การผลิตผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* TN51 เพื่อใช้หมักถั่วเหลือง

จักรกฤษ แจ่มจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
2559

Production of Starter Culture Powder of *Bacillus subtilis* TN51 for Soybean Fermentation

Jukkit Jamjan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Field in Food Science and Technology

Pibulsongkram Rajabhat University

2016

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* TN 51 เพื่อใช้หมักถั่วเหลือง
ชื่อนักศึกษา	จักรกฤษ แจ่มจันทร์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกตุการ ตาจันทา
กรรมการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา

คณะกรรมการบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

.....ประธานคณะกรรมการบัณฑิตศึกษา
(อาจารย์ ดร.สาคร สร้อยสังวาลย์)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ 2559

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ศุภวิทิตพัฒนา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกตุการ ตาจันทา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร กงบังเกิด)

.....กรรมการและเลขานุการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คงศักดิ์ ศรีแก้ว)

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* TN51 เพื่อใช้หมักถั่วเหลือง
ชื่อนักศึกษา	นายจักรกฤษ แจ่มจันทร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกตุการ ดาจันทา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* TN51 สำหรับหมักถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า) โดยศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ *B. subtilis* ในเบื้องต้น และศึกษาอุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อ กระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อที่เหมาะสม และอายุการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อ ผลจากการผลิตผงกล้าเชื้อพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 40 (w/w) ช่วยเพิ่มจำนวน total viable count (TVC) และ spore count (SPC) หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง การเติมแป้งสาลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอช่วยเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อได้ดีกว่าการเติมแป้งสาลีที่ผ่านการอบจากตู้อบลมร้อน หลังการอบแห้งแป้งหมักกล้าเชื้อในตู้อบลมร้อนและบดให้เป็นผงละเอียดได้ผงกล้าเชื้อที่มีสปอร์จำนวน 7.71 log CFU/g และมีค่า water activity ต่ำกว่า 0.6 หลังการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อในถุงพลาสติกใสและอลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิ 37 หรือ 4 องศาเซลเซียส นาน 90 วัน พบการเหลือรอดของสปอร์อยู่ในช่วงร้อยละ 72 – 83

สำหรับการหมักถั่วเน่าด้วยการเติมผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้ลงในถั่วเหลืองต้มสุก (BTN) และถั่วเหลืองที่นึ่งสุกด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (ATN) ในปริมาณร้อยละ 0.1 (w/w) และบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และมักถั่วเน่าแบบพื้นบ้าน (CTN) เป็นชุดควบคุม ผลการศึกษาพบว่า ถั่วเน่า ATN มีการเพิ่มขึ้นของ TVC SPC ค่า pH น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าถั่วเน่า BTN และ CTN นอกจากนี้ยังตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อยีสต์และรา *E. coli* *S. aureus* และ *B. cereus* ในปริมาณต่ำอีกด้วย

หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ลายมือชื่อนักศึกษา.....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร	ลายมือชื่อประธานที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2558	ลายมือชื่อกรรมการที่ปรึกษา.....

Title	Production of Starter Culture Powder of *Bacillus subtilis* TN51 for Soybean Fermentation
Author	Mr. Jukkit Jamjan
Advisors	Asst. Prof. Dr. Katekan Dajanta
	Asst. Prof. Dr. Piyawan Supavititpatana

This research aims to study the production process of starter culture powder of *Bacillus subtilis* TN51 for fermenting of soybeans. Media for the production of primary powder of *Bacillus subtilis* were studied. The optimal incubation temperatures, production process of starter culture powder and its shelf-life were investigated. The results of the production of starter culture powder found that a basal medium supplemented with 40% (w/w) wheat flour enhanced the yields of total viable count (TVC) and spore count (SPC) after incubation at 42°C for 24 hrs. Autoclaved wheat flour was proved to be better supplement baked wheat flour. After drying in hot air oven, wheat flour culture was ground to fine powder which contained 7.71 log spores/g and less than 0.6 water activity. After storage of packed culture powder in plastic or aluminium foil bags at 37 or 4°C for 90 days, the survival of spores was found to be in the range of 72 – 83%.

For the production of *thua nao*, boiled soybean-*thua nao* (BTN) and autoclaved soybean- *thua nao* (ATN) were prepared by inoculating 0.1% (w/w) of developed culture powder into boiled and autoclaved soybeans followed by incubation at 42°C for 24 hrs. Traditional fermented *thua nao* (CTN) was also produced as control. The results found that the higher values of TVC, SPC, pH, reducing sugars and total sugars were found in ATN than those in BTN and CTN. In addition, small contents of contaminated yeast and mould, *E. coli*, *S. aureus* and *B. cereus* were also found in ATN product.

Degree of Master of Science
Field in Food Science and Technology
Academic Year 2015

Student's Signature.....
Advisor's Signature .....
Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา ปี 2554 ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ในการบริหารจัดการงานวิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกตุการ ดาจันทา ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ช่วยให้คำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัยตลอดจนการปรับปรุงแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหารทุกท่านที่มอบความรู้ให้เป็นพื้นฐานและสามารถประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ในการอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารทุกท่านที่ให้ความรู้และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ในระหว่างการดำเนินงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนทั้งทางด้านค่าใช้จ่ายในระหว่างการศึกษา และคอยให้กำลังใจ ตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

จักรกฤษ แจ่มจันทร์

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ช
สารบัญภาพ		ซ
บทที่		
1	บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 จุดมุ่งหมายของการวิจัย	3
	1.3 ขอบเขตงานวิจัย	3
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	2.1 ถั่วเหลืองหมัก	4
	2.2 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองหมัก	7
	2.2.1 กรดอะมิโนอิสระ (free amino acids)	7
	2.2.2 ไอโซฟลาโวน (isoflavone)	9
	2.2.3 สารประกอบฟีนอลและการต้านออกซิเดชัน	10
	2.3 การหมักถั่วเหลืองด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์	11
	2.4 การผลิตผงกล้าเชื้อ	12
	2.5 องค์ประกอบของแป้ง	13
	2.5.1 แป้งสาลี	13
	2.5.2 แป้งข้าวเจ้า	14
	2.5.3 แป้งถั่วเหลือง	15

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	วิธีดำเนินการวิจัย	17
	3.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	17
	3.2 สารเคมี	17
	3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ	17
	3.4 วิธีดำเนินการวิจัย	18
4	ผลการวิจัยและอภิปรายผล	23
	4.1 ศึกษากระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51	23
	4.1.1 ศึกษากระบวนการเตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อชนิดผงแห้ง	23
	4.1.1.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและราคาถูกเพื่อใช้เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51	23
	4.1.1.2 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของแป้งสาลีที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว	25
	4.1.1.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลี	26
	4.1.2 ผลการศึกษาวิธีการอบแป้งที่มีผลต่อการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51	28
	4.2 ผลการศึกษาวิธีเก็บรักษาผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51	32
	4.3 ผลการศึกษาวิธีการหมักถั่วเน่าด้วยผงกล้าเชื้อเปรียบเทียบคุณภาพกับถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้าน	36
5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	41
	5.1 สรุปผลการวิจัย	41
	5.1.1 ผลของการศึกษากระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51	41
	5.1.2 ผลการศึกษาวิธีเก็บรักษาผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51	42
	5.1.3 ผลการศึกษาวิธีการหมักถั่วเน่าด้วยผงกล้าเชื้อและเปรียบเทียบคุณภาพกับถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้าน	42
บรรณานุกรม		43

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ภาคผนวก	51
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	52
ภาคผนวก ข ภาพการหมักผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 และการดำเนินงาน	55
ภาคผนวก ค การนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ	58
ภาคผนวก ง อนุสิทธิบัตร	68
ประวัติผู้วิจัย	75

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	การบริโภคถั่วเหลืองหมักในประเทศต่างๆ	5
2	ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในถั่วเน่าและถั่วเหลืองหมักของต่างประเทศ	8
3	คุณภาพการต้านออกซิเดชันของถั่วเน่าและถั่วเหลืองหมักชนิดอื่น	11
4	องค์ประกอบทางเคมีเมล็ดข้าวสาลี	14
5	องค์ประกอบทางเคมีเมล็ดข้าวเจ้า	15
6	องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองและแป้งต่างๆ	16
7	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง	18
8	ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีสำหรับเพาะเลี้ยง *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปผลิตเป็นผงกล้าเชื้อ	26
9	คุณภาพทางจุลชีววิทยาของถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 เปรียบเทียบกับวิธีพื้นบ้าน	38
10	คุณภาพทางเคมีและกายภาพของถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 เปรียบเทียบกับวิธีพื้นบ้าน	40

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ลักษณะของถั่วเหลืองหมักของไทยใ.....	4
2	ลักษณะโคโลนีและรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรีย *B. subtils*.....	5
3	แผนผังการผลิตถั่วเน่าและนัตโตะ.....	7
4	โครงสร้างของไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง.....	9
5	แผนผังวิธีการผลิตถั่วเน่าจากผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับวิธีพื้นบ้าน...	21
6	ปริมาณ TVC และ SPC ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรพื้นฐานที่เติมแป้งถั่วเหลือง แป้งสาลีและแป้งข้าว.....	23
7	ปริมาณ total viable count และ spore count ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน.....	25
8	ปริมาณ total viable count ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ในระหว่างการบ่มเพาะที่อุณหภูมิแตกต่างกัน.....	27
9	ปริมาณ spore count ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40 ในระหว่างการบ่มเพาะที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน.....	28
10	ลักษณะผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51.....	29
11	ปริมาณจุลินทรีย์ในผงกล้าเชื้อที่ผลิตจากแป้งสาลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่แตกต่างกัน.....	30
12	แผนผังกระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ที่พัฒนาได้จากงานวิจัยนี้.....	31
13	ผงกล้าเชื้อบรรจุในถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 90 วัน.....	32
14	การเปลี่ยนแปลง moisture content ในผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (A) และ 4 องศาเซลเซียส (B) นาน 90 วัน.....	33
15	การเปลี่ยนแปลง total viable count ในผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (A) และ 4 องศาเซลเซียส (B) นาน 90 วัน.....	34
16	การเปลี่ยนแปลง spore count ในผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (A) และ 4 องศาเซลเซียส (B) นาน 90 วัน.....	35
17	ลักษณะการหมักถั่วเน่าในงานวิจัยนี้	36
18	ลักษณะของถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีแตกต่างกัน.....	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
19	แบคทีเรีย *B. subtilis* TN51 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA.....	56
20	ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนผสมของแป้งสาลีร้อยละ 30 40 และ 50 ก่อนและหลังการหมักเชื้อ *B. subtilis* TN51.....	56
21	แป้งหมัก *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปอบแห้ง.....	57

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ถั่วเหลืองหมัก จัดเป็นอาหารสุขภาพที่มีการบริโภคอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ โดยมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันตามท้องถิ่น คือ นัตโตะ (ญี่ปุ่น) คีนีมา (อินเดีย) ดาวาดาวา (เกาหลี) และถั่วเน่า (ไทย) ได้จากการหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* มีลักษณะสีเหลืองคล้ำปนกับเมือกเหนียวเล็กน้อยและมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนีย ถั่วเหลืองหมักของไทยนิยมบริโภคในหลายจังหวัดทางภาคเหนือโดยใช้เป็นเครื่องปรุงรสชาติในอาหารพื้นเมืองหลายชนิด เนื่องจากถั่วเหลืองหมักมีรสชาติอร่อยคล้ายกับผงชูรส ถั่วเหลืองหมักจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเนื่องจากเป็นแหล่งของโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการหมักย่อยของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้ร่างกายดูดซึมได้ง่าย จากการศึกษาของ Dajanta, Apichartsrangkoon, Chukeatirote, & Frazier (2011) พบว่าถั่วเน่ามีกรดอะมิโนอิสระชนิดจำเป็น (essential amino acids) มากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักถึง 7 เท่า นอกจากนี้ถั่วเหลืองหมักยังเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านออกซิเดชันและอนุมูลอิสระ คือสารไอโซฟลาโวนและสารประกอบฟีนอล โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารไอโซฟลาโวนในรูปของอะไกลโคน (aglycone isoflavones) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมากที่สุดและร่างกายสามารถดูดซึมได้ในปริมาณที่สูงและรวดเร็วมากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (Dajanta, Chukeatirote, Apichartsrangkoon, & Frazier, 2009) การบริโภคถั่วเหลืองหมักช่วยรักษาและป้องกันโรคที่สำคัญ ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งลำไส้ (Gotoh et al., 1998) โรคหลอดเลือดหัวใจ (Potter et al., 1998; Park, Jung, Rhee, & Choi, 2003) โรคเบาหวาน (Liu et al., 2006) โรคกระดูกพรุน (Potter et al., 1998; Ishimi et al., 2002) โรคคอเลสเตอรอลในเลือดสูง รวมถึงการใช้ไอโซฟลาโวนเป็นสารทดแทนฮอร์โมนเพศหญิงในหญิงวัยหมดประจำเดือนได้อีกด้วย (Morabito, Crisafulli, & Vergara, 2002)

กระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักของไทยในปัจจุบันยังเป็นการผลิตแบบพื้นบ้านดั้งเดิม คือการหมักถั่วเหลืองที่ต้มสุกแล้วในตะกร้าไม้ไผ่และคลุมด้วยใบตองหรือวัสดุอื่น บ่มที่อุณหภูมิห้อง อาศัยการหมักย่อยจากเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่ปนเปื้อนอยู่กับเมล็ดถั่วเหลืองหรือภาชนะที่ใช้ในกระบวนการผลิตทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอขึ้นอยู่กับสุขลักษณะของผู้ผลิต มีกลิ่นของแอมโมเนียค่อนข้างแรง บางครั้งอาจเกิดการเน่าเสียเนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และยังเสี่ยงต่ออันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดที่

ปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต (Nout, Bakshi, & Sarkar, 1998; Dike & Odunfa, 2003; Leejeerajumnean, 2003) และเพื่อแก้ไขปัญหาด้านสุขอนามัย ความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์ และเพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตให้สอดคล้องกับการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม จากผลงานการวิจัยของ ดร.เอกชัย ชูเกียรติโรจน์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ได้คัดแยกเชื้อ *B. subtilis* TN51 จากถั่วเน่าพื้นเมือง และ Dajanta, Chukeatirote, & Apichartsrangkoon (2011) ได้ทดลองใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตถั่วเน่าในห้องปฏิบัติการพบว่าถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ที่มีคุณภาพที่ดีกว่าถั่วเน่าที่ผลิตจากวิธีดั้งเดิมทั้งทางเคมีกายภาพ การยอมรับจากผู้บริโภคจากการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส กลิ่นรสที่ระเหยได้ (Dajanta, Apichartsrangkoon, & Chukeatirote, 2011) และสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น กรดอะมิโนอิสระ (Dajanta, Apichartsrangkoon, Chukeatirote, & Frazier, 2011) สารไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคน (aglycone isoflavone) (Dajanta, Chukeatirote, Apichartsrangkoon, & Frazier, 2009) สารประกอบฟีนอล และค่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชัน (Dajanta, Apichartsrangkoon, & Chukeatirote, 2011) ระหว่างกระบวนการผลิต (Nout, Bakshi, & Sarkar, 1998; Dike & Odunfa, 2003; Leejeerajumnean, 2003) และเพื่อแก้ไขปัญหาด้านสุขอนามัย ความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์และเพื่อปรับปรุงกระบวนการผลิตให้สอดคล้องกับการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาวิธีการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ชนิดสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการหมักถั่วเหลืองเพื่อยกระดับกระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักแบบวิถีพื้นบ้านดั้งเดิมสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ทั้งในระดับวิสาหกิจชุมชนและระดับอุตสาหกรรมโดย เลือกใช้เทคโนโลยีการผลิตผงเชื้อแบบง่ายและต้นทุนต่ำเพื่อให้สามารถขยายผลสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ได้อย่างแท้จริง

1.2 จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและราคาถูกเพื่อใช้เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

1.2.2 เพื่อศึกษาระดับของแป้งที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเหลวสำหรับการเตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเหลวจากแป้ง

1.2.4 เพื่อศึกษาวิธีการอบแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตผงเชื้อ *B. subtilis* TN51

1.2.5 เพื่อศึกษาวิธีการหมักถั่วเหลืองด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

1.2.6 เพื่อศึกษาอายุการเก็บผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษากระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากถั่วเน่าพื้นเมืองและได้ทดสอบศักยภาพในการหมักถั่วเหลืองมาแล้วก่อนหน้านี้ เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตถั่วเหลืองหมัก โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสปอร์ของเชื้อหลายปัจจัย คือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ระดับของแป้งที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเหลว ผลของอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ ผลของวิธีการฆ่าเชื้อแป้งที่มีต่อการผลิตผงกล้าเชื้อและวิธีการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปสำหรับการผลิตถั่วเหลืองหมัก

1.4.2 ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจากแป้ง

1.4.3 ได้กระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

1.4.4 ได้วิธีการผลิตถั่วเน่าหรือถั่วเหลืองหมักจากผงกล้าเชื้อจากแป้ง

1.4.5 ทราบอายุการเก็บผงกล้าเชื้อที่เหมาะสม

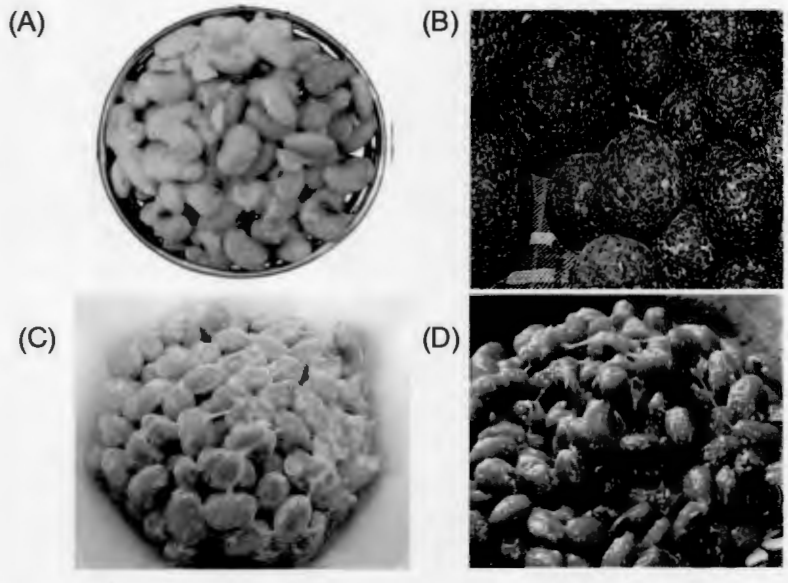
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ถั่วเหลืองหมัก

ถั่วเหลืองหมักแบ่งตามประเภทของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้หมักได้เป็น 2 ประเภท (Teng, Lin, & Hsieh, 2004) ได้แก่

1. ถั่วเหลืองหมักโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ อิโทฮิกินัตโตะ (*Itohiki Natto* หรือ *Natto*) ของญี่ปุ่น ตาวาตาวา (*Dawadawa*) หรืออิรุ (*Iru*) ของไนจีเรีย คินีมา (*Kinema*) ของประเทศเนปาลและอินเดีย จุงคุคแจง (*Chungkukjang*) ของเกาหลี และถั่วเน่า (*Thua Nao*) ของไทย แสดงลักษณะถั่วเหลืองหมักแบบต่างๆ ในภาพ 1

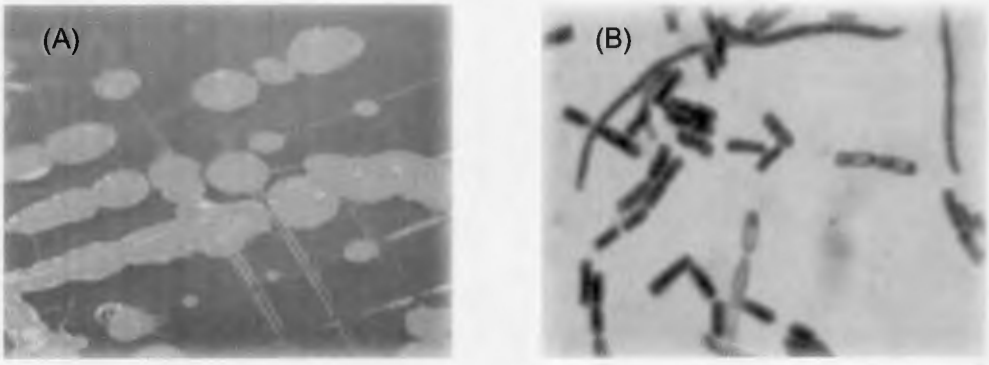
2. ถั่วเหลืองหมักโดยใช้เชื้อรา ได้แก่ ฮานานัตโตะ (*Hama Natto*) โดชิ (*Douche*) มิโซะ (*Miso*) และเทมเป้ (*Tempeh*)



ภาพ 1 ลักษณะของถั่วเหลืองหมักของไทย (A) ตาวาตาวา (B) นัตโตะ (C) และ จุงคุคแจง (D)
ที่มา : Teng, Lin, & Hsieh (2004)

แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักถั่วเหลืองคือ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนขนาดกว้าง 0.7 - 0.8 ไมโครเมตร และยาว 2 - 3 ไมโครเมตร ลักษณะ

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะกลม หรือมีรูปร่างไม่แน่นอน มีผิวย่นและด้าน สีครีมจนถึงสีน้ำตาล (ภาพ 2) ต้องการอากาศในการเจริญ พบได้ทั่วไปในฟางข้าวและเมล็ดธัญพืช



ภาพ 2 ลักษณะโคโลนี (A) และรูปร่างเซลล์ (B) ของแบคทีเรีย *B. subtilis*
ที่มา : เกตุการ ดาจันทา, ธวัชชัย ศุภวิทิตพัฒนา, ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา, อุทัยวรรณ ฉัตรธง และเอกชัย ซูเกียรติโรจน์ (2555)

การบริโภคถั่วเหลืองหมักในประเทศต่างๆ นั้นมีความแตกต่างกัน เช่น ใช้เป็นเครื่องปรุงรสหรือบริโภคกับข้าวโดยตรง แสดงความแตกต่างในการบริโภคถั่วเหลืองหมักในตาราง 1

ตาราง 1 การบริโภคถั่วเหลืองหมักในประเทศต่างๆ

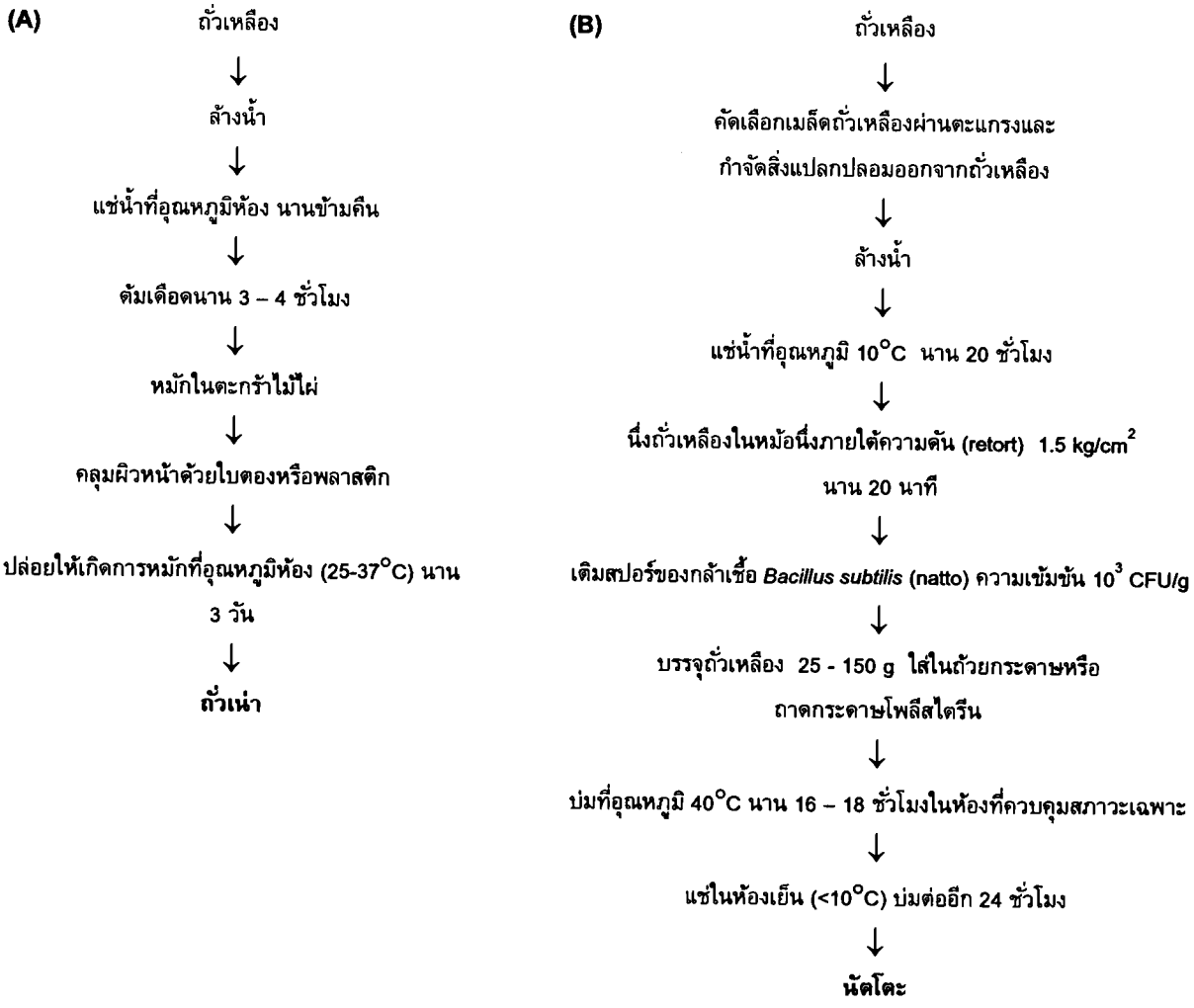
ถั่วเหลืองหมัก	ประเทศ	ลักษณะการบริโภค	เอกสารอ้างอิง
ถั่วเน่า	ไทย	- เครื่องปรุงรสในอาหารพื้นเมือง - ห่อหมกถั่วเน่าผสมกับเกลือ พริก ตะไคร้ หอมแดง และกระเทียม กินกับข้าวเหนียว	Sundhagul, Smanmathuroj & Bhodacharoen (1972)
นัตโตะ	ญี่ปุ่น	- บริโภคกับข้าวโดยตรง - เครื่องปรุงรสในอาหารพื้นเมือง เช่น ซุบมิโซะ และซูชิ - บริโภคเป็นเครื่องเคียงเครื่องดื่ม เช่น สาเก และชา - ผสมเครื่องปรุงรสอื่น เช่น มิโซะ เกลือ น้ำตาล กระเทียมและทำการหมักนาน 2-3 วัน รับประทานเป็นอาหารหลัก	Kiuchi & Watanabe (2004)

ตาราง 1 (ต่อ)

ถั่วเหลืองหมัก	ประเทศ	ลักษณะการบริโภค	เอกสารอ้างอิง
คินีมา	อินเดีย	ทอดคินีมาในน้ำมัน 3-5 นาที และเติมมะเขือเทศ หอมแดง เครื่องเทศ เกลือและน้ำเล็กน้อย	Tamang, Sarkar,& Hesseltine (1988); Nout, Bakshi, & Sarkar (1998)
ดาวาดาวา	ไนจีเรียและกานา	เครื่องปรุงรสในอาหารพื้นเมือง	Omafuvbe, Abiose, & Shonukan (2002)
จุงคุคแจง	เกาหลี	เครื่องปรุงรสในอาหารพื้นเมือง	Kwak, Lee, & Park (2007)

ที่มา : Dajanta (2010)

กระบวนการผลิตถั่วเน่า คินีมา และดาวาดาวามีลักษณะใกล้เคียงกัน เป็นการหมักถั่วเหลืองต้มสุกในภาชนะที่หาได้ในแต่ละพื้นที่ ปกคลุมผิวหน้าถั่วเหลืองด้วยใบตองหรือใบพืชชนิดอื่น ปล่อยให้เกิดการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติเป็นระยะเวลา 2-3 วัน จนได้ถั่วเหลืองหมักที่มีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนีย สี และรสชาติเฉพาะตัว คุณภาพของถั่วเหลืองหมักที่ได้ไม่สม่ำเสมอ บางครั้งอาจมีการเน่าเสียและมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งแตกต่างกับนัตโตะที่เป็นการหมักถั่วเหลืองด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาอย่างเฉพาะ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นและรสชาติที่ได้รับการยอมรับจากทั่วโลก แสดงแผนผังกระบวนการผลิตที่แตกต่างกันของถั่วเน่าและนัตโตะในภาพ 3



ภาพ 3 แผนผังการผลิตถั่วเน่า (A) และนัตโตะ (B)

ที่มา: Chukeatirote et al. (2006); Hosoi & Kiuchi (2003)

2.2 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองหมัก

ถั่วเหลืองหมักจัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่ได้รับการยอมรับทั่วโลก นอกจากใช้เป็นอาหารเสริมรสชาติแล้วยังอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงหลายประเภท ดังนี้

2.2.1 กรดอะมิโนอิสระ (free amino acids)

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีราคาถูก ถั่วเหลืองสายพันธุ์การค้าของไทย เช่น เชียงใหม่ 60 มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 39 ขององค์ประกอบทั้งหมด (Dajanta, 2010) ถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักเป็นแหล่งของกรดอะมิโนอิสระที่ร่างกายสามารถดูดซึมและย่อยสลายได้ง่าย เนื่องจากโปรตีนในถั่วเหลืองจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรดิเอสที่เชื้อแบคทีเรียสร้างขึ้นในระหว่างการหมัก นอกจากนี้ยังช่วยให้ถั่วเหลืองหมักมีรสชาติอร่อยคล้ายกับผงชูรสซึ่งเป็น

รสชาติของกรดอะมิโนอิสระกลูตามิคและแอสปาติก (Tseng, Lee, Li, & Mau, 2005) จากรายงานของ Dajanta, Apichartsrangkoon, Chukeatirote, & Frazier (2011) พบว่าถั่วเน่าที่หมักด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์ *B. subtilis* strain TN51 มีกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดมากกว่าถั่วเน่าที่หมักด้วยเชื้อตามธรรมชาติถึง 2 เท่า กรดอะมิโนอิสระในถั่วเหลืองหมักมีประโยชน์ต่อร่างกายในด้านการรักษาโรคหลายชนิด เช่น ช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลชนิด LDL และไตรกลีเซอไรด์ในเลือด จึงเป็นการลดความเสี่ยงของโรคหลอดเลือดหัวใจ ซึ่งมักเป็นโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ (Hermansen, Sondergaard, Hoie, Carstensen, & Brock, 2001) ชนิดของกรดอะมิโนอิสระในถั่วเหลืองหมักแตกต่างกันขึ้นกับกระบวนการหมัก สายพันธุ์ของถั่วเหลืองและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ แสดงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระในถั่วเน่าและถั่วเหลืองหมักของต่างประเทศในตาราง 2

ตาราง 2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในถั่วเน่าและถั่วเหลืองหมักของต่างประเทศ

กรดอะมิโนอิสระ	ถั่วเน่า[1]	คินีมา[2]	ตาวาตาวา[3]	จุงคุคแจง[4]	นัตโตะ[5]
Ala	0.12 - 4.44	4.73	0.12	0.40	0.66
Arg	0.10 – 0.52	0.22	0.15	1.02	0.17
Asp	0.22 – 1.53	6.25	0.15	0.50	0.84
Cys	0.10 – 8.62	<0.01	0.03	0.51	0.00
Glu	1.13 – 6.11	21.06	0.12	4.58	4.12
Gly	0.25 – 1.07	5.08	0.11	0.51	0.72
His	0.29 – 1.76	4.25	0.07	1.07	1.70
Ile	0.12 – 1.69	6.22	0.12	3.62	2.10
Leu	0.27 – 3.70	9.50	0.22	7.73	4.56
Lys	0.35 – 4.40	8.23	0.18	1.30	3.24
Met	0.13 – 0.63	3.15	0.03	1.43	1.24
Phe	1.01 – 3.56	11.82	0.14	5.74	5.26
Pro	0.00 - 3.24	3.54	0.15	0.12	0.30
Ser	0.05 – 0.70	3.24	0.15	1.49	0.44
Thr	0.08 – 0.55	2.79	0.11	0.06	0.62
Tyr	0.42 – 2.19	4.86	0.09	1.88	3.77
Trp	3.92 – 21.30	<0.01	0.03	-	-
Val	0.26 – 2.47	7.05	0.13	-	2.19

หมายเหตุ : ค่าในตารางแสดงในหน่วย กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง; (-), ไม่ระบุข้อมูล

ที่มา : [1]Dajanta, Chukeatirote, & Apichartsrangkoon (2011); [2]Sarkar, Jones, Craven, Somerset, & Palmer (1997); [3]Dakwa, Sakyi-Dawson, Diako, Annan, & Amoa-Awua (2005); [4]Lee, Park, Jung, Park, & Kim (2005); [5]Nikkuni et al. (1995)

2.2.2 ไอโซฟลาโวน (isoflavone)

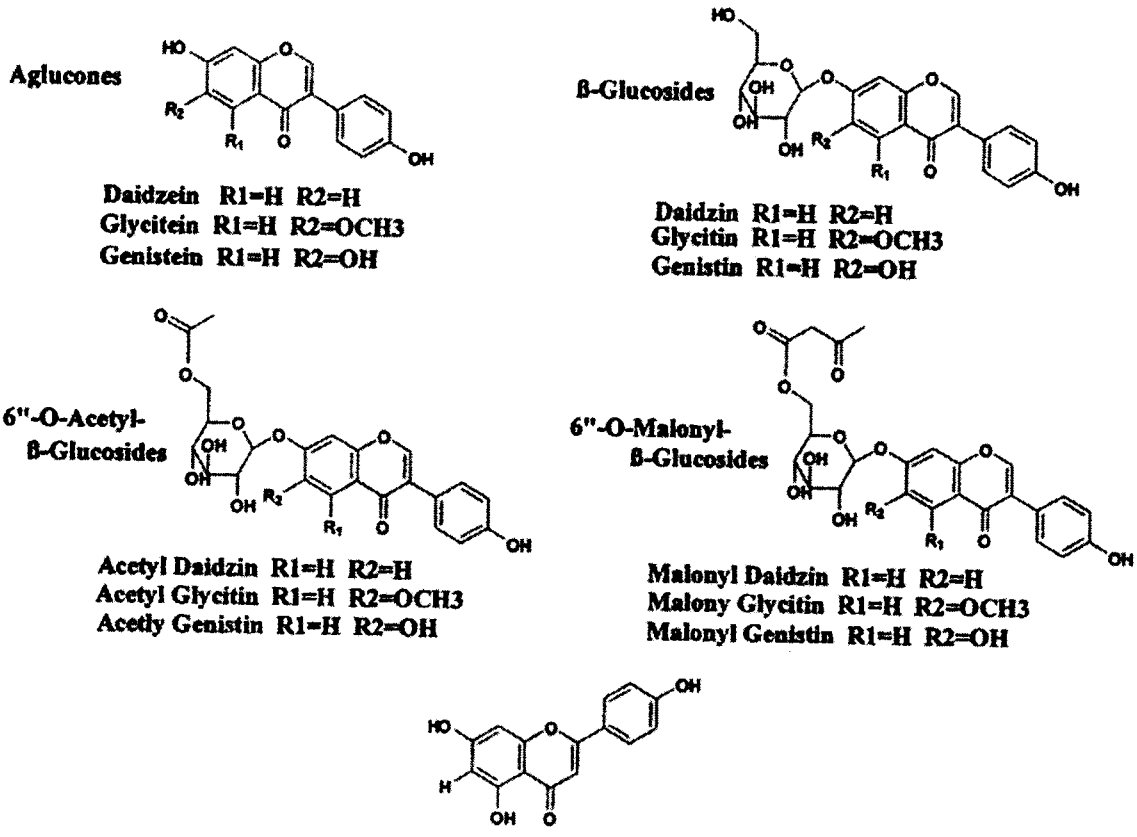
ไอโซฟลาโวน (ภาพ 4) เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ในถั่วเหลืองพบไอโซฟลาโวน 12 อนุพันธ์ โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 4 อนุพันธ์ คือ

(1) acetyl glycoside ได้แก่ acetyldaidzin, acetylgenistin และ acetylglycintin

(2) aglycone ได้แก่ daidzein, genistein และ glycitein

(3) glycoside ได้แก่ daidzin, genistin และ glycitin

(4) malonyl glycoside ได้แก่ malonyl daidzin, malonyl genistin และ malonyl



ภาพ 4 สูตรโครงสร้างของไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง

ที่มา: Griffith & Collisn (2001)

ไอโซฟลาโวน มีโครงสร้างและการออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนของเพศหญิง สามารถใช้ทดแทนการขาดหรือน้อยลงของฮอร์โมนเอสโตรเจน (phytoestrogen) ได้ในหญิงวัยหมดประจำเดือน (Setchell, 1998) มีรายงานวิจัยหลายฉบับเสนอแนะว่าการบริโภคสารไอโซฟลาโวนในปริมาณ 100 มิลลิกรัม ต่อวันช่วยลดภาวะไม่พึงประสงค์ของวัยหมด

ประจำเดือนได้ (Makela, Pylkkänen, Santti, & Adlercreutz, 1995; Eden, 1998; Kim et al., 2006) ซึ่งประเทศไทยมีการนำเข้าผลิตภัณฑ์ไอโซฟลาโวนในรูปของอาหารเสริมในราคาที่แพงถึงกิโลกรัมละ 30,000 บาท การรับประทาน genistein ในปริมาณ 54 มิลลิกรัมต่อวันติดต่อกันนาน 6-12 เดือนจะทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงและมีมวลกระดูกเพิ่มขึ้น (Morabito, Crisafulli, & Vergara, 2002; Crisafulli, Altavilla, & Marini, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่บ่งชี้ว่าไอโซฟลาโวนช่วยป้องกันโรคมะเร็ง (Jung, Park, & Park, 2006) โรคเบาหวาน (Liu et al., 2006) ลดคอเลสเตอรอลในเลือด (Park, Jung, Rhee, & Choi, 2003) ป้องกันการเกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ (Park, Jung, Rhee, & Choi, 2003) และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Georgetti, Vicentini, Yokoyama, Borin, & Spadaro, 2009; Dajanta, Apichartsrangkoon, & Chukeatirote, 2011b) สารไอโซฟลาโวนในกลุ่ม aglycone เป็นอนุพันธ์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมากที่สุด โดยร่างกายสามารถดูดซึมได้ในปริมาณมากและรวดเร็วกว่าอนุพันธ์อื่นๆ มักพบในถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักมากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก เช่น นัตโตะ (Wei, Chen, & Chen, 2008) และจุงคุคแจง (Kwak, Lee, & Park, 2007) จากผลงานวิจัยของ Dajanta, Chukeatirote, Apichartsrangkoon, & Frazier (2009) พบว่าถั่วเน่าที่หมักด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์ *B. subtilis* TN51 ช่วยเพิ่มปริมาณของสารไอโซฟลาโวนในกลุ่ม aglycone มากกว่าร้อยละ 300 เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักและเพิ่มสารไอโซฟลาโวนทั้งหมดมากกว่าถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีดั้งเดิมถึง 2 เท่า

2.2.3 สารประกอบฟีนอลและการต้านออกซิเดชัน

ถั่วเหลืองหมักได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบฟีนอลและสารไอโซฟลาโวน มีรายงานการตรวจพบสารประกอบฟีนอลและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในถั่วเหลืองหมักมากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก แสดงชนิดของสารต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในถั่วเน่าและถั่วเหลืองหมักชนิดอื่นๆ ในตาราง 3

ตาราง 3 คุณภาพการต้านออกซิเดชันของถั่วเน่าและถั่วเหลืองหมักชนิดอื่น

ถั่วเหลืองหมัก	จุลินทรีย์ที่หมัก	ชนิดของสารสกัด	สารต้านออกซิเดชัน	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน
ถั่วเน่า[1]	*B. subtilis* TN51	เมทานอล	ไอโซฟลาโวนและสารประกอบฟีโนลิค	anti-DPPH radicals, total antioxidant
จุงคุคแจง[2]	*Bacillus* species	เอทานอล	ไอโซฟลาโวนและสารประกอบฟีโนลิค	anti-DPPH radicals, LDL oxidation
คินีมา[3]	*B. subtilis* DK-W1	เมทานอล	สารประกอบฟีโนลิค	- anti-DPPH radicals, metal chelator, LPIA
โดชิ[4]	*Aspergillus oryzae*	น้ำ	ไอโซฟลาโวนและโปรตีนสายสั้น	50% inhibition of DPPH

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

ที่มา : [1]Dajanta, Apichartsrangkoon, & Chukeatirote (2011b); [2]Kim, Song, Kwon, Kim, & Heo (2008); [3]Moktan et al. (2008); [4]Wang et al. (2008)

2.3 การหมักถั่วเหลืองด้วยกล้าเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

กระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักพื้นเมืองมักเป็นการผลิตแบบพื้นบ้าน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ มีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนีย บางครั้งอาจมีการเน่าเสียและมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรค มีรายงานการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคและสาเหตุการเน่าเสียหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus saprophysicus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeroginosa*, Enterobacteriaceae, coliforms และ *Escherichia coli* ในดาวาดาวา (ถั่วเหลืองหมักของไนจีเรีย) คินีมา (ถั่วเหลืองหมักของอินเดียและเนปาล) และถั่วเหลืองหมักของไทยที่ผลิตโดยวิธีพื้นบ้านดั้งเดิม (Jideani & Okeke, 1991; Nout, Bakshi, & Sarkar, 1998; Dike & Odunfa, 2003; Leejeerajumnean, 2003) จากปัญหาทางด้านสุขลักษณะดังกล่าวทำให้ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยได้มีการวิจัยคัดเลือกกล้าเชื้อที่เหมาะสมและนำมาพัฒนายกระดับกระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม เช่น กระบวนการผลิตคินีมา ดาวาดาวา และจุงคุคแจง (Tamang, Sarkar, & Hesseltine, 1988; Sarkar & Tamang, 1995; Tamang & Nikkuni, 1996; Omafuvbe, Abiose, & Shonukan, 2002; Lee, Park, Jung, Park, & Kim, 2005; Omafuvbe, 2008) การใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักถั่วเหลืองช่วยเพิ่มสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิดรวมทั้งการยอมรับของผู้บริโภคจากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส สำหรับถั่วเน่าได้มีการศึกษานำกล้าเชื้อบริสุทธิ์ *B. subtilis* TN51 มาใช้ในกระบวนการผลิตถั่วเน่า ซึ่งพบว่าถั่วเน่าที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์มีคุณภาพที่ดีกว่าถั่วเน่าที่ผลิตจากวิธีดั้งเดิมทั้งทางเคมีกายภาพ การยอมรับจากผู้บริโภคจากการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส และสารอาหาร

ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (Dajanta, Apichartsrangkoon, Chukeatirote, & Frazier, 2011; Dajanta, Apichartsrangkoon, & Chukeatirote, 2011a)

2.4 การผลิตผงกล้าเชื้อ

ในปัจจุบันการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* ในเชิงการค้าสำหรับการผลิตถั่วเหลองหมักมีเพียงผงกล้าเชื้อสำหรับผลิตนัตโตะเท่านั้น และเทคโนโลยีการผลิตยังเป็นคงเป็นความลับในเชิงการค้า ผงกล้าเชื้อสำหรับผลิตนัตโตะเตรียมจากสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่คัดแยกมาโดยเฉพาะ เนื่องจากมีความทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีและมีปริมาณเชื้ออยู่ประมาณ 10^8 สปอร์/กรัม การใช้ผงกล้าเชื้อเพิ่มความสะดวกต่อการใช้งานมากเพียงละลายผงกล้าเชื้อในน้ำต้มสุกและคลุกกับถั่วเหลองต้มสุกทำให้ได้นัตโตะที่มีคุณภาพและปลอดภัย ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมของการหมักนัตโตะคือ 10^3-10^4 สปอร์/กรัม ดังนั้นผงเชื้อเพียง 1 กรัมสามารถใช้หมักถั่วเหลองได้มากถึง 1 กิโลกรัม (Teng, Lin, & Hsieh, 2004) สำหรับการผลิตผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปสำหรับหมักถั่วเน่าของไทยยังไม่มีรายงาน รวมถึงยังไม่มีการผลิตถั่วเน่าด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนากระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อสำหรับหมักถั่วเน่าโดยใช้เชื้อ *B. subtilis* TN51

มีรายงานการผลิตกล้าเชื้อผงสำหรับกระบวนการผลิตอาหารหมักพื้นบ้านหลายชนิด เช่น ผงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับการผลิตหน่อไม้เปรี้ยว (วรรณทิชา ลาภศิริ และศรีเวียง ทิพกานนท์, 2539) ผงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับการผลิตปลาส้ม (ชุดินุช สุจริต, 2543) เป็นต้น ซึ่งกระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อมีหลายวิธี เช่น วิธีการพ่นฝอย การใช้สารพยุง และการทำแห้งด้วยวิธีการแช่แข็งแบบระเหิด การผลิตผงกล้าเชื้อด้วยวิธีการใช้สารพยุงเป็นวิธีการที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ เนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือชั้นสูงที่มีราคาแพง เช่นเดียวกับวิธีการพ่นฝอยและการทำแห้งด้วยวิธีการแช่แข็งแบบระเหิด ซึ่งต้องใช้เครื่อง spray dryer และ freeze-dryer ตามลำดับ จากรายงานของชุดินุช สุจริต (2543) ที่ได้ศึกษาชนิดของแป้งที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารพยุงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตปลาส้ม โดยการผันแปรชนิดของแป้ง 3 ชนิด คือ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวเจ้าผสมแป้งข้าวเหนียว พบว่าแป้งทั้ง 3 ชนิดสามารถใช้เป็นสารพยุงที่ดีทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการรอดที่สูง นอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อในถุงโพลีเอธิลีน และถุงโพลีเอธิลีนฉาบอลูมิเนียมฟอยล์ช่วยรักษาอัตราการเหลือรอดของเชื้อไว้ได้นาน 20 วันในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาของเพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐ (2524) พบว่า การกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเจริญในสภาพ solid state ให้เหมาะสมก่อนการทำเป็นผงแห้งด้วยการเติมสารพยุงช่วยให้ได้ผงกล้าเชื้อที่มีคุณภาพและสามารถเก็บรักษาได้นานอย่างน้อย 3 เดือน

2.5 องค์ประกอบของแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วย anhydroglucose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glucosidic linkage ที่คาร์บอนตำแหน่งที่หนึ่งทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่อัลดีไฮด์ เรียกว่า reducing end group แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (แอมิโลส) และ พอลิเมอร์เชิงกิ่ง (แอมิโลเพคติน) โดยวางตัวในแนวรัศมี ซึ่งแป้งจากแหล่งต่างกันจะมีอัตราส่วนของแอมิโลสและแอมิโลเพคตินแตกต่างกัน ให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยองค์ประกอบหลักภายในเม็ดแป้ง (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550)

2.5.1 แป้งสาลี

ข้าวสาลี (wheat) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Triticum* spp. มีปลูกตั้งแต่สมัยโบราณ ในประเทศอิหร่าน อียิปต์ กรีก และประเทศในทวีปยุโรป ต่อมาได้ขยายพื้นที่ไปตามส่วนต่างๆ ของโลก ข้าวสาลีที่นิยมปลูก ได้แก่ พันธุ์ที่ใช้ทำขนมปัง (*T. aestivum*) พันธุ์ที่ใช้ทำมักกะโรนี (*T. durum*) และพันธุ์ที่ใช้ทำขนมเค้ก (*T. compactum*) เนื่องจากสภาพอากาศและพื้นที่ที่ไม่เหมาะสม แป้งข้าวสาลีจึงไม่เป็นที่นิยมปลูกในประเทศไทย ดังนั้นประเทศไทยจึงต้องนำเข้าข้าวสาลีหรือแป้งสาลีจากต่างประเทศในยุคอียิปต์โบราณได้มีการนำแป้งจากข้าวสาลีมาใช้เคลือบผ้าลินินให้แข็งเพื่อใช้สำหรับห่อมัมมี่ ในปัจจุบันได้มีการนำแป้งสาลีมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น ในด้านการซักรีด ได้ใช้แป้งสาลีในการเคลือบผ้าให้อยู่ทรง โดยอาศัยความแตกต่างของเม็ดแป้ง เม็ดแป้งที่มีขนาดเล็กจะเข้าไปในช่องว่างระหว่างเส้นใยของเนื้อผ้า ส่วนเม็ดแป้งขนาดใหญ่จะเคลือบผิวหน้าผ้า ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง แป้งสาลีใช้เป็นส่วนผสมอย่างหนึ่งเนื่องจากมีสีขาวบริสุทธิ์และเป็นองค์ประกอบในการขึ้นรูปเม็ดยา สำหรับอุตสาหกรรมอาหารได้มีการนำแป้งสาลีมาใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติการเป็นเจลที่อุณหภูมิต่ำ และการเกิดกลูเตนในก้อนโดซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแป้งสาลีทำสามารถกักเก็บอากาศไว้ได้และให้ความพองตัวในผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลังการอบ ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดได้แก่ เค้ก ขนมปัง เป็นต้น แป้งสาลียังใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแป้งแปรรูปต่างๆ เช่น ไดแอลดีไฮด์สตาร์ช (dialdehyde starch) สตาร์ชแซนไทด์ (starch xanthide) และวัตถุดิบในการหมักกรดอินทรีย์อีกมากมาย นอกจากนี้ยังมีการใช้งานในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น การผลิตกาวดิด wallpaper เป็นต้น องค์ประกอบต่างๆ ในเมล็ดข้าวสาลี แสดงในตาราง 4 (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

ตาราง 4 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวสาลี

องค์ประกอบ	ร้อยละ
ความชื้น	14
แป้ง	64
โปรตีน	12.5
ไขมัน	1.65
เยื่อใย	2.5
เถ้า	1.75
น้ำตาลและกัม	3.6

ที่มา : กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2546)

แป้งสาลีมีองค์ประกอบของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของโปรตีนกับเพนโทแซน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายได้ในน้ำ มีผลต่อคุณลักษณะการยืดหยุ่นของกลูเตน (gluten) และการอุ้มก๊าซในการอบ โปรตีนชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในแป้งสาลีมีความสำคัญทั้งในด้านคุณค่าทางอาหาร โดยเฉพาะในส่วนของไกลอะดินและกลูเดนินที่รวมตัวกันเป็นกลูเตน นอกจากนี้โปรตีนบางชนิดยังมีผลต่อการเกิดสีน้ำตาลในขนมปัง

2.5.2 แป้งข้าวเจ้า

แป้งข้าวที่สำคัญที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยมีหลายชนิด ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวฟ่าง แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวหอมมะลิ เป็นต้น

แป้งข้าวเจ้า หมายถึง แป้งที่ได้จากข้าวเจ้าขาว ซึ่งข้าวเจ้าขาวหมายถึง ข้าวที่เป็นเมล็ดเต็ม ข้าวหักหรือปลายข้าว ที่ได้จากการสีข้าวเปลือกเจ้ามีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. แป้งข้าวเจ้าเป็นแป้งชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการทำขนมไทย และอาหารขบเคี้ยวโดยใช้เป็นส่วนประกอบหลักในตัวผลิตภัณฑ์ ขนมหลายชนิดที่ทำจากแป้งจะมีลักษณะ หรือคุณภาพเป็นไปตามการพองตัว ความขันใสของเม็ดแป้งเป็นสำคัญ องค์ประกอบภายในเมล็ดข้าวเจ้าแสดงในตาราง 5 (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

ตาราง 5 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวเจ้า

องค์ประกอบ	ร้อยละ
ความชื้น	2
แป้ง	79.2
โปรตีน	7.0
ไขมัน	0.4
เถ้า	0.5
น้ำตาลและกัม	0.9

ที่มา : กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2546)

ในการผลิตแป้งข้าวเจ้าในประเทศไทยนั้น ถึงจะเป็นการโม่เปียก แต่โปรตีนและสิ่งแปลกปลอมส่วนใหญ่ยังติดอยู่กับแป้ง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จึงเป็นประเภทฟลาวร์ (rice flour) การผลิตฟลาวร์นิยมใช้ข้าวประเภทที่มีอะมิโลสสูง ทั้งนี้เพราะเมื่อนำไปประกอบอาหารจะให้ลักษณะที่เป็นที่พึงพอใจของผู้บริโภค เช่น เมื่อนำไปทอดจะให้ความกรอบแข็ง หรือเมื่อนำไปนึ่ง เย็นลงจะเกิดแผ่นฟิล์ม (เช่น ก๋วยเตี๋ยว เส้นหมี่) ส่วนข้าวหอมมะลิที่ใช้บริโภคโดยทั่วไปไม่ เหมาะสมใช้ผลิตฟลาวร์ และมีปริมาณอะมิโลสต่ำ ส่วนการผลิตแป้งสตาร์ช (rice starch) คือการสกัดเอาโปรตีนและสิ่งแปลกปลอมในแป้งฟลาวร์ออกจนเกือบหมด ปัจจุบันในประเทศไทยเริ่มมีการผลิตแป้งสตาร์ชจากข้าวกันบ้างแล้ว (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

2.5.3 แป้งถั่วเหลือง

แป้งถั่วเหลืองได้จากการบดถั่วเหลืองไขมันเต็มหรือ ถั่วเหลืองที่แยกไขมันออกแล้วโดยกำหนดขนาดความละเอียดของแป้งถั่วเหลืองว่า แป้งถั่งเหลืองจะต้องผ่านตะแกรงมาตรฐานขนาด 100 เมชคิดเป็นปริมาณร้อยละ 97 เป็นอย่างน้อย แป้งถั่วเหลืองแตกต่างจากแป้งสาลีโดยแป้งถั่วเหลืองไม่มีโปรตีนชนิดกลูเต็น เหมือนกับแป้งสาลี แต่มีโปรตีนโกลบูลิน (globlin) และปริมาณโปรตีนและไขมันที่มากกว่า (Smith & Circle, 1972)

แป้งถั่วเหลืองอาจแบ่งเป็นชนิดต่างๆ ได้หลายชนิดเช่น

1. แป้งถั่วเหลืองชนิดไม่มีไขมัน (defatted soy flour) ได้จากถั่วเหลืองผ่าซีกที่แยกเปลือกและไขมันออกแล้ว ผ่านการบดให้เป็นไปตามข้อกำหนดและให้มีไขมันน้อยกว่าร้อยละ 1

2. แป้งถั่วเหลืองไขมันเต็ม (full fat soy flour) ได้จากถั่วเหลืองแยกเปลือกผ่านขั้นตอนการบดให้ละเอียดเป็นไปตามข้อกำหนด ซึ่งมีปริมาณโปรตีนและไขมันตามธรรมชาติโดยปกติจะมีไขมันไม่ต่ำกว่าร้อยละ 18

3. แป้งถั่วเหลืองชนิดไขมันต่ำ (low fat soy flour) ได้จากการเติมไขมันลงในแป้งถั่วเหลืองปลอดไขมันให้ได้ปริมาณไขมันตามต้องการ โดยปกติจะให้มีไขมันประมาณร้อยละ 4.5

4. แป้งถั่วเหลืองชนิดมีเลซิติน (lecithinated soy flour) ได้จากการเติมเลซิติน (lecithin) ลงในแป้งถั่วเหลืองชนิดไม่มีไขมันให้ได้ปริมาณเลซิตินตามต้องการจนถึงประมาณร้อยละ 15 แสดงองค์ประกอบของแป้งถั่วเหลืองชนิดต่างๆ ในตาราง 6

ตาราง 6 องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลืองและแป้งต่างๆ

ชนิดของแป้ง	โปรตีน	ความชื้น	ไขมัน	เส้นใย	เถ้า
ถั่วเหลือง	42.6	11.0	20.0	5.3	5.0
แป้งถั่วเหลืองชนิดไขมันเต็ม	46.6	5.0	22.1	2.1	5.2
แป้งถั่วเหลืองชนิดไม่มีไขมัน	59.0	7.0	0.9	2.6	6.4
แป้งถั่วเหลืองชนิดมีเลซิติน	48.6	5.5	16.4	2.2	5.3

ที่มา : Smith & Circle (1972)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 เชื้อ *B. subtilis* TN51 ได้รับจาก ผศ.ดร. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย

3.1.2 แป้งสาลีเอนกประสงค์ (ตราเซอรี่ฟ้า, บริษัทคิงส์ มิลลิง จำกัด)

3.1.3 แป้งข้าวเจ้า (ตรานิวเกรด, บริษัทไทยวาฟูดโปรดักส์ จำกัด (มหาชน))

3.1.4 แป้งถั่วเหลืองชนิดที่มีไขมันเต็ม (full-fat soy flour) (ตราดอยคำ, บริษัทดอยคำผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด)

3.2 สารเคมี

3.2.1 เปปโตน (Merck, Germany)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (Merck, Germany)

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (Merck, Germany)

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) (Merck, Germany)

3.2.5 น้ำตาลซูโครส (ตรามิตรผล, บริษัทน้ำตาลมิตรผล จำกัด)

3.2.6 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4) (Merck, Germany)

3.2.7 ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4) (Rankem, India)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ KERN ; ALJ 220 - 4NM)

3.3.2 เครื่อง Water activity meter (Decagon Devices, Inc., Aqualab 4TE, USA)

3.3.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven : Memmert UM400, Germany)

3.3.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer : UV-VIS Model UV - 1700, USA)

3.4 ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งระเบียบวิธีวิจัยออกเป็น 3 ตอน รายละเอียดของระเบียบวิธีวิจัยมีดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษากระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

1.1 ศึกษากระบวนการเตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อชนิดผงแห้ง

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อผงแห้งดังนี้

1.1.1 ศึกษาชนิดของแป้งที่เหมาะสมในการเตรียมสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

(1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง

ศึกษาหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนการทำเป็นผง โดยผันแปรชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง 3 ชนิด คือ แป้งถั่วเหลืองชนิดที่มีไขมันเต็ม แป้งข้าวเจ้า และแป้งสาลี เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน (basal medium, BSM) (ตาราง 7) ในอัตราร้อยละ 20

ตาราง 7 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
น้ำตาล ซูโครส	10
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5
ปรับ pH = 7 ฆ่าเชื้อใน autoclave นาน 15 นาที	

ที่มา: Farzana, Shah, Butt, & Awan (2005)

(2) การเตรียมเชื้อ *B. subtilis* TN51

เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryticase soy broth (TSB) อีกครั้ง บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ได้กล้าเชื้อที่นำไปทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง

(3) การทดสอบการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง

เติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ (2) อัตราร้อยละ 2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งทั้ง 3 สูตร รวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน (BSM) เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำการตรวจนับ Total viable count และ Spore count ตามวิธีของ AOAC (2000) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range tests (DMRT) ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.1.2 ศึกษาปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในการเตรียมสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เตรียมอาหารเหลวจากแป้งชนิดที่คัดเลือกจากการทดลองตอนที่ 1.1.1 ผันแปรระดับของแป้งที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน 3 ระดับ คือร้อยละ 30 40 และ 50 เติมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 (วิธีการเตรียมกล้าเชื้อทำเช่นเดียวกับตอนที่ 1.1.1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งในอัตราร้อยละ 2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำการตรวจนับ Total viable count และ Spore count ตามวิธีของ AOAC (2000) เหมือนการทดลองตอนที่ 1.1.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.1.3 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาการหมักที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง

ทำการเตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ตามวิธีการที่แสดงในตอนที่ 1.1.1 และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งที่คัดเลือกจากตอนที่ 1.1.1 และ 1.1.2 เติมกล้าเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งในอัตราร้อยละ 2 ผันแปรอุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างหลังการบ่มเพาะเชื้อนาน 0 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง เพื่อตรวจวิเคราะห์ Total viable count (AOAC, 2000) และ Spore count (AOAC, 2000) วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.2 ศึกษากระบวนการผลิตกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ชนิดผงแห้งจากแป้ง

(1) เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ตามวิธีที่คัดเลือกจากข้อ 1.1

(2) เตรียมแป้งปลอดเชื้อ (ชนิดเดียวกับที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว) ด้วยวิธีการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งภายใต้ความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และการอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

(3) เติมแป้งในข้อ (2) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในข้อ (1) ในอัตรา 1:1 เพื่อลดความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและปรับสภาวะให้เกิดการหมักแบบ solid state fermentation ในตู้บ่มอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแป้งมาอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนได้ค่า water activity ลดลงต่ำกว่า 0.6 และบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น ได้ผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* ทำการตรวจนับ Total viable count, Spore count และ ความชื้น ตามวิธีของ AOAC (2000) วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตอนที่ 2 ศึกษาอายุการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ด้วยวิธีการที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1 บรรจุในภาชนะบรรจุ 2 ชนิด คือ ถุงพลาสติกใส (Polyethylne, PE) และถุงอลูมิเนียมฟอยล์ (ชนิด PETNPP มี 3 ชั้นประกอบไปด้วย Polyethylene Terphthalate (PET) ความหนา 12 µm ชั้นกลางเป็น Nylon ความหนา 15 µm และชั้นในสุดเป็น Polypropylene ความหนา 70 µm) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส ศึกษาการเหลือรอดของแบคทีเรีย โดยสุ่มผงกล้าเชื้อทุก 15 วัน จนครบ 3 เดือน เพื่อตรวจนับ Total viable count, Spore count และ Yeast and mould และตรวจวิเคราะห์ค่าความชื้น ตามวิธีของ AOAC (2000) วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

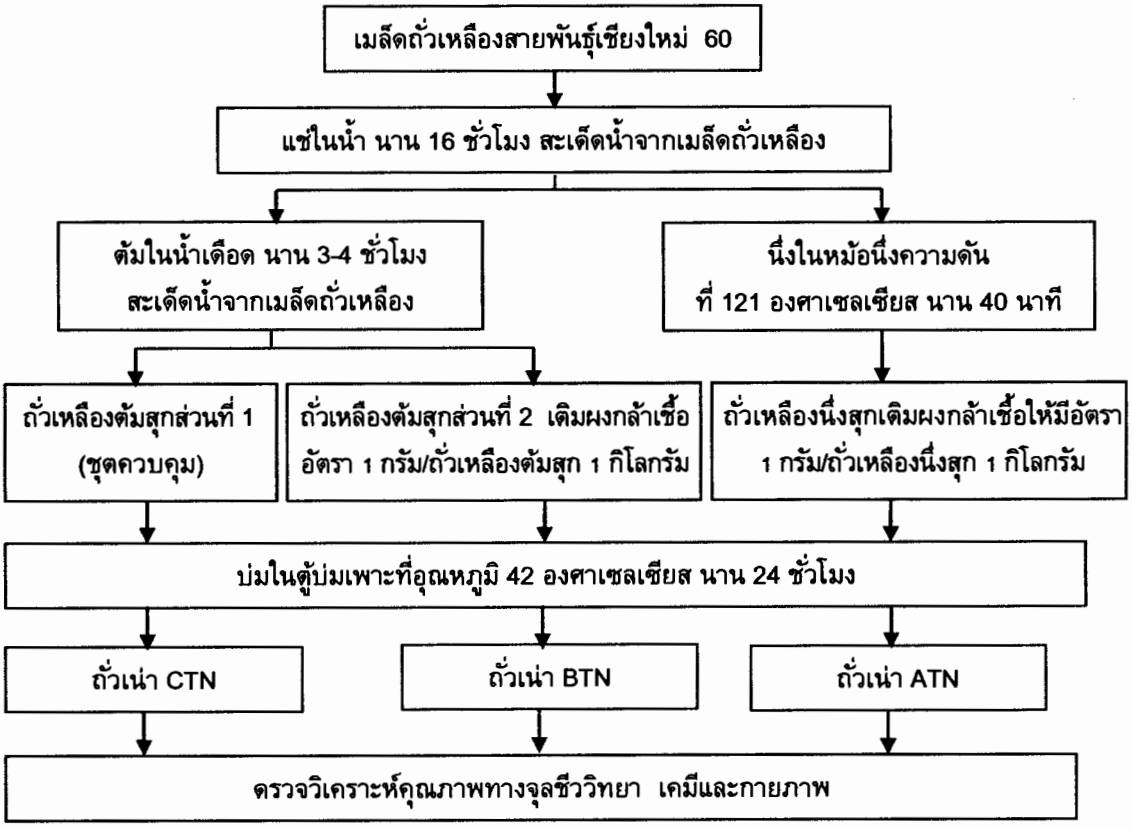
ตอนที่ 3 ศึกษาวิธีการหมักถั่วเน่าด้วยผงกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้าน

3.1 การเตรียมถั่วเหลือง

แช่เมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในน้ำ นาน 16 ชั่วโมง หลังสะเด็ดน้ำแบ่งถั่วเหลืองออกเป็น 2 ส่วน โดยนำถั่วเหลืองส่วนที่ 1 ต้มในน้ำเดือดนาน 4 ชั่วโมง และส่วนที่ 2 นึ่งให้สุกในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที (Dajanta, Chukeatirote, & Apichartsrangkoon, 2011)

3.2 การหมักถั่วเหลือง

แบ่งถั่วเหลืองต้มสุกจากข้อ 3.1 ออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ปล่อยให้ถั่วเหลืองต้มสุกเกิดการหมักเองตามธรรมชาติตามวิธีพื้นบ้าน (ชุดควบคุม) สำหรับถั่วเหลืองต้มส่วนที่ 2 และถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งในหม้อนึ่งความดันนำไปเติมผงกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากการทดลองตอนที่ 1 ในอัตรา 1 กรัม/ถั่วเหลืองสุก 1 กิโลกรัม บรรจุถั่วเหลืองที่เติมกล้าเชื้อแล้วในกล่องพลาสติกปลอดเชื้อและบ่มในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แสดงแผนผังการทดลองในภาพ 5 วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพ 5 แผนผังวิธีการผลิตถั่วเน่าจากผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับวิธีพื้นบ้าน

หมายเหตุ CTN คือ ถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน

BTN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ATN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดันหมักด้วยผงกล้า เชื้อ *B. subtilis* TN51

ตรวจวิเคราะห์คุณภาพถั่วเน่า ดังนี้

1. คุณภาพทางจุลชีววิทยา
   1.1 Total viable count (AOAC, 2000)
   1.2 Spore count (AOAC, 2000)
   1.3 Yeast and mould (AOAC, 2000)
   1.4 Coliform (AOAC, 2000)
   1.5 *Escherichia coli* (AOAC, 2000)
   1.6 *Bacillus cereus* (AOAC, 2000)
   1.7 *Staphylococcus aureus* (AOAC, 2000)
2. คุณภาพทางเคมีและกายภาพ
   2.1 Colour L a* b* วัดด้วยเครื่องวัดสี Minolta
   2.2 pH value (AOAC, 2000)
   2.3 Total sugar ด้วย Dinitrosalicylic reagent method (Miller, 1959)
   2.4 Reducing sugar ด้วย Dinitrosalicylic reagent method (Miller, 1959)

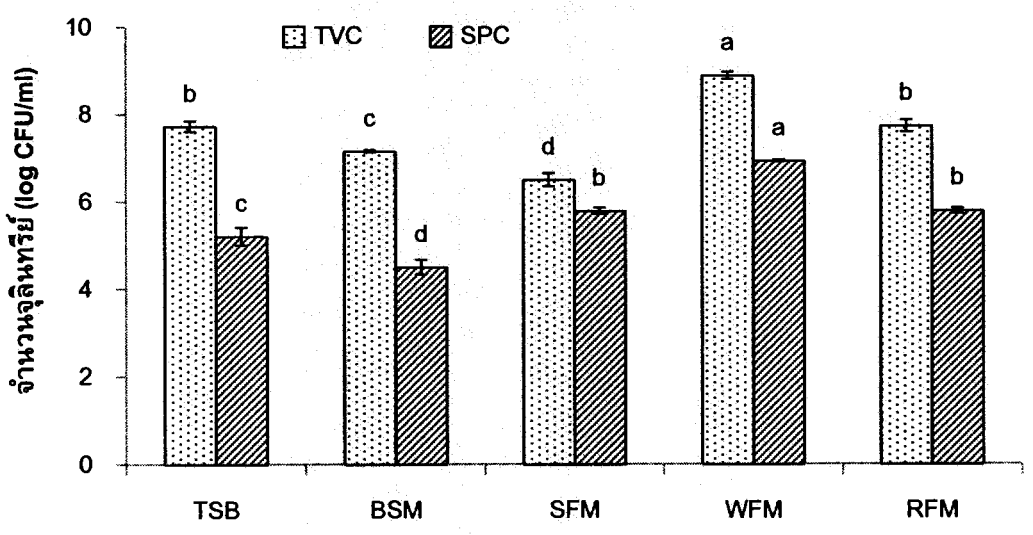
บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษากระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

4.1.1 ศึกษากระบวนการเตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อชนิดผงแห้ง

4.1.1.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและราคาถูกเพื่อใช้เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

จากการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้ง 3 ชนิด คือ แป้งถั่วเหลืองชนิดที่มีไขมันเต็ม แป้งข้าวเจ้า และแป้งสาลี โดยการเติมแป้งในอัตราร้อยละ 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน (BSM) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทางการค้า Trypticase soy broth (TSB) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* TN51 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งทั้ง 3 ชนิด โดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด (Total viable count, TVC) อยู่ในช่วง 6.50 – 8.88 log CFU/ml และตรวจพบแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมด (Spore count, SPC) อยู่ในช่วง 5.79 – 6.93 log CFU/ml (ภาพ 6)



ภาพ 6 ปริมาณ TVC และ SPC ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรพื้นฐานที่เติมแป้งถั่วเหลือง (SFM) แป้งสาลี (WFM) และแป้งข้าว (RFM) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทางการค้า (TSB) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน (BSM)

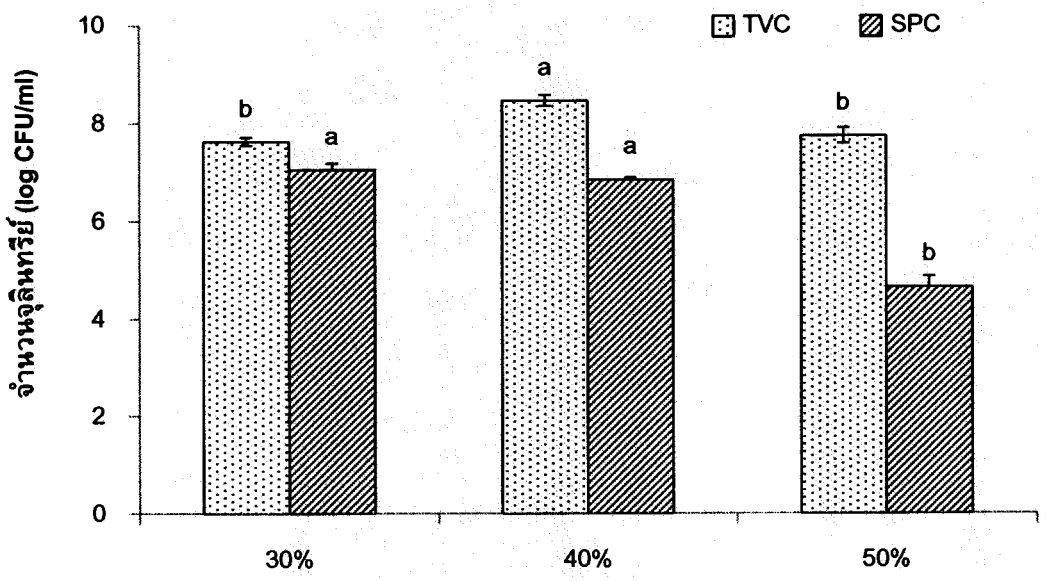
แป้งทั้ง 3 ชนิดที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีและแป้งข้าวเจ้าตรวจพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีสปอร์สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งถั่วเหลืองแม้ว่าแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบมีปริมาณน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานคือ 6.5 เท่า แต่มีปริมาณของแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานถึง 12.9 เท่า ในการผลิตผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปสำหรับหมักถั่วเน่าในครั้งนี้ต้องการให้แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในรูปที่มีสปอร์มากกว่าเซลล์ปกติ เนื่องจากสปอร์สามารถทนต่อความแห้งและความร้อนสูง รวมทั้งทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อกระบวนการผลิตกล้าเชื้อสำเร็จรูปชนิดผงที่ต้องผ่านการอบแห้งที่ความร้อนสูงและสามารถเหลือรอดในผงแป้งที่แห้งในระหว่างการเก็บรักษาได้

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสร้างสปอร์ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทางการค้า TSB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยพบเซลล์แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทางการค้า 6 - 17 เท่า และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีสามารถใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TN51 ได้ดีที่สุดโดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดในปริมาณที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า 12 เท่า และตรวจพบแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้ามากถึง 17 เท่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งทั้ง 3 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 มากที่สุด โดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากคุณสมบัติทางเคมีของแป้งที่มีความแตกต่างโดย แป้งถั่วเหลืองเป็นแป้งที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากกว่าแป้งสาลีและแป้งข้าวคือร้อยละ 38-44 10-11 และ 8.9 ตามลำดับ (สมชาย ประภาวัต, 2535; อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550) โปรตีนถั่วเหลืองมีกรดอะมิโนซีสทีนซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของ *Bacillus* ค่อนข้างต่ำขณะที่โปรตีนในแป้งสาลีคือไกลอะดินและกลูเตนิน มีองค์ประกอบของซีสทีนและซีสทีอีนค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงอาจส่งผลต่อการเจริญที่ดีกว่าของ *Bacillus* ได้ นอกจากนี้ชนิดและปริมาณของน้ำตาลซึ่งแบคทีเรียใช้เป็นแหล่งคาร์บอนก็อาจส่งผลต่อการเจริญที่แตกต่างกันนี้ด้วย แบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งราฟฟิโนสและสตาชิโอสในปริมาณสูง และอาจหยุดการเจริญลงเมื่อมีปริมาณของน้ำตาลซูโครสสูงเกินไป (Taira, Tanaka, Saito, & Saito, 1990; Taira, 1992) เช่น น้ำตาล โปรตีนและกรดอะมิโนชนิดต่างๆ

ดังนั้นจึงคัดเลือกแป้งสาลีไปศึกษาหาระดับความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมในการเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อใช้เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปผลิตเป็นผงแห้งในตอนต่อไป

4.1.1.2 ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของแป้งสาลีที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีที่ ผันแปรความเข้มข้น 3 ระดับคือร้อยละ 30 40 และ 50 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย TVC และ SPC ดังแสดงในภาพ 7 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40 มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 มากที่สุด โดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 30 และ 50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นส่วนผสมร้อยละ 30 40 และ 50คือ 7.62 8.46 และ 7.4 log CFU/g ตามลำดับ



ภาพ 7 ปริมาณ TVC และ SPC ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 30 และ 40 ตรวจพบแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีปริมาณสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 50 คิดเป็น 24 และ 22 เท่า ตามลำดับ การที่แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งได้แตกต่างกันนั้นอาจเป็นผลจาก

ระดับความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งที่แตกต่างกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40 มีค่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 64.41 ซึ่งมีความเหมาะสมกับการเจริญของ *B. subtilis* TN51 ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 30 และ 50 ซึ่งมีค่าความชื้นสูงเริ่มต้นร้อยละ 74.56 และ 53.92 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Zhao, Hu, Huang, Liang, & Zhao (2008) ที่ได้ระบุว่าค่าความชื้นของวัสดุหมักแบบ solid state fermentation ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของ *B. licheniformis* อยู่ที่ระดับร้อยละ 65

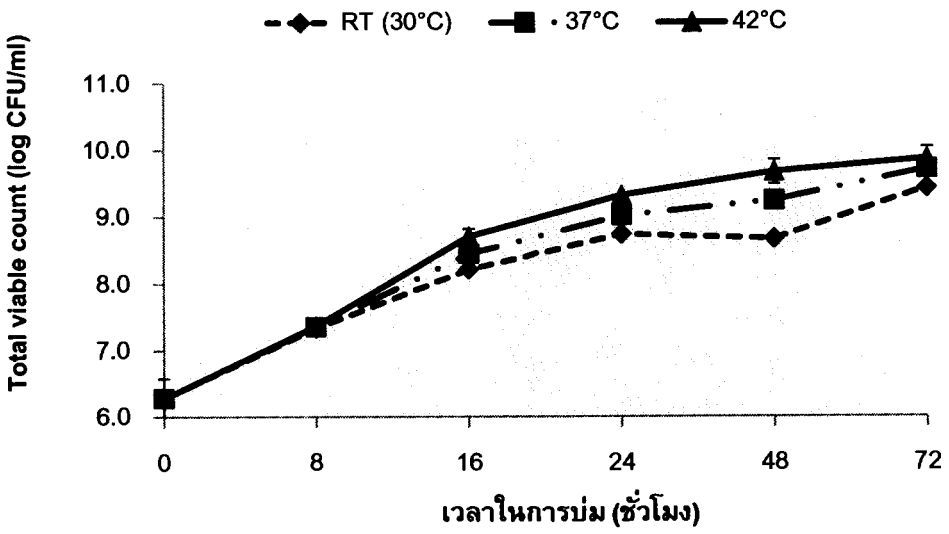
งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกการเติมแป้งสาลีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรพื้นฐานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปผลิตเป็นผงกล้าเชื้อในขั้นตอนต่อไป และจากผลการศึกษาในตอนที่ 4.1.1.1 และ 4.1.1.2 ทำให้สามารถสรุปสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งที่เหมาะสมและราคาถูกเพื่อใช้เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปผลิตเป็นผงกล้าเชื้อดังตาราง 8

ตาราง 8 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีสำหรับเพาะเลี้ยง *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปผลิตเป็นผงกล้าเชื้อ

ส่วนประกอบ	ปริมาณต่อลิตร	
น้ำตาลซูโครส	10	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส	0.5	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
แป้งสาลี	400	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

4.1.1.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลี

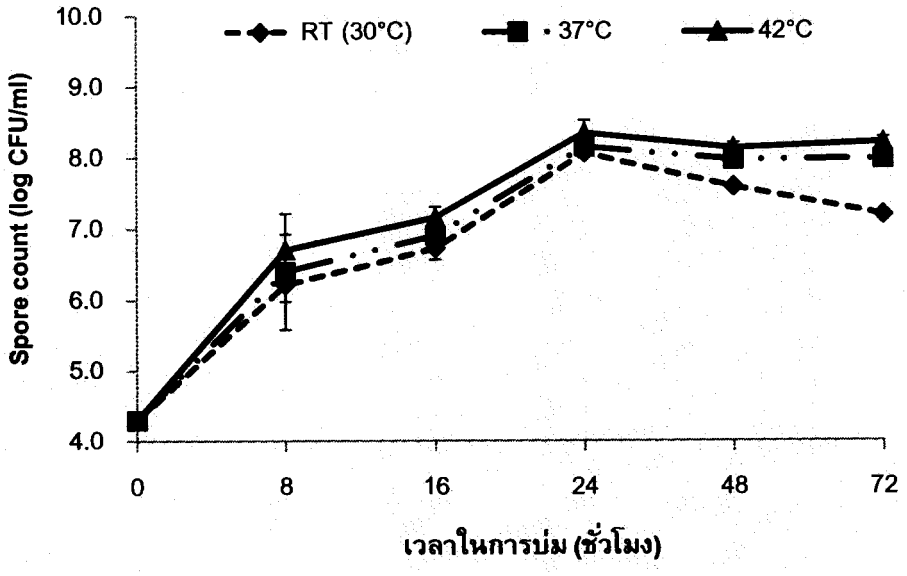
ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเพาะเชื้อ *B. subtilis* TN51 ด้วยการเพาะเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) 37 และ 42 องศาเซลเซียส แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมงในภาพ 8



ภาพ 8 ปริมาณ total viable count ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40 ในระหว่างการบ่มเพาะที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

จุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปริมาณเริ่มต้น 2.46 – 3.04 log CFU/g คิดเป็น 25 – 30 เท่าของปริมาณเริ่มต้น หลังจากชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 72 ของการบ่ม ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยมีปริมาณเพิ่มขึ้น 0.5 - 0.7 log CFU/g เท่านั้น อุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีอย่างชัดเจนในช่วงการบ่มเพาะ 16 - 72 ชั่วโมง โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าการบ่มที่อุณหภูมิอื่นอย่างชัดเจน เมื่อสิ้นสุดการบ่ม 72 ชั่วโมง จุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีมีปริมาณอยู่ระหว่าง 9.43 – 9.87 log CFU/ml

แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรียที่มีสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีในภาพ 9 อุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่มีสปอร์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 และมีการเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่ม โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 8.06 – 8.34 log CFU/g หลังจากนั้นปริมาณของแบคทีเรียที่มีสปอร์ค่อนข้างคงที่จนครบเวลาการบ่มเพาะ 72 ชั่วโมง

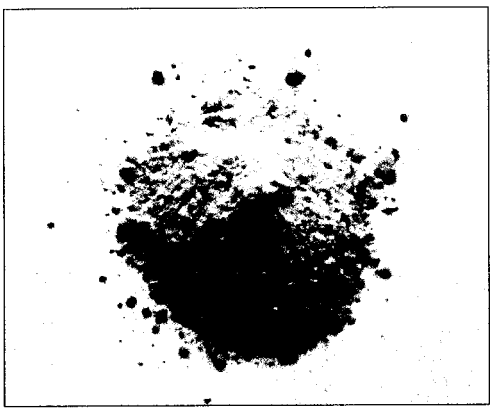


ภาพ 9 ปริมาณ spore count ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40 ในระหว่างการบ่มเพาะที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

การบ่มเพาะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส มีปริมาณของแบคทีเรียที่มีสปอร์สูงกว่าการบ่มเพาะที่อุณหภูมิอื่นตลอดช่วงการบ่ม 8 - 72 ชั่วโมง เช่นเดียวกับผลการตรวจพบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในภาพ 9 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียสในการบ่มเพาะเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40 ก่อนนำไปผลิตผงกล้าเชื้อต่อไป สำหรับเวลาในการบ่มได้เลือกที่เวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นเวลาที่แบคทีเรียมีอัตราการเพิ่มจำนวนได้สูงสุดและเริ่มเข้าสู่ช่วงการเจริญในระยะคงที่ (stationary phase) นอกจากนี้ยังเป็นการประหยัดเวลาและพลังงานในการบ่มอีกด้วย

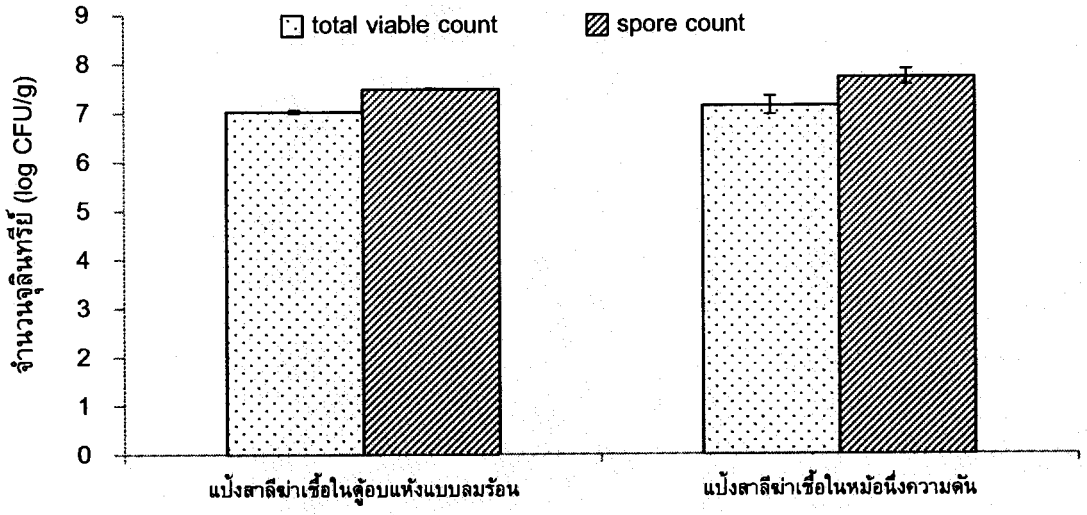
4.1.2 ผลการศึกษาวิธีการอบแป้งที่มีผลต่อการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ในการลดความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีก่อนนำไปผลิตเป็นเป็นผงแห้งได้ทำการเติมแป้งสาลีที่ผ่านการนึ่งในหม้อนึ่งความดันหรือที่ผ่านการอบในตู้อบแบบลมร้อนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ในอัตรา 1:1 และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นอบแห้งแป้งในตู้อบแบบลมร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนได้ค่า water activity ต่ำกว่า 0.6 และบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่นปลอดเชื้อทำให้ได้ผงกล้าเชื้อที่มีลักษณะเป็นผงแห้งดังแสดงในภาพ 10



ภาพ 10 ลักษณะผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีสปอร์ในผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้จากแป้งสาลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่แตกต่างกัน พบว่า วิธีการฆ่าเชื้อแป้งสาลีในหม้อนึ่งความดันช่วยส่งเสริมการเจริญของ *B. subtilis* TN51 ได้ดีกว่าการอบแห้งในตู้อบลมร้อน โดยพบปริมาณ TVC และ SPC ในผงกล้าเชื้อ 7.14 และ 7.71 log CFU/g ตามลำดับ (ภาพ 11) ขณะที่ผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้จากแป้งสาลีที่ฆ่าเชื้อด้วยตู้อบลมร้อนตรวจพบ TVC และ SPC ในจำนวน 7.02 และ 7.48 log CFU/g ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของแป้งสาลีเมื่อผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนเปียกของหม้อนึ่งความดันทำให้เกิดการแตกตัวของสารชีวโมเลกุลขนาดเล็กที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ดีกว่าความร้อนแห้งของตู้อบลมร้อน แบคทีเรียในผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้อยู่ในรูปของเซลล์ที่มีสปอร์ ซึ่งเป็นผลดีต่อการใช้งานและการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อไว้ใช้งานในระยะยาวเนื่องจากเซลล์ที่สร้างสปอร์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ความร้อนสูงและความแห้งได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (vegetative cell)



ภาพ 11 ปริมาณจุลินทรีย์ในผงกล้าเชื้อที่ผลิตจากแป้งสาลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อในตู้อบแห้งแบบลมร้อนและในหม้อนึ่งความดัน

การฆ่าเชื้อในแป้งด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งภายใต้ความดันนอกจากจะช่วยให้ได้ผงกล้าเชื้อที่มีจำนวนแบคทีเรียสูงแล้วยังเป็นวิธีการที่ใช้เวลาสั้นและง่ายต่อการใช้งาน ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการควบคุมการปลอดเชื้อในการผลิตผงกล้าเชื้อ รวมทั้งการประหยัดเวลาและพลังงานในการดำเนินงาน งานวิจัยนี้จึงเลือกวิธีการฆ่าเชื้อแป้งสาลีด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งภายใต้ความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนนำไปผสมกับเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีเพื่อลดความชื้นก่อนนำไปอบแห้งในขั้นตอนการผลิตผงกล้าเชื้อต่อไป

จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปกระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ได้ดังแสดงในภาพ 12 และสามารถนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ยื่นจดอนุสิทธิบัตร (เลขที่อนุสิทธิบัตร 9285)

เพาะเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40

↓

บ่มเพาะในตู้บ่มอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

↓

เติมแป้งสาลีที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในอัตรา 1:1

↓

บ่มเพาะในตู้บ่มอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

↓

อบแห้งในตู้อบแห้งแบบลมร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 - 6 ชั่วโมง
(ค่า water activity ของแป้ง < 0.6)

↓

ปั่นให้เป็นผงละเอียด

↓

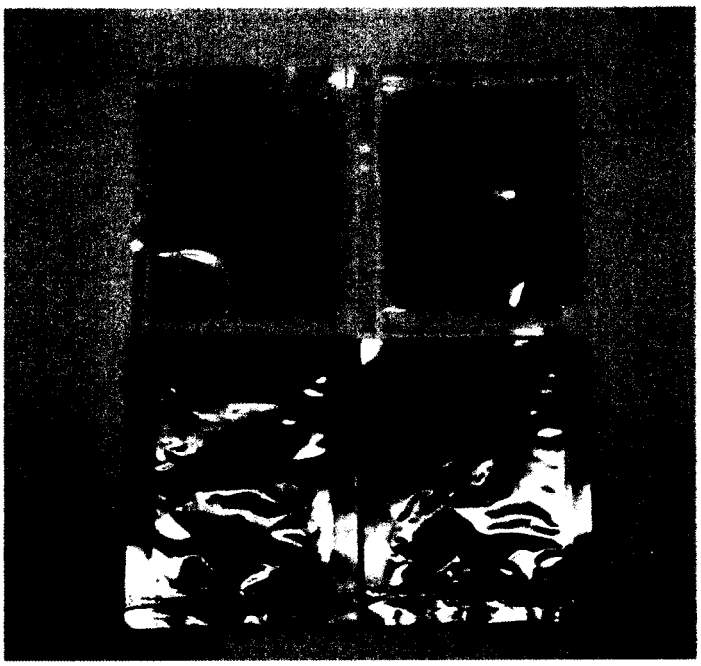
ผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 สำเร็จรูป

ภาพ 12 แผนผังกระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ที่พัฒนาได้จากงานวิจัยนี้

ผงกล้าเชื้อจากแป้งสาลีที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้มีปริมาณของแบคทีเรีย *B. subtilis* TN51 ในรูปของเซลล์ที่มีสปอร์ค่อนข้างสูงด้วยเทคโนโลยีการผลิตที่ไม่ซับซ้อนและต้นทุนต่ำ ในการนำผงกล้าเชื้อไปใช้ในการหมักถั่วเน่านั้นหากต้องการให้มีปริมาณสุดท้ายในถั่วเหลืองนึ่งสุกในปริมาณ 10^3 - 10^4 เซลล์/กรัมของถั่วเหลืองเช่นเดียวกันกับการผลิตถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่นหรือนัตโตะ (Hosoi & Kiuchi, 2003) จะต้องใช้ผงกล้าเชื้อปริมาณ 1 กรัมต่อถั่วเหลืองนึ่งสุก 1 กิโลกรัมซึ่งนับว่าเป็นปริมาณที่น้อยมาก ในญี่ปุ่นซึ่งเป็นประเทศต้นแบบในการพัฒนาและมีการผลิตผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปจำหน่ายในเชิงการค้าได้มีการผลิตผงกล้าเชื้อสำหรับหมักนัตโตะด้วยเทคโนโลยีที่รักษาสภาพของจุลินทรีย์ได้ดีคือวิธีการทำแห้งสปอร์ด้วยเทคนิค freeze-dry แต่วิธีนี้มีเทคโนโลยีการผลิตที่ค่อนข้างซับซ้อนและต้นทุนสูง ปัจจุบันประเทศญี่ปุ่นมีบริษัทผู้ผลิตและจำหน่ายผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปสำหรับหมักนัตโตะในเชิงการค้ารายใหญ่ประมาณ 3 บริษัท โดยมีการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์ของกล้าเชื้อ *B. subtilis* ให้มีลักษณะเฉพาะเป็นเอกลักษณ์ของตนเอง งานวิจัยนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีในการพัฒนากระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักของไทยเพื่อให้สามารถยกระดับคุณภาพและกระบวนการผลิตจากวิธีพื้นบ้านสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ได้ทั้งห่วงโซ่กระบวนการผลิต

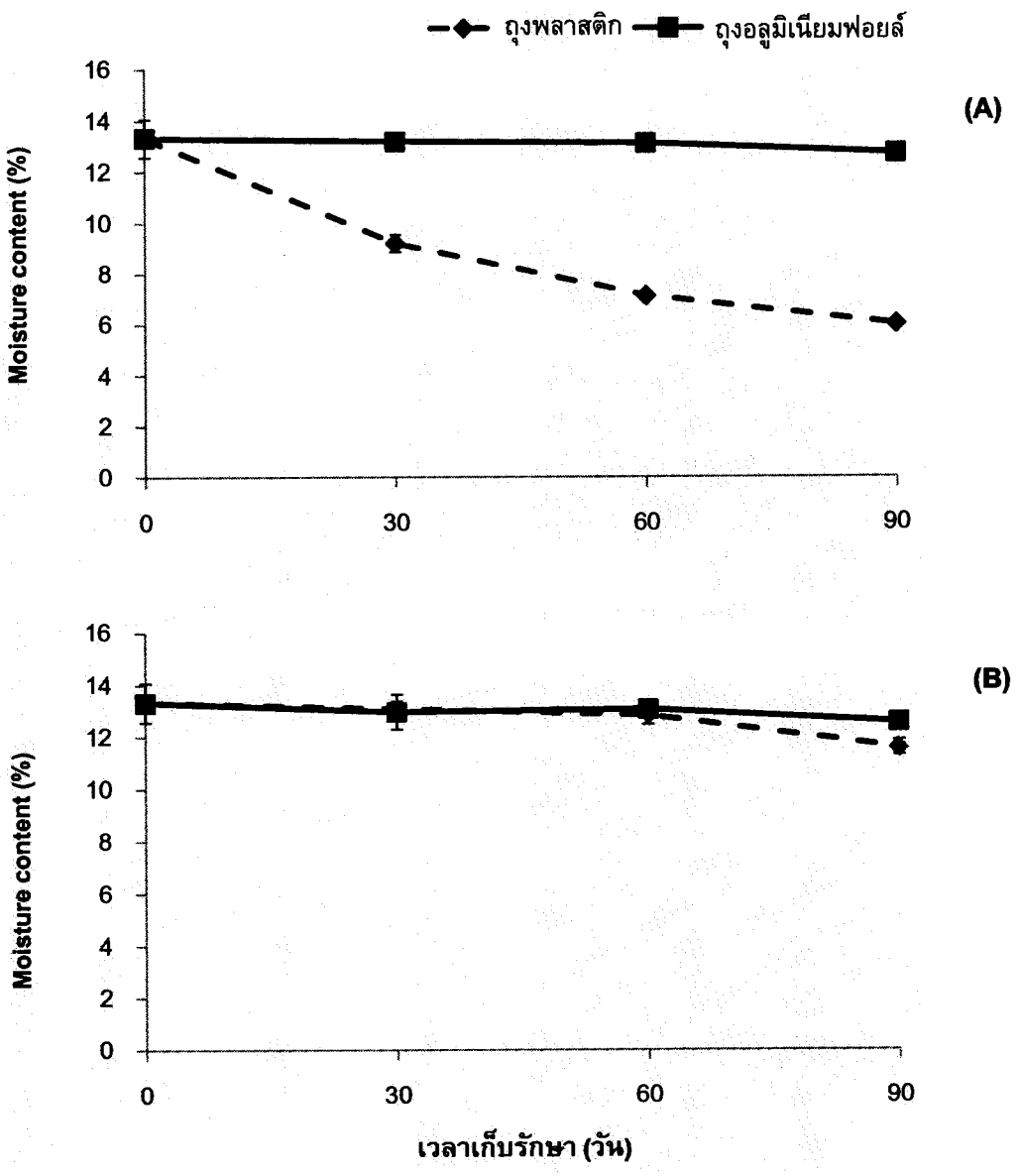
4.2 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *B. subtilis* TN51 ในผงกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์ (ภาพ 13) ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน



ภาพ 13 ผงกล้าเชื้อบรรจุในถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 90 วัน

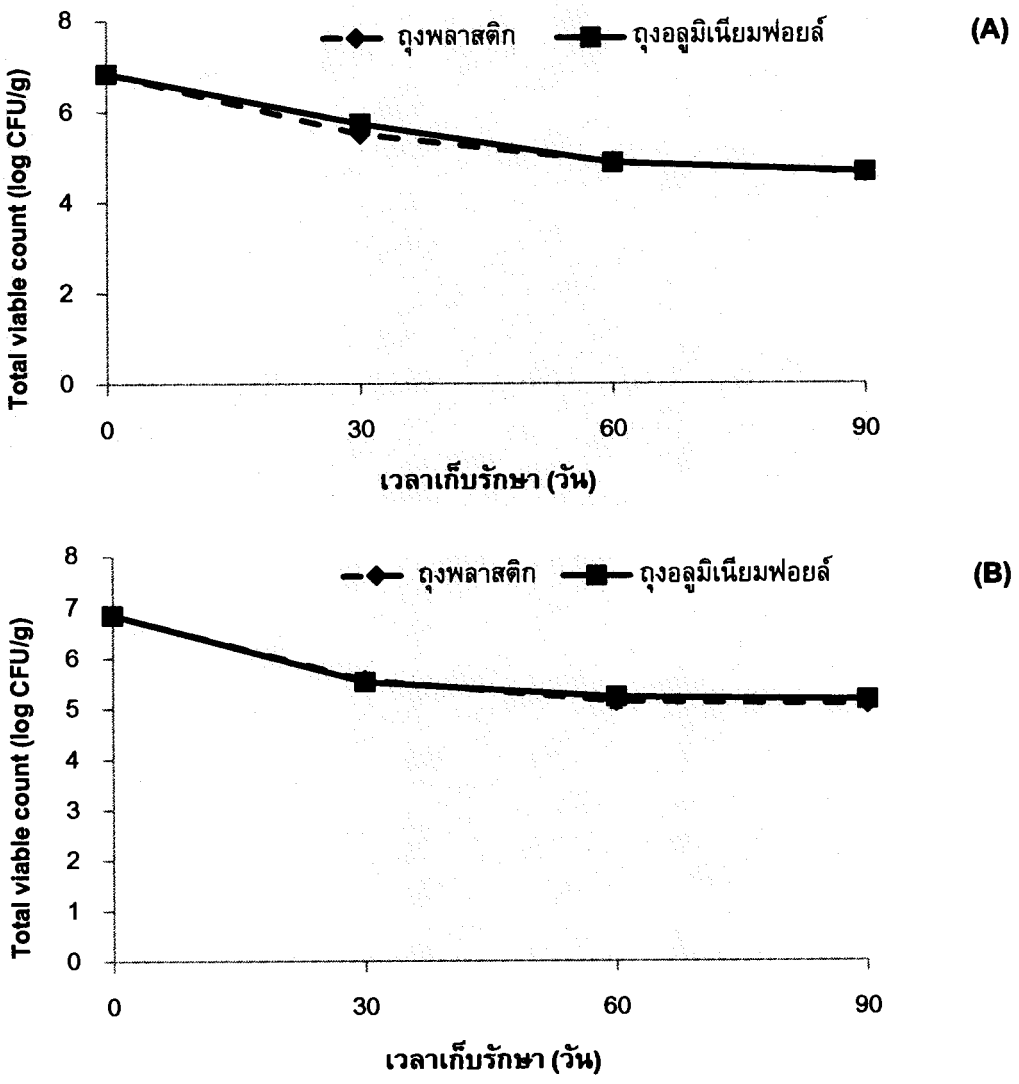
การเปลี่ยนแปลงค่าความชื้นของผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษา 90 วัน แสดงในภาพ 14 พบว่า ความชื้นของผงกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงพลาสติกใสลดลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขณะที่ความชื้นของผงกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์มีค่าคงที่ตลอดการเก็บรักษา สำหรับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่าความชื้นของผงกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงตลอดอายุการเก็บรักษา 90 วัน เช่นเดียวกัน



ภาพ 14 การเปลี่ยนแปลง moisture content ในผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (A) และ 4 องศาเซลเซียส (B) นาน 90 วัน

ถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์สามารถเก็บรักษาแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้เหลือรอดได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 และ 4 องศาเซลเซียสนาน 90 วัน (ภาพ 15) ตามลำดับ เมื่อครบเวลาในการเก็บรักษาพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 1.7 - 2.2 log cycle เมื่อเปรียบเทียบกับผงกล้าเชื้อก่อนการเก็บรักษา (ชุด 0 วัน) คิดเป็นร้อยละการเหลือรอด (%survival) 68 - 75 และพบว่าอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษากล้าเชื้อให้เหลือรอดได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

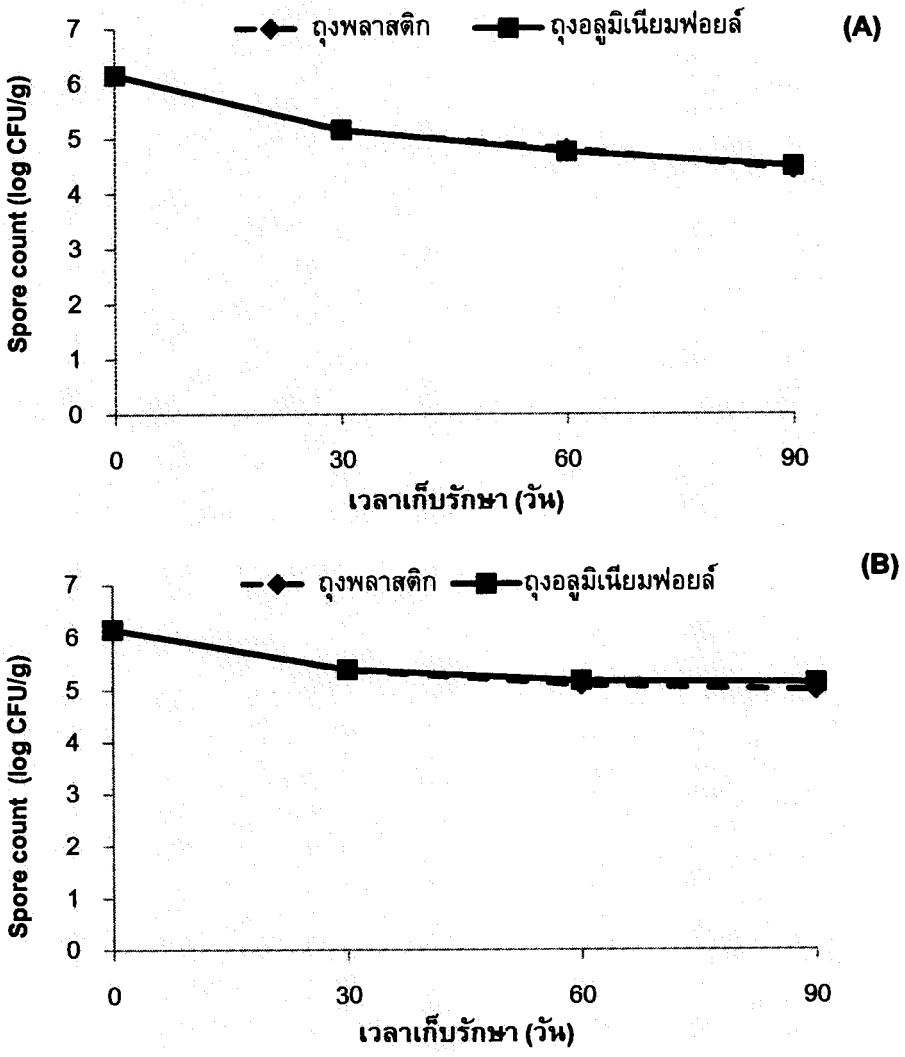
เล็กน้อย โดยหลังการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์ครบ 90 วัน มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเหลือรอดอยู่ 5.08 และ 5.16 log CFU/g ตามลำดับ ขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเหลือรอดอยู่ 4.64 และ 4.66 log CFU/g



ภาพ 15 การเปลี่ยนแปลง total viable count ในผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (A) และ 4 องศาเซลเซียส (B) นาน 90 วัน

ผลการตรวจวิเคราะห์ spore count (ภาพ 16) มีการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงของ total viable count โดยถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์สามารถเก็บรักษากล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ได้ใกล้เคียงกัน และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถเก็บ

รักษาแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้เหลือรอดได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพียงเล็กน้อย เท่านั้น หลังเก็บรักษาครบ 90 วัน จำนวนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ลดลงประมาณ 1 log cycle หรือประมาณ 10 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผงกล้าเชื้อก่อนการเก็บรักษา (ชุด 0 วัน) คิดเป็นร้อยละการเหลือรอดของแบคทีเรีย 72 - 83 นอกจากนี้ยังพบว่าผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้ตรวจพบยีสต์และราในปริมาณที่ต่ำกว่า 10 CFU/g ตลอดอายุการเก็บรักษา 90 วัน

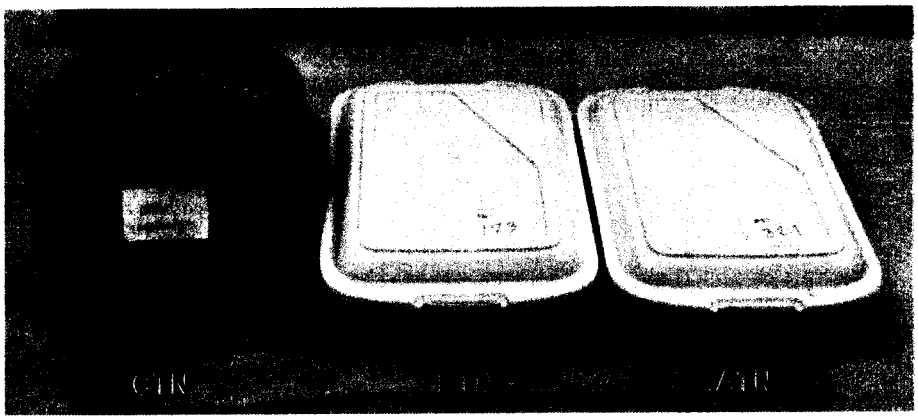


ภาพ 16 การเปลี่ยนแปลง spore count ในผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (A) และ 4 องศาเซลเซียส (B) นาน 90 วัน

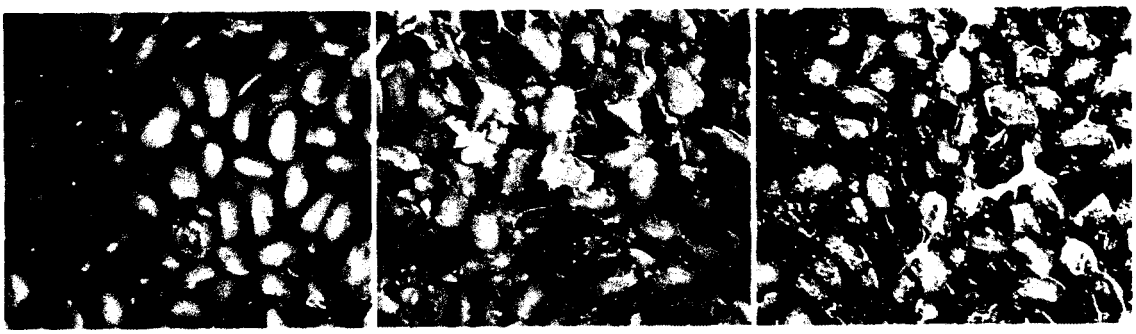
จากผลการตรวจพบปริมาณ total viable count และ spore count ในผงกล้าเชื้อที่ผ่านการเก็บรักษานาน 90 วัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ที่ผลิตจากแป้งสาลีสามารถเก็บรักษาไว้ในถุงบรรจุชนิดพลาสติกใสหรืออลูมิเนียมฟอยล์ได้อย่างน้อย 90 วัน แม้ไม่เก็บรักษาในอุณหภูมิตู้เย็นซึ่งจะทำให้สะดวกและง่ายต่อการนำผงกล้าเชื้อไปใช้งานจริง

4.3 ผลการศึกษาวิธีการหมักถั่วเน่าด้วยผงกล้าเชื้อเปรียบเทียบคุณภาพกับถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้าน

งานวิจัยนี้ได้ทดลองหมักถั่วเน่าด้วยผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้จากข้อ 4.1 ในถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มให้สุกในน้ำเดือดนาน 4 ชั่วโมง (BTN) และถั่วเหลืองที่นึ่งให้สุกในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที (ATN) ในอัตราร้อยละ 0.1 (w/w) หรือใช้ผงกล้าเชื้อ 1 กรัมต่อถั่วเหลืองสุก 1 กิโลกรัม เปรียบเทียบการหมักถั่วเน่าแบบพื้นบ้านซึ่งผลิตโดยการต้มถั่วเหลืองให้สุกในน้ำเดือดนาน 4 ชั่วโมง หลังจากการสะเด็ดน้ำทำการหมักถั่วเหลืองในตะกร้าไม้ไผ่และปกคลุมผิวหน้าด้วยใบตอง (control; CTN) (ภาพ 17) หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จนครบ 24 ชั่วโมงพบว่าถั่วเน่า ATN และ BTN มีกลิ่นหอมของถั่วเหลืองหมักและมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียเพียงเล็กน้อย ถั่วเน่า ATN มีเมือกเหนียวปกคลุมเมล็ดถั่วเหลืองและมีสีน้ำตาลเข้มกว่า BTN อย่างชัดเจน ขณะที่ถั่วเน่าที่หมักแบบพื้นบ้านพบเมือกเหนียวเพียงเล็กน้อย (ภาพ 17)



ภาพ 17 ลักษณะการหมักถั่วเน่าในงานวิจัยนี้: CTN – หมักถั่วเน่าแบบพื้นบ้าน; BTN – ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกผสมผงกล้าเชื้อ; ATN – ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกจากหม้อนึ่งความดันผสมผงกล้าเชื้อ



(A) (B) (C)

ภาพ 18 ถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีแดกต่างกัน: (A) CTN – ถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน; (B) BTN – ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51; (C) ATN – ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดันหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ถั่วเน่า ATN พบเมือกเหนียวสีขาวปกคลุมเมล็ดถั่วมากกว่าถั่วเน่า BTN และ CTN อย่างชัดเจน บ่งชี้ว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญและเกิดการหมักได้ดีในถั่วเหลืองที่นึ่งสุกด้วยหมอนึ่งความดันไอ เมือกเหนียวที่พบในถั่วเหลืองหมักคือส่วนของแคปซูลของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในระหว่างการหมัก ประกอบไปด้วยโพลีเมอร์ของกรดกลูตามิคและลีแวน (levan) (Kunioka, & Goto, 1994; Ogawa, Yamaguchi, Yuasa, & Tahara, 1997) เมือกเหนียวของถั่วเหลืองหมักถูกนำมาใช้เป็นเกณฑ์การประเมินคุณภาพที่ดีของนัตโตะของญี่ปุ่นและจัดเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายโดยทำหน้าที่เป็นเส้นใยและช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (Tsuji & Tsuji, 1986)

ตาราง 9 แสดงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของถั่วเน่าที่ผลิตด้วยกรรมวิธีแดกต่างกัน ถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อทั้ง ATN และ BTN มีปริมาณ total viable count และ spore count มากกว่าถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน (CTN) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมผงกล้าเชื้อเป็นการเพิ่มปริมาณของเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักและ *B. subtilis* TN51 เจริญได้ดีในถั่วเหลืองที่ต้มหรือนึ่งสุกทำให้ใช้เวลาในการหมักถั่วเน่าสั้นกว่าการหมักแบบพื้นบ้าน ถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้านและผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์มีการปนเปื้อนเชื้อยีสต์และราต่ำเช่นเดียวกัน โดยพบเชื้อยีสต์และราทั้งหมดต่ำกว่า 10 CFU/g หรือต่ำกว่า 1 log CFU/g

ตาราง 9 คุณภาพทางจุลชีววิทยาของถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 เปรียบเทียบกับวิธีพื้นบ้าน

คุณภาพทางจุลชีววิทยา	CTN	ถั่วเน่าหมักด้วยผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์	
		BTN	ATN
Total viable count (log CFU/g)	8.99 ± 0.14c	9.95 ± 0.07b	10.13 ± 0.04a
Spore count (log CFU/g)	8.64 ± 0.00c	9.16 ± 0.09b	9.29 ± 0.08a
Yeast and mould (log CFU/g)^{ns}	<1.00 ± 0.00	<1.00 ± 0.00	<1.00 ± 0.00
Coliform (MPN/g)	886.67 ± 0.00a	33.20 ± 0.00b	<3.00 ± 0.00c
E. coli (MPN/g)^{ns}	<3.00 ± 0.00	<3.00 ± 0.00	<3.00 ± 0.00
S. aureus (log CFU/g)^{ns}	<1.00 ± 0.00	<1.00 ± 0.00	<1.00 ± 0.00
B. cereus (log CFU/g)	5.63 ± 0.50a	3.67 ± 0.25b	<2.00 ± 0.00c

- ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และ ns แสดงค่าความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)
- CTN คือ ถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน; BTN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51; ATN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดันหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้านตรวจพบแบคทีเรียกลุ่ม coliform มากกว่าถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์ คือ BTN และ ATN คิดเป็น 26 และ 294 เท่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในระหว่างการผลิตถั่วเน่าแบบพื้นบ้านอาจมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม coliform จากอุปกรณ์และภาชนะที่ใช้ในการหมักเช่น ตะกร้าไม้ไผ่และใบตอง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุการเสื่อมเสียและกลิ่นเหม็นของถั่วเน่า ถั่วเน่าทั้ง 3 ตัวอย่างตรวจพบเชื้อ *E. coli* ต่ำกว่า 3 MPN/g ซึ่งแสดงให้เห็นถึงสุขลักษณะที่ดีในกระบวนการผลิต ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียดัชนีที่บ่งชี้ว่ามีการปนเปื้อนอุจจาระซึ่งอาจแพร่มาจากน้ำ อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตและผู้ผลิตที่สุขอนามัยไม่ดี

เมื่อพิจารณาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มก่อโรค คือ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* พบว่าถั่วเน่าทั้ง 3 ตัวอย่างตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ต่ำกว่า 1 log CFU/g ซึ่งบ่งชี้ว่าผู้ผลิตมีสุขลักษณะที่ดีในระหว่างการผลิตทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรีย *S. aureus* มีแหล่งอาศัยตามธรรมชาติอยู่ตามผิวหนังและบาดแผลที่เป็นหนอง ถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้าน (CTN) ตรวจพบ *B. cereus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วงและอาเจียนมากที่สุด โดยมีปริมาณมากกว่าถั่วเน่า BTN ซึ่งเป็นถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มเช่นเดียวกันถึง 130 เท่า ขณะที่ถั่วเน่า ATN ซึ่งผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดันตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในระดับต่ำกว่า 100 CFU/g จากผลการทดลองจะเห็นว่าการต้มสุกถั่วเหลืองในน้ำเดือดอาจไม่สามารถทำลายแบคทีเรีย *B. cereus* ได้ทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจาก *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ที่

ทนต่อความร้อนได้ดีและอาจหลงเหลืออยู่กับถั่วเหลืองต้มสุกส่งผลให้ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกทั้งวิธีพื้นบ้าน (CTN) และผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์ (BTN) ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในปริมาณที่สูงกว่าถั่วเน่า ATN ซึ่งผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดัน นอกจากนี้ยังอาจมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้จากตะกร้าไม้ไผ่และใบตองที่ใช้ในการผลิตถั่วเน่าด้วยวิธีพื้นบ้าน ทำให้ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในปริมาณที่มากกว่าถั่วเน่า BTN ซึ่งเป็นถั่วเน่าที่ผลิตได้จากถั่วเหลืองต้มเช่นเดียวกัน งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการนึ่งถั่วเหลืองให้สุกด้วยหม้อนึ่งความดันและการใช้ผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ช่วยเพิ่มความปลอดภัยและรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักหรือถั่วเน่าได้โดยการลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคและสาเหตุการเน่าเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อมีการเพิ่มขึ้นของค่า pH น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดมากกว่าถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้านอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตาราง 10) สอดคล้องกับปริมาณ total viable count และ spore count ที่แสดงในตาราง 9 โดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดัน (ATN) แสดงให้เห็นว่าการนึ่งสุกถั่วเหลืองในหม้อนึ่งความดันทำให้ถั่วเหลืองสุกนิ่มทั่วถึงและช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าการต้มสุกถั่วเหลืองในน้ำเดือด และในระหว่างการหมักแบคทีเรียได้สร้างเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสออกมาย่อยโปรตีนและน้ำตาลในถั่วเหลืองได้รวดเร็วกว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดและปลดปล่อยออกมาในระหว่างการหมักถั่วเหลืองโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรติเอสและอะไมเลส (Visessanguan, Benjakul, Potachareon, Panya, & Riebroy 2005; Chukeatirote et al., 2006) ปฏิกิริยาหลักที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักถั่วเหลืองคือการหมักย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรติเอสทำให้ได้โปรตีนเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระออกมาส่งผลให้ถั่วเหลืองหมักมีรสชาติอร่อยคล้ายผงชูรสหรือที่เรียกว่ารสอูมามิ (Yoshida, 1998) หลังจากนั้นแบคทีเรียจะใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งของคาร์บอนในการสร้างพลังงานในการเจริญเติบโตส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นสารแอมโมเนียและทำให้ถั่วเหลืองหมักมีค่า pH เพิ่มสูงขึ้น (Ohta, 1986; Steinkraus, 1991) และสารแอมโมเนียจะเปลี่ยนเป็นสารระเหยที่ทำให้ถั่วเหลืองหมักมีกลิ่นเหม็นได้เมื่อค่า pH ของถั่วเหลืองหมักเพิ่มสูงเป็น 8.0–8.3 (Campbell-Platt, 1980; Sarkar, Snibbe, Tversky, & Reiss 1993)

ตาราง 10 คุณภาพทางเคมีและกายภาพของถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 เปรียบเทียบกับวิธีพื้นบ้าน

คุณภาพ	CTN	ถั่วเน่าหมักด้วยผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์	
		BTN	ATN
ค่า pH	6.75 ± 0.14b	7.45 ± 0.03a	7.55 ± 0.02a
น้ำตาลรีดิวซ์	1.36 ± 0.12c	1.56 ± 0.04b	2.09 ± 0.03a
น้ำตาลทั้งหมด	3.61 ± 0.08b	3.54 ± 0.04b	5.09 ± 0.21a
ค่าสี L*	52.28 ± 1.49b	54.67 ± 0.25a	45.91 ± 0.71c
ค่าสี a*	9.20 ± 0.71a	8.77 ± 0.45a	8.99 ± 0.33a
ค่าสี b*	22.24 ± 0.96a	23.87 ± 0.28a	18.93 ± 1.36b

- ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดแสดงในหน่วยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเปียก
- CTN คือ ถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน; BTN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51; ATN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดันหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดัน (ATN) มีค่าความสว่าง (ค่า L*) และค่าสีเหลือง (ค่า b*) ต่ำกว่าถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกทั้ง CTN และ BTN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ขณะที่มีค่าสีเหลืองหรือค่า b* ใกล้เคียงกัน (ตาราง 10) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความร้อนสูงของหม้อนึ่งความดันขณะนึ่งสุกถั่วเหลืองทำให้ถั่วเหลืองมีน้ำตาลเข้มกว่าถั่วเหลืองที่ต้มสุกในน้ำเดือดส่งผลให้ถั่วเน่าที่ผลิตได้มีสีน้ำตาลเข้มกว่าด้วย

การนึ่งสุกถั่วเหลืองในหม้อนึ่งความดันเป็นวิธีการที่ใช้เวลาสั้นกว่าการต้มถั่วเหลืองในน้ำเดือดและสามารถทำให้ถั่วเหลืองสุกจนนิ่มได้ดีกว่าถั่วเหลืองต้มจึงส่งผลให้เชื้อ *B. subtilis* TN51 เจริญได้อย่างรวดเร็วทำให้ใช้เวลาในการหมักถั่วเน่าสั้นกว่า ดังนั้นการนึ่งสุกถั่วเหลืองในหม้อนึ่งความดันจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการใช้ผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตถั่วเน่าในเชิงพาณิชย์ ซึ่งนอกจากจะง่ายและสะดวกในการใช้งานแล้วยังสามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีความสม่ำเสมอ ปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรค ประหยัดเวลาในการผลิตและสามารถทำการผลิตถั่วเน่าในปริมาณมากได้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการสร้างมูลค่าและต่อยอดฐานภูมิปัญญาของท้องถิ่นของไทยสู่การใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์และสาธารณะด้วยการพัฒนาผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 สำหรับหมัก ถั่วเน่าซึ่งเป็นการยกระดับกระบวนการผลิตกล้าเชื้อแบบวิถีพื้นบ้านดั้งเดิมสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ทั้งในระดับวิสาหกิจชุมชนและระดับอุตสาหกรรม

5.1.1 ผลของการศึกษากระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ผลจากการทดลองการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้ง 3 ชนิด ช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานและอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า และพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 มากที่สุด โดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดสูงกว่า

ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีผันแปรความเข้มข้น 3 ระดับคือร้อยละ 30 40 และ 50 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40 มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 มากที่สุด โดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีสปอร์สูงกว่า

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเพาะเชื้อ *B. subtilis* TN51 ด้วยการเพาะเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) 37 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการบ่มเพาะเชื้อคือการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีสปอร์สูงกว่าการบ่มที่อุณหภูมิอื่นอย่างชัดเจน

การฆ่าเชื้อแป้งสาลีในหม้อนึ่งความดันช่วยให้แบคทีเรียเจริญในสภาวะ solid state ได้ดีกว่าการฆ่าเชื้อแป้งสาลีในตู้อบลมร้อนและเซลล์ของแบคทีเรียในผงกล้าเชื้ออยู่ในรูปของเซลล์ที่มีสปอร์มากกว่าเซลล์ปกติ ดังนั้นวิธีการฆ่าเชื้อแป้งด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งภายใต้ความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จึงเหมาะสมกับการนำไปใช้งานมากกว่าวิธีการอบแห้ง

ในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 100 นาน 2 ชั่วโมง เนื่องจากมีความสะดวกในการควบคุมการปลอดเชื้อในการผลิตผงกล้าเชื้อ รวมทั้งการประหยัดเวลาและพลังงานในการดำเนินงาน

5.1.2 ผลการศึกษาวิธีเก็บรักษาผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

จากการศึกษาวิธีการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อโดยการผันแปรชนิดของภาชนะบรรจุคือถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์และอุณหภูมิในการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อที่ 37 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 90 วัน พบว่า ถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์สามารถเก็บรักษาแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้เหลือรอดได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 และ 4 องศาเซลเซียส นาน 90 วัน โดยมีค่าร้อยละการเหลือรอด (%survival) ของจุลินทรีย์ทั้งหมด 68 - 75 และมีค่าร้อยละการเหลือรอดของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ 72 - 83 นอกจากนี้ยังพบว่าผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้ตรวจพบยีสต์และราในปริมาณต่ำตลอดอายุการเก็บรักษา

5.1.3 ผลการศึกษาวิธีการหมักถั่วเน่าด้วยผงกล้าเชื้อและเปรียบเทียบคุณภาพกับถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้าน

จากการทดลองหมักถั่วเน่าด้วยผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ในถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มให้สุกในน้ำเดือดนาน 4 ชั่วโมง และถั่วเหลืองที่นึ่งให้สุกในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที เปรียบเทียบการหมักถั่วเน่าแบบพื้นบ้าน พบว่าถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อใช้เวลาในการหมักสั้นกว่าการหมักแบบพื้นบ้านและมีกลิ่นหอมของถั่วเหลืองหมักและมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียต่ำกว่าถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน ถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้านและผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์มีการปนเปื้อนเชื้อยีสต์และรา *E. coli* และ *S. aureus* ในปริมาณต่ำเช่นเดียวกัน แต่ถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้านตรวจพบแบคทีเรียกลุ่ม coliform และแบคทีเรียก่อโรค *B. cereus* มากกว่าถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อ การนึ่งถั่วเหลืองในหม้อนึ่งความดันช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าการต้มสุกถั่วเหลืองในน้ำเดือด ดังนั้นการนึ่งสุกถั่วเหลืองในหม้อนึ่งความดันจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการใช้ผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. (2546). **เทคโนโลยีของแป้ง**. กรุงเทพฯ : สานักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกตุการ ดาจันทา, ธวัชชัย ศุภวิทิตพัฒนา, ปิยวรรณ ศุภวิทิตพัฒนา, อุทัยวรรณ ฉัตรธง, และ เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. (2555). **การผลิตผงกล้าเชื้อและผงปรุงรสจากถั่วเหลืองหมักเพื่อการยกระดับอาหารพื้นบ้านสู่การแข่งขันในตลาดธุรกิจ**. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. พิษณุโลก : มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

ชุดินุช สุจริต. (2544). **การเตรียมกล้าเชื้อผงสำหรับการผลิตปลาส้ม**. รายงานการวิจัย การเตรียมกล้าเชื้อผงสำหรับการผลิตปลาส้ม. กระทรวงศึกษาธิการ : สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐ. (2524). **การผลิตและการเก็บเชื้อบักเตรีแลกติคที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุกรในรูปเชื้อผง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณทิชา ลาภศิริ และ ศรีเวียง ทิพกานนท์. (2539). **การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากหน่อไม้เปรี้ยวเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ**. รายงานการวิจัย กรุงเทพมฯ : คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

สมชาย ประภาวัต. (2535). **เทคโนโลยีในการทำแป้งถั่วเหลือง**. กรุงเทพฯ : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรอนงค์ นัยวิกุล. (2550). **ข้าวสาลี : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. กรุงเทพมฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

AOAC. (2000). **Official methods of analysis of AOAC International**. (17th ed). Gaithersburg, MD : AOAC International.

Campbell-Platt, G. (1980). African locust bean *(Parkia* species) and its West African fermented food products, dawadawa. **Ecology of Food and Nutrition**. 9: 123-132.

Chukeatirote, E., Chainun, C., Siengsubchart, A., Moukamnerd, C., Chantawannakul, P., Lumyong, S., Boontim, N., & Thakang, P. (2006). Microbiological and biochemical changes in *Thua Nao* fermentation. **Research Journal of Microbiology**. 1 : 38-44.

Crisafulli A., Altavilla D., & Marini H. (2005). Effects of the phytoestrogen genistein on cardiovascular risk factors in post-menopausal women. **Menopause**. 12 : 186-192.

Dajanta, K. (2010). **Production of high nutritional fermented soybean (*Thua Nao*) by *Bacillus subtilis***. Dissertation Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University.

Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A., & Chukeatirote, E. (2011a). Antioxidant properties and total phenolics of Thua Nao (a Thai fermented soybean) as affected by *Bacillus*-fermentation. **Journal of Microbial and Biochemical and Technology**. 3(4) : 056-059.

_____. (2011b). Volatile profiles of *thua nao*, a Thai fermented soy products. **Food Chemistry**. 125 : 464-470.

_____. (2011c). Free amino acid profiles of *Thua Nao*, a Thai fermented soybean. **Food Chemistry**. 125 : 342-247.

Dajanta, K., Chukeatirote, E., Apichartsrangkoon, A., & Frazier, R.A. (2009). Enhanced aglycone production of fermented soybean products by *Bacillus* species. **Acta Biologica Szegediensis**. 53 : 93-98.

Dakwa, S., Sakyi-Dawson, E., Diako, C., Annan, N. T., & Amoa-Awua, W. K. (2005). Effect of boiling and roasting on the fermentation of soybeans into dawadawa (soy-dawadawa). **International Journal of Food Microbiology**. 104 : 69-82.

Dike, E. N., & Odunfa, S. A. (2003). Microbiological and biochemical evaluation of a fermented soyabean product (soy-dadawadwa). **Journal of Food Science and Technology**. 40 : 606-610.

Eden, J. (1998). Phytoestrogens and the menopause. **Balliere's Clinical Endocrinology and Metabolism**. 12 : 581–587.

Farzana, K., Shah, S.N.H., Butt, F.B. & Awan, S.B. (2005). Biosynthesis of bacitracinin solid-state fermentation by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 18(1) : 55-57.

Georgetti, S. R., Vicentini, F. T. M. C., Yokoyama, C. Y., Borin, M. F., & 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 β-glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**. 106 : 459-466.

Gotoh, T., Yamada, K., Yin, H., Ito, A., Kataoka, T., & Dohi, K. (1998). Chemoprevention of *N*-Nitroso-*N*-methylurea-induced rat mammary carcinogenesis by soy foods or biochanin A. **Japanese Journal Cancer Research**. 89 : 137–142.

Griffith, A. P., & Collisn, M. W. (2001). Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. 913 : 397-413.

Hermansen K., Sondergaard M., Hoie L., Carstensen M., & Brock B. (2001). Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. **Diabetes Care**. 24 : 228-233.

Hosoi, T., & Kiuchi, K. (2003). **Natto-A Food Made by Fermenting Cooked Soybeans with *Bacillus subtilis* (natto)**. In E. R. Farnworth (Ed.), Handbook of Fermented Functional Foods (pp. 267-290). Boca Raton : CRC Press.

Ishimi, Y., Yoshida, M., Wakimoto, S., Wu, J., Chiba, H., Wang, X., Takeda, K., & Miyaura, C. (2002). Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. **Bone**. 31 : 180-185.

Jideani, I. A. O., & Okeke, C. R. (1991). Comparative-study of microorganisms and sensory attributes of condiments from the fermentation of different seeds. **Plant foods for Human Nutrition**. 41 : 27-34.

Jung, K.-O., Park, S.-Y., & Park, K.-Y. (2006). Basic nutritional investigation: longer aging time increases the anticancer and antimetastatic properties of *doenjang*. **Nutrition**. 22 : 539–545.

Kim, N. Y., Song, E. J., Kwon, D. Y., Kim, H. P., & Heo, M. Y. (2008). Antioxidant and antigenotoxic activities of Korean fermented soybean. **Food and Chemical Toxicology**. 46 : 1184-1189.

Kim, S. L., Chi, H. Y., Kim, J. T., Lee, Y. H., Park, N. K., Son, J. R., & 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.

Kiuchi, K., and Watanabe, S. (2004). **Industrialization of Japanese natto**. In K. H. Steinkraus (Ed.), Industrialization of Indigenous Fermented Foods. (pp. 193-246). (2nd ed). Marcel Dekker : New York.

Kunioka M. & Goto A. (1994). Biosynthesis of poly (y-glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 40 : 867-872.

Kwak, C. S., Lee, M. S., & 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.

Lee, M. Y., Park, S.-Y., Jung, K.-O., Park, K.-Y., & 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.

Leejeerajumnean, A. (2003). Thua nao: alkali fermented soybean from *Bacillus subtilis*. **Silpakorn University International Journal**. 3 : 277-292.

Liu, D., Zhen, W., Yang, Z., Carter, J.D., Si, H., & Reynolds, K.A. (2006). Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. **Diabetes**. 55 : 1043–1050.

Makela S. I., Pylkkänen L. H., Santti R. S., & Adlercreutz H. (1995). Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. **Journal of Nutrition**. 125 : 437-445.

Moktan, M.R., Norbu, L., Nirola, H., Dukpa, K., Rai, T.B., & Dorji, R. (2008). Ecological and social aspects of transhumant herding in Bhutan. **Mountain Research and Development**. 28(1) : 41-48.

Morabito N, Crisafulli A., & Vergara C. (2002). Effects of genestein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: A randomized double blind placebo-controlled study. **Journal of Bone Mineral Research**. 17 : 1904-1912.

Nikkuni, S., Karki, T.B., Vilkhu, K. S., Suzuki, T., Shindoh, K., Suzuki, C., & 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.

Nout, M. J. R., Bakshi, D., & Sarkar, P. K. (1998). Microbiological safety of kinema, a fermented soya bean food. **Food Control**. 9 : 357-362.

Ogawa Y, Yamaguchi F, Yuasa K, & Tahara Y. (1997). Efficient production of – polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 61 : 1684-1687.

Ohta T. (1986) **Natto**. In Legume-Based Fermented Foods, eds. N.R. Reddy, M.D. Pierson, and D.K. Salunkhe, pp. 85-95. Boca Raton, FL: CRC Press.

Omafuvbe, B. O. (2008). Effect of temperature on biochemical changes induced by *Bacillussubtilis* (SDA3) during starter culture fermentation of soybean into condiment (soy-Daddawa). **American Journal of Food Technology**. 3 : 33-41.

Omafuvbe, B. O., Abiose, S. H., & Shonukan, O. O. (2002). Fermentation of soybean (*Glycine max)* for soy-daddawa production by starter cultures of *Bacillus*. **Food Microbiology**. 19 : 561-566.

Park, K.-Y., Jung, K.-O., Rhee, S.-H., & 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.

Potter, S. M., Baum, J. A., Teng, H., Stillman, R. J., Shay, N. F., & 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.

Sarkar, M., Snibbe, S. S., Tversky, O. J., & Reiss, S. P. (1993). **Stretching the rubber sheet: A metaphor for viewing large layouts on small screens**. In Proceedings of UIST. 93 : 81-91.

Sarkar, P. K., Jones, L. J., Craven, G. S., Somerset, S. M., & Palmer, C. (1997). Amino acid profiles of kinema, a soybean-fermented food. **Food Chemistry**. 59 : 69-75.

Sarkar, P. K., & 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.

Setchell K.D.R. (1998). Phytroestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of isoflavones. **American Journal of Clinical Nutrition**. 68 : 1333s-1346s.

Smith, A.K., & Circle, S.J. (1972). **Soybean : Chemistry and Technology**. AVI Publishing Co. Inc.

Steinkraus, K.H. (1991). **African alkaline Fermented Foods and their relationship to similar foods in other parts of the world**. Westby, A. & Reilly. J.A. eds. pp 87-92 Traditional African Foods-Quality and Nutrition Stockholm, Sweden. IFS.

Sundhagul, M., Smanmathuroj, P., & Bhodacharoen, W. (1972). Thua-Nao: A fermented soybean food of northern Thailand. I. Traditional processing method. **Thai Journal of Agricultural Science**. 5 : 43-56.

Taira, H. (1992). Quality and its variation on soybeans in Japan. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**. 39: 122-133.

Taira, H., Tanaka, H., Saito, M. & Saito, M. (1990). Effect of cultivar, seed size and crop year on total and free sugar contents of domestic soybean. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology**. 37: 203-213.

Tamang, J. P., & Nikkuni, S. (1996). Selection of starter cultures for the production of kinema, a fermented soybean food of the Himalaya. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 12 : 629-635.

Tamang, J. P., Sarkar, P. K., & Hesseltine, C. W. (1988). Traditional fermented foods and beverages of Darjeeling and Sikkim-a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 4 : 375-385.

Teng, D.F., Lin, C.S., & Hsieh, P.C. (2004). Fermented Whole Soybean and Soybean Paste. **In Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology**. Marcel Dekker, Inc. United States of America.

Tseng, Y. H., Lee, Y. L., Li, R. C., & Mau, J. L. (2005). Non-volatile flavor components of *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**. 90 : 409-415.

Tsuji, K. & Tsuji, E. (1986). Effect of natto-feeding on cholesterol level of rats. **Japanese Journal of Nutrition**. 44 : 41-44.

Visessanguan. W., S. Benjakul. W. Potachareon, A. Panya, & S. Riebroy. (2005). Accelerated proteolysis of soy proteins during fermentation of Thua-nao inoculated with Bacillus subtilis. **Journal of Food Biochemistry**. 29(4): 349-366.

Wang, D., Wang, L.-J., Zhu, F.-X., Zhu, J.-Y, Chen, X.D., Zou, L., Saito, M., & 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.

Wei, Q.-K., Chen, T.-R., & 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.

Yoshida, T. (1988). **Marine algae of Japan**. Tokyo, Japan : Uchida Rokakuho.

Zhao, S., Hu, N., Huang, J., Liang, Y. and Zhao, B. (2008). High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. **Biotechnology Letters**. 30: 295-297.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

อาหารผงสำเร็จรูป PDA ยี่ห้อ Merck	39	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Plate count agar (PCA)

อาหารผงสำเร็จรูป PCA	23.5	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

Sucrose	10	กรัมต่อลิตร
K2HPO4	0.5	กรัมต่อลิตร
K2HPO4	0.5	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH = 7 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Tryptic soy broth (TSB)

อาหารผงสำเร็จรูป PCA	3	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	0.1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Peptone water (PW)

อาหารผงสำเร็จรูป PW	1	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการตรวจวิเคราะห์ Total viable count (TVC)

1. เตรียมสารละลายอาหารโดยชั่งตัวอย่างอาหารแข็ง 25 กรัมใส่ในถุงตีป่น เติมสารละลาย peptone water เข้มข้นร้อยละ 0.1 จำนวน 225 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องตีป่นนาน 1-2 นาที จะได้สารละลายอาหารความเข้มข้น 1:10 หรือ 10^{-1} จากนั้นทำเจือจางทีละ 10 เท่า โดยดูดสารละลายอาหารความเข้มข้น 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสารละลาย peptone water ซึ่งบรรจุในหลอดๆ ละ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ทำเช่นนี้ซ้ำจนได้ระดับสารละลายอาหารความเข้มข้นที่เหมาะสม

2. ใช้ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายอาหารจากหลอดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 3 ระดับติดกัน จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 1 จาน (duplicate คือทำความเข้มข้นละ 2 จาน) และทำซ้ำเช่นนี้ในทุกความเข้มข้น

3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมเหลวอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส จำนวน 10-15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ผสมสารละลายเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้กระจายเข้ากันดีวางจานเพาะเชื้อไว้ให้วุ้นแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

4. นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนของเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็น CFU/กรัม หรือ มิลลิลิตร

วิธีการตรวจวิเคราะห์ Spore count (SPC)

1. วิธีการเตรียมสารละลายอาหารทำเหมือนกับการตรวจวิเคราะห์ Total viable count ยกเว้นนำสารละลายอาหารไปต้มในน้ำร้อน 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ก่อนนำมาทำเจือจางทีละ 10 เท่า และ

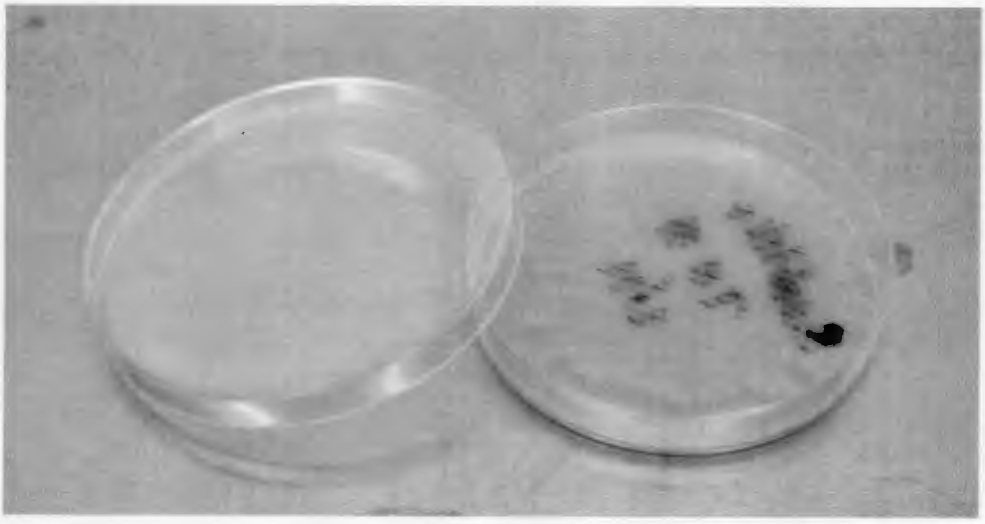
2. ใช้ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายอาหารจากหลอดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 3 ระดับติดกัน จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 1 จาน (duplicate คือทำความเข้มข้นละ 2 จาน) และทำซ้ำเช่นนี้ในทุกความเข้มข้น

3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมเหลวอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส จำนวน 10-15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ผสมสารละลายเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้กระจายเข้ากันดีวางจานเพาะเชื้อไว้ให้วุ้นแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

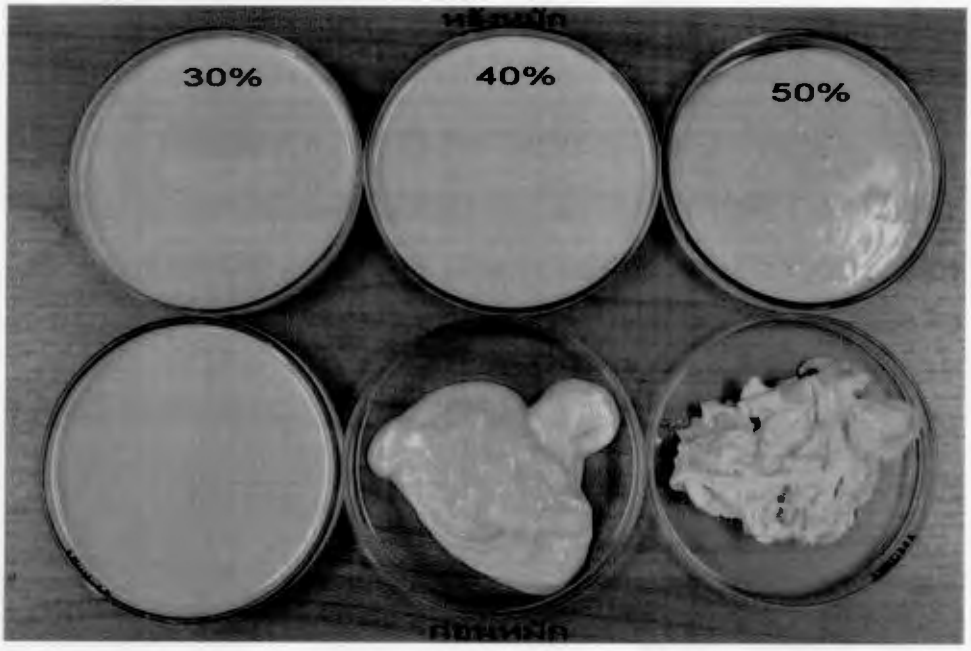
4. นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนของเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็น CFU/กรัม หรือ มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ภาพการหมักผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 และการดำเนินงาน



ภาพ 19 แบคทีเรีย *B. subtilis* TN51 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA



ภาพ 20 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนผสมของแป้งสาลีร้อยละ 30 40 และ 50 ก่อนและหลังการหมักเชื้อ *B. subtilis* TN51

ภาพ 21 แป้งหมัก *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปอบแห้ง

ภาคผนวก ค
การนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ

การนำเสนองานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ

งานประชุมสัมมนาวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ เครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 11 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ 15 กุมภาพันธ์ 2556

รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการ (Proceedings)
การนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ เครือข่ายวิจัยพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ ครั้งที่ 1 หน้า 309

การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสำหรับเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis*

จักรกฤษ แจ่มจันทร์*
เกตุการ ดาจันทา**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปสำหรับหมักถั่วเน่าจากแป้ง โดยได้ศึกษาหาชนิดของแป้งที่เหมาะสมเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมแป้ง (ชุดควบคุม) และอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า trypticase soy broth (TSB) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานอีกด้วย ผลการศึกษาพบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* TN51 มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งข้าวและแป้งถั่วเหลือง และตรวจพบจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า TSB มากถึง 12 และ 17 เท่า ตามลำดับ ปริมาณของแป้งสาลีที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานคือร้อยละ 40 โดยพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งสาลีเป็นส่วนผสมร้อยละ 30 และ 50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปจากแป้งที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และแป้งสาลี 400 กรัมต่อลิตร โดยตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมด 8.46 และ 6.85 log CFU/g ตามลำดับ

คำสำคัญ : บาซิลลัส, อาหารเลี้ยงเชื้อ, กล้าเชื้อ, อาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้ง

* หลักสูตรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, E-mail: molbutter_07@hotmail.com
** ดร., อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

The Development of Media From Flour for Culturing *Bacillus Subtilis*

Jakkrit Jamjan*
Katekan Dajanta**

ABSTRACT

This research aims to study preliminary culture media for *Bacillus subtilis* TN51 before developed to starter powder from flour for Thua Nao fermentation. The optimal flour added in basal medium was investigated and compared with basal medium without flour (control) and commercial trypticase soy broth (TSB). Furthermore, optimal amount of flour in basal medium was also studied. The results found that wheat flour medium (WFM) showed the superior promote growth of *B. subtilis* TN51 than rice flour and soy flour mediums. In addition, the higher levels of total viable count and total spore count were accounted in WFM than those in TSB for 12 and 17 times, respectively. The optimal amount of wheat flour added in basal medium was 40%. Total viable count in WFM was significantly higher than those found in 30 and 50% of wheat flour media ($P \leq 0.05$). This study obtained the preliminary culture media for *B. subtilis* TN51 before developed to starter powder from flour that composed of 10 g/L of sucrose, 0.5 g/L of potassium dihydrogen phosphate, 0.05 g/L of dipotassium hydrogen phosphate and 400 g/L of wheat flour. The contents of 8.46 log CFU/g total viable count and 6.85 log CFU/g spore count were found in this medium.

KEYWORDS : Bacillus, Culture medium, Starter culture, Flour medium

* Educational Administration Master of Food Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University,
E-mail: maibaba_07@hotmail.com
** Dr., Thesis Advisor

บทนำ

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน มีสปอร์ทำให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและสามารถเก็บรักษาไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ในถั่วเหลืองและเมล็ดธัญพืชอื่นได้ดี เนื่องจากสามารถใช้แหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนที่ซับซ้อนที่มีอยู่พืชเกษตรได้ ต้องการวิตามินบีและ ไบโอตินในการเจริญของเซลล์และการงอกของสปอร์ (Watanabe *et al.*, 1975) แร่ธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์ได้ดีขึ้น (Cote and Ghema, 1999) กรดอะมิโนกลูตามิค แอสปาติค และซิสทีนหรือ ซีสทีอีนช่วยกระตุ้นให้เชื้อ *Bacillus* เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานหรือสารละลายเกลือ (mineral salt medium) ได้ดี (Singer *et al.*, 1966; Nickerson and Bulla, 1975) นอกจากสารอาหารต่างๆ แล้วระดับความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีผลต่อการเจริญแบบ solid state ของ *Bacillus* ด้วย (Zhao *et al.*, 2008)

มีรายงานการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Bacillus* เพื่อใช้เพิ่มปริมาณของสปอร์และสาวด้านจุลินทรีย์จากวัสดุการเกษตรหลายชนิด โดย Vora and Shethna (1999) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมการตะมีโน ซิสทีน ถั่วเหลือง ไร้ไขมันและสารสกัดจาก groundnut meal ช่วยกระตุ้นให้ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* เจริญและสร้างสปอร์ได้ดี ขณะที่ Zhao *et al.* (2008) ได้พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ในสภาวะ solid state fermentation จากสารละลายเกลือที่มีส่วนผสมของซังข้าวโพดละเอียด จมูกข้าวสาลี กลูโคส เปปโตนและยีสต์เอกแหรกส์ และไวรุจน์และคณะ (2550) ได้ศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *B. subtilis* เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ โดยสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาล 19.85 กรัม/ลิตรและสูตรที่มีกากถั่วเหลือง 20 กรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการสร้างสปอร์ของเชื้อ จากรายงานของ ชุติบุช (2543) ที่ได้ศึกษาชนิดของแป้งที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารพยุงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตปลาส้ม โดยการดัดแปรชนิดของแป้ง 3 ชนิด คือ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวเจ้าผสมแป้งข้าวเหนียวพบว่าแป้งทั้ง 3 ชนิดสามารถใช้เป็นสารพยุงที่ดีทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการรอดที่สูงและจากการศึกษาของเพิ่มพงษ์ (25524) พบว่าการกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเจริญในสภาพ solid state ให้เหมาะสมก่อนการทำเป็นผงแห้งด้วยการเติมสารพยุงช่วยให้ได้ผงกล้าเชื้อที่มีคุณภาพดี

ถั่วเน่าเป็นถั่วเหลืองหมักของไทยที่ได้จากหมักถั่วเหลืองต้มสุกด้วยแบคทีเรียโปรจีนัส *Bacillus* กระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักหรือถั่วเน่าของไทยในปัจจุบันยังเป็นการผลิตแบบพื้นบ้านคือการหมักถั่วพาเลืองที่ ต้มสุกแล้วในตะกร้าไม้ไผ่และคลุมด้วยใบตองหรือวัสดุอื่น หมักบ่มที่อุณหภูมิห้องและอาศัยการหมักย่อยจากเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่ปนเปื้อนอยู่กับเมล็ดถั่วเหลืองหรือภาชนะที่ใช้ในการผลิต ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอขึ้นอยู่กับสุขลักษณะของผู้ผลิต มีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียค่อนข้างแรง บางครั้งอาจเกิดการเน่าเสียเนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และยังเสี่ยงต่ออันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดที่ปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต (Nout *et al.*, 1998; Dike and Odunfa, 2003; Leejeerajumnean, 2003) กระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักของไทยแตกต่างจากนัตโตะซึ่งเป็นถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่นที่ใช้กล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* บริสุทธิ์และควบคุมสภาวะการหมักบ่มทำให้สามารถควบคุมคุณภาพได้ดีและเป็นที่ยอมรับของคนทั่วโลก มีรายงานการใช้กล้าเชื้อ *B. subtilis* บริสุทธิ์ในการหมักถั่วเหลืองเพื่อช่วยแก้ปัญหาด้านคุณภาพ สุขอนามัยและรองรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ในถั่วเหลืองหมักที่ปีมา (ถั่วเหลืองหมักของประเทศอินเดีย) (Sarkar and Tamang, 1995; Tamang and Nikkuni, 1996) ดาวาดาวา (ถั่วเหลืองหมักของประเทศไนจีเรียและกานา) (Omafuvbe *et al.*, 2002; Omafuvbe, 2008) และจุงคุกแจง (ถั่วเหลืองหมักของประเทศเกาหลี) (Lee *et al.*, 2005) สำหรับประเทศไทยได้มีความพยายามในการยกระดับกระบวนการผลิตถั่วเน่าโดยการใช้กล้าเชื้อ *B. subtilis* บริสุทธิ์เช่นกัน แต่ยังต้องอาศัยกล้าเชื้อที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ (Dajanta *et al.*, 2011) ทำให้ไม่สะดวกต่อการใช้งานจริง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อด้วยวิธีการใช้สารพยุงจากแป้ง โดยได้ศึกษาหาชนิดของแป้งและปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่มีสารช่วยกระตุ้นการสร้างสปอร์ก่อนนำไปพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปสำหรับหมักถั่วเน่าต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสำหรับเพาะเลี้ยง Bacillus subtilis

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แหล่งของจุลินทรีย์

แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TN51 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.เอกชัย ชูเกียรติไวจน์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากถั่วเน่าพื้นเมืองและมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเนสสูง (Dajanta *et al*., 2009) เตรียมกล้าเชื้อสำหรับการทดลองโดยการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar บ่มในตู้บ่มเพาะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth (TSB) บ่มในตู้บ่มเพาะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2. การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้ง 3 ชนิด คือ แป้งถั่วเหลืองชนิดไขมันเต็ม แป้งข้าว และแป้งสาลีอเนกประสงค์ โดยเติมแป้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในอัตรา 200 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน (basal medium; BSM) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ประกอบด้วยน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.5 กรัมต่อลิตร และ ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.5 กรัมต่อลิตร (Vora and Shethna, 1999; Farzana *et al*., 2005)

เติมกล้าเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาณร้อยละ 2 ลงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งทั้ง 3 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน และอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มในตู้บ่มเพาะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total viable count; TVC) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (Merck, Germany) ด้วยวิธี pour plate บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี (AOAC, 2000) และตรวจวัดปริมาณสปอร์ทั้งหมด (spore count; SPC) โดยการปนสารละลายตัวอย่างในอ่างน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากทำให้เย็นลงและทำเจือจางในระดับที่เหมาะสมเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar ด้วยวิธี pour plate บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี (AOAC, 2000)

3. การศึกษาปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 2 ดัดแปรปริมาณของแป้งชนิดที่เหมาะสมกับการเจริญของ *B. subtilis* 3 ระดับ คือร้อยละ 30 40 และ 50 เติมกล้าเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาณร้อยละ 2 ลงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้ง บ่มในตู้บ่มเพาะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณสปอร์ทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2

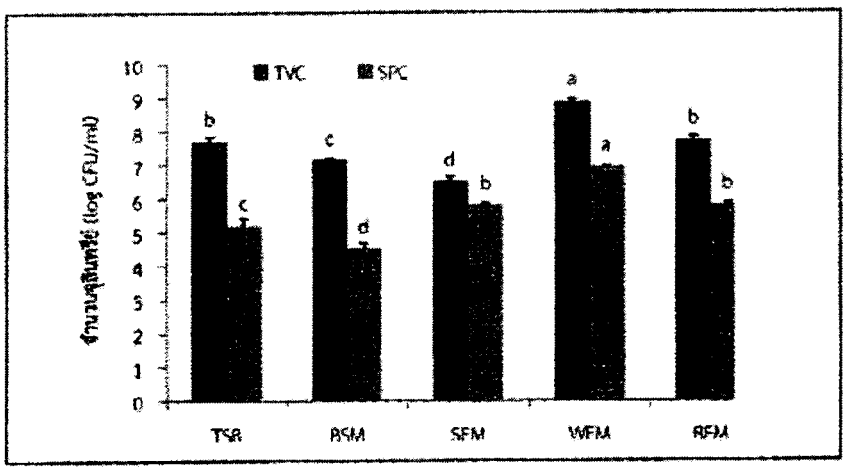
4. แผนการทดลองและวิเคราะห์สถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range tests (DMRT) ที่ $P \leq 0.05$

ผลการวิจัย

1. การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51

จากการทดลองประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากแป้ง ถั่วเหลืองชนิดไขมันเต็ม แป้งข้าวเจ้า และแป้งสาลี เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อผลิตภัณฑ์การค้า TSB และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ไม่มีแป้งเป็นส่วนผสม (ชุดควบคุม) พบว่า *B. subtilis* TN51 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากแป้งทั้ง 3 ชนิด โดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 6.50 – 8.88 log CFU/ml และตรวจพบแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 5.79-6.93 log CFU/ml (รูป 1)



รูป 1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่เติมแป้งถั่วเหลือง แป้งสาลีและแป้งข้าว เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเพลาะทางการค้า TSB และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมแป้ง (ชุดควบคุม): TSB = อาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า trypticase soy broth; BSM = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมแป้ง; SFM = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานเติมแป้งถั่วเหลือง; WFM = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานเติมแป้งสาลี; RFM = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานเติมแป้งข้าวเจ้า

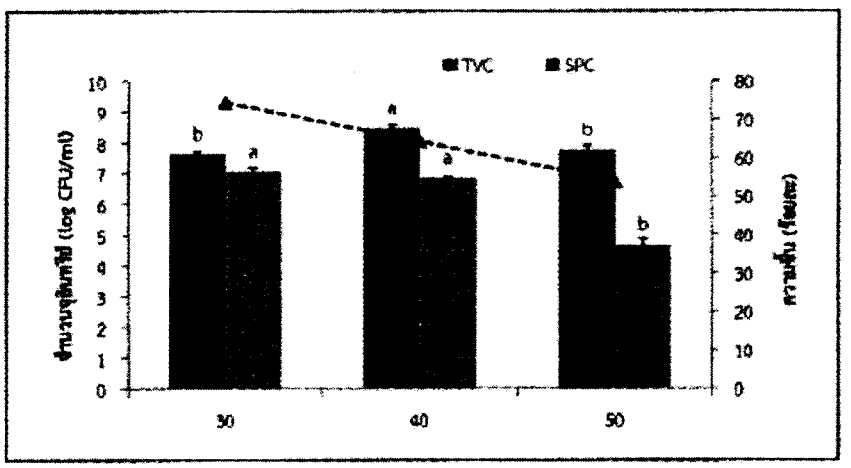
แป้งทั้ง 3 ชนิดที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ไม่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีและแป้งข้าวเจ้าตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และปริมาณสปอร์ (SPC) สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งถั่วเหลืองแม้ว่าแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบมีปริมาณน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่กลับพบปริมาณของสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานมากถึง 12.9 เท่า ในการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในครั้งนี้ต้องการให้แบคทีเรียที่จริญอยู่ในรูปที่มีสปอร์มากกว่าเซลล์ vegetative เนื่องจากสปอร์สามารถทนต่อความแห้งและความร้อนสูง รวมทั้งทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าเซลล์ vegetative ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อกระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อและสามารถเหลือรอดในระหว่างการเก็บรักษาได้ดี

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของแป้งช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสร้างสปอร์ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า TSB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยพบเซลล์ที่สร้างสปอร์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งทั้ง 3 ชนิดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า 6-17 เท่า และอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีตรวจพบจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมดในปริมาณที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า TSB มากถึง 12 และ 17 เท่า ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากแป้งทั้ง 3 ชนิด พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* TN51 มากที่สุด โดยตรวจพบจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากคุณสมบัติทางเคมีของแป้งที่มีความแตกต่างกัน เช่น น้ำตาล โปรตีนและกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ดังนั้นจึงเลือกแป้งสาลีไปใช้ในการศึกษาปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อในตอนต่อไป

2. การศึกษาปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีโดยการดัดแปรปริมาณของแป้ง 3 ระดับคือร้อยละ 30 40 และ 50 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมดดังแสดงในรูป 2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 40 มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 มากที่สุด โดยตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 30 และ 50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบคือ 8.46 7.62 และ 7.4 log CFU/g ตามลำดับ



รูป 2 ปริมาณจุลินทรีย์และสปอร์ทั้งหมด และความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีในปริมาณที่แตกต่างกัน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 30 และ 40 ตรวจพบสปอร์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีปริมาณ 7.05 และ 6.85 log CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 50 คิดเป็น 24 และ 22 เท่า ตามลำดับ

จากการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งในครั้งนี้ทำให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์สำเร็จรูปที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และแป้งสาลี 400 กรัมต่อลิตร โดยตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมด 8.46 และ 6.85 log CFU/g ตามลำดับ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ง่าย ไม่ซับซ้อนและมีราคาถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์สำเร็จรูปได้ต่อไป

อภิปรายผล

แป้งถั่วเหลืองเป็นแป้งที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากกว่าแป้งสาลีเอนกประสงค์และแป้งข้าวเจ้าร้อยละ 38-44 10-11 และ 8.9 ตามลำดับ (สมชาย, 2535; อรอนงค์, 2540) โปรตีนถั่วเหลืองมีโครงสร้องมีโนซีลทีนซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของ *Bacillus* ต่อนข้างต่ำขณะที่โปรตีนในแป้งสาลีคือไกลอะดินและกลูเตนินมีองค์ประกอบของซีสทีนและซีสทีอีนค่อนข้างสูง (Yoda, 2004) ดังนั้นจึงอาจส่งผลต่อการเจริญที่ดีกว่าของ *Bacillus* ได้ นอกจากนี้ชนิดและปริมาณของน้ำตาลซึ่งแบคทีเรียใช้เป็นแหล่งคาร์บอนก็อาจส่งผลต่อการเจริญที่แตกต่างกันนี้ด้วย แบคทีเรีย *B. subtilis*

สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งราฟฟิโนสและสตาชิโอสในปริมาณสูง และอาจหยุดการเจริญเมื่อมีปริมาณของน้ำตาลดังกล่าวสูงเกินไป (Taira *et al.*, 1989; 1990; Taira, 1992) การหมักแบบ solid state fermentation นอกจากสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์แล้วความชื้นก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การที่ *B. subtilis* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีในปริมาณต่างๆ ได้แตกต่างกันนั้นอาจเป็นผลจากความชื้นของสารอาหารต่างๆ และระดับความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันตามปริมาณของแป้งสาลีที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 40 มีค่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 64.41 อาจมีความเหมาะสมกับการเจริญของ *B. subtilis* TN51 ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 30 และ 50 ซึ่งมีค่าความชื้นสูงเริ่มต้นร้อยละ 74.56 และ 53.92 ตามลำดับ (รูป 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Zhao *et al.* (2008) ที่ได้ระบุว่าค่าความชื้นของวัสดุหมักแบบ solid state fermentation ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของ *B. licheniformis* อยู่ที่ระดับร้อยละ 65

ข้อเสนอแนะ

ควรตรวจวัดคุณลักษณะการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี เช่น ปริมาณน้ำตาลอิสระ กรดอะมิโนชนิดต่างๆ และค่าความชื้นในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งเพื่อให้สามารถอธิบายผลของการศึกษาความแตกต่างของแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

เอกสารอ้างอิง

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐ. (2524). *การผลิตและการเก็บเชื้อบักเตรีแลกติคที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุกรในรูปเชื้อผง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล.

โวรุจน์ เดชมหิทกุล จันทร์จิรา อยู่คง กนกวรรณ ทุ่มสุทรา แสงชัย เอกประทุมชัย และเพ็ญจันทร์ เมธาวิจิตรแสง. (2550). การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 เมษายน-มิถุนายน 2550

ชุติบุช อุรชิต. (2543). *การผลิตเกลือเชื้อผงสำหรับการผลิตปลาส้ม*. รายงานการวิจัยการเตรียมกล้าเชื้อผงสำหรับการผลิตปลาส้ม สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

สมชาย ประภาวัต. (2535). *เทคโนโลยีในการทำแป้งถั่วเหลือง*. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. 61 หน้า.

อรอนงค์ นัยวิกุล. (2540). *ข้าวสาลี: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. 371หน้า.

AOAC. (2000). Official methods of analysis of AOAC International, 17th edition. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Cote, R. and Ghema, R.L. (1999). Medium Formulation and Design, *E.coli* and *Bacillus* spp. In Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Flickinger, M.C. and Drew, S.W. (Eds.), John Wiley & Sons, New York, pp. 1676-1683.

Dajanta, K., Chukeatirote, E. and Apichartsrangkoon, A. (2011). Improvement of thua nao production using protein-rich soybean and *Bacillus subtilis* TN51 starter culture. Annals of Microbiology. 1-11.

Dajanta K., Wongkham, S, Thirach, P., Baophoeng, P., Apichartsrangkoon, A., Santithum, P. and Chukeatirote, E. (2009). Comparative study of proteolytic activity of protease-producing bacteria isolated from *thua nao*. Maejo International Journal of Science and Technology. 3: 269-276.

Dike, E.N. and Odunfa, S.A. (2003). Microbiological and biochemical evaluation of a fermented soyabean product-Soy-dadawadwa. Journal of Food Science and Technology. 40: 606-610.

Farzana, K., Shah, S.N.H., Butt, F.B. and Awan, S.B. (2005). Biosynthesis of bacitracin in solid-state fermentation by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 18(1): 55-57.

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.

Leejeerajumnean, A. (2003). Thua nao: alkali fermented soybean from *Bacillus subtilis*. Silpakorn University International Journal. 3: 277-292.

Nickerson, K.W. and Bulla, L.A. Jr. (1975). Lipid metabolism during bacterial growth, sporulation and germination: an obligate nutritional requirement in *Bacillus thuringiensis* for compounds that stimulate fatty acid synthesis. Journal of Bacteriology. 123(2): 598-603.

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.

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.

Omafuvbe, B.O. (2008). Effect of temperature on biochemical changes induced by *Bacillus subtilis* (SDA3) during starter culture fermentation of soybean into condiment (soy-Daddawa). American Journal of Food Technology. 3: 33-41.

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.

Singer, S., Goodman, N.S. and Rogoff, M.H. (1966). Defined media for the study of Bacilli pathogenic to insects. Annals of the New York Academy of Sciences. 139(16): 16-23.

Taira, H., Tanaka, H. and Saito, M. (1989). Total sugar, free type of sugar, and free sugar contents of domestic soybean seeds. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 36: 968-980.

Taira, H., Tanaka, H., Saito, M. and Saito, M. (1990). Effect of cultivar, seed size and crop year on total and free sugar contents of domestic soybean. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology. 37: 203-213.

Taira, H. (1992). Quality and its variation on soybeans in Japan. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology. 39: 122-133.

Tamang, J.P. and Nikkuni, S. (1996). Selection of starter cultures for the production of kinema, a fermented soybean food of the Himalaya. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 12: 629-635.

Vora, D. and Shethna, Y.I. (1999). Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in oil seed meal extract media containing cystine. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 15: 747-749.

Watanabe, T., Ebine, H. and Ohta, T. (1975). Natto bacilli and their characteristics. In S.C. Kohrin (Ed.), Soybean Food (pp. 124-125). Tokyo.

Yada, R.Y. (2004). Protein in Food Processing. Boca Raton: CRC Press.

Zhao, S., Hu, N., Huang, J., Liang, Y. and Zhao, B. (2006). High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. Biotechnology Letters. 30: 295-297.

ภาคผนวก ง
จดอนุสิทธิบัตร

เลขที่อนุสิทธิบัตร 9285 อสป/200 - ธ

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
ให้อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึงสงคราม

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตร

เลขที่คำขอ	1203000378
วันยื่นคำขอรับอนุสิทธิบัตร	28 มีนาคม 2555
ผู้ประดิษฐ์	นางสาวเกตุการ ดาจันทา
เรื่องที่แสดงถึงการประดิษฐ์	ธาตุอาหารสลายเชื้อ *Bacillus subtilis* รวมกับเหลวจากแป้ง

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 22 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2557

หมดอายุ ณ วันที่ 27 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2581

(ลงชื่อ) .....

(นายสมศักดิ์ ศรีสันติธรกุล)

อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ 1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีในแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรจะสิ้นอายุ

2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวก็ได้

3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 คราว มีกำหนดคราวละ 1 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

019373

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

ภูมิหลังของศิลปหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

ในประเทศไทยมีรายงานการผลิตผงกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการผลิตอาหารหมักพื้นบ้านหลายชนิด เช่น ผงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับการผลิตหน่อไม้ปี๊บอ (วรรณทิชาและศรีเวียง, 2539) ผงกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter* สำหรับการผลิตน้ำส้มสายชู (รสสุคนธ์และนลา, 2532) และผงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับการผลิตปลาส้ม (ชุดินุช, 2543) เป็นต้น กระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อมีหลายวิธี เช่น วิธีการพ่นฝอย การทำแห้งด้วยวิธีการแช่เข็งแบบระเหิด และการใช้สารพยุง การผลิตผงกล้าเชื้อด้วยวิธีการใช้สารพยุงเป็นวิธีการที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำเนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือชั้นสูงที่มีราคาแพงเช่นเดียวกับวิธีการพ่นฝอยและการทำแห้งด้วยวิธีการแช่เข็งแบบระเหิดซึ่งต้องใช้เครื่อง spray dryer และ freeze-dryer ตามลำดับ จากรายงานของชุดินุช (2543) ที่ได้ศึกษาชนิดของแป้งที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารพยุงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตปลาส้ม โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR423 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 กรัม เปปโตน 10 กรัม อีสต์แอกซ์แทรกต์ 10 กรัม โซเดียมอะซิเตต 10 กรัม สารละลายบี (ประกอบด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม แมงกานีสซัลเฟต 10 กรัม เฟอร์รัสซัลเฟต 10 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) จำนวน 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงแยกเอาเฉพาะเซลล์ของแบคทีเรียนำไปผสมกับสารพยุงแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวเจ้าผสมแป้งข้าวเหนียวจะได้ผงกล้าเชื้อสำหรับหมักปลาส้ม ผลการศึกษาพบว่าแป้งทั้ง 3 ชนิดสามารถใช้เป็นสารพยุงที่ดีทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการรอดที่สูง

สำหรับการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีรายงานการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโมลาส (molasses broth medium) ซึ่งมีส่วนประกอบคือ โมลาส 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร (Younis et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานของโสพลและคณะ (2010) ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและกากถั่วเหลืองในเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* ในระดับอุตสาหกรรม และไวรุฬห์และคณะ (2550) ได้รายงานสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ 2 สูตร คือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาล 19.85 กรัม/ลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.35 กรัม/ลิตร และ

แมงกานีสซัลเฟตในไนโอเดรต 0.15 กรัม/ลิตร และสูตรที่มีกากถั่วเหลือง 20 กรัม/ลิตร กากน้ำตาล 3 กรัม/ลิตร และไดโปแตสเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัม/ลิตร สำหรับการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเหลวจากแป้งสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อสำหรับหมักถั่วเน่าหรือถั่วเหลืองหมักของไทยยังไม่พบการรายงาน ปัญหาที่พบในการประดิษฐ์ที่มีอยู่คือ ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ผลิตได้จากผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ตามการประดิษฐ์เดิมนั้น จะมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียมาก อีกทั้งยังอาจประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นสาเหตุให้ไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคเท่าที่ควร การประดิษฐ์นี้มีขึ้นเพื่อต้องการแก้ไขข้อบกพร่องดังกล่าว โดยการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ขึ้นมาใหม่ ที่ซึ่งมีราคาไม่สูง และสามารถทำได้ง่าย

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วยแป้งสาลี 200-400 กรัม น้ำตาลซูโครส 10 กรัม ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส 0.5 กรัม ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส 0.5 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงดังกล่าว เริ่มจากการนำส่วนผสมไปฆ่าเชื้อก่อนเติมแป้งสาลี และสารละลายแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จากนั้นนำแป้งสาลีหมักไปอบแห้ง แล้วบดในเครื่องปั่นป่นออกเป็นผงละเอียด

วัตถุประสงค์ในการประดิษฐ์อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งนี้ เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* ก่อนนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อชนิดผง ซึ่งนอกจากจะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาไม่สูงแล้วยังสามารถทำได้ง่าย และใช้เทคโนโลยีการผลิตที่ไม่ซับซ้อน กล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดผงที่ผลิตได้ตามการประดิษฐ์นี้ จะมีลักษณะภายนอกเป็นผงละเอียด สีขาวครีม ความชื้นร้อยละ 10 - 13 มีปริมาณเชื้อ *Bacillus subtilis* 10^{9}-10^{7} สปอร์ ในผงแป้ง 1 กรัม สามารถนำไปใช้ในการหมักถั่วเหลืองได้ 1 กิโลกรัม ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ผลิตได้จาก ผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ตามการประดิษฐ์นี้ จะมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียน้อยกว่าการหมักด้วยวิธีดั้งเดิม ปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากกว่าถั่วเหลืองที่หมักด้วยวิธีดั้งเดิม

การปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วย

น้ำตาลซูโครส	10	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส	0.5	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

แป้งสาลี 200-400 กรัม

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง มีขั้นตอนเริ่มจากการละลายส่วนประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งทั้งหมดในน้ำกลั่น โดยยกเว้นแป้งสาลีที่ทำการแยกส่วนในการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ในอัตราร้อยละ 20 - 40 ของน้ำหนัก แล้วจึงเขย่าผสมให้เข้ากันดี

เพื่อให้ได้หัวเชื้อ *Bacillus subtilis* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง มีขั้นตอนเริ่มจาก การเพาะเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 – 48 ชั่วโมง แล้วจึงเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ในอัตราส่วนร้อยละ 2 - 4 โดยปริมาตร ก่อนทำการบ่มในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 - 48 ชั่วโมง

จากนั้นจึงเติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งที่ผ่านการบ่มเรียบร้อยแล้วในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปหมักต่อในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง

จากนั้นจึงทำการอบแห้งแป้งหมักในตู้อบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 - 6 ชั่วโมง แล้วจึงบดแป้งหมักอบแห้งในเครื่องปั่นปลอดเชื้อจนเป็นผงละเอียด จึงจะได้กัมเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดผง

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถือสิทธิ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ที่มีลักษณะเฉพาะประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส	0.5	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
แป้งสาลี	200-400	กรัม

2. กรรมวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามข้อถือสิทธิ 1 มีขั้นตอนดังนี้

ละลายส่วนประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งทั้งหมดในน้ำกลั่น โดยยกเว้นแป้งสาลีที่ทำการแยกส่วนในการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ในอัตราร้อยละ 20 - 40 ของน้ำหนัก แล้วจึงผสมให้เข้ากัน

3. กรรมวิธีการเตรียมผงคลัสเชื้อ *Bacillus subtilis* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามข้อถือสิทธิ 1 มีขั้นตอนดังนี้

เพาะเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 – 48 ชั่วโมง แล้วจึงเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ตามข้อถือสิทธิ 1 ในอัตราส่วนร้อยละ 2 - 4 โดยปริมาตร ก่อนทำการบ่มในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 - 48 ชั่วโมง แล้วจึง

เติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งที่ผ่านการบ่มเรียบร้อยแล้วในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปบ่มต่อในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึง

ทำการอบแห้งผงแป้งหมักในตู้อบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 - 6 ชั่วโมง แล้วจึงบดแป้งหมักอบแห้งในเครื่องปั่นป่นปลอดเชื้อจนเป็นผงละเอียด

บทสรุปการประดิษฐ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วยแป้งสาลี น้ำตาลซูโครส โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส และน้ำกลั่น โดยมีขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงดังกล่าว เริ่มด้วยการนำส่วนผสมไปผ่านเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ แล้วเติมแป้งสาลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ก่อนจะเขย่าผสมให้เข้ากันดี

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายจักรกฤษ แจ่มจันทร์
วัน เดือน ปีเกิด	31 ธันวาคม 2531
ที่อยู่ปัจจุบัน	12/2 หมู่ 3 ตำบลซุมแสงสงคราม อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก 65240

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2550	มัธยมศึกษาปีที่ 6 (สายวิทย์-คณิต) โรงเรียนบ้านกร่างวิทยาคม
พ.ศ. 2554	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
พ.ศ. 2558	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม