บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่เหมาะสมแก่การนำมาใช้ทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะโปรตีน ซึ่งมีมากถึง 38.37 เปอร์เซ็นต์ (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527) ดังนั้นจึงมีความสำคัญต่อสุขภาพของคนไทยซึ่งมักมีปัญหาทางด้านการขาดสารอาหารโปรตีน โดยเฉพาะประชาชนในชนบทที่มีรายได้น้อย ผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลืองอาจแบ่งออก ดังนี้

2.1.1 **ผลิตภัณฑ์อาหารที่ไม่ผ่านการหมัก** (Non-Fermented Soybean Food) มีอยู่หลายชนิดที่ได้รับความนิยมในการบริโภคกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ นมถั่วเหลือง โปรตีนเกษตรหรือเนื้อเทียม ฟองเต้าหู้ เต้าฮวย และเต้าหู้ซึ่งมีทั้งชนิดแข็ง ชนิดอ่อน และเต้าหู้หลอด

2.1.2 **ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลือง** (Fermented Soybean Food) จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเมล็ดถั่วเหลืองมาต้ม หรือนึ่งให้สุก จากนั้นจะเพาะเชื้อจุลินทรีย์พวกเชื้อรา หรือแบคทีเรียลงไป เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สร้างเอนไซมที่จะช่วยย่อยโปรตีนให้มีโครงสร้างเล็กลง จนถึงขนาดเป็นกรดอะมิโนก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดังกล่าวมีทั้งที่ใช้บริโภคเป็นอาหาร เช่น เทมเป้ เต้าหู้ยี้ ถั่วเน่า และใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งรสชาติของอาหาร เช่น ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว เป็นต้น และยังมีผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลืองอื่น ๆ ที่มักผลิตขึ้นในชุมชนเล็ก ๆ และการใช้ประโยชน์ก็ไม่กระจายแพร่หลายมากนัก แต่มีการยอมรับในการบริโภคของคนบางกลุ่ม เช่น ถั่วเน่า มีถิ่นกำเนิดมาจากชาวไทยภูเขา ถั่วเหลืองงอกดอง เป็นต้น (สมชาย ประภาวัต, 2533)

2.2 เต้าหู้ยี้

2.2.1 **ลักษณะเฉพาะ** เป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก ที่อาศัยการทำงานของเชื้อราซึ่งอาจใช้เชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่งหรือใช้ร่วมกัน มีลักษณะเป็นก้อนสี่เหลี่ยม เนื้อเนียน ละเอียด นุ่ม มีสีขาวจนถึงเหลืองซีด หรือสีแดง กลิ่นหอมเฉพาะ รสเค็ม (Geoffery, 1987)

2.2.2 ชื่อที่ใช้เรียก เต้าหู้ยี้ที่ปรากฏในเอกสารตีพิมพ์ต่าง ๆ มีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน ดังนี้ Bean cake : (general term-S.E. Asia), Bean curd cheese : (China), Chao : (Vietnam), Che-fan : (aged in wine, small cubes-China), Chinese cheese : (general term-China), Chou-tofu : (allowed to mature to give strong odour-China), Doufu-ru : (fermented in wine-China), Foo-yue : (same as sufu-China), Dou-tofu : (fermented in wine-China), Kat jang-boengki :(Indonesia), Mejia : (Korea), Tahuli : (Philippines), Teou-fu-ru : (Japan), Tao-hu-yi : (Central Thailand) (Geoffery, 1987 ; Lim, 1991)

2.2.3 คุณค่าทางโภชนาการ เต้าหู้ยี้จัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะมีโปรตีนชนิดที่ย่อยง่าย เหมาะกับเด็ก ผู้สูงอายุ และผู้ป่วย (Hesseltine, 1976) ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมี ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเต้าหู้ยี้

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)
ความชื้น	60-70%
โปรตีน	50-55 กรัม
ไขมัน	30-35 กรัม
คาร์โบไฮเดรท	3-5 กรัม
เส้นใย	1-2 กรัม
เถ้า	10-15 กรัม
พลังงาน	510-530 กิโลแคลอรี
แคลเซียม	600 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	1,000 มิลลิกรัม
เหล็ก	30 มิลลิกรัม
โปแตสเซียม	600 มิลลิกรัม
ไทอะมิน	0.3 มิลลิกรัม
ไนอะซิน	0.9 มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน	(trace)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Geoffery (1987)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 ขั้นตอนการผลิตเต้าหู้ยี้

การผลิตเต้าหู้ยี้มี 2 แบบ คือ แบบใช้เชื้อรา และแบบไม่ใช้เชื้อรา โดยวิธีแรกจะให้เชื้อราเจริญบนก้อนเต้าหู้ก่อนจากนั้นจึงนำมาหมักในน้ำปรุง ส่วนวิธีที่สองจะหมักเต้าหู้ในน้ำหมักโดยไม่อาศัยการเจริญของเชื้อรา ซึ่งเป็นวิธีแบบชาวบ้าน (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และสุรเชษฐ์ จิตตวิกูล, 2530) มีสูตรประกอบดังนี้ คือ เต้าหู้ขาว 4 แผ่น เกลือ 40 กรัม ซีอิ้วขาว 200 กรัม ผงพะโล้ 5 กรัม เหล้าโรง 20 กรัม ข่า 30 กรัม เต้าเจี้ยว 100 กรัม และน้ำตาลทรายตามต้องการ

ขั้นตอนการผลิต เริ่มจากนำเต้าหู้ขาวมาหั่นเป็นก้อนสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดตามต้องการ จากนั้นนำไปแช่น้ำเกลือความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยจะอบในตู้อบหรือผึ่งแดดจนหมาด ๆ ก็ได้ ทั้งนี้เพื่อให้เต้าหู้มีน้ำลดลง จะทำให้ได้ลักษณะของก้อนเต้าหู้ที่แข็งขึ้น และนำไปบรรจุในขวดสะอาดที่เตรียมไว้แล้ว นำส่วนผสมทั้งหมดที่เตรียมไว้มาตีปั่นจนละเอียดแล้วนำไปต้มจนเดือด เมื่อส่วนผสมเย็นลงเทส่วนผสมทั้งหมดลงในขวดที่ใส่เต้าหู้ไว้ หมักประมาณ 2-3 เดือน ที่อุณหภูมิ 32-40 องศาเซลเซียส โดยการวางไว้กลางแดด จะได้เต้าหู้ยี้ตามต้องการ

ส่วนการผลิตเต้าหู้ยี้วิธีแรกนั้น จะเป็นวิธีที่ใช้ผลิตในต่างประเทศ เช่น ไต้หวัน จีน ซึ่งกระบวนการผลิตแสดงดังแผนภูมิรูปที่ 2.1

Tofu

↓

Cut into cubes

↓

Immersed in acidic saline solution ;1 hr

(NaCl 6 g + Citric acid 2.5 g / 100 ml)

↓

Heat treat at 100 °C for 10 min

In hot-air oven

↓

Inoculate

↓

รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตเต้าหู้ยี้ (รวบรวมจาก Hesseltine, 1965 ; Lin, 1977 และ Shurtleff and Aoyagi, 1979)

จากกระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้ สามารถแบ่งขั้นตอนการผลิตออกได้เป็น 3 ขั้นตอน (Shurtleff and Aoyagi, 1979) ที่สำคัญ คือ

2.3.1 การเตรียมเต้าหู้ (Preparation of tofu)

2.3.2 การหมักด้วยเชื้อรา (Molding)

2.3.3 การหมักด้วยน้ำเกลือ (Brining)

2.3.1 การเตรียมเต้าหู้

เต้าหู้ที่เหมาะแก่การผลิตเต้าหู้ยี้ ต้องเป็นเต้าหู้แข็ง เนื้อเนียน ละเอียด สม่ำเสมอ และมีความชื้นประมาณ 83 เปอร์เซ็นต์ ในการเตรียมเต้าหู้มีปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของเต้าหู้ อยู่ 5 ประการ ได้แก่ ความเข้มข้นของนมถั่วเหลือง ชนิดและปริมาณของสารตกตะกอนที่ใช้ อุณหภูมิในการตกตะกอน อัตราเร็วในการกวนนมถั่วเหลืองขณะเติมสารตกตะกอน แรงกดที่ใช้ในการขึ้นรูปก้อนเต้าหู้ (สถาบันฯ, 2527 ; Saio, 1979 ; Shurtleff and Aoyagi, 1979) ดังนั้นในการทำเต้าหู้เพื่อใช้ในการผลิตเต้าหู้ยี้จึงต้องคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้

2.3.1.1 อายุของถั่วเหลือง

การเลือกถั่วเหลืองที่จะนำมาแปรรูปเป็นเต้าหู้ ควรใช้ถั่วเหลืองที่มีความแก่-อ่อนพอเหมาะ เป็นถั่วใหม่และไม่เก็บไว้นานหลายเดือน เพราะจะมีคุณภาพโปรตีนสูงกว่า แต่ถ้าเป็นถั่วเหลืองเก่าเก็บ จะมีเถ้าและความเป็นกรดสูง ทั้งนี้ถ้าเก็บไว้นานเกินไปหรือเก็บในสภาวะไม่เหมาะสม จะทำให้สกัดโปรตีนออกมาได้น้อย หรือมีค่า NSI (nitrogen solubility index) ต่ำ เป็น

ผลให้การสกัดเอาโปรตีนออกมาจากถั่วเหลืองน้อยลง ดังนั้นในการเก็บจึงต้องใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิและความชื้นต่ำ เพราะมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้และเนื้อสัมผัสของเต้าหู้ เมล็ดถั่วเหลืองที่มีอายุน้อยจะมีเซลลูโลสมาก แต่มีโปรตีนและน้ำมันต่ำ เมล็ดที่มีอายุมากเกินไปจะมีเปลือกหนาและ มีคุณภาพทางเคมีต่ำ ดังนั้นควรเลือกถั่วเหลืองที่มีเปลือกบาง เนื้อหนา ปราศจากการทำลายของแมลงและสิ่งแปลกปลอม (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534 ; สถาบันฯ, 2527)

2.3.1.2 การล้าง

ถั่วเหลืองที่ใช้ทำเต้าหู้ ต้องเป็นถั่วเหลืองที่สะอาด ไม่มีสิ่งปนเปื้อน ดังนั้นการล้างทำความสะอาด จึงมีความจำเป็นในการทำเต้าหู้ เพราะถั่วเหลืองที่ไม่สะอาดจะทำให้ได้เต้าหู้ที่มีรสชาติไม่ดี สีหมอง คล้ำ อายุการเก็บสั้น นอกจากนี้เศษหินและตะปูที่อาจปนมา จะทำให้ใบมีดที่ใช้บดถั่วเสียหาย และอาจมีเศษโลหะปนลงมาในส่วนผสมของถั่วเหลืองบดกับน้ำ (Shurtleff and Aoyagi, 1979)

