใส่จะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเกิดเป็นเอสเตอร์ที่มีกลิ่นหอมให้แก่เต้าหู้ยี้ นอกจากนี้แอลกอฮอล์ยังช่วยยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ต่าง ๆ อีกด้วย (ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536)

การเติมเกลือทำให้เต้าหู้ยี้มีรสเค็ม ขณะเดียวกันเกลือช่วยยับยั้งการเติบโตของเชื้อราและจุลินทรีย์ปนเปื้อน ที่สำคัญที่สุด คือ เกลือจะทำให้เกิดการปล่อยเอนไซม์โปรทีเอสที่จับอยู่กับเส้นใย (mycelium-bound proteases) กล่าวคือในระหว่างการหมัก เชื้อราที่ใส่เข้าไปจะเติบโตเฉพาะที่ผิวของเต้าหู้ โดยเส้นใยของเชื้อราจะไม่ไชทะลุก้อนเต้าหู้เข้าไป และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เชื้อราสร้างขึ้นก็ไม่ได้สร้างภายนอกเซลล์ แต่เป็นเอนไซม์ที่อยู่อย่างหลวม ๆ กับเส้นใยของเชื้อรา อาจโดยพันธะไอออนิก (ionic linkage) เอนไซม์เหล่านี้จะถูกชะออกได้โดยง่ายด้วยเกลือหรือสารละลายของเกลือไอออนิก (ionic salt solution) อื่น ๆ แต่ชะไม่ออกด้วยน้ำหรือเกลือที่ไม่ไอออนไนซ์ (non - ionizable salt) น้ำเกลือที่เติมจึงช่วยชะเอาเอนไซม์ออกจากเส้นใยของเชื้อราทำให้เอนไซม์สามารถซึมเข้าไปในก้อนเต้าหู้ ช่วยย่อยโปรตีนและไขมันต่อไป (ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536) ในการผลิตเต้าหู้ยี้พบว่า หลังจาก 30 วันของการบ่มที่อุณหภูมิห้องปริมาณไนโตรเจนชนิดละลายน้ำได้ทั้งหมดเพิ่มจาก 1.00% เป็น 2.74% และปริมาณไนโตรเจนชนิดไม่ละลายน้ำทั้งหมดลดลงจาก 7.89% เป็น 6.05% ในขณะที่ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเปลี่ยนแปลงน้อยมาก และพบว่าสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้ดังกล่าว ประกอบด้วย โปรตีน เพปไทด์ และกรดอะมิโนชนิดละลายน้ำได้ ซึ่งได้แก่ กรดกลูตามิก กรดแอสพาร์ทิก ลูซีน ไอโซลูซีน เซรีน และอะลานีน และเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเต้าหู้ยี้ ประกอบด้วย โปรตีน

55% และไขมัน 30% ไม่มีคาร์โบไฮเดรตที่หัวเชื้อเต้าหู้ยี้ใช้เป็นแหล่งพลังงานในวัตถุดิบ หัวเชื้อเต้าหู้ยี้จึงใช้คาร์บอนในกรดไขมันเป็นแหล่งพลังงานแทน ซึ่งพบว่าในระหว่างการบ่ม กรดไขมันบางส่วนในก้อนเต้าหู้จะถูกย่อยเป็นกรดไขมันอิสระ โดยพบว่าในระหว่างบ่ม ปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มจาก 12.8% เป็น 37.1% โดยปริมาณรวมของกรดไขมันไม่เปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามเต้าหู้ยี้ที่ชาวจีนนิยมบริโภคนั้น มีรสเค็มเกินไป ปัญหานี้แก้ไขได้ง่ายโดยลดความเข้มข้นของเกลือจาก 12% เป็น 3% ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะทำให้โปรติเอสที่อยู่กับเส้นใยของราหลุดออกช่วยย่อยโปรตีนและไขมันดังกล่าวแล้วข้างต้น (Wai, 1968)

Smith (1978) ได้รายงานว่า ในช่วงของการหมักเต้าหู้ยี้ เชื้อรามีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและไขมันสูง กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนดังกล่าวเกิดจากเชื้อ *M. hiemalis* 28 NRRL 3103 และ *A. elegans* พบว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ ย่อยโปรตีน ของ *M. hiemalis* อยู่ระหว่าง 3.0 - 3.5 ในขณะที่ pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน ของ *A. elegans* คือ 3.0 ,6.0 และ 9.0

ประเสริฐ สายสิทธิ์ (2527) รายงานว่า ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในช่วงของการหมักเชื้อรามีการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนขึ้น เพื่อย่อยสลายโปรตีน โดยพบว่าปริมาณของโปรตีนละลายได้เพิ่มขึ้น ในขณะที่โปรตีนไม่ละลายมีปริมาณลดลง ซึ่งช่วงหมักจะเป็นช่วงที่มีการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและไขมันสูง ทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะของเต้าหู้ยี้ รวมทั้งการใส่เหล้าแดงลงไปก็จะทำให้เกิดเอสเตอร์ และกรดอินทรีย์ ที่ช่วยเพิ่มกลิ่นของเต้าหู้ยี้ให้เป็นที่ยอมรับมากขึ้น

สิริพร ภูมะธน (2540) ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ ตรวจพบเชื้อรา คือ *Aspergillus*, *Syncephalastrum*, และ *Penicillium* ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus* สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและโปรตีนได้ดี นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ก็สามารถผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้ด้วย ดังนั้น เชื้อ *Aspergillus* และ *Bacillus* จึงน่าจะมีบทบาทขั้นแรกในการย่อยสับสเตรท คือ เต้าหู้

Chou และคณะ (1988) ได้ศึกษาผลของความชื้นและอุณหภูมิ ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Actinomucor taiwanensis* ในระหว่างการหมักเต้าหู้ยี้ พบว่า อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน , อะไมเลส , กาแลคโตซิเดส และไลเปส อยู่ระหว่าง 25 – 30 °ซ และ 97% ตามลำดับ

Chou and Hwan (1994) ได้ศึกษาถึงผลของเอทานอลและหัวเชื้อเริ่มต้น คือ *A. taiwanensis* และ *A. elegans* ต่อการย่อยสลายโปรตีนและไขมัน ในระหว่างการหมักเต้าหู้ยี้เป็นเวลา 75 วัน ที่อุณหภูมิ 25 °ซ พบว่า เมื่อเติม 10% เอทานอล ในน้ำเกลือ 12% ในระหว่างการหมักเต้าหู้ยี้ มีปริมาณของโปรตีนที่ละลายได้และกรดไขมันต่ำกว่าการหมักเต้าหู้ยี้ที่ไม่มีการเติมเอทานอล สำหรับหัวเชื้อเริ่มต้นไม่มีผลต่อปริมาณของโปรตีนที่ละลายได้ แต่เมื่อใช้ *A. taiwanensis* เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น พบว่า กรดไขมันมีปริมาณสูงขึ้น ในขณะที่เมื่อใช้ *A. elegans* เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาณกรดไขมันมีปริมาณลดลง

Lu และคณะ (1996) ได้ศึกษาพบว่า การทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์กูลตามิเนส ของเชื้อ *A. taiwanensis* มีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ เท่ากับ 65 ยูนิตต่อมก.โปรตีนมี yield 18% pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 8.0 และ 45 °ซ ตามลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตัน แต่กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย $HgCl_2$

กระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้

1. วัตถุดิบ

1.1 ถั่วเหลือง ควรมีขนาดเปลือกบาง ขั้วเมล็ดไม่มีสีดำ อายุไม่เกิน 6 เดือน ถ้าเก่ามากจะได้เต้าหู้ปริมาณน้อย

1.2 สารตกตะกอน แบ่งเป็น 4 ชนิด

1.2.1 สารประกอบคลอไรด์ ได้แก่ แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 .H_2O$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) น้ำทะเล สารพวกนี้จะให้ผลิตภัณฑ์มีรสหอมหวาน เนื้อแข็งเหมาะในการทำเต้าหู้ทอด ปริมาณที่ใช้ประมาณ 3% ของน้ำหนักถั่วเหลืองแห้ง

1.2.2 สารประกอบซัลเฟต ได้แก่ แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4.2H_2O$) นิยมใช้กันมากและมีราคาถูกที่สุด คนจีนเรียกว่า " เจี๊ยะกอ " จะให้เต้าหู้มีเนื้อนิ่ม เหมาะในการทำเต้าหู้อ่อน เต้าฮวย ปริมาณที่ใช้ประมาณ 2% ของน้ำหนักถั่วเหลืองแห้ง ส่วนแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) หรือดีเกลือ เป็นสารสีขาว รสขม เฝื่อน เหมาะในการทำเต้าหู้แข็ง

1.2.3 กลูโคโน เดลต้า แลคโตน (Glucono delta lactone) ใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุดในประเทศญี่ปุ่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำเต้าหู้แบบบรรจุถุง หรือเต้าหู้หลอด ซึ่งใช้ได้ผลดีกว่าตัวตกตะกอนชนิดอื่น แต่มีราคาแพง ปริมาณที่ใช้ในการทำเต้าหู้หลอด 1% ของน้ำหนักถั่วเหลืองแห้ง ให้สี กลิ่น รสชาติ และเนื้อเต้าหู้ยี้ที่ดีที่สุด

1.2.4 กรด กรดที่นิยมใช้มีทั้งกรดอินทรีย์ และกรดแร่ เช่น กรดเกลือ กรดมะนาว เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำผลไม้ในการตกตะกอนอีกด้วย เช่น น้ำส้มคั้น น้ำมะนาว น้ำสับปะรด ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะกรอบ หักง่าย มีรสเฝื่อนเล็กน้อย (นิศานาถ ชัยงาม, 2540)

จากการทดลองของนักวิจัยหลายท่าน ได้ให้ข้อสรุปในทางเดียวกัน คือ พบว่า แคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4.2H_2O$) เป็นสารตกตะกอนที่ดีและมีราคาถูกหาได้ง่าย การใช้แคลเซียมในอัตราน้อย คือ น้อยกว่า 8 mM ไม่เกิดการจับตัวเป็นเต้าหู้ แต่อาจจะทำให้น้ำนมนั้นข้นขึ้น และถ้าใช้ประมาณ 10 mM ของ $CaSO_4.2H_2O$ จะเกิดเป็นตะกอนบางส่วนที่ไม่สมบูรณ์ โดยที่ไม่สามารถนำมากดเป็นเต้าหู้ได้ ดังนั้นความเข้มข้นของสารตกตะกอนควรอยู่ระหว่าง 20 – 40 mM ยกเว้น Glucono delta lactone (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2527)

2. การผลิตเต้าหู้

2.1 การเตรียมน้ำนมถั่วเหลือง

ล้างเมล็ดถั่วเหลือง เอาเปลือกออกหรือไม่ก็ได้ นำไปแช่น้ำค้างคืน (16 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 20 °ซ เติมน้ำลงในถั่วเหลืองในอัตราส่วนของ น้ำ : ถั่วเหลือง เท่ากับ 10 : 1 บดจนละเอียด นำน้ำเต้าหู้ (น้ำนมถั่วเหลือง) ที่ได้ไปต้มให้เดือดนาน 20 นาที นำไปกรองผ่านผ้าขาวบางสองชั้น เพื่อเอาตะกอนที่ไม่ละลายน้ำออก ได้เป็นน้ำนมถั่วเหลือง ทำให้เย็น 80 – 85 °ซ การต้มมีจุดม่งหมาย คือ ทำลายสารบางชนิดในถั่วเหลืองที่ทำให้ร่างกายได้ประโยชน์น้อยลง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการรักษาคุณค่าทางโภชนาการได้มากที่สุด และไม่ทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของเต้าหู้เสียไป คือ การใช้ความร้อนประมาณ 93 °ซ 10 – 15 นาที, ทำให้นมมีกลิ่นดีขึ้น, เก็บได้นาน, สกัดนมได้ง่าย และเปลี่ยนโปรตีนให้อยู่ในรูปที่ตกตะกอนได้ง่าย

2.2. การตกตะกอนโปรตีน เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เพราะมีปัจจัยและสภาวะหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง อาจมีผลต่อผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ปริมาณสารตกตะกอน การใช้ปริมาณที่เหมาะสมทำให้ได้หางนมใส ถ้าน้อยเกินไปหางนมจะขุ่น โปรตีนตกตะกอนไม่หมด แต่ถ้าใช้มากเกินไป ปริมาตรของเต้าหู้จะลดลงเนื้อแข็งและมีรสขม, ความเข้มข้นของนมถั่วเหลืองถ้าข้นมากปริมาณสารที่ใช้ก็มากด้วย, อุณหภูมิขณะทำการตกตะกอน ถ้าอุณหภูมิสูงจะเกิดปฏิกิริยาเร็ว ถ้าใช้สารตกตะกอนน้อยเต้าหู้ที่ได้มีเนื้อแข็งหยาบ, การผสมขณะตกตะกอนต้องไม่แรงมากนัก ถ้าคนแรงมากตะกอนจะแข็งกระด้างและมีฟองอากาศ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 อุณหภูมิและปริมาณของสารตกตะกอนที่ใช้ในการทำเต้าหู้แข็ง

สารตกตะกอน	ปริมาณ (% ของนน. ถั่วแห้ง)	อุณหภูมิ (°ซ)
สารประกอบคลอไรด์	3.0	78-85
แมกนีเซียมซัลเฟต	2.2	75-80
แลคโตน	3.0	90
น้ำมะนาว	21.0	80-90
น้ำส้ม	16.4	80-90

ที่มา : สิริพร ภูมะธน (2540)

2.3 การกำจัดหางนมน้ำใส ๆ ที่เหลือจากการจับตัวเป็นก้อนของโปรตีน ต้องกำจัดออกไปส่วนหนึ่งก่อนที่จะนำก้อนโปรตีนใส่ลงในแบบพิมพ์ จะทำให้เต้าหู้จับตัวเป็นก้อนได้ดีขึ้น และก่อนเข้าแบบพิมพ์ ทำให้เย็นเหลือ 50 °ซ

2.4 การกดทับ ทำให้โปรตีนจับเป็นก้อนแข็ง ลดความชื้น ระยะแรกกดทับด้วยน้ำหนักน้อยประมาณ 2 - 4 กรัม/ตร.ซม. นาน 20 – 30 นาที หลังจากนั้นยกแบบพิมพ์แช่ลงในน้ำเย็น คว่ำเต้าหู้ออก การแช่น้ำจะช่วยให้การแกะออกจากแบบพิมพ์ได้ง่ายโดยไม่ติดผ้า

3. การผลิตเต้าหู้ยี้

การผลิตเต้าหู้ยี้ สามารถทำได้ 4 วิธี ดังต่อไปนี้

วิธีที่ 1 เริ่มจากการทำเต้าหู้แข็ง เมื่อได้แผ่นเต้าหู้แล้วก็นำมาตัดเป็นก้อนที่มีขนาดตามต้องการ จากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อโดยตู้อบ ที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งการอบนี้ทำให้เต้าหู้มีน้ำลดลงและทำให้ลักษณะก้อนเต้าหู้แข็งขึ้น ในการทำขั้นตอนนี้บางแห่งอาจนำเต้าหู้ไปแช่ในน้ำเกลือ 6% ที่มีกรดซิตริก 2.5% เป็นเวลา 1 คืน ก่อนนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 °ซ 10 นาที หรือผึ่งแดดจนหมาด ๆ จากนั้นก็นำมาใส่เชื้อรา *Actinomucor elegans* โดยการเอาเต้าหู้ที่เย็นแล้วใส่ในถาดโปร่งปรุเพื่อให้มีอากาศถ่ายเทได้ดี และเพื่อให้เชื้อราเติบโตรอบก้อนเต้าหู้ได้ หลังจากใส่เชื้ออาจจะใส่แป้งลงไปเล็กน้อย แล้วนำไปบ่มเพื่อให้เชื้อเติบโตที่อุณหภูมิประมาณ 20 °ซ เป็นระยะเวลา 3 – 7 วัน จะมีเส้นใยของเชื้อราเติบโตขึ้นเต็มโดยรอบ มีลักษณะสีขาวและมีกลิ่นดี ในช่วงนี้เต้าหู้มีความชื้นประมาณ 74% โปรตีนไม่ละลาย 11% โปรตีนละลายได้ 1.3% และไขมันประมาณ 4.3% เมื่อได้เต้าหู้ที่มีเชื้อเติบโตดีแล้วจึงนำเอาเต้าหู้ไปหมักในน้ำเกลือ โดยการเรียงเต้าหู้ลงในถังหมักโดยรอบข้างเป็นชั้น ๆ และเว้นช่องตรงกลางไว้ และใช้เกลือโรยรอบ ๆ เป็นระยะ ๆ จำนวนเกลือที่ใช้เทียบเป็นปริมาณน้ำเกลือ 12% และใส่ไวน์แดงปริมาณ 10% แล้วปิดฝาหมักไว้เป็นระยะเวลา 1.5 – 2 เดือน สารเติมแต่งที่อาจใช้ทำให้เต้าหู้มีรสดีมากขึ้นและใส่ในช่วงหมักได้แก่ พริกแดง ขิง ผงพะโล้ เต้าเจี้ยวบด และข้าวแดงที่เรียกกันว่า อังกั๊ก เพื่อทำเป็น

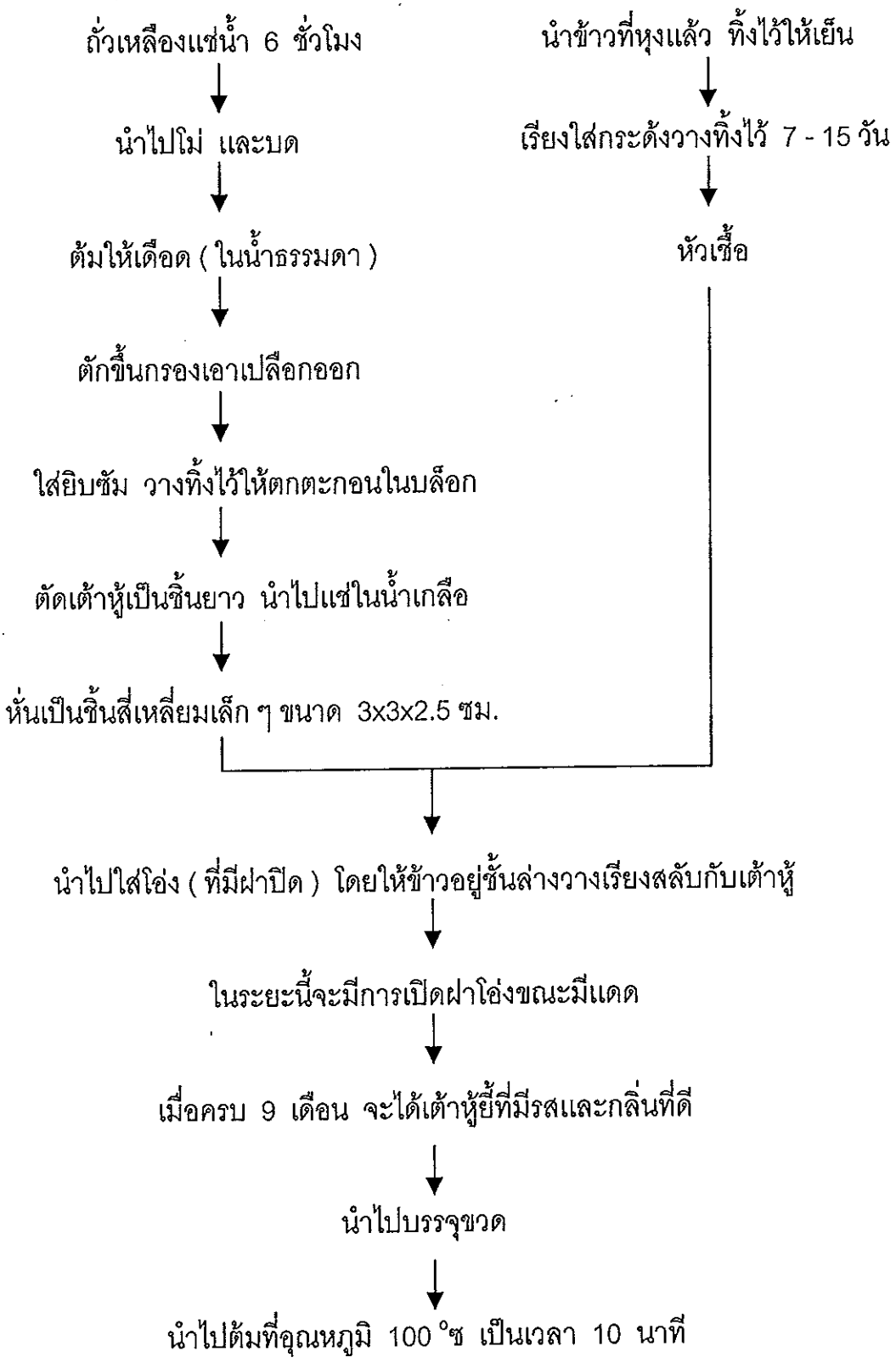
เต้าหู้ยี้ชนิดสีแดงซึ่งทำจากเชื้อ *Monascus purpureus* ให้สารสีแดงของ monascarubrin , $C_{12}H_{22}O_5$ (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2527)

วิธีที่ 2 ใช้ส่วนผสมของเต้าหู้ขาวชนิดแข็ง 4 แผ่น เกลือ ½ ถ้วย (93 กรัม) ซีอิ้วขาว 1¼ ถ้วย (300 กรัม) ผงพะโล้ 1 ช้อนชา (5 กรัม) เหล้าโรงหรือเอทิลแอลกอฮอล์ 20 ซีซี ข่า 7 ช้อนชา (30 กรัม) เต้าเจี้ยว 1 ถ้วย (150 กรัม) น้ำตาลทราย 2 ช้อนชา (10 กรัม) น้ำ ½ ถ้วย วิธีทำเริ่มจาก หั่นเต้าหู้ขาวให้เป็นก้อนสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ แล้วแช่ในน้ำเกลือ 4% เตรียมโดยใช้เกลือ ¼ ถ้วยต่อน้ำ 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด กรอง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ทิ้งเต้าหู้ที่แช่น้ำเกลือไว้ค้างคืน จากนั้นนำเต้าหู้ที่แช่น้ำเกลือไปตากแดดให้ผิวตึงหมาด ๆ แล้วเรียงใส่ขวดโหล นำส่วนผสมดังกล่าวไปตีปั่นให้ละเอียดหรือต้มให้เดือด ในกรณีที่ใช้วิธีต้มอย่าเพิ่งเติมเหล้าโรงหรือเอทิลแอลกอฮอล์ ต้องต้มให้เสร็จก่อน แล้วค่อยเติมทีหลังเพื่อป้องกันการระเหย เทลงไปในขวดที่เรียงเต้าหู้ไว้แล้วปิดฝาขวดโหลเก็บไว้ประมาณ 70 วัน นำไปบริโภคได้ (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2527)

