นิพนธ์ต้นฉบับ

จุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้ที่หมักแบบดั้งเดิม

ประเสริฐ สันตินานาเลิศ[1] ชาคริยา ฉลาด[2] สิริพร ภูมะธน[3]
สุวรรณี แสงแก้ว[3] และ อำไพทิพย์ สุขหอม[4]

Abstract

Suntinanalert, P., Chalad, C., Phumathon, S., Sangkaew, S. and Sukhoom, A.
Microbiology of traditional fermented soybean curd (Sufu)
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(2) : 363-375

Microorganisms in traditional fermenting soybean curd (Sufu) were quantitated. Total microbial populations of bacteria, molds and yeasts were 1.6×10^1 to 4.0×10^5, 2.4×10^1 to 3.9×10^5 and 4.4×10^3 to 8.0×10^5 CFU/g, respectively. *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus* and *Bacillus* were dominantly found in koji inoculum. *Bacillus, Pediococcus* and *Saccharomyces* were mainly detected throughout the fermentation process. The other microorganisms were *Staphylococcus, Pichia* and *Debaryomyces*. All isolated microorganisms were halotolerant at salt concentrations between 5 to 20%. *Aspergillus, Penicillium* and *Bacillus* could produce potential proteolytic and amylolytic enzymes, implying that these microorganisms may play significant roles in the fermentation of tofu substrate.

The nutritional evaluation of fermenting Sufu had protein content between 16.09-21.91%, sugar 4.23-9.14%, lipid 7.20-12.76%, salt 10.06-11.26%, humidity 47.55-57.97%, ash 9.24-15.63%, fibre 0.10-0.16%, pH 4.99-5.75 and fermenting temperature at 29-31ºC. Additionally, aflatoxin B1 at the concentration of 10.8-22.8 ppb could be detected in the fermenting Sufu by ELISA methods whereas the final product of Sufu

Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkhla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[1]Ph.D.(Microbiology), รองศาสตราจารย์, [2]วท.บ.(ศึกษาศาสตร์), [3]นักศึกษาชั้นปีที่ 4 สาขาวิชาจุลชีววิทยา [4]Ph.D.(Microbiology), ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: prasert.s@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 12 กรกฎาคม 2547 รับลงพิมพ์ 9 กันยายน 2547

remained 18.4 ppb. Additionally, the commercial Sufu in the markets had aflatoxin in the range of 1.5-15.2 ppb which is in the control of FDA (U.S.A.) standard that aflatoxin in food and peanut products should be less than 20 ppb.

Key words : soybean curd, soybean, sufu, microbiology, fermented food

บทคัดย่อ

ประเสริฐ สันตินานาเลิศ ชาคริยา ฉลาด สิริพร ภูมะธน สุวรรณี แสงแก้ว และ อำไพทิพย์ สุขหอม

จุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้ที่หมักแบบดั้งเดิม

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(2) : 363-375

การตรวจทางจุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้ที่หมักแบบดั้งเดิม ตั้งแต่เริ่มหมักจนเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป พบว่ามีปริมาณแบคทีเรีย รา และยีสต์อยู่ระหว่าง 1.6×10^{1} ถึง 4.0×10^{5}, 2.4×10^{1} ถึง 3.9×10^{5} และ 4.4×10^{3} ถึง 8.0×10^{5} CFU/กรัม ตามลำดับ จุลินทรีย์ที่เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นบนโคจิ คือ *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus* และ *Bacillus* ส่วน *Bacillus, Pediococcus* และ *Saccharomyces* เป็นจุลินทรีย์ที่ตรวจพบตลอดการหมัก นอกจากนี้ยังตรวจพบจุลินทรีย์อื่นๆ อีก ได้แก่ *Staphylococcus, Pichia* และ *Debaryomyces* จุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้เป็นจุลินทรีย์ทนเกลือความเข้มข้นระหว่าง 5 ถึง 20% และมีบทบาทในการย่อยสลายเต้าหู้ในกระบวนการหมัก โดยเฉพาะ *Aspergillus, Penicillium* และ *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและแป้งได้ดี

จากการตรวจสอบคุณภาพทางอาหารของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิต พบว่ามีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 16.09-21.91% ปริมาณน้ำตาล 4.23-9.14% ปริมาณไขมัน 7.20-12.76% ปริมาณเกลือ 10.06-11.26% ปริมาณความชื้น 47.55-57.97% ปริมาณเถ้า 9.24-15.63% ปริมาณเส้นใย 0.10-0.16% ค่าความเป็นกรดด่าง 4.99-5.75 และอุณหภูมิระหว่างการหมัก 29-31°C ส่วนปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด B1 ที่ตรวจพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิตโดยวิธี ELISA อยู่ระหว่าง 10.8-22.8 ppb แต่เมื่อทำเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปมีอะฟลาทอกซินเหลือ 18.4 ppb ส่วนเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่วางขายตามท้องตลาด มีปริมาณอะฟลาทอกซินอยู่ระหว่าง 1.5-15.2 ppb. ซึ่งไม่เกินมาตรฐานขององค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (FDA) ที่กำหนดให้อาหารและผลิตภัณฑ์ถั่วมีอะฟลาทอกซินไม่เกิน 20 ppb.

เต้าหู้ยี้เป็นอาหารหมักพื้นเมืองของชาวจีน ที่ทำจากเต้าหู้ ซึ่งนิยมบริโภคกันทั่วไป โดยใช้เป็นเครื่องปรุงรสในอาหารประเภทสุกี้ เย็นตาโฟ หรือนำมาบริโภคร่วมกับข้าวต้ม เนื่องจากเป็นอาหารหมักที่ให้กลิ่น สี รสชาติที่ดี และยังให้คุณค่าทางโภชนาการ โดยเป็นแหล่งของสารอาหารโปรตีน คาร์โบไฮเดรท และไขมัน กระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้มีหลายวิธีซึ่งแตกต่างกันไปตามสูตรของแต่ละโรงงานเนื่องจากได้รับการถ่ายทอดมาในระบบครอบครัว ซึ่งพอสรุปขั้นตอนได้ดังนี้ ตัดเต้าหู้ให้ได้ขนาด 2.5×3×2 ซม. แช่ก้อนเต้าหู้ในสารละลายที่มีส่วนผสมของเกลือ (NaCl) 6% กับกรดซิตริก 2.5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปนึ่งหรืออบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อทำลายจุลินทรีย์ปนเปื้อน แล้ววางก้อนเต้าหู้บนกระด้งหรือถาดที่มีช่องเพื่อช่วยให้อากาศถ่ายเทได้สะดวกและเหมาะแก่การเกิดเส้นใยของราแล้วปล่อยให้เย็นจากนั้นใส่หัวเชื้อ *Actinomucor elegans* ลงบนผิวของเต้าหู้เพื่อทำเป็นโคจิ (koji) แล้วนำก้อนเต้าหู้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 3-7 วัน จนกระทั่งเต้าหู้มีเส้นใยของเชื้อราขึ้นฟู จากนั้นนำก้อนเต้าหู้ไปเรียงลงในถังหมักเป็นชั้นๆ สลับกับการโรยเกลือบนก้อนเต้าหู้ ซึ่งมีปริมาณเกลือประมาณ 6-12 % (หรือเติมเป็นน้ำเกลือความเข้มข้น 6-12%) ปิดฝาถังหมักแล้วบ่มไว้กลางแดดประมาณ 2-6 เดือน แต่บางโรงงานบ่มไว้ 9 เดือน แล้วแต่งกลิ่นและรสของเต้าหู้ยี้ตามต้องการ เช่น เติมไวน์ข้าวเจ้า ถั่วเหลืองบดหรือข้าวบด ส่วนในกรณี

ผลิตเต้าหู้ยี้แดง ให้ใส่เชื้อ *Monascus purpureus* ซึ่งให้สารสีแดงของ monascarubrin แล้วบ่มต่ออีก 40-60 วัน จากนั้นนำไปบรรจุขวดและผ่านการต้มหรือพาสเจอร์ไรส์ เพื่อฆ่าเชื้อก่อนนำไปจำหน่ายหรือบริโภค (ประเสริฐ, 2527; ลัดดาวัลย์, 2536)

เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในเต้าหู้ยี้ ได้แก่ เชื้อรา *Actinomucor elegans*, *Mucor sufu*, *M. hiemalis*, *M. silvaticus*, *M. subtilissimus* (Wai, 1968), *A. taiwanensis* (Chou *et al*., 1988) และ *Rhizopus* sp. (Han *et al*., 2001) ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบ ได้แก่ *Bacillus* และ *Micrococcus* (Han *et al*., 2001 และ Han *et al*., 2004)

ปัจจุบันยังมีโรงงานเป็นจำนวนมากที่ผลิตเต้าหู้ยี้แบบดั้งเดิมโดยใช้เชื้อราที่มีอยู่ในห้องบ่มเต้าหู้ และยังไม่มีรายงานของข้อมูลทางจุลชีววิทยาของกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ทั้งระบบและไม่ทราบถึงบทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการตรวจหาปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด การเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ กัน การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน ตลอดจนการตรวจสอบคุณภาพทางอาหารของเต้าหู้ยี้ และตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซินในกระบวนการผลิตรวมทั้งผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาด้านเทคโนโลยีในการผลิตเต้าหู้ยี้ให้มีความรวดเร็วและมีคุณภาพที่ดีต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานของบริษัท Difco (Difco Laboratories, Detriot, Michigan, U.S.A.) ได้แก่ Triptic Soy Agar (TSA), Nutrient Agar (NA), de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSA), Fluid Thioglycollate ที่เติม 2% agar (THIO), Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติมยาปฏิชีวนะ streptomycin 200 μg/มล. และอาหารสำหรับบ่งชี้เชื้อจุลินทรีย์ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกแบคทีเรียชอบเกลือคือ Halophilic Medium Agar (HMA) (Cote, 1989)

การเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้

เก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้ประมาณ 100 กรัม จากตุ่มหมักเดียวกันของโรงงานเต้าหู้ยี้ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ซึ่งทำเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน โรงงานนี้ผลิตเต้าหู้ยี้สีเหลืองโดยการหมักแบบดั้งเดิมนานถึง 9 เดือน โดยเก็บตัวอย่างทุกเดือนตั้งแต่เริ่มต้นการหมักบนโคจิจนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย รวม 11 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างลงในขวดฝาเกลียวปราศจากเชื้อ แล้วนำมาตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทันที และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4ºC เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางอาหารต่อไป

การตรวจนับจุลินทรีย์

ตรวจนับจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรีย รา และยีสต์จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ โดยชั่งเต้าหู้ยี้ 25 กรัม ใส่ใน 6% เกลือ (NaCl) 225 มล. ทำให้ตัวอย่างเจือจางครั้งละ 10 เท่าในน้ำเกลือ 6% แล้วกระจายเชื้อลงบนอาหารแข็ง TSA, MRSA ที่เติม 0.04% bromcresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ เพื่อตรวจหาแบคทีเรียแลคติกซึ่งเห็นเป็นสีเหลืองรอบโคโลนีบน MRSA และ THIO ที่เติมเกลือความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% บ่มที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในกรณีของอาหารเลี้ยงเชื้อ THIO บ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใน anaerobic jar ส่วนอาหาร PDA เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราและยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 7 วันและ 2 วัน ตามลำดับ และสำหรับอาหาร HMA ที่เติมเกลือความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% บ่มที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ โดยดูผลทุกวัน แล้วคัดเลือกและแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์บนอาหารที่เหมาะสม โดยดูจากลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนี เก็บเชื้อใน agar slant ที่มีพาราฟินเหลวปิดทับที่ 4ºC สำหรับการศึกษาต่อไป

การบ่งชี้สกุลของจุลินทรีย์

การบ่งชี้สกุลของแบคทีเรีย โดยการทดสอบทางชีวเคมีตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Krieg, 1984) โดยการนำเชื้อบริสุทธิ์มาทดสอบทางกายภาพและทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบการย้อมสี

กรัม, การสร้างสปอร์, การเคลื่อนที่, การสร้างเอนไซม์ catalase, oxidase, lysine decarboxylase, การเจริญในสภาพไม่มีออกซิเจน, การทดสอบ indole, methyl red (MR), Voges-Proskauer (VP), การใช้ citrate, urea, triple sugar iron (TSI), ความสามารถในการใช้น้ำตาลได้แก่ กลูโคส, ซูโครส, ฟรุคโตส, มอลโตส, แมนนิทอล, แลคโตส และกาแลคโตส

ส่วนการบ่งชี้สกุลของเชื้อราโดยการทดสอบทางสัณฐานวิทยาทางราตาม Biology of Fungi (Rose, 1979) โดยศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะเส้นใยเกาะแน่นหรือฟูกระจายเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของเส้นใย สีของสปอร์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการย้อมด้วยสี lacto-phenol cotton blue เพื่อดูลักษณะเส้นใยมีผนังกั้นหรือไม่ ทึบหรือใส ลักษณะสปอร์แบบไม่อาศัยเพศเป็นแบบ conidia หรือ sporangiospore รวมทั้งลักษณะก้านชู (sporangiophore) ส่วนการบ่งชี้สกุลของเชื้อยีสต์ โดยการทดสอบทางชีววิทยาตาม The Yeast, Vol.1., The Biology of Yeast (Rose and Harrison, 1969) ศึกษาลักษณะ ขนาด สีโคโลนี และดูลักษณะรูปร่างของยีสต์ การสร้างเส้นใยเป็นแบบ true mycelium หรือ pseudo-mycelium สังเกต ascospore การสร้างฝ้า ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ และความสามารถในการใช้เกลือไนเตรต

การทดสอบการเติบโตของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้บนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ทดสอบการเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่เติมเกลือความเข้มข้น 0%, 5%, 10%, 15% และ 20% บ่มที่อุณหภูมิ 35ºC ตรวจดูผลทุกวันเป็นเวลา 3 วัน สำหรับราและยีสต์ ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติมเกลือความเข้มข้น 0%, 5%, 10%, 15% และ 20% บ่มที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ โดยดูผลการเติบโตทุกวัน

การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน

ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันของแบคทีเรียที่แยกได้ โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ ป้ายเชื้อแต่ละสายพันธุ์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA + 1%skim milk, NA + 1%corn starch และ NA + 1% tributyrin นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับราและยีสต์ ให้ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อป้ายเชื้อแต่ละสายพันธุ์ลงบนอาหาร Glucose medium ซึ่งในปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 0.5 กรัม, peptone 10.0 กรัม, agar 15.0 กรัม และ glucose 10 กรัม แต่เติมสารต่อไปนี้แทนกลูโคส ในกรณีทดสอบการย่อยโปรตีน แป้งและไขมัน โดยเติม 1%skim milk, 1%corn starch หรือ 1%tributyrin ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันเห็นเป็นวงใสรอบโคโลนี วัดความสามารถในการย่อยสลายโดยประมาณ เป็นดีกรีของการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ซึ่งเท่ากับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มม.) หารด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มม.)

การวิเคราะห์คุณภาพทางอาหารของเต้าหู้ยี้

การตรวจหาคุณภาพทางอาหารของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย ได้แก่ การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 1990) การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้ phenol sulfuric method (Chaplin, 1986) การวิเคราะห์หาปริมาณไขมันโดยใช้ soxhlet method (AOAC, 1990) การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือด้วยวิธี silver nitrate (AOAC, 1990) การวิเคราะห์หาความชื้นโดยใช้ hot air oven method (AOAC, 1990) การวิเคราะห์หาเถ้าโดยใช้ direct method (AOAC,1990) การวิเคราะห์หาเส้นใยโดยใช้ extraction unit method (AOAC, 1990) และการวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดด่างโดยใช้เครื่อง pH meter

การตรวจหาอะฟลาทอกซิน B1 (Aflatoxin B1)

การตรวจหาอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิตและเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป 11 ตัวอย่าง ที่วางขายในตลาดสดและห้างสรรพสินค้าใน อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา โดยใช้ Aflatoxin B_1 ELISA Test Kit และทำตามขั้นตอนที่

แนบมากับชุดทดสอบ (กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร, 2543) ดังนี้ นำตัวอย่างที่บดละเอียดปริมาณ 20 กรัม แล้วสกัดด้วย 100 มล. 70% methanol นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบ/นาที 20 นาที จากนั้นวางตัวอย่างทิ้งไว้ 5-10 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 เก็บส่วนใสในขวดที่มีฝาปิดสนิท หุ้มด้วยฟอยล์เพื่อป้องกันแสงสว่างแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20ºC ก่อนจะนำมาวิเคราะห์ต้องเจือจางด้วย washing buffer ให้เป็น 1:20 (สารสกัด 1 มล. ต่อ buffer 3 มล.) นำสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยหยด 50 µl ของสารพิษมาตรฐาน 5 ความเข้มข้นคือ 0, 10, 20, 40 และ 100 ppb. (part per billion) ลงในหลุม micro titer plate ความเข้มข้นละ 1 หลุม และหยด 50 µl ของสารสกัดตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงในหลุมที่เหลือ หยด 50 µl ของ enzyme conjugate ที่เจือจางแล้วตามลงไปทุกหลุม เขย่าเบาๆ 4-5 ครั้ง เพื่อให้เข้ากัน หุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิ 37ºC ในที่มืดนาน 30 นาที คว่ำ plate เคาะเอาสารในหลุมทิ้งแล้วล้างด้วย washing buffer 3-4 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งทิ้งไว้ 1-3 นาที หยด substrate A 100 µl ลงในหลุม หุ้มด้วยกระดาษฟอยล์แล้วบ่มในที่มืดนาน 10-15 นาที จะเกิดสีฟ้าในหลุมที่ไม่มีสารพิษหรือมีน้อย ส่วนหลุมที่มีสารพิษสีจะจางหรือใสตามความเข้มข้นของสารพิษที่ตรวจพบ แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติม stopping solution 100 µl ซึ่งจะทำให้สีที่เกิดขึ้นเป็นสีเหลือง นำมาอ่านผลด้วยเครื่อง Micro Elisa Plate Reader ELx808 (Bio-Tex Instruments, Inc., U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 630 nm สำหรับสีฟ้า และ 450 nm สำหรับสีเหลือง นำค่า O.D. ที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารอะฟลาทอกซิน นำค่าที่ได้มาคูณด้วย dilution factor เป็นความเข้มข้นสารอะฟลาทอกซิน ในหน่วย ppb

ผลการทดลอง

ปริมาณของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเต้าหู้ยี้

จุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด คือ TSA, MRSA, THIO, PDA และ HMA พบว่าแบคทีเรียที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA+0% เกลือ (Figure 1) มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นที่

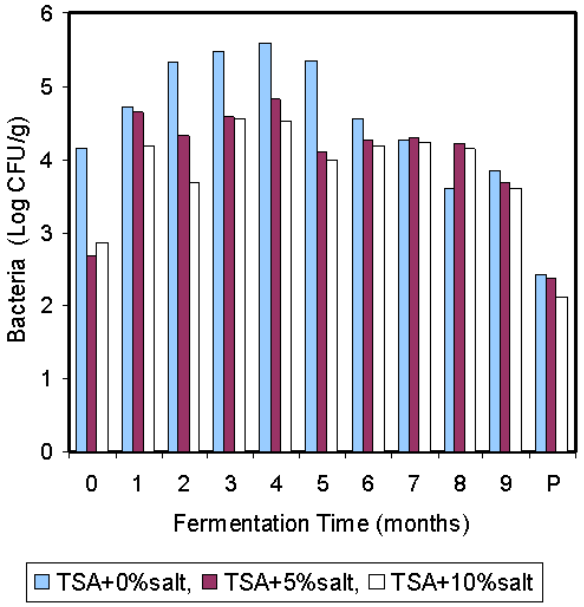

Figure 1. Growth of bacteria isolated from fermenting Sufu on TSA added with 0%, 5% and 10% salt at 35ºC for 24 h. (P = final product)

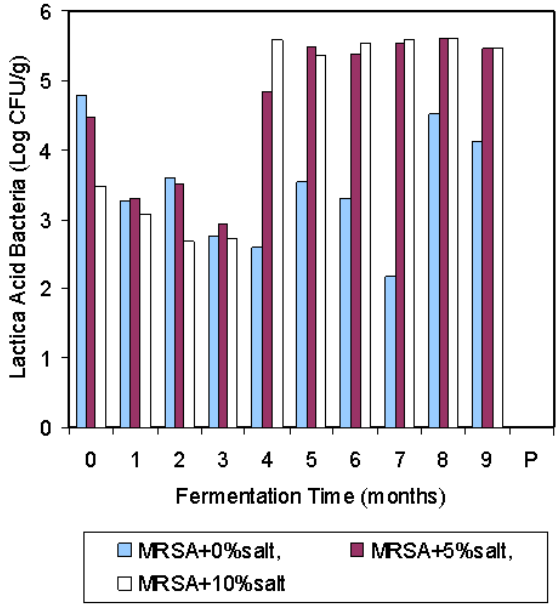

Figure 2. Growth of lactic acid bacteria isolated from fermenting Sufu on MRSA added with 0%, 5% and 10% salt at 35ºC for 24 h. (P = final product)

แยกจากโคจิ (เดือน 0) เท่ากับ 1.4×10^4 CFU/กรัม และเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อหมักไปได้ 4 เดือน โดยมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 3.9×10^5 CFU/กรัม จากนั้นจำนวนเชื้อลดลงจนถึงสิ้นสุดการหมักในเดือนที่ 9 มีจำนวน 6.8×10^3 CFU/กรัม และจะเห็นได้ว่าจำนวนเชื้อลดน้อยลง 9 และ 10 เท่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือความเข้มข้น 5% และ 10% ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (P) พบว่าจำนวนแบคทีเรียลดลงประมาณ 26 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุ 9 เดือน ทั้งนี้เนื่องมาจากผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีขั้นตอนการผลิตโดยนำเต้าหู้ยี้จากการหมักใส่ขวดแก้วแล้วใส่น้ำต้มกากซึ่งประกอบด้วยกากเต้าหู้ยี้และน้ำเกลือในปริมาณเท่ากัน จากนั้นนำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที ซึ่งเป็นสาเหตุให้แบคทีเรียมีจำนวนลดลงโดยมีจำนวนเชื้อ 2.6×10^2, 2.4×10^2 และ 1.3×10^2 CFU/กรัม ที่เกลือความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% ตามลำดับ

ส่วนแบคทีเรียแลคติกที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRSA (Figure 2) พบว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้น 0%, 5% และ 10% มีแบคทีเรียเริ่มต้น 6.0×10^4, 3.0×10^4 และ 3.0×10^3 CFU/กรัม ตามลำดับ และแบคทีเรียลดลงประมาณ 10 เท่าในเดือนที่ 2-3 จากนั้นแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 4.0×10^5 CFU/กรัม ในเดือนที่ 8 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้น 5% และ 10% แต่ไม่พบเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป

เชื้อแบคทีเรียที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ THIO (Figure 3) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็น facultative anaerobe และไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่เป็น anaerobe ส่วนจำนวนเชื้อที่พบมากที่สุดในตัวอย่างเต้าหู้ยี้อายุ 1-2 เดือน และจำนวนเชื้อลดลงเมื่อการหมักนานขึ้น

จากการตรวจนับเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Figure 4) พบว่ามีปริมาณเชื้อราเริ่มต้นบนโคจิ (เดือน 0) เท่ากับ 5.2×10^4 CFU/กรัม บนอาหารที่มีเกลือ 0% และมีปริมาณมากที่สุด 3.9×10^5 CFU/กรัม เมื่อหมักไปได้ 1 เดือน จากนั้นปริมาณเชื้อราลดลงเหลือ 2.4×10^1 CFU/กรัม ในเดือนที่ 2 ของการหมัก และไม่พบเชื้อราหลังอายุการหมัก 2 เดือน รวมทั้งผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อรามีการเติบโตในช่วง 15 วันแรกของการเตรียมเต้าหู้ และมีจำนวนลดลงจนตรวจไม่พบเมื่อนำโคจิมาเติมเกลือความเข้มข้น 10% ลงในกระบวนการ

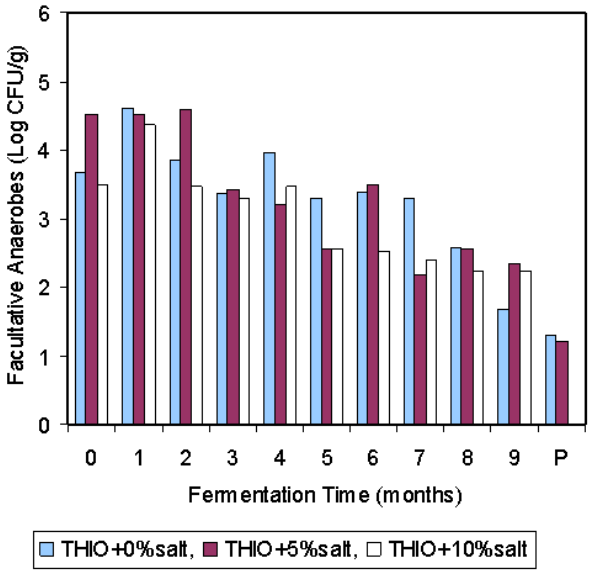

Figure 3. Growth of facultative anaerobic bacteria isolated from fermenting Sufu on THIO added with 0%, 5% and 10% salt at 35ºC for 24 h. (P = final product)

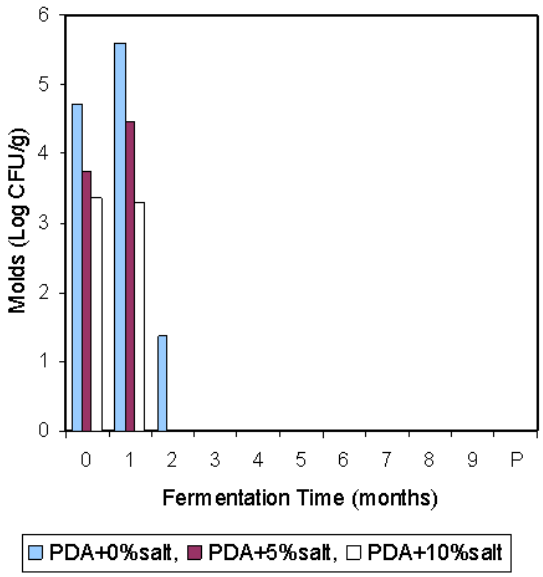

Figure 4. Growth of molds isolated from fermenting Sufu on PDA added with 0%, 5% and 10% salt at 30ºC for 1 week. (P = final product)

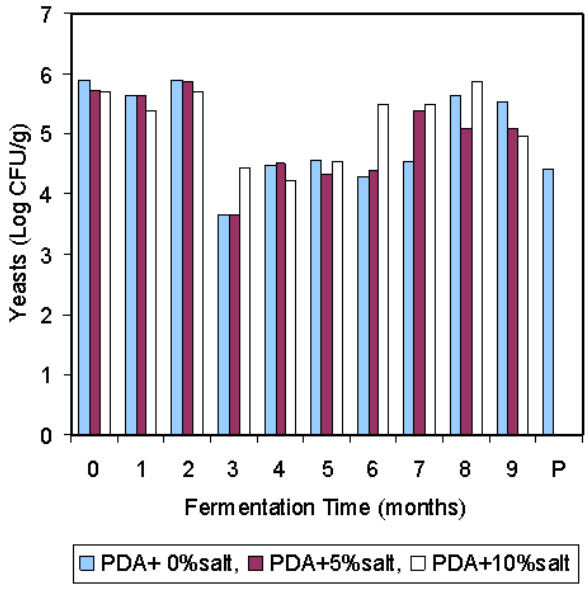

Figure 5. Growth of yeasts isolated from fermenting Sufu on PDA added with 0%, 5% and 10% saltl at 30ºC for 48 h. (P = final product)

หมัก นอกจากนี้เชื้อราที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือมีจำนวนน้อยกว่าบนอาหารที่ไม่เติบเกลือถึง 195 เท่า ส่วนเชื้อยีสต์ที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Figure 5) มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7.6×10^5 CFU/กรัม บนอาหารที่มีเกลือ 0% และยังคงเติบโตจนมีปริมาณมากที่สุด 8.0×10^5 CFU/กรัม ในเดือนที่ 2 จากนั้นจำนวนเชื้อลดลงเพียงเล็กน้อย แล้วค่อยๆ เพิ่มจำนวนอีกครั้งและตรวจพบยีสต์ตลอดกระบวนการหมัก ส่วนเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือ โดยเฉพาะ extremely halophilic bacteria นั้นตรวจไม่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HMA ซึ่งอาจเนื่องจากปริมาณเกลือในเต้าหู้ยี้มีเพียงประมาณ 10% และสภาวะที่เป็นกรด (pH 5.1-5.7) ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเติบโตของแบคทีเรียดังกล่าว

การบ่งชี้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ทำโดยคัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีที่เหมือนกัน ซึ่งมีทั้งหมด 20 สายพันธุ์ จำแนกเป็นแบคทีเรีย 14 สายพันธุ์ (PS901-PS914) เชื้อรา 3 สายพันธุ์ (PS915-PS917) และเชื้อยีสต์ 3 สายพันธุ์ (PS918-PS920) ผลการบ่งชี้สกุลของจุลินทรีย์ (Table 1 และ 2) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PS901-PS912 เป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ซึ่งสามารถตรวจพบทุกตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการหมัก แบคทีเรียสายพันธุ์ PS913 เป็น *Staphylococcus* ตรวจพบในตัวอย่างช่วง 2 เดือนแรก และแบคทีเรียสายพันธุ์ PS914 เป็น *Pediococcus* ซึ่งตรวจพบตลอดการหมัก ยกเว้นผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (P) ส่วนเชื้อรา ตรวจพบ 3 สายพันธุ์ เป็นสกุล *Aspergillus* PS915 และ *Rhizopus* PS917 ซึ่งตรวจพบในช่วง 2 เดือนแรกของการหมัก ส่วน *Penicillium* PS916 ตรวจพบในช่วงเดือนแรก ส่วนยีสต์ตรวจพบ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สกุล *Saccharomyces* PS919 ซึ่งตรวจพบในทุกตัวอย่างตลอดกระบวนการหมัก ส่วนยีสต์สกุล *Pichia* PS919 และ *Debaryomyces* PS920 ซึ่งตรวจพบในตัวอย่างช่วง 1 เดือน และ 5 เดือนแรกของการหมัก ตามลำดับ

การเติบโตของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

จุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ (100%) เป็นจุลินทรีย์ทนเกลือ (halotolerant) (Table 2) จำแนกเป็นจุลินทรีย์ทนเกลือความเข้มข้น 5% จำนวน 3 สายพันธุ์ (*Bacillus* PS901, PS906 และ PS912) คิดเป็น 15%, จุลินทรีย์ทนเกลือ

Table 1. Microorganisms isolated from fermenting Sufu.

Strains	Fermentation time (months) *										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	P
Bacillus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Staphylococcus	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pediococcus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Anaerobic bacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Halophilic bacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aspergillus	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillium	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhizopus	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharomyces	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pichia	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Debaryomyces	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

*** + = detected, - = not detected, P = final product**

Table 2. Growth of microorganisms strains isolated from fermenting Sufu on selective media added with different salt concentrations.

Strains	Growth on selective media added with salt*				
	0%	5%	10%	15%	20%
Bacillus PS901	+++	++	-	-	-
Bacillus PS902	+++	+++	++	+	-
Bacillus PS903	+++	+++	++	+	-
Bacillus PS904	+++	+++	+	-	-
Bacillus PS905	+++	++	+	-	-
Bacillus PS906	++	++	-	-	-
Bacillus PS907	+++	++	+	-	-
Bacillus PS908	+++	+++	++	-	-
Bacillus PS909	+++	+++	+	-	-
Bacillus PS910	+++	++	+	-	-
Bacillus PS911	++	+++	+	-	-
Bacillus PS912	+++	++	-	-	-
Staphylococcus PS913	+++	+++	++	+	-
Pediococcus PS914	+++	++	++	-	-
Aspergillus PS915	+++	++	+	-	-
Penicillium PS916	+++	++	+	+	-
Rhizopus PS917	+++	++	+	+	-
Saccharomyces PS918	+++	+++	+++	++	+
Pichia PS919	+++	+++	++	+	-
Debaryomyces PS920	+++	+++	+++	++	+

*** +, ++ and +++ = Degree of growth, - = No growth**

Table 3. Hydrolysis of protein, starch and lipid by microorganisms isolated from fermenting Sufu.

Strains	Degree of hydrolysis *		
	Protease	Amylase	Lipase
Bacillus PS901	1.94	-	2.48
Bacillus PS902	2.40	-	1.34
Bacillus PS903	-	2.63	2.23
Bacillus PS904	1.09	1.10	1.91
Bacillus PS905	2.67	-	1.59
Bacillus PS906	2.76	1.35	3.38
Bacillus PS907	1.62	1.21	1.78
Bacillus PS908	2.01	1.29	2.14
Bacillus PS909	1.86	1.27	1.91
Bacillus PS910	2.17	1.24	2.92
Bacillus PS911	1.15	1.43	3.20
Bacillus PS912	2.87	-	1.38
Staphylococcus PS913	-	-	1.80
Pediococcus PS914	-	1.49	-
Aspergillus PS915	1.82	1.66	-
Penicillium PS916	1.29	1.90	-
Rhizopus PS917	-	-	1.16
Saccharomyces PS918	-	-	2.87
Pichia PS919	-	-	2.52
Debaryomyces PS920	-	-	1.43

*** Degree of hydrolysis = diameter of clear zone (mm) / diameter of colony (mm)**

ความเข้มข้น 10% จำนวน 9 สายพันธุ์ (*Bacillus* PS904, PS905, PS907, PS908, PS909, PS910, PS911, *Pediococcus, Aspergillus*) คิดเป็น 45% จุลินทรีย์ทนเกลือความเข้มข้น 15% จำนวน 6 สายพันธุ์ (*Bacillus* PS902 และ PS903, *Staphylococcus, Penicillium, Rhizopus* และ *Pichia*) คิดเป็น 30% ส่วนจุลินทรีย์ทนเกลือความเข้มข้น 20% มีจำนวน 2 สายพันธุ์ (Saccharomyces และ *Debaryomyces*) คิดเป็น 10%

การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน ของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้

การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน โดยจุลินทรีย์สกุลต่างๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ (Table 3) พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน ได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS904, PS906, PS907, PS908, PS909, PS910 และ PS911 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและแป้ง ได้แก่ *Aspergillus* และ *Penicillium* จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและไขมัน ได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS901, PS902, PS905 และ PS912 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง และไขมัน ได้แก่ *Bacillus* PS903 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้อย่างเดียว ได้แก่ *Pediococcus* และจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันได้อย่างเดียว ได้แก่ *Staphylococcus, Rhizopus, Saccharomyces, Pichia* และ *Debaryomyces* จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่สุด ได้แก่ *Bacillus* PS912 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีที่สุด ได้แก่ *Bacillus* PS903 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันได้ดีที่สุด ได้แก่ *Bacillus* PS906 และจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันได้ดีที่สุด ได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ PS906

Table 4. Properties of fermenting Sufu and the final product (P).

Properties	Fermentation time (months)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	P
Protein (%)	20.01	21.07	21.72	21.61	21.57	21.78	21.71	20.40	21.91	21.12	16.09
Carbohydrate (%)	5.22	7.16	6.12	5.12	6.28	4.29	4.23	5.20	5.32	6.22	9.14
Lipid (%)	12.76	9.57	10.55	9.86	9.95	10.88	11.71	11.62	12.35	11.78	7.20
Salt (%)	10.13	10.89	10.92	11.18	11.02	11.13	11.03	11.17	11.24	11.26	10.06
Humidity (%)	47.68	49.47	47.55	50.44	50.47	50.57	50.11	51.35	47.88	48.35	57.97
Ash (%)	15.63	13.23	15.06	13.97	13.15	13.48	13.24	12.43	13.54	13.53	9.24
Fibre (%)	0.13	0.15	0.14	0.12	0.10	0.13	0.16	0.15	0.15	0.11	0.12
pH	5.21	5.11	5.10	5.48	5.33	5.40	5.41	5.75	5.54	5.11	4.99
Temperature (ºC)	29	30	30	32	30	30	31	30	30	31	30

คุณภาพทางอาหารของตัวอย่างเต้าหู้ยี้

จากการตรวจสอบคุณภาพทางอาหารของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ โดยตรวจหาปริมาณโปรตีน น้ำตาล ไขมัน เกลือ ความชื้น เถ้า เส้นใย ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิ (Table 4) ปรากฏว่าปริมาณคุณภาพทางอาหารไม่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก โดยมีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 20.01-21.91% ปริมาณน้ำตาลอยู่ระหว่าง 4.23-7.16% ปริมาณไขมันอยู่ระหว่าง 9.57-12.76% ปริมาณเกลืออยู่ระหว่าง 10.13-11.26% ปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 47.55-51.35% ปริมาณเถ้าอยู่ระหว่าง 12.43-15.63% ปริมาณเส้นใยอยู่ระหว่าง 0.10-0.16% ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 4.99-5.75 และอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 29-31ºC ส่วนผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีปริมาณโปรตีน 16.09%, น้ำตาล 9.14%, ไขมัน 7.20%, เกลือ 10.06%, ความชื้น 57.97%, เถ้า 9.24%, เส้นใย 0.12% ค่าความเป็นกรดด่าง 4.99 และอุณหภูมิ 30ºC

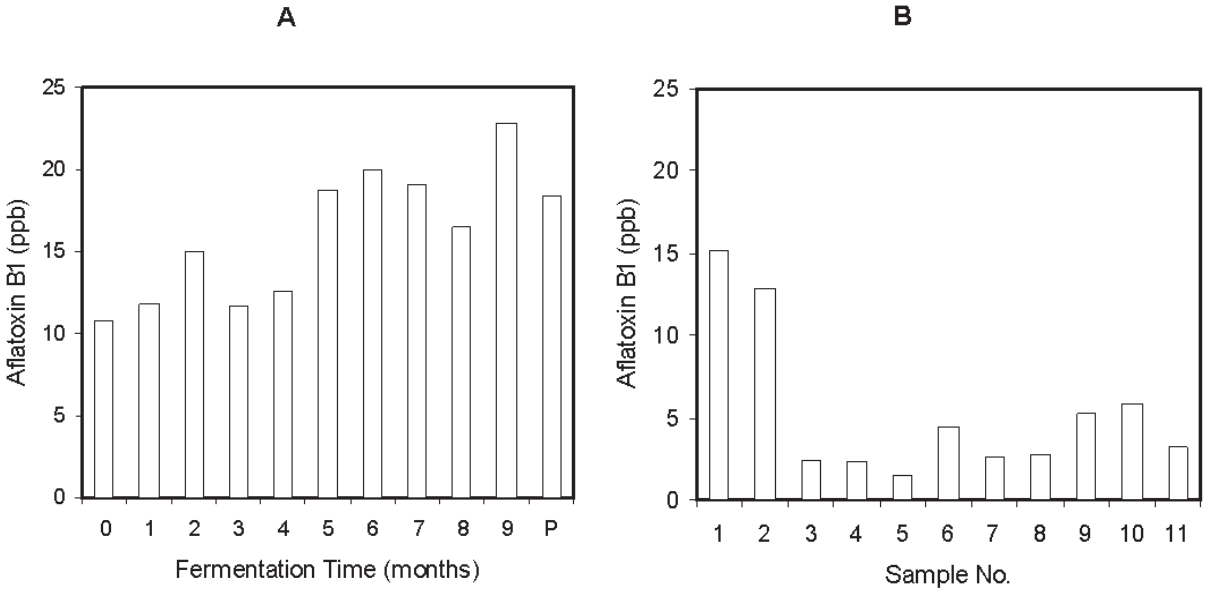

Figure 6. Aflatoxin B1 in (A) fermenting Sufu (P = final product) and (B) commercial Sufu of 11 samples collected from supermarkets in Hat Yai.

ปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ที่ตรวจพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้

จากการตรวจสอบหาปริมาณสารอะฟลาทอกซิน B1 ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิต (Figure 6) พบว่า มีปริมาณอะฟลาทอกซินเริ่มต้นในตัวอย่างแรกของการหมักเท่ากับ 10.8 ppb และค่อยๆ เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า เมื่อหมักไปได้ 6 เดือน และมีปริมาณสูงสุด 22.8 ppb ในเดือนที่ 9 ของการหมัก ส่วนในผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีปริมาณอะฟลาทอกซิน 18.4 ppb นอกจากนี้ยังได้ตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปอีก 11 ตัวอย่างที่วางขายในตลาดสดและห้างสรรพสินค้าใน อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา พบว่ามีปริมาณอะฟลาทอกซินอยู่ระหว่าง 1.5-15.2 ppb.

วิจารณ์

จุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ แบคทีเรีย: *Bacillus, Staphylococcus, Pediococcus*, เชื้อรา: *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus*, และยีสต์: *Saccharomyces, Pichia* และ *Debaryomyces* จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในทุกตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการหมักคือ *Bacillus, Pediococcus* และ *Saccharomyces* ส่วนจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นตรวจพบในช่วงอายุ 1-2 เดือนของการหมัก ยกเว้น *Debaryomyces* ซึ่งตรวจพบหลังจากหมักไปได้ 1 เดือน และยังคงมีอยู่ถึง 5 เดือนของการหมัก เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มาจากวัตถุดิบที่ทำเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นบนโคจิ ได้แก่ เต้าหู้ซึ่งตรวจพบ *Bacillus, Aspergillus* และ *Rhizopus* ผ้าขาวที่ใช้ปิดถาดเต้าหู้ตรวจพบ *Bacillus, Aspergillus* และ *Penicillium* และเกลือที่ใช้ ตรวจพบ *Bacillus* (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ส่วนเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป พบแต่ *Bacillus* และ *Saccharomyces* ซึ่งสอดคล้องกับ สิริพร (2540) ที่รายงานว่าจากการสุ่มเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้อย่างอิสระของโรงงานเดียวกัน โดยเก็บจากโอ่งหมักต่างๆ ที่มีอายุตั้งแต่ 1-8 เดือน พบเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bacillus, Staphylococcus, Aspergillus, Penicillium, Syncephalastrum, Saccharomyces, Pichia* และ *Debaryomyces* และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสุวรรณี (2543) ที่รายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่ซื้อตามท้องตลาด ในเขตจังหวัดสงขลาเป็นเชื้อ *Bacillus* และ *Saccharomyces* ในทุกตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดยังคงเหลือจากกระบวนการหมัก แม้ว่ามีการต้มผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้ายก่อนวางจำหน่าย อย่างไรก็ตามเชื้อราที่แยกได้ในการทดลองนี้แตกต่างจากรายงานอื่นที่ตรวจพบเชื้อรา *Actinomucor* spp. (Wai, 1968; Chou *et al*., 1988) และ *Mucor* spp. (Wai, 1968) นอกจากนี้ Han และคณะ (2004) ได้ตรวจพบแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ และบ่งชี้เป็นสายพันธุ์ *B. subtilis* และ *B. cereus* โดยมีปริมาณของ *B. cereus* น้อยกว่า 10^3 CFU/กรัม ซึ่งไม่เกินกำหนดขององค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) ที่ได้กำหนดผลิตภัณฑ์อาหารเป็นพิษที่เกิดจากการปนเปื้อนของ *B. cereus* มีปริมาณเชื้อมากกว่า 10^6 CFU/กรัม (http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html, July 12, 2004)

จากการวิเคราะห์ปริมาณเกลือที่มีในตัวอย่างเต้าหู้ยี้พบว่ามีเกลือความเข้มข้น 10.06% ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทนเกลือสามารถเติบโตและยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้และยังช่วยยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (Han *et al*., 2001) นอกจากนี้ Han และคณะ (2003) ยังพบว่าการหมักเต้าหู้ยี้แบบธรรมชาติต้องใช้เวลาในการหมักนานกว่า 6 เดือน และใส่ปริมาณเกลือสูงถึง 14% แต่ถ้าลดปริมาณเกลือให้ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5% จะทำให้ผลผลิตส่งกลิ่นและเน่าเสีย หลังจากหมักไปได้ 20 วัน และมี pH ลดลงต่ำกว่า 4.6

เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้โดยเฉพาะ *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน รวมทั้ง *Aspergillus* และ *Penicillium* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและแป้งได้ดี นอกจากนี้ *Rhizopus* และยีสต์ สามารถย่อยไขมันได้ดีในระยะแรกของการหมัก เชื้อดังกล่าวน่าจะมีบทบาทขั้นแรกในการย่อยสับสเตรท (เต้าหู้) ส่วน *Saccharomyces* และยีสต์สายพันธุ์อื่น รวมทั้ง *Pediococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติก น่าจะมีบทบาทในการทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติของเต้าหู้ยี้ เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตเป็นแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ ซึ่งจากการสำรวจเต้าหู้ยี้

สำเร็จรูปที่วางจำหน่ายในประเทศจีน จำนวน 23 ตัวอย่าง โดย Han และคณะ (2001) พบว่าเต้าหู้ยี้มีปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ระหว่าง 1.1-6.3% นอกจากนี้ยังสามารถแต่งกลิ่นและรสของผลิตภัณฑ์โดยเติมแอลกอฮอล์ในน้ำเกลือ เนื่องจากแอลกอฮอล์จะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเกิดเป็นเอสเตอร์ที่มีกลิ่นหอมและยังช่วยยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ อีกด้วย

การตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดการผลิต พบว่าในระหว่างการหมัก ปริมาณโปรตีน น้ำตาล และไขมันมีค่าค่อนข้างคงที่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์เป็นจุลินทรีย์ทนเกลือ จึงมีการเติบโตได้น้อยลงเมื่อปริมาณเกลือสูงขึ้น นอกจากนี้ปริมาณอาหารที่แสดงเป็นค่ารวมของเต้าหู้ยี้ และเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหาร แต่เมื่อเป็นผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป ปริมาณโปรตีนและไขมันมีค่าลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีการเติมน้ำต้มกากเต้าหู้ยี้ อีกประการหนึ่งปริมาณเกลือของผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปจากการทดลองนี้มีปริมาณ 10.06% ซึ่งสูงกว่ารายงานของ ประเสริฐ (2527) ที่ว่าปริมาณเกลือในเต้าหู้ยี้ มีค่า 6.72% ซึ่งทำให้มีผลในด้านรสชาติโดยทำให้ผลิตภัณฑ์มีความเค็มมากกว่าปรกติ อย่างไรก็ตามคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปจากการทดลองนี้มีค่าปริมาณโปรตีน และไขมันมากกว่าเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปยี่ห้ออื่นๆ (11 ยี่ห้อ) ซึ่งสำรวจโดย สุวรรณี (2543) โดยพบว่าเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปยี่ห้ออื่นมีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 9.9-13.3% ปริมาณน้ำตาล 4.0-20.7% ปริมาณไขมัน 2.4-7.2% ปริมาณเกลือ 4.1-16.2% ปริมาณความชื้น 52.0-72.8% ปริมาณเถ้า 5.9-18.8% และปริมาณเส้นใย 0.1-0.6% และมีคุณค่าทางอาหารมากกว่าที่ได้เคยมีรายงานมาแล้วคือมีปริมาณโปรตีน 10.04% ไขมัน 3.51% เกลือ 6.72% ความชื้น 70.36% เถ้า 9.47% และเส้นใย 0.35% (ประเสริฐ, 2527)

จากการตรวจสอบหาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตลอดกระบวนการหมักโดยวิธี Aflatoxin B_1 ELISA Test Kit ซึ่งเป็นวิธีการที่ไวต่อการตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซินในระดับไมโครกรัม (1 ppb = 1 μg/l หรือ μg/kg) แต่วิธีการนี้สามารถตรวจหาอะฟลาทอกซินได้เพียงชนิดเดียวคือ ชนิด B1 เนื่องจาก B1 เป็นสารพิษอะฟลาทอกซินที่พบได้บ่อยและมีระดับความเป็นพิษรุนแรงที่สุด และจากการศึกษาพบว่า เต้าหู้ยี้ในระหว่างการหมักมีปริมาณอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วง 10.8-22.8 ppb แต่เมื่อทำเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป มีปริมาณอะฟลาทอกซินเหลือ 18.4 ppb และสอดคล้องกับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่วางขายทั่วไป พบว่ามีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินอยู่ระหว่าง 1.5-15.2 ppb แต่อย่างไรก็ตามปริมาณอะฟลาทอกซินดังกล่าวยังคงไม่เกินมาตรฐานที่ FDA กำหนดไว้ โดย FDA กำหนดให้อาหารและผลิตภัณฑ์ถั่วมีอะฟลาทอกซินได้ไม่เกิน 20 ppb (http://www.fda.gov/ora/compliance_ref/cpg/cpgfod/cpg570-375.html, July 12, 2004) การพบอะฟลาทอกซินในเต้าหู้ยี้อาจเนื่องมาจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเป็นถั่วเหลืองซึ่งอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อราในแหล่งธรรมชาติและระหว่างการเก็บ นอกจากนี้อะฟลาทอกซินยังอาจผลิตจากเชื้อราที่เป็นเชื้อเริ่มต้นในระหว่างการหมักอีกด้วย

ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่มีอะฟลาทอกซิน ถ้ามีการบริโภคอาหารชนิดเดิมอยู่เสมอจะเกิดการสะสมของอะฟลาทอกซินในร่างกาย และก่อให้เกิดโรคมะเร็งตับ ปอด ไต และลำไส้ใหญ่ โดยมีตับเป็นมีอวัยวะเป้าหมายที่ไวต่ออะฟลาทอกซิน แต่โดยปรกติแล้วปริมาณต่ำๆ ของสารพิษนี้ ร่างกายสามารถกำจัดออกได้ และควรบริโภคอาหารให้หลากหลายชนิด ไม่ควรบริโภคอาหารชนิดเดียวกันซ้ำๆ อย่างต่อเนื่อง (แก้ว, 2526) อารันต์ (2528) ได้รายงานวิธีลดปริมาณอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง โดยใส่สารละลายเกลือให้มีความเข้มข้น 10% แล้วนำไปทำให้ต้มที่อุณหภูมิ 90ºC เป็นเวลา 30 นาที พบว่าสามารถลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินระหว่าง 80-85% ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ที่ตรวจพบปริมาณอะฟลาทอกซินได้ในปริมาณน้อยในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือความเข้มข้น 10% และยังคงปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ดังนั้นการทดลองครั้งนี้ จึงทำให้เข้าใจกระบวนการทางจุลชีววิทยาของการหมักเต้าหู้ยี้ที่ใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามแบบธรรมชาติ รวมทั้งคุณภาพทางอาหารของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. 2543. คู่มือใช้งานการตรวจสอบอะฟลาทอกซิน บี 1. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ: 1-7.

แก้ว กังสดาลอำไพ. 2526. สารพิษในอาหาร ตอนที่ 2 ปัญหาสารพิษจากเชื้อราในอาหาร. ว. รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. 14: 25-31.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. 2527. ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 123-126.

ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต. 2536. จุลินทรีย์กับอุตสาหกรรมอาหาร. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา. หน้า 237-242.

สิริพร ภูมะธน. 2540. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากเต้าหู้ยี้. รายงานโครงงานทางจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุวรรณี แสงแก้ว. 2543. คุณภาพทางจุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้. รายงานโครงงานทางจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อารันต์ พัฒโนทัย. 2528. อะฟลาทอกซินปัญหาของถั่วลิสง. แก่นเกษตร. 13: 1-9.

AOAC. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 15th edition, Verginia. The Association of Official Analytical Chemist, Inc. USA.

Chaplin, M.F. and Kenedy, J.F. 1986. Carbohydrate Analysis: A practical approach. Washington DC: Oxford IRL Press. p. 2.

Chou, C.C., Ho, F.M. and Tsai, C.S. 1988. Effects of temperature and relative humidity on growth and enzyme production by *Actinomucor taiwanensis* during Sufu Pehtze preparation. Appl. Environ. Microbiol. 54: 688-692.

Cote, M.A. 1989. Catalogue of Bacteria and Phages. American Type Culture Collection. 17th edition, Maryland. p. 299.

Han, B-Z.,Breumer, R.R., Rombouts, F.M. and Nout, M.J.R. 2001. Microbiological safety and quality of commercial Sufu - a Chinese fermented soybean food. Food Control. 12: 541-547.

Han, B-Z., Cao, C-F., Rombouts, F.M. and Nout, M.J.R. 2004. Microbial changes during the production of Sufu-a Chineses fermented soybean food. Food Control. 15: 265-270.

Han, B-Z., Wang, J-H., Rombouts, F.M. and Nout, M.J.R. 2003. Effect of NaCl on textural changes and protein and lipid degradation during the ripening stage of sufu, a Chinese fermented soybean food. J. Sci. Food Agric. 83: 899-904.

Krieg, N.R. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1, Baltimore: The Williams and Wilkins Co.

Rose, A.H. and Harrison, J.S. 1969. The Yeast . Vol.1. Biology of Yeast. London: Academic Press.

Rose, I.K. 1979. Biology of Fungi. New York: McGraw -Hill Inc.

Wai, N. 1968. Investigation of the various processes used in preparing Chinese cheese by the fermentation of soybean curd with *Mucor* and other fungi. USDA Final Tech. Dept. Public Law 480. Project UR-A6-(40)-1. Available at a cost from Natl. Agr. Library.