การศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

สารนิพนธ์

ของ

ภคธีรา อุปจักร์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรศึกษา

พฤษภาคม 2550

การศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

สารนิพนธ์

ของ

ภคธีรา อุปจักร์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรศึกษา

พฤษภาคม 2550

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง

บทคัดย่อ

ของ

ภคธีรา อุปจักร์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรศึกษา
พฤษภาคม 2550

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ภคธีรา อุปจักร์.(2550) *การศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง*. สารนิพนธ์ กศ.ม. (วิทยาศาสตร์ศึกษา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย

ถั่วมะแฮะเป็นถั่วชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าอาหารครบถ้วน จึงถูกนำไปเป็นอาหารโดยตรง แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานเกี่ยวกับการการแปรรูปถั่วมะแฮะเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ น้อยมาก การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ถั่วมะแฮะให้เป็นซีอิ๊ว โดยทำการหมักระหว่างถั่วมะแฮะกับถั่วเหลืองในอัตราส่วนต่างๆ เป็น 5 สูตร สูตรที่ 1 (100:0) สูตรที่ 2 (80:20) สูตรที่ 3 (60:40) สูตรที่4 (40:60) และสูตรที่ 5 (20:80) โดยทำการเปรียบเทียบกับการหมักด้วยถั่วเหลืองล้วนเป็นสูตรควบคุม (สูตรที่ 6) ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา การเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมักเป็นเวลานาน 3 เดือน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์ อะไมเลส โปรทีเอส ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณกรดอะมิโน ปริมาณจุลินทรีย์ และค่า pH เมื่อครบตามกำหนดจึงผลิตเป็นซีอิ๊วและนำไปตรวจสอบคุณภาพอีกครั้ง โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน น้ำตาล เกลือ โลหะทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ตามมาตรฐานอุตสาหกรรม จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณของเอนไซม์อะไมเลสอยู่ในช่วง 361.86-930.49 ยูนิตต่อกรัม กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นตามอัตราส่วนของถั่วเหลืองที่เพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณของเอนไซม์นี้อยู่ในช่วง 108.08-683.93 ยูนิตต่อกรัม กิจกรรมของเอ็นไซม์โปรทีเอสต่ำในช่วงแรกของการหมักและเพิ่มขึ้นตามเวลา จากการวัดปริมาณกรดอินทรีย์พบปริมาณกรดแลกติกอยู่ในช่วง 0.01-5.94 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณกรดอะซิติกอยู่ในช่วง 0.62-2.33 กรัมต่อกิโลกรัม แต่ไม่พบกรดซิตริก ปริมาณกรดอะมิโนที่ตรวจพบมีทั้งหมด 16 ชนิด และพบ กลูตาเมตมากที่สุด 1200 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจพบว่าปริมาณ แบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสอง และค่า pH ที่ตรวจวัดได้ในช่วงแรกอยู่ในระดับสูงและลดลงเมื่อเวลาการหมักผ่านไป 20 วัน สำหรับผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน น้ำตาล เกลือ ในซีอิ๊วที่ทดลองทุกสูตรพบว่า ปริมาณโปรตีนร้อยละ 5.45 - 6.98 ปริมาณน้ำตาลร้อยละ 0.09 - 0.19 ปริมาณเกลือในซีอิ๊วแต่ละส่วนผสมอยู่ในช่วงร้อยละ 11.9 - 13.7 ตรวจปริมาณโลหะทั้งสามชนิดพบเพียงชนิดเดียว คือ ตะกั่ว ซึ่งมีไม่เกิน 1 ส่วนในล้านส่วน พิจารณาผลการวิเคราะห์พบว่าการหมักในสูตรที่ 3 ซึ่งมีถั่วมะแฮะร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก มีความเหมาะสมเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วต่อไป งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าถั่วมะแฮะสามารถใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนถั่วเหลืองในการผลิตซีอิ๊วได้บางส่วน

STUDY OF PROCESSING SOY SAUCE FROM PIGEON PEA AND SOY BEAN

AN ABSTRACT

BY

PHAKHATHIRA OUPAJAK

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Master of Science degree in Science Education

At Srinakharinwirot University

May 2550

Phakhathira Oupajak. (2007). *Study of Processing Soy Sauce from Pigeon Pea and Soy Bean.* Master's Project, M.Ed. (Science Education). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Project Advisor: Associate Professor Dr. Pornpimol Muangthai

Pigeon pea is one type of bean which full of nutritional value and it was used directly as food. However there was a few report about processed product from pigeon pea, thus the aim of research is to developed the soy sauce product from pigeon pea by fermentation process. The different ratios between pigeon pea and soy bean were studied for 5 formula as formula 1(100:0) formula 2 (80:20) formula 3 (60:40) formula 4 (40:60) formula 5 (20:80) and compared with controlled formula which made of pure soy bean (formula 6). In this work, the biochemical change of fermentation process for 3 months were examined from koji to moromi process by monitoring the amylase enzyme activities, protease enzyme activities, organic acid content, amino acid content, microorganism and pH. All those fermentation medias were produced to soy sauce and quality testing by analysis protein, sugar, salt, lead ,cadmium and copper content as referred in the standard AOAC method. The result showed that amylase contents were in the range of 361.81-930.49 unit/g and its activities increased as increased soy bean content. Protease content were in the range of 108.08-683.93 unit/g and its activities depended on the time of fermentation, lactic acid contents were in the range of 0.01-5.94 g/kg, acetic acid contents were in the range of 0.62-2.33 g/kg and citric acid was not founded in this work. Furthermore 16 amino acids were measured and glutamate was the highest (1200 mg/100 g). The microbial content in each formula correlated with both enzyme activities. The pH value was high at the initial of fermentation and decreased after 20 days of fermentation. The results were shown that the salt contents were in the range of 11.9 – 13.7% , the protein contents were in the range of 5.45–6.98% , total sugar contents were in the range of 0.09-0.19 % and only lead was detected in soy sauce not exceed than 1 ppm. Those formulated soy sauces not differ from the controlled sauce. The soy sauce that contains pigeon peas 60 % showed the best properties to further produce commercial soy sauce. This research presents that pigeon peas can be the replacer of soy bean as raw material in production of soy sauce.

อาจารย์ที่ปรึกษาสารนิพนธ์ ประธานคณะกรรมการบริหารหลักสูตร และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาสารนิพนธ์เรื่อง การศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง ของ ภคธีรา อุปจักร์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรศึกษา ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

อาจารย์ที่ปรึกษาสารนิพนธ์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

ประธานคณะกรรมการบริหารหลักสูตร

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องลดา วีระสัย)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สมปรารถนา วงศ์บุญหนัก)

..... กรรมการ

(ดร.ไว ประทุมผาย)

อนุมัติให้รับสารนิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรศึกษา ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร มากตุ่น)

วันที่ เดือน พ.ศ. 2550

ประกาศคุณูปการ

สารนิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับพระมหากรุณาธิคุณจากสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระมหากรุณาธิคุณในพระองค์ที่ทรงมีพระมหากรุณาดำริโครงการส่งเสริมคุณภาพการศึกษาในโรงเรียนถิ่นทุรกันดาร พื้นที่อำเภอบ่อเกลือ และอำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดน่าน อันเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาครูถิ่นทุรกันดารให้ได้รับการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรศึกษา ซึ่งนับเป็นเกียรติอันสูงสุดที่ข้าพเจ้าได้รับโอกาสอันดียิ่งนี้ และจะได้นำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาเด็กนักเรียนต่อไป

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย ประธานควบคุมสารนิพนธ์ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนการแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องต่างๆ อันเกิดขึ้นในงานวิจัยและการเขียนสารนิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษาผ่านโครงการส่งเสริมคุณภาพการศึกษาโรงเรียนถิ่นทุรกันดาร ในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ไว ประทุมผาย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำในการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติและขอขอบคุณคุณลาวัลย์ ชตานนท์ จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้อนุเคราะห์มอบเชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus oryzae* บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยกระบวนการหมักในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรพิมล ม่วงไทย อาจารย์ ดร.สมปรารถนา วงศ์บุญหนัก และ ดร. ไว ประทุมผาย ในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าสารนิพนธ์ ตลอดจนการให้คำแนะนำต่างๆ เพื่อให้สารนิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบคณาจารย์ในคณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้ความเมตตาเอาใจใส่แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณ คุณวนิจ อุปจักร์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยและขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้องๆ และนิสิตปริญญาโททุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษาและการทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณทุกๆ ท่านไว้ ณ โอกาสนี้

และขอ ขอบพระคุณบิดา มารดาที่ได้อบรมเลี้ยงดู ให้โอกาสทางการศึกษาที่ดี ให้กำลังใจและการสนับสนุนด้านการวิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มิได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ภคธีรา อุปจักร์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	2
	ขอบเขตของงานวิจัย	2
	นิยามศัพท์เฉพาะ	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
	ข้อมูลพื้นฐานวัตถุดิบ	5
	ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	12
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
3	วิธีดำเนินการวิจัย	23
	ตอนที่ 1 การดำเนินการทดลองศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงและวิเคราะห์คุณภาพ	23
	ตอนที่ 2 การเผยแพร่ข้อมูล	33
4	ผลการวิวัย	35
	ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก	35
	ผลการวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรม	46
5	สรุปผล อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	50
	สรุปผลการวิจัย	50
	การอภิปรายผล	51
	ข้อเสนอแนะ	55
บรรณานุกรม		57

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

ภาคผนวก..... 60

ภาคผนวก ก..... 61

ภาคผนวก ข..... 70

ภาคผนวก ค..... 74

ภาคผนวก ง..... 105

ประวัติย่อผู้วิจัย..... 136

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตารางเปรียบเทียบสารอาหารที่จำเป็นระหว่างถั่วมะแฮะกับถั่วเหลือง	10
2	คุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส.....	12
3	มาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วของกระทรวงอุตสาหกรรม.....	16
4	สภาวะสำหรับการแยกกรดอะมิโน.....	31
5	ปริมาณเอนไซม์อะไมเลส การหมักแต่ละสูตร……...	61
6	ปริมาณเอนไซม์โปรทีเอส ในการหมักแต่ละสูตร……..……...	61
7	ปริมาณกรดแลกติกในกระบวนการหมักซีอิ๊ว……	62
8	ปริมาณกรดอะซิติกในกระบวนการหมักซีอิ๊ว……	62
9	ค่า pH ของซีอิ๊วแต่ละสูตรตลอดระยะเวลาการหมัก.....	63
10	ปริมาณจุลินทรีย์ แบคทีเรีย ราและยีสต์ ในแต่สูตร.....	64
11	ปริมาณกรดอะมิโนในช่วงการหมักเวลา 0 วัน.....	65
12	ปริมาณกรดอะมิโนในช่วงการหมักเวลา 60 วัน.....	66
13	ปริมาณกรดอะมิโนในช่วงการหมักเวลา 90 วัน.....	67
14	ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาล และปริมาณเกลือในน้ำซีอิ๊ว.....	68
15	ปริมาณโลหะหนักจากซีอิ๊วในแต่ละสูตร.....	68

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	ภาพถั่วมะแฮะ	5
2	กระบวนการหมักซีอิ๊ว	27
3	ปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในการหมักแต่ละสูตร	36
4	ปริมาณเอนไซม์โปรทีเอสในการหมักแต่ละสูตร	37
5	ปริมาณกรดแลกติกในกระบวนการหมักซี้วแต่ละสูตร	39
6	ปริมาณกรดอะซิติกในกระบวนการหมักซี้วแต่ละสูตร	40
7	ปริมาณแบคทีเรียในกระบวนการหมักซีอิ๊วแต่ละสูตร	41
8	ปริมาณราและยีสต์ในกระบวนการหมักซีอิ๊วแต่ละสูตร	42
9	ค่า pH ในซีอิ๊วแต่ละสูตร ตลอดระยะเวลาหมัก	43
10	ปริมาณกรดอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมักเวลา 0 วัน	44
11	ปริมาณกรดอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมักเวลา 60 วัน	45
12	ปริมาณกรดอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมักเวลา 90 วัน	45
13	ปริมาณโปรตีนของซีอิ๊วในแต่ละสูตร	46
14	ปริมาณน้ำตาลของซีอิ๊วในแต่ละสูตร	47
15	ปริมาณเกลือของซีอิ๊วในแต่ละสูตร	48
16	ปริมาณโลหะหนักที่ตรวจพบในซีอิ๊วทั้ง 6 สูตร	49
17	กราฟมาตรฐานกรดซิตริก	74
18	กราฟมาตรฐานกรดแลกติก	74
19	กราฟมาตรฐานกรดอะซิติก	75
20	กราฟมาตรฐานเอนไซม์อะไมเลส	75
21	กราฟมาตรฐานเอนไซม์โปรทีเอส	76
22	โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์กรดอะมิโนมาตรฐาน (Standard amino acid)	76
23	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานตัวอย่างที่ 1	77
24	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานตัวอย่างที่ 2	77
25	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานตัวอย่างที่ 3	78
26	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานตัวอย่างที่ 4	78
27	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานตัวอย่างที่ 5	79
28	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานตัวอย่างที่ 6	79

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

29 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 0 วัน..... 80
30 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 10 วัน..... 80
31 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 20 วัน..... 81
32 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 30 วัน..... 81
33 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 45 วัน..... 82
34 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 60 วัน..... 82
35 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 75 วัน..... 83
36 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 90 วัน..... 83
37 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 0 วัน..... 84
38 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 10 วัน..... 84
39 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 20 วัน..... 85
40 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 30 วัน..... 85
41 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 45 วัน..... 86
42 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 60 วัน..... 86
43 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 75 วัน..... 87
44 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 90 วัน..... 87
45 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 0 วัน..... 88
46 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 10 วัน..... 88
47 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 20 วัน..... 89
48 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 30 วัน..... 89
49 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 45 วัน..... 90
50 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 60 วัน..... 90
51 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 75 วัน..... 91
52 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 90 วัน..... 91
53 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 0 วัน..... 92
54 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 10 วัน..... 92
55 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 20 วัน..... 93
56 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 30 วัน..... 93
57 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 45 วัน..... 94
58 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 60 วัน..... 94

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

59 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 75 วัน..... 95
60 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 90 วัน..... 95
61 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 0 วัน..... 96
62 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 10 วัน..... 96
63 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 20 วัน..... 97
64 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 30 วัน..... 97
65 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 45 วัน..... 98
66 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 60 วัน..... 98
67 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 75 วัน..... 99
68 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 90 วัน..... 99
69 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 6 ระยะเวลาหมัก 0 วัน..... 100
70 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 6 ระยะเวลาหมัก 10 วัน..... 100
71 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 6 ระยะเวลาหมัก 20 วัน..... 101
72 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 6 ระยะเวลาหมัก 30 วัน..... 101
73 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 6 ระยะเวลาหมัก 45 วัน..... 102
74 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 6 ระยะเวลาหมัก 60 วัน..... 102
75 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 6 ระยะเวลาหมัก 75 วัน..... 103
76 โครมาโทแกรมของซีอี๊สูตรที่ 6 ระยะเวลาหมัก 90 วัน..... 103
77 ถั่วมะแฮะต้มสุก..... 105
78 เตรียมถั่วมะแฮะ 100 % กับแป้งข้าวสาลี..... 105
79 การหมักช่วงโคจิ..... 106
80 เชื่อจุลินทรีย์บนเมล็ดถั่ว..... 106
81 การกลับถั่วที่หมักช่วงโคจิ..... 107
82 ขั้นตอนนำถั่วหมักช่วงโคจิลงในไหหมักเพื่อหมักช่วงโมโรมิต่อ..... 107
83 การหมักช่วงโมโรมินาน 2 เดือน..... 108
84 ไหหมักซีอิ๊วช่วงโมโรมิ..... 108
85 โรงหมักซีอิ๊ว..... 109
86 หมักครบ 3 เดือน..... 109
87 โป๊สเตอร์แสดงการเผยแพร่ข้อมูลฯ..... 110
88 ผู้วิจัยถ่ายร่วมกับอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมเผยแพร่ข้อมูล..... 111

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ถั่วมะแฮะ (Pigeon Pea) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Cajanus cajan* Millsp. มีถิ่นกำเนิดที่อัฟริกา แล้วแพร่กระจายไปสู่ อเมริกา อินเดีย ออสเตรเลีย ฮาวาย อินเดีย ต้นถั่วมะแฮะมีลักษณะเป็นไม้พุ่ม มีความสูงประมาณ 1.2 - 3 เมตร ใบมีรูปทรงคล้ายหอก ปลายแคบ (กอง-พฤกษศาสตร์และวัชพืช. 2549: ออนไลน์) ยาวประมาณ 5 - 10 เซนติเมตร และมีขนบางๆ ทั้ง 2 ด้าน ดอกสีเหลืองด้านหลังกลีบดอกมีสีน้ำตาล เส้นผ่านศูนย์กลางดอกประมาณ 2 เซนติ เมตร ฝักมีความยาวประมาณ 5 - 7.6 เซนติเมตร ความกว้างประมาณ 1.3 เซนติเมตร ปลายโค้งมีขน เมล็ดมีเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 0.6 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลและมีรูเล็ก ถั่วมะแฮะสามารถขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด ปลูกง่ายและสามารถปลูกได้เกือบทุกพื้นที่ เนื่องจากเป็นพืชทนแล้งเติบโตเร็ว ในประเทศไทยเรานิยมปลูกถั่วมะแฮะเพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมโดยปลูกเป็นพืชคลุมดินเพื่อปรับ ปรุงสภาพดินและยังนำไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ เช่น อาหารลูกโคนม อาหารไก่ไข่ เป็นต้น ส่วนในประเทศอื่น เช่น ที่ประเทศอินเดียนิยมปลูกถั่วมะแฮะเพื่อเป็นแหล่งอาหารโปรตีนโดยการใช้เมล็ดแปรรูปเป็นอาหารโปรตีนสำหรับมนุษย์ (Sing Hu.1991)

ในพื้นที่อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน ได้มีการขยายพันธุ์ถั่วมะแฮะ โดยทำการปลูกตามพื้นที่ว่างของชาวบ้านที่อยู่ในเขตบริการของศูนย์การศึกษานอกโรงเรียน อำเภอบ่อเกลือ เพื่อนำผลผลิตส่วนหนึ่งไปจำหน่ายให้สำนักงานเกษตรอำเภอบ่อเกลือ เพื่อส่งต่อให้สำนักงานพัฒนาที่ดินจังหวัดน่าน สำหรับการขยายพันธุ์ และอีกส่วนหนึ่งเพื่อทดลองทำอาหารเสริมประเภทขนมหวานให้เด็กนักเรียนในศูนย์การศึกษานอกโรงเรียนพื้นที่อำเภอบ่อเกลือได้รับประทานเป็นอาหารเสริม (ปราโมทย์ หมู่พยัคฆ์. 2548) นอกจากนี้ยังมีโครงการขยายสู่โรงเรียนสังกัดสำนัก งานคณะกรรมการการศึกษาขั้นพื้นฐาน พื้นที่อำเภอบ่อเกลือและชุมชนที่สนใจ ดังนั้นผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษากระบวนการแปรรูปถั่วมะแฮะให้เป็นผลิตภัณฑ์อีกประเภทที่จะช่วยเสริมมูล ค่าให้แก่ถั่วมะแฮะ โดยจากการศึกษาและค้นคว้าข้อมูลของถั่วมะแฮะที่ได้มีการแปรรูปเป็นผลิต ภัณฑ์ชนิดต่างๆ นั้น พบว่ามีการแปรรูปของถั่วมะแฮะเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ น้อยมาก เพื่อเพิ่มปริมาณการบริโภคถั่วมะแฮะและเพื่อพัฒนาความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วมะแฮะ ถั่วมะแฮะจึงเป็นทางเลือกใหม่เพื่อใช้ทดแทนถั่วเหลืองเพื่อผลิตซีอิ๊ว ซึ่งโดยทั่วไปซีอิ๊วเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากการหมักถั่วเหลืองเป็นหลัก มีรายงานการผลิตซีอิ๊วจากวัตถุดิบชนิดอื่น เช่น ในประเทศฟิลิปปินส์ใช้ถั่วเหลืองผสมจาวมะพร้าว (Soriano ey al. 1967) หรือผสมกับเนื้อมะพร้าว (Baens-Arcega. 1966) กับถั่วmecan pea (Crisostomo et al. 1974) ในประเทศไทยมีรายงานว่ามีการแทนที่ถั่วเหลืองด้วยเมล็ดถั่วมีปีก (winged bean seeds) (Bovounsombat. 1981) เมื่อทำการศึกษาถึงองค์ประกอบโดยรวมของถั่วมะแฮะ พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าถั่วเหลือง และคุณสมบัติอื่นที่ใกล้เคียงถั่วเหลือง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำถั่วมะแฮะมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตซีอิ๊ว หรือเพื่อใช้ถั่ว

มะแฮะในอัตราส่วนที่เหมาะ สมในการหมักกับถั่วเหลือง เพื่อให้ได้ซีอิ๊วที่มีรสชาติดีและคุณสมบัติใกล้เคียงกับซีอิ๊วที่ผลิตจากถั่วเหลืองหรือที่มีขายตามท้องตลาด การวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางอีกทางหนึ่งที่จะช่วยพัฒนาการผลิตซีอิ๊วจากวัตถุดิบอื่นที่ไม่ใช่ถั่วเหลือง ดังนั้นจึงมีการศึกษาการแปรรูปถั่วมะแฮะให้เป็นซีอิ๊วในอัตราส่วนที่เหมาะสม รวมถึงมีการศึกษากลไกในกระบวนการหมักซีอิ๊ว โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีระหว่างกระบวนการหมัก เช่น กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์โปรทีเอส การเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ ปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดจากการผลิตของจุลินทรีย์ ปริมาณกรดอะมิโนต่าง ๆ เป็นต้น

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาแนวทางการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะ
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะกับถั่วเหลืองที่เป็นวัตถุดิบมาตรฐาน รวมถึงศึกษากระบวนการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะในอัตราส่วนที่เหมาะสมกับถั่วเหลืองเพื่อผลิตซีอิ๊วที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับซีอิ๊วที่มีขายในท้องตลาด
3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบหลักในซีอิ๊วที่ผลิตได้จากถั่วมะแฮะ
4. เพื่อเผยแพร่ความรู้สู่ชุมชนและโรงเรียนในโครงการพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พื้นที่อำเภอบ่อเกลือ และอำเภอเฉลิมพระเกียรติ

ความสำคัญของงานวิจัย

1. เป็นแนวทางในการพัฒนาถั่วมะแฮะในท้องถิ่นให้เป็นแหล่งอาหารโปรตีนสูง
2. เป็นแนวทางการพัฒนาความรู้และทักษะการพัฒนากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะ
3. เป็นแนวทางในการพัฒนาอาหารหมักชนิดอื่นจากถั่วมะแฮะ
4. เป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าถั่วมะแฮะทำให้ท้องถิ่นมีรายได้มากขึ้น
5. เป็นแนวทางการเผยแพร่ความรู้สู่ชุมชนและโรงเรียน

ขอบเขตของงานวิจัย

1. สำรวจข้อมูลพื้นฐาน
   1.1 สำรวจข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับถั่วมะแฮะในพื้นที่อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน จากศูนย์ภูฟ้าพัฒนา สำนักงานเกษตรอำเภอบ่อเกลือ ศูนย์การศึกษานอกโรงเรียนอำเภอบ่อเกลือ
   1.2 สำรวจข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับสารอาหารในถั่วมะแฮะ
   1.3 ศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการผลิตซีอิ๊ว
2. การวางแผนการทดลอง
   2.1 ศึกษาส่วนประกอบและการเตรียมวัตถุดิบ
   2.2 ศึกษากระบวนการหมักและสภาวะการหมักซีอิ๊ว

2.3 พัฒนาการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะ

2.4 วิธีวิเคราะห์สารอาหาร

2.5 ศึกษาเปรียบเทียบสภาวะการหมักซีอิ๊วและองค์ประกอบทางอาหารระหว่างซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะ ซีอิ๊วจากถั่วเหลือง และซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะผสมถั่วเหลือง

3. การทดลอง

3.1 หมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะ ถั่วเหลือง และจากถั่วมะแฮะผสมถั่วเหลืองในอัตราส่วนต่างๆ โดยน้ำหนัก ดังนี้

สูตรที่ 1 ถั่วมะแฮะ 100 %

สูตรที่ 2 ถั่วมะแฮะ : ถั่วเหลือง = 80 : 20

สูตรที่ 3 ถั่วมะแฮะ : ถั่วเหลือง = 60 : 40

สูตรที่ 4 ถั่วมะแฮะ : ถั่วเหลือง = 40 : 60

สูตรที่ 5 ถั่วมะแฮะ : ถั่วเหลือง = 20 : 80

สูตรที่ 6 ถั่วเหลือง 100 %

3.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก

ส่วนผสมในสูตรที่ 1- 6 จะถูกสุ่มตัวอย่างเป็นระยะเวลาต่างๆ กันตลอด 3 เดือน โดยเก็บตัวอย่างใส่ถุง แช่เย็นที่อุณหภูมิ – 4 $^{\circ}$C แล้วนำไปเตรียมวิเคราะห์ ดังนี้

1. ปริมาณเอนไซม์ อะไมเลส โปรทีเอส ในส่วนผสมแต่ละสูตร

2. ปริมาณกรดอินทรีย์

3. ปริมาณกรดอะมิโน

4. ปริมาณจุลินทรีย์

3.3 การผลิตซีอิ๊วจากส่วนผสมแต่ละสูตร

เมื่อครบกำหนดระยะเวลา 3 เดือน แต่ละส่วนผสมจะถูกนำมาแยกเอาน้ำซีอิ๊วออกมา และนำน้ำซีอิ๊วที่ได้ไป ทำการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที เก็บน้ำซีอิ๊วในขวดแก้ว และนำส่วนหนึ่งไปตรวจสอบคุณภาพต่อไป

3.4 วิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊ว

นำน้ำซีอิ๊วไปตรวจวิเคราะห์ คุณภาพทางเคมี ตามมาตรฐาน มอก. ของผลิตภัณฑ์ซีอิ๊ว ได้แก่

1. ปริมาณโปรตีนรวม

2. ปริมาณเกลือ

3. ปริมาณน้ำตาล

4. ปริมาณโลหะหนัก

4. ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ

1. ระยะเวลาที่ใช้เป็นเวลานาน 1 ปี 1 เดือน เริ่มตั้งแต่ วันที่ 1 มกราคม 2549 ถึง 30 มกราคม 2550

2. สถานที่ทำการทดลองหมักซีอิ๊ว บ้านเลขที่ 170 หมู่ 1 ต.บ่อเกลือใต้ อ.บ่อเกลือ จ. น่าน และ ห้องปฏิบัติการทดลองวิจัยสาขาเคมีวิเคราะห์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

3. สถานที่ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ คือ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1.ถั่วมะแฮะ หมายถึง ถั่วชนิดหนึ่งเป็นไม้พุ่ม เมล็ดมีเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 0.6 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลและมีรูเล็ก

2.กระบวนการผลิตซีอิ๊ว หมายถึง การนำถั่วเหลือง แป้งข้าวสาลี หมักในน้ำเกลือโดยอาศัยการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ ใช้เวลาการหมัก 90 วัน หลังจากนั้นกรองเอาน้ำซีอิ๊วที่หมักได้ไปผ่านการฆ่าเชื้อ

3.กระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะ หมายถึง การใช้ถั่วมะแฮะเป็นวัตถุดิบหลักหรือใช้ทดแทนถั่วเหลืองบางส่วนในการผลิตซีอิ๊ว โดยใช้ระยะเวลาการหมัก 90 วัน ซึ่งใช้วิธีการผลิตซีอิ๊วตามกระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วเหลืองล้วน

4.การวิเคราะห์ผลระหว่างกระบวนการหมัก หมายถึง การเก็บตัวอย่างในช่วงของการหมักโมโรมิเป็นระยะๆ โดยเริ่มเก็บวันแรก (0 วัน) 10 20 30 45 60 75 และ 90 วันตามลำดับ และนำไปวิเคราะห์ หาปริมาณเอนไซม์อะไมเลส โปรทิเอส ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณกรดอะมิโน ปริมาณจุลินทรีย์ และวัดค่า pH

5.การวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรม หมายถึง การนำซีอิ๊วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปวิเคราะห์คุณภาพหาปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาล ปริมาณเกลือ และปริมาณโลหะหนัก

6.โคจิ (Koji) หมายถึง การเลี้ยงเชื้อด้วยส่วนประกอบดังนี้คือ ถั่ว (ถั่วเหลืองและ/หรือถั่วมะแฮะ)ที่ผ่านการนึ่งสุกแล้ว แป้งข้าวสาลี ผสมกันและนำเชื้อรา *A. oryzae* แผ่กระจายไว้ในกระด้ง เก็บไว้ในอุณหภูมิ 25-30 $^{\circ}$C นาน 72 ชั่วโมง สังเกตจะมีสปอร์ของเชื้อคลุมเมล็ดถั่วเป็นสีเหลืองแกมเขียว เรียกว่า ลูกแป้ง

7.โมโรมิ (Moromi) หมายถึง การนำลูกแป้งในช่วงโคจิลงหมักในภาชนะไหดินเคลือบเติมน้ำเกลือความเข้มข้น 20 % โดยให้มีปริมาตรของลูกแป้งต่อน้ำเกลือเป็น 1 ต่อ 1-2 เท่า จากนั้นก็ปิดฝาเพื่อกันแมลงและน้ำฝนเข้า นำโอ่งไปตั้ง ตากแดด กวนเป็นครั้งคราว ระยะเวลาหมักนาน 3 เดือน

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าข้อมูลวิจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ ได้แก่

1. ข้อมูลพื้นฐานวัตถุดิบในการนำมาใช้ในงานวิจัย
2. ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง
3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลพื้นฐานวัตถุดิบในการนำมาใช้ในงานวิจัย

1.1 ข้อมูลพื้นฐานถั่วมะแฮะ

ภาพประกอบ 1 ถั่วมะแฮะ

ถั่วมะแฮะมีชื่ออื่นๆ ถั่วแม่ตาย ถั่วแระ (ภาคกลาง) ถั่วแรด (ชุมพร) มะแฮะ มะแฮะต้น (ภาคเหนือ) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cajanus cajan* Millsp. ชื่อสามัญ Angola Pea, Congo Pea, Pigeon Pea อยู่ในวงศ์ LEGUMINOSAE ชื่อพ้อง *Cajanus indicus* Spreng. ในปัจจุบันนี้มีการเพาะปลูกถั่วมะแฮะกันอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในแถบเขตร้อน เนื่องจากถั่วมะแฮะเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ดินไม่อุดมสมบูรณ์ ทนต่อสภาพภูมิอากาศที่แห้งแล้งได้ดี เช่น เติบโตได้ในพื้นที่ที่มีปริมาณน้ำฝนน้อยกว่า 650 มิลลิเมตรต่อปี นอกจากนี้ยังเป็นพืชที่โตเร็วสามารถให้ร่มเงากับ

พืชผักสมุนไพรได้ ลักษณะเป็นไม้พุ่ม สูง 1.2-3 เมตรหรือมากกว่าแตกกิ่งก้านกว้างประมาณ 2 เมตร และเมื่อเติบโตถึง 120-150 วัน จะออกดอกและให้ดอกได้ตลอดปี ถั่วมะแฮะมีใบรูปหอกถึงแหลม แคบปลายแหลมยาว 5-10 เซนติเมตร มีขนบางๆทั้ง 2 ด้านดอกสีเหลืองด้านหลังสีน้ำตาลเส้นผ่านศูนย์กลางดอก 2 เซนติเมตร ลักษณะของฝักยาว 5-7.6 เซนติเมตร กว้าง 1.3 เซนติเมตร ปลายโค้งมีขน เมล็ดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร สีน้ำตาลมีรูเล็กๆ สีขาว ฝักเป็นฝักถั่ว โดยแต่ละฝักจะมีเมล็ดถั่วประมาณ 9 เมล็ด ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดถั่วมะแฮะมีเปลือกห่อหุ้มเมล็ดหนา เนื้อถั่วแข็ง การเพาะปลูกถั่วมะแฮะสามารถปลูกร่วมกับธัญพืชอื่นๆเช่น ข้าวฟ่าง ข้าวเดือย หรือข้าวโพด การเพาะปลูกถั่วมะแฮะนั้นมีทั้งระยะยาว (5-12 เดือน) กับระยะสั้น (3-4 เดือน) ซึ่งขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการเก็บเกี่ยว และขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น การใช้ปุ๋ย การชลประทาน และการใช้ยาฆ่าแมลง ซึ่งจะได้ผลผลิตของถั่วมะแฮะต่ำโดยเฉลี่ย 70 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ ในปัจจุบันมีการพัฒนาการเพาะปลูกใหม่ เนื่องจากมีความต้องการถั่วมะแฮะสูงขึ้น และมีผลกำไรสูงขึ้น ปัจจุบันพื้นที่ผลิตถั่วมะแฮะที่มีอยู่ทั่วโลกสามารถผลิตถั่วมะแฮะได้ประมาณ 46000 ลูกบาศก์กิโลเมตร โดยผลิตได้มากที่ประเทศอินเดียซึ่งสามารถผลิตได้ถึงร้อยละ 82 ของปริมาณถั่วมะแฮะทั้งหมด

โดยทั่วไปถั่วมะแฮะสามารถใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่รากถึงยอด และที่พบกันมาก คือนำ มาเป็นปุ๋ยพืชสด ปลูกเพื่อปรับสภาพดิน และนำมาเป็นอาหารสัตว์ เป็นผักพื้นเมืองฝักอ่อนบริโภคพร้อมกับส้มตำ ใช้จิ้มเมี่ยง ใช้ลวกจิ้มน้ำพริก การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับถั่วมะแฮะเพื่อนำมาประกอบอาหารในประเทศไทยมีหลายประเภท เช่น ปี พ.ศ. 2532 สมชาย ประภาวัต ศึกษาการทำและการยอมรับเต้าส่วนจากถั่วมะแฮะพันธ์ต่างๆเปรียบเทียบกับถั่วเขียว พ.ศ. 2536 นิรมล ล้อสุริยนต์ ศึกษาการพัฒนาอาหารเช้าสำเร็จรูปชนิดแผ่นจากถั่วมะแฮะ และในปี พ.ศ. 2541 สมชาย ประภาวัต ทำการศึกษาการทำคุกกี้จากถั่วเขียวผิวดำเปรียบเทียบกับถั่วเขียวและถั่วมะแฮะ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่ามีการวิจัยเกี่ยวกับการแปรรูปถั่วมะแฮะเพื่อประกอบเป็นอาหารอยู่แล้วบ้าง ส่วนในบางประเทศ เช่น ประเทศอินเดียมีอาหารที่ทำจากถั่วมะแฮะเรียกว่า Turvara Parippu และ Sambhar ประเทศสาธารณรัฐโดมินิแกนและฮาวาย นำถั่วมะแฮะมาแปรรูปเป็นอาหารกระป๋อง เนื่องจากตรวจพบในถั่วมะแฮะที่แก่จัดมีสารอาหารต่างๆ ประกอบด้วย ถั่วมะแฮะสามารถนำไปใช้ได้ทั้งเป็นอาหาร เช่น พวกถั่วแห้ง แป้ง เป็นต้น และยังใช้เป็นอาหารสัตว์เหมือนพวกธัญพืชทั่วไป เมล็ดถั่วที่แห้งอาจนำไปใช้แตกหน่อได้ นำไปทำอาหารซึ่งจะให้รสชาติที่แตกต่างไปจากถั่วชนิดอื่นๆ

ในถั่วมะแฮะมีสารอาหารที่สำคัญโดยจะมี คาร์โบไฮเดรต 63.4 กรัมต่อร้อยกรัม โปรตีน 20.4 กรัมต่อร้อยกรัม ไขมัน 11.5 กรัมต่อร้อยกรัม ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยัง ประกอบไปด้วย แคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามิน เอ บี บี1 บี2 และกรดอะมิโน โดยกรดอะมิโนที่สำคัญได้แก่ เมทไทโอนีน ไลซีน ทริปโตเฟน และ ไนอาซีน เมื่อนำถั่วนี้ไปประกอบอาหารร่วมกับพวกธัญพืชอื่นจะให้อาหารที่มีประโยชน์มากขึ้น ถั่วมะแฮะสามารถนำมาใช้ได้เหมือนพวกธัญพืชอื่นๆ (เมล็ดแห้งของธัญพืชนำมาใช้เป็นอาหารได้) เมื่อนำมาใช้เป็นผักต้องให้เมล็ดถั่วเจริญเติบโตได้เต็มที่ก่อนแต่ต้องก่อน ที่สีเขียวของถั่วจะหายไปเพราะในขั้นที่เมล็ดถั่วเป็นสีเขียวนี้จะมีสารอาหารมากกว่าถั่วที่

เป็นเมล็ดแห้งซึ่งจะมีโปรตีน น้ำตาลและไขมันที่สูง ถ้าจะนำถั่วมะแฮะมาใช้มาเป็นอาหารสัตว์ควรเป็นถั่วมะแฮะที่ปลูกไม่ถึง 5 ปี

นอกจากตัวของถั่วมะแฮะจะนำมาใช้ประโยชน์ในเรื่องอาหารแล้ว ส่วนต่างๆของต้นถั่วมะแฮะไม่ว่าจะเป็นลำต้น ก้าน หรือใบ ก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เช่นกัน เช่นการนำไปใช้เป็นถ่านไม้ รั้ว และ นำมามุงหลังคาได้ด้วย ในประเทศไทยได้นำถั่วมะแฮะมาใช้เป็นบ้านของแมลงชนิดต่างๆ เช่น แมลงครั่ง เป็นต้น ต้นถั่วมะแฮะนั้นสามารถใช้นำมาปรับปรุงดินให้อุดมสมบูรณ์มากขึ้นได้ดีกว่าถั่วบางชนิด เพราะเกิดการตรึงไนโตรเจนดีและ ต้นถั่วมะแฮะยังสามารถทนต่อดินที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือที่ 0.0005 กรัม / ดิน 1 กรัม ได้จึงเป็นการปรับปรุงดินจาก pH 5 ให้สูงขึ้นเป็น pH 8 นอกจากนี้ต้นไม้ชนิดนี้ยังสามารถต่อต้านสิ่งมีชีวิตพวกนีมาโทด (nematodes) ได้

ในการเพาะปลูกถั่วมะแฮะนี้จะปลูกถั่วมะแฮะเพียงอย่างเดียวก็ได้หรือปลูกร่วมกับธัญพืชชนิดต่างๆก็ๆได้ไม่ว่าจะเป็นข้าว ข้าวฟ่าง (*Sorchum bicolor*) เมล็ดเดือย (*Pennisetium glaucum*) ข้าวโพด (*Zea maays*) หรือถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) ถ้าปลูกถั่วลิสงร่วมกับถั่วมะแฮะจะทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์เนื่องจากมีการเกิดการตรึงไนโตรเจนขึ้นมาก

1.2 ข้อมูลพื้นฐานถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองมีชื่ออื่นๆ คือ ถั่วพระเหลือง มะถั่วเน่า ถั่วหนัง (ภาคเหนือ) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Glycine max* (L.) Merr. ชื่อสามัญ Soya bean, Soy bean อยู่ในวงศ์ LEGUMINOSAE โดยถั่วเหลืองมีถิ่นกำเนิดที่บริเวณหุบเขาแม่น้ำเหลือง (ประมาณเส้นรุ้งที่ 35 องศาเหนือ) ประเทศจีน การจารึกครั้งแรกเกี่ยวกับถั่วเหลือง เมื่อ2295 ปีก่อนพุทธกาล ที่หุบเขาแม่น้ำเหลืองจากนั้นถั่วเหลืองได้แพร่กระจายสู่ประเทศเกาหลีและญี่ปุ่น เมื่อ 200 ปีก่อนคริสตกาล แล้วเข้าสู่ยุโรปในช่วงหลัง พ.ศ. 2143 และไปสู่สหรัฐอเมริกาในปี พ.ศ. 2347 จากนั้นกว่า 100 ปี ชาวอเมริกันได้ปลูกถั่วเหลืองเพื่อเป็นอาหารสัตว์ใช้เลี้ยงวัวโดยไม่ได้นำเมล็ดมาใช้ประโยชน์อย่างอื่น จนถึงปี พ.ศ. 2473 สหรัฐอเมริกาได้นำพันธ์ถั่วเหลืองจากจีนเข้าประเทศกว่า 1,000 สายพันธุ์ เพื่อการผสมและคัดเลือกพันธุ์ทำให้ได้เมล็ดพันธุ์ที่มีเมล็ดโต ผลผลิตสูง เหมาะแก่การเพาะปลูก

ลักษณะของต้นถั่วเหลืองเป็นพืชล้มลุก สูงประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นสี่เหลี่ยมปกคลุมด้วยขนสีเทาขาว ใบเป็นใบประกอบแบบนิ้วมือ ใบประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบ รูปร่างคล้ายรูปไข่ปลาย แหลมใบค่อนข้างหนาผิวมันทั้งด้านบนและด้านล่าง ดอกเป็นช่อสีขาวหรือม่วงแดง ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 25-30 วัน เก็บเกี่ยวอายุประมาณ 90-100 วันฝักแบนขาวติดเป็นกระจุกที่ข้อของต้น และ กิ่งในฝักมีเมล็ด 3-5 เมล็ด รูปไข่ เมล็ดกลม ผิวสีเหลืองมัน ตาค่อนข้างเล็ก สีน้ำตาลอ่อน ในประเทศไทยสามารถปลูกถั่วเหลืองได้ทั้งตลอด 3 ฤดูกาล ซึ่งการปลูกอาจต้องปรับสภาพดินให้เหมาะสมก่อน pH ประมาณ 5.5-6.5 และเตรียมเมล็ดโดยมีการผสมกับเชื้อไรโซเบียม ในการผสมกับเชื้อชนิดนี้นิยมใช้กับถั่วเหลืองเท่านั้น ถั่วเหลืองต้องการน้ำประมาณ 300-400 มิลลิลิตรตลอดฤดูปลูก ช่วงที่สำคัญที่ไม่ควรขาดน้ำ คือ ช่วงการงอกและช่วงออกดอกอายุการเก็บเกี่ยวของถั่วเหลืองจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณ 60 -110 วัน

ถั่วเหลืองขยายพันธุ์โดยเพาะเมล็ด ประเทศไทยสามารถปลูกถั่วเหลืองได้ทั้งปี ปีละ 3 ฤดู การปลูกอาจต้องปรับสภาพดินให้เหมาะสมก่อน pH ประมาณ 5.5 - 6.5 และเตรียมเมล็ดโดยการคลุกเชื้อไรโซบียม การคลุกเชื้อไรโซเบียมต้องใช้เชื้อที่ใช้กับถั่วเหลืองเท่านั้น ถั่วเหลืองต้องการน้ำประมาณ 300 - 400 มิลลิลิตร ตลอดฤดูปลูก ช่วงที่สำคัญที่ไม่ควรขาดน้ำคือช่วงการงอกและช่วงออกดอก อายุการเก็บเกี่ยวของถั่วเหลืองจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณ 60-110 วัน

การนำถั่วเหลืองมาใช้ประโยชน์นั้น นิยมเลือกเมล็ดที่แก่จัด ทั้งนี้เพราะในเมล็ดถั่วเหลืองแก่จะมี สารอาหารต่างๆ ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรท 33.5 กรัมต่อร้อยกรัม โปรตีน 34.1 กรัมต่อร้อยกรัม ไขมัน 10.0 กรัมต่อร้อยกรัม ของน้ำหนักแห้ง และในไขมันประกอบด้วยกรดไขมันต่างๆ ได้แก่ กรดลิโนเลอิก กรดโอเลอิก กรดลิโนเลนิก กรดปาล์มมิติก และ กรดสเตียริก นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยแคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามิน เอ บี บี1 บี2 บี6 บี12 ดี และอี ไนอาซีน ถั่วเหลืองที่แก่จัดสามารถนำมาแปรรูปได้หลากหลาย เช่น น้ำมันถั่วเหลือง ถั่วเน่า เทมเป้ ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เนื้อเทียม ไอศกรีม โยเกิร์ตถั่วเหลือง บัตเตอร์ถั่วเหลือง เป็นต้น

สารอาหารหลักในถั่วเหลืองคือโปรตีน โปรตีนของถั่วเหลืองจะถูกสะสมในเซลล์ของเนื้อถั่วเหลือง โดยสะสมกันเป็นที่เรียกว่า Protein bodies หรือ Storage Proteins ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 2 - 20 ไมครอน แต่ส่วนใหญ่มีขนาด 5 - 8 ไมครอน และมีน้ำหนักโมกุลอยู่ในช่วงของ 200,000-600,000 ในสภาวะธรรมชาติโมเลกุลของโปรตีนขนาดใหญ่เหล่านี้ยังสามารถจับตัวกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ได้อีกด้วยการเชื่อมกันของพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide linkage polymer) และโปรตีนที่แยกมาได้เพื่อทำเป็นผลิตภัณฑ์นั้นจะเป็นชนิดของโปรตีนที่เปลี่ยนสภาพ โดยการเกิดปฏิกิริยาที่ซับซ้อนรวมกันอยู่โดยที่อย่างน้อย 7 ชนิด ของโปรตีนจะจับกันเป็นกลุ่มย่อย ซึ่งอาจถูกทำให้โมเลกุลเปลี่ยนขนาดไปโดยสภาวะต่างๆ เนื่องจากโปรตีนในถั่วเหลืองส่วนใหญ่เป็นโปรตีนประเภทก้อนกลม ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำในสภาวะที่มี pH อยู่ในช่วงที่เรียกว่า จุดไอโซอิเล็กทริก ซึ่งเป็นจุดที่มี pH ประมาณ 4.2 - 4.6 ถ้า pH สูงหรือต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก โกลบูลินก็จะยังคงสามารถละลายได้ในสภาวะที่ไม่มีเกลืออยู่ แต่ถ้ามีเกลือโปรตีนก็สามารถละลายน้ำได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามโปรตีนถั่วเหลืองนั้นจะไวต่อการเปลี่ยนแปลงในสภาวะการต่างๆ ทั้งทางกายภาพและเคมี

การเปลี่ยนจากสภาพธรรมชาติของโปรตีน (Denaturation) ในถั่วเหลืองเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุดังนี้

1) การเปลี่ยนแปลงเนื่องจากความร้อน ในการนำเอาถั่วเหลืองไปแปรรูปเป็นอาหารจำเป็นจะต้องนำไปผ่านขั้นตอนของความร้อนต่างๆซึ่งมีผลทำให้สภาพโปรตีนของถั่วเหลืองเปลี่ยนแปลงไป เช่น การละลายของโปรตีนในน้ำ หรือในสารละลายเกลือ เป็นต้น ซึ่งผลจากการใช้ความร้อนต่อถั่วเหลืองที่มีไขมันและปราศจากไขมันในช่วงเวลาต่างๆและที่ความดันบรรยากาศต่างๆ จะพบว่าโปรตีนจะมีการละลายได้ในน้ำลดลงอย่างรวดเร็ว จากการที่ถูกความร้อน

2) การเปลี่ยนแปลงเนื่องจากกรดเบส การเปลี่ยนแปลง pH จะมีผลให้โปรตีนโกลบูลิน ในถั่วเหลืองเปลี่ยนสภาพไป ถ้าค่าของ pH สูง เช่น pH 12 จะทำให้เปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลย่อย และเป็นปฏิกิริยาที่ไม่สามารถเกิดย้อนกลับที่เดิม เมื่อปรับสภาวะของ pH ให้เป็นกลาง และ

ถ้าค่า pH ต่ำลง ก็จะทำให้เกิดการแตกตัวของ โครงสร้างจตุรภูมิ และไม่สามารถกลับสภาพเดิมได้เช่นกัน

3) การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเนื่องจากตัวทำละลายต่างๆ เช่น เมทานอล เอทานอล อะซิโตนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนโกลบูลิน ตัวทำละลายเหล่านี้ถ้าอยู่ในรูปของสารละลายในน้ำจะมีผลทำให้การเปลี่ยนแปลงได้มากกว่าที่อยู่ในรูปของสารบริสุทธิ์ การทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของตัวทำละลายต่อโปรตีนนั้นจะเกิดขึ้นสมบูรณ์ภายในเวลาประมาณ 5 นาที ความสามารถ ของแอลกอฮอล์ โมเลกุลต่ำ ที่เปลี่ยนสภาพโปรตีนจะเพิ่มขึ้นตามขนาดความยาวของโมเลกุลเพิ่มขึ้นเกิดจากการที่โครงสร้างของโมเลกุลเป็นลักษณะมีไฮโดรโฟบิก ฝังอยู่ด้านในทำให้โมเลกุลทนต่อความร้อนในขณะอยู่ในน้ำแอลกอฮอล์ซึ่งสามารถซึมเข้าไปด้านในของโมเลกุลได้ จึงทำให้แขนของโมเลกุลแตกหักได้เมื่อเทียบกับน้ำซึ่งทำให้แขนของไฮโดรเจนแตกหักได้เฉพาะบริเวณผิวและทำให้เกิดเป็นลักษณะมีขั้วมาก ฉะนั้นน้ำจึงอาจเป็นเหตุผลการที่สารละลายของตัวทำละลายในน้ำมีประสิทธิภาพในการทำให้เปลี่ยนแปลงโปรตีนมากกว่า

ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนนั้นต้องนำค่าแฟคเตอร์มาตรฐานมาคูณกับปริมาณของไนโตรเจนที่ได้จากการทดลอง เพื่อคิดคำนวณเป็นปริมาณของโปรตีน(nitrogen conversion factor) ได้มีการกำหนดเอาตัวคูณ ในการใช้คิดเป็นปริมาณของโปรตีนในถั่วเหลืองคือ 6.25 ตั้งแต่เริ่มแรก เพื่อใช้เป็นบรรทัดฐานคำนวณโปรตีนในด้านการค้า

นอกจากในถั่วเหลืองจะมีโปรตีนที่เป็นสารอาหารหลักแล้วยังมีคาร์โบไฮเดรตเป็นสารอาหารอีกชนิดหนึ่ง โดยคาร์โบไฮเดรตที่พบในถั่วเหลืองมี 2 ประเภท คือ คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ น้ำตาล ต่างๆ เช่น ซูโครส เรฟฟิโนส (raffinose) สตาร์ชีโอส (stachyose) เวอร์บาโคส (verbascose) นอกจากนี้อีกประเภทหนึ่งคือ คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ ส่วนใหญ่พบในใบเลี้ยง เป็นสารพวกที่มีโครงสร้างที่ซับซ้อนคือ เป็นน้ำตาลหลายโมเลกุล

ถั่วเหลืองจะมีกลิ่นเฉพาะตัวอันเนื่องมาจากสารอินทรีย์ในถั่วที่ทำให้ถั่วเหลืองมีกลิ่น ได้แก่ สารฟีโนลิก (phenolic acid) สารนี้พบในพืชโดยทั่วไป มีปริมาณไม่มาก บทบาทของสารฟีโนลิก ในถั่วเหลืองจัดว่ามีความสำคัญอันหนึ่ง โดยเป็นสารร่วมที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นในแป้งถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง และสารที่ให้กลิ่นอื่นๆ ส่วนใหญ่แล้วจะเกี่ยวข้องกับสารที่ให้กลิ่นในถั่วเหลือง และสารที่เกิดขึ้นในช่วงของการแปรรูปถั่วเหลือง หรือเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของ เอนไซม์ในธรรมชาติของถั่ว เช่น ลิปิดออกซิเดส (lipidoxidase) นอกจากนี้ยังมีสารประกอบบางประเภท ที่อาจรวมตัวกับโปรตีนหรือหรือสารอื่นๆในถั่วเหลืองอีกด้วย ทำให้ได้สารที่มีสมบัติให้กลิ่นเฉพาะ เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วพบว่า ถั่วเหลืองและถั่วมะแฮะมีความแตกต่างกันในเรื่องของปริมาณสารอาหารตามแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 เปรียบเทียบสารอาหารที่จำเป็นระหว่างถั่วมะแฮะกับถั่วเหลือง

ชนิดสารอาหาร	ถั่วมะแฮะ	ถั่วเหลือง
คาร์โบไฮเดรต (กรัมต่อ 100กรัมของน้ำหนักแห้ง)	63.4	33.5
โปรตีน (กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง)	20.4	34.1
ไขมัน (กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักแห้ง)	11.5	10.0
แคลเซียม	มี	มี
ฟอสฟอรัส	มี	มี
วิตามิน	เอ บี บี1 และบี2	เอ บี บี1 บี2 บี6 บี 12 ดี และอี
กรดอะมิโนสำคัญ	เมทไทโอนีน ไลซีน ทริปโตเฟน	ไนอาซีน

ที่มา: ดัดแปลงจาก วันชัย สมชิต. (2527). ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย และ กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช. (2549) พฤกษศาสตร์ของผักพื้นเมือง

1.3 ข้อมูลพื้นฐานจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย คือ เชื้อราในสกุลแอสเปอร์จิลลัส ซึ่งพบในธรรมชาติ ฝุ่นละอองในอากาศ ตามผัก ผลไม้ ลักษณะรูปร่างเป็นไมซีเลียมที่แตกแขนง ๆ และมีผนังกั้น แต่ละส่วนที่กั้นแล้วมีนิวเคลียสหลายอัน โคนิดิโอฟอร์เกิดจากฟูตเซลล์ (foot cell) โคนิดิโอฟอร์อาจมีผนังกั้นหรือไม่มีก็ได้ ที่ส่วนปลายของโคนิดิโอฟอร์จะโป่งออกเป็นเวสซิเคิล (Vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็นสะเตอริกมา (sterigma) ซึ่งอาจมีชั้นเดียว หรือสองชั้นก็ได้ โคนีเดียจะถูกสร้างชั้นภายในสเตอริกมา โคนิเดียที่สร้างขึ้นภายหลังจะดัน โคนีเดียอันแรก ๆ ออกมาและยังติดต่อกันอยู่จึงเกิดเป็นสายของโคนีเดีย โคนิเดียมีสีต่างๆ กัน และเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละชนิดส่วนใหญ่ มีสีดำ น้ำตาล เขียว ในโลกนี้พบว่ามีเชื้อสกุลแอสเปอร์จิลลัส ประมาณ 600 สายพันธ์ (นงลักษณ์ สุวรรณ์พินิจ. 2541) เชื่อราสกุลนี้มีทั้งชนิดที่ให้โทษและให้ประโยชน์จึงมีความสำคัญต่ออาหารหลายด้าน การใช้ประโยชน์จากราสกุลนี้ คือ ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น *A.oryzae* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการหมักอาหารพื้นเมืองพวกถั่วเหลือง เช่น เมจู ของเกาหลี มิโซ โซยู ของญี่ปุ่น และเต้าเจี้ยว

ซีอิ๊วของจีน และการใช้ผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ เช่น *A. niger* ให้ผลิตกรดซิตริก กรดกลูโคนิก กรดตาร์ตาริก กรดออกซิลิก และนอกจากนี้ *A. oryzae* *A. niger* ยังผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดย *A. awamori* เอนไซม์เพคติเนส แล็กเทส กลูโคออกซิเดส คาตาเลส โดย *A. niger* และผลิตเอนไซม์โปรทีเอส โดย *A. oryzae* นอกจากประโยชน์แล้วยังมีราอีกหลายชนิดที่ให้โทษคือ ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *A. alliaceus* ทำให้หอม กระเทียมเน่าดำ *A. niger* เติบโตในขนมปังสร้างสปอร์สีเขียว น้ำตาล หรือดำ และสร้างสารสีเหลืองแพร่กระจายในขนมปัง และสร้างสารพิษในอาหาร เช่น อะฟลาทอกวิน โดย *A flavus A. parasiticus* ซึ่งพบในอาหารพวกถั่วละสง ข้าวโพด ข้าว ข้าวฟ่าง

ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกเชื้อราสายพันธ์ *A. oryzae* บริสุทธิ์โดยผู้เชี่ยวชาญจากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เนื่องจากสมบัติของเชื้อคือสามารถใช้ในอาหารหมักเพราะช่วยผลิตกรดอินทรีย์ และเอนไซม์ อะไมเลส โปรทีเอส

เอนไซม์อะไมเลสจัดเป็นเอนไซม์ประเภท extracellular enzyme ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์หลายชนิด สามารถแบ่งชนิดของเอนไซม์ได้ตามตำแหน่งที่เข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ได้เป็น 2 ประเภท คือ เอนโดอะไมเลสและเอกโซอะไมเลส โดยที่อะไมเลสทั้ง 2 ชนิดมีการทำงานแตกต่างกัน ซึ่งเอนโดอะไมเลสจะไฮโดรไลซ์แป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่งพันธะอัลฟา - 1,4 - ไกลโคซิดิก (α -1,4 - glycosidic linkage) ถ้าการย่อยเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์กลูโคส มอลโตส และเด็กซตริน แต่ถ้าการย่อยเกิดขึ้นสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นมอลโตสและกลูโคสเท่านั้น เอนไซม์ประเภทนี้เป็นที่รู้จักการในชื่อ อัลฟาอะไมเลส (α - amylase) (จันทนา ก่อนเก่า. 2535) โดยมีชื่อทางการค้าว่า เทอร์มามิล (termamyl) และมีชื่อสามัญว่า ไดเอสเทส (diastase) ชื่อตามระบบ IUPAC คือ α - 1,4 – glucanohydrolase, E.C.3.2.1.1

สำหรับเอนไซม์เอกโซอะไมเลสจะทำหน้าที่นอน-รีดิวซิงก์ (non-reducing) โดยจะย่อยที่ตำแหน่งพันธะอัลฟา - 1,4 - ไกลโคซิดิกและพันธะอัลฟา - 1,6 - ไกลโคซิดิก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นดี-กลูโคส (D-glucose) เอนไซม์นี้ รู้จักในนามของเบตา - อะไมเลส (β - amylase) และ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase ; amylo (1 -4, 1 - 6) glucosidase) หรือแกรมมา - อะไมเลส (จันทนา ก่อนเก่า. 2535) ชื่อตามระบบ IUPAC คือ α - 1,4 –glucan maltohydrolase,E.C.3.2.1.2 ซึ่งพบในพืชชั้นสูง เช่นข้าวบาร์เลย์ที่กำลังงอกเป็นข้าวมอลท์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง และมันเทศ มักจะพบร่วมกับอัลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการผลิตสาเก ซึ่งเป็นเครื่องดื่มพื้นเมืองประเภทแอลกอฮอล์ของญี่ปุ่น และมิโซเครื่องปรุงรสอาหารของชาวญี่ปุ่น หรือที่รู้จักกันดีในทางการผลิตกลูโคสเพื่อการค้าจากแป้งเพราะว่าสามารถย่อยแป้งให้กลายเป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ (Mitsue. 1979) สำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติต่างๆที่เปรียบเทียบในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสแต่ละประเภท

คุณสมบัติ	แอลฟา-อะไมเลส	เบตา-อะไมเลส	กลูโคอะไมเลส
กลไกการย่อยแป้ง	ที่กลางโมเลกุลแป้ง	ที่ปลายโมเลกุลแป้ง	ที่ปลายโมเลกุลแป้ง
ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย	สารผสมของโอลิโกแซคคาไรด์	มอลโตส	กลูโคส
ลักษณะโครงสร้างของไอโซเมอร์	แอลฟา	เบตา	เบตา
ความเร็วในการลดลงของความหนืด	เร็ว	ช้า	ช้า
ความเร็วในการเปลี่ยนปฏิกิริยาการเกิดสีกับสารละลายไอโอดีน	เร็ว	ช้า	ช้า
ปฏิกิริยาที่จุดแยกแขนง	ข้ามจุดที่มีพันธะอัลฟา - 1,6 – ไกลโคซิดิก	ไม่สามารถข้ามพันธะที่มี อัลฟา - 1,6 - ไกลโคซิดิก	สามารถตัดพันธะอัลฟา - 1,6 – ไกลโคซิดิก

ที่มา: ดัดแปลงจาก ศุภชัย สมัปปิโต. (2541). การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส. หน้า 5

2. ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ซีอิ๊วตามความหมายกระทรวงอุตสาหกรรม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลือง การหมัก จะนำมาแต่งรสและหรือสีหรือไม่ก็ได้ตามชนิดของผลิตภัณฑ์นั้นๆ แล้วนำไปผ่านการพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) ในประเทศไทยมีการผลิตซีอิ๊วระดับอุตสาหกรรมส่วนมากมีพื้นที่ตั้งอยู่แถบชานเมืองของกรุงเทพมหานคร ในต่างจังหวัดมีไม่มากมายนัก ทั้งนี้เพราะว่าการหมักทำซีอิ๊ว และเต้าเจี้ยวของไทยเป็นการหมักที่ต้องใช้พื้นที่มาก และอาศัยอุณหภูมิจากแสงแดดเป็นตัวเร่งการบ่มในช่วงการหมัก จากการศึกษาประวัติซีอิ๊วพบว่า ซีอิ๊วเป็นอาหารที่ชาวจีนคิดค้นผลิตขึ้นเป็นเวลานานกว่า 3000 ปีมาแล้ว หลังจากนั้นได้มีการคิดค้นและพัฒนา เมื่อ ปี พ.ศ. 2343 ประเทศญี่ปุ่นมีการผลิตหัวเชื้อซีอิ๊วขาย และประเทศจีนค้นพบว่าวัตถุดิบที่สำคัญในการใช้ผลิตซีอิ๊วได้แก่ ถั่วเหลือง และข้าวสาลี จนถึงปี พ.ศ. 2473 ประเทศญี่ปุ่นค้นพบการผลิตกรดอะมิโนในรูป

สารละลาย ซึ่งต่อมาจีนก็เริ่มผลิตเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นประเทศญี่ปุ่นเริ่มค้นคว้าเอนไซม์ในซีอิ๊ว ในขณะที่จีนเริ่มเติมของเสียจากผงชูรสในซีอิ๊วและเริ่มผลิตหัวเชื้อซีอิ๊ว ปี พ.ศ. 2488 ประเทศญี่ปุ่นเริ่มใช้จุลินทรีย์ในการหมักซีอิ๊ว และเริ่มนำกากที่เหลือจาการหมักครั้งแรกมาหมักต่อ เริ่มคิดค้นวิธีหมักแบบเร็ว และทดลองหมักแบบกึ่งเคมี ในขณะที่มีการพัฒนาการหมักซีอิ๊วและมีการเติมสารชูรสและสารกันบูดลงลงไปในซีอิ๊วทำให้เกิดปัญหา กระทรวงเศรษฐการของประเทศจีนจึงประกาศใช้มาตรฐานซีอิ๊วและเริ่มมีการเติมผงยีสต์ในการหมักซีอิ๊วหลังจากนั้นได้มีการพัฒนาโดยใช้เครื่องมืออุตสาหกรรมช่วยในการ จนในปี 2513 ประเทศจีนมีกำหนดให้โรงงานผู้ผลิตแจ้งให้ผู้บริโภคทราบว่าเป็นซีอิ๊วประเภทหมักหรือเคมี ดังนั้นโดยทั่วไปจึงแบ่งซีอิ๊วออกเป็นประเภทมี 3 ประเภท ได้แก่

1) ซีอิ๊วหมัก (fermented soy sauce) หมายถึงซีอิ๊วที่ได้จากการหมักถั่วเหลืองหรือส่วนผสมของถั่วเหลืองและแป้งสาลีโดยอาศัยการทำงานร่วมกันของจุรินทรีย์ 3 ชนิด คือ เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ ซึ่งใช้ระยะเวลาในการหมักนานตั้งแต่ 3 เดือน ถึง 1 ปี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอากาศ อุณหภูมิของการหมัก เอนไซม์ชนิดต่างๆ ในเชื้อเริ่มต้น เช่น โปรทีเอส อะไมเลส จะทำงานในช่วงเวลาหนึ่ง การหมักจะแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือระยะแรกการหมักชนิดให้กรดแลกติก โดยกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติกและเพดดิโอคอคคัสจะผลิตกรดเพิ่มเต็ม ระยะที่สอง การหมักชนิดให้แอลกอฮอล์โดยกิจกรรมของยีสต์ และระยะสุดท้ายการทำให้กระบวนการหมักและการบ่มสมบูรณ์ หลังจากนั้นนำซีอิ๊วที่ผ่านการหมักไปสกัดเอาแต่น้ำทิ้งให้ตกตะกอนเป็นระยะเวลา 7 วัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อ และบรรจุขวดจำหน่าย

2) ซีอิ๊วเคมี (chemical soy sauce) หมายถึง ซีอิ๊วที่ได้จากการใช้กรดเกลือเข้มข้นมาย่อยถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกไปแล้ว ใช้เวลาน้ำกว่าการหมักแบบธรรมชาติโดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ ปริมาณกรดอะมิโนที่ได้จะมากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ การผลิตซีอิ๊วเคมีโดยการใช้กรดย่อยโปรตีนแล้วผ่านการทำให้เป็นกลาง จึงได้กรดอะมิโนหลายชนิดออกมาในสารละลาย โดยกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติให้รสพิเศษได้แก่ กรดอะมิโนกลูตามิค (glutamic amino acid) กรดอะมิโนชนิดนี้ทำหน้าที่เพิ่มรสชาติ เหมือนกับในผงชูรสซึ่งประกอบ ด้วย โซเดียมกลูตาเมท (sodium glutamate) เป็นส่วนใหญ่ เมื่อใช้กรดเกลือต้มกับถั่วเหลืองก็จะได้กรดอะมิโนหลายชนิด โดยเฉพาะกรดกลูตามิกมากที่สุด รสดี มีกลิ่นหอม การผลิตสารละลายกรดอะมิโนในซีอิ๊วนี้มีระยะเวลาสั้นเพราะเกิดปฏิกิริยาเคมีรวดเร็ว และมีต้นทุนการผลิตต่ำซึ่งเป็นข้อดีของการผลิตซีอิ๊วเคมี แต่ซีอิ๊วเคมีจะไม่มีกลิ่นหอมพิเศษเหมือนซีอิ๊วหมัก

3) ซีอิ๊วกึ่งเคมี (Semi – chemical soy sauce) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการดัดแปลงนำเอาวิธีการผลิตซีอิ๊วหมักกับซีอิ๊วเคมีมารวมกันเพื่อให้ได้ซีอิ๊วที่มีคุณภาพ กลิ่น รสดี และใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้น โดยแบ่งวิธีการผลิตได้ 2 วิธี คือการผลิตแบบใช้เอนไซม์ช่วยในการผลิต และอีกวิธีหนึ่งคือไม่ใช้เอนไซม์ช่วยในการผลิต

วัตถุดิบหลักที่ใช้ในกระบวนการผลิตซีอิ๊วมีดังนี้

1) หัวเชื้อจุลินทรีย์ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักมี 3 กลุ่ม ได้แก่ เชื้อรา จะทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ อะไมเลส โพรทีเอส และไลเพส ออกมาย่อยสลายแป้ง โปรตีน และไขมัน ทำให้ได้สารโมเลกุลเล็กหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน กรดไขมัน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวของซีอิ๊วและเป็นแหล่งอาหารสำหรับเชื้อแบคทีเรียแลกติก เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแลกติก เกิดขึ้นในกระบวนการหมักขั้นตอนการเติมน้ำเกลือ แบคที เรียแลกติกจะทำหน้าที่ผลิตกรดแลกติกซึ่งมีกลิ่นเฉพาะ กรดที่ผลิตออกมาจะทำให้ค่า pH ของน้ำหมักซีอิ๊วลดลง ช่วยปรับสภาพให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิต แอลกอฮอลล์และสารให้กลิ่นรสที่ดีแก่ซีอิ๊ว

2) ถั่วเหลือง เป็นแหล่งอาหาร โปรตีน แป้ง และไขมัน โดยปรกติในประเทศไทยจะใช้ถั่วเหลือง แต่ในบางประเทศเช่น ประเทศญี่ปุ่นนิยมใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมัน เป็นวัตถุดิบในการผลิตซีอิ๊ว เพราะนอกจากเป็นการลดต้นทุนแล้วยังทำให้ได้ปริมาณของไนโตรเจนในซีอิ๊วสูงกว่าการใช้ถั่วทั้งเมล็ด และ ใช้เวลาในการหมักเร็วกว่า

3) แป้งสาลี ช่วยลดความชื้นในถั่วนึ่งจากร้อยละ 60 เป็น 45 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อหมัก ในขณะที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ และยังเป็นแหล่งอาหารให้เชื้อราในโคจิเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ ซึ่งเป็ฯตัวกลางของน้ำตาล แอลกอฮอลล์ และกรดอินทรีย์ หลายชนิดโดยเฉพาะ กรดกลูทามิก ทำให้เกิดสารกลิ่น รส ขึ้นในซีอิ๊ว นอกจากนี้แป้งยังช่วยเพิ่มความสมบูรณ์ของสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการเจริญได้ดีและสร้างน้ำย่อยสลายโปรตีนในถั่ว ให้ซีอิ๊วเป็นไปอย่างรวดเร็ว

4) เกลือ เกลือเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อร่างกายมนุษย์ เกลือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของซีอิ๊ว สามารถป้องกันการสุกเกินไปของวัตถุดิบ ป้องกันการเกิดการเสื่อมเสีย และเป็นแหล่งให้รสเค็ม

5) น้ำ หน้าที่ละลายเกลือให้อยู่ในรูปของสารละลาย น้ำที่ใช้ต้องเป็นน้ำที่มีคุณภาพดีเพราะเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดในในการผลิตและมีผลต่อ สี-กลิ่นและรส ของผลิตภัณฑ์โดยตรง ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะต้องใช้น้ำที่มีมาตรฐานเป็นไปตามมาตรฐานของน้ำดื่ม

สำหรับขั้นตอนการผลิตซีอิ๊วนั้นสามารถทำได้ดังนี้

การผลิตซีอิ๊วในช่วงแรกก็จะเป็นการเตรียมถั่วเหลืองโดยการนำถั่วเหลืองมาล้างให้สะอาด คัดเลือกเอาส่วนที่ไม่ต้องการออกไป จากนั้นก็นำไปแช่น้ำนาน 15 ชั่วโมง เมื่อถั่วนิ่มตัวแล้วก็นำเอาถั่วเหลืองที่นิ่มไปนึ่งหรือต้มให้สุกโดยใช้หม้อต้มความดัน จากนั้นก็นำมาทำให้สะเด็ดน้ำและปล่อยให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง นำมาถั่วเหลืองกับแป้งสาลีคลุกเข้าด้วยกัน เติมเชื้อ *A. oryzae* และ *A. sojae* ร้อยละ 0.1-0.2 (Hesseltine. 1965 ; Yong and Wood. 1974) ในทางปฏิบัติเชื้อผสมประกอบด้วย *A. oryzae* ร้อยละ 80 และ *A. sojae* ร้อยละ 20 (Yokotsuka. 1960) เทส่วนผสมลงในกระด้ง วางบนชั้นในห้องบ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิประมาณ 25-30 $^{\circ}$C เชื้อราจะเจริญและมีผลทำให้อุณหภูมิของ

เชื้อหมักสูงขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องกลับเชื้อหมักบ้างประมาณ 2-3 ครั้งต่อรุ่น (Yokotsuka. 1960) หลังจากเวลาผ่านไป 3 วัน เชื้อราจะมีสีเขียวอมเหลืองตามสีของสปอร์เชื้อรา เรียกว่า โคจิ

หลังจากการผ่านการเลี้ยงเชื้อจนได้โคจิแล้วก็จะได้เป็นแผ่นแห้งพอสมควร ซึ่งก็จะนำไปเรียงใส่ในโอ่งมังกรขนาดใหญ่จนเกือบเต็ม หรือ 3/4 ของโอ่ง จากนั้นก็เตรียมน้ำเกลือความเข้มข้น 17-20% ใส่เข้าไปในโอ่ง โดยให้มีปริมาตรของลูกแป้งต่อน้ำเกลือเป็น 1 ต่อ 1-2 เท่า จากนั้นก็ปิดฝาเพื่อกันแมลงและน้ำฝนเข้า นำโอ่งไปตั้ง ตากแดดไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการหมัก ซึ่งถ้าเป็นฤดูร้อนก็จะใช้เวลา 3-4 เดือนก็จะได้ที่ แต่ถ้าเป็นฤดูฝนหรือฤดูหนาวก็จะกินเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 4-6 เดือน ในช่วงของการหมักในโอ่งมังกรนี้เรียกส่วนที่อยู่ในโอ่ง เรียกว่า โมโรมิ อาจเปิดฝามากวนบ้างเป็นบางโอกาส และในช่วงนี้จะเกิดปฏิกิริยาทางเคมีอันเนื่องมาจากน้ำย่อยต่างๆ มากมายรวมทั้งมีจุลินทรีย์อีกบางประเภทร่วมด้วยกันเช่น โปรตีนจะถูกย่อยเป็นเปปไทด์ (peptide) และกรดอะมิโนจากน้ำย่อยที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา ในช่วงแรกแป้งจะถูกย่อยเป็นสีน้ำตาลจากน้ำย่อยของเชื้อราในที่เลี้ยงในช่วงแรกน้ำตาลนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลกติก แอลกอฮอล์ แลคาร์บอนไดออกไซด์ความเป็นกรดของโมโรมิก็จะเพิ่มขึ้น คือ pH เปลี่ยนจาก 6.5-7 เป็น 4.5-4.8 ปริมาณเกลือที่ใส่เข้าไปโดยมี 17-19% ก็จะกำจัดเชื้อบางตัวออกไป และจะเหมาะสมในการให้เชื้อที่ต้องการเจริญเติบโตอันได้แก่ พวก Lactobacillus delbrueckii, Pediococcus holophilus, Saccharomyces rouxii, Saccharomyces hansenula ซึ่งเชื้อยีสต์และแบคทีเรียเหล่านี้จะสร้างกรดและแอลกอฮอล์ทำให้กลิ่นและรสชาติของซีอิ๊วเป็นไปตามที่ชอบมากขึ้น เมื่อผ่านการหมักในช่วงโมโรมิซึ่งสมบูรณ์หรือได้ที่แล้วมีอายุการหมักอย่างน้อย 3 เดือน สามารถนำมาสกัดเอาเฉพาะน้ำ เรียกว่าซีอิ๊วดิบ ตั้งซีอิ๊วดิบทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำไปผ่านการต้มฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 65-80 ^{0}C จากนั้นจึงนำไปกรองเพื่อกำจัดเอาตะกอนที่มีอยู่ออกไปก่อนบรรจุขวดจะได้ซีอิ๊วที่มีสีน้ำตาลปนแดงสด กลิ่นหอม รสเค็มพอสมควร และมีรสชาติที่น่ารับประทาน

ซีอิ๊วมีถั่วเหลืองเป็นแหล่งของสารอาหารทั้งโปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และวิตามิน ฉะนั้นการนำถั่วเหลืองมาทำเป็นซีอิ๊ว สารอาหารโปรตีนก็ยังเป็นสารอาหารหลัก เพียงแต่ชนิดของโปรตีนจะอยู่ในลักษณะที่ถูกย่อยแล้วให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง หรือปรากฏในรูปของกรดอะมิโน มากขึ้น อันเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ปริมาณของกรดอะมิโนกลูตามิก จะเป็นตัวทำให้เพิ่มรสชาติของผลิตภัณฑ์ให้น่าบริโภคมากขึ้น ขณะเดียวกันกรดไขมันและน้ำตาลในถั่วเหลืองจะถูกย่อยสลายและเปลี่ยนแปลงเป็นสารให้กลิ่นหอม มีสีเหลืองทองหรือสีน้ำตาล ชวนให้น่าบริโภค ผลจากการที่มีเอนไซม์จากจุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาย่อยสารอาหารในถั่วเหลืองทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีกลิ่น และเปลี่ยนเป็นรูปสารอาหารที่ถูกย่อยและดูดซึมได้ง่ายขึ้น ซึ่งเป็นผลดีในด้านโภชนาการ คุณสมบัติและองค์ประกอบของซีอิ๊วจึงขึ้นอยู่กับ อัตราส่วนของถั่วเหลืองและแป้งข้าวสาลีที่ใช้ในการหมัก ในการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีระหว่างกระบวนการหมักเป็นการย่อยสลายของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมและการพิจารณาถึงคุณค่าของซีอิ๊วจึงพบว่าซีอิ๊วที่มีการผลิตและจำหน่ายในท้องตลาดของบ้านเราจึงมีอยู่หลายลักษณะดังตาราง 3

ตาราง 3 มาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วของกระทรวงอุตสาหกรรม

คุณลักษณะ	ชนิด					
	ซีอิ๊วขาว		ซีอิ๊วดำเค็ม		ซีอิ๊วดำ	ซีอิ๊วหวาน
	ชั้นพิเศษ	ชั้นที่หนึ่ง	ชั้นพิเศษ	ชั้นที่หนึ่ง		
ปริมาณของแข็งที่ระเหยไม่ได้น้อยกว่าร้อยละของน้ำหนัก	32	32	35	32	50	50
เกลือ (คิดเป็นโซเดียมคลอไรด์) ร้อยละของน้ำหนัก	17-23	17-23	17-23	17-23	6-16	ไม่เกิน 1
น้ำตาลทั้งหมด(คิดเป็นน้ำตาลอินเวออ์ด)ไม่เกินร้อยละของน้ำหนัก	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
ความถ่วงจำเพาะที่ อุณหภูมิ $27 \pm 3^{\circ}$ซ ไม่น้อยกว่า	1.20	1.20	1.23	1.23	1.33	ไม่กำหนด

ที่มา: วันชัย สมชิต. (2527). ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย หน้า 116

หลักการวิเคราะห์

สำหรับงานวิจัยได้ศึกษาวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่างๆ ในซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองในอัตราส่วนที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ในช่วงระหว่างการหมักเพื่อหาปริมาณ เอนไซม์อะไมเลส โปรทีเอส ปริมาณน้ำตาล และปริมาณกรดอินทรีย์ โดยใช้เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และการหาปริมาณจุลินทรีย์โดยการเลี้ยงบนเพสเคาท์ และการวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วหลังจากที่หมักเป็นซีอิ๊วแล้วเพื่อหาปริมาณโลหะหนัก คือ ตะกั่ว แคดเมียม และทองแดง โดยใช้เทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรสโกปี และการหาปริมาณโปรตีนรวม ปริมาณเกลือ โดยเทคนิคการไทเทรต ดังนั้นจึงขอกล่าวถึงหลักการที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่างๆดังนี้

เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี

เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรีเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่สนใจทั้งในเชิงคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ โดยสามารถวิเคราะห์สารอินทรีย์และอนินทรีย์ได้ ทั้งนี้อาศัยหลักการที่สารที่จะวิเคราะห์สามารถดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตและแสงวิสิเบิล ซึ่งมีความยาวคลื่นในช่วง 190 – 800 นาโนเมตร พลังงานจากแสงในช่วงดังกล่าวมี

ผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลของสารโดยมีผลกระทบโดยตรงต่ออิเล็กตรอนในวงนอกสุดของสารทำให้มีพลังงานสูงขึ้น จึงเกิดการเปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็กตรอนจากสถานะปกติ หรือสถานะพื้นไปสู่สภาวะกระตุ้น ซึ่งอิเล็กตรอนนั้นๆ จะมีช่วงระยะเวลาไม่นานก็เกิดการสลายคายพลังงานส่วนเกินกลับสู่สภาวะปกติดังเดิม ผลการดูดกลืนและเกิดปรากฏการณ์นี้เองทำให้ถ้ามีการวัดความเข้มของแสงอัลตราไวโอเลตหรือแสงวิสิเบิลก่อนการดูดกลืนแสงของโมเลกุลและภายหลังการดูดกลืนแสงพบว่า ความเข้มแสงที่หายไปหรือลดลงนี้แปรผันตามความเข้มข้นของสารที่จะวิเคราะห์หรือที่ทราบคือ กฎของ เบียร์แลมเบร์ท (Beer Lambert's Law) ดังสมการที่(1)

$$A = \varepsilon bC \qquad \text{.....(1)}$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

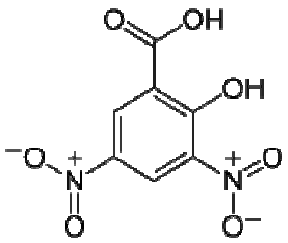
ε คือ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของสาร หรือ เรียกว่า ค่า molar extinction coefficient

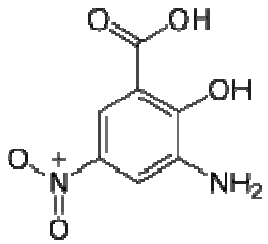
b คือ ระยะทางที่แสงผ่านสารตัวอย่าง

C คือ ความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์

ในการทดลองนี้ได้นำเทคนิคนี้ มาใช้ในการตรวจหาแอคติวิตีของอะไมเลส และ โปรตีเอส โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นซับสเตรทซึ่งในการทดลองนี้คือ แป้งในระบบ ซึ่งอาจมาจากแป้งในองค์ประกอบของถั่วเองและแป้งสาลีที่มีในส่วนผสมของการหมัก โดยอะไมเลสจะมีหน้าที่ย่อยแป้ง จนได้เป็นน้ำตาลที่มีขนาดเล็กลง โดยอาศัยกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลที่มีหมู่รีดิวซ์สามารถทำปฏิกิริยากับสารเคมีคือ 3,5-dinitrosalicylic acid ดังสมการที่ 2 (Miller, G.L.1959)

3,5-dinitrosalicylic acid + reducing sugar ----------> 3-amino,5-nitrosalicylic acid .....2)





ซึ่ง สาร 3-amino,5-nitrosalicylic acid มีความสามารถในการดูดกลืนแสงวิสิเบิลได้มากที่สุด ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหรือที่นิยมเรียกว่า HPLC เป็นเทคนิคการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) ที่นิยมใช้มากวิธีหนึ่ง โดยสามารถใช้กับงานด้านต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่นในการวิเคราะห์ทางอาหาร ยา ยาฆ่าแมลง ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ฯลฯ สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณในระดับไมโครกรัม ในกรณีทั่วๆ ไปหรือละเอียดถึงพิโคกรัม เมื่อเลือกหน่วยตรวจวัดที่เหมาะสม

HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูงสูบของเหลวหรือตัวทำละลาย ซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสารเคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นวัฏภาคคงที่ ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด สัญญาณที่ตรวจวัดได้ซึ่งอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ โดยสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม ประกอบด้วยพีคของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม

หลักการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในตัวอย่างส่วนผสมในระหว่างกระบวนการหมักซีอิ๊วด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงนี้ กรดอินทรีย์จะถูกแยกด้วยคอลัมน์และชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งทำการตรวจวัดสัญญาณด้วยดีเทคเตอร์ที่เหมาะสม ผลการทดลองที่ได้เป็นโครมาโทแกรม เมื่อนำพื้นที่ใต้พีค ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดอินทรีย์ ก็สามารถคำนวณหาปริมาณกรดในสารตัวอย่างได้

เทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรสโกปี (Atomic Absorption Spectroscopy)

เทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรสโกปี สามารถวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เทคนิคนี้ใช้หลักการศึกษาและการวัดการดูดกลืนหรือการเปล่ง (emission) รังสีอุลตราไวโอเลตหรือแสงที่แลเห็นได้ โดยอะตอมของธาตุ

อะตอมมิกแอบซอร์บชันเป็นกระบวนการที่เกิดจากอะตอมเสรีของธาตุดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นอันหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของธาตุ ธาตุแต่ละชนิดมีระดับพลังงานแตกต่างกัน จึงมีการดูดกลืนพลังงานแตกต่างกัน เช่น อะตอมของโซเดียมจะดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 589 นาโนเมตร เพราะแสงที่ความยาวคลื่นนี้เป็นแสงที่มีพลังงานพอดีที่จะทำให้อิเล็กตรอนของโซเดียมอะตอมเกิดการเปลี่ยนสถานะจากสถานะพื้นไปสู่สถานะกระตุ้น ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัวของธาตุแต่ละชนิด ในการทำให้อะตอมของธาตุในสารประกอบเกิดเป็นอะตอมเสรีได้นั้น ต้องมีการดูดกลืนพลังงานเข้าไป ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปต่างๆ กัน เช่น พลังงานความร้อนจากเปลวไฟ หรือความร้อนจากไฟฟ้า เป็นต้น ความร้อนจะทำให้เกิดกระบวนการแตกตัว หรือเปลี่ยนให้เป็นไอ หรืออาจแตกตัวเป็นอะตอม หรือทำให้อะตอมอยู่ในสถานะกระตุ้น หรืออาจกลายเป็นไอออนก็ได้

การดูดกลืนแสงโดยอะตอมจะเป็นไปตามกฎของแลมเบิร์ตและเบียร์ (Lambert – Beer's law) ซึ่งกล่าวว่าเมื่อความยาวคลื่นของแสงมีค่าคงที่ปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนจะมีความสัมพันธ์แบบเอกซ์โพเนนเชียลกับระยะทางที่แสงเคลื่อนที่ผ่านอะตอมและความเข้มข้นของอะตอมภายในเซลล์ที่ใช้บรรจุอะตอม สัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของอะตอมเป็นค่าที่แสดงว่าอะตอมนั้นดูดกลืน

แสงได้มากน้อยเพียงใด ค่านี้จะขึ้นอยู่กับธรรมชาติของอะตอมและความยาวคลื่นของแสงที่ถูกดูดกลืน

อะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ใช้วัดความเข้มข้นของตะกั่ว แคดเมียม และทองแดง เพื่อหาสารเจือปนในซีอิ๊ว

<u>การไทเทรต (Titration)</u>

การไทเทรตเป็นวิวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างที่เป็นสารละลาย โดยการวัดปริมาตรของสารละลายไทแทรนต์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนซึ่งทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลายตัวอย่าง การไทเทรตแบ่งออกเป็น 4 ประเภทตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ

1. การไทเทรตแบบกรด – เบส (Acid – Base Titration)
2. การไทเทรตแบบตกตะกอน (Precipitation Titration)
3. การไทเทรตแบบเกิดสารเชิงซ้อน (Complex metric Titration)
4. การไทเทรตแบบเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox Titration)

การไทเทรตสามารถแบ่งได้ 3 วิธี คือ

1) การไทเทรตโดยตรง (Direct Titration) เป็นการไทเทรตที่เกิดปฏิกิริยาโดยตรงระหว่างสารตัวอื่นซึ่งมีปริมาณสมมูลกับสารที่ต้องการวิเคราะห์กับสารละลายมาตรฐาน

2) การไทเทรตแบบอ้อม (Indirect Titration) เป็นการไทเทรตระหว่างสารละลายมาตรฐานกับสารตัวอื่นซึ่งมีปริมาณสมมูลกับสารที่ต้องการวิเคราะห์

3) การไทเทรตแบบย้อนกลับ (Back Titration) เป็นการเติม reagent ที่ราบปริมาณหรือความเข้มข้นที่แน่นอนลงในสารละลายที่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้มากเกินพอ จากนั้นทากรไทเทรตหาปริมาณ ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับสารที่ท้องการวิเคราะห์

ในการวิเคราะห์หาปริมาณของคลอไรด์ในซีอิ๊วนี้เป็นการใช้เทคนิคการไทเทรตแบบตกตะกอน ด้วยวิธีการไทเทรตแบบย้อนกลับ (Back Titration) โดยเป็นการเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ซึ่งเป็นไทแทรนต์ลงไปให้มากเกินพอและทราบปริมาณที่แน่นอนแล้วไทเทรตหาปริมาณซิลเวอร์ไนเตรตส่วนเกินที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาด้วยสารละลายมาตรฐานของไทโอไซยาเนต ใช้เฟอร์ริคอะลัมเป็นอินดิเคเตอร์ ที่จุดยุติจะเห็นสารละลายแดงของ $Fe(SCN)^{2+}$ ดังสมการ

$$Ag^{+} + SCN^{-} \rightleftharpoons AgSCN \qquad \text{.....4)}$$

$$Fe^{3+} + SCN^{-} \rightleftharpoons Fe(SCN)^{2+} \qquad \text{.....5)}$$

ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใช้เทคนิคฟอร์มาลดีไฮด์ไทเทรชัน (formaldehyde titration)ซึ่งเป็นเทคนิคการไทเทรตแบบกรดเบส โดยที่สารละลายฟอร์มัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยาที่หมู่ อะมิโน เมื่อนำไปไทเทรตกับสารละลายเบสจะเกิดปฏิกิริยาตามสมการที่ 6

$$\text{- R -}NH_2 + HCHO + KOH \rightarrow \text{R – NCHO} + 2H_2O \qquad \text{.....6)}$$

COOK COOK

จากการศึกษาทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัยได้ศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วโดยนำกรรมวิธีที่ได้ศึกษามาทดลองทำวิจัยหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะซึ่งเป็นถั่วในท้องถิ่นโดยได้ทำการหมักซีอิ๊วจากถั่วเหลืองเพื่อสูตรควบคุมควบคู่กันไป และนอกจากนี้ได้ทดลองหาอัตราส่วนผสมของถั่วมะแฮะต่อถั่วเหลืองในการหมักซีอิ๊วหลังจากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ทั้งระหว่างกระบวนการหมักโดยศึกษาปริมาณของเอนไซม์อะไมเลส โปรทีเอส กรดอินทรีย์ กรดอะมิโน ปริมาณจุลินทรีย์ และค่า pH อีกทั้งได้ศึกษาวิเคราะห์คุณภาพของซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรม โดยการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จารุณี มีจุ้ย และไทกิ คามิจิมา (2536) ทำการศึกษาการเจริญของเชื้อบักเตรีแลกติก ยีสต์ทั้งหมด และ *Saccharomyces rouxii* ตลอดระยะเวลาการหมักน้ำเกลือของซีอิ๊วเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าจำนวนของบักเตรีแลกติกจะเพิ่มสูงสุด 2.5X108 เซลต่อกรัม ภายใน 3 สัปดาห์แรกของการหมักลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนจำนวนยีสต์ทั้งหมดจะลดลงในระยะ 2 สัปดาห์แรกของการหมักหลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นจนตรวจนับได้ในปริมาณสูงสุด 2.7X108 เซลต่อกรัม หลังจากการหมักได้นา 6 สัปดาห์ จำนวนยีสต์ *S. rouxii* จะเพิ่มขึ้นในช่วงที่บักเตรีแลกติกเริ่มลดลงอย่างช้าๆ จากการศึกษาความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีเกลือ *Pediococcus halophilus* จำนวน 26 ไอโซเลต พบว่าบักเตรีพวกนี้สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีเกลือ 10 % และไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีเกลือ ส่วนยีสต์ *S. rouxii* จะแสดงความเป็น obligate haligate halophile ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 °C แต่ที่อุณหภูมิห้อง จะแสดงคุณสมบัติเป็น halophile นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนทั้งหมด ฟอร์มอลไนโตรเจน น้ำตาลรีดิ้ว กรด พีเอช และโซเดียมคลอไร พบว่าในช่วงที่การเจริญของบักเตรีแลกติกเพิ่มขึ้นนั้น ปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ pH ลดลงอย่างรวดเร็วจาก 5.70 ลงเหลือ 4.77 ซึ่งในช่วงนี้ *S. Rouxii* จะเพิ่มขึ้นจำนวนมากขึ้น ส่วนปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอร์มอลไนโตรเจน และน้ำตาลรีดิวซิงค์จะเพิ่มขึ้นในช่วง 1-3 สัปดาห์แรกของการหมักและจะค่อยๆ ลดลง ส่วนเกลือโซเดียมคลอไรด์จะมีประมาณคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก

นภา โล่ทอง. (2531). รายงานถึงจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในระยะหมักน้ำเหลือ ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียสร้างกรดแลกติกที่ทนเกลือ เช่น *Lactobacillus delbrueckii* และ *Pediococcus halophils* แบคที เรียทั้งสองชนิดจะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลกติก ทำให้ภาวะภายในถังหมักเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสติ คือ *Saccharomyces rouxii* และ *Torulopsis holmii* ซึ่งจะหมักน้ำตาลให้ได้แอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นรสอื่นๆ แบคทีเรียและยีสต์ดังกล่าวมีอยู่ทั่วไปในบรรยากาศ แต่น้ำซีอิ๊วที่ผลิตได้รุ่นแรกมีคุณภาพกลิ่นรสไม่ดีนัก เนื่องจากจุลินทรีย์แพร่กระจายน้อย

นิรมล ล้อสุริยนต์ (2536) ได้ศึกษาการนำถั่วมะแฮะมาพัฒนาเป็นอาหารเช้าสำเร็จรูปชนิดแผ่น จากผลการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้า และเยื่อใย เท่ากับร้อยละ 3.85 16.35 2.12 76.84 3.12 และ 1.57

มิลลิกรัม ตามลำดับ มีปริมาณเกลือแร่และวิตามินได้แก่ ตุเหล็ก ไทอามีน โทโปฟาวิน ไนอาซีน เท่ากับ 3.65 1.75 0.38 4.40 มิลลิกรัม ตามลำดับ และวิตามิน 216.67 เรตินอล มีจำนวนจะลินรีย์ทั้งหมด 70 โคโลนีต่อกรัม ยีสต์และราน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาพบว่าสามารถเก็บได้ทั้งห้องปรับอากาศและห้องธรรมดาเป็นระยะเวลานาน 10 สัปดาห์ การสำรวจความพึงพอใจของผู้บริโภคจากจำนวน 200 คน พบว่า ความชอบในผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับปานกลาง ร้อยละ 81 และพบว่า ร้อยละ 46 ยินดีที่จะซื้อผลิตภัณฑ์

สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ (2522). รายงานเกี่ยวกับจุลินทรียทีเข้ามามีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการหมักน้ำเกลือ คือแบคทีเรียและยียต์ที่สามารถเจริญในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆ ได้ แบคทีเรียดังกล่าวเป็นประเภทที่สร้างกรดแลกติกได้จากน้ำตาล โดยผ่านแระบวนการ glycolysis ซึ่งจะทำให้ pH ลดลง แบคทีเรียประเภทนี้ ได้แก่ *Pediococcus halophils*, *Pediococcus soyae* และ *Lactobacillus delbrueckii* สำหรับยีสต์ที่มีหน้าที่สำคัญโดยให้น้ำตาลในน้ำซีอิ๊วสร้างเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งรวมกับสารอื่น เกิดเป็นสารให้กลิ่นรสน้ำซีอิ๊ว ยีสต์ที่พบมาได้แก่ *Saccharomyces rouxii* ลำดับต่อมาคือ *Torulopsis* และที่พบบ้างเล็กน้อยคือ *Pichia, Debaryomyces* และ *Candida* โดยมีข้อเสนอแนะตามรายงานนี้คือควรใช้สารพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพสูงแทนการใช้เชื้อธรรมดา

สถาบันวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. (2527). ใช้วิธีการผลิตน้ำซีอิ๊วแบบธรรมชาติโดยการหมักโมโรมิจะเติมน้ำเกลือลงไปในโคจิ ทำให้ความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นถึงร้อยละ 17-20 จุลินทรีย์บางชนิดถูกกำจัดออกไป และเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus delbrueckii, Pediococcus halophils*, *Saccharomyces rouxii* และ *Hansenula* แบคทีเรียและยีสต์เหล่านี้จะสร้างกรดแลกติกและแอลกอฮอล์ ทำให้กลิ่นและรสชาติของน้ำซีอิ๊วดีขึ้น

สมชาย จอมดวง. (2533) ทำการศึกษาการใช้ข้าวสาลีไทยใน 3 รูปแบบ คือ แป้งข้าสาลีทั้งหมด ข้าวสาลีบดแตกและข้าวสาลีทั้งเมล็ด เปรียบเทียบกับแป้งขนมปัง โดยผสมกับถั่วเหลืองนึ่งสุก และคลุกด้วยเชื้อราผง *A. oryzae* นำส่วนผสมเทใส่กระด้งแล้วเพาะให้เชื้อราเจริญขึ้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเพาะ นำส่วนผสมที่ได้ผสมกับน้ำเกลือ ซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 22 แล้วหมักในโรงหมักเปรียบเทียบกับห้องควบคุมอุณหภูมิ พบว่าในระหว่างการเพาะโคจิอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 43 องศาเซลเซียส โคจิที่มีส่วนผสมของข้าวสาลีบดแตกมีคุณภาพดีที่สุด ค่าความเป็นกรด และ pH เปลี่ยนแปลงมากในช่วง 3 สัปดาห์แรกและค่อนข้างคงที่จนหมักครบ 16 สัปดาห์ ความเข้มข้นของเกลือในเต้าเจียวเริ่มต้นมีค่าประมาณร้อยละ 17 เมื่อหมักครบ 16 สัปดาห์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 20-21 เต้าเจี้ยวที่หมักในโรงหมักจะมีสีเข้มกว่าการหมักในห้องควบคุมอุณหภูมิ เต้าเจี้ยวทีมีส่วนผสมของข้าวสาลีบดแตกมีคุณภาพดีที่สุด

สมชาย ประภาวัต. (2541) ศึกษาการทำคุกกี้จากถั่วเขียวผิวดำเปรียบเทียบกับถั่วเขียวและถั่วมะแฮะผลการศึกษาพบว่าสามารถให้แป้งถั่วมะแฮะผสมในแป้งสาลีได้สูงถึงร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก จะได้ปริมาณโปรตีน ไขมัน ร้อยละ 7.56 และ 28.47 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

ซีดับบลิว เฮทเซลไทน์ และ เค ชิบาซากิ (C.W. Hesseltine and K. Shibasaki. 1961)) ได้ศึกษาการหมักเต้าเจี้ยวแบบดั้งเดิมโดยการเติมยีสต์ *S. rouxii* พบว่า คุณภาพดีของเต้าเจี้ยวนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับการเตรียมถั่วเหลืองแล้วยังขึ้นกับ การเพิ่มเชื้อ *S. rouxii* โดยเติมยีสต์ในส่วนผสมที่ทำการหมักและแยกเอาเกลือออกก่อน วิธีการนี้สามารถนำมาใช้ในการผลิตเต้าเจี้ยวจำนวนมาก

เอ เค ลูนดา และเอส ดัส (A.K.Lundu and S.Das .1969) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตอะไมเลสในของน้ำหมักแบบดั้งเดิมโดยใช้ *A. oryzae* พบว่า สามารถแยกอะไมเลสได้แตกต่างกันตามชนิดของตัวกลาง และ ค่า pH

อัมเรต ภูมิรัตน์ ที ดับบลิวเฟลเจล ที กลิ่นสุคณ และ ดับบลิว สมพอรัน (A.Bhumiratana, T.W.Flegel, T.Glinsukon and W.Somporan .1980) ได้ทำการแยก *Aspergillus* 5 ชนิด และมี รา เมือก 1 ชนิด เปรียบเทียนกับสายพันธุ์ *A. oryzae* จากญี่ปุ่นโดยใช้ซับเสตรทจากประเทศญี่ปุ่น และพบว่า *A. flavus*. Var *columnaris* มีประสิทธิภาพในการผลิต โปรทีเอสมากที่สุด และสามารถตรวจพบเชื้ออัลฟาทอกซินที่อยู่ในกระบวนการผลิต

อรรถวุธ อิ่มพูลทรัพย์ อัมเรต ภูมิรัตน์ และทิโมธี ดับบลิวเฟลเจล (A. Impoolsup, A. Bhumiratana and Timothy W.Flegel. 1981) ได้ศึกษาการแยก proteases ในสภาวะที่เป็นกลางกับ สภาวะเบส จากเชื้อรา *Aspergilus flavus*. Var *columnaris* ในซีอิ๊วช่วง การหมักโคจิ และทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยการใช้การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ก่อนการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีที่มี diethylaminoethy – Sephadex A – 50 , carboxymethycellulose CM – 52 และ Sephadex G – 100 เป็นตัวแยก พบว่าการอธิบายเกี่ยวกับการหมักซีอิ๊วช่วงโคจิ ดังกล่าวข้างต้นจะทำให้ผลของผลผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมดีขึ้น

ยัง และวูด (Yong and Wood.) ได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus delbrueckii,* และ *Saccharomyces rouxii* ในดมโรมิ พบว่าช่วง pH ที่ *Lactobacillus delbrueckii,* มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดคือ 5.0-5.5 และของ *Saccharomyces rouxii* คือ 5.0 pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดคือ pH 5.0

การศึกษางานวิจัยในครั้งนี้จะได้นำงานวิจัยที่เกี่ยวข้องนี้ไปเป็นส่วนหนึ่งของศึกษาด้านกระบวนการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักโมโรมิ เพื่อติดตามการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส โปรทีเอส จากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้เติมลงไปและค่าของ pH ทีมีผลต่อการสร้างกรดอินทรีย์ซึ่งจะทำให้กลิ่นและรสของซีอิ๊วดีขึ้น และนอกจากนี้ได้ทราบถึงองค์ประกอบถั่วมะแฮะเมื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ทางอาหารด้านต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบในงานวิจัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองแบ่งเป็น 2 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 ขั้นตอนการทำการทดลองเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมักและเพื่อวิเคราะห์คุณภาพของซีอิ๊ว

ตอนที่ 2 การเผยแพร่ข้อมูล

ตอนที่ 1 ขั้นตอนการทำการทดลองเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมักและเพื่อวิเคราะห์คุณภาพของซีอิ๊ว

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือระยะที่ 1 เป็นขั้นตอนการหมักซีอิ๊ว ซึ่งได้ทำการทดลองในพื้นที่อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน และห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ระยะที่ 2 เป็นการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ และระยะที่ 3 เป็นการวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊ว โดยได้ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยมีรายละเอียดดังนี้

<u>การเตรียมเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. <u>เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>
   - เครื่องอุลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet visible spectrophotometer)
   - เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)
   - เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Atomic Adsorption Spectrophotometer)
   - เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Precisa รุ่น 205 A Superbalance series
   - เครื่องปั่นไฟฟ้า
   - เครื่องอบลมร้อน
   - เครื่อง Vortex

2. <u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง</u>
   - ไหดินเคลือบ
   - กระด้ง
   - ผ้าขาวบาง
   - หม้อสำหรับนึ่งวัตถุดิบ
   - ไม้พาย
   - อุปกรณ์เคมีพื้นฐาน
3. <u>วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>
   1. วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการหมักซีอิ๊ว
      - ถั่วมะแฮะ จากอำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน
      - ถั่วเหลืองคัดพันธุ์ ตราไร่ทิพย์ ผลิตโดยบริษัทไร่ธัญญะจำกัด
      - แป้งสาลี ตราบัวแดงผลิตโดยบริษัทยูไนเต็ดฟลาวมิลล์ จำกัด (มหาชน)
      - เกลือ จากอำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน
      - เชื้อ *A. oryzae* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
   2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลองวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก
      - โฟลินรีเอเจนต์ (Folin reagent) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
      - ไตรคลอโรอะซีติก (Trichllocroacetic acid) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
      - โปรตีนมาตรฐานที่แยกจากถั่วเหลือง (Soy Protein Isolate)
      - โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศฝรั่งเศส
      - กรดอะมิโนไทโรซีน (Amino tyrosine) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
      - ไดไนโตรซาลิกไซลิก (Dinitrosalicylic acid) ของบริษัท Fluka ประเทศสวิทเซอร์แลนด์
      - กลูโคส (Glucose) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศผรั่งเศส
      - อาหารเลี้ยงเชื้อโปเตโตเดกซโตรอาการ์ (Potato dextrose agar)
      - นิวเตรียนอาการ์ (Nutrient agar)
      - เพนนิซิลินจีโซเดียม (Penicillin G sodium)ของบริษัทเอ็มแอนเอชเมนูแฟคทูริงค์ ประเทศไทย
      - กรดไอโดรคลอริก (Hydrochloric acid) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
      - กรดแลกติกมาตรฐาน (Lactic acid) ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน
      - กรดอะซีติกมาตรฐาน (Acetic acid) ของบริษัท Carlo Erba ประเทศผรั่งเศส
      - กรดซิตริกมาตรฐาน (Citric acid)
      - อัลฟากรดอะมิโนบิวไทริค (α- Aminobutyric acid)

- กรดอะมิโนมาตรฐาน (Amino acid standard H) ของบริษัท Pirce ประเทศสหรัฐอเมริกา
- อะซิเตทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Acetate – Phosphate Buffer pH 5.02) ของบริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา Waters, USA
- เอซีซีคิว แทกอีเลนท์ (AccQ Tag Eluent A)
- เอซีซีคิว โฟลรีเอเจนท์คิต (AccQ-Fluor™ reagent kit)
- เอบีเอเอ (ABAA) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- อะลานีน (Alanine) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ไคซ์ซิน (Cysteine) ของบริษัทซิ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- กลูตามีน (Glutamine) ของบริษัท Sigmaประเทศสหรัฐอเมริกา
- ฮิสทิดีน (Histidine) ของบริษัท Sigmaประเทศสหรัฐอเมริกา
- ไฮโดรซีพราลิน (Hydroxy praline) ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน
- เมทไทโอนีน (Methionine) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- โปรลีน (Proline) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดลองวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊ว
   - เพนนิซิลินจีโซเดียม (Penicillin)
   - ซิลเวอร์ไนเตรท (Silver)
   - โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)
   - แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate)
   - โปตัสเซียมไทโอไซยาเนต (Potassium thiocyanate)
   - เฟอร์ริคอะลัม (Ferric alum)
   - ไนโตรเบนซีน (Nitro benzene)
   - ฟอร์มาลดีไฮด์ (Formaldehyde)
   - โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
   - ฟีนอลฟ์ทาลีน (Phenolphthalein)
   - โปตัสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (Potassium hydrogen phthalate)

<u>วิธีการดำเนินการทดลอง</u>

1. วิธีการหมักซีอิ๊ว

1. ศึกษาข้อมูล รวบรวมผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. เก็บและคัดถั่วมะแฮะที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบในการหมัก

3. จัดหาวัตถุดิบอื่นๆที่ต้องใช้ในกระบวนการหมัก แป้งสาลี เกลือ น้ำสะอาดรวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ สายพันธุ์ *A. oryzae*

4. จัดหาภาชนะสำหรับทำการหมัก คือ ไหดินเคลือบ ผ้าขาวบาง กระด้ง ตามจำนวนสูตรที่วางแผนไว้ รวมทั้งชุดกลุ่มควบคุมที่ใช้ถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลัก

5. แช่ถั่วเหลือง ถั่วมะแฮะที่คัดสรรแล้วในน้ำสะอาด เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และนำไปนึ่งจนสุก

6. นำถั่วที่นึ่งแล้วมาใส่บนกระด้งคลุกเคล้ากับแป้งสาลีในอัตราส่วน 3:1 แล้วนำเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ สายพันธุ์ *A. oryzae* มาผสม คลุกเคล้าให้ทั่ว พร้อมพรมน้ำสะอาดเพื่อให้เกิดความชื้นที่เหมาะสม ก่อนจะคลุมด้วยผ้าขาวบางที่สะอาดผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บส่วนผสมในที่ได้ไว้ในที่ที่มีอากาศถ่ายเท บ่มไว้นาน 72 ชั่วโมง เรียกว่าการหมักช่วงโคจิ

7. นำส่วนผสมที่ได้มาตรวจดูการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *A. oryzae* เมื่อเชื้อราเจริญ จะสังเกตเห็นสีเขียวอ่อนเกิดขึ้น จึงจะนำไปผ่านกระบวนการหมักต่อ

8. นำไปบรรจุลงในโอ่งดินเคลือบ เติมน้ำเกลือที่เข้มข้นความเข้มข้น 20% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปิดฝาโอ่งด้วยผ้าขาวบาง นำไปตากแดดเพื่อเร่งปฏิกิริยาการหมัก ทำการคนเป็นระยะๆ ในช่วงนี้เรียกว่าการหมักช่วง โมโรมิ

9. เก็บตัวอย่างส่วนผสมทุกสูตรเป็นระยะๆ ตั้งแต่ เริ่มหมัก (0 วัน) 10 20 30 45 60 75 และ 90 วัน เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์อะไมเลส โปรทีเอส และปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณกรดอะมิโน ปริมาณจุลินทรีย์ และค่า pH

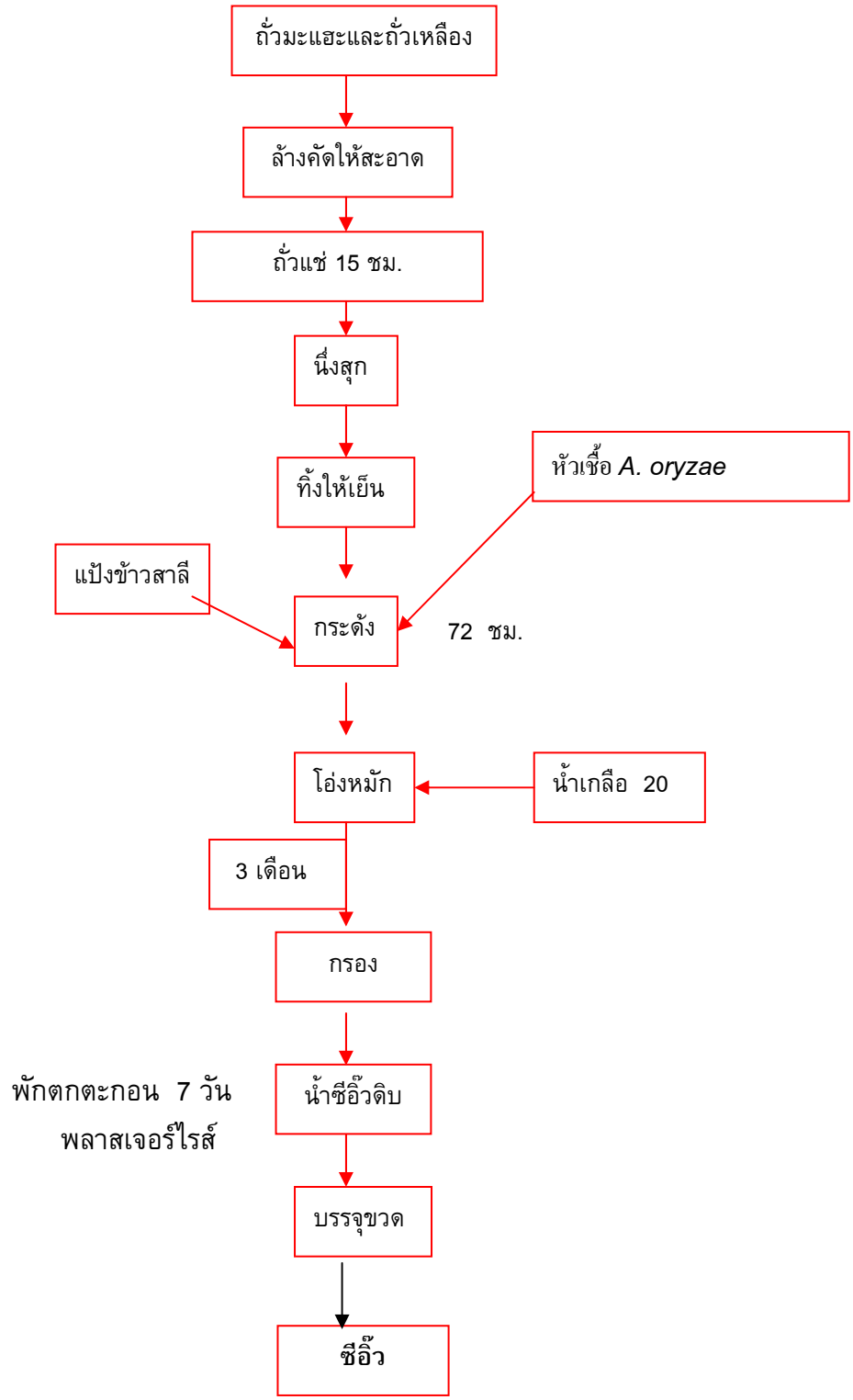
10. เมื่อครบกำหนดเวลา 90 วัน นำส่วนผสมมากรองด้วยผ้าขาวบาง จนได้น้ำซีอิ๊วดิบ ตั้งทิ้งไว้ 7 วัน เพื่อให้ตกตะกอน หลังจากนั้นนำน้ำซีอิ๊วไปทำการพาสเจอร์ไรซ์โดยต้มที่อุณหภูมิ 80-85 ^{0}C นาน 10-15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อและตกตะกอนโปรตีน กรองเอาตะกอนออกก่อนนำไปบรรจุขวด ซึ่งได้แสดงแผนการทดลองในแผนภาพที่ 1

11. นำน้ำซีอิ๊วแต่ละสูตรที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้วไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาล ปริมาณเกลือ และปริมาณโลหะหนัก

2. วิธีการทดลองวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก

ในงานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างซีอิ๊วระหว่างการหมักเป็นระยะเวลาต่างๆ ดังนี้ คือ 0 10 20 30 45 60 75 และ 90 วัน ตามลำดับเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก ดังนี้ การเก็บตัวอย่างทุกช่วงระยะเวลาที่กำหนดสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ อะไมเลส โปรทีเอส ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณจุลินทรีย์ ตรวจวัดค่า pH ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนได้นำตัวอย่างที่เก็บเฉพาะ 0 60 และ 90 วัน ตามลำดับ

กระบวนการหมักซีอิ๊วจัดทำเป็นขั้นตอนดังแสดงให้เห็นชัดในภาพประกอบ



ภาพประกอบ 2 กระบวนการหมักซีอิ๊ว

<u>หมายเหตุ</u> อัตราส่วนของถั่วมะแฮะต่อถั่วเหลือง โดยมีการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนตามสูตร

<u>การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ อะไมเลส และโปรทีเอส วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์อะไมเลส และโปรทีเอส</u>

การสร้างกราฟมาตรฐานเอนไซม์ อะไมเลส

1. ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1% ใส่หลอดทดลอง 6 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เติมเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เวลา นาน10 นาที

3. เติมสารละลายไดไนโตรซาลิกไซลิก (DNS) 1.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่า Vortex

4. ต้มนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

5. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลตวิสิเลสเปกโทรมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ อะไมเลส

1. ปิเปตตัวอย่าง 0.75 มิลลิลิตรเติมสารละลายไดไนโตรซาลิกไซลิก 0.75 มิลลิลิตร

2. นำไปต้มนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

3. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลตวิสิเลสเปกโทรมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การสร้างกราฟมาตรฐานเอนไซม์ โปรทีเอส

1. ปิเปตสารละลาย Soy Protein Isolate (SPI) มาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง 6 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เติมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ที่ pH 6.8 ลงไป 352ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 625 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ 100 ไมโครลิตร

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เวลา 30 นาที

3. เติมไตรคลอโรอะซีติกความเข้มข้น 50 % ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่า

4. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที

5. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลตวิสิเลสเปกโทรมิเตอร์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ โปรทีเอส

1. ปิเปตตัวอย่าง 0.75 มิลลิลิตร เติมสารละลายไดไนโตรซสลิกไซลิก 0.75 มิลลิลิตร

2. นำไปต้มนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

3. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรมิเตอร์

<u>การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์</u>

นำตัวอย่างที่กรองแล้วมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและกรดอินทรีย์ สารอินทรีย์ที่เกิดจากการผลิตของเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างซีอิ๊ว คือ กรดซิตริก กรดแลกติก กรดอะซิติก ที่เกิดจากกิจกรรมการย่อยของจุลินทรีย์ ทำการวัดโดยใช้น้ำหมักที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 nm ผ่านเข้า HPLC ที่ต่อกับคอลัมน์ Aminex HPX-87 H (BioRad, Hercules, Calif., USA) ที่มีกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5 mM เป็น mobile phase กรดอินทรีย์จะถูกวัดด้วย Waters 996 Photodiode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 210 nm น้ำตาลถูกวัดด้วย Waters 410 Differential Refractometer Detector (Millipore Corp., Milford, MA, USA)

<u>การวิเคราห์ปริมาณจุลินทรีย์</u>

นำตัวอย่างทั้งหมดตัวอย่างละ 1 กรัมเปียก มาทำการเจือจางด้วยการเตรียมตัวอย่างทั้งหมดที่จะใช้สำหรับนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย รา และ ยีสต์ โดยเตรียม Potato Dextrose Agar (PDA) และ Nutrient Agar (NA) เพื่อใช้เป็นอาหารของราและแบคทีเรีย ตามลำดับ ปรับค่า pH ของอาหาร PDA ด้วยการเติม 2M HCL 1 mL/L และเติม antibiotic Penicillin G (100 mg/L)จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างที่ความเจือจางที่เหมาะสมให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ 30–300 CFU /mL และใส่ลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 1 mL และเทอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ^{O}C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงสำหรับการนับจำนวนแบคทีเรีย และ 48-72 ชั่วโมงสำหรับการนับจำนวนราและยีสต์

<u>การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน</u>

การเตรียมสารละลายกรดอะมิโนผสมเพื่อใช้ในการตรวจสอบ

เตรียมกรดอะมิโนผสม ซึ่งประกอบด้วย อะลานีน (alanine) ซิสตีน (cystine) กลูตามิก (glutamic) ฮิสทิดิน (histidine) ไฮดรอกซีโปรลีน (hydroxyproline) เมไทโอนีน (methionine) และ โปรลีน (proline) เข้มข้นอย่างละ 20 มิลลิโมลาร์

การสกัดตัวอย่างถั่วหมักและ SNB

ทำการสกัดกรดอะมิโนอิสระชั่งตัวอย่า 1 กรัม ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสที่ได้ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดไตรคลอโอะซิติกเข้มน้นร้อยละ 5 ปริมาตร

0.8 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 *xg* เป็นเวลา 10 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วนใสสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

การเตรียมอนุพันธ์

ปิเปตสารละลายมาตรฐานภายใน ABAA เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงหลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตน้ำนาโนเพียว 780 ไมโครลิตร เติมสารละลายน้ำสกัดจากถั่วหมักปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองสารละลายที่ได้ผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ที่ต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ในหลอดปั่นขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Waters AccQ Fluor Borate buffer 70 ไมโครลิตร ลงในขวดสำหรับทำปฏิกิริยา เติมสารละลายตัวอย่างหรือ สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย AccQ Fluor Reagent 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการถ่ายสารละลายทั้งหมดลงใน insert glass จากนั้นประกอบเข้ากับขวดสำหรับเครื่อง HPLC ปิดฝาด้วย silicone-lined septum บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้ heating block

สำหรับสารละลายแบลงก์ ทำโดยใช้ Waters AccQ Fluor Borate buffer แทนการเติมสารละลายตัวอย่างหรือ สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนตัวอย่าง และทำตามขั้นตอนข้างต้น

เตรียมส่วนสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน ผสมสารละลายมาตรฐานภายใน ABAA เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ 20 ไมโครลิตร และกรดอะมิโนมาตรฐาน 40 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนาโนเพียว 940 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองและเก็บเพื่อเตรียมอนุพันธ์ของกรดะมิโน

การวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

วิเคราะห์สารประกอบอนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่เตรียมได้ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งต่อกับคอลัมน์ AccQ Tag C18 4 mm สารประกอบอนุพันธ์ชนิดต่างๆ ถูกแยกออกจากกันโดยฉีดสารประกอบดังกล่าวปริมาตร 5 ไมโครลิตร เข้าคอลัมน์ และชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ดังตาราง 3 โดย A = AccQTag eluent A pH 5.02 B = Acetonitrile HPLC grade C = Nanopure distilled water ตรวจวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง fluorescent detector (Water 2475, USA) โดยกำหนดให้ excitation wavelength เท่ากับ 250 nm และ Emission wavelength เท่ากับ 395 nm ประมวลผลและบันทึกด้วยโปรแกรม Millennium

ตาราง 4 สภาวะสำหรับการแยกกรดอะมิโน

Time (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	100	0	0
0.5	99	1	0
21.0	95	5	0
22.0	91	9	0
32.5	83	17	0
38.0	0	60	40
46.0	100	0	0
55.0	100	0	0

แปลผลด้วยวิธีใช้สารมาตรฐานภายใน (Internal standard method) โดยใช้ ABAA เป็นพีคมาตรฐานสำหรับการคำนวณของแต่ละโครมาโตแกรม ซึ่งสามารถคำนวณปริมาณกรดอะมิโนอิสระได้ ดังสมการ

$$DRf_X = \frac{A_{SD} \times C_{IS\text{-}SD}}{C_{SD} \times A_{IS\text{-}SD}}$$

$$C_x = \frac{A_X \times C_{IS}}{A_{IS} \times DR_{fX}}$$

โดยกำหนดให้

DRf_X = ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

A_{SD} = พื้นที่ใต้พีคของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในสารละลายกรดมาตรฐาน

C_{SD} = ความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในสารละลายกรดมาตรฐาน

$C_{IS\text{-}SD}$ = ความเข้มข้นของกรดอะมิโนมาตรฐานภายใน (ABAA) สารละลายกรดมาตรฐาน

$A_{IS\text{-}SD}$ = พื้นที่ใต้พีคของกรดอะมิโนมาตรฐานภายใน (ABAA) สารละลายกรดมาตรฐาน

C_{IS} = ความเข้มข้นของกรดอะมิโนมาตรฐานภายใน (ABAA) ในตัวอย่าง

A_{IS} = พื้นที่ใต้พีคของกรดอะมิโนมาตรฐานภายใน (ABAA) ในตัวอย่าง

C_x = ความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในตัวอย่าง

A_x = พื้นที่ใต้พีคของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในตัวอย่าง

3. การวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.)

ในงานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างซีอิ๊วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำการทดลองวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรม คือ การวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์ การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน กาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล และการวิเคราะห์หาโลหะ คือ แคดเมียม ทองแดง ตะกั่ว ตามขั้นตอนการทดลอง ดังนี้

การวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์ ทดลองตามวิธี AOAC

1. ปิเปตตัวอย่างหนัก 3 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่
4. เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จำนวน 20 มิลลิลิตร
5. เติมสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น 3.0 ฟอร์มอล จำนวน 5 มิลลิลิตรและเติมสารละลายเฟอร์รัสอะลัม 0.5-1.0 มิลลิลิตร
6. นำไทเทรตกับสารละลายโปตัสเซียมไทโอไซยาเนต เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้สารละลายสีแดงแสดงว่าปฏิกิริยาถึงจุดยุติ บันทึกปริมาตร เพื่อนำไปคำนวณ

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ทดลองตามวิธี AOAC

1. ปิเปตตัวอย่าง 1.4 มิลลิลิตร
2. เจือจางด้วยน้ำให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 12.5 มิลิลิตร ใส่ ในขวดรูปชมพู่
4. เติมฟอร์มาลดีไฮไฮด์ 37% 14 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที
5. นำไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.5 นอร์มอล โดยใช้ ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรตจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาณเบสที่ใช้ เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณโปรตีน

กาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ทดลองตามวิธี ฟีนอลซัลฟูริก

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 30 50 70 และ 90 ppm ใส่หลอดทดลอง 5 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร
2. จากนั้น เติม 4% สารละลายฟีนอล 0.5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่า จากนั้นเติมน้ำกลั่น 11.5 มิลลิลิตร
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลตวิสิเลสเปกโทรมิเตอร์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล

1. ปิเปตตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตร เติมน้ำ 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองและปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง จากนั้น เติม 4% สารละลายฟีนอล 0.5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า

3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่า จากนั้นเติมน้ำกลั่น 11.5 มิลลิลิตร

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรด้วยเครื่องอุลตราไวโอเลตวิสิเลสเปกโทรมิเตอร์ นั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาล

การวิเคราะห์หาโลหะ คือ Cd, Cu, Pb ในเตาเจี้ยวและซีอิ๊ว

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Cd, Cu, Pb ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.25, 0.5, 1.0 , 1.5, 2.0 ppm นำสารละลายมาตรฐานแต่ละชุดไป ผ่านเข้าเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรมิเตอร์ เพื่อบันทึกค่าการดูดกลืนแสง โดย การวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่ว จะบันทึกการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 217 นาโนเมตร การวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียม จะบันทึกการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 273 นาโนเมตร การวิเคราะห์หาปริมาณทองแดง จะบันทึกการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 324.8 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟมาตรฐานแต่ละชนิด

2.นำตัวอย่างมาทำย่อย โดยปิเปตตัวอย่างซีอิ๊วมา 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดไนตริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อน จนกระทั่งควันสีน้ำตาลหมดไป

3 นำสารละลายตัวอย่างแต่ละชุดไป ผ่านเข้าเครื่องอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรมิเตอร์ เพื่อบันทึกค่าการดูดกลืนแสง โดย การวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่ว แคดเมียม และ ทองแดง ตามสภาวะในข้อ 1ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

ตอนที่ 2 การเผยแพร่ข้อมูล

1. จัดเสนอผลงานวิชาการต่อสาธารณชนโดยการจัดป้ายนิเทศ

1.1 นำเสนอผลงานวิชาการในวโรกาสสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เสด็จติดตามงานในโครงการพระราชดำริ ณ ศูนย์ภูฟ้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2550

1.2 นำเสนอผลงานวิชาการ ในการประชุมวิชาการ “วิทยาศาสตร์นเรศวร ครั้งที่ 1 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก วันที่ 15-16 มีนาคม 2550

2. ส่งเสริมความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับถั่วมะแฮะ ตลอดจนเสนอแนวทางในการใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะในการนำไปหมักซีอิ๊วให้แก่ชุมชน กลุ่มผู้สนใจ

2.1 จัดแสดงผลงานแก่กลุ่มแม่บ้าน บ้านนากอก หมู่ที่ 1 ตำบลภูฟ้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน

2.2 จัดส่งเสริมความรู้เรื่องการหมักเต้าเจี้ยวและซีอิ๊วแก่กลุ่มฝึกอาชีพ อำเภอปัว จังหวัดน่าน

2.3 ส่งเสริมความรู้เรื่องการหมักเต้าเจี้ยวและซีอิ๊วแก่นักเรียนช่วงชั้นที่ 2 โรงเรียนบ้านนากอก อำเภอบ่อเกลือ สำนักงานเขตพื้นที่การศึกษาน่าน เขต 2 จังหวัดน่าน

3. เพิ่มเติมในการจัดการเรียนการสอนในวิชาวิทยาศาสตร์ สาระสิ่งมีชีวิตกับกระบวนการดำรงชีวิต โดยจัดทำแผนการสอนบูรณาการ ที่เกี่ยวข้องกับคุณลักษณะ การเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์ ของถั่วมะแฮะ

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้เสนอผลการวิจัยได้ตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

1. ผลการการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก
2. ผลการวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.)

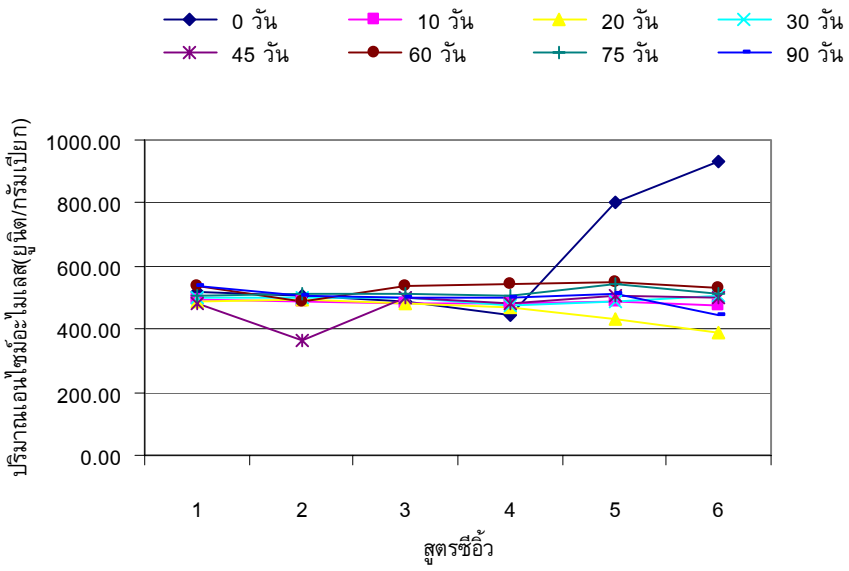
1. ผลการการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการบวนการหมักได้เก็บตัวอย่างในช่วงการหมักโมโรนิตามช่วงระยะเวลาการหมักดังนี้ เริ่มเก็บตัวอย่างที่ 0 10 20 30 45 60 75 และ 90 วันตามลำดับ โดยติดตามการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส และโปรทีเอส ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณจุลินทรีย์ และค่า pH

ปริมาณเอนไซม์อะไมเลส และโปรทีเอส

การทดลองบทที่ 3 ตอนที่ 1 ซึ่งได้วิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์โดยวิธีวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี โดยได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐานดังภาพประกอบ 21 และ 22 เมื่อวิเคราะห์เทียบกับกราฟมาตรฐานดังกล่าวสามารถคำนวณหาปริมาณเอนไซม์ตามสมการ 1 และ 2 พบว่าปริมาณ เอนไซม์อะไมเลสที่ตรวจพบ ปริมาณเอนไซม์อะไมเลสที่พบจากการตรวจตัวอย่างที่เก็บ 0 10 20 30 45 60 75 และ 90 วัน ในสูตรที่ 1 อยู่ในช่วง 481.56 - 534.58 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ 2 อยู่ในช่วง 485.16 - 510.99 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ 3 อยู่ในช่วง 479.02 - 539.14 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ 4 อยู่ในช่วง 446.58 - 544.86 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ 5 อยู่ในช่วง 432.05 - 803.50 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก และสูตรที่ 6 อยู่ในช่วง 391.51 - 930.09 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก ดังแสดงให้เห็นชัดตามตาราง 4 จากผลการทำลองจะเห็นได้ว่าปริมาณเอนไซม์อะไมเลสที่ตรวจพบในแต่ละสูตรการหมักมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาที่ทำการศึกษา ซึ่งเอนไซม์อะไมเลสเกิดจากเชื้อ *A.oryzae* ผลิตขึ้นเอนไซมอะไมเลสจึงทำหน้าที่ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (สุมาลี เหลืองสกุล. 2539: 217-218) ; (Yong and Wood. 1974) ในถั่วมะแฮะมีแป้งเป็นองค์ประกอบมากกว่าในถั่วเหลืองหากจะพิจารณาตามทฤษฎีแล้วกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสหน้าจะเกิดขึ้นกับสูตรที่มีถั่วมะแฮะเป็นองค์ประกอบหลักหรือถั่วมะแฮะล้วนได้มากกว่าในสูตรที่มีถั่วเหลืองล้วนแต่เมื่อพิจารณาจากปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่างที่เก็บช่วงเริ่มต้นของการหมัก (0 วัน) ของสูตรที่ 1 ที่มีถั่วมะแฮะ 100 % โดยน้ำหนัก พบว่ามีปริมาณเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 517.69 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก ซึ่งน้อยกว่าสูตรที่ 6 ที่มีถั่วเหลือง 100 % โดยน้ำหนัก ที่มีเอนไซม์

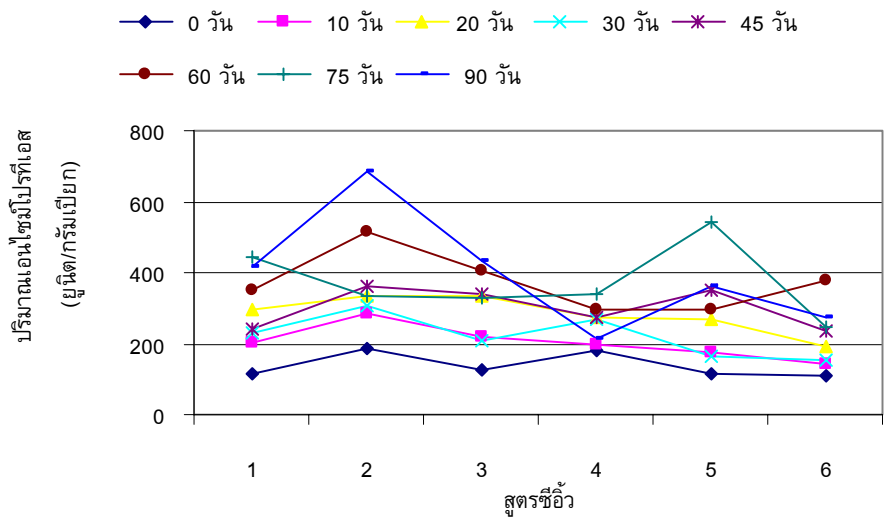
อะไมเลส สูงถึง 930.09 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสดังกล่าวนั้นทั้งนี้สันนิษฐานได้ว่ามีผลมาจากโครงสร้างทางกายภาพของเมล็ดถั่วทั้ง 2 ชนิด ที่แตกต่างกัน คือ เมล็ดถั่วมะแฮะมีลักษณะของเปลือกหนาและเนื้อแข็งย่อยยากจึงทำให้การทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่จะเข้าไปย่อยแป้วได้ยากกว่าเมล็ดของถั่วเหลืองที่มีเปลือกบาง เนื้ออ่อนนิ่มกว่า จึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้น



ภาพประกอบ 3 ปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในการหมักแต่ละสูตร

ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์โปรทีเอสนั้นมีแนวโน้มมากขันตามระยะเวลาการหมัก โดยตรวจวิเคราะห์ตามระยะเวลาของการหมักเป็นช่วงๆ ดังเช่นการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์อะไมเลส พบว่าปริมาณเอนไซม์โปรทีเอสในสูตรที่ 1 อยู่ในช่วง 115.50 - 441.79 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ 2 อยู่ในช่วง 187.28 - 683.93 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ 3 อยู่ในช่วง 128.78 - 430.44 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ 4 อยู่ในช่วง 182.74 - 337.43 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตร 5 อยู่ในช่วง 115.09 - 542.03 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก และสูตรที่

6 อยู่ในช่วง 108.08 - 380.33 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก ดังแสดงให้เห็นชัดในตาราง 5 เอนไซม์โปรทีเอสเกิดจากเชื้อ *A.oryzae* ผลิตขึ้น เอนไซม์โปรทีเอสจึงมีหน้าที่ย่อยโปรตีนในถั่วให้โมเลกุลเล็กลงได้กรดอะมิโน (สุมาลี เหลืองสกุล. 2539: 217-218) ; (Yong and Wood. 1974) นอกจากนี้โปรตีนที่ถูกย่อยยังเป็นอาหารของแบคทีเรียแลกติก ซึ่งเมื่อสังเกตกิจกรรมของเอนไซม์โปรทีเอสที่เริ่มต้นการหมัก (0 วัน) ของแต่ละสูตรจะมีปริมาณเอนไซม์โปรทีเอสน้อยกว่าในช่วงการหมักสุดท้าย (90 วัน) ซึ่งสอดคล้องกับกราฟมาตรฐาน ภาพ ประกอบ 22 และสอดคล้องกับปริมาณของกรดแลกติก ภาพประกอบ 5 ที่เมื่อเริ่มหมัก 0 วัน เอนไซม์โปรทีเอสมีกิจกรรมการย่อยโปรตีนน้อยจึงไม่สามารถตรวจพบปริมาณกรดแลกติกในช่วง 0-10 วันแรกของการหมักในทุกสูตร

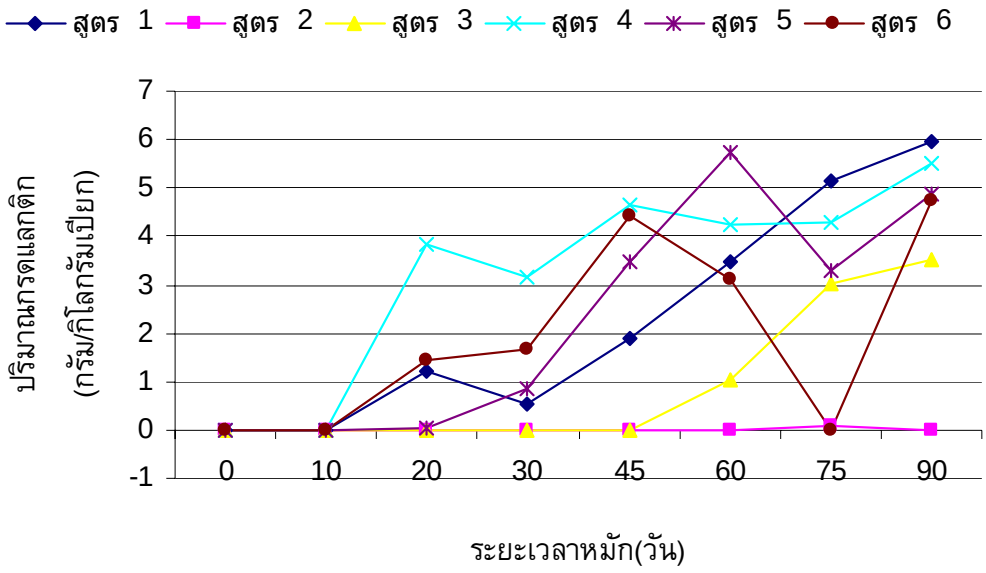


ภาพประกอบ 4 ปริมาณเอนไซม์โปรทีเอสในการหมักแต่ละสูตร

การวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ 3 ชนิด คือ กรดแลกติก กรดอะซิติก กรดซิตริก โดยทำการทดลองด้วยเทคนิคเทคนิคโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถณสูง ผลการวิเคราะห์สามารถเทียบได้กับกราฟมาตรฐานของกรดมาตรฐานแต่ละชนิดดังแสดงในภาพประกอบ 18 19 และ 20 เมื่อเปรียบเทียบค่าพื้นที่พีคของโครมาโทแกรมทำให้สามารถคำนวณหาปริมาณกรดแต่ละชนิดที่มีในส่วนประกอบหมักแต่ละสูตรของการเก็บตัวอย่างในแต่ละช่วยโดยเริ่มก็บตัวอย่างที่ 0 10 20 30 45 60 75 และ 90 วัน ตามลำดับ พบว่าการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวไม่ปรากฏปริมาณกรดซิตริกอันเนื่องมาจากกรดซิตริกจะถูกสร้างจาก *A. niger* (สุมาลี เหลืองสกุล. 2539: 217) ; (วิลาวัณย์ เจริญจีรตระกูล. 2539: 110) ส่วนมากจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เครื่องดื่ม ลูกกวาด หรือใช้เติมในปลาเพื่อการถนอม และใช้ในอุตสาหกรรมยา แต่เนื่องจากการหมักซีอิ๊วใช้เชื้อ *A.oryzae* และหมักในน้ำเกลือ จึงทำให้มาสามารถตรวจพบปริมาณกรดซิตริกในการทดลองของแต่ละสูตรได้ การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกในช่วง 0-10 วันแรกของการหมักทุกสูตรไม่พบปริมาณกรดแลกติกอันเนื่องมาจากในช่วงแรกยังไม่มีการทำงานของเชื้อแบทีเรียแลกติกซึ่งประกอบกับ ค่า pH ภาพประกอบ 10 ไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก โดยเชื้อแบคทีเรียแลกติกจะเจริญได้ดีในช่วงของ pH 4.5 ในการหมักช่วงระยะเวลาตั้งแต่ 20 30 45 60 75 และ 90 วัน ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกในสูตรที่ 1 อยู่ในช่วง 0.56-5.94 กรัมต่อกิโลกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ 2 อยู่ในช่วง 0.00 - 0.08 กรัมต่อกิโลกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ อยู่ในช่วง0.00 - 3.50 กรัมต่อกิโลกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ 4 อยู่ในช่วง 3.14 - 5.49 กรัมต่อกิโลกรัมเปียกของถั่วหมัก สูตรที่ 5 อยู่ในช่วง 0.04 - 5.73 กรัมต่อกิโลกรัมเปียกของถั่วหมัก และสูตรที่ 6 อยู่ในช่วง 0.00 - 4.75 กรัมต่อกิโลกรัมเปียกของถั่วหมัก ตาราง 5 เมื่อพิจารณาแล้วพบว่ามีการทำงานของแบคทีเรียแลกติกเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นซึ่งทราบได้จากการตรวจพบปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นตามช่วงระยะเวลาของการหมักสัมพันธ์กับค่า pH ภาพประกอบ 10 ที่อยู่ในช่วงของการเจริญได้ดีของแบคทีเรียแลกติก และเมื่อพิจารณาจากการวิเคราะห์ปริมาณแคทีเรียที่สามารถตรวจพบได้เมื่อหมักถึง 90 วัน (ตาราง 6) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกในสูตรที่ 2 นั้นจะพบว่าตรวจพบปริมาณกรดแลกติกได้น้อยมากเมื่อเทียบกับสูตรอื่นๆหรือแทบจะไม่พบเลย สาเหตุหนึ่งคือความเป็นไปได้จากการเออร์เรอร์ของเครื่องมือวิเคราะห์และเมื่อพิจารณาปริมาณแบคทีเรีย ตาราง 10 พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจพบโดยเฉลี่ยแล้วน้อยกว่าซีอิ๊วสูตรอื่นๆ

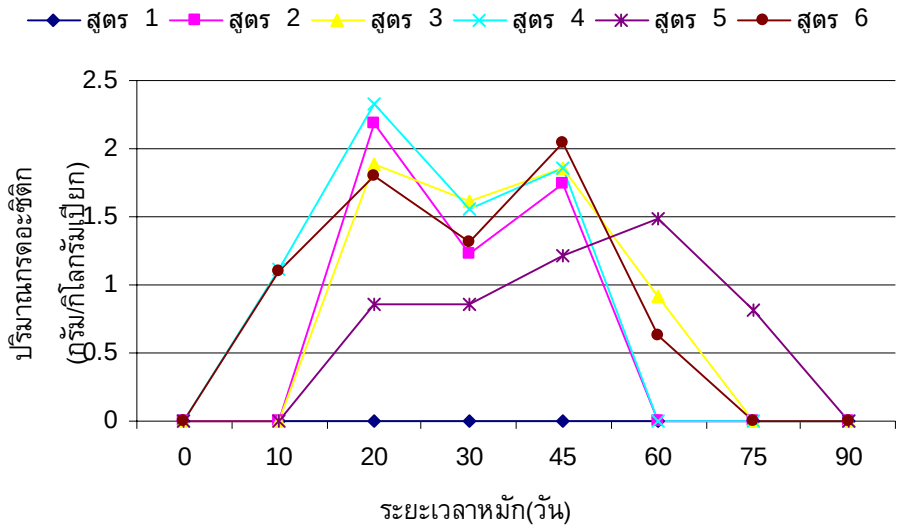
การตรวจปริมาณกรดแลกติกปรากฏให้เห็นชัดเจนดังภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 ปริมาณกรดแลกติกในกระบวนการหมักซิ้วแต่ละสูตร

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดอิซิติก ซึ่งโดยทั่วไปแล้วกรดอะซิติกจะถูกผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobaacter* และ *Gluconbacter* แบคทีเรียทั้งสองสกุลสามารถออกซิไดส์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก แต่แตกต่างกันที่ *Acetobaacter* จะเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้ปริมาณมากว่าและพวกนี้สามารถออกซิไดส์กรดอะซิติกต่อไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ จึงเรียกว่า โอเวอร์ออกซิไดเซอร์ ส่วน *Gluconbacter* เปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้ต่ำหว่าและพวกนี้ไม่สามารถออกซิไดส์กรดอะซิติกต่อไปจึงเรียกว่า อันเดอร์ออกซิไดเซอร์ จากความสามารถในการออกซิไดเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกดังกล่าว จึงนิยมในไปใช้ประโยชน์ในการผลิตน้ำส้มสายชูมากว่าซึ่งมีรสเปรี้ยวที่เกิดจากกรดอะซิติกเป็นส่วนใหญ่ (วิลาวัณย์ เจริญจีรตระกูล. 2539: 86) ดังนั้นการหมักซีอิ๊วไม่ได้นำแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobaacter* และ *Gluconbacter* มาใช้ในการหมักโดยตรง จึงทำให้ผลการทดลองกล่าวพบว่าปริมาณกรดอะซิติกของการหมัก 0 และ 90 วัน นั้นไม่สามารถตรวจพบได้ซึ่งสามารถ

บอกถึงความสามารถของการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้ต้องการว่าสามารถเจริญได้ในช่วงไหนบ้างนั้นก็คือจุลินทรีย์อื่นสามารถเจริญได้ในการหมักถึง 75 วันในสูตรที่ 1 และ 5 เจริญได้ถึงการหมัก 60 วัน ในสูตรที่ 3 5 และ 6 ตามลำดับและเจริญได้ในการหมัก 45 วัน ในสูตรที่ 2 และ 4 เท่านั้น ส่วนหลังจากนั้นจุลินทรีย์เหล่านั้นจะถูกยับยั้งการเจริญและถูกกำจัดออกไป ดังนั้นเมื่อหมักครบ 90 วัน จึงไม่สามารถตรวจพบปริมารกรดอะซิติกอีกซึ่ง นอกจากนี้ปริมาณกรดอะซิติกจะบ่งบอกถึงความพอดีของซีอิ๊วว่าการหมักซีอิ๊วสมบูรณ์หรือไม่



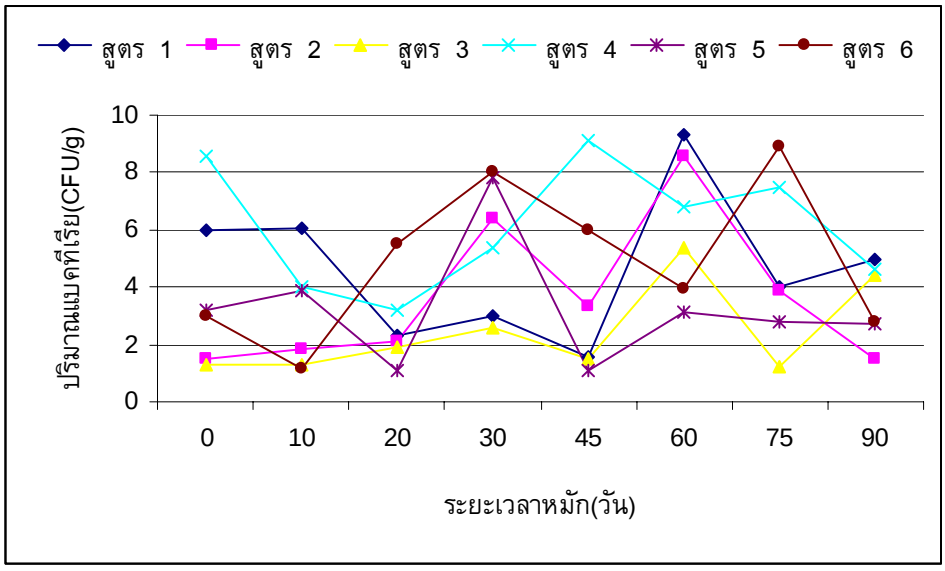
ภาพประกอบ 6 ปริมาณกรดอะซิติกในกระบวนการหมักซี้วแต่ละสูตร

วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ แบคทีเรีย รา และยีสต์ จากการเก็บตัวอย่าง 0 10 20 30 45 60 75 และ 90 วัน ตามลำดับ โดยการนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแยกเป็นการเลี้ยงด้วยอาหารสองชนิดคือการเพาะเลี้ยง แบคทีเรียด้วย Nutrient agar และการเพาะเลี้ยงราและยีสต์ด้วย Potato dextrose agar ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในสูตรต่างๆดังนี้ สูตรที่ 1 อยู่ในช่วง 4.00×10^{10} - 6.00×10^{12} โคโลนีต่อกรัม สูตรที่ 2 อยู่ในช่วง 1.50×10^{10} - 2.08×10^{11} โคโลนีต่อกรัม สูตรที่ 3 อยู่ในช่วง 1.22×10^{10} - 2.57×10^{11} โคโลนีต่อกรัม

ตามลำดับ สูตรที่ 4 อยู่ในช่วง 6.80 x10^{9} - 8.60 x10^{10} โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ สูตรที่ 5 อยู่ในช่วง 1.09 x10^{11} - 3.23 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ และสูตรที่ 6 อยู่ในช่วง 2.76 x10^{10} - 2.97 x10^{12} โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ดังแสดงให้เห็นชัดเจน

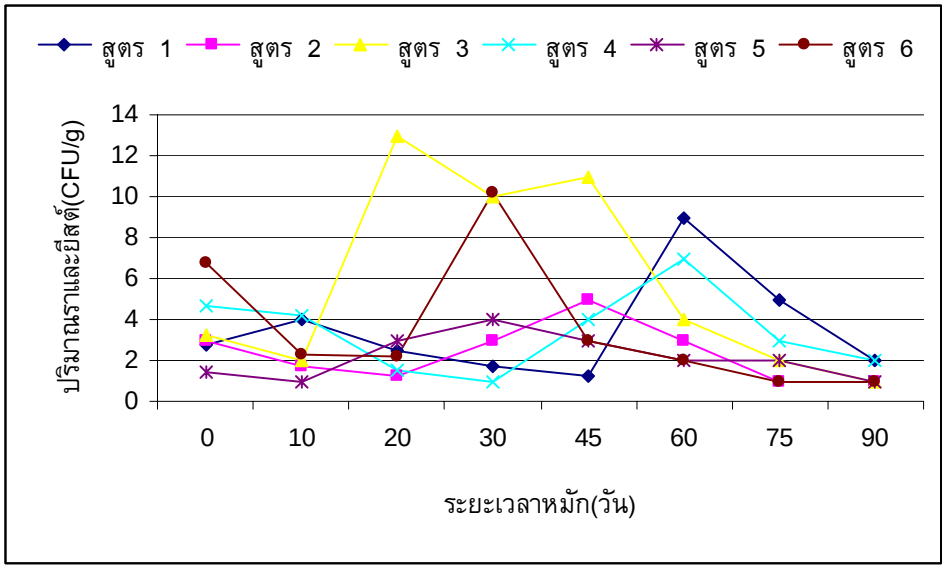
ในตาราง 10 จะเห็นได้ว่ามีการทำงานของแบคทีเรียตลอดการทดลองอันส่งผลให้มีการผลิตกรดแลกติกตลอดการทดลองเช่นกัน



ภาพประกอบ 7 ปริมาณแบคทีเรียในกระบวนการหมักซีอิ๊วแต่ละสูตร

ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณราและยีสต์ในสูตรต่างๆ ได้ผลดังนี้ สูตรที่ 1 อยู่ในช่วง 2.00 x10^{4} - 4.00 x10^{10} โคโลนีต่อกรัม สูตรที่ 2 อยู่ในช่วง 1.00 x10^{4} - 3.00 x10^{10} โคโลนีต่อกรัม สูตรที่ 3 อยู่ในช่วง 1.00 x10^{3} - 13.00 x10^{10} โคโลนีต่อกรัม สูตรที่ 4 อยู่ในช่วง 2.00 x10^{3} - 4.70 x10^{10} โคโลนีต่อกรัม สูตรที่ 5 อยู่ในช่วง 1.00 x10^{3} - 1.40 x10^{10} โคโลนีต่อกรัม สูตรที่ 6 อยู่ในช่วง 1.00 x10^{3} - 6.80 x10^{10} 2 โคโลนีต่อกรัม ดังแสดงให้เห็นชัดในตาราง 10 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสามารถตรวจพบเชื้อราในช่วงแรกของการหมักได้มากกว่าช่วงการหมักสุดท้ายเมื่อครบ 90 วัน

นั้นเนื่องมาจากในการหมักซีอิ๊วได้ใช้หัวชื้อ *A.oryzae* ในการหมักในช่วงโคจิจึงทำให้ตรวจพบปริมาณราและยีสต์ในช่วงแรกมากกว่าช้างสุดท้ายนั้นเอง

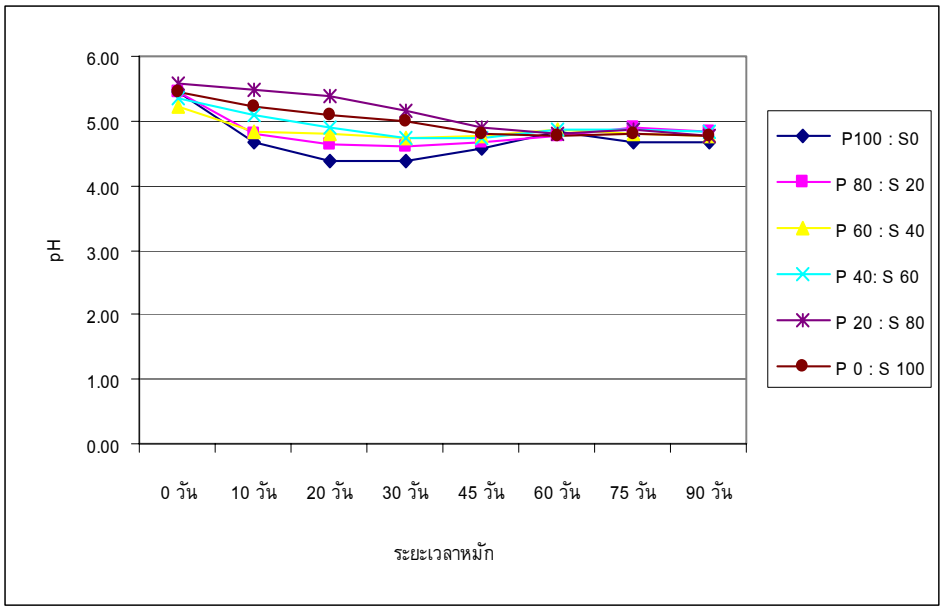


ภาพประกอบ 8 ปริมาณราและยีสต์ในกระบวนการหมักซีอิ๊วแต่ละสูตร

ค่า pH

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ตรวจวัดค่า pH ตลอดช่วงระยะเวลาการหมัก จากการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 0 10 20 30 45 60 75 และ 90 วัน นั้น พบว่าค่า pH ในสูตรที่ 1 อยู่ในช่วง 4.37 - 5.46 สูตรที่ 2 อยู่ในช่วง 4.59 - 5.46 สูตรที่ 3 อยู่ในช่วง 4.74 - 5.21 สูตรที่ 4 อยู่ในช่วง 4.73 - 5.36 สูตรที่ 5 อยู่ในช่วง 4.77 - 5.74 และสูตรที่ 6 อยู่ในช่วง 4.77 - 5.44 จากการทดลองค่า pH จะคงที่เมื่อช่วงระยะเวลาการหมักประมาณ 60 วันขึ้นไป และเมื่อพิจารณาความเหมาะสมของการตรวจพบปริมาณกรดแลกติกก็เริ่มมากขึ้นเมื่อหมัก 60 วันขึ้นไปเช่นกัน

ดังแสดงชัดเจนในภาพประกอบ 9

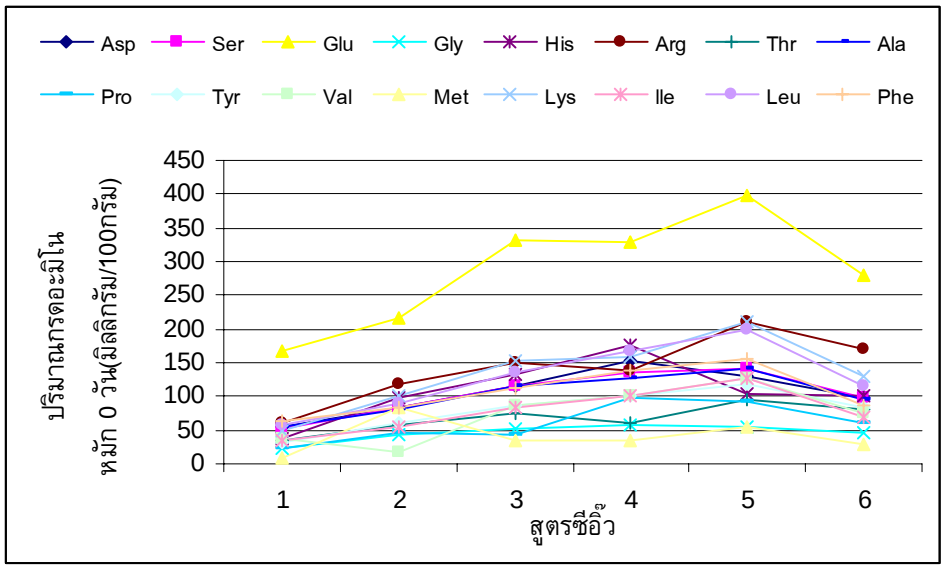


ภาพประกอบ 9 ค่า pH ในซีอิ๊วแต่ละสูตร ตลอดระยะเวลาหมัก

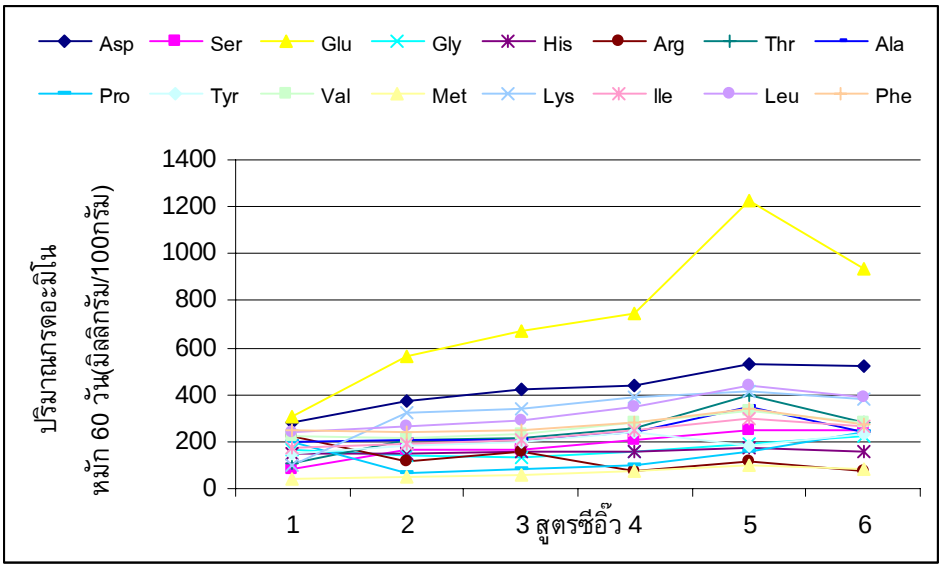
การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน

จากการตรวจสอบประสิทธิภาพของการวิเคราะห์กรดอะมิโน โดยใช้วิธี AccQ Taq พบว่า สามารถวิเคราะห์กรดอะมิโนได้ทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ Alanine (Ala) Arginine (Arg) Asparagine (Asp) Cystine (Cys) Glutamine (Glu) Glycine (Gly) Histidine (His) Isoleucine (Lue) Leucine (Ile) Lysine (Lys) Methionine (Met) Phenylalanine (Phe) Proline (Pro) Serine (Ser) Theonine (Thr) Tyrosine (Tyr) Valine (Val) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน ภาพประกอบ.. อย่างไรก็ตาม ด้วยสภาวะที่ใช้ไม่สามารถแยกพีคของอนุพันธ์ของกลูทามีนกับฮีสทิดีน และอนุพันธ์ของซิสเทอีนกับซิสทีนได้ จึงไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระทั้ง 4 ชนิดได้อย่างถูกต้อง ในการทดลองการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ตรวจวิเคราะห์หารปริมาณกรดอะมิโนในระหว่างกระบวนการหมัก โดยแบ่งเป็นการเก็บตัวอย่าง 3 ช่วง คือ ระยะเวลาที่เริ่มหมัก(0 วัน) 60 และ 90 วัน

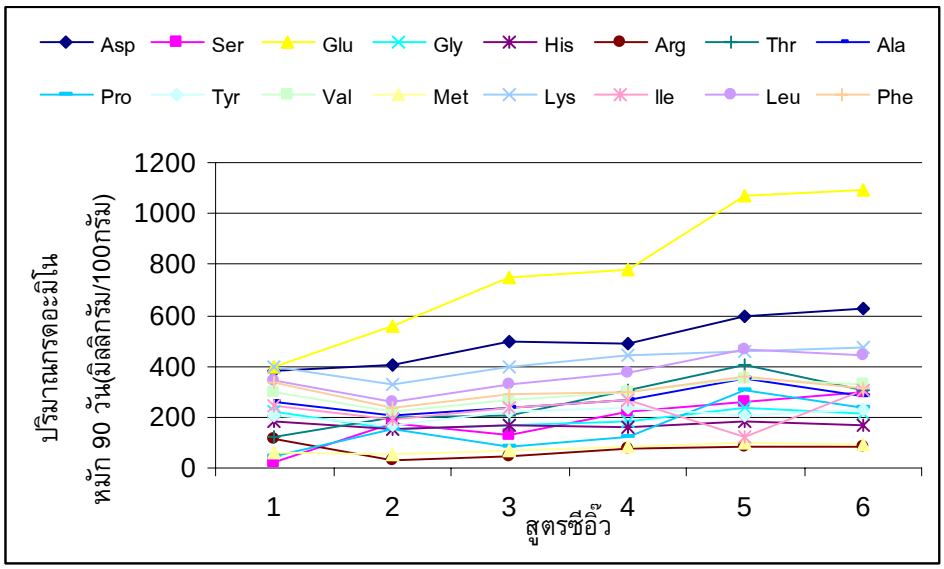
ตามลำดับ ในการตรวจวิเคราะห์พบกรดอะมิโนที่ได้จากการหมักซีอิ๊วทั้งหมดเพียง 16 ชนิด ในการหมัก 0 วัน พบปริมาณกรด อะมิโนรวมของทุกสูตรอยู่ในช่วง 741.89 – 2214.67 มิลลิกรัม/100 กรัม ในการหมัก 60 วัน พบปริมาณกรดอะมิโนรวมของทุกสูตรอยู่ในช่วง 3244.47 – 5157.99 มิลลิกรัม/100 กรัม และในการหมัก 90 วัน พบปริมาณกรดอะมิโนรวมของทุกสูตรอยู่ในช่วง 3275.59 – 5324.03 มิลลิกรัม/100 กรัม ดังแสดงค่าในตาราง 12 - 14 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 10 ปริมาณกรดอะมิโนในช่วงการหมักเวลา 0 วัน



ภาพประกอบ 11 ปริมาณกรดอะมิโนในช่วงการหมักเวลา 60 วัน



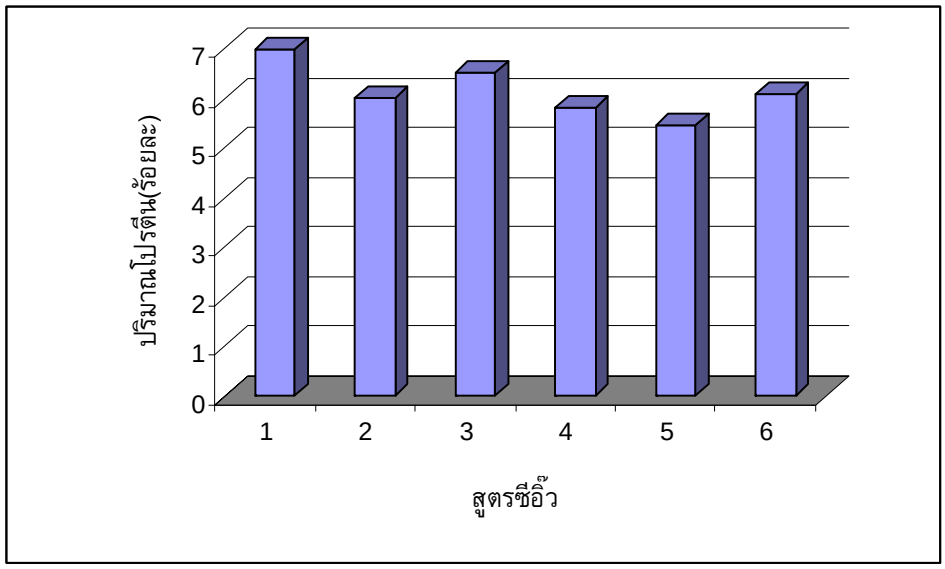
ภาพประกอบ 12 ปริมาณกรดอะมิโนในช่วงการหมักเวลา 90 วัน

2. ผลการวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.)

การศึกษาวิเคราะห์คุณภาพน้ำซีอิ๊วแต่ละสูตรที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้วไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาล ปริมาณเกลือ และปริมาณโลหะหนัก เมื่อทำการทดลองแล้วได้ผลการทดลองดังนี้

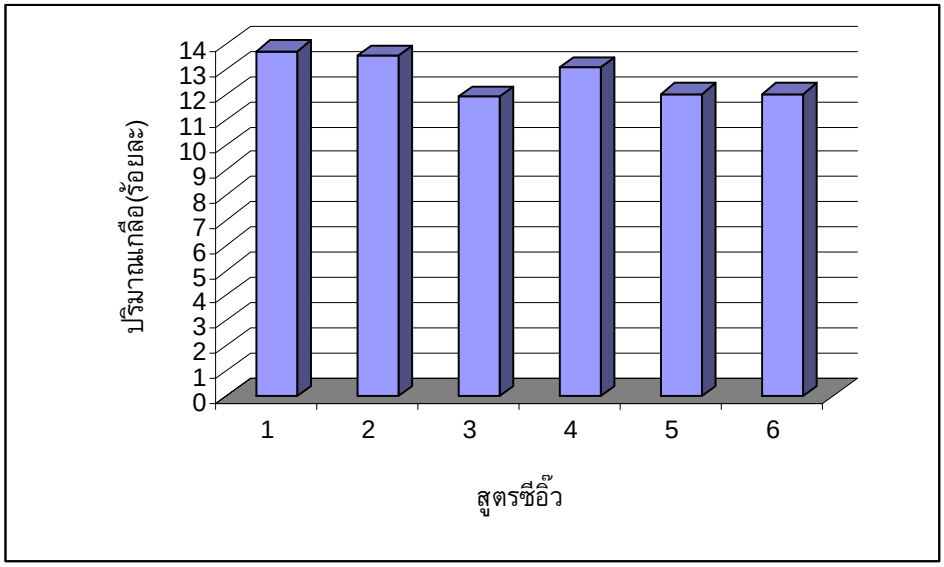
2.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาล และปริมาณเกลือ

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีไทเทรตแบบกรด-เบส ซึ่งได้ทดลองตามวิธี AOAC โดยวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้วได้ผลคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ปรากฏว่าปริมาณโปรตีนสูตรที่ 1-6 ได้ร้อยละ 6.98 6.00 6.50 5.80 5.45 และ 6.10 ตามลำดับ ปริมาณโปรตีนนี้ได้รับผลเนื่องมาจากการทำกิจกรรมของเอนไซม์โปรทีเอสจากกระบวนการหมักจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือซีอิ๊ว และเมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนระหว่างสูตรที่ 1 ถั่วแฮะล้วน และสูตรที่ 6 ถั่วเหลืองล้วนแล้วพบว่า ในสูตรที่ 1 นั้นมีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 6.98 และกว่าสูตรที่ 6 ที่มีเพียงร้อยละ 6.10 ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าระหว่างกระบวนการหมักในสูตรที่ 1 เกิดกิจกรรมการย่อยโปรตีนที่สมบูรณ์กว่า และรองลงมาคือจากสูตรที่ 3 คือ ส่วนผสมถั่วมะแฮะร้อยละ 60 ต่อถั่วเหลืองร้อยละ 40 คิดเป็นร้อยละ 6.50 ซึ่งมีมากกว่าสูตรที่ 6



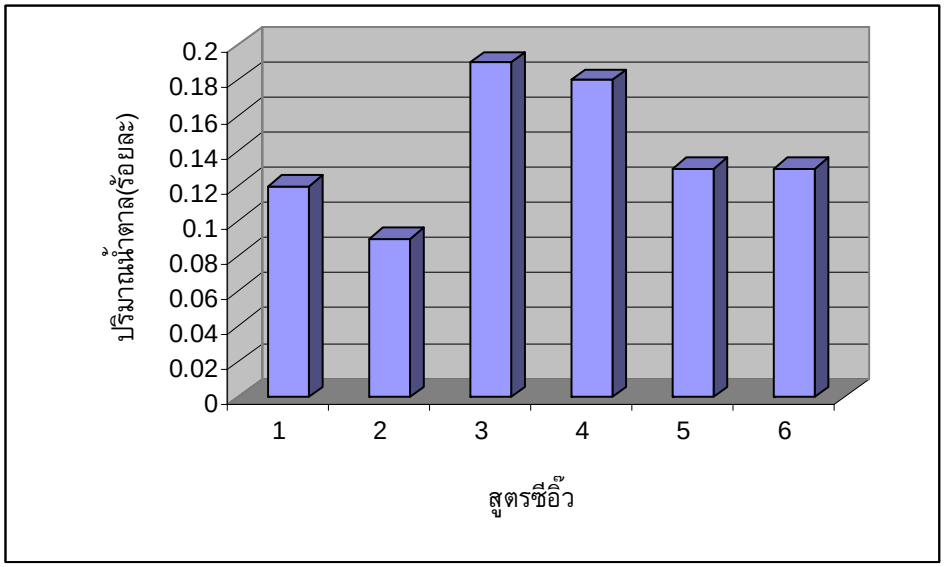
ภาพประกอบ 13 ปริมาณโปรตีนของซีอิ๊วในแต่ละสูตร

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเกลือนั้นได้ทดลองตามวิธี AOAC โดยการไทเทรตแบบตกตะกอน ปริมาณเกลือที่พบในซีอิ๊วทั้ง 6 สูตรร้อยละ 13.74 13.54 11.90 13.10 12.05 12.05 ตามลำดับจากผลการทดลองพบว่าปริมาณเกลือในซีอิ๊วสูตรที่ 1 มีมากที่สุดคือเป็นร้อยละ 13.74 และปริมาณเกลือที่พบน้อยที่สุดในสูตรที่ 3 ร้อยละ 11.90 ซึ่งเมื่อเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วขาวชั้นที่หนึ่งหรือชั้นพิเศษที่กำหนดให้มีปริมาณเกลือคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักอยู่ในช่วงร้อยละ 17-23 นั้น ปริมาณเกลือในซีอิ๊วที่ได้จากการทดลองทั้ง 6 สูตร ยังมีน้อยกว่า



ภาพประกอบ 14 ปริมาณเกลือของซีอิ๊วในแต่ละสูตร

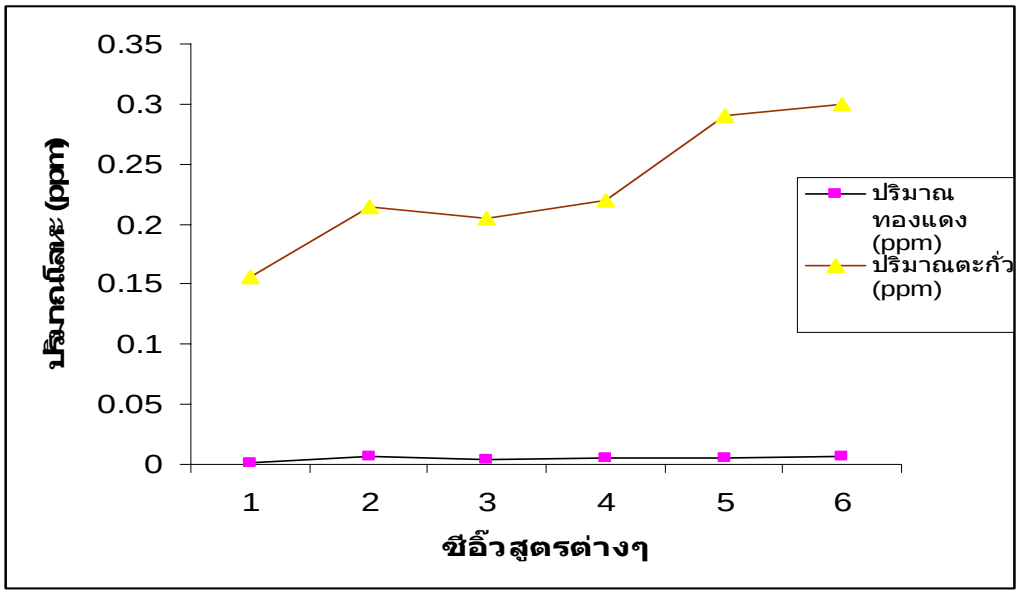
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลได้ทดลองตามวิธี AOAC พบว่าปริมาณน้ำตาลในแต่ละสูตรคือ สูตรที่ 1-6 ได้ร้อยละ 0.12 0.09 0.19 0.18 0.13 และ 0.13 ตามลำดับ ซึ่งทั้งนี้เมื่อเทียบกับปริมาณกลูโคสที่วิเคราะห์โดยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง แล้วจะพบว่าการตรวจน้ำตาลรวมได้น้อยกว่า ทั้งนี้สันนิษฐานว่าการทดลองตามวิธี AOAC อาจเกิดความคลาดเคลื่อนนั้นเอง แต่อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลของทั้ง 6 สูตร จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำตาลจากสูตรที่ 3 คือ ส่วนผสมถั่วมะแฮะร้อยละ 60 ต่อถั่วเหลืองร้อยละ 40 นั้นมีมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 0.19 ซึ่งเมื่อเทียบกับสูตรที่ 6 ที่มีถั่วเหลืองล้วนเป็นวัตถุดิบมาตรฐานการผลิตซีอิ๊วนั้นมีปริมาณน้ำตาลเพียงร้อยละ 0.13



ภาพประกอบ 15 ปริมาณน้ำตาลของซีอิ๊วในแต่ละสูตร

2.2 ผลการวิเคราะห์โลหะหนัก

ในการทำวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์โลหะหนักในซีอิ๊วที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ทั้ง 6 สูตร โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก 3 ชนิด คือ ตะกั่ว ทองแดงและแคดเมียม โดยเทคนิคอะตอมมิกแอบซอร์บชันสเปกโทรสโกปี พบว่าในการวิเคราะห์ปริมาณโลหะในซีอิ๊วแต่ละสูตรนั้นมีการตรวจพบโลหะหนักในซีอิ๊วเพียงชนิดเดียว คือ ตะกั่ว ซึ่งปริมาณที่พบทั้ง 6 สูตร อยู่ในช่วง 0.001 – 0.004 ppm เท่านั้น เมื่อเทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรมที่กำหนดไม่ให้มีโลหะหนักในอาหารเกิน 2 ppm นั้นแสดงให้เห็นว่าซีอิ๊วจากการทดลองในครั้งนี้ไม่มีโลหะหนักเกินที่มาตรฐานกระทรวงอุตสาหกรรมกำหนดไว้ นั้นแสดงถึงความปลอดภัยในเรื่องสารพิษจากโลหะหนักที่ตกค้าง



ภาพประกอบ 16 ปริมาณโลหะหนักที่ตรวจพบในซีอิ๊วทั้ง 6 สูตร

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลือง โดยทำการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก และวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.)หลังผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้ว ซึ่งได้สรุปผล อภิปรายผลและให้ข้อเสนอแนะเป็นหัวข้อต่างๆ ดังนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผล
3. ข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองวิเคราะห์ในด้านต่างๆ สามารถสรุปได้ดังนี้

1.1 ในระหว่างกระบวนการหมักได้ตรวจการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะไมเลส ซึ่งปริมาณอะไมเลสที่ตรวจพบในแต่ละสูตรมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา แสดงว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักจึงส่งผลให้ สามารถตรวจพบปริมาณน้ำตาลในซีอิ๊วได้

1.2 ปริมาณเอนไซม์โปรทีเอสมีแนวโน้มมากขึ้น แสดงว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์โปรทีเอสเกิดขึ้นตลอดเวลาการหมักเช่นกัน ดังนั้นเมื่อระยะเวลาหมักนานขึ้นก็เกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในถั่วมากขึ้น จึงทำให้ตรวจพบปริมาณของกรดอะมิโน ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของโปรตีนในถั่วซึ่งเป็นวัตถุดิบในการหมัก ซึ่งจากผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในชุดหมักแต่ละส่วนผสม พบว่า มีกรดอะมิโน 16 ชนิด

1.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ในกระบวนการหมักนี้ สามารถตรวจพบปริมาณกรดอินทรีย์ได้เพียง 2 ชนิด คือกรดแลกติก และกรดอะซิติก ซึ่งกรดทั้งสองชนิดนี้มีผลส่งให้ลักษณะทางประสาทสัมผัสในด้านกลิ่นและรสของซีอิ๊วดีขึ้น นอกจากนี้ปริมาณกรดยังแสดงถึงความสมบูรณ์ในกระบวนการหมักซีอิ๊วด้วย

1.4 ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ได้แก่ แบคทีเรีย รา และยีสต์ พบว่า มีการทำงานของแบคทีเรียตลอดการทดลองอันส่งผลให้มีการผลิตกรดแลกติก นอกจากนี้สามารถตรวจพบเชื้อราในช่วงแรกของการหมักได้มากกว่าช่วงการหมักสุดท้าย เมื่อครบกำหนดระยะ เวลา 90 วัน ของการหมัก ปริมาณจุลินทรีย์ต่างๆ เริ่มมีปริมาณลดลงจนเกือบคงที่ แสดงว่า ผลิตภัณฑ์เกิดเป็นซีอิ๊วแล้ว

1.5 ผลการวิเคราะห์คุณภาพของซีอิ๊ว โดยการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ โปรตีน น้ำตาล เกลือ พบว่า ปริมาณโปรตีนในซีอิ๊วสูตรที่ 1-5 มีปริมาณร้อยละ 6.98 6.00 6.50 5.80 และ 5.45 ตามลำดับ ซึ่งในซีอิ๊วสูตรควบคุมมีปริมาณโปรตีนรวมร้อยละ 6.10 ปริมาณน้ำตาลในซีอิ๊วสูตรที่ 1-5 มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 0.12 0.09 0.19 0.18 และ 0.13 ตามลำดับ ส่วนสูตรควบคุมมีน้ำตาลร้อยละ 0.13 ส่วนผลการตรวจหาปริมาณเกลือในซีอิ๊วทั้ง 5 สูตร มีค่าร้อยละ 13.74 13.54 11.90 13.10 และ12.05 ตามลำดับ สูตรควบคุมมีเกลือร้อยละ 12.05 ผลจากการทดลองนี้จะเห็นว่า ปริมาณโปรตีน น้ำตาล และเกลือ อยู่ในช่วงเดียวกับสูตรควบคุม

1.6 การตรวจปริมาณโลหะหนักพบเพียงชนิดเดียว คือ ตะกั่ว อยู่ในช่วง 0.001-0.004 ppm เท่านั้น เมื่อเทียบกับกำหนดของมาตรฐานอุตสาหกรรม จัดว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

1.7 จากผลการทดลองนี้ พบว่า ถั่วมะแฮะสามารถนำมาหมักเป็นผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วได้ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบอัตราส่วนในแต่ละสูตร ซึ่งมีถั่วมะแฮะเป็นวัตถุดิบร่วมกับถั่วเหลืองซึ่งนิยมใช้เป็นวัตถุดิบมาตรฐานในการผลิตซีอิ๊วนั้น จะเห็นว่า ส่วนผสมหมักทุกสูตร สามารถทำเป็นซีอิ๊วได้ โดยเป็นผลจากการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าต้องการจะใช้ส่วนผสมที่มีถั่วมะแฮะเป็นวัตถุดิบหลักในปริมาณที่มากที่สุดสามารถใช้ถั่วมะแฮะได้สูงสุดถึงร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก ซึ่งทำให้ได้ซีอิ๊วมีคุณภาพ ไม่แตกต่างจากซีอิ๊วสูตรควบคุม

2. อภิปรายผล

การวิเคราะห์ติดตามผลช่วงระหว่างกระบวนการหมัก

ในการติดตามกระบวนการหมักครั้งนี้ได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์อะไมเลส โปรทีเอส ปริมาณกรดอินทรีย์ และปริมาณจุลินทรีย์ โดยการเก็บตัวอย่างเริ่มต้นการหมักช่วงโมโรมิ โดยเริ่มเก็บตัวอย่างที่ 0 10 20 30 45 60 75 และ 90 วัน ซึ่งในช่วงของการหมักโคจินั้นผู้วิจัยได้เติมเชื้อ *A. oryzae* ซึ่งเป็นเชื้อราสำหรับการหมักเต้าเจี้ยวและซีอิ๊ว เชื้อราชนิดนี้จะทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ อะไมเลส โปรทีเอส และไลเพส ออกมาย่อยสลายแป้ง โปรตีน และไขมัน ทำให้ได้สารโมเลกุลเล็กหลายชนิด เช่น กรดอะมิโน กรดไขมัน เป็นต้น (สุมาลี เหลืองสกุล. 2539: 217-218) ; (Yong and Wood. 1974) ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวของซีอิ๊วและเป็นแหล่งอาหารสำหรับเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก ในขั้นตอนการเติมน้ำเกลือหรือช่วงการหมักโมโรมิ แบคทีเรียแลกติกจะทำหน้าที่ผลิตกรดแลกติกซึ่งมีกลิ่นเฉพาะ กรดที่ผลิตออกมาจะทำให้ค่า pH ของน้ำหมักซีอิ๊วลดลง ช่วยปรับสภาพให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ผลิต แอลกอฮอล์และสารให้กลิ่นรสที่ดีแก่ซีอิ๊ว

จากการทดลองพบว่าในระหว่างกระบวนการหมักปริมาณอะไมเลสที่ตรวจพบในแต่ละส่วนผสมการหมักมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในถั่วมะแฮะมีแป้งเป็นองค์ประกอบมากกว่าในถั่วเหลือง ซึ่งถ้าพิจารณาตามทฤษฎีแล้ว กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ควรจะมีผลมากกับส่วนผสมหมักที่มีถั่วมะแฮะเป็นองค์ประกอบหลักหรือถั่วมะแฮะล้วนได้มากกว่าในสูตรที่มีถั่ว

เหลืองล้วน แต่เมื่อพิจารณาจากปริมาณเอนไซม์อะไมเลสในตัวอย่างที่เก็บช่วงเริ่มต้นของการหมัก (0วัน) ของสูตรที่ 1 ที่มีถั่วมะแฮะ 100 % โดยน้ำหนัก พบว่ามีปริมาณเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 517.69 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก ซึ่งน้อยกว่าสูตรที่ 6 ที่มีถั่วเหลือง 100 % โดยน้ำหนัก ที่มีเอนไซม์อะไมเลสสูงถึง 930.09 ยูนิต ต่อ กรัมเปียกของถั่วหมัก ในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส อาจมีผลมาจากโครงสร้างทางกายภาพของเมล็ดถั่วทั้ง 2 ชนิด ที่แตกต่างกัน คือ เมล็ดถั่วมะแฮะมีลักษณะของเปลือกหนาและเนื้อแข็ง ทำให้ย่อยได้ยากกว่าถั่วเหลืองจึงทำให้การทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่จะเข้าไปย่อยแป้งได้ยากกว่าเมล็ดของถั่วเหลืองซึ่งมีเปลือกหุ้มที่บางกว่า และมีเนื้อที่อ่อนนิ่มกว่าจึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ถ้าพิจารณาในการหมักโมโรมิทุกสูตรจะพบว่าในช่วง 20 วันแรก ปริมาณเอนไซม์อะไมเลสจะลดลงมากเนื่องจากความเป็นกรดของโมโรมิเพิ่มขึ้น ดังแสดงให้เห็นชัดในตาราง 4 และ 6

ส่วนปริมาณเอนไซม์โปรทีเอสมีแนวโน้มมากขึ้น เมื่อระยะเวลาหมักนานขึ้นก็เกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในถั่วมากขึ้น ตามขั้นตอนการหมักซีอิ๊วของเฉิน เซิ้งเหอะ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ; 2534 : 15 – 39 แปล) เอนไซม์โปรทีเอสมีหน้าที่ย่อยโปรตีนในถั่วให้โมเลกุลเล็กลงได้กรดอะมิโน (สุมาลี เหลืองสกุล. 2539: 217-218) ; (Yong and Wood. 1974) นอกจากนี้โปรตีนที่ถูกย่อยแล้วยังเป็นอาหารสำคัญของแบคทีเรียแลกติก ที่ผลิตกรดแลกติกซึ่งให้กลิ่นเฉพาะตัว จึงมีการทดลองหมักซีอิ๊วนานถึง 12 เดือน จากการเติมน้ำเกลือระดับของเอนไซม์โปทีเอสจะลดลงในช่วงแรกของการหมักและจะเพิ่มขึ้นทั้งนี้เพราะเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรม ชาติหรือตกตะกอน ติดตามด้วยปฏิกิริยา resolubilization และ/หรือการปล่อยเอนไซม์ใหม่ออก มาจากเส้นใยของราที่ถูกย่อยสลาย (Yong and Wood. 1977b) อย่าง ไรก็ตามภาวะที่เหมาะสมในการหมักโมโรมิเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงสุดยังขึ้นกับระดับอุณหภูมิด้วย โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมของกระบวนการหมักควรเท่ากับ 40 ^{O}C แต่เนื่องจากระดับอุณหภูมิของอำเภอบ่อเกลือ สถานที่ทำการทดลองหมักซีอิ๊วนั้น อาจต่ำกว่าระดับ 40 ^{O}C เนื่องจาก สภาพภูมิอากาศแปรปรวน เนื่องจากฝน และอากาศเย็น จึงทำให้ปริมาณของเอนไซม์โปรทีเอสที่ตรวจพบไม่ค่อยสม่ำเสมอ ปริมาณโปทีเอสที่ตรวจพบ จึงอยู่ในช่วง 108.08 - 683.93 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก ดังแสดงให้เห็นชัดในตาราง 5 ซึ่งเมื่อพิจารณาการเกิดกิจกรรมอย่างสม่ำเสมอจากปริมาณเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด คือ อะไมเลส และโปรทีเอสแล้วพบว่า ในสูตรที่ 3 มีปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ

จากการศึกษาวิจัยได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ 3 ชนิด และปริมาณกลูโคส จากการวิเคราะห์พบว่าพบว่าการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวไม่ปรากฏปริมาณกรดซิตริกอันเนื่องมา จากกรดซิตริกจะถูกสร้างจาก *A. niger* (สุมาลี เหลืองสกุล. 2539: 217) ; (วิลาวัณย์ เจริญจีรตระกูล. 2539: 110) ส่วนมากจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เครื่องดื่ม ลูกกวาด หรือใช้เติมในปลาเพื่อการถนอมและใช้ในอุตสาหกรรมยา แต่เนื่องจากการหมักซีอิ๊วใช้เชื้อ *A.oryzae* และหมักในน้ำเกลือ จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบปริมาณกรดซิตริกในการทดลองของแต่ละสูตรได้ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกในช่วง 0-10 วันแรกของการหมักทุกสูตรไม่พบปริมาณกรดแลกติกอันเนื่องมาจากการเติมน้ำเกลือ ดังนั้นในช่วงแรกยังไม่มีการทำงานของเชื้อแบคทีเรียแลกติกถึงแม้จะมี

การตรวจพบปริมาณของแบคทีเรียในช่วงแรกสูงก็ตามแต่ค่า pH ดังแสดงให้เห็นชัดเจนในภาพประกอบ 10 ซึ่งไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติก ค่า pH ที่เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียแลกติก คือ 4.5 (Yong and Wood. 1977b) ดังนั้นปริมาณปริมาณกรดแลกติกที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 0.01 - 5.94 กรัมต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก นอกจากนี้ยังตรวจปริมาณกรดอิซิติก ซึ่งโดยทั่วไปแล้วกรดอะซิติกจะถูกผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobaacter* และ *Gluconbacter* แบคทีเรียทั้งสองสกุลสามารถออกซิไดส์เอทานอลไปเป็นกรดอะซิติก แต่แตกต่างกันที่ *Acetobaacter* จะเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้ปริมาณมากว่าและพวกนี้สามารถออกซิไดส์กรดอะซิติกต่อไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ จึงเรียกว่า โอเวอร์ออกซิไดเซอร์ ส่วน *Gluconbacter* เปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกได้ต่ำกว่าและพวกนี้ไม่สามารถออกซิไดส์กรดอะซิติกต่อไปจึงเรียกว่า อันเดอร์ออกซิไดเซอร์ จากความสามารถในการออกซิไดเอทานอลไปเป็นกรดอะซิติกดังกล่าว จึงนิยมในไปใช้ประโยชน์ในการผลิตน้ำส้มสายชูมากว่าซึ่งมีรสเปรี้ยวที่เกิดจากกรดอะซิติกเป็นส่วนใหญ่ (วิลาวัณย์ เจริญจีรตระกูล. 2539: 86) ดังนั้นการหมักซีอิ๊วไม่ได้นำแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobaacter* และ *Gluconbacter* มาใช้ในการหมักโดยตรง จึงทำให้ผลการทดลองกล่าวพบว่าปริมาณกรดอะซิติกของการหมัก 0 และ 90 วัน นั้นไม่สามารถตรวจพบได้ซึ่งสามารถบอกถึงความสามารถของการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้ต้องการ ว่าสามารถเจริญได้ในช่วงใด กล่าวคือ จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในการหมักถึง 75 วันในสูตรที่ 1 และ 5 เจริญได้ถึงการหมัก 60 วัน ในสูตรที่ 3 5 และสูตรควบคุม ตามลำดับและเจริญได้ในการหมัก 45 วัน ในสูตรที่ 2 และ 4 เท่านั้น ส่วนหลังจากนั้นจุลินทรีย์เหล่านั้นจะถูกยับยั้งการเจริญและถูกกำจัดออกไป ดังนั้นเมื่อหมักครบ 90 วัน จึงไม่สามารถตรวจพบปริมาณกรดอะซิติกอีกซึ่ง ปริมาณกรดอะซิติก อยู่ในช่วง 0.10 – 2.33 กรัมต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก นอกจากนี้ปริมาณกรดอะซิติกจะบ่งบอกถึงความพอดีของซีอิ๊วว่าการหมักซีอิ๊วสมบูรณ์หรือไม่ ดังนั้นจากการวิเคราะห์พบว่าในสูตรที่ 4 มีการเกิดกรดอะซิติกได้มากและสิ้นสุดเร็วกว่า ซึ่งแสดงว่าซีอิ๊วสูตรนี้มีความพอเหมาะความสมบูรณ์ของการหมักมากว่าสูตรอื่น นอกจากได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์

การศึกษาวิจัยใช้ถั่วเป็นวัตถุดิบหลักในการทดลอง ซึ่งในตัวถั่วเป็นแหล่งโปรตีน เมื่อโปรตีนที่ถูกย่อยแล้วให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง หรือปรากฏในรูปของกรดอะมิโน มากขึ้น อันเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ปริมาณของกรดอะมิโนที่พบในการทดลองครั้งนี้มี 16 ชนิด คือ อะลานิน แอสปาเตท กลูตาเมท ไกลซีน ฮิสทีดีน ฟินิลอะลานิน ไอโซลิวซีน ไลซีน ลิวซีน เมทไทโอนีน โปรลีน อาร์จินิน เซอร์ริน ทรีโอนิน วาลีน และไทโรซีน ปรากฏว่าพบ กรดอะมิโนกลูทาเมตมีปริมาณมากที่สุด กรดอะมิโนกลูทาเมตนี้จะเป็นตัวทำให้เพิ่มรสชาติของผลิตภัณฑ์ให้น่าบริโภคมากขึ้นนั้น จากการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์เป็นช่วง สูตรที่พบปริมาณกรดอะมิโนกลูทาเมตมากที่สุดคือ สูตรที่ 5 ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากที่สุดตามระยะเวลาการหมัก

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณต่างๆ จากการวิเคราะห์แล้วนำมาหาความสัมพันธ์กับปริมาณจุลินทรีย์และค่า pH ที่วัดได้จะเห็นว่า การหมักซีอิ๊วที่เติมเชื้อ *A.oryzae* ลงไปในช่วงการหมักโคจิ อันส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของโคจิ (Yong and Wood. 1977a) คือ ในช่วงนี้ระดับ

ของอัลฟาอะไมเลสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องของช่วงการหมัก เนื่องจากเชื้อราเริ่มสร้างสปอร์ แอคติวิตีของเอนไซม์โปรทีเอสจะเริ่มขึ้น จากการวิจัยของยังและวูด พบว่าการหมักโคจิ นาน 72 ชั่วโมงดีที่สุด เนื่องจากเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุด (Yong and Wood. 1977a) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกการหมักโคจิ นาน 72 ชั่วโมง และเมื่อนำมาหมักโมโรมิต่อทำให้พบว่าจากการทำงานของเชื่อ *A.oryzae* ที่เติมลงไปในช่วงโคจินั้นส่งผลให้ มีปริมาณเอนไซม์อะไมเลสสูงถึง 930.09 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก และปริมาณเอนไซม์โปรทีเอสสูงสุดคือ 683.93 ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก จะเห็นได้ว่าในระยะแรกของการหมักปริมาณเอนไซม์โปรทีเอสมีน้อยและเมื่อผ่านไปได้ระยะหนึ่งปริมาณโปรทีเอสและ เอนไซม์โปรทีเอสเพิ่มขึ้น แต่ค่าpHลดลงซึ่งเหมาะต่อการเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii*, *Pediococcus halophilus* และ *Saccharomyces rouxii* ซึ่งมีอยู่ในอากาศ เชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวนี้มีบทบาทสำคัญที่สุดในการหมักโมโรมิเพราะช่วยสร้างกรดแลกติก ทำให้กลิ่นและรสของซีอิ๊วดีขึ้น อีกทั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวยังมีความสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงถึงร้อยละ 20 จึงทำให้จุลินทรีย์บางชนิดถูกกำจัดออกไป เมื่อตรวจปริมาณแบคทีเรียจึงทำให้พบมากในช่วงแรกของการหมักและตลอดระยะเวลาที่ได้เก็บตัวอย่างตรวจก็พบแบคทีเรียอยู่ถึงแม้จะลดลงบ้างเพราะเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นจุลินทรีย์เหล่านี้ก็จะเริ่มลดลง ดังนั้นเมื่อเอนไซม์โปรทีเอสมีกิจกรรมสูงจึงทำให้ตรวจพบปริมาณกรดอะมิโนได้มากถึง 16 ชนิด และจากการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนจึงทำให้พบปริมาณกรดอะมิโนกลูทาเมตมากที่สุด

การวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรม

การศึกษากระบวนการหมักซีอิ๊วจากถั่วเหลืองและถั่วมะแฮะ เมื่อหมักครบ 90 วัน ทั้งหมด 6 สูตร นำไปกรองเอาน้ำซีอิ๊วไปผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ หลังจากนั้นนำซีอิ๊วไปวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรมโดยได้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาล ปริมาณเกลือ และโลหะหนัก

ซีอิ๊วที่ได้จากการหมักมีถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีน การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ในน้ำซีอิ๊วในสูตรต่างๆ ทั้ง 6 สูตร ดังนี้ 6.98 6.00 6.50 5.80 5.45 6.10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเทียบสูตรการการหมักซีอิ๊วสูตรที่ 1 และสูตรที่ 6 ที่เป็นสูตรควบคุมจะเห็นได้ว่าซีอิ๊วสูตรที่ 1 มีปริมาณโปรตีนร้อยละของน้ำหนักมากกว่าซีอิ๊วสูตรที่ 6 เมื่อพิจารณาจากการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์โปรทีเอสพบว่าในสูตรที่ 1 มีปริมาณเอนไซม์ที่สม่ำเสมอและสูงกว่าสูตรที่ 6 นั่นแสดงว่าเอนไซม์โปรทีเอสในสูตรที่ 1 มีกิจกรรมดีกว่า ซึ่งแสดงว่ากระบวนการหมักของซีอิ๊วสูตรที่ 1 ในมีการย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่าในสูตรที่ 6 จึงทำให้มีปริมาณโปรตีนมากกว่าและเมื่อเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วของกระทรวงอุตสาหกรรมที่ได้ตั้งเกณฑ์มาตรฐานไว้ว่าซีอิ๊วชั้น 1 (วันชัย สมชิต. 2527: 116) ต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 4.5 ของน้ำหนัก นั้นแสดงให้เห็นว่าน้ำซีอิ๊วสูตรที่ 1 มีโปรตีนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วของกระทรวงอุตสาหกรรม และสามารถเรียงลำดับปริมาณโปรตีนของสูตรต่างๆ จากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ สูตรที่ 1 3 6 2 4 และ 5 ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำซีอิ๊วทั้ง 6 สูตร เมื่อเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วของกระทรวงอุตสาหกรรมที่ได้ตั้งเกณฑ์มาตรฐานของซีอิ๊วชั้น 1 ปรากฏว่านำน้ำซีอิ๊วทั้ง 6 สูตร ยังมาปริมาณน้ำตาลในระดับต่ำกว่ามาตรฐานคือปริมาณน้ำตาลของซีอิ๊วทั้ง 6 สูตรอยู่ในช่วง 0.09 - 0.19 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ปริมาณเกลือในน้ำซีอิ๊วทั้ง 6 สูตร เมื่อเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วของกระทรวงอุตสาหกรรมที่ได้ตั้งเกณฑ์มาตรฐานไว้ว่าในน้ำซีอิ๊วต้องมีปริมาณเกลือร้อยละ 17 – 23 ของน้ำหนัก ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ปริมาณเกลือในน้ำซีอิ๊วทั้ง 6 สูตร พบว่ามีปริมาณเกลืออยู่ในช่วงร้อยละ 11.90 - 13.74 ของน้ำหนัก ดังนั้นถ้าเทียบกับมาตรฐาน น้ำซีอิ๊วจากการวิจัยจึงมีปริมาณเกลือต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์น้ำซีอิ๊วของกระทรวงอุตสาหกรรม

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์โลหะหนักจำนวน 3 ชนิด คือ ตะกั่ว ทองแดง และแคดเมียม ผลการวิเคราะห์พบว่าในน้ำซีอิ๊วทั้ง 6 สูตร โลหะหนักที่ตรวจพบมีเพียงชนิดเดียวคือ ตะกั่ว อยู่ในช่วง 0.001 – 0.004 ppm (ตาราง 15) ซึ่งตามมาตรฐานกระทรวงอุตสาหกรรมที่กำหนดให้มีปริมาณโลหะหนักในอาหารได้ไม่เกิน 2 ppm ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าน้ำซีอิ๊วจาการทดลองทั้ง 6 สูตร มีความปลอดภัยจากโลหะหนัก

3. ข้อเสนอแนะ

3.1 การวิจัยถั่วมะแฮะยังไม่มีปรากฏว่ามีการวิจัยใดได้ทดลองนำมาผลิตเป็นซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะ(สมชาย ประภาวัต. 2541: การศึกษาการทำและการยอมรับเต้าส่วนจากถั่วมะแฮะพันธุ์ต่างๆ เปรียบ เทียบกับถั่วเขียว); (นิรมล ล้อสุริยนต์. 2536: การพัฒนาอาหารเช้าสำเร็จรูปชนิดแผ่นจากถั่วมะแฮะ); (สมชาย ประภาวัต. 2541: การศึกษาการทำคุกกี้จากถั่วเขียวผิวดำเปรียบเทียบกับถั่วเขียวและถั่วมะแฮะ) จากการทำวิจัยในครั้งเป็นครั้งแรก จากผลการวิเคราะห์ทั้งในระหว่างกระบวนการหมักและวิเคราะห์ด้านคุณภาพซีอิ๊ว ควรมีการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์

3.2 ในการวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์ติดตามผลช่วงระหว่างกระบวนการหมักและการวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรมเท่านั้นการศึกษาขั้นต่อไปควรมีการทดสอบทางประสาทสัมผัสเพื่อหาความชอบในผลิตภัณฑ์ และเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ควรมีการคัดเลือกและพิจารณาศึกษากระบวนการหมักซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะได้ถึงร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก ในสูตรที่ 3

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กองโภชนาการ กรมอนามัย. (ม.ป.ป.). *ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม.* กรุงเทพฯ: ม.ป.พ.

กลุ่มงานพฤกษศาสตร์ กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช. (2549). *พฤกษศาสตร์ของผักพื้นเมือง.* สืบค้นเมื่อวันที่ 15 ตุลาคม 2549 จาก http://www.doa.go.th/botany/cajca.html

จันทนี อุริยะพงศ์สรรค์ และบวรศักดิ์ ลิลานนท์. (2548) สมบัติทางกายภาพของบะหมี่จีนจากถั่วมะแฮะ. *วารสารแก่นนคร.* 33(3): 242-251

จันทนา ก่อนเก่า. (2535). *การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเชื้อรา Aspergillus niger จากแป้งข้าวเหนียว.* ปัญหาพิเศษ. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตมหาสารคาม. มหาสารคาม. ถ่ายเอกสาร

เฉิน เซิ้งเหอะ. (2534). *ซีอิ๊ว.* แปลโดย วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. กรุงเทพ: โอเดียนสโตร์

ณรงค์ นิยมวิทย์. (2539) *องค์ประกอบและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของอาหาร.* คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ: ม.ป.พ.

นิรม ล้อสุริยนต์. (2536). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเช้าสำเร็จรูปชนิดแผ่นจากถั่วมะแฮะ* ปริญญานิพนธ์ วท.ม.(สาขาวิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

บุญเชิด วิมลสุจริต. (2543, กรกฎาคม – สิงหาคม). ซีอิ๊วน้ำใจจากถั่วเขียว. *วารสารกสิกร.* 73(4)

ประดิษฐ์ มีสุข. (2524). *เคมีชีวิต : ชีวเคมีเบื้องต้น.* กรุงเทพ: โอเดียนสโตร์

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2535*). เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1 และ 2.* กรุงเทพ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปราโมทย์ หมู่พยัคฆ์. (2548). *เอกสารรายงานผลการส่งเสริมการปลูกถั่วมะแฮะในเขตพื้นที่อำเภอบ่อเกลือ.*ศูนย์การศึกษานอกโรงเรียนอำเภอบ่อเกลือ อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน

พันธ์ณรงค์ จันทรแสงสี. (ม.ป.ป.) ซีอิ๊ว ตอนที่ 2 กรรมวิธีการผลิตซีอิ๊ว. *วารสารเกษตรนเรศวร.* มปพ.

พันธ์ณรงค์ จันทรแสงสี. (ม.ป.ป.) ซีอิ๊ว ตอนที่ 3 จุลินทรีและการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักซีอิ๊ว. *วารสารเกษตรนเรศวร.* มปพ.

แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. (2534). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.* กรุงเทพ: โรงพิมพ์ชวนพิมพ์

วันชัย สมชิต. (2527). *ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย.* สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ: บริษัทสยามออฟเซ็ทจำกัด

วิลาวัณย์ เจริญจีรตระกูล. (2539). *จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร.* กรุงเทพ: โอเอสพริ้นติ้ง เฮ้าส์

วิสิฐ จะวะสิต และ สิติมา จิตตินันทร์. (2537, ตุลาคม). ซีอิ๊วและเต้าเจี้ยว. *วารสารหมอชาวบ้าน.* 2537(16): 186

ศุภชัย สมัปปิโต. (2541). *การคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส.* มหาวิทยาลัยสารคาม. มหาสารคาม: ม.ป.พ.

สุมาลี เหลืองสกุล. (2539). *จุลชีววิทยาทางอาหาร.* พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ: โรงพิมพ์ชัยเจริญ

สุมณฑา วัฒนาสินธุ์. (2545). *จุลินทรียวิทยาทางอาหาร.* กรุงเทพ: โรงพิมมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สำนักงานเกษตรอำเภอบ่อเกลือ.*เอกสารการส่งเสริมการขยายพันธ์ถั่วมะแฮะในพื้นที่อำเภอบ่อเกลือ.* น่าน: มีนาคม, 2548

Amarat Bhumiratana; et al. (1980). *Department of microbiology and Physiology*. Bangkok: Mahidol University

Attanut Impoolsup, Amarat Bhumiratana and Timothy W. Flegel. (1981) *Department of Microbiology*. Bangkok: Mahidol University

Baens-Arcega, L. (1966). Feasibility of mould process production of sauce from copra and soybean mixture with authentic Philippines strain of *Aspergillus oryzae* (Cehburg) Coh. *Araneta Journal of Agriculture.* 12:80-103

Bovornsombat, S. (1981). Feasibility study on soy sauce production by using winged bean seeds. *MSc Thesis, Kasetsart University*. Bangkok.

Crisistimi, L.C. Corpuz, and F.F.Cells. (1974). A comparative study on the utilization of mecan pea for soy sauce preparation. Handout copy.

Hesseltine, C.W. and Shibasaki, K. (1961). *Miso III Pure Cuture Fermentation with Saccharomyces rouxii.* Northen Regionnal Research Laboratory, Peoria, Illinois, and Faculty of the Collegeof Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan: n.p.

Il-Yong Maing, Ayres J.C., and Koehler P.E. (1973). *Persistence of Aflatoxin During the Fermentation of Soy Sauce.* Georgia: University of Georgia

Lundu, A.K. and Das, S. (1969). *Production of Amylase in Liquid Culture by Strain of Asp. Oryzae.* India: Pharnaceutical Worls,Ltd.

Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing Sugar. *Anal. Chem.,* **31,** 426,1956

Singh Hu. and Jambunathan R. (1991). *A Survery of the Methods of Milling and Consumer Acceptance of Pigeon peas in India*. International Workshop on Pigeon peas, Volume 2. India: n.p.

Soriano,M.R., O. Gonzalez and E.Avelino. (1967) Studies on the preparation of soy sauce from coconut paring meal. *Philippines Journal of Science*. 96: 129-137

Yong, F.M. and B.J.B. Wood. (1975). Sucrase from soy sauce mould. Transactions of the *British Mycological Society*. 64: 197-247

--------. (1977a). Microbial succession in experimental soy sauce Koji. *J. Food Technol*. 12: 163-157

--------. (1977a). Microbial succession in experimental soy sauce moromi. *J. Food Technol*. 12: 163-157

ภาคผนวก ก
ตารางข้อมูลผลการทดลอง

ภาคผนวก ก
ตารางข้อมูลผลการทดลอง

ตาราง 5 ปริมาณเอนไซม์อะไมเลส การหมักแต่ละสูตร

สูตร / ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณเอนไซม์อะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	517.69	490.94	488.27	502.76	481.56	534.52	505.96	534.58
2	504.41	488.27	491.06	497.49	361.89	485.16	510.99	503.26
3	486.96	479.76	479.02	501.49	499.81	539.14	512.57	502.67
4	446.58	483.27	471.72	476.10	484.11	544.86	508.44	498.08
5	803.50	487.27	432.05	490.41	506.89	550.20	542.03	512.29
6	930.09	474.45	391.51	505.93	502.05	528.00	513.10	444.28

ตาราง 6 ปริมาณเอนไซม์โปรทีเอส ในการหมักแต่ละสูตร

สูตร / ระยะเวลา(วัน)	ปริมาณเอนไซม์โปรทีเอส (ยูนิตต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก)							
	0	10	20	30	45	60	75	90
1	115.50	203.57	296.38	228.53	240.08	348.56	441.79	415.18
2	187.28	284.21	332.48	309.17	363.41	514.39	333.92	683.93
3	128.70	217.39	334.54	208.93	338.04	404.87	327.90	430.44
4	182.74	198.41	275.14	269.98	273.49	297.62	337.43	212.44
5	115.09	174.69	266.06	163.76	348.77	297.41	542.03	361.97
6	108.08	143.96	192.23	151.39	234.09	380.33	247.09	274.52

ตาราง 7 ปริมาณกรดแลกติกในกระบวนการหมักซีอิ๊ว

สูตร	ปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก)							
ระยะเวลา(วัน)	0	10	20	30	45	60	75	90
1	0.00	0.00	1.22	0.56	1.88	3.49	5.14	5.94
2	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.03	3.02	3.50
4	0.00	0.00	3.86	3.14	4.67	4.25	4.28	5.49
5	0.00	0.00	0.04	0.85	3.48	5.73	3.30	4.89
6	0.00	0.00	1.44	1.67	4.42	3.14	0.00	4.75

ตาราง 8 ปริมาณกรดอะซิติกในกระบวนการหมักซีอิ๊ว

สูตร	ปริมาณกรดอะซิติก(กรัมต่อกรัมเปียกของถั่วหมัก)							
ระยะเวลาหมัก(วัน)	0	10	20	30	45	60	75	90
1	0.00	0.00	1.10	1.80	1.31	2.05	0.62	0.00
2	0.00	0.00	2.18	1.22	1.74	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	1.88	1.61	1.86	0.91	0.00	0.00
4	0.00	1.12	2.33	1.56	1.86	0.00	0.00	0.00
5	0.00	0.00	0.86	0.86	1.22	1.49	0.82	0.00
6	0.00	1.10	1.80	1.31	2.05	0.62	0.00	0.00

ตาราง 9 แสดงค่า pH ของซีอิ๊วแต่ละสูตรตลอดระยะเวลาการหมัก

ช่วงระยะเวลาการหมัก(วัน)	สูตรการหมักซีอิ๊ว ถั่วมะแฮะ : ถั่วเหลือง					
	1	2	3	4	5	6
0	5.46	5.46	5.21	5.36	5.58	5.44
10	4.66	4.79	4.84	5.10	5.47	5.23
20	4.39	4.65	4.79	4.89	5.38	5.10
30	4.37	4.59	4.74	4.73	5.17	4.98
45	4.56	4.68	4.78	4.75	4.89	4.79
60	4.84	4.78	4.85	4.88	4.79	4.77
75	4.67	4.90	4.79	4.87	4.85	4.81
90	4.67	4.83	4.77	4.84	4.77	4.78

ตาราง 10 ปริมาณจุลินทรีย์ แบคทีเรีย ราและยีสต์ ในแต่สูตร

ระยะเวลา	สูตร 1		สูตร 2		สูตร 3		สูตร 4		สูตร 5		สูตร 6	
หมัก	แบคทีเรีย	รา/ยีสต์	แบคทีเรีย	รา/ยีสต์	แบคทีเรีย	รา/ยีสต์	แบคทีเรีย	รา/ยีสต์	แบคทีเรีย	รา/ยีสต์	แบคทีเรีย	รา/ยีสต์
0	$6.00x10^{12}$	$2.80x10^{10}$	$1.49x10^{11}$	$3.00x10^{11}$	$1.32x10^{11}$	$3.20x10^{10}$	$8.60x10^{10}$	$4.70x10^{10}$	$3.23x10^{12}$	$1.40x10^{10}$	$2.97x10^{12}$	$6.80x10^{10}$
10	$6.08x10^{11}$	$4.00x10^{10}$	$1.81x10^{11}$	$1.70x10^{10}$	$1.31x10^{12}$	$2.00x10^{10}$	$4.00x10^{10}$	$4.20x10^{10}$	$3.90x10^{11}$	$1.00x10^{10}$	$1.13x10^{11}$	$2.30x10^{7}$
20	$2.32x10^{11}$	$2.50x10^{10}$	$2.08x10^{11}$	$1.20x10^{7}$	$1.93x10^{11}$	$13.00x10^{10}$	$3.20x10^{10}$	$1.50x10^{10}$	$1.09x10^{11}$	$3.00x10^{9}$	$5.50x10^{10}$	$2.20x10^{7}$
30	$2.96x10^{11}$	$1.70x10^{10}$	$6.40x10^{10}$	$3.00x10^{8}$	$2.57x10^{11}$	$10.00x10^{10}$	$5.36x10^{11}$	$1.00x10^{8}$	$7.84x10^{11}$	$4.00x10^{7}$	$8.00x10^{10}$	$1.20x10^{7}$
45	$1.56x10^{11}$	$1.20x10^{10}$	$3.30x10^{10}$	$5.00x10^{6}$	$1.49x10^{11}$	$11.00x10^{10}$	$9.10x10^{10}$	$4.00x10^{6}$	$1.12x10^{12}$	$3.00x10^{6}$	$6.00x10^{10}$	$3.00x10^{6}$
60	$9.30x10^{10}$	$9.00x10^{4}$	$8.60x10^{10}$	$3.00x10^{5}$	$5.40x10^{10}$	$4.00x10^{4}$	$6.80x10^{10}$	$7.00x10^{5}$	$3.16x10^{11}$	$2.00x10^{5}$	$3.96x10^{11}$	$2.00x10^{5}$
75	$4.00x10^{11}$	$5.00x10^{4}$	$3.90x10^{10}$	$1.00x10^{4}$	$1.22x10^{11}$	$2.00x10^{3}$	$7.50x10^{10}$	$3.00x10^{4}$	$2.77x10^{11}$	$2.00x10^{3}$	$8.88x10^{11}$	$1.00x10^{3}$
90	$4.96x10^{11}$	$2.00x10^{4}$	$1.50x10^{10}$	$1.00x10^{4}$	$4.45x10^{11}$	$1.00x10^{3}$	$4.60x10^{10}$	$2.00x10^{3}$	$2.74x10^{11}$	$1.00.x10^{3}$	$2.76x10^{11}$	$1.00x10^{3}$

ตาราง 11 ปริมาณกรดอะมิโนในช่วงการหมักเวลา 0 วัน

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อ100 กรัม)					
	1	2	3	4	5	6
Asp	51.86	77.67	109.81	142.64	123.46	93.40
Ser	48.96	79.58	108.15	126.73	131.66	91.73
Glu	157.25	203.83	311.45	308.71	374.78	263.98
Gly	21.88	39.41	48.64	55.30	51.87	43.05
His	35.76	92.88	125.91	166.13	98.31	94.35
Arg	55.82	110.34	141.45	129.62	197.42	159.37
Thr	31.25	55.31	70.09	57.62	88.52	75.56
Ala	50.76	76.56	107.24	119.04	133.00	88.43
Pro	22.43	43.09	41.97	93.30	86.58	56.50
Tyr	30.81	56.85	81.33	93.82	111.75	78.88
Val	36.58	15.77	81.26	94.74	118.17	69.65
Met	7.95	79.42	32.08	31.68	51.48	26.37
Lys	44.91	93.75	143.97	148.97	197.78	121.07
Ile	33.84	52.84	78.63	94.72	118.34	66.32
Leu	53.05	83.95	127.59	156.30	186.30	107.96
Phe	58.78	79.37	106.68	131.10	145.24	80.56
Total	741.89	1240.63	1716.25	1950.41	2214.67	1517.18

ตาราง 12 ปริมาณกรดอะมิโนในช่วงการหมักเวลา 60 วัน

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อ100 กรัม)					
	1	2	3	4	5	6
Asp	261.16	354.41	393.91	413.44	500.61	489.65
Ser	74.12	154.41	154.67	192.83	237.41	237.55
Glu	286.93	527.83	634.25	697.55	1150.29	879.86
Gly	159.01	133.13	126.12	149.49	177.75	211.53
His	139.77	142.92	147.15	149.17	165.63	146.85
Arg	211.63	111.74	149.44	66.62	111.59	69.65
Thr	102.24	192.80	204.78	242.14	373.06	268.52
Ala	183.32	191.96	196.31	224.90	326.34	229.22
Pro	184.37	61.48	75.06	93.58	145.30	227.06
Tyr	143.67	167.67	189.00	222.55	167.65	220.24
Val	208.10	205.44	221.58	263.50	307.92	265.90
Met	35.75	49.24	58.33	72.70	91.08	77.51
Lys	285.14	301.29	320.13	366.76	387.10	356.70
Ile	162.50	177.90	197.79	232.65	283.90	246.53
Leu	228.81	245.64	273.13	328.36	415.22	364.21
Phe	233.61	226.59	235.15	264.59	317.16	254.16
Total	2900.12	3244.47	3576.81	3980.82	5157.99	4545.15

ตาราง 1 ปริมาณกรดอะมิโนในช่วงการหมักเวลา 90 วัน

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อ100 กรัม)					
	1	2	3	4	5	6
Asp	361.73	378.22	468.27	457.78	559.83	588.78
Ser	24.46	162.59	118.76	209.50	246.80	281.20
Glu	377.13	523.75	704.19	735.07	1009.83	1030.52
Gly	211.21	145.66	160.31	173.30	222.66	204.29
His	175.90	141.39	159.05	149.77	170.05	161.66
Arg	109.60	30.16	46.47	74.47	79.17	79.42
Thr	117.15	184.65	194.49	288.33	383.87	284.27
Ala	243.65	192.31	222.98	251.14	331.75	263.24
Pro	41.53	140.67	78.52	116.92	192.20	223.79
Tyr	194.98	161.58	209.49	223.92	196.62	217.41
Val	282.28	208.76	250.78	283.96	328.06	307.86
Met	54.26	47.26	64.88	76.67	94.58	88.14
Lys	374.00	308.16	374.02	416.40	430.67	445.95
Ile	227.73	180.19	225.17	248.83	303.65	286.64
Leu	320.37	244.34	308.44	349.01	439.25	418.88
Phe	315.25	225.88	269.64	279.53	335.04	297.61
Total	3431.23	3275.59	3855.45	4334.58	5324.03	5179.66

ตาราง 14 ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาล และปริมาณเกลือในน้ำซีอิ๊ว

สูตร	ปริมาณสารวิเคราะห์ (ร้อยละ)		
	โปรตีน	น้ำตาล	เกลือ
1	6.98	0.12	13.74
2	6.00	0.09	13.54
3	6.50	0.19	11.90
4	5.80	0.18	13.10
5	5.45	0.13	12.05
6	6.10	0.13	12.05

ตาราง 15 แสดงปริมาณโลหะหนักจากซีอิ๊วในแต่ละสูตร

สูตรซีอิ๊ว	ปริมาณโลหะหนัก (ppm)		
	ตะกั่ว	คอปเปอร์	แคดเมียม
1	0.003	0	0
2	0.003	0	0
3	0.003	0	0
4	0.004	0	0
5	0.003	0	0
6	0.001	0	0

ภาคผนวก ข

การคำนวณการวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊ว

ภาคผนวก ข

การคำนวณการวิเคราะห์คุณภาพซีอิ๊ว

การคำนวณหาปริมาณคลอไรด์ในและซีอิ๊ว

ตัวอย่าง ปิเปตซีอิ๊ว 4.1 มิลลิลิตร ไปทำปฏิกิริยากับ $AgNo_3$ 0.1 N ในปริมาณที่มากเกินพอ 20 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปเติม 3 M HNO_3 แล้วนำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน KSCN 0.1 N ใช้ปริมาตรไป 5.3 มิลลิลิตร โดยใช้เฟอร์ริคอะลัม 1 มิลลิลิตร เป็นอินดิเคเตอร์

ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง

$Cl^- + Ag^+ \longrightarrow AgCl$ .....(1)

Ag^+ ที่เหลือ $+ KSCN \longrightarrow AgKSCN$ .....(2)

จำนวนโมลของ $AgNO_3$ เริ่มต้น

$$\text{Mol } AgNO_3 = \frac{CV}{1000}$$

$$= \frac{0.1 \times 20}{1000} = 0.002 \text{ ml}$$

จำนวนโมลของ KSCN ที่ทำปฏิกริยา

$$\text{Mol KSCN} = \frac{0.1 \times 5.3}{1000} = 5.3 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

จากปฏิกิริยาที่ 2 จะได้จำนวนโมลของ $AgNO_3$ เหลือจากการทำปฏิกิริยา

$$\text{Mol } AgNO_3 = \frac{0.1 \times 5.3}{1000} = 5.3 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

ดังนั้นจำนวนโมลของ $AgNO_3$ ที่ทำปฏิกิริยากับ KSCN เท่ากับ $0.002 - 5.3 \times 10^{-4} = 0.00147$ mol

จากปฏิกิริยาที่ 1 Ag^+ 1 mol = Cl^- 1 mol

ดังนั้น Ag^+ 0.00147 = Cl^- 0.00147 mol

Cl^- 0.00147 mol มาจากสารตัวอย่าง 10 ml

ซึ่งในแต่ละตัวอย่าง 10 ml ถูกเจือจางมาจากสารตัวอย่าง 50 ml

ดังนั้น Cl^- มี $0.00147 \times 5 = 7.35 \times 10^{-3}$ mol

ในตัวอย่าง 4.1 มิลลิลิตร มี $Cl^- = 7.35 \times 10^{-3}$ mol = 0.26 กรัม

ซึ่ง Cl^- 35.5 กรัม ได้มาจาก NaCl 58.5 กรัม

Cl^- 0.26 กรัม ได้มาจาก NaCl $\frac{58.5 \times 0.26}{35.5}$ = 0.42 กรัม

ดังนั้นในตัวอย่าง 4.1170 กรัม มี NaCl 0.42 กรัม

ดังนั้นในตัวอย่าง 100 กรัม มี NaCl $\frac{0.42 \times 100}{4.1170}$

= 10.20%

ดังนั้น ในเต้าเจี้ยวมีปริมาณ NaCl อยู่ร้อยละ 10.20%

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนในเต้าเจี้ยวและซีอิ๊ว

ตัวอย่าง ปิเปตซีอิ๊ว 1.42 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับ 37% HCHO จำนวน 14 ml จากนั้นนำไปไทเทรตกับสารละลายมาตร 0.25 N NaOH ซึ่งใช้ปริมาตรไป 1.6 ml โดยใช้ ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

ความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH

ชั่ง KHP มา 0.4033 g นำมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.5 N NaOH ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ ครั้งที่ 1 3.2 ml

จากสูตร

$$\text{Normality} = \frac{\text{gKHP} \times 1000}{\text{ml NaOH x204.224}}$$

ครั้งที่ 1

$$N = \frac{0.4033 \times 1000}{3.2 \times 204.224}$$

ครั้งที่ 2

$$N = \frac{0.4033 \times 1000}{3.3 \times 204.224}$$

$$= 0.5984$$

ความเข้มข้นของ NaOH เฉลี่ย เท่ากับ $\frac{0.6171 \times 0.5984}{2}$ = 0.6078 N

ปริมาณโปรตีน

จากสูตร

$$\% \text{ ammonical} = \frac{\text{vol.NaOH(ml)} \times \text{N(NaOH)} \times 1.4007}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

$$= \frac{1.6 \times 0.6078 \times 1.4007}{1.4226}$$

$$= 0.958\%$$

การคำนวณหาปริมาณน้ำตาล

ชั่งสารตัวอย่างมา 3.0933 g เติมน้ำกลั่นไป 30 ml จากนั้นนำไปกรองแล้วนำสารละลายที่กรองได้มาปรับปริมาตรให้เป็น 50 ml ด้วยน้ำกลั่น แล้วปิเปตมา 0.5 ml ใส่หลอดทดลอง จาสกนั้นเติม 4% phenol 0.5 ml เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 15 ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.808 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าความเข้มข้นจากสมการกราฟมาตรฐาน ดังนี้

$Y = 0.0238x - 0.1716$

$0.808 = 0.0238x - 0.1716$

$X = 41.16$ ppm

จะได้ $x = 41.16$ mg/L

$$= \frac{41.16 \times 10^{-3}}{180.16} \text{ g/1000g}$$

$= 2.28 \times 10^{-7}$ mol/g

จากสูตร concentration (mol/g) $= \frac{x(g)}{\text{M.W.} \times \text{น้ำหนักสารตัวอย่าง}}$

$$2.28 \times 10^{-7} \text{ mol/g} = \frac{x(g)}{180.16. \times 3.0933}$$

$X(g) = 1.27 \times 10^{-4}$

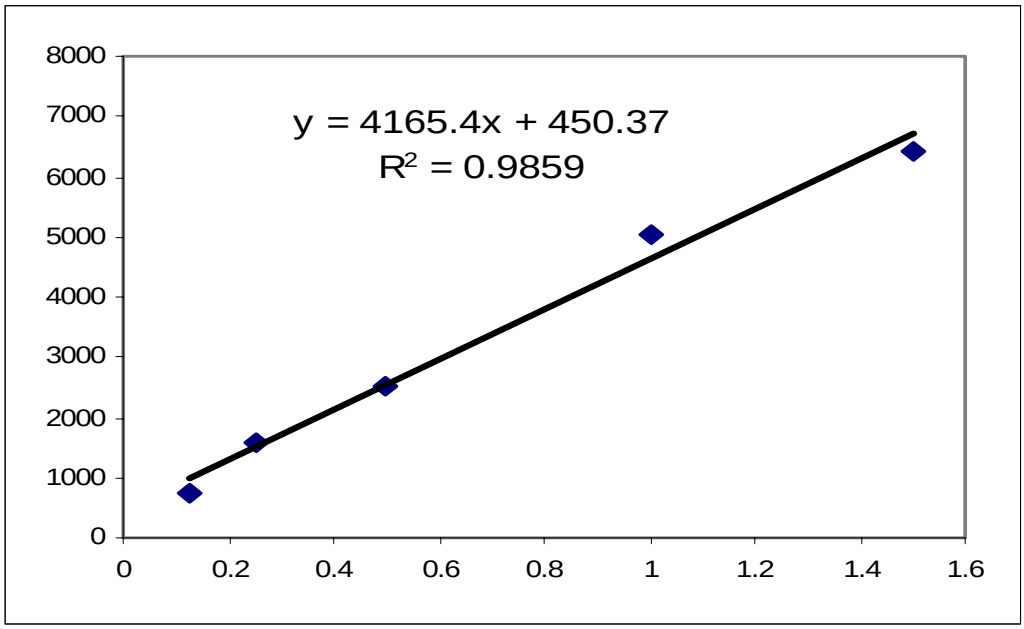
จากสูตร %sugar $= \frac{x(g)}{\text{M.W.} \times \text{น้ำหนักสารตัวอย่าง}} \times 100$

$$= \frac{1.27 \times 10^{-4}}{3.0933} \times 100$$

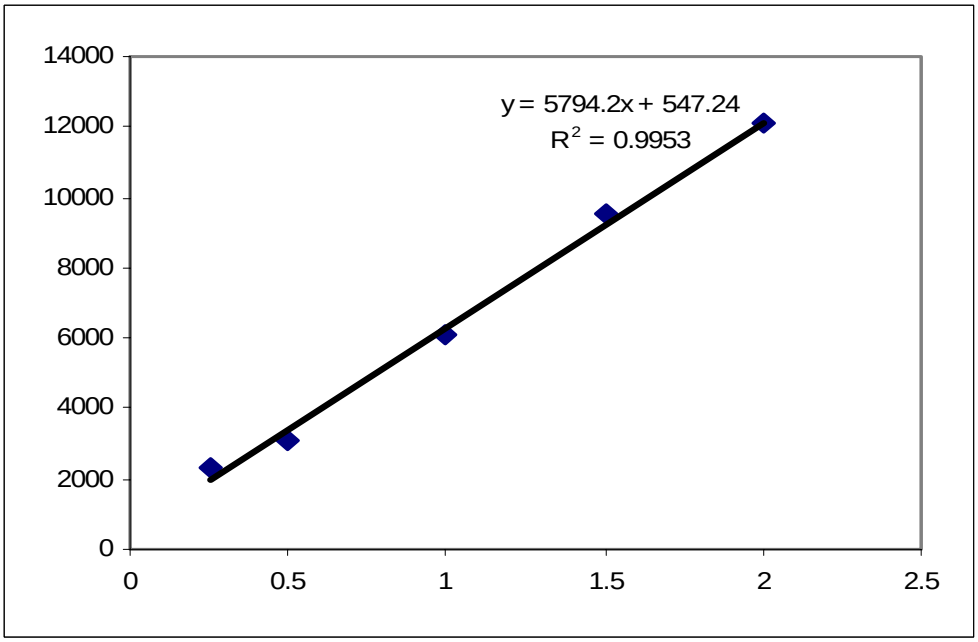
$= 4.116 \times 10^{-3}$

ภาคผนวก ค
แสดงกราฟมาตรฐานและโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์

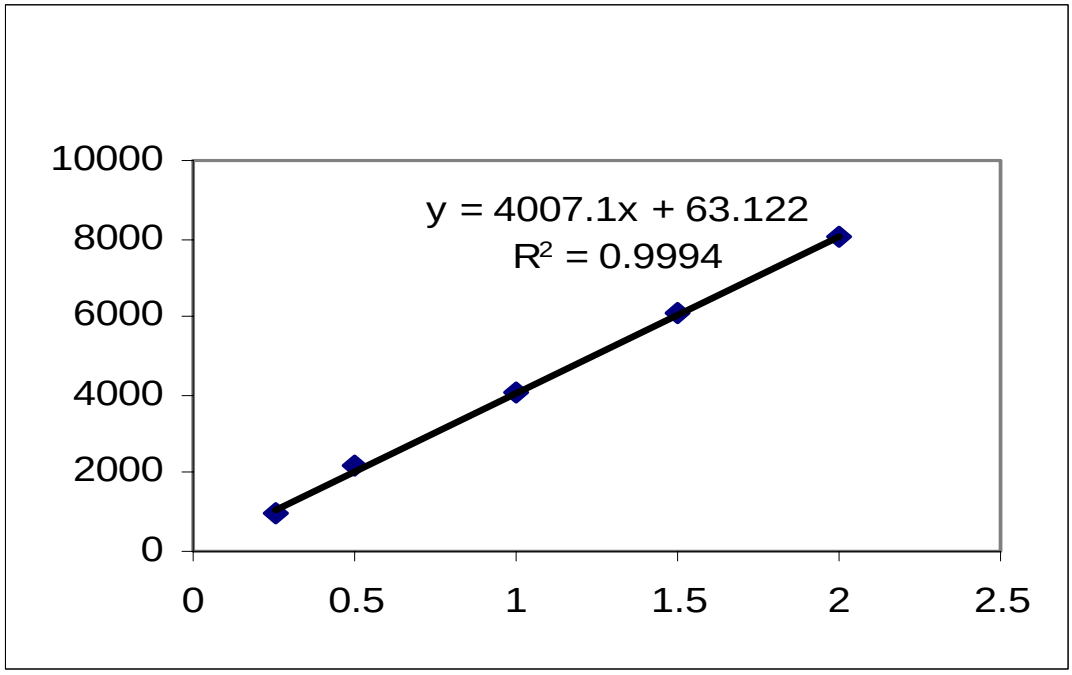
ภาคผนวก ค
แสดงกราฟมาตรฐานและโครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์



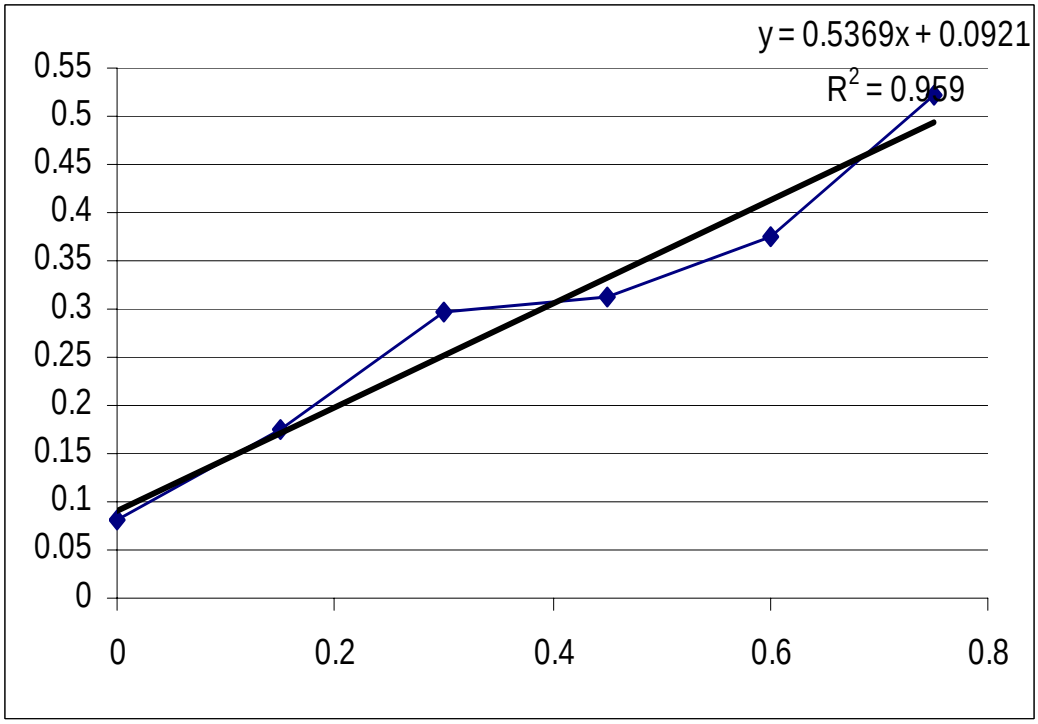
ภาพประกอบ 17 กราฟมาตรฐานกรดซิตริก



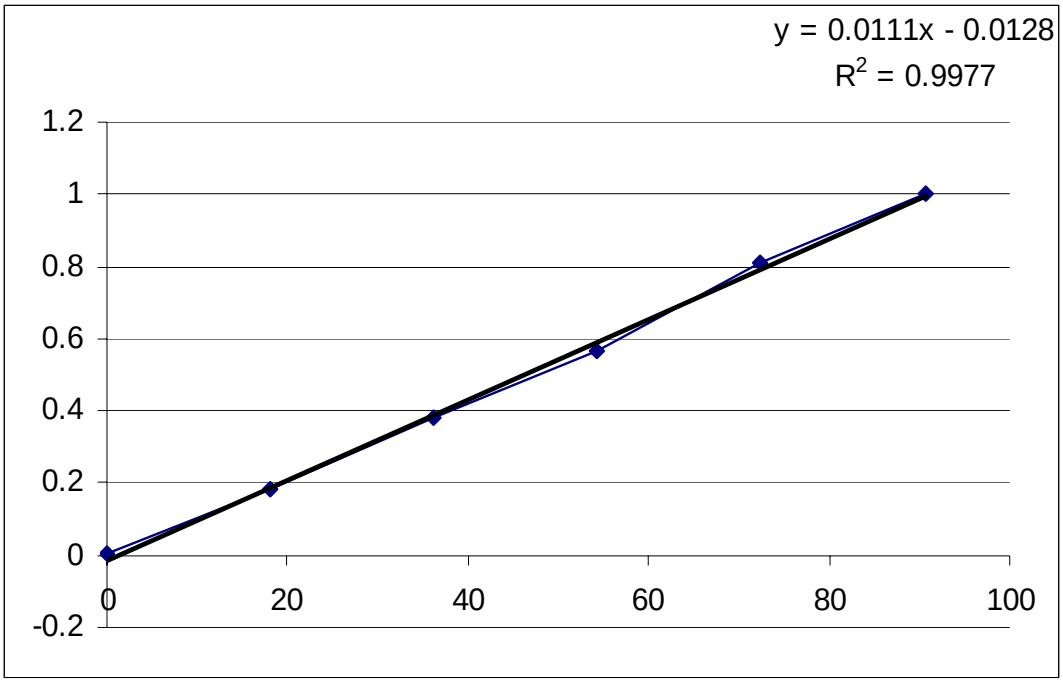
ภาพประกอบ 18 กราฟมาตรฐานกรดแลกติก



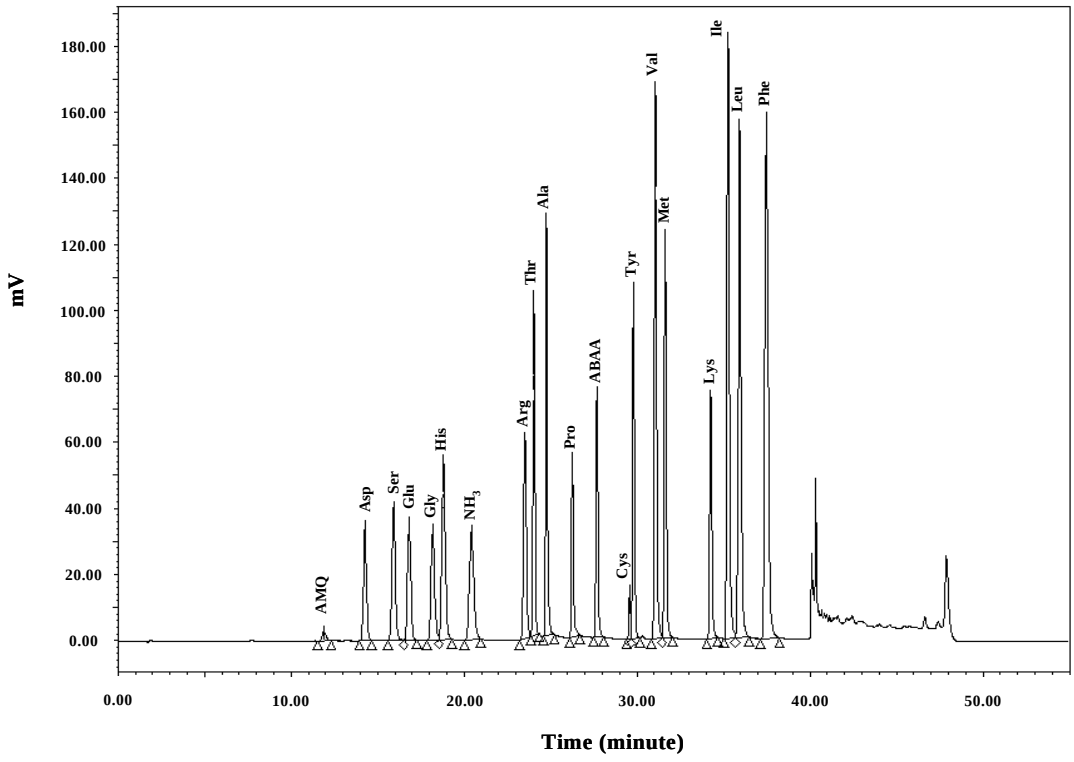
ภาพประกอบ 19 กราฟมาตรฐานกรดอะซิติก



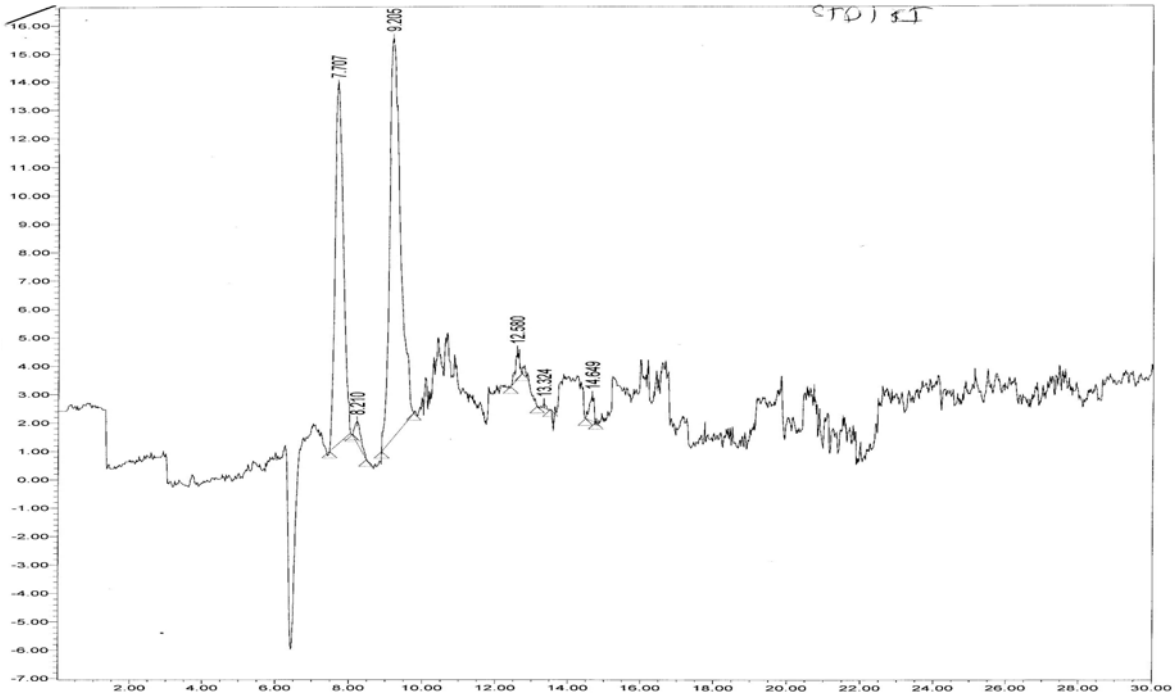
ภาพประกอบ 20 กราฟมาตรฐานเอนไซม์อะไมเลส



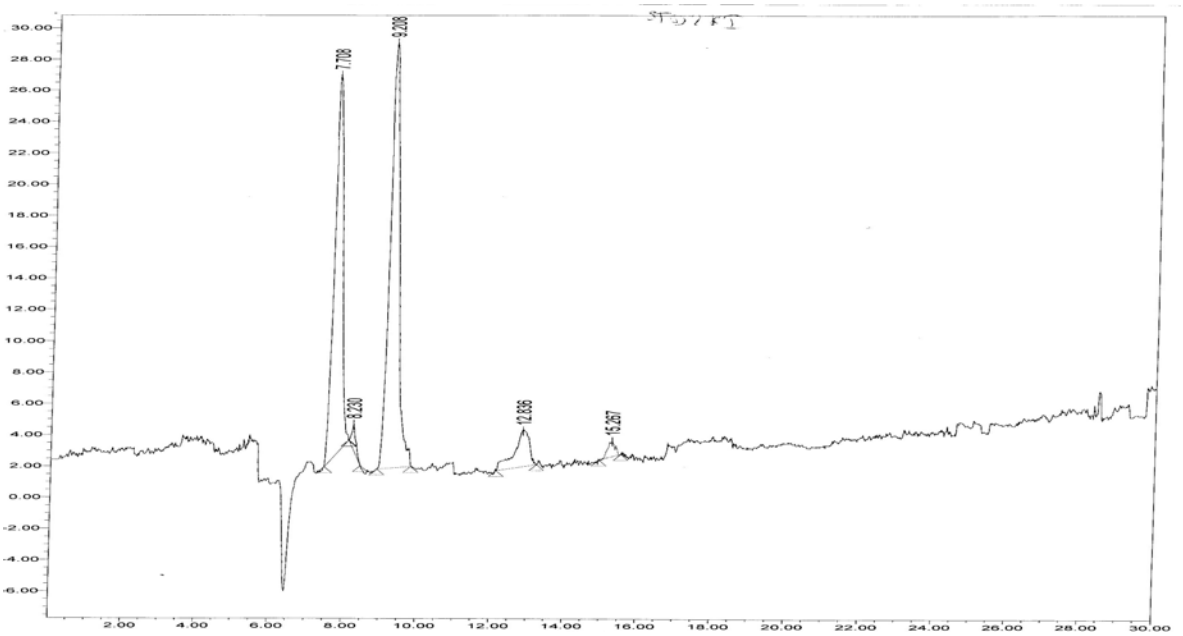
ภาพประกอบ 21 กราฟมาตรฐานเอนไซม์โปรทีเอส



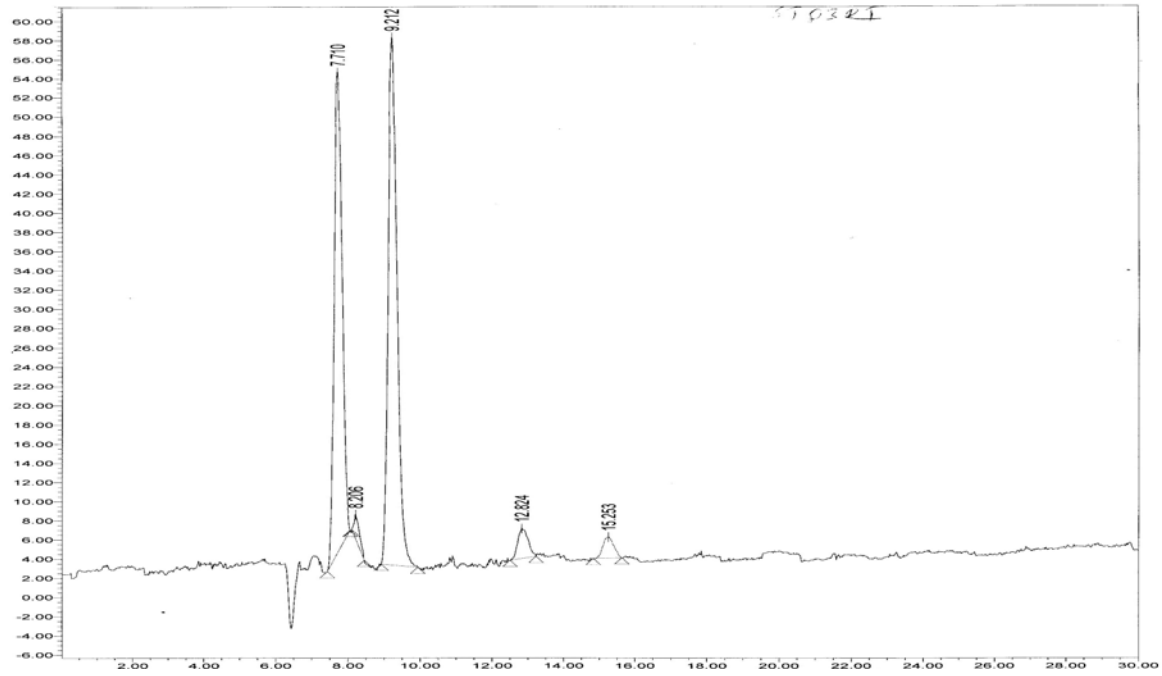
ภาพประกอบ 22 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์กรดอะมิโนมาตรฐาน (Standard amino acid)



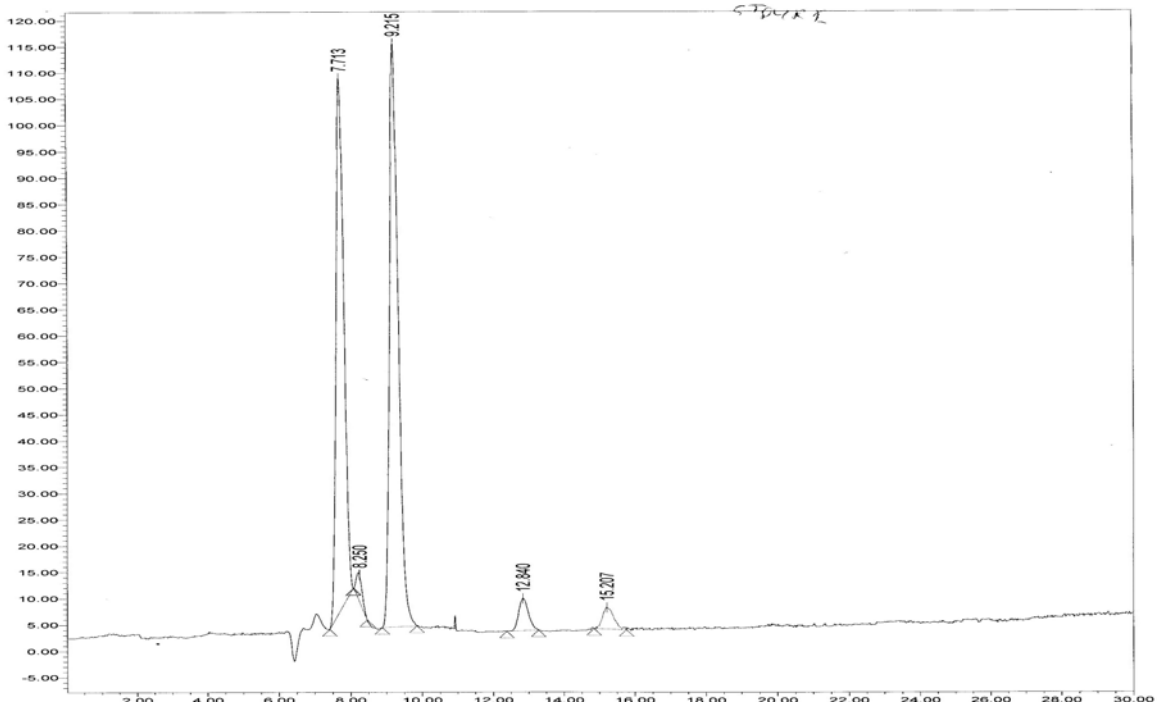
ภาพประกอบ 23 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลกติก อะซิติก และกรดซิตริก เข้มข้น 0.125 g/L



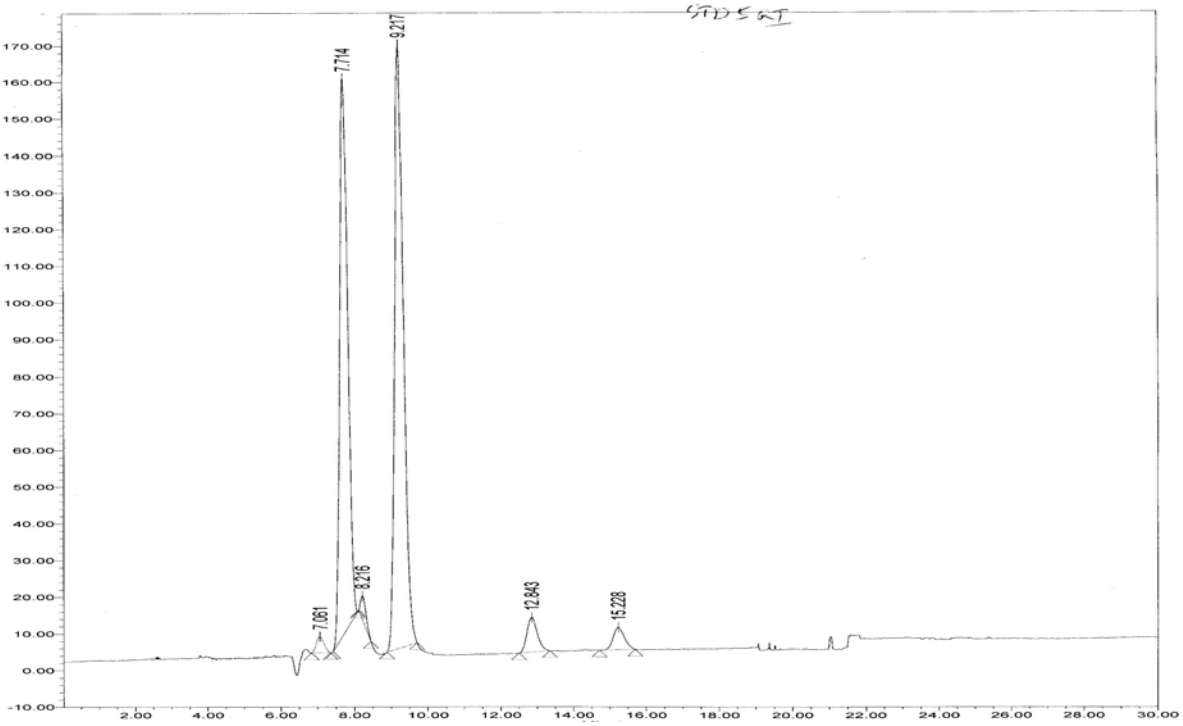
ภาพประกอบ 24 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลกติก อะซิติก และกรดซิตริก เข้มข้น 0.25 g/L



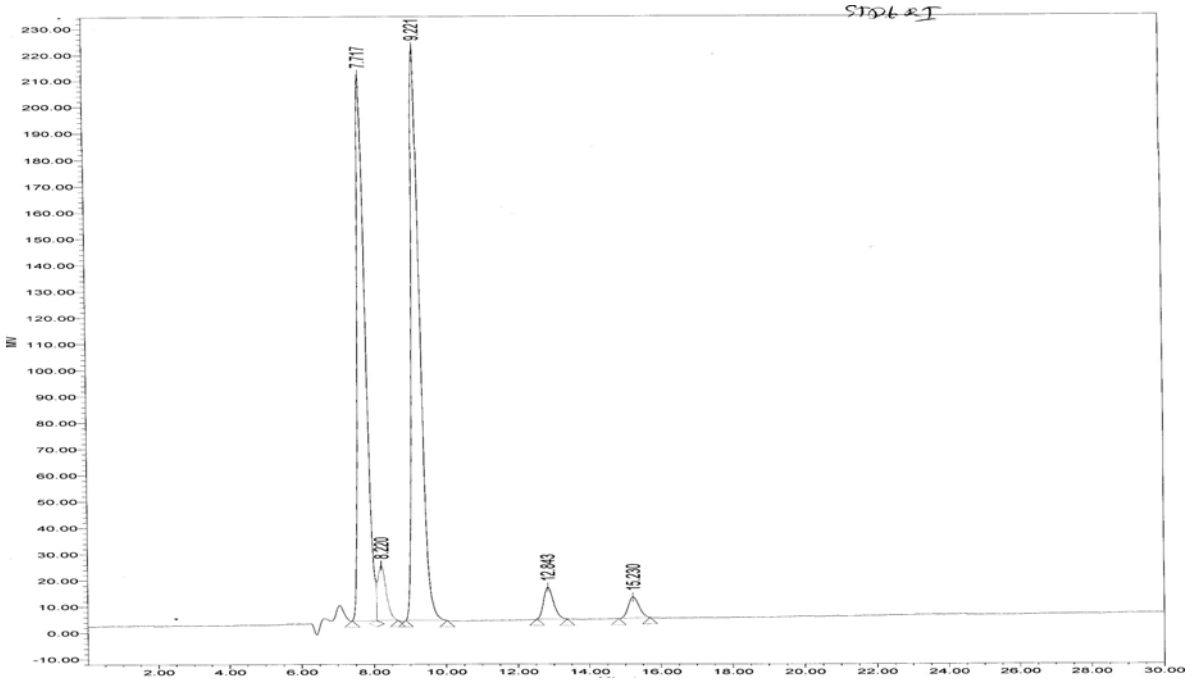
ภาพประกอบ 25 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลกติก อะซิติก และกรดซิตริก เข้มข้น 0.5 g/L



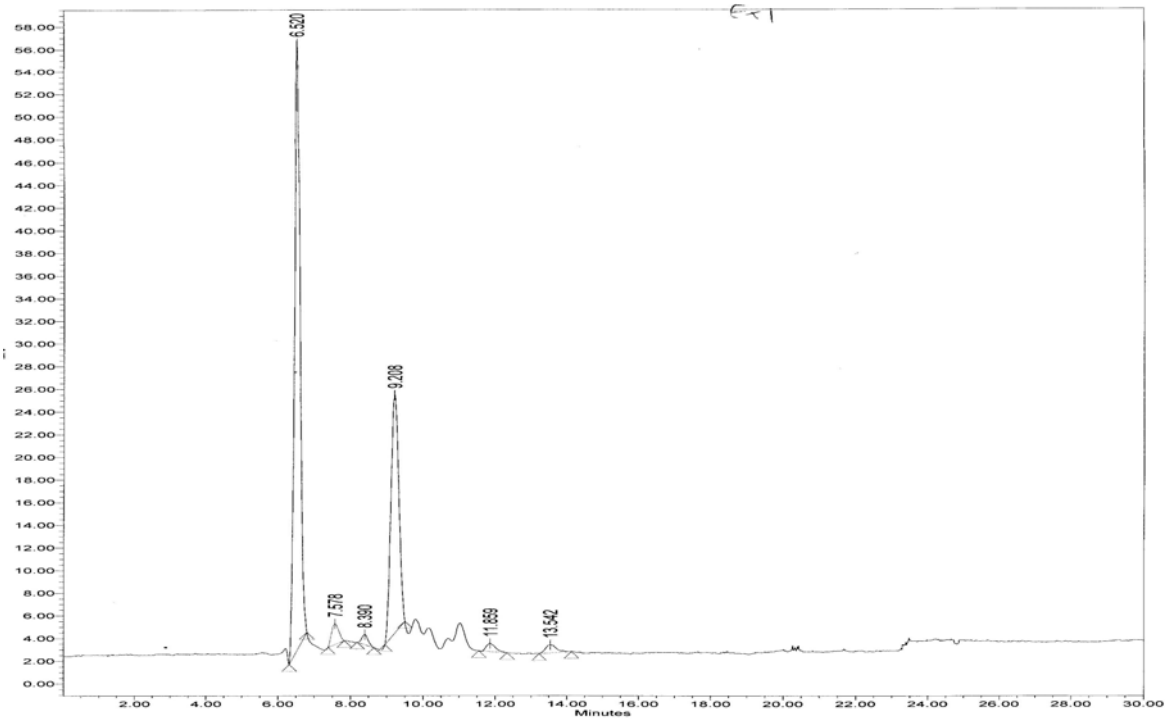
ภาพประกอบ 26 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลกติก อะซิติก และกรดซิตริก เข้มข้น 1 g/L



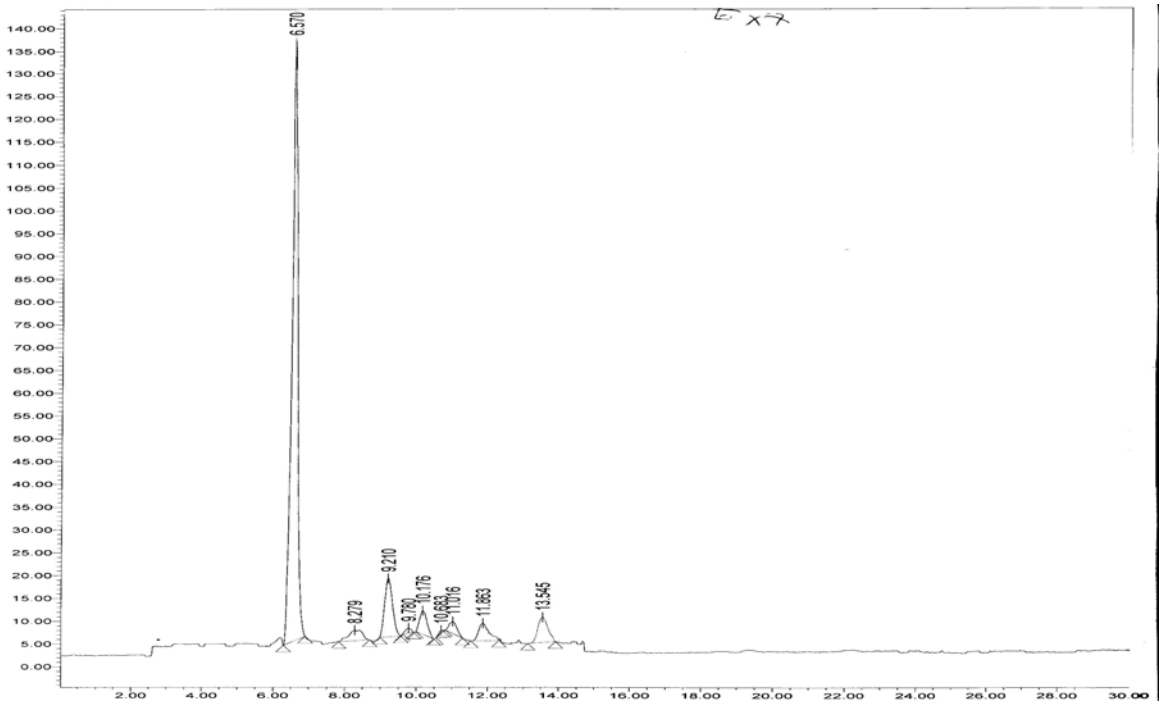
ภาพประกอบ 27 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลกติก อะซิติก และกรดซิตริก เข้มข้น 1.5 g/L



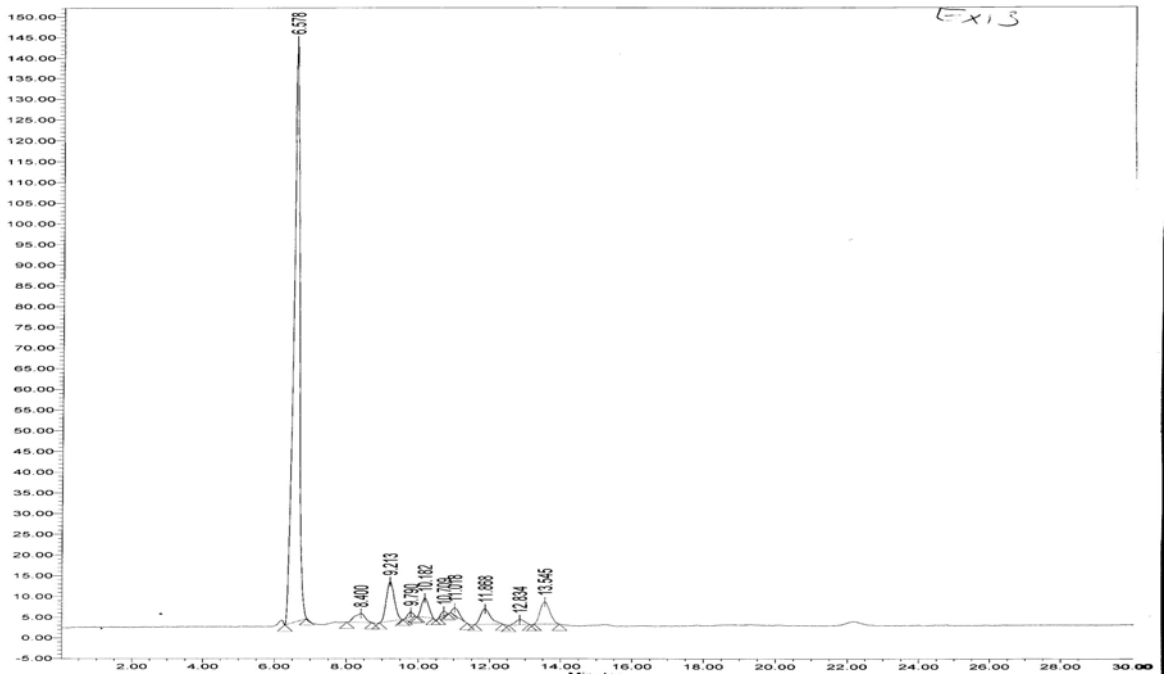
ภาพประกอบ 28 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดแลกติก อะซิติก และกรดซิตริก เข้มข้น 2 g/L



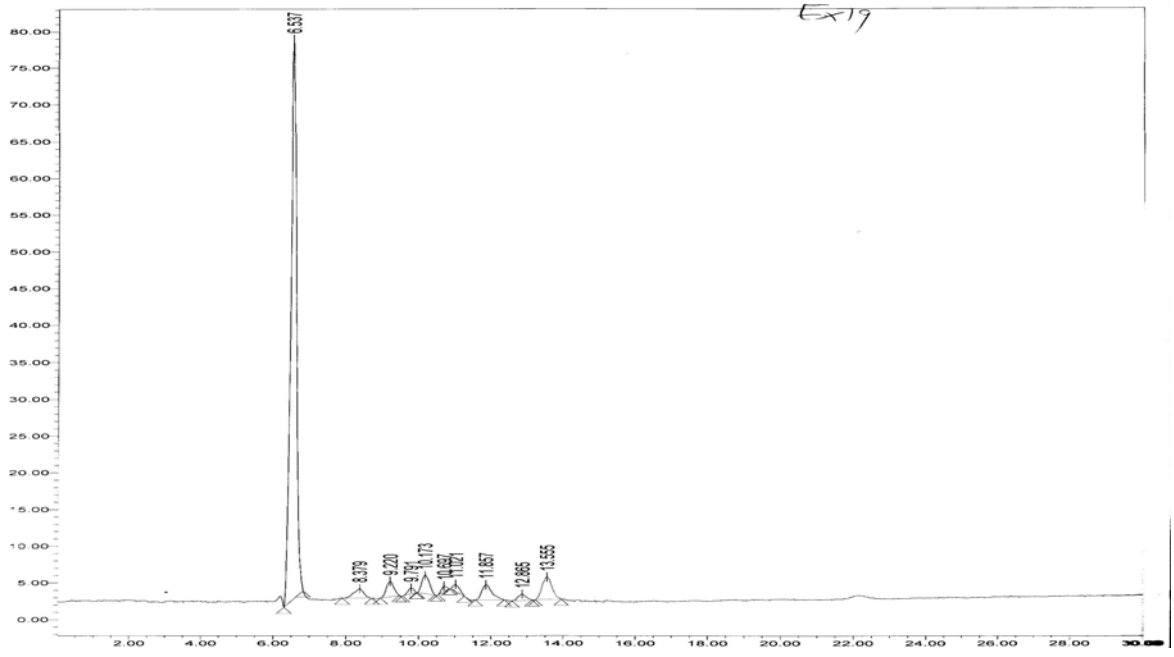
ภาพประกอบ 29 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 0 วัน



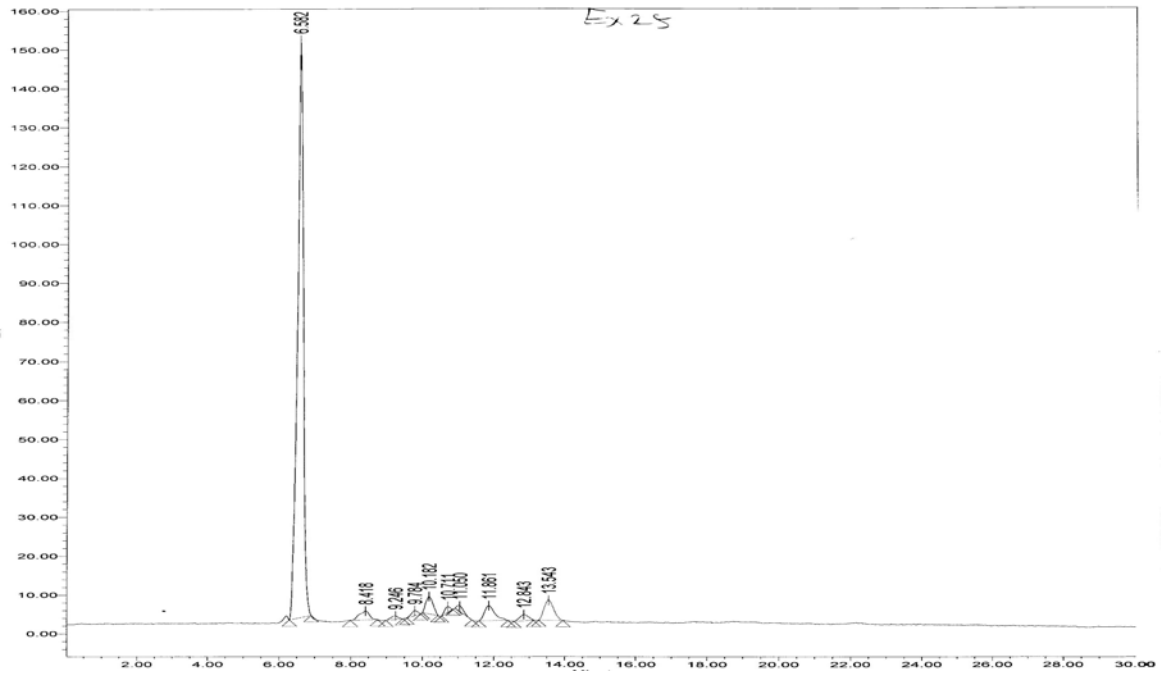
ภาพประกอบ 30 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 10 วัน



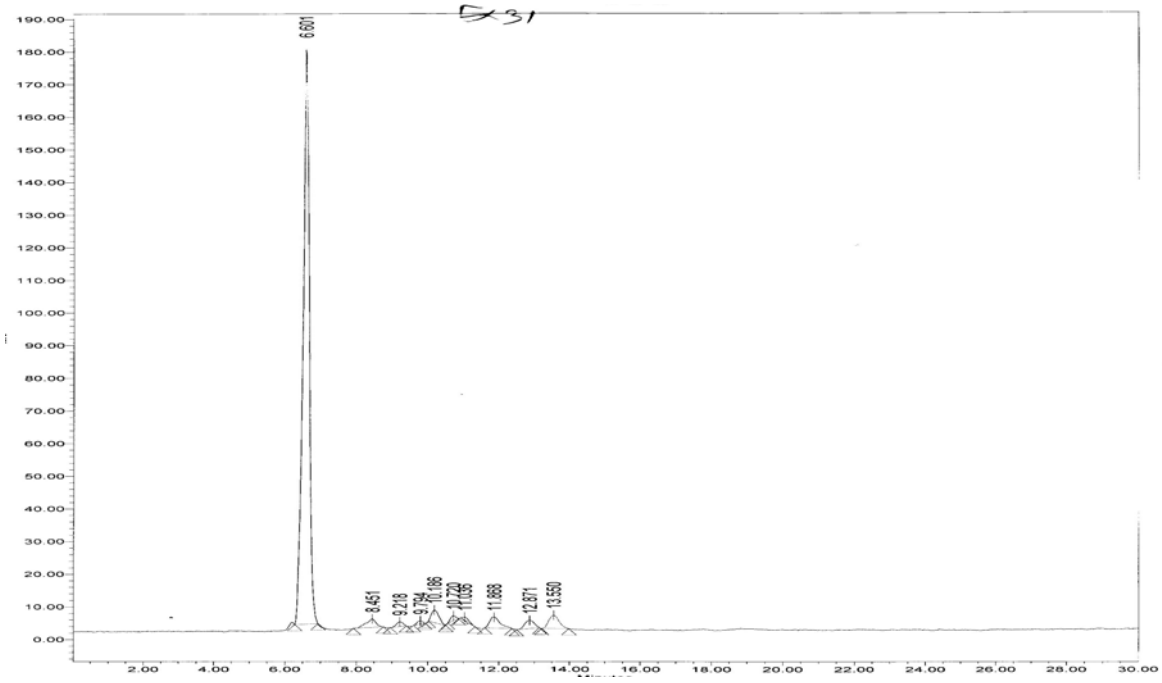
ภาพประกอบ 31 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 20 วัน



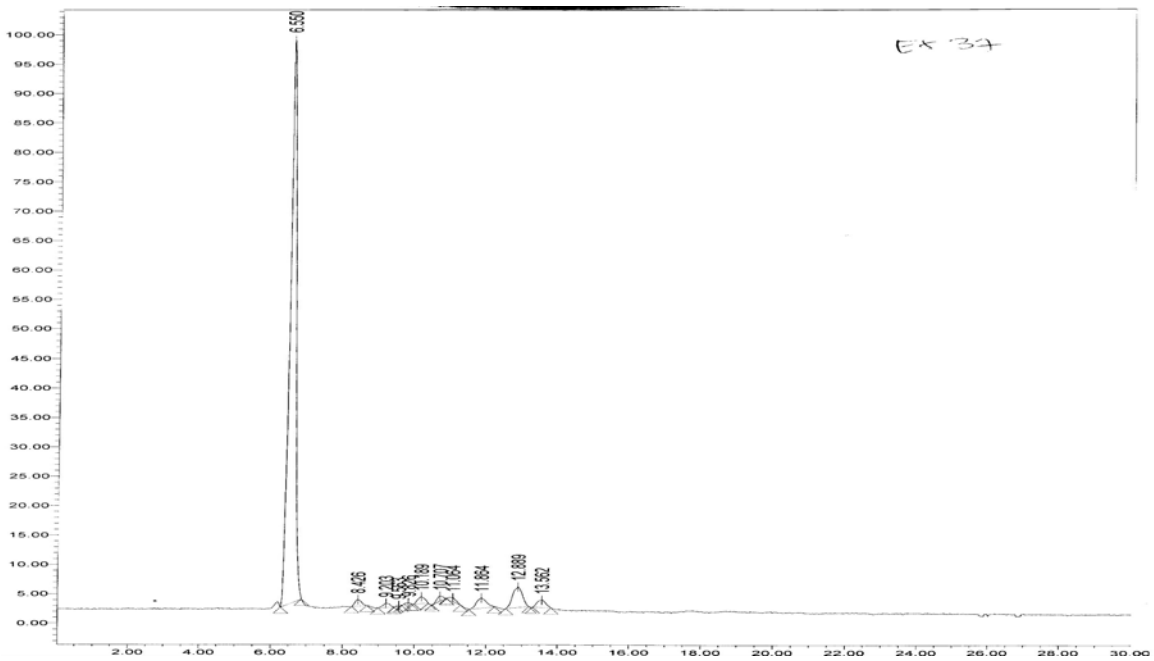
ภาพประกอบ 32 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 30 วัน



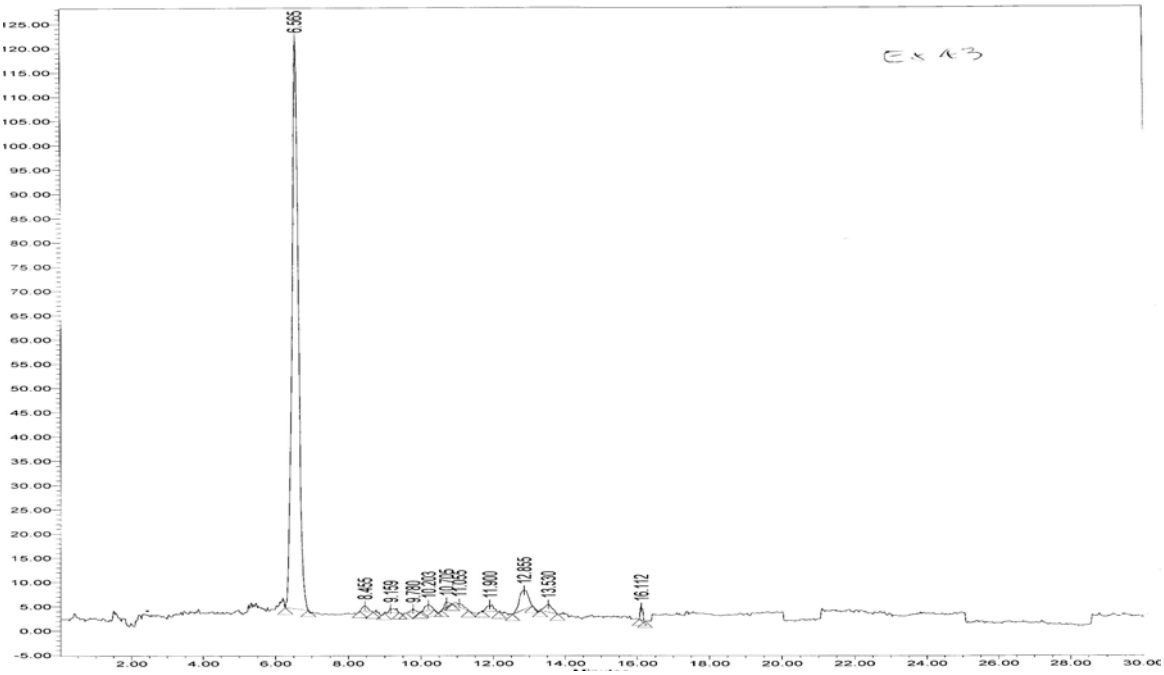
ภาพประกอบ 33 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 45 วัน



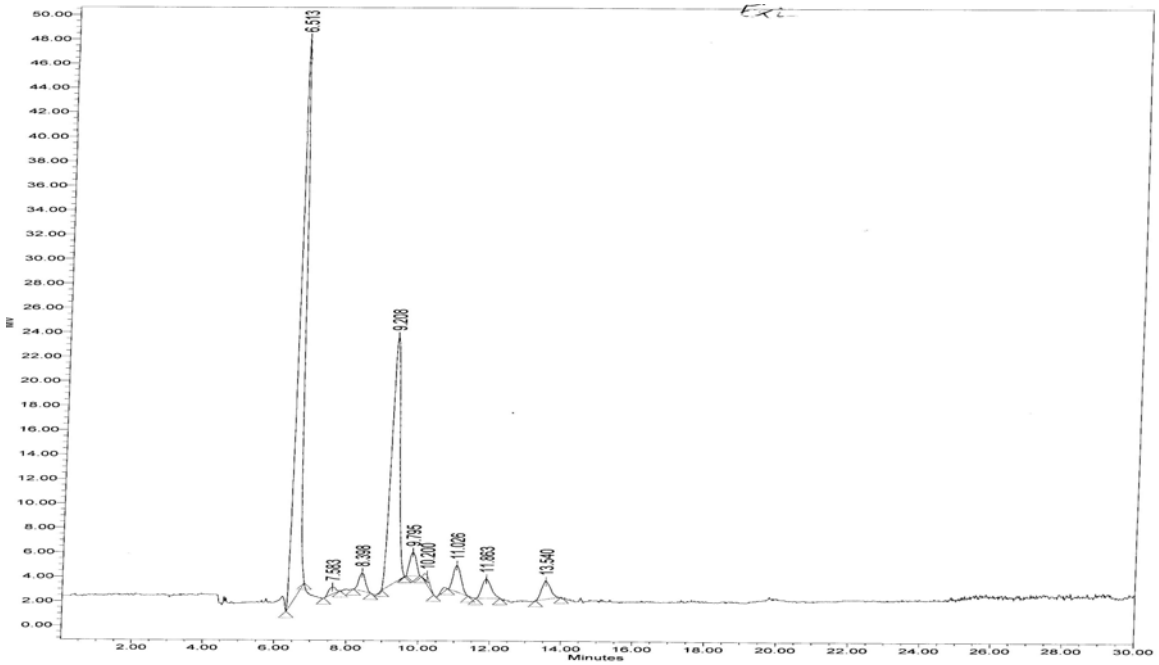
ภาพประกอบ 34 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 60 วัน



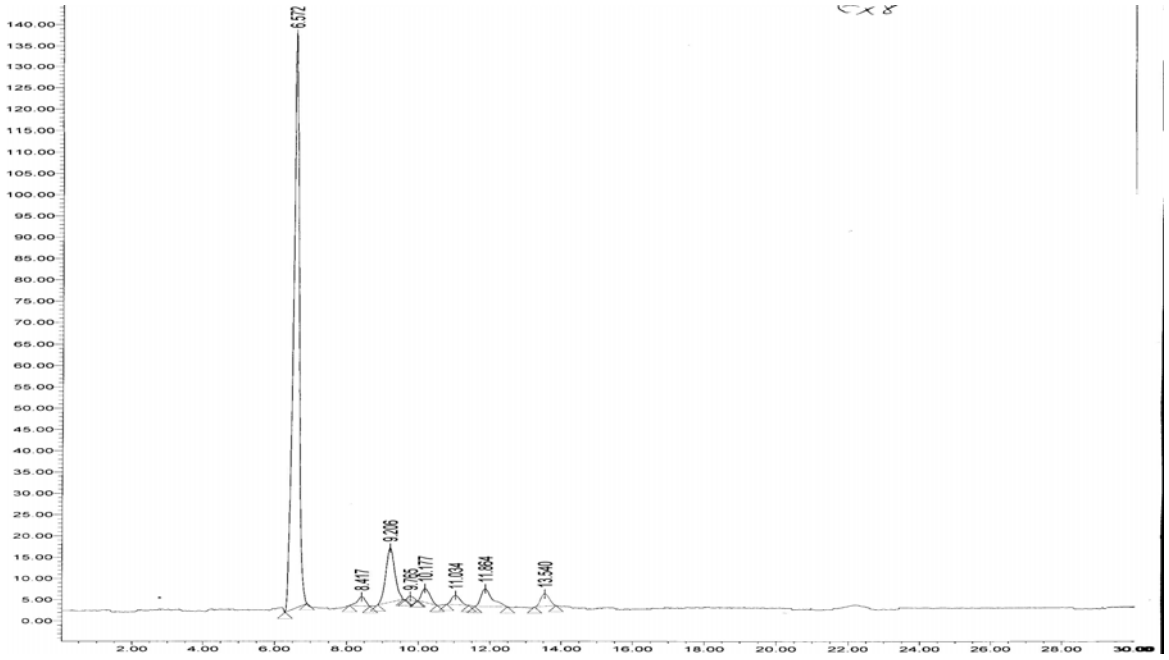
ภาพประกอบ 35 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 75 วัน



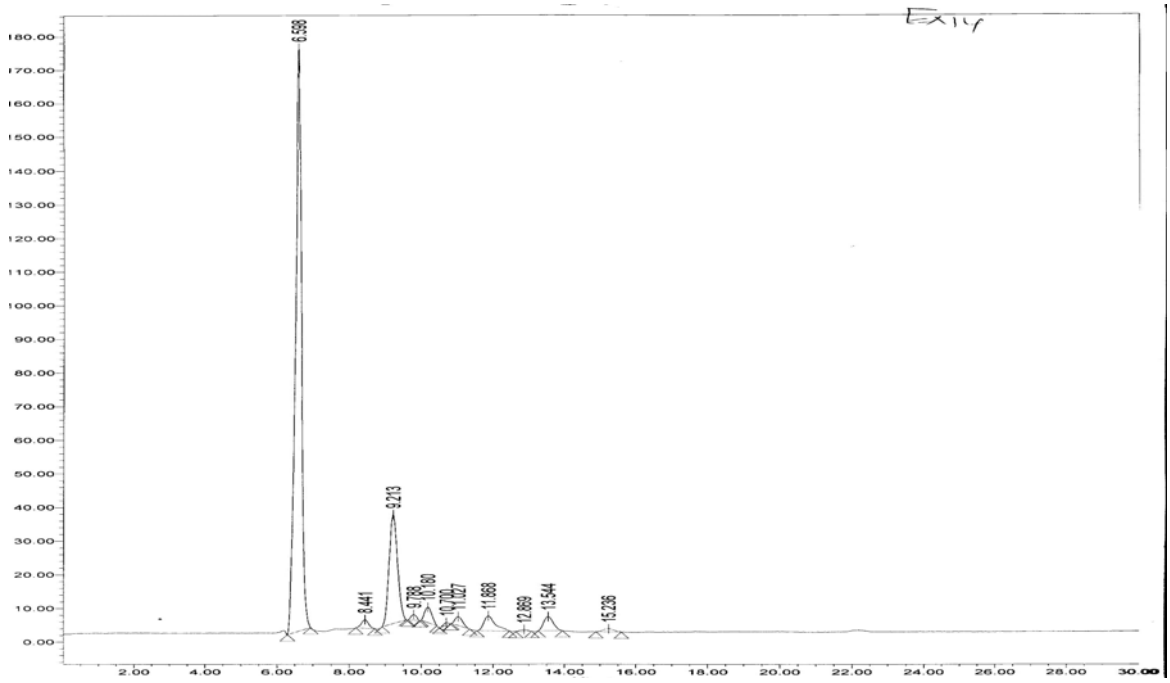
ภาพประกอบ 36 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 1 ระยะเวลาหมัก 90 วัน



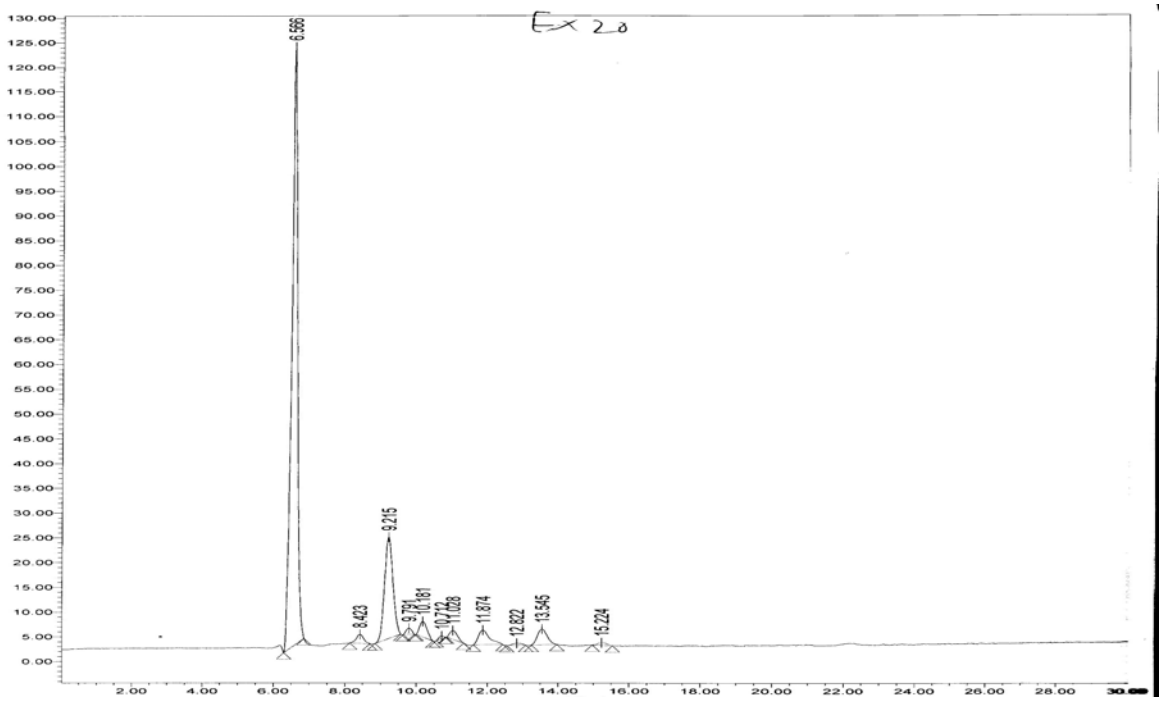
ภาพประกอบ 37 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 0 วัน



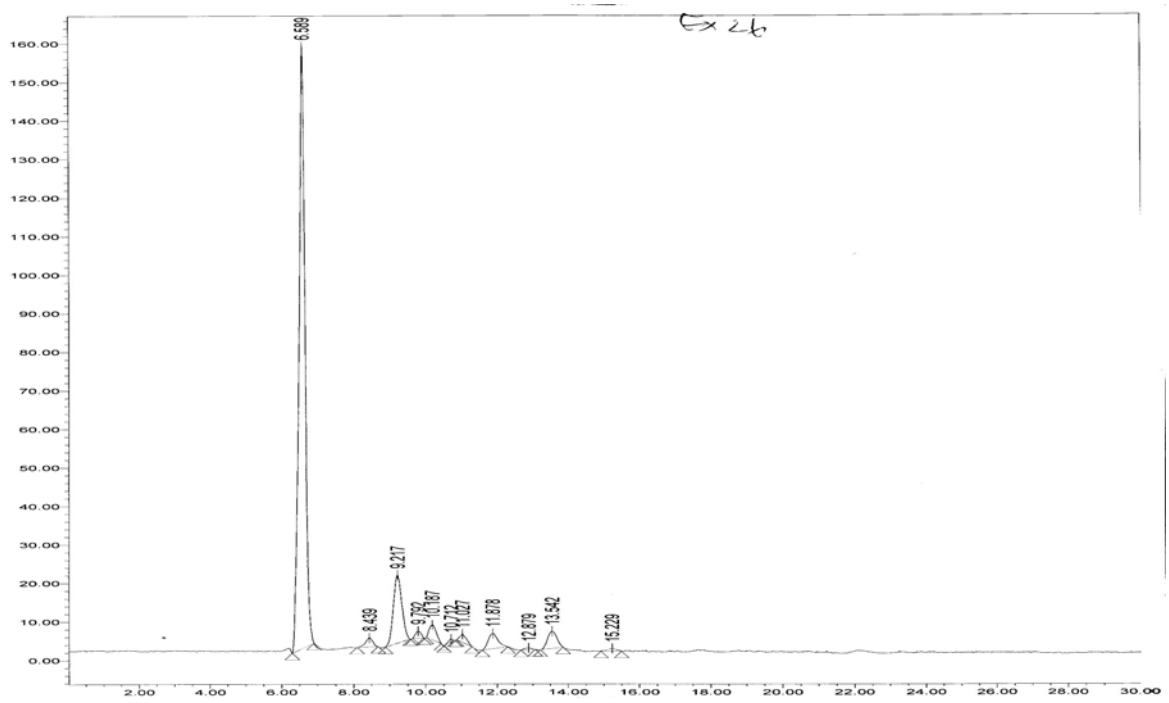
ภาพประกอบ 38 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 10 วัน



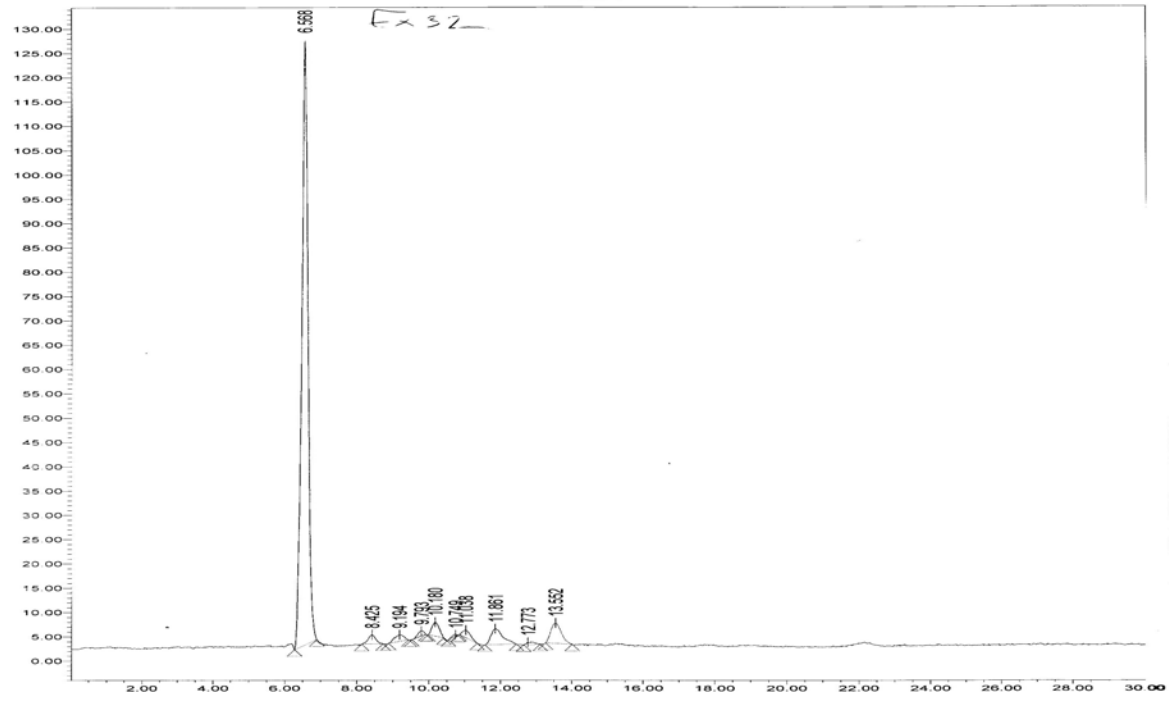
ภาพประกอบ 39 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 20 วัน



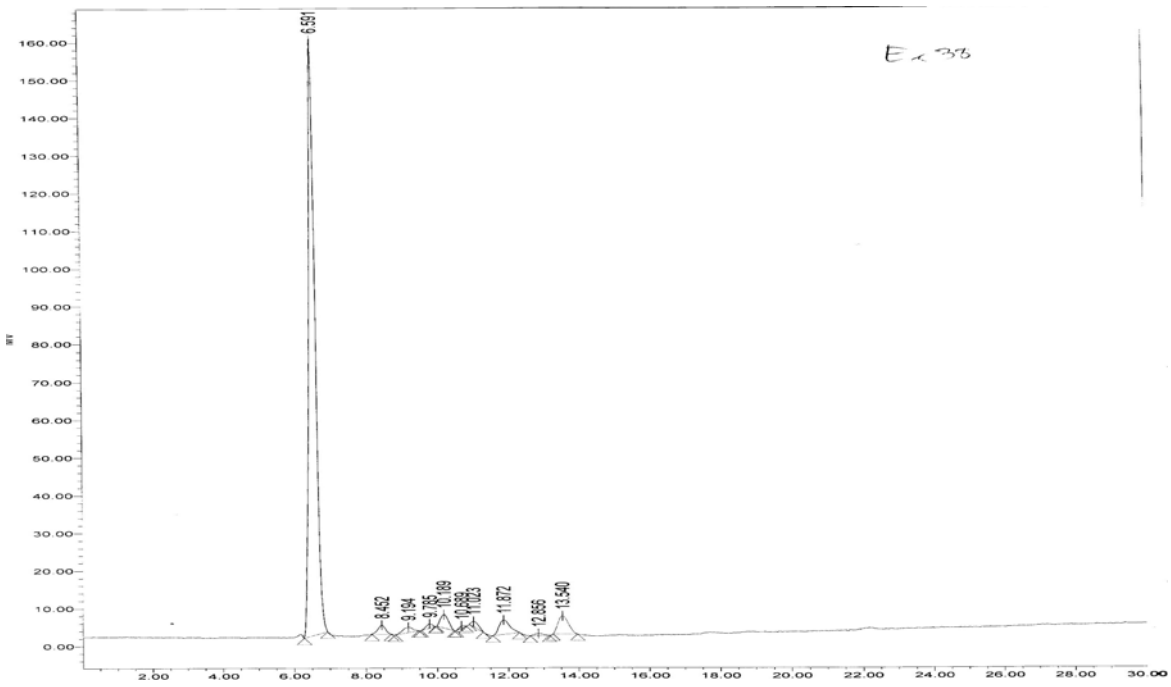
ภาพประกอบ 40 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 30 วัน



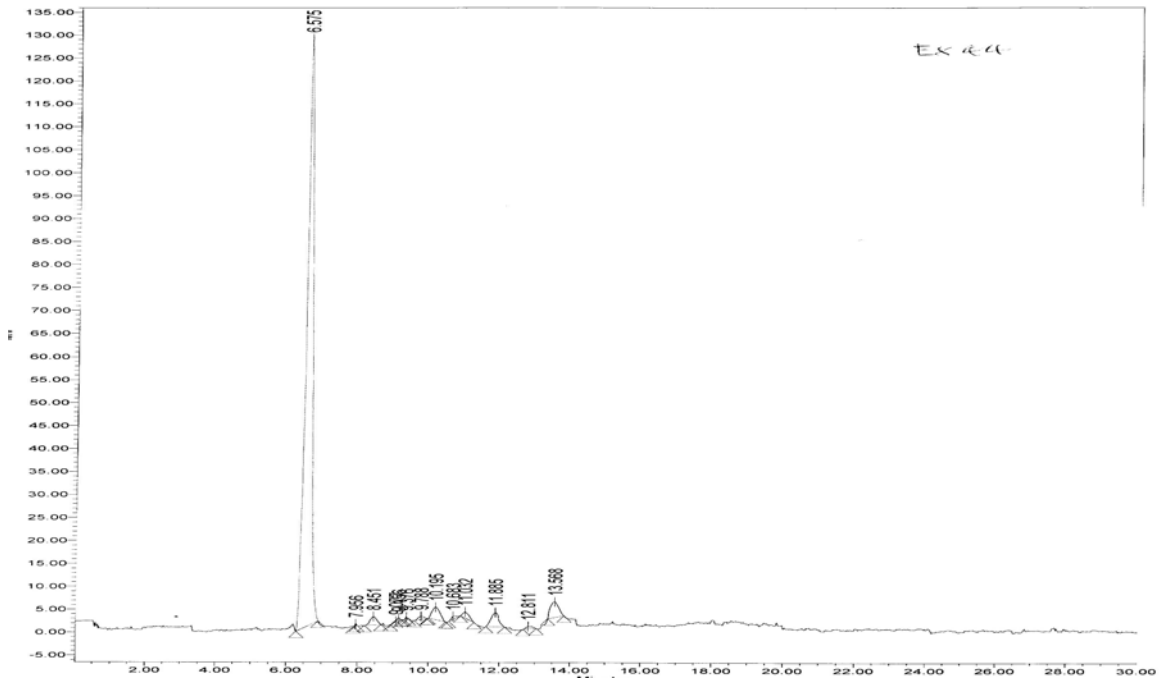
ภาพประกอบ 41 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 45 วัน



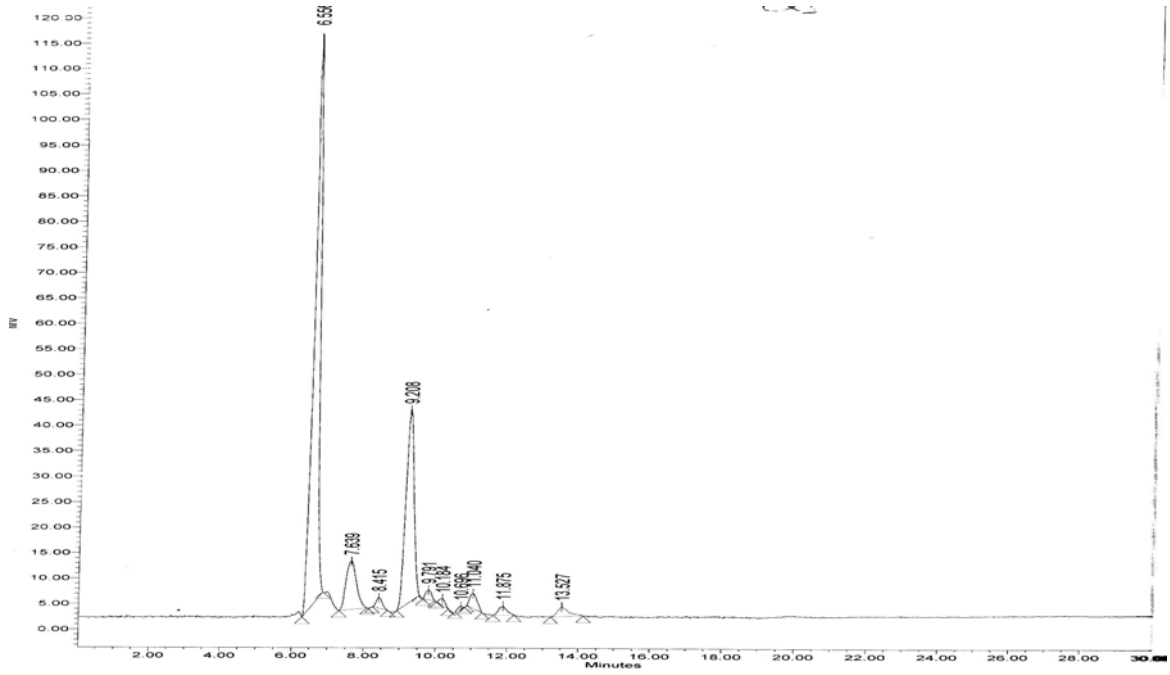
ภาพประกอบ 42 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 60 วัน



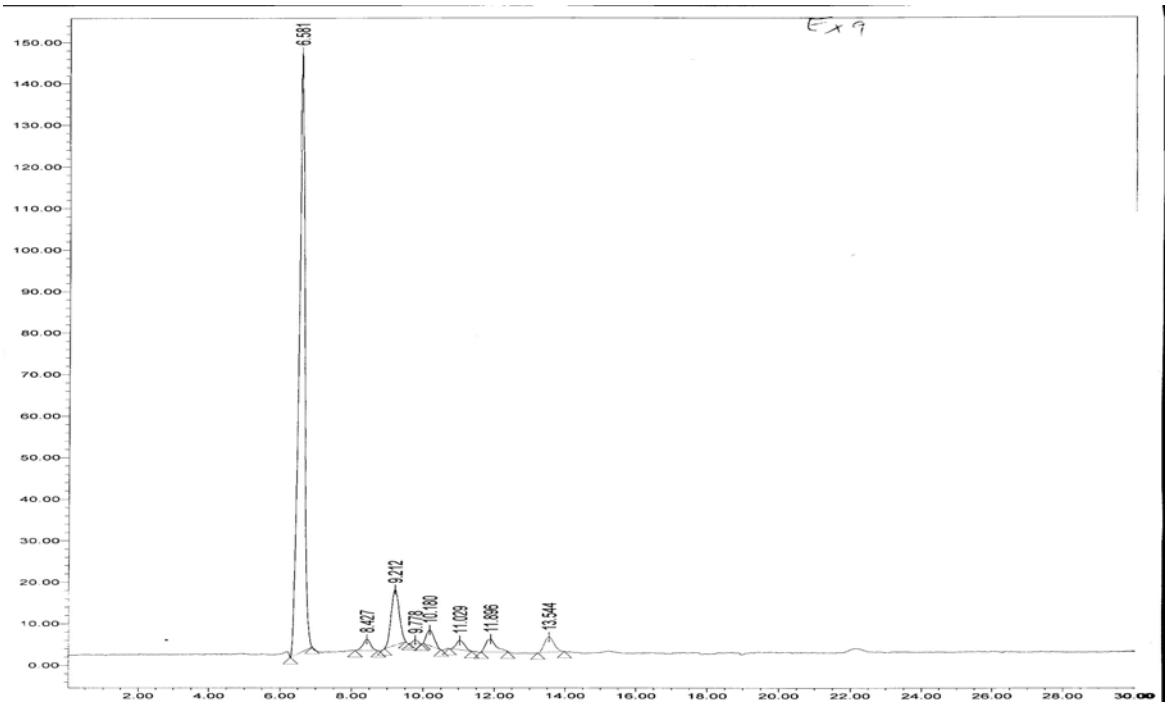
ภาพประกอบ 43 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 75 วัน



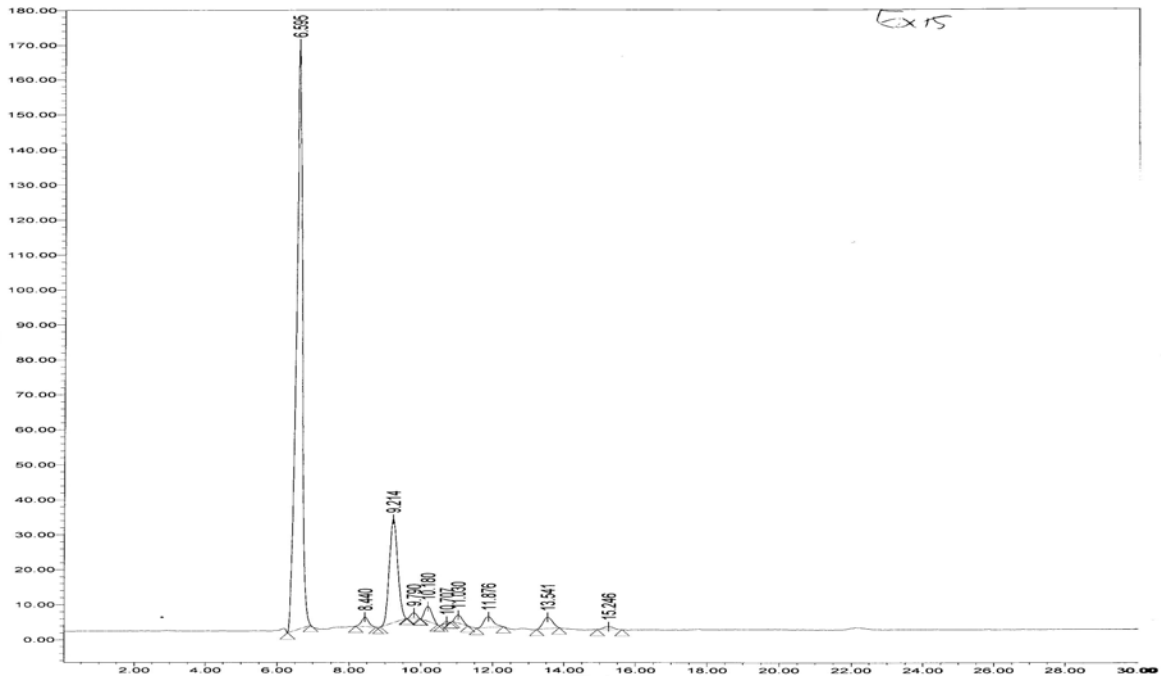
ภาพประกอบ 44 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 2 ระยะเวลาหมัก 90 วัน



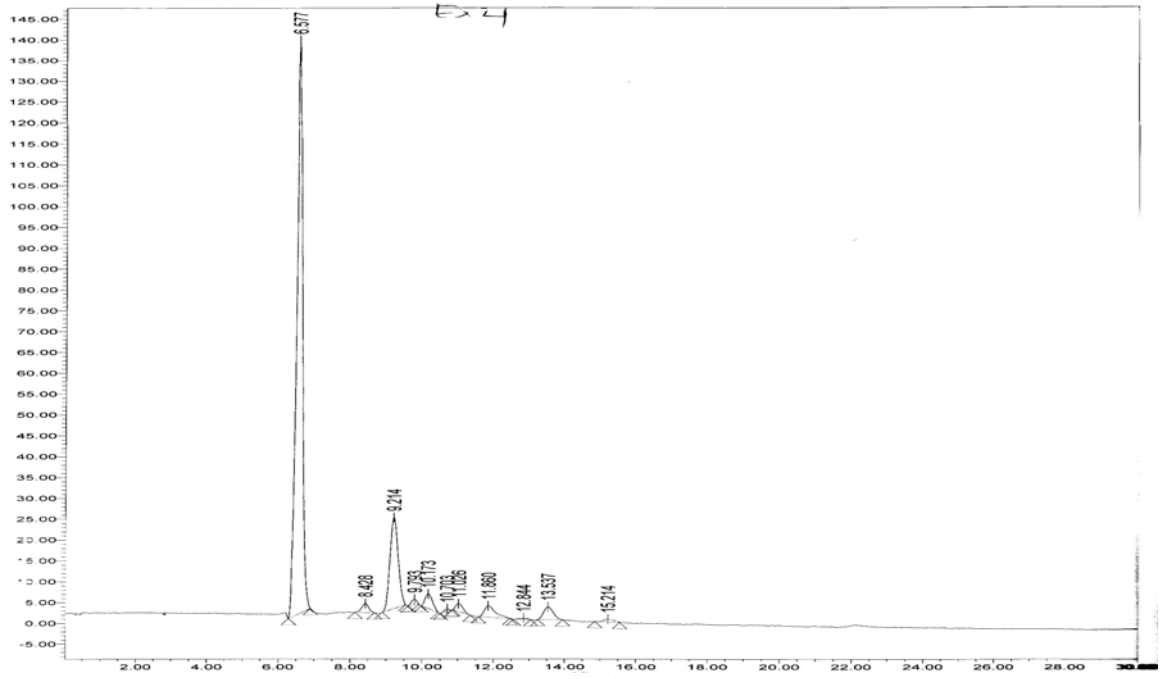
ภาพประกอบ 45 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 0 วัน



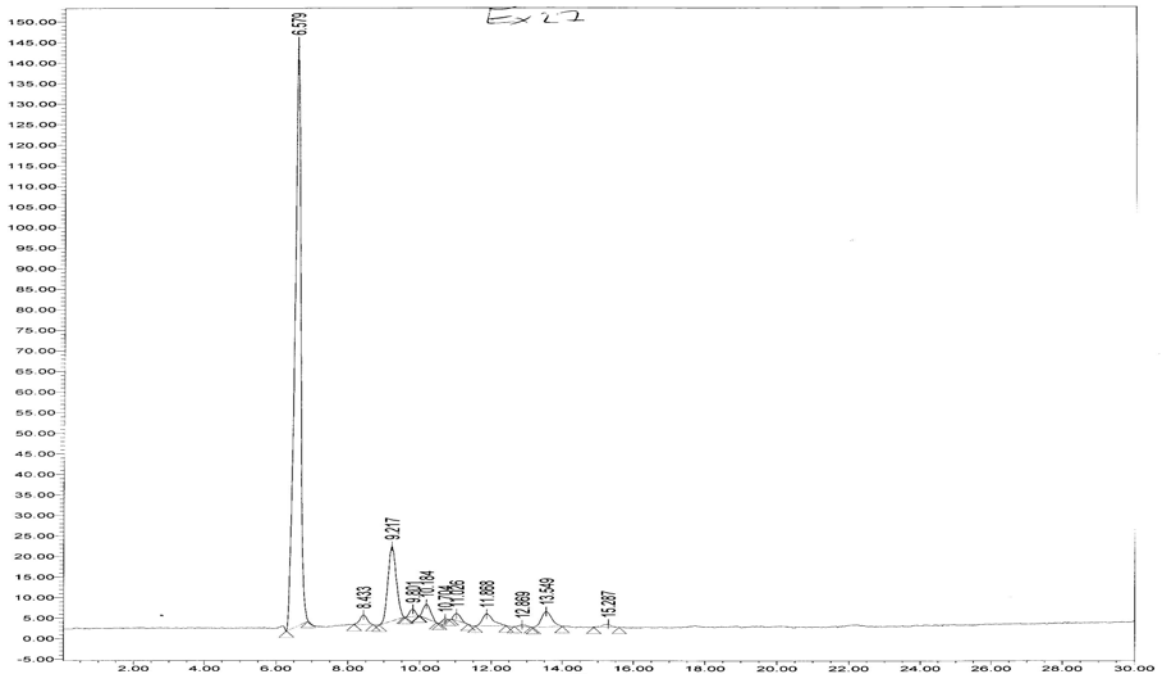
ภาพประกอบ 46 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 10 วัน



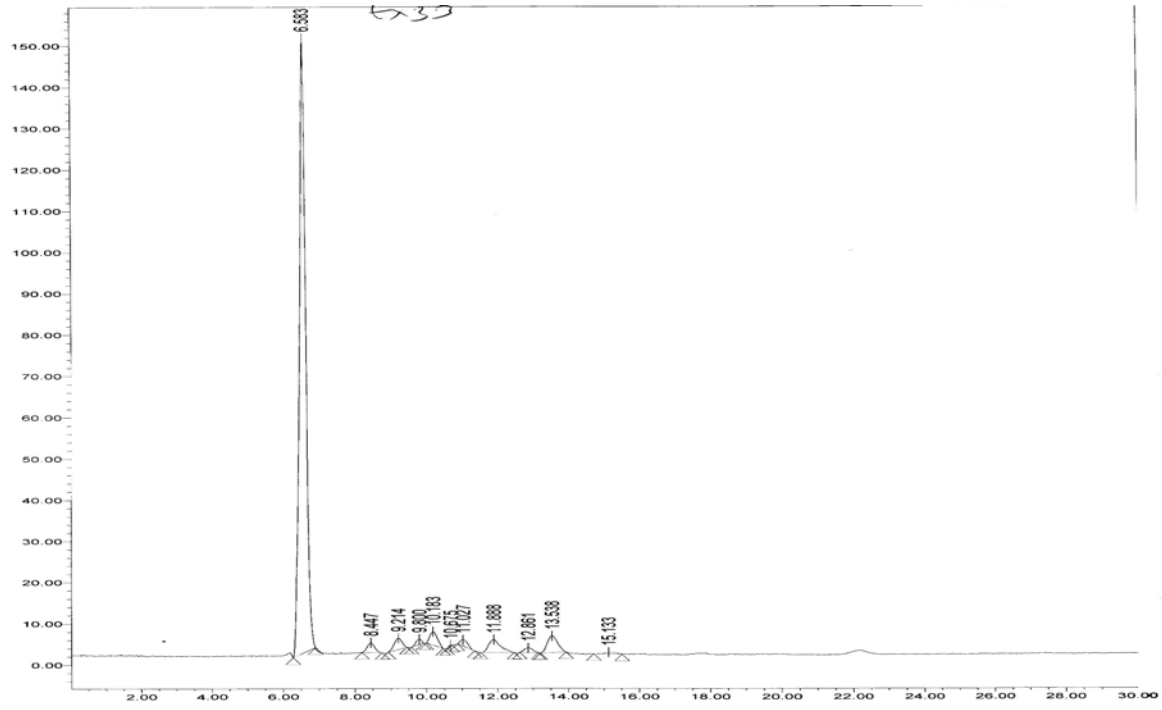
ภาพประกอบ 47 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 20 วัน



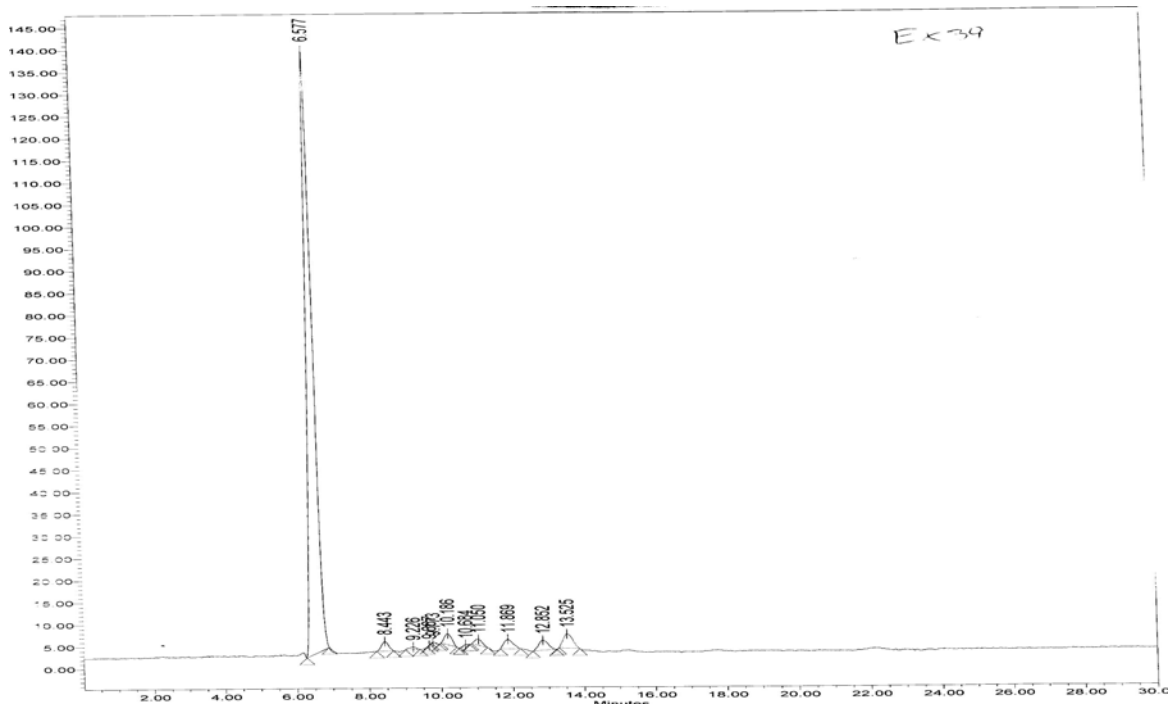
ภาพประกอบ 48 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 30 วัน



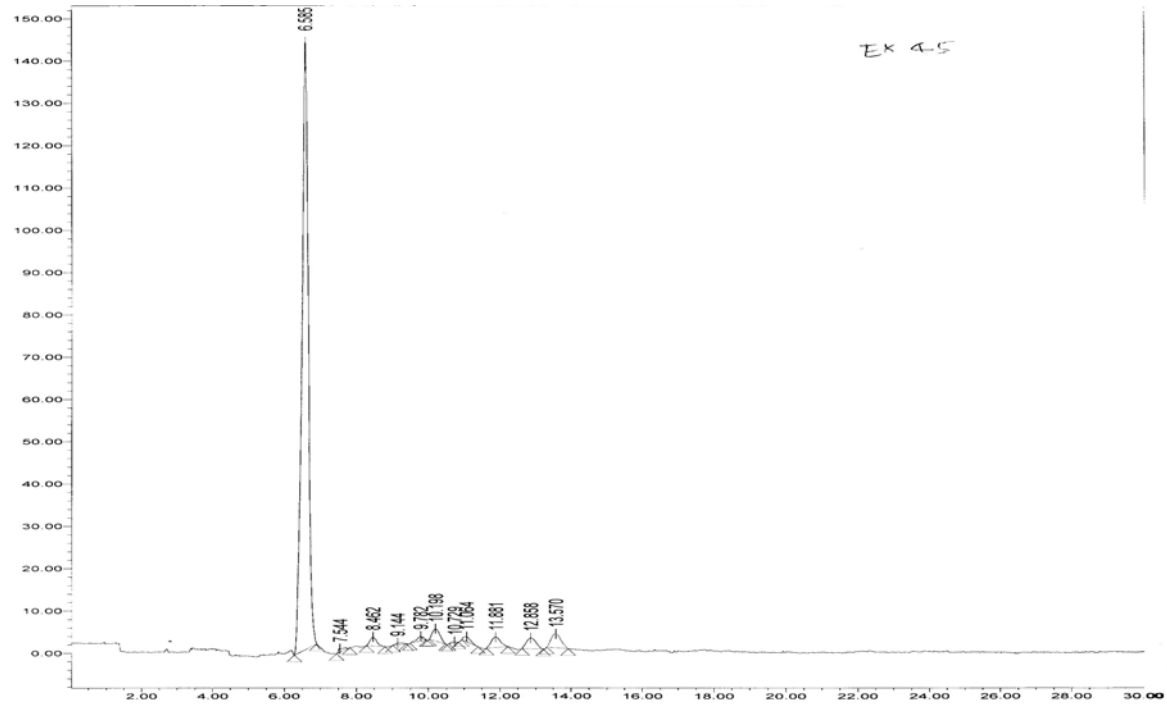
ภาพประกอบ 49 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 45 วัน



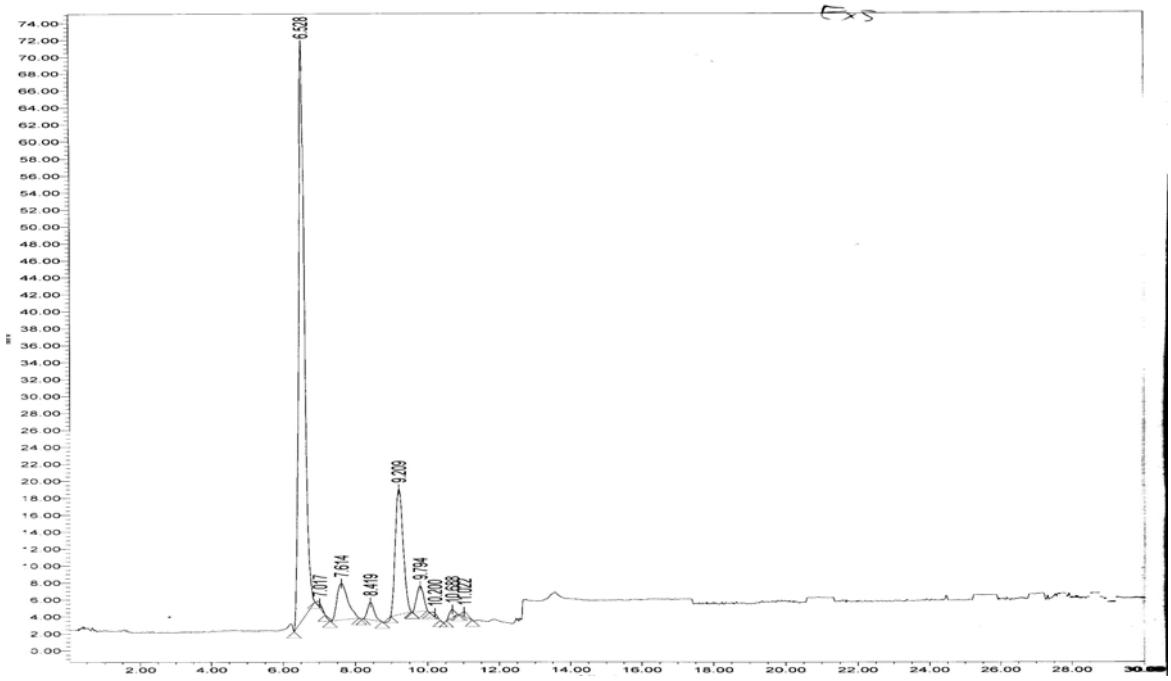
ภาพประกอบ 50 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 60 วัน



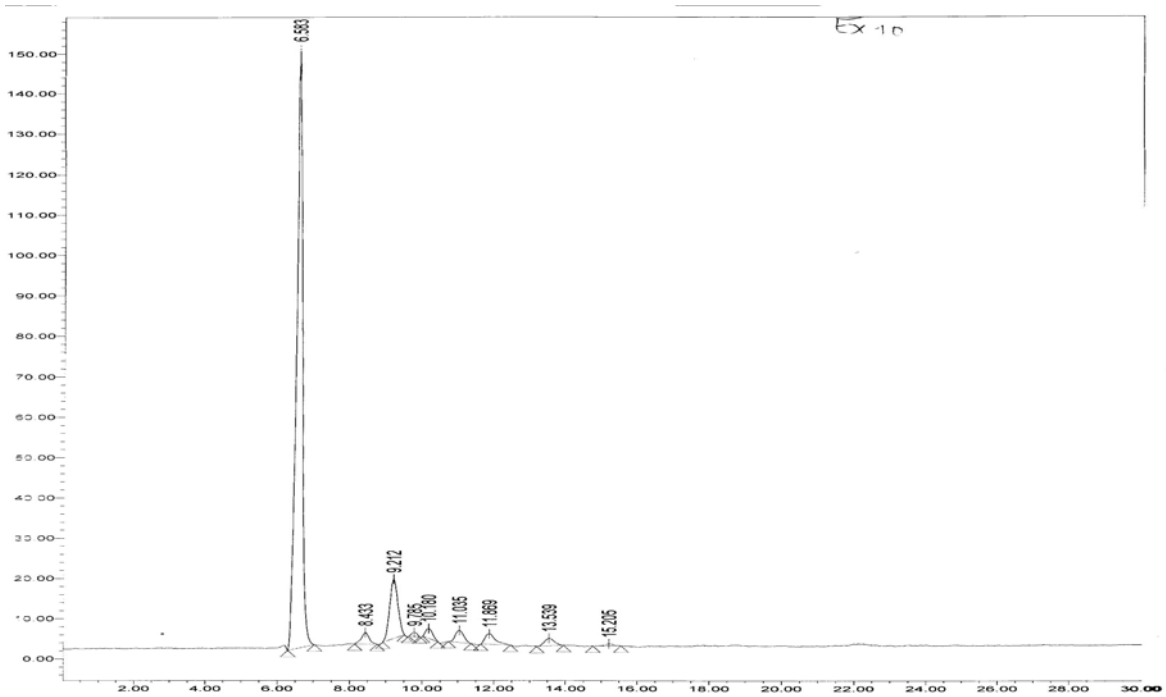
ภาพประกอบ 51 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 75 วัน



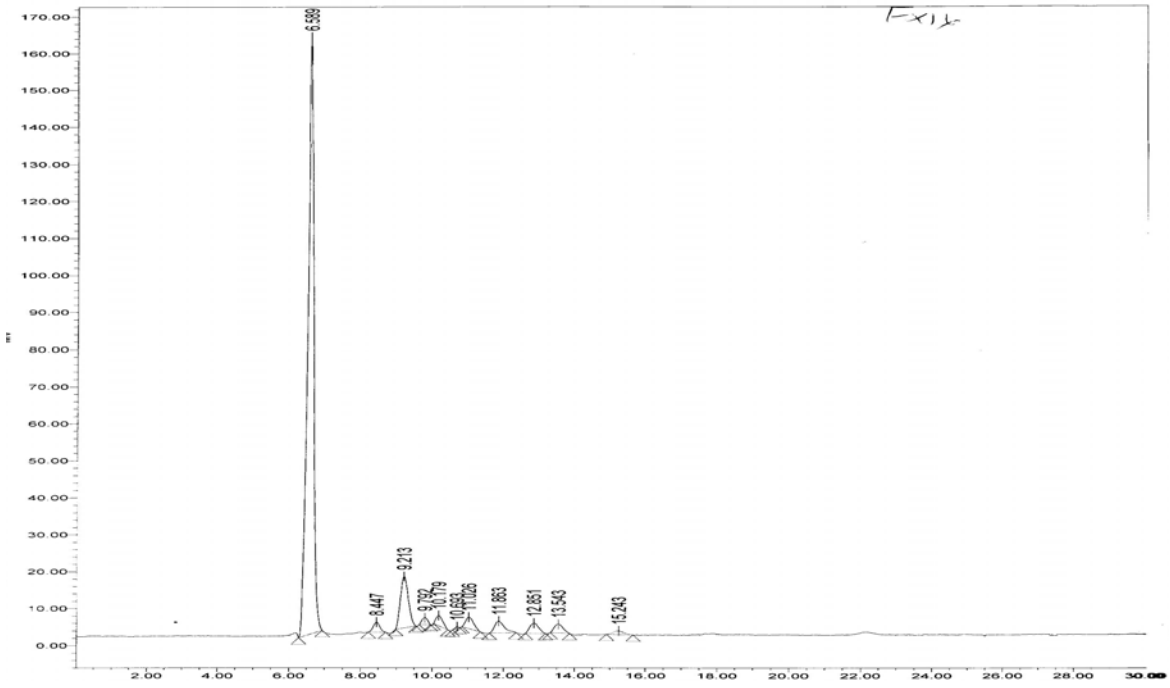
ภาพประกอบ 52 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 3 ระยะเวลาหมัก 90 วัน



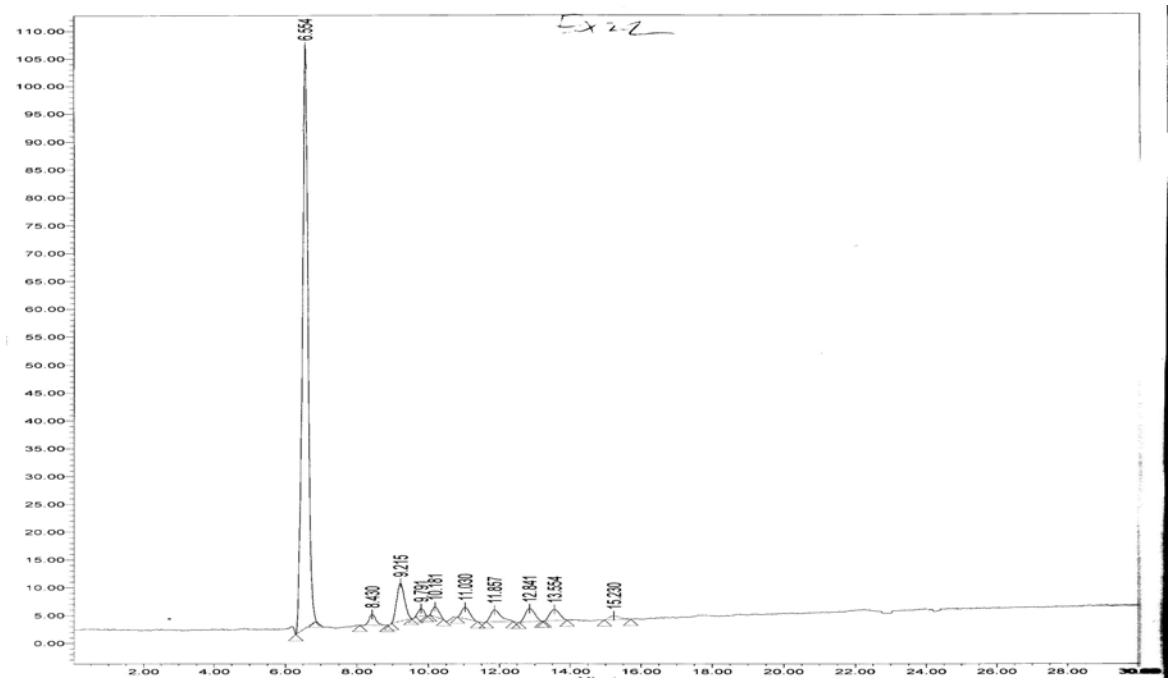
ภาพประกอบ 53 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 0 วัน



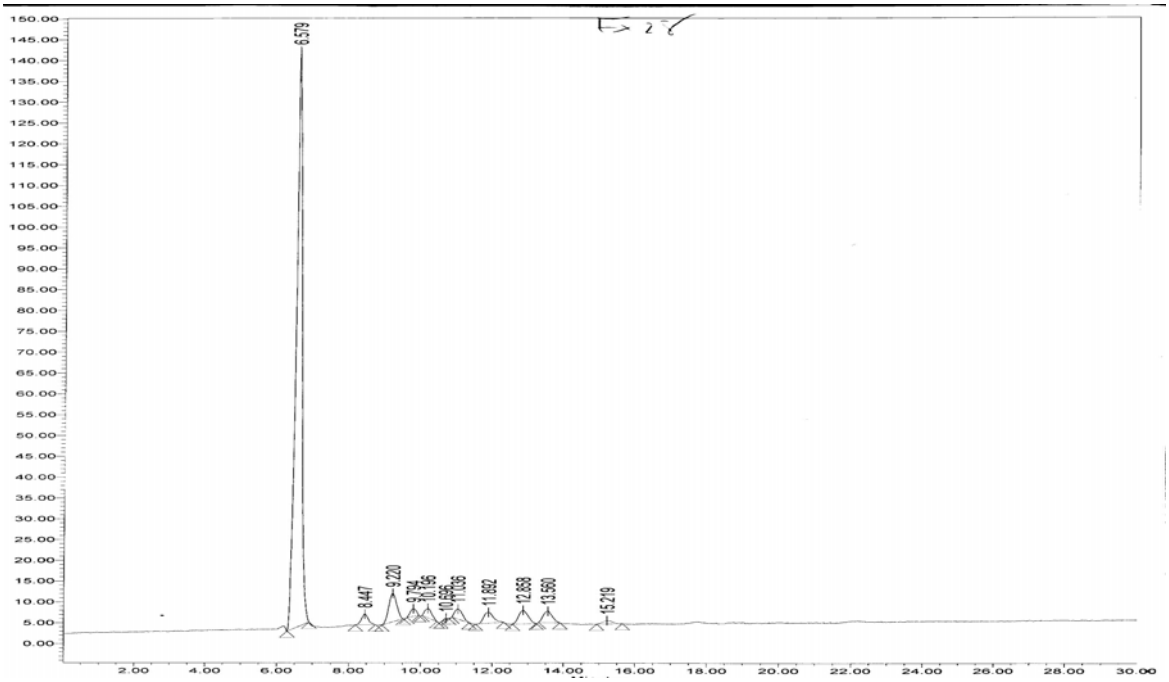
ภาพประกอบ 54 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 10 วัน



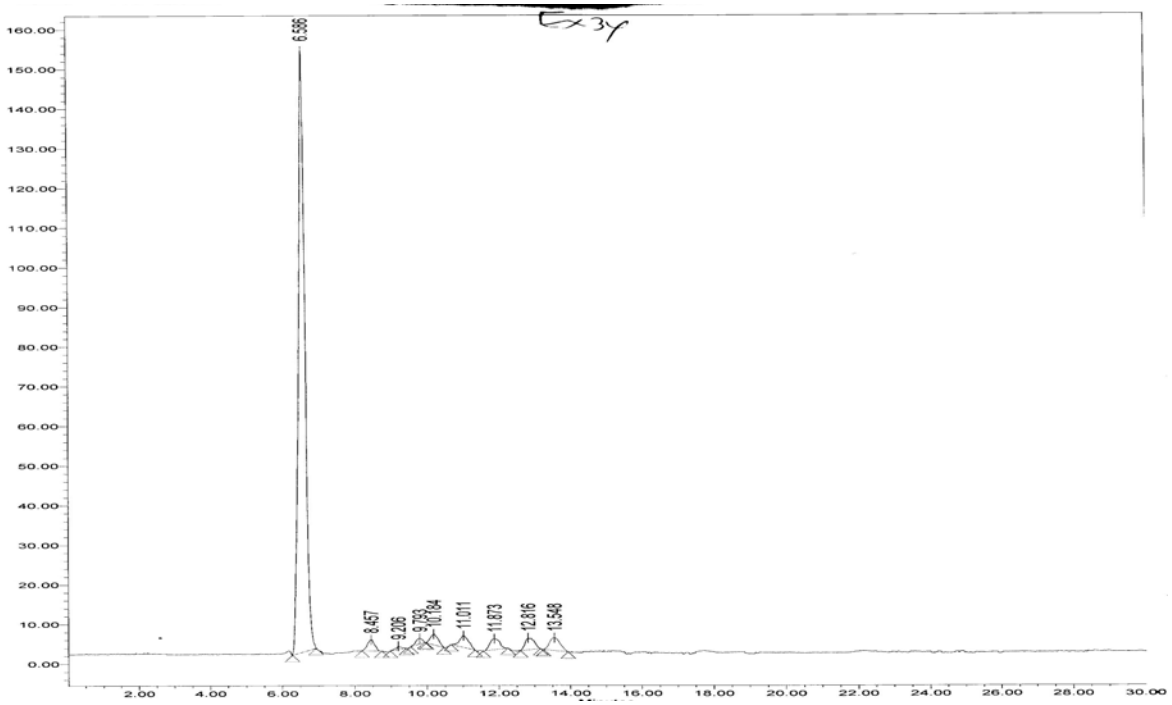
ภาพประกอบ 55 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 20 วัน



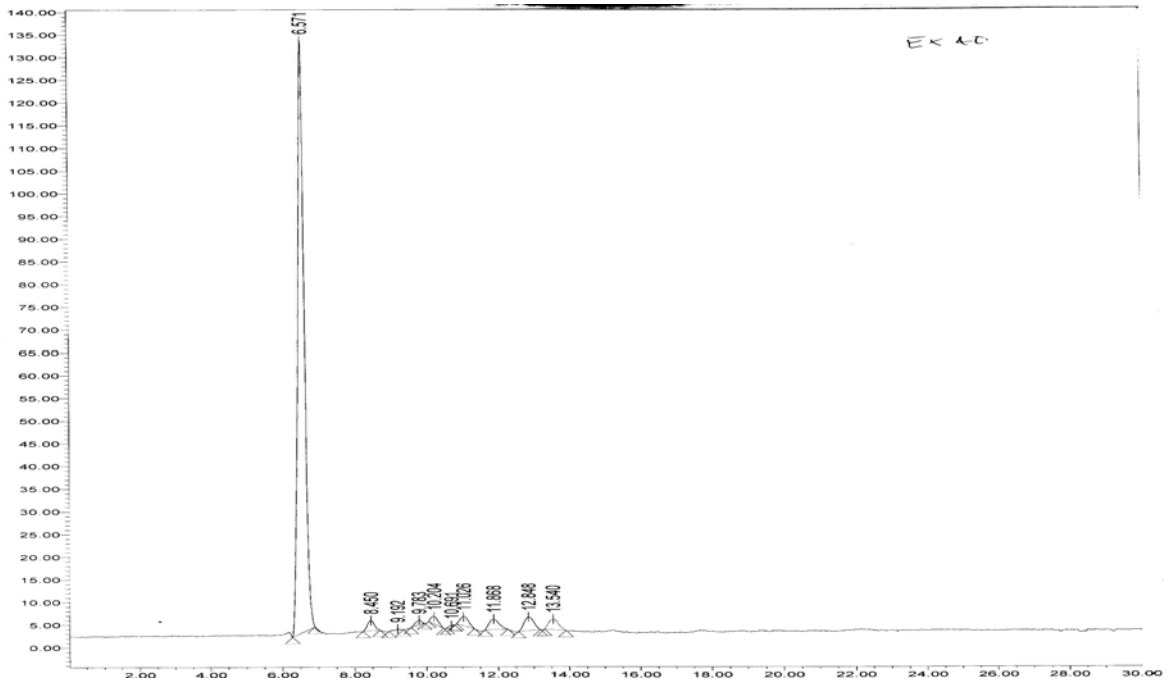
ภาพประกอบ 56 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 30 วัน



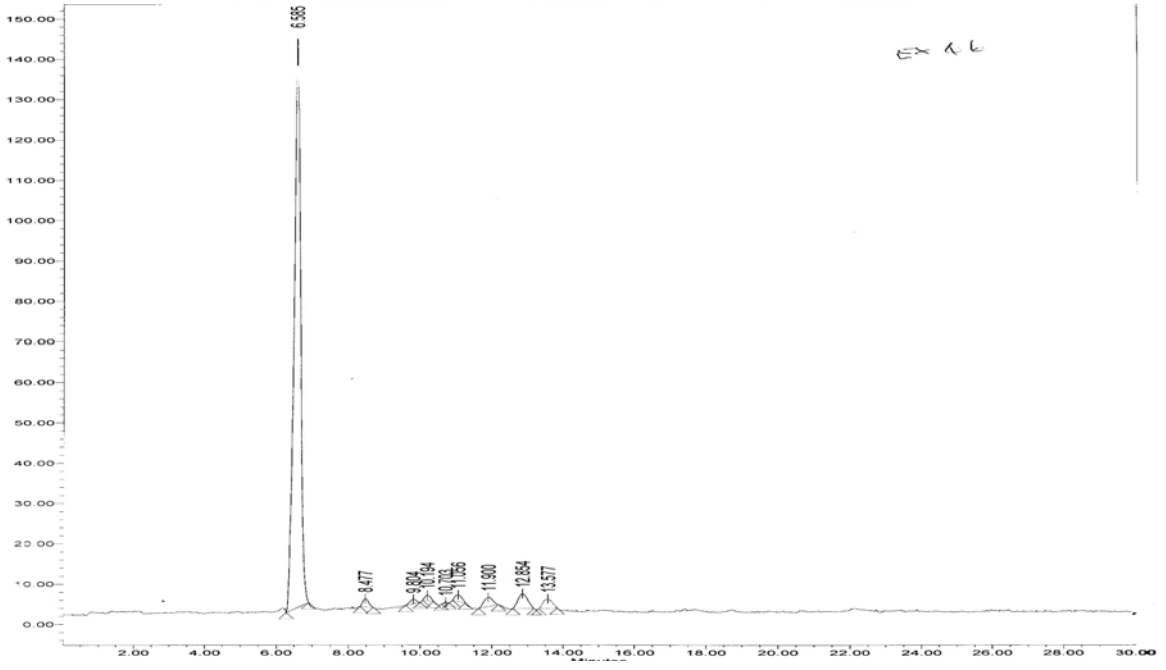
ภาพประกอบ 57 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 45 วัน



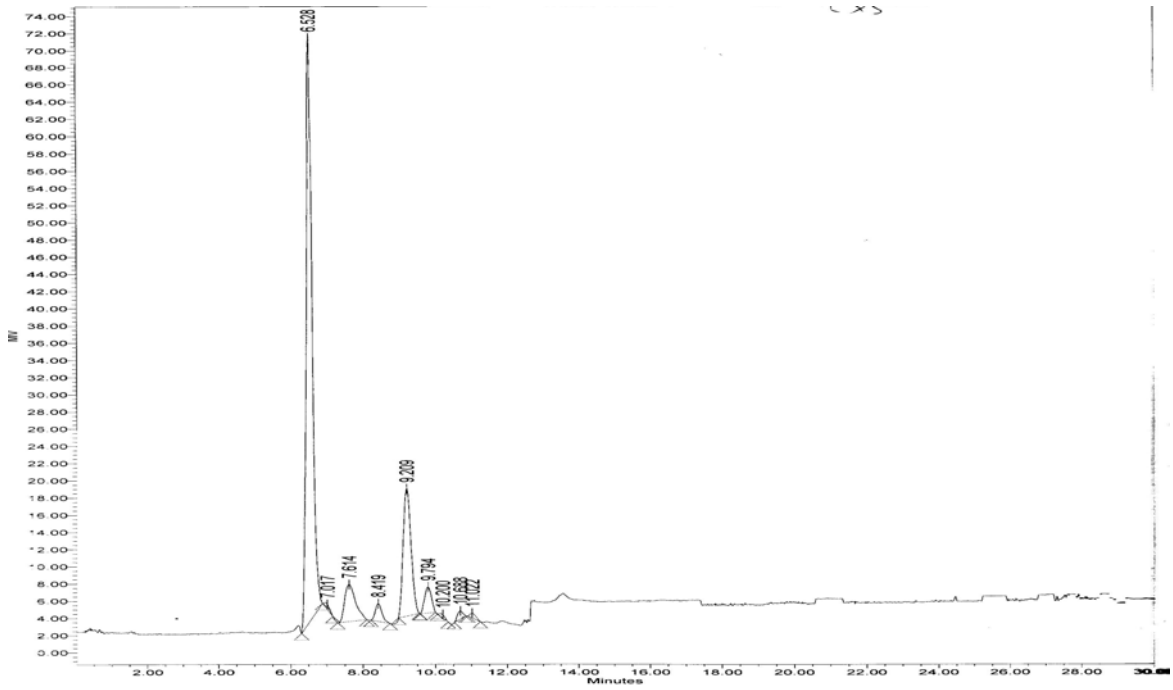
ภาพประกอบ 58 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 60 วัน



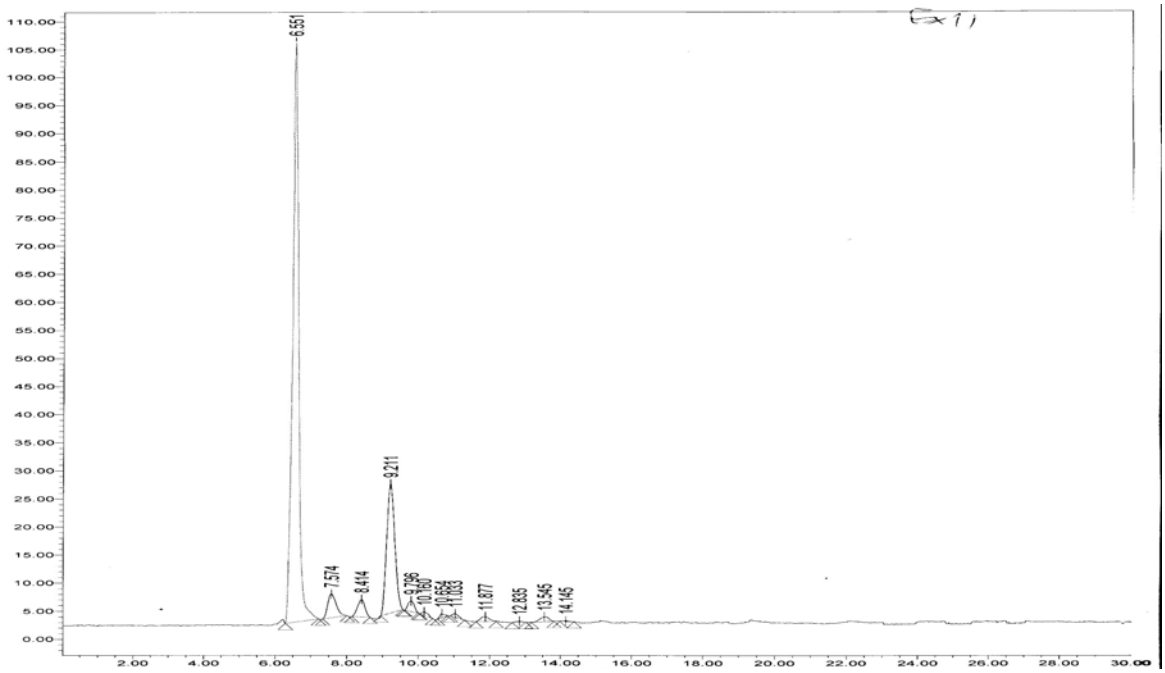
ภาพประกอบ 59 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 75 วัน



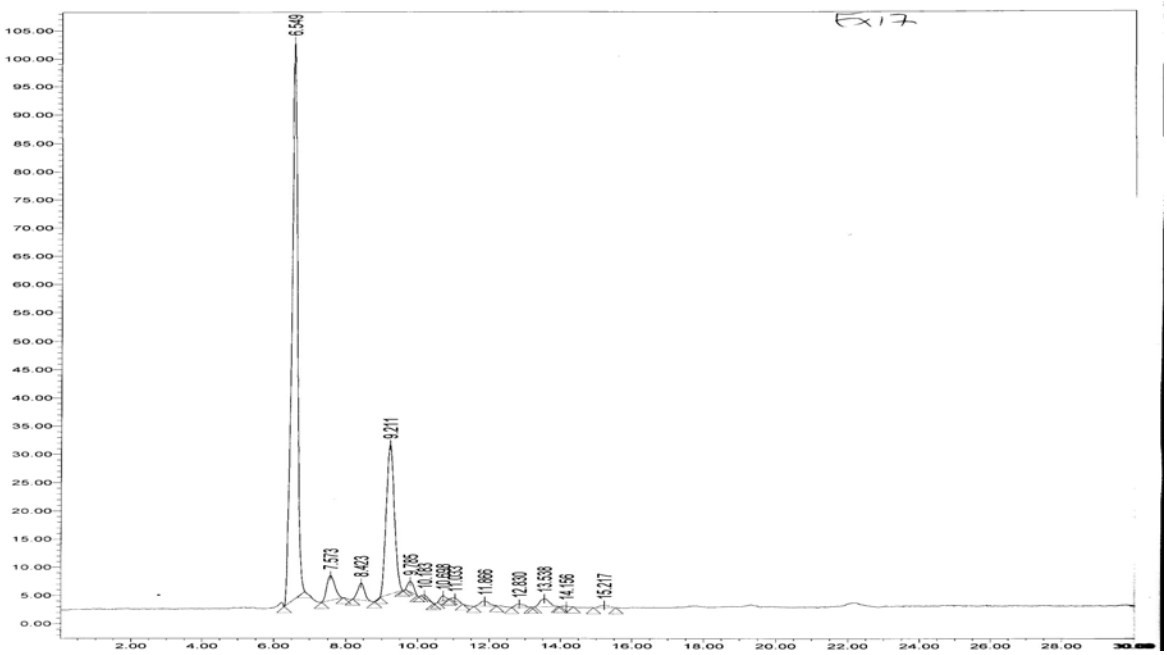
ภาพประกอบ 60 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 4 ระยะเวลาหมัก 90 วัน



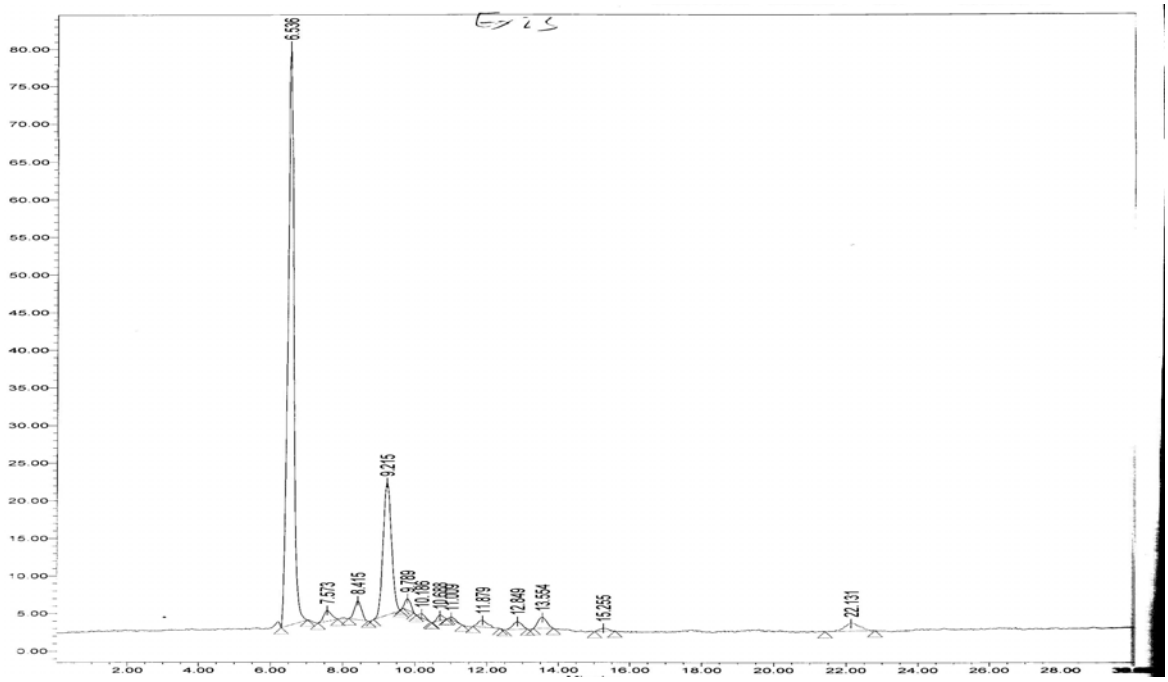
ภาพประกอบ 61 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 0 วัน



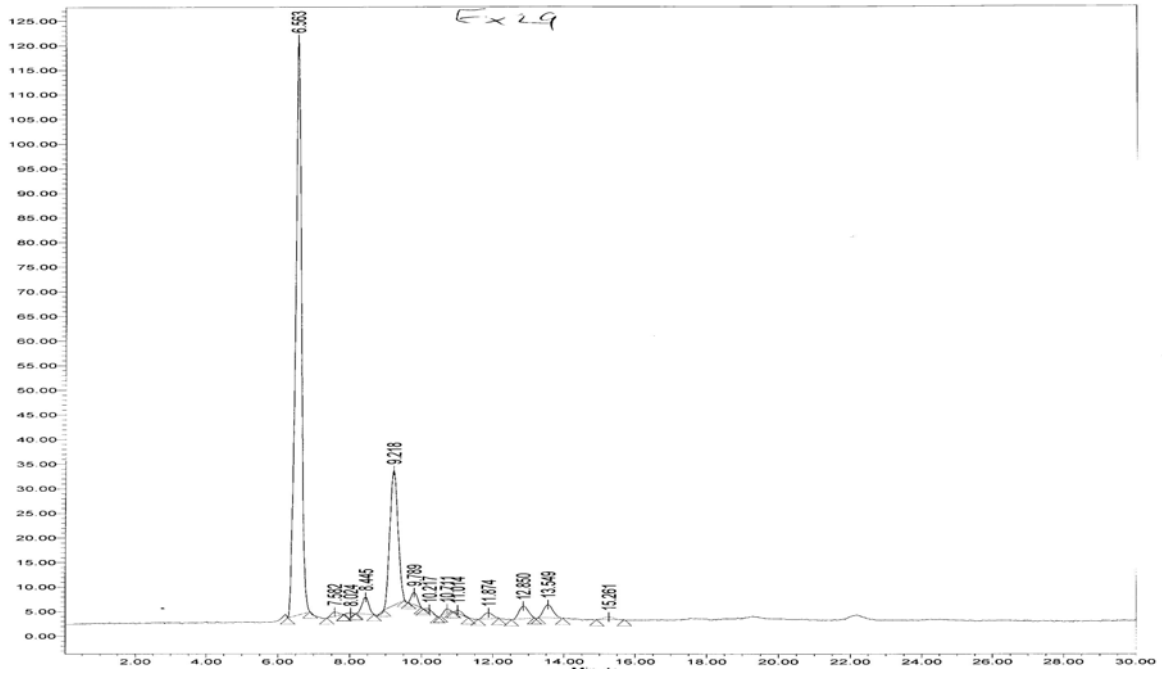
ภาพประกอบ 62 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 10 วัน



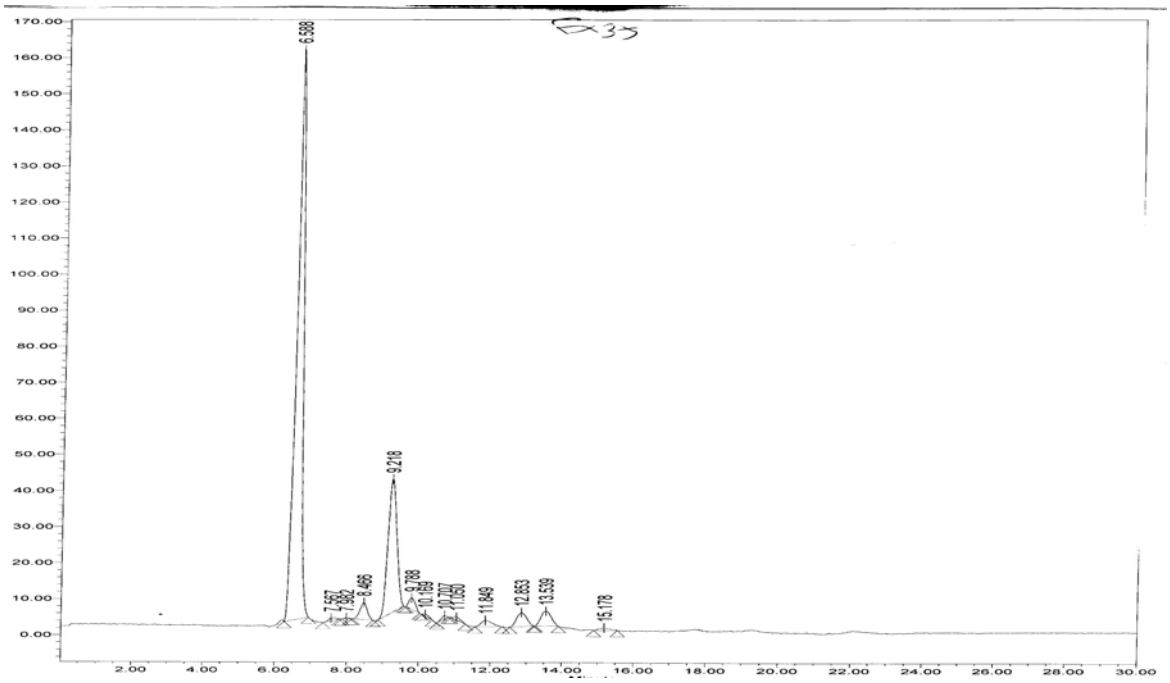
ภาพประกอบ 63 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 20 วัน



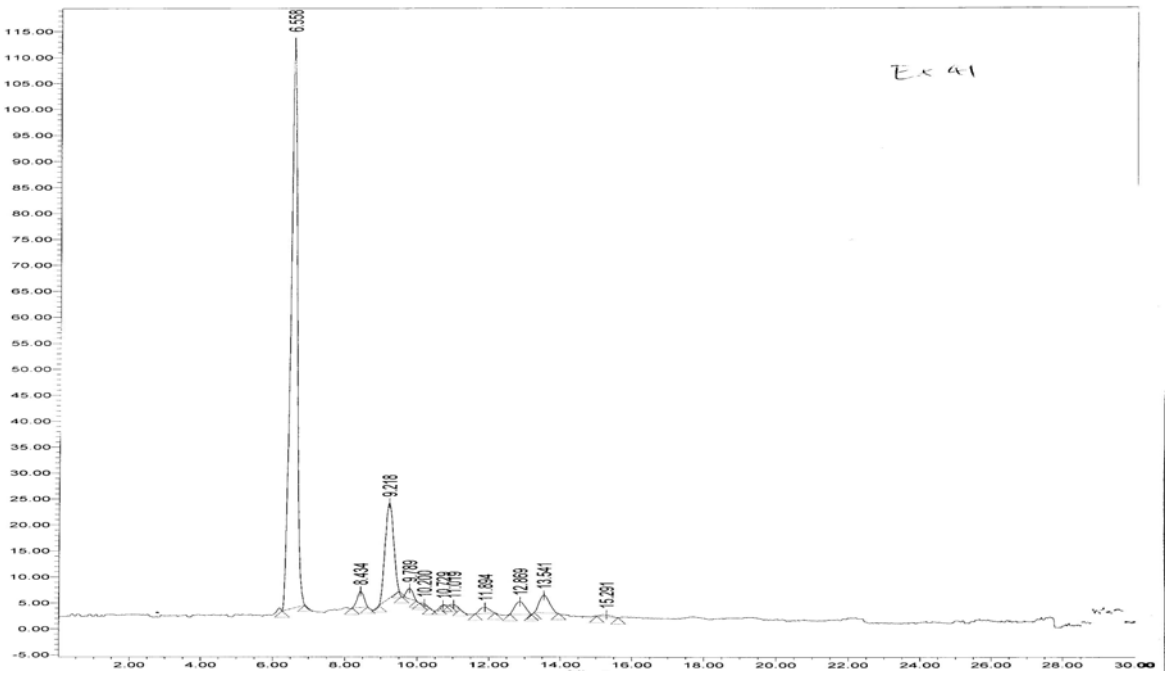
ภาพประกอบ 64 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 30 วัน



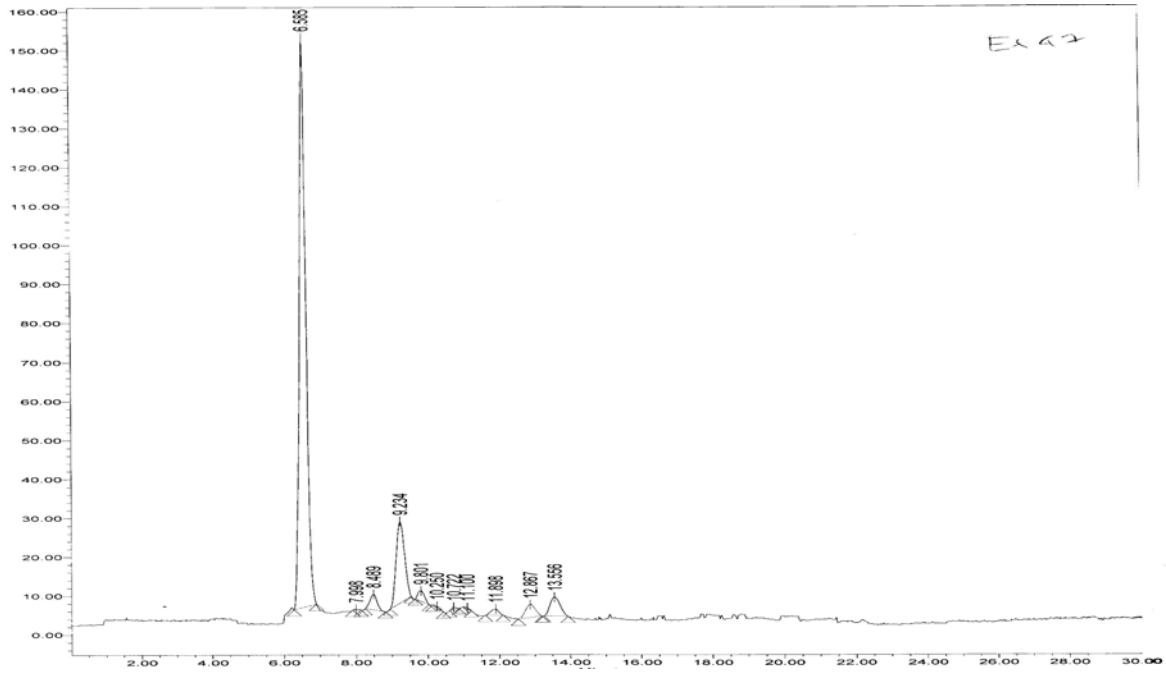
ภาพประกอบ 65 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 45 วัน



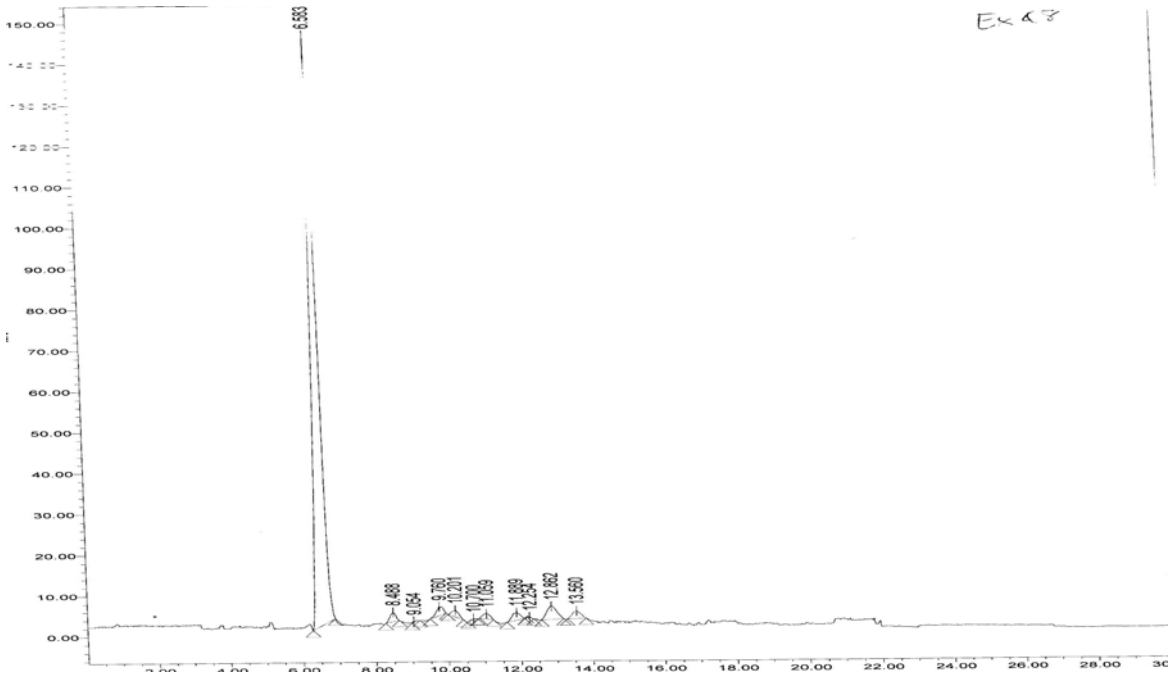
ภาพประกอบ 66 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 60 วัน



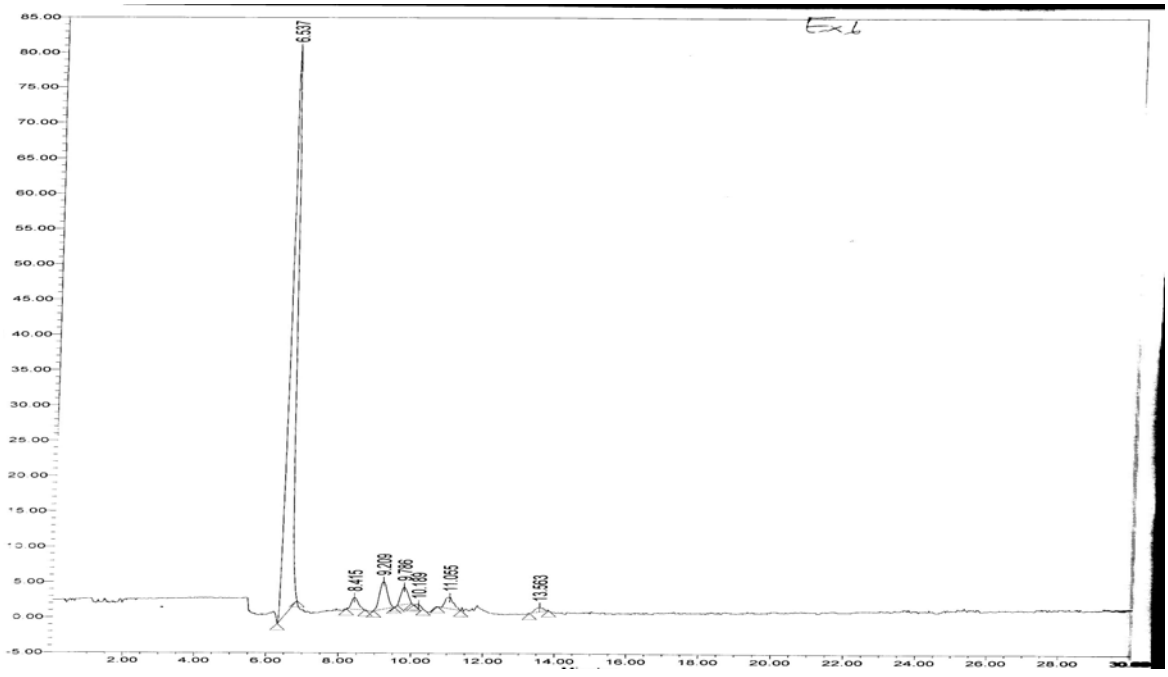
ภาพประกอบ 67 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 75 วัน



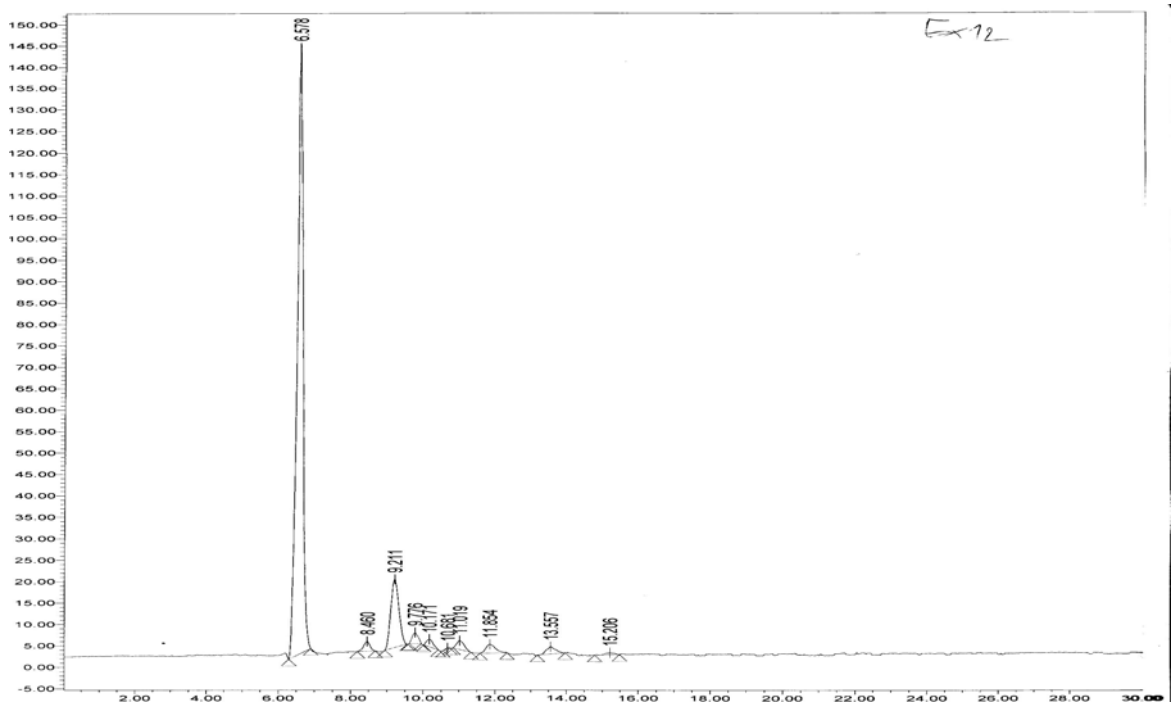
ภาพประกอบ 68 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 90 วัน



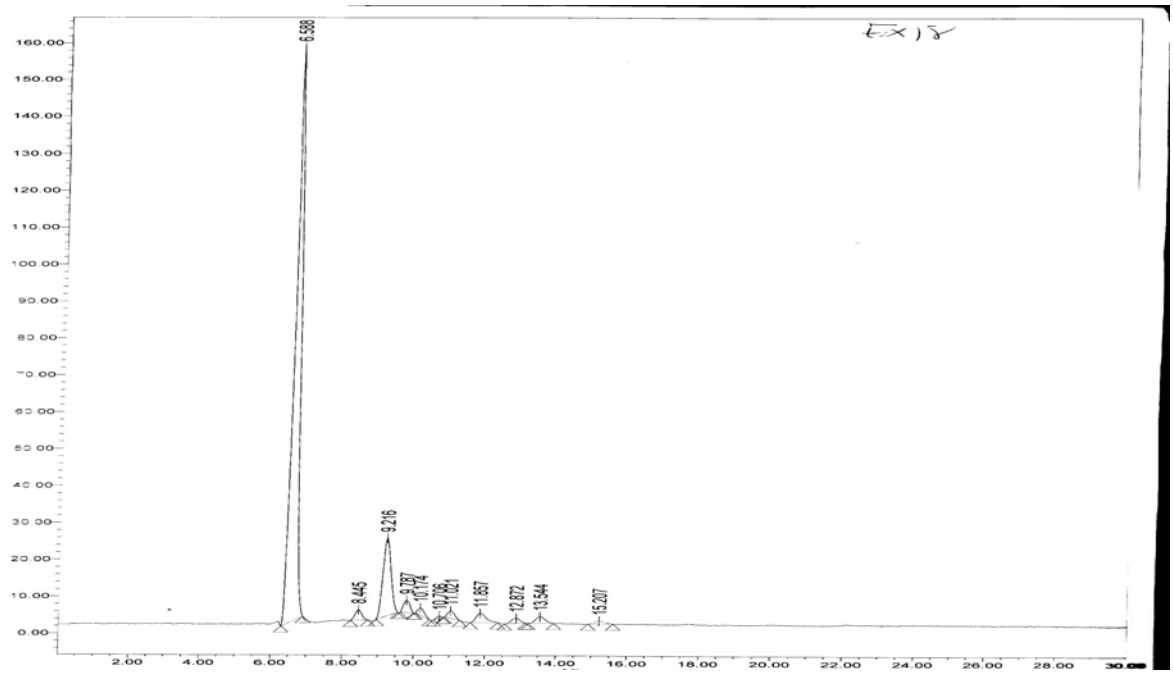
ภาพประกอบ 69 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 6 ระยะเวลาหมัก 0 วัน



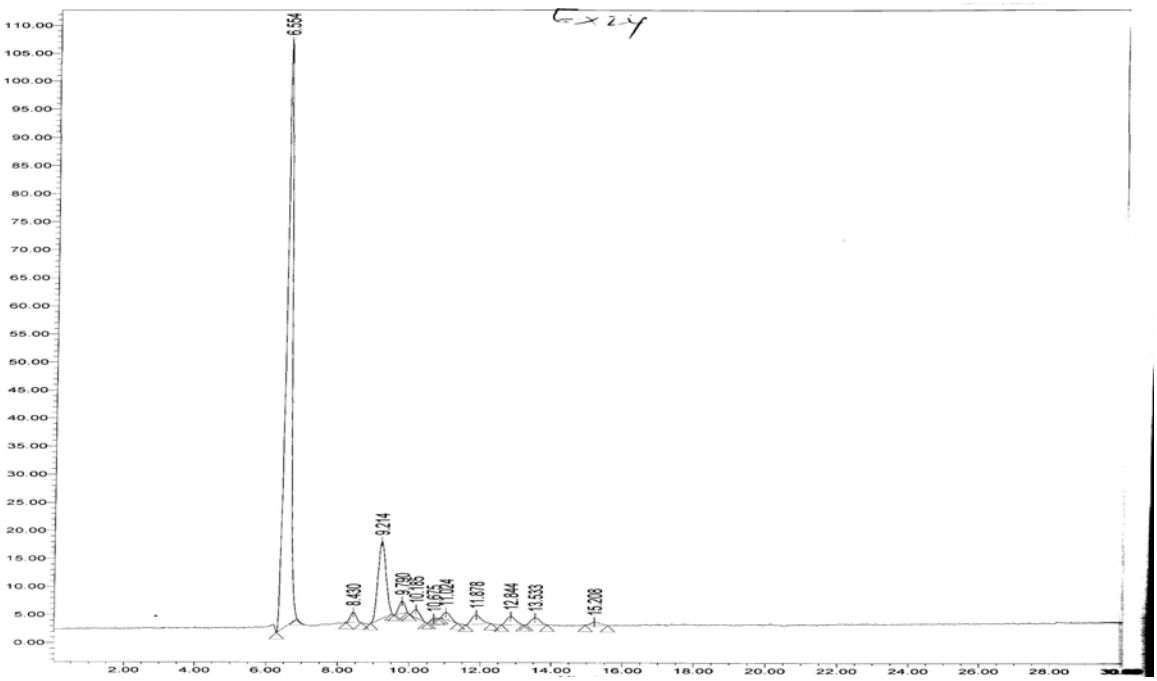
ภาพประกอบ 70 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 10 วัน



ภาพประกอบ 71 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 20 วัน

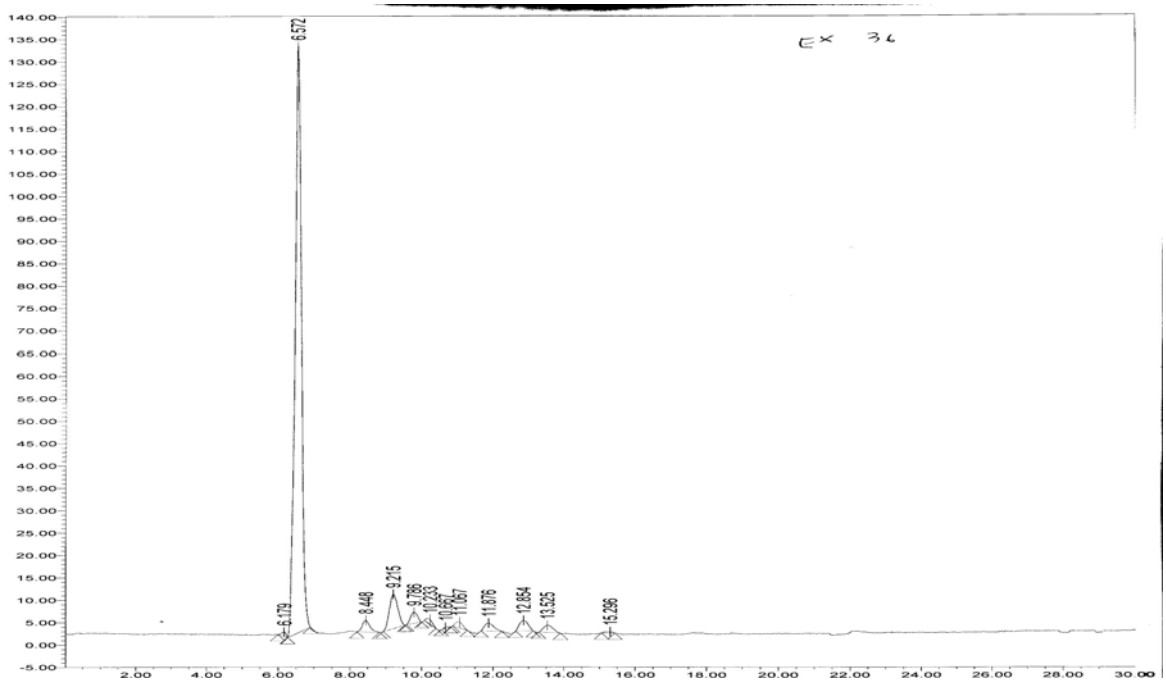


ภาพประกอบ 72 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 30 วัน

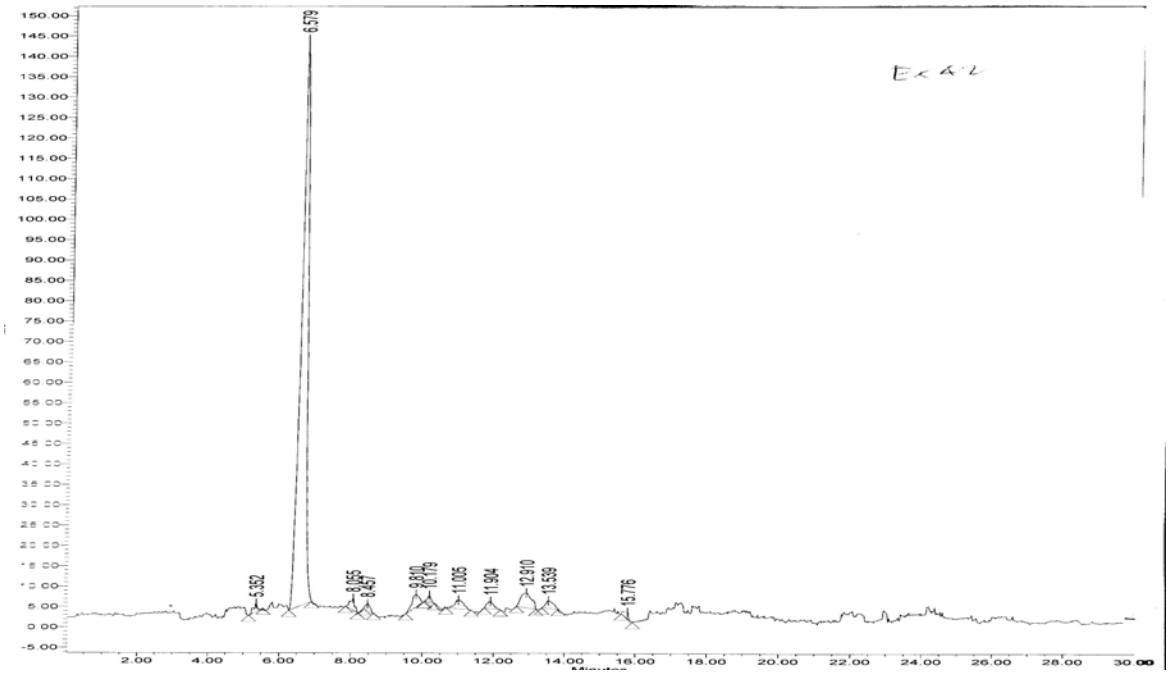


ภาพประกอบ 73 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 45 วัน

ภาพประกอบ 74 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 60 วัน



ภาพประกอบ 75 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 75 วัน



ภาพประกอบ 76 โครมาโทแกรมของซีอิ๊วสูตรที่ 5 ระยะเวลาหมัก 90 วัน

ภาคผนวก ง
ภาพการทดลองผลิตซีอิ๊วและการเผยแพร่ข้อมูล

ภาคผนวก ง
ภาพการทดลองผลิตซีอิ๊วและการเผยแพร่ข้อมูล

ภาพประกอบ 77 ถั่วมะแฮะต้มสุก

ภาพประกอบ 78 การเตรียมถั่วมะแฮะ 100 % กับแป้งข้าวสาลี

ภาพประกอบ 79 การหมักช่วงโคจิ

ภาพประกอบ 80 เชื่อจุลินทรีย์บนเมล็ดถั่ว

ภาพประกอบ 81 การกลับถั่วที่หมักช่วงโคจิ

ภาพประกอบ 82 ขั้นตอนนำถั่วหมักช่วงโคจิลงในไหหมักเพื่อหมักช่วงโมโรมิต่อ

ภาพประกอบ 83 การหมักช่วงโมโรมินาน 2 เดือน

ภาพประกอบ 84 ไหหมักซีอิ๊วช่วงโมโรมิ

ภาพประกอบ 85 โรงหมักซีอิ๊ว

ภาพประกอบ 86 หมักครบ 3 เดือน

ภาพประกอบ 87 โป๊สเตอร์แสดงเผยแพร่ข้อมูลการทดลองในวโรกาส สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เสด็จติดตามงานโครงการพระราชดำริ ณ ศูนย์ภูฟ้าพัฒนา อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2550

ภาพประกอบ 88 ผู้วิจัยถ่ายร่วมกับอาจารย์ที่ปรึกษาและผู้บริหารสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ร่วมเผยแพร่ข้อมูลการทดลองในวโรกาส สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เสด็จติดตามงานโครงการพระราชดำริ ณ ศูนย์ภูฟ้าพัฒนา อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2550

แผนการสอนบูรณาการ กลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์พื้นฐาน

สาระ สิ่งมีชีวิตและกระบวนการดำรงชีวิต **ช่วงชั้นที่** 2

เรื่อง การศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะกับถั่วเหลือง

1.สาระการเรียนรู้

1.1 สารหลัก สาระที่ 1 สิ่งมีชีวิตกับกระบวนการดำรงชีวิต

1.2 สารเสริม -

1.3 สารที่นำมาบูรณาการ

สาระที่ 4 พีชคณิต มาตรฐาน ค 4.2 กราฟ

สาระที่ 1 ทัศนศิลป์ มาตรฐานที่ ศ 1.1 การวาดรูป

สาระที่ 1 การดำรงชีวิตและครอบครัว

มาตรฐาน ง 1.1 การแปรรูปอาหาร

2. มาตรฐานการเรียนรู้ มาตรฐาน ว1.1

เข้าใจหน่วยพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ของโครงสร้างและหน้าที่ของระบบต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตที่ทำงานสัมพันธ์กัน มีกระบวนการสืบเสาะหาความรู้ สื่อสารสิ่งที่เรียนรู้และนำความรู้ไปใช้ในการดำรงชีวิตของตนเองและดูแลสิ่งมีชีวิต

3. มาตรฐานช่วงชั้นที่ 2

สำรวจตรวจสอบสืบค้นข้อมูล อภิปรายและอธิบายโครงสร้างและหน้าที่ของโครงสร้างต่างๆ ของพืช วัฏจักรชีวิต การสืบพันธ์ และการขยายพันธุ์พืช ปัจจัยบางประการที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต การสังเคราะห์ด้วยแสง การตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมและนำความรู้ไปใช้ประโยชน์

4. ผลการเรียนรู้ที่คาดหวัง

1. สังเกต สำรวจและอธิบายการเจริญเติบโตของพืชดอกตั้งแต่ ต้นอ่อน จนมีดอก มีผล

2. นำเสนอผลงานโดยอธิบายด้วยวาจาหรือเขียนเกี่ยวกับแนวคิด กระบวนการและผลงานโครงงานหรือชิ้นงานให้ผู้อื่นเข้าใจ

<u>จุดประสงค์ เมื่อทำกิจกรรมนี้แล้วนักเรียนสามารถ</u>

1. บอกกระบวนการที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตได้
2. เขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโตของถั่วมะแฮะและแปลความหมายได้
3. สรุปการเปลี่ยนแปลงของราง ลำต้น และใบ ของพืชขณะที่มีการเจริญเติบโตได้
4. อธิบายการใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะในแต่ละส่วนได้
5. นำความรู้ที่ได้จากเรียนเลือกทำโครงงานเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะได้

5. ชิ้นงาน/หลักฐานการเรียนรู้ของผู้เรียน

1. ใบงานเรื่องการเจริญเติบโตของถั่วมะแฮะ
2. ใบงานเรื่องการใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะ
3. แบบฝึกคิดหัวเรื่องโครงงาน
4. โครงงาน

6. บูรณาการ

การเรียนการสอนเรื่อง การศึกษากระบวนการผลิตซีอิ๊วจากถั่วมะแฮะและถั่วเหลืองได้นำเอา การเขียนกราฟ การวาดรูป และการแปรรูปอาหารเข้ามาเป็นส่วนประกอบในการเรียนเพื่อให้นักเรียนเกิดความสนุกในการเรียนและมีความสนใจในเนื้อหามากขึ้น สามารถนำความรู้ไปใช้ในวิชาคณิตศาสตร์ ศิลปะ และการงานพื้นฐานอาชีพและเทคโนโลยีได้

7. แนวความคิดหลัก

ถั่วมะแฮะ (Pigeon Pea) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Cajanus cajan* Millsp. มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม ถั่วมะแฮะสามารถขยายพันธุ์โดยการใช้เมล็ด โดยทั่วไปสามารถนำถั่วมะแฮะมาใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่รากถึงยอด และที่พบกันมากคือนำมาเป็นปุ๋ยพืชสด ปลูกเพื่อปรับสภาพดิน และนำมาเป็นอาหารสัตว์ เป็นผักพื้นเมืองฝักอ่อนบริโภคพร้อมกับส้มตำ ใช้จิ้มเมี่ยง ใช้ลวกจิ้มน้ำพริก ในถั่วมะแฮะที่แก่จัดมีสารอาหารต่างๆ ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรท 63.4 กรัม/100 กรัม โปรตีน 20.4 กรัม/100 กรัม ไขมัน 11.5 กรัม/100 กรัม (คำนวณจากน้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ยัง ประกอบไปด้วย แคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามิน A, B, B_1, B_2, และ ไนอาซีน

8. กระบวนการจัดการเรียนรู้

<u>กิจกรรมการเรียนการสอน ครั้งที่ 1</u>

<u>เรื่อง</u> การเจริญเติบโตของถั่วแมะแฮะ เวลา 2 ชั่วโมง

<u>1.ขั้นสร้างความสนใจ</u>

1 ครูถามนักเรียนว่า “รู้จักถั่วมะแฮะหรือไม่” นักเรียนร่วมตอบ

2 ครูถามนักเรียนว่า “นักเรียนทราบหรือไม่ว่าถั่วมะแฮะเจริญเติบโตได้อย่างไร และมีปัจจัยอะไรบ้างที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของถั่วมะแฮะ” นักเรียนร่วมกันอภิปราย

3 ครูนำเมล็ดถั่วมะแฮะมาให้นักเรียนดูและถามว่า “นักเรียนเคยสงสัยหรือเปล่าว่าถั่วมะแฮะกว่าจะเติบโตเป็นต้นกล้าจะต้องใช้เวลากี่วัน” นักเรียนร่วมกันอภิปราย

<u>2.ขั้นสอน</u>

4.ครูและนักเรียนร่วมกันอภิปราย เรื่องการเจริญเติบโตของพืช

5.นักเรียนแบ่งกลุ่ม ลงมือทำใบงานที่ 1 เรื่อง การเจริญเติบโตของถั่วมะแฮะ

6.นักเรียนรับใบงานการฝึกคิดหัวเรื่องโครงงานใช้เวลาในการทำ 20 นาที หลังจากนั้นนำเสนอหน้าชั้นเรียน ทุกคนร่วมกันแสดงความคิดเห็น

3.ขั้นอภิปรายและสรุป

7. นักเรียนและครูร่วมกันอภิปรายเกี่ยวกับการทดลองเพื่อนำไปสู่การในวันสุดท้ายของการสังเกตการเจริญเติบโตของถั่วมะแฮะ

8. ครูสรุปแนะนำการคิดหัวเรื่องโครงงานที่นักเรียนแต่ละกลุ่มร่วมกันคิดมา

กิจกรรมการเรียนการสอน ครั้งที่ 2 เรื่อง การใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะ เวลา 2 ชั่วโมง

1.ขั้นสร้างความสนใจ

1. ครูซักถามนักเรียนว่า “นักเรียนทราบหรือเปล่าว่าในชุมชนของนักเรียนมีการนำเอาถั่วมะแฮะมาใช้ประโยชน์ในเรื่องใดบ้าง” นักเรียนร่วมกันอภิปราย

2. ครูนำภาพการใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะมาให้นักเรียนศึกษาดู

2.ขั้นสอน

3. นักเรียนศึกษาใบความรู้ เรื่อง การใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะ

4. นักเรียนแต่ละกลุ่มร่วมกันจำแนกประโยชน์ที่ได้จากถั่วมะแฮะ และร่วมกันอภิปรายหน้าชั้นเรียน

5. นักเรียนรับใบงานการฝึกคิดหัวเรื่องโครงงานใช้เวลาในการทำ 20 นาที หลังจากนั้นนำเสนอหน้าชั้นเรียน ทุกคนร่วมกันแสดงความคิดเห็น

3.ขั้นอภิปรายและสรุป

6. นักเรียนและครูร่วมกันอภิปรายเรื่องการใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะ เพื่อนำไปสู่การสรุปเป็นความรู้ใหม่

7. ครูสรุปแนะนำการคิดหัวเรื่องโครงงานที่นักเรียนแต่ละกลุ่มร่วมกันคิดมาเพื่อเป็นแนวทางการทำโครงงานของนักเรียน

กิจกรรมการเรียนการสอน ครั้งที่ 3

เรื่อง การทำโครงงานการใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะ เวลา 2 ชั่วโมง

1.ขั้นสร้างความสนใจ

1. ครูซักถามนักเรียนเกี่ยวกับหัวเรื่องโครงงานการนำเอาถั่วมะแฮะมาใช้ประโยชน์ที่นักเรียนได้คิดมา นักเรียนร่วมกันอภิปราย

2. ครูนำตัวอย่างโครงร่างโครงงาน และโครงงานของนักเรียนรุ่นพี่ที่ทำไว้ให้นักเรียนดู นักเรียนร่วมกันอภิปรายเกี่ยวกับการศึกษาโครงงานตัวอย่าง

2.ขั้นสอน

3. นักเรียนศึกษาใบความรู้ เรื่อง การเขียนเค้าโครงของโครงงาน และการจัดทำรายงานโครงงาน

4. ครูร่วมกับนักเรียนอภิปรายเรื่องการเขียนเค้าโครง

5. นักเรียนรับใบงานที่ 2 เรื่อง การเขียนเค้าโครงของโครงงาน โดยเลือกใช้หัวเรื่องโครงงานในใบงานที่เคยทำผ่านมา หลังจากนั้นนำเสนอหน้าชั้นเรียน ทุกคนร่วมกันแสดงความคิดเห็น

3.ขั้นอภิปรายและสรุป

6. นักเรียนและครูร่วมกันอภิปรายเค้าโครงของโครงงานเกี่ยวกับเรื่องการใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะ ของนักเรียนที่ละกลุ่มเพื่อนำไปสู่การสรุปและจัดทำเป็นโครงงาน

7. ครูสรุปแนะนำการทำโครงงานที่นักเรียนแต่ละกลุ่มร่วมกันคิดมาเพื่อเป็นแนวทางการทำโครงงานของนักเรียน และให้นำมาส่งในชั่วโมงถัดไป

กิจกรรมการเรียนการสอน ครั้งที่ 4

เรื่อง การทำโครงงานการใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะ เวลา 2 ชั่วโมง

1.ขั้นสร้างความสนใจ

1. ครูซักถามนักเรียนเกี่ยวกับโครงงานการนำเอาถั่วมะแฮะมาใช้ประโยชน์ที่นักเรียนได้ทำมา นักเรียนร่วมกันอภิปราย

2.ขั้นสอน

3. นักเรียนแต่ละกลุ่มออกมานำเสนอโครงงานที่ได้ไปทำมาให้เพื่อนในห้องและครูได้รับฟังทีละกลุ่มจนครบทุกกลุ่ม

4. ครูร่วมกับนักเรียนอภิปรายโครงงานที่ได้รับฟังการนำเสนอที่ละกลุ่ม

3.ขั้นอภิปรายและสรุป

7. ครูสรุปแนะนำการทำโครงงานที่นักเรียนแต่ละกลุ่มร่วมกันทำมาเพื่อเป็นแนวทางการทำโครงงานเรื่องต่อไป

9. สื่อและแหล่งการเรียนรู้

สื่อการเรียนรู้

1. ใบงานเรื่อง การเจริญเติบโตของถั่วมะแฮะ
2. ใบความรู้เรื่อง การใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะ
3. ใบงานเรื่อง การใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะ
4. แบบฝึกคิดหัวเรื่องโครงงาน
5. เค้าโครงงานตัวอย่าง
6. โครงงานตัวอย่าง
7. ใบความรู้ เรื่อง การเขียนเค้าโครงของโครงงาน และการจัดทำรายงานโครงงาน

แหล่งการเรียนรู้

1. ห้องสมุดโรงเรียน
2. แปลงปลูกถั่วมะแฮะในโรงเรียน

10. การวัดและประเมินผล

พฤติกรรมที่ต้องการวัดและประเมินผล	วิธีการ	เครื่องมือ
ความรู้ – ความคิด	1. สังเกตจากการตอบคำถามและการซักถามปัญหาและการแสดงความคิดเห็น 2. สังเกตจากการอภิปรายกลุ่มย่อย 3. การตรวจผลงาน	1. ใบงาน 2. สมุดบันทึกของนักเรียน
ด้านทักษะกระบวนการ	1. ให้ปฏิบัติกิจกรรมการทดลอง (กระบวนการกลุ่ม 2. ให้อภิปรายกลุ่มย่อยและนำเสนอผลงาน 3. การจัดทำโครงงานและการนำเสนอโครงงาน	1. แบบบันทึกการประเมินการทดลอง 2. แบบประเมินโครงงาน
ด้านจิตวิทยาศาสตร์	สังเกตและบันทึกผลการสังเกต	1. สมุดบันทึกการเข้าเรียน 2. แบบสังเกตพฤติกรรมรายบุคคล

11.บันทึกหลังการสอน

ผลการสอน……

……..

……..

……..

……..

ปัญหาอุปสรรค์……..

……..

……..

……..

ข้อเสนอแนะ……

……..

……..

แบบประเมินพฤติกรรมและคุณลักษณะที่พึงประสงค์

คำชี้แจง ให้ผู้ประเมินทำเครื่องหมาย / ลงในช่องที่ตรงกับความเป็นจริง โดยมีเกณฑ์ในการประเมินดังนี้

5 หมายถึง ปฏิบัติหรือแสดงคุณลักษณะนั้นเด่นชัดที่สุด (5 คะแนน)
4 หมายถึง ปฏิบัติหรือแสดงคุณลักษณะนั้นค่อนข้างเด่นชัด (4 คะแนน)
3 หมายถึง ปฏิบัติหรือแสดงคุณลักษณะนั้นปานกลาง (3 คะแนน)
2 หมายถึง ปฏิบัติหรือแสดงคุณลักษณะนั้นน้อย (2 คะแนน)
1 หมายถึง ปฏิบัติหรือแสดงคุณลักษณะนั้นน้อยที่สุด (1 คะแนน)

	พฤติกรรมที่แสดงออก	ระดับการปฏิบัติ				
		1	2	3	4	5
1	แต่งกายถูกต้องตามระเบียบ	.....	.....	.....	.....	....
2	แสดงกริยา วาจา สุภาพเรียบร้อย	.....	.....	.....	.....	....
3	กระตือรือร้น สนใจต่อการเรียน	.....	.....	.....	.....	....
4	ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติกิจกรรมในชั้นเรียน	.....	.....	.....	.....	....
5	ซักถามครูเมื่อมีข้อสงสัยในบทเรียนและเรื่องต่างๆ	.....	.....	.....	.....	....
6	มีน้ำใจกับเพื่อฟๆ และยอมรับฟังความคิดเห็นของคนอื่น	.....	.....	.....	.....	....
7	ปฏิบัติงานที่ได้รับมอบหมายด้วยความตั้งใจส่งทันตามกำหนด	.....	.....	.....	.....	....
8	มีความมั่นใจในตนเอง แสดงความคิดเห็นในชั้นเรียน	.....	.....	.....	.....	....
9	ศึกษาความรู้จากแหล่งต่างๆ ในชุมชน โรงเรียน	.....	.....	.....	.....	....
10	นำความรู้ที่ได้จากการศึกษาไปใช้ในชีวิตประจำวัน	.....	.....	.....	.....	....
	รวม	.....	.....	.....	.....	....

ลงชื่อ.....

(.....)

ผู้ประเมิน

เกณฑ์การประเมินผลโครงงาน

รายการประเมิน	ระดับคุณภาพ
- มีการวางแผนวิธีการทำโครงงานได้ถูกต้องครบถ้วน - ลงมือปฏิบัติตามวิธีการที่วางแผนจนทำโครงงานได้สำเร็จ - สรุปและอภิปรายผลการทำโครงงานได้ถูกต้องชัดเจน - เขียนรายงานเป็นลำดับขั้นตอน - นำเสนอโครงงานได้ชัดเจน สมบูรณ์	4 ดีมาก
- มีการวางแผนวิธีการทำโครงงานได้ถูกต้อง - ลงมือปฏิบัติตามวิธีการที่วางแผนจนทำโครงงานได้สำเร็จ - สรุปและอภิปรายผลการทำโครงงานได้ - นำเสนอโครงงานได้ชัดเจน - เขียนรายงาน	3 ดี
- มีการวางแผนวิธีการทำโครงงานได้ถูกต้องบางส่วน - ลงมือปฏิบัติตามวิธีการวางแผนจนทำโครงงานได้สำเร็จบางส่วน - สรุปและอภิปรายผล ไม่ชัดเจน - เขียนรายงานได้ไม่ชัดเจน นำเสนอชัดเจนบางส่วน	2 พอใช้
- ต้องอาศัยคำแนะนำในการวางแผนวิธีการทำโครงงาน - มีความยากลำบากในการลงมือปฏิบัติตามวิธีการทำโครงงาน - สรุปและอภิปรายผลไม่ถูกต้อง - เขียนรายงานไม่ครบตามขั้นตอน ไม่ถูกต้อง - นำเสนอโครงงานไม่ชัดเจน	1 ปรับปรุง

เกณฑ์การประเมินผลปฏิบัติการทดลอง

รายการประเมิน	ระดับความคิดเห็น			
	ดีมาก (4)	ดี (3)	พอใช้ (2)	ปรับปรุง (1)
1. ความรู้ ความคิด				
1.1 จุดประสงค์การทำภาระงานที่ชัดเจน				
1.2 สาระสำคัญของภาระงานครบถ้วน				
1.3 เนื้อหาสาระถูกต้อง				
1.4 แสดงความคิดริเริ่มสร้างสรรค์				
2. กระบวนการเรียนรู้				
2.1 วางแผนและเตรียมการที่เป็นระบบ				
2.2 ปฏิบัติภาระงานเป็นไปตามแผน				
2.3 ประเมินการทำภาระงานและมีการปรับปรุง				
2.4 ร่วมมือในการทำงานของสมาชิกกลุ่ม				
3. การเสนอผลงานหรือเขียนรายงาย				
3.1 สื่อสารได้ชัดเจน เข้าใจง่าย				
3.2 รูปแบบการนำเสนอเหมาะสม				
3.3 ข้อมูลการทำภาระงานสมบูรณ์				
3.4 สรุปผลการทำภาระงานได้ตรงตามจุดประสงค์				
3.5 เอกสารอ้างอิง/แหล่งข้อมูล				

4. ความคิดเห็นเพิ่มเติม

.....

.....

.....

.....

.....

แบบประเมินผลการปฏิบัติงานผู้เรียน

คำชี้แจง

จงทำเครื่องหมาย ✓ ลงในช่องตรงข้อความที่ท่านเห็นด้วย และเสนอความคิดเห็นเพิ่มเติม โดยจำแนกระดับความคิดเห็นออกเป็น 4 ระดับ ดังนี้

มากที่สุด	หมายถึง	ผู้เรียนมีพฤติกรรมการแสดงออกด้านนั้นได้มากที่สุด = 4
มาก	หมายถึง	ผู้เรียนมีพฤติกรรมการแสดงออกด้านนั้นได้มาก = 3
พอใช้	หมายถึง	ผู้เรียนมีพฤติกรรมแสดงออกด้านนั้นได้น้อย = 2
ปรับปรุง	หมายถึง	ผู้เรียนมีพฤติกรรมแสดงออกด้านนั้นได้น้อยที่สุด = 1

สถานะของผู้ประเมิน

☐ ผู้สอน.....

☐ ผู้เรียน ชื่อ..... ชั้น ..... เลขที่..... กลุ่ม .....

แบบบันทึกการประเมินการทดลอง

กิจกรรมที่สังเกต.....วันที่สังเกต.....

ชื่อกลุ่ม.....ชั้น.....

สมาชิกได้แก่ 1.....2.....

3.....4.....

5.....6.....

ที่	รายการพฤติกรรม	คุณภาพการปฏิบัติ			ไม่ปฏิบัติ
		ดีมาก	ปานกลาง	พอใช้	ปรับปรุง
		4 คะแนน	3 คะแนน	2 คะแนน	1 คะแนน
1	มีการปรึกษากันก่อนทำงาน	.....	.....	.....	.....
2	จัดเตรียมวัสดุ/อุปกรณ์พร้อมและเหมาะสมก่อนปฏิบัติงาน	.....	.....	.....	.....
3	ปฏิบัติงานตามขั้นตอนและวิธีการที่ตกลงกัน	.....	.....	.....	.....
4	ขณะปฏิบัติงานมีการปรึกษาและให้ความช่วยเหลือกัน	.....	.....	.....	.....
5	ระมัดระวังเพื่อให้เกิดความปลอดภัยขณะทำการทดลอง	.....	.....	.....	.....
6	การทดลองเป็นไปตามวัตถุประสงค์	.....	.....	.....	.....
7	ผลการทดลองเสร็จภายในเวลาที่กำหนด	.....	.....	.....	.....
8	เก็บวัสดุ/อุปกรณ์เป็นระเบียบหลังเลิกทำการทดลอง	.....	.....	.....	.....
9	การนำเสนอผลการทำลอง	.....	.....	.....	.....
10	การสรุป/วิเคราะห์การทดลอง	.....	.....	.....	.....
	รวม	.....	.....	.....	.....

ลงชื่อ.....

(.....)

ผู้ประเมิน

เกณฑ์การประเมินผลภาระงาน

การสืบค้นข้อมูล วิชาวิทยาศาสตร์

รายการประเมิน	ระดับคะแนน			
	3	2	1	หมายเหตุ
1. รูปแบบของรายงาน	.....	.....	.....	.....
2. ความสมบูรณ์ของเนื้อหา	.....	.....	.....	.....
3. ความทันสมัยของเนื้อหา (การ up date ข้อมูล)	.....	.....	.....	.....
4. การนำเสนอหน้าชั้น				
4.1 สื่อสารชัดเจน เข้าใจง่าย	.....	.....	.....	.....
4.2 รูปแบบการนำเสนอเหมาะสม	.....	.....	.....	.....
4.3 ข้อมูลของรายงานสมบูรณ์	.....	.....	.....	.....
4.4 สรุปข้อมูลได้ตรงตามจุดประสงค์	.....	.....	.....	.....
คะแนนรวม	.....	.....	.....	.....

ข้อเสนอแนะ/การแก้ไข

.....

.....

.....

การแปลผล

17-21 ดีเยี่ยม

12-16 ดี

7-11 พอใช้

เกณฑ์การประเมินผลภาระงาน

การทดลองแยกย่อย

รายการประเมิน	ระดับคุณภาพ
ด้านที่ 1 การตั้งปัญหา	
- ถูกต้อง ตรงประเด็น	3
- ถูกต้องบางส่วน ไม่ตรงประเด็น	2
- ไม่ถูกต้องและไม่ตรงประเด็น	1
ด้านที่ 2 การตั้งสมมติฐาน	
- ตั้งสมมติฐานได้ตรงประเด็น	3
- ถูกต้องบางส่วน ไม่ตรงประเด็น	2
- ไม่ถูกต้องและไม่ตรงประเด็น	1
ด้านที่ 3 ออกแบบและวางแผนทดลอง	
- สามารถออกแบบได้อย่างถูกต้องและหลากหลาย คลุมเนื้อหา	3
- ออกแบบได้แต่ยังไม่คลุมเนื้อหา	2
- ออกแบบไม่ได้ ครูต้องคอยชี้แนะ	1
ด้านที่ 4 การทดลอง	
- ใช้อุปกรณ์เรียงลำดับการทดลองถูกต้อง ปลอดภัย ทันเวลาที่กำหนด	3
- ใช้อุปกรณ์ได้แต่ยังไม่ถูกต้อง ครูชี้แนะเป็นบางครั้ง ตรงเวลา	2
- ใช้ไม่เป็น ครูต้องคอยแนะนำเสมอ ไม่ตรงเวลา	1
ด้านที่ 5 การลงข้อมูลสรุปผลการทดลอง บันทึกและเขียนรายงาน	
- บันทึกผลการทดลอง สรุปผลถูกต้องและชัดเจน	3
- บันทึกผลการทดลองได้เอง เขียนรายงานได้บ้าง แต่ยังไม่สมบูรณ์	2
- เขียนผลการทดลองยังไม่ได้ ครูต้องคอยแนะนำการเขียนและสรุปผลการทดลอง	1
ด้านที่ 6 การนำเสนอผลการทดลอง	
- นำเสนอด้วยความมั่นใจ ถูกต้อง คล่องแคล่ว ตรงต่อเวลา	3
- นำเสนอได้บ้างแต่ยังไม่คล่องแคล่วเท่าที่ควร	2
- นำเสนอได้แต่ครูต้องคอยชี้แนะ	1

แบบบันทึกการประเมินการทดลอง

กิจกรรมที่สังเกต.....วันที่สังเกต.....

ชื่อกลุ่ม.....ชั้น.....

สมาชิกได้แก่ 1.....2.....

3.....4.....

5.....6.....

ชื่อโครงงาน.....

ที่	รายการประเมิน	คุณภาพโครงงาน			
		ดีมาก 4 คะแนน	ปานกลาง 3 คะแนน	พอใช้ 2 คะแนน	ปรับปรุง 1 คะแนน
1	ชื่อเรื่องมีความน่าสนใจ	.....	.....	.....	.....
2	มีการตั้งสมมติฐานที่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์	.....	.....	.....	.....
3	ออกแบบและวางแผนการทดลอง	.....	.....	.....	.....
4	การทดลอง	.....	.....	.....	.....
5	การลงข้อมูลสรุปผลการทดลอง บันทึกและเขียนรายงาน	.....	.....	.....	.....
6	การนำเสนอผลการทดลอง	.....	.....	.....	.....
	รวม	.....	.....	.....	.....

ลงชื่อ.....

(.....)

ผู้ประเมิน

ใบงานที่ 1 เรื่อง การเจริญเติบโตของถั่วมะแฮะ

<u>คำชี้แจง</u> ให้นักเรียนปฏิบัติตามขั้นตอนและบันทึกการทดลองโดยละเอียด

1. แบ่งเมล็ดถั่วมะแฮะออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดละ 10 เมล็ด
2. นำถั่วมะแฮะทั้ง 3 ชุดการทดลองไปแช่น้ำไว้ ประมาณ 30 นาที
3. นำสำลีรองก้นถาด 1 ชั้น กระดาษทิชชู 3 ชั้น ทั้ง 3 ถาด หลังจากนั้นพรมน้ำให้ชุ่ม
4. นำถั่วที่แช่น้ำแล้วเรียงในถาดที่เตรียมไว้ ถาดละ 10 เมล็ด แล้วแยกถาดไว้ดังนี้

4.1 ถาดที่ 1 เก็บในที่สว่างได้รับแสงปกติ พรมน้ำเช้า – เย็น ให้ชุ่ม สังเกตการณ์เจริญเติบโต บันทึกผลการทดลอง

4.2 ถาดที่ 2 เก็บในที่สว่างได้รับแสงปกติ ไม่พรม สังเกตการณ์เจริญเติบโต บันทึกผลการทดลอง

4.3 ถาดที่ 3 เก็บในที่ไม่มีแสงสว่าง พรมน้ำเช้า – เย็น ให้ชุ่ม สังเกตการณ์เจริญเติบโต บันทึกผลการทดลอง

5. ให้นักเรียนวาดภาพการเจริญเติบโตของถั่วมะแฮะ
6. ให้นักเรียนเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโตพร้อมกับอธิบายโดยละเอียด
7. นำเสนอผลงานหน้าชั้นเรียน

แบบบันทึกการทดลอง

การทดลองเรื่อง.....วันที่ทดลอง.....

ชื่อกลุ่ม.....ชั้น.....

สมาชิกได้แก่ 1.....2.....

3.....4.....

5.....6.....

วัตถุประสงค์การทดลอง

.....

.....

.....

สมมติฐานการทดลอง

.....

.....

.....

ตัวแปรการทดลอง

.....

.....

.....

วิธีการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

วัสดุ/อุปกรณ์ในการทดลอง

.....

.....

.....

.....

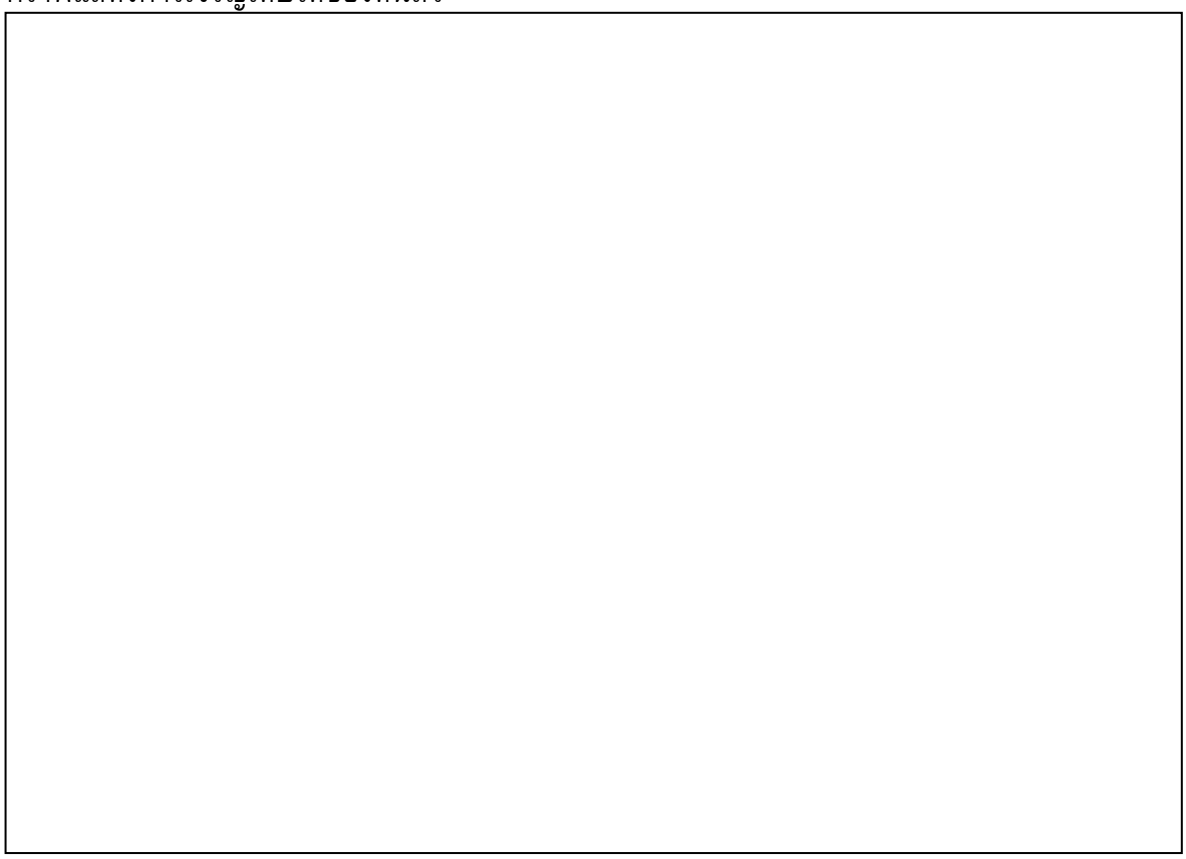
.....

ผลการทดลอง

วัน เดือน ปี	ถาดที่ 1		ถาดที่ 2		ถาดที่ 3	
	จำนวนเม็ดที่งอก	ความสูงของต้น	จำนวนเม็ดที่งอก	ความสูงของต้น	จำนวนเม็ดที่งอก	ความสูงของต้น
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

ภาพการเจริญเติบโตของต้นถั่วมะแฮะ

กราฟแสดงการเจริญเติบโตของต้นถั่ว



สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

แบบฝึกคิดหัวเรื่องโครงงาน

ชื่อกลุ่ม.....ชั้น.....

สมาชิกได้แก่ 1.....2.....

3.....4.....

5.....6.....

<u>คำชี้แจง</u> ให้นักเรียนฝึกคิดหัวเรื่องโครงงานจากสถานการณ์ที่กำหนดให้

สถานการณ์

นายสมปลูกถั่วมะแฮะไว้จำนวน 1 แปลง ในช่วงระยะแรกนายสมรดน้ำดูแลจนถั่วมะแฮะโตได้ระยะหนึ่ง หลังจากนั้นนายสมไปทำงานในกรุงเทพเป็นเวลา 3 ทิ้งถั่วมะแฮะให้เติบโตเอง เนื่องจากว่าเกษตรอำเภอมาบอกว่าเมื่อถั่วมะแฮะโตแล้วก็รอไปเก็บเกี่ยวเมล็ดอย่างเดียวไม่ต้องรดน้ำใส่ปุ๋ยอีก แต่ปรากฏว่าเมื่อนายสมกลับมาหวังจะเก็บเกี่ยวถั่วมะแฮะกลับพบว่าต้นถั่วมะแฮะบางต้นแคะแกรน ไม่โต บางต้นใบซีดเหลือง ไม่ออกดอกออกผลตามที่ได้รับคำแนะนำมา

********** นายสมจะแก้ปัญหานี้ได้อย่างไร **********

หัวเรื่องโครงงาน ตัวอย่าง การคัดเลือกเมล็ดถั่วมะแฮะมีผลต่อการเจริญเติบโต

หัวเรื่องที่ 1 .....

หัวเรื่องที่ 2 .....

หัวเรื่องที่ 3 .....

หัวเรื่องที่ 4 .....

หัวเรื่องที่ 5 .....

หัวเรื่องที่ 6 .....

หัวเรื่องที่ 7 .....

หัวเรื่องที่ 8 .....

หัวเรื่องที่ 9 .....

หัวเรื่องที่ 10 .....

ใบงานที่ 2 เรื่อง การเขียนเค้าโครงของโครงงาน

<u>คำชี้แจง</u> ให้นักเรียนเขียนเค้าโครงจากสถานการณ์ต่อไปนี้มา 1 เรื่อง หลังจากนั้นนำเสนอผลงานหน้าชั้นเรียน

สถานการณ์

ถั่วมะแฮะมาใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่รากถึงยอด และที่พบกันมากคือนำมาเป็นปุ๋ยพืชสด ปลูกเพื่อปรับสภาพดิน และนำมาเป็นอาหารสัตว์ เป็นผักพื้นเมืองฝักอ่อนบริโภคพร้อมกับส้มตำ ใช้จิ้มเมี่ยง ใช้ลวกจิ้มน้ำพริก ทั้งนี้ได้มีการวิจัยการแปรรูปถั่วมะแฮะเพื่อประกอบเป็นอาหาร ของขบเคี้ยว แป้งถั่ว อาหารเสริม เป็นต้น ในบางประเทศ เช่น ประเทศอินเดียมีอาหารที่ทำจากถั่วมะแฮะเรียกว่า Turvara Parippu และ Sambhar ประเทศ Dominican Republic และฮาวาย นำถั่วมะแฮะมาแปรรูปเป็นอาหารกระป๋อง เนื่องจากตรวจพบในถั่วมะแฮะที่แก่จัดมีสารอาหารต่างๆ ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรท 63.4 กรัม/100 กรัม โปรตีน 20.4 กรัม/100 กรัม ไขมัน 11.5 กรัม/100 กรัม (คำนวณจากน้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ยัง ประกอบไปด้วยแคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามิน A, B, B_1, B_2, และ ไนอาซีน

เค้าโครง โครงงาน

เรื่อง.....

ชื่อกลุ่ม.....ชั้น.....

สมาชิกได้แก่ 1.....2.....

3.....4.....

5.....6.....

หลักการและเหตุผล

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

วัตถุประสงค์การทดลอง

.....

.....

.....

สมมติฐานการทดลอง

.....

.....

.....

ตัวแปรการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

วิธีการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

วัสดุ/อุปกรณ์ในการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

แบบจำแนกประโยชน์จากถั่วมะแฮะ

ชื่อกลุ่ม.....ชั้น.....

สมาชิกได้แก่ 1.....2.....

3.....4.....

5.....6.....

ส่วนที่ใช้ประโยชน์	อาหารคน	อาหารสัตว์	ยารักษาโรค	ปุ๋ย	อื่นๆ
ราก	.....	.....	.....	.....	.....
ลำต้น	.....	.....	.....	.....	.....
ใบ	.....	.....	.....	.....	.....
ผล (เมล็ด)	.....	.....	.....	.....	.....

สรุปผล

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ใบความรู้ที่ 1
เรื่อง การใช้ประโยชน์จากถั่วมะแฮะ

โดยทั่วไปสามารถนำถั่วมะแฮะมาใช้ประโยชน์ได้ตั้งแต่รากถึงยอด และที่พบกันมาก คือ นำมาเป็นปุ๋ยพืชสด ปลูกเพื่อปรับสภาพดิน และนำมาเป็นอาหารสัตว์ เป็นผักพื้นเมืองฝักอ่อนบริโภคพร้อมกับส้มตำ ใช้จิ้มเมี่ยง ใช้ลวกจิ้มน้ำพริก ทั้งนี้ได้มีการวิจัยการแปรรูปถั่วมะแฮะเพื่อประกอบเป็นอาหาร ของขบเคี้ยว แป้งถั่ว อาหารเสริม เป็นต้น ในบางประเทศ เช่น ประเทศอินเดียมีอาหารที่ทำจากถั่วมะแฮะเรียกว่า Turvara Parippu และ Sambhar ประเทศสาธารณรัฐโดมินิแกน และฮาวาย นำถั่วมะแฮะมาแปรรูปเป็นอาหารกระป๋อง เนื่องจากตรวจพบในถั่วมะแฮะที่แก่จัดมีสารอาหารต่างๆ ประกอบด้วย ถั่วมะแฮะสามารถนำไปใช้ได้ทั้งเป็นอาหาร เช่น พวกถั่วแห้ง แป้ง เป็นต้น และยังใช้เป็นอาหารสัตว์เหมือนพวกธัญพืชทั่วไป เมล็ดถั่วที่แห้งอาจนำไปใช้แตกหนอได้ นำไปทำอาหารซึ่งจะให้รสชาติที่แตกต่างไปจากถั่วชนิดอื่นๆ

ในถั่วมะแฮะมีสารอาหารที่สำคัญโดยจะมี คาร์โบไฮเดรต 63.4 กรัม/100 กรัม โปรตีน 20.4 กรัม/100 กรัม ไขมัน 11.5 กรัม/100 กรัม (คำนวณจากน้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ยัง ประกอบไปด้วยแคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามิน A B B_1 B_2 และกรดอะมิโนคือ เมทไทโอนีน ไลซีน ทริปโตเฟน และ ไนอาซีน เมื่อนำไปประกอบอาหารร่วมกับพวกซีเรียลจะให้อาหารที่มีประโยชน์

ส่วนต่างๆของต้นถั่วมะแฮะไม่ว่าจะเป็นลำต้น ก้าน หรือใบ สามารถนำมาใช้เป็นถ่านไม้รั้วและนำมามุงหลังคาได้ด้วย ในประเทศไทยได้นำถั่วมะแฮะมาใช้เป็นบ้านของแมลงชนิดต่างๆ เช่น แมลงครั่ง เป็นต้น

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสุกล	นางภคธีรา อุปจักร์
วันเดือนปีเกิด	วันที่ 24 เดือนกรกฎาคม ปีพุทศักราช 2516
สถานที่เกิด	อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 170 หมู่ที่ 1 ตำบลบ่อเกลือใต้ อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน 55220
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ข้าราชการครู คศ.1
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนบ้านนากอก หมู่ 1 ตำบลภูฟ้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2531	มัธยมศึกษาตอนต้น จากโรงเรียนออนเหนือ เชียงใหม่
พ.ศ. 2536	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากศูนย์การศึกษานอกโรงเรียน เชียงใหม่
พ.ศ. 2541	ครุศาสตรบัณฑิต สาขาภาษาไทย ระดับบัณฑิต จากสถาบันราชภัฏเชียงใหม่ เชียงใหม่
พ.ศ. 2550	วิทยาศาศตรศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์ศึกษาระดับมหาบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร