บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

เมล็ดถั่วเหลืองที่ใช้ในงานวิจัยมีความชื้น 8.15 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณโปรตีน ไขมัน เส้นใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรท เท่ากับ 37.71, 20.85, 5.58, 4.77 และ 31.09 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมล็ดถั่วเหลืองมีปริมาณความชื้นที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการผลิตอาหาร คือ มีความชื้นไม่เกิน 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าเป็นถั่วเหลืองที่ผ่านการเก็บที่ถูกต้อง (สถาบันฯ, 2527) และมีปริมาณโปรตีนสูง เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นอาหารโปรตีน ส่วนปริมาณเส้นใย พบว่ามีปริมาณเส้นใยต่ำ เพราะในงานวิจัยครั้งนี้ใช้เมล็ดถั่วเหลืองที่กะเทาะเปลือกออกแล้วเป็นวัตถุดิบ

ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตเป็นอาหารได้เนื่องจากมีความชื้นที่เหมาะสม และมีปริมาณโปรตีนสูง

5.2 การศึกษาผลของชนิด และปริมาณของสารตกตะกอนที่มีต่อคุณภาพเต้าหู้

จากการทดลองในขั้นนี้ พบว่า การศึกษาผลของชนิดของสารตกตะกอน 4 ชนิด คือ แคลเซียมซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ และปริมาณของสารตกตะกอนที่ใช้ คือ 0.01 0.02 และ 0.03 โมลาร์ ที่มีต่อเต้าหู้และคุณสมบัติของเต้าหู้ที่ได้ พบว่า ความเข้มข้นของสารตกตะกอนที่เหมาะสมในสารตกตะกอนประเภทซัลเฟต คือ 0.02 โมลาร์ และสารตกตะกอนประเภทคลอไรด์ คือ 0.01 โมลาร์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลไกในการตกตะกอนของโปรตีนในน้ำนมถั่วเหลือง เมื่อใช้สารตกตะกอนคนละประเภทกัน โดยตามที่ Kohyama, Sano และ Doi (1995) ได้เสนอกลไกในการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นเต้าหู้ไว้ว่า ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเมื่อโปรตีนได้รับความร้อนจากการต้มน้ำนมถั่วเหลือง โปรตีนจะเสียสภาพธรรมชาติไปส่วนหนึ่ง ส่วนที่เป็น hydrophobic ของโปรตีนซึ่งในสภาพธรรมชาติจะอยู่ด้านในจะเปลี่ยนมาอยู่ด้านนอก และมีสภาพเป็นประจุลบ (Kohyama and Nishinari, 1993) ต่อมาในขั้นตอนที่สอง โปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติ และมีประจุเป็นลบจะจับกับประจุบวกของสารตกตะกอน ทำให้โปรตีนมีสภาพเป็นกลางทางไฟฟ้า และเข้ามาจับกันด้วยปฏิกิริยา hydrophobic (hydrophobic coagulation) เกิดเป็นโครงสร้างตาข่าย (gel networks) ซึ่งในโครงสร้างนี้ก็จะมีน้ำและของแข็งอื่น ๆ เช่น ไขมัน แทรกตัวอยู่(Shurtleff

and Aoyagi, 1979) สำหรับการใช้เกลือแคลเซียม และแมกนีเซียมการตกตะกอนของโปรตีนนั้น นอกจากโปรตีนจะจับกันเองด้วยพันธะ hydrophobic แล้ว เกลือแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) และแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ก็จะไปจับไฟเตต (phytate) ที่อยู่รวมกับโมเลกุลของโปรตีนโดยไฟเตตจะทำตัวเป็นเหมือนสะพานเชื่อม ทำให้โครงสร้างของเต้าหู้ที่ได้จากการใช้เกลือแคลเซียมและเกลือแมกนีเซียมเป็นตัวตกตะกอนนั้น สามารถจับน้ำไว้ในโครงสร้างได้ (Lee and Rha, 1978) เต้าหู้ที่ทำจากแคลเซียมซัลเฟตจะให้น้ำหนักเต้าหู้สูงสุด ปริมาณความชื้นก็เช่นเดียวกัน แต่ที่ความเข้มข้นของสารตกตะกอนเพิ่มขึ้น เต้าหู้ที่ทำจากแคลเซียมซัลเฟตจะมีปริมาณเต้าหู้ลดลง แต่อย่างไรก็ตาม เต้าหู้ที่ทำจากสารตกตะกอนแคลเซียมซัลเฟตก็ยังมีปริมาณมากกว่าเต้าหู้ที่ผลิตจากสารตกตะกอนชนิดอื่น ส่วนทางด้านคุณลักษณะของเต้าหู้ที่ได้ พบว่า ชนิดของสารตกตะกอนมีผลต่อลักษณะในด้านความแข็ง คือ แคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์จะให้เต้าหู้ที่มีความแข็งมากกว่าแคลเซียมซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟต

จากการทดลองในขั้นนี้ พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารตกตะกอนเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อยก็จะมีผลต่อเต้าหู้อย่างมาก อาจเป็นเพราะกระบวนการทำให้เป็นกลางทางไฟฟ้าของ protein micelles หรือ protein-fat micelles (อัตราเร็วในการเกิดขึ้นอยู่กับปริมาณของสารตกตะกอน คือ ถ้าปริมาณสารตกตะกอนมากจะทำให้กระบวนการทำให้เป็นกลางทางไฟฟ้าเกิดเร็วขึ้นกว่าที่ปริมาณสารตกตะกอนน้อย) ซึ่งเป็นการทำให้เกิดการรวมกันเป็นโครงสร้างขึ้นมา ถ้ากระบวนการทำให้เป็นกลางทางไฟฟ้าเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เช่น ในกรณีที่ความเข้มข้นของสารตกตะกอนสูง ๆ จะทำให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ละลายอยู่ เช่น โปรตีน 2S และ 4S ซึ่งเกิดจากการแยกของโปรตีน 11S เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงจะไม่รวมเข้ามาในโครงสร้างที่เกิดขึ้น เป็นเหตุให้ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารตกตะกอนสูง ๆ จะทำให้ได้เต้าหู้ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำ ดังนั้น อัตราการทำให้เป็นกลางทางไฟฟ้าต้องเพียงพอที่จะรวมเอาโปรตีนที่ละลายอยู่เข้ามารวมกันในโครงสร้าง (Lee and Rha, 1978)

ดังนั้นสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของแคลเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนในนมถั่วเหลืองเพื่อผลิตเต้าหู้ คือ 0.02 โมลาร์

5.3 การศึกษาแรงกดเพื่อขึ้นรูปก้อนเต้าหู้ที่เหมาะสม

แรงกดเพื่อขึ้นรูปก้อนเต้าหู้ เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเนื้อสัมผัสของเต้าหู้โดยตรง โดยในการทำเต้าหู้แข็งจะมีการกดทับด้วยน้ำหนัก 2 ช่วงด้วยกัน คือ กดทับในช่วงแรก 30 นาที และกดทับในช่วงที่สองอีก 30 นาที ด้วยแรงกดที่เหมาะสม (Shurtleff and

