

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



250458

การพัฒนากระบวนการผลิตคว้าน้ำโดยใช้เส้นใยพื้ที่กัดเลือก

สันตฤกษ์ เฉลิมขลุ

วิชาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
กันยายน 2553

การพัฒนากระบวนการผลิตตัวนำโดยใช้เชื้อผสมที่คัดเลือก

พันพงส์ เลขะกุล

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



..... ประธานกรรมการ  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์



..... กรรมการ  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล



..... กรรมการ  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรชัย ราชตะนะพันธุ์



..... กรรมการ  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์



..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล



..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรชัย ราชตะนะพันธุ์

17 กันยายน 2553

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงที่ได้ให้ความกรุณาให้คำปรึกษา ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรชัย ราชชนะพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ เสนอแนะแนวทางการแก้ไขปัญหา และข้อบกพร่องในการทำงานวิจัยชิ้นนี้ให้ดียิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์ ที่กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ดียิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. พิษญา บุญประสม ที่ให้ความกรุณาใช้เครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ ตลอดจนให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณป้าแดง และกลุ่มแม่บ้านเกษตรกรตำบลกัวมิ่ง จ. ลำพูน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างถั่วเน่า และการชิมตัวอย่าง และกลุ่มแม่บ้านผู้ผลิตถั่วเน่า อ. แม่แจ่ม จ. เชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างถั่วเน่า

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ในห้องปฏิบัติการ 2704 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาและเสนอแนะ รวมทั้งบรรยากาศอันดีในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ สวทช. ภาคเหนือ ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณคุณพ่อ และคุณแม่ ที่เข้าใจและให้กำลังใจลูกคนนี้เสมอมา

พันพงส์ เลขะกุล



การหมัก ที่มีผลต่อคุณลักษณะของถั่วเน่า โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบทากูชิพบว่า ปัจจัยด้านการผลิตมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน ขนาดของวงไตต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* และค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่จากการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส โดยการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าอย่างพบว่า ปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าที่ศึกษาในครั้งนี้ไม่มีผลต่อคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าอย่างมีนัยสำคัญ โดยระดับของปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าที่เหมาะสมอยู่ที่ใช้เวลาในการต้มถั่วเหลือง 6 ชั่วโมง ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนและวิตามินบีสิบสองของถั่วเน่าเป็น 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) ถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นมีปริมาณโปรตีน (591.82 mg/g dry weight) และวิตามินบีสิบสอง (1.76 ng/g dry weight) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับถั่วเน่าแผ่นจากแหล่งผลิต และถั่วเน่าแผ่นที่วางขายในท้องตลาดพบว่า ถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

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

### ABSTRACT

250458

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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> (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 (4<sup>5</sup>) 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> retention. The solar drying for 6 hour was the most minimal in water activity;  $a_w$  as 0.75 with protein and vitamin B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> of produced *Thua-nao* and traditional *Thua-nao* products, our dried *Thua-nao* shows the highest protein content significant ( $P < 0.05$ ).

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	34
บทที่ 4 ผลการวิจัย	43
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	80
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	87
บรรณานุกรม	89
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	99
ภาคผนวก ข สารเคมี	101
ภาคผนวก ค การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี	103
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีน โดยวิธีของ Lowry	110
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีสิบสอง โดยวิธี Bioassay	112
ภาคผนวก ฉ ข้อมูลการทดลอง	115
ภาคผนวก ช วิธีการคำนวณ	125
ภาคผนวก ซ แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส	126
ประวัติผู้เขียน	128

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า	
1	คุณลักษณะและคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลือง	4
2	คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเน่า	8
3	ส่วนประกอบของกรดอะมิโนในถั่วเน่า	9
4	คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเน่าในแต่ละพื้นที่การผลิต	9
5	จุลินทรีย์ในกลุ่มของ <i>Bacillus</i> ที่พบในระหว่างการหมักถั่วเน่า	10
6	การเปลี่ยนแปลงของค่า pH, NH <sub>3</sub> และปริมาณโปรตีนในระหว่างการหมักถั่วเน่า	12
7	การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์บางชนิดในระหว่างการหมักถั่วเน่า	14
8	สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่แนะนำให้ใช้ในการผลิตวิตามินบีสิบสองในระดับอุตสาหกรรม	21
9	ปริมาณวิตามินบีสิบสองที่แนะนำให้บริโภคในแต่ละวัน	22
10	ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ	24
11	ตัวอย่างของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างแบคทีเรียโอซินที่แยกได้จากอาหาร	25
12	การจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียโอซิน	26
13	ค่า a <sub>w</sub> กับการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร	31
14	แผนการทดลองแบบส่วนผสมของเชื้อทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ในการผลิตถั่วเน่า	38
15	ปัจจัยด้านการผลิตและระดับที่มีผลต่อคุณลักษณะของถั่วเน่า	40
16	แผนการทดลองแบบทากูชิ L16 (4 <sup>5</sup> ) ในการศึกษาผลกระทบของปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่า	41
17	ขนาดวงใสของเอนไซม์โปรติเอสและการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิดของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากถั่วเน่า	43
18	การผลิตวิตามินบีสิบสองของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากถั่วเน่า	46
19	ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากถั่วเน่า	47
20	ผลการทดลองการแปรผันอัตราส่วนของเชื้อผสมต่อคุณลักษณะต่างๆ ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนผสม	50
21	การกำหนดขอบเขตอัตราส่วนของเชื้อผสม และค่าตอบสนองคุณลักษณะของถั่วเน่า	53

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
22 การทำนายอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสม และค่าตอบสนองของคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น	54
23 ผลการทดสอบอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสม โดยการทดลองใช้ผลิตถั่วเน่า	55
24 ผลการทดลองการศึกษาปัจจัยด้านการผลิตของถั่วเน่า โดยการออกแบบการทดลองแบบทากูชิ	58
25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตกับปริมาณ โปรตีน	62
26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตกับขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค <i>S. aureus</i>	63
27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตกับค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น	64
28 การทดสอบคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น	67
29 การประมาณค่าระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสมแบบจุด และผลการทำนายค่าตอบสนองของคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น	69
30 ผลของค่าตอบสนองของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นจากการประมาณค่าของระดับปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสม	71
31 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีน ปริมาณวิตามินบีสิบสอง ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรคของสารสกัดจากถั่วเน่า และจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นภายหลังจากการทำแห้ง	74
32 ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพบางประการของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นภายหลังจากการทำแห้ง	76
33 เปรียบเทียบคุณค่าทางด้านโภชนาการ และคุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อก่อโรค <i>S. aureus</i> ของถั่วเน่าแบบเปียกที่ผลิตขึ้นกับถั่วเน่าจากแหล่งผลิตถั่วเน่า	78
34 การเปรียบเทียบคุณค่าทางด้าน โภชนาการและคุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อก่อโรค <i>S. aureus</i> ของถั่วเน่าแบบแห้งที่ผลิตขึ้นกับถั่วเน่าจากแหล่งผลิตถั่วเน่า	79

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 ลักษณะของเมล็ดถั่วเหลือง	3
2 ถั่วเน่าชาที่ผลิต โดยกลุ่มแม่บ้านเกษตรหมู่บ้านกัวมื่น อ.ป่าซาง จ.ลำพูน	6
3 ผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าเมอะและถั่วเหลืองทรงเครื่องเจที่ผลิต โดย กลุ่มแม่บ้านเกษตรหมู่บ้านกัวมื่น อ.ป่าซาง จ.ลำพูน	6
4 ถั่วเน่าชาที่ผลิต โดยกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตถั่วเน่า อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่	7
5 ผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าเมอะ (ก) และเครื่องแกงถั่วเน่า (ข) ที่ผลิต โดย กลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตถั่วเน่า อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่	7
6 สารประกอบในกลุ่มของ pyrazines บางชนิดที่พบในถั่วเน่า	13
7 การเปลี่ยนแปลงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในระหว่างการหมักถั่วเน่า	15
8 การเปลี่ยนแปลงจำนวนของแบคทีเรีย ค่า pH อัตราการย่อยสลายโปรตีน และการผลิตแอม โมเนียในการหมักคีนมา โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ของ <i>Bacillus</i> sp. DK-W1 ที่ 37°C	16
9 การทำแห้งถั่วเน่าโดยการตากแดด	18
10 โครงสร้างของวิตามินบีสิบสอง	19
11 เครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ที่พัฒนาขึ้น โดย พิชญา และคณะ (2547)	33
12 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นต่อเชื้อก่อโรค <i>B. cereus</i>	51
13 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นต่อเชื้อก่อโรค <i>S. aureus</i>	52
14 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นต่อเชื้อก่อโรค <i>S. aureus</i> จากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมที่วิเคราะห์ได้	56
15 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นต่อเชื้อ <i>B. cereus</i>	59
16 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นต่อเชื้อ <i>S. aureus</i>	60
17 อิทธิพลของปัจจัยด้านการผลิตต่อคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น	61
18 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยปริมาณ โปรตีนที่เกิดจากระดับของปัจจัยด้านการผลิต ที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น	62
19 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค <i>S. aureus</i> ที่เกิดจากระดับ ของปัจจัยด้านการผลิตที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น	64

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
20	การเปลี่ยนแปลงค่า pH เจลลี่ที่เกิดจากระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น	65
21	ผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าอย่างของชุดการทดลองต่างๆ	66
22	อิทธิพลของปัจจัยด้านการผลิตที่มีผลกระทบต่อคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น	68
23	Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตได้ต่อเชื้อก่อโรค <i>S. aureus</i> จากการประมาณระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสม	72

## อักษรย่อและสัญลักษณ์

$\alpha$	=	แอลฟา
$\beta$	=	เบตา
$\gamma$	=	แกมมา
$^{\circ}\text{C}$	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
cfu/g wet weight	=	โคโลนีต่อกรัมน้ำหนักเปียก
log cfu/g wet weight	=	ค่าล็อกของจำนวนโคโลนีต่อกรัม น้ำหนักเปียก
g	=	กรัม
g wet weight	=	กรัมน้ำหนักเปียก
g dry weight	=	กรัมน้ำหนักแห้ง
g/l	=	กรัมต่อลิตร
g/ml	=	กรัมต่อมิลลิลิตร
h	=	ชั่วโมง
mg	=	มิลลิกรัม
mg/ml	=	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
mg/g wet weight	=	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก
mg/g dry weight	=	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
ml	=	มิลลิลิตร
mm	=	มิลลิเมตร
mm <sup>2</sup>	=	ตารางมิลลิเมตร
ng	=	นาโนกรัม
ng/ml	=	นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
ng/g wet weight	=	นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก
ng/g dry weight	=	นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
$\mu\text{g}$	=	ไมโครกรัม
$\mu\text{l}$	=	ไมโครลิตร
rpm	=	รอบต่อนาที