

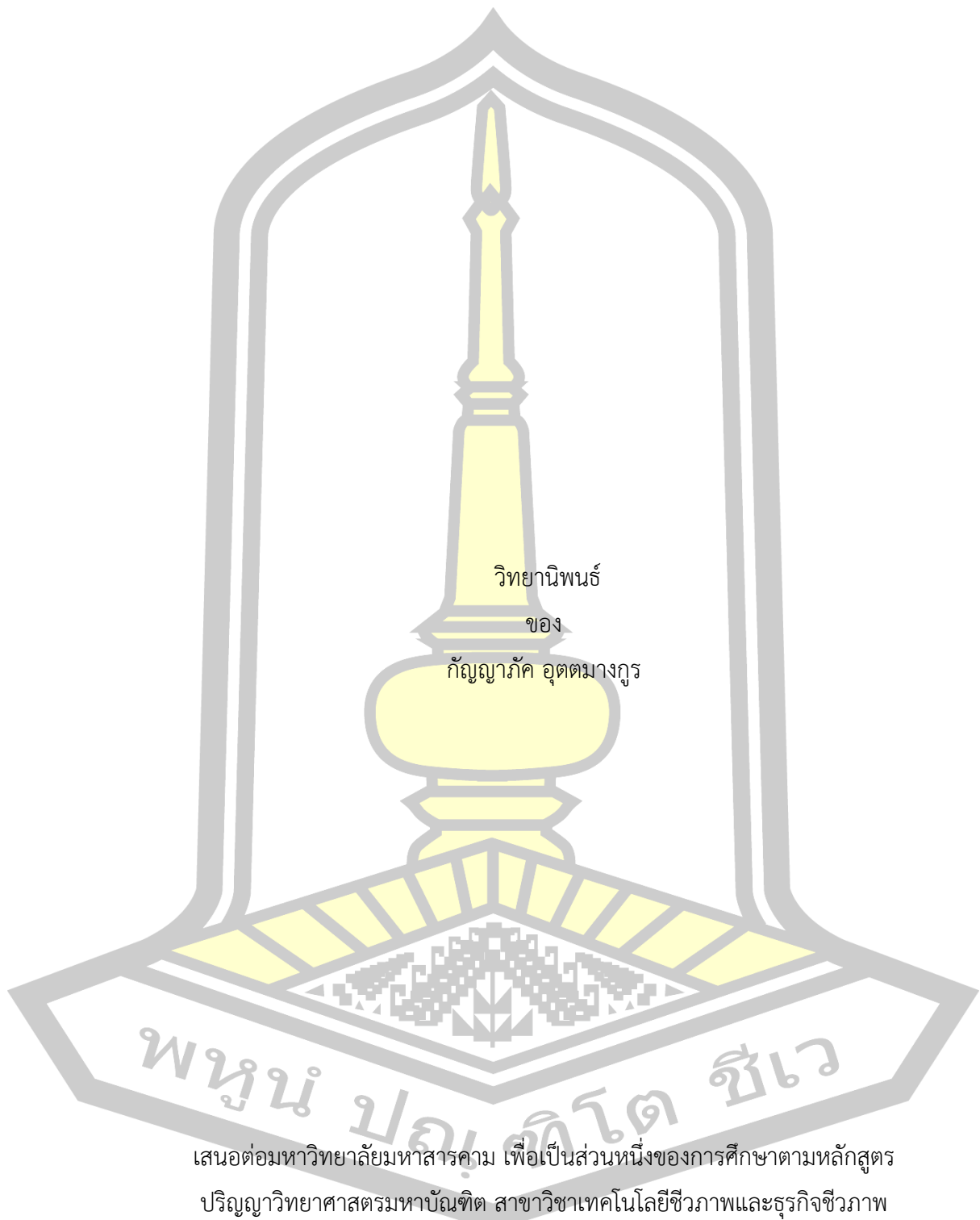
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตเทมเป้

วิทยานิพนธ์
ของ
กัญญภาศ อุตตมางกูร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพและธุรกิจชีวภาพ
สิงหาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตเทมเป้

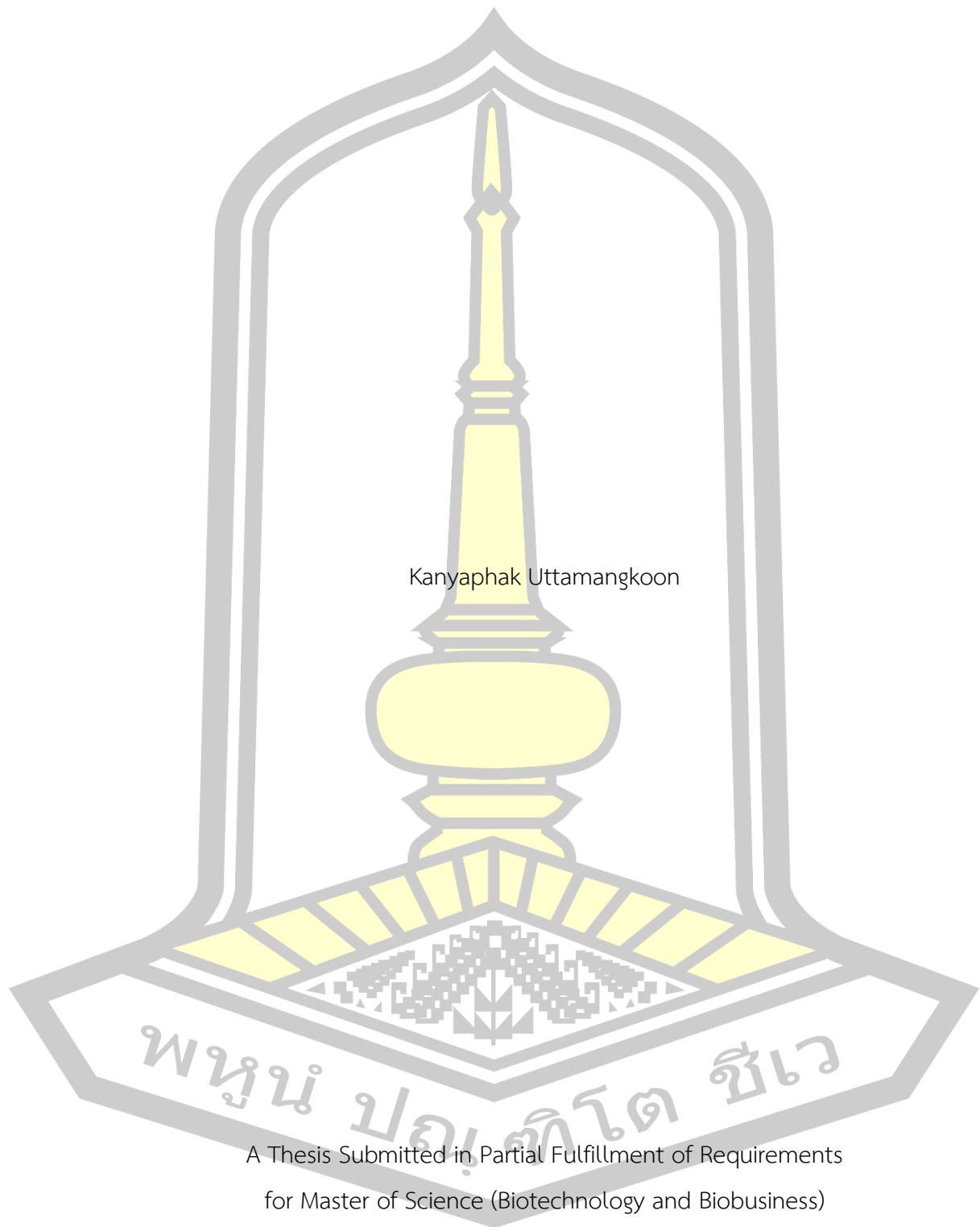


เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพและธุรกิจชีวภาพ

สิงหาคม 2567

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Process Optimization for Tempeh Production



Kanyaphak Uttamangkoon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biotechnology and Biobusiness)

August 2024

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางกัญญภักดิ์ อุตตมางกูร
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพและธุรกิจชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. บวรศักดิ์ สีนานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. ปริญญาธิปไตย อิศรานุกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อ. ดร. อิศราภรณ์ สมบุญวัฒนกุล)

.....กรรมการ

(ผศ. ดร. เกศสุคนธ์ มณีวรรณ)

.....กรรมการ

(ศ. ดร. ศิริธร ศิริอมรพรรณ)

มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพและธุรกิจชีวภาพ ของมหาวิทยาลัย
มหาสารคาม

.....
(ผศ. ดร. สุมลวรรณ ชุ่มเชื้อ)

คณบดีคณะเทคโนโลยี

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตเทมเป้		
ผู้วิจัย	กัญญารักษ์ อุตตมางกูร		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปริญญาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ อาจารย์ ดร. อิศราภรณ์ สมบุญวัฒนกุล		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพและธุรกิจชีวภาพ
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2567

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เทมเป้ที่มีคุณภาพดี โดยใช้วิธีการแช่ถั่วเหลืองในระยะเวลา 5 สภาวะ คือ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงพบว่าผู้บริโภคมีความชอบในเทมเป้จากทุกสภาวะ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามผลการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส อย่างไรก็ตาม พบว่าค่าสีของเทมเป้ที่ผลิตมาในแต่ละสภาวะมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะค่า L^* เทมเป้ที่ผลิตจากการแช่ถั่วเหลือง 24 ชั่วโมงจะมีสีสว่างน้อยกว่าเทมเป้ที่ผลิตจากน้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 120 ชั่วโมง ค่า a^* และ b^* เทมเป้ในน้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมงมีค่าสูงกว่าเทมเป้ที่ผลิตจากน้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 120 ชั่วโมง สอดคล้องกับการยอมรับทางประสาทสัมผัส นอกจากนี้ยังพบว่าเทมเป้ในสภาวะน้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมงให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเทมเป้ที่ผลิตจากระยะเวลาการแช่ถั่วเหลืองในระยะอื่นๆ จากผลวัดค่า pH ของน้ำแช่ถั่วเหลืองพบค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 4.80 ซึ่งสอดคล้องกับสภาวะของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria (LAB)) ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในสภาวะเป็นกรด โดย LAB เป็นจุลินทรีย์ที่ดีมีประโยชน์หรือโพรไบโอติก ส่งผลต่อคุณภาพของเทมเป้ สำหรับปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิต พบว่าปริมาณ 0.25 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการผลิตเทมเป้ให้ได้มาตรฐานเทมเป้ที่องค์การอนามัยโลก (WHO) กำหนด จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนก็พบว่าเทมเป้ที่แช่ 24 ชั่วโมงมีกรดกลูตามิกปริมาณสูง ส่งผลต่อรสชาติที่คล้ายเนื้อสัตว์มากกว่ารสชาติของเห็ด จากผลการวิจัยสรุปได้ว่า เทมเป้ที่ผลิตจากน้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเทมเป้เพื่อการพาณิชย์ต่อไป

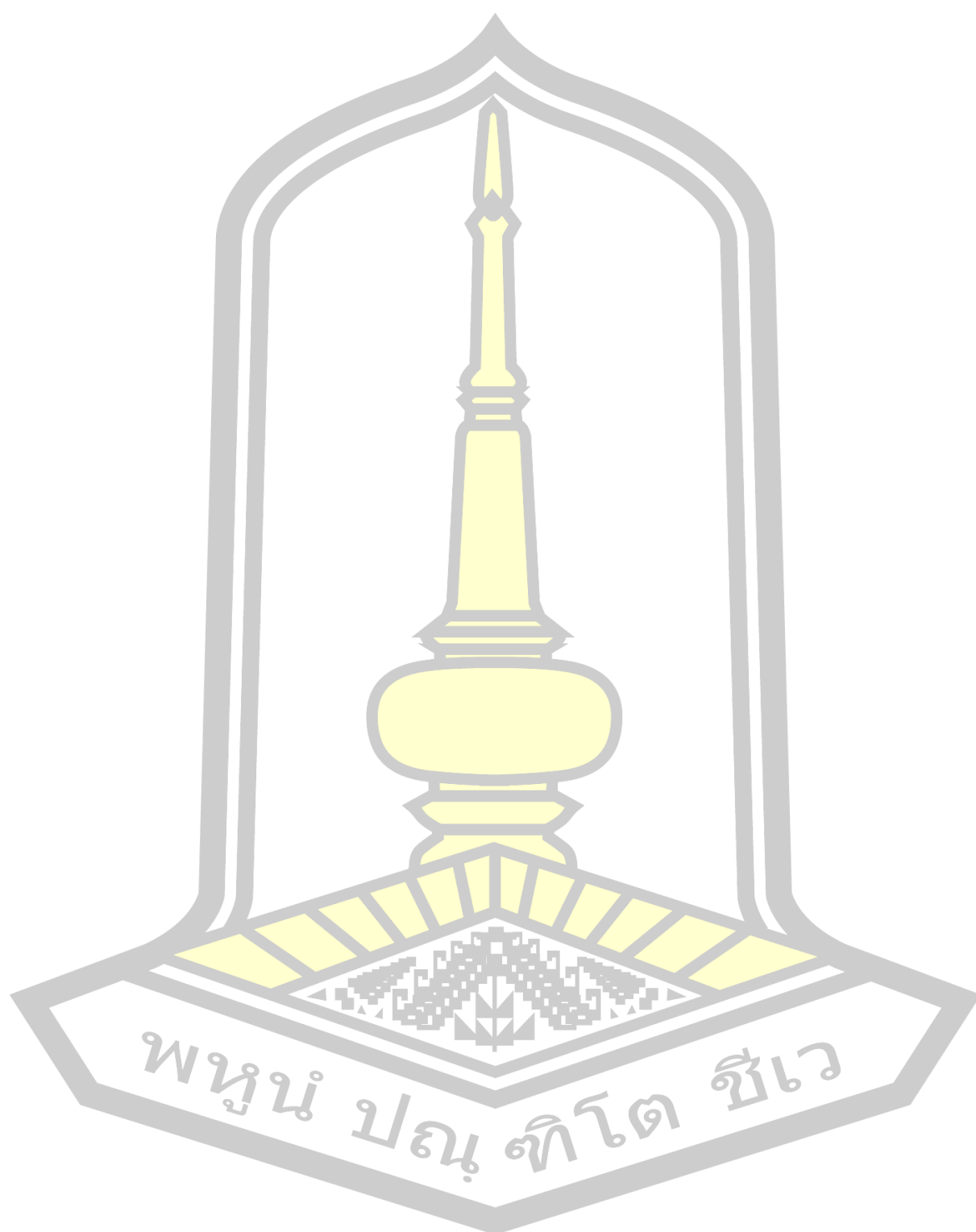
คำสำคัญ : เทมเป้, น้ำแช่ถั่วเหลือง, แลคติกแอซิคแบคทีเรีย

TITLE	Process Optimization for Tempeh Production		
AUTHOR	Kanyaphak Uttamangkoon		
ADVISORS	Assistant Professor Pariyaporn Itsaranuwat , Ph.D. Issaraporn Somboonwatthanakul , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Biotechnology and Biobusiness
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2024

ABSTRACT

This research aimed to determine the optimal conditions for producing high-quality tempeh using different soybean soaking time: 24, 48, 72, 96 and 120 hours. Sensory evaluation revealed no significant statistical differences in consumer preferences among tempeh produced under different soaking times. However, color values of tempeh varied with soaking time. Tempeh soaked for 24 hours exhibited lower lightness (L^*) values compared to tempeh soaked for 120 hours. Values of a^* and b^* were also higher in tempeh soaked for 24 hours compared to those soaked for 120 hours, consistent with sensory evaluation results. Analysis of total phenolic and total flavonoid compounds revealed the highest concentrations in tempeh soaked for 24 hours. The average pH of the soaking water was 4.80, favorable for the growth of lactic acid bacteria (LAB), beneficial microorganisms or probiotics, contributing to tempeh quality. An initial starter culture volume of 0.25 - 0.5 % produced tempeh that met World Health Organization (WHO) standards. Amino acid analysis revealed high glutamic acid content in tempeh soaked for 24 hours, imparting a meat-like flavor rather than a mushroom-like taste. In conclusion, soaking soybeans for 24 hours was determined as the optimal condition for commercial tempeh production.

Keyword : Tempe, Soaking, Lactic acid bacteria



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากอุทยานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภายใต้โครงการ การพัฒนากระบวนการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปแช่เยือกแข็งจากเห็ดแปะสำหรับผู้สูงอายุ ภายใต้โครงการพัฒนาขีดความสามารถทางเทคโนโลยี และวิจัยของภาคเอกชนในพื้นที่ (IRTC) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากบริษัท กานต์ญา ไทยคูซีน จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนวัตถุดิบและวัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัยเห็ดแปะ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.อิสราภรณ์ สมบุญวัฒนกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำปรึกษาชี้แนะ ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.บวรศักดิ์ ลีนานนท์ ประธานกรรมการสอบ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกศสุคนธ์ มณีวรรณ กรรมการสอบ และ ศาสตราจารย์ ดร.ศิริธร ศิริอมรพรรณ กรรมการสอบ

ขอขอบคุณน้องพลอย ดร. วราธร ชุมชูชาติ ที่ช่วยชี้แนะในการวิเคราะห์กิจกรรมการดำเนินงานอนุโลมอิสระ น้องปริญาตริและน้องปริญาโทที่มาทำวิจัยในห้องปฏิบัติการด้วยกัน ที่ช่วยสอนใช้เครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัยและแนะนำอุปกรณ์ต่างๆ ให้รู้จัก

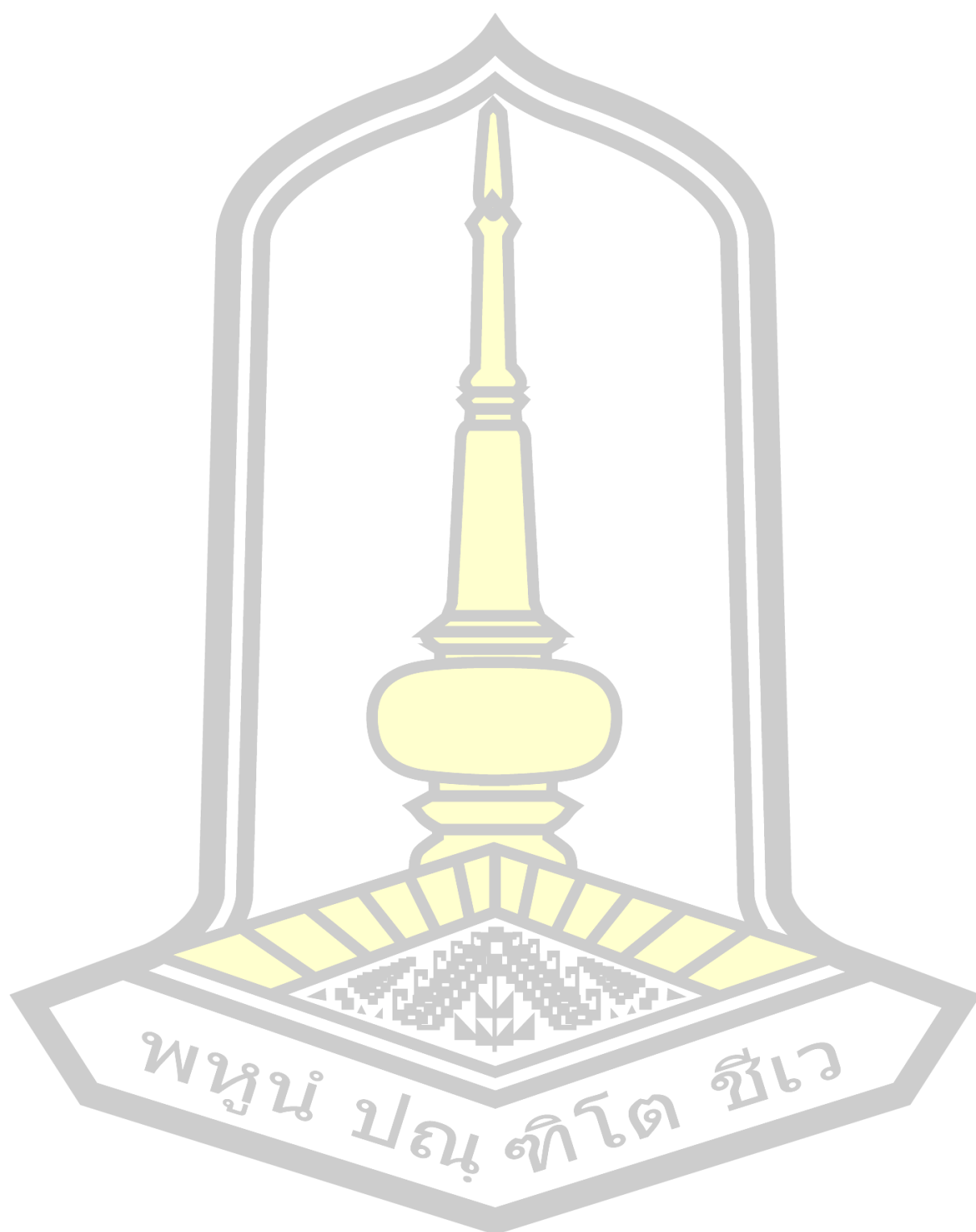
ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้คำแนะนำ ช่วยในการแก้ไขปัญหาทางเคมี และการวิจัยที่เกิดปัญหาขึ้นจนทุกอย่างผ่านไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณคุณสามีที่คอยทำอาหารให้ทานขณะทำงานวิจัยและคอยสนับสนุนช่วยเหลือในการช่วยล้างอุปกรณ์ และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ เป็นกำลังใจที่สำคัญที่ทำให้มีแรงฮึดในการทำงานวิจัยต่อไป

ขอบคุณกำลังใจที่สำคัญคือ แม่ และ พ่อ ที่คอยถามไถ่ถึงการเรียน เพราะเป็นเรื่องที่ยากมากในการที่จะเปลี่ยนสาขาวิชาจากนิติศาสตร์บัณฑิตที่เรียนจบและทำงานเป็นทนายความมากกว่า 20 ปีมาเป็นสายเทคโนโลยีชีวภาพ

คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นทุกท่านที่ต้องการมีสุขภาพดี และผู้ที่ดูแลบุพการีหรือผู้สูงอายุทุกท่าน

กัญญภาค อุตตมางกูร



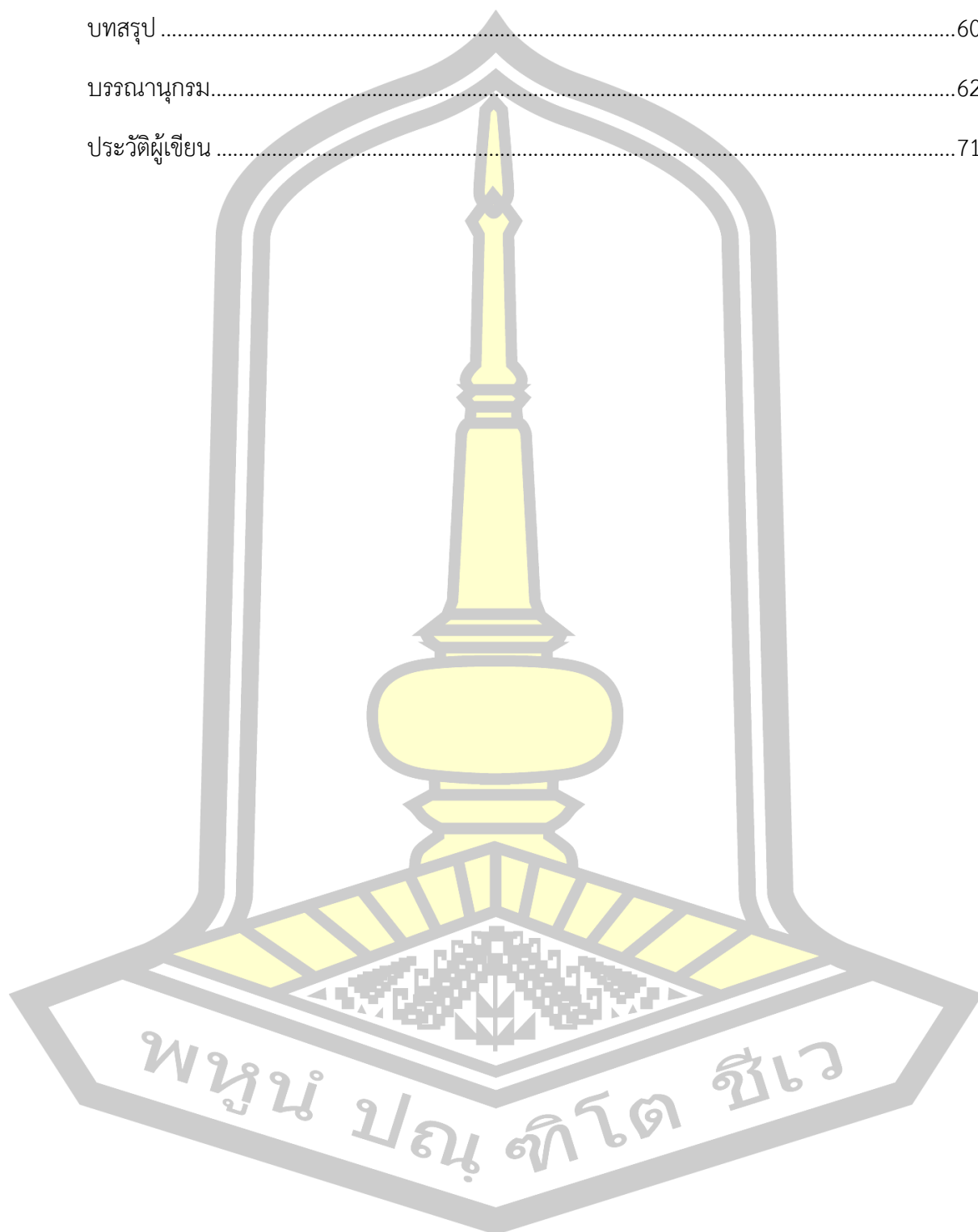
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ณ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.3 ความสำคัญของการวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เหมเป้.....	4
2.1.1 ผลิตภัณฑ์เหมเป้และคุณค่าทางอาหาร.....	4
2.1.2 กระบวนการผลิตเหมเป้ (Christodouleas et al., 2015).....	4
2.2 ประวัติความเป็นมาของเหมเป้ในประเทศไทย.....	6
2.3 ถั่วเหลือง.....	6
2.3.1 สายพันธุ์ถั่วเหลืองในประเทศไทย (ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่).....	7
2.4 โปรตีนและกรดอะมิโน.....	8
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ และการตรวจวิเคราะห์.....	19
2.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	25

2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzothiazoline-6- Sulfonic Acid) radical scavenging activity ABTS (Re et al., 1999).....	25
2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....	25
2.5.4 สารประกอบฟีนอลิก (Total Phenolic)	26
2.5.5 สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids).....	28
2.6 หัวเชื้อเริ่มต้น (Starter Culture)	30
2.6.1 สันฐานวิทยาและการศึกษา <i>R. oligosporus</i>	30
2.7 กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในการผลิตอาหารในประเทศไทย.....	31
2.7.1 ข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก (WHO) เกี่ยวกับเทมเป้ ("CODEX Alimentarius International Food Standards," 2013).....	34
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	36
3.1 อาหาร สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	36
3.1.1 หัวเชื้อเริ่มต้น.....	36
3.1.2 วัตถุดิบ	36
3.1.3 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย	36
3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	37
3.1.5 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ.....	37
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
3.2.1 เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น (Starter Culture).....	37
3.2 การศึกษาระยะเวลาในการแช่แก้วเหล็อง.....	38
3.2.1 การวิเคราะห์ค่า pH	38
3.2.2 วิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory evaluation).....	38
3.2.3 การวิเคราะห์ทดสอบกิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน.....	38
3.2.4 การวิเคราะห์เชื้อ Lactic acid bacteria ในน้ำแช่แก้วเหล็อง.....	39

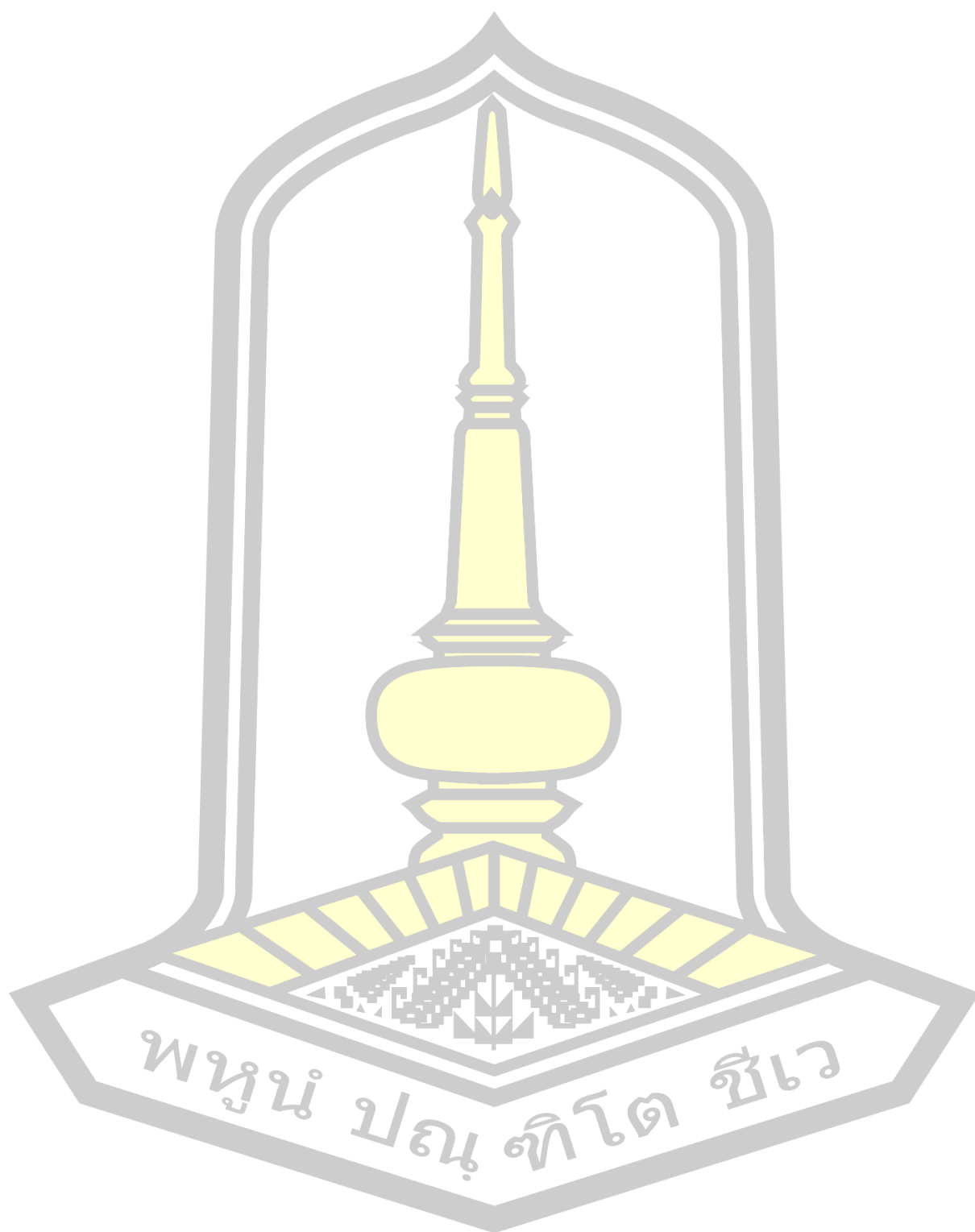
3.3 การผลิตเทมเป้.....	40
3.3.1 การเตรียมถั่วเหลือง.....	40
3.3.2 การเตรียมผลิตเทมเป้.....	40
3.3.3 การวิเคราะห์ค่า pH ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย.....	40
3.3.4 วิเคราะห์ค่าสีของเทมเป้.....	41
3.3.5 วิเคราะห์ค่า Proximate analysis.....	41
3.3.6 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน.....	41
3.5.8 การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	42
บทที่ 4.....	43
ผลการวิจัย.....	43
4.1 ผลการคัดเลือกหัวเชื้อเริ่มต้น.....	43
4.2 ผลการศึกษาระยะเวลาในการแช่ถั่วเหลือง.....	46
4.2.1 ผลการวิเคราะห์ค่า pH ของน้ำแช่ถั่วเหลือง.....	46
4.2.2 ผลการวิเคราะห์ Sensory evaluation.....	47
4.2.3 การหาผลการทดสอบกิจกรรมอนุมูลอิสระ (Antioxidants) สารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic determination) และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid determination).....	48
4.2.4 ผลการวิเคราะห์การเกิด Lactic acid bacteria ในน้ำแช่ถั่วเหลืองแต่ละช่วงเวลา.....	53
4.3 ผลการวิเคราะห์เทมเป้.....	55
4.3.1 ผลการวิเคราะห์ค่า pH ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย.....	55
4.3.2 ผลการวิเคราะห์ค่าสีในเทมเป้.....	56
4.3.3 ผลการวิเคราะห์ค่า Proximate Analysis.....	56
4.3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน (Total Amino acid).....	57
4.3.5 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลชีววิทยา.....	59

บทที่ 5	60
บทสรุป	60
บรรณานุกรม.....	62
ประวัติผู้เขียน	71



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลือง (ต่อ 100 กรัม).....	6
ตารางที่ 2 Major metabolites and functions of Amino acid (AA) in nutrition and metabolism	13
ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเมล็ดถั่วเหลือง	17
ตารางที่ 4 ความต้องการกรดอะมิโนโดยประมาณของผู้ใหญ่	18
ตารางที่ 5 รูปแบบกรดอะมิโนของส่วนผสมของนมเป้ เทียบกับรูปแบบของ FAO (มก./กรัมของไนโตรเจน)	19
ตารางที่ 6 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีสเปกโตรเมตริก.....	21
ตารางที่ 7 Classification, structure, and food sources of some dietary flavonoids.....	29
ตารางที่ 8 ลักษณะของนมเป้ที่ใช้หัวเชื้อปริมาณต่างๆ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	43
ตารางที่ 9 ค่า pH ของน้ำแช่ถั่วที่ระยะเวลาต่างๆ.....	46
ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ประสาทสัมผัสโดยวิธี 9-point hedonic scale.....	47
ตารางที่ 11 น้ำหนักตัวอย่างนมเป้ก่อนและหลังนำไปอบแห้ง เพื่อนำไปคำนวณกลับเป็นนมเป้สด	48
ตารางที่ 12 จำนวนโคโลนีของ Lactic acid bacteria ในน้ำแช่ถั่ว.....	54
ตารางที่ 13 สัณฐานวิทยาของ LAB ในน้ำแช่ถั่วเหลือง	54
ตารางที่ 13 (ต่อ) สัณฐานวิทยาของ LAB ในน้ำแช่ถั่วเหลือง.....	55
ตารางที่ 14 ค่า pH ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการแช่ถั่วที่ระยะเวลาต่างๆ.....	55
ตารางที่ 15 ค่าสีนมเป้สดในแต่ละสภาวะที่แช่ถั่วเหลืองในน้ำเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน	56
ตารางที่ 16 ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า Proximate analysis ของนมเป้	57
ตารางที่ 17 ปริมาณกรดอะมิโน ของนมเป้ที่ได้จากการแช่ถั่วเหลืองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	58

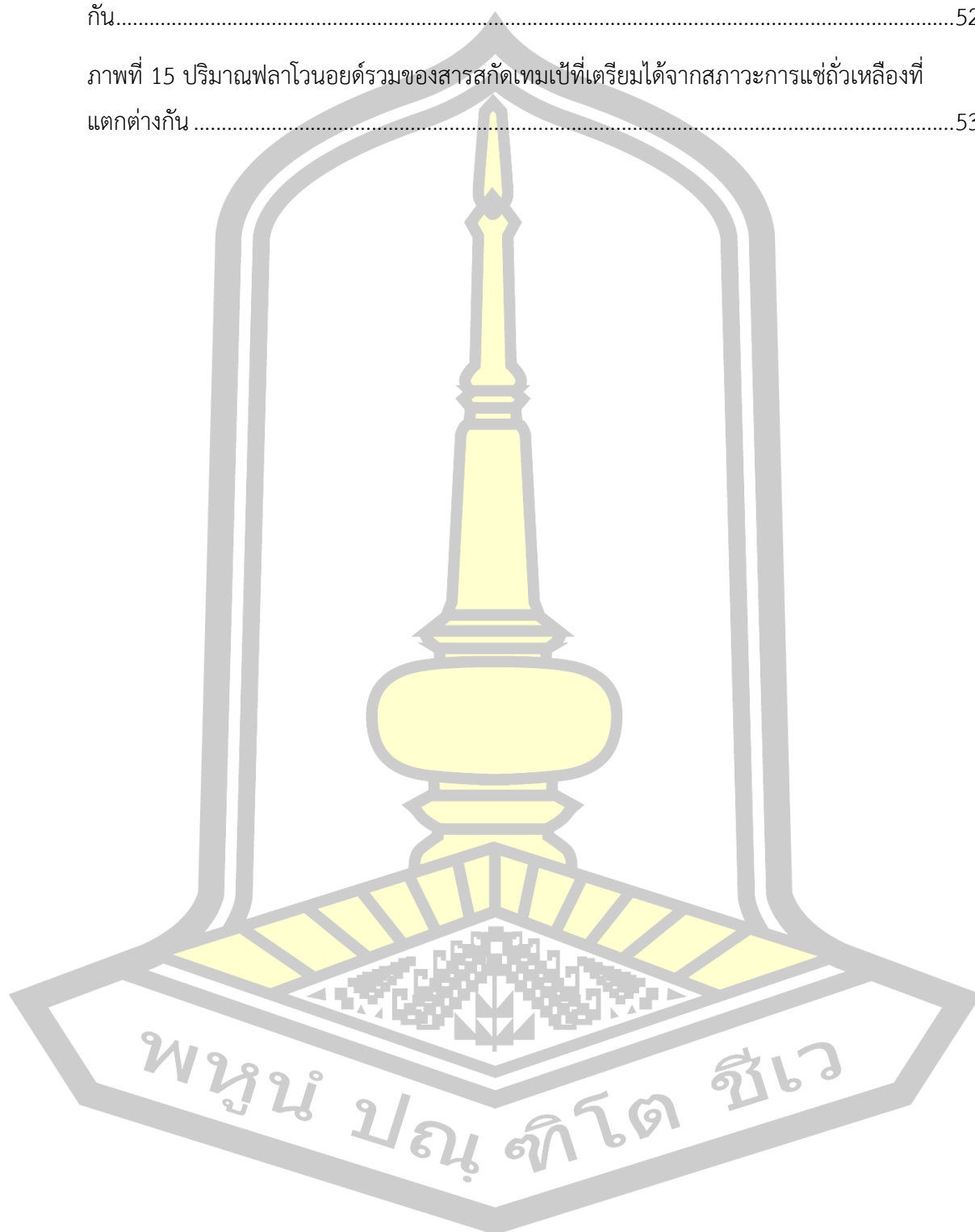


สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทำเหมเป้	5
ภาพที่ 2 โครงสร้างหลัก (primary structure) ของโปรตีนที่กรดอะมิโนเรียงต่อเนื่องกัน (Nina Parker, 2024).....	10
ภาพที่ 3 โครงสร้างลำดับที่สอง (secondary structure) ของโปรตีนที่อาจจะเป็น Alpha-helix และ bata-pleated sheet หรือเป็นทั้งสอง(Nina Parker, 2024)	10
ภาพที่ 4 โครงสร้างลำดับที่สาม (tertiary structure) ของโปรตีนที่ถูกดึงดูดด้วยแรงดึงดูดที่ หลากหลาย รวมถึงปฏิกิริยาที่ไม่ชอบน้ำ พันธะไฮโดรเจน พันธะไอออนิกและพันธะไดซัลไฟด์ (Nina Parker, 2024).....	11
ภาพที่ 5 โมเลกุลของฮีโมโกลบินที่มี 2 เบต้าและ 2 อัลฟา โพลีเปปไทด์รวมกันกับกลุ่มฮีม (heme) (Nina Parker, 2024)	11
ภาพที่ 6 สรุปโครงสร้างของโปรตีนทั้ง 4 ระดับ (Nina Parker, 2024)	12
ภาพที่ 7 การพุ่งเป้าทางชีวภาพของอนุมูลอิสระ (Gulcin, 2020).....	20
ภาพที่ 8 Structure of isoflavones in the forms of aglycones (a), β - gly-cosides, 6"-O- acetyl- β -glycosides, and 6"-O-malonyl- β -glycosides (b) (Teekachunhatean et al., 2013)	23
ภาพที่ 9 Antioxidants classification (Flieger et al., 2021).....	24
ภาพที่ 10 Classification of phenolic antioxidants (Gulcin, 2020)	27
ภาพที่ 11 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay ของสารสกัดเหมเป้ที่เตรียมได้จาก สภาวะการแช่ลว้เหลืองที่แตกต่างกัน	49
ภาพที่ 12 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay ของสารสกัดเหมเป้ที่เตรียมได้จาก สภาวะการแช่ลว้เหลืองที่แตกต่างกัน	50
ภาพที่ 13 ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ของสารสกัดเหมเป้ที่เตรียมได้จาก สภาวะการแช่ลว้เหลืองที่แตกต่างกัน	51

ภาพที่ 14 ปริมาณพินอลิกรวมของสารสกัดเหมีเป้ที่เตรียมได้จากสภาวะการแช่ถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน.....52

ภาพที่ 15 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเหมีเป้ที่เตรียมได้จากสภาวะการแช่ถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน53



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา

การถนอมอาหาร เป็นภูมิปัญญาที่มีมาแต่อดีตกาลอันไกลโพ้น โดยส่วนใหญ่เป็นที่รู้จักกันว่า ประเทศจีนมีกรรมวิธีการถนอมอาหารแบบต่างๆ เช่น การหมัก การดอง การบ่ม การตากแดด การรมควัน การกวน เหล่านี้เป็นต้น เหตุจากการอพยพของชาวจีนที่เดินทางข้ามน้ำข้ามทะเลมายังประเทศไทย ได้นำภูมิปัญญาทางอาหารติดตัวมา เกิดการถ่ายทอดความรู้จากรุ่นสู่รุ่นจนมาถึงปัจจุบัน โดยกระบวนการหมักถือเป็นกระบวนการทางเคมีธรรมชาติที่เกิดจากการใช้เชื้อจุลินทรีย์เป็นปัจจัยในการถนอมอาหาร

โดยที่กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นนั้นเป็นการเกิดขึ้นตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา เปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีอาหารด้วยกระบวนการที่เรียกว่า เมแทบอลิซึม ที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดเป็นพลังงานเปลี่ยนโครงสร้างของสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน, คาร์โบไฮเดรตเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส ไขมันเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน การแตกตัวของโครงสร้างเคมีเป็นโครงสร้างโมเลกุลที่เล็กลง ทำให้ลำไส้มนุษย์ดูดซึมได้ดีขึ้น

ในกระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักเกิดมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อลำไส้และมีอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ โดยแต่ละคนจะมีจุลินทรีย์ในร่างกายที่แตกต่างกันไป ดังนั้นการที่เรารับประทานอาหารประเภทหมัก ร่างกายของเราก็จะได้รับคุณค่าทางโภชนาการทั้งจากอาหารและจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารหรือที่เราเรียกว่า โปรไบโอติก นั่นเอง อาหารหมักที่มีโปรไบโอติกที่เราส่วนใหญ่รู้จักและนิยมรับประทานในปัจจุบันที่เห็นในห้างสรรพสินค้าได้แก่ โยเกิร์ต นมเปรี้ยว ยาคุล์ คอมบูชา ไวน์ เปียร์ น้ำส้มสายชูหมักแอปเปิ้ล (apple cider) และกิมจิ เป็นต้น ส่วนอาหารหมักของไทยที่เป็นที่นิยมอย่างมากที่ทุกครัวเรือนต้องมีได้แก่ กะปิ น้ำปลา ซีอิ๊ว และปลาร้า เป็นต้น

ปัจจุบันอาหารหมักดองที่วางจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด จะมีการทำลายจุลินทรีย์โดยความร้อนจากกระบวนการผลิตอาหารหรือเพื่อฆ่าเชื้ออันเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ในอาหารซึ่งจะทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ หรือเป็นการป้องกันการเกิดจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาจปนเปื้อนในอาหาร ดังนั้นสำหรับผู้บริโภคที่มองหาอาหารที่มีจุลินทรีย์โปรไบโอติกอาจจะต้องหันมาทำอาหารหมักแบบโฮมเมดบริโภค หรือมองหาผลิตภัณฑ์จากผู้ผลิตระบุว่ายังมีโปรไบโอติกอยู่ในผลิตภัณฑ์ตามที่สำนักงานอาหารและยา กองอาหารมีประกาศกระทรวงกำหนดไว้ หากรับประทานอาหารโดยขาดความรู้ความเข้าใจในอาหารที่รับประทานอาจทำให้ผู้บริโภคไม่ได้รับประโยชน์จากอาหารอย่างที่ควรจะเป็น การรับประทานอาหารในแต่ละมื้ออาหารเพื่อประโยชน์ในผลลัพธ์ต่อ

สุขภาพที่ดี ควรมีอาหารหมักอยู่ในทุกมื้ออาหารของเราเพื่อเพิ่มจุลินทรีย์ที่ดีให้กับลำไส้ และควรบริโภคอาหารหมักที่หลากหลายเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่หลากหลายสายพันธุ์ในการเติมเข้าสู่ลำไส้

เทมเป้ ถือเป็นหนึ่งในอาหารหมักที่เป็นอาหารประเภทโปรตีนสูงเทียบเท่ากับเนื้อสัตว์ อีกทั้งยังมีโภชนาการสูงจึงถือเป็นโปรตีนทางเลือกที่มีราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับเนื้อสัตว์ในปัจจุบันที่ราคาของเนื้อสัตว์มีราคาที่สูงขึ้นเพราะสภาวะเศรษฐกิจและสงครามระหว่างรัสเซีย-ยูเครน สภาพเงินเฟ้อของโลกที่สูงขึ้น ทำให้โลกในยุคหลังการแพร่ระบาดของโรคไวรัสโควิด-19 ทั่วโลกเกิดวิกฤติการณ์ทางพลังงานและอาหาร นอกจากนี้ เนื้อสัตว์ในปัจจุบันยังเกิดการติดเชื้อไวรัส ทำให้ผู้บริโภคเริ่มไม่แน่ใจในการบริโภคว่าจะปลอดภัยหรือไม่ ดังนั้นโปรตีนจากพืชจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกให้แก่ผู้บริโภค โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการแช่ถั่วเหลืองสัมพันธ์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ใช้ในการหมักเทมเป้ซึ่งคาดว่าจะส่งผลต่อกลิ่นและรสชาติของเทมเป้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตเทมเป้

1.2.2 เพื่อศึกษาระยะเวลาการแช่ถั่วเหลืองต่อคุณภาพของเทมเป้

1.2.3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา เคมี กายภาพ การยอมรับทางประสาทสัมผัส และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเทมเป้

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

1.3.1 ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการแช่ถั่วเหลืองกับกลิ่นและรสชาติของเทมเป้หลังจากบ่มครบเวลาแล้ว

1.3.2 ทราบถึงการผลิตเทมเป้ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเทมเป้เพื่อผลิตเชิงพาณิชย์

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1.4.1 สิ่งที่น่าสนใจในการศึกษา ได้แก่

1.4.1.1 สภาวะความเป็นกรด-ด่างของน้ำที่ใช้ในการแช่ถั่วเหลือง

1.4.1.2 น้ำแช่ถั่วเหลือง คือ น้ำที่ผ่านการแช่ถั่วเหลืองตามระยะเวลาที่กำหนด

1.4.1.3 หัวเชื้อเริ่มต้น (Starter culture)

1.4.1.4 เชื้อแลคติกแอซิกแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria)

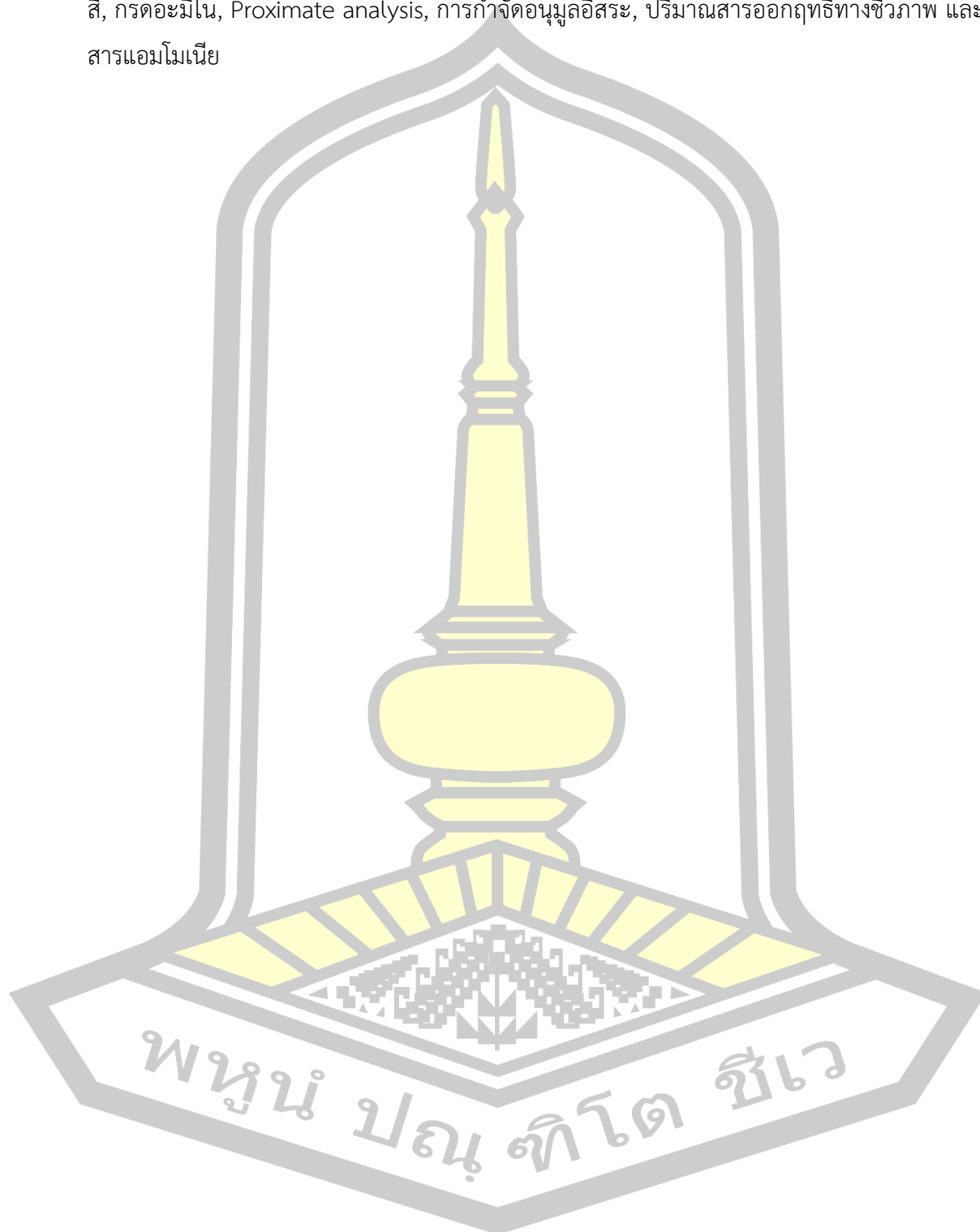
1.4.1.5 กระบวนการหมักที่ใช้ในการศึกษา คือ กระบวนการหมักตามอุณหภูมิห้องปกติที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ตามกระบวนการหมักเชิงพาณิชย์

1.4.2 ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย

1.4.2.1 ตัวแปรต้น ได้แก่ ระยะเวลาในการแช่ถั่วเหลืองจำนวนวันที่ 0, 1, 2, 3, 4

และ 5

1.4.2.2 ตัวแปรตาม ได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่างและเชื้อแบคทีเรีย, รสสัมผัส, กลิ่น, สี, กรดอะมิโน, Proximate analysis, การกำจัดอนุมูลอิสระ, ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และ สารแอมโมเนีย



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เทมเป้

2.1.1 ผลิตภัณฑ์เทมเป้และคุณค่าทางอาหาร

เทมเป้ คือ ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่ใช้หัวเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ในการหมัก เพื่อให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์เทมเป้ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์กลุ่มโปรตีนพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่อร่างกายของมนุษย์ ให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์โดยเฉพาะสารพฤษกาเคมีและคุณค่าทางโภชนาการที่ได้จากถั่วเหลืองและจุลินทรีย์ อันได้แก่ สารไอโซฟลาโวน สารซาโปนิน กรดอะมิโน และสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Romulo & Surya, 2021)

2.1.2 กระบวนการผลิตเทมเป้ (Christodouleas et al., 2015)

- 1) เริ่มจากการเตรียมถั่วเหลืองที่จะใช้ในการผลิตจะเป็นถั่วเหลืองเต็มเมล็ด หรือถั่วเหลืองซีกก็สามารถทำได้
- 2)เตรียมน้ำที่จะใช้ในการแช่ถั่ว โดยต้องเป็นน้ำ R.O.(Reverse Osmosis) หรือน้ำดื่ม
- 3) เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น *Rhizopus oligosporus* ที่จะใช้ในกระบวนการหมักถั่วเหลือง
- 4) นำถั่วเหลืองที่แช่ครบตามระยะเวลาที่กำหนด มาล้างและทำการต้มถั่วเหลืองเป็นระยะเวลา 50 นาทีนับแต่น้ำเดือด
- 5) ตักถั่วขึ้นและทำให้เมล็ดถั่วแห้งไม่มีน้ำเกาะที่เมล็ด
- 6) นำถั่วที่แห้งและเย็นเรียบร้อยแล้วมาทำการคลุกกับหัวเชื้อที่เตรียมไว้

พูน ปณ จิต ชีเว



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทำเทมเป้

2.2 ประวัติความเป็นมาของเทมเป้ในประเทศไทย

ถ้าจะกล่าวถึงอาหารในกลุ่ม “โปรตีน” เทมเป้คือทางเลือกลำดับรอง รองจากโปรตีนเกษตร และถั่วชนิดต่าง ๆ รวมถึงเต้าหู้ที่ผู้คนนึกถึง ในช่วง 2-3 ปีนี้ที่เทมเป้เริ่มเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในกลุ่มนักเรียนกลุ่มนักวิ่งสวิตตี้ กลุ่มวีแกน เหล่านี้เป็นต้น

เทมเป้เดินทางเข้ามาในประเทศไทยได้อย่างไร จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า เทมเป้ได้เริ่มต้นเข้าสู่ประเทศไทยโดยวงการวิชาการสมัยเมื่อ 40 กว่าปีที่แล้ว แต่ไม่ปรากฏหลักฐานแน่ชัดว่าเทมเป้เข้ามาประเทศไทยทางใด โดยหลักฐานที่ศึกษาค้นพบได้คือ งานวิจัยโดยเริ่มจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดย ลาวัญย์ ไกรเดช พ.ศ.2519 (ไกรเดช, 1976), รวมเรื่องย่อ และ ตีพิมพ์เรื่อง นมเปรี้ยวและเทมเป้ จากถั่วลิสง พ.ศ.2528 (ไกรเดช, 2530) หลักฐานที่ปรากฏดังกล่าวข้างต้นจึงพอจะอนุมานได้ว่า เทมเป้ได้เข้าสู่ประเทศไทยโดยแวดวงวิชาการในปี 2519 และต่อมาได้มีการเผยแพร่สู่ชุมชน แต่ก็ไม่ใช่ที่แพร่หลายอีกเช่นกัน เนื่องจากคนไทยไม่คุ้นเคยกับถั่วหมักเทมเป้ ภายหลังจากนั้นมหาวิทยาลัยต่างๆ ในประเทศไทยได้มีความพยายามในการเผยแพร่ความรู้ในการทำเทมเป้แก่ชุมชนหรือประชาชนทั่วไป จนถึงปัจจุบันนี้

2.3 ถั่วเหลือง

ถั่วเหลือง (Soybean) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* จัดเป็นโปรตีนทางเลือกจากพืชอันดับต้นๆ ของโลกที่นำมาแปรรูปเป็นอาหาร อีกทั้งยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยฐานข้อมูลทางโภชนาการของสำนักงานอาหารและยา สหรัฐอเมริกา (USDA) เมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วย โปรตีน 36.5% คาร์โบไฮเดรต 30% ลิพิด 19.9% และไฟเบอร์ 9.3% ข้อมูลทางโภชนาการของถั่วเหลืองโดยทาง USDA ได้แนะนำในการบริโภคของผู้ใหญ่ในสหรัฐอเมริกาไว้ในตารางที่ 1 (Haytowitz et al., 2011)

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลือง (ต่อ 100 กรัม)

Components	Mass
Carbohydrates	30.0 g
Sugars	7.3 g
Dietary Fiber	9.3 g
Fat	19.9 g
Saturated	2.8 g
Monounsaturated	4.5 g
Polyunsaturated	11.2 g

ตารางที่ 1 (ต่อ) คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลือง (ต่อ 100 กรัม)

Components	Mass
Protein	36.5 g
Minerals	
Calcium	28% (277 mg)
Iron	126% (15.70 mg)
Phosphorus	101% (704 mg)
Potassium	38% (1797 mg)
Magnesium	76% (280 mg)
Sodium	0%
Zinc	49% (4.89 mg)
Vitamin	
Vitamin B6	29% (0.3 mg)
Vitamin C	10% (6.0 mg)
Vitamin K	45% (0.04 mg)
Water	8.5 g

2.3.1 สายพันธุ์ถั่วเหลืองในประเทศไทย (ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่)

2.3.1.1 ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่

ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 2

ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 3

ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 4

ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 5

ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60

2.3.1.2 ถั่วเหลืองพันธุ์ขอนแก่น

ถั่วเหลืองพันธุ์ขอนแก่น

2.3.1.3 ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.

ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 1

ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 2

ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4

ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5

ถั่วเหลืองผิวดำพันธุ์สุโขทัย 3

ถั่วเหลืองพันธุ์สุโขทัย 2

ถั่วเหลืองพันธุ์สุโขทัย 1

ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นครสวรรค์ 1

ถั่วเหลืองพันธุ์ มข.35

ถั่วเหลืองที่นำมาศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยใช้ถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ สจ.2 ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท กานต์ถั่ว ไทยคูซิ่น จำกัด ถั่วเหลืองสายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์มาตรฐานของกรมกสิกรรมในสมัยนั้น ที่พัฒนาปรับปรุงพันธุ์ในปี 2503 (สมุทคุปต์, 1971) ปัจจุบันถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.2 ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ได้หยุดการเพาะเมล็ดพันธุ์เพื่อจำหน่ายให้กับเกษตรกรแล้ว ดังนั้นเมล็ดพันธุ์ในปัจจุบันจึงเกิดจากการที่เกษตรกรผู้ปลูกได้เก็บเมล็ดพันธุ์เพื่อการเพาะปลูกไว้เอง อีกทั้งสายพันธุ์นี้ไม่ได้มีการตัดต่อพันธุกรรมพืชหรือ GMO เนื่องจากในประเทศไทยมีศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่เป็นผู้พัฒนาสายพันธุ์เพื่อจำหน่ายให้เกษตรกร จึงไม่มีการตัดต่อพันธุกรรมพืช

2.4 โปรตีนและกรดอะมิโน

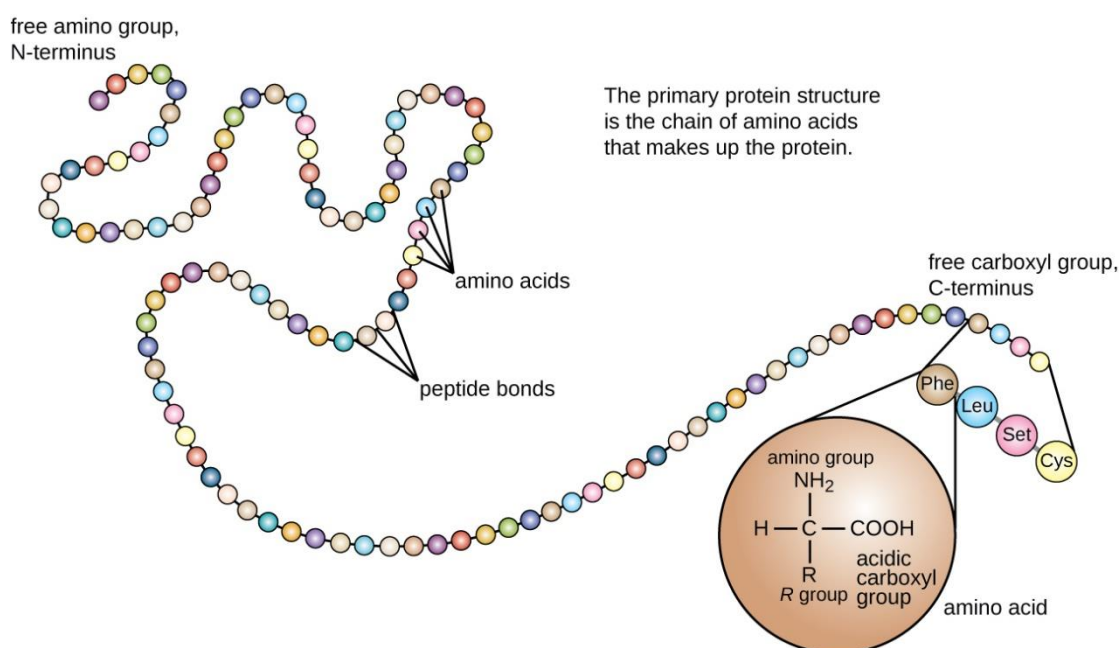
โครงสร้างหลักของโปรตีนคือสายเปปไทด์ที่เกิดจากกรดอะมิโนที่ถูกดัดโมเลกุลของน้ำออกไปหนึ่งโมเลกุล เกิดขึ้นในขณะที่สร้างพันธะเปปไทด์ กรดอะมิโนถือเป็นโมโนเมอร์ของโปรตีนลักษณะโครงสร้างทางเคมีของกรดอะมิโนที่เป็นโมเลกุลอินทรีย์จะประกอบด้วยอะตอมไฮโดรเจน หมู่คาร์บอกซิล ($-\text{COOH}$) หมู่อะมิโน ($-\text{NH}_2$) และหมู่ R (side chain) ติดอยู่กับคาร์บอนอะตอมในตำแหน่งแอลฟา (Alpha-carbon) กรดอะมิโนประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจนและออกซิเจนเป็นหลัก ในโปรตีนจะพบกรดอะมิโน 20 ชนิด จัดเป็น amphoteric compound เนื่องจากมีทั้งประจุบวกและประจุลบในโมเลกุลเดียวกันหรือ สวิตเตอร์ไอออน เป็นได้ทั้งกรดและเบส เมื่อกรดอะมิโนต่อกันจนเป็นสายยาวมีโมเลกุลขนาดใหญ่ เรียกว่า “โปรตีน” โครงสร้างโปรตีนแบ่งออกเป็น 4 ระดับคือ ระดับที่หนึ่ง (primary) ระดับที่สอง (secondary) ระดับที่สาม (tertiary) และระดับที่สี่ (quaternary) โดยที่โครงสร้างระดับที่หนึ่งหรือโครงสร้างหลัก(primary structure)นี้จะเรียงต่อเนื่องกันด้วยกรดอะมิโนเป็นสายเปปไทด์ ดังภาพที่ 2 เป็นการยัดเกาะกันแบบที่ยืดหยุ่นได้ โครงสร้างระดับที่สอง (secondary structure) เกิดขึ้นเมื่อสายโซ่อะมิโนยาวเพียงพอทำปฏิกิริยากันด้วยพันธะไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นในระหว่างกลุ่มฟังก์ชันเอมีน (amine) และ คอรับอนิล (carbonyl) ภายในสายพอลิเปปไทด์เดียวกัน (ไม่รวมหมู่ R) ส่งผลให้มีการพับโซ่โพลีเปปไทด์เป็นอัลฟาเฮลิก (Alpha-helix) และเป็นแผ่นชีท (β -pleated sheet) ดังภาพที่ 3 โครงสร้างระดับที่สาม (tertiary structure) เป็นรูปร่างสามมิติขนาดใหญ่เป็นโครงสร้างที่เกิดจากพันธะต่างๆ ระหว่างหมู่ R (side

chain) ของกรดอะมิโนสายเดี่ยวทำให้โพลีเปปไทด์เกิดการพับตัวกันไปมา เปลี่ยนรูปร่างไปตามชนิด และแรงดึงดูดของพันธะมีทั้งอ่อนแอและแข็งแรงรวมกันจึงเกิดเป็นรูปร่างของโปรตีนและหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีน เรียกว่า Protein folding ดังภาพที่ 4 โครงสร้างระดับที่สี่ (quaternary structure) เป็นโครงสร้างที่เกิดจากการรวมกันของสายโพลีเปปไทด์มากกว่า 1 สาย ระหว่างหมู่ R ระหว่างสายโพลีเปปไทด์ที่ยังไม่เกิดพันธะอยู่บริเวณด้านนอกของโครงสร้าง พบในโมเลกุลของเอนไซม์ (enzyme) ตัวอย่างของโครงสร้างโปรตีนระดับที่สี่ เช่นเฮโมโกลบินที่มี 2 เบต้าและ 2 อัลฟา โพลีเปปไทด์ ดังภาพที่ 5 สรุปโครงสร้างของโปรตีนทั้ง 4 ระดับดังภาพที่ 6 (Nina Parker, 2024)

หน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีนแบ่งได้เป็น ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (enzyme catalysts) ได้แก่ เอนไซม์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในร่างกายสิ่งมีชีวิต, ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างโปรตีน (structural proteins) ได้แก่ คอลลาเจนในผิวหนัง กระดูกและกระดูกอ่อน, ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหว (contractile proteins) เช่น myosin และ actin พบในกล้ามเนื้อ, ทำหน้าที่ควบคุมเมตาบอลิซึมของร่างกาย (hormones), ทำหน้าที่ขนส่ง (transfer proteins), เป็นแอนติบอดี (antibodies), ทำหน้าที่สะสมอาหาร (storage protein) และ ทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันโรคให้กับร่างกาย (protective protein) (Damodaran & Parkin, 2017) โปรตีนแบ่งตามชีวเคมีได้ 2 ชนิดคือ

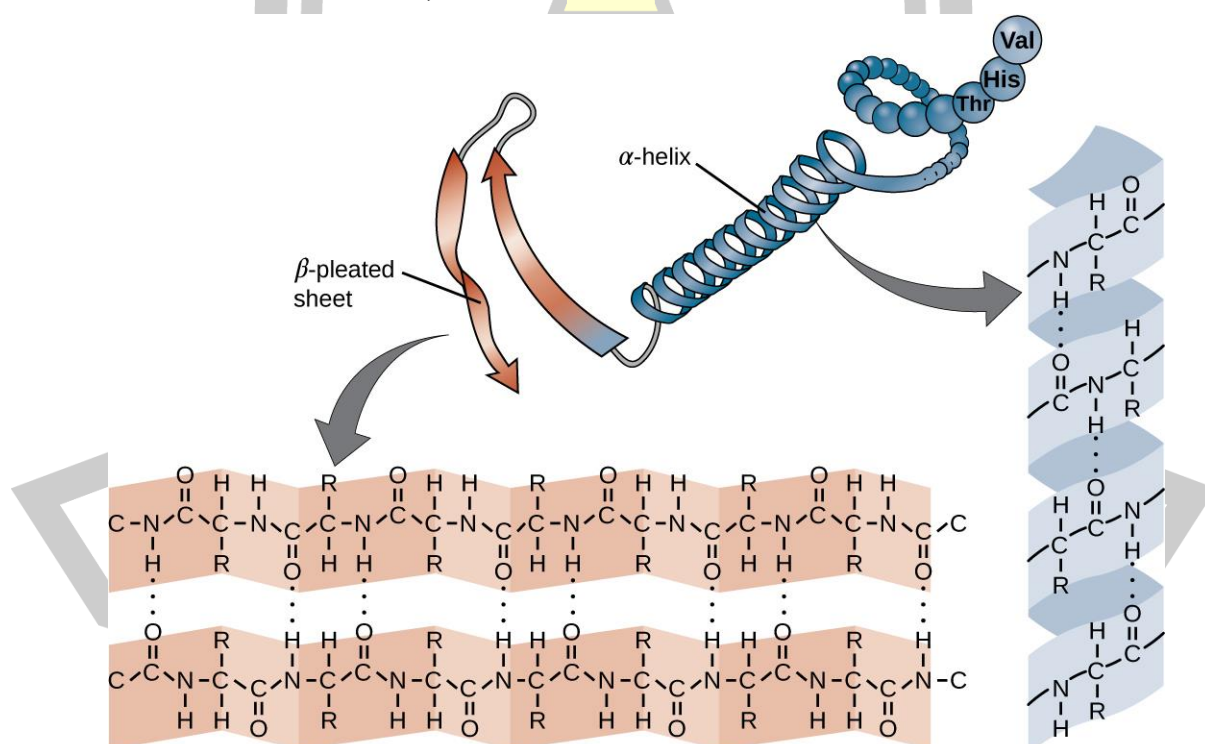
1. โปรตีนชนิดไม่ซับซ้อน คือโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนอย่างเดียว ไม่มีสารอื่นเจือปนอยู่ เช่น อัลบูมิน (Albumin) เป็นโปรตีนที่พบในไข่ขาว (egg albumin)และในเลือด (serum albumin), ฮิสโตน (Histone) เป็นโปรตีนที่พบในต่อมไทมัสและตับอ่อน, กลูเตลิน (Glutelin) เป็นกลุ่มโปรตีนโกลบูลินที่พบอยู่ในเมล็ดข้าวสาลี ข้าวไรย์และข้าวบาร์เลย์, โปรตามีน (Protamines) เป็นโปรตีนที่พบในสัตว์จำพวกปลา

2. โปรตีนชนิดที่ซับซ้อน คือโปรตีนที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนและสารอื่นปนอยู่ด้วย เช่น นิวคลีโอโปรตีน (Nucleoprotein) เป็นการรวมตัวของโปรตีนกับกรดนิวคลีอิก (ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ), ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนเกิดจากการรวมตัวของพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตกับโปรตีนพบในน้ำลาย ไข่ขาว และเยื่อหุ้มเซลล์สัตว์, โครโมโปรตีน (Chromoprotein) เป็นโปรตีนที่มีสารประกอบที่มีสี เช่น เฮโมโกลบิน (hemoglobin) ฟลาโวนโปรตีน (flavoprotein), ฟอสโฟโปรตีน (Phosphoproteins) เป็นโปรตีนที่มีฟอสฟอรัสปนอยู่ด้วย เชื่อมเข้ากับหมู่ไฮดรอกซีของกรดอะมิโนเซรีน (serine) หรือเทรโอนีน (threonine), ลิโปโปรตีน (Lipoprotein) เป็น compound lipid ประกอบด้วยลิพิดและโปรตีน เป็นสารที่พบอยู่ในเลือดมีหน้าที่พาคอเลสเตอรอลไปในกระแสเลือดไปยังเซลล์ต่างๆ

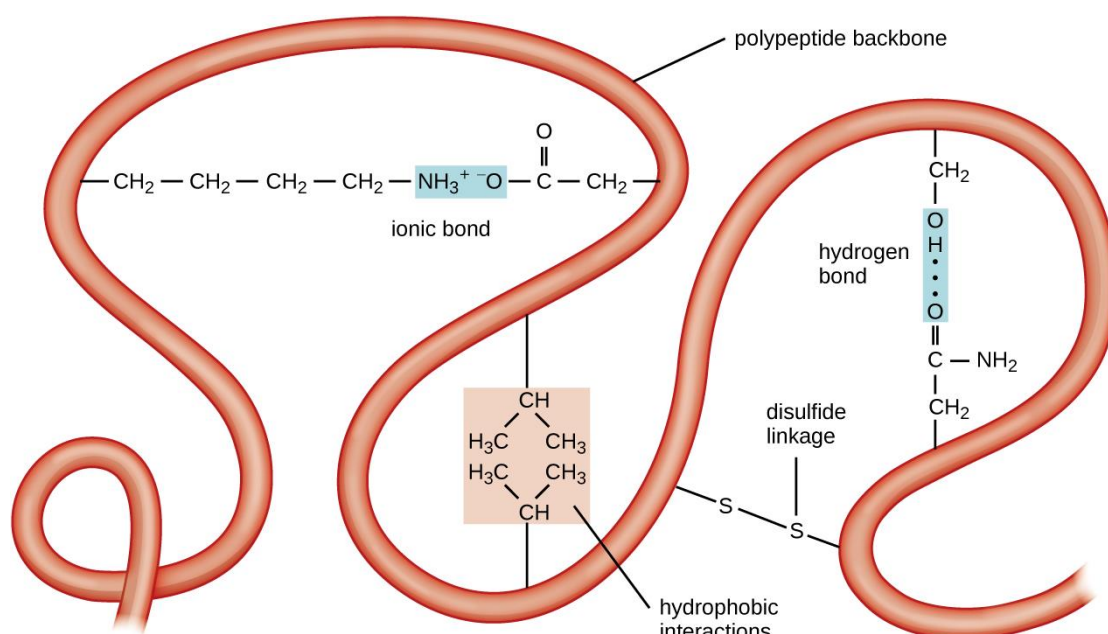


ภาพที่ 2 โครงสร้างหลัก (primary structure) ของโปรตีนที่กรดอะมิโนเรียงต่อกัน (Nina Parker, 2024)

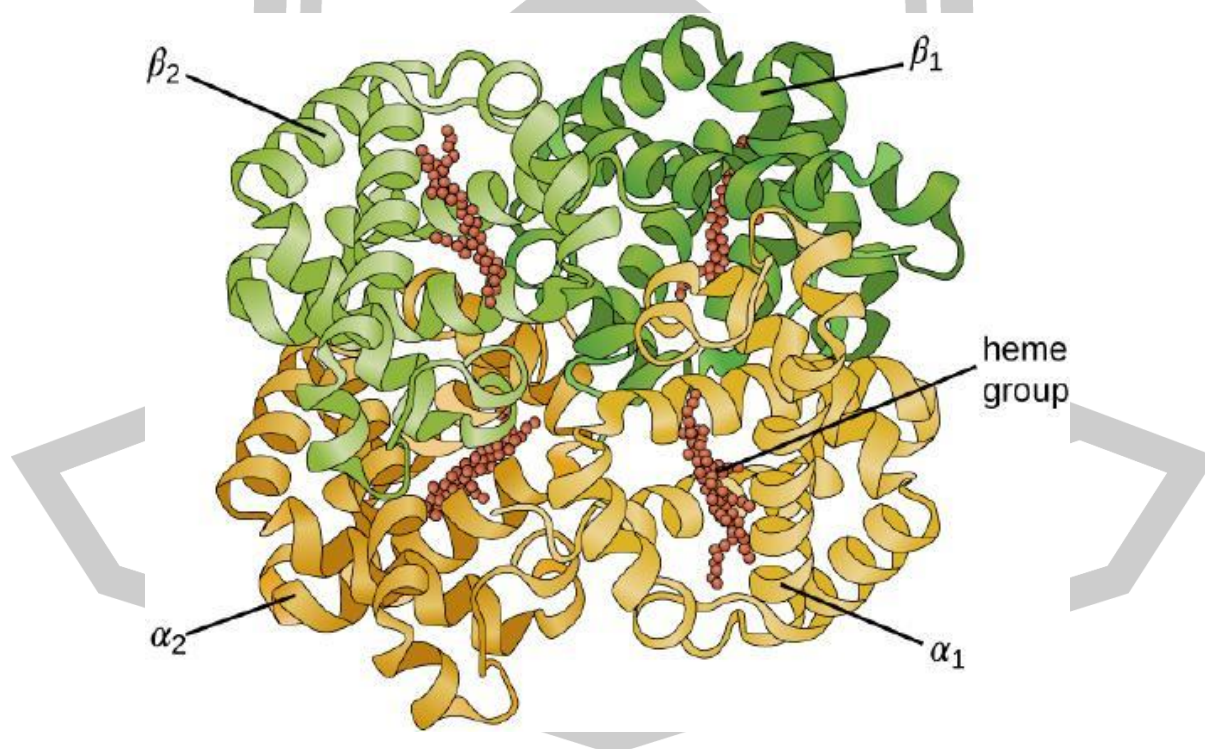
ที่มา: modification of work by National Human Genome Research Institute



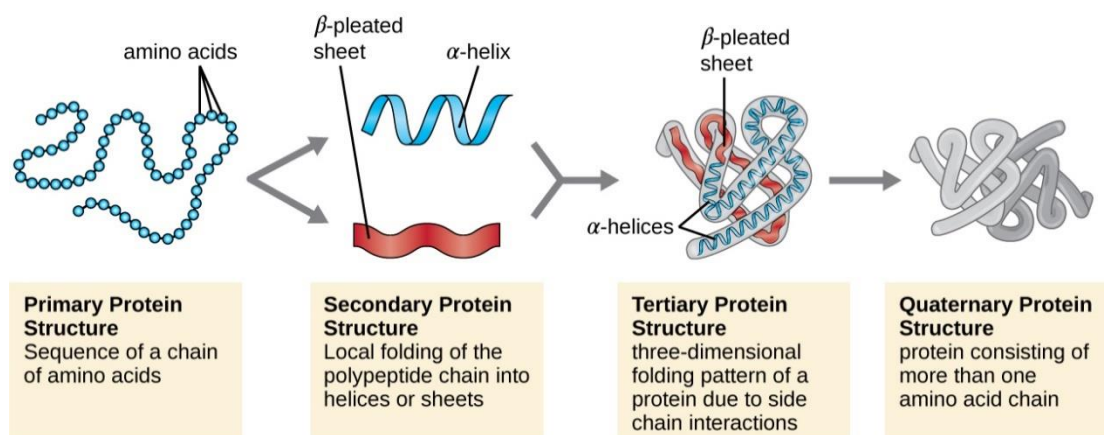
ภาพที่ 3 โครงสร้างลำดับที่สอง (secondary structure) ของโปรตีนที่อาจจะเป็น Alpha-helix และ beta-pleated sheet หรือเป็นทั้งสอง (Nina Parker, 2024)



ภาพที่ 4 โครงสร้างลำดับที่สาม (tertiary structure) ของโปรตีนที่ถูกดึงดูดด้วยแรงดึงดูดที่หลากหลาย รวมถึงปฏิกิริยาที่ไม่ชอบน้ำ พันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจนและพันธะไดซัลไฟด์ (Nina Parker, 2024)



ภาพที่ 5 โมเลกุลของฮีโมโกลบินที่มี 2 เบต้าและ 2 อัลฟา โพลีเปปไทด์รวมกันกับกลุ่มฮีม (heme) (Nina Parker, 2024)



ภาพที่ 6 สรุปโครงสร้างของโปรตีนทั้ง 4 ระดับ (Nina Parker, 2024)

ที่มา: modification of work by National Human Genome Research

กระบวนการของการให้ได้มาซึ่งกรดอะมิโนตามธรรมชาติ คือ ได้จากกระบวนการหมักด้วย จุลินทรีย์ทั้งจากเชื้อรา และแบคทีเรียโพรไบโอติก จุลินทรีย์จะใช้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยประมาณ 10-30 ชนิดในการสังเคราะห์สารอาหารเพื่อให้ได้สารใหม่ขึ้นมา (ที่มา: <http://www.ajinomoto.com>)

กรดอะมิโนมีทั้งหมด 20 ชนิด โดยที่ 9 ชนิดร่างกายเราไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ ต้องได้มาจากการบริโภคเท่านั้น ได้แก่ Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophan และ Valine กรดอะมิโนอีก 11 ชนิดที่ร่างกายสามารถผลิตได้เอง ได้แก่ Alanine, Arginine, Asparagine, Aspartic acid, Cysteine, Glutamic acid, Glutamine, Glycine, Proline, Serine และ Tyrosine กรดอะมิโนแต่ละชนิดมีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญกับร่างกายทั้งด้านโภชนาการและการเผาผลาญ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนที่รวมเอาแอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ กรดไขมันสายสั้น และสายยาว กลูโคส ไฮโดรเจนซัลไฟด์ สารคีโตนบอดีส์ (สารประกอบที่สังเคราะห์ได้ในร่างกายเมื่อมีเมตาบอลิซึมของไขมันเพิ่มขึ้น) ไนตริกออกไซด์(NO) ยูเรีย กรดยูริก โพลิอะไม และสารไนโตรเจนอื่นๆ ที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ดังตารางที่ 2(Wu, 2009)



ตารางที่ 2 Major metabolites and functions of Amino acid (AA) in nutrition and metabolism

Amino Acid	Products	Major Functions
Amino Acid	Directly	Protein synthesis; osmolytes; regulation of hormone secretion, gene expression and cell signaling
Alanine	Directly	Inhibition of pyruvate kinase and hepatic autophagy; gluconeogenesis; transamination; glucose-alanine cycle
β -Alanine	Directly	A component of coenzyme A and pantothenic acid
	Dipeptides	Carnosine (β -alanyl-L-histidine), carcine (β -alanyl-histamine), anserine (β -alanyl-1-methyl-L-histidine), and balenine (β -alanyl-3-methyl-histidine) with antioxidative function
Arginine	Directly	Activation of mTOR signaling; antioxidant; regulation of hormone secretion; allosteric activation of NAG synthase; ammonia detoxification; regulation of gene expression; immune function; activation of BH4 synthesis; N reservoir; methylation of proteins; deimination (formation of citrulline) of proteins ^a
	NO	Signaling molecule; regulator of nutrient metabolism, vascular tone, hemodynamics, angiogenesis, spermatogenesis, embryogenesis, fertility, immune function, hormone secretion, wound healing, neurotransmission, tumor growth, mitochondrial biogenesis, and function
	Agmatine	Inhibition of NOS, ODC, and monoamine oxidase; ligand for α_2 -adrenergic and imidazoline receptors
	Ornithine	Ammonia detoxification; syntheses of proline, glutamate, and polyamines; mitochondrial integrity; wound healing
	Methylarginines	Competitive inhibition of NOS
Asparagine	Directly	Cell metabolism and physiology; regulation of gene expression and immune function; ammonia detoxification; function of the nervous system
	Acrylamide ^b	Oxidant; cytotoxicity; gene mutation; food quality
Aspartate	Directly	Purine, pyrimidine, asparagine, and arginine synthesis; transamination; urea cycle; activation of NMDA receptors; synthesis of inositol and β -alanine
Citrulline	Directly	Antioxidant; arginine synthesis; osmoregulation; ammonia detoxification; N reservoir
Cysteine	Directly	Disulfide linkage in protein; transport of sulfur
	Taurine	Antioxidant; regulation of cellular redox state; osmolyte
	H ₂ S	A signaling molecule

ตารางที่ 2 (ต่อ) Major metabolites and functions of Amino acid (AA) in nutrition and metabolism

Amino Acid	Products	Major Functions
Glutamate	Directly	Glutamine, citrulline, and arginine synthesis; bridging the urea cycle with the Krebs cycle; transamination; ammonia assimilation; flavor enhancer; activation of NMDA receptors; NAG synthesis
	GABA	Excitatory neurotransmitter; inhibition of T-cell response and inflammation
Glutamine	Directly	Regulation of protein turnover through cellular mTOR signaling, gene expression, and immune function; a major fuel for rapidly proliferating cells; inhibition of apoptosis; syntheses of purine, pyrimidine, ornithine, citrulline, arginine, proline, and asparagines; N reservoir; synthesis of NAD(P)
	Glu and Asp	Excitatory neurotransmitters; components of the malate shuttle; cell Metabolism; ammonia detoxification; major fuels for enterocytes
	Glucosamine-6-P	Synthesis of aminosugars and glycoproteins; inhibition of NO synthesis
	Ammonia	Renal regulation of acid-base balance; synthesis of glutamate and CP
Glycine	Directly	Calcium influx through a glycine-gated channel in the cell membrane; purine and serine synthesis; synthesis of porphyrins; inhibitory neurotransmitter in CNS; co-agonist with glutamate for NMDA receptors
	Heme	Hemoproteins (e.g., hemoglobin, myoglobin, catalase, and cytochrome c); production of CO (a signaling molecule)
Histidine	Directly	Protein methylation; hemoglobin structure and function; antioxidative dipeptides; one-carbon unit metabolism
	Histamine	Allergic reaction; vasodilator; central acetylcholine secretion; regulation of gut function
	Urocanic acid	Modulation of the immune response in skin
Isoleucine	Directly	Synthesis of glutamine and alanine; balance among BCAA
Leucine	Directly	Regulation of protein turnover through cellular mTOR signaling and gene expression; activator of glutamate dehydrogenase; BCAA balance; flavor enhancer
	Gln and Ala	Interorgan metabolism of nitrogen and carbon
	HMB	Regulation of immune responses

ตารางที่ 2 (ต่อ) Major metabolites and functions of Amino acid (AA) in nutrition and metabolism

Amino Acid	Products	Major Functions
Lysine	Directly	Regulation of NO synthesis; antiviral activity (treatment of Herpes simplex); Protein methylation (e.g., trimethyllysine in calmodulin), acetylation, ubiquitination, and O-linked glycosylation
	OH-lysine	Structure and function of collagen
Methionine	Homocysteine	Oxidant; independent risk factor for CVD; inhibition of NO synthesis
	Betaine	Methylation of homocysteine to methionine; one-carbon unit metabolism
	Choline	Synthesis of betaine, acetylcholine, phosphatidylcholine, and sarcosine
	Cysteine	Cellular metabolism and nutrition
	DCSAM	Methylation of proteins and DNA; polyamine synthesis; gene expression
	Taurine	Antioxidant; osmoregulation; organ development; vascular, muscular, cardiac, and retinal functions; anti-inflammation
	Phospholipids	Synthesis of lecithin and phosphatidylcholine cell signaling
Phenylalanine	Directly	Activation of BH ₄ (a cofactor for NOS) synthesis; synthesis of tyrosine; neurological development and function
Proline	Directly	Collagen structure and function; neurological function; osmoprotectant
	H ₂ O ₂	Killing pathogens; intestinal integrity; a signaling molecule; immunity
	P5C	Cellular redox state; DNA synthesis; lymphocyte proliferation; ornithine, citrulline, arginine and polyamine synthesis; gene expression; stress response
	OH-proline	Structure and function of collagen
Sarcosine	Directly	An intermediate in the synthesis of glycine from choline; possible treatment of certain mental disorders; a source of formaldehyde and H ₂ O ₂ ; inhibition of glycine transport
Serine	Directly	One-carbon unit metabolism; syntheses of cysteine, purine, pyrimidine, ceramide and phosphatidylserine; synthesis of tryptophan in bacteria; gluconeogenesis (particularly in ruminants); protein phosphorylation
	Glycine	Antioxidant; one-carbon unit metabolism; neurotransmitter
	D-Serine ^c	Activation of NMDA receptors in brain

ตารางที่ 2 (ต่อ) Major metabolites and functions of Amino acid (AA) in nutrition and metabolism

Amino Acid	Products	Major Functions
Theanine	Directly	An amino acid (glutamine analog) in tea leaves; antioxidant; increasing levels of GABA, dopamine, and serotonin in brain; neuroprotective effect
Threonine	Directly	Synthesis of the mucin protein that is required for maintaining intestinal integrity and function; immune function; protein phosphorylation and O-linked glycosylation; glycine synthesis
Tryptophan	Serotonin	Neurotransmitter; inhibiting production of inflammatory cytokines and superoxide
	NAS	Inhibitor of BH ₄ synthesis; antioxidant; inhibition of the production of inflammatory cytokines and superoxide
	Melatonin	Antioxidant; inhibition of the production of inflammatory cytokines and superoxide
	ANS	Inhibiting production of proinflammatory T-helper-1 cytokines; preventing autoimmune neuroinflammation; enhancing immune function
	Niacin	A component of NAD and NADP, coenzymes for many oxidoreductases
Tyrosine	Directly	Protein phosphorylation, nitrosation, and sulfation
	Dopamine	Neurotransmitter; regulation of immune response
	EPN and NEPN	Neurotransmitters; cell metabolism
	Melanin	Antioxidant; inhibition of the production of inflammatory cytokines and superoxide
Valine	Directly	Synthesis of glutamine and alanine; balance among BCAA
Arg and Met	Polyamines	Gene expression; DNA and protein synthesis; ion channel function; apoptosis; signal transduction; antioxidants; cell function; cell proliferation and differentiation
Arg, Met, and Gly	Creatine	Antioxidant; antiviral; antitumor; energy metabolism in muscle and brain; neurological and muscular development and function
Cys, Glu, and Gly	Glutathione	Free radical scavenger; antioxidant; cell metabolism (e.g., formation of leukotrienes, mercapturate, glutathionylspermidine, glutathione-NO adduct and glutathionylproteins); signal transduction; gene expression; apoptosis; cellular redox; immune response
Gln, Asp, Gly, and Ser	Nucleic acids	Coding for genetic information; gene expression; cell cycle and function; protein and uric acid synthesis; lymphocyte proliferation
	Uric acid	Antioxidant; the major end product of amino acid oxidation in avian species

ตารางที่ 2 (ต่อ) Major metabolites and functions of Amino acid (AA) in nutrition and metabolism

Amino Acid	Products	Major Functions
Lys, Met, and Ser	Carnitine	Transport of long-chain fatty acids into mitochondria for oxidation; storage of energy as acetylcarnitine; antioxidant

ANS anthranilic acid, BCAA branched-chain AA, BH₄ tetrahydrobiopterin, CNS central nervous system, CP carbamoylphosphate, CVD cardiovascular disease, DCSAM decarboxylated S-adenosylmethionine, EPN epinephrine, GABA c-aminobutyrate, HMB β -hydroxy-b-methylbutyrate, NAG N-acetylglutamate, NAS N-acetylserotonin, NEPN norepinephrine, NOS NO synthase, ODC ornithine decarboxylase, P5C pyrroline-5-carboxylate, Tau-Cl taurine chloramine

^a Including myelin basic protein, filaggrin, and histone proteins

^b Formed when asparagine reacts with reducing sugars or reactive carbonyls at high temperature

^c Synthesized from L-serine by serine racemase

(ที่มา: (Wu, (2009)))

โปรตีนถั่วเหลืองนั้นถือว่ามีคุณค่าทางชีวภาพที่สูงสุด องค์ประกอบของกรดอะมิโนจากโปรตีนถั่วเหลืองมีใกล้เคียงกับโปรตีนที่ได้จากเนื้อสัตว์ เช่นฟีนิลอะลานีน เมไทโอนีน ทรีโอนีน วาลีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ทรีปโตเฟน และไลซีน(Kudetka et al., 2021) องค์ประกอบของกรดอะมิโนในถั่วเหลืองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 (Aijie et al., 2014; Liu & Liu, 1997) (Vagadia et al., 2017)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของกรดอะมิโนในเมล็ดถั่วเหลือง

Amino acid	Mg/g protein
Arginine	77.16 (7.71%)
Alanine	40.23 (4.02%)
Aspartic acid	68.86 (6.88%)
Cysteine	25.00 (2.50%)
Glutamic acid	190.1 (19.01%)
Isoleucine	51.58 (5.15%)
Leucine	81.69 (8.16%)
Lysine	68.37 (6.83%)
Phenylalanine	56.29 (5.62%)
Proline	52.91 (5.29%)
Serine	54.05 (5.40%)

(ที่มา: (Asif & Acharya, 2013; Liu & Liu, 1997))

นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังเป็นแหล่งเปปไทด์โปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพด้วยเช่นกัน โดยโปรตีนถั่วเหลืองในเชิงหน้าที่พอจะกล่าวได้ถึง โปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต (Soy Protein Hydrolysates (SPHs)) เป็นผลผลิตจากโปรตีนถั่วเหลืองที่ผลิตจากกรรมวิธีต่างๆ รวมถึง ไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และการถนอมอาหารด้วยความร้อน (thermal treatments) หรือกระบวนการทางชีวภาพหมายถึงการย่อยในระบบทางเดินอาหารและการหมักด้วยจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน กระบวนการดังที่กล่าวมาให้คุณสมบัติของไฮโดรไลเสตที่แตกต่างกัน (Ashaolu, 2020) ความหลากหลายของโปรตีนถั่วเหลืองที่นำมาผลิตในอุตสาหกรรมได้แก่ โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (Soy protein concentrate) โปรตีนไอโซเลต (Soy protein isolates) และ เนื้อโปรตีนถั่วเหลือง (Textured soy proteins) (Rhee, 1994) ในขณะที่โปรตีนที่ใช้กระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ในเชิงอุตสาหกรรมยังมีน้อยมากในปัจจุบันเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดที่มีอาหารประเภทโปรตีนออกมามากมายหลากหลาย

ปริมาณกรดอะมิโนที่ร่างกายต้องการต่อวันคำนวณจากปริมาณน้ำหนักต่อกิโลกรัมตามข้อมูลปริมาณสารอาหารอ้างอิงของประเทศสหรัฐอเมริกาตารางที่ 4 โดยประเทศไทยใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงโภชนาการ

ตารางที่ 4 ความต้องการกรดอะมิโนโดยประมาณของผู้ใหญ่

Amino acid	Some reported amino acid Requirements (mg per day)			Combined adult value (mg. per kg per day)	Suggested pattern (mg. per g. protein)
	Men	Women			
		Observed	Recalculated-ed		
Histidine	0	0	0	0	0
Isoleucine	700	450	550	10	18
Leucine	1100	710	730	14	25
Lysine	800	700	545	12	22
Methionine+ cystine	1100	550	700	13	24
Phenylalanine + tyrosine	1100	700	-	14	25
Threonine	500	310	375	7	13
Tryptophan	250	160	168	3.5	6.5
Valine	800	650	622	10	18

(ที่มา: (Joint, 1973))

จากการศึกษาของ M.P. Vaidehi et al. (1985) ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างกรดอะมิโนในเทมเป้กับปริมาณกรดอะมิโนที่ World Health Organization แนะนำต่อการบริโภค ดังตารางที่ 5 (Vaidehi et al., 1985)

ตารางที่ 5 รูปแบบกรดอะมิโนของส่วนผสมของเทมเป้ เทียบกับรูปแบบของ FAO (มก./กรัมของไนโตรเจน)

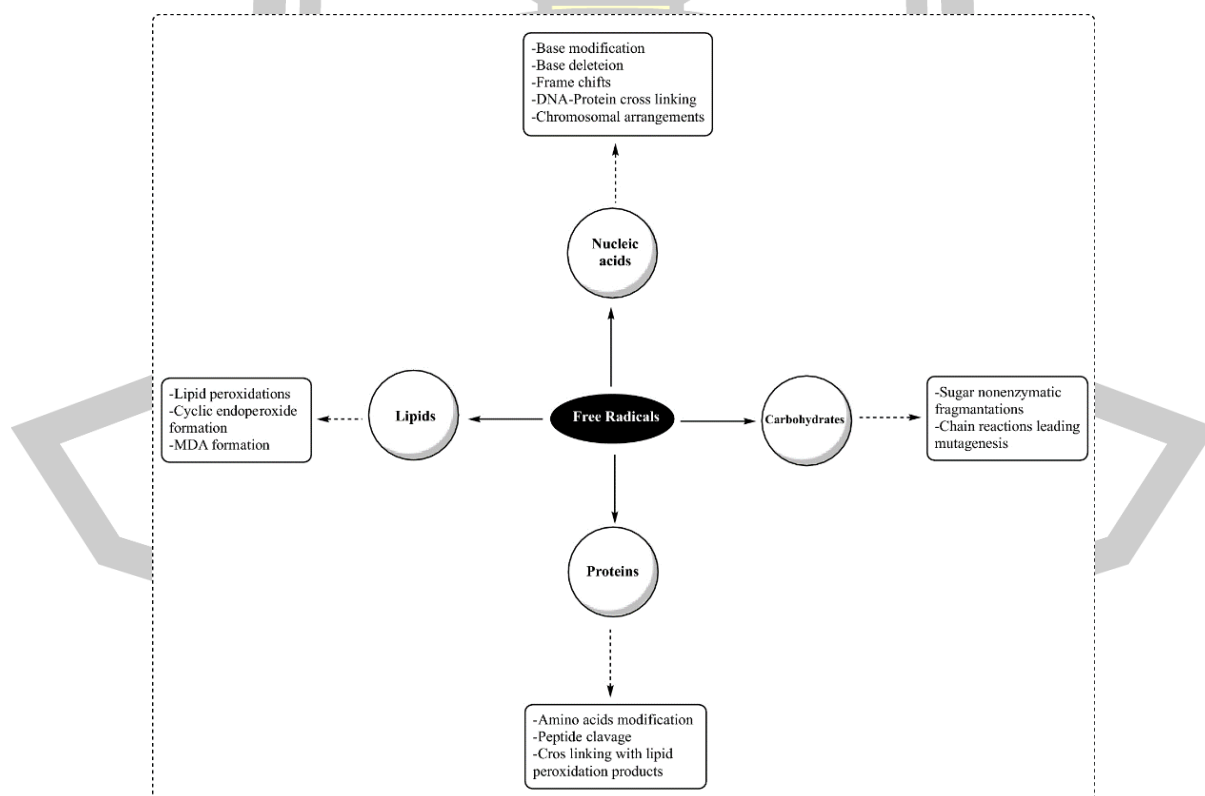
Amino Acids	FAO	Soy Tempeh
Methionine+ cysteine	220	180
Lysine	340	400
Leucine	440	480
Isoleucine	250	320
Phenylalanine+ tyrosine	380	510
Threonine	250	240
Tryptophan	60	60
Valine	310	320

(ที่มา: Vaidehi et al., 1985)

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ และการตรวจวิเคราะห์

อนุมูลอิสระ (free radicals) คืออะตอม โมเลกุลหรือสารประกอบอิเล็กตรอนเดี่ยว เป็นอิสระไม่มีคู่ จึงพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ในทางชีววิทยา แบ่งอนุมูลอิสระเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และ กลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) ในสิ่งมีชีวิตออกซิเจนจะถูกการรีดิวซ์โดยการเติมอิเล็กตรอน 2 อิเล็กตรอน ได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) และออกซิเจน (oxygen) จะถูกการรีดิวซ์โดยการเติมอิเล็กตรอน 4 อิเล็กตรอนได้เป็นน้ำ สารหลายชนิดในสิ่งมีชีวิตสามารถให้กำเนิดอนุมูลอิสระได้เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับชีวโมเลกุล เช่น ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ ส่วนใหญ่จะเป็นชนิดที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (วัชรคุปต์ et al., 2550) ดังนั้นการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายของมนุษย์จึงเกิดจากกระบวนการเผาผลาญที่ร่างกายใช้ออกซิเจนในกระบวนการเผาผลาญเกิดมี “อนุมูลอิสระ” ในทางเคมีสารรับอิเล็กตรอน (oxidant) และ สารที่สูญเสียอิเล็กตรอน (reducing agent หรือ reductants) ถือเป็นปฏิกิริยาในกระบวนการของอนุมูล

อิสระ อย่างไรก็ตามสภาพแวดล้อมทางชีวภาพจะเรียกสารที่ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ส่วนสารที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เรียกว่า โปรออกซิแดนต์ (pro-oxidants) โดย pro-oxidants เป็นสารที่มุ่งเป้าในการทำลายความหลากหลายทางชีวภาพในร่างกายมนุษย์ไม่ว่าจะเป็น คาร์โบไฮเดรต, กรดนิวคลีอิก, ไขมันและโปรตีน โดยสามารถทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อได้ จึงเป็นเหตุให้ร่างกายของมนุษย์เกิดความผิดปกติก่อให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (Gulcin, 2020) ดังภาพที่ 7 นอกจากกระบวนการภายในร่างกายแล้ว ยังมีมลพิษต่างๆ จากภายนอกที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ เป็นตัวทำลายเซลล์ในร่างกายของมนุษย์ทำให้เกิดโรคต่างๆ รวมทั้งการกลายพันธุ์ของเซลล์ (mutation) ร่างกายมนุษย์มีกระบวนการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้สารที่ร่างกายผลิตได้ แต่ร่างกายก็ไม่สามารถผลิตได้มากเพียงพอหากพิจารณาจากสภาพแวดล้อมและการบริโภคอาหารของผู้คนในปัจจุบันที่มีปัจจัยผันแปรตามสภาพอากาศและการดำรงชีวิตของมนุษย์ในปัจจุบัน จึงจำเป็นที่จะต้องบริโภคอาหารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ ซึ่งสารดังกล่าวเรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) (สวรรณ, 2013) มีหน้าที่ในการป้องกันกลไกการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น มะเร็ง พาร์กินสัน อัลไซเมอร์ โรคหลอดเลือด เป็นต้น (Moharram & Youssef, 2014)



ภาพที่ 7 การพุ่งเป้าทางชีวภาพของอนุมูลอิสระ (Gulcin, 2020)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับอนุมูลอิสระที่นักวิจัยได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องต่อการอักเสบและความเสียหายของเซลล์อันเกิดจากการขาดสมดุลของร่างกายระหว่างอนุมูลอิสระ (free radicals) กับ สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) เรียกว่า “Oxidative Stress” เป็นภาวะที่เยื่อหุ้มเซลล์ในร่างกายเกิดการอักเสบและได้รับความเสียหายทำให้เซลล์เสื่อมสภาพจนนำไปสู่ความผิดปกติทำให้เกิดโรคได้ (Munteanu & Apetrei, 2021) Ma’rcio Carocho และ Isabel C.F.R. Ferreira ได้จำแนกสารต้านอนุมูลอิสระไว้ 2 กลุ่มหลักคือ สารต้านอนุมูลอิสระจากเอนไซม์และสารออกซิเดชั่นที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Carocho & Ferreira, 2013) อีกทั้งการจำแนกประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระที่แยกย่อยลงไปในแต่ละลำดับของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถแยกได้ ดังภาพที่ 9 (Flieger et al., 2021) การประเมินความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีสเปกโตรเมตริก จะกระทำผ่านกลไกการถ่ายโอนอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer (HAT))และกลไกการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยว (Single electron transfer(SET)) (Sirivibulkovit et al., 2018) มีวิธีการดังตารางที่ 6 (Pisoschi & Negulescu, 2011) เป็นการอาศัยปฏิกิริยาของไอออนบวกที่รุนแรงที่มีโมเลกุลต้านอนุมูลอิสระที่สามารถมอบอะตอมไฮโดรเจนให้ได้

ตารางที่ 6 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีสเปกโตรเมตริก

Antioxidant capacity assay by Spectrometry	Principle of the method	End-product determination
DPPH	Antioxidant reaction with an organic radical	Colorimetry
ABTS	Antioxidant reaction with an organic cation radical	Colorimetry
FRAP	Antioxidant reaction with a Fe(III) complex	Colorimetry
PFRAP	Potassium ferricyanide reduction by antioxidants and subsequent reaction of potassium ferrocyanide with Fe^{3+}	Colorimetry
CUPRAC	Cu(II) reduction to Cu (I) by antioxidants	Colorimetry
ORAC	Antioxidant reaction with peroxy radicals, induced by AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propane)	Loss of fluorescence of fluorescein

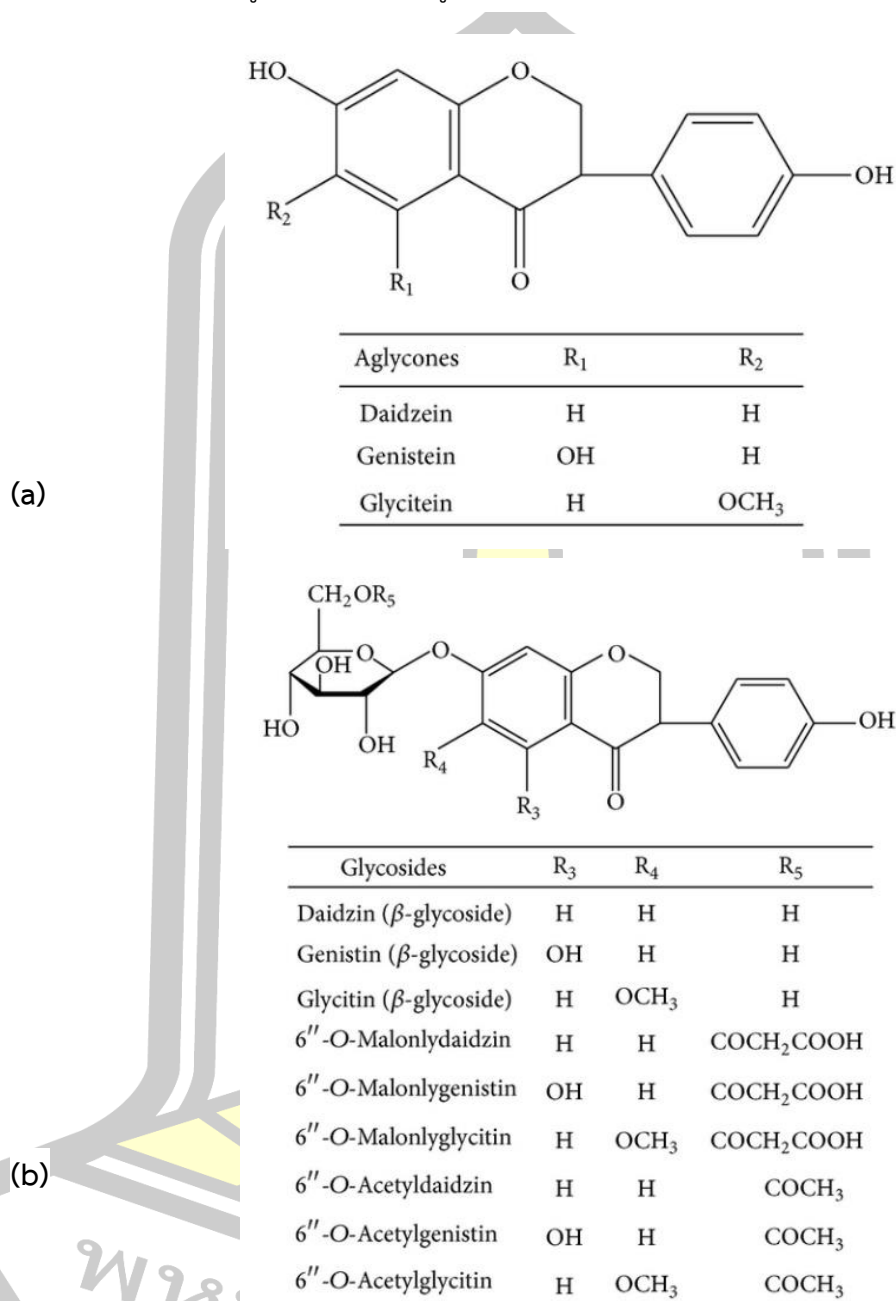
ตารางที่ 6 (ต่อ) การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีสเปกโตรเมตริก

Antioxidant capacity assay by Spectrometry	Principle of the method	End-product determination
HORAC	Antioxidant capacity to quench OH radicals generated by a Co(II) based Fenton-like system	Loss of fluorescence of fluorescein
TRAP	Antioxidant capacity to scavenge luminol-derived radicals, generated from AAPH decomposition	Chemiluminescence quenching
Fluorimetry	Emission of light by a substance that has absorbed light or other electromagnetic radiation of a different wavelength	Recording of fluorescence excitation/emission spectra

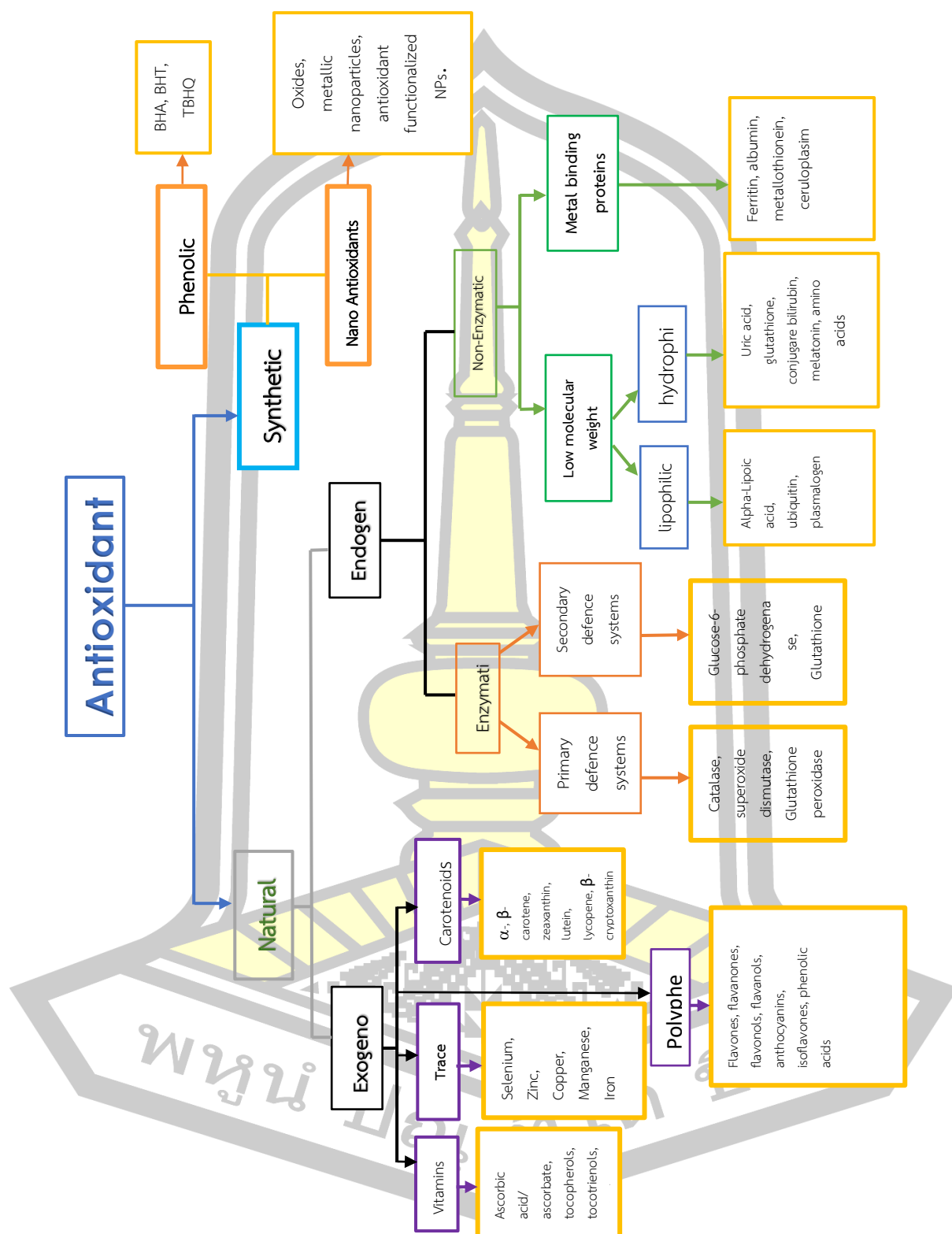
ที่มา : (Pisoschi & Negulescu, 2011)

ถั่วเหลืองพบว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่ในกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระคือ สารไอโซฟลาโวน (isoflavones) เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก จัดเป็นสารจำพวก polyphenol ในปริมาณที่สูงระหว่าง 1.2 - 3.3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักถั่วเหลืองแห้ง 1 กรัม จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารไอโซฟลาโวนจัดอยู่ในกลุ่มของไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogen) เป็นสารประกอบเคมีธรรมชาติที่พบได้ในพืช (Phytochemical) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สำคัญในเพศหญิงคือ อีสตราไดออล 17 เบต้า (estradiol-17 β) ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางและกระตุ้นการเจริญเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์เพศหญิง ไอโซฟลาโวนมีโครงสร้างอะไกลโคน (aglycone) ซึ่งเป็นรูปแบบที่ไม่มีโมเลกุลของน้ำตาลมาเชื่อมต่อ มี 3 โครงสร้าง ได้แก่ เดดซีน (daidzein) เจนิสทิน (genistein) และ ไกลซิทิน (glycitein) รวมอยู่ใน β -glycoside conjugates (daidzin, genistin and glycitin) โดยแต่ละส่วนมีคอนจูเกตอะซิดิลและมาโลนิลไกลโคไซด์ที่สอดคล้องกันตามภาพที่ 8 (Teekachunhatean et al., 2013; Thawornkuno, 2014) ส่วนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลำดับรองคือ ซาโปนิน (saponin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ oleanane triterpenoids ซึ่งมีโครงสร้างที่ซับซ้อน มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ, ต้านการกลายพันธุ์, ต้านมะเร็ง, ต้านจุลชีพ และปกป้องตับ หัวใจและหลอดเลือด (Guang et al., 2014) เนื่องจากร่างกายมนุษย์นั้นไม่สามารถย่อยสารซาโปนินเพื่อนำเข้าสู่กระแสเลือดได้ แต่ยังคงสภาพอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นสารซาโปนินซึ่งมีโครงสร้างในการยึดจับกลุ่มไขมันและกลุ่มที่ละลายน้ำ จึงยึดจับกับน้ำดีในระบบทางเดินอาหารและทำ

ปฏิกิริยากับน้ำย่อยในกลุ่มที่ย่อยไขมัน ทำให้ร่างกายไม่ย่อยคอเลสเตอรอล ทำให้ลำไส้เล็กไม่สามารถนำคอเลสเตอรอลเข้าสู่กระแสเลือด จึงถูกขับถ่ายออกทางลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (Chitisankul, 2016)



ภาพที่ 8 Structure of isoflavones in the forms of aglycones (a), β -glycosides, 6''-O-acetyl- β -glycosides, and 6''-O-malonyl- β -glycosides (b) (Teekachunhatean et al., 2013)



ภาพที่ 9 Antioxidants classification (Flieger et al., 2021)

2.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

วิธี DPPH ได้รับการพัฒนาโดย Blois (Blois, 1958) เป็นการกำหนดฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Kedare & Singh, 2011) DPPH เป็นวิธีในการตรวจวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่สะดวกและง่ายวิธีหนึ่งจากหลายวิธีในการตรวจอนุมูลอิสระ เป็นการทดสอบที่ขึ้นอยู่กับการลดลงของการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH• ที่ 515 nm เมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในสารตัวอย่าง (Christodouleas et al., 2015) DPPH ถูกใช้เป็นสารในการตรวจหากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (Elmastas et al., 2006) โดยใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ เมทานอล (methanol) เป็นตัวทำละลาย ใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ โดย Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) เป็นอนุพันธ์ของ α -tocopherol (วิตามินอี) ที่ละลายได้ในน้ำ ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุม (Control) โดยจะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเมื่อสารทำปฏิกิริยาในการตรวจจับเจอสารต้านอนุมูลอิสระ ในการทดสอบ DPPH นี้จะมีความแตกต่างกันไปตามแต่ละโปรโตคอลของห้องปฏิบัติการในแต่ละแห่ง ส่งผลให้ผลลัพธ์มีความแตกต่างกันออกไป (Sharma & Bhat, 2009) กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสามารถคำนวณเป็น % Inhibition ได้ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

โดย A_{control} คือ การดูดซับของตัว Control และ A_{sample} คือ การดูดซับของสารสกัดตัวอย่าง

2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) radical scavenging activity ABTS (Re et al., 1999)

เป็นวิธีการวัดโดยใช้สาร 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzoline-6-sulfonic acid) หรือ (ABTS•⁺) เป็นการกระตุ้น เมตไมโอโกลบิน (metmyoglobin สภาวะที่ธาตุเหล็กสูญเสียอิเล็กตรอน) ด้วย Hydrogen peroxide ให้เกิด ABTS เพื่อผลิตไอออนบวกที่รุนแรงในการมีอยู่หรือไม่มีของสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นกระบวนการทำให้สาร ABTS•⁺ เกิดโคโมฟอร์สีน้ำเงิน/เขียวผ่านปฏิกิริยาระหว่าง ABTS และ โพแทสเซียม เปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) โดยนำสาร ABTS และ Potassium persulfate ผสมกันแล้วนำไปบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ในอุณหภูมิห้อง ใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน และเตรียม Potassium phosphate เป็น buffer

2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เป็นวิธีการที่ขึ้นอยู่กับความสามารถของตัวอย่างในการลดไอออน Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} (ธาตุเหล็กที่มีสถานะ oxidation หลัก 2 สถานะ โดยจากอิเล็กตรอน 3 ตัวเหลือ อิเล็กตรอน 2 ตัว) โดยสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กจะลดลงเป็นรูปแบบเหล็ก Fe^{3+} -TPTZ (ferric tripyridyl triazine)

โดยมีการก่อตัวของสารสีน้ำเงินเข้มที่มีการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 593 nm (Shah & Modi, 2015) reagents ของ FRAP ประกอบไปด้วยสารดังนี้(Bahukhandi et al., 2013)

ก.) Acetate buffer 300 mM pH 3.6 : ชั่ง sodium acetate trihydrate และเติม glacial acetic acid ปรับด้วย distilled water

ข.) สาร TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine)

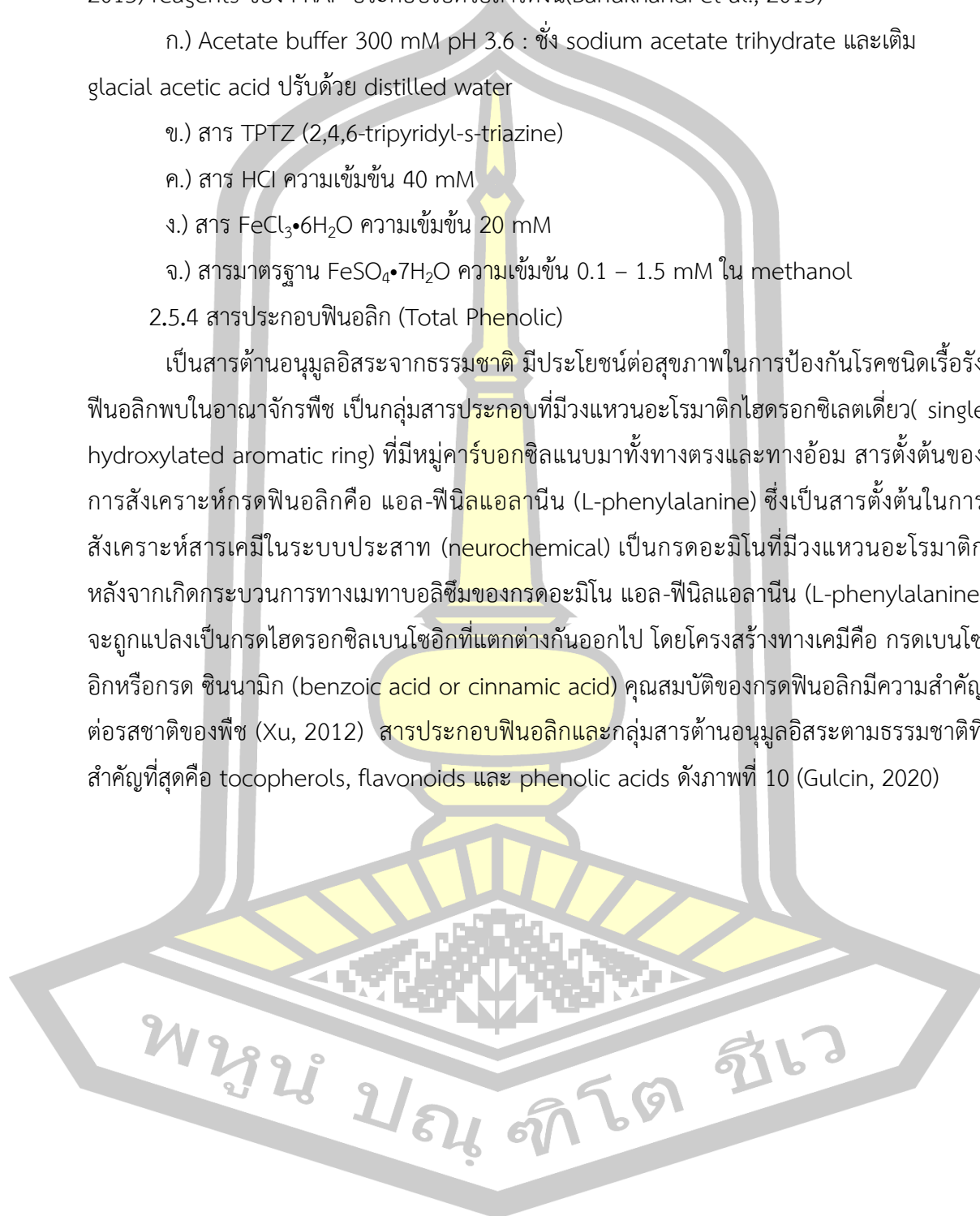
ค.) สาร HCl ความเข้มข้น 40 mM

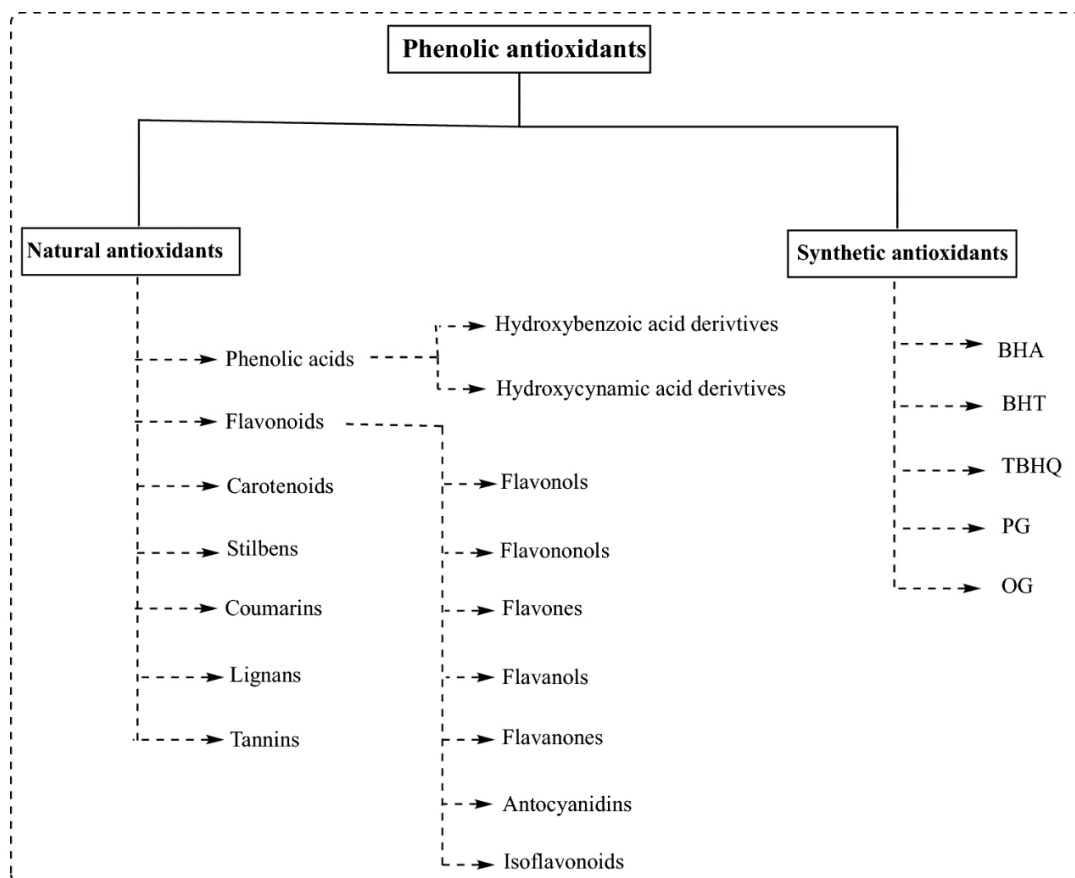
ง.) สาร $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 20 mM

จ.) สารมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.1 – 1.5 mM ใน methanol

2.5.4 สารประกอบฟีนอลิก (Total Phenolic)

เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ มีประโยชน์ต่อสุขภาพในการป้องกันโรคชนิดเรื้อรัง ฟีนอลิกพบในอาณาจักรพืช เป็นกลุ่มสารประกอบที่มีวงแหวนอะโรมาติกไฮดรอกซีเลตเดี่ยว (single hydroxylated aromatic ring) ที่มีหมู่คาร์บอกซิลแนบมาทั้งทางตรงและทางอ้อม สารตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดฟีนอลิกคือ แอล-ฟีนิลแอลานีน (L-phenylalanine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเคมีในระบบประสาท (neurochemical) เป็นกรดอะมิโนที่มีวงแหวนอะโรมาติก หลังจากเกิดกระบวนการทางเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน แอล-ฟีนิลแอลานีน (L-phenylalanine) จะถูกแปลงเป็นกรดไฮดรอกซิลเบนโซอิกที่แตกต่างกันออกไป โดยโครงสร้างทางเคมีคือ กรดเบนโซอิกหรือกรด ซินนามิก (benzoic acid or cinnamic acid) คุณสมบัติของกรดฟีนอลิกมีความสำคัญต่อรสชาติของพืช (Xu, 2012) สารประกอบฟีนอลิกและกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติที่สำคัญที่สุดคือ tocopherols, flavonoids และ phenolic acids ดังภาพที่ 10 (Gulcin, 2020)





ภาพที่ 10 Classification of phenolic antioxidants (Gulcin, 2020)

จากการศึกษาของ Shioh Y. Wang และ Wei Zheng (2001) ค้นพบว่าการปลูกพืชที่อุณหภูมิประมาณ 12°C - 18°C ทั้งในเวลากลางวันและกลางคืนจะได้ปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโธไซยานิน ในปริมาณน้อย แต่หากอุณหภูมิในเวลากลางคืนสูงขึ้น ในขณะที่อุณหภูมิในเวลากลางวันคงที่ประมาณ 25°C มีผลให้ปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโธไซยานินมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จึงอาจกล่าวได้ว่าสภาพแวดล้อม ภูมิประเทศและสภาพอากาศที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละท้องถิ่นมีผลต่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกในพืช (Mpofu et al., 2006; Wang & Zheng, 2001)

สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกรวม (total Phenolic) อ้างอิงตามวิธีการที่นำเสนอโดย Otto Folin และ Vintila Ciocalteu ในปี 1927 ที่คิดค้นวิธีการนี้สำหรับการกำหนดไทโรซีนทริปเฟนและโปรตีน (FDLIN, 1927) ต่อมาได้มีการปรับปรุงพัฒนานำมาใช้ในการตรวจเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกในไวน์ทางการค้าเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มไวน์ขาว ชมพู และไวน์แดง (Singleton et al., 1999) จึงเรียกวิธีการในการตรวจหาปริมาณฟีนอลิกนี้ว่า “Folin-Ciocalteu reagent” (Nikolaeva et al., 2022) ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้วิธี Folin-Ciocalteu ใน

การตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกรวม (total Phenolic) มีการเตรียมสารเคมีดังนี้(Hudz et al., 2019)

ก.) Folin-Ciocalteu

ข.) Sodium carbonate

ค.) Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน

การวัดสีของ Folin-Ciocalteu อยู่ที่ปฏิกิริยาการลดสารเคมีของ reagent ที่มีส่วนผสมของทั้งสแตนและโมลิบดีนัมออกไซด์ สารจะมีสีฟ้าที่แสดงการดูดกลืนแสงในวงกว้างที่ 765 nm ความเข้มข้นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเป็นสัดส่วนความเข้มข้นของฟีนอลิก(Waterhouse, 2002)

2.5.5 สารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์ถือเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตามธรรมชาติเช่นเดียวกับสารประกอบ ฟีนอลิก การตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (total Flavonoids) เป็นการทดสอบสีของอะลูมิเนียมคลอไรด์กับสารมาตรฐานฟลาโวนอยด์ ต่อมาได้มีการปรับปรุงพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ของ Christ and Muller ในปี 1960 โดยเตรียม Sodium nitrite (NaNO_2) ก่อนที่จะเพิ่ม Aluminium chloride (AlCl_3) โดยสาร sodium nitrite จะทำหน้าที่เป็นสารไนเตรตที่คัดเลือกอะตอมกลุ่มไฮดรอกซีที่มีอะตอมเดียวกันผูกติดกัน (aromatic vicinal diol) (Shraim et al., 2021) ฟลาโวนอยด์เป็นสารไฮดรอกซีเลตฟีนอลิกที่สังเคราะห์ได้โดยพืช ฟลาโวนอยด์เป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มโพลีฟีนอลของไฟโตนิวเทรียนท์ โพลีฟีนอล ในถั่วเหลืองพบสารไอโซฟลาโวน Isoflavones ซึ่งเป็น subclass ของฟลาโวนอยด์ มีสารประกอบคือเจนีสทิน (genistein) และแดดซีน (daidzein) (Karak, 2019) ฟลาโวนอยด์สามารถจำแนกประเภทและโครงสร้างจากแหล่งอาหารบางชนิดได้ดังตารางที่ 7 กระบวนการย่อยของมนุษย์ ฟลาโวนอยด์จะถูกจุลินทรีย์ในลำไส้ทำลายโครงสร้างวงแหวนฟลาโวนอยด์ (Kumar & Pandey, 2013)



ตารางที่ 7 Classification, structure, and food sources of some dietary flavonoids.

Class	Flavonoid	Dietary source
Flavanol	(+) -Catechin (-) -Epicatechin Epigallocatechin Chrysin Apigenin	Tea, Apple, Peaches, Grapes, Red pepper, Lettuce, Broccoli, Kale, Endive, Potatoes, Onions, tomatoes, and Nuts
Flavone	Rutin, Luteolin, Luteolin glucosides, Sinensetin, Isosinensetin, Nobiletin, Tangeretin, Galangin, Chrysin, and Baicalin	Fruit skins, red wine, buckwheat, red pepper, tomato skin, Citrus fruits, Green tea, Olive oil, Oregano, Thyme, Rosemary, Peppermint, Parsley and Cacao
Flavonol	Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Tamarixetin	Onion, red wine, olive oil, berries, Tea, Cacao, Raspberry, Apple, Red grape, Nectarine, Peach. Mango, Pear, Plum and grapefruit.
Flavanone	Naringin, Naringenin, Taxifolin, Hesperidin, Eriodicytol, Hesperetin	Citrus fruits, grapefruits, lemons, and oranges
Isoflavone	Genistein, Daidzein, Daidzin	Soybean, Chickpeas, Peanuts, Lupin and Fava beans
Anthocyanin	Apigenidin, Cyanidin, Delphinidin, Peonidin, Petunidin, Malvidin	Cherry, raspberry, strawberry, cranberry, Black beans, Blackberry, Grapes, Cherries, Plums and Purple corn

ที่มา : (Dias et al., 2021; Kumar & Pandey, 2013)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ total flavonoids ตามวิธี Aluminium chloride colorimetric มีดังนี้

- ก.) Sodium nitrate (NaNO_2)
- ข.) Aluminium chloride (AlCl_3)
- ค.) Sodium hydroxide (NaOH)
- ง.) Catechin ใช้เป็นสารมาตรฐาน

2.6 หัวเชื้อเริ่มต้น (Starter Culture)

ในการศึกษาวิจัยผู้วิจัย เลือกใช้เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* สายพันธุ์ทางการค้า เพื่อใช้ในการทดลองโดยเป็นเชื้อที่อยู่ภายใต้ความร่วมมือด้านการวิจัยกับนักวิจัยจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่หลากหลายในเชิงพาณิชย์ โดยลักษณะของ sporangiospore ของเชื้อรา *Rhizopus* sp. ที่เกิดอยู่ในถุงหุ้มที่เรียกว่า sporangium มีรูปกลมหรือรูปทรงไข่

Rhizopus oligosporus เป็นเชื้อราที่มีมานานอยู่ในวงศ์ Mucoraceae ที่นำมาใช้ในการผลิตอาหารหมัก *Rhizopus oligosporus* จัดอยู่ในประเภท *R. microsporus* var. *oligosporus* ที่มีความหลากหลาย ด้วยเครื่องมือระดับโมเลกุลสมัยใหม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ *R. oligosporus* อยู่ในสายพันธุ์ *R. microsporus* ชนิดย่อยในส่ว micro-*Rhizopus* (Schipper, 1984) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *R. oligosporus* ถือเป็นรูปแบบของ *R. microsporus* ที่สูญเสียความสามารถในการผลิตสารพิษ โดยผ่านกระบวนการปรับตัวของเชื้อราที่พึ่งพาอาศัยในการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (Jennessen et al., 2005; Jennessen et al., 2008) มีรายงานพบว่า *R. oligosporus* สามารถผลิตสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ได้ (Polanowska et al., 2020)

2.6.1 สัณฐานวิทยาและการศึกษา *R. oligosporus*

อาณาจักรของ *R. oligosporus* เป็นสี่เหลี่ยมอ่อนถึงน้ำตาลเทา rhizoids เป็นแบบธรรมดา กิ่งโปร่งแสง Sporangioophores และ rhizoids มีเส้นใยที่ทอดยาวถึง 300 μm และกว้างถึง 15 μm มีสีน้ำตาล Sporangiospores มีสัณฐานทรงกลมถึงเกือบเป็นทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 9 μm แต่จะมีขนาดที่ไม่สม่ำเสมอ (>10%)

R. oligosporus เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 30-35 $^{\circ}\text{C}$ (86-95 $^{\circ}\text{F}$) โดยอุณหภูมิขั้นต่ำที่ 12 $^{\circ}\text{C}$ (53.6 $^{\circ}\text{F}$) และอุณหภูมิสูงสุดที่ 45 $^{\circ}\text{C}$ (107.6 $^{\circ}\text{F}$) อัตราการขยายของเส้นใยไวต่อค่า pH และค่า pH ที่เหมาะสมควรอยู่ที่ 5.85 (Sparringa et al., 2002; Wang et al., 1974) เชื้อ *R. oligosporus* เติบโตได้ดีมากในช่วงค่า water activity (A_w) เท่ากับ 0.98 และ CO_2 12.5%

2.7 กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในการผลิตอาหารในประเทศไทย

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยต้องการนำเสนอถึงมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหารในประเทศไทย เพื่อให้ผู้ประกอบการหรือผู้เกี่ยวข้องได้ทราบถึงการยื่นคำขออนุญาตในการผลิตอาหารที่มีการใช้จุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบในการผลิตอาหาร โดยผู้วิจัยได้ศึกษาถึงบทบัญญัติ ระเบียบ ข้อกำหนด ประกาศกระทรวงและข้อบังคับ กองอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข และมาตรฐาน เหมเป็ดตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization (WHO))

การกำหนดหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการใช้จุลินทรีย์ในอาหารให้ถูกต้องเหมาะสม และปลอดภัยต่อผู้บริโภคนั้น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย ได้มีประกาศกฎระเบียบด้านคุณภาพหรือมาตรฐานในการใช้จุลินทรีย์ในอาหาร จากการศึกษาพบว่า กฎหมายที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตอาหาร มีสาระสำคัญสรุปได้ดังนี้

1. กฎหมายจัดให้จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหารอยู่ในหมวดหมู่อาหารประเภท วัตถุเจือปนอาหาร
2. จัดอยู่ในสารช่วยในการผลิต ซึ่งโดยลักษณะทางกายภาพไม่สามารถนำจุลินทรีย์นั้นมาบริโภคได้โดยตรง อันเป็นลักษณะของส่วนประกอบอาหาร แต่เป็นการใช้รูปแบบของการผลิตวัตถุดิบเพื่อให้เป็นไปตามเทคโนโลยีการปรับคุณภาพอาหารหรือแปรรูปอาหาร
3. กฎหมายได้วางหลักเกณฑ์ข้อกำหนดหรือมาตรฐานไว้ชัดเจนโดยคณะกรรมการ เพื่อใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิง

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 281) พ.ศ. 2547 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร ได้กำหนดค่านิยามของวัตถุเจือปนอาหารไว้ดังนี้

“วัตถุเจือปนอาหาร หมายถึง วัตถุที่ตามปกติมิได้ใช้เป็นอาหารหรือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร ไม่ว่าวัตถุนั้นจะมีคุณค่าทางอาหารหรือไม่ก็ตาม แต่ใช้เจือปนในอาหารเพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต การแต่งสีอาหาร การปรุงแต่งกลิ่นรส การบรรจุ การเก็บรักษา หรือการขนส่ง ซึ่งมีผลต่อคุณภาพหรือมาตรฐานหรือลักษณะของอาหาร ทั้งนี้ให้หมายความรวมถึงวัตถุที่มีได้เจือปนในอาหาร แต่มีภาชนะบรรจุไว้เฉพาะแล้วใส่รวมอยู่กับอาหารเพื่อประโยชน์ดังกล่าวข้างต้นด้วย เช่น วัตถุกันชื้น วัตถุดูดออกซิเจน เป็นต้น”

ในส่วนของการกำหนดคุณภาพและมาตรฐานของวัตถุเจือปนอาหาร ได้ออกเป็นประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของวัตถุเจือปนอาหาร ชนิดเดี่ยว ลงวันที่ 24 มิถุนายน พ.ศ. 2548 กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของวัตถุเจือปนอาหาร จำนวน 11 รายการ ดังต่อไปนี้

1. กรดซัคซินิก (Succinic Acid)

2. ไกลซีน (Glycine)
3. ไดโซเดียมซัคซิเนต (Disodium Succinate)
4. ดีแอลแอละนีน (DL-Alanine)
5. เชื้อราที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Starter Culture)
6. มอลโทเดกซ์ทริน (Maltodextrin)
7. ยีสต์ผงจากยีสต์ในกลุ่มแซ็กคาโรไมซีส (*Saccharomyces*) หรือ ทอรูลา (*Torula*)
8. ยีสต์ชนิดอื่น
9. แล็กติกแอซิดแบคทีเรีย
10. ออกซิไดส์พอลิเอทิลีน (Oxidised Polyethylene)
11. เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์สเตรปโทเวอร์ทีซิลเลียม มอบาร์นส์

วาร์ (*Enzyme Transglutaminase from Streptovorticillium mobaraense* var.)

ในส่วนของวัตถุเจือปนอาหารชนิดเดียว ตามข้อ 4 ของกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 281) พ.ศ. 2547 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร ได้กำหนดให้วัตถุเจือปนอาหารต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามเงื่อนไขใดเงื่อนไขหนึ่ง ดังต่อไปนี้

1. ตามที่กำหนดไว้ใน Codex Advisory Specification for the Identity and Purity of Food Additives

2. ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการอาหาร

- ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง การกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของวัตถุเจือปนอาหารชนิดเดียว ลงวันที่ 24 มิถุนายน 2548

- ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง การกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของวัตถุเจือปนอาหารชนิดเดียว (ฉบับที่ 2) ลงวันที่ 12 ตุลาคม 2549

- ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง การกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของวัตถุเจือปนอาหารชนิดเดียว (ฉบับที่ 3) ลงวันที่ 23 มิถุนายน 2552

- ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง การกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของวัตถุเจือปนอาหารชนิดเดียว (ฉบับที่ 4) ลงวันที่ 5 กรกฎาคม 2553

3. ตามที่ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการเพื่อการศึกษาวิเคราะห์ปัญหาและวินิจฉัยในเชิงวิชาการเกี่ยวกับอาหาร โดยผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าจะต้องส่งมอบผลการประเมินความปลอดภัยของวัตถุเจือปนอาหารชนิดนั้น พร้อมรายละเอียดข้อมูลประกอบการยื่นขอ ตาม ข้อ 4 (3) ของประกาศฯ มาให้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พิจารณากำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานและประกาศไว้ในประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเพื่อบังคับใช้ต่อไป

โดยในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงเชื้อราที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Starter Culture) ตามประกาศเรื่องคุณภาพและมาตรฐานวัตถุดิบอาหารชนิดเดียว ดังนั้นในกรณีที่ผู้ประกอบการต้องการนำเชื้อชนิดดังกล่าวมายื่นคำขออนุญาตอาหาร ผู้ประกอบการจะต้องระบุถึงชื่อ สายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาใช้ โดยยื่นเป็นวัตถุดิบอาหารนั่นเอง ทั้งนี้กฎหมายไม่อนุญาตให้ใช้จุลินทรีย์ที่ผ่านการดัดแปรพันธุกรรม เว้นแต่กรณีเป็นจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมซึ่งได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเป็นรายกรณี โดยกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์จะอยู่ในประกาศฉบับลงวันที่ 24 มิถุนายน 2548 ว่าด้วยข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร โดยกำหนดชนิด คุณภาพหรือมาตรฐาน รวมถึงเงื่อนไขการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร ได้แก่

เชื้อราที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Starter Culture) ได้แก่ เชื้อราดังต่อไปนี้

- เพนิซิลเลียม แคนดิดัม (*Penicillium candidum*)
- ไรโซปัส โอลิโกสปอรัส (*Rhizopus oligosporus*)
- ไรโซปัส ออไรซี (*Rhizopus oryzae*)
- ไรโซปัส สโตโลนิเฟอร์ (*Rhizopus stolonifer*)

ข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร มีดังนี้

1. เชื้อราที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Starter Culture)

เชื้อจุลินทรีย์ : เชื้อราที่ใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ จุลินทรีย์ดังต่อไปนี้

- เพนิซิลเลียม แคนดิดัม (*Penicillium candidum*)
- ไรโซปัส โอลิโกสปอรัส (*Rhizopus oligosporus*)
- ไรโซปัส ออไรซี (*Rhizopus oryzae*)
- ไรโซปัส สโตโลนิเฟอร์ (*Rhizopus stolonifer*)

คุณลักษณะ : เป็นเชื้อราที่ไม่สร้างสารพิษที่เป็นอันตราย อาจอยู่ในรูปของเหลว หรือในรูปของกึ่งแข็งกึ่งเหลว หรือในรูปผง ซึ่งได้จากการผลิตภายใต้การควบคุมกระบวนการหมักที่ดี อาจมีการผสมกับวัตถุอื่นที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพเพื่อช่วยในการกระจายตัว ป้องกันการจับตัวเป็นก้อน และช่วยในการผลิต

หน้าที่ (functional use) : เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักอาหารตามชนิดอาหารที่ระบุไว้ในเอกสารแนบท้าย 1 (บัญชีชนิดอาหารที่ให้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิต)

ข้อกำหนดเฉพาะ : ปริมาณไม่ต่ำกว่าร้อยละ ๘๕.๐ ของจำนวนหน่วยที่แจ้ง

ข้อจำกัดของสารแปลกปน

- ตะกั่ว (Lead) ไม่เกิน ๕ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
- โคลิฟอร์ม (Total coliforms) ไม่เกิน ๓๐ โคโลนีต่อกรัม

- ซัลโมเนลลา (*Salmonella spp.*) ไม่พบใน ๒๕ กรัม
- เอสเชอริเชีย โคลิ (*Escherichia coli*) ไม่พบใน ๒๕ กรัม
- ไม่พบสารพิษจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ ดังมีแนวทางการพิจารณาตามเอกสารแนบท้าย ๒ แนวทางการพิจารณาการควบคุมกระบวนการผลิตและการตรวจวิเคราะห์ตามข้อกำหนด “ไม่พบสารพิษจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ” ประกอบการขออนุญาตด้านอาหารตามข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร

การบรรจุและการเก็บรักษา : เก็บในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท

ข้อกำหนดเงื่อนไขสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร ตามเอกสารแนบท้าย 1 บัญชีชนิดอาหารที่ให้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตอาหาร เฉพาะจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย โดยอ้างอิงตามเอกสารตารางที่ 3 ของประกาศฯ

รายชื่อจุลินทรีย์	ชนิดอาหาร
ไรโซปัส โอลิโกสปอรัส (<i>Rhizopus oligosporus</i>)	ถั่วเหลือง (เทมเป้)
ไรโซปัส ออไรซี (<i>Rhizopus oryzae</i>)	ถั่วเหลือง
ไรโซปัส สตอลอนิเฟอร์ (<i>Rhizopus stolonifer</i>)	ถั่วเหลือง

โดยกองอาหาร สำนักงานอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุขได้อ้างอิงจาก Bulletin of the International Dairy Federation, No.377/2002 และ No. 455/2021 และเงื่อนไขตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาเคยให้ความเห็นชอบไว้

2.7.1 ข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก (WHO) เกี่ยวกับเทมเป้ ("CODEX Alimentarius International Food Standards," 2013)

CODEX ALIMENTARIUS (คณะกรรมการอาหารโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ) ได้กำหนดมาตรฐานระดับภูมิภาคของเทมเป้ (Regional Standard for TEMPE) ตามข้อกำหนด CXS 313R-2013 Adopted in 2013. Amended in 2015, 2017 เกี่ยวกับองค์ประกอบและปัจจัยคุณภาพของเทมเป้ ไว้ดังนี้.

1. ด้านองค์ประกอบ

ผลิตภัณฑ์ภายใต้มาตรฐานนี้ควรมีส่วนผสมดังต่อไปนี้:

- 1) ถั่วเหลือง (อย่างอื่น ถ้ามี)
 - 2) เชื้อราสายพันธุ์ *Rhizopus spp.* (*R. oligosporus*, *R. oryzae* และหรือ *R. stolonifer*)
- ผสมคลุกกับผงแป้งข้าว, พงรำข้าว และหรือ พงข้าวสาลี เป็นหัวเชื้อ

2. ด้านคุณภาพการผลิต

2.1 ด้านประสาทสัมผัส

- 1) เนื้อสัมผัส: กระชับไม่แตกตัวออกจากกันได้ง่ายเมื่อตัดด้วยมีด
- 2) สี: สีขาวอันเกิดจากการเจริญเติบโตของไมซีเลียมที่เกิดจากเชื้อ *Rhizopus* spp.
- 3) รสชาติ: ลักษณะเด่นของรสชาติเหมเป้, รสถั่ว เนื้อแน่น และมีกลิ่นคล้ายเห็ด
- 4) กลิ่น: ลักษณะเด่นของเหมเป้สด ควรมีกลิ่นที่ปราศจากกลิ่นแอมโมเนีย



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อาหาร สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 หัวเชื้อเริ่มต้น

ในการทดลองนี้ ได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์สายพันธุ์ *Rhizopus oligosporus* โดยได้รับความอนุเคราะห์หัวเชื้อทางการค้าจากบริษัท กานต์ญา ไทยคูซีน จำกัด นำมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Broth (PDB) เป็นระยะเวลา 3-7 วัน ก่อนจะย้ายไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose agar (PDA) บ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 5-7 วัน แล้วตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อยืนยันเชื้อ *R. oligosporus* จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA Slant บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 7 วัน ก่อนนำมาทำเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นต่อไป

3.1.2 วัสดุดิบ

ถั่วเหลืองเชียงใหม่ สายพันธุ์ สจ.2 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท กานต์ญา ไทยคูซีน จำกัด

3.1.3 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

1) วัสดุอุปกรณ์

หม้อสเตเลสมีฝาปิดขนาด 26 cm.

เตาแก๊ส

อุปกรณ์พื้นฐานต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

Flasks

Erlenmeyer flask

Volumetric flask

Tissue bottle

Filter Whatman No.1

Set Funnel Filtration

96 well plates

2) เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่อง pH meter (ยี่ห้อ OHAUS รุ่น Starter 2100 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

เครื่องวิเคราะห์โปรตีน Kjeldahl nitrogen (รุ่น B324, Büchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

เครื่อง Ultra Scan Vision

ตู้อบ (Incubator)

Hot air oven

Shaking Incubator

Rotary evaporator

Centrifuge machine

Microscope

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีในการวิเคราะห์ห่อนุคลิอิสระ ได้แก่ DPPH, Trolox, Ethanol, HCl, Sodium acetate, TPTZ, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sodium nitrate, Aluminium chloride, Sodium hydroxide, Catechin, Dipotassium hydrogen phosphate, Potassium dihydrogen phosphate, ABTS และ Potassium persulfate

2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเห็บ ได้แก่ Hexane and Methanol

3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจ Lactic acid bacteria ได้แก่ Sodium Chloride

3.1.5 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ Potato Dextrose agar (PDA), Potato Dextrose Broth (PDB)

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ DeMan, Rogosa and Sharpe (MRS) broth, Agar

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น (Starter Culture)

นำหัวเชื้อทางการค้าที่แช่เย็นในอุณหภูมิ 4°C มาทำการปรับสภาพโดยการนำเข้าสู่ตู้อบที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลาข้ามคืนเพื่อให้เชื้อ active ก่อนทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ใน test tube เพื่อให้เชื้อได้เจริญเติบโตมีจำนวนที่เยอะเพื่อนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยบ่มไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 3-5 วัน เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA โดยทำการเท plate สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา (Cultivation) เตรียมอุปกรณ์สำหรับการใช้ในการแยกเชื้อรา อัน ได้แก่ Needle, PDA plate และ Alcohol lamp

นำหัวเชื้อที่เพาะไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB โดยการเชื่อมาวางไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA นำเข้าบ่มในตู้อบอุณหภูมิที่ 30°C เป็นระยะเวลา 5-7 วันเพื่อให้เชื้อราเกิดสปอร์ จากนั้นนำไปส่องกล้องเพื่อศึกษา Morphology ของเชื้อโดยวิธีการ wet mount เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อก่อนนำมาทำการเพาะเชื้อเพื่อนำมาทำหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเห็บต่อไป ทำการถ่าย

เชื้อลงใน PDA slant เพื่อเก็บเชื้อไว้เป็น Stock ส่วนหนึ่ง และอีกส่วนหนึ่งนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไปเพื่อนำมาทำเป็น Starter culture สำหรับใช้ในการผลิตเห็ดต่อไป

3.2 การศึกษาระยะเวลาในการแช่หัวเห็ด

3.2.1 การวิเคราะห์ค่า pH

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากน้ำแช่หัวเห็ดในชั่วโมงที่ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ปริมาณ 50 ml. มาทำการตรวจด้วยเครื่อง pH meter ยี่ห้อ OHAUS รุ่น Starter 2100 ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์

ระหว่างการเก็บตัวอย่างน้ำแช่หัวเห็ด ได้มีการนำหัวเห็ดที่แชในแต่ละสภาวะมาทำการ ต้มทดลองทำเป็นเห็ดเป้ ตรวจสอบผลที่เกี่ยวข้องกับรสชาติและกลิ่นของเห็ดในแต่ละสภาวะ เพื่อหา สภาวะที่ดีที่สุดในการกระบวนการผลิตเพื่อนำมาทำการทดลองผลต่อไป

3.2.2 วิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส (Sensory evaluation)

ทำการประเมินค่าทางประสาทสัมผัส (Sensory evaluation) โดยวิธี 9-points hedonic scale โดยผู้ทดสอบ 13 คน ออกแบบการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

3.2.3 การวิเคราะห์ทดสอบกิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

โดยวิธีการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH scavenging activity) การ ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิธี ABTS วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) ได้แก่ ปริมาณ สารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic content) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content)

การเตรียมสารสกัดเห็ดเป้ อ้างอิงตามวิธีในการเตรียมสารสกัดเห็ดเป้ (Tempeh extract) เพื่อใช้ในการทดสอบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของ (Athailah et al., 2019)

วิธีการเตรียมสารสกัดเห็ดเป้

การทำสารสกัดเห็ดเป้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบกิจกรรมอนุมูลอิสระของเห็ด เป้ทั้ง 5 สภาวะ ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างเห็ดเป้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C ทั้ง 5 สภาวะมาทำการย่อยโดย การหั่นให้มีขนาดกว้าง 10.5 cm.หนา 0.5 cm. อบแห้งในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นระยะเวลาข้ามคืน (24 ชั่วโมง) จนตัวอย่างแห้งดี นำไปบดเป็นผงด้วยเครื่องบด แล้วนำไป สกัดด้วยน้ำกลั่น (Distilled water: DI) โดยแยกออกเป็น 2 วิธี กล่าวคือ การสกัดเห็ดเป้ด้วยน้ำกลั่น โดยไม่ผ่านการกำจัดไขมัน (Tempe_DI) และกากของการสกัดเห็ดเป้ผ่านการกำจัดไขมันด้วยเฮกเซน (Tempe_HD) โดยทั้ง 2 วิธีดัดแปลงมาจากวิธีการของ Athailah และคณะ (2019) (Athailah et al., 2019)

วิธีที่ 1 การสกัดเทมเป้ด้วยน้ำกลั่นโดยไม่ผ่านการกำจัดไขมัน (Tempe_DI) เตรียมตัวอย่างเทมเป้ผงบดละเอียดจำนวน 30 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 300 มิลลิลิตร อัตราส่วน 10 ต่อ 1 ลงในขวดรูปชมพู่ เขย่าด้วยตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking Incubator) ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (ยี่ห้อ Sorvall Instruments OUPONT รุ่น RC5C) เพื่อปั่นเหวี่ยงแยกกากและสารสกัดออกจากกัน เทสารสกัดที่แยกออกจากกากใส่ขวดรูปชมพู่ กรองสารสกัดอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ภายใต้สุญญากาศ นำสารสกัดที่กรองแล้วไปเข้าเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) เพื่อทำการระเหยน้ำที่ตกค้างออก โดยตั้งอุณหภูมิในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่ 55 องศาเซลเซียส รอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 54 นาที นำสารสกัดที่ได้มาใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue bottle) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยอบที่ตู้อบในอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และซังน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว นำไปอบไล่ความชื้นออกในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาปิดปากขวดสารสกัดด้วยพาราฟิน ห่อขวดด้วยแผ่นฟอยล์อะลูมิเนียม เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 2 กากของการสกัดเทมเป้ที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยเฮกเซน (Tempe_HD) มาซังน้ำหนักและเติมน้ำกลั่นโดยใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 10 โดยกากเทมเป้ 1 ส่วน เติมน้ำ 10 ส่วน ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยตู้ควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking Incubator) ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (ยี่ห้อ Sorvall Instruments OUPONT รุ่น RC5C) เพื่อปั่นเหวี่ยงแยกกากและสารสกัดออกจากกัน เทสารสกัดที่แยกออกจากกากใส่ขวด (flask) กรองสารสกัดอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ภายใต้สุญญากาศ นำสารสกัดที่กรองแล้วไปเข้าเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) เพื่อทำการระเหยน้ำที่ตกค้างออก โดยตั้งอุณหภูมิในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่ 55 องศาเซลเซียส รอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 54 นาที นำสารสกัดที่ได้มาใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue bottle) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยอบที่ตู้อบในอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และซังน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว นำไปอบไล่ความชื้นออกในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำออกมาปิดปากขวดสารสกัดด้วยพาราฟิน ห่อขวดด้วยแผ่นฟอยล์อะลูมิเนียม เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.4 การวิเคราะห์เชื้อ Lactic acid bacteria ในน้ำแช่หัวเหียง

นำตัวอย่างน้ำแช่หัวเหียงจากบริษัท กานต์อุฯ ไทยคูซีน จำกัด สถานที่ตั้ง ตำบลยางเนิ้ง อำเภอสรรค จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 5 treatment คือ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง จำนวน treatment ละ 3 ถัง รวมทั้งสิ้น 15 ถัง

กรรมวิธีในการเก็บตัวอย่างน้ำแช่หัวเหลือง มีดังนี้

- 1) เก็บน้ำแช่หัวจำนวน 5 Treatment จำนวนตัวอย่างละ 3 ถัง
- 2) นำน้ำแช่หัวเหลืองใส่ถุงรีทอร์ทเพาซีไล ปริมาณ 50 ml.
- 3) นำไปแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศา
- 4) เคลื่อนย้ายตัวอย่างจากจังหวัดเชียงใหม่มาจังหวัดมหาสารคามโดยทางรถยนต์ ใส่กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิของเชื้อในน้ำแช่หัวเหลืองไว้ สำหรับการตรวจนับจำนวนเชื้อ Lactic acid bacteria ต่อไป

นำตัวอย่างน้ำแช่หัวมาตรวจวิเคราะห์หาเชื้อกรดแลคติกแอซิคแบคทีเรีย (LAB) ด้วยวิธีการเจือจาง 10 เท่าเพื่อตรวจหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำแช่หัวเหลืองและนับจำนวนโคโลนี จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (BARUS et al., 2020) โดยวิธีการ pour plate นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์และแสดงผลในหน่วย CFU/ml

3.3 การผลิตเทมเป้

หลังจากที่ศึกษาถึงสภาวะของน้ำแช่หัวและการตรวจหาอนุผลิตภัณฑ์แล้ว นำสภาวะที่ดีที่สุดมาทำการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เทมเป้ที่มีคุณภาพ โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้

3.3.1 การเตรียมหัวเหลือง

หัวเหลืองที่ใช้ในการศึกษาคือ สายพันธุ์เชียงใหม่ สจ.2 โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท กานต์ญา ไทยคูซีน จำกัด เป็นหัวเหลืองซีก นำมาคัดเม็ดเสียออก จากนั้นนำมาล้างน้ำทำความสะอาดประมาณ 5-10 ครั้ง หรือจนกว่าน้ำที่ล้างจะใสสะอาด โดยน้ำที่ล้างเป็นน้ำประปา ช้อนขึ้นมาสะอาด น้ำก่อนนำมาแช่น้ำสะอาดเพื่อให้หัวเหลืองซีกมีความชุ่มน้ำ โดยทำการแช่หัวในสภาวะที่วิเคราะห์มาแล้วมาดีที่สุด

3.3.2 การเตรียมผลิตเทมเป้

นำหัวเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำในสภาวะที่ดีที่สุดแล้ว มาทำการล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นนำไปต้มในน้ำ Reverse Osmosis (RO) ระยะเวลาในการต้มนับแต่น้ำเดือด 90-100 °C เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นตักขึ้นนำมาทำให้สะเด็ดน้ำ และทำให้แห้ง มีพัดลมช่วยเป่าให้แห้งและเย็นลง นำมาพักไว้เพื่อทำการคลุกหัวเชื้อเทมเป้ *R. oligosporus* ที่เตรียมไว้ใน บรรจุใส่ถุงซิปล็อคขนาด 200 กรัม เเจาะถุงเพื่อให้อากาศเข้าได้ จากนั้นนำไปบ่มในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อราได้เจริญเติบโต สร้างไมซีเรียมปกคลุมหัวเหลืองให้ทั่วภายในบรรจุภัณฑ์ จะได้เทมเป้พร้อมรับประทาน

3.3.3 การวิเคราะห์ค่า pH ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

นำเทมเป้สดที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่า pH นำเทมเป้สดที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ที่ได้จากระยะเวลาในการแช่หัวเหลืองในน้ำที่แตกต่างกันทั้ง 5 สภาวะมาทำการชั่งน้ำหนักที่ 10 กรัม บด

ด้วยโรงแบบตา เต็มน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 30 ml จากนั้นทำการวัดค่า pH ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วยเครื่อง pH meter ดัดแปลงจากวิธีของ Handoyo และ Morita เป็นเวลานาน 2-3 นาที แล้วอ่านค่าที่ได้ (Handoyo & Morita, 2006)

3.3.4 วิเคราะห์ค่าสีของเหมาเป้

นำเหมาเป้สดทั้ง 5 สภาวะมาทำการวัดค่าสีในห้องปฏิบัติการโดยใช้เครื่องวัดสีมาตรฐานทางวิทยาศาสตร์ UltraScan PRO ยี่ห้อ HunterLab จากบริษัท คัลเลอ โกลบอล จำกัด มีหน่วยการวัดเป็นระบบ CIE ; L^* - a^* - b^* บรรยายลักษณะสีแบบ 3 มิติ โดยที่แกน L^* บรรยายถึงความสว่าง (Lightness) จาก $+L^*$ แสดงถึงสีขาว จนถึง $-L^*$ แสดงถึงสีดำ แกน a^* จะบรรยายถึงแกนสีจากสีเขียว $-a^*$ ไปจนถึงสีแดง $+a^*$ ส่วนแกน b^* บรรยายถึงแกนสีจากสีน้ำเงิน $-b^*$ ไปถึงสีเหลือง $+b^*$ กำหนดผลการวัดสีค่า L^* , a^* , b^* ดังนี้

แกน L^* = ค่าตั้งแต่ 50-100 คือค่าสีขาว หรือความสว่าง หรือความใส ยิ่งค่าสูงแสดงว่ามีความใสมากหรือสว่างมาก และค่าตั้งแต่ 50-0 คือค่าสีดำ หรือความทึบ หรือความเข้ม ยิ่งค่าต่ำใกล้ 0 มาก แสดงว่ามีความทึบแสง หรือเข้มมาก

แกน a^* = ค่าเป็นจำนวนเต็มบวก คือค่าสีแดง ค่าสีแดงจะเพิ่มขึ้นตามค่าตัวเลขที่มากขึ้น ค่าติดลบ คือค่าสีเขียว ค่าสีเขียวจะเพิ่มขึ้นตามค่าตัวเลขที่ติดลบมากขึ้น

แกน b^* = ค่าเป็นจำนวนเต็มบวก คือค่าสีเหลือง ค่าสีเหลืองจะเพิ่มขึ้นตามค่าตัวเลขที่มากขึ้น ค่าติดลบ คือค่าสีน้ำเงิน ค่าสีน้ำเงินจะเพิ่มขึ้นตามค่าตัวเลขที่ติดลบมากขึ้น

3.3.5 วิเคราะห์ค่า Proximate analysis

วิเคราะห์ค่า Proximate analysis (Protein, Carbohydrate, Fat, Ash and Moisture Content) โดยวิธีการทดสอบดังนี้ เถ้าใช้วิธีทดสอบตาม AOAC (2019) 923.03 and 920.153 คาร์โบไฮเดรตใช้วิธีทดสอบตาม Method of Analysis for Nutrition Labelling (1993), Chapter 6 Proximate and Mineral Analysis เส้นใยอาหารใช้วิธีทดสอบตาม AOAC (2019) 985.29, 991.42 and 993.19 พลังงานใช้วิธีทดสอบตาม Method of Analysis for Nutrition Labelling (1993), Chapter 6 Proximate and Mineral Analysis ไขมันใช้วิธีทดสอบตาม AOAC (2019) 948.15 ความชื้นใช้วิธีทดสอบตาม AOAC (2019) 925.10 and 950.46 และโปรตีนใช้วิธีทดสอบตาม AOAC (2019) 991.20

3.3.6 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน

ได้เตรียมตัวอย่างของเหมาเป้ที่ได้จากการแช่ถั่วเหลืองในน้ำเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้แห้งโดยการอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C ระยะเวลา 24 ชั่วโมงและบดเป็นผง นำตัวอย่างจำนวน 10 กรัมทำการตรวจ ใช้วิธีทดสอบ HPLC System รายงานผลการทดสอบปริมาณกรดอะมิโนชนิดการทดสอบ Total Amino Acid โดยตรวจกรดอะมิโน 15 ชนิด ได้แก่ Aspartic acid, Serine,

Glutamic acid, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Tyrosine, Valine, Lysine, Isoleucine, Leucine และ Phenylalanine นำตัวอย่างใส่เข้าไปในหลอดทดลอง 5 ml ของ 6N HCl และนำเข้าไปในเครื่องอุ่นหลอดทดลอง (Heating block) โดยตั้งอุณหภูมิที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง เติมน้ำมาตรฐานในไฮโดรไลเซตและทำการเจือจางด้วยน้ำ DI (deionized water) กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเมมเบรน ขนาด 0.45 μm ผสมสารที่กรองแล้วเข้ากับ AccQ-fluor derivatization buffer และ AccQ-fluor reagent ของสารอนุพันธ์ ทำตัวอย่างให้ร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที ในเครื่องอุ่นหลอดทดลอง (Heating block) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

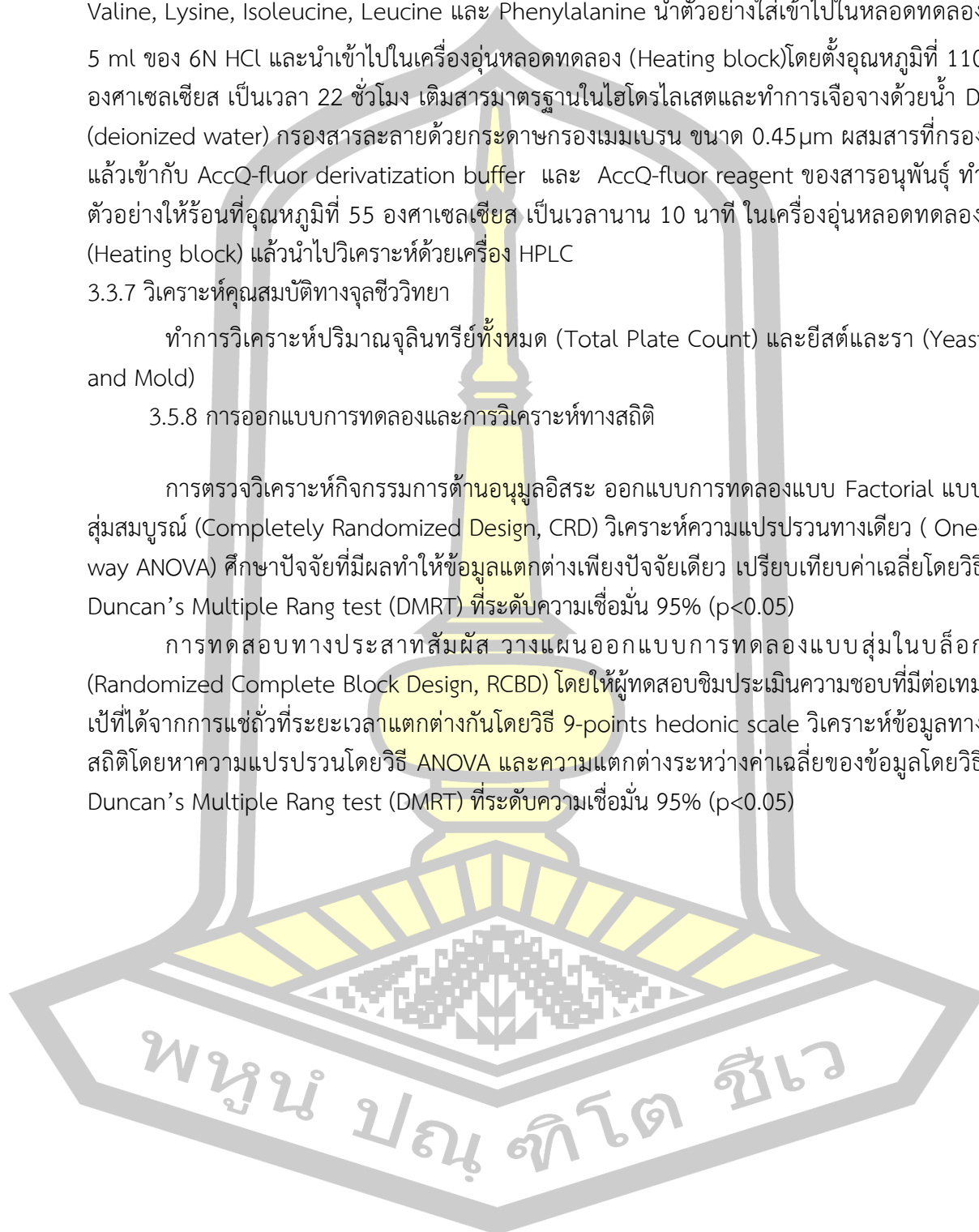
3.3.7 วิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลชีววิทยา

ทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) และยีสต์และรา (Yeast and Mold)

3.5.8 การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การตรวจวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ออกแบบการทดลองแบบ Factorial แบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) ศึกษาปัจจัยที่มีผลทำให้ข้อมูลแตกต่างกันเพียงปัจจัยเดียว เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

การทดสอบทางประสาทสัมผัส วางแผนออกแบบการทดลองแบบสุ่มในบล็อก (Randomized Complete Block Design, RCBD) โดยให้ผู้ทดสอบชิมประเมินความชอบที่มีต่อแบบที่ได้จากการแช่ที่ระยะเวลาแตกต่างกันโดยวิธี 9-points hedonic scale วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยหาความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA และความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's Multiple Rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)



บทที่ 4

ผลการวิจัย

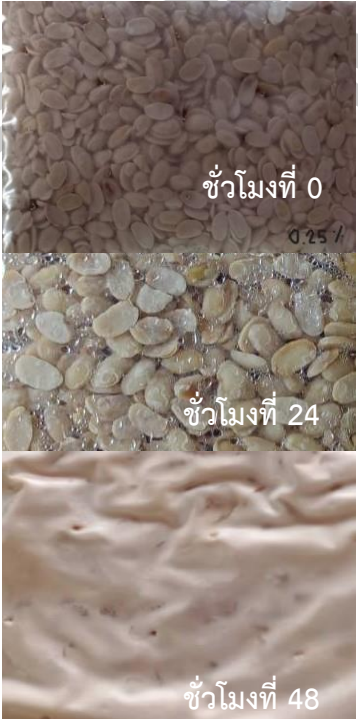
4.1 ผลการคัดเลือกหัวเชื้อเริ่มต้น

จากการนำหัวเชื้อทางการค้าที่ได้รับความนิยมเคราะห์มาจากบริษัท กานต์ญา ไทยคูซีน จำกัด มาทำการ Active เชื้อและนำมาทำเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นนำมาทดลองผลิตเทมเป้ เพื่อหาปริมาณการใช้หัวเชื้อเริ่มต้นต่อปริมาณถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการแช่และต้มเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยทำการทดลองผสมหัวเชื้อเริ่มต้นจากปริมาณร้อยละ 0.25, 0.5, 1 และ 1.5 บ่มในอุณหภูมิห้องประมาณ 32°C ถึง 40°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างที่ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 0.25 และ 0.50 ในช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการหมักมีไอน้ำขึ้นเต็มถุงแต่ไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับหัวเชื้อที่ร้อยละ 1 และ 1.5 แต่หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 30 จึงเกิดไมซีเลียม (mycelium) ขึ้นปกคลุมเต็มถุงพลาสติกเนื้อเทมเป้แน่นขึ้นไม่เปราะ เมื่อครบเวลาหมักที่ 48 ชั่วโมงความร้อนในถุงหมักเทมเป้ลดลงทำให้เทมเป้มีสีขาวสวยตามมาตรฐานของ WHO ในส่วนหัวเชื้อที่ร้อยละ 1 และ 1.5 นั้นในช่วง 24 ชั่วโมงแรกมีไอน้ำขึ้นเต็มถุงพลาสติกเป็นจำนวนมาก เมื่อเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมงไมซีเลียมเจริญเติบโตเต็มถุงพลาสติกจนมองไม่เห็นเมล็ดถั่วเหลืองความร้อนในถุงหมักเทมเป้ลดลง เมื่อหมักต่อไปให้ครบ 48 ชั่วโมงไมซีเลียมเริ่มเป็นสีเหลืองอ่อนซึ่งจะตรงกับงานวิจัยของ M.A.A. Schipper (Schipper, 1984) ที่ค้นพบลักษณะของสปอร์แรงจิโอสปอร์ตั้งแต่สีเหลืองอ่อน น้ำตาลอ่อนไปจนถึงสีเทา จากลักษณะปรากฏดังกล่าวพอสรุปได้ว่าปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมควรอยู่ที่ร้อยละ 0.25 และ 0.5 ดังตารางที่ 8

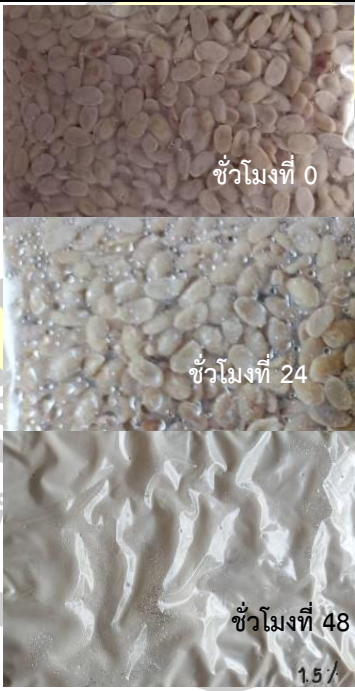
ตารางที่ 8 ลักษณะของเทมเป้ที่ใช้หัวเชื้อปริมาณต่างๆ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	รูป	ลักษณะของเทมเป้
ลักษณะเทมเป้มาตรฐานตามข้อกำหนดของ WHO		1. เนื้อสัมผัส เนื้อต้องแน่นเป็นก้อน ไม่แตกง่ายเมื่อตัดด้วยมี 2. สี จะต้องเป็นสีขาวที่เกิดจากการเจริญเติบโตของไมซีเลียมจากเชื้อ <i>Rhizopus</i> spp. 3. รสชาติ ต้องมีลักษณะคล้ายถั่ว เนื้อ และคล้ายเห็ด 4. กลิ่น ของเทมเป้สดจะต้องปราศจากกลิ่นของแอมโมเนีย

ตารางที่ 8 (ต่อ) ลักษณะของเห็บที่ใช้หัวเชื้อปริมาณต่างๆ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	รูป	ลักษณะของเห็บ
หัวเชื้อ	0.25%	 ชั่วโมงที่ 0 ชั่วโมงที่ 24 ชั่วโมงที่ 48 เมื่อคลุกผสมเชื้อปริมาณที่ 0.25% และบรรจุลงถุงพลาสติก ยังไม่มีไอน้ำขึ้นในถุง หมักผ่านไป 24 ชั่วโมง หยดน้ำเริ่มขึ้นเต็มถุงแต่เล็กน้อย เมล็ดถั่วยังร่วนไม่เกาะติดกัน มองด้วยตาเปล่าจะไม่เห็นเส้นใยเชื้อรา เมื่อครบเวลาหมัก 48 ชั่วโมง ไม่ซีเลียมขึ้นปกคลุมเต็มถุงสีขาวสวยงามตามมาตรฐานที่ WHO กำหนด
	0.50%	 ชั่วโมงที่ 0 ชั่วโมงที่ 24 ชั่วโมงที่ 48 คลุกเชื้อปริมาณที่ 0.5% และบรรจุลงถุงพลาสติกดูเวลาที่ 0 ไอน้ำจะขึ้นในถุงบางๆต่อเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงไอน้ำจะเต็มถุงมากกว่าปริมาณหัวเชื้อที่ 0.25% มองดูด้วยตาเปล่ายังไม่เห็นเส้นใยเชื้อรา เมล็ดถั่วยังร่วนไม่เกาะติดกัน เมื่อครบเวลาหมักที่ 48 ชั่วโมง ไม่ซีเลียมขึ้นปกคลุมเต็มถุงแบบหนาแน่นมาก เนื้อเห็บเกาะกันเป็นก้อนแข็งแรง เห็นสปอร์ของเชื้อ <i>R. oligosporus</i> เป็นสีเหลืองขาว

ตารางที่ 8 (ต่อ) ลักษณะของเทมเป้ที่ใช้หัวเชื้อปริมาณต่างๆ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ตัวอย่าง		รูป	ลักษณะของเทมเป้
หัวเชื้อ	1%	 ชั่วโมงที่ 0 ชั่วโมงที่ 24 ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 0 หลังจากคลุกเชื้อเทมเป้ที่ปริมาณ 1 % บรรจุลงถุงพลาสติกเจาะรูแล้ว จะเกิดมีไอน้ำขึ้นมาบ้าง ทั้งถุง ต่อเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง จะมีไอน้ำเต็มถุงเยอะมากเมื่อเปรียบเทียบกับหัวเชื้อที่ปริมาณ 0.5% ถ้วยยังร่วนอยู่ไม่เกาะติดกัน เมื่อมองดูด้วยตาเปล่าจะยังไม่เห็นเส้นใยเชื้อรา เมื่อหมักครบ 48 ชั่วโมง ไมซีเลียมเดินปกคลุมเต็มถุงแน่นมาก ก้อนเทมเป้แข็ง ไม่แตกหักออกจากกัน แต่จากสภาพของสปอร์จะมีสีเหลืองอ่อนๆ
	1.5%	 ชั่วโมงที่ 0 ชั่วโมงที่ 24 ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 0 หลังจากคลุกเชื้อเทมเป้ที่ปริมาณ 1.5 % บรรจุลงถุงพลาสติกเจาะรูแล้ว จะเกิดมีไอน้ำขึ้นมาบ้าง ทั้งถุง ต่อเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ไมซีเลียมได้ขึ้นปกคลุมเกือบเต็มถุงมองเห็นว่าถ้วยเหลืองอยู่ภายใต้ไมซีเลียมที่เดินเกือบเต็มถุง สภาพเทมเป้มีเนื้อที่เกาะกันแน่นไม่แตกหัก เมื่อหมักครบ 48 ชั่วโมง ไมซีเลียมเดินปกคลุมเต็มถุงแน่นมาก ก้อนเทมเป้แข็งไม่แตกหักออกจากกัน แต่จากสภาพของสปอร์จะมีสีเหลืองอ่อนๆ

4.2 ผลการศึกษาระยะเวลาในการแช่หัวเหลือง

4.2.1 ผลการวิเคราะห์ค่า pH ของน้ำแช่หัวเหลือง

จากการเก็บตัวอย่างของน้ำแช่หัวเหลืองมาจากจังหวัดเชียงใหม่ ในสถานะที่แช่หัวในน้ำเป็นเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำที่ปริมาณ 50 ml ของแต่ละตัวอย่างรวมจำนวนทั้งสิ้น 5 treatment ใช้เครื่องวัด pH ยี่ห้อ OHAUS รุ่น Starter 2100 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ทำการตรวจวัดค่า pH จากการตัวอย่างที่เก็บมา ได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่า pH ของน้ำแช่หัวที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาในการแช่หัว (ชั่วโมง)	ค่า pH
ตัวอย่างที่ 1 (24)	4.81±0.50
ตัวอย่างที่ 2 (48)	4.74±0.12
ตัวอย่างที่ 3 (72)	4.86±0.18
ตัวอย่างที่ 4 (96)	4.88±0.22
ตัวอย่างที่ 5 (120)	4.83±0.34

จะเห็นได้ว่าหลังจากแช่หัวเป็นเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง น้ำแช่หัวมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ไม่แตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยค่า pH อยู่ที่ 4.80 ซึ่งเกิดจากการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria (LAB)) ในระหว่างการแช่หัว ทำให้ค่า pH ลดลง และอยู่ในสภาพที่เป็นกรด ซึ่งช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ไม่ต้องการ จากการศึกษาของ Magdalena และคณะ (2022) (Magdalena et al., 2022) ได้ศึกษาถึง LAB ของน้ำแช่หัวเหลือง พบว่าจุลินทรีย์ในน้ำที่แช่หัวเหลืองที่หลากหลายอาจส่งผลต่อโภชนาการและคุณภาพของเห็ดแป้ LAB ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจะมีบทบาทในเห็ดแป้ในฐานะโพรไบโอติก และเมื่อเปรียบเทียบค่า pH ของ Magdalena ที่แช่หัวในน้ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมงหลังเติม LAB ลงในน้ำแช่หัวเหลืองพบว่าค่า pH ที่ยังไม่เติมเชื้อ LAB อยู่ที่ 8.00 ภายหลังการเติมอยู่ที่ 6.96 จากการอ้างอิงถึงงานวิจัยของ Mulyowidarso และคณะ (1989) ที่ศึกษาค่า pH ที่ระยะเวลาการแช่หัวในน้ำที่ 12-48 ชั่วโมง ค่า pH จาก 6.5 ถึง 7.0 เป็น 4.5 ถึง 5.5 (Mulyowidarso et al., 1990) M.J.R. Nout และคณะ (Nout et al., 1987) ได้ทำการศึกษากการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ในการทำเห็ดแป้พบว่า น้ำแช่หัวเหลืองที่ทำให้เห็ดแป้ได้คุณภาพที่ดีควรมีค่า pH อยู่ที่ 4.85 แต่หากค่า pH ในน้ำแช่หัวเหลืองอยู่ที่ 5.70 ถึง 6.00 จะเป็นสถานะที่เชื้อ *B. cereus* เจริญเติบโตได้ดีและทำให้เห็ดแป้เน่าเสียง่าย โดย M.J.R. Nout และคณะ ได้ทำการวิจัยจนพิสูจน์ได้ว่าการแช่หัวในน้ำจนได้ค่า pH 4.85 เพียงพอที่จะป้องกันการเจริญเติบโตของ *B. cereus* ทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติหรือการเติมเข้าไป ค่า pH ของน้ำแช่หัวเหลืองจึงมีความสำคัญต่อความปลอดภัยและคุณภาพการผลิตเห็ดแป้

เมื่อพิจารณาค่า pH สรุปได้ว่าน้ำแช่หัวเหียงค่า pH เฉลี่ยอยู่ที่ 4.80 ทำให้เหิมแป้ของผู้วิจัยเป็นเหิมแป้ที่มีคุณภาพและมีความปลอดภัยช่วยป้องกันการเกิดขึ้นเองของเชื้อ *B. cereus* ผู้บริโภคสามารถมั่นใจในความปลอดภัยและคุณภาพของเหิมแป้ได้

4.2.2 ผลการวิเคราะห์ Sensory evaluation

การผลิตเหิมแป้เพื่อใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่มีต่อผู้บริโภค ผู้วิจัยได้ผลิตเหิมแป้จากสภาวะที่แช่หัวเหียงเป็นเวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง นำมาให้ผู้บริโภคทดสอบเพื่อประเมินความชอบจากสภาวะที่แช่หัวเหียงทั้ง 5 สภาวะ นำตัวอย่างที่ได้มาทดสอบประเมินทางประสาทสัมผัส

การวิเคราะห์ผลทางประสาทสัมผัสผู้วิจัยใช้แบบประเมิน 9-point hedonic scale ประเมินด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ประสาทสัมผัสโดยวิธี 9-point hedonic scale

ลักษณะ	ตัวอย่าง				
	24	48	72	96	120
ลักษณะที่ปรากฏ	6.08±1.50 ^a	6.62±1.61 ^a	6.92±1.26 ^a	6.92±1.80 ^a	7.15±1.34 ^a
สี	5.77±1.36 ^b	6.54±1.27 ^{ab}	6.69±1.44 ^{ab}	7.15±1.68 ^a	7.38±1.19 ^a
กลิ่น	6.69±1.25 ^a	6.62±1.56 ^a	6.77±1.48 ^a	6.62±1.19 ^a	6.69±1.49 ^a
รสชาติ	6.69±1.44 ^a	6.15±1.72 ^a	5.58±1.77 ^a	5.69±2.36 ^a	6.38±2.18 ^a
เนื้อสัมผัส	6.92±1.71 ^a	6.46±1.90 ^a	6.15±1.57 ^a	6.46±1.94 ^a	6.77±1.59 ^a
ความชอบโดยรวม	6.77±1.36 ^a	6.92±1.32 ^a	6.46±1.39 ^a	6.38±1.85 ^a	6.92±1.55 ^a

หมายเหตุ * ตัวอักษร a, b, c ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างในแนวโน้มของแต่ละสภาวะที่แช่หัวเหียงในน้ำเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ 9-Point Hedonic Scale จากจำนวนผู้ทดสอบ 13 คน พบว่าระยะเวลาในการแช่หัวเหียงที่ 120 ชั่วโมง ได้คะแนนสูงสุดด้านลักษณะที่ปรากฏ โดยมีคะแนน 7.15±1.34 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระยะเวลาในการแช่หัวเหียงที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ในขณะที่เหิมแป้ที่ผลิตจากระยะเวลาแช่หัวเหียงในน้ำเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงได้คะแนนด้านสีน้อยที่สุด โดยมีคะแนน 5.77±1.36 ซึ่งค่าสีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับระยะเวลาในการแช่หัวเหียงที่ 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เนื่องจากสภาพที่ปรากฏนั้นมีสีที่คล้ำ เนื้อของเหิมแป้ดูแข็งมอดดูไม่น่ารับประทานเท่ากับตัวอย่างอื่นๆ สอดคล้องกับการยอมรับด้านลักษณะที่ปรากฏ ด้านค่าการยอมรับเรื่องกลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ระยะเวลาในการแช่หัวเหียงในแต่ละเวลาได้คะแนนที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จึงพอสรุปได้ว่าภาพลักษณ์ที่ปรากฏ สี และกลิ่นของผลิตภัณฑ์มีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคในการบริโภคเห็บสดเป็นอย่างมาก จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นสามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เห็บสดแปรรูปสู่ตลาดเชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

4.2.3 การหาผลการทดสอบกิจกรรมอนุมูลอิสระ (Antioxidants) สารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic determination) และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid determination)

น้ำหนักของเห็บใช้ในการเตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบกิจกรรมอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ได้น้ำหนักก่อนและหลังนำไปอบแห้งเพื่อใช้สำหรับการคำนวณกลับเป็นเห็บสดได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 น้ำหนักตัวอย่างเห็บก่อนและหลังนำไปอบแห้ง เพื่อนำไปคำนวณกลับเป็นเห็บสด

ตัวอย่างเห็บ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่างแช่แข็ง ก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่างหลัง อบแห้ง (กรัม)	Yield %
ตัวอย่างที่ 1 (24)	194.66	77.12	39.62
ตัวอย่างที่ 2 (48)	190.98	74.76	39.15
ตัวอย่างที่ 3 (72)	193.06	74.74	38.71
ตัวอย่างที่ 4 (96)	196.28	74.86	38.14
ตัวอย่างที่ 5 (120)	148.76	57.49	36.63

4.2.3.1. การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant determination)

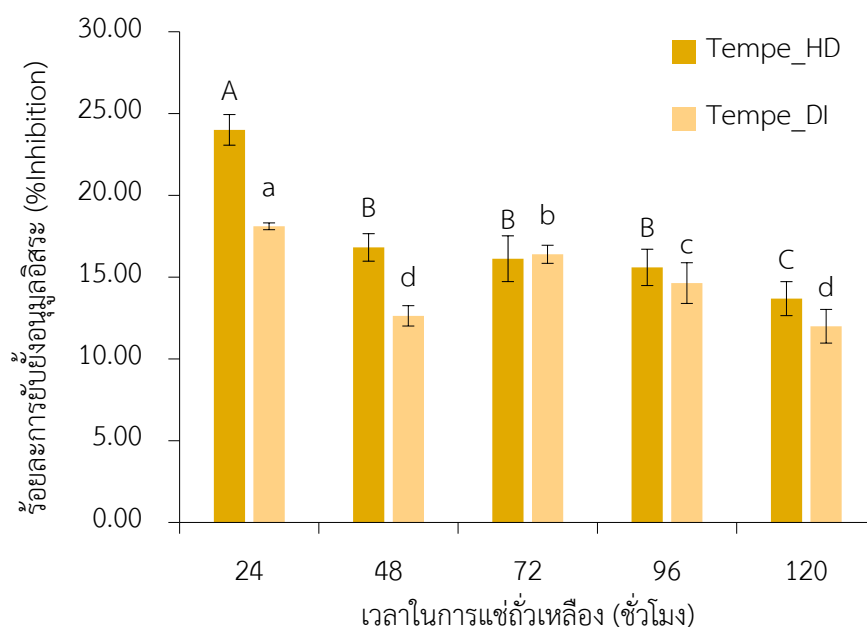
สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเห็บด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธี ได้แก่ การสกัดเห็บด้วยน้ำกลั่นโดยไม่ผ่านการกำจัดไขมัน (Tempe_DI) และกากของการสกัดเห็บผ่านการกำจัดไขมันด้วยเฮกเซน (Tempe_HD) ถูกนำมาหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ซึ่งจะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ABTS และ FRAP และแสดงผลการทดสอบเป็นค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition)

1) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์ของ (Abu Bakar et al., 2020; Guo et al., 2011) การเตรียมสารเคมีสำหรับการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH วิธีการเตรียมสารเคมีอยู่ในภาคผนวก ก.

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็บทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ Tempe_HD และ Tempe_DI ด้วยวิธี DPPH assay แสดงดังภาพที่ 11 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการแช่หัวเหลืองเพิ่มขึ้น

ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) ของทั้ง 2 ตัวอย่าง มีแนวโน้มที่ลดลง โดยพบว่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของ Tempe_HD และ Tempe_DI พบมากที่สุดเมื่อสารสกัดแช่แก้วเหลียงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ Tempe_HD มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า Tempe_DI อยู่ที่ร้อยละ 24.00 ± 0.93 และ 18.11 ± 0.21 นอกจากนี้ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของ Tempe_HD ที่ 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง มีค่าการยับยั้งอยู่ที่ร้อยละ 16.82 ± 0.84 , 16.12 ± 1.40 , 15.60 ± 1.11 และ 13.68 ± 1.40 ตามลำดับ ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของ Tempe_DI ที่ 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง มีค่าการยับยั้งอยู่ที่ร้อยละ 12.63 ± 0.62 , 16.40 ± 0.55 , 14.63 ± 1.24 และ 11.99 ± 1.03 ตามลำดับ



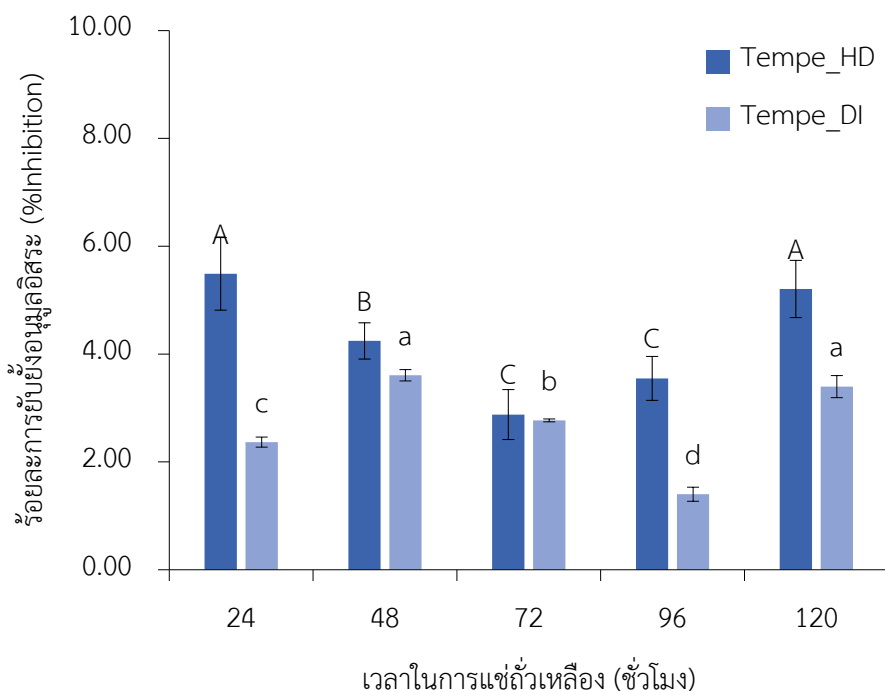
หมายเหตุ* ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แสดงสถิติของตัวอย่าง Tempe_HD ตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงสถิติของตัวอย่าง Tempe_DI

ภาพที่ 11 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay ของสารสกัดเหมาเป้ที่เตรียมได้จากสภาวะการแช่แก้วเหลียงที่แตกต่างกัน

2) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) radical scavenging activity (ABTS assay)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหมาเป้ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ Tempe_HD และ Tempe_DI ด้วยวิธี ABTS assay แสดงดังภาพที่ 12 พบว่า ตัวอย่าง Tempe_HD มีฤทธิ์ที่ดีกว่า Tempe_DI โดย Tempe_HD ที่การแช่แก้วเหลียง 24 ชั่วโมง มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ร้อยละ 5.49 ± 0.67 โดยฤทธิ์ลดลงเมื่อแช่แก้วเหลียงที่ 48 ชั่วโมง (ร้อยละ 4.24 ± 0.34) 72 ชั่วโมง (ร้อยละ 2.88 ± 0.46) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อแช่แก้วเหลียงเป็นเวลา 96 และ 120 ชั่วโมง ซึ่งมีร้อยละ

ละการยับยั้งอนุมูลอิสระอยู่ที่ 3.55 ± 0.41 และ 5.21 ± 0.53 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่าง Tempe_DI ที่การแช่หัวเหียง 48 ชั่วโมง พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ร้อยละ 3.61 ± 0.11 และการแช่หัวเหียงที่ 24 72 96 และ 120 ชั่วโมง พบร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 2.37 ± 0.09 , 2.77 ± 0.03 , 1.40 ± 0.13 และ 3.40 ± 0.20 ตามลำดับ



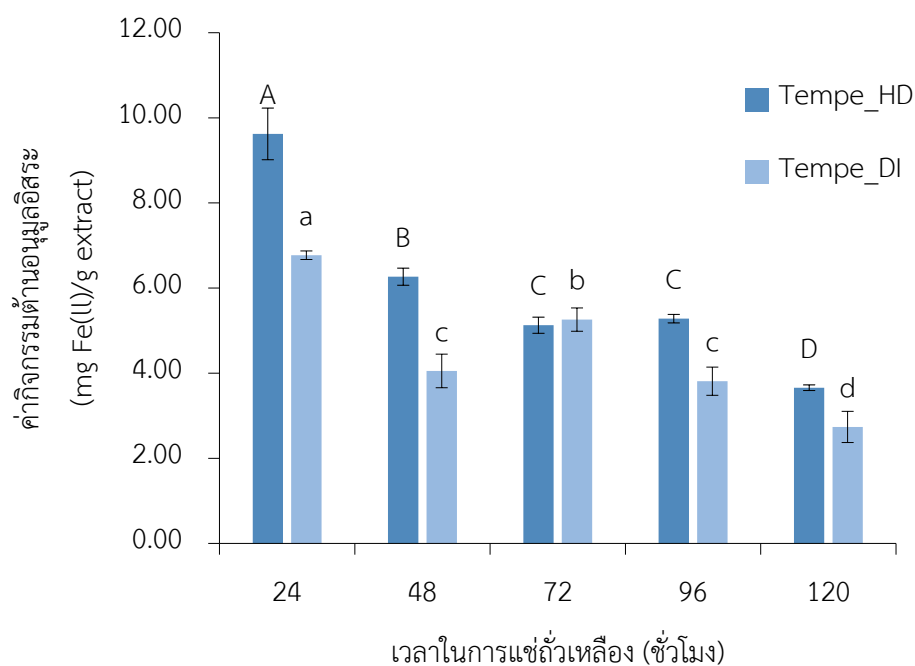
หมายเหตุ* ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แสดงสถิติของตัวอย่าง Tempe_HD ตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงสถิติของตัวอย่าง Tempe_DI

ภาพที่ 12 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS assay ของสารสกัดเหียงที่เตรียมได้จากสภาวะการแช่หัวเหียงที่แตกต่างกัน

3) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหียงทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ Tempe_HD และ Tempe_DI ด้วยวิธี FRAP assay แสดงดังภาพที่ 13 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการแช่หัวเหียงเพิ่มขึ้น ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ของทั้ง 2 ตัวอย่าง มีแนวโน้มที่ลดลง โดยพบค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ Tempe_HD และ Tempe_DI พบมากที่สุดเมื่อสารสกัดแช่หัวเหียงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ Tempe_HD มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า Tempe_DI อยู่ที่ 9.62 ± 0.61 และ 6.77 ± 0.10 mg Fe(II)/g extract นอกจากนี้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ Tempe_HD ที่ 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ 6.27 ± 0.20 , 5.13 ± 0.19 , 5.28 ± 0.10 และ 3.66 ± 0.07 mg Fe(II)/g extract ตามลำดับ ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ Tempe_DI ที่ 48

72 96 และ 120 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 4.05 ± 0.39 , 5.26 ± 0.27 , 3.81 ± 0.33 และ 2.74 ± 0.37 mg Fe(II)/g extract ตามลำดับ



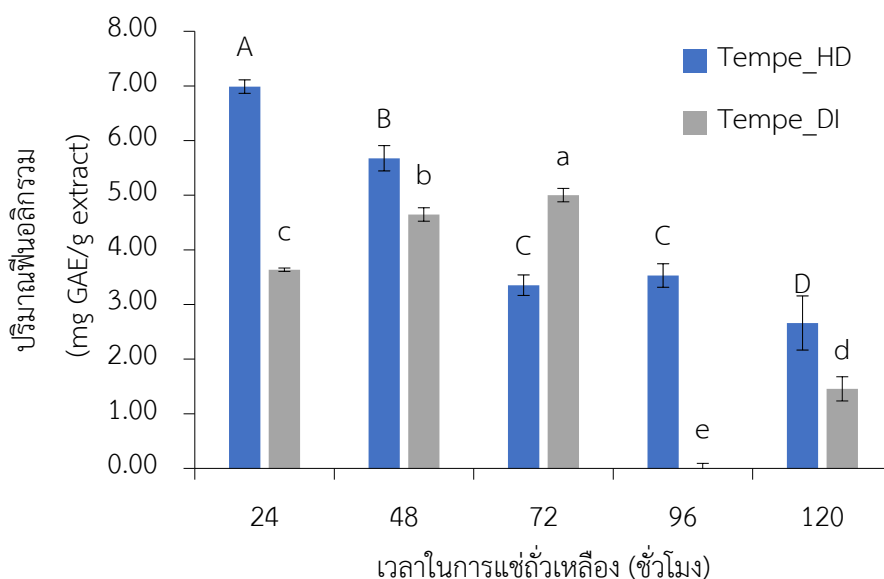
หมายเหตุ* ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แสดงสถิติของตัวอย่าง Tempe_HD ตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงสถิติของตัวอย่าง Tempe_DI

ภาพที่ 13 ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ของสารสกัดเหิมเป่ที่เตรียมได้จากสภาวะการแช่หัวเหียงที่แตกต่างกัน

4) ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic determination)

ผลจากการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของ Tempe_HD และ Tempe_DI จากสภาวะการแช่หัวเหียงที่แตกต่างกัน ได้แก่ 24 48 96 และ 120 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 14 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการแช่หัวเหียงเพิ่มขึ้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของ Tempe_HD มีแนวโน้มของปริมาณฟีนอลิกรวมที่ลดลง โดยมีปริมาณฟีนอลิกรวมของสภาวะแช่หัวเหียงสูงที่สุดเมื่อใช้ระยะเวลาแช่ที่ 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณฟีนอลิกรวม 6.99 ± 0.12 mg GAE/g extract เมื่อใช้สภาวะแช่หัวเหียงที่ 48 96 และ 120 ชั่วโมง พบปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 5.68 ± 0.23 , 3.35 ± 0.19 , 3.53 ± 0.21 และ 2.66 ± 0.49 mg GAE/g extract ตามลำดับ ในทางกลับกันผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง Tempe_DI พบว่า ระยะเวลาการแช่หัวเหียงที่ 72 ชั่วโมง ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุดที่ 5.00 ± 0.12 mg GAE/g extract และที่ระยะเวลาแช่หัวเหียงที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีแนวโน้ม

ของปริมาณฟีนอลิกรวมที่เพิ่มขึ้นที่ 3.64 ± 0.03 , 4.65 ± 0.12 และ 5.00 ± 0.12 mg GAE/g extract ตามลำดับ และมีปริมาณลดลงเมื่อแช่แก้วเหลืงที่เวลา 96 และ 120 ชั่วโมง โดยที่ระยะเวลาแช่ที่ 96 ชั่วโมง ตรวจไม่พบปริมาณฟีนอลิกรวม และที่ 120 ชั่วโมง พบปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ที่ 1.46 ± 0.22 mg GAE/g extract



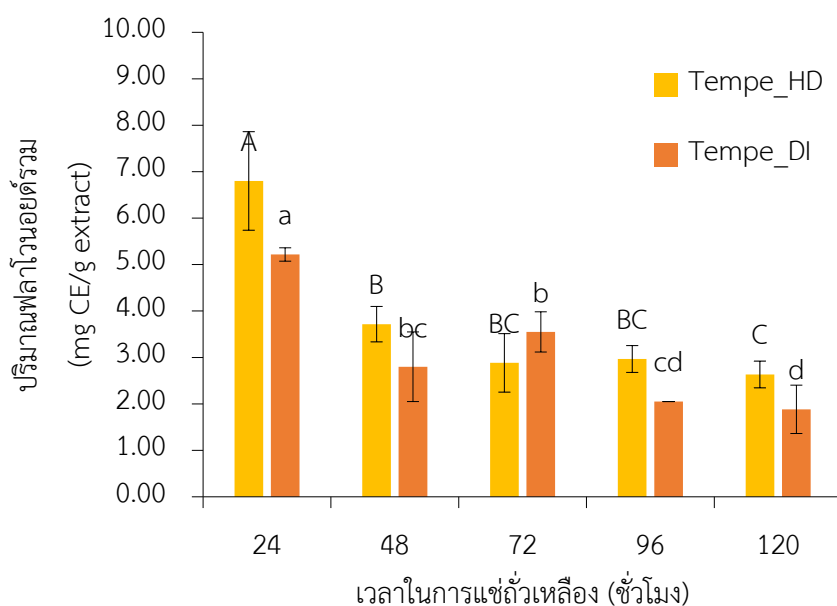
หมายเหตุ* ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แสดงสถิติของตัวอย่าง Tempe_HD ตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงสถิติของตัวอย่าง Tempe_DI

ภาพที่ 14 ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดเหมาเป้ที่เตรียมได้จากสภาวะการแช่แก้วเหลืงที่แตกต่างกัน

5) ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total

Flavonoids determination)

ผลจากการหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของ Tempe_HD และ Tempe_DI จากสภาวะการแช่แก้วเหลืงที่แตกต่างกัน ได้แก่ 24 48 96 และ 120 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 15 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการแช่แก้วเหลืงเพิ่มขึ้นปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของทั้ง 2 ตัวอย่าง มีแนวโน้มของปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ลดลง โดยมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสภาวะแช่แก้วเหลืงสูงที่สุดเมื่อใช้ระยะเวลาแช่ที่ 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของ Tempe_HD อยู่ที่ 6.80 ± 1.09 mg CE/g extract และเมื่อใช้สภาวะแช่แก้วเหลืงที่ 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง พบปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 3.72 ± 0.38 , 2.88 ± 0.63 , 2.97 ± 0.29 และ 2.63 ± 0.29 mg CE/g extract ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง Tempe_DI พบว่า ระยะเวลาการแช่แก้วเหลืงที่ 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดที่ 5.22 ± 0.14 mg CE/g extract และเมื่อใช้สภาวะแช่แก้วเหลืงที่ 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง พบปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 2.80 ± 0.75 , 3.55 ± 0.43 , 2.05 ± 0.00 และ 1.88 ± 0.52 mg CE/g extract ตามลำดับ



หมายเหตุ* ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่แสดงสถิติของตัวอย่าง Tempe_HD ตัวอักษรพิมพ์เล็กแสดงสถิติของตัวอย่าง Tempe_DI

ภาพที่ 15 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเหียงที่เตรียมได้จากสภาวะการแช่หัวเหียงที่แตกต่างกัน

4.2.4 ผลการวิเคราะห์การเกิด Lactic acid bacteria ในน้ำแช่หัวเหียงแต่ละช่วงเวลา

จากการนำตัวอย่างน้ำแช่หัวเหียงที่แช่หัวเหียงในแต่ละช่วงเวลาแตกต่างกัน 5 สภาวะ (24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง) มาทำการเจือจางเชื้อที่ 10^{-1} ถึง 10^{-10} เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar โดยวิธี pour plate นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบหาปริมาณเชื้อเพื่อนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ Lactic acid bacteria (LAB) สามารถนับจำนวนได้ดังตารางที่ 12 พบว่าน้ำแช่หัวเหียงในสภาวะเวลาที่ 120 ชั่วโมงจุลินทรีย์มากที่สุดอยู่ที่ 4.96×10^{10} CFU/mL เมื่อพิจารณาจากน้ำแช่หัวเหียงในสภาวะเวลาที่ 24 ชั่วโมงจุลินทรีย์อยู่ที่ 1.12×10^7 CFU/mL จุลินทรีย์มีปริมาณเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับค่า pH ของระยะเวลาแช่หัวเหียงในน้ำ และจากการตรวจสอบฐานวิทยาของเชื้อ LAB ของระยะเวลาน้ำแช่หัวเหียงทั้ง 5 สภาวะ เลี้ยงบนอาหารแข็งเบื้องต้นสามารถแยกออกมาได้ด้วยตาเปล่ามีประมาณ 14 Isolate ดังตารางที่ 13 พบว่ามีความหลากหลายทางสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในน้ำแช่หัวเหียงในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจมีผลต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่พึงประสงค์ในการผลิตเหียง เช่น *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. จากการศึกษาของ Robert K. Mulyowidarso และคณะ (1988) (Mulyowidarso et al., 1989) พบว่าเมื่อแช่หัวเหียงในน้ำเป็นระยะเวลา 24 ถึง 36 ชั่วโมงและค่า pH ลดลงจาก 6.5 เป็น 4.5 จุลินทรีย์จะเจริญเติบโตถึง 10^8 ถึง 10^{10} CFU/ml ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ Mulyowidarso ยังค้นพบอีกว่าในน้ำแช่หัวเหียงมีจุลินทรีย์ *Lactobacillus casei* และยังพบ

จุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นในน้ำแช่ถั่วเหลืองอีกด้วย ได้แก่ *Streptococcus faecium* subsp. *casseliflavus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus brevis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Pichia burtonii*, *Candida diddensiae*, *Rhodotorula rubra* เป็นต้น

ตารางที่ 12 จำนวนโคโลนีของ *Lactic acid bacteria* ในน้ำแช่ถั่ว

ระยะเวลาในการแช่ถั่ว (ชั่วโมง)	จำนวนโคโลนี (CFU/mL)
ตัวอย่างที่ 1 (24)	1.12×10^7
ตัวอย่างที่ 2 (48)	2.99×10^9
ตัวอย่างที่ 3 (72)	9.60×10^9
ตัวอย่างที่ 4 (96)	2.62×10^{10}
ตัวอย่างที่ 5 (120)	4.96×10^{10}

ตารางที่ 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ LAB ในน้ำแช่ถั่วเหลือง

รหัสเชื้อ LAB	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
TP-W01	กลม ขอบเรียบ สูงขึ้นจากผิวหน้าของอาหาร สีขาวขุ่น สีดำน มีจุดตรงกลาง
TP-W02	กลม ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย สีขาวใส มีสีขาวขุ่นตรงกลาง มันวาว แบนราบติดกับอาหาร
TP-W03	กลม มีจุดตรง ของเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย สีขาวใส มีขนาดใหญ่ แบนเรียบ ติดกับอาหาร สีดำน
TP-W04	กลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น แบนราบติดกับอาหาร
TP-W05	กลม ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย มีจุดตรงกลาง มันวาว แบนราบติดกับอาหาร
TP-W06	รูปไข่ มีจุดตรงกลาง สีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ
TP-W07	รูปปลายแหลมเรียวยาวทั้งสองข้าง สีเหลือง อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
TP-W08	รูปไข่ ขาวขุ่น ขนาดใหญ่ ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย มีจุดตรงกลาง นูนมันวาว

ตารางที่ 14 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ LAB ในน้ำแช่หัวเหียง

รหัสชื่อ LAB	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
TP-W09	กลม ของเป็นเส้นสายยาวไม่แน่นอน สีขาวขุ่น แบนบาง
TP-W010	กลม หนูน้โค้งขึ้นมาจากผิวอาหารมาก มันวาว ขาวใส
TP-W011	กลม ขอบเป็นคลื่น สีขาว มีจุดตรงกลาง
TP-W012	กลม ขนาดเล็ก ขาวขุ่น มีความโค้งนูนเล็กน้อย
TP-W013	กลม ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้าและยื่นมาก สีขาวใสมองเห็นทะลุได้ มีขนาดใหญ่่มาก
TP-W014	กลม ขอบเรียบ มีปุ่มนูนตรงกลาง มันวาว

สรุปได้ว่าในน้ำแช่หัวเหียงในแต่ละระยะเวลานั้นพบความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งยังมีประโยชน์ต่อคุณภาพของเห็บอีกด้วย

4.3 ผลการวิเคราะห์เห็บ

4.3.1 ผลการวิเคราะห์ค่า pH ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

จากการวัดค่า pH ได้ผลดังตารางที่ 14 พบว่าสภาวะที่ 24 มีค่า pH เป็นกรดอ่อนๆ คือ 6.28 ค่าดังกล่าวนี้เป็นค่าการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเจริญเติบโตของ *R. oligosporus* ผลการทดสอบพบว่าเห็บในสภาวะน้ำแช่หัวที่ผ่านแปรรูป 5 สภาวะ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงค่า pH อยู่ในช่วง 5.86 ถึง 6.28 จากการศึกษาของ Tri Handoyo และ Naofumi Morita (Handoyo & Morita, 2006) พบว่าค่า pH ของหัวเหียงจะอยู่ที่ 6.30 เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตในหัวเหียงค่า pH จะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงเป็นกลางคือระหว่าง 6.30 ถึง 7.18 การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการดอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ ผลิตภัณฑ์จากไขมัน โปรตีน และโอลิโกแซ็กคาไรด์ เมื่อเปรียบเทียบค่า pH จะพบว่าค่า pH ของผู้วิจัยจะอยู่ต่ำกว่าค่าของ Tri Handoyo และ Naofumi Morita เมื่อเทียบกับค่าของหัวเหียง

ตารางที่ 15 ค่า pH ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการแช่หัวที่ระยะเวลาดังๆ

ระยะเวลาในการแช่หัวของเห็บ (ชั่วโมง)	ค่า pH ที่วัดได้ในผลิตภัณฑ์เห็บ
24	6.28±0.51
48	5.93±0.13
72	6.03±0.45
96	5.86±0.78
120	5.86±0.60

4.3.2 ผลการวิเคราะห์ค่าสีในเหมเป้

จากผลที่นำเหมเป้สดทั้ง 5 สภาวะทำการวัดค่าสีเป็นจำนวน 3 ซ้ำได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 15 พบว่าค่าสีในแกน L* ตัวอย่างเหมเป้ในน้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 48, 72 และ 96 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ตัวอย่างเหมเป้ในน้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมงมีความสว่างที่แตกต่างกับตัวอย่างเหมเป้ในน้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 120 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แกน a* ตัวอย่างเหมเป้ที่น้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 48, 72 และ 96 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ตัวอย่างเหมเป้ที่น้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 24 และ 120 ชั่วโมงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แกน b* ตัวอย่างเหมเป้ในน้ำแช่ถั่วเหลืองที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 16 ค่าสีเหมเป้สดในแต่ละสภาวะที่แช่ถั่วเหลืองในน้ำเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน

เหมเป้ในแต่ละสภาวะที่แช่ถั่ว เหลืองในน้ำเป็นเวลาที่แตกต่างกัน	L*	a*	b*
แช่ถั่วเหลือง 24 ชั่วโมง	62.13±1.02 ^c	7.46±0.39 ^a	25.90±0.76 ^{ab}
แช่ถั่วเหลือง 48 ชั่วโมง	65.90±0.86 ^{ab}	6.55±0.32 ^b	25.86±1.04 ^{ab}
แช่ถั่วเหลือง 72 ชั่วโมง	64.83±1.51 ^b	6.35±0.51 ^b	25.82±0.67 ^{ab}
แช่ถั่วเหลือง 96 ชั่วโมง	65.89±1.31 ^{ab}	6.29±0.60 ^b	26.94±0.78 ^a
แช่ถั่วเหลือง 120 ชั่วโมง	67.95±0.83 ^a	5.37±0.43 ^c	24.82±0.22 ^b

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b, c ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันในแนวตั้งของเหมเป้ในน้ำแช่ถั่วในแต่ละสภาวะที่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.5)

4.3.3 ผลการวิเคราะห์ค่า Proximate Analysis

จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระพบว่าเหมเป้ที่ได้จากถั่วเหลืองที่แช่ในน้ำเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงมีการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเหมเป้ที่ได้จากการแช่ถั่วเหลืองในน้ำที่ระยะเวลาอื่นๆ จึงได้เลือกสภาวะในการแช่ถั่วเหลืองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อผลิตเหมเป้ จากการตรวจวิเคราะห์ค่า Proximate อ้างอิงถึงวิธีการทดสอบ แสดงดัง ตารางที่ 16 มาเปรียบเทียบกับผลการทดสอบของ Omosebi M. O. และ Otunola E. T. (2013) (Omosebi & Otunola, 2013) ที่ทำการทดลองเหมเป้ในการใช้เชื้อ *R. oligosporus*, *R. oryzae*, *R. stolonifer* ในการตรวจวิเคราะห์ค่า proximate composition โดยผู้วิจัยได้นำเปรียบเทียบเฉพาะในส่วนของการใช้เชื้อ *R. oligosporus* ซึ่งเป็นเชื้อตัวเดียวกันกับผู้วิจัยที่ใช้ในการหมักเหมเป้ พบว่าเส้นใย ไขมัน ความชื้นและโปรตีนของผู้วิจัยมีผลวิเคราะห์ที่สูงกว่าคือ เส้นใย 12.99 กรัม ไขมัน 25.41 กรัม ความชื้น 10.27 กรัม ส่วนของเถ้าและคาร์โบไฮเดรตของ Omosebi M. O. และ Otunola E. T. มีค่าสูงกว่าคือ เถ้า 5.60% คาร์โบไฮเดรต 33.52%

ตารางที่ 17 ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า Proximate analysis ของนมแม่

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Ash	1.87	g/100g	-	AOAC (2019) 923.03 and 920.153
Carbohydrate	17.20	g/100g	-	Method of Analysis for Nutrition Labelling (1993), Chapter 6 Proximate and Mineral Analysis
Dietary fiber (total)	12.99	g/100g	-	AOAC (2019) 985.29, 991.42 and 993.19
Energy	478.49	Kcal/100g	-	Method of Analysis for Nutrition Labelling (1993), Chapter 6 Proximate and Mineral Analysis
Fat	25.41	g/100g	-	AOAC (2019) 948.15
Moisture	10.27	g/100g	-	AOAC (2019) 925.10 and 950.46
Protein	45.25	g/100g	-	AOAC (2019) 991.20

4.3.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน (Total Amino acid)

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน ได้ผลดังตารางที่ 17 จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้นพบว่าตัวอย่างนมแม่สถานะที่แช่ถั่วเหลืองในน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้กรดอะมิโนชนิด กรดกลูตามิก สูงถึง 8.61 mg/100mg โดยกรดกลูตามิกทำหน้าที่คล้ายกับกรดแอสปาร์ติกทำหน้าที่ในการให้เซลล์ในร่างกายผลิตพลังงาน กรดกลูตามิกเป็นพื้นฐานของอูมามิ ผลการทดสอบพบว่าตัวอย่างนมแม่ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ให้กรดอะมิโนจำเป็น 7 ชนิดจาก 9 ชนิดที่ร่างกายต้องการ ได้แก่ Histidine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Phenylalanine, Threonine, Tryptophan และ Valine จากตัวอย่างนมแม่ในสถานะที่แช่ถั่วเหลืองในน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนกรดอะมิโน 2 ตัว ได้แก่ Methionine ที่มีบทบาทในการช่วยป้องกันการสะสมของไขมันในตับ และการเกิดโรคซึมเศร้า และ Tryptophan ที่มีบทบาทในการช่วยให้นอนหลับสนิท ลดการเป็นโรคซึมเศร้า บรรเทาความเครียด ร่างกายสามารถสังเคราะห์ไนอะซิน (Vitamin B3) ได้จากทริปโตเฟนนั่น ไม่ได้อยู่ในรายการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการจึงไม่สามารถรายงานได้ ส่วนกรดอะมิโนที่ร่างกายผลิตได้เองและในตัวอย่างนมแม่ตรวจพบได้แก่ Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Glycine, Arginine, Alanine, Proline และ Tyrosine เป็น 8 ชนิดจาก 11 ชนิด ที่ตรวจวิเคราะห์จึงรายงานผลการวิเคราะห์ 8 ชนิด

ตารางที่ 18 ปริมาณกรดอะมิโน ของเทมเปที่ได้จากการแช่หัวเหียงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Amino Acids	Mg/100mg
Aspartic acid	5.65
Serine	2.47
Glutamic acid	8.61
Glycine	1.92
Histidine	1.07
Threonine	1.84
Arginine	2.87
Alanine	2.70
Proline	2.63
Tyrosine	1.43
Valine	2.55
Lysine	3.36
Isoleucine	2.21
Leucine	3.64
Phenylalanine	2.46

งานวิจัยของ Bernard F. Gibbs และคณะ (Gibbs et al., 2004) ได้ทำการศึกษากระบวนการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเปปไทด์ (bioactive peptides) จากหัวเหียงไฮโดรไลสและอาหารที่ได้จากการหมักหัวเหียง พบว่าหัวเหียงที่ถูกย่อยด้วยเอนโดโปรตีเอสหลายชนิด ได้แก่ โปรนาส, ทริปซิน, Glu C protease (เอนไซม์โปรตีเอสที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน) เอนไซม์โปรตีเอสในพลาสมา และโปรตีเอสในเยื่อหุ้มไต เพื่อสร้างโอลิโกเปปไทด์ โดยเปปไทด์ที่นำมาใช้ทางชีวภาพส่วนใหญ่ได้มาจากไกลซีน ซึ่งพบในโปรตีนหัวเหียงและพบได้ในเอนไซม์โปรนาส โปรตีเอสในเยื่อหุ้มไตและเอนไซม์โปรตีเอสในพลาสมาซึ่งย่อยมาจากอาหารหมัก ให้เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารที่หมักด้วยหัวเหียงที่ย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีโอไลติก ให้กิจกรรมการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แปลงแองจิโอเทนซิน (Angiotensin converting enzyme-ACE) การต้านการเกิดลิ่มเลือด และการต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์โปรตีเอสที่เกิดจากเชื้อสายพันธุ์ *Rhizopus* spp. ได้ไฮโดรไลซ์โปรตีนหัวเหียงให้เป็นเปปไทด์ขนาดใหญ่โดยการย่อยโอลิโกเปปไทด์ การไฮโดรไลสเกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ไม่ใช่เกิดจากเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Rhizopus* spp.

จากงานวิจัยของ Bernard F. Gibbs และคณะ จึงพอสรุปได้ว่า ถั่วเหลืองที่ได้จากกระบวนการหมักเป็นกระบวนการไฮโดรไลสเสดจากธรรมชาติให้คุณสมบัติทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์

4.3.5 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางจุลชีววิทยา

1) Yeast and Mold และ Total Plate Count

เป็นการตรวจผลิตภัณฑ์สุดท้ายก่อนออกสู่ตลาด เพื่อให้ผู้บริโภคมั่นใจในผลิตภัณฑ์ นำเทมเป้สดมาทำเป็นผงเทมเป้โดยวิธีการFreez-drier และอบแห้ง โดยเลือกวิธีการใช้แบบ pour plate method ได้ผลการตรวจวิเคราะห์ดังตารางที่18 จากผลวิเคราะห์พบว่าเทมเป้อบแห้งด้วยลมร้อนมีปริมาณยีสต์และราในปริมาณที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเทมเป้ทำแห้งแบบเยือกแข็ง แต่เนื่องจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560) ข้อ 3 อาหารหมักพื้นบ้าน ไม่มีรายการตรวจหาจำนวนยีสต์และรา และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารหมักพื้นบ้าน จากปริมาณของจำนวนเชื้อที่ปรากฏในผลิตภัณฑ์เทมเป้จึงเป็นการแสดงให้เห็นถึงปริมาณเชื้อที่ยังมีอยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของเทมเป้ ในขณะที่ R.A. Samson และคณะ (Samson et al., 1987) ที่ตรวจพบยีสต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เทมเป้เท่ากับ 10^5 CFU/g ในขณะที่ของผู้วิจัยพบยีสต์และราในตัวอย่างเทมเป้อบแห้งด้วยลมร้อนเท่ากับ 3.37×10^6 CFF/g ถือเป็นจำนวนที่สูงกว่า Sammonและคณะอย่างมาก คาดว่าอาจเกิดจากการที่เชื้อที่นำมาใช้ในการหมักเทมเป้มีความ active มากจึงทำให้จำนวนยีสต์และราที่มีปริมาณที่สูง

ตารางที่ 18 ปริมาณยีสต์และรา และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

ตัวอย่างเทมเป้	จำนวนยีสต์และรา	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด
	(Yeast and Mold) (CFU/g)	(PCA) (CFU/g)
เทมเป้อบแห้งด้วยลมร้อน	3.37×10^6	1.43×10^5

พูน ปณ จิต ชีเว

บทที่ 5

บทสรุป

จากการศึกษาการผลิตแอมป์ในสภาวะน้ำแช่หัวเหลืองที่แตกต่างกัน ทั้ง 5 สภาวะได้แก่ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงจากการทดลองสามารถบอกได้ว่า ผู้บริโภคชอบแอมป์ในสภาวะน้ำแช่หัวเหลืองในทุกสภาวะไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญตามผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส ที่มีความแตกต่างจะเป็นลักษณะของสีแอมป์ที่สีในน้ำแช่หัวเหลืองที่ 24 ชั่วโมงผู้บริโภคชอบน้ำกว่าแอมป์ในสภาวะน้ำแช่หัวเหลืองที่ 120 ชั่วโมงซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบค่าสีตามหน่วยการวัดระบบ CIE; $L^* - a^* - b^*$ โดยค่า L^* ของแอมป์ในสภาวะน้ำแช่หัวเหลืองที่ 24 ชั่วโมงมีความสว่างน้อยกว่าแอมป์ในน้ำแช่หัวเหลืองที่ 120 ชั่วโมง ค่า a^* และ b^* ของแอมป์ที่ 24 ชั่วโมงมีค่าสูงกว่าแอมป์ที่ 120 ชั่วโมง จึงบอกได้ว่าแอมป์ที่ 24 ชั่วโมงมีสีที่คล้ำกว่าแอมป์ที่ 120 ชั่วโมง สอดคล้องกับความชอบและไม่ชอบของผู้บริโภคตามการทดสอบด้วยวิธี 9- point hedonic scale เมื่อนำมาทดสอบกิจกรรมอนุโมลีอิสระ สารประกอบฟีนอลิกรวมและ สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมพบว่าแอมป์ในสภาวะน้ำแช่หัวเหลืองที่ 24 ชั่วโมงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำแช่หัวเหลืองในสภาวะอื่นๆ การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม แอมป์ในสภาวะน้ำแช่หัวเหลืองที่ 24 ชั่วโมงให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด

ดังนั้นแล้วผู้วิจัยจึงเลือกนำแอมป์ในสภาวะที่แช่หัวเหลืองเป็นระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมงมาใช้ในการวิเคราะห์และทดสอบทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นสภาวะที่ลดระยะเวลาการผลิตเพิ่มกำไรลดต้นทุนให้กับผู้ประกอบการ อีกทั้งเชื้อจุลินทรีย์ Lactic acid bacteria (LAB) ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติมีผลต่อคุณภาพของแอมป์และวัดค่า pH ในน้ำแช่หัวเหลืองได้ที่ 4.81 ซึ่งเป็นระยะการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่หลากหลายซึ่งส่งผลต่อโภชนาการและคุณภาพของแอมป์ โดยเชื้อจุลินทรีย์ LAB ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจะมีบทบาทในฐานะโปรไบโอติก จึงเลือกใช้ระยะเวลาแช่หัวเหลืองที่ 24 ชั่วโมงมาทำการทดสอบปริมาณการใช้หัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตแอมป์พบว่าในปริมาณร้อยละ 0.25 และ 0.5 ให้ลักษณะปรากฏที่ตรงตามมาตรฐานของ WHO มากที่สุด กล่าวคือเนื้อสัมผัสแน่นเป็นก้อนไม่แตกหักง่าย สีขาวอันเกิดจากไมซีเรียมของเชื้อ *Rhizopus oligosporus* รสชาติคล้ายเห็ด ไม่มีกลิ่นของแอมป์เนย เมื่อนำมาวัดค่า pH ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ pH 6.28 เป็นช่วงที่เชื้อราเจริญเติบโตในหัวเหลือง เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ การผลิตไขมัน โปรตีนและโอลิโกแซ็กคาไรด์ การวิเคราะห์ค่า Proximate เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Omosed M. O. และ otunola E. T. ในการตรวจวิเคราะห์ค่า proximate composition ในส่วนของการใช้เชื้อ *R. oligosporus* พบว่าเส้นใย ไขมัน ความชื้นและโปรตีนของผู้วิจัยมีผลวิเคราะห์

ที่สูงกว่าคือ เส้นใย 12.99 กรัม ไขมัน 25.41 กรัม ความชื้น 10.27 กรัม ส่วนของเถ้าและคาร์โบไฮเดรตของ Omosebi M. O. และ Otunola E. T. มีค่าสูงกว่าคือ เถ้า 5.60% คาร์โบไฮเดรต 33.52% เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนพบว่ามีการตกดูละเอียดปริมาณที่สูง โดยการตกดูละเอียดเป็นพื้นฐานของอูมามิเรื่องของรสชาติทำให้เพิ่มเป็นสถานะการแช่หัวเหลืองที่ 24 ชั่วโมงเมื่อรับประทานแบบสดจะให้รสชาติคล้ายกับเนื้อสัตว์มากกว่ารสชาติของเห็ด และมีการดูละเอียดในจำเป็นที่ร่างกายต้องการครบทั้ง 7 ชนิดตามผลการตรวจของห้องปฏิบัติการที่รับตรวจกรดอะมิโนรวมทั้งหมด 15 ตัว ได้แก่ Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Arginine, Threonine, Alanine, Proline, Tyrosine, Valine, Lysine, Isoleucine, Leucine และ Phenylalanine เพิ่มไปที่ส่งตรวจจึงพบกรดอะมิโนเพียง 15 ตัว จากรายงานผลการทดสอบกรดอะมิโนจะเห็นว่าจุลินทรีย์ได้ทำการย่อยโปรตีนหัวเหลืองด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากโปรตีนสายยาวเป็นเปปไทด์โปรตีนซึ่งเป็นโปรตีนสายสั้น โดยกระบวนการนี้เราเรียกว่า “กระบวนการไฮโดรไลส” เป็นกระบวนการของการได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ชีวภาพเปปไทด์พบว่าในกระบวนการไฮโดรไลสเกิดจากการหมักจะให้คุณค่าทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์กว่ากระบวนการไฮโดรไลสแบบอื่น ในการทดสอบผลิตภัณฑ์สุดท้ายก่อนออกสู่ตลาดในส่วนของผู้ผลิตเพิ่มเติมนั้นยังไม่มีประกาศกระทรวงสาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560) ข้อ 3 อาหารหมักพื้นบ้าน ไม่มีรายการตรวจหาจำนวนยีสต์และรา และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารหมักพื้นบ้าน

ข้อเสนอแนะ

สำหรับงานวิจัยในอนาคต อาจมีการศึกษาและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ LAB ในน้ำแช่หัวเหลืองเพื่อนำมาเป็นเชื้อเริ่มต้นในขั้นตอนการแช่หัว เพื่อควบคุมการปนเปื้อนและการเจริญของเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

พูน ปณ จิต ชีวะ

บรรณานุกรม

- Abu Bakar, M. H., Lee, P. Y., Azmi, M. N., Lotfiamir, N. S., Faris Mohamad, M. S., Nor Shahril, N. S., Shariff, K. A., Ya'akob, H., Awang, K., & Litaudon, M. (2020). In vitro anti-hyperglycemic, antioxidant activities and intestinal glucose uptake evaluation of *Endiandra kingiana* extracts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101594.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101594>
- Aijie, L., Shouwei, Y., & Li, L. (2014). Structure, trypsin inhibitor activity and functional properties of germinated soybean protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(3), 911-919.
- Ashaolu, T. J. (2020). Applications of soy protein hydrolysates in the emerging functional foods: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(2), 421-428.
- Asif, M., & Acharya, M. (2013). Phytochemicals and nutritional health benefits of soy plant. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 3(1).
https://journals.lww.com/ijnp/fulltext/2013/03010/phytochemicals_and_nutritional_health_benefits_of.10.aspx
- Athaillah, Z. A., Muzdalifah, D., Lestari, A., Devi, A. F., Udin, L. Z., & Artanti, N. (2019). Phenolic compound profile and functionality of aqueous overripe tempe extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 7(2), 382-392.
- Bahukhandi, A., Rawat, S., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2013). Influence of Solvent Types and Source of Collection on Total Phenolic Content and Antioxidant Activities of *Acorus calamus* L. *National Academy Science Letters*, 36(1), 93-99.
<https://doi.org/10.1007/s40009-012-0109-8>
- BARUS, T., GIOVANIA, G., & LAY, B. W. (2020). Lactic acid bacteria from tempeh and their ability to acidify soybeans in tempeh fermentation. *Microbiology Indonesia*, 14(4), 4-4.
- Barus, T., Titarsole, N. N., Mulyono, N., & Prasasty, V. D. (2019). Tempeh antioxidant

- activity using DPPH method: effects of fermentation, processing, and microorganisms. *Journal of Food Engineering and Technology*, 8(2), 75-80.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Chitisankul, W. T. (2016). Saponin in soybean for healthy. *Food Journal*, 46(1), 43-46.
- Christodouleas, D. C., Fotakis, C., Nikokavoura, A., Papadopoulos, K., & Calokerinos, A. C. (2015). Modified DPPH and ABTS Assays to Assess the Antioxidant Profile of Untreated Oils. *Food Analytical Methods*, 8(5), 1294-1302. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-0005-6>
- CODEX Alimentarius International Food Standards, (2013).
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2012). Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148-173.
- Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2017). Amino acids, peptides, and proteins. In *Fennema's food chemistry* (pp. 235-356). CRC Press.
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17), 5377. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/17/5377>
- Elmastas, M., Turkecul, I., Ozturk, L., Gulcin, I., Isildak, O., & Aboul-Enein, H. Y. (2006). Antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*) from North Turkey. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 9(6), 443-448.
- FDLIN, O. (1927). On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.*, 27, 627-650.
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the

Synthesis of Nanoparticles. *Materials*, 14(15), 4135.

<https://www.mdpi.com/1996-1944/14/15/4135>

Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R., & Mulligan, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37(2), 123-131.

Guang, C., Chen, J., Sang, S., & Cheng, S. (2014). Biological Functionality of Soyasaponins and Soyasapogenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(33), 8247-8255. <https://doi.org/10.1021/jf503047a>

Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

Guo, X.-D., Ma, Y.-J., Parry, J., Gao, J.-M., Yu, L.-L., & Wang, M. (2011). Phenolics Content and Antioxidant Activity of Tartary Buckwheat from Different Locations. *Molecules*, 16(12), 9850-9867. <https://www.mdpi.com/1420-3049/16/12/9850>

Handoyo, T., & Morita, N. (2006). Structural and Functional Properties of Fermented Soybean (Tempeh) by Using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Properties*, 9(2), 347-355. <https://doi.org/10.1080/10942910500224746>

Haytowitz, D., Lemar, L., Pehrsson, P., Exler, J., Patterson, K., Thomas, R., Nickle, M., Williams, J., Showell, B., & Khan, M. (2011). USDA national nutrient database for standard reference, release 24. *US Department of Agriculture: Washington, DC, USA*.

Hudz, N., Yezerska, O., Shanaida, M., Sedláčková, V. H., & Wieczorek, P. P. (2019). Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of *Salvia sclarea* extracts. *Pharmacia*, 66(4), 209-215.

Irshad, M., Zafaryab, M., Singh, M., & Rizvi, M. M. A. (2012). Comparative Analysis of the Antioxidant Activity of *Cassia fistula* Extracts. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 157125. <https://doi.org/10.1155/2012/157125>

Jennessen, J., Nielsen, K. F., Houbraken, J., Lyhne, E. K., Schnürer, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2005). Secondary Metabolite and Mycotoxin Production by the *Rhizopus microsporus* Group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1833-1840. <https://doi.org/10.1021/jf048147n>

Jennessen, J., Schnürer, J., Olsson, J., Samson, R. A., & Dijksterhuis, J. (2008).

Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group.

Mycological Research, 112(5), 547-563.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.11.006>

Joint, F. (1973). *Energy and protein requirements: report of a Joint FAO/WHO ad hoc expert committee*. Food and Agriculture Organization.

Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: An overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 10(4), 1567-1574.

Kedare, S. B., & Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48, 412-422.

Kudelka, W., Kowalska, M., & Popis, M. (2021). Quality of soybean products in terms of essential amino acids composition. *Molecules*, 26(16), 5071.

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750.

<https://doi.org/10.1155/2013/162750>

Liu, K., & Liu, K. (1997). Chemistry and nutritional value of soybean components. *Soybeans: chemistry, technology, and utilization*, 25-113.

Magdalena, S., Hogaputri, J., Yulandi, A., & Yogiara, Y. (2022). The addition of lactic acid bacteria in the soybean soaking process of tempeh. *Food Research*, 6(3), 27-33.

Moharram, H., & Youssef, M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31-42.

Mpofu, A., Sapirstein, H. D., & Beta, T. (2006). Genotype and Environmental Variation in Phenolic Content, Phenolic Acid Composition, and Antioxidant Activity of Hard Spring Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1265-1270.

<https://doi.org/10.1021/jf052683d>

Mulyowidarso, R. K., Fleet, G. H., & Buckle, K. A. (1989). The microbial ecology of soybean soaking for tempe production. *International Journal of Food Microbiology*, 8(1), 35-46.

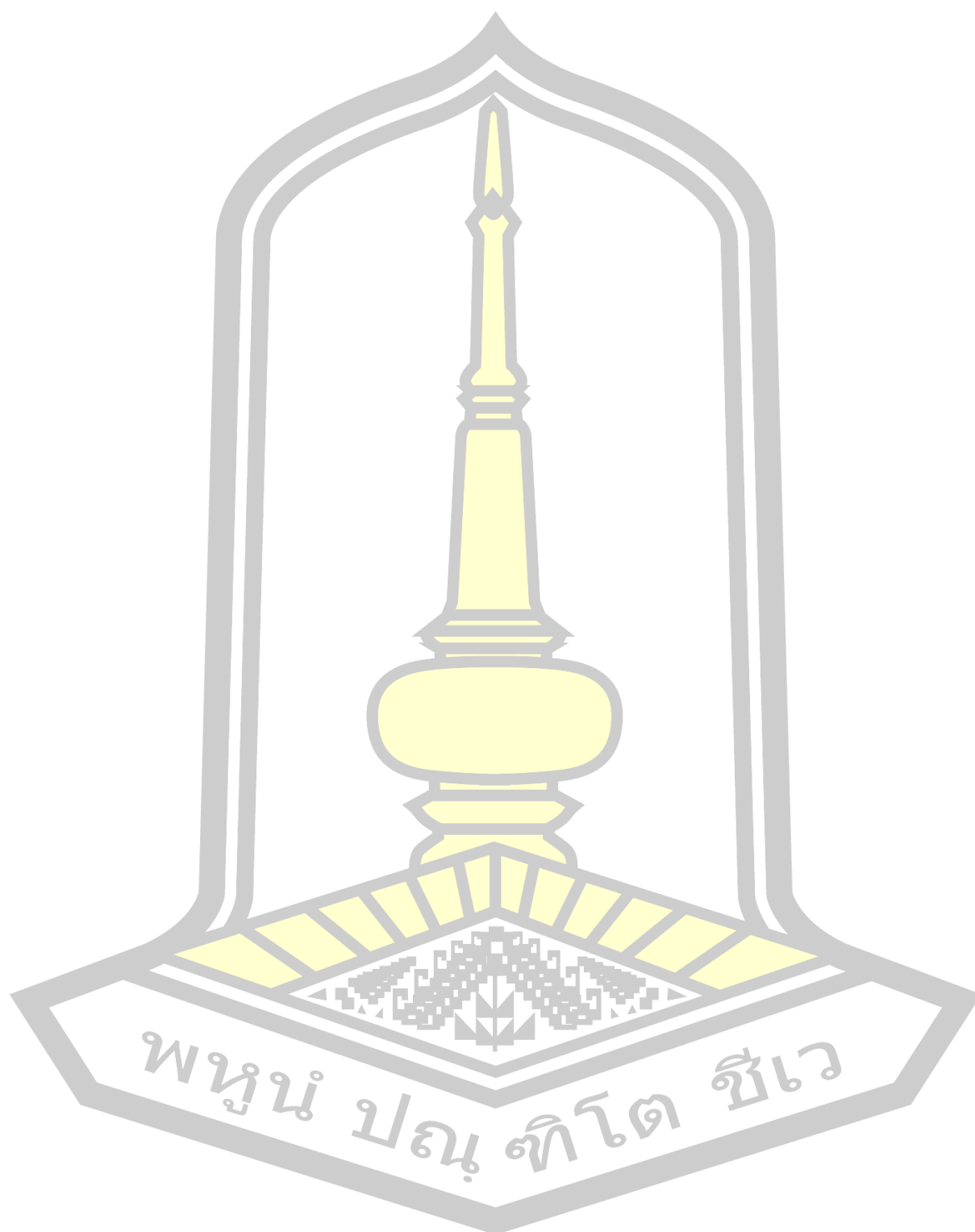
Mulyowidarso, R. K., Fleet, G. H., & Buckle, K. A. (1990). Association of bacteria with the fungal fermentation of soybean tempe. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(1), 43-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02546.x>

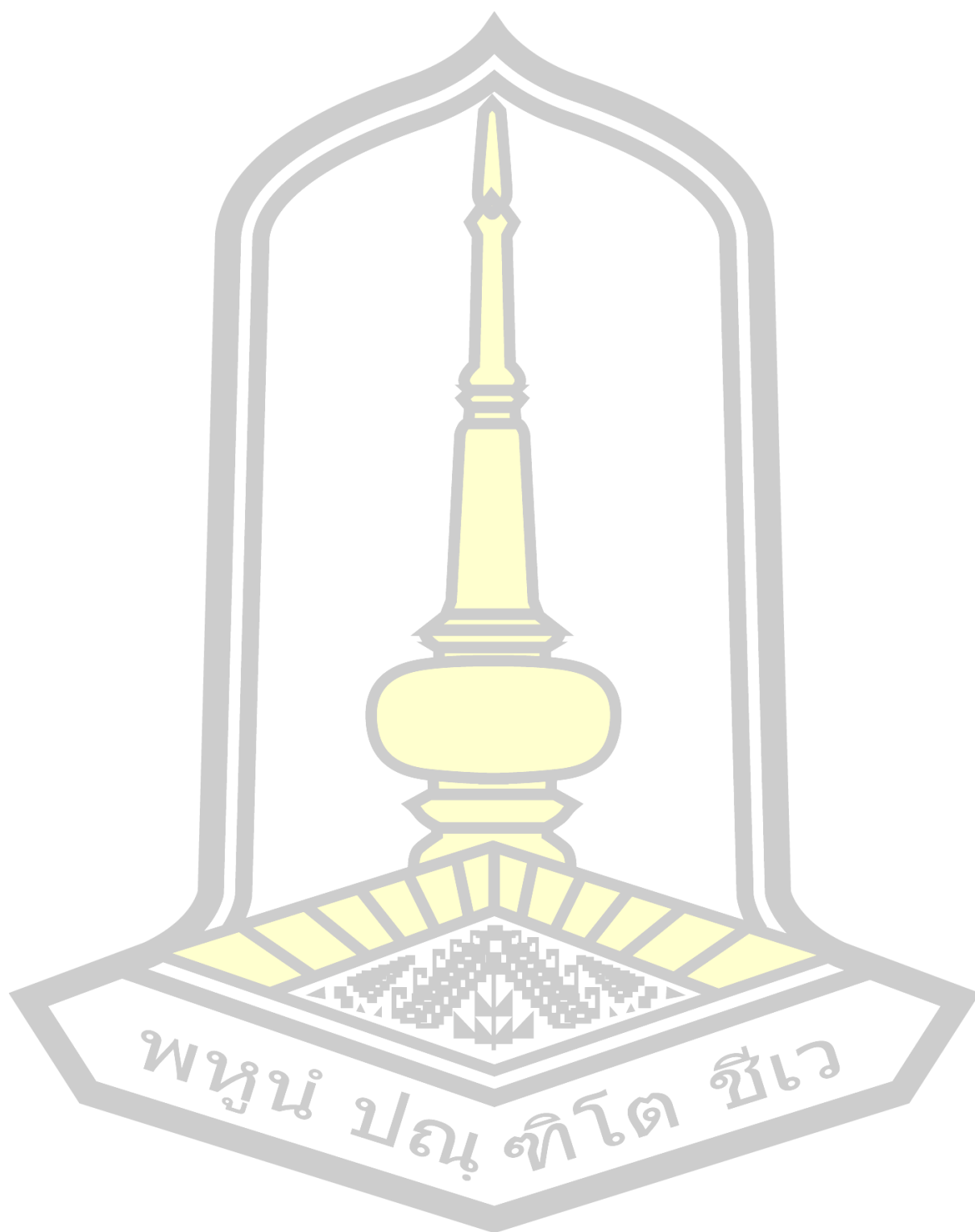
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3380>
- Nikolaeva, T. N., Lapshin, P. V., & Zagoskina, N. V. (2022). Method for Determining the Total Content of Phenolic Compounds in Plant Extracts with Folin–Denis Reagent and Folin–Ciocalteu Reagent: Modification and Comparison. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 48(7), 1519-1525. <https://doi.org/10.1134/S1068162022070214>
- Nina Parker, M. S., Anh-Hue Thi Tu, Philip Lister, Brian M. Forster, Summer Allen, Ann Auman, Graciela Brelles-Marino, Myriam Alhadeff Feldman, Paul Flowers, George Pinchuk, Ben Rowley, Mark Sutherland, Clifton Franklund and Ann Paterson. (2024). *Microbiology (OpenStax)*. The LibreTexts libraries are Powered by NICE CXone EXPert. <https://ibreTExts.org>
- Nout, M. J. R., Beernink, G., & Bonants-van Laarhoven, T. M. G. (1987). Growth of *Bacillus cereus* in soyabean tempeh. *International Journal of Food Microbiology*, 4(4), 293-301. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90004-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90004-3)
- Omosebi, M., & Otunola, E. (2013). Preliminary studies on tempeh flour produced from three different *Rhizopus* species. *International Journal of Biotechnology and Food Science*, 1(5), 90-96.
- Pisoschi, A., & Negulescu, G. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem*, 1(106), 2161-1009.1000106.
- Polanowska, K., Grygier, A., Kuligowski, M., Rudzińska, M., & Nowak, J. (2020). Effect of tempe fermentation by three different strains of *Rhizopus oligosporus* on nutritional characteristics of faba beans. *LWT*, 122, 109024. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109024>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rhee, K. C. (1994). Functionality of soy proteins. *Protein functionality in food systems*, 349, 311-324.

- Romulo, A., & Surya, R. (2021). Tempe: A traditional fermented food of Indonesia and its health benefits. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 26, 100413. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100413>
- Samson, R. A., Van Kooij, J. A., & De Boer, E. (1987). Microbiological Quality of Commercial Tempeh in The Netherlands. *Journal of Food Protection*, 50(2), 92-94. <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.2.92>
- Schipper, M. A. A. (1984). *A revision of the genus Rhizopus I. The Rhizopus stolonifer-group and Rhizopus oryzae* (Vol. 25). <https://www.studiesinmycology.org/index.php/issue/27-studies-in-mycology-no-25>
- Shah, P., & Modi, H. (2015). Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol*, 3(6), 636-641.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M. M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT*, 150, 111932. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Elsevier.
- Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical Sciences*, 34(7), 795-800. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P014>
- Sparringa, R. A., Kendall, M., Westby, A., & Owens, J. D. (2002). Effects of temperature, pH, water activity and CO₂ concentration on growth of *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 329-337. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01534.x>
- Teekachunhatean, S., Hanprasertpong, N., & Teekachunhatean, T. (2013). Factors Affecting Isoflavone Content in Soybean Seeds Grown in Thailand. *International Journal of Agronomy*, 2013, 163573. <https://doi.org/10.1155/2013/163573>

- Thawornkuno, C. (2014). ไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลือง: ชีวเคมี กลไกการออกฤทธิ์ และความเกี่ยวข้องในการป้องกันมะเร็งเต้านม (Soy isoflavones: Biochemistry, mechanism of action and implication for breast cancer preventions). 1, 7, 7.
<https://doi.org/https://doi.org/10.14456/tjg.2014.5>
- Vagadia, B. H., Vanga, S. K., & Raghavan, V. (2017). Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 115-125.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.003>
- Vaidehi, M., Annapurna, M., & Vishwanath, N. (1985). Nutritional and sensory evaluation of tempeh products made with soybean, ground-nut, and sunflower-seed combinations. *Food and nutrition bulletin*, 7(1), 1-4.
- Wang, H. L., Vespa, J. B., & Hesseltnine, C. W. (1974). Acid protease production by fungi used in soybean food fermentation. *Appl Microbiol*, 27(5), 906-911.
<https://doi.org/10.1128/am.27.5.906-911.1974>
- Wang, S. Y., & Zheng, W. (2001). Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4977-4982.
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, 6(1), 11. 1.1-11. 1.8.
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 37(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>
- Xu, Z. (2012). Analysis methods of phenolic acids. *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*, 69-104.
- ไกรเดช, ล. (1976). การทำ *Tempeh* และ *Tempeh-like products*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไกรเดช, ล. (2530). นมเปรี้ยวและเทมเป้ จากถั่วลิสง. In รายงานการสัมมนา เรื่อง งานวิจัยถั่วลิสง ครั้งที่ 5 ประจำปี 2528 (pp. 561-563).
- วัชรคุปต์, โ., บุญจุง, ป., บุญยรัตน์, จ., & อัดตสินทอง, ม. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ. มหาวิทยาลัยมหิดล.
<https://repository.li.mahidol.ac.th/handle/123456789/1435>
- ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่. องค์ความรู้ถั่วเหลือง. https://www.doa.go.th/fc/chiangmai/?page_id=860
- สมุทคุปต์, ส. (1971). ผลผลิตของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.2 ในจังหวัดเชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สวรรณ, บ. ห. ร. พ. (2013). อนุมูล อิสระ สาร ต้าน อนุมูล อิสระ และ การ วิเคราะห์ ฤทธิ์ ต้าน อนุมูล อิสระ. *Thai*

Science and Technology Journal, 21(3), 275-286.





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางกัญญารักษ์ อุตตมางกูร
วันเกิด	29 กรกฎาคม 2519
สถานที่เกิด	ประจวบคีรีขันธ์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	114/1 หมู่ที่ 5 ตำบลยางเนิ้ง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	ที่ปรึกษากฎหมาย/ออกแบบและพัฒนาผลิตภัณฑ์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท กานต์อยู่ ไทยคูชิน จำกัด บริษัท นาคา ไปโอเทรต จำกัด
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2565- ปัจจุบัน วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพและ ธุรกิจชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2563-2564 ประกาศนียบัตรหลักสูตรผู้จัดการนวัตกรรม (CIM) อุทยานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2563 ประกาศนียบัตรนวัตกรรมการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร เพื่อการค้า มหาวิทยาลัยแม่โจ้ พ.ศ. 2562 ประกาศนียบัตรหลักสูตรมาตรฐานและข้อกำหนดการทำเกษตร อินทรีย์สากล สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ พ.ศ. 2554 ประกาศนียบัตรชั้นสูงหลักสูตรภาชีอากร ศาลาภาชีอากรกลาง พ.ศ. 2554 ประกาศนียบัตรชั้นสูงหลักสูตรทนายความรับรองลายมือชื่อสภา ทนายความในพระบรมราชูปถัมภ์ พ.ศ. 2538- 2554 นิติศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยรามคำแหง พ.ศ. 2537-2537 ประกาศนียบัตรวิชาชีพ (ปวช.) การบัญชี โรงเรียนจรัสพิ ชากร อาชีวศึกษา

พูน ปณ ภัโต ชเว

