บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ถั่วเน่า

1.1 ถั่วเน่า ที่มา และความสำคัญ

ถั่วเน่าเป็นอาหารหมักพื้นบ้านทางภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งเกิดจากภูมิปัญญาชาวบ้านที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษ และเป็นการถนอมอาหารให้มีอายุการเก็บยาวนานขึ้น โดยมีถิ่นกำเนิดมาจากชาวไทยภูเขา และเป็นอาหารประจำท้องถิ่นของไทลื้อ ไทยใหญ่ มีการทำขึ้นมาบริโภคในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน เป็นต้น (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527; มาลี และคณะ, 2547) ถั่วเน่าเป็นอาหารหมักพื้นบ้านที่ได้จากการหมักถั่วเหลืองสุกด้วยจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Bacillus* ที่มีอยู่ตามธรรมชาติจนมีกลิ่น สี รสชาติ และลักษณะเฉพาะตัว (Leejeerajumnean, 2003) มีกระบวนการผลิต และลักษณะคล้ายกับนัตโตะ (natto) ของประเทศญี่ปุ่น แต่มีความแตกต่างกันตรงที่ถั่วเน่าเกิดจากการหมักด้วยเชื้อผสม และรูปลักษณะของถั่วเน่าจะไม่เหนียวหนืด (กนกศรี, 2550)

ถั่วเน่าเป็นอาหารที่มีประโยชน์ซึ่งแปรรูปจากถั่วเหลืองที่อุดมไปด้วยโปรตีนไขมัน และคาร์โบไฮเดรต อีกทั้งยังประกอบด้วยเกลือแร่ที่สำคัญต่างๆ เช่น โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และ ธาตุเหล็ก วิตามิน ได้แก่ วิตามิน B_1 วิตามิน B_2 และ ไนอะซิน (Hesseltine and Wang, 1980) อีกทั้งในระหว่างการหมักโปรตีนในถั่วเหลืองจะถูกย่อยให้เป็นกรดอะมิโน นอกจากนี้พวก Trypsin inhibitor และ Hemagglutin จะถูกทำลายโดยความร้อน หรือต้มในน้ำเดือด (รัศมีกร, 2544)

ถั่วเน่าสามารถใช้บริโภคได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นเครื่องปรุงรสแทนกะปิ ส่วนใหญ่ใช้เติมในซุปผักเพื่อเพิ่มรสชาติอาหารให้กลมกล่อมยิ่งขึ้น หรือนำมาห่อในใบตองนึ่งหรือปิ้งพอสุกรับประทานกับข้าวเหนียว (Leejeerajumnean, 2003; Chukeatirote *et al.*, 2006) ถั่วเน่าจึงเป็นอาหารที่มีประโยชน์นอกจากใช้เป็นอาหารเสริมรสชาติแล้วยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยเฉพาะโปรตีน และสารอาหารอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายอีกมากมาย

1.2 ถั่วเหลือง วัตถุดิบที่สำคัญในการทำถั่วเน่า

ถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merrill] อยู่ในวงศ์ Leguminosae วงศ์ย่อย Papilionoideae มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออก คือดินแดนตอนเหนือและตอนกลางของประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนในปัจจุบัน ถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญทั้งโปรตีนและไขมัน โดยเมล็ดมีโปรตีนประมาณ 38-40% มีน้ำมันประมาณ 18-20% (ของน้ำหนักเมล็ดแห้ง) โปรตีนของถั่วเหลืองมีคุณภาพดีมากในด้านองค์ประกอบของกรดอะมิโน โดยเฉพาะ lysine และ tryptophan สูงกว่าเมล็ดธัญพืชอื่นๆ น้ำมันถั่วเหลืองมีกรดไขมันที่อิ่มตัวเพียง 12-14% แต่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงถึง 86-88% ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ประกอบด้วยกรด oleic 30-35% กรด linoleic 45-55% และกรด linolenic 5-10% นอกจากโปรตีนและไขมันถั่วเหลืองมีคุณค่าอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพแล้ว เมล็ดถั่วเหลืองมีเลซิตินสูง 1,480 mg/100 g เลซิตินมีประโยชน์ต่อร่างกายผู้บริโภค คือ ทำหน้าที่เป็นตัวละลายโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และไขมันอื่นๆ ป้องกันไม่ให้ไขมันไปเกาะติดผนังเลือด ตับและอวัยวะอื่นๆ ช่วยซ่อมแซมเซลล์ที่สึกหรอ ส่งเสริมการทำงานของเซลล์ให้มีประสิทธิภาพอย่างสม่ำเสมอ ให้ความชุ่มชื้นแข็งแรง โดยเฉพาะกล้ามเนื้อหัวใจ ตับ ไต และต่อมไร้ท่อ ตลอดจนการไหลเวียนของโลหิตดีขึ้น รักษาผิวพรรณ รอยตกกระบนผิวหนัง และป้องกันการเกิดนิ่วในถุงน้ำดี สารสกัดจากเมล็ดถั่วเหลือง ชื่อ isoflavones เป็นสารช่วยเพิ่มมวลกระดูกลดความเสี่ยงจากโรคกระดูกพรุน (Osteoporosis) ลดอาการจากสาเหตุการหมดประจำเดือน หรืออาการวัยทอง (Menopausal symptoms) ลดความเสี่ยงจากการเกิดมะเร็งเต้านม (Breast cancer) มะเร็งต่อมลูกหมาก (Prostate cancer) และโรคหัวใจตีบ (Coronary heart disease) (กรมวิชาการเกษตร, 2547) คุณลักษณะและคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองสรุปไว้ในตาราง 1

ภาพ 1 ลักษณะของเมล็ดถั่วเหลือง

ตาราง 1 คุณลักษณะและคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลือง

คุณลักษณะ	ถั่วเหลือง
Moisture (%)	0.00
Fats (%)	21.45
Fiber (%)	5.16
Protein (%)	38.26
Ash (%)	4.85
Carbohydrates (%)	30.28
Phosphorus (mg/100g)	659
Calcium (mg/100g)	210
Iron (mg/100g)	9.3
Phytic acid (mg/100g)	11.6
Lecithin (%)	0.64
Glucose (%)	0.60
Sucrose (%)	5.00
Raffinose (%)	0.30
Estachiose (%)	3.00

ที่มา: Hernandez *et al.* (1981)

1.3 กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่า

เนื่องจากถั่วเน่ามีการผลิตและจำหน่ายที่จำกัดเฉพาะในท้องถิ่นที่มีการแปรรูปเท่านั้น จึงทำให้เทคนิคในการผลิตถั่วเน่าในแต่ละท้องถิ่นมีความแตกต่างกันไป (มาลี และคณะ, 2547) โดยถั่วเน่าที่หมักเสร็จแล้วชาวบ้านจะเรียกว่า "ถั่วเน่าซา" (ถั่วเน่าที่ยังเป็นเมล็ดคล้ายเต้าเจี้ยว แต่ไม่มีน้ำ) ซึ่งโดยทั่วไปชาวบ้านจะนิยมผลิตถั่วเน่าอยู่ 2 ชนิด ได้แก่

1. ถั่วเน่าแบบเปียก หรือ "ถั่วเน่าเมอะ" หรือ "ถั่วเน่าเปอะ"

2. ถั่วเน่าแบบแห้ง หรือ "ถั่วเน่าแคป" หรือ "ถั่วเน่าแข็ป"

ตัวอย่างเช่น **รสวิไล (2526) ได้อธิบายกรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่า** ดังนี้

1. ล้างถั่วเหลืองให้สะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก

2. ต้มถั่วเหลืองนาน 3-4 ชั่วโมง คอยเติมน้ำให้ท่วมเมล็ดถั่วเสมอ (อัตราส่วนถั่วเหลือง 1 ลิตร ต่อน้ำ 2 ลิตร) หลังจากต้มถั่วแล้วตักออกผึ่งให้แห้ง

3. ทำการหมักโดยเตรียมตะกร้ารองด้วยใบตอง แล้วนำถั่ววางบนใบตองปิดทับด้วยใบตองอีกชั้นหนึ่ง เพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น และป้องกันเชื้อรา

4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 - 3 วัน

5. บดถั่วเน่าเติมเกลือหรืออาจเติมสารที่ทำให้รสชาติดี เช่น ขิง พริกแดง ห่อด้วยใบตอง นำไปนึ่งหรือย่าง วิธีนี้สามารถเก็บรักษาถั่วเน่าได้นาน 2 วัน

6. หรือนำถั่วเน่ามาทำเป็นแผ่นแบนตากแดดให้แห้งจะเก็บได้นาน เรียกเป็นภาษาเหนือว่า "ถั่วเน่าแคป" โดยมีวิธีทำคือ

6.1 บดถั่วเน่าให้ละเอียดแล้วนำมาทำเป็นแผ่นบาง ๆ ลักษณะกลมใช้ใบตอง "หุก" โดยใบหนึ่งวางแบนอยู่บนฝ่ามือซ้าย อีกใบหนึ่งอยู่ในมือขวาใช้ขยำถั่วเน่าวางลงบนใบตองมือซ้าย ใช้มือสองข้างวางประกบกันจนแบนราบ ซึ่งมีลักษณะคล้ายมะม่วงกวน

6.2 นำไปตากแดด 1 วัน เก็บไว้ในที่แห้ง

มาลี และคณะ (2547) ได้อธิบายขั้นตอนการทำถั่วเน่า ดังนี้

1. คัดแยกเม็ดหิน ดิน ทราย และกากถั่วเหลืองที่เจือปนในถั่วเหลืองออกให้หมด

2. นำถั่วเหลืองมาล้างให้สะอาดอย่างน้อย 2 ครั้งหรือจนน้ำที่ล้างสะอาด

3. ต้มถั่วเหลืองให้สุกจนเปื่อย

4. หลังจากต้มสุกจนเปื่อยแล้วเทใส่ตะกร้ารองด้วยใบตอง หมักทิ้งไว้ 2-3 คืน

5. นำถั่วเหลืองหมักมาบดให้ละเอียด

6. นำถั่วเน่าที่บดแล้วมาทำเป็นแผ่น แล้วนำไปตากแดดประมาณ 8 ชั่วโมง

นอกจากนี้ในบางท้องที่ยังคงกรรมวิธีการผลิตถั่วเน่าในแบบดั้งเดิมที่ได้รับการถ่ายทอดสืบต่อกันมาพร้อมกับได้แปรรูปผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าออกจำหน่ายด้วย ตัวอย่างเช่น

การผลิตถั่วเน่าโดยกลุ่มแม่บ้านเกษตรกรหมู่บ้านกิ่วมื่น อ.ป่าซาง จ.ลำพูน ซึ่งมีรูปแบบการผลิตกึ่งอุตสาหกรรมมีกระบวนการผลิตถั่วเน่า ดังนี้

1. คัดเลือกเมล็ดถั่วเหลือง แยกสิ่งสกปรกและเมล็ดถั่วที่เสียออก ล้างน้ำทำความสะอาด

2. นำไปต้มจนเมล็ดถั่วเหลืองอ่อนนุ่มประมาณ 3-4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น

3. นำไปบรรจุลงในตะกร้าไม้ไผ่สานเป็นรูที่อาจรองด้วยใบตอง เพื่อไม่ให้เมล็ดถั่วเกาะติดตะกร้า ใส่เมล็ดถั่วเหลืองลงไปประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของตะกร้าปิดด้วยผ้าสะอาดให้มิดชิด คลุมด้วยกระสอบพลาสติกซ้ำอีกชั้นหนึ่ง นำตะกร้าวางไว้ในที่ร่มเป็นเวลา 1-2 วัน

4. เมื่อหมักเสร็จแล้ว (ภาพ 2) ถั่วเน่าจะนำมาบดและปรุงรสโดยใช้เกลือป่น เครื่องเทศ กระเทียม พริกป่น แล้วห่อด้วยใบตองเป็นถั่วเน่าเมอะ (ภาพ 3 ก) นำไปนึ่งหรือย่างก่อนรับประทาน

5. หรือสามารถนำถั่วเน่ามาจัดเป็นแผ่นวงกลม ผึ่งแดดให้แห้งแล้วจึงนำมาทอดในน้ำมัน บรรจุถุงขายเป็นถั่วเหลืองเจทรงเครื่อง (ภาพ 3 ข) (กลุ่มแม่บ้านเกษตรหมู่บ้านกิ่วมื่น อ.ป่าซาง จ.ลำพูน, การติดต่อส่วนตัวเมื่อวันที่ 5 มี.ค. 2551)

ภาพ 2 ถั่วเน่าซาที่ผลิตโดยกลุ่มแม่บ้านเกษตรหมู่บ้านกิ่วมื่น อ.ป่าซาง จ.ลำพูน

(ก)

(ข)

ภาพ 3 ผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าเมอะ (ก) และถั่วเหลืองทรงเครื่องเจ (ข)
ที่ผลิตโดยกลุ่มแม่บ้านเกษตรหมู่บ้านกิ่วมื่น อ.ป่าซาง จ.ลำพูน

กรรมวิธีการผลิตโดยกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตถั่วเน่า อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ ค่อนข้างมีการผลิตในรูปแบบดั้งเดิมที่สืบต่อกันมาในท้องถิ่นโดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ต้มถั่วเหลืองทิ้งไว้ข้ามคืน

2. นำไปใส่ในตะกร้าที่รองและปิดทับด้วยใบตองตึง คลุมด้วยผ้าขาวบางให้มิดชิด แล้วทำการหมักเป็นเวลา 2-3 วัน

3. หลังจากหมักเสร็จแล้ว (ภาพ 4) จะนำไปบดแล้วตำผสมกับเกลือนำไปแปรรูปเป็นถั่วเน่าเมอะ (ภาพ 5 ก) หรือขายในรูปของเครื่องแกงแทนกะปิ (ภาพ 5 ข) (กลุ่มเกษตรผู้ผลิตถั่วเน่า อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่, การติดต่อส่วนตัวเมื่อวันที่ 27 มิ.ย. 2552)

ภาพ 4 ถั่วเน่าซาที่ผลิตโดยกลุ่มเกษตรผู้ผลิตถั่วเน่า อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่

(ก) (ข)

ภาพ 5 ผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าเมอะ (ก) และเครื่องแกงถั่วเน่า (ข)
ที่ผลิตโดยกลุ่มเกษตรผู้ผลิตถั่วเน่า อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่

1.4 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเน่า

กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2527) ได้รายงานคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเน่าเปียกและถั่วเน่าแห้งในตาราง 2

ตาราง 2 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเน่า (คำนวณจากส่วนที่กินได้ 100 g)

สารอาหาร (Nutrients)	ถั่วเน่าเปียก (Fermented soybeans, Wet)	ถั่วเน่าแห้ง (Fermented soybeans, dry)
พลังงาน (Cal.)	152	388
ความชื้น (%)	61.8	12.0
โปรตีน (g)	17.9	43.9
ไขมัน (g)	6.6	17.6
คาร์โบไฮเดรต (g)	5.3	13.5
ใยอาหาร (g)	3.8	8.4
เถ้า (g)	4.6	4.6
Ca (mg)	198.0	292.0
P (mg)	223.0	5.0
FE (mg)	6.1	21.0
Vitamin A (I.U.)	328.00	283.00
Vitamin B_1 (mg)	0.04	0.06
Vitamin B_2 (mg)	0.45	0.73
Niacin (mg)	1.60	1.50
Vitamin C (mg)	0.00	0.00

ที่มา: กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2527)

Marie-Paule (1985) ได้ทำการศึกษาส่วนประกอบของกรดอะมิโนในถั่วเน่า ซึ่งสรุปผลดังตาราง 3 พบว่า ภายหลังจากการหมักถั่วเน่า กรดอะมิโนบางชนิดมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับถั่วเหลืองต้ม เช่น Asparagine และ Glutamic acid เป็นต้น

และต่อมา Kungsadalaumpai (2005) ได้ทำการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเน่าจากพื้นที่การผลิตในจังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และเชียงราย ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 3 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนในถั่วเน่า

ชนิดของกรดอะมิโน *	ถั่วเหลือง คัดแยกเปลือก	ถั่วเหลืองต้ม	ถั่วเน่าหมัก เป็นเวลา 2 วัน	ถั่วเน่า
Lysine	4.8	12.1	5.7	6.7
Histidine	2.8	5.6	2.5	3.1
Arginine	8.0	6.6	7.5	6.4
Asparagine	12.5	10.7	12.5	11.0
Threonine	4.7	3.6	4.3	4.1
Serine	3.9	4.3	3.5	3.9
Glutamic acid	18.7	15.8	19.9	18.8
Proline	6.3	4.7	3.8	3.8
Glycine	4.0	4.1	4.0	4.4
Alanine	4.1	4.5	4.2	4.2
Valine	6.0	5.2	5.8	6.1
Methionine	1.8	2.3	2.5	2.4
Isoleucine	5.0	4.6	5.1	5.3
Leucine	8.1	6.8	8.0	8.5
Tyrosine	3.8	3.9	4.2	4.6
Phenylalanine	5.7	5.3	6.4	6.4

หมายเหตุ: * ในหน่วย 100 กรัมของถั่วเหลือง

ที่มา: Marie-Paule (1985)

ตาราง 4 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเน่าในแต่ละพื้นที่การผลิต

Sampling Locations		**Nutrition Values (%)**					
Province	**District**	**Protein**	**Oil**	**Carbohydrate**	**Fiber**	**Ash**	**Moisture content**
Chiang Mai	Maewang	38.94	3.15	40.43	5.44	0.02	12.02
	Fang	42.81	3.59	38.86	6.03	0.02	8.69
Maehongson	Wangmapa	42.19	8.20	33.62	7.86	0.04	8.09
	Muang	42.38	7.23	36.08	5.89	0.06	8.36
	Khunyaum	42.12	4.63	38.45	5.31	0.09	9.40
Chiang Rai	Maejun	39.25	8.10	39.35	6.26	0.01	7.30
	Maesai	41.25	9.33	34.81	6.40	0.07	8.14

ที่มา: Kungsadalaumpai (2005)

1.5 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการหมักถั่วเน่า

ในช่วงแรกนั้น Sundhagul *et al.* (1972) ได้ทำการศึกษากระบวนการทำถั่วเน่าของชาวบ้านทางภาคเหนือตอนบนของไทย และศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของถั่วเน่า พบว่าจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง สามารถสร้างสปอร์ได้ ซึ่งก็คือเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสามารถแยกได้ 2 ไอโซเลต และเมื่อทดลองนำเอาแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตมาทำให้บริสุทธิ์ และใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก พบว่าสามารถทำให้เกิดถั่วเน่าได้เป็นอย่างดี ต่อมา พิชามญชุ์ (2545) ได้ทำการแยกแบคทีเรียจำนวน 40 ไอโซเลต จากถั่วเน่าที่ผลิตในเขต จ.เชียงใหม่ และเชียงราย พบว่ามี 26 ไอโซเลต อยู่ในจีนัส *Bacillus*

Leejeerajumnean (2003) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักถั่วเน่าโดยทำการคัดแยกเชื้อจากตัวอย่างถั่วเน่า และรายงานว่าเป็น *B. subtilis*, *B. megaterium* ในบางครั้งยังพบว่ามี *B. cereus* อีกด้วย (ตาราง 5) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *B. subtilis* เป็นเชื้อที่มีความสำคัญในกระบวนการหมัก เนื่องจากตรวจพบตั้งแต่ช่วงเริ่มการหมักจนถึงการหมักสิ้นสุดลง ซึ่งผลของการหมักใกล้เคียงกับอาหารหมักที่ทำจากถั่วเหลืองในประเทศอื่นๆ ซึ่งพบว่า *B. subtilis* เป็นเชื้อที่มีความสำคัญในการหมัก ตัวอย่างเช่น dadwada จากประเทศไนจีเรียประกอบด้วยกลุ่มของ *B. subtilis*, *B. pumilus* และ *B. licheniformis* ในคีเนมาของประเทศอินเดียพบ *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. badius* แต่ตรวจพบว่ามีจุลินทรีย์ในกลุ่มของ lactic acid bacteria และ *Enterococcus* อยู่ด้วย ในขณะที่การผลิตนัตโตะของประเทศญี่ปุ่นที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์ของ *B. subtilis* ในการหมักเพียงชนิดเดียว (Sugawara *et al.*, 1985)

ตาราง 5 จุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Bacillus* ที่พบในระหว่างการหมักถั่วเน่า

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	***Bacillus* spp. ที่พบ**
ชั่วโมงที่ 0	*B. subtitlis, B. megaterium*
ชั่วโมงที่ 24	*B. subtitlis, B. megaterium*
ชั่วโมงที่ 36	*B. subtitlis, B. megaterium*
ชั่วโมงที่ 72	*B. subtitlis, B. megaterium, B. cereus*
ผลิตภัณฑ์ที่หมักเสร็จสิ้นแล้ว	*B. subtitlis, B. megaterium*

ที่มา: Leejeerajumnean (2003)

Bacillus เป็นแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากหลายๆ แหล่งโดยใช้กระบวนการ Pasteurization ซึ่งจะทำให้ความร้อนกับตัวอย่างที่จำนำมาแยกเชื้อประมาณ 80°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเป็นการแยกเชื้อเบื้องต้น เนื่องจาก *Bacillus* ส่วนใหญ่ทนความร้อนได้สูง หลังจากนั้นก็นำมาคัดแยกอีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (ไพโรจน์, 2543) ลักษณะของแบคทีเรียในจีนัสนี้คือ เป็นเซลล์รูปแท่ง (rod shape) ขนาด 0.3 – 2.2 × 1.2 - 7.0 μm ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ ติดสีแกรมบวก (gram positive) ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobe) หรือเป็น facultative anaerobe ปริมาณ G + C ประมาณ 32-62 % สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ที่ทนความร้อน รูปร่างและตำแหน่งของเอนโดสปอร์จะแตกต่างกัน เช่น *B. subtilis, B. licheniformis, B. cereus, B. anthracis* จะมีสปอร์เป็นรูปรี ตำแหน่งอยู่ตรงกลางเซลล์ เป็นต้น บางชนิดเป็นพวกที่เจริญได้ที่สภาวะอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) เช่น *B. subtilis* ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45-55°C บางชนิดเป็นพวกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (Obligate thermophile) เช่น *B. stearothermophilus* ซึ่งมีอุณหภูมิสูงสุดในการเจริญเติบโตที่ 65-75°C ต่ำสุด 30-45°C หรือบางชนิดเป็นพวก facultative thermophile เช่น *B. coagulans* ที่โตที่ 55-60°C (พันพงศ์, 2548)

1.6 ปฏิกิริยาชีวเคมีที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักถั่วเน่า

1.6.1 การย่อยสลายโปรตีนและการสร้างแอมโมเนียในระหว่างการหมัก

ในระหว่างการหมัก *B. subtilis* จะเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายโปรตีนที่มีอยู่ในถั่วเหลือง ให้เป็นกรดอะมิโนและผลพลอยได้เป็นสารประกอบแอมโมเนีย มีผลทำให้ค่า pH ของถั่วเน่ามีค่าสูงขึ้น (Leejeerajumnean, 2003)

ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน (Proteolysis)

$$NH_2\text{-CHR-CO-(NH-CHR-CO-)}_n\text{-NH-CHR}_1\text{-COOH} \xrightarrow{H_2O} NH_2\text{-CHR-CO-(NH-CHR-CO-)}_{n-1}\text{-NH-CHR-COOH} + R_1CH(NH_2)COOH$$

Small peptide → Small peptide + Amino acid

ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดอะมิโน (Amino acid oxidation)

$$R_1CH(NH_3^-)COO^- + O_2 \longrightarrow CO_2 + H_2O + NH_4^+ + \text{Energy}$$

ต่อมา Chukeatirote *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่า pH, NH_3 และปริมาณโปรตีนในระหว่างการหมักถั่วเน่า พบว่าค่า pH, NH_3 และ total proteins มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมัก (ตาราง 6)

ตาราง 6 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH, NH_3 และปริมาณโปรตีนในระหว่างการหมักถั่วเน่า

Time (h)	pH	NH_3 (mg ml^{-1})	Total proteins (mg ml^{-1})
0	6.33	0.034	0.238
12	6.37	0.041	0.296
24	6.47	0.045	0.305
36	7.17	0.061	0.340
48	7.67	0.076	1.072
60	7.93	0.094	1.381
72	7.97	0.121	1.451

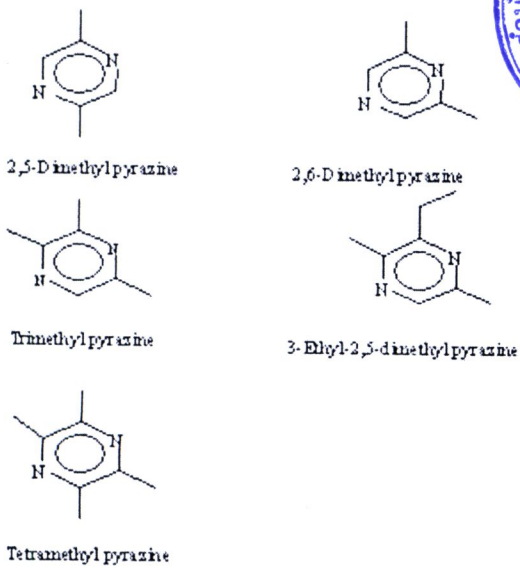
ที่มา: Chukeatirote *et al.* (2006)

1.6.2 การเกิดกลิ่นจากสารประกอบแอมโมเนีย

การเกิดกลิ่นของถั่วเน่าเป็นผลมาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนลงไปทำให้เกิดการหมักถั่วเน่าและใช้สารอาหารที่มีอยู่ในถั่วเหลือง โดยเฉพาะโปรตีนเป็นแหล่งพลังงานจึงทำให้เกิดการผลิตสารประกอบแอมโมเนียอันเป็นผลพลอยได้จากปฏิกิริยา และเมื่อค่า pH เพิ่มสูงขึ้นจนอยู่ในช่วง 8.0 – 8.3 สารประกอบแอมโมเนียนั้นจะกลายเป็นสารที่ระเหยได้ (volatile compounds) ทำให้เกิดกลิ่นฉุนจากสารประกอบแอมโมเนียซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของถั่วเน่า (Leejeerajumnean, 2003)

เกรียงศักดิ์ (2531) ได้รายงานว่า การหมักถั่วเหลืองจะได้สารประกอบในกลุ่มเอสเทอร์เป็นจำนวนมาก เช่น ethyl, isobutyl, isoamyl ester ของ isobutyric, α-methylbutyric, isovaleric และ tiglic acids ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของโปรตีน กลีเซอไรด์ และกรดไขมันในถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมีสารที่มีกลิ่นหอมฉุน เช่น 2-heptanone, pyrazine และ benzaldehyde ต่อมา Leejeerajumnean *et al.* (2001) ได้ศึกษาสารประกอบแอมโมเนียที่ระเหยได้เหล่านี้ส่วนใหญ่พบว่า ได้แก่ 3-hydroxybutanone, 2-methylbutanoic acid, pyrazines, dimethyl disulphide และ 2-methylfuran เช่นเดียวกับ Sugawara *et al.* (1998) พบว่าสารประกอบในกลุ่มของ pyrazines (ภาพ 6) น่าจะเป็นสารให้กลิ่นหลักในถั่วเหลืองหมัก ซึ่งในถั่วเน่าพบสารให้กลิ่นในกลุ่ม pyrazines ทั้งหมด 9 ชนิด โดยสารที่มีความเข้มข้นสูงสุดคือ tetramethylpyrazine รองลงมาคือ trimethylpyrazine

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพ 6 สารประกอบในกลุ่มของ pyrazines บางชนิดที่พบในถั่วเน่า

(ที่มา: Leejeerajumnean, 2003)

1.6.3 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักถั่วเน่า

ในระหว่างการหมักถั่วเน่าจะเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก Chantawannakul *et al.* (2002) ได้ทำการแยกเชื้อสร้างสปอร์จากถั่วเน่าที่ได้จาก 6 จังหวัดภาคเหนือตอนบนของไทย จำนวน 82 ไอโซเลต และนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยดูจากการสร้างวงใสในอาหารแข็ง skim milk ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *B. subtilis* 38 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ด้วยวิธี azocasein พบว่าเชื้อ *B. subtilis* 38 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 47°C และที่อุณหภูมิ 60°C เอนไซม์จะเสียสภาพการทำงาน โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะถูกยับยั้งด้วย inhibitor คือ 1,10-phenanthroline แสดงว่าเอนไซม์ชนิดนี้เป็น metalloprotease

ต่อมา Chukeatirote *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ amylase, protease, lipase และ phytase ในระหว่างการหมักถั่วเน่าตามธรรมชาติ พบว่าเอนไซม์ amylase และ phytase มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยมีค่าสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมงของการหมัก เท่ากับ 1,379.66 และ 152.6 Unit ตามลำดับ สำหรับเอนไซม์ protease มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 ของการหมัก ในขณะที่เอนไซม์ lipase นั้นตรวจพบค่ากิจกรรมน้อยมากเพียง 0.78 – 1.31 Unit เท่านั้น เนื่องมาจากจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ lipase ได้น้อย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์บางชนิดในระหว่างการหมักถั่วเน่าแสดงในตาราง 7

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 31 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 250458

ตาราง 7 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์บางชนิดในระหว่างการหมักถั่วเน่า

Time (h)	Amylase (U)	Lipases (U)	Phytases (U)	Proteases (%)
0	198.88	1.31	114.70	15.21
12	222.84	1.15	120.99	22.12
24	363.51	1.10	127.48	30.18
36	396.34	0.89	143.42	58.41
48	669.69	1.06	150.23	62.90
60	914.63	1.24	152.60	100
72	1,379.66	0.78	152.60	74.42

ที่มา: Chukeatirote *et al.* (2006)

1.6.4 การผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก (γ-Polyglutamic acid, PGA)

กรดพอลิกลูตามิก หรือ PGA เป็นสารพอลิเมอร์ซึ่งประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ D- และ L-glutamic acid ที่มาประกอบกันด้วยพันธะ γ-glutamyl และเป็นองค์ประกอบหลักของสารเมือกเหนียวที่พบในนัตโตะของญี่ปุ่น และถั่วเน่าของประเทศไทย ซึ่งเกิดจากเชื้อในกลุ่มของ *Bacillus* บางชนิดผลิตขึ้น จึงทำให้ถั่วเน่าที่หมักเสร็จแล้วมีลักษณะเป็นเมือกเหนียว (Chunhachart *et al.*, 2006)

Inatsu *et al.* (2006) ได้ตรวจสอบการผลิตสาร γ-polyglutamic acid จากเชื้อ *B. subtilis* ที่แยกจะได้จากตัวอย่างถั่วเน่าจากประเทศไทย พบว่าการผลิตเอนไซม์และ PGA มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตนัตโตะอย่างมาก ซึ่งอาจมีการนำสายพันธุ์ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมอาหารต่อไปได้

1.7 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตถั่วเน่า

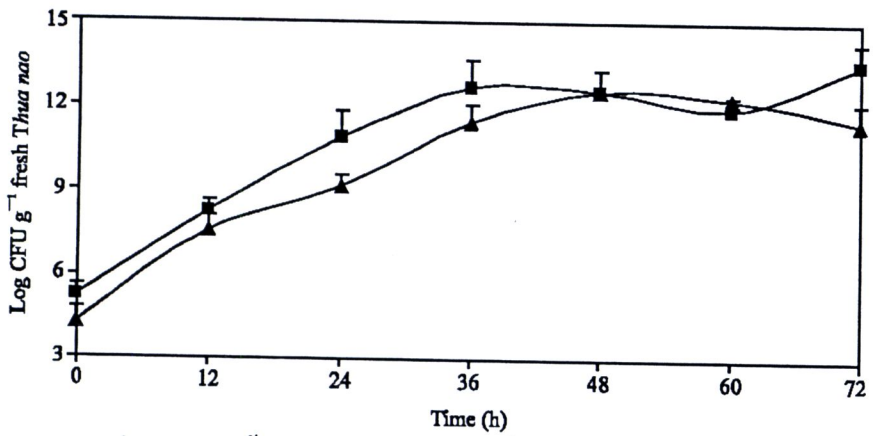
1.7.1 อุณหภูมิในการหมัก

การหมักถั่วเน่าแบบดั้งเดิมจะไม่มีการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมัก อาศัยเพียงอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมในขณะนั้นๆ (ambient temperature) พบว่าหากเป็นในช่วงฤดูร้อนอุณหภูมิจะสูงขึ้นทำให้การหมักจะเสร็จเร็วขึ้น ในขณะที่ในฤดูหนาวการหมักจะช้าลง จากการศึกษาผลของอุณหภูมิในการหมักถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ KK2: B10 (MTTC 2756) โดย Tamang and Nikkuni (1998) เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการหมักคีเนมาที่ 35, 40 และ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 45°C

ต่อมา Tangjitjaroenkun *et al.* (2003) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบีสิบสองโดยใช้เชื้อผสมของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B4 กับเชื้อ *Klebsiella pneumonia* ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าการหมักที่อุณหภูมิห้องให้ปริมาณวิตามินบีสิบสองสูงสุด และที่อุณหภูมิ 45°C พบการผลิตวิตามินบีสิบสองต่ำที่สุดอย่างเห็นได้ชัด

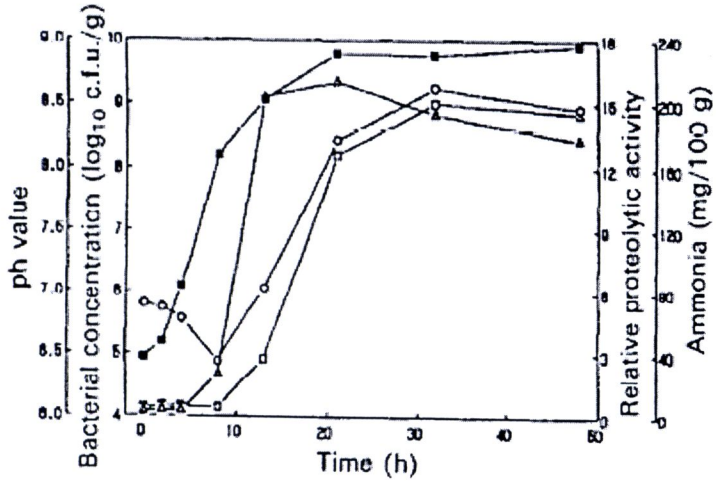
1.7.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก

โดยทั่วไปแล้วระยะเวลาที่ใช้ในการหมักถั่วเน่าด้วยวิธีดั้งเดิมจะใช้เวลา 2-4 วัน ซึ่งขึ้นอยู่กับแต่ละพื้นที่ในการผลิตถั่วเน่า และพบว่าฤดูกาลมีผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการหมักด้วย ซึ่งการหมักในฤดูหนาวจะใช้เวลานานกว่าในฤดูร้อน (Suppadit *et al.*, 2005) จากรายงานของ Chukeatirote *et al.* (2006) พบว่าระยะเวลามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักตามธรรมชาติจะพบทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ดังภาพ 7



ภาพ 7 การเปลี่ยนแปลงเชื้อแบคทีเรีย (■) และเชื้อรา (▲) ในระหว่างการหมักถั่วเน่า
(**ที่มา:** Chukeatirote *et al.*, 2006)

ในขณะที่ Sarkar *et al.* (1993) ได้สรุปเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักคีเนมาไว้สองช่วงด้วยกันดังแสดงในภาพ 8 กล่าวคือ ช่วงแรกจะมีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมัก pH มีค่าลดลง โดยในช่วงนี้จะไม่มีการย่อยสลายโปรตีนหรือการผลิตแอมโมเนียแต่อย่างใด ต่อมาในช่วงที่สองจะเป็นช่วงที่เพิ่มชีวมวลของเชื้อ และมีอัตราการย่อยสลายโปรตีนอย่างมาก อันทำให้เกิดการสร้างแอมโมเนียและการเพิ่มขึ้นของ pH ในระหว่างการหมัก



ภาพ 8 การเปลี่ยนแปลงจำนวนของแบคทีเรีย (■) ค่า pH (○) อัตราการย่อยสลายโปรตีน (▲) และการผลิตแอมโมเนีย (□) ในการหมักคีเนมา โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ของ *Bacillus* sp. DK-W1 ที่ 37°C (**ที่มา:** Sarkar *et al.*, 1993)

1.7.3 ระยะเวลาในการแช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม

การแช่ถั่วเหลืองก่อนการนำไปต้มมีจุดประสงค์เพื่อทำให้เมล็ดถั่วเหลืองอ่อนตัวลง เชื่อว่าการแช่ถั่วเหลืองจะช่วยลดเวลาในการต้มถั่วเหลืองลง จากการสอบถามผู้ผลิตถั่วเน่ามักจะไม่นิยมแช่ถั่วเหลืองเนื่องจากเสียเวลาแต่นิยมนำไปต้มหลังจากทำความสะอาดเมล็ดถั่วเหลืองเรียบร้อยแล้วทันที ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าปัจจัยด้านแช่ถั่วเหลืองก่อนการนำไปต้มนั้นจะมีผลกระทบต่อการหมักถั่วเน่าหรือไม่

Pan and Tangtaranavalee (2003) ได้รายงานคุณลักษณะของถั่วเหลืองภายหลังจากการแช่น้ำพบว่า ในระหว่างการแช่เมล็ดถั่วเหลืองจะพองตัวขึ้นเนื่องจากมีการดูดน้ำเข้าสู่เมล็ด มีการสูญเสียของแข็ง (solid loss) และการเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้น ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสและคุณสมบัติในการบด นอกจากนี้ยังแนะนำว่าการแช่ถั่วเหลืองเป็นระยะเวลาหนึ่งจะทำให้กระบวนการบดภายหลังจากการผลิตทำได้ง่ายขึ้น ในขณะที่ Bayram *et al.* (2004) พบว่าเนื่องจากมีการแพร่ของน้ำเข้าสู่ในเมล็ดมากขึ้นจึงทำให้วิตามินที่ละลายน้ำได้แพร่เข้าสู่เอนโดสเปิร์มของถั่วเหลืองมากขึ้นด้วย อันเป็นผลทำให้ถั่วเหลืองมีคุณค่าสารอาหารเพิ่มขึ้น

1.7.4 ระยะเวลาที่ใช้ในการต้มถั่วเหลือง

จากการศึกษาของ Suppadit *et al.* (2005) ระยะเวลาในการต้มถั่วเหลืองโดยทั่วไปใช้เวลาอยู่ในช่วง 5 - 8 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจากเวลาที่ใช้ในการต้มถั่วเหลืองของกลุ่มแม่บ้านเกษตรกรหมู่บ้านกิ่วมื่น จ.ลำพูน ที่ใช้เวลาต้ม 3 - 4 ชั่วโมง แต่สำหรับกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตถั่วเน่า อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ ใช้เวลาในการต้มข้ามคืนจนมล็ดถั่วเหลืองเปื่อยยุ่ย ทั้งนี้จุดประสงค์หลักในการต้มเพียงต้องการทำให้ถั่วเหลืองที่ได้สุกเท่านั้น และไม่มีกฎเกณฑ์ที่แน่นอนว่าควรจะใช้เวลาในการต้มกี่ชั่วโมง เวลาที่ใช้ในการต้มจึงขึ้นอยู่กับผู้ผลิตถั่วเน่าในแต่ละพื้นที่เป็นหลัก

1.7.5 การทำแห้งถั่วเน่าแผ่น

ภายหลังจากการหมักแล้วผู้ผลิตถั่วเน่าในบางพื้นที่จะนำถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมาทำให้เป็นแผ่น จากนั้นนำไปตากแดดให้แห้งพอสมควร เพื่อทำให้ถั่วเน่าแผ่นมีอายุในการเก็บรักษาที่นานขึ้น ซึ่งมักจะประสบปัญหาในฤดูฝนจากการเจริญเติบโตของเชื้อราอันเนื่องมาจากข้อจำกัดด้านแสงแดดที่ไม่เพียงพอ การทำแห้งจึงต้องใช้ระยะเวลาที่มากขึ้น ส่งผลทำให้ผลผลิตในฤดูนั้นลดลง นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการเก็บรักษาถั่วเน่าแผ่นภายหลังจากการผลิตหากถั่วเน่าแผ่นมีปริมาณความชื้นมากเกินไป โดยการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าแผ่นที่เหมาะสมควรจะมีความแห้งมากเพียงพอ และมีปริมาณความชื้นไม่เกิน 14% (Suppadit *et al.*, 2005)

1.8 ปัญหาที่พบในกระบวนการผลิตถั่วเน่า

มาลี และคณะ (2547) และ Suppadit *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษากระบวนการผลิตถั่วเน่าของกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตถั่วเน่าต่างๆ ในบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ซึ่งได้พบประเด็นปัญหาเกี่ยวกับการผลิตถั่วเน่า ซึ่งสรุปได้ดังนี้

1. กระบวนการต้มถั่วเหลืองใช้เวลานานถึง 6 - 9 ชั่วโมงเพื่อให้ถั่วเหลืองเปื่อยนุ่ม เป็นเหตุให้สิ้นเปลืองเชื้อเพลิง และเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้สูงขึ้น

2. การขึ้นรูปเป็นแผ่น ซึ่งแม้ว่าจะมีการพัฒนาเครื่องมือการทำให้เป็นแผ่น แต่ก็ยังคงทำได้ในปริมาณที่ไม่มากนัก อีกทั้งใช้เวลาในขั้นตอนนี้ค่อนข้างมาก

3. การตากถั่วเน่าแผ่นให้แห้ง ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตถั่วเน่าแผ่น เนื่องจากมักประสบปัญหาในฤดูฝนทำให้ไม่สามารถตากถั่วเน่าแผ่นได้ ซึ่งผู้ผลิตบางรายมีการพัฒนาเตาอบถั่วเน่าแผ่นเพื่อช่วยในการแก้ปัญหา นอกจากนี้ยังมักประสบปัญหาการเจริญของเชื้อราบนถั่วเน่าแผ่น หากมีการตากแดดไม่เพียงพอ

4. การเก็บรักษาถั่วเน่า เนื่องจากถั่วเน่าเปียก (ถั่วเน่าเมอะ) ไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน ซึ่งเก็บไว้ได้ 2-3 วันเท่านั้น จึงจำเป็นต้องมีการผลิตทุกวัน และจำหน่ายให้หมดภายใน 1 - 2 วันสำหรับถั่วเน่าแผ่นแม้ว่าจะเก็บไว้ได้หลายเดือน แต่บางครั้งต้องมีการนำออกมาตากแดดเพื่อไม่ให้ขึ้นรา จึงเป็นเหตุให้อาชีพการผลิตถั่วเน่าทำไม่ได้เต็มประสิทธิภาพ

ภาพ 9 การทำแห้งถั่วเน่าโดยการตากแดด

5. ปัญหาด้านสุขอนามัยในการผลิต ซึ่งพบว่าในทุกขั้นตอนการผลิตยังไม่ถูกสุขลักษณะซึ่งอาจส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องความสะอาดของพื้นที่ สภาพแวดล้อม อุปกรณ์การผลิต และภาชนะที่ใช้

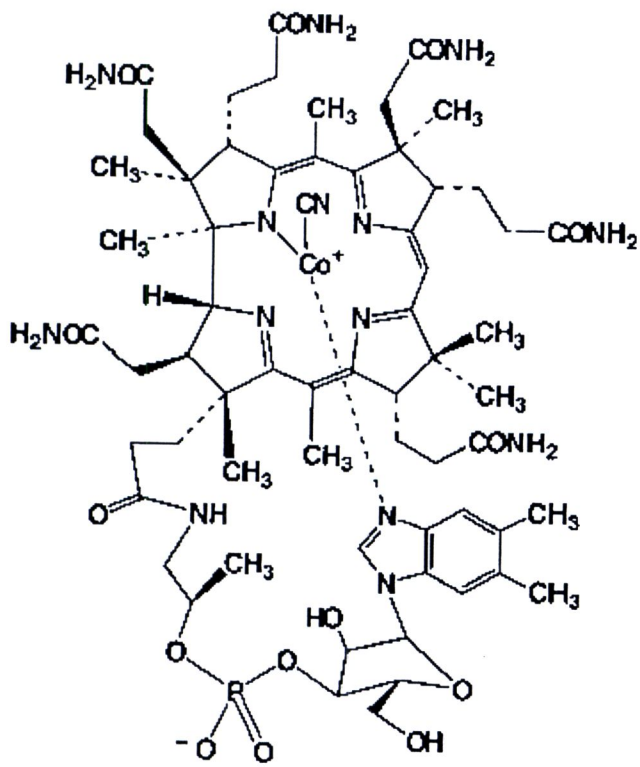
6. ปัญหาด้านการตลาด และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ โดยคุณภาพและลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นไม่มีมาตรฐานด้าน สี กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัส โดยถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นในแต่ละท้องที่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ การบริโภคยังอยู่ในพื้นที่การผลิต หรือท้องถิ่นใกล้เคียงเท่านั้น ซึ่งควรการพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าสำหรับส่งไปจำหน่ายในท้องตลาด

2. วิตามินบีสิบสอง (Vitamin B_{12})

2.1 วิตามินบีสิบสอง โครงสร้าง และประวัติการค้นพบ

วิตามินบีสิบสอง หรือ โคบาลามิน (cobalamin); ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamin) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}PCo$ มีลักษณะเป็นผลึกแข็ง และมีลักษณะเฉพาะคือมีไอออนของโคบอลต์เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย (ภาพ 10) (นันทฤทธิ์, 2550)

ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับวิตามินบีสิบสองเริ่มต้นในปี ค.ศ.1926 เมื่อ Minot และ Murphy ได้รักษาผู้ป่วยโรคโลหิตจางชนิดเพอร์นิเชีย (pernicious anemia) โดยให้ผู้ป่วยกินตับ ต่อมาปี ค.ศ.1929 Castle พบว่าโรคนี้เกิดจากการขาดสารที่จำเป็นในการสร้างเม็ดเลือดแดง ซึ่งประกอบด้วย เอกทรินซิคแฟคเตอร์ (extrinsic factor) ที่ได้จากอาหาร และอินทรินซิคแฟคเตอร์ (intrinsic factor) ซึ่งมีอยู่ในกระเพาะอาหาร ต่อมา Rickes และ Parker (1948) สามารถแยกผลึกสีแดงจากตับ ซึ่งสามารถรักษาโรคโลหิตจางชนิดเพอร์นิเชียสได้เป็นผลสำเร็จ และพบว่าสารดังกล่าวที่ได้จากตับนั้นคือ วิตามินบีสิบสอง นอกจากนั้นยังเป็นสารตัวเดียวกับเอกทรินซิคแฟคเตอร์ที่ Castle ได้ค้นพบ (กนกศรี, 2550)



Vitamin B_{12}

ภาพ 10 โครงสร้างของวิตามินบีสิบสอง (**ที่มา:** Scott, 2003)

ในปี ค.ศ.1956 Hodgkin และคณะ พบว่าโครงสร้างของไซยาโนโคบาลามินมีโครงสร้างใหญ่ที่สุดในบรรดารูปแบบอื่น ๆ ทั้งหมดของวิตามินบีสิบสองโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค x-ray crystallography ต่อมาในปี ค.ศ. 1960 Barker และคณะ สามารถทำการแยกวิตามินบีสิบสองโคเอนไซม์ (cobamide coenzyme) ได้เป็นผลสำเร็จ ซึ่งประกอบด้วยอะดีนีนนิวคลีโอไซด์ (adenine nucleoside) ที่อยู่ในตำแหน่งเดียวกับไซยาไนด์ (cyanide) ในโครงสร้างของไซยาโนโคบาลามิน (กนกศรี, 2550)

ในปี ค.ศ.1961 Lenhert และ Hodgkin ได้วิเคราะห์โครงสร้างของวิตามินบีสิบสองโดยใช้เทคนิค x-ray crystallography พบว่านิวคลีโอไซด์จะถูกเชื่อมต่อกันเป็นวิตามินบีสิบสองด้วยพันธะโคบอลต์คาร์บอน ซึ่งพบว่าเป็นพันธะที่มีความเสถียร ต่อมาในปี ค.ศ.1964 Dorathy Hodgkin ได้รับรางวัลโนเบลจากการแสดงโครงสร้างของวิตามินบีสิบสองได้เป็นผลสำเร็จด้วยเทคนิค x-ray crystallography ต่อมาในปี ค.ศ.1965 Chalmers และ Shinton ประสบความสำเร็จในการผลิตวิตามินบีสิบสองจากแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตสารสเตรปโตไมซิน (streptomycin) และในปี ค.ศ. 1973 Woodword สามารถสังเคราะห์วิตามินบีสิบสองทางเคมีได้สำเร็จ (Chin, 1985)

2.2 หน้าที่ของวิตามินบีสิบสอง (นันทฤทธิ์, 2550)

วิตามินบีสิบสองมีหน้าที่ทางชีวเคมีที่สำคัญ 2 ประการ คือ

1. เป็นโคแฟกเตอร์ของเมไธโอนีนซินเทส (methionine synthase) โดยเอนไซม์ชนิดนี้จำเป็นต้องมีโฟเลต และเมธิลโคบาลามินอยู่ด้วยจึงจะทำงาน เพื่อเร่งปฏิกิริยาการสร้างเมไธโอนีนจากโฮโมซิสเตอิน โดยร่างกายของมนุษย์ใช้เมไธโอนีนเพื่อสร้างเป็น เอส-อะดิโนซิลเมไธโอนีน (S-adenosyl methionine) เพื่อใช้เป็นสารให้หมู่เมธิลกับโมเลกุลของดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ซึ่งมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดมะเร็ง และหากเมไธโอนีนซินเทสทำงานได้ไม่ดีพอจะทำให้เกิดการสะสมของโฮโมซิสเตอินมากขึ้น อันเป็นการเพิ่มความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด

2. เป็นโคแฟกเตอร์ของเมทิลมาโลนิล-โคเอนไซม์เอมิวเตส (methylmalonyl-CoA mutase) เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน แอล-เมทิลมาโลนิล-โคเอนไซม์เอ (L-methylmalonyl-CoA) ให้เป็น ซักซินิลโคเอนไซม์เอ (succinyl-CoA) ซึ่งการเร่งปฏิกิริยานี้จำเป็นต้องมี 5-ดีออกซิอะดีโนซิลโคบาลามิน (5-deoxylcobalamin) เป็นโคแฟกเตอร์จึงจะทำงานได้ มีความสำคัญในการผลิตพลังงานจากการสลายอาหารประเภทไขมันและโปรตีน นอกจากนี้ซักซินิลโคเอนไซม์เอยังมีความจำเป็นในการสร้างฮีโมโกลบิน (Haemoglobin) อีกด้วย

2.3 แหล่งของวิตามินบีสิบสอง

วิตามินบีสิบสองพบในอาหารที่มาจากสัตว์ ได้แก่ ไข่แดง เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์นม และเกิดจากการผลิตของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Propionibacterium, Kiebsiella pneumoniae, Pseudomonas denitrificans, Methanococcus jannaschii* และ *B. megaterium* เป็นต้น แต่ไม่พบในผลิตภัณฑ์ที่มาจากพืช หรือพบได้น้อยมาก (Rauz *et al.*, 1998; Watanabe, 2007) โดยการผลิตวิตามินบีสิบสองในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้การผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีมีความยุ่งยาก และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงมาก สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แนะนำให้ใช้ในการผลิตวิตามินบีสิบสอง แสดงดังตาราง 8 (Martens *et al.*, 2002)

ตาราง 8 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แนะนำให้ใช้ในการผลิตวิตามินบีสิบสองในระดับอุตสาหกรรม

Species of microorganism or microbiological process	**Main component of culture medium**	**Conditions of fermentation**	**Vitamin B_{12} production (mg/l)**
Propionibacterium freudenreichii	Glucose	Anaerobiosis, 5,6-dimethyl benzimidazole	206.0
Rhodopseudomonas protamicus	Glucose	5,6-dimethyl benzimidazole	135.0
Propionibacterium shermanii	Glucose	5,6-dimethyl benzimidazole Aerobiosis, betaine	60.0
Pseudomonas denitrificans	Sucrose	Aerobiosis	60.0
Nocardia rugosa	Glucose	Aerobiosis	18.0
Rhizobium cobalaminogenum	Sucrose	5,6-dimethyl benzimidazole	16.5
Micromonospora sp.	Glucose	5,6-dimethyl benzimidazole Aerobiosis	11.5
Streptomyces olivaceus	Glucose	Anaerobiosis	6.0
Nocardia gardneri	Hexadecane	5,6-dimethyl benzimidazole	4.5
Butyribacterium methylotrophicum	Methanol	5,6-dimethyl benzimidazole	3.6

ที่มา: Martens *et al.* (2002)

2.4 ความต้องการวิตามินบีสิบสอง

จากการศึกษาของ Herbert (1987) ซึ่งได้แสดงปริมาณวิตามินบีสิบสองที่แนะนำให้บริโภคในแต่ละวัน (Recommended dietary intake; RDI) ไว้ดังตาราง 9

ตาราง 9 ปริมาณวิตามินบีสิบสองที่แนะนำให้บริโภคในแต่ละวัน

Category	Age	RDI (µg)
Infants	0 – 2.9 month	0.3
	3 – 5.9 month	0.4
	6 – 11.9 month	0.5
Children	1 – 1.9 yr	0.7
	2 – 5.9 yr	1.0
	6 – 9.9 yr	1.5
Males & Females	-	2
Pregnant	0 – 2.9 month	+0
	3 – 5.9 month	+0.5
	6 – 9.0 month	+0.5
Lactating	0 – 5.0 month	+0.5
	6+ month	+0.5

ที่มา: Herbert (1987)

2.5 การขาดวิตามินบีสิบสอง (นันทฤทธิ์, 2550; เสาวนีย์, 2542)

ในมนุษย์และสัตว์ การขาดวิตามินบีสิบสอง หรือการได้รับวิตามินบีสิบสองไม่เพียงพอกับความต้องการ มีผลทำให้

1. เกิดโรคโลหิตจางชนิดร้ายแรงที่เรียกว่า pernicious anemia เนื่องจากการขาดปัจจัยภายในน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร ทำให้มีอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหารเหนื่อยง่าย ความจำเสื่อม อารมณ์เปลี่ยนแปลง ทำให้ทำสมาธิได้ยาก มีอาการมึนงง เดินไม่ถนัดเจ็บจี๊ด ๆ ตามผิวหนัง และเสียความสมดุลของร่างกาย

2. เกิดความผิดปกติในการสร้างปุ่มรับรสชาติของลิ้น ทำให้เกิดความรู้สึกว่าลิ้นเรียบลื่นผิดปกติไป

3. เกิดความผิดปกติในการทำงานของลำไส้เล็ก บางเวลามีอาการท้องผูกหรือท้องร่วง ทำให้มีผลต่อการดูดซึมสารอาหารของลำไส้เล็ก

4. ทำให้ไขกระดูกไม่สามารถผลิตเม็ดเลือดแดงให้เจริญเต็มที่ได้ ไม่ถูกแบ่งตัว และมีขนาดใหญ่ เรียกว่า เมกกะโลบลาสท์ (megaloblast) ส่งผลต่อความสามารถในการทำงานของฮีโมโกลบิน และนำไปสู่โรคโลหิตจางชนิดเพอร์นิเซียส

5. การขาดวิตามินบีสิบสองอย่างรุนแรงมีผลทำให้เส้นใยประสาทของกระดูกสันหลังส่วนสั่งการและส่วนรับความรู้สึกเสื่อมสภาพ เกิดเป็นเหน็บชาที่ปลายนิ้วมือนิ้วเท้า หรือหมดความรู้สึกไป หากไม่ได้รับการรักษาอาจเกิดภาวะอัมพาตตามมา

2.6 การศึกษาผลิตวิตามินบีสิบสองจากจุลินทรีย์ในถั่วเหลืองหมัก

การผลิตวิตามินบีสิบสองมักพบในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต เช่น *Propionibacterium, Pseudomonas, Clostridium* และ *Streptomyces* ซึ่งส่วนใหญ่สิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตจะไม่สามารถผลิตวิตามินบีสิบสองเองได้ (Rhodes and Flecher, 1966) ยกเว้นเชื้อราบางชนิด เช่น *Aspergillus niger* (Nicholas, 1952)

Liem *et al.* (1977) ได้ศึกษาการหมักเทมเป้ (Tempeh) โดยใช้เชื้อรา พบว่าเชื้อราที่ใช้ในการหมักเทมเป้ไม่สามารถผลิตวิตามินบีสิบสองได้ แต่พบว่าแบคทีเรียที่ติดมากับเชื้อราจากเทมเป้สามารถผลิตวิตามินบีสิบสองได้ในระหว่างการหมัก และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบริสุทธิ์ลงในถั่วเหลือง ตรวจพบว่ามีวิตามินบีสิบสองสูงสุดถึง 148 ng/g ถั่วเหลือง

Tangjitjaroenkun *et al.* (2003) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่โดดเด่นในการหมักถั่วเน่า แต่พบว่ามีการสร้างวิตามินบีสิบสองในปริมาณน้อย ซึ่งสอดคล้องกับ Liem *et al.* (1977) ซึ่งได้กล่าวว่า แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ส่วนใหญ่จะไม่สามารถสร้างวิตามินบีสิบสองได้ จึงได้ทำการใช้เชื้อ *Klebsiella* sp. KB2 ที่สามารถสร้างวิตามินบีสิบสองได้ในปริมาณสูง ร่วมกับเชื้อ *Bacillus* sp. B4 ซึ่งเป็นเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดี อีกทั้งปรับปรุงกลิ่นของถั่วเน่าให้มีกลิ่นหอมขึ้นโดยใช้เชื้อ *Candida* sp. KB1 ซึ่งจากการหมักถั่วเน่าโดยใช้เชื้อ 3 ชนิดพร้อมกัน พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. B4 และ *Klebsiella* sp. KB2 จะช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ และปริมาณวิตามินบีสิบสองของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นถึง 91.43 µg/100 g dry weight โดยเชื้อ *Candida* sp. KB1 ช่วยลดกลิ่นฉุนแอมโมเนียได้โดยไม่ไปรบกวนการสร้างวิตามินบีสิบสองในระหว่างการหมักถั่วเน่า

3. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)

แบคเทอริโอซิน คือ สารจำพวกโปรตีนที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ซึ่งค้นพบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมลบ คือ โคไลซิน (colicine) จากเชื้อ *E. coli* (Chen and Hoover, 2003)

แบคเทอริโอซินมีข้อดีในการใช้เพื่อควบคุมคุณภาพอาหารและป้องกันโรคระบาดวิทยาของอาหารเป็นพิษ ซึ่งมีกิจกรรมในการยับยั้งทั้งแบคทีเรียเชื้อโรคที่สำคัญ เช่น *Clostridium botulinum*, *B. cereus* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น และแบคทีเรียเน่าเสียได้ โดยแบคเทอริโอซินที่มีความปลอดภัยและได้รับการยอมรับในการพาณิชย์มากกว่า 50 ประเทศ คือ ไนซิน (nisin) ซึ่งได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium* spp. ทำให้วงการอุตสาหกรรมอาหารมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยถึงแบคเทอริโอซินตัวใหม่ๆ ในสถานะของสารเติมแต่งในอาหาร ใช้ในเชิงพาณิชย์ต่อไป (สาโรจน์, 2547) นอกจากนี้แบคเทอริโอซินมีความแตกต่างกับสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ซึ่งสรุปในตาราง 10 และพบว่ามีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยเฉพาะ (Cleveland *et al.*, 2001)

ตาราง 10 ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ

Characteristic	**Bacteriocins**	**Antibiotics**
Application	Food	Clinical
Synthesis	Ribosomal	Secondary metabolite
Activity	Narrow spectrum	Varying spectrum
Host cell immunity	Yes	No
Mechanism of target cell resistance or tolerance	Usually adaptation affecting cell membrane composition	Usually a genetically transferable determinant affecting different sites depending the mode of action
Interaction requirements		Specific target
Mode of action	Sometimes docking molecules	Cell membrane or intracellular targets
Toxicity/side effects	Mostly pore formation, but in a few cases possibly cell wall biosynthesis	Yes
	None known	

ที่มา: Cleveland *et al.* (2001)

3.1 แหล่งที่มาของแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาและรายงานถึงแบคเทอริโอซินที่มีแหล่งที่มาจากจุลินทรีย์พบว่าส่วนใหญ่มาจากแบคทีเรียในกลุ่มแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) เช่น แบคทีเรียในจีนัส *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* และ *Pediococcus* เป็นต้น ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตแบคเทอริโอซิน (Deegan *et al.*, 2006) ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแบคที-ริโอซินที่แยกได้จากอาหารแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ตัวอย่างของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากอาหาร

Strain	Source	Active against
Streptococcus sp. CNCM I-841	Commercial probiotic product	*Clostridium* sp., *Listeria monocytogenes*
Lactoacillus. delbrueckii	Bulgarian yellow cheese	*Listeria. monocytogenes*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*,
Enterococcus mundtii	Vegetables	*Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*
Lac. lactis subsp. *cremoris* R	Radish	*Listeria monocytogenes*, *C. botulinum*
Lac. plantarum UG1	Dry sausage	*Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, and *Leuconostoc* spp.
Lac. lactis DPC3147	Irish kefir grain	*L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *C. perfringens*, *C. sporogenes*
Lac. lactis (NisA)	Dry fermented sausage	*Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Leuconostoc* spp.
Lac. plantarum SA6	Fermented sausage	*L. monocytogenes* *Lactobacillus* spp.
Lac. lactis subsp. *lactis* (Nis)	Sauerkraut	*L. monocytogenes*

ที่มา: Cleveland *et al.* (2001)

3.2 การจำแนกหมวดหมู่ของแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาของ Klaenhammer (1993) และ Nes *et al.* (1996) ได้ทำการจัดหมวดหมู่ของแบคเทอริโอซินออกเป็น 3 กลุ่ม ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 การจัดหมวดหมู่ของแบคเทอริโอซินของ Klaenhammer (1993) และ Nes *et al.* (1996)

Class	Type	Feature	Bacteriocins	Producer
I		Lantibiotics, small (< 5 kDa) containing lanthionine and β-methyl lanthionine		
	Ia	- Flexible molecules comp to Ib	nisin	*Lactococcus lactis*
			epidermin	*S. epidermidis*
			lacticin 481	*L. lactis*
	Ib	- Globular peptides with no net charge or net negative charge	mersacidin	*Bacillus subtilis*
			ancovenin	*Streptomyces* ssp.
II	IIa	Small heat-stable peptides, synthesis in form of precursor which is processed after two glycine residues	pediocin PA-1/AcH	*Pediococcus acidilactici*
			sakacin A and P	*L. sake*
			enterocin A	*Ent. faecium*
	IIb	Two component systems: two different peptides required to form an active poration complex	lactococcin G and M	*L. lactis*
			plantaricin A, S, EF, JK	*L. plantarum*
	IIc		acidocin B	*L. acidophilus*
			enterocin P and B	*Ent. faecium*
III		Large molecules sensitive to heat	helveticin J	*L. heleveticus*

ที่มา: Cleveland *et al.* (2001); Chen and Hoover (2003)

3.3 การศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus*

แม้ว่าแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะได้มาจากแบคทีเรียในกลุ่มแลคติก แต่ก็มีการศึกษาสารต้านแบคทีเรีย หรือแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ตัวอย่างเช่น

Pinchuk *et al.* (2001) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* 3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่ก่อให้เกิดแผลเรื้อรังในกระเพาะอาหาร (chronic gastritis) และโรคเยื่อบุกระเพาะอาหารอักเสบ (peptic ulcer disease) รวมถึงโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารในคน (gastric cancer) นอกจากนี้ยังพบว่า supernatant ที่ได้จากเชื้อ *B. subtilis* 3 ไม่มีความสัมพันธ์กับค่า pH และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง และไม่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โปรติเอส (protease) เมื่อทำการจัดจำแนกสารปฏิชีวนะดังกล่าวพบว่าเป็นสารอะมิคูมาซินเอ (amicoumacin A)

Aslim (2002) ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบ โดยใช้เชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 40 ไอโซเลต ที่แยกได้จากดิน พบว่าเชื้อ *B. thuringiensis* D1, D3 และ *B. megaterium* Y6 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้ทั้งหมด ซึ่งได้แก่ เชื้อ *E. coli, S. aureus, Yersinia enterocolitica* และ *Micrococcus flavus* ได้ และต่อมา Yilmaz *et al.* (2006) ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 29 ไอโซเลตจากดิน และทดสอบการยับยั้งเชื้อทดสอบพบว่า agar well diffusion พบว่าเชื้อ *B. cereus* M15 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบที่เป็นกรัมบวกได้ดีกว่ากรัมลบ

Kim *et al.* (2004) พบว่าเชื้อ *B. licheniformis* B65-1 ที่แยกได้จาก chungkookjang ซึ่งเป็นถั่วเหลืองหมักพื้นบ้านของประเทศเกาหลี มีประสิทธิภาพในการยั้งยั้งแบคทีเรีย และยีสต์ เช่น เชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Candida albicans* ได้ดี

Phister *et al.* (2004) ได้ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากโพซอล (pozol) ซึ่งเป็นอาหารหมักที่ผลิตจากแป้งข้าวโพดของชนพื้นเมืองทางตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศแมกซิโก พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. CS 93 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. CS 93 ได้แก่ สารอิทูริน (iturin) สารแบคซิไลซิน (bacilysin) และสารคลอโรเทเทน (chlorotetaine)

Santong *et al.* (2008) ได้ทำการแยกเชื้อในกลุ่มของ *Bacillus* ที่สามารถทนอุณหภูมิสูงจากน้ำนมดิบ พบว่าเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion เชื้อสายพันธุ์ BA8 และ BA16 สามารถสร้างวงใสต่อเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ได้

Motta and Brandelli (2008) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. P34 พบว่าอุณหภูมิและ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน โดยมีค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.0 -8.0 และอุณหภูมิในช่วง 25-37°C และพบว่าเชื้อมีการผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีโปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบ

Shih *et al.* (2008) ได้ใช้เทคนิค Response surface methodology (RSM) ในการหาปัจจัยการผลิตที่เหมาะสมในการผลิต iturin A จากเชื้อ *B. subtilis* S3 ในการหมักด้วยอาหารแข็ง พบว่าปัจจัยด้านการผลิต iturin A ที่เหมาะสมและสามารถเพิ่มการผลิตได้อีก 23% จากเดิม เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 วัน และใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท

4. จุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหารของคนที่สำคัญบางชนิด

4.1 *Bacillus cereus*

แบคทีเรีย *B. cereus* จัดเป็นแบคทีเรียชนิด facultative anaerobe คือเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียทั่วๆ ไป เจริญที่อุณหภูมิประมาณ 8 - 55°C แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 28 - 35°C ไม่ทนกรด โดยค่า pH ต่ำสุดอยู่ที่ 5.0 - 6.0 และค่า a_w ต่ำสุดประมาณ 0.95 สร้างสปอร์ตรงกลางเซลล์ ทำให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แพร่กระจายทั่วไปในธรรมชาติสามารถแยกได้จาก ดิน น้ำ ผัก และธัญพืช ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีลักษณะ 2 แบบซึ่งเกิดจากเอนเทอโรทอกซินที่เชื้อสร้างขึ้น คือ

4.1.1 อาการท้องร่วง (diarrheal syndrome) อาการที่เกิดขึ้นคือ ปวดท้อง ถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ และปวดแสบอันเนื่องมาจากการถ่ายเบ่ง ส่วนอาการคลื่นไส้อาเจียนมักจะไม่เกิดขึ้น

4.1.2 อาการอาเจียน (emetic syndrome) มีอาการคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* แต่ระยะการเกิดอาการสั้นกว่าคือภายใน 1-5 ชั่วโมง มีอาการคลื่นไส้อาเจียน อาการดังกล่าวเป็นอยู่ 6-24 ชั่วโมง (Ouoba *et al.*, 2008)

เนื่องจาก *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ สปอร์จึงสามารถแพร่กระจายไปในอากาศ ฝุ่นละออง จึงพบบ่อยในอาหารต่างๆ แม้ในอาหารแห้งที่มีค่า a_w ต่ำ เช่น แป้ง และธัญพืช (สุมณฑา, 2549)

4.2 *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น จึงพบบ่อยในอุจจาระของคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้จึงใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร (index of fecal contamination) ในปี ค.ศ. 1982 ได้มีการจัดจำแนก *E. coli* ออกเป็นทั้งหมด 5 กลุ่มตามความรุนแรงของการเกิดโรค ลักษณะนิสัยการเจริญเติบโต และลักษณะทางพันธุกรรมดังนี้

4.2.1 กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร (Enteropathogenic *E. coli* หรือ EPEC)

4.2.2 กลุ่มที่ทำลายระบบเซลล์ในทางเดินอาหาร (Enteroinvasive *E. coli* หรือ EIEC)

4.2.3 กลุ่มที่สร้างสารพิษในทางเดินอาหาร (Enterotoxigenic *E. coli* หรือ ETEC)

4.2.4 กลุ่มที่ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร (Enterohemorrhagic *E. coli* หรือ EHEC)

4.2.5 กลุ่มที่ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์บุผนังลำไส้ (Enteroaggregative *E. coli* หรือ EAggEC)

E. coli สายพันธุ์ EPEC, EIEC และ ETEC จะแพร่กระจายอยู่ในน้ำและอาหาร และเกือบทุกชนิดปนเปื้อนมาจากอุจจาระ ที่น่ากลัวที่สุดคือเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ EHEC โดยเฉพาะ *E. coli* O157:H7 ซึ่งสามารถสร้างสารพิษที่มีสมบัติคล้ายสารพิษของชิเกลลา (Shiga-like toxins) และสารพิษประเภทเวอโรทอกซินหรือเวอโรไซโตทอกซิน (verotoxin, verocytotoxin) ได้ *E. coli* O157:H7 ไวต่อกรดโดยเฉพาะกรดน้ำส้มหรือกรดแลคติก นอกจากนี้ยังไม่ทนต่อสภาวะที่มีเกลือแกงสูง และไม่ทนต่อความร้อนเหมือน *E. coli* สายพันธุ์อื่น (สุมณฑา, 2549)

4.3 *Staphylococcus aureus*

เชื้อ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะกลม (cocci) อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวกองุ่น สามารถสร้างสารพิษที่ขับออกมานอกเซลล์ เรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxins) ได้แก่ สารพิษที่ชักนำให้เกิดการหลั่งของเหลวขึ้นภายในลำไส้หรือทางเดินอาหาร เป็นผลทำให้เกิดอาการท้องเดิน เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ปรับตัวตามเจ้าบ้าน (host-adapted organism) อาศัยอยู่ในมนุษย์และสัตว์อื่นๆ มีอุณหภูมิในการเจริญอยู่ระหว่าง 7 - 47.8 °C ช่วงอุณหภูมิที่สร้างเอนเทอโรทอกซินอยู่ระหว่าง 10 - 46 °C สามารถเจริญได้ในช่วง pH ที่กว้างตั้งแต่ 4.0 - 9.8 แต่เหมาะสมที่ 6 - 7 ค่า a_w ต่ำสุดของ *S. aureus* อยู่ที่ 0.86 ซึ่งเป็นที่ยอมรับและนำมาใช้อ้างอิงในการประเมินความเสี่ยง

อาการโรคอาหารเป็นพิษจาก *S. aureus* มักเกิดประมาณ 4 ชั่วโมงภายหลังการบริโภคอาหารเข้าไป มีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย เหงื่อแตก ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย บางครั้งมีไข้ด้วย โดยปริมาณเอนเทอโรทอกซินต่ำที่สุดที่จะทำให้เกิดอาการของโรคเป็นพิษอยู่ที่ 20 ng (สุมณฑา, 2549) นอกจากนี้ *S. aureus* ยังเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีนัยสำคัญกับการก่อโรคในมนุษย์มากที่สุดในกลุ่มของ Staphylococci สามารถก่อโรคได้ตั้งแต่อาการติดเชื้อทางผิวหนังและอาจรุนแรงไปจนถึงการเสียชีวิตได้ (Sandel and McKillip, 2004)

5. การทำแห้ง (drying)

การทำแห้ง (drying) หมายถึง การใช้ความร้อนภายใต้สภาวะควบคุมเพื่อกำจัดน้ำส่วนใหญ่ที่อยู่ในอาหารโดยการระเหยน้ำ หรือระเหิดของแข็ง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ ยืดอายุการเก็บรักษาอาหารโดยการลดค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ (water activity, a_w) ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อลดน้ำหนักอาหาร ทำให้สะดวกในการบรรจุ เก็บรักษาและขนส่ง (ปิยรัตน์, 2551) นอกจากนี้ อิ่มเอิบ (2549) ได้ให้ความหมายของการทำแห้งไว้ว่า การทำแห้งเป็นการทำให้ปริมาณน้ำอิสระในเนื้อถูกกำจัดออกไป ส่วนน้ำที่เหลืออยู่ภายหลังจากการทำแห้งจะเป็นน้ำที่ถูกตรึงซึ่งเป็นน้ำส่วนที่อยู่ในโครงสร้างหรือองค์ประกอบของสารอาหารในเนื้อสัตว์ โดยจุลินทรีย์ไม่สามารถนำน้ำส่วนนี้มาใช้ประโยชน์ได้จึงเป็นการช่วยให้เกิดการเสื่อมเสียช้าลง ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา

การทำแห้งมีหลายวิธี เช่น ใช้กระแสลมร้อนสัมผัสกับอาหาร เช่น ตู้อบแสงอาทิตย์ ตู้อบลมร้อน (Hot-air dryer) ใช้การพ่นอาหารที่เป็นของเหลวไปในลมร้อน เช่น เครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) ให้อาหารข้นสัมผัสผิวหน้าของลูกกลิ้งร้อน เช่น เครื่องอบแห้งแบบลูกกลิ้ง (Drum dryer หรือ Roller dryer) กำจัดความชื้นในอาหารในสภาพที่ทำน้ำให้เป็นน้ำแข็งแล้วกลายเป็นไอในห้องสุญญากาศ ซึ่งเป็นการทำให้อาหารแห้งแบบเยือกแข็ง โดยเครื่องอบแห้งเยือกแข็ง (Freeze dryer) และลดความชื้นในอาหารโดยใช้ไมโครเวฟ (Microwave) เป็นต้น (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่ม 19, 2540)

5.1 ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ (water activity, a_w)

ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ (a_w) หรือ ค่าความชื้นสัมพัทธ์สมดุล คือ อัตราส่วนระหว่างความดันไอของน้ำในอาหารต่อความดันไออิ่มตัวของน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิเดียวกัน ซึ่งค่า a_w มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เอนไซม์ และจุลินทรีย์ในอาหาร และเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อคุณภาพและการเน่าเสียของอาหาร (ปิยรัตน์, 2551) ค่า a_w กับการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 ค่า a_w กับการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร

Range of a_w	Microorganisms Generally Inhibited by Lowest aw in This Range	Foods Generally within This Range
1.00 – 0.95	*Pseudomonas, Escherichia, Proteus, Shigells, Klebsiella, Bacillus, Clostridium perfringens,* some yeasts	Highly perishable (fresh) foods and canned fruits, vegetables, meat, fish, and milk
0.95 – 0.91	*Salmonella, Vibrio parahaemolyticus, C. botulinum, Serratia, Lactobacillus, Pediococcus,* some molds, yeasts (*Rhodotorula, Pichia*)	Some cheeses (Cheddar, Swiss, Muenster, Provolone), cured meat (ham)
0.91 – 0.87	Many yeasts (*Candida, Torulopsis, Hansenula), Micrococcus*	Fermented sausage (salami), sponge cakes, dry cheeses, margarine
0.87 – 0.80	Most molds (mycotoxigenic penicillia), *Staphyloccocus aureus,* most *Saccharomyces* (bailii) spp., *Debaryomyces*	Fruit juice concentrates, sweetened condensed milk, syrups
0.80 – 0.75	Most halophilic bacteria, mycotoxigenic aspergilla	Jam, marmalade
0.75 – 0.65	Xerophilic molds (*Aspergillus chevalieri, A. candidus, Wallemia sebi*), *Saccharomyces bisporus*	Jelly, molasses, raw cane sugar, some dried fruits, nuts
0.65 – 0.60	Osmophilic yeasts (*Saccharomyces rouxii*), few molds (*Aspergillus echinulatus, Monascus bisporus*)	Dried fruits containing 15-20% moisture; some toffees and caramels; honey
<0.60	No microbial proliferation	

ที่มา: Beuchat (1983)

5.2 ปัจจัยที่มีต่อการทำแห้ง (พิชญา และคณะ, 2547)

1. ลักษณะธรรมชาติของอาหาร ซึ่งอาหารที่มีรูพรุนมากๆ จะมีอัตราการอบแห้งที่เร็ว เนื่องจากน้ำสามารถเคลื่อนที่ออกไปภายนอกได้ง่าย และอาหารที่มีพื้นที่ผิวมาก ก็จะช่วยในการระเหยน้ำในวัสดุได้มากขึ้นด้วย

2. รูปร่างและความหนาของอาหาร ปริมาณของอาหารที่นำมาอบแห้ง โดยอาหารที่มีความหนามากอัตราการอบแห้งจะช้ากว่าอาหารที่มีลักษณะบางกว่า

3. ปัจจัยอื่น เช่น ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และความเร็วลม ความดันซึ่งเกี่ยวเนื่องกับการระเหยของน้ำ

5.3 ตัวอย่างชนิดของการทำแห้ง

5.3.1 การทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์ (sun drying)

วิธีการทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์ (sun drying) เป็นการใช้พลังงานความร้อนจากแสงอาทิตย์ เป็นวิธีที่เก่าแก่ที่สุดและใช้กันมาเป็นเวลานาน แต่ผลิตภัณฑ์แห้งที่ได้มักมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สูง และอาจมีความชื้นเหลืออยู่สูงมาก ถ้าเก็บไว้นานอาจจะเสียได้ง่าย ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีคุณภาพต่ำเนื่องจากไม่สามารถควบคุมอัตราเร็วในการทำแห้งได้ อาจทำให้อาหารแห้งไม่ต่อเนื่อง เป็นผลทำให้อาหารเน่าเสียระหว่างรอการตากแดดครั้งต่อไป การตากแดดยังทำให้สูญเสียคุณค่าทางอาหารมาก จึงต้องควบคุม ปัจจัยที่มีผลต่อการทำแห้งเป็นอย่างดี เช่น ขนาดชิ้นอาหาร เวลาในการทำแห้ง อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมและฤดูกาล เป็นต้น (อิ่มเอิบ, 2549) แต่ยังคงเป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลายในประเทศที่กำลังพัฒนาและมีแสงแดดเพียงพอ เพราะต้นทุนต่ำ ทำได้ง่ายโดยไม่มีเทคนิคและหลักวิชาการเข้าไปเกี่ยวข้อง

5.3.2 การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบใช้ลมร้อน (hot air dryer)

วิธีการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบใช้ลมร้อน (hot air drying) ใช้หลักการการถ่ายโอนความร้อนแบบการพา (convection heat transfer) ของอากาศร้อนไปสู่อาหารและทำให้อาหารมีอุณหภูมิสูงขึ้น (ปิยรัตน์, 2551) โดยการใช้อุปกรณ์ช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์แห้งตามต้องการและมีความชื้นสม่ำเสมอ ผลิตภัณฑ์ที่ตากแห้งโดยวิธีนี้จะมีความสะอาดและลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์ การทำแห้งด้วยลมร้อนที่นิยมใช้กับ เนื้อสัตว์ คือ การใช้ตู้อบลมร้อน (hot air oven) และตู้อบแบบอุโมงค์ (carbinet dryer) โดยการตากผลิตภัณฑ์ในตู้ขนาดใหญ่ซึ่งมีลมร้อนเป่าผ่าน จึงสามารถระเหยน้ำออกไปกับลมร้อนและปล่อยออกทางช่องระบายลมภายในตู้อบโดยใช้อุณหภูมิในการอบประมาณ 50 - 70°C (อิ่มเอิบ, 2549)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

5.3.3 การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ (solar dryer)

เครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ (ภาพ 11) พัฒนามาจากเครื่องอบแห้งแบบตู้โดยใช้แสงแดดเป็นพลังงานความร้อนให้กับเครื่องอบเพื่อให้มีความเหมาะสมกับประเทศไทย ทำให้ไม่เสียต้นทุนด้านพลังงาน เครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์โดยทั่วไปประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ เครื่องอบแห้งและตัวรับรังสีดวงอาทิตย์ ตัวรับสีทำหน้าที่เปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์ให้เป็นความร้อนเพื่อนำมาใช้อุ่นอาหารก่อนที่จะไหลเข้าห้องอบแห้ง ซึ่งความร้อนนี้จะไปกระทบกับอาหารทำให้น้ำในอาหารระเหยออกมา และผ่านออกไปทางช่องระบายอากาศของตู้อบ หรือโรงอบ มีผลทำให้อาหารแห้ง ส่วนมากตู้อบแสงอาทิตย์นี้จะใช้กับพวกผัก ผลไม้ และธัญพืช ข้อดีสำหรับการใช้ตู้อบที่ใช้ความร้อนจากแสงอาทิตย์ คือ

1. ได้ผลิตภัณฑ์สีสวย และสม่ำเสมอ
2. สะอาดเพราะสามารถควบคุมไม่ให้ฝุ่นละอองหรือแมลงเข้าไปได้
3. ใช้เวลาน้อยกว่าการตากแดดตามธรรมชาติ ประหยัดเวลาในการตากได้ประมาณ 1/3
4. ประหยัดพื้นที่ในการตาก เพราะในตู้อบสามารถวางถาดที่จะใส่ผลผลิตได้หลายถาดหรือหลายชั้น
5. ประหยัดแรงงาน เพราะไม่ต้องเก็บอาหารที่กำลังตากเข้าที่ร่มในตอนเย็น และเอาออกตากในตอนเช้าเหมือนสมัยก่อน ซึ่งมีผลทำให้ต้นทุนในการผลิตอาหารแห้งลดลง (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่ม 19, 2540)

ภาพ 11 เครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ที่พัฒนาขึ้นโดย พิชญา และคณะ (2547)