การพัฒนาผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบ

นางสาวศศิกานต์ เกตุมาลา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF DEEP FRIED CORN MIXED TEMPEH

Miss Sasikan Katemala

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบ
โดย	นางสาวศศิกานต์ เกตุมาลา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์

คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

ศศิกานต์ เกตุมาลา: การพัฒนาผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบ
(DEVELOPMENT OF DEEP FRIED CORN MIXED TEMPEH)
อ.ที่ปรึกษา: ผศ.สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์, 97 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบสำหรับเป็นอาหารขบเคี้ยวที่มีใยอาหารสูง โดยศึกษาขนาดของเมล็ดถั่วเหลือง ชนิดและขนาดของเมล็ดข้าวโพดที่ใช้ผลิตเทมเป้ โดยแปรเมล็ดถั่วเหลืองเป็น 2 ขนาดคือ เมล็ดซีกและปั่นละเอียด พบว่าเทมเป้ถั่วเหลืองเมล็ดปั่นละเอียดมีเนื้อเกาะกันแน่นกว่าเทมเป้ที่ทำจากถั่วเหลืองเมล็ดซีก โดยมีค่าความแน่นเนื้อ 282.61 gf ดังนั้นจึงเลือกถั่วเหลืองเมล็ดปั่นละเอียดเป็นวัตถุดิบในการผลิตเทมเป้ จากนั้นเลือกข้าวโพด 2 ชนิด มาใช้ในการทดลอง คือ ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว และแปรขนาดเมล็ดเป็น เต็มเมล็ด ½ เมล็ดและ ¼ เมล็ด พบว่าเทมเป้จากข้าวโพดหวานขนาด ¼ เมล็ดมีการเจริญของเชื้อราที่ทำให้เทมเป้มีค่าความแน่นเนื้อสูงที่สุดคือ 319.61 gf จากนั้นศึกษาอัตราส่วนถั่วเหลืองต่อข้าวโพดที่เหมาะสม โดยแปรอัตราส่วนถั่วเหลืองต่อข้าวโพดเป็น 5:0 4:1 3:2 2:3 1:4 และ 0:5 (น้ำหนักเปียก) พบว่าเทมเป้ที่ผลิตจากถั่วเหลืองผสมข้าวโพดอัตราส่วน 2:3 มีปริมาณเส้นใยอาหาร 16.48% ปริมาณโปรตีน 23.65% (น้ำหนักแห้ง) และได้รับความชอบจากผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสและความชอบโดยรวมสูงที่สุด จึงเลือกเทมเป้ที่อัตราส่วนดังกล่าวมาศึกษาสภาวะการ pre-drying (60°C 32%RH) และการทอด (180°C) โดยแปรเวลาการ pre-drying และเวลาการทอดเป็น 3 สภาวะ คือ pre-drying 0 นาที และทอด 2 นาที pre-drying 15 นาที และทอด 1.5 นาที และ pre-drying 30 นาที และทอด 1 นาที เพื่อให้ได้ความชื้นในผลิตภัณฑ์สุดท้ายประมาณ 3% พบว่าเทมเป้ที่ผ่านการ pre-drying 30 นาที แล้วทอด 1 นาที ได้รับความชอบโดยรวมสูงที่สุด รวมทั้งมีปริมาณไขมันต่ำที่สุด ในขณะที่ค่าเนื้อสัมผัสด้านความกรอบมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับเทมเป้ที่ไม่ผ่านการ pre-drying และเมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45°C และ 55°C โดยบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอล์ยแล้วปิดผนึกแบบสุญญากาศ พบว่ามีอายุการเก็บรักษาประมาณ 21 วัน

ภาควิชา……เทคโนโลยีทางอาหาร……..ลายมือชื่อนิสิต……...
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร……ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา...2549……..

4672420423 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEY WORD: DEEP FRIED / SOYBEAN / CORN / TEMPEH

SASIKAN KATEMALA: DEVELOPMENT OF DEEP FRIED CORN MIXED TEMPEH. THESIS ADVISOR :AAST.PROF. SUTTISAK SUKNAISILP, M. Sc. 97 pp.

The objective of this research is to develop a deep fried corn mixed tempeh to produce a high dietary fiber snack. Suitable size of soybean seed was studied by using ground and half seed. The study show that ground soybean tempeh gave the highest firmness of 282.61 gf therefore ground soybean was selected to produce the later tempeh mixed with corn. Two varieties of corn, namely sweet corn and waxy corn were chosen to use in the tempeh mixture. The size of corn seed was varied to full, half and quarter size. The quarter kernel of sweet corn gave the highest firmness of 319.61 gf therefore quarter kernel of sweet corn was selected to mix with ground soybean. In next experiment, the ratio of mixture of soybean and corn was developed by vary soybean and corn to 5:0 4:1 3:2 2:3 1:4 and 0:5 (wet basis). The soybean and corn mixture of 3:2 had the highest acceptability score. It contained 16.48% (dry basis) dietary fiber and 23.65% (dry basis) protein content. The dietary fiber and protein content was improved from using soybean of corn alone to make tempeh. Optimum condition of pre-drying (60°C 32%RH) and frying (180°C) was investigated. Three conditions consisting pre-drying 0 min and frying 2 min, pre-drying 15 min and frying 1.5 min and pre-drying 30 min and frying 1 min were used to obtain the final product which contained 3% moisture content. Corn mixed tempeh which had been pre-dried at 30 min and fried for 1 min was found to have the highest overall acceptance sensory score and lowest fat content. However, the crispness was not significant different between each treatment ($p>0.05$). The shelf-life of the final product (corn mixed tempeh, 3:2, pre-drying 30 min and frying 1 min at 30°C) was found to be 21 days.

Department…Food Technology…….. Student's signature……
Field of study….Food Technology……..… Advisor's signature……
Academic year …….2006…….Co-advisor's signature……..……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยความช่วยเหลือและคอยให้คำแนะนำอย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา และ อาจารย์ ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล ที่กรุณาร่วมเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้คำแนะนำและตรวจสอบ เพื่อปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ น้อง ระดับปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ รวมถึงให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ และขอขอบคุณพี่ ๆ นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และขอบคุณน้องชาย ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าให้ตั้งใจและมานะอดทนจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ 1

2. วารสารปริทัศน์ 3

2.1 เทมเป้ 3

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเทมเป้ 4

2.3 คุณภาพโปรตีน 9

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเทมเป้ 11

2.5 กระบวนการผลิตเทมเป้ 12

2.6 การเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมักเทมเป้ 17

2.7 การติดตามการเจริญของเชื้อรา 18

2.8 การเก็บรักษาเทมเป้ 20

2.9 รูปแบบการบริโภคเทมเป้ 21

2.10 ประโยชน์ของเทมเป้ต่อสุขภาพ 23

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย 28

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี 28

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย 32

4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 37

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของวัตถุดิบ 37

4.2 ผลการศึกษาชนิดและขนาดของเมล็ดข้าวโพด ขนาดเมล็ดถั่วเหลืองและระยะเวลาการหมักเทมเป้ที่เหมาะสมต่อการผลิตเทมเป้ 38

4.3 ผลการศึกษาอัตราส่วนถั่วเหลืองต่อข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตเทมเป้ 41

4.4 ผลการศึกษาระยะเวลา pre-drying และการทอดที่เหมาะสม 47

4.5 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบ 51

บทที่ หน้า
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 62
รายการอ้างอิง..... 64
ภาคผนวก.....
ภาคผนวก ก.....
ภาคผนวก ข.....
ภาคผนวก ค.....
ภาคผนวก ง.....
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 อุณหภูมิลมเข้าและ feed rate ที่ใช้ทำแห้ง…….. 26

4.1 ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ต่อการรอดชีวิตของเชื้อผง…… 37

4.2 ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ต่อปริมาณความชื้นในเชื้อผง
เมื่อมีขนาดอนุภาคหลังทำแห้งที่แตกต่างกัน…….….. 38

4.3 ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ที่มีผลต่อความชื้นและค่า a_w
ระหว่างการเก็บรักษาเชื้อผง ซึ่งบรรจุในถุง laminated aluminium foil
เป็นเวลา 60 วัน ที่ 20 และ 30°C……..… 40

4.4 ค่าความแปรปรวนระหว่างอิทธิพลร่วมของอุณหภูมิลมเข้าและอัตราการป้อน
ตัวอย่างต่อการรอดชีวิต ความชื้น และค่า a_w ของเชื้อผงหลังทำแห้ง…… 42

4.5 ผลของอุณหภูมิลมเข้าที่มีผลต่อการรอดชีวิต, ความชื้น
และค่า a_w ของเชื้อผง……..…. 43

4.6 ผลของอัตราการป้อนตัวอย่าง (feed rate) ที่มีผลต่อการรอดชีวิต,
ความชื้น และค่า a_w ของเชื้อผง……... 44

4.7 ค่าแรงตึงผิวและความหนืดของ MNF ผสมน้ำตาล ที่ใช้เป็นสารปกป้องเซลล์
เมื่อสารละลายมีองค์ประกอบแตกต่างกันแต่ total solids เท่ากัน……..…….. 44

4.8 จำนวนเชื้อที่รอดชีวิต ค่าแรงตึงผิว ขนาดอนุภาคและค่า bulk density ของ
เชื้อผงที่ผ่านการทำแห้งเมื่อใช้ MNF ผสมน้ำตาลเป็นสารปกป้องเซลล์และ
มี total solids ไม่แตกต่างกัน…….. 45

4.9 จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตของเชื้อผงที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง
เมื่อสารปกป้องเซลล์มีองค์ประกอบแตกต่างกันแต่ปริมาณ total solid เท่ากัน…….... 46

4.10 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต, ปริมาณความชื้นและค่า a_w ของเชื้อผง
จากการทำแห้งโดยวิธีพ่นกระจายและแช่เยือกแข็ง……..……. 48

4.11 ปริมาณความชื้น ของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นกระจายและแช่เยือกแข็ง
เมื่อเก็บรักษาที่ 4°C และ 30°C เป็นเวลา 16 สัปดาห์ในถุง
laminated aluminium foil…….. 49
4.12 ค่า a_w ของเชื้อผงที่ผลิตโดยวิธีพ่นกระจายและแช่เยือกแข็งเมื่อเก็บรักษา
ที่4°C และ 30°C เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ในถุง laminated aluminium foil…….. 50
1-ค ข้อมูลทั่วไปของเชื้อผงขณะทำแห้งแบบพ่นกระจายที่อุณหภูมิ
ลมเข้า 160°C อัตราการป้อน 34 ml/min แปรความเข้มข้นของ
สารละลาย MNF ระดับต่างๆ……. 90
2-ค ความเข้มข้นของสารละลาย MNF ต่อปริมาณความชื้น, ค่า a_w, ความหนืด
แรงตึงผิว และ bulk density หลังการทำแห้งแบบพ่นกระจาย
แปรอุณหภูมิลมเข้าและอัตราการป้อนค่าต่างๆใ…… 91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ค่า protein efficiency ratio (PER) เมื่อผสมข้าวโพดและถั่วเหลือง ในอัตราส่วนต่าง ๆ 10

4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าสี L ของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน 53

4.2 การเปลี่ยนแปลงค่าสี a ของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน 54

4.3 การเปลี่ยนแปลงค่าสี b ของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน 54

4.4 การเปลี่ยนแปลงค่า a_w ของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน 55

4.5 การเปลี่ยนแปลงค่าค่าความกรอบของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน.....56

4.6 การเปลี่ยนแปลงค่าเพอร์ออกไซด์ของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน 57

4.7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน 58

4.8 การเปลี่ยนแปลงจำนวนราในผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน 58

4.9 การเปลี่ยนแปลงค่า a_wในผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิเร่ง 45°C และ 55°C ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน.....59

ก.1 กราฟมาตรฐาน glucosamine hydrochloride 74

ข.1 ข้าวโพดหวาน พันธุ์ไฮบริกซ์ 3 80

ข.2 ข้าวโพดข้าวเหนียว พันธุ์ศรแดง.....80

ข.3 ถั่วเหลืองเมล็ดซีกแห้งกะเทาะเปลือกแล้ว ตราไร่ทิพย์ (ซ้าย) แช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เวลา 12 ชั่วโมง (ขวา).....80

ข.4 *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 เจริญบน PDA agar slant ที่ 30°C เป็นเวลา 5-7 วัน.....81

ข.5 วิธีการปาดเพื่อแปรขนาดเมล็ดข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวเป็นเต็มเมล็ด ½ เมล็ดและ ¼ เมล็ด.....81

ข.6 ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวขนาดเต็มเมล็ด ½ เมล็ด และ ¼ เมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที.....82

ข.7 เทมเป้ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวขนาดเต็มเมล็ด ½ เมล็ด และ ¼ เมล็ด.....82

ข.8 ถั่วเหลืองเมล็ดซีกแช่กรด.....83

ข.9 ถั่วเหลืองเมล็ดซีกต้ม (ซ้าย) และเมล็ดปั่นละเอียดหลังต้ม (ขวา).....83

ข.10 ถั่วเหลืองเมล็ดซีก (ซ้าย) และเมล็ดปั่นละเอียด (ขวา) ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที.....83

ข.11 เทมเป้ถั่วเหลืองเมล็ดซีก (ซ้าย) เทมเป้ถั่วเหลืองเมล็ดปั่นละเอียด (ขวา) 83

ข.12 ถั่วเหลืองผสมข้าวโพดอัตราส่วน 5:0 4:1 3:2 2:3 1:4 และ 0:5 ตามลำดับ (จากซ้ายไปขวา) 84

ข.13 ถั่วเหลืองผสมข้าวโพดอัตราส่วน 5:0 4:1 3:2 2:3 1:4 และ 0:5 ตามลำดับ (จากซ้ายไปขวา) ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที 84

ข.14 เทมเป้ผสมข้าวโพดในอัตราส่วน 5:0 4:1 3:2 2:3 1:4 และ 0:5 ตามลำดับ (จากซ้ายไปขวา) 84

ข.15 เทมเป้ผสมข้าวโพดที่หั่นเป็นแผ่นขนาด 0.2 x 2.0 x 5.0 เซนติเมตร 85

ข.16 เทมเป้ผสมข้าวโพดที่หั่นเป็นแผ่นขนาด 0.2 x 2.0 x 5.0 เซนติเมตร แล้ว pre-drying (60°C 32%RH) โดยแปรระยะเวลา 0 15 และ 30 นาที (จากซ้ายไปขวา) 86

ข.17 เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ผ่านการ pre-drying (60°C 32%RH) แล้วทอด (180°C) 3 สภาวะคือ pre-drying 0 นาทีแล้วทอด 2.0 นาที pre-drying 30 นาที แล้วทอด 1.5 นาที และ pre-drying 30 นาทีแล้วทอด 1.0 นาที (จากซ้ายไปขวา) 85

ข.18 เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟลอยด์ (Foil pouch) ขนาด 20 x 16 เซนติเมตร หนา100μm OPP/PE/Alu/PE/LL ปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45°C (ซ้าย) และ 55°C (ขวา) 86

บทที่ 1

บทนำ

เทมเป้เป็นอาหารหมักพื้นเมืองของประเทศอินโดนีเซีย ที่ผลิตจากเชื้อรา *Rhizopus* spp. เจริญสร้างเส้นใยยึดเกาะวัตถุดิบให้ประสานกันเป็นแผ่นแน่น ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบนอกจากนี้ยังสามารถใช้เมล็ดพืชชนิดอื่นซึ่งหาได้ง่ายในท้องถิ่นที่มีราคาถูกผลิตเทมเป้ได้เช่นกัน ได้แก่ พืชตระกูลถั่วชนิดอื่น เช่น ถั่วลิสง ถั่วแดงและถั่วดำ หรือธัญพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์และข้าวโพด ซึ่งกระบวนการหมักจะช่วยปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการโดยเชื้อราจะย่อยสลายสารอาหารในวัตถุดิบทำให้ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้แบคทีเรียที่เจริญร่วมกับเชื้อราในกระบวนการหมักเทมเป้ยังสร้างสารที่มีประโยชน์ต่างๆ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ (Klus และ Barz, 1997) และวิตามินบี 12 (Liem, Steinkraus และ Cronk, 1977) ดังนั้นเทมเป้จึงเป็นอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพเหมาะสำหรับผู้บริโภคในปัจจุบันที่ให้ความสำคัญต่อสุขภาพเพิ่มมากขึ้น เทมเป้สามารถนำมาบริโภคได้หลายรูปแบบโดยใช้เป็นอาหารหลัก เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารประเภทต้ม ผัด แกง ทอด โดยเทมเป้สามารถดูดซับเครื่องปรุงรสต่าง ๆ ได้ดีหรือบริโภคเป็นอาหารขบเคี้ยว ซึ่งโดยทั่วไปนิยมนำมาหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วทอดกรอบ (Shurtleff และ Aoyagi, 1976) สำหรับประเทศไทยนั้นนอกจากผู้รับประทานอาหารมังสวิรัติแล้ว ผู้บริโภคทั่วไปยังไม่รู้จักและนิยมบริโภคเทมเป้มากนัก และพบว่าในปัจจุบันตลาดอาหารขบเคี้ยวในประเทศไทยมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น เพื่อตอบสนองกับสภาพสังคมในปัจจุบันที่ต้องการอาหารที่รับประทานง่าย สะดวกและรวดเร็ว ดังนั้นจึงมีการผลิตอาหารขบเคี้ยว (snack food) จำหน่ายหลายชนิดและเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งวัยเด็กและผู้ใหญ่วัยทำงาน ซึ่งส่วนใหญ่มีส่วนประกอบหลักเป็นแป้ง ไขมัน น้ำตาลและเกลือ ที่ให้พลังงานค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบร้อยละของพลังงานที่ควรได้รับประจำวันตามข้อกำหนดของ DRI (dietary reccommended intakes) โดยพบว่าใน 100 กรัมให้พลังงานอยู่ระหว่าง 171 – 592 กิโลแคลอรี (ภัทธิรา ยิ่งเลิศรัตนะกุล, 2549) แต่มีคุณค่าทางโภชนาการด้านอื่นต่ำ ดังนั้นเมื่อรับประทานในปริมาณมากอาจทำให้เกิดโรคอ้วนและเกิดโรคอื่นตามมาได้ อีกทั้งมีราคาแพงเมื่อเทียบกับประโยชน์ที่ควรได้รับ

ถั่วเหลืองและข้าวโพดเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีปริมาณโปรตีนสูง โดยประกอบด้วยกรดอะมิโน tryptophan และ lysine สูง แต่มีปริมาณ sulfur containing amino acids (methionine และ cystine) จำกัด (Liu, 1999) ส่วนข้าวโพดเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในท้องถิ่น แต่รูปแบบการนำข้าวโพดฝักสดมาใช้ประโยชน์บริโภคโดยตรงยังมีน้อย เช่น

นึ่ง ต้ม ปิ้ง ย่างหรือเป็นส่วนประกอบในอาหารคาวหวานประเภทต่าง ๆ ซึ่งโปรตีนในข้าวโพดประกอบด้วยกรดอะมิโน tryptophan และ lysine ในปริมาณจำกัดแต่มี sulfur containing amino acids สูง และข้าวโพดมีปริมาณเส้นใยอาหารสูงกว่าถั่วเหลือง (White และ Johnson, 1987) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบ สำหรับเป็นอาหารขบเคี้ยวที่มีใยอาหารสูง โปรตีนมีคุณภาพสูงขึ้นและมีปริมาณไม่ต่ำกว่าที่ร่างกายต้องการ ดูดซับไขมันน้อยที่สุด รวมถึงมีลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสีและเนื้อสัมผัสที่ดีเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำข้าวโพดมาใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบ นอกจากนี้กระบวนการผลิตเทมเป้ยังทำได้ง่ายและไม่ซับซ้อน ต้นทุนต่ำ ใช้เครื่องมือทั่ว ๆ ไป ระยะเวลาหมักสั้น สามารถผลิตเองได้ที่บ้าน รวมถึงประเทศไทยมีสภาพอากาศและอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา จึงไม่สิ้นเปลืองพลังงานเพื่อใช้ในกระบวนการบ่มเทมเป้ ดังนั้นจึงอาจเป็นแนวทางในการผลิตระดับอุตสาหกรรมครัวเรือนต่อไปได้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 เทมเป้ (Tempeh)

เทมเป้เป็นอาหารพื้นเมืองที่นิยมบริโภคทั่วไปในประเทศอินโดนีเซียมานานกว่า 2000 ปี โดยพบว่าชาวชวาตอนกลางใช้บริโภคเป็นอาหารในชีวิตประจำวันตั้งแต่ศตวรรษที่ 17 ซึ่งตามวิธีดั้งเดิมผลิตโดยใช้เชื้อราในสกุล *Rhizopus* เป็นหัวเชื้อ (culturing agent) ผสมกับเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำ (soaking) ลอกเปลือก (dehulling) แกะซีกแล้วทำให้สุกบางส่วน (partial cooking) โดยการนึ่งหรือต้มผสมกับหัวเชื้อ (inoculating) จากนั้นนำไปบ่ม (inocubation) ประมาณ 20-30 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) จนกระทั่งได้เทมเป้ที่มีเส้นใยสีขาวของเชื้อราประสานปกคลุมยึดเมล็ดถั่วเหลืองให้เกาะกันเป็นแผ่นแน่น (semi-firm solid cake) หนาประมาณ 2 เซนติเมตร มีลักษณะเป็นก้อนคล้ายเค้กหรือเต้าหู้ สามารถหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ ได้ เทมเป้สดที่ยังไม่ผ่านการปรุงอาหารจะมีกลิ่นรสคล้ายเห็ด (mushroom odor) มีเนื้อสัมผัสนุ่มและยืดหยุ่นคล้ายเนื้อสัตว์ (meat-like texture) ผู้รับประทานอาหารมังสาวิรัติจึงนิยมบริโภคแทนเนื้อสัตว์ นอกจากประเทศอินโดนีเซียแล้วเทมเป้ยังนิยมบริโภคเป็นอาหารพื้นบ้านของหลาย ๆ ประเทศอื่นในทวีปเอเชียอีกด้วย เช่น ศรีลังกา สิงคโปร์ มาเลเซีย และฟิลิปปินส์ เป็นต้น (Shurtleff และ Aoyagi, 1976) สำหรับประเทศไทยผู้บริโภคทั่วไปยังไม่รู้จักและนิยมรับประทานเทมเป้มากเท่ากับอาหารหมักจากถั่วชนิดอื่น ได้แก่ tofu, miso และ shoyu เป็นต้น ส่วนเทมเป้และอาหารพื้นเมืองอื่น ๆ เข้าสู่ยุโรปและอเมริกาในปี ค.ศ. 1946 โดยชาวดัตช์ซึ่งเคยปกครองประเทศอินโดนีเซีย จนกระทั่งศตวรรษที่ 20 อาหารพื้นเมืองของประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จึงเป็นที่รู้จักในประเทศตะวันตก (Shurtleff และ Aoyagi, 1976) ปัจจุบันเทมเป้เป็นที่รู้จักและได้รับความนิยมจากผู้รับประทานอาหารมังสวิรัติในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก ฮอลแลนด์ แคนาดา เนเธอร์แลนด์ ออสเตรเลียและญี่ปุ่น เป็นต้น และกลายเป็นอาหารเพื่อสุขภาพโดยพบทั่วไปตาม supermarket และ natural food หรือ health food stores เป็นต้น โดยร้านค้าจะเก็บรักษาในตู้เย็นหรือในส่วนแช่แข็ง จากเดิมที่พบเป็นอาหารพื้นเมืองที่ขายตามร้านค้าของชาวเอเชีย

เทมเป้เป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญเนื่องจากมีโปรตีน คุณภาพดีและปริมาณสูง คือ มีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบ 8 ชนิดตามที่ร่างกายต้องการ รวมถึงให้คุณค่าทางโภชนาการสูงเนื่องจากกระบวนการหมักจะปรับปรุงคุณค่างทางโภชนาการและเชื้อราเจริญจะผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเมล็ดถั่วบางส่วน ทำให้ร่างกายย่อยโปรตีนได้ง่ายขึ้น รวมถึงมีปริมาณไขมันอิ่มตัวต่ำ ไม่มีคอเลสเตอรอล นอกจากนี้เทมเป้ยังเป็นแหล่งของวิตามินหลายชนิด เช่น กลุ่มวิตามินบี โดยเฉพาะ

วิตามินบี B_{12} (Leim, Steinkraus และ Cronk, 1977) จึงเหมาะสำหรับผู้บริโภคอาหารมังสวิรัติที่มักขาดวิตามินชนิดนี้ เทมเป้มีประโยชน์ต่อสุขภาพโดยพบว่ามีสาร antibiotic ที่เชื้อราสร้างขึ้นระหว่างการหมักทำให้ร่างกายสามารถต่อต้านการติดเชื้อในลำไส้ได้ดีขึ้น (Wang และ Hesseltine, 1969) ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มให้ความสนใจศึกษาเกี่ยวกับเทมเป้ โดยมีงานตีพิมพ์ทางวิชาการเกี่ยวกับเทมเป้ตั้งแต่ ค.ศ. 1960 (Steinkraus, 1996) ทั้งในด้านการผลิตกล้าเชื้อและจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการหมัก (Wang, Swain และ Hesseltine, 1975 และ Wiesel, Rehm และ Bisping, 1997) การปรับปรุงกระบวนการผลิต (Wiesel, Rehm และ Bisping, 1997) และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ (Jurus และ Sundberg, 1976) การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและปริมาณเอ็นไซม์ระหว่างกระบวนการหมัก (Ruiz-Terán และ Owens, 1996) รวมถึงคุณค่าทางโภชนาการ (Murata, Ikehata และ Miyamoto, 1967 และ Wagenknecht และคณะ, 1961) และการพัฒนาเทมเป้จากวัตถุดิบชนิดอื่น (Feng และคณะ, 2005; Mugula และ Lyimo, 2000 และ Reyes-Moreno และคณะ, 2000) เป็นต้น

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเทมเป้

โดยทั่วไปเทมเป้ส่วนใหญ่ที่ผลิตตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันคือ เทมเป้ถั่วเหลือง (soybean tempeh) แต่อาจผลิตเทมเป้จากเมล็ดพืชตระกูลถั่วชนิดอื่นและพืชเมล็ดชนิดอื่น เช่น ธัญพืชชนิดต่าง ๆ หรือผักที่สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่นและมีราคาไม่แพงได้เช่นกัน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เทมเป้ที่มีเนื้อสัมผัส กลิ่นและรสชาติต่างกัน (Steinkraus, 1996) นอกจากนี้การใช้วัตถุดิบหลาย ๆ ชนิดร่วมกันยังเป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากทำให้โปรตีนสมบูรณ์มากขึ้นอีกด้วย ซึ่งสามารถแบ่งและเรียกชื่อตามกลุ่มของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเทมเป้เป็นประเภทใหญ่ ๆ (Steinkraus, 1996) ได้ดังนี้

1. Legumes พืชตระกูลถั่วเกือบทุกชนิดสามารถนำมาผลิตเทมเป้ได้ แต่ตามปกติแล้วใช้ถั่วเหลือง (*Glycine max*) ซึ่งเทมเป้ถั่วเหลืองได้รับความนิยมมากที่สุด โดยทั่วไปคำว่าเทมเป้หมายถึง เทมเป้ถั่วเหลือง นั่นเอง

2. Pulses ได้แก่ broad หรือ fava beans (Robinson และ Kao, 1977) chickpeas หรือ garbanzo beans (Reyes-Moreno และคณะ, 2000 และ Robinson และ Kao, 1977) common beans (Mugula และ Lyimo, 2000 และ Paresdes-Lopez, Harry และ Gonzalez-Castaneda, 1990) cowpeas (Mugula และ Lyimo, 2000) lupine (Davey และคณะ, 1991) mung beans (Mugula และ Lyimo, 2000) pigeon peas (Mugula และ Lyimo, 2000) quinoa (Davey และคณะ, 1991) และ velvet beans (Egounlety และ Aworth, 2003) เป็นต้น

3. Cereal grains ได้แก่ sorghum (Mugula และ Lyimo, 2000) barley (Feng, Eriksson และ Schnürer, 2005) oats (Berghofer และคณะ, 1998) wheat (Wang และ Hesseltine, 1966) และ corn (Cuevas-Rodríguez และคณะ, 2003) เป็นต้น

4. Oilseeds ได้แก่ seasame seeds (Mugula และ Lyimo, 2000) groundnuts (peanuts) (Mugula และ Lyimo, 2000) sunflower seeds (Vaidehi, Annapurna และ Vishwanath, 1985) และ melon seeds (Amadi และคณะ, 2003) เป็นต้น

5. Press caked เช่น กากถั่วเหลืองที่เหลือจากกระบวนการผลิตเต้าหู้ (soy-pulp) ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า okara tempeh (Steinkraus, 1996) เป็นต้น

โดยเทมเป้อาจผลิตจากวัตถุดิบเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันก็ได้ (mixed tempeh) เช่น corn-soybean barley-soybean wheat-soybean soy-sunflower และ sorghum-commonbean เป็นต้น Vaidehi, Annapurna และ Vishwanath (1985) ผลิตเทมเป้จากถั่วเหลืองผสมถั่วสิสงและถั่วเหลืองผสมเมล็ดดอกทานตะวันในอัตราส่วน 52:48 และ 46:54 ตามลำดับ จากนั้นนำมาทอดเพื่อประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความชอบ 5 ระดับ พบว่าเทมเป้ถั่วเหลืองผสมเมล็ดดอกทานตะวันได้รับการยอมรับสูงที่สุดทั้งทางด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น รสชาติและเนื้อสัมผัส รองลงมาคือเทมเป้ถั่วเหลืองผสมถั่วลิสง ในขณะที่เทมเป้จากถั่วเหลืองเพียงชนิดเดียวได้รับการยอมรับน้อยที่สุด David และ Verma (1981) ผลิตเทมเป้จากถั่วเหลืองผสม Bakla พบว่าเมื่อมีอัตราส่วนถั่วเหลืองในปริมาณสูงขึ้น จะได้รับการยอมรับน้อยลง และที่อัตราส่วน 1 : 1 จะได้รับการยอมรับสูงที่สุด

สำหรับประเทศไทยมีงานวิจัยที่ศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์เทมเป้จากวัตถุดิบที่มีในประเทศ เช่น ลาวัณย์ ไกรเดช (2530) ผลิตเทมเป้จากถั่วลิสงทั้งที่มีเยื่อหุ้มหรือลอกเยื่อหุ้มเมล็ดและกากถั่วลิสง ได้เทมเป้ที่มีเนื้อแน่น เมื่อนำมาทอดจะกรอบและมีกลิ่นหอม รสอร่อยพอใช้ ต่อมา ธงชัย (2531) ได้ทดลองพัฒนาเทมเป้จากถั่วลิสงพบว่าวิธีผลิตเทมเป้ที่เหมาะสมคือใช้ tempeh starter และ tempeh powder ผสมกันและถั่วลิสงที่ใช้ควรลอกเยื่อหุ้มออกก่อน เมื่อทดสอบความชอบของเทมเป้ชุบแป้งทอดด้วยวิธี hedonic scale 9 ระดับ พบว่าสีและกลิ่น ได้คะแนนความชอบเล็กน้อย เนื้อสัมผัส ลักษณะทั่วไปและความชอบโดยรวม ได้คะแนนความชอบระดับเฉยๆ ส่วนรสชาติมีคะแนนความชอบต่ำเนื่องจากมีรสขมและเฝื่อน และสุจินดา สุวรรณกิจ (2534) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเทมเป้ถั่วลิสงจากเชื้อ *Rhizopus oligosporus* คือนำถั่วลิสงแช่น้ำเดือด 1 ชั่วโมง ทำให้สะเด็ดน้ำ แล้วนึ่ง 45 นาที ทิ้งให้เย็น ผสมหัวเชื้อ 3% (wet basis) อัดแน่นแล้วบรรจุในถุงพลาสติกเจาะรู บ่มที่อุณหภูมิห้อง (32°C) เวลา 20 ชั่วโมง ได้เทมเป้ที่มีเส้นใยสีขาวยึดเกาะทั่วทั้งแผ่นสามารถหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ ได้ และพบว่าวัตถุดิบที่เหมาะสมในการพัฒนาเทมเป้ถั่วลิสงต่อไปคือ ถั่วลิสงลอกเยื่อบางส่วน เนื่องจากการเตรียมวัตถุดิบมีขั้นตอนและ

ค่าใช้จ่ายต่ำกว่าและผลิตได้เทมเป้ที่มีคุณภาพดี นอกจากถั่วลิสงแล้วประเทศไทยยังปลูกพืชตระกูลถั่วอีกหลายชนิด เช่น ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วแดง และถั่วดำ ส่วนธัญพืชที่ปลูก เช่น ข้าวเจ้า ข้าวโพด ข้าวฟ่างและลูกเดือย ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สามารถนำมาผลิตเทมเป้ได้ ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบชนิดแรกที่ใช้ผลิตเทมเป้ผลิตก่อนที่จะมีการพัฒนานำวัตถุดิบชนิดอื่นมาใช้ผลิตเทมเป้ และพบว่าเทมเป้ถั่วเหลืองได้รับความนิยมมากที่สุดและพบได้ทั่วไป

ถั่วเหลือง (*Glycine max*) จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทยเช่นกัน ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีโปรตีนในปริมาณและคุณภาพสูงกว่าพืชตระกูลถั่วชนิดอื่นเนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกตัว รวมทั้งมีปริมาณไขมันสูง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไตรกลีเซอไรด์ประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่จำเป็นในปริมาณสูง คือ กรดไลโนเลอิก 53% และกรดโอเลอิก 23% โดยมีปริมาณโปรตีนและไขมัน 40% และ 20% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 35% และเถ้า 5% โดยคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน คือ sucrose, stachyose และ raffinose 5.0% 3.8% และ 1.1% ตามลำดับ (Liu, 1999) ถั่วเหลืองมีวิตามินและเกลือแร่หลายชนิด เช่น มีแคลเซียมสูงกว่าถั่วชนิดอื่น 3 เท่า แต่พบว่าในถั่วเหลืองตามธรรมชาติจะมีสารต้านคุณค่าทางโภชนาการ เช่น oligosaccharide, protease inhibitor, haemagglutinin, tannin, phytate, polyphenol และ lectin เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้การนำสารอาหารในถั่วเหลืองไปใช้ประโยชน์ได้น้อยลง แต่ในกระบวนการผลิตเทมเป้ในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ เช่น การแช่น้ำ (soaking) การลอกเปลือก (dehulling) รวมถึงการหมักจะช่วยลดและกำจัดสารต้านคุณค่าทางโภชนาการเหล่านี้ ทำให้เกิดการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบได้ (Steinkraus, 1996) ซึ่งมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับเทมเป้ถั่วเหลือง เช่น กระบวนการผลิตเทมเป้ถั่วเหลือง (Hedger, 1982) ผลของการแช่น้ำ (soaking) การลอกเปลือก (dehulling) การให้ความร้อน (cooking) และการหมัก (fermentation) ในกระบวนการผลิตเทมเป้ต่อปริมาณ oligosaccharide, trypsin inhibitor, phytic acid และ tannins ในถั่วเหลือง (Egounlety และ Aworth, 2003) ตลอดจนศึกษาปริมาณสารที่มีประโยชน์ต่าง ๆ ในเทมเป้ถั่วเหลือง เช่น isoflavone (Nakajima และคณะ, 2005) เป็นต้น ลักษณะที่ไม่ต้องการของถั่วเหลืองคือกลิ่น beany flavor ซึ่ง off-flavor นี้อาจเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ lipoxidase ซึ่งถูกทำลายได้ด้วยความร้อน แต่ถูกทำลายบางส่วนได้ด้วยความร้อนแบบแห้งหรือเปียกก็ได้ นอกจากนี้จะมีรสขม และทำให้ท้องอืดเนื่องจากเกิดการหมักของน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น oligosaccharide raffinose และ stachyose ซึ่งร่างกายมนุษย์ย่อยไม่ได้เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ galactosidase ภายในระบบย่อยอาหาร

ส่วนข้าวโพด (*Zea mays* L.) จัดอยู่ในวงศ์ Graminae เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งปลูกมานานกว่า 40 ปี ในช่วงก่อนสงครามโลกครั้งที่สอง (พ.ศ. 2482-

2489) เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกง่าย ใช้เวลาสั้นและปลูกได้ตลอดปีในพื้นที่ที่มีน้ำเพียงพอ (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2531) ภายในเมล็ดมีแป้งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ใช้เป็นอาหารหลักของมนุษย์ในหลายประเทศ เช่น เม็กซิโก สเปน อิตาลี โปรตุเกส แอฟริกา อินเดียและอินโดนีเซีย เป็นต้น โดยสามารถจำแนกข้าวโพดได้ 7 ชนิดตามคุณสมบัติของแป้งที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ข้าวโพดป่า (pod corn) ข้าวโพดคั่ว (pop corn) ข้าวโพดหัวแข็ง (flint corn) ข้าวโพดหัวบุบ (dent corn) ข้าวโพดแป้ง (flour corn) ข้าวโพดหวาน (sweet corn) และข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn) โดยข้าวโพดฝักสดที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วที่นิยมบริโภคในประเทศไทย ได้แก่ ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว ซึ่งในเมล็ดสด 100 กรัม จะประกอบด้วย โปรตีน 4.9% และ 4.4% ไขมัน 1.9% และ 0.8% และคาร์โบไฮเดรต 27.0% และ 39.3% ตามลำดับ (กระทรวงสาธารณสุข, 2530) สำหรับข้าวโพดหวานนั้นมีลักษณะเฉพาะตัวคือมีรสหวานมากกว่าข้าวโพดชนิดอื่น เนื่องจากมียีนควบคุมความหวานไม่ให้เกิดการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแป้ง ส่วนข้าวโพดข้าวเหนียวนั้นมีลักษณะเฉพาะตัวคือแป้งส่วนใหญ่ประกอบด้วย amylopectin ประมาณ 73% ส่วน amylose มีประมาณ 27% ตามลำดับ (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2531) น้ำมันข้าวโพดประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่จำเป็นในปริมาณสูง คือ กรดไลโนเลอิก 57% และกรดโอเลอิก 27.5% (Liu, 1999) มีงานวิจัยที่ผลิตแป้งจากเทมเป้ข้าวโพด โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (อุณหภูมิและเวลา) ในกระบวนการหมักเทมเป้ข้าวโพดโดยใช้ response surface methodology (RSM) เพื่อผลิตเป็นแป้ง พบว่าที่อุณหภูมิ 35.4°C และเวลา 54.6 ชั่วโมง จะทำให้ได้แป้งจากเทมเป้ข้าวโพดที่มีค่า in vitro protein digestibility true protein water และ absorption index (WAI) สูงที่สุดเป็น 83.6% 9.1 g/100 g และ 2.9 g gel/g dry flour (Cuevas-Rodríguez และคณะ, 2003) ต่อมาได้มีการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของแป้งจากเทมเป้ข้าวโพดพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแป้งข้าวโพดที่ไม่ผ่านการหมักจะมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นคือ histidine, isoleucine และ leucine เพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เป็น 0.81 0.52 และ 1.46 g/100 g protein ตามลำดับ ส่วนกรดอะมิโนพวก total sulphur และ total aromatic จะเพิ่มขึ้นเป็น 0.55 และ 3.45 g/100 g protein ตามลำดับ รวมถึงมีค่า PER (protein efficiency ratio) เพิ่มขึ้นจาก 0.55 เป็น 0.83 ดังนั้นจึงสามารถนำแป้งที่ได้ไปเติมในผลิตภัณฑ์อาหารจากธัญพืชชนิดอื่นเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการได้ เช่น tortilla, breas, cookie และ atoles เป็นต้น (Cuevas-Rodríguez และคณะ, 2006) ซึ่งพบว่าโปรตีนในพืชตระกูลถั่ว (legumes) จะมีปริมาณ lysine สูงแต่มีปริมาณ sulfur containing amino acids คือ methionine และ cystine ไม่เพียงพอ ในขณะที่ธัญพืช (cereal grains) มีปริมาณ lysine ต่ำแต่มีปริมาณ sulfur containing amino acids ในระดับที่เพียงพอ ดังนั้นการนำพืชตระกูลถั่วกับธัญพืชมาผสมกันเพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการทำให้มีระดับ lysine และ sulfur containing amino acids สูงขึ้นเพียงพอได้ (Liu, 1999) โดยกระทรวง

สาธารณสุข (2533) ได้วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในถั่วเหลืองและข้าวโพด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อประเมินคุณภาพโปรตีนในอาหารไทย ดังแสดงในตารางที่ 2.1

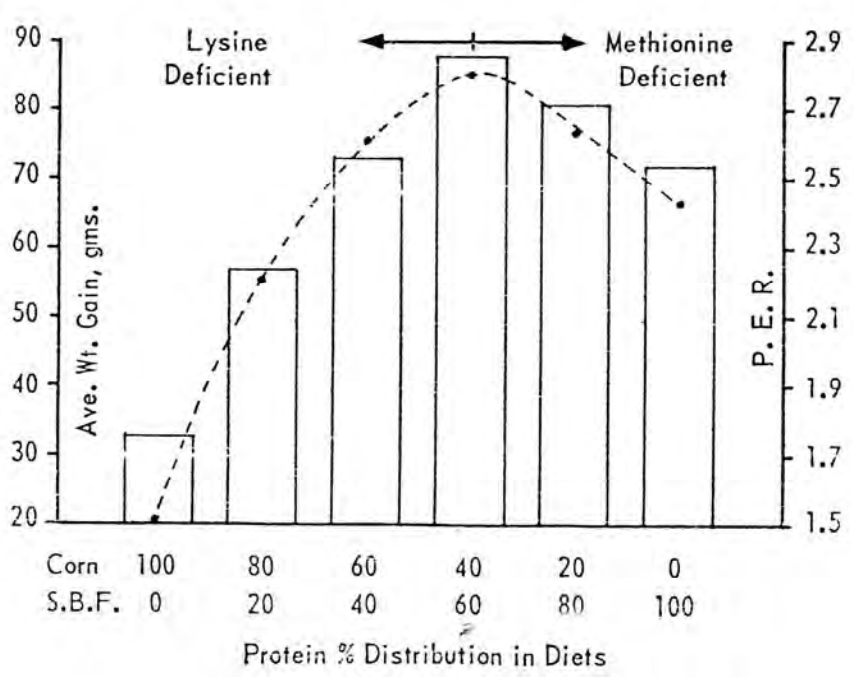
ตารางที่ 2.1 ปริมาณกรดอะมิโน (mg/g protein) ในอาหารที่กินได้ 100 กรัม

amino acids	ถั่วเหลือง (เมล็ดแห้ง)	ข้าวโพด (เมล็ดแห้ง)
protein (g/100 g)	34.60	10.30
isoleucine	37.08	32.52
leucine	73.67	116.80
lysine	59.08	25.05
methionine	7.75	11.84
cystine	14.60	20.78
total sulphur containing amino acids	21.18	32.62
phenylalanine	38.06	38.16
tyrosine	25.78	20.10
total aromatic amino acids	63.84	58.25
threonine	41.53	36.99
tryptophan	15.17	3.01
valine	50.40	38.83
arginine	59.51	36.12
histidine	24.22	34.66
alanine	36.33	60.68
aspartic acid	104.34	53.40
glutamic acid	166.97	186.89
glycine	36.07	29.42
proline	61.94	80.68
serine	47.60	42.72
limit amino acid	sulfur containing amino acids	Tryptophan

ที่มา: กระทรวงสาธารณสุข (2533)

2.3 คุณภาพโปรตีน

ร่างกายต้องการปริมาณโปรตีนที่เพียงพอเพื่อดำรงชีวิต การเจริญเติบโต การเสริมสร้างกล้ามเนื้อและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ ตลอดจนให้น้ำนมและรักษาสุขภาพร่างกายตลอดการดำรงชีวิต โดยโปรตีนส่วนใหญ่ร่างกายจะใช้เป็นโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อซึ่งมีประมาณร้อยละ 16 บางชนิดเป็นเอนไซม์ ฮอร์โมน แอนติบอดี้ สารขนส่งไขมันในเลือด องค์ประกอบของระบบขนส่งโมเลกุลขนาดเล็กผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น เมื่อโปรตีนเกิดการย่อยสลายจะให้กรดอะมิโนซึ่งใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อโปรตีนหรือสารโมเลกุลขนาดเล็กอื่น ๆ ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยกรดอะมิโนที่อยู่ในอาหารและเนื้อเยื่อโปรตีนแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายเนื่องจากร่างกายสังเคราะห์เองไม่ได้ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น (indispensable amino acids หรือ essential amino acids) ได้แก่ histidine (His) isoleucine (Ilue) leucine (Leu) lysine (Lys) total sulphur containing amino acids คือ methionine (Met) และ cystine (Cys) total aromatic amino acids คือ phenylalanine (Phe) และ tyrosine (Tyr) threonine (Thr) tryptophan (Tryp) และ valine (Val) และกรดอมิโนที่ไม่จำเป็นต่อร่างกาย (dispensable amino acids หรือ non essential amino acids) ได้แก่ arginine (Arg) alanine (Ala) aspartic acid (Asp) glutamic acid (Glu) glycine (Gly) proline (Pro) และ serine (Ser) (กระทรวงสาธารณสุข, 2533) โปรตีนจากถั่วเหลืองมีปริมาณ sulfur containing amino acids ต่ำ คือมีเมทไธโอนีนเป็นกรดอะมิโนจำกัด (limiting amino acid) ตามด้วยซิสทีนและทรีโอนีน แต่มีปริมาณไลซีนเพียงพอ ซึ่งพบว่าโปรตีนจากธัญพืชส่วนมากขาดไลซีน ดังนั้นการนำโปรตีนจากถั่วเหลืองและข้าวโพดมาผสมกันจะช่วยเสริมปริมาณไลซีนและเมทไธโอนีนให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ซึ่งช่วยปรับปรุงคุณภาพโปรตีนให้มีองค์ประกอบและสัดส่วนของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับที่ร่างกายต้องการมากที่สุด ทำให้ร่างกายสามารถย่อยและนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Liu, 1999) ซึ่งมีงานวิจัยของ Bressani, Elías และ Braham (1966) แสดงถึงสัดส่วนของกรดอะมิโนในถั่วเหลืองและข้าวโพดที่ผสมกันอัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่งเสริมกันทำให้โปรตีนสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 พบว่าการผสมถั่วเหลืองและข้าวโพดในอัตราส่วน 60:40 จะทำให้โปรตีนมีค่า PER (protein efficiency ratio) หรือประสิทธิภาพการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ได้สูงที่สุด เนื่องจากมีกรดอะมิโนที่สมดุลทำให้โปรตีนมีคุณภาพสูงขึ้นมากกว่าในข้าวโพดหรือถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียว โดยเมื่อนำถั่วเหลืองและข้าวโพดมาผสมกันจะทำให้ข้าวโพดมีปริมาณ lysine สูงขึ้นในขณะที่ถั่วเหลืองมี methionine สูงขึ้น



รูปที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงค่า protein efficiency ratio (PER) เมื่อผสมถั่วเหลืองกับข้าวโพดในอัตราส่วนต่าง ๆ

ที่มา: Bressani, Elías และ Braham (1966)

กรดอะมิโนที่สมดุล (amino acid balance) คือ มีกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณและสัดส่วนใกล้เคียงกับที่ร่างกายต้องการมากที่สุด ทำให้ร่างกายสามารถนำไปใช้สังเคราะห์โปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุด แม้บริโภคในปริมาณต่ำ จึงใช้เป็นเกณฑ์ที่ดีในการประเมินคุณภาพโปรตีน โดยไข่ไก่เป็นอาหารมีปริมาณและสัดส่วนกรดอะมิโนที่จำเป็นใกล้เคียงกับที่ร่างกายต้องการมากที่สุด ดังนั้นจึงใช้เป็นมาตรฐานในการประเมินคุณภาพโปรตีน ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการนำกรดอะมิโนมาใช้ประโยชน์คือโปรตีนจะต้องย่อยได้ง่ายและโปรตีนจะต้องมีกรดอะมิโนในปริมาณและสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์โปรตีนและสารอื่น ๆ ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นต่ออวัยวะในร่างกาย ส่วนกรดอะมิโนไม่สมดุล (amino acid imbalance) คือมีกรดอะมิโนที่จำเป็นไม่เพียงพอทำให้นำไปใช้ได้ต่ำ โดย limiting amino acid คือ กรดอะมิโนที่มีปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของกรดอะมิโนที่ร่างกายต้องการ ดังนั้นถ้าโปรตีนมีปริมาณกรดอะมิโนในปริมาณต่ำเพียงหนึ่งชนิดหรือมากกว่า จะทำให้ประสิทธิภาพการนำกรดอะมิโนชนิดอื่นไปใช้ถูกจำกัดโดยกรดอะมิโนที่มีปริมาณต่ำที่สุด ส่งผลให้เกิดการยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโต ดังนั้นความต้องการโปรตีนของร่างกายควรพิจารณาจากโปรตีนที่มีปริมาณ

กรดอะมิโนจำเป็นในปริมาณและสัดส่วนที่เหมาะสมมากกว่าการเพิ่มปริมาณการรับประทานโปรตีน โดยความต้องการกรดอะมิโนในวัยต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณและสัดส่วนของกรดอะมิโนที่ร่างกายต้องการ (mg/g protein)

amino acid	เด็กทารก	เด็กเล็ก	ผู้ใหญ่
histidine	14	-	-
isoleucine	35	37	18
leucine	80	56	25
lysine	52	75	22
methionine + cystine	29	34	24
phenylalanine + tyrosine	63	34	25
threonine	44	44	13
tryptophan	8.5	4.6	6.5
valine	47	41	18

ที่มา: FAO/WHO/UNU (1981)

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเทมเป้

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเทมเป้คือ *Rhizopus* ssp. เช่น *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae* หรือใช้ผสมกัน โดยเมื่อใช้เชื้อราชนิดต่างกันจะมีผลต่อคุณภาพของเทมเป้ที่ผลิตได้ เนื่องจากระหว่างกระบวนการหมักเชื้อราจะผลิตเอนไซม์ชนิดและปริมาณที่ต่างกัน ซึ่งมีงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและโปรติเอสของเชื้อรา *Rhizopus* ชนิดต่าง ๆ พบว่า เชื้อ *R. arrhizus* และ *R. oryzae* มี amylolytic acitivity สูง *R. microsporus* มี amylolytic และ proteolytic acitivity สูง *R. oligosporus* มี amylolytic activity ค่อนข้างแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0.00-0.82 แต่มี proteolytic activity สูงถึง 0.98-1.02 (activity index) ซึ่งพบว่าสามารถย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลืองได้มากกว่าร้อยละ 50 เกิดกรดอะมิโนหรือสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ที่ละลายน้ำได้ จึงเหมาะสมกับกระบวนการผลิตเทมเป้ ในขณะที่ *R. stolonifer* ไม่มี amylolytic และ proteolytic activity (Lim, Tan และ Rahim, 1987) ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดเชื้อราจึงขึ้นกับวัตถุประสงค์ของกระบวนการผลิต

2.5 กระบวนการผลิตเทมเป้

เทมเป้เป็นอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักแบบ solid-substate fermentation (SSF) ที่ผลิตมาหลายร้อยปีแล้ว โดยกระบวนการผลิตเทมเป้มีข้อดีซึ่งแตกต่างจากอาหารหมักชนิดอื่นคือ มีขั้นตอนการผลิตง่าย ใช้เวลาสั้น สามารถใช้อุปกรณ์ที่มีอยู่ในครัวเรือนโดยไม่ต้องใช้เครื่องจักรและเทคโนโลยีระดับสูง จึงมีต้นทุนการผลิตต่ำ สามารถผลิตเองได้ที่บ้านและเหมาะกับกระบวนการผลิตเป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็กและขนาดกลางในระดับครัวเรือน ใช้วัตถุดิบเป็นพืชตระกูลถั่วหรือธัญพืชที่ปลูกในท้องถิ่นหรือส่วนที่เหลือจากกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ มาใช้ผลิตได้ เช่น กากถั่วเหลือง ถั่วลิสง และมันสำปะหลัง เป็นต้น มาผ่านกระบวนการผลิตทำให้ได้เทมเป้ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ราคาถูกเหมาะกับประเทศที่มีภูมิอากาศร้อนชื้นซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราโดยเฉพาะประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ประเทศไทย อินโดนีเซีย มาเลเซีย เป็นต้น จึงสามารถผลิตเทมเป้ได้ตลอดปีโดยไม่เกิดการสิ้นเปลืองพลังงาน กระบวนการผลิตเทมเป้มีขั้นตอนพื้นฐาน 4 ขั้นตอนคือ การแช่ (soaking) การต้ม (cooking) การผสมหัวเชื้อ (inoculating) และการบ่ม (incubating) ซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของเทมเป้ พื้นที่และบุคคลากรที่ผลิต โดยมีขั้นตอนการหมักคล้ายกัน ดังนี้ (Steinkraus, 1996)

1. การล้าง (cleaning) ทำความสะอาดวัตถุดิบและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเพื่อกำจัดเศษผง ฝุ่นละออง และสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ

2. การแช่น้ำ (soaking) และการลอกเปลือก (dehullling) ซึ่งการแช่น้ำเพื่อให้เกิดการดูดซับน้ำ (hydration) และการหมักเพื่อให้เกิดสภาวะกรดตามธรรมชาติ (bacterial acid fermentation) โดยกระบวนการผลิตแบบพื้นเมืองจะแช่ถั่วเหลืองในน้ำ 1 คืน ทำให้ค่า pH ลดลงเป็น 5.0 หรือต่ำกว่า หรืออาจแช่ถั่วเหลืองในน้ำแล้วต้มให้เดือด ทิ้งไว้ 1 คืนเช่นกัน จะทำให้ลอกเปลือกและทำให้เมล็ดแตกเป็น 2 ซีกได้ง่ายขึ้น ในกระบวนการผลิตเทมเป้จะมีการแช่น้ำ 1-2 ครั้ง ในระยะเวลาแตกต่างกัน (2-24 ชั่วโมง) หรืออาจมีการให้ความร้อน (precooking) ก่อนการแช่น้ำก็ได้ แต่โดยทั่วไปจะแช่ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เวลาประมาณ 12-15 ชั่วโมง (overnight) ควรแช่น้ำให้สูงกว่าวัตถุดิบประมาณ 5 เซนติเมตร เวลา 8-16 ชั่วโมง หรือต้มก่อน 20 นาที แล้วแช่ในน้ำที่ต้ม 2 ชั่วโมง (Steinkraus,1996) อาจเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักโดยเติมน้ำที่แช่ครั้งก่อนบางส่วนหรือเติมกรดลงไปผสมน้ำแช่ครั้งก่อนบางส่วนกับน้ำใหม่ 2 ส่วน ต่อถั่ว 1 ส่วน หรือเติม lactic acid (<0.5%) หรือ acetic acid (<0.25%) (Steinkraus, 1996) เพื่อให้เกิด acidification ซึ่งช่วยลดและควบคุมการเจริญเติบโตของ *Klebsiella pneumoniae* และช่วยยับยั้ง *Staphylococcus aureus* เพื่อป้องกันการผลิต enterotoxin นอกจากนี้ในขั้นตอนการแช่น้ำจะช่วยลดปริมาณ inhibitors ที่อยู่ในถั่วเหลือง เช่น แทนนิน น้ำที่ใช้แช่อาจพบแบคทีเรีย ได้แก่ Enterobacteriaceae

(ส่วนใหญ่พบเมื่อปล่อยให้เกิดการหมักตามธรรมชาติ), gram-negative rods shaped bacteria, *Lactobacillus* (ส่วนใหญ่พบเมื่อมีการใส่น้ำแช่ครั้งก่อนลงไป) *Flavobacterium* และ *Bacillus* เป็นต้น เชื้อยีสต์และรา ได้แก่ *Saccharomyces*, *Cryptococcus* เป็นต้น ดังนั้นการแช่น้ำที่ทำให้เกิดสภาวะกรดนั้นมีผลต่อองค์ประกอบทางจุลชีววิทยาในขั้นตอนต่อไปและผลิตภัณฑ์สุดท้าย

3. การให้ความร้อน (partial cooking) มีจุดประสงค์เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ซึ่งจะรบกวนการหมักของเชื้อราในกระบวนการผลิตขั้นต่อไป ทำลาย trypsin inhibitor และปลดปล่อยสารอาหารทำให้เชื้อรานำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่าวัตถุดิบ (Steinkraus, 1996) โดยทั่วไปในการผลิตระดับพื้นบ้านจะให้ความร้อนโดยการต้ม (cooking) ในน้ำที่แช่หรือใช้การนึ่ง (steaming) แทนจะทำให้เกิดการสูญเสียของแข็งทั้งหมดน้อยลง โดยใช้ระยะเวลาแตกต่างกันตั้งแต่ 20 นาทีถึง 1 ชั่วโมง (Steinkraus, 1996) ซึ่งในการผลิตเทมเป้ระดับโรงงานขั้นตอนการแช่น้ำและการให้ความร้อนจะใช้ steam-jacketed kettle ส่วนระดับครัวเรือนจะใช้หม้อธรรมดา (Steinkraus, 1996) การนึ่งที่ 100°C เวลา 15-30 นาที (Shurtleff และ Aoyagi, 1976) จะทำให้ถั่วเหลืองสุกบางส่วน (partial cooking) จึงทำให้โปรตีนเสียสภาพและทำลายโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งช่วยให้เชื้อราเจริญแทรกเข้าไปได้ดีขึ้น รวมถึงสารต้านคุณค่าทางโภชนาการที่ไม่ทนต่อความร้อนบางตัวจะถูกทำลาย เช่น trypsin inhibitors, haemaglutinins และ enzyme inhibitors อื่น ๆ ทำให้ร่างกายย่อยได้ง่ายขึ้น (Liu, 1999) โดยพบว่าถั่วเหลืองต้ม (Boiled whole soybean) มีค่า protein digestibility 91% โดยรสขมในถั่วเหลืองจะหายไปเมื่อต้มที่ 95°C อย่างน้อย 15 นาที ส่วนสารที่ทนความร้อนและสารที่ละลายในน้ำที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราซึ่งออกมากับน้ำที่ต้มจะถูกกำจัดออกไป โดยเมล็ดที่แช่น้ำแล้วให้ความร้อนจะเพียงพอในการกำจัดกลิ่นและรสขมในถั่วเหลืองได้ (Steinkraus, 1996)

4. การกรองแยกเมล็ดวัตถุดิบออกจากน้ำ (draining) ทิ้งให้เย็น (cooling) และทำให้ผิววัตถุดิบแห้ง (surface drying) เมื่อผ่านขั้นตอนการให้ความร้อนแล้วจะกรองแยกเมล็ดวัตถุดิบออกจากน้ำที่ใช้ต้มแล้วทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิประมาณ 35-40°C แต่ไม่ควรทิ้งให้เย็นเกินไปก่อนผสมกับกล้าเชื้อเทมเป้เนื่องจากจะอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา (Hedger, 1982) โดยที่ผิววัตถุดิบจะต้องไม่มีชั้นน้ำเกาะเคลือบอยู่เนื่องจากน้ำส่วนเกินที่เกิดขึ้นจะส่งเสริมให้เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ดีโดยเฉพาะ *Bacillus subtilis* และเกิดการปนเปื้อนรวมถึงยับยั้งในกระบวนการหมักของเชื้อรา อย่างไรก็ตามสามารถทำให้บริเวณผิวเมล็ดแห้งด้วยการเกลี่ยให้ถั่วแผ่เป็นชั้นบาง ๆ บนตะแกรง ใช้ผ้าบางหรือกระดาษ (paper towel) ซับน้ำส่วนเกินออก เติมแป้งข้าวสาลี แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้าหรือแป้งมันสำปะหลังประมาณร้อยละ 2 (w/w) ลงไปเคลือบที่ผิวและดูดซับน้ำที่เกินไว้ (Shurtleff และ Aoyagi, 1976) ซึ่งจะช่วยเร่งการเจริญของเชื้อราและทำให้ได้เทมเป้ที่แน่นขึ้น หรือตามวิธีพื้นบ้านจะแผ่เมล็ดถั่วเหลืองบนถาดไม้ไผ่ (tampah) วางไว้

กลางแจ้งเพื่อระเหยน้ำออกและทำให้วัตถุดิบเย็นลง ที่อุณหภูมิห้องในเวลา 30-60 นาที (Shurtleff และ Aoyagi, 1976) โดยเมล็ดถั่วมีผิวค่อนข้างแห้งจะมีสีด้าน แต่ถ้ามีความวาวแสดงว่ายังคงเปียกอยู่ ในกรณีที่ผลิตในปริมาณมากอาจใช้ basket centrifuges เพื่อทำให้เกิดการกำจัดน้ำที่ต้มออก แล้วผ่านน้ำประปาที่เย็นลงไปใน centrifuge ที่หมุน วิธีนี้จะทำให้วัตถุดิบเย็นลงรวดเร็วขึ้น แต่ยังคงเหลือความชื้นบางส่วน (Steinkraus, 1996)

5. การผสมกล้าเชื้อ (inoculation of starter culture) ควรผสมหัวเชื้อให้ทั่วถึง ภายในระยะเวลาสั้น เนื่องจากมีผลต่อการปนเปื้อนและช่วยให้หมักได้เร็วขึ้น เชื้อราที่ใช้ผลิตเทมเป้โดยทั่วไปอยู่ในสกุล *Rhizopus* ได้แก่ *R. oligosporus* *R. oryzae* *R. arrhilus* *R. stolonifer* *R. fermosaesis* *R. achlamydosporus* *R. chinesis* และ *R. cohnii* เป็นต้น โดยมีการศึกษาพบว่า *R. oryzae* จะทำให้เทมเป้ที่ได้มีรสเปรี้ยว ส่วน *R. arrhinus* จะผลิตได้เทมเป้คุณภาพต่ำ และ *R. oligosporus* เหมาะสมที่สุดสำหรับการใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักเทมเป้ เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30-42°C โดยจะสร้างเส้นใยปกคลุมวัตถุดิบทั่วทั้งแผ่นได้ภายใน 20-24 ชั่วโมง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดอื่น ๆ เจริญแข่งขันได้ยาก และเจริญที่ pH ของวัตถุดิบที่ต่ำประมาณ 4.0 ได้ และได้มีการคัดเลือกเชื้อไว้หลายสายพันธุ์ด้วยกัน เช่น *R. oligosporus* NRRL 1521 NRRL 2710 NRRL 5905 และ CBS 338.62 เป็นต้น (นภา โล่ห์ทอง , 2537) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของชนิดเชื้อที่ใช้ผลิตต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี เช่น ธงชัย (2531) ผลิตเทมเป้จากถั่วลิสงลอกเยื่อพร่องไขมันและลอกเยื่อและพร่องไขมันบางส่วน โดยใช้เชื้อ *Rhizopus oligosporus* และ *Neurospora sitophila* พบว่าได้เทมเป้ที่ได้มีองค์ประกอบทางเคมีต่างกัน ซึ่งกล้าเชื้อเทมเป้ ที่ใช้กันจะมีอยู่หลายลักษณะ ดังนี้

เทมเป้ที่เก็บไว้จนเชื้อราสร้างสปอร์ (sporulated tempe) ซึ่งจะสะดวกในกรณีที่มีการใช้อย่างต่อเนื่อง แต่ไม่ควรใช้ต่อเนื่องกันมากกว่า 5-6 ครั้ง (Steinkraus, 1996) เนื่องจากเทมเป้ที่เก็บไว้จะมีแบคทีเรียปนเปื้อนมากขึ้นและเทมเป้เก่านี้จะสามารถเก็บเป็นกล้าเชื้อได้นานขึ้น ถ้านำไปตากแดดให้แห้งหรือใช้เทมเป้ที่มีคุณภาพดีมาตากแดดหรือทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วบดเป็นผงละเอียดไว้ใช้ต่อไป ซึ่งโดยทั่วไปใช้ในอัตราส่วน 1-3 กรัม ต่อถั่วเหลือง 1000 กรัม (Steinkraus, 1996)

ยูซาร์ (usar) คือ กล้าเชื้อพื้นบ้านที่มีมานานแล้ว ผลิตโดยให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญบนใบไม้บางชนิดที่มีขนใต้ใบ ได้แก่พืชสกุล *Hibiscus* เช่น *H. tiliaceus* (ปอทะเลหรือโพธิ์ทะเล) *H. similes* (ไม้พื้นเมืองของประเทศอินโดนีเซีย) *Tectona grandis* (ใบสัก) และ *Bambusa* spp. (ใบไผ่) ทำให้แห้ง แล้วบดเป็นผงละเอียดไว้ใช้เป็นหัวเชื้อ โดยแต่ละท้องถิ่นมีกรรมวิธีการผลิตคล้ายกัน (Wang และคณะ, 1975)

ลูกแป้งเทมเป้ (ragi-tempe inocula) โดยผลิตจากข้าว (rice cake) ผสมกับเชื้อราเทมเป้และเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ปั้นเป็นก้อนกลมแบนเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5 เซนติเมตร (Steinkraus, 1996)

กล้าเชื้อบริสุทธิ์ (pure mold starter) มักใช้ในกระบวนการผลิตเทมเป้ระดับอุตสาหกรรม ซึ่งส่วนใหญ่เชื้อราสายพันธุ์ *Rhizopus oligosporus* ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว โดยใช้วัตถุดิบและวิธีการผลิตต่างกัน เช่น ผงสปอร์เชื้อจากการใช้ถั่วเหลืองที่ผ่านการแยกเปลือก แช่น้ำ 2 ชม. แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C 30 นาทีเป็นวัตถุดิบผสมกับ spore suspension ของเชื้อรา โดยเพาะเลี้ยงในฟลาสค์แบบเฟอร์นบัค (Fernbach flask) บ่มที่ 37°C 4 วัน จากนั้นนำไปไลโอฟิลไลส์แล้วบดให้ละเอียดด้วย Burr mill ในสภาพปลอดเชื้อ เก็บในภาชนะที่แห้ง โดยใช้กล้าเชื้อประมาณ 1-3 กรัมต่อถั่วเหลือง 1 กิโลกรัม (Steinkraus, 1996) นอกจากนี้ยังมีการใช้ข้าวเจ้านึ่งสุกเป็นวัตถุดิบ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในภาชนะต่าง ๆ กัน เช่น ถาดอลูมิเนียมที่เจาะรูให้อากาศเข้าออกได้ กระด้งไม้ไผ่ หรือกล่องเหล็กไร้สนิม เป็นต้น (นภา โล่ห์ทอง, 2537) ในปัจจุบันสหรัฐอเมริกาได้มีการผลิตผงเชื้อบรรจุซองเล็ก ๆ และจัดเป็นชุดสำหรับผลิตเทมเป้ซึ่งประกอบด้วยถั่วเหลือง ผงเชื้อ และรายละเอียดวิธีการผลิตจำหน่ายแก่ผู้บริโภคที่ต้องการผลิตเทมเป้เองในครัวเรือน (Shurtleff และ Aoyagi, 1976)

สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราบริสุทธิ์ (spore suspension) มักใช้ในห้องปฏิบัติการหรือกระบวนการหมักระดับอุตสาหกรรม โดยการเติมน้ำกลั่นหรือ normal saline ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในสปอร์ของเชื้อราโดยตรง (Steinkraus, 1996)

6. ภาชนะบ่มที่ใช้หมัก โดยภาชนะบรรจุที่ดีจะต้องให้อากาศผ่านเข้าออกได้ในปริมาณที่พอเหมาะ ดังนั้นควรเจาะรูเล็ก ๆ ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.6-1.0 มิลลิเมตรเพื่อให้เชื้อราได้รับก๊าซออกซิเจนในการหายใจอย่างเพียงพอและเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังช่วยระบายความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก แต่ถ้าไม่มีการเจาะรูจะทำให้เชื้อราเจริญได้เพียงเล็กน้อย แต่แบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศและยีสต์เจริญได้ดี ในทางตรงกันข้ามถ้าเจาะรูขนาดใหญ่เกินไปหรือได้รับอากาศมากเกินไปจะทำให้เชื้อราเกิดการสร้างสปอร์และจะเจริญได้ดีมากและเกิดความร้อนสูง อุณหภูมิของวัตถุดิบจึงเพิ่มขึ้นมากกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา ซึ่งแบคทีเรียที่ทนความร้อน (thermophilic bacteria) จะสามารถเจริญปนเปื้อนได้ดี เกิดการย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) และการย่อยสลายอื่น ๆ ทำให้เปียกชุ่ม มีกลิ่นรุนแรง เนื้อสัมผัสร่วนไม่เกาะกัน (Hedger, 1982) โดยชาวอินโดนีเซียพื้นเมืองใช้ใบตอง (ที่ตากแดดให้นิ่มแล้ว) หรือใบไม้ชนิดอื่นที่มีขนาดใหญ่ (Shurtleff และ Aoyagi, 1976) ในขณะกระบวนการผลิตสมัยใหม่ใช้ถุงพลาสติก โดยบรรจุวัตถุดิบก่อนบ่มเป็นแผ่นหนาประมาณ 1-2 เซนติเมตร เพื่อให้ได้รับอากาศเพียงพอและควรเจาะรูด้วย hot needle เป็นช่วง ๆ ห่างกันอย่างสม่ำเสมอ 1-2

เซนติเมตรทั่วทั้งถุง (Steinkraus, 1996) แล้วปิดปากถุง ในห้องปฏิบัติการใช้จานเพาะเลี้ยงเชื้อแต่จะได้เทมเป้ที่มีคุณภาพต่ำกว่าปกติเล็กน้อย (Hedger, 1982)

7. การบ่ม (incubation) ถ้าเป็นวิธีพื้นเมืองจะบ่มในห้องที่มีอุณหภูมิอบอุ่น 2-3 วัน จนพบว่าเส้นใยเชื้อราเจริญบนถั่วเหลืองอย่างสมบูรณ์ การบ่มไม่ควรวางซ้อนทับกัน เนื่องจากจะทำให้จำกัดปริมาณอากาศและควรกลับด้านหลังจากบ่มได้ 16-20 ชั่วโมง (Hedger, 1982) ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก ได้แก่ อุณหภูมิการบ่ม โดยอัตราเร็วของการหมักขึ้นกับอุณหภูมิการบ่ม ถ้าอุณหภูมิการบ่มสูงระยะเวลาการหมักเทมเป้จะสั้น โดยอุณหภูมิการบ่มควรอยู่ประมาณ 28-30°C ถ้าอุณหภูมิบ่มสูงกว่า 40°C และต่ำกว่า 25°C จะทำให้ได้เทมเป้คุณภาพไม่ดี (Hedger, 1982) ดังนั้นจึงควรควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมตลอดระยะเวลาการบ่มเทมเป้ (Shurtleff และ Aoyagi, 1976) ความชื้น เป็นปัจจัยที่สำคัญในการทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ เนื่องจากถ้าวัตถุดิบเริ่มต้นมีความชื้นมากเกินไป จุลินทรีย์ชนิดอื่นจะสามารถเจริญได้ดี พร้อมกับเชื้อราที่ใช้ผลิตเทมเป้จะทำให้เกิดเนื้อสัมผัสเป็นเมือก (slimy texture) และให้กลิ่นรสที่ไม่ต้องการ (off-flavor) โดยความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราคือ 60-85% (สุจินดา สุวรรณกิจ, 2534) pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราคือประมาณ 6-7 (สุจินดา สุวรรณกิจ, 2534) อากาศที่ได้รับควรอยู่ในระดับพอเหมาะคือ ประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไม่เกิน 5-10% v/v ส่วนปริมาณออกซิเจนไม่จำกัดแต่ไม่ควรต่ำกว่า 0.5% ซึ่งจะทำให้การเจริญของเชื้อราลดลง (Han และ Nout, 2000) ปริมาณแสง ควรบ่มในห้องมืด รวมทั้งสายพันธุ์ของกล้าเชื้อ ความหนาแน่น และชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเทมเป้

8. การเก็บเกี่ยวเทมเป้ (harvesting) ลักษณะของเทมเป้ที่ดีที่แสดงว่าหมักเสร็จสมบูรณ์ คือ ที่สภาวะสุดท้ายของการหมักถั่วเหลืองหรือวัตถุดิบชนิดอื่นที่ใช้ต้องจับตัวกันแน่นปกคลุมด้วยเส้นใยสีขาวของเชื้อราทั่วทั้งแผ่น เมื่อตัดขวางจะพบว่าพื้นที่ว่างระหว่างเมล็ดถั่วจะถูกเติมด้วยเส้นใยสีขาวของเชื้อราจนเต็ม โดยแผ่นเทมเป้ที่ได้จะต้องแน่น เมื่อถือมุมใดมุมหนึ่งควรจะงอเพียงเล็กน้อย ถ้ามีเส้นใยสีเทาหรือสีดำ และกลิ่นแอมโมเนียรุนแรงเกิดขึ้นแสดงว่าบ่มนานเกินไป (Steinkraus, 1996) ส่วนแผ่นเทมเป้ที่นิ่มและมีเส้นใยเชื้อราระหว่างช่องวัตถุดิบเพียงเล็กน้อย เส้นใยเกาะกันหลวม เมื่อหั่นเทมเป้ทำให้ถั่วหรือวัตถุดิบหลุดออกจากกันและแตกง่าย แสดงว่าบ่มยังไม่ได้ที่ อุณหภูมิบ่มในช่วงสุดท้ายสูงเกินไปหรือเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย (Steinkraus, 1996) โดยถ้าเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียจะเกิดกลิ่นรสที่ไม่ต้องการ ส่วนจุดสีดำรอบ ๆ รูที่รับอากาศ เกิดจากการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่ได้รับออกซิเจนมากเกินไปแต่ไม่มีผลต่อคุณภาพเทมเป้ (Steinkraus, 1996) และวงสีเหลืองที่เกิดขึ้น เกิดจากเชื้อราสร้าง β-carotene เนื่องจากได้รับแสงระหว่างการหมัก ในขณะที่บางครั้งอาจพบจุดสีดำหรือสีเทาบ้างเล็กน้อย แต่ไม่ควรเปลี่ยนเป็นสีชมพู เหลืองหรือน้ำเงินซึ่งแสดงว่าหมักนานเกินไป (Hedger, 1982)

2.6 การเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมักเทมเป้

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เมื่อหมักได้ 12-20 ชั่วโมง เส้นใยของเชื้อราจะปกคลุมบนเมล็ดถั่วเหลืองแต่ยังคงมองเห็นเมล็ดถั่วเหลือง ส่วนจุดหรือวงเปียก ที่ไม่มีเส้นใยขึ้นปกคลุม แสดงว่าเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียควรทิ้ง และเมื่อหมักได้ 12-16 ชั่วโมง จะเกิดความร้อนขึ้น โดยถ้าตู้บ่มมีขนาดเล็กและใช้บ่มเทมเป้ในปริมาณมาก อุณหภูมิในแผ่นเทมเป้อาจจะสูงถึง 50°C และควรตรวจเช็คการเจริญเติบโตของเชื้อรา ถ้าเทมเป้มีความร้อนมากเกินไปที่ช่วงเวลา 16-24 ชั่วโมง สามารถเคลื่อนย้ายไปตู้บ่มที่สามารถลดอุณหภูมิลงได้หรือเปิดตู้บ่มทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการระบายอากาศ (Hedger, 1982) ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญเพื่อทำให้กระบวนการหมักเสร็จสมบูรณ์ระหว่างการบ่มภายใน 16-20 ชั่วโมง (Hedger, 1982)

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี จะเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของสารอาหารบางชนิดและเกิดการสร้างวิตามินต่าง ๆ phytochemicals และสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เชื้อราจะสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายองค์ประกอบในถั่วเหลือง แล้วสร้างกลิ่น รสชาติและเนื้อสัมผัสเฉพาะตัว นอกจากนี้การย่อยสลายจากเอ็นไซม์ยังลดหรือกำจัดองค์ประกอบที่ต้านการดูดซึมสารอาหาร (antinutritional components) (Shurtleff และ Aoyagi, 1976) ดังนั้นจึงเป็นการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก จะทำให้ค่าการย่อยและปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น ดังงานวิจัยของ Paresdes-Lopez, Harry และ Gonzalez-Castaneda (1990) ผลิตเทมเป้จาก common beans พบว่าเชื้อราจะสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายองค์ประกอบในถั่วเหลืองทำให้ได้เทมเป้ที่มีเนื้อสัมผัส กลิ่นและรสชาติที่ต้องการ ปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการ นอกจากนี้ยังช่วยทำให้เก็บรักษาได้นานขึ้น และพบว่าเมื่อหมักเทมเป้จาก fresh common beans และ hard-to-cook common beans ที่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีนจะเพิ่มขึ้นจากวัตถุดิบที่ยังไม่ผ่านการหมัก แต่ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไขมันและเส้นใยลดลงเนื่องจากเชื้อราใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโต ส่วนค่า pH จะเพิ่มขึ้นใกล้ความเป็นกลาง หลังจากหมักได้ประมาณ 48 ชั่วโมง เนื่องจากการปลดปล่อยแอมโมเนีย ซึ่งระหว่างกระบวนการหมักเทมเป้เชื้อราจะสร้างเอ็นไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น protease และ lipase เป็นต้น ย่อยสลายสารอาหารในวัตถุดิบ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในการเจริญเติบโต ทำให้ปริมาณ total dry matter ลดลงประมาณ 7-10% (Ruiz-Terán และ Owens, 1996; Steinkraus, 1996 และ Van der Riet และคณะ, 1987) ไขมันจะถูกย่อยสลายเป็นกรดไขมันอิสระโดยพบในเทมเป้ที่หมักเสร็จสมบูรณ์แล้วประมาณ 15-30% ของไขมันทั้งหมด (total crude lipid) เมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบซึ่งพบในวัตถุดิบเพียงร้อยละ 1 เท่านั้น โดยปริมาณไขมันทั้งหมดในเทมเป้จะลดลงจากวัตถุดิบประมาณ 13% (Ruiz-Terán และ Owens, 1996) โปรตีนจะถูกเชื้อรายย่อย

เป็นกรดอะมิโนอิสระ (free amino acids) ทำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากวัตถุดิบก่อนการหมักคือ 0.2% เป็น 2-5% ในเทมเป้ (Murata และคณะ, 1967 และ Nowak และ Szebiotko, 1992) ปริมาณโปรตีนทั้งหมดจะเปลี่ยนแปลงน้อยมาก รวมถึงปริมาณแร่ธาตุจะคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก (Ruiz-Terán และ Owens, 1996) ส่วนการเปลี่ยนแปลงวิตามิน Wang และ Hesseltine (1966) ผลิตเทมเป้จากข้าวสาลีพบว่ามีปริมาณวิตามินบี 12 niacin และ riboflavin สูงขึ้น

2.7 การติดตามการเจริญของเชื้อรา

กระบวนการหมักแบบ solid state fermentation มีข้อจำกัดในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อราระหว่างกระบวนการหมัก เนื่องจากเป็นระบบที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันและซับซ้อน โดยเฉพาะการตรวจวัดปริมาณการเจริญของเชื้อราหรือเส้นใยของเชื้อรา (fungal หรือ micelial biomass) บนวัตถุดิบซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่เห็นได้ชัดเจนที่ใช้ในการติดตามกระบวนการหมักเพื่อควบคุมกระบวนการหมักให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราหรือพัฒนาระบบการหมักในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปนั้น ทำได้ยากเนื่องจากเส้นใยของเชื้อราเจริญแทรกผ่านเข้าไปในเนื้อของเหลวในวัตถุดิบ (solid matrix) โดยในทางปฏิบัติไม่สามารถแยกเส้นใยของเชื้อราออกจากวัตถุดิบได้อย่างสมบูรณ์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อหาวิธีการตรวจวัดปริมาณการเจริญของเชื้อราทางอ้อมโดยการประมาณการเจริญของเชื้อราทางกายภาพ เช่น ใช้วิธีทาง microscopic สังเกตการณ์เจริญของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ระหว่างการผลิตเทมเป้ แต่จะประมาณค่าทางปริมาณเป็นน้ำหนักของเชื้อราได้ยาก (Jurus และ Sundberg, 1976) วิธีทางเคมีเป็นวิธีที่ง่ายและมีความไวสูง จะประมาณการเจริญของเชื้อราจากองค์ประกอบที่มีในเชื้อราแต่ไม่มีในวัตถุดิบเช่น กลูโคซามีน (glucosamine), เออโกสเตอรอล (ergosterol), ATP หรือตรวจวัดกิจกรรมทางชีวภาพ (biological activities) เช่น กิจกรรมของเอนไซม์ (enzymic activity) อัตราการหายใจ (respiration rate) หรืออัตราการใช้สารอาหาร (nutrient consumption rate) เป็นต้น (Desgranges และคณะ, 1991) หรือตรวจวัดการเพิ่มน้ำหนักของเชื้อราจากค่าการเปลี่ยนแปลงของคลื่นความถี่ชนิดต่าง ๆ จากหัววัดเซ็นเซอร์ (Davey และคณะ, 1991) โดยจากวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น การติดตามปริมาณกลูโคซามีน เป็นปัจจัยที่ดีที่บ่งชี้ถึงการเจริญของเชื้อรา (Sparringa และ Owens, 1999) โดยมีงานวิจัยที่ติดตามการเปลี่ยนแปลงการเจริญของเชื้อราในกระบวนการหมักเทมเป้จากปริมาณกลูโคซามีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รา (Ruiz-Teran และ Owens, 1996) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคซามีนกับปริมาณของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* โดยใช้น้ำหนักแห้งของเทมเป้ พบว่าสามารถให้ค่าที่เที่ยงตรง (reproducible) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การแปรผันอยู่ในช่วงร้อยละ 3-11 ตามชนิด

ของอาหาร (Sparringa และ Owens, 1999) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกลูโคซามีนของเส้นใยเชื้อราขึ้นกับชนิดและองค์ประกอบของอาหารที่เชื้อราเจริญ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกลุ่มก้อนเส้นใยของเชื้อรา (mycelial pellets) อายุของเชื้อรา เป็นต้น (Ride และ Drysdale, 1971; Desgranges และคณะ, 1991 และ Sparringa และ Owens, 1999) สร้างระบบจำลอง เพื่อให้เชื้อราเจริญเติบโต ที่มีสภาวะเหมือนจริงมากที่สุด แต่วัตถุดิบที่จำลองขึ้นนั้นจะมีโครงสร้างและมีสารอาหารที่เป็นเนื้อเดียวกัน สามารถปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสารอาหารตามต้องการ นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อราออกจากวัตถุดิบด้วยการกรองแยกได้

เซลล์ผนังเส้นใยเชื้อราประกอบด้วย ไคติน (chitin) คือ โพลิเมอร์ของ N-acetylglucosamine ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α, 1-4 links เป็นสายโซ่ตรง ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญและพบมากที่สุดในผนังเซลล์ของเชื้อราแต่ไม่พบหรือพบสารที่มีคุณสมบัติคล้ายไคตินน้อยมากในพืชชั้นสูง เช่น มะเขือเทศดังนั้นการวัดปริมาณไคตินในผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศจึงใช้เป็นค่าที่แสดงถึงการปนเปื้อนจากเชื้อราได้ดี (Ride และ Drysdale, 1971) นอกจากนี้ยังมีการใช้ไคตินแสดงถึงการปนเปื้อนจากเชื้อราระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดข้าวโพดและถั่วเหลือง (Donald และ Mirocha, 1977) โดยขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณไคตินประกอบด้วย การสลายพันธะของไคติน (depolymerization) และการตัดหมู่อะเซทิล (deacetylation) ด้วยกรดแก่ (acid hydrolysis) เช่น กรดซัลฟิวริก กรดไฮโดรคลอริก เป็นต้น ด่างแก่ (alkaline hydrolysis) เช่น โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น หรือเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) เพื่อให้ได้ไคโตซาน (chitosan) (Aidoo, Hendry และ Wood, 1981) โดยการใช้กรดหรือด่างแก่ในการสลายพันธะให้สมบูรณ์ จะใช้เวลาสั้นกว่าการใช้เอนไซม์ ส่วนการใช้เอ็นไซม์จะใช้เวลานานเนื่องจากต้องใช้เอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงเพื่อให้เกิดการย่อยและได้สารที่ต้องการ (Ride และ Drysdale, 1971) ซึ่งข้อดีเมื่อใช้ด่างในการตัดหมู่อะเซทิล คือ ลดการรบกวนจากองค์ประกอบในพืช (Aidoo, Hendry และ Wood, 1981) ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อหาวิธีการย่อยสลายไคตินด้วยด่างเพื่อให้สะดวกและสามารถประยุกต์ใช้วิเคราะห์ได้ทั่วไป โดยพบว่าเมื่อย่อยด้วยด่างที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิสูงจะเกิดการย่อยสลายสารโพลิเมอร์ของไคตินบางส่วนแต่ส่วนใหญ่จะเกิดการตัดหมู่อะเซทิล (deacetylation) ทำให้เกิดกลุ่มของสารประกอบไคโตซาน (chitosan) ซึ่งไม่ละลายในด่างและสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้นที่จะใช้ล้างด่างออกจากสารประกอบไคโตซาน (Ride และ Drysdale, 1972) และในขั้นตอนสุดท้ายคือ การกำจัดหมู่เอมีน (deamination) เพื่อเปลี่ยนไคโตซานเป็นสารประกอบ aldehyde 2,5-anhydromannose ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคซามีน แต่ยังอาจพบไคโตซานที่เหลืออยู่บางส่วนได้ การตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น HPLC (Ester และคณะ, 2006), Colorimetric โดยใช้ Erhlick's reagent หรือ 3-methyl-2-benzothiazone hydrazone (MBTH) ในปฏิกิริยาการเปลี่ยน

สีเพื่อใช้ประมาณการเจริญของเชื้อราที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะมีความไวสูง (Ride และ Drysdale, 1972 และ Tsuji, Kinoshita และ Hoshino, 1969) โดยมีงานวิจัยศึกษาเพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีนระหว่างกระบวนการหมักโคจิที่ได้จากการผสมถั่วเหลืองและข้าวสาลีพบว่า การย่อยสลายไคตินด้วยกรดไฮโดรคลอริกเพื่อให้ได้กลูโคซามีน แล้วตรวจวัดปริมาณด้วย Erhlick's reagent จะทำให้ได้ค่าแบลงค์ที่สูงและสามารถตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีนได้ต่ำเพียงร้อยละ 61.0 และ 68.5 ของทั้งหมด แต่การย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกแล้วตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีนด้วย MBTH และ ferric chloride สามารถตรวจวัดได้สูงถึงร้อยละ 81.0 แต่อย่างไรก็ตาม reagent blank และ sample blank ยังคงให้ค่าสูงอยู่ (Aidoo, Hendry และ Wood, 1981) นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงกระบวนการย่อยสลายไคตินให้เป็นกลูโคซามีนด้วยกรดไนตรัส (nitrous acid) แล้วตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีนด้วย MBTH และเฟอริกคลอไรด์ (ferric chloride) พบว่าสามารถตรวจวัดได้ถึงร้อยละ 93.2 ของเฮกโซซามีนทั้งหมด (hexosamine) รวมถึงให้ค่า blank ต่ำ ดังนั้นจึงเป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสมในการใช้ตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีน (Ride และ Drysdale 1972)

2.8 การเก็บรักษาเทมเป้

เทมเป้มีอายุการเก็บรักษาจำกัดโดยเทมเป้สดสามารถเก็บในตู้เย็น (6-10°C) ได้เพียง 7-10 วัน (Hedger, 1982) เนื่องจากกิจกรรมของเอ็นไซม์ที่สร้างจากเชื้อรา ซึ่งทำให้เทมเป้สดเกิดสีน้ำตาล เนื้อสัมผัสนิ่มและเละ มีกลิ่นแอมโมเนีย รวมถึงเส้นใยเชื้อราจะเสื่อมและมองเห็นเมล็ดวัตถุดิบ ซึ่งในประเทศอินโดนีเซียเรียกเทมเป้ลักษณะนี้ว่า tempe bosok (ripe tempe) แต่ถึงแม้ว่า tempe bosok จะไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคในการนำมาทอดหรือทำสตู แต่ชาวอินโดนีเซียจะใช้เป็นส่วนผสมในคุกกี้ที่ให้กลิ่นแรง (mendol) ซึ่งเป็นรสที่คุ้นเคยและชื่นชอบ แต่อาจนำมานึ่งที่ 100°C เวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอ็นไซม์และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้ นอกจากนี้ยังมีการนำเทมเป้สดมาแช่แข็งทันทีจะสามารถเก็บรักษาเทมเป้ได้หลายเดือน และยังมีการยืดอายุการเก็บรักษาเทมเป้โดยต้มในน้ำเกลือ นึ่ง บรรจุกระป๋อง (canning) (Nout และ Rombouts, 1990) และทำแห้ง โดย air-dried tempeh สามารถเก็บรักษาได้นาน 6 เดือน ในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนโดยไม่เกิดการปนเปื้อนและการเปลี่ยนแปลงกลิ่นและรสชาติ (Vaidehi, Annapurna และ Vishwanath, 1985) หรือนำมาทอดกรอบ (Shurtleff และ Aoyagi,1976) เป็นต้น

2.9 รูปแบบการบริโภคเทมเป้

เทมเป้ที่ผลิตได้สามารถนำมาประกอบอาหารเพื่อบริโภคหรือจำหน่ายในรูปเทมเป้สด แช่เย็นหรือแช่แข็ง หรืออาจอยู่ในรูปของผงเทมเป้ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในการปรุงและประกอบอาหารชนิดอื่น ๆ เนื่องจากเทมเป้สามารถดูดซับกลิ่นรสของเครื่องปรุงและอาหารชนิดอื่นที่นำมาปรุงได้ง่าย จึงสามารถประยุกต์ใช้เทมเป้เป็นส่วนผสมประยุกต์ในอาหารได้หลายชนิด และประเภท เช่น sandwiches satays salads cookies barbecued biscuits จากแป้งเทมเป้ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ หรือ crisps ตลอดจนอาหารขบเคี้ยว และ atoles (custard-type desserts) (Shurtleff และ Aoyagi,1976) หรือหั่นเป็นก้อนสี่เหลี่ยมใช้แทนเนื้อสัตว์เติมใน soups, curries, spaghetti sauce และ casseroles ในการประกอบอาหารมังสวิรัติ โดยการให้ความร้อนจะทำให้เทมเป้มีกลิ่นรสคล้ายเนื้อสัตว์จึงนิยมปรุงเป็นอาหารจานหลัก (meal) ร่วมกับข้าวแทนเนื้อสัตว์ ไก่ และปลา โดยทั่วไปชาวอินโดนีเซียนิยมบริโภคเทมเป้เป็นอาหารขบเคี้ยว โดยการหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วนำมาทอดจนกระทั่งมีผิวมีสีน้ำตาลทองและกรอบ (Shurtleff และ Aoyagi,1976) บางครั้งอาจบริโภคเทมเป้ดิบ (Shurtleff และ Aoyagi,1976) โดยเฉพาะหลังจากบ่มเสร็จทันทีเนื่องจากเทมเป้ที่ได้จะสดมากและมีวิตามินมากว่าเทมเป้ที่ผ่านความร้อน และเอ็นไซม์จากเชื้อราจะไม่ถูกทำลายจึงช่วยในการย่อยได้ดีขึ้น ซึ่งไม่มีข้อมูลบ่งบอกว่าเทมเป้ดิบส่งผลเสียต่อสุขภาพ แต่ก็ยังไม่มีหลักฐานเพียงพอจากผู้บริโภคเทมเป้ว่ารู้สึกดีหลังจากบริโภคเทมเป้ดิบ ซึ่งโดยทั่วไปจะไม่นิยมบริโภคเทมเป้ดิบ ปัจจุบันได้มีการผลิตเทมเป้เป็นการค้าขึ้นในหลายประเทศ เช่น อเมริกา แคนาดา เนเธอร์แลนด์ ออสเตรเลีย แอฟริกา และญี่ปุ่น ซึ่งส่วนใหญ่นิยมบริโภคในหมู่ผู้รับประทานอาหารมังสวิรัติ โดยดัดแปลงวิธีการบริโภคให้เหมาะสมกับชาวตะวันตกมากขึ้น เช่น นำมาใส่ในแซนวิช หรือเบอร์เกอร์แทนเนยแข็งหรือเนื้อบด หรือปรุงเป็นหน้าสำหรับทาขนมปัง เป็นต้น (Shurtleff และ Aoyagi,1976) นอกจากนี้ยังไม่มีการกำหนดปริมาณที่เหมาะสมในการบริโภคเทมเป้ว่าควรมากหรือน้อยเท่าใด จึงควรบริโภคในปริมาณที่เหมาะสมทำให้เกิดสมดุลของสารอาหาร โดย FAO แนะนำให้บริโภคโปรตีนจากถั่วเหลืองประมาณ 2.5 กรัมต่อวัน ซึ่งเท่ากับเทมเป้ 125 กรัม มีงานวิจัยมากมายที่มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเทมเป้ เช่น ผลิต tempeh toffee, tempeh chips แบบเค็มและหวาน โดยนำเทมเป้สดมาปั่นแล้วขึ้นรูปใหม่ ผลิตแป้งหรือ porridges เช่น สุภางค์ (2539) กล่าวว่าสถาบันวิจัยอาหารที่เมือง Bogor ประเทศอินโดนีเซียได้มีการพัฒนาเทมเป้ผสมที่มีราคาถูกแต่คุณภาพสูง ซึ่งประกอบด้วย เทมเป้ เนื้อปลาและข้าว เรียกว่า TFR (tempeh fish rice) โดยผลิตเป็นอาหารสำหรับเด็กทารกวัย 6-12 เดือน แล้วทดสอบกับเด็กที่เป็นโรค PCM (protein calorie malnutrition) พบว่าช่วยในการเพิ่มน้ำหนักและปรับปรุงสภาพร่างกายของเด็กได้ดี รวมถึงมีการผลิตอาหารทารกที่มีราคาถูกที่ได้รับการยอมรับและมีคุณค่าทางโภชนาการจากเทม

เป้ที่ได้จาก fingermillet (*Eleusine caracana*) ผสมกับ commonbeans, groundnuts, cowpea, mungbean, chickpea, seasame ในอัตราส่วนร้อยละ 70:30 โดยน้ำหนักแห้ง โดยใช้หัวเชื้อ *R. oligosporus* NRRL 2710 (Mugula และ Lyimo 2000) นอกจากนี้ยังมีการผลิตอาหารขบเคี้ยว Hesseltine (1965) กล่าวว่าเทมเป้ที่ทอดด้วยน้ำมันพืชร้อน ๆ จะมีรสชาติดี Youch และคณะ (1979) เติมเทมเป้ในแป้งมันฝรั่งหรือธัญพืชแล้ว pre-gelatinized ทำให้เป็นผงแล้วทอดจะได้รับการยอมรับมากขึ้น Nout และ Rombouts (1990) ผลิตอาหารขบเคี้ยวจากมันฝรั่งผสมเทมเป้ โดยผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยว (snack food) พัฒนาจากอาหารที่ใช้รับประทานเป็นอาหารว่างระหว่างมื้อหรือที่เรียกว่าอาหารว่าง เป็นอาหารที่เตรียมง่าย มีส่วนประกอบไม่มาก รับประทานสะดวก พกติดตัวได้และพร้อมบริโภคทันที สอดคล้องกับวิถีการดำเนินชีวิตของผู้บริโภคที่เร่งรีบและไม่มีเวลาจัดเตรียมมากนัก โดยผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยวที่จำหน่ายในท้องตลาดมีหลายรูปแบบ ซึ่งผลิตจากวัตถุดิบและวิธีการผลิตที่แตกต่างกันไป ทำให้อาหารขบเคี้ยวได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น ตลาดของอาหารขบเคี้ยวจึงมีอัตราการเติบโตสูง กระบวนการผลิตอาหารขบเคี้ยวมีหลายรูปแบบ ขึ้นกับลักษณะสุดท้ายของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่งการทอดแบบน้ำมันท่วม (deep fat frying) เป็นวิธีการหนึ่งในการผลิตอาหารขบเคี้ยว ที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยวทอดกรอบที่มีลักษณะเฉพาะ คือ มีกลิ่นและรสชาติดีขึ้น สีเหลืองทอง เนื้อสัมผัสแห้งและกรอบ (crispness) ซึ่งแสดงถึงความสดใหม่และมีคุณภาพสูง จึงมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค ทำให้ผู้บริโภคเกิดความพึงพอใจและมีความรู้สึกอยากอาหารมากขึ้น โดยมีงานวิจัยที่ศึกษาหาวิธีการทางเครื่องมือที่เหมาะสมในการตรวจวัดค่าความกรอบ เช่น ใช้วิธี puncture test และแสดงค่าความกรอบด้วยค่าความชันเริ่มต้น (initial slope) และค่าแรงสูงสุดจากความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงและระยะทางที่ทำให้ตัวอย่างแตก (maximum force) พบว่าค่าความชันเริ่มต้นให้ค่าที่น่าเชื่อถือมากกว่าค่าแรงสูงสุดที่ทำให้ตัวอย่างแตก (Bourne, Moyer และ Hand, 1966) โดยความกรอบจะขึ้นกับวัตถุดิบที่ใช้ โครงสร้างของอาหารและกระบวนการผลิตระหว่างทอด การทอดแบบน้ำมันท่วม คือ การทอดในน้ำมันปริมาณมากจนท่วมอาหาร ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 177-199°C แต่อุณหภูมิที่ใช้ทั่วไปคือ 180°C (Pedreschi และ Moyano, 2005) ซึ่งกระบวนการทอดเป็นการให้ความร้อนและทำให้อาหารแห้งในน้ำมันร้อนด้วยการถ่ายโอนความร้อนและการถ่ายเทมวล คือ ความร้อนจะถ่ายเทจากน้ำมันสู่อาหารและน้ำจะระเหยออกจากอาหารโดยน้ำมันจะถูกดูดซึมเข้าไปแทนที่ในอาหาร ปัจจัยที่บ่งชี้คุณภาพของอาหารทอด ได้แก่ ลักษณะปรากฏด้านสี รูปร่าง ความมันวาว รวมถึงกลิ่นรสชาติ เนื้อสัมผัสและคุณค่าทางโภชนาการ (ภัทธิรา ยิ่งเลิศรัตนะกุล, 2546) รวมถึงปริมาณความชื้นทั้งหมด ปริมาณน้ำมันที่ดูดซับ ปริมาณผลผลิตที่ได้ และความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น ซึ่งในผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันจะคำนึงถึงคุณลักษณะของคุณภาพที่แตกต่างกันและเนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคจำนวนมากให้ความสนใจต่อสุขภาพมากขึ้น ดังนั้นปริมาณไขมันที่ดูดซับ

ระหว่างทอดจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่กำหนดคุณภาพของอาหารทอด โดยมีงานวิจัยมากมายเพื่อศึกษาวิธีการลดการดูดซับไขมันในอาหารทอด เช่น ใช้วิธีการทอดแบบ vacuum frying ในกระบวนการผลิตมันฝรั่งทอด โดยที่ยังคงรักษาความกรอบและกลิ่นรส ตามต้องการ (Grarayo และ Moreira, 2002) แช่ในน้ำเกลือ (Bunger, Moyano และ Rioseco, 2003) หรือเติมฟรุคโตสเพื่อปรับปรุงโครงสร้างที่ผิวของมันฝรั่ง ทำให้ลดการดูดซับไขมันระหว่างการทอดได้ (Robnov และ Saguy, 1997) แต่วิธีที่ง่ายและใช้ทั่วไปคือ pre-drying มันฝรั่งก่อนทอด เพื่อลดการดูดซับไขมัน (Krokida และคณะ, 2001 และ Moyano, Rioseco และ Gonzalez, 2002) นอกจากนี้อาจมีการเคลือบที่ผิวของมันฝรั่งเพื่อลดการดูดซับไขมัน เช่น gellan gum corn zein cellulose derivatives pectin และ sodium alginate เป็นต้น (Khall, 1999 และ William และ Mittal, 1999) ส่วนการเก็บรักษานั้น เนื่องจากอาหารขบเคี้ยวที่ผ่านกระบวนการทอดจะทำให้มีปริมาณความชื้นต่ำและไขมันสูง ซึ่งจะไวต่อความชื้นและปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ดังนั้นปัจจัยที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารขบเคี้ยวจะเกิดขึ้นจากการสูญเสียลักษณะเนื้อสัมผัสเนื่องจากการดูดซับความชื้นและการเกิดการเหม็นหืนเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหรืออาจเกิดจากแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ไพศาล วุฒิจำนงและคณะ, 2546) ส่วนการทำนายอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์นั้นเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับผู้บริโภคที่แสดงว่าผลิตภัณฑ์นั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงจากผลิตภัณฑ์เริ่มต้น ทางด้านต่าง ๆ เช่น กลิ่น รสและเนื้อสัมผัสที่ไม่ต้องการ ในระดับที่ไม่ยอมรับ แต่การศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ของอาหารขบเคี้ยวภายใต้สภาวะบรรยากาศปกตินั้นใช้เวลานาน ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อทำนายอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาวะเร่งเพื่อลดระยะเวลาลงโดยใช้ค่า Q_{10} (accelerating factor) (Labuza, 1984 และ Labuza และ Schmidl, 1985)

2.10 ประโยชน์ของเทมเป้ต่อสุขภาพ

เทมเป้เป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีประโยชน์ต่อสุขภาพหลายด้าน เนื่องจากเป็นแหล่งที่ดีของโปรตีนทั้งทางปริมาณและคุณภาพ วิตามินและเกลือแร่ โดยมีโปรตีนที่สมบูรณ์เนื่องจากมีชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นที่เป็นองค์ประกอบครบทุกตัว ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นที่เป็นองค์ประกอบในเทมเป้ (mg/ 100 g)

amino acid	เทมเป้
histidine	26.29
isoleucine	54.35
leucine	89.24
lysine	65.88
methionine + cystine	31.88
phenylalanine + threonine	97.29
tyrosine	36.12
tryptophan	13.82
valine	54.18

ที่มา: FAO (1970)

เทมเป้สดมีปริมาณโปรตีนประมาณ 19.5% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับแหล่งโปรตีนจากสัตว์ ได้แก่ เนื้อไก่ เนื้อวัว ไข่และนม เป็นต้น (สุจินดา สุวรรณกิจ, 2534) ซึ่งค่าองค์ประกอบของสารอาหารในเทมเป้ 100 กรัม แสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบทางเคมี (%) ของสารอาหารในเทมเป้สด ทอด ตากแห้งและแช่แข็งแห้ง 100 กรัม

ชนิดของเทมเป้ถั่วเหลือง	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	เยื่อใย	เถ้า
สด	60.4	19.5	7.5	9.9	1.4	1.3
ทอด	50.0	23.0	18.0	8.0	2.0	1.0
ตากแห้ง	8.9	43.1	18.0	26.2	3.8	3.8
แช่เยือกแข็ง	1.9	46.2	23.4	25.8	2.7	2.7

ที่มา: Winarno และ Reddy (1986)

ซึ่งไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเทมเป้ถั่วเหลืองสด 100 กรัม ได้แก่ กรดไขมันอิ่มตัว ประมาณ 0.60 กรัม (15% ของกรดไขมันทั้งหมด) ประกอบด้วย กรดปาล์มมิติคและกรดสเตียริค 0.42 และ 0.18 กรัม ตามลำดับ กรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโมเลกุลเดี่ยว 0.71 กรัม ประกอบด้วยกรด

โอเลอิค 0.71 กรัม และกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวโมเลกุลใหญ่ 2.80 (62% ของกรดไขมันทั้งหมด) ประกอบด้วยกรดลิโนเลอิคและลิโนเลนิค 2.51 และ 0.29 ตามลำดับ (Wagenknecht และคณะ, 1961) นอกจากนี้เทมเป้ยังเป็นแหล่งวิตามินและเกลือแร่ของวิตามินบี 12 ที่สำคัญสำหรับผู้รับประทานอาหารมังสวิรัติทั่วโลก เนื่องจากผู้รับประทานอาหารมังสวิรัติส่วนใหญ่ขาดวิตามินบี 12 และเทมเป้ยังประกอบด้วยวิตามินและเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ มากมาย ดังแสดงในตารางที่ 2.3 โดยเทมเป้เป็นแหล่งของวิตามินที่สำคัญ ได้แก่ ไธอะมีน ไรโบฟลาวิน ไพริดอกซิน กรดโฟลิคและวิตามินบี 12 เป็นต้น ส่วนเกลือแร่ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัสและเหล็ก เป็นต้น โดยเทมเป้สด 100 กรัม จะมีวิตามิน 18-30% ของ RDA (recommended daily allowance)

ตารางที่ 2.5 ปริมาณวิตามินและเกลือแร่ที่เป็นองค์ประกอบในเทมเป้ 100 กรัม

วิตามินและเกลือแร่	เทมเป้	ปริมาณที่ควรได้รับใน 1 วัน
วิตามินเอ	42 IU	5000 IU
ไธอะมีน	0.28 มิลลิกรัม	1.50 มิลลิกรัม
ไรโบฟลาวิน	0.65 มิลลิกรัม	1.70 มิลลิกรัม
ไนอะซีน	2.52 มิลลิกรัม	20.0 มิลลิกรัม
กรดแพนโทธีนิค	0.52 มิลลิกรัม	10.0 มิลลิกรัม
ไพริดอกซิน	830.0 มิลลิกรัม	2000.0 มิลลิกรัม
โฟลาซิน	100.0 ไมโครกรัม	400.0 ไมโครกรัม
วิตามินบี 12	3.9 ไมโครกรัม	3.0 ไมโครกรัม
ไบโอติน	53.0 มิลลิกรัม	300.0 มิลลิกรัม
แคลเซียม	142.0 มิลลิกรัม	1000.0 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	240.0 มิลลิกรัม	1000.0 มิลลิกรัม
เหล็ก	5.0 มิลลิกรัม	18.0 มิลลิกรัม

ที่มา: Winarno และ Reddy (1986)

เทมเป้มีเส้นใยมากจึงช่วยกระตุ้นและช่วยระบบการย่อยในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ส่งผลให้ระบบการขับถ่ายเป็นไปตามปกติ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) ซึ่งใยอาหารมีทั้งชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ ใยอาหารที่ละลายน้ำ เช่น แป้งที่ทนต่อการย่อย เบต้ากลูแคน เพคติน มิวซิเลจ อินนูลิน ส่วนใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน ไคตินและไคโตซาน เป็นต้น ซึ่งใยอาหารพบได้ในผัก ผลไม้ ธัญพืช ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดพืช เป็นต้น โดยใยอาหารจะไม่

ถูกดูดซึม แต่ช่วยให้อาหารอยู่ในลำไส้ในเวลาสั้นลง ท้องไม่ผูก ลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ เนื่องจากช่วยลดความเข้มข้นของสารก่อมะเร็งและเร่งเวลาในการขับถ่าย ซึ่งเป็นโอกาสที่เนื้อเยื่อของลำไส้จะสัมผัสกับสารก่อมะเร็งที่มีอยู่ในอาหาร โดยผู้ใหญ่ควรบริโภคใยอาหารวันละ 25 กรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2546) นอกจากนี้เทมเป้ยังมีสาร isoflavones ได้แก่ 6,7,4-trihydroxyisoflavone (Factor 2) genistein และ daidzein โดยอัตราส่วนระหว่าง Factor 2:genistein:daidzein = 1:0.05:0.01 จะทำให้เกิด hemolysis-preventing activities ส่วน antioxidative effect ของ Factor 2 บน ratinol จะเหมือนกับ DL-α-tocopherol และเป็น 3 เท่าของ genistein นอกจากนี้ Factor 2 ยัง active เท่ากับ DL-α-tocopherol ในการป้องกัน in vitro oxidation ของ sodium linoleate รวมถึงมีการสกัดน้ำมันในเทมเป้ด้วย hexane:alcohol = 1:2 มาเติมใน edible oils เพื่อป้องกันการเกิด oxidation ซึ่งเป็นการแสดงว่าสารประกอบ flavonoid ไม่เพียงเป็นสาร antioxidants ในเทมเป้เท่านั้นยังสามารถเป็น antioxidant factors ที่ละลายในน้ำมันได้ และยังพบว่ามีการเติมใน perishable foods, feed และ cosmetic อีกด้วย โปรตีนและ isoflavones ในเทมเป้จะช่วยเสริมสร้างกระดูก ลดการเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและโรคมะเร็งบางประเภท (Murata, Ikehata และ Miyamoto, 1967) เทมเป้ย่อยได้ง่ายเนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบและการทำงานของเอ็นไซม์จากเชื้อราในกระบวนการหมักจะทำให้เกิดการย่อยของโปรตีนและไขมันบางส่วน ร่างกายจึงสามารถดูดซึมสารอาหารไปใช้ได้ง่ายขึ้น ดังงานวิจัยของ Kiers, Nout และ Rombouts (2000) ผลิตเทมเป้จาก tropical legumes ได้แก่ soya bean และ cowpea รวมถึงเทมเป้จากข้าวโพดสีขาว (white maize) โดยผ่านการแช่น้ำ (soaking) ให้เกิดการหมักตามธรรมชาติ (lactic acid fermentation) แล้วผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) ด้วยเชื้อ *Rhizopus* spp. จากนั้นนำเทมเป้ที่ได้มาตรวจหา digestibility โดยใช้วิธี *in vitro* digestion method พบว่าการหมักจะทำให้ค่า total digestibility ของข้าวโพดสีขาวเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าคือจาก 25.5% เป็น 63.6% ส่วน soya bean และ cowpea เพิ่มขึ้นประมาณ 3% ส่วน โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 7.0% เป็น 27.3% และ 4.3% เป็น 24.17% ตามลำดับ Cuevas-Rodríguez (2003) กล่าวว่าโปรตีนย่อยได้ดีขึ้นเนื่องจากโปรตีนถูกทำให้เสียสภาพในช่วงการให้ความร้อน และถูกย่อยสลายระหว่างการหมักทำให้เอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาง่ายขึ้น ซึ่งในกระบวนการหมักเทมเป้เชื้อราจะผลิตสาร antibiotic ตามธรรมชาติ ซึ่งช่วยส่งเสริมให้ร่างกายมีการต้านทานการติดเชื้อของลำไส้ได้เพิ่มขึ้น (Gyorgy, Murata และ Ikehata, 1964) นอกจากนี้มีการศึกษาวิจัยพบว่าเทมเป้ถั่วเหลืองที่ผลิตจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* เมื่อใช้เป็นอาหารของหนูทดลองจะทำให้เจริญเติบโตได้ดีกว่าและต้านทานต่อ dialuric acid ที่ก่อให้เกิดการสลายตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้มากกว่าถั่วเหลืองที่ต้มที่ไม่ได้หมักด้วยเชื้อรา โดยสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนั้นอาจได้จากเชื้อราสร้างขึ้นใหม่หรือได้จากการย่อยสลาย

สารประกอบ inactive compounds ที่มีอยู่ในถั่วเหลืองที่เป็นวัตถุดิบ ระหว่างการหมัก (Gyorgy, Murata และ Ikehata, 1964) เทมเป้ถั่วเหลืองมี bioactive compounds ที่ดีต่อสุขภาพ เช่น superoxide dismutase (SOD) enzyme และ dietary fibre นอกจากนี้เทมเป้ถั่วเหลืองยังประกอบด้วย isoflavones aglucone ได้แก่ genistein และ daidzin ซึ่งมี estrogenic effect, anti-oxidant และ anticancer functions โดยในถั่วเหลืองจะมี aglucone ในปริมาณต่ำเนื่องจากอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับคาร์โบไฮเดรตในรูป glucoside แต่ในระหว่างการหมักเทมเป้เชื้อรา Rhizopus oligosporus จะสลายพันธะ isoflvone glucosides ทำให้ได้ genistein และ daidzin ส่วน Factor II (6,7,4-trihydroxy isoflavone) จะถูกสังเคราะห์จาก genistein และ daidzin โดยเชื้อรา

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

ข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.1) และข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์ศรแดง (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.2) มีฝักขนาดกลางและเส้นรอบฝักประมาณ 16 และ 14.5 เซนติเมตร ตามลำดับ อายุการเก็บเกี่ยว 65-70 และ 55-70 วัน ตามลำดับ ซื้อจากตลาดสี่มุมเมือง รังสิต เก็บรักษาทั้งฝักมีเปลือกหุ้มในตู้เย็น (8-10°C) ไว้ใช้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ (Wright และคณะ, 1954)

ถั่วเหลืองเมล็ดซีกแห้งกะเทาะเปลือกแล้ว ตราไร่ทิพย์ บริษัท ไร่ธัญญะ จำกัด ซื้อจากซุปเปอร์มาร์เก็ต (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.3) อายุการเก็บรักษาไม่เกิน 6 เดือน (Wright และคณะ, 1954)

น้ำมันถั่วเหลือง ตราองุ่น บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน) ซื้อจากซุปเปอร์มาร์เก็ต

ตัวอย่างเทมเป้ ตราเฮลท์ตี้เมท บริษัท สามพรานฟู้ด จำกัด ซื้อจากซุปเปอร์มาร์เก็ต

ตัวอย่างขนมขบเคี้ยว ซอยครั้นช์ บริษัท แพรรี่มาร์เก็ตติ้ง จำกัด ซื้อจากซุปเปอร์มาร์เก็ต

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Rhizopus oligosporus NRRL 2710 ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยเลี้ยงบน agar slant ของอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ 30°C เป็นเวลา 5-7 วัน (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.4) แล้วเก็บในตู้เย็น (8-10°C) ถ่ายเชื้อทุกเดือน

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพ

- acetic acid	Merck	A.R. grade
- alcohol 70%		
- alcohol 95%		
- ammonium sulfamate	Acros organics	A.R. grade

- boric acid	Univa	A.R. grade
- chloroform	Merck	A.R. grade
- ethyl alcohol absolute	Carlo Erba	A.R. grade
- glucosamine hydrochloride	Sigma	A.R. grade
- hydrochloric acid	Carlo Erba	A.R. grade
- iron (III) chloride, hexahydrate	Univar	A.R. grade
- lactic acid	Merck	A.R. grade
- MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrozone hydrochloride monohydrate)	Fluka	A.R. grade
- methyl red	Merck	A.R. grade
- methylene blue	Merck	A.R. grade
- petroleum ether	Carlo Erba	A.R. grade
- plate count agar	Merck	A.R. grade
- potato dextrose agar	Merck	A.R. grade
- potassium dichromate	Univar	A.R. grade
- potassium hydrogen sulphate	Univar	A.R. grade
- potassium hydroxide	Univar	A.R. grade
- potassium iodine	Merck	A.R. grade
- selenium reagent mixture	Merck	A.R. grade
- sodium carbonate	Univar	A.R. grade
- sodium chloride	Univar	A.R. grade
- sodium hydroxide	Univar	A.R. grade
- sodium nitrite	M & B Lab	A.R. grade
- sodium thiosulphate	Merck	A.R. grade
- soluble starch	Univar	A.R. grade
- sulfuric acid	Carlo Erba	A.R. grade
- tartaric acid	Univar	A.R. grade

อุปกรณ์

- ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 8-10°C (refrigerator) (Gallenkamp Cooled, Germany)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) (ยี่ห้อ EUTECH รุ่น Cyberscan pH 1000, USA)
- เครื่องวัดสี Chromameter (Minolta รุ่น CR-300 series, Japan)
- เครื่องวัด a_w (รุ่น Aqualink series 3 บริษัท Decagon Device, USA)
- เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo รุ่น AB204, USA และ บริษัท Satorius รุ่น A200S, Germany)
- เครื่องชั่งนำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (รุ่น BP3100s, บริษัท Sartorius, Ireland รุ่น BP 31003 บริษัท Sartorius, Germany และ รุ่น HR-200 บริษัท A&D, Japan)
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 42 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร
- เครื่องย่อยโปรตีน (Buchi รุ่น K-424, Switzerland)
- เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Buchi รุ่น B-324, Switzerland)
- ทิมเบิล (thimble)
- ชุดสกัดไขมัน (Gerhardt Soxtherm Automatic, S166)
- เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)
- เครื่องปั่นผสมไฟฟ้า (blender) (Panasonic, China)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (ยี่ห้อ Memmert รุ่น model 600, Germany ยี่ห้อ WTC Binder รุ่น E53, Germany และ Kobishi รุ่น BZ-17H บริษัท, Japan)
- ถ้วยอะลูมิเนียม (aluminium pan)
- โถดูดความชื้น (desiccator)
- ครูซิเบิล (crucible)
- เตาเผา (muffle furnace, Carbolite รุ่น CWF 1200, England)
- ถุงอะลูมิเนียมฟลอยด์ (Foil pouch) ขนาด 20 x 16 cm.
- หนา100µm OPP/PE/Alu/PE/LL (บ. เจนจรัส ซับพลาย)
- ถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีนแบบซิปล็อค ขนาด 5 x 7 นิ้ว ที่ผ่านการใช้เข็มลนไฟฆ่าเชื้อเจาะให้มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ห่างกันทุก 1 เซนติเมตร ทั่วทั้งถุง
- เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Instron Texture Analyzer รุ่น 5560P9835, USA) และชุดหัวกดรูปทรงกระบอกปลายตัด (cylinder probe) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 และ 4 มิลลิเมตร
- เตาอบไมโครเวฟ (microwave) (ยี่ห้อ Daewoo รุ่น KOR-63D7, Malaysia)

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอสูง (autoclaved) (ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-320, England, ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS832 , Japan และ ยี่ห้อ Labo รุ่น MLS-2400, Japan)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (ยี่ห้อ Memmert รุ่น B30, Germany) สำหรับอุณหภูมิ 37, 45 และ 55°C
- เครื่องตีตัวอย่างสำหรับงานวิจัย (Stomacher) (บริษัท AES Laboratorire, France)
- ถุงใส่ตัวอย่างสำหรับใช้กับเครื่องตีตัวอย่าง (stomacher bag)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- จานเพาะเชื้อชนิดพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 x 15 มิลลิเมตร
- ปิเปต ขนาด 0.1 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
- ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 50 125 และ 250 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองขนาด 13 มิลลิเมตร พร้อมฝาปิด
- แท่งแก้วรูปตัวแอล (L-shape spreader)
- Vortex mixer (ยี่ห้อ Thermolyne รุ่น 37600 mixer)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)
- กล้องจุลทรรศน์ (ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30FF200, Japan)
- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (ยี่ห้อ Themo ICE รุ่น ICE Multi RF, USA)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10 25 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Jasco UV/VIS Spectrophotometer รุ่น V-530, USA)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (ยี่ห้อ Memmert รุ่น D-91126, Germany)
- เครื่องเขย่า (shaker) (ยี่ห้อ New Brunswick, USA)
- เตาทอดไฟฟ้า (ยี่ห้อ Wai-laan รุ่น 89-80, Thailand)
- เครื่องปิดผนึกถุงแบบสุญญากาศ (ยี่ห้อ Wabomatic รุ่น Easy-Pack)

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของวัตถุดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของถั่วเหลือง ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว ดังนี้ ความชื้น (ภาคผนวก ก.1) โปรตีน (ภาคผนวก ก.2) ไขมัน (ภาคผนวก ก.3) และเส้นใยอาหาร (dietary fiber) เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ซึ่งในการทดลองมีขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อเทมเป้ เตรียมข้าวโพด ถั่วเหลือง และการผสมหัวเชื้อ ดังนี้

เตรียมหัวเชื้อเทมเป้ เลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 บน agar slant ของอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ 30°C เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นทำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 มิลลิลิตร แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยให้เกิดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราซึ่งมีความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (Cuevas-Rodriquez และคณะ, 2003) ในการทดลองขั้นต่อไป

เตรียมข้าวโพด

นำข้าวโพดมาปอกเปลือก ล้างน้ำทำความสะอาด แล้วปาดเพื่อแปรขนาดเมล็ดแต่ละพันธุ์ให้มีขนาดเต็มเมล็ด ½ เมล็ดและ ¼ เมล็ด (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.5) จากนั้นชั่ง 300 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 35-40°C (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.6) (ดัดแปลงจาก Liu, 1999)

เตรียมถั่วเหลือง โดยนำถั่วเหลืองเมล็ดซีกแห้งที่ลอกเปลือกออกแล้วมาล้างทำความสะอาด แล้วแช่น้ำในอัตราส่วนถั่วเหลือง:น้ำ = 1:3 (w / v) ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เวลา 12 ชั่วโมง กรองแยกเมล็ด แล้วชั่ง 300 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีระดับสูงกว่าวัตถุดิบประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วปรับ pH = 4.0 ด้วยสารละลายกรดแลคติก (lactic acid) เข้มข้น 0.85% ปิดด้วย aluminium foil ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.8) แล้วต้มให้เดือดในน้ำที่ใช้แช่ 15 นาที กรองแยกเมล็ดจะได้ถั่วเหลืองเมล็ดซีก ส่วนถั่วเหลืองเมล็ดปั่นได้จากนำถั่วเหลืองเมล็ดซีกที่ได้ไปปั่นในเครื่องปั่นผสมไฟฟ้า (lender) แบบแห้ง ที่ความเร็วต่ำ ครั้งละประมาณ 60 กรัม เวลา 1 นาที (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.9) จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.10) ทิ้งให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 35-40°C (ดัดแปลงจาก Liu, 1999)

ผสมหัวเชื้อเทมเป้ นำหัวเชื้อกับวัตถุดิบที่เตรียมได้มาผสมกันในอัตราส่วน 3 มิลลิลิตร ต่อวัตถุดิบ 300 กรัม (wet basis) ให้เข้ากันอย่างทั่วถึง ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) แล้วบรรจุในถุงโพลิเอทธิลีน (perforated polyethylene bags) ขนาด 5 x 7 นิ้ว ที่ผ่านการใช้เข็มลนไฟฆ่าเชื้อ เจาะให้มีรูขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ห่างกัน 1 เซนติเมตร ทั่วทั้งถุง จากนั้นทำเป็นแผ่นหนาประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 30°C และ 90-99%RH โดยสังเกตว่าการหมักเสร็จสมบูรณ์เมื่อเทมเป้มีเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญประสานเมล็ดวัตถุดิบเป็นแผ่นแน่นทั่วทั้งแผ่น

3.2.2 ศึกษาชนิดและขนาดของเมล็ดข้าวโพด ขนาดเมล็ดถั่วเหลืองและระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเทมเป้

ผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองและเทมเป้ข้าวโพด โดยนำวัตถุดิบถั่วเหลืองและข้าวโพดมาผสมกับหัวเชื้อเทมเป้ที่เตรียมได้ แล้วบ่มในสภาวะตามวิธีในข้อ 3.2.1 จนได้เทมเป้ที่หมักเสร็จสมบูรณ์ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเทมเป้จากข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวขนาดเต็มเมล็ด ½ เมล็ด และ ¼ เมล็ด จากนั้นตรวจวัดค่าความแน่นเนื้อด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส Instron texture analyzer (Kronenberg และ Hang,1985) รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ก.4 วิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนที่เป็นองค์ประกอบของไคตินซึ่งอยู่ในผนังเซลล์เส้นใยของเชื้อรา (Ruiz-Terán และ Owens, 1996) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก.5 และค่า pH (ภาคผนวก ก. 6)

วางแผนการทดลองแบบ asymetric factorial design ขนาด 2 x 3 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992) เพื่อคัดเลือกชนิดและขนาดเมล็ดข้าวโพด รวมทั้งขนาดเมล็ดถั่วเหลืองที่เหมาะสมต่อการผลิตเทมเป้โดยใช้ค่าความแน่นเนื้อสูงที่สุดเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก

จากนั้นศึกษาระยะเวลาการหมักที่เหมาะสม โดยนำข้าวโพดชนิดและขนาดที่คัดเลือกได้และถั่วเหลืองที่มีขนาดเมล็ดที่คัดเลือก มาผลิตเทมเป้แล้วเก็บตัวอย่างเมื่อหมักเป็นเวลา 0 16 24 และ 40 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992) เพื่อคัดเลือกระยะเวลาการหมักเทมเป้ข้าวโพดและถั่วเหลืองให้ค่าความแน่นเนื้อสูงที่สุด

3.2.3 ศึกษาอัตราส่วนถั่วเหลืองต่อข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตเทมเป้

นำวัตถุดิบถั่วเหลืองและข้าวโพดที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.2 มาผลิตเทมเป้ โดยผสมถั่วเหลืองกับข้าวโพดในอัตราส่วน 5:0 4:1 3:2 2:3 1:4 และ 0:5 (Bressani, Elías และ Braham, 1966) (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.12) จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจนมีอุณหภูมิ 35- 40°C (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.13) แล้วผสมกับหัวเชื้อเทมเป้ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 บรรจุในถุงโพลีเอทธีลีนแล้วบ่มที่ 30°C 24 ชั่วโมง เมื่อหมักเสร็จสมบูรณ์จะได้เทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วนต่าง ๆ (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.14) นำตัวอย่างเทมเป้ผสมข้าวโพดมาตรวจวัดลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ค่าสี (ภาคผนวก ก.7) ความชื้น pH ความแน่นเนื้อ ปริมาณกลูโคซามีน โปรตีน ไขมัน เส้นใยอาหาร และคำนวณปริมาณกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับปริมาณที่ร่างกายต้องการ (เด็ก) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992) เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนถั่วเหลืองต่อข้าวโพดที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากการมีปริมาณโปรตีนเพียงพอกับความต้องการของร่างกาย(กระทรวงสาธารณสุข, 2546) และกรดอะมิโนจำเป็นที่สมดุลและมีคุณภาพใกล้เคียงกับไข่มากที่สุด (Harper and Yoshimura, 1993) ร่วมกับการพิจารณาปริมาณเส้นใยอาหาร ไขมันและความแน่นเนื้อ

ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความชอบ (hedonic scale) 9 ระดับ (แบบทดสอบแสดงในภาคผนวก ค.2) วางแผนการทดลองแบบ randomized completely block design (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992) แล้วคัดเลือกอัตราส่วนถั่วเหลืองต่อข้าวโพดที่เหมาะสมที่ทำให้เทมเป้ผสมข้าวโพดได้รับการยอมรับมากที่สุด

3.2.4 ศึกษาระยะเวลาการ pre-drying และการทอดที่เหมาะสม

นำเทมเป้ผสมข้าวโพดที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 มาศึกษาสภาวะ pre-drying ที่เหมาะสม โดยนำมาหั่นเป็นชิ้นขนาด 0.2 x 2.0 x 5.0 เซนติเมตร เนื่องจากเป็นขนาดที่บางที่สุดที่สามารถหั่นแล้วไม่หลุดลุ่ย (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.15) แล้วอบที่อุณหภูมิประมาณ 60°C 32%RH โดยแปรระยะเวลา 0 15 30 45 และ 60 นาที (Debnath, Bhat และ Rastogi, 2003) โดยนำตัวอย่างที่อบระยะเวลาต่าง ๆ มาตรวจวัดค่าความชื้น สี วางแผนการทดลองแบบ

completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992) เพื่อคัดเลือกระยะเวลาการ pre-drying จากค่าสีด้านความสว่าง (L) ที่อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (ไม่ต่ำกว่า 50) (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.16)

จากนั้นศึกษาระยะเวลาการทอดที่เหมาะสม โดยนำเทมเป้ผสมข้าวโพดที่ผ่านการ pre-drying ในระยะเวลาที่คัดเลือก มาทอดที่อุณหภูมิ 180°C โดยใช้ตัวอย่าง:น้ำมัน = 1:5% w/w (Debnath, Bhat และ Rastogi, 2003) เพื่อให้ได้ความชื้นในผลิตภัณฑ์สุดท้ายประมาณร้อยละ 3 (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมขนมอบกรอบจากธัญชาติ, 2541) (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.17) จากนั้นทำให้สะเด็ดน้ำมัน ทิ้งให้เย็นโดยพักไว้บนกระดาษซับน้ำมัน ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาตรวจวัด ค่าสี ปริมาณไขมัน (ภาคผนวก ก.3) และ ความกรอบ (ภาคผนวก ก.4) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวัดตัวอย่างละ 7 แผ่น วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992) เพื่อคัดเลือกสภาวะการ pre-drying และการทอดที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดดูดซับไขมันน้อยที่สุด รวมถึงค่าความกรอบอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ซึ่งใกล้เคียงกับค่าทางการค้า คือ 95.10-170.84 gf/mm

ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความชอบ (hedonic scale) 9 ระดับ (แบบทดสอบแสดงในภาคผนวก ค.2) วางแผนการทดลองแบบ randomized completely block design (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992) แล้วคัดเลือกระยะเวลาการ pre-drying และการทอดที่เหมาะสมที่ทำให้เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบได้รับการยอมรับมากที่สุด

3.2.5 **ศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบ**

นำเทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 มาบรรจุในถุง foil pouch ขนาด 20x16 เซนติเมตร หนา 100 µm OPP/PE/Alu/PE/LL โดยแต่ละถุงบรรจุ 30 กรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2544) เก็บรักษาโดยปิดผนึกแบบสุญญากาศ ภายใต้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45°C และ 55°C (แสดงในภาคผนวก ข รูปที่ ข.18) สุ่มเก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 24 วัน เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านกายภาพ ได้แก่ สี a_w (ภาคผนวก ก.8) และความกรอบ คุณภาพทางด้านเคมี ได้แก่ ค่าเพอร์ออกไซด์ (peroxide value) (ภาคผนวก ก.9) คุณภาพ

ทางด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (ภาคผนวก ก.10) จำนวนเชื้อรา (ภาคผนวก ก. 11) จนกระทั่งมีค่าใดค่าหนึ่งเกินมาตรฐาน (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมขนมอบกรอบจากธัญชาติ, 2541) วางแผนการทดลองแบบ randomized completely block design (RCBD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran และ Cox, 1992)

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของวัตถุดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของวัตถุดิบ ได้แก่ ถั่วเหลืองที่แช่น้ำ นาน 12 ชั่วโมง ข้าวโพดหวาน และข้าวโพดข้าวเหนียว ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีและทางกายภาพของวัตถุดิบ

องค์ประกอบ	ถั่วเหลืองแช่น้ำ 12 ชั่วโมง	ข้าวโพดหวาน	ข้าวโพดข้าวเหนียว
ความชื้น (%wet basis)	$60.21^{a}\pm1.90$	$71.94^{b}\pm1.06$	$69.82^{c}\pm0.89$
โปรตีน (%dry basis)	$33.74^{a}\pm0.32$	$7.87^{b}\pm0.32$	$7.90^{b}\pm0.68$
ไขมัน (%dry basis)	$21.26^{a}\pm0.57$	$2.12^{b}\pm0.43$	$1.23^{b}\pm0.76$
เส้นใยอาหาร (%dry basis)	$3.68^{a}\pm0.07$	$5.51^{b}\pm0.04$	$5.57^{b}\pm0.04$

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนพบว่าในถั่วเหลืองมี 33.74% ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวมี 7.87% และ 7.90% โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนปริมาณไขมันนั้นพบว่าในถั่วเหลืองมี 21.26% ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวมี 7.87% และ 7.90% โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนและไขมันสูงกว่าข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งค่าที่ได้ใกล้เคียงกับรายงานของอารีย์ วรัญญูวัฒน์ (2544) ที่กล่าวว่าถั่วเหลืองมีโปรตีนและไขมันประมาณ 40% และ 20% โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แต่แตกต่างจากตารางคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม (กระทรวงสาธารณสุข, 2530) รายงานว่าข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ10.42% และ 13.37% ปริมาณไขมันเท่ากับ 1.9% และ 4.04% โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากสายพันธุ์แหล่งปลูก ฤดูกาล สภาพแวดล้อมที่ปลูกแตกต่างกัน ทำให้ได้ค่าดังกล่าวแตกต่างกัน ส่วนปริมาณเส้นใยในข้าวโพดหวานและข้าวโพดเหนียวที่เท่ากับ 5.51 และ 5.57% โดยน้ำหนักแห้ง มีค่าสูงกว่าถั่วเหลืองที่มีปริมาณ 3.68% โดยน้ำหนักแห้ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$) และจากการศึกษาปริมาณกรดอะมิโนในถั่วเหลืองและ

ข้าวโพด (ตารางที่ 2.1) พบว่าถั่วเหลืองมีปริมาณกรดอะมิโน lysine และ tryptophan สู้ แต่มีปริมาณ sulfur containing amino acids (methionine และ cystine) ต่ำ ในขณะที่ข้าวโพดมีปริมาณ sulfur containing amino acids สูง แต่มีปริมาณ lysine และ tryptophan ต่ำ ดังนั้นการผสมถั่วเหลืองกับข้าวโพดจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เทมเป้ เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการโดยให้มีปริมาณเส้นใยและกรดอะมิที่จำเป็นเพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณไขมันลดต่ำลงเมื่อเทียบกับเทมเป้ที่ผลิตจากถั่วเหลืองเพียงชนิดเดียว

4.2 ผลการศึกษาชนิดและขนาดของเมล็ดข้าวโพด ขนาดเมล็ดถั่วเหลืองและระยะเวลาการหมักเทมเป้ที่เหมาะสมต่อการผลิตเทมเป้

เทมเป้ข้าวโพดและเทมเป้ถั่วเหลืองที่แปรขนาดของเมล็ดต่าง ๆ กัน หมักที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะได้ลักษณะที่มีเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญปกคลุมวัตถุดิบทั่วทั้งแผ่น เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแน่นเนื้อพบว่าขนาดวัตถุดิบที่เล็กลงส่งผลให้ค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีนในเทมเป้เพิ่มขึ้น โดยในเทมเป้ข้าวโพดหวานขนาด ¼ เมล็ดมีค่าความแน่นเนื้อสูงที่สุดคือ 319.61 gf ซึ่งใกล้เคียงกับเทมเป้ที่ผลิตทางการค้าคือ 325 gf ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีนของเทมเป้ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวที่ผลิตจากข้าวโพดขนาดเต็มเมล็ด ½ เมล็ด และ ¼ เมล็ด และเทมเป้จากถั่วเหลืองเมล็ดซีกและเมล็ดปั่นละเอียด หมักที่ 30°C 24 ชั่วโมง

เทมเป้	ความแน่นเนื้อ (gf)	กลูโคซามีน (g/kg dry biomass)
ข้าวโพดหวานขนาด		
เต็มเมล็ด	$84.40^{d}\pm10.53$	$6.37^{d}\pm0.15$
1/2 เมล็ด	$301.97^{ab}\pm11.00$	$7.58^{ab}\pm0.06$
1/4 เมล็ด	$319.61^{a}\pm40.16$	$7.66^{a}\pm0.07$
ข้าวโพดข้าวเหนียวขนาด		
เต็มเมล็ด	$61.42^{e}\pm25.56$	$6.14^{e}\pm0.10$
1/2 เมล็ด	$214.45^{c}\pm19.78$	$7.21^{c}\pm0.10$
1/4 เมล็ด	$286.79^{b}\pm14.44$	$7.46^{b}\pm0.10$
เทมเป้ถั่วเหลืองขนาด		
เมล็ดซีก	269.82 ± 38.04	6.92 ± 0.02
เมล็ดปั่นละเอียด	282.61 ± 68.11	7.39 ± 0.04

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

พบว่าเมื่อขนาดเมล็ดข้าวโพดและถั่วเหลืองลดลง ความแน่นเนื้อของเทมเป้จะมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากเส้นใยของเชื้อราที่เจริญเกาะยึดประสานวัตถุดิบเป็นแผ่น ทำให้มีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้น จะมีพื้นที่ผิวในการยึดเกาะวัตถุดิบที่มีขนาดเล็กและสามารถเจริญแทรกผ่านเข้าไปในช่องว่างระหว่างวัตถุดิบได้มากขึ้นรวมทั้งใช้สารอาหารในวัตถุดิบได้ดีมากกว่าในวัตถุดิบที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นปริมาณกลูโคซามีนในเทมเป้ที่ทำจากวัตถุดิบขนาดเล็กจึงมีค่าสูงมากกว่าวัตถุดิบที่ขนาดใหญ่ขึ้นทั้งในข้าวโพดและถั่วเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Michell, Doelle และ Greenfield (1988) ที่ศึกษาวิธีการปรับปรุงการเจริญเติบโตของ *Rhizopus oligosporus* บนแบบจำลองวัตถุดิบที่เป็นของแข็ง (model solid substrate) พบว่าเมื่อขนาดวัตถุดิบเล็กลงอัตราการเจริญของเชื้อราจะสูงขึ้น เนื่องจากอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเพิ่มขึ้นทำให้เส้นใยราเจริญหนาแน่นขึ้น และเทมเป้ข้าวโพดหวานจะมีค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีนที่แสดงถึงการเจริญของเชื้อราได้สูงกว่าเทมเป้ข้าวโพดข้าวเหนียวที่ผลิตจากขนาดเมล็ดเท่ากัน โดยในเทมเป้ข้าวโพดหวานจะมีปริมาณกลูโคซามีนสูงกว่าเทมเป้ข้าวโพดข้าวเหนียว เนื่องจากข้าวโพดข้าวเหนียวมี amylopectin สูงถึง 73% (กฤษฎา สัมพันธารักษ์, 2531) ซึ่งมากกว่าข้าวโพดหวาน ดังนั้นเมื่อผ่านการให้ความร้อนซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในขั้นตอนการผลิตเทมเป้ ทำให้ข้าวโพดข้าวเหนียวเกิด gelatinization ได้ดีกว่าข้าวโพดหวานที่มีขนาดเท่ากัน ส่งผลให้ในข้าวโพดข้าวเหนียวเมล็ดข้าวเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อน ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสลดลง เชื้อราจึงเจริญเติบโตได้น้อยกว่าข้าวโพดหวาน เมื่อศึกษาค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีนในเทมเป้จากข้าวโพดหวานขนาด ¼ เมล็ดและเทมเป้จากถั่วเหลืองเมล็ดปั่นละเอียดพบว่าค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีนในเทมเป้ข้าวโพดมีค่าเท่ากับ 319.61 gf และ 7.66 g/kg dry biomass ส่วนในเทมเป้จากถั่วเหลืองมีค่าเท่ากับ 286.79 gf และ 7.46 g/kg dry biomass ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าขนาดของข้าวโพดและถั่วเหลืองระดับอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกข้าวโพดหวาน ขนาด ¼ เมล็ด และถั่วเหลืองเมล็ดปั่นละเอียด มาศึกษาหาระยะเวลาการหมักที่เหมาะสม โดยนำถั่วเหลืองและข้าวโพดหวานขนาดดังกล่าวมาผลิตเทมเป้แล้วเก็บตัวอย่างที่ผ่านการหมัก 0 16 24 และ 40 ชั่วโมง มาตรวจวัดค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีน พบว่าในช่วงระยะเวลาการหมัก 0-24 ชั่วโมง จะทำให้เทมเป้ที่ผลิตได้มีค่าความแน่นเนื้อสูงที่สุด ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีนในเทมเป้ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว ที่ผลิตจากข้าวโพดขนาด ¼ เมล็ดและเทมเป้ถั่วเหลืองเมล็ดปั่นละเอียด หมักที่ 30°C เป็นเวลา 0 16 24 และ 40 ชั่วโมง

ระยะเวลาการหมักเทมเป้ (ชั่วโมง)	ความแน่นเนื้อ (gf)	กลูโคซามีน (g/kg dry biomass)
เทมเป้ข้าวโพดหวาน		
0	$8.67^{f}\pm3.90$	$2.65^{d}\pm0.02$
16	$43.32^{d}\pm3.99$	$4.52^{c}\pm0.15$
24	$344.03^{a}\pm27.58$	$7.66^{b}\pm0.69$
40	$41.00^{d}\pm4.31$	$8.54^{a}\pm0.36$
เทมเป้ถั่วเหลือง		
0	$20.73^{e}\pm3.07$	$2.63^{d}\pm0.02$
16	$103.94^{c}\pm10.25$	$5.42^{c}\pm0.03$
24	$293.95^{b}\pm70.28$	$7.34^{b}\pm0.08$
40	$90.57^{d}\pm10.26$	$7.56^{a}\pm0.05$

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

จากตารางที่ 4.3 พบว่าในช่วง 0-24 ชั่วโมง เมื่อระยะเวลาการหมักเทมเป้ข้าวโพดหวานและเทมเป้ถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น ความแน่นเนื้อของเทมเป้ทั้งสองชนิดจะมีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากมีการเจริญของเชื้อราเพิ่มมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากปริมาณกลูโคซามีนที่เป็นสารองค์ประกอบในผนังเส้นใยเชื้อรามีค่าเพิ่มขึ้น โดยในเทมเป้ข้าวโพดหวานมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 2.65±0.02 เป็น 7.66±0.69 g/kg dry biomass และเทมเป้ถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นจาก 2.63±0.02 เป็น 7.34±0.08 g/kg dry biomass ซึ่งสอดคล้องกับ Ruiz-Teran และ Owens (1996) ที่ติดตามการเจริญของเส้นใยเชื้อราในกระบวนการผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองโดยวัดปริมาณกลูโคซามีน พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณกลูโคซามีนจะมีค่าเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเชื้อรา รวมถึง Sparringa และ Owens (1999) ที่รายงานว่าเส้นใยเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 ที่อยู่ในรูป pellets เจริญบน Sabouraud dextrose broth ที่ 30°C เวลา 72 ชั่วโมง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่จะมีปริมาณกลูโคซามีนมากกว่าขนาดเล็ก โดยที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ≤5, 5-15 และ 16-35 มิลลิเมตร จะมีปริมาณกลูโคซามีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 51±1.8 75±2.3 และ 107±4.3 g/kg dry biomass ตามลำดับ แสดง

ให้เห็นว่าปริมาณกลูโคซามีนจะเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ และเมื่อหมักเทมเป้เป็นเวลา 40 ชั่วโมง ค่าความแน่นเนื้อของเทมเป้ข้าวโพดหวานและเทมเป้ถั่วเหลืองจะลดลงจาก 344.03±27.58 gf และ293.95±70.28 gf เป็น 41.00±4.31 gf และ 90.57±10.26 gf ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณกลูโคซามีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 8.54±0.36 และ 7.56±0.05 g/kg dry biomass ตามลำดับ นั่นคือมีเส้นใยของเชื้อราเพิ่มขึ้นและการที่ค่าความแน่นเนื้อของเทมเป้ลดลงก็เนื่องจากเมื่อเชื้อราเจริญได้ระยะหนึ่งเส้นใยของเชื้อราจะสร้างเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นย่อยสลายองค์ประกอบของวัตถุดิบทำให้โครงสร้างของเทมเป้อ่อนแอลง ซึ่ง Milto, Yayoi และ Nobuko (2004) รายงานว่า *Rhizopus oligosporus* จะผลิต cellulolytic enzymes และhydrolase enzymes หลายชนิด เช่น cellulose (1.7 U/ml) beta-glucosidase (0.1 U/ml) xylanase 90.8 U/ml) amylase (3.9 U/ml) และ acid protease (0.01 U/ml) ย่อยสลายถั่วเหลืองในกระบวนการผลิตเทมเป้ทำให้มีเนื้อสัมผัสนิ่มลง และงานวิจัยของ Handoyo และ Morita (2006) ที่ศึกษาผลของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ต่อโครงสร้างของถั่วเหลืองระหว่างการหมักเทมเป้พบว่าเมื่อหมักได้ 48 ชั่วโมงจะมีค่า modulus elalsticity (Pa) สูงที่สุดคือ 0.73 x 10^9 Pa และหลังจากนั้นคือ 72 ชั่วโมงค่าจะลดลงเป็น 0.61 x 10^9 Pa เนื่องจากเส้นใยเชื้อรามีอายุมากขึ้นจึงเสื่อมลงและจะไม่เจริญขึ้นใหม่ ประกอบกับถั่วเหลืองที่เป็นวัตถุดิบถูกย่อยทำให้มีเนื้อสัมผัสนิ่มมากขึ้น เทมเป้จึงมีความยืดหยุ่นน้อยลง ในขณะที่ปริมาณกลูโคซามีนยังคงเพิ่มขึ้นในอัตราที่ลดลง จากการทดลองจะเห็นว่าปริมาณกลูโคซามีนแสดงถึงมวลเส้นใยเชื้อราและสัมพันธ์กับค่าความแน่นเนื้อในช่วง 0-24 ชั่วโมงเท่านั้น ดังนั้นจึงใช้ค่าความแน่นเนื้อเป็นตัวบ่งบอกถึงการเจริญของเส้นใยเชื้อราในกระบวนการหมักเทมเป้ถั่วเหลืองและข้าวโพดในช่วงระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง จากผลการทดลองจึงใช้ระยะเวลาหมัก 24 ชั่วโมงเป็นเวลาที่เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์และให้ค่าความแน่นเนื้อสูงที่สุด จึงเลือกใช้ระยะเวลาหมักที่ 24 ชั่วโมงในการทดลองขั้นต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kronenberg และ Hang (1985) ที่พบว่าค่าแรงที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการสร้างเส้นใยของเชื้อราทำให้ค่าความแน่นเนื้อเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น

4.3 ผลการศึกษาอัตราส่วนถั่วเหลืองต่อข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตเทมเป้

การปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เทมเป้ให้มีปริมาณเส้นใยสูง ปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นสมดุลมากขึ้น ดังนั้นจึงเลือกผสมถั่วเหลืองกับข้าวโพดโดยนำข้าวโพดและถั่วเหลืองขนาดที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 4.2 มาผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน เพื่อผลิตเทมเป้ แล้วนำตัวอย่างเทมเป้มาตรวจวัดลักษณะทางกายภาพด้านค่าสี ความชื้นและ pH

พบว่าเมื่อผสมข้าวโพดในอัตราส่วนเพิ่มขึ้น จะทำให้ค่าความสว่าง (L) ลดลง ส่วนค่าสีแดง (a) และค่าสีเหลือง (b) เพิ่มขึ้น ค่าความชื้นเพิ่มขึ้นและค่า pH ลดลง ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าสี ความชื้นและ pH ในเทมเป้ผสมข้าวโพดที่อัตราส่วนต่าง ๆ หมักที่ 30°C 24 ชั่วโมง

เทมเป้ถั่วเหลือง: ข้าวโพด	ค่าสี			ความชื้น (%)	pH
	L	a	b		
5 : 0	87.25^{a}±1.38	0.79^{d}± 0.26	11.01^{e}±0.87	60.70^{d}±0.11	7.10^{a}±0.02
4 : 1	86.57^{a}±1.37	0.90^{cd}±0.12	12.44^{e}± 2.00	65.45^{c}±0.39	7.03^{b}±0.03
3 : 2	76.03^{b}±1.43	1.19^{c}±0.37	23.14^{d}±3.29	68.86^{b}±2.23	6.90^{c}±0.02
2 : 3	73.02^{c}±0.98	1.52^{b}±0.57	25.62^{c}±1.70	70.22^{b}±0.81	6.46^{d}±0.04
1 : 4	71.86^{d}±1.06	1.65^{b}±0.57	30.00^{b}±3.70	73.10^{a}±0.47	6.24^{e}±0.03
0 : 5	69.49^{e}±1.22	2.22^{a}±0.48	32.94^{a}±3.94	74.52^{a}±1.06	5.04^{f}±0.02

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$

จากตารางที่ 4.4 เมื่อผสมข้าวโพดในอัตราส่วนเพิ่มขึ้นเทมเป้ที่ผลิตได้จะมีค่าความสว่าง (L) ลดลง ส่วนค่าสีแดง (a) และค่าสีเหลือง (b) เพิ่มขึ้นเนื่องจากมีสีเหลืองจากข้าวโพดเพิ่มขึ้น แต่ลักษณะโดยรวมคือจะมีสีขาวเหลืองคล้ายก้น ส่วนค่าความชื้นจะสูงขึ้นเนื่องจากข้าวโพดที่เป็นวัตถุดิบมีความชื้นสูงกว่าถั่วเหลือง ค่า pH ในเทมเป้ถั่วเหลืองจะสูงใกล้เป็นกลาง เนื่องจากเกิดการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างการหมักและเกิดแอมโมเนีย (Paredes-Lopez, Harry และ Montes-Rivera, 1987) แต่เมื่ออัตราส่วนข้าวโพดในเทมเป้เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ค่า pH ลดลง เนื่องจากในกระบวนการหมักจะเกิดการสร้างกรดอินทรีย์ ทำให้ผลิตภัณฑ์เปรี้ยวเล็กน้อย และมีลักษณะเฉพาะตัวคือมีกลิ่น yeasty และ fruit-like (Steinkraus, 1983) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และ Hesseltine (1966) ที่ผลิต wheat tempeh หมัก 24 ชั่วโมงค่า pH จะลดลงเป็น 5.7 และ Cuevas-Rodríguez (2003) ผลิตแป้งจากเทมเป้ข้าวโพดพบว่ามีค่า pH ลดลงจากแป้งข้าวโพดที่ไม่ผ่านการหมักคือ 6.1 เป็น 4.5

สำหรับค่าความแน่นเนื้อของเทมเป้ผสมข้าวโพด เมื่อสัดส่วนของข้าวโพดเพิ่มขึ้นค่าความแน่นเนื้อก็จะเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับปริมาณกลูโคซามีนก็มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีนในเทมเป้ผสมข้าวโพดในอัตราส่วนต่าง ๆ หมักที่ 30°C 24 ชั่วโมง

เทมเป้ ถั่วเหลือง:ข้าวโพด	ความแน่นเนื้อ (gf)	กลูโคซามีน (g/kg dry biomass)
5:0	$286.11^{c}\pm20.96$	$7.17^{d}\pm0.14$
4:1	$289.89^{c}\pm14.65$	$7.44^{c}\pm0.15$
3:2	$293.00^{bc}\pm21.13$	$7.64^{b}\pm0.06$
2:3	$295.85^{bc}\pm18.41$	$7.67^{b}\pm0.04$
1:4	$312.11^{b}\pm11.48$	$7.72^{b}\pm0.01$
0:5	$335.55^{a}\pm15.44$	$8.33^{a}\pm0.01$

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

โดยเทมเป้ข้าวโพดมีค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดคือ 335.55 gf และ 8.33 g/kg dry biomass ตามลำดับ ซึ่งค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างเทมเป้ที่ผลิตทางการค้าคือ 325 gf ส่วนเทมเป้ถั่วเหลืองมีค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีนต่ำที่สุดคือ 286.11 gf และ 7.17 g/kg dry biomass ตามลำดับ เนื่องจากเชื้อรา *Rhizopus* มี proteolytic activity สูงกว่า amylolytic activity โดยมีค่า activity index ประมาณ 0.98-1.02 และ 0-0.82 ตามลำดับ (Lim, Tan และ Rahim, 1987) ซึ่งจากองค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองพบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงถึง 18.20% (โดยน้ำหนักเปียก) ในขณะที่ข้าวโพดมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าคือประมาณ 4.59% โดยน้ำหนักเปียก ทำให้ถั่วเหลืองเกิดการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสูงกว่า ทำให้เทมเป้ถั่วเหลืองมีโครงสร้างนิ่มกว่าเทมเป้ข้าวโพดค่าความแน่นเนื้อจึงลดลงและในเทมเป้ข้าวโพดมีปริมาณเส้นใยเชื้อราสูงกว่าเทมเป้ถั่วเหลือง ดังจะเห็นได้จากปริมาณของกลูโคซามีนที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากข้าวโพดมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตประมาณ 39.3% ในขณะที่ถั่วเหลืองมีเพียง 10.8% โดยน้ำหนักเปียก (กระทรวงสาธารณสุข, 2530) ทำให้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเชื้อราเพื่อให้ในการเจริญเติบโตได้ดีกว่า เนื่องจากเชื้อราสามารถจะใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน กรดอินทรีย์และโพลิเมอร์ ต่าง ๆ แต่ส่วนใหญ่แหล่งคาร์บอนที่เชื้อราสามารถจะเจริญได้ดีก็คือคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ hexose เช่น glucose, sucrose, lactose โดยน้ำตาล hexose ส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate หรือ fructose-6-phosphate ก่อนที่จะถูก metabolize โดยขบวนการ glycolysis และ tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) ได้พลังงาน คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ

เมื่อนำเทมเป้ผสมข้าวโพดในอัตราส่วนต่าง ๆ มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่าเทมเป้ที่ผสมข้าวโพดในอัตราส่วนเพิ่มขึ้นจะมีปริมาณเส้นใยอาหารเพิ่มขึ้น ปริมาณโปรตีนและไขมันลดลง ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6 และ 4.7

ตารางที่ 4.6 องค์ประกอบทางเคมีในเทมเป้ผสมข้าวโพดในอัตราส่วนต่าง ๆ หมักที่ 30°C 24 ชั่วโมง

เทมเป้ ถั่วเหลือง:ข้าวโพด	โปรตีน (g/100 g)	ไขมัน (g/100 g)	เส้นใยอาหาร (g/100 g)
5:0	$33.84^{a}\pm0.26$	$20.64^{a}\pm0.16$	$10.82^{f}\pm0.91$
4:1	$28.74^{b}\pm0.81$	$17.00^{b}\pm0.22$	$14.80^{e}\pm0.04$
3:2	$23.65^{c}\pm1.95$	$13.54^{c}\pm1.25$	$16.48^{de}\pm0.05$
2:3	$17.63^{d}\pm1.00$	$8.36^{d}\pm1.21$	$18.11^{cd}\pm0.02$
1:4	$12.70^{e}\pm1.04$	$5.02^{e}\pm0.24$	$22.78^{b}\pm0.02$
0:5	$7.29^{f}\pm0.91$	$1.09^{f}\pm1.91$	$28.70^{a}\pm0.06$

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ตารางที่ 4.7 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายในเทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองและข้าวโพดเปรียบเทียบกับไข่ไก่ (mg/g protein)

amino acids	ไข่ไก่*	ถั่วเหลือง:ข้าวโพด					
		5:0	4:1	3:2	2:3	1:4	0:5
Histidine	22	24.22	26.31	28.40	30.48	32.57	34.66
Isoleucine	54	37.08	36.17	35.26	34.34	33.43	32.52
Leucine	86	73.67	82.30	90.92	99.55	108.17	116.80
Lysine	70	59.07	52.27	45.46	38.66	31.85	25.05
methionine and cystine	57	22.35	24.41	26.46	28.51	30.56	32.62
phenylalanine and tyrosine	93	63.84	66.10	68.36	70.63	72.89	75.15
threonine	47	41.53	37.24	32.96	28.67	24.39	20.10
tryptophan	17	15.17	12.74	10.31	7.87	5.44	3.01
valine	51	50.40	48.09	45.77	43.46	41.14	38.83

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

* FAO/WHO (1985)

จากการคำนวณปริมาณกรดอะมิโนในเทมเป้ผสมข้าวโพด พบว่าเมื่อผสมข้าวโพดสูงขึ้น เทมเป้ผสมข้าวโพดจะมี sulfur containing amino acids (methionine และ cystine) เพิ่มขึ้นและเมื่ออัตราส่วนถั่วเหลืองสูงขึ้น เทมเป้ผสมข้าวโพดจะมีปริมาณ lysine และ tryptophan เพิ่มขึ้น

สำหรับความสมดุลของกรดอะมิโนที่จำเป็นในโปรตีนของเทมเป้ผสมข้าวโพดนั้นจะขึ้นกับอัตราส่วนที่เหมาะสมของถั่วเหลืองและข้าวโพดที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งผลสามารถคำนวณค่าได้จาก amino acid score (Harper and Yoshimura, 1993) ของเทมเป้ผสมข้าวโพดในอัตราส่วนต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ค่า amino acid score เทมเป้ผสมข้าวโพดที่อัตราส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการนำค่ากรดอะมิโนในเมล็ดถั่วเหลืองและข้าวโพดมาเป็นหลักในการคำนวณ โดยเปรียบเทียบกับปริมาณความต้องการกรดอะมิโนของเด็ก (mg/g protein)

amino acids	เด็ก*	ถั่วเหลือง : ข้าวโพด					
		5:0	4:1	3:2	2:3	1:4	0:5
isoleucine	40	92.70	90.43	88.15	85.85	83.58	81.30
leucine	70	105.24	117.57	129.89	142.21	154.53	166.86
lysine	53	107.40	95.04	82.65	70.29	57.91	45.55
methionine and cystine	35	63.86	69.74	75.60	81.46	87.31	93.20
phenylalanine and tyrosine	60	106.40	110.17	113.93	117.72	121.48	125.25
threonine	40	103.83	93.10	82.40	71.68	60.98	50.25
tryptophan	10	151.70	127.40	103.10	78.70	54.40	30.10
valine	50	100.80	96.18	91.54	86.92	82.28	77.66

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

* FAO/WHO/UNU (1981)

พบว่าเมื่อข้าวโพดในอัตราส่วนเพิ่มขึ้นจะทำให้ limiting amino acid ในเทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วน 5:0 4:1 3:2 2:3 1:4 และ 0:5 มีค่า amino acid score เป็น 63.86 69.74 75.60 70.29 54.40 และ 30.10 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า amino acid score ของไข่ไก่ที่มีค่าเท่ากับ 100 เด็กจะต้องบริโภคโปรตีนในเทมเป้ผสมข้าวโพดในปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 1.57

1.43 1.32 1.44 1.84 และ 3.32 เท่าของโปรตีนในไข่ ตามลำดับ จึงจะได้รับประโยชน์เทียบเท่ากับไข่ ดังนั้นโปรตีนในเทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วน 3:2 จึงให้โปรตีนที่มีคุณภาพดีกว่าอัตราส่วนอื่น เนื่องจากมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่สมดุลกว่า ซึ่งสอดคล้องกับ Bressani, Elías และ Braham (1966) แสดงถึงสัดส่วนของกรดอะมิโนในถั่วเหลืองและข้าวโพดที่ผสมกันอัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่งเสริมกันทำให้โปรตีนสมบูรณ์ ดังแสดงในรูปที่ 2.1 พบว่าการผสมถั่วเหลืองและข้าวโพดในอัตราส่วน 3:2 จะทำให้ค่าประสิทธิภาพการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ได้สูงที่สุด เนื่องจากมีกรดอะมิโนที่สมดุลทำให้โปรตีนมีคุณภาพสูงขึ้นมากกว่าในข้าวโพดหรือถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียว โดยเมื่อนำถั่วเหลืองและข้าวโพดมาผสมกันจะทำให้ข้าวโพดมีปริมาณ lysine สูงขึ้นในขณะที่ถั่วเหลืองมี methionine สูงขึ้น

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสด้านความชอบต่อสี ความแน่นเนื้อและความชอบโดยรวมของเทมเป้ผสมข้าวโพดที่อัตราส่วนต่าง ๆ

เทมเป้ ถั่วเหลือง:ข้าวโพด	สี	ความแน่นเนื้อ	ความชอบโดยรวม
5:0	$5.17^{a}\pm0.38$	$6.44^{b}\pm1.88$	$5.20^{a}\pm1.01$
4:1	$5.33^{a}\pm0.65$	$6.62^{bc}\pm1.50$	$6.00^{ab}\pm0.82$
3:2	$6.38^{b}\pm0.45$	$6.81^{c}\pm0.46$	$6.95^{b}\pm0.85$
2:3	$6.54^{b}\pm0.58$	$6.53^{b}\pm1.13$	$6.74^{ab}\pm0.98$
1:4	$6.73^{bc}\pm0.68$	$6.14^{ab}\pm1.20$	$6.32^{ab}\pm0.82$
0:5	$7.38^{c}\pm0.88$	$5.98^{a}\pm0.77$	$6.54^{ab}\pm0.75$

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

[1] ทดสอบด้านความชอบ (hedonic scale) 9 ระดับ โดย 1 = ไม่ชอบมากที่สุด 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 5 = เฉย ๆ 6 = ชอบเล็กน้อย 7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก และ 9 = ชอบมากที่สุด

ผลการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสด้านความชอบต่อสี ความแน่นเนื้อและความชอบโดยรวมของเทมเป้ผสมข้าวโพดที่อัตราส่วนต่างๆ (ตารางที่ 4.9) พบว่า คะแนนความชอบต่อสีของเทมเป้จะมีค่าสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนข้าวโพด โดยเมื่อใช้อัตราส่วนถั่วเหลือง:ข้าวโพดเป็น 3:2, 2:3, และ 1:4 มีคะแนนความชอบต่อสีไม่แตกต่างกัน คือ มีความชอบต่อสีเล็กน้อยถึงปานกลาง ส่วนความชอบความแน่นเนื้อพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยเทมเป้ผสมข้าวโพดในอัตราส่วนถั่วเหลือง:ข้าวโพด เป็น 3:2 มีคะแนนสูงที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่อมีการใช้ข้าวโพด

ในอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นมีความแน่นเนื้อเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.6) ทำให้มีคะแนนความชอบทางด้านนี้เพิ่มขึ้น แต่ถ้ามีความแน่นเนื้อมากเกินไปอาจทำให้ผู้ทดสอบมีความชอบน้อยลง และเมื่อพิจารณาความชอบโดยรวม พบว่า เทมเป้ผสมข้าวโพดในอัตราส่วนถั่วเหลือง:ข้าวโพด เป็น 3:2 มีคะแนนสูงที่สุด โดยคะแนนความชอบโดยรวมจะแปรตามคะแนนความชอบความแน่นเนื้อ

เมื่อพิจารณาจากปริมาณโปรตีนร่วมกับคะแนนทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าเทมเป้ผสมข้าวโพดในอัตราส่วนถั่วเหลือง:ข้าวโพด เป็น 3:2 เป็นสูตรที่ดีที่สุด เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนเพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย (กระทรวงสาธารณสุข, 2546) และมีคะแนนความชอบทางประสาทสัมผัสที่ดีที่สุดนอกจากนี้เทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วน 3:2 ยังมีปริมาณโปรตีน 23.65$\pm$1.95% ซึ่งแม้จะมีปริมาณไม่สูงเท่ากับเทมเป้ถั่วเหลืองแต่ก็เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายคนไทยสำหรับเด็กวัย 1-5 ปี ที่ต้องการโปรตีน 8-10% ต่อวัน (กระทรวงสาธารณสุข, 2546) และมีปริมาณไขมัน 13.54$\pm$1.25% ซึ่งลดลงจากเทมเป้ถั่วเหลือง และเทมเป้ผสมข้าวโพดจะมีปริมาณเส้นใยสูงกว่าเทมเป้ถั่วเหลืองคือมีปริมาณ 16.48$\pm$0.05% ซึ่งเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำจะรวมตัวกันเป็นก้อนช่วยให้ระบบขับถ่ายดีขึ้น ส่วนเส้นใยที่ละลายน้ำได้จะถูกหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังช่วยลดการดูดซับไขมันในร่างกายได้ และเมื่อพิจารณาค่าความแน่นเนื้อของเทมเป้ผสมข้าวโพดที่อัตราส่วนต่าง ๆ จะเห็นว่าแม้จะต่างกันแต่อยู่ในช่วงมาตรฐานทางการค้า จากเหตุผลข้างต้นจึงเลือกเทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วน 3:2 มาวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน จึงเลือกเทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วน 3:2 มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ปริมาณกรดอะมิโนในเทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วน 3:2 หมักที่ 30°C 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับไข่ไก่ (mg/g protein)

amino acids	ไข่ไก่*	เทมเป้ผสมข้าวโพด วิเคราะห์	เทมเป้ คำนวณ
isoleucine	54	55.35	88.15
leucine	86	49.26	129.89
lysine	70	47.74	82.65
methionine and cystine	57	52.05	75.60
phenylalanine and tyrosine	93	57.84	113.93
threonine	47	22.02	82.40
tryptophan	17	15.26	103.10
valine	51	12.43	91.54

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

* FAO/WHO/UNU (1981)

จากตารางที่ 4.10 เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในเทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วน 3:2 กับค่าที่คำนวณได้ก่อนการหมัก พบว่าปริมาณ histidine, isoleucine, lysine, methionine และ cystine และ tryptophan เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณ leusine, phenylalanine, tyrosine, threonine และ valine ลดลง อาจเนื่องจากผลของกระบวนการผลิตเทมเป้ เช่น ในขั้นตอนการแช่กรด การให้ความร้อน และกระบวนการหมักโดยเอนไซม์จากเชื้อรา จะย่อยสลายโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Varzakas (1998) ที่ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองพบว่าเมื่อหมักได้ 24 ชั่วโมง เชื้อรา *Rhizopus* จะผลิตเอนไซม์ส่วนใหญ่คือ leucine acrylamidases และ valine acrylamidases ในปริมาณ 40 และ 20 นาโนโมล ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็น aminopeptidases ที่จำเพาะเจาะจงต่อการสลายพันธะ CO-NH ใน leucine และ valine ทำให้มีปริมาณกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดลดลง นอกจากนี้ Cuevas-Rodríguez และคณะ (2003) ที่ศึกษาการผลิตแป้งเทมเป้จากเทมเป้ข้าวโพดพบว่า มีค่า available lysine เพิ่มขึ้นจากแป้งข้าวโพดที่ไม่ผ่านการหมักคือ 4.2 เป็น 5.68 g lysine/100 g

protein และ Wang, Ruttle และ Hesseltine (1969) ที่รายงานว่าปริมาณ available lysine จะสูงขึ้นหลังจากหมัก wheat และ soybean ด้วย เชื้อรา *Rhizopus*

4.4 ผลการศึกษาระยะเวลา pre-drying และการทอดที่เหมาะสม

เมื่อนำเทมเป้ผสมข้าวโพดในอัตราส่วนที่ได้จากข้อ 4.3 มาศึกษาหาระยะเวลา pre-drying (60°C 32 %RH) และการทอด (180°C) ที่เหมาะสม โดยแปรระยะเวลาการ pre-drying เป็น 0 15 30 45 และ 60 นาที และแปรเวลาในการทอด 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 นาที ผลการทดลองพบว่าเมื่อระยะเวลาการ pre-drying เพิ่มขึ้น ค่าความชื้นและค่าสีด้านความสว่างจะลดลง ส่วนค่าสีน้ำตาลจะเพิ่มขึ้นอย่างแตกต่างกันทางสถิติเมื่อ pre-drying (60°C 32 %RH) เวลา 45 นาที ผลดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นและค่าสีของเทมเป้ผสมข้าวโพด (ขนาด 0.2 x 2.0 x 5.0 เซนติเมตร) ที่ระยะเวลาการ pre-drying (60°C 32 %RH) 0 15 30 45 และ 60 นาที

ระยะเวลาการ pre-drying	ความชื้น	ค่าสี		
(นาที)	(%)	L	a	b
0	69.69^{a} ± 0.20	71.34^{a} ± 1.85	2.15^{e} ± 0.64	27.93^{c} ± 1.79
15	58.31^{b} ± 1.44	67.17^{b} ± 1.54	2.57^{d} ± 0.19	28.12^{c} ± 2.95
30	46.34^{c} ± 2.44	65.98^{b} ± 1.80	3.42^{c} ± 0.17	28.61^{c} ± 1.56
45	40.21^{d} ± 3.46	48.65^{c} ± 1.29	6.93^{b} ± 0.56	33.85^{b} ± 0.48
60	28.46^{e} ± 3.46	43.73^{d} ± 1.29	7.23^{a} ± 0.24	35.64^{a} ± 1.48

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการวิเคราะห์ค่าสีพบว่า ความสว่าง (L) ของตัวอย่างเทมเป้ผสมข้าวโพดมีค่าลดลง ในขณะที่ค่าสีแดง (a) และสีเหลือง (b) เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการ pre-drying เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ของโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดได้ดีในสภาวะที่ค่า a_w อยู่ในช่วง 0.6-0.7 (ไพศาล วุฒิจำนงและคณะ, 2546) และพบว่าการ pre-drying เป็นเวลา 45 และ 60 นาที มีผลทำให้สีคล้ำ

ขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ดังจะเห็นได้จากค่าความสว่าง ค่าสีแดงและเหลืองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกผลิตภัณฑ์เทมเป้ที่ผ่านการ pre-drying ที่ 15 และ 30 นาที เพื่อใช้ในการศึกษาระยะเวลาการทอดที่เหมาะสม โดยแปรระยะเวลาในการทอดเป็น 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 นาที ผลดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในเทมเป้ผสมข้าวโพด (ขนาด 0.2 x 2.0 x 5.0 เซนติเมตร) ที่ผ่านการทอดที่อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลา 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 นาที

Pre-drying	ร้อยละของความชื้นที่ระยะเวลาในการทอด (นาที)				
(นาที)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	25.33±2.72	7.78± 3.40	2.32± 1.10	0.97± 0.04	0.52± 0.99
15	9.48± 3.34	2.79± 1.20	1.72± 0.59	0.90± 0.09	0.39± 0.05
30	2.72± 0.38	1.51± 0.38	1.04± 0.14	0.65± 0.14	0.27± 0.03

a, b, c, ... ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.12 เมื่อนำเทมเป้ผสมข้าวโพดที่ผ่านการ pre-drying ที่ 15 และ 30 นาที มาทอดที่อุณหภูมิ 180 °C เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีค่าความชื้นประมาณร้อยละ 3 พบว่าเมื่อระยะเวลาการ pre-drying เพิ่มขึ้น ทำให้ผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดมีความชื้นลดลง ส่งผลให้ระยะเวลาในการทอดเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นตามที่ต้องการสั้นลง โดยเทมเป้ผสมข้าวโพดที่ไม่ผ่านการ pre-drying จะใช้เวลาการทอด 2.0 นาที ส่วนเทมเป้ที่ผ่านการ pre-drying เป็นเวลา 15 นาที จะใช้เวลาทอด 1.5 นาที ในขณะที่ pre-drying 30 นาที จะใช้เวลาทอดเพียง 1.0 นาที ดังนั้นจึงนำเทมเป้ผสมข้าวโพดที่ผ่านการทอดที่ภาวะดังกล่าว มาวิเคราะห์ค่าสี ปริมาณไขมันและความกรอบต่อไป

ตารางที่ 4.13 ค่าสี ปริมาณไขมันและ ความกรอบของเทมเป้ผสมข้าวโพดที่ผ่านการ pre-drying (60°C 32%RH) เวลา 0 นาทีแล้วทอด (180°C) 2.0 นาที pre-drying 15 นาทีแล้วทอด 1.5 นาที และ pre-drying 30 แล้วทอด 1.0 นาที

ระยะเวลา (นาที)		ค่าสี			ปริมาณไขมัน	ความกรอบ[ns]
pre-drying	frying	L	a	b	(%)	(gf/mm)
0	2.0	58.97[a]±2.20	9.09[a]±0.19	21.68[a]±2.39	45.68[a]±2.26	127.61±19.41
15	1.5	43.32[b]±2.29	11.10[b]±1.05	19.09[b]±3.20	40.11[b]±3.54	128.11±16.88
30	1.0	42.65[b]±2.34	12.64[b]±0.51	18.70[b]±4.20	35.84[c]±1.05	132.12±20.87

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลอง ตารางที่ 4.13 พบว่าเทมเป้ที่ไม่ผ่านการ pre-drying และทอด 2.0 นาที มีปริมาณไขมันสูงที่สุด คือ ร้อยละ 45.68 ในขณะที่เทมเป้ที่ผ่านการ pre-drying 30 นาที และทอด 1.0 นาที มีปริมาณไขมันน้อยที่สุด คือ 35.84% และเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เทมเป้ที่ผ่านการทอดทั้ง 3 ภาวะกับเทมเป้ที่ยังไม่ผ่านการทอดซึ่งมีปริมาณไขมัน 20.58% พบว่า เทมเป้เมื่อเวลาการ pre-drying เพิ่มขึ้น จะใช้เวลาในการทอดลดลง ทำให้ผลิตภัณฑ์มีการดูดซับน้ำมันลดลงด้วย ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากความชื้นในผลิตภัณฑ์ที่ลดลง ทำให้ช่องว่างภายในอาหารลดลง ส่งผลให้อัตราการถ่ายเทความชื้นจากอาหารสู่น้ำมันและการดูดซับน้ำมันเข้าสู่อาหารลดลง รวมถึงการเกิดเปลือกแข็งที่ผิวของอาหาร (crust) จะช่วยชะลอการดูดซับน้ำมันของอาหารระหว่างทอดได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Pedreschi และ Moyano (2004) ที่พบว่าการ pre-drying มันฝรั่งก่อนการทอดมีผลทำให้การดูดซับน้ำมันของผลิตภัณฑ์สุดท้ายลดลง และทำให้เนื้อสัมผัสของมันฝรั่งทอดดีขึ้น

เมื่อพิจารณาค่าสีพบว่า เทมเป้ที่ผ่านการ pre-drying แล้วทอดจะมีค่าความสว่าง (L) ค่าสีเหลือง (b) ต่ำกว่าเทมเป้ที่ไม่ผ่านการ pre-drying และทอด 2.0 นาที แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ส่วนค่าสีแดง (a) จะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Krokida และคณะ (2001) ที่พบว่าขั้นตอนการ pre-drying มันฝรั่งก่อนทอดจะทำให้ค่าความสว่างของผลิตภัณฑ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับ Pedreschi และคณะ (2007) ที่รายงานว่าการ pre-drying ก่อนทอดในกระบวนการผลิตมันฝรั่งแผ่น (potato chips) จะทำให้ค่าความสว่างลดลง

เมื่อพิจารณาความกรอบ พบว่าผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบจากทั้ง 3 ภาวะ มีค่าความกรอบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยค่าที่ได้ใกล้เคียงกับตัวอย่างทางการค้า คือ 95.10-170.84 gf/mm จากตารางที่ 4.14 เมื่อนำผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ภาวะมาทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าผู้ทดสอบให้คะแนนการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการ pre-drying ด้านสีลดลง แต่ให้คะแนนความชอบด้านความกรอบเพิ่มขึ้น และความชอบโดยรวมเพิ่มขึ้น โดยการ pre-drying 30 นาทีแล้วทอด 1.0 นาที ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบโดยรวมสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสภาวะดังกล่าวในการผลิตเทมเป้ทอดกรอบเพื่อศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ต่อไป

ตารางที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสด้านความชอบต่อสี ความกรอบและความชอบโดยรวมของเทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ผ่านการ pre-drying เวลา 0 นาทีแล้วทอด 2.0 นาที pre-drying 15 นาทีแล้วทอด 1.5 นาที และ pre-drying 30 นาทีแล้วทอด 1.0 นาที

ระยะเวลา (นาที)		สี	ความกรอบ	ความชอบโดยรวม
Pre-drying	Frying			
0	2.0	$6.00^{a}\pm0.58$	$4.83^{b}\pm1.88$	$5.33^{c}\pm1.11$
15	1.5	$5.33^{b}\pm0.75$	$6.33^{a}\pm1.50$	$6.00^{b}\pm0.82$
30	1.0	$5.17^{b}\pm0.38$	$6.50^{a}\pm0.97$	$6.33^{a}\pm0.75$

a, b, c, ... ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

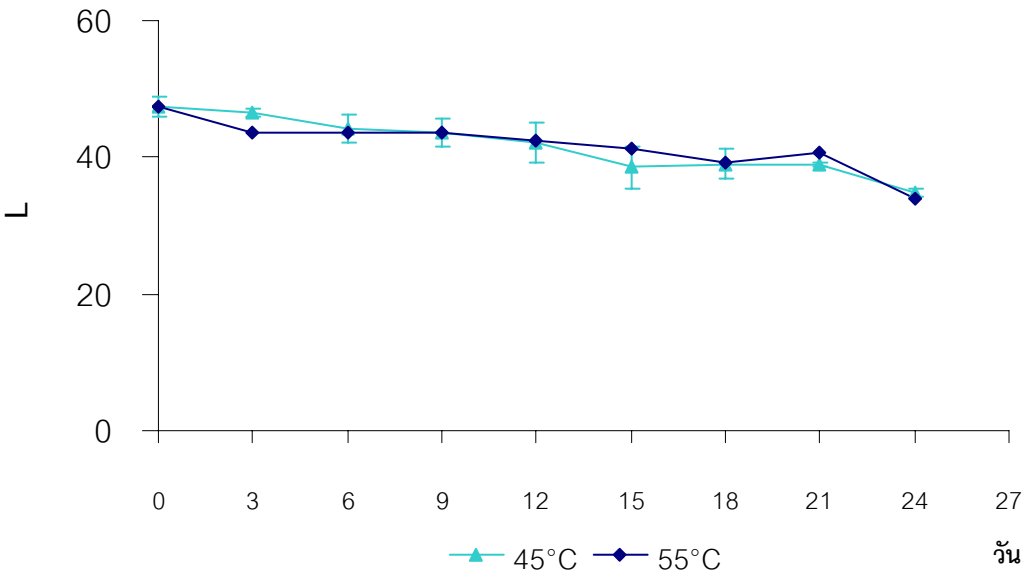
[1] ทดสอบด้านความชอบ (hedonic scale) 9 ระดับ โดย 1 = ไม่ชอบมากที่สุด 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 5 = เฉย ๆ 6 = ชอบเล็กน้อย 7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก และ 9 = ชอบมากที่สุด

4.5 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบ

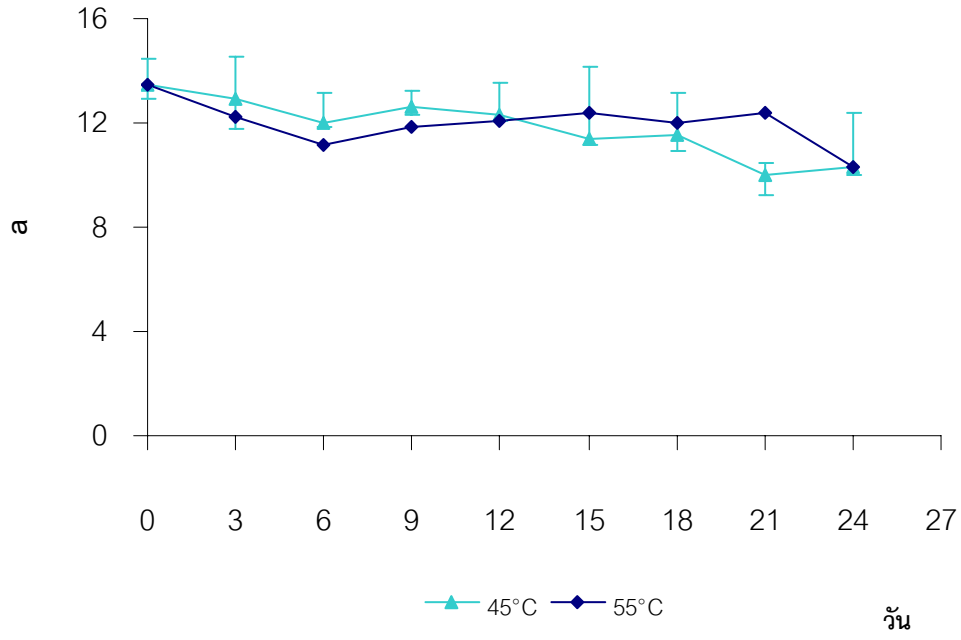
ในการทดลองนี้กำหนดเกณฑ์กำหนดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์คือมีค่า a_w ไม่เกิน 0.6 ค่าเพอร์ออกไซด์ (PV)ไม่เกิน 30 milliequivalent O_2/kg จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ไม่เกิน 1 x 10^3 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม และจำนวนเชื้อราต้องไม่เกิน 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมขนมอบกรอบจากธัญชาติ, 2541) โดยถ้ามีค่าใดค่าหนึ่งเกินเกณฑ์ที่กำหนดถือว่าไม่ยอมรับ จากการทดลองเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบโดยบรรจุถุงและปิดผนึกแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 45°C และ 55°C ซึ่งเป็นสภาวะเร่งเพื่อทำนายอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) ภายใต้สภาวะเดียวกัน พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพมีแนวโน้มที่เหมือนกันคือ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น

ผลิตภัณฑ์จะมีค่าความสว่าง (L) และค่าสีแดง (a) ลดลง แต่ค่าสีเหลือง (b) เพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าความกรอบของผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มลดลง ส่วนค่า PV และค่า a_w จำนวนแบคทีเรียและราจะเพิ่มขึ้น

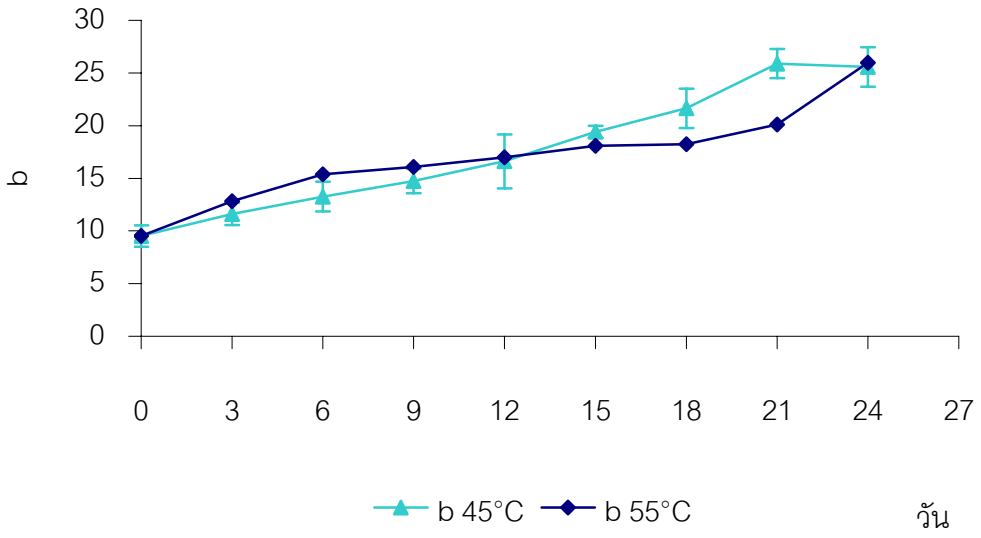
จากการวิเคราะห์ค่าสีพบว่าค่าความสว่างและค่าสีแดงลดลง ค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.1-4.3 (ข้อมูลดังแสดงในภาคผนวก ง ตารางที่ ง.1-3) ซึ่งสอดคล้องกับ ไพศาล วุฒิจำนงและคณะ (2546) ที่รายงานว่าเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด จากน้ำตาลรีดิวซ์ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนในอาหาร



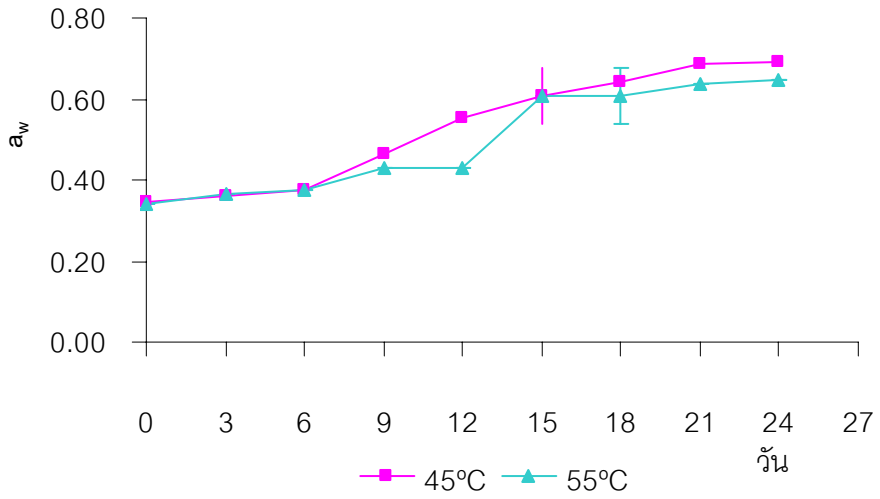
รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าสี L ของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงค่าสี a ของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน



รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่าสี b ของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน



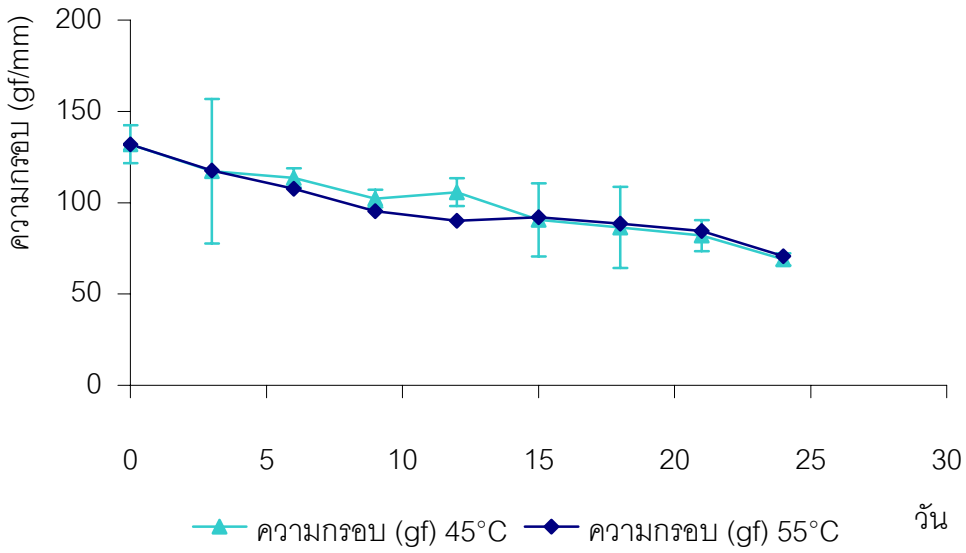
รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงค่า a_w ของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน

จากการทดลองพบว่า a_w มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ผลดังแสดงในรูปที่ 4.4 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก ง ตารางที่ ง.4) ซึ่งสอดคล้องกับ ไพศาล วุฒิจำนงและคณะ (2546) ที่ศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กล้วยอบพบว่าระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อค่า a_w ของผลิตภัณฑ์กล้วยอบเพิ่มขึ้นอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความชื้นจะมีผลต่อเนื้อสัมผัสของอาหาร

จากผลการทดลองพบว่าในระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วันค่าความกรอบมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากความชื้นที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่าความกรอบลดลง โดยน้ำจะทำหน้าที่เป็นตัวประสาน (plasticizer) โครงสร้างไม่ให้แตกหักได้ง่าย นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณน้ำสูงขึ้นจะทำให้สภาวะภายในของตัวอย่างเทมเป้ทอดกรอบที่อยู่ในสภาวะคล้ายแก้ว (glassy state) เปลี่ยนเป็นสภาวะคล้ายยาง (rubbery) ผลดังแสดงในรูปที่ 4.5 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก ง ตารางที่ ง.5)

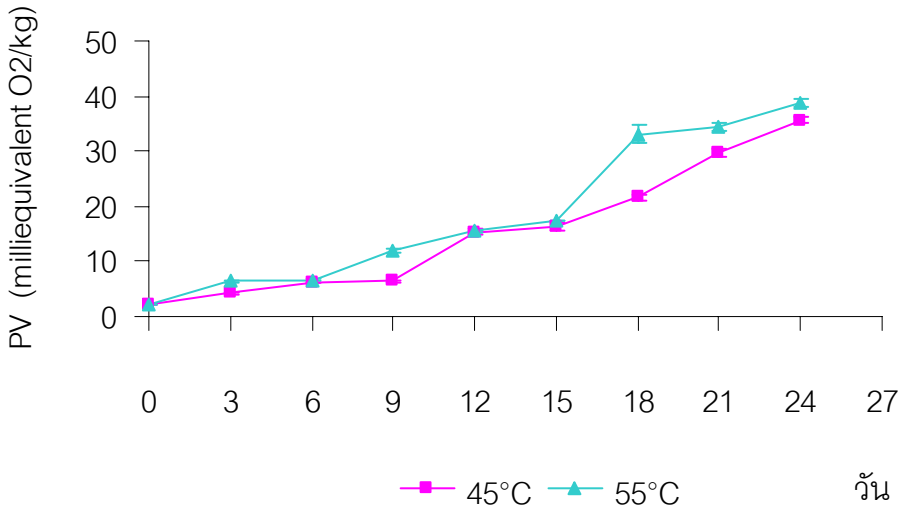
ซึ่งสอดคล้องกับปาริฉัตร (2545) อธิบายโครงสร้างและการเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสของอาหารคือ อาหารประกอบด้วยสารประเภทไบโอพอลิเมอร์ ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญคือประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นระเบียบ (crystalline structure) และโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous structure) ซึ่งสามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและระดับความชื้น โดยเมื่ออุณหภูมิของอาหารอยู่ต่ำกว่าอุณหภูมิกลาสทรานซิชัน (T_g) อาหารจะเปราะแตกง่าย ซึ่ง T_g เป็นอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกลของวัสดุซึ่งเป็นของแข็งซึ่งมีความหนืดสูงมากคล้ายกระจก (glass) หรือมีค่ามอดุลัส (modulus) สูง เป็นวัสดุที่มีความแข็งลดลงและมีความยืดหยุ่นมากขึ้น ซึ่งเมื่อเพิ่มอุณหภูมิของวัสดุให้สูงกว่า T_g วัสดุจะยังเป็นของแข็งที่สามารถเปลี่ยนรูปร่างได้ง่ายขึ้น แต่ไม่สามารถไหลได้เหมือนของเหลว มีลักษณะเหนียวคล้าย

หนังหรือเป็นยาง (rubbery) และเมื่ออุณหภูมิสูงจนกระทั่งสูงว่าอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) วัสดุจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับของเหลว เนื่องจากโครงสร้างมีความแข็งแรงลดลง ดังนั้นหากปล่อยให้อาหารมีความชื้นในระหว่างการเก็บรักษาจะทำให้อาหารมีเนื้อสัมผัสเปลี่ยนไป และซึ่งสอดคล้องกับโครงการวิจัยเรื่องการศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารไทยของ ไพศาล วุฒิจำนงค์ (2546) ที่รายงายว่าปริมาณความชื้นในผลิตภัณฑ์ข้าวตังที่มีความชื้นเพิ่มขึ้นตั้งแต่ร้อยละ 11.21 ของน้ำหนักแห้งหรือมีค่า a_w ตั้งแต่ 0.80 ขึ้นไป จะทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของตัวอย่างเปลี่ยนแปลงคือ นุ่ม ไม่คงตัว อยู่ในสภาวะคล้ายพลาสติก ทำให้แรงค่าความชันของกราฟคือความกรอบลดลง Moreira และคณะ (1999) กล่าวว่าปริมาณความชื้น (moisture content) มีผลต่อเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยว โดยทำให้โครงสร้าง starch/protein-matrix เกิดพลาสติกไซซิ่ง (plasticizing) และนิ่ม ทำให้แรงกลของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป ความกรอบลดลง ซึ่งธัญพืชแห้งจะมีความกรอบเมื่ออยู่ในสภาวะกระจก (glassy state) แต่การเกิดพลาสติกไซเซชัน (plasticization) จากปริมาณน้ำหรืออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น จะทำให้วัสดุเปลี่ยนสถานะเป็นรับเบอรี่ (rubbery state) ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะชื้น ไม่กรอบ (soggy)



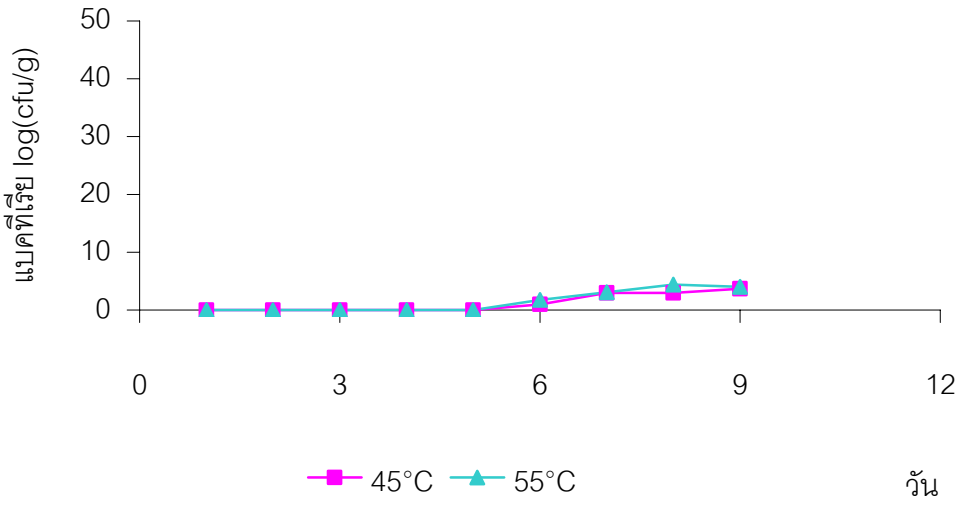
รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่าความกรอบของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน°

จากผลการทดลองพบว่าในระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วันค่า PV มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 30°C ซึ่งปิดปากถุงที่ความดันบรรยากาศ จะมีค่าเพอร์ออกไซด์สูงที่สุด รองลงมาคือ 45 และ 55°C ซึ่งบรรจุแบบปิดผนึกสุญญากาศ ตามลำดับ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น เกิดเป็นสารเพอร์ออกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นสารที่ระเหยง่าย มีกลิ่นเหม็นหืน เช่น สารประกอบแอลดีไฮน์ คีโตนโพลิเมอร์ โพลิเพอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระ เป็นต้น นอกจากนี้ยังทำลายวิตามินที่ละลายในไขมันด้วย ผลดังแสดงในรูปที่ 4.6

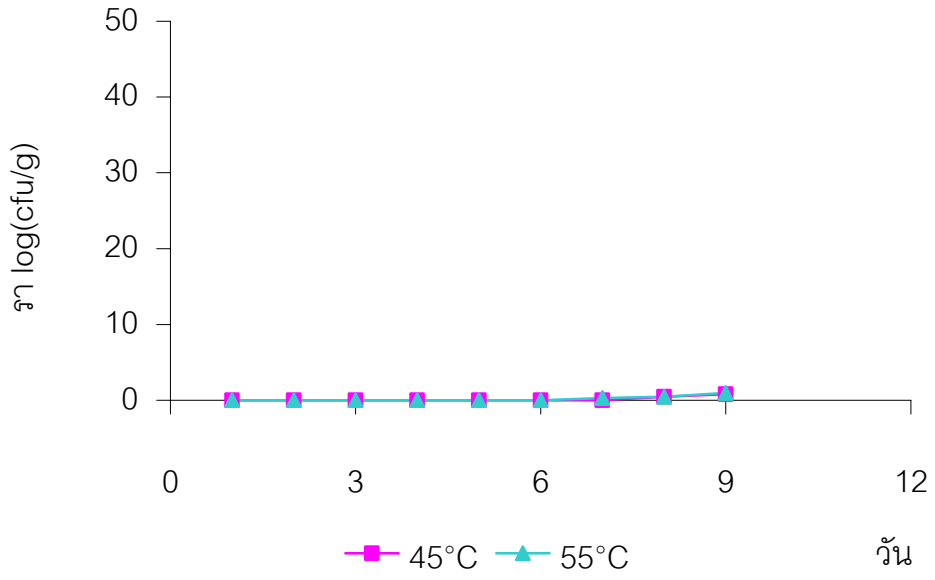


รูปที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงค่าเพอร์ออกไซด์ของผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน

จากผลการทดลองพบว่าในระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วัน จะมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียและรา น้อยมากโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและค่าไม่เกินเกณฑ์กำหนด ดังนั้นการทอดจะทำให้อายุการเก็บรักษานานขึ้นเนื่องจากจะช่วยยับยั้งและทำลายการเจริญของเชื้อรา เนื่องจากทำให้ค่า a_w ลดลงโดยระหว่างการเก็บรักษาค่า a_w จะเพิ่มจากประมาณ 0.3 เป็น 0.6 ซึ่งอยู่ในระดับที่เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ รูปที่ 4.7 และ 4.8 (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก ง ตารางที่ ง.7-8)



รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน



รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงจำนวนราในผลิตภัณฑ์ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน

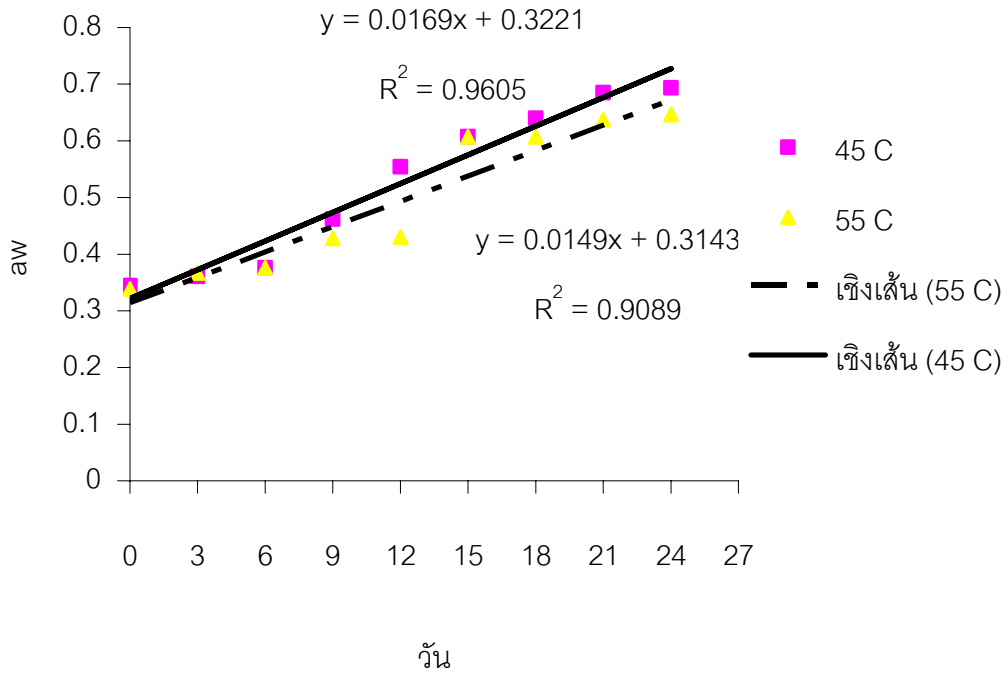
ซึ่งสอดคล้องกับ ไพศาล วุฒิจำนงและคณะ (2546) ที่รายงานว่า a_w เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการควบคุมการเสียของอาหาร แต่ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาค่า a_w จะเพิ่มขึ้นโดยที่อุณหภูมิ 55°C ค่าจะเพิ่มเร็วกว่า 45°C โดยมีค่าเกินมาตรฐานคือ 0.6 เมื่อเก็บรักษาถึงวันที่ 18 และ 15 ตามลำดับ ดังนั้นค่าดัชนีบ่งชี้การหมดอายุของผลิตภัณฑ์คือ a_w ซึ่งเมื่อทราบเวลาที่ผลิตภัณฑ์เสื่อมเสียคุณภาพที่อุณหภูมิเร่งทั้ง 2 อุณหภูมิแล้ว จึงทำนายอายุการเก็บรักษาโดยใช้สมการของ Q_{10} ดังสมการที่ 4.1 และ 4.2 เพื่อทำนายอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30°C) โดยการ

เปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์จะต้องเป็นการเปลี่ยนแปลงที่อธิบายได้ด้วยทฤษฎีจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ (zero-order) หรืออันดับที่หนึ่ง (first-order) จึงสามารถทำนายอายุการเก็บด้วยสมการได้ (Labuza, 1984)

$$Q_{10} = \frac{\text{อายุการเก็บที่อุณหภูมิ T}}{\text{อายุการเก็บที่อุณหภูมิ T+10}} = \frac{\theta s\ (T)}{\theta s\ (T+10)} \qquad (4.1)$$

$$Q_{10}^{\Delta T/10} = \frac{\theta s\ (T_1)}{\theta s\ (T_2)} \qquad (4.2)$$

จากข้อมูลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงค่า a_w มีแนวโน้มเป็นไปตามทฤษฎีจลศาสตร์ของปฏิกิริยาอันดับที่ศูนย์ (zero-order) (Labuza, 1984) ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และเมื่อคำนวณ Q_{10} ตามสมการที่ 4.1 และทำนายอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 30°C ตามสมการที่ 4.2 จะได้ว่าผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบมีอายุการเก็บรักษาประมาณ 21 วัน



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงค่า a_w ในผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิเร่ง 45°C และ 55°C ในช่วงการเก็บรักษา 24 วัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 วัตถุดิบถั่วเหลือง ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวมีปริมาณความชื้น 60.21, 71.94 และ 69.82%(wet basis) ตามลำดับ ปริมาณโปรตีน 33.74 7.87 และ 7.90%(dry basis) ตามลำดับ ปริมาณไขมัน 21.26 2.12 และ 1.23% (dry basis) ตามลำดับ และปริมาณเส้นใยอาหาร (dietary fiber) 3.68 5.51 และ 5.57% (dry basis) ตามลำดับ

5.1.2 ถั่วเหลืองเมล็ดปั่นละเอียดและข้าวโพดหวานขนาด ¼ เมล็ด ผลิตได้เทมเป้ที่มีค่าความแน่นเนื้อและปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดคือ 319.61 gf และ 7.66 g/kg dry biomass ตามลำดับ และระยะเวลาที่ทำให้เกิดการหมักสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 30°C คือ 24 ชั่วโมง จึงเลือกถั่วเหลืองเมล็ดปั่นละเอียดและข้าวโพดหวานขนาด ¼ เมล็ด เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเทมเป้ผสมข้าวโพดที่อุณหภูมิ 30°C คือ 24 ชั่วโมง ในขั้นตอนการวิจัยต่อไป

5.1.3 เทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วน 3:2 มีค่าความแน่นเนื้อ 293.00 gf และมีปริมาณโปรตีนและไขมัน 23.65 และ 13.54% ตามลำดับ โดยโปรตีนประกอบด้วย sulfur containing amino acids (methionine และ cystine) กรดอะมิโน lysine และ tryptophan ในปริมาณและสัดส่วนที่สมดุลขึ้นและมีคุณภาพใกล้เคียงกับโปรตีนในไข่ไก่มากที่สุด รวมทั้งได้รับการยอมรับด้านรสชาติและความชอบโดยรวมสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกเทมเป้ผสมข้าวโพดอัตราส่วน 3:2 เพื่อศึกษาระยะเวลาการ pre-drying และการทอดที่เหมาะสมต่อไป

5.1.4 เทมเป้ผสมข้าวโพดที่ผ่านการ pre-drying ที่ 60°C เวลา 30 นาที แล้วทอดที่อุณหภูมิ 180°C เวลา 1 นาที จะดูดซับน้ำมันน้อยที่สุด รวมทั้งได้รับการยอมรับด้านความกรอบและความชอบโดยรวมสูงที่สุด ดังนั้นเลือกเทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ผ่านการ pre-drying ที่ 60°C 32%RH เวลา 30 นาที แล้วทอดที่ 180°C เวลา 1.0 นาที เพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ต่อไป

5.1.5 ทำนายอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่อุณหภูมิ 30°C ได้ประมาณ 21วัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาด้านรสเปรี้ยวที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตเทมเป้และปรับปรุงกระบวนการผลิตเทมเป้ข้าวโพดให้เหมาะสมต่อไป

5.2.2 ควรมีการศึกษาในด้านคุณค่าทางโภชนาการของเทมเป้ผสมข้าวโพดทั้งก่อนหมักและหลังหมัก เช่น การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนและวิตามิน เป็นต้น หรือศึกษาการสร้างสารที่มีประโยชน์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก เช่น antioxidant และ antimicrobial เป็นต้น

5.2.2 ควรมีการศึกษาในการปรุงรสชาติแบบต่าง ๆ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติดีตรงกับความต้องการของผู้บริโภคมากขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในระดับอุตสาหกรรมครัวเรือนต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2531. พืชไร่. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ไทยวัฒนาพานิช.

นภา โลห์ทอง. 2537. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: ฟันนี่.

ธงชัย สุวรรณลิชณน์. 2531. การพัฒนาเทมเป้จากถั่วลิสง. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปาริฉัตร หงสประภาส. 2545. เคมีกายภาพของอาหาร คอลลอยด์ อิมัลชันและเจล. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพศาล วุฒิจำนงค์, ธงชัย สุวรรณสิชณน์, อนุวัตร แจ้งชัด, วาณี ชนเห็นชอบ และ กมลวรรณ แจ้ง-ชัด. 2546. การศึกษาอายุการเก็บผลิตภัณฑ์อาหารไทยแบบครบวงจร. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภัทธิรา ยิ่งเลิศรัตนะกุล. 2549. การศึกษาปริมาณพลังงานในอาหารว่างและขนมขบเคี้ยว/กลุ่มวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ [online]. Available from: http://nutrition.anamai.moph.go.th/temp/main/view.php?group=2&id=123. [2006, October 25].

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, สำนักงาน. 2541. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมขนมอบกรอบจากธัญชาติ. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงอุตสาหกรรม.

ลาวัณย์ ไกรเดช. 2530. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วลิสง. อาหาร. 17(1): 1-6.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เรามารู้จักเทมเป้กันดีกว่า. เกษตรพระจอมเกล้า. 4(3): 63-73.

สาธารณสุข, กระทรวง. กรมอนามัย. 2530. ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: องค์การทหารผ่านศึก.

สาธารณสุข, กระทรวง. กรมอนามัย. 2533. ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: องค์การทหารผ่านศึก.

สาธารณสุข, กระทรวง. กรมอนามัย. 2546. ปริมาณสารอาหารอ้างอิงที่ควรได้รับประจำวันสำหรับคนไทย พ.ศ. 2546. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์.

สาธารณสุข, กระทรวง. กรมอนามัย. 2549. ข่าวโภชนาการ [online]. Available from: http://nutrition.anamai.moph.go.th/. [2006, August 17].

สุจินดา สุวรรณกิจ. 2534. การผลิตเทมเป้ถั่วลิสงระดับอุตสาหกรรมในครัวเรือน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุชาดา สังขพันธุ์. 2541. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวตังหน้าตั้งสำเร็จรูปจากเทมเป้ข้าว ถั่วลิสงและงา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภางค์ เรืองฉาย. 2539. การผลิตเชื้อเทมเป้ผงในระดับอุตสาหกรรมครัวเรือน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารีย์ วรัญญูวัฒน์. 2544. ถั่วเหลือง ถั่วลิสงและละหุ่ง. กรุงเทพมหานคร: โชติวงศ์.

ภาษาอังกฤษ

Aidoo, K. E., Hendry, R., and Wood, B. J. B. 1981. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. European J. of Appl. Microbiol. Biotechnol. 12: 6-9.

Alfred, E. H., and Norman, N. Y. 1993. Protein Quality, Amino Acid Balance [Online]. Available from: http://www.oralchelation.com/technical/amino1.htm. [2007, May 15].

Amadi, E. N., Barimalaa, I. S., Blankson, C. D., and Achinewhuk, S. C. 2003. Melon seeds (*Citrullus vulgaris*) as a possible substrate for the production of tempeh. Plant Foods for Human Nutri. 58(3): 1-11.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington.: Association of Official Analytical Chemists.

Arcidiacono, S., and Kaplan, D. L. 1992. Molecular weight distribution of chitosan isolated from Mucor rouxii under different culture and processing conditions. Biotech. Bioeng. 39: 281-286.

Ashenafi, M., and Busse, M. 1991. The microflora of soak water during tempeh production from various beans. J. Appl. Bact. 70: 334-338.

Berenzon, S., and Saguy, S. I. 1998. Oxygen absorbers for extension of crackers shelf-life. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 31(1): 1-5.

Berghofer, E., Grzeskowiak, N., Mundigler, N., Sentall, W. B., and Walcak, J. 1998. Antioxidative properties of faba bean-, soybean- and oat tempeh. Int. J. Food Sci. and Nutri. 49: 45-54.

Bourne, M. C., Moyer, J. C., and Hand, D. B. 1966. Measurement of food texture by a universal testing machine. Food Technol. 20: 170-174.

Bressani, R., Elĺas, L. G., and Braham, J. E. 1966. Cottonseed Protein in Human Foods. Washington, D. C.: American Chemical Society.

Bunger, A., and Moyano, P. 2003. NaCl soaking treatment for improving the quality of French-fried potatoes. Food Res. Int. 36: 161-166.

Cochran, W. C., and Cox, G. M. 1992. Experimental Design. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.

Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., Cárdenas-Velenzuela, O. G., and Reyes-Merono, C. 2003. Quality protein maize (*Zea mays* L.) tempeh flour through solid state fermentation process. Lebensm.-Wiss. u. Technol. 37: 59-67.

Cuevas-Rogríguez, E. O., Verdugo-Montoya, N. M., Angulo-Bejarano, P. I., Milán-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., Bello-Pérez, L. A., Garzón-Tiznado, J. A., and Reyes-Moreno, C. 2006. Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.). Lebensm.-Wiss. u. Technol. 39: 1072-1079.

Davey, C. L., Peñaloza, W., Kell, D. B., and Hedger, J. N. 1991. Real-time monitoring of the accretion of *Rhizopus oligosporus* biomass during the solid-substrate tempe fermentation. World J. Microbiol and Biotechnol. 7: 248-259.

David, I. M., and Verma, J. 1981. Modification of tempeh with the addition of Bakla. Food Technol. 16(1): 39.

Debnath, S., Bhat, K.K., and Rastogi, N.K. 2003. Effect of pre-drying on kinetics of moisture loss and oil uptake during deep fat frying chickpea flour-based snack food. Lebensm. Wiss. U. Technol. 36: 91-98.

Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M., and Durand, A. 1991. Biomass estimation in solid state fermentation I mannual biochemical methods. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 200-205.

Donald, W. W.,and Mirocha, C. J. 1977. Chitin as a measure of fungal growth in stored corn and soybean seed. Cereal Chem. 54: 466.

Egounlety, M., and Aworth, O. C. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannin of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). J. Food Eng. 56: 249-254.

Esters, V., Angenot, L., Brandt, V., Brandt, V., Frédérich, M., Tits, M., Nerum, C. V., Wauters, J. N., and Hubert, P. 2006. Validation of a high-performance thin layer chromatography/densitometry method for the quantitative determination of glucosamine in a herbal dietary supplement. J. of Chro. 1112: 156-164.

Feng, X. M., Eriksson, A. R. B., and Schnürer, J. 2005. Growth of lactic acid bacteria and *Rhizopus oligosporus* during barley tempeh fermentation. Int. J. Food Microbiol. 104: 249-256.

Garayo, J., and Moreira, R. 2002. Vacuum frying of potato chips. J. Food Eng. 55(2): 181-191.

Gyorgy, P., Murata, K., and Ikehata, H. 1964. Antioxidants isolated from Fermented Soybeans (Tempeh). Nature. 203: 870 – 872.

Handoyo, T., and Morita, N. 2006. Structural and functional properties of fermenter soybean (tempeh) by using *Rhizopus oligosporus*. Int. J. Food Prop. 9(2): 347-355.

Han, B-Z., and Nout, R. M. J. 2000. Effect of temperature, water activity and gas atmosphere on mycelial growth of tempe fungi *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *R. micorsporus* var. *oligosporus*. World J. Microbiol and Biotechnol. 16: 8-9.

Hedger, J. N. 1982. Production of tempe, and Indonesian fermented food. Wales: The Society for General Microbiology.

Hesseltine, C. W. 1965. A millennium of fungi, food and fermentation. Mycologia. 57: 149-197.

Jurus, A. M., and Sundberg, W. J. 1976. Penetration of *Rhizopus oligosporus* into soybeans tempeh. Appl. and Environ. Microbiol. 32: 284-287.

Katz, E. E., and Labuza, T. P. 1981. Effect of water activity on the sensory crispness and mechanical deformation of snack food products. J. Food Sci. 46: 403-409.

Khall, A. H. 1999. Quality of French fried potatoes as influenced by coating with hydrocolloids. Food Chem. 66:201-214.

Kiers, J. L., Nout, R. M. J., and Rombouts, F. M. 2000. In vitro digestibility of processed and fermented soya bean, cowpea and maize. J. the Sci. of Food and Agric. 80(9): 1325-1331.

Klus, K.,and Barz, W. 1998. Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin a by bacteria isolated from tempe. Phytochemistry. 47: 1045-1048.

Krokida, M. K., Oreopolou, V., Maroulis, Z. B., and Marinos-Kouris, D. 2001. Deep fat frying of potato strip-quality issues. Drying Technol. 19: 897-935.

Kronenberg, H. G., and Hang, Y. D. 1985. A research note: A puncture testing method for mornitoring solid substrate fermentation. J. of Food Sci. 50: 539-540.

Labuza, T. P. 1984. Application of chemical kinetics to deterioration of foods. J. Chem. Edu. 61: 348-358.

Labuza, T. P., and Schmidl, M. K. 1985. Accelerated shelf-life testing of foods. Food Technol. 57-64.

Lane, R. L., and Gilerson, E. 1979. Quantification of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. Anal. Biochem. 98: 478-480.

Liem, I. T. H., Steinkraus, K. H., and Cronk, T. C. 1977. Production of vitamin B-12 in *tempeh*, a fermented soybean food. Appl. and Environ. Microbiol. 34: 773-776.

Lim, G., Tan, T. K., and Rahim, N. A. 1987. Variations in amylase protease activities among Rhizopus isolates. World J. Microbiol. And Biotechnol. 3(3): 319-322.

Liu, K. 1999. Fermented oriental soyfoods. In Liu, K. Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization, Chapman and Hall: New York.

López, P. O., Harry, G., Montes, R. R. 1987. Development of a fermentation procedure to produce a tempeh–an Indonesian ferment prods. Food Res. 25: 777–781

Low, T. K., and Ng, C. S. 1987. Detemination of peroxide value. In Hasegaws, H. Laboratory Mannual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fish. Products. Singapore: Marine Fisheries Research Department.

Martinelli, A., and Hesseltine. 1964. Tempeh fermentation: Package and tray fermentation. Food Technol. 18: 167-171.

Michell, D. A., Doelle, H. W., and Greenfield, P. F. 1988. Improve growth of *Rhizopus oligosporus* on a model solid substrate. Biotechnol. Letters. 10(7): 497-502.

Milto, O., Yayoi, O., and Nobuko, O. 2004. Production of hydrolase by a tempeh manufacturing fungus, *Rhizopus oligosporus*. Wayo Joshi Daigaku Kiyo. Kaseikeihen. 44: 147-158.

Moreira, R. G., Castell-Pezez, M. E., and Berrufet, M. A. 1999. Deep-Fat Frying: Fundamentals and Applications. Maryland: Aspen.

Moyano, P. C., Rioseco, V. K., and Gonzalez, P. A. 2002. Kinetics of crust color changes during deep-fat frying of impregnated French fries. J. Food Eng. 54: 249-255.

Mugula, J. K., and Lyimo, M. 2000. Evaluation of the nutritional quality and acceptability of sorghum-based tempe as potential weaning foods in Tanzania. Int. J. Food Sci. and Nutri. 51: 269-277.

Murata, K. Ikehata, H., and Miyamoto, T. 1967. Studies on the nutrition value of tempeh. J. Food Sci. 32: 580-585.

Nakajima, N., Nozaki, N., Ishihara, K., Ishikawa, A., and Tsuji, H. 2005. Analysis of isoflavone content in tempeh, a fermented soybean, and preparation of a new isoflavone-enriched tempeh. J. Biosci. and Bioeng. 100: 685-687.

Nout, R. M. J., and Han, B.-Z. 2000. Effect of temperature, water activity and gas atmosphere on mycelial growth of tempe fungi *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *R. microsporus* var. *oligosporus*. Abstract. World J. Microbiol. and Biotechnol. 16: 8-9.

Nout, M. J. R., and Kiers, J. L. 2005. A review Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. J. Appl. Microbiol. 98: 789-805.

Nout, M. J. R., and Rombouts, F. M. 1990. A review Recent developments in tempe research. J. Appl. Bacteriol. 69: 609-633.

Nowak, J., and Szebiotko, K. 1992. Some biochemical changes during soybean and pea tempeh fermentation. Food Microbiol. 9(1): 37-43.

Paresdes-Lopez, O., Harry, G. I., and Gonzalez-Castaneda, J. 1990. Sensory evaluation of tempeh produced by fermentation of commonbeans. J. Food Sci. 55(1): 123-126.

López, P. O., Harry, G., Montes, R. R. 1987. Development of a fermentation procedure to produce a tempeh–an Indonesian ferment prods. Food Res. 25: 777–781.

Pedreschi, F., and Moyano, P. 2007. Effect of pre-drying on texture and oil uptake of potato chips. LWT. 38: 599-604.

Pfaff, G., and Shipley, B. 1996. New technology for making tempeh: A cultured soyfood. Arlington: Progress In New Crops.

Reilly, A., and Man, C. M. D. 1994. Potato crisps and savoury snacks. In Man, C. M. D., and Jones, A. A. Shelf life Evaluation of Foods. New York: Blackie Academic & Professional.

Reyes-Moreno, C., Romero-Urias, C., Milian-Carrillo, J., Valdez-Torres, B., and Zarate-Marquez, E. 2000. Optimization of the solid state fermentation process to optain tempeh from hardend chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Plant Foods for Human Nutri. 55(3): 219-228.

Ride, J. P., and Drysdale, R. B. 1971. A chemical method for estimating *Fusarium oxysporum f. lycopersici* in infected tomato plants. Physio. Plant Pathology. 1: 409-420.

Ride, J. P., and Drysade, R. B. 1972. A chemical method for estimating *Fusarium oxysporum f. lycopersici* in infected tomato plants. Physio. Plant Pathology. 2: 7-11.

Robinson, R. J., and Kao, C. 1977. Tempeh and miso from chickpea, horse bean, and soybean. Cereal Chem. 54: 1192-1197.

Ronov, M., and Saguy, I. S. 1997. Fractal analysis and crust water diffusivity of a restructer potato product during deep fat frying. J. Food Sci. 62: 134-135.

Terán, R. F., and Owens, J. D. 1996. Chemical and enzymatic changes during the fermentation of bacteria-free soya bean tempe. J. the Sci. Food and Agric. 71: 523-530.

Shurtleff, W., and Aoyagi, A. 1976. The book of tempeh. Los Angeles: Happer & Row.

Sparringa, R. A., and Owens, J. D. 1999. Glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*. Int. J. Food Microbiol. 47: 153-157.

Steinkraus, K. H. 1983. Handbook of Indigenous Fermented Foods. New York: Marcel Dekker .

Steinkraus, K. H. 1996. Handbook of Indigeneous Fermented Food. 2nd ed. New York: Marcel Dekker

Tsuji, A., Kinoshita, T., and Hoshino, M. 1969. Analytical chemical studies on amino sugars II. Chem. and Pharm. Bulletin. 17: 1505-1510.

Vaidehi, M. P., Annapurna, M. L., and Vishwanath, N. R. 1985. Nutritional and sensory evaluation of tempeh products made with soybean, ground-nut, and sunflower-seed combinations. Food and Nutri. Bulletin. 7(1):54-57.

Van der Riet, W. B., Weight, A. W., Cilliers, J. J. L., and Dentel, J. M. 1987. Food chemical analysis of tempeh prepared from South African-grown soybeans. Food Chem. 1987. 25: 197-206.

Varsakas, T. 1998. *Rhizopus oligosporus* myceliam penetration and enzyme diffusion in soya bean tempeh. Proc. Biochem. 33: 741-747.

Wagenknecht, A.C., Mattick, L.R., Lewin, L.M., Hand, D.B., and Streinkraus, K.H. 1961. Changes in soybean lipids during tempeh fermentation. J. Food Sci. 26(4): 373-376.

Wang, H. L., and Hesseltine, C. W. 1966. Wheat tempeh. Cereal Chem. 43: 563-570.

Wang, H. L., Ruttle, D. L., and Hesseltine, C. W. 1969. Protein quality of wheat and soybeans after *Rhizopus oligosporus* fermentation. J. Nutri. 96(1): 109-114.

Wang, H. L., Swain, E. W., and Hesseltine, C. W. 1975. Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh fermentation. J. Food Sci. 40: 168-170.

White, P. J., and Johnson, L. A. 1987. Corn: Chemistry and Technology. 2nd ed. USA: American Association of Cereal Chemists.

Wiesel, I., Rehm, H. J., and Bisping, B. 1997. Improvement of tempe fermentations by application of mixed cultures consisting of *Rhizopus* sp. and bacterial strains. J. Appl. Microbiol. Biotech. 47: 218-225.

William, R., and Mittal, G. S. 1999. Low-fat fried foods with edible coatings: modeling and simulation. J. Food Sci. 64: 317-322.

Winarno, F.G., and Reddy, N.R. 1986. Tempe. In Reddy, N. R., Pierson, M. D. and Salunkhe, D.K. Legume-based fermented foods. Indonesia: Indonesia institute of sciences.

Wright, R. C., Rose, D. H., and Whiteman, T. M. 1954. Agriculture Hand book No. 66. . New York: U.S. Department of Agriculture.

Youch, M. H., Darvingas, G. V., Rigether, F. J., and Muller, H. W. 1979. Process for producing a snack food containing tempeh [Online]. Available from: http://nutrition.anamai.moph.go.th/. [2006, August 17].

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ทางเคมีและกายภาพ

ก.1 การวิเคราะห์ความชื้น (moisture)

ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานของ A.O.A.C. (1995) คือ เปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้อบจาก 130±3°C เป็น 100±5°C

วิธีการทดลอง

1. เตรียมตัวอย่างโดยนำมาบดด้วยเครื่องปั่นผสมไฟฟ้า แล้วผสมให้เข้ากัน โดยให้เสร็จสิ้นอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น
2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นนอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียม (อบแห้งและชั่งน้ำหนักแน่นอนแล้ว)
3. นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่ 100±5°C ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณปริมาณความชื้น โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%wet basis)} = \frac{(\text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ}}$$

ก.2 การวิเคราะห์โปรตีน (crude protein)

ตามวิธีมาตรฐานของ A.O.A.C. (1995)

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 มิลลิกรัม ลงบนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ห่อกระดาษกรอง ใส่ลงในหลอดย่อย แล้วเติม selenium reagent mixture เพื่อเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม
2. เติมสารละลาย sulfuric acid เข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย
3. ทำ blank โดยการใช้น้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกัน
4. ต่อหลอดย่อยโปรตีนเข้ากับเครื่องย่อยโปรตีน เปิดเตาให้ความร้อนที่เบอร์ 8 ย่อยจนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวอ่อนใส
5. ปิดเตาแล้วยกหลอดออกจากเครื่องย่อย จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. นำหลอดย่อยโปรตีนและขวดรูปชมพู่ที่เติมอินดิเคเตอร์ คือ methyl red-methylene blue 2-3 หยด ไปต่อเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจน กำหนดสภาวะกลั่น ดังนี้

- สารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 35% ปริมาตร 60 มิลลิลิตร
- สารละลาย boric acid เข้มข้น 4% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- เวลาในการกลั่น 5 นาที

7. ในระหว่างการกลั่นจะเกิดแอมโมเนียและแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะถูกจับไว้ด้วยสารละลาย boric acid ได้สารละลายสีเขียว เมื่อกลั่นเสร็จแล้วนำขวดรูปชมพู่ที่ได้จากการกลั่นไปไตเตรตด้วยสารละลาย hydrochloric acid เข้มข้น 0.1 นอร์มัล ที่วิเคราะห์หาความเข้มข้นที่แน่นอนแล้ว จนกระทั่งถึงจุดยุติได้สารละลายสีม่วงแดง จดปริมาตรที่ใช้ในการไตเตรตเพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีน

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} = \frac{(V-B) \times N \times 1.4 \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%wet basis)} = \text{ปริมาณไนโตรเจน} \times 6.25$$

V คือ ปริมาตรของสารละลาย hydrochloric acid ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง
B คือ ปริมาตรของสารละลาย hydrochloric acid ที่ใช้ในการไตเตรต blank
N คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย hydrochloric acid

ก.3 การวิเคราะห์ไขมัน (crude fat)

ตามวิธีมาตรฐานของ A.O.A.C. (1995)

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งแล้วให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม จากนั้นห่อตัวอย่างให้มิดชิดด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

2. ใส่ตัวอย่างที่ห่อด้วยกระดาษกรองลงในทิมเบิล (thimble) แล้วนำไปประกอบเข้าในชุดเครื่อง Soxhlet ซึ่งต่อกับขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร (อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100$\pm$5°C จนแห้งสนิท แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อให้ทราบน้ำหนักแน่นอน) ที่บรรจุสารละลาย petroleum ether เพื่อสกัดไขมันปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำการสกัดนาน 3-4 ชั่วโมง

3. นำขวดก้นกลมที่ได้จากข้อ 2. ไประเหย petroleum ether ออกจากไขมันด้วยเครื่องระเหย (rotary evaporator) จนหมด

4. นำไขมันที่สกัดได้ในขวดก้นกลมไปอบที่อุณหภูมิ 105±5°C ประมาณ 2 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator จากนั้นชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมหลังการสกัดไขมันที่แน่นอนเพื่อนำไป คำนวณปริมาณไขมันโดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{(A - B) \times 100}{C}$$

A = น้ำหนักที่แน่นอนของขวดก้นกลมและไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

B = น้ำหนักที่แน่นอนของขวดก้นกลม (กรัม)

C = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

ก.4 วิธีการใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Instron texture analyzer, รุ่น 5565P9835)

การเตรียมตัวอย่าง

1.1 วัดความแน่นเนื้อ (firmness)

หั่นเทมเป้ผสมข้าวโพดขนาด 2.0 x 2.0 x 2.0 เซนติเมตร แล้ววัดค่าความแน่นเนื้อ จากการเจริญของเชื้อรา โดยวัดแบบ puncture test 70% ด้วยหัววัดรูปทรงกระบอกปลายตัด (cylinder probe) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ระยะห่างจากตัวอย่าง 3 เซนติเมตร ด้วยความเร็ว 200 มิลลิเมตร/นาที (Kronenberg และ Hang,1985) วิเคราะห์ตัวอย่างละ 15 ซ้ำ

1.2 วัดความกรอบ (crispness)

นำเทมเป้ผสมข้าวโพดทอดขนาด 0.2 x 2.0 x 5.0 เซนติเมตร มาวัดค่าความกรอบ แบบ puncture test 100% ด้วยหัววัดรูปทรงกระบอกปลายตัด (cylinder probe) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ระยะห่างจากตัวอย่าง 2 เซนติเมตร กดลงด้วยความเร็ว 200 มิลลิเมตรต่อนาที (Katz และ Labuza, 1981) วิเคราะห์ตัวอย่างละ 15 ซ้ำ

วิธีวัดค่าเนื้อสัมผัส

1. เปิดเครื่อง แล้วเข้าสู่โปรแกรม merlin โดย double click ที่ icon ของ merlin
2. เลือก user name หรือ method ที่ต้องการโดย double click
3. ติดตั้งหัวกดเข้ากับ load cell ของเครื่อง พร้อมทั้งติดตั้งแท่นวางและตุ้มน้ำหนักขนาด 5 kN แล้ว click ที่ calibrate เครื่องจะขึ้นว่า remove load from load cell จากนั้น click OK. รอให้เครื่องแสดงข้อความว่า calibrate completed จากนั้น click ปุ่ม balance แล้ว click ที่ done รอจนเครื่องกลับไปสู่หน้าจอปกติ

4. กดปุ่ม down เพื่อเลื่อนตำแหน่งของหัววัดให้มาแตะกับแท่นวาง จากนั้นกดปุ่ม reset GL จากนั้นกดปุ่ม up เพื่อเลื่อนหัววัดขึ้นไปให้ห่างจากแท่นวางตามต้องการ (มิลลิเมตร) จากนั้นกดปุ่ม reset GL

5. กดปุ่ม start test เพื่อเลื่อนหัวเจาะลงมาที่ตัวอย่างจนกระทั่งเจาะทะลุผ่านชิ้นตัวอย่าง จะได้กราฟ force-deformation เพื่อวิเคราะห์ค่า maximum forces คือค่าความแน่นเนื้อ (gf) ของเทมเป้ผสมข้าวโพดและค่าความชันที่อ่านได้จากกราฟคือ ค่าความกรอบ (gf/mm) ของเทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบ

ก.5 การวิเคราะห์กลูโคซามีน

การเตรียมตัวอย่าง ตามวิธีของ Ruiz- Terán และ Owens (1996)

นำตัวอย่างที่สกัดไขมัน (defatted meal) ตามวิธีข้อ ก.3 มาอบแห้งที่ 100°C เวลา 4 ชั่วโมง และเก็บใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อไว้ใช้วิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย potassium hydroxide (KOH) เข้มข้น โดยชั่ง KOH 120 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4°C

2. สารละลาย ethanol เข้มข้น 75% (v/v) โดยผสม ethanol ปริมาตร 750 มิลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4°C

3. สารละลาย ethanol เข้มข้น 40% (v/v) โดยผสม ethanol ปริมาตร 400 มิลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 600 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4°C

4. สารละลาย sodium nitrite ($NaNO_2$) เข้มข้น 5% (w/v) โดยชั่ง $NaNO_2$ 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

5. สารละลาย potassium hydrogen sulphate ($KHSO_4$) เข้มข้น 5% (w/v) โดยชั่ง $KHSO_4$ 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

6. สารละลาย ammonium sulfamate ($NH_4SO_3NH_2$) เข้มข้น 12.5% (w/v) โดยชั่ง $NH_4SO_3NH_2$ 12.5 กรัม ละลาย ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

7. สารละลาย 3-methyl-2-benzothaizolone hydrazone hydrochloride (MBTH) เข้มข้น 0.5% (w/v) โดยชั่ง MBTH 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4°C ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

8. สารละลาย ferric chloride ($FeCl_3$) เข้มข้น 0.5% โดยชั่ง $FeCl_3.6H_2O$ 0.83 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4°C ไว้ใช้ได้ 3 วัน

วิธีการทดลอง

1. **ขั้นตอนการเปลี่ยนไคโตซานเป็นกลูโคซามีน** ตามวิธีของ Ruiz- Terán และ Owens (1996)

1.1 ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม แล้วเติมสารละลาย KOH เข้มข้น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนที่ 130°C เวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (30°C)

1.2 สารละลาย ethanol เข้มข้น 75% (v/v) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แล้วทิ้งให้เย็นในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที

1.3 นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 2°C ด้วยความเร็ว 15000 x g เวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนที่เป็นสารละลาย

1.4 ล้างตะกอนด้วยสารละลาย ethanol เข้มข้น 40% (v/v) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร โดย resuspended แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนอีกครั้งที่อุณหภูมิ 2°C ด้วยความเร็ว 15000 x g เวลา 10 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นสารละลาย

1.5 ล้างตัวทำละลายออกจากตะกอนด้วยน้ำกลั่นเย็น (2°C) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ด้วยการปั่นเหวี่ยงและครั้งสุดท้ายให้เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เป็นสารแขวนลอย (suspension)

2. **ขั้นตอนการตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีนด้วยวิธี colorimetric** ตามวิธีของ Ride และ Drysdale (1972)

2.1 เก็บตัวอย่างที่ได้จากข้อ 1.5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (สำหรับ blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)

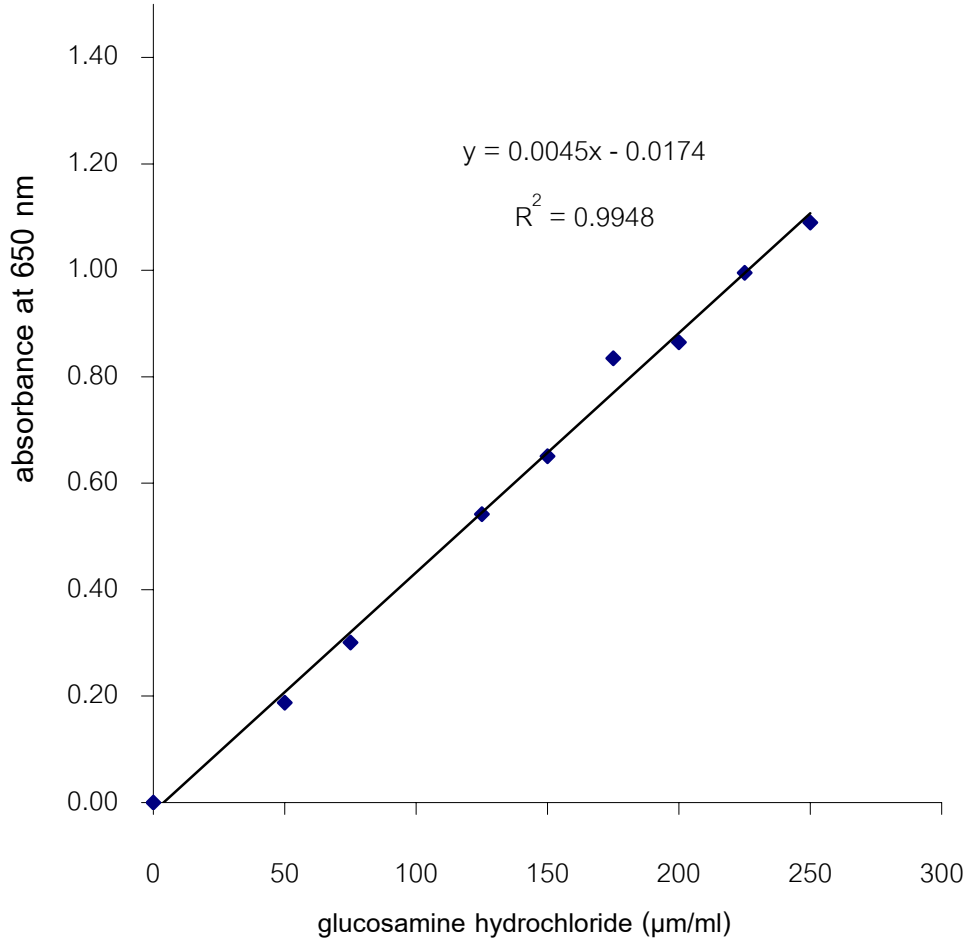
2.2 เติมสารละลาย $NaNO_2$ เข้มข้น 5% (w/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย $KHSO_4$ เข้มข้น 5 % (w/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่า 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 2°C ด้วยความเร็ว 15000 x g เวลา 2 นาที

2.3 ปิเปตส่วนที่เป็นสารละลายใสปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย $NH_4SO_3NH_2$ เข้มข้น 12.5 % (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลาย MBTH เข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2.4 นำไปให้ความร้อนใน water bath 3 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติม 0.5 % $FeCl_3$ 1 มิลลิลิตร

2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm. เทียบกับ blank

2.6 นำผลของการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride ความเข้มข้น 25-250 µg/ml แล้วทำตามขั้นตอนข้อ 2.1-2.5 นำผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐาน glucosamine hydrochloride

ก.6 วิธีการวัด pH

ตามวิธีของ Ashenafi และ Busse (1991)

1. ชั่งวัตถุดิบ:น้ำกลั่น อัตราส่วน 1:5 (w/v) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 2 นาที

2. วัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter โดยจุ่มหัววัดในตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 1.

ก.7 วิธีการใช้เครื่อง chromameter (Minolta รุ่น CR-300)

1. เสียบปลั๊ก

2. เลื่อนสวิทซ์ power on พร้อมกดปุ่ม all data clear ค้างไว้ รอจนเครื่องมีเสียงพร้อมตัวเลขขึ้นที่หน้าจอ

3. กดปุ่ม index set และกดปุ่ม เพื่อเลือกแหล่งแสง D_{65} โดยกดปุ่ม หรือ → แล้วกด ← enter

4. กดปุ่ม calibrate เพื่อป้อนค่า Y, x และ y ตามแหล่งแสงที่เลือกไว้ โดยทราบค่าได้จากแผ่น calibrate

5. นำหัววัดสีมาวางบนแผ่น calibrate กดปุ่ม measure แล้วรอจนเกิดการสะท้อนแสง (reflect) ครบ 3 ครั้ง

6. กดปุ่ม color space select เพื่อเลือกระบบสีที่ต้องการใช้งาน เช่น L, a, b เป็นต้น

7. วัดตัวอย่าง โดยกดปุ่ม measure จนครบตามต้องการ

8. ถ้าต้องการวิเคราะห์สถิติ ให้กดปุ่ม statistic แล้วกด enter เครื่องจะแสดงค่า Max, Min, Mean และ SD

9. ปิดเครื่อง

ก.8 วิธีการใช้เครื่องวัด a_w (AquaLab, รุ่น AquaLink3.0)

1. เข้าสู่โปรแกรม AquaLink3.0 โดย double click ที่ icon AquaLink3.0 แล้วเชื่อมต่อเข้ากับเครื่องวัด a_w โดยกด connect

2. เปิดเครื่องทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อ warm เครื่อง ก่อนวัดตัวอย่าง

3. เตรียมน้ำกลั่นและตัวอย่างใส่ในถ้วยวัดตัวอย่าง โดยรอให้มีอุณหภูมิประมาณ 25°C

4. click ที่ปุ่ม connect ให้เปลี่ยนเป็น disconnect เพื่อเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์

5. calibrate เครื่อง โดยนำถ้วยตัวอย่างที่ใส่น้ำกลั่นใส่ในช่องวัดตัวอย่าง รอให้เครื่องอ่านค่าเสร็จไฟสีเขียวจะกระพริบ และค่า a_w ของน้ำกลั่นที่ได้จะต้องมีค่าอยู่ในช่วง 1.0 ± 0.3

6. วัดตัวอย่างโดยนำถ้วยวัดที่มีตัวอย่างที่เตรียมไว้ ใส่ในช่องวัดตัวอย่าง รอให้เครื่องอ่านค่าเสร็จ ไฟสีเขียวจะกระพริบ

ก.9 การวิเคราะห์ค่าเพอร์ออกไซด์

ตามวิธีของ Low และ Ng (1987)

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย chloroform:acetic acid อัตราส่วน 2:3 (v/v)

2. สารละลาย potassium iodide (KI) อิ่มตัว เตรียมโดยชั่ง potassium iodide 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มและทำให้เย็นแล้วปริมาตร 70 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

3. สารละลาย sodium thiosulphate ($Na_2S_2O_3.5\ H_2O$) ความเข้มข้น 0.01 นอร์มัล เตรียมโดยชั่ง sodium thiosulphate 25 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือดอ่อน ๆ เป็นเวลา 5 นาที ยกลงแล้วเทใส่ขวดสีชาขณะร้อนเพื่อเก็บสารละลาย เมื่อนำมาใช้ให้เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นต้มใหม่ 10 เท่า

4. น้ำแป้ง ความเข้มข้น 1.5% เตรียมโดยชั่ง soluble starch 1.5 กรัม จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 วินาที ยกลงทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) อบที่อุณหภูมิ 100±5°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6. สารละลาย hydrochloric acid (HCl) เข้มข้น 1 นอร์มัล เตรียมโดยปิเปต hydrochloric acid เข้มข้นมา 8.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

ก. การหาความเข้มข้นที่แน่นอน (standardization) ของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ของตามวิธีมาตรฐานของ A.O.A.C. (1995)

1. ชั่ง potassium dichromate ที่อบแห้งแล้วให้ได้น้ำหนักแน่นอน 0.2 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีจุกแก้วปิด

2. เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากคลอรีนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่มี potassium iodide อยู่ 2 กรัม

3. เติมสารละลาย hydrochloric acid เข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมกับแกว่งขวดเพื่อผสมให้เข้ากัน แล้วปิดจุก เก็บในที่มืดทันทีเป็นเวลา 10 นาที

4. ไตเตรตด้วยสารละลาย sodium thiosulphate เมื่อสารละลายในขวดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนให้เติมน้ำแป้ง แล้วไตเตรตต่อไป จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นไม่มีสี

5. คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย sodium thiosulphate โดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มัล)} = \frac{\text{น้ำหนัก potassium dichromate (กรัม)} \times 1000}{\text{ปริมาตร sodium thiosulphate (มิลลิลิตร)} \times 49.032}$$

ข. การสกัดไขมัน ตามวิธีข้อ ก.3

ค. วิเคราะห์ค่าเพอร์ออกไซด์

1. เติมสารละลาย chloroform:acetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดที่มีไขมัน แล้วแกว่งขวดเพื่อละลายไขมัน

2. เติมสารละลาย potassium iodide อิ่มตัวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดปากขวดทันที แล้วนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที

3. เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วเขย่า

4. ไตเตรตไอโอดีนที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตเข้มข้น 0.01 นอร์มัล จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อนแล้วจึงเติมน้ำแป้งปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นไตเตรตต่อไปจนกระทั่งสารละลายไม่มีสี

5. ทำ blank ตามวิธีข้างต้นแต่ไม่มีตัวอย่าง

6. คำนวณหาค่าเพอร์ออกไซด์ โดยใช้สูตร

$$\text{ค่าเพอร์ออกไซด์ (milliequivalent } O_2\text{/kg oil)} = \frac{(A-B) \times C \times 100}{W}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรสารละลาย sodium thiosulphate ที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรสารละลาย sodium thiosulphate ที่ใช้ไตเตรตกับ blank (มิลลิลิตร)

C คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย sodium thiosulphate (นอร์มัล)

W คือ น้ำหนักตัวอย่างไขมัน (กรัม)

ก.10 วิธีการตรวจวัดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total plate count)

ตามวิธีมาตรฐานของ A.O.A.C. (1995)

การเตรียมอาหารเลี้ยงและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยชั่ง plate count agar 22.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นร้อนปริมาตร 1 ลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45°C แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ จานละประมาณ 10-15 มิลลิลิตร

2. สารละลายเกลือเพื่อเจือจาง (normal saline) โดยชั่ง sodium chloride 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 15 นาที

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติมสารละลายเกลือเพื่อเจือจางปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปตีให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที จะได้ความเข้มข้น 10^{-1} หรือทำให้เจือจางต่อไปจนได้ความเข้มข้น 10^{-4}-10^{-6} เพื่อให้สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ 30-300 โคโลนี ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1. แล้วเกลี่ยให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อซึ่งมีปริมาณ 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณเป็นจำนวณโคโลนีต่อกรัม (colony forming unit หรือ cfu/g)

ก.11 วิธีการตรวจนับจำนวนเชื้อรา

ตามวิธีมาตรฐานของ A.O.A.C. (1995)

การเตรียมอาหารเลี้ยงและสารเคมี

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยชั่ง potato dextrose agar 39.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นร้อนปริมาตร 1 ลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45°C แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ จานละประมาณ 10-15 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายเกลือเพื่อเจือจาง (normal saline) โดยชั่ง sodium chloride 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 lb/in^2 เป็นเวลา 15 นาที

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติมสารละลายเกลือเพื่อเจือจางปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปตีให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที จะได้ความเข้มข้น 10^{-1} หรือทำให้เจือจางต่อไปจนได้ความเข้มข้น 10^{-4}-10^{-6} เพื่อให้สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ 30-300 โคโลนี ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1. แล้วเกลี่ยให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อซึ่งมีปริมาณ 30-300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณเป็นจำนวณโคโลนีต่อกรัม (colony forming unit หรือ cfu/g)

ก.11 วิธีการคำนวณ amino acid score

ตามวิธีของ Harper and Yoshimura (1993)

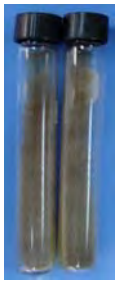
คำนวณค่า amino acid scores โดยเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบในอาหารกับความต้องการกรดอะมิโนของร่างกายในหน่วย mg/g protein โดยค่า amino acid scores ที่ได้จากการคำนวณถ้ามากกว่า 100 ให้มีค่าเท่ากับ 100 (ค่า amino acid scores ของไข่ไก่) และค่า amino acid scores ที่น้อยที่สุดคือ limiting amino acid เช่น ใน whole wheat มีปริมาณไลซีน 2.6% ส่วนความต้องการไลซีนในวัยเด็กมีค่า 5.1% สามารถหาค่า amino acid scores ได้จากการคำนวณ คือ 2.6/5.1x100 = 51

ภาคผนวก ข

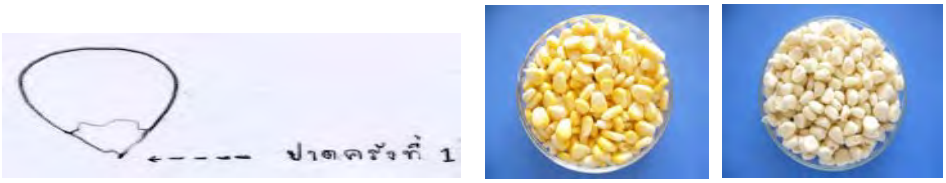
รูปที่ ข.1 ข้าวโพดหวาน พันธุ์ไฮบริกซ์ 3

รูปที่ ข.2 ข้าวโพดข้าวเหนียว พันธุ์ศรแดง

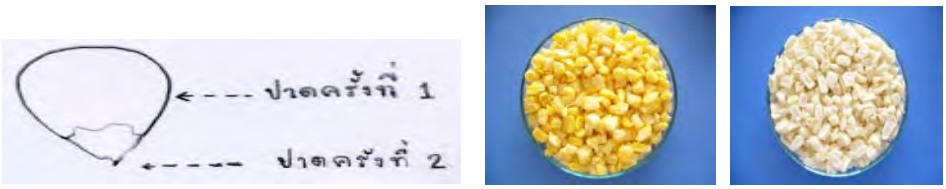
รูปที่ ข.3 ถั่วเหลืองเมล็ดซีกแห้งกะเทาะเปลือกแล้ว ตราไร่ทิพย์ (ซ้าย) แช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เวลา 12 ชั่วโมง (ขวา)



รูปที่ ข.4 *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 เจริญบน PDA agar slant ที่ 30°C เป็นเวลา 5-7 วัน



ขนาดเต็มเมล็ด



ขนาด ½ เมล็ด

ขนาด ¼ เมล็ด

รูปที่ ข.5 วิธีการปาดเพื่อแปรขนาดเมล็ดข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวเป็นเต็มเมล็ด ½ เมล็ดและ ¼ เมล็ด

ข้าวโพดหวาน

ขนาดเต็มเมล็ด

ขนาด ½ เมล็ด

ขนาด ¼ เมล็ด

ข้าวโพดข้าวเหนียว

ขนาดเต็มเมล็ด

ขนาด ½ เมล็ด

ขนาด ¼ เมล็ด

รูปที่ ข.6 ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวขนาดเต็มเมล็ด ½ เมล็ด และ ¼ เมล็ด ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที

ข้าวโพดหวาน

ข้าวโพดข้าวเหนียว

เต็มเมล็ด ½ เมล็ด ¼ เมล็ด

เต็มเมล็ด ½ เมล็ด ¼ เมล็ด

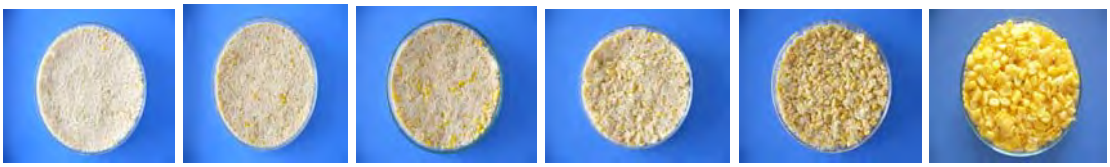
รูปที่ ข.7 เทมเป้ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียวขนาดเต็มเมล็ด ½ เมล็ด และ ¼ เมล็ด

รูปที่ ข.8 ถั่วเหลืองเมล็ดซีกแช่กรด

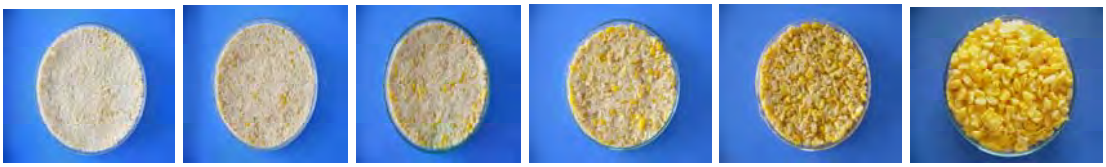
รูปที่ ข.9 ถั่วเหลืองเมล็ดซีกต้ม (ซ้าย) และเมล็ดปั่นละเอียดหลังต้ม (ขวา)

รูปที่ ข.10 ถั่วเหลืองเมล็ดซีก (ซ้าย) และเมล็ดปั่นละเอียด (ขวา) ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที

รูปที่ ข.11 เทมเป้ถั่วเหลืองเมล็ดซีก (ซ้าย) เทมเป้ถั่วเหลืองเมล็ดปั่นละเอียด (ขวา)



รูปที่ ข.12 ถั่วเหลืองผสมข้าวโพดอัตราส่วน 5:0 4:1 3:2 2:3 1:4 และ 0:5 ตามลำดับ (จากซ้ายไปขวา)



รูปที่ ข.13 ถั่วเหลืองผสมข้าวโพดอัตราส่วน 5:0 4:1 3:2 2:3 1:4 และ 0:5 ตามลำดับ (จากซ้ายไปขวา) ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121°C เวลา 15 นาที

รูปที่ ข.14 เทมเป้ผสมข้าวโพดในอัตราส่วน 5:0 4:1 3:2 2:3 1:4 และ 0:5 ตามลำดับ (จากซ้ายไปขวา)

รูปที่ ข.15 เทมเป้ผสมข้าวโพดที่หั่นเป็นแผ่นขนาด 0.2 x 2.0 x 5.0 เซนติเมตร

รูปที่ ข.16 เทมเป้ผสมข้าวโพดที่หั่นเป็นแผ่นขนาด 0.2 x 2.0 x 5.0 เซนติเมตร แล้ว pre-drying (60°C 32%RH) โดยแปรระยะเวลา 0 15 และ 30 นาที (จากซ้ายไปขวา)

รูปที่ ข.17 เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ผ่านการ pre-drying (60°C 32%RH) แล้วทอด (180°C) 3 สภาวะคือ pre-drying 0 นาทีแล้วทอด 2.0 นาที pre-drying 30 นาที แล้วทอด 1.5 นาที และ pre-drying 30 นาทีแล้วทอด 1.0 นาที (จากซ้ายไปขวา)

รูปที่ ข.18 เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟลอยด์ (Foil pouch) ขนาด 20 x 16 เซนติเมตร หนา100µm OPP/PE/Alu/PE/LL ปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45°C (ซ้าย) และ 55°C (ขวา)

ภาคผนวก ค

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

ค.1 แบบทดสอบผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดที่อัตราส่วนต่าง ๆ

ใบรายงานผลการทดสอบ 9 points hedonic scale

ผลิตภัณฑ์ เทมเป้ผสมข้าวโพด

ชื่อผู้ทดสอบ _____ วันที่ _____ ครั้งที่ _____

คำแนะนำ : กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวาแล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

9 = ชอบมากที่สุด	4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
8 = ชอบมาก	3 = ไม่ชอบปานกลาง
7 = ชอบปานกลาง	2 = ไม่ชอบมาก
6 = ชอบเล็กน้อย	1 = ไม่ชอบมากที่สุด
5 = เฉย ๆ	

	คะแนนความชอบของตัวอย่าง					
ปัจจัย	_____	_____	_____	_____	_____	_____
สี	.....	.....	.....	.....	.....	.....
เนื้อสัมผัส (ความแน่น)	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ความชอบโดยรวม	.....	.....	.....	.....	.....	.....

ข้อเสนอแนะ

:_____

_____

ค.2 แบบทดสอบผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่สภาวะต่าง ๆ

ใบรายงานผลการทดสอบ 9 points hedonic scale

ผลิตภัณฑ์ เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบ

ชื่อผู้ทดสอบ _____ วันที่ _____ ครั้งที่ _____

คำแนะนำ : กรุณาทดสอบตัวอย่างที่เสนอให้จากซ้ายไปขวาแล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างในแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

9 = ชอบมากที่สุด	4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
8 = ชอบมาก	3 = ไม่ชอบปานกลาง
7 = ชอบปานกลาง	2 = ไม่ชอบมาก
6 = ชอบเล็กน้อย	1 = ไม่ชอบมากที่สุด
5 = เฉย ๆ	

	คะแนนความชอบของตัวอย่าง		
ปัจจัย	_____	_____	_____
สี	.....	.....	.....
เนื้อสัมผัส (ความกรอบ)	.....	.....	.....
ความชอบโดยรวม	.....	.....	.....

ข้อเสนอแนะ

:_____

_____

ภาคผนวก ง

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ง.1 การเปลี่ยนแปลงค่าสีด้านความสว่าง (L) ของผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วัน

ระยะเวลาเก็บ	L	
(วัน)	45°C	55°C
0	47.48±1.40[a]	47.48±1.40[a]
3	46.53±1.11[a]	43.75±0.65[b]
6	44.19±1.61[b]	43.57±1.98[b]
9	43.57±1.98[b]	43.51±2.14[b]
12	42.11±1.56[c]	42.39±3.02[c]
15	38.51±0.24[d]	41.21±3.06[d]
18	39.00±1.33[d]	39.08±2.21[d]
21	39.00±1.17[d]	40.62±0.30[d]
24	34.90±1.11[e]	33.90±0.56[e]

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง.2 การเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง (a) ของผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วัน

ระยะเวลาเก็บ	a	
(วัน)	45°C	55°C
0	13.48±0.58^{a}	13.48±0.58^{a}
3	12.94±0.49^{a}	12.26±1.14^{b}
6	12.01±0.40^{bcd}	11.14±0.17^{d}
9	12.58±0.59^{ab}	11.84±0.26^{bc}
12	12.27±0.46^{abc}	12.07±0.17^{bc}
15	11.41±1.19^{d}	12.38±0.28^{b}
18	11.55±0.39^{cd}	12.03±0.66^{bc}
21	9.99±1.44^{f}	12.37±0.79^{b}
24	10.27±1.11^{e}	10.27±0.78^{e}

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง.3 การเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง (b) ของผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วัน

ระยะเวลาเก็บ	b	
(วัน)	45°C	55°C
0	9.51±1.02^{h}	9.51±1.02^{d}
3	11.63±1.06^{g}	12.82±1.57^{e}
6	13.27±1.41^{f}	15.39±1.15^{d}
9	14.74±1.15^{e}	16.09±0.64^{c}
12	16.61±2.56^{d}	16.98±1.27^{c}
15	19.41±0.57^{c}	18.08±2.72^{b}
18	21.65±1.87^{b}	18.22±1.57^{b}
21	25.88±1.38^{a}	20.10±0.47^{b}
24	25.57±1.87^{a}	25.97±2.12^{a}

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง.4 การเปลี่ยนแปลงค่า a_w ของผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วัน

ระยะเวลาเก็บ (วัน)	a_w	
	45°C	55°C
0	0.3443±0.0006^{e}	0.3390±0.0000^{c}
3	0.3610±0.0000^{e}	0.3670±0.0000^{c}
6	0.3760±0.0010^{e}	0.3760±0.0000^{c}
9	0.4620±0.0010^{d}	0.4280±0.0000^{b}
12	0.5542±0.0002^{c}	0.4300±0.0400^{b}
15	0.6074±0.0692^{b}	0.6072±0.0005^{a}
18	0.6398±0.0010^{b}	0.6074±0.0692^{a}
21	0.6850±0.0000^{a}	0.6372±0.0001^{a}
24	0.6932±0.0027^{a}	0.6465±0.0015^{a}

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง.5 การเปลี่ยนแปลงค่าความกรอบของผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วัน

ระยะเวลาเก็บ	ความกรอบ (gf/mm)	
(วัน)	45°C	55°C
0	131.99±10.38^{g}	131.99±10.38^{f}
3	117.22±22.53^{f}	117.65±39.53^{f}
6	113.50±16.67^{f}	107.56±5.26^{e}
9	102.21±6.38^{e}	95.40±4.80^{e}
12	105.74±6.03^{d}	90.10±7.64^{d}
15	90.57±37.93^{d}	92.50±20.02^{d}
18	86.45±31.11^{c}	86.45±22.26^{c}
21	81.98±25.45^{b}	81.98±8.44^{b}
24	68.92±3.22^{a}	68.52±3.32^{a}

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง.6 การเปลี่ยนแปลงค่าเพอร์ออกไซด์ของผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วัน

ระยะเวลาเก็บ	เพอร์ออกไซด์ (milliequivalent O_2/kg oil)	
(วัน)	45°C	55°C
0	2.04±0.04^{g}	2.04±0.04^{f}
3	4.20±0.25^{f}	6.36±0.22^{f}
6	6.06±0.38^{e}	6.69±0.15^{f}
9	6.42±0.46^{e}	11.96±0.05^{e}
12	15.34±0.24^{d}	15.41±3.02^{d}
15	16.32±0.13^{d}	17.35±0.17^{d}
18	21.58±1.73^{c}	33.11±0.45^{c}
21	29.68±0.68^{b}	34.29±1.50^{b}
24	35.63±0.60^{a}	38.72±3.44^{a}

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง.7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วัน

ระยะเวลาเก็บ	แบคทีเรีย (โคโลนีต่อกรัม)	
(วัน)	45°C	55°C
0	0	0
3	0	0
6	0	0
9	0	0
12	0	0
15	1×10^{1}	6×10^{1}
18	95×10^{1}	12×10^{2}
21	100×10^{1}	263×10^{2}
24	50×10^{2}	116×10^{2}

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ง.8 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อราของผลิตภัณฑ์เทมเป้ผสมข้าวโพดทอดกรอบที่ปิดผนึกแบบสุญญากาศ แล้วเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 35°C และ 45°C ในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 24 วัน

ระยะเวลาเก็บ	รา (โคโลนีต่อกรัม)	
(วัน)	45°C	55°C
0	0	0
3	0	0
6	0	0
9	0	0
12	0	0
15	0	1
18	1	2
21	3	3
24	6	9

a, b, c, … ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน หมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศศิกานต์ เกตุมาลา เกิดวันที่ 9 ตุลาคม พ.ศ.2524 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี ภาควิชาเคมี จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปี พ.ศ.2546 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ.2546