

สำนักหอสมุดและวิชาเทคโนโลยีสารสนเทศ (บง)



การเกิดสารนิพนธ์ออนไลน์สำหรับนักศึกษาชั้นระหว่างกระบวนการหมักชีว



นางสาวนัตติยา ทิพย์สุวรรณ
นางสาวจิรัญญา วนะสิทธิ์
นางสาวนิรมล ดวงใจ

ม.ท.
บ ๒12ก

612581577

เลขหมู่.....	๑๐๑๕
เลขทะเบียน.....	
วัน,เดือน,ปี.....	

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2535 ✓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Persistence of aflatoxin During the fermentation of Soy Sauce



**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Bachelor of Science**

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1992

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Persistence of aflatoxin During the
Fermentation of Soy Sauce

Name Khattiya Thipsuwan
Jiranya Wanasith
Niramol Duangjai

Special Project Advisor Dr. Dusanee Thanaboripat
Archarn Orathai Sukchareon

Department Applied Biology

Academic Year 1992

Abstract

Aflatoxin production and its persistence during soy sauce fermentation were studied under 5 conditions, that is, natural fermentation (C_1), fermentation with *A. oryzae* (C_2), fermentation with *A. oryzae* and addition of aflatoxin B_1 (C_3), fermentation with *A. oryzae* and *A. flavus* (C_4), and fermentation with *A. flavus* (C_5). The results showed that during koji process, aflatoxin production was increased in conditions C_1 , C_4 and C_5 but in condition C_3 aflatoxin was decreased from 2200 ppb to 237 ppb. It could be explained that *A. oryzae* was able to reduce aflatoxin level during soy sauce fermentation. Conditions C_1 , C_3 , C_4 and C_5 showed the gradual decrease of aflatoxin during moromi process after 6 weeks of fermentation.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์อย่างยิ่ง จาก รศ.ดร.ตฤณี ธนะบริพัทธ์ อาจารย์อรไท สุขเจริญ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา และชี้แนวทางที่เป็นประโยชน์ นอกจากนี้คณะผู้จัดทำยังได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ได้ให้คำแนะนำในการปฏิบัติการทดลอง รวมถึงพี่ ๆ ห้องธุรการและห้องสารเคมีที่ได้ช่วยเหลือในด้านการติดต่อต่าง ๆ เป็นอย่างดี

ท้ายสุดนี้ คณะผู้จัดทำขอขอบคุณคุณโยธิน พรหมดี และคุณสมชาย สันต์วรารถ ซึ่งเป็นพี่และเพื่อนที่แสนดี ให้ความสะดวกในการใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ และช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้จนกระทั่งสำเร็จ รวมถึงเพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ มาตลอด และที่จะขาดเสียไม่ได้ คือ บุญคุณของบิดามารดา ที่ได้ให้กำเนิดเราขึ้นมา และสนับสนุนในการทำโครงการพิเศษมาตลอด

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1	1
บทนำ	1
- วัดสุทัศน์	2
- ขอบเขตการทดลอง	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	4
ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	4
- ประวัติแอฟฟลาทอกซิน	4
- ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอฟฟลาทอกซิน	9
- แอฟฟลาทอกซินในถั่วเหลือง	13
- ซีอีวี	15
- การผลิตซีอีวี	16
- กระบวนการหมักเพื่อผลิตซีอีวี	17
- จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักซีอีวี	26
- ส่วนประกอบทางเคมีของซีอีวี	31

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 3	
ขั้นตอนการทำงาน อุปกรณ์ และวิธีการ	33
- เชื้อจุลินทรีย์	33
- อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษ	33
- การทดลอง	38
บทที่ 4	
ผลการทดลองและวิจารณ์	51
บทที่ 5	
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	63
ภาคผนวก ก	65
ภาคผนวก ข	67
ภาคผนวก ค	73
เอกสารอ้างอิง	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	แสดงคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของแอฟฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ	7
4-1	แสดงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ตรวจพบในชั้นตอนโคจิ	54
4-2	แสดงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน บีหนึ่ง ที่ตรวจพบในชั้นตอนโมโรมิ	55
4-3	แสดงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน จีหนึ่ง ที่ตรวจพบในชั้นตอนโมโรมิ	56
4-4	แสดงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน บีหนึ่ง+จีหนึ่ง ที่ตรวจพบในชั้นตอนโมโรมิ	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2-1 โครงสร้างของแอฟฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ	8
2-2 แอฟฟลาทอกซิน บีหนึ่ง ที่เกิดจากการใช้กรดแอซติก (C ¹⁴ acetic acid) และกรดอะมิโนเมทไทโอนีน (C ¹⁴ methionine)	12
2-3 กระบวนการผลิตซีอิ๊วหมักในประเทศไทย	29
3-1 กรวยแยก	35
3-2 เครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศ	35
3-3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำให้แอฟฟลาทอกซินบริสุทธิ์ (ซ้าย) teflon membrane filter (ขวา) Sep pak silica gel cartridge column chromatography	36
3-4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ Thin Layer chromatography	36
3-5 Sinter glass No.4	37
3-6 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์	37
3-7 การเตรียมกล้ำเชื้อ	39

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
3-9	43
3-10	43
3-11	44
3-12	47
3-13	50
4-1	59
4-2	60
4-3	61

บทที่ 1

บทนำ

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ทำให้เกิดผลกระทบต่อสวัสดิภาพของผู้บริโภค ตลอดจนถึงมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจการส่งออกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร นอกจากผลเสียที่ได้รับจากตัวจุลินทรีย์โดยตรงแล้ว ยังมีจุลินทรีย์บางประเภทที่สามารถสร้างสารพิษที่มีอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ หนึ่งในสารพิษที่เป็นที่รู้จักและมีอันตรายต่อผู้บริโภคมากที่สุดชนิดหนึ่ง คือ สารพิษแอฟลาทอกซิน

สารพิษแอฟลาทอกซิน เป็นสารพิษที่สร้างโดยเชื้อราพวก *Aspergillus* โดยเฉพาะ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* แอฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่ไม่ละลายน้ำและทนความร้อนได้สูงถึง 260°C มีผลทำให้เกิดมะเร็งต่อสัตว์และมนุษย์ ทำให้เกิดอาการได้ ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ซึ่งจะทำให้เกิดการตายของเซลล์ในตับเป็นส่วนใหญ่ และยังมีผลทำให้เกิดมะเร็งในปอดอีกด้วย

จากการศึกษาปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินในอาหารต่าง ๆ ในประเทศไทย อาหารที่พบว่ามียปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินมากที่สุดคือ ถั่วลิสง รองลงมา คือ อาหารประเภทธัญพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วเขียว และอาหารที่มีกรรมวิธีในการผลิตที่จะต้องผ่านการตากแห้ง เช่น กุ้งแห้ง พริกแห้ง เป็นต้น ซึ่งจากการศึกษานี้ อาหารพวกธัญพืชอย่างหนึ่งที่มีการปนเปื้อนของเชื้อราคือ ถั่วเหลือง

ผลิตภัณฑ์จากการแปรรูปของถั่วเหลืองในอุตสาหกรรมอาหารหมักที่เป็นที่นิยมและรู้จักกันดีในแถบเอเชียก็คือ การทำซีอิ๊ว สาหร่ายถั่วของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วก็คือ *A. oryzae* และถึงแม้ว่าเชื้อ *A. oryzae* ที่ใช้นี้จะเป็นสาหร่ายที่ไม่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซินก็ตาม แต่ก็เป็นการยากที่จะแยกเชื้อ *A. oryzae* นี้ออกจากอาหารที่มีการปนเปื้อนของ *A. flavus* หรือ *A. parasiticus* อยู่ได้ ดังนั้นการศึกษาถึงการ

ปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* ในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมการทำซีอิ๊วจึงเกิดขึ้น
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยและเผยแพร่ข้อมูลด้านวิชาการ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักซีอิ๊ว โดยเชื้อ *A. flavus* และสภาวะต่าง ๆ ของการหมักซีอิ๊ว ในการยับยั้งหรือทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินจากเชื้อราดังกล่าว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วเหลือง
2. ศึกษาถึงการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง และปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้น
3. ศึกษาถึงการยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน โดยเชื้อรา *A. oryzae* 3048 ซึ่งใช้ในกระบวนการผลิตซีอิ๊วในอุตสาหกรรม และการยับยั้ง หรือการทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซิน เนื่องจากสภาวะต่าง ๆ ในกระบวนการหมักซีอิ๊ว
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพความเข้มข้นของน้ำเกลือที่เติมลงไปในการผลิตซีอิ๊ว (10% และ 20%) ว่ามีผลต่อการเกิดแอฟฟลาทอกซินหรือไม่
5. เพื่อศึกษาสภาวะต่างๆ ในการผลิตซีอิ๊วว่ามีผลต่อการเกิดแอฟฟลาทอกซินหรือไม่ อย่างไร

ขอบเขตของการทดลอง

1. สามารถทราบว่า เชื้อรา *A. oryzae* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วนั้น มีผลทำให้ *A. flavus* สร้างแอฟฟลาทอกซินได้น้อยลง
2. สามารถทราบได้ว่า สภาวะต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักซีอิ๊ว สามารถลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อรา *A. flavus* ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นการแนะแนวทางในการใช้เชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ใช้ในกระบวนการหมักของผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน

2. เพื่อเป็นการชี้แนะให้เห็นถึงอันตรายจากสารพิษแอฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมัก

3. เป็นการสนับสนุนการใช้เทคโนโลยีทางด้านชีววิทยา ให้เผยแพร่กว้างขวางยิ่งขึ้น



ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

ประวัติแอฟฟลาทอกซิน

เชื้อราสามารถเข้ากัดกร่อนอาหาร แล้วทำให้อาหารสูญเสียคุณค่าไป เชื้อราทำลายอาหารในแต่ละปีทั่วโลกคิดเป็นมูลค่าแล้วเกือบพันล้านบาท เนื่องจากตัวเชื้อราเองสามารถผลิตสารพิษ ซึ่งมีผลให้เกิดโรคร้ายไข้เจ็บในมนุษย์ได้ มนุษย์ได้เริ่มสนใจโทษของเชื้อรามานานเป็นเวลากว่า 20-30 ปี สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) คือสารที่เกิดขึ้นระหว่างการเผาผลาญอาหารในเชื้อรา แล้วมีโทษต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์ ชนิดของสารพิษจากเชื้อราก็มีหลายชนิด แล้วยังมีคุณสมบัติแตกต่างกันด้วย ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

สารพิษของเชื้อราตัวที่มีการศึกษาค้นคว้ามากที่สุด ได้แก่ แอฟฟลาทอกซิน ทั้งนี้ เป็นเพราะว่าแอฟฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลัน (acute toxicity) และยังทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenicity) ที่ตับได้อีกด้วย ในปี ค.ศ. 1960 ได้เกิดโรคระบาดชนิดใหม่ขึ้นในไก่งวง ซึ่งไม่ทราบสาเหตุของโรคว่าเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใด จึงได้ตั้งชื่อโรคใหม่นี้ว่า "Turkey X disease" (Blount, 1961) ภายหลังจากนั้นไม่นาน ได้มีรายงานโรคระบาดชนิดเดียวกันนี้เกิดขึ้นกับเป็ดและไก่ฟ้าในประเทศอังกฤษ และในระยะเวลาต่อมา ก็มีผู้รายงานโรคระบาดชนิดนี้เกิดขึ้นกับเป็ดในประเทศเคนยาและซูดาน (Asplin และ Carnaghan, 1961) จากการศึกษาค้นคว้าถึงสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคนี้ในประเทศอังกฤษ พบว่าโรค "Turkey X disease" นี้เกี่ยวข้องกับถั่วลิสงซึ่งซื้อมาจากประเทศบราซิลเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์พวกนี้ ภายหลังจากการนำเอาถั่วลิสงเหล่านี้มาเลี้ยงกับเป็ดทดลองแล้วปรากฏว่า เกิดอาการเป็นพิษเช่นเดียวกันกับเป็ดและไก่งวงในระยะที่มีโรคระบาด กล่าวคือ มีอาการซึม เบื่ออาหาร

เอกสารนี้เป็น ปกติกรที่คัดลอกไว้ ขาอ่อน เหนียว และตายในที่สุด ต่อมาในปีเดียวกันนั้นเอง Sargeant คำนึงว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคณะ (1961 a) ได้ทำการสกัด แยก และทำให้ สารพิษบริสุทธิ์ จากถั่วลิสงเหล่านั้น ที่นำมาจากประเทศบราซิล ขณะเดียวกันนี้ Austwick และ Ayerst (1963) ได้ทำการ ตรวจถั่วลิสงเหล่านี้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วพบว่า เนื้อของถั่วลิสงเหล่านี้มีเชื้อราขึ้นอยู่ เป็นจำนวนมาก แต่เชื้อราพวกนี้ได้ตายหมดแล้ว อย่างไรก็ตาม Sargeant และคณะ (1961 b) สามารถแยกเชื้อราหลายชนิดที่ยังมีชีวิตที่ยังมีชีวิตอยู่ จากเนื้อของถั่วลิสงที่เป็น พิษจากประเทศยูกันดา เชื้อราชนิดหนึ่งชื่อ *Aspergillus flavus* Link สามารถ สร้างสารพิษได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนวุ้น สารพิษที่ถูกสร้างขึ้นจาก เชื้อราตัวนี้บนวุ้นเป็นชนิด เดียวกันกับที่พบจากส่วนสกัดของถั่วลิสงที่เป็นพิษ ดังนั้นสารพิษที่ได้จาก เชื้อราตัวนี้จึงเรียก ว่า แอฟฟลาทอกซินตามชื่อของเชื้อราที่สร้าง นับจากพบสารพิษตัวนี้เป็นสาเหตุให้เกิด โรคมะเร็งเป็นต้นมา นักจุลชีววิทยาและแม่บ้านทั่วโลกต่าง เริ่มระมัดระวังการปนเปื้อน จากเชื้อราในอาหาร (ธีระยุทธ และ ชัยวัฒน์, 2524)

ปี 2507 สถาบันป้องกันและควบคุมสาธารณสุขแห่งชาติของญี่ปุ่นแผนกจุลชีววิทยา อาหารได้รวบรวมเชื้อ และสาเกทั่วประเทศ ที่ใช้หัวเชื้อในการหมักได้ 131 ชนิด และ ได้ใช้อาหารที่อังกฤษและอเมริกา รายงานไว้ว่า มีแอฟฟลาทอกซินหลายชนิดมาทำการ ทดลองหาปริมาณสารพิษในอาหารแต่ละชนิด จากการทดลองและเปรียบเทียบ พบว่า *A. flavus* จากอังกฤษและอเมริกานั้นผลิตสารพิษได้ แต่อาหารในญี่ปุ่นที่ใช้หัวเชื้อนั้น ผลิตสารพิษได้น้อยหรือไม่ผลิตเลย ดังนั้นคิดว่า การใช้หัวเชื้อในอังกฤษและอเมริกานั้น แตกต่างกับประเทศญี่ปุ่น

แอฟฟลาทอกซิน เป็นกลุ่มของสารเคมีฟวกบิล - ฟิวราโนคิวมาริน

(bisfuranocoumarin) และเป็น secondary metabolite ของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* แอฟฟลาทอกซินแบ่งเป็น 4 ชนิด ตามการเรืองแสงภายใต้ แสงอัลตราไวโอเลต และค่า R_f บนแผ่น thin layer chromatography คือ B_1 , B_2 , G_1 และ G_2 โดย B_1 และ B_2 จะเรืองแสงสีน้ำเงิน (blue fluorescence) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ส่วน G_1 และ G_2 จะเรืองแสงสีเขียวปนเหลือง

(yellowish green fluorescence) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งคุณลักษณะทาง เคมีของแอฟฟลาทอกซินแต่ละชนิดนั้นแตกต่างกันไป ซึ่งคุณลักษณะทาง เคมีที่ว่านี้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคมีและฟิสิกส์ของแอฟฟลาทอกซินเหล่านี้แสดงไว้ในตารางที่ 2-1 แอฟฟลาทอกซินที่กำลังศึกษาอยู่ขณะนี้ มี B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , B_{2a} , G_{2a} , M_1 , M_2 , GM_1 , GM_2 , M_{2a} , GM_{2a} , B_3 , P_1 , Q_1 , aflatoxicol และ dihydroaflatoxicol (R_0) (Vladimir Betina) แต่ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปมีเพียง B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 , M_2 , B_{2a} และ G_{2a} (ศุภกิจและคณะ, 2520)

จากสูตรโครงสร้างของแอฟฟลาทอกซินต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2-1 จะเห็นได้ว่าชนิด B_1 แตกต่างจาก B_2 ตรงที่มีพันธะคู่ (double bond) ที่วงแหวนที่หนึ่ง ส่วน B_1 และ G_1 แตกต่างกันตรงที่ B_1 ไม่มีกลุ่มแลคโตน (lactone group) ในวงแหวนที่ห้า การที่แอฟฟลาทอกซินมีสูตรโครงสร้างทางเคมีทางเคมีแตกต่างกัน ทำให้ความรุนแรงของการเกิดพิษแตกต่างกันไปด้วย กล่าวคือ การที่แอฟฟลาทอกซินมีพันธะคู่ในวงแหวนที่หนึ่ง และไม่มีกลุ่มแลคโตนที่วงแหวนที่ห้า จะทำให้เกิดการเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน และมีผลทำให้เกิดมะเร็งที่ตับเพิ่มขึ้น ความเป็นพิษของแอฟฟลาทอกซินจะเรียงตามความรุนแรงได้ดังนี้ คือ B_1 , G_1 , B_2 และ G_2 ตามลำดับ (ธีรยุทธ และ ชัยวัฒน์, 2524)

ตารางที่ 2-1 แสดงลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์ของแอฟฟลาทอกซินชนิดต่างๆ

แอฟฟลาทอกซิน สูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล จุดหลอมตัว การเรืองแสงภายใต้แสง UV
(ซ)

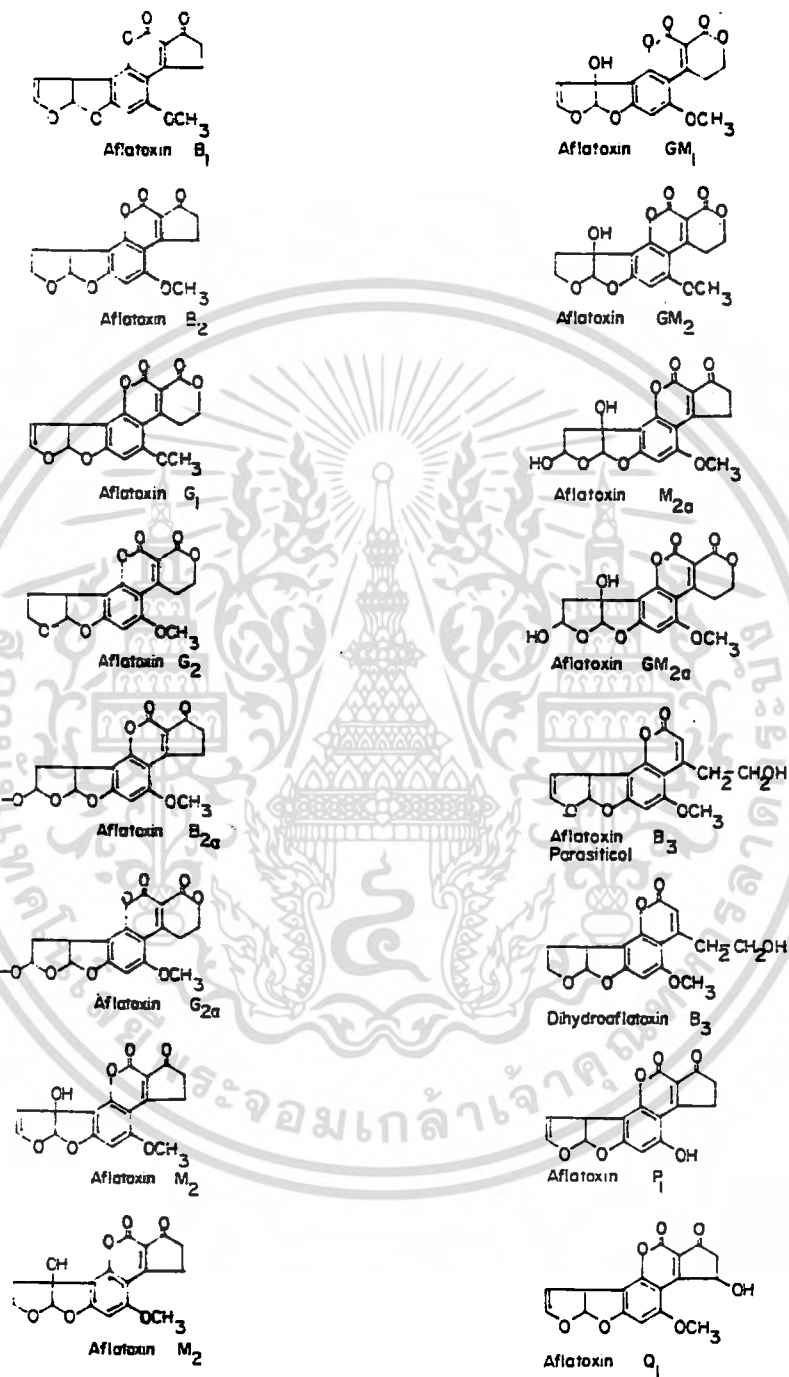
กลุ่ม ไดฟิวโรควิมาโรไซโคลเพนเทน :

B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	267	สีน้ำเงิน
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	303-306	สีน้ำเงิน
B _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	240	สีน้ำเงิน
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	สีน้ำเงิน
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	สีน้ำเงิน
M _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	248	สีเหลือง
R ₀	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	I, 224-226 II, 233	สีน้ำเงิน

กลุ่ม ไดฟิวโรควิมาโรแลคโตน :

G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	257-259	สีเหลือง
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	สีเหลือง
G _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	190	สีเหลือง
GM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₈	344	276	สีเหลือง
GM ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346	270-272	สีเหลือง
GM _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₉	362	195	สีเหลือง
B ₃	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302	217	สีน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอฟฟลาทอกซิน

ปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแอฟฟลาทอกซินมีอยู่หลายอย่างด้วยกัน คือชนิดของเชื้อรา ชนิดของอาหาร ความชื้นในอากาศ และอาหาร อุณหภูมิ ระยะเวลา และปริมาณออกซิเจนในอากาศเหล่านี้เป็นต้น

1. เชื้อรา *A. flavus*

เป็นเชื้อราที่สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ดีกว่าเชื้อราชนิดอื่น ๆ ถึงกระนั้นก็ตาม *A. flavus* บางสายพันธุ์ ก็ไม่สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้จะเห็นได้ว่าชนิดของเชื้อรา ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างแอฟฟลาทอกซิน ซึ่งอาจจะทำให้อาหารที่มีเชื้อราชนิดนี้ขึ้นอยู่อาจจะไม่มีแอฟฟลาทอกซินปะปนอยู่ก็ได้

2. ปริมาณออกซิเจนและความชื้น

ปริมาณออกซิเจนมีความสำคัญต่อการสร้างแอฟฟลาทอกซิน กล่าวคือ ถ้ามีปริมาณออกซิเจนในอาหารน้อยก็จะทำให้เชื้อราเจริญได้ช้า ความชื้นทั้งความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ และความชื้นภายในเมล็ดพืชเอง มีส่วนทำให้เชื้อราเจริญและสร้าง สารพิษมากขึ้น เพราะถ้าความชื้นสัมพัทธ์อากาศสูง จะเกิดการถ่ายเทความชื้นไปให้กับอาหารที่เชื้อราขึ้นอยู่ เป็นผลให้เชื้อราเจริญได้ดีและสร้างสารพิษได้มาก ขณะเดียวกันถ้ามีปริมาณความชื้นในอาหารและอากาศต่ำ ก็จะทำให้การสร้างแอฟฟลาทอกซินลดน้อยลงไปด้วย ดังนั้น การลดปริมาณความชื้นของอาหาร จึงอาจจะนำมาเป็นวิธีป้องกันการขึ้นปะปนของเชื้อราบนอาหารได้ด้วย

3. สาตอาหารชนิดต่าง ๆ

การนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารชนิดต่าง ๆ กันจะทำให้ปริมาณของแอฟฟลาทอกซินที่ถูกสร้างขึ้นแตกต่างกันออกไปด้วย ความแตกต่างในการสร้างแอฟฟลาทอกซินจากเชื้อราชนิดเดียวกันบนอาหารพวกเมล็ดพืช หรืออาหารสังเคราะห์ (semi-synthetic medium) อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากสาตอาหารที่มีอยู่ในอาหารเหล่านั้นแตกต่างกันออกไปได้

3.1 แหล่งอาหารคาร์บอน

การเพิ่มอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน สัมพันธ์กับการสร้าง แอพฟลาทอกซิน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตจนถึงระดับหนึ่ง ทำให้สร้างสารพิษได้เพิ่มขึ้น Shih และ Marth (1974) ได้เลี้ยง *A. parasiticus* ในสารอาหาร พบว่าแอพฟลาทอกซินถูกสร้างสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 30% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1% แต่เชื้อรามีน้ำหนักแห้งของใยราสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10% สำหรับธาตุอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่เชื้อรานั้น ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรักโทส ซาโลส และโรโบส เป็นต้น แต่พบว่าซูโครสจะช่วยทำให้เชื้อราสร้างแอพฟลาทอกซินได้ดีที่สุด

3.2 แหล่งอาหารไนโตรเจน

อาจใช้ กรดอะมิโน แอสพาราจีน แอสปาเตต ไกลซีน กลูตามีน และ กลูตาเมต ซึ่งจะให้ปริมาณแอพฟลาทอกซินประมาณ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร (Purchase and Worster, 1968) Rassy และคณะ (1971) ได้รายงานว่าการเพิ่มกรดแอสพาทิก และแอสพาราจีน ในสารอาหารจะกระตุ้นให้เชื้อราสังเคราะห์ แอพฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น Davis และ Diener (1983) ได้อธิบายสาเหตุที่แอสปาเตต มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์แอพฟลาทอกซินมากที่สุดเพราะแอสปาเตตถูกใช้เป็นองค์ประกอบของ tricarboxylic acid (TCA) intermediate และเป็นตัวให้กรดแอสซิติค เพื่อสร้าง secondary metabolite

3.3 เกลือแร่

เกลือแร่ที่สำคัญที่ช่วยทำให้เชื้อราสร้างแอพฟลาทอกซินได้ดี คือ สังกะสี (Zn^{2+}) (Nesbitt et al, 1962) ถ้าขาดสังกะสี แอพฟลาทอกซินจะถูกสร้างน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากสังกะสีไปกระตุ้นเอนไซม์ ในกระบวนการ glycolysis และกระตุ้นให้สะสม adenosine mono phosphate (AMP) เพิ่มขึ้น ซึ่ง AMP อาจเป็นสาเหตุให้ระงับการสังเคราะห์ไขมัน แต่กลับสร้างแอพฟลาทอกซินแทน (Gupta และคณะ 1976; Davis and Diener, 1983)

3.4 ปฏิกริยาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกัน

บนอาหารทั่วไป มักมีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดขึ้นปะปนกัน และเชื้อเหล่านี้มีปฏิกริยาต่อกัน ซึ่งเป็นผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของ

A. flavus

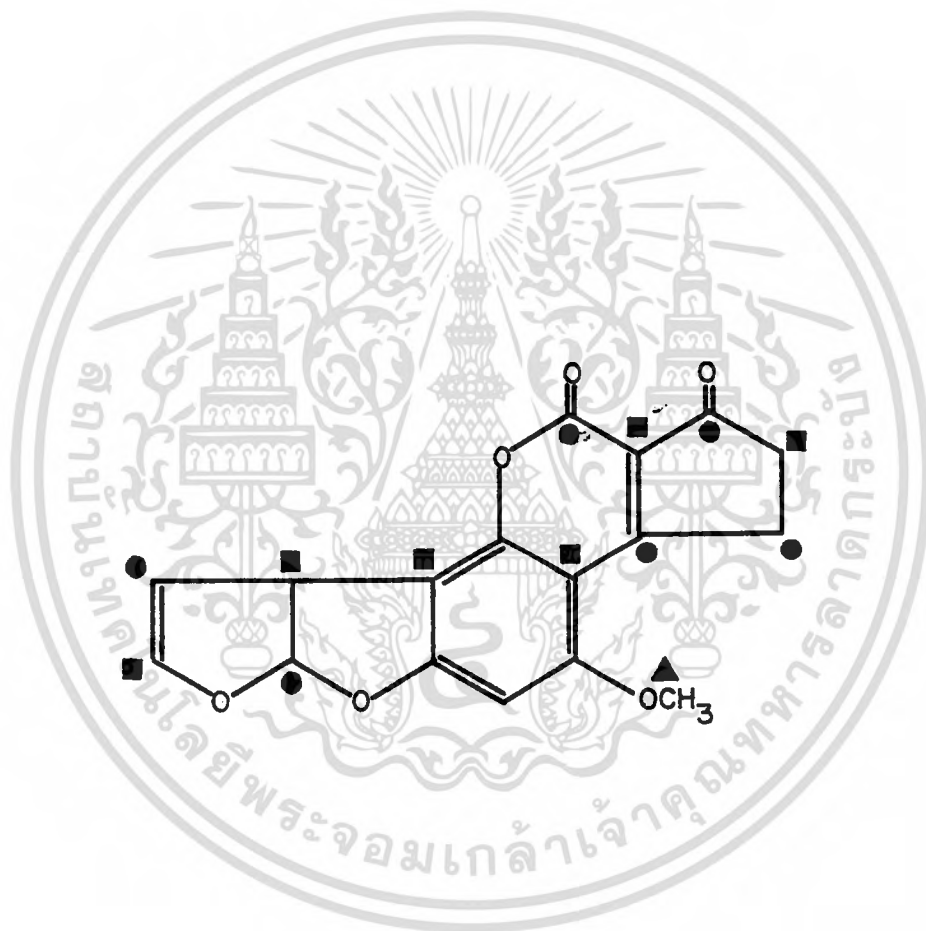
3.5 อุณหภูมิและระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อรา

เชื้อรา *A. flavus* สามารถเจริญเติบโตได้บ้างที่อุณหภูมิ 6-8 °C และ 44-46 °C สำหรับอุณหภูมิที่ทำให้การเจริญเติบโตดีที่สุดได้แก่ 36-38 °C

3.6 กระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินจากเชื้อรา

การศึกษาถึงกระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินจากเชื้อรานั้นได้กระทำในอาหารสังเคราะห์โดยใช้สารกัมมันตรังสีที่เป็นแหล่งอาหารชนิดต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อรา จากผลการทดลองพบสรุปได้ว่าธาตุอาหารที่มีโมเลกุลใหญ่ จะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิติก ซึ่งจะใช้เป็นสารเริ่มต้นที่จะให้คาร์บอนและออกซิเจนในโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซินเป็นส่วนใหญ่ นอกจากกรดอะมิติกแล้ว เมทไทโอนีนจะเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนของกลุ่มเมทิล (methyl group) ในโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซินอีกด้วย (Eldridge, 1964; Meteles และ Abye, 1965; Davis et al., 1968 a, b) ดังที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2-2

รูปที่ 2-2 แอฟฟลาทอกซิน บีชนิดหนึ่ง ที่เกิดจากการใช้กรดแอซติก (C^{14} -acetic acid) และ กรดอะมิโนเมทไทโอนีน (C^{14} -methionine) กับมันตรังสี เป็นสารเริ่มต้น ในอาหารสังเคราะห์ (semisynthetic medium) ชนิดเหลวที่ใช้เลี้ยง *A. flavus*



CH_3COOH = กรดแอซติก (acetic acid) (C^{14} = C และ C)

$CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$ = กรดอะมิโนเมทไทโอนีน (methionine) (C^{14} = C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอฟฟลาทอกซินในถั่วเหลือง

เป็นที่ทราบกันแล้วว่าแอฟฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่สร้างขึ้นโดย *A. flavus* และ *A. parasiticus* ซึ่งแอฟฟลาทอกซินที่สร้างโดย *A. flavus* นั้นมักพบในพืชเศรษฐกิจ พวกถั่วลิสง ฝ้าย ข้าวบาร์เลย์ มะพร้าว ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต และ มันฝรั่ง ดังนั้นในขณะที่ถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งอาหารที่มีประโยชน์มากต่อคนและสัตว์ เนื่องจากถั่วเหลืองมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ โปรตีนในปริมาณที่สูง แต่ก็มีคำถามขึ้นว่า เมล็ดถั่วเหลืองสามารถปนเปื้อนแอฟฟลาทอกซินได้หรือไม่ Shotwell และคณะ (1969) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ถั่วเหลือง 866 ตัวอย่าง ซึ่งสำรวจจากที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดในสหรัฐอเมริกา พบว่ามีการปนเปื้อนของแอฟฟลาทอกซินเพียง 0.8% ในขณะที่ 50% ของตัวอย่างมีเชื้อ *A. flavus* ปรากฏอยู่

Chaney และคณะ (1966) รายงานว่า ไม่สามารถตรวจพบสารแอฟฟลาทอกซินในถั่วเหลืองที่มีเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารพิษ

Davis and Diener (1970) รายงานว่ามีการผลิตสารพิษในถั่วลิสงโดยสายพันธุ์ Brasz ภายหลังจากบ่มไว้ 21 วัน ด้วยเชื้อ *A. parasiticus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (48-238 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

Nagarajan และคณะ (1973) ตรวจพบการผลิตสารพิษแอฟฟลาทอกซินขึ้นอยู่กับชนิดของถั่วเหลือง และสายพันธุ์ของเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus*

Gupta และ Venkatasubramanian (1975) ได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยที่ควบคุมการผลิตแอฟฟลาทอกซินในถั่วเหลือง โดยใช้เชื้อ *A. parasiticus* NRRL 3240 พบว่า การ autoclave ถั่วเหลือง 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที จะทำให้ปริมาณแอฟฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น ซึ่งได้ผลคล้ายคลึงกับการทดลองโดย Kratzer และคณะ (1959) ซึ่งอาจเนื่องจากการมีธาตุสังกะสีมากขึ้น และทำให้การเพิ่มธาตุสังกะสีในถั่วเหลืองที่ autoclave และไม่ autoclave ทำให้มีปริมาณแอฟฟลาทอกซินมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่ม phytic acid ที่ระดับสังกะสีคงที่ จะทำให้การสร้างแอฟฟลาทอกซินลดลง และการเติม phytic acid ใน synthetic medium ซึ่งเป็นอาหารที่

ทำให้มีการผลิตแอฟฟลาทอกซินในปริมาณสูง ก็ทำให้มีการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินลดลง
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำไปใช้
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถั่วเหลืองมี phytic acid เป็นองค์ประกอบ (Gopalah et al., 1971) phytic acid จะจับอยู่กับสังกะสี (O'Dell et al., 1960) และสังกะสีเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างแอนฟลาทอกซิน (David et al., 1969, Lee et al., 1966; Mateles and Abye, 1965) Mateles and Abye (1965) รายงานว่า เมื่อมีปริมาณธาตุสังกะสีลดลง จะทำให้ปริมาณสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้นลดลง ดังนั้น การที่ถั่วเหลืองมี phytic acid อยู่ปริมาณสูงซึ่งจับตัวกับสังกะสีไอออน (Zn^{2+}) ได้มาก จึงเป็นต้นเหตุหนึ่งที่ทำให้การสร้างแอนฟลาทอกซินจากเชื้อราบนถั่วเหลืองน้อยกว่าถั่วชนิดอื่น ๆ (ธีระยุทธ และชัยวัฒน์, 2524)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซีอิ้ว

ซีอิ้วเป็นอาหารที่ชาวจีนคิดค้นผลิตขึ้น เป็นเวลานานกว่า 3 พันปีมาแล้ว เริ่มต้นจากพระสงฆ์เป็นผู้ผลิต เนื่องจากถั่วเป็นอาหารที่เป็นแหล่งของโปรตีนและไขมัน ต่อจากนั้นจึงถูกเผยแพร่ไปทั่วประเทศ (ประมาณ 2 พันปีที่ผ่านมา) เช่น ญี่ปุ่น เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากเครื่องปรุงรสนับเป็นอาหารประจำวันที่จะขาดเสียมิได้

สำหรับประเทศไทย อุตสาหกรรมการผลิตซีอิ้วส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก และผลิตกันแบบครัวเรือน กรรมวิธีที่ใช้ก็เป็นการถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่งเท่านั้น โดยไม่มีการศึกษาปรับปรุงกระบวนการหมัก ปริมาณการผลิตในประเทศไทยในบิหนึ่ง ๆ ผลิตได้ 5,000 กิโลลิตร ในขณะที่ญี่ปุ่นผลิตได้ประมาณหนึ่งล้านกิโลลิตร โรงงานผลิตซีอิ้วในเมืองไทยมีประมาณ 50 แห่ง กระจายอยู่ในกรุงเทพฯ และจังหวัดใกล้เคียง เช่น ชลบุรี อุทัยธานี ในแต่ละโรงงานกำลังผลิตจะไม่เกิน 100 กิโลลิตรต่อปี ซีอิ้วที่ผลิตขึ้นในเมืองไทยส่วนมากจะใช้ภายในประเทศ แต่ก็มีส่งขายต่างประเทศ ตามสถิติของกระทรวงการคลังในปี 1979 ว่า ส่งซีอิ้วออก 15,894 กิโลกรัม โดยส่งไปยังประเทศพม่า ลาว ฮองกง อินเดีย ออสเตรเลีย อีรัก อิสราเอล ประเทศอาหรับ สำหรับประเทศตะวันตกที่ซื้อซีอิ้วจากไทยมี เดนมาร์ค เยอรมัน ฝรั่งเศส และสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยก็ยังมีซีอิ้วเข้าประเทศจากญี่ปุ่นและจีนในประมาณทั้งหมด 83,832 กิโลกรัม

การผลิตซีอิ้ว

การผลิตซีอิ้วสามารถผลิตได้โดยอาศัย 3 วิธีการดังนี้

1. กระบวนการหมัก

เป็นวิธีการที่ทำกันมาแต่ดั้งเดิม อาศัยการทำงานของเอนไซม์ซึ่งผลิตจากเชื้อราที่ใช้ในการหมัก วิธีการนี้เป็นที่นิยมทำกันมากที่สุด

2. กระบวนการทางเคมี

อาศัยการย่อยสลายวัตถุดิบ (ส่วนผสมของถั่วเหลืองกับข้าวสาลี) โดยใช้กรดเกลือที่มีความเข้มข้น 20% วิธีการนี้เป็นวิธีที่ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย แต่ซีอิ้วที่ได้จะมีกลิ่นรสและคุณค่าของอาหารต่ำกว่าที่ได้รับจากวิธีการหมัก

3. กระบวนการกึ่งทางเคมี

เป็นวิธีการที่นำเอาวิธีการหมักและวิธีการทางเคมีมาใช้ร่วมกัน ทั้งนี้โดยทำการย่อยสลายวัตถุดิบด้วยกรดเกลือ ความเข้มข้น 7-8% ก่อน จากนั้นจึงปรับพีเอชให้เป็นกลาง (ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์) แล้วจึงเติมโคจิลงไป เพื่อทำการย่อยสลายวัตถุดิบส่วนที่เหลือด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา (โคจิ) จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ในกลุ่มที่สามารถเจริญในสภาพที่มีเกลือสูงได้ (halophilic yeast) ลงไปด้วย ทำการหมักต่อไปอีกประมาณ 2-3 เดือน

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้กระบวนการผลิตจะมี 3 วิธีการ แต่กระบวนการหมักจะให้กลิ่นและรสชาติที่ดีที่สุด ดังนั้นในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะรายละเอียดของวิธีการหมักเท่านั้น

กระบวนการหมักเพื่อผลิตซีอิ๊ว

1. การเตรียมวัตถุดิบ

การทำซีอิ๊ว วัตถุดิบที่สำคัญที่สุดได้แก่ แหล่งโปรตีน (ถั่วเหลืองหรือถั่วเหลืองปราศจากไขมัน) แหล่งคาร์โบไฮเดรต (ข้าวสาลี หรือรำข้าวสาลี) เกลือ และน้ำ

- ถั่วเหลือง

กลิ่นหอมในซีอิ๊วนั้นได้มาจากการย่อยสลายถั่วเหลือง ผลผลิตถั่วเหลืองของโลกในปัจจุบันตกปีละ 43.5 ล้านตัน ประเทศที่ผลิตได้มากที่สุดคือ สหรัฐอเมริกา และจีนแผ่นดินใหญ่ (โดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์มากกว่า 90% ของประเทศที่ผลิต

1. โครงสร้างของถั่วเหลือง :

เมล็ดถั่วเหลืองจะใหญ่หรือเล็กขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ ซึ่งมีความแตกต่างกันมาก เช่น พันธุ์ป่า 100 เมล็ดจะหนักเพียง 2 กรัม พันธุ์ที่มีเมล็ดใหญ่ 100 เมล็ดจะหนักถึง 40 กรัม ตามธรรมดาที่ปลูกกันทั่ว ๆ ไป 100 เมล็ด จะหนัก 10-20 กรัม

2. ส่วนประกอบของถั่วเหลือง

2.1 โปรตีน

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่อุดมสมบูรณ์ที่สุดถ้าคิดเปรียบเทียบกับทางด้านน้ำหนักกับอาหารประเภทอื่น ๆ เช่น สูงกว่าเนื้อสัตว์ 2 เท่า สูงกว่าไข่ไก่และข้าวสาลี 4 เท่า สูงกว่าขนมปัง 5-6 เท่า สูงกว่านมวัว 12 เท่า

2.2 ไขมัน

ถั่วเหลืองไม่เพียงแต่จะมีโปรตีนสูง แต่ยังมีปริมาณน้ำมันสูง คือ ประมาณ 20% น้ำมันถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบหลักของแหล่งไขมัน ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานความร้อน กรดไขมันที่มีอยู่ก็ไม่มีการดัดไขมันอิสระ ในบรรดาน้ำมันพืชนับเป็นน้ำมันพืชที่มีคุณภาพดีที่สุดเมื่อเทียบปริมาณไขมันระหว่างถั่วเหลืองกับอาหารประเภทอื่น ๆ ได้ดังนี้ :

ถั่วเหลือง 20% ไข่ไก่ 11% นมวัว 3.5%

2.3 คาร์โบไฮเดรต

ถั่วเหลืองมีคาร์โบไฮเดรตอยู่ 25% ประกอบด้วย ซูโครส กาแลคแทน (galactan) แป้ง เป็นต้น ปริมาณแป้งมีน้อยมาก ดังนั้นจึงเป็นอาหารเหมาะสำหรับผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน

2.4 วิตามิน

ถั่วเหลืองมีวิตามินอยู่ในปริมาณมากกว่าวิตามินซี นอกนั้นล้วนแต่มีอยู่ในถั่วเหลือง เช่น วิตามินที่ละลายน้ำได้ คือ วิตามินบี และที่ละลายได้ในไขมันคือ วิตามินเอ ดี อี เค นอกจากนี้ยังมีวิตามิน B₆ (Pyridoxin) ในปริมาณมากอีกด้วย นอกจากวิตามินแล้วยังประกอบด้วย Biotin, Choline และ Inositol

2.5 แร่ธาตุ

ถั่วเหลืองประกอบด้วยแร่ธาตุประมาณ 5% เช่น โพแทสเซียม (45%), ฟอสฟอรัส (29%), แคลเซียม (9%), แมกนีเซียม (8%) และ เหล็ก เป็นต้น ปริมาณแคลเซียมในถั่วเหลืองมีมากกว่าในนมแข็ง 12 เท่า มากกว่าไข่ไก่ 5 เท่า และมากกว่าเนื้อวัว 26 เท่า

- ข้าวสาลี

กลิ่นและสีของซีอิ๊ว ขึ้นอยู่กับคุณภาพของข้าวสาลีเป็นหลัก และส่วนประกอบทางเคมีของข้าวสาลีขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์และสภาพแวดล้อมการปลูก เช่น ดิน ภูมิอากาศ เป็นต้น

ปริมาณแป้งในข้าวสาลีมีผลต่อซีอิ๊ว เนื่องจากข้าวสาลีมีปริมาณแป้งมาก เวลาคั่วจะทำให้หนองตัว และหลังจากบดแล้วทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา จะทำให้ไฮราเจริญเข้าไปได้ง่าย ปริมาณเอนไซม์ก็สูง ถ้าหากข้าวสาลีที่มีแป้งน้อย เวลาคั่วจะไม่หนองตัว หลังจากบดแล้วทำการเพาะเลี้ยงจะดูดซึมน้ำได้น้อยไฮราของเชื้อราเจริญได้ลำบากปริมาณเอนไซม์ก็ต่ำด้วย

- เกลือ

เกลือเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อร่างกายมนุษย์ เกลือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของซีอิ๊ว สามารถป้องกันการสุกเกินไปของวัตถุดิบ ป้องกันการเกิดการเสื่อมเสีย และเป็นแหล่งให้รสเค็ม

คุณสมบัติของเกลือ

ส่วนประกอบที่สำคัญของเกลือ คือ โซเดียมคลอไรด์ สำหรับโซเดียมคลอไรด์ที่บริสุทธิ์จะอยู่ในรูปผลึกหกเหลี่ยมไม่มีสี ใส แต่ในขณะที่ทำจะมีสีเกิดขึ้น เช่น สีขาว สีเทา โซเดียมคลอไรด์บริสุทธิ์ ณ 25°C จะมีความถ่วงจำเพาะ 2.161 แต่เกลือที่ใช้ในการทำซีอิ๊ว ควรมีความถ่วงจำเพาะ 2.1-2.3 จุดหลอมเหลว $800-803^{\circ}\text{C}$ การละลายของเกลือขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในน้ำ 100 มล. เกลือจะละลายได้ในระดับต่าง ๆ กัน ขณะอุณหภูมิเปลี่ยนแปลง

ข้อควรระวัง เนื่องจากการพัฒนาการทางด้านอุตสาหกรรมเคมีเจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้มีการขายเกลือที่เป็นของเสียจากโรงงานเคมีในราคาที่ถูก เช่น โรงงานผงชูรส จะใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ทำปฏิกิริยากับของเสียที่ได้ เพื่อตกตะกอนผงชูรสที่หลงเหลืออยู่หรือจากผลพลอยได้ของโรงงานผลิตปุ๋ย ซึ่งเกลือประเภทนี้ประกอบด้วยยูเรีย และแอมโมเนียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นผลเสียต่อการทำซีอิ๊ว

- น้ำ

ในซีอิ๊วจะมีน้ำเป็นส่วนประกอบถึง 60-70% ดังนั้นน้ำจึงมีผลต่อคุณภาพของซีอิ๊วมาก นอกจากนี้การเตรียมวัตถุดิบก็ต้องใช้น้ำล้างในปริมาณมาก ดังนั้นจึงควรระมัดระวังการใช้น้ำด้วย

น้ำที่ใช้ในการทำซีอิ๊วมีอยู่ 3 ประเภท คือ

1. น้ำที่ใช้กับการละลายเกลือ
2. น้ำที่ใช้แช่ตัวเหลือง
3. น้ำที่ใช้ทั่ว ๆ ไป

การเตรียมวัตถุดิบเพื่อหมักซีอิ๊วเป็นวิธีการเบื้องต้น และมีผลต่อขั้นตอนภายหลังจากด้วย ดังนั้นจะต้องระมัดระวังในการเตรียม การหมักซีอิ๊วนั้นวิธีการเตรียมวัตถุดิบดังต่อไปนี้

1. การคัดเลือกถั่วเหลืองและข้าวสาลี

ตามปกติในถั่วเหลืองจะประกอบด้วย หินทราย เศษเหล็กหรือเมล็ดหญ้าต่าง ๆ เป็นสิ่งปลอมปน สำหรับ หินทราย เศษเหล็ก ตะปู จะต้องกำจัดออกให้หมด ถ้าไม่เช่นนั้นจะมีผลต่อกระบวนการผลิตโดยเฉพาะเครื่องจักร เครื่องกรอง โดยเฉพาะในเมล็ดหญ้าบางชนิดมีสารเป็นพิษ ซึ่งมีผลต่อคุณภาพของซีอิ๊ว เมื่อสืบปีก่อน ผู้ปลูกได้กำหนดถั่วเหลืองที่จะเข้าประเทศว่าจะต้องมีเมล็ดหญ้าปนน้อยกว่า 0.07% ในโรงงานเล็ก ๆ ใช้กระดังที่สานห่าง ๆ เล็กน้อย แล้วใช้พัดลมเป่าเอาเศษทรายและเมล็ดหญ้าออก ต่อมาต้องใช้ตระแกรงขนาดรูต่าง ๆ แยกเศษดินและวัตถุที่มีขนาดใหญ่กว่าออก วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่ายที่สุด ในโรงงานขนาดใหญ่ใช้เครื่องหมุนรอบตัวเองซึ่งมีตะแกรงขนาดรูต่าง ๆ แยกเอาดินและเมล็ดหญ้าออก หรือใช้เครื่องสั่นสะเทือนในการคัดเลือก

2. การเตรียมถั่วเหลือง

2.1 การล้างและแช่ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจะต้องล้างด้วยน้ำ แล้วค่อยแช่ไว้ในน้ำ เพื่อให้ถั่วเหลืองพองตัว ถั่วเหลืองภายใต้สภาพแห้งไม่เหมาะที่จะนำมาหมัก เนื่องจากการล้างน้ำนั้นทำให้ผิวภายนอกเปียกเท่านั้น ส่วนด้านในนั้นยังแห้งเหมือนเดิม สมมติว่าใช้การเพิ่มความดันนิ่งถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการแช่ เวลาทำการหมัก เชื้อก็ยังคงขาดน้ำอยู่เช่นกัน ดังนั้นจะต้องแช่ถั่วเหลืองให้พองโดยมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นประมาณ 1 เท่าตัวของน้ำหนักเดิม จนกระทั่งเกิดการสมดุลระหว่างน้ำที่จะถูกดูดซึมเข้าไป จึงจะนำไปนึ่งได้ การแช่ และนึ่งถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์กันโดยตรง และจะมีผลต่อการกรองและคุณภาพซีอิ๊วด้วย ดังนั้น จะต้องระมัดระวังให้ดี

2.2 การนึ่งถั่วเหลือง

การนึ่งถั่วเหลืองมีความสำคัญกว่าการแช่หมัก การแช่ที่ดีและการนึ่งที่มีความเหมาะสมจะทำให้ได้ผลตามที่มุ่งหมาย แต่ว่า การให้ความร้อนสูงเกินไปจะทำให้ปริมาณไนโตรเจนถูกทำลาย

ถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งแล้ว ควรที่จะรีบทำการหมักทันทีในวันนั้น ถึงแม้วิธีทิ้งไว้ข้ามวันสามารถประหยัดเชื้อเพลิงได้ และความสุกของเมล็ดถั่วสม่ำเสมอตลอดจนสีก็เป็นสีเดียวกัน แต่ว่าเวลาทำหัวเชื้อแล้ว เชื้อจะเจริญเติบโตได้ไม่ทันพอ และขณะหมัก การย่อยสลายโปรตีนก็ไม่ดีพอ

3. การเตรียมข้าวสาลี

การเตรียมข้าวสาลีมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี คือ

1. ข้าวเสร็จไม่ละเอียด
2. ไม่เสร็จแล้วนึ่ง
3. ไม่อย่างเดียว

ตามปกติใช้วิธีที่ 1 เนื่องจากวิธีที่ 2 หลังนึ่งจะทำให้เนื้อมากขึ้น อยู่รวมกันเป็นชั้นหนา ทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หยุดชะงัก และวิธีที่ 3 ข้าวสาลีดิบจะมีสารเป็นพิษกับจุลินทรีย์มาก การปรับอุณหภูมิขณะทำหัวเชื้อก็ลำบาก ทำให้กลิ่นรสไม่ดี และชีวีที่ได้อาจจะบูด ดังนั้นในปัจจุบันนิยมใช้วิธีที่ 1

4. การเตรียมน้ำเกลือ

การเตรียมน้ำเกลือส่วนมากใช้น้ำเย็น ณ อุณหภูมิห้องมาละลายเกลือ อาจจะใช้ถังไม้หรือบ่อซีเมนต์ ถ้าจะใช้น้ำร้อนก็ให้ละลายในหม้อธรรมดาโดยเติมน้ำแล้วให้ความร้อน 60-100° ซ ค่อย ๆ เติมเกลือแล้วคนปรับให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

ประโยชน์ของการใช้น้ำร้อนเตรียมน้ำเกลือ

1. สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับเกลือหรือน้ำได้
2. ละลายเร็วกว่า
3. ทำให้ใสเร็ว

5. การเตรียมหัวเชื้อ

5.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักซีอิ๊วเป็นเชื้อรา ซึ่งเชื้อราที่เกี่ยวข้องในกระบวนการได้แก่

1. *A. glaucus* มีสีเขียวเมื่อยังอายุน้อย และเมื่ออายุมากจะมีสีเขียวแก่น้ำตาล เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 15-20°ซ สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยแป้งและโปรตีนได้ แต่ในปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังสามารถย่อยน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และ ไฟเบอร์ได้ ทำให้เกิดกรดอินทรีย์ต่าง ๆ และสี

2. *A. flavus* มีสีเขียวหรือสีเหลือง มีสปอร์ซึ่งในตอนแรกจะมีสีเหลืองแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลือง-เขียว

3. *A. niger* มีสีน้ำตาลดำเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37°ซ ชอบเจริญบนพื้นที่มีความชื้นสูง และบนร่างกายสัตว์ มีความสามารถผลิตอะไมเลส มอลเตส และอินเวอร์เทส และผลิตกรด oxalic, citric, glycolic, pyruvic และ gluconic ได้

4. *A. wentii* มีสีขาวในขณะอายุน้อย เมื่ออายุมากจะมีสีน้ำตาลเหลือง และสีกาแฟ จะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37°ซ สามารถผลิตอะไมเลส (saccharification), โปรติเอส และ liquification amylase ที่มีประสิทธิภาพสูงถ้าหากเพาะเลี้ยงบนมอลโตสจะได้ gluconic acid และ citric acid

5. *A. oryzae* พบในกระบวนการหมักในไวน์ และซีอิ๊ว ในการผลิตซีอิ๊วจะต้องใช้เชื้อราตัวนี้ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะ โปรติเอส และ saccharification amylase จะผลิตได้มากที่สุด และมีประสิทธิภาพ

สูงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในหัวเชื้อ ได้แก่

5.2.1 โปรติเอส มีอุณหภูมิที่เหมาะสม ที่ $35-45^{\circ}\text{C}$ และ
พีเอช 3.0-5.5

5.2.2 อะไมเลส มีอุณหภูมิที่เหมาะสม ที่ $30-60^{\circ}\text{C}$ และ
พีเอช 4.0-7.0

5.2.3 ไลเปส

5.2.4 ออกซิเตส

การเตรียมหัวเชื้อแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน คือ

1. ถั่วเหลืองนึ่ง แล้วปล่อยให้เย็นผสมกับข้าวสาลีที่คั่วและบดแล้ว การ
ปล่อยให้ถั่วเหลืองที่นึ่งแล้วเย็น มีประโยชน์ 2 อย่างคือ ทำให้อุณหภูมิลดลง และปล่อยให้
ให้น้ำระเหยออกไปบ้าง ข้าวสาลีที่ใช้เมื่อคั่วเสร็จจะต้องผ่านการบดอีกครั้งหนึ่ง ตามปกติ
อัตราส่วนระหว่างถั่วเหลืองกับข้าวสาลีใช้ 1:1

2. การผึ่งเชื้อ ปกติใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 40°C หัวเชื้อที่ใช้ทุกครั้งจะต้อง
เตรียมใหม่เสมอ

3. การผสม ใช้ถั่วเหลืองที่นึ่งแล้วผสมกับข้าวสาลีที่บด จะทำให้ลดความ
ชื้นในถั่วเหลืองนึ่งได้ และการผสมจะต้องผสมให้ทั่วถึง อย่าให้มีการจับตัวกันเป็นก้อน

4. การบรรจุถาด (starter) หลังจากผสมถั่วเหลืองนึ่งและข้าวสาลี
บดแล้วให้ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ผสมกับเชื้อในถาดที่ผ่านการอบด้วยไอน้ำและปล่อยให้เย็น
แล้วนำถาดนี้ไปวางไว้ในห้องเก็บ การกะปริมาณถั่วเหลืองนึ่ง ข้าวสาลีบดและเชื้อนั้น
เมื่อมีความชำนาญก็อาศัยสายตาเป็นเครื่องวัด ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพของเชื้อ ปริมาณ
ความชื้นในถั่วเหลืองนึ่ง ตลอดจนภูมิอากาศขณะปฏิบัติด้วย ขณะบรรจุถาดนั้นจะเกิดการปน
เปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังในขณะที่ปฏิบัติ

เมื่ออุณหภูมิห้องเก็บเพิ่มขึ้น แต่อุณหภูมิของ starter ไม่เพิ่ม ทั้งนี้
เพราะความชื้นภายในห้องสูงเกินไป หรือมีจุลินทรีย์อื่นปะปนเข้า ถ้าหากความชื้นของ
starter สูงเกินไป จะต้องมีการกลับวัตถุดิบในวันที่สองหลังการเตรียม starter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ภายในเท่านั้น ไม่สามารถเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหตุการณ์เช่นนี้จะ ต้องมีผู้ชำนาญคอยควบคุมอย่างใกล้ชิด ภาชนะนิยมใช้กันมาก ก็คือกระดิ่ง ที่ใช้ไม้ไผ่สานซึ่งมีข้อดีคือ ความร้อนและความชื้นระเหยได้ง่าย

การวางภาชนะโดยปกติวางเป็นชั้น ๆ บนชั้นวางของ สูงประมาณ 15 ชั้น มีถั่วเหลืองนึ่งและข้าวสาลีบด 2000 กก. ใช้กระดิ่งที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 ซม. สามารถบรรจุได้ 210 กระดิ่งในฤดูร้อน ถ้าฤดูหนาวบรรจุได้ประมาณ 170 กระดิ่ง

5. การกลับ starter ครั้งแรก ห้องที่เก็บภาชนะ starter ควรควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25-28°C และหลังจากเติมเชื้อเข้าไปแล้ว 8-9 ชม. สปอร์ก็จะเริ่มคุดน้ำและขยายพันธุ์ ซึ่งจะสังเกตได้จากอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้น ผู้ควบคุมจะต้องทำการเปลี่ยนชั้นของกระดิ่งเพื่อทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ หลังจากเติมเชื้อ 14 ชม. จะพบเส้นใยสีขาว อุณหภูมิประมาณ 29-30°C และการเจริญเติบโตขึ้น log phase ก็จะดำเนินการไปเรื่อย ๆ ซึ่งจะสังเกตได้จากอุณหภูมิสูงขึ้น มี CO₂ เกิดขึ้น หลังจากเติมเชื้อแล้ว 20 ชม. ปริมาณความชื้นจะค่อย ๆ ระเหยไป ซึ่งอุณหภูมิเฉลี่ยขณะนั้นประมาณ 36-38°C ให้กลับวัตถุดิบครั้งแรก ซึ่งมีประโยชน์ดังต่อไปนี้

1. ปรับอุณหภูมิ เนื่องจากขณะที่เชื้อราอยู่ในขั้น log phase นั้น อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงถึงประมาณ 40°C อุณหภูมิสูงจะมีประโยชน์ต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นเจริญเติบโต ซึ่งอาจทำลายเชื้อราที่มีอยู่ ดังนั้นจึงต้องกลับวัตถุดิบ เพื่อทำให้ปริมาณความร้อนและปริมาณ CO₂ ระเหยไปและยังเป็นการให้อากาศที่บริสุทธิ์แก่ starter ด้วย
2. ความแห้งของ starter ถ้าวัตถุดิบมีความชื้นมากเกินไป หรือ starter มีความชื้นสูง ซึ่งไม่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโต จึงจำเป็นต้องมีการกลับวัตถุดิบเพื่อลดความชื้น

3. การทำให้แตกกระจายขณะเตรียม starter ย่อมมีบางส่วนเกิดการจับกันเป็นก้อน ความชื้นภายในย่อมสูง เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ดี ดังนั้นการกลับครั้งแรกยังสามารถทำให้พวกที่จับกันเป็นก้อนแตกกระจายออกเป็นก้อนเล็ก ๆ

การกลับ starter นั้นอาศัยการเจริญเติบโตของเชื้อราเป็นหลัก มิได้ใช้เวลาและอุณหภูมิเป็นหลัก

6. การกลับ starter ครั้งที่สอง วัตถุประสงค์คล้ายกับครั้งแรก หลังจากกลับ starter ครั้งแรก แล้วอุณหภูมิจะสูงขึ้นเนื่องจากเกิดความร้อน ดังนั้นต้องระมัดระวังนับตั้งแต่นำกรด starter เข้าห้องเก็บจนถึงการกลับ starter ครั้งแรก จะต้องระมัดระวังอุณหภูมิภายในห้อง แต่จากการกลับ starter ครั้งแรกถึงครั้งที่สอง จะต้องระมัดระวังอุณหภูมิของ starter การกลับ starter ครั้งที่สองก็เช่นกันกับครั้งแรก คืออาศัยการเจริญเติบโตของเชื้อราเป็นหลัก โดยปกติทั่ว ๆ ไปจะกลับ starter ครั้งที่สอง หลังจากกลับครั้งแรกแล้ว 5-10 ชม.

7. หัวเชื้อสำเร็จ หลังการกลับ starter ครั้งที่สอง เชื้อราก็จะเริ่มสร้างสปอร์ดังนั้นไม่จำเป็นต้องกลับ starter อีก เพียงแต่ปรับอุณหภูมิห้องให้เท่ากับอุณหภูมิของหัวเชื้อ นับตั้งแต่เริ่มเตรียม starter จนถึงขั้นหัวเชื้อสำเร็จใช้เวลาประมาณ 4 วัน

8. ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของหัวเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของหัวเชื้อขึ้นอยู่กับโครงสร้างของห้องและเวลา

2. การหมัก

กระบวนการหมักซึ่งมีสองขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ ขั้นแรกเรียกว่า โคจิ (koji) และขั้นที่สองเรียก โมโรมิ (moromi) โคจินั้นเป็นขั้นตอนของการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราที่ใส่ลงไปในส่วนผสมของถั่วเหลือง ข้าวสาลีหรือข้าวเจ้า แล้วส่วนผสมทั้งหมดจะเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง หรือห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ช่วงระยะเวลาหนึ่ง เชื้อราจะมีการเจริญสร้างไฮฟา และสปอร์ ซึ่งในระยะนี้จะมีเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ผลิตออกมาย่อยวัตถุดิบพวกแป้ง โปรตีน ไขมัน เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส เป็นต้น เมื่อสิ้นสุดขั้นโคจิ ก็จะนำโคจินี้ไปใส่ลงในน้ำเกลือ แล้วทำการบ่มไว้ 6 - 12 เดือน ในประเทศที่มีอากาศเย็น ส่วนประเทศไทยนั้น มักจะบ่มตากแดดไว้เพียง 2-3 เดือนก็ใช้ได้ ในระหว่างขั้นตอนบ่มที่สองนี้ (moromi) จะมีจุลินทรีย์หลายชนิดเจริญในสภาพที่มีเกลือสูง จุลินทรีย์เหล่านี้มีทั้งยีสต์ แบคทีเรียจำพวกผลิตกรดแลกติก ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการทำให้เกิดรสและกลิ่นที่ดี เมื่อบ่มได้แล้วก็ทำการคูดน้ำชี้อ้อออก

(pasteurized) แล้วบรรจุขวดเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักซีอิ๊ว

ชนิดจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักซีอิ๊ว มีทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ โดยการพบอยู่ทั้งในชั้นโคจิ และโมโรมิ โดยแต่ละขั้นตอนการทำงานของจุลินทรีย์จะแตกต่างกันไป

จุลินทรีย์พบในชั้นโคจิ โคจิเป็นขั้นแรกของการหมักเพื่อผลิตซีอิ๊ว เมื่อผสมเชื้อราลงในถั่วเหลืองและข้าวสาลีที่ต้มแล้ว ก็จะทำการบ่มไว้เป็นขั้นตอนที่สำคัญ และเชื้อราที่เกี่ยวข้องจะเป็นกลุ่มที่อยู่ใน *A. flavus - oryzae* (*A. oryzae* หรือ *A. sojae*) บางครั้งก็พบ *Rhizopus nigricans* ซึ่งจะปะปนมา และยังมี *Monilia* sp., *Penicillium* sp. โดยมีบทบาทต่อคุณภาพของซีอิ๊ว

สำหรับในเมืองไทย การผลิตซีอิ๊วยังไม่ได้ใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ เชื้อราส่วนใหญ่เชื้อที่ปะปนมาจะมี *Rhizopus* sp., *Mucor* spp., *Absidia* spp. และ *Syncephalastrum* sp. กนิษฐา (2522) ได้ทำการแยกเชื้อราจากซีอิ๊ว และรายงานพบ *A. flavus* และ *phycomycetes* ประมาณ 175 ไอโซเลท และ *A. oryzae* เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ ทั้งอะไมเลส และโปรติเอสได้สูง เอนไซม์หลายชนิดพบในชั้นโคจิ คือ อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส อินเวอร์เทส ไลเปส เอนไซม์อะไมเลสจะย่อยแป้งได้ไคแท็กคาไรด์ และโมโนแซ็กคาไรด์ อินเวอร์เทสไฮโดรไลซ์ซูโครสที่มีอยู่ในถั่วให้เป็นกลูโคส และฟรักโทส นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสจะทำหน้าที่ ย่อยโปรตีนในถั่วให้เป็นกรดอะมิโน และเปปไทด์ ชนิดของโปรติเอสที่สำคัญคือ neutral และ alkaline protease

ส่วนแบคทีเรียที่พบในโคจิ มักจะพบพวก *Bacillus* sp. และจะเจริญในช่วงโคจิและรูปสปอร์อยู่ในช่วงหมักน้ำเกลือ แบคทีเรียมักจะปะปนมากับวัตถุดิบ และที่พบเสมอ คือ *B. subtilis* เข้าใจว่าแบคทีเรียมักจะไม่แสดงบทบาทมากมายในชั้นโคจิ นอกจากนี้เชื้ออื่นที่พบได้แก่ *B. pumilus*, *Micrococcus conglomeratus*, *M. rubens* และ *M. candidus* ซึ่งเชื้อเหล่านี้อาจจะทำให้เกิดสารประกอบที่ทำให้ซีอิ๊วมึกลิ่นไม่ดี ตรงข้าม *B. subtilis* ที่แยกได้จากโคจิแล้วนำมาเติมลงในชั้นโมโรมิ

เอกสารนี้เป็น จะทำให้ได้ซีอิ๊วที่กลิ่นรสดี การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ที่พบมีหลายชนิดด้วยกันคือ *Saccharomyces rouxii*, *S. fermentati*, *S. rosei*, *Hansenula anomala*, *H. suaveolens*, *Debaryomyces hansenii*, *D. nicotianae*, *Torulopsis candida*, *T. saka*, *Pichia polymorpha* และ *Candida pelliculosa* ซึ่งยีสต์ที่พบในซีอิ๊วไทย คือ *Trichosporon spp.*, *Candida spp.*, *Endomycopsis spp.*, *Pichia spp.* และ *Rhodotorula spp.*

จุลินทรีย์ที่พบในช่วงหมักโมโรมิ การหมักซีอิ๊วขั้นที่สอง คือการหมักในน้ำเกลือ โดยเติมน้ำเกลือลงไปโคจิ ซึ่งทำให้เชื้อราที่เป็นพวก vegetative เกิดการสลายตัว แต่สปอร์ของเชื้อรายังคงอยู่ ซึ่งสปอร์ที่พบเสมอคือ *A. oryzae*, *A. sojae*, *Monilia sp.*, *Penicillium sp.* และ *Rhizopus sp.*

ส่วนแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่เป็นพวกทนต่อเกลือได้สูง คือ พวก homofermentative tetrad forming cocci เช่น *Sarcina hamaguchiae* หรือ *Tetracoccus soyae* นอกจากนี้ยังพบ *Pedococcus acidilactici* var. *soya*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus faecalis*, *Micrococcus epilermidis*, *Pedococcus halophilus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus epilermidis*, *Pedococcus halophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii*

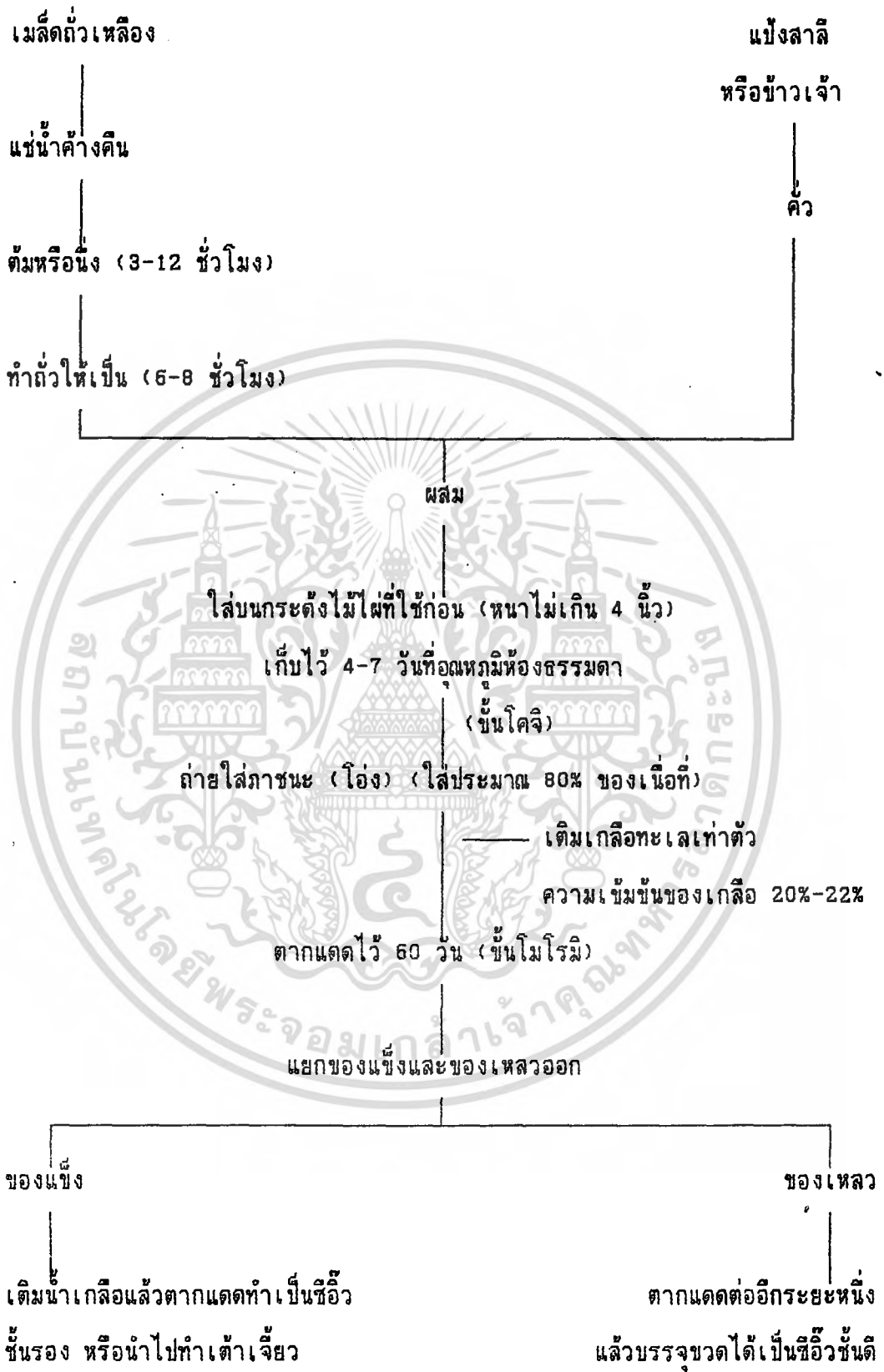
กิจกรรมของแบคทีเรีย มีความสำคัญต่อการหมักซีอิ๊ว โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก จะผลิตกรดแลคติก ทำให้ซีอิ๊วมีพีเอชลดลงจาก 6-7 ไปเป็น 4.5-5.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของยีสต์ในซีอิ๊ว ที่จะผลิตแอลกอฮอล์หลายชนิด และมีผลทำให้ซีอิ๊วมีกลิ่น รสดี จุลินทรีย์ *Pedococcus soyae* ที่ผลิตแลกติกและแยกได้จาก ซีอิ๊ว เป็นเชื้อที่มีคุณลักษณะสำคัญในการให้กลิ่น รส และความกลมกล่อมแก่ซีอิ๊ว ทำให้กลิ่น คล้ายยาที่เกิดจากเชื้อราลดลง การเจริญของเชื้อนี้ทำให้พีเอชลดต่ำกว่า 5.0 ช่วยป้องกันการเน่าเสียอันเนื่องมาจากแบคทีเรียรูปท่อนที่ทนต่อเกลือ และพีเอชของน้ำหมักในช่วงพีเอช 4.0-5.0 นี้เหมาะกับการเจริญของยีสต์ เป็นตัวการสำคัญให้กลิ่นแก่ซีอิ๊ว ดังนั้นกิจกรรมของยีสต์จึงเกิดหลังจากกิจกรรมของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก ถ้าขาด *Pedococcus soyae* จะทำให้การเจริญของยีสต์ และการหมักไม่สมบูรณ์ ส่วนเชื้อ *Micrococcus arease* และ *Micrococcus caseolyticus* ที่แยกได้จากน้ำหมักและโคจินั้นทำให้ซีอิ๊วขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ใดๆ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ทำให้เกิดแอมโมเนียสูงขึ้นในขณะที่ *Bacillus pumilus* และ *Bacillus* ชนิดอื่นจะมีคุณสมบัติในการสร้างกรดแลกติก และทำให้แอมโมเนียไนโตรเจนลดลง

ยีสต์ที่เกิดขึ้นในการหมัก จะทำให้กลิ่น รสชาติของซีอิ๊วดีขึ้น จากการศึกษาของเชื้อ *Saccharomyces rouxii* พบว่ายีสต์จะใช้น้ำตาลในซีอิ๊วผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งเมื่อไปรวมกับสารอื่นจะทำให้เกิดรสที่ดี ถ้าใช้ยีสต์ร่วมกับ *Pediococcus soyae* จะทำให้กลิ่น รสดีขึ้นกว่าที่ใส่ยีสต์อย่างเดียว





รูปที่ 2-3 กระบวนการผลิตซีอิ๊วหมักในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า เมื่อผู้ผู้ใดเห็นนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การต้มซีอิ๊ว

วัตถุประสงค์ :

1. ซ้ำเชื้อ ในซีอิ๊วดิบซึ่งจะประกอบด้วย แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และ เอนไซม์ซึ่งเมื่อผ่านการให้ความร้อนแล้วจะถูกทำลายไป แล้วยังสามารถทำให้ซีอิ๊วเก็บไว้ได้นานด้วย

2. กำจัดสารที่ตกตะกอน เมื่อซีอิ๊วดิบถูกความร้อนก็จะทำให้โปรตีนส่วนที่ตกตะกอนได้รวมตัวกันเป็นตะกอนตกลงมา ซึ่งทำให้ซีอิ๊วที่ได้อุ่น

3. ช่วยเพิ่มกลิ่นหอม ในซีอิ๊วดิบจะมีกลิ่นไม่ค่อยดีปะปนอยู่ ดังนั้นกลิ่นหอมจึงไม่สามารถจะกระจายออกมาได้ ทำให้มีกลิ่นไม่เจริญอาหาร ดังนั้นเมื่อผ่านความร้อนแล้วก็จะทำให้กลิ่นหอมที่แสดงออกมา ทำให้เจริญอาหาร

4. ช่วยเพิ่มสีและความเข้มข้น ปกติซีอิ๊วจะมีสีค่อนข้างอ่อน ความเข้มข้นต่ำ เมื่อให้ความร้อนไอน้ำระเหยออกไปทำให้สีเข้มข้นขึ้น และมี ความเข้มข้นมากขึ้นถ้าหากจะมีการปรุงแต่งกลิ่นสีและสารกันบูด ก็จะไม่เติมในระยะที่จะเสร็จกระบวนการให้ความร้อน อุณหภูมิที่ใช้ตามปกติใช้ $60-70^{\circ}\text{C}$ ต่อมาได้รับการร้องขอจากผู้บริโภค จึงใช้อุณหภูมิ $80-83^{\circ}\text{C}$ เพื่อที่จะทำให้สารกันบูดละลายได้หมดแต่ถ้าหากอุณหภูมิสูงเกินไปก็จะทำให้เกิดกลิ่นไหม้ หลังจากให้ความร้อนแล้วจะต้องปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อขจัดน้ำมันที่ลอยอยู่ที่ผิวหน้าหรือตะกอนที่ตกอยู่ข้างล่าง

4. การฆ่าเชื้อ

ซีอิ๊วที่แยกมาได้เรียกว่า ซีอิ๊วดิบ จะต้องนำมาทำการฆ่าเชื้อ ที่ทำลายการทำงานของเอนไซม์ด้วย และทำให้โปรตีนที่ไม่ได้ถูกย่อยตกตะกอน ปกติมักจะทำการฆ่าเชื้อที่ 65°C แล้วเติม Alum (1 ออนซ์ ต่อ 80 แกลลอน) หรือ Kaolin (1 ออนซ์ ต่อ 1 แกลลอน) เพื่อทำให้ซีอิ๊วใส การตกตะกอนนั้นทิ้งให้ตกตะกอนค้างคืน แล้วจึงทำการกรองแยกซีอิ๊วออก

มักจะมีการเติมสารเคมีลงไป ป้องกันการเสื่อมเสียของซีอิ๊วที่ผ่านการ

ฆ่าเชื้อแล้ว ป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์ที่ทำให้เกิดแผ่นขาว
เอกสารนี้เป็นเอกสารของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ โดย เฉพาะยีสต์ที่ทำให้เกิดแผ่นขาว
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zygosaccharomyces sulisus, *Z. japonicus*, *Pichia* และ *Torulopsis* ซึ่งยีสต์ระหว่างนี้ จะเจริญบนผิวหน้าและรอบ ๆ ขอบของภาชนะ สารเคมีที่ใช้กันมากในญี่ปุ่น ในซีอิ๊วคือ butyl-p-hydroxy benzoate ในปริมาณ 0.005% หรือ sodium benzoate ในปริมาณ 6.20%

สีของซีอิ๊ว สีของซีอิ๊วเป็นสิ่งสำคัญและสัมพันธ์กับรส กลิ่นด้วย การเกิดสีของซีอิ๊วนั้นสาเหตุใหญ่คือ จากปฏิกิริยาเคมีที่เรียกว่า ปฏิกิริยาสีน้ำตาล ปฏิกิริยานี้มีผลต่อทั้งสีและกลิ่น ส่วนสีของซีอิ๊วนั้นจะวัดโดยใช้ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ใช้คลื่นแสงที่ 590-620 mμ ถ้าวัด transmittance อยู่ในช่วง 0.14-1.17 แต่ปัจจุบันทางสมาคมซีอิ๊วของญี่ปุ่นได้วางมาตรฐานของซีอิ๊วขึ้น การวัดก็เทียบกับมาตรฐานนี้

กลิ่นของซีอิ๊ว งานวิจัยทางด้านเคมีเกี่ยวกับเรื่องส่วนประกอบของกลิ่นซีอิ๊วนี้ ได้เริ่มทำการศึกษาในประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1887 วิธีการที่ใช้มีหลายวิธี เช่น การทำให้แห้ง กลั่นโดยใช้น้ำ การกลั่นโดยใช้น้ำมัน และ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย ส่วนประกอบของรส กลิ่นในซีอิ๊วเป็นพวกสารที่เป็นกรดซึ่งมีหลายชนิด เช่น กรดออกซาลิก และกรดแอสซิติค เป็นต้น

ส่วนประกอบทางเคมีของซีอิ๊ว

ลักษณะของซีอิ๊วในประเทศทางเอเชียแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดของจีนกับชนิดของญี่ปุ่น ในประเทศจีน ซีอิ๊วส่วนใหญ่จะทำจากถั่วเหลืองอย่างเดียว หรือ ถั่วเหลืองผสมกับข้าวสาลี โดยที่มีปริมาณถั่วเหลืองมากกว่า ส่วนซีอิ๊วของญี่ปุ่นนั้นจะใช้อัตราส่วนของถั่วเหลืองและข้าวสาลีเท่ากัน ญี่ปุ่นได้พยายามที่จะทำซีอิ๊วโดยใช้ส่วนผสมของข้าวสาลีมากกว่า ข้อแตกต่างระหว่างซีอิ๊วของจีนและของญี่ปุ่นคือ ซีอิ๊วของจีนจะมี specific gravity สูง และมีส่วนประกอบไนโตรเจนสูง และ ซีอิ๊วนี้มีสีเข้ม บางครั้งได้ทำให้มีรสหวานขึ้นโดยการเติมน้ำตาลจากอ้อย ซึ่งคุณสมบัตินี้แตกต่างไปจากของญี่ปุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมต่อการหมักซีอิ๊ว

1. แสงแดด กรรมวิธีการผลิตซีอิ๊วแบบเก่า นั้น แสงแดดมีความสำคัญมากต่อการผลิตซีอิ๊ว เพราะว่าเมื่อผลหมักวัตถุดิบที่มีเชื้อราลงในน้ำเกลือแล้วนั้น จำเป็นจะต้องตากแดดเป็นเวลานาน เพื่อให้ส่วนผสมได้รับความร้อน ซึ่งเป็นการช่วยเร่งปฏิกิริยาทางเคมี กระบวนการหมัก เมื่อแสงแดดมีมาก อุณหภูมิของกระบวนการหมักก็จะสูง ทำให้การหมักเร็วกว่าเมื่อตากในที่ ๆ มีแสงแดดอ่อน ดังนั้นระยะเวลาการหมักเพื่อจะให้ได้ซีอิ๊วนั้นจึงไม่แน่นอนในแต่ละแห่ง เช่น การหมักซีอิ๊วในประเทศไทยจะใช้เวลายาวกว่าการหมักซีอิ๊วในประเทศจีนและญี่ปุ่น แต่ถ้าหากเพิ่มอุณหภูมิเพื่อเร่งกระบวนการหมักโดยใช้ไอน้ำแทนแสงแดดแล้ว พบว่า คุณภาพของซีอิ๊วที่ผลิตได้นั้นจะดีกว่าที่หมักและตากแดดโดยตรง แม้แต่การปิดฝาภาชนะแล้วทำการตากแดด คุณภาพของซีอิ๊วที่ได้ก็ยังดีกว่าภาชนะที่ไม่ได้ปิดฝาดังนั้นทางโรงงานจึงใช้ภาชนะหมักซีอิ๊วชนิดที่ได้รับแสงแดดให้มากที่สุด

2. เวลา ระยะเวลาการหมักซีอิ๊วนั้นมีผลต่อคุณภาพของซีอิ๊วเป็นอย่างมาก ถ้าหากเร่งปฏิกิริยาเพื่อลดช่วงเวลาการหมัก ปฏิกิริยาบางขั้นตอนอาจจะไม่สมบูรณ์ ทำให้ซีอิ๊วที่ได้ผิดไปจากเดิม จะสังเกตว่าถ้าหมักซีอิ๊วนาน คุณภาพของซีอิ๊วจะดีกว่าเมื่อหมักในเวลาสั้น

3. ขนาดของภาชนะที่ใช้หมัก จำเป็นจะต้องมีการคำนึงถึงขนาด และชนิดของภาชนะที่ใช้หมัก เนื่องจากมีผลต่อการส่งผ่านความร้อนของแสงแดด ภาชนะที่ใช้ปกติมักจะใช้โองเคลือบ สำหรับในไต้หวันหรือญี่ปุ่นจะสร้างเป็นบ่อซีเมนต์แทน ทั้งนี้แล้วแต่ขนาดของโรงงาน ขนาดและชนิดของภาชนะที่แตกต่างกันนี้ ทำให้การใช้ความร้อนไม่เท่ากัน ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก ซึ่งมีผลทำให้กลิ่นรสของซีอิ๊วแตกต่างกันไปได้

บทที่ 3

ขั้นตอนการทำงาน อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Aspergillus flavus* 102566 อายุ 7 วัน
2. *Aspergillus oryzae* 3048 อายุ 7 วัน

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตู้บ่ม (Incubator)
2. กล้องจุลทรรศน์
3. Haemocytometer
4. กรวยแยก (separatory funnel)
5. เครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศ (Rotary evaporator)
6. ปั๊มสูญญากาศ (Vacuum pump)
7. กระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1
8. เครื่องเขย่า (rotary shaker)
9. syringe ขนาด 10 มล.
10. เครื่องชั่งสาร
11. ฟลาสก์ขนาด 250 มล.
12. centrifuge
13. Sep-pak silica gel cartridge column chromatography
14. Teflon membrane filter
15. cuvette

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. vial
 17. Sinter glass filter No.4
 18. Thin layer chromatographic plate - K6F SILICA GEL
60A ขนาด 20x20 เซนติเมตร หนา 0.25 มิลลิเมตร
 19. UV chamber
 20. Chromatographic column
 21. Micropipette - 100 ul
 22. Solvent tank
 23. UV spectrophotometer
- สารเคมี
1. methanol
 2. chloroform
 3. diethyl ether
 4. benzene
 5. dichloromethane
 6. acetone
 7. glacial acetic acid
 8. hexane
 9. toluene
 10. ethyl acetate
 11. formic acid
 12. standard aflatoxin solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3-1 กรวยแยก



รูปที่ 3-2 เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

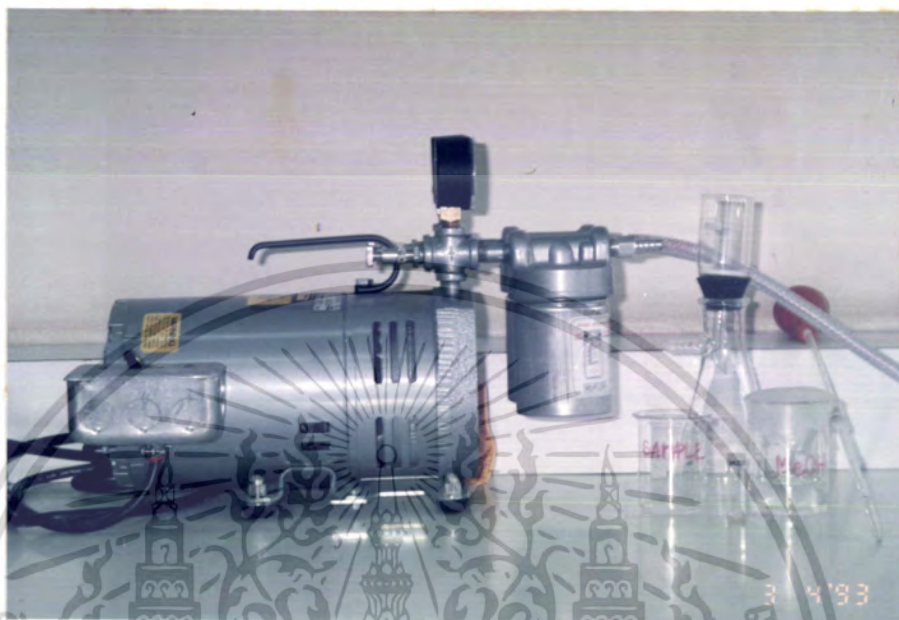


รูปที่ 3-3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำให้แอลกอฮอล์แห้งบริสุทธิ์
 (ซ้าย) Teflon membrane filter
 (ขวา) Sep-pak silica gel cartridge column chromatography



รูปที่ 3-4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย Thin layer chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3-5 Sinter glass filter No.4



รูปที่ 3-6 Spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลอง

ขั้นตอนการดำเนินการแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อรา

1.1 เตรียมถุงเชื้อรา โดยใส่ปลายข้าวบดหยาบ ๆ ผสมน้ำในอัตราส่วน

10 : 1

1.2 สวมปลอกกวางแวนที่ปลายเปิดของถุง ตลบปากถุงออกโดยรอบ ปิดทับด้วยเทปกาว อุดจุกด้วยสำลี ปิดครอบสำลิตัวด้วยถุงที่มีขนาดใหญ่กว่าจุกเล็กน้อย

1.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่หม้อนึ่งความดันไอ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

1.4 ใส่ suspension ของเชื้อ *A. flavus* และ *A. oryzae* อายุ 7 วัน โดยใส่ suspension ของเชื้อรา 1 มล. เลี้ยงในถุงข้าวสารบดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และใส่น้ำพอประมาณเพื่อให้ความชื้นแก่เชื้อรา

1.5 การบ่มที่ 28°C ประมาณ 4-5 วัน โดยวางถุงในแนวนอน

1.6 ทำการตรวจนับสปอร์ของเชื้อราทั้งสองชนิด เพื่อหาปริมาณสปอร์ของเชื้อที่ใช้โดย Haemocytometer

ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อรา และการเก็บเกี่ยวสปอร์ของเชื้อรา ได้แสดงไว้ในรูปที่ 3-7 และ 3-8

ข้าวสารดิบ 20 กรัม : น้ำ 2 มล.

นำใส่ถุงร้อน ใส่ปลอกคอขวด และอุดสำลี

ฆ่าเชื้อที่ 121°ซ 15 นาที

ใส่ suspension ของราที่เตรียมไว้ประมาณ 1 มล.

กล้าเชื้อราความชื้น 10%

รูปที่ 3-7 การเตรียมกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สปอร์ของราในถุง (ข้าว 20 กรัม) + tween 80 0.01 % 50 มล.

↓
ตั้งทิ้งไว้ 15-20 นาที

↓
เขย่าให้สปอร์ลอยอยู่ในน้ำ

↓
กรองผ่านสำลีที่ใส่ในกรวยแก้วลงในฟลasks เปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว

↓
ล้างสปอร์ออกจากอาหารอีก 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

↓
นำสารละลายสปอร์หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบ ต่อ นาที
เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกสปอร์ออกจากน้ำกลั่น

↓
เทน้ำทิ้ง

↓
เติมน้ำกลั่น 10 มล.

↓
นำมาตรวจนับโดยใช้ counting chamber

↓
นำค่าเฉลี่ย 1 ช่องเล็ก คูณด้วย 4×10^5

↓
บันทึกผลเป็นสปอร์ต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 3-8 การเก็บเกี่ยวสปอร์ของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ขั้นตอนการหมักซีอิ๊ว

2.1 สูตรซีอิ๊วขาว

1. ถั่ว 1 กิโลกรัม
2. แป้งข้าวเจ้า 400 กรัม
3. แป้งข้าวสาลี 400 กรัม
4. เชื้อจุลินทรีย์ 50 กรัม อายุ 7 วัน (*A. oryzae* 3048, *A. flavus* 102566)
5. น้ำเกลือ 20% 1.5 ลิตร

2.2 วิธีทำน้ำซีอิ๊วขาว

- 2.2.1 นำถั่วเหลืองมาคัดเอาสิ่งเจือปนออก พร้อมกับแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน โดยเปลี่ยนน้ำบ่อย ๆ หรือเปิดให้ไหลล้นเรื่อย ๆ เพื่อไม่ให้ถั่วเหลืองมีกลิ่นบูดเนื่องจากแก๊ส
- 2.2.2 นำถั่วเหลืองที่แช่ไว้มาล้างให้สะอาด นำไปต้มหรือนึ่งจนสุก แล้วนำมาผึ่งบนตะแกรงเพื่อให้สะเด็ดน้ำ
- 2.2.3 ผสมแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวสาลีให้เข้ากันดี ใส่กล้าเชื้อราที่เตรียมไว้จากข้อ 1 โดยแบ่งเป็น 5 สภาวะ คือ
 - ถั่วเหลือง + เชื้อธรรมชาติ
 - ถั่วเหลือง + *A. oryzae*
 - ถั่วเหลือง + *A. oryzae* + Aflatoxin B₁
 - ถั่วเหลือง + *A. oryzae* + *A. flavus*
 - ถั่วเหลือง + *A. flavus*
- 2.2.4 เมื่อถั่วเหลืองเย็นดีแล้ว นำถั่วมาคลุกกับส่วนผสมของแป้งและเชื้อราที่เตรียมไว้จากทั้ง 5 สภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 นำส่วนผสมที่ได้มาวางผึ่งลมในกระด้ง (โดยการทำให้เป็นรูปก้นหอย ดังรูปที่ 3-9) ที่อุณหภูมิปกติ ประมาณ 3 วัน จะพบว่ามีการขึ้นของเชื้อราจับตัวเป็นแผ่น ๆ เรียกขั้นนี้ว่า โคจิ

2.2.6 ใช้มือบีบตัวให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ (ใส่ถุงมือยางป้องกัน) พร้อมกับกลับตัว เอาด้านล่างขึ้นบน และเอาส่วนบนลงล่าง ทิ้งไว้ประมาณ 3-4 วัน

2.2.7 นำตัวเหลืองที่เชื้อราเจริญเต็ม บรรจลงโหลแก้ว พร้อมกับเติมน้ำเกลือเข้มข้น 20% ลงไปจนเต็มโหล

2.2.8 หมักส่วนผสมไว้ประมาณ 45-60 วัน จะได้ดังรูปที่ 3-10

ขั้นตอนการทำชีอิ้วได้แสดงการทำไว้ในรูปที่ 3-11



รูปที่ 3-10: ครอบวนถาวรหมักชีวภัณฑ์ไมโรมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูฝึกงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้เช่าได้เห็นใบใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3-11 ขั้นตอนการทำชีอิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาหาปริมาณแอฟฟลาทอกซิน
 - 3.1 สุ่มเก็บตัวอย่างถั่วดิบ 2 ถุง ๆ ละ 25 มก.
 - 3.2 สุ่มเก็บตัวอย่างถั่วต้มสุก เช่นเดียวกับ 3.1
 - 3.3 สุ่มเก็บตัวอย่างถั่วที่คลุกส่วนผสมในกระดังแล้วโดยตักถั่วที่อยู่ต่าง ๆ มุมกันเพื่อให้เกิดการกระจายของตัวอย่าง ใส่ถุงเช่นเดียวกับ 3.1
 - 3.4 เก็บตัวอย่างน้ำเกลือที่ใช้หมักซีอิ๊วทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 4 ครั้ง ต่อจากนั้นเก็บทุก ๆ 14 วัน จนครบ 3 เดือน โดยเก็บแต่ละครั้ง 25 มล. 2 ถุง
4. ขั้นตอนการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณแอฟฟลาทอกซิน
 - 4.1 การแยกแอฟฟลาทอกซินโดยวิธี Sep Pak method
 - 4.1.1 นำตัวอย่างใส่ลงในฟลาสก์ 250 มล. เต็มคลอโรฟอร์ม 150 มล. น้ำ 25 มล. เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
 - 4.1.2 กรองด้วยกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1 โดยใช้ celite เป็นตัวช่วยกรอง จะได้สารละลายของคลอโรฟอร์มและน้ำที่มีแอฟฟลาทอกซินละลายอยู่
 - 4.1.3 นำสารละลายที่ได้ใส่ในกรวยแยก เขย่า ทิ้งไว้จนแยกชั้นของคลอโรฟอร์มออกมา ชั้นที่เหลืออยู่ทำการสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม 50 มล. อีกครั้ง
 - 4.1.4 นำสารละลายคลอโรฟอร์มที่ได้มาทำการระเหย ด้วย เครื่องกลั่นระเหยภายใต้สุญญากาศจนแห้ง
 - 4.1.5 เติมส่วนผสมของคลอโรฟอร์มกับเอกเซน ในอัตราส่วน 3 : 7 ลงไป 10 มล.
 - 4.1.6 นำสารละลายที่ได้มาผ่าน Sep - Pak Silica gel Cartridge Column Chromatography หลังจากนั้นทำการล้างคอลัมน์โดยใช้เอกเซน 10 มล. และส่วนผสมของเบนซีนกับกรดแอซิติก (ในอัตราส่วน 95.5 : 4.5) 10 มล. ล้างผ่านครั้งสุดท้ายใช้ส่วนผสมของ เอทิลอีเทอร์กับเอกเซน (อัตราส่วน 60 : 40) 10 มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.7 หลังจากนั้นจะล้างแอฟฟลาทอกซินออกโดยใช้ไดคลอโรมีเทน กับ อะซีโตน (9+1) 15 มล. ล้างผ่านคอลัมน์

4.1.8 นำสารละลายที่ได้ไปทำการระเหย โดยใช้เครื่องกลั่น ระเหยภายใต้สูญญากาศจนแห้ง

4.1.9 ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 1 มล. แล้วใช้ pasteur pipette ตูดสารละลายมาใส่ใน vial แล้วเก็บไว้วิเคราะห์หาแอฟฟลาทอกซินต่อไป

ขั้นตอนสรุปการแยกแอฟฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างได้แสดงไว้ในรูปที่ 3-12

4.2 การวิเคราะห์โดยใช้ TLC และ UV Spectrophotometer

4.2.1 เตรียม TLC plate - Silica gel 60 A ขนาด 20x20 ซม. หนา 0.25 มม. (Whatman) โดยการ activate ที่ 105°C เพื่อให้เกิดแถบสีได้ดี แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

4.2.2 เตรียม solvent system ใส่ใน solvent tank (สะอาดและไม่เปียกน้ำ) ในอัตราส่วนของ toluene : chloroform : ethyl acetate : formic acid = 70 : 50 : 50 : 20 เทตามอัตราส่วนที่ทำให้ solvent อยู่ต่ำกว่าระดับที่ spot บน TLC plate จากนั้นใส่กระดาษกรองข้าง tank เพื่อให้ระเหยอิ่มตัวด้วย solvent

4.2.3 ละลายแอฟฟลาทอกซินที่ได้จากขั้นตอน 4.1.9 ด้วยคลอโรฟอร์มอีกครั้งหนึ่งในกรณีที่มีสารละลายแห้ง

4.2.4 ทำการ spot โดยใช้ micropipette ตูดสารละลายแอฟฟลาทอกซิน 0.1 มล. ลงบน TLC plate ให้เป็นจุดต่อเนื่องกันยาวประมาณ 2 นิ้ว เพื่อให้การแยกของสารมีลักษณะเป็นแถบ (band) พร้อมทั้ง spot standard aflatoxin solution ลงไปเพื่อใช้เปรียบเทียบด้วย ทิ้งไว้ให้แห้ง

4.2.5 นำ TLC plate มา develop ใน solvent tank ที่บรรจุ solvent system แล้ว ทิ้งไว้ให้มีการเคลื่อนที่ของสารละลายจนถึง solvent

front จึงนำออกมาทิ้งไว้ให้แห้ง เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใส่ถั่ว 50 กรัม ลงในฟลasks 250 มล.

เอ็กเซน 150 มล. และ น้ำ 25 มล.

เขย่าด้วย Rotary shaker 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

กรองด้วยกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1 โดยใช้ซีไลท์เป็นตัวช่วยกรอง

ใส่กรวยแยกเขย่าแยกชั้นคลอโรฟอร์ม

ชั้นบนแยกชั้นด้วยคลอโรฟอร์ม 50 มล.

กลั่นระเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศจนแห้ง

เติมส่วนผสมของคลอโรฟอร์มกับเอ็กเซน (3:7) จำนวน 10 มล.

ผ่าน sep pak silica gel cartridge column chromatography

ล้างคอลัมน์โดยใช้เอ็กเซน 10 มล.

ล้างด้วยส่วนผสมของเบนซีนกับแอซีติก (95.5:4.5) จำนวน 10 มล.

ล้างผ่านครั้งสุดท้ายด้วยส่วนผสมของ

เอทิลอีเทอร์กับเอ็กเซน (60:40) จำนวน 10 มล.

ล้างอีกครั้งด้วยส่วนผสมของไดคลอโรมีเทนกับอะซีโตน (9:1) 15 มล.

กลั่นระเหยภายใต้สูญญากาศ

ตรวจวิเคราะห์ด้วย TLC ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้รูปที่ 3-12 การแยกแอฟฟลาทอกซินหน้าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.6 นำเอา TLC plate มาตรวจหาแอฟฟลาทอกซินด้วย UV chamber โดยเทียบกับ standard aflatoxin ทำเครื่องหมายรอบ ๆ ไว้บริเวณที่มีการเรืองแสงของแอฟฟลาทอกซินแต่ละชนิด โดย แอฟฟลาทอกซิน บีหนึ่ง จะเรืองแสงสีน้ำเงิน และ แอฟฟลาทอกซิน จีหนึ่ง จะเรืองแสงสีเขียว

4.2.7 ขูด Silica gel บริเวณที่ทำเครื่องหมายไว้ของแอฟฟลาทอกซินแต่ละชนิดใส่ไว้ในฟลาสก์เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

4.2.8 ละลายแอฟฟลาทอกซินออกจาก Silica gel ด้วยเมทานอล 5 มล. แล้วนำมากรองด้วย sinter glass filter No. 4

4.2.9 นำสารละลายของแอฟฟลาทอกซินแต่ละชนิด มาวัดค่า absorbance ที่ 363 นาโนเมตร บันทึกค่าที่อ่านได้

4.3 การวัดความเข้มข้นของแอฟฟลาทอกซิน

ถ้า A = ค่า absorbance ที่อ่านได้ที่ 363 นาโนเมตร

มีหน่วยเป็น $g\ mole/l$

$M.W.$ = น้ำหนักโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซินแต่ละชนิด

สำหรับ aflatoxin B_1 มีค่า 312

สำหรับ aflatoxin B_2 มีค่า 328

E = the molar extinction coefficient หรือ absorptivity

สำหรับ aflatoxin B_1 มีค่า 21,800

สำหรับ aflatoxin G_1 มีค่า 17,700

d = dilution factor

D = diameter ของ cell path (มีค่า = 1)

$$A = E \times C \times D$$

$$C = A / (E \times D)$$

$$C = (A / E) \times M.W. \quad (\text{g/l})$$

$$C = \frac{A \times M.W. \times 10^6}{E \times 1000/5(\text{MeOH})} \quad (\mu\text{g/l})$$

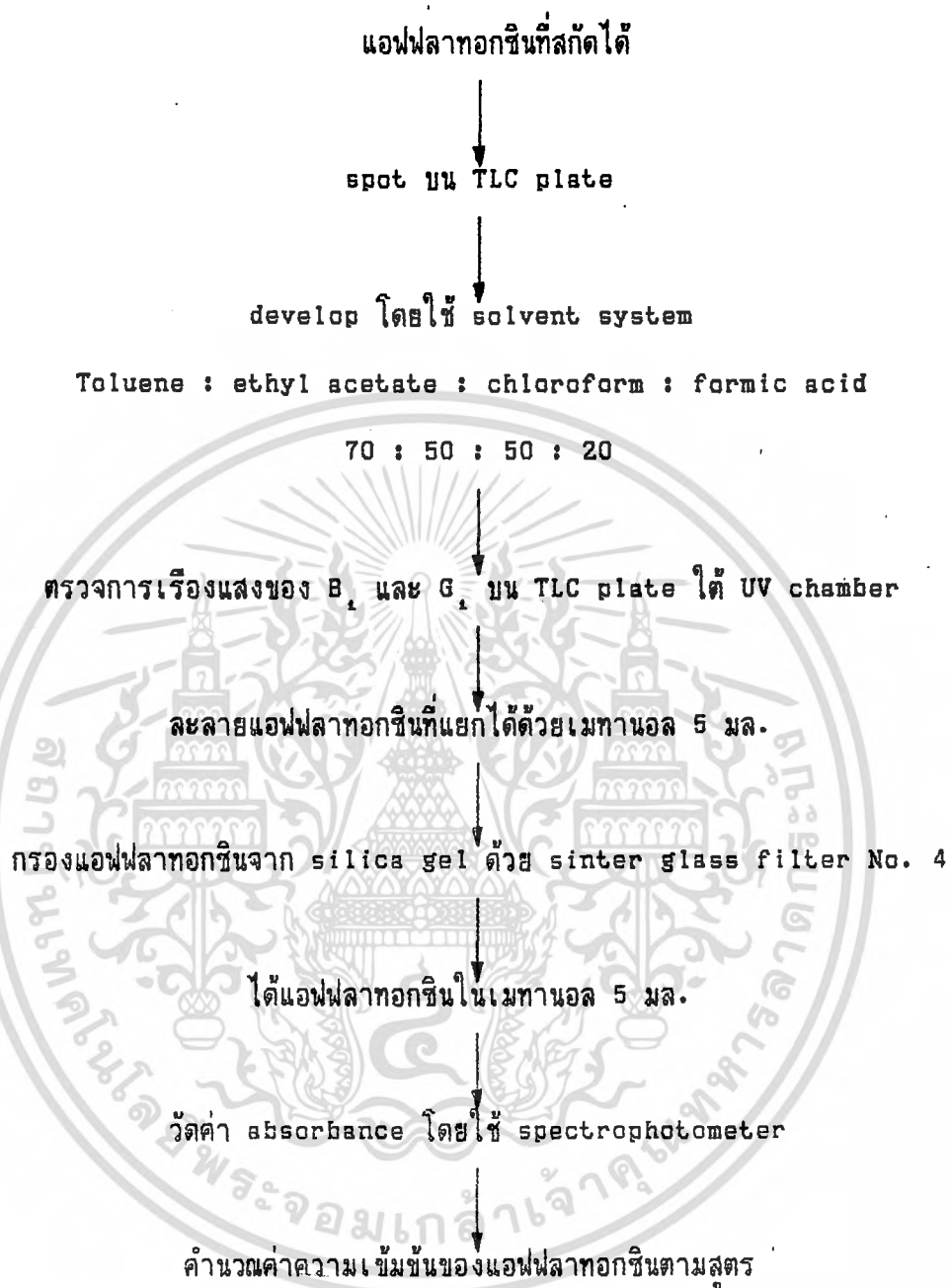
ดังนั้น

$$\text{ความเข้มข้น} = (A \times M.W. \times 10^6) / (E \times 2 \times d) \quad (\text{ไมโครกรัม/กรัม})$$

$$= C (\mu\text{g/g}) \times 1000 \quad (\text{พิพิบี})$$

แผนผังสรุปขั้นตอนการวิเคราะห์แอฟฟลาทอกซินแสดงไว้ในรูปที่ 3-13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3-13 แผนผังสรุปขั้นตอนการวิเคราะห์แอนฟลาทอกซิน

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองนี้ ได้มุ่งเน้นพิจารณาถึงปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในระหว่างการหมักข้าวในขั้นตอนการทำโคจิ หรือมีการปนเปื้อนของสารพิษแอฟลาทอกซินในระหว่างกระบวนการเตรียมการหมัก โดยพิจารณาว่าจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วโดยตรงคือ เชื้อรา *Aspergillus oryzae* และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง หรือพบในระหว่างกระบวนการหมักซีอิ๊วนั้นจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* หรือมีผลต่อการลดปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินอย่างไร โดยทำการทดลองซึ่งแบ่งตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ถ่ายลงในขั้นตอนการทำโคจิ ออกเป็น 5 สภาวะ คือ

สภาวะที่ 1 (C_1) ใช้เชื้อธรรมชาติ

สภาวะที่ 2 (C_2) ใช้เชื้อ *A. oryzae*

สภาวะที่ 3 (C_3) ใช้เชื้อ *A. oryzae* และใส่แอฟลาทอกซิน บี, ความเข้มข้น 2.2 ไมโครกรัมต่อกรัม

สภาวะที่ 4 (C_4) ใช้เชื้อ *A. oryzae* และ *A. flavus*

สภาวะที่ 5 (C_5) ใช้เชื้อ *A. flavus*

สภาวะทั้ง 5 ที่เตรียมขึ้นนี้ ทำขึ้นเพื่อศึกษาปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นในขั้นตอนโคจิ ส่วนในขั้นตอนโมโรมินั้น จะไม่มีการควบคุมสภาวะในระหว่างการหมักแต่อย่างใด เนื่องจากมิได้เป็นการพิจารณาเฉพาะถึงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่เป็นการศึกษาถึงเชื้อจุลินทรีย์ทุก ๆ ชนิดที่อาจพบได้ในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้น ในขั้นตอนโมโรมิจึงทำตามวิธีการที่ใช้ในกระบวนการผลิตจริง มิได้มีการควบคุมเกี่ยวกับจุลินทรีย์ ซึ่งได้รายงานปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินที่ตรวจพบในขั้นตอนโคจิ และโมโรมิ ดังตาราง

เอกสารนี้เป็นที่ 4-1, 4-2, 4-3 และ 4-4 ตามลำดับ ยานเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางแสดงผลการทดลอง สามารถอธิบายได้โดยต้องเริ่มพิจารณาการเจริญของเชื้อที่ใช้ในแต่ละสภาวะเสียก่อน คือ

ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *A. oryzae* และ *A. flavus* ที่ใช้เริ่มต้นในรูปของกล้าเชื้อบริสุทธิ์มีปริมาณเท่ากับ 3.82×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 3.30×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ลงในส่วนผสมของถั่วและแป้งตามสภาวะที่กำหนดขึ้นแต่ละสภาวะเรียบร้อยแล้ว ก็จะบ่มส่วนผสมโคจี้เน้อเอาไว้เป็นเวลา รวมทั้งสิ้น 7 วัน ตามวิธีการ ซึ่งภายใน 7 วันนี้ สามารถสังเกตการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดได้ คือ ในสภาวะที่ 2 ซึ่งใช้เชื้อ *A. oryzae* เพียงชนิดเดียวมีการเจริญสูงที่สุด ตามด้วยสภาวะที่ 5 ซึ่งใช้เชื้อ *A. flavus* ชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่าในถั่วเหลืองนั้น เชื้อ *A. oryzae* จะเจริญได้ดีกว่า *A. flavus* ขณะเดียวกันในสภาวะที่ 1 ซึ่งเป็นการปล่อยให้เชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเจริญขึ้นเองนั้น มีปริมาณเชื้อเจริญขึ้นน้อยที่สุด เนื่องจากมิได้เป็นการถ่ายเชื้อลงโดยตรง และในสภาวะที่ 3 ซึ่งใช้เชื้อ *A. oryzae* ชนิดเดียว และมีการเติมแอฟฟลาทอกซิน บี ความเข้มข้น 2.2 ไมโครกรัมต่อกรัมลงไปด้วย มีอัตราการเจริญต่ำกว่าสภาวะที่ 2 และ 5 ตามลำดับ ส่วนในสภาวะที่ 4 จุลินทรีย์ที่ใช้ทั้ง 2 ชนิด คือ *A. flavus* และ *A. oryzae* พบในอัตราการเจริญที่ค่อนข้างต่ำ (แต่จะพบการเจริญของ *A. oryzae* มากกว่า *A. flavus*) เนื่องจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด จะแย่งกันใช้สารอาหารเพื่อแข่งกันเจริญเติบโต จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการวิจัยของ Nagarajan และคณะ (1973) ซึ่งได้ศึกษาการผลิตแอฟฟลาทอกซินในถั่วเหลืองที่มีสภาวะต่างกัน

จากตารางที่ 4-1 แสดงถึงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ตรวจพบในชั้นตอน โคจิ สรุปลักษณะดังนี้

ในสภาวะที่ 1 ซึ่งเป็นเชื้อธรรมชาติ มีการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินในปริมาณค่อนข้างต่ำ แต่ก็พบว่ามีการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้

ในสภาวะที่ 2 ตรวจไม่พบสารพิษแอฟฟลาทอกซิน เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ *A. oryzae* 3048 ที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊ว และไม่สร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน

ในสภาวะที่ 3 ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่เติมไปในวันเริ่มต้นของการทำโคจิ 2,200 นิตีบิ จะลดลงเหลือเพียง 237 นิตีบิ เมื่อบ่มจนถึงวันที่ 7 และเนื่องจากผลจากการคำนวณค่าความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95.00 % เมื่อเทียบกับ control คือปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินในสภาวะที่ 1 ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเชื้อที่ใช้ในสภาวะนี้คือ *A. oryzae* สามารถทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่เติมลงไป ทำให้สารพิษแอฟฟลาทอกซินมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด

ในสภาวะที่ 4 ตรวจพบปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินในปริมาณต่ำที่สุด ซึ่งอาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด คือ *A. flavus* และ *A. oryzae* มีการแข่งขันเจริญ ทำให้ *A. flavus* สร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ในปริมาณต่ำกว่าปกติ

ในสภาวะที่ 5 มีการเจริญของเชื้อ *A. flavus* เพียงชนิดเดียว และมีอัตราการเจริญของเชื้อในอัตราที่ค่อนข้างสูง ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ตรวจพบ จึงมีปริมาณมากกว่าทุกสภาวะนอกจากสภาวะที่ 3

อนึ่งในทุกสภาวะที่ตรวจพบสารพิษแอฟฟลาทอกซิน จะมีปริมาณของสารพิษแอฟฟลาทอกซินชนิด จีหนึ่ง มากกว่าชนิด บีหนึ่ง ยกเว้นในสภาวะที่ 3 ที่ตรวจพบเฉพาะชนิด บีหนึ่ง เนื่องจากเติมแอฟฟลาทอกซินชนิด บีหนึ่ง ลงไปเพียงชนิดเดียว และเชื้อราที่เจริญก็ไม่ใช้สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้

ตารางที่ 4-1 แสดงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ตรวจพบในชั้นตอนโคจิ

ระยะเวลาบ่ม (วัน)	สภาวะ	แอฟฟลาทอกซิน บีหนึ่ง (พพิบี)	แอฟฟลาทอกซิน จีหนึ่ง (พพิบี)	แอฟฟลาทอกซิน บีหนึ่ง+จีหนึ่ง (พพิบี)
0	C ₁	0	0	0
	C ₂	0	0	0
	C ₃	2,200 [*]	0	2,200 [*]
	C ₄	0	0	0
	C ₅	0	0	0
7	C ₁	140	698	838
	C ₂	0	0	0
	C ₃	237	0	237
	C ₄	132	538	670
	C ₅	800	708	1,508

หมายเหตุ * หมายถึง ข้อมูลที่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95.00 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-2 แสดงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน บีหนึ่ง ที่ตรวจพบในชั้นตอนโมโรมิ

ระยะเวลาบ่ม (สัปดาห์)	แอฟฟลาทอกซิน บีหนึ่ง (พิกิบี)				
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
0	0	0	0	0	0
1	569	0	344	281	601
2	229	0	816	172	344
3	172	0	787	157	243
4	161	0	660	115	186
6	200	0	483	258	173
8	301	0	476	229	168
10	301	0	394	200	57
12	315	0	315	158	616

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-3 แสดงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน จีหนึ่ง ที่ตรวจพบในชั้นตอนไมโรมิ

ระยะเวลาบ่ม (สัปดาห์)	แอฟฟลาทอกซิน จีหนึ่ง (พีพีบี)				
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
0	0	0	0	0	0
1	577	0	0	90	1,184*
2	494	0	0	167	888
3	408	0	0	174	315
4	272	0	0	105	296
6	796	0	0	315	297
8	602	0	0	222	594
10	501	0	0	296	553
12	445	0	0	296	741

หมายเหตุ * ข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95.00 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4-4 แสดงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน บีหนึ่ง+จีหนึ่ง ที่ตรวจพบในชั้นตอนโมโรมิ

ระยะเวลาบ่ม (สัปดาห์)	แอฟฟลาทอกซิน (พิกีบ)				
	C ₁	C ₂	C _a	C ₄	C _B
0	0	0	0	0	0
1	1,146	0	344	371	1,785*
2	723	0	816	339	232
3	580	0	787	331	558
4	433	0	660	220	482
6	996	0	483	573	470
8	921	0	476	451	762
10	802	0	394	496	610
12	760	0	315	454	1,357

หมายเหตุ * ข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95.00 %

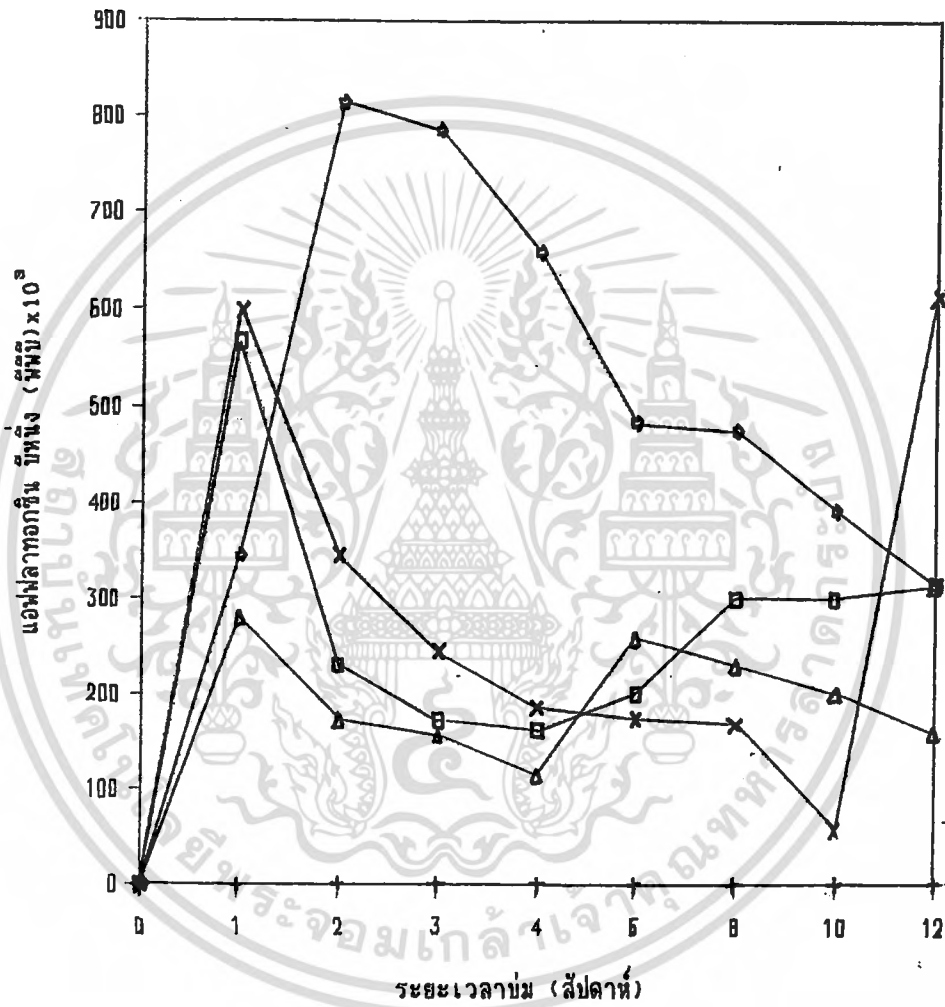
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในตารางที่ 4-2 และ 4-3 แสดงถึงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ตรวจพบในน้ำซีอิ๊วระหว่างขั้นตอนการทำโมโรมิ ปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ตรวจพบนี้คือ จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่พบในระหว่างกระบวนการหมักซีอิ๊วในขั้นตอนโมโรมิ ซึ่งเป็นการกล่าวถึงจุลินทรีย์โดยรวม มิได้บ่งชี้ถึงจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ การทดลองที่ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Young Maing และ คณะ (1973) และสามารถอธิบายได้ดังนี้

ในสภาวะที่ 1, 3, 4 และ 5 ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินทั้งชนิด บีหนึ่ง และ จีหนึ่ง (ในสภาวะที่ 3 พบเฉพาะชนิด บีหนึ่งเท่านั้น) ที่ตรวจพบมีแนวโน้มว่าจะมีปริมาณลดลงเมื่อทำการหมักเป็นเวลาประมาณ 4-6 สัปดาห์ คาดว่า ในระหว่างกระบวนการหมักซีอิ๊ว จะมีจุลินทรีย์บางชนิดซึ่งมิได้ทำการศึกษาละเอียดลงไปว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดใด (แต่ย่อมมิใช่ *A. oryzae* เนื่องจากในขั้นตอนนี้ เชื้อราจะไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากสภาวะที่มีน้ำเกลือเข้มข้น 17-22% และมีการกวนโมโรมิ เพื่อมิให้เชื้อราได้ใช้แก๊สออกซิเจนจากอากาศเพื่อการเจริญบนผิวหน้าของโมโรมิ) และจุลินทรีย์นั้นมีส่วนในการย่อยสลาย และลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่มีอยู่นั้นให้น้อยลงจากเดิมภายใน 4-6 สัปดาห์ของการหมักโมโรมิ หลังจากการหมักเป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ไปแล้ว ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ตรวจพบจะมีปริมาณคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แล้วคงที่ต่อไปอีก 2-4 สัปดาห์ จากนั้นจึงจะมีแนวโน้มที่จะมีปริมาณลดลงอีกครั้ง

อนึ่ง ในขณะขั้นตอนนี้ ปริมาณโดยรวมของสารพิษแอฟฟลาทอกซินชนิด จีหนึ่ง ยังคงตรวจพบในปริมาณที่สูงกว่าสารพิษแอฟฟลาทอกซินชนิด บีหนึ่ง เหมือนกับในขั้นตอนของโคจิ

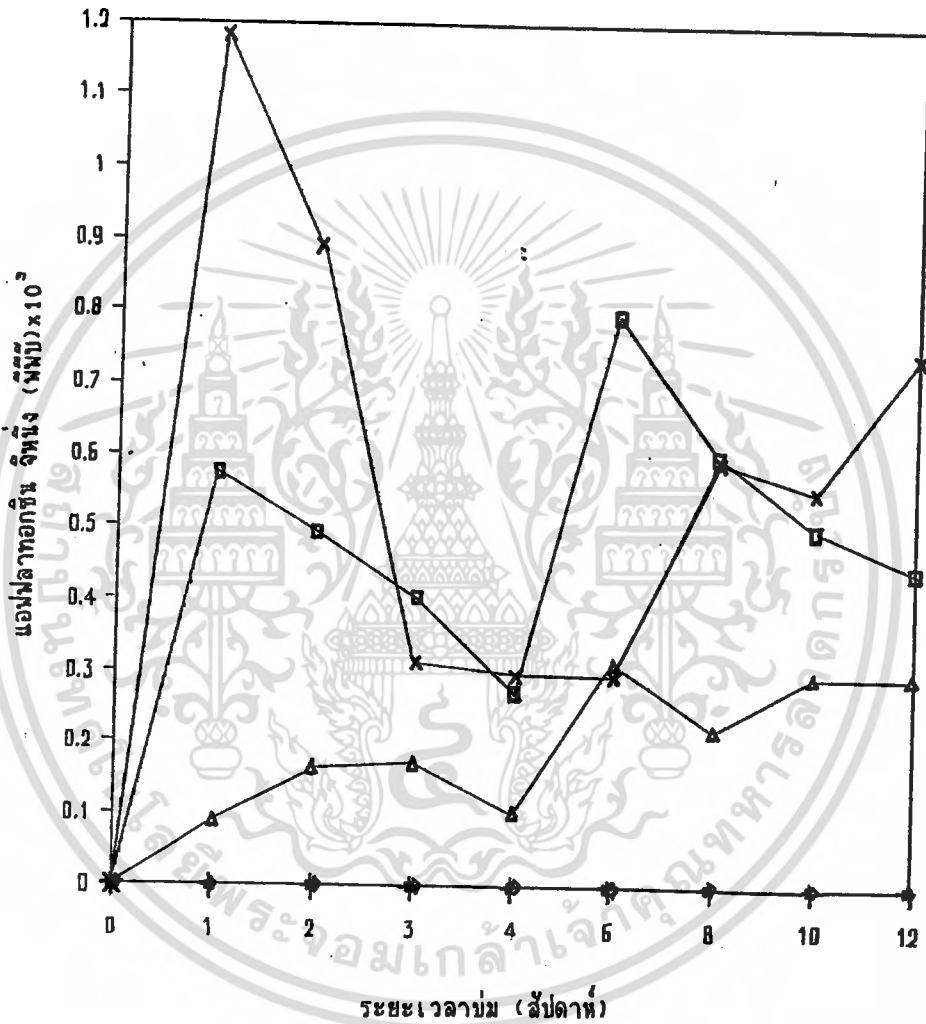
ส่วนในสภาวะที่ 2 เชื้อที่ใช้ในขั้นตอนการทำโคจิ คือ เชื้อ *A. oryzae* ATCC 3048 ซึ่งไม่สร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน จึงไม่สามารถตรวจพบสารพิษนี้ในน้ำซีอิ๊วที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว และสามารถแสดงผลเปรียบเทียบปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินในสภาวะต่าง ๆ ได้ดังรูปที่ 4-1, 4-2 และ 4-3



- C₁
- + C₂
- C₃
- △ C₄
- × C₅

รูปที่ 4-1 แสดงปริมาณสารพิษแอมฟลาทอกซินชนิด บิทัง (พีบี)

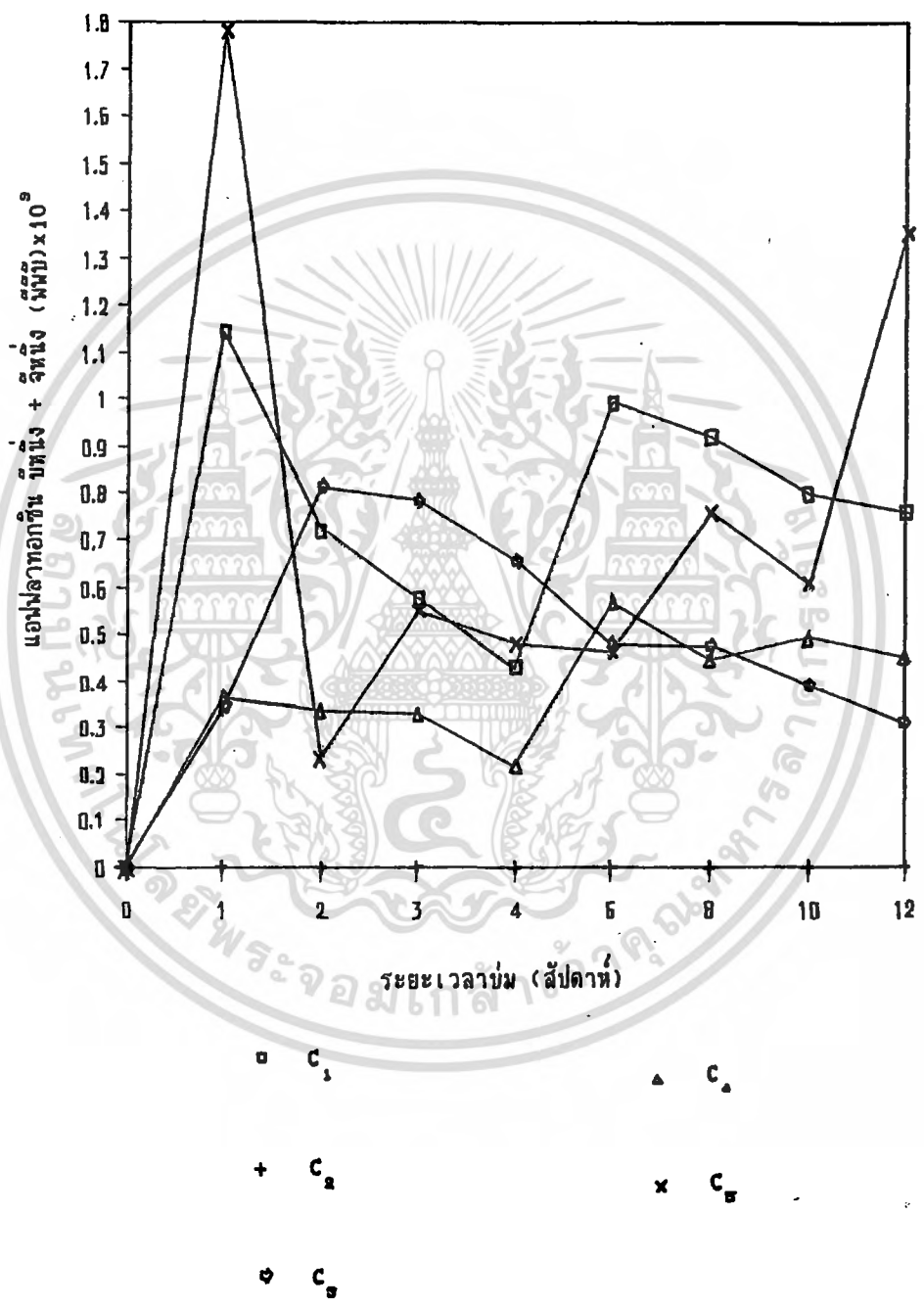
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากสำนักงานการคุ้มครองผู้บริโภค กระทรวงสาธารณสุข
 กิตติกรรมคุณในระหว่างกระบวนการหมักไมโรมิในระยะเวลาต่าง ๆ
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- C₁
- + C₂
- ◇ C₃
- △ C₄
- × C₅

รูปที่ 4-2 แสดงปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินชนิด จีหนึ่ง (พีบี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์และบุคลากรที่ดูแลห้องปฏิบัติการเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่สู่สาธารณะโดยไม่ได้รับอนุญาตจากผู้อำนวยการฯ
 ที่ตรวจพบในระหว่างกระบวนการหมักโมโรมิในระยะเวลาต่าง ๆ
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4-3 แสดงปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซิน บีทีเอ็น + จีทีเอ็น (นิพบี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ว่าห้ามมิให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากศูนย์วิจัยการหมักไมโครในระยะเวลาต่าง ๆ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้ ยังไม่สามารถอธิบายถึงการเพิ่มปริมาณของ สารพิษแอฟฟลาทอกซิน จีหนึ่ง ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 6 สัปดาห์ได้ แต่คาดว่า การเพิ่มปริมาณของสารพิษแอฟฟลาทอกซินทั้งชนิด บีหนึ่งและ จีหนึ่ง (แอฟฟลาทอกซิน ชนิด บีหนึ่ง เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ จีหนึ่ง) อาจเนื่องมาจาก ในระยะเวลา ในการเก็บเกี่ยวตัวอย่างน้ำซีอิ๊วเพิ่มจาก 1 สัปดาห์ต่อครั้ง เป็น 2 สัปดาห์ต่อครั้ง ซึ่งอาจ ทำให้สปอร์ของเชื้อราที่ยังคงเหลืออยู่สามารถเจริญขึ้น และผลิตสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ทำให้ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ตรวจพบมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย แต่จาก การหาค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99.95% และ 99.99% ตามลำดับ พบว่า ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ตรวจพบในตารางที่ 2 นี้ ไม่มีความแตกต่างกัน ในทางสถิติ ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า สภาวะต่าง ๆ ที่เกิดในขั้นตอนโมโรมินั้น ไม่มีผลต่อการลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินแต่อย่างใด

ข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นในการทดลองนี้ อาจเกิดขึ้นได้ในช่วงขั้นตอน การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) เนื่องจากในการตรวจผลและวัดปริมาณโดยการวัดค่า Adsorbant ที่ 363 นาโนเมตร มิได้ใช้เครื่องมือในการวัดปริมาณแอฟฟลาทอกซิน ดังนั้น ปริมาณสารพิษ แอฟฟลาทอกซินที่คำนวณได้จากสูตร จึงอาจคลาดเคลื่อนจากปริมาณที่แท้จริงได้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สารพิษแอฟฟลาทอกซินซึ่งเกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ในจีนัส *A. flavus* หรือ *A. parasiticus* (ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ *A. flavus*) มีโอกาสตรวจพบในถั่วเหลือง ในปริมาณที่ต่ำมาก ถึงมีจะมีการปนเปื้อนของเชื้อจำนวนนี้ค่อนข้างสูง เนื่องจากถั่วเหลืองมีกรด phytic ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อเราสามารถผลิตสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ในปริมาณที่ต่ำลง

เมื่อนำถั่วเหลืองที่อาจมีการปนเปื้อนสารพิษแอฟฟลาทอกซิน มาใช้ในการผลิตซีอิ๊ว หรือมีการปนเปื้อนของเชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน นี้เจริญอยู่ในขั้นตอนการทำโคจิ หรืออาจมีการปนเปื้อนสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ในช่วงใด ๆ ระหว่างการทำซีอิ๊วก็ตาม ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่มีอยู่ จะถูกทำลายได้โดยเชื้อ *A. oryzae* ที่ใช้หมักโคจิ ทำให้ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ที่พบในตอนแรกลดปริมาณลงอย่างมาก ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า *A. oryzae* สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ซึ่งเกิดจากเชื้อ *A. flavus* หรือเชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน สายพันธุ์อื่นได้ภายในเวลา 7 วันที่ใช้ในการหมักโคจิ แต่หลังจากที่กระบวนการดำเนินมาถึงขั้นของโมโรมิแล้ว ถ้าส่วนผสมนั้นยังคงมีสารพิษแอฟฟลาทอกซินหลงเหลืออยู่ จุลินทรีย์ที่สามารถพบในช่วงนี้ รวมถึงสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ของการหมักโมโรมิ จะไม่มีผลในการลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ที่หลงเหลืออยู่ได้เลย

ดังนั้น ในกรรมวิธีการผลิตซีอิ๊วให้ปลอดภัยจากอันตรายที่เกิดจากสารพิษ แอฟลาทอกซิน นั้น จึงสามารถทำได้โดยการใช้วัตถุดิบที่ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อรา สายพันธุ์อื่น ๆ ที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน การใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อที่ใช้ในการ ทำซีอิ๊วโดยเฉพาะ หรืออาจลดเวลาในการบ่มในช่วงโคจิ จากเดิมเวลา 7 วัน เป็นเวลา ประมาณ 2-3 วัน เนื่องจากเชื้อ *A. oryzae* นั้นมีอัตราการเจริญที่รวดเร็วและใช้เวลา สั้นกว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน เช่น *A. flavus* รวมทั้งควรระมัด ระวังในด้านความสะอาดของวัตถุดิบ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตเพื่อป้องกัน การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอีกด้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

มาตรฐานของน้ำชื้อวของไทย

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานที่กำหนด ชนิด ส่วนประกอบ และคุณลักษณะที่ต้องการ วัตถุดิบในอาหาร สารปนเปื้อน สุขลักษณะ ภาชนะบรรจุ การชั่ง ตวง วัด การทำ เครื่องหมายและฉลาก การชักตัวอย่าง การวิเคราะห์และเกณฑ์การตัดสิน

1.2 มาตรฐานนี้ใช้กับน้ำชื้อวได้ จากวิธีหมักถั่วเหลืองเท่านั้น

2. บทนิยาม

2.1 น้ำชื้อว หมายถึง ผลิตภัณฑ์ของเหลวที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน ของถั่วเหลืองด้วยการหมัก แล้วนำมาแต่งรส และ/หรือสีหรือไม่ก็ได้ ตามชนิดของผลิตภัณฑ์ และนำไปพาสเจอร์ไรส์

2.2 ชื้อวขาว หมายถึง น้ำชื้อวจาก 2.1 ซึ่งมีได้แต่งรสและ/หรือสี

2.3 ชื้อวเค็ม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากชื้อวขาวมาเก็บต่อตามกรรมวิธี ผลิต (aging) จนกระทั่งได้ความเข้มข้นและสีตามเกณฑ์ที่กำหนด

2.4 ชื้อวดำ หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากชื้อวขาวผสมกับสารให้ความหวาน ในอัตราส่วนที่พอเหมาะจนได้ความหวานและความเค็มตามเกณฑ์ที่กำหนด

2.5 ชื้อวหวาน หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากชื้อวขาวในปริมาณน้อย ผสมกับสารให้ความหวานจนได้ความหวานตามเกณฑ์ที่กำหนด

3. ส่วนประกอบ

3.1 ชื้อวดำเค็มและชื้อวขาว ส่วนประกอบต้องมีถั่วเหลือง แป้งสาลี หรือ แป้งข้าวเจ้า เกลือ น้ำบริโภค นอกจากนี้ส่วนประกอบที่อาจจะมิตคือ โปรตีน จากพืชที่ถูกย่อยสลายแล้ว

3.2 ชื้อวดำและชื้อวหวาน มีส่วนประกอบตั้ง 3.1 และมีสารเพิ่มเติมที่ ให้ความหวานซึ่งจะเป็นอย่างหนึ่งอย่างใดหรือผสมกันก็ได้ สารที่ให้ความหวานมีน้ำตาลหรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารน้ำตาล น้ำเชื่อมข้าวโพด เดกซ์โทส ลิวคิตกลูโคส อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วัตถุเจือปนในอาหาร

ห้ามใช้วัตถุเจือปนในอาหารอื่นใด เว้นไว้แต่ที่ระบุดังนี้

4.1 สารกันเสีย (Preservative) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 29 (พ.ศ. 2517) เรื่องการใช้วัตถุเจือปนในอาหารและฉลากสำหรับอาหารที่มี วัตถุเจือปนในอาหาร

4.2 ถ้ำแต่งสีให้ใช้เฉพาะน้ำตาลเคี้ยวไหม้ (caramel)

5. สารปนเปื้อน

ให้มีได้ไม่เกินดังนี้

ปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

ตะกั่ว

1

ทองแดง

5

อาร์เซนิก

0.5 (คิดเป็น As)

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน

1. การวิเคราะห์โดยใช้ HPLC (High pressure liquid chromatography) วิธีนี้สามารถอ่านค่าความเข้มข้นของแอฟฟลาทอกซินได้ถึงหน่วยส่วนในพันล้านส่วน แต่มีข้อเสียคือไม่รวดเร็ว ในกรณีที่ต้องวิเคราะห์ตัวอย่างในปริมาณมาก ๆ และวิธีที่ใช้ในการสกัดสาร จะต้องทำให้สารที่สกัดได้บริสุทธิ์ ไม่มีสารอื่นเจือปนก่อนจะนำมาใช้วิเคราะห์ด้วยเครื่องนี้ นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ยังค่อนข้างสูงอีกด้วย

2. การวิเคราะห์โดยใช้ Thin layer chromatography (TLC) และ Fluorodensitometer วิธีนี้จะนำสารที่สกัดจากตัวอย่างแล้ว มาละลายในคลอโรฟอร์ม และนำมา spot บน TLC plate ที่งัวให้เกิดการ develop ใน solvent tank โดยใช้ solvent system ที่เหมาะสม เพื่อแยกแอฟฟลาทอกซินแต่ละชนิดออกจากกัน นำมาหาปริมาณ โดยเปรียบเทียบความเข้มของแสงที่เรืองออกมาด้วยเครื่องมือ fluorodensitometer ที่ 363 นาโนเมตร

3. การวิเคราะห์โดยใช้ TLC และ UV spectrophotometer วิธีนี้ยุ่งยากกว่าวิธีที่สอง ตรงที่ต้องขูดเอาแอฟฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่กับ silica gel บน TLC plate ออกมา แล้วสกัดแอฟฟลาทอกซินออกมาด้วยเมทานอล แล้วจึงนำไปวัดค่าด้วย UV spectrophotometer

นอกจากนี้ยังมีวิธีการตรวจวิเคราะห์แอฟฟลาทอกซินอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ทราบปริมาณอย่างคร่าว ๆ ดังนี้

1. BGYF (bright greenish yellow fluorescence) เช่นการตรวจปริมาณการเรืองแสงของเมล็ดข้าวโพดที่ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ แล้วเกิดการเรืองแสง เมื่อนำมาตรวจภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าประมาณ 50% ของสารที่เรืองแสงจะเป็นแอฟฟลาทอกซิน

2. minicolumn เป็นคอลัมน์ขนาดเล็กที่บรรจุ silica gel, alumina, florasil และแคลเซียมซัลเฟต หลังจากสกัดแอฟฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างแล้ว นำสารละลายของสารพิษผ่านคอลัมน์ ทิ้งไว้ให้ develop แล้วนำมาตรวจภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ถ้าหากว่าตัวอย่างอาหารมีสารพิษแอฟฟลาทอกซิน จะปรากฏแถบเรืองแสงขึ้นที่ส่วนบนของชั้น florasil โดยการใส่สายตาคาดคะเนเทียบกับคอลัมน์มาตรฐาน ก็จะทราบค่าความเข้มข้นอย่างคร่าว ๆ ของแอฟฟลาทอกซิน

ปัจจุบันมีการใช้ minicolumn กันอย่างกว้างขวาง ทั้งในภาคสนามและตามโรงงานอาหารสัตว์ ซึ่งนอกจากจะใช้ในการตรวจสอบแอฟฟลาทอกซินแล้ว ยังมีการใช้ตรวจสอบสารพิษตัวอื่นด้วย เช่น ochratoxin A และ zearalenone เพราะเป็นเครื่องมือที่ใช้ง่าย และสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว วิธีนี้สามารถตรวจหาปริมาณแอฟฟลาทอกซินได้ถึง 5-15 ส่วนในพันล้านส่วนในอาหารสัตว์ผสม และตรวจได้ถึง 2-5 ส่วนในพันล้านส่วนสำหรับข้าวโพดและถั่วลิสง (Bullerman, 1978)

นอกจากนี้ ปัจจุบันมีหลายบริษัทที่ผลิตน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับตรวจวัดแอฟฟลาทอกซิน โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งสะดวกและไวกว่าวิธีอื่นมาก สามารถวัดระดับแอฟฟลาทอกซินที่น้อยที่สุดในขนาดนาโนกรัม (10^{-9}) ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบแอฟฟลาทอกซิน สามารถกระทำได้หลายวิธีดังได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งแต่ละวิธีอาจแตกต่างกันในเรื่องของสารเคมีที่ใช้ในการสกัด และการวิเคราะห์ปริมาณ ในขั้นสุดท้าย แต่โดยสรุปแล้วมีขั้นตอนหลัก ๆ ดังต่อไปนี้

1. การสุมตัวอย่าง และการเตรียมตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์
2. การกำจัดไขมัน ขั้นตอนนี้มีความจำเป็น ถ้าหากตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ มีปริมาณไขมันน้อยกว่า 5% แต่อาจข้ามขั้นตอนนี้ได้ โดยจะมีการสกัดทั้งไขมันและสารพิษ ออกมาด้วยกันในขั้นที่ 3 จากนั้นจึงสกัดเอาไขมันออกต่อไปในขั้นตอนที่ 4
3. การสกัดแอฟฟลาทอกซินออกจากตัวอย่าง โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม
4. การทำให้สารที่สกัดได้สะอาดโดยการกำจัด interfering fluorescent material หรือกำจัดไขมันและน้ำมัน
5. การประเมินผลความเข้มข้นของแอฟฟลาทอกซิน
6. การยืนยันผลว่า สารที่ได้เป็นสารพิษแอฟฟลาทอกซิน หรือว่าเป็น fluorescent material โดยเทียบกับ standard aflatoxin

หลักการและวิธีการของ Chromatographic technique ที่เกี่ยวข้องในการแยกสารผสมออกจากกัน

เมื่อนำสารที่ต้องการแยกมาใส่ในระบบที่มีเฟสสองเฟสที่สัมผัสกัน แต่ไม่ผสมเข้าด้วยกัน คือ stationary phase และ mobile phase สารจะกระจายตัวอยู่ระหว่างสองเฟสนี้ได้มากน้อยตามคุณสมบัติของสารแต่ละชนิด ทำให้สามารถแยกสารออกมาได้ลักษณะการกระจายตัว ซึ่งเป็นคุณสมบัติของสารแต่ละชนิดในสภาวะที่กำหนด เรียกว่า partition coefficient หรือ distribution coefficient ซึ่งเป็นอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารใน mobile phase และ stationary phase

ส่วนของ mobile phase เป็นส่วนที่เคลื่อนที่ได้ จึงอาจเป็นของเหลวหรือก๊าซ ส่วน stationary phase เป็นเฟสที่อยู่กับที่ ส่วนมากจึงเป็นของแข็ง ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ แต่ถ้าเป็นของเหลว (โดยมากเป็นน้ำ) ซึ่งถูกยึดให้ติดอยู่กับที่โดยของแข็ง ของแข็งนั้นจะเรียกว่า support หรือ matrix การเลือกว่าควรจะใช้ stationary phase หรือ mobile phase ชนิดใดนั้น อาศัยหลักการว่า ต้องเลือกระบบที่ทำให้สารที่ต้องการแยกมี distribution coefficient แตกต่างกันจึงจะแยกได้ดีในที่นี้จะขอยกกล่าวถึงเฉพาะหลักการและวิธีการของ Thin layer chromatography เท่านั้น

Thin layer chromatography (TLC)

1. หลักการและวิธี

เป็นวิธีการแยกสารที่นิยมกันมาก ใช้สารปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ให้ผลการแยกภายในเวลาอันรวดเร็วใช้หลักการเดียวกันกับ column chromatography ต่างกันตรงที่ว่า column chromatography จะให้ตัวทำละลายไหลขึ้นเป็นแบบ descending แต่ thin layer chromatography จะให้ตัวทำละลายไหลขึ้นแบบ ascending

วิธีนี้ตัวดูดซับจะถูกฉาบไว้บาง ๆ บนแผ่นกระจก และปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง แผ่นกระจกที่ได้จะเรียกว่า thin layer chromatography plate (TLC plate) ปัจจุบันนี้การทำ TLC plate สำเร็จรูปขึ้นจำหน่ายเป็นการค้า มักฉาบด้วย silica gel หรือ alumina ซึ่งจะช่วยให้สะดวกในการใช้มากขึ้น นอกจากนี้ TLC plate อาจทำด้วย flexible plastic ซึ่งปัจจุบันมีการใช้อย่างแพร่หลาย แม้ว่าจะมีราคาแพง แต่ตัวดูดซับที่ฉาบจะไม่หลุดเป็นแผ่น ๆ หรือแตกได้ง่าย และยังสามารถตัดออกให้ได้ขนาดตามที่ต้องการใช้อีกด้วย

ตัวอย่างที่จะทำการแยก จะถูก spot ที่ปลายด้านล่างของ TLC plate ด้วยหลอด capillary หรือ micropipette การ spot อาจทำเป็นจุด ซึ่งต้องพยายามให้เป็นจุดเล็กที่สุด หรืออาจ spot ให้เป็นจุดติดต่อกันยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ถ้าต้องการหยดซ้ำเพื่อให้สารมีความเข้มข้น จะต้องรอให้สารที่ spot ลงไปครั้งแรกแห้งก่อน จึงจะ spot ซ้ำลงไป เพื่อไม่ให้จุดที่ spot ใหญ่เกินไป เมื่อทำการ spot เสร็จ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปวางใน solvent tank ที่อิมตัวด้วยไอของตัวทำละลาย โดยให้ปลายด้านล่างของ TLC plate จุ่มอยู่ในตัวทำละลาย แต่ต้องให้ระดับของตัวทำละลายอยู่ใต้ระดับสารที่ spot ปล่อยให้ตัวทำละลาย developing หรือ running สารต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของสารผสมก็จะถูกแยกออกมา

เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปบน TLC plate นั้นจะเกิดการแยกสารตามคุณสมบัติในการละลายและการดูดซับของสารแต่ละตัว สารที่เป็น polar จะถูกยึดติด

กับตัวดูดซับบน TLC plate เคลื่อนที่ขึ้นช้าหรือไม่สามารถเคลื่อนที่ ส่วนสาร nonpolar ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะถูกพาขึ้นไปตอนบนโดยตัวทำละลาย การเคลื่อนที่ของสาร nonpolar จะถูกพาขึ้นไปข้างบนโดยตัวทำละลาย การเคลื่อนที่ของสาร nonpolar จึงเป็นไปได้เร็วกว่าสารที่เป็น polar ทำให้แยกสารออกจากกันได้ ระวังอย่าให้ ตัวทำละลายเคลื่อนไปบนจุดของด้านบน มิฉะนั้น จะเกิดการแพร่กระจายของสารขณะที่ตัวทำละลายไม่สามารถเคลื่อนที่ต่อไปได้อีก นำ TLC plate ออกมา ใช้ดินสอขีดระดับการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายไว้ เส้นนี้เรียกว่า solvent front ทำให้ TLC plate แห้งและหาวิธีที่เหมาะสมในการทำให้มองเห็นสารต่อไป

2. วิธีการทำให้มองเห็นสาร

ถ้าสารที่แยกออกมาโดยใช้วิธี TLC มีสี ก็สามารถติดตามผลการแยกได้ด้วยตามเปล่า แต่ถ้าสารที่แยกออกมาไม่มีสี จะต้องนำไปทำปฏิกิริยากับ reagent ที่จำเพาะต่อสารนั้น ๆ เพื่อให้เกิดสีขึ้นมาและสามารถมองเห็นได้ reagent ที่มักใช้กัน คือ ไอโอดีน ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบอินทรีย์หลายชนิดแล้ว จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลืองหรือสีน้ำตาล สีนี้จะไม่ถาวร เมื่อไอโอดีนระเหิดออกไปสีก็จะจางลง ดังนั้น เมื่อเกิดสีแล้ว ให้รีบวางตำแหน่งของสารด้วยดินสอทันที สารประกอบอินทรีย์ส่วนใหญ่ จะทำปฏิกิริยากับไอโอดีน ยกเว้นสารพวกไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัว และ alkyl halide

วิธีทำให้มองเห็นสารอีกวิธีหนึ่ง คือ การส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต สารที่แยกถ้ามีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงช่วงของอัลตราไวโอเล็ตได้ ก็จะเรืองแสงให้เห็น วิธีนี้จะใช้ในการวิเคราะห์สารพิษแอฟฟลาทอกซิน

นอกจากนี้ ยังมีวิธีการอื่น ๆ เช่น การใส่อินดิเคเตอร์ที่เรืองแสงได้ ลงไปผสมกับตัวดูดซับที่จะฉาบบน TLC plate ซึ่งโดยมากจะใช้สารผสมระหว่าง ซิงค์ซัลไฟด์ และแคดเมียมซัลไฟด์ หรือวิธีการที่จำเพาะต่อ functional group ของสารแต่ละชนิด ซึ่งเป็นวิธีการทางเคมี สารที่แยกออกมาจะถูกทำปฏิกิริยาเปลี่ยนไปเป็นสารอื่น และปรากฏให้เห็นสีบน TLC plate เป็นต้น

ภาคผนวก ค

วิธีการลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินในอาหาร

1. วิธีป้องกันการขึ้นปะปนของ เชื้อราและแอฟฟลาทอกซินในอาหาร

1.1 การเลือกหาพันธุ์พืชเพื่อทำการเพาะปลูก

การเลือกหาพันธุ์พืชที่เหมาะสมเพื่อทำการเพาะปลูกนั้น จะมีความจำเป็นต่อผลผลิตที่จะได้รับมากมายทีเดียว ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติต่าง ๆ หลายประการด้วยกันดังนี้ คือ

- ก. จะต้องเป็นพันธุ์ที่ให้เมล็ดพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง
- ข. จะต้องเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคพืชชนิดต่าง ๆ ได้ดี
- ค. จะต้องเป็นพันธุ์ให้เมล็ดพืชซึ่งสามารถป้องกันการขึ้นปะปนของเชื้อราได้มากที่สุด หรืออาจจะขึ้นปะปนอยู่ได้แต่ไม่สามารถสร้างสารพิษ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอฟฟลาทอกซินได้

1.2 การลดปริมาณความชื้นในอาหารพวกเมล็ดพืช และในอากาศ เพื่อป้องกันการขึ้นปะปนของเชื้อรา

ความชื้นในเมล็ดพืชนั้น จะมีความสัมพันธ์กันกับความชื้นในอากาศ กล่าวคือ เมื่อความชื้นในอากาศเพิ่มมากขึ้น ก็อาจจะทำให้ความชื้นในเมล็ดพืชสูงขึ้นไปด้วย ฉะนั้นการลดปริมาณความชื้นในอากาศ และความชื้นในเมล็ดพืช จะทำให้ปริมาณแอฟฟลาทอกซินในอาหารลดน้อยลงไปด้วย การลดปริมาณความชื้นในเมล็ดพืชลงให้เหลือน้อยกว่า 10% แล้วเก็บไว้ในบรรยากาศที่มีความชื้นในอากาศน้อยกว่า 50% จะป้องกันการปะปนของเชื้อราบนเมล็ดพืชได้มากพอสมควร

1.3 การอบเมล็ดพืชในไอรระเหยของน้ำยาเคมี

การอบเมล็ดพืชในไอรระเหยของน้ำยาเคมีชนิดต่าง ๆ เพื่อฆ่าเชื้อราที่ขึ้นปะปนอยู่บนเมล็ดพืช ก็เป็นวิธีการป้องกันการสร้างแอฟฟลาทอกซินอีกวิธีหนึ่งนอกจากจะทำให้จำนวนเชื้อราที่ขึ้นอยู่ลดน้อยลงหรือหมดไปแล้ว ยังจะทำการฆ่าแมลงที่กินเมล็ดพืชเป็นอาหารอีกด้วย แต่ทว่า น้ำยาเคมีส่วนใหญ่ที่ทำการทดลอง ถึงแม้ว่าจะทำลาย ซีสต์และเชื้อราได้ แต่ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ที่อุณหภูมิสูง (37 °C) จะทำให้มีการทำลายเชื้อราได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (25 °C) อีกด้วย

2. การทำลายแอฟฟลาทอกซิน

- 2.1 การลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินในเมล็ดพืช โดยการปนเมล็ดพืชที่ตกลงไป
- 2.2 การลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินในเมล็ดพืช โดยการแยกเมล็ดพืชที่เสียออกด้วยเครื่องมือ
- 2.3 การกำจัดแอฟฟลาทอกซิน โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี
- 2.4 การทำลายแอฟฟลาทอกซินในเมล็ดพืช โดยวิธีการทางเคมี
- 2.5 การทำลายโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ จิตต์อารี, ทวีรัตน์ เกียรติสมภพ และวรสิทธิ์ ปานช้าง "การป้องกันการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงโดยใช้เกลือ" โครงการพิเศษปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ สจล. 2534

นภา โล่ห์ทอง กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต พันธุ์พืชไร่ซึ่ง กรุงเทพฯ 2534

คุณิ ธนะบริวัฒน์ การวิเคราะห์หาสารพิษแอฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง 64-76. 2531

ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และ ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. แอฟลาทอกซิน (สารพิษจากเชื้อราที่ก่อให้เกิดมะเร็งของตับ). ภาควิชาสรีรวิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล. 2524.

วรศักดิ์ ปัจฉิมะศิริ, โสภา สอนดี และสมชัย พงศ์จรรยากุล. "การตรวจสอบแอฟลาทอกซินโดยวิธีมินิคอลัมน์ในอาหารสัตว์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก" วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์.) 23(2532) : 178-187.

สิริมา หอตระกุล "การยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินในข้าวโพดโดยเชื้อรา *A. niger*" โครงการพิเศษปริญญาตรี สจล. 2530.

สุขใจ ชูจันทร์ การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง. 19-26. 2533

อาภรณ์ จันทร์สมวงศ์ "การศึกษาการทำสารพิษแอนฟลาทอกซินให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์" โครงการพิเศษปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ สจล. 2533

Butler, W.H. Aflatoxin. In : Purchase, I.F.H., ed. Mycotoxins, Amsterdam. Elsevier, 1 - 28., 1974

Chang, Y. H., C. H. Beng, J. T. Ponnampalam, and R. K. H. Lim. 1966 "Mouldy soybeans as potential source of aflatoxin contamination." Far East. Med. J. 2 : 298-300.

C. H. Bourgeois, in J. D. Pollack (Editor). Reye's Syndrome. Grune and Stratton. New York. 1975. p. 131

Davis, N. D., U. L. Diener, and D. W. Eldridge. 1966. "Production of aflatoxin B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in a semi-synthetic medium". Appl. Microbiol. 14 : 378-380.

Davis, N. D., U. L. Diener, and V. P. Agnihotri. 1967. "Production of aflatoxin B₁ and G₁ in chemical defined medium." Mycophytol. Mycol. Appl. 31 : 251-256.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Davis, N.D. and U.L. Diener. Environmental factors affecting the production of aflatoxin. In : Herzberg, M., ed. Proceedings of the Forst US - Japan Conference on Toxic Microorganisms, Washington, D.C., U.S Govt. Printing Office, 43 - 47., 1970.

E. G. Lee, P. M. Townsley and C. C. Walden. J. Food Sci., 31 (1966) 432.

George A. Bean, John A. Schillinger; and William L. Klarman
"Occurrence of Aflatoxins and Aflatoxin Producing strains of *Aspergillus* spp. in Soybeans". Applied Microbiology 24(3) pp. 437-439, 1972

Glinsulol, T., Thamavit, W. and Ruchirawat, M. (1967). Studies on the population of toxigenic fungi in market foods and foodstuff. J. Sci. Soc. Thailand. 2. 176.

G. N. Wogan. "Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 27 (1968) 932.

Gupta, S. K., Maggon. K. K. and Venkatasubramanian. U. A. (1976)
Effect of zinc on adenine nucleotide pools in relation to aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*.
Appl. Environ. Microbio., 32. 753-756.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hartley, R. D., Nesbitt, B. F. and Kelly, J. O. (1963) Toxic metabolite of *Aspergillus flavus*. Nature. London. 198. 1056-1058.

Heathcote, J.G., and J.P. Hibbert. Aflatoxins : Chemical and biological aspects. Developments in food science Elsevier Science Publishing, Inc., New York., 1978.

Hesseltine, C. W., O. L. Shotwell, J. j. Ellis, and R. D. Stubblefield. 1966. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Bacteriol. Rev. 30 : 795-805.

Hesseltine, C. W., W. G. Sorenson, and M. Smith. 1970. Taxonomic studies of the aflatoxin-producing strains in the *Aspergillus flavus* group. Micrologia. 62 : 123-132.

Howell, R.W., 1968. Mycotoxin research in oilseeds, p. 61-66. In M. Herzberg (ed.). Toxic microorganisms. mycotoxins-botulism. U.S. Department of interior. Washington. D.C.

IL-Young Maing, J.C. Ayres, and P.F. Koehler "Persistence of Aflatoxin During the Fermentation of Soy Sauce". Applied Microbiology. 25(6) pp. 1015-1017, 1973

Kratzer, F. H., J. B. Allred, P. N. Davis, B. J. Marshall, and P. Vohra. 1959. "Effect of autoclaving soybean protein and the addition of ethylenediamine tetra acetic acid in the biological availability of dietary zinc for turkey poultts. J. Nutr. 68 : 315-322.

Kun-Young Park and Lloyd B, Bullerman. "Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*". J. Food Sci. 46(3) 178-184. 1983.

Lee, E. G. H., P. M. Townsley, and C. C. Walden. 1966. "Effect of bivalent metals on the production of aflatoxin in submerged cultures." J. Food Sci. 31 : 432-436.

Mateles, R. I., and J. C. Adye. 1965. "Production of aflatoxin in submerged cultures. Appl. Microbiol. 13 : 208-211.

N. D. Davis, U. L. Diener and D.W. Eldridge. Appl. Microbiol., 14 (1966) 378.

N. D. Davis, U. L. Diener and V. P. Agnihotri. Mycopathol. Mycol. Appl., 3 (1967) 251.

Nabney, J., and B. F. Neshitt. 1965. A spectrophotometric method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ for determining the aflatoxins. Analyst. 90 : 155-160
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nagarajan, V., R. V. Bhat, and P. G. Tulpule. 1973. Aflatoxins production in some varieties of soybean (Glycine max. L.) Experientia. 29 : 1302-1303.

O'Dell, B. L., and J. E. Savage. 1960. "Effect of phytic acid on zinc availability." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103 : 304-305.

R. I. Mateles and J. C. Adye. Appl. Microbiol., 13 (1965) 208.

Romer, T.R. "Screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds and other agricultural commodities with subsequent confirmation and quantitative measurement of aflatoxins in positive samples." J. Assoc. Off. Anal. Chem., 58 (1975) : 500 - 506.

Peter M. Scott. "Natural Poison" J. Assoc. Off. Anal. Chem., Associate Chapter Editor, (1990) 1184-1198.

Sargeant, K. (1961) Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature. 192. 1096-1097.

Seitz, L. M. and Mchr, H. E. (1974) Aflatoxin detection in corn : a simple screening test. Cereal Chem., 51. 487-491.

- S.K. Gupta and T.A. Venkitasubramanian "Production of aflatoxin on soybean". Appl. Microbiol., 29(6) pp. 834-836, June 1975.
- Shank. R. C., Wogan, G. N., Gicson, J. B. and Nondasuta, A. (1972) Dietary aflatoxins and human liver cancer : Aflatoxins in market foods and foodstuffs in Thailand and Hong Kong. Food Cosmet. Toxicol., 10. 61-65.
- Shih, C. N. and Marth, E. H. (1974) Some cultural conditions that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*. Appl. Microbiol., 27. 452-456.
- Shotwell, C. L., C. W. Hesseltine, H. R. Burmeister, W. F. Kwolek, Gail M. Shannon, and H. H. Hall. 1969. Survey of cereal grains and soybeans for the presence of aflatoxin. II. Corn and soybeans. Cereal Chem. 46 : 454-463.
- Trione, E. J. and Leach, C. M. (1969) Light-induced sporulation and sporogenic substance in fungi. Phytology, 59. 1077-1083.