

การศึกษาผลของปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อกระบวนการหมักซีอิ๊ว
จากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

สารนิพนธ์

ของ

เพ็ญประภา สุวรรณะ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ตุลาคม 2551

การศึกษาผลของปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อกระบวนการหมักชีอิ๋ว
จากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

สารนิพนธ์

ของ

เพ็ญประภา สุวรรณะ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ตุลาคม 2551

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาผลของปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อกระบวนการหมักซีอิ๊ว
จากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

บทคัดย่อ

ของ

เพ็ญประภา สุวรรณะ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ตุลาคม 2551

เพ็ญประภา สุวรรณะ.(2551) การศึกษาผลของปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อกระบวนการหมัก
ชีอิ้วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง. สารนิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปริมาณเกลือที่มีต่อกระบวนการหมักชีอิ้วจากถั่วมะ
แฮะและถั่วเหลือง รวมทั้งเพื่อเป็นแนวทางในการหมักชีอิ้วที่มีปริมาณเกลือต่ำ โดยทำการหมักชีอิ้วจาก
ถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือที่แตกต่างกันดังนี้ ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 20(สูตร 1) 18
(สูตร 2) 16(สูตร 3) 14(สูตร 4) 12(สูตร 5) และ 10(สูตร 6) โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ
ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณจุลินทรีย์ ปริมาณเกลือ กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส กิจกรรมของ
เอนไซม์อะไมเลส ปริมาณกลูโคสและปริมาณเอทานอล ในระหว่างขั้นตอนการหมักโมโรมิและในน้ำ
ชีอิ้วขาว จากผลการศึกษาพบว่า พบปริมาณกรดแลคติกมากที่สุดในช่วงการหมัก ปริมาณจุลินทรีย์ที่
พบมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก ปริมาณเกลือมีการเปลี่ยนแปลงคงที่ในการหมักโมโรมิ
และเพิ่มขึ้นในน้ำชีอิ้วขาว กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นสูงสุด ในช่วง 10 วันแรกของการหมัก
และลดลงเมื่อหมักนาน 90 วัน กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่พบมีความสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคสที่
พบ และปริมาณเอทานอลตรวจพบมากในช่วงแรกของการหมัก พิจารณาผลการวิเคราะห์พบว่า การ
ลดปริมาณเกลือในช่วงความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 18-10 ไม่มีความแตกต่างจากการใช้ปริมาณ
เกลือปกติ การใช้ปริมาณเกลือร้อยละ 12 คุณสมบัติของโมโรมิและน้ำชีอิ้วขาวใกล้เคียงกับสูตรควบคุม
มากที่สุด

A STUDY ON THE EFFECT OF SODIUM CHLORIDE CONTENT ON
FERMENTATION PROCESS OF SOY SAUCE FROM PIGEON PEA AND
SOY BEAN

AN ABSTRACT

BY

PENPRAPA SUWUNNA

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University

October 2008

Penprapa Suwunna. (2008). *A study on the effect of sodium chloride contents on fermentation process of soy sauce from Pigeon Pea and Soy bean*. Master's Project, M.Ed. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University.
Project Advisor: Assoc. Prof. Dr. Pornpimol Muangthai

The objective of this research was conducted to study the effect of sodium chloride content in fermentation process of soy sauce from Pigeon Pea and Soy Bean. It is also aimed to propose ways to fermentation process of soy sauce when the salt content was low. The different of sodium chloride content were studied at 20% (formula 1), 18% (formula 2), 16% (formula 3), 14% (formula 4), 12% (formula 5) and 10% (formula 6). In this work, the chemical change of organic acid content, microorganism content, sodium chloride content, protease enzyme activities, amylase enzyme activities, glucose content and ethanol content in Moromi and soy sauce. The results showed that the lactic acid content is maximum in fermentation process. The microorganism active in fermentation system. The sodium chloride content constant in Moromi and increased soy sauce. After 10 days of fermentation protease enzyme activities was highest and decreased fermentation 90 days. The amylase enzyme activities correlated with glucose content. The ethanol content detected at the beginning of fermentation process. This study has shown that the reduce of salt contents in the range of 18-10% clearly shown that the fermentation process of soy sauce made of Pigeon Pea and Soy Bean by minimization of sodium chloride concentration used has no effects on the quality of moromi and soy sauce. The quality of soy sauce using 12% of sodium chloride was similar to control recipes.

ประกาศคุณูปการ

สารนิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในการให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือ สารเคมี และอุปกรณ์เครื่องแก้วที่เกี่ยวข้องในการทดลอง เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารนิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย ที่ปรึกษาสารนิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหาและข้อบกพร่องที่เกิดขึ้น รวมทั้งให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัย ท่านเป็นที่ปรึกษาสารนิพนธ์ที่ดีมาก ท่านได้เสียสละเวลาอันมีค่าของท่าน เพื่อมาให้คำแนะนำและคำปรึกษาแก่ผู้วิจัยอย่างสม่ำเสมอ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและเคารพรักในตัวท่าน

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรารัตน์ ศุภศิริ ในการเป็นประธานการสอบเค้าโครงสารนิพนธ์และกรรมการสอบปากเปล่าสารนิพนธ์ ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าของท่าน เพื่อให้คำแนะนำในการจัดทำสารนิพนธ์ทุกขั้นตอน ทำให้ผู้วิจัยนำไปเป็นแนวทางในการทำสารนิพนธ์ให้สมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณในฐานะที่ท่านเป็นที่ปรึกษานิสิตหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ซึ่งท่านได้ทำหน้าที่ได้ดีมากคอยให้คำแนะนำ ให้ความชัดเจนในทุกเรื่องที่ปรึกษา และให้ความช่วยเหลือผู้วิจัยและนิสิตตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สิริธร สโมสร ในการเป็นกรรมการสอบเค้าโครงสารนิพนธ์ ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าของท่าน เพื่อให้การสอบของผู้วิจัยผ่านไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ไฉ ประทุมฉาย ในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าสารนิพนธ์ และให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ ที่ท่านได้เสียสละเวลาอันมีค่าของท่าน เพื่อให้ผู้วิจัยจัดทำสารนิพนธ์ได้ครบถ้วนและสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้อบรมเลี้ยงดูและให้ความช่วยเหลือในการศึกษา รวมทั้งขอขอบคุณพี่ๆทุกคน ในหมวดวิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยศรีปทุม ที่คอยให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือให้สารนิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เพ็ญประภา สุวรรณะ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ขั้นตอนของการวิจัย.....	3
ตัวแปรที่ศึกษา.....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
วัตถุดิบ.....	6
กรรมวิธีในการผลิตซีอิ๊ว.....	8
คุณลักษณะของน้ำซีอิ๊วตามมาตรฐาน.....	12
เกลือ.....	13
กรดอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตซีอิ๊ว.....	15
จุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว.....	16
เอนไซม์ที่สำคัญในระหว่างการผลิตซีอิ๊ว.....	19
หลักการวิเคราะห์.....	23
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	27
ตอนที่ 1 การหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง.....	28
ตอนที่ 2 การเก็บตัวอย่าง.....	30
ตอนที่ 3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของการหมักซีอิ๊วถั่วมะแฮะ และถั่วเหลือง.....	30
การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในตัวอย่าง.....	30
การวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่าง.....	32

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือในตัวอย่าง.....	33
การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่าง.....	33
การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่าง.....	34
การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง.....	37
การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลในตัวอย่าง.....	38
4 ผลการทดลอง.....	40
ตอนที่ 1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์.....	40
ตอนที่ 2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์.....	44
ตอนที่ 3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเกลือ.....	46
ตอนที่ 4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์โปรติเอส.....	48
ตอนที่ 5 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณของเอนไซม์อะไมเลส.....	50
ตอนที่ 6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส.....	51
ตอนที่ 7 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล.....	53
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	55
สรุปผลการวิจัย.....	55
อภิปรายผลการวิจัย.....	57
ข้อเสนอแนะ.....	63
บรรณานุกรม.....	65
ภาคผนวก.....	73
ประวัติย่อผู้ทำสารนิพนธ์.....	125

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงสูตรต่างๆ ที่ใช้ในการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง.....	3
2 แสดงส่วนประกอบของถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมัน โดยประมาณ.....	7
3 มาตรฐานของผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วของกระทรวงอุตสาหกรรม.....	13
4 แสดงกรดอินทรีย์ที่มีในน้ำซีอิ๊ว.....	16
5 แสดงการเจือจางสารละลายตั้งต้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด.....	31
6 แสดงการเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น ของสารละลายมาตรฐานกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง.....	35
7 แสดงการเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น ของสารละลายเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐานกับปริมาณกลูโคส.....	36
8 ปริมาณกรดซิตริกในโมโรมิแต่ละสูตร.....	74
9 ปริมาณกรดแอสติกในโมโรมิแต่ละสูตร.....	74
10 ปริมาณกรดแลคติกในโมโรมิแต่ละสูตร.....	75
11 ปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำซีอิ๊วขาวแต่ละสูตร.....	75
12 ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในโมโรมิแต่ละสูตร.....	76
13 ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในน้ำซีอิ๊วขาวแต่ละสูตร.....	76
14 ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในโมโรมิแต่ละสูตร.....	77
15 ปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในโมโรมิแต่ละสูตร.....	77
16 ปริมาณกลูโคสในโมโรมิแต่ละสูตร.....	78
17 ปริมาณกลูโคสในน้ำซีอิ๊วขาวแต่ละสูตร.....	78
18 ปริมาณเอทานอลในโมโรมิแต่ละสูตร.....	79
19 แสดงปริมาณจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียในโมโรมิแต่ละสูตร.....	80
20 แสดงปริมาณจุลินทรีย์พวกราและยีสต์ในโมโรมิแต่ละสูตร.....	81

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงกระบวนการหมักซีอิ๊ว.....	29
2 ปริมาณกรดซิตริกในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน.....	41
3 ปริมาณกรดแอสิติกในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน.....	42
4 ปริมาณกรดแลคติกในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน.....	43
5 ปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำซีอิ๊วขาวแต่ละสูตร.....	44
6 ปริมาณแบคทีเรียในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน.....	45
7 ปริมาณราและยีสต์ในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน.....	46
8 ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน.....	47
9 ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในน้ำซีอิ๊วขาวแต่ละสูตร.....	48
10 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน.....	49
11 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน.....	51
12 ปริมาณกลูโคสในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน.....	52
13 ปริมาณกลูโคสในน้ำซีอิ๊วขาว.....	53
14 ปริมาณเอทานอลในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน.....	54
15 กราฟมาตรฐานของกรดซิตริก.....	83
16 กราฟมาตรฐานของกรดแอสิติก.....	83
17 กราฟมาตรฐานของกรดแลคติก.....	84
18 กราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส.....	84
19 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์อะไมเลส.....	85
20 กราฟมาตรฐานของไทโรซีน.....	85
21 กราฟมาตรฐานของกลูโคส.....	86
22 กราฟมาตรฐานของเอทานอล.....	86
23 โคโรมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสิติก และกรดซิตริกความเข้มข้น 0.125 g/L.....	87
24 โคโรมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสิติก และกรดซิตริกความเข้มข้น 0.250 g/L.....	87

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
25 โคโรมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสีติก และกรดซิตริกความเข้มข้น 0.500 g/L.....	88
26 โคโรมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสีติก และกรดซิตริกความเข้มข้น 1.000 g/L.....	88
27 โคโรมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสีติก และกรดซิตริกความเข้มข้น 1.500 g/L.....	89
28 โคโรมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสีติก และกรดซิตริกความเข้มข้น 2.000 g/L.....	89
29 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 1 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน.....	90
30 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 2 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน.....	90
31 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 3 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน.....	91
32 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 4 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน.....	91
33 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 5 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน.....	92
34 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 6 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน.....	92
35 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 1 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน.....	93
36 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 2 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน.....	93
37 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 3 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน.....	94
38 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 4 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน.....	94
39 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 5 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน.....	95
40 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 6 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน.....	95
41 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 1 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน.....	96
42 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 2 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน.....	96
43 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 3 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน.....	97
44 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 4 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน.....	97
45 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 5 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน.....	98
46 โคโรมาโทแกรมของซีอีวสูตร 6 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน.....	98

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

[illegible]

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
73 โครมาโทแกรมของชีอิ้วสูตร 3 ที่ระยะเวลาหมัก 90 วัน.....	112
74 โครมาโทแกรมของชีอิ้วสูตร 4 ที่ระยะเวลาหมัก 90 วัน.....	112
75 โครมาโทแกรมของชีอิ้วสูตร 5 ที่ระยะเวลาหมัก 90 วัน.....	113
76 โครมาโทแกรมของชีอิ้วสูตร 6 ที่ระยะเวลาหมัก 90 วัน.....	113
77 โครมาโทแกรมของน้ำชีอิ้วขาวสูตร 1.....	114
78 โครมาโทแกรมของน้ำชีอิ้วขาวสูตร 2.....	114
79 โครมาโทแกรมของน้ำชีอิ้วขาวสูตร 3.....	115
80 โครมาโทแกรมของน้ำชีอิ้วขาวสูตร 4.....	115
81 โครมาโทแกรมของน้ำชีอิ้วขาวสูตร 5.....	116
82 โครมาโทแกรมของน้ำชีอิ้วขาวสูตร 6.....	116

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ซีอิ๊วเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นที่นิยมในแถบเอเชีย โดยมีต้นกำเนิดในประเทศจีนมานานกว่าสามพันปี (Groff. 1919) โดยอาศัยกรรมวิธีการหมักที่ประกอบด้วยถั่วเหลือง ข้าวสาลี หรือข้าวเจ้า เกลือ และน้ำ ต่อมาได้แพร่หลายเข้าสู่ประเทศต่างๆ เช่น ญี่ปุ่น ไทย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย สหรัฐอเมริกา (Hesseltine. 1965) และทั่วทุกประเทศในโลก โดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่น ได้ผลิตน้ำซีอิ๊ว ในปี ค.ศ. 1598 เป็นที่รู้จักในนามของโชยุ (shoyu) และมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับซีอิ๊วมากกว่าประเทศอื่นๆ ประมาณกันว่าในปี ค.ศ. 1977 ญี่ปุ่นผลิตซีอิ๊วได้สูงถึง 1,200 ล้านลิตร หรือเทียบได้กับ 10 ลิตรต่อคนต่อปี จากการแพร่หลายของการผลิตซีอิ๊วทำให้ซีอิ๊วในแต่ละท้องถิ่น แต่ละประเทศ มีชื่อเรียกต่างกันไป ไม่ว่าจะเป็น โชยุ เจียงอิ๊ว เป็นต้น นอกจากนี้รสชาติของซีอิ๊วแตกต่างกัน เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตและกรรมวิธีในการผลิตแตกต่างกัน (Onichi; &Blenford. 1981)

สำหรับในประเทศไทยซีอิ๊วจัดเป็นเครื่องปรุงรสที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภค เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นคล้ายน้ำปลา นิยมใช้เป็นเครื่องจิ้ม หรือเครื่องปรุงรสอาหารคาวได้เกือบทุกชนิด มีรสชาติหลักคือเค็ม ลักษณะอีกประการหนึ่งคือมีกลิ่นและรสเฉพาะตัว จึงทำให้ผู้บริโภคมีความพึงพอใจ รวมทั้งเป็นเครื่องปรุงรสที่ให้อาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น กรดอะมิโนชนิดต่างๆ สารอาหารจะได้จากถั่วเหลืองที่เป็นส่วนประกอบของซีอิ๊ว ซีอิ๊วถือได้ว่ามีความนิยมเป็นอันดับหนึ่งในกลุ่มของผู้บริโภคอาหารมังสวิรัต เพราะเป็นเครื่องปรุงรสที่สามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำปลาได้ และประยุกต์ใช้ได้กับอาหารประเภทต่างๆ ได้หลายชนิด

จากการศึกษาพบว่า ซีอิ๊วที่หมักโดยวัตถุดิบและกรรมวิธีที่ต่างกันทำให้กลิ่นรสของซีอิ๊วแตกต่างกัน โดยปกติแล้วถั่วเหลืองจะถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตซีอิ๊ว การใช้พืชอื่นๆ มาเป็นวัตถุดิบมีรายงานเช่น ในปี ค.ศ. 1967 Lebumfacil-davide ใช้ข้าวโพดและข้าวฟ่างมาผสมกับถั่วเหลืองในการผลิตซีอิ๊ว แต่ได้ซีอิ๊วที่มีกลิ่นรสไม่ดี ในปี ค.ศ. 1979 Nakamura และคณะ ได้ศึกษาการผลิตซีอิ๊วจากถั่ว สามารถผลิตซีอิ๊วได้ ซีอิ๊วที่ได้มีกลิ่นรสดี สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการนำเมล็ดถั่วพุดมาหมักซีอิ๊วพบว่า คุณภาพของน้ำซีอิ๊วที่ได้มีความคล้ายคลึงกับน้ำซีอิ๊วที่หมักจากถั่วเหลือง เมื่อเปรียบเทียบกับข้อกำหนดในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมซีอิ๊ว ของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พบว่าน้ำซีอิ๊วที่หมักด้วยเมล็ดถั่วพุดมีคุณลักษณะทางเคมีหลายประการอยู่ในเกณฑ์ของน้ำซีอิ๊วขาวชั้นที่หนึ่ง ยกเว้นแต่ปริมาณโปรตีนและ pH ที่ต่ำกว่าข้อกำหนด (สิทธิสิน บวรสมบัติ. 2524) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตซีอิ๊วจากถั่วเขียว ซีอิ๊วที่ได้มีกลิ่นหอม มีสีน้ำตาลแดงเกือบดำ มี

คุณภาพเยี่ยม และมีโปรตีนสูงถึง 9 เปอร์เซ็นต์ (ศรีชัย สิงห์เชนทร์; และคนอื่นๆ. 2534) วัตถุดิบที่น่าสนใจอีกประเภทหนึ่งคือถั่วมะแฮะที่จะนำมาใช้ในการผลิตชีอิ้ว ถั่วมะแฮะเป็นพืชตระกูลถั่วชนิดหนึ่งที่ปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากข้อมูลที่ค้นคว้าส่วนใหญ่ถั่วมะแฮะถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรม โดยนำไปเป็นอาหารเสริมโปรตีนให้แก่หมู ไก่ และสัตว์ปีก นอกจากนี้พบว่ามีการนำถั่วมะแฮะไปผลิตเป็นอาหาร เช่น การทำคุกกี้ ซึ่งนำถั่วมะแฮะมาผสมกับถั่วเขียว (สมชาย ประภาวัต. 2541) และจากการศึกษาส่วนประกอบของถั่วมะแฮะเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองมีส่วนประกอบใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงจะนำถั่วมะแฮะมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตชีอิ้ว เพื่อให้ได้ชีอิ้วที่มีกลิ่นรสอีกแบบหนึ่ง และเป็นแนวทางหนึ่งในการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากถั่วมะแฮะ นอกจากนี้จากการศึกษารวบรวมรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าถั่วมะแฮะผสมกับถั่วเหลืองสามารถนำมาใช้ในการผลิตชีอิ้วได้ (ภคธิดา อุปจักร. 2550) จากความสำคัญและเหตุผลที่กล่าวมา การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตชีอิ้วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง และเป็นแรงจูงใจให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของการผลิตชีอิ้วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองที่มีปริมาณเกลือที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงและพัฒนาการแปรรูปผลิตภัณฑ์ถั่วมะแฮะที่เป็นพืชในท้องถิ่น ให้เป็นผลิตภัณฑ์ชีอิ้วที่จะพัฒนาต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์ “หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์” หรือ “OTOP” และพัฒนาคุณภาพชีอิ้วให้เทียบเท่ากับผลิตภัณฑ์ชีอิ้วของมาตรฐานอุตสาหกรรม

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของปริมาณเกลือที่เหมาะสมและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างกระบวนการหมักชีอิ้วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง
2. เพื่อศึกษาการหมักชีอิ้วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักชีอิ้วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 20

ความสำคัญของงานวิจัย

1. เป็นแนวทางในการแปรรูปผลิตภัณฑ์ถั่วมะแฮะในท้องถิ่น
2. เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตชีอิ้วถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองให้เป็นผลิตภัณฑ์ OTOP ของท้องถิ่น
3. เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตชีอิ้วที่ใช้วัตถุดิบชนิดอื่น

ขอบเขตของการวิจัย

ถั่วมะแฮะที่ทำการวิจัยเป็นถั่วมะแฮะจาก อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน ถั่วเหลืองเป็นถั่วเหลือง คัดพันธุ์ ตราไร้ทิพย์ ของบริษัท ไร่บุญโญ จำกัด

ตัวอย่างซีอิ๊วที่ทำการวิจัยเป็นตัวอย่างซีอิ๊วที่หมักจากถั่วมะแฮะ 6 ส่วนผสมกับถั่วเหลือง 4 ส่วน ในปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 20, 18, 16, 14, 12 และ 10 ซึ่งหมักเป็นระยะเวลา 3 เดือน

ขั้นตอนของการวิจัย

1. ศึกษาค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับถั่วมะแฮะและกระบวนการผลิตซีอิ๊ว รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของการหมักซีอิ๊ว

2. วางแผนการทดลอง

2.1 ศึกษาส่วนประกอบและการเตรียมวัตถุดิบในการหมักซีอิ๊ว

2.2 ศึกษากระบวนการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน

2.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างกระบวนการหมักซีอิ๊ว

3. การทดลอง

3.1 ทำการทดลองหมักซีอิ๊วโดยใช้กลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือกลุ่มตัวอย่างควบคุม 1 กลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่างซีอิ๊วที่หมักด้วยถั่วมะแฮะ 6 ส่วน ผสมกับถั่วเหลือง 4 ส่วน ในปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นสูตร 1 อีกหากกลุ่มตัวอย่างคือตัวอย่างที่ทดลอง ได้แก่ซีอิ๊วที่หมักด้วยถั่วมะแฮะ 6 ส่วนผสมกับถั่วเหลือง 4 ส่วน แต่ละกลุ่มตัวอย่างจะหมักในปริมาณเกลือที่แตกต่างกันดังนี้

ตาราง 1 แสดงสูตรต่างๆ ที่ใช้ในการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

สูตร	ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
1 (ควบคุม)	20
2	18
3	16
4	14
5	12
6	10

3.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของโมโรมิในการผลิตซีอิ๊ว

ส่วนผสมหมักแต่ละสูตรเก็บตัวอย่างเป็นระยะเวลาที่ 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วันตลอดการหมักในช่วงของโมโรมิเป็นเวลา 3 เดือน เพื่อนำไปวิเคราะห์ ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณเกลือ (ในรูปโซเดียมคลอไรด์) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณเอนไซม์อะไมเลสและโปรติเอส

3.3 การผลิตน้ำซีอิ๊ว

เมื่อครบกำหนดการหมักโมโรมิ ส่วนผสมหมักโมโรมิแต่ละสูตรจะถูกนำมากรองเอากาก ถั่วที่เหลือออกได้น้ำซีอิ๊ว ซึ่งเรียกว่าน้ำซีอิ๊วดิบ นำน้ำซีอิ๊วดิบไปพาสเจอร์ไรส์ได้เป็นน้ำซีอิ๊วขาว แล้วเก็บ ตัวอย่างน้ำซีอิ๊วขาวในขวดแก้ว ทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ เกลือ และจุลินทรีย์ทั้งหมดอีกครั้ง

4. วิเคราะห์ผลการทดลองของตัวอย่างซีอิ๊วตามองค์ประกอบที่กล่าวมาแล้วในขั้นตอนการทดลอง
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง
6. รายงานผลการทดลอง

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรต้นคือปริมาณเกลือที่ใช้ในการหมักซีอิ๊วถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง
2. ตัวแปรตามคือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในการหมักซีอิ๊วถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง
3. ตัวแปรควบคุม คือซีอิ๊วที่หมักโดยใช้ถั่วมะแฮะ 6 ส่วนผสมกับถั่วเหลือง 4 ส่วน ระยะเวลาในการหมักซีอิ๊วเป็นระยะเวลา 3 เดือน ตั้งแต่เดือนกันยายน – พฤศจิกายน พ.ศ. 2550

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. น้ำซีอิ๊ว หมายถึง ผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง ด้วยการหมัก แล้วนำไปผ่านการพาสเจอร์ไรส์
2. กระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง หมายถึง การนำถั่วมะแฮะ 6 ส่วน ผสมกับถั่วเหลือง 4 ส่วน และแบ่งสาลิ จากนั้นคลุกด้วยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนำไปหมักต่อในน้ำเกลือเป็นระยะเวลาสามเดือน
3. โคจิ (Koji) หมายถึง การเลี้ยงเชื้อในส่วนประกอบของถั่วมะแฮะ 6 ส่วน ผสมกับถั่วเหลือง 4 ส่วน และแบ่งสาลิ และนำเชื้อรา *A. oryzae* มาคลุกผสม แล้วแผ่กระจายส่วนผสมดังกล่าวไว้ในกระด้งคลุมด้วยผ้าขาวบาง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25-30°C นาน 3 วัน จะมีสปอร์เป็นสีเหลืองแกมเขียวคลุมเมล็ดถั่ว ซึ่งเรียกว่า ลูกแป้ง

4. โมโรมิ (Moromi) หมายถึง การนำลูกแป้งหรือโคจิที่ได้ไปหมักในน้ำเกลือในไหดินเคลือบ แล้วปิดฝาภาชนะเพื่อป้องกันแมลง ฝุ่นละออง และน้ำฝน นำไปตากแดดโดยการเปิดฝาเพื่อเร่งปฏิกิริยาระหว่างการหมัก สัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง มีการคนเป็นครั้งคราวและตั้งหมักไว้เป็นระยะเวลาสามเดือน

5. น้ำซีอิ๊วดิบ หมายถึง น้ำซีอิ๊วที่แยกได้จากโมโรมิ โดยการกรองก่อนที่จะนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ $80-85^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที

6. น้ำซีอิ๊วขาว หมายถึง น้ำซีอิ๊วที่แยกได้จากโมโรมิ โดยการกรองแล้วนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ $80-85^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในน้ำแข็ง แล้วเก็บน้ำซีอิ๊วขาวที่ได้ในขวดแก้ว

7. การเปลี่ยนแปลงทางเคมี หมายถึง การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ได้แก่กรดซิตริก กรดแอสติก และกรดแลคติก ปริมาณเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณเอนไซม์โปรติเอส ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณกลูโคส และปริมาณเอทานอล ในช่วงการหมักของโมโรมิและน้ำซีอิ๊วขาว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยเรื่อง การศึกษาปริมาณเกลือที่มีผลต่อกระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องโดยมีเนื้อหาสาระเกี่ยวกับ วัตถุประสงค์ กรรมวิธีการผลิตซีอิ๊ว คุณลักษณะของน้ำซีอิ๊วตามมาตรฐาน เกลือ จุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว กรดอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตซีอิ๊ว เอนไซม์ที่สำคัญในระหว่างการหมักซีอิ๊วและหลักการวิเคราะห์

วัตถุดิบ

ถั่วเหลือง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L) Merrill ชื่อสามัญมักเรียกกันไปต่างๆ เช่น Soja bean, Soya bean, Chinese bean, Manchurian bean และ Soybean ซึ่งชื่อ Soybean เป็นที่รู้จักและยอมรับกันมากที่สุด เป็นพืชอยู่ในตระกูล Leguminosae subfamily papilionoidear มีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่ตั้งแต่เอเชียตะวันออกเฉียงและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก ไปจนถึงทวีปออสเตรเลีย

ถั่วเหลืองเป็นพืชล้มลุก มีอายุเพียงฤดูเดียว ชอบอากาศค่อนข้างร้อน มีลักษณะเป็นพุ่มตรง มีใบมาก สูงประมาณ 45-120 เซนติเมตร สามารถเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุประมาณ 75-120 วัน เกือบทุกพันธุ์จะมีแกนลำต้นอย่างชัดเจน และมีกิ่งแตกแขนงออกมา บริเวณข้อด้านล่างเมื่อมีระยะปลูกที่ห่างหลายพันธุ์จะแสดงลักษณะการออกดอกที่สั้นสุดในช่วงเวลาอันสั้น ใบสองใบแรกเป็นใบเดี่ยว และใบหลังๆเป็นใบแบบสามแฉก ใบย่อยอาจมีรูปร่างและขนาดต่างกันแล้วแต่พันธุ์ เมื่อถึงระยะแก่เต็มที่ใบเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง และร่วงก่อนที่ฝักจะแก่เต็มที่ พืชทั้งต้นจะปกคลุมด้วยขนค่อนข้างแข็ง สีเทาดอกจะมีสีขาวหรือม่วง มีก้านดอกสั้นงอกออกมาตามข้อของลำต้น ลักษณะฝักจะเล็กตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย มีสีตั้งแต่สีฟางแห้ง เทา น้ำตาล หรือเกือบดำ ในหนึ่งฝักจะมีเมล็ดประมาณ 1-4 เมล็ด ลักษณะเมล็ดกลมหรือกลมรี พันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้ามักมีเมล็ดสีเหลือง แต่พันธุ์อื่นๆ อาจมีสีเขียวอมเหลือง เขียว น้ำตาล หรือดำ เปลือกของเมล็ดที่มีสีอาจจะมีจุดน้ำตาลหรือดำปนอยู่ ลักษณะจุดบนเมล็ดอาจเกิดจากพันธุกรรมหรือสภาพแวดล้อมก็ได้ แต่ไม่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ด

การใช้ประโยชน์ของถั่วเหลืองพบว่า ฝักถั่วเหลืองที่ยังไม่โตเต็มที่ เป็นอาหารชั้นดีเทียบกับเมล็ดถั่วลิ้นเต่า คาวปิ่น (cowbean) บรอดปิ่น (broad bean) และถั่วอื่นๆ จะไม่มีปัญหาเรื่องสารพิษเมื่อบริโภคถั่วเหลืองในระยะที่ไม่แก่จัด ถั่วเหลืองถูกนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันสลัด เนยเทียม แป้งถั่วเหลือง หรือถั่วนำไปผสมกับแป้งสาลีประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ จะนำไปผลิตเป็นขนมปังต่างๆได้ หลายชนิด ดีกว่าการใช้แป้งข้าวสาลีเพียงอย่างเดียว ถั่วเหลืองเป็นอาหารโปรตีนหลักประเภทหนึ่ง จากตาราง 2 แสดงองค์ประกอบต่างๆของเมล็ดถั่วเหลืองพบว่า มีโปรตีนสูง

กว่าพืชอาหารถั่วอื่นๆ ซึ่งมีโปรตีนอยู่เพียง 20-25 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับกากถั่วเหลืองซึ่งมีโปรตีนถึง 44 เปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนได้อย่างดีเยี่ยม นอกจากนี้กากถั่วเหลืองยังมีแร่ธาตุต่างๆ สูง เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และยังมีวิตามินไทอะมิน ไรโบฟลาวิน และไนอะซิน สูงอีกด้วย แต่ก็เช่นเดียวกับพืชอาหารถั่วอื่นๆ โปรตีนของถั่วจะมีกรดอะมิโน พวกลิวซีน โพรลีน และซิสเทอีนต่ำ แต่กรดอะมิโนทั้งสองตัวนี้มีอยู่อย่างเพียงพอในถั่วพืช โปรตีนจากถั่วเหลืองยังอาจใช้เป็นอาหารเสริมแทนโปรตีนที่ได้จากสัตว์เช่นเนื้อ นม ไข่ ปลา เป็นต้น ซึ่งปกติราคาจะแพงกว่า

ตาราง 2 แสดงส่วนประกอบของถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองจากการสกัดน้ำมันโดยประมาณ

	โปรตีน	น้ำมัน	คาร์โบไฮเดรต	เถ้า%
	%	%	%	
เมล็ดถั่วเหลือง	39	18	25	4.8
กากถั่วเหลือง	44	0.5	33	6.0

ที่มา: กลุ่มงานเศรษฐกิจ กองนโยบายและแผน. (2542). *การศึกษาพืชเศรษฐกิจถั่วเหลือง* หน้า 32

ถั่วมะแฮะ เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cajanus canga* (L) Millsp. มีชื่อสามัญว่า Pigeon Pea อยู่ในวงศ์ Leguminosae มีชื่ออื่นๆว่า Kadios เป็นพืชตระกูลถั่ว มีลักษณะต้นเป็นพุ่ม มีความสูงตั้งแต่ 2-12 ฟุต ลักษณะใบเป็นใบประกอบ มีใบย่อยสามใบ รูปกว้างใบคล้ายหอก ปลายใบแหลม และขอบใบเรียบ มีขนละเอียดหนาแน่นใต้ใบ ดอกมีสีเหลืองหรือเหลืองส้ม ฝักส่วนใหญ่มีลักษณะตั้งตรงมีความยาวตั้งแต่ 5.5-10.0 เซนติเมตร กว้าง 0.6-0.9 เซนติเมตร มีสีเขียว สีเขียวลาย สีน้ำตาลหรือสีม่วงและดำ หรือสีดอามม่วง เมล็ดมีลักษณะกลม รูปไข่ รูปไต หรือค่อนข้างเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีขาว ขาวหม่น น้ำตาลอ่อน น้ำตาลแก่ น้ำตาลจุดดำ และดอามชมพู เมล็ดถั่วมะแฮะไม่มีการพักตัว จึงสามารถปลูกได้โดยทั่วไปในประเทศเขตร้อน ตลอดจนสามารถเจริญเติบโตได้ในดินแทบทุกชนิด แม้กระทั่งดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ทนทานต่อความแห้งแล้งได้ดี แต่ไม่ทนต่อสภาพน้ำแช่ขัง และดินที่มีความเป็นกรด-เบสระหว่าง 4.5-8 นอกจากนี้ยังมีระบบรากแก้ว และรากแขนงจำนวนมากและหยั่งลึกสามารถดูดฟอสฟอรัสได้ดี จึงทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุฟอสฟอรัสจากดินชั้นล่างสู่ผิวดิน โดยทั่วไปถั่วมะแฮะมักปลูกในลักษณะพืชไร่ เพื่อเก็บเมล็ดมากกว่าจะใช้ประโยชน์อย่างอื่น สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทยคิดเป็นเนื้อที่การเพาะปลูกดังนี้ ภาคกลาง 791 ไร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2,104 ไร่ ภาคเหนือ 874 ไร่ และภาคใต้ 148 ไร่ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2546) การใช้ประโยชน์ของถั่วมะแฮะ ฝักอ่อนสามารถลวกจิ้มกับน้ำพริก

รับประทานได้ ใบของถั่วมะแฮ่นนำมาใช้เป็นปุ๋ยบำรุงดินได้เป็นอย่างดี จึงนิยมปลูกเป็นพืชแซมร่วมกับพืชชนิดอื่น เช่น ถั่วลิสง ถั่วพีช ใช้เป็นพืชร่มเงาให้กับพืชยืนต้นชนิดอื่น เช่น ไม้ผล ชา กาแฟ โกโก้ และกระถิน นอกจากนั้นใช้เป็นอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มโปรตีนในอาหารสัตว์ และลำต้นใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงได้ ถั่วมะแฮ่นมีสารสำคัญต่างๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต 61.86 - 65.81 %, โปรตีน 21.44 - 23.64 % และไขมัน 1.60 - 2.47 % (Raniah; & Satyanaragana. 1938) จะเห็นว่าเมื่อเทียบปริมาณโปรตีนกับถั่วเหลืองจะมีปริมาณน้อยกว่าประมาณ 50 % เมื่อเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตจัดว่าเป็นถั่วที่มีแป้งมากกว่าถั่วเหลือง

กรรมวิธีการผลิตซีอิ๊ว

การผลิตน้ำซีอิ๊วของโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศไทยทั่วไป (สถาบันวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. 2527) ใช้วัตถุดิบหลักในการผลิตคือ ถั่วเหลืองทั้งเมล็ด แป้งข้าวสาลี หรือแป้งข้าวเจ้า เกลือ และน้ำ การผลิตน้ำซีอิ๊วแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. การเตรียมโคจิ
2. การหมักโมโรมิ
3. การทำน้ำซีอิ๊ว

กรรมวิธีการผลิตซีอิ๊วประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. การเตรียมโคจิ

ในขั้นตอนการผลิตน้ำซีอิ๊วในช่วงแรกเป็นการเตรียมถั่วเหลือง โดยการนำถั่วเหลืองมาล้างให้สะอาด คัดเลือกเอาส่วนที่ไม่ต้องการออกไป จากนั้นนำไปแช่น้ำเพื่อให้ถั่วเหลืองนึ่ม ซึ่งอาจแช่ไว้ค้างคืน หรือ 2-3 ชั่วโมงก็ได้ เมื่อถั่วเหลืองนึ่มแล้วจึงนำไปต้มหรือนึ่งให้สุกโดยใช้หม้อนึ่งความดัน ซึ่งการนึ่งอาจใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง นำถั่วเหลืองนึ่งมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำและปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง นอกจากจะใช้ถั่วเหลืองทั้งเมล็ดเป็นวัตถุดิบ ยังอาจใช้กากถั่วเหลืองจากโรงงานสกัดน้ำมันพืช แต่น้ำซีอิ๊วที่ได้จะมีกลิ่นด้อยกว่า และจากการศึกษาวัตถุดิบชนิดอื่นที่น่าจะนำมาผลิตซีอิ๊วได้คือ ถั่วมะแฮ่น ซึ่งในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการผลิตซีอิ๊วโดยใช้วัตถุดิบเป็นถั่วมะแฮ่นผสมกับถั่วเหลืองสำหรับขั้นตอนต่อไปของการเตรียมโคจิโดยการนำถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งเรียบร้อยแล้วมาคลุกกับแป้งโรงงานผลิตน้ำซีอิ๊วทั่วไปในสมัยก่อนจะใช้แป้งข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบ ต่อมาในระยะหลังได้พยายามลดต้นทุนการผลิตจึงมีผู้นำแป้งข้าวเจ้ามาใช้ เนื่องจากราคาถูกและหาได้ง่ายกว่า อีกทั้งคุณภาพของน้ำซีอิ๊วก็ไม่แตกต่างกันมาก บางโรงงานนำข้าวเจ้าทั้งเมล็ดมานึ่งให้สุกก่อน แล้วจึงผสมกับถั่วเหลือง บางโรงงานใช้แป้งข้าวเหนียว ลักษณะการคลุกแป้งกับถั่วเหลือง อาจนำแป้งมาคลุกกับถั่วเหลืองนึ่งโดยตรง หรือนำแป้งมาคั่วให้หอมก่อนแล้วจึงนำมาคลุกกับถั่วเหลืองนึ่ง อัตราส่วนระหว่างแป้งกับถั่ว

เหลืองส่วนใหญ่จะเป็น 1 ต่อ 1 เมื่อถั่วเหลืองและแป้งถูกนำมาคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วขั้นตอนต่อไปจะนำไปเลี้ยงเชื้อ (พันธัณรงค์ จันทรแสงศรี. 2539: 7)

จุดประสงค์ของการใช้แป้งเป็นส่วนผสมในการผลิตน้ำซีอิ๊วคือ

(1) เพื่อให้จุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อราเจริญเติบโตได้แล้วสร้างสารที่ระเหยได้ออกมา เช่น กรดวานิลลิก (vanillic) กรดเฟอร์ริก (ferulic) เป็นต้น

(2) ลดความชื้นที่มีอยู่ในถั่วเหลืองให้ลงมาอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

(3) เพิ่มความสมบูรณ์ของสารอาหารซึ่งจุลินทรีย์ต้องใช้สำหรับเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยโปรตีนในถั่วเหลือง

เมื่อนำแป้งคลุกกับถั่วเหลืองนึ่งแล้วต่อไปจะนำเชื้อจุลินทรีย์มาคลุกกับส่วนผสมดังกล่าวซึ่งเป็นขั้นตอนของการเลี้ยงเชื้อ เชื้อที่ใช้ในการทำซีอิ๊วในขั้นตอนนี้จะเป็นเชื้อรา *A. oryzae* หรือ *Aspergillus sojae* เชื้อราจะเจริญเติบโตบนแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลือง เชื้อราประเภทนี้จะสร้างเอนไซม์มาหลายชนิดเช่น อะไมเลสทำหน้าที่ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล โปรติเอสทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลืองให้เป็นกรดอะมิโน เชื้อราที่เจริญบนแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลืองนี้จะสร้างเส้นใยติดกันเป็นแผ่น ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อราควรจะพอเหมาะคือ ระยะเวลาก่อนเชื้อราสร้างสปอร์ ซึ่งเป็นระยะที่เอนไซม์ถูกสร้างขึ้นมากที่สุด โดยสามารถสังเกตว่ามีสีเหลืองแกมเขียวและสีเทาขึ้นปกคลุมบนแผ่นลูกแป้งกับถั่วเหลืองไม่ควรมีราสีดำปะปน ในระยะการเลี้ยงเชื้อนี้จำเป็นต้องระวังมัดระวังไม่ให้เชื้อราชนิดอื่นปนเปื้อนมาเจริญบนแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลือง ซึ่งได้แก่ เชื้อราประเภท *mucoraceous* รวมทั้ง *penicillium* และ *Aspergilli* เชื้อราพวกนี้มักสร้างสารพิษที่เรียกว่า ไมโคทอกซิน (mycotoxins) ปะปนลงไปในการน้ำซีอิ๊วได้ สำหรับโรงงานผลิตน้ำซีอิ๊วจะมีโรงบ่มเชื้อ ซึ่งเป็นโรงเรือนเล็กๆ ใต้โดยเฉพาะและมีการควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆด้วย โดยนำถั่วเหลืองนึ่งที่คลุกกับแป้งแล้วนำมาเกลี่ยลงบนกระด้งไม้ไผ่ให้มีความหนาประมาณ 1-1.5 นิ้ว แล้วนำไปเรียงบนชั้นภายในโรงบ่มเชื้อ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-7 วัน ระหว่างนี้จะมีความร้อนเกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเชื้อรา จึงควรพลิกกลับแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลือง 2-3 ครั้ง เพื่อระบายความร้อนออกไปบ้าง

2. การหมักโมโรมิ

ลูกแป้งและถั่วเหลืองที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อจนได้ที่แล้ว จะมีลักษณะเป็นแผ่นพอสมควร นำไปเรียงในโถงขนาดใหญ่ ประมาณ 3 ใน 4 ของโถงหรือเกือบเต็มโถง จากนั้นเติมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 17-20 ลงไปในโถง โดยมีอัตราส่วนระหว่างแผ่นลูกแป้งและถั่วเหลือง กับน้ำเกลือเป็น 1 ต่อ 1 หรือ 1 ต่อ 2 แล้วปิดฝาโถงเพื่อป้องกันแมลงและน้ำฝนเข้าไป นำโถงดังกล่าวไปตั้งกลางแจ้งเพื่อให้เกิด

กระบวนการหมัก ถ้าเป็นฤดูร้อนจะใช้เวลา 6-8 เดือนจึงจะได้ที่ แต่ถ้าเป็นฤดูฝนหรือฤดูหนาวจะใช้เวลานานขึ้นเป็น 8-12 เดือน ระหว่างการหมักโมโรมิเปิดฝาโถเพื่อควนบ้างเป็นบางครั้ง

3. การทำน้ำซีอิ๊ว

เมื่อกระบวนการหมักที่สมบูรณ์เสร็จสิ้นลงจะได้น้ำซีอิ๊วที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลปนแดง มีกลิ่นหอม น้ำซีอิ๊วจะถูกนำมาต้มฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 65-80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปกรองเพื่อกำจัดตะกอนไปก่อนบรรจุขวดเพื่อจำหน่าย น้ำซีอิ๊วที่ได้นี้จะมีอายุการเก็บรักษานาน สำหรับเนื้อถั่วซึ่งแยกน้ำซีอิ๊วที่เรียกว่า ซีอิ๊วน้ำ 1 ออกไปจะเติมน้ำเกลือลงไปแล้วหมักต่อไปอีกระยะหนึ่งเพื่อให้ได้ ซีอิ๊วน้ำ 2 และ น้ำ 3 ต่อไปจนกระทั่งน้ำซีอิ๊วที่ได้มีกลิ่นรสจางลง จึงนำเนื้อถั่วเหลือนั้นมาปรุงแต่งกลิ่นรสด้วยเครื่องปรุงแต่งรสต่างๆ ผลิตเป็นเต้าเจี้ยวบรรจุขวดจำหน่ายต่อไป ผู้ผลิตในประเทศญี่ปุ่นส่วนใหญ่เก็บเกี่ยวน้ำซีอิ๊วโดยกดให้ไหลออกมาจากส่วนผสมที่ถูกหมักแล้วเหลือกากแข็งเก็บแห้งไว้ แต่ผู้ผลิตบางวิธีคูดของเหลวออกจากส่วนผสมที่ถูกหมัก จากนั้นเติมน้ำเกลือในปริมาณเท่ากับของเหลวส่วนที่คูดออก ปล่อยให้ทิ้งไว้หลายวัน แล้วจึงคูดของเหลวออกอีก ทำเช่นนี้อีก 5 ครั้ง ภายหลังผสมของเหลวที่คูดออกมาครั้งที่สองจะได้น้ำซีอิ๊วคุณภาพชั้นที่ 1 ของเหลวที่คูดได้ครั้งต่อมาจะถูกผสมกับกากน้ำตาลและ/หรือคาราเมล เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ประกอบอาหารประเภทอื่น (Wood. 1982)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตซีอิ๊วมีหลายประการ ได้แก่

1. แสงแดดและอุณหภูมิ เป็นสิ่งที่มีผลต่อการผลิตซีอิ๊วเป็นอย่างมาก แสงแดดจะช่วยเร่งปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายใต้การหมักนั้นให้เกิดขึ้นตามที่ต้องการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตซีอิ๊วแบบเก่าแสงแดดจะเป็นปัจจัยที่ควบคุมการผลิตซีอิ๊วที่สำคัญมาก เนื่องจากในขั้นตอนของการหมักในน้ำเกลือต้องตากแดดเป็นเวลานาน ในธรรมชาติแสงแดดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอุณหภูมิ เมื่อแสงแดดมีมาก อุณหภูมิจะสูงขึ้น ในสภาพเช่นนี้การหมักซีอิ๊วจะใช้เวลานั้นกว่าเมื่อแสงแดดอ่อน ดังนั้นอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยที่เร่งปฏิกิริยาเคมีด้วยเช่นกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในแต่ละช่วงจะช่วยให้ได้ผลผลิตที่ดีใช้เวลาน้อยลงได้ ในขั้นที่เป็นโคจิ อุณหภูมิมีผลต่อการผลิตเอนไซม์อย่างมาก แต่ก่อนนิยมบ่มโคจิที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เพื่อให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด (Yokotsuka. T. 1971)

2. เวลา เป็นปัจจัยที่สำคัญไม่ว่าจะผลิตซีอิ๊วอย่างไร เวลาที่มีผลต่อคุณภาพทั้งนี้เพราะการเร่งปฏิกิริยา เพื่อลดช่วงเวลาของการหมักให้สั้นลงนั้น ปฏิกิริยาบางขั้นตอนเกิดไม่สมบูรณ์ หรือผิดไปจากเดิม ซึ่งมีผลต่อคุณภาพโดยตรง

3. ขนาดของภาชนะที่ใช้ในการหมัก จะมีผลโดยตรงต่อคุณภาพของซีอิ๊วเพราะว่า ขนาดของภาชนะที่ต่างกันทำให้การส่งผ่านความร้อน พื้นที่ผิวและอัตราการระเหยของน้ำระหว่างการหมักต่างกัน ซึ่งมีผลให้การเจริญของจุลินทรีย์ในส่วนต่างๆของภาชนะเกิดขึ้นต่างกัน และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ต่างกัน ผลลัพธ์คือคุณภาพของน้ำซีอิ๊วต่างกัน (ไพบูลย์ สุเมธอักษร. 2521: 10-11)

จากกระบวนการหมักซีอิ๊วที่กล่าวมานั้นพบว่าถั่วเหลืองใช้เป็นวัตถุดิบหลักในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว จากรายงานการวิจัยที่ศึกษาพบว่าถั่วอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจนำมาผลิตซีอิ๊วได้คือ ถั่วพุด ซึ่งทำการศึกษาโดยสิทธิสิน บวรสมบัติ (2524: บทคัดย่อ) ได้ทำการทดลองใช้เมล็ดถั่วพุดในการหมักซีอิ๊ว พบว่าเปลือกของเมล็ดถั่วพุดเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คุณภาพซีอิ๊วไม่ดี จึงต้องทำการแยกเอาเปลือกออกโดยการต้มเมล็ดถั่วพุดในน้ำเดือดนานประมาณ 25 นาที แล้วนำเข้าเครื่องโม่เพื่อฉีกเอาเปลือกออก เมล็ดถั่วพุดที่ได้ถูกทำให้สุกด้วยการนึ่งในหม้อหนึ่งความดัน โดยใช้ความดันไอน้ำ 10-13 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 25-30 นาที เมื่อทำเป็นโคจิโดยการปลูกเชื้อรา *A. oryzae* ลงไป วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจะสูงสุดเมื่อโคจิมีอายุ 3 วัน ในขณะที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะสูงสุดเมื่อโคจิอายุ 4 วัน และคุณลักษณะของน้ำซีอิ๊วทุกตัวอย่างที่หมักได้เมื่อเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมซีอิ๊วพบว่า คุณลักษณะหลายประการอยู่ในข้อกำหนดสำหรับน้ำซีอิ๊วขาวชั้นที่หนึ่ง ยกเว้นแต่ปริมาณโปรตีนที่มีค่าต่ำกว่ากำหนดคือประมาณ 1.35-1.97 เปอร์เซ็นต์ และค่า pH ที่ต่ำกว่าข้อกำหนดเล็กน้อย จึงไม่อาจจัดเป็นซีอิ๊วขาวชั้นที่หนึ่งได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมล็ดถั่วพุดมีแนวโน้มที่จะนำมาหมักซีอิ๊วได้เช่นเดียวกับถั่วเหลือง

จากการศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง (ภคธีรา อุปจักร์, 2550: บทคัดย่อ) โดยทำการหมักระหว่างถั่วมะแฮะกับถั่วเหลืองในอัตราส่วนต่างๆ เป็น 5 สูตรดังนี้ แต่ละสูตรมีอัตราส่วนถั่วเหลืองและถั่วมะแฮะที่แตกต่างกัน สูตรที่ 1 (100:0) สูตรที่ 2 (80:20) สูตรที่ 3 (60:40) สูตรที่ 4 (40:60) และสูตรที่ 5 (20:80) โดยทำการเปรียบเทียบกับหมักด้วยถั่วเหลืองล้วนเป็นสูตรควบคุม พบว่าปริมาณของเอนไซม์อะไมเลสอยู่ในช่วง 361.86-930.49 หน่วยต่อกรัม กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นตามอัตราส่วนของถั่วเหลืองที่เพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณของเอนไซม์นี้อยู่ในช่วง 108.08-683.93 หน่วยต่อกรัม กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสต่ำในช่วงแรกของการหมักและเพิ่มขึ้นตามเวลา จากการวัดปริมาณกรดอินทรีย์พบปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วง 0.01-5.94 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณกรดอะซิติกอยู่ในช่วง 0.62-2.33 กรัมต่อกิโลกรัม แต่ไม่พบกรดซิตริก ปริมาณกรดอะมิโนที่ตรวจพบมีทั้งหมด 16 ชนิด และพบกลูตาเมตมากที่สุด 1,200 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจพบพบว่า แบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสอง และค่า pH ที่ตรวจวัดได้ในช่วงแรกอยู่ในระดับสูงและลดลงเมื่อเวลาการหมักผ่านไป 20 วัน สำหรับผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนน้ำตาล เกลือ ในซีอิ๊วที่ทดลองทุกสูตรพบว่า ปริมาณโปรตีนร้อยละ 5.45-6.98 ปริมาณน้ำตาลร้อยละ 0.09-0.19 ปริมาณเกลือในซีอิ๊วแต่ละส่วนผสมอยู่ในช่วงร้อยละ 11.9-13.7 ผลการตรวจปริมาณโลหะทั้งสามชนิดได้แก่ แคดเมียม ทองแดง และตะกั่ว พบว่ามีโลหะตะกั่ว เพียงชนิดเดียว ซึ่งมีปริมาณไม่เกิน 1 ส่วนในล้านส่วน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าถั่วมะแฮะใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนถั่วเหลืองในการผลิตซีอิ๊วได้บางส่วน ซึ่งจากการศึกษายังไม่มีผู้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของการผลิต

ซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองที่มีปริมาณเกลือที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาในเรื่องนี้

คุณลักษณะของน้ำซีอิ๊วตามมาตรฐาน

คุณลักษณะที่ต้องการของน้ำซีอิ๊วตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 2547) ต้องเป็นไปดังนี้

1. ลักษณะทั่วไป ต้องเป็นของเหลว ไม่ข้น ไม่มีตะกอน หรือฝ้า
2. สี ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของน้ำซีอิ๊ว
3. กลิ่นรส ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของน้ำซีอิ๊ว ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์
4. สิ่งแปลกปลอม ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์
5. โปรตีน ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 4.5 โดยน้ำหนัก
6. อะฟลาทอกซิน ต้องไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
7. วัตถุเจือปน หากมีการแต่งสีให้ใช้เฉพาะน้ำตาลเคี้ยวไหม้เท่านั้น หากมีการใช้วัตถุกันเสีย ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด
8. ความเป็นกรด-ด่าง ต้องอยู่ระหว่าง 4.5 – 5.5
9. เกลือ ต้องอยู่ระหว่างร้อยละ 17 – 23 โดยน้ำหนัก
10. น้ำตาลทั้งหมด (คำนวณเป็นน้ำตาลอินเวิร์ต) ต้องไม่เกินร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก
11. จุลินทรีย์ โคลิฟอร์ม โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม หรือ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 10 โคลินี่ต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม หรือ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ส่วนซีอิ๊วที่มีการผลิตและจำหน่ายในท้องตลาดของประเทศไทยหรือในบ้านเรามีอยู่หลายลักษณะเมื่อพิจารณาคุณค่าของซีอิ๊วตามสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนั้น ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 มาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำซึ้วของกระทรวงอุตสาหกรรม

คุณลักษณะ	ชนิด					
	ซึ้วขาว		ซึ้วดำเค็ม		ซึ้วดำ	ซึ้วหวาน
	ชั้นพิเศษ	ชั้นที่ 1	ชั้นพิเศษ	ชั้นที่ 1		
ปริมาณของแข็งที่ระเหยไม่ได้ น้อยกว่าร้อยละของน้ำหนัก	32	32	35	32	50	50
เกลือ(คิดเป็นโซเดียมคลอไรด์) ร้อยละของน้ำหนัก	17-23	17-23	17-23	17-23	6-16	ไม่เกิน1
น้ำตาลทั้งหมด(คิดเป็นน้ำตาล อินเวิร์ต)ไม่เกินร้อยละของ น้ำหนัก	7	6	12	10	25	80
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	4.5-5.3	4.5-5.3	4.5-5.3	4.5-5.3	4.5-5.5	4.5-5.5
ความถ่วงจำเพาะที่อุณหภูมิ 27±3 °C ไม่น้อยกว่า	1.20	1.20	1.23	1.23	1.33	ไม่กำหนด

ที่มา: วันชัย สมชิต. (2527). *ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย* หน้า 114

สำหรับในงานวิจัยนี้ตัวอย่างน้ำซึ้วขาวที่หมักได้จากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือที่แตกต่างกันของแต่ละสูตรที่ทำการศึกษามีการตรวจสอบคุณลักษณะของน้ำซึ้วบางประการเปรียบเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำซึ้วได้แก่ เกลือและจุลินทรีย์

เกลือ

เกลือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของการผลิตซึ้ว สามารถป้องกันการสุกเกินไปของวัตถุดิบป้องกันการเสื่อมเสีย และเป็นแหล่งให้รสเค็ม นอกจากนี้เกลียวยังเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารเคมีบางตัว เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมซัลเฟต และไฮโดรคลอริก เป็นต้น เกลือมีอยู่ 2 ชนิด คือเกลือสินเธาว์ (rock salt) และเกลือทะเล (sea salt) โดยทั่วไปการผลิตซึ้วจะใช้เกลือทะเล ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ (Yokotsuka. 1988) โดยโซเดียมคลอไรด์มีหน้าที่เสมือนกับสารยับยั้งและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นการหมักน้ำเกลือ (Yong; & Wood. 1974) นอกจากนี้เกลียวยังช่วยในการปรุงแต่งรสชาติให้กับซึ้วด้วย โซเดียมคลอไรด์บริสุทธิ์จะอยู่ในรูปหกเหลี่ยมไม่มีสี ใส แต่ใน

กระบวนการผลิตเกลือจะมีสีเกิดขึ้นเช่น สีขาว สีชา โซเดียมคลอไรด์บริสุทธิ์ ณ อุณหภูมิ 25 °C จะมีความถ่วงจำเพาะ 2.161 แต่เกลือที่ใช้ในการทำซีอิ๊วควรมีความถ่วงจำเพาะ 2.1-2.3 จุดหลอมเหลว 800-803 °C การละลายของเกลือขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ พบว่าในน้ำ 100 mL เกลือจะละลายได้ในระดับต่างๆกัน ขณะที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลง ส่วนเกลือที่มีขายอยู่ในท้องตลาดนอกจากจะประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์แล้วยังมีความชื้น แมกนีเซียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต โพแทสเซียมคลอไรด์ และสารที่ไม่ละลายน้ำปะปนอยู่ โดยขึ้นอยู่กับแหล่งและวิธีการผลิต ซึ่งมีข้อควรระวังเนื่องจากวิวัฒนาการทางด้านอุตสาหกรรมเคมีทำให้มีการขายเกลือที่เป็นของเสียจากโรงงานเคมี ในราคาถูก (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534: 9-11) นอกจากนั้นเกลือที่ผลิตจากนาเกลือบางแห่งที่มีฟ้าแดงเกิดขึ้นระหว่างการตากจะมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Halobium* spp. แบคทีเรียพวกนี้จะมีสีแดงและเจริญได้ดีมากในความเข้มข้นของเกลือมากๆ ทำให้มีปัญหาเกิดขึ้นได้ระหว่างขั้นตอนการหมักน้ำเกลือ (นภา โล่ทอง. 2531) ในประเทศญี่ปุ่นใช้ความเข้มข้นของสารละลายเกลือประมาณ 17-19 เปอร์เซ็นต์ (ต่อน้ำหนักปริมาตร) (Yong; & Wood. 1974) แต่ในประเทศไทยโดยทั่วไปใช้ 20-22 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการหมักน้ำแรกและความเข้มข้น 16-18 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำที่สองหรือน้ำที่สาม (พิมพ์พร เทวาคูดี. 2521; และกนิษฐา สุวรรณเมนะ. 2522) โดยที่โรงงานซีอิ๊วต้องเตรียมน้ำเกลือให้มีความเข้มข้น 23-35 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นนี้จะเจือจางให้ความเข้มข้นของเกลือลดลงเหลือประมาณ 19-22 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในงานวิจัยที่ศึกษานี้ได้ศึกษาผลของปริมาณเกลือที่มีต่อการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง จากรายงานการวิจัยของ ภคธิดา อุปลักร (2550) ได้ศึกษาการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือร้อยละ 20 ตามมาตรฐานของการหมักซีอิ๊ว ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ใช้ปริมาณเกลือดังกล่าวเป็นซีอิ๊วของสูตรควบคุม พบว่าซีอิ๊วที่ได้มีความเค็มมากเนื่องจากไม่ได้ทำการปรุงแต่งซีอิ๊วด้วยน้ำตาลดังเช่นซีอิ๊วที่มีจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไป ซึ่งมีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้ปริมาณเกลือน้อยลงในการหมักซีอิ๊ว เพื่อศึกษาว่าซีอิ๊วที่ได้มีปริมาณเกลือที่ลดลงหรือเป็นซีอิ๊วที่มีรสเค็มน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับซีอิ๊วสูตรควบคุม

ศิริพร เอื้ออังกูร (2538: บทคัดย่อ) ได้ศึกษาการปรับปรุงกระบวนการหมักซีอิ๊วในขั้นตอนการหมักน้ำเกลือในระดับโรงงาน โดยศึกษาผลของการหมักโคจิในน้ำ เป็นระยะเวลาต่างๆกัน ได้แก่ 0, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ก่อนเติมน้ำเกลือความเข้มข้น 26 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลองหาปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในน้ำหมักพบว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลองหลังจากเติมน้ำและน้ำเกลือแล้วจะมีเกลือในน้ำหมักของแต่ละการทดลองใกล้เคียงกันได้แก่ 17.53 ถึง 18.70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสิ้นสุดการหมักเป็นเวลา 36 วัน โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี เคมี และจุลชีววิทยาตลอดระยะเวลาการหมัก มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ปริมาณโปรตีน และน้ำตาลกลูโคสใกล้เคียงกันในทุกการทดลอง นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของเกลือที่มีความเข้มข้น 5, 10, 18, 20 และ 21 เปอร์เซ็นต์ ต่อระยะเวลา

ความคงทนของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากโคจิ โดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.03 เปอร์เซ็นต์ และคลอแรมฟินิคอล 0.01 เปอร์เซ็นต์ เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือสูงจะมีอัตราการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์มากกว่าที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำ โดยจะมีการลดลงอย่างรวดเร็วใน 2 วันแรกของการบ่ม และลดลงอย่างช้าๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 วัน

กมุทนาถ ปานหอ; สุรีย์พร กังสนันท์; และอรัญ หันพงศ์กิตติกุล (2546) ทำการศึกษาการลดความเค็มของซีอิ๊วด้วยการไดอะไลซิส อัลตราฟิเตรชัน และการตกผลึก พบว่าไดอะไลซิสโดยใช้ถุงกรองเซลลูโลสขนาดรูพรุน 3,500 ใช้เวลา 15 นาที สามารถลดเกลือได้เหลือ 14.62 ± 0.00 % อัลตราฟิเตรชัน โดยการใช้แผ่นกรองขนาด 10 กิโลดาลตัน สามารถลดเกลือเหลือ 22.38 ± 0.2 % และการตกผลึกก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ลดความเค็มในซีอิ๊วได้ จากปริมาณเกลือเริ่มต้น 23.11 ± 0.17 % สามารถลดลงเหลือ 18.38 ± 0.48 % จากการศึกษาทั้งสามวิธี วิธีตกผลึกเป็นแนวทางที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ดีกว่าไดอะไลซิสและอัลตราฟิเตรชัน ทั้งนี้เนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัดและไม่ยุ่งยาก

กรดอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตซีอิ๊ว

องค์ประกอบทางเคมีของซีอิ๊วเกิดจากส่วนประกอบของวัตถุดิบที่ใช้คือถั่วเหลือง ข้าวสาลีหรือข้าวเจ้า เกลือ และน้ำ ซึ่งน้ำเป็นตัวช่วยให้องค์ประกอบต่างๆ รวมอยู่ด้วยกัน เมื่อผ่านกระบวนการหมักจนสิ้นสุดลง องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบย่อมเปลี่ยนแปลงไป บางส่วนถูกย่อยสลายให้เล็กลงเช่น โปรตีนและแป้ง บางส่วนถูกใช้ไปและเปลี่ยนเป็นอย่างอื่นเกิดขึ้นมาแทนเช่น เกิดกรดต่างๆ และแอลกอฮอล์ เป็นต้น หนึ่งในองค์ประกอบทางเคมีที่เกิดขึ้นก็คือกรดอินทรีย์ กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักซีอิ๊วเกิดจากการทำงานของแบคทีเรีย ในบรรดาแบคทีเรียที่มีอยู่แบคทีเรียแลคติกจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักของขั้นตอนการเติมน้ำเกลือ แบคทีเรียแลคติกจะทำหน้าที่ผลิตกรดแลคติกซึ่งมีกลิ่นเฉพาะ กรดที่ผลิตออกมาจะทำให้ค่า pH ของน้ำหมักซีอิ๊วลดลง ช่วยปรับสภาพให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิตแอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นรสที่ดีแก่ซีอิ๊ว (สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์. 2522) ซึ่งสอดคล้องกับตาราง 4 จะเห็นได้ว่าเมื่อเทียบปริมาณกรดอินทรีย์จะมีปริมาณกรดแลคติกมากที่สุด สำหรับในน้ำซีอิ๊วที่มีการปรุงแต่งสารแต่งกลิ่นและรสของซีอิ๊วเพื่อให้ซีอิ๊วมีกลิ่นและรสที่ดี จากการวิเคราะห์สารปรุงแต่งรสที่พบในน้ำซีอิ๊วมีหลายชนิดหนึ่งในสารที่พบมีกรดแลคติกสูงถึงประมาณ 14.35 กรัมต่อลิตร (Yokotsuka. 1986) กรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำซีอิ๊วจะมีอยู่ 2 รูป คือจะอยู่ในรูปกรดอิสระและอาจอยู่รวมกับสารอื่น ปริมาณกรดอินทรีย์จะมีผลต่อกลิ่นรสของซีอิ๊วโดยตรงและการที่กรดมีรูปแบบอย่างไรก็ยังคงผลให้กลิ่นรสเปลี่ยนไปได้เช่นกัน ในปี

ค.ศ.1932 Udo ได้สังเคราะห์กรดชนิดต่างๆ ที่พบในซีอิ๊วและแบ่งพวกตามลักษณะของกลิ่นรสของกรด เขายังค้นพบว่ากรดชนิดเดียวกันเมื่อรวมอยู่กับสารต่างกัน จะให้กลิ่นรสต่างๆ กัน

ตาราง 4 แสดงกรดอินทรีย์ที่มีในน้ำซีอิ๊ว

กรดอินทรีย์	ปริมาณกรดอินทรีย์ (%)
แลคติก	1.24
ซักซินิก	0.11
แอสติก	0.10
ฟอร์มิก	0.003

ที่มา: ดัดแปลงจาก ไพบูลย์ สุเมธอักษร. (2521). *อุตสาหกรรมการทำซีอิ๊วในเมืองไทย*.

หน้า 17

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษากรดอินทรีย์ในการผลิตซีอิ๊วมีรายงานว่า ในปี ค.ศ. 1980 Noda; et al ได้ศึกษา การยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ระหว่างแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกในช่วงการหมักน้ำเกลือของซีอิ๊ว พบว่าปัจจัยสำคัญที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ *Saccharomyces rouxii* คือผลิตภัณฑ์จากเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเช่น กรดแลคติก กรดแอสติก กรดฟอร์มิก เป็นต้น ต่อมา ในปี ค.ศ. 1982 Noda; et al ได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ *S. rouxii* และพบว่ากรดแลคติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักในเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก เมื่อมีความเข้มข้นร้อยละ 1 จะทำให้ pH ของโมโรมิลลดลงไป 1 หน่วย และไปเพิ่มความสามารถของกรดแอสติกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ ซึ่งกรดแอสติกนี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญสามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ถึงร้อยละ 25

จุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว

เชื้อราที่มีบทบาทโดยตรงคือ เชื้อรา *A. oryzae* หรือ *A. sojae* ซึ่งจะเจริญเติบโตในช่วงของการหมักโคจิ เมื่อบรรจุโคจิลงในบ่อหมักใหม่ๆ เชื้อราที่มีอยู่ในหัวเชื้อจะหยุดการเจริญเติบโต แต่เวลายาวนานการทนอยู่ได้ของเชื้อราก็เริ่มลดลง ระยะเวลาที่อยู่ได้ประมาณ 1-2 เดือน หลังจากนั้นจะค่อยๆ ตายไป ประมาณ 3 เดือน เชื้อราแทบจะไม่มีอยู่เลย (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534: 36)

ยีสต์ที่สำคัญในกระบวนการหมักซีอิ๊วเป็นยีสต์ *S. rouxii* มีประโยชน์ต่อการหมักมากที่สุด ยีสต์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ย่อยถั่วเหลืองและข้าวสาลีด้วยเอนไซม์ในช่วงทำหัวเชื้อ จะย่อยโปรตีนได้

กรดอะมิโนและย่อยแบ่งให้ได้มอลโทส ย่อยกลูโคสได้แอลกอฮอล์ CO₂ หรือกรดแลคติก นอกจากนี้ยังมีกลิ่นหอมซึ่ง Yokotsuka (1986) ได้วิจัยออกมาว่าเป็นสาร 4-ethylguaiacol และ 4-ethylphenol

แบคทีเรียในการหมักซีอิ๊วจะมีเชื้อแบคทีเรียเช่น *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Brevibacterium* และ *Pediococcus* เป็นต้น โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ทนความเข้มข้นของเกลือได้สูงๆ จะมีอยู่ในบ่อขณะหมักตามปกติ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและโรคนั้นจะอาศัยอยู่ได้น้อยมาก หรือไม่มีเลย ในความเข้มข้นของเกลือ 18% แบคทีเรียที่มีอยู่ได้เหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตได้ ทำให้เกิดกรดต่างๆ เช่น กรดแลคติก กรดแอซีติก และกรดซัคซินิก ซึ่งช่วยให้การหมักเป็นซีอิ๊วได้เร็วขึ้น ในบรรดาแบคทีเรียที่มีอยู่แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกสำคัญที่สุด เพราะขณะบรรจุขวดจึงบ่มหมักนั้นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจะผลิตกรดแลคติกออกมาทำให้ pH ของโคจิต่ำลง ทำให้จุลินทรีย์อื่นๆ ที่เป็นพิษถูกทำลาย แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจึงมีบทบาทสำคัญมาก

ประโยชน์ของเชื้อแบคทีเรีย (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534: 38)

1. เชื้อราและแบคทีเรียมีการทำงานช่วยกันเพื่อย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนและเพื่อให้กรดอะมิโนทำปฏิกิริยากับเกลืออินทรีย์

2. เกิดกรดที่ระเหยได้และไม่ได้ เช่น กรดแลคติก กรดแอซีติก กรดซัคซินิกและเอสเทอร์

3. ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี

4. ทำให้เกิดกลิ่นหอม

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว

ปี ค.ศ. 1947 Lockwood ศึกษากระบวนการผลิตน้ำซีอิ๊วจีน โดยใช้จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเป็นเชื้อบริสุทธิ์ของ *A. oryzae*, *Lactobacillus delbrueckii* และยีสต์ *Zygosaccharomyces soyae* น้ำซีอิ๊วแบบจีนนั้นผลิตจากถั่วเหลืองทั้งหมด หรือถ้ามีแป้งก็มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงทำให้น้ำซีอิ๊วที่ได้มีความถ่วงจำเพาะและความหนืดสูง อีกทั้งมีปริมาณไนโตรเจนมากกว่าน้ำซีอิ๊วแบบญี่ปุ่น ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า กระบวนการหมักน้ำซีอิ๊วต้องอาศัยกิจกรรมร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์ทั้งสามชนิด เพื่อให้เกิดน้ำซีอิ๊วที่มีกลิ่นรสน่ารับประทาน

ปี ค.ศ. 1965 Hesseltine แยกเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักของประเทศตะวันออก เช่น เต้าเจี้ยว น้ำซีอิ๊ว tempeh ang-kok sufu ragi เป็นต้น โดยเฉพาะน้ำซีอิ๊วนั้นเมื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกมา พบว่า มีแบคทีเรีย *L. delbrueckii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง สร้างสปอร์ได้ และเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่สำคัญในการผลิตน้ำซีอิ๊วช่วงโมโรมิ และยีสต์ *S. rouxii* ซึ่งเป็น *osmophilic yeast* ที่มีบทบาทสูงสุดเพราะเป็นยีสต์ที่พบในช่วงสุดท้าย ซึ่งเป็นการหมักเพื่อให้เกิดแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังอาจพบ *Z. soyae* และยีสต์ในสายพันธุ์ *Hansenula* และ *Torulopsis* ร่วมอยู่ด้วย

ปี ค.ศ. 1976 Yong และ Wood ได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *L. delbrueckii* และ *S. rouxii* ในโมโรมิ พบว่า pH ช่วง 5.0-5.5 มี *L. delbrueckii* มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด และ *S. rouxii* ที่ pH 5.0 และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดคือ pH 5.0 ในปีต่อมา Yong และ Wood (1976) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของโมโรมิที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 18 พบว่าโมโรมิที่ใส่เพียงยีสต์ *S. rouxii* ชนิดเดียวจะมีปริมาณกลูโคสมากที่สุด แต่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ร้อยละ 7 ในขณะที่โมโรมิที่มีทั้ง *L. delbrueckii* และ *S. rouxii* จะมีปริมาณกลูโคสน้อยกว่ามาตรฐานเพียงเล็กน้อยคือ ร้อยละ 6.5 นอกจากนั้นแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกหยุดการเจริญเติบโตเพราะผลิตภัณฑ์จากเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย แต่สาเหตุที่ทำให้ยีสต์หยุดการเจริญเติบโตไม่ชัดเจนนัก

ปี พ.ศ. 2520 สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ ศึกษาน้ำหมักซีอิ๊ว 45 ตัวอย่าง ที่เก็บมาจากโรงงานซีอิ๊วในกรุงเทพมหานคร และสมุทรปราการ 5 โรงงาน ตัวอย่างน้ำหมักซีอิ๊วที่เก็บจากส่วนบน และส่วนล่างของถังหมักจะไม่มี ความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณแบคทีเรีย จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการหมักซีอิ๊ว โดยอาศัยคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อ ทั้งทางด้านความสามารถในการทนเกลือความเข้มข้นสูง ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 43 °C ความสามารถในการเปลี่ยนแปลง pH และสร้างกลิ่น พบว่า *Pediococcus halophilus* เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าวดีกว่าแบคทีเรียอื่นๆ ที่แยกได้ และเมื่อนำ *P. halophilus* ไปหมักซีอิ๊วร่วมกับยีสต์ *S. rouxii* NRRL Y-2547 เชื้อ *P. halophilus* นี้ก็สามารถเจริญเติบโตได้ดี สามารถทำให้ pH ของน้ำหมักลดลงใกล้เคียงหรือต่ำกว่าซีอิ๊วหมักทั่วไป ปริมาณกรดแลคติกที่ได้ก็สูง และกลิ่นรสความกลมกล่อมของน้ำหมักที่ได้ก็ดียิ่ง

ปี พ.ศ. 2522 กนิษฐา สุวรรณเมนะ ศึกษาการแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากโคจิทั้งสิ้น 175 เชื้อ ซึ่งเป็นเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus flavus* 90 เชื้อ และอยู่ในกลุ่ม *Phycomycetes* 85 เชื้อ และทำการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตซีอิ๊วโดยอาศัยความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส และโปรติเอส โดยการใช้สารละลายน้ำแป้งและนมพร่องมันเนย เป็นสับสเตรตจะสามารถคัดเลือกเชื้อได้ 27 เชื้อ พบว่าเชื้อราในกลุ่ม *A. flavus* มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและโปรติเอสสูงสุด ส่วน *A. oryzae* มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงเช่นกันแต่น้อยกว่า *A. flavus*

ปี พ.ศ. 2527 สถาบันวิจัยและพัฒนาอาหาร ใช้วิธีการผลิตน้ำซีอิ๊วแบบธรรมชาติ โดยการหมักโมโรมิจะเติมน้ำเกลือลงไปโคจิ ทำให้ความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นถึงร้อยละ 17-20 จุลินทรีย์บางชนิดถูกกำจัดออกไปหมด และเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *L. delbrueckii*, *P. halophilus*, *S. rouxii* และ *Hansenula* แบคทีเรียและยีสต์เหล่านี้จะสร้างกรดแลคติกและแอลกอฮอล์ ทำให้กลิ่นและรสชาติของน้ำซีอิ๊วดีขึ้น

ปี พ.ศ. 2531 นภา โล่ทอง รายงานถึงจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในระยหมักน้ำเกลือ ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่ทนเกลือ เช่น *L. delbrueckii* และ *P. halophilus* แบคทีเรียทั้งสองชนิดจะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติก ทำให้ภาวะในถังหมักเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์คือ *S. rouxii* และ *Torulopsis holmii* ซึ่งจะหมักน้ำตาลให้ได้แอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นรสอื่นๆ แบคทีเรียและยีสต์ดังกล่าวมีอยู่ทั่วไปในบรรยากาศ แต่น้ำซี้วที่ผลิตได้รุ่นแรกมีคุณภาพด้านกลิ่นรสไม่ดีนักเนื่องจากจุลินทรีย์แพร่กระจายน้อย

ปี พ.ศ. 2532 วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล ศึกษาขั้นตอนการผลิตน้ำซี้วและบทบาทของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักน้ำซี้ว พบว่า แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่แยกได้และนำมาใช้ในกระบวนการผลิตน้ำซี้วได้แก่ *P. halophilus*, *P. soyae* และ *L. delbrueckii* ยีสต์ส่วนใหญ่ที่ทำหน้าที่หมักต่อจากแบคทีเรียคือ *S. rouxii* รองลงมาคือ *Torulopsis* แต่ยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญและนำมาใช้ในอุตสาหกรรมน้ำซี้วคือ *S. rouxii*

ปี พ.ศ. 2537 พันธณรงค์ จันทร์แสงศรี ทดลองนำ *L. delbrueckii* TISTR 108 และ *S. rouxii* TISTR 5058 มาตรึงรูปร่วมกันในเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร มาใช้ในการผลิตน้ำซี้วทั้งกระบวนการแบบไม่ต่อเนื่องและแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 30 °C โดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ พบว่ากระบวนการผลิตน้ำซี้วแบบไม่ต่อเนื่องใช้เวลาการหมักจนได้น้ำซี้วที่มี pH เท่ากับ 4.5 เป็นเวลา 21 วัน มีปริมาณกรดแลคติก 7.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณแอลกอฮอล์ 9.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนกระบวนการผลิตน้ำซี้วแบบต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าเวลาที่ใช้ในการหมักจนได้น้ำซี้วที่มี pH เท่ากับ 4.5 คือ 108 ชั่วโมง น้ำซี้วที่ได้มีปริมาณกรดแลคติก 7.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณแอลกอฮอล์ 9.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีคุณสมบัติตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำซี้ว มอก.252-2521

สำหรับในงานวิจัยครั้งนี้ได้สนใจศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดได้แก่แบคทีเรีย ราและยีสต์ในกระบวนการหมักซี้วในช่วงของโมโรมิและในตัวอย่างน้ำซี้ว ซึ่งศึกษาจุลินทรีย์ทั้งหมดตามมาตรฐานผลิตซี้วอุตสาหกรรมของมาตรฐานซี้วชุมชนว่าอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดหรือไม่

เอนไซม์ที่สำคัญในระหว่างการผลิตซี้ว

ในกระบวนการหมักซี้ววัตถุดิบที่ใช้ในการหมักจะมีแบ่งเป็นส่วนประกอบ แบ่งส่วนหนึ่งที่พบมาจากถั่วที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมัก ส่วนแบ่งอีกส่วนหนึ่งมาจากข้าวสาลีที่ใช้เป็นส่วนผสมในการหมักซี้ว เมื่อกระบวนการหมักเกิดขึ้นแบ่งเหล่านี้จะถูกย่อยโดยเอนไซม์อะไมเลสให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ซึ่งเอนไซม์อะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายสับสเทรตจำพวกแป้ง ไกลโคเจน มี 3 ชนิด ดังนี้

1. แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) พบได้ทั่วไปทั้งในอาณาจักรพืชและสัตว์ ตลอดทั้งในคน ลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ในการย่อยสลายก็คือ เจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดของแป้งที่ α -1,4 ในลักษณะตัดภายในสายพอลิเมอร์ได้ผลผลิตเป็นกลูแคน และลิมิตเดกซ์ทริน ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังมีโครงสร้างเดิม

2. เบตา-อะไมเลส (β -amylase) พบทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ในลักษณะกำลังออกเป็นข้าวมอลท์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง และมันเทศ ปฏิกริยาการย่อยสลายของเบตา-อะไมเลสจะเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิดของแป้งที่ α -1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปที่ละ 1 หน่วยของมอลโตส หรือที่ละ 2 หน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกริยาที่พันธะไกลโคซิดที่ α -1,6 ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกริยาย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจนจะเป็นกลูแคน และลิมิตเดกซ์ทริน และส่วนใหญ่เป็นมอลโตสที่มีโครงสร้างต่างไปจากเดิมหรือเบตา-มอลโตส

3. แกมมา-อะไมเลส (γ -amylase) หรือกลูโคอะไมเลสหรืออะมิโนกลูโคซิเดส เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ลักษณะที่สำคัญของปฏิกริยาการย่อยสลายแป้งก็คือ สามารถย่อยสลายได้หลายพันธะ ไม่ว่าจะเป็นพันธะไกลโคซิดที่เป็น α -1,4, α -1,6 และ α -1,3 แต่จะช้ากว่า α -1,4 การตัดสายพอลิเมอร์จะเหมือนกับเบตา-อะไมเลส แต่ตัดปลายสายเข้าไปที่ละ 1 หน่วยของกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มีโครงสร้างต่างไปจากเดิมคือ ไดเบตา-ดี-กลูโคส และส่วนของกลูแคน และเดกซ์ทริน

สำหรับในกระบวนการหมักซีอิ๊วมีเอนไซม์หลายชนิดที่เชื้อรา *A. oryzae*, *A. sojae* หรือ *A. flavus* var. *columnaris* สร้างขึ้นในขั้นการหมักโคจิ เช่น อะไมเลส เซลลูเลส อินเวอร์เทส ไลเปส และโปรตีเอส เอนไซม์อินเวอร์เทส จะทำการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในเมล็ดถั่วให้เป็นกลูโคสและฟรุกโตส (Yong; & Wood. 1974) จึงทำให้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นในโคจิหลังจากบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อบ่มเป็นเวลา 25-30 ชั่วโมง เอนไซม์อะไมเลสจะย่อยสลายแป้งในข้าวสาลีหรือแป้งอื่นๆ ไปเป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์และโมโนแซคคาไรด์ ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเป็นครั้งที่สอง (Lotong. 1985) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ติดตามเอนไซม์อะไมเลสที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองด้วย

เอนไซม์โปรตีเอส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน โพลีเปปไทด์และเปปไทด์ มีเอนไซม์โปรตีเอสอยู่มากมายหลายชนิดที่จะทำให้โมเลกุลของโปรตีนแตกออกที่ตำแหน่งต่าง ๆ กัน ซึ่งทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ กัน เอนไซม์โปรตีเอสจะแบ่งออกตามขนาดของโมเลกุล ประจุและความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรต ปัจจุบันได้มีการจัดระบบที่ใช้หลักการทำงานของเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ เอนไซม์ที่ทำปฏิกริยาโดยเข้าตัดพันธะเปปไทด์ของโปรตีนทางด้านปลายอะ

มิโน (N-terminal) หรือเข้าตัดพันธะเปปไทด์ในโปรตีนทางด้านปลายคาร์บอกซิลิก (C-terminal) เรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า เอกโซเปปติเดส (exopeptidases) และกลุ่มของเอนไซม์ที่เข้าตัดภายในสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีน เรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า เอนโดเปปติเดส (endopeptidases) กระบวนการเกิดการสลายพันธะเปปไทด์จะเกิดที่ตำแหน่งพันธะระหว่างคาร์บอนกับออกซิเจน จะเกิดทั้งโดยตรงหรือโดยผ่านโมเลกุลของน้ำ ในการเกิดปฏิกิริยาจะมีการให้โปรตอนกับ peptide nitrogen หรือที่เรียกว่า leaving group ซึ่งในแต่ละกลุ่มของโปรติเอสจะมีกรดอะมิโนที่ทำให้เกิดตำแหน่งบริเวณเร่งของปฏิกิริยาแตกต่างกัน

สำหรับแหล่งของเอนไซม์โปรติเอสที่พบในจุลินทรีย์มีทั้งแบคทีเรียและราได้แก่ กลุ่มแบคทีเรีย *Bacillus* กลุ่มราจีนัส *Aspergillus* และ *Mucor* ส่วนในกระบวนการหมักชีวจีการของเอนไซม์โปรติเอสจะเพิ่มขึ้นอย่างมากในระยะท้ายของการเจริญในโคจิ ซึ่งโดยทั่วไปจะสูงสุดที่ประมาณ 48 ชั่วโมง (Impoolsup; et al. 1981) โปรติเอสจะมีความสำคัญมากในการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วไปเป็นเปปไทด์ และกรดอะมิโน ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณไนโตรเจนละลายในน้ำชีวจีเพิ่มขึ้น (Lotong. 1985)

จากรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษาเอนไซม์ที่สำคัญในการหมักชีวจีพบว่า

ในปี ค.ศ. 1981 Impoolsup; et al ได้ทำการศึกษาและพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *A. flavus* var. *columnaris* ในน้ำเกลือ 18 เปอร์เซ็นต์ค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก 45 วัน โดยกิจกรรมของโปรติเอสที่เหมาะสมต่อ pH ที่ เป็นกลางจะเสถียรมากกว่า และเพื่อที่จะให้มีการย่อยโปรตีนในโคจิได้มากที่สุดจึงควรที่จะบ่มโคจิเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส หลังจากการบ่มปกติเป็นเวลา 2 วัน

ในปี ค.ศ. 1958 และ 1959 Sakaguchi ได้ทำการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย *P. halophilus* สามารถผลิตเอนไซม์ในเซลล์ 2 ชนิดสำหรับย่อยโปรตีน และเปปไทด์ที่เอนไซม์โปรติเอสของ *Aspergillus* spp. ย่อยไม่ได้ และทำให้โปรตีนที่แขวนลอยในชีวจีหายไปทำให้ชีวจีใสมากขึ้น นอกจากนี้ *P. halophilus* ยังมีเอนไซม์ทรานส์มิเนส (transsminase) ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างกรดกลูตามิกในชีวจี

ในปี พ.ศ. 2526 มณี ดันติรุ่งกิจ ศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Aspergillus niger* โดยใช้มิวทาเจน โดยการชักนำ *A. niger* N-2 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยมิวทาเจน 5 ชนิด คือ N-methy-N-nitro-N-nitrosoguanidine, ethylmethane sulfonate, nitrous acid, แสงอัลตราไวโอเลต และรังสีแกมมา พบว่า *A. niger* NE 10 ซึ่งเป็นมิวแทนท์ที่ได้จากการใช้สาร ethylmethane sulfonate สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดีกว่าเชื้อเดิม 2 เท่า และ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ pH 4.0 และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

ในปี พ.ศ. 2534 วรณา พรเศรษฐคุณ ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต้องการเกลือเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมหมัก โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ทนหรือชอบเกลือด้วยอาหารเค็ม จำนวน 283 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากน้ำปลาที่มีอายุการหมักต่างกัน 16 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียทนเกลือที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดคือ *Bacillus* sp. นอกจากนี้ยังศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือและ pH ที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *Bacillus* sp. พบว่าที่ความเข้มข้นเกลือ 6 เปอร์เซ็นต์และ pH เริ่มต้น 7 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด

ในปี พ.ศ. 2545 กาญจนา ชาญสง่าเวช ได้ศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณโปรตีนในซีอิ๊ว โดยการเติมผงโปรติเอสลงในระยะโมโรมิของการผลิตซีอิ๊ว โดยทำการทดลองแยกแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* T25 ซึ่งผลิตโปรติเอสที่มีแอกติวิตีสูงสุด ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตนิวทรัลโปรติเอส พบว่าผลการเติมผงโปรติเอสที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ลงในระยะโมโรมิ ทำให้โปรติเอสมีแอกติวิตีในน้ำหมักซีอิ๊วสูงขึ้น และพบปริมาณโปรตีนในน้ำหมักซีอิ๊วเพิ่มจากเดิม 6.0 เปอร์เซ็นต์ เป็น 8.8 เปอร์เซ็นต์

ในปี พ.ศ. 2541 ขจีนาฏ โพธิเวชกุล; สุมาลี เหลืองสกุล; และ สมใจ ศิริโชค ศึกษาการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส โดยอาศัยความสามารถในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวจากอาหารแข็ง 3 ชนิด คือ starch agar, skim milk agar และ tributyrin agar พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส และการวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งสามชนิด พบว่ามีแอกติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ในปี พ.ศ. 2546 ปาริชาติ กิจสงเสริมธน ได้ทำการผลิตน้ำซอสปรุงรส โดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสมาตรึงไว้บนโคโคซาน โดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้ม โดยเฉพาะวิธีการตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูตาอัลดีไฮด์ ระยะเวลาการกระตุ้นด้วยกลูตาอัลดีไฮด์ ผลของอุณหภูมิ และ pH ที่มีต่อการตรึงเอนไซม์ เปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกตรึงในแต่ละวิธีกับเอนไซม์อิสระและดูการกระจายตัวของเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด จากนั้นนำเอนไซม์ตรึงรูปที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ ความคงตัวต่ออุณหภูมิและ pH นอกจากนั้นนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงในสภาวะที่เหมาะสมไปผลิตน้ำซอสปรุงรส พบว่าปริมาณไนโตรเจนจากกรดอะมิโนที่ได้จากการใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการห่อหุ้มในการผลิตน้ำซอสปรุงรสหลังจากการใช้ซ้ำครั้งที่สี่ มีค่าเท่ากับ 1,800 และ 706 ไมโครกรัม ตามลำดับ

หลักการวิเคราะห์

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของปริมาณเกลือที่มีต่อกระบวนการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง โดยติดตามการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในช่วงการหมักของโมโรมิและในน้ำซีอิ๊วขาว เพื่อหาปริมาณกรดอินทรีย์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหาปริมาณจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการเทเพลท หาปริมาณเกลือโดยใช้เทคนิคการไทเทรต หาปริมาณเอนไซม์โปรติเอสและปริมาณเอนไซม์อะไมเลสโดยใช้เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี ดังนั้นจึงขอกล่าวถึงหลักการที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่างๆ ดังนี้

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหรือที่นิยมเรียกว่า HPLC เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง เนื่องจากสามารถแยกสารได้ในเวลาที่รวดเร็ว สะดวกและง่ายต่อการทำปริมาณวิเคราะห์ โดยสามารถใช้กับงานด้านต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง เช่นในการวิเคราะห์ทางอาหาร ยา ยาฆ่าแมลง ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ฯลฯ HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูงสูบของเหลวหรือตัวทำละลาย ซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พาสสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสารเคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นวัฏภาคคงที่ ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด สัญญาณที่ตรวจวัดได้ซึ่งอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ โดยสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม ประกอบด้วยพีกของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม

หลักการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในตัวอย่างในระหว่างกระบวนการหมักซีอิ๊วด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนี้ กรดอินทรีย์จะถูกแยกด้วยคอลัมน์และชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งทำการตรวจวัดสัญญาณด้วยดีเทคเตอร์ที่เหมาะสม ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นโครมาโทแกรม เมื่อนำพื้นที่ใต้พีกไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดอินทรีย์ก็สามารถคำนวณหาปริมาณกรดอินทรีย์ในสารตัวอย่างได้

วิธีการเลี้ยงเชื้อและตรวจนับจุลินทรีย์

วิธีการเทเพลทเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้สำหรับการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ซึ่งการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อาศัยวิธี Aseptic technique หมายถึงวิธีการป้องกันไม่ให้เชื้อจากภายนอกเข้าไปปะปน ในระหว่างการปฏิบัติการต่างๆ เช่นการเขี่ยเชื้อ การเพาะเชื้อ การบรรจุอาหารลงในจานเพาะเชื้อ สำหรับการเทเพลทจะทำการเจือจางเชื้อแบบทำการเจือจางสิบเท่า (tenfold dilution) แล้วนำระดับความเจือจางที่ต้องการมาทำการเทเพลท โดยดูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เทอาหารเลี้ยง

เชื้อที่กำลังหลอมเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 45°C ลงในจานที่มีเชื้อ หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้เชื้อผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจนทั่วจาน บ่มเชื้อทิ้งไว้เป็นระยะเวลาหนึ่งแล้วทำการคำนวณจำนวนจุลินทรีย์เป็น colony forming unit (CFU/g) โดยนับจำนวนจุลินทรีย์ในช่วง 30-300 โคโลนีของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบันทึกผลเป็น น้อยกว่า 30 โคโลนี มากกว่า 300 โคโลนี และจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองด้วย

การไทเทรต

การไทเทรตเป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างที่เป็นสารละลาย โดยการวัดปริมาตรของสารละลายไทเทรนต์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลายตัวอย่าง การไทเทรตแบ่งออกเป็น 4 ประเภทตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ

1. การไทเทรตแบบกรด-เบส (acid-base titration)
2. การไทเทรตแบบตกตะกอน (precipitation titration)
3. การไทเทรตแบบเกิดสารเชิงซ้อน (complex metric titration)
4. การไทเทรตแบบเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox titration)

สำหรับในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้การไทเทรตแบบตกตะกอนเพื่อหาปริมาณคลอไรด์ในตัวอย่างซีอิ๊ว ซึ่งเป็นเทคนิคการไทเทรตที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานของผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหรือ มอก. กระบวนการไทเทรตที่สำคัญที่สุดสำหรับการวิเคราะห์โดยวิธีนี้คือ การใช้เงินไนเทรตเป็นตัวตกตะกอน เงินไอออนสามารถตกตะกอนกับแอนไอออนได้หลายชนิด ซึ่งจะเกิดเป็นตะกอนที่ละลายน้ำยากจึงสามารถใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธีการไทเทรตได้ดี การไทเทรตที่ใช้เงินไอออนนิยมใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอนไอออนจำพวกเฮไลด์มากที่สุด ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งทางตรง (direct titration) และทางอ้อม (back titration) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกการไทเทรตแบบทางอ้อมคือ วิธีการเติมสารละลายเงินไนเทรตลงในสารละลายของแอนไอออนที่ต้องการวิเคราะห์ให้มากเกินพอแล้วไทเทรตหาปริมาณของเงินไนเทรตที่มากเกินพอ ด้วยสารละลายไทโอไซยาเนต โดยใช้เฟอร์ริกอะลัมเป็นอินดิเคเตอร์ การไทเทรตโดยวิธีนี้เรียกว่า วิธีโวลฮาร์ด (Volhard's method) และพบว่าที่จุดยุติจะเห็นสารละลายแดงของ $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ ดังสมการ



เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี

เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจทั้งในเชิงคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ โดยสามารถวิเคราะห์สารอินทรีย์

และอินทรีย์ได้ ทั้งนี้อาศัยหลักการที่สารต้องการวิเคราะห์จะสามารถดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต และแสงวิสิเบิล ซึ่งมีความยาวคลื่นในช่วง 190 – 800 นาโนเมตร พลังงานจากแสงในช่วงดังกล่าวมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลของสารโดยมีผลกระทบโดยตรงต่ออิเล็กตรอนในวงนอกสุดของสารทำให้มีพลังงานสูงขึ้น จึงเกิดการเปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็กตรอนจากสถานะปกติหรือสภาวะพื้นไปสู่สภาวะกระตุ้น ซึ่งอิเล็กตรอนนั้นๆ จะมีช่วงระยะเวลาไม่นานก็เกิดการสลายคายพลังงานส่วนเกินกลับสู่สถานะปกติดังเดิม ผลการดูดกลืนแสงและเกิดปรากฏการณ์นี้เองทำให้ถ้ามีการวัดความเข้มของแสงอัลตราไวโอเล็ตหรือแสงวิสิเบิลก่อนการดูดกลืนแสงของโมเลกุลและภายหลังการดูดกลืนแสงพบว่า ความเข้มแสงที่หายไปหรือลดลงนี้แปรผันตามความเข้มข้นของสารที่จะวิเคราะห์หรือที่ทราบคือ กฎของเบียร์แลมเบิร์ต (Beer Lambert's Law) ดังสมการที่ (4)

$$A = \epsilon bc \quad \dots\dots\dots(3)$$

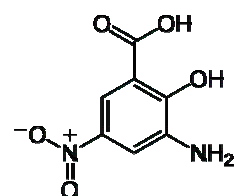
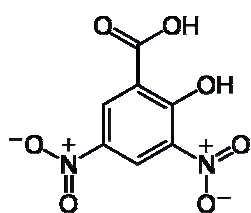
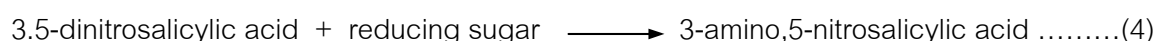
เมื่อ A คือค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

ϵ คือ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของสาร

b คือ ระยะทางที่แสงผ่านสารตัวอย่าง

c คือ ความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์

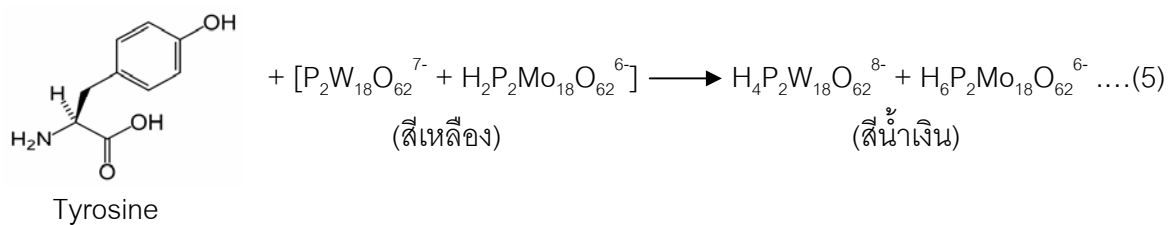
ในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจหาปริมาณเอนไซม์อะไมเลส โดยให้เอนไซม์อะไมเลสที่มีอยู่ในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นสับสเตรตในที่นี้ใช้แป้ง โดยเอนไซม์อะไมเลสจะมีหน้าที่ย่อยแป้งจนได้เป็นน้ำตาลที่มีขนาดเล็กลง โดยอาศัยกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลที่มีหมู่รีดิวซ์ ซึ่งในการทดลองติดตามจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลที่มีหมู่รีดิวซ์สามารถทำปฏิกิริยากับสารเคมีคือ 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด ดังสมการที่ 5



ซึ่งสาร 3-amino,5-nitrosalicylic acid มีความสามารถในการดูดกลืนแสงวิสิเบิลได้ที่มีความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์โปรติเอสก็ใช้เทคนิคอัลตราไวโอเล็ตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรีเช่นเดียวกัน โดยให้เอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในตัวอย่างทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นสับสเตรตในที่นี้ใช้เคซีน เอนไซม์โปรติเอสจะทำหน้าที่ย่อยโปรตีนให้มีขนาดเล็กลงจนได้กรดอะมิโน ซึ่งในการทดลอง

ติดตามกรดอะมิโนไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยโปรตีน อาศัยกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไทโรซีนกับ Folin-Ciocalteu reagent โดยไทโรซีนจะทำปฏิกิริยาดังสมการ 6



โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ กราฟมาตรฐานของไทโรซีน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

ตอนที่ 1 การหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

ตอนที่ 2 การเก็บตัวอย่าง

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของการหมักซีอิ๊วถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ถั่วมะแฮะ จากอำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน
2. ถั่วเหลืองคัดพันธุ์ ตราไรท์พิพย์ ผลิตโดยบริษัท ไร่บุญญะ จำกัด
3. แป้งสาลี ตราบัวแดง ผลิตโดยบริษัท ยูนิเท็ดฟลาวมิลล์ จำกัด (มหาชน)
4. เกลือ ตราปทุมพิพย์ ผลิตโดยบริษัท อุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์ จำกัด
5. ไหดินเคลือบ
6. กระด้ง
7. ผ้าขาวบาง
8. เชื้อรา *A. oryzae* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
9. กรดซिटริก ชนิด Analytical Grade ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน
10. กรดแลคติก ชนิด Analytical Grade ของบริษัท Carlo Erba ประเทศฝรั่งเศส
11. กรดแอสซิทิก ชนิด Analytical Grade ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน
12. เอการ์ (Agar) ของบริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. นิวเทรียนบรอก (Nutrient Broth) ของบริษัท Becton และ Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. โปเตโต เดกซ์โตรส อาการ์ (Potato Dextrose Agar) ของบริษัท Becton และ Dickinson ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. ซิลเวอร์ไนเทรต ของบริษัท Carlo Erba ประเทศสวีเดน
16. กรดไนตริก ของบริษัท UNIVAR ประเทศออสเตรเลีย
17. โพแทสเซียมไฮโอไซยาเนต ของบริษัท UNIVAR ประเทศออสเตรเลีย
18. เฟอริก อะลัม ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมัน

19. ไทโรซีน ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมัน
20. กรดไฮโดรคลอริก ของบริษัท UNIVAR ประเทศออสเตรเลีย
21. โซเดียมคาร์บอเนต ของบริษัท UNIVAR ประเทศออสเตรเลีย
22. สารละลาย Folin-ciocalteu reagent ของบริษัท Carlo Erba ประเทศสวีเดน
23. เคซีน ของบริษัท Fluka ประเทศเยอรมัน
24. กรดไตรคลอโรแอสติก ของบริษัท Carlo Erba ประเทศสวีเดน
25. โซเดียมอะซิเตท ของบริษัท Carlo Erba ประเทศสวีเดน
26. กลูโคส ของบริษัท UNIVAR ประเทศออสเตรเลีย
27. 3,5-ไดไนโตรซาลิกไซคลิก ของบริษัท Carlo Erba ประเทศสวีเดน
28. โซเดียมไฮดรอกไซด์ ของบริษัท J.T. Baker
29. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ของบริษัท Carlo Erba ประเทศสวีเดน
30. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ UV-2401 และ UV-2450 ยี่ห้อ SHIMADZU
31. เครื่อง HPLC model Waters 2690 คอลัมน์เป็นชนิด Aminex Biorad (Hercules, CA,USA) ขนาดของคอลัมน์ 30 cm × 6.5 mm Detector คือ Waters 410 Differential Refractometer Detector (Millipore Corp., Milford, MA, USA)

ตอนที่ 1 การหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

ทำการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองที่ห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

1. การหมักถั่วและแบ่งด้วยเชื้อราหรือการหมักโคจิ

1.1 นำถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองที่คัดแล้วมาแช่ในน้ำประมาณ 15 ชั่วโมง และนำมาล้าง

จนสุก

1.2 นำถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองที่นึ่งสุกแล้ว มาผสมกันโดยใช้ถั่วมะแฮะ 6 ส่วนผสมกับถั่วเหลือง 4 ส่วน แล้วนำมาคลุกเคล้ากับแป้งสาลีในอัตราส่วนของถั่วต่อแป้งสาลีเป็นอัตราส่วน 3 : 1

1.3 นำส่วนผสมดังกล่าวไปกระจายในกระด้งแล้วคลุกด้วยเชื้อรา *A. oryzae* โดยใช้เชื้อรา *A. oryzae* ปริมาณ 3.3 กรัม ต่อส่วนผสมถั่วหมัก 1 กิโลกรัม แล้วพรมด้วยน้ำที่สะอาดเพื่อให้เกิดความชื้นที่เหมาะสม คลุมด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

