



รายงานการวิจัย

การลดกลิ่นไม่พึงประสงค์และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์
ถั่วหมัก โดยใช้ *Bacillus subtilis* เป็นกล้าเชื้อในการหมัก
(Decreasing of undesirable aroma compound and valuating
nutritional fermented soybean by the use of *Bacillus subtilis*
as fermentation starter culture)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การลดกลิ่นไม่พึงประสงค์และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์
ถั่วหมัก โดยใช้ *Bacillus subtilis* เป็นกล้าเชื้อในการหมัก
(Decreasing of undesirable aroma compound and valuating
nutritional fermented soybean by the use of *Bacillus subtilis*
as fermentation starter culture)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปิยะวรรณ กาสลัก

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไธย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

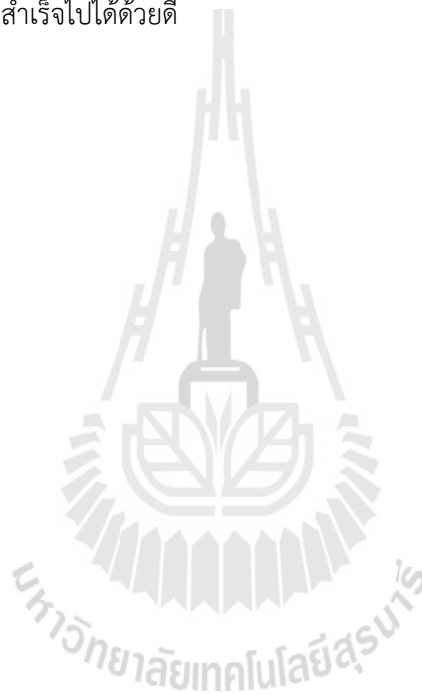
เมษายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผู้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 ที่ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมทั้งขอบคุณหน่วยงานอาคารศูนย์เครื่องมือ 1 และอาคารศูนย์เครื่องมือ 3 ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัยทดลอง ตลอดจนศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นแหล่งให้ข้อมูลประกอบงานวิจัยและเอกสารอ้างอิงต่างๆ เพื่อจัดทำรายงานการวิจัยเล่มนี้ให้ลุล่วงสำเร็จไปได้ด้วยดี

ผศ.ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก

29 เมษายน 2554



บทคัดย่อ

ปัญหาเรื่องกลิ่นของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า) ยังคงเป็นเรื่องที่ต้องพัฒนาให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคให้มากขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการลดกลิ่นที่ไม่ดีและขณะเดียวกันพัฒนากระบวนการหมักเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในผลิตภัณฑ์ให้มากขึ้น โดยการผลิตถั่วเหลืองหมักจากถั่วเหลือง *Bacillus subtilis* ที่ทำการคัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักธรรมชาติ ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E เรียบร้อยแล้ว ทำการทดลองโดยแยกวิธีการให้ความร้อนถั่วเหลืองหมัก 2 แบบ คือ การต้มเป็นเวลา 7 ชั่วโมง และนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน 121°C 15 นาที เปรียบเทียบกับการหมักโดยธรรมชาติ เมื่อทำการตรวจวัดคุณภาพของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งมาเชื้อและเติมถั่วเหลืองหมักจะมีปริมาณวิตามินบี 12 0.27 µg/100 g ฟอสฟอรัส 3250.74 mg/kg แคลเซียม 2984.65 mg/kg และธาตุเหล็ก 175.40 mg/kg ซึ่งมีปริมาณมากกว่าตัวอย่างที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมถั่วเหลืองหมัก (P<0.05) ซึ่งการเติมถั่วเหลืองหมักให้คุณค่าทางโภชนาการมากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ เมื่อพิจารณาจากค่ากลิ่นส่วนใหญ่จะเป็นจำพวก alcohols, aldehydes, esters and acids, pyrazines, aromatic compounds, ketones, และ alkanes เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่เติมถั่วเหลืองหมัก จะพบ indole ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป ซึ่งทำให้ระยะเวลาในการหมักลดลงมากกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมถั่วเหลืองหมัก ที่พบ indole ในชั่วโมงที่ 72 นอกจากนี้ยังมีสารประกอบที่กลิ่นหอมฉุน เช่น 2-heptanone, pyrazine และ benzaldehyde เป็นต้น โดยตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่เติมถั่วเหลืองหมัก จะพบ 2-heptanone และ benzaldehyde ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการพบ indole สำหรับตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่หมักโดยธรรมชาติ จะพบ 2-heptanone, benzaldehyde เฉพาะชั่วโมงที่ 72 เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า การเติมถั่วเหลืองหมัก *Bacillus subtilis* ช่วยลดระยะเวลาในการหมักและการให้กลิ่นที่หอมฉุนมากกว่าด้วย นอกจากนี้สามารถเพิ่มบทบาทในการหมักที่ให้คุณภาพโดยรวมได้มากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ

Abstract

The undesirable smell problems of fermented soybean products (Thu-nao) is needed to be developed to be acceptable to more consumers. This research is aimed to reduce that of bad smell and valuated the nutritional properties by the use of *B. subtilis*, isolated from conventional fermented soybean products and identified with the test kit package API 50 CHB medium and API 20E, as starter culture in fermentation process. Heat treatment were subjected to soybeans into 2 conditions, boiling with water for 7 hours and steam autoclave at 121 °C for 15 minutes Those of the results will be compared to natural fermentation. The fermented soybean products produced by using autoclaved soybean inoculated with *B. subtilis* (CB) showed the phosphorus 3250.74 mg / kg, calcium 2984.65 mg / kg, iron 175.40 mg / kg, and 0.27 mg per 100 grams of vitamin B12 which higher than that of natural fermentation, This suggests that the fermentation by the inoculums of starter culture provided a higher nutritional value. Based on the fermented product smell usually be alcohol, aldehyde, esters, acid, pyrazines, aromatic compound, ketones and alkanes, etc., the indole was appeared from the hours of 48 onwards, which will the fermentation period lower than samples without starter culture which were indole in 72 hours. It also showed that the strong aroma such as 2-heptanone, pyrazine, and benzaldehyde, etc. The soybean fermentation starter culture will find 2-heptanone, pyrazine and benzaldehyde from 48 hours onwards, which is in the same direction found indole. 2-heptanone and benzaldehyde was found only in 72 hours fermentation with natural soybean. Shows that the fermentation by *B. subtilis* starter cultures reduces the period of fermentation, and the more strong aroma. In addition to the role of fermentation in the overall quality than the natural fermentation.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	2
ข้อตกลงเบื้องต้น	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล	3
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	5
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	11
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	12
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	28
ข้อเสนอแนะ	28
บรรณานุกรม	29
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	32
ภาคผนวก ข	37
ภาคผนวก ค	42
ภาคผนวก ง	57
ภาคผนวก จ	59
ประวัติผู้วิจัย	61

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น	3
ตารางที่ 2 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองและถั่วหมักในส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม	5
ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก	14
ตารางที่ 4 ปริมาณวิตามินบี 12 ที่พบในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก	16
ตารางที่ 5 ปริมาณฟอสฟอรัส (mg/kg) ที่พบในถั่วหมักชั่วโมงต่างๆ	18
ตารางที่ 6 ปริมาณแคลเซียม (mg/kg) ที่พบในถั่วหมักชั่วโมงต่างๆ	18
ตารางที่ 7 ปริมาณธาตุเหล็ก (mg/kg) ที่พบในถั่วหมักชั่วโมงต่างๆ	19
ตารางที่ 8 ค่า pH ของถั่วหมักที่ระยะเวลาต่างๆ	20
ตารางที่ 9 ค่าสีของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก	21
ตารางที่ 10 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> (BB) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ	23
ตารางที่ 11 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและไม่เติมกล้าเชื้อ (BN) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ	24
ตารางที่ 12 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการclave และเติมกล้าเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> (CB) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ	25
ตารางที่ 13 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการclave และเติมกล้าเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> (CB) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ	26

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	7
รูปที่ 2 คุณสมบัติของกล้าเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i>	13
รูปที่ 3 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ระยะเวลาต่างๆ	15



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันประชาชนส่วนมากหันมาให้ความสนใจกับสุขภาพร่างกายกันมากขึ้น โดยจะใส่ใจกับการบริโภคอาหารที่ผลิตจากธรรมชาติหรือผ่านการแปรรูปให้น้อยที่สุด เพื่อหลีกเลี่ยงจากการได้รับสารเคมีที่เป็นอันตราย การรับประทานอาหารเช้า อาหารมังสวิรัตและอาหารชีวจิต ก็เป็นอีกหลายทางเลือกที่ประชาชนให้ความสนใจมาก อาหารเหล่านี้ส่วนใหญ่ประกอบด้วยผักและธัญพืชเป็นหลัก โดยการรับประทานถั่วชนิดต่างๆ เพื่อทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์และถั่วเหลืองก็ถูกนำมาแปรรูปเป็นอาหารมากที่สุด เพราะถั่วเหลืองมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมอาหารประเภทโปรตีนและแคลอรีในประเทศที่กำลังพัฒนา เนื่องจากสามารถผลิตภายในประเทศได้เองมีปริมาณโปรตีนและแคลอรีสูง ราคาต่ำกว่าอาหารโปรตีนประเภทเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังมีวิตามินหลายชนิด รวม ถึงเลซิติน (Lecitin) ซึ่งเป็นสารบำรุงสมอง เพิ่มความทรงจำ ลดไขมัน ลดโคเรสเตอรอลในร่างกาย โดยสารดังกล่าวมีมากบริเวณผิวหุ้มเมล็ด (อภิษฐา, 2550) ดังนั้นจึงเหมาะแก่การแก้ปัญหาทุพโภชนาการ และจากปัญหาโรคโลหิตจางที่มีสาเหตุมาจากการขาดธาตุเหล็ก ทำให้ผู้ป่วยมีการพัฒนาด้านต่างๆ ของร่างกายช้ากว่าคนปกติ การพัฒนาด้านสติปัญญา การเรียนรู้ ประสิทธิภาพในการทำงานตลอดจนด้านภูมิคุ้มกันโรคต่ำลง ทั้งนี้ ในเมล็ดถั่วเหลืองยังอุดมไปด้วยธาตุเหล็ก (Tajima, 2003) สำหรับประเทศไทยโดยเฉพาะภาคเหนือตอนบน จะนิยมบริโภคอาหารหมักจากถั่วเหลืองที่เรียกกันว่า ถั่วเน่า แต่ยังไม่ค่อยนิยมแพร่หลายนัก เนื่องจากการผลิตแบบพื้นบ้าน กระบวนการหมักเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์โดยธรรมชาติ ไม่มีการควบคุมสภาวะการหมัก ทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่สม่ำเสมอ (Visessanguan, 2005) และยังประสบปัญหาในการยอมรับของผู้บริโภค ทั้งในเรื่องกลิ่น สี รสชาติของถั่วหมัก และสายพันธุ์ของถั่วเหลืองที่ใช้ในการหมัก ดังนั้นคณะผู้วิจัยเห็นว่าการพัฒนาการหมักถั่วหมัก โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ น่าจะช่วยให้ลดกลิ่นของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก และทำให้คุณภาพโดยรวมดีกว่าการหมักโดยวิธีพื้นบ้าน อีกทั้งมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อพัฒนาการหมักเพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ถั่วหมักเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทางด้านกลิ่น สี และคุณค่าทางโภชนาการของถั่วหมัก
- 2) เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในส่วนของคุณค่าธาตุเหล็กและวิตามินในผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก
- 3) เพื่อลดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ของถั่วหมักจากการหมักโดยใช้ลำเชื้อ *Bacillus subtilis*

ขอบเขตของการวิจัย

การเตรียมถั่วเหลือง โดยผ่านกระบวนการให้ความร้อน 2 แบบ คือ การต้มถั่วเหลือง 7 ชั่วโมง และนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน 121°C 15 นาที เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อย Oligosaccharide แล้วจึงเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ทำการตรวจวัดคุณภาพของผลิตภัณฑ์ โดยพิจารณาจากค่าสี กลิ่น วิตามินบี 12 และปริมาณของแคลเซียม (Ca) ฟอสฟอรัส (P) ธาตุเหล็ก (Fe) ติดตามการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดระหว่างการหมัก ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 เพื่อพัฒนากระบวนการหมักถั่วหมักและทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ประโยชน์ที่รับจากการวิจัย

เพื่อนำผลงานวิจัยที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการถ่ายทอดบรรมให้ความรู้ต่อผู้บริโภค และชุมชนท้องถิ่น ให้ตระหนักถึงความสำคัญและประโยชน์ที่ได้จากการบริโภคถั่วหมัก เพื่อเสริมสุขภาพร่างกายให้ดีขึ้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์ถั่วหมักมีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้นไป เมื่อผ่านการหมักโดยการควบคุมสภาวะกระบวนการหมัก เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ถั่วหมักมีคุณภาพและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

กลุ่มผู้ผลิตและจำหน่ายอาหารประเภทมังสรีรติ ผู้บริโภคที่สนใจเรื่องการดูแลสุขภาพและหน่วยงานของรัฐและเอกชน ที่เกี่ยวข้อง เช่น องค์การบริหารส่วนท้องถิ่น

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

จากนโยบายอาหารและโภชนาการแห่งชาติ จัดทำโดยคณะกรรมการวางแผนงานและโภชนาการ สำนักงานคณะกรรมการวางแผนพัฒนาเศรษฐกิจสังคมแห่งชาติ ได้ชี้ให้เห็นว่าโรคขาดสารอาหารที่รุนแรงและเป็นปัญหามากที่สุดคือ โรคขาดโปรตีนและแคลอรีในทารก เด็กก่อนวัยเรียน เด็กวัยเรียน หญิงมีครรภ์และแม่ลูกอ่อน (ภาณุวรรณ, 2543) ดังนั้นควรสนับสนุนให้มีการรับประทานถั่วชนิดต่างๆ เพื่อทดแทนปริมาณโปรตีนจากเนื้อสัตว์ ทั้งนี้ถั่วเหลืองก็มีปริมาณโปรตีนสูงเมื่อเทียบกับอาหารประเภทอื่นๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น

ชนิด	ปริมาณโปรตีน กรัม/100 กรัม
ถั่วเหลือง	34.1
ถั่วพู	32.8
ถั่วลิสงคั่ว	28.6
ถั่วเขียว	24.4
ถั่วดำ	22.7
ถั่วแดงหลวง	20.3
เนื้อวัวไม่มีมัน	20.0
เนื้อไก่	18.0
กุ้งน้ำจืด	16.2
เนื้อหมูไม่ติดมัน	14.1
ไข่เป็ด	13.2
ข้าวสาลี	11.8
ข้าวเจ้า	6.4

ที่มา : กองโภชนาการ กรมอนามัย : 2535

กระบวนการหมักที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก จำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากจุลินทรีย์จะไปมีบทบาทในการเปลี่ยนวัตถุดิบให้มีลักษณะของผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ โดยการทำงานที่จำเพาะของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น และเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารของวัตถุดิบให้มีมากขึ้น ทั้งยังช่วยทำให้โครงสร้างที่ส่งเสริมให้อาหารมีรสชาติดี และช่วยทำลายส่วนประกอบที่ไม่ต้องการในอาหารให้หมดไป การหมักจะช่วยกำจัดกลิ่นถั่วเหลืองให้หมดไปได้ เนื่องจากกลิ่นของถั่วเหลืองที่เกิดจากสารพวก carboxyl compound พวก xexanol และ pentanol นอกจากนี้ *B. subtilis* ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Aspergillus* (Petchkongkaew, 2008)

ถ้าเชื้อ *B. subtilis* มีบทบาทสำคัญในการทำผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มแกรมบวก รูปร่างตรง มี flagella แบบ peritrichous เจริญได้ดีที่ pH 5.5-8.5 ในสภาวะที่มีอากาศ (aerobes) หรือ มีอากาศเล็กน้อย (facultative anaerobes) สร้าง catalase มี endospore ที่ทำให้มีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่ดีได้ ไม่ทำให้เกิดโรค สร้าง Hydrolytic enzyme ที่ย่อยสลาย polysaccharide, nucleic acid และ lipid โดยใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและตัวให้อิเล็กตรอน มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน บทบาทสำคัญของเชื้อตัวนี้ในการหมักคือการปล่อยเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส ออกมาย่อยโปรตีน ช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายและเป็นประโยชน์มากขึ้น (Feng et al., 2007; Suppadit, Sangla & Pintasean, n.d.; Inatsu et al., 2006) ซึ่งเมื่อทำการหมักถั่วจะได้สารประกอบจำพวก ester เป็นส่วนมาก เช่น ethyl, isobutyl และ isoamyl ester ของ isobutyric, α-methylbutyric, isovaleric, tiglic acids ซึ่งเกิดจากการสลายตัว และการหมักของโปรตีนกลีเซอรไรต์และกรดไขมันในถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมีสารที่ให้กลิ่นหอมฉุน เช่น 2-heptanone pyrazine และ benzaldehyde โดยไพราซีนจะเกิดขึ้นจากการต้มถั่วให้สุกก่อนนำไปหมัก ในขณะที่สาร 1-ออกทีน-3-อล มีปริมาณลดลง (ภานุวรรณ, 2543) นอกจากนี้เมื่อทำการหมักยังพบสารประกอบที่ระเหยได้ เช่น butanone, 3-hydroxybutanone (acetoin), 2-methylbutanoic acid, pyrazines, 2-pentylfuran และ dimethyl disulfide (Leejeerajumnean et al., 2001) 3-hydroxy-butanone (acetone), 2,5-dimethylpyrazine และ trimethylpyrazine (Owens et al., 1997) aldehydes, ketones และ acids (Beaumont, 2000) ซึ่งสารประกอบทั้งหมดเกิดขึ้นจากการหมักถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อ *B. subtilis*

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าถั่วเหลืองหมักมีปริมาณธาตุเหล็กสูงกว่าถั่วเหลืองที่ยังไม่ได้ผ่านการแปรรูป และถั่วเหลืองจะมีโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตแล้วยังประกอบด้วย เกลือแร่ที่สำคัญ เช่น โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม กำมะถัน และเหล็ก สำหรับวิตามินที่มีในถั่วเหลืองได้แก่ วิตามิน B₁ วิตามิน B₂ และไนอาซิน นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยวิตามิน A, B₆, B₁₂ และวิตามิน C, D, E อีกด้วย (อภิษฐา, 2550) ดังตารางที่ 2 ซึ่งสามารถนำมาเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาโรคขาดสารอาหารต่างๆ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

ตารางที่ 2 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองและถั่วหมักในส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม

สารอาหาร	ถั่วเหลืองดิบ ^b	ถั่วเหลืองสุก ^a	ถั่วหมักเปียก ^b	ถั่วหมักแห้ง ^b
ความชื้น (%)	11.1	71.0	61.8	12.0
โปรตีน (g)	34.0	11.0	17.9	43.9
ไขมัน (g)	18.7	5.7	6.6	17.6
คาร์โบไฮเดรต (g)	26.7	10.8	5.3	13.5
แคลเซียม (mg)	245	73	198	292
ฟอสฟอรัส (mg)	500	179	223	5
เหล็ก (mg)	10.0	2.7	6.1	21
วิตามินบี1 (mg)	0.73	0.21	0.04	0.06
วิตามินบี2 (mg)	0.19	0.09	0.45	0.73
ไนอาซีน (mg)	1.5	0.6	1.6	1.5

ที่มา : ^a กองโภชนาการ กรมอนามัย : 2530, ^b กองโภชนาการ กรมอนามัย : 2535

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

ตอนที่ 1 การคัดเลือกกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

1. การคัดแยก *Bacillus subtilis* จากถั่วหมัก

นำถั่วเหลืองมาคัดเลือกเพื่อแยกสิ่งเจือปนออกให้หมด ล้างให้สะอาด แช่ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วรินน้ำ ออก นำไปต้มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ระหว่างการต้มต้องคอยเติมน้ำให้ท่วมเมล็ดถั่วเสมอ เมื่อให้ความร้อนเสร็จแล้วทิ้งให้เย็นและผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ถ่ายใส่ตะกร้าพลาสติกที่รองด้วย อะลูมิเนียมฟอยล์ ทำการหมักที่อุณหภูมิ 35°C เป็นระยะเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างถั่วหมัก 25 กรัม ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water 225 มิลลิลิตร ใน stomacher bag ตีบดด้วยเครื่อง stomacher โดยใช้ความเร็วรอบปานกลางเป็นเวลา 60 วินาที ได้ตัวอย่างถั่วหมักที่มีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางเป็นลำดับจนได้ระดับความเจือจางประมาณ 10^{-5} ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารวุ้น MYP เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค spread plate ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันชนิดละ 5 โคโลนี นำไปแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบน Nutrient agar ด้วยวิธีการ streak plate เก็บสายพันธุ์ *Bacillus* บริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ใน Nutrient broth รวมกับ Skim milk เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

2. การศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

(1) การย้อมสีแกรมโดยลักษณะของแบคทีเรีย *Bacillus* จะติดสีแกรมบวกรูปร่างเป็นแท่ง (rod)

(2) การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) โดยการหยดซัสเพนชันของแบคทีเรียสร้างกรดลงบนสไลด์ 2 จุด หยดน้ำกลั่นบนหยดซัสเพนชันของแบคทีเรียจุดที่ 1 ใช้ไม้จิ้มฟันผสมให้เข้ากัน สังเกตว่าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น ซึ่งแสดง catalase negative ใช้เป็นตัวควบคุมสำหรับจุดที่ 2 หยด 3% H_2O_2 บนหยดซัสเพนชันของแบคทีเรีย ใช้ไม้จิ้มฟันอีกด้านหนึ่งผสมให้เข้ากัน สังเกตการเกิดฟองก๊าซเปรียบเทียบกับตัวควบคุม ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* จะเป็น catalase positive

3. การคัดกรองสายพันธุ์ตามคุณสมบัติของการผลิตเอนไซม์ Amylase และ Proteinase

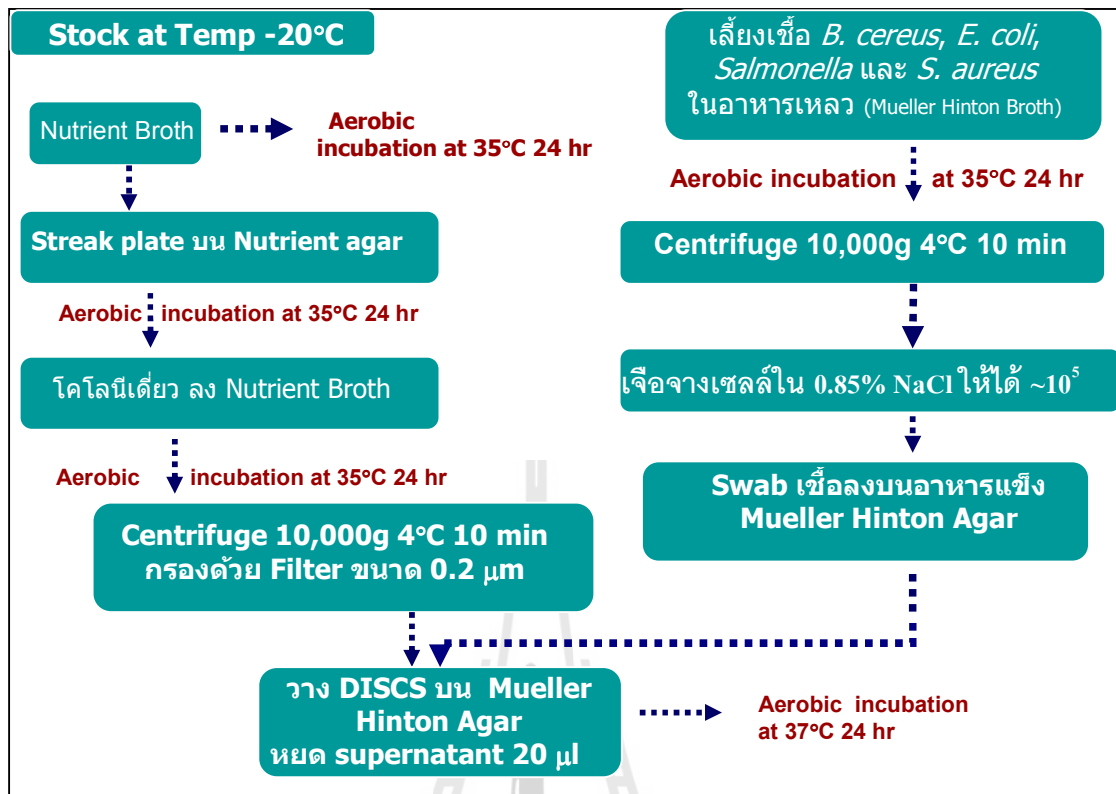
นำจำนวนแบคทีเรียที่มีคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี จำนวน 25 ไอโซเลท มาทดสอบการผลิตเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ Amylase และ Proteinase ดังรูปที่ 2 โดยการทดสอบเอนไซม์ Amylase ใช้อาหาร Nutrient agar modified ที่เติม 1% soluble starch และการทดสอบเอนไซม์ Proteinase ใช้อาหาร Nutrient agar modified ที่เติม 10% skim milk

4. การศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยา

นำจำนวนแบคทีเรียที่มีคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี จำนวน 25 ไอโซเลท มาศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยา ได้แก่ ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ $35^{\circ}C$ และ $50^{\circ}C$ ทดสอบการทนเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 0%, 7.5% และ 10% และความทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ pH 5.7 และ pH 6.8

5. การศึกษาคุณสมบัติเป็น Motility การย่อย citrate และคุณสมบัติการเป็น Antimicrobial

นำจำนวนแบคทีเรียที่มีคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี จำนวน 25 ไอโซเลท มาศึกษาคุณสมบัติการเป็น Motility โดยการนำโคโลนีเดี่ยว stab ลงในหลอดอาหาร Motility และอาหาร citrate ลึกประมาณ 5 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ $35^{\circ}C$ 24 ชั่วโมงแล้วจึงอ่านผล การทดสอบคุณสมบัติการเป็น Antimicrobial (Zheng & Slavik, 1999) ดังรูปที่ 1 พบว่า มีเชื้อที่มีคุณสมบัติของการเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน 2 ไอโซเลท



รูปที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

6. การคัดเลือกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E

(Petchkongkaew et al., 2008)

นำเชื้อที่มีคุณสมบัติการเป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจำนวน 2 ไอโซเลท จาก stock ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมา Streak plate บนอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง และแยกโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง และนำมา Streak plate บนอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 2 ml ให้เข้มข้น และใช้ dropper หยดลงใน 0.85% NaCl ปริมาตร 5 ml เทียบกับ McFarland No.2 นับจำนวนหยด (n) และใช้ dropper หยดลงในอาหาร 50 CHB จำนวน 2n หยด ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นใช้ Micropipett หยดลงในชุด API 50 CH strips และ API 20E บ่มที่อุณหภูมิ 35°C อ่านผล 24 ชั่วโมง

7. ขั้นตอนการหา Growth rate ของกล้าเชื้อที่แยกได้จากถั่วหมัก

นำกล้าเชื้อที่คัดเลือกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E จำนวน 2 ไอโซเลท มาหาอัตราการเจริญเติบโตชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 และ 72 วัดค่า OD ค่า pH รวมทั้งทดสอบการย่อยเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส ทดสอบการผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยนำกล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดจำนวน 1 ไอโซเลท มาเป็นกล้าเชื้อในการผลิตถั่วหมัก

ตอนที่ 2 การนำกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* มาทำการหมักถั่วเหลือง

1. การหมักถั่วเหลืองด้วยกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

นำเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เป็นกล้าเชื้อในการหมัก หลังจากนั้นนำถั่วเหลืองมาคัดเลือกเพื่อแยกสิ่งเจือปนออกให้หมด ล้างให้สะอาด แช่ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วรินน้ำออกให้ความร้อน 2 แบบคือ นำไปต้มเป็นเวลานาน 7 ชั่วโมง ระหว่างการต้มต้องคอยเติมน้ำให้ท่วมเมล็ดถั่วเสมอ และการให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดัน 121°C 15 นาที เมื่อให้ความร้อนเสร็จแล้วทิ้งให้เย็นและผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ถ่ายใส่ตะกร้าพลาสติกที่รองด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์นำ *Bacillus subtilis* อยู่ในรูป spore suspension ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิกรัม เติมน้ำลงไป 1 มิลลิลิตรต่อถั่วเหลือง 500 กรัม หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง

2. การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (FDA-BAM (2001))

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก 25 กรัม ผสมกับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water 225 มิลลิลิตร ใน stomacher bag ตีบดด้วยเครื่อง stomacher โดยใช้ความเร็วรอบปานกลางเป็นเวลา 60 วินาที ได้ตัวอย่างถั่วหมักที่มีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางเป็นลำดับ จนได้ระดับความเจือจางประมาณ 10^{-6} ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารรูน PCA เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค spread plate ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 (AOAC (2005), 952.20)

3.1 เตรียม stock solution

ซึ่งผลึกของสารประกอบวิตามินบี 12 คือ Cyanocobalamin 5 มิลลิกรัม โดยสารประกอบวิตามินบี 12 จะละลายใน 0.05 M Acetate Buffer pH 5.0 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จะได้สารประกอบวิตามินบี 12 ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่มีด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์

นำสารละลายจากการเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดสอบ เติมน้ำกลั่นละลายพอแช่เยือกในน้ำแข็ง แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไดรเจน แอสเตทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (โพแทสเซียมไฮยาไดรเจน 1 กรัม ในแอสเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 4.6) เขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องผสมทันที แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ เพราะระหว่างที่นึ่งฆ่าเชื้อ cobalamin จะถูกปล่อยออกมาและเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin อยู่ในส่วนของส่วนใสด้านบน นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเจือจางส่วนใสด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ปริมาณวิตามิน บี 12 อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้

3.3 การไล่อากาศ

นำสารละลายวิตามินบี 12 มาตรฐานและสารละลายตัวอย่างใส่เครื่อง ultrasonic bath เพื่อทำการไล่อากาศ เป็นเวลา 20 นาที

3.4 การวิเคราะห์หาวิตามินบี 12

ใช้ syringe ดูดสารละลายของสารประกอบวิตามินบี 12 และสารละลายตัวอย่างตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามลำดับ บันทึกลับโครมาโตแกรม นำพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12 มาพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค (โดยให้แกน Y เป็นค่าพื้นที่ใต้พีค และแกน X เป็นความเข้มข้น) แล้วนำพื้นที่ใต้พีคของสารละลายตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ก็จะได้ความเข้มข้นหรือปริมาณวิตามินบี 12 ของสารละลายตัวอย่าง โดยทำการฉีดครั้งละ 2 ซ้ำ

3.5 สภาวะการวิเคราะห์

คอลัมน์ : Inertsil ODS-3V 5 μ m (150×4.6 mm. I.D.)

เฟสเคลื่อนที่ : Acetonitrile/0.05 M Acetate Buffer pH 5.0 (10/90)

อัตราการไหล : 1.0 มิลลิลิตร/ นาที

เครื่องวัด : UV 265 nm.

4. การวิเคราะห์แคลเซียม ฟอสฟอรัสและธาตุเหล็ก (Ozden & Erkan, 2007)

4.1 การเตรียมตัวอย่างใช้เครื่อง microwave

การย่อยตัวอย่างโดยซังตัวอย่าง 0.5 กรัม เติม nitric acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ย่อยด้วยเครื่อง microwave นาน 30 นาที หลังจากนั้นเติม hydrogen peroxide ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ย่อยต่อด้วยเครื่อง microwave นาน 30 นาที เติสสารละลายที่ได้ลงในขวดปรับปริมาตรแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

4.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-MS

โดยการวิเคราะห์ธาตุฟอสฟอรัส ใช้ mode no gas ในการวิเคราะห์ ส่วนการวิเคราะห์ธาตุแคลเซียมและธาตุเหล็ก ใช้ mode Hydrogen

5. วิธีวิเคราะห์หาค่า pH

นำถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักปริมาณ 2 กรัม บดให้ละเอียด เติมน้ำกลั่นปริมาณ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จึงนำมาวัดด้วย pH meter (Omafuvbe, 2006)

6. การวิเคราะห์ค่าสีของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก (Hunter Lab รุ่น Colour Quest XE)

ซังตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วหมักปริมาณ 25 กรัม ทำการวัดค่าสี Lab* ด้วยเครื่อง Hunter Lab รุ่น Colour Quest XE

7. การวิเคราะห์กลิ่นของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก (ดัดแปลงจาก Leejeerajumnean et al., 2001)

นำตัวอย่างถั่วหมัก 200 กรัม เติมน้ำกลั่นครบ 500 มิลลิลิตร ทำการกลั่นแบบสกัดพร้อมกัน (Simultaneous steam distillation and extraction apparatus) จนได้ไอรระเหยไปผสมกับตัวทำละลายคือ ไดอิทิลอีเทอร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาให้ความร้อนอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไอรระเหยของไดอิทิลอีเทอร์จะผ่านไปยังเครื่องควบแน่น แล้วไปรวมกับไอรระเหยของสารให้กลิ่นซึ่งมากับตัวอย่าง กลายเป็นของเหลวไหลผ่านลงมาส่วนล่างและเกิดการแยกชั้นของน้ำและตัวทำละลายที่มีสารให้กลิ่นละลายอยู่โดยตัวทำละลายอยู่ชั้นบน จะได้สารให้กลิ่นเพียง พอที่จะนำไปวิเคราะห์ จากนั้นเติม Sodium sulphate anhydrous เขย่าแล้วปล่อยให้ตกตะกอน จากนั้นก็เทสารละลายแยกออกจากตะกอน เพื่อที่จะเอาไปทำให้เข้มข้นโดยการไล่ไดอิทิลอีเทอร์ออกอีกด้วย การเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน จนเหลือปริมาตรประมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gas chromatography - mass spectrometry โดยมีสภาวะดังนี้ :

Column : DB-Wax column

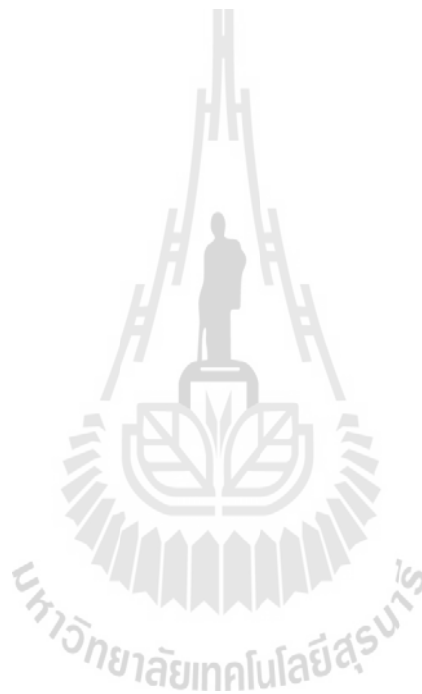
Injection temperature : 200 °C

Program : 60 °C (4 min hold) จนถึง 180 °C

Rate : 2 °C/min

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลทั้งหมดของการวิจัยมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ CRD
แบบจำนวนซ้ำเท่ากัน



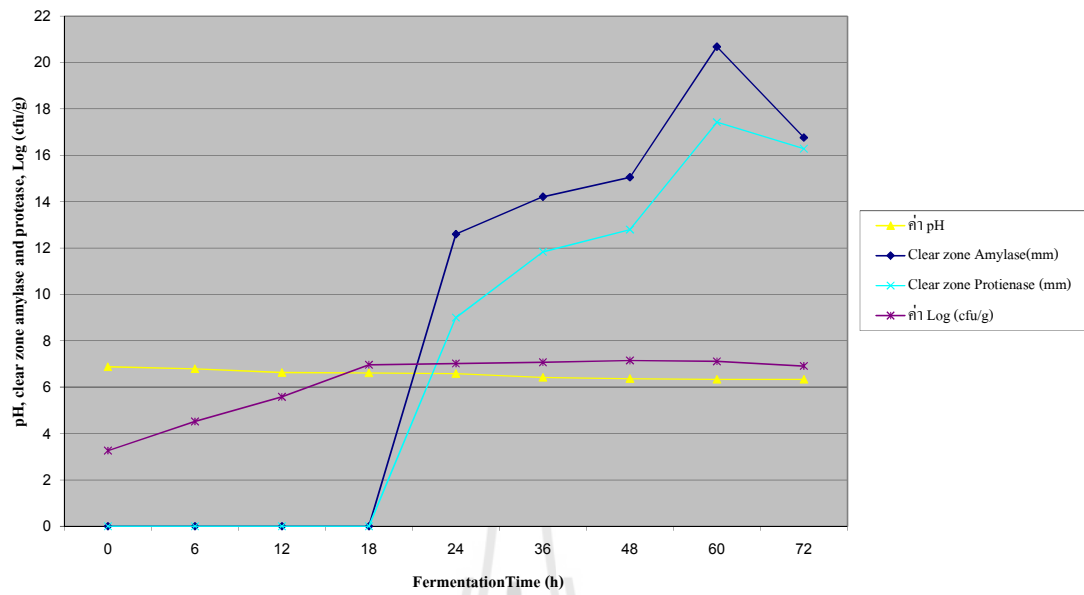
บทที่ 3

ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การคัดเลือกลำเชื้อ *Bacillus subtilis*

ผลการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* จากถั่วเหลืองหมัก จำนวน 25 ไอโซเลท เมื่อจำแนกคุณสมบัติของเชื้อที่แยกได้ตามคุณลักษณะทางชีวเคมีพบว่า มี Catalase test positive 25 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 100 การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาพบว่า ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง 20 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 80 และศึกษาคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์ พบว่าผลิตเอนไซม์ Amylase ได้ 15 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 60 และสามารถผลิตเอนไซม์ Proteinase ได้ 14 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 56

หลังจากนั้นนำแบคทีเรีย *Bacillus* ทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาด้าน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของเกลือ พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* มีความสามารถในการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35°C และ 50°C ได้ทั้งหมด และมีความสามารถในการเจริญได้ที่ pH 5.7 และ 6.8 ร้อยละ 100 มีความสามารถเจริญที่เกลือ 7.5% NaCl, 10% NaCl ร้อยละ 100 (ตารางที่ 3) เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติการผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Bacillus cereus* TISTR NO.687, *E. coli* TISTR NO.780, *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* TISTR NO.118 พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้นที่ยับยั้ง *S. aureus* TISTR NO.118 คิดเป็นร้อยละ 8 โดยรหัส SB_MYP_1 ยับยั้ง *S. aureus* TISTR NO.118 ได้ 128.17 IU และ รหัส SB_MYP_2 *S. aureus* TISTR NO.118 ได้ 90.78 IU นำกล้ำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท มาทดสอบโดยการคัดเลือกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E ได้กล้ำเชื้อ *B.subtilis* ร้อยละ 98.2 จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ รหัส SB_MYP_1 และ รหัส SB_MYP_2 จึงเลือกกล้ำเชื้อรหัส SB_MYP_1 มาศึกษาต่อ เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์และยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากกว่า กล้ำเชื้อรหัส SB_MYP_2 แสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งคุณสมบัติของกล้ำเชื้อ รหัส SB_MYP_1 มีการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นในช่วง Stationary phase โดยเมื่อเกิดกระบวนการหมัก กล้ำเชื้อสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ ซึ่งพบในช่วง Stationary phase ของการเจริญ ซึ่งการผลิตช่วงนี้มีความสำคัญ เช่น สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้



รูปที่ 2 คุณสมบัติของกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* รหัสเชื้อ SB_MYP_1

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก

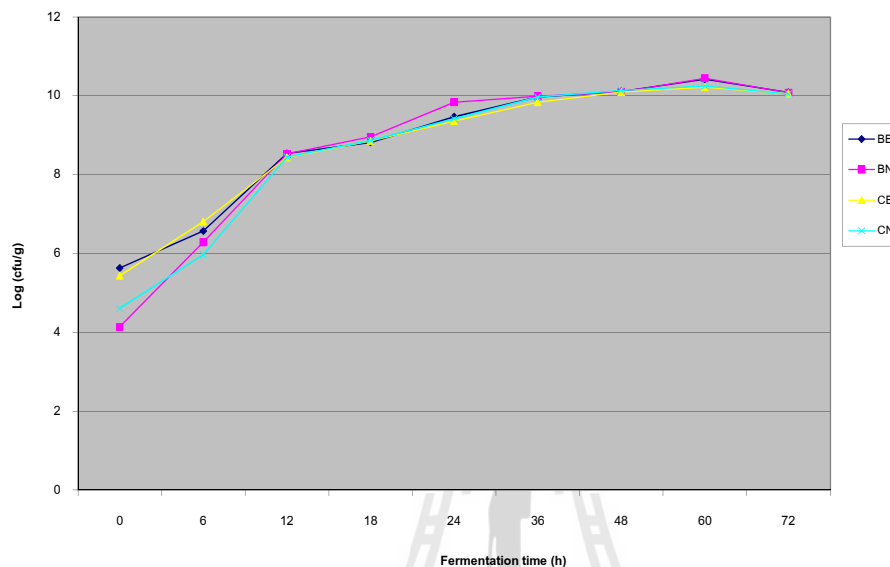
รหัส ตัวอย่าง	Gram ^a	Catalase test	Temp ^b (°C)		ไม่มี O ₂	Motility	NaCl ^b (%)		pH ^b		Citrate ^c
			35	50			7.5	10	5.7	6.8	
SB_MYP_1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_8	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_10	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_12	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_13	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_14	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_15	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_17	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_18	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_19	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_20	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_21	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_22	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_23	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_25	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

หมายเหตุ : SB = soybean, MYP = Manitol eggolk polymyxin

a = Gram staining, b = growth ability, c = ความสามารถในการย่อย citrate

ตอนที่ 2 การนำกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* มาทำการหมักถั่วเหลือง

1. การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (FDA-BAM (2001))



รูปที่ 4 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ระยะเวลาต่างๆ

หมายเหตุ : BB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

BN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

CB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + เติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

CN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + ไม่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

จากการนำกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก มาทำการหมัก โดยเปรียบเทียบการให้ความร้อน 2 แบบ คือ การนำไปต้มและการให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นของถั่วหมักที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่าถั่วหมักแบบธรรมชาติ แต่เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป ปริมาณเชื้อจะเพิ่มมากขึ้นตามด้วย จนกระทั่งถึงการหมักที่ 60 ชั่วโมง พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลดลงเมื่อครบระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

2. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12

ตารางที่ 4 ปริมาณวิตามินบี 12 ที่พบในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก

Samples	Vitamin B12 μ g/100g
BB	0.18 ^b
BN	<0.10 ^a
CB	0.27 ^c
CN	0.16 ^b
P-value	0.001

หมายเหตุ : BB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เติมน้ำเชื้อ *Bacillus subtilis*

BN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เติมน้ำเชื้อ *Bacillus subtilis*

CB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + เติมน้ำเชื้อ *Bacillus subtilis*

CN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + ไม่เติมน้ำเชื้อ *Bacillus subtilis*

เมื่อนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่สิ้นสุดระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 พบว่า ตัวอย่างถั่วหมักที่มีการให้ความร้อนแบบการนึ่งฆ่าเชื้อ และเติมน้ำเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) มีปริมาณวิตามินบี 12 มากที่สุด คือ 0.27 μ g/100g รองลงมาเป็นตัวอย่างที่ให้ความร้อนโดยการต้มและเติมน้ำเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) พบปริมาณวิตามินบี 12 0.18 μ g/100g โดยตัวอย่างที่ให้ความร้อนโดยการต้ม แต่ไม่มีการเติมน้ำเชื้อ (BN) จะมีปริมาณวิตามินบี 12 ต่ำสุด คือ <0.10 μ g/100g ทั้งนี้อาจเป็นสาเหตุจากวิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่ละลายน้ำ จึงเกิดการสูญเสียวิตามินระหว่างขั้นตอนของการแช่ถั่วก่อนการนำมาให้ความร้อน และการให้ความร้อนโดยการต้มเป็นระยะเวลานาน ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สูญเสียวิตามินบี 12 ระหว่างกระบวนการได้เช่นเดียวกัน จึงทำให้ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนโดยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมน้ำเชื้อ (CB) มีปริมาณวิตามินบี 12 มากกว่า การให้ความร้อนแบบต้มและเติมน้ำเชื้อ (BB) นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.05$)

3. การวิเคราะห์แคลเซียม ฟอสฟอรัสและธาตุเหล็ก (ICP-MS 7500CE)

จากการนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักมาวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส แคลเซียม และธาตุเหล็ก ดังตารางที่ 5-7 ตามลำดับ พบว่า เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่มีการให้ความร้อนแบบต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) มีปริมาณฟอสฟอรัส 2533.33 mg/kg แคลเซียม 1700.77 mg/kg และธาตุเหล็ก 126.63 mg/kg ซึ่งมากกว่าตัวอย่างถั่วหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (BN) สำหรับการให้ความร้อนแบบการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) มีปริมาณฟอสฟอรัส 3250.74 mg/kg แคลเซียม 2984.65 mg/kg และธาตุเหล็ก 175.40 mg/kg ซึ่งมากกว่าตัวอย่างถั่วหมักที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (CN) ทั้งนี้ตัวอย่างที่ให้ความร้อนแบบการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ (CB) จะมีปริมาณฟอสฟอรัส แคลเซียมและธาตุเหล็กที่มากกว่าตัวอย่างที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ตารางที่ 5 ปริมาณฟอสฟอรัส (mg/kg) ที่พบในถั่วหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
BB	2230.89 ± 1.58 ^a	2178.92 ± 1.68 ^a	2501.58 ± 1.88 ^b	2747.37 ± 0.71 ^d	2420.79 ± 4.04 ^b	2352.58 ± 1.43 ^a	2533.33 ± 1.48 ^b
BN	2423.03 ± 0.82 ^b	2220.61 ± 3.45 ^c	2613.83 ± 3.29 ^c	2257.12 ± 0.99 ^b	2648.06 ± 3.34 ^c	2509.48 ± 5.52 ^b	2449.89 ± 1.76 ^a
CB	2612.27 ± 2.90 ^c	2581.30 ± 5.50 ^d	2181.18 ± 1.43 ^a	2448.00 ± 2.71 ^c	2698.45 ± 3.14 ^d	2849.77 ± 2.40 ^c	3250.74 ± 1.37 ^d
CN	2889.79 ± 3.63 ^d	2194.82 ± 1.34 ^b	2828.79 ± 1.30 ^d	2202.82 ± 1.60 ^a	2171.94 ± 1.57 ^a	3044.68 ± 0.64 ^d	3105.56 ± 1.20 ^c
P-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

ตารางที่ 6 ปริมาณแคลเซียม (mg/kg) ที่พบในถั่วหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
BB	1875.63 ± 0.13 ^d	1362.57 ± 0.77 ^d	1683.19 ± 0.35 ^d	1110.97 ± 0.24 ^b	1400.33 ± 0.31 ^c	1813.67 ± 0.17 ^c	1700.77 ± 1.07 ^c
BN	1141.66 ± 1.38 ^a	1163.43 ± 0.47 ^a	1188.93 ± 0.54 ^b	1489.46 ± 0.76 ^c	1675.86 ± 0.97 ^d	1019.97 ± 1.54 ^a	1598.54 ± 0.74 ^b
CB	1810.55 ± 0.43 ^c	1284.71 ± 0.87 ^c	1493.07 ± 0.13 ^c	2256.34 ± 0.19 ^d	1034.84 ± 0.52 ^a	2312.98 ± 0.04 ^d	2984.65 ± 0.79 ^d
CN	1267.26 ± 1.69 ^b	1205.57 ± 1.50 ^b	722.88 ± 1.08 ^a	850.67 ± 2.51 ^a	1121.13 ± 0.59 ^b	1147.80 ± 2.05 ^b	1020.10 ± 0.89 ^a
P-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

ตารางที่ 7 ปริมาณธาตุเหล็ก (mg/kg) ที่พบในถั่วหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
BB	107.63 ± 0.21 ^b	93.54 ± 0.23 ^a	96.15 ± 0.06 ^a	135.55 ± 0.13 ^c	110.08 ± 0.07 ^b	82.54 ± 0.18 ^a	126.63 ± 0.11 ^c
BN	111.57 ± 0.21 ^c	108.81 ± 0.09 ^d	145.65 ± 0.10 ^c	89.92 ± 0.36 ^a	114.67 ± 0.12 ^c	99.08 ± 0.27 ^b	112.72 ± 0.19 ^a
CB	113.11 ± 0.17 ^d	103.14 ± 0.24 ^b	108.17 ± 0.07 ^b	111.14 ± 0.12 ^b	101.55 ± 0.17 ^a	142.12 ± 0.99 ^d	175.40 ± 0.13 ^d
CN	86.31 ± 0.19 ^a	107.54 ± 0.31 ^c	277.44 ± 0.09 ^d	387.55 ± 0.09 ^d	115.55 ± 0.10 ^d	122.68 ± 0.29 ^c	126.58 ± 0.25 ^b
P-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

หมายเหตุ : BB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เติมน้ำเชื้อ *Bacillus subtilis*

BN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เติมน้ำเชื้อ *Bacillus subtilis*

CB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งน้ำเชื้อ (clave) + เติมน้ำเชื้อ *Bacillus subtilis*

CN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งน้ำเชื้อ (clave) + ไม่เติมน้ำเชื้อ *Bacillus subtilis*

ค่าเฉลี่ยที่ปรากฏในตารางได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

ถ้าค่า P-value < 0.05 แสดงว่าตัวอย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 8 ค่า pH ของถั่วหมักที่ระยะเวลาต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)									
	0	6	12	18	24	36	48	60	72	
BB	6.992 ± 0.001 ^d	7.028 ± 0.001 ^d	6.391 ± 0.001 ^b	7.288 ± 0.001 ^d	7.283 ± 0.003 ^c	7.454 ± 0.003 ^a	8.352 ± 0.001 ^a	8.314 ± 0.001 ^a	8.516 ± 0.001 ^d	
BN	6.612 ± 0.001 ^b	7.003 ± 0.001 ^c	6.435 ± 0.001 ^d	6.744 ± 0.001 ^b	7.652 ± 0.001 ^d	8.507 ± 0.003 ^d	8.513 ± 0.003 ^c	8.363 ± 0.003 ^b	8.362 ± 0.003 ^a	
CB	6.653 ± 0.001 ^c	6.760 ± 0.001 ^a	6.045 ± 0.001 ^a	6.687 ± 0.001 ^a	7.114 ± 0.001 ^b	8.061 ± 0.001 ^c	8.495 ± 0.001 ^b	8.377 ± 0.001 ^c	8.479 ± 0.001 ^b	
CN	6.608 ± 0.001 ^a	6.764 ± 0.001 ^b	6.409 ± 0.001 ^c	7.012 ± 0.003 ^c	7.082 ± 0.003 ^a	7.539 ± 0.001 ^b	8.585 ± 0.001 ^d	8.437 ± 0.003 ^d	8.489 ± 0.001 ^c	
P-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

หมายเหตุ : BB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

BN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

CB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งน้ำเกลือ (clave) + เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

CN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งน้ำเกลือ (clave) + ไม่เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

ค่าเฉลี่ยที่ปรากฏในตารางได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

ถ้าค่า P-value < 0.05 แสดงว่าตัวอย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อพิจารณาค่า pH ของถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มแบบเติมน้ำเกลือ (BB) และไม่เติมน้ำเกลือ (BN) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมากกว่าถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งน้ำเกลือแบบการเติมน้ำเกลือ (CB) และไม่เติมน้ำเกลือ (CN) จนกระทั่งถึงระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง และจะมีค่าน้อยลงหลังจาก 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อครบระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ค่า pH ของตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มจะมีค่ามากกว่าตัวอย่างถั่วเหลืองที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งน้ำเกลือส่วนกรณีของการหมักแบบธรรมชาติจะพบการเปลี่ยนแปลงของ pH ไม่สม่ำเสมอ แต่เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 9 ค่าสีของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก

Color	Samples	Fermentation time (h)								
		0	6	12	18	24	36	48	60	72
L*value	BB	52.67 ± 0.14 ^b	53.08 ± 0.01 ^c	53.64 ± 0.03 ^c	57.61 ± 0.01 ^c	58.17 ± 0.14 ^d	58.20 ± 0.01 ^c	60.02 ± 0.01 ^c	61.29 ± 0.14 ^c	65.91 ± 0.01 ^c
	BN	56.42 ± 0.03 ^c	56.84 ± 0.14 ^d	57.46 ± 0.03 ^d	57.50 ± 0.14 ^c	57.71 ± 0.01 ^c	59.94 ± 0.03 ^d	60.88 ± 0.01 ^d	61.34 ± 0.03 ^c	70.76 ± 0.14 ^d
	CB	44.94 ± 0.06 ^a	46.18 ± 0.01 ^a	48.14 ± 0.14 ^a	50.20 ± 0.01 ^a	55.89 ± 0.14 ^b	57.05 ± 0.01 ^b	58.36 ± 0.01 ^a	59.34 ± 0.06 ^b	61.95 ± 0.03 ^b
	CN	43.09 ± 1.41 ^a	50.13 ± 0.04 ^b	51.28 ± 0.01 ^b	52.98 ± 0.01 ^b	53.20 ± 0.01 ^a	53.37 ± 0.03 ^a	58.56 ± 0.04 ^b	59.11 ± 0.01 ^a	60.27 ± 0.03 ^a
	P-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
a*value	BB	0.72 ± 0.14 ^b	1.55 ± 0.01 ^d	1.97 ± 0.01 ^c	1.99 ± 0.01 ^{ab}	2.09 ± 0.01 ^b	2.21 ± 0.01 ^b	2.47 ± 0.28 ^a	2.70 ± 0.01 ^a	3.16 ± 0.04 ^c
	BN	0.88 ± 0.03 ^b	1.32 ± 0.01 ^c	1.53 ± 0.04 ^a	1.68 ± 0.14 ^a	2.11 ± 0.14 ^b	2.17 ± 0.03 ^b	2.32 ± 0.14 ^a	2.43 ± 0.01 ^a	2.87 ± 0.03 ^b
	CB	0.36 ± 0.03 ^a	0.63 ± 0.07 ^a	1.97 ± 0.01 ^c	2.26 ± 0.04 ^c	2.27 ± 0.03 ^b	2.37 ± 0.01 ^b	2.42 ± 0.03 ^a	2.43 ± 0.04 ^a	2.95 ± 0.03 ^b
	CN	1.12 ± 0.01 ^c	1.15 ± 0.03 ^b	1.76 ± 0.04 ^b	1.80 ± 0.14 ^{ab}	1.81 ± 0.01 ^a	1.89 ± 0.14 ^a	2.23 ± 0.04 ^a	2.58 ± 0.28 ^a	2.62 ± 0.03 ^a
	P-value	0.002	0.000	0.000	0.018	0.014	0.012	0.519	0.310	0.000
B*value	BB	9.71 ± 0.01 ^c	10.97 ± 0.03 ^d	12.48 ± 0.01 ^d	12.54 ± 0.14 ^d	12.59 ± 0.14 ^a	13.37 ± 0.01 ^a	13.40 ± 0.01 ^a	15.63 ± 0.03 ^c	16.33 ± 0.04 ^c
	BN	8.66 ± 0.01 ^b	9.85 ± 0.14 ^c	11.85 ± 0.01 ^c	12.00 ± 1.41 ^c	12.69 ± 0.14 ^a	13.40 ± 0.14 ^a	13.43 ± 0.04 ^a	14.68 ± 0.01 ^b	15.69 ± 0.14 ^b
	CB	7.80 ± 0.14 ^a	8.35 ± 0.01 ^a	8.37 ± 0.03 ^a	9.98 ± 0.01 ^a	12.38 ± 0.14 ^a	13.00 ± 0.41 ^a	14.42 ± 0.14 ^b	15.75 ± 0.03 ^d	16.93 ± 0.04 ^d
	CN	7.93 ± 0.04 ^a	9.51 ± 0.01 ^b	9.94 ± 0.06 ^b	11.14 ± 0.06 ^{ab}	12.71 ± 0.01 ^a	12.72 ± 0.03 ^a	13.19 ± 0.14 ^a	13.42 ± 0.01 ^a	15.42 ± 0.01 ^a
	P-value	0.000	0.000	0.000	0.079	0.156	0.751	0.001	0.000	0.000

หมายเหตุ : BB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

BN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

CB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งสุ้าเกลือ (clave) + เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

CN = ตัวอย่างแก้วเหล็องหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + ไม่เติมกล้ำเชื้อ *Bacillus subtilis*

ค่าเฉลี่ยที่ปรากฏในตารางได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

ค่า P-value < 0.01 หมายถึงตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่า P-value < 0.05 หมายถึงตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่า P-value > 0.05 หมายถึงตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการวิเคราะห์ค่าสีของแก้วเหล็องระหว่างการหมัก ที่เวลา 0 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยการต้มแบบเติมกล้ำเชื้อ (BB) และไม่เติมกล้ำเชื้อ (BN) กับการให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อแบบเติมกล้ำเชื้อ (CB) และไม่เติมกล้ำเชื้อ (CN) มีค่า Lightness, Redness และ Yellowness แตกต่างกัน โดยสีของแก้วเหล็องที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อจะมีสีเข้มกว่าแก้วเหล็องที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม ในระหว่างระยะเวลาการหมัก ทั้ง 4 ตัวอย่างจะมีค่าสีเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการหมัก จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ตัวอย่างทั้งหมด มีค่า Lightness, Redness และ Yellowness แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญถึง ($P < 0.05$) ตามลำดับ

ตารางที่ 10 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อน
ด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
Alcohols							
1-octen-3-ol	+	+	+	-	-	-	-
2,3-Butanediol	+	-	-	-	-	-	-
3-Octanol	+	+	+	-	-	-	-
Aldehydes							
Benzaldehyde	-	+	+	+	+	+	+
2,2-dimethyl Hexanal	-	-	-	-	-	+	-
Hexanal	-	-	-	+	+	-	-
Esters and acid							
2-methyl propanoic acid	-	-	-	-	+	+	+
Ethyl acetate	-	+	+	+	-	-	-
Pyrazines							
2,6-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	-	+	+
2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	+	+	+	+
Trimethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	+
Tetramethyl pyrazine	-	-	-	+	+	+	+
3,5-dimethyl-2-propyl pyrazine	-	-	-	-	-	-	+
3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	-	+	+
Aromatic compounds							
2-methoxy phenol	-	-	-	+	-	-	-
Ketones							
3-Octanone	-	-	-	-	-	-	+
4-methyl 2-Hexanone	-	-	-	-	+	-	-
2-heptanone	-	-	-	-	+	+	+
Alkanes							
2,6,10-trimethyl tetradecane	-	-	-	-	-	-	+
hexadecane	-	-	+	+	+	+	+
pentadecane	-	-	+	-	-	-	-
cyclopentasiloxane	-	-	-	+	-	-	-
Octadecane	-	-	-	-	+	-	-
Miscellaneous							
indole	-	-	-	-	+	+	+

หมายเหตุ : - หมายถึง ตรวจไม่พบกลิ่น

+ หมายถึง ตรวจพบกลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 11 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อน
ด้วยการต้มและไม่เติมกลูต้าเชื้อ (BN) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
Alcohols							
1-octen-3-ol	+	+	+	+	+	+	+
3-Octanol	+	+	+	-	-	-	-
2,3-Butanediol	-	-	+	-	-	-	-
1-nonen-3-ol	-	-	-	+	+	+	+
Aldehydes							
2-Methylbutanal	+	+	+	-	-	-	-
2-Methylpropanal	-	+	+	+	-	-	-
Benzaldehyde	-	-	-	-	-	+	+
Esters and acids							
Ethyl acetate	-	+	+	+	-	-	-
Pyrazines							
2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	+	-	+	+
Trimethyl pyrazine	-	-	-	+	+	+	
Tetramethyl pyrazine	-	-	-	+	-	+	+
3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	-	+	+
3,5-dimethyl-2-propyl pyrazine	-	-	-	-	-	-	+
Aromatic compounds							
2-methoxy phenol	-	-	+	+	-	-	-
Ketones							
2-Butanone, 3-phenyl	-	-	-	-	+	-	-
2-heptanone	-	-	-	-	-	-	+
Alkanes							
Cyclopentasiloxane, decamethyl	+	+	-	+	-	+	-
Decane, 2,6,8- trimethyl	-	-	+	-	-	-	-
2,6,8-trimethyl Decane	-	-	-	+	+	+	+
Miscellaneous							
indole	-	-	-	-	-	-	+

หมายเหตุ : - หมายถึง ตรวจไม่พบกลิ่น

+ หมายถึง ตรวจพบกลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 12 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อน
ด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*(CB) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
Alcohols							
1-octen-3-ol	+	+	+	-	-	-	-
3-Octanol	+	+	-	-	-	-	-
2,3-Butanediol	-	-	+	-	-	-	-
Aldehydes							
Benzeneacetaldehyde	+	+	-	+	+	-	-
Benzaldehyde	-	+	+	+	+	+	+
Esters and acids							
2-methyl propanoic acid	-	-	-	-	+	+	+
Ethyl acetate	-	+	+	+	-	-	-
Pyrazines							
2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	+
Trimethyl pyrazine	-	-	-	+	-	+	+
tetramethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	-
2,5-dimethyl-3-propyl pyrazine	-	-	-	+	-	-	-
2,3,5-trimethyl-6-ethyl pyrazine	-	-	-	-	+	-	-
3,5-dimethyl-2-propyl pyrazine	-	-	-	-	-	-	+
3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	-	+	+
Aromatic compounds							
Mequinol	-	-	-	+	-	-	-
Ketones							
Acetone	+	+	+	-	-	-	-
2-heptanone	-	-	-	-	+	+	+
Alkanes							
hexadecane	-	+	-	-	-	-	+
Miscellaneous							
indole	-	-	-	-	+	+	+

หมายเหตุ : - หมายถึง ตรวจไม่พบกลิ่น

+ หมายถึง ตรวจพบกลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 13 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อน
ด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและไม่เติมกลูตาเชื้อ (CN) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
Alcohols							
1-octen-3-ol	+	+	+	+	+	+	+
1-Hexanol	+	+	-	-	-	-	-
3-Octanol	+	+	+	+	-	-	-
2,3-Butanediol	-	-	-	+	-	-	-
Aldehydes							
Benzaldehyde	-	-	-	-	-	+	+
Esters and acids							
Ethyl acetate	+	+	+	-	-	-	-
Pyrazines							
2,6-dimethyl pyrazine	-	-	-	+	-	-	-
2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	+	-	-
Trimethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	+
Tetramethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	+
2,5-dimethyl-3-ethyl pyrazine	-	-	-	-	+	-	+
2,3,5-trimethyl-6-ethyl pyrazine	-	-	-	-	-	+	+
Aromatic compounds							
Mequinol	-	+	+	+	-	-	-
Ketones							
3-Octanone	-	+	+	+	-	-	+
2-heptanone	-	-	-	-	-	-	+
Alkanes							
Cyclopentasiloxane, decamethyl	-	-	+	-	-	+	+
hexadecane	-	-	+	-	+	+	+
2-pentadecane	-	-	-	-	+	-	-
2,4,6-trimethyl octane	-	-	-	-	+	+	-
Miscellaneous							
indole	-	-	-	-	-	-	+

หมายเหตุ : - หมายถึง ตรวจไม่พบกลิ่น

+ หมายถึง ตรวจพบกลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก

จากการนำตัวอย่างตัวเหลืองหมักมาวิเคราะห์กลิ่นด้วย GC-MS ซึ่งแสดงดังตารางที่ 10-13 โดยกลิ่นที่พบส่วนใหญ่จะเป็นจำพวก alcohols, aldehydes, esters and acids, pyrazines, aromatic compounds, ketones, และ alkanes เป็นต้น โดยตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้ำเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) กับตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้ำเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) จะพบ indole ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป ซึ่งทำให้ระยะเวลาในการหมักลดลงมากกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมกล้ำเชื้อ ซึ่งจะพบ indole ในชั่วโมงที่ 72

ในช่วงแรกของการหมักในตัวอย่างที่มีการเติมกล้ำเชื้อจะพบสารประกอบในกลุ่ม alcohols ได้แก่ 1-octen-3-ol, 1-Hexanol และ 3-Octanol เป็นต้น แต่ในตัวอย่างที่หมักแบบธรรมชาติจะพบกลิ่น 1-octen-3-ol ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ชั่วโมงที่ 72 นอกจากนี้ยังมีสารประกอบที่ให้กลิ่นหอมฉุน เช่น 2-heptanone, pyrazine และ benzaldehyde เป็นต้น โดยตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้ำเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) กับตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้ำเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) จะพบ 2-heptanone และ benzaldehyde ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการพบ indole สำหรับตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เติมกล้ำเชื้อ *Bacillus subtilis* (BN) และ ตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ + ไม่เติมกล้ำเชื้อ *Bacillus subtilis* (CN) จะพบ 2-heptanone, benzaldehyde เฉพาะชั่วโมงที่ 72 เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า การเติมกล้ำเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถเพิ่มบทบาทในการหมักที่ให้คุณภาพได้มากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ ทั้งการลดระยะเวลาในการหมักและการให้กลิ่นที่หอมฉุนมากกว่าด้วย

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักด้วยการเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ไม่ว่ากรณีให้ความร้อนด้วยการต้มหรือการนึ่งฆ่าเชื้อ จะให้ลักษณะผลิตภัณฑ์โดยรวมดีกว่าการหมักแบบธรรมชาติทั้งในด้านของ กลิ่น สีและคุณค่าทางโภชนาการ ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ และเติมกล้าเชื้อจะมีปริมาณวิตามินบี 12 ฟอสฟอรัส แคลเซียมและธาตุเหล็กที่มากกว่าตัวอย่างที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ ซึ่งการเติมกล้าเชื้อจะให้คุณค่าทางโภชนาการมากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ ทั้งนี้ด้วยคุณสมบัติการผลิต amylase และ protease ของกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่แยกได้นี้มีผลต่อการให้กลิ่น ทั้งนี้กลิ่นที่ได้ส่วนใหญ่พบ alcohols, aldehydes, esters and acids, pyrazines, aromatic compounds, ketones, และ alkanes เป็นต้น โดยสารประกอบที่ให้กลิ่นหอมฉุนได้แก่ 2-heptanone และ benzaldehyde จะพบในตัวอย่างถั่วหมักที่มีการเติมกล้าเชื้อมากกว่าตัวอย่างที่หมักจากธรรมชาติ นอกจากนี้การใช้กล้าเชื้อช่วยทำให้ระยะเวลาในการหมักสั้นลงและมีความปลอดภัยจากเชื้อก่อโรคในอาหารจากสารธรรมชาติชีวภาพ (biopreservative agent หรือ crude bacteriocin) อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยเพื่อยืนยันคุณสมบัติของกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ใช้ในการหมักถั่วเหลือง เป็นข้อมูลที่ใช้เพื่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และสามารถยกระดับการผลิตเชิงพาณิชย์ได้ แต่สิ่งที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมได้แก่คุณภาพเชิงปริมาณของปริมาณของกล้าเชื้อต่อผลผลิตของสารเสริมสุขภาพ (yield) รวมถึงการจำแนกประเภทเชิงปริมาณของสารให้กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์รวมถึงสาเหตุที่ทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่ดีเหล่านั้น เพื่อวัตถุประสงค์ในการควบคุมการหมักให้คงคุณภาพอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ การทดสอบอายุการเก็บรักษา การทดสอบการทำงานในระบบทางเดินอาหาร ภายหลังบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีผลในการเสริมการทำงานของสุขภาพ เป็นข้อมูลที่จำเป็นต้องพิสูจน์อย่างยิ่ง

บรรณานุกรม

- กองโภชนาการ กรมอนามัย. (2530). **ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม.**
องค์การทหารผ่านศึก.
- กองโภชนาการ กรมอนามัย. (2535). **ตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย.**
องค์การทหารผ่านศึก.
- นวลละออง อุ้นบำรุง. (2546). **สรรพคุณทางยาและคุณค่าทางอาหารของถั่วเหลือง** [ออนไลน์].
ได้จาก : http://www.geocities.com/psplant/ps_seminar_Nuanlaoong.htm
- ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร. (2543). **การศึกษาถั่วหมัก.....อาหารพื้นบ้านในภาคเหนือ** [ออนไลน์].
ได้จาก : <http://www.science.cmu.ac.th/jou7.html>
- ธิดา ศรีปวน. (2547). **“ถั่วเน่า” อาหารหมักจากภูมิปัญญาท้องถิ่น.** [ออนไลน์]. ได้จาก :
<http://www.ist.cmu.ac.th/riseat/nl/2004/05/11.php>
- ชนากานต์ พรหมอุทัย, ศันสนีย์ จำจด และ เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม. (7 กันยายน 2549). **ธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวไทย ตอนที่ 1. เชียงใหม่นิวส์.**
- อภิษฐา ช่างสุพรรณ. (29 มีนาคม 2550). **มาบริโภคถั่วเหลืองเพื่อสุขภาพกันเถอะ.** [ออนไลน์].
ได้จาก : http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/bsp_3_2550_soybean.pdf
- Allagheny, N., Obanu, Z.A., Campbell-Platt, G., and Owens, J.D. (1996). Control of ammonia formation during *Bacillus subtilis* fermentation of legumes. **Food Microbiology.** 29: 321-333.
- AOAC official Method 952.20, 2005. Cobalamin (Vitamin B12 Activity) in Vitamin Preparations Microbiological Methods. **Vitamins and Other Nutrients. Chapter 45, P.02**
- Azokpota, P., Hounhouigan, J.D., Annan, N.T., Nago, M.C., and Jakobsen, M. (2008). Diversity of volatile compounds of *afitin*, *iru* and *sonru*, three fermented food condiments from Benin. **World J Microbiol Biotechnol.** 24: 879-885.
- Beaumont, M. (2000). Flavouring composition prepared by fermentation with *Bacillus* spp. **International Journal of Food Microbiology.** 75: 189-196.

- Chantawannakul, P., Chukeatirote, E., Oncharoen, A., Klanbut, K., and Lumyong, S. (2003). **Screening and isolation of *Bacillus subtilis* exhibiting protease activity from Thua Nao** [On-line]. Available: http://agriqua.doae.go.th/worldfermentedfood/P_6_Lumyong.pdf
- Dakwaa, S., Sakyi-Dawsonb, E., Diakoc, C., and Annan, N.T. (2005). Effect of boiling and roasting on the fermentation of soybeans into dawadawa (soy-dawadawa). **International Journal of Food Microbiology**. 104 : 69– 82.
- Erkan, N., and Oxden, O. (2007). Proximate composition and mineral contents in aqua cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*) analyzed by ICP-MS. **Food Chemistry**. 102 : 721–725.
- Feng, J., Liu, X., Xu, Z.R., Lu, Y.P., and Liu, Y.Y. (2007). Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. **Dig Dis Sci**. 52: 1845-1850.
- Inatsu, Y., Kimura, K., and Itoh, Y., (2002). Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in Southeast Asia : comparison with *B. subtilis* (*natto*) starter strains. **Japan Agri. Res. Quart.** 36: 169-175.
- Inatsu, Y., Nakamura, N., Yuriko, Y., Fushimi, T., Watanasiritum, L., and Kawamoto, S. (2006). Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. **Letters in Applied Microbiology**. 43: 237-242.
- Leejeerajumnean, A., Duckham, S.C., Owens, J.D., and Ames, J.M. (2001). Volatile compounds in *Bacillus*-fermented soybeans. **J. Sci. Food Agric.** 81: 525–529.
- Leejeerajumnean, A. (2003). Thua nao : Alkali fermented soybean from *Bacillus subtilis*. **Silpakorn inter J.** 3: 277-292.
- Owens, J.D., Allagheny, N., Kippinga G., and Ames, J.M. (1997). Formation of volatile compounds during *Bacillus subtilis* fermentation of soya beans. **J Sci Food Agric.** 74:132-140.

- Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P., and Lebrihi1, A. (2008). Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. **Journal of Applied Microbiology**. 104: 1495-1502.
- Suppadit, T., Sangla, L., and Pintasean, S. (n.d.). **A study on productive process and quality of fermented soybean (Thua – Nao) in the upper North of Thailand** [On-line]. Available: <http://ssde.nida.ac.th/EMTeachingstaff/Tawadchai/research/Thua%20Nao.pdf>
- Tajima, T. (2003). **Processing and Utilization of Legumes** [On-line]. Available: http://www.apo-tokyo.org/00e-books/AG-12_Legumes/AG-12_Legumes.pdf
- Tangitjaroenkun, J., et al. (n.d.). **Improvement of high vitamin B12 Thua nao by mixed cultures of soybean oligosaccharide utilizing Bacteria and Yeasts** [On-line]. Available: http://agriqua.doae.go.th/worldfermentedfood/P8_Janpen.pdf
- 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.
- 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.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ



Nutrient Agar

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือดแล้วใส่ขวดรูปชมพู่ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที pH สุดท้าย 7.3 ± 0.2 เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มล.

Nutrient Broth

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อน pH สุดท้าย 7.3 ± 0.2 แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที

Plate Count Agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อละลายส่วนผสม แบ่งใส่หลอดหรือขวดรูปชมพู่ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH วัดครั้งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ก่อนใช้ให้เติมสารปฏิชีวนะ Chlortetracycline-HCl บวก Chloramphenicol 2 มล. ต่ออาหาร 100 มล.

Peptone Water Diluent, 0.1%

Peptone	1.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ละลาย peptone ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.1 ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดที่จะทำการเจือจาง โดยเพื่อปริมาตรที่จะหายระหว่างการฆ่าเชื้อ ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

VP test media

Semi-solid VP medium

Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
K_2HPO_4	5.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.1 ถ่ายใส่หลอดทดลอง ฆ่าเชื้อที่ 115°C นาน 10 นาที

Starch agar

Potato starch	10	กรัม
Distilled water	50	มิลลิลิตร
Nutrient agar	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Potato starch ในน้ำให้มีลักษณะเป็นครีม จากนั้นเติม Nutrient agar ฆ่าเชื้อที่ 115°C นาน 10 นาที

Casein agar

Milk, skim	500	มิลลิลิตร
Nutrient agar, double-strength	500	มิลลิลิตร

เตรียม skim milk ฆ่าเชื้อที่ 115°C นาน 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 50°C แล้วเติม Nutrient agar, double-strength

Citrate media

Sodium citrate	3	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
L-cysteine hydrochloride	0.1	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.4	กรัม
KH ₂ PO ₄	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
Na ₂ S ₂ O ₃	0.08	กรัม
Agar	20	กรัม
Phenol red, 0.2% aq. Soln	6	มิลลิลิตร
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมแล้วให้ความร้อนแล้วกรอง ปรับ pH 6.8-6.9 แล้วเติมอินดิเคเตอร์ ฆ่าเชื้อที่

115 °C นาน 20 นาที

MYP

MYP agar base	43	กรัม
Distilled water	900	มิลลิลิตร
Egg yolk emulsion	100	มิลลิลิตร
0.1% polymyxin B sulfate solution	10	มิลลิลิตร

ละลาย MYP agar base ในน้ำกลั่น ต้มให้เดือด แบ่งใส่ขวดๆ ละ 225 มิลลิลิตร นำไปฆ่า

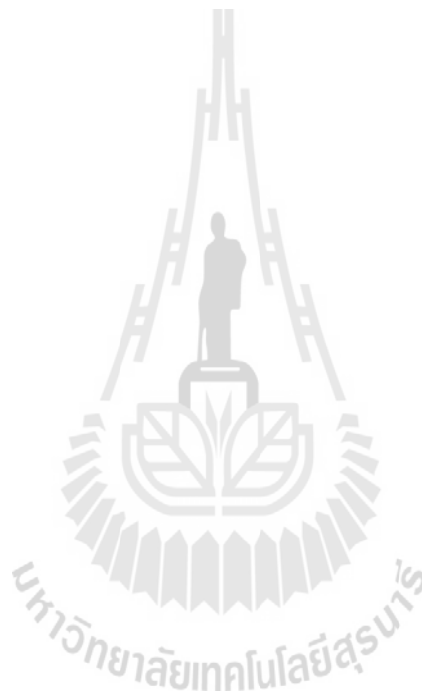
เชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที เมื่อจะเท plate เติม 0.1% polymyxin B sulfate solution ขวดละ 2.5 มิลลิลิตร และเติม Egg yolk emulsion 12.5 มิลลิลิตรต่อขวด

Motility media

Meat extract	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	4	กรัม
Gelatin	80	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำเจลาตินละลายในน้ำประมาณ 30 นาที จากนั้นละลายส่วนผสมอื่นๆ แล้วฆ่าเชื้อที่ 115

°C นาน 20 นาที

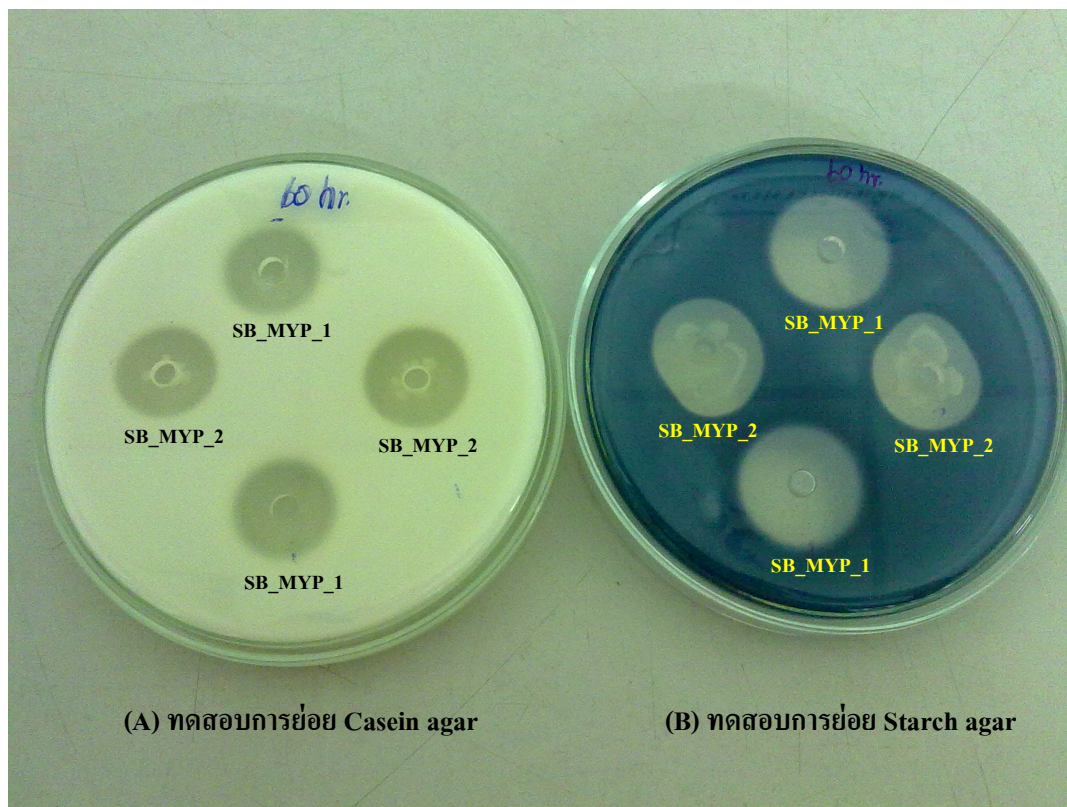


ภาคผนวก ข
การคัดแยก *bacillus subtilis*



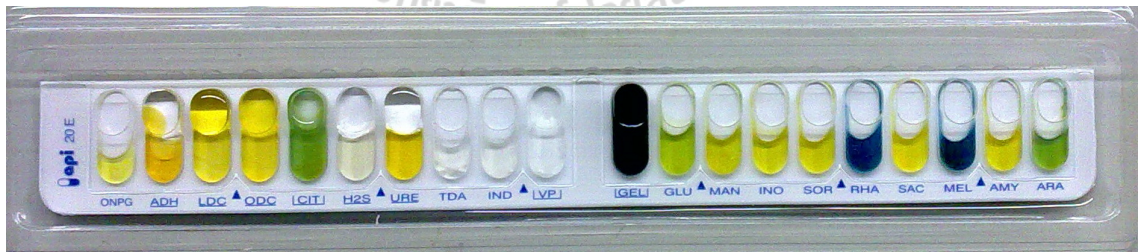
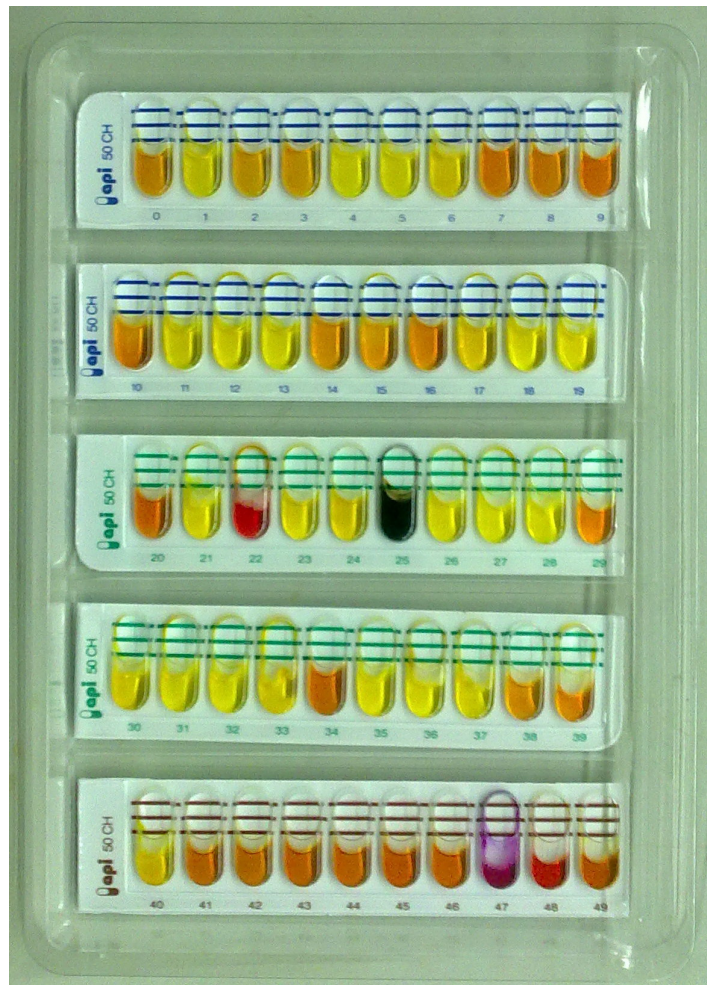
ตารางที่ 14 ผลการคัดเลือกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E

รหัสตัวอย่าง	Genus ของเชื้อ	คิดเป็นร้อยละ
SB_MYP_1	<i>B.subtilis</i>	98.2
SB_MYP_2	<i>B.subtilis</i>	98.2

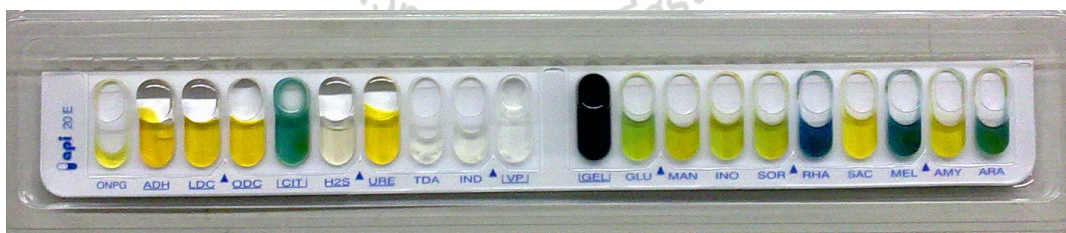
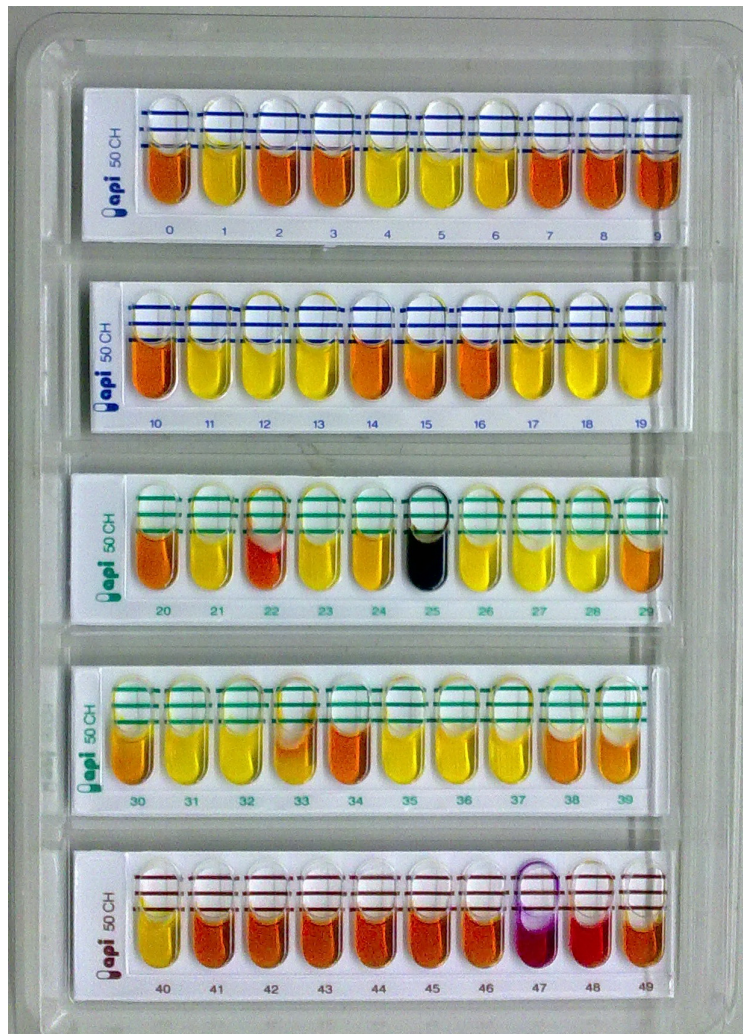


(A) ทดสอบการย่อย Casein agar

(B) ทดสอบการย่อย Starch agar



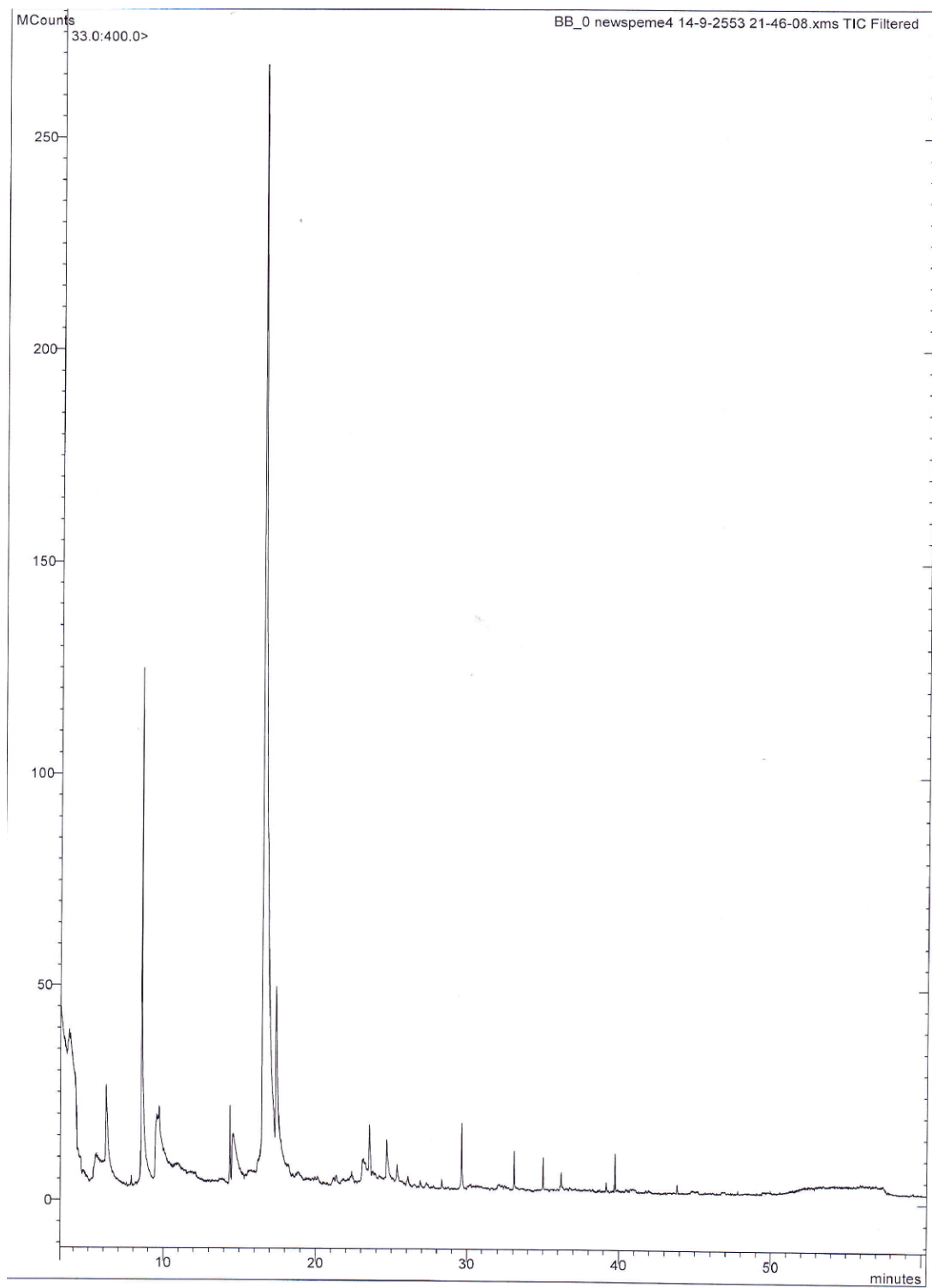
การทดสอบด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E
ของกล้ำเชื้อรหัส SB_MYP_1



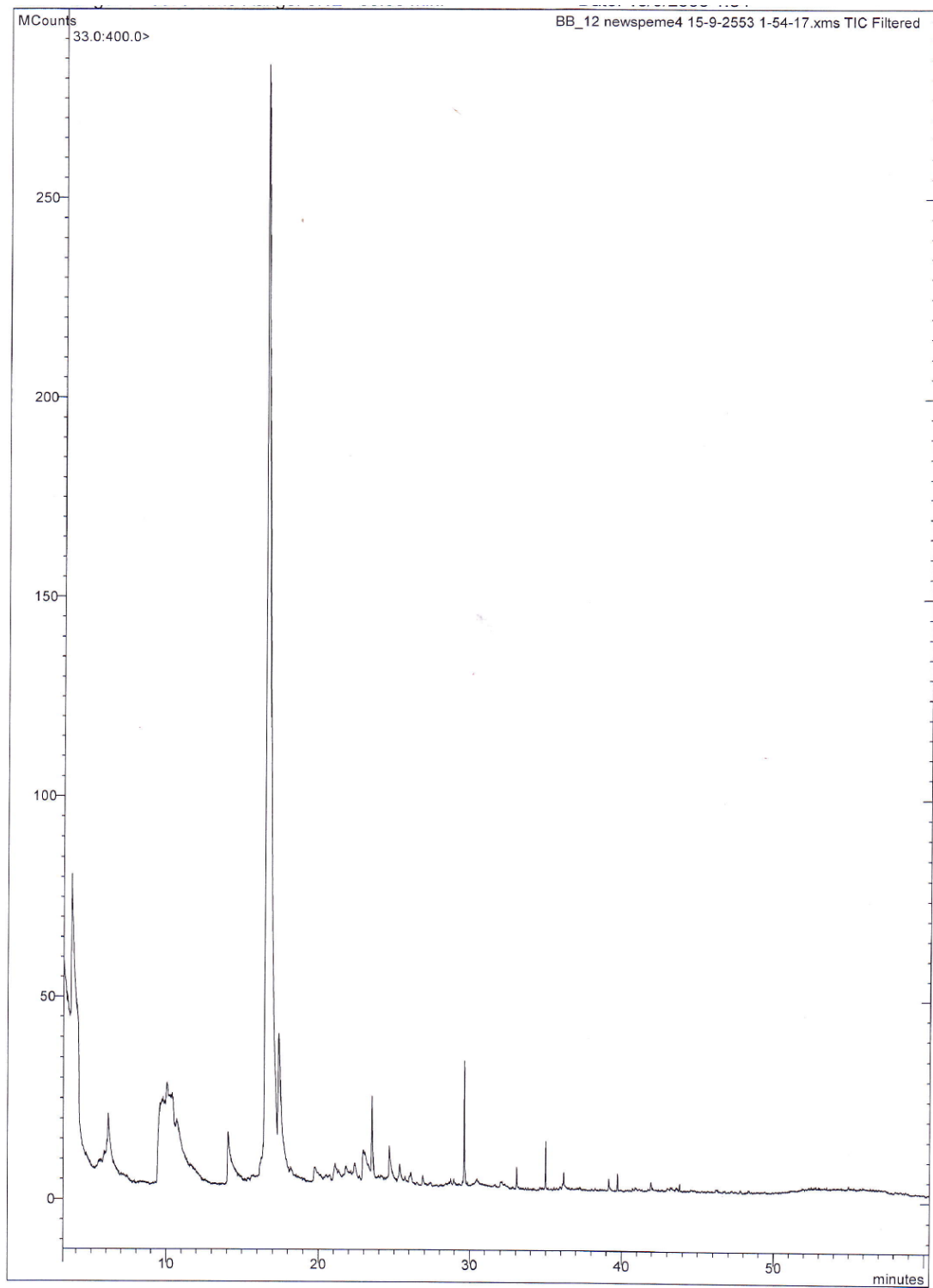
การทดสอบด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E
ของกล้าเชื้อรหัส SB_MYP_2

ภาคผนวก ค
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์กลิ่นด้วย GC-MS

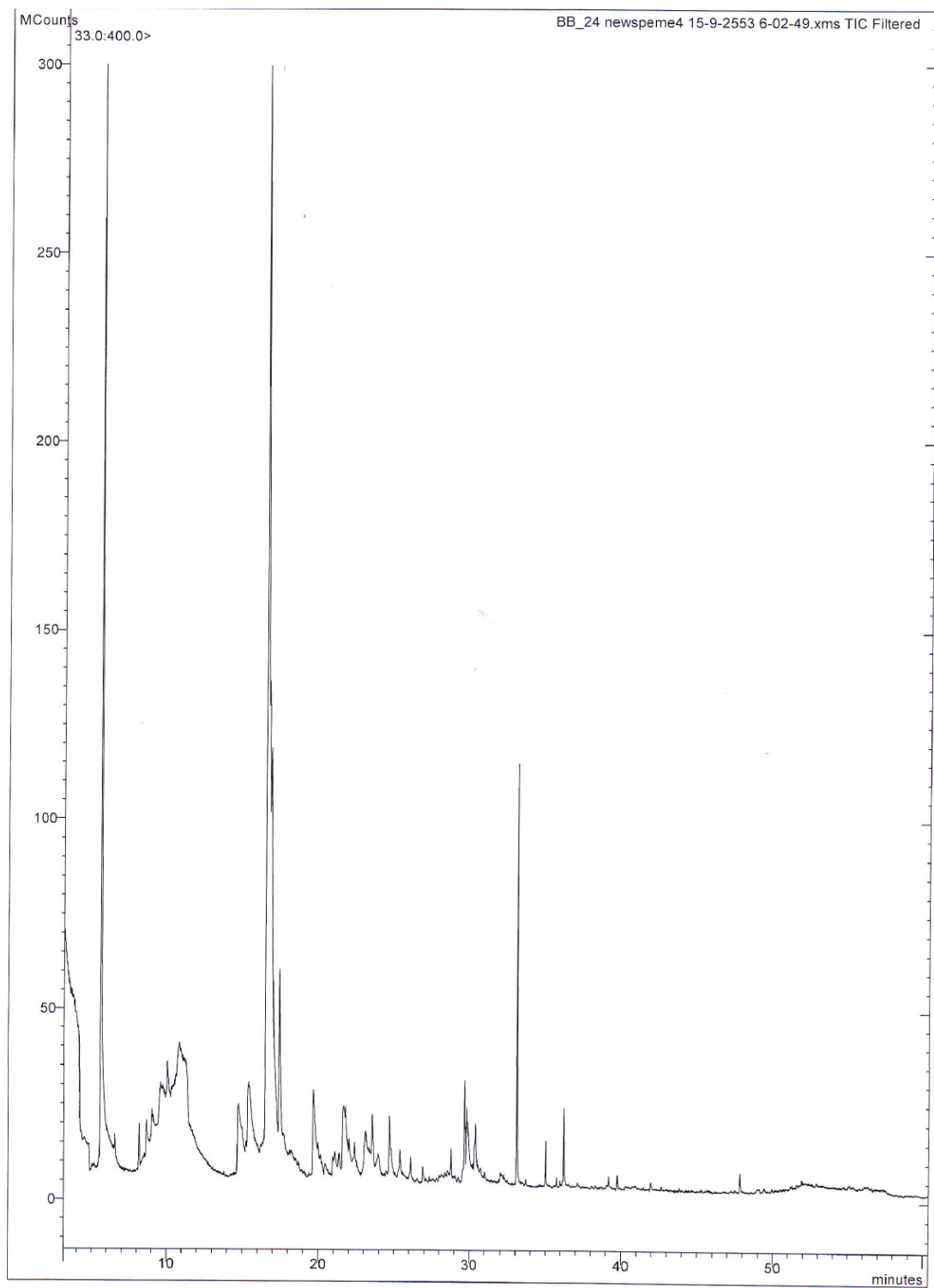




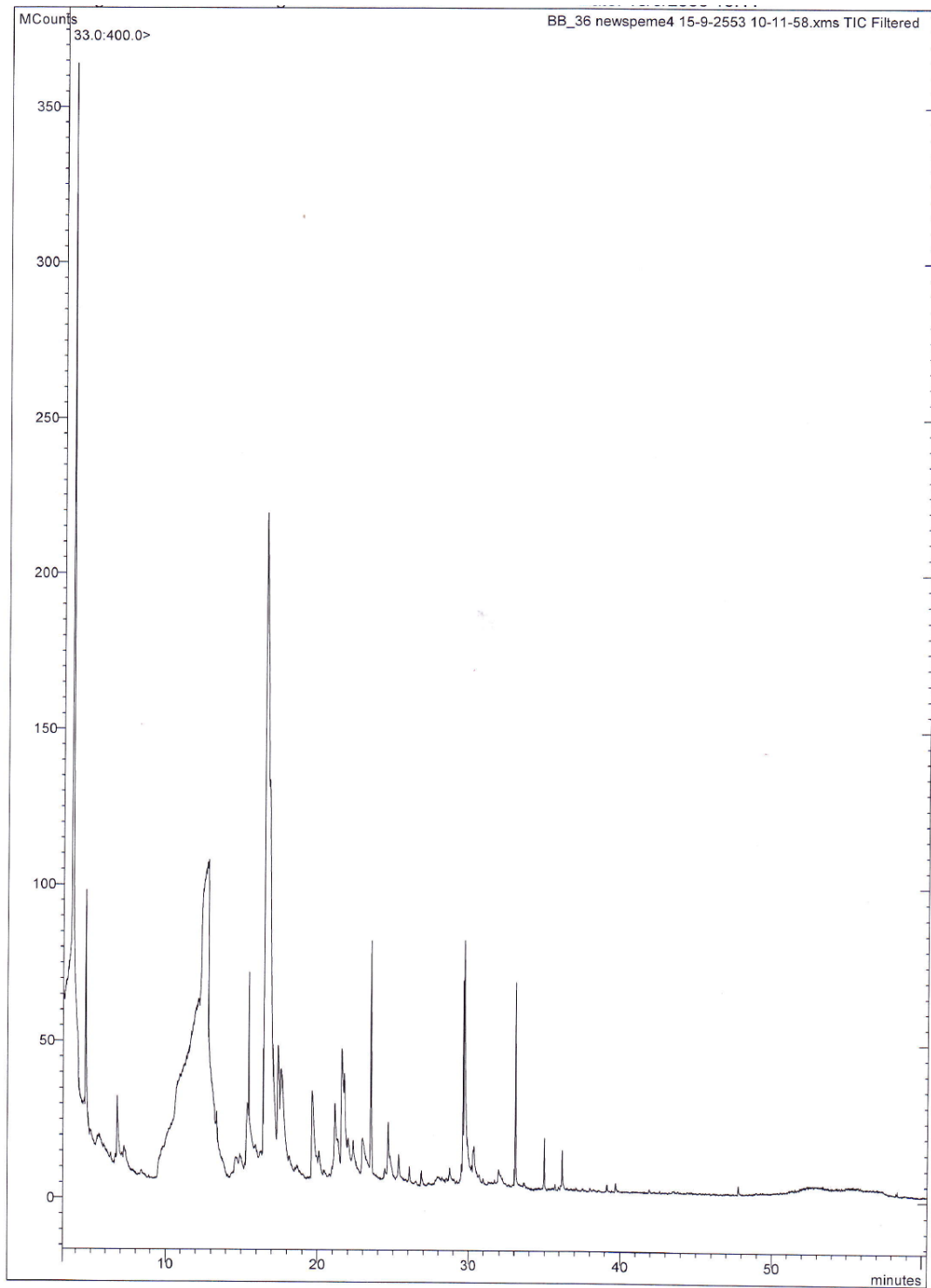
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อน
ด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 0



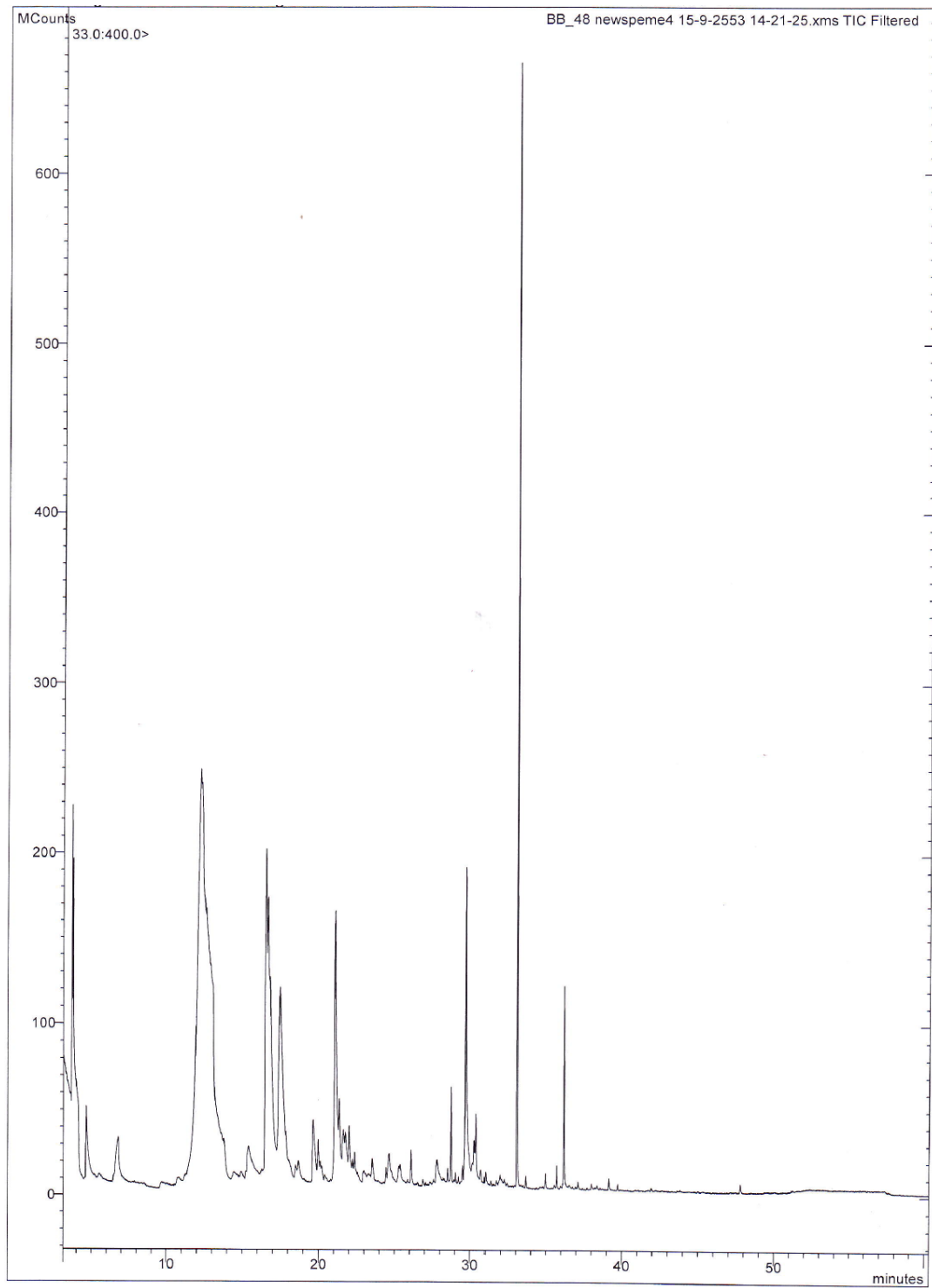
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่หักกลั่นในตัวอย่างแก้วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 12



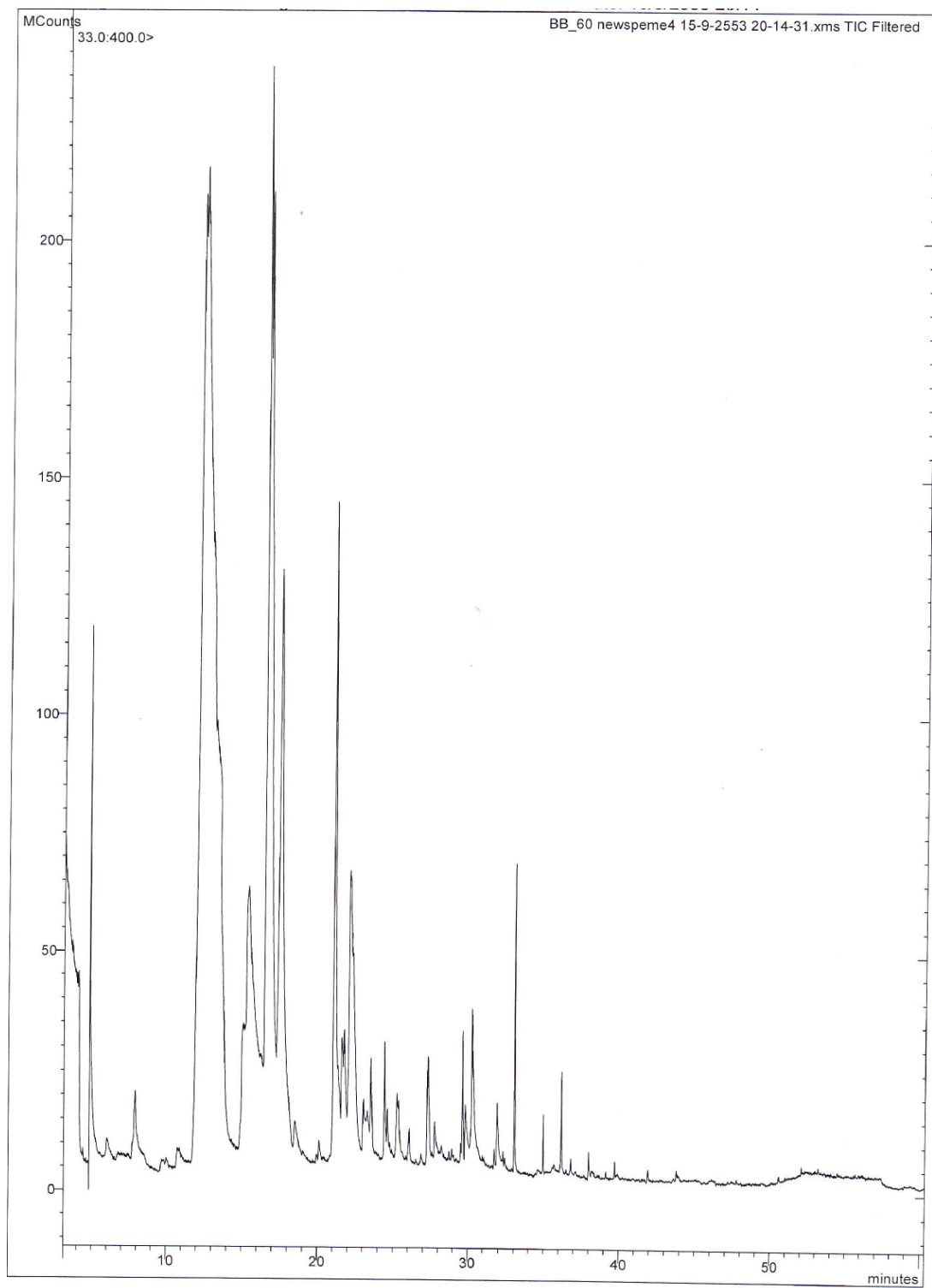
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างข้าวเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 24



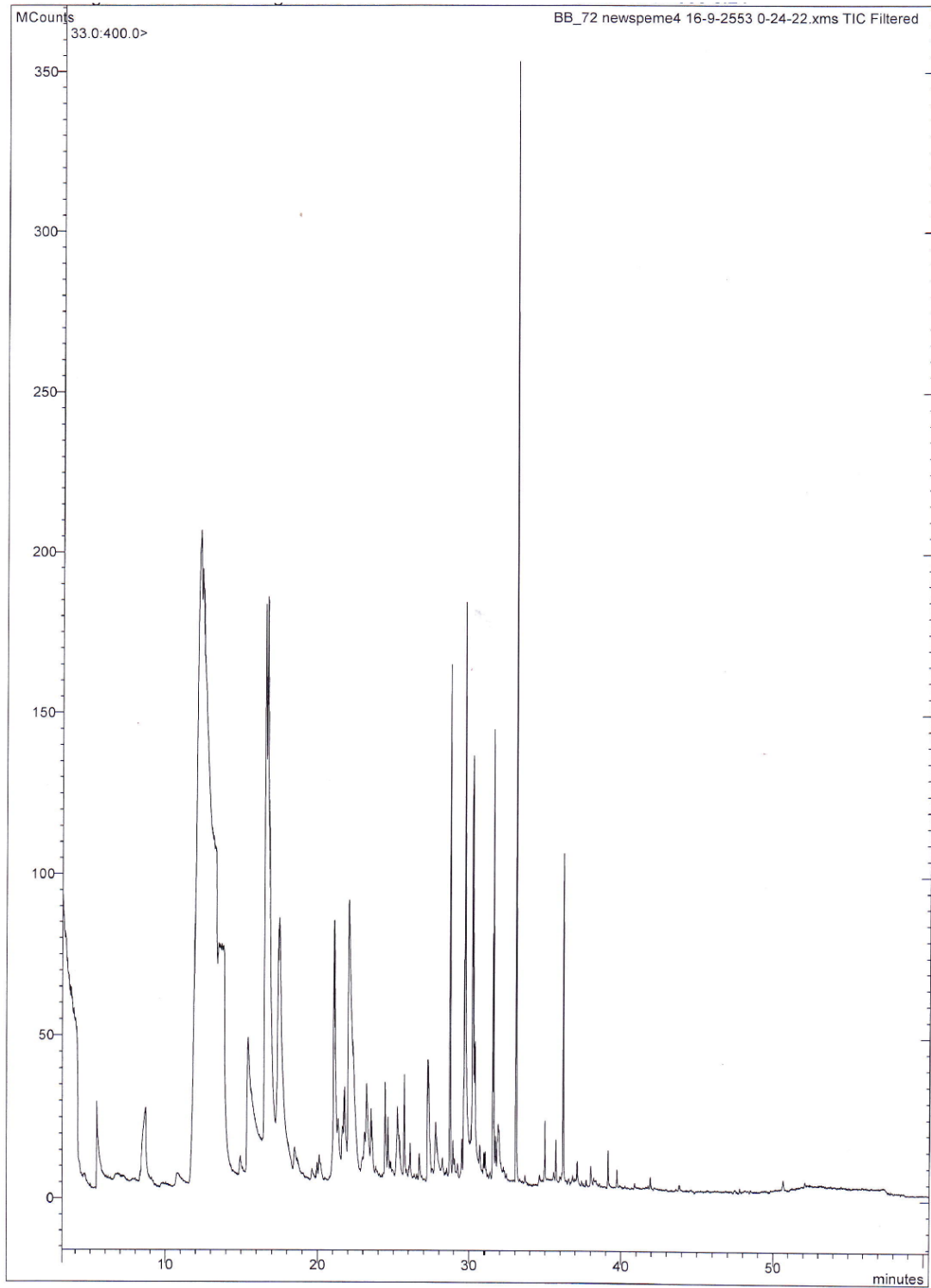
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 36



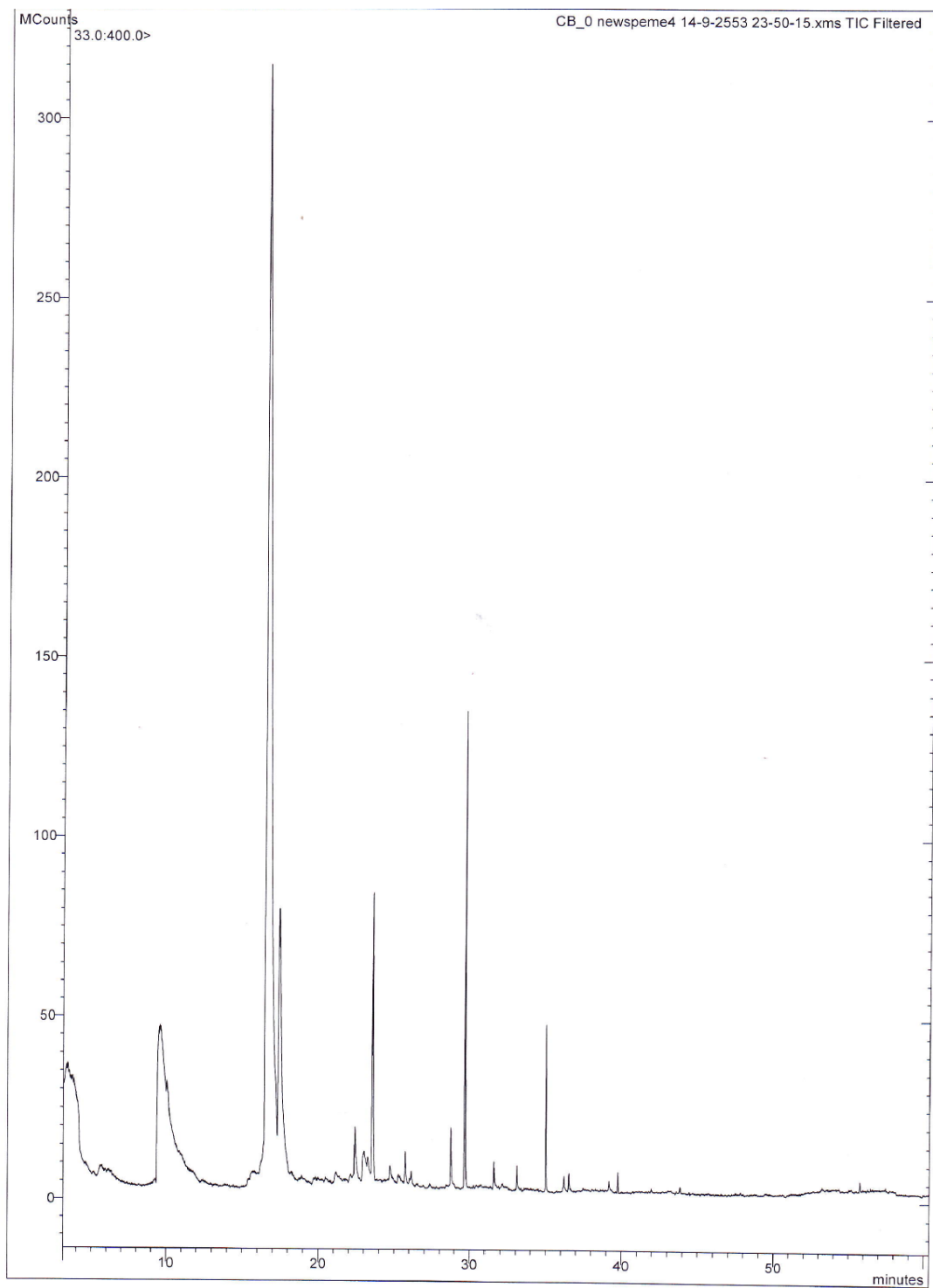
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 48



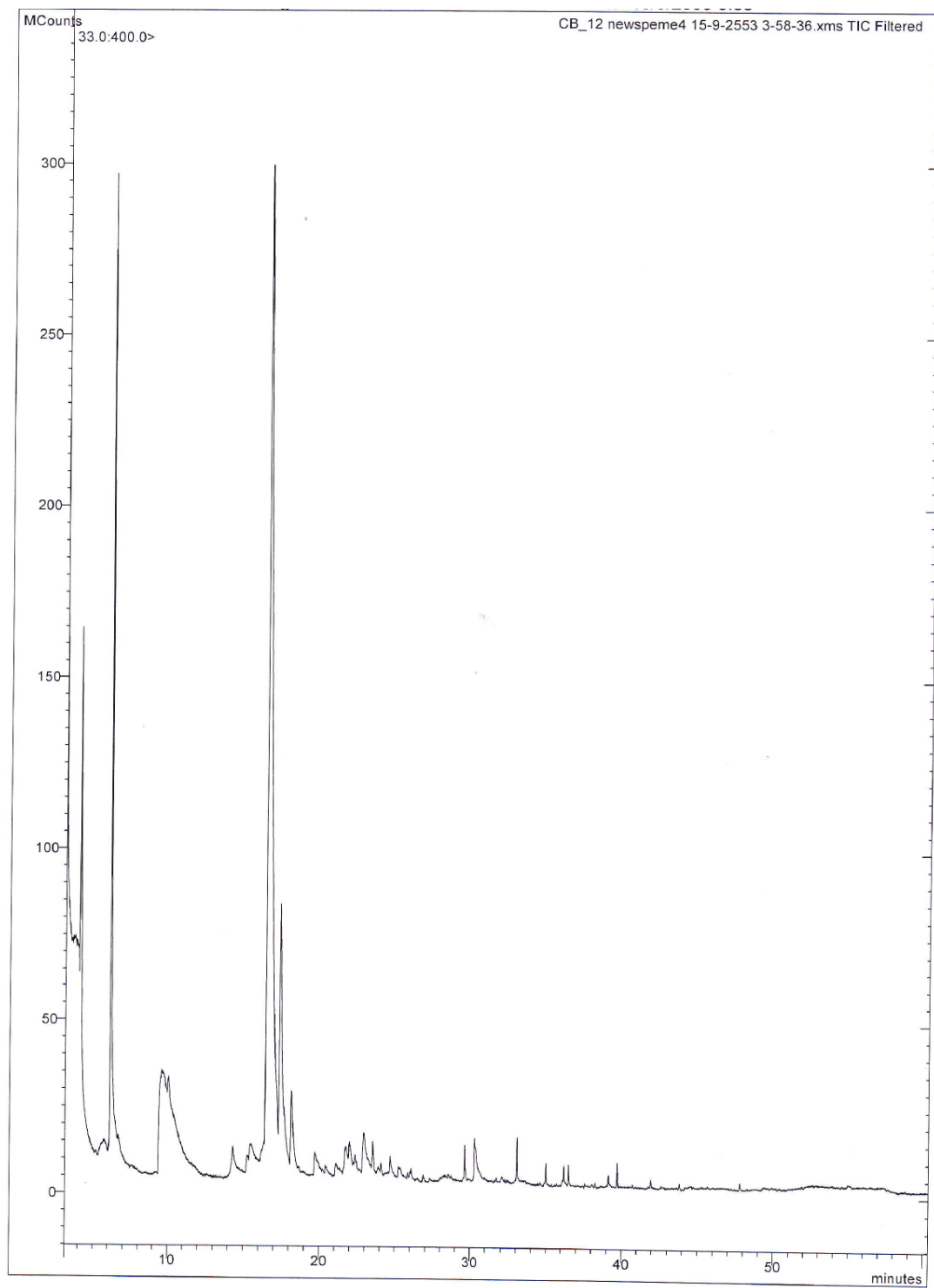
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่หักกลืนในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 60



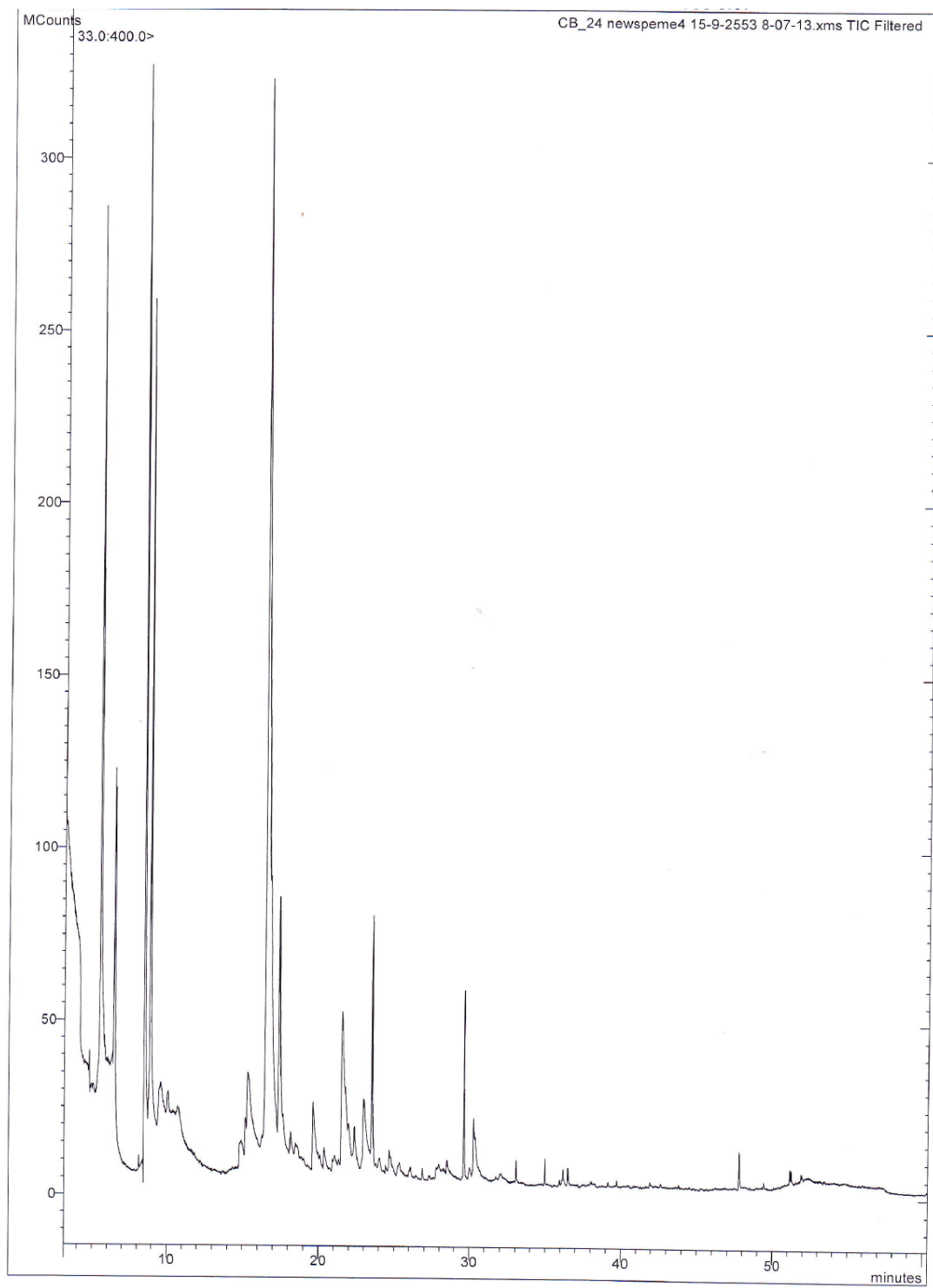
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อน
ด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 72



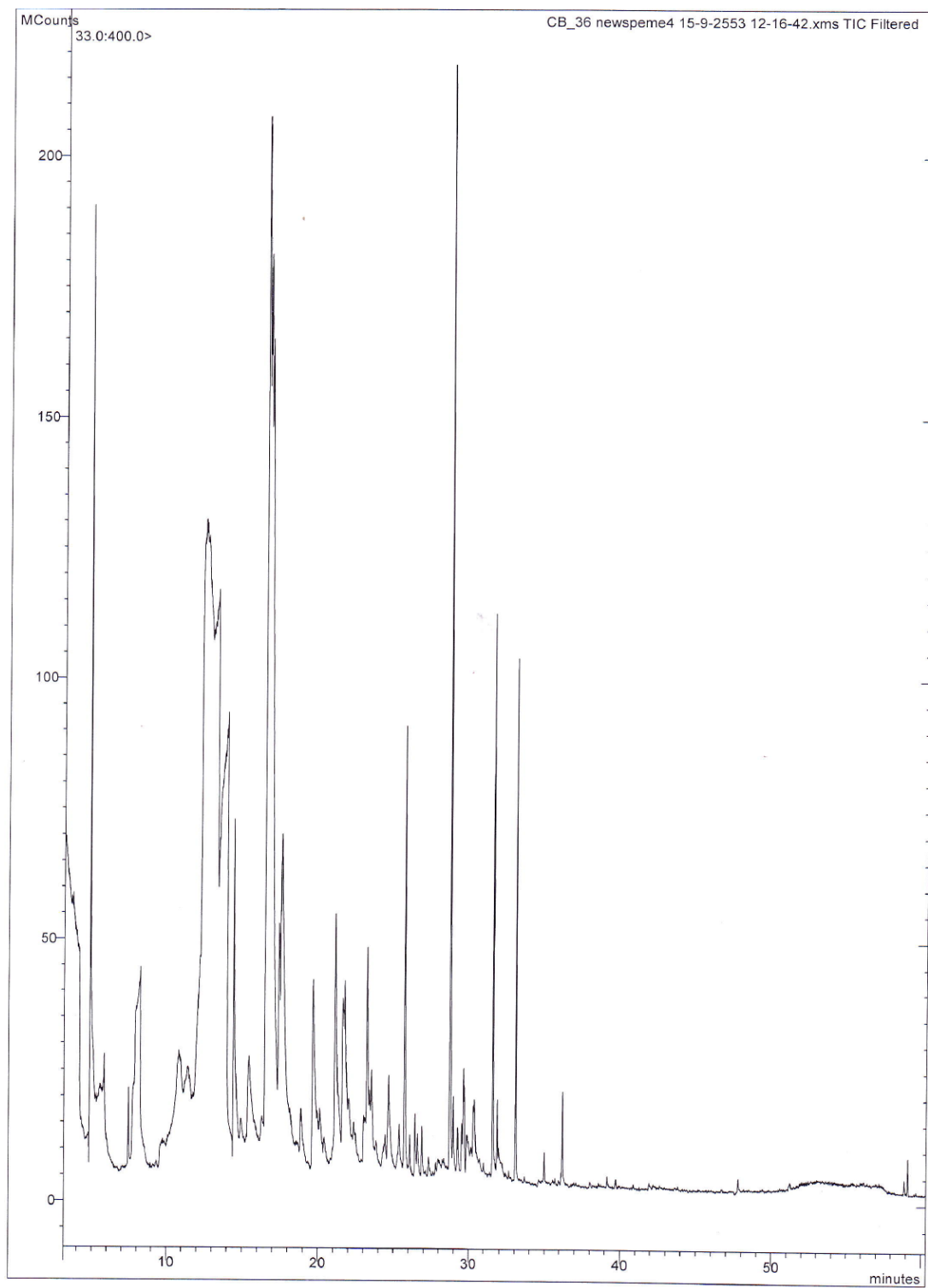
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้อกลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 0



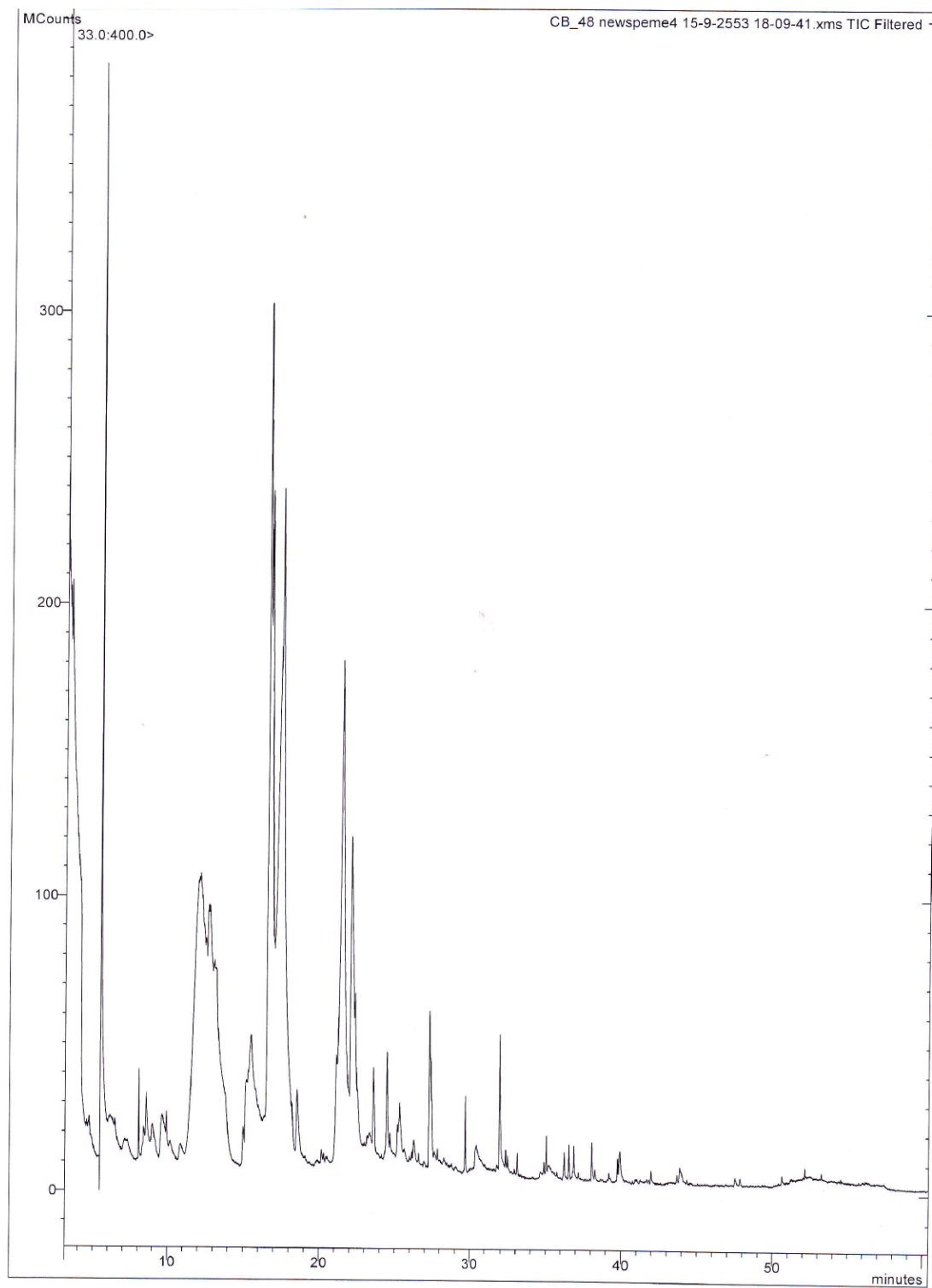
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 12



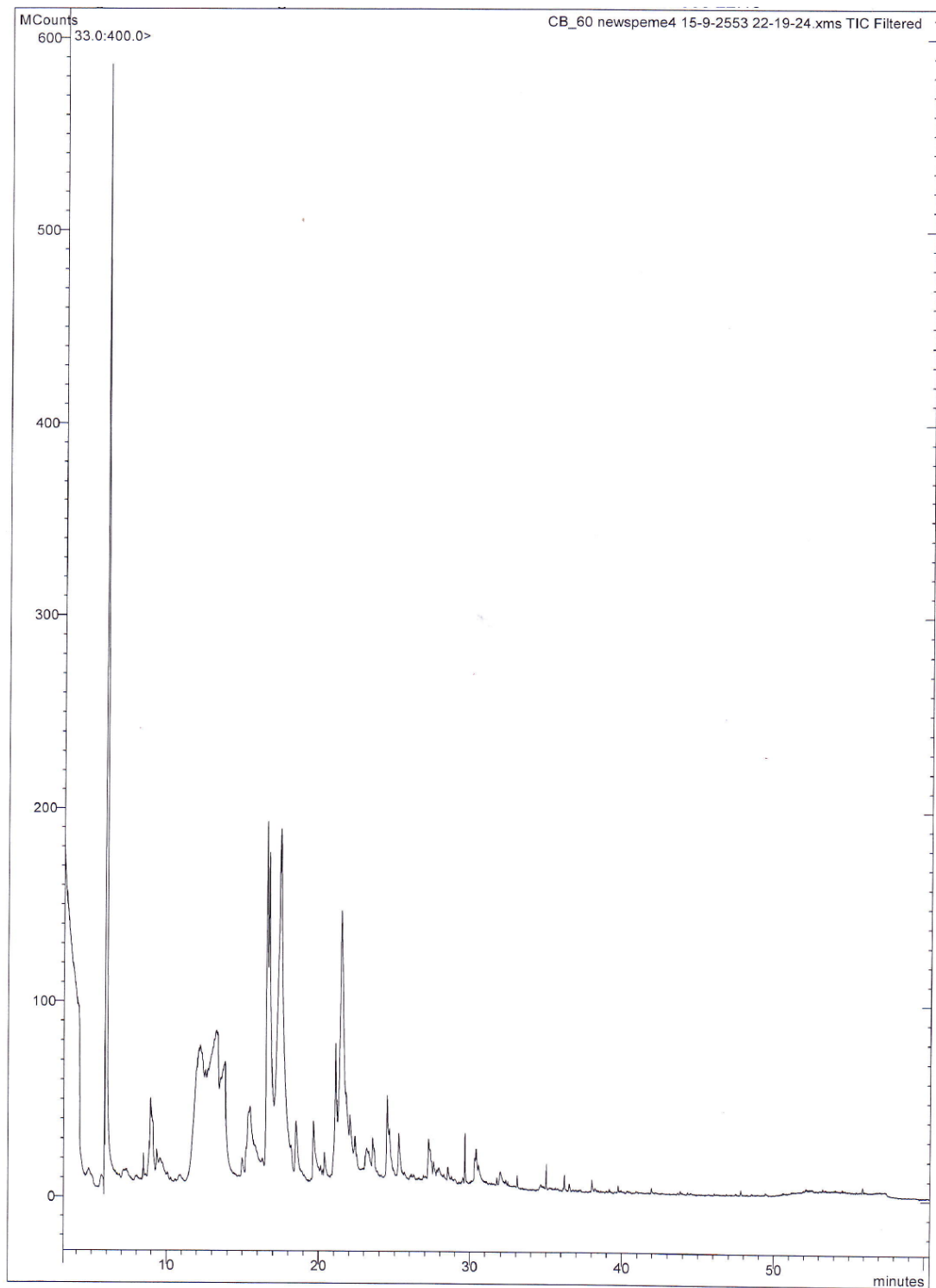
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 24



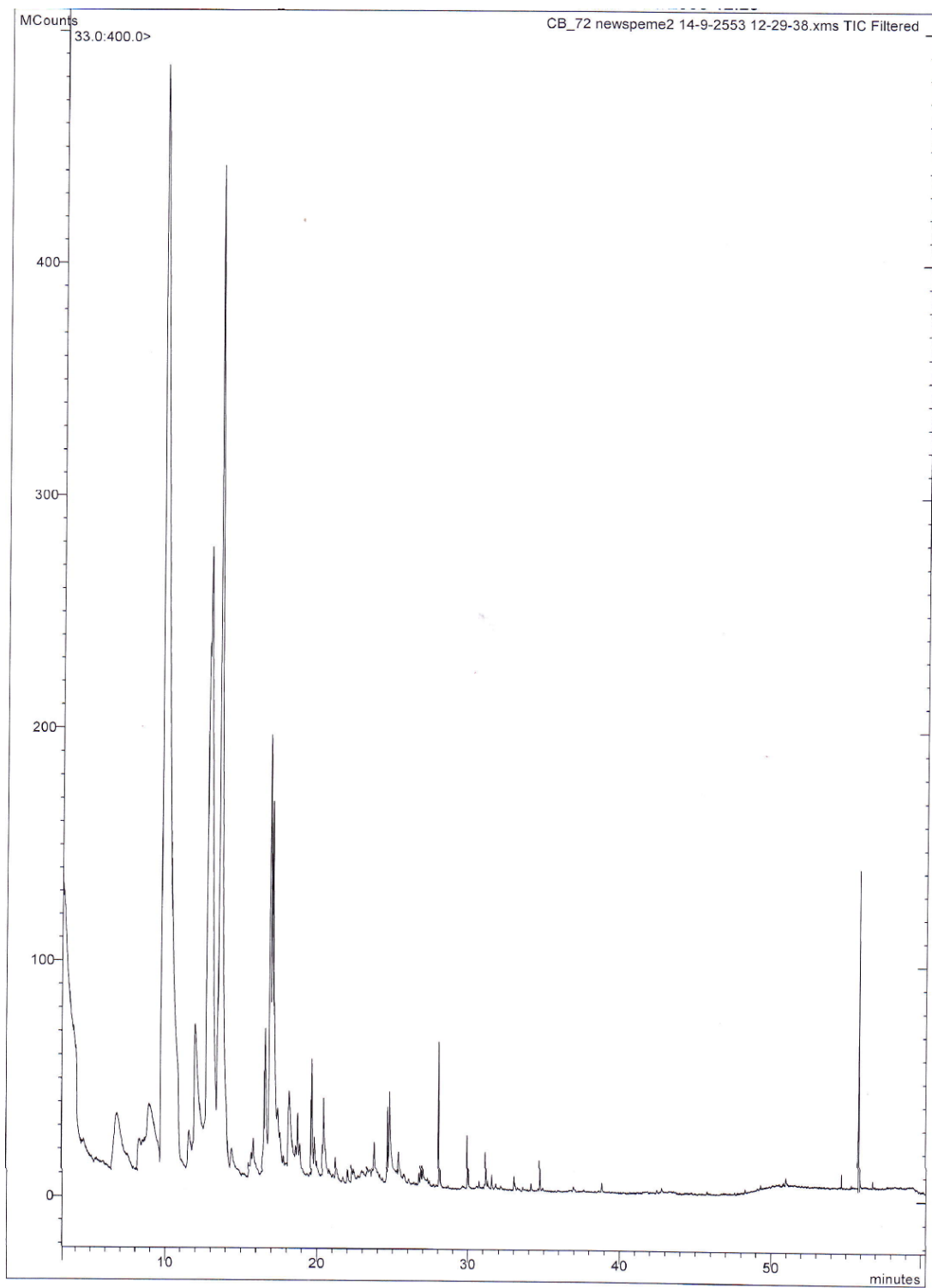
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 36



ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 48



ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 60



ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 72

ภาคผนวก ง

การคำนวณ growth rate



ค่า growth rate คำนวณได้จาก

$$\begin{aligned}k &= \frac{\log N_t - \log N_0}{0.301 \times t} \\&= \frac{\log 8.2 \times 10^6 - \log 1.8 \times 10^3}{0.301 \times 72} \\&= \frac{10.09 - 5.63}{21.67} \\&= 0.21 \text{ generation/ชั่วโมง} \\g &= \frac{1}{0.21 \text{ generation/ชั่วโมง}} \\&= 5 \text{ ชั่วโมง/generation}\end{aligned}$$



ภาคผนวก จ
การคำนวณค่า antimicrobial activity



การคำนวณค่า antimicrobial activity

เตรียม Nisin 10 mg/ml ละลายใน HCl 0.02 N มีความเข้มข้น 10^4 IU/ml

Nisin 1000 μ l = 10^4 IU

ใช้ Nisin 20 μ l = 10^4 IU $\times$ 20 μ l

1000 μ l

= 200 IU

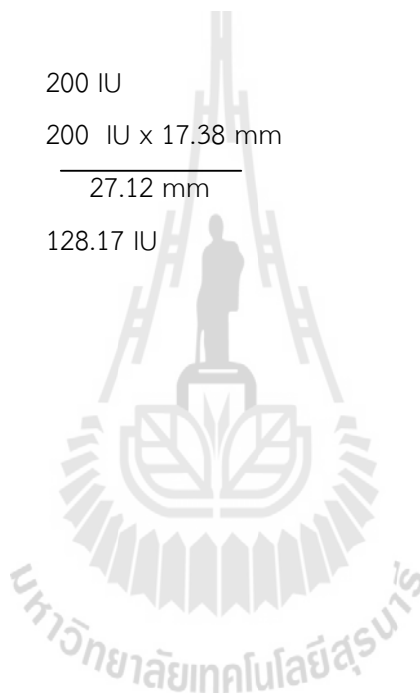
Nisin 200 IU ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ 27.12 mm.

27.12 mm. เท่ากับ 200 IU

17.38 mm. เท่ากับ 200 IU $\times$ 17.38 mm

27.12 mm

= 128.17 IU



ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

นางปิยะวรรณ กาสลัก

นางปิยะวรรณ กาสลัก เกิดเมื่อวันที่ 12 เดือนมีนาคม พ.ศ.2502 ณ จังหวัดนครราชสีมา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังกัดสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2523 จบการศึกษาระดับปริญญาโท (Biotechnology and Biochemistry) จาก Mie University ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2536 และจบการศึกษาระดับปริญญาเอก (Applied Sciences and Biotechnology) จาก Mie University ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2539

นางปิยะวรรณ กาสลัก ได้มีผลงานงานวิชาการดังต่อไปนี้

- Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P., and Lebrihi, A. 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai Fermented Soybean (Thua-nao): Screening for Aflatoxin B1 and Ochratoxin A detoxification. *Journal of Applied Microbiology* Vol.104 (No.5)1495-1502 (8)
- Oonmetta-aree J., Suzuki T., Gasaluck, P., and Eumkeb, G. 2006. Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT Food Science and Technology* (39) 1214-1220
- Thongbai, B., Gasaluck, P., and Waites, W. M. 2006. Morphological changes of temperature- and pH-stressed *Salmonella* following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. *LWT - Food Science and Technology*. (39) 1180-1188
- Thongbai, B., Waites, W. M. and Gasaluck, P. The susceptibility of Bioluminescent *Salmonella typhimurium* Contaminating Chicken Carcasses to Cetylpyridinium Chloride and Nisin. *Kasetsart Journal: Natural Science* October-December 2005. Vol. 39 No. 4 (622-632)
- Gasaluck, P. 1999. The Development of the Curricula of Food Technology of Suranaree University of Technology (SUT). In *Proceedings of the International Workshop on University Education, Research and in Asia-Pacific Region*, Mie University Press, April 6 and 7.

- Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I. 1996. The occurrence of *Bacillus cereus* in Local hai Traditional Foods. J. Antibact. Antifung. Agents Vol 24. No. 5 (349-356)
- Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I. 1996. Some Chemical and Microbiological Properties of Thai Fish Sauce and Paste. J. Antibact. Antifung. Agents Vol 24. No. 6, (385-390)
- Gasaluck, P. 1994. "Thai Fermented Fish Sauce." In Proceedings of the International Seafood Research Meeting Of Mie University, Mie Academic Press, September 30.
- Gasaluck, P., Midorigawa, Y., Imai, M. and Yoshimura, H. 1990. Enteropathogenic E.coli (ETEC) Isolation in Northeast Thailand and Their Resistance to Antibiotics. Mie Medical Journal Vol 40 (3):379-384.

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- | | |
|---------------------|--|
| ผู้ร่วมวิจัย | โครงการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในโรงฆ่าสุกร การขนส่งจากโรงฆ่าไป ยังจุดจำหน่าย และแหล่งจำหน่ายเนื้อสุกร ในเขตจังหวัดนครราชสีมา 2552 |
| หัวหน้าโครงการวิจัย | โครงการการคัดแยกและบ่งชี้แบคทีเรีย กรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์หมั่มเพื่อใช้ในการผลิตเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ 2553 |
| หัวหน้าโครงการวิจัย | โครงการการวิจัยและพัฒนานวัตกรรมผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งไขมันต่ำ 2553 |
| หัวหน้าโครงการวิจัย | การศึกษามลภาวะเพิ่มเติม “แคลเซียมเบนโทไนด์” ในอาหารสัตว์ต่อการดูดซับสารพิษจากเชื้อรา 2553 |
| หัวหน้าโครงการวิจัย | การศึกษาอายุการเก็บของขนมถั่วอบเทียน 2552 |

ที่อยู่ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
 จังหวัด นครราชสีมา 30000
 โทรศัพท์ 0-4422 - 4270 โทรสาร 0-4422 – 4387
 Email address: piyawan@sut.ac.th

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

นางรัชฎาพร อุ่นศิริไทย์

นางรัชฎาพร อุ่นศิริไทย์ เกิดเมื่อวันที่ 7 เดือน กันยายน พ.ศ. 2508 ปัจจุบันดำรงตำแหน่ง อาจารย์ ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (พยาบาล)จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2530 จบการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร จาก Dalhousie University ประเทศแคนาดา เมื่อปี พ.ศ. 2543 และจบการศึกษาระดับปริญญาเอก วท.ด. (เทคโนโลยีอาหาร) จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เมื่อปี พ.ศ. 2549

นางรัชฎาพร อุ่นศิริไทย์ ได้มีผลงานงานวิชาการดังต่อไปนี้

- **R. Oonsivilai, N. Chaijareonudomrongs, Y. Huantanom., and A. Oonsivilai. 2010.**
Extraction condition of *Echinocactus grusonii*. ICCBEE 2010: International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering, World Academy of Science, Engineering and Technology, Paris, France, 27-29 October, pp: 366: 369.
- **Oonsivilai, R. and Oonsivilai, A. 2010.** Differential evolution application in temperature profile of fermenting. WSEAS TRANSACTION on SYSTEMS. Issue. ISSN: 1109-2777. Issue 6(9): 618-628.
- **Oonsivilai, R. and Oonsivilai, A. 2010.** Temperature profiling during fermenting processing differential evolution. Proceeding of the 9th WSEAS International conference on energy and environment. February 23-25, Cambridge, London
- ** Oonsivilai, R. Euaungganond, S. Boonpakong, Y. (2010).** Phaseolamin in white kidney beans. 4th Thailand Congress of Nutrition : TCN 2010, September 13-15, pp: 33. Poster presentation No. EXP-11.
- Posridee, K. Sripa, B. Jitsomboon, B. and **Oonsivilai, R. 2010.** The acute oral toxicity determination (LD50) of Rang Chute extract. 3rd SUT Graduate Conference 2010, Nakhon Ratchasima, Thailand, November 21-23, pp: 224-225. Poster presentation No.ARG-18.

- **Oonsivilai, A. and Oonsivilai, R.** 2009. A genetic algorithm application in natural cheese products. WSEAS TRANSACTIONS on SYSTEMS. Issue 1, Vol 8, January, ISSN : 1109 – 2777, pp: 44 – 54.
- **Oonsivilai, R and Oonsivilai, A.** 2008. Apply a genetic algorithm to natural cheese product. Proceeding of the 8th WSEAS International conference on applied computer science (ACS'08). ISSN 1790 – 5109, pp: 269 – 274.
- **Oonsivilai, A. and Oonsivilai, R.** 2008 Parameter Estimation of Frequency Response Twin-Screw Food Extrusion Process using Genetic Algorithm. WSEAS TRANSACTIONS on SYSTEMS. Issue 7 Volume 7, July, ISSN: 1109 – 2777, pp: 44 – 54.
- **Oonsivilai, R. and Oonsivilai, A.** 2008. Genetic Algorithm Approach to Twin-Screw Food Extrusion Process Frequency Domain Parameter Estimation. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Applied Computer & Applied Computational Science (ACACOS' 08), Hangzhou, China, April 6-8. pp: 645 – 650.
- Oonsivilai, R., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S.** 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. As. J. Food Ag-Ind. 1(02): pp 116 – 128.
- Oonsivilai, R. and Oonsivilai, A.** 2007. Probabilistic neural network for β -glucan suspensions. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Simulation, Modeling and Optimization, Beijing, China, September 15-17.
- Oonsivilai, R., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S.** 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. Presented at FoSTAT 2007. BITEC, June 14-15, Bangkok, Thailand.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S.** 2007. Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia Laurifolia* Lindl (Rang Chuet) extracts. Journal of Ethnopharmacology 114: 300–306.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G.** 2006. Induction of quinone reductase activity in murine hepatoma cells by extracts of *Thunbergia Laurifolia* Lindl. *FASEB Journal*. Vol. 20, no. 4, Part 1: A154

- Speers, R. A., Patelakis, S.J.J., A. T. Paulson, and **Oonsivilai, R.** 2004. Shear rate during brewing operations. MBAA TQ vol. 41, no. 3, pp. 241-247.
- Oonsivilai, R.**, Speers, R.A. and Paulson, A.T. 2000. Effects of pH, maltose and ethanol on the physical properties of model beta-glucan suspensions. Presented at IOB 2000, Institute of Brewing, Asia-Pacific Section 26th Convention, Mar. 19-24, Singapore, SGP.
- Oonsivilai, R.** Patelakis, S.J.J., Speers, R.A., and Paulson, A.T. 1999. Rheological and filtration properties of beta-glucan polymers in the brewing process. CIFST Annual Meeting, Presentation #OR-12, June 6-9, Kelowna, BC. Canada.

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการประยุกต์ใช้ neural network สำหรับหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในสารละลาย beta-glucan

แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทุนวิจัยอาจารย์ใหม่ 2543:

หัวหน้าโครงการโครงการ IRPUS; การเตรียมสารสกัดด้วยวิตามินซีจากหัวไซเท้า ทุนวิจัย สกว. 2550: หัวหน้าโครงการ

โครงการ UBI; การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเจียวกู่หลาน ทุนวิจัย SUT-UBI: หัวหน้าโครงการ

โครงการ iTAP; การพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับสายเส้นแก้ว: หัวหน้าโครงการ

โครงการ UBI; การยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์สำหรับสายเส้นแก้ว: หัวหน้าโครงการ

โครงการ iTAP ; โครงการการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาล้างเครื่องซักผ้า : หัวหน้าโครงการ

โครงการการศึกษาการปรับแต่งกระบวนการหมักเบียร์ที่เหมาะสมโดยใช้profileของอุณหภูมิเป็นตัวกำหนด: หัวหน้าโครงการ

ที่อยู่ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
จังหวัด นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 0-4422 - 4232 โทรสาร 0-4422 – 4387
Email address: roonsivi@sut.ac.th

