การผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองด้วยผงกล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* TISTR 3098 ในระดับห้องปฏิบัติการ

พรดรัล จุลกัลป์ * และธนพล กิจพจน์
คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก
*corresponding author e-mail : porndarun@yahoo.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองด้วยผงกล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* TISTR 3098 โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ศึกษาผลของอุณหภูมิในการบ่ม (25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส) และเวลาในการบ่ม (18, 24 และ 30 ชั่วโมง) ผลการศึกษาพบว่า อุณหภูมิและเวลาในการบ่มมีผลต่อลักษณะปรากฏของเทมเป้ถั่วเหลือง กระบวนการผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองในระดับห้องปฏิบัติการทำได้โดยนำถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 มาแช่น้ำ 16 ชั่วโมง ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดถั่วออก ต้มในน้ำเดือดนาน 40 นาที สะเด็ดน้ำให้แห้งในขณะที่ยังร้อน เติมผงกล้าเชื้อร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก คลุกให้เข้ากัน ตักใส่ถุงพลาสติก (12 x 18 นิ้ว) ถุงละ 500 กรัม อัดให้เมล็ดถั่วเหลืองเป็นก้อนสี่เหลี่ยม ปิดปากถุง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จะได้เทมเป้ถั่วเหลืองที่มีลักษณะปรากฏที่ดี พบเส้นใยสีขาวเจริญปกคลุมเมล็ดถั่วเหลือง ไม่พบการสร้างสปอร์สีดำและเมื่อหั่นเป็นชิ้นเมล็ดถั่วยังคงเกาะติดไม่หลุดออกจากกัน ผลการวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีของเทมเป้ถั่วเหลือง (ผง) พบว่า มีค่าความชื้นร้อยละ 4.11 ไขมันร้อยละ 17.88 โปรตีนร้อยละ 43.17 เถ้าร้อยละ 3.79 เส้นใยหยาบร้อยละ 5.57 และคาร์โบไฮเดรต (รวมเส้นใยหยาบ) ร้อยละ 31.05 ผลการศึกษาแสดงว่า กระบวนการหมักมีผลให้ปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่หมัก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการนำถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อรา *R. oligosporus* ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ทดแทนเนื้อสัตว์ในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ : เทมเป้ ถั่วเหลือง ปริมาณโปรตีน ผงกล้าเชื้อ *Rhizopus oligosporus*

Production of soybean tempeh with *Rhizopus oligosporus* TISTR 3098 starter powder in laboratory scale

Phondaran Chunlakan* and Thanapon Kitpot
Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand
*corresponding author e-mail : porndarun@yahoo.com

Abstract

The objective of this study was to produce soybean tempeh with *Rhizopus oligosporus* TISTR 3098 starter powder. Factorial arrangement in completely randomized design (CRD) was used to assess the effects of temperature (25 ^{o}C 30 ^{o}C and 35^{o}C) and incubation time (18 hr 24 hr and 48 hr). The results showed that temperature and incubation time affected soybean tempeh appearance. The production process of soybean tempeh in laboratory scale involved, soaking soybean (Chiang Mai 60) for 16 hr, peeling membrane, cooking in water (100 ^{o}C) for 40 mins draining water, adding 5.0% (w/w) starter powder of *R. oligosporus*, mixing, putting 500 g of mixed soybean in plastic bag (12" x 18"), pelletizing, sealing plastic bag and incubating at 25^{o}C for 24 hr. Soybean tempeh had a

good appearance, the hyphal growth covered soybean, no black spores, and fermented soybean were still sticking when sliced. The chemical compositions of soybean tempeh (powder) were 4.11% moisture content, 17.88% fat, 43.17% protein, 3.79% ash, 5.57% crude fiber and 31.05% carbohydrate (include crude fiber). The result from this study showed that the fermentation process increased the protein content in comparison to soybean without fermented. Therefore the utilization of fermented soybean to replace meat protein for new products should be subjected to future study.

keywords : tempeh, soybean, protein content, starter powder, *Rhizopus oligosporus*

บทนำ

เทมเป้ (tempeh) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านของอินโดนีเซียที่ผลิตโดยการหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อราในสกุล *Rhizopus* มีลักษณะเป็นก้อนสีขาวล้อมรอบด้วยเส้นใยรา เมื่อหั่นเป็นชิ้นๆ แล้วทอดจะมีสีเหลือง กรอบ มีกลิ่นหอม รสชาติดี เทมเป้ถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่อุดมไปด้วยสารอาหารมากมายทั้ง โปรตีน ไขมัน ใยอาหาร วิตามิน และเกลือแร่ (Seng, 1998; Ogawa et al., 2004; Chen et al., 2012) เทมเป้จึงถูกจัดเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูงและย่อยได้ง่ายเพราะในระหว่างการหมัก เชื้อราจะมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนและไขมันถั่วบางส่วน มีผลทำให้เทมเป้ย่อยได้ง่าย และยังมีคุณสมบัติพิเศษซึ่งไม่พบในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักประเภทอื่นๆ คือ มีรสชาติ กลิ่นรสและลักษณะเนื้อสัมผัสคล้ายเนื้อสัตว์ (สุจินดา, 2534; สุภางค์, 2539; Ogawa et al., 2004) เทมเป้จึงถูกนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนการใช้โปรตีนจากเนื้อสัตว์เนื่องจากผู้บริโภคไม่รู้สึกว่ามีความแตกต่างในด้านเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสเมื่อเปรียบเทียบกับการบริโภคเนื้อสัตว์ นอกจากเทมเป้ถั่วเหลืองแล้วยังสามารถใช้วัตถุดิบทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้จากกระบวนการผลิตอาหารอื่นๆ เช่น ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วแดง กากมะพร้าว ผัก หรือกากถั่วลิสง สำหรับคนไทยเราอาจไม่คุ้นเคยกับผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักประเภทนี้มากนัก ทำให้มีรายงานการศึกษาน้อยมากเมื่อเทียบกับต่างประเทศ ลาวัณย์ (2530) ได้ทดลองทำผลิตภัณฑ์เทมเป้จากถั่วลิสงและกากถั่วลิสง ผลการศึกษาพบว่าสามารถนำถั่วลิสงทั้งที่มีเยื่อหุ้มหรือลอกเยื่อหุ้มเมล็ดและกากถั่วลิสงมาทำเทมเป้ได้ โดยเทมเป้ที่ได้จะมีลักษณะเนื้อแน่น เมื่อทอดแล้วกรอบ มีกลิ่นหอม รสอร่อยพอใช้ ธงชัย (2531) ได้ศึกษากรรมวิธีการทำเทมเป้ถั่วลิสง โดยพบว่า กรรมวิธีที่เหมาะสมคือ ใช้กล้าเชื้อ (tempeh starter) และ tempeh powder ผสมกันและถั่วลิสงที่จะนำมาทำเทมเป้ควรลอกเยื่อหุ้มเมล็ดออกก่อน เมื่อทดสอบความชอบผลิตภัณฑ์เทมเป้ชุบแป้งทอดด้วยวิธี 9-point hedonic scale พบว่า สี และกลิ่น ได้คะแนนความชอบเล็กน้อย ส่วนเนื้อสัมผัส ลักษณะทั่วไปและความชอบรวมได้คะแนนความชอบระดับเฉยๆ ส่วนรสชาติได้คะแนนความชอบต่ำ เนื่องจากเทมเป้มีรสขมและเฝื่อน สุจินดา (2533) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเทมเป้ถั่วลิสงจากเชื้อ *R. oligosporus* คือ นำถั่วลิสงมาแช่น้ำเดือด 1 ชั่วโมง สะเด็ดน้ำ แล้วนึ่ง 45 นาที ทิ้งให้เย็น คลุกด้วยกล้าเชื้อร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก อัดให้แน่น บรรจุในถุงพลาสติกเจาะรู บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 32 องศาเซลเซียส) นาน 20 ชั่วโมง จะได้เทมเป้ที่มีเส้นใยสีขาวยึดเกาะทั่วทั้งก้อน สามารถหั่นเป็นชิ้นบางๆ ได้ จากคุณประโยชน์ทางโภชนาการที่สูงและกระบวนการเตรียมเทมเป้ที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดอื่น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองด้วยผงกล้าเชื้อรา *R. oligosporus* สายพันธุ์บริสุทธิ์ สำหรับใช้เป็นแหล่งโปรตีนราคาถูก เสริมหรือทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ผู้บริโภคคนไทยคุ้นเคยและเพิ่มความหลากหลายให้กับผลิตภัณฑ์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมถั่วเหลืองและการวิเคราะห์คุณภาพ

นำถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 จากสถานีวิจัยพืชไร่เชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ มาคัดเอาสิ่งปนเปื้อนออก บรรจุในถุงพลาสติกชนิด Polyethylene (PE) ถุงละ 2 กิโลกรัม ปิดผนึกโดยใช้ความร้อนและเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง (อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส) แล้วนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate analysis) ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เส้นใยหยาบและคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการของ AOAC (2005) เพื่อกำหนดคุณสมบัติของวัตถุดิบเริ่มต้น

2. การเตรียมผงกล้าเชื้อและการคัดเลือกวัสดุหมัก

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อจะใช้เชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3098 ที่เก็บรักษาในหลอด lyophilized จากฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) นาน 2-3 วัน ในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วจึงถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อจากการสร้างเส้นใยและสปอร์และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำสปอร์มาเพาะเลี้ยงต่อในหลอดอาหารเอียง PDA ให้เจริญจนสร้างสปอร์สีดำ เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น (5-10 องศาเซลเซียส) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น (stock culture) (Junlakun, 2010) การเตรียมกล้าเชื้อจะใช้เชื้อจาก slant มาทำสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยใช้เชื้อรา 1 slant เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร เขย่า จะได้สารแขวนลอยสปอร์สำหรับใช้เพาะเลี้ยงเชื้อบนวัสดุหมักต่อไป (สุจินดา, 2534)

2.2 การคัดเลือกวัสดุหมัก (substrate) เพื่อผลิตผงกล้าเชื้อและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ

ทำการทดสอบเปรียบเทียบวัสดุหมัก 2 สิ่งทดลอง (treatment) คือ

สิ่งทดลองที่ 1: ใช้รำข้าว 10 กรัม ผสมให้เข้ากับน้ำ 5 มิลลิลิตร บรรจุใส่ถุงขนาด 5 x 8 นิ้ว ใส่คอขวดที่ปากถุงแล้วใช้สำลีอุด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำออกแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมเชื้อในรูปสารแขวนลอยสปอร์ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 5 วัน นำเชื้อที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำไปบดเป็นผงแล้วผสมกับแป้งมันสำปะหลังที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:99 ดัดแปลงจาก (สุจินดา, 2534)

สิ่งทดลองที่ 2: ใช้แป้งข้าวเจ้า รำ และน้ำ ในอัตราส่วน 9: 1: 7 โดยน้ำหนัก บรรจุใส่ถุงขนาด 5 x 8 นิ้ว ใส่คอขวดที่ปากถุงแล้วใช้สำลีอุด รีดให้เป็นแผ่น นึ่งฆ่าเชื้อความดันไอสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมสารแขวนลอยสปอร์ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 65 ชั่วโมง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง (สุภางค์, 2539)

นำกล้าเชื้อที่ได้จากทั้ง 2 สิ่งทดลอง บรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บไว้ในตู้เย็น (5-10 องศาเซลเซียส) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา *R. oligosporus* ที่เจริญบนวัสดุหมักทั้ง 2 สิ่งทดลองโดยการเตรียมสารละลายสปอร์จากกล้าเชื้อ 1 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่า ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA วัดอัตราการเจริญของเชื้อจากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อคัดเลือกชนิดของวัสดุหมักที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อเพื่อใช้เตรียมเทมเป้ถั่วเหลืองในขั้นตอนต่อไป

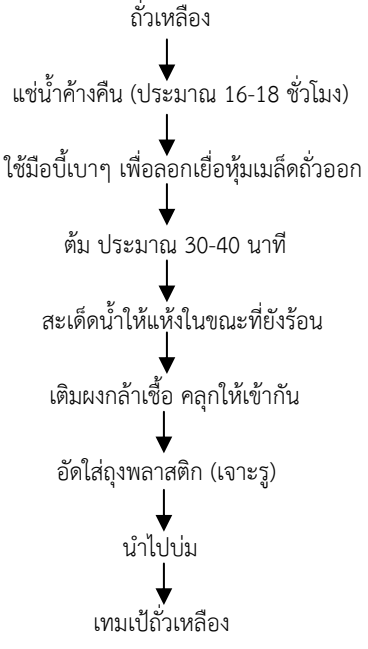
3. การศึกษาการผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองในระดับห้องปฏิบัติการ

3.1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเทมเป้ถั่วเหลือง

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองด้วยผงกล้าเชื้อรา *R. oligosporus* สายพันธุ์บริสุทธิ์ ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยดัดแปลงจากกรรมวิธีของสุจินดา (2534) แสดงดังภาพที่ 1 โดยจัดการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะปรากฏของเทมเป้ถั่วเหลือง 2 ปัจจัย คือ

1) อุณหภูมิในการบ่ม (องศาเซลเซียส) โดยศึกษาที่อุณหภูมิในการบ่ม 3 ระดับ คือ 25, 30, 35 องศาเซลเซียส

2) ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง) โดยศึกษาที่เวลาในการบ่ม 3 ระดับ คือ 18, 24, 30 ชั่วโมง โดยมีจำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด 9 สิ่งทดลอง



ภาพที่ 1 กรรมวิธีการผลิตเทมเป้ถั่วเหลือง
ที่มา: ดัดแปลงจากสุจินดา (2534)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์คุณภาพ ดังนี้

คุณภาพทางกายภาพ

- ลักษณะปรากฏ โดยดูจากการสร้างเส้นใยของเชื้อราว่ามีการกระจายทั่วทั้งผิวหน้าเมล็ดถั่ว การยึดเกาะตัวกันของเมล็ดถั่วและต้องสามารถหั่นเป็นชิ้นได้โดยเมล็ดถั่วยังเกาะติดกัน (สุจินดา, 2534)

- ค่า water activity (a_w) (AQUALAB Model series 3TE, USA)

คุณภาพทางเคมี

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเทมเป้ถั่วเหลืองด้วยเครื่องวัด pH (pH meter, Consort C830, Belgium)

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 หากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD

3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเทมเป้ถั่วเหลืองผง

นำเทมเป้ถั่วเหลืองที่คัดเลือกจากข้อ 3.1 ไปอบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนแบบถาด โดยใช้อุณหภูมิในการอบ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าองค์ประกอบทางเคมีเช่นเดียวกับข้อ 1 เพื่อเปรียบเทียบค่าองค์ประกอบทางเคมีกับถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักด้วยผงกล้าเชื้อ

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 พบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีค่าความชื้นร้อยละ 9.05 ไขมันร้อยละ 12.99 โปรตีนร้อยละ 37.79 เส้นใยหยาบร้อยละ 4.32 เถ้าร้อยละ 5.26 และคาร์โบไฮเดรต (รวมเส้นใยหยาบ) ร้อยละ 34.91 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีค่าโปรตีนสูงและแม้จะมีค่าไขมันในปริมาณที่ค่อนข้างสูงแต่ส่วนใหญ่เป็นไขมันที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ (มลศิริ, 2545) ถั่วเหลืองจึงเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพสูงและมีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับโปรตีนจากเนื้อสัตว์ สำหรับไขมันในถั่วเหลืองนั้นส่วนใหญ่เป็นไขมันที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ คือ

ร้อยละ 50 ของกรดไขมันทั้งหมดเป็นกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้เองต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังประกอบไปด้วยสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพอื่นๆ มากมาย เช่น เลซิติน ใยอาหาร วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ไนอะซินโฟเลต วิตามินอี วิตามินเค สารโพลีฟินอล เลกตินและไอโซฟลาโวน เป็นต้น (จันทร์เพ็ญ และคณะ, 2546) จึงมีการนำถั่วเหลืองมาเป็นวัตถุดิบหลักในการประกอบอาหารอย่างกว้างขวาง (มลศิริ, 2545)

2. ผลการเตรียมผงกล้าเชื้อและชนิดของวัสดุหมัก

2.1 ผลการเตรียมกล้าเชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3089 ผลการศึกษาพบว่า เชื้อรา *R. oligosporus* TISTR 3089 เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หลังการบ่มเชื้อนาน 2-3 วัน ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยจะปรากฏเส้นใยสีขาวเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อและเมื่อเพิ่มเวลาการบ่มเชื้อให้นานขึ้นเป็น 7-10 วัน จะพบการสร้างสปอร์สีดำ ไม่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น สังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีลักษณะขุ่นและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยยังคงมีสีเหลืองอ่อนเหมือนก่อนการเติมเชื้อ เมื่อถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และวัดอัตราการเจริญของเชื้อโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกๆ วัน พบว่าเชื้อรามีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มเชื้อนานขึ้น และเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (9.0 เซนติเมตร) เมื่อบ่มเชื้อนาน 7 วัน โดยสามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 1.0, 2.3, 5.0, 6.3, 8.0, 8.5 และ 9.0 เซนติเมตร เมื่อบ่มเชื้อนาน 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 2 (ก) และ (ข)

ภาพที่ 2 เชื้อ *R. oligosporus* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (ก) และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ข)

2.2 ผลการเจริญของกล้าเชื้อ *R. oligosporus* บนวัสดุหมัก

ผลการศึกษาการเตรียมกล้าเชื้อโดยใช้วัสดุหมัก ทั้ง 2 สิ่งทดลองพบว่า เชื้อ *R. oligosporus* เจริญได้บนวัสดุหมักทั้ง 2 สิ่งทดลอง สังเกตได้จากการพบเส้นใยสีขาวที่เชื้อสร้างขึ้นบนวัสดุหมักทั้ง 2 สิ่งทดลอง ผลการทดสอบการเจริญของผงกล้าเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และวัดอัตราการเจริญของเชื้อพบว่า กล้าเชื้อ *R. oligosporus* ที่เตรียมจากวัสดุตามสิ่งทดลองที่ 1 ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นปรากฏบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ และเมื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีพบว่า เชื้อรามีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มเชื้อนานขึ้น และเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (9.0 เซนติเมตร) เมื่อบ่มเชื้อนาน 7 วัน โดยเกิดการสร้างเส้นใยสีขาว ฟู และเมื่อเพิ่มเวลาการบ่มเชื้อให้นานขึ้นจะพบการสร้างสปอร์สีดำและเส้นใยเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเทา ในขณะที่กล้าเชื้อ *R. oligosporus* ที่เตรียมจากวัสดุตามสิ่งทดลองที่ 2 พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นปรากฏบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยสังเกตเห็นโคโลนีสีครีมของเชื้อแบคทีเรียเจริญร่วมด้วย และเมื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีพบว่า สามารถวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีได้เพียงหลังการบ่มเชื้อนาน 3 วัน เนื่องจากมีการเจริญของจุลินทรีย์อื่นแทนที่เชื้อราจนไม่สามารถวัดการเจริญของเชื้อได้ แสดงดังตารางที่ 1 และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า กล้าเชื้อ *R. oligosporus* ที่เตรียมจากวัสดุตามสิ่งทดลองที่ 1 ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นและพบการสร้างเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ *R. oligosporus* เช่นเดิม สำหรับกล้าเชื้อ *R. oligosporus* ที่เตรียมจากวัสดุหมักและกรรมวิธีตามสิ่งทดลองที่ 2 พบว่า มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียแต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นสายพันธุ์ใด

ตารางที่ 1 การเจริญของกล้าเชื้อ *R. oligosporus* ที่เจริญบนบนวัสดุหมัก

เวลาบ่ม (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)		ลักษณะปรากฏ	
	สิ่งทดลองที่ 1	สิ่งทดลองที่ 2	สิ่งทดลองที่ 1	สิ่งทดลองที่ 2
1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.4	พบเส้นใยสีขาว	พบเส้นใยสีขาว
2	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.4	พบเส้นใยสีขาว	พบเส้นใยสีขาว
3	3.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2	พบเส้นใยสีขาว ฟู	พบเส้นใยสีขาว
4	6.3 ± 0.1	ไม่สามารถวัดได้	พบเส้นใยสีขาว ฟู	พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นปรากฏบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ
5	7.1 ± 0.4	ไม่สามารถวัดได้	เส้นใยบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีเทา ฟู	พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นปรากฏบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ
6	7.8 ± 0.2	ไม่สามารถวัดได้	เส้นใยบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีเทา ฟู พบการสร้างสปอร์สีดำ	พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นปรากฏบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ
7	9.0 ± 0.0	ไม่สามารถวัดได้	เส้นใยสีขาว ฟู พบการสร้างสปอร์สีดำ	พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นปรากฏบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

สิ่งทดลองที่ 1 หมายถึง ใช้รำข้าว 10 กรัม ผสมให้เข้ากับน้ำ 5 มิลลิลิตร
สิ่งทดลองที่ 2 หมายถึง ใช้แป้งข้าวเจ้า รำ และน้ำ ในอัตราส่วน 9: 1: 7 โดยน้ำหนัก

ดังนั้นวัสดุหมักและกรรมวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อรา *R. oligosporus* คือ สิ่งทดลองที่ 1 ซึ่งจะใช้รำข้าวผสมกับน้ำในอัตราส่วน 10 กรัม: 5 มิลลิลิตร เติมสารแขวนลอยสปอร์ 1 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน นำเชื้อที่ได้ไปอบแห้งแล้วบดเป็นผง แล้วจึงนำไปผสมกับแป้งมันสำปะหลังที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:99 บรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น (5-10 องศาเซลเซียส) จะได้ผงกล้าเชื้อ *R. oligosporus* สำหรับใช้ผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองต่อไป

3. ผลการศึกษาการผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองในระดับห้องปฏิบัติการ

3.1 ผลการศึกษากระบวนการเตรียมเทมเป้ถั่วเหลืองด้วยผงกล้าเชื้อ *R. oligosporus* ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ สุจินดา (2534) โดยจัดการทดลองแบบ Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะปรากฏของเทมเป้ถั่วเหลือง ผลการศึกษาพบว่า เมื่อใช้ผงกล้าเชื้อ *R. oligosporus* ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มมีผลต่อการเจริญและการสร้างเส้นใยราที่เจริญปกคลุมเมล็ดถั่วเหลืองซึ่งมีผลต่อลักษณะปรากฏของเทมเป้ถั่วเหลือง แต่ไม่มีผลต่อค่า water activity (aw) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของเทมเป้ถั่วเหลือง โดยการใช้อุณหภูมิการบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการบ่มนาน 18 ชั่วโมง มีผลให้ *R. oligosporus* เจริญได้ดี รามีการสร้างเส้นใยสีขาวฟู เจริญปกคลุมเมล็ดถั่วเหลืองแต่ไม่หนาแน่นมีผลให้การเกาะติดกันของเมล็ดถั่วเหลืองเกิดได้ไม่ดีนัก เมื่อหั่นเป็นชิ้นจึงมีผลให้เมล็ดถั่วเหลืองหลุดออกจากกัน เมื่อเพิ่มเวลาการบ่มเป็น 24 ชั่วโมง พบว่า มีผลให้ *R. oligosporus* เจริญได้ดี มีการสร้างเส้นใยสีขาวเพิ่มมากขึ้นและฟู เจริญปกคลุมเมล็ดถั่วเหลืองอย่างหนาแน่นมีผลให้เมล็ดถั่วเหลืองเกาะติดกันได้ดีและสามารถหั่นเป็นชิ้นได้โดยที่เมล็ดถั่วเหลืองยังเกาะติดไม่หลุดออกจากกันซึ่งเป็นลักษณะปรากฏที่ดีของเทมเป้ถั่วเหลือง แต่เมื่อเพิ่มเวลาการบ่มเป็น 30 ชั่วโมง พบว่า แม้จะมีผลให้ราสร้างเส้นใยได้มากขึ้น แต่ก็ทำให้เส้นใยสีขาวเปลี่ยนเป็นสีเทาและพบการสร้างสปอร์สีดำเพิ่มมากขึ้นด้วย ซึ่งจะมีผลให้เทมเป้ถั่วเหลืองที่ได้มีลักษณะปรากฏไม่ดี สำหรับการใช้อุณหภูมิการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อบ่มนาน 18 ชั่วโมง มีผลให้ *R. oligosporus* เจริญได้ดี แต่เส้นใยราเปลี่ยนเป็นสีเทา มีการสร้างสปอร์สีดำ

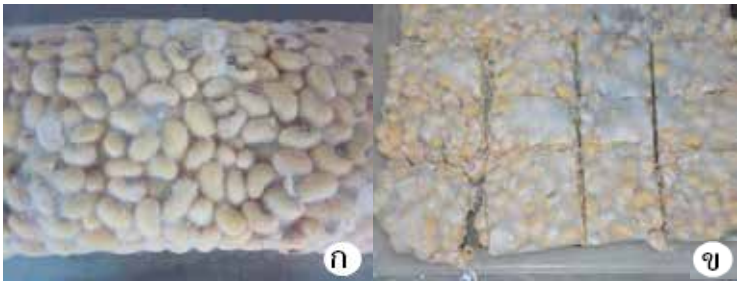
เล็กน้อย และเมื่อเพิ่มเวลาการบ่มเป็น 24 และ 30 ชั่วโมง พบว่า เส้นใยราเปลี่ยนเป็นสีเทาเพิ่มขึ้นและมีการสร้างสปอร์สีดำเพิ่มขึ้นด้วย ในขณะที่เมื่อใช้อุณหภูมิการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส กลับพบว่าสร้างเส้นใยราน้อยลง การเกาะติดกันของเมล็ดถั่วเหลืองเกิดได้ไม่ดี และไม่สามารถหั่นเป็นชิ้นได้ แสดงดังตารางที่ 2

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองด้วยผงกล้าเชื้อ *R. oligosporus* คือ ใช้ผงกล้าเชื้อร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการบ่มนาน 24 ชั่วโมง จะได้เทมเป้ถั่วเหลืองที่มีลักษณะปรากฏที่ดี พบเส้นใยสีขาวเจริญปกคลุมเมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดถั่วอัดแน่น ไม่พบการสร้างสปอร์สีดำและเมื่อหั่นเป็นชิ้น เมล็ดถั่วยังคงเกาะติดไม่หลุดออกจากกัน เทมเป้ถั่วเหลืองสดและลักษณะปรากฏของเทมเป้ถั่วเหลืองสดที่ดี แสดงดังภาพที่ 3 (ก) และ (ข) ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลของอุณหภูมิและเวลาในการบ่มต่อการเจริญของ *R. oligosporus* และลักษณะปรากฏของเทมเป้ถั่วเหลืองสด

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	การเจริญของ *R. oligosporus*	ลักษณะปรากฏของเทมเป้ถั่วเหลือง	ค่าคุณภาพ	
				a_w ns	pH ns
25	18	เจริญได้ดี มีการสร้างเส้นใยสีขาว ฟูปกคลุมเมล็ดถั่วเหลืองแต่ไม่หนาแน่น	ถั่วเหลืองเกาะติดกันดีพอควร	0.72	6.52
25	24	เจริญได้ดีมีการสร้างเส้นใยสีขาว ฟูและหนาแน่น ปกคลุมเมล็ดถั่วเหลือง	ถั่วเหลืองเกาะติดกันดี เมื่อหั่นเป็นชิ้นเมล็ดยังคงเกาะติดกันอยู่	0.72	6.52
25	30	เจริญได้ดี เส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเทาและพบการสร้างสปอร์สีดำ	ถั่วเหลืองเกาะติดกันดี เมื่อหั่นเป็นชิ้นเมล็ดยังคงเกาะติดกันอยู่	0.74	6.54
30	18	เจริญได้ดี เส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเทาและพบการสร้างสปอร์สีดำเล็กน้อย	ถั่วเหลืองเกาะติดกันดี เมื่อหั่นเป็นชิ้นเมล็ดยังคงเกาะติดกันอยู่	0.72	6.54
30	24	เจริญได้ดี เส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเทาและพบการสร้างสปอร์สีดำมากขึ้น	ถั่วเหลืองเกาะติดกันดี เมื่อหั่นเป็นชิ้นเมล็ดยังคงเกาะติดกันอยู่	0.72	6.54
30	30	เจริญได้ดี เส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเทาและพบการสร้างสปอร์สีดำมากขึ้น	ถั่วเหลืองเกาะติดกันดี เมื่อหั่นเป็นชิ้นเมล็ดยังคงเกาะติดกันอยู่	0.74	6.54
35	18	การเจริญลดลง การสร้างเส้นใยน้อยลง	เมล็ดถั่วไม่เกาะติดกัน	0.74	6.54
35	24	การเจริญลดลง การสร้างเส้นใยน้อยลง	เมล็ดถั่วไม่เกาะติดกัน	0.74	6.56
35	30	การเจริญลดลง การสร้างเส้นใยน้อยลง	เมล็ดถั่วไม่เกาะติดกัน	0.76	6.56

ns หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในแนวตั้งเดียวกันแสดงความไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 3 เทมเป้ถั่วเหลืองสด จากการเตรียมด้วยผงกล้าเชื้อรา *R. oligosporus* (ก) ลักษณะปรากฏของเทมเป้ถั่วเหลืองสด (ข)

3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเทมเป้ถั่วเหลืองด้วยผงกล้าเชื้อ *R. oligosporus*

เมื่อนำเทมเป้ถั่วเหลืองจากข้อ 3.1 ไปอบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน โดยใช้อุณหภูมิในการอบ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า เทมเป้ถั่วเหลืองผงมีค่าความชื้นร้อยละ 4.11 ไขมันร้อยละ 17.88 โปรตีนร้อยละ 43.17 เส้นใยหยาบร้อยละ 5.57 เถ้าร้อยละ 3.79 และคาร์โบไฮเดรต (รวมเส้นใยหยาบ) ร้อยละ 31.05 เปรียบเทียบกับถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 แสดงดังตารางที่ 3

จากผลการศึกษาพบว่า ถั่วเหลืองหมักจะมีปริมาณโปรตีน ไขมัน และเส้นใยหยาบสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองซึ่งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในกระบวนการหมัก โดยปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเป็นผลจากกิจกรรมของเชื้อราที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพและชีวเคมีที่สามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตให้เป็นโปรตีนได้ จึงมีผลให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตลดลง สอดคล้องกับผลการศึกษาของเอกชัย และคณะ (2554) ที่พบว่า กระบวนการหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อจุลินทรีย์มีผลให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่าถั่วเหลืองหมักที่ได้มีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มสูงขึ้นและพบกรดอะมิโนรวมทั้งสารอื่นๆ ที่มีประโยชน์มากมาย ซึ่งเป็นผลจากเหตุผล 2 ประการ คือ ประการแรกรามิได้เพียงแต่ย่อยอาหารเท่านั้น แต่ยังสร้างสารต่างๆ เช่น วิตามินบี 1 และ วิตามินบี 12 ประการที่สองสารอาหารที่มีคุณค่า เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีนที่ถูกอัดอยู่ในเอนโดสเปิร์ม (endosperm)

ตารางที่ 3 ค่า water activity (a_w) และองค์ประกอบทางเคมี (โดยประมาณ) ของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และเทมเป้ถั่วเหลืองผง

ค่าคุณภาพ (ร้อยละ)	ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60	เทมเป้ถั่วเหลืองผง
a_w	0.55	0.23
ความชื้น	9.05	4.11
ไขมัน	12.99	17.88
โปรตีน (%Nx6.25)	37.79	43.17
เส้นใยหยาบ	4.32	5.57
เถ้า	5.26	3.79
คาร์โบไฮเดรต (รวมเส้นใยหยาบ)	34.91	31.05

และล้อมรอบด้วยเยื่อเซลลูโลสที่ย่อยยากแม้แต่การโม่หรือการบดจะทำให้อาหารบางส่วนเท่านั้นที่ถูกย่อย แต่หากอาหารชนิดเดียวกันนี้ผ่านการหมักโดยรา แล้วราจะผลิตเซลลูเลสสำหรับย่อยเซลลูโลส ซึ่งจะทำให้ผนังที่ล้อมรอบโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตถูกทำลายไป และเมื่อนำธัญพืชเหล่านั้นมาแช่น้ำ มีผลให้การดูดซึมสารประกอบของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตเกิดขึ้นได้มากและน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของมนุษย์จะทำงานได้ดียิ่งขึ้น (Murooka & Yamshita, 2008 และ Chen et al., 2012)

จากคุณประโยชน์ทางด้านโภชนาการของเทมเป้ถั่วเหลืองโดยเฉพาะปริมาณโปรตีนที่มีปริมาณสูงจากผลการศึกษาขั้นต้น ตลอดจนผลการวิจัยที่ผ่านมาที่แสดงให้เห็นว่า ถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราในสกุล *Rhizopus* จะมีลักษณะพิเศษคือ มีเนื้อสัมผัสคล้ายเนื้อสัตว์ มีกลิ่นรสที่ดี และมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับเนื้อสัตว์ โดยเทมเป้ถั่วเหลืองสดจะมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 19.5 เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อไก่ เนื้อวัว ไข่ และนม ซึ่งจะมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 21, 20, 13, 4 ตามลำดับ (กองโภชนาการ, 2545) ในขณะที่เทมเป้ถั่วเหลืองผง ที่ได้มีแนวโน้มความเป็นไปได้ในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่ ดังนั้นจึงควรมีการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่เพื่อ เพิ่มความหลากหลายให้กับผลิตภัณฑ์และยังสามารถทำให้ผู้บริโภคเข้าถึงแหล่งโปรตีนคุณภาพสูงแต่มีราคาถูกเพื่อเป็นทางเลือกใหม่แก่ผู้บริโภคต่อไป

สรุปผลการวิจัย

กระบวนการผลิตเทมเป้ถั่วเหลืองด้วยผงกล้าเชื้อ *R. oligosporus* TISTR 3098 ในระดับห้องปฏิบัติการ คือ นำถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 มาแช่น้ำ 16 ชั่วโมง ลอกเยื่อหุ้มเมล็ดถั่วออก ต้มในน้ำเดือดนาน 40 นาที สะเด็ดน้ำให้แห้งในขณะที่ยังร้อน เติมผงกล้าเชื้อร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก คลุกให้เข้ากัน ตักใส่ถุงพลาสติก (12 x 18 นิ้ว) ถุงละ 500 กรัม อัดให้เมล็ดถั่วเหลืองเป็นก้อนสี่เหลี่ยม ปิดปากถุง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อนำเทมเป้ถั่วเหลืองไปอบแห้งและนำไปวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบทางเคมีพบว่า มีค่าความชื้นร้อยละ 4.11 ไขมันร้อยละ 17.88 โปรตีนร้อยละ 43.17 เถ้าร้อยละ 3.79 เส้นใยหยาบร้อยละ 5.57 และคาร์โบไฮเดรต (รวมเส้นใยหยาบ) ร้อยละ 31.05 นั่นคือ กระบวนการหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *R. oligosporus* มีผลให้องค์ประกอบที่สำคัญทางเคมีของถั่วเหลือง คือ โปรตีน ไขมัน และเส้นใยหยาบเพิ่มขึ้นแต่มีผลให้คาร์โบไฮเดรตลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่หมัก ดังนั้นจึงควรมีการนำถั่วเหลืองหมักไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่เพื่อทดแทนเนื้อสัตว์ในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะนักวิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำหรับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยและคณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่อำนวยความสะดวกและสนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กองโภชนาการ กรมอนามัย. 2545. ตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สยามเจริญพาณิชย์.

จันทร์เพ็ญ ตั้งจิตรเจริญกุล, วิเชียร กิจปรีชาวนิช, สุรางค์ สุธิราวุธ, ปทุมพร ฉิมอเนก, วรรณา ประไพหลง, วราวุฒิ ครูส่ง และบุษบา ยงสมิทธ์. 2546. การเพิ่มปริมาณวิตามินบี 12 ของถั่วเน่าด้วยจุลินทรีย์ผสม. (ออนไลน์). http://www.kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC4 105017.pdf. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41. 3-7 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2546 (15 ตุลาคม 2553).

ธงชัย สุวรรณสิชณ์. 2531. การพัฒนาเทมเป้ถั่วลิสง. สัมมนาปริญญาตรี. สาขาวิชาพัฒนผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มลศิริ วีโรทัย. 2545. เทคโนโลยีของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: บริษัทพัฒนาคุณภาพวิชาการจำกัด.

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

สุจินดา สุวรรณกิจ. 2533. การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเทมเป้ถั่วลิสง. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. สาขาวิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ: เกษตรศาสตร์.

สุจินดา สุวรรณกิจ. 2534. การผลิตถั่วเหลืองหมักถั่วลิสงระดับอุตสาหกรรมในครัวเรือน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภางค์ เรืองฉาย. 2539. การผลิตหัวเชื้อเทมเป้ผงในระดับอุตสาหกรรมครัวเรือน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกชัย ชูเกียรติโรจน์, ศศิธร อินเขียน, เกตุการ ดาจันทา และ อรุณี อภิชาติสรางกูร. 2554. ถั่วเน่า-ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองของประเทศไทย. SWU Science Journal 1: 198-213.

AOAC. 2005. Official method of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 18th (ed.). The Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. Gaithersburg, MD, USA.

Chen K, Erh MH, Su NW, Liu WH, Chou CC, Cheng KC. 2012. Soy foods and soybean products: from traditional use to modern applications. Applied Microbiology & Biotechnology 96: 9-22.

Junlakun P, Haruthaithanasan V, Chompreeda P, Chantarapanont W. 2010. Effects of Hom Mali brown rice flour extract on *Aspergillus niger* growth. Kasetsart Journal: Natural Science. 44 (1): 100- 106.

Murooka Y, Yamshita M. 2008. Traditional healthful fermented products of Japan**.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 35(8): 791-798.

Ogawa O, Tokumasu S, Keisuke T. 2004. An original habitat of tempeh molds. Mycoscience. 45: 271-276.

Seng K. 1998. Development of tempeh based snack food. [online]. available at: http//: www.nre.vic.gov.au/TRADE/ASIAVEG/nlaf_02 (2 February 2011).