2.3.1.3 การแช่

การแช่มีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้โครงสร้างของเซลล์เมล็ดถั่วเหลืองอ่อน นุ่มขึ้น ลดพลังงานในการบดถั่วเหลือง ทำให้สกัดสารอาหารต่าง ๆ ออกมาได้มากขึ้น

เวลาที่ใช้ในการแช่ถั่วเหลืองจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำที่ใช้แช่ พันธุ์ และระยะเวลาในการเก็บของเมล็ด อุณหภูมิของน้ำแช่ยิ่งเย็นเวลาที่ใช้แช่ถั่วเหลืองยิ่งนาน ปกติจะแช่ถั่วเหลืองเป็นเวลา 8-10 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ถ้าถั่วเหลืองเก็บไว้นานมากกว่า 6 เดือน หรือมีขนาดเล็ก จะมีปริมาณน้ำมันสูงต้องใช้เวลาในการแช่ถั่วเหลืองนานขึ้น (Shurtleff and Aoyagi, 1979)

การพิจารณาว่าถั่วเหลืองแช่น้ำได้พอดีหรือไม่ พิจารณาได้จาก

1. ผิวของน้ำที่ใช้แช่ถั่วเหลือง ถ้ามีฟองมาก แสดงว่ามีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักของแบคทีเรีย ซึ่งหมายถึงเวลาในการแช่ถั่วเหลืองนานเกินไป

2. เปลือกของเมล็ดที่แช่น้ำแล้ว ถ้าเมล็ดแช่น้ำได้ที่แล้ว เปลือกจะตึง เรียบ และหลุดออกจากเมล็ดถั่วง่าย

3. สีของเนื้อในเมล็ด ทำโดยบิเมล็ดถั่วออกเป็น 2 ส่วน พิจารณาดูสีของเนื้อในเมล็ด ถ้าเป็นสีเดียวกันตลอด แสดงว่าถั่วแช่น้ำได้ที่ดีแล้ว แต่ถ้าตรงกลางมีสีเหลืองเข้มกว่าด้านนอก แสดงว่ายังแช่น้ำไม่พอ

ถั่วเหลืองที่แช่น้ำนานเกินไป ก็ไม่สามารถดูดซึมน้ำไปได้มากกว่าที่เมล็ดจะสามารถดูดซึมได้ แต่จะทำให้เกิดผลเสีย คือ ทำให้เกิดการหมัก และการเสื่อมเสียตามมา Shurtleff และ Aoyagi, (1979) พบว่า เมล็ดถั่วเหลืองจะดูดซึมน้ำได้เร็วที่สุด เมื่อน้ำที่ใช้แช่มีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (131 องศาฟาเรนไฮต์) แต่ถ้าใช้น้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่านี้จะทำให้เมล็ดถั่วเหลืองสุกเป็นบางส่วน ทำให้โปรตีนในถั่วเหลืองเสียสภาพธรรมชาติ และปริมาณนมถั่วเหลืองที่ควรได้ก็จะลดลง

2.3.1.4 **การบดถั่วเหลือง**

การบดมีวัตถุประสงค์เพื่อลดขนาดของเมล็ดถั่วเหลืองให้กลายเป็นอนุภาคเล็ก ๆ ผสมกับน้ำ ปริมาณน้ำที่เติมมีความสำคัญต่อการผลิต ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตเต้าหู้ยี้ คือ อัตราส่วนของน้ำต่อถั่วเหลือง หรือความเข้มข้นของนมถั่วเหลือง ต่อจากนั้นนำมากรองแยกกากออกจากนมถั่วเหลือง จะได้นมถั่วเหลืองเพื่อนำมาผลิตเต้าหู้

2.3.1.5 **การให้ความร้อนแก่นมถั่วเหลือง**

การให้ความร้อนแก่นมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม มีวัตถุประสงค์เพื่อทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในถั่วเหลือง ปรับปรุงกลิ่นรส ด้วยการลดกลิ่นถั่วดิบ ปรับปรุงอายุการเก็บของเต้าหู้ให้นานขึ้น โดยการทำลายแบคทีเรียในนมถั่วเหลือง ทำให้โปรตีนในนมถั่วเหลืองเสียสภาพธรรมชาติ และอยู่ในสภาพที่พร้อมจะจับกับสารตกตะกอน

อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนแก่นมถั่วเหลือง คือ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 7-14 นาที (Shurtleff and Aoyagi, 1979) ซึ่งเป็นเวลาเพียงพอที่จะทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในนมถั่วเหลืองได้ประมาณ 80% (Van Buren et al, 1964)

การให้ความร้อนมากเกินไป (overcooking) จะทำให้เกิดผลเสีย หลายประการ เช่น เป็นการทำลายกรดอะมิโนพวกซีสตีน (cystine) และไลซีน (lysine) ซึ่งเป็น กรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acids) ทำให้คุณภาพของโปรตีนในเต้าหู้ลดลง ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ต้องการ เช่น กลิ่นถั่วไหม้ กลิ่นกำมะถัน ทำให้โปรตีนถูกย่อยได้ยากขึ้น ทำให้เต้าหู้ที่ได้มีสีคล้ำ หลังจากให้ความร้อนแก่นมถั่วเหลืองในระดับอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมแล้วปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิระดับหนึ่งก่อนเติมสารตกตะกอน

