

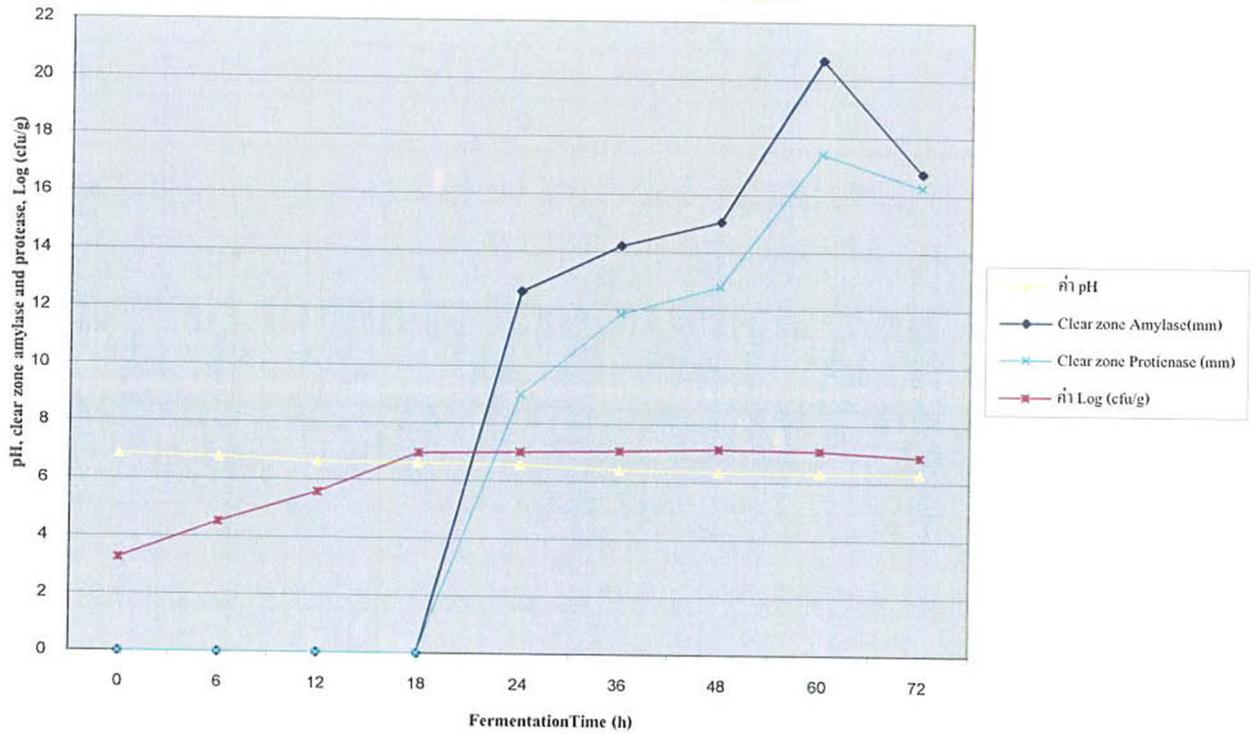
บทที่ 3

ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การคัดเลือกกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

ผลการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* จากถั่วเหลืองหมัก จำนวน 25 ไอโซเลท เมื่อจำแนกคุณสมบัติของเชื้อที่แยกได้ตามคุณลักษณะทางชีวเคมีพบว่า มี Catalase test positive 25 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 100 การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาพบว่า ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างแท่ง 20 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 80 และศึกษาคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์ พบว่าผลิตเอนไซม์ Amylase ได้ 15 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 60 และสามารถผลิตเอนไซม์ Proteinase ได้ 14 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 56

หลังจากนั้นนำแบคทีเรีย *Bacillus* ทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาต้าน อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของเกลือ พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* มีความสามารถในการเจริญได้ที่ อุณหภูมิ 35°C และ 50°C ได้ทั้งหมด และมีความสามารถในการเจริญได้ที่ pH 5.7 และ 6.8 ร้อยละ 100 มีความสามารถเจริญที่เกลือ 7.5% NaCl, 10% NaCl ร้อยละ 100 (ตารางที่ 3) เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติการผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *Bacillus cereus* TISTR NO.687, *E. coli* TISTR NO.780, *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* TISTR NO.118 พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้นที่ยับยั้ง *S. aureus* TISTR NO.118 คิดเป็นร้อยละ 8 โดยรหัส SB_MYP_1 ยับยั้ง *S. aureus* TISTR NO.118 ได้ 128.17 IU และ รหัส SB_MYP_2 *S. aureus* TISTR NO.118 ได้ 90.78 IU นำกล้าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท มาทดสอบโดยการคัดเลือกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E ได้กล้าเชื้อ *B. subtilis* ร้อยละ 98.2 จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ รหัส SB_MYP_1 และ รหัส SB_MYP_2 จึงเลือกกล้าเชื้อรหัส SB_MYP_1 มาศึกษาต่อ เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์และยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากกว่า กล้าเชื้อรหัส SB_MYP_2 แสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งคุณสมบัติของกล้าเชื้อ รหัส SB_MYP_1 มีการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นในช่วง Stationary phase โดยเมื่อเกิดกระบวนการหมัก กล้าเชื้อสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ ซึ่งพบในช่วง Stationary phase ของการเจริญ ซึ่งการผลิตช่วงนี้มีความสำคัญ เช่น สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้



รูปที่ 2 คุณสมบัติของกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* รหัสเชื้อ SB_MYP_1

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 ห้องสมุดงานวิจัย
 วันที่..... 14 ก.ย. 2555

เลขทะเบียน..... 243902

เลขเรียกหนังสือ.....

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางด้านชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก

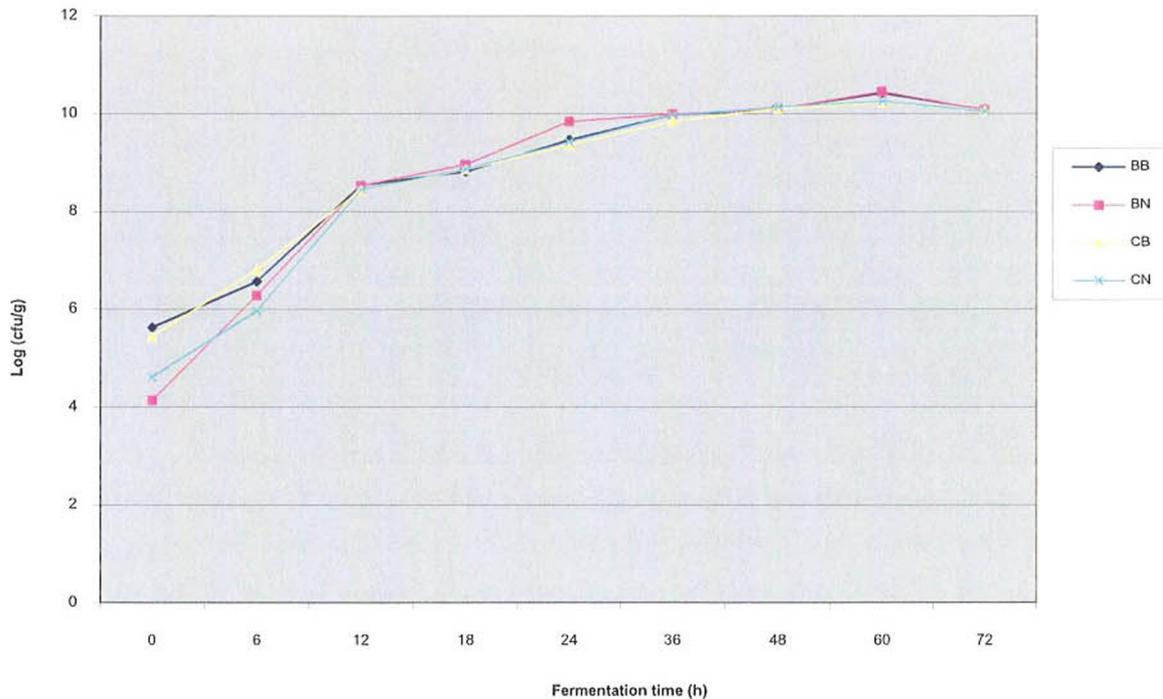
รหัส ตัวอย่าง	Gram ^d	Catalase test	Temp ^b (°C)		ไม่มี O ₂	Motility	NaCl ^b (%)		pH ^b		Citrate ^c
			35	50			7.5	10	5.7	6.8	
SB_MYP_1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_8	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_10	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_12	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_13	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_14	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_15	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_17	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_18	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_19	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_20	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_21	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SB_MYP_22	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_23	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SB_MYP_25	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

หมายเหตุ : SB = soybean, MYP = Manitol egg yolk polymyxin

a = Gram staining, b = growth ability, c = ความสามารถในการย่อย citrate

ตอนที่ 2 การนำกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* มาทำการหมักถั่วเหลือง

1. การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (FDA-BAM (2001))



รูปที่ 4 การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ระยะเวลาต่างๆ

หมายเหตุ : BB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เดิมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

BN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เดิมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

CB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + เดิมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

CN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + ไม่เดิมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

จากการนำกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก มาทำการหมักโดยเปรียบเทียบการให้ความร้อน 2 แบบ คือ การนำไปต้มและการให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นของถั่วหมักที่มีการเดิมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่าถั่วหมักแบบธรรมชาติ แต่เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป ปริมาณเชื้อจะเพิ่มมากขึ้นตามด้วยจนกระทั่งถึงการหมักที่ 60 ชั่วโมง พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลดลงเมื่อครบระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

2. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12

ตารางที่ 4 ปริมาณวิตามินบี 12 ที่พบในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก

Samples	Vitamin B12 $\mu\text{g}/100\text{g}$
BB	0.18 ^b
BN	<0.10 ^a
CB	0.27 ^c
CN	0.16 ^b
P-value	0.001

หมายเหตุ : BB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เต็มกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

BN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เต็มกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

CB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + เต็มกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

CN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + ไม่เต็มกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

เมื่อนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่สิ้นสุดระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 พบว่า ตัวอย่างถั่วหมักที่มีการให้ความร้อนแบบการนึ่งฆ่าเชื้อ และเต็มกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) มีปริมาณวิตามินบี 12 มากที่สุด คือ 0.27 $\mu\text{g}/100\text{g}$ รองลงมาเป็นตัวอย่างที่ให้ความร้อนโดยการต้มและเต็มกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) พบปริมาณวิตามินบี 12 0.18 $\mu\text{g}/100\text{g}$ โดยตัวอย่างที่ให้ความร้อนโดยการต้ม แต่ไม่มีการเต็มกล้าเชื้อ (BN) จะมีปริมาณวิตามินบี 12 ต่ำสุด คือ <0.10 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ทั้งนี้อาจเป็นสาเหตุจากวิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่ละลายน้ำ จึงเกิด การสูญเสียวิตามินระหว่างขั้นตอนของการแช่ถั่วก่อนการนำมาให้ความร้อน และการให้ความร้อนโดยการต้มเป็นระยะเวลาสั้น ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สูญเสียวิตามินบี 12 ระหว่างกระบวนการได้เช่นเดียวกัน จึงทำให้ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนโดยการนึ่งฆ่าเชื้อและเต็มกล้าเชื้อ (CB) มีปริมาณวิตามินบี 12 มากกว่า การให้ความร้อนแบบต้มและเต็มกล้าเชื้อ (BB) นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.05$)

3. การวิเคราะห์แคลเซียม ฟอสฟอรัสและธาตุเหล็ก (ICP-MS 7500CE)

จากการนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักมาวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัส แคลเซียม และธาตุเหล็ก ดังตารางที่ 5-7 ตามลำดับ พบว่า เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่มีการให้ความร้อนแบบต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) มีปริมาณฟอสฟอรัส 2533.33 mg/kg แคลเซียม 1700.77 mg/kg และธาตุเหล็ก 126.63 mg/kg ซึ่งมากกว่าตัวอย่างถั่วเหลืองที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (BN) สำหรับการให้ความร้อนแบบการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) มีปริมาณฟอสฟอรัส 3250.74 mg/kg แคลเซียม 2984.65 mg/kg และธาตุเหล็ก 175.40 mg/kg ซึ่งมากกว่าตัวอย่างถั่วเหลืองที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (CN) ทั้งนี้ตัวอย่างที่ให้ความร้อนแบบการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ (CB) จะมีปริมาณฟอสฟอรัส แคลเซียมและธาตุเหล็กที่มากกว่าตัวอย่างที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 ปริมาณธาตุเหล็ก (mg/kg) ที่พบในถั่วหมักชนิดต่าง ๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
BB	107.63 ± 0.21 ^b	93.54 ± 0.23 ^a	96.15 ± 0.06 ^a	135.55 ± 0.13 ^c	110.08 ± 0.07 ^b	82.54 ± 0.18 ^a	126.63 ± 0.11 ^c
BN	111.57 ± 0.21 ^c	108.81 ± 0.09 ^d	145.65 ± 0.10 ^c	89.92 ± 0.36 ^a	114.67 ± 0.12 ^c	99.08 ± 0.27 ^b	112.72 ± 0.19 ^a
CB	113.11 ± 0.17 ^d	103.14 ± 0.24 ^b	108.17 ± 0.07 ^b	111.14 ± 0.12 ^b	101.55 ± 0.17 ^a	142.12 ± 0.99 ^d	175.40 ± 0.13 ^d
CN	86.31 ± 0.19 ^a	107.54 ± 0.31 ^c	277.44 ± 0.09 ^d	387.55 ± 0.09 ^d	115.55 ± 0.10 ^d	122.68 ± 0.29 ^c	126.58 ± 0.25 ^b
P-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

หมายเหตุ : BB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เต็มกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

BN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เต็มกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

CB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งมาเชื้อ (clave) + เต็มกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

CN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งมาเชื้อ (clave) + ไม่เต็มกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis*

ค่าเฉลี่ยที่ปรากฏในตารางได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

ถ้าค่า P-value < 0.05 แสดงว่าตัวอย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 8 ค่า pH ของถั่วหมักที่ระยะเวลาต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)								
	0	6	12	18	24	36	48	60	72
BB	6.992 ± 0.001 ^d	7.028 ± 0.001 ^d	6.391 ± 0.001 ^b	7.288 ± 0.001 ^d	7.283 ± 0.003 ^c	7.454 ± 0.003 ^a	8.352 ± 0.001 ^a	8.314 ± 0.001 ^a	8.516 ± 0.001 ^d
BN	6.612 ± 0.001 ^b	7.003 ± 0.001 ^c	6.435 ± 0.001 ^b	6.744 ± 0.001 ^b	7.652 ± 0.001 ^d	8.507 ± 0.003 ^d	8.513 ± 0.003 ^c	8.363 ± 0.003 ^b	8.362 ± 0.003 ^a
CB	6.653 ± 0.001 ^c	6.760 ± 0.001 ^c	6.045 ± 0.001 ^a	6.687 ± 0.001 ^a	7.114 ± 0.001 ^b	8.061 ± 0.001 ^c	8.495 ± 0.001 ^b	8.377 ± 0.001 ^c	8.479 ± 0.001 ^b
CN	6.608 ± 0.001 ^a	6.764 ± 0.001 ^b	6.409 ± 0.001 ^c	7.012 ± 0.003 ^c	7.082 ± 0.003 ^a	7.539 ± 0.001 ^b	8.585 ± 0.001 ^d	8.437 ± 0.003 ^d	8.489 ± 0.001 ^c
P-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

หมายเหตุ : BB = ถั่วอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

BN = ถั่วอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

CB = ถั่วอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

CN = ถั่วอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + ไม่เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

ค่าเฉลี่ยที่ปรากฏในตารางได้จากวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

ถ้าค่า P-value < 0.05 แสดงว่าตัวอย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อพิจารณาค่า pH ของถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มแบบเติมน้ำเกลือ (BB) และไม่เติมน้ำเกลือ (BN) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมากกว่าถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อแบบการเติมน้ำเกลือ (CB) และไม่เติมน้ำเกลือ (CN) จนกระทั่งถึงระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง และจะมีค่าน้อยลงหลังจาก 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อครบระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ค่า pH ของตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มจะมีความมากกว่าตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อส่วนกรณีของการหมักแบบธรรมชาติจะพบการเปลี่ยนแปลงของ pH ไม่สม่ำเสมอ แต่เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P < 0.05)

ตารางที่ 9 ค่าสีของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก

Color	Samples	Fermentation time (h)									
		0	6	12	18	24	36	48	60	72	
L*value	BB	52.67 ± 0.14 ^b	53.08 ± 0.01 ^c	53.64 ± 0.03 ^c	57.61 ± 0.01 ^b	58.17 ± 0.14 ^d	58.20 ± 0.01 ^c	60.02 ± 0.01 ^c	61.29 ± 0.14 ^c	65.91 ± 0.01 ^c	
	BN	56.42 ± 0.03 ^a	56.84 ± 0.14 ^d	57.46 ± 0.03 ^d	57.50 ± 0.14 ^c	57.71 ± 0.01 ^c	59.94 ± 0.03 ^d	60.88 ± 0.01 ^d	61.34 ± 0.03 ^c	70.76 ± 0.14 ^d	
	CB	44.94 ± 0.06 ^a	46.18 ± 0.01 ^d	48.14 ± 0.14 ^c	50.20 ± 0.01 ^d	55.89 ± 0.14 ^b	57.05 ± 0.01 ^b	58.36 ± 0.01 ^a	59.34 ± 0.06 ^b	61.95 ± 0.03 ^b	
	CN	43.09 ± 1.41 ^a	50.13 ± 0.04 ^a	51.28 ± 0.01 ^a	52.98 ± 0.01 ^a	53.20 ± 0.01 ^a	53.37 ± 0.03 ^a	58.56 ± 0.04 ^b	59.11 ± 0.01 ^a	60.27 ± 0.03 ^a	
	P-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
a*value	BB	0.72 ± 0.14 ^b	1.55 ± 0.01 ^d	1.97 ± 0.01 ^d	1.99 ± 0.01 ^{ab}	2.09 ± 0.01 ^b	2.21 ± 0.01 ^b	2.47 ± 0.28 ^b	2.70 ± 0.01 ^a	3.16 ± 0.04 ^b	
	BN	0.88 ± 0.03 ^b	1.32 ± 0.01 ^c	1.53 ± 0.04 ^a	1.68 ± 0.14 ^d	2.11 ± 0.14 ^c	2.17 ± 0.03 ^b	2.32 ± 0.14 ^a	2.43 ± 0.01 ^a	2.87 ± 0.03 ^b	
	CB	0.36 ± 0.03 ^d	0.63 ± 0.07 ^d	1.97 ± 0.01 ^c	2.26 ± 0.04 ^c	2.27 ± 0.03 ^b	2.37 ± 0.01 ^b	2.42 ± 0.03 ^a	2.43 ± 0.04 ^a	2.95 ± 0.03 ^b	
	CN	1.12 ± 0.01 ^a	1.15 ± 0.03 ^b	1.76 ± 0.04 ^b	1.80 ± 0.14 ^{ab}	1.81 ± 0.01 ^a	1.89 ± 0.14 ^a	2.23 ± 0.04 ^a	2.58 ± 0.28 ^a	2.62 ± 0.03 ^a	
	P-value	0.002	0.000	0.000	0.018	0.014	0.012	0.519	0.310	0.000	
B*value	BB	9.71 ± 0.01 ^c	10.97 ± 0.03 ^d	12.48 ± 0.01 ^d	12.54 ± 0.14 ^d	12.59 ± 0.14 ^d	13.37 ± 0.01 ^a	13.40 ± 0.01 ^a	15.63 ± 0.03 ^c	16.33 ± 0.04 ^c	
	BN	8.66 ± 0.01 ^b	9.85 ± 0.14 ^a	11.85 ± 0.01 ^c	12.00 ± 1.41 ^c	12.69 ± 0.14 ^d	13.40 ± 0.14 ^a	13.43 ± 0.04 ^a	14.68 ± 0.01 ^b	15.69 ± 0.14 ^b	
	CB	7.80 ± 0.14 ^a	8.35 ± 0.01 ^a	8.37 ± 0.03 ^a	9.98 ± 0.01 ^a	12.38 ± 0.14 ^b	13.00 ± 0.41 ^a	14.42 ± 0.14 ^b	15.75 ± 0.03 ^d	16.93 ± 0.04 ^d	
	CN	7.93 ± 0.04 ^a	9.51 ± 0.01 ^b	9.94 ± 0.06 ^b	11.14 ± 0.06 ^{ab}	12.71 ± 0.01 ^a	12.72 ± 0.03 ^a	13.19 ± 0.14 ^a	13.42 ± 0.01 ^a	15.42 ± 0.01 ^a	
	P-value	0.000	0.000	0.000	0.079	0.156	0.751	0.001	0.000	0.000	

หมายเหตุ : BB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

BN = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

CB = ตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งมาเชื้อ (clave) + เติมน้ำเกลือ *Bacillus subtilis*

CN = ตัวอย่างแก้วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (clave) + ไม่เติมกล้ำเชื้อ *Bacillus subtilis*

ค่าเฉลี่ยที่ปรากฏในตารางได้จากกราฟวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

ค่า P-value < 0.01 หมายถึงตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเชิงทางสถิติ

ค่า P-value < 0.05 หมายถึงตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่า P-value > 0.05 หมายถึงตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการวิเคราะห์ค่าสีของแก้วเหลืองระหว่างการผลิตหมัก ที่เวลา 0 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยการต้มแบบเติมกล้ำเชื้อ (BB) และไม่เติมกล้ำเชื้อ (BN) กับการให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อแบบเติมกล้ำเชื้อ (CB) และไม่เติมกล้ำเชื้อ (CN) มีค่า Lightness, Redness และ Yellowness แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อจะมีสีเข้มกว่าแก้วเหลืองที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม ในระหว่างระยะเวลาหมัก ทั้ง 4 ตัวอย่าง จะมีค่าสีเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการผลิต จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ตัวอย่างทั้งหมด มีค่า Lightness, Redness และ Yellowness แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ตามลำดับ

ตารางที่ 10 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อน
ด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
Alcohols							
1-octen-3-ol	+	+	+	-	-	-	-
2,3-Butanediol	+	-	-	-	-	-	-
3-Octanol	+	+	+	-	-	-	-
Aldehydes							
Benzaldehyde	-	+	+	+	+	+	+
2,2-dimethyl Hexanal	-	-	-	-	-	+	-
Hexanal	-	-	-	+	+	-	-
Esters and acid							
2-methyl propanoic acid	-	-	-	-	+	+	+
Ethyl acetate	-	+	+	+	-	-	-
Pyrazines							
2,6-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	-	+	+
2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	+	+	+	+
Trimethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	+
Tetramethyl pyrazine	-	-	-	+	+	+	+
3,5-dimethyl-2-propyl pyrazine	-	-	-	-	-	-	+
3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	-	+	+
Aromatic compounds							
2-methoxy phenol	-	-	-	+	-	-	-
Ketones							
3-Octanone	-	-	-	-	-	-	+
4-methyl 2-Hexanone	-	-	-	-	+	-	-
2-heptanone	-	-	-	-	+	+	+
Alkanes							
2,6,10-trimethyl tetradecane	-	-	-	-	-	-	+
hexadecane	-	-	+	+	+	+	+
pentadecane	-	-	+	-	-	-	-
cyclopentasiloxane	-	-	-	+	-	-	-
Octadecane	-	-	-	-	+	-	-
Miscellaneous							
indole	-	-	-	-	+	+	+

หมายเหตุ : - หมายถึง ตรวจไม่พบกลิ่น

+ หมายถึง ตรวจพบกลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 11 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อน
ด้วยการต้มและไม่เติมกล้าเชื้อ (BN) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
Alcohols							
1-octen-3-ol	+	+	+	+	+	+	+
3-Octanol	+	+	+	-	-	-	-
2,3-Butanediol	-	-	+	-	-	-	-
1-nonen-3-ol	-	-	-	+	+	+	+
Aldehydes							
2-Methylbutanal	+	+	+	-	-	-	-
2-Methylpropanal	-	+	+	+	-	-	-
Benzaldehyde	-	-	-	-	-	+	+
Esters and acids							
Ethyl acetate	-	+	+	+	-	-	-
Pyrazines							
2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	+	-	+	+
Trimethyl pyrazine	-	-	-	+	+	+	
Tetramethyl pyrazine	-	-	-	+	-	+	+
3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	-	+	+
3,5-dimethyl-2-propyl pyrazine	-	-	-	-	-	-	+
Aromatic compounds							
2-methoxy phenol	-	-	+	+	-	-	-
Ketones							
2-Butanone, 3-phenyl	-	-	-	-	+	-	-
2-heptanone	-	-	-	-	-	-	+
Alkanes							
Cyclopentasiloxane, decamethyl	+	+	-	+	-	+	-
Decane, 2,6,8- trimethyl	-	-	+	-	-	-	-
2,6,8-trimethyl Decane	-	-	-	+	+	+	+
Miscellaneous							
indole	-	-	-	-	-	-	+

หมายเหตุ : - หมายถึง ตรวจไม่พบกลิ่น

+ หมายถึง ตรวจพบกลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 12 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อน
ด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
Alcohols							
1-octen-3-ol	+	+	+	-	-	-	-
3-Octanol	+	+	-	-	-	-	-
2,3-Butanediol	-	-	+	-	-	-	-
Aldehydes							
Benzeneacetaldehyde	+	+	-	+	+	-	-
Benzaldehyde	-	+	+	+	+	+	+
Esters and acids							
2-methyl propanoic acid	-	-	-	-	+	+	+
Ethyl acetate	-	+	+	+	-	-	-
Pyrazines							
2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	+
Trimethyl pyrazine	-	-	-	+	-	+	+
tetramethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	-
2,5-dimethyl-3-propyl pyrazine	-	-	-	+	-	-	-
2,3,5-trimethyl-6-ethyl pyrazine	-	-	-	-	+	-	-
3,5-dimethyl-2-propyl pyrazine	-	-	-	-	-	-	+
3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	-	+	+
Aromatic compounds							
Mequinol	-	-	-	+	-	-	-
Ketones							
Acetone	+	+	+	-	-	-	-
2-heptanone	-	-	-	-	+	+	+
Alkanes							
hexadecane	-	+	-	-	-	-	+
Miscellaneous							
indole	-	-	-	-	+	+	+

หมายเหตุ : - หมายถึง ตรวจไม่พบกลิ่น

+ หมายถึง ตรวจพบกลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก

ตารางที่ 13 สารประกอบให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างถั่วตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อน
ด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและไม่เติมกลูตาซีโอ (CN) ที่ระยะเวลาการหมักชั่วโมงต่างๆ

Samples	Fermentation time (h)						
	0	12	24	36	48	60	72
Alcohols							
1-octen-3-ol	+	+	+	+	+	+	+
1-Hexanol	+	+	-	-	-	-	-
3-Octanol	+	+	+	+	-	-	-
2,3-Butanediol	-	-	-	+	-	-	-
Aldehydes							
Benzaldehyde	-	-	-	-	-	+	+
Esters and acids							
Ethyl acetate	+	+	+	-	-	-	-
Pyrazines							
2,6-dimethyl pyrazine	-	-	-	+	-	-	-
2,5-dimethyl pyrazine	-	-	-	-	+	-	-
Trimethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	+
Tetramethyl pyrazine	-	-	-	-	+	+	+
2,5-dimethyl-3-ethyl pyrazine	-	-	-	-	+	-	+
2,3,5-trimethyl-6-ethyl pyrazine	-	-	-	-	-	+	+
Aromatic compounds							
Mequinol	-	+	+	+	-	-	-
Ketones							
3-Octanone	-	+	+	+	-	-	+
2-heptanone	-	-	-	-	-	-	+
Alkanes							
Cyclopentasiloxane, decamethyl	-	-	+	-	-	+	+
hexadecane	-	-	+	-	+	+	+
2-pentadecane	-	-	-	-	+	-	-
2,4,6-trimethyl octane	-	-	-	-	+	+	-
Miscellaneous							
indole	-	-	-	-	-	-	+

หมายเหตุ : - หมายถึง ตรวจไม่พบกลิ่น

+ หมายถึง ตรวจพบกลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก

จากการนำตัวอย่างตัวเหลืองหมักมาวิเคราะห์กลิ่นด้วย GC-MS ซึ่งแสดงดังตารางที่ 10-13 โดยกลิ่นที่พบส่วนใหญ่จะเป็นจำพวก alcohols, aldehydes, esters and acids, pyrazines, aromatic compounds, ketones, และ alkanes เป็นต้น โดยตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) กับตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) จะพบ indole ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป ซึ่งทำให้ระยะเวลาในการหมักลดลงมากกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมกล้าเชื้อ ซึ่งจะพบ indole ในชั่วโมงที่ 72

ในช่วงแรกของการหมักในตัวอย่างที่มีการเติมกล้าเชื้อจะพบสารประกอบในกลุ่ม alcohols ได้แก่ 1-octen-3-ol, 1-Hexanol และ 3-Octanol เป็นต้น แต่ในตัวอย่างที่หมักแบบธรรมชาติจะพบกลิ่น 1-octen-3-ol ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ชั่วโมงที่ 72 นอกจากนี้ยังมีสารประกอบที่ให้กลิ่นหอมฉุน เช่น 2-heptanone, pyrazine และ benzaldehyde เป็นต้น โดยตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) กับตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) จะพบ 2-heptanone และ benzaldehyde ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการพบ indole สำหรับตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม + ไม่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BN) และ ตัวอย่างตัวเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ + ไม่เติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CN) จะพบ 2-heptanone, benzaldehyde เฉพาะชั่วโมงที่ 72 เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า การเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถเพิ่มบทบาทในการหมักที่ให้คุณภาพได้มากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ ทั้งการลดระยะเวลาในการหมักและการให้กลิ่นที่หอมฉุนมากกว่าด้วย

