

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การพัฒนากระบวนการผลิตถั่วนำโดยใช้เชื้อผสมที่คัดเลือก

ผู้เขียน

นายพันพงศ์ เลขะกุล

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ผศ. ดร. พรชัย ราชตะนะพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกแบคทีเรียสร้างสปอร์ในกลุ่มของ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างถั่วนำสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลต และทำการคัดเลือกเชื้อ 4 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูง (*B. subtilis* MCG8) สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางด้านชีวภาพด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิด (*B. subtilis* MHS1 และ KMB2) และสามารถผลิตวิตามินบีสิบสองสูง (*B. megaterium* B39) นำมาใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตถั่วนำ โดยทำการศึกษาอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมโดยการออกแบบการทดลองแบบส่วนผสม ที่ให้ถั่วนำที่ผลิตขึ้นคุณค่าทางโภชนาการด้านโปรตีนและวิตามินบีสิบสอง และสมบัติของสารสกัดจากถั่วนำในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิดสูง ได้แก่ เชื้อ *B. cereus* และ *Staphylococcus aureus* ศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมด และค่า pH ซึ่งจากการทดสอบอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Design-Expert (ver. 6.0.2) พบว่าอัตราส่วนของเชื้อผสม MCG8 (13%), MHS1 (64%), KMB2 (15%) และ B39 (8%) เป็นอัตราส่วนของเชื้อผสมที่ดีที่สุด โดยทำให้ถั่วนำที่ผลิตขึ้นมีปริมาณโปรตีน (306.99 mg/g wet weight) วิตามินบีสิบสอง (3.66 ng/g wet weight) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus* (14.67 mm) จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight (10.76) และมีค่า pH (8.34) อย่างไรก็ตามพบว่า สารสกัดจากถั่วนำที่ผลิตขึ้นโดยใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมดังกล่าวสามารถไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ได้ ต่อมาเมื่อทำการศึกษาปัจจัยด้านการผลิต คือ เวลาที่ใช้แช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม เวลาที่ใช้ต้มถั่วเหลือง ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก และระยะเวลาที่ใช้ใน

การหมัก ที่มีผลต่อคุณลักษณะของถั่วเน่าโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบทากูชิพบว่า ปัจจัยด้านการผลิตมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ โปรตีน ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* และค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่จากการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส โดยการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าพบว่า ปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าที่ศึกษาในครั้งนี้ไม่มีผลต่อคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าอย่างมีนัยสำคัญ โดยระดับของปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าที่เหมาะสมอยู่ที่ใช้เวลาในการต้มถั่วเหลือง 6 ชั่วโมง ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน สามารถเพิ่มปริมาณ โปรตีนและวิตามินบีสิบสองของถั่วเน่าเป็น 371.84 mg/g wet weight และ 4.86 ng/g wet weight การศึกษาวิธีที่ใช้ทำแห้งถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นโดยใช้การทำแห้งโดยการตากแดดโดยตรง การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C และเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ พบว่าการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C และเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ช่วยรักษาปริมาณ โปรตีน และลดค่า a_w ในระหว่างการทำแห้งได้ดีกว่าการทำแห้งโดยการตากแดดโดยตรงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ทั้ง 3 วิธีที่ใช้ไม่มีความแตกต่างกันในการรักษาปริมาณวิตามินบีสิบสองในระหว่างการทำแห้ง โดยการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ที่เวลา 6 ชั่วโมง สามารถลดค่า a_w ในถั่วเน่าแผ่นได้มากที่สุด (0.75) ถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นมีปริมาณ โปรตีน (591.82 mg/g dry weight) และวิตามินบีสิบสอง (1.76 ng/g dry weight) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับถั่วเน่าแผ่นจากแหล่งผลิต และถั่วเน่าแผ่นที่วางขายในท้องตลาดพบว่า ถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นมีปริมาณ โปรตีนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

Thesis Title	Process Development in Production of <i>Thua-nao</i> Using Selected Mixed Cultures	
Author	Mr. Punpong Lekhakula	
Degree	Master of Science (Biology)	
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Panuwan Chantawannakul	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Pornchai Rachtanapun	Co-advisor

ABSTRACT

Screening and isolation of *Bacillus* spp. from *Thua-nao*; fermented soybeans in Northern Thailand from total of 56 isolates, 4 strains of these (*B. subtilis* MCG8, *B. subtilis* MHS1, *B. subtilis* KMB2 and *B. megaterium* B39) were selected and used to formulate of the pure mixed cultures in *Thua-nao* fermentation. The influence of the different mixtures of four strains on the five responses of protein and vitamin B₁₂ contents, antibacterial activity of *Thua-nao* extracts against some intestinal pathogens (*B. cereus* and *Staphylococcus aureus*), viable cell counts and pH values in *Thua-nao* were studied using the mixture design. The predictable compositions for maximum of nutritional contents of protein, vitamin B₁₂ and the inhibition zone against *S. aureus* were tested in real experiments. The results suggested that the most excellent combination of four *Bacillus* spp. strains were MCG8 (13%), MHS1 (64%), KMB2 (15%) and B39 (8%) with the optimized contents of protein (309.66 mg/g wet weight), vitamin B₁₂ (3.66 ng/g wet weight), inhibition zone of *S. aureus* (14.67 mm), viable cell count in log cfu/g wet weight (10.76) and pH value (8.34). Unfortunately, it was not found an inhibition of *B. cereus* of *Thua-nao* extracts on above-mentioned combination. The effect of production conditions on five parameters were investigated using Taguchi design of experiment. Five parameters of *Thua-nao* production processes including soaking time, boiling time, salt added, fermented temperature and fermented time at four levels were selected and an orthogonal array of L16 (4⁵) were performed. It was found that five parameters of *Thua-nao* production processes had the influence on protein

contents, the inhibition zone against *S. aureus* and pH value. Unfortunately, none of these production parameters were affected to organoleptic attributes of produced *Thua-nao*. The optimal condition of *Thua-nao* production for nutritional contents of protein, vitamin B₁₂ and the inhibition zone against *S. aureus* was boiled for 6 hour and fermented at 30°C for 3 day. Under these condition, protein and vitamins B₁₂ contents increased to 371.84 mg/g wet weight and 4.86 ng/g wet weight, respectively. Finally, the different drying treatments; sun-drying, hot-air drying at 60°C and solar drying were applied to *Thua-nao* disc. Solar and hot-air drying at 60°C significantly decreased in water activity (a_w) and retained more protein content than sun-drying method ($P < 0.05$), while not different in vitamin B₁₂ retention. The solar drying for 6 hour was the most minimal in water activity; a_w as 0.75 with protein and vitamin B₁₂ contents were 591.82 mg/g dry weight and 1.74 ng/g dry weight, respectively. When compared in nutrition values of protein and vitamin B₁₂ of produced *Thua-nao* and traditional *Thua-nao* products, our dried *Thua-nao* shows the highest protein content significant ($P < 0.05$).