1.4 ตรวจดูการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. oryzae* โดยสังเกตจากสปอร์ที่มีสีเหลืองแกมเขียวคลุมเมล็ดถั่ว ซึ่งเรียกว่าโคจิ แล้วนำไปหมักต่อในน้ำเกลือ

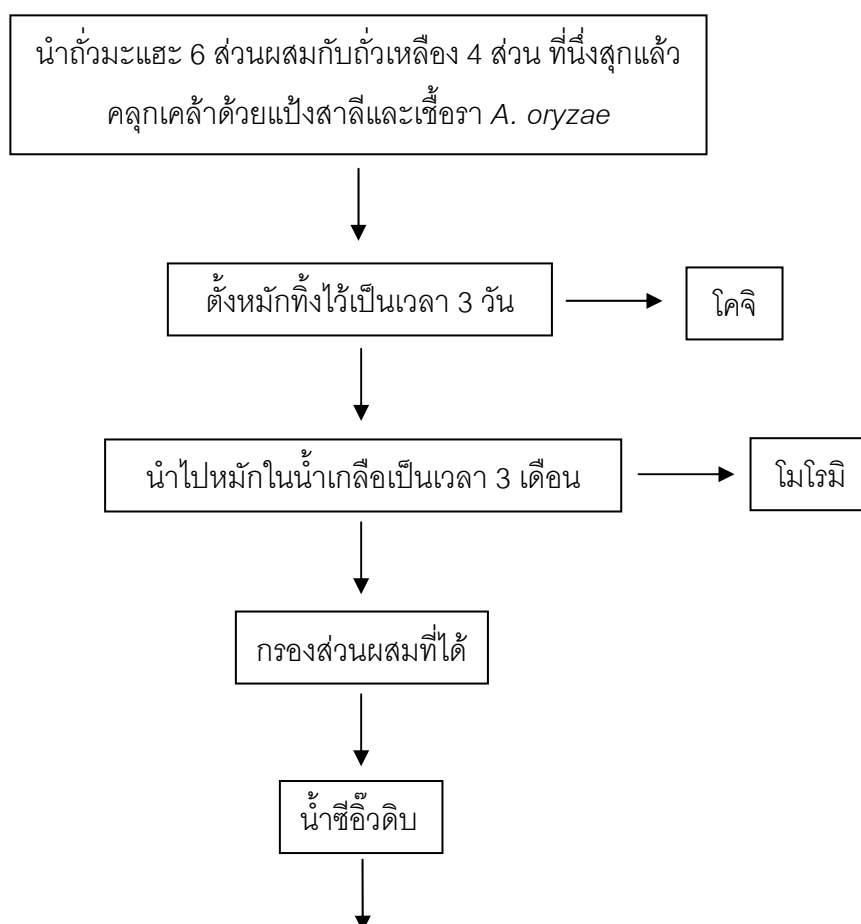
2. การหมักน้ำเกลือหรือการหมักโมโรมิ

นำก้อนโคจิที่ได้ในข้อ 1.4 ใส่ลงในดินเคลือบแล้วเติมน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20(สูตร 1 ซึ่งเป็นสูตรควบคุม), 18(สูตร 2), 16(สูตร 3), 14(สูตร 4), 12(สูตร 5) และ 10(สูตร 6) ลงในแต่ละไห ปิดฝาไหเพื่อป้องกันแมลง ฝุ่นละออง และน้ำฝน นำไหไปตากแดดโดยการเปิดฝา เพื่อเร่งปฏิกิริยาระหว่างการหมัก สัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง มีการคนเป็นครั้งคราวและตั้งหมักไว้เป็นระยะเวลา 3 เดือน

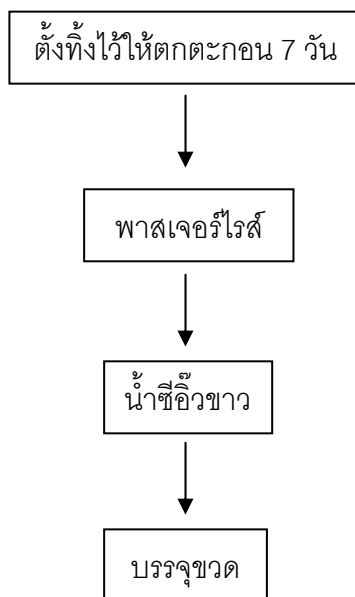
3. การพาสเจอร์ไรส์

เมื่อการหมักโมโรมิครบกำหนด 3 เดือน นำส่วนผสมมากรองด้วยผ้าขาวบาง จะได้น้ำซีอิ๊วดิบ ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำน้ำซีอิ๊วไปทำการพาสเจอร์ไรส์ โดยการต้มที่อุณหภูมิ 80-85°C นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในน้ำแข็ง แล้วเก็บน้ำซีอิ๊วที่ได้ในขวดแก้ว น้ำซีอิ๊วที่ได้นี้เรียกว่า น้ำซีอิ๊วขาว

กระบวนการหมักซีอิ๊วแสดงเป็นขั้นตอนให้เห็นชัดเจนดังแผนภาพประกอบข้างล่างนี้



กระบวนการหมักชีอิ้วแสดงเป็นขั้นตอนให้เห็นชัดเจนดังแผนภาพประกอบข้างล่างนี้ (ต่อ)



ภาพประกอบ 1 แสดงกระบวนการหมักชีอิ้ว

หมายเหตุ อัตราส่วนของถั่วต่อแป้งสาลีเป็น 3 : 1 และความเข้มข้นของน้ำเกลือที่ใช้ในการหมักโมโรมิเปลี่ยนแปลงตามสูตรที่ศึกษา

ตอนที่ 2 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างแบ่งออกเป็นสามช่วงดังนี้คือ

1. การเก็บตัวอย่างในช่วงการหมักโมโรมิ ทำการสุ่มตัวอย่างเป็นระยะๆ ตั้งแต่วันแรกที่หมัก (0 วัน), 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ โดยสุ่มตัวอย่างในทุกความเข้มข้นของเกลือที่ทำการทดลอง ใส่ในถุงเย็นแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่สนใจ
2. การเก็บตัวอย่างน้ำชีอิ้วขาว โดยเก็บจากตัวอย่างน้ำชีอิ้วดิบที่ทำการพาสเจอร์ไรส์แล้ว โดยสุ่มตัวอย่างในทุกความเข้มข้นของเกลือที่ทำการทดลอง ใส่ในถุงเย็นแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่สนใจ

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของการหมักชีอิ้วถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

3.1. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในตัวอย่าง

วิธีการทดลอง

3.1.1. การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์

1. เตรียมสารละลายกรดอินทรีย์ที่ประกอบด้วยกรดซิตริก กรดแลคติก และกรดแอสซิติคความเข้มข้น 4g/L
2. ปิเปตสารละลายกรดอินทรีย์ปริมาตร 3 mL แล้วเติมน้ำกลั่น 3 mL ซึ่งใช้เป็นสารละลายตั้งต้น
3. ทำการเจือจางสารละลายตั้งต้นให้มีปริมาณกรดอินทรีย์ ดังตาราง

ตาราง 5 แสดงการเจือจางสารละลายตั้งต้นของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด

สารละลายตั้งต้น (mL)	น้ำ (mL)	กรดซิตริก (g/L)	กรดแลคติก (g/L)	กรดแอสซิติค (g/L)
0.0625	0.9375	0.125	0.125	0.125
0.1250	0.8750	0.250	0.250	0.250
0.2500	0.7500	0.500	0.500	0.500
0.5000	0.5000	1.000	1.000	1.000
0.7500	0.2500	1.500	1.500	1.500
1.0000	0.0000	2.000	2.000	2.000

4. ฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาตร 20 μ L เข้าเครื่อง HPLC ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ อัตราการไหล 0.5 mL/min อุณหภูมิของคอลัมน์ 90 °C และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.5 mM เพื่อหาค่าระยะเวลาริเทนชันของสารละลายมาตรฐาน และค่าพื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น
5. พล็อตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าพื้นที่พีค

3.1.2. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างมาปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น
2. ปิเปตตัวอย่างที่ปั่นเรียบร้อยแล้วปริมาตร 1 mL ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 mL
3. นำตัวอย่างไปเซนตริฟิวจ์ นาน 5 นาที

4. ใช้ปิเปตดูดสารละลายใส่ของตัวอย่างใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์อันใหม่แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ นาน 10 นาที
5. นำสารตัวอย่างที่ได้ไปกรองด้วยวิธีการกรองดูด โดยกรองผ่านกระดาษกรองชนิดเมมเบรนขนาด 0.45 μm
6. ได้สารละลายใส่ของตัวอย่างแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แล้วคำนวณหาปริมาณกรดอินทรีย์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.2. การวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่าง

จุลินทรีย์ที่วิเคราะห์ในตัวอย่างคือได้แก่ แบคทีเรีย ราและยีสต์

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยการชั่งเอการ์ (agar) 15 g ผสมกับ Nutrient 8 g แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 L นำสารละลายอาหารที่ได้ไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที
2. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อราและยีสต์ โดยการชั่ง Potato Dextrose Agar 39 g แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 L นำสารละลายอาหารที่ได้ไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที
3. วิเคราะห์การวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในตัวอย่างโดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งใช้วิธีการเทเพลท ทำการทดลองดังนี้
 - 3.1 ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 9 mL ใส่หลอดทดลองจำนวน 6 หลอด แล้วนำน้ำกลั่นดังกล่าว ไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที
 - 3.2 ทำการเจือจางตัวอย่างสิบเท่า (ten fold dilution) ใช้ น้ำกลั่นปริมาตร 9 mL ในหลอดที่ 1 ผสมกับตัวอย่าง 1 mL จะได้เป็นระดับความเจือจางที่ 10^{-1} เท่าจากนั้นปิเปตสารละลายจากหลอดที่ 1 ใส่หลอดที่ 2 ซึ่งมีน้ำกลั่นอยู่ปริมาตร 9 mL จะได้เป็นระดับความเจือจางที่ 10^{-2} เท่า ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆจนกว่าจะได้ระดับความเจือจางเป็น 10^{-4} เท่า และ 10^{-5} เท่า สำหรับวิเคราะห์ราและยีสต์ในตัวอย่างและระดับความเจือจางเป็น 10^{-5} เท่า และ 10^{-6} เท่า สำหรับวิเคราะห์แบคทีเรียในตัวอย่าง
 - 3.3 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางเป็น 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} เท่า ปริมาตร 1 mL ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ
 - 3.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลวมีอุณหภูมิประมาณ 45 °C ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ราและยีสต์ให้เติมยาเพนนิซิลลิน 0.1 mg ลงในอาหาร

เลี้ยงเชื้อด้วย จากนั้นหมุนจานเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจนทั่วจาน

3.5 นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับ

จำนวนแบคทีเรีย ราและยีสต์เป็น colony forming unit, CFU/g แล้วบันทึกผล

3.3. การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือในตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์

วิธีการทดลอง

1. ใส่ตัวอย่างซีอิ๊วที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 4 mL ลงในขวดรูปกรวย
2. เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเทรตความเข้มข้น 0.1 N ลงไป 20 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมกรดไนตริกความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 2 mL
3. ใส่สารละลายเฟอร์ริกอะลัมปริมาตร 1mL เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโพแทสเซียมไดออกไซด์ไฮยาเนตความเข้มข้น 0.1 N เมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะมีสีแดงอิฐเกิดขึ้น บันทึกปริมาตรโพแทสเซียมไดออกไซด์ไฮยาเนตที่ใช้
4. คำนวณหาปริมาณของเกลือที่มีอยู่ในตัวอย่างซีอิ๊วเป็นร้อยละของความเข้มข้น

3.4. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่าง

วิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่าง โดยการดัดแปลงจากวิธีการของ

Anson, 1938

วิธีการทดลอง

1. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสง
 - 1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานไทโรซีนความเข้มข้น 100 µg/mL โดยชั่งไทโรซีนปริมาณ 100 mg แล้วจึงนำสารละลายนี้มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของไทโรซีนเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 100 µg/mL ตามลำดับ
 - 1.2 นำสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1.0 mL ใส่ในหลอดทดลองและเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 5.0 mL ผสมให้เข้ากัน
 - 1.3 เติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 1.0 mL ผสมให้เข้ากัน บ่ม

ในอุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดสีชัดเจน

- 1.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสง

2. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่าง

- 2.1 เจือจางตัวอย่างซีอิ๊วด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วใช้ปิเปตดูดใส่หลอดทดลองหลอดละ 1.0 mL ปิดปากหลอด
- 2.2 ใส่สารละลายเคซีน ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 mL เพื่อใช้เป็นสับสเทรต ลงในหลอดตัวอย่างแต่ละหลอด ปิดปากหลอด บ่มในน้ำที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเร่งปฏิกิริยา
- 2.3 หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายไตรคลอโรแอซิดิกความเข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 2 mL เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที
- 2.4 กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1
- 2.5 นำสารละลายใสที่กรองได้ ปริมาตร 1.0 mL ใส่หลอดทดลอง แล้วดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานในข้อ 1.2-1.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน สำหรับหลอดควบคุมดำเนินการตามข้อ 2.1-2.5 แต่หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ก่อนด้วยการเติมสารละลายไตรคลอโรแอซิดิก แล้วจึงเติมสารละลายเคซีนที่เป็นสับสเทรต
- 2.6 คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์
กำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์โปรติเอส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้ไทโรซีน 1 $\mu\text{g/mL}$ ในเวลา 1 นาที ที่สภาวะของการวิเคราะห์

3.5. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่าง

วิธีการทดลอง

- 3.5.1. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส โดยการละลายกลูโคส 0.1 g ในน้ำกลั่น 100 mL จะได้สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.1 % W/V ซึ่งเป็นสารละลายตั้งต้น
2. เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอด แล้วเติมสารละลายต่างๆ ดังตารางข้างล่างดังนี้

ตาราง 6 แสดงการเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง

หลอดที่ สารละลาย (mL)	1	2	3	4
สารละลาย 3,5-ไดไนโตรซาลิก ไซคลิกแอซิด	0.5	0.5	0.5	0.5
สารละลายกลูโคสตั้งต้น	0.1	0.2	0.3	0.4
น้ำกลั่น	0.4	0.3	0.2	0.1

3. ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็น โดยแช่หลอดในน้ำ
 4. เติมน้ำกลั่นเพิ่มลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 4 mL เพื่อเจือจาง
 5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วบันทึกค่าการดูดกลืนแสง
 6. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับปริมาณของกลูโคสในแต่ละหลอด ซึ่งปริมาณของกลูโคสในแต่ละหลอดเป็น 20, 40, 60 และ 80 mg/L ตามลำดับ
- 3.5.2. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐานกับปริมาณกลูโคส
1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐาน โดยการละลายเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐานประมาณ 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น 250 mL จะได้สารละลายเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 g/L แล้วเจือจางสารละลายอะไมเลสมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 0.2 g/L ซึ่งใช้เป็นสารละลายตั้งต้น
 2. เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอด แล้วเติมสารละลายต่างๆ ดังตารางต่อไป

ตาราง 7 แสดงการเตรียมสารละลายต่างๆ สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐานกับปริมาณกลูโคส

สารละลาย (mL) \ หลอดที่	1	2	3	4
สารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1 % W/V	2.0	2.0	2.0	2.0
สารละลายเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐานที่เป็น	0.5	1.0	1.5	2.0
สารละลายตั้งต้น				
น้ำกลั่น	1.5	1.0	0.5	0.0

โดยเติมเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐานเป็นลำดับสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3. ปิเปตสารละลาย 3,5-กรดไดไนโตรซาลิกไซคลิกใส่หลอดทดลอง 4 หลอดๆ ละ 0.5 mL เมื่อครบเวลา 10 นาที ในแต่ละหลอดให้ปิเปตสารผสมจากข้อ 2 มาหลอดละ 0.5 mL เพื่อหาปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้น
 4. นำสารละลายแต่ละหลอดไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 4 mL
 5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วบันทึกค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นคำนวณหาปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส
 6. สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอดกับปริมาณเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐาน ซึ่งปริมาณเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐานในแต่ละหลอดเป็น 0,1, 0.2, 0.3 และ 0.4 mg ตามลำดับ
- 3.5.3. การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างชีอิ้วประมาณ 2 กรัมเปียก แล้วทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 mL ผสมให้เข้ากัน
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างชีอิ้วที่เจือจางแล้วในข้อ 2.1 ปริมาตร 1 mL ไปเจือจางอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น 19 mL จะได้สารละลายตัวอย่างชีอิ้วที่เจือจาง 1 ต่อ 200
3. ปิเปตสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1 % W/V ปริมาตร 2 mL ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 mL หลังจากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง

- ในข้อ 2 ปริมาตร 1 mL ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
4. ปิเปตสารละลาย 3,5-กรดไดไนโตรซาลิกไซคลิกใส่หลอดทดลองอันใหม่ปริมาตร 0.5 mL แล้วเติมสารละลายผสมในข้อ 3 ปริมาตร 0.5 mL เพื่อหาปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้น โดยให้ทำปฏิกิริยาระหว่าง 3,5-กรดไดไนโตรซาลิกไซคลิก
 5. นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาทีแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 4 mL
 6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ คำนวณหาปริมาณกลูโคสเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส
 7. คำนวณหาปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่างที่สภาวะทำการทดลองเทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณเอนไซม์อะไมเลสมาตรฐานกับปริมาณกลูโคส
 8. กำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยแบ่งให้ได้กลูโคส 1 mg ในเวลา 1 นาที ที่สภาวะของการวิเคราะห์

3.6. การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง

วิธีการทดลอง

3.6.1. สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

1. เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 120 g/L แล้วจึงนำสารละลายนี้มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสเท่ากับ 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 g/L
2. ชีดสารละลายมาตรฐานกลูโคสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 μ L เข้าเครื่อง HPLC ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC เป็นเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น
3. ได้ค่าระยะเวลาริเทนชันและค่าพื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น
4. พล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสกับค่าพื้นที่พีค

3.6.2. การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างมาปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น
2. ปิเปตตัวอย่างที่ปั่นเรียบร้อยแล้วปริมาตร 1 mL ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

- แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 mL
3. นำตัวอย่างไปเซนตริฟิวส์ นาน 5 นาที
4. ใช้ปิเปตดูดสารละลายใสของตัวอย่างใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์อันใหม่แล้วนำไปเซนตริฟิวส์ นาน 10 นาที
5. นำสารตัวอย่างที่ได้ไปกรองด้วยวิธีการกรองดูด โดยกรองผ่านกระดาษกรองชนิดเมมเบรนขนาด 0.45 μm
6. ได้สารละลายใสของตัวอย่างแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แล้วคำนวณหาปริมาณกลูโคส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.7. การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลในตัวอย่าง

วิธีการทดลอง

3.7.1. สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล

1. เตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 30 g/L แล้วจึงนำสารละลายนี้มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลเท่ากับ 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 11.5 และ 15.0 g/L
2. ฉีดสารละลายมาตรฐานเอทานอลแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 20 μL เข้าเครื่อง HPLC ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC เป็นเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น
3. ได้ค่าระยะเวลารีเทนชันและค่าพื้นที่พีคของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น
4. พล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอลกับค่าพื้นที่พีค

3.7.2. การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลในตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างมาปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น
2. ปิเปตตัวอย่างที่ปั่นเรียบร้อยแล้วปริมาตร 1 mL ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 mL
3. นำตัวอย่างไปเซนตริฟิวส์ นาน 5 นาที
4. ใช้ปิเปตดูดสารละลายใสของตัวอย่างใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์อันใหม่แล้วนำไปเซนตริฟิวส์ นาน 10 นาที
5. นำสารตัวอย่างที่ได้ไปกรองด้วยวิธีการกรองดูด โดยกรองผ่านกระดาษกรองชนิด

เมมเบรนขนาด 0.45 μm

6. ได้สารละลายใสของตัวอย่างแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แล้ว
คำนวณหาปริมาณเอทานอล โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

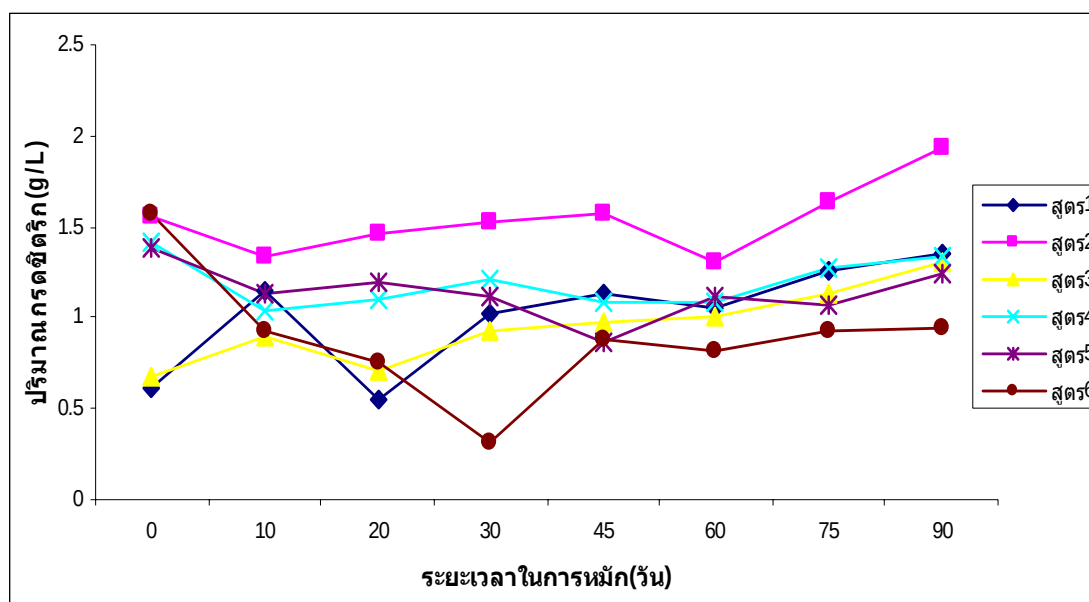
บทที่ 4

ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์

จากการศึกษาและวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในระหว่างการหมักโมโรมิได้เก็บตัวอย่างจากทุกสูตรที่ทำการศึกษาในช่วงของการหมักโมโรมิตามช่วงระยะเวลาการหมักดังนี้ เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่หมัก (0 วัน), 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ โดยติดตามจากปริมาณกรดซิตริก กรดแอสติก และกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในช่วงการหมัก ซึ่งใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

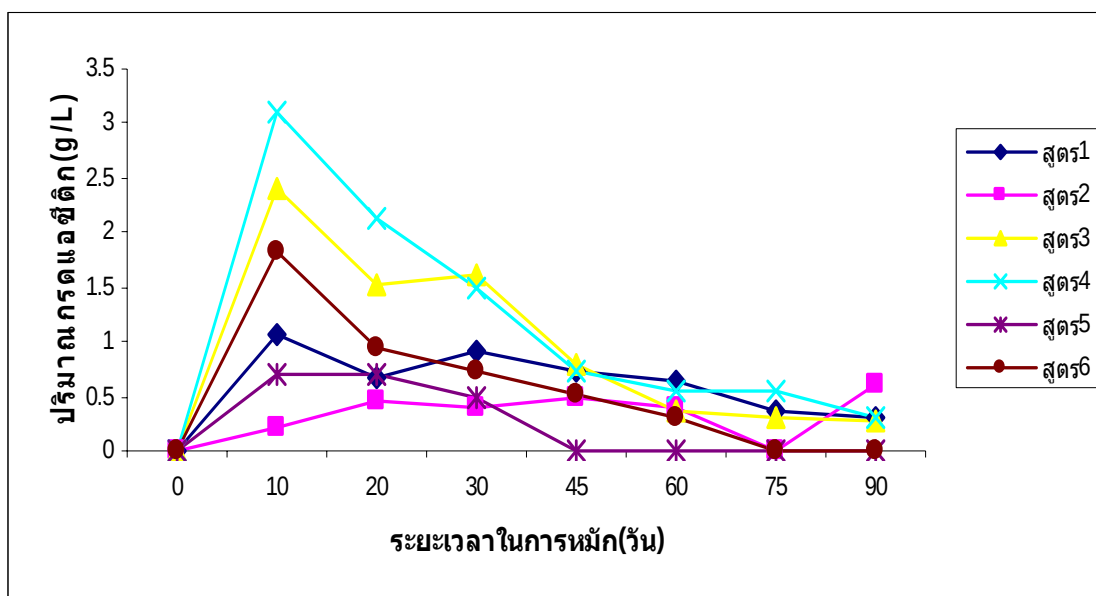
ในการทดลองได้วิเคราะห์หาปริมาณกรดซิตริกที่ได้ในตัวอย่างแต่ละสูตรเทียบกับกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ 15 เมื่อวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาปริมาณกรดซิตริกในตัวอย่างได้ พบว่าปริมาณกรดซิตริกที่ตรวจพบจากตัวอย่างที่เก็บ 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ในสูตร 1 อยู่ในช่วง 0.55 – 1.35 กรัมต่อลิตร สูตร 2 อยู่ในช่วง 1.31 – 1.94 กรัมต่อลิตร สูตร 3 อยู่ในช่วง 0.67 – 1.31 กรัมต่อลิตร สูตร 4 อยู่ในช่วง 1.03 – 1.42 กรัมต่อลิตร สูตร 5 อยู่ในช่วง 0.87 – 1.39 กรัมต่อลิตร และสูตร 6 อยู่ในช่วง 0.32 – 1.58 กรัมต่อลิตร ดังแสดงให้เห็นชัดเจนตามตาราง 8 จากผลการทดลองปริมาณกรดซิตริกที่ตรวจพบในทุกสูตรที่ทำการศึกษาของการหมัก มีปริมาณกรดซิตริกเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมักในช่วง 90 วัน โดยแต่ละสูตรจะมีปริมาณเกลือลดลง ปริมาณกรดซิตริกที่เปลี่ยนแปลงในทุกสูตรมีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะในสูตร 2 มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดซิตริกมากที่สุดตลอดระยะเวลาการหมัก ส่วนสูตร 6 เมื่อหมักครบ 90 วันจะพบปริมาณกรดซิตริกต่ำสุด ปริมาณกรดซิตริกที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 ปริมาณกรดซัลฟิวริกในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน

จากภาพประกอบ 2 จะเห็นได้ว่าปริมาณกรดซัลฟิวริกในโมโรมิของแต่ละสูตรมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ซึ่งแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกันเล็กน้อย

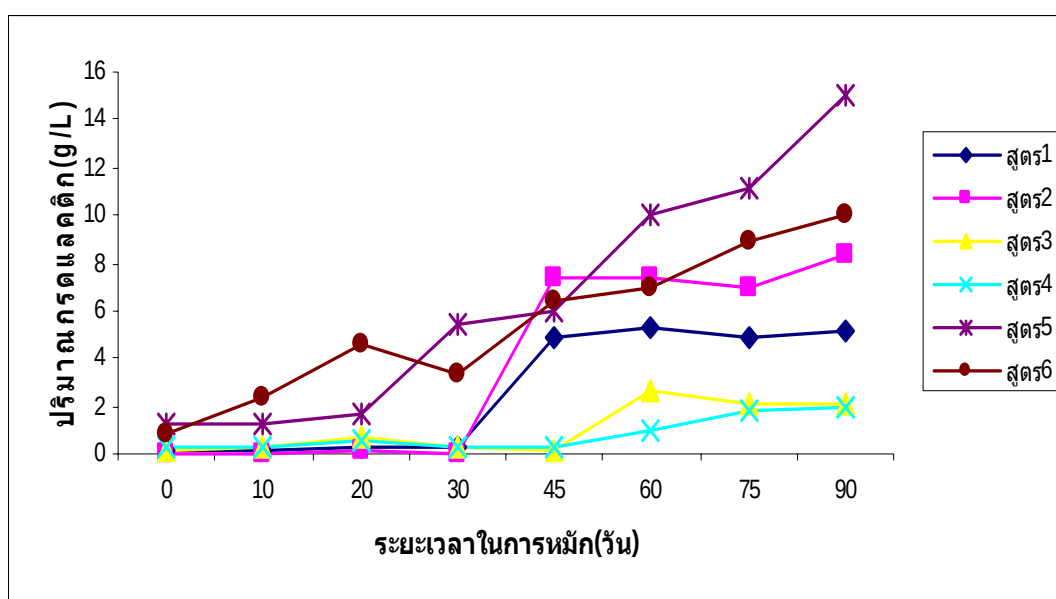
ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสซิดิกที่ได้ในตัวอย่างแต่ละสูตรเทียบกับกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ 16 เมื่อวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาปริมาณกรดแอสซิดิกในตัวอย่างได้ พบว่าปริมาณกรดแอสซิดิกที่ตรวจพบจากตัวอย่างที่เก็บ 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ในสูตร 1 อยู่ในช่วง 0.00 – 0.73 กรัมต่อลิตร สูตร 2 อยู่ในช่วง 0.00 – 0.48 กรัมต่อลิตร สูตร 3 อยู่ในช่วง 0.00 – 2.41 กรัมต่อลิตร สูตร 4 อยู่ในช่วง 0.00 – 3.11 กรัมต่อลิตร สูตร 5 อยู่ในช่วง 0.00 – 0.70 กรัมต่อลิตร และสูตร 6 อยู่ในช่วง 0.00 – 1.83 กรัมต่อลิตร ดังแสดงให้เห็นชัดเจนตามตาราง 9 ในช่วง 10 วันแรกของการหมักในแต่ละสูตร จะไม่พบปริมาณกรดแอสซิดิก ซึ่งสอดคล้องกับสูตร 1 ที่ใช้เป็นสูตรควบคุม แต่จะตรวจพบปริมาณกรดแอสซิดิกในระยะการหมักตั้งแต่ 10 – 90 วัน ในทุกสูตรที่ทำการศึกษา สำหรับสูตร 4 มีแนวโน้มที่พบปริมาณกรดแอสซิดิกมากกว่าสูตรอื่นๆ ที่ทำการศึกษา สูตร 5 จะไม่พบปริมาณกรดแอสซิดิกภายหลังการหมัก 45 วัน และในทุกสูตรที่ทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแอสซิดิกภายหลังการหมัก 45 วัน มีแนวโน้มคงที่จนกระทั่งหมักครบ 90 วัน ปริมาณกรดแอสซิดิกที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 ปริมาณกรดแอซิดิกในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน

จากภาพประกอบ 3 จะเห็นได้ว่าโดยรวมแล้วเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณกรดแอซิดิกที่พบในโมโรมิของแต่ละสูตรจะลดลง ซึ่งเป็นเช่นเดียวกันกับสูตรควบคุม

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกที่ได้ในตัวอย่างแต่ละสูตรเทียบกับกราฟมาตรฐาน ดังภาพประกอบ 17 เมื่อวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาปริมาณกรดแลคติกในตัวอย่างได้ พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ตรวจพบจากตัวอย่างที่เก็บ 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ในสูตร 1 อยู่ในช่วง 0.14 – 5.29 กรัมต่อลิตร สูตร 2 อยู่ในช่วง 0.00 – 8.28 กรัมต่อลิตร สูตร 3 อยู่ในช่วง 0.17 – 2.64 กรัมต่อลิตร สูตร 4 อยู่ในช่วง 0.23 – 2.01 กรัมต่อลิตร สูตร 5 อยู่ในช่วง 1.20 – 15.06 กรัมต่อลิตร และสูตร 6 อยู่ในช่วง 0.87 – 10.06 กรัมต่อลิตร ดังแสดงให้เห็นชัดเจนตามตาราง 10 ปริมาณกรดแลคติกที่พบมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จะเห็นได้ชัดเจนในช่วงของการหมักระหว่างระยะเวลา 30 – 90 วัน สูตร 2 กับสูตร 6 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกใกล้เคียงกัน และสูตร 3 กับสูตร 4 พบปริมาณกรดแลคติกน้อยกว่าสูตรอื่นแต่อยู่ในปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนสูตร 5 พบปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ระยะเวลาการหมักครบ 90 วัน สำหรับในช่วงแรกของการหมักระหว่างระยะเวลา 0 – 30 วัน แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกคงที่ในสูตร 2, สูตร 3 และสูตร 4 ส่วนสูตร 5 และสูตร 6 พบปริมาณกรดแลคติกสูงกว่าเล็กน้อยแต่อยู่ในปริมาณใกล้เคียงกัน ปริมาณกรดแลคติกที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 4

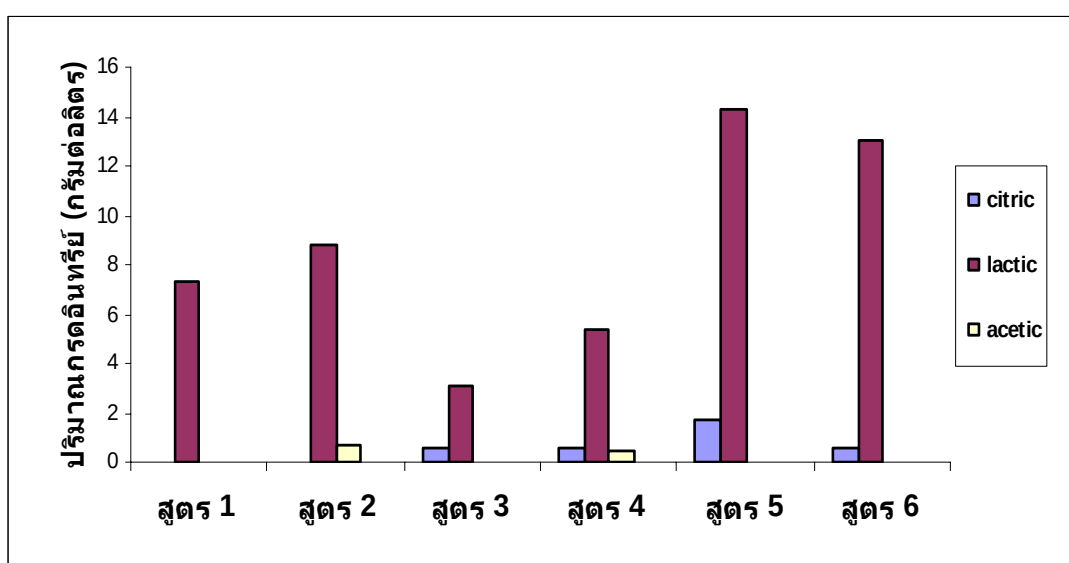


ภาพประกอบ 4 ปริมาณกรดแลคติกในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน

จากภาพประกอบ 4 จะเห็นได้ว่า ปริมาณกรดแลคติกที่พบในโมโรมิในทุกสูตรที่ทำการศึกษามีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยรวมเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจะพบปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นด้วยเป็นเช่นเดียวกันกับสูตรควบคุม

การศึกษากาโรวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำชีอี๊วขาว โดยเก็บตัวอย่างจากทุกสูตรที่ทำการศึกษา ซึ่งติดตามจากปริมาณกรดซิตริก กรดแอสติก และกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในน้ำชีอี๊วขาว ใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในการหมักชีอี๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในช่วงการหมักโมโรมิ ในการทดลองได้วิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ได้ในตัวอย่างน้ำชีอี๊วขาวแต่ละสูตรเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด ดังภาพประกอบ 15 16 และ 17 เมื่อวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาปริมาณกรดอินทรีย์แต่ละชนิดในตัวอย่างได้ พบว่าน้ำชีอี๊วขาวในสูตร 1 ที่ใช้เป็นสูตรควบคุม ไม่พบปริมาณกรดซิตริกและกรดแอสติก ส่วนปริมาณกรดแลคติกที่พบ 7.31 กรัมต่อลิตร สูตร 2 ไม่พบปริมาณกรดซิตริก ปริมาณกรดแอสติกที่พบ 0.67 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกรดแลคติกที่พบ 8.82 กรัมต่อลิตร สูตร 3 ไม่พบปริมาณกรดแอสติก ปริมาณกรดซิตริกที่พบ 0.61 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกรดแลคติกที่พบ 3.11 กรัมต่อลิตร สูตร 4 จะพบปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งสามชนิด โดยปริมาณกรดซิตริกที่พบ 0.53 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแอสติกที่พบ 0.47 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกรดแลคติกที่พบ 5.32 กรัมต่อลิตร สูตร 5 ไม่พบปริมาณกรดแอสติก ปริมาณกรดซิตริกที่พบ 1.68 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกรดแลคติกที่พบ 14.30 กรัมต่อลิตร และสูตร 6 ไม่พบปริมาณกรดแอสติก ปริมาณกรดซิตริกที่พบ 0.53 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกรดแลคติกที่พบ 13.07 กรัมต่อลิตร ดังแสดงให้เห็นชัดเจนตามตาราง 11 จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งสามชนิด พบว่าในน้ำชีอี๊วที่หมักได้ในแต่ละ

สูตรจะมีปริมาณกรดแลคติกมากที่สุด โดยเฉพาะสูตร 5 พบปริมาณกรดแลคติกมากที่สุด ซึ่งจะพบปริมาณกรดแลคติกสูงถึง 14.30 กรัมต่อลิตร ส่วนสูตร 3 พบปริมาณกรดแลคติกน้อยสุดอยู่ที่ 3.11 กรัมต่อลิตร โดยรวมแล้วปริมาณกรดแลคติกที่พบในน้ำชีอิ้วขาวอยู่ในช่วง 3.11 – 14.30 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกรดซิตริกและกรดแอซีติกพบเฉพาะบางสูตรที่ทำการศึกษา โดยรวมแล้วอยู่ระหว่าง 0 – 1.68 และ 0 – 0.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ที่พบมีปริมาณใกล้เคียงกัน ปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งสามชนิดที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจน ดังภาพประกอบ 5



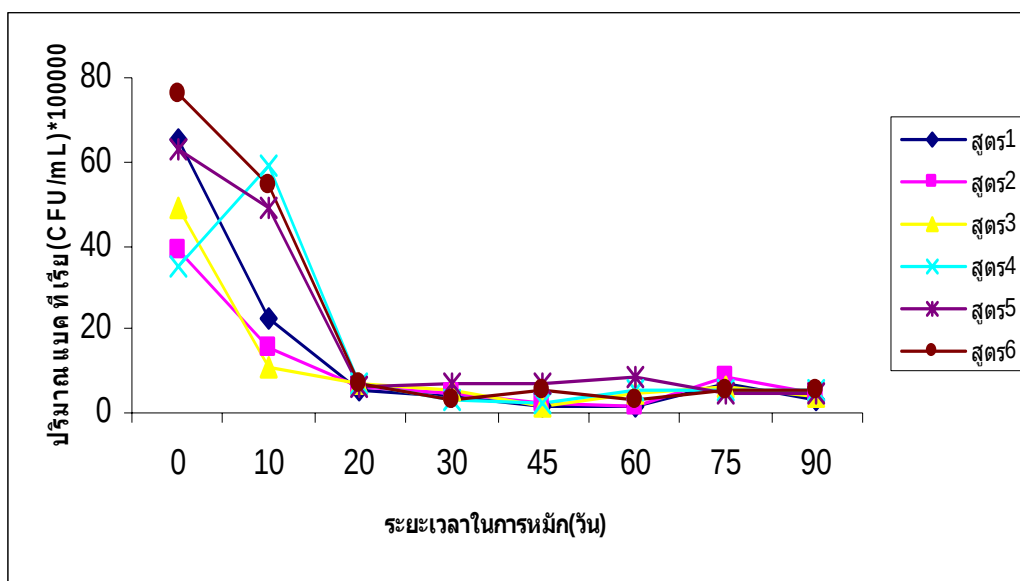
ภาพประกอบ 5 ปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำชีอิ้วขาวแต่ละสูตร

จากภาพประกอบ 5 จะเห็นได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุม ในน้ำชีอิ้วขาวของทุกสูตรที่ทำการศึกษากรดอินทรีย์ที่พบมากที่สุดคือ กรดแลคติก ส่วนกรดซิตริกและกรดแอซีติกจะตรวจพบเฉพาะบางสูตรและมีปริมาณน้อยหรือไม่พบกรดอินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้

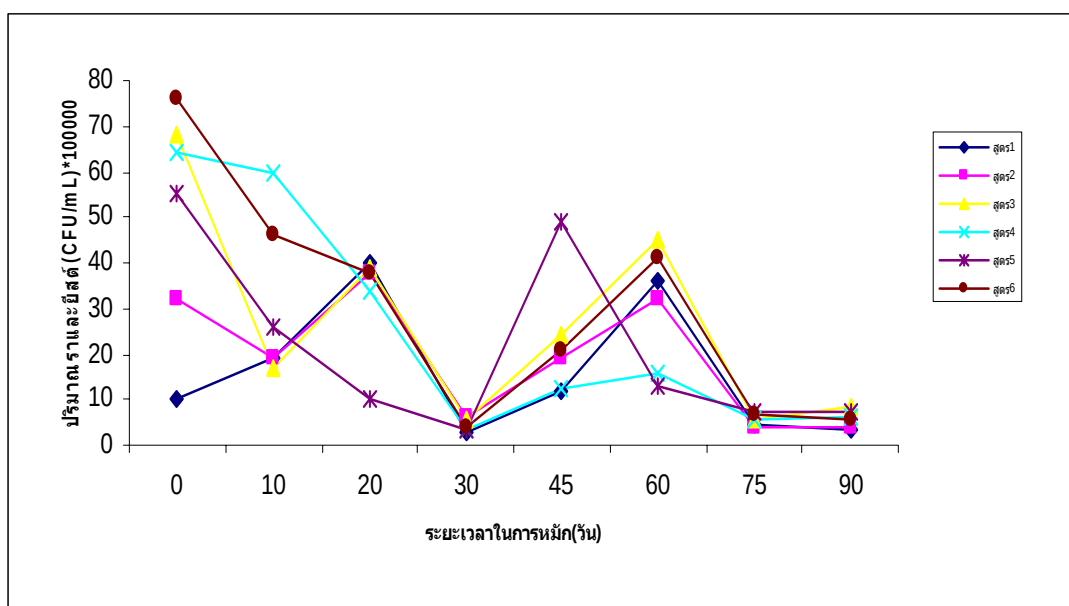
ตอนที่ 2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์

2.1 การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักโมโรมิได้เก็บตัวอย่างจากทุกสูตรที่ทำการศึกษาในช่วงของการหมักโมโรมิตามช่วงระยะเวลาการหมักดังนี้ เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่แรกที่หมัก (0 วัน), 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ โดยติดตามจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ แบคทีเรีย ราและยีสต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างช่วงของการหมักในโมโรมิ ซึ่งใช้วิธีการเทเพลท (pour plate) ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในสูตรต่างๆ ดังนี้ สูตร 1 ที่ใช้เป็นสูตรควบคุม ปริมาณแบคทีเรียที่พบอยู่ในช่วง 1.30×10^5 - 6.50×10^6 CFU/g สูตร 2 อยู่ในช่วง

1.50×10^5 - 3.90×10^6 CFU/g สูตร 3 อยู่ในช่วง 1.80×10^5 - 4.90×10^6 CFU/g สูตร 4 อยู่ในช่วง 2.20×10^5 - 3.50×10^6 CFU/g สูตร 5 อยู่ในช่วง 4.70×10^5 - 6.30×10^6 CFU/g และสูตร 6 อยู่ในช่วง 3.30×10^5 - 7.60×10^6 CFU/g สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณราและยีสต์ในสูตร 1 ที่ใช้เป็นสูตรควบคุม ปริมาณราและยีสต์ที่พบอยู่ในช่วง 2.80×10^5 - 4.00×10^6 CFU/g สูตร 2 อยู่ในช่วง 4.00×10^5 - 3.80×10^6 CFU/g สูตร 3 อยู่ในช่วง 5.40×10^5 - 6.80×10^6 CFU/g สูตร 4 อยู่ในช่วง 3.20×10^5 - 6.40×10^6 CFU/g สูตร 5 อยู่ในช่วง 2.60×10^5 - 5.50×10^6 CFU/g และสูตร 6 อยู่ในช่วง 4.00×10^5 - 7.60×10^6 CFU/g แบคทีเรียจะพบการเปลี่ยนแปลงสูงมากในช่วงแรกของการหมักไมโรมิระหว่าง 0 – 20 วัน และเมื่อเวลาระยะเวลาการหมักตั้งแต่ 30 – 90 วัน การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียจะเริ่มจะลดลงและมีแนวโน้มคงที่ แต่ยังพบการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียจนกระทั่งการหมักครบ 90 วัน สำหรับราและยีสต์ที่ระยะการหมักในช่วงระหว่าง 0 – 20 วันและ 30 – 60 วัน จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของราและยีสต์ได้ค่อนข้างมาก ซึ่งเริ่มลดลงที่การหมักครบ 30 วัน ส่วนช่วงท้ายของการหมักการเปลี่ยนแปลงของเชื้อราจะคงที่จนกระทั่ง 90 วัน ปริมาณจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ที่พบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 6 และ 7



ภาพประกอบ 6 ปริมาณแบคทีเรียในช่วงการหมักไมโรมิเวลา 90 วัน



ภาพประกอบ 7 ปริมาณราและยีสต์ในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน

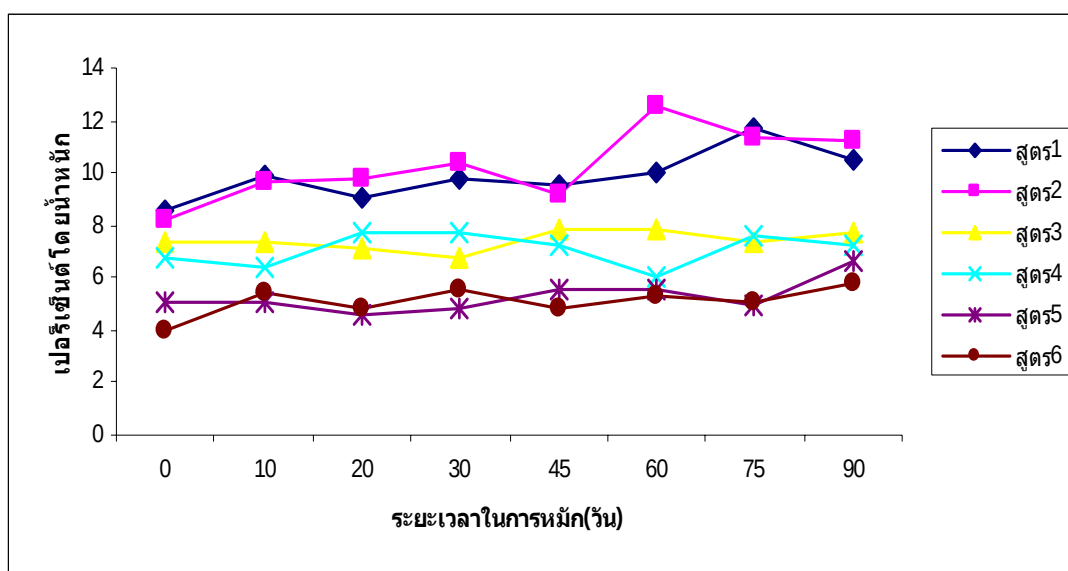
จากภาพประกอบ 6 และภาพประกอบ 7 จะเห็นได้ว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ที่พบในแต่ละสูตรมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยจะพบการเปลี่ยนแปลงมากในช่วงแรกของการหมัก ส่วนช่วงท้ายของการหมักการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์จะคงที่ ซึ่งเป็นเช่นเดียวกันกับสูตรควบคุม

2.2 การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำซีอิ๊วขาว โดยเก็บตัวอย่างจากทุกสูตรที่ทำการศึกษา ซึ่งติดตามจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ แบคทีเรีย ราและยีสต์ที่เกิดขึ้นในน้ำซีอิ๊วขาว ซึ่งใช้วิธีการเทเพลท เช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ในการหมักซีอิ๊วจากถั่วหมะและถั่วเหลืองในช่วงการหมักโมโรมิ ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรีย ราและยีสต์ในทุกสูตรที่ทำการศึกษาไม่พบจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับในน้ำซีอิ๊วขาวของสูตรควบคุม

ตอนที่ 3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเกลือ

3.1 การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณเกลือในระหว่างการหมักโมโรมิได้เก็บตัวอย่างจากทุกสูตรที่ทำการศึกษาในช่วงของการหมักโมโรมิตามช่วงระยะเวลาการหมักดังนี้ เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่แรกที่หมัก (0 วัน), 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ โดยติดตามจากปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เปลี่ยนแปลงในช่วงการหมัก ซึ่งใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการไทเทรตแบบตกตะกอนโดยวิธีของโวลฮาร์ดดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่พบในช่วงการหมักโมโรมิของสูตร 1 ที่ใช้เป็นสูตรควบคุม พบปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 8.62 – 11.70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สูตร 2 อยู่ในช่วง 8.15 – 12.51 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สูตร 3 อยู่

ในช่วง 6.77 – 7.83 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สูตร 4 อยู่ในช่วง 6.02 – 7.67 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สูตร 5 อยู่ในช่วง 4.54 – 6.61 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และสูตร 6 อยู่ในช่วง 4.04 – 5.82 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงให้เห็นชัดเจนตามตาราง 12 ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่พบในโมโรมิมีการเปลี่ยนแปลงในปริมาณใกล้เคียงกันได้แก่ สูตร 1 กับ สูตร 2, สูตร 3 กับ สูตร 4 และสูตร 5 กับ สูตร 6 สำหรับสูตร 2 ตลอดระยะเวลาการหมักครบ 90 วันพบปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการหมักโมโรมิมากที่สุด ซึ่งพบสูงสุดที่ระยะการหมัก 60 วัน โดยพบปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 12.51 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 8

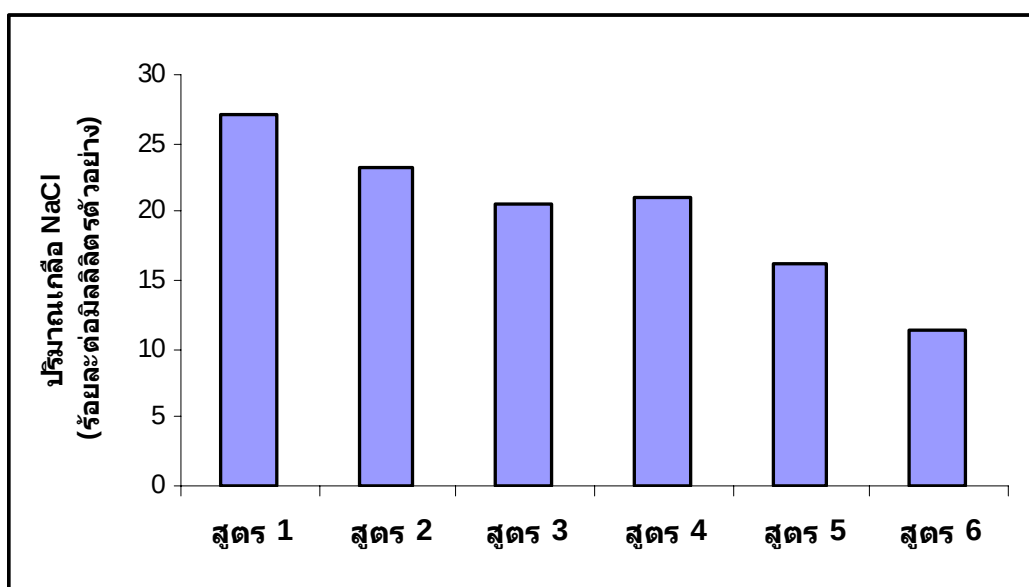


ภาพประกอบ 8 ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน

จากภาพประกอบ 8 จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุม ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่พบในโมโรมิของทุกสูตรจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมักตั้งแต่ 0 – 90 วัน โดยรวมพบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์คงที่ และมีปริมาณน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเกลือเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักของแต่ละสูตร

3.2 การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณเกลือในน้ำซีอิ๊วขาว โดยเก็บตัวอย่างจากทุกสูตรที่ทำการศึกษา ซึ่งติดตามจากปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เกิดขึ้นในน้ำซีอิ๊วขาว ซึ่งใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการไทเทรตแบบตกตะกอนโดยวิธีของโวลฮาร์ดเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในช่วงการหมักโมโรมิ ผลการวิเคราะห์พบว่าปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่พบในน้ำซีอิ๊วขาวของสูตร 1 ที่ใช้เป็นสูตรควบคุม พบปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 26.99 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนปริมาณเกลือโซเดียมคลอ

ไรวด์ที่พบในน้ำซีอิ๊วขาวทั้ง 5 สูตร ที่ทำการศึกษาตั้งแต่สูตร 2 – 6 พบปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ 23.11, 20.48, 20.95, 16.27, และ 11.44 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ดังแสดงให้เห็นชัดเจนตามตาราง 13 ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่พบในน้ำซีอิ๊วขาว พบว่าสูตร 2 มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์มากที่สุดถึง 23.11 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนสูตร 6 มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์น้อยที่สุดเป็น 11.44 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งน้ำซีอิ๊วขาวในสูตร 3 และสูตร 4 มีปริมาณเกลือเป็นไปตามเกณฑ์ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำซีอิ๊ว สูตร 1 มีปริมาณเกลือสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน และสูตร 5 และสูตร 6 มีปริมาณเกลือต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 9



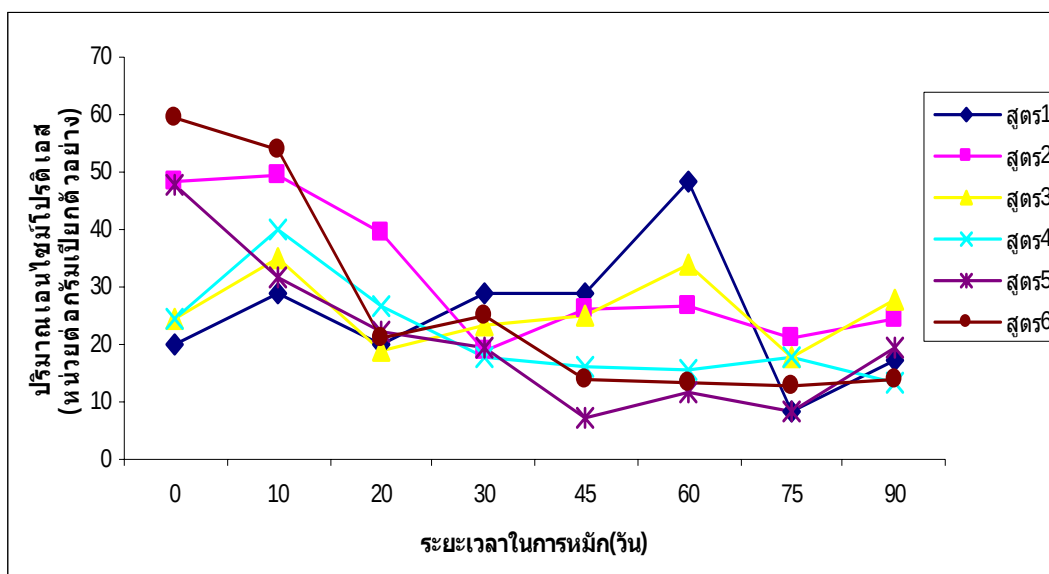
ภาพประกอบ 9 ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในน้ำซีอิ๊วขาวแต่ละสูตร

จากภาพประกอบ 9 จะเห็นได้ว่า โดยรวมแล้วปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่พบในแต่ละสูตร จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปริมาณเกลือเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักซีอิ๊ว ซึ่งเป็นเช่นเดียวกันกับสูตรควบคุม เนื่องจากเมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการหมักแล้ว จุลินทรีย์ต่างๆ จะหยุดการทำงานประกอบทั้งมีน้ำระเหยออกไปในขั้นตอนการหมักจึงทำให้มีปริมาณเกลือเพิ่มขึ้น

ตอนที่ 4 ผลการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

การศึกษากิจกรรมวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างการหมักโมโรมิได้เก็บตัวอย่างจากทุกสูตรที่ทำการศึกษาในช่วงของการหมักโมโรมิตามช่วงระยะเวลาการหมักดังนี้ เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่หมัก (0 วัน), 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ โดยติดตามกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่างที่เกิดขึ้นในช่วงการหมัก โดยเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่างจะ

ทำการย่อยเคซีนที่ใช้เป็นสับสเตรตให้ได้เป็นไทโรซีนในสภาวะที่ทำการทดลอง ซึ่งใช้การวิเคราะห์โดยการดัดแปลงจากวิธีการของ Anson, 1938 ในการทดลองได้วิเคราะห์หาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยเคซีนโดยเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในตัวอย่างแต่ละสูตรเทียบกับกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ 20 เมื่อวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยเคซีนโดยเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่างได้ แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามสมการ 9 ผลการวิเคราะห์พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ตรวจพบจากตัวอย่างที่เก็บ 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ในสูตร 1 อยู่ในช่วง 8.51 – 48.11 หน่วยต่อกรัม สูตร 2 อยู่ในช่วง 18.96 – 49.37 หน่วยต่อกรัม สูตร 3 อยู่ในช่วง 17.92 – 33.99 หน่วยต่อกรัม สูตร 4 อยู่ในช่วง 13.51 – 39.80 หน่วยต่อกรัม สูตร 5 อยู่ในช่วง 7.44 – 47.72 หน่วยต่อกรัม และสูตร 6 อยู่ในช่วง 12.69 – 59.63 หน่วยต่อกรัม ดังแสดงให้เห็นชัดเจนตามตาราง 14 ในช่วง 10 วันแรกของการหมักพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นสูงสุด สำหรับสูตร 4, สูตร 5 และสูตร 6 พบการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์โปรติเอสมีแนวโน้มลดลงเมื่อหมักครบระยะเวลา 90 วัน ส่วนในช่วงแรกของการหมัก 30 วัน กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พบในทุกสูตรอยู่ในปริมาณใกล้เคียงกัน กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจน ดังภาพประกอบ 10



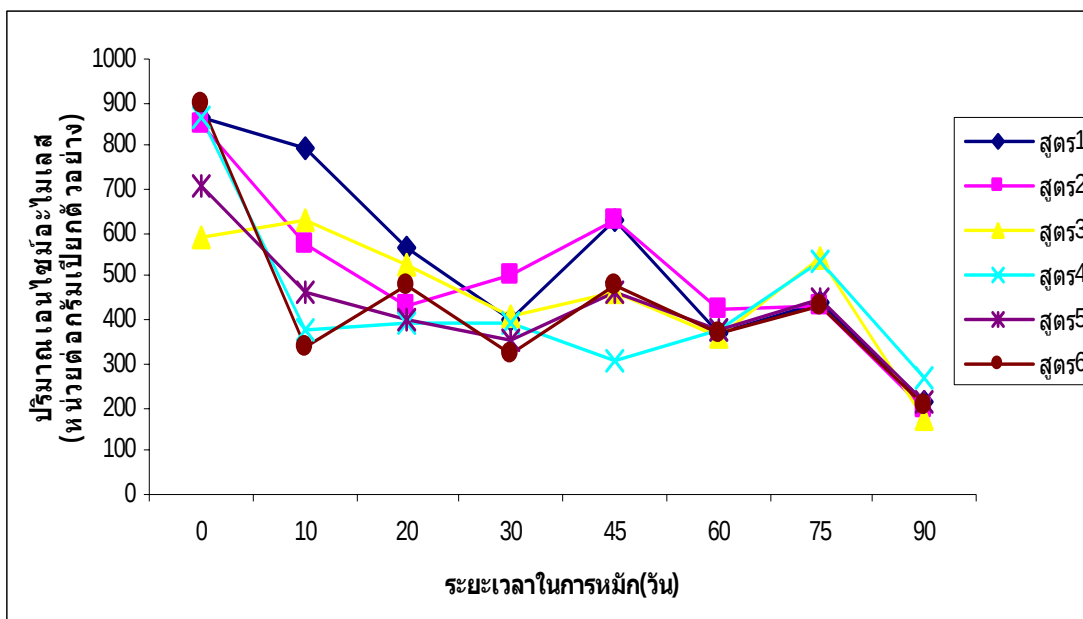
ภาพประกอบ 10 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในช่วงการหมักไมโรมิเวลา 90 วัน

จากภาพประกอบ 10 จะเห็นได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมจะสอดคล้องกันคือ กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก แสดงว่ากระบวนการหมักสามารถเกิดขึ้นได้โดยเอนไซม์โปรติเอสจะทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในถั่วทั้งสองชนิดที่ใช้เป็นวัตถุดิบ

ในการหมักซีอิ๊ว ซึ่งโปรตีนที่ถูกย่อยสลายจะมีความสำคัญต่อกลิ่นรสของซีอิ๊ว รวมทั้งคุณค่าทางด้านโภชนาการด้วย

ตอนที่ 5 ผลการศึกษาการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

การศึกษากิจกรรมวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในระหว่างการหมักโมโรมิได้เก็บตัวอย่างจากทุกสูตรที่ทำการศึกษาในช่วงของการหมักโมโรมิตามช่วงระยะเวลาการหมักดังนี้ เริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันแรกที่หมัก (0 วัน), 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ โดยติดตามกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่างที่เกิดขึ้นในช่วงการหมัก โดยเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่างจะทำการย่อยแป้งที่ใช้เป็นสับสเตรตให้ได้เป็นกลูโคสในสภาวะที่ทำการทดลอง ในการทดลองได้วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งโดยเอนไซม์อะไมเลสที่มีอยู่ในตัวอย่างแต่ละสูตรเทียบกับกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ 18 เมื่อวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานดังกล่าวสามารถคำนวณหาปริมาณกลูโคสจากการย่อยแป้งโดยเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่างได้ แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสกับปริมาณกลูโคสดังภาพประกอบ 19 ซึ่งกำหนดให้เอนไซม์อะไมเลสมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมเท่ากับ 31.8 หน่วย ผลการวิเคราะห์พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ตรวจพบจากตัวอย่างที่เก็บ 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ในสูตร 1 อยู่ในช่วง 212.18 – 866.79 หน่วยต่อกรัม สูตร 2 อยู่ในช่วง 195.34 – 850.57 หน่วยต่อกรัม สูตร 3 อยู่ในช่วง 176.65 – 632.63 หน่วยต่อกรัม สูตร 4 อยู่ในช่วง 266.25 – 868.51 หน่วยต่อกรัม สูตร 5 อยู่ในช่วง 209.46 – 707.41 หน่วยต่อกรัม และสูตร 6 อยู่ในช่วง 206.26 – 898.77 หน่วยต่อกรัม ดังแสดงให้เห็นชัดเจนตามตาราง 15 ในช่วงแรกของการหมัก สูตร 6 พบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดถึง 898.77 หน่วยต่อกรัม ภายหลังการหมัก 10 วัน สูตร 3, สูตร 4, สูตร 5 และสูตร 6 พบการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์อะไมเลสใกล้เคียงกัน โดยรวมแล้วกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 11



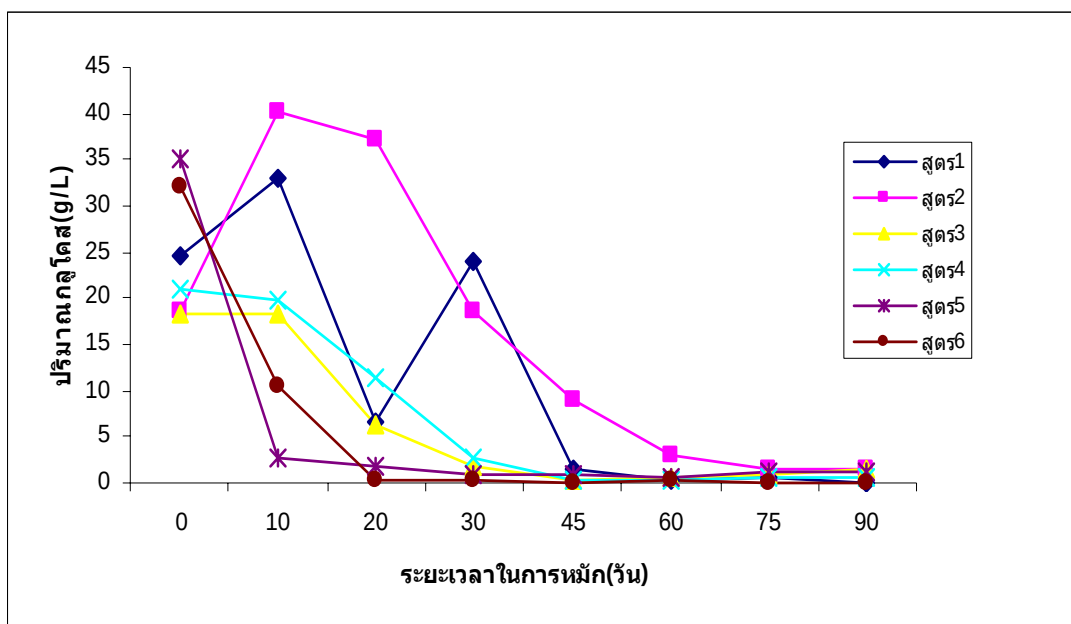
ภาพประกอบ 11 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน

จากภาพประกอบ 11 จะเห็นได้ว่า ในทุกสูตรที่ทำการศึกษาในช่วงแรกของการหมักจะมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุด และเมื่อหมักครบ 90 วัน เอนไซม์อะไมเลสจะลดลงต่ำสุด นอกจากนี้เอนไซม์อะไมเลสมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งเป็นเช่นเดียวกันกับสูตรควบคุม แสดงว่ากระบวนการหมักสามารถเกิดขึ้นได้โดยเอนไซม์อะไมเลสจะทำหน้าที่ย่อยแป้งที่มีอยู่ในถั่วทั้งสองชนิดและแป้งที่ใช้เป็นส่วนผสมในวัตถุดิบที่ใช้การหมักซีอิ๊ว ซึ่งแป้งจะถูกย่อยสลายจนได้เป็นน้ำตาลรีดิคซ์

ตอนที่ 6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส

ในการทดลองได้วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสที่ได้ในตัวอย่างแต่ละสูตรเทียบกับกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ 21 เมื่อวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาปริมาณกลูโคสในตัวอย่างได้ พบว่า สำหรับการหมักในโมโรมิปริมาณกลูโคสที่ตรวจพบจากตัวอย่างที่เก็บ 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ในสูตร 1 อยู่ในช่วง 0.14 – 33.14 กรัมต่อลิตร สูตร 2 อยู่ในช่วง 1.53 – 40.19 กรัมต่อลิตร สูตร 3 อยู่ในช่วง 0.36 – 18.29 กรัมต่อลิตร สูตร 4 อยู่ในช่วง 0.20 – 21.06 กรัมต่อลิตร สูตร 5 อยู่ในช่วง 0.81 – 35.17 กรัมต่อลิตร และสูตร 6 อยู่ในช่วง 0.00 – 32.14 กรัมต่อลิตร ดังแสดงให้เห็นชัดเจนตามตาราง 16 จากผลการทดลองปริมาณกลูโคสที่ตรวจพบในช่วงแรกหลังจากการหมัก 10 วัน ปริมาณกลูโคสที่พบในทุกสูตรมีแนวโน้มลดลง โดยสูตร 3, สูตร 4, สูตร 5 และสูตร 6 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสใกล้เคียงกัน สูตร 2 พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสสูงสุดหลังจากการหมัก 45 วัน ในทุกสูตรที่ทำการศึกษาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสคงที่ เมื่อ

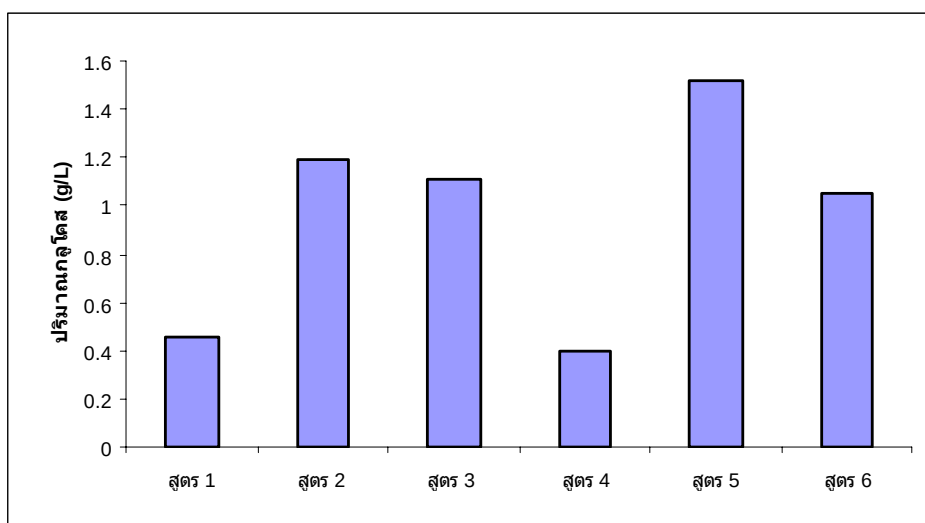
หมักครบ 90 วัน ในทุกสูตรมีปริมาณกลูโคสลดลงต่ำสุด ปริมาณกลูโคสที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 12



ภาพประกอบ 12 ปริมาณกลูโคสในช่วงการหมักโมโรมิเวลา 90 วัน

จากภาพประกอบ 12 จะเห็นได้ว่า ในทุกสูตรที่ทำการศึกษาในช่วงแรกของการหมักจะพบปริมาณกลูโคสมาก ส่วนในช่วงท้ายของการหมักปริมาณกลูโคสลดลง และแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่ทำหน้าที่ย่อยแป้งที่อยู่ในส่วนผสมการหมักซีอิ๊วจนได้เป็นน้ำตาล

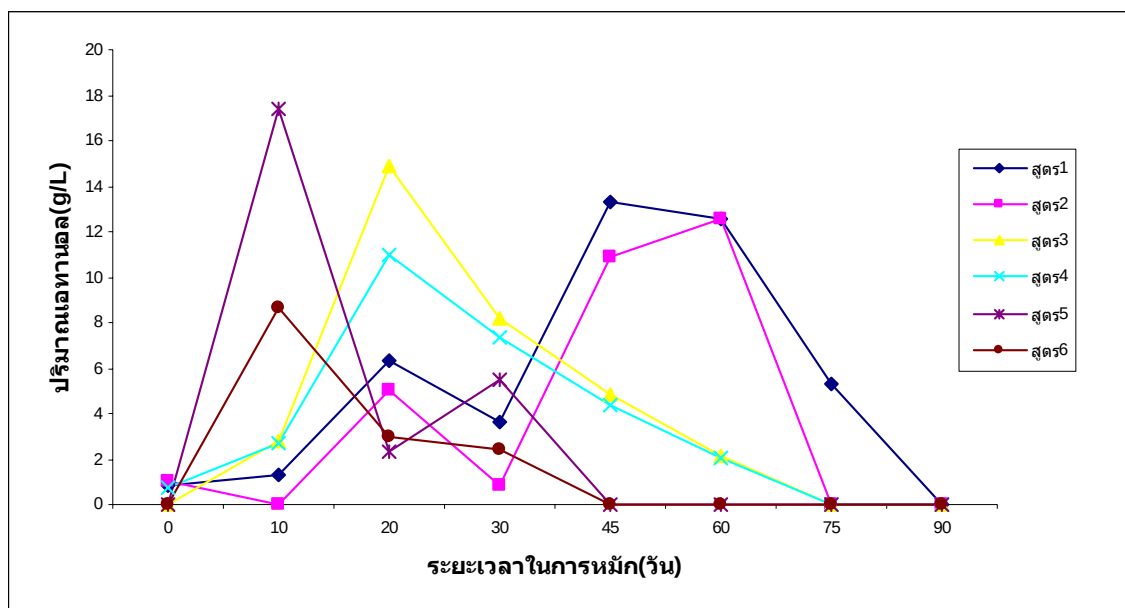
ส่วนในน้ำซีอิ๊วขาวในสูตร 1- 6 ปริมาณกลูโคสที่ตรวจพบเท่ากับ 0.46, 1.19, 1.11, 0.40, 1.52 และ 1.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าสูตร 1 กับสูตร 4 และสูตร 2 กับสูตร 3 พบกลูโคสในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ส่วนสูตร 5 พบปริมาณกลูโคสมากที่สุด ปริมาณกลูโคสที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 ปริมาณกลูโคสในน้ำซีอิ๊วขาว

ตอนที่ 7 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล

ในการทดลองได้วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่ได้ในตัวอย่างแต่ละสูตรเทียบกับกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ 22 เมื่อวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานสามารถคำนวณหาปริมาณเอทานอลในตัวอย่างได้ พบว่า สำหรับการหมักในไมโรมีปริมาณเอทานอลที่ตรวจพบจากตัวอย่างที่เก็บ 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 และ 90 วัน ในสูตร 1 อยู่ในช่วง 0.00 – 13.28 กรัมต่อลิตร สูตร 2 อยู่ในช่วง 0.00 – 12.60 กรัมต่อลิตร สูตร 3 อยู่ในช่วง 0.00 – 14.88 กรัมต่อลิตร สูตร 4 อยู่ในช่วง 0.00 – 10.97 กรัมต่อลิตร สูตร 5 อยู่ในช่วง 0.00 – 17.37 กรัมต่อลิตร และสูตร 6 อยู่ในช่วง 0.00 – 8.69 กรัมต่อลิตร ดังแสดงให้เห็นชัดเจนตามตาราง 18 จากผลการทดลองปริมาณเอทานอลที่ตรวจพบตลอดระยะเวลาการหมัก 90 วัน มีปริมาณเอทานอลเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกันคือ สูตร 1 กับสูตร 2, สูตร 3 กับสูตร 4 และสูตร 5 กับสูตร 6 แต่สูตร 5 ในช่วง 10 วันแรกของการหมักมีปริมาณเอทานอลสูงกว่าสูตร 6 มาก นอกจากนี้สูตร 5 กับสูตร 6 หลังการหมัก 45 วัน ไม่พบปริมาณเอทานอล ส่วนในสูตรอื่นๆ จะลดลงจนกระทั่งการหมักครบ 90 วัน จะไม่พบเอทานอลในทุกสูตรที่ศึกษา ปริมาณเอทานอลที่ตรวจพบในแต่ละสูตรจะปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 ปริมาณเอทานอลในช่วงการหมักไมโรมิเวลา 90 วัน

จากภาพประกอบ 14 จะเห็นได้ว่าปริมาณเอทานอลที่ตรวจพบในแต่ละสูตรที่ทำการศึกษาค้นคว้าจะพบมากในช่วงแรกของการหมักและมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก 90 วัน ส่วนการหมักในช่วงท้ายปริมาณเอทานอลจะลดลงหรือไม่พบปริมาณเอทานอลในบางสูตรที่ศึกษา สำหรับในน้ำที่อ้าวขาวตรวจพบปริมาณเอทานอลเฉพาะในสูตร 4 และสูตร 6 ปริมาณเอทานอลที่พบ 1.06 และ 1.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาค้นคว้าของปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อกระบวนการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง โดยทำการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมี ซึ่งประกอบด้วย การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณจุลินทรีย์ ปริมาณเกลือ ปริมาณกลูโคส ปริมาณเอทานอล ในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิและในน้ำซีอิ๊วขาว และติดตามการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิ ซึ่งได้สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของซีอิ๊วที่หมักได้จากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกันตามสูตรต่างๆ ที่ทำการทดลอง สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิได้ตรวจสอบปริมาณกรดอินทรีย์ 3 ชนิดได้แก่ กรดซิตริก กรดแอสซิติคและกรดแลคติกในแต่ละสูตรที่ทำการศึกษพบว่าปริมาณกรดซิตริกที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 0.32 – 1.94 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร 1 ที่ใช้เป็นสูตรควบคุม ในแต่ละสูตรที่ทำการศึกษามีปริมาณกรดซิตริกเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมักในช่วง 90 วัน สูตร 2 พบกรดซิตริกมากที่สุด และสูตร 6 พบปริมาณกรดซิตริกต่ำสุดปริมาณกรดแอสซิติคที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 0.00 – 3.11 กรัมต่อลิตร ในช่วง 10 วันแรกของการหมักไม่พบปริมาณกรดแอสซิติค แต่จะตรวจพบปริมาณกรดแอสซิติคในระยะการหมักตั้งแต่ 10 – 90 วัน ในทุกสูตรที่ทำการศึกษา โดยรวมแล้วเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณกรดแอสซิติคที่พบในแต่ละสูตรจะมีปริมาณลดลง ปริมาณกรดแลคติกที่พบอยู่ในช่วง 0.00 – 15.06 กรัมต่อลิตร ในทุกสูตรที่ทำการศึกษามีการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติกตลอดระยะเวลาการหมัก โดยรวมเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณกรดแลคติกที่พบมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย สูตร 5 พบปริมาณกรดแลคติกมากที่สุดเมื่อหมักครบ 90 วัน สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำซีอิ๊วขาวพบว่าปริมาณกรดซิตริก กรดแอสซิติคและกรดแลคติกที่พบอยู่ในช่วง 0.00 – 1.68, 0.00 – 0.67 และ 3.11 – 14.30 กรัมต่อลิตร เมื่อ

เปรียบเทียบกับสูตร 1 ที่เป็นสูตรควบคุม ในทุกสูตรที่ทำการศึกษ พบปริมาณกรดแลคติกมากที่สุด ส่วนปริมาณกรดซิตริกพบในสูตร 3, สูตร 4, สูตร 5 และสูตร 6 ส่วนปริมาณกรดแอสซิดิกพบเฉพาะในสูตร 2 และสูตร 4 โดยรวมแล้วปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งสองชนิดดังกล่าวที่พบในน้ำชีอี๊วขาวมีปริมาณใกล้เคียงกัน

1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิ โดยติดตามจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ 3 ชนิดได้แก่ แบคทีเรีย ราและยีสต์ ผลการวิเคราะห์พบว่าแบคทีเรียอยู่ในช่วง $1.30 \times 10^5 - 7.60 \times 10^6$ CFU/g ราและยีสต์อยู่ในช่วง $2.60 \times 10^5 - 7.60 \times 10^6$ CFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร 1 ที่เป็นสูตรควบคุม ปริมาณจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดที่พบในทุกสูตรที่ทำการศึกษ มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก จะพบการเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงแรกของการหมัก ภายหลังการหมัก 20 วัน การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียมพบน้อยมาก สำหรับราและยีสต์ภายหลังการหมัก 75 วัน พบปริมาณการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เป็นเช่นเดียวกันในทุกสูตรที่ทำการศึกษ ส่วนการวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดในน้ำชีอี๊วขาวในทุกสูตรที่ทำการศึกษไม่พบจุลินทรีย์ดังกล่าวในน้ำชีอี๊วขาว

1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือ โดยติดตามการวิเคราะห์ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิ พบว่าปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่พบอยู่ในช่วง 4.04 – 11.70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร 1 ที่เป็นสูตรควบคุม ในทุกสูตรที่ทำการศึกษมีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมักแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างคงที่และมีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเกลือเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักชีอี๊วแต่ละสูตร สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในน้ำชีอี๊วขาวพบว่า ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่พบอยู่ในช่วง 11.44 – 26.99 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในทุกสูตรที่ทำการศึกษจะมีปริมาณเกลือเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเกลือเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักชีอี๊วแต่ละสูตร สูตร 3 และสูตร 4 มีปริมาณเกลือเป็นไปตามเกณฑ์ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำชีอี๊ว ดังนั้นสามารถลดปริมาณเกลือในน้ำชีอี๊วที่หมักได้เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมสามารถลดเกลือได้ถึงประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์

1.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิ กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พบอยู่ในช่วง 7.44 – 59.63 หน่วยต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร 1 ที่เป็นสูตรควบคุม ในทุกสูตรที่ทำการศึกษมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วง 10 วันแรกของการหมัก หลังจากการหมักช่วงดังกล่าวกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีแนวโน้มลดลง แสดงว่ากระบวนการหมักสามารถเกิดขึ้นได้โดยเอนไซม์โปรติเอสจะทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในถั่วที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักชีอี๊ว

1.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่พบอยู่ในช่วง 176.65 – 898.77 หน่วยต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร 1 ที่เป็นสูตรควบคุม ในทุกสูตรที่ทำการศึกษามีปริมาณเอนไซม์มากที่สุดในช่วงแรกของการหมัก โดยรวมแล้วกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น และพบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสลดลงต่ำสุดเมื่อการหมักครบกำหนดตามระยะเวลา 90 วัน แสดงว่ากระบวนการหมักสามารถเกิดขึ้นได้โดยเอนไซม์อะไมเลสจะทำหน้าที่ย่อยแบ่งที่มีอยู่ในถั่วทั้งสองชนิดและแบ่งที่ใช้เป็นส่วนผสมจนได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์

1.6 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณกลูโคสที่พบอยู่ในช่วง 0.02 – 40.19 กรัมต่อลิตร ในทุกสูตรที่ทำการศึกษาจะพบปริมาณกลูโคสในช่วงแรกของการหมัก โดยรวมแล้วปริมาณกลูโคสมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น และพบปริมาณกลูโคสลดลงต่ำสุดเมื่อหมักครบ 90 วัน ซึ่งปริมาณกลูโคสที่พบจะสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ส่วนในน้ำซีอิ๊วขาวปริมาณกลูโคสที่พบอยู่ในช่วง 0.40 - 1.52 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณกลูโคสที่ตรวจพบในสูตร 5 มีปริมาณกลูโคสสูงสุด

1.7 การวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณเอทานอลที่พบอยู่ในช่วง 0.00 – 17.37 กรัมต่อลิตร ในทุกสูตรที่ทำการศึกษาจะพบการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลตลอดระยะเวลาการหมักจะเห็นได้ชัดเจนในช่วงแรกของการหมัก ส่วนในช่วงท้ายของการหมักพบเอทานอลล้น้อยมากหรือไม่พบเลย แสดงว่าจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักสามารถเปลี่ยนน้ำตาลที่อยู่ในขั้นตอนการหมักให้เกิดเป็นเอทานอลได้ โดยจะเกิดได้มากในช่วงแรกของการหมัก ส่วนในน้ำซีอิ๊วขาวพบปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 1.06 – 1.43 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะพบได้เฉพาะบางสูตรที่ศึกษา

จากทุกสูตรที่ทำการศึกษากิจกรรมหมักซีอิ๊วถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือต่ำ เมื่อพิจารณาผลการทดลองทั้งหมดเปรียบเทียบกับซีอิ๊วโดยทั่วไปที่ใช้ถั่วเหลืองล้วนในการหมัก พบว่าส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำซีอิ๊วที่มีคุณภาพดีจะพบ กรดแลคติก 0.48 g/100 mL, แอลกอฮอล์ 2.00 %, น้ำตาลรีดิวซ์ 5.99 g/100 mL และโซเดียมคลอไรด์ 18.02 g/100 mL (Yokotsuka. 1960) สำหรับซีอิ๊วที่หมักด้วยถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองที่ทำการทดลองไม่มีสูตรใดมีปริมาณสารดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์นี้ที่กำหนด เมื่อพิจารณาสูตรที่เหมาะสมสำหรับการหมักซีอิ๊วตามเกณฑ์ดังกล่าว ควรจะเป็นซีอิ๊วที่หมักด้วยถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในสูตร 5 หรือซีอิ๊วที่หมักด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 12

2. อภิปรายผลการวิจัย

การวิเคราะห์ติดตามผลปริมาณกรดอินทรีย์

จากการศึกษาวิจัยได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ 3 ชนิดคือ กรดซิตริก กรดแอสติกและ กรดแลคติก ในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิและในน้ำซีอิ๊วขาว โดยปริมาณกรดซิตริกที่ตรวจพบ ในช่วงการหมักโมโรมิของแต่ละสูตรที่ทำการศึกษาที่หมักในช่วงเวลาเดียวกัน ในตอนเริ่มต้นจะมี ปริมาณแตกต่างกัน เมื่อครบระยะเวลา 90 วันของการหมักในทุกสูตรจะมีกรดซิตริกสูง แต่เมื่อเป็นน้ำ ซีอิ๊วขาวยังคงตรวจพบปริมาณกรดซิตริก ยกเว้นในสูตร 1 ที่หมักด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 20 ซึ่งใช้เป็นสูตรควบคุม และสูตร 2 ที่หมักด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 18 ทั้งนี้สูตร 5 ที่หมักด้วย ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 14 ในน้ำซีอิ๊วขาวจะมีปริมาณกรดซิตริกสูงสุด สำหรับกรดแอสติกจะไม่สามารถตรวจพบในช่วงแรกของการหมักในทุกสูตร แต่ที่ระยะเวลาการหมัก 10 วันปริมาณกรดแอสติก จะสูงสุดในทุกสูตร เมื่อครบระยะเวลาการหมัก 90 วัน ปริมาณกรดแอสติกมีแนวโน้มลดลง แต่เมื่อเป็น น้ำซีอิ๊วขาวจะตรวจพบปริมาณกรดแอสติกเฉพาะในสูตร 2 และสูตร 4 หรือซีอิ๊วที่หมักด้วยความเข้มข้น ของเกลือร้อยละ 18 และ 14 ตามลำดับ ส่วนกรดแลคติกในช่วงแรกของการหมักพบว่าปริมาณกรด แลคติกน้อย แต่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อหมักนานถึง 90 วัน โดยในช่วงโมโรมิของทุกสูตรมีปริมาณกรด แลคติกมากที่สุด ซึ่งสูตร 5 ที่หมักด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 12 จะมีปริมาณกรดแลคติกสูงสุด และในน้ำซีอิ๊วขาวพบปริมาณกรดแลคติกในทุกสูตร เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วปริมาณกรดซิตริกและ ปริมาณกรดแอสติกที่ตรวจพบมีปริมาณน้อยกว่าปริมาณกรดแลคติก อันเนื่องมาจากกรดซิตริกจะถูก ผลิตขึ้นจากเชื้อรา *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบและมีการปรับพีเอชให้อยู่ ในระดับกรด ในระหว่างการหมักจะต้องมีการปรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารที่ใช้เลี้ยง เชื้อให้เหมาะสมด้วย ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 15-18 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ เกินไป จะส่งผลให้ผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้ลดน้อยลงด้วยและในขณะเดียวกันก็จะเกิดการสะสมของ กรดออกซาลิกด้วย (Kovats. 1960) ส่วนมากจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มและ อุตสาหกรรมยา เนื่องจากกรดซิตริกมีความสามารถในการละลายสูง ความเป็นพิษต่ำและให้รสเปรี้ยว ที่ยอมรับได้ แต่เนื่องจากการหมักซีอิ๊วจะใช้เชื้อรา *A. oryzae* และหมักในน้ำเกลือ จึงทำให้ตรวจพบ ปริมาณกรดซิตริกน้อย ส่วนกรดแอสติกจะถูกผลิตขึ้นจากแบคทีเรีย *Acetobacter* หรือยีสต์ *Saccharomyces ellipsoideus* โดยแบคทีเรียหรือยีสต์ที่ใช้ในการหมักจะเปลี่ยนน้ำตาลซึ่งมาจาก วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเช่น ผลไม้ ผักที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ ธัญพืชต่างๆ ให้เป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นจะออกซิไดส์แอลกอฮอล์ให้เป็นอะซีทัลดีไฮด์แล้วออกซิไดส์ต่อได้เป็นไฮเดรตอะซีทัลดีไฮด์ ใน ขั้นตอนสุดท้ายจะออกซิไดส์ไฮเดรตอะซีทัลดีไฮด์เปลี่ยนเป็นกรดแอสติก ซึ่งจะผ่านปฏิกิริยาออกซิไดส์ สามขั้นตอนโดยอาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากกระบวนการหมักดังกล่าวจึงนิยมนำไปใช้ใน อุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชู ซึ่งมีรสเปรี้ยวที่เกิดจากกรดแอสติก (วรารุณ คุรุสง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532) สำหรับในกระบวนการหมักซีอิ๊วไม่ได้นำแบคทีเรียและยีสต์ดังกล่าวมาใช้ใน

การหมักโดยตรง รวมทั้งในระหว่างการหมักชีอิ้วจะมีน้ำตาลเกิดขึ้นด้วย ซึ่งทำให้จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแอซีติกได้ จึงตรวจพบปริมาณกรดแอซีติกได้ในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณกรดแลคติกที่ตรวจพบ ดังนั้นปริมาณกรดซิตริกและกรดแอซีติกที่ตรวจพบจึงมีน้อยในขณะที่ลดความเข้มข้นของเกลือลง ซึ่งมีผลดีต่อรสชาติของชีอิ้วหากมีปริมาณกรดซิตริกและกรดแอซีติกมากอาจทำให้ชีอิ้วที่ได้มีรสเปรี้ยวได้ เนื่องจากกรดทั้งสองชนิดนี้เป็นกรดอินทรีย์ที่มีรสเปรี้ยวดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่วนปริมาณกรดแลคติกที่ตรวจพบจะมีปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับกรดทั้งสองชนิดที่กล่าวมา อันเนื่องมาจากกรดแลคติกเป็นกรดสำคัญที่แสดงถึงกลไกการทำงานของแบคทีเรียแลคติก ในช่วงการหมักของโมโรมิทุกสูตรจากการทดลองจะเห็นได้ว่า ในช่วงแรกของการหมักจะพบปริมาณกรดแลคติกน้อย แต่จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อหมักนานถึง 90 วัน โดยเฉพาะสูตร 5 ที่หมักด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 12 จะมีปริมาณกรดแลคติกสูงสุดแสดงว่าเกิดการทำงานของแบคทีเรียแลคติกในช่วงความเข้มข้นของเกลือดังกล่าวได้มากที่สุด โดยรวมคือ แม้ว่าจะลดปริมาณเกลือให้น้อยลงแต่กรดแลคติกที่ตรวจพบก็มีมากขึ้น แสดงว่าจุลินทรีย์ยังสามารถเจริญได้ดีทำให้เกิดกรดดังกล่าวออกมาได้ ซึ่งสอดคล้องกับโมโรมิที่หมักด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 20 ที่ใช้เป็นสูตรควบคุม นอกจากนี้จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าในบรรดาแบคทีเรียที่มีอยู่แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจะมีบทบาทสำคัญ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534) ดังนั้นในการทดลองจึงตรวจพบกรดแลคติกมากกว่ากรดซิตริกและกรดแอซีติกทั้งในการหมักในช่วงโมโรมิและในน้ำชีอิ้วขาว

การวิเคราะห์ติดตามผลปริมาณจุลินทรีย์

จากการศึกษาวิจัยได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ 3 ชนิดคือ แบคทีเรีย ราและยีสต์ ในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิและในน้ำชีอิ้วขาว โดยปริมาณจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ที่ตรวจพบในช่วงการหมักโมโรมิของแต่ละสูตรที่ทำการศึกษามีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมักและจะพบการเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงแรกของการหมัก แสดงว่าถึงแม้ว่าปริมาณเกลือจะลดลงจุลินทรีย์ก็สามารถเจริญเติบโตได้เพื่อผลิตสารต่างๆออกมา เช่น กรดอินทรีย์ จะเห็นได้จากการทดลองสามารถตรวจพบกรดซิตริก กรดแอซีติกและกรดแลคติกได้ เพื่อให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นได้และทำให้ได้เป็นชีอิ้วเกิดขึ้น ถึงแม้ว่าสภาวะที่ทำการทดลองของแต่ละสูตรในการหมักจะมีปริมาณเกลือลดลงก็ตาม รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ใช้เป็น starter ในที่นี้คือ เชื้อรา *A. oryzae* จะหยุดการเจริญเติบโตและเริ่มลดลง ซึ่งระยะเวลาที่อยู่ได้ของเชื้อราดังกล่าวประมาณ 1-2 เดือน (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534) ดังนั้นจึงพบการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ได้ในช่วงแรกของการหมัก ส่วนในช่วงท้ายของการหมักพบการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดน้อยมาก ดังเช่นผลการทดลองและสอดคล้องกับสูตร 1 ที่หมักด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 20 ที่ใช้เป็นสูตรควบคุม ส่วนในน้ำชีอิ้วขาวของทุกสูตรถึงแม้ว่าหมักด้วยปริมาณเกลือที่ลดลงก็ตามไม่สามารถตรวจพบจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดในน้ำชีอิ้วขาว ซึ่งเป็นผลดีต่อน้ำชีอิ้วขาวที่หมักได้

ในแต่ละสูตร เนื่องจากคุณลักษณะที่ต้องการของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำซีอิ๊วที่หมักได้จะมียีสต์ และเราได้ตั้งไม่เกิน 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง(สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. 2547) แสดงว่าน้ำซีอิ๊วขาวที่หมักจากปริมาณเกลือที่ลดลงในแต่ละสูตรเป็นไปตามเกณฑ์ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำซีอิ๊ว

การวิเคราะห์ติดตามผลปริมาณเกลือ

จากการศึกษาวิจัยได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเกลือ โดยติดตามปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิและในน้ำซีอิ๊วขาว ในโมโรมิของทุกสูตรที่ทำการศึกษามีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก และมีปริมาณน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเกลือเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักของแต่ละสูตร อันเนื่องมาจากเกลือโซเดียมคลอไรด์มีหน้าที่เสมือนกับสารยับยั้งและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นการหมักน้ำเกลือ (Yong; & Wood. 1974) โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการหมักช่วงโมโรมิเพื่อผลิตเป็นน้ำซีอิ๊วจะสร้างและผลิตสารหลายชนิดออกมาเพื่อให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นได้ ยกตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์อินทรีย์ในช่วงของการหมักโดยเฉพาะกรดแลคติกที่ผลิตจากแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก สร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆเช่น เอนไซม์อะไมเลสเพื่อทำหน้าที่ในการย่อยแป้งที่มีอยู่ในกระบวนการหมักให้เกิดเป็นสารโมเลกุลเล็กลงคือน้ำตาลรีดิคซ์ สร้างเอนไซม์โปรติเอสเพื่อย่อยโปรตีนโมเลกุลใหญ่ให้เกิดเป็นกรดอะมิโน ซึ่งจากผลของโปรตีนที่ถูกย่อยสลายจนเกิดเป็นกรดอะมิโนมีผลทำให้เกิดไนโตรเจนที่ละลายได้ในช่วงของการหมักเกิดขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อตรวจปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแต่ละสูตรจึงมีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก รวมทั้งความชื้นที่อยู่ในโคจิจะเจือจางให้ความเข้มข้นของเกลือลดลงด้วยเมื่อหมักในน้ำเกลือหรือโมโรมิ (พิมพาพร เทวาคูดี. 2521; และกนิษฐา สุวรรณเมนะ. 2522) ซึ่งสอดคล้องกับสูตร 1 ที่หมักด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 20 ที่ใช้เป็นสูตรควบคุม ถึงแม้ว่าปริมาณเกลือในแต่ละสูตรที่ทำการศึกษามีปริมาณลดลงก็ตาม สำหรับในน้ำซีอิ๊วขาวในทุกสูตรที่ทำการศึกษามีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปริมาณเกลือเริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก อันเนื่องมาจากกระบวนการหมักได้สิ้นสุดลงทำให้ความชื้นหรือน้ำที่มีอยู่ในกระบวนการหมักลดปริมาณลงด้วย รวมทั้งมีการสูญเสียน้ำในช่วงของการพาสเจอร์ไรส์ก่อนที่จะได้น้ำซีอิ๊วขาวที่สมบูรณ์ ทำให้น้ำซีอิ๊วที่ได้เมื่อตรวจปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ของทุกสูตรจึงมีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงกว่าตอนเริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก โดยรวมแล้วปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละสูตรจะลดลงตามปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ลดลงที่ใช้ในการศึกษา สำหรับน้ำซีอิ๊วที่หมักได้ในสูตร 3 และสูตร 4 ที่หมักด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 16 และ 14 มีปริมาณเกลือเป็นไปตามเกณฑ์ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำซีอิ๊ว จากผลการทดลองนี้สามารถลดปริมาณเกลือในน้ำซีอิ๊วที่หมักได้เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมสามารถลดเกลือได้ถึงประมาณ 24 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ติดตามผลกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

จากการศึกษาวิจัยได้ตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิ ในทุกสูตรที่ทำการศึกษามีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วง 10 วันแรกของการหมัก เอนไซม์โปรติเอสที่เกิดขึ้นมีหน้าที่ย่อยโปรตีนที่อยู่ในถั่วทั้งสองชนิดที่ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการหมักชีวีวให้มีโมเลกุลเล็กลงจนได้เป็นกรดอะมิโน ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ในช่วงของการหมักโคจิ เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยสลายมีความสำคัญอย่างมากต่อคุณภาพของน้ำชีวีวตั้งแต่กลั่นรสไปจนถึงคุณค่าทางด้านโภชนาการ (พันธณรงค์ จันทรแสงศรี. 2540) แต่เมื่อหมักในน้ำเกลือหรือโมโรมิระดับของเอนไซม์โปรติเอสลดลงมากในระยะ 2 วันแรก หลังจากเติมน้ำเกลือลงไป ดังนั้นในช่วงแรกของการหมักในทุกสูตรที่ทำการศึกษายังคงพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด แต่หลังจากการหมักช่วงดังกล่าวกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีแนวโน้มลดลง แสดงว่าเป็นเพราะเอนไซม์โปรติเอสสูญเสียสภาพธรรมชาติหรือตกตะกอน ซึ่งติดตามด้วยปฏิกิริยา resolubilization และการปล่อยเอนไซม์ใหม่ออกมาจากเส้นใยของราที่ถูกย่อยสลาย (Yong; & Wood. 1976) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าในช่วงท้ายของการหมักจะตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในแต่ละสูตรมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาจนกระทั่งการหมักครบ 90 วัน ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเกลือลดลง ซึ่งโดยรวมการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยหรือมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเกือบจะคงที่ ทั้งนี้เพราะในช่วงท้ายจุลินทรีย์มีการเจริญลดลงทำให้เอนไซม์ที่ปล่อยออกมาจากเส้นใยของราที่ถูกย่อยสลายลดลงด้วย จึงพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เปลี่ยนแปลงน้อยเช่นเดียวกัน

การวิเคราะห์ติดตามผลกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาวิจัยได้ตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิ พบว่าในทุกสูตรที่ทำการศึกษามีปริมาณเอนไซม์มากที่สุดในช่วงแรกของการหมัก โดยรวมแล้วกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสได้ถึงแม้ว่าจะลดปริมาณเกลือที่ใช้ในการหมักชีวีวก็ตาม เอนไซม์อะไมเลสจะทำหน้าที่ย่อยแป้งที่เป็นส่วนผสมหรือที่มีอยู่ในถั่วทั้งสองชนิดที่ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นให้เกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์มีร้อยละการเพิ่มมากที่สุดในระยะเวลา 5-6 วันแรกของการหมักในน้ำเกลือ โดยจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและช้าลงในเวลาต่อมา (Yong; & Wood. 1976) ดังนั้นในช่วงแรกของการหมักการย่อยแป้งจะเกิดขึ้นมากที่สุด จึงส่งผลให้ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมากที่สุดในช่วงแรกของการหมัก หลังจากนั้นเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไปนานขึ้นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสมีการเจริญเติบโตน้อยลงการผลิตเอนไซม์อะไมเลสก็น้อยลง

ด้วย จึงตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสลดลงต่ำสุดเมื่อการหมักครบกำหนดตามระยะเวลาหรือครบกำหนด 90 วัน

การวิเคราะห์ติดตามผลปริมาณกลูโคส

จากการศึกษาวิจัยได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิ พบว่าในทุกสูตรที่ทำการศึกษาปริมาณกลูโคสมากที่สุดในช่วงแรกของการหมัก โดยรวมแล้วปริมาณกลูโคสมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถตรวจพบปริมาณกลูโคสได้ถึงแม้ว่าจะลดปริมาณเกล็ดที่ใช้ในการหมักซีอิ๊ว กลูโคสที่เกิดขึ้นเป็นผลผลิตจากการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่มีอยู่ในกระบวนการหมัก โดยเอนไซม์อะไมเลสจะย่อยแป้งและถั่วที่อยู่ในส่วนผสมของการหมักซีอิ๊วให้ได้เป็นน้ำตาล ซึ่งเอนไซม์อะไมเลสจะสร้างจากเชื้อรา *A. oryzae* ในขั้นตอนของการหมักโคจิ เมื่อถึงขั้นตอนการหมักโมโรมิหรือในการหมักน้ำเกลือ เชื้อราชนิดนี้จะอยู่ได้ในช่วงแรกของการหมัก เอนไซม์อะไมเลสก็จะเกิดขึ้นมากในช่วงแรกของการหมักเช่นเดียวกัน ดังนั้นเมื่อกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเกิดขึ้นก็สามารถตรวจพบกลูโคสได้ในช่วงแรกของการหมักเช่นเดียวกัน ส่วนในช่วงท้ายเชื้อราดังกล่าวจะเริ่มตายลง เอนไซม์อะไมเลสก็จะมีน้อยลงด้วยปริมาณกลูโคสที่ตรวจพบจึงมีน้อยด้วย จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณกลูโคสที่ตรวจพบสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่พบในระหว่างขั้นตอนการหมัก

การวิเคราะห์ติดตามผลปริมาณเอทานอล

จากการศึกษาวิจัยได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิ พบว่าในทุกสูตรที่ทำการศึกษาปริมาณเอทานอลมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยรวมแล้วจะพบปริมาณเอทานอลมากในช่วงแรกของการหมัก เมื่อการหมักครบ 90 วัน พบปริมาณเอทานอลน้อยมากหรือไม่พบเลย ซึ่งสามารถตรวจพบเอทานอลได้ถึงแม้ว่าจะลดปริมาณเกล็ดที่ใช้ในการหมักซีอิ๊ว เอทานอลที่เกิดขึ้น เกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ที่ทนเกลือได้ในขั้นตอนการหมักของโมโรมิ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะเปลี่ยนน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลสให้เปลี่ยนเป็นเอทานอลหรือแอลกอฮอล์ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณเอทานอลที่พบจะสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและปริมาณของกลูโคสที่พบด้วย สำหรับในการหมักซีอิ๊วเอทานอลที่เกิดขึ้นจะมีผลต่อกลิ่นรสของซีอิ๊วเช่นเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ติดตามผลในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณเกลือไฮเดียมคลอไรด์ ปริมาณจุลินทรีย์ กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณกลูโคส และปริมาณเอทานอล สำหรับการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองเมื่อใช้ปริมาณเกล็ดลดลง โดยทำการศึกษาศีอิ๊วที่ทำจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองรวมทั้งหมด 5 สูตร ซึ่งหมักด้วยเกล็ดที่มีความเข้มข้นร้อยละ 18, 16, 14, 12 และ 10 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับสูตรควบคุมที่

หมักด้วยความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 20 จากการทดลองในช่วงความเข้มข้นของเกลือดังกล่าว พบ จุลินทรีย์ชนิดที่เจริญเติบโตได้ในน้ำเกลือ โดยทำหน้าที่ผลิตกรดอินทรีย์ขึ้นในระหว่างขั้นตอนหมัก กรดอินทรีย์ที่ผลิตออกมาจะพบกรดแลคติกมากที่สุดแสดงว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ดีในขั้นตอนการหมัก จุลินทรีย์ชนิดนี้ได้แก่จุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติก ซึ่งกรดแลคติกเป็นกรดที่สำคัญในการหมักซีอิ๊วเนื่องจากทำให้ซีอิ๊วมีรสชาติดี ส่วนจุลินทรีย์พวกที่ผลิตกรดซิตริกและกรดแอสติติกจะเจริญเติบโตได้น้อย จึงพบกรดซิตริกและกรดแอสติติกในปริมาณน้อยกว่ากรดแลคติก นอกจากนี้เมื่อเกิดการทำงานของจุลินทรีย์ในขั้นตอนการหมักส่วนของแป้งที่มีอยู่ในการหมักซีอิ๊วจะถูกย่อยโดยเอนไซม์อะไมเลสที่สร้างจากเชื้อรา *A. oryzae* มาก่อนจนสุดท้ายได้เป็นน้ำตาล รวมทั้งจุลินทรีย์เหล่านี้จะเปลี่ยนน้ำตาลที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักเป็นเอทานอล ซึ่งเอทานอลก็มีผลต่อกลิ่นรสของซีอิ๊วเช่นเดียวกัน สำหรับเอนไซม์โปรติเอสที่สร้างจากเชื้อรา *A. oryzae* เอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่อยู่ในถั่วจนได้เป็นกรดอะมิโน ในโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในกรดอะมิโนนี้จะมีผลต่อกลิ่นรสของซีอิ๊วเช่นกัน จะเห็นได้ว่ากระบวนการหมักสามารถเกิดขึ้นได้ในการหมักซีอิ๊วถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองที่มีปริมาณเกลือต่ำ โดยสามารถตรวจพบกรดอินทรีย์ จุลินทรีย์ เอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์อะไมเลส กลูโคสและเอทานอลในช่วงความเข้มข้นของเกลือดังกล่าว โดยปกติแล้วสำหรับซีอิ๊วในประเทศญี่ปุ่นจะใช้ความเข้มข้นของสารละลายเกลือประมาณร้อยละ 17-19 (Yong; & Wood 1974) สำหรับซีอิ๊วในประเทศไทยจะใช้ความเข้มข้นของสารละลายเกลือร้อยละ 20-22 ในการหมักซีอิ๊วในน้ำแรกและความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 16-18 ในการหมักซีอิ๊วน้ำที่สองหรือน้ำที่สาม (พิมพ์พร เทวาคูดี. 2521; และกนิษฐา สุวรรณเมนะ. 2522) แต่ในการทดลองที่ศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเกลือระหว่างร้อยละ 18-10 สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองที่มีปริมาณเกลือต่ำได้เพื่อให้ซีอิ๊วที่ได้มีรสชาติเข้มข้นโดยไม่มีกรปรุ่งแต่งรสชาติด้วยน้ำตาลเพื่อให้ความเค็มลดลง

3. ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยที่ศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์ติดตามผลการลดปริมาณเกลือที่มีผลต่อกระบวนการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักหรือในโมโรมิและในน้ำซีอิ๊วขาว ซึ่งติดตามการเปลี่ยนแปลงการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ การวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือ การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวเมื่อใช้ความเข้มข้นของเกลือระหว่างร้อยละ 18 – 10 ในกระบวนการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองพบว่ากระบวนการหมักในช่วงความเข้มข้นของเกลือดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ เมื่อเทียบกับความเข้มข้น

ของเกลือร้อยละ 20 ที่ใช้ในการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองที่ได้ศึกษาไว้แล้วในงานวิจัยของ ภคธีรา อุดจักร (2550) จะเห็นได้ว่าในงานวิจัยที่ศึกษาครั้งนี้ใช้ปริมาณเกลือลดลงในการหมักซีอิ๊วจาก ถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองก็สามารถเกิดกระบวนการหมักขึ้นได้และได้ซีอิ๊วที่มีรสชาติเค็มน้อยลง การศึกษาขั้นต่อไปควรจะมีการศึกษาซีอิ๊วที่หมักได้จากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือที่ลดลง โดยเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วของกระทรวงอุตสาหกรรม เช่น การตรวจสอบปริมาณโปรตีน ปริมาณของแข็งที่ระเหยไม่ได้ ความถ่วงจำเพาะ เป็นต้น การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส รวมทั้งแปรรูปซีอิ๊วที่หมักได้ให้เป็นซีอิ๊วอีกชนิดหนึ่งคือซีอิ๊วดำหวาน เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วที่ทำการศึกษานอกจากนี้ควรจะมีการศึกษาการหมักซีอิ๊วจากวัตถุดิบชนิดอื่นๆ นอกจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วที่มีกลิ่น รส แตกต่างจากซีอิ๊วที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กาญจนา ชาญสง่าเวช. (2545). การแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สร้างแอซิดโปรติเอส การหาภาวะเหมาะสมในการผลิตแอซิดโปรติเอส และการนำไปใช้ในการผลิตซีอิ๊วโปรตีนสูง. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- กนิษฐา สุวรรณเมนะ. (2522). การศึกษาเชื้อราในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2546). ลำมะโนเกษตร พืชไร่ถั่วมะแฮะ. สืบค้นเมื่อ 24 มีนาคม 2551, จาก <http://www.moac-info.net/ict/census/templates/fieldcrop/index>.
- กลุ่มงานเศรษฐกิจ กองนโยบายและแผน. (2542). การศึกษาพืชเศรษฐกิจถั่วเหลือง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 53 สำนักงานปฏิรูปที่ดินเพื่อเกษตรกรรม.
- กฤษณา ปานหอย, สุรีย์พร กังสนันท์ และอรัญ หันพงศ์กิตติกุล. (2546). การศึกษาการลดความเค็มในซีอิ๊ว. โครงการ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- กุลวดี ครอบพาณิชย์. (2517). น้ำปลาถั่วเหลือง. วารสารอาหาร 6(4): 11-13.
- ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และสมใจ ศิริโชค. (2541). การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตอะไมเลส โปรติเอสและไลเปส. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- เต็ม สมิตินันท์. (2523). ซีอิ๊วพื้นบ้านแห่งประเทศไทย (ซีอิ๊วพื้นบ้าน-ซีอิ๊วพื้นเมือง). กรมป่าไม้.
- นภา โล่ห์ทอง. (2531). ซีอิ๊ว. วารสารวิทยาศาสตร์ 42(3):217-224.
- บุญเชิด วัฒนสุจริต. (2543). ซีอิ๊วน้ำจืดจากถั่วเขียว. วารสารหนังสือพิมพ์กสิกรไทย. 73(4):

423-427.

ปาริชาติ กิจสงเสริมธน. (2546). การตรึงโปรตีนเอสบนไคโตซานด้วยพันธะโควาเลนต์และวิธีการ
ห่อหุ้มเพื่อใช้ในการผลิตน้ำซอสปรุงรส. วิทยานิพนธ์ วศ.ม. (วิศวกรรมเคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิต
วิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2543). เอนไซม์ทางอาหาร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พันธ์ณรงค์ จันทรแสงศรี. (2537). การตรึงรูพรูร่วมกันของเซลล์จุลินทรีย์สำหรับทดลองผลิตน้ำซีอิ้ว.
วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีทางอาหาร). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

พันธ์ณรงค์ จันทรแสงศรี. (2539ก). ซีอิ้ว ตอนที่ 1 ความเป็นมาของซีอิ้ว. วารสารเกษตร นเรศวร.
2(3): 9-10.

----- (2539ข). ซีอิ้ว ตอนที่ 2 กรรมวิธีการผลิตซีอิ้ว. วารสารเกษตร นเรศวร. 2(4): 6-9.

----- (2540). ซีอิ้ว ตอนที่ 3 จุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักซีอิ้ว. วารสาร
เกษตร นเรศวร. 3(3): 1-5.

----- (2541). ซีอิ้ว ตอนที่ 4 ลักษณะของน้ำซีอิ้ว. วารสารเกษตร นเรศวร. 4(1): 43-46.

พิมพ์พร เทวานุดี. (2521). การศึกษายีสต์ในซีอิ้วและเต้าเจี้ยว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (จุลชีววิทยา).
กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

ไพบุลย์ สุเมธอักษร. (2521). อุตสาหกรรมการทำซีอิ้วในเมืองไทย. ภาควิชาวิทยาศาสตร์
การอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภคธีรา อุปจักร. (2550). การศึกษากระบวนการผลิตซีอิ้วจากถั่วมะเะและถั่วเหลือง. สารนิพนธ์

กศ.ม. (วิทยาศาสตร์ศึกษา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

มณี ต้นตุงกิจ. (2526). การเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของ *Aspergillus niger* โดยใช้
มิวทาเจน. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม สำนักงาน. (2521). ซีอิ๊ว. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก.
2520-2521 กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์กระทรวงอุตสาหกรรม.

วรารุณิ ครูสง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. (2534). เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.
กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์

วันชัย สมชิต. (2527). ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ถั่วเหลืองในประเทศไทย. สถาบันค้นคว้าและ
พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร: บริษัทสยามออฟเซ็ท
จำกัด

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

----- (2534). ซีอิ๊ว. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์.

วิสิฐุ จະนะสิต และ สติมา จิตตินันท์. (2537). ซีอิ๊วและเต้าเจี้ยว. วารสารหมอชาวบ้าน. 16(18):
76-79.

วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล. (2532). ซีอิ๊ว. อาหาร. 19: 58-62.

วรรณา พรเศรษฐคุณ. (2534). การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ
เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต้องการเกลือเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก. วิทยานิพนธ์

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

ศรีชัย สิงห์เชนทร์; คนอื่นๆ. (2534). ความก้าวหน้างานวิจัยเครื่องมือการผลิตโปรตีนจากถั่วเขียวและซีอิ้วจากโปรตีนถั่วเขียว. รายงานการสัมมนาเชิงวิชาการเรื่องงานวิจัยถั่วเขียว ครั้งที่ 4 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิริพร เอื้ออังกูร. (2538). การปรับปรุงกระบวนการหมักซีอิ้วในขั้นตอนการหมักน้ำเกลือ. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

สถาบันวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. (2527). ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร.

สิทธิสิน บวรสมบัติ. (2524). การทดลองใช้เมล็ดถั่วพุดในการหมักซีอิ้ว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์. (2520). การศึกษาเชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักซีอิ้ว. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (จุลชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

----- (2522). บทบาทความสำคัญของเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมซีอิ้วหมัก. เคมีวิศวกรรมเทคโนโลยีทางอาหารและเชื้อเพลิง. 1: 89-95.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. (2547). น้ำซีอิ้ว. สืบค้นเมื่อ 6 สิงหาคม 2551, จาก <http://www.tisi.go.th/otop/standard/standards.html>

สมชาย ประภาวัต. (2541). ศึกษาการทำคุกกี้จากถั่วเขียวผิวดำเปรียบเทียบกับถั่วเขียวและถั่วมะแฮะ. วิทยาศาสตร์เกษตร สาขาวิทยาศาสตร์. 32(3): 319-328.

อัฉร่า เพิ่ม. (2550). จุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

- Groff, E.M. (1919). Soy sauce manufacture in Kwangtung, China. *Philippine J. Sci.* 15:307-316.
- Hesseltine, C.W. (1965). A millennium of fungi, food and fermentation. *Mycologia* 57:149-197.
- Impoolsup, A.; Bhumiratana, A. & Flegek, T.W. (1981). Isolation of alkaline and neutral proteases from *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, a soy sauce koji mold. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 619-628.
- Kovats, J. (1960). Studies on submerged citric acids fermentation. *Acta Microbiol. Pol.* 9: 275-287
- Lebumfacil-davide, C.S. (1967). Corn and sorghum as possible substituted for wheat in soy sauce production. *Philippine Agriculturist.* 50: 843-860.
- Lockwood, L. B. (1947). *The production of Chinese soy sauce*. Soybean Dig. 7: 10-11. quoted in Prescott, S. C., and Dunn. C. G., eds. 1959. *Industrial Microbiology*. New York: McGraw-Hill Co., Inc.
- Lotong. (1985). *Koji*. In B.J.B. Wood (ed.). *Microbiology of Fermented Food*. Vol.2. pp.237-269. Elsevier Applied Science Publisher, London.
- Nakadai, T. & Nasuno, S. (1976). Enzymatic hydrolysis of protein by various enzyme preparation. *J. Ferment. Technol.* 54: 872-884.
- Nakamura, H.; Mohri, Y.; Muraoka, J. & Ito, K. (1979). Studies on fermented food containing Antarctic Krill. I. Production of soy sauce with cryo-ground Antarctic krill, *Euphasia superba*. *Food Sci. and Tect. Abstracts.* 13(2): Abstracts 2 R 77.

- Noda, F.; Hayashi, K. & Mizunuma, T. (1980a). Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeasts in brine fermentation of soy sauce. *Appli. Environ. Microbiol.* 40(3):452-457.
- (1982b). Influence of pH on inhibitory activity of acetic acid on osmophilic yeasts use in brine fermentation of soy sauce. *Appli. Environ. Microbiol.* 43:245-246.
- Onichi, H. & Blenford, D.E. (1981). The soy sauce explosion. *J. Food Tech.* in Australia. 33(5): 242-244.
- Raniah, P.V. & Satyanaragana, P. (1938). The chemical composition of some tropical food plants, pigeonpeas and cowpeas. *Trop. Sci.* 6(2):68-70
- Sakaguchi, K. (1958a). Studies on the activities of bacteria in soy sauce brewing. II The proteinases and existence of bacilli spores in the soy mash. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan.* 22: 345-352.
- (1959b). Studies on the activities of bacteria in soy sauce brewing. IV The proteinases, transaminases of *Pediococcus soyac*, nov. sp., and its numerical transition in soy mash. *Agric. Chem. Soc. Japan.* 23: 22-28.
- Udo, S. (1932). Studies on the taste of soy-sauce fermentation. *J. Agr. Che. Soc. Japan* 8, 675-84. Cited in Yokotsuka. T. 1965.
- Wood, B. J.; Cardenas, O.S.; Yong, F.M. & Nulty, D.W. Mc. (1975). *Lactobacilli in production of soy sauce, sour dough bread and Parisian barm.* Vol. 4. p. 325-335. In Curr, J.C. ; C.V. Cutting and G.C. Whitting. 1975. Lactic acid bacteria in brewerages and food. New York: Academic Press.
- Wood, B. J. B. (1982). *Soy sauce and miso.* In Rose, A. H. (ed.), *Fermented Food.*, pp. 39-85. London: Academic Press, Inc.

- Yokotsuka, T. (1971a). Shoyu conversion and manufacture of Foodstuffs by Micro organisms, processing of the sixth. *Int.Symp.* 117-125.
- . (1986b). Soy sauce biochemistry. *Adv. Food Res.* 30: 195-329.
- . (1988c). *Factors contributing to flavor quality and productivity in shoya manufacture.* International Symposium on Application of Biotechnology for small Industries Developments in Developing Countries. Bangkok, Thailand. 30p.
- Yong, F.M. & Wood, B. J. B. (1974a). Microbiology and biochemistry of soy sauce fermentation. *Adv. Appli. Microbiol.* 17: 157-194.
- . (1976b). Microbial succession in experimental soy sauce fermentation. *J. Food Technol.* 11: 525-532.
- . (1976c). Biochemistry changes in experimental soy sauce moromi. *J. Food Technol.* 12: 263-273.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ตารางข้อมูลการทดลอง

ภาคผนวก ก
ตารางข้อมูลผลการทดลอง

ตาราง 8 ปริมาณกรดซิตริกในโมโรมิแต่ละสูตร

สูตร เวลา (วัน)	ปริมาณกรดซิตริก (กรัมต่อลิตร)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	0.62	1.15	0.55	1.02	1.13	1.06	1.26	1.35
2	1.55	1.33	1.46	1.52	1.57	1.31	1.64	1.94
3	0.67	0.90	0.70	0.93	0.97	1.01	1.13	1.31
4	1.42	1.03	1.10	1.21	1.08	1.08	1.27	1.34
5	1.39	1.13	1.20	1.11	0.87	1.11	1.07	1.25
6	1.58	0.93	0.75	0.32	0.88	0.82	0.93	0.95

ตาราง 9 ปริมาณกรดแอสซิดิกในโมโรมิแต่ละสูตร

สูตร เวลา (วัน)	ปริมาณกรดแอสซิดิก (กรัมต่อลิตร)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	0.00	1.08	0.67	0.91	0.73	0.63	0.37	0.29
2	0.00	0.22	0.45	0.40	0.48	0.41	0.00	0.60
3	0.00	2.41	1.51	1.62	0.80	0.36	0.31	0.26
4	0.00	3.11	2.12	1.50	0.74	0.56	0.54	0.29
5	0.00	0.69	0.70	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	1.83	0.93	0.73	0.53	0.31	0.00	0.00

ตาราง 10 ปริมาณกรดแลคติกในโมโรมิแต่ละสูตร

สูตร เวลา (วัน)	ปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	0.14	0.17	0.21	0.21	4.85	5.29	4.82	5.08
2	0.00	0.00	0.12	0.00	7.36	7.33	6.93	8.28
3	0.18	0.22	0.66	0.21	0.17	2.64	2.11	2.11
4	0.23	0.27	0.54	0.34	0.27	1.03	1.85	2.01
5	1.20	1.30	1.63	5.42	5.94	10.02	11.16	15.06
6	0.87	2.42	4.60	3.28	6.45	7.01	8.90	10.06

ตาราง 11 ปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำซีอิ๊วขาวแต่ละสูตร

สูตร	ปริมาณกรดอินทรีย์ (กรัมต่อลิตร)		
	กรดซิตริก	กรดแอซีติก	กรดแลคติก
1	0.00	0.00	7.31
2	0.00	0.67	8.82
3	0.61	0.00	3.11
4	0.53	0.47	5.32
5	1.68	0.00	14.30
6	0.53	0.00	13.07

ตาราง 12 ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในโมโรมิแต่ละสูตร

สูตร เวลา (วัน)	ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ (% โดยน้ำหนัก)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	8.62	9.84	9.06	9.76	9.58	10.01	11.70	10.47
2	8.15	9.71	9.79	10.43	9.15	12.51	11.29	11.26
3	7.31	7.36	7.10	6.77	7.79	7.83	7.39	7.78
4	6.79	6.37	7.67	7.67	7.30	6.02	7.61	7.27
5	5.04	5.11	4.54	4.87	5.56	5.54	5.00	6.61
6	4.04	5.43	4.84	5.55	4.87	5.26	5.01	5.82

ตาราง 13 ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในน้ำซีอิ๊วขาวแต่ละสูตร

สูตร	ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ (% น้ำหนักต่อปริมาตร)
1	26.99
2	23.11
3	20.48
4	20.95
5	16.27
6	11.44

ตาราง 14 ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในโมโรมิแต่ละสูตร

สูตร เวลา (วัน)	ปริมาณเอนไซม์โปรติเอส (หน่วยต่อกรัมเปียกตัวอย่าง)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	19.78	29.09	19.76	28.74	28.65	48.11	8.51	17.19
2	48.14	49.37	39.42	18.96	26.21	26.40	20.9	24.31
3	24.41	34.79	18.86	23.38	25.01	33.99	17.92	27.68
4	24.46	39.80	26.58	17.79	16.16	15.46	17.59	13.51
5	47.72	31.60	22.36	19.57	7.44	11.72	8.57	19.59
6	59.63	53.96	21.20	24.85	14.02	13.59	12.69	13.72

ตาราง 15 ปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในโมโรมิแต่ละสูตร

สูตร เวลา (วัน)	ปริมาณเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อกรัมเปียกตัวอย่าง)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	866.79	794.47	569.89	399.72	632.24	366.53	441.8	212.18
2	850.57	577.29	431.06	502.57	626.14	422.06	429.34	195.34
3	590.33	632.63	527.47	408.90	465.55	363.75	539.66	176.65
4	868.51	376.77	390.46	392.63	310.40	374.97	534.63	266.25
5	707.41	462.82	398.99	356.54	467.25	380.34	446.29	209.46
6	898.77	342.09	481.20	319.53	477.04	366.63	432.77	206.26

ตาราง 16 ปริมาณกลูโคสในโมโรมิแต่ละสูตร

สูตร เวลา (วัน)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	24.49	33.14	6.58	23.91	1.53	0.19	0.56	0.14
2	18.73	40.19	37.17	18.65	8.91	3.08	1.62	1.53
3	18.29	18.21	6.26	1.75	0.36	0.51	0.93	1.39
4	21.06	19.76	11.44	2.60	0.29	0.20	0.58	0.58
5	35.17	2.61	1.78	1.03	0.81	0.66	1.25	1.33
6	32.14	10.40	0.25	0.43	0.13	0.17	0.00	0.02

ตาราง 17 ปริมาณกลูโคสในน้ำซีอิ๊วขาวแต่ละสูตร

สูตร	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
1	0.46
2	1.19
3	1.11
4	0.40
5	1.52
6	1.05

ตาราง 18 ปริมาณเอทานอลในโมโรมิแต่ละสูตร

สูตร เวลา (วัน)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	0.88	1.30	6.31	3.62	13.28	12.56	5.29	0.00
2	1.06	0.00	5.00	0.87	10.93	12.60	0.00	0.00
3	0.00	2.83	14.88	8.23	4.83	2.18	0.00	0.00
4	0.72	2.71	10.97	7.35	4.34	2.08	0.00	0.00
5	0.00	17.37	2.36	5.51	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	8.69	2.98	2.42	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ

สูตร 1 ซี้วี่ที่หมักจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือความเข้มข้นร้อยละ 20
ซึ่งใช้เป็นสูตรควบคุม

สูตร 2 ซี้วี่ที่หมักจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือความเข้มข้นร้อยละ 18

สูตร 3 ซี้วี่ที่หมักจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือความเข้มข้นร้อยละ 16

สูตร 4 ซี้วี่ที่หมักจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือความเข้มข้นร้อยละ 14

สูตร 5 ซี้วี่ที่หมักจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือความเข้มข้นร้อยละ 12

สูตร 6 ซี้วี่ที่หมักจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในปริมาณเกลือความเข้มข้นร้อยละ 10

ตาราง 19 แสดงปริมาณจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียในโมโรมิแต่ละสูตร

สูตร	ระยะเวลาในการหมัก (วัน)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	6.50×10^6	2.24×10^6	5.10×10^5	4.00×10^5	1.50×10^5	1.30×10^5	6.80×10^5	3.10×10^5
2	3.90×10^6	1.59×10^6	6.60×10^5	4.80×10^5	2.20×10^5	1.50×10^5	8.80×10^5	4.30×10^5
3	4.90×10^6	1.11×10^6	6.80×10^5	5.30×10^5	1.80×10^5	4.40×10^5	6.30×10^5	3.70×10^5
4	3.50×10^6	5.90×10^5	7.30×10^5	3.20×10^5	2.20×10^5	5.50×10^5	5.50×10^5	5.10×10^5
5	6.30×10^6	4.90×10^5	5.90×10^5	7.20×10^5	6.70×10^5	8.90×10^5	4.90×10^5	4.70×10^5
6	7.60×10^6	5.40×10^5	6.70×10^5	3.30×10^5	5.80×10^5	3.30×10^5	5.40×10^5	5.50×10^5

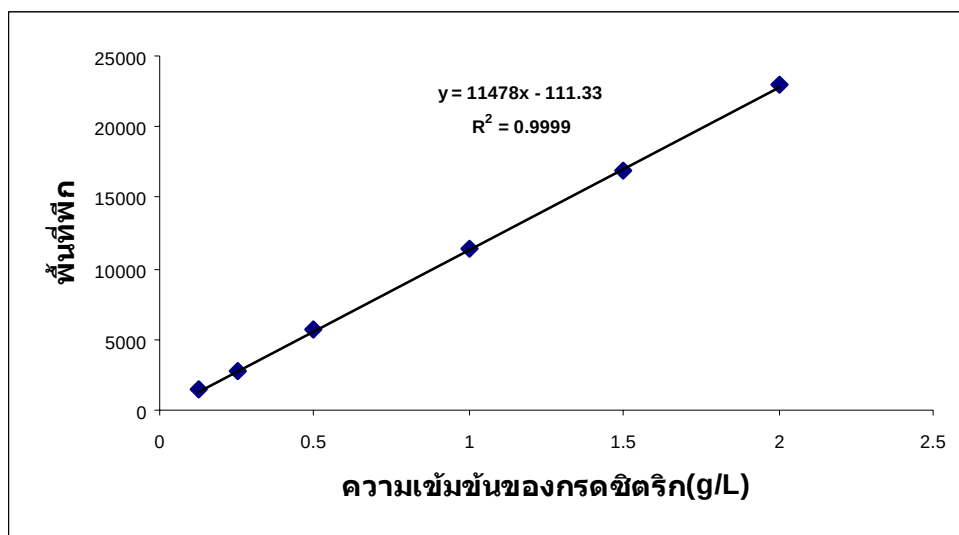
ตาราง 20 แสดงปริมาณจุลินทรีย์พวกราและยีสต์ในโมโรมิแต่ละสูตร

สูตร	ระยะเวลาในการหมัก (วัน)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	1.04×10^6	1.90×10^6	4.00×10^6	2.80×10^5	1.18×10^6	3.60×10^6	4.70×10^5	3.50×10^5
2	3.20×10^6	1.90×10^6	3.80×10^6	6.00×10^5	1.90×10^6	3.20×10^6	4.10×10^5	4.00×10^5
3	6.80×10^6	1.70×10^6	3.90×10^6	5.40×10^5	2.40×10^6	4.50×10^6	5.40×10^5	8.30×10^5
4	6.40×10^6	6.00×10^5	3.40×10^6	3.20×10^5	1.22×10^6	1.58×10^6	5.90×10^5	6.00×10^5
5	5.50×10^6	2.60×10^5	1.00×10^6	3.40×10^5	4.90×10^6	1.29×10^6	7.30×10^5	7.40×10^5
6	7.60×10^6	4.60×10^5	3.80×10^6	4.00×10^5	2.10×10^6	4.10×10^6	6.60×10^5	5.40×10^5

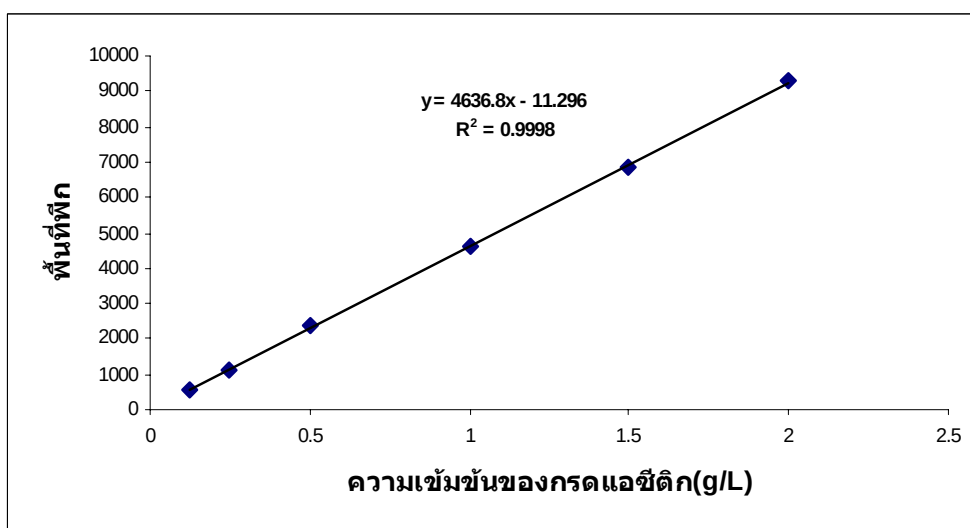
ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานและโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์

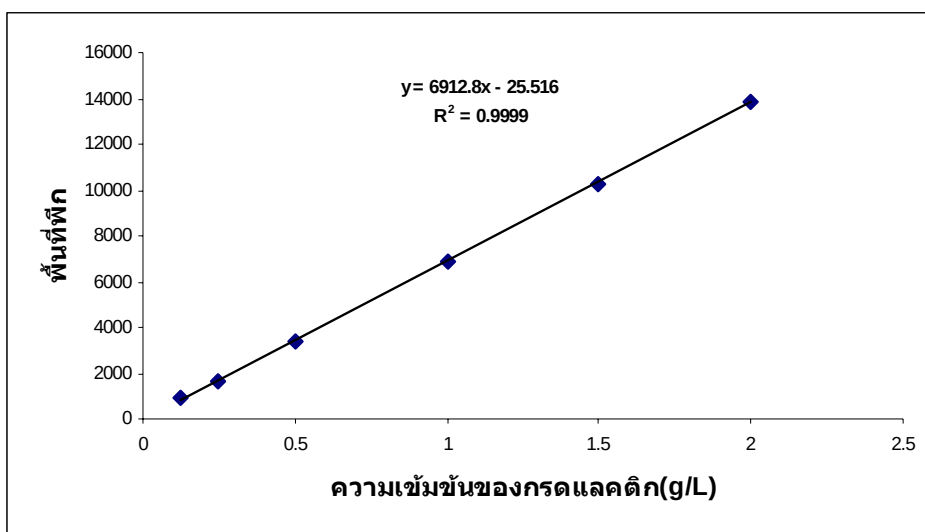
ภาคผนวก ข
แสดงกราฟมาตรฐานจากการวิเคราะห์



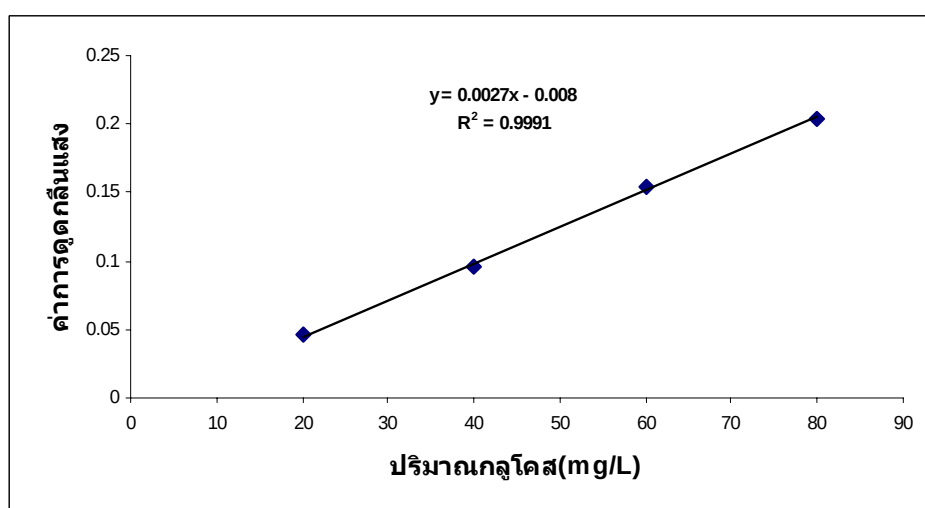
ภาพประกอบ 15 กราฟมาตรฐานของกรดคลอโรฟิล



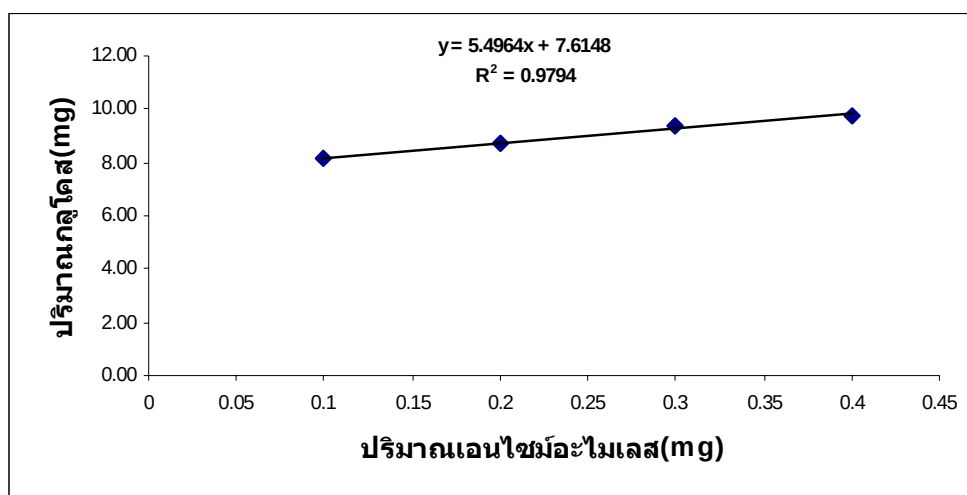
ภาพประกอบ 16 กราฟมาตรฐานของกรดคลอโรฟิล



ภาพประกอบ 17 กราฟมาตรฐานของกรดแลคติก

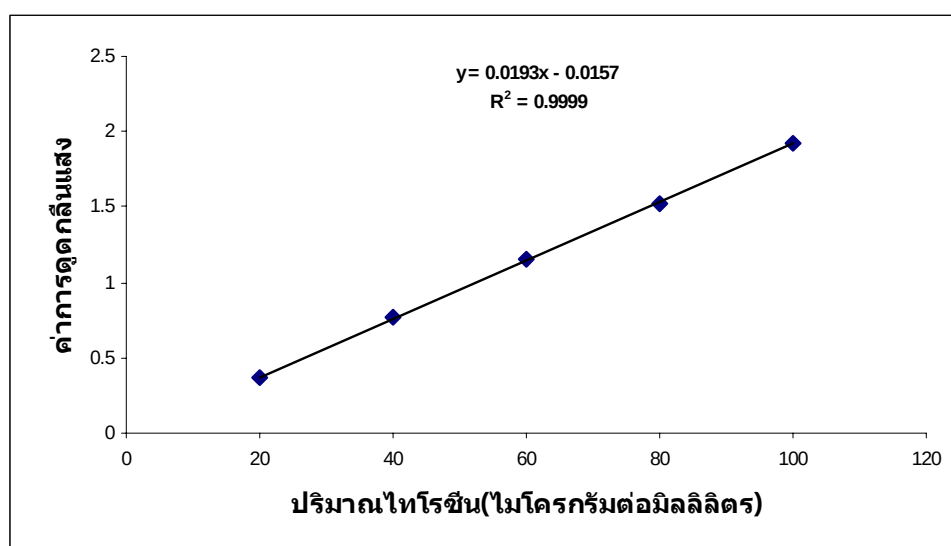


ภาพประกอบ 18 กราฟมาตรฐานของกลูโคสสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์อะไมเลส

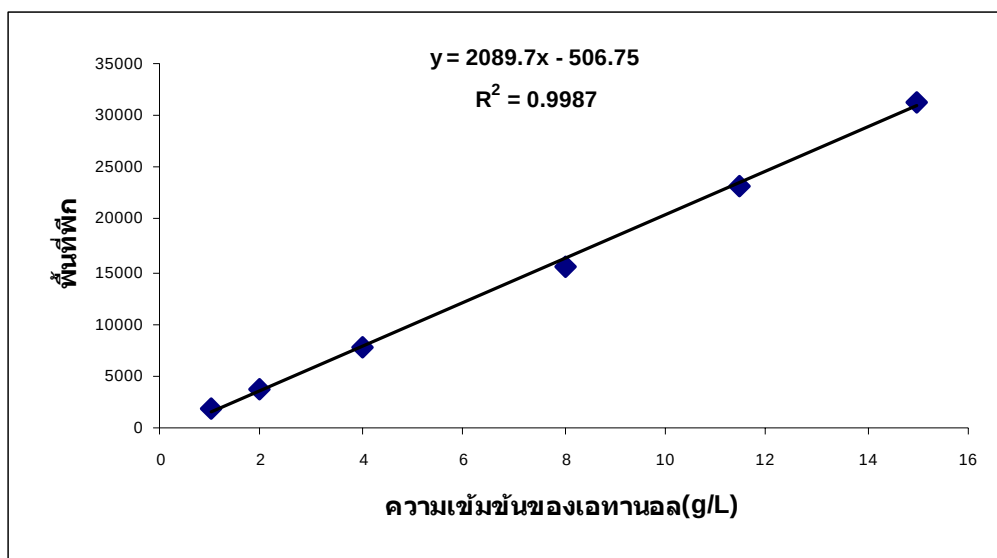


ภาพประกอบ 19 กราฟมาตรฐานของเอนไซม์อะไมเลส

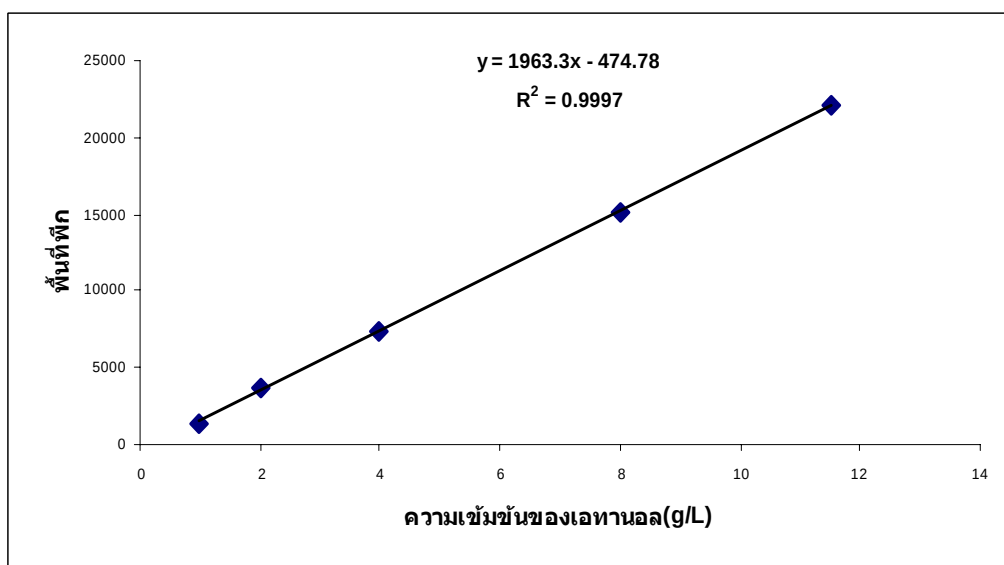
หมายเหตุ กำหนดให้เอนไซม์อะไมเลสมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมเท่ากับ 31.8 หน่วย



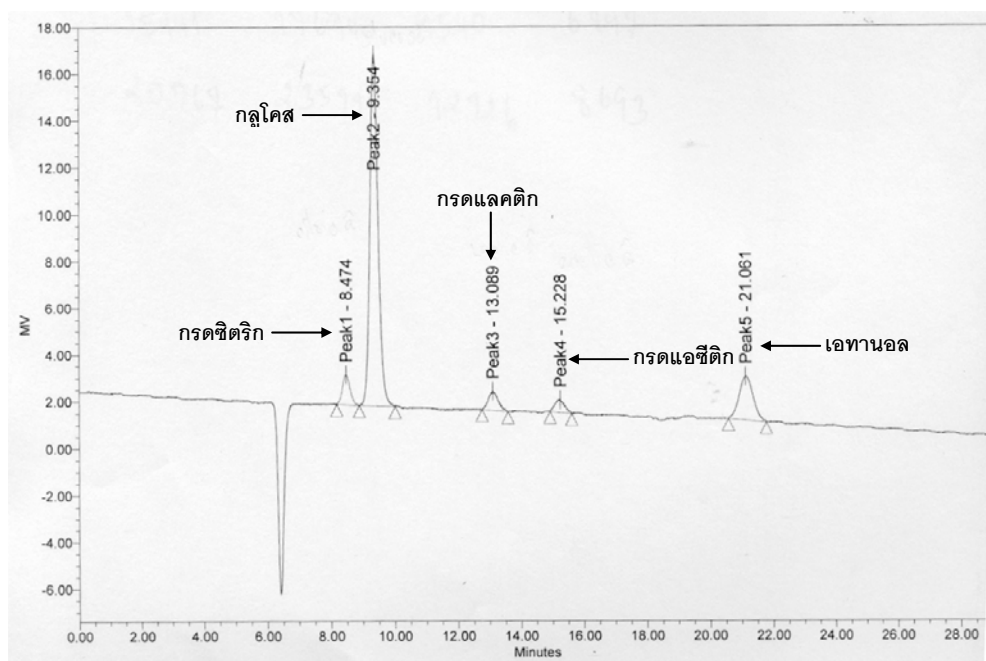
ภาพประกอบ 20 กราฟมาตรฐานของไทโรซีน



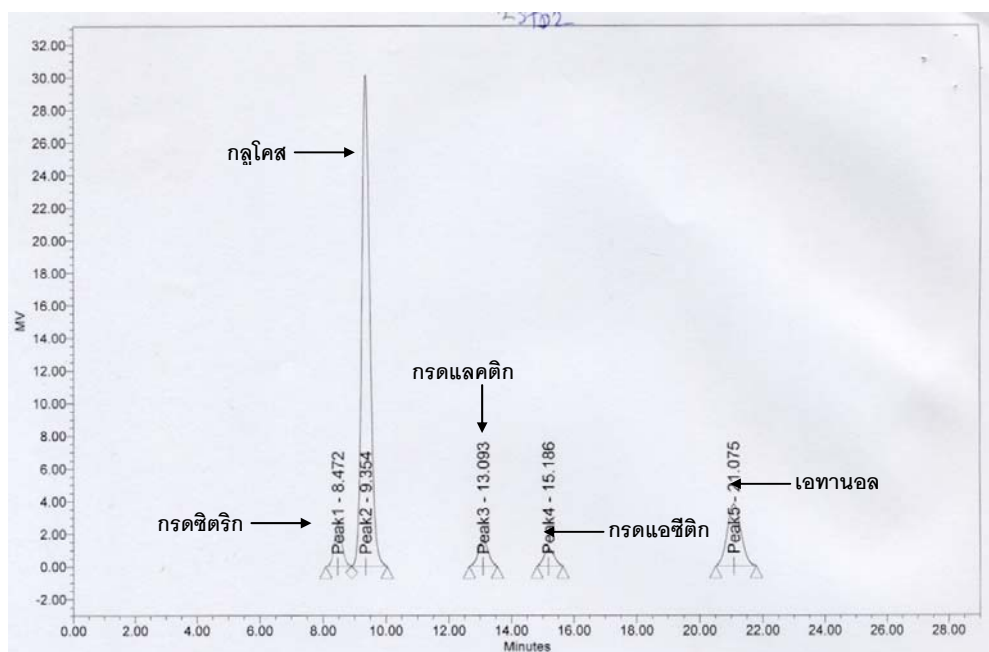
ภาพประกอบ 21 กราฟมาตรฐานของกลูโคส



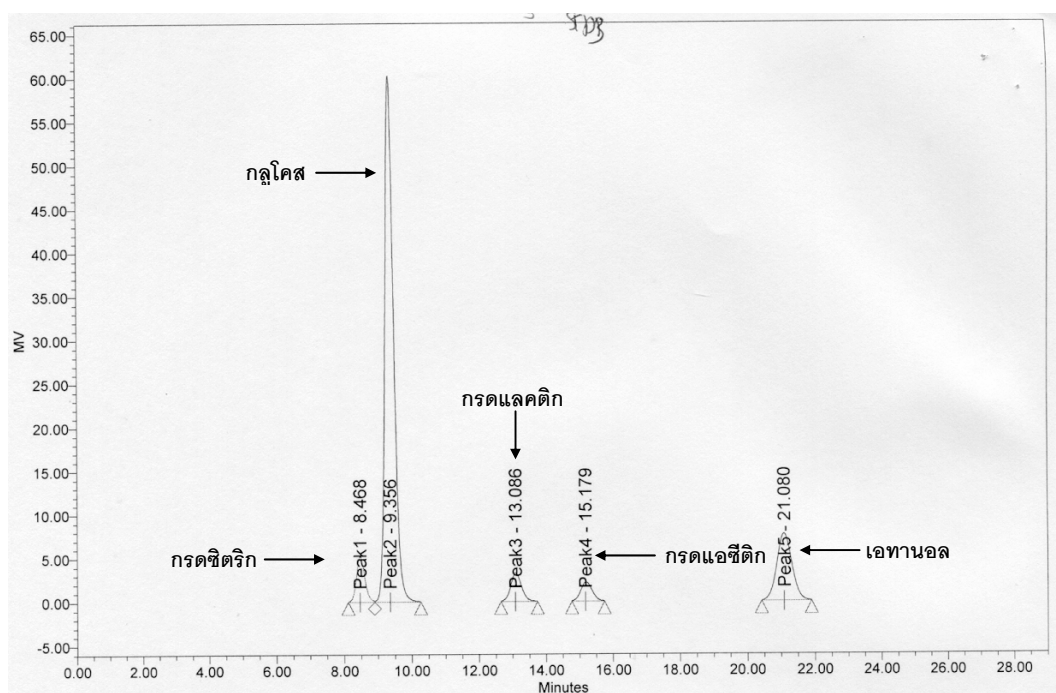
ภาพประกอบ 22 กราฟมาตรฐานของเอทานอล



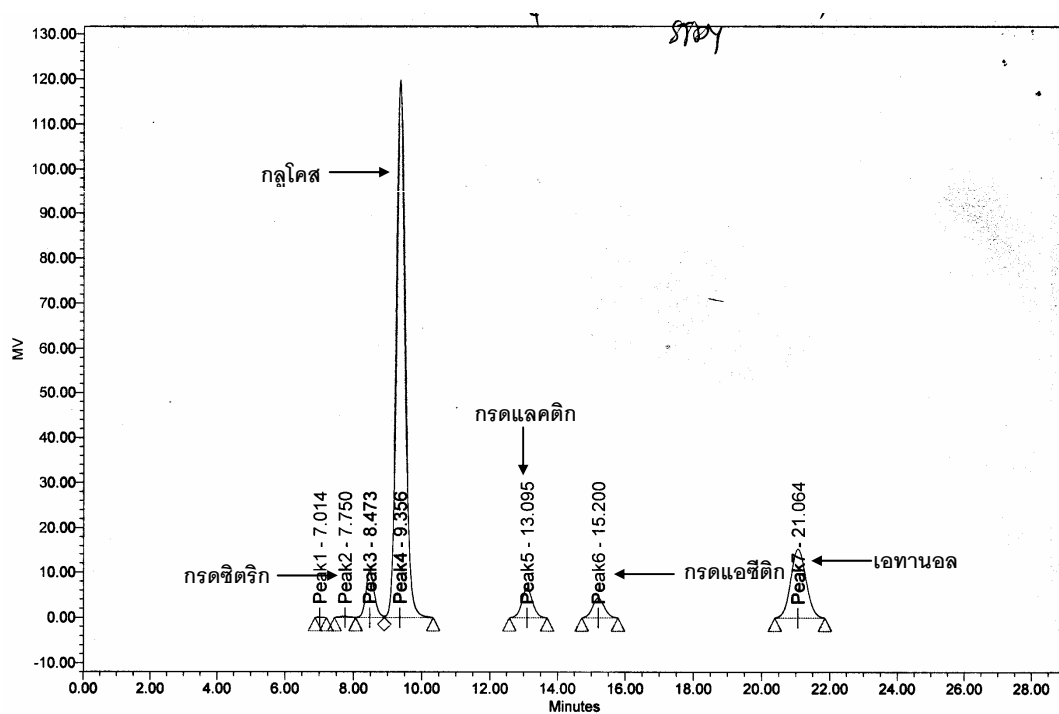
ภาพประกอบ 23 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสซิติคและกรดซิตริกความเข้มข้น 0.125 g/L



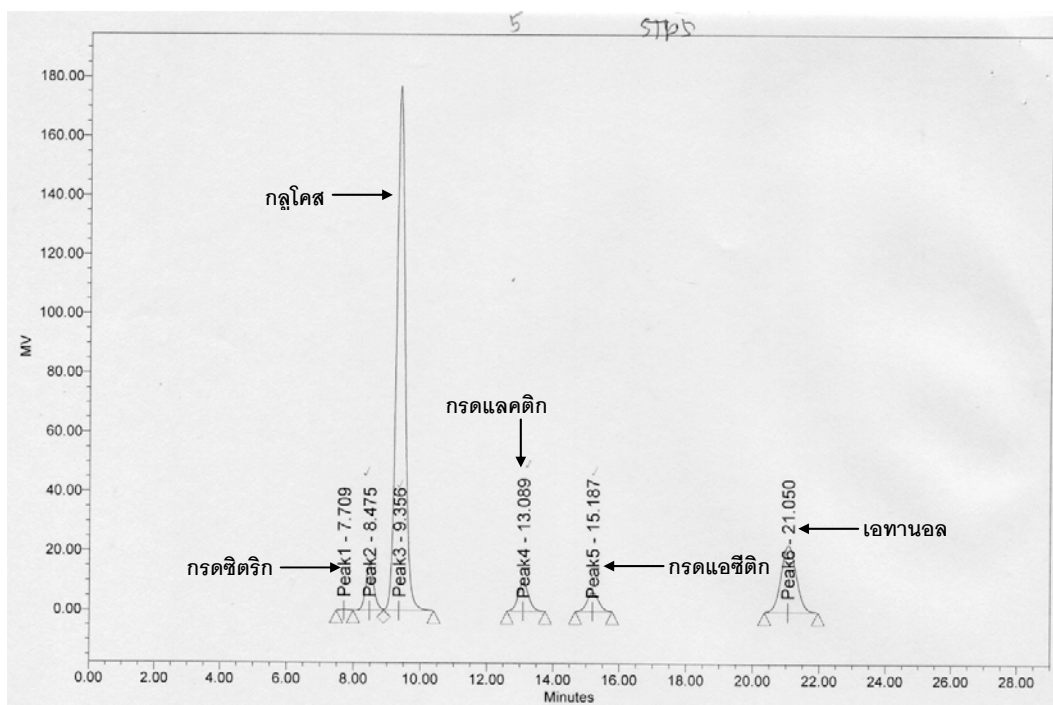
ภาพประกอบ 24 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสซิติคและกรดซิตริกความเข้มข้น 0.250 g/L



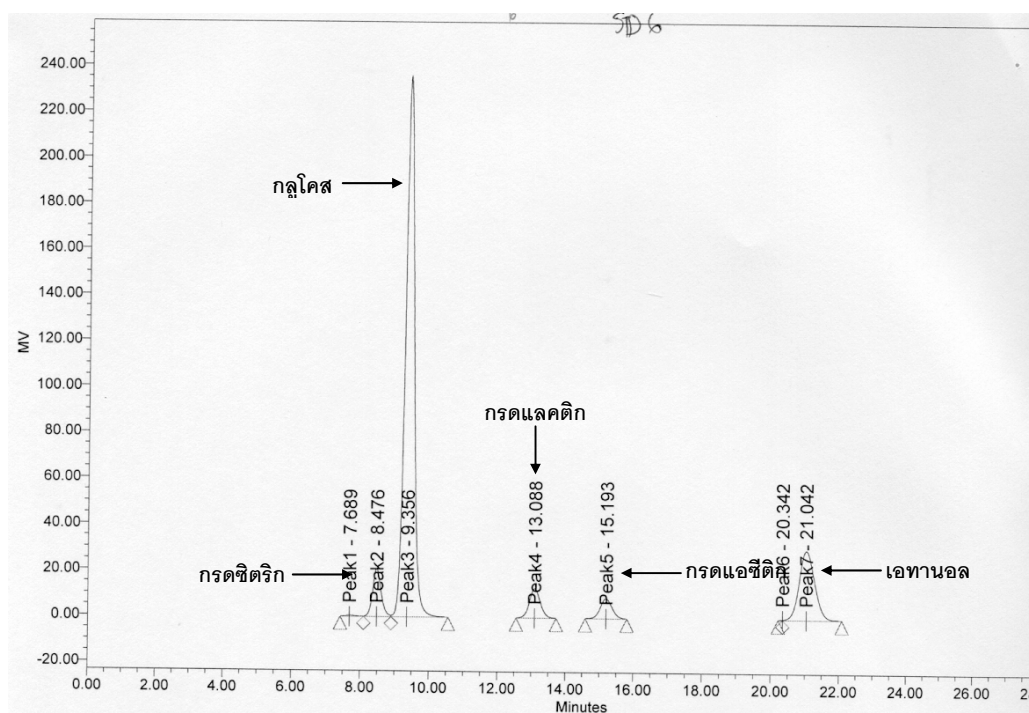
ภาพประกอบ 25 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสซิติคและกรดซิตริกความเข้มข้น 0.500 g/L



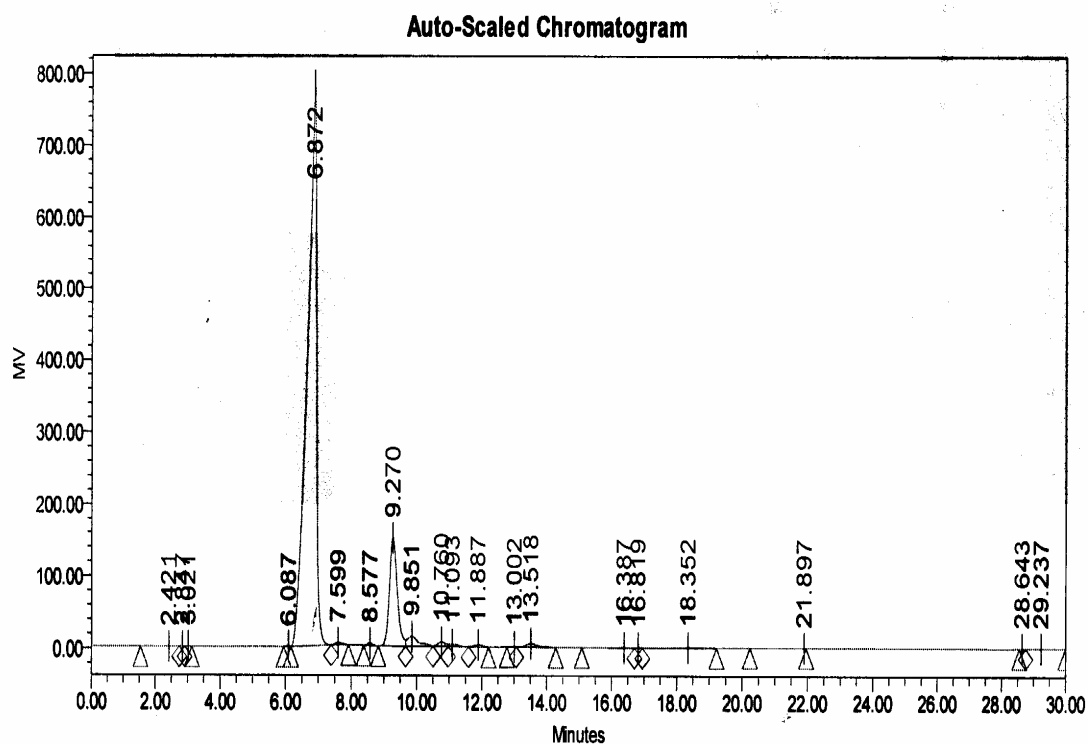
ภาพประกอบ 26 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสซิติคและกรดซิตริกความเข้มข้น 1.000 g/L



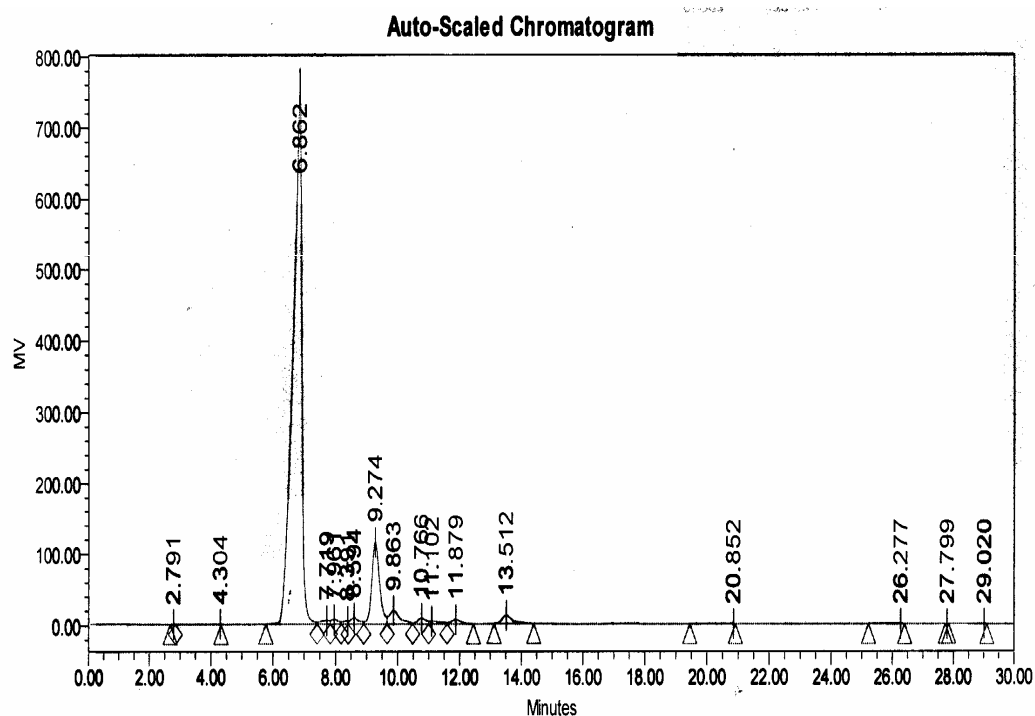
ภาพประกอบ 27 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสซิติคและกรดซิตริกความเข้มข้น 1.500 g/L



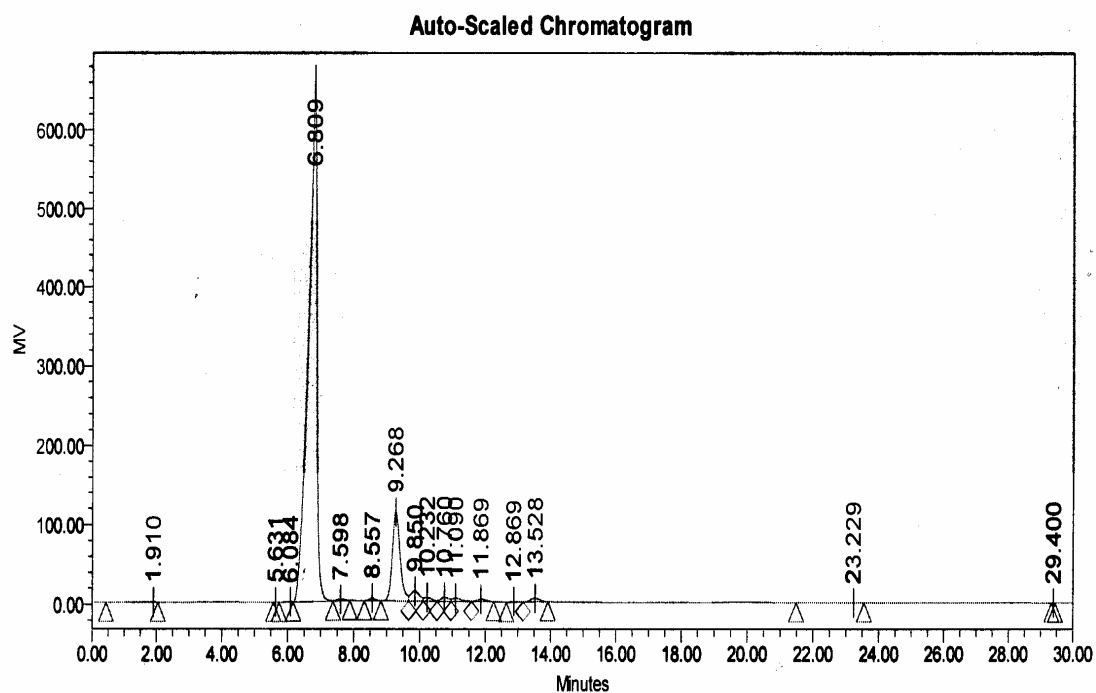
ภาพประกอบ 28 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลคติก กรดแอสซิติคและกรดซิตริกความเข้มข้น 2.000 g/L



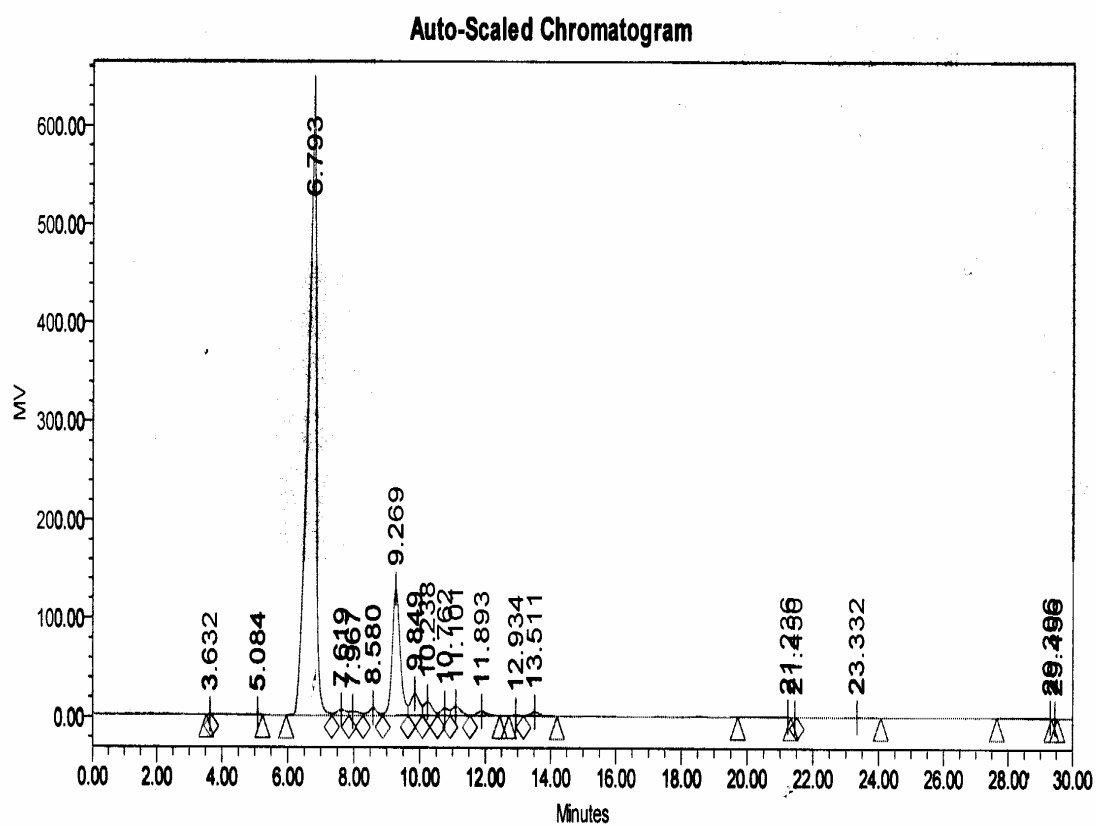
ภาพประกอบ 29 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 1 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน



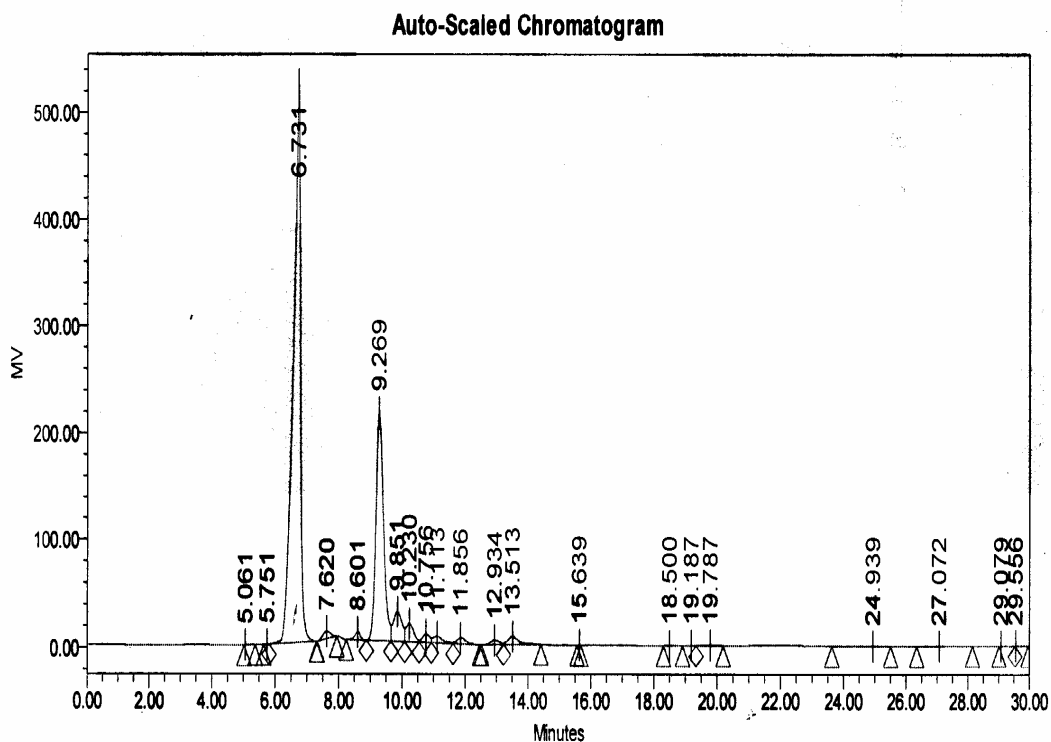
ภาพประกอบ 30 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 2 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน



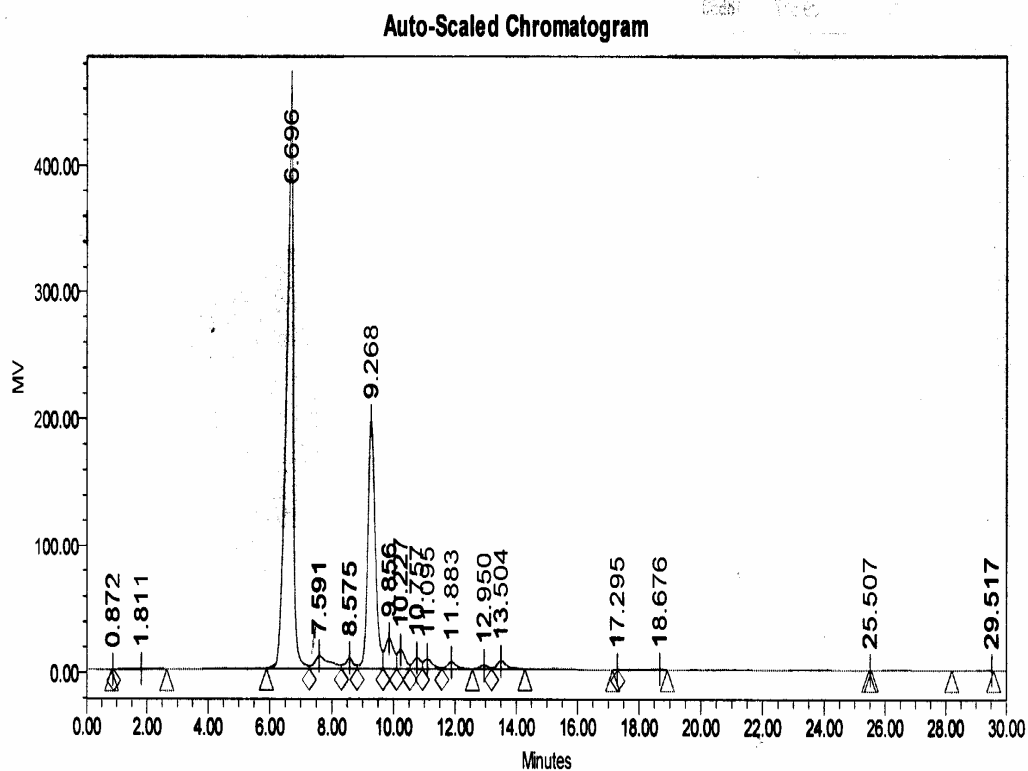
ภาพประกอบ 31 โครมาโทแกรมของซีอีวสูตร 3 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน



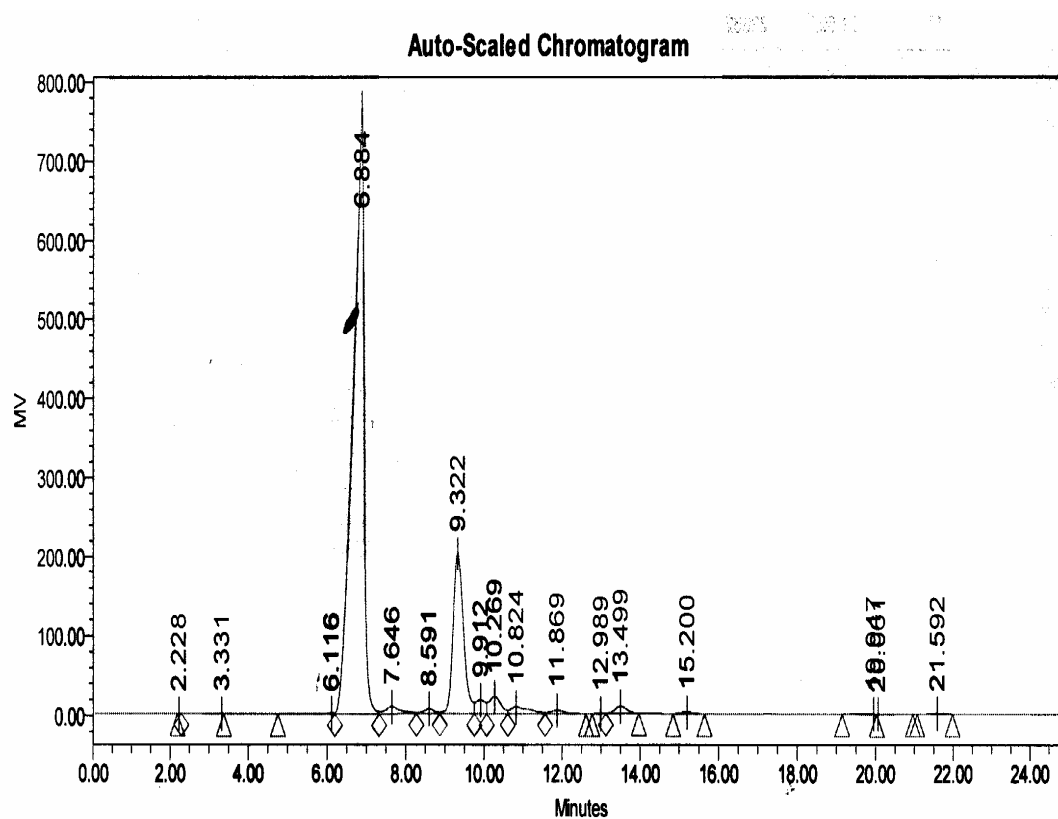
ภาพประกอบ 32 โครมาโทแกรมของซีอีวสูตร 4 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน



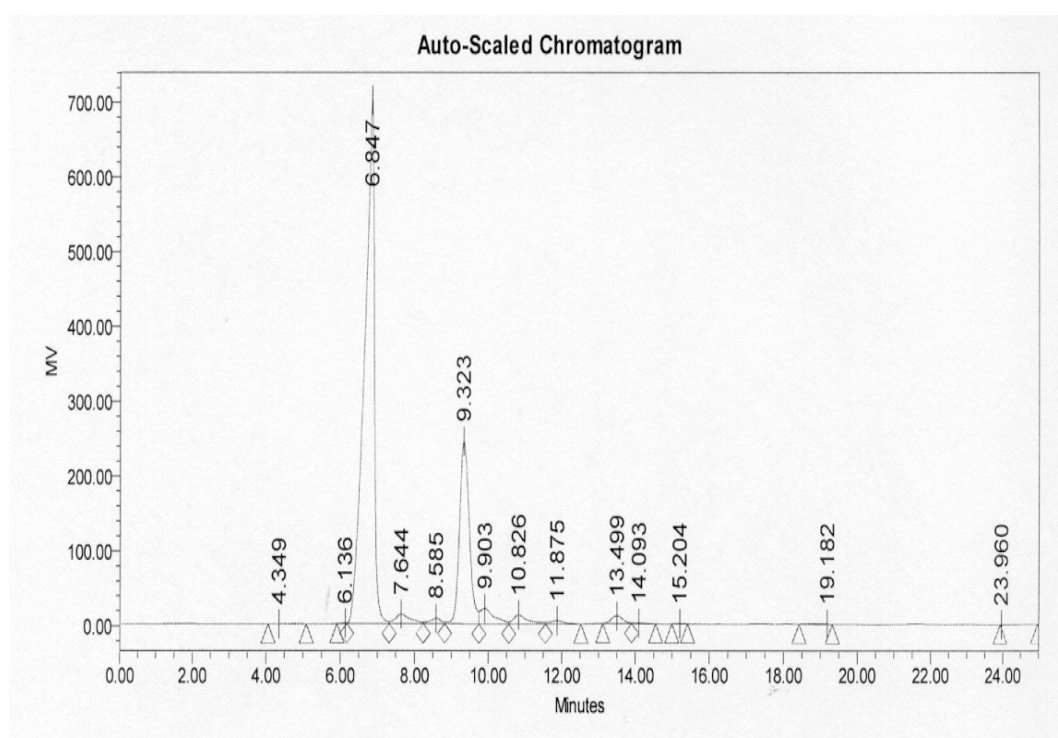
ภาพประกอบ 33 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 5 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน



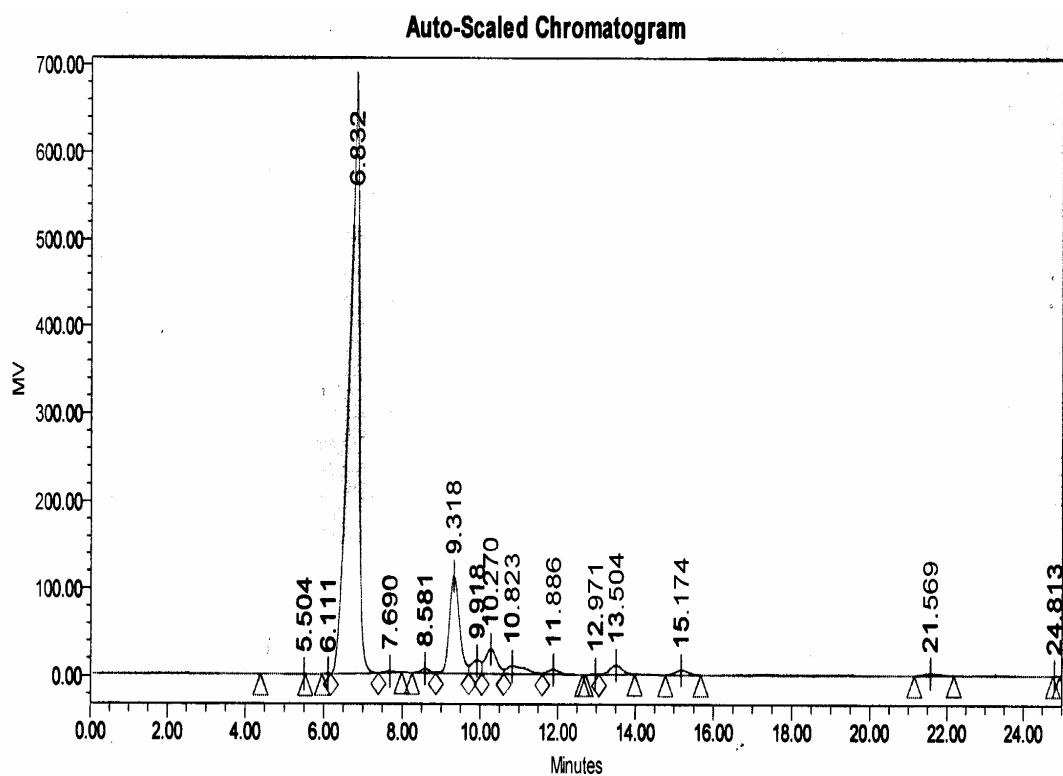
ภาพประกอบ 34 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 6 ที่ระยะเวลาหมัก 0 วัน



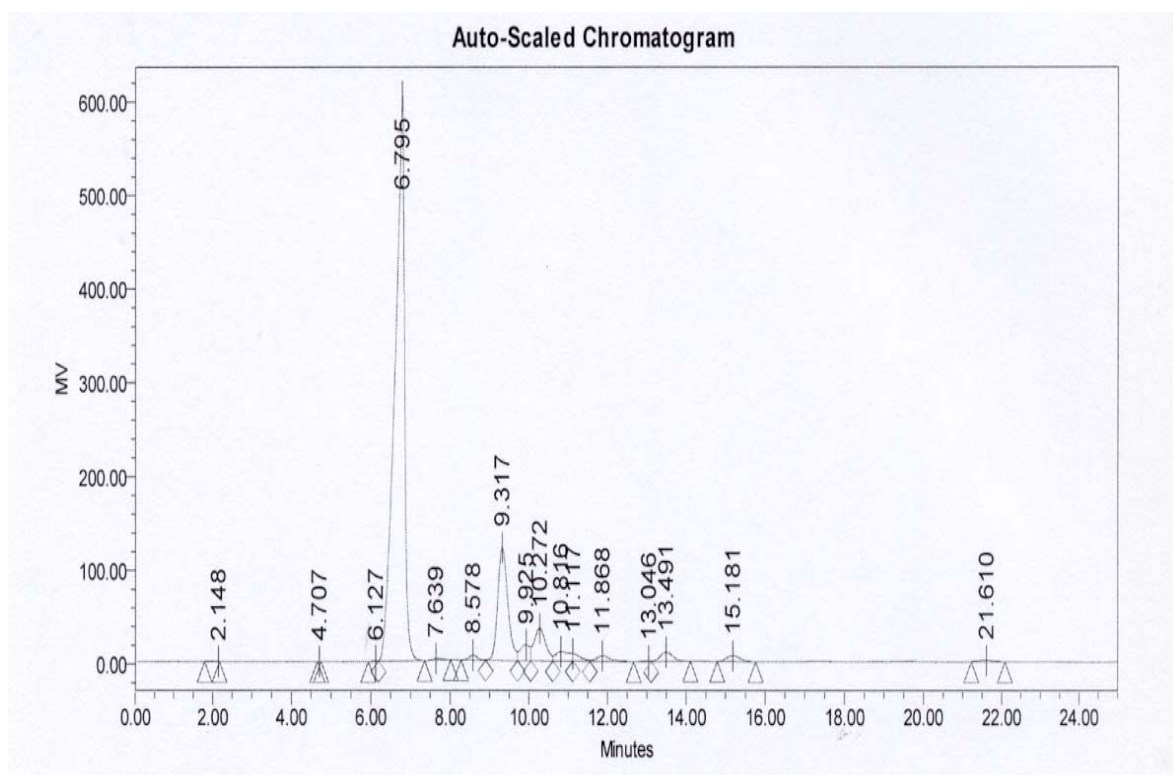
ภาพประกอบ 35 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 1 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน



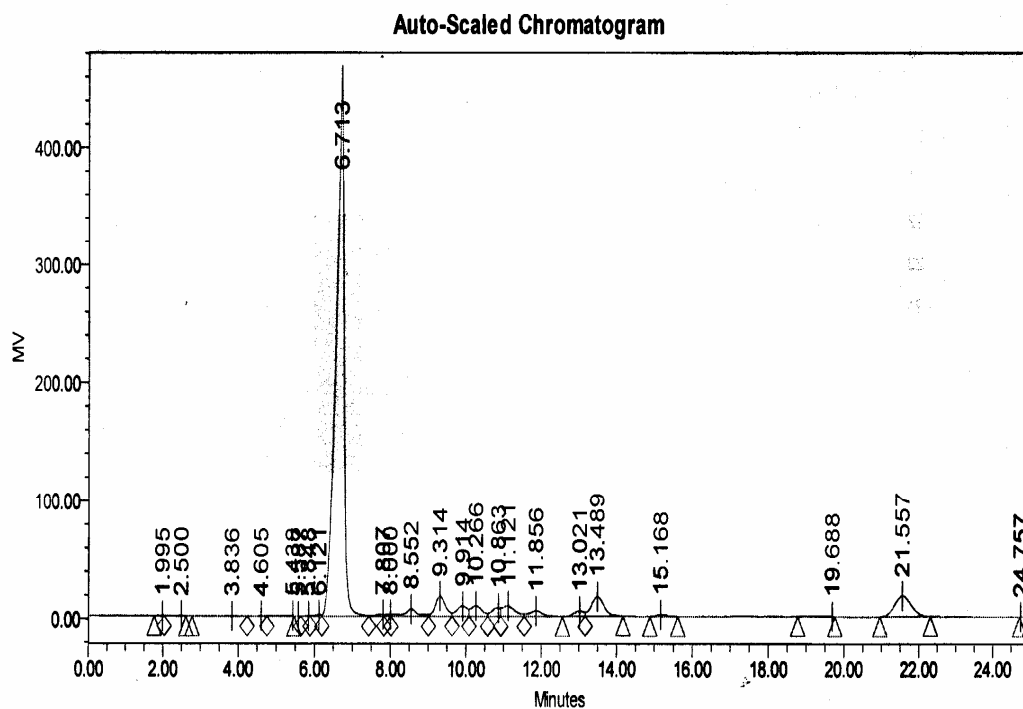
ภาพประกอบ 36 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 2 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน



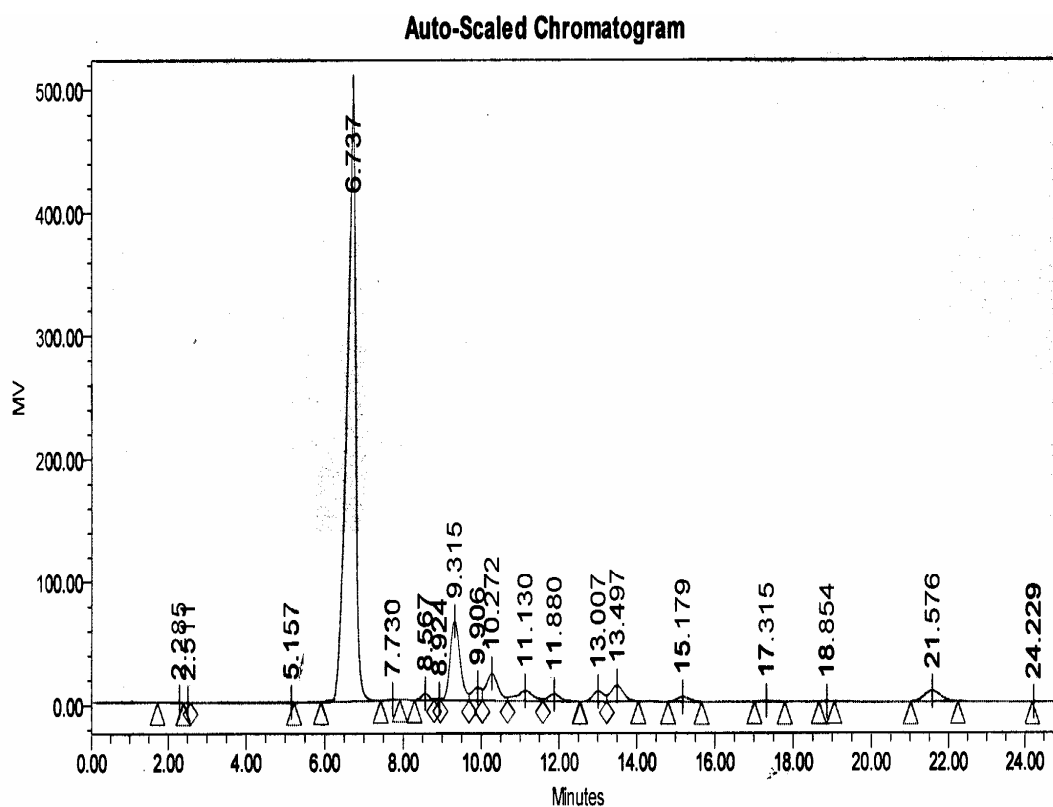
ภาพประกอบ 37 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 3 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน



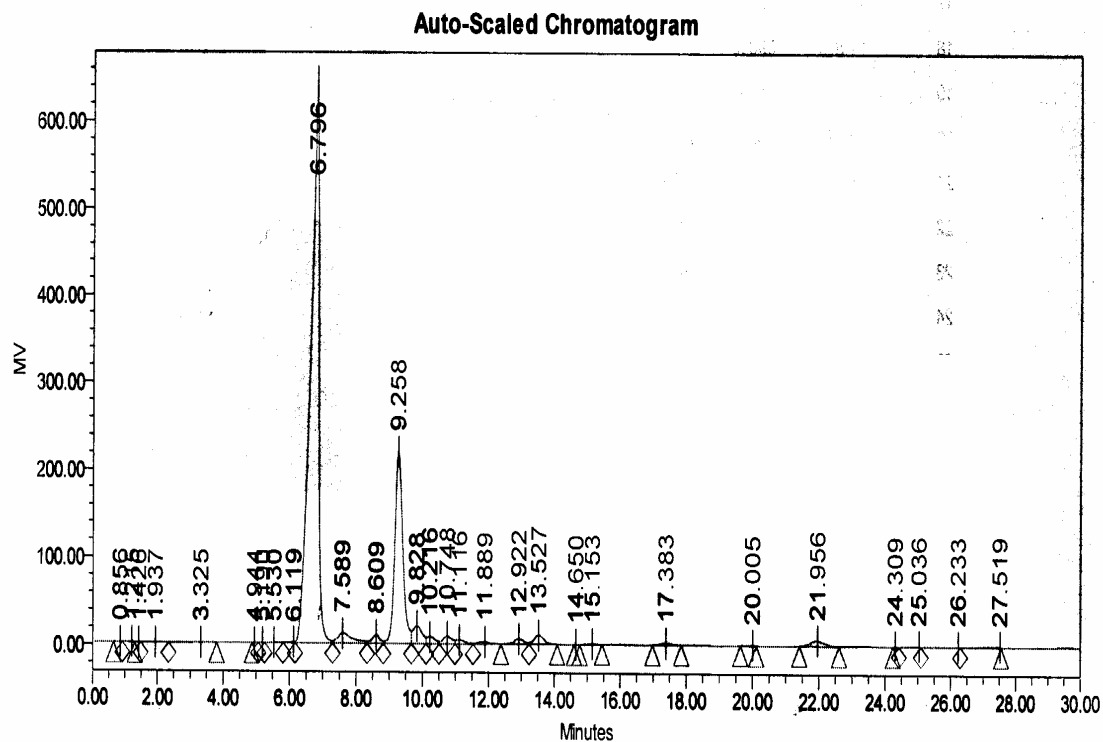
ภาพประกอบ 38 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 4 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน



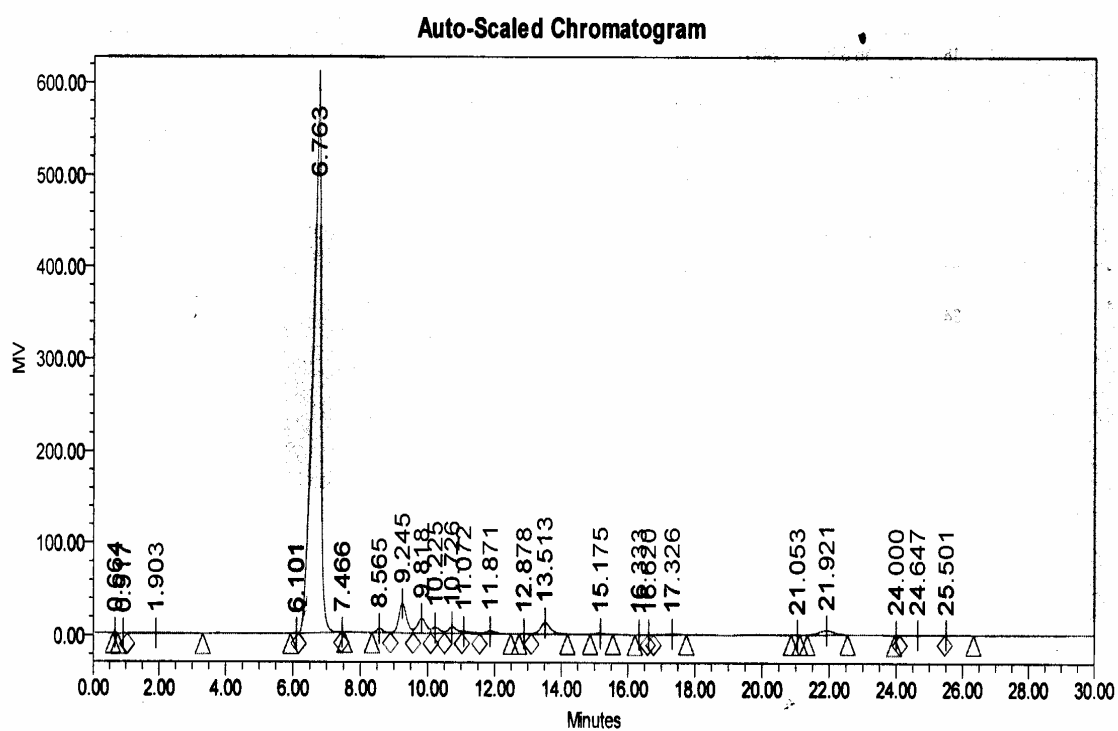
ภาพประกอบ 39 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 5 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน



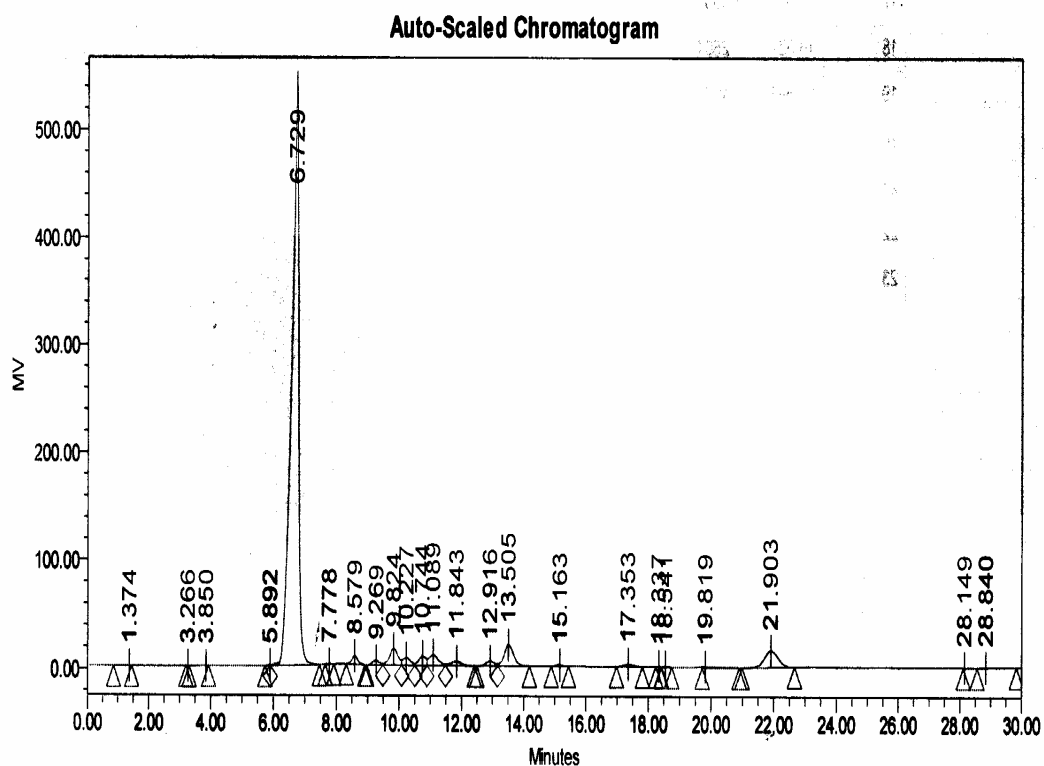
ภาพประกอบ 40 โคโรนาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 6 ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน



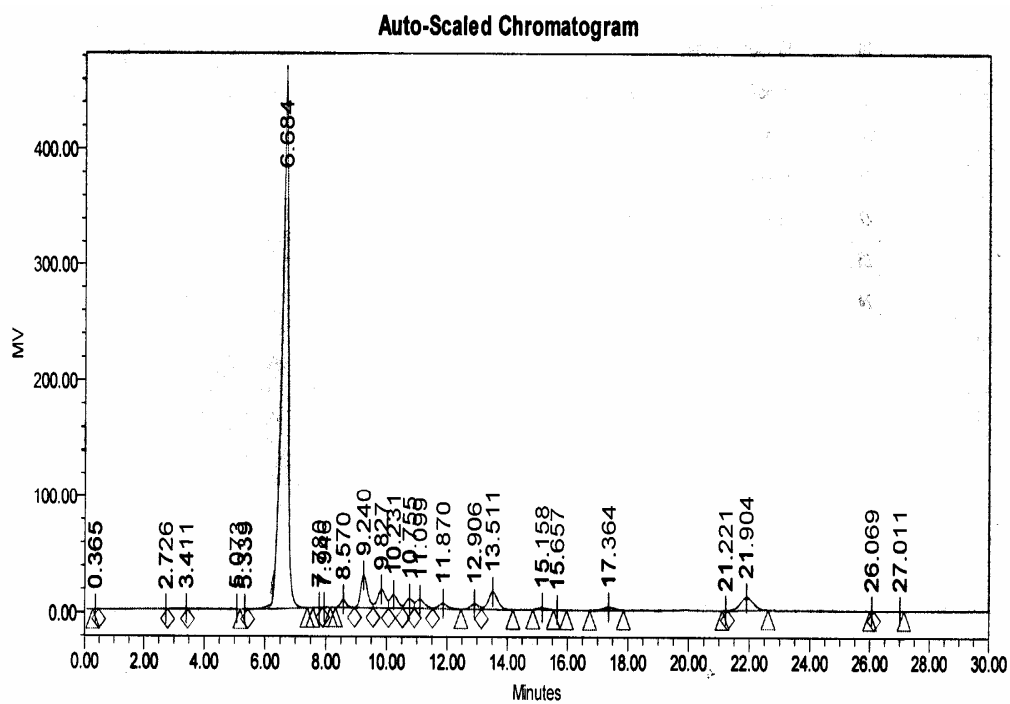
ภาพประกอบ 41 โคโรนาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 1 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน



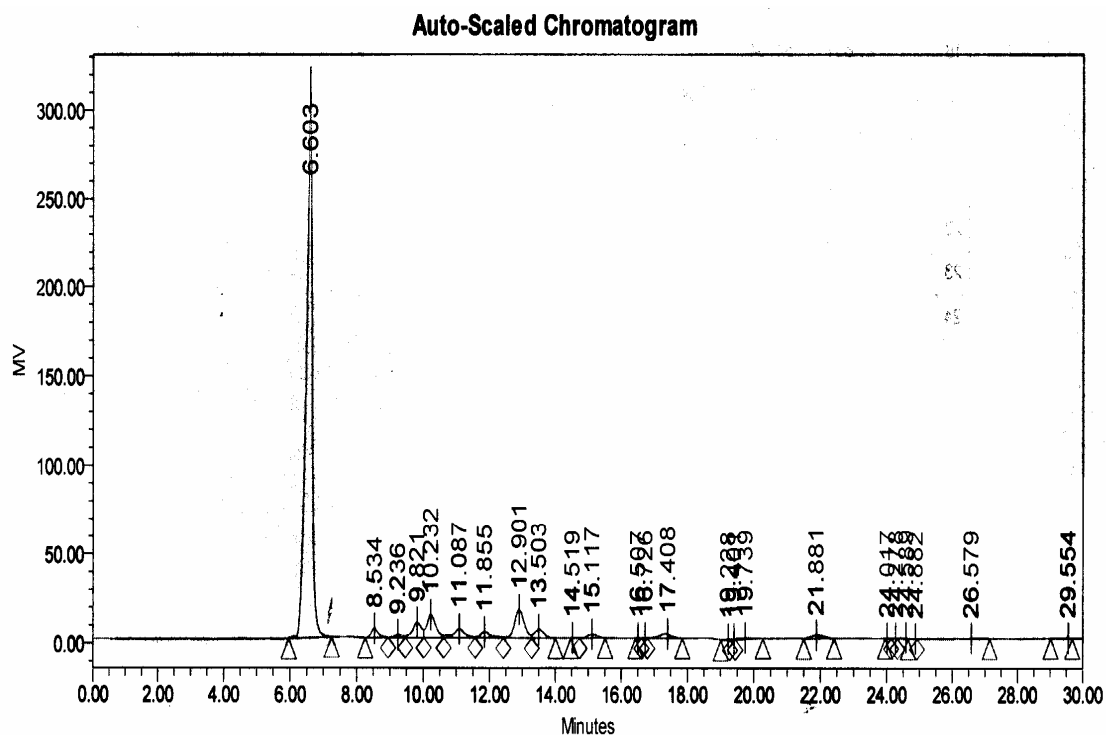
ภาพประกอบ 42 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 2 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน



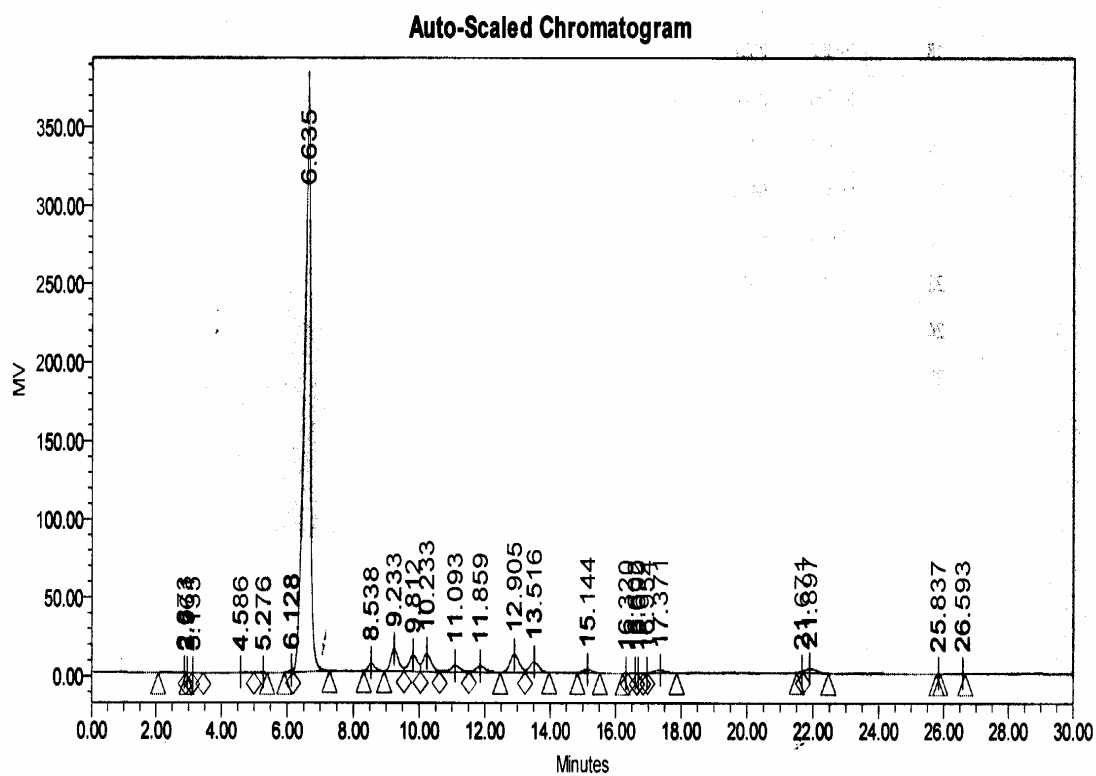
ภาพประกอบ 43 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 3 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน



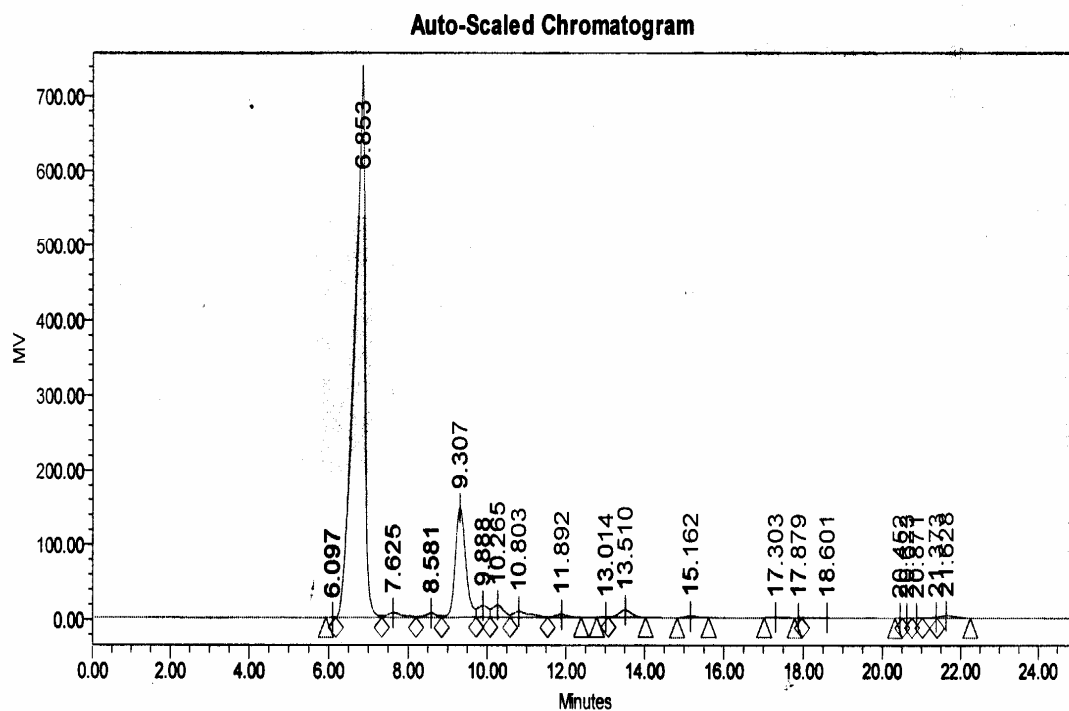
ภาพประกอบ 44 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 4 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน



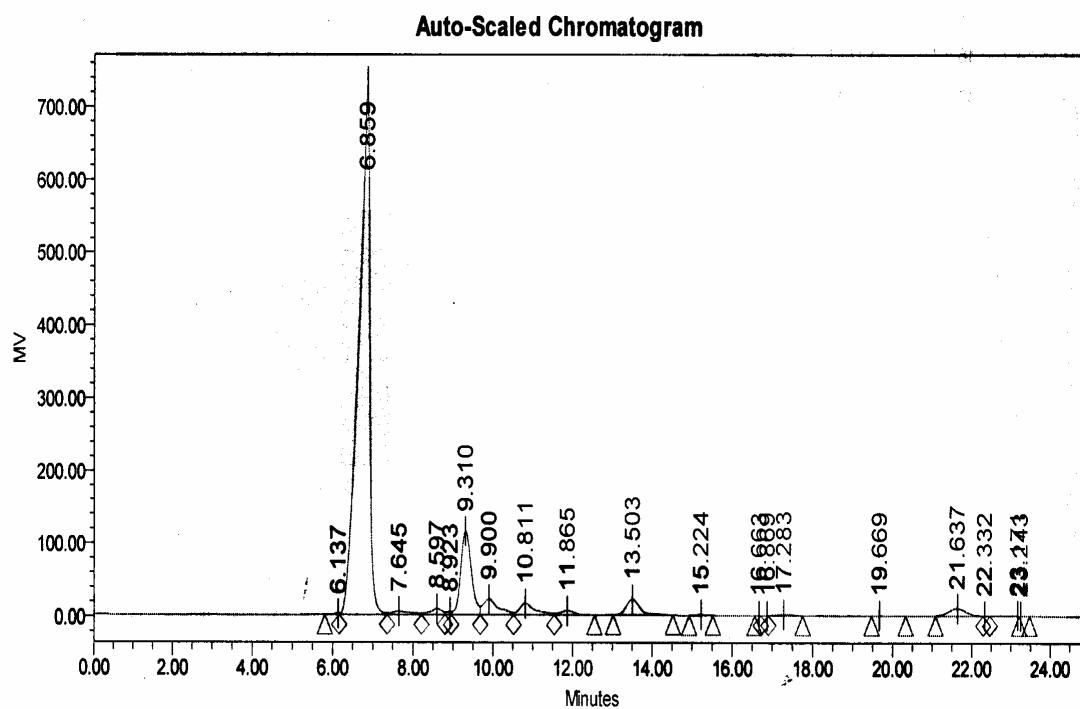
ภาพประกอบ 45 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 5 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน



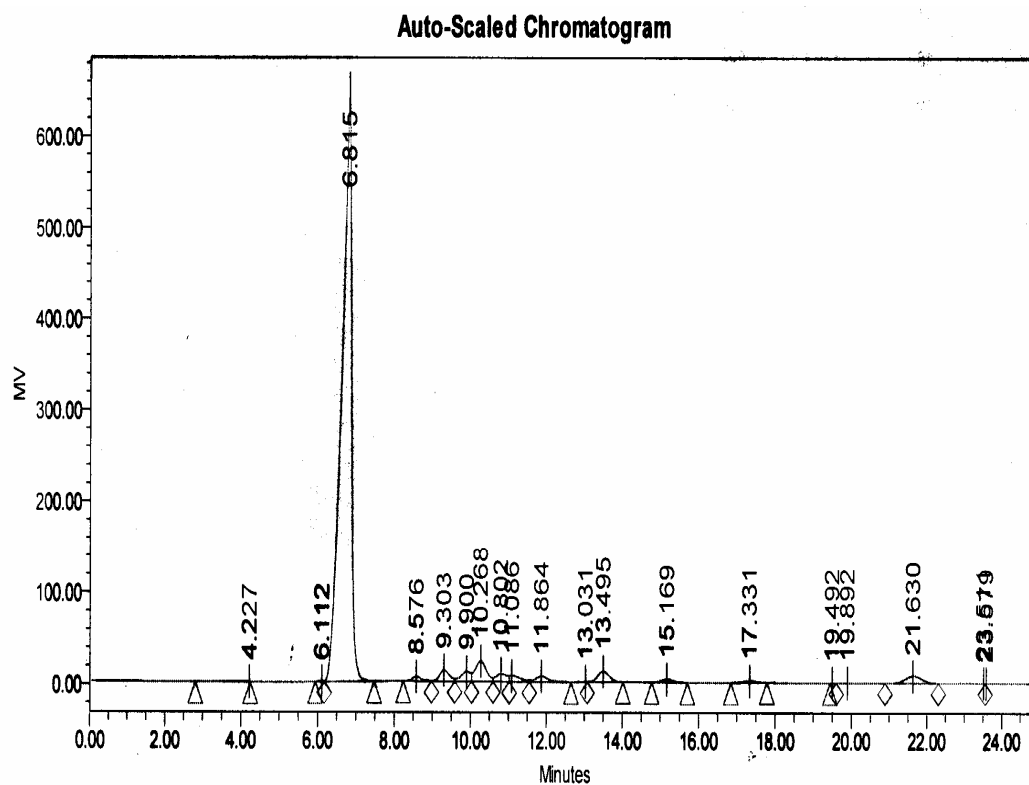
ภาพประกอบ 46 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 6 ที่ระยะเวลาหมัก 20 วัน



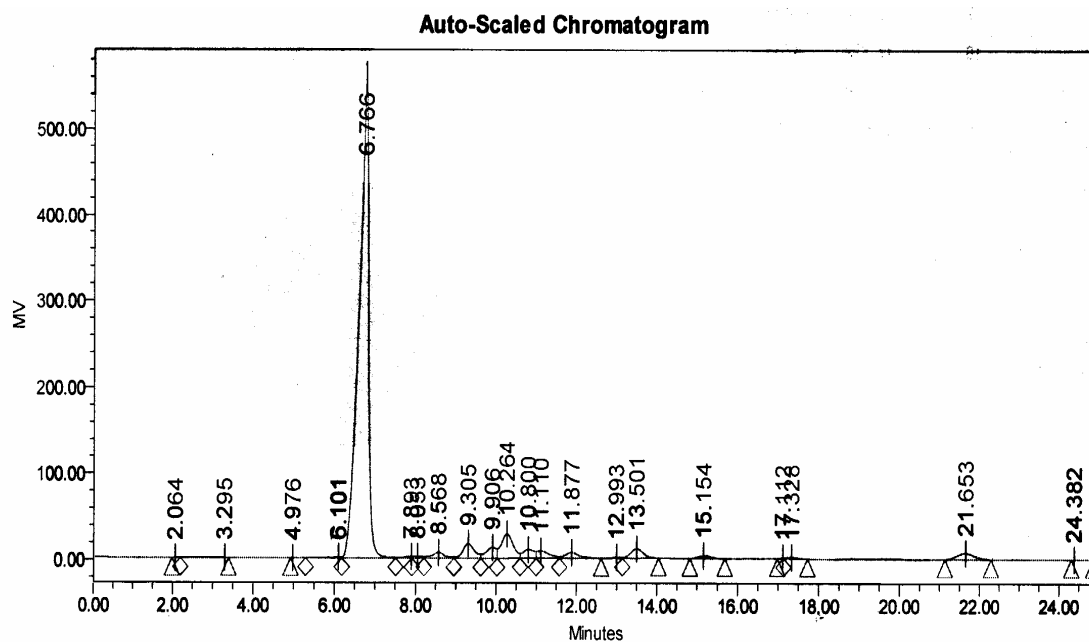
ภาพประกอบ 47 โครมาโทแกรมของซีอีวสูตร 1 ที่ระยะเวลาหมัก 30 วัน



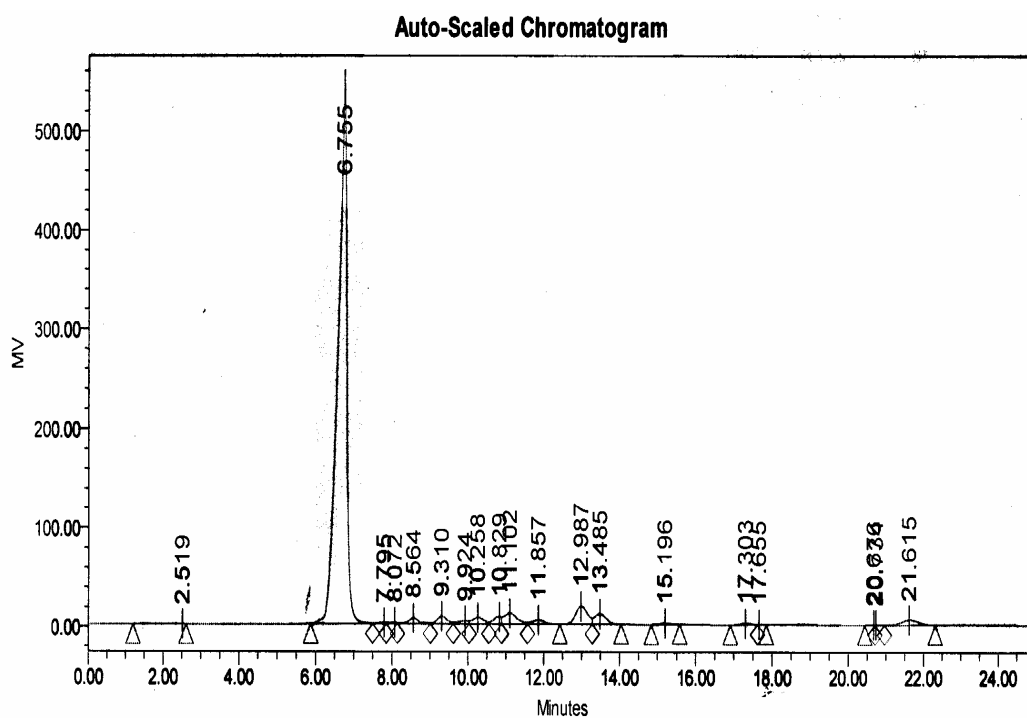
ภาพประกอบ 48 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 2 ที่ระยะเวลาหมัก 30 วัน



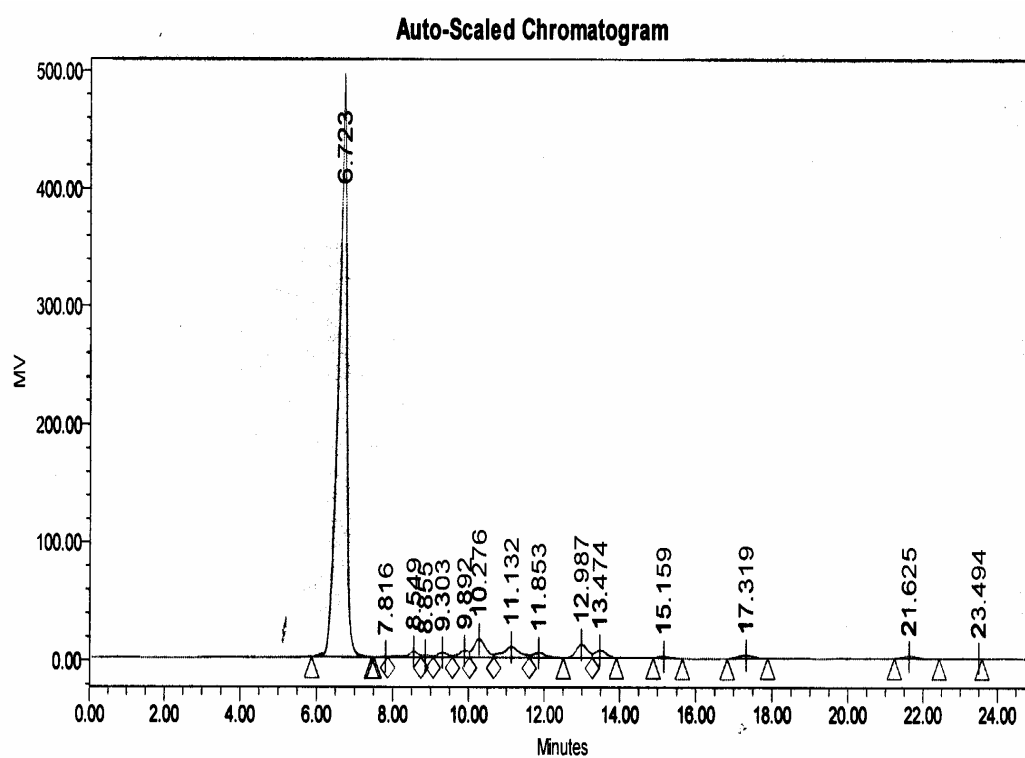
ภาพประกอบ 49 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 3 ที่ระยะเวลาหมัก 30 วัน



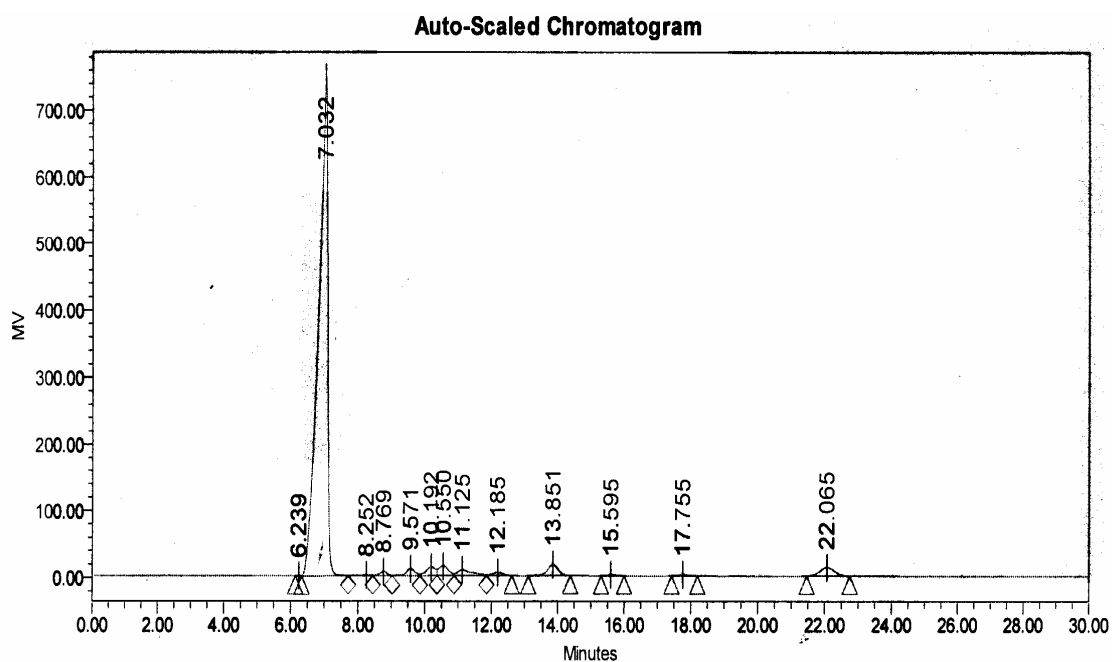
ภาพประกอบ 50 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 4 ที่ระยะเวลาหมัก 30 วัน



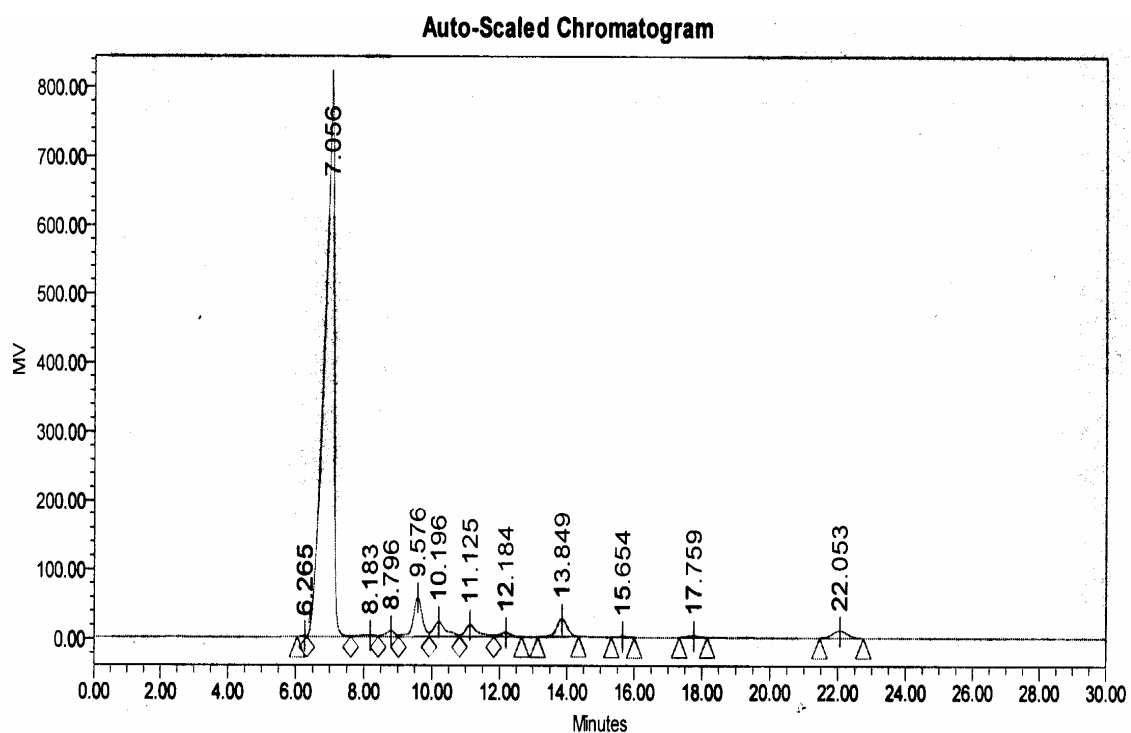
ภาพประกอบ 51 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 5 ที่ระยะเวลาหมัก 30 วัน



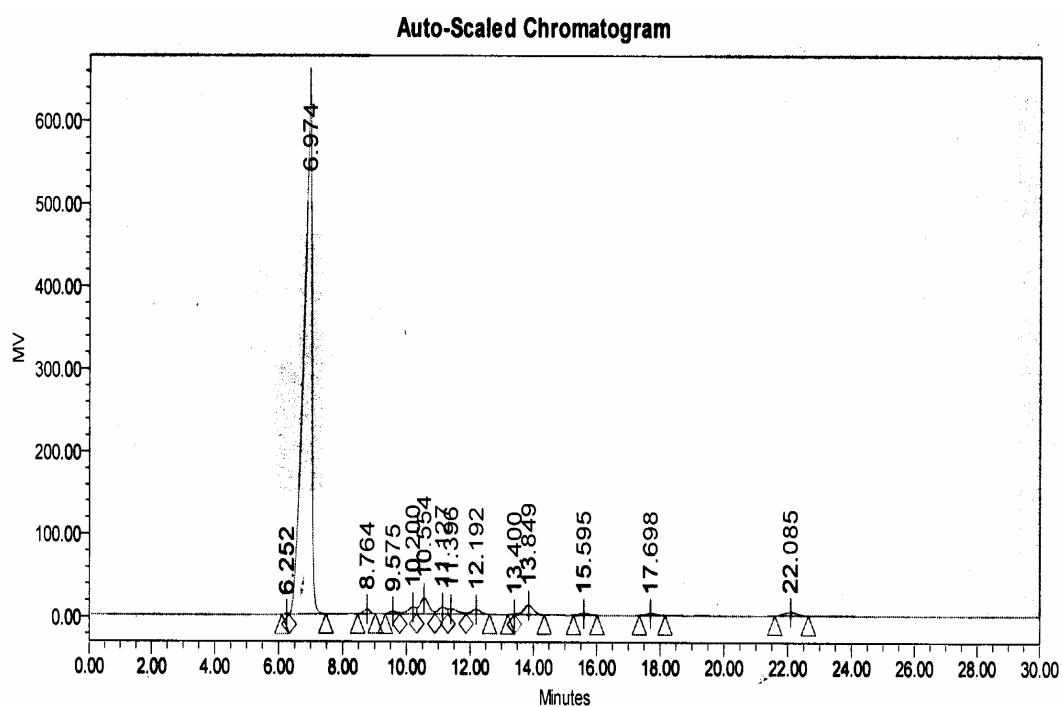
ภาพประกอบ 52 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 6 ที่ระยะเวลาหมัก 30 วัน



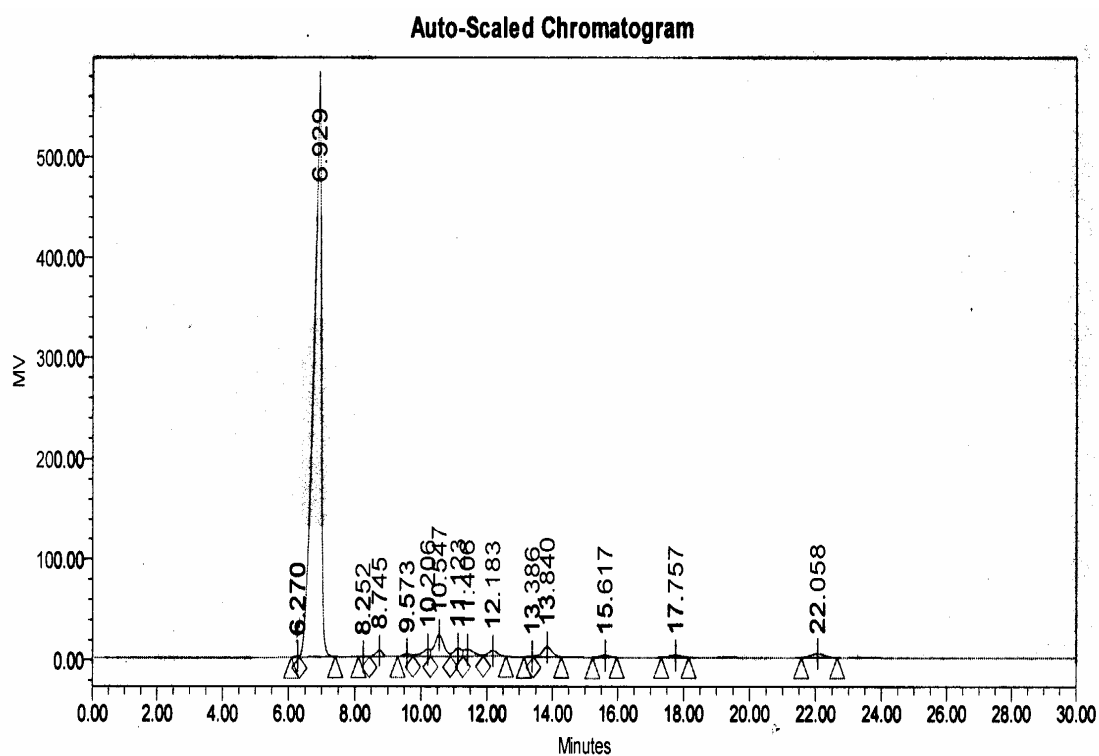
ภาพประกอบ 53 โครมาโทแกรมของซีอีวสูตร 1 ที่ระยะเวลาหมัก 45 วัน



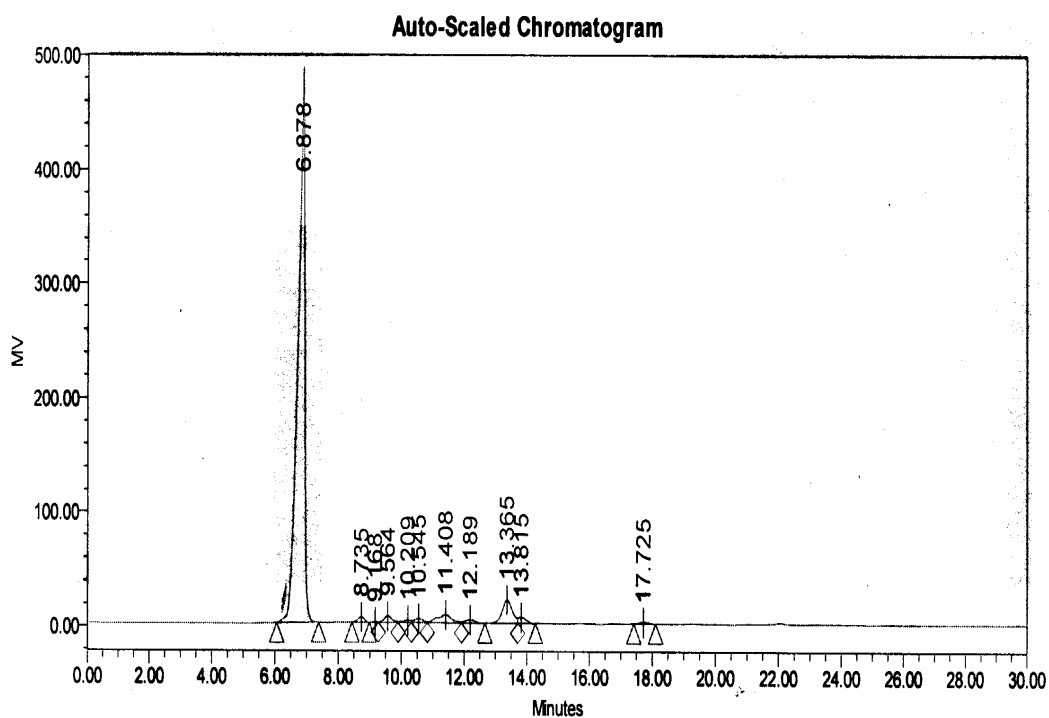
ภาพประกอบ 54 โครมาโทแกรมของซีอีวสูตร 2 ที่ระยะเวลาหมัก 45 วัน



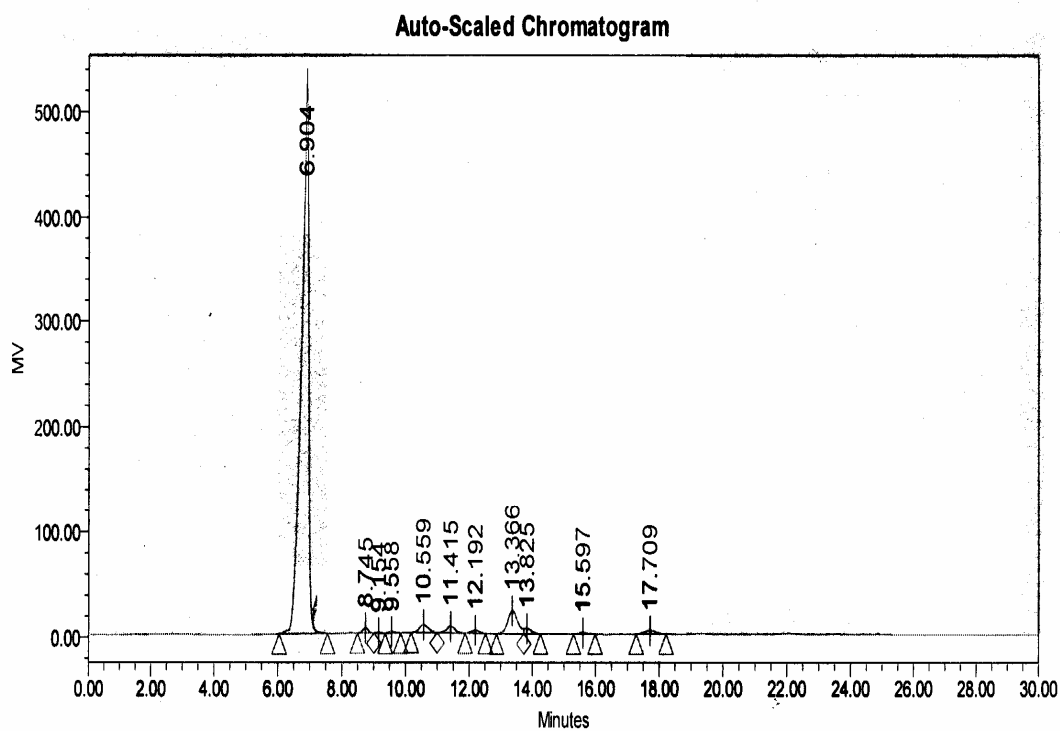
ภาพประกอบ 55 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 3 ที่ระยะเวลาหมัก 45 วัน



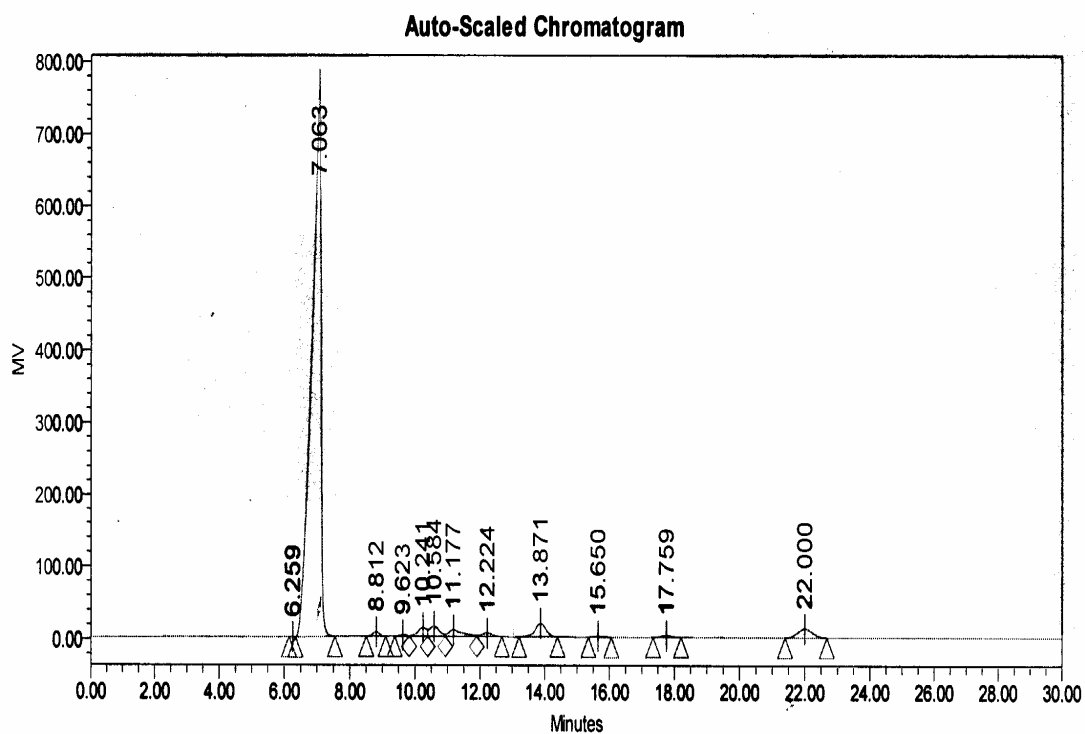
ภาพประกอบ 56 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 4 ที่ระยะเวลาหมัก 45 วัน



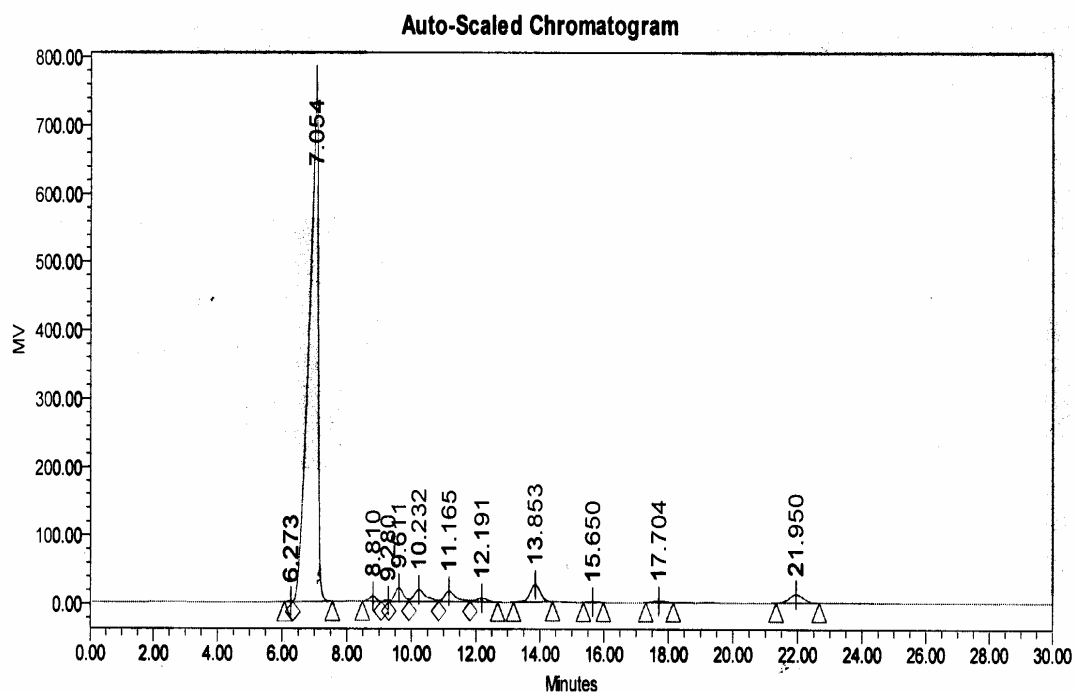
ภาพประกอบ 57 โครมาโทแกรมของซีอีวสูตร 5 ที่ระยะเวลาหมัก 45 วัน



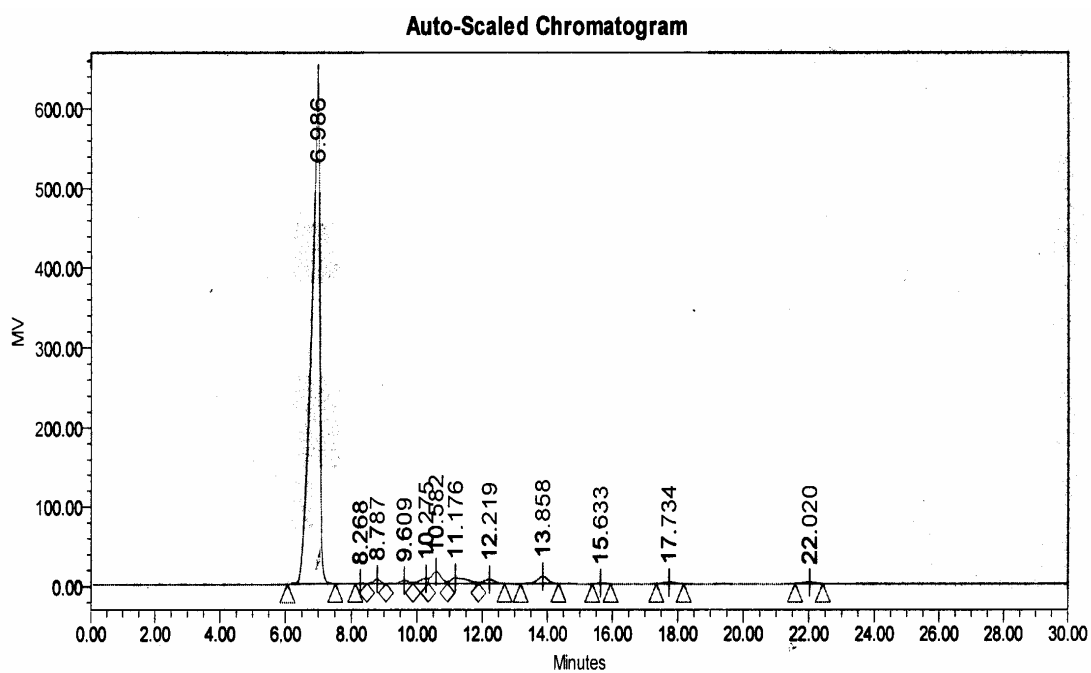
ภาพประกอบ 58 โครมาโทแกรมของซีอีวสูตร 6 ที่ระยะเวลาหมัก 45 วัน



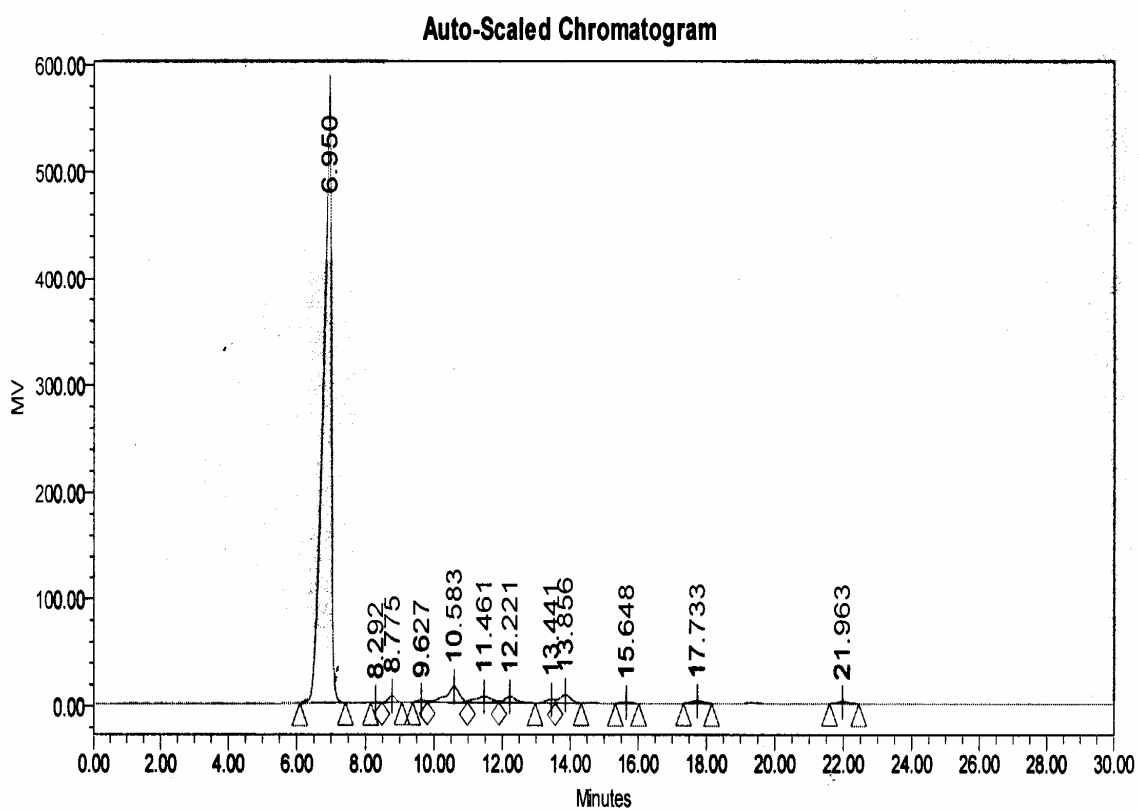
ภาพประกอบ 59 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 1 ที่ระยะเวลาหมัก 60 วัน



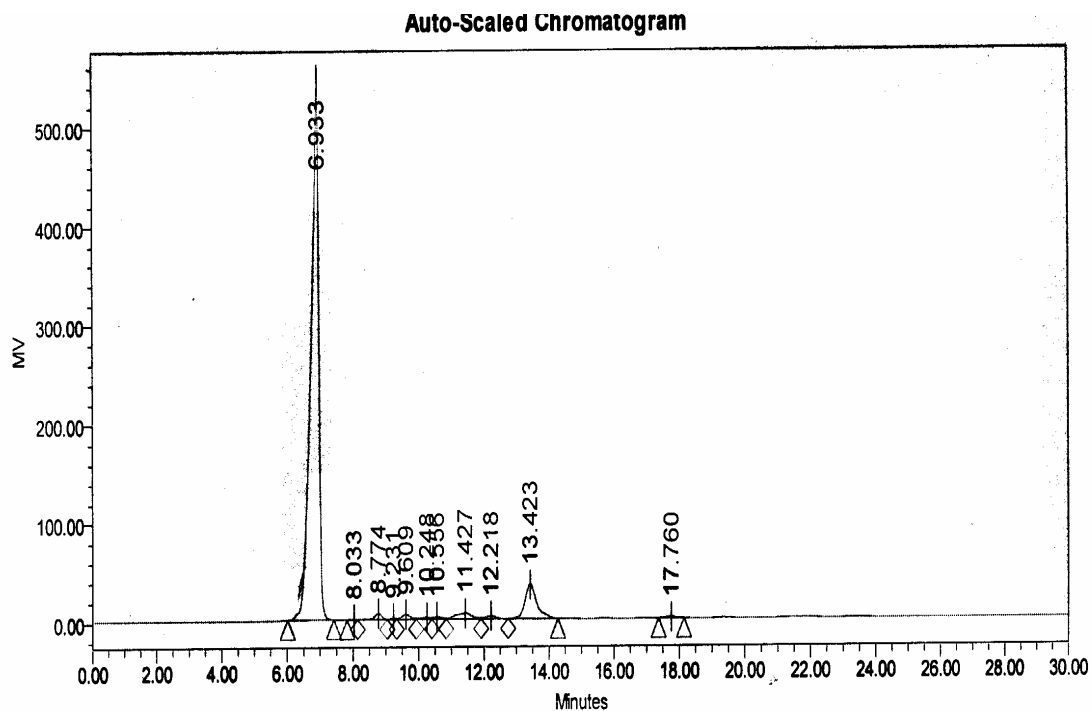
ภาพประกอบ 60 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 2 ที่ระยะเวลาหมัก 60 วัน



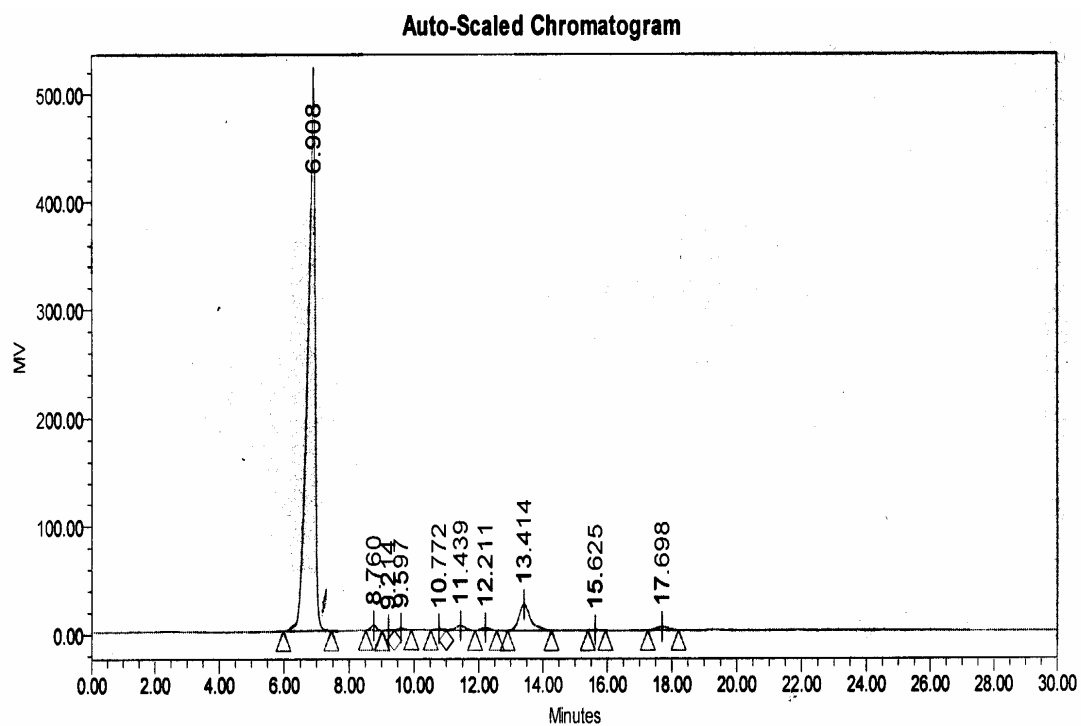
ภาพประกอบ 61 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 3 ที่ระยะเวลาหมัก 60 วัน



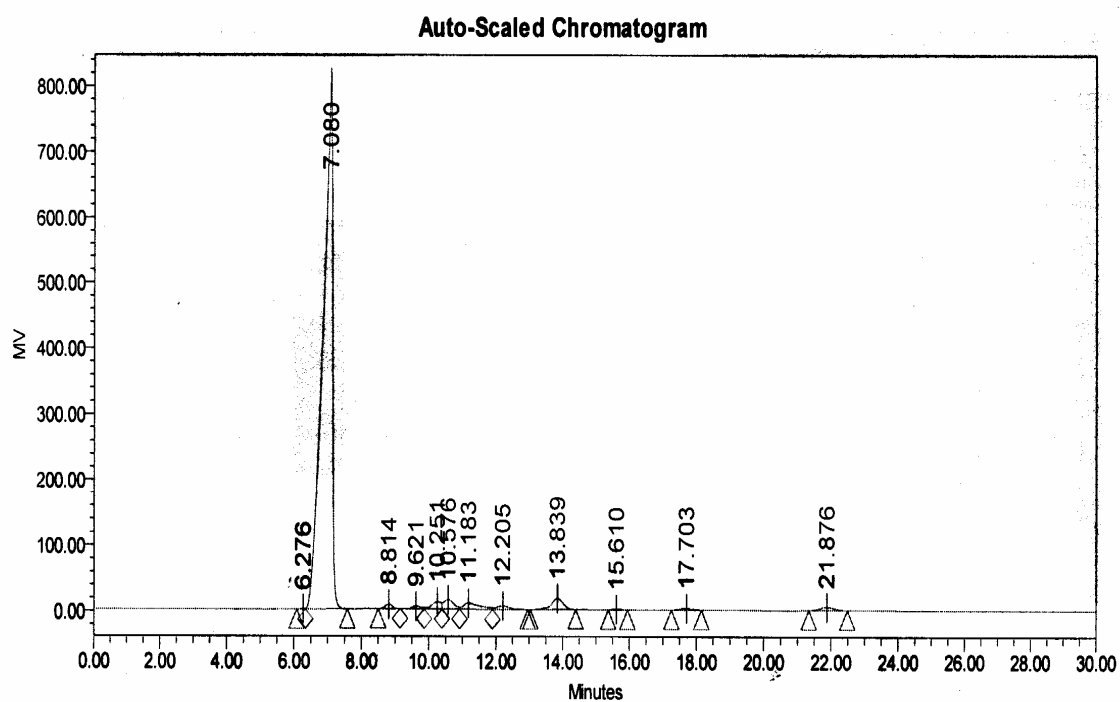
ภาพประกอบ 62 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 4 ที่ระยะเวลาหมัก 60 วัน



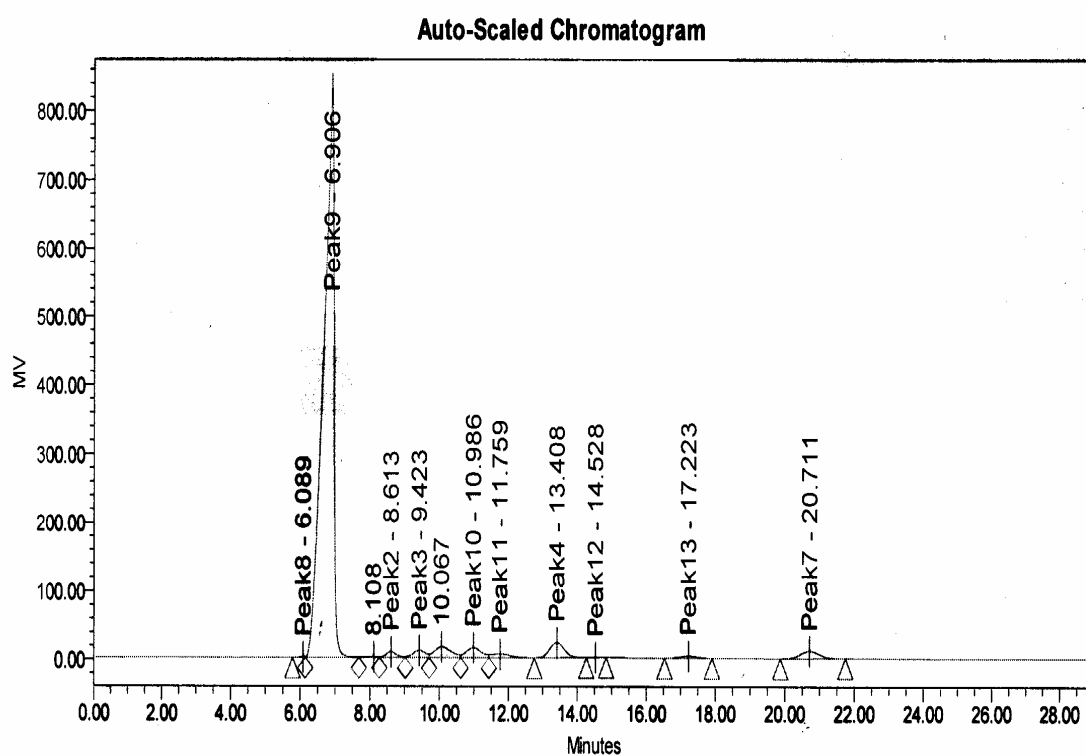
ภาพประกอบ 63 โครมาโทแกรมของซีอิ้วสูตร 5 ที่ระยะเวลาหมัก 60 วัน



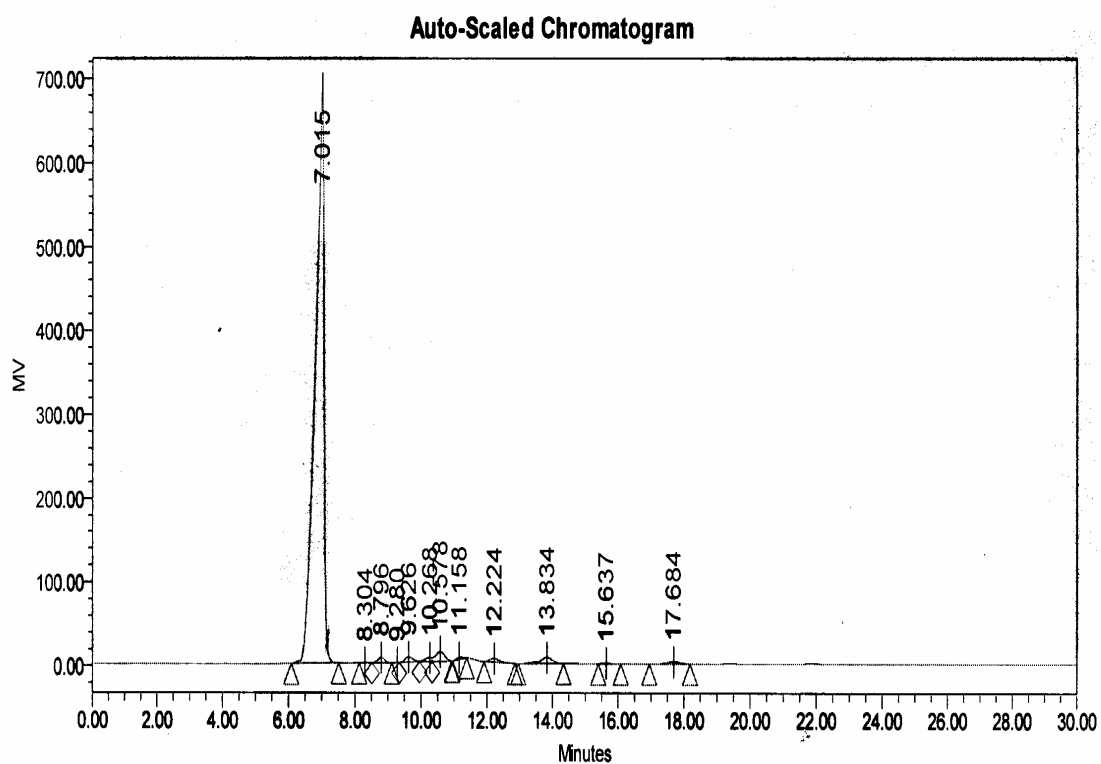
ภาพประกอบ 64 โครมาโทแกรมของซีอิ้วสูตร 6 ที่ระยะเวลาหมัก 60 วัน



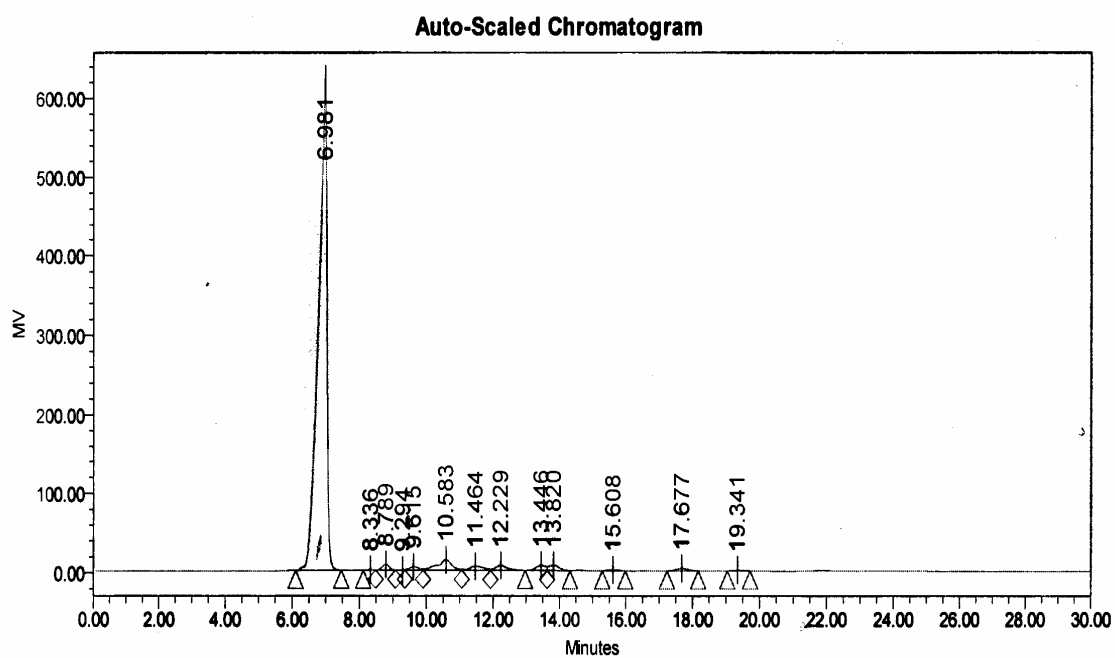
ภาพประกอบ 65 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 1 ที่ระยะเวลาหมัก 75 วัน



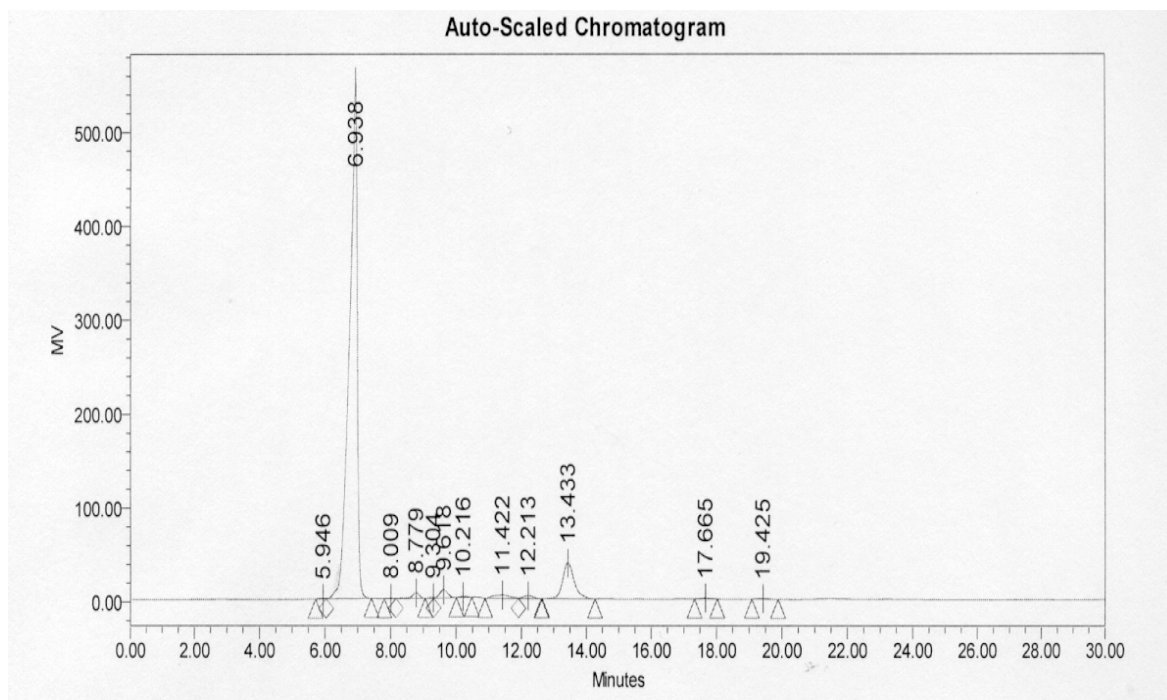
ภาพประกอบ 66 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 2 ที่ระยะเวลาหมัก 75 วัน



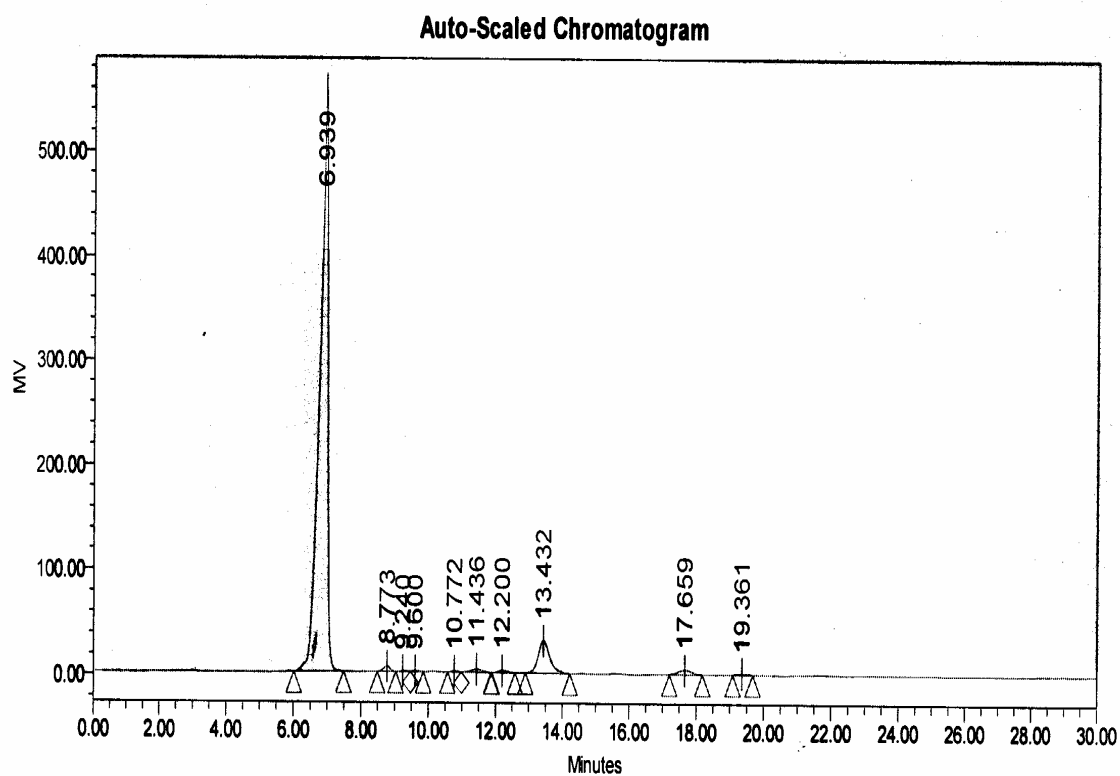
ภาพประกอบ 67 โครมาโทแกรมของซีอิ้วสูตร 3 ที่ระยะเวลาหมัก 75 วัน



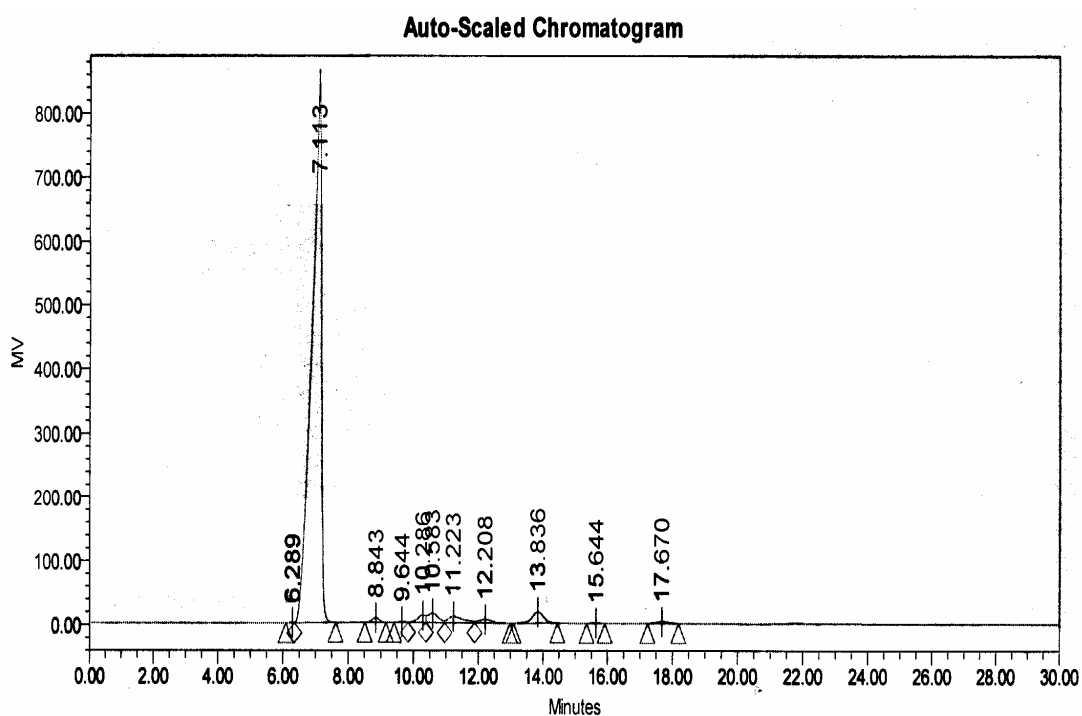
ภาพประกอบ 68 โครมาโทแกรมของซีอิ้วสูตร 4 ที่ระยะเวลาหมัก 75 วัน



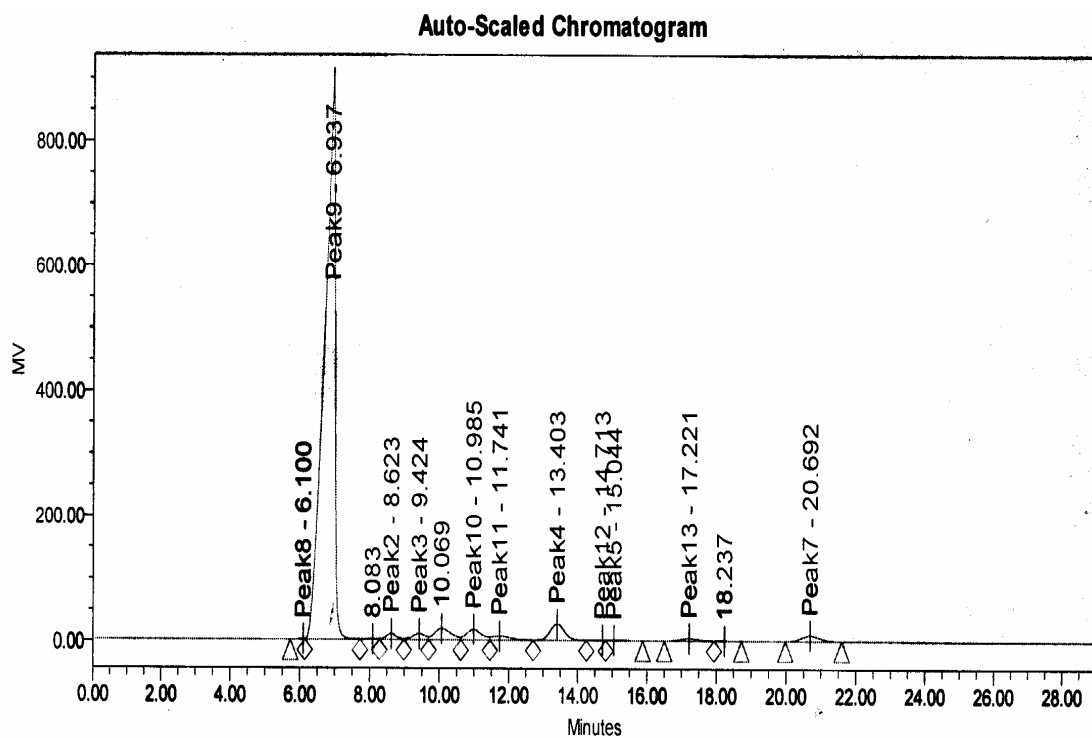
ภาพประกอบ 69 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 5 ที่ระยะเวลาหมัก 75 วัน



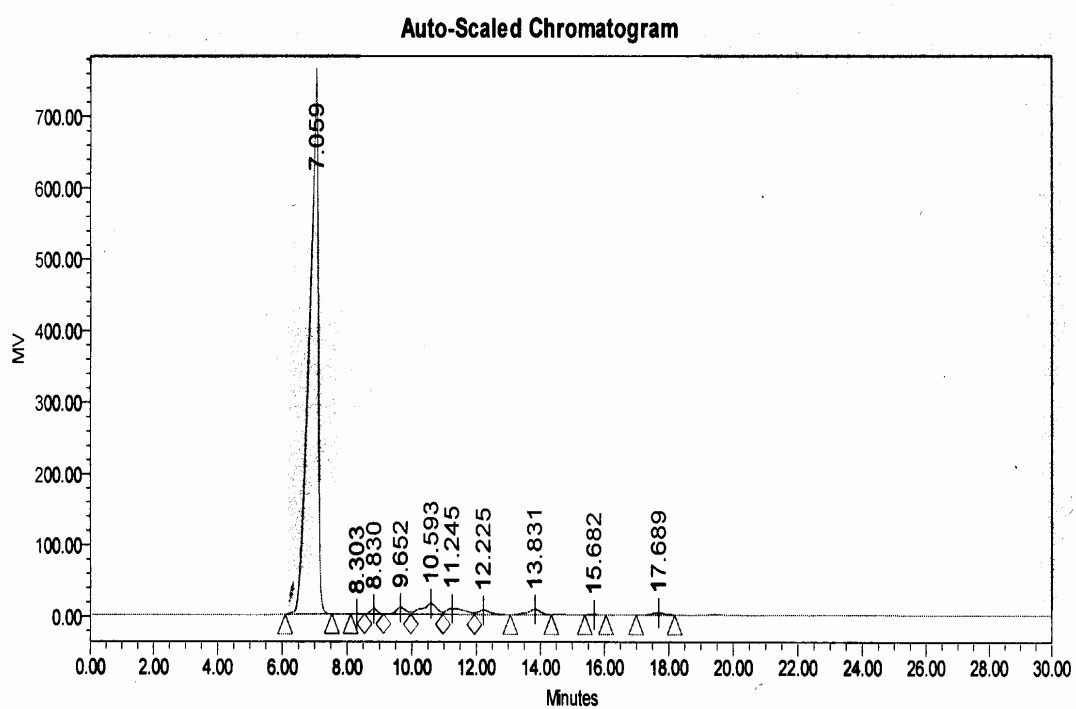
ภาพประกอบ 70 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 6 ที่ระยะเวลาหมัก 75 วัน



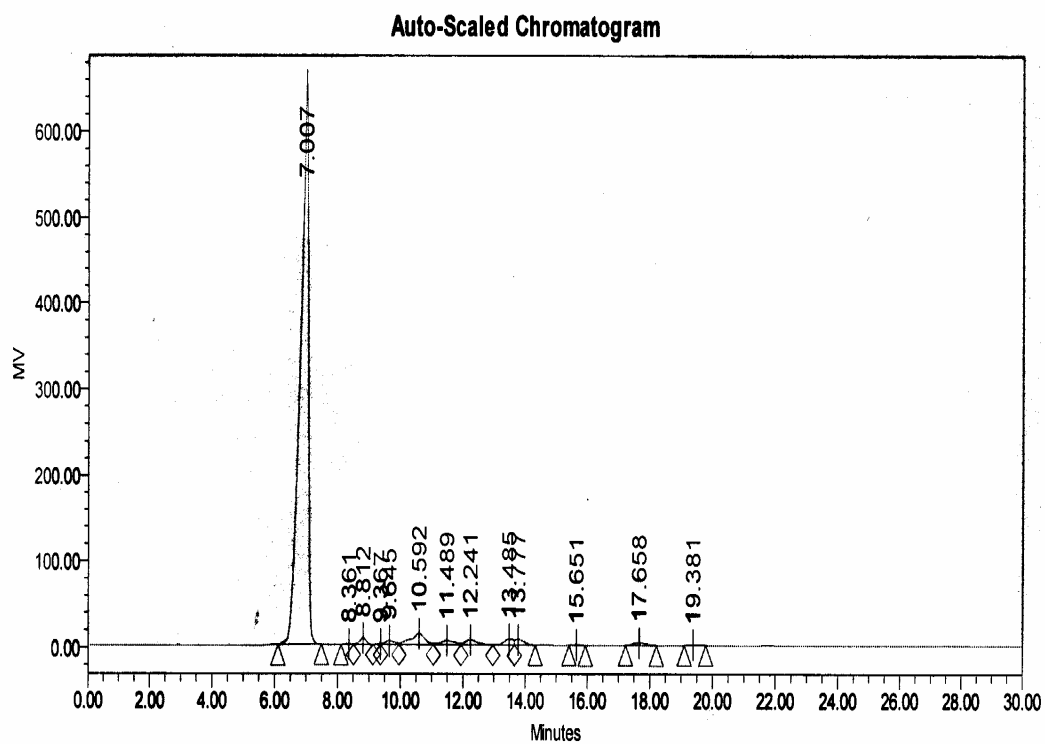
ภาพประกอบ 71 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 1 ที่ระยะเวลาหมัก 90 วัน



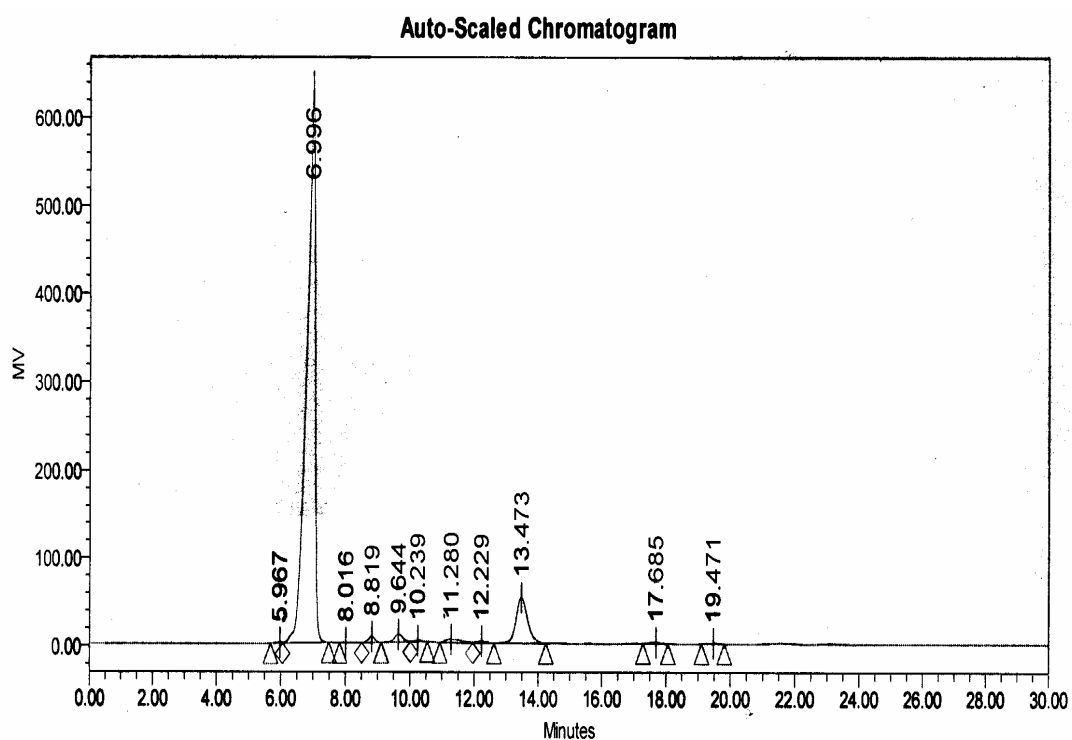
ภาพประกอบ 72 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง 2 ที่ระยะเวลาหมัก 90 วัน



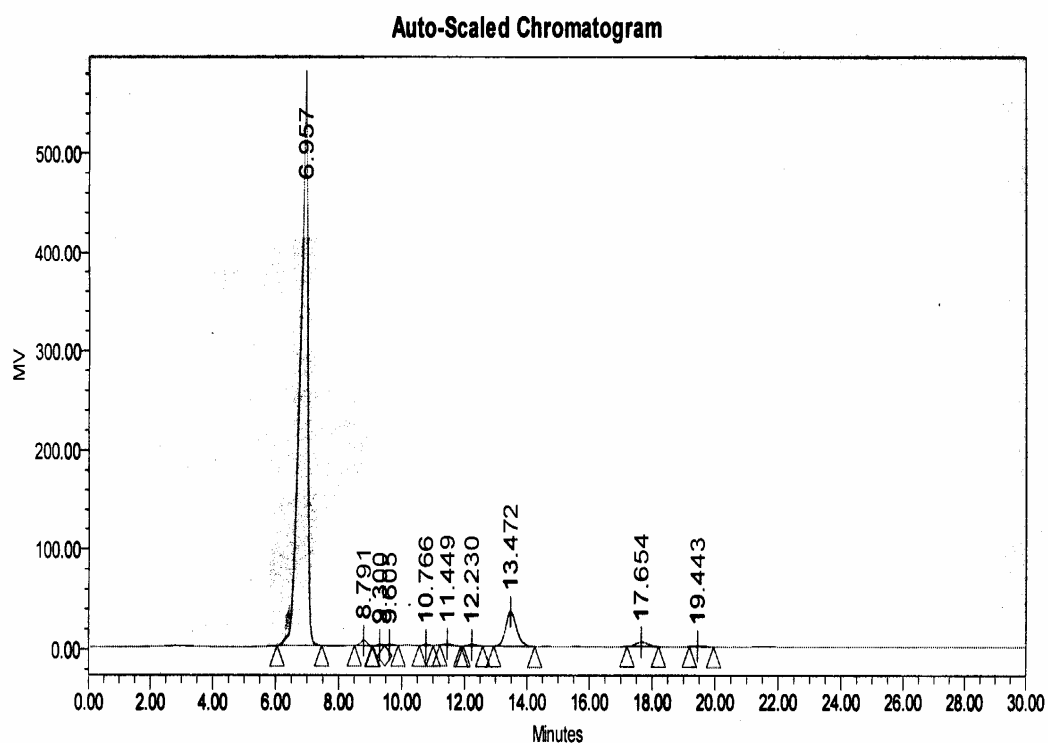
ภาพประกอบ 73 โครมาโทแกรมของข้อมูลชุด 3 ที่ระยะเวลาหมัก 90 วัน



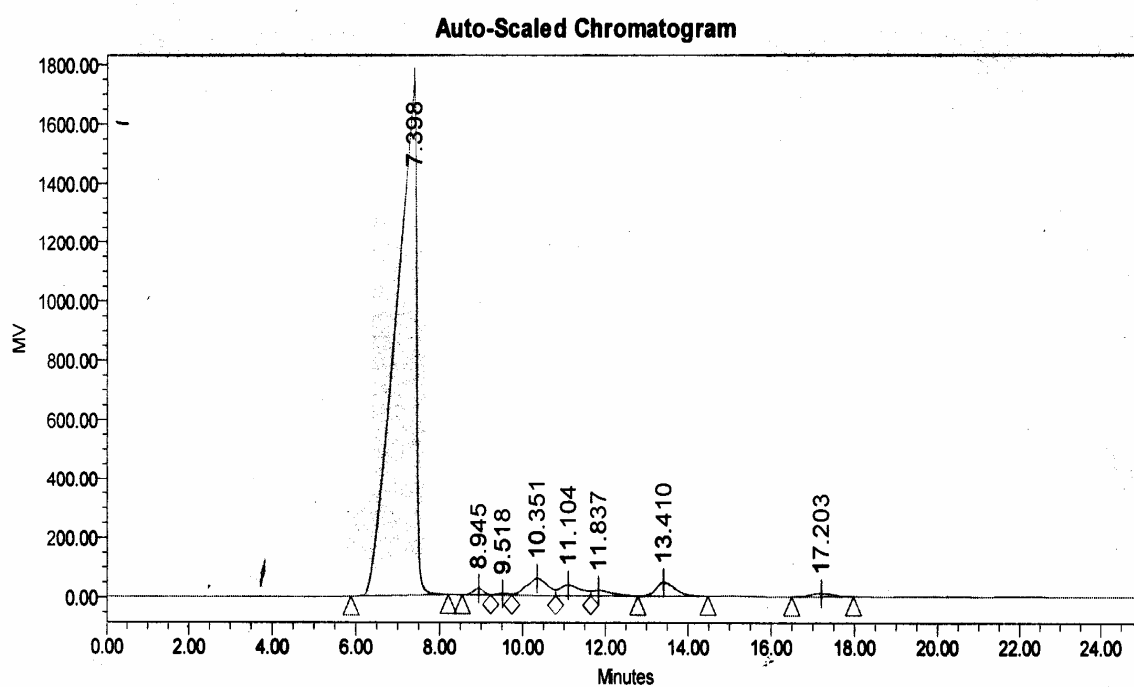
ภาพประกอบ 74 โครมาโทแกรมของข้อมูลชุด 4 ที่ระยะเวลาหมัก 90 วัน



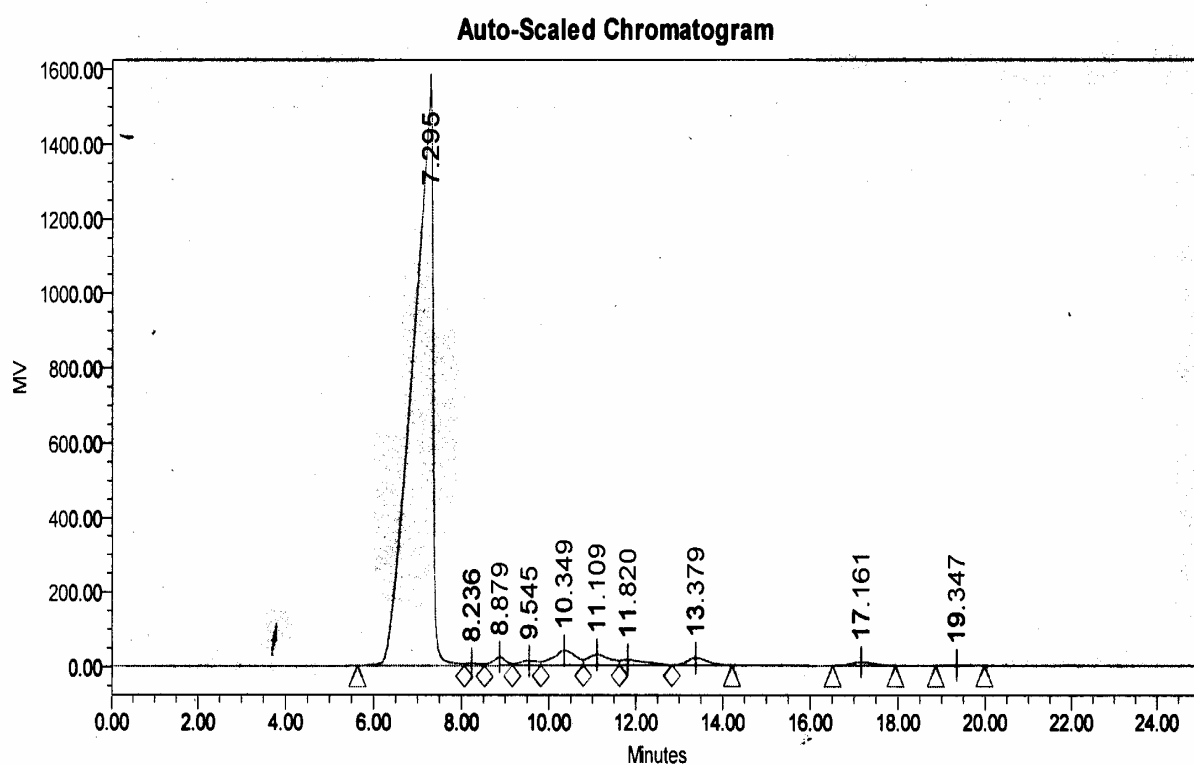
ภาพประกอบ 75 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 5 ที่ระยะเวลาหมัก 90 วัน



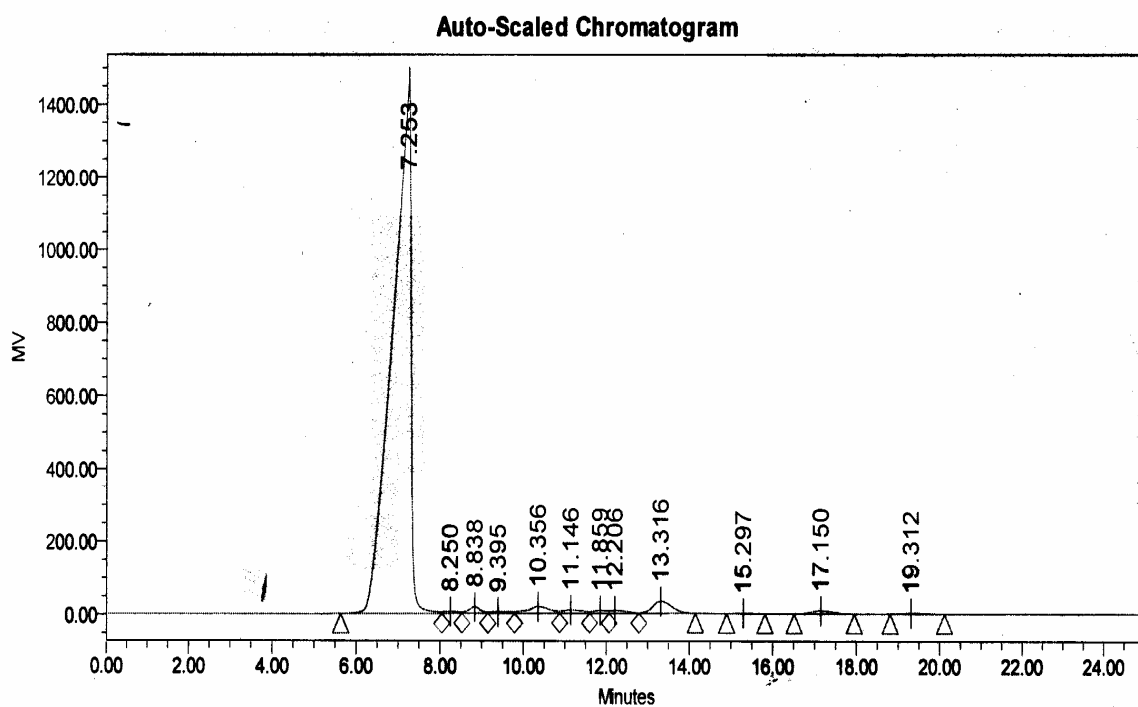
ภาพประกอบ 76 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตร 6 ที่ระยะเวลาหมัก 90 วัน



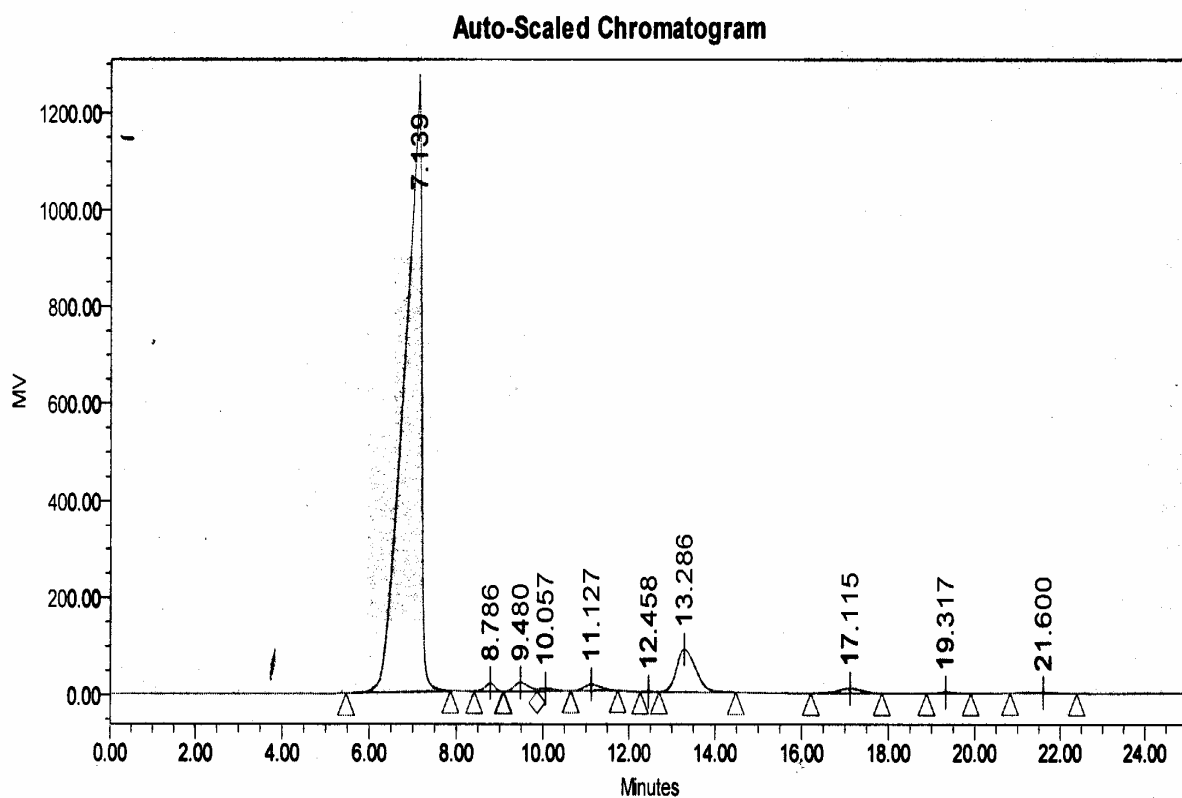
ภาพประกอบ 77 โครมาโทแกรมของน้ำชีอิ้วขาวสูตร 1



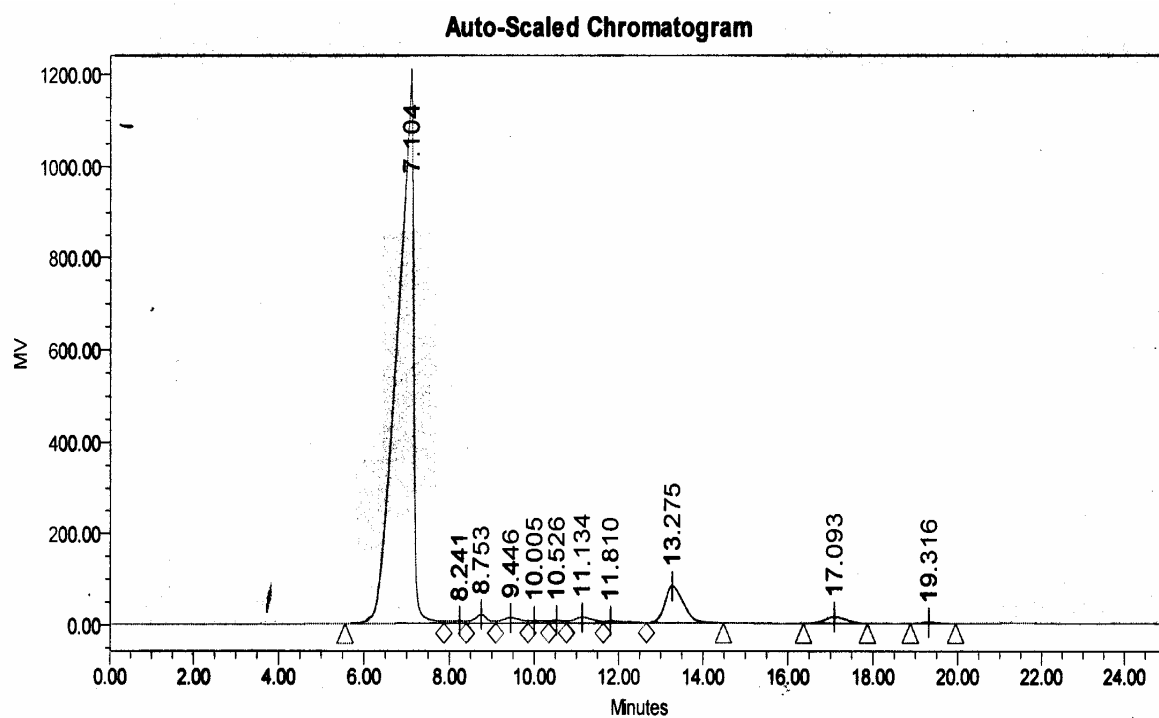
ภาพประกอบ 78 โครมาโทแกรมของน้ำชีอิ้วขาวสูตร 2



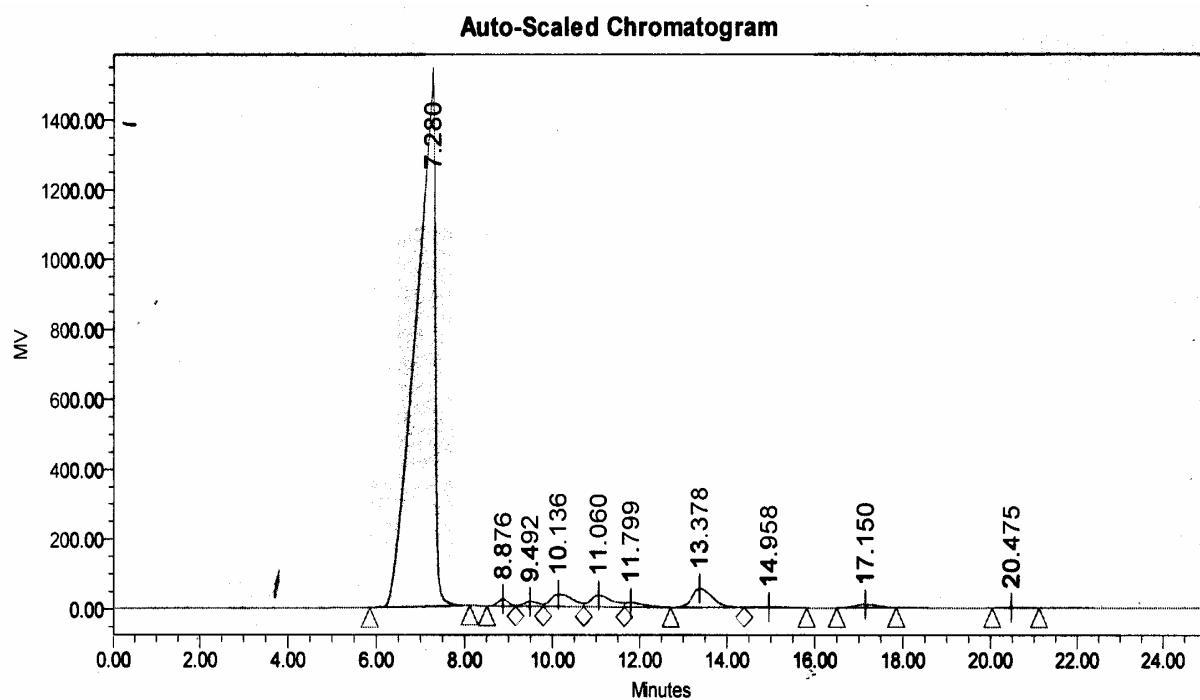
ภาพประกอบ 79 โคโรนาโทแกรมของน้ำชีวัวสูตร 3



ภาพประกอบ 80 โคโรนาโทแกรมของน้ำชีวัวสูตร 4



ภาพประกอบ 81 โคโรมาโทแกรมของน้ำชีอิ้วขาวสูตร 5



ภาพประกอบ 82 โคโรมาโทแกรมของน้ำชีอิ้วขาวสูตร 6

ภาคผนวก ค
แสดงการคำนวณจากการวิเคราะห์

ภาคผนวก ค
แสดงการคำนวณจากการวิเคราะห์

การคำนวณหาปริมาณคลอไรด์ในโมโรมิและน้ำชีอิ้ว

คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐาน KSCN

เตรียมสารละลายมาตรฐานดังนี้

1. ชั่ง AgNO_3 มา 16.9208 กรัม แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร
2. ชั่ง KSCN มา 9.7340 กรัม แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร

ปิเปตสารละลาย AgNO_3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย HNO_3 ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอร์ริกอะลัมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำไปไทเทรตกับสารละลาย KSCN ใช้ปริมาตรไป 10.4 มิลลิลิตร แล้วทำการทดลองซ้ำอีก 1 ครั้ง ใช้ปริมาตรสารละลาย KSCN ที่ไทเทรตเท่ากับ 10.1 มิลลิลิตร คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐาน KSCN

ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง



$$\text{จำนวนกรัมสมมูลของ } \text{AgNO}_3 = \frac{16.9208}{169} = 0.1001 \text{ กรัมสมมูล}$$

$$\text{ความเข้มข้นของ } \text{AgNO}_3 ; c = \frac{m}{v} = \frac{0.1001}{1} = 0.1001 \text{ N}$$

$$\text{จำนวนโมลของ KSCN} = \text{จำนวนโมลของ } \text{AgNO}_3$$

$$C_{\text{KSCN}} = C_{\text{AgNO}_3}$$

$$C_{\text{KSCN}} \times 10.4 \text{ mL} = 0.1001 \times 10.0 \text{ mL}$$

$$C_{\text{KSCN}} = \frac{0.1001 \times 10.0 \text{ mL}}{10.4 \text{ mL}}$$

$$C_{\text{KSCN}} = 0.0963 \text{ N}$$

ความเข้มข้นของสารละลาย KSCN จากการไทเทรตครั้งที่ 1 ได้เท่ากับ 0.0963 N

ความเข้มข้นของสารละลาย KSCN จากการไทเทรตครั้งที่ 2 คำนวณได้ในทำนองเดียวกันได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.0991 N

∴ ความเข้มข้นเฉลี่ยของสารละลาย KSCN เท่ากับ 0.0977 N

คำนวณหาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างมี 3.1016 กรัม แล้วเจือจางสารละลายตัวอย่างในปริมาตร 50 มิลลิลิตร
 ปิเปตสารละลายที่เจือจางมาปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสารละลายเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 4 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย AgNO_3 ความเข้มข้น 0.1001 N ในปริมาณที่มากเกินไปปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปเติมสารละลาย HNO_3 ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์ริกอะลัมปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน KSCN ความเข้มข้น 0.0977 N ใช้ปริมาตรไป 18.2 มิลลิลิตร

ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง



จำนวนโมลของ AgNO_3 เริ่มต้น

$$\text{mol AgNO}_3 = \frac{cv}{100} = \frac{0.1001 \times 20}{1000} = 0.002 \text{ mol}$$

จำนวนโมลของ KSCN ที่ทำปฏิกิริยา

$$\text{mol KSCN} = \frac{0.0977 \times 18.2}{1000} = 1.78 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

จากปฏิกิริยาที่ 2 ได้จำนวนโมลของ AgNO_3 เหลือจากการทำปฏิกิริยา

$$\text{mol AgNO}_3 = \frac{0.0977 \times 18.2}{1000} = 1.78 \times 10^{-3} \text{ mol}$$

ดังนั้นจำนวนโมลของ AgNO_3 ที่ทำปฏิกิริยากับ KSCN เท่ากับ $0.002 - 1.78 \times 10^{-3}$
 $= 2.20 \times 10^{-4} \text{ mol}$

จากปฏิกิริยาที่ 1 Ag^+ 1 โมล ทำปฏิกิริยาพอดีกับ Cl^- 1 โมล

ดังนั้น $\text{Ag}^+ 2.20 \times 10^{-4} \text{ mol} = \text{Cl}^- 2.20 \times 10^{-4} \text{ mol}$

$\therefore$ ในสารละลายตัวอย่างปริมาตร 4 มิลลิลิตรมี Cl^- เท่ากับ $2.20 \times 10^{-4} \text{ mol}$

สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 10 มิลลิลิตร มี $\text{Cl}^- = \frac{(2.20 \times 10^{-4}) \times 10}{4} = 5.50 \times 10^{-4} \text{ mol}$

ดังนั้นในสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรมี Cl^- เท่ากับ $5.50 \times 10^{-4} \text{ mol}$

สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 50 มิลลิลิตร มี $\text{Cl}^- = \frac{(5.50 \times 10^{-4}) \times 50}{5} = 5.50 \times 10^{-3} \text{ mol}$

ในสารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 50 มิลลิลิตร มี $\text{Cl}^- = 5.50 \times 10^{-3} \text{ mol} = 0.1953 \text{ กรัม}$

ซึ่ง Cl^- 35.5 กรัมได้มาจาก NaCl 58.5 กรัม

$$\text{Cl}^- 0.1953 \text{ กรัมได้มาจาก NaCl} = \frac{58.5 \times 0.1953}{35.5} = 0.3218 \text{ กรัม}$$

ดังนั้นในตัวอย่าง 3.1016 กรัม มี NaCl = 0.3218 กรัม

$$\text{ดังนั้นในตัวอย่าง 100 กรัม มี NaCl} = \frac{0.3218 \times 100}{3.1016} = 10.38 \%$$

∴ ในตัวอย่างโมโรมีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10.38 ต่อกรัมเปียกตัวอย่าง

สำหรับตัวอย่างน้ำชีอิ้ว ปิเปตน้ำชีอิ้วตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายตัวอย่างเป็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายที่เจือจางมาปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสารละลายเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 4 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย AgNO_3 ความเข้มข้น 0.1001 N ในปริมาณที่มากเกินพอปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปเติมสารละลาย HNO_3 ความเข้มข้น 3 M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์ริกอะดัม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน KSCN ความเข้มข้น 0.0977 N ใช้ปริมาตรไป 11.4 มิลลิลิตร แล้วคำนวณหาปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นร้อยละต่อมิลลิลิตรตัวอย่าง ซึ่งคำนวณในทำนองเดียวกันกับตัวอย่างในโมโรมีข้างต้น

การคำนวณหาปริมาณปริมาณเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่าง

กำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์โปรติเอส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้ไทโรซีน 1 $\mu\text{g/mL}$ ในเวลา 1 นาที ในสภาวะของการวิเคราะห์

$$\text{หน่วยของเอนไซม์โปรติเอสต่อมิลลิลิตร} = \frac{(C - C_0) \times b \times c}{a \times t} \dots\dots\dots(9)$$

C = ความเข้มข้นของไทโรซีนที่วัดได้เมื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีน (สับสเตรท) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 40°C pH 6.5

C_0 = ความเข้มข้นของไทโรซีนที่วัดได้เมื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ก่อนแล้วจึงเติมสารละลายเคซีน

a = ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (mL) ที่ใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาการทำงาน ซึ่งในที่นี้ใช้ครั้งละ 1 mL

b = ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด (mL) นำไปทำปฏิกิริยาให้เกิดสี

คือปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง สารละลายเคซีน และ
 สารละลายที่ใช้ตกตะกอนโปรตีน (TCA) รวมกันในที่นี้ใช้ปริมาตร
 รวมเท่ากับ 4 mL

c = จำนวนเท่าของการเจือจางสารละลายตัวอย่างที่เริ่มต้น

t = เวลาที่เอนไซม์ทำการย่อยเคซีน ในที่นี้ใช้ 10 นาที

ภาคผนวก ง
การเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์

ภาคผนวก ง

การเตรียมสารละลายในการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือในตัวอย่าง

1.1 การเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 0.1 N

ซึ่ง AgNO_3 ประมาณ 16.9 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1 ลิตร

1.2 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไทโอไซยาเนตความเข้มข้น 0.1 N

ซึ่ง KSCN ประมาณ 9.7 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1 ลิตร

1.3 การเตรียมสารละลายกรดไนตริกความเข้มข้น 3 M

ปิเปตสารละลายกรด HNO_3 เข้มข้น ปริมาตร 187.44 cm^3 แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1 ลิตร

1.4 การเตรียมอินดิเคเตอร์เฟอร์ริคอะลัม

ซึ่ง $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ประมาณ 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 cm^3 แล้วหยดกรด HNO_3 ความเข้มข้น 3 M จำนวน 3-5 หยด ลงในสารละลายที่ได้

2. การวิเคราะห์หาปริมาณแอนไอออนโปรติเอสในตัวอย่าง

2.1 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.2 N

ปิเปตสารละลายกรด HCl เข้มข้น ปริมาตร 16.7 cm^3 แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1 ลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.4 M

ซึ่ง Na_2CO_3 ประมาณ 42.4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1 ลิตร

2.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M

ซึ่ง NaOH ประมาณ 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1 ลิตร

2.4 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ความเข้มข้น 0.05 M

2.4.1 เตรียมสารละลาย A จากสารละลายกรดแอสติกความเข้มข้น 0.2 M โดย

ปิเปตสารละลายกรด CH_3COOH เข้มข้น ปริมาตร 1.08 cm^3 แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 100 cm^3

2.4.2 เตรียมสารละลาย B จากสารละลายโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 0.2 M โดย

ซึ่ง $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ประมาณ 13.6 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 500 cm^3

2.4.3 นำสารละลาย B ปริมาตร 234.7 cm^3 ปรับ pH สารละลายให้ได้ 6.5 โดยค่อยๆ หยดสารละลาย A ลงในสารละลาย B

2.4.4 นำสารละลายที่ได้ในข้อ 1.4.3 มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 cm^3

2.4.5 สารละลายที่ได้ในข้อ 1.4.4 คือสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ความเข้มข้น 0.2 M แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ความเข้มข้น 0.05 M ก่อนนำไปใช้

2.5 การเตรียมสารละลายไตรคลอโรซีตริกความเข้มข้น 0.4 M

ซึ่ง $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ ประมาณ 65.4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1 ลิตร

2.6 การเตรียมสารละลายเคซีนความเข้มข้น 1.5%W/V

ซึ่งเคซีน 1.5 กรัม ละลายในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 20 cm^3 ต้มและคนจนละลาย แล้วปรับ pH สารละลายให้ได้ 6.5 โดยค่อยๆ เติมสารละลายกรด HCl ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 10 cm^3 จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 100 cm^3 ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ความเข้มข้น 0.05 M

2.7 การเตรียมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent

นำสารละลาย Folin-ciocalteu reagent มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ก่อนนำไปใช้

3. การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่าง

3.1 การเตรียมสารละลายน้ำแป้งความเข้มข้น 1%W/V

ละลายแป้งมัน 0.5 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 35 cm^3 นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดโดยคนตลอดเวลา วัดอุณหภูมิของสารละลายเมื่ออุณหภูมิสูง 80°C ให้นำออกจากอ่างน้ำเดือดแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 cm^3 คนให้เข้ากัน วางให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องเตรียมแล้วใช้ทันที

3.2 การเตรียมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid

ละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid 1.0 กรัม ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 M ปริมาตร 200 cm^3 จากนั้นละลาย sodium potassium tartrate 300 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 cm^3 แล้วค่อยๆ เติมสารละลายนี้ลงในสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid โดยคนอยู่เรื่อยๆ ปรับปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนออกก่อนใช้

ประวัติย่อผู้ทำสารนิพนธ์

ประวัติย่อผู้ทำสารนิพนธ์

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวเพ็ญประภา สุวรรณะ
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 3 เดือนสิงหาคม ปีพุทธศักราช 2520
สถานที่เกิด	อำเภอสิงหนคร จังหวัดสงขลา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 33/1 ซอยพหลโยธิน 44 แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์ประจำ มหาวิทยาลัยศรีปทุม
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	เลขที่ 61 มหาวิทยาลัยศรีปทุม แขวงเสนานิคม เขต จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2535	มัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนสงขลาวิทยาคม จังหวัดสงขลา
พ.ศ. 2538	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสงขลาวิทยาคม จังหวัดสงขลา
พ.ศ. 2543	ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2552	ปริญญาโทการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