

บทที่ 4

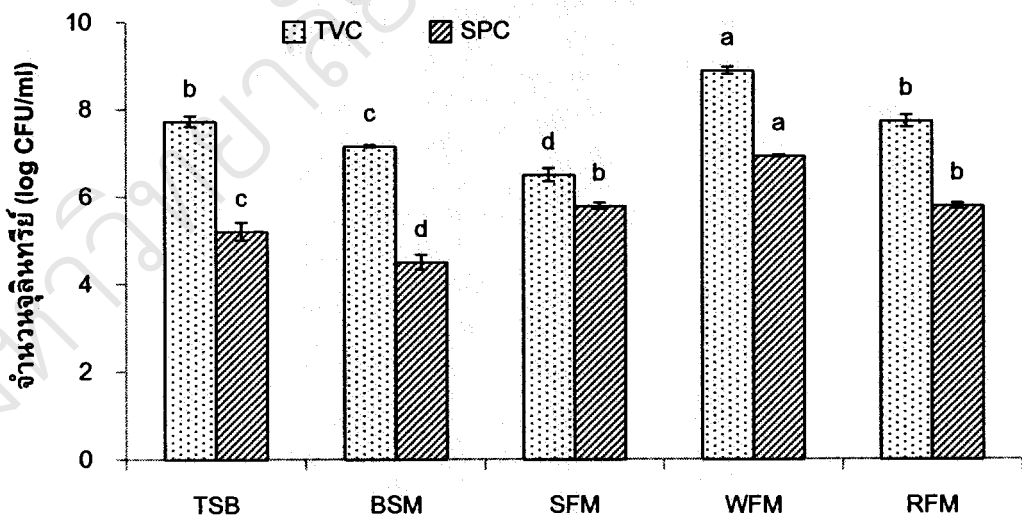
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษากระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

4.1.1 ศึกษากระบวนการเตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อชนิดผงแห้ง

4.1.1.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและราคาถูกเพื่อใช้เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

จากการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้ง 3 ชนิด คือ แป้งถั่วเหลืองชนิดที่มีไขมันเต็ม แป้งข้าวเจ้า และแป้งสาลี โดยการเติมแป้งในอัตราร้อยละ 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน (BSM) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทางการค้า Trypticase soy broth (TSB) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* TN51 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งทั้ง 3 ชนิด โดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด (Total viable count, TVC) อยู่ในช่วง 6.50 – 8.88 log CFU/ml และตรวจพบแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมด (Spore count, SPC) อยู่ในช่วง 5.79 – 6.93 log CFU/ml (ภาพ 6)



ภาพ 6 ปริมาณ TVC และ SPC ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรพื้นฐานที่เติมแป้งถั่วเหลือง (SFM) แป้งสาลี (WFM) และแป้งข้าว (RFM) เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทางการค้า (TSB) และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน (BSM)

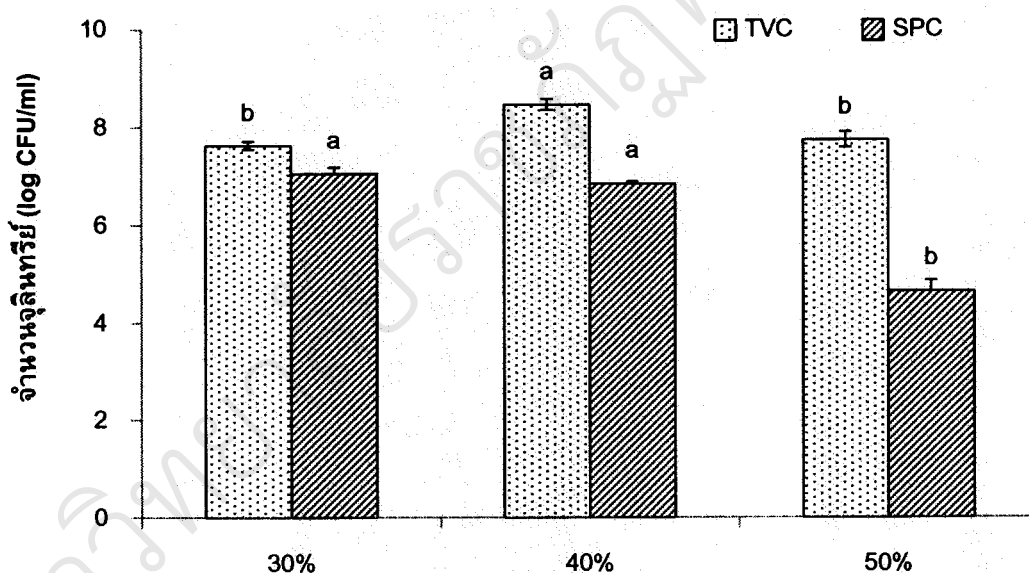
แป้งทั้ง 3 ชนิดที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งสาลีและแป้งข้าวเจ้าตรวจพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีสปอร์สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งถั่วเหลืองแม้ว่าแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบมีปริมาณน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานคือ 6.5 เท่า แต่มีปริมาณของแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานถึง 12.9 เท่า ในการผลิตผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปสำหรับหมักถั่วเน่าในครั้งนี้ต้องการให้แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในรูปที่มีสปอร์มากกว่าเซลล์ปกติ เนื่องจากสปอร์สามารถทนต่อความแห้งและความร้อนสูง รวมทั้งทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อกระบวนการผลิตกล้าเชื้อสำเร็จรูปชนิดผงที่ต้องผ่านการอบแห้งที่ความร้อนสูงและสามารถเหลือรอดในผงแป้งที่แห้งในระหว่างการเก็บรักษาได้

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสร้างสปอร์ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทางการค้า TSB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยพบเซลล์แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทางการค้า 6 - 17 เท่า และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีสามารถใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* TN51 ได้ดีที่สุดโดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดในปริมาณที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า 12 เท่า และตรวจพบแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้ามากถึง 17 เท่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งทั้ง 3 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากแป้งสาลีมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 มากที่สุด โดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากคุณสมบัติทางเคมีของแป้งที่มีความแตกต่างโดย แป้งถั่วเหลืองเป็นแป้งที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากกว่าแป้งสาลีและแป้งข้าวคือร้อยละ 38-44 10-11 และ 8.9 ตามลำดับ (สมชาย ประภาวัต, 2535; อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550) โปรตีนถั่วเหลืองมีกรดอะมิโนซิสทีนซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของ *Bacillus* ก่อนข้างต่ำขณะที่โปรตีนในแป้งสาลีคือ ไกลอะดินและกลูเตนิน มีองค์ประกอบของซิสทีนและซิสทีอินค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงอาจส่งผลต่อการเจริญที่ดีกว่าของ *Bacillus* ได้ นอกจากนี้ชนิดและปริมาณของน้ำตาลซึ่งแบคทีเรียใช้เป็นแหล่งคาร์บอนก็อาจส่งผลต่อการเจริญที่แตกต่างกันนี้ด้วย แบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งราฟฟิโนสและสตาซิโอส ในปริมาณสูง และอาจหยุดการเจริญลงเมื่อมีปริมาณของน้ำตาลซูโครสสูงเกินไป (Taira, Tanaka, Saito, & Saito, 1990; Taira, 1992) เช่น น้ำตาล โปรตีนและกรดอะมิโนชนิดต่างๆ

ดังนั้นจึงคัดเลือกแป้งสาลีไปศึกษาหาระดับความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมในการเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลาวเพื่อใช้เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปผลิตเป็นผงแห้งในตอนต่อไป

4.1.1.2 ผลการศึกษาในระดับความเข้มข้นของแป้งสาลีที่เหมาะสมในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลาว

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลาวที่เตรียมจากแป้งสาลีที่ ผันแปรความเข้มข้น 3 ระดับคือร้อยละ 30 40 และ 50 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย TVC และ SPC ดังแสดงในภาพ 7 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลาวที่เตรียมจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 40 มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 มากที่สุด โดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลาวที่เตรียมจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 30 และ 50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นส่วนผสมร้อยละ 30 40 และ 50 คือ 7.62 8.46 และ 7.4 log CFU/g ตามลำดับ



ภาพ 7 ปริมาณ TVC และ SPC ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลาวจากแป้งสาลีที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลาวที่เตรียมจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 30 และ 40 ตรวจพบแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีปริมาณสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลาวที่เตรียมจากแป้งสาลีความเข้มข้นร้อยละ 50 คิดเป็น 24 และ 22 เท่า ตามลำดับ การที่แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลาวจากแป้งได้แตกต่างกันนั้นอาจเป็นผลจาก

ระดับความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดจากแป้งที่แตกต่างกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดจากแป้งสาธิตความเข้มข้นร้อยละ 40 มีค่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 64.41 ซึ่งมีความเหมาะสมกับการเจริญของ *B. subtilis* TN51 ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดจากแป้งสาธิตความเข้มข้นร้อยละ 30 และ 50 ซึ่งมีค่าความชื้นสูงเริ่มต้นร้อยละ 74.56 และ 53.92 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Zhao, Hu, Huang, Liang, & Zhao (2008) ที่ได้ระบุว่าค่าความชื้นของวัสดุหมักแบบ solid state fermentation ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของ *B. licheniformis* อยู่ที่ระดับร้อยละ 65

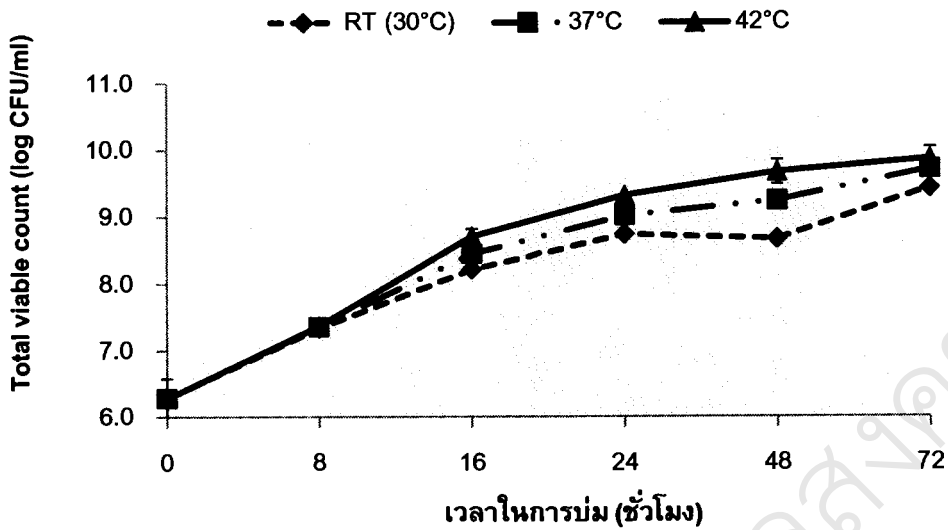
งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกการเติมแป้งสาธิตในอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดสูตรพื้นฐานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปผลิตเป็นผงกล้าเชื้อในขั้นตอนต่อไป และจากผลการศึกษาในตอนที่ 4.1.1.1 และ 4.1.1.2 ทำให้สามารถสรุปสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดจากแป้งที่เหมาะสมและราคาถูกเพื่อใช้เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปผลิตเป็นผงกล้าเชื้อดังตาราง 8

ตาราง 8 ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดจากแป้งสาธิตสำหรับเพาะเลี้ยง *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปผลิตเป็นผงกล้าเชื้อ

ส่วนประกอบ	ปริมาณต่อลิตร	
น้ำตาลซูโครส	10	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
แป้งสาธิต	400	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

4.1.1.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดจากแป้งสาธิต

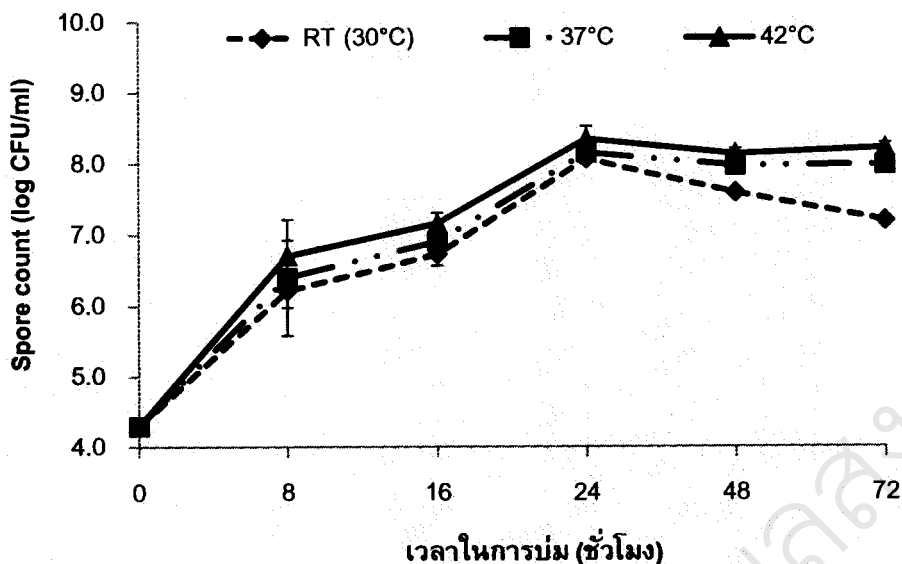
ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเพาะเชื้อ *B. subtilis* TN51 ด้วยการเพาะเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดจากแป้งสาธิตความเข้มข้นร้อยละ 40 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) 37 และ 42 องศาเซลเซียส แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมงในภาพ 8



ภาพ 8 ปริมาณ total viable count ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแบ่งสาธิตความเข้มข้นร้อยละ 40 ในระหว่างการบ่มเพาะที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

จุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแบ่งสาธิตเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการบ่ม โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปริมาณเริ่มต้น 2.46 – 3.04 log CFU/g คิดเป็น 25 – 30 เท่าของปริมาณเริ่มต้น หลังจากชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 72 ของการบ่ม ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยมีปริมาณเพิ่มขึ้น 0.5 - 0.7 log CFU/g เท่านั้น อุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแบ่งสาธิตอย่างชัดเจนในช่วงการบ่มเพาะ 16 - 72 ชั่วโมง โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าการบ่มที่อุณหภูมิต่ำอย่างชัดเจน เมื่อสิ้นสุดการบ่ม 72 ชั่วโมง จุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแบ่งสาธิตมีปริมาณอยู่ระหว่าง 9.43 – 9.87 log CFU/ml

แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรียที่มีสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแบ่งสาธิตในภาพ 9 อุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่มีสปอร์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 และมีการเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการบ่ม โดยมีปริมาณอยู่ระหว่าง 8.06 – 8.34 log CFU/g หลังจากนั้นปริมาณของแบคทีเรียที่มีสปอร์ค่อนข้างคงที่จนครบเวลาการบ่มเพาะ 72 ชั่วโมง

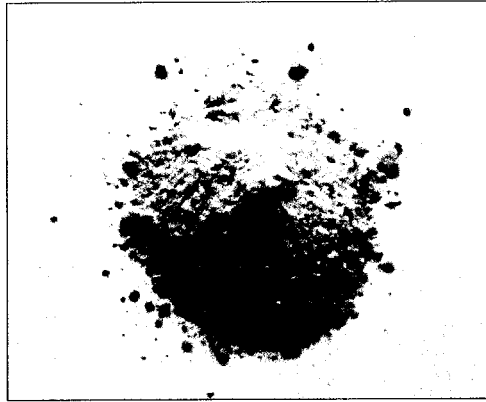


ภาพ 9 ปริมาณ spore count ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแบ่งสาลิความเข้มข้นร้อยละ 40 ในระหว่างการบ่มเพาะที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

การบ่มเพาะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแบ่งสาลิที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส มีปริมาณของแบคทีเรียที่มีสปอร์สูงกว่าการบ่มเพาะที่อุณหภูมิต่ำตลอดช่วงการบ่ม 8 - 72 ชั่วโมง เช่นเดียวกับผลการตรวจพบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในภาพ 9 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียสในการบ่มเพาะเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแบ่งสาลิความเข้มข้นร้อยละ 40 ก่อนนำไปผลิตผงกล้าเชื้อต่อไป สำหรับเวลาในการบ่มได้เลือกที่เวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นเวลาที่แบคทีเรียมีอัตราการเพิ่มจำนวนได้สูงสุดและเริ่มเข้าสู่ช่วงการเจริญในระยะคงที่ (stationary phase) นอกจากนี้ยังเป็นการประหยัดเวลาและพลังงานในการบ่มอีกด้วย

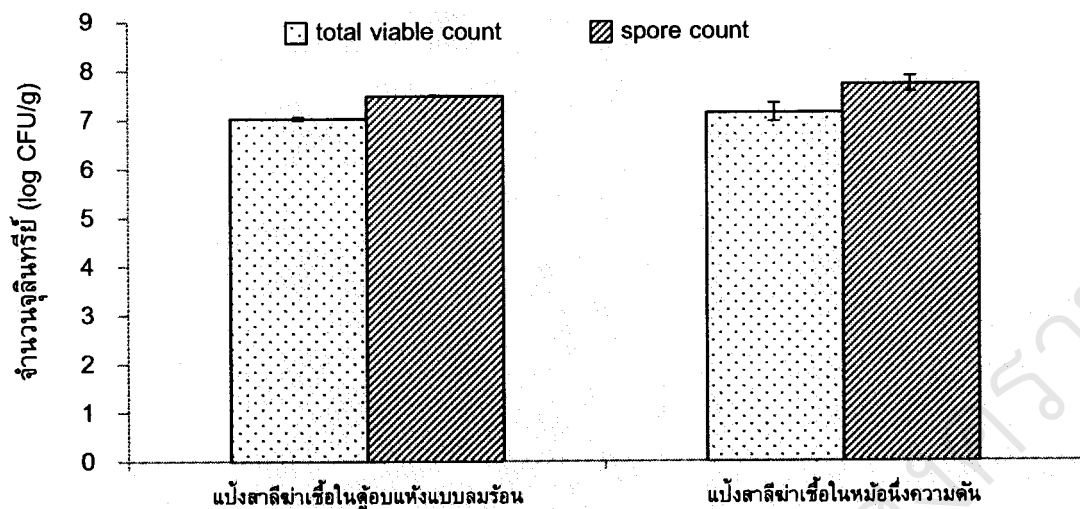
4.1.2 ผลการศึกษาวิธีการอบแห้งที่มีผลต่อการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ในการลดความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแบ่งสาลิก่อนนำไปผลิตเป็นผงแห้งได้ทำการเติมแบ่งสาลิที่ผ่านการนิ่งในหม้อนึ่งความดันหรือที่ผ่านการอบในตู้อบแบบลมร้อนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ในอัตรา 1:1 และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นอบแห้งแบ่งในตู้อบแบบลมร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนได้ค่า water activity ต่ำกว่า 0.6 และบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดปั่นปลอดเชื้อทำให้ได้ผงกล้าเชื้อที่มีลักษณะเป็นผงแห้งดังแสดงในภาพ 10



ภาพ 10 ลักษณะผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

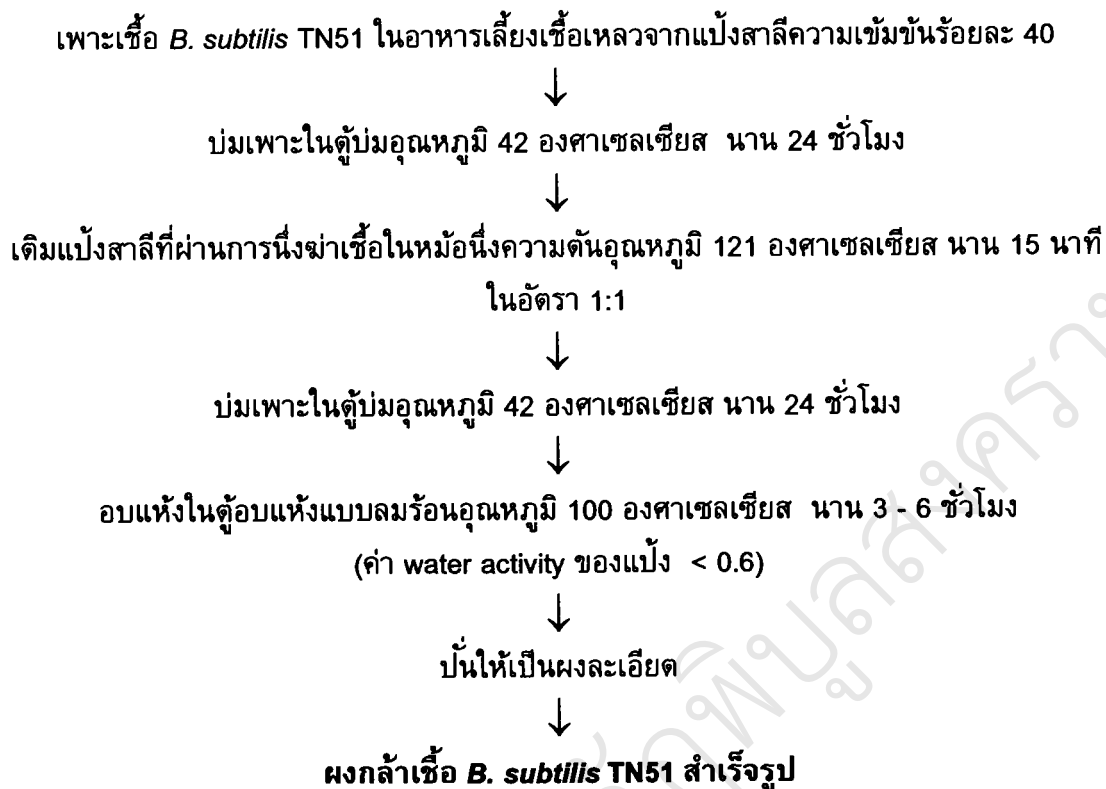
ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียที่มีสปอร์ในผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้จากแป้งสาลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่แตกต่างกัน พบว่า วิธีการฆ่าเชื้อแป้งสาลีในหม้อนึ่งความดันช่วยส่งเสริมการเจริญของ *B. subtilis* TN51 ได้ดีกว่าการอบแห้งในตู้อบลมร้อน โดยพบปริมาณ TVC และ SPC ในผงกล้าเชื้อ 7.14 และ 7.71 log CFU/g ตามลำดับ (ภาพ 11) ขณะที่ผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้จากแป้งสาลีที่ฆ่าเชื้อด้วยตู้อบลมร้อนตรวจพบ TVC และ SPC ในจำนวน 7.02 และ 7.48 log CFU/g ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของแป้งสาลีเมื่อผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนเปียกของหม้อนึ่งความดันทำให้เกิดการแตกตัวของสารชีวโมเลกุลขนาดเล็กที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ดีกว่า ความร้อนแห้งของตู้อบลมร้อน แบคทีเรียในผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้อยู่ในรูปของเซลล์ที่มีสปอร์ ซึ่งเป็นผลดีต่อการใช้งานและการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อไว้ใช้งานในระยะยาวเนื่องจากเซลล์ที่สร้างสปอร์มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ความร้อนสูงและความแห้งได้ดีกว่าเซลล์ปกติ (vegetative cell)



ภาพ 11 ปริมาณจุลินทรีย์ในผงกล้าเชื้อที่ผลิตจากแบ่งสาธิตที่ผ่านการฆ่าเชื้อในตู้อบแห้งแบบลมร้อนและในหม้อหุงความดัน

การฆ่าเชื้อในแบ่งด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อหุงภายใต้ความดันนอกจากจะช่วยให้ได้ผงกล้าเชื้อที่มีจำนวนแบคทีเรียสูงแล้วยังเป็นวิธีการที่ใช้เวลาน้อยและง่ายต่อการใช้งาน ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการควบคุมการปลอดเชื้อในการผลิตผงกล้าเชื้อ รวมทั้งการประหยัดเวลาและพลังงานในการดำเนินงาน งานวิจัยนี้จึงเลือกวิธีการฆ่าเชื้อแบ่งสาธิตด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อหุงภายใต้ความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนนำไปผสมกับเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแบ่งสาธิตเพื่อลดความชื้นก่อนนำไปอบแห้งในขั้นตอนการผลิตผงกล้าเชื้อต่อไป

จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปกระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ได้ดังแสดงในภาพ 12 และสามารถนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ยื่นจดอนุสิทธิบัตร (เลขที่อนุสิทธิบัตร 9285)

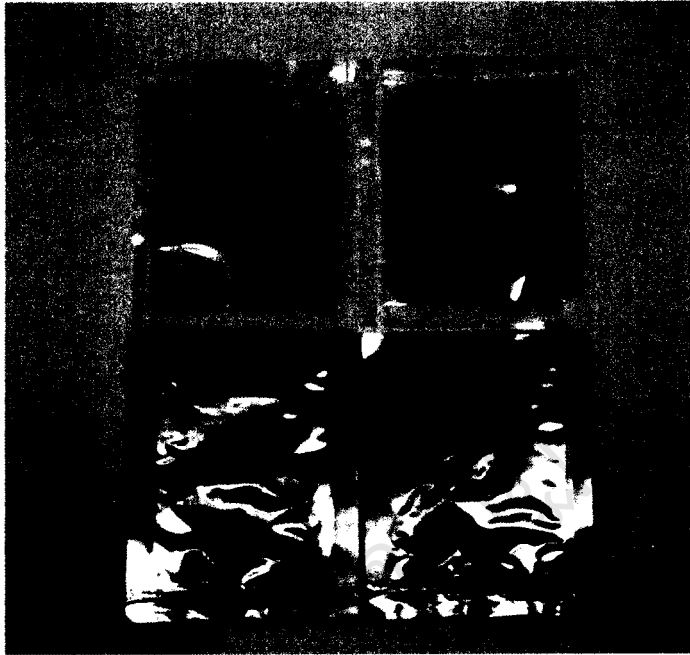


ภาพ 12 แผนผังกระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ที่พัฒนาได้จากงานวิจัยนี้

ผงกล้าเชื้อจากแป้งสาลีที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้มีปริมาณของแบคทีเรีย *B. subtilis* TN51 ในรูปของเซลล์ที่มีสปอร์ค่อนข้างสูงด้วยเทคโนโลยีการผลิตที่ไม่ซับซ้อนและต้นทุนต่ำ ในการนำผงกล้าเชื้อไปใช้ในการหมักถั่วเน่านั้นหากต้องการให้มีปริมาณสุดท้ายในถั่วเหลืองหนึ่งสูกในปริมาณ $10^3 - 10^4$ เซลล์/กรัมของถั่วเหลืองเช่นเดียวกันกับการผลิตถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่นหรือนัตโตะ (Hosoi & Kiuchi, 2003) จะต้องใช้ผงกล้าเชื้อปริมาณ 1 กรัมต่อถั่วเหลืองหนึ่งสูก 1 กิโลกรัมซึ่งนับว่าเป็นปริมาณที่น้อยมาก ในญี่ปุ่นซึ่งเป็นประเทศต้นแบบในการพัฒนาและมีการผลิตผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปจำหน่ายในเชิงการค้าได้มีการผลิตผงกล้าเชื้อสำหรับหมักนัตโตะด้วยเทคโนโลยีที่รักษาสภาพของจุลินทรีย์ได้ดีคือวิธีการทำแห้งสปอร์ด้วยเทคนิค freeze-dry แต่วิธีนี้มีเทคโนโลยีการผลิตที่ค่อนข้างซับซ้อนและต้นทุนสูง ปัจจุบันประเทศญี่ปุ่นมีบริษัทผู้ผลิตและจำหน่ายผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปสำหรับหมักนัตโตะในเชิงการค้ารายใหญ่ประมาณ 3 บริษัท โดยมีการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์ของกล้าเชื้อ *B. subtilis* ให้มีลักษณะเฉพาะเป็นเอกลักษณ์ของตนเอง งานวิจัยนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีในการพัฒนากระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักของไทย เพื่อให้สามารถยกระดับคุณภาพและกระบวนการผลิตจากวิธีพื้นบ้านสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ได้ทั้งห่วงโซ่กระบวนการผลิต

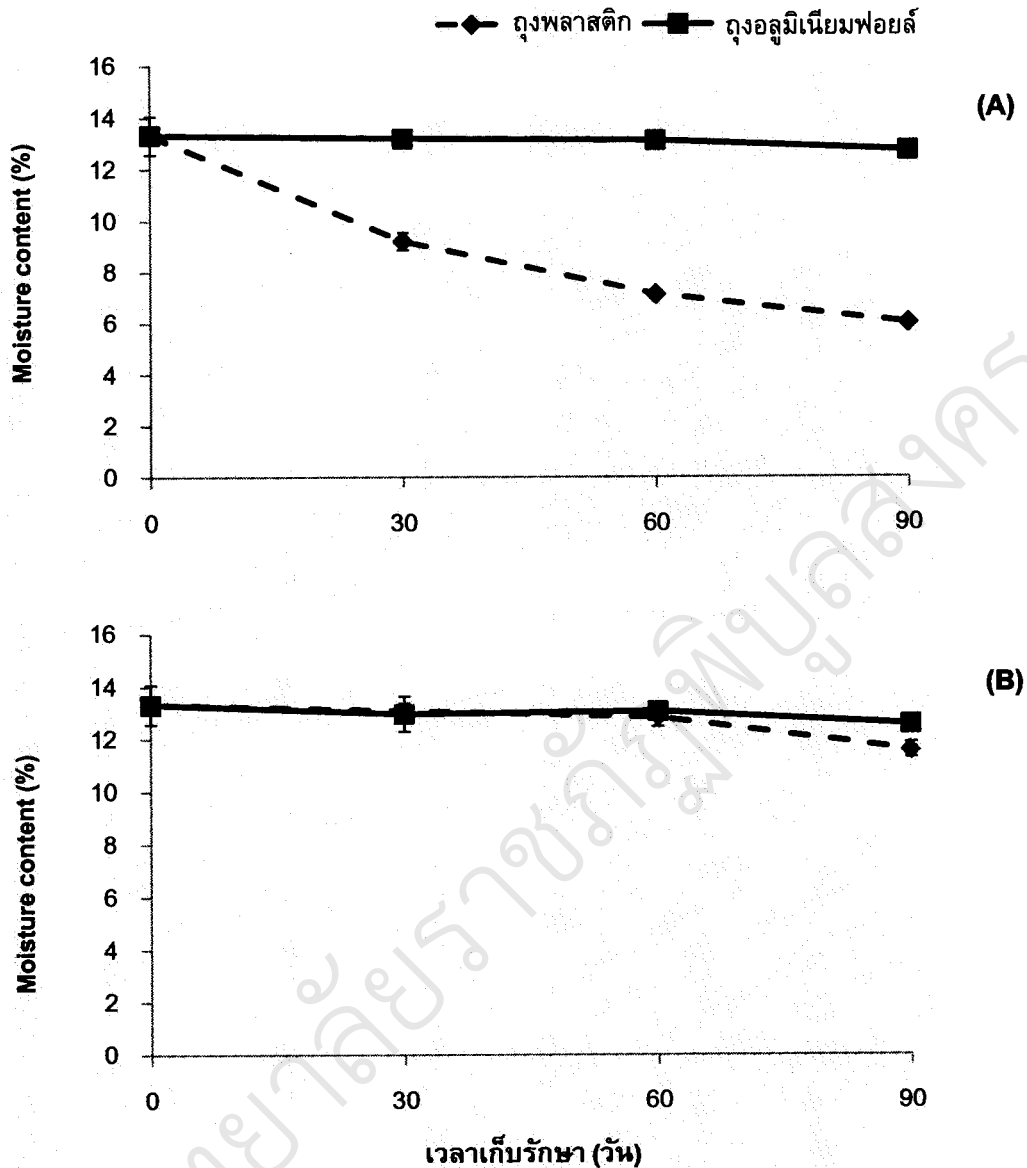
4.2 ผลการศึกษาอายุการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *B. subtilis* TN51 ในผงกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์ (ภาพ 13) ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน



ภาพ 13 ผงกล้าเชื้อบรรจุในถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 90 วัน

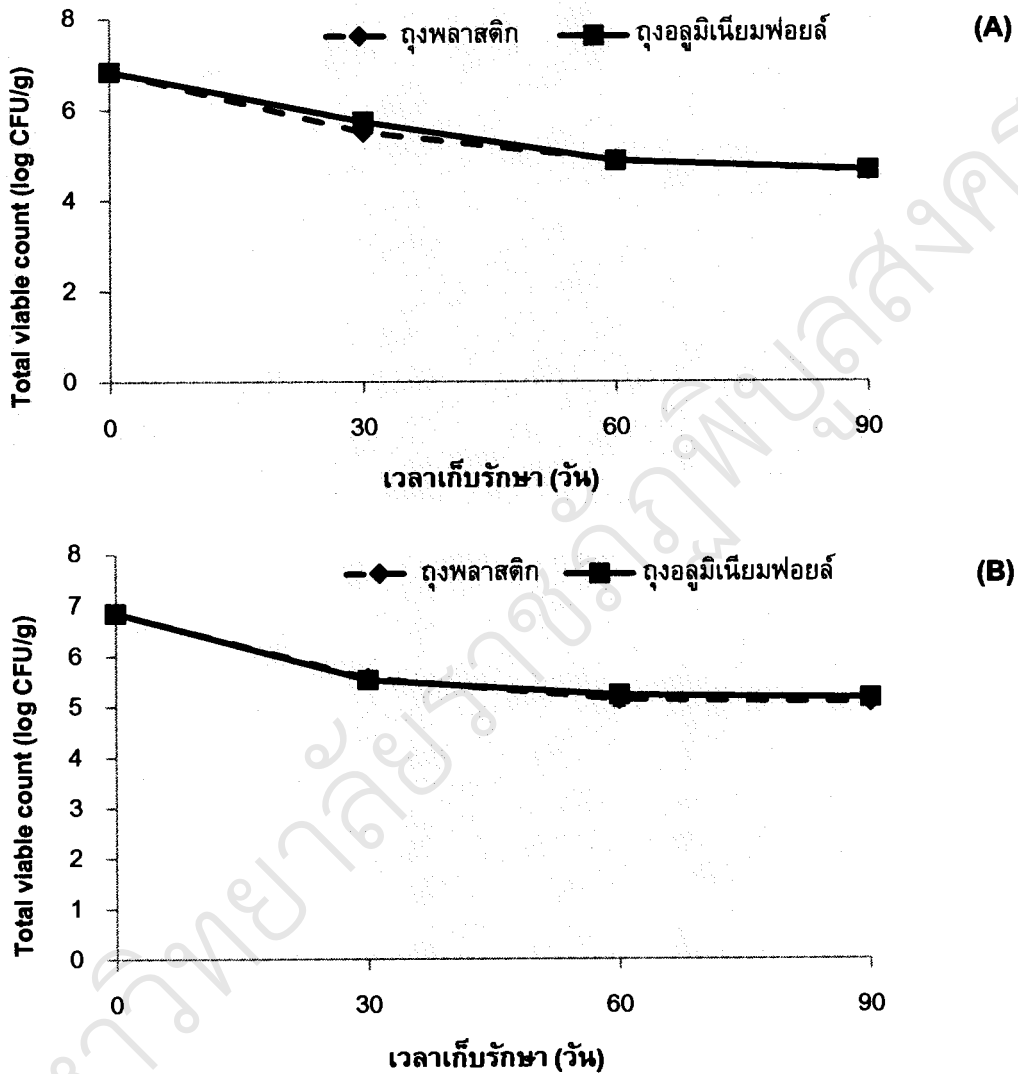
การเปลี่ยนแปลงค่าความชื้นของผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษา 90 วัน แสดงในภาพ 14 พบว่า ความชื้นของผงกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงพลาสติกใสลดลงอย่างต่อเนื่องในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขณะที่ความชื้นของผงกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์มีค่าคงที่ตลอดการเก็บรักษา สำหรับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่าความชื้นของผงกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงตลอดอายุการเก็บรักษา 90 วัน เช่นเดียวกัน



ภาพ 14 การเปลี่ยนแปลง moisture content ในผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (A) และ 4 องศาเซลเซียส (B) นาน 90 วัน

ถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมพอยล์สามารถเก็บรักษาแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้เหลือรอดได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 และ 4 องศาเซลเซียส นาน 90 วัน (ภาพ 15) ตามลำดับ เมื่อครบเวลาในการเก็บรักษาพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 1.7 - 2.2 log cycle เมื่อเปรียบเทียบกับผงกล้าเชื้อก่อนการเก็บรักษา (จุด 0 วัน) คิดเป็นร้อยละการเหลือรอด (%survival) 68 - 75 และพบว่าอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษากล้าเชื้อให้เหลือรอดได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

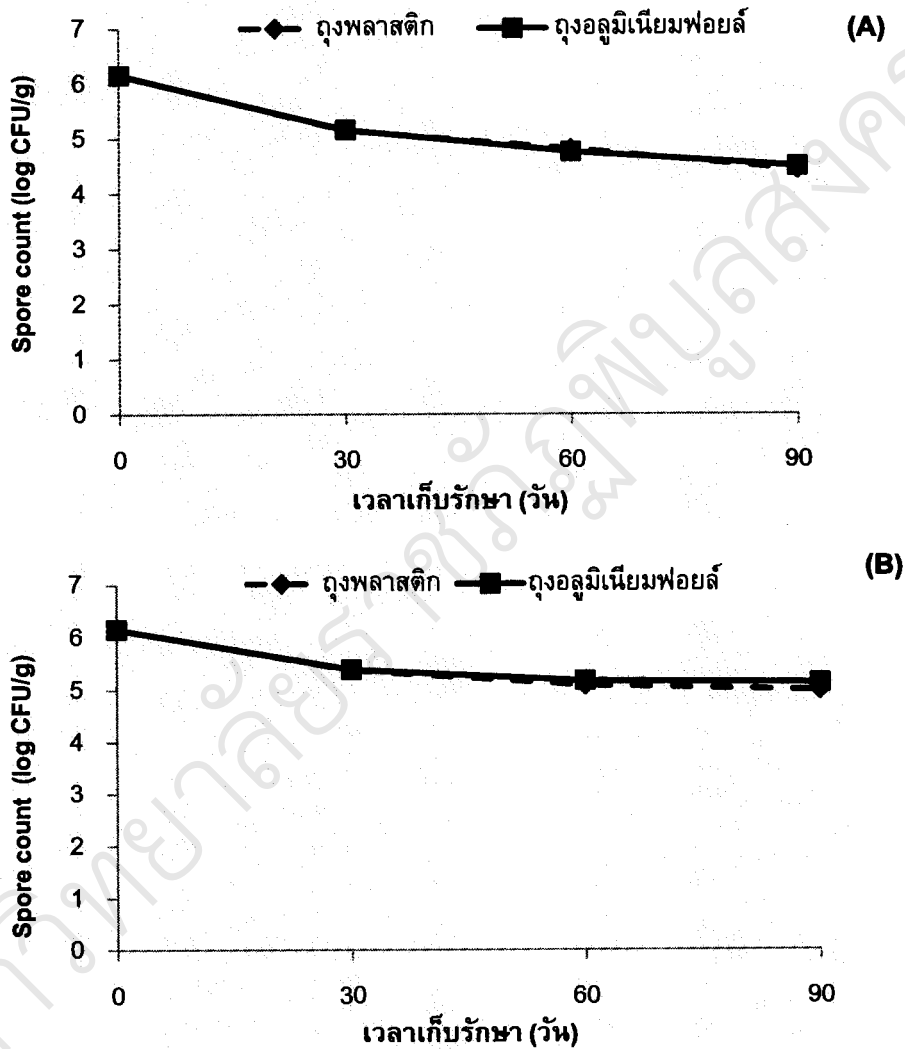
เล็กน้อย โดยหลังการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อที่บรรจุในถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์ครบ 90 วัน มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเหลือรอดอยู่ 5.08 และ 5.16 log CFU/g ตามลำดับ ขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเหลือรอดอยู่ 4.64 และ 4.66 log CFU/g



ภาพ 15 การเปลี่ยนแปลง total viable count ในผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (A) และ 4 องศาเซลเซียส (B) นาน 90 วัน

ผลการตรวจวิเคราะห์ spore count (ภาพ 16) มีการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงของ total viable count โดยถุงพลาสติกใสและถุงอลูมิเนียมฟอยล์สามารถเก็บรักษากล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ได้ใกล้เคียงกัน และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถเก็บ

รักษาแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้เหลือรอดได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังเก็บรักษาครบ 90 วัน จำนวนแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ลดลงประมาณ 1 log cycle หรือประมาณ 10 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผงกล้าเชื้อก่อนการเก็บรักษา (ชุด 0 วัน) คิดเป็นร้อยละการเหลือรอดของแบคทีเรีย 72 - 83 นอกจากนี้ยังพบว่าผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้ตรวจพบยีสต์และราในปริมาณที่ต่ำกว่า 10 CFU/g ตลอดอายุการเก็บรักษา 90 วัน

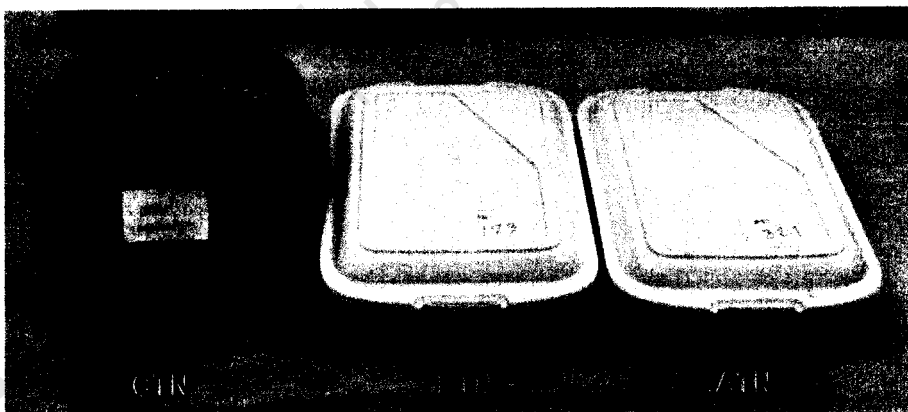


ภาพ 16 การเปลี่ยนแปลง spore count ในผงกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (A) และ 4 องศาเซลเซียส (B) นาน 90 วัน

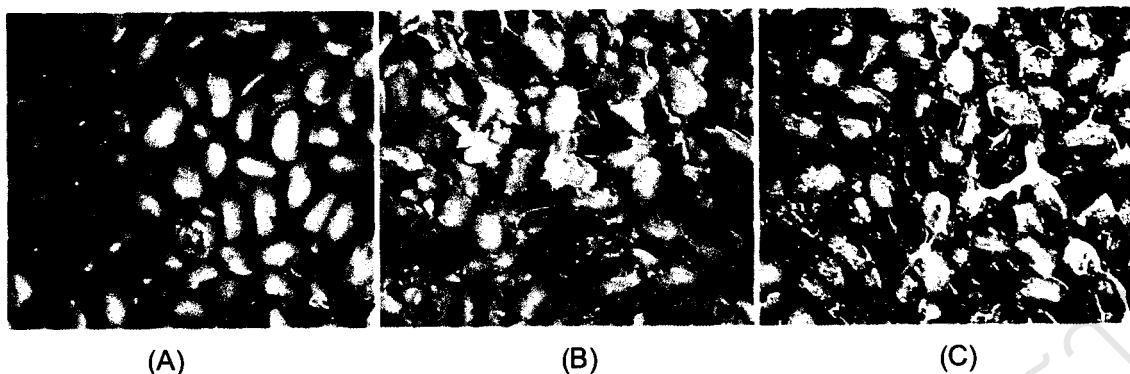
จากผลการตรวจพบปริมาณ total viable count และ spore count ในผงกล้าเชื้อที่ผ่านการเก็บรักษานาน 90 วัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ที่ผลิตจากแป้งสาลีสามารถเก็บรักษาไว้ในถุงบรรจุชนิดพลาสติกใสหรืออลูมิเนียมฟอยล์ได้อย่างน้อย 90 วัน แม้ไม่เก็บรักษาในอุณหภูมิตู้เย็นซึ่งจะทำให้สะดวกและง่ายต่อการนำผงกล้าเชื้อไปใช้งานจริง

4.3 ผลการศึกษาวิธีการหมักถั่วเน่าด้วยผงกล้าเชื้อเปรียบเทียบคุณภาพกับถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้าน

งานวิจัยนี้ได้ทดลองหมักถั่วเน่าด้วยผงกล้าเชื้อที่ผลิตได้จากข้อ 4.1 ในถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มให้สุกในน้ำเดือดนาน 4 ชั่วโมง (BTN) และถั่วเหลืองที่ึ่งให้สุกในหม้อหนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที (ATN) ในอัตราร้อยละ 0.1 (w/w) หรือใช้ผงกล้าเชื้อ 1 กรัมต่อถั่วเหลืองสุก 1 กิโลกรัม เปรียบเทียบการหมักถั่วเน่าแบบพื้นบ้านซึ่งผลิตโดยการต้มถั่วเหลืองให้สุกในน้ำเดือดนาน 4 ชั่วโมง หลังจากการสะเด็ดน้ำทำการหมักถั่วเหลืองในตะกร้าไม้ไผ่และปกคลุมผิวหน้าด้วยใบตอง (control; CTN) (ภาพ 17) หลังการป่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จนครบ 24 ชั่วโมงพบว่าถั่วเน่า ATN และ BTN มีกลิ่นหอมของถั่วเหลืองหมักและมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียเพียงเล็กน้อย ถั่วเน่า ATN มีเมือกเหนียวปกคลุมเมล็ดถั่วเหลืองและมีสีน้ำตาลเข้มกว่า BTN อย่างชัดเจน ขณะที่ถั่วเน่าที่หมักแบบพื้นบ้านพบเมือกเหนียวเพียงเล็กน้อย (ภาพ 17)



ภาพ 17 ลักษณะการหมักถั่วเน่าในงานวิจัยนี้: CTN – หมักถั่วเน่าแบบพื้นบ้าน; BTN – ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกผสมผงกล้าเชื้อ; ATN – ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองึ่งสุกจากหม้อหนึ่งความดันผสมผงกล้าเชื้อ



ภาพ 18 ถั่วน้ำที่หมักด้วยวิธีแตกต่างกัน: (A) CTN - ถั่วน้ำที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน; (B) BTN - ถั่วน้ำที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51; (C) ATN - ถั่วน้ำที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดันหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ถั่วน้ำ ATN พบเมือกเหนียวสีขาวปกคลุมเมล็ดถั่วมากกว่าถั่วน้ำ BTN และ CTN อย่างชัดเจน บ่งชี้ว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญและเกิดการหมักได้ดีในถั่วเหลืองที่นึ่งสุกด้วยหมอนึ่งความดันไอ เมือกเหนียวที่พบในถั่วเหลืองหมักคือส่วนของแคปซูลของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในระหว่างการหมัก ประกอบไปด้วยโพลีเมอร์ของกรดกลูตามิกและลิแวน (levan) (Kunioka, & Goto, 1994; Ogawa, Yamaguchi, Yuasa, & Tahara, 1997) เมือกเหนียวของถั่วเหลืองหมักถูกนำมาใช้เป็นเกณฑ์การประเมินคุณภาพที่ดีของนัตโตะของญี่ปุ่นและจัดเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายโดยทำหน้าที่เป็นเส้นใยและช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (Tsuji & Tsuji, 1986)

ตาราง 9 แสดงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของถั่วน้ำที่ผลิตด้วยกรรมวิธีแตกต่างกัน ถั่วน้ำที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อทั้ง ATN และ BTN มีปริมาณ total viable count และ spore count มากกว่าถั่วน้ำที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน (CTN) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมผงกล้าเชื้อเป็นการเพิ่มปริมาณของเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักและ *B. subtilis* TN51 เจริญได้ดีในถั่วเหลืองที่ต้มหรือนึ่งสุกทำให้ใช้เวลาในการหมักถั่วน้ำสั้นกว่าการหมักแบบพื้นบ้าน ถั่วน้ำที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้านและผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์มีการปนเปื้อนเชื้อยีสต์และราต่ำเช่นเดียวกัน โดยพบเชื้อยีสต์และราทั้งหมดต่ำกว่า 10 CFU/g หรือต่ำกว่า $1 \log \text{ CFU/g}$

ตาราง 9 คุณภาพทางจุลชีววิทยาของถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 เปรียบเทียบกับวิธีพื้นบ้าน

คุณภาพทางจุลชีววิทยา	CTN	ถั่วเน่าหมักด้วยผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์	
		BTN	ATN
Total viable count (log CFU/g)	8.99 ± 0.14c	9.95 ± 0.07b	10.13 ± 0.04a
Spore count (log CFU/g)	8.64 ± 0.00c	9.16 ± 0.09b	9.29 ± 0.08a
Yeast and mould (log CFU/g) ^{ns}	<1.00 ± 0.00	<1.00 ± 0.00	<1.00 ± 0.00
Coliform (MPN/g)	886.67 ± 0.00a	33.20 ± 0.00b	<3.00 ± 0.00c
<i>E. coli</i> (MPN/g) ^{ns}	<3.00 ± 0.00	<3.00 ± 0.00	<3.00 ± 0.00
<i>S. aureus</i> (log CFU/g) ^{ns}	<1.00 ± 0.00	<1.00 ± 0.00	<1.00 ± 0.00
<i>B. cereus</i> (log CFU/g)	5.63 ± 0.50a	3.67 ± 0.25b	<2.00 ± 0.00c

- ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และ ns แสดงค่าความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

- CTN คือ ถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน; BTN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51; ATN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อหนึ่งความดันหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้านตรวจพบแบคทีเรียกลุ่ม coliform มากกว่าถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์ คือ BTN และ ATN คิดเป็น 26 และ 294 เท่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในระหว่างการผลิตถั่วเน่าแบบพื้นบ้านอาจมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่ม coliform จากอุปกรณ์และภาชนะที่ใช้ในการหมักเช่น ตะกร้าไม้ไผ่และใบตอง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุการเสื่อมเสียและกลิ่นเหม็นของถั่วเน่า ถั่วเน่าทั้ง 3 ตัวอย่างตรวจพบเชื้อ *E. coli* ต่ำกว่า 3 MPN/g ซึ่งแสดงให้เห็นถึงสุขลักษณะที่ดีในกระบวนการผลิต ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียดัชนีที่บ่งชี้ว่ามีการปนเปื้อนอุจจาระซึ่งอาจแพร่มาจากน้ำ อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตและผู้ผลิตที่สุขอนามัยไม่ดี

เมื่อพิจารณาปริมาณแบคทีเรียกลุ่มก่อโรค คือ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* พบว่าถั่วเน่าทั้ง 3 ตัวอย่างตรวจพบเชื้อ *S. aureus* ต่ำกว่า 1 log CFU/g ซึ่งบ่งชี้ว่าผู้ผลิตมีสุขลักษณะที่ดีในระหว่างการผลิต ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรีย *S. aureus* มีแหล่งอาศัยตามธรรมชาติอยู่ตามผิวหนังและบาดแผลที่เป็นหนอง ถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้าน (CTN) ตรวจพบ *B. cereus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วงและอาเจียนมากที่สุด โดยมีปริมาณมากกว่าถั่วเน่า BTN ซึ่งเป็นถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มเช่นเดียวกันถึง 130 เท่า ขณะที่ถั่วเน่า ATN ซึ่งผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อหนึ่งความดันตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในระดับต่ำกว่า 100 CFU/g จากผลการทดลองจะเห็นว่าการต้มสุกถั่วเหลืองในน้ำเดือดอาจไม่สามารถทำลายแบคทีเรีย *B. cereus* ได้ทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจาก *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ที่

ทนต่อความร้อนได้ดีและอาจหลงเหลืออยู่กับถั่วเหลืองต้มสุกส่งผลให้ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกทั้งวิธีพื้นบ้าน (CTN) และผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์ (BTN) ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในปริมาณที่สูงกว่าถั่วเน่า ATN ซึ่งผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดัน นอกจากนี้ยังอาจมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้จากตะกร้าไม้ไผ่และใบตองที่ใช้ในการผลิตถั่วเน่าด้วยวิธีพื้นบ้าน ทำให้ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในปริมาณที่มากกว่าถั่วเน่า BTN ซึ่งเป็นถั่วเน่าที่ผลิตได้จากถั่วเหลืองต้มเช่นเดียวกัน งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการนึ่งถั่วเหลืองให้สุกด้วยหม้อนึ่งความดันและการใช้ผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ช่วยเพิ่มความปลอดภัยและรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักหรือถั่วเน่าได้โดยการลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคและสาเหตุการเน่าเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อมีการเพิ่มขึ้นของค่า pH น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดมากกว่าถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้านอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตาราง 10) สอดคล้องกับปริมาณ total viable count และ spore count ที่แสดงในตาราง 9 โดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดัน (ATN) แสดงให้เห็นว่าการนึ่งสุกถั่วเหลืองในหม้อนึ่งความดันทำให้ถั่วเหลืองสุกนุ่มทั่วถึงและช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าการต้มสุกถั่วเหลืองในน้ำเดือด และในระหว่างการหมักแบคทีเรียได้สร้างเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสออกมาย่อยโปรตีนและน้ำตาลในถั่วเหลืองได้รวดเร็วกว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดและปลดปล่อยออกมาในระหว่างการหมักถั่วเหลืองโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรติเอสและอะไมเลส (Visessanguan, Benjakul, Potachareon, Panya, & Riebroy 2005; Chukeatirote et al., 2006) ปฏิกริยาหลักที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักถั่วเหลืองคือการหมักย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรติเอสทำให้ได้โปรตีนเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระออกมาส่งผลให้ถั่วเหลืองหมักมีรสชาติอร่อยคล้ายผงชูรสหรือที่เรียกว่ารสอูมามิ (Yoshida, 1998) หลังจากนั้นแบคทีเรียจะใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งของคาร์บอนในการสร้างพลังงานในการเจริญเติบโตส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนไปเป็นสารแอมโมเนียและทำให้ถั่วเหลืองหมักมีค่า pH เพิ่มขึ้น (Ohta, 1986; Steinkraus, 1991) และสารแอมโมเนียจะเปลี่ยนเป็นสารระเหยที่ทำให้ถั่วเหลืองหมักมีกลิ่นเหม็นได้เมื่อค่า pH ของถั่วเหลืองหมักเพิ่มสูงเป็น 8.0–8.3 (Campbell-Platt, 1980; Sarkar, Snibbe, Tversky, & Reiss 1993)

ตาราง 10 คุณภาพทางเคมีและกายภาพของถั่วเน่าที่ผลิตจากผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 เปรียบเทียบกับวิธีพื้นบ้าน

คุณภาพ	CTN	ถั่วเน่าหมักด้วยผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์	
		BTN	ATN
ค่า pH	6.75 ± 0.14b	7.45 ± 0.03a	7.55 ± 0.02a
น้ำตาลรีดิวซ์	1.36 ± 0.12c	1.56 ± 0.04b	2.09 ± 0.03a
น้ำตาลทั้งหมด	3.61 ± 0.08b	3.54 ± 0.04b	5.09 ± 0.21a
ค่าสี L*	52.28 ± 1.49b	54.67 ± 0.25a	45.91 ± 0.71c
ค่าสี a*	9.20 ± 0.71a	8.77 ± 0.45a	8.99 ± 0.33a
ค่าสี b*	22.24 ± 0.96a	23.87 ± 0.28a	18.93 ± 1.36b

- ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดแสดงในหน่วยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเปียก
- CTN คือ ถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน; BTN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51; ATN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดันหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดัน (ATN) มีค่าความสว่าง (ค่า L*) และค่าสีเหลือง (ค่า b*) ต่ำกว่าถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกทั้ง CTN และ BTN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ขณะที่ค่าสีเหลืองหรือค่า b* ใกล้เคียงกัน (ตาราง 10) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความร้อนสูงของหม้อนึ่งความดันขณะนึ่งสุกถั่วเหลืองทำให้ถั่วเหลืองมีน้ำตาลเข้มข้นกว่าถั่วเหลืองที่ต้มสุกในน้ำเดือดส่งผลให้ถั่วเน่าที่ผลิตได้มีสีน้ำตาลเข้มกว่าด้วย

การนึ่งสุกถั่วเหลืองในหม้อนึ่งความดันเป็นวิธีการที่ใช้เวลาน้อยกว่าการต้มถั่วเหลืองในน้ำเดือดและสามารถทำให้ถั่วเหลืองสุกจนนิ่มได้ดีกว่าถั่วเหลืองต้มจึงส่งผลให้เชื้อ *B. subtilis* TN51 เจริญได้อย่างรวดเร็วทำให้ใช้เวลาในการหมักถั่วเน่าสั้นกว่า ดังนั้นการนึ่งสุกถั่วเหลืองในหม้อนึ่งความดันจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการใช้ผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตถั่วเน่าในเชิงพาณิชย์ ซึ่งนอกจากจะง่ายและสะดวกในการใช้งานแล้วยังสามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีความสม่ำเสมอ ปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรค ประหยัดเวลาในการผลิตและสามารถทำการผลิตถั่วเน่าในปริมาณมากได้