Aoyagi, 1979) จะทำการทดลองโดยเลือกภาวะที่ดีที่สุดจากผลการทดลองข้อ 4.2 ใช้แคลเซียมซัลเฟตเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เป็นสารตกตะกอน จากการทดลองเบื้องต้นโดยทดลองใช้น้ำหนักกดเพื่อขึ้นรูปก้อนเต้าหู้ เท่ากับ 10 และ 15 กรัมต่อตารางเซนติเมตร พบว่าการเกาะติดกันของ curd ไม่ดี มี curd บางส่วนติดไปกับผ้าขาวบางและทำให้ผิวหน้าของเต้าหู้บางส่วนจะติดไปกับผ้าขาวบางขณะนำก้อนเต้าหู้ออกจากผ้าขาวบางอีกด้วย เต้าหู้ที่ได้ผิวไม่เรียบ และมีน้ำมาก ทั้งนี้จากการทดลองเบื้องต้น พบว่า ที่ความห่างกันของน้ำหนักกดเพียง 5 กรัมต่อตารางเซนติเมตรจะไม่ทำให้ลักษณะของเต้าหู้แตกต่างกันแต่อย่างใด ดังนั้นจึงทำการศึกษาน้ำหนักกดเพื่อขึ้นรูปก้อนเต้าหู้ที่เหมาะสม โดยการแปรน้ำหนักกดเป็น 5 ระดับ คือ 20, 30, 40, 50 และ 60 กรัมต่อตารางเซนติเมตร พบว่าการใช้น้ำหนักกดเพื่อการขึ้นรูปก้อนเต้าหู้แข็งที่ต่ำเกินไป (ต่ำกว่า 30 กรัมต่อตารางเซนติเมตร) จะทำให้น้ำหนักของเต้าหู้ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น ทั้งนี้เนื่องจากมีการสูญเสีย curd บางส่วนติดอยู่กับผ้าขาวบางจึงทำให้น้ำหนักเต้าหู้ต่ำ และเมื่อปริมาณแรงกดเพิ่มขึ้น น้ำหนักของเต้าหู้ ปริมาณความชื้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เพราะเมื่อใช้แรงกดมากขึ้น ความสามารถในการกำจัดน้ำออกจาก curd ย่อมเพิ่มมากขึ้น ทำให้น้ำหนัก และปริมาณความชื้นลดลง และที่แรงกด 20 กรัมต่อตารางเซนติเมตรจะมีน้ำหนัก และปริมาณความชื้นสูงกว่าที่แรงกดระดับอื่น ทั้งนี้เพราะแรงที่ใช้กดน้อย ทำให้ความสามารถในการไล่น้ำออกจาก curd ต่ำ มีน้ำอยู่ใน curd มากส่งผลให้น้ำหนักและความชื้นมีค่าสูงกว่าที่แรงกดระดับอื่น เมื่อเพิ่มแรงกดมากขึ้นน้ำหนักของเต้าหู้ลดลงและเริ่มคงที่เมื่อใช้แรงกดตั้งแต่ 30 กรัมต่อตารางเซนติเมตรเป็นต้นไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำในเต้าหู้แข็งสามารถถูกขับออกมาได้ ถูกขับออกมาหมดแล้ว ดังนั้นการเพิ่มแรงกดไปจนถึง 60 กรัมต่อตารางเซนติเมตรจึงไม่มีผลต่อน้ำหนักเต้าหู้ สำหรับปริมาณความชื้นก็เช่นเดียวกัน สำหรับค่าความแข็งและความเหนียวของเต้าหู้ พบว่าเมื่อเพิ่มแรงกด จะทำให้ค่าความแข็งและความเหนียวของเต้าหู้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เพราะแรงกดที่มากขึ้นจะส่งผลทำให้ curd เข้ามาใกล้กันและยึดติดกันมากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากค่าความเหนียวที่เพิ่มขึ้น ที่น้ำหนักกดทับจาก 20 กรัมต่อตารางเซนติเมตรถึง 30 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ความแข็งจะเพิ่มขึ้นมากกว่าความแข็งที่น้ำหนักกดทับตั้งแต่ 30-60 กรัมต่อตารางเซนติเมตร คือ ตั้งแต่แรงกด 30 กรัมต่อตารางเซนติเมตรเป็นต้นไป ค่าความแข็งและความเหนียวเริ่มคงที่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะข้อจำกัดของความสามารถในการยึดติดกันของ curd ดังนั้นการเพิ่มแรงกดไปจนถึง 60 กรัมต่อตารางเซนติเมตรจึงไม่มีผลต่อความแข็ง และความเหนียว เมื่อพิจารณาลักษณะปรากฏของเต้าหู้ พบว่าความเป็นรูพรุนที่ผิวของก้อนเต้าหู้จะลดลงเมื่อแรงกดเพิ่มกัน ทั้งนี้เป็นเพราะแรงกดอัด curd ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมีผลให้ curd ติดกันดีขึ้นทำให้รูพรุนลดน้อยลง

ดังนั้นในการทดลองขั้นนี้จึงสรุปได้ว่าน้ำหนักกดเพื่อขึ้นรูปก้อนเต้าหู้ที่เหมาะสมเมื่อใช้แคลเซียมซัลเฟตเข้มข้น 0.02 โมลาร์เป็นสารตกตะกอน คือ 30 กรัมต่อตารางเซนติเมตร

5.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการลดความชื้นของก้อนเต้าหู้

การใช้ความร้อนในการอบก้อนเต้าหู้ก่อนการใส่เชื้อรา เพื่อป้องกันเจริญของแบคทีเรียที่อาจมีการปนเปื้อนมาในระหว่างกระบวนการผลิต แต่จะไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อราแต่อย่างใด (Wang and Heessltine, 1970) ดังนั้นก่อนการใส่เชื้อราลงบนก้อนเต้าหู้ และเพื่อให้เชื้อราเจริญได้ดี จำเป็นต้องใช้ความร้อนในการอบแห้งเพื่อไล่ความชื้นบางส่วนที่ก้อนเต้าหู้ออก จึงได้มีการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ โดยแปรอุณหภูมิเป็น 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส และเวลา เป็น 10, 15, 20 และ 25 นาที จากผลการทดลองพบว่า เมื่ออบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่เวลา 10-20 นาที จะทำให้มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่ปนเปื้อนมาในระหว่างการผลิต ส่งผลให้เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ ทั้งนี้เพราะ เป็นอุณหภูมิที่ต่ำเกินไปไม่สามารถป้องกันการเจริญของเชื้อที่ปนเปื้อนมาในระหว่างการผลิตได้ และไม่มีประสิทธิภาพในการไล่ความชื้นของก้อนเต้าหู้ออกดังจะเห็นได้จาก ลักษณะของก้อนเต้าหู้ภายหลังการอบนั้น ผิวหน้ายังมีความชื้นเหลืออยู่มาก ซึ่งทำให้มีปริมาณความชื้นของก้อนเต้าหู้สูงและเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นจึงทำให้เชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาเจริญได้ เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิสูง คือ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในทุก ๆ เวลา พบว่าลักษณะของก้อนเต้าหู้ที่ได้ภายหลังการอบจะเกิดการไหม้เป็นสีน้ำตาล ทั้งนี้เพราะที่อุณหภูมิสูงจะทำให้มีอัตราเร็วในการอบแห้งสูง น้ำบริเวณผิวก้อนเต้าหู้ระเหยออกมาเร็วในช่วงแรก และทำให้ผิวของอาหารแห้งแข็ง หลังจากนั้น อัตราเร็วในการอบแห้งจะลดลง ทั้งนี้เพราะผิวที่แห้งเป็นอุปสรรคในการแพร่ของน้ำจากในก้อนออกมาสู่ผิว (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2532) ดังนั้นความชื้นของก้อนเต้าหู้จึงลดลงไม่มากเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาผลของการเจริญของเชื้อรา พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีในทุก ๆ อุณหภูมิ ยกเว้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ทำให้เชื้อราที่ใส่ลงไปไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสไม่สามารถป้องกันการเจริญของเชื้อที่อาจปนเปื้อนมาได้ เมื่อพิจารณาในด้านความแข็งและความเหนียวของก้อนเต้าหู้หลังการอบไล่ความชื้น จะมีค่ามากขึ้นเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการอบมากขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะเมื่อน้ำระเหยออกจากโครงสร้างย่อมทำให้พันธะของโปรตีนสามารถเข้ามาใกล้กันและยึดติด (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2532) ส่งผลให้ค่าความแข็งและความเหนียวมีค่ามากขึ้น และเมื่อพิจารณาถึงลักษณะของก้อนเต้าหู้ภายหลังการอบไล่ความชื้น พบว่าลักษณะของก้อนเต้าหู้ที่

อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ยังคงเป็นก้อนรูปทรงเดิม ไม่มีการเสียรูปร่างและไม่เกิดสีน้ำตาลที่ผิวก้อนเต้าหู้ แต่ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ก้อนเต้าหู้มีการเสียรูปร่าง เกิดการหดตัวของเหลี่ยมและมุม ทั้งนี้เพราะที่ 100 องศาเซลเซียส จัดว่าเป็นอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดอัตราการอบแห้งที่เร็ว น้ำที่ผิวจะระเหยออกมาเร็ว ทำให้ผิวของอาหารแข็งและโครงสร้างก็จะยึดติดกันเป็นการขัดขวางการแพร่ของน้ำจากภายในอาหาร (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2532)

ดังนั้นในการทดลองขั้นนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิและเวลาในการอบไล่ความชื้นที่ผิวก้อนเต้าหู้ ที่ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที

5.5 **การศึกษาและคัดเลือกเชื้อราที่ใช้ในการหมักเต้าหู้**

ใช้เชื้อรา 3 สายพันธุ์ด้วยกัน *A. elegans*, *M. hiemalis* และ *R. oligosporus* เชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลือกศึกษา เป็นเชื้อที่ได้รับการรายงานว่าสามารถใช้ในการผลิตเต้าหู้ยี้ได้ โดยเชื้อราที่สามารถนำมาใช้ต้องมีเส้นใยสีขาว หรือสีเหลืองอ่อนๆ เพื่อจะให้ได้เต้าหู้ยี้ที่มีคุณภาพดี และควรเป็นเส้นใยที่หนาทึบ เพื่อให้เกิดแผ่นฟิล์มที่แน่นอยู่ที่ผิวของก้อนเต้าหู้ จะได้ไม่ทำให้รูปร่างเปลี่ยนไป สามารถเจริญได้ดีบนอาหารโปรตีน (protein-rich medium) เช่น เต้าหู้ ข้อสำคัญการเจริญของราต้องสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เหมาะสม ไม่สร้างกลิ่นหรือรสชาติที่ไม่พึงประสงค์หรือผลิตไมโคทอกซิน ก้อนเต้าหู้ที่มีราเจริญขึ้นใหม่ ๆ จะมีรสจืดชืด เนื่องจากกลิ่นรสของเต้าหู้จะเกิดภายหลัง คือ ในระยะของการแช่น้ำเกลือและระยะบ่ม (Hesseltine, 1976 ; Steinkraus, 1983 ; Wai, 1929) หัวเชื้อเริ่มต้นของเต้าหู้ยี้ที่ใช้ต้องมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนและไขมันสูง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อกลิ่นและรสชาติของเต้าหู้ยี้ (Wang and Hesseltine, 1970) จากผลการทดลองพบว่า เมื่อบ่มก้อนเต้าหู้ที่ใส่เชื้อ *A. elegans* ที่อุณหภูมิห้อง (27$\pm$2) จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในวันที่ 4 ประกอบกับสามารถเจริญได้ดีและเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับ Wai (1986) ที่พบว่า *A. elegans* จะเป็นเชื้อที่มีความเหมาะสมและนิยมใช้มากที่สุด สามารถเจริญได้ดีบนก้อนเต้าหู้และผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากและสมบูรณ์กว่าเชื้อตัวอื่น พบว่าเมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้นจะทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มมากขึ้นด้วย ทั้งนี้เป็นเพราะเมื่อเชื้อราเจริญก็จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้นด้วย โดยในช่วงวันแรกของการบ่ม กิจกรรมของเอนไซม์จะน้อยกว่าในช่วงอื่น ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อรายังเจริญอยู่ในช่วง lag phase ซึ่งเป็นช่วงที่กำลังเริ่มเจริญ และจะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นมากในช่วง 2-3 วันแรกของการบ่ม ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะเชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase มีการเจริญมากและเร็ว และในช่วงหลัง 3 วันแรกกิจกกรรมของเอนไซม์จะลดลงทั้งนี้น่าจะเป็น

เพราะเชื้อเจริญอยู่ในช่วง stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเจริญคงที่ แต่กิจกรรมเอนไซม์ไม่ควรลดลง เพราะเอนไซม์เมื่อย่อยโปรตีนแล้วจะไม่มีการสลายไป แต่ในการหากิจกรรมเอนไซม์จะกระทำโดย ใช้ปากคีบนำเอาก้อนเต้าหู้ที่มีเชื้อราปกคลุมขึ้นมาและจะสังเกตเห็นน้ำบริเวณก้นขวดโหล ซึ่งคาดว่าน้ำที่สังเกตเห็นน่าจะมีเอนไซม์อยู่ ดังนั้นจึงส่งผลให้เมื่อหาค่ากิจกรรมเอนไซม์ใน 3 วันหลังจะพบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีค่าลดลง เมื่อพิจารณาถึงปริมาณโปรตีนของก้อนเต้าหู้ที่มีเชื้อราขึ้นปกคลุม พบว่าในช่วงแรกจะมีปริมาณโปรตีนลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อราสร้างขึ้นสามารถย่อยโปรตีนในก้อนเต้าหู้ได้ และปริมาณโปรตีนควรจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น แต่จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 ของการบ่มทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในการหาปริมาณโปรตีนจะใช้ก้อนเต้าหู้ทั้งก้อนที่มีเชื้อราขึ้นปกคลุม ซึ่งน่าจะมีโปรตีนจากเส้นใยเชื้อรามาร่วมด้วยในปริมาณโปรตีน และอาจเนื่องมาจากความไม่สม่ำเสมอของเต้าหู้ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งไม่สามารถใช้เต้าหู้ที่ได้จากการผลิตในครั้งเดียวกันได้ เมื่อพิจารณาในด้านความแข็งของก้อนเต้าหู้จะเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาในการบ่มนานขึ้น ทั้งนี้เพราะลักษณะของเส้นใยเชื้อราจะเจริญปกคลุมหนาแน่น ทำให้ความแข็งเพิ่มขึ้น ประกอบกับมีเส้นใยเชื้อราบางส่วนแทงลงไปในก้อนเต้าหู้ไปช่วยยึดโครงสร้างเต้าหู้ได้อีกส่วนหนึ่งด้วย (Hesseltine, 1976) จึงทำให้ความแข็งมีค่ามากขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มนานขึ้น แต่ในการเจริญของเชื้อจะมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสขึ้นมาเพื่อย่อยโปรตีนในก้อนเต้าหู้ ในการนี้น่าจะทำให้ก้อนเต้าหู้มีความแข็งลดลง แต่ผลการทดลอง พบว่าความแข็งมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการหมักมากขึ้นทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะ เส้นใยที่ขึ้นปกคลุมก้อนเต้าหู้จะช่วยยึดผิวรอบ ๆ ก้อนเต้าหู้และในการวัดความแข็งจะเป็นค่าแรกที่หัววัดกดลงบนก้อนเต้าหู้ที่มีเส้นใยเชื้อราขึ้นอย่างหนาแน่นขึ้น ทำให้เนื้อสัมผัสแข็งขึ้น และค่าความเหนียวจะเพิ่มขึ้นแสดงว่าเนื้อเต้าหู้ยังยึดติดกันดี ถึงแม้จะมีการย่อยโปรตีนก็ตามซึ่งเกิดกับทุกเชื้อ เมื่อพิจารณาอุณหภูมิในการบ่ม พบว่าที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C) เชื้อราจะสามารถผลิตปริมาณเอนไซม์ได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ในทุกเชื้อ และเชื้อ *A. elegans* จะสามารถเจริญได้เร็ว และสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่น ซึ่งรุ่งนภา พงษ์สวัสดิ์มานิต และวราวุฒิ ครูส่ง (2532) ได้กล่าวว่า เชื้อราสายพันธุ์ *A. elegans* จะให้ผลของเต้าหู้ยี้ที่มีคุณภาพดีที่สุด ส่วนเชื้อ *M. hiemalis* ก็สามารถเจริญ และผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีแต่ยังด้อยกว่าเชื้อ *A. elegans* ส่วนเชื้อ *R. oligosporus* พบว่าทั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสนั้นด้อยที่สุดและสปอร์ที่สร้างมีสีดำทำให้ลักษณะปรากฏของเต้าหู้ไม่ดี และสร้างกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ คือ เชื้อตัวนี้สามารถสร้างกลิ่นแอมโมเนียได้

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ทั้งเชื้อ *A. elegans* และ *M. hiemalis* ในการทดลองต่อไป

5.6 ผลการหมักในสารละลายน้ำเกลือ

การหมักในสารละลายน้ำเกลือทำให้เต้าหู้ยี้มีรสเค็ม ขณะเดียวกันเกลือก็ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อราและจุลินทรีย์ปนเปื้อนต่าง ๆ ที่สำคัญที่สุด คือ เกลือจะทำให้เกิดการปล่อยเอนไซม์โปรติเอสที่ในเส้นใย (mycelium-bound protease) ในการทดลองขั้นนี้จะใช้แคลเซียมซัลเฟตเข้มข้น 0.02 โมลาร์เป็นสารตกตะกอน ในการขึ้นรูปก้อนเต้าหู้ใช้แรงกด 30 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ปรับภาวะก้อนเต้าหู้ให้เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรา และป้องกันแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาด้วยการอบไล่ความชื้นที่ผิวก้อนเต้าหู้ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และใช้เชื้อ *A. elegans* และ *M. hiemalis* ในการหมักก้อนเต้าหู้ โดยให้เส้นใยเชื้อราเจริญขึ้นปกคลุมก้อนเต้าหู้ เรียกก้อนเต้าหู้ที่มีเชื้อราขึ้นปกคลุมว่า "pehtze" ทั้งนี้ในขั้นตอนนี้ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงด้านชีวเคมีในก้อน pehtze โดยเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในเส้นใยเชื้อรา ซึ่งเป็น Intracellular enzyme ของเชื้อราจะถูกปลดปล่อยออกมา โดย ionizable salt ซึ่ง ionizable salt ที่ใช้ คือโซเดียมคลอไรด์ โดยจะไปทำให้ ionic linkage ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนกับเส้นใยของเชื้อราคลายและหลุดออก (Wang, 1967) เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะแทรกซึมเข้าไปใน pehtze เพื่อย่อยสลายโปรตีน จึงกล่าวได้ว่าเป็นช่วงที่การทำงานของเอนไซม์ประเภท proteolytic และโซเดียมคลอไรด์ยังทำหน้าที่ให้รสเค็มอีกด้วย จากการติดตามผลการหมัก จะติดตามปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ในน้ำ ซึ่งหาได้จากปริมาณไนโตรเจนที่ละลายในน้ำเทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (water soluble nitrogen/total nitrogen) หรือเรียกว่า ripening ratio ซึ่งเป็นการรายงานถึงความก้าวหน้าของการย่อยของเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยโปรตีนในก้อนเต้าหู้ไปเป็น เปปไทด์ และกรดอะมิโน จากการทดลอง พบว่า ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ในน้ำจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์โปรติเอสที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเส้นใยเชื้อราจะไปย่อยโปรตีนในก้อนเต้าหู้ ทำให้โปรตีนเปลี่ยนรูปไปเป็นเปปไทด์ และกรดอะมิโนในที่สุด ซึ่งกรดอะมิโนที่สามารถละลายได้ในน้ำ เช่น glutamic acid, aspartic acid เป็นต้น และส่งผลให้ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ในน้ำมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จะเป็นตัวให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chou และ Hwan (1994) ซึ่งพบว่าในระหว่างการหมักปริมาณโปรตีนในก้อนเต้าหู้จะลดลง ซึ่งเป็นผลจากเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อราสร้างขึ้นไปย่อยโปรตีนในก้อนเต้าหู้ไปเป็นเปปไทด์ และกรดอะมิโนในที่สุด จากการย่อย

โปรตีนของเอนไซม์โปรติเอสนี้จะทำให้ปริมาณของกรดอะมิโน และเปอร์เซ็นต์ของอัตราส่วนโปรตีนที่ละลายได้ (ratio of amino nitrogen content to total nitrogen content) เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาถึงปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่มีในระหว่างการหมักด้วยสารละลายน้ำเกลือ 12% พบว่าปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นและลดลงเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณเอนไซม์ในก้อนเต้าหู้หมักจะมีปริมาณมากกว่าเอนไซม์ในสารละลายน้ำเกลือ 12% และปริมาณเอนไซม์ของก้อนเต้าหู้ที่หมักโดยใช้เชื้อ *A. elegans* จะมีปริมาณมากกว่าปริมาณเอนไซม์ของก้อนเต้าหู้ที่หมักโดยใช้เชื้อ *M. hiemalis* และจากการหมักก้อนเต้าหู้ที่มีเชื้อราขึ้นปกคลุมในสารละลายน้ำเกลือ 12% ในสัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป เนื้อด้านในของเต้าหู้เปื่อยยุ่ย เละ ไม่คงรูปร่างเดิม ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการทำงานเอนไซม์โปรติเอสไปย่อยโปรตีน แต่พบว่าผิวของก้อนเต้าหู้ยังคงยึดติดกันด้วยเส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะเป็นเปลือกห่อหุ้มเนื้อเต้าหู้ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นจากการหมักนี้จึงไม่สามารถนำมาใส่น้ำปรุงรสเพื่อหมักเป็นเต้าหู้ยี้ต่อไปได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเส้นใยเชื้อรามีผลต่อการรักษารูปร่างของก้อนเต้าหู้ แต่กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สูง จะมีผลทำให้เนื้อของเต้าหู้ยี้ยุ่ยเกินไป

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ทั้ง เชื้อ *A. elegans* และ *M. hiemalis* ในการหมักในน้ำปรุงต่อไป

5.7 การทดลองทำเพื่อให้ได้เต้าหู้ยี้ โดยนำผลของปัจจัยต่าง ๆ มาใช้ร่วมกัน

5.7.1 การนำปัจจัยต่าง ๆ มาใช้ร่วมกันในการผลิตเต้าหู้ยี้

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเต้าหู้ยี้ที่ผลิตเองร่วมกับเต้าหู้ยี้ที่สุ่มมาจากตลาด โดยเลือกที่ผลิตขายทั่วประเทศ คือ เต้าหู้ยี้ตราเด็กซี่กิเลน, ที่ผลิตแบบท้องถิ่น คือ เต้าหู้ยี้ตราเสวย ผลิตจากจังหวัดสงขลา มีขายไม่แพร่หลายนัก ที่ผลิตจากต่างประเทศ คือ เต้าหู้ยี้ตราจูกัง เป็นเต้าหู้ยี้สีแดง และที่ผลิตเองจากการหมักก้อนเต้าหู้ด้วยเชื้อ จากตารางที่ 4.23 พบว่าเต้าหู้ยี้ที่หมักด้วยเชื้อ *A. elegans* และ *M. hiemalis* ในด้านการยอมรับรวมอยู่ในเกณฑ์ชอบปานกลาง แสดงว่าผู้ทดสอบชิมให้การยอมรับ และเมื่อเปรียบเทียบกับเต้าหู้ยี้ที่ขายในท้องตลาด พบว่าไม่แตกต่างกันในด้านลักษณะปรากฏภายนอก และภายใน ซึ่งจัดว่าอยู่ในเกณฑ์ที่รูปร่างก้อนเต้าหู้ยังเป็นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์แต่ไม่สมบูรณ์ แสดงว่าเชื้อราสามารถยึดก้อนเต้าหู้ให้คงรูปร่างเดิมได้ แต่ที่เป็นก้อนไม่สมบูรณ์อาจเนื่องมาจากขณะหมักจะหมักขวดโหลละ 3 ก้อน เมื่อเชื้อราเจริญจะทำให้ก้อนเต้าหู้ทั้ง 3 ก้อนยึดติดกัน และเมื่อนำแยกเป็นก้อน ๆ เพื่อทดสอบชิมทำให้ก้อนเต้าหู้เสียรูปร่างไป ส่วนกลิ่นรส อยู่ในเกณฑ์มีกลิ่นหอมปานกลาง แต่ผู้ทดสอบชิมไม่คุ้นเคยกับกลิ่นที่

ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะส่วนผสมในน้ำปรุงประกอบด้วยผงพะโล้ และข่าอ่อน ซึ่งให้กลิ่นเฉพาะและมีกลิ่นแรงทำให้ไปบดบังกลิ่นที่แท้จริงของกลิ่นโปรตีนในก้อนเต้าหู้ยี้ และจากการทดสอบชิมเต้าหู้ยี้ที่สุ่มมาจากท้องตลาด พบว่า เต้าหู้ยี้ตราเสวยให้คะแนนการยอมรับสูงที่สุด ลักษณะปรากฏภายนอก และภายในอยู่ในเกณฑ์ดีมาก คือ เป็นก้อนสี่เหลี่ยมสมบูรณ์ ทั้งนี้เป็นเพราะเต้าหู้ยี้ตราเสวย ใช้การแช่น้ำเกลือนาน 1 สัปดาห์ ก่อนการหมักด้วยของหมักและใช้เวลาในการหมักนาน ประมาณ 8 เดือน จากการที่แช่น้ำเกลือนาน 1 สัปดาห์ มีผลให้เนื้อสัมผัสของเต้าหู้แข็งและคงรูปร่างได้ดี เต้าหู้ยี้ตราจูกัง เป็นเต้าหู้ยี้ที่ผลิตจากประเทศไต้หวัน ใช้เชื้อราในการหมักโดยให้เชื้อราเจริญขึ้นปกคลุมก้อนเต้าหู้ก่อนการหมักด้วยสารละลายน้ำเกลือ และปรุงรสโดยใส่อังกั๊กลงไปด้วยเพื่อให้มีสีแดง ดังนั้นเต้าหู้ยี้ที่ได้จึงมีสีแดง คงก้อนรูปสี่เหลี่ยมได้แต่บริเวณมุมจะไม่คม ทั้งนี้น่าจะเป็นมาจากระยะเวลาในการหมัก และการกระแทกในระหว่างการขนส่ง เนื้อสัมผัสด้านในของเต้าหู้ยี้จะนิ่ม แสดงได้โดยคะแนนทดสอบทางประสาทสัมผัสของเต้าหู้ยี้ตราจูกังจะต่ำกว่าเต้าหู้ยี้ชนิดอื่น ส่วนทางด้านกลิ่นรส พบว่าไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะกลิ่นรสของเต้าหู้ยี้ที่นำมาให้ทดสอบ มีกลิ่นรสเฉพาะ คือหอมกลิ่นโปรตีนย่อยของก้อนเต้าหู้ประกอบกับกลิ่นของน้ำปรุงของแต่ละตัวอย่าง ดังนั้น ผู้ทดสอบชิมจึงให้คะแนนไม่แตกต่างกัน

5.7.2 การตรวจสอบทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ที่ได้กับที่มีขายในท้องตลาด ในด้านปริมาณโปรตีน ไขมัน เส้นใย เถ้า คาร์โบไฮเดรท และความชื้น

เป็นการตรวจคุณภาพทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้แต่ละตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเต้าหู้ยี้ที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ *A. elegans* และ *M. hiemalis* พบว่าปริมาณโปรตีนของเต้าหู้ยี้ที่ทำจากเชื้อ *M. hiemalis* มีปริมาณโปรตีนมากกว่า ทั้งนี้เป็นเพราะปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อผลิตได้มีปริมาณน้อยกว่าเชื้อ *A. elegans* ซึ่งส่งผลให้การย่อยโปรตีนในก้อนเต้าหู้จะย่อยได้น้อยกว่า จึงเหลือโปรตีนในตัวอย่างปริมาณมากกว่าพบว่าเต้าหู้ยี้ตราเสวยมีปริมาณโปรตีนสูงสุด และเต้าหู้ยี้ตราจูกังมีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจากการศึกษากระบวนการผลิตของเต้าหู้ยี้ตราเสวย พบว่าไม่ได้ใช้เชื้อราโดยตรงในการหมัก แต่ใช้ starter เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก และมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสอยู่สามารถย่อยโปรตีนในก้อนเต้าหู้ได้ แต่ปริมาณเอนไซม์อาจมีไม่มากจึงย่อยโปรตีนไปได้ไม่มาก ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์จึงมีมาก ในขณะที่เต้าหู้ยี้ตราจูกังเป็นเต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักของเชื้อรา (Wai, 1968) ปริมาณโปรตีนที่เหลือในผลิตภัณฑ์จึงน้อยกว่าเต้าหู้ยี้ตัวอย่างอื่น ในด้านปริมาณเถ้า พบว่าเต้าหู้ยี้ตราเสวยมีปริมาณน้อยที่สุด