บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกและการจำแนกเชื้อจากถั่วเหลืองหมักพื้นบ้าน (ถั่วเน่า)

เชื้อจุลินทรีย์ในจีนัส บาซิลลัส (*Bacillus* spp.) เป็นเชื้อที่มีบทบาทในกระบวนการหมักถั่วเหลืองโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักพื้นบ้านของไทย (Sundhagul *et al*., 1972) ดังนั้นเพื่อให้ได้เชื้อที่ต้องการ และกำจัดเชื้ออื่นที่มีการปนเปื้อนจากตัวอย่างออกไปจึงอาศัยคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อชนิดนี้ซึ่งมีการสร้างเอนโดสปอร์ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดได้ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง อาทิเช่น ความร้อน และความแห้งแล้ง เป็นต้น ดังนั้น ก่อนทำการคัดแยกเชื้อจะนำตัวอย่างที่ได้ไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เหลือเพียงเชื้อในกลุ่มที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์เท่านั้น จึงนำไปทำการคัดแยกเชื้อโดยวิธีการ Pour plate ลงบนอาหาร Plate Count Agar (PCA) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory, 2005) พบว่าลักษณะของเชื้อจากตัวอย่างถั่วเน่าได้ทำการเก็บจาก 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบนมีโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันทั้งหมดเป็นจำนวน 63 ไอโซเลท ตามที่แสดงไว้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วเน่า

เชื้อ	ลักษณะโคโลนี
เชื้อลำปาง 01 (LG 01)	กลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 mm ขอบขรุขระ สีครีม ขุ่น
เชื้อลำปาง 02 (LG 02)	กลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น
เชื้อลำปาง 03 (LG 03)	กลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น
เชื้อลำปาง 04 (LG 04)	กลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 mm ขอบขรุขระ สีครีม ขุ่น
เชื้อลำปาง 05 (LG 05)	กลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น
เชื้อลำปาง 06 (LG 06)	กลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น
เชื้อลำปาง 07 (LG 07)	กลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วเน่า

เชื้อ	ลักษณะโคโลนี
เชื้อลำปาง 08 (LG 08)	กลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อลำปาง 09 (LG 09)	กลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.8 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อลำปาง 10 (LG 10)	กลม นูน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.2 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น
เชื้อลำปาง 11 (LG 11)	กลม นูน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น
เชื้อลำปาง 12 (LG 12)	กลม นูน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อพะเยา 01 (PY 01)	กลม นูน เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น สร้างสารเมือก ผิวหน้ามัน
เชื้อพะเยา 02 (PY 02)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.4 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อพะเยา 03 (PY 03)	กลมรี เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น สร้างสารเมือกใส ผิวหน้ามัน
เชื้อพะเยา 04 (PY 04)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น สร้างสารเมือก ผิวหน้าด้าน
เชื้อแม่ฮ่องสอน 01 (MH 01)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อแม่ฮ่องสอน 02 (MH 02)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อแม่ฮ่องสอน 03 (MH 03)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าด้านคล้ายเม็ดทราย
เชื้อแม่ฮ่องสอน 04 (MH 04)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ตรงกลางนูน
เชื้อแม่ฮ่องสอน 05 (MH 05)	กลม นูน เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อแม่ฮ่องสอน 06 (MH 06)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น ผิวหน้ามัน
เชื้อแพร่ 01 (PR 01)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้ามัน
เชื้อแพร่ 02 (PR 02)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าด้าน
เชื้อแพร่ 03 (PR 03)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้ามัน
เชื้อแพร่ 04 (PR 04)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้ามัน
เชื้อแพร่ 05 (PR 05)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วเน่า

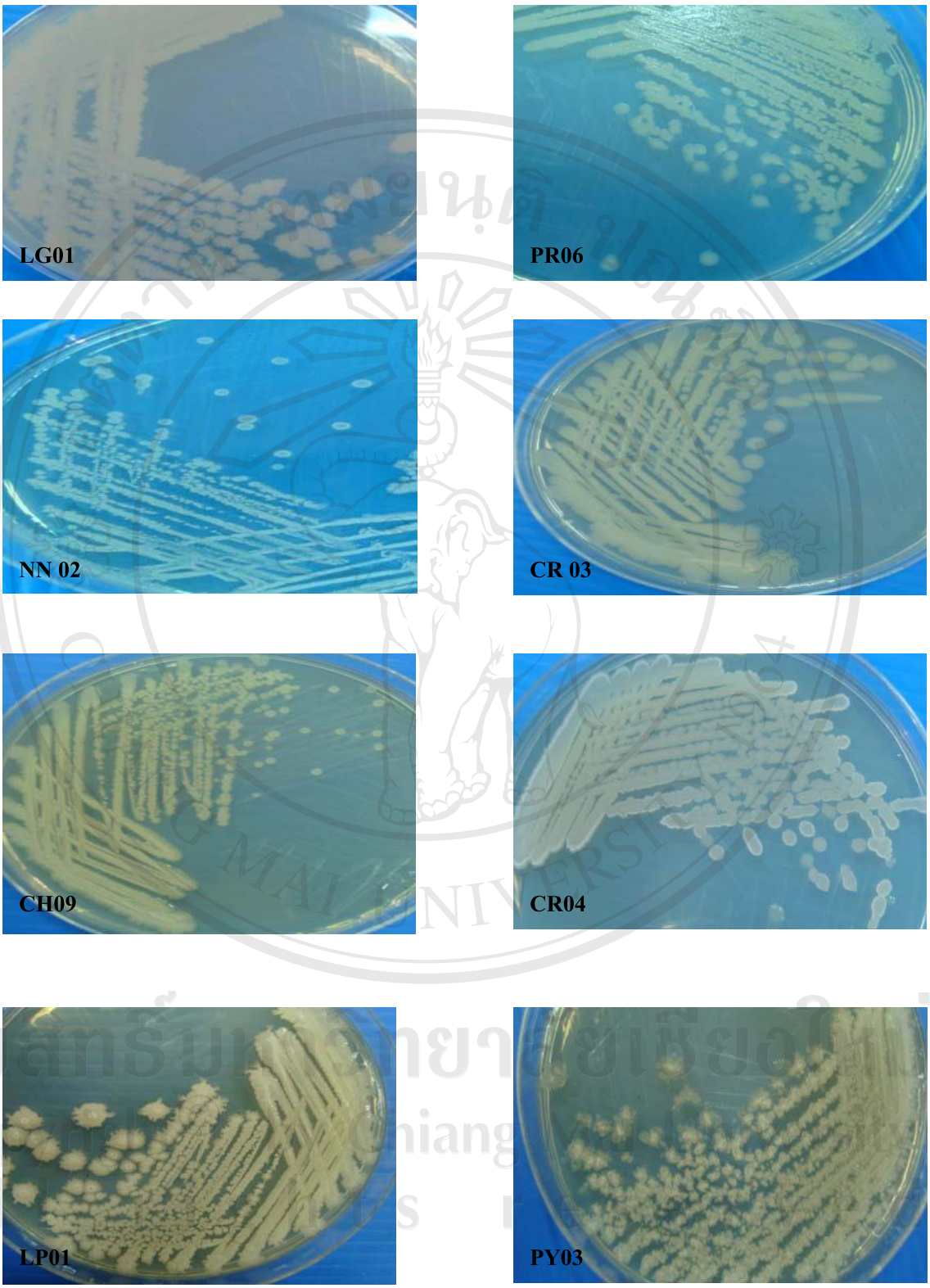
เชื้อ	ลักษณะโคโลนี
เชื้อแพร่ 06 (PR 06)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้ามัน
เชื้อแพร่ 07 (PR 07)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อแพร่ 08 (PR 08)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น
เชื้อแพร่ 09 (PR 09)	กลมรี เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 mm ขอบขรุขระ สีครีม ขุ่น
เชื้อลำพูน 01 (LP 01)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 mm ขอบขรุขระ สีครีม ผิวหน้าย่น
เชื้อลำพูน 02 (LP 02)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น ตรงกลางนูนขึ้น
เชื้อลำพูน 03 (LP 03)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าย่น
เชื้อลำพูน 04 (LP 04)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าย่น
เชื้อลำพูน 05 (LP 05)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5 mm ขอบขรุขระ สีขาว ผิวหน้าย่น
เชื้อเชียงใหม่ 01 (CH 01)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น
เชื้อเชียงใหม่ 02 (CH 02)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 mm ขอบขรุขระ สีขาว ผิวหน้าย่น
เชื้อเชียงใหม่ 03 (CH 03)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อเชียงใหม่ 04 (CH 04)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อเชียงใหม่ 05 (CH 05)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 mm ขอบขรุขระ สีครีม ขุ่น
เชื้อเชียงใหม่ 06 (CH 06)	กลม นูน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.4 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น
เชื้อเชียงใหม่ 07 (CH 07)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 mm ขอบขรุขระ สีครีม ผิวหน้าย่น
เชื้อเชียงใหม่ 08 (CH 08)	กลม นูน เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.3 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อเชียงใหม่ 09 (CH 09)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 mm ขอบขรุขระ สีครีม ขุ่น
เชื้อเชียงใหม่ 10 (CH 10)	กลม นูน เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.4 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น
เชื้อเชียงใหม่ 11 (CH 11)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น ตรงกลางนูน
เชื้อเชียงราย 01 (CR 01)	กลม นูน เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าย่น
เชื้อเชียงราย 02 (CR 02)	กลม นูน เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าย่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วเน่า

เชื้อ	ลักษณะโคโลนี
เชื้อเชียงราย 03 (CR 03)	กลม นูน เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น สร้างสารเมือกเยิ้ม
เชื้อเชียงราย 04 (CR 04)	กลมรี นูน เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น สร้างสารเมือกเยิ้ม
เชื้อเชียงราย 05 (CR 05)	กลม นูน เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าย่น
เชื้อเชียงราย 06 (CR 06)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าย่น
เชื้อน่าน 01 (NN 01)	กลมรี เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้ามัน
เชื้อน่าน 02 (NN 02)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 9.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าด้าน
เชื้อน่าน 03 (NN 03)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 8.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้ามัน ตรงกลางนูน
เชื้อน่าน 04 (NN 04)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 10.0 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น
เชื้อน่าน 05 (NN 05)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 8.6 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้ามัน
เชื้อน่าน 06 (NN 06)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าย่น
เชื้อน่าน 07 (NN 07)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.2 mm ขอบขรุขระ สีขาว ขุ่น ผิวหน้าย่น
เชื้อน่าน 08 (NN 08)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.1 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น ผิวหน้ามัน
เชื้อน่าน 09 (NN 09)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 mm ขอบเรียบ สีครีม ขุ่น ผิวหน้าด้าน
เชื้อน่าน10 (NN 10)	กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.4 mm ขอบเรียบ สีขาว ขุ่น ผิวหน้ามัน สร้างสารเมือกเยิ้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วเน่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Plate Count Agar เป็นอาหารที่ไม่สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ ดังนั้นจึงต้องนำเชื้อที่ได้ 63 ไอโซเลทไปทำการจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อต่อไปเพื่อให้ทราบว่าเชื้อทั้งหมดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ใดโดยเริ่มแรกได้นำไปทำการย้อมสีกรัม (Gram stain) จากนั้นนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า โดยใช้เลนส์หัวน้ำมัน เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง การติดสีของเซลล์ และตำแหน่งในการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อ เพื่อให้การปฏิบัติงานและการรายงานผลสะดวกจึงใช้รหัสแทนเชื้อแต่ละไอโซเลทแสดงไว้ในวงเล็บของ ตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.2 ลักษณะของเซลล์และการติดสีกรัมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยกจากถั่วเน่า

รหัสเชื้อจุลินทรีย์	การติดสีกรัม	รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์	ตำแหน่งของเอนโดสปอร์
LG 01	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LG 02	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
LG 03	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
LG 04	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LG 05	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LG 06	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
LG 07	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LG 08	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LG 09	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
LG 10	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LG 11	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LG 12	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
PY 01	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
PY 02	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
PY 03	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
PY 04	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
MH 01	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะของเซลล์และการติดสีกรัมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยกจากถั่วเน่า

รหัสเชื้อจุลินทรีย์	การติดสีกรัม	รูปร่าง/การเรียงตัวของเซลล์	ตำแหน่งของเอนโดสปอร์
MH 02	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
MH 03	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
MH 04	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
MH 05	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
MH 06	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
PR 01	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
PR 02	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
PR 03	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
PR 04	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
PR 05	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
PR 06	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
PR 07	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
PR 08	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
PR 09	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LP 01	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LP 02	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LP 03	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LP 04	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
LP 05	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CH 01	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CH 02	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CH 03	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CH 04	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

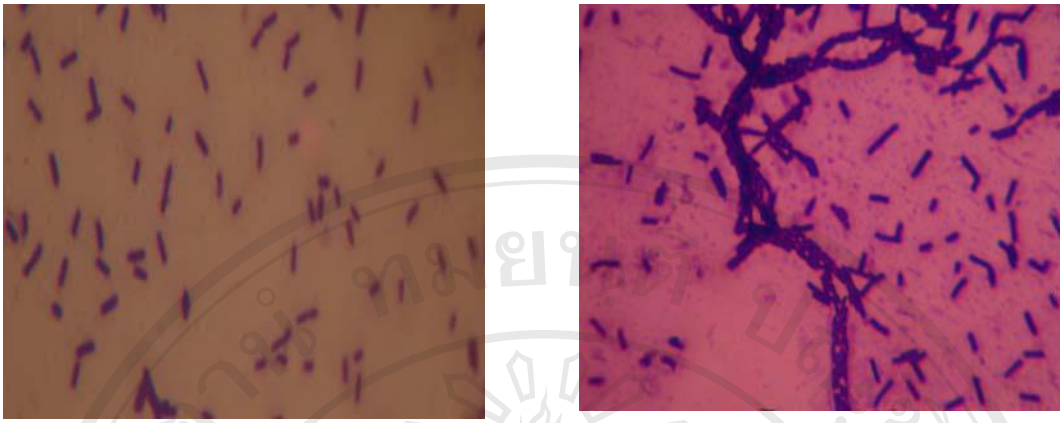
ตารางที่ 4.2 (ต่อ) ลักษณะของเซลล์และการติดสีกรัมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแยกจากถั่วเน่า

รหัสเชื้อจุลินทรีย์	การติดสีกรัม	รูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์	ตำแหน่งของเอนโดสปอร์
CH 05	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CH 06	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CH 07	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
CH 08	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CH 09	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CH 10	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CH 11	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CR 01	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
CR 02	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CR 03	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CR 04	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CR 05	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
CR 06	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
NN 01	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
NN 02	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
NN 03	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
NN 04	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
NN 05	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
NN 06	+	Rod/อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว	กึ่งกลางของเซลล์
NN 07	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
NN 08	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
NN 09	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์
NN 10	+	Rod/ต่อกันเป็นสาย	กึ่งกลางของเซลล์

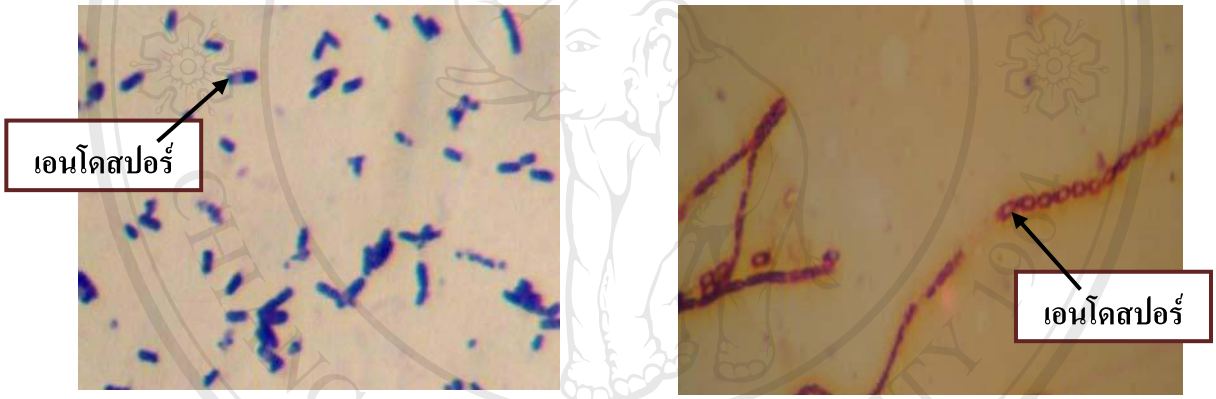
หมายเหตุ + **หมายถึง เซลล์ย้อมติดสีม่วงแกมน้ำเงินของ Crystal violet**

\- **หมายถึง เซลล์ย้อมติดสีชมพูของ Safranin**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.2 ตัวอย่างลักษณะเชื้อในจีนัสบาซิลัสที่ 18 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.3 ตัวอย่างลักษณะเชื้อในจีนัสบาซิลัส ที่ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.2 พบว่าเชื้อที่ทำการคัดแยกเป็นเชื้อที่มีรูปแท่ง โดยมีการเรียงตัวกันทั้งแบบเซลล์เดี่ยว ต่อกันเป็นคู่ และ ต่อกันเป็นสาย ติดสีกรัมบวก และสามารถสร้างเอนโดสปอร์ตรงกึ่งกลางของเซลล์

การบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อโดยทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในระบบเมทาบอลิซึมของเชื้อได้ทำการทดสอบตามตารางที่ 3.1 เนื่องจากในการศึกษานี้มีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาการหมักถั่วเหลืองเพื่อบริโภคโดยจะใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพนำมาใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ดังนั้นการจำแนกเชื้อจึงมุ่งเน้นไปที่เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคซึ่งผู้วิจัยได้ทำการสืบค้นข้อมูลพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในการผลิตถั่วเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมักซึ่งเชื้อที่ได้รับการรับรองเป็นเชื้อที่ระบุ GRAS (generally regarded as safe) จาก องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Federal Drug Administration, FDA) จัดว่าเป็น จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างปลอดภัย (Citizendium, 2009) นอกจากนี้ *Bacillus megaterium* ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่พบได้ในอาหารหมักทั่วไป เช่น คินีมาผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของประเทศอินเดีย (Sarkar *et al*., 2002) และผลิตภัณฑ์น้ำปลา (Crisan and Sand, 1975) เป็นต้น อีกทั้งเชื้อนี้สามารถพบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์โดยไม่ก่อให้เกิดโรคในบุคคลที่มีสุขภาพปกติ

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่สร้างเอนโดสปอร์

เชื้อจุลินทรีย์	Allantoin required	Catalase test	Voges-Proskauer	Acid and gas from glucose	Anaerobe growth	Growth at 65°C	Width of rod 1 µm or greater	Hydrolysis of starch
LG 01	-	+	+	-	-	-	+	+
LG 02	-	+	+	-	+	-	+	-
LG 03	-	+	+	-	-	-	+	+
LG 04	-	+	+	-	-	-	-	+
LG 05	-	+	+	-	-	-	+	+
LG 06	-	+	-	-	-	-	+	+
LG 07	-	+	+	-	+	-	+	-
LG 08	-	+	+	-	+	-	+	-
LG 09	-	+	+	-	-	-	+	+
LG 10	-	+	+	-	-	-	+	+
LG 11	-	+	+	-	-	-	+	+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่สร้างเอนโดสปอร์

เชื้อจุลินทรีย์	Allantoin required	Catalase test	Voges-Proskauer	Acid and gas from glucose	Anaerobe growth	Growth at 65°C	Width of rod 1 µm or greater	Hydrolysis of starch
LG 12	-	+	+	-	+	-	+	-
PY 01	-	+	+	-	+	-	+	+
PY 02	-	+	+	-	+	-	+	+
PY 03	-	+	-	-	+	-	+	+
PY 04	-	+	+	-	-	-	+	+
MH 01	-	+	-	-	+	-	-	-
MH 02	-	+	-	-	+	-	+	-
MH 03	-	+	+	-	-	-	+	+
MH 04	-	+	+	-	-	-	+	+
MH 05	-	+	-	-	-	-	+	+
MH 06	-	+	+	-	+	-	+	-
PR 01	-	+	+	-	+	-	+	+
PR 02	-	+	+	-	-	-	+	+
PR 03	-	+	-	-	+	-	+	+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่สร้างเอนโดสปอร์

เชื้อจุลินทรีย์	Allantoin required	Catalase test	Voges-Proskauer	Acid and gas from glucose	Anaerobe growth	Growth at 65°C	Width of rod 1 µm or greater	Hydrolysis of starch
PR 04	-	+	-	-	-	-	+	+
PR 05	-	+	-	+	+	-	+	-
PR 06	-	+	-	-	-	-	-	-
PR 07	-	+	+	-	-	-	+	+
PR 08	-	+	+	-	-	-	+	-
PR 09	-	+	-	-	-	-	+	-
LP 01	-	+	+	-	-	-	+	+
LP 02	-	+	+	-	-	-	-	+
LP 03	-	+	-	-	+	-	+	+
LP 04	-	+	+	-	+	-	-	+
LP 05	-	+	+	-	-	-	+	+
CH 01	-	+	-	-	-	-	-	+
CH 02	-	+	+	-	-	-	+	+
CH 03	-	+	+	-	+	-	+	+
CH 04	-	+	+	-	-	-	+	+
CH 05	-	+	+	-	+	-	+	+
CH 06	-	+	+	-	-	-	-	+
CH 07	-	+	+	-	-	-	+	+
CH 08	-	+	+	-	+	-	+	+

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของ แบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่สร้างเอนโดสปอร์

เชื้อจุลินทรีย์	Allantoin required	Catalase test	Voges-Proskauer	Acid and gas from glucose	Anaerobe growth	Growth at 65°C	Width of rod 1 µm or greater	Hydrolysis of starch
CH 09	-	+	+	-	-	-	+	+
CH 10	-	+	+	-	-	-	+	+
CH 11	-	+	+	-	-	-	+	+
CR 01	-	+	+	-	-	-	+	+
CR 02	-	+	+	-	-	-	+	+
CR 03	-	+	+	-	-	-	+	-
CR 04	-	+	+	-	-	-	+	+
CR 05	-	+	+	-	-	-	+	-
CR 06	-	+	+	-	-	-	-	+
NN 01	-	+	-	-	+	-	+	+
NN 02	-	+	+	-	+	-	+	+
NN 03	-	+	+	-	+	-	+	+
NN 04	-	+	+	-	+	-	-	+
NN 05	-	+	+	-	+	-	+	+
NN 06	-	+	+	-	+	-	-	+
NN 07	-	+	+	-	-	-	-	+
NN 08	-	+	+	-	+	-	+	+
NN 09	-	+	+	-	+	-	+	+
NN 10	-	+	+	-	-	-	+	+

หมายเหตุ + ผลการทดสอบเป็นบวก

_ ผลการทดสอบเป็นลบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบเชื้อทั้งหมด 63 ไอโซเลท แสดงผลการทดสอบเชื้อดังตารางที่ 4.3 เมื่อทำการแปลผลพบว่ามีเชื้อสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* จำนวนทั้งหมด 25 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท LG01, LG03, LG04, LG05, LG09, LG10, LG11, MH03, MH04, LP01, LP02, LP05, CR01, CR02, CR04, CR06, PR02, PY04, CH06,CH07, CH09, CH10, CH11, NN07 และ NN10 สำหรับเชื้อสายพันธุ์ *Bacillus megaterium* มีจำนวนทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท MH05, LP03, PY03 และ PR04

4.2 การคัดเลือกเชื้อเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นและศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมักจากเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

4.2.1 การคัดเลือกเชื้อเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

สำหรับการคัดเลือกเชื้อเพื่อนำไปผลิตเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น มีการนำเชื้อไปทำการหมักถั่วเหลืองด้วยวิธีดั้งเดิมซึ่งจะมีการบรรจุถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มเป็นเวลา 3 ชั่วโมงลงในกระติ๊บที่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วย Autoclave และ Inoculate เชื้อแต่ละไอโซเลทลงไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycones ได้แก่ ไดซิอิน (Daidzein) และเจนิสทิอิน (Genistein)

ตารางที่ 4.4 ปริมาณไอโซฟลาโวน (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักและถั่วเน่า

ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ/ถั่วเน่า	ไอโซฟลาโวน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)		
	เจนิสทิอิน	ไดซิอิน	ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม
Bacillus subtilis LG01	91.81±5.42^{u}	80.16±5.31^{l}	171.97±10.73^{r}
Bacillus subtilis LG03	92.00±2.17^{u}	75.89±1.51^{k}	167.90±3.68^{qr}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ปริมาณไอโซฟลาโวน (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักและถั่วเน่า

ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ/ถั่วเน่า	ไอโซฟลาโวน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)		
	เจนิสทิอิน	ไดซิอิน	ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม
Bacillus subtilis LG04	71.06±3.53^{r}	66.84±3.67^{e}	137.90±7.20^{l}
Bacillus subtilis LG05	78.30±0.8^{s}	69.09±0.76^{f}	147.38±1.54^{mn}
Bacillus subtilis LG09	91.84±3.24^{u}	73.23±3.17^{j}	165.08±7.82^{q}
Bacillus subtilis LG10	87.99±3.71^{t}	72.90±2.25^{j}	160.89±5.94^{p}
Bacillus subtilis LG11	78.44±5.67^{s}	72.14±4.46^{hi}	150.58±10.10^{no}
Bacillus subtilis MH03	51.56±0.76^{n}	80.48±0.64^{lm}	132.04±1.38^{jk}
Bacillus subtilis MH04	52.17±0.31^{o}	83.26±0.56^{op}	135.42±0.6^{kl}
Bacillus megaterium MH05	34.58±0.40^{i}	62.60±0.73^{c}	97.18±1.01^{d}
Bacillus subtilis PR02	63.94±1.03^{q}	90.81±0.36^{r}	154.76±1.39^{o}
Bacillus megaterium PR04	63.90±1.38^{q}	82.89±1.35^{o}	146.80±2.71^{mn}
Bacillus subtilis NN07	24.43±0.61^{cd}	72.92±0.37^{ij}	97.35±0.24^{d}
Bacillus subtilis NN10	25.68±0.59^{f}	96.24±1.53^{t}	121.92±2.11^{hi}
Bacillus megaterium PY03	56.22±1.87^{p}	92.30±2.17^{s}	148.58±4.02^{n}
Bacillus subtilis PY04	30.39±0.96^{h}	83.64±0.21^{p}	114.03±1.17^{fg}
Bacillus subtilis CR01	35.43±0.48^{j}	81.00±0.03^{m}	116.43±0.45^{g}
Bacillus subtilis CR02	36.04±1.64^{j}	71.23±0.75^{g}	107.27±1.59^{e}
Bacillus subtilis CR04	38.49±0.49^{k}	71.94±1.25^{h}	110.43±1.60^{ef}
Bacillus subtilis CR06	15.66±0.11^{a}	80.65±1.67^{lm}	96.31±1.78^{d}
Bacillus subtilis CH06	47.77± 1.13^{m}	82.04±1.37^{n}	129.80±1.81 ^{ij}
Bacillus subtilis CH07	23.45 ± 0.65^{b}	55.79±0.48^{b}	79.24±0.88^{b}
Bacillus subtilis CH09	43.91± 0.26^{l}	82.00±2.18^{n}	125.91±2.42^{h}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ปริมาณไอโซฟลาโวน (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักและถั่วเน่า

ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ/ ถั่วเน่า	ไอโซฟลาโวน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)		
	เจนิสทิอิน	ไดซิอิน	ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม
Bacillus subtilis CH10	24.87± 3.84 ^{de}	65.07±10.1 ^{d}	89.94±14.0 ^{c}
Bacillus subtilis CH11	23.76± 0.80 ^{bc}	62.45±0.67 ^{c}	86.20±1.45 ^{c}
Bacillus subtilis LP01	43.95±0.86 ^{l}	99.66±0.62 ^{u}	143.61±1.48 ^{m}
Bacillus subtilis LP02	29.43±0.87 ^{g}	65.26±0.69 ^{d}	94.69±1.35 ^{d}
Bacillus megaterium LP03	43.64±0.88 ^{l}	87.67±1.07 ^{q}	131.32±1.92 ^{ijk}
Bacillus subtilis LP05	47.38±1.91 ^{m}	90.42±1.22 ^{r}	137.80±2.16 ^{l}
ตัวอย่างถั่วเหลืองต้ม	15.53±0.46 ^{a}	25.28±0.11 ^{a}	40.01±0.58 ^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

หลังจากการหมักถั่วเหลืองพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อได้เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะของถั่วเหลืองหมัก

กลุ่มแรก คือ กลุ่มเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อหมักถั่วเหลืองแล้วไม่มีการสร้างพอลิเมอร์ ได้แก่ ไอโซเลท LG01, LG03, LG04, LG05, LG09, LG10, LG11, MH03, MH04, LP01, LP02, LP05, CR01, CR02, PR02, PY04, CH06, CH07, CH09, CH10, CH11 และ NN10 เพื่อความสะดวกจึงแสดงให้เห็นว่าเป็นเชื้อกลุ่มนี้โดยจะมีการเพิ่มคำว่า THUANAO และต่อท้ายด้วยรหัสเชื้อ ดังตัวอย่างเช่น *Bacillus subtilis* THUANAOLG01

กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งหมักถั่วเหลืองแล้วมีการสร้างพอลิเมอร์ที่ลักษณะคล้ายนัตโต ได้แก่ CR04, NN07 และ CR06 เพื่อแสดงให้ทราบว่าเชื้อเหล่านี้อยู่ในกลุ่มที่สามารถสร้างพอลิเมอร์มีลักษณะเป็นเมือกคล้ายกับที่เกิดในผลิตภัณฑ์นัตโต จึงจะมีการเพิ่มคำว่า NATTO และต่อท้ายด้วยรหัสเชื้อ ดังตัวอย่าง เช่น *Bacillus subtilis* NATTOCR04

กลุ่มที่สาม คือ กลุ่มเชื้อ *Bacillus megaterium* ได้แก่ MH05, LP03, PY03 และ PR04

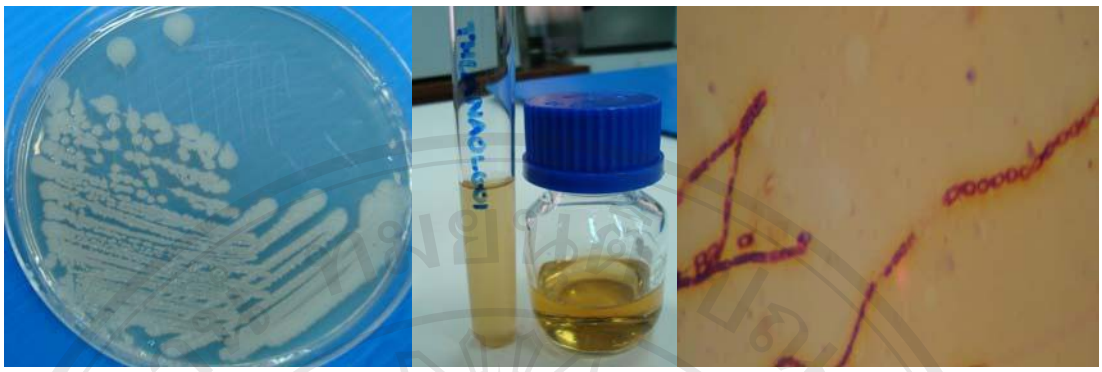
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด ไดซิอินและเจนิสทิอินของสิ่งทดลองทั้งหมด ดังตารางที่ 4.4 พบว่าปริมาณไอโซฟลาโวนชนิดไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมในถั่วเหลืองหมักจากเชื้อแต่ละไอโซเลท และตัวอย่างถั่วเหลืองต้ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) สาเหตุที่ทำให้ถั่วเหลืองหมักจากเชื้อในจีนัส *Bacillus* spp. มีค่าปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมแตกต่างกันอาจเกิดจากเชื้อต่างสายพันธุ์กันนั้นมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ β-glucosidase ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Choi *et al*. (2002) มีความสนใจเอนไซม์ β-glucosidase ในการย่อยไอโซฟลาโวนชนิด Glycosides ด้วยเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* spp. เพื่อให้ได้ไดซิอินและเจนิสทิอิน พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 4 สายพันธุ์มีเพียงสายพันธุ์เดียวคือ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 เท่านั้นที่สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวออกมาย่อยเจนิสทิน (Genistin) และ ไดซิน(Daidzin) ซึ่งเป็นสับสเตรทได้หมดทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MRS และในน้ำนมถั่วเหลือง ส่วนสายพันธุ์ที่เหลือก็มีความสามารถในการย่อยสับสเตรทในปริมาณที่แตกต่างกันไป

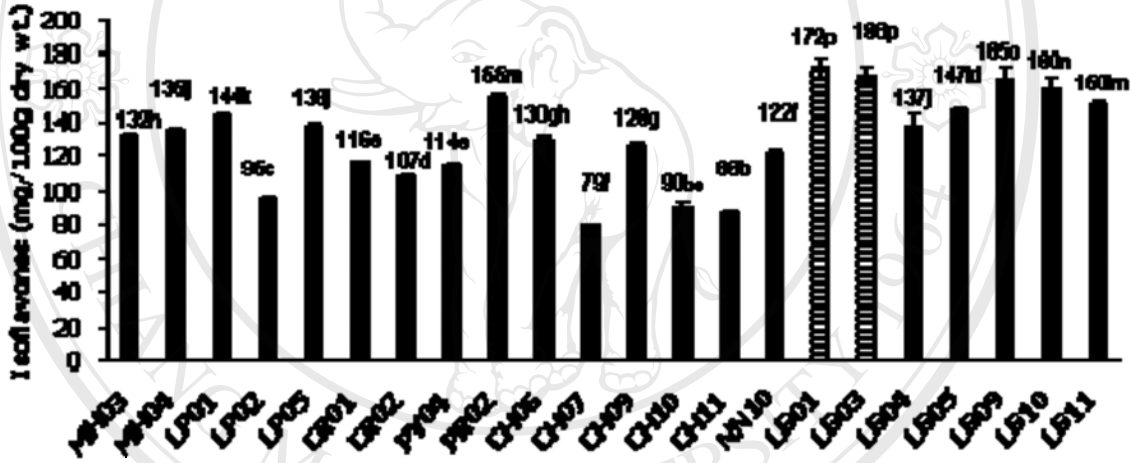
เมื่อทำการแบ่งกลุ่มของเชื้อตามลักษณะของถั่วเหลืองหมักได้ทั้งหมดเป็น 3 กลุ่มแล้วจึงนำปริมาณไอโซฟลาโวนรวมของสมาชิกในแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และทำการแบ่งกลุ่มของเชื้อที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ภาพที่ 4.5 แสดงปริมาณไอโซฟลาโวนรวมจากถั่วเหลืองที่ทำการหมักจากเชื้อในกลุ่มแรกคือกลุ่มของเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งหมักถั่วเหลืองแล้วไม่มีการสร้างสารพอลิเมอร์ เชื้อที่มีความสามารถโดดเด่นในการผลิตถั่วเหลืองให้มีปริมาณไอโซฟลาโวนสูง คือ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 และ *Bacillus subtilis* THUANAOLG03 ซึ่งถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักจากเชื้อทั้งสองชนิดมีค่าปริมาณไอโซฟลาโวนที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยมีปริมาณไอโซฟลาโวนรวมถึง 172.00 ± 5.98 และ 168.00 ± 3.68 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แต่เพื่อการผลิตถั่วเหลืองให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตไอโซฟลาโวนจึงเลือกเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 (ภาพที่ 4.4) ซึ่งมีความสามารถได้สูงสุดในกลุ่มเพื่อนำมาใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลองขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.4 เชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 **บนอาหารแข็ง อาหารเหลว และ ในกล้องจุลทรรศน์**



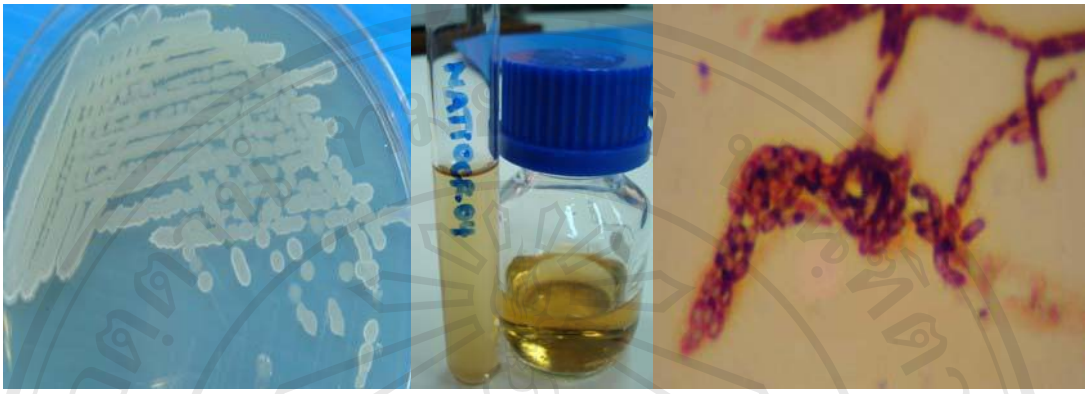
ภาพที่ 4.5 ปริมาณไอโซฟลาโวนรวมในถั่วเหลืองหมักจากเชื้อ *Bacillus subtilis* **ในกลุ่มที่ไม่มีการสร้างสารพอลิเมอร์**

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงผลข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

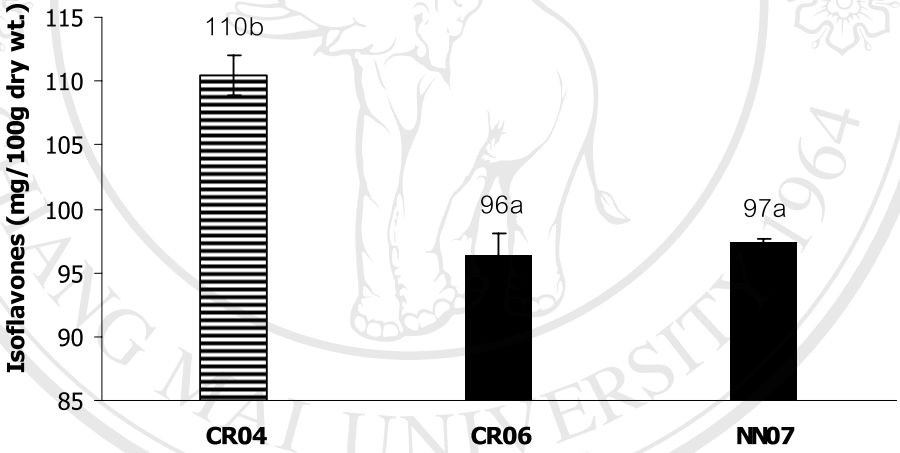
เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนของถั่วเหลืองที่หมักจากเชื้อในกลุ่มที่สองซึ่งเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างพอลิเมอร์ลักษณะเป็นเมือกคล้ายกับในผลิตภัณฑ์นัตโต โดยกลุ่มนี้ประกอบด้วยสมาชิกทั้งหมด 3 ไอโซเลท จากภาพที่ 4.7 พบว่าเชื้อที่สามารถผลิตถั่วเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมักแล้วมีปริมาณไอโซฟลาโวนรวมสูงที่สุดในกลุ่มนี้คือ *Bacillus subtilis* NATTOCR04 (ภาพที่ 4.6) ซึ่งสามารถผลิตได้ 110 ± 1.16 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง



ภาพที่ 4.6 เชื้อ *Bacillus subtilis* NATTOCR04 **บนอาหารแข็ง อาหารเหลว และ ในกล้องจุลทรรศน์**



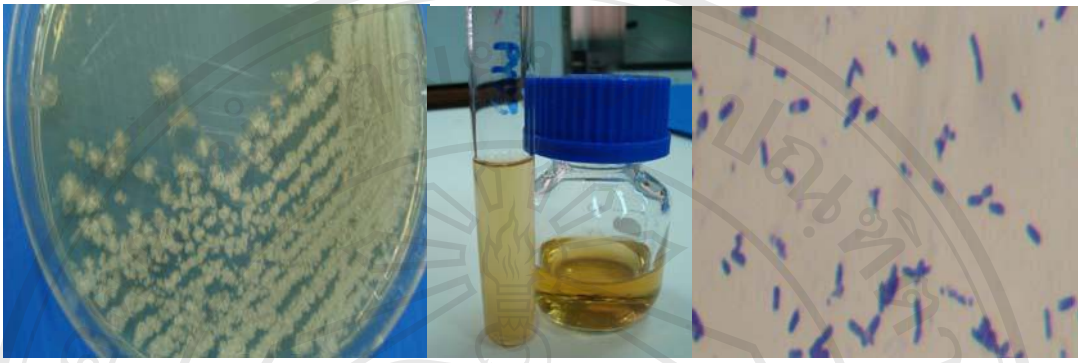
ภาพที่ 4.7 ปริมาณไอโซฟลาโวนรวมในถั่วเหลืองหมักจากเชื้อ *Bacillus subtilis* **ในกลุ่มที่มีการสร้างสารพอลิเมอร์คล้ายนัตโต**

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงผลข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

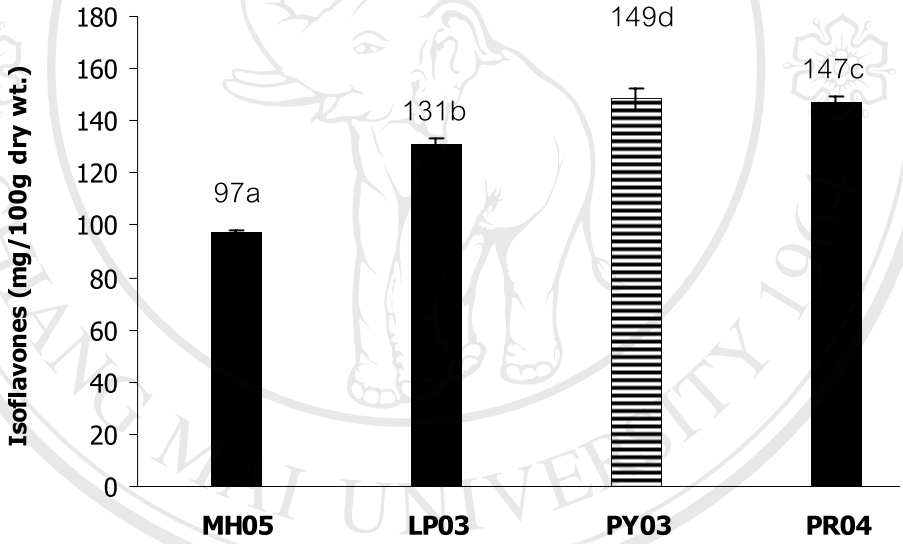
ภาพที่ 4.9 พบว่าเชื้อในกลุ่มของ *Bacillus megaterium* สามารถหมักถั่วเหลืองแล้วทำให้มีปริมาณของไอโซฟลาโวนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* PY03 เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการหมักถั่วเหลืองแล้วส่งผลให้มีปริมาณไอโซฟลาโวนสูงที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับเชื้อในกลุ่ม โดยปริมาณไอโซฟลาโวนที่ได้ คือ 149 ± 4.02 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม



ภาพที่ 4.8 เชื้อ *Bacillus megaterium* PY03 บนอาหารแข็ง อาหารเหลว และ ในกล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 4.9 ปริมาณไอโซฟลาโวนรวมในถั่วเหลืองหมักจากเชื้อ *Bacillus megaterium*

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงผลข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาปริมาณไอโซฟลาโวนรวม ไดซิอินและเจนิสทิอิน รวมถึงคุณลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก เช่น สี กลิ่น และ เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่ได้ พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก เช่นเดียวกับดาวาดาวา ผลิตภัณฑ์ถั่ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหลืองหมักพื้นบ้านจากทวีปแอฟริกา (Terlabie *et al*., 2006) และคีนิมาผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักจากอินเดีย (Tamang *et al*., 1996) ซึ่งได้ศึกษาผลของเชื้อต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ พบว่าการใช้เชื้อสายพันธุ์ (strain) ต่างกันจะส่งผลโดยตรงต่อการหมัก คุณภาพของผลิตภัณฑ์ และการยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อที่มีความเหมาะสมเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมักจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณลักษณะตามความต้องการและเพื่อให้ได้ไอโซฟลาโวนรวมในปริมาณมาก จึงคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถหมักถั่วเหลืองแล้วทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนมีค่าสูงที่สุด จากแต่ละกลุ่ม ได้แก่ เชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 *Bacillus subtilis* NATTOCR04 และ *Bacillus megaterium* PY03 ไปใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นเพื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไป

อย่างใดก็ตามการจำแนกเชื้อในตัวอย่างถั่วเน่าทั้ง 8 จังหวัด พบว่า ในแต่ละจังหวัดมีความหลากหลายของเชื้อซึ่งเป็นเชื้อประจำท้องถิ่นของแต่ละจังหวัดแตกต่างกันเชื้อดังกล่าวส่งผลให้คุณลักษณะของถั่วเหลืองหมักในแต่ละท้องถิ่นมีความเป็นเอกลักษณ์ ดังนั้นในแต่ละจังหวัดอาจทำการคัดเลือกเชื้อภายในท้องถิ่นของตนเพื่อนำไปใช้ในการผลิตหัวเชื้อเริ่มต้นแทนการใช้หัวเชื้อจากจังหวัดอื่นๆ แม้ว่าหัวเชื้อจะหมักถั่วเหลืองแล้วส่งผลให้มีปริมาณไอโซฟลาโวนน้อยกว่าเชื้อตัวที่ได้ทำการคัดเลือกไว้ข้างต้นแล้วก็ตาม

4.2.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้เพื่อใช้ในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

เมื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแล้ว ขั้นตอนต่อไปจึงศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละตัวโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 *Bacillus subtilis* NATTOCR04 และ *Bacillus megaterium* PY03 ซึ่งนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการวัดค่าการดูดกลืนของแสงจากเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อ ดูอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ จากการคำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ) และหาช่วงเวลาที่ส่งผลให้เชื้อแบ่งเซลล์ในแต่ละgeneration ของเชื้อทั้งสามชนิดที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการคำนวณแสดงดังสมการข้างล่างตามลำดับ ดังนี้

อัตราการเจริญเติบโต $dx/dt = \mu X$ ----------1

เมื่อ dx = ค่าที่เพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพในช่วงเวลา dt

$dx/x = \mu \cdot dt$ ----------2

เมื่อทำการ Integrate สมการที่ 2 จะได้

$Xt = X_0 \cdot e^{\mu t}$ ----------3

เมื่อ X_0 = ค่ามวลชีวภาพ หรือค่าความขุ่นเริ่มต้นเมื่อ t=0

Xt = ค่ามวลชีวภาพ หรือ ค่าความขุ่นภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

เมื่อใส่ Natural logarithm ในสมการที่ 3 จะได้

$\ln Xt = \ln X_0 + \mu t$----------4

ดังนั้นจะได้สมการ

$$\mu = \frac{\ln (Xt/X0)}{t}$$ ----------5

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยที่ อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ (**μ**) จะแทนค่าลงในสมการที่ 6 เพื่อหาช่วงเวลาที่ส่งผลให้เชื้อแบ่งเซลล์ในแต่ละgeneration (Generation time)

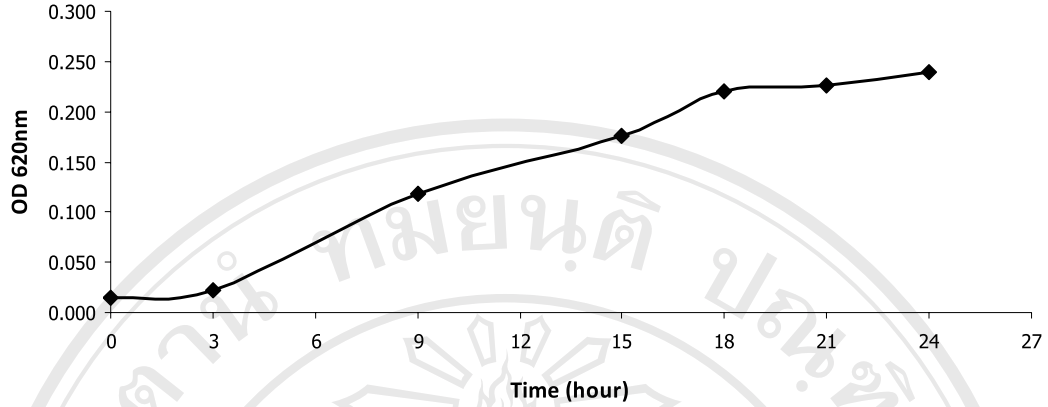
Generation time (T) = ln2/ μ----------6

4.2.2.1 การศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะของ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01

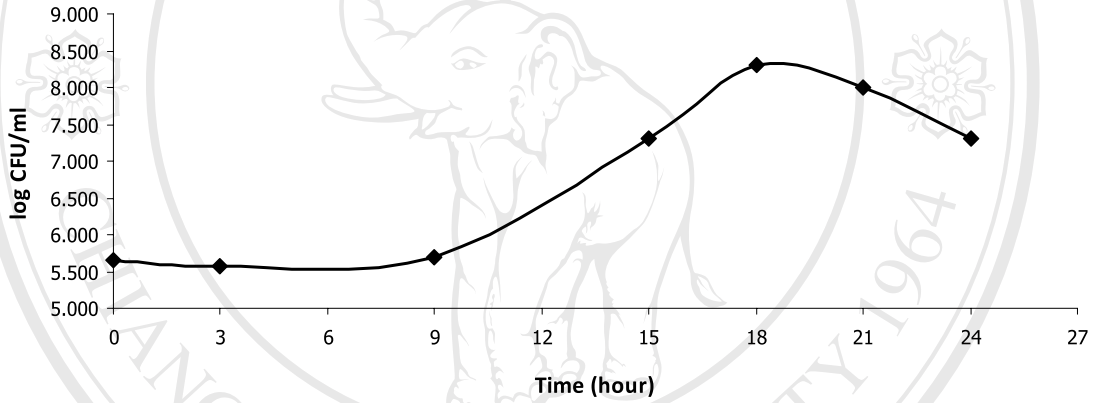
ตารางที่ 4.5 การดูดกลืนของแสงและปริมาณโคโลนี ณ ที่เวลาต่างๆ ของเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01

ชั่วโมง	เชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01	
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 620 นาโนเมตร	จำนวนโคโลนี N log CFU/ml
0	0.015	5.66
3	0.022	5.58
9	0.119	5.70
15	0.177	7.30
18	0.220	8.30
21	0.226	8.00
24	0.239	7.30

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.10 การดูดกลืนแสงของเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 ณ ช่วงเวลาต่างๆ



ภาพที่ 4.11 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 ณ ช่วงเวลาต่างๆ

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้พบว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 มีช่วง log phase อยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 3 - 18 จึงนำค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเวลาดังกล่าวมาใช้คำนวณ หาค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 (Specific growth rate, μ) และหาช่วงเวลาที่ส่งผลให้เชื้อแบ่งเซลล์ในแต่ละgeneration ดังนี้

โดยทำการแทนค่าสมการที่ 5 ด้วยข้อมูลที่แสดงจากตาราง 4.5 เพื่อใช้คำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01

อัตราการเจริญจำเพาะของ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01

$$\mu_{THUANAOLG01} = [\ln (X_{18}/X_0)] - [\ln (X_3/X_0)] /t$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

= [ln (0.220/0.015)] – [ln (0.022/0.015)]/(18-3)

= 0.154 hr^{-1}

Generation time $_{THUANAOLG01}$ = $\ln 2/ \mu_{THUANAOLG01}$

= ln2/0.154

= 4.501 hr

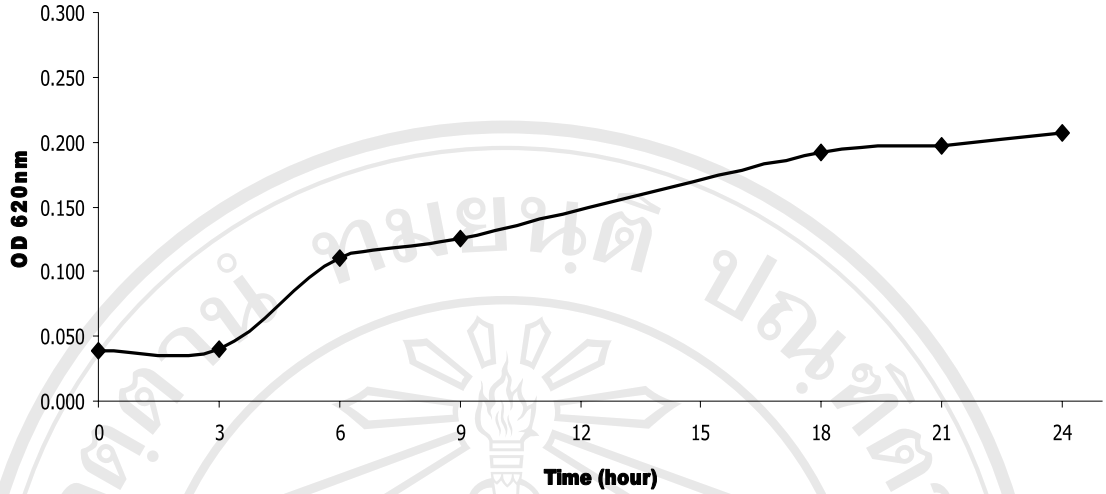
จากการคำนวณสามารถอธิบายได้ว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้เป็น 0.154 CFU ต่อ เวลา 1 ชั่วโมง และเชื้อจะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์เมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 4.501 ชั่วโมง

4.2.2.2 การศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะของ *Bacillus subtilis* NATTOCR04

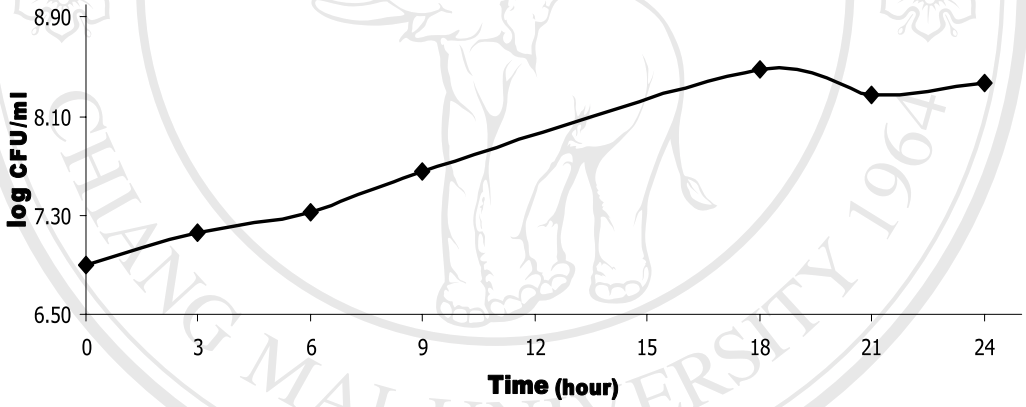
ตารางที่ 4.6 การดูดกลืนของแสงและปริมาณโคโลนี ณ ที่เวลาต่างๆ ของเชื้อ *Bacillus subtilis* NATTOCR04

ชั่วโมง	เชื้อ *Bacillus subtilis* NATTOCR04	
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 620 นาโนเมตร	จำนวนโคโลนี N log CFU/ml
0	0.039	6.903
3	0.041	7.163
6	0.111	7.322
9	0.126	7.653
18	0.192	8.477
21	0.197	8.270
24	0.207	8.362

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.12 การดูดกลืนแสงของเชื้อ *Bacillus subtilis* NATTOCR04 ณ ช่วงเวลาต่างๆ



ภาพที่ 4.13 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Bacillus subtilis* NATTOCR04 ณ ช่วงเวลาต่างๆ

สำหรับ เชื้อ *Bacillus subtilis* NATTOCR04 เมื่อพิจารณา ภาพที่ 4.12 และ 4.13 จะเห็นว่าเชื้ออยู่ในระยะ log phase ณ ชั่วโมงที่ 3 - 18 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเวลาดังกล่าวมาใช้คำนวณ หาค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อโดยแทนค่าสมการด้วยข้อมูลที่แสดงผลดังตาราง 4.6 ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อัตราการเจริญจำเพาะของ *Bacillus subtilis* NATTOCR04

$\mu_{NATTOCR04}$ = $[\ln (X_{18}/X_0)] - [\ln (X_3/X_0)] /t$

= $[\ln (0.192/0.039)] - [\ln (0.041/0.039)]/(18-3)$

= $0.103\ hr^{-1}$

Generation time $_{NATTOCR04}$ = $\ln2/ \mu_{NATTOCR04}$

= $\ln2/0.103$

= 6.730 hr

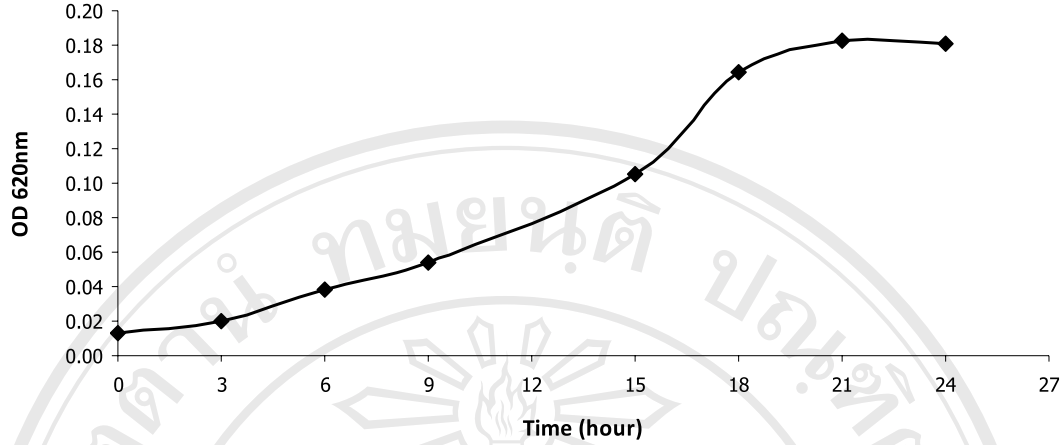
จากการคำนวณสามารถอธิบายได้ว่า *Bacillus subtilis* NATTOCR04 มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้เป็น 0.103 CFU ต่อ เวลา 1 ชั่วโมง และเชื้อจะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์เมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 6.730 ชั่วโมง

4.2.2.3 การศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะของ *Bacillus megaterium* PY03

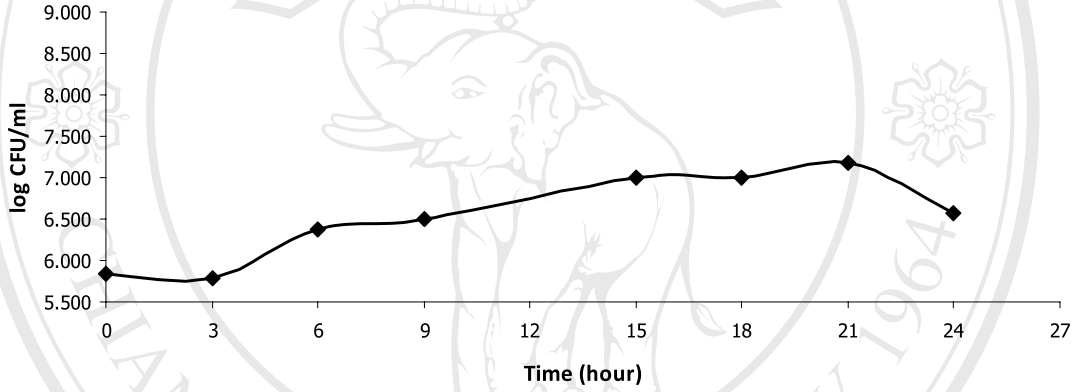
ตารางที่ 4.7 การดูดกลืนของแสงและปริมาณโคโลนี ณ ที่เวลาต่างๆ ของเชื้อ *Bacillus megaterium* PY03

ชั่วโมง	เชื้อ *Bacillus megaterium* PY03	
	ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 620 นาโนเมตร	จำนวนโคโลนี N log CFU/ml
0	0.013	5.840
3	0.020	5.780
6	0.054	6.369
9	0.054	6.502
15	0.105	7.000
18	0.164	7.000
21	0.183	7.176
24	0.181	6.568

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.14 การดูดกลืนแสงของเชื้อ *Bacillus megaterium* PY03 ณ ช่วงเวลาต่างๆ



ภาพที่ 4.15 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Bacillus megaterium* PY03 ณ ช่วงเวลาต่างๆ

เมื่อพิจารณาภาพที่ 4.14 และ 4.15 พบว่า เชื้อ *Bacillus megaterium* PY03 มีช่วงระยะ log phase ณ ชั่วโมงที่ 3 – 18 จากนั้นจึงนำค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเวลาดังกล่าวมาใช้คำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อโดยทำการแทนค่าสมการด้วยข้อมูลที่แสดงผลดัง ตาราง 4.7 ดังนี้

อัตราการเจริญจำเพาะของ *Bacillus megaterium* PY03

$$\mu_{PY03} = [\ln (X_{18}/X_0)] - [\ln (X_3/X_0)] /t$$

$$= [\ln (0.164/0.013)] - [\ln (0.020/0.013)]/(18-3)$$

$$= 0.140\ hr^{-1}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Generation time $_{PY03}$ = **ln2/** μ_{PY03}

= ln2/0.140 hr^{-1}

= 4.591 hr

จากการคำนวณสามารถอธิบายได้ว่า *Bacillus megaterium* PY03 มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้เป็น 0.140 CFU ต่อ เวลา 1 ชั่วโมง และเชื้อจะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์เมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 4.591 ชั่วโมง

ระยะของเชื้อในช่วง Early Stationary phase เป็นช่วงที่นิยมนำมาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมักเนื่องจากการใช้หัวเชื้อที่อยู่ในระยะนี้เป็นช่วงที่เชื้อมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม มีความพร้อมในการหมักมากที่สุด อีกทั้งเชื้อจะสามารถผลิตสารสำคัญ เช่น แอนติไบโอติก (Demain *et al*., 1983; Chater, 1989; Gramajo1993) เอนไซม์ได้ในปริมาณสูงที่สุด (Priest, 1977) ดังนั้น ผลการนับโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเชื้อ ทั้ง 3 ชนิด มีช่วง early Stationary phase ณ ชั่วโมงที่ 18 และพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 และ *Bacillus subtilis* NATTOCR04 มีจำนวนเชื้อที่สามารถเจริญสูงสุดอยู่ในช่วง 8 log CFU/ml สำหรับเชื้อ *Bacillus megaterium* PY03 พบว่ามีจำนวนเชื้อที่สามารถเจริญสูงสุดในช่วง 7 log CFU/ml (ตาราง 4.5-4.7)

4.3 การศึกษาสภาวะการหมักที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมัก

4.3.1 การศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักถั่วเหลืองที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

เมื่อหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการแปรผันปริมาณเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการคัดเลือกแล้วโดยใช้แผนการทดลองแบบ2^3 Factorial Experiment in Central Composite Design (CCD) จากตารางที่ 4.8 พบว่าการใช้หัวเชื้อเริ่มต้นทั้ง 3 ชนิด(*Bacillus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

subtilis THUANAOLG01, *Bacillus subtilis* NATTOCR04 และ *Bacillus megaterium* PY03) ในการหมักถั่วเหลืองมีผลต่อการผลิตเจนิสทิอินในถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.8 ผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมัก

สิ่งทดลอง	ไอโซฟลาโวน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)		
	ไดซิอิน	เจนิสทิอิน	ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม
(1)	97.82 ± 1.94	20.06 ± 1.54	117.88 ± 0.40
a	108.87 ± 0.05	32.49 ± 0.12	141.36 ± 0.06
b	101.06 ± 0.73	19.91 ± 0.58	120.97 ± 0.15
ab	108.87 ± 0.05	32.49 ± 0.12	141.36 ± 0.06
c	103.13 ± 0.66	27.50 ± 0.62	130.64 ± 0.04
ac	106.53 ± 0.68	38.31 ± 0.45	144.84 ± 0.23
bc	96.94 ± 1.33	26.32 ± 1.15	123.26 ± 0.17
abc	98.00 ± 0.74	27.02 ± 0.66	125.02 ± 0.08
-αa	95.74 ± 1.68	17.37 ± 1.44	113.11 ± 0.24
+αa	98.95 ± 2.85	26.78 ± 2.19	125.73 ± 0.67
-αb	102.28 ± 0.57	23.09 ± 1.67	125.36 ± 0.36
+αb	98.86 ± 0.53	23.92 ± 0.91	122.78 ± 0.26
-αc	91.09 ± 0.98	14.46 ± 0.85	105.55 ± 0.13
+αc	104.64 ± 0.98	31.35 ± 0.89	135.99 ± 0.09
Cp1	90.09 ± 0.25	17.20 ± 0.31	107.29 ± 0.06
Cp2	97.37 ± 0.83	24.72 ± 0.78	122.08 ± 0.05
Cp3	101.40 ± 2.03	23.94 ± 0.43	125.34 ± 0.14
Cp4	101.52 ± 2.03	25.07 ± 1.71	126.59 ± 0.33
Cp5	104.33 ± 0.35	39.76 ± 0.27	144.09 ± 0.09
Cp6	103.84 ± 1.16	28.54 ± 0.43	132.38 ± 0.10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert version 7.0.0 ทำให้ทราบได้ว่าการแปรผันปริมาณเชื้อทั้งสามชนิด และปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไดซิอินในถั่วเหลืองหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่4.9) ดังนั้นปริมาณเชื้อที่ระดับต่ำที่สุดในการทดลอง คือ การใช้เชื้อทั้งสามชนิดเป็นร้อยละ 0.1 ของปริมาณถั่วเหลือง ก็จะให้ผลของค่าปริมาณไดซิอินเช่นเดียวกับการใช้ในปริมาณที่สูง เพราะฉะนั้นการใช้หัวเชื้อในระดับต่ำจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมที่สุดในการหมักถั่วเหลืองให้ได้ปริมาณไดซิอินที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างไรก็ตามการใช้เชื้อทั้งสามที่ระดับร้อยละ 0.1 มีการเตรียมที่ยุ่งยากในเชิงปฏิบัติจึงอาจจะใช้ที่ระดับสูงขึ้นอีกเล็กน้อย คือ ร้อยละ 2.11 หรือประมาณ ร้อยละ 2.00 เป็นทางเลือกที่เหมาะสมในทางปฏิบัติ

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของปริมาณหัวเชื้อทั้งสามชนิดที่มีต่อปริมาณไดซิอิน

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	150.29	6	25.05	1.20	0.3671	not significant
A	*34.54*	*1*	*34.54*	*1.65*	*0.2214*	
B	7.67	1	7.67	0.37	0.5555	
C	23.12	1	23.12	1.10	0.3125	
AB	0.25	1	0.25	0.012	0.9143	
AC	6.85	1	6.85	0.33	0.5772	
BC	77.88	1	77.88	3.72	0.0759	
Residual	272.17	13	20.94			
Lack of Fit	129.64	8	16.20	0.57	0.7725	not significant
Pure Error	142.54	5	28.51			
Cor Total	422.47	19				

****หมายเหตุ** A แทนด้วยเชื้อ Bacillus subtilis THUANAOLG01 (LG01)

B แทนด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* NATTOCRO4 (CRO4)

C แทนด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* PY03 (PY03)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สมการทำนายปริมาณไดซิอินจากปริมาณเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมัก

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Daidzein = +100.22 +1.59 *A - 0.75*B +1.30 *C +0.18 * A * B-0.93 * A * C -3.12 * B * C

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Daidzein = +85.15567 + 0.97607*LG01 + 1.46076 * CR04 + 2.80004 * PY03 + 0.020490*LG01*CR04 - 0.10678 *LG01* PY03 - 0.36015*CR04*PY03

R^2 = 0.3550

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert version 7.0.0 พบว่าการแปรผันปริมาณเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 และ *Bacillus megaterium* PY03 ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเจนิสทิอินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในขณะที่การแปรผันปริมาณของ *Bacillus subtilis* NATTOCRO4 ไม่ส่งผลต่อปริมาณเจนิสทิอินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 4.10) และแนวโน้มจากภาพที่ 4.16-4.18 พบว่าการเพิ่มปริมาณ ของ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 (LG01) และ *Bacillus megaterium* PY03 (PY03) จะทำให้แนวโน้มปริมาณเจนิสทิอินในถั่วเหลืองหมักสูงขึ้น ในทางกลับกันเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ *Bacillus subtilis* NATTOCRO4 (CRO4) ไม่ส่งผลต่อปริมาณเจนิสทิอินแต่อย่างใด นอกจากนี้แนวโน้มแสดงให้เห็นจากภาพ 4.18 ว่าเมื่อทำการหมักถั่วเหลืองด้วยทั้งเชื้อ *Bacillus megaterium* PY03 และ *Bacillus subtilis* NATTOCRO4 ถ้าทำการเพิ่มสัดส่วนปริมาณ *Bacillus subtilis* NATTOCRO4 จะทำให้ปริมาณเจนิสทิอินต่ำลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของปริมาณหัวเชื้อทั้งสามชนิดที่มีต่อปริมาณเจนิสทิอิน

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	344.14	3	114.71	3.65	0.0353	significant
A	*203.95*	1	*203.95*	*6.49*	*0.0215*	
B	*9.95*	1	*9.95*	*0.32*	*0.5815*	
C	*130.25*	1	*130.25*	*4.14*	*0.0587*	
Residual	502.79	16	31.42			
Lack of Fit	*224.55*	11	*20.41*	*0.37*	*0.9230*	not significant
Pure Error	*278.24*	5	*55.65*			
Cor Total	846.93	19				

หมายเหตุ A แทนด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 (LG01)

B แทนด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* NATTOCRO4 (CRO4)

C แทนด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* PY03 (PY03)

สมการทำนายปริมาณเจนิสทิอินจากปริมาณเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมัก

Final Equation in Terms of Coded Factors:

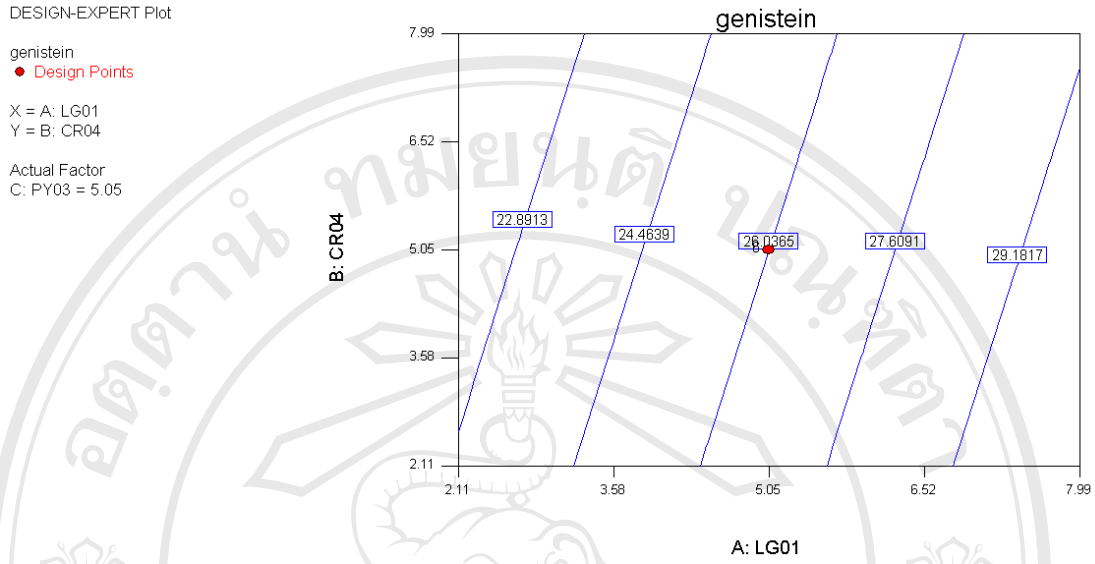
Genistein = +26.04 +3.86*A - 0.85 * B+3.09 * C

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Genistein = +15.57154 + 1.31296* LG01 -0.28993 * CR04 +1.04924 * PY03

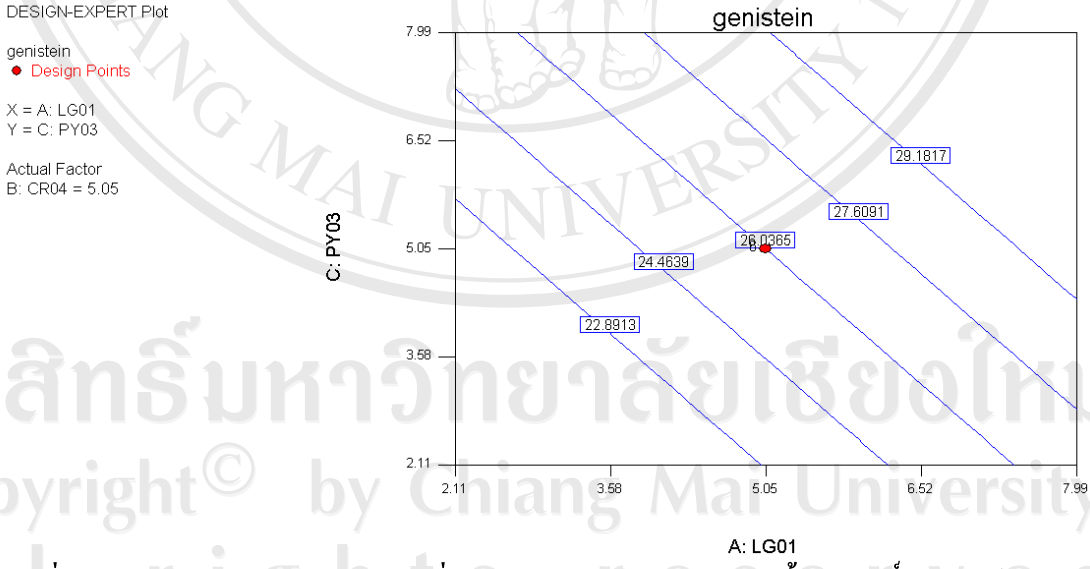
R^2 = 0.4063

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.16 แนวโน้มของเจนิสทิอินจากถั่วเหลืองต่อระดับของปริมาณเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์

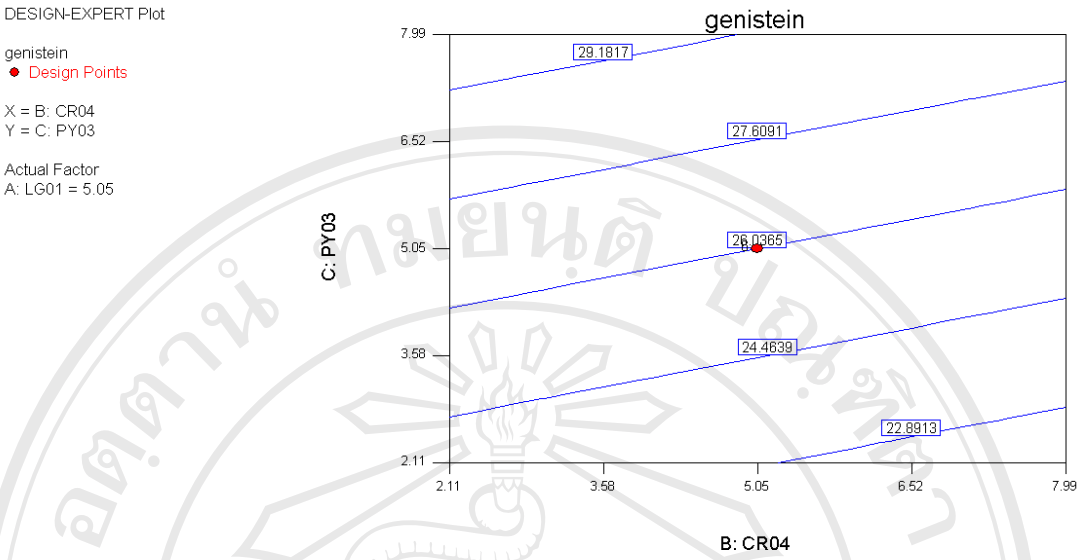
***Bacillus subtilis* NATTOCRO4 และ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01**



ภาพที่ 4.17 แนวโน้มของเจนิสทิอินจากถั่วเหลืองต่อระดับของปริมาณเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์

***Bacillus megaterium* PY03 และ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.18 แนวโน้มของเจนิสทิอินจากถั่วเหลืองต่อระดับของปริมาณเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ *Bacillus megaterium* PY03 และ *Bacillus subtilis* NATTOCRO4

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert version 7.0.0 ทำให้ทราบได้ว่าการแปรผันปริมาณเชื้อทั้งสามชนิด และปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไอโซฟลาโวนรวมในถั่วเหลืองหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับปริมาณไดซิอิน (P>0.05) (ตารางที่ 4.11) ดังนั้นปริมาณเชื้อที่ระดับต่ำที่สุดในการทดลอง คือ การใช้เชื้อทั้งสามชนิดเป็นร้อยละ 0.1 ของปริมาณถั่วเหลือง ก็จะให้ผลของค่าปริมาณไอโซฟลาโวนรวมเช่นเดียวกับการใช้ปริมาณเชื้อในระดับสูง เพราะฉะนั้นการใช้หัวเชื้อในระดับต่ำจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมที่สุดในการหมักถั่วเหลืองให้ได้ปริมาณไอโซฟลาโวนสูง อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อทั้งสามที่ระดับร้อยละ 0.1 อาจเตรียมยากในทางปฏิบัติ จึงใช้ที่ระดับ ร้อยละ 2.11 หรือ ประมาณร้อยละ 2.00 ก็น่าจะเป็นทางเลือกที่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของปริมาณหัวเชื้อทั้งสามชนิดที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวนรวม

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	941.31	6	156.89	1.60	0.2247	not significant
A	406.34	1	*406.34*	*4.14*	*0.0628*	
B	35.08	1	35.08	0.36	0.5602	
C	263.11	1	263.11	2.68	0.1256	
AB	10.06	1	10.06	0.10	0.7540	
AC	56.98	1	56.98	0.58	0.4597	
BC	169.74	1	169.74	1.73	0.2112	
Residual	1276.13	13	98.16			
Lack of Fit	542.48	8	67.81	0.46	0.8414	not significant
Pure Error	733.64	5	146.73			
Cor Total	2217.44	19				

****หมายเหตุ** A แทนด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 (LG01)

B แทนด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* NATTOCRO4 (CRO4)

C แทนด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* PY03 (PY03)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สมการทำนายปริมาณไอโซฟลาโวนรวมจากปริมาณเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมัก

Final Equation in Terms of Coded Factors:

total isoflavone = +126.25 +5.45* A-1.60*B+4.39 *C -1.12 *A*B -2.67 *A* C -4.61* B * C

Final Equation in Terms of Actual Factors:

total isoflavone = + 87.39560+ 4.06263 * LG01+ 2.79425 * CR04 + 5.73219* PY03 - 0.12943 * LG01* CR04-0.30807 * LG01 * PY03-0.53172 * CR04 * PY03

$\mathbf{R^2}$ = 0.4245

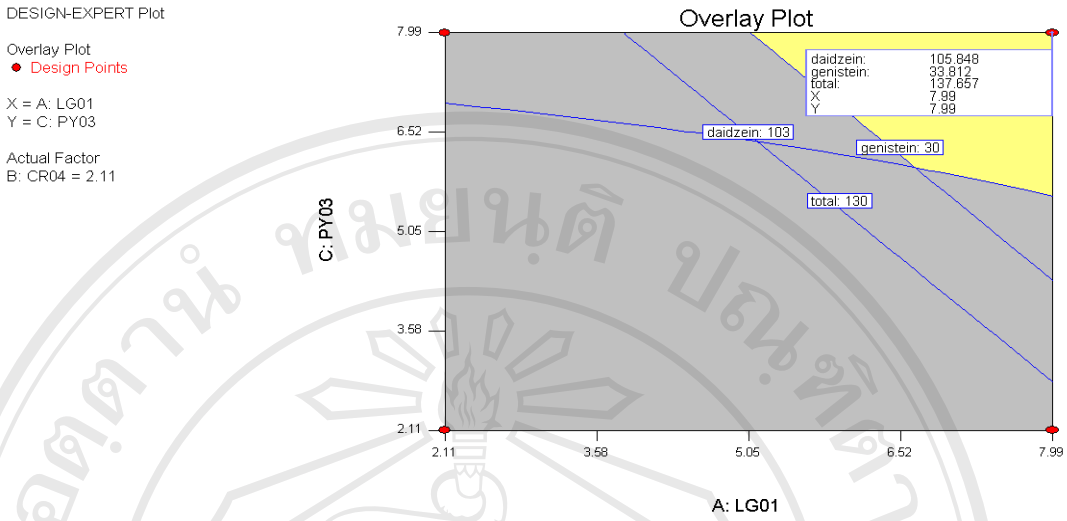
ตารางที่ 4.12 สมการทำนายปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมจากปริมาณเชื้อทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมัก

ตัวแปรตาม	สมการทำนาย*	R^2	P
ไดซิอิน	+85.15567 + 0.97607*LG01 + 1.46076*CR04 + 2.80004 *PY03 + 0.020490*LG01*CR04 -0.10678 *LG01* PY03 - 0.36015*CR04*PY03	0.36	0.43
เจนิสทิอิน	+15.57154 + 1.31296* LG01 -0.28993 * CR04 +1.04924 * PY03	0.40	0.04
ไอโซฟลาโวนรวม	+ 87.39560+ 4.06263 * LG01+ 2.79425 * CR04 + 5.73219* PY03 - 0.12943 * LG01* CR04-0.30807 * LG01 * PY03-0.53172 * CR04 * PY03	0.42	0.22

*ตัวอักษร LG01 หมายถึง *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 CR04 หมายถึง *Bacillus subtilis* NATTOCRO4 และ PY03 หมายถึง *Bacillus megaterium* PY03

จากตารางที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่า การแปรผันปริมาณของหัวเชื้อไม่ส่งผลต่อปริมาณของไดซิอินและปริมาณไอโซฟลาโวนรวมในถั่วเหลืองหมัก ในขณะที่ปริมาณของเจนิสทิอินนั้นการแปรผันปริมาณของเชื้อในแต่ละชนิดจะส่งผลทำให้ปริมาณเจนิสทิอินในถั่วเหลืองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4.19 ระดับของปริมาณเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 และ *Bacillus megaterium* PY03 ที่ให้ปริมาณ เจนิสทิอินสูงที่สุด (พื้นที่สีอ่อน)

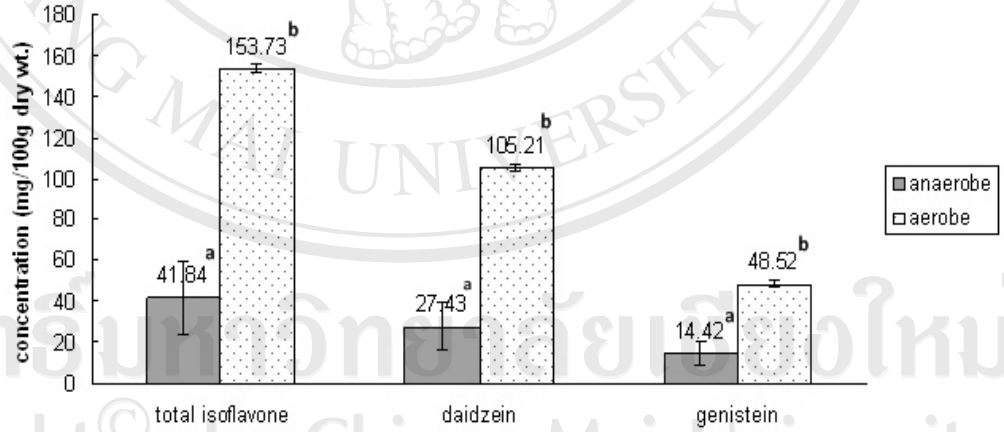
จากภาพแนวโน้มทั้งหมดข้างต้นแสดงให้เห็นว่าถ้าหมักโดยใช้ปริมาณของเชื้อ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 และ *Bacillus megaterium* PY03 มากจะส่งผลให้มีปริมาณไอโซฟลาโวนมากขึ้นแต่การเพิ่มปริมาณ *Bacillus subtilis* NATTOCR04 อาจส่งผลทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมักมีน้อยลง ดังนั้นปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดเพื่อทำให้ปริมาณไอโซฟลาโวนมีปริมาณสูงจึงทำการกำหนดให้ปริมาณของ *Bacillus subtilis* NATTOCR04 ในระดับต่ำที่สามารถปฏิบัติได้โดยให้มีปริมาณคงที่เท่ากับร้อยละ 2.11 หรือประมาณร้อยละ 2.00 ของน้ำหนักถั่วเหลือง จากนั้นจึงทำการหาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมเพื่อที่จะนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ ดังภาพที่ 4.19 แสดงให้เห็นว่าปริมาณที่เหมาะสม *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 จะอยู่ในช่วง ร้อยละ2.11 ถึง ร้อยละ 7.99 และ *Bacillus megaterium* PY03 จะอยู่ในช่วง ร้อยละ 2.11 ถึง ร้อยละ 7.99 และจาก overlay plot แสดงให้เห็นว่าปริมาณเจนิสทิอินสูงสุดเมื่อใช้ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 ร้อยละ7.99 หรือประมาณ ร้อยละ 8.0 และ *Bacillus megaterium* PY03 ร้อยละ 7.99 หรือประมาณ ร้อยละ 8.0 ของน้ำหนักถั่วเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**หมายเหตุ จุดที่ทำการคัดเลือกในกราฟ Overlay plot มีการแสดงปริมาณเป็นค่าตัวเลขทศนิยมเพื่อความสะดวกในการเตรียมหัวเชื้อจึงทำการปรับตัวเลขดังกล่าวเป็นจำนวนเต็ม เช่น ค่า ร้อยละ 2.11 จะใช้เป็นค่า ร้อยละ 2.0 และ ค่าที่ร้อยละ 7.99 จะใช้เป็นค่า ร้อยละ 8.0

4.3.2 การศึกษาสภาวะออกซิเจนในการหมักถั่วเหลืองที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

เมื่อทำการหมักถั่วเหลืองด้วยหัวเชื้อเริ่มต้นที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD พบว่า การหมักถั่วเหลืองในสภาวะที่มีออกซิเจนจะมีปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และปริมาณไอโซฟลาโวนรวม เท่ากับ 105.21±1.70 48.52±2.11 และ 153.73±1.86 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าในสภาวะปราศจากออกซิเจนที่มีปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และ ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม คือ 27.43 ± 11.64 14.42 ±5.82 และ 41.84±17.46 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในการผลิตถั่วเหลืองหมักที่ส่งผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวน ดังภาพที่ 4.20



ภาพที่ 4.20 ผลของออกซิเจนในสภาวะการหมักถั่วเหลืองที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.3 การศึกษาปริมาณน้ำในการหมักถั่วเหลืองที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

ตารางที่ 4.13 แสดงปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมักที่ได้ทำการแปรผันปริมาณน้ำในกระบวนการหมักทั้งหมด 4 ระดับ พบว่าถั่วเหลืองที่ทำการหมักโดยมีปริมาณน้ำแตกต่างกันจะส่งผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนรวม ไดซิอิน และเจนิสทิอินอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยพบว่าในกระบวนการหมักถั่วเหลืองหากใช้ถั่วเหลืองที่มีปริมาณน้ำร้อยละ 70 จะสามารถผลิตไอโซฟลาโวนรวม ไดซิอิน เจนิสทิอิน ได้สูงที่สุด คือ 255.98±8.14 155.28±0.44 และ 100.96±8.57 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้คุณลักษณะของถั่วเหลืองหมักทางด้าน สี และกลิ่น ที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักโดยใช้ถั่วเหลืองที่มีปริมาณน้ำร้อยละ 70 พบว่า มีสีและกลิ่นแอมโมเนียที่อ่อนกว่าการหมักโดยวิธีธรรมชาติ การที่ปริมาณน้ำส่งผลกระทบต่อปริมาณไอโซฟลาโวนชนิด Aglycone ได้แก่ ไดซิอิน และเจนิสทิอิน เนื่องจากปริมาณน้ำมีความเกี่ยวข้องโดยตรงต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ถ้าปริมาณน้ำไม่เหมาะสมจะส่งผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงได้ (Bell, 2003; Yamane *et al*., 2004)

ตารางที่ 4.13 ปริมาณไอโซฟลาโวนของถั่วเหลืองหมักที่ปริมาณน้ำระดับต่างๆ

ปริมาณน้ำของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก (ร้อยละ)	ไอโซฟลาโวน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)		
	ไดซิอิน	เจนิสทิอิน	ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม
60	146.50±0.37[b]	32.12±3.30[a]	178.62±2.93[a]
70	155.28±0.44[b]	100.96±8.57[c]	255.98±8.14[b]
80	104.155±18.24[a]	62.22±8.29[b]	187.48±0.72[a]
90	92.69±0.64[a]	94.80±1.36[c]	166.37±26.54[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.4 การศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างในการหมักถั่วเหลืองที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

เมื่อทำการทดลองหมักถั่วเหลืองโดยวางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial Experiment in Central Composite Design (CCD) ซึ่งทำการแปรผันอุณหภูมิ (25-45 องศาเซลเซียส) และ ค่าความเป็นกรดด่าง (5.0-8.0) ผลการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม ไดซิอิน และเจนิสทิอินในแต่ละสิ่งทดลองแสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ปริมาณไอโซฟลาโวนที่เกิดขึ้นจากถั่วเหลืองที่ผ่านการหมัก ณ อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างแต่ละระดับ

สิ่งทดลอง	ไอโซฟลาโวน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)		
	ไดซิอิน	เจนิสทิอิน	ปริมาณไอโซฟลาโวนรวม
(1)	88.26±0.92	57.26±1.00	145.53±1.92
a	129.44±0.64	83.21±1.49	212.65±0.84
b	121.56±0.06	75.97±0.07	197.53±0.13
ab	143.14±1.58	96.71±2.83	239.85±1.68
$-\alpha_a$	79.65±1.58	48.07±0.55	127.72±2.13
$+\alpha_a$	122.7±1.11	80.94±0.58	203.64±1.68
$-\alpha_b$	102.10±0.59	64.38±2.96	166.48±3.55
$+\alpha_b$	128.57±2.11	83.95±1.43	212.52±3.54
Cp1	123.96±0.58	80.86±0.35	204.16±0.93
Cp2	112.48±1.52	83.96±1.07	196.45±2.59
Cp3	129.39±1.36	82.98±0.93	212.38±2.29

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทั้งปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และปริมาณไอโซฟลาโวนรวม แสดงดังตารางที่ 4.15-4.18 พบว่า การแปรผันอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างส่งผลต่อปริมาณ ไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในขณะที่ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง ไม่ส่งผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนทั้งสามชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 4.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่มีต่อปริมาณไดซิอินในถั่วเหลืองหมัก

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	2725.87	3	908.62	6.61	0.0188	significant
A	*1610.95*	1	*1610.95*	*11.73*	*0.0111*	
B	*721.61*	1	*721.61*	*5.25*	*0.0557*	
AB	*93.35*	1	*93.35*	*0.68*	*0.4370*	
Residual	961.73	7	137.39			
Lack of Fit	*812.65*	5	*162.53*	*2.18*	*0.3437*	not significant
Pure Error	*149.07*	2	*74.54*			
Cor Total	3687.60	10				

****หมายเหตุ** รหัส A แทนด้วยอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
รหัส B แทนด้วยค่าความเป็นกรดด่าง

สมการทำนายปริมาณไดซิอินจากค่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Daidzein = +117.50 +14.61 * A+10.67* B-6.36 * A * B

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Daidzein = -213.24849 +7.58245 * temp+39.75604* pH-0.84857* temp * pH

R^2 = 0.7392

ตารางที่ 4.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของอุณหภูมิและเวลาที่มีต่อปริมาณเจนิสทิอินในถั่วเหลืองหมัก

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	1458.15	3	486.05	7.60	0.0132	significant
A	*984.66*	1	*984.66*	*15.39*	*0.0057*	
B	*366.49*	1	*366.49*	*5.73*	*0.0479*	
AB	*6.47*	1	*6.47*	*0.10*	*0.7598*	
Residual	447.73	7	63.96			
Lack of Fit	*403.25*	5	*80.65*	*3.63*	*0.2302*	not significant
Pure Error	*44.49*	2	*22.24*			
Cor Total	1905.89	10				

****หมายเหตุ** รหัส A แทนด้วยอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
รหัส B แทนด้วยค่าความเป็นกรดด่าง

สมการทำนายปริมาณเจนิสทิอินจากอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการหมัก

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Genistein = +76.03 +11.43 * A +7.60* B-1.67 * A * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Genistein = -77.91033 +3.06735 * temp +14.98250 * pH -0.22331 * temp * pH

R^2 = 0.7651

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของอุณหภูมิและเวลาที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวนรวมในถั่วเหลืองหมัก

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	8138.50	3	2712.83	7.03	0.0161	significant
A	*5114.24*	1	*5114.24*	*13.26*	*0.0083*	
B	*2114.03*	1	*2114.03*	*5.48*	*0.0518*	
AB	*148.81*	1	*148.81*	*0.39*	*0.5542*	
Residual	2700.48	7	385.78			
Lack of Fit	*2349.29*	5	*469.86*	*2.68*	*0.2941*	not significant
Pure Error	*351.19*	2	*175.60*			
Cor Total	10838.98	10				

****หมายเหตุ** รหัส A แทนด้วยอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
รหัส B แทนด้วยค่าความเป็นกรดด่าง

สมการทำนายปริมาณเจนิสทิอินจากค่าอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการหมัก

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Total isoflavone = +193.47+26.04* A+18.26* B-8.04* A * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Total isoflavone = 291.03105+10.64643 * temp+54.71048 * pH-1.07138 * temp * pH

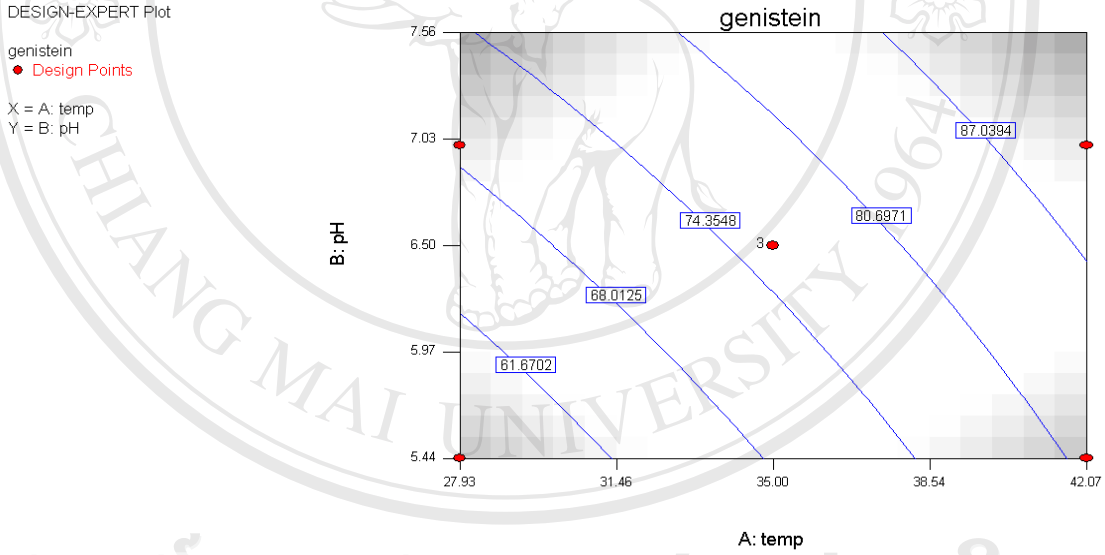
R^2 = 0.7509

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.18 สมการทำนายปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมจากค่าอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างในกระบวนการหมัก

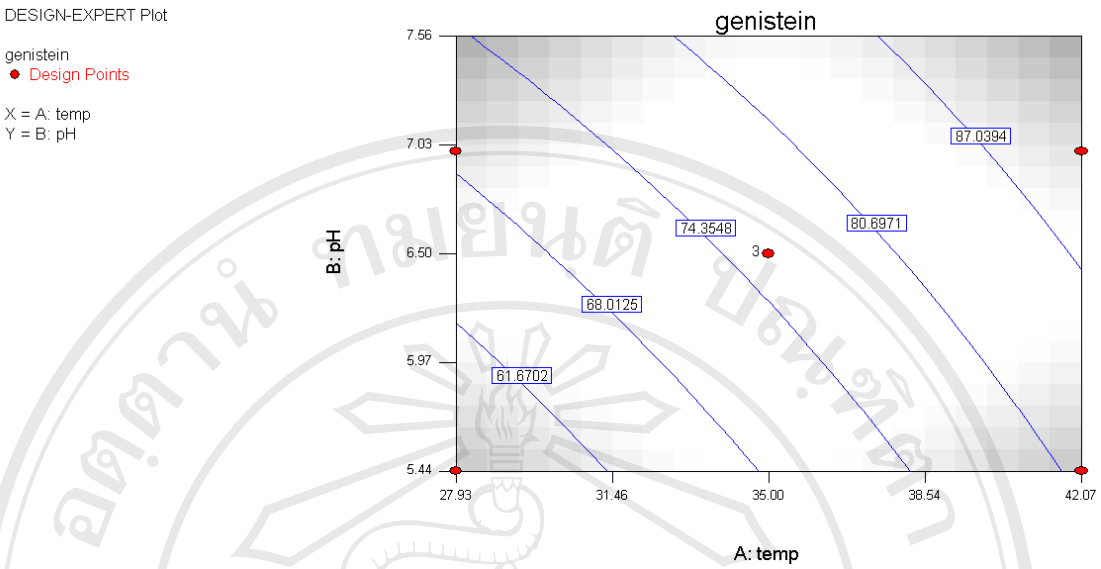
ตัวแปรตาม	สมการทำนาย*	R^2	P
ไดซิอิน	213.24849 +7.58245 * temp+39.75604* pH-0.84857* temp * pH	0.74	0.02
เจนิสทิอิน	-77.91033 +3.06735 * temp +14.98250 * pH -0.22331 * temp * pH	0.77	0.01
ไอโซฟลาโวนรวม	291.03105+10.64643 * temp+54.71048 * pH -1.07138 * temp *pH	0.75	0.02

*ตัวอักษร temp หมายถึงอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และ pH หมายถึงค่าความเป็นกรดด่าง

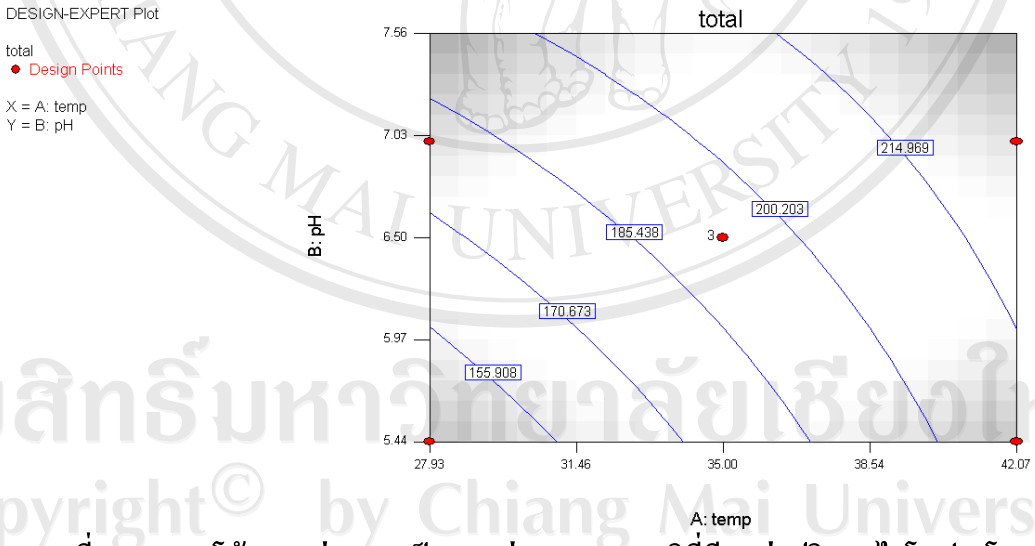


ภาพที่ 4.21 แนวโน้มของค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณไดซิอิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



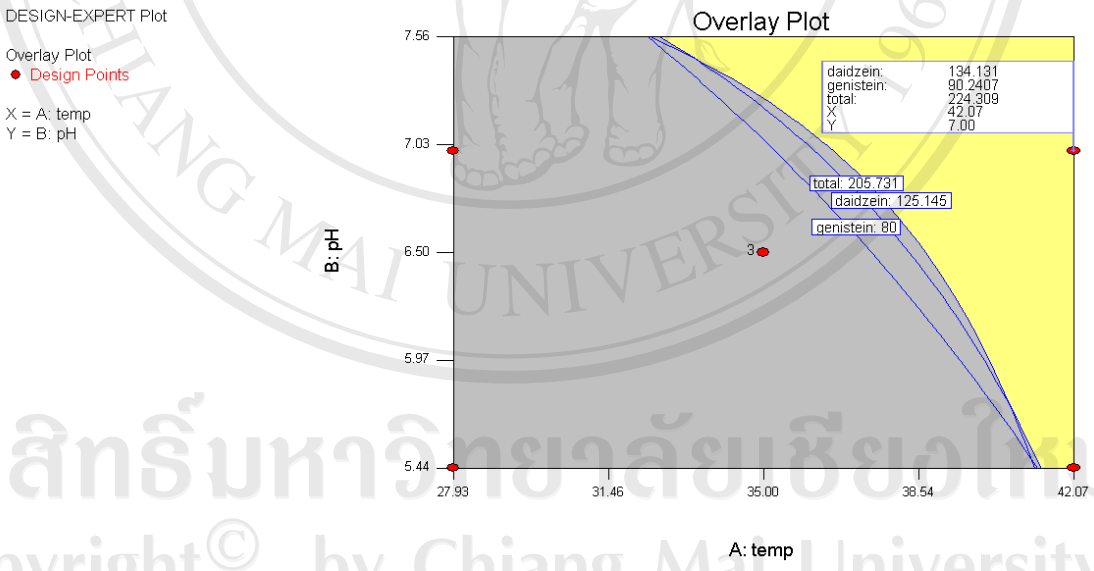
ภาพที่ 4.22 แนวโน้มของค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณเจนิสทิอิน



ภาพที่ 4.23 แนวโน้มของค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4.21 ถึง 4.23 พบว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างในการหมักถั่วเหลืองส่งผลต่อปริมาณ ไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวม โดยค่าดังกล่าวจะมีปริมาณสูงขึ้น เมื่ออุณหภูมิและ ค่าความเป็นกรดด่างในการหมักสูงขึ้น มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพในการหมักซึ่งพบว่า อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างจะมีผลต่อความสามารถในการหมักของเชื้อเนื่องจากการที่อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างสูงหรือต่ำเกินไปจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นปัจจัยสำคัญในการหมัก โดยเชื้อ *Bacillus* spp. จะสามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเชื้อคือ ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 (Spizizen,1958) ส่วนช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์ β-glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ส่งผลต่อปริมาณไดซิอินและเจนิสทิอินในถั่วเหลืองหมักนั้น สามารถทำงานได้ดี คือช่วงระหว่าง 37 – 45 องศาเซลเซียส (Matsuura *et al*., 1995; Kuo and Lee, 2008) จากภาพที่ 4.24 กราฟ Overlay plot ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.0 จะมีสภาวะการหมักที่เหมาะสมเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ประกอบกับในการทดลองพบว่าในช่วงนี้เป็นช่วงที่สามารถหมักแล้วได้ปริมาณของไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมสูงสุด เท่ากับ 143.14±1.58 96.71±2.83 และ 239.85±1.68 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.24 Overlay plot ของสภาวะค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวน (พื้นที่สีอ่อน)

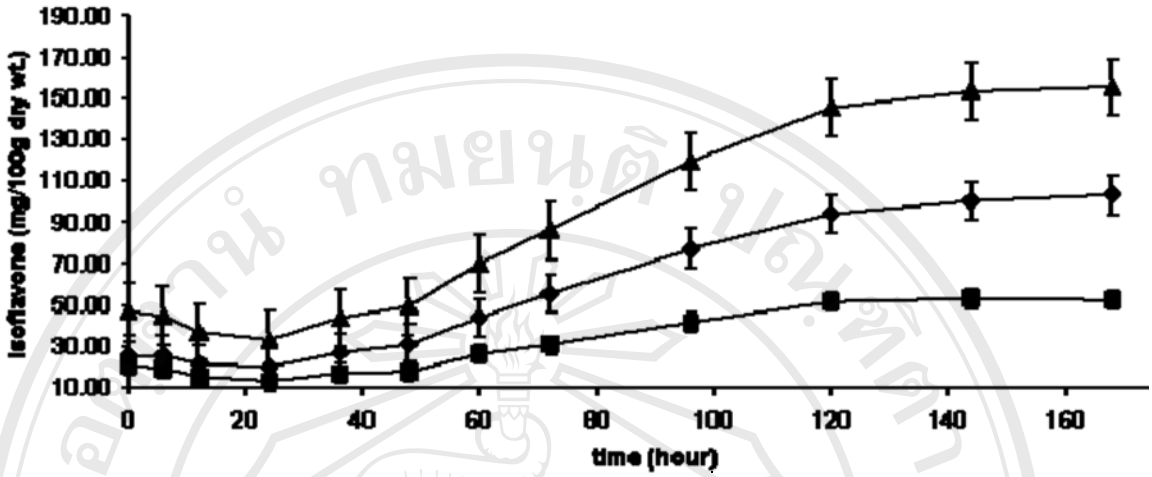
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.5 การศึกษาระยะเวลาในการหมักถั่วเหลืองที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

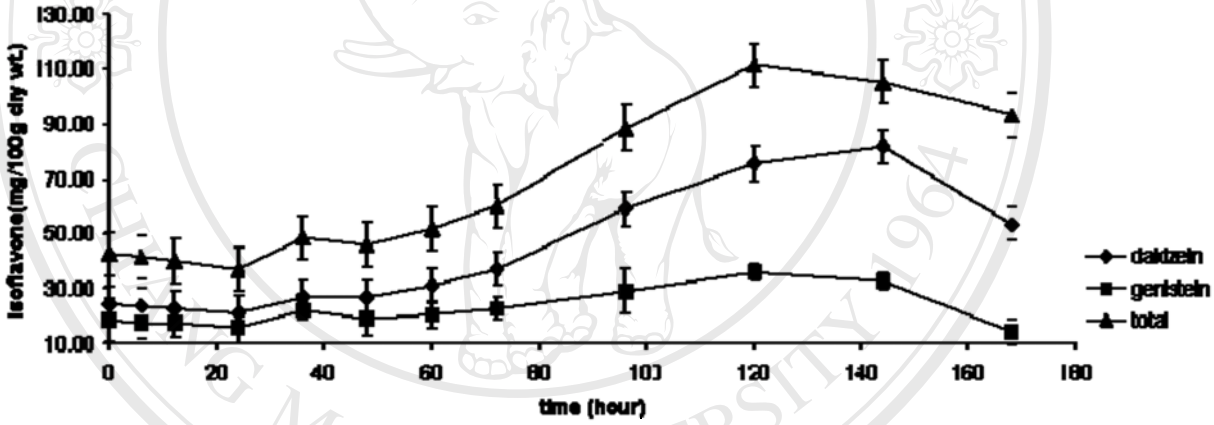
เมื่อทำการเก็บตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก ซึ่งผลิตด้วยหัวเชื้อที่แตกต่างกัน คือ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 *Bacillus subtilis* NATTOCR04 และ *Bacillus megaterium* PY03 ณ ช่วงเวลาต่างๆ เพื่อทำการตรวจหาปริมาณไดซิอินและเจนิสทิอิน พบว่า ปริมาณของไดซิอิน เจนิสทิอิน และปริมาณไอโซฟลาโวนรวมจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาหมัก จนกระทั่งชั่วโมงที่ 120 ปริมาณไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองหมักโดยเชื้อทั้ง 3 ชนิด จะมีปริมาณสูงสุด และเมื่อทำการหมักต่อไปจนครบ 168 ชั่วโมงพบว่า ปริมาณไอโซฟลาโวนที่ทำการตรวจวิเคราะห์ในช่วงชั่วโมงที่ 120-168 ของการหมักไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) แสดงดังภาพ 4.25 ในขณะที่ระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น สีของถั่วเหลืองก็จะกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มมากขึ้นมีกลิ่นหมักและกลิ่นแอมโมเนียที่จะปลดปล่อยออกมามากขึ้นเนื่องจากการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองโดยเชื้อ(Sarkar *et al.,* 1993) ซึ่งคุณลักษณะเหล่านี้อาจส่งผลสำคัญในการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก ดังนั้นเพื่อให้ได้ถั่วเหลืองหมักที่มีปริมาณไอโซฟลาโวนสูงที่สุดและยังคงคุณลักษณะที่ดีที่สุดของถั่วเหลืองหมักจึงควรทำการหมักให้มีระยะเวลาที่สั้นที่สุดคือ การหมักถั่วเหลืองเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

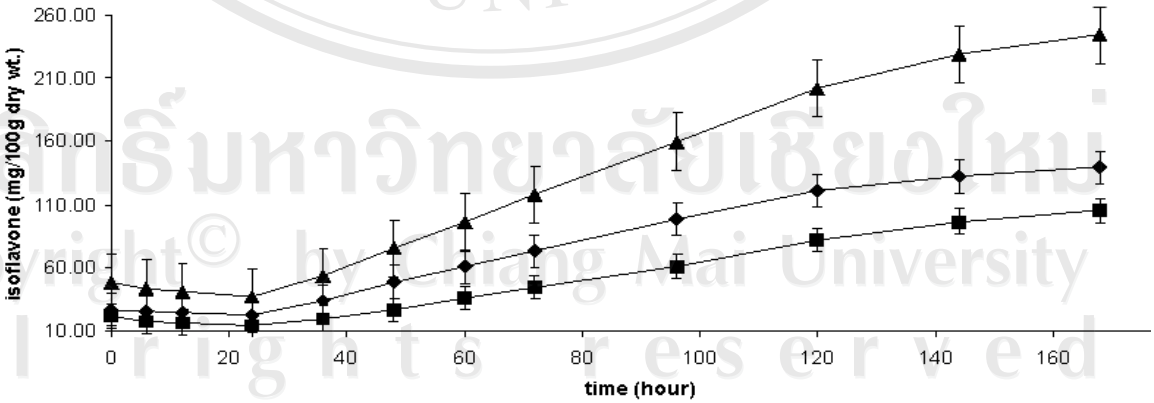
(A) *Bacillus subtilis* THUANAOLG01



(B) *Bacillus subtilis* NATTOCR04



(C) *Bacillus megaterium* PY03



ภาพที่ 4.25 ผลของระยะเวลาหมักที่มีต่อปริมาณไดซิอิน (●) เจนิสทิอิน (■) และปริมาณไอโซฟลาโวนรวม (▲) ในการถั่วเหลืองหมักจากเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 3 ชนิด

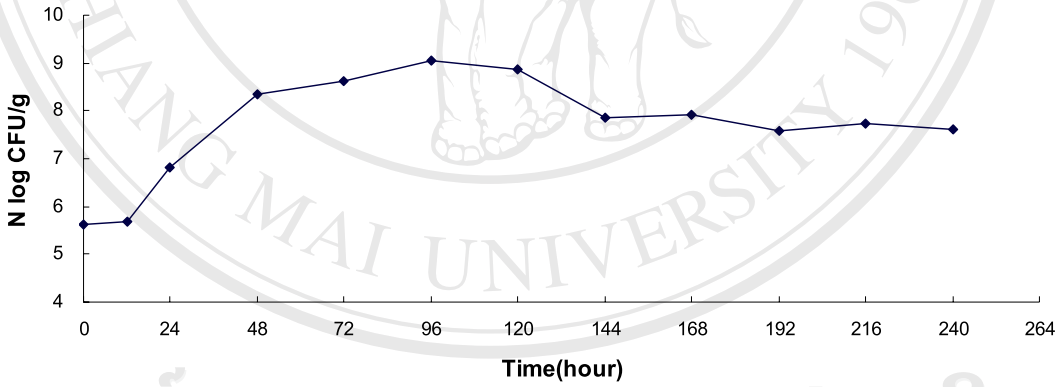
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมักถั่วเหลืองโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นผสมเพื่อทำการศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไอโซฟลาโวนระหว่างกระบวนการหมัก

ในการศึกษาจลนพลศาสตร์จะใช้ถั่วเหลืองที่ทำการหมักในสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 4.3 และ ทำการวิเคราะห์คุณลักษณะต่างๆของถั่วเหลืองหมัก รวมถึงปริมาณไอโซฟลาโวน

4.4.1 ศึกษาการอัตราการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นผสม

เพื่อศึกษาถึงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของหัวเชื้อเริ่มต้นผสมที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักถั่วเหลืองอีกทั้งเพื่อทำการติดตามผลของปริมาณเชื้อในการหมักถั่วเหลืองแต่ละช่วงระยะเวลา ตั้งแต่เริ่มทำการหมักจนกระทั้งครบ 240 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.26 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.19 ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.ในถั่วเหลืองหมักที่ได้ในช่วงเวลาต่างๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณเชื้อ (N log CFU/g)
0	5.63±0.15[a]
12	5.69±0.07[a]
24	6.81±0.21[b]
48	8.36±0.09[cd]
72	8.62±0.20[de]
96	9.04±0.41e
120	8.86±0.38e
144	7.85±0.09cd
168	7.93±0.09cd
192	7.58±0.46bc
216	7.74±0.18c
240	7.61±0.52bc

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในคอลัมน์ แสดงว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การหาอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อในการผลิตถั่วเหลืองหมัก (μ)

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ผ่านการคัดเลือกเพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น ในถั่วเหลืองหมักเป็นระยะเวลา 240 ชั่วโมงพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ มีการเจริญในระยะ Log phase อยู่ในชั่วโมงที่ 12-48 (ภาพที่ 4.26) นำข้อมูลของปริมาณเชื้อจากตารางที่ 4.19 ไปใช้เพื่อคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อในการผลิตถั่วเหลืองหมัก พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะโดยมีค่าเท่ากับ 0.011 ชั่วโมง$^{-1}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อัตราการเจริญ $dx/dt = \mu X$ ----------1

เมื่อ dx = ค่าที่เพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพในช่วงเวลา dt

$dx/x = \mu \cdot dt$ ----------2

เมื่อทำการ Integrate สมการที่ 2 จะได้

$Xt = X_0 \cdot e^{\mu t}$ ----------3

เมื่อ X_0 = ค่ามวลชีวภาพ หรือค่าความขุ่นเริ่มต้นเมื่อ t = 0

Xt = ค่ามวลชีวภาพ หรือ ค่าความขุ่นภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

เมื่อใส่ Natural logarithm ในสมการที่ 3 จะได้

$\ln Xt = \ln X_0 + \mu t$----------4

ดังนั้น

$$\mu = \frac{\ln (Xt/X0)}{t}$$ ----------5

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate)

อัตราการเจริญจำเพาะของหัวเชื้อเริ่มต้นผสม

$\mu = [\ln (X_{48}/X_0) - \ln (X_{12}/X_0)]/t$

$= [\ln (8.36/5.63) - \ln (5.69/5.63)]/(48-12)$

$\mu_{\text{Mixed culture}} = 0.011$ ชั่วโมง$^{-1}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการคำนวณสามารถอธิบายได้ว่า มีการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นผสม เพิ่มจำนวนถั่วเหลืองหมักในได้เป็น 0.011 CFU ต่อ เวลา 1 ชั่วโมง

จลนศาสตร์การใช้อาหารและการสร้างผลิตภัณฑ์

ประสิทธิภาพการสร้างผลิตภัณฑ์จากอาหาร

$$Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S \quad \text{----------6}$$

เมื่อ $Y_{p/s}$ = ประสิทธิภาพการสร้างผลิตภัณฑ์จากอาหาร

ΔP = มวลของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น

ΔS = มวลของสารอาหารที่ลดลง

การหาประสิทธิภาพของการหมัก นอกจากจะแสดงในรูปของประสิทธิภาพการสร้างผลิตภัณฑ์จากอาหารแล้วยังสามารถหาออกมาในรูปของอัตราการใช้อาหารจำเพาะ (Specific product formation rate, q_p) ดังสมการต่อไปนี้

จลนพลศาสตร์การใช้อาหาร

อัตราเร็วในการใช้อาหาร = อาหารที่เพิ่มในระบบ – การเจริญ –ผลิตภัณฑ์ที่สร้าง – พลังงานเพื่อการดำรงอยู่ – อาการที่ออกจากระบบ

$$-dS/dt = FiSo/V - \mu X/Y_{x/s} - q_p X/Y_{p/s} - mX - FoS/V \quad \text{----------7}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เนื่องจากการหมักถั่วเหลืองเป็นการหมักที่ไม่มีการเติมอาหารใหม่เข้าไป หรือ เอาอาหารออกจากระบบในระหว่างที่ทำการหมัก ดังนั้นสมการที่ 7 ได้เป็น

$$-dS/dt = -\mu X/Y_{x/s} - q_p X/Y_{p/s} - mX \quad \text{----------8}$$

$-(1/X)ds/dt = -\mu/Y_{x/s} - q_p/Y_{p/s} - m = -q_p$ ----------9

$(1/X)ds/dt = \mu/Y_{x/s} + q_p/Y_{p/s} + m = q_p$ ----------10

เมื่อ q_s = อัตราการใช้อาหารจำเพาะ (Specific substrate uptake rate, q_s)

X = ปริมาณของจุลินทรีย์

dS/dt = อัตราเร็วในการใช้อาหาร

จลนพลศาสตร์การสร้างผลิตภัณฑ์

อัตราเร็วที่ผลิตภัณฑ์สร้างขึ้น = การสร้างผลิตภัณฑ์ – ผลิตภัณฑ์ที่ถูกทำลาย

$dP/dt = (q_pX) - KP$ ----------11

เนื่องจากการหมัก เป็นการเลี้ยงแบบกะ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ถูกทำลายมีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมัก จึงไม่นำค่า KP มาใช้ในสมการนี้และเขียนสมการใหม่ได้เป็น สมการที่ 12

$dP/dt = (q_pX)$ ----------12

$(1/X) \cdot dP/dt = q_p$ ----------13

เมื่อ q_p = อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific product formation rate)

X = ปริมาณของจุลินทรีย์

dP/dt = อัตราเร็วที่ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น

หารสมการ 13 ด้วยสมการ 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

q_p/q_s = dP/ds ----------14

และสมการ 14 เท่ากับสมการ 6

$Y_{p/s}$ = qp/qs = dP/ds ----------15

เมื่อหารสมการ 15 ด้วยสมการที่ 1

q_p/μ = [(1/X)dP/dt]×[X•dt/dX] ----------16

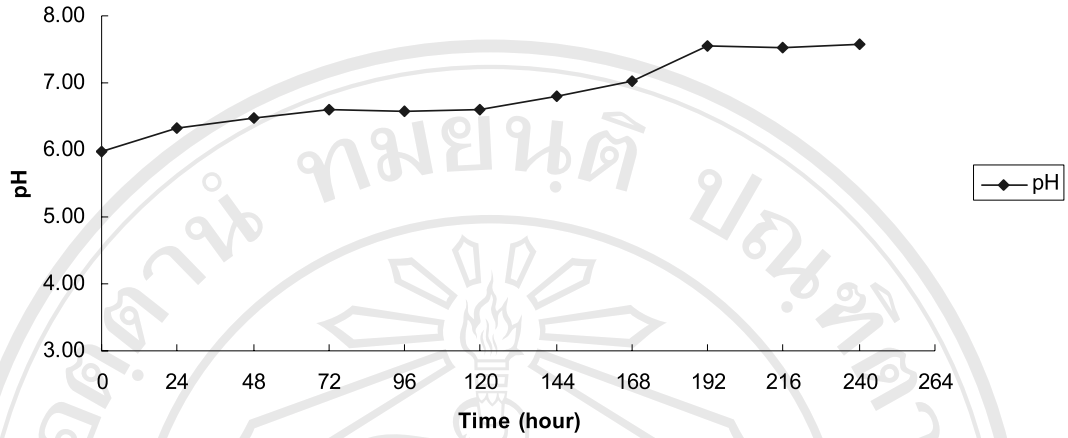
q_p/μ = dP/dX = $Y_{p/x}$ ----------17

q_p = (dP/dX) μ ----------18

เมื่อ Yp/s = ประสิทธิภาพการสร้างผลิตภัณฑ์ (Product yield coefficient)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.2 อัตราการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างจำเพาะ



ภาพที่ 4.27 ค่าความเป็นกรดด่างของถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

ตารางที่ 4.20 ค่าความเป็นกรดด่างในช่วงเวลาต่างๆ

วันที่	ค่าความเป็นกรดด่าง
0	5.97±0.02^{a}
24	6.33±0.09^{b}
48	6.47±0.02^{c}
72	6.59±0.02^{cd}
96	6.58±0.02^{cd}
120	6.60±0.03^{d}
144	6.80±0.02^{e}
168	7.02±0.03^{f}
192	7.56±0.01^{g}
216	7.53±0.02^{g}
240	7.56±0.04^{g}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในคอลัมน์ แสดงว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$q_{pH} = (dP/dX)\mu$$

$$= [(7.56-6.33)/(7.58-6.81)]\times 0.011$$

$$= 0.018 \frac{\text{ml} \cdot \text{hr}^{-1}}{\text{CFU}}$$

ค่าจากการคำนวณพบว่าการเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรดด่างในถั่วเหลืองหมักเท่ากับ 0.018 ต่อเวลา 1 ชั่วโมงต่อปริมาณหัวเชื้อผสมเริ่มต้นปริมาณ 1 CFU

4.4.3 อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนจำเพาะ

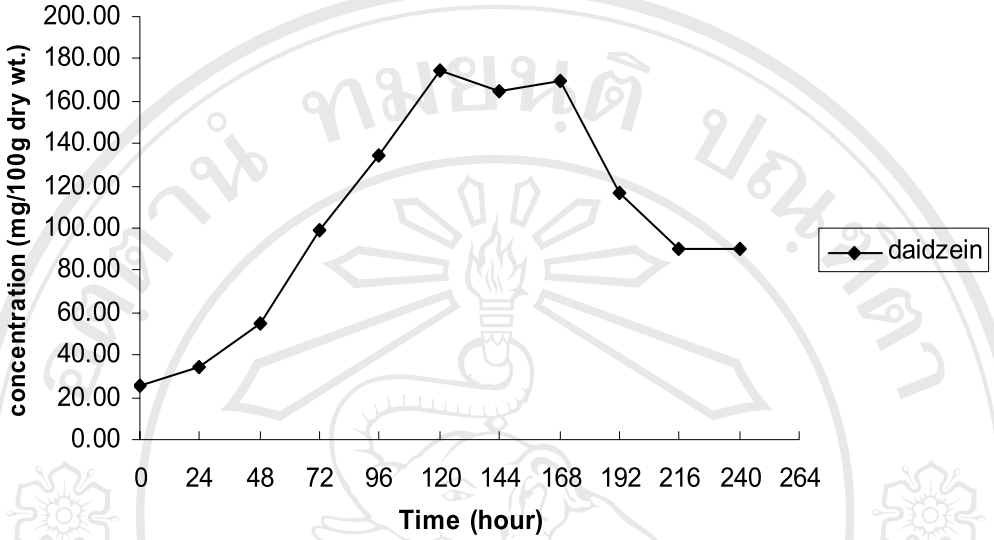
ตารางที่ 4.21 ปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

วันที่	ปริมาณไอโซฟลาโวน (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม น้ำหนักแห้ง)		
	ไดซิอิน	เจนิสทิอิน	ไอโซฟลาโวนรวม
0	25.42±0.92^{a}	25.90±0.41^{a}	51.33±1.33^{a}
24	33.99±7.25^{a}	30.90±4.11^{a}	64.90±2.86^{ab}
48	55.06±5.80^{b}	37.56±2.35^{a}	92.63±8.14^{b}
72	99.25±0.24^{c}	67.08±0.62^{bc}	166.34±9.42^{c}
96	134.14±9.95^{cd}	78.16±5.12^{c}	204.10±7.12^{c}
120	174.59±9.91^{e}	95.50±7.36^{d}	263.54±5.86^{e}
144	164.23±8.20^{de}	92.16±2.10^{cd}	256.73±10.31^{e}
168	169.47±10.31^{de}	94.07±3.49^{d}	253.54±9.91^{e}
192	117.08±2.57^{d}	90.48±3.07^{cd}	207.56±0.49^{d}
216	90.30±0.89^{c}	93.36±2.06^{d}	183.66±2.04^{c}
240	90.35±5.74^{c}	92.73±5.84^{d}	183.08±11.58^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในคอลัมน์ แสดงว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.3.1 อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไดซิอินจำเพาะ



ภาพที่ 4.28 ปริมาณไดซิอินของถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

$$q_{daidzein} = (dP/dX)\mu$$

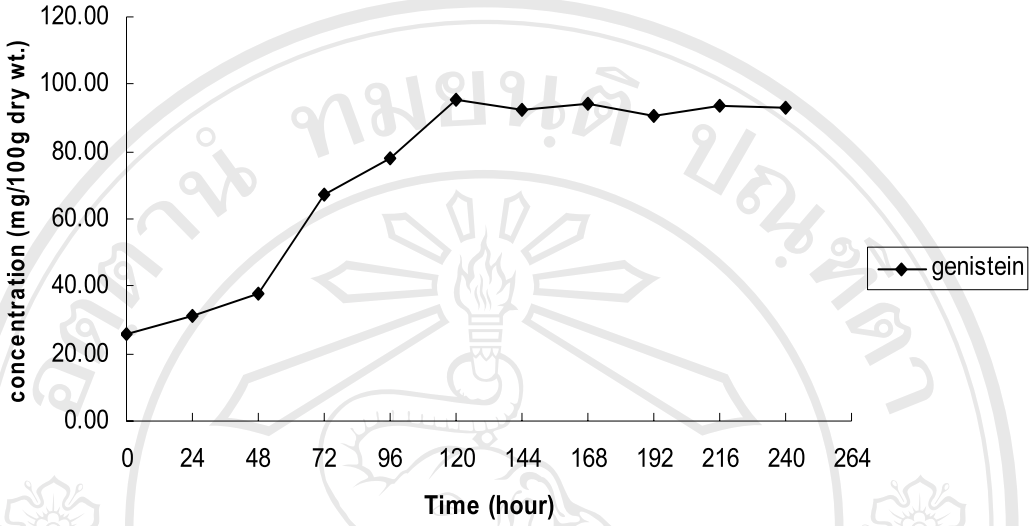
$$= [(174.590-33.990)/(8.860-6.810)]\times 0.011$$

$$= 0.754 \quad \frac{mg \cdot hr^{-1}}{100\ g \cdot CFU}$$

ค่าจากการคำนวณพบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณไดซิอินในถั่วเหลืองหมักเท่ากับ 0.754 มิลลิกรัม ต่อเวลา 1 ชั่วโมง ต่อปริมาณหัวเชื้อผสมเริ่มต้นปริมาณ 1 CFU ในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.3.2 อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณเจนิสทิอินจำเพาะ



ภาพที่ 4.29 ปริมาณเจนิสทิอินของถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

$$q_{genistein} = (dP/dX)\mu$$

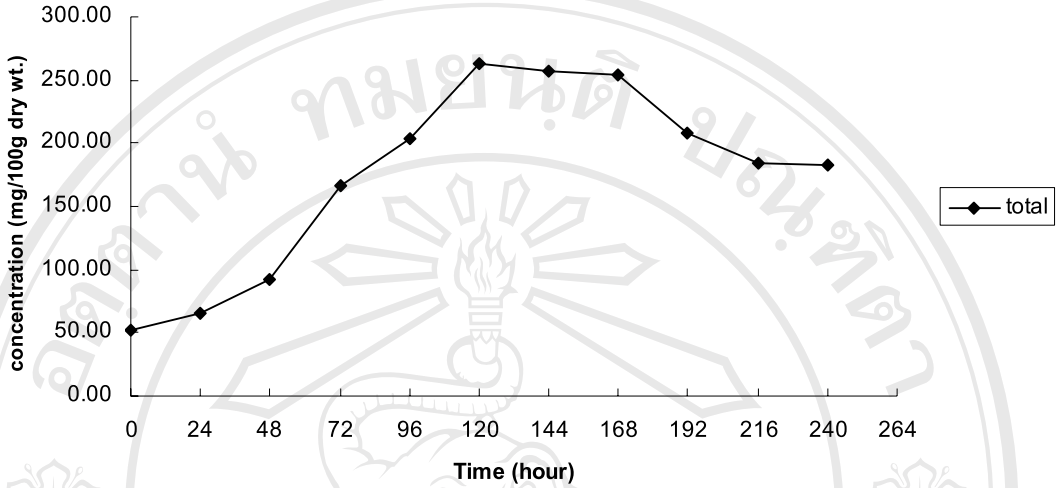
$$= [(95.500-30.900)/(8.860-6.810)] \times 0.011$$

$$= 0.347 \ \frac{mg \cdot hr^{-1}}{100\ g \cdot CFU}$$

ค่าจากการคำนวณพบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณเจนิสทิอินในถั่วเหลืองหมักเท่ากับ 0.347 มิลลิกรัม ต่อเวลา 1 ชั่วโมง ต่อปริมาณหัวเชื้อผสมเริ่มต้นปริมาณ 1 CFU ในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.3.3 อัตราการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอโซฟลาโวนรวมจำเพาะ



ภาพที่ 4.30 ปริมาณไอโซฟลาโวนรวมของถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

$$q_{total} = (dP/dX)\mu$$

$$= [(263.540-64.900)/(8.860-6.810)] \times 0.011$$

$$= 1.066 \text{ mg} \cdot \text{hr}^{-1} \over 100 \text{ g} \cdot \text{CFU}$$

ค่าจากการคำนวณพบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณไดซิอินในถั่วเหลืองหมักเท่ากับ 1.066 มิลลิกรัม ต่อเวลา 1 ชั่วโมง ต่อปริมาณหัวเชื้อผสมเริ่มต้นปริมาณ 1 CFU ในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก 100 กรัม น้ำหนักแห้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าสีของถั่วเหลืองหมัก

เมื่อศึกษาคุณลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสีในถั่วเหลืองหมัก ที่ทำการหมักถั่วเหลืองเป็นระยะเวลา 240 ชั่วโมง จะได้ผลของค่าสีที่ทำการตรวจวัดที่แสดงดังตารางที่ 4.22 พบว่าค่า L* มีค่าลดลงแสดงว่าค่าความสว่างลดลง สำหรับค่า a* ให้ค่าเป็นบวกแสดงให้เห็นว่าถั่วเหลืองหมักจะมีคุณลักษณะที่มีความเป็นสีแดง b* ให้ค่าเป็นบวกเช่นกันซึ่งแสดงว่าถั่วเหลืองหมักที่ได้มีแนวโน้มไปทางสีเหลือง ค่าสีที่ได้มีแนวโน้มใกล้เคียงจากการสังเกต ด้วยสายตา คือ สีของถั่วเหลืองหมักจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.22 ค่าสี L* a* b* ของถั่วเหลืองหมัก ณ ช่วงเวลาต่างๆ

วันที่	ค่าสี		
	L*	a*	b*
0	61.64±2.84^{ab}	6.58±0.68	17.27±0.89^{b}
24	63.30±1.17^{b}	6.40±0.47	17.71±0.40^{b}
48	57.20±1.23^{ab}	6.18±0.84	14.02±1.16^{a}
72	52.71±2.48^{a}	6.54±0.39	14.20±1.63^{a}
96	56.96±3.30^{ab}	5.77±0.70	16.21±0.41^{ab}
120	53.81±3.63^{ab}	5.85±0.56	16.12±0.61^{ab}
144	51.81±6.64^{ab}	6.80±1.43	15.91±0.16^{ab}
168	51.88±5.87^{ab}	6.69±0.59	15.85±1.05^{ab}
192	57.39±5.29^{ab}	7.19±0.17	18.31±0.69^{b}
216	54.69±4.43^{ab}	6.98±0.30	18.32±0.68^{b}
240	50.70±3.56^{a}	7.19±0.55	17.05±0.69^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.5 เปรียบเทียบคุณลักษณะของถั่วเน่าในท้องตลาดและถั่วเหลืองหมักโดยหัวเชื้อเริ่มต้น

ผลจากการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าจากตลาดเมืองใหม่และผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ผลิตโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นซึ่งทำการหมักเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (ถั่วชีวภาพ) ดังตาราง 4.23 พบว่าถั่วเน่าที่ทำการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นจะมีสี และมีกลิ่นที่อ่อนกว่าในถั่วเน่าจากตลาดเมืองใหม่ และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวน พบว่าถั่วเน่ามีปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และ ไอโซฟลาโวนรวมต่ำกว่าถั่วเหลืองหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และจากการเก็บข้อมูลเบื้องต้นพบว่าการผลิตถั่วเน่าแบบพื้นบ้านมีการให้ความร้อนในการต้มถั่วเหลืองเป็นเวลานานเพื่อให้เมล็ดถั่วเหลืองที่จะทำการหมักมีความอ่อนนุ่มซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจส่งผลให้ถั่วเหลืองมีสีเข้มและการหมักที่ไม่ได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อทำให้ปริมาณของไอโซฟลาโวนที่ได้ไม่แน่นอน

ตารางที่ 4.23 เปรียบเทียบค่าคุณภาพของถั่วเน่า และถั่วเหลืองหมักโดยหัวเชื้อเริ่มต้น

ค่าคุณภาพ	ถั่วเน่า	ถั่วเหลืองหมักโดยหัวเชื้อเริ่มต้น
ค่าสี L*	42.12±0.05[a]	53.83±0.04[b]
ค่าสี a*	8.25±0.03[b]	5.76±0.10[a]
ค่าสี b*	12.33±0.04[a]	16.26±0.29[b]
ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)	7.83±0.01[b]	6.53±0.09[a]
ไดซิอิน (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม น้ำหนักแห้ง)	109.66±0.54[a]	150.75±1.15[b]
เจนิสทิอิน(มิลลิกรัมต่อ 100กรัม น้ำหนักแห้ง)	10.49±0.25[a]	95.94±0.27[b]
ไอโซฟลาโวนรวม (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม น้ำหนักแห้ง)	120.14±0.88[a]	247.23±4.20[b]

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 4.31 เปรียบเทียบตัวอย่างถั่วเหลืองหมักพื้นบ้าน(ถั่วเน่า) และตัวอย่างถั่วเหลืองหมักโดยเชื้อบริสุทธิ์ (ถั่วชีวภาพ)

4.5 ศึกษาผลกระทบของการหยุดปฏิกิริยาการหมักถั่วเหลืองหมักด้วยกระบวนการให้ความร้อนด้วยการนึ่ง และอบแห้ง

4.5.1 ผลของการให้ความร้อนด้วยกระบวนการนึ่งถั่วเหลืองหมักที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

เมื่อทำการนึ่งถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial Experiment in Central Composite Design (CCD) โดยแปรผันอุณหภูมิ (100-121 องศาเซลเซียส) ใช้ระยะเวลา (15-30 นาที) จากตารางที่ 4.24 แสดงให้เห็นว่าการนึ่งถั่วเหลืองที่อุณหภูมิและเวลาแตกต่างกันไม่ส่งผลต่อปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และปริมาณไอโซฟลาโวนรวม ($P>0.05$) ดังนั้นการนึ่งด้วยไอน้ำปกติ (100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที จึงเป็นสภาวะที่สะดวกในการใช้หยุดปฏิกิริยาการหมักถั่วเหลืองได้ดีที่สุด และวิธีนี้ยังสามารถกำจัดกลิ่นแอมโมเนียที่ปลดปล่อยออกมาจากการย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองได้ (Leejeerajumnean, 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.24 ปริมาณไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองหมักซึ่งผ่านกระบวนการนึ่งด้วยความร้อน ณ อุณหภูมิต่างๆ

สิ่งทดลอง	ปริมาณไอโซฟลาโวน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)		
	ไดซิอิน	เจนิสทิอิน	ไอโซฟลาโวนรวม
(1)	144.68±2.53	90.98±1.55	235.66±4.89
a	141.80±0.99	75.39±0.11	217.19±1.67
b	141.48±1.76	73.93±0.93	215.41±2.87
ab	137.89±0.37	55.43±3.00	193.33±2.33
- αa	140.01±3.06	67.28±1.42	207.29±1.59
+ αa	136.85±1.51	53.75±4.28	190.60±6.66
- αb	139.34±0.79	50.56±0.25	189.91±1.37
+ αb	138.46±1.51	52.72±3.78	191.18±5.73
Cp1	136.88±0.43	44.46±0.31	181.34±1.05
Cp2	135.48±5.69	49.04±2.48	184.52±9.58
Cp3	137.96±0.55	46.06±0.10	184.01±1.24
Cp4	136.26±0.94	47.85±0.35	184.10±1.17
Cp5	132.21±1.20	47.52±0.47	179.73±1.52
Control	149.27±1.80	95.38±0.64	244.65±3.03

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert version 7.0.0 ดังตารางที่ 4.25-4.28 พบว่าผลการแปรผันอุณหภูมิและเวลาในการนึ่ง อีกทั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาในการนึ่งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง เจนิสทิอิน ไดซิอิน และปริมาณไอโซฟลาโวนรวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบกับตัวอย่างในกลุ่มควบคุม (ถั่วเหลืองหมัก) กลับพบว่าปริมาณของไอโซฟลาโวนทั้งสามชนิดมีค่าลดลงอย่างชัดเจน แสดงว่าความร้อนเป็นปัจจัยที่ส่งผลทำให้เกิดการสูญเสียปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 4.25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของอุณหภูมิและเวลาในการนึ่งที่มีต่อปริมาณไดซิอิน

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	23.81	3	7.94	0.74	0.5553	not significant
A	*14.96*	1	*14.96*	*1.39*	*0.2684*	
B	*8.72*	1	*8.72*	*0.81*	*0.3911*	
AB	*0.13*	1	*0.13*	*0.012*	*0.9162*	
Residual	96.74	9	10.75			
Lack of Fit	*77.72*	5	*15.54*	*3.27*	*0.1372*	not significant
Pure Error	*19.03*	4	*4.76*			
Cor Total	120.55	12				

**หมายเหตุ รหัส A แทนด้วยอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
รหัส B แทนด้วยเวลาการนึ่ง (นาที)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สมการทำนายปริมาณไดซิอินจากอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการนึ่ง

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Daidzein = +138.41-1.37 *A -1.04 * B-0.18 *A* B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Daidzein =+150.32659 -0.079511* temp +0.10982 * time -2.25397E-003 * temp * time

R^2 = 0.2109

ตารางที่ 4.26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของอุณหภูมิและเวลานึ่งที่มีต่อปริมาณเจนิสทิอิน

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	500.34	3	166.78	0.77	0.5406	not significant
A	*354.10*	1	*354.10*	*1.63*	*0.2338*	
B	*144.12*	1	*144.12*	*0.66*	*0.4365*	
AB	*2.12*	1	*2.12*	*9.738E-003*	*0.9236*	
Residual	1956.49	9	217.39			
Lack of Fit	*1944.00*	5	*388.80*	*124.53*	*0.0002*	significant
Pure Error	*12.49*	4	*3.12*			
Cor Total	2456.83	12				

****หมายเหตุ** รหัส A แทนด้วยอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
รหัส B แทนด้วยเวลาการนึ่ง (นาที)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สมการทำนายปริมาณเจนิสทิอินจากอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการนึ่ง

Final Equation in Terms of Coded Factors:

genistein = +58.07 -6.65 * A -4.24* B -0.73 * A * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

genistein = +117.85495 -0.42577 * temp +0.45489 * time -9.23810E-003 * temp * time

R^2 = 0.2037

ตารางที่ 4.27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของอุณหภูมิและเวลานึ่งที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวนรวม

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	741.52	3	247.17	0.80	0.5237	not significant
A	*514.45*	1	*514.45*	*1.67*	*0.2286*	
B	*223.81*	1	*223.81*	*0.73*	*0.4163*	
AB	*3.26*	1	*3.26*	*0.011*	*0.9204*	
Residual	2775.00	9	308.33			
Lack of Fit	*2757.35*	5	*551.47*	*124.97*	*0.0002*	significant
Pure Error	*17.65*	4	*4.41*			
Cor Total	3516.52	12				

****หมายเหตุ** รหัส A แทนด้วยอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
รหัส B แทนด้วยเวลาการนึ่ง (นาที)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สมการทำนายปริมาณไอโซฟลาโวนรวมจากอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการนึ่ง

Final Equation in Terms of Coded Factors:

total = +196.48 -8.02 * A -5.29 * B -0.90 * A * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

total = +268.24886 -0.50587* temp +0.56113 * time-0.011460* temp * time

R^2 = 0.2109

ตารางที่ 4.28 สมการทำนายปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมจากค่าอุณหภูมิ และเวลาในกระบวนการนึ่ง

ตัวแปรตาม	สมการทำนาย*	R^2	P
ไดซิอิน	150.33- 0.08 * temp+0.11* time-2.25-3 *temp*time	0.20	0.55
เจนิสทิอิน	117.86 -0.43* temp+0.46 *time-9.24E-3*temp*time	0.20	0.54
ไอโซฟลาโวนรวม	268.25-0.51 * temp+0.56 * time-0.01 *temp*time	0.21	0.52

*ตัวอักษร temp หมายถึงอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และ time หมายถึง เวลา (นาที)

4.5.2 ผลของการให้ความร้อนด้วยกระบวนการอบถั่วเหลืองหมักที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

เมื่อนำถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการนึ่งที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการอบโดยการแปรผันอุณหภูมิ (50-70 องศาเซลเซียส) และระยะเวลา (12-24 ชั่วโมง) พบว่า การอบถั่วเหลืองในสภาวะดังกล่าวไม่ส่งผลต่อปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และปริมาณไอโซฟลาโวนรวม (P >0.05) ในแต่ละสิ่งทดลองและตัวอย่างที่เป็นกลุ่มควบคุมดังแสดงในตารางที่ 4.29 ดังนั้นการอบที่เหมาะสมที่สุดคือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงซึ่งเป็นสภาวะที่ทำให้ได้ถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการนึ่งและมีลักษณะแห้งสม่ำเสมอและมีปริมาณไอโซฟลาโวนสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.29 ปริมาณไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองหมักซึ่งผ่านกระบวนการอบด้วยความร้อน ณ อุณหภูมิต่างๆ

สิ่งทดลอง	ปริมาณไอโซฟลาโวน (มิลลิกรัมต่อ 100กรัม น้ำหนักแห้ง)		
	ไดซิอิน	เจนิสทิอิน	ไอโซฟลาโวนรวม
(1)	144.99±0.60	111.9±0.38	207.29±1.59
a	129.84±2.11	101.34±1.44	235.66±4.89
b	122.24±3.44	97.77±2.95	220.01±2.58
ab	133.35±6.59	103.14±4.8	236.49±6.87
- αa	119.28±8.08	95.49±6.11	214.74±1.38
+ αa	121.92±1.72	96.00±1.14	224.24±5.72
- αb	124.83±0.67	99.40±0.75	224.23±1.07
+ αb	121.68±2.71	95.59±2.32	217.27±1.78
Cp1	125.25±4.85	99.01±3.84	225.08±1.23
Cp2	126.38±2.52	99.83±2.11	226.21±1.88
Cp3	119.57±4.19	95.37±3.29	214.94±4.87
Cp4	122.22±0.67	96.73±0.53	218.95±2.45
Cp5	123.58±2.97	97.46±2.35	221.04±6.68
Control	129.81±0.87	101.50±0.75	231.31±3.22

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert version 7.0.0 ดังตารางที่ 4.30-4.33 พบว่าผลการแปรผันอุณหภูมิและเวลาของการอบ อีกทั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาในการนึ่งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง เจนิสทิอิน ไดซิอิน และปริมาณไอโซฟลาโวนรวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังนั้นการอบถั่วเหลืองหมักนึ่งที่อุณหภูมิในระดับต่ำส่งผลให้ปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การอบที่ระดับอุณหภูมิต่ำจะต้องใช้เวลานาน ในขณะที่การอบที่อุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้สีของถั่วเหลืองหมักสีเข้มขึ้น และอาจไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของอุณหภูมิและเวลาอบที่มีต่อปริมาณไดซิอิน

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	169.02	3	56.34	1.22	0.3562	not significant
A	*54.36*	1	*54.36*	*1.18*	*0.3053*	
B	*31.03*	1	*31.03*	*0.67*	*0.4327*	
AB	*83.63*	1	*83.63*	*1.82*	*0.2105*	
Residual	414.08	9	46.01			
Lack of Fit	*343.21*	5	*68.64*	*3.87*	*0.1069*	not significant
Pure Error	*351.19*	4	*17.72*			
Cor Total	583.09	12				

****หมายเหตุ** รหัส A แทนด้วยอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
รหัส B แทนด้วยเวลาการอบ (ชั่วโมง)

สมการทำนายปริมาณไดซิอินจากอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการอบ

Final Equation in Terms of Coded Factors:

daidzein = +125.74 -2.61 * A -1.97 * B +4.57 * A * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

daidzein = +229.59384 -1.63242* temp -4.90073 * time +0.076208 * temp * time

R^2 = 0.2899

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของอุณหภูมิและเวลาอบที่มีต่อปริมาณเจนิสทิอิน

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	72.53	3	24.18	1.26	0.3440	not significant
A	*27.65*	1	*27.65*	*1.45*	*0.2600*	
B	*18.36*	1	*18.36*	*0.96*	*0.3529*	
AB	*26.52*	1	*26.52*	*1.39*	*0.2692*	
Residual	172.19	9	19.13			
Lack of Fit	*141.63*	5	*28.33*	*3.71*	*0.1142*	not significant
Pure Error	*30.56*	4	*7.64*			
Cor Total	244.72	12				

หมายเหตุ รหัส A แทนด้วยอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
รหัส B แทนด้วยเวลาการอบ (ชั่วโมง)

สมการทำนายปริมาณเจนิสทิอินจากอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการอบ

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Genistein = +99.16-1.86 *A-1.51 *B +2.58 * A* B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Genistein = +161.20517 -0.95840* temp -2.82749 * time + 0.042917 * temp * time

R^2 = 0.2964

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการตอบสนองต่อพื้นที่ของอุณหภูมิและเวลาอบที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวนรวม

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	195.28	3	65.09	0.99	0.4418	not significant
A	*50.98*	1	*50.98*	*0.77*	*0.4023*	
B	*90.36*	1	*90.36*	*1.37*	*0.2720*	
AB	*53.95*	1	*53.95*	*0.82*	*0.3895*	
Residual	593.96	9	66.00			
Lack of Fit	*279.47*	5	*55.89*	*0.71*	*0.6471*	not significant
Pure Error	*314.50*	4	*78.62*			
Cor Total	789.25	12				

หมายเหตุ รหัส A แทนด้วยอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
รหัส B แทนด้วยเวลาการอบ (ชั่วโมง)

สมการทำนายปริมาณไอโซฟลาโวนรวมจากอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการอบ

Final Equation in Terms of Coded Factors:

Total isoflavone = +222.01 +2.52 * A +3.36 * B -3.67 * A * B

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Total isoflavone = +130.67850 +1.35418 * temp+4.23263* time-0.061208 * temp * time

R^2 = 0.2474

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.33 สมการทำนายปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมจากค่าอุณหภูมิ และเวลาในกระบวนการอบ

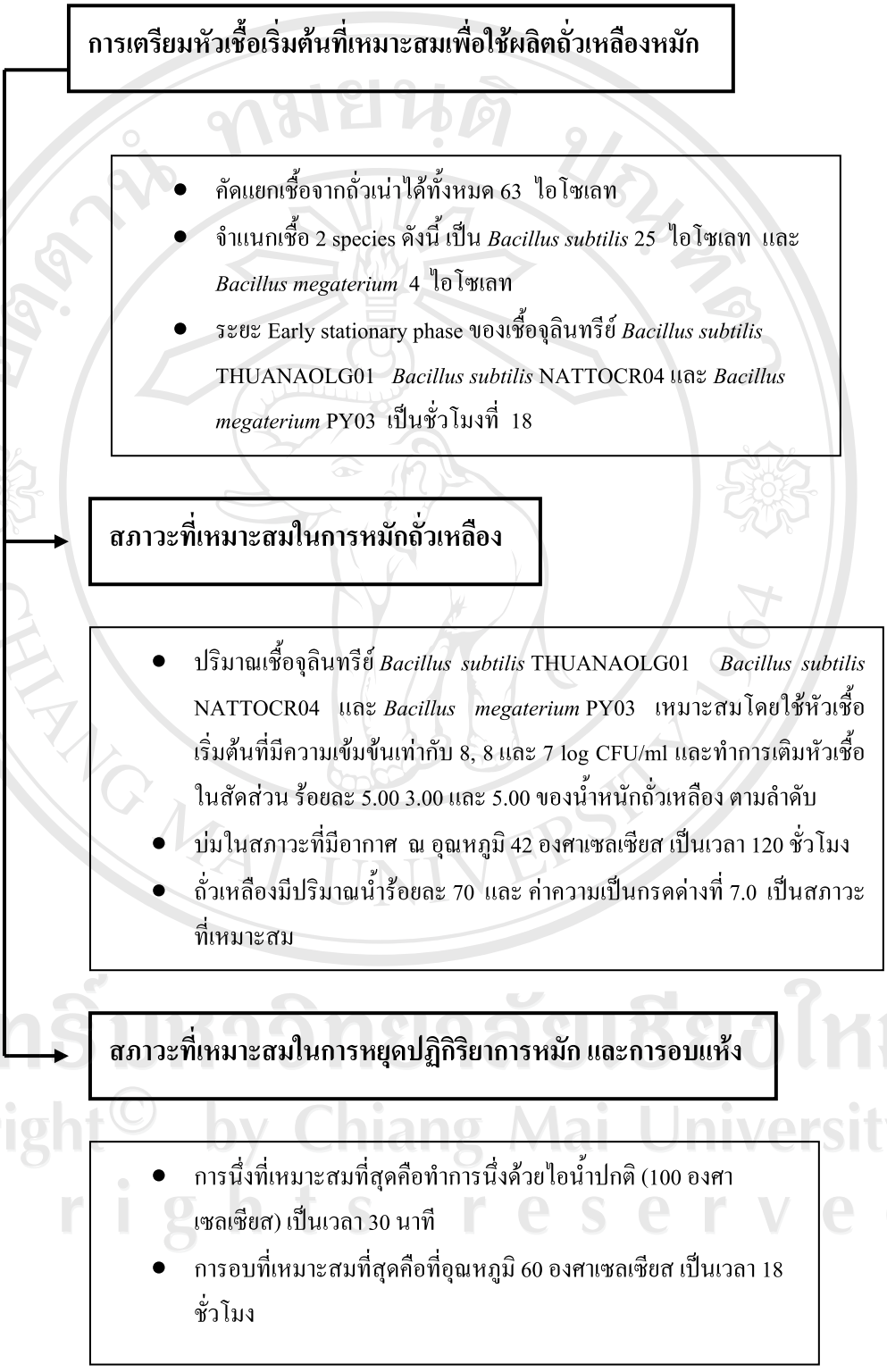
ตัวแปรตาม	สมการทำนาย*	R^2	P
ไดซิอิน	229.59 – 1.63* temp-4.90* time+0.08 temp* time	0.29	0.36
เจนิสทิอิน	161.21 - 0.96 * temp-2.83 * time+0.04 temp* time	0.30	0.34
ไอโซฟลาโวนรวม	130.68+1.35 * temp+4.23 * time-0.06 temp* time	0.25	0.44

หมายเหตุ*ตัวอักษร temp หมายถึงอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และ time หมายถึง เวลา (ชั่วโมง)

ผลจากความร้อนที่ใช้ในการผลิตถั่วเหลืองหมักเพื่อบริโภคพบว่าทั้งการนึ่งและการอบที่มีการแปรผันปริมาณความร้อนและเวลาในช่วงการทดลองดังกล่าวไม่ส่งผลต่อปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวม อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4.33 และ4.28) แต่ในทุกสิ่งทดลองของกระบวนการให้ความร้อนด้วยการนึ่งจะส่งผลให้มีปริมาณไอโซฟลาโวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองหมักที่เป็นกลุ่มควบคุม (ถั่วเหลืองหมัก) ความคงตัวของไอโซฟลาโวนต่อความร้อน ในรายงานวิจัยของ Xu *et al.* (2002) พบว่าที่ความร้อน 200 องศาเซลเซียส ไดซิอิน เจนิสทิอิน สามารถคงสภาพได้เป็นเวลา 30 นาที และโครงสร้างที่มีความคงตัวต่อความร้อนมากที่สุดคือโครงสร้างไอโซฟลาโวนชนิด ไดซิอิน ดังนั้นถั่วเหลืองหมักที่ผ่านความร้อนด้วยกระบวนการนึ่ง ในช่วงอุณหภูมิ 100-121 องศาเซลเซียสในช่วงเวลา 15-30 นาที และการอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิระหว่าง 50-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาระหว่าง 12-24 ชั่วโมง จึงมีปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวมที่ใกล้เคียงกับถั่วเหลืองหมักที่ยังไม่ผ่านความร้อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนผังแสดงภาพรวมของผลการทดลอง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved