บทที่ 3
วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างถั่วเน่า และการคัดเลือกแบคทีเรียสร้างสปอร์เพื่อใช้ในการผลิตถั่วเน่า

1.1 การคัดแยกแบคทีเรียสร้างสปอร์จากตัวอย่างถั่วเน่า

ทำการเก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่ยังไม่ผ่านการแปรรูปเพื่อการบริโภคจากแหล่งผลิตถั่วเน่า ได้แก่ ถั่วเน่าจากกลุ่มแม่บ้านเกษตรกรบ้านกิ่วมื่น อ.ป่าซาง จ.ลำพูน (Kew Meon, KM) ถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นจากกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตถั่วเน่า อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ (Mae Chaem, MC) และผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าแผ่นจาก จ.แม่ฮ่องสอน (Mae Hong Son, MHS) สำหรับเชื้อ *Bacillus megaterium* B39 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตวิตามินบีสิบสองสูง ซึ่งได้รับมาจาก กนกศรี (2550)

ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างถั่วเน่าโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Inatsu *et al.* (2006) โดยชั่งตัวอย่างถั่วเน่าจำนวน 10.0 g ลงในขวด Duran® ขนาด 250 ml ที่บรรจุ 0.85% NaCl ปริมาตร 90 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเป็นการกำจัด vegetative cells ของแบคทีเรียให้เหลือแต่สปอร์ของแบคทีเรียแล้วจึงนำไป dilution spread plate บนผิวหน้าอาหาร tryptic soy agar (TSA) (Merck, Germany) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวโดยวิธีการสุ่มเลือกตามลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน แล้วทำการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อที่แยกได้ไว้ใน 50% glycerol ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.2 การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียสร้างสปอร์จากตัวอย่างถั่วเน่า

1.2.1 การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

ทำการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธีการตรวจดูวงใสบนอาหาร Skim milk agar (Chantawannakul *et al.*, 2002) โดยทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลตนำมาทำการ streak plate บนอาหาร TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหาร Nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ทำการหยดน้ำเลี้ยง (supernatant) ที่ได้

ปริมาตร 5 µl บนผิวหน้าอาหาร skim milk agar (ภาณุวรรณ และคณะ 2543) (ภาคผนวก ก) แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจดูขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นในหน่วยตารางมิลลิเมตร (mm^2) (Cooper, 1963) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของวงใสที่เกิดขึ้นโดยวิธี Tukey's HSD (Bechoff *et al.*, 2009)

1.2.2 การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิดด้วยวิธี Agar well diffusion

ทำการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิดด้วยวิธี Agar well diffusion (Okeke *et al.*, 2001) โดยทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลตนำมาทำการ streak plate บนอาหาร TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหาร NB ปริมาตร 5 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำ supernatant ที่ได้มากรองด้วยเมมเบรนกรองเชื้อแบคทีเรียขนาด 0.2 µm (Sartorius, Germany) ตามลำดับ นำสารละลายที่กรองได้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการทดสอบต่อไป

นำเชื้อทดสอบที่ได้รับมาจากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ได้แก่ เชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ TISTR 687 และ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ TISTR 517 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อทดสอบลงมาเพาะเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 5 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อทดสอบในอาหารเหลวให้เท่ากับ McFarland standard เบอร์ 0.5 จากนั้นปิเปตเชื้อทดสอบปริมาตร 0.1 ml มา spread ลงบนอาหาร NA ปริมาตร 15 ml ให้ทั่วบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและทิ้งให้แห้งเป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วจึงทำการเจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ด้วยคอร์กบอเรอร์ (cork borer) นำสารละลายที่กรองได้มาหยดลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 30 µl โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamycin (GM) ความเข้มข้น 0.5000 mg/ml และ NB เป็น positive และ negative control ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นในหน่วยมิลลิเมตร (mm) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของวงใสที่เกิดขึ้นโดยวิธี Tukey's HSD (Bechoff *et al.*, 2009)

1.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีสิบสอง

หลังจากที่ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติในการการสร้างเอนไซม์โปรติเอส และคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิดในขั้นตอน 1.2.1 และ 1.2.2 ตามลำดับ จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่สูง และเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิดได้สูง มาทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีสิบสอง โดยทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ได้คัดเลือกนำมา streak plate บนอาหาร TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหาร NB ปริมาตร 5 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำ supernatant ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีสิบสองด้วยวิธี Bioassay (AOAC, 1980) (ภาคผนวก จ) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้โดยวิธี Tukey's HSD (Bechoff *et al.*, 2009)

1.3 การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์โดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี

นำเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่คัดเลือกได้มาจัดจำแนกโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical characteristics) ตามวิธีของ Norris *et al.* (1973) (ภาคผนวก ค) ซึ่งทำการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ดังต่อไปนี้

1.2.1 การทดสอบแคตาเลส (Catalase test)

1.2.2 การทดสอบ VP (Voges-Proskauer test)

1.2.3 การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในสภาพไร้ออกซิเจน (Growth in anaerobic agar)

1.2.4 การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 50°C และ 65°C (Growth at 50°C and 65°C)

1.2.5 การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 5%, 7% และ 10% (Growth at 5%, 7% and 10% NaCl)

1.2.6 การทดสอบการหมักกลูโคส (Production of acid and gas from glucose)

1.2.7 การทดสอบการลดออกซิเจนของไนเตรท (Reduction of nitrate)

1.2.8 การทดสอบการย่อยแป้ง (Hydrolysis of starch)

2. การศึกษาอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตถั่วเน่า

2.1 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์เพื่อใช้ในการผลิตถั่วเน่า

นำเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่คัดเลือกไว้ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* MCG8, *B. subtilis* MHS1, *B. subtilis* KMB2 และ *B. megaterium* B39 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์ลงในอาหาร NB ปริมาตร 10 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เท supernatant ทิ้งไป ทำการล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 10 ml ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เท supernatant ทิ้งไป และทำการกระจายเซลล์ของแต่ละสายพันธุ์ที่ได้ด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 0.1% peptone และ 0.85% NaCl ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (Amoa-Awua *et al.*, 2006) ปรับความขุ่นของสารละลายเซลล์ให้เท่ากับ McFarland standard เบอร์ 4 (เท่ากับเซลล์จำนวน 1.2 x 10^9 cfu/ml หรือมีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.669) (Murray *et al.*, 2007)

2.2 การเตรียมถั่วเหลืองต้มสุก

นำถั่วเหลืองมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นนำไปแช่ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากเทน้ำทิ้งแล้วจึงชั่งถั่วเหลืองประมาณ 125.0 g wet weight ลงในฟลาสก์ขนาด 250 ml แล้วจึงปิดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที พักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอการหมักต่อไป (Sarkar *et al.*, 1993)

2.3 การศึกษาอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนผสม (Mixture design)

นำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของแต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมได้จากขั้นตอน 2.1 มาทำการศึกษาอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการหมักถั่วเน่าโดยออกแบบการทดลองแบบส่วนผสม โดยทำการแปรผันอัตราส่วนของเชื้อผสมที่ใช้ดังแสดงในตาราง 14 แล้วจึงนำมาผสมลงในถั่วเหลืองต้มสุกที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.2 ใส่ลงในแต่ละชุดการทดลองให้มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ 1.5 x 10^7 cfu/g wet weight ทำการกวนผสมเชื้อที่ลงไปให้เข้ากันด้วยไม้ไผ่ที่นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำแต่ละชุดการทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เตรียมนำถั่วเน่าที่ได้ไปวิเคราะห์คุณลักษณะต่อไป

ตาราง 14 แผนการทดลองแบบส่วนผสมของเชื้อทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ในการผลิตถั่วเน่า

ชุดการทดลองที่	อัตราส่วนของเชื้อบริสุทธิ์ในแต่ละสายพันธุ์ (x 100%)			
	X_1: MCG8	X_2: MHS1	X_3: KMB2	X_4: B39
1	1.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	1.0	0.0	0.0
3	0.0	0.0	1.0	0.0
4	0.0	0.0	0.0	1.0
5	0.5	0.5	0.0	0.0
6	0.5	0.0	0.5	0.0
7	0.5	0.0	0.0	0.5
8	0.0	0.5	0.5	0.0
9	0.0	0.5	0.0	0.5
10	0.0	0.0	0.5	0.5
11	0.334	0.333	0.333	0.0
12	0.333	0.334	0.0	0.333
13	0.333	0.0	0.334	0.333
14	0.0	0.333	0.333	0.334
15	0.625	0.125	0.125	0.125
16	0.125	0.625	0.125	0.125
17	0.125	0.125	0.625	0.125
18	0.125	0.125	0.125	0.625
19	0.25	0.25	0.25	0.25
ชุดควบคุม	-	-	-	-

2.4 การวิเคราะห์คุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

2.4.1 การเตรียมสารสกัดจากถั่วเน่าและทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารในคนบางชนิดโดยวิธี Agar well diffusion

นำตัวอย่างถั่วเน่าจำนวน 10.0 g มาสกัดด้วย 50 mM Phosphate buffer pH 7.0 (ภาคผนวก ข) ในสภาพเย็นจัดในอัตราส่วน 1:1 (ต่อน้ำหนัก) บนเครื่องกวนสารละลายแบบใช้แท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 และเมมเบรนกรองเชื้อแบคทีเรียขนาด 0.2 µm (Sartorius, Germany) ตามลำดับ นำสารละลายที่กรอง

ได้มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารในคนบางชนิดโดยวิธี Agar well diffusion (ดังวิธีที่ได้อธิบายไว้ในขั้นตอน 1.2.2)

2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณวิตามินบีสิบสอง

นำตัวอย่างถั่วเน่าประมาณ 10 g มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Philips HR2001, Netherland) เป็นเวลา 30 วินาที ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วจำนวน 5.0 g ลงใน 50 mM Phosphate buffer pH 7.0 จำนวน 45 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำ supernatant มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) (ภาคผนวก ง) และการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีสิบสองด้วยวิธี Bioassay (AOAC, 1980) (ภาคผนวก จ) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้โดยวิธี Tukey's HSD (Bechoff *et al.*, 2009)

2.4.3 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมด (viable cell counts) และค่า pH

ชั่งตัวอย่างถั่วเน่าจำนวน 5.0 g มาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 45 ml ทำการเจือจางเป็นลำดับแบบสิบเท่า (ten-fold dilution) จนได้ระดับการเจือจางที่เหมาะสมจากนั้นเกลี่ยเชื้อลงบนอาหาร Plate count agar (PCA) (Merck, Germany) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเดี่ยวที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ สำหรับการวัดค่า pH ของถั่วเน่านั้นทำได้โดยการนำตัวอย่างถั่วเน่า 10.0 g มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นจึงทำการวัดค่า pH โดยใช้ pH meter (Metroph 713 pH meter) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้โดยวิธี Tukey's HSD (Bechoff *et al.*, 2009)

2.5 การทำนายและทดสอบอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมในการผลิตถั่วเน่า

นำผลการศึกษาที่ได้จากขั้นตอน 2.4.1 – 2.4.3 มาทำการวิเคราะห์และทำนายอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม Design-Expert (*ver.* 6.0.2) (Stat-Ease, Inc., U.S.A.) จากนั้นนำอัตราส่วนของเชื้อผสมที่วิเคราะห์ได้มาทดสอบด้วยการทดลองผลิตถั่วเน่าโดยทำการเตรียมหัวเชื้อผสม และเตรียมถั่วเหลืองต้มสุก ตามขั้นตอน 2.1 และ 2.2 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อผสมที่มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ 1.5×10^7 cfu/g wet weight ลงในแต่ละชุดการทดลอง ทำการกวนผสมเชื้อที่ลงไปให้เข้ากันด้วยไม้ไผ่ที่นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นตามขั้นตอน 2.4 และทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้

3. การศึกษาปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสมของเชื้อผสมเพื่อใช้ในการผลิตถั่วเน่า

3.1 การศึกษาผลกระทบของปัจจัยด้านการผลิตที่มีผลต่อคุณลักษณะของถั่วเน่า

การศึกษาผลกระทบของปัจจัยด้านการผลิตที่มีผลต่อคุณลักษณะของถั่วเน่าได้ใช้การออกแบบการทดลองแบบทากูชิ (Taguchi design of experiment) โดยปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าที่สนใจในการศึกษาครั้งนี้มีทั้งหมด 5 ปัจจัย ได้แก่ เวลาที่ใช้แช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม เวลาที่ใช้ต้มถั่วเหลือง ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (Dakwa *et al.*, 2005; Omafuvbe, 2006; Suppadit *et al.*, 2005; Tamang and Nikkuni, 1998) โดยระดับของปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าแสดงในตาราง 15

ตาราง 15 ปัจจัยด้านการผลิตและระดับที่มีผลต่อคุณลักษณะของถั่วเน่า

ปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่า	ระดับของแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษา			
	1	**2**	**3**	**4**
A: เวลาที่ใช้แช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม (ชั่วโมง)	0	8	16	24
B: เวลาที่ใช้ต้มถั่วเหลือง (ชั่วโมง)	0	3	6	8
C: ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก (%)	0.0	0.4	0.8	1.0
D: อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (°C)	25	30	37	45
E: ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (วัน)	1	2	3	4

การศึกษาเริ่มจากการนำถั่วเหลืองล้างน้ำให้สะอาด และทำการเตรียมหัวเชื้อผสมที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในขั้นตอน 2 แล้วจึงนำไปทำการหมักด้วยปัจจัยด้านการผลิตในตาราง 16 หลังจากนั้นจึงนำถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นไปทดสอบคุณลักษณะตามขั้นตอน 2.4.1 – 2.4.3 จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย และนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Design-Expert (*ver.* 6.0.2) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's HSD (Bechoff *et al.*, 2009)

ตาราง 16 แผนการทดลองแบบทากูชิ L16 (4^5) ในการศึกษาปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่า

สิ่งทดลองที่	ระดับของปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่า				
	A: เวลาที่ใช้แช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม	**B:** เวลาที่ใช้ต้มถั่วเหลือง	**C:** ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก	**D:** อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก	**E:** ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	1	2	3	4
6	2	2	1	4	3
7	2	3	4	1	2
8	2	4	3	2	1
9	3	1	3	4	2
10	3	2	4	3	1
11	3	3	2	2	4
12	3	4	1	1	3
13	4	1	4	2	3
14	4	2	3	1	4
15	4	3	2	4	1
16	4	4	1	3	2

3.2 การศึกษาผลกระทบของปัจจัยด้านการผลิตที่มีผลต่อคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่า

นำถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นในขั้นตอน 3.1 ในแต่ละชุดการทดลองมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าย่างโดยนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ห่อด้วยใบตองและให้หมายเลขสุ่มในแต่ละสิ่งทดลอง จากนั้นนำไปปิ้งบนตะแกรงย่างด้วยไฟอ่อน เป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างถั่วเน่าย่างมาทดสอบคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ และการยอมรับรวม กับผู้ที่บริโภคถั่วเน่าเป็นประจำ และให้คะแนนความชอบแบบ 9-hedonic scale (ภาคผนวก ซ) (Terlabie *et al.*, 2006) จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย และนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Design-Expert (*ver.* 6.0.2) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (Chung and Chung, 2007)

3.3 การประมาณค่าและทดสอบระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสมในการผลิตถั่วเน่า

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ผลกระทบของปัจจัยด้านการผลิตที่มีผลต่อคุณลักษณะของถั่วเน่าในขั้นตอน 2.4.1 – 2.4.3 และคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสในขั้นตอน 3.2 มาทำการวิเคราะห์และประมาณค่าระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสมในการผลิตถั่วเน่าโดยใช้โปรแกรม Design-Expert (*ver.* 6.0.2) จากนั้นนำระดับของปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าที่เหมาะสมที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมดังกล่าวมาทำการทดสอบด้วยการทดลองผลิตถั่วเน่า และทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้

4. การศึกษาผลกระทบของกระบวนการทำแห้งถั่วเน่าแผ่น

นำถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นที่ใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมและระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด จากนั้นแปรรูปเป็นแผ่นกลมขนาด 8.5 x 8.5 cm น้ำหนักแผ่นละประมาณ 20 g โดยให้หมายเลขและจดน้ำหนักที่แน่นอนของถั่วเน่าแผ่นแต่ละแผ่นไว้ นำถั่วเน่าแผ่นมาศึกษาผลกระทบของการทำแห้งโดยการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design) ซึ่งมี 2 ปัจจัยที่ทำการศึกษา ดังนี้

ปัจจัยแรก คือ วิธีที่ใช้ในการทำแห้ง ได้แก่ การทำแห้งโดยการตากแดดโดยตรง การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C และการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์

ปัจจัยที่สอง คือ เวลาที่ใช้ในการทำแห้ง ที่ 2, 4 และ 6 ชั่วโมง

นำถั่วเน่าแผ่นที่ทำแห้งแล้วมาวิเคราะห์คุณลักษณะตามขั้นตอน 2.4.1 – 2.4.3 พร้อมทั้งวัดค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ ปริมาณความชื้น การสูญเสียน้ำหนัก และค่าสีในระบบ CIE L* a* b* (CIELAB) (Sinnecker *et al.*, 2002) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้น นำผลที่ได้มาทำค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS (*ver.* 14.0) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้โดยวิธี Tukey's HSD (Bechoff *et al.*, 2009)