บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

1. ปริมาณโปรตีนในซีอิ๊วที่ผลิตในประเทศไทย ประเทศญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวันและจีน

ซีอิ๊วตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก 252-2521) หมายถึงผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้จากการย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองโดยการหมัก จะนำมาแต่งรส และ/หรือ สี หรือไม่ก็ตามตามแต่ชนิดของผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วนั้นๆ แล้วนำไปผ่านการพาสเตอร์ไรส์ แบ่งซีอิ๊วเป็น 4 ประเภทตามลักษณะทางเคมีที่ระบุไว้ในตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 การแบ่งประเภทซีอิ๊วตามลักษณะทางเคมี (มอก.252-2521)

คุณลักษณะ	ชนิด					
	ซีอิ๊วขาว		ซีอิ๊วดำเค็ม		ซีอิ๊วดำ	ซีอิ๊วหวาน
	ชั้นพิเศษ	ชั้นหนึ่ง	ชั้นพิเศษ	ชั้นหนึ่ง		
โปรตีน(%Nx6.25)ไม่น้อยกว่าร้อยละของน้ำหนัก	5.5	4.5	8.5	7.5	2.0	1.5
ปริมาณของแข็งที่ระเหยไม่ได้ไม่น้อยกว่าร้อยละของน้ำหนัก	32	30	35	32	50	50
เกลือ(คิดเป็นโซเดียมคลอไรด์)ร้อยละของน้ำหนัก	17ถึง23	17ถึง23	17ถึง23	17ถึง23	8ถึง16	ไม่เกิน1
น้ำตาลทั้งหมด (คิดเป็นน้ำตาลอินเวิร์ต)ไม่เกินร้อยละของน้ำหนัก	7	6	12	10	25	80
พีเอช	4.5ถึง5.3	4.5ถึง5.3	4.5ถึง5.3	4.5ถึง5.3	4.5ถึง5.5	4.5ถึง5.5
ความถ่วงจำเพาะที่ 27± 3 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า	1.20	1.20	1.23	1.23	1.33	ไม่กำหนด
สารปนเปื้อน	ตะกั่ว ทองแดง อาร์ซินิค ไม่เกิน 1 , 5 , 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ					

ซีอิ๊วขาว หมายถึงซีอิ๊วที่ได้จากการหมัก ไม่ได้ปรุงแต่งรส สี แบ่งเป็นสองชั้นคุณภาพ ได้แก่ ชั้นพิเศษและชั้นหนึ่ง

ซีอิ๊วดำเค็ม หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำซีอิ๊วขาวมาบ่ม(ageing)จนกระทั่งได้ความเข้มข้นตามเกณฑ์ที่กำหนด แบ่งเป็นสองชั้นคุณภาพได้แก่ ชั้นพิเศษและชั้นหนึ่ง

ซีอิ๊วดำ หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากซีอิ๊วขาวผสมสารให้ความหวานในอัตราส่วนที่พอเหมาะจนได้ความหวานและเค็ม ได้รสชาติตามเกณฑ์ที่กำหนด

ซีอิ๊วหวาน หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากซีอิ๊วขาวในปริมาณน้อยผสมกับสารให้ความหวานจนได้ความหวานตามเกณฑ์ที่กำหนด

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมระบุด้วยว่าผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วจะต้องไม่มีเชื้อราและยีสต์ โคลิฟอร์มแบคทีเรีย สตาฟิโลคอกไค ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการพาสเตอร์ไรส์จะต้องทำให้ซีอิ๊วปราศจากเชื้อดังกล่าวเหล่านี้

นอกจากนี้มอก.252-2521 ยังระบุว่าส่วนประกอบหลักที่สำคัญของซีอิ๊ว คือ ถั่วเหลือง แป้งสาลี หรือแป้งข้าวเจ้า เกลือ น้ำบริโภค และอาจจะมีโปรตีนจากพืชที่ถูกย่อยสลายแล้วหรือไม่ก็ได้ (hydrolysed plant proteins) ส่วนซีอิ๊วดำและซีอิ๊วหวานจะต้องมีส่วนประกอบที่เพิ่มขึ้นจากซีอิ๊วขาวและซีอิ๊วดำเค็ม คือจะต้องมีส่วนประกอบอย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกันดังนี้ น้ำตาลหรือกากน้ำตาล น้ำเชื่อมข้าวโพด (corn syrup) เดกซ์โตรส ลิควิดกลูโคส

โชยูเป็นคำศัพท์ภาษาญี่ปุ่นสำหรับใช้เรียกซีอิ๊วญี่ปุ่น ในประเทศญี่ปุ่นมีการผลิตซีอิ๊วหลายชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดและอัตราส่วนของวัตถุดิบที่ใช้ ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ และภาวะการผลิต ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การผลิตซีอิ๊วญี่ปุ่นชนิดต่างๆในประเทศญี่ปุ่น (Yokotsuka,1986)

	เปอร์เซ็นต์การผลิตในปี ค.ศ. 1982
โคอิคูชิโชยู (Koikuchi shoyu)	84.4
ยูซูคูชิโชยู (Usukuchi shoyu)	12.4
ทามาริโชยู (Tamari shoyu)	2.0
ซาอิชิโคมิโชยู (Saishikomi shoyu)	0.3
ชิโรโชยู (Shiro shoyu)	0.5

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Yokotsuka (1986) รายงานว่ามาตรฐานการเกษตรญี่ปุ่น (Japanese Agricultural Standard, JAS) ระบุคำจำกัดความของซีอิ๊วญี่ปุ่นที่ได้จากการหมักว่าผลิตจากวัตถุดิบถั่วเหลืองและข้าวสาลีที่ผ่านความร้อน และบ่มด้วยเชื้อ ***Aspergillus oryzae*** หรือ ***A.sojae*** เพื่อให้เกิดโคจิซึ่งนำไปผสมกับน้ำเกลือได้เป็นระยะโมโรมิ ระยะโมโรมิเป็นการหมักโดยแลคโตบาซิลลัสและยีสต์ มาตรฐานการเกษตรญี่ปุ่น กล่าวถึงซีอิ๊วญี่ปุ่น 5 ชนิดซึ่งมีหลายเกรดตามสมบัติดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สมบัติบางประการของซีอิ๊วญี่ปุ่น (ดัดแปลงจาก Yokotsuka ,1986)

	เกรด	จำนวนตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์	เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์โปรตีน (% N x 6.25)	Baume′	NaCl	พีเอช
โคอิคูชิโชยู	ธรรมดา	6	1.56	9.8	21.8	17.1	4.85
	ซูเปอร์	3	1.69	10.6	22.4	17.1	4.84
	อัลตราซูเปอร์	1	1.83	11.3	23.5	17.4	4.79
	เกลือน้อย	5	1.57	9.8	19.9	13.5	4.88
	เกลือต่ำ	2	1.55	9.8	16.3	8.9	4.86
ยูซูคูชิโชยู	ธรรมดา	5	1.19	7.4	22.2	18.5	4.89
	ซูเปอร์	1	1.49	9.3	22.3	18.1	3.97
	เกลือน้อย	1	1.20	7.5	19.5	14.9	4.95
ทามาริโชยู		1	1.89	11.8	23.1	17.1	4.97
ซาอิชิโคมิโชยู		2	2.24	14.0	27.5	14.1	4.89
ชิโรโชยู		1	0.53	3.3	24.9	17.9	4.74

Yokotsuka (1986) รายงานว่า ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ของซีอิ๊วญี่ปุ่นที่บริโภคภายในประเทศญี่ปุ่นเป็นชนิด โคอิคูชิโชยู ซึ่งมีสีเข้มและผลิตจากเมล็ดถั่วเหลือง กับแป้งสาลีใน

ปริมาณเกือบเท่าๆกัน ในระยะโมโรมิของการผลิตโคอิคูชิโชยูเกิดกระบวนการหมักซึ่งได้กรดแลคติคและแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะผ่านการพาสเตอร์ไรส์ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง (ประมาณ 80 องศาเซลเซียส) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ ที่มีสีน้ำตาลแดงเข้ม และมีรสชาติไหม้

โคอิคูชิโชยูชนิดที่มีคุณภาพดีมีไนโตรเจนทั้งหมด(กรัมต่อปริมาตร) เท่ากับ 1.5-1.8 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 9.4-11.3 เปอร์เซ็นต์ มีรีดิวซิ่งชูการ์ (ส่วนใหญ่กลูโคส) 3.0-5.0 เปอร์เซ็นต์ , เอธานอล 2.0-2.5 เปอร์เซ็นต์ , โพลิแอลกอฮอล์ (กลีเซอรอลเป็นส่วนใหญ่) 1.0-1.5 เปอร์เซ็นต์, กรดอินทรีย์(โดยมากเป็นกรดแลคติคที่พีเอช 4.7-4.8) 1.0-2.0 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ 17-18 เปอร์เซ็นต์ ในการที่จะทำให้ซีอิ๊วญี่ปุ่นมีรสชาตินำรับประทาน จะต้องมีสารประกอบไนโตรเจนประมาณครึ่งหนึ่งอยู่ในรูปของกรดอะมิโนอิสระและสารประกอบไนโตรเจนมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์อยู่ในรูปกรดกลูตามิคอิสระ

ยูซูคูชิโชยูทำจากส่วนผสมที่มีถั่วเหลืองมากกว่าและข้าวสาลีน้อยกว่าส่วนผสมที่ใช้ผลิตโคอิคูชิโชยู บางครั้งมีการเติม อามาสาเก (amasake) ซึ่งเป็นน้ำที่ละลายน้ำตาลจากโคจิที่เตรียมจากข้าวเจ้า หรือเติม saccharified starch ที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ลงในระยะโมโรมิของการผลิตยูซูคูชิโชยู เพื่อทำให้รสชาติดีขึ้น ปริมาณไนโตรเจนในยูซูคูชิโชยูไม่เกิน 1.2 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณโปรตีน 7.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ชาวญี่ปุ่นใช้ ยูซูคูชิโชยูในการประกอบอาหาร ที่ต้องการรักษาสีและรสชาติเด่นของวัตถุดิบที่ใช้ในการประกอบอาหาร ทั้งนี้เพราะซีอิ๊วประเภทโคอิคูชิโชยูให้กลิ่นและสีเข้มแก่อาหาร

ทามาริโชยูผลิตจากถั่วเหลืองโดยใช้แป้งสาลีเล็กน้อย ปริมาณไนโตรเจนบางครั้งมากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ (เทียบเท่ากับปริมาณโปรตีน 12.5 เปอร์เซ็นต์) และมีแอลกอฮอล์เล็กน้อย

ชิโรโชยูมีสีจางและผลิตจากแป้งสาลีเป็น ส่วนใหญ่ โดยใช้ถั่วเหลืองเล็กน้อย

ซาอิชิโคมิโชยู ผลิตโดยใช้เอนไซม์ย่อยถั่วเหลืองและแป้งสาลีในซีอิ๊วแทนที่จะใช้การหมักในน้ำเกลือ ซีอิ๊วชนิดนี้มีรสชาติเข้มข้นเนื่องจากมีสารประกอบไนโตรเจนและน้ำตาลในปริมาณสูง ชาวญี่ปุ่นใช้เป็นน้ำจิ้มสำหรับปลาดิบและปลาไหลย่าง

มาตรฐานการเกษตรญี่ปุ่นระบุเกรด 3 เกรดสำหรับซีอิ๊วญี่ปุ่นแต่ละชนิดได้แก่เกรดพิเศษ(special grade) เกรดสูง(upper grade)และเกรดธรรมดา(ordinary grade) โดยพิจารณาจากการประเมินกลิ่นและรสชาติ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณกรดที่ละลาย(ในภาวะ

ที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์) และปริมาณแอลกอฮอล์ โดยพิจารณาให้เกรดพิเศษแก่ซีอิ๊วที่ผลิตโดยวิธีการหมักเท่านั้น

ประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ของซีอิ๊วญี่ปุ่นได้รับการพิจารณาเป็นเกรดพิเศษในปี ค.ศ. 1980 โดยโคอิคูชิโชยู เกรดพิเศษมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.5 เปอร์เซ็นต์ (เทียบเท่ากับปริมาณโปรตีนทั้งหมด 9.4 เปอร์เซ็นต์) และมีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์มากกว่า 0.8 เปอร์เซ็นต์

ในการผลิตซีอิ๊วญี่ปุ่นเกรดสูงและเกรดธรรมดาอาจเติมโปรตีนจากพืชซึ่งได้จากการไฮโดรไลซ์โดยวิธีการทางเคมี ไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์หรือเติมโปรตีนจากพืชที่ได้จากการใช้เอนไซม์ย่อยไม่เกิน 30 เปอร์เซ็นต์ ลงในซีอิ๊วที่ได้จากการหมักตราบใดที่รสชาติซีอิ๊วเฉพาะตัวยังคงอยู่

Yokotsuka (1986) รายงานว่าการผลิตซีอิ๊วในประเทศเกาหลีประกอบด้วยการปั้นเมล็ดถั่วเหลืองต้มสุกและแป้งสาลีในปริมาณที่เท่ากันเป็นก้อนกลม และบ่มด้วย ***Aspergillus*** หรือ ***Rhizopus*** sp.เป็นเวลาหลายเดือนในช่วงฤดูหนาว และเมื่อฤดูใบไม้ผลิมาถึงก็จะนำก้อนโคจิมาสกัดด้วยน้ำเกลือ นำสารละลายที่สกัดได้ไปบ่มกลางแดดเพื่อผลิตซีอิ๊ว อย่างไรก็ตามยังตรวจไม่พบเอกสารที่ระบุปริมาณไนโตรเจนของซีอิ๊วเกาหลี

ในตอนใต้ของสาธารณรัฐประชาชนจีนมีการผลิตซีอิ๊วแบบเกาหลีและแบบทามาริของญี่ปุ่นเช่นกัน และ Yokotsuka (1986) รายงานว่าประเทศจีนเป็นต้นแบบการผลิตซีอิ๊วจากถั่วเหลืองโดยไม่ใช้แป้งสาลี อย่างไรก็ตามในกรุงปักกิ่งและเซี่ยงไฮ้มีการเตรียมโคจิสเกลใหญ่โดยเลี้ยง *A. oryzae* บนถั่วเหลืองต้มสุกและข้าวสาลี หรือรำข้าวสาลี (6:4) และผสมโคจิลงในน้ำเกลือ โดยมีความชื้นประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเกลือ 6-7 เปอร์เซ็นต์ เก็บระยะโมโรมิที่ 45-50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 สัปดาห์เพื่อให้เกิดการย่อยโดยเอนไซม์ สกัดสารที่ได้จากการย่อยโดยใช้น้ำเกลือร้อนและน้ำร้อน ไม่มีการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ และไม่มีการกดเพื่อกรองซีอิ๊ว จึงเป็นกระบวนการผลิตซีอิ๊วที่แตกต่างจากกระบวนการผลิตซีอิ๊วแบบญี่ปุ่น มาตรฐานสูงสุดของรัฐบาลจีนสำหรับซีอิ๊วได้แก่ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.6 เปอร์เซ็นต์(เทียบเท่ากับโปรตีนทั้งหมด 10 เปอร์เซ็นต์ รีดิ๊วซิ่งชูการ์ 4 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมคลอไรด์ 19 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า)

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ระบุว่าซีอิ๊วที่ผลิตโดยกระบวนการหมักในประเทศได้หวันเป็นเวลา 1-15 เดือนมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดตั้งแต่ 0.95 เปอร์เซ็นต์ ถึง 1.49 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณโปรตีน 5.9-9.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Yong และ Wood (1974) รายงานว่าซีอิ๊วจีนจากนานกิงมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ (เทียบเท่ากับปริมาณโปรตีนทั้งหมด 6.3 เปอร์เซ็นต์)

จากผลการตรวจเอกสารจะเห็นได้ว่าซีอิ๊วที่ผลิตในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังไม่ได้รับตรามาตรฐานอุตสาหกรรม เพราะมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานคือ 5.5 เปอร์เซ็นต์หรือเทียบเท่ากับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.88 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ซีอิ๊วญี่ปุ่น ไต้หวัน และจีน มีปริมาณโปรตีนในช่วง 9.8-11.3 เปอร์เซ็นต์ 5.9-9.3 เปอร์เซ็นต์ และ 6.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นในเบื้องต้นของการปรับปรุงคุณภาพซีอิ๊วที่ผลิตในประเทศไทยควรมีปริมาณโปรตีนในช่วง 5.5 เปอร์เซ็นต์เป็นอย่างน้อย และ 11.5 เปอร์เซ็นต์เป็นอย่างมากทั้งนี้ต้องคำนึงถึงกลิ่น สี ความใส และรสชาติของซีอิ๊วให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศด้วย

2. กระบวนการผลิตซีอิ๊วในประเทศต่างๆ

Yong and Wood (1974) รายงานว่า การผลิตซีอิ๊วในปัจจุบัน แบ่งได้เป็น 3 วิธีดังนี้

2.1 กระบวนการหมักซีอิ๊ว (fermented soy sauce process) วิธีนี้เป็นวิธีสืบทอดกันมา และยังเป็นที่นิยมในปัจจุบันโดยอาศัยเอนไซม์จาก *A. oryzae A.sojae* มาย่อยส่วนผสมของถั่วเหลืองและแป้งสาลี กระบวนการนี้จะได้ซีอิ๊วที่มีกลิ่นและรสชาติดี เป็นที่ยอมรับและมีคุณค่าทางอาหารสูง

2.2 กระบวนการผลิตซีอิ๊วทางเคมี (chemical soy sauce process) วิธีนี้เป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายในทวีปยุโรป และในสหรัฐอเมริกา วิธีนี้จะใช้กรดอนินทรีย์ ย่อยส่วนผสมของถั่วเหลืองและแป้งสาลี แทนการใช้เอนไซม์จากรา กรดที่นิยมใช้คือกรดไฮโดรคลอริก 20 เปอร์เซ็นต์ ปรับสารละลายให้เป็นกลางโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ซีอิ๊วที่ผลิตโดยวิธีนี้จะมีกลิ่นและรสชาติไม่ดี เนื่องจากไม่พบสารเปปไทด์ แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ และ กรดอินทรีย์เช่นกรดอะซิติก กรดแลคติก แต่การย่อยโปรตีนจากถั่วเหลืองจะทำได้สมบูรณ์กว่า

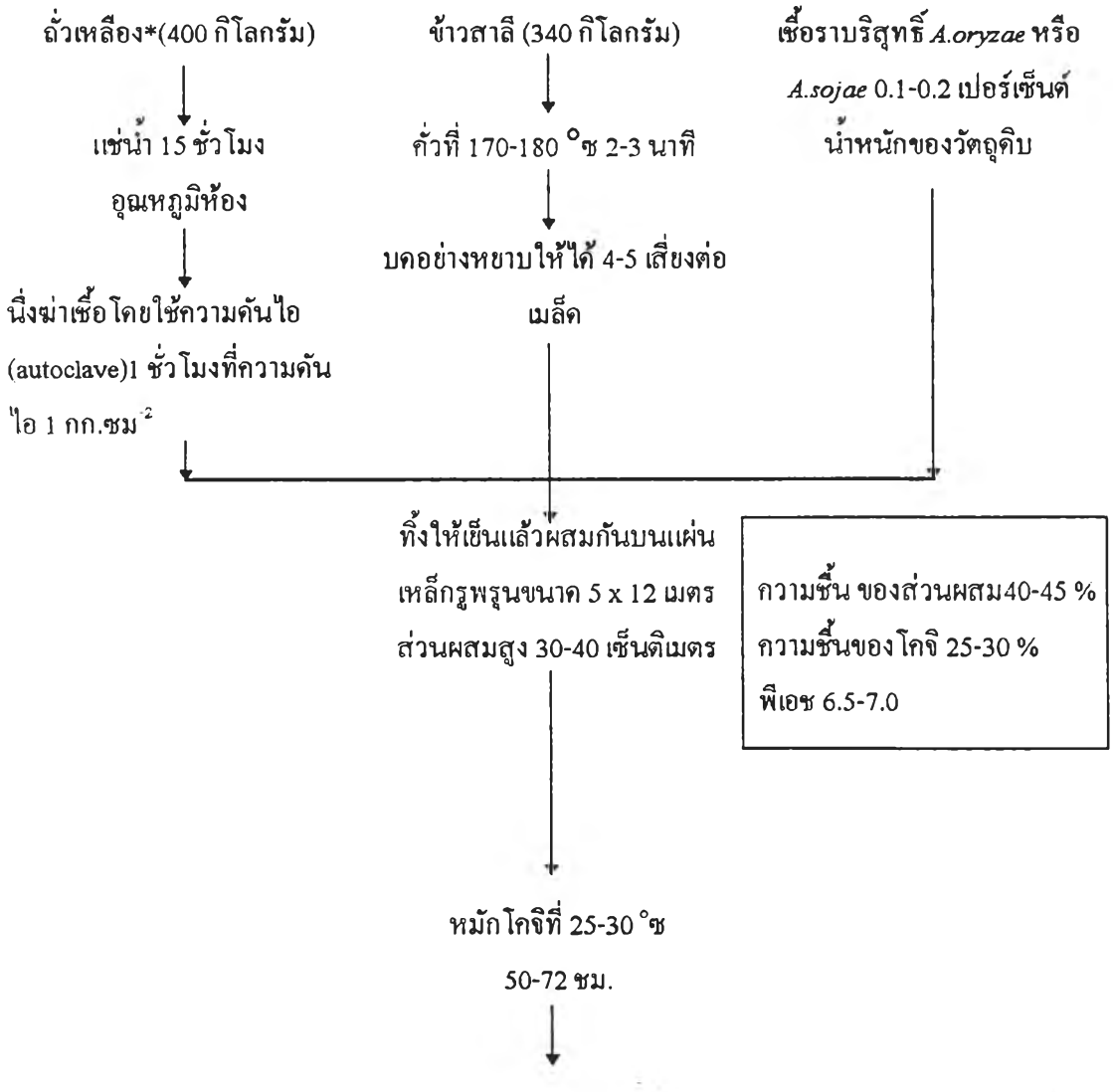
2.3 กระบวนการผลิตซีอิ๊วกึ่งเคมี (semichemical soy sauce process) เป็นวิธีที่ใช้การหมักแบบดั้งเดิมรวมกับการย่อยโดยใช้กรดอนินทรีย์ การผลิตโดยใช้วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมแพร่หลายนักในประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากกลิ่นและรสชาติซีอิ๊วที่ได้จากกระบวนการนี้ไม่ดี วิธีการคือใช้กรดอนินทรีย์ แทนเชื้อราเช่นเดียวกับกระบวนการผลิตทางเคมีแต่ใช้ความเข้มข้น 7-8 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และทำให้สารละลายเป็นกลางโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ นอกจากนี้ยังมีการเติมรำข้าวสาลีและแบคทีเรียกับยีสต์ลงไปในระยะโมโรมิด้วย ใช้ระยะเวลาในการหมัก 2 เดือน

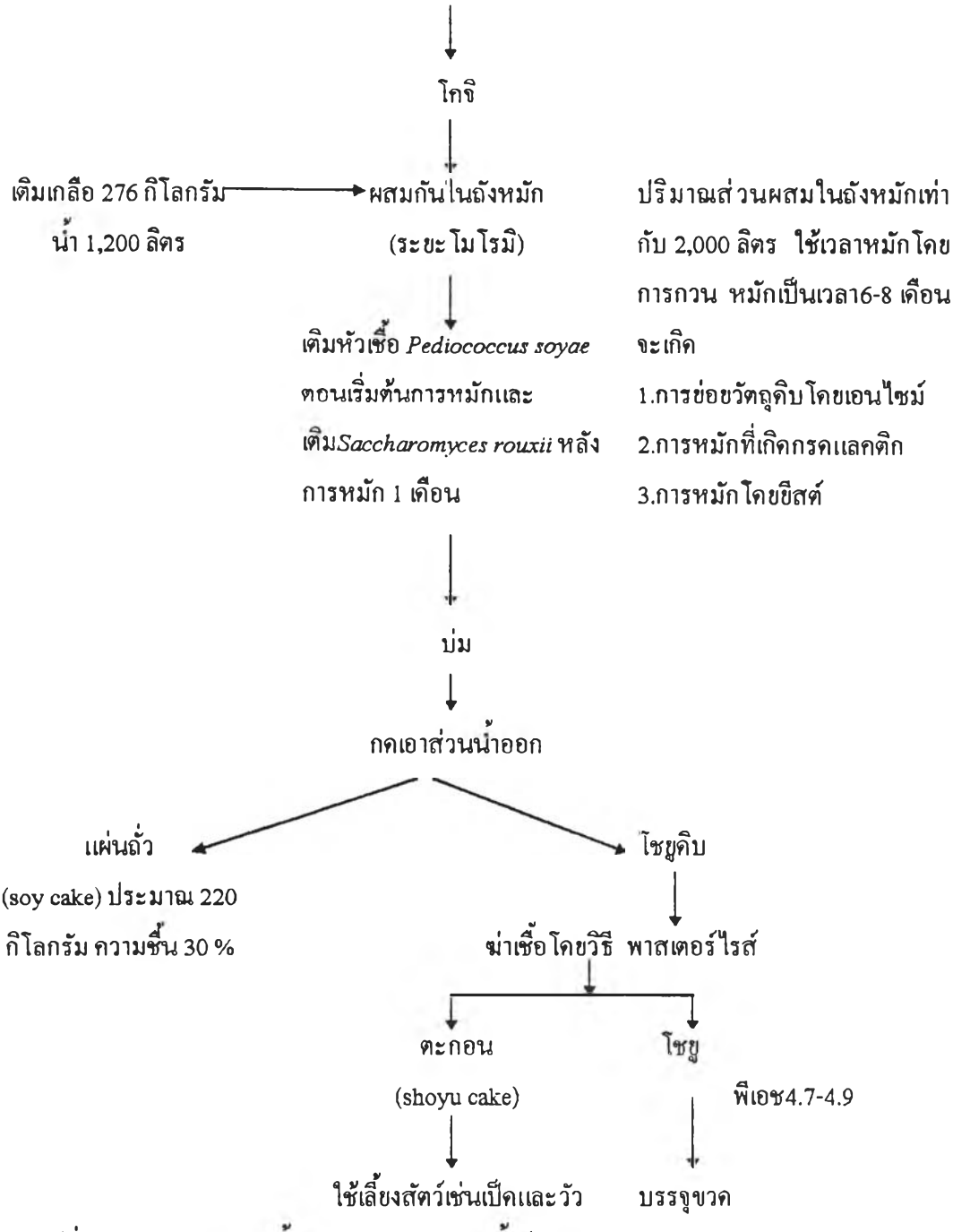
จากข้อมูลการผลิตซีอิ๊วข้างต้นจะเห็นได้ว่ากระบวนการหมักซีอิ๊วแบบดั้งเดิมเป็นกระบวนการผลิตซีอิ๊วที่มีกลิ่นและรสชาติดี ดังนั้นการตรวจเอกสารวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเน้นเฉพาะกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม

3. กระบวนการหมักซีอิ๊วแบบดั้งเดิม

Hesseltine and Wang (1967) รายงานว่าการหมักซีอิ๊วแบบดั้งเดิมแบ่งเป็น 2 แบบคือ การหมักแบบจีนและการหมักแบบญี่ปุ่น การหมักแบบจีนจะนิยมใช้อัตราส่วนของเมล็ดถั่วเหลืองมากกว่าแป้งสาลีหรือแป้งข้าวเจ้า Yong and Wood (1974) รายงานว่าการผลิตซีอิ๊วแบบดั้งเดิมของจีนจะใช้แป้งสาลีทั้งสิ้น ต่อมาได้มีการทดลองผสมแป้งสาลีกับแป้งข้าวเจ้าในอัตราส่วนต่างๆกัน เพื่อลดต้นทุนในการผลิต การหมักซีอิ๊วประเภทโคอิคูชิโชยูแบบญี่ปุ่นจะใช้ข้าวสาลีคั่วและบดหยาบและเมล็ดถั่วเหลืองในอัตราส่วนที่เท่ากัน นอกจากนี้อาจนำเมล็ดถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออกแล้วมาใช้เป็นวัตถุดิบด้วย

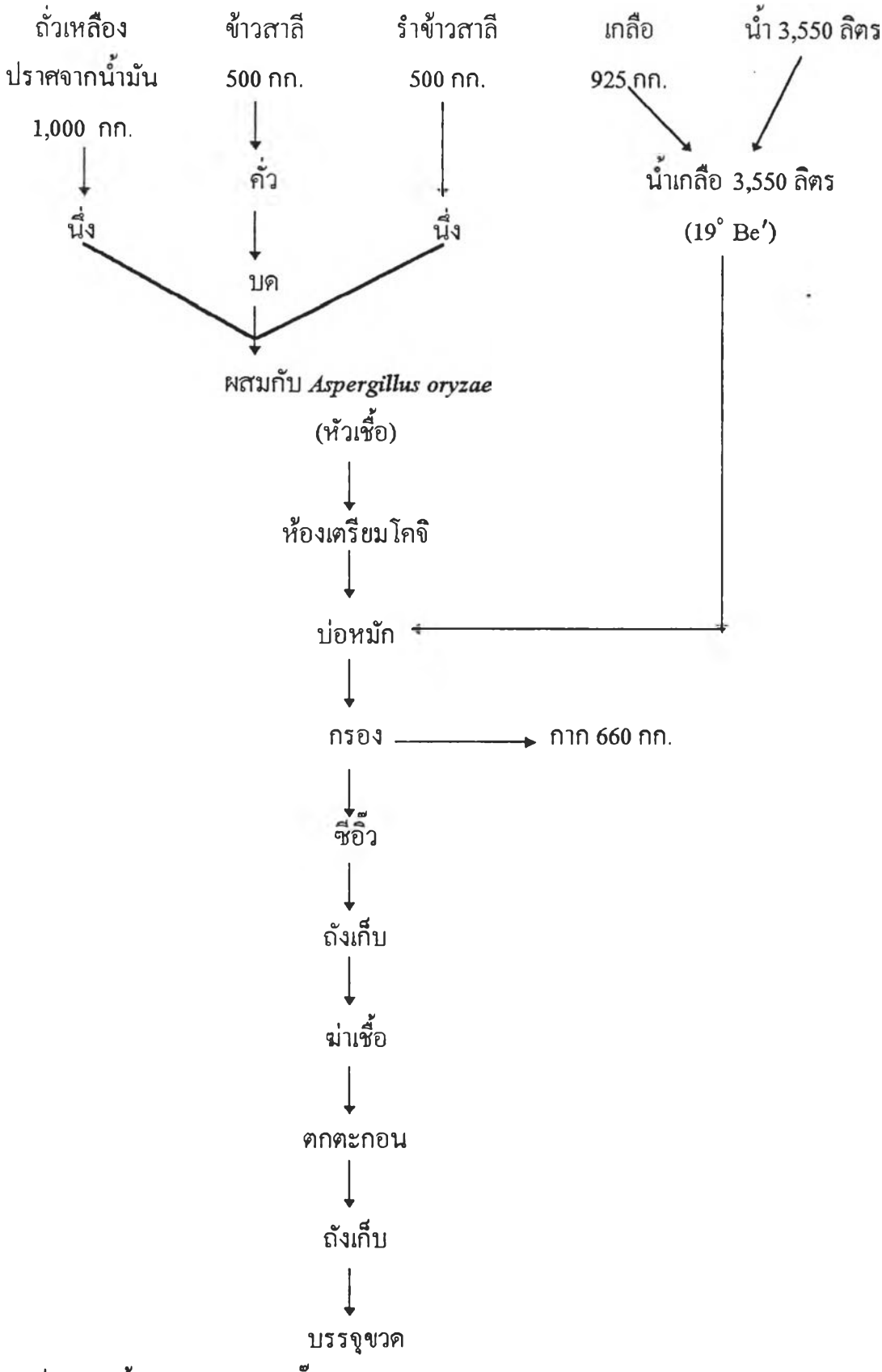
รูปที่ 1 (ก) แสดงขั้นตอนการผลิตโคอิคูชิโชยูโดยกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม





*หรือใช้ถั่วเหลืองปราศจากน้ำมัน 330 กก. ผสมน้ำร้อน 420 ลิตร

รูปที่ 1 (ก) แสดงขั้นตอนการผลิตโคอิคูชิโชยูโดยการหมักแบบดั้งเดิม (ดัดแปลงจากวิเชียร ลีลาวัชรมาศ ,2534, และYokotsuka,1986)



รูปที่ 1 (ข) ขั้นตอนการผลิตซีอิ๊วไต้หวัน (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ,2534)

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ระบุว่าการหมักซีอิ๊วแบบไต้หวันดังแสดงในรูปที่ 1 (ข) มีการเพิ่มรำข้าวสาลีเพื่อเป็นแหล่งอาหารของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์เช่น อะไมเลสและโปรติเอส เป็นต้น

การหมักซีอิ๊วในประเทศไทยส่วนใหญ่จะใช้วิธีการหมักแบบจีนมากกว่าแบบญี่ปุ่น โดยนำถั่วเหลืองมาแช่น้ำค้างคืน และนำไปต้มด้วยน้ำหรือไอน้ำ และนำไปคลุกกับแป้งสาลีและหรือแป้งข้าวเจ้าโดยปริมาณแป้งที่ใช้อยู่ระหว่าง 15-50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักถั่วเหลืองแห้ง นำไปเกลี่ยบนกระด้งแบบไม่ปราศจากเชื้อเป็นเวลา 4-7 วัน เชื้อราที่ใช้ในกระบวนการหมักเป็นเชื้อราที่ได้จากอากาศและวัตถุดิบ ไม่มีการฆ่าจุลินทรีย์บนกระด้งก่อนการหมักครั้งต่อไป นำโคจิที่ได้มาเติมน้ำเกลือ 22 เปอร์เซ็นต์อัตราส่วน 1: 3 บ่มตากแดดไว้ 60 วันจะได้ระยะโมโรมิ ทำการแยกถั่วเหลืองและน้ำหมักโดยจะนำถั่วเหลืองไปทำเต้าเจี้ยวเกรดต่ำ หรือเติมน้ำเกลือทำการหมักเป็นซีอิ๊วเกรดต่ำต่อไป น้ำใสที่กรองได้เป็นซีอิ๊วชั้นหนึ่ง(Bhumiratana และคณะ,1980)

จากการตรวจเอกสารอาจสรุปในเบื้องต้นได้ว่า การที่ซีอิ๊วญี่ปุ่นโดยเฉพาะโคอิคูชิโชยู มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดหรือมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าซีอิ๊วที่ผลิตในประเทศไทย ประเทศจีนและไต้หวัน อาจเนื่องมาจากการใช้เมล็ดถั่วเหลืองและข้าวสาลีในปริมาณเท่ากัน พร้อมทั้งมีการคั่วข้าวสาลีและบดหยาบ นอกจากนี้ยังมีการใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ในระยะโคจิและระยะโมโรมิ ดังนั้นในการตรวจเอกสารต่อไปนี้จะเป็นเรื่องวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วและจุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการหมักซีอิ๊ว

4. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊ว

4.1 เมล็ดถั่วเหลือง

Yong and Wood (1974) รายงานว่า ถั่วเหลืองมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max*(L) Merr หรือเรียกว่า soy bean ,soya bean ,Chinese pea และ Manchurian bean เป็นที่รู้จักกันดีในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองจะแตกต่างกันตามสถานที่ปลูกเช่น ถั่วเหลืองในประเทศจีนมีปริมาณน้ำ 13 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีน 38 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 16 เปอร์เซ็นต์ และ Invert sugar 15 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลืองในประเทศญี่ปุ่นมีปริมาณน้ำ 11 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีน 38 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 19 เปอร์เซ็นต์ Invert sugar 19 เปอร์เซ็นต์

วันชัย สมชิต (2527) รายงานว่าถั่วเหลืองในประเทศไทยมีปริมาณโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 21 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 34 เปอร์เซ็นต์ และ เถ้า 4.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งองค์ประกอบต่างๆจะต่างกันตามพันธุ์และสถานที่ปลูกเช่น พันธุ์ ส.จ.2 มีปริมาณไขมันสูงกว่าพันธุ์ ส.จ.1 และ ส.จ.4 ส่วนพันธุ์ที่ให้โปรตีนสูงได้แก่ พันธุ์ ส.จ.4 มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 44.6-48.7 เปอร์เซ็นต์

การหมักซีอิ๊วในประเทศไทย และประเทศเพื่อนบ้านใกล้เคียง ยังคงใช้ถั่วเหลืองทั้งเมล็ดในกระบวนการผลิต แต่ โรงงานใหญ่ๆหลายแห่งในประเทศญี่ปุ่น ได้เปลี่ยนมาใช้กากถั่วเหลืองที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก (นภา โล่ห์ทอง 2531)

4.2 แป้งสาลี

Yong and Wood (1974) รายงานว่าแป้งสาลีที่ใช้ในกระบวนการหมักซีอิ๊วเป็นแป้งสาลีชนิดเบา (soft wheat flour) ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 8-9 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนัก การเติมแป้งสาลีลงไปเพื่อทำให้

(1) ความชื้นเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา ความชื้นที่เชื้อราต้องการคือ 45 เปอร์เซ็นต์ แต่ในถั่วเหลืองต้มสุกจะมีความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ แป้งสาลีหรือข้าวสาลีบดจะช่วยลดปริมาณความชื้น

(2) ทำให้โปรติเอสแอคติวิตีของเชื้อราในโคจิสูงขึ้น และการเจริญของเชื้อราจะดีขึ้นเมื่อวัตถุดิบเริ่มต้นมีถั่วเหลืองและแป้งสาลีในอัตราส่วนเท่ากัน

(3) แป้งสาลีเป็นแหล่งของสารประกอบหลักของน้ำตาลและแอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ในซีอิ๊ว

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) รายงานว่าการคั่วข้าวสาลี วัตถุประสงค์เพื่อทำให้แป้งสาลีในข้าวสาลีมีลักษณะเหนียวแบบเจลาติน และโปรตีนย่อยง่าย ทำให้หัวเชื้อผลิตเอนไซม์ดีขึ้น เป็นการปรับความชื้นให้เหมาะสม ง่ายต่อการโม่ นอกจากนี้ยังเป็นการทำลายจุลินทรีย์ที่ผิวเมล็ดทำลายจุลินทรีย์ที่ผิวเมล็ด การบดข้าวสาลีอย่างหยาบให้ได้ 4-5 เสี่ยงต่อเมล็ดเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวของข้าวสาลีเพิ่มขึ้น และทำให้ซีอิ๊วมีกลิ่นหอม สีของซีอิ๊วดีขึ้น

4.3 เกลือ

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ระบุว่าเกลือเป็นสารป้องกันการเสียของวัตถุดิบในการผลิตซีอิ๊วที่สำคัญ ถ้าหากความเข้มข้นของน้ำเกลือไม่สม่ำเสมอ คุณภาพของซีอิ๊วที่ได้ก็ต่างกันไปด้วย ดังนั้นจะต้องควบคุมความเข้มข้นของน้ำเกลือให้คงที่ทุกครั้ง การเตรียมน้ำเกลือ

ส่วนมากใช้น้ำเย็น ณ อุณหภูมิห้องมาละลายเกลือ ไม่นิยมใช้น้ำร้อนเพราะเหตุผลเชิงเศรษฐกิจ ถึงแม้ว่าน้ำร้อนอาจฆ่าจุลินทรีย์บางชนิดที่ติดมากับเกลือหรือน้ำได้ การควบคุมความเข้มข้นของน้ำเกลือนิยมใช้°Be′(Baume′)ในช่วง 19.5-20.0°Be′ทั้งนี้เพราะโรงงานไม่ได้ใช้เกลือบริสุทธิ์ ดังนั้นน้ำเกลือที่มีความถ่วงจำเพาะเท่ากันอาจมีปริมาณเกลือที่แท้จริงต่างกันได้ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534)โรงงานอุตสาหกรรมขนาดย่อมในประเทศไทยนิยมใช้ ไฮโดรมิเตอร์ (hydrometer) ในการวัดความเข้มข้นของน้ำเกลือ มีหน่วยเป็น °Be′

4.4 น้ำ

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) ระบุว่าน้ำที่ใช้ในการหมักซีอิ๊วแบ่งเป็น 3 ประเภท คือ น้ำที่ใช้ละลายเกลือ น้ำที่ใช้แช่ถั่วเหลือง และน้ำใช้ทั่วๆไปในการทำความสะอาดไหหมัก ฯลฯ น้ำที่ใช้ละลายเกลือจะต้องเป็นน้ำที่ได้มาตรฐานน้ำดื่ม ถ้าน้ำมีธาตุเหล็กอยู่มากจะทำให้กลิ่นและรสชาติของซีอิ๊วเปลี่ยนไป น้ำที่ใช้ไม่ควรมีสารอินทรีย์ แอมโมเนีย และสารแขวนลอยอื่นๆ ตามปกติโรงงานทั่วไปใช้น้ำกรอง

นอกจากวัตถุดิบจะมีความสำคัญต่อการผลิตซีอิ๊วแล้ว Yong and Wood (1974) ได้รายงานว่า สภาวะแวดล้อมก็มีบทบาทอย่างมากในการผลิตซีอิ๊ว คือถ้าความชื้นสูงจะเกิดเชื้อราวงศ์ Mucoraceae และแบคทีเรียเจริญขึ้นบนโคจิทำให้มีเอนไซม์ย่อยโปรตีนน้อยลง อุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วงระยะโคจิคือ 25-35 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ก็ต้องลดอุณหภูมิลงเพราะทำให้อัตราการเจริญของเชื้อราหยุดได้ ดังนั้นควรวางกระด้งโคจิไว้ในที่ที่มีอากาศถ่ายเทได้ดี อุณหภูมิไม่สูงเกินไป

5.จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักซีอิ๊ว

5.1 โคจิ (*Koji*) มาจากคำว่า Kabi-tachi หมายถึงการเจริญของรา ราที่เจริญบนโคจิจะสร้างและปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยถั่วเหลืองและแป้งสาลี

เชื้อราที่พบว่ามีบทบาทมากที่สุดในการหมักซีอิ๊วระยะโคจิคือ ***Aspergillus oryzae*** และ ***A.sojae*** เป็นเชื้อราที่มีบทบาทเพราะมีเอนไซม์สำคัญได้แก่ โปรติเอสย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองให้เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ โพลีเปปไทด์ เปปไทด์ เปปโตน และกรดอะมิโน โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อราได้แก่โปรติเอสที่ทำงานในสภาวะความเป็นกรดด่างที่เป็นกลาง (neutral proteases) โปรติเอสที่ทำงานในสภาวะที่เป็นด่าง (alkaline proteases) นอกจากนี้เชื้อรายังผลิตเอนไซม์อะไมเลส ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ไดแซคคาไรด์ และ โมโนแซคคาไรด์ (Yong and Wood ,1974 และวารุณี ประดิษฐศรีกุล,2533) บางครั้งพบราชนิดอื่นนอกเหนือจาก ***Aspergillus oryzae*** , ***A.soyae*** ขึ้นปนมาด้วยเนื่องจากสภาวะในห้องเก็บโคจิไม่

ปลอดเชื้อดังเช่นที่พบในประเทศที่ผลิตซีอิ๊วเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ เช่น ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งราเหล่านี้จะทำให้กลิ่นและรสของซีอิ๊วเปลี่ยนไป เช่น *A. fumigatus* , *A. niger*, *A. flavus* , *A. terreus* *Rhizopus* spp. ,*Mucor* spp.,*Chlamydomucor* spp. รามีบทบาทในการหมักโคจิจึง ทำให้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสูงและแยกโปรตีเอส อะไมเลสของ *Aspergillus oryzae, A. soyae* ให้บริสุทธิ์ (Yong and Wood ,1974)

นภา โล่ห์ทอง (2531) รายงานว่าเชื้อราที่ใช้ในการหมักซีอิ๊วในปัจจุบันคือ *Aspergillus oryzae, A.soyae* เชื้อทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะทางสรีระวิทยาที่แตกต่างกัน ทำให้เหมาะแก่การหมักในสภาวะที่ต่างกัน คือ *Aspergillus oryzae* เส้นใยจะมีลักษณะฟูยาวจึงเหมาะแก่การเตรียมโคจิโดยวิธีดั้งเดิมคือบ่มในกระด้ง ส่วน *A.soyae* เป็นเชื้อที่มีลักษณะเส้นใยสั้นจึงเหมาะสำหรับการหมักในห้องบ่มโคจิในห้องที่มีการกวนหรือเกลี่ย

นภา โล่ห์ทอง (2531) รายงานว่าโคจิของโรงงานต่างๆในประเทศไทยจำนวน 15 โรงงานประกอบด้วยเชื้อรา 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือกลุ่ม *Aspergillus flavus* ,*Aspergilus oryzae* ,*Aspergilus sojae* และเชื้อราพวก Phycomyces เช่น *Rhizopus* spp. *Absidia* spp. และ *Syncephalastrum* spp. และพบว่าเมื่อนำโคจิที่มีเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus flavus* , *Aspergillus oryzae* เป็นจำนวนมากมาใช้ในการหมักซีอิ๊ว จะได้ซีอิ๊วที่มีกลิ่นรสดีกว่าโคจิที่มีเชื้อราพวก Phycomyces ปนเปื้อน

5.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักซีอิ๊วระยะโมโรมิ

รา เชื้อราที่พบในช่วงนี้มักจะเป็นเชื้อราที่ติดมาจากระยะโคจิ และจะอยู่ในรูปของสปอร์ โดยพบในช่วงที่เติมน้ำเกลือใหม่ๆ หลังจากหมักเป็นเวลานาน จะพบเชื้อราน้อยลงหรือไม่พบเลย ทั้งนี้เพราะสภาวะหมักในระยะโมโรมิมีเกลือปริมาณสูง เชื้อราที่พบอยู่เสมอได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Mucor* spp.และ *Rhizopus* spp. (Yong and Wood ,1974)

แบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียที่พบในระยะโมโรมิจะเป็นแบคทีเรียที่ชอบเค็มหรือทนโซเดียมคลอไรด์มี 4 กลุ่มคือ กลุ่มแรก *Pediococcus* spp. กลุ่มที่สอง *Staphylococcus* spp. กลุ่มที่สาม *Bacillus* spp. และกลุ่มที่สี่คือ แบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบ แบคทีเรียที่มีการศึกษามากที่สุดคือ *Pediococcus* spp.ซึ่งจะพบมากในระยะการหมักวันที่ 20-25 และแบคทีเรียที่สำคัญรองลงมาคือ *Staphylococcus* spp.ซึ่งจะพบมากใน 7 วันแรก การทดสอบความสามารถในการทนเกลือของแบคทีเรียเหล่านี้พบว่า *Staphylococcus* spp.และ *Bacillus* spp.เจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีเกลือ แต่ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงก็เจริญได้

Pediococcus spp.และกลุ่มแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบที่พบไม่สามารถเจริญได้ที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ แต่เจริญได้ดีที่มีเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และจากการทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียสพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้สามารถเจริญได้ เป็นการยืนยันได้ว่าแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในถังหมักซีอิ๊วที่มีอุณหภูมิสูงตอนกลางวันได้จริง (สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ ,2520)

Sukthavorn (1996) รายงานว่าจากการแยกแบคทีเรียจากโรงงานซีอิ๊วในเขตกรุงเทพมหานครรวมทั้งสิ้น 136 ตัวอย่างพบว่าได้แบคทีเรีย 507 สายพันธุ์และมี 447 สายพันธุ์ที่เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ย้อมติดแกรมบวก เป็นพวก facultative anaerobes สามารถเจริญได้ที่ 37 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงแชื้อที่มีเกลือ5-15 จัดอยู่ในกลุ่ม *Tetragenococcus halophilus* และพบ *Staphylococcus* spp. 48 สายพันธุ์ และ *Micrococcus* spp. 12 สายพันธุ์

นภา โล่ห์ทอง (2531) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในระยะโมโรมิได้แก่ แบคทีเรียแลคติกและยีสต์ทนเกลือ เช่น ***Pediococcus halophilus***, ***Lactobacillus delbrueckii***, ***Saccharomyces rouxii*** และ ***Torulopsis holmii***

6. การกรองซีอิ๊วที่ได้จากการหมัก

เครื่องมือที่ใช้ในการกรองซีอิ๊วโดยใช้แรงดันผ่านตัวกรองมี 3 แบบคือ Lever press Screw press และ Water press ซึ่ง 2 แบบแรกเป็นแบบที่ใช้แรงงานมนุษย์นั้นจะได้ผลน้อยที่สุด เหมาะสำหรับโรงงานขนาดเล็ก โรงงานขนาดใหญ่จะใช้แบบที่ 3 โดยใช้ถุงผ้าขนาดใหญ่กว้าง 1 x 1 เมตร 400 ใบ (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ ,2534)

การกรองโดยอาศัยเมมเบรนประเภทเซรามิค เป็นการใช้เซรามิคเมมเบรนในการทำให้ซีอิ๊วมีความใสขึ้น นิยมทำการกรองหลังจากฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วและมีตะกอน (particles) นำซีอิ๊วที่ได้มาผ่านการกรองโดยเซรามิคเมมเบรนที่มีขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร โดยให้อัตราการไหลผ่าน 861 ลิตรต่อชั่วโมง ภายใต้ความดัน 11 บาร์ ที่ 25 องศาเซลเซียส (Chin and Been ,1992)

7. องค์ประกอบทางเคมีของซีอิ๊ว

ซีอิ๊วที่ดีจะต้องประกอบด้วยไนโตรเจนทั้งหมด 1.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นมีปริมาณกรดอะมิโน น้ำตาล แอลกอฮอล์ กลีเซอรีน และกรดอินทรีย์ในปริมาณที่พอเหมาะ มีกลิ่นและรสที่ดี สารประกอบไนโตรเจนในซีอิ๊วประกอบด้วยกรดอะมิโน 40-50 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนีย 10-15 เปอร์เซ็นต์ เปปไทด์ และ เปป

โทน 40-50 เปอร์เซนต์ และโปรตีนน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (Yong and Wood ,1974 และ Yokotsuka ,1960) ส่วนกรดอะมิโนในซีอิ๊วมี 17 ชนิดดังนี้คือ อาร์จินีน กรดแอสปาร์ติก ซิสเตอีน กรดกลูตามิค ฮีสติดีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมไธโอนีน ฟีนิลอะลานิน โพรลีน ซีรีน ทริโอนีน ทริพโทเฟน ไทโรซีน วาลีน ไกลซีน ไม่พบกรดอะมิโนอีก 3 ชนิด คือ กลูตามีน แอสปาราจีน และอะลานิน

ส่วนสารประกอบอินทรีย์ที่มีภาวะเบส (organic bases) ที่พบในซีอิ๊วได้แก่ อดินิน ไฮโปแซนทิน แซนทิน กัวนิน ไซโตซีน และ ยูราซิล

น้ำตาลที่พบในซีอิ๊วได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส มอลโทส อราบิโนส และไซโลส

กรดอินทรีย์ที่พบได้แก่ กรดแลคติก ไพโรกลูตามิค ซัคซินิค อะซิติค วานิลลิค (vanillic) ไซรินจิก (syringic) เฟอรูลิค (ferulic) และ trimethyl gallic acid โดยที่กรดแลคติคเป็นกรดอินทรีย์ที่สำคัญที่สุด

สารระเหยที่พบในการหมักได้แก่ สารพวก เอสเทอร์ แอลกอฮอล์ และกรด

8. การปรับปรุงคุณภาพซีอิ๊ว

8.1 การปรับปรุงด้านวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊ว

Lebumfacil-Davide (1967) รายงานว่ามีการทดลองใช้ข้าวโพด และข้าวฟ่างแทนข้าวสาลีในประเทศฟิลิปปินส์ เนื่องจากประเทศฟิลิปปินส์ ไม่มีการปลูกข้าวสาลีและถั่วเหลือง เพื่อลดต้นทุนการผลิตจึงทดลองใช้ ข้าวโพดและข้าวฟ่างนำมาบดหยาบๆ ผสมแทนข้าวสาลีพบว่า พีเอช ปริมาณกรดทั้งหมดซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีไตเตรชัน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีนอะมิโนไนโตรเจนในรูปของไนโตรเจนทั้งหมด ของแข็งที่ไม่ใช่คลอไรด์ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของซีอิ๊วที่ผลิตโดยใช้ข้าวสาลีสูงกว่าการใช้ข้าวโพดหรือข้าวฟ่าง นอกจากนี้การวัดปริมาณกรดอะมิโนพบว่าซีอิ๊วที่ได้จากการใช้ข้าวฟ่างแทนข้าวสาลีจะมีกรดอะมิโน ทริพโตเฟน ไลซีน และฮีสติดีนสูงกว่าซีอิ๊วที่ผลิตจากข้าวชนิดอื่น ซีอิ๊วที่ได้จากการใช้ข้าวโพดแทนข้าวสาลีจะมีกรดแอสปาร์ติกและกรดกลูตามิคสูง แต่กลิ่นและรสของซีอิ๊วจากข้าวโพดและข้าวฟ่างยังไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

8.2 การปรับปรุงด้านสายพันธุ์จุลินทรีย์

จากการตรวจเอกสารพบว่านักวิจัยชาวไทยและชาวต่างประเทศจำนวนมากได้ปรับปรุงสายพันธุ์ ***Aspergillus*** spp. ซึ่งใช้ในกระบวนการหมักซีอิ๊วให้ผลิตโปรติเอสในปริมาณสูง

ในปี พ.ศ. 2530 นภา โล่ห์ทองและคณะ ได้คัดเลือกสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสร้างโปรติเอส และอะไมเลสสูง เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง ซึ่งเหมาะต่อภูมิอากาศของประเทศไทย จากการทดลองใช้เชื้อนี้หมักซีอิ๊ว พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรส กลิ่น และสีเป็นที่ยอมรับของโรงงาน

ในปี ค.ศ.1980 Bhumiratana และคณะ ได้แยก *Aspergillus* spp. 5 สายพันธุ์ และ *Mucor* sp.1 สายพันธุ์ จากโคจิซึ่งเก็บตัวอย่างจากโรงงานผลิตซีอิ๊วบางแห่งในเขตกรุงเทพมหานคร ผลการจำแนกเชื้อราและเปรียบเทียบโปรติเอสแอคติวิตีของเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ กับ *Aspergillus oryzae* ซึ่งมีขายเป็นกล้าเชื้อในประเทศญี่ปุ่นสำหรับทำซีอิ๊วพบว่า *Aspergillus flavus* var. *columnaris* มีโปรติเอสแอคติวิตีสูงสุดเมื่อใช้ถั่วเหลืองคลุกกับแป้งสาลีในอัตราส่วน 1:1 เป็นซับสเตรต นอกจากนี้ผู้วิจัยพบว่าราชนิดนี้ไม่ผลิตอฟลาท็อกซิน Bhumiratana และคณะ จึงใช้ *Aspergillus flavus* var. *columnaris* เตรียมโคจิจากถั่วเหลืองต้มสุกและแป้งสาลี ผลการส่งโคจิไปใช้ผลิตซีอิ๊วในโรงงานผลิตซีอิ๊วแห่งหนึ่ง พบว่าซีอิ๊วที่ผลิตจากโคจิที่เตรียมในห้องปฏิบัติการโดยใช้กระด้งที่ล้างสะอาด และใช้ *Aspergillus flavus* var. *columnaris* มีรสและกลิ่นเป็นที่ยอมรับของผู้ประกอบกิจการผลิตซีอิ๊ว นอกจากนี้ในซีอิ๊วที่เตรียมได้ ยังตรวจพบโปรติเอสแอคติวิตี ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายในซีอิ๊วและปริมาณกลูโคสที่สูงกว่าซีอิ๊วที่ผลิตโดยใช้โคจิที่เตรียมตามกรรมวิธีของโรงงาน ซึ่งไม่ใช้กล้าสปอร์ของเชื้อรา แต่ใช้สปอร์ที่หลงเหลืออยู่บนกระด้งจากการเตรียมโคจิครั้งก่อน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงแนะนำให้มีการเตรียมกล้าเชื้อโคจิโดยใช้ *Aspergillus flavus* var. *columnaris* และในปี พ.ศ. 2533 ได้มีการจัดตั้ง Quality Control and Training Center for Soy Sauce ขึ้นที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งมีการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตกล้าสปอร์เชื้อราโคจิที่ใช้ชื่อว่า Ozy-Kat1® และให้บริการด้านเทคนิคและการรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์ให้กับโรงงานหลายแห่งพร้อมทั้งติดตามผลการประกอบการอย่างต่อเนื่อง (อมเรศ ภูมิรัตน, 2535)

นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาเรื่องการทำโปรติเอสซึ่งสกัดจากโคจิให้บริสุทธิ์บางส่วน (Impoolsup et al, 1981) การผ่าเหล่า *Aspergillus flavus* var. *columnaris* โดยการฉายยูวีเพื่อให้ผลิตโปรติเอสในปริมาณสูง ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าสายพันธุ์กลายบางสายพันธุ์สร้างอฟลาท็อกซิน (Kalayanamitr et al,1987) ดังนั้นผลงานวิจัยของ Kalayanamitr et al (1987) จึงชี้ให้เห็นข้อควรระวังในการวิจัยและปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus* spp.เพื่อนำมาใช้ในการเตรียมโคจิสำหรับการผลิตซีอิ๊ว

ในต่างประเทศโดยเฉพาะที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยซีอิ๊วของบริษัทคิโคแมน ที่เมืองโนะดะ ประเทศญี่ปุ่น ยังคงมีการวิจัยปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus sojae* โดยในปี ค.ศ. 1987 Ushijima et al รายงานว่าได้ทำการผ่าเหล่า โดยฉายแสงยูวีแก่ heterozygous diploids ที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ของ *Aspergillus sojae* สายพันธุ์ที่ผลิตโปรติเอสในปริมาณสูง และโปรโตพลาสต์ของ *Aspergillus soyae* สายพันธุ์ที่ผลิตกลูตามิเนสในปริมาณสูง ผลการทดลองพบว่าแอคติวิตีของโปรติเอสและกลูตามิเนสใน heterozygous diploids ที่ถูกกลายพันธุ์แล้วเพิ่มขึ้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงแนะนำว่าการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชัน เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของโปรติเอส และกลูตามิเนสสูงเป็นวิธีการหนึ่งที่อาจนำมาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราสำหรับใช้เตรียมโคจิเพื่อใช้ในการผลิตซีอิ๊ว

ในปี ค.ศ. 1988 Tatsumi et al รายงานว่าแอลคาไลน์โปรติเอสที่แยกจาก *Aspergillus oryzae* เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดเอนไซม์หนึ่งในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว คณะผู้ทำการวิจัยจึงทำการโคลนแอลคาไลน์โปรติเอสยีนส์ของ *Aspergillus oryzae* และหาลำดับเบส ผลการทดลองพบพลาสมิด pOAP3 ซึ่งมีขนาดเพียง 750 คู่เบส ซึ่งมีขนาดสั้นเกินกว่าที่จะระบุรหัสการสังเคราะห์แอลคาไลน์โปรติเอสอย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้เพราะขนาดของเอ็มอาร์เอนเอของ *Aspergillus oryzae* แอลคาไลน์โปรติเอสมีขนาด 1,700 คู่เบส จึงใช้พลาสมิด pOAP 3 เป็นโพรบในการทำโคโลนีไฮบริไดเซชัน เพื่อหาชิ้นส่วนดีเอนเอที่ระบุรหัสการสังเคราะห์แอลคาไลน์โปรติเอสของ *Aspergillus oryzae* ผลการทดลองพบว่าพลาสมิด pOAP5 ซึ่งมีขนาด insert เท่ากับ 1,100 คู่เบส ระบุรหัสการสังเคราะห์แอลคาไลน์โปรติเอสของ *Aspergillus oryzae* ผลการหาลำดับเบสของ insert 1.100 คู่เบสโดยวิธี dideoxy chain termination และผลการแปลลำดับเบสให้เป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่า แอลคาไลน์โปรติเอสของรา *Aspergillus oryzae* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 282 ชนิด มีขนาด 29 กิโลดาลตัน และเป็นซีรีนโปรติเอสที่มีการคงชนิด (conservation) Asp ^{32} His ^{64} และ Ser ^{221} ซึ่งเป็น active site ของซีรีนโปรติเอสชนิดต่างๆที่แยกจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

8.3 การปรับปรุงด้านกระบวนการหมักซีอิ๊ว

Osaki et al.(1985) รายงานว่าการตรึงเซลจุลินทรีย์ 3 ชนิดคือ *P. halophilus* , *Saccharomyces rouxii* และ *Torulopsis versatilis* ในแคลเซียมอัลจิเนตและนำไปใช้ในถังหมักแบบฟลูอิไดซ์ พบว่าระยะเวลาในการหมักซีอิ๊วลดลงเหลือเพียง 80 วันเมื่อเทียบกับการหมักแบบดั้งเดิมซึ่งใช้เวลาถึง 6 เดือน ซีอิ๊วที่ได้มีกลิ่นรสใกล้เคียงกับการหมักแบบดั้งเดิม

Hamada และคณะ (1989) รายงานว่า การหมักซีอิ๊วแบบดั้งเดิมจะใช้ถั่วเหลืองต้มสุกกับข้าวสาลีบดผสมกับสปอร์ของเชื้อรา *A. sojae* และ/หรือ*A.oryzae* หมักเป็นเวลา 2 วันและนำมาหมักในน้ำเกลือ 17 เปอร์เซ็นต์ เชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้จะต้องทนเกลือ แบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* สามารถเจริญและสร้างกรดแลคติก และยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* จะสร้างแอลกอฮอล์ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดี ดังนั้นจึงนำ *Z. rouxii* มาตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต และหมักในถังหมักแบบพ่นอากาศ (air lift) ผลการทดลองพบว่าการหมักใช้ระยะเวลา 50 วันได้ซีอิ๊วที่มีกลิ่นรสเช่นเดียวกับซีอิ๊วที่ผลิตโดยวิธีแบบดั้งเดิม

Xu (1990)รายงานว่าในปัจจุบันในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยทั่วไปมีการผลิตซีอิ๊วในโรงงานขนาดใหญ่ โดยต้มกากถั่วเหลืองและแป้งสาลีผสมกับรำข้าวสาลีในสัดส่วน 100:50:15 ในหม้อนึ่งแบบหมุนขนาดใหญ่ (rotary cooker) และออกแบบภาชนะขนาดใหญ่ สำหรับเตรียมโคจิ โดยมีระบบให้อากาศหมุนเวียนจากด้านล่างของภาชนะขนาดใหญ่สำหรับเตรียมโคจิ โดยมีระบบให้อากาศหมุนเวียนจากด้านล่างของภาชนะผ่านแผ่นที่มีรูพรุนเพื่อเป็นการให้อากาศแก่เชื้อราในระยะโคจิ นอกจากนี้มีการเติม *Lactobacillus plantarum* และ Torulopsis mogii ในถังคอนกรีตเพื่อเร่งระยะเวลาการหมัก กระบวนการผลิตซีอิ๊วที่มีรสชาติใกล้เคียงกับซีอิ๊วที่ผลิตโดยการหมักที่ใช้เวลานาน ในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว มีการออกแบบสายพานที่ขนถ่ายโคจิมาใส่ในบ่อหมัก และมีการออกแบบ storage tank และheat transfer สำหรับการพาสเตอร์ไรส์ซีอิ๊ว รายละเอียดของเครื่องมือที่ใช้ผลิตซีอิ๊วดังกล่าวข้างต้นมีดังรายงานโดย Xu (1990)ขั้นตอนการผลิตซีอิ๊วดังกล่าวทำให้ลดระยะเวลาการผลิตซีอิ๊วในระยะโคจิเหลือ 24 ชั่วโมงและลดระยะเวลาการหมักในช่วงโมโรมิเหลือ 15-30 วัน ทั้งนี้เพื่อให้คุ้มค่าแก่การลงทุนสร้างโรงงานผลิตซีอิ๊วขนาดใหญ่จำเป็นต้องผลิตผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วออกจำหน่ายเป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้นๆ

Ueki และคณะ (1994) รายงานว่าในการทดลองหมักซีอิ๊วโดยใช้ถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออกแล้ว 3,600 กิโลกรัม เมล็ดข้าวสาลี 3,600 กิโลกรัม และใช้สปอร์ราเริ่มต้น (*tane-koji*) ที่ผสมกันระหว่างสปอร์ของราที่มีแอคติวิตีของกลูตามิเนสสูง 2 สายพันธุ์ คือ *A. oryzae* สายพันธุ์ K2 ที่มีความยาวของโคนิดิโอฟอร์ 350 ไมโครเมตร และ *A. oryzae* สายพันธุ์ HG ที่มีความยาวของโคนิดิโอฟอร์ 2,500 ไมโครเมตร ผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตซีอิ๊วที่มีแอคติวิตีของกลูตามิเนสสูงถึง 5.5 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งโคจิ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ราสายพันธุ์ K2 เพียงอย่างเดียวในการเป็นหัวเชื้อในการหมักโดยจะมีแอคติวิตีกลูตามิเนสเพียง 1.8 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งโคจิ และเมื่อเติมน้ำเกลือ 23 เปอร์เซ็นต์และ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการหมักเป็นเวลา 180 วัน พบว่าซีอิ๊วที่ผลิตได้มีกรดกลูตามิคมากกว่าซีอิ๊วที่ผลิตโดยวิธีการแบบดั้งเดิม

เพ็ญศรี และ ปราณี (2536)รายงายว่าทดลองตรึงเซล *Lactobacillus delbrueckii* TISTR 108 และ *Zygosaccharomyces rouxii* ที่ห่อหุ้มโดยวิธี interfacial polymerization ใช้หมักโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลืองเพื่อผลิตซีอิ๊วที่มีกลิ่นรสใกล้เคียงกับซีอิ๊ว โดยทำการหมักในถังหมักแบบฟลูอิไดซ์พบว่าเซลตรึงของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมีความทนต่อเกลือมากกว่าเซลอิสระ

Mongkolwai et al 1997 รายงานว่า ศูนย์ QCTC -Soy bean fermentation ได้ทำการปรับปรุงเครื่องจักรสำหรับการหมักระยะโคจิที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ทั้งนี้ได้ทำการทดลองติดตั้งเครื่องมือในโรงงานอุตสาหกรรม ใช้วัตถุดิบป้อนเข้าสู่เครื่อง 2 ตัน และควบคุมอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ความชื้น 90-93 เปอร์เซ็นต์ การหมักใช้เวลา 44 ชั่วโมง ผลการตรวจสอบคุณภาพของโคจิและคุณภาพของซีอิ๊วที่ได้ พบว่าซีอิ๊วที่ผลิตได้มีคุณภาพดีกว่าซีอิ๊วที่ผลิตโดยใช้ถาดไม้แบบดั้งเดิมในการหมักระยะโคจิ

จากการตรวจเอกสารการปรับปรุงคุณภาพซีอิ๊วจะเห็นได้ว่ายังไม่มีผู้ทำการทดลองเติมผงโปรดิเอสลงในน้ำหมักซีอิ๊วระยะโมโรมิ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยใหม่ การตรวจเอกสารต่อไปนี้จะเป็นเรื่องชนิดของโปรติเอสและการใช้โปรติเอสในอุตสาหกรรมอาหาร

9. ชนิดของโปรติเอส

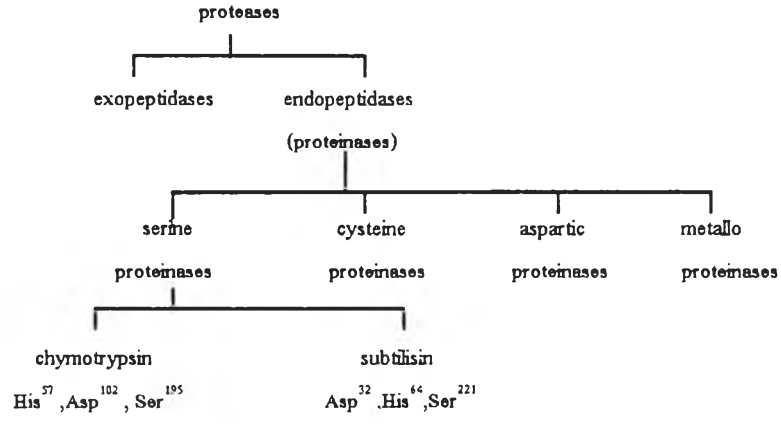
โปรติเอสเป็นชื่อที่ใช้เรียกเอนไซม์ทุกชนิดที่ย่อยพันธะเปปไทด์ (EC 3.4) แบ่งโปรติเอสออกเป็นเอกโซเปปติเดส (EC 3.4.11-19)และเอนโดเปปติเดส(EC 3.4.21-24,99) เอกโซเปปติเดสย่อยพันธะเปปไทด์ด้านปลายอะมิโนหรือปลายคาร์บอกซี ในขณะที่เอนโดเปปติเดสย่อยพันธะเปปไทด์ภายในสายเปปไทด์ (Khan and Roufogalis,1994)

โปรติเนสเป็นศัพท์ที่ใช้สำหรับเรียกเอนโดเปปติเดสเท่านั้น ถูกแบ่งย่อยเป็น 4 ประเภทตามชนิดของกรดอะมิโนบริเวณ active site ได้แก่ 1.ซีรีนโปรติเนส (EC 3.4.21) 2. ซีสเตอีน โปรติเนส (EC 3.4.22) 3. แอสปาร์ติคโปรติเนส (EC 3.4.23) และ 4. เมทอลโลโปรติเนส (EC 3.4.24) ซีรีนโปรติเอสมีซีรีนที่ active site ซึ่งเป็นบริเวณที่ซับสเตรตมาเกาะ โปรติเนสประเภทซีรีนโปรติเนสแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ คีโมทริพซิน (Chymotrypsin) และซับทิลิซิน (Subtilisin) โดยที่ active site ของคีโมทริพซินประกอบด้วยสามเหลี่ยมที่เกิดจากการโยงเชื่อม His^{57}, Asp^{102} และ Ser^{195} (ใช้การให้ตัวเลขสำหรับ

คีโมทริพซิน) ส่วนโปรติเนสประเภทซับทิลิซิน มี Asp^{32} ,His^{64},Ser^{221} (ใช้การให้ตัวเลขสำหรับซับทิลิซิน)ที่active site ถึงแม้ว่าโปรติเนสในกลุ่มคีโมทริพซินและในกลุ่มซับทิลิซินจะมีชนิดของกรดอะมิโนที่ active site เหมือนกัน ลักษณะสามมิติของโปรติเนสทั้งสองประเภทนี้แตกต่างกันเพราะโปรตีนมีการพับตัว (folding) ต่างกัน (Khan and Roufogalis,1994)

ซีสเตอินโปรติเนสประกอบด้วยกรดอะมิโนซีสเตอินบริเวณที่เกาะกับซับสเตรต แอสปาร์ติกโปรติเนสมีกรดแอสปาร์ติก 2 โมเลกุลที่ active site ซึ่งมีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยา ส่วนเมทอลโลโปรติเนสต้องใช้ไอออนของโลหะซึ่งตามปกติได้แก่ Zn ที่ active site ซึ่งทำให้เกิดขั้วที่พันธะเปปไทด์ที่จะถูกย่อย รูปที่ 2 สรุปโปรติเนสชนิดต่างๆดังกล่าวข้างต้น

รูปที่ 2. โปรติเอสชนิดต่างๆ (Khan and Roufogalis,1994)



แบคทีเรียกลุ่ม ***Bacillus*** สามารถสร้างโปรติเอสทั้งที่อยู่ภายในเซลและภายนอกเซลในระยะปลาย log phaseหรือ ระหว่างการงอกของสปอร์ ตารางที่ 4 แสดงตัวอย่างโปรติเอสจาก ***Bacillus*** spp.

ตารางที่ 4 โปรติเอสจาก ***Bacillus*** สายพันธุ์ต่างๆ

.	ชนิดโปรติเอส	เอกสารอ้างอิง
B. licheniformis ATCC 14580	Glutamic acid specific protease	Kakudo et al. 1992
B. subtilis	neutral protease	McConn et al. 1964
B. subtilis 168	serine protease	Roitsch &Hageman1983
B. subtilis	neutral protease	Wu et al 1991

	subtilisin metallo protease Bacillo peptidase F neutral protease B extracellular protease	
B. subtilis	subtilisin BPN (alkaline protease)	Matsubara et al 1965
B. subtilis	subtilisin Carlsberg (alkaline protease)	Delange et al 1968
B. subtilis NT02	neutral protease (thermosensitive ; extracellular)	Uehara et al. 1979
B. subtilis NT17	neutral protease (thermosensitive ; extracellular)	Uehara et al. 1979
B. stearothermophilus F1	alkaline protease	Rahman et al. 1994
B. stearothermophilus	neutral protease	Hardy et al. 1993
B. stearothermophilus NCIB 8924	heat -stable alkaline protease	Sidler and Zuber 1980
B. stearothermophilus NRRLB-3880	thermostable neutral protease	Sidler and Zuber 1980
B .brevis	serine protease	Kelebina et al. 1988
B. amyloliquefaciens	subtilisin metalloprotease	Vansantha et al 1984
B. alcalophilus subsp. *Halodurans* KP1239	serine proteinase alkaline serine protease alkaline protease	Takii et al. 1990
Bacillus sp. No 221	alkaline and heat-stable	Horikoshi 1971
Bacillus sp. GX 6638	protease	Durham et al. 1987

Bacillus sp. AH101	themostable alkaline protease	Takami et al. 1989
Bacillus sp. KSM-K16	alkaline proteases	Kobayashi et al. 1996
B. megaterium	metallo protease	Chaloupka et al. 1982
B. thermoruber	thermostable alkaline protease	Manachini et al 1988
B. thermoproteolyticus	thermostable protease	Ohta 1967
B. polymyxa	extra cellular neutral protease intracellular serine protease	Takekawa et al.1991

10. การใช้โปรติเอสในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

Aunstrup (1979) รายงานว่า มีการใช้โปรติเอสในอุตสาหกรรมอาหารเป็นเวลานานแล้ว เช่นการหมักเบียร์ โดยใช้โปรติเอสชนิด neutral metalloprotease จากแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* เติมลงในขั้นตอนของการหมัก wort ซึ่งเนส่วนผสมระหว่างมอลต์กับฮอพ เนื่องจากพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ชนิดนี้จะใกล้เคียงกับพีเอชของwort และ โปรติเอสชนิดนี้จะไม่ถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้งโปรติเอส (protease inhibitor) ซึ่งมีอยู่ในข้าวบาร์เลย์ ซึ่งจะสามารถยับยั้งซีรีนโปรติเอส (serine protease) โปรติเอสที่เติมลงไปจะช่วยกระตุ้นการทำงานของ เบตาอะไมเลสในข้าวบาร์เลย์ ทำให้การย่อยแป้งในส่วนผสมดีขึ้น และปริมาณโปรติเอสที่ใช้จะใช้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

การใช้โปรติเอสทำให้เกิดความนุ่มในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ เป็นการปรับปรุงคุณภาพของเนื้อสัตว์ในภูมิภาคแถบร้อน โดยการใช้สับปะรดสด วางบนเนื้อสัตว์หรือหมักด้วยยางมะละกอ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนที่ได้จากพืช โดยจะทำให้เกิดการย่อยบริเวณ connective tissue , collagen และ elastin โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส

ทางด้านความปลอดภัยในการใช้โปรติเอส Aunstrup (1979) รายงานว่า โปรติเอสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาตามธรรมชาติ และผลิตในทางการค้า ไม่เป็นพิษ สร้างโดยจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นอันตราย โปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้หรือผู้บริโภค เพราะยัง

ไม่มีรายงานว่าโปรติเอสของแบคทีเรียสามารถเป็นแอนติเจน จึงไม่มีปัญหาในการนำโปรติเอสไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

11. การทดสอบความชอบ (Hedonic test)

Watts และคณะ (1989) ระบุว่าการทดสอบความชอบถูกออกแบบขึ้นเพื่อวัดระดับความชอบผลิตภัณฑ์ สเกลเริ่มตั้งแต่ชอบมากสุดๆ ไปจนถึงเฉยๆและไม่ชอบสุดๆ โดยผู้ชิมให้คะแนนตามอันดับความชอบ ตั้งแต่ 1-7 หรือ 9 โดย 7 แทนการชอบมากที่สุด และ 1 แทนความไม่ชอบมากที่สุด เป็นต้น วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของคะแนนความชอบโดย ANOVA (Analysis of Variance) เพื่อหาสาเหตุที่ทำให้เกิดความแปรปรวนในค่าเฉลี่ยของคะแนนความชอบ/ไม่ชอบ สาเหตุที่ทำให้เกิดความแปรปรวนในค่าเฉลี่ยได้แก่สาเหตุอันเนื่องมาจากชนิดผลิตภัณฑ์ และสาเหตุอันเนื่องมาจากความแตกต่างด้านลักษณะนิสัย ความชอบส่วนบุคคล ฯลฯ ของผู้ชิมภายในกลุ่มผู้ชิม รายละเอียดของการคำนวณมีตามที่ระบุโดย Watts และคณะ (1989) ซึ่งคำนวนหาตัวเลขสำหรับค่าต่างๆดังนี้

- ตัววัดความแปรปรวนทั้งหมดในการทดสอบคือ total sum of squares SS(T)
- ตัววัดความแปรปรวนระหว่างชนิดของผลิตภัณฑ์เรียกว่า treatment sum of squares หรือ SS(Tr)
- ตัววัดความแปรปรวนระหว่างความชอบของผู้ชิมเรียกว่า panelist sum of squares SS(P)
- ตัววัดความแปรปรวนอันเนื่องมาจากความผิดพลาด ของการทดลอง(Error)เรียกว่า error sum of squares SS(E)
- คำนวณค่า mean squares (MS) สำหรับชนิดผลิตภัณฑ์ ผู้ชิมและความผิดพลาดของการทดลอง โดย หาร sum of squares SS(Tr) , SS(P) และ SS(E) ด้วย degrees of freedom
- อัตราส่วนระหว่าง $\frac{MS(Tr)}{MS(E)}$ หรือ $\frac{MS(P)}{MS(E)}$ เรียกว่า F ratio

เปรียบเทียบค่า F ratios ที่คำนวนได้กับค่า F ratios ที่แสดงในตาราง F Distribution ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 5 เปอร์เซ็นต์ ในภาคผนวก ง ถ้าค่า F ratio ที่คำนวนได้จากอัตราส่วน $\frac{MS(Tr)}{MS(E)}$ หรือ $\frac{MS(P)}{MS(E)}$ มีค่าสูงกว่า F ratio ในตารางเมื่อมีค่า degrees of freedom เดียวกัน แสดงว่าชนิดของผลิตภัณฑ์และความแตกต่างภายในตัวผู้ชิมเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความแปรปรวนในค่าเฉลี่ยของคะแนนความชอบ/ไม่ชอบ