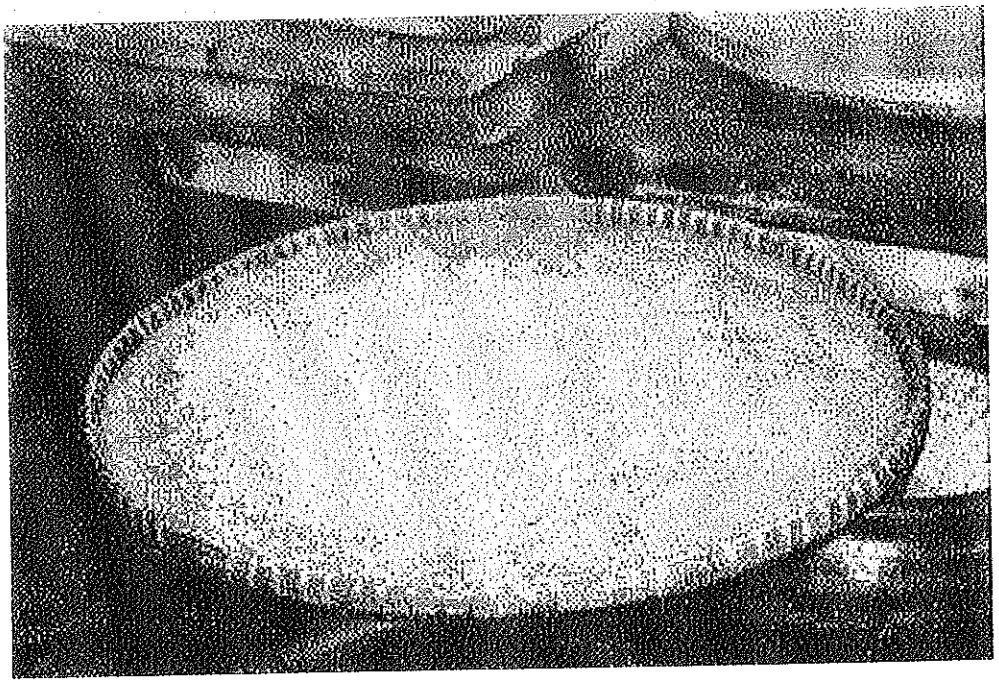
วิธีที่ 3 ตัดเต้าหู้ให้ได้ขนาด 2.5 x 3 x 2 เซ็นติเมตร แช่ก้อนเต้าหู้ในสารละลายที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์ 6% กับกรดซิตริก 2.5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปผ่านไอความร้อนอุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อนไม่ให้เติบโต โดยไม่มีผลต่อเชื้อราที่จะใส่เข้าไปในการทำเต้าหู้ยี้ในภายหลังแยกก้อนเต้าหู้ออกจากกันวางในถาดซึ่งมีรูที่ก้น เพื่อช่วยให้อากาศถ่ายเทได้ดี เหมาะแก่การเกิดเส้นใยของรา ทำให้เย็นตัวลง จากนั้นใส่หัวเชื้อ *Actinomucor elegans* ลงบนผิวของเต้าหู้ นำก้อนเต้าหู้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 °ซ หรือต่ำกว่า เป็นเวลา 3 – 7 วัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ จนก้อนเต้าหู้มีเส้นใยของเชื้อราสีขาวขึ้นฟูอยู่รอบ ๆ จากนั้นนำก้อนเต้าหู้ที่มีเส้นใยสีขาวของราขึ้นเต็มไปแช่ในน้ำเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วแต่งกลิ่นของเต้าหู้ยี้ที่ต้องการจะผลิต ซึ่งปกตินิยมใช้โซเดียมคลอไรด์ 12% ผสมกับไวน์ข้าวเจ้าที่มีเอทิลแอลกอฮอล์ 10% และมักจะเติมสารสีที่ให้สี กลิ่นและรส เช่น ข้าวแดง ถั่วเหลืองบดหรือข้าวบดในกรณีผลิตเต้าหู้แดง นำก้อนเต้าหู้ไปบ่มนานประมาณ 40 - 60 วัน จนได้เต้าหู้ยี้ที่มีลักษณะคล้ายเนยแข็งมีกลิ่นอ่อน ๆ

จากนั้นนำไปบรรจุขวดและผ่านการพาสเจอร์ไรส์เพื่อฆ่าเชื้อ และนำไปบริโภคได้ (ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536)

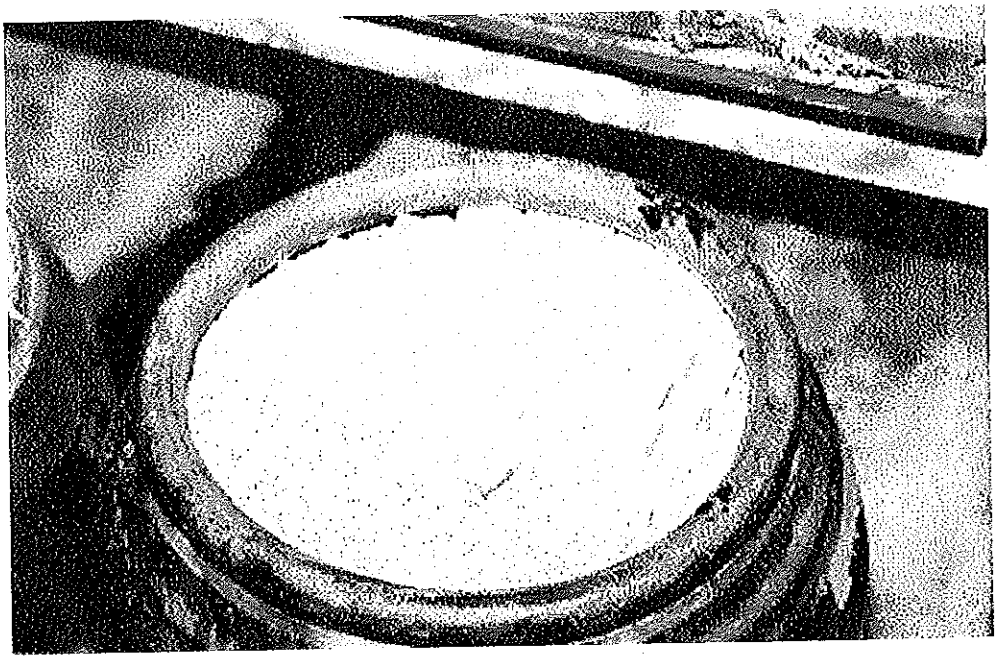
วิธีที่ 4 เป็นวิธีทำเต้าหู้ยี้ของโรงงานเต้าหู้ยี้เสวย ซึ่งใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ซึ่งทำโดยตัดเต้าหู้แข็งเป็นชิ้นยาว นำไปแช่น้ำเกลือ แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 3 x 3 x 2.5 เซ็นติเมตร และเตรียมหัวเชื้อโดยการนำข้าวที่หุงแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเกลี่ยลงบนกระด้งวางทิ้งไว้ประมาณ 7 – 15 วัน (เชื้อราใช้เวลาในการเจริญไม่เท่ากันในข้าวแต่ละชนิด) นำเต้าหู้และหัวเชื้อที่เตรียมไว้เรียงใส่โอ่งที่มีฝาปิด โดยให้ข้าวอยู่ชั้นล่าง วางเรียงสลับกับเต้าหู้ หมักทิ้งไว้ 9 เดือน ระหว่างทำการหมักมีการเปิดฝาโอ่งขณะมีแดด เมื่อครบ 9 เดือน จะได้เต้าหู้ยี้ที่มีรส กลิ่นที่ดีและมีสีเหลือง นำไปบรรจุขวด แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 10 นาที (รูปที่ 1, 2)



รูปที่ 1 ขั้นตอนการผลิตเต้าหู้ยี้วิธีที่ 4



a



b

รูปที่ 2 โคจิ (Koji) หัวเชื้อเริ่มต้น (a)
การหมักเต้าหู้ยี้ในโอ่งหมักวันแรก (b)

2. เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme)

เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Protease) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ (peptide hydrolase ; EC. 3.4) ภายในโมเลกุลโปรตีนให้เป็นสายเปปไทด์สั้น ๆ และกรดอะมิโน ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1. เปปทิเดส (peptidase; EC. 3.4.11-19) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการตัดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณปลายสายเปปไทด์ (exocleaving peptidase) ได้แก่ อะมิโนเปปทิเดส (aminopeptidase; EC. 3.4.11), ไดเปปทิเดส (dipeptidase; EC. 3.4.13) และคาร์บอกซีเปปทิเดส (carboxypeptidase; EC. 3.4.16-18)

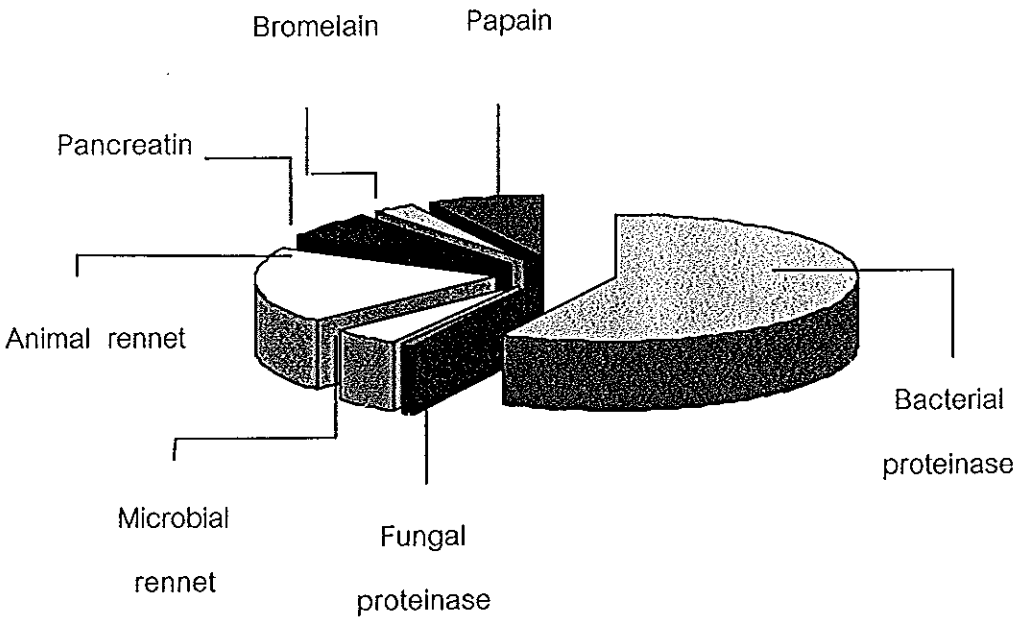
2. โปรติเนส (proteinase; EC. 3.4.21-24) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายเปปไทด์ (endocleaving peptidase) ได้แก่ ซีรีนโปรติเนส (serine proteinase) ซีสเตอีน โปรติเนส (cysteine proteinase; EC. 3.4.22) แอซิดโปรติเนส (acid proteinase; EC. 3.4.23) และ เมทาลโลโปรติเนส (metalloproteinase; EC. 3.4.24) (Ward,1983)

2.1 แหล่งของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

เอนไซม์ย่อยโปรตีนพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่เป็นพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สำหรับเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มาจากพืช ได้แก่ ปาเปน (papain) และ ไคโมปาเปน (chymopapain) จากยางมะละกอ (papain latex) ฟิซิน (ficin) จากยางของผลมะเดื่อ (fig latex) และโบรมีเลน (bromelain) จากน้ำสับปะรด (pineapple juice) (Yamamoto, 1990) เอนไซม์ปาเปนเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีกลุ่ม thiol ซึ่งพบในมะละกอ เป็นเอนไซม์ชนิดที่ทำงานในพีเอชช่วง 7.0 ถึง 8.0 ปาเปนเป็นเอนไซม์เอนโดเปปติเดสมีส่วนคล้ายกับ อีลาสเทส โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 23,400 ดาลตัน ส่วนเอนไซม์โบรมิเลนจากสับปะรด ที่มีความเสถียรที่พีเอช 4.5 ถึง 6.5 แต่สามารถทำงานย่อยสลายได้ดีที่ พีเอช 7.0 ถึง 8.0 (Christopher and Robert, 1981)

ส่วนเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีแหล่งกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น เรนนิน (rennin) และเปปซิน (pepsin) จากกระเพาะอาหาร, ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และทริปซิน (trypsin) จากตับอ่อนนั้น เป็นที่ศึกษากันอย่างกว้างขวาง (Yamamoto, 1990) โดยไคโมทริปซิน ทริปซิน อีลาสเทส ซึ่งหลั่งมาจากตับอ่อนนั้น เป็นโกลบูลาร์โปรตีน ถูกสังเคราะห์ที่ตับอ่อนในรูป zymogen ที่ยังทำงานไม่ได้ และจะถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยการย่อยซึ่งเกิดที่ลำไส้เล็ก ไคโมทริปซินเป็นเอนไซม์ที่อยู่นอกเซลล์ ซึ่งเป็นอาหารประเภทโปรตีนในทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ถูกสังเคราะห์ที่ตับอ่อนในรูปไคโมทริปซิโนเจน ซึ่งเป็นโปรเอนไซม์ สามารถทำงานได้เมื่อถูกย่อยด้วยทริปซิน ในสภาพธรรมชาติไคโมทริปซินจะย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน แต่ในหลอดทดลองเอนไซม์สามารถย่อยสลายสารประเภทเอสเทอร์ และเอไมด์ได้ (Christopher and Robert, 1981) ส่วนทริปซินเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนประกอบด้วย กรดอะมิโนที่มีประจุบวกอยู่ทางด้าน side chain มีคุณสมบัติย่อยพันธะเปปไทด์ทางด้านคาร์บอกซิลของไลซีน และอาร์จีนีนได้ ในทางด้านอุตสาหกรรมใช้ทริปซินในการทำให้หนังสัตว์อ่อนนุ่ม (Leadly, 1978)

สำหรับเอนไซม์ย่อยโปรตีนของจุลินทรีย์ มักเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ ทั้งนี้เพื่อใช้ย่อยโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมภายนอก ให้ได้กรดอะมิโน สำหรับดูดซึมเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเติบโต (Ward, 1983) เอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เอนไซม์ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายส่วนใหญ่ได้จากแบคทีเรีย ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 60 ของการใช้เอนไซม์ทั้งหมด (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 สัดส่วนของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ
ที่มา : Rehn and Reed (1987)

2.2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic microorganisms)

แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีหลายชนิด เช่น *Clostridium sporogenes, C. perfringens, C. bifermentans, C. histolyticum, C. putrefaciens, C. leutroputrescens, Bacillus cereus, B. subtilis, B. megaterium, Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Acromobacter* sp., *Proteus* sp., *Flavobacterium* sp., *Microbacterium thermophatum, Micrococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. (วนิดา ฤทธิเดช, 2542)

Priest (1977) พบว่า *Bacillus* sp. เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น Facultative thermophilic *B. liceniformis* สามารถผลิตเอนไซม์ทนความร้อนชนิด alkaline proteinase, strict thermophilic *B. thermoproteolyticus* และ *B. stearothermophilus* สามารถผลิตเอนไซม์ทนความร้อนชนิด neutral proteinase

Woods and Kinsella (1980) พบว่า ยีสต์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น ไรโบนิวคลีเอส และ โปรตีเอส โดย *Saccharomyces carlbergensis* ผลิตเอนไซม์ neutral serine protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางการค้า

Fogarty (1983) พบว่า มีแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Bacillus* sp. เช่น *Bacillus liceniformis* ผลิตเอนไซม์ทนร้อนชนิด alkaline proteinase ส่วน *B. thermoproteolyticus* และ *B. stearothermophilus* ผลิตเอนไซม์ทนความร้อนชนิด neutral proteinase

วราวุฒิ ครูสง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต (2532) พบว่า เชื้อ *Aspergillus oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ และยังแบ่งเอนไซม์โปรติเอสออกได้หลายชนิด ทั้งในลักษณะที่เป็น กรด, ด่าง หรือกลาง

เอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ อุตสาหกรรมเนยแข็ง เบียร์ ไวน์ เนื้อสัตว์ ธัญพืช อุตสาหกรรมการฟอกหนัง อุตสาห

กรรมผงซักฟอก ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ผลิตภัณฑ์จากไข่ และอาหารสัตว์ เป็นต้น (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

3. **เอนไซม์ย่อยแป้ง** (Amylolytic enzyme)

เอนไซม์อะไมเลสแบ่งออกเป็น 5 ชนิด คือ อัลฟาอะไมเลส (α - amylase), เบต้าอะไมเลส (β - amylase) โดยทั้งสองชนิดนี้สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α-(1,4), กลูโคอะไมเลส (γ - amylase) จะย่อยพันธะ α-(1,4) ได้ดีกว่าการย่อยพันธะ α-(1,6) และ α-(1,3) ส่วนพูรูลาเนส (pululanase) และไอโซอะไมเลส (isoamylase) จะย่อยพันธะ α-(1,6) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

เอนไซม์ย่อยแป้งสามารถพบในน้ำลาย ตับอ่อน ข้าวมอลต์ ข้าวบาเลย์และจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไกโคซิดิกบอนด์ (glycosidic bond) ชนิด α-(1,4) ของโพลีแซกคาไรด์ เช่น แป้ง ไกลโคเจนหรือเกิดจากการไฮโดรไลซีสของแป้งและไกลโคเจน จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งมีทั้งแบคทีเรีย ราและยีสต์ เช่น *Bacillus polymyxa, B. liceniformis, Pseudomonas, Endomycopsis fibuligera, E. hordei, E. capsularis, Aspergillus niger, A. candidus, A. oryzae, Rhizopus* sp. และ *Mucor* เป็นต้น

การใช้ประโยชน์เอนไซม์อะไมเลสในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ซอคโกเลต โกโก้ ขนมหวาน น้ำเชื่อม ผลิตภัณฑ์ธัญญพืช เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ และอุตสาหกรรมทอผ้า เป็นต้น (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

4. **เอนไซม์ย่อยไขมัน** (Lipolytic enzyme)

เอนไซม์ย่อยไขมันทำหน้าที่ ในการย่อยไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล เอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายชนิด เช่น ไฮโดรไลซีส (hydrolysis)

ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (tranesterification) (ซึ่งประกอบด้วย acidolysis, alcoholysis, ester exchange และ aminolysis) และการสังเคราะห์เอสเตอร์ เป็นต้น (ฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์, 2541)

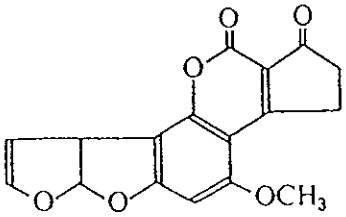
ไลเปสพบได้ทั่วไปในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากธรรมชาติหรือที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งจะผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งที่อยู่ภายในเซลล์และปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (Balcalo *et al.*, 1996) ไลเปสที่พบในพืช เช่น เมล็ดละหุ่ง (castor bean) ธัญพืช (cereal grains) พวกข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวบาเล่ย์ สำหรับไลเปสในสัตว์พบทั่วไปในเนื้อเยื่อ อวัยวะของสัตว์ เช่น หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และซีรั่ม ซึ่งแหล่งสำคัญที่พบไลเปสมากที่สุด คือ ตับอ่อน (Shahani, 1975) ส่วนไลเปสจากจุลินทรีย์ปัจจุบันได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีความคงตัวสูงกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ และสามารถผลิตในปริมาณมากเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วย โดยวิธีการปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตได้ง่ายจึงนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมและการวินิจฉัยโรค (Malcata *et al.*, 1992) จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการผลิต ยีตส์ที่นิยมนำมาผลิตไลเปสทางการค้า ได้แก่ *Candida cylindracea* หรือ *Candida rugosa* สำหรับราที่ผลิตไลเปสอยู่ในกลุ่ม *Rhizomucor* และพบว่า *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันได้ปริมาณสูงและมีความคงตัวดี (Sugihara *et al.*, 1988) แบคทีเรียที่นิยมผลิตไลเปสทางการค้าได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas*, *Bacillus* และ *Staphylococcus* (Kazlauskas and Bornscheuer, 1977)

การนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ประโยชน์ เช่น อุตสาหกรรมอาหารและยา ผงซักฟอก เครื่องสำอาง เครื่องหนัง รวมทั้งการบำบัดน้ำเสียจากชุมชน และโรงงาน (ฉัตรชัย สังข์ผุด, 2542)

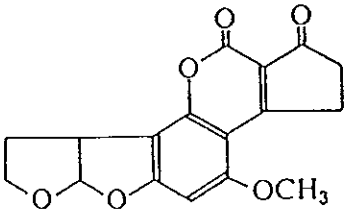
Central Library
Prince of Songkla Univ.

5. อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin)

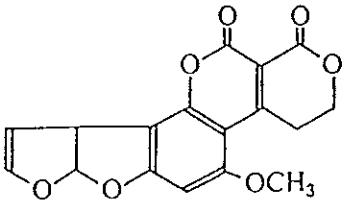
อะฟลาทอกซิน จัดเป็น secondary metabolite ซึ่งเป็นสารพิษที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ เช่น *A. parasiticus, A. niger, A. ochraceous, A. ruber, A. wentii, Penicillium citrinum, P. puberrulum, P. variable* และ *Rhizopus* spp. (Goldblatt, 1968) เชื้อราเหล่านี้พบได้ทั่วไปเขตร้อนชื้น สารพิษอะฟลาทอกซินเป็นสารอินทรีย์ แบบวงแหวน ประเภท heterocyclic compounds จัดอยู่ในกลุ่ม diflanocoumarin เป็นสารที่ไม่อิ่มตัว ตามธรรมชาติซึ่งเป็นสารเฉื่อย (inert) สามารถเปลี่ยนเป็นสารที่ไว (active) ได้ทั้งในและนอกร่างกาย ไม่ละลายในน้ำแต่ละลายใน polar solvents เช่น เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม อีเธอร์ และอะซีโตน (ธรรมศักดิ์ สมมาตย์, 2533) ไม่ละลายในปิโตรเลียมอีเธอร์และเฮกเซน มีน้ำหนักโมเลกุล 312 – 320 ดาลตัน และมีจุดหลอมเหลวสูงถึง 270 – 290 °ซ เรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และเสียสภาพอย่างไม่สมบูรณ์ในสารละลายกรดหรือด่างที่มีความเข้มข้นสูง (สุธน วงษ์ชีรี, 2529) ตามธรรมชาติสารพิษอะฟลาทอกซินมีอยู่ 4 ชนิด คือ B_1 , B_2 , G_1 และ G_2 ซึ่งมีสูตรโครงสร้างเคมีคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 4) แต่สารพิษในกลุ่มนี้ยังมีอนุพันธ์อื่น ๆ ที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้น และจากกระบวนการเมตาบอลิสมเมื่ออยู่ในร่างกายมนุษย์และสัตว์ เช่น B_1 aldehyde, $B_{1\alpha}$, 3- hydroxyaflatoxin B_1, 1- acetoxy-aflatoxim B_2, 1-ethoxy-aflatoxim B_2, 1-methoxy- aflatoxim B_2, $B_{2\alpha}$, B_3, 2-mothoxy- aflatoxim B_2, D_1, delshydro D_1, H_1, M_1, M_2, P_1, P_2, Q_1, GM_1,1-ethoxy-aflatoxin G_2, RB_1, RB_2 และ R_0 (Miloslav, 1983) ความแตกต่างทางชีวเคมีของสารพิษ 4 ชนิดนี้มีผลเนื่องมาจากความแตกต่างทางโครงสร้างเคมี กล่าวคือ ถ้ามี pentanone ring และพันธะคู่ในวงแหวนที่ 1 จะมีฤทธิ์รุนแรงกว่าโครงสร้างแบบอื่น ๆ โดยพบว่าอะฟลาทอกซินชนิด B_1 และ G_1 มี double bond ที่ ring ที่ 1 ส่วนอะฟลาทอกซินชนิด B_2 และ G_2 ไม่มี และกลุ่มอะฟลาทอกซิน B จะแตกต่างจากกลุ่ม G โดยมี lactone group ใน ring ที่ 5 ของกลุ่ม G ระดับการเกิดพิษจึงเรียงจากมากไปน้อยได้ดังนี้ อะฟลาทอกซินชนิด B_1, G_1, B_2 และ G_2 (สุธน วงษ์ชีรี, 2529)



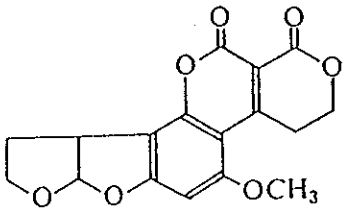
อะฟลาทอกซินบีหนึ่ง



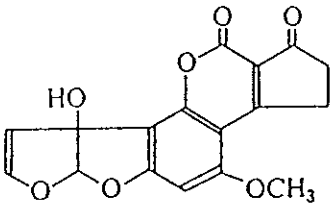
อะฟลาทอกซินบีสอง



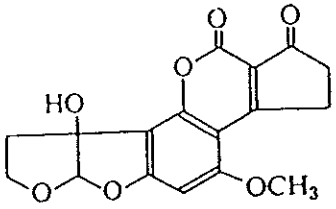
อะฟลาทอกซินจีหนึ่ง



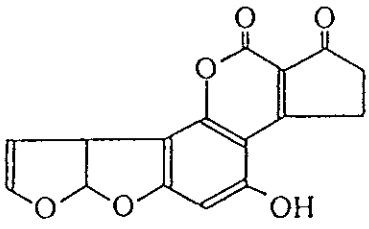
อะฟลาทอกซินจีสอง



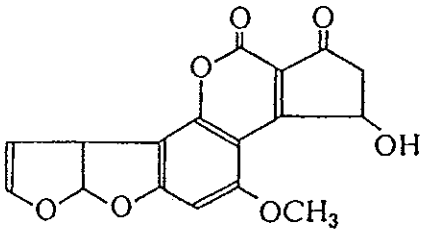
อะฟลาทอกซินเอ็มหนึ่ง



อะฟลาทอกซินเอ็มสอง



อะฟลาทอกซินพีหนึ่ง



อะฟลาทอกซินคิวหนึ่ง

รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ (นิธิยา และ วิบูลย์ รัตนาปนนท์, 2543)

อะฟลาทอกซินสามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ทั้งมนุษย์และสัตว์ที่บริโภคอาหารที่มีสารพิษเหล่านี้เข้าไปโดยจะชักนำให้เกิด mutagenic activity และทำลาย DNA (Subhkij, 1989) รายงานฉบับแรกที่รายงานถึงโรคที่มีสาเหตุมาจากอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1960 ในประเทศอังกฤษ คือ turkey X disease เมื่อไก่งวงประมาณ 100,000 ตัวได้ตายภายในเวลา 1 สัปดาห์ ภายหลังจากการศึกษาสาเหตุโดยสถาบันผลิตผลเมืองร้อน (Tropical Product Institute) ร่วมกับ Central Veterinary ของประเทศอังกฤษ พบว่า สาเหตุการล้มตายของไก่งวงนั้นไม่ได้เกิดจากเชื้อไวรัสหรือผลตกค้างของสารกำจัดแมลง แต่เกิดจากอาหารสัตว์ที่มีกากถั่วลิสงเป็นส่วนผสม ซึ่งส่งมาจากประเทศบราซิลและมีเชื้อรา *Aspergillus flavus* ปะปนอยู่ เชื้อราดังกล่าวผลิตสารพิษชนิดหนึ่งและเรียกชื่อต่อมาว่า อะฟลาทอกซิน (Sargeant *et al.*, 1961) อะฟลาทอกซินไม่ได้เป็นสารก่อมะเร็งปฐมภูมิแต่จัดเป็นโปรมิวตาเจน (promutagen) และโปรทอกซิน (protoxin) คือ เมื่อกินสารนี้เข้าไปจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในเมแทบอลิซึมเป็นสารที่มีพิษและออกฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ ผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า อะฟลาทอกซินสามารถทำให้เกิดมะเร็งที่ตับ ปอด ไต และลำไส้ใหญ่ แต่ตับเป็นอวัยวะเป้าหมายที่ได้รับพิษของอะฟลาทอกซินไวที่สุด และทำให้เกิดมะเร็งที่เซลล์ตับ (นิธิยา และ วิบูลย์ รัตนาปนนท์, 2543) พิษจากอะฟลาทอกซินก่อให้เกิดโรคมะเร็งในตับ หรือในระบบทางเดินอาหาร เป็นอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงแทบทุกชนิด ตั้งแต่เป็ด ไก่ ปลา ไปจนถึง วัว ควาย แพะ แกะ และสุกร โดยเฉพาะกับสัตว์ที่มีอายุยังน้อย สัตว์แต่ละชนิดมีความทนทานต่อสารพิษชนิดนี้แตกต่างกัน เป็ดเป็นอันตรายจากสารนี้ได้ง่ายที่สุด ไก่มีความทนทานพอสมควร สุกร วัว และควาย ก็เป็นอันตรายจากสารนี้ได้ง่าย ส่วนแกะมีความต้านทานค่อนข้างสูง สัตว์ตัวเมียจะทนทานต่อสารนี้มากกว่าสัตว์ตัวผู้ (อารันต์ พัฒโนทัย, 2528) Bryden (1982) ได้รวบรวมผลงานทดลอง แสดงถึงอัตราการตาย 50% (LD_{50}) ของสัตว์ต่าง ๆ เมื่อได้รับอะฟลาทอกซินชนิด B_1 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 อัตราการตาย 50% (LD_{50}) ที่เกิดกับสัตว์ต่าง ๆ เมื่อได้รับสารอะฟลาทอกซินชนิดบี 1

ชนิดของสัตว์	LD_{50} *
เป็ด	0.34
ไก่งวง	1.36
ไก่	6.5 – 16.5 +
หมู	0.62
ลูกวัว	1.6
แกะ	2.0
ปลาเทราท์	1.0
ปลาแซลมอน	12.5
แมว	0.55
สุนัข	1.0
ลิง	2.2
หนูตะเภา	1.4
หนู (rat)	7.2 - 16.0
หนู (mice)	9.0
หมู (เพศผู้ โตเต็มที่)	7.2
(เพศเมีย โตเต็มที่)	17.9

* mg อะฟลาทอกซินบี 1 ต่อ 1 กก. ของน้ำหนักสัตว์

\+ แปรผันตามสายพันธุ์

ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินแปรผันตามชนิด อายุ น้ำหนัก ปริมาณ เพศ ช่องทาง ระยะเวลาที่ได้รับและภาวะโภชนาการ อวัยวะแรกที่ได้รับผลกระทบคือ ตับ ลักษณะเด่นที่ปรากฏ คือ การเจริญช้าลง กินอาหารน้อย น้ำหนักลด สำหรับอาการอื่นที่ปรากฏร่วม เช่น มีไขมันแทรกในตับ ท้องมาน บวมน้ำ ท่อน้ำดีเกิดการขยายตัวใหญ่ขึ้น และ มะเร็งตับ ซึ่งอาการที่ปรากฏเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ (Cole and Cox, 1981) การได้รับสารนี้เป็นปริมาณมากอาจมีผลทำให้สัตว์ตายได้ (lethal dose) หากลดปริมาณให้น้อยลง (sub-lethal dose) จะทำให้เกิดพิษเรื้อรัง และถ้าได้รับปริมาณต่ำ ๆ ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ โดยเฉพาะมะเร็งที่ตับซึ่งเกิดขึ้นในสัตว์ทดลองหลายชนิด (นิธิยา และ วิบูลย์ รัตนาปนนท์, 2543) อันตรายจากสารพิษอะฟลาทอกซินในคนมีอาการแสดงออก 2 แบบ คือ แบบรุนแรง และแบบเรื้อรัง อาการแบบรุนแรงจะเกิดในกรณีที่ได้รับสารนี้ในปริมาณที่สูงมาก มักเป็นกับเด็ก และถ้าเป็นเด็กที่เป็นโรคขาดสารอาหารด้วยแล้วอาการอาจรุนแรงถึงตายได้ อาการแบบเรื้อรังได้แก่ มะเร็งในตับ จะเกิดในกรณีที่ได้รับอะฟลาทอกซินในปริมาณน้อย ๆ แต่ได้รับอยู่เป็นเวลานาน (อารันต์ พัฒโนทัย, 2528)

ลักษณะการก่อพิษโดยอะฟลาทอกซิน

1. การก่อพิษแบบเฉียบพลัน (aflatoxicosis)

จากรายงาน เมื่อให้อะฟลาทอกซินขนาด 5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม แก่หนูขาว (Spraque Dawley rat) ผสมกับอาหารวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน หนูขาวมีลักษณะทางพยาธิสภาพ ดังนี้คือ มีการทำลายเซลล์ตับอย่างรุนแรง (hepatocytic necrosis) ตับมีอาการตกเลือด (hemorrhage) มีจำนวนท่อน้ำดีเพิ่มขึ้นมากมาย (bile duct degeneration) มีภาวะการสะสมไขมันอย่างผิดปกติที่เซลล์ตับ (fatty liver) และเกิดภาวะโลหิตจาง (anemia) อย่างไรก็ตามระดับของอะฟลาทอกซินที่ก่อพิษแบบนี้ต่อสัตว์แต่ละชนิดจะไม่เท่ากัน (Buter, 1964 and Wogan, 1977) อาการเกิดพิษจากอะฟลาทอกซินแบบเฉียบพลันที่พบในประเทศไทย ได้แก่ Udorn encephalopathy และ Reye's syndrome (Bourgeois *et al.*, 1969 and Reye *et al.*, 1963) ซึ่งเกิดกับเด็กชาวอีสานอายุ 1 – 7 ขวบ

โดยมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 80 ของคนไข้ เด็กเหล่านี้จะมีลักษณะทางพยาธิสภาพคล้ายกับหนูขาวที่เกิดพิษแบบเฉียบพลัน แต่มีอาการเพิ่มเติม คือ มีอาการสมองบวมน้ำโดยไม่มีการอักเสบ (brain edema, non - encephalitis) ลักษณะทางเคมีคลีนิกบ่งอย่างชัดเจนว่า มีการทำลายเซลล์ตับอย่างรุนแรง เพราะตรวจพบว่าระดับเอนไซม์และเมตาโบไลท์บางตัวจากเซลล์ตับอ่อนสูงมากในซีรั่มของผู้ป่วย เช่น serum glutamate oxaloacetate transaminase (SGOT) serum glutamate pyruvate transaminase (SGPT) บิลิรูบิน (bilirubin) และแอมโมเนีย เมื่อตรวจอาหารของผู้ป่วย คือ ข้าวเหนียวนึ่งค้างสัปดาห์ เนื่องมาจากภาวะขาดแคลนจากอุทกภัย พบว่า มีอะฟลาทอกซินในระดับสูงและเมื่อนำไปให้ลิงกิน ลิงจะมีอาการเป็นพิษ แบบเฉียบพลันเช่นเดียวกับที่เกิดกับเด็ก

2. การก่อพิษแบบเรื้อรังและการเกิดมะเร็งที่ตับ

จากการตรวจชิ้นเนื้อที่ตัดจากตับของหนูขาวที่ได้รับอะฟลาทอกซินปริมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ทางช่องท้อง (intraperitoneal injection, IP) ทุกวัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าชิ้นเนื้อตับมีพยาธิสภาพที่บ่งถึงการเกิดมะเร็ง คือ มีก้อนเนื้องอก (nodule) ท่อน้ำดีขยายขนาดขึ้น (bile duct hyperplasia) และท่อนำน้ำดีในระหว่างเซลล์ตับ ก็ขยายขนาดด้วย (bile canaliculi hyperplasia) ลักษณะทางเคมีคลีนิกที่สำคัญ คือ เซลล์ตับมีระดับเอนไซม์ alkaline phosphatase สูงขึ้นในขณะที่ระดับกลูต้าไธโอน (glutathione) กลับลดลง (สุธน วงษ์ชีรี, 2525)

จากอันตรายของสารพิษอะฟลาทอกซิน ทำให้หลายประเทศได้กำหนดปริมาณขั้นสูงของสารนี้ที่อนุญาตให้มีได้ในอาหาร ปริมาณที่กำหนดก็แตกต่างกันในแต่ละประเทศ มีตั้งแต่ไม่เกิน 5 ppb (1 ppb เท่ากับ 1 ส่วนใน 1,000 ล้านส่วน) จนถึงไม่เกิน 30 ppb สำหรับในประเทศไทยกำหนดไว้ให้มีได้ไม่เกิน 20 ppb แต่ในทางปฏิบัติก็ยังไม่มีมาตราการควบคุมให้ได้ตามเกณฑ์ที่กำหนด (อารันต์ พัฒโนทัย, 2528)

จากอุบัติการณ์ของเชื้อราและอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารจากตลาดในประเทศไทย พบว่า มีเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซินบนธัญญพืชและผลิตภัณฑ์จาก

ธัญญพืชสูงถึงร้อยละ 60 - 100 ของตัวอย่างที่สำรวจและสอดคล้องกับอัตราการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารที่สำรวจจากตลาดของประเทศไทยและฮ่องกง โดยเฉพาะถั่วลิสงและข้าวโพด จะมีอะฟลาทอกซินโดยเฉลี่ยร้อยละ 35 – 49 ของตัวอย่าง คิดเป็นปริมาณอะฟลาทอกซิน 400 – 1500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม (Shank, 1972)

จากการตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตผลทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ ได้พบสารอะฟลาทอกซินในผลิตผลหลายชนิด อาทิ ถั่วลิสง ข้าวโพด ข้าวสาลี มันสำปะหลัง หอม กระเทียม พริกแห้ง งา ถั่วเหลืองและถั่วอื่น ๆ โดยเฉพาะถั่วลิสงนั้นพบทั้งในถั่วลิสงดิบ ถั่วลิสงคั่วที่ใช้ปรุงอาหาร เนยถั่วลิสง กากถั่วลิสงและน้ำมันถั่วลิสง ส่วนในเมล็ดถั่วเหลืองนั้น พบค่อนข้างน้อยแต่มักพบในผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากถั่วเหลือง เช่น เต้าเจี้ยว ถั่วเน่า นอกจากนี้ยังพบในพวกอาหารแห้ง เช่น ปลาแห้ง กุ้งแห้ง เนื้อมะพร้าว สมุนไพร เนย และอาหารชนิดอื่นที่ทำจากนม (ไมตรี สุทธิจิตต์, 2531)

Pinto และคณะ (1991) รายงานว่าโดยทั่วไปถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่ไม่เหมาะต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินเมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบอื่น ๆ เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด และเมล็ดธัญญพืชอื่น ๆ ซึ่งจากการสันนิษฐานว่าเนื่องจากถั่วเหลืองมีปริมาณกรดไฟติก (phytic acid) อยู่สูงและรวมอยู่กับธาตุสังกะสีที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินและเมื่อธาตุสังกะสีไม่ถูกปลดปล่อยออกมา เชื้อราก็ไม่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (Gupta and Venkitasubramanian, 1975) และยังพบว่าการเก็บรักษาถั่วเหลืองที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 40 – 90% ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 28 °ซ จะไม่พบการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (Dachoviboon *et al.*, 1987) แต่มีรายงานของ Beuchat (1983) พบว่าเมื่อนำถั่วเหลืองที่มีเชื้อรา *A. parasiticus* มาบ่มไว้เป็นเวลา 21 วัน จะมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในปริมาณ 48 – 138 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Alpert (1978) ได้รายงาน อัตราการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหาร โลหิต และปัสสาวะของประชากรในประเทศไทย ฟิลิปปินส์ และแอฟริกา

พบว่า อะฟลาทอกซินมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับอัตราการเกิดมะเร็งที่ตับของประชากร อย่างไรก็ตามสำหรับประเทศไทยแล้วยังมีโรคตับอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น จากโรคพิษสุราเรื้อรัง (alcoholism) พยาธิใบไม้ในตับ (liver flukes) และไวรัสตับอักเสบ (hepatitis virus)

จากการทดลองในหนู พบว่า อะฟลาทอกซินสามารถส่งผ่านทางรกของแม่ไปสู่ตัวอ่อนได้ มีผลทำให้ตัวอ่อนมีการเจริญผิดปกติและอาจถึงตายได้ และจากการศึกษาพบว่า อะฟลาทอกซินในปริมาณ 0.3 ppm สามารถก่อมะเร็งในตับสัตว์ทดลองได้ เช่น ในลูกเป็ดเทราท์ โดยอะฟลาทอกซินจะไปยับยั้งเอนไซม์ DNA – dependent RNA polymerase การสังเคราะห์ RNA และการสังเคราะห์โปรตีนในกระต่าย อะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้นประมาณ 0.3 – 1.0 mg kg^{-1} สามารถทำให้เกิด chronic aflatoxicosis เช่น chronic hepatitis และ childhood อะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้น 0.5 – 6 mg kg^{-1} ทำให้เกิด acute hepatitis, โรคหลับไหล (encephalopathy and fatty degeneration of the viscera, EFDV) และตาย (Suttajit and Pichitpaja, 1983) อะฟลาทอกซินเมื่อเกิดขึ้นแล้วยากที่จะทำลายให้หมดไปได้ เพราะสารชนิดนี้ทนต่อความร้อนและกรด ความร้อนขนาดที่ใช้ในการหุงต้มคือประมาณ 140 °ซ ไม่อาจทำลายสารพิษนี้ได้ การอบ (roasting) อาจจะทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซินลดลงได้บ้าง แต่ไม่ถึงกับหมดไป ถ้าจะทำให้หมดต้องใช้ความร้อนสูงกว่า 260 °ซ ซึ่งก็จะทำให้อาหารหรือเมล็ดพืชนั้นเสียไปด้วย อะฟลาทอกซินอาจทำลายได้ด้วยด่างเข้มข้น 2% หรือสารเคมีบางชนิด เช่น สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 6% สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 5% แต่สารเคมีเหล่านี้ก็ไม่อาจนำมาใช้กับเมล็ดพืชได้ เพราะจะทำให้กลิ่น รส และคุณค่าทางอาหารเสียไปด้วย และข้อสำคัญก็คือ ค่าใช้จ่ายสูง ไม่คุ้มค่ากับราคาของผลิตผล (อารันต์ พัฒโนทัย, 2528)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารอะฟลาทอกซิน ได้แก่ ชนิดของเชื้อราซึ่งมีทั้งสายพันธุ์ที่สร้างและไม่สร้างสารพิษ, ชนิดของอาหารที่เชื้อราเจริญอยู่ มีรายงานพบว่า เชื้อราสร้างสารพิษบนถั่วลิสงได้ดีที่สุด โดยเฉพาะในถั่วที่แก่จัด และรองลงมา

คือ ข้าวโพด ส่วนในถั่วเหลืองพบสารพิษอะฟลาทอกซินค่อนข้างน้อย, ปฏิกิริยาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นด้วยกัน อาทิ *Aspergillus niger* จะทำให้ *A. flavus* เติบโตและสร้างสารพิษได้น้อยลง และมีบางชนิดทำให้พิษหมดไปได้, อุณหภูมิมีความสำคัญเพราะเชื้อราเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิที่กว้างมาก คือ 0 - 60 °ซ แต่อุณหภูมิที่เจริญได้ดีอยู่ในช่วง 24 - 30 °ซ ถ้าสูงกว่า 40 °ซ เชื้อราจะตาย ที่อุณหภูมิ 20 °ซ เชื้อราจะสร้างสารพิษได้สูงสุดระหว่างวันที่ 11 - 13 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °ซ เชื้อราจะสร้างสารพิษได้สูงสุดวันที่ 7 - 9 และ 5 - 7 ตามลำดับ สำหรับสภาพประเทศไทย โดยเฉลี่ยเชื้อราจะสร้างสารพิษได้ดีในระยะ 7 - 14 วัน สำหรับความชื้น เชื้อราจะเจริญและสร้างสารพิษได้ในสภาพที่มีความชื้นสูง คือ มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูงตั้งแต่ 75% ขึ้นไป และเจริญอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 80 - 100% และแม้ว่าปริมาณก๊าซออกซิเจนน้อยลงหรือมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซม์มากขึ้นก็ตาม เชื้อรายังคงเจริญได้ แต่การสร้างสารพิษจะลดลง นอกจากนี้ พลังงาน วิตามินและแร่ธาตุปลีกย่อยมีผลต่อการสร้างสารพิษ โดยแร่ธาตุบางตัวช่วยเร่งการเติบโตของเชื้อราได้ เช่น เกลือที่มีอยู่ในอาหารสัตว์ระดับ 1 - 1.5% จะเร่งการสร้างสารพิษของเชื้อรา เช่นเดียวกับธาตุเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และโมลิบดินัม ยกเว้นแบเรียมทำให้การสร้างสารพิษลดลง สำหรับสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด หรือเมล็ดพืชซึ่งมีไขมันที่มีความเป็นกรดสูงจะมีเชื้อราเข้ามาทำลายและสร้างสารพิษ ดังนั้นถ้าใช้กรดหรือเกลือของกรดที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ เพื่อวัตถุประสงค์ที่จะทำลายเชื้อรา กลับเป็นการเร่งให้เชื้อราสร้างสารพิษ (วรรณา ชูฤทธิ์ และ จักรี สุวรรณภูมิ, 2535)

6. การตรวจสอบอะฟลาทอกซิน

Lin and Deanese (1976) ศึกษาการสร้างอะฟลาทอกซินโดยใช้ coconut agar ซึ่งปรับให้มี pH 6.9 เป็นอาหารเพื่อตรวจหาอะฟลาทอกซิน พบว่าเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซินเมื่อเติบโตบนอาหารนี้จะเกิดการเรืองแสงสีน้ำเงิน หรือสีเขียวขึ้นภายในวุ้นอาหารที่อยู่รอบ ๆ โคโลนี โดยไม่ต้องส่องดูการเรืองแสงภายใต้คลื่นอุลตราไวโอเลต ซึ่งช่วยให้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้นและเมื่อนำมาส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต พบว่า ความเข้มข้นของการเรืองแสงมีความสัมพันธ์กับปริมาณของอะฟลาทอกซิน

Bothast and Hesseltine (1975) พัฒนาการตรวจสอบอะฟลาทอกซินในเมล็ดธัญญพืชโดยใช้คุณสมบัติการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต เรียกว่า BGYF test (bright greenish yellow fluorescence test) หรือ black light test ปัจจุบันเป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อการตรวจหาอะฟลาทอกซิน เพราะเป็นวิธีการที่ง่าย ได้ผลดี และไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย (ฉายแสง แนคเลอร์ และคณะ, 2529) การตรวจสอบกระทำโดยนำเอาตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ เช่น ข้าวโพด เมล็ดธัญญพืช บดให้แตกมาส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่นแสง 365 นาโนเมตร เพื่อตรวจหาจุดสีเขียวเหลืองสะท้อนแสง ซึ่งวิธีการนี้ก็พบว่ามีการนำมาใช้ในประเทศไทย โดยบริษัทผู้ส่งออกข้าวโพดนิยมเพื่อใช้ตรวจสอบคุณภาพเมล็ดก่อนรับซื้อจากเกษตรกร เนื่องจากรวดเร็วและแม่นยำพอสมควร (Prisner, 1989) Marsh และคณะ (1969) พบว่าจุดสีเขียวเหลืองสะท้อนแสงเกิดขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ peroxidase ที่พบในพืช เช่น ในฝ้าย ข้าวโพด ทำปฏิกิริยากับกรด kojic ที่เชื้อราสร้างขึ้น ซึ่งการประเมินระดับอะฟลาทอกซินที่ปรากฏทำได้โดยการนับจำนวนจุดเรืองแสงที่เกิดขึ้น หรือโดยน้ำหนักแห้งและต่อพื้นที่ของจุดเรืองแสงที่ปรากฏในตัวอย่าง และจากผลงานวิจัยของศูนย์วิจัยปรับปรุงคุณภาพข้าวโพด (2535) พบว่า เมื่อเกลี่ยข้าวโพดบนถาดขนาด 33 x 38 เซนติเมตร^2 แล้วนับจุดเรืองแสงได้ประมาณ 5 จุด เมื่อนำไปสกัดสารพิษพบว่ามีอะฟลาทอกซินต่ำกว่า 20 ppb แต่เมื่อนับจำนวนจุดเรืองแสงได้มากกว่า 5 จุด จะไม่สามารถประเมินค่าอะฟลาทอกซินได้ใกล้เคียงความเป็นจริง เนื่องจากความสัมพันธ์ของจำนวนจุดสีเขียว

สะท้อนแสงกับปริมาณอะฟลาทอกซินที่วิเคราะห์ได้นั้นค่อนข้างแปรปรวน (Shotwell *et al.*, 1975) Shotwell and Hesseltine (1981) กล่าวว่าการศึกษาปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างกับจุดสีเขียวเหลืองสะท้อนแสงอาจให้ค่าจากไม่มีจนมีในปริมาณสูงมาก นักวิจัยได้พยายามค้นคว้าวิจัยหาวิธีหรือปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์สารพิษให้ละเอียดและสะดวกมากขึ้น โดยทั่วไปเทคนิกในการตรวจสอบสารพิษในปัจจุบันมี 3 วิธี คือ

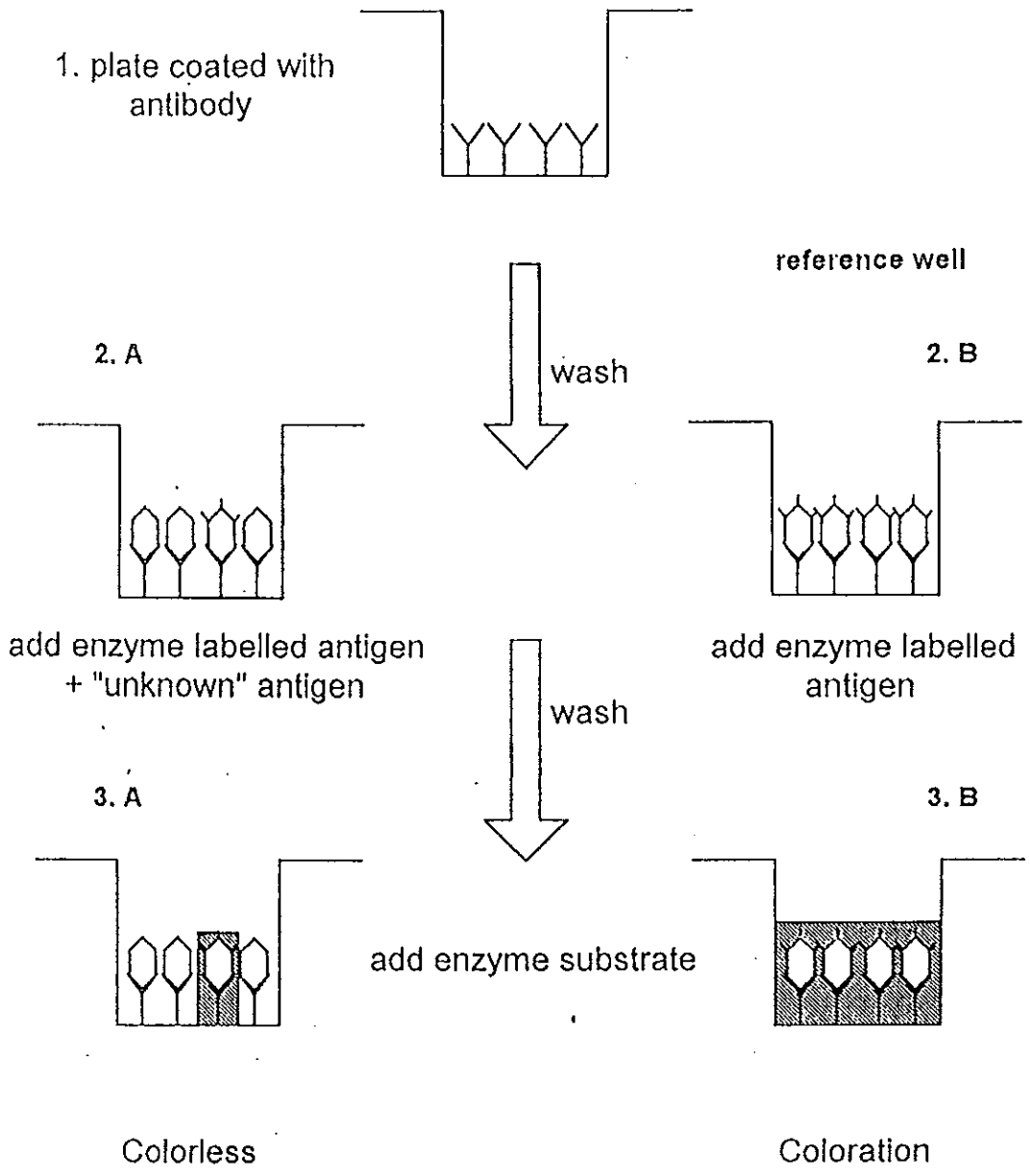
1. Chemical method เป็นวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี มีวัตถุประสงค์ในการจำแนกและการตรวจหาปริมาณ มีหลายวิธีเช่น high performance liquid chromatography (HPLC), thin layer chromatography (TLC) และ gas chromatography (GS) เป็นต้น โดยมีหลักการคือ ทำการสกัดสารพิษออกจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ และนำไปตรวจหาปริมาณสารพิษตามขั้นตอนของแต่ละวิธี ซึ่งอาจใช้ column หรือ plate ก็ได้ ซึ่งตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบนั้นต้องมีการทำความสะอาดก่อน ผลที่ได้มีความเฉพาะเจาะจง แม่นยำสูง เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งต้องมีการควบคุมคุณภาพ (Traisat, 1989) แต่ใช้เวลานาน ต้นทุนการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างสูง และวิเคราะห์ได้ครั้งละตัวอย่างเท่านั้น ศักดิ์สิทธิ์ การุณยะวานิช และคณะ (2526) กล่าวถึงวิธี mini column ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ประหยัด และมีความแม่นยำ มาแทนวิธี TLC หรือ GS ซึ่งวิธีนี้สามารถบอกปริมาณสารพิษได้ต่ำถึง 10 ppb

2. Biological method เป็นการตรวจหาเฉพาะทางด้านคุณภาพเท่านั้น โดยอาศัยสิ่งมีชีวิตที่อ่อนแอต่อสารพิษเป็นตัวตรวจสอบ แต่ความแม่นยำและความไวในการตรวจจับของวิธีนี้ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น วิธีการทาง biological เหมาะสำหรับใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษของสารหรือใช้ในการแยกสารพิษชนิดใหม่ของเชื้อรา สิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการทดสอบเช่น ตัวอ่อนของไก่ ลูกเป็ด และแบคทีเรีย เป็นต้น

3. Immunological method เป็นวิธีการที่ผสมผสานกันระหว่าง chemical method และ biological method เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงระหว่างสาร

พิษจากเชื้อรา (antigen และ antibody) ที่เฉพาะเจาะจงกับสารพิษชนิดนั้น ๆ immunoassay เป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ประหยัด และมีประสิทธภาพสูง นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้หลายตัวอย่างพร้อม ๆ กัน ซึ่งวิธี immunological method นี้กำลังเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย เช่น วิธี enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นต้น (อัจฉรา พัฒนเดช, 2543)

การตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยวิธี Direct Competitive ELISA (รูปที่ 5) โดยนำตัวอย่างมาตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA ซึ่งมีสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ เป็นตัวเปรียบเทียบ วิธี Direct competitive ELISA นี้จะเป็นการแข่งขันกันระหว่างสารพิษในตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ (free aflatoxin B_1) กับสารพิษอะฟลาทอกซินที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์ชี้บอก (labelled toxin) ในการเกาะจับกับแอนติบอดี้ที่ถูกเคลือบไว้บนผิวของ polystyrene plate ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปฏิกิริยา แต่มีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับความเข้มข้นของสารพิษอะฟลาทอกซินที่มีอยู่ในตัวอย่างนั้น ๆ นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐานมาทำกราฟมาตรฐาน โดยให้ค่าความเข้มข้นของสารพิษเป็นแกน x และค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เป็นแกน y (กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543)



รูปที่ 5 หลักการ Direct Competitive ELISA (กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543)

วัตถุประสงค์

1. ตรวจหาปริมาณและบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการหมัก
2. ศึกษาการเติบโตของจุลินทรีย์ที่แยกได้ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่างกัน
3. ตรวจหาการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันของจุลินทรีย์ที่แยกได้
4. ตรวจหาปริมาณโปรตีน น้ำตาล ไขมัน เกลือ ความชื้น เถ้า เส้นใย ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ทั้งระบบ

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี ที่ใช้ในการทดลองและบริษัทผู้ผลิตได้แสดงในตารางที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน และสารเคมีเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ อาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ปราศจากเชื้อโดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ urea medium ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยมิลลิพอร์ ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

อุปกรณ์

เครื่องมือทั่วไป

Anaerobic jar : Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

Autoclave : Model SS 320, Tomy Seiko Co, Ltd., Tokyo, Japan.

Centrifuge : H – 11NA Kokusan Enshinki Co, Ltd., Japan.

Deep-freeze : Freeze Dryer IKEDA Scientific Co, Ltd., Tokyo, Japan.

Electronic balance : Satorius BF 210S SV Medico Co, Ltd., Germany.

ELISA Reader : BIO-TEK, ELX 808, U.S.A.

Hot air oven : Memmert UM 400, Germany.

Incubator : Typ B 5100E, D-6450 Hanau, Germany.

Larminar flow : BVT 125 ISS Co, Ltd., Bangkok.

Microscope : Olympus Optical Co, Ltd., Tokyo, Japan.

Micropipette : Gilson, Japan.

Millipore filter : Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, U.S.A.

pH meter : Backman M PHI 32 Delta Laboratory Co, Ltd., Bangkok.

ตารางที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี และบริษัทผู้ผลิต

อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ	
Corn starch	Sigma
De, Man Rogosa and Sharpe	Difco
Fructrose	Sigma
Galactose	Sigma
Glucose	Sigma
Indole	Difco
Lactose	Sigma
Lysine Decarboxylase medium	Difco
Mannitol	Sigma
Maltose	Sigma
Motility test medium	Difco
MR-VP medium	Difco
Nitrate medium	Difco
Peptone	Difco
Potato Dextrose Agar	Difco
Simmon's citrate agar	Difco
Skim milk	Difco
Sucrose	Sigma
Thioglycolate	Difco
Triple Sugar Iron agar	Difco
Tryptic Soy Agar	Difco

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Tryptone	Difco
Urea medium	Difco
Yeast extract	Difco

2. สารเคมี

Alcohol	Merck
Ammonium thiocyanate	Merck
Ammonium sulphate	May & Baker
Boric acid	Merck
Bromcresol purple blue	Merck
Bromcresol green	Fluka
Calcium chloride	Merck
Crystal violet	Riedel-de Haen
Dichloromethane	Merck
Hydrochloric acid	Merck
Hydrogen peroxide	Merck
Iodine solution	Merck
Kovac's reagent	Merck
Lactophenol cotton blue	Merck
Magnesium sulphate	Merck
Methanol	Merck
Methyl red	Riedel-de Haen
α- napthol	Riedel-de Haen

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Nitric acid	Merck
Oil immersion	Fluka
Potassium chloride	Merck
Potassium hydroxide	Merck
Potassium sulphate	Merck
Phenol	Merck
Safranin	Merck
Silver nitrate	Merck
Sodium chloride	Merck
Sodium hydroxide	Merck
Sodium sulphate	Merck
Sulphuric acid	Merck
1% Tetramethyl -p-phenylenediamine	Fluka
Tributyrin	Fluka
Tween 20	Merck
3. ชุดสารเคมีตรวจหาอะฟลาทอกซิน	
Conjugate buffer	กรมวิชาการเกษตร
Enzyme conjugate	
Micro Elisa plate	
Standard Aflatoxin B_1	
Stopping solution	
Substrate A and substrate B	
Washing buffer (Phosphate Buffered Saline- Tween 20)	

เครื่องมือทั่วไป (ต่อ)

Sonicator : Branson Sonifer 450, U.S.A.

Stirring hot plate : Thermolyne Barnstead Thermolyne Coorperation,U.S.A.

Spectrophotometer : Shimadzu UV-1601, Japan.

Water bath : Memmert Co, Ltd., Germany.

เครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพเต้าหู้ยี้จากสถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา

Protein digestor : Kjeltec System 1002 Distilling Unit, Japan.

Quick Digester MRK, Mitamura riken, Japan.

645 Multi-Dosimet Metrohn Herisau, Switzerland.

Lipid analyzer : Soxtec System HT2, 1045 Extraction Unit, Japan.

Fiber analyzer : Fibertec System 1021 Cold Extraction, Japan.

: Fibertec System M 1020 Hot Extraction, Japan.

Ash analyzer : Ney Volcan 3-550, U.S.A.

*** ที่อยู่บริษัทผู้ผลิตต่าง ๆ ที่อ้างถึง**

กลุ่มวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

Difco : Difco Laboratories, Detriot, Michigan, U.S.A.

Fluka : Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland.

May & Baker : May & Baker Ltd., Dagenham, England.

Merck : E. Merck, Darmstadt, Postfach, Germany.

Riedel-de Haen : Riedel-de Haen AG, Seelze, Germany.

Sigma : Sigma Chemical Co., St. Loius Missouri, U.S.A.

วิธีการ

1. การตรวจหาจำนวนและแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

1.1 การเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้

เก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 100 กรัม อายุต่าง ๆ กัน โดยเก็บทุกเดือนจากตุ่มหมักเดียวกันตั้งแต่เริ่มต้นการหมักจนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย รวม 11 ตัวอย่าง จากโรงงานเต้าหู้ยี้เสวย อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา และเก็บตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเต้าหู้ยี้ ได้แก่ โคจิ เกลือ และผ้าขาวบางที่ใช้ปิดโคจิซึ่งใช้ในการหมัก รวม 3 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างลงในขวดฝาเกลียวปราศจากเชื้อ แล้วนำมาตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทันที และเก็บตัวอย่างไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารต่อไป พร้อมทั้งวัดอุณหภูมิของตัวอย่างทุกครั้ง

1.2 การตรวจนับจุลินทรีย์

ตรวจนับจุลินทรีย์ที่เป็น แบคทีเรีย รา และยีสต์จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ โดยชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 25 กรัม ใส่ใน 6% NaCl 225 มล. ทำให้ตัวอย่างเจือจางต่อไปแบบ 10 – fold dilution กระจายเชื้อแบบ spread plate method ลงบนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar (TSA), De, Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSA) ซึ่งใช้ bromcresol purple blue เป็นอินดิเคเตอร์เพื่อตรวจหาแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเห็นเป็นสีเหลืองบน MRSA และ Thioglycolate medium agar (THIO) ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0% , 5% และ 10% บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ในกรณีของอาหารเลี้ยงเชื้อ THIO บ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใน anaerobic jar ส่วน Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และสำหรับ Halobacterium Medium Agar (HMA) (ภาคผนวก ก ข้อ 1) เติม NaCl ความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 2 – 3 สัปดาห์ โดยดูผลทุกวัน

1.3 **การแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์**

แยกเชื้อจุลินทรีย์โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่เติบโตในอาหารชนิดต่าง ๆ ซึ่งดูจากลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนีที่เหมือนกัน และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate แบบ 16 แถว ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ทำเช่นเดียวกับยีสต์ แต่ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง สำหรับราเขี่ยสปอร์มา แล้ว streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียที่เติบโตบน THIO ในสภาวะไม่มีออกซิเจนให้คัดเลือกเชื้อที่เป็น anaerobe โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อต่อไป ถ้าเชื้อเติบโตในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แสดงว่าเป็น facultative anaerobe แต่ถ้าไม่เติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจน แต่เติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แสดงว่าเป็น anaerobe

2. การทดสอบการเติบโตของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ บนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ทดสอบการเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5%, 10%, 15% และ 20% บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ ตรวจดูผลทุกวันเป็นเวลา 3 วัน สำหรับราและยีสต์ ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5%, 10%, 15% และ 20% บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลาประมาณ 1 – 2 สัปดาห์ โดยดูผลการเติบโตทุกวัน

3. การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน

ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันของแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ ป้ายเชื้อแต่ละสายพันธุ์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + 1%skim milk, TSA + 1%corn starch และ TSA + 1%tributyrin ใส่ tween 20 ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง สำหรับราและยีสต์

ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ ป้ายเชื้อแต่ละสายพันธุ์ลงบนอาหาร Glucose medium (อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 0.5 กรัม, peptone 10.0 กรัม, agar 15.0 กรัม และ dextrose 10 กรัม) ซึ่งใส่ 1%skim milk แทน dextrose เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน ใส่ 1%corn starch แทน dextrose เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง และใส่ 1%tributyrin และ tween 20 แทน dextrose เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ย่อยไขมัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน เห็นเป็นวงใสรอบโคโลนี วัดความสามารถในการย่อยสลายอย่างคร่าว ๆ เป็นดีกรีของการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis) ซึ่งเท่ากับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มม.) หารด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มม.) (ภาคผนวก ก ข้อ 3)

4. การบ่งชี้สกุลของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

การบ่งชี้สกุลของแบคทีเรีย โดยการทดสอบทางชีวเคมีตาม Bergey ' s Manual of Determinative Bacteriology. (Buchanan and Gibbon, 1974) โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์มาทดสอบทางกายภาพและทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบการย้อมสีแกรม, การสร้างสปอร์, การเคลื่อนที่, การสร้างเอนไซม์ catalase, การสร้างเอนไซม์ oxidase, การเจริญในสภาพไม่มีอากาศ, Indole, Methyl Red (MR), Voges – Proskauer (VP), Citrate, Urea, Lysine decarboxylase, Triple Sugar Iron (TSI), ความสามารถในการหมักน้ำตาล ได้แก่ กลูโคส, ซูโครส, ฟรุคโตส, มอลโตส, แมนนิทอล, แลคโตส และกาแลคโตส

ส่วนการบ่งชี้สกุลของเชื้อรา โดยการทดสอบทางสัณฐานวิทยาทางราตาม Biology of Fungi (Rose, 1979) และ Introduction of Fungi (Webster, 1970) ศึกษาลักษณะโคโลนี สังเกตและบันทึกผลลักษณะต่อไปนี้ คือ ลักษณะเส้นใยเกาะแน่นหรือฟูกระจายเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของเส้นใย สีของสปอร์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ใช้เข็มเขี่ยเชื้อรา แตะลงบน lactophenol cotton blue ที่

อยู่บนสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ขยาย 400 เท่า สังเกตและบันทึกผลดังนี้ คือ เส้นใยมีผนังกั้นหรือไม่ ทึบหรือใส ลักษณะสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เป็นแบบ conidia หรือ sporangiospore รวมทั้งลักษณะก้านชู (sporangiophore) และการบ่งชี้สกุลของเชื้อยีสต์ โดยการทดสอบทางชีววิทยาตาม The Yeast , Vol.1., The Biology of Yeast. (Rose and Harrison , 1969) ศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์ในจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ สังเกตลักษณะดังนี้ ลักษณะ ขนาด และสีโคโลนี ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยดูลักษณะรูปร่างของยีสต์ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ การสร้างเส้นใยเป็นแบบ true mycelium หรือ pseudomycelium สังเกต ascospore การสร้างฝ้า ความสามารถในการหมักน้ำตาล ความสามารถในการใช้เกลือไนเตรต

5. การวิเคราะห์หาคุณภาพของเต้าหู้ยี้

การตรวจหาคุณภาพทางอาหารของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ ได้แก่ ปริมาณโปรตีน น้ำตาล ไขมัน เกลือ ความชื้น เถ้า เส้นใย และความเป็นกรดด่าง โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้ Kjeldahl method (Kenneth, 1990)

ชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้บนกระดาษกรอง ประมาณ 0.2 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน ตัวอย่างละ 3 หลอด ใส่ catalyst K_2SO_4 ลงในหลอดทุกหลอด ๆ ละ 1 เม็ด เติม conc.H_2SO_4 ลงในหลอดประมาณ 15 มล. แกว่งหลอดให้ผสมกัน แล้ววางลงในเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 °ซ ย่อย 2 ชั่วโมง จนสารละลายในหลอดใสและไม่มีควัน นำหลอดออกจากจานเครื่องย่อยวางในที่วางหลอด และทิ้งไว้ให้สารละลายอุ่น เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 75 มล. จัดอุปกรณ์กลั่น เปิดสวิตซ์ไฟ และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น เติม 4%boric acid ลงในขวดรูปชมพู่ ประมาณ 40 มล.

จากนั้นวางลงในเครื่องกลั่นซึ่งพร้อมที่จะกลั่น โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้ นำหลอดตัวอย่างที่ย่อยแล้ววางในที่วางหลอดของเครื่องกลั่น เติม 40%NaOH ประมาณ 20 มล. ทำการกลั่นจนสารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว ได้สารละลายที่กลั่นปริมาตร 150 มล. นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ที่ได้มาไตเตรตกับกรด 0.1N HCl จนได้จุดยุติเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ ทำ blank ด้วยวิธีเดียวกัน แต่ไม่ใส่ตัวอย่างเต้าหู้ยี้ คำนวณค่า %โปรตีน (crude protein) โดยสูตร

$$\%\text{โปรตีน} = \frac{(A - B) \times N \times 14 \times 6.25}{W}$$

A = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรตกับตัวอย่าง (มล.)

B = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรตกับ blank (มล.)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ (นอร์มัล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้ Phenol sulfuric method (Chaplin, 1986)

ใส่สารละลายตัวอย่าง 1 มล. ในหลอดทดลอง นำไปแช่บนน้ำแข็ง เติม 1 มล. 5%phenol ทิ้งไว้ 2 - 3 นาที เติม 5 มล. conc.H_2SO_4 เขย่าให้เข้ากันทันที วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่นแสง 490 นาโนเมตร เทียบค่า O.D. ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของกลูโคสความเข้มข้น 10, 35, 50 และ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก ข้อ 4) (รูปที่ 15)

5.3 **การวิเคราะห์หาปริมาณไขมันโดยใช้** Soxhlet method (Kenneth, 1990)

อบ extraction cup 30 นาที เพื่อไล่ความชื้นออก จากนั้นนำไปเก็บในที่ ๆ เก็บความชื้น เพื่อป้องกันไขมัน เตรียมกระดาษกรองสำหรับชั่งตัวอย่าง (เบอร์ 5) โดยสกัดไขมันออกก่อนแล้วจึงนำมาใช้พร้อมสำลี โดยพับกระดาษกรองเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ก่อนใช้เครื่องสกัดไขมัน ต้องอุ่นเครื่องก่อนประมาณ 30 นาที ชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 2.0 กรัม ใส่ลงใน extraction thimble ปิดทับด้วยสำลีที่สกัดไขมันแล้ว ปิด extraction thimble ด้วยปลอกเหล็ก นำ extraction thimble ใส่ในเครื่องสกัดไขมันโดยยกแขวนไว้ในตำแหน่ง rising เตรียม dichloromethane ใส่ในบีกเกอร์ ประมาณ 50 มล. สำหรับการสกัดครั้งแรก ครั้งต่อไปใช้ dichloromethane 25 มล. นำ extraction cup เบอร์ตรงกับที่จดน้ำหนักไว้ เติม dichloromethane ใส่ในเครื่องสกัดโดย extraction cup ตั้งบนแผ่นความร้อน ปลด extraction thimble ที่แขวนลงจุ่มลงใน extraction cup เปิด valve 15 นาที เมื่อครบเวลา ยก extraction thimble ขึ้นในตำแหน่ง rising 45 นาที เมื่อครบเวลา ปิด valve แล้วเปิด air 20 นาที เมื่อครบเวลา ปิด air นำเอา extraction cup ออก เข้าตู้อบประมาณ 30 นาที และนำ extraction thimble ออกใส่ตัวอย่างต่อไป นำ extraction cup ใส่ใน dessicator ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปชั่ง จดค่าที่ได้ไปคำนวณหา %ไขมัน โดยใช้สูตร

$$\%\text{ไขมัน} = \frac{W_3 - W_2 \times 100}{W_1}$$

W_1 = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

W_2 = น้ำหนัก extraction cup (กรัม)

W_3 = น้ำหนัก extraction cup + lipid (กรัม)

5.4 **การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือโดยใช้** Volumetric method (Lane, 1990)

ชั่งเต้าหู้ยี้ 5 กรัม บดให้ละเอียดใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมสารละลาย 0.1N $AgNO_3$ ปริมาณ 100 มล. เขย่าขวดให้เข้ากัน เติม conc.NHO_3 20 มล. เพื่อป้องกัน $AgNO_3$ ไปทำปฏิกิริยากับแอนอิออนชนิดอื่นที่อาจปะปนมากับเต้าหู้ยี้ นอกจากคลอไรด์อิออน นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนเดือด เพื่อให้ตะกอนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ AgCl ละลาย ใช้เวลาประมาณ 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำ 50 มล. และ ferric alum 3 มล. แล้วไตเตรตด้วย 0.1N NH_4SCN จนได้จุดยุติสีน้ำตาลอ่อน คำนวณหา %เกลือจากสูตร

$$\% \text{ เกลือ} = \frac{0.058 \times (X_1 N_1 - X_2 N_2) \times 100}{W}$$

X_1 = ปริมาตรของ $AgNO_3$ ที่เติม (มล.)

N_1 = ปริมาตรของ NH_4SCN ที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง (มล.)

X_2 = ความเข้มข้นที่แท้จริงของ $AgNO_3$ (นอร์มัล)

N_2 = ความเข้มข้นที่แท้จริงของ NH_4SCN (นอร์มัล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

5.5 **การวิเคราะห์หาความชื้นโดยใช้** Air oven method (Kenneth, 1990)

อบ drying pan 30 นาที ทำให้เย็นใน dessicator 30 นาที ชั่งน้ำหนัก drying pan ชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 3.0 กรัม ใส่ใน drying pan นำ drying pan + sample ไปอบในตู้อบความชื้น ประมาณ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 105 °ซ เมื่อครบ 12 ชั่วโมง นำ drying pan + sample ใส่ใน dessicator ประมาณ 30 นาที แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึกไว้ คำนวณหา %ความชื้น โดยใช้สูตร

$$\%\text{ความชื้น} = \frac{B - C \times 100}{B - A}$$

A = น้ำหนัก drying pan (กรัม)

B = น้ำหนัก drying pan + sample (กรัม) ก่อนอบ

C = น้ำหนัก drying pan + sample (กรัม) หลังอบ

5.6 **การวิเคราะห์หาเถ้าโดยใช้** Direct method (Kenneth, 1990)

อบ crucible 30 นาที นำไปใส่ใน dessicator ทิ้งให้เย็น 30 นาที ชั่งน้ำหนัก crucible และชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 1.0 กรัม ใส่ใน crucible นำ crucible + sample ไปเผาในเตาเผา ประมาณ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 600 °ซ เมื่อครบ 6 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำ crucible + sample ออก ใส่ไว้ใน dessicator ประมาณ 30 นาที แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึกไว้ คำนวณหา %เถ้า โดยใช้สูตร

$$\%\text{เถ้า} = \frac{C - A \times 100}{B - A}$$

A = น้ำหนัก crucible (กรัม)

B = น้ำหนัก crucible + sample (กรัม) ก่อนเผา

C = น้ำหนัก crucible + sample + ash (กรัม) หลังเผา

5.7 **การวิเคราะห์หาเส้นใยโดยใช้** Extraction unit method (Kenneth, 1990)

อบ Filter crucible ที่ 130 °ซ 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน dessicator ชั่งน้ำหนักเต้าหู้ยี้ประมาณ 1 กรัม ใส่ลงใน crucible นำ crucible ใส่เข้าเครื่อง Hot extraction unit เลื่อน hot plate ปิด crucible เปิดน้ำให้ไหลผ่านเครื่อง อัตรา 2 ลิตร/นาที เปิดสวิตซ์ main ใส่กรด 1.25%H_2SO_4 ที่ต้มร้อนทางด้านบน column

ประมาณ 150 มล. หยด n- octanal 2-3 หยด ป้องกันการเกิดฟอง ให้ความร้อนจนเดือด เมื่อเริ่มเดือดให้ลดความร้อนลงให้เดือดพอดีเป็นเวลา 30 นาที ปิด heater กรองเอาสารละลายออกโดยเลื่อน valve อยู่ที่ vacuum กด pressure หากกรองสารละลายไม่ลง กรองเสร็จ เลื่อน valve อยู่ที่ close เติม 1.25%KOH ประมาณ 150 มล. ทำเช่นเดียวกับการต้มด้วยกรด นำ crucible ออกโดยใช้ crucible holder ใส่ใน Cold extraction unit ล้างด้วย ethyl alcohol 25 มล. 3 ครั้ง อบ crucible ที่ 130 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน dessicator ชั่งน้ำหนัก เผา crucible ที่ 500 °ซ มากกว่า 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน dessicator ชั่งน้ำหนัก คำนวณหา %เส้นใย โดยใช้สูตร

$$\%\text{เส้นใย} = \frac{W_1 - W_2}{W_0} \times 100$$

W_0 = น้ำหนัก sample (กรัม)

W_1 = น้ำหนัก crucible + sample (กรัม) หลังอบ

W_2 = น้ำหนัก crucible + sample (กรัม) หลังเผา

5.8 การวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดด่างโดยใช้ pH meter (Kenneth, 1990)

ชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. เติมน้ำกลั่น pH 7 ปริมาณ 10 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer วัดความเป็นกรดด่าง ด้วยเครื่อง pH meter

6. การตรวจหาอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิตโดยวิธี Aflatoxin B_1 ELISA Test Kit **(กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543)**

ทำการสกัดตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างที่บดละเอียดปริมาณ 20 กรัม ใส่ในฟลาสก์ เติม 100 มล. 70% methanol แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวางตัวอย่างทิ้งไว้ 5 – 10 นาที กรองตัวอย่างโดยใช้กระดาษกรอง Whatman no. 1 เก็บส่วนใสในขวดที่มีฝาปิดสนิท หุ้มด้วยฟอล์ยเพื่อป้องกันแสงสว่าง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ ก่อนจะนำมาวิเคราะห์ต้องเจือจางด้วย washing buffer ให้เป็น 1 : 20 (สารสกัด 1 มล. ต่อ buffer 3 มล.) นำสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยหยด 50 µl ของสารพิษมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น คือ 0, 10, 20, 40 และ 100 ppb. ลงในหลุม micro titer plate ความเข้มข้นละ 1 หลุม และหยด 50 µl ของสารสกัดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ลงในหลุมที่เหลือ หยด 50 µl ของ enzyme conjugate ที่เจือจางแล้วตามลงไปทุกหลุม เขย่าเล็กน้อย 4-5 ครั้ง เพื่อให้เข้ากัน หุ้มด้วยกระดาษฟอล์ย เก็บที่อุณหภูมิ 37 °ซ ในที่มืดนาน 30 นาที คว่ำ plate เคาะเอาสารในหลุมทิ้งแล้วล้างด้วย washing buffer (PBS-T) 3-4 ครั้ง โดยทิ้งไว้ 1-3 นาที ในแต่ละครั้ง หยด 100 µl ของ substrate ที่เตรียมไว้ลงในหลุมหุ้มด้วยกระดาษฟอล์ย แล้วบ่มในที่มืดนาน 10-15 นาที จะเกิดปฏิกิริยาสีฟ้าในหลุมที่ไม่มีสารพิษหรือมีน้อย ส่วนหลุมที่มีสารพิษสีจะจางหรือใสตามความเข้มข้นของสารพิษที่ตรวจพบ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสามารถหยุดได้โดยเติม 100 µl ของ stopping solution ซึ่งจะทำให้สีที่เกิดขึ้นเป็นสีเหลือง นำมาอ่านผลด้วยเครื่อง Micro Elisa Plate Reader ให้อ่านในช่วงคลื่น 630 นาโนเมตร สำหรับสีฟ้า และ 450 นาโนเมตร สำหรับสีเหลือง นำค่า O.D. ที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารอะฟลาทอกซิน นำค่าที่ได้มาคูณด้วย 20 เป็นความเข้มข้นสารอะฟลาทอกซิน ในหน่วย ppb (part per billion) (ภาคผนวก ก ข้อ 5) (รูปที่ 16)

นอกจากนี้ ยังได้ทำการตรวจหาอะฟลาทอกซินที่ผลิตได้จากเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ จนเติบโตเต็มที่ เป็นเวลา 3 วัน ตัดก้อนเชื้อราขนาด 1 x 1 ซม^2 ใส่ลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 200 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เก็บตัวอย่างเชื้อราที่ 0, 3 และ 5 วัน โดยนำตัวอย่างมาทำการปั่นที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บ ส่วนใส และนำตะกอนเซลล์ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator ใช้ %dutycycle เท่ากับ 50 และ out put control เท่ากับ 5 หยุดทุก ๆ 30 วินาที โดยแช่สารละลายในน้ำแข็ง เมื่อสารละลายเปลี่ยนสีจากขุ่นเป็นใส แสดงว่าเซลล์แตกอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้มาวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินที่เชื้อราผลิตทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ โดยนำส่วนใสและสารละลายตะกอนเซลล์ 10 มล. เติม 70% methanol 50 มล. และกระทำเช่นเดียวกับการตรวจหาอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเต้าหู้ยี้

3. ผลการทดลอง

1. จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ในระยะต่าง ๆ ของการหมักเต้าหู้ยี้

1.1 การตรวจนับจุลินทรีย์ จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการหมัก

ตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุต่าง ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด (ตารางที่ 4) คือ TSA (รูปที่ 6), MRSA (รูปที่ 7), THIO (รูปที่ 8), PDA (รูปที่ 9, 10) และ HMA พบว่า แบคทีเรียที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + 0%NaCl มีจำนวนเริ่มต้น 1.4×10^4 CFU/g และเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อหมักไปได้ 4 เดือน โดยมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 3.9×10^5 CFU/g จากนั้นจำนวนเชื้อมีจำนวนลดลงจนถึงสิ้นสุดการหมักในเดือนที่ 9 มีจำนวน 6.8×10^3 CFU/g และจะเห็นได้ว่าจำนวนเชื้อลดน้อยลง 9 และ 10 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือความเข้มข้นสูงขึ้น 5% และ 10% ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (P) พบว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียลดลงประมาณ 26 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุ 9 เดือน ทั้งนี้เนื่องมาจากผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป มีขั้นตอนการผลิต โดยนำเต้าหู้ยี้จากการหมักใส่ขวดแก้วแล้วใส่น้ำต้มกาก ซึ่งประกอบด้วย กากเต้าหู้ยี้ และน้ำ ในปริมาณเท่ากัน จากนั้นนำไปต้มให้เดือด (100 $^{\circ}$ซ) เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งเป็นสาเหตุให้แบคทีเรียมีจำนวนลดลง ซึ่งมีจำนวนอยู่ในช่วง 2.6×10^2, 2.4×10^2 และ 1.3×10^2 CFU/g ที่ความเข้มข้น 0%NaCl , 5%NaCl และ 10% NaCl ตามลำดับ

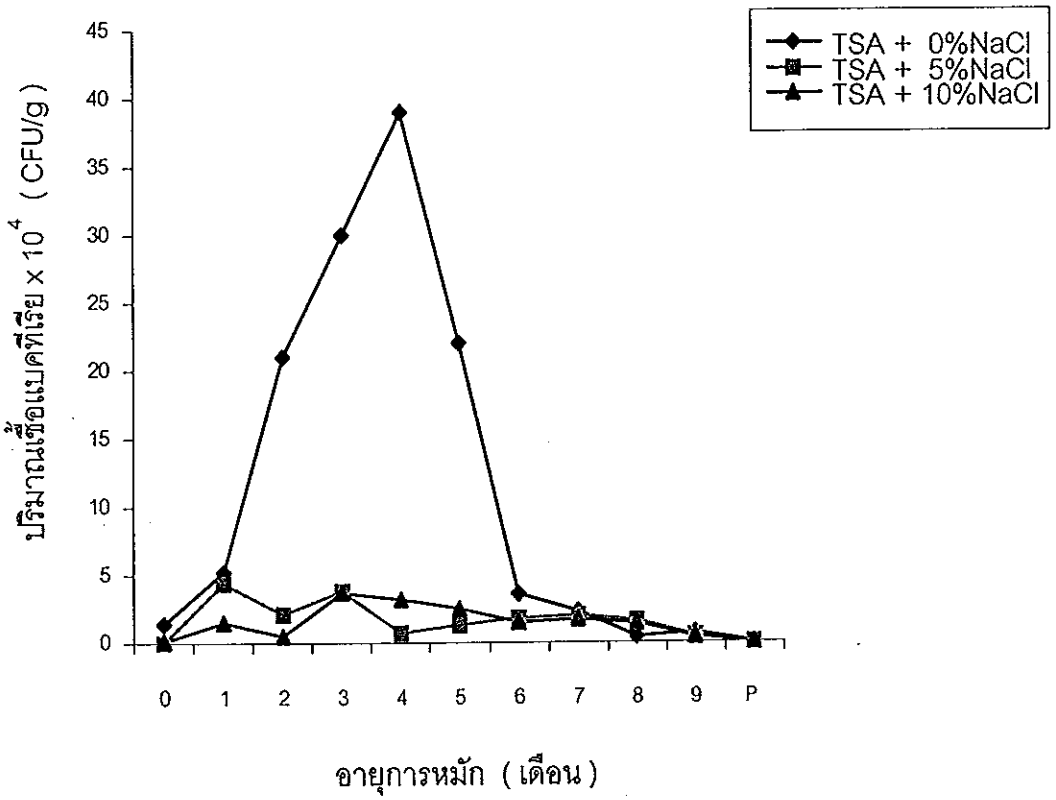
ส่วนแบคทีเรียที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRSA ซึ่งเป็น selective medium สำหรับแบคทีเรียแลคติก โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRSA มีสีเหลืองเมื่อมีแบคทีเรียแลคติกเติบโต เนื่องจากเติม brom cresol purple ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ลงไป พบว่า มีแบคทีเรียแลคติกมากที่สุด 4.0×10^5 CFU/g บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้น 5%NaCl และ 10%NaCl ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุการหมัก 8 เดือน แต่ไม่พบเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป

ตารางที่ 4 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ที่ระยะต่าง ๆ

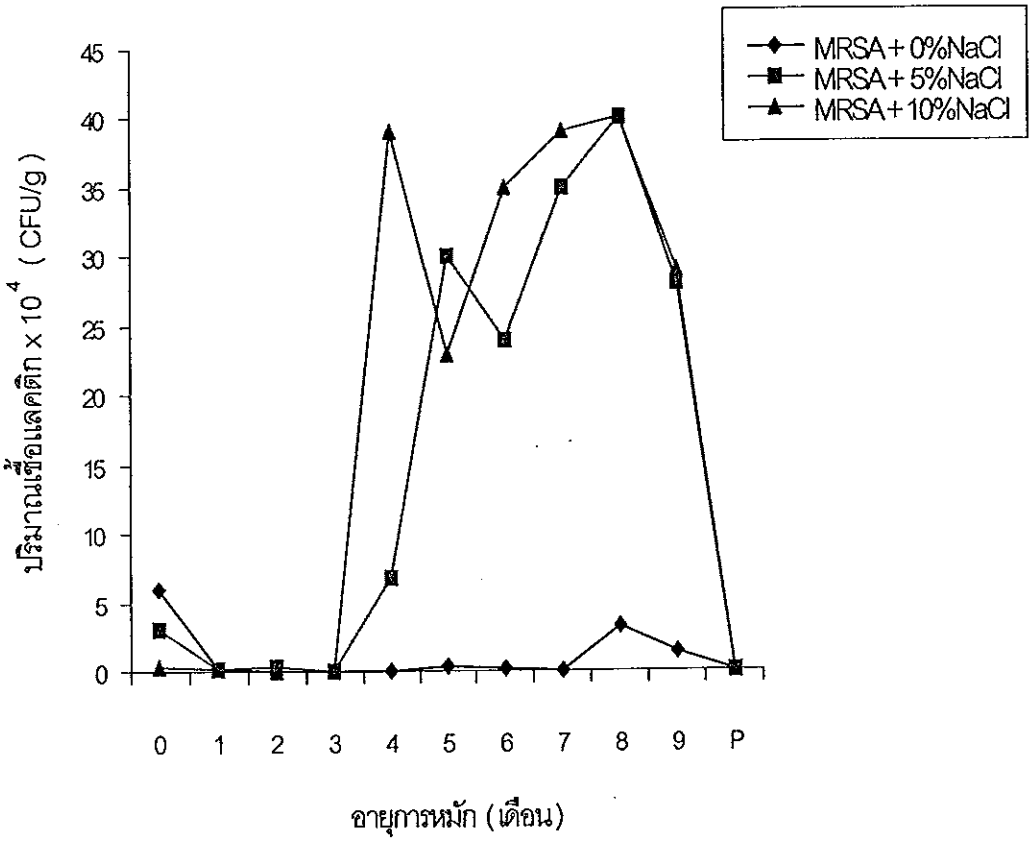
อายุการหมักเต้าหู้ยี้ (เดือน)	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)								
	TSA + NaCl (%)			MRSA + NaCl (%)			THIO + NaCl (%)		
	0	5	10	0	5	10	0	5	10
เริ่มต้น	$1.4x10^4$	$4.8x10^2$	$7.3x10^2$	$6.0x10^4$	$3.0x10^4$	$3.0x10^3$	$4.8x10^3$	$3.2x10^4$	$3.0x10^3$
1	$5.2x10^4$	$4.4x10^4$	$1.5x10^4$	$1.8x10^3$	$2.0x10^3$	$1.2x10^3$	$4.0x10^4$	$3.2x10^4$	$2.3x10^4$
2	$2.1x10^5$	$2.1x10^4$	$4.8x10^3$	$4.0x10^3$	$3.3x10^3$	$4.8x10^2$	$7.2x10^3$	$3.7x10^4$	$2.9x10^3$
3	$3.0x10^5$	$3.8x10^4$	$3.7x10^4$	$5.6x10^2$	$8.4x10^2$	$5.2x10^2$	$2.3x10^3$	$2.7x10^3$	$2.0x10^3$
4	$3.9x10^5$	$6.8x10^3$	$3.2x10^4$	$4.0x10^2$	$6.8x10^4$	$3.9x10^5$	$9.2x10^3$	$1.6x10^3$	$3.0x10^3$
5	$2.2x10^5$	$1.3x10^4$	$2.5x10^4$	$3.4x10^3$	$3.0x10^5$	$2.3x10^5$	$1.9x10^3$	$3.6x10^2$	$3.6x10^2$
6	$3.6x10^4$	$1.8x10^4$	$1.5x10^4$	$2.0x10^3$	$2.4x10^5$	$3.5x10^5$	$2.4x10^3$	$3.0x10^3$	$3.2x10^2$
7	$2.3x10^4$	$2.0x10^4$	$1.7x10^4$	$1.5x10^2$	$3.5x10^5$	$3.9x10^5$	$2.0x10^3$	$1.5x10^2$	$2.4x10^2$
8	$4.0x10^3$	$1.6x10^4$	$1.4x10^4$	$3.2x10^4$	$4.0x10^5$	$4.0x10^5$	$3.9x10^2$	$3.6x10^2$	$1.7x10^2$
9	$6.8x10^3$	$4.8x10^3$	$4.0x10^3$	$1.3x10^4$	$2.8x10^5$	$2.9x10^5$	4.8x10	$2.2x10^2$	$1.7x10^2$
P	$2.6x10^2$	$2.4x10^4$	$1.3x10^2$	-	-	-	1.9x10	1.6x10	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

อายุการหมักเต้าหู้ยี้ (เดือน)	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)								
	PDA + NaCl (%) (Mold)			PDA + NaCl (%) (Yeast)			HMA + NaCl (%)		
	0	5	10	0	5	10	10	15	20
เริ่มต้น	$5.2x10^4$	$5.6x10^3$	$2.3x10^3$	$7.6x10^5$	$5.2x10^5$	$4.8x10^5$	-	-	-
1	$3.9x10^5$	$2.9x10^4$	$2.0x10^3$	$4.4x10^5$	$4.4x10^5$	$2.5x10^5$	-	-	-
2	2.4x10	-	-	$8.0x10^5$	$7.2x10^5$	$4.8x10^5$	-	-	-
3	-	-	-	$4.4x10^3$	$4.4x10^3$	$2.6x10^4$	-	-	-
4	-	-	-	$3.1x10^4$	$3.2x10^4$	$1.7x10^4$	-	-	-
5	-	-	-	$3.6x10^4$	$2.1x10^4$	$3.4x10^4$	-	-	-
6	-	-	-	$1.9x10^4$	$2.4x10^4$	$3.0x10^5$	-	-	-
7	-	-	-	$3.5x10^4$	$2.4x10^5$	$3.0x10^5$	-	-	-
8	-	-	-	$4.4x10^5$	$1.2x10^5$	$7.2x10^5$	-	-	-
9	-	-	-	$3.5x10^5$	$1.2x10^5$	$8.8x10^4$	-	-	-
P	-	-	-	$2.5x10^4$	-	-	-	-	-



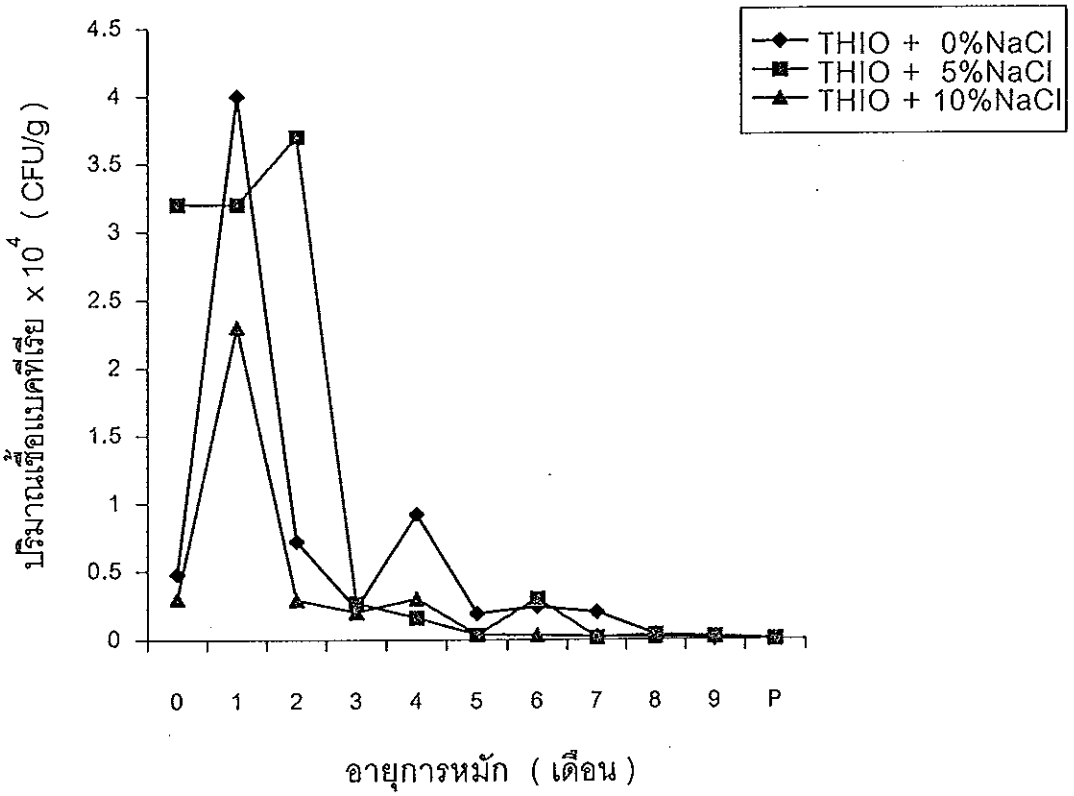
รูปที่ 6 การเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, P=ผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป



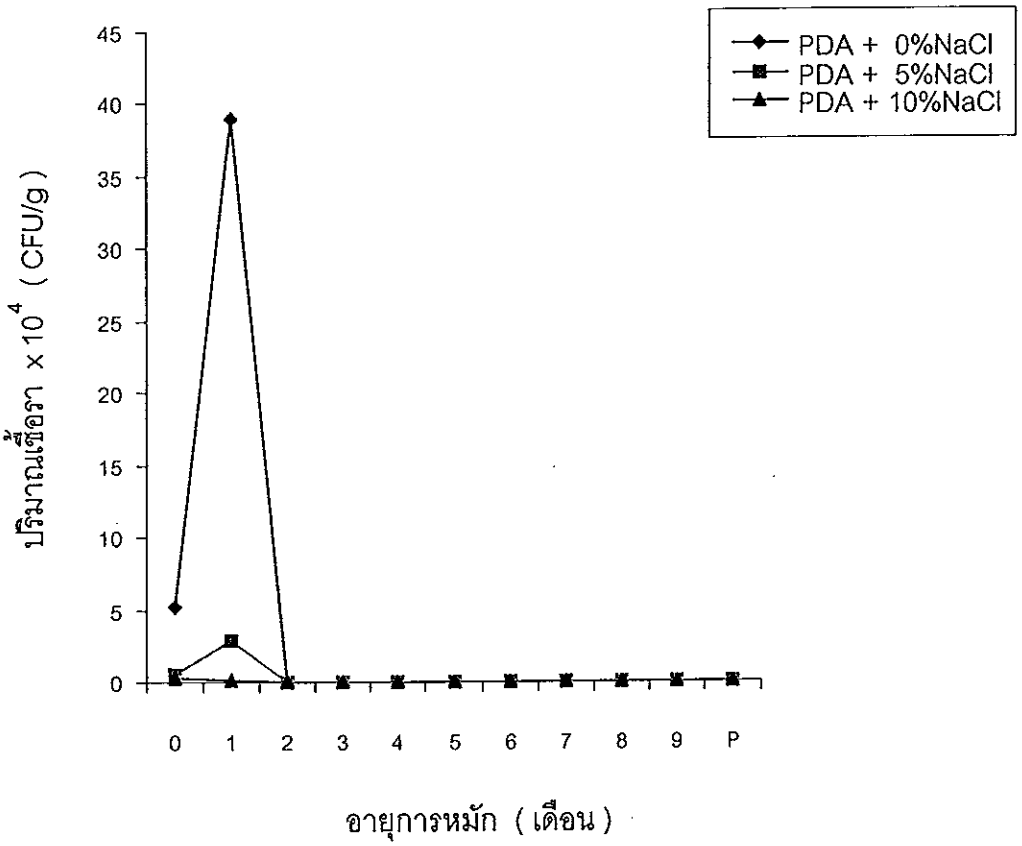
รูปที่ 7 การเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRSA ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, P = ผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป

เชื้อแบคทีเรียที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ THIO ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็น facultative anaerobe และไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่เป็น anaerobe จำนวนเชื้อที่พบมากที่สุดในตัวอย่างเต้าหู้ยี้เดือน 1 – 2 และจำนวนเชื้อลดลงเมื่อการหมักนานขึ้น

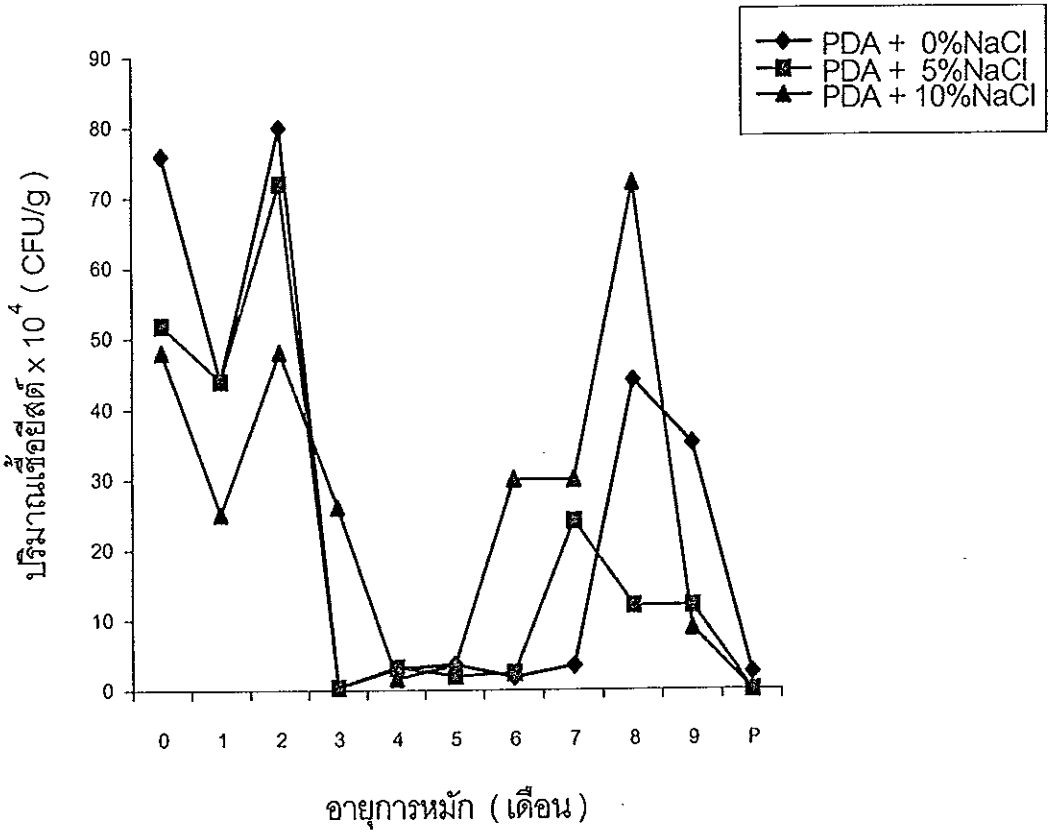
จากการตรวจนับเชื้อรา ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบเชื้อรามากที่สุด จำนวน 3.9×10^5 CFU/g ที่ความเข้มข้น 0%NaCl ในเต้าหู้ยี้อายุการหมัก 1 เดือน จำนวนเชื้อราลดลงเมื่อเต้าหู้ยี้มีอายุการหมัก 2 เดือน มีจำนวน 2.4 x 10 CFU/g และไม่พบเชื้อราในเต้าหู้ยี้หลังอายุการหมัก 2 เดือน รวมทั้งผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป ส่วนเชื้อราที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือมีจำนวนน้อยกว่าถึง 195 เท่า เชื้อยีสต์ที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีจำนวน 8.0×10^5 CFU/g ในอายุการหมัก 2 เดือนแรก จากนั้นจำนวนเชื้อลดลง แล้วเพิ่มจำนวนอีกครั้งเมื่ออายุการหมัก 8 เดือน และไม่พบเชื้อ Halophilic bacteria ที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Halobacterium Medium Agar



รูปที่ 8 การเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ THIO ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, P = ผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป



รูปที่ 9 การเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 1 สัปดาห์, P=ผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป



รูปที่ 10 การเติบโตของเชื้อยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง, P=ผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป

2. ปริมาณจุลินทรีย์จากโคจิ เกลือ และผ้าขาวที่ใช้ปิดโคจิ

จากการตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดในโคจิ ซึ่งเตรียมโดยนำข้าวที่หุงแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น เกลี่ยลงในกระด้ง แล้ววางทิ้งไว้ 15 วัน และใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมักตัวอย่างเต้าหู้ยี้ (ตารางที่ 5) พบว่า มีเชื้อแบคทีเรีย 1.8×10^6, 8.8×10^5 และ 4.0×10^5 CFU/g ที่ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10%NaCl ตามลำดับ และมีเชื้อรา 2.1×10^6, 3.8×10^6 และ 9.2×10^5 CFU/g ที่ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10%NaCl ตามลำดับ จุลินทรีย์ในเกลือ ซึ่งเป็นส่วนผสมในการหมักตัวอย่างเต้าหู้ยี้ (ตารางที่ 6) พบว่า มีแบคทีเรีย 2.2×10^2, 1.6×10^4 และ 3.5×10^5 CFU/g ที่ความเข้มข้น 0%, 5% และ 10%NaCl ตามลำดับ และจุลินทรีย์จากผ้าขาวซึ่งใช้ปิดโคจิ (ตารางที่ 7) พบว่า มีเชื้อแบคทีเรีย 2.7×10^5, 5.2×10^4 และ 3.7×10^5 CFU/g ที่เกลือความเข้มข้น 0%, 5% และ 10%NaCl ตามลำดับ และมีเชื้อรา 7.6×10^4, 6.0×10^3 และ 2.8×10^4 CFU/g ที่เกลือความเข้มข้น 0%, 5% และ 10%NaCl ตามลำดับ

ตารางที่ 5 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในโคจิ (Koji) ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)								
TSA + NaCl (%)			MRSA + NaCl (%)			THIO + NaCl (%)		
0	5	10	0	5	10	0	5	10
1.8×10^6	8.8×10^5	4.0×10^5	-	-	-	3.0×10^6	3.2×10^5	1.9×10^5

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)								
PDA + NaCl (%) (Mold)			PDA + NaCl (%) (Yeast)			HMA + NaCl (%)		
0	5	10	0	5	10	10	15	20
2.1×10^6	3.8×10^6	9.2×10^5	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 6 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในเกลือ ซึ่งเป็นส่วนผสมในการหมักเต้าหู้ยี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)								
TSA + NaCl (%)			MRSA + NaCl (%)			THIO + NaCl (%)		
0	5	10	0	5	10	0	5	10
$2.2x10^2$	$1.6x10^4$	$3.5x10^5$	-	-	-	2.4x10	2.1x10	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)								
PDA + NaCl (%) (Mold)			PDA + NaCl (%) (Yeast)			HMA + NaCl (%)		
0	5	10	0	5	10	10	15	20
-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบบนผ้าขาว ซึ่งใช้ปิดโคจิ (Koji) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)								
TSA + NaCl (%)			MRSA + NaCl (%)			THIO + NaCl (%)		
0	5	10	0	5	10	0		10
$2.7x10^5$	$5.2x10^4$	$3.7x10^5$	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)								
PDA + NaCl (%) (Mold)			PDA + NaCl (%) (Yeast)			HMA + NaCl (%)		
0	5	10	0	5	10	10	15	20
$7.6x10^4$	$6.0x10^3$	$2.8x10^4$	-	-	-	-	-	-

3. การบ่งชี้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ทำโดยคัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีที่เหมือนกัน ซึ่งมีทั้งหมด 20 สายพันธุ์ (ตารางที่ 8) จำแนกเป็น เชื้อแบคทีเรีย 14 สายพันธุ์ รหัส PS901- PS914 เชื้อรา 3 สายพันธุ์ รหัส PS915 – PS917 และเชื้อยีสต์ 3 สายพันธุ์ รหัส PS918 – PS920 ผลการบ่งชี้สกุลของจุลินทรีย์ (ตารางที่ 9) (ภาคผนวก ข ตารางที่ 15, 16) พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ PS901 - PS912 เป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ซึ่งสามารถตรวจพบทุกตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการหมัก แบคทีเรียสายพันธุ์ PS913 เป็น *Staphylococcus* ตรวจพบในตัวอย่างช่วง 2 เดือนแรก และแบคทีเรียสายพันธุ์ PS914 เป็น *Pediococcus* ซึ่งตรวจพบตลอดการหมัก ยกเว้นผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (P) ส่วน anaerobe bacteria และ extremely halophilic bacteria ตรวจไม่พบในทุกตัวอย่างของเต้าหู้ยี้

ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ PS915 เป็นเชื้อราสกุล *Aspergillus* (รูปที่ 11) สายพันธุ์ PS916 เป็น *Penicillium* (รูปที่ 12) และสายพันธุ์ PS917 เป็น *Syncephalastrum* (รูปที่ 13) ซึ่งตรวจพบในตัวอย่างอายุ 2 เดือนแรก ส่วนสายพันธุ์ PS918 เป็นยีสต์สกุล *Saccharomyces* ซึ่งตรวจพบในทุกตัวอย่าง สายพันธุ์ PS919 เป็นยีสต์สกุล *Pichia* และสายพันธุ์ PS920 เป็นยีสต์สกุล *Debaryomyces* ซึ่งตรวจพบในตัวอย่างช่วง 1 เดือน และ 5 เดือนแรกของการหมัก ตามลำดับ

ส่วนจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในโคจิ (ตารางที่ 10) คือ *Bacillus* สายพันธุ์ PS903, PS906, PS910, *Aspergillus* และ *Syncephalastrum* จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในเกลือ คือ *Bacillus* สายพันธุ์ PS906, PS909 และ PS910 และจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากผ้าขาว คือ *Bacillus* สายพันธุ์ PS903, PS906, PS909, PS910, PS912, *Aspergillus* และ *Penicillium*

ตารางที่ 8 ชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

Strain	PS number
Bacillus	PS901-PS912
Staphylococcus	PS913
Pediococcus	PS914
Aspergillus	PS915
Penicillium	PS916
Syncephalastrum	PS917
Saccharomyces	PS918
Pichia	PS919
Debaryomyces	PS920

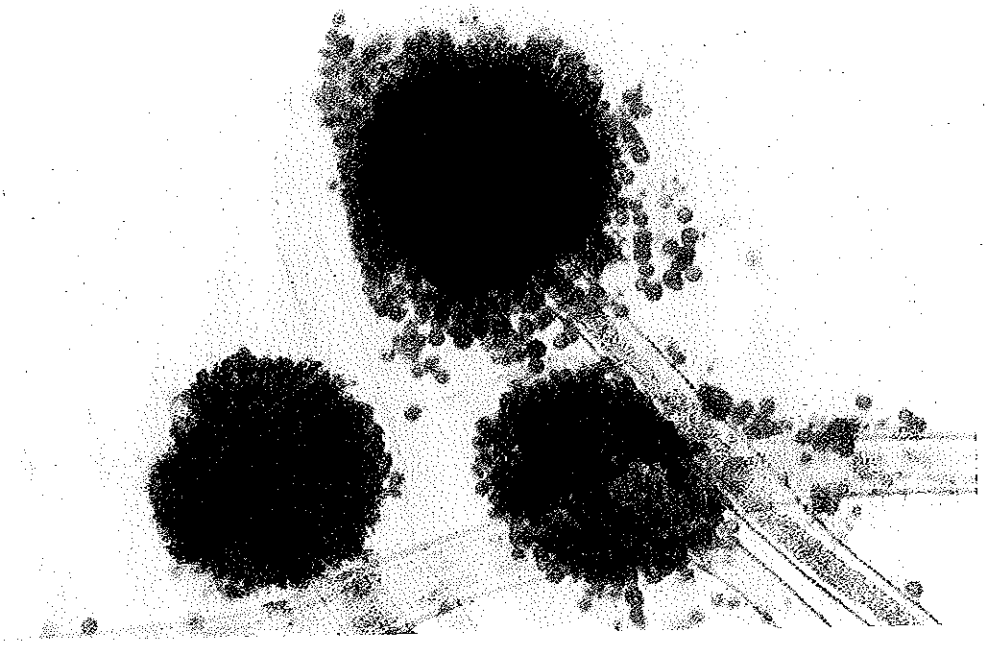
ตารางที่ 9 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุต่าง ๆ กัน

สายพันธุ์	ระยะเวลาการหมัก (เดือน)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	P
Bacillus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Staphylococcus	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pediococcus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Anaerobic bacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Halophilic bacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aspergillus	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillium	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Syncephalastrum	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharomyces	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pichia	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Debaryomyces	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

<u>หมายเหตุ</u> + = ตรวจพบ

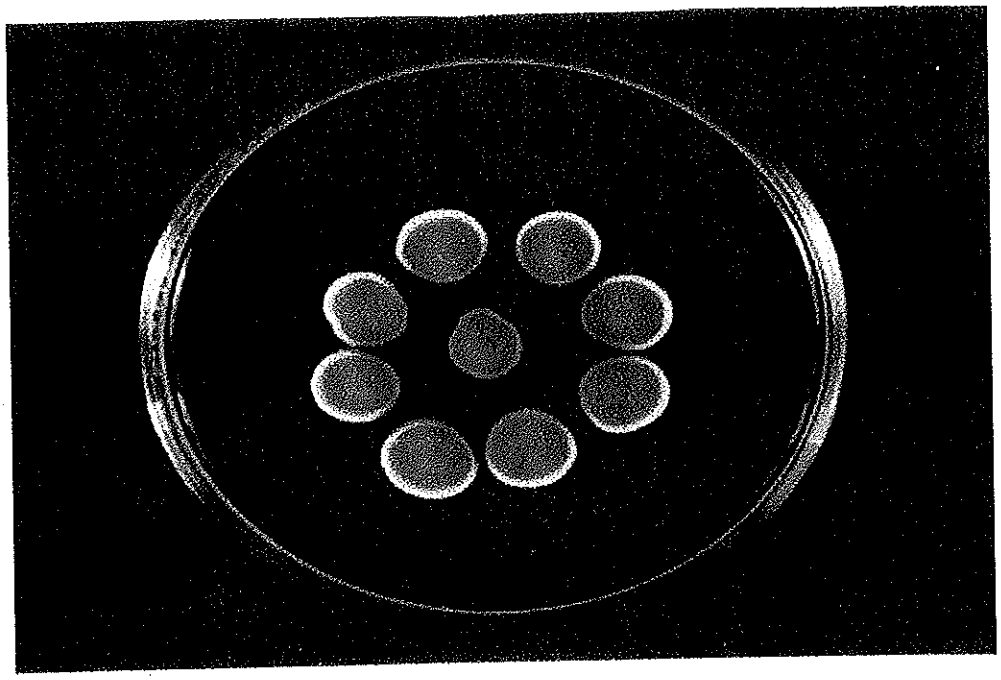
\- = ตรวจไม่พบ

a

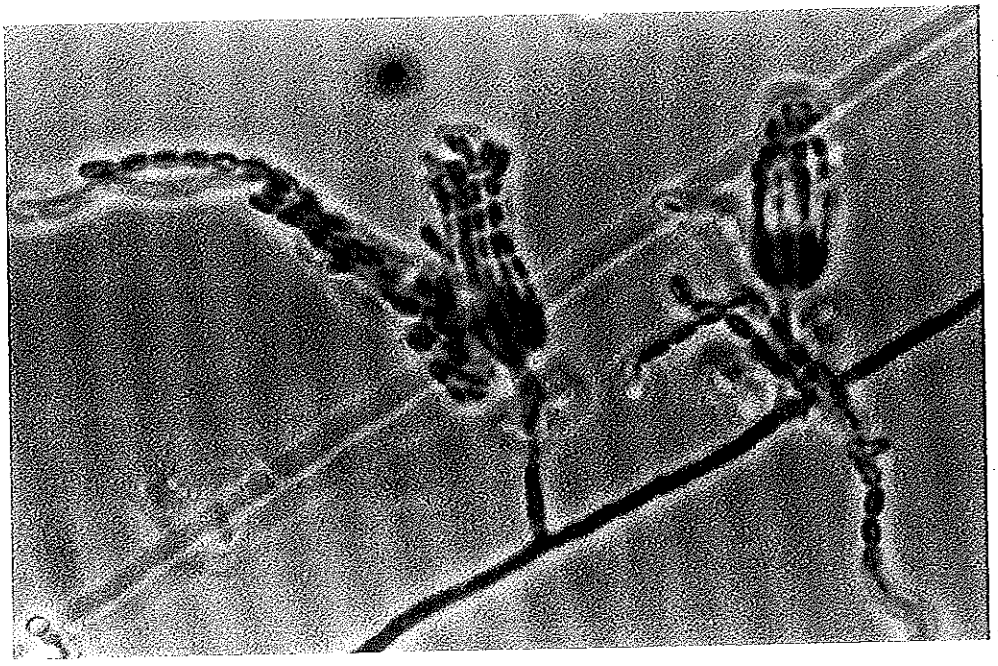


b

รูปที่ 11 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Aspergillus* สายพันธุ์ PS915 (a) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (b)



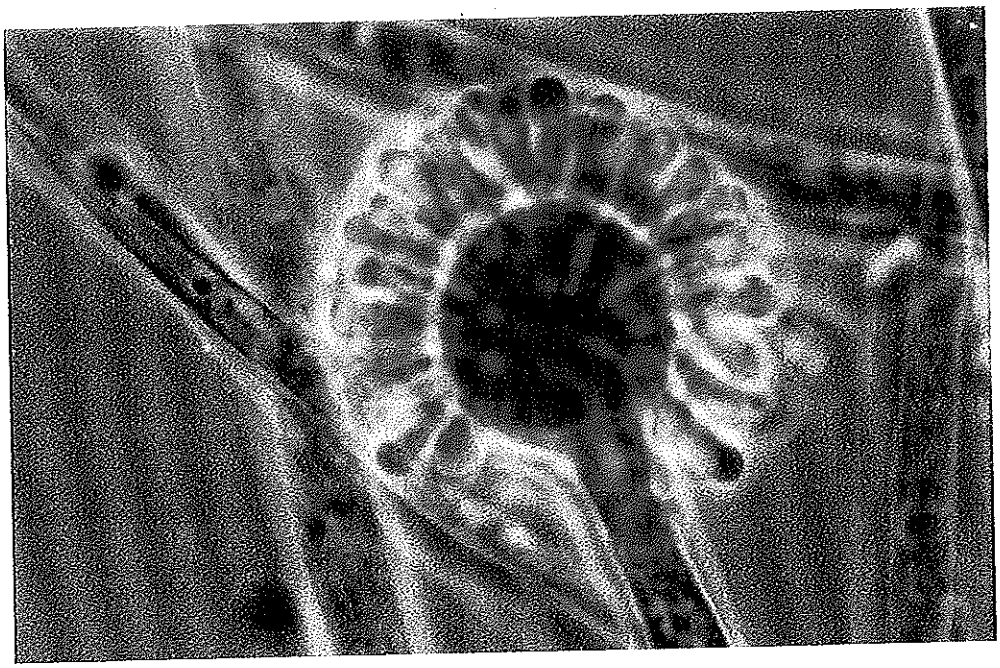
a



b

รูปที่ 12 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Penicillium* สายพันธุ์ PS916 (a) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (b)

a



b

รูปที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Syncephalastrum* สายพันธุ์ PS917 (a) ลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (b)

ตารางที่ 10 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในโคจิ เกลือ และผ้าขาวที่ใช้ปิดโคจิ

สายพันธุ์	ระยะเวลาการหมัก (เดือน)		
	โคจิ	เกลือ	ผ้าขาว
Bacillus	+	+	+
Staphylococcus	-	-	-
Pediococcus	-	-	-
Anaerobic bacteria	-	-	-
Halophilic bacteria	-	-	-
Aspergillus	+	-	+
Penicillium	-	-	+
Syncephalastrum	+	-	-
Saccharomyces	-	-	-
Pichia	-	-	-
Debaryomyces	-	-	-

หมายเหตุ + = ตรวจพบ

\- = ตรวจไม่พบ

4. การเติบโตของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ (ตารางที่ 11) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ (100%) เป็นจุลินทรีย์ทนเกลือ (halotolerant) ความเข้มข้น 5%, จุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ ยกเว้น *Bacillus* PS901, PS906 และ PS912 (85%) สามารถทนเกลือความเข้มข้น 10%, จุลินทรีย์ *Bacillus* PS902, PS903, *Staphylococcus*, *Penicillium*, *Sencephalastrum* และ *Pichia* (40%) สามารถทนเกลือความเข้มข้น 15% ส่วนจุลินทรีย์ *Saccharomyces* และ *Debaryomyces* (10%) สามารถทนเกลือความเข้มข้น 20%

5. การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน ของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้

การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน โดยจุลินทรีย์สกุลต่าง ๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ (ตารางที่ 12) พบว่า จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน ได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS906, PS907, PS908, PS909, PS910 และ PS911 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและแป้ง ได้แก่ *Aspergillus* และ *Penicillium* จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและไขมัน ได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS901, PS902, PS905 และ PS912 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง และไขมัน ได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS903 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้อย่างเดียวได้แก่ *Pediococcus* และจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันได้อย่างเดียว ได้แก่ *Staphylococcus*, *Syncephalastrum*, *Saccharomyces*, *Pichia* และ *Debaryomyces* จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่สุดได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS912 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีที่สุดได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS903 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันได้ดีที่สุดได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS906 และจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันได้ดีที่สุดได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS906

ตารางที่ 11 การเติบโตของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ กัน

สายพันธุ์	การเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม NaCl				
	0%	5%	10%	15%	20%
Bacillus PS901	+++	++	-	-	-
Bacillus PS902	+++	+++	++	+	-
Bacillus PS903	+++	+++	++	+	-
Bacillus PS904	+++	+++	+	-	-
Bacillus PS905	+++	++	+	-	-
Bacillus PS906	++	++	-	-	-
Bacillus PS907	+++	++	+	-	-
Bacillus PS908	+++	+++	++	-	-
Bacillus PS909	+++	+++	+	-	-
Bacillus PS910	+++	++	+	-	-
Bacillus PS911	++	+++	+	-	-
Bacillus PS912	+++	++	-	-	-
Staphylococcus PS913	+++	+++	++	+	-
Pediococcus PS914	+++	++	++	-	-
Aspergillus PS915	+++	++	+	-	-
Penicillium PS916	+++	++	+	+	-
Syncephalastrum PS917	+++	++	+	+	-
Saccharomyces PS918	+++	+++	+++	++	+
Pichia PS919	+++	+++	++	+	-
Debaryomyces PS920	+++	+++	+++	++	+

หมายเหตุ - = ไม่เติบโต ++ = เติบโตได้ดี

\+ = เติบโตได้ +++ = เติบโตได้ดีมาก

ตารางที่ 12 การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้

สายพันธุ์	Degree of hydrolysis*		
	Protease	Amylase	Lipase
Bacillus PS901	1.94	-	2.48
Bacillus PS902	2.40	-	1.34
Bacillus PS903	-	2.63	2.23
Bacillus PS904	1.09	1.10	1.91
Bacillus PS905	2.67	-	1.59
Bacillus PS906	2.76	1.35	3.38
Bacillus PS907	1.62	1.21	1.78
Bacillus PS908	2.01	1.29	2.14
Bacillus PS909	1.86	1.27	1.91
Bacillus PS910	2.17	1.24	2.92
Bacillus PS911	1.15	1.43	3.20
Bacillus PS912	2.87	-	1.38
Staphylococcus PS913	-	-	1.80
Pediococcus PS914	-	1.49	-
Aspergillus PS915	1.82	1.66	-
Penicillium PS916	1.29	1.90	-
Syncephalastrum PS917	-	-	1.16
Saccharomyces PS918	-	-	2.87
Pichia PS919	-	-	2.52
Debaryomyces PS920	-	-	1.43

<u>หมายเหตุ</u> * Degree of hydrolysis หมายถึง ความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มม.) หารด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มม.)

6. คุณภาพทางอาหารของตัวอย่างเต้าหู้ยี้

จากการตรวจสอบคุณภาพทางอาหารของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ โดยตรวจหาปริมาณโปรตีน น้ำตาล ไขมัน เกลือ ความชื้น เถ้า เส้นใย ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิ (ตารางที่ 13) ปรากฏว่า ปริมาณคุณภาพทางอาหารไม่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก โดยมีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 20.01 - 21.91% ปริมาณน้ำตาลอยู่ระหว่าง 4.23 – 7.16% ปริมาณไขมันอยู่ระหว่าง 9.57 – 12.76% ปริมาณเกลืออยู่ระหว่าง 10.13 – 11.26% ปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 47.55 – 51.35% ปริมาณเถ้าอยู่ระหว่าง 12.43 – 15.63 % ปริมาณเส้นใยอยู่ระหว่าง 0.10 – 0.16% ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 4.99 – 5.75 และอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 29 – 31°ซ ส่วนผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีปริมาณโปรตีน 16.09%, น้ำตาล 9.14%, ไขมัน 7.20%, เกลือ 10.06%, ความชื้น 57.97%, เถ้า 9.24%, เส้นใย 0.12% ค่าความเป็นกรดด่าง 4.99 และอุณหภมิ 30 °ซ

ตารางที่ 13 คุณภาพทางอาหารของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิต

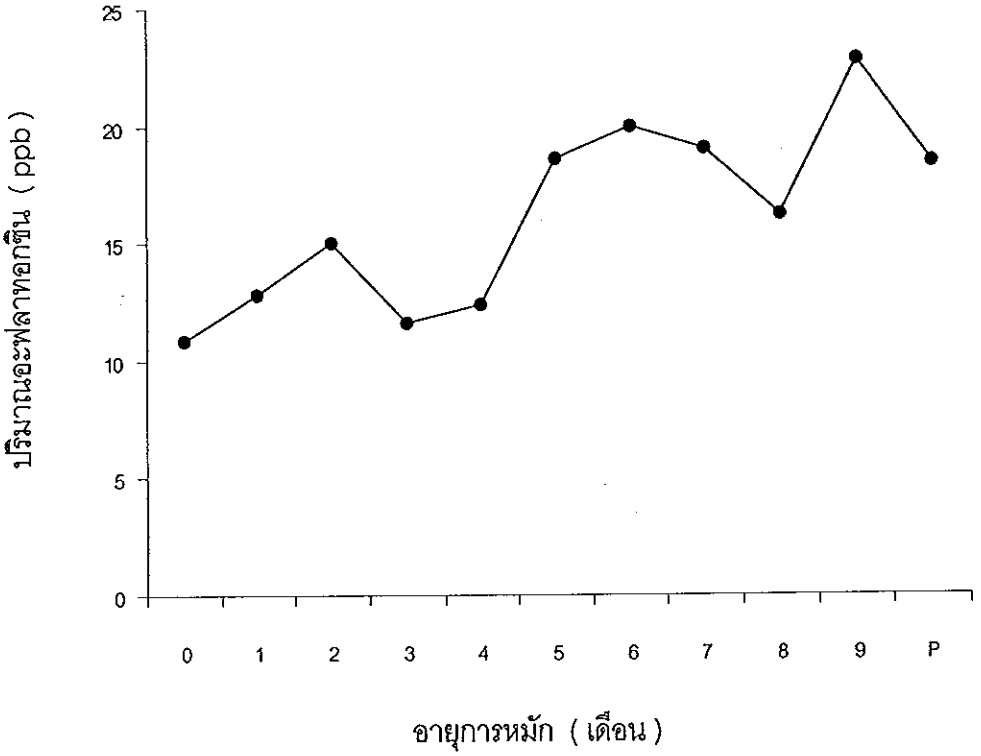
องค์ประกอบ	อายุตัวอย่างเต้าหู้ยี้ (เดือน)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	P*
โปรตีน (%)	20.01	21.07	21.72	21.61	21.57	21.78	21.71	20.40	21.91	21.12	16.09
น้ำตาล (%)	5.22	7.16	6.12	5.12	6.28	4.29	4.23	5.20	5.32	6.22	9.14
ไขมัน (%)	12.76	9.57	10.55	9.86	9.95	10.88	11.71	11.62	12.35	11.78	7.20
เกลือ (%)	10.13	10.89	10.92	11.18	11.02	11.13	11.03	11.17	11.24	11.26	10.06
ความชื้น (%)	47.68	49.47	47.55	50.44	50.47	50.57	50.11	51.35	47.88	48.35	57.97
เถ้า (%)	15.63	13.23	15.06	13.97	13.15	13.48	13.24	12.43	13.54	13.53	9.24
เส้นใย (%)	0.13	0.15	0.14	0.12	0.10	0.13	0.16	0.15	0.15	0.11	0.12
กรดด่าง	5.21	5.11	5.10	5.48	5.33	5.40	5.41	5.75	5.54	5.11	4.99
อุณหภูมิ	29	30	30	32	30	30	31	30	30	31	30

หมายเหตุ P = ผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป

7. ปริมาณอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้

จากการตรวจสอบหาปริมาณสารอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิต (รูปที่ 14) พบว่า มีปริมาณอะฟลาทอกซินเริ่มต้นในตัวอย่างแรกของการหมักเท่ากับ 10.8 ppb และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (20 ppb) เมื่ออายุการหมัก 6 เดือน และมีปริมาณสูงสุด 22.8 ppb ในเดือนที่ 9 ของการหมัก ส่วนในผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีปริมาณอะฟลาทอกซิน 18.4 ppb

จากการตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินจากเชื้อรา 3 ชนิด ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ ได้แก่ *Aspergillus, Penicillium* และ *Syncephalastrum* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 , 3 และ 5 วัน และนำ supernatant และสารละลายจาก cell pellet มาตรวจหาอะฟลาทอกซิน (ตารางที่ 14) พบว่า เชื้อรา *Aspergillus* , *Penicillium* และ *Syncephalastrum* สามารถผลิตอะฟลาทอกซินออกสู่นอกเซลล์มากที่สุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีปริมาณ 176, 124 และ 44 ppb ตามลำดับ และยังสามารถตรวจพบอะฟลาทอกซินที่อยู่ภายในเซลล์ของเชื้อราทั้ง 3 สกุลด้วย แต่มีอยู่ในปริมาณที่น้อยกว่าอะฟลาทอกซินที่อยู่นอกเซลล์ ประมาณ 2 เท่า



รูปที่ 13 ปริมาณอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 14 ปริมาณอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบในเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่อุณหภูมิ 30 °ซ

อายุของเชื้อรา	ปริมาณอะฟลาทอกซิน (ppb)*		
	Aspergillus	*Penicillium*	*Syncephalastrum*
วันแรก	4	2	0
วันที่ 3			
Supernatant	80	40	20
Cell pellet	46	24	20
วันที่ 5			
Supernatant	176	124	44
Cell pellet	92	64	28

หมายเหตุ * ppb = part per billion

4. วิจารณ์

จุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุต่าง ๆ ของการหมัก ได้แก่ *Bacillus, Staphylococcus, Pediococcus, Aspergillus, Penicillium, Syncephalastrum, Saccharomyces, Pichia* และ *Debaryomyces* จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในทุกตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการหมัก คือ *Bacillus, Pediococcus* และ *Saccharomyces* ส่วนจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นตรวจพบในช่วงอายุ 1 – 2 เดือน ของการหมัก ยกเว้น *Debaryomyces* ซึ่งตรวจพบหลังจากหมักไปได้ 1 เดือน และยังคงมีอยู่ถึง 5 เดือน ของการหมัก เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มาจากวัตถุดิบที่ทำเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น คือ โคจิ ซึ่งตรวจพบ *Bacillus, Aspergillus* และ *Syncephalastrum* ผ้าขาวที่ใช้ปิดโคจิตรวจพบ *Bacillus, Aspergillus* และ *Penicillium* และเกลือที่ใช้ตรวจพบ *Bacillus* ส่วน *Pediococcus* ซึ่งตรวจพบในระยะเริ่มต้นของการหมัก (เดือนที่ 0) นั้นน่าจะมาจากเต้าหู้ที่เป็นวัตถุดิบ ส่วนเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป พบแต่ *Bacillus* และ *Saccharomyces* ซึ่งสอดคล้องกับ สิริพร ภูมะธน (2540) ที่รายงานว่า จากการสุ่มเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้ของโรงงานเดียวกัน โดยเก็บจากโอ่งหมักต่าง ๆ ที่มีอายุตั้งแต่ 1 – 8 เดือน พบเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus, Staphylococcus, Aspergillus, Penicillium, Syncephalastrum, Saccharomyces, Pichia* และ *Debaryomyces* และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสุวรรณี แสงแก้ว (2543) ที่รายงานว่า เชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่ซื้อตามท้องตลาดในเขตจังหวัดสงขลา ซึ่งพบเชื้อ *Bacillus* และ *Saccharomyces* ในทุกตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดยังคงหลงเหลือจากกระบวนการหมัก แม้ว่ามีการต้มผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้ายก่อนวางจำหน่าย

Wai (1929) ได้บ่งชี้เชื้อราที่ใช้ในการผลิตเต้าหู้ยี้แบบธรรมชาติ ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ *Mucor sufu* ต่อมามีรายงานเชื้อราสายพันธุ์ *Actinomucor elegans, A. taiwanensis, Mucor hiemalis, M. silvaticus* และ *M. subtillissimus*

(ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536) ซึ่งต่างจากการวิจัยครั้งนี้ คือ ตรวจพบเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* และ *Syncephalastrum* ส่วนแบคทีเรียตรวจพบสายพันธุ์ *Bacillus*

จากการวิเคราะห์ปริมาณเกลือที่มีในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ พบว่า มีเกลือความเข้มข้น 10.06% ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทนเกลือสามารถเติบโตและยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้ แต่การที่ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือความเข้มข้นสูงอาจเนื่องจาก เชื้อจุลินทรีย์ชอบเกลือเติบโตได้ดีในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 15 - 25% ซึ่งเป็นสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูงกว่าในเต้าหู้ยี้

เชื้อ *Aspergillus* และ *Bacillus* สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและแป้งได้ดี *Pediococcus* สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้อย่างเดียว ดังนั้น เชื้อดังกล่าวน่าจะมีบทบาทขั้นแรกในการย่อยสับสเตรท (เต้าหู้) ส่วน *Saccharomyces* น่าจะมีบทบาทในการทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติของเต้าหู้ยี้ โดยสามารถใช้น้ำตาลแล้วได้กลิ่นแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังสามารถแต่งกลิ่นและรสของผลิตภัณฑ์โดยเติมแอลกอฮอล์ในน้ำเกลือ แอลกอฮอล์ที่ใส่จะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเกิดเป็นเอสเตอร์ที่มีกลิ่นหอม นอกจากนี้ แอลกอฮอล์ยังช่วยยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ต่าง ๆ อีกด้วย

จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น facultative thermophilic *B. liceniformis* สามารถผลิตเอนไซม์ทนความร้อนชนิด alkaline proteinase, strict thermophilic *B. thermoproteolyticus* และ *B. stearothermophilus* สามารถผลิตเอนไซม์ทนความร้อนชนิด neutral proteinase (Priest, 1977) แบคทีเรียที่สร้างสปอร์และต้องการอากาศในการเติบโต เช่น *Bacillus cereus, B. subtilis, B. megaterium* (วนิดา ฤทธิเดช, 2542) เชื้อรา *Aspergillus oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส (วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532) และยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* สามารถผลิตเอนไซม์ neutral serine protease (Priest, 1977) ส่วนเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันได้ดี ได้แก่ *Aspergillus niger* (Sugihara *et al.*, 1988), *Aspergillus oryzae* (Ohnishi *et al.*, 1994), *Penicillium cyclopium* (Isobe

et al., 1988, Okumura *et al.*, 1980) และ *Penicillium roqueforti* (Petrovic *et al.*, 1990)

การตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิต พบว่า ในระหว่างการหมัก ปริมาณโปรตีน น้ำตาล และไขมันมีค่าคงที่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์เป็นจุลินทรีย์ทนเกลือ จึงมีการเติบโตได้น้อยลงเมื่อปริมาณเกลือสูงขึ้น นอกจากนี้ปริมาณอาหารดังกล่าวเป็นค่าปริมาณรวมของเต้าหู้ยี้และเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารอีกด้วย แต่เมื่อเป็นผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป ปริมาณโปรตีนและไขมันมีค่าลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีการเติมน้ำต้มกาก ซึ่งประกอบด้วย กากเต้าหู้ยี้จากโอ่งหมักและเติมน้ำในปริมาณเท่ากัน แล้วนำไปต้มให้เดือด (100 °ซ) เป็นเวลา 10 นาที อีกประการหนึ่ง ปริมาณเกลือของผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปจากการทดลองนี้มีปริมาณ 10.06% ซึ่งสูงกว่ารายงานของ ประเสริฐ สายสิทธิ์ (2527) ที่ว่าปริมาณเกลือในเต้าหู้ยี้ มีค่า 6.72% ซึ่งทำให้มีผลในด้านรสชาติ คือทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเค็มมากกว่าปรกติ อย่างไรก็ตาม คุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปจากการทดลองนี้มีค่าปริมาณโปรตีน และไขมันมากกว่าเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปยี่ห้ออื่น ๆ (10 ยี่ห้อ) ซึ่งสำรวจโดย สุวรรณี แสงแก้ว (2543) มีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 9.9 – 13.3% ปริมาณน้ำตาลอยู่ระหว่าง 4.0 – 20.7% ปริมาณไขมันอยู่ระหว่าง 2.4 – 7.2% ปริมาณเกลืออยู่ระหว่าง 4.1 – 16.2% ปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 52.0 – 72.8% ปริมาณเถ้าอยู่ระหว่าง 5.9 – 18.8% และปริมาณเส้นใยอยู่ระหว่าง 0.1 –0.6% และมีคุณค่าทางอาหารมากกว่าที่ได้เคยมีรายงานมาแล้ว คือ มีปริมาณโปรตีน 10.04% ไขมัน 3.51% เกลือ 6.72% ความชื้น 70.36% เถ้า 9.47% และเส้นใย 0.35% (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2527)

จากการตรวจสอบหาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการหมัก และจากเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ โดยวิธี UV - Absorbance โดยนำ 10 กรัม ของเต้าหู้ยี้ที่บดละเอียดแต่ละอายุการหมัก และผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปสกัดด้วย methanol 20 มล. กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 และ micropore ได้ปริมาตรสุดท้าย 3 มล. นำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย uv – visible

spectrophotometer โดยใช้ methanol เป็น blank ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 223, 214, 242, 265 และ 362 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงมาหาสัดส่วนที่ 223/265 นาโนเมตร, 214/265 นาโนเมตร, 242/265 นาโนเมตร และ 362/265 นาโนเมตร นำค่าสัดส่วนที่ได้เปรียบเทียบกับค่าในตารางมาตรฐาน (ภาคผนวก ค) เพื่อหาว่าเต้าหู้ยี้แต่ละอายุการหมักและผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีการผลิตอะฟลาทอกซิน B_1 , B_2 , G_1 และ G_2 ซึ่งจากผลการตรวจสอบไม่พบอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ในเต้าหู้ยี้ทุกอายุการหมัก (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการดังกล่าว สามารถตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินที่มีอยู่ในระดับไมโครกรัมเท่านั้น ดังนั้น จึงได้ทำการทดลองต่อไปโดยวิธี Aflatoxin B1 ELISA Test Kit ซึ่งเป็นการตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซินได้ระดับนาโนกรัม แต่วิธีการนี้สามารถตรวจหาอะฟลาทอกซินได้เพียงชนิดเดียว คือ B_1 เนื่องจาก B_1 เป็นสารพิษอะฟลาทอกซินที่พบได้บ่อยที่สุดและมีระดับความเป็นพิษรุนแรงที่สุด พบว่า เต้าหู้ยี้ที่ตรวจหาทั้งหมดมีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วง 10.8 – 22.8 ppb โดยเต้าหู้ยี้อายุการหมัก 9 เดือน ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินมากที่สุด คือ 22.8 ppb และพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุการหมักเริ่มต้นมีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินน้อยที่สุด คือ 10.8 ppb ซึ่งสารพิษในผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีปริมาณ 18.4 ppb ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันเล็กน้อยกับรายงานของสุวรรณี แสงแก้ว (2543) ที่ได้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปชนิดเดียวกัน พบว่ามีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน 15.2 ppb แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่ตรวจสอบได้ก็ไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) ซึ่งกำหนดให้อาหารและผลิตภัณฑ์ถั่วมีอะฟลาทอกซินได้ไม่เกิน 20 ppb และในน้ำนมมีได้ไม่เกิน 0.5 ppb

การพบสารพิษอะฟลาทอกซินในเต้าหู้ยี้ อาจเนื่องมาจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเป็นถั่วเหลือง ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อรา ในแหล่งธรรมชาติและระหว่างการเก็บ นอกจากนี้อะฟลาทอกซินยังมาจากเชื้อราที่เป็นเชื้อเริ่มต้นของการหมักที่อยู่บนโคจิ ซึ่งการทดลองนี้ตรวจพบสกุล *Aspergillus, Penicillium* และ *Syncephalastrum*

โดยผลิตอะฟลาทอกซินปริมาณสูงสุด 176, 124 และ 44 ppb ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง

ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ที่มีอะฟลาทอกซิน ถ้ามีการบริโภคอาหารชนิดเดิมอยู่เสมอ จะเกิดการสะสมของอะฟลาทอกซินในร่างกาย และก่อให้เกิดโรคมะเร็งตับ ปอด ไต และลำไส้ใหญ่ โดยมีอวัยวะเป้าหมายที่ไวต่ออะฟลาทอกซิน คือ มะเร็งตับ แต่โดยปรกติแล้วปริมาณต่ำ ๆ ของสารพิษนี้ ร่างกายสามารถกำจัดออกได้ และควรบริโภคอาหารให้หลากหลายชนิด ไม่ควรบริโภคอาหารชนิดเดียวกันซ้ำ ๆ อย่างต่อเนื่อง (แก้ว กังสดาลอำไพ, 2526) อารันต์ พัฒโนทัย (2528) รายงานว่า อะฟลาทอกซินในถั่วลิสงสามารถกำจัดได้ โดยใส่สารละลายเกลือแกงความเข้มข้น 10% แล้วนำไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 90 °ซ เป็นเวลา 30 นาที พบว่า สามารถลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินลงได้ 80-85% ดังนั้น จึงอาจเป็นไปได้ที่ตรวจพบปริมาณอะฟลาทอกซินปริมาณน้อยในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือความเข้มข้น 10%

การทดลองครั้งนี้จึงทำให้เข้าใจกระบวนการทางจุลชีววิทยาของการหมักเต้าหู้ยี้ รวมทั้งคุณภาพทางอาหารของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

5. สรุป

การตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดในเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิต พบแบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่ไม่พบแอนแอโรบิคแบคทีเรีย และแบคทีเรียชอบเกลือ จุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมดมี 20 สายพันธุ์ จำแนกเป็นแบคทีเรีย 14 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus* 12 สายพันธุ์ *Staphylococcus* 1 สายพันธุ์ *Pediococcus* 1 สายพันธุ์ รา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus* 1 สายพันธุ์ *Penicillium* 1 สายพันธุ์ *Syncephalastrum* 1 สายพันธุ์ และยีสต์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Saccharomyces* 1 สายพันธุ์ *Pichia* 1 สายพันธุ์ และ *Debaryomyces* 1 สายพันธุ์ *Bacillus* สายพันธุ์ PS906, PS909, PS910, *Saccharomyces* PS913 และ *Pediococcus* PS914 สามารถตรวจพบทุกอายุการหมัก รวมทั้งผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้เป็นจุลินทรีย์ทนเกลือ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่สุดได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS912 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีที่สุดได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS903 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันได้ดีที่สุดได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS906 และจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันได้ดีที่สุดได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS906

คุณภาพทางอาหารของเต้าหู้ยี้ตลอดการหมัก พบว่า มีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 20.01 – 21.91% ปริมาณน้ำตาล 4.23 – 7.16% ปริมาณไขมัน 9.57 – 12.76% ปริมาณเกลือ 10.13 – 11.26% ปริมาณความชื้น 47.55 – 51.35% ปริมาณเถ้า 12.43 – 15.63% ปริมาณเส้นใย 0.10 – 0.16% ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 4.99 – 5.75% และอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 29 – 31 °ซ ส่วนผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีปริมาณโปรตีน 16.09% คาร์โบไฮเดรต 9.14% ไขมัน 7.20% เกลือ 10.06% ความชื้น 57.97% เถ้า 9.24% เส้นใย 0.12% ความเป็นกรดด่าง 4.99 และอุณหภูมิ 30 °ซ นอกจากนี้ยังตรวจพบปริมาณสารอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการหมักซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง 10.8 – 22.8 ppb สารอะฟลาทอกซินในผลิต

ภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีปริมาณ 18.4 ppb (ซึ่งไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ คือ 20 ppb) และยังตรวจพบสารอะฟลาทอกซินจากเชื้อราที่แยกได้ คือ *Aspergillus, Penicillium* และ *Syncephalastrum* มีปริมาณอยู่ในช่วง 0.0 – 176 ppb โดยเชื้อราสามารถผลิตอะฟลาทอกซินออกสู่ภายนอกเซลล์มากที่สุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีปริมาณ 176, 124 และ 44 ppb ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตรกองโรคพืชและจุลชีววิทยา. 2543. คู่มือใช้งานชd ตรวจสอบแอฟลาทอกซิน บี1. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ : 1-7.

แก้ว กังสดาลอำไพ. 2526. สารพิษในอาหาร ตอนที่ 2 ปัญหาสารพิษจากเชื้อราในอาหาร. ว. รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพ ฯ. 14 : 25-31.

ฉัตรชัย สังข์ผุด. 2542. การย่อยสลายน้ำมันปาล์มโอเลอีนในตัวทำละลายอินทรีย์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตริงรูป. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ฉายแสง แนคเลอร์, M. Nagler, อรุณศรี วงษ์อุไร และ ดารา พวงสุวรรณ. 2529. ศึกษาและปรับปรุงการตรวจหาสารแอฟลาทอกซินโดยวิธี BGYF. รายงานผลการวิจัย พ.ศ. 2529 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ : 141-154.

ฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์. 2541. ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. ผลิตภัณฑ์เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์. หน้า 46-66.

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2533. สารพิษแอฟลาทอกซินในถั่วลิสง. รายงานการสัมมนาถั่วลิสงแห่งชาติ ครั้งที่ 9 ณ โครงการชลประทานลำพระเพลิง จ. นครราชสีมา. 7-11 พฤษภาคม 2533 หน้า 113-134.

นิธิยา และ วิบูลย์ รัตนาปนนท์. 2543. สารพิษในอาหาร. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์. หน้า 135-155.

นิศานาถ ชัยงาม. 2540. การทำเต้าหู้ยี้. รายงานการฝึกงานทางจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ : 35-41.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. 2527. ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า123-126.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไมตรี สุทธิจิตต์. 2531. สารพิษรอบตัวเรา. ภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. หน้า 340.

ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต. 2536. จุลินทรีย์กับอุตสาหกรรมอาหาร. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา. หน้า 237-242.

วนิดา ฤทธิเดช. 2542. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์อะไมเลสจากตัวอย่างจุลินทรีย์กระป๋องและการศึกษาหา

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง. รายงานโครงงานทางจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 11-13.

วรรณา ชูฤทธิ์ และ จักรี สุวรรณภูมิ. 2535. เกณฑ์สารพิษของถั่วลิสงกะเทาะเปลือกในเขตเทศบาลเมืองหาดใหญ่. รายงานการวิจัยโครงงานนักศึกษา. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ : 1-35.

วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์. หน้า 209.

ศักดิ์สิทธิ์ การุณวานิช, ทัศนีย์ จุฬามรกต และเกษร นันทจิตต์. 2526. มินิคอลัมน์พลาสติกสำหรับตรวจแอฟลาทอกซิน. รายงานการสัมมนาเรื่องงานวิจัยถั่วลิสง ครั้งที่ 2 ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ จ. นครสวรรค์ 11-13 กุมภาพันธ์ 2526 หน้า 113-132.

ศูนย์วิจัยการปรับปรุงคุณภาพข้าวโพด. 2535. การป้องกันสารพิษแอฟลาทอกซินในข้าวโพดของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ร่วมกับองค์กรความร่วมมือระหว่างประเทศแห่งประเทศญี่ปุ่น (JICA)

สิริพร ภูมะธน. 2540. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากเต้าหู้ยี้. รายงานโครงงานทางจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ : 1-37.

สุธน วงษ์ชีรี. 2525. การศึกษาหมู่ thiol และเอนไซม์ Alkaline Phosphatase ในตับหนูขาวที่ได้รับอะฟลาทอกซิน. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต

(เทคนิคการแพทย์) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 1 : 221-229.

สุธน วงษ์ชีรี. 2529. อะฟลาทอกซิน. วารสารวิทยาศาสต์และเทคโนโลยี. 1 : 221-229.

สุวรรณี แสงแก้ว. 2543. คุณภาพทางจุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป. รายงานโครงงานทางจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ : 1-34.

อัจฉรา พัฒนเดช. 2543. เชื้อรา *Aspergillus* ที่สร้างแอฟลาทอกซินในพืชสมุนไพรตากแห้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อารันต์ พัฒโนทัย. 2528. อะฟลาทอกซินปัญหาของถั่วลิสง. แก่นเกษตร. 13 (1) : 1-9.

Alpert, M.E., Wogan,G.N., Gibbon, J.B. and Nandasuta.1978. Dietary aflatoxins and human liver cancer. III. Field survey of rural Thai families for ingested aflatoxins. Fd. Cosmet. Toxicol. 10 : 71.

Balcalo, V.M., Piava, A.L. and Malcata, F.X. 1996. Bioreactors with immobilized lipase : State of art. Enzyme Microb. Technol. 18 : 392-416.

Beuchat, L.R. 1983. Ingeneous fermented foods. *In* Rehm, H.HJ. and Reed, G. (eds). Biotechnology. Vol. 5. Verlag Chamie, Weinhiem. p. 503

Bothast, R.J. and Hesseltine, C.W. 1975. Bright greenish – yellow fluorescence and aflatoxin in agriculture commodities. Appl. Microbiol. 28 : 337-338.

Bourgeois, C.H., Keschamras, N., Comer, D.S., Harikul, S., Ervans, H., Olsan, L., Smith, T. and Beck, M. 1969. Udom Encephalopathy, fatal cerebral edema and fatty degeneration of the viscera in Thai children. J. Med. Assooc. Thailand. 52 : 553.

Bryden, W.L. 1982. Aflatoxins and animal production : an Australian perspective. Food Tech. In Aust. 34 : 216-223.

Buchanan, R.E. and Gibbon,N.E. 1974. Bergey ,s Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore : The William & Wilkins Co.

Buter, W.H. 1964. Acute toxicity of Aflatoxin B in rat. Brit. J. cancer. 18 : 756.

Chapline, M.F. and Kenedy, J.F. 1986. Cabohydrate analysis : A practical approach. Washington DC : Oxford IRL Press. p. 2.

Chou, C.C. and Hwan, C.H. 1994. Effect of ethanol on the hydrolysis of protein and lipid during the aging of a chinese fermented soya bean curd-sufu. J. Sci Food Agric. 66 : 393-398.

Chou, C.C., Ho, F.M. and Tsai, C.S. 1988. Effects of Temperature and Relative Humidity on Growth of and Enzyme Production by *Actinomucor taiwanensis* during Sufu Pehtze Preparation. Appl. Envi. Microbiol. 54 : 688-692.

Christopher, S. and Robert, E. 1981. Molecular Enzymology. Blackie and Son-Limited London. p. 310.

Cole, R.J. and Cox, R.H. 1981. Handbook of Toxin Fungal Metabolite. New York : Academic Press. p. 937.

Cote, M.A. 1989. Catalogue of Bacteria and Phages. 17th ed. Maryland : American Type Culture Collection. p. 299.

Dachoviboon, D., Tiewsomboonkit, A. and Somathiti, S. 1987. Presence of aflatoxin in storage soybeans. Proceeding of the 25th Annual Conference. Plant Science. Kasetsart University, Februry 3-6 1987 pp. 363-370. .

Fogarty, W.M. 1983. Microbial Enzyme and Biotechnology. Applied Science Publisher, London. pp. 45-49.

Goldblatt, L.A. 1968. Aflatoxin and its control. Econ. Bot. 22 : 51-62

Gupta, S.K. and Vankitasubramanian, T.B. 1975. Production of aflatoxin on soybeans. App. Microbial. 29 : 834-836.

Isobe, K., Akiba, T. and Yamagushi, S. 1988. Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. Agric. Biol. Chem. 52 : 41-47.

Kazlauskas, R.J. and Bornscheuer, U.T. 1997. Biotransformation with lipase. *In* Biotechnology (eds.H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler, P.J.M. Stadler and D.R. Kelly) Vol. VIII :Biotransformation. Weinheim : VCH Verlagagesellscaft mbH. p. 226.

Kenneth, H. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 15 th ed. Verginia : The Association of Official Analytical Chemist, Inc. pp. 712-713, 782-783.

Lane, R.H. 1990. . Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 15 th ed. Verginia : The Association of Official Analytical Chemist, Inc. p. 778.

Leadlay, P.E. 1978. An Introduction to Enzyme Chemistry. Adlard and Son London. pp. 67-78.

Lin, M.T. and Deanese, J.C. 1976. Coconut – agar medium for lipid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. Phytopath. 66 : 1466-1469.

Lu, J.M., Yu, R.C. and Chou, C.C. 1996. Purification and Some Properties of Glutaminase from *Actinomucor taiwanensis*, starter of Sufu. J. Sci Food Agric. 70 : 509-514.

Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G. and Amundson, C.H. 1992. Kinatics and mechanisms of catalyzed by immoblilized lipase. Enzyme Microb. Technol. 14 : 426-446.

Marsh, P.B., Simpson, M.E., Ferrett, R.J., erola, G.V., Dosono, J., Craig, G.O., Trucksess, M.W.. and Work, P.S. 1969. Mechanism of formation of a fluorescence in cotton fiber associated with aflatoxin in the seeds at havest. Agric. Food Chem. 17 : 468-472.

Miloslav, R. 1983. Handbook of foodborne disease of Biological origin, Florida : CRC Press.

Ohnishi, K., Yoshida, Y., Toiya, J., and Sekiguchi, J. 1994. Purification and characterization of a novell lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae* . J. Ferment. Boieng. 78 : 413-419.

Okumura, S., Iwai, M. and Tsujisaka, Y. 1980. Purification and properties of partial glyceride hydrolase of *Penicillium cyclopium* M1. J. Biochem. 87 : 205-211.

Petrovic, J.E., Skrinjar, M., Becarevic, A., Vujicic, I.F. and Banka, L. 1990. Effect of various carbon sources on microbial lipase biosynthesis. Biotechnol. Lett. 12 : 299-304.

Pinto, V.E.F., Vaamodnde, G., Brizzio, S.B. and Apro, N. 1991. Aflatoxin production in soybean varieties grown in Argentina. J. Food Prot. 54 : 542-545.

Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriological Reviews 41. pp. 711-753.

Prisnar, S. 1989. Bright greenish -- yellow fluorescence test for aflatoxin estimatation. Mycotoxin prevention and control in foodgrains edited by Simple, R.L., Frio A.S., Hicks, P.A. and Lozare, J.V. A collaborative publication of the UNDP/FAO Regional Network Inter-Country Cooperation on Postharvest Technology and Quality Control of Foodgrains (REGNET) and the ASEAN Grain Postharvest Programme, Bangkok, Thailand. 31 July – 12 August 1989 pp. 86-87.

Rehn, H.J. and Reed, G. 1987. Biotechnology : Enzyme Technology. New York. อ้างโดย ไตรตะวัน คงแก้ว. 2542. โปรตีนไฮโดรไลเสทและน้ำมัน

ดิบจากหัวกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ประมง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Reye, R.D.K., Morgan, G. and Baral, J. 1963. Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera, a disease entity in childhood. Lancet. 2 : 749.

Rose, A.H. and Harrison, J.S. 1969. The Yeast . Vol.1. Biology of Yeast. London : Acadermic Press.

Rose, I.K. 1979. Biology of Fungi. New York : McGraw - Hill Inc.

Sargeant, K., Sheridan, A., O' Kelly, J. and Carnaghan, R.B.A. 1961. Toxicity associated with certain sample of groundnut. Nature. 192 : 1096-1097.

Scott, P. M. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 15 th ed. Verginia : The Association of Official Analytical Chemist, Inc. pp. 1185-1186.

Shahani, K.M. 1975. Lipase and esterase In Enzyme in Food Processing. 2nd ed. (ed.G. Reed) New York. Academic Press. pp. 181-217.

Shank, R.C., Wogan, G.N., Gibbon, J.B. and Nondasuta, A. 1972. Dietary aflatoxins and human liver cancer. II. Aflatoxins in market foods and food stuffs of Thailand and Hong Kong. III. Field survey of

rural Thai families for ingested aflatoxin. Ed. Cosmet. Toxicol. 10 : 61- 71.

Shotwell, O.L. and Hesseltine, C.W. 1981. Use of bright greenish – yellow fluorescence as a presumptive test aflatoxins in corn. Cereal Chem. 58 : 124-127.

Shotwell, O.L., Goulden, M.L., Jepson, A.M., Kwolex, W.F. and Hesseltine, C.W. 1975. Aflatoxin occurrence in some white corn under loan, 1971, III Association with bright greenish – yellow fluorescence in corn. Cereal Chem. 52 : 670-677.

Smith, A.K. 1978. Soybean : Chemistry and Technology. pp 410-413. Texus, Connecticut : The AVI Publishing Company Inc.

Subhkij, A. 1989. Mycotoxin and human health risk ; An Overview. Mycotoxin prevention and control in foodgrains edited by Simple, R.L., Frio, A.S., Hicks, P.A. and Lozare, J.V. A collaborative publication of the UNDP/FAO Regional Network Inter-Country Cooperation on Postharvest Technology and Quality Control of Foodgrains (REGNET) and the ASEAN Grain Postharvest Programme, Bangkok, Thailand. 31 July – 12 August 1989 pp. 8-24.

Sugihara, A., Tani, T. and Yomina, Y. 1988. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase. Agric. Biol. Chem. 52 : 1591-1592.

Suttajit, M. and Pichitpaja, N. 1983. Effects of aflatoxin B_1 on erythropoiesis *In* Mycotoxin : Proceedings of Regional Workshop on Mycotoxins. Government of Thailand in cooperation with UNESCO. Mahidol University, Bangkok. March 23-26 1983 pp. 303-310.

Traisat, H. 1989. Overview of analytical method for mycotoxin contamination in maize and peanuts sampling, sample handing and preparation in grains and cereals in mycotoxin preventation and control in foodgrains edited by Simple, R.L., Frio A.S., Hicks, P.A. and Lozare, J.V. . A collaborative publication of the UNDP/FAO Regional Network Inter-Country Cooperation on Postharvest Technology and Quality Control of Foodgrains (REGNET) and the ASEAN Grain Postharvest Programme, Bangkok, Thailand. 31 July – 12 August 1989 pp. 59-82.

Wai, N. 1929. A new species of *Mono - Mucor*, *Mucor sufu* ; on Chinese soybean cheese. Science. 70 : 307-308. cited by Smith, A.K. 1978. Soybean : Chemistry and Technology. pp. 410. Texus, Connecticut : The AVI Publishing Company Inc.

Wai, N. 1968. Investigation of the various processes used in preparing Chinese cheese by the fermentation of soybean curd with *Mucor* and other fungi. USDA Final Tech. Rept Public Law 480. Project *UR - A6 - (40) - 1* . Available at a cost from Natl. Agr. Library.

Wang, H.L. and Hesseltine, C.W. 1970. Sufu and lao - chao. Agric Food Chem. 18 : 572-575.

Ward, O.P. 1983. Proteinase Microbial enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishers, England. pp. 251-317.

Webster, J. 1970. Introduction to Fungi. London : Cambridge at the University Press.

Wogan, G.N. 1977. Advances in Modern Toxicology. 3 : 263.

Woods, F.C. and Kinsella, J.E. 1980. Protease from *Saccharomyces carlbergensis* : activity on food protein. J. Food science. 45 : 120-125.

Yamamoto, K. 1990. Alkaline serine produced from citric acid by *Bacillus alcalophilus* spp. halodurans KP 1239. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 : 57-62.

ภาคผนวก ก

1. Halophilic Medium Agar (HMA) (Cote, M. A., 1989)

NaCl	250.0g
$MgSO_4.7H_2O$	10.0g
KCl	5.0g
$CaCl_2.6H_2O$	0.2g
Yeast Extract	10.0g
Tryptone	2.5g
Agar	20.0g

วิธีการ

แยกเตรียมเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำ Yeast Extract, Tryptone และ Agar ละลายในน้ำกลั่น 200 มล. และนำ NaCl, $MgSO_4.7H_2O$, KCl และ $CaCl_2.6H_2O$ ละลายในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH เป็น 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาผสมกันโดยวิธีปราศจากเชื้อ

2. Aflatoxin B_1 ELISA test kit (กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืช และจุลชีววิทยา, 2543)

1. Micro Elisa plate ที่เคลือบด้วยแอนติบอดี้ต่อสารอะฟลาทอกซิน
2. สารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 (Standard Aflatoxin B1) 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 10, 20, 40 และ 100 ppb
3. Conjugate buffer (PBS –T)
4. Enzyme conjugate (Anti-AFB_1 Horseradish peroxidase)
5. Stopping solution (0.1N H_2SO_4)
6. Substrate A (Tetramethylbensidiine, TMB) and substrate B (H_2O_2)
7. Washing buffer (0.01M PBS + 0.05% Tween 20)

3. การหาค่า Degree of Hydrolysis

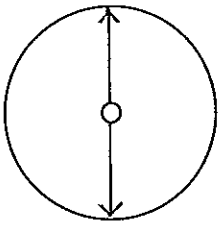
การคำนวณ

$D = d_z/d_{mo}$

D - degree of hydrolysis

d_z - diameter of zone

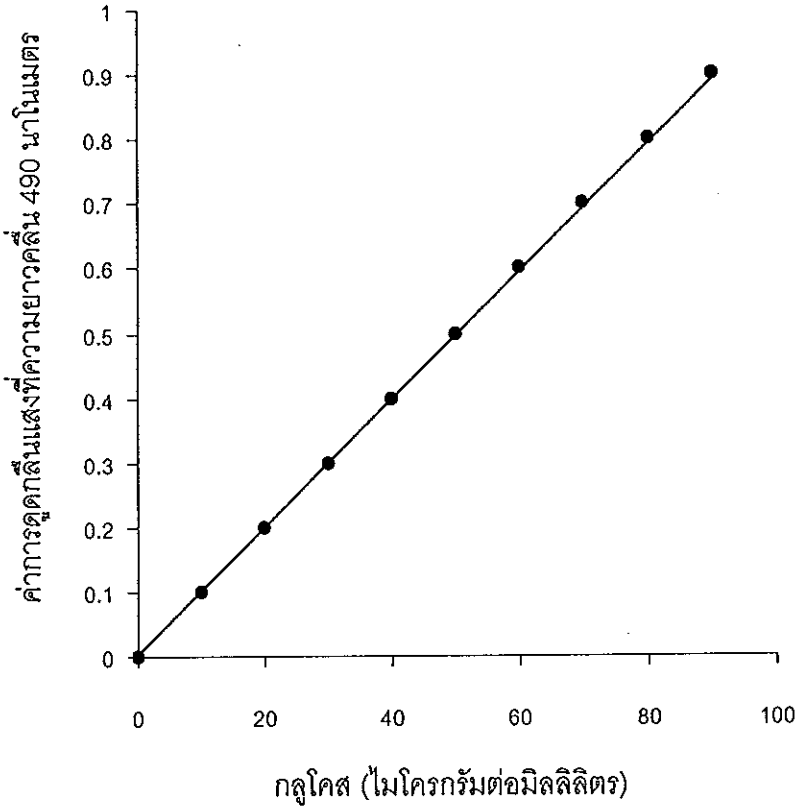
d_{mo} - diameter of microorganism



↕ - diameter of zone

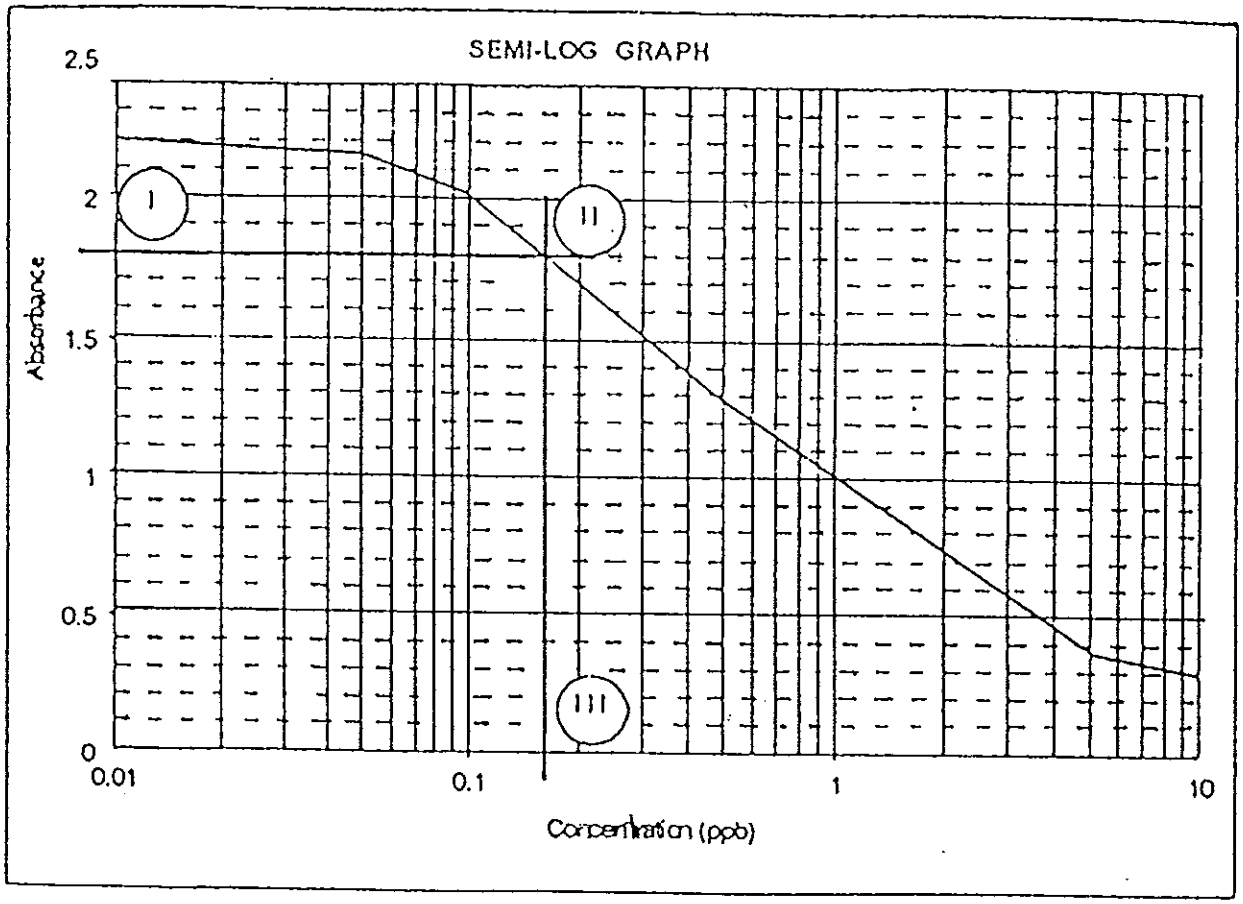
⦶ - diameter of microorganism

4. กราฟมาตรฐานกลูโคส



รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซิน



รูปที่ 16 การคำนวณหาสารพิษอะฟลาทอกซินที่ความยาวคลื่น 450 และ 630 นาโนเมตร (กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543)

ตารางที่ 15 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

strain	gram stain	spore	motility	catalase	oxidase	Anaerobic growth	indole	MR	VP	citrate	urease	LPC	TSI	glucose	sucrose	fructose	maltose	mannitol	lactose	galactose
PS901	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	A/A	+	-	+	+	-	+	-
PS902	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	K/A	+	+	+	+	-	+	-
PS903	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	A/K	+	-	+	+	-	-	-
PS904	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	A/A	+	+	+	+	-	+	-
PS905	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	A/A	+	+	+	+	-	+	-
PS906	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	A/K	+	-	+	+	-	+	+
PS907	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	A/K	+	+	+	+	-	+	-
PS908	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	K/A	+	+	+	+	+	+	+
PS909	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	K/A	-	+	+	+	+	+	+
PS910	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	A/A	+	+	+	+	-	+	+
PS911	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	K/A	+	-	+	+	+	+	-
PS912	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	A/A	+	-	+	+	-	+	-
PS913	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	A/K	+	-	+	-	-	-	-
PS914	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	A/K	+	-	+	+	-	-	-

ตารางที่ 16 การทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

Strain	Shape	Vegetative cell			Fermentation					Nitrate assimilation
		reproduction	ascospore	mycelium	glucose	sucrose	maltose	galactose	lysine	
PS918	spheroidal	budding	spheroidal	-	v_i	v_i	w	-	v_i	-
PS919	spheroidal	budding	hat-shaped	True mycelium	v_i	-	-	s	s	-
PS920	ellipsoidal	budding	spheroidal	-	w	-	-	-	s	-

v_i - เฟอร์เมนต์เร็ว

s - เฟอร์เมนต์ช้า

w - เฟอร์เมนต์น้อย

(-) - ไม่เฟอร์เมนต์

ตารางที่ 17 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากโคจิ (Koji) ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมักเต้าหู้ยี้

strain	gram stain	spore	motility	catalase	oxidase	Anaerobic growth	indole	MR	VP	citrate	urease	LPC	TSI	glucose	sucrose	fructose	maltose	mannitol	lactose	galactose
PS903	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	A/K	+	-	+	+	-	+	+
PS906	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	A/K	+	-	+	+	-	+	+
PS910	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	A/A	+	+	+	+	-	+	+

ตารางที่ 18 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากเกลือ ซึ่งเป็นส่วนผสมในการหมักเต้าหู้ยี้

strain	gram stain	spore	motility	catalase	oxidase	Anaerobic growth	indole	MR	VP	citrate	urease	LPC	TSI	glucose	sucrose	fructose	maltose	mannitol	lactose	galactose
PS906	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	A/K	+	-	+	+	-	+	+
PS909	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	K/A	-	+	+	+	+	+	+
PS910	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	A/A	+	+	+	+	-	+	+

ตารางที่ 19 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากการ Swab จากผ้าขาวที่ใช้ปิดโคจิ (Koji) สำหรับเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

strain	gram stain	spore	motility	catalase	oxidase	Anaerobic growth	indole	MR	VP	citrate	urease	LPC	TSI	glucose	sucrose	fructose	maltose	mannitol	lactose	galactose
PS903	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	A/K	+	-	+	+	-	-	-
PS906	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	A/K	+	-	+	+	-	+	+
PS909	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	K/A	-	+	+	+	+	+	+
PS910	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	A/A	+	+	+	+	-	+	+
PS912	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	A/A	+	-	+	+	-	+	-

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบค่าอะฟลาทอกซินที่สัดส่วนความยาวคลื่นต่าง ๆ (Scott, 1990)

ความยาวคลื่น(nm)	อะฟลาทอกซิน			
	B_1	B_2	G_1	G_2
223/265	1.77 +-0.04	1.54 +-0.05		
214/265			2.86 +-0.15	2.83 +-0.13
242/265			1.00 +-0.02	1.20 +-0.07
362/265	1.76 +-0.04	1.98 +-0.08	1.84 +-0.06	2.09 +-0.18

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวชาคริยา ฉลาด

วัน เดือน ปีเกิด 31 พฤษภาคม 2519

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ศึกษาศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี	2541

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน