บทความวิชาการ

ถั่วเน่า-ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองของประเทศไทย

เอกชัย ชูเกียรติโรจน์[1*] ศศิธร อินเขียน[2] เกตุการ ดาจันทา[3] และ อรุณี อภิชาติสรางกูร[2]

บทคัดย่อ

ถั่วเน่าเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองที่นิยมบริโภคในเขตภาคเหนือของประเทศไทย และมีกระบวนการผลิตคล้ายคลึงกับถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองที่พบในประเทศอื่น ขั้นตอนการผลิตจะเริ่มจากการนำถั่วเหลืองมาต้มจนสุก และหมักด้วยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติจนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่น สี และรสที่เป็นเอกลักษณ์ กระบวนการหมักถั่วเน่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพและชีวเคมีของผลิตภัณฑ์ งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับถั่วเน่ายังไม่แพร่หลายมากเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของประเทศอื่น ดังนั้น บทความนี้ได้เรียบเรียงขึ้นเพื่อรวบรวมข้อมูลและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับถั่วเน่า โดยนำเสนอในด้านกรรมวิธีการผลิตจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก ตลอดจนคุณค่าทางโภชนาการ

คำสำคัญ: ถั่วเน่า ถั่วเหลืองหมัก *Bacillus*

[1] สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

[2] ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[3] คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน, E-mail: ekachai@mfu.ac.th

Thua Nao - An Indigenous Fermented Soybean of Thailand

Ekachai Chukeatirote[1*], Sasitorn In-khian[2], Katekan Dajanta[3] and Arunee Apichartsrangkoon[2]

ABSTRACT

Thua Nao, an indigenous fermented soybean of Thailand, is popularly consumed in Northern Thailand. Similar to other fermented soybean foods, the production of *Thua Nao* typically begins with the boiling of soybean seeds. The cooked soybeans are then naturally fermented yielding the products with distinct characteristics (i.e, aromas and flavours). It has been found that, during the fermentation, major groups of bacteria are *Bacillus,* which are responsible for changes of physico-and biochemical qualities of the products. This present paper aims to document up-to-date information of Thai *thua nao* including fermentation process, microbes involved, and nutritive data.

Keywords: *Thua Nao,* fermented soybeans, *Bacillus*

[1]School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai

[2]Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai

[3]Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok

[*]Corresponding author: ekachai@mfu.ac.th

ถั่วเน่าและผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก

ถั่วเน่าเป็นถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองของประเทศไทย นิยมบริโภคในเขตภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แพร่ และแม่ฮ่องสอน โดยใช้เป็นเครื่องปรุงรสในอาหารพื้นเมือง เช่น ขนมจีน-น้ำเงี้ยว น้ำพริกอ่อง เป็นต้น ถั่วเหลืองหมักเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วย โปรตีน และสารอาหารอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากถั่วเน่าแล้วยังพบผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักในอีกหลายประเทศที่รู้จักกันดี ได้แก่ นัตโตะ *(Natto)* ของประเทศญี่ปุ่น *Dawadawa* หรือ *Iru* ของประเทศไนจีเรียและอีกหลายประเทศในทวีปแอฟริกา *Kinema* ของประเทศอินเดียและเนปาล และ *Chungkukjang* ของประเทศเกาหลี [1] (รูปที่ 1) ผลจากการหมักถั่วเหลืองจะได้สารเหนียวซึ่งเป็นพอลิกลูทามิก (polyglutamic acid, PGA) พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) มีกลิ่นฉุนของแอมโมเนีย และมีรสชาติเฉพาะ

รูปที่ 1 ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก ก) ถั่วเน่าสด จากอำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่; ข) Natto [2]; ค) Dawadawa [3]; และ ง) Chungkukjang [4]

กรรมวิธีการผลิต

วัตถุดิบสำคัญในการผลิตถั่วหมัก ได้แก่ ถั่วเหลือง น้ำ และจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแล้ว กรรมวิธีการผลิตถั่วเน่าและถั่วเหลืองหมักชนิดอื่นๆ จะมีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ในขั้นต้นจะนำถั่วเหลืองมาล้างให้สะอาด และแช่น้ำไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จนเมล็ดถั่วนิ่ม (แต่ไม่เละ) สามารถทดสอบได้โดยการใช้นิ้วมือบีบเมล็ดถั่วให้แตกได้ง่าย นำเมล็ดถั่วเหลืองสุกมากรองน้ำออก ผึ่งให้เย็น และบรรจุลงในภาชนะ (ตะกร้าสาน หรือชะลอม) ที่รองด้วยใบตองสะอาด ปิดด้วยผ้าขาวบาง และหมักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังกระบวนการหมักจะมีกลิ่น สี และรสชาติเฉพาะตัว โดยเฉพาะกลิ่นจะรุนแรง คล้ายกับอาหารที่เน่าเสีย และเป็นที่มาของชื่อผลิตภัณฑ์ กระบวนการหมักถั่วเน่าเกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ [5] ในขณะที่การผลิต *Natto* เกิดขึ้นจากการใช้เชื้อบริสุทธิ์ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ *natto* [6] สำหรับตารางที่ 1 ได้แสดงรายชื่อผลิตภัณฑ์ถั่วหมักตลอดจนกระบวนการผลิต

ตารางที่ 1 ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักและกระบวนการผลิต

ผลิตภัณฑ์	กระบวนการผลิต	เอกสารอ้างอิง
ถั่วเน่า	ต้มเมล็ดถั่วเหลืองให้เปื่อยใช้เวลา 2 - 3 ชั่วโมง หมักในภาชนะบรรจุ หรือตะกร้ารองด้วยใบตองนาน 2 - 3 คืน	[5]
Natto	แช่เมล็ดถั่วเหลืองเป็นเวลา 12 - 20 ชั่วโมง ต้มให้สุก จากนั้นผึ่งให้เย็นและใส่เชื้อ B. subtilis (natto) คลุกให้เข้ากันและห่อด้วยกระดาษหรือฟางข้าวที่อุณหภูมิ 40 - 43°C เป็นเวลา 18 - 20 ชั่วโมง	[6]
Kinema	แช่เมล็ดถั่วเหลืองเป็นเวลา 12 - 20 ชั่วโมง ต้มให้สุก ประมาณ 90 นาที ผึ่งให้เย็น และหมักในภาชนะที่ปิดผิวหน้าด้วยใบตอง หมักที่อุณหภูมิห้อง 1 - 3 วัน	[7, 8]
Chungkukjang	แช่เมล็ดถั่วเหลืองข้ามคืน นึ่งภายใต้ความดัน 120°C นาน 3.5 ชั่วโมง เมื่ออุณหภูมิลดลงถึง 40°C ห่อด้วยฟางข้าว หมักในตู้บ่มอุณหภูมิ 38°C นาน 3 วัน	[9]
Dawadawa	แช่เมล็ดถั่วเหลืองข้ามคืน ต้มให้สุกนาน 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็น หมักในภาชนะปิดผิวหน้าด้วยใบตองเป็นเวลา 3 วัน	[10, 11]

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักถั่วเน่า

ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่า การผลิตถั่วเน่ายังเป็นการหมักแบบดั้งเดิม โดยใช้เชื้อตั้งต้นที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ จากรายงานการวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องจะเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* สำหรับชนิดของแบคทีเรียในจีนัสนี้ที่มีรายงานว่าพบในกระบวนการหมักถั่วเน่า ได้แก่ *B. subtilis, B. licheniformis, B. thermocatenulatus, B. pumilus* และ *B. megaterium* [5, 12, 13] มีรายงานของการพบเชื้อในกลุ่มอื่นเช่นกัน อาทิ lactic acid bacteria และแบคทีเรียในกลุ่ม cocci ที่ยังระบุชนิดไม่ได้ [5, 14]

เชื้อ *Bacillus* spp. มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักถั่วเน่า โดยจะผลิตเอนไซม์มาใช้ในการย่อยโปรตีนในถั่วเหลือง แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดที่สำคัญ คือ เอนไซม์โปรติเอส (proteases) ในกระบวนการย่อยโปรตีนจะได้เปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดสารประกอบเอมีนอิสระในรูปของเกลือแอมโมเนียมด้วย และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของถั่วเน่ามีค่าสูงขึ้น (alkaline condition) [1]

Chantawannakul et al. [12] ได้ทำการแยกและคัดกรองเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างถั่วเน่าที่ผลิตในภาคเหนือของประเทศไทย คือ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง แพร่ พะเยา และแม่ฮ่องสอน พบว่าเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสามารถคัดเลือกได้แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 38 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ดี นอกจากนี้งานวิจัยดังกล่าวยังได้เสนอแนวทางการพัฒนากระบวนการหมักถั่วเน่าโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้

คุณค่าทางโภชนาการ

Proximate composition

การผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการหมักถั่วเน่ามีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านกายภาพและชีวเคมีของผลิตภัณฑ์ ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Campbell-Platt [15] พบว่า 95% ของเชื้อ *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่าง *Dawadawa* สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสและอะไมเลส ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ และมีรายงานวิจัยที่ศึกษาถึงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก เช่น *Natto* [16], *Kinema* [7] และถั่วเน่า [12, 17] เอนไซม์โปรติเอสจะทำหน้าที่ย่อยโปรตีนในกระบวนการหมักถั่วเหลือง ได้สายเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระออกมา ทำให้เกิดรสชาติเฉพาะของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้แบคทีเรียสามารถใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ ทำให้มีการสะสมของแอมโมเนียทำให้ค่า pH สูงขึ้น [1, 18, 19] ในบางสภาวะที่ค่า pH มีค่าสูงมากถึง 8.0-8.3 จะทำให้เกิดการระเหยของแอมโมเนีย ทำให้มีกลิ่นฉุน ซึ่งส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคบางกลุ่ม ดังนั้น มีงานวิจัยที่พยายามศึกษาถึงการยับยั้งกระบวนการเกิดแอมโมเนีย (ammonogenesis) นี้ โดยเติมสารบางอย่าง เช่น glycerol และ sodium chloride ในขั้นตอนการหมักหรือการควบคุมปริมาณของก๊าซบางชนิด ในภาชนะที่จำกัดปริมาณออกซิเจนได้ [13, 20] สำหรับผลิตภัณฑ์ *Natto* มีรายงานว่าสามารถควบคุมการเกิดแอมโมเนียโดยใช้อุณหภูมิต่ำเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในขณะที่เอนไซม์ย่อยโปรตีนยังคงทำงานได้ [18]

กิจกรรมทางชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงมีผลให้รูปแบบของ proximate compositions ของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ตารางที่ 2 ได้สรุปถึงค่า proximate compositions ของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่เคยมีการรายงาน อย่างไรก็ตาม มีปัจจัยอื่นที่ทำให้เกิดความแตกต่างของข้อมูลดังกล่าวด้วย อาทิ พันธุ์ของถั่วเหลืองและกรรมวิธีการผลิต เป็นต้น

ตารางที่ 2 Proximate compositions ของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *Bacillus* spp.

Chemical *compositions*	***Kinema*** **[7]**	***Thua Nao*** **[21, 22]**	***Dawadawa*** **[10, 23]**	***Chungkukjang*** **[24]**	***Natto*** **[25]**
Protein (%)	48	38.76	31.25	15.70	42.51
Fat (%)	17	16.97	19.90	9.0	21.11
Ash (%)	7	5.73	1.72	5.2	4.38
Carbohydrate (%)	28	26.38	22.86	16.1	30.80
Fiber (%)	-	11.93	3.47	-	-
Reducing sugar (%)	-	-	-	-	8.20
Ammonia (mg/100g)	-	-	-	-	240.49
Moisture (%)	62	-	59.40	54.00	59.30
pH	7.89	8.0 - 8.6	8.2 - 8.9	8.49	6.83

หมายเหตุ: -, ไม่มีรายงานของข้อมูล

กรดอะมิโน

ถั่วเหลืองมีโปรตีนสูงถึง 40% จัดว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่ดีไม่แพ้เนื้อสัตว์ โปรตีนในถั่วเหลืองประกอบไปด้วยสารประกอบหลายชนิด และมี β-conglycinin และ glycinin ในสัดส่วน 65 - 80% ของโปรตีนทั้งหมด [24] สำหรับปริมาณกรดอะมิโนในถั่วเหลืองมีรายงานของ Gupta [25] ว่าพบกรดอะมิโน glutamic, aspartic, leucine, lysine, arginine, proline และ serine ในปริมาณมาก ส่วนกรดอะมิโน methionine และ cysteine มีปริมาณน้อยมาก และจัดเป็นปัจจัยจำกัดเมื่อพิจารณาถึงคุณค่าทางโภชนาการ สำหรับผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักพบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระ ทั้งนี้เนื่องมาจากการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนของจุลินทรีย์ [28] จากการศึกษาพบว่ามีปัจจัยสำคัญต่างๆ เช่น สายพันธุ์ของถั่วเหลือง กรรมวิธีการผลิต สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ระยะเวลา และสภาวะที่ใช้ในการหมักที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก และสภาวะในการบ่มในกระบวนการผลิต [24,28,29] เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะมิโนระหว่างถั่วเหลืองก่อนและหลังการหมัก พบว่าผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก *Kinema* จะมีปริมาณของกรดอะมิโนในกลุ่ม hydrophobic ในสัดส่วน

ที่สูง [28] นอกจากนี้ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักยังมีบทบาทสำคัญต่อรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์นั้นด้วย จากรายงานการวิจัยพบว่าผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักจะมีการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนที่ให้รสขม (เช่น arginine, histidine, isoleucine, leucine และ methionine เป็นต้น) อย่างมีนัยสำคัญ ตารางที่ 3 ได้รวบรวมข้อมูลของชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระที่พบในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักแต่ละชนิด

ตารางที่ 3 กรดอะมิโนอิสระ (กรัม ต่อ กิโลกรัม ของน้ำหนักแห้งผลิตภัณฑ์) ของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก

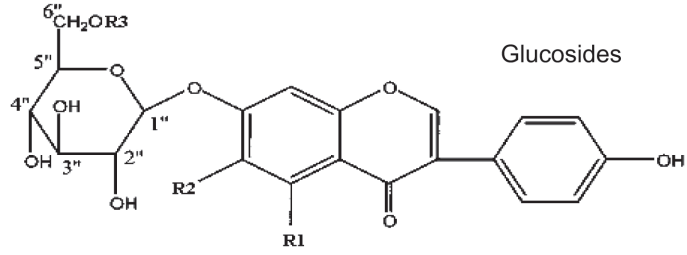
Free amino acids	***Thua Nao*** **[30]**	***Natto*** **[31]**	***Kinema*** **[28]**	***Chungkukjang*** **[24]**	***Dawadawa*** **[29]**
Alanine	2.03	0.66	4.73	0.40	0.12
Arginine	0.34	0.17	0.22	1.02	0.15
Aspartic acid	1.23	0.84	6.25	0.50	0.15
Cysteine	5.09	0	<0.01	0.51	0.03
Glutamic acid	4.75	4.12	21.06	4.58	0.12
Glycine	0.66	0.72	5.08	0.51	0.11
Histidine	1.06	1.70	4.25	1.07	0.07
Isoleucine	1.09	2.10	6.22	3.62	0.12
Leucine	3.50	4.56	9.50	7.73	0.22
Lysine	3.43	3.24	8.23	1.30	0.18
Methionine	0.46	1.24	3.15	1.43	0.03
Phenylalanine	3.43	5.26	11.82	5.74	0.14
Proline	0.56	0.30	3.54	0.12	0.15
Serine	0.23	0.44	3.24	1.49	0.15
Threonine	0.55	0.62	2.79	0.06	0.11
Tyrosine	2.19	3.77	4.86	1.88	0.09
Tryptophan	17.67	-	<0.01	-	0.03
Valine	1.53	2.19	7.05	-	0.13

หมายเหตุ: -, ไม่มีรายงานของข้อมูล

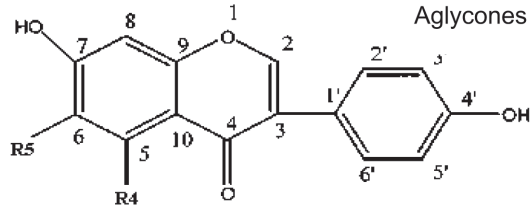
ข้อมูลของถั่วเน่าได้จากผลิตภัณฑ์ที่มาจากอำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่

สารประกอบไอโซฟลาโวน (isoflavone compounds)

ไอโซฟลาโวนเป็นสารประกอบในกลุ่ม phenolic โดยอาจจะเกิดจากปฏิกิริยารวมตัวกันของสาร phenylpropane และ malonyl coenzyme A จำนวน 3 โมเลกุล สารในกลุ่มนี้จะพบมากในถั่วเหลือง และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ สารประกอบไอโซฟลาโวนมีหลายรูปแบบ อาทิ กลุ่ม aglycones (เช่น daidzein, genistein และ glycitein), กลุ่ม β-glucosides (เช่น daidzin, genistin และ glycitin), กลุ่ม malonylglucosides (เช่น malonyldaidzin, malonylgenistin และ malonylglycitin) และกลุ่ม acetylglucosides (เช่น acetyldaidzin, acetylgenistin และ acetylglycitin) (รูปที่ 2)



R1	R2	R3	Compounds
H	H	H	daidzin
OH	H	H	genistin
H	OCH_3	H	glycitin
H	H	$COCH_3$	acetyldaidzin
OH	H	$COCH_3$	acetylgenistin
H	OCH_3	$COCH_3$	acetylglycitin
H	H	$COCH_2COOH$	malonyldaidzin
OH	H	$COCH_2COOH$	malonylgenistin
H	OCH_3	$COCH_2COOH$	malonylglycitin



R4	R5	Compounds
H	H	daidzein
OH	H	genistein
H	OCH_3	glycitein

รูปที่ 2 ชนิดและโครงสร้างของสารประกอบไอโซฟลาโวนที่พบในถั่วเหลือง [32]

สารประกอบไอโซฟลาโวนมีสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญหลายประการ เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของสารก่อมะเร็ง [33, 34] มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารไลโพโปรตีน (lipoprotein) [35, 36] ช่วยรักษาโรคกระดูกพรุน [37] ช่วยบรรเทาและลดปัญหาของอาการวัยทอง [38, 39] ป้องกันโรคเบาหวาน [40] และมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ [41-43] จากผลงานวิจัยพบว่าชนิดและปริมาณของสารไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมักจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของถั่ว ระยะเวลาในการเจริญเติบโต ฤดูกาล สถานที่เพาะปลูก เวลาในการเก็บรักษา ตลอดจนกรรมวิธีในการหมักถั่ว [44-47] โดยทั่วไปพบว่าในถั่วเหลืองดิบจะมีปริมาณไอโซฟลาโวนกลุ่ม malonylglucosides ค่อนข้างมาก และเมื่อนำถั่วเหลืองมาผ่านกรรมวิธีต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น การต้ม หรือการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารไอโซฟลาโวน จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่า ในผลิตภัณฑ์ *Natto* จะมีปริมาณสารไอโซฟลาโวนในกลุ่ม

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารไอโซฟลาโวน (มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง) ของถั่วเหลืองและถั่วเหลืองหมัก

Isoflavones	Non-fermented soybean		Fermented soybean		
	Soybean [41]	Steamed bean [41]	*Thua Nao* [48]	*Natto* [49]	*Chungkukjang* [41]
Malonylglucosides					
Malonyldaidzin	330	-	-	-	2.02
Malonylgenistin	680	-	-	-	2.36
Malonylglycitin	20	-	-	-	3.06
Acetylglucosides					
Acetyldaidzin	-	-	-	-	0.66
Acetylgenistin	4.7	-	-	-	-
Acetylglycitin	-	2.14	-	-	4.31
Glucosides					
Daidzin	130	6.04	0.068	375	0.35
Genistin	150	3.90	0.084	765	0.23
Glycitin	11	1.76	0.191	138	-
Aglycones					
Daidzein	3.4	0.77	0.195	786	21.59
Genistein	2.6	0.56	0.07	349	19.00
Glycitein	-	1.97	0.032	11	3.99

หมายเหตุ: -, ไม่มีรายงานของข้อมูล

ของ glucosides และ aglycones ในปริมาณที่สูง การพัฒนากรรมวิธีการหมักถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของสารในกลุ่ม aglycones ได้ ดังรายงานวิจัยของ Dajanta และคณะ [48] ที่ใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* TN51 ในการผลิตถั่วเน่า

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

Kim และคณะ [39] รายงานว่า ถั่วเหลืองสายพันธุ์พื้นเมืองของประเทศเกาหลีจำนวน 9 ชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสมบัติดังกล่าวจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารในกลุ่ม phenolic นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดและปริมาณของสารในกลุ่ม phenolic จะมีผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารไอโซฟลาโวนในกลุ่ม glucosides ชนิด genistin จะมีสมบัติเป็นแอนติราดิคอล (antiradical) ได้ดีกว่า glucosides อื่น นอกจากนี้มีรายงานวิจัยถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักว่าน่าจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารไอโซฟลาโวนในกลุ่ม aglycones ที่เพิ่มขึ้น [41-43, 50] ในตารางที่ 5 ได้รวบรวมงานวิจัยที่ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 5 ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

Products	Fermented microbes	Solvent used	Antioxidants	Antioxidant activity
Thua Nao [51]	*Bacillus subtilis*	Methanol	Total phenolics	anti-DPPH radicals, LDL oxidation
Chungkukjang [52]	*Bacillus* species	Ethanol	Isoflavones and other polyphenolic compounds	anti-DPPH radicals, LDL oxidation
Kinema [42]	*B. subtilis* DK-W1	Methanol	Total phenolics	anti-DPPH radicals, metal chelator, LPIA
Douchi [53]	*Aspergillus oryzae*	Aqueous	Peptides, isoflavones	50% inhibition of DPPH

หมายเหตุ: LDL หมายถึง low density lipoprotein; LPIA หมายถึง lipid peroxidation inhibition activity

ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* มีความสามารถในการผลิตสาร metabolites ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักสามารถสร้างสารปฏิชีวนะหรือแบคทีริโอซิน [54,55] สำหรับผลิตภัณฑ์ถั่วเน่ามีรายงานว่า เชื้อ *Bacillus* TN79 ที่แยกได้จากถั่วเน่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *Lasiodiplodia theobromae* ได้ [56] ในขณะที่มีงานวิจัยของ Dajanta [57] ที่รายงานว่าสารสกัดจากถั่วเน่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Bacillus cereus* นอกจากนี้ Yun [58] พบว่าสารสกัดจากถั่วเหลืองหมัก *Doenjang* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า

ในปัจจุบันกรรมวิธีการผลิตถั่วเน่ายังเป็นแบบดั้งเดิม ซึ่งจะเน้นการผลิตในระดับครัวเรือน ทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่สม่ำเสมอ มีกลิ่นฉุนของแอมโมเนีย และที่สำคัญมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ ดังรายงานของ Leejeerajumnean [13] ที่ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์ หรือการตรวจพบเชื้อที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารที่สำคัญหลายชนิดในผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก *Dawadawa* [59] และ *Kinema* [60] เช่น *B. cereus, Staphylococcus saprophyticus, S. epidermidis, Micrococcus luteus, Pseudomonas aeruginosa,* Enterobacteriaceae, Coliforms และ *Escherichia coli*

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ถั่วหมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเชื้อบริสุทธิ์ที่นำมาใช้ได้รับการคัดกรองสมบัติตามที่ต้องการ เช่น มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส หรือสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ เป็นต้น การใช้เชื้อตั้งต้นบริสุทธิ์จะช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการปนเปื้อน นอกจากนี้การควบคุมสภาวะในการหมักก็สามารถทำได้โดยสะดวก ตัวอย่างที่ได้รับการพัฒนาและนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ ได้แก่ การผลิตถั่วหมัก *Natto* ของประเทศญี่ปุ่นที่มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ *natto* [61] นอกจากนี้ การพัฒนาผลิตภัณฑ์ถั่วหมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่าสามารถเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ให้ดีขึ้น เช่น การเพิ่มปริมาณของกรดอะมิโนอิสระและสารไอโซฟลาโวน หรือสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ดังได้กล่าวมาข้างต้น

สำหรับถั่วเน่า จากการตรวจสอบพบว่ายังมีการศึกษาและงานวิจัยที่ค่อนข้างจำกัด อย่างไรก็ตามมีความพยายามที่จะใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตถั่วเน่าเช่นกัน ดังรายงานวิจัยของ Chantawannakul และคณะ [12] และ Visessanguan และคณะ [62] ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์มีผลให้กระบวนการหมักเกิดได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ การใช้เชื้อผสมของ *Bacillus* sp. B4 และ *Klebsiella* sp. KB2 ในการผลิตถั่วเน่าทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณวิตามินบี 12 สูงขึ้น [63]

สรุป

ถั่วเน่าเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักประเภทหนึ่งที่นิยมบริโภคในเขตภาคเหนือของประเทศไทย กรรมวิธีการผลิตยังคงจำกัดอยู่ในระดับครัวเรือน โดยทั่วไปแล้วผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักได้รับการยอมรับว่าเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นแหล่งของโปรตีนที่อุดมไปด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญหลายชนิด ตลอดจนสมบัติที่เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น การพัฒนาและปรับปรุงกรรมวิธีการหมักถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เป็นวิธีที่น่าสนใจและมีศักยภาพในการเพิ่มคุณค่าของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ การควบคุมสภาวะในการหมักนับว่ามีบทบาทที่สำคัญเช่นกันสำหรับการพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์

เอกสารอ้างอิง

1. Steinkraus, K. H. 1996. Handbook of Indigenous Fermented Foods. 2nd Edition. New York, Marcel Dekker.
2. Natto. Available from URL: http://giacomobutte.wordpress.com/category/food. 17 September 2010.
3. Dawadawa. Available from URL: http://eduanepa.com/soya-dawadawa.html. 17 September 2010.
4. Chungkukjang. Available from URL: http://www.tradekorea.com/product-detail/P00095875/Chunggukjang.html#. 17 September 2010.
5. Chukeatirote, E., Chainun, C., Siengsubchart, A., Moukamnerd, C., Chantawannakul, P., Lumyong, S., Boontim, N., and Thakang, P. 2006. Microbiological and Biochemical Changes in *Thua Nao* Fermentation. *Research Journal of Microbiology* 1: 38-44.
6. Kiuchi, K., and Watanabe, S. 2004. Industrialization of Japanese Natto. In: Industrialization of Indigenous Fermented Foods, Steinkraus, K. H., Editor. New York. Marcel Dekker.
7. Sarkar, P. K., Tamang, J. P., Cook, P. E., and Owens, J. D. 1994. Kinema-a Traditional Soybean Fermented Food: Proximate Composition and Microflora. *Food Microbiology* 11: 47-55.
8. Sarkar, P. K., and Tamang, J. P. 1995. Changes in the Microbial Profile and Proximate Composition During Natural and Controlled Fermentation of Soybeans to Produce Kinema. *Food Microbiology* 12: 317-325.
9. Kwak, C. S., Lee, M. S., and Park, S. C. 2007. Higher Antioxidant Properties of Chungkukjang, a Fermented Soybean Paste, may be due to Increased Aglycone and Malonylglycoside Isoflavone During Fermentation. *Nutrition Research* 27: 719-727.
10. Omafuvbe, B. O., Shonukan, O. O., and Abiose, S. H. 2000. Microbiological and Biochemical Changes in the Traditional Fermentation of Soybean for Soydaddawa-Nigerian Food Condiment. *Food Microbiology* 17: 465-474.

11. Omafuvbe, B. O., Abiose, S. H., and Shonukan, O. O. 2002. Fermentation of Soybean (*Glycine max*) for Soy-daddawa Production by Starter Cultures of *Bacillus*. *Food Microbiology* 19: 561-566.
12. Chantawannakul, P., Oncharoan, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., and Lumyong, S. 2002. Characterization of Protease of *Bacillus subtilis* Strain 38 Isolated from Traditionally Fermented Soybean in Northern Thailand. *Science Asia* 28: 241-245.
13. Leejeerajumnean, A. 2003. Thua Nao: Alkali Fermented Soybean from *Bacillus subtilis*. *Silpakorn University International Journal* 3: 277-292.
14. Boontim, N., Lumyong, S., and Moriguchi, M. 2003. Characterization of Thai Fermented Foods by Organic Acid Contents. ScienceAsia 29: 301-306.
15. Campbell-Platt, G. 1980. African Locust Bean (*Parkia Species*) and its West African Fermented Food Product, *Dawadawa. Ecology of Food Nutrition* 9: 123-132.
16. Sakurai, Y. 1960. Report of the Researches on the Production of High-protein Food from Fermented Soybean Products. Tokyo. Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry.
17. Visessanguan, W., Benjakul, S., Potachareon, W., Panya, A., and Riebroy, S. 2005. Accelerated Proteolysis of Soy Proteins During Fermentation of Thua-Nao Inoculated with *Bacillus subtilis*. *Journal of Food Biochemistry* 29: 349-366.
18. Ohta, T. 1986. *Natto.* In Reddy, N. R., Pierson, M. D., Merle, D., and Salunkhe, D. K., Editors. Legume-Based Fermentated Foods. Boca Raton. CRC Press. p. 85-93.
19. Sarkar, P. K., Cook, P. E., and Owens, J. D. 1993. *Bacillus* Fermentation of Soybeans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 295 299.
20. Allagheny, N., Obanu, Z.A., Campbell-Platt, G., and Owens, J.D. 1996. Control of Ammonia Formation During *Bacillus subtilis* Fermentation of Legumes. *International Journal of Food Microbiology* 29: 321-333.
21. Sundhagul, M., Smanmathuroj, P., and Bhodacharoen, W. 1972. Thua-Nao: a Fermented Soybean Food of Northern Thailand. I. Traditional Processing Method. *Thai Journal of Agricultural Science* 5: 43-56.
22. Chukeatirote, E., and Thakang, P. 2006. Chemical Composition of Thua Nao-a Fermented Soybean Food of Northern Thailand. *Chiang Mai Journal of Science* 33: 243-245.
23. Jeff-Agboola, Y. A., and Oguntuase, O. S. 2006. Effect of *Bacillus sphaericus* on Proximate Composition of Soybean (*Glycine max*) for the Production of Soy Iru. *Pakistan Journal of Nutrition* 5: 606-607.
24. Lee, M. Y., Park, S. Y., Jung, K. O., Park, K. Y., and Kim, S. D. 2005. Quality and Functional Characteristics of Chungkukjang Prepared with Various *Bacillus* sp. Isolated

from Traditional Chungkukjang. *Journal of Food Science* 70: M191-M196.

25. Wei, Q., and Chang, S. K. C. 2004. Characteristics of Fermented Natto Products as Affected by Soybean Cultivars. *Journal of Food Processing and Preservation* 28: 251-273.
26. Nielsen, N. C. 1985. Structure of Soy Proteins. In: Altschul, A. M., and Wilcke, H. L., Editors. New Protein Foods, Vol. 5. Orlando. Academic Press. p. 27-64.
27. Gupta, Y. P. 1983. Nutritive Value of Food Legumes. In: Arora, S. K., Editor, Chemistry and Biochemistry of Legumes. London. Edward Arnold Publishers. p. 287-327.
28. Sarkar, P. K., Jones, L. J., Craven, G. S., Somerset, S. M., and Palmer, C. 1997. Amino Acid Profiles of Kinema, a Soybean-fermented Food. *Food Chemistry* 59: 69-75.
29. Dakwa, S., Sakyi-Dawson, E., Diako, C., Annan, N. T., and Amoa-Awua, W. K. 2005. Effect of Boiling and Roasting on the Rermentation of Soybeans into dawadawa (Soy-dawadawa). *International Journal of Food Microbiology* 104: 69-82.
30. Dajanta, K., Chukeatirote, E., and Apichartsrangkoon, A. 2010. Analysis and Characterisation of Amino Acid Contents of *Thua Nao,* a Traditionally Fermented Soybean Food of Northern Thailand. *International Food Research Journal* (In Press).
31. Nikkuni, S., Karki, T. B., Vilkhu, K. S., Suzuki, T., Shindoh, K., Suzuki, C., and Okada, N. 1995. Mineral in Nepal and Amino Acid Contents of Kinema, a Fermented Soybean Food Prepared in Nepal. *Food Science and Technology International* 1: 107-111.
32. Liu, K. 2004. Soy Isoflavones: Chemistry, Processing Effects, Health Benefits, and Commercial Production. In: Liu, K. (Editor), Soybeans as Functional Foods and Ingredients, Champaign, IL. AOCS Press. p. 51-72.
33. Peterson, T. G., Ji, G. P., Kirk, M., Coward, L., Falany, C. N., and Barnes, S. 1998. Metabolism of the Isoflavones Genistein and Dichanin A in Human Breast Cancer Cell Lines. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68: 1505S-1511S.
34. Jung, K. O., Park, S. Y., and Park, K. Y. 2006. Basic Nutritional Investigation: Longer Aging Time Increases the Anticancer and Antimetastatic Properties of Doenjang. *Nutrition* 22: 539-545.
35. Potter, S. M., Baum, J. A., Teng, H., Stillman, R. J., Shay, N. F., and Erdman, J. W. Jr. 1998. Soy Protein and Isoflavones: Their Effects on Blood Lipids and Bone Density in Postmenopausal Women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 68: 1375S-1379S.
36. Park, K. Y., Jung, K. O., Rhee, S. H., and Choi, Y. H. 2003. Antimutagenic Effects of Doenjang (Korean Fermented Soypaste) and its Active Compounds. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 523-524: 43-53.
37. Ishimi, Y., Yoshida, M., Wakimoto, S., Wu, J., Chiba, H., Wang, X., Takeda, K., and Miyaura, C. 2002. Genistein, a Soybean Isoflavone, Affects Bone Marrow Lymphopoiesis

and Prevents Bone Loss in Castrated Male Mice. *Bone* 31: 180-185.

38. Eden, J. 1998. Phytoestrogens and the Menopause. *Balliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 12: 581-587.
39. Kim, S. L., Chi, H. Y., Kim, J. T., Lee, Y. H., Park, N. K., Son, J. R., and Kim, S. J. 2006. Isoflavone Content and its Relationship with other Seed Quality Traits of Soybean Cultivars Collected in South Korea. *Korean Journal of Crop Science* 51: 81-88.
40. Liu, D., Zhen, W., Yang, Z., Carter, J. D., Si, H., and Reynolds, K. A. 2006. Genistein Acutely Stimulates Insulin Secretion in Pancreatic Cells Through a cAMP-dependent Protein Kinase Pathway. *Diabetes* 55: 1043-1050.
41. Kwak, C. S., Lee, M. S., and Park, S. C. 2007. Higher Antioxidant Properties of Chungkukjang, a Fermented Soybean Paste, may be due to Increased Aglycone and Malonylglycoside Isoflavone During Fermentation. *Nutrition Research* 27: 719-727.
42. Moktan, B., Saha, J., and Sarkar, K. 2008. Antioxidant Activities of Soybean as Affected by *Bacillus*-fermentation of Kinema. *Food Research International* 41: 586-593.
43. Georgetti, S. R., Vicentini, F. T. M. C., Yokoyama, C. Y., Borin, M. F., and Spadaro, A. C. C. 2009. Enhanced *in vitro* and *in vivo* Antioxidant Activity and Mobilization of Free Phenolic Compounds of Soybean Flour Fermented with Different Glucosidase-producing Fungi. *Journal of Applied Microbiology* 106: 459-466.
44. Wang, H., and Murphy, P. A. 1994. Isoflavone Composition of American and Japanese Soybean in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1674-1677.
45. Hoeck, J. A., Fehr, W. R., Murphy, P. A., and Welke, G. A. 2000. Influence of Genotype and Environment on Isoflavone Contents of Soybean. *Crop Science* 40: 48-51.
46. Lee, S. J., Chung, I. M., Ahn, J. K., Kim, J. T., Kim, S. H., and Hahn, S. J. 2003. Variation in Isoflavone of Soybean Cultivars with Location and Storage Duration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3383-3389.
47. Kim, J. A., and Chung, I. M. 2007. Change in Isoflavone Concentration of Soybean (*Glycine max* L.) Seeds at Different Growth Stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 496-503.
48. Dajanta, K., Chukeatirote, E., Apichartsrangkoon, A., and Frazier, R.A. 2009. Enhanced Aglycone Production of Fermented Soybean Products by *Bacillus* Species. *Acta Biologica Szegediensis* 53: 93-98.
49. Wei, Q. K., Chen, T. R., and Chen, J. T. 2008. Use of *Bacillus subtilis* to Enrich Isoflavone Aglycones in Fermented Natto. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 1007-1011.
50. Lee, Y. W., Kim, J. D., Zheng, J., and Row, K. H. 2007. Comparisons of Isoflavones from

Korean and Chinese Soybean and Processed Products. *Biochemical Engineering Journal* 36: 49-53.

51. Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A., and Chukeatirote, E. Antioxidant Properties and Total Phenolics of Fermented Soybean as Affected by *Bacillus*-fermentation to *Thua Nao.* (in preparation).
52. Kim, N. Y., Song, E. J., Kwon, D. Y., Kim, H. P., and Heo, M. Y. 2008. Antioxidant and Antigenotoxic Activities of Korean Fermented Soybean. *Food and Chemical Toxicology* 46: 1184-1189.
53. Wang, D., Wang, L. J., Zhu, F. X., Zhu, J. Y, Chen, X. D., Zou, L., Saito, M., and Li, L. T. 2008. *in vitro* and *in vivo* Studies on the Antioxidant Activities of the Aqueous Extracts of Douchi (a Traditional Chinese Salt-fermented Soybean Food). *Food Chemistry* 107: 1421-1428.
54. Zheng, G., and Slavik, M. F. 1999. Isolation, Partial Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by a Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain. *Letters in Applied Microbiology* 28: 363-367.
55. Kim, Y., Cho, J.Y., Kuk, J.H., Moon, J.H., Cho, J.I., Kim, Y.C., and Park, K.H. 2004. Identification and Antimicrobial Activity of Phenylacetic Acid Produced by *Bacillus licheniformis* Isolated from Fermented Soybean, Chungkookjang. *Current Microbiology* 48: 312-317.
56. Chukeatirote, E., Niraphai, K., and Sardsud, U. 2006. Biocontrol of *Lasiodiplodia* spp., the Fungal Causative Agent of Postharvest Diseases. *Agricultural Science Journal* 37 (Suppl): 1075-1078.
57. Dajanta, K. 2010. Production of High Nutritional Fermented Soybean (*Thua Nao*) by *Bacillus subtilis.* Ph.D. Thesis, Chiang Mai, Chiang Mai University, Thailand.
58. Yun, I. S. 2005. Antibacterial, Free Radical Scavenging, and Proliferative Effects of Korean Fermented Soybean Paste (Doenjang) Extracts. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 48: 138-143.
59. Dike, E. N., and Odunfa, S. A. 2003. Microbiological and Biochemical Evaluation of a Fermented Soya Bean Product-soy-dadawadwa. *Journal of Food Science and Technology* 40: 606-610.
60. Nout, M. J. R., Bakshi, D., and Sarkar, P. K. 1998. Microbiological Safety of Kinema, a Fermented Soya Bean Food. *Food Control* 9: 357-362.
61. Hosoi, T., and Kiuchi, K. 2003. Natto-a Food Made by Fermenting Cooked Soybeans with *Bacillus subtilis (natto)*. In: Farnworth, E.R., Editor. Handbook of Fermented Functional Foods. Boca Raton. CRC Press. p. 267-290.

62. Visessanguan, W., Benjakul, S., Potachareon, W., Panya, A., and Riebroy, S. 2005. Accelerated Proteolysis of Soy Proteins During Fermentation of Thua-nao Inoculated with *Bacillus subtilis. Journal of Food Biochemistry* 29: 349-366.
63. Tangjitjaroenkun, J., Kitpreechavanich, V., Suthirawut, S., Chim-anage, P., Praprilong, W., Krusong, W., and Yongsmith, B. 2004. Improvement of High Vitamin B12 Thua Nao by Mixed Cultures of Soybean Oligosaccharide and the Use of Bacteria and Yeasts. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 38: 123-130.

ได้รับบทความวันที่ 17 กันยายน 2553
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 21 ตุลาคม 2553