2.3.1.6 **สารตกตะกอน**

สารตกตะกอนที่ใช้ในการผลิตเต้าหู้แบ่งเป็น 4 ประเภท (Shurtleff and Aoyagi, 1979) คือ

2.3.1.6.1 สารตกตะกอนประเภทคลอไรด์ เหมาะสำหรับใช้ผลิตเต้าหู้แข็ง ทำให้ได้เต้าหู้ที่มีเนื้อแข็ง มีรสหอมหวาน เหมาะสำหรับใช้ทำเต้าหู้ทอด เพราะเต้าหู้ที่ได้จะมีการพองตัวที่ดี ประกอบด้วย

2.3.1.6.1.1 แมกนีเซียมคลอไรด์ มีลักษณะเป็นผง หรือเป็นเกล็ดสีขาว ละลายน้ำได้ดี เมื่อละลายน้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 7.0

2.6.3.1.1.2 แคลเซียมคลอไรด์ เป็นผลพลอยได้จากการผลิตโซเดียมคาร์บอเนต เป็นตัวที่ทำให้เกิดการตกตะกอนเร็วที่สุด ทำให้ได้เต้าหู้ที่มีสีขาวกว่า และอ่อนนุ่มกว่าการใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ที่ได้จากธรรมชาติ

2.3.1.6.2 สารตกตะกอนประเภทซัลเฟต ประกอบด้วย

2.3.1.6.2.1 แคลเซียมซัลเฟต เป็นตัวตกตะกอนที่ทำให้ได้ผลผลิตสูง ในสมัยก่อนจะได้จากแร่ยิปซั่มตามธรรมชาติ นำมาทำให้เป็นผงและใช้เป็นสารตกตะกอน แต่ปัจจุบันเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตโซดา มีข้อจำกัดในการใช้คือ แคลเซียมซัลเฟตจะละลายน้ำได้ไม่ดี เวลาใช้จะต้องทำให้เป็นสารแขวนลอยในน้ำ แล้วต้องผสมในน้ำนมถั่วเหลืองภายใน 30 วินาที ถ้าทิ้งไว้นานเกินไป ประสิทธิภาพของสารจะลดลงอย่างรวดเร็ว สามารถใช้ทำได้ทั้งเต้าหู้แข็งและเต้าหู้อ่อนขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ ถ้าต้องการผลิตเต้าหู้แข็งก็จะใช้ประมาณ 2.2% และจะใช้ในปริมาณ 1% เพื่อผลิตเต้าหู้อ่อน

2.3.1.6.2.2 แมกนีเซียมซัลเฟต มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว หรือไม่มีสี มีรสขม ตัวแมกนีเซียมซัลเฟตจะมีคุณสมบัติเป็นยาถ่าย แต่เมื่อใช้ผลิตเต้าหู้แล้ว เต้าหู้ที่ได้จะไม่มีคุณสมบัติเป็นยาถ่าย เต้าหู้ที่ได้จะมีลักษณะเป็นเต้าหู้แข็ง ที่ไม่เหมาะสำหรับทำเต้าหู้ทอด เพราะทอดแล้วไม่พอง เต้าหู้ทอดที่ได้จะมีเนื้อทึบ แน่นและแข็ง ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับประกอบอาหารอื่น ๆ เช่น ผัดกับถั่วงอก เป็นต้น (สถาบันฯ, 2527)

ผู้ผลิตเต้าหู้ทั่วไปนิยมใช้แคลเซียมซัลเฟตเป็นตัวตกตะกอนโปรตีน (Sun and Breene, 1991) และ deMan, deMan and Gupta. (1986) เพราะเต้าหู้ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแคลเซียมซัลเฟตจะดีกว่าเกลือแคลเซียม (calcium salt) ชนิดอื่น ๆ เช่น เต้าหู้ที่ตกตะกอนด้วยแคลเซียมคลอไรด์ หรือแมกนีเซียมคลอไรด์ จะได้เต้าหู้เนื้อสัมผัสหยาบ เป็นเม็ดแข็ง แต่ถ้าใช้แคลเซียมซัลเฟตในรูปสารละลายที่เตรียมใหม่จะได้เต้าหู้ที่มีเนื้อสัมผัสเนียนมาก นุ่มเป็นเนื้อเดียวกัน

2.3.1.7 โปรตีนในถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองสะสมโปรตีนไว้ในรูปของ protein bodies หรือ storage proteins ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2-20 ไมครอน แต่ส่วนใหญ่มีขนาด 5-8 ไมครอน และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 200,000 – 600,000 ดาลตัน ในสภาวะธรรมชาติ โมเลกุลของโปรตีนขนาดใหญ่เหล่านี้ยังสามารถจับตัวกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่เพิ่มขึ้นได้อีกด้วยการเชื่อมกันของพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide linkage polymer) (สถาบันฯ, 2527)

โปรตีนในถั่วเหลืองประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนประเภทกลอบูลิน (globulins) สามารถแบ่งโปรตีนในถั่วเหลืองตามคุณสมบัติในการตกตะกอน (sedimentation properties) ได้เป็นโปรตีน ชนิด 2S, 7S, 11S และ 15S ("S" คือ สัมประสิทธิการตกตะกอน แสดงถึงอัตราเร็วของการตกตะกอน เป็นค่าที่ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุลโปรตีน โดยจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น แต่ไม่เป็นปฏิภาคโดยตรง เนื่องจากมีความเสียดทานที่เกิดขึ้นกับตัวทำกระจาย และรูปร่างของโมเลกุล (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2538)) โปรตีนชนิด 2S จะมีอยู่ประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด ที่สำคัญได้แก่ สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (trypsin inhibitors) ซึ่งต้องทำลายโดยใช้ความร้อน เพื่อให้ร่างกายสามารถใช้ประโยชน์จากโปรตีนได้มากขึ้น โปรตีนชนิด 7S มีปริมาณมากถึง 37 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด ในจำนวนนี้ปริมาณครึ่งหนึ่งจะเป็นโปรตีนประเภท Glycoprotein ซึ่งตัวที่สำคัญก็ได้แก่ Hemagglutinins, Lipoxygenases, β-amylase และ 7S-Globulin ส่วนโปรตีน 11S จะมีอยู่ประมาณ 31 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโปรตีน 15S จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่มีน้ำหนักถึง 600,000 ดาลตัน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่มีอยู่ในปริมาณน้อย (Kinsella, 1979 ; Smith and Circle, 1972)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลือง

ชนิดของโปรตีน	ปริมาณ (%)	องค์ประกอบ
2S	22	Trypsin inhibitors, Cytochrome C
7S	37	Hemagglutinin, Lipoxigenase, β-Amylase, 7S Globulin
11S	31	11S Globulin
15S	11	

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Wolf, 1970.

โปรตีนที่มีอยู่หลัก ๆ ในเต้าหู้ คือโปรตีนชนิด 7S และ 11S เจลของโปรตีนชนิด 11S จะมีลักษณะเนื้อแน่น ส่วนเจลของโปรตีนชนิด 7S จะมีลักษณะอ่อนนุ่มกว่า ดังนั้นถ้าเมล็ดถั่วเหลืองมีอัตราส่วนของโปรตีน 11S ต่อ 7S ในปริมาณสูง ก็จะทำให้ได้เต้าหู้ที่มีลักษณะเนื้อแน่น แข็ง (Saio, Kamiya and Watanabe, 1969)

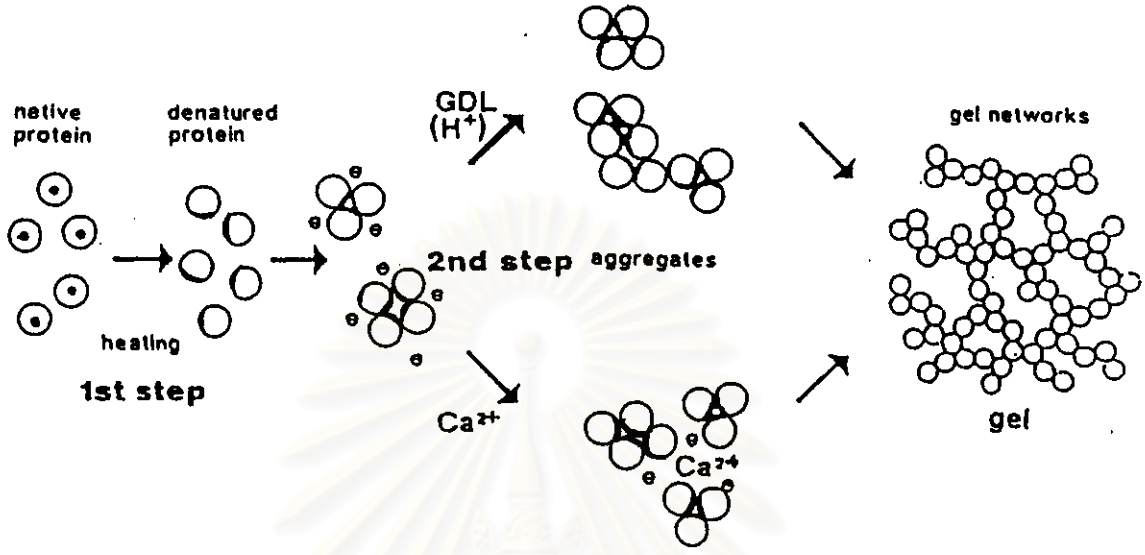
2.3.1.8 กลไกในการเกิดเจลโปรตีน

การทำเต้าหู้เป็นปรากฏการณ์อย่างหนึ่งที่เกิดจากเจลของโปรตีนถั่วเหลือง ซึ่งกลไกในการเกิดเจลของโปรตีนถั่วเหลืองในรูปแบบต่าง ๆ ได้มีนักวิทยาศาสตร์ศึกษาไว้ดังนี้

Lee และ Rha (1978) ได้เสนอกลไกในการเกิดเจลโดยใช้แคลเซียมซัลเฟต เป็นตัวตกตะกอน ว่าเจลโปรตีนเกิดจากการ cross-link ระหว่างโมเลกุลโปรตีนโดยแคลเซียมไอออนจะจับกับประจุลบของโปรตีนด้วยพันธะไอออนิก (ionic bond) และกรดไฟติก (phytic acid) จะทำตัวเป็นเหมือนสะพานเชื่อมในการเกิดเจลโปรตีน

Kohyama, Sano และ Doi (1995) ได้เสนอกลไกในการเกิดเจลโปรตีนในนมถั่วเหลืองเมื่อเติมสารตกตะกอนลงไปว่า การเกิดเจลโปรตีนประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากความร้อน (protein denature) และการตกตะกอนของโปรตีนแล้วเกิดการจับกันของโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยปฏิกิริยา hydrophobic (hydrophobic coagulation) ดังรูปที่ 2.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.2 กลไกการเกิดเจลโปรตีนในนมถั่วเหลืองเมื่อเติมตัวตกตะกอนลงไป โดยใช้แคลเซียมซัลเฟต และกลูโคโนเดลตาแลคโตนเป็นสารตกตะกอน (วงกลม หมายถึง โมเลกุลของโปรตีน และส่วนที่เป็นสีดำ คือ บริเวณที่เป็น hydrophobic) (Kohyama et al, 1995)

ขั้นตอนที่หนึ่ง เมื่อโปรตีนได้รับความร้อนจากการต้มนมถั่วเหลือง โปรตีนจะเสียสภาพธรรมชาติไปส่วนหนึ่ง ส่วนที่เป็น hydrophobic ของโปรตีน ซึ่งในสภาพธรรมชาติจะอยู่ด้านในจะเปลี่ยนมาอยู่ด้านนอก และเมื่อโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติก็จะมีประจุเป็นลบ

ขั้นตอนที่สอง โปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติ และมีประจุเป็นลบ จะจับกับประจุของสารตกตะกอน ทำให้โปรตีนมีสภาพเป็นกลางทางไฟฟ้า และเข้ามาจับกันด้วยปฏิกิริยา hydrophobic เกิดเป็นโครงสร้างตาข่าย (gel networks) ขึ้นมา

การตกตะกอนของโปรตีนนี้ จะตกตะกอนพร้อมกับของแข็งอื่น ๆ ในนมถั่วเหลือง เช่น ไขมัน (Shurtleff and Aoyagi, 1979)

2.3.1.9 **การขึ้นรูปก้อนเต้าหู้และการกำจัด whey ออก**

มีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้เจลโปรตีน หรือ curd เกาะติดกัน และมีรูปร่างตามพิมพ์ที่ใช้ ทำให้ก้อนเต้าหู้ที่ได้มีความชื้นลดลง เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเนื้อสัมผัสของเต้าหู้โดยตรง โดยทั่วไปในการผลิตเต้าหู้อ่อนจะใช้น้ำหนักในการกดทับ 2-4 กรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงกดด้วยน้ำหนักที่มากขึ้น คือ 5-15 กรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 10-15 นาที และสำหรับเต้าหู้แข็งจะกดด้วยน้ำหนัก 20-100 กรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 20-30 นาที (Shurtleff and Aoyagi, 1979) ซึ่งการใช้น้ำหนักกดที่น้อยเกินไปจะทำให้ curd เกาะติดกันได้ไม่ดี และมีเนื้อสัมผัสนิ่มมากเกินไป ส่งผลให้ curd บางส่วนติดไปกับผ้าขาวบางที่รองแม่พิมพ์ ทำให้ได้ yield ต่ำ และเต้าหู้ที่ได้จะมีน้ำมาก ส่วนการกดด้วยน้ำหนักที่มากเกินไป เต้าหู้ที่ได้ก็จะมีน้ำน้อยลง เนื้อแน่นและแข็งมากขึ้น (Beddow and Wong, 1987) โดยในการทำเต้าหู้แข็งจะมีการกดทับด้วยน้ำหนัก 2 ช่วงด้วยกัน คือ กดทับในช่วงแรก 30 นาที และกดทับในช่วงที่สองอีก 30 นาที ด้วยแรง 20-100 กรัมต่อตารางเซนติเมตร (Shurtleff and Aoyagi, 1979)

2.3.2 **การหมักด้วยเชื้อรา**

ในอดีตมีความเชื่อว่าการผลิตเต้าหู้ยี้ขึ้นอยู่กับปรากฏการณ์ทางธรรมชาติที่เกิดจากการกระทำของพระเจ้า ต่อมาในปี 1929 Wai พบว่า เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากการหมักเต้าหู้ยี้ และสามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อราในสกุล Mucor แต่ไม่สามารถระบุถึง specie ได้ จึงได้เสนอชื่อ *Mucor sufu* ซึ่งเชื่อว่าแหล่งของเชื้อคือ ฟางข้าว เพราะในการผลิตดั้งเดิมใช้ฟางข้าวคลุมก้อนเต้าหู้เพื่อหมักเป็นเต้าหู้ยี้

Wai (1968) ได้สำรวจจุลินทรีย์ในการหมักเต้าหู้ยี้ โดยเก็บตัวอย่างเชื้อราจากโรงงานผลิตเต้าหู้ยี้ในไต้หวันและฮ่องกง พบว่าเป็นเชื้อราสายพันธุ์เดียวกัน คือ *Actinomucor elegans* และพบสายพันธุ์ *M. hiemalis* และ *M. silvatiens* จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ที่ผลิตในครัวเรือน และจากการแยกเชื้อในเต้าหู้ยี้หมักจากหลายโรงงาน พบว่าเป็นเชื้อราที่อยู่ในสกุล Mucor และมีความสัมพันธ์กับเชื้อราในสกุล Actinomucor และ Wai ยังรายงานอีกว่าเชื้อราสายพันธุ์ *A. elegans*, *M. hiemalis*, *M. siluatieus* และ *M. subtilissimus* มีลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อที่สามารถใช้ผลิตเต้าหู้ยี้ให้มีคุณภาพดีได้

ลักษณะเชื้อราที่เหมาะสมในการใช้ผลิตเต้าหู้ยี้ (Hesseltine,1976 ; Steinkraus, 1983 ; Wai, 1929) คือ

1. เส้นใยต้องมีสีขาว หรือสีเหลืองอ่อนๆ
2. เส้นใยห่อหุ้มก้อนเต้าหู้ทั่วทั้งก้อนอย่างแน่นหนา เพื่อป้องกันและคงรูปเต้าหู้ยี้ให้เป็นก้อนสี่เหลี่ยม
3. เชื้อสามารถเจริญได้ดีบนอาหารโปรตีน (protein-rich medium) เช่น เต้าหู้ และไม่สร้างกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์
4. เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เหมาะสม คือสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองได้สูง รวมทั้งมีการเจริญปกคลุมก้อนเต้าหู้ที่เรียกว่า "pehtze" ได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่มีการสร้างสารอันตราย

(โปรตีนในถั่วเหลืองจะถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อราได้เป็นเปปไทด์ และกรดไขมันอิสระ เช่น aspartic acid, glutamic acid, serine, alanine และ leucine)

เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Actinomucor elegans และ *Mucor hiemalis* จัดอยู่ใน DIVISION : Eumycota, SUBDIVISION : Zygomycotina, CLASS : Zygomycetes, ORDER : Mucorales และ FAMILY : Mucoracease (Alexopoulos and Mins, 1979)

คุณสมบัติของเชื้อในกลุ่มนี้มีความสามารถในการสร้างเส้นใยได้ดีมาก ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบ saprobe บางชนิดอาจเป็น obligate parasite พบได้ในเศษซากพืชที่เริ่มเน่าเปื่อย จัดเป็นพวก "sugar fungi" sporangiospore ของราพวกนี้มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันไป แต่ส่วนใหญ่มี รูปร่างกลม รูปไข่ หรือค่อนข้างเป็นทรงกระบอก

เมื่อเจริญในอาหารที่ขาดออกซิเจน (anaerobe) โดยอาจมี หรือไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์ และมีกลูโคสในปริมาณสูง เส้นใยของราหลายสกุล เช่น Actinomucor, Mucor และ Mycophyta อาจสร้างสปอร์ที่เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่ เรียกว่า arthrospore (oidium) ซึ่งอาจเกิดที่ปลาย หรือระหว่างเส้นใยและมักมีการแตกหน่อ (budding) ได้เช่นเดียวกับพวกยีสต์ แต่ละหน่วย (เซลล์) ที่ได้จากการแตกหน่อนี้เรียกว่า gamma (พหูพจน์ เรียก gammae) ในสภาวะที่มีออกซิเจน อาจชักนำให้ราบางชนิด เช่น *M. pusillus* และ *A. elegans* มีการเจริญแบบ yeast-like ได้ ถ้าเติมสารปฏิชีวนะ fungicide หรือ metabolic inhibitor ลงไป

สร้าง columellate sporangium โดยไม่มีการสร้าง sporangium เลย ผนังของ sporangium มีอายุสั้น การปล่อย sporangiospore เกิดจากการแตกออก หรือสลายตัวของผนัง sporangium, suspensor ที่สร้างส่วนใหญ่เป็นแบบ ooposed ผนังของเส้นใยมีสารไคติน ส่วนใหญ่เป็น saprobe อยู่ในดิน มูลสัตว์ ตลอดจนอินทรีย์วัตถุที่สดและชื้น เมื่อสัมผัสอยู่กับดิน cytoplasm มักมีการไหลเวียนอย่างรวดเร็ว และมีเม็ด granule มากมายอยู่ภายใน ที่ปลายเส้นใยมี mitochondrion ที่มีลักษณะสั้นกว่าที่พบในส่วนอื่นๆ ที่แก่กว่า นิวเคลียสจะค่อย ๆ คอดตัวออกเป็นสองส่วน

sporangiophore อาจแตกกิ่งก้าน หรือไม่แตกกิ่งก้าน ผนัง sporangium สลายตัวได้รวดเร็วในน้ำ ไม่มีสารคิวติน แต่อาจพบผลึกของ calcium oxalate, somatic thallus ไม่มี rhizoid และ stolon sporangiophore เกิดโดยตรงแตกแขนงออกจาก aerial mycelium ในเส้นใยที่มีอายุมากมักพบ septum และอาจสร้าง chlamydospore ได้ การสืบพันธุ์แบบใช้เพศเป็นแบบ homothallic หรือ heterothallic และ isogamous สร้าง zygosporangium (Alexopoulos and Mins, 1979)

นอกจากนี้ยังมีเชื้ออื่น ๆ ที่สามารถใช้ผลิตเต้าหู้ยี้ในระดับอุตสาหกรรมและระดับครัวเรือน อีกได้แก่เชื้อ *M. racemosus*, *M. sufu*, *R. oligosporus* (Hesseltine, 1965 ; Wang and Hesseltine, 1970 ; Shurtleff and Aoyagi, 1983)

เชื้อ *A. elegans* จะเป็นเชื้อที่มีความเหมาะสมที่สุด และนิยมใช้มากที่สุด ซึ่งสามารถเจริญได้ดีบนก้อนเต้าหู้และผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มาก และสมบูรณ์กว่าเชื้อตัวอื่น โดยใช้เวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิประมาณ 20 °C (Wai, 1968)

2.3.3 การหมักในน้ำเกลือ (brining)

ในขั้นตอนการหมักในสารละลายน้ำเกลือ(brine solution)นั้น กลิ่นและรสชาติของเต้าหู้ยี้จะเกิดขึ้นเพราะส่วนประกอบของ brine solution (โซเดียมคลอไรด์และเอทธิลแอกอฮอล์) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านชีวเคมีในก้อน pehtze โดยเอนไซม์โปรติเอสที่ (bond) อยู่กับเส้นใยเชื้อรา ซึ่งจัดเป็น intracellular enzyme จะถูกปลดปล่อยออกมา โดย ionizable salt เท่านั้น ซึ่ง ionizable salt ที่ใช้ คือ โซเดียมคลอไรด์ โดยจะไปทำให้ ionic linkage ของเอนไซม์โปรติเอสกับเส้นใยของเชื้อราคลายและเอนไซม์หลุดออก (Wang, 1967) เอนไซม์โปรติเอสที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะแทรกซึมเข้าไปใน pehtze เพื่อย่อยสลายโปรตีน (Steinkraus, 1983) เมื่อเอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีน พบว่า ปริมาณของ soluble protein จะเพิ่มขึ้น ขณะที่ insoluble

protein มีปริมาณลดลง สารที่เรียกว่า soluble nitrogenous compound ประกอบด้วย soluble protein, peptides และกรดอะมิโน ซึ่งได้แก่ aspartic acid, serine, alanine, leucine, isoleucine และ glutamic acid นอกจากนั้นไขมันที่อยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระจะเพิ่มขึ้นจาก 13 เปอร์เซ็นต์ เป็น 17 เปอร์เซ็นต์ (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และสุรเชษฐ์ จิตตวิกูล, 2530) โซเดียมคลอไรด์จะทำหน้าที่ให้รสเค็มและควบคุมจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมา ส่วนแอลกอฮอล์มีหน้าที่หลัก คือ ควบคุมจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมาด้วยเช่นกันและทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะโดยจะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเกิดเป็นเอสเทอร์ และใช้เวลาในการหมัก 12 สัปดาห์ ก็จะได้เต้าหู้ยี้ (Shurtleff and Aoyagi, 1979) ระหว่างการหมักอาจมีการเติมสารให้สีหรือกลิ่น รวมไปใน brine solution ด้วย เช่น ข้าวแดง (ang-kak) เติมเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีสีแดง เรียกผลิตภัณฑ์ที่ได้ว่าเต้าหู้ยี้แดง หรือ hon-fang (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และสุรเชษฐ์ จิตตวิกูล, 2530)

Chou และ Hwan (1994) ได้ศึกษาผลของเอทธานอลต่อการย่อยโปรตีนและไขมันของก้อนเต้าหู้ในระหว่างการหมักเต้าหู้ยี้ โดยการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักเต้าหู้ยี้ใน brine solution ที่เติม และไม่เติมเอทธานอล พบว่าปริมาณโปรตีนในก้อนเต้าหู้ลดลง ซึ่งเป็นผลจากเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อราสร้างขึ้นมาย่อยโปรตีนในก้อนเต้าหู้ไปเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนในที่สุด ทั้งนี้ย่อมทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงในระหว่างการหมัก จากการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรติเอสนี้จะทำให้ปริมาณของกรดอะมิโน และเปอร์เซ็นต์ของอัตราส่วนโปรตีนที่ละลายได้ (ratio of amino nitrogen content to total nitrogen content) เพิ่มขึ้นด้วย เต้าหู้ยี้ที่หมักใน brine solution ที่เติมเอทธานอล มีอัตราส่วนของโปรตีนที่ละลายได้ต่ำกว่าที่หมักใน brine solution ที่ไม่เติมเอทธานอลในทุกระยะเวลาของการหมัก ซึ่งแสดงว่าเอทธานอลมีผลในการยับยั้งการย่อยโปรตีนในระหว่างการหมักเต้าหู้ยี้ และพบว่าเต้าหู้ยี้ที่หมักด้วยเชื้อ *A. taiwanensis* และไม่เติมเอทธานอลใน brine solution มีอัตราส่วนของโปรตีนที่ละลายได้สูงสุดเท่ากับ 27.5% หลังการหมัก 75 วัน และพบว่าปริมาณไขมันมีการเปลี่ยนแปลงขึ้น-ลงตลอดระยะเวลาการหมัก และในระยะสุดท้ายของการหมักด้วยเชื้อ *A. taiwanensis* มีปริมาณไขมันสูงสุด เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันอิสระในระหว่างการหมัก พบว่าปริมาณกรดไขมันอิสระในเต้าหู้ยี้ที่ปมใน brine solution ที่เติมและไม่เติมเอทธานอลเพิ่มขึ้นในช่วง 30 วันแรกของการหมัก ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่เชื้อราสร้างขึ้นไปย่อยไขมันในก้อนเต้าหู้ยี้ และในช่วงสุดท้ายของการหมัก พบว่า มีปริมาณกรดไขมันอิสระจะมากกว่าช่วงเริ่มต้นการหมักและในช่วง 30 วันแรกของการหมัก ปริมาณกรดไขมันอิสระลดลง อาจเกิดจากมีกรดไขมันอิสระบางส่วนไปทำปฏิกิริยากับเอทธานอลเกิดเป็นเอสเทอร์ จึงทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระลดลง