

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ถั่วเหลืองหมัก

เชื้อ Rhizopus oligosporus จัดเป็นเชื้อราสกุล Rhizopus สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิห้อง เมื่อหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อราชนิดนี้ในระยะ เวลาสั้นๆ จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อ คือจาก ถั่วเหลืองเป็นเม็ดๆจะจับติดกันเป็นก้อนหนาแน่นโดยเส้นใยไมซีเลียมสีขาว และมีการ เปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบภายในของถั่วเหลือง (วรารุณี ครุสง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต , 2532)

วิธีการหมักถั่วให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดี มีการเจริญของเชื้อราอย่างสม่ำเสมอเต็ม ก้อนนั้น มีปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือ

1. อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อรา Rhizopus คือ ประมาณ 30 - 38 องศาเซลเซียส (Beuchat , 1984)

2. การถ่ายเทอากาศ และการควบคุมความชื้น เชื้อ Rhizopus ไม่ต้องการอากาศมากนักในการเจริญเติบโต ในกรณีที่มีอากาศถ่ายเทมากเกินไป จะทำให้เชื้อสร้างสปอร์ หรือมีผลทำให้ถั่วแห้งไป เชื้อราเจริญเติบโตไม่ได้ (Wang, 1984) ดังนั้นระหว่างการหมักถั่วจึงควรมีภาชนะปิดไว้

3. ระยะเวลาการหมัก เวลาที่เหมาะสมคือ 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในของถั่วเหลืองอย่างสมบูรณ์ การหมักถั่วนานเกินไป มีผล เสียมากกว่าผลดีคือ (Beuchat, 1974 , 1984)

3.1 เกิดสปอร์สีดำ การเกิดสปอร์นี้ นอกจากเกิดจากการหมักถั่วนานเกินไปแล้ว อาจเกิดจากสภาวะการหมักถั่ว ที่ไม่เหมาะสมด้วย

3.2 เกิดกลิ่นแอมโมเนีย ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของเส้นใยไมซีเลียม และโปรตีนภายในถั่วเหลือง

3.3 เกิดกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นมาก

เนื่องจากในระหว่างการหมัก เชื้อราจะผลิตเอ็นไซม์ไลเปสออกมาย่อยไขมันทำให้เกิดกรดไขมันอิสระขึ้น โดยในช่วง 30 ชั่วโมงแรกของการหมัก ปริมาณกรดไขมันอิสระยังเกิดขึ้นน้อย แต่เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 3 วัน พบว่าไขมันจะถูกย่อยไปมากกว่าร้อยละ 30 (Beuchat, 1974; Beuchat และ Worthington, 1974) การเกิดกรดไขมันอิสระขึ้นนี้ ถึงแม้จะไม่ทำให้คุณค่าทางโภชนาการเปลี่ยนไป แต่ก็มีผลต่อคุณสมบัติของน้ำมันที่สกัดจากถั่วเหลืองหมักที่จะนำไปใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันต่อไป

ในการวิจัยนี้ ทำการหมักถั่วเหลือง ที่อุณหภูมิห้อง คือประมาณ 30-34 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา และมี การถ่ายเทอากาศบ้างพอสมควร การสูญเสียความชื้นเกิดขึ้นน้อย เนื่องจากทำการหมักในจานแก้วเพาะเชื้อมีฝาครอบปิด และจากการทดลองเพื่อหาปริมาณสปอร์ที่เหมาะสม ในการเตรียมถั่วเหลืองหมัก (ตามตารางที่ 3)พบว่า

วิธีที่ 1 ความชื้นสูง ปริมาณสปอร์ที่ใช้มากเกินไป ทำให้ไมซีเลียมขึ้นเต็มภายในเวลาเพียง 18 ชั่วโมง ซึ่งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงภายในเนื้อถั่วยังไม่สมบูรณ์

วิธีที่ 2 และ 3 ได้ผลดี แต่เมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว จะเห็นได้ว่าวิธีที่ 3 ใช้ปริมาณสปอร์มากกว่า แต่ได้ผลิตภัณฑ์แบบเดียวกัน ทำให้สิ้นเปลืองมากกว่า ดังนั้นวิธีที่ 2 จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการหมักถั่วเหลืองที่สุด

น้ำมันถั่วเหลืองหมัก

เมื่อเตรียมถั่วเหลืองหมักได้แล้ว นำไปอบจนเหลือน้ำหนักก่อนละลายประมาณ 50

กรัม (จากน้ำหนักเปียก 75 กรัม) จึงนำไปสกัดน้ำมันต่อไป จากการทดลองพบว่าการสกัดน้ำมันจากถั่วเหลืองหมักโดยวิธีการปั่น (ตามตารางที่ 4) เป็นวิธีที่เหมาะสมดีกว่าการสกัดโดยเครื่องมือ Soxhlet ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการปั่นจะให้ผลผลิต (yield) มากกว่า และค่าเปอร์ออกไซด์ที่ได้ (1.19 มิลลิอิกวิวาเลนซ์/น้ำมันตัวอย่าง 1 กิโลกรัม) ก็ต่ำกว่าวิธี Soxhlet (7.23 มิลลิอิกวิวาเลนซ์/น้ำมันตัวอย่าง 1 กิโลกรัม) การใช้เครื่องมือ Soxhlet เพื่อสกัดน้ำมันนั้น จำเป็นที่จะต้องมีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง เพื่อให้เฮกเซนเดือด (ประมาณ 70 องศาเซลเซียส) ประกอบกับเครื่องมือที่ใช้ ก็เป็นแก้วใส ไม่สามารถป้องกันแสงได้ ทั้งความร้อนและแสงเป็นปัจจัยสำคัญในการเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้มีอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์เพิ่มมากขึ้น ผลก็คือค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำมันที่สกัดโดยเครื่องมือ Soxhlet สูงกว่าวิธีการปั่น

น้ำมันถั่วเหลืองหมักที่ได้จากการปั่นนี้ ยังไม่ผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีขั้นตอนกำจัดสี (bleaching) อยู่ด้วยจึงทำให้มีสีเหลืองเข้ม และจะมีกลิ่นเฉพาะตัว (ตามตารางที่ 5) จากการวิเคราะห์หาค่ากรด พบว่ามีค่าค่อนข้างสูงคือ 47.97 มิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำมัน 1 กรัม ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Beuchat และ Worthington (1974) ที่ว่าเชื้อรา R. oligosporus สามารถผลิตเอ็นไซม์ไลเปส ออกมาย่อยสลายไขมันในระหว่างการหมัก ทำให้เกิดกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น ค่ากรดที่วัดได้จากน้ำมันถั่วเหลืองหมักจึงค่อนข้างสูง

คุณสมบัติของน้ำมันถั่วเหลืองหมักในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในน้ำมันถั่วเหลือง

น้ำมันพืชที่ใช้เป็นน้ำมันตัวอย่างในการศึกษานี้ คือน้ำมันถั่วเหลือง เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ

1. นิยมใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน
2. มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ในปริมาณสูง ทำให้มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้ชัดในระยะเวลาสั้นๆ
3. วัตถุดิบในการสกัดน้ำมันคือ ถั่วเหลือง หาซื้อได้ง่าย และมีราคาถูก (ประมาณกิโลกรัมละ 13.50 บาท)

เนื่องจากการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันในการยืดอายุน้ำมันนั้น จะต้องเติมสารต้านออกซิเดชันลงไปน้ำมันตัวอย่างขณะที่ผลิตเสร็จใหม่ๆ ในการวิจัยนี้จึงต้องทำการสกัดน้ำมันถั่วเหลืองขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ผลผลิตที่ได้คิดเป็นร้อยละ 22.05 ของน้ำหนักถั่วเหลืองแห้ง โดยทั่วไปถั่วเหลืองจะมีน้ำมันอยู่ประมาณร้อยละ 20 (Mattill และคณะ 1964) และเมื่อนำน้ำมันถั่วเหลืองที่สกัดได้นี้ไปผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งจะกำจัดสารบางอย่างที่ไม่ต้องการออกไป เช่น ฟอสฟาไทด์ กรดไขมันอิสระ หรือทำให้สารบางอย่าง เช่น วิตามินอี สเตอรอล มีปริมาณลดลง (Mounts, 1981) จะเหลือน้ำมันถั่วเหลืองเพียงร้อยละ 14.74 ของถั่วเหลืองแห้ง หรือคิดเป็นร้อยละ 72 ของน้ำมันถั่วเหลืองที่ยังไม่ผ่านกรรมวิธี

ในกรณีของน้ำมันถั่วเหลืองหมัก ที่ผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเกิดการสูญเสียของน้ำมันไปมาก เหลือน้ำมันเพียงร้อยละ 9.53 ของน้ำมันถั่วเหลืองหมักที่สกัดได้ ทั้งนี้เกิดจากการที่น้ำมันถั่วเหลืองหมัก มีกรดไขมันอิสระสูง ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อรา กรดไขมันอิสระนี้จะถูกกำจัดออกไปเป็นจำนวนมากในขั้นตอนการทำให้เป็นกลางโดยด่าง (neutralisation) จึงทำให้สูญเสียน้ำหนักของน้ำมันไปมาก

เมื่อได้น้ำมันตัวอย่าง (น้ำมันถั่วเหลืองดิบและน้ำมันถั่วเหลืองผ่านกรรมวิธี) และสารต้านออกซิเดชัน (น้ำมันถั่วเหลืองหมักและน้ำมันถั่วเหลืองหมักผ่านกรรมวิธี) แล้วนำมาเตรียมเป็นน้ำมันผสม ตามตารางที่ 6 และ 7 ได้น้ำมันตัวอย่าง 8 ชนิดคือ B S B+T5 B+T10 B+RT0.5 B+RT1 (CB+T5)R และ (CB+T10)R แล้ว นำมาวัดค่าเปอร์ออกไซด์ และค่ากรดของน้ำมัน เพื่อดูความเหมาะสมในการที่จะใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป โดยเปรียบเทียบกับค่าเปอร์ออกไซด์และค่ากรดที่กำหนดในกฎหมาย

ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 22 (พ.ศ.2522) ซึ่งออกโดยอาศัยอำนาจแห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2530) กำหนดไว้ว่า น้ำมันและไขมันที่ใช้เป็นอาหารที่ผลิตเพื่อจำหน่าย เพื่อใช้รับประทานหรือใช้ปรุงแต่งในอาหาร ต้องมีคุณภาพ หรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

1. มีค่าของกรด คิดเป็นมิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำมันหรือไขมัน
หนัก 1 กรัม

ก. ได้ไม่เกิน 0.6 สำหรับน้ำมันและไขมันซึ่งทำโดยวิธีผ่านกรรมวิธี

ข. ได้ไม่เกิน 1.0 สำหรับน้ำมันและไขมันซึ่งทำโดยวิธีผ่านกรรมวิธี
ผสมกับน้ำมันและไขมัน ซึ่งทำโดยวิธีธรรมชาติ

2. มีค่าเปอร์ออกไซด์ คิดเป็นมิลลิอิกวาเลนซ์ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1
กิโลกรัม ได้ไม่เกิน 1.0

ค่าเปอร์ออกไซด์ และค่ากรดของน้ำมัน 6 ชนิดคือ B S B+RT0.5 B+RT1
(CB+T5)R และ (CB+T10)R (ตามตารางที่ 8) มีค่าต่ำกว่าที่กฎหมายกำหนด แต่น้ำมัน
ผสม B+T5 และ B+T10 มีค่ากรดสูงกว่ามาตรฐาน เนื่องจากน้ำมันผสม 2 ชนิดหลังนี้
ใช้น้ำมันถั่วเหลืองหมักที่ยังไม่ผ่านกรรมวิธีเป็นสารต้านออกซิเดชันและน้ำมันถั่วเหลืองหมัก
โดยตัวของมันเองก็มีค่ากรดสูงถึง 47.94 อยู่แล้ว จึงทำให้น้ำมันผสมมีค่ากรดสูงเกินกว่า
มาตรฐานด้วย

นำน้ำมันตัวอย่างทั้งสี่ชนิดมาศึกษา เพื่อเปรียบเทียบการหืนจากผลของปฏิกิริยา
ออกซิเดชันในสภาวะต่างๆ และใช้ค่าเปอร์ออกไซด์เป็นตัวชี้บอกปริมาณการเกิดออกซิเดชัน
โดยในสภาวะแรก เป็นสภาวะที่มีอุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา น้ำมันตัวอย่างที่ใช้คือ
B S B+T5 B+T10 (ตามตารางที่ 9) พบว่าน้ำมันทุกชนิด จะมีค่าเปอร์ออกไซด์
เพิ่มขึ้นตามเวลา โดยน้ำมันตัวอย่างที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองหมัก จะเริ่มมีค่าเปอร์ออกไซด์
ต่ำกว่าน้ำมันตัวอย่างอื่นๆ ตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 21 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ
ระหว่าง B+T5 และ B+T10 จะไม่มีความแตกต่างกัน ผลของการวิจัยนี้ตรงกับการ
ศึกษาของ Gyorgy และคณะ (1974) ที่พบว่าน้ำมันถั่วเหลืองหมักเพียงร้อยละ 10
สามารถป้องกันการหืนในน้ำมันถั่วเหลืองได้

แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า น้ำมันถั่วเหลืองที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองหมักสังเคราะห์
บีเอชที (S) ร้อยละ 0.02 นั้น มีค่าเปอร์ออกไซด์สูงกว่าน้ำมันตัวอย่างชนิดอื่นๆ
แม้กระทั่งน้ำมันถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมน้ำมันใดๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปรากฏการณ์
นี้อาจอธิบายได้ว่า เนื่องจาก บีเอชที เป็นสารต้านออกซิเดชัน ในกลุ่มของสารประกอบ
ฟีนอล ซึ่งมีลักษณะพิเศษอย่างหนึ่งคือ ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจะเพิ่ม

ขึ้นตามปริมาณสารที่ใช้ จนถึงระดับหนึ่ง ซึ่งเป็นระดับสูงสุด (Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additive, 1971) ถ้าใช้ปริมาณเกินกว่าระดับนี้ แทนที่จะต้านออกซิเดชัน สารดังกล่าวจะกลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันแทน (prooxidant) ปรากฏการณ์นี้เห็นได้ชัดในกรณีของวิตามินอี ซึ่งจัดเป็นสารประกอบฟีนอลตัวหนึ่ง Husain Cillard และ Cillard (1987) รายงานว่า วิตามินอีในความเข้มข้นสูง ประมาณ 1.25×10^{-4} โมลาร์ จะแสดงฤทธิ์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของกรดไลโนเลอิก ทำให้เกิดพันธะคู่สลับเดี่ยวเพิ่มขึ้น

ในกรณีของบีเอชทีนั้น การศึกษาที่ผ่านมายังไม่แน่ชัดว่าจะ เป็นโปรออกซิแดนท์ เมื่อความเข้มข้นเลเยระดับสูงสุดไป (Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additive, 1971) แต่ถ้าพิจารณาจากผลของการวิจัยนี้ (ตามตารางที่ 9) เป็นไปได้ว่า บีเอชที ในปริมาณที่ใช้คือ ร้อยละ 0.02 ซึ่งเป็นปริมาณสูงเมื่อเทียบกับปริมาณที่ใช้ในน้ำมันพืชที่จำหน่ายในท้องตลาด (ซึ่งใช้เพียงร้อยละ 0.01 ร่วมกับกรดซิตรีกอีกร้อยละ 0.01) นั้น จะแสดงสมบัติเป็นโปรออกซิแดนท์ โดยเฉพาะเมื่อเติมลงในน้ำมันถั่วเหลือง ที่มีสารต้านออกซิเดชัน จากธรรมชาติ คือวิตามินอี อยู่บ้างแล้ว

การศึกษาในสภาวะที่มีแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ตามตารางที่ 10) นั้น ค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำมันตัวอย่างทั้งสองชนิด จะเพิ่มขึ้นตามเวลา แต่การเพิ่มขึ้นจะน้อยกว่าเมื่อใช้อุณหภูมิเป็นตัวเร่ง และค่าเปอร์ออกไซด์ของ B+T5 ยังคงต่ำกว่าน้ำมันตัวอย่างชนิดอื่น แต่ความแตกต่างที่เกิดขึ้น ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อศึกษาถึงผลกันหันต่อเนืองของน้ำมันตัวอย่าง B S B+T5 และ B+T10 ในอาหารทอดคือข้าวเกรียบกุ้ง (ตามตารางที่ 12) นั้นพบว่า ค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำมันแต่ละชนิดที่สกัดจากข้าวเกรียบกุ้งมีค่าเปอร์ออกไซด์ขึ้น ลง ไม่มีแนวโน้มที่แน่นอน อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดน้ำมันที่ไม่เหมาะสม คือใช้เครื่องมือ Soxhlet ซึ่งต้องอาศัยความร้อนในการสกัดน้ำมันออกจากข้าวเกรียบกุ้งเป็นเวลานาน ความร้อนที่ใช้ นี้ อาจจะไปทำลายไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น เนื่องจากไฮโดรเปอร์ออกไซด์ เป็นสารตัวกลางที่ไม่คงตัว จะสลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงๆ และที่ 100 องศาเซลเซียส การสลายตัว จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (Allen และ Hamilton, 1983)

ถ้าดูลักษณะของน้ำมันตัวอย่างแต่ละชนิดระหว่างการทอด และหลังการทอด (ตามตารางที่ 11) จะเห็นได้ว่า ถึงแม้ว่าน้ำมันถั่วเหลืองหมักจะมีคุณสมบัติเป็น สารต้านออกซิเดชันในน้ำมันถั่วเหลืองก็ตาม แต่การเติมน้ำมันถั่วเหลืองหมักลงไป ในน้ำมัน ถั่วเหลืองผ่านกรรมวิธีในลักษณะนี้นั้น ยังมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ เนื่องจากทำให้เกิดควันมาก มีกลิ่นฉุนและน้ำมันมีสีเข้มขึ้นมาก การที่มีควันมากนั้นเกิดจากกรดไขมัน อิสระที่มีอยู่มากในน้ำมันถั่วเหลืองหมัก จะทำให้เกิดควันต่ำลง (Fennema, 1978) และการที่น้ำมันมีสีเข้มขึ้นนั้นเป็นผลมาจากฟอสฟาไทด์ในน้ำมันถั่วเหลืองหมักที่ไม่ได้ผ่าน กรรมวิธี (Joint FAO/WHO Expert Consultation, 1980) นอกจากข้อจำกัด ดังกล่าวแล้ว การเติมน้ำมันถั่วเหลืองหมักในน้ำมันถั่วเหลืองผ่านกรรมวิธี ยังมีความไม่ เหมาะสมอีกหลายประการ กล่าวคือ

1. ค่ากรดของน้ำมันผสม B+T5 และ B+T10 หลังจากผลิตเสร็จใหม่ๆ มีค่าเท่ากับ 3.83 และ 7.67 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำมันหรือไขมัน หนัก 1 กรัม ตามลำดับ (ตามตารางที่ 8) ซึ่งสูงกว่าที่กฎหมายอนุญาตให้ไว้คือ เท่ากับ 1 มิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์/น้ำมัน 1 กรัม

2. จากการศึกษาของ Stahl และ Sims (1986) เปรียบเทียบการ ดูดซึมออกซิเจนของน้ำมันพืชที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองหมัก กับน้ำมันพืชธรรมดาพบว่า น้ำมัน ถั่วเหลืองหมักมีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (โปรออกซิแดนซ์) อย่างอ่อน มากกว่าเป็นสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งตรงข้ามกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Gyorgy และคณะ (1974) Stahl และ Sims ได้อธิบายว่า การศึกษาของ Gyorgy ใช้ การวัดค่าเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นตัวชี้บอกปริมาณการเกิด ออกซิเดชันซึ่งเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า กรดไขมันอิสระในน้ำมัน จะเร่งการสลายตัวของ ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ไปเป็นสารประกอบพวกอัลดีไฮด์ คีโตน (Popov, และ Mizev, 1966 ; Miyashita และ Takagi, 1986) และในน้ำมัน ถั่วเหลืองหมัก ก็มีกรดไขมันอิสระอยู่มาก ซึ่งจะเร่งให้เกิดการสลายตัวของ ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ทำให้ผลการวัดค่าเปอร์ออกไซด์ต่ำ ทั่วๆ ที่มีปฏิกิริยาออกซิเดชัน เกิดขึ้นมาก

จะเห็นได้ว่า ข้อเสียของน้ำมันผสม B+T5 และ B+T10 นั้น เกิดจากกรดไขมัน อิสระที่ติดมาจากน้ำมันถั่วเหลืองหมักนั่นเอง ดังนั้นเพื่อลดข้อบกพร่องดังกล่าว ให้สามารถ

ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ และศึกษาให้แน่นอนว่าค่าเปอร์ออกไซด์ที่ต่ำนั้น เกิดจากการที่น้ำมันถั่วเหลืองหมักมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน หรือเกิดจากผลของกรดไขมันอิสระที่ทำให้ไฮโดรเปอร์ออกไซด์สลายตัว จึงได้ออกแบบการทดลอง โดยเปลี่ยนวิธีการเติมน้ำมันถั่วเหลืองหมัก เพื่อกำจัดกรดไขมันอิสระออก ซึ่งทำได้ 2 วิธีคือ

1. โดยเติมน้ำมันถั่วเหลืองหมักที่ยังไม่ผ่านกรรมวิธีในน้ำมันถั่วเหลืองดิบ แล้วจึงผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์ [(CB+T)R]

2. โดยนำน้ำมันถั่วเหลืองหมัก ไปผ่านกรรมวิธี ทำให้บริสุทธิ์ก่อน แล้วจึงเติมลงในน้ำมันถั่วเหลืองที่ผ่านกรรมวิธีมาก่อนแล้วเช่นกัน (B+RT)

เนื่องจากน้ำมันถั่วเหลืองหมัก เมื่อนำไปผ่านกรรมวิธี จะได้น้ำมันผ่านกรรมวิธีเพียงร้อยละ 9.53 ดังนั้น ถ้าใช้น้ำมันถั่วเหลืองหมักในข้อ 1 ร้อยละ 5 และ 10 จะต้องเติมน้ำมันถั่วเหลืองหมักผ่านกรรมวิธี ในข้อ 2 ประมาณร้อยละ 0.5 และ 1.0 ตามลำดับ

น้ำมันผลที่ได้ใหม่นี้มีสี่ชนิดคือ B+RT0.5 B+RT1 (CB+T5)R และ (CB+T10)R นำมาเปรียบเทียบการหืนในสภาวะต่างๆ กับน้ำมันถั่วเหลืองธรรมดา (B) และน้ำมันถั่วเหลืองที่เติมสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ บีเอชที (S) ในสภาวะต่างๆคือ

ในสภาวะที่มีอุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำมันผลสี่ชนิดคือ B S (CB+T5)R และ (CB+T10)R (ตามตารางที่ 13) ในวันที่ 1 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เมื่อเวลาผ่านไป จึงเริ่มเห็นความแตกต่าง จนถึงวันที่ 21 พบว่า (CB+T5)R มีค่าเปอร์ออกไซด์ต่ำที่สุด และต่ำกว่าน้ำมันทุกชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ในขณะที่ ค่าเปอร์ออกไซด์ของ (CB+T5)R ต่ำกว่าน้ำมันถั่วเหลืองที่ไม่ได้เติมสารใดๆ แต่ค่าเปอร์ออกไซด์ ของ (CB+T10)R กลับมีค่าสูงกว่า ปรากฏการณ์นี้อาจเนื่องมาจากการแสดงฤทธิ์เป็น โปรออกซิแดนซ์ ของน้ำมันถั่วเหลืองหมัก

สำหรับน้ำมันถั่วเหลืองผ่านกรรมวิธี ที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองหมักผ่านกรรมวิธี ร้อยละ 0.5 (B+RT0.5) และร้อยละ 1 (B+RT1) มีค่าเปอร์ออกไซด์สูงกว่าน้ำมันชนิดอื่น อาจเป็นเพราะ

1. ปริมาณสารต้านออกซิเดชันคือ น้ำมันถั่วเหลืองหมักผ่านกรรมวิธีที่ใช้บ่อยเกินไป จึงไม่สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้

2. การเติมสารต้านออกซิเดชัน ไม่ได้เติมในน้ำมันถั่วเหลือง ที่ผลิตเสร็จใหม่ๆ เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องมือกำจัดสี และกำจัดกลิ่นตามที่ได้กล่าวมาแล้ว น้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้จึงเป็นส่วนผสมระหว่างน้ำมันที่ผลิตเสร็จใหม่ๆ กับน้ำมันที่ผลิตเสร็จแล้ว 1-2 วัน นอกจากนั้นระหว่างการเติม ต้องมีการคนเพื่อให้เข้ากัน การคนจะทำให้อากาศเข้าไปในน้ำมันผสม และเร่งให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดมากขึ้น โดยปกติแล้ว การเติมสารต้านออกซิเดชัน จะต้องเติมในถังกำจัดกลิ่น ซึ่งเป็นสูญญากาศ ในช่วงที่ทำการกำจัดกลิ่นเสร็จใหม่ๆ เพื่อป้องกันการละลายของอากาศในน้ำมันที่เตรียม (สุปรียา ศุขเกษม, สัมภาษณ์, 8 ม.ค. 2534)

การศึกษาในสภาวะที่มีแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ตามตารางที่ 14) ซึ่งให้เห็นว่า น้ำมันผสม (CB+T5)R มีความทนทานต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ถูกเร่งโดยแสงมากกว่าน้ำมันชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา และ น้ำมันผสม (CB+T5)R ยังมีผลกันหันต่อเนื้อไปสุ่วขาวเกรียบกึ่งที่ทอดด้วยน้ำมันชนิดนี้ อีกด้วย (ตามตารางที่ 16) (เนื่องจากในการศึกษาขั้นต้น ใช้วิธีสกัดน้ำมันจากข้าวเกรียบที่ไม่เหมาะสม คือมีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ อาจถูกทำลายไปบางส่วน ดังนั้นการศึกษาดังนี้ จึงใช้วิธีแช่ในเฮกเซนแทน) นอกจากนั้น ลักษณะน้ำมันผสมซึ่งได้จากการผสมน้ำมันถั่วเหลืองดิบกับน้ำมันถั่วเหลืองหมัก แล้วจึงผ่านกรรมวิธี ระหว่างและหลังการทอด ก็คล้ายกับน้ำมันถั่วเหลืองธรรมดา คือมีควันเพียงเล็กน้อย ไม่มีกลิ่นฉุน และน้ำมันที่ทอดอาหารแล้วจะค่อนข้างใส สีไม่เข้มมาก

จากผลการวิจัยทั้งหมด สรุปได้ว่า น้ำมันถั่วเหลืองหมักมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน หรือป้องกันการหืนในน้ำมันถั่วเหลือง และสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันนี้ จะไม่ถูกกำจัดออกไป ระหว่างกรรมวิธีการทำน้ำมันให้บริสุทธิ์

ถึงแม้ไขมันถั่วเหลืองหมักจะมีคุณสมบัติที่ติดต่อกันก็ตาม แต่การจะนำมาใช้นั้น ต้องเลือกวิธีการเติมที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ไขมันผสมที่มีคุณภาพดี มีคุณสมบัติต่างๆ ตรงตามข้อกำหนด และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ปรุงอาหาร ซึ่งจากการศึกษาพบว่า วิธีที่ดีที่สุดคือการเติมน้ำมันถั่วเหลืองหมักที่ยังไม่ผ่านกรรมวิธี ลงไปในน้ำมันถั่วเหลืองดิบ ในปริมาณร้อยละ 5 ของน้ำมันถั่วเหลืองดิบ แล้วจึงนำไปผ่านกรรมวิธี (CB+T5)R การเติมสารต้านออกซิเดชันในลักษณะนี้มีข้อดีประการหนึ่งก็คือ สารต้านออกซิเดชันที่เติมลงไปจะช่วยทำให้ไขมันถั่วเหลืองดิบ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันช้าลง เมื่อนำไปผ่านกรรมวิธี จะเกิดการสูญเสียน้ำหนักน้อยลง และได้ผลิตภัณฑ์ ที่มีคุณภาพดี มีค่ากรด และค่าเปอร์ออกไซด์ หลังผลิตเสร็จใหม่ๆ ต่ำ เช่นเดียวกับการเติม ทีบีเอชคิว ในน้ำมันปาล์มดิบ เพื่อรักษาคุณภาพของน้ำมันระหว่างการขนส่งจากมาเลเซียไปสู่ตลาดยุโรป (Patterson, 1989) นั่นเอง

ไขมันผสม (CB+T5)R นี้ จะคงทนต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ถูกเร่งโดยอนุมูลอิสระ และแสง และมีผลกันหันต่อเนื่องไปสู่อาหารที่ทอดด้วยน้ำมันชนิดนี้

ในกรณีที่จะนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม วิธีการเตรียมถั่วเหลืองหมัก จำเป็นที่จะต้องมีการปรับปรุงให้เหมาะสม เนื่องจากการเตรียมถั่วเหลืองหมักในการวิจัยครั้งนี้อาศัยการเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* ในหลอดอาหารแข็ง (agar slants) จนเชื้อสร้างสปอร์เต็มที่แล้ว จึงนำไปถ่ายใส่ถั่วเหลืองที่เตรียมไว้ ซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น ถ้าต้องการขยายการเตรียมถั่วเหลืองหมักเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องหาวิธีอื่นที่สะดวกกว่า เช่น การเตรียมหัวเชื้อผง (powdered inoculum) โดยใช้ข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบ หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว ถ่ายสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus* คลุกให้ทั่วแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งสปอร์ของเชื้อราเจริญเต็มที่ นำไปอบให้แห้ง แล้วจึงบดให้ละเอียด ผสมกับแป้งให้คลุกเคล้าเข้ากันอย่างดี ก็จะได้หัวเชื้อ ซึ่งนำไปทำถั่วเหลืองหมักในลักษณะเดียวกับหัวเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้หัวเชื้อผง ในอัตราร้อยละ 0.1-0.5 (วราวุฒ ครุสงฆ์ และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532)

การเตรียมไขมันผสม (CB+T5)R ในห้องปฏิบัติการ จะทำให้เพิ่มต้นทุนการผลิตของน้ำมันถั่วเหลืองอีกประมาณลิตรละ 47 บาท แต่ถ้านำไปเตรียมในระดับอุตสาหกรรม การสกัดน้ำมันถั่วเหลืองหมักอาจทำไปพร้อมกับการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง

โดยผสมถั่วเหลืองหมักอบแห้งกับถั่วเหลืองก่อนแล้วจึงนำไปสกัดน้ำมัน น้ำมันผสมที่ได้นำไปผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์ จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ต้นทุนที่เพิ่มขึ้นก็คือค่าผลิตถั่วเหลืองหมักเท่านั้น นอกจากนั้นกากถั่วเหลืองที่ได้จากการสกัดน้ำมันยังมีคุณค่าทางอาหารดีกว่าถั่วเหลืองธรรมดา โดยเฉพาะปริมาณวิตามินบี 1 ไรโบเฟลวิน ไนอะซิน และวิตามินบี 12 จะสูงกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (วราวุฒิ ครุสง และ รุ่งนภาพงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532) กากถั่วเหลืองดังกล่าวนี้ จึงสามารถนำไปเป็นอาหารสัตว์ได้เป็นอย่างดี