ถั่วเน่าเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วหมักชนิดหนึ่ง ซึ่งอาศัยบทบาทของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการย่อยสลายโปรตีน ให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค จากการเก็บผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าจำนวน 25 ตัวอย่าง ในเขต 5 อำเภอ ของจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ อำเภอหางดง อำเภอสันทราย อำเภอสันป่าตอง อำเภอแม่แตง และ อำเภอสารภี พบว่าถั่วเน่าในแต่ละอำเภอ มีการใช้เครื่องปรุงที่แตกต่างกัน และถูกห่อหุ้มด้วยใบตองที่มีรูปแบบการห่อที่แตกต่างกัน ถั่วเน่าที่ผลิตได้ทั้งหมด มีสีคล้ำกว่าถั่วเหลืองปกติโดย มีค่า L* อยู่ในช่วง 37-58, มีค่า a* อยู่ในช่วง 5-15 และค่า b* อยู่ในช่วง 18-28 มีปริมาณความชื้นร้อยละ 60-70 มีค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ในช่วง 6-8 มีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 8-10 log cfu/g เมื่อนำถั่วเน่าที่สุ่มเก็บได้ทั้งหมดมาทำการแยกเชื้อ *B. subtilis* พบว่าได้แบคทีเรียจำนวน 498 ไอโซเลท (isolates) มีเพียง 169 ไอโซเลท ที่เป็น*B. subtilis* และเมื่อนำไอโซเลทที่เป็น *B. subtilis* มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีน บนอาหารskim milk agar พบว่ามีเพียง 7 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างวงใส (clear zone) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง > 8 มิลลิเมตร *B. subtilis* S2-20 เป็นไอโซเลทเดียวที่สามารถสร้างวงใสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดบนอาหาร skimmilk agar โดยได้วงใสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.6 มิลลิเมตร ดังนั้นจึงนำ เชื้อ *B. subtilis* S2-20 มาศึกษาเป็นต้นเชื้อในการหมักถั่วเน่า

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและจุลชีววิทยาในระหว่างการหมักถั่วเน่า พบว่าการเปลี่ยนแปลงสีของถั่วเน่าแบบใช้เชื้อ *B. subtilis* S2-20 มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกับการหมักแบบใช้เชื้อตามธรรมชาติ โดยพบว่า ค่าสีของถั่วเน่ามีแนวโน้มลดลงทั้ง L*, a* และ b* ถั่วเน่าที่ผ่านการหมักแบบใช้เชื้อ *B. subtilis* S2-20 มีค่า L*, ค่า a* และค่า b* ลดลงจากเดิมเป็น 59.10, 9.11 และ 23.87 ตามลำดับ ปริมาณความชื้นของถั่วเน่าที่ผ่านการเติมเชื้อ *B. subtilis* S2-20 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเช่นเดียวกับถั่วเน่าที่หมักแบบใช้เชื้อตามธรรมชาติ โดยมีความชื้นเพิ่มขึ้นจากเดิมร้อยละ 65.71 เป็นร้อยละ 67.28

224523

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีในระหว่างการหมักถั่วเน่า พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 6-24 ชั่วโมงของการหมักแบบที่เติมเชื้อ *B.subtilis* S2-20 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในขณะที่การหมักแบบใช้เชื้อธรรมชาติอยู่ในช่วง 6-36 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 121.08 และ 104.50 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ($P<0.05$) โดยการหมักถั่วเน่าแบบเติมเชื้อ *B. subtilis* S2-20 มีปริมาณ กรดอะมิโนอิสระทั้งหมดและปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 31.66 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 241.61 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนการหมักถั่วเน่าแบบใช้เชื้อธรรมชาติ มีค่าเท่ากับ 25.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 238.08 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

ปริมาณสารประกอบฟีนอล และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นเกือบตลอดช่วงระยะเวลาของการหมัก อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยเฉพาะถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีการเติมเชื้อ *B. subtilis* S2-20 จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอล และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการหมักแบบใช้เชื้อตามธรรมชาติ ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอล และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH$^{\cdot}$ และ วิธี ABTS$^{\cdot+}$ จะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 393.68 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง 3.84 และ 34.40 มิลลิกรัมโทลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่การหมักแบบใช้เชื้อตามธรรมชาติ มีปริมาณสารประกอบฟีนอล และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 244.06 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง 2.90 และ 20.09 มิลลิกรัมโทลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

การวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีของถั่วเน่าผง เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าผงบรรจุแคปซูล โดยวิธีการหมักแบบเติมเชื้อ *B. subtilis* S2-20 พบว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด และปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างถั่วเน่าสดเป็น 132.82 และ 374.10 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอล และค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS$^{\cdot+}$ และวิธี DPPH$^{\cdot}$ พบว่าลดลงเหลือเพียง 74.56 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง, 10.40 และ 0.90 มิลลิกรัมโทลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

ถั่วเน่าผงบรรจุแคปซูล มีค่าความแปรปรวนน้ำหนักบรรจุ และค่าการแตกตัว อยู่ในช่วง 362.488 - 443.652 .มิลลิกรัม และมีความสามารถในการแตกตัวในน้ำที่เวลา 2.01 นาที อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

Thau-nao, a kind of fermented soybean, exploits *B. subtilis* in order to hydrolyze protein into small molecules to become a source of nutritive substances. A total of 25 samples of thau-nao product from 5 districts of Chiang Mai, i.e. Hang Dong, San Sai, Sanpatong, Mae Taeng and Saraphi, were randomly collected. Primary investigation revealed thau-nao products in each district having their own recipes and distinct style of wrapping with banana leaves. Slightly dark color of all samples was obviously noticeable with L*, a* and b* values found in the range of 37-58, 5-15 and 18-28, respectively. Moisture content was about 60-70% and pH was at 6-8 level. Total viable count for each sample varied from 8-10 log cfu/g. Isolation of bacteria resulted to 498 isolates with only 169 isolates identified as *B. subtilis*. Test of on protease ability for these isolates was conducted by measuring the clear zone produced on skim milk agar after inoculation. Highest clear zone size of over 8 mm was shown in 7 isolates. *B. subtilis* S2-20 showed the highest value of clear zone at 8.6 mm and thus was used as a starter culture in thau-nao fermentation.

Fermentation results showed physical and microbiological changes of thau-nao with L*, a* and b* values potentially lower in both seed and ground forms (59.10, 9.11, 23.87, respectively). Moisture content of thau-nao as starter culture with *B. subtilis* S2-20 increased slightly (65.71 to 67.28%) as similar to naturally fermented thau-nao.

Meanwhile, biochemical changes during fermentation of thau-nao showed significant increase ($P<0.05$) in protease activity (121.08 unit/ml) during 6-24 hours of fermentation of thau-nao with *B. subtilis* S2-20 as starter culture while naturally fermented thau-nao had protease activity increased during 6-36 hours of fermentation with highest level of protease activity at 104.50 unit/ml.

Total free amino acid and soluble protein were found to significantly increase ($P<0.05$) following fermentation in thau-nao with *B. subtilis* S2-20 as starter culture at 31.66 mg/g dry weight and 241.61 mg/g dry weight, respectively, as compared to naturally fermented thau-nao (25.46 mg/g dry weight and 238.54 mg/g dry weight, respectively).

Phenolic compounds and antioxidant activities were found to significantly increase ($P<0.05$) throughout fermentation espcially in thau-nao with *B. subtilis* S2-20, as indicated by higher amount of phenolic compounds and antioxidant activity than thau-nao that was naturally fermented. Highest levels of phenolic compounds and antioxidant were determined through $ABTS^{\cdot+}$ and $DPPH^{\cdot}$ assays (393.68 mg gallic acid/ g dry weight 3.84 and 34.40 mg trolox/ g dry weight respectively), while in naturally fermented thau-nao, phenolic compounds and antioxidant activity were at 244.06 mg gallic acid/ g dry weight 2.90 and 20.09 mg trolox/ g dry weight, respectively.

Further results showed chemical properties of thau-nao powder developed into capsules which used *B. subtilis* S2-20 as starter culture, contained more increasing amount of total free amino acid and protein than fresh thau-nao (132.82 mg/g dry weight and 374.10 mg/g dry weight, respectively). Phenolic compounds and antioxidant activity as analyzed by $ABTS^{\cdot+}$ and $DPPH^{\cdot}$ assays, were reduced to 74.56 mg gallic acid/ g dry weight, and 10.40 mg trolox/ g dry weight and 0.90 mg trolox/ g dry weight, respectively

Finally, fermented thau-nao capsules were tested for quality in appearance and weight variation and results ranged from 362.488 to 443.652 mg while disintegration time took 2.01 min, indicating acceptance levels.