บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกแบคทีเรียสร้างสปอร์เพื่อใช้ในการผลิตถั่วเน่า

1.1 การคัดแยกและการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากถั่วเน่า

จากการเก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่ยังไม่ผ่านการแปรรูปเพื่อการบริโภค สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต KM1-KM16, KMB2 จำนวน 17 ไอโซเลต จากตัวอย่างถั่วเน่าของกลุ่มแม่บ้านเกษตรกรบ้านกิ่วมื่น อ.ป่าซาง จ.ลำพูน ไอโซเลต MCS1-MCS14 และ MCG1-MCG9 จำนวน 23 ไอโซเลต จากตัวอย่างถั่วเน่าของกลุ่มเกษตรกรผู้ผลิตถั่วเน่า อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ และไอโซเลต MHS1-MHS17 จำนวน 16 ไอโซเลต จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าแผ่นแห้งจาก จ.แม่ฮ่องสอน มาทำการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสและคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิดด้วยวิธี Agar well diffusion ได้ผลดังตาราง 17

ตาราง 17 ขนาดวงใสของเอนไซม์โปรติเอสและการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิดของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากถั่วเน่า

ไอโซเลต	ขนาดของวงใสบนอาหาร Skim milk agar (mm^2)	ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค (mm)*	
		B. cereus	*S. aureus*
KM1	211.69 ± 51.93 fghijkl	10.83 ± 1.26 abcd	NI
KM2	NI	NI	NI
KM3	211.69 ± 51.93 fghijkl	11.17 ± 0.76 ab	NI
KM4	161.45 ± 13.15 jklmn	11.83 ± 1.26 a	NI
KM5	140.25 ± 23.57 klmnop	11.00 ± 0.87 abc	NI
KM6	102.05 ± 27.77 mnop	11.67 ± 1.53 a	NI
KM7	85.04 ± 25.37 nopq	10.50 ± 1.32 abcdef	NI
KM8	NI	8.83 ± 1.61 cdefghij	NI
KM9	NI	NI	NI
KM10	170.09 ± 34.61 ijklmn	9.17 ± 1.26 bcdefgh	NI
KM11	214.31 ± 76.14 efghijkl	NI	NI
KM12	89.23 ± 56.37 nopq	8.83 ± 1.04 cdefghij	NI

ตาราง 17 ขนาดวงใสของเอนไซม์โปรติเอสและการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิดของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากถั่วเน่า (ต่อ)

ไอโซเลต	ขนาดของวงใสบนอาหาร Skim milk agar (mm^2)	ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค (mm)*	
		B. cereus	*S. aureus*
KM13	304.32 ± 36.26 bcde	9.17 ± 0.29 bcdefgh	NI
KM14	226.87 ± 0.00 cdefghijk	10.33 ± 1.53 abcdefg	NI
KM15	189.45 ± 71.35 ghijklm	10.67 ± 1.15 abcde	NI
KM16	279.99 ± 101.70 bcdefg	8.17 ± 0.76 ghij	NI
KMB2	184.74 ± 14.05 hijklm	11.16 ± 0.29 ab	20.50 ± 0.50
MCS1	319.30 ± 9.18 b	8.33 ± 0.76 fghij	NI
MCS2	293.72 ± 23.04 bcdef	8.33 ± 0.58 fghij	NI
MCS3	249.70 ± 8.04 bcdefghij	NI	NI
MCS4	324.73 ± 18.58 b	7.83 ± 0.29 hij	NI
MCS5	278.61 ± 17.22 bcdefg	NI	NI
MCS6	308.83 ± 8.95 bcd	NI	NI
MCS7	278.48 ± 8.50 bcdefg	NI	NI
MCS8	153.86 ± 0.00 klmno	9.00 ± 1.00 bcdefghi	NI
MCS9	136.40 ± 15.93 klmnop	8.00 ± 0.50 hij	NI
MCS10	324.73 ± 18.58 b	NI	NI
MCS11	86.94 ± 14.62 nopq	NI	NI
MCS12	104.21 ± 15.29 mnop	8.50 ± 0.50 efghij	NI
MCS13	150.26 ± 6.23 klmno	NI	NI
MCS14	154.39 ± 21.98 klmno	NI	NI
MCG1	132.67 ± 0.00 lmnop	NI	NI
MCG2	150.40 ± 12.69 klmno	8.00 ± 1.00 hij	NI
MCG4	209.47 ± 7.37 fghijkl	11.83 ± 0.58 a	NI
MCG5	NI	8.50 ± 0.50 efghij	NI
MCG6	184.74 ± 14.05 hijklm	NI	NI
MCG7	NI	NI	NI
MCG8	421.35 ± 10.54 a	8.17 ± 0.29 ghij	NI
MCG9	218.10 ± 7.59 defghijkl	NI	NI
MCG10	254.34 ± 0.00 bcdefghi	NI	NI
MHS1	169.04 ± 13.15 ijklmn	10.83 ± 0.29 abcd	18.33 ± 0.58
MHS2	50.37 ± 6.28 pq	7.33 ± 0.58 hij	NI

ตาราง 17 ขนาดวงใสของเอนไซม์โปรติเอสและการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคนบางชนิดของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากถั่วเน่า (ต่อ)

ไอโซเลต	ขนาดของวงใสบนอาหาร Skim milk agar (mm^2)	ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค (mm)*	
		B. cereus	*S. aureus*
MHS3	263.89 ± 8.27 bcdefgh	8.67 ± 0.76 defgh	NI
MHS4	86.68 ± 8.25 nopq	8.33 ± 0.29 fghij	NI
MHS5	NI	NI	NI
MHS6	319.56 ± 24.33 b	7.50 ± 0.00 hij	NI
MHS7	54.82 ± 9.85 pq	8.17 ± 0.76 ghij	NI
MHS8	314.13 ± 15.70 bc	7.00 ± 0.00 hij	NI
MHS9	180.62 ± 6.91 hijklm	10.83 ± 0.29 abcd	NI
MHS10	NI	NI	NI
MHS11	66.79 ± 18.37 opq	8.33 ± 0.58 fghij	NI
MHS12	NI	NI	NI
MHS13	NI	6.67 ± 0.29 j	NI
MHS14	NI	NI	NI
MHS15	NI	6.83 ± 0.29 ij	NI
MHS16	NI	6.83 ± 0.29 ij	NI
B39	NI	NI	NI
	GM	27.17 ± 2.75	24.17 ± 0.76

หมายเหตุ : * เป็นขนาดวงใสที่รวมขนาดความกว้างของหลุมที่มี Ø เท่ากับ 6 mm; a-q แสดงความมีนัยสำคัญระหว่างค่าเฉลี่ยเมื่อทดสอบโดยใช้ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$)

NI = ไม่พบวงใส

GM = Gentamycin (ความเข้มข้น 0.5000 mg/ml) ใช้เป็น Positive control

พบว่า มีแบคทีเรียสร้างสปอร์จำนวน 44 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างวงใสบนอาหาร skim milk agar ได้ โดยไอโซเลต MCG8 มีขนาดวงใสสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (421.35 mm^2) รองลงมาคือ ไอโซเลต MCS4 และ MCS10 มีขนาดวงใสเท่ากัน (324.73 mm^2) ในขณะที่เชื้อ *B. megaterium* B39 ตรวจไม่พบวงใสดังกล่าว (ตาราง 17)

พบว่า มีแบคทีเรียสร้างสปอร์จำนวน 36 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ได้ โดยไอโซเลต MCG4 และ KM4 มีขนาดของวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Agar well diffusion สูงที่สุด (11.83 mm) รองลงมาคือ ไอโซเลต KM6 (11.67 mm) แต่ขนาดวงใสทั้งสองไอโซเลตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 17)

ในขณะที่พบว่า มีแบคทีเรียสร้างสปอร์จำนวน 2 ไอโซเลตที่สามารถสร้างวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus* ได้ คือ ไอโซเลต KMB2 สามารถสร้างวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus* ได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (20.50 mm) และไอโซเลต MHS1 (18.33 mm) ทั้งนี้ไม่พบวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* และ *S. aureus* ของเชื้อ *B. megaterium* B39 (ตาราง 17)

หลังจากนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกไอโซเลต MCG8, MHS1 และ KMB2 พร้อมทั้งเชื้อ *B. megaterium* B39 มาทดสอบการผลิตวิตามินบีสิบสองโดยวิธี Bioassay (AOAC, 1980) ได้ผลดังตาราง 18

ตาราง 18 การผลิตวิตามินบีสิบสองของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากถั่วเน่า

ไอโซเลต	ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/ml)
MCG8	0.450 ± 0.09 b
MHS1	0.152 ± 0.07 d
KMB2	0.252 ± 0.03 c
B39	0.525 ± 0.02 a

พบว่าเชื้อ *B. megaterium* B39 สามารถผลิตวิตามินบีสิบได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (0.525 ng/ml) รองลงมาคือ ไอโซเลต MCG8 (0.450 ng/ml) ในขณะที่ไอโซเลต MHS1 สามารถผลิตวิตามินบีสิบสองได้น้อยที่สุด (0.152 ng/ml)

1.2 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

จากผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไอโซเลต MCG8, MHS1, KMB2 และ *B. megaterium* B39 โดยเมื่อใช้การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับ Key ของ Norris *et al.* (1973) และการทดสอบว่าเป็นเชื้อ *B. subtilis* (คนึงกานต์ และอัญชลี, 2543) พบว่าไอโซเลต MCG8, MHS1, KMB2 เป็นเชื้อ *B. subtilis* ดังแสดงในตาราง 19

ตาราง 19 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากถั่วเน่า

Biochemical characteristics	***Bacillus* spp. สายพันธุ์**				**Reference strains***	
	MCG8	**MHS1**	**KMB2**	**B39**	***B. subtilis* KB099**	***B. megaterium* KB008**
- Catalase test	+	+	+	+	+	+
- Voges-Proskauer test	+	+	+	-	+	-
- Growth in anaerobic agar	-	-	-	-	-	-
- Growth at 50°C	-	+	+	-	-	-
- Growth at 65°C	-	-	-	-	ND	ND
- Growth in 5% NaCl	+	+	+	-	ND	ND
- Growth in 7% NaCl	-	-	-	-	+	+
- Growth in 10% NaCl	-	-	-	-	-	-
- Acid from glucose	+	+	+	+	+	+
- Gas from glucose	-	-	-	-	-	-
- Hydrolysis of starch	+	+	+	+	+	+
- Reduction of nitrate	+	+	+	-	+	+
- Growth in VP pH < 6	+	+	+	+	ND	ND

หมายเหตุ: * อ้างอิงจาก Nagal and Jain (2010)

- = ผลลบ

+ = ผลบวก

ND = ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

2. การศึกษาอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตถั่วเน่า

2.1 การศึกษาอัตราส่วนของเชื้อผสมโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนผสม

จากการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วเน่า และคัดเลือกเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ มาศึกษาอัตราส่วนของเชื้อผสมเพื่อใช้ในการผลิตถั่วเน่า โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนผสม และทำการวิเคราะห์คุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น ซึ่งได้ผลการทดลองดังตาราง 20

พบว่า ชุดการทดลองที่ 18 (MCG8 12.5%, MHS1 12.5%, KMB2 12.5% และ B39 62.5%) มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (422.65 mg/g wet weight) และ ชุดการทดลองที่ 4 (B39 100%) มีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด (111.34 mg/g wet weight) ในขณะที่ถั่วเหลืองต้มสุกที่ใช้เป็นชุดควบคุมมีปริมาณโปรตีนเพียง 100.17 mg/g wet weight (ตาราง 20)

พบว่า ไม่มีชุดการทดลองใดที่มีสมบัติของสารสกัดจากถั่วเน่าในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ได้ (ภาพที่ 12) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 8 (MHS1 50% และ KMB2 50%) มีขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* สูงสุด (15.67 mm) และชุดการทดลองที่ 1 (MCG8 100%), 4 (B39 100%) 7 (MCG8 50% และ B39 50%) และชุดควบคุมไม่พบวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* (ตาราง 20 และ ภาพ 13)

พบว่า ชุดการทดลองที่ 19 (MCG8 25%, MHS1 25%, KMB2 25% และ B39 25%) มีปริมาณวิตามินบีสิบสองสูงสุด (3.08 ng/g wet weight) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 3 (KMB2 100%) มีปริมาณวิตามินบีสิบสองต่ำสุด (0.18 ng/g wet weight) แต่ไม่พบวิตามินบีสิบสองในชุดควบคุม (ตาราง 20)

จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมด พบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกัน แต่ในชุดการทดลองที่ 18 (MCG8 12.5%, MHS1 12.5%, KMB2 12.5% และ B39 62.5%) มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (9.11) (ตาราง 20)

ในขณะที่ค่า pH ของถั่วเหลืองต้มสุกที่ผ่านการหมักมีค่าสูงขึ้นกว่าชุดควบคุม (6.58) โดยชุดการทดลองที่ 4 (B39 100%) มีค่า pH สูงที่สุด (8.43) และชุดการทดลองที่ 18 (MCG8 12.5%, MHS1 12.5%, KMB2 12.5% และ B39 62.5%) มีค่า pH ต่ำที่สุด (7.91) (ตาราง 20)

2.2 การวิเคราะห์สมการการถดถอยของคุณลักษณะ ถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

จากการวิเคราะห์สมการการถดถอย พบว่าอัตราส่วนของเชื้อผสมมีความสัมพันธ์กับขนาดของวงใสต่อของเชื้อก่อโรค *S. aureus* และ ค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น โดยที่อัตราส่วนของเชื้อผสมกับขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* มีความสัมพันธ์กันแบบหุ่นเส้นตรง (linear model) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสรุปสมการแบบหุ่นจำลอง (model) ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ดังแสดงในสมการ (1) มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2) ที่ปรับค่าแล้ว (adj. R^2) = 0.6376 ในขณะที่อัตราส่วนของเชื้อผสมกับค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมีความสัมพันธ์กันแบบหุ่นกำลังสอง (quadratic model) อย่างมีนัยสำคัญ สามารถสรุปสมการแบบหุ่นจำลองดังสมการ (2) และมีค่า adj. R^2 = 0.5297

$$Y_{s.\ aureus} = +3.52A + 15.69B + 17.01C + 4.24D \quad (1)$$

$$Y_{pH} = +8.14A + 8.04B + 8.04C + 8.38D - 0.15AB + 0.21AC + 0.38AD + 0.038BC - 0.95BD - 1.07CD \quad (2)$$

A = อัตราส่วนของเชื้อ *B. subtilis* MCG8 (%)

B = อัตราส่วนของเชื้อ *B. subtilis* MHS1 (%)

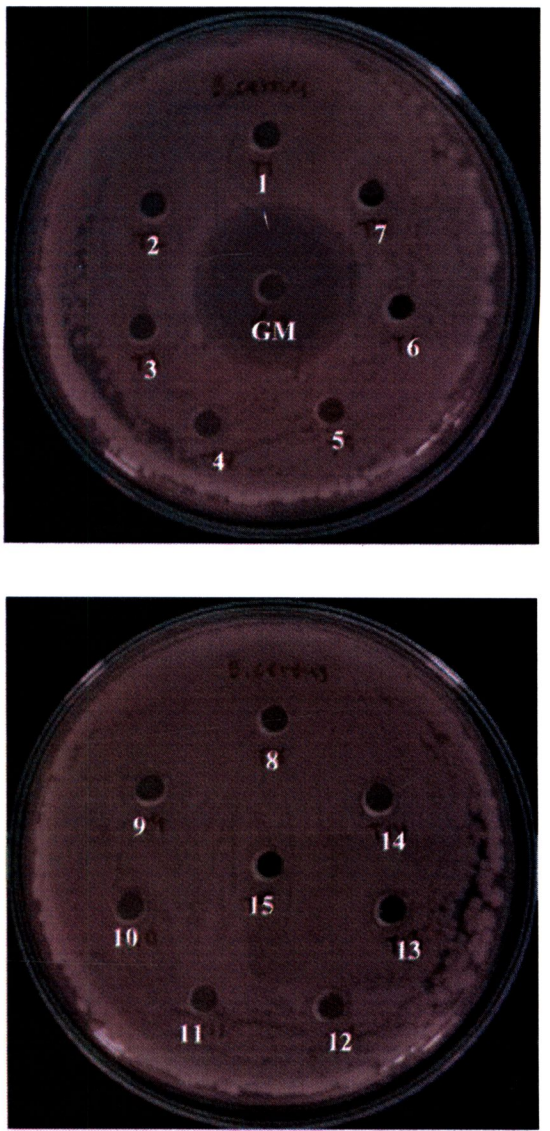
C = อัตราส่วนของเชื้อ *B. subtilis* KMB2 (%)

D = อัตราส่วนของเชื้อ *B. megaterium* B39 (%)

ตาราง 20 ผลการทดลองการแปรผันอัตราส่วนของเชื้อผสมต่อคุณลักษณะต่างๆ ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบส่วนผสม

ชุดการทดลองที่	ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค (mm)*		ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight	pH
		B. cereus	*S. aureus*			
1	356.35 ± 42.71 abc	NI	NI	2.76 ± 0.26 ab	9.46 ± 0.11 a	8.12
2	291.14 ± 31.00 cde	NI	12.50 ± 0.87 bcd	1.55 ± 0.43 abcd	9.41 ± 0.08 a	8.02
3	267.54 ± 26.23 de	NI	14.17 ± 1.26 abc	0.18 ± 0.31 d	9.45 ± 0.01 a	8.02
4	111.34 ± 11.09 f	NI	NI	1.48 ± 0.46 abcd	9.47 ± 0.19 a	8.43
5	354.19 ± 29.12 abc	NI	11.17 ± 0.29 def	1.47 ± 0.59 abcd	9.50 ± 0.04 a	8.08
6	268.62 ± 8.58 de	NI	11.17 ± 1.04 def	1.26 ± 0.79 abcd	9.41 ± 0.03 a	8.16
7	356.53 ± 13.09 abc	NI	NI	2.40 ± 0.56 abc	9.46 ± 0.08 a	8.39
8	364.10 ± 15.02 ab	NI	15.67 ± 1.53 a	2.38 ± 0.56 abc	9.66 ± 0.18 a	8.06
9	265.01 ± 6.76 de	NI	12.33 ± 1.61 bcd	1.21 ± 0.51 abcd	9.41 ± 0.12 a	8.00
10	230.60 ± 9.15 e	NI	10.83 ± 1.04 def	0.65 ± 0.44 cd	9.43 ± 0.15 a	7.96
11	257.99 ± 20.04 de	NI	13.33 ± 0.58 abcd	1.65 ± 0.64 abcd	9.54 ± 0.10 a	8.03
12	407.52 ± 14.41 a	NI	11.83 ± 0.29 cde	3.06 ± 1.74 ab	9.54 ± 0.08 a	8.15
13	290.24 ± 37.40 cde	NI	11.00 ± 0.87 def	2.36 ± 0.97 abc	9.55 ± 0.06 a	8.20
14	319.42 ± 10.52 bcd	NI	12.17 ± 0.29 cd	1.13 ± 0.87 bcd	9.48 ± 0.06 a	8.01
15	372.93 ± 8.07 ab	NI	8.83 ± 1.44 f	1.84 ± 1.23 abcd	9.56 ± 0.02 a	8.15
16	384.64 ± 31.45 ab	NI	11.33 ± 0.58 def	2.37 ± 0.63 abc	9.48 ± 0.05 a	8.03
17	375.45 ± 19.52 ab	NI	15.00 ± 1.00 ab	1.14 ± 0.39 bcd	9.52 ± 0.02 a	8.02
18	422.65 ± 11.17 a	NI	11.50 ± 0.50 cdef	1.74 ± 0.75 abcd	9.11 ± 0.08 b	7.91
19	409.86 ± 34.97 a	NI	9.33 ± 0.58 ef	3.08 ± 0.17 a	9.42 ± 0.05 a	8.00
ชุดควบคุม	100.17 ± 6.71 f	NI	NI	-	-	6.58

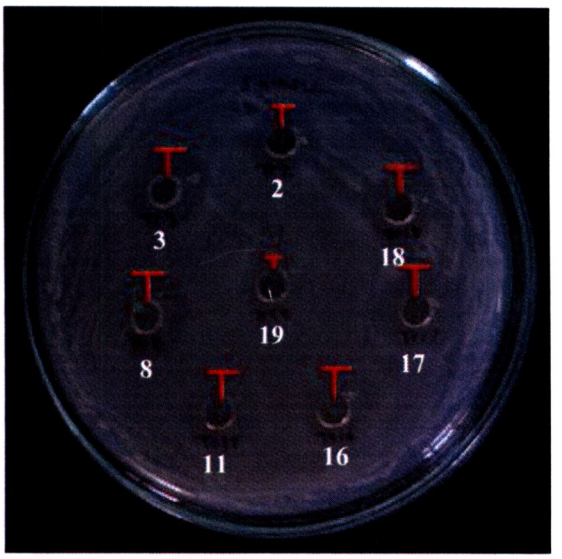
หมายเหตุ: * เป็นขนาดวงใสที่รวมขนาดความกว้างของหลุมที่มี Ø เท่ากับ 6 mm; NI = ไม่พบวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรค; a-f แสดงความมีนัยสำคัญระหว่างชุดการทดลองเมื่อทดสอบโดยใช้ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$); จำนวนซ้ำของค่าเฉลี่ยของคุณลักษณะของถั่วเน่า ค่า pH (2 ซ้ำ) ปริมาณโปรตีน จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมด และขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค (3ซ้ำ) และปริมาณวิตามินบีสิบสอง (4 ซ้ำ)

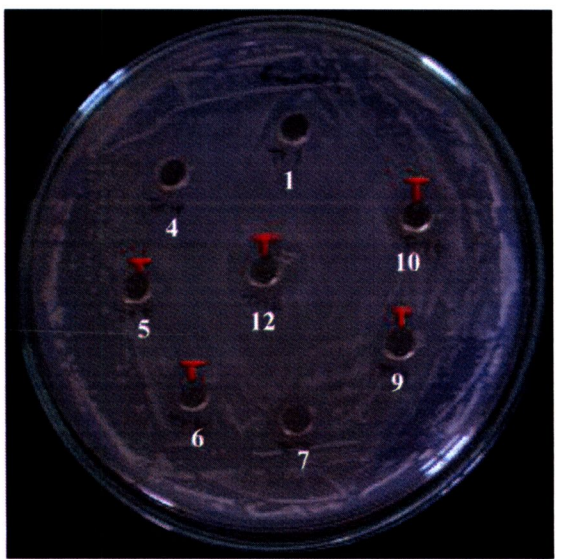


ภาพ 12 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นต่อเชื้อก่อโรค *B. cereus*

GM = Gentamycin (ความเข้มข้น 0.5000 mg/ml) ใช้เป็น Positive control

หมายเลข 1 = ชุดการทดลองที่ 1	หมายเลข 2 = ชุดการทดลองที่ 2	หมายเลข 3 = ชุดการทดลองที่ 3
หมายเลข 4 = ชุดการทดลองที่ 4	หมายเลข 5 = ชุดการทดลองที่ 5	หมายเลข 6 = ชุดการทดลองที่ 6
หมายเลข 7 = ชุดการทดลองที่ 7	หมายเลข 8 = ชุดการทดลองที่ 8	หมายเลข 9 = ชุดการทดลองที่ 9
หมายเลข 10 = ชุดการทดลองที่ 10	หมายเลข 11 = ชุดการทดลองที่ 11	หมายเลข 12 = ชุดการทดลองที่ 12
หมายเลข 13 = ชุดการทดลองที่ 13	หมายเลข 14 = ชุดการทดลองที่ 14	หมายเลข 15 = ชุดการทดลองที่ 15





ภาพที่ 13 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus*

หมายเลข 1 = ชุดการทดลองที่ 1 หมายเลข 2 = ชุดการทดลองที่ 2 หมายเลข 3 = ชุดการทดลองที่ 3
หมายเลข 4 = ชุดการทดลองที่ 4 หมายเลข 5 = ชุดการทดลองที่ 5 หมายเลข 6 = ชุดการทดลองที่ 6
หมายเลข 7 = ชุดการทดลองที่ 7 หมายเลข 8 = ชุดการทดลองที่ 8 หมายเลข 9 = ชุดการทดลองที่ 9
หมายเลข 10 = ชุดการทดลองที่ 10 หมายเลข 11 = ชุดการทดลองที่ 11 หมายเลข 12 = ชุดการทดลองที่ 12
หมายเลข 16 = ชุดการทดลองที่ 16 หมายเลข 17 = ชุดการทดลองที่ 17 หมายเลข 18 = ชุดการทดลองที่ 18
หมายเลข 19 = ชุดการทดลองที่ 19

2.3 การทำนายและทดสอบอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตถั่วเน่า

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการกำหนดขอบเขตของค่าตอบสนองของคุณลักษณะของถั่วเน่า ซึ่งได้จากการแปรผันอัตราส่วนของเชื้อผสมสายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในตาราง 21

ตาราง 21 การกำหนดขอบเขตอัตราส่วนของเชื้อผสม และค่าตอบสนองคุณลักษณะของถั่วเน่า

สายพันธุ์ที่ใช้ในการหมัก	**ค่าต่ำสุด**	**ค่าสูงสุด**
A: MCG8	0.0	1.0
B: MHS1	0.0	1.0
C: KMB2	0.0	1.0
D: B39	0.0	1.0
ค่าการตอบสนองของคุณลักษณะของถั่วเน่า	**ค่าต่ำสุด**	**ค่าสูงสุด**
- ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	354.19	422.65
- ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	1.21	3.08
- ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* (mm)	13.33	15.67
- จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight	9.11	9.66
- pH	7.91	8.43

การกำหนดช่วงของค่าตอบสนองของคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นด้านปริมาณโปรตีน (354.19 – 422.65 mg/g wet weight) ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (1.21 – 3.08 ng/g wet weight) ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* (13.33 - 15.67 mm) จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight (9.11 - 9.66) และค่า pH (7.91 - 8.43) (ตาราง 21)

ตาราง 22 แสดงจุดที่เหมาะสมทั้งหมด 4 จุด ที่จะใช้เป็นอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Design-Expert (*ver.* 6.0.2) ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า อัตราส่วนของเชื้อผสม Opt_{mixed1} เป็นจุดที่จะทำให้ถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (365.73 mg/g wet weight) ในขณะที่ Opt_{mixed2} ทำให้มีขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* สูงสุด (16.32 mm) และ Opt_{mixed3} ทำให้มีวิตามินบีสิบสองสูงที่สุด (1.883 ng/g wet weight) และสุดท้ายคือ Opt_{mixed4} เป็นจุดที่ทำให้ค่าการตอบสนองของคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมีเกณฑ์สูงในทั้งด้านปริมาณโปรตีน ปริมาณวิตามินบีสิบสอง และขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus*

ตาราง 22 การทำนายอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสม และค่าตอบสนองคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

จุดที่เหมาะสม	อัตราส่วนของเชื้อผสมของ *Bacillus* spp.				ค่าการตอบสนองคุณลักษณะของถั่วเน่า	การทำนายผลค่าการตอบสนองของคุณลักษณะของถั่วเน่า
	MCG8	MHS1	KMB2	B39		
Opt_{mixed1}	0.00	0.49	0.41	0.10	- ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	365.73
					- ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	1.407
					- ขนาดของวงใสต่อเชื้อ *S. aureus* (mm)	15.10
					- จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight	9.49
					- pH	7.99
Opt_{mixed2}	0.00	0.44	0.55	0.01	- ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	361.35
					- ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	1.232
					- ขนาดของวงใสต่อเชื้อ *S. aureus* (mm)	16.32
					- จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight	9.50
					- pH	8.05
Opt_{mixed3}	0.13	0.64	0.15	0.08	- ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	354.19
					- ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	1.883
					- ขนาดของวงใสต่อเชื้อ *S. aureus* (mm)	13.33
					- จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight	9.49
					- pH	8.02
Opt_{mixed4}	0.00	0.57	0.38	0.05	- ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	363.64
					- ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	1.461
					- ขนาดของวงใสต่อเชื้อ *S. aureus* (mm)	15.57
					- จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight	9.49
					- pH	8.02

จากนั้นจึงได้นำอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมที่วิเคราะห์ดังกล่าวนำมาใช้เป็นหัวเชื้อผสมในการผลิตถั่วเน่า ซึ่งได้ผลดังตาราง 23

ตาราง 23 ผลการทดสอบอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตถั่วเน่า

จุดที่เหมาะสม	ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* (mm)*	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight	pH
Opt_{mixed1}	257.09 ± 11.09 b	2.77 ± 0.28 a	15.00 ± 0.50 a	10.72 ± 0.17 a	8.26
Opt_{mixed2}	282.13 ± 3.38 b	2.64 ± 0.90 a	14.83 ± 1.04 a	10.76 ± 0.08 a	8.30
Opt_{mixed3}	306.99 ± 19.61 a	3.66 ± 0.86 a	14.67 ± 1.04 a	10.76 ± 0.05 a	8.34
Opt_{mixed4}	296.36 ± 12.16 b	3.18 ± 0.89 a	15.67 ± 0.58 a	10.71 ± 0.03 a	8.37

หมายเหตุ: * เป็นขนาดวงใสที่รวมขนาดความกว้างของหลุมที่มี Ø เท่ากับ 6 mm; ความมีนัยสำคัญระหว่างชุดการทดลองเมื่อทดสอบโดยใช้ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$)

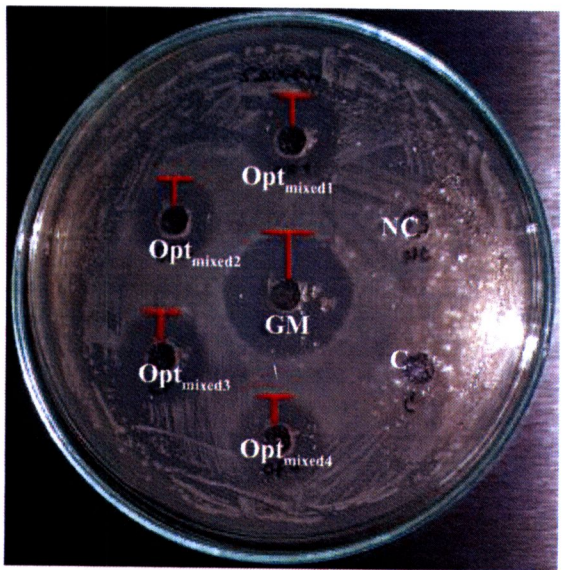
พบว่า ปริมาณโปรตีนมีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้ทำนายไว้ (ตาราง 22 และ 23) โดยจากค่าที่ได้จากการทดสอบอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมทั้งหมด 4 จุด Opt_{mixed3} มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (306.99 mg/g wet weight) (ตาราง 23)

พบว่า ปริมาณวิตามินบีสิบสองมีค่าสูงกว่าที่ค่าที่ได้ทำนายไว้ (ตาราง 22 และ 23) แต่ค่าที่ได้จากการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดย Opt_{mixed3} มีปริมาณวิตามินบีสิบสองสูงสุด (3.66 ng/g wet weight) (ตาราง 23)

ค่าที่ได้จากทดสอบของขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่ได้ทำนายไว้ (ตาราง 22 และ 23) โดย Opt_{mixed4} มีขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* สูงสุด (15.67 mm) (ตาราง 23 และภาพ 14)

พบว่า จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดที่ได้จากการทดสอบมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 22 และ 23) แต่จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดและค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมีค่าที่ได้จากการทดสอบสูงกว่าค่าที่ทำนายไว้ (ตาราง 22)

เมื่อพิจารณาในด้านปริมาณโปรตีน วิตามินบีสิบสอง และขนาดของวงใสของสารสกัดจากถั่วเน่าในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus* พบว่า Opt_{mixed3} เป็นอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมที่สุด โดยทำให้ถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมีปริมาณโปรตีน (306.99 mg/g wet weight) วิตามินบีสิบสอง (3.66 ng/g wet weight) มีขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* (14.67 mm) จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight (10.76) และค่า pH (8.34) (ตาราง 23)



ภาพ 14 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* จากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมที่วิเคราะห์ได้

Opt_{mixed1} = สารสกัดจากถั่วเน่าจากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมจุดที่ 1
Opt_{mixed2} = สารสกัดจากถั่วเน่าจากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมจุดที่ 2
Opt_{mixed3} = สารสกัดจากถั่วเน่าจากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมจุดที่ 3
Opt_{mixed4} = สารสกัดจากถั่วเน่าจากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมจุดที่ 4
GM = Gentamycin (ความเข้มข้น 0.5000 mg/ml) ใช้เป็น Positive control
NC = 50 mM Phosphate buffer ใช้เป็น Negative control
C = สารสกัดจากถั่วเหลืองต้มที่ไม่ผ่านการหมัก ใช้เป็น Control

3. การศึกษาปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสมของเชื้อผสมเพื่อใช้ในการผลิตถั่วเน่า

3.1 การศึกษาปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าโดยการออกแบบการทดลองแบบทากูชิ

จากการศึกษาอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมซึ่งได้เลือก Opt_{mixed3} มาใช้ในการผลิตถั่วเน่าโดยการออกแบบการทดลองแบบทากูชิ เพื่อศึกษาผลของปัจจัยด้านการผลิตต่อคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น ได้ผลการทดลองดังตาราง 24

จากการทดลองพบว่า ชุดการทดลองที่ 3 (ต้มถั่วเหลืองเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติมเกลือ 0.8% หมักที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 วัน) มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (368.24 mg/g wet weight) และมีปริมาณโปรตีนมากกว่าถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นโดยใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสม (Opt_{mixed3}) (325.01 mg/g wet weight) อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 1 (หมักที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 วัน) มีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด (127.73 mg/g wet weight) (ตาราง 24)

พบว่าไม่มีสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นจากชุดการทดลองใดที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* ได้ (ตารางที่ 24 และภาพ 15) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 7 (แช่ถั่วเหลือง 8 ชั่วโมง ต้มถั่วเหลืองเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติมเกลือ 1% หมักที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 วัน) มีขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* สูงที่สุด (18.17 mm) และมีค่ามากกว่า Opt_{mixed3} อย่างมีนัยสำคัญ (14.67 mm) (ตาราง 24 และภาพ 16)

พบว่าชุดการทดลองที่ 13 (แช่ถั่วเหลือง 24 ชั่วโมง เติมเกลือ 1% หมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน) มีปริมาณวิตามินบีสิบสองสูงที่สุด (2.59 ng/g wet weight) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ Opt_{mixed3} (1.68 ng/g wet weight) (ตาราง 24)

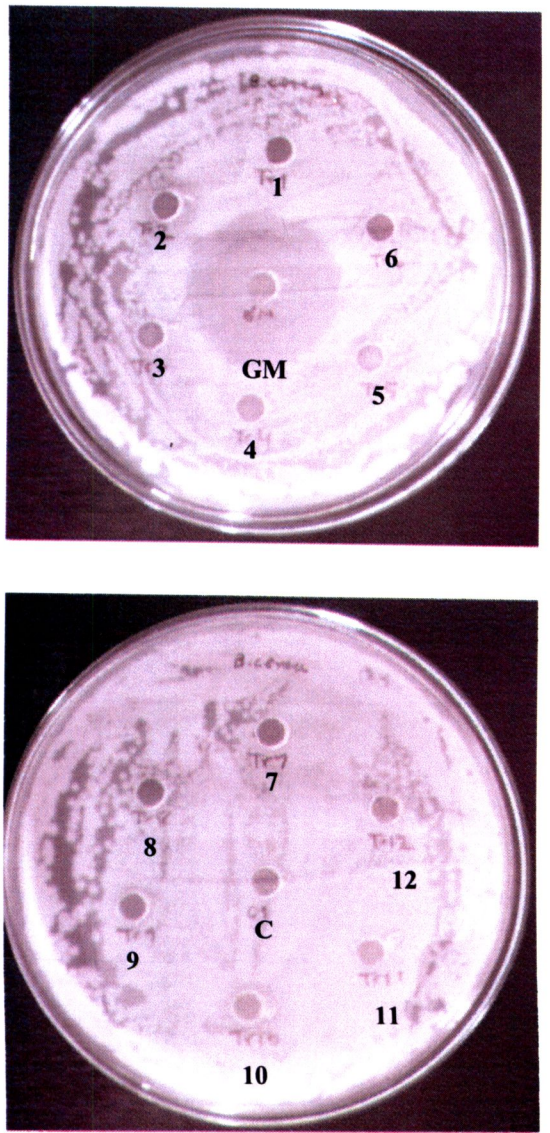
พบว่า ชุดการทดลองที่ 9 (แช่ถั่วเหลือง 16 ชั่วโมง เติมเกลือ 0.8% หมักที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 วัน) มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight สูงที่สุด (9.92) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ Opt_{mixed3} (9.76) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 1 (หมักที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 วัน) มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight ต่ำที่สุด (8.06) (ตาราง 24)

ในขณะที่ค่า pH ในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยชุดการทดลองที่ 6 (แช่ถั่วเหลือง 8 ชั่วโมง ต้มถั่วเหลืองเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หมักที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 3 วัน) มีค่า pH สูงที่สุด (8.49) และชุดการทดลองที่ 1 หมักที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 วัน) มีค่า pH ต่ำสุด (6.45) (ตาราง 24)

ตาราง 24 ผลการทดลองการศึกษาปัจจัยด้านการผลิตของถั่วเน่าโดยการออกแบบการทดลองแบบทากูชิ

ชุดการทดลองที่	ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค (mm)*		ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight	pH**
		B. cereus	*S. aureus*			
1	127.73 ± 4.53 d	NI	NI	0.03 ± 0.04 f	8.06 ± 0.03 i	6.45
2	269.52 ± 11.56 bc	NI	14.33 ± 0.76 cd	0.65 ± 0.02 cdef	8.84 ± 0.15 g	7.73
3	368.24 ± 21.08 a	NI	14.83 ± 0.29 bc	1.93 ± 0.58 ab	9.78 ± 0.11 ab	8.31
4	337.44 ± 19.95 abc	NI	NI	0.23 ± 0.13 ef	9.64 ± 0.02 bc	8.45
5	281.95 ± 20.91 bc	NI	7.50 ± 0.50 e	1.85 ± 0.43 abc	9.78 ± 0.04 ab	8.11
6	323.93 ± 29.18 abc	NI	NI	0.89 ± 0.15 bcdef	9.60 ± 0.01 bc	8.49
7	273.12 ± 10.46 bc	NI	18.17 ± 1.76 a	0.61 ± 0.25 def	8.44 ± 0.09 h	6.25
8	332.93 ± 26.06 abc	NI	15.50 ± 1.32 abc	1.29 ± 0.31 bcde	8.52 ± 0.06 h	6.64
9	301.23 ± 28.67 abc	NI	NI	1.63 ± 0.48 abcd	9.92 ± 0.05 a	8.24
10	299.42 ± 10.31 abc	NI	16.00 ± 1.50 abc	1.55 ± 0.76 abcd	9.32 ± 0.02 de	7.17
11	359.42 ± 53.75 ab	NI	11.50 ± 1.50 d	0.82 ± 0.40 bcdef	9.72 ± 0.06 ab	8.44
12	269.34 ± 3.30 bc	NI	13.50 ± 1.80 cd	0.99 ± 0.43 bcdef	8.82 ± 0.08 g	7.30
13	331.67 ± 43.65 abc	NI	17.67 ± 0.58 ab	2.59 ± 0.29 a	9.49 ± 0.05 cd	8.04
14	256.37 ± 37.57 bc	NI	16.00 ± 1.50 abc	1.66 ± 0.39 abcd	9.20 ± 0.01 ef	7.45
15	315.46 ± 31.34 abc	NI	NI	1.73 ± 0.17 abcd	9.00 ± 0.08 fg	7.55
16	328.07 ± 5.64 abc	NI	13.33 ± 1.53 cd	1.73 ± 0.52 abcd	9.59 ± 0.05 bc	8.22
Opt_{mixed3}	325.01 ± 45.80 abc	NI	14.67 ± 1.15 bcd	1.68 ± 0.54 abcd	9.76 ± 0.05 ab	8.34

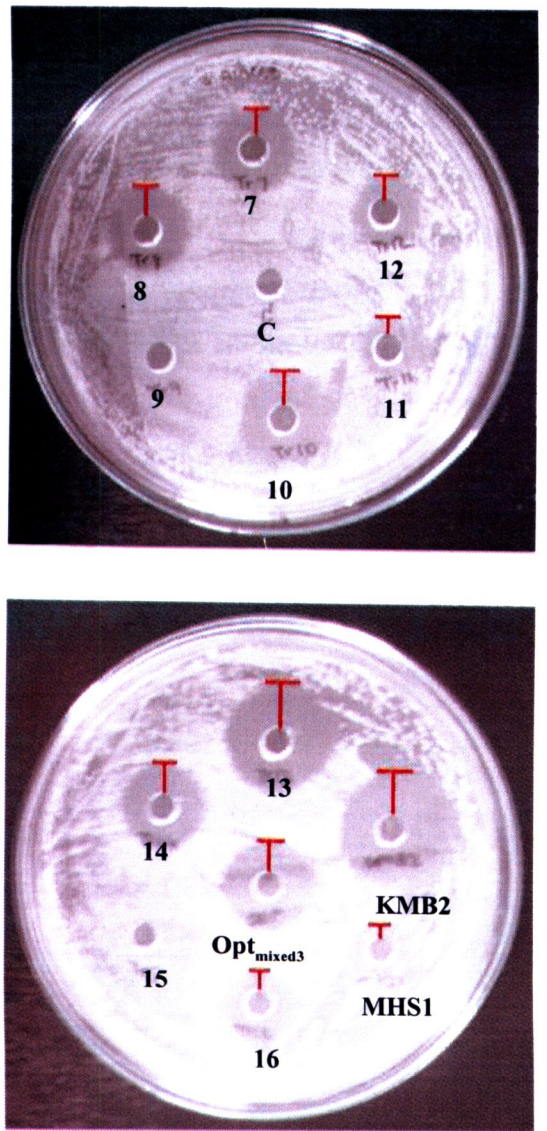
หมายเหตุ : * เป็นขนาดวงใสที่รวมขนาดความกว้างของหลุมที่มี Ø เท่ากับ 6 mm; NI = ไม่พบวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรค; a-i แสดงความมีนัยสำคัญระหว่างชุดการทดลองเมื่อทดสอบโดยใช้ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$); ** ค่า pH ของแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$); จำนวนซ้ำของค่าเฉลี่ยของคุณลักษณะของถั่วเน่า ค่า pH (2 ซ้ำ) ปริมาณโปรตีน จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมด และ ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค (3ซ้ำ) และปริมาณวิตามินบีสิบสอง (4 ซ้ำ)



ภาพที่ 15 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นต่อเชื้อก่อโรค *B. cereus*

GM = Gentamycin (ความเข้มข้น 0.5000 mg/ml) ใช้เป็น Positive control

หมายเลข 1 = ชุดการทดลองที่ 1	หมายเลข 2 = ชุดการทดลองที่ 2	หมายเลข 3 = ชุดการทดลองที่ 3
หมายเลข 4 = ชุดการทดลองที่ 4	หมายเลข 5 = ชุดการทดลองที่ 5	หมายเลข 6 = ชุดการทดลองที่ 6
หมายเลข 7 = ชุดการทดลองที่ 7	หมายเลข 8 = ชุดการทดลองที่ 8	หมายเลข 9 = ชุดการทดลองที่ 9
หมายเลข 10 = ชุดการทดลองที่ 10	หมายเลข 11 = ชุดการทดลองที่ 11	หมายเลข 12 = ชุดการทดลองที่ 12



ภาพ 16 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus*

C = สารสกัดจากถั่วเหลืองต้มที่ไม่ผ่านการหมัก ใช้เป็น Control

Opt_{mixed3} = อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตถั่วเน่า ใช้เป็น Control

MHS1 = สารสกัดจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ MHS1 ที่เลี้ยงใน Nutrient broth ใช้เป็น Positive control

KMB2 = สารสกัดจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ KMB2 ที่เลี้ยงใน Nutrient broth ใช้เป็น Positive control

หมายเลข 7 = ชุดการทดลองที่ 7 หมายเลข 8 = ชุดการทดลองที่ 8 หมายเลข 9 = ชุดการทดลองที่ 9

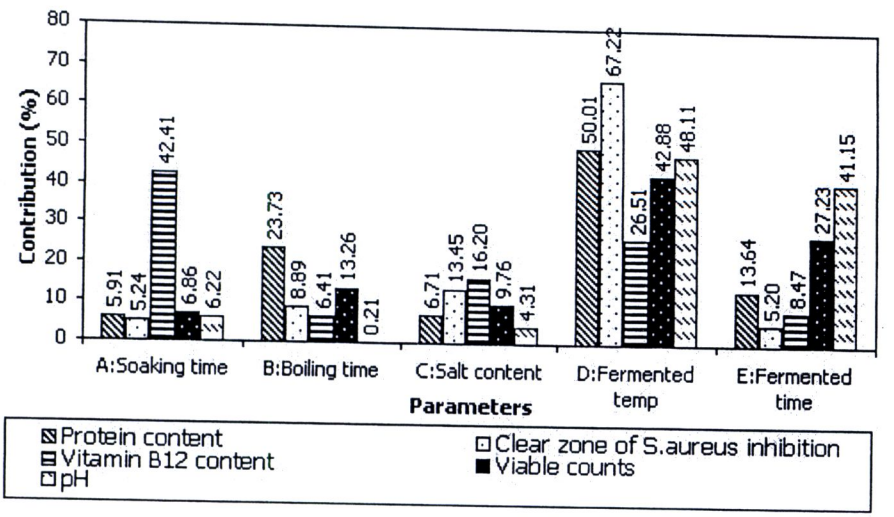
หมายเลข 10 = ชุดการทดลองที่ 10 หมายเลข 11 = ชุดการทดลองที่ 11 หมายเลข 12 = ชุดการทดลองที่ 12

หมายเลข 13 = ชุดการทดลองที่ 13 หมายเลข 14 = ชุดการทดลองที่ 14 หมายเลข 15 = ชุดการทดลองที่ 15

หมายเลข 16 = ชุดการทดลองที่ 16

3.2 การศึกษาอิทธิพลและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตที่มีผลต่อคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยการผลิตที่มีผลต่อคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น เมื่อคิดในสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของอิทธิพลที่เกิดจากปัจจัยด้านการผลิตทั้งหมด (% contribution) ของทั้ง 5 ปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าที่ทำการศึกษาพบว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (D) มีอิทธิพลต่อคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมากที่สุด โดยมีอิทธิพลต่อปริมาณโปรตีน (50.01%) ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* (67.22%) จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมด (42.88%) และค่า pH (48.11%) (ภาพที่ 17) ในขณะที่เวลาที่ใช้แช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม (A) มีอิทธิพลต่อปริมาณวิตามินบีสิบสองสูงที่สุด (42.41%) และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (E) มีอิทธิพลต่อค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นรองลงมาจากอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (D) (41.15%) ในขณะที่เวลาที่ใช้ต้มถั่วเหลือง (B) มีอิทธิพลต่อค่า pH น้อยที่สุด (0.21%) (ภาพ 17)



ภาพ 17 อิทธิพลของปัจจัยด้านการผลิตต่อคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

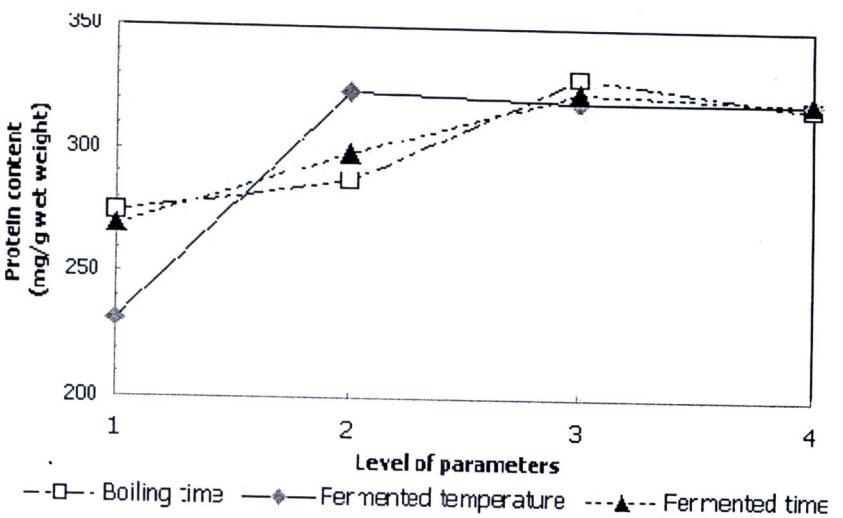
จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนพบว่า ปัจจัยด้านการผลิตมีผลต่อ ปริมาณโปรตีน ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* และค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น โดยที่เวลาที่ใช้ในการต้มถั่วเหลือง (B) อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (D) และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (E) มีผลกระทบต่อปริมาณโปรตีนของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น ในขณะที่ปัจจัยด้านเวลาที่ใช้ในการแช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม (A) และปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก (C) ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณโปรตีนในถั่วเน่าอย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 25)

ตาราง 25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตกับปริมาณโปรตีน

Source	Sum of Squares	DF	Mean square	F-value	*Prob > F*
Model	41717.06	9	4635.23	4.62	**0.0381***
B	*11329.48*	*3*	*3776.49*	*3.76*	*0.0786*
D	*23875.31*	*3*	*7958.44*	*7.93*	***0.0165****
E	*6512.28*	*3*	*2170.76*	*2.16*	*0.1935*
Residual	*6022.08*	*6*	*1003.68*		
Total	*47739.14*	*15*			

หมายเหตุ : B: เวลาที่ใช้ในการต้มถั่วเหลือง; D: อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก; E: ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก; * ค่าที่ได้มีนัยสำคัญ; adj. $R^2 = 0.6846$

ภาพ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีนัยสำคัญต่อถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น โดยที่เวลาที่ใช้ในการต้มถั่วเหลือง (B) เป็นเวลา 6 ชั่วโมงทำให้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นสูงที่สุด ในขณะที่อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (D) ที่ 30, 37 และ 45°C ทำให้ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนมีค่าสูง แตกต่างจากการหมักที่อุณหภูมิ 25°C ที่ส่งผลทำให้ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (E) ที่มากขึ้นมีผลทำให้ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนสูงขึ้น



ภาพ 18 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนที่เกิดจากระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

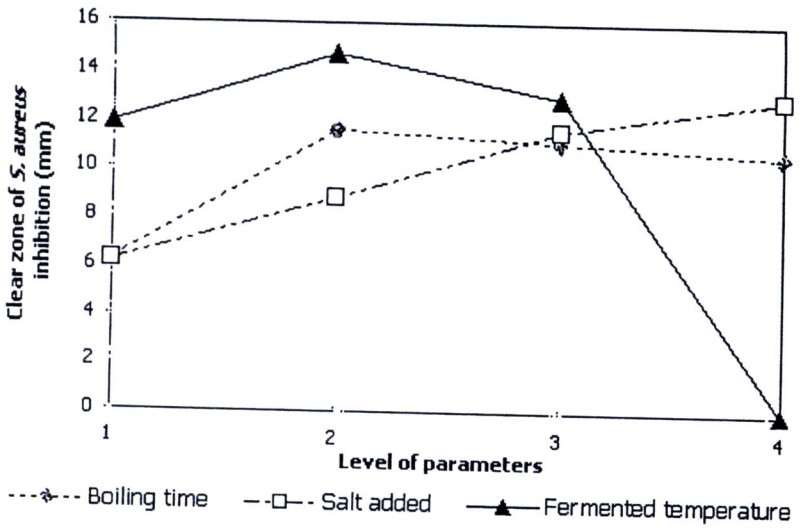
ในขณะที่การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตกับขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* ของสารสกัดของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น พบว่า เวลาที่ใช้ในการต้มถั่วเหลือง (B) ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก (C) และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (D) มีผลต่อขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เวลาที่ใช้ในการแช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม (A) และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (E) ไม่มีผลต่อขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* อย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 26)

ตาราง 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตกับขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus*

Source	Sum of Squares	DF	Mean square	F-value	*Prob > F*
Model	*717.90*	*9*	*79.77*	*5.72*	**0.0230 ***
B	*71.28*	*3*	*23.76*	*1.70*	*0.2646*
C	*107.81*	*3*	*35.94*	*2.58*	*0.1493*
D	*538.80*	*3*	*179.60*	*12.88*	***0.0050 ****
Residual	*83.65*	*6*	*13.94*		
Total	*801.55*	*15*			

หมายเหตุ : B: เวลาที่ใช้ในการต้มถั่วเหลือง; C: ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก; D: อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก; * ค่าที่ได้มีนัยสำคัญ; adj. $R^2 = 0.7391$

โดยภาพ 19 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีนัยสำคัญต่อถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น พบว่า เวลาที่ใช้ในการต้มถั่วเหลือง (B) ตั้งแต่ 3 ชั่วโมงขึ้นไปทำให้ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* มีค่าสูงกว่าการที่ไม่ได้ต้มถั่วเหลือง ในขณะที่ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก (C) ที่มากขึ้นมีแนวโน้มทำให้ค่าเฉลี่ยขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* สูงขึ้น และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (D) ที่ 45°C มีผลในการทำลายสมบัติของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นจนหมดไป



ภาพ 19 การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* ที่เกิดจากระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

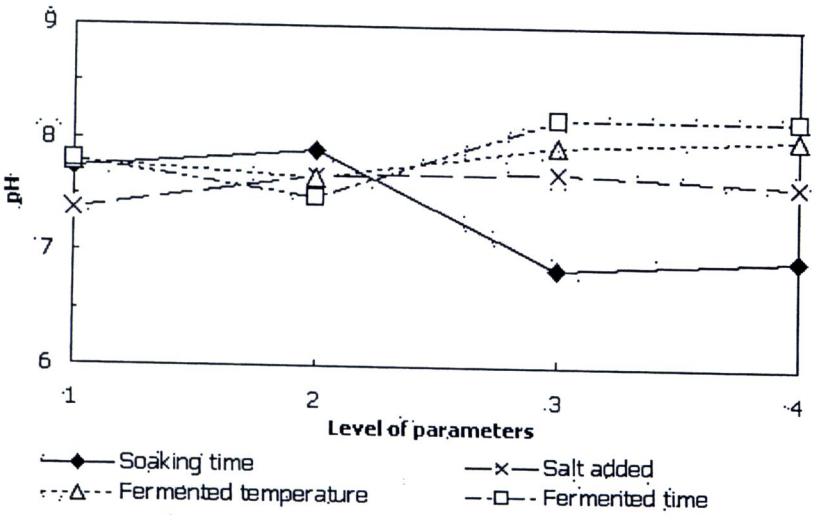
จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตกับค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น พบว่า เวลาที่ใช้ในการแช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม (A) ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก (C) อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (D) และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (E) มีผลอย่างมีนัยสำคัญกับค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น ในขณะที่เวลาที่ใช้ในการต้มถั่วเหลือง (B) ไม่มีผลต่อค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 27)

ตาราง 27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตกับค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Source	Sum of Squares	DF	Mean square	F-value	*Prob > F*
Model	8.22	12	0.68	118.34	**0.0011 ***
A	*0.51*	*3*	*0.17*	*29.50*	***0.0100 ****
C	*0.36*	*3*	*0.12*	*20.45*	***0.0168 ****
D	*3.96*	*3*	*1.32*	*228.24*	***0.0005 ****
E	*3.39*	*3*	*1.13*	*195.18*	***0.0006 ****
Residual	*0.017*	*3*	*5.787E-003*		
Total	*8.24*	*15*			

หมายเหตุ : A: เวลาที่ใช้ในการแช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม; C: ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก; D: อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก; E: ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก; * ค่าที่ได้มีนัยสำคัญ; adj. $R^2 = 0.9895$

โดยภาพ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า pH เฉลี่ยที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีนัยสำคัญต่อถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น โดยเวลาที่ใช้ในการแช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม (A) มากกว่า 8 ชั่วโมงขึ้นไปส่งผลให้ค่า pH เฉลี่ยของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก (C) และ อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก (D) ส่งผลทำให้ค่า pH เฉลี่ยเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และสุดท้ายระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (E) ตั้งแต่ 2 วันขึ้นไป มีผลทำให้ค่า pH เฉลี่ยของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นเพิ่มมากขึ้น



ภาพ 20 การเปลี่ยนแปลงค่า pH เฉลี่ยที่เกิดจากระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

2.3 การศึกษาคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

การศึกษาคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นทั้งหมด 5 ด้าน ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่นรสชาติ และการยอมรับรวม โดยนำไปแปรรูปเป็นถั่วเน่าย่าง (ภาพ 21) และทำการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์โดยการให้คะแนนความชอบแบบ 9-hedonic scales ได้ผลดังตาราง 28 พบว่า

ชุดการทดลองที่มีคะแนนด้านลักษณะปรากฏสูงสุด คือ ชุดการทดลองที่ 7 (แช่ถั่วเหลือง 8 ชั่วโมง ต้มถั่วเหลืองเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เติมเกลือ 1% หมักที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 วัน) (6.58) รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 9 (แช่ถั่วเหลือง 16 ชั่วโมง เติมเกลือ 0.8% หมักที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 วัน) (6.50) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 4 (ต้มถั่วเหลือง 8 ชั่วโมง เติมเกลือ 1% หมักที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 4 วัน) มีคะแนนด้านลักษณะปรากฏต่ำสุด (2.50)

ชุดการทดลองที่มีคะแนนด้านสีสูงที่สุด คือ ชุดการทดลองที่ 14 (แช่ถั่วเหลือง 24 ชั่วโมง ต้มถั่วเหลือง 3 ชั่วโมง เติมเกลือ 0.8% หมักที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 4 วัน) (6.58) และชุดการทดลองที่ 4 มีค่าต่ำที่สุด (3.25)

ชุดการทดลองที่มีคะแนนด้านกลิ่นสูงที่สุด คือ ชุดการทดลองที่ 8 (แช่ถั่วเหลือง 8 ชั่วโมง ต้มถั่วเหลือง 8 ชั่วโมง เติมเกลือ 0.8% หมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 วัน) (6.00) และชุดการทดลองที่ 14 (5.92) ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีคะแนนด้านกลิ่นต่ำที่สุด คือ ชุดการทดลองที่ 2 (ต้มถั่วเหลือง 3 ชั่วโมง เติมเกลือ 0.4% หมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 วัน), 4 และ 16 (แช่ถั่วเหลือง 24 ชั่วโมง ต้มถั่วเหลือง 8 ชั่วโมง หมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 วัน) โดยมีคะแนนเท่ากับ 3.17 เท่ากันทั้งหมด

ชุดการทดลองที่มีคะแนนด้านรสชาติสูงที่สุด คือ ชุดการทดลองที่ 15 (แช่ถั่วเหลือง 24 ชั่วโมง ต้มถั่วเหลือง 6 ชั่วโมง เติมเกลือ 0.4% หมักที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 1 วัน) (5.33) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ 1 (หมักที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 วัน) มีค่าต่ำที่สุด (2.41) และมีคะแนนต่ำกว่าถั่วเหลืองต้ม (2.92) ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม

ชุดการทดลองที่มีคะแนนด้านการยอมรับรวมสูงที่สุด คือ ชุดการทดลองที่ 14 (5.83) และชุดการทดลองที่ 10 (แช่ถั่วเหลือง 16 ชั่วโมง ต้มถั่วเหลือง 6 ชั่วโมง เติมเกลือ 1% หมักที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน) (5.75) และมีค่าต่ำสุดในชุดการทดลองที่ 16 (2.33)

ในขณะที่ถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม คือ Opt_{mixed3} (แช่ถั่วเหลือง 16 ชั่วโมง หมักที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน) และถั่วเหลืองต้ม มีคะแนนคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสในด้าน ลักษณะปรากฏ (5.17 และ 2.08), สี (5.75 และ 2.58), กลิ่น (4.17 และ 3.00), รสชาติ (3.25 และ 2.92) และการยอมรับรวม (4.50 และ 2.00) ตามลำดับ (ตาราง 28)

ภาพ 21 ผลิตภัณฑ์ถั่วเน่าย่างของชุดการทดลองต่างๆ

ตาราง 28 การทดสอบคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

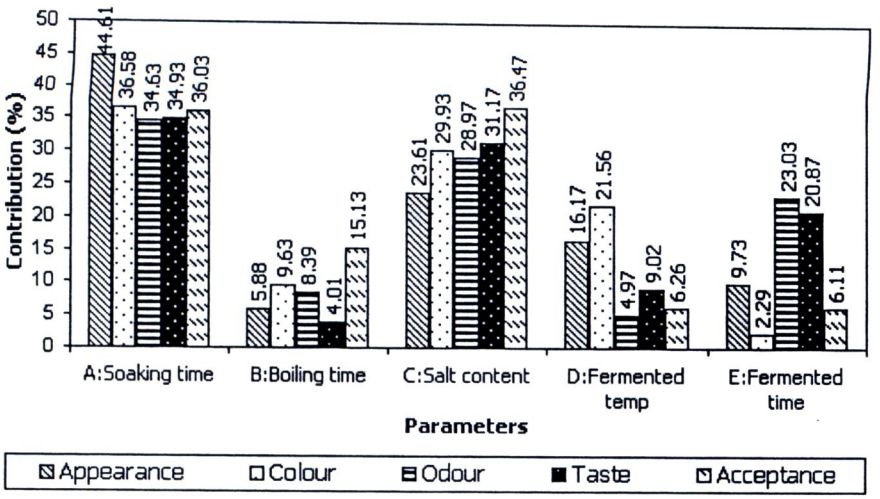
ชุดการทดลองที่	หมายเลขสุ่ม	คะแนนด้านคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส *				
		ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	การยอมรับรวม
1	810	3.58 ± 1.93 efgh	4.00 ± 2.30 efgh	3.33 ± 1.83 ef	2.41 ± 1.44 e	2.58 ± 1.98 de
2	337	4.00 ± 1.76 defg	5.08 ± 1.51 abcde	3.17 ± 1.11 ef	3.83 ± 1.85 abcde	4.08 ± 2.02 abcd
3	635	3.33 ± 1.67 efgh	3.58 ± 1.68 fgh	3.83 ± 1.85 cdef	3.25 ± 1.66 cde	3.58 ± 1.93 cde
4	963	2.50 ± 1.39 gh	3.25 ± 1.76 gh	3.17 ± 1.47 ef	3.00 ± 1.86 de	2.50 ± 1.57 de
5	446	4.33 ± 2.35 cdef	5.67 ± 1.37 abcd	4.17 ± 2.17 bcdef	4.42 ± 1.83 abcd	4.42 ± 1.98 abc
6	871	4.83 ± 1.27 bcde	4.50 ± 1.68 cdefg	3.50 ± 1.68 def	2.83 ± 1.85 de	3.67 ± 1.23 cde
7	523	6.58 ± 1.63 a	6.08 ± 1.56 ab	4.92 ± 1.78 abcd	4.17 ± 1.64 abcd	5.58 ± 2.19 ab
8	306	5.75 ± 1.82 abc	5.92 ± 2.02 abc	6.00 ± 1.04 a	5.08 ± 2.57 ab	5.67 ± 2.02 ab
9	807	6.50 ± 1.45 a	4.83 ± 1.53 bcdef	4.58 ± 1.44 abcde	4.83 ± 1.53 abc	4.92 ± 2.15 abc
10	250	5.75 ± 1.06 abc	5.50 ± 1.51 abcd	5.42 ± 1.44 ab	4.92 ± 2.02 abc	5.75 ± 1.48 a
11	751	3.58 ± 2.19 efgh	4.33 ± 2.06 defg	4.67 ± 1.87 abcde	4.08 ± 1.93 abcde	4.08 ± 2.31 abcd
12	627	6.00 ± 1.35 ab	5.67 ± 1.15 abcd	4.33 ± 1.30 bcdef	3.50 ± 1.38 bcde	4.42 ± 2.35 abc
13	765	5.42 ± 1.38 abcd	5.75 ± 0.87 abcd	3.75 ± 1.29 cdef	4.00 ± 2.00 abcde	3.92 ± 2.11 bcd
14	800	6.08 ± 2.07 ab	6.58 ± 1.31 a	5.92 ± 1.88 a	4.17 ± 1.70 abcd	5.83 ± 1.99 a
15	559	5.42 ± 1.56 abcd	5.50 ± 1.51 abcd	5.17 ± 1.47 abc	5.33 ± 1.56 a	4.67 ± 2.10 abc
16	067	3.08 ± 2.02 fgh	3.42 ± 1.56 fgh	3.17 ± 1.53 ef	3.42 ± 1.68 bcde	2.33 ± 1.30 de
Opt_{mixed3}	124	5.17 ± 2.08 abcd	5.75 ± 1.36 abcd	4.17 ± 1.85 bcdef	3.25 ± 1.14 cde	4.50 ± 1.51 abc
ถั่วเหลืองต้ม	656	2.08 ± 1.24 h	2.58 ± 1.73 h	3.00 ± 1.91 f	2.92 ± 2.12 de	2.00 ± 1.28 e

หมายเหตุ : * ค่าเฉลี่ยจากการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์จำนวน 12 คน (n = 12); a-h แสดงความแตกต่างทางสถิติโดยใช้การทดสอบด้วยวิธี Duncan's multiple range tests ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$)

2.4 การศึกษาอิทธิพลและการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตต่อคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

จากผลการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยด้านการผลิตต่อคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นพบว่า เวลาที่ใช้ในการแช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม (A) มีอิทธิพลต่อ ลักษณะปรากฏ (44.61%) สี (36.58%) กลิ่น (34.63%) รสชาติ (34.93%) และการยอมรับรวม (36.03%) สูงที่สุด (ภาพ 22)

ปัจจัยด้านการผลิตที่มีอิทธิพลรองลงมาคือ ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก (C) มีอิทธิพลต่อ ลักษณะปรากฏ (23.61%) สี (29.93%) กลิ่น (28.97%) รสชาติ (31.17%) และการยอมรับรวม (36.47%) (ภาพ 22)



ภาพ 22 อิทธิพลของปัจจัยด้านการผลิตที่มีผลกระทบต่อ
คุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

และเมื่อนำข้อมูลจากการทดลองในตาราง 28 มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยด้านการผลิตที่มีผลต่อคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส ไม่พบว่ามีปัจจัยด้านการผลิตใดที่มีผลต่อคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

2.5 การประมาณค่าและทดสอบระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสมในการผลิตถั่วเน่า

การประมาณค่าปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสมในการผลิตถั่วเน่าแบบจุด (point prediction) โดยทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบทากูชิโดยใช้โปรแกรม Design-Expert (*ver.* 6.0.2) ซึ่งการประมาณค่าของระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสมและผลการทำนายค่าตอบสนองของคุณลักษณะของถั่วเน่าแสดงในตาราง 29

ตาราง 29 การประมาณค่าระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสมแบบจุด และผลการทำนายค่าตอบสนองของคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

	การทำนายค่าตอบสนองต่างๆ ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นจากระดับของปัจจัยการผลิตที่เหมาะสม				
	$Opt_{process1}$	**$Opt_{process2}$**	**$Opt_{process3}$**	**$Opt_{process4}$**	**$Opt_{process5}$**
คุณลักษณะของถั่วเน่า :					
- ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	378.76	282.60	378.76	190.86	324.35
- ขนาดของวงใสต่อเชื้อ *S. aureus* (mm)	12.29	19.50	19.04	15.29	17.67
- ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	*1.26*	*1.26*	*1.26*	*1.26*	1.26
- จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight	9.23	9.23	9.23	9.23	9.23
- ค่า pH	8.35	6.84	7.93	6.23	7.08
คะแนนความชอบของคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น :					
- ลักษณะปรากฏ	4.80	4.80	4.80	5.46	5.46
- สี	4.98	4.98	4.98	5.08	5.08
- กลิ่น	4.32	4.32	4.32	4.75	4.75
- รสชาติ	3.95	3.95	3.95	4.44	4.44
- การยอมรับรวม	4.25	4.25	4.25	4.79	4.79
การประมาณค่าระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสม :					
- A : เวลาที่ใช้แช่ถั่วเหลืองก่อนการต้ม	Ns	Ns	Ns	3	3
- B : เวลาที่ใช้ต้มถั่วเหลือง	3	2	3	2	3
- C : ปริมาณเกลือที่เติมในระหว่างการหมัก	Ns	4	4	3	3
- D : อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก	2	2	2	1	2
- E : ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก	3	Ns	3	1	1

หมายเหตุ : Ns คือไม่มีระดับของปัจจัยด้านการผลิตใดที่มีนัยสำคัญ

อธิบายได้ว่า $Opt_{process1}$ (ต้มถั่วเหลือง 6 ชั่วโมง หมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน) และ $Opt_{process3}$ (ต้มถั่วเหลือง 6 ชั่วโมง เติมเกลือ 1% หมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน) เป็นระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่ทำให้ถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (378.76 mg/g wet weight) $Opt_{process2}$ (ต้มถั่วเหลือง 3 ชั่วโมง เติมเกลือ 1% หมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 วัน)เป็นระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่ทำให้ถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมีขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* สูงที่สุด (19.50 mm) และ $Opt_{process4}$ (แช่ถั่วเหลือง 16 ชั่วโมง ต้มถั่วเหลือง 3 ชั่วโมง เติมเกลือ 0.8% หมักที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 1 วัน) และ $Opt_{process5}$ (แช่ถั่วเหลือง 16 ชั่วโมง ต้มถั่วเหลือง 6 ชั่วโมง เติมเกลือ 0.8% หมักที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1 วัน)เป็นระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่ทำให้ถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมีค่าคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสสูงที่สุด และ $Opt_{process5}$ ยังทำให้ถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นมีปริมาณโปรตีน และขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* สูงเท่ากับ 324.35 mg/g wet weight และ 17.67 mm ตามลำดับ (ตาราง 29)

หลังจากนั้นจึงทำการผลิตถั่วเน่าจากการประมาณค่าของระดับปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสม (ตาราง 29) ซึ่งได้ผลการทดสอบดังตาราง 30

เมื่อพิจารณาด้านคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น พบว่า $Opt_{process3}$ มีปริมาณโปรตีนสูงสุด (401.03 mg/g wet weight) รองลงมาคือ $Opt_{process1}$ (371.84 mg/g wet weight) ในขณะที่ $Opt_{process4}$ มีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด (292.94 mg/g wet weight)

ระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่ มีขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* สูงที่สุด คือ $Opt_{process2}$ (16.67 mm) รองลงมาคือ $Opt_{process5}$ (16.33 mm) ในขณะที่ $Opt_{process4}$ มีขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* ต่ำที่สุด (12.33 mm) (ภาพ 23)

ระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีปริมาณวิตามินบีสิบสองสูงสุด คือ $Opt_{process1}$ (4.86 ng/g wet weight) รองลงมาคือ $Opt_{process3}$ (4.63 ng/g wet weight) ในขณะที่ $Opt_{process4}$ มีปริมาณวิตามินบีสิบสองต่ำที่สุด (1.75 ng/g wet weight)

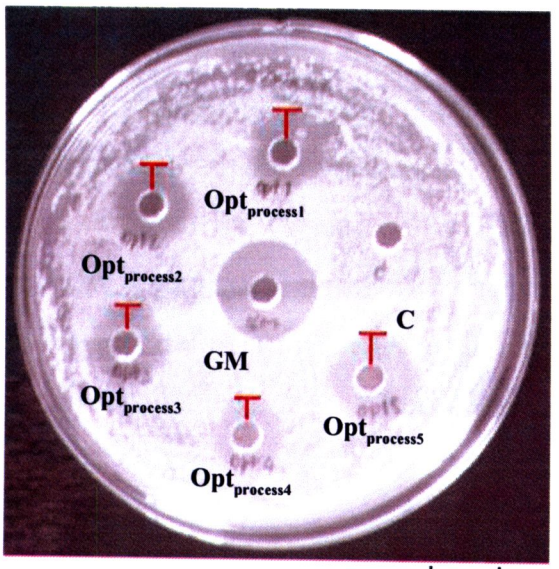
ระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตสูงสุดในหน่วย log cfu/g wet weight คือ $Opt_{process3}$ (10.03) รองลงมาคือ $Opt_{process1}$ (9.87) ในขณะที่ $Opt_{process4}$ มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดน้อยที่สุด (7.27)

ระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีค่า pH สูงที่สุด คือ $Opt_{process3}$ (8.00) รองลงมาคือ $Opt_{process1}$ (7.97) ในขณะที่ $Opt_{process4}$ มีค่า pH ต่ำที่สุด (6.26)

ตาราง 30 ผลของค่าตอบสนองของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นจากการประมาณค่าของระดับปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสม

	ผลของค่าตอบสนองของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นจากระดับปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสม				
	$Opt_{process1}$ (323)	$Opt_{process2}$ (259)	$Opt_{process3}$ (387)	$Opt_{process4}$ (298)	$Opt_{process5}$ (268)
คุณลักษณะของถั่วเน่า :					
- ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	371.84±30.14 a	288.42±31.58 b	401.03±14.05 a	292.94±14.05 b	348.07±31.14 ab
- ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* (mm)	14.33±1.15 ab	16.67±1.44 a	14.00±1.00 ab	12.33±2.02 b	16.33±1.53 a
- ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	4.86±1.29 a	1.91±0.31 b	4.63±1.19 a	3.33±1.63 ab	1.75±0.40 b
- จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g wet weight	9.87 ± 0.05 a	8.59 ± 0.03 b	10.03 ± 0.04 a	7.27 ± 0.16 c	8.35 ± 0.13 b
- ค่า pH	7.97 ± 0.03 a	6.51 ± 0.01 b	8.00 ± 0.03 a	6.26 ± 0.03 c	6.53 ± 0.01 b
คะแนนความชอบของคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส :					
- ลักษณะปรากฏ	4.17±2.79 b	5.83±1.85 ab	5.42±2.07 ab	6.33±2.10 a	4.58±2.57 ab
- สี	5.33±1.97 ab	6.08±1.98 a	3.67±2.39 b	6.08±1.93 a	4.33±2.19 ab
- กลิ่น	6.08±2.50 ab	6.67±1.97 a	4.42±2.81 b	6.83±2.04 a	4.50±2.32 b
- รสชาติ	5.25±2.26 a	5.92±1.98 a	4.42±2.07 a	5.50±1.98 a	4.25±2.01 a
- การยอมรับรวม	6.08±1.44 a	5.67±1.87 a	5.50±1.98 a	6.00±1.65 a	5.17±2.29 a

หมายเหตุ : a-c แสดงความมีนัยสำคัญระหว่างชุดการทดลองทดสอบโดยใช้ Tukey's HSD (คุณลักษณะของถั่วเน่า) และ Duncan's multiple range test (คุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$)



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพ 23 Agar well diffusion ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตได้ต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* จากการประมาณระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสม

$Opt_{process1}$ = สารสกัดจากถั่วเน่าจากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมจุดที่ 1
$Opt_{process2}$ = สารสกัดจากถั่วเน่าจากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมจุดที่ 2
$Opt_{process3}$ = สารสกัดจากถั่วเน่าจากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมจุดที่ 3
$Opt_{process4}$ = สารสกัดจากถั่วเน่าจากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมจุดที่ 4
$Opt_{process5}$ = สารสกัดจากถั่วเน่าจากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสมจุดที่ 5
GM = Gentamycin (ความเข้มข้น 0.5000 mg/ml) ใช้เป็น Positive control
C = สารสกัดจากถั่วเหลืองต้มที่ไม่ผ่านการหมัก ใช้เป็น Control

เมื่อพิจารณาด้านคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น พบว่า $Opt_{process4}$ มีคะแนนด้านลักษณะปรากฏสูงที่สุด (6.33) ในขณะที่ $Opt_{process1}$ มีคะแนนต่ำที่สุด (4.17)

ระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีคะแนนด้านสีสูงสุด คือ $Opt_{process2}$ และ $Opt_{process4}$ ซึ่งมีคะแนนเท่ากันเท่ากับ 6.08 ในขณะที่ $Opt_{process3}$ มีคะแนนด้านสีต่ำที่สุด (3.67)

ระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีคะแนนด้านกลิ่นสูงสุด คือ $Opt_{process4}$ (6.83) ในขณะที่ $Opt_{process3}$ มีคะแนนด้านกลิ่นต่ำที่สุด (4.42)

ระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีคะแนนด้านรสชาติสูงสุด คือ $Opt_{process2}$ (5.92) ในขณะที่ $Opt_{process5}$ มีคะแนนด้านกลิ่นต่ำที่สุด (4.25) อย่างไรก็ตาม คะแนนด้านรสชาติของทั้ง 5 ระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่มีคะแนนด้านการยอมรับรวมสูงสุด $Opt_{process1}$ (6.08) ในขณะที่ $Opt_{process5}$ มีคะแนนด้านการยอมรับรวมต่ำที่สุด (5.17) อย่างไรก็ตาม คะแนนด้านการยอมรับรวมของทั้ง 5 ระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบการประมาณค่าของระดับของปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าทั้งหมด 5 จุด ที่วิเคราะห์ได้จะพบว่า $Opt_{process1}$ และ $Opt_{process3}$ มีปริมาณโปรตีน วิตามินบีสิบสอง และขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ $Opt_{process3}$ มีการเติมเกลือในระหว่างการหมักที่ 1% จึงได้ทำการคัดเลือก $Opt_{process1}$ ที่ไม่ต้องมีการเติมเกลือในระหว่างการหมักใช้ศึกษาผลของการทำแห้งต่อไป

4. การศึกษาผลกระทบของกระบวนการทำแห้งถั่วเน่าแผ่น

4.1 ปริมาณโปรตีน วิตามินบีสิบสอง ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* ของสารสกัดจากถั่วเน่า และจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้น

ภายหลังจากการนำอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสม (Opt_{mixed3}) และระดับของปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าที่เหมาะสม ($Opt_{process1}$) ที่วิเคราะห์ได้มาทำการผลิตถั่วเน่า และแปรรูปถั่วเน่าเป็นแผ่น แล้วจึงนำไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งและระยะเวลาในการทำแห้งที่แตกต่างกัน จากนั้นนำมาทดสอบคุณลักษณะของถั่วเน่าแผ่นในด้านต่างๆ สามารถสรุปผลได้ในตาราง 31

พบว่า วิธีการทำแห้งและระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อปริมาณโปรตีนของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และมีปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างวิธีการทำแห้งและระยะเวลาในการทำแห้ง ($P < 0.05$) ซึ่งปริมาณโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการทำแห้งที่เพิ่มขึ้น โดยที่เวลา 6 ชั่วโมงของการทำแห้งพบว่า วิธีการทำแห้งด้วยด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด (591.82 mg/g dry weight) ในขณะที่การทำแห้งโดยการตากแดดโดยตรงมีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุด (499.40 mg/g dry weight)

พบว่า วิธีการทำแห้งและระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งไม่มีผลต่อปริมาณวิตามินบีสิบสองของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้น แต่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการทำแห้งและระยะเวลาในการทำแห้ง ($P < 0.05$) โดยวิตามินบีสิบสองมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 ชั่วโมงแรกของการทำแห้ง หลังจากนั้นจึงมีค่าค่อนข้างคงที่ โดยที่เวลา 6 ชั่วโมงของการทำแห้ง วิธีการทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรงทำให้ปริมาณวิตามินบีสิบสองมีค่าลดลงมากที่สุด (1.03 ng/g dry weight) ในขณะที่การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ มีปริมาณวิตามินบีสิบสองเหลืออยู่มากที่สุด (1.74 ng/g dry weight) อย่างไรก็ตาม ปริมาณวิตามินบีสิบสองในแต่ละชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตาราง 31 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ปริมาณวิตามินบีสิบสอง ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรคของสารสกัดจากถั่วเน่า และจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นภายหลังจากการทำแห้ง

วิธีที่ใช้ในการทำแห้ง	เวลาที่ใช้ในการทำแห้ง (h)	ปริมาณโปรตีน (mg/g dry weight)	ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g dry weight)	ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรคของสารสกัดจากถั่วเน่า (mm)		จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g dry weight
				B. cereus	*S. aureus*	
ถั่วเน่าเปียก (ควบคุม)	0	371.84 ± 30.14 d	4.86 ± 1.29 a	NI	14.33 ± 1.15 a	10.87 ± 0.05 a
การตากแดดโดยตรง	2	399.95 ± 4.62 d	1.97 ± 0.94 b	NI	NI	8.91 ± 0.14 c
	4	494.72 ± 12.15 b	1.65 ± 0.23 b	NI	NI	9.47 ± 0.10 b
	6	499.40 ± 8.93 b	1.03 ± 0.11 b	NI	NI	9.26 ± 0.16 b
การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C	2	442.47 ± 14.32 c	1.70 ± 0.50 b	NI	NI	9.32 ± 0.08 b
	4	588.40 ± 29.01 a	1.38 ± 0.18 b	NI	NI	9.56 ± 0.09 b
	6	574.35 ± 4.87 a	1.04 ± 0.40 b	NI	NI	9.51 ± 0.08 b
การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์	2	462.65 ± 8.42 bc	1.95 ± 0.58 b	NI	NI	9.36 ± 0.06 b
	4	604.25 ± 14.33 a	1.88 ± 0.33 b	NI	NI	9.29 ± 0.22 b
	6	591.82 ± 10.13 a	1.74 ± 0.45 b	NI	NI	9.58 ± 0.04 b
Drying methods		**	Ns	ND	ND	**
Drying times		**	Ns	ND	ND	**
Drying methods X Drying times		*	*	ND	ND	**

หมายเหตุ : a-d แสดงความมีนัยสำคัญระหว่างชุดการทดลองเมื่อทดสอบโดยใช้ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$); NI = ตรวจไม่พบวงใสของสารสกัดจากถั่วเน่าแผ่นในการยับยั้งเชื้อก่อโรค; ND = ไม่ได้ทำการวิเคราะห์; * แสดงความมีนัยสำคัญของปัจจัยที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P < 0.05$); ** แสดงความมีนัยสำคัญของปัจจัยที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 99% ($P < 0.01$); Ns แสดงว่าปัจจัยนั้นไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ;

เมื่อทำการสกัดสารจากถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้น เพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติในการต้านเชื้อก่อโรคของถั่วเน่าแผ่น ไม่พบวงใสของสารที่สกัดจากถั่วเน่าแผ่นต่อทั้งเชื้อก่อโรค *B. cereus* และ *S. aureus*

พบว่า วิธีการทำแห้งและระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการทำแห้งและระยะเวลาในการทำแห้ง ($P < 0.01$) ซึ่งจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g dry weight ของถั่วเน่าแผ่นมีค่าลดลงในระหว่างการทำแห้ง โดยมีค่าลดลงมากที่สุดในการทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (10.87) หลังจากนั้นพบว่า จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นในแต่ละวิธีการทำแห้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

4.2 คุณลักษณะทางกายภาพของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้น

จากการทดสอบคุณลักษณะทางกายภาพของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นภายหลังจากการทำแห้ง สามารถสรุปผลได้ดังตาราง 32

พบว่า วิธีการทำแห้งและระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อค่า pH ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้น และมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการทำแห้งและระยะเวลาในการทำแห้ง ($P < 0.01$) ซึ่งค่า pH ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นมีค่าลดลงจากเดิมเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเน่าเปียกที่ใช้เป็นชุดควบคุม (7.97) โดยค่า pH ลดลงมากที่สุดเมื่อทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (6.57) ในขณะที่การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรงทำให้ค่า pH ลดลงน้อยที่สุด (6.90)

พบว่า วิธีการทำแห้งและระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ (Water activity, a_w) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการทำแห้งและระยะเวลาในการทำแห้ง ($P < 0.05$) ซึ่งค่า a_w ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นมีค่าลดลงมากที่สุดเมื่อผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (0.75) รองลงมาคือ การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (0.79)

พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อปริมาณความชื้น (Moisture content) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) โดยมีแนวโน้มในการลดลงที่ใกล้เคียงกันในแต่ละชุดการทดลอง และภายหลังจากการทำแห้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณความชื้นของถั่วเน่าแผ่นในแต่ละชุดการทดลองมีค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตาราง 32 ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพบางประการของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นภายหลังจากการทำแห้ง

วิธีที่ใช้ในการทำแห้ง	เวลาที่ใช้ในการทำแห้ง (h)	คุณลักษณะทางกายภาพของถั่วเน่าแผ่น						
		pH	Water activity (a_w)	Moisture content (%)	การสูญเสียน้ำหนัก (%)	L*	a*	b*
ถั่วเน่าเปียก (ควบคุม)	0	7.97 ± 0.01 i	0.96 ± 0.00 f	70.13 ± 0.01 d	-	55.60 ± 2.81 a	10.85 ± 0.51 a	26.17 ± 1.65 a
การตากแดดโดยตรง	2	7.76 ± 0.01 h	0.95 ± 0.01 e	43.07 ± 6.45 c	36.15 ± 0.64 d	37.48 ± 2.55 b	10.88 ± 0.64 a	17.12 ± 0.96 b
	4	7.24 ± 0.01 f	0.91 ± 0.00 de	28.60 ± 0.49 b	53.80 ± 0.43 c	25.43 ± 0.72 c	5.09 ± 0.30 b	4.99 ± 0.47 c
	6	6.90 ± 0.01 d	0.84 ± 0.00 bc	20.99 ± 0.21 ab	56.20 ± 0.57 bc	25.52 ± 0.79 c	5.22 ± 0.59 b	5.21 ± 0.31 c
การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C	2	7.61 ± 0.01 g	0.94 ± 0.01 de	46.63 ± 3.21 c	34.49 ± 1.52 d	40.81 ± 1.61 b	11.15 ± 0.37 a	18.51 ± 0.57 b
	4	6.68 ± 0.01 b	0.89 ± 0.01 cd	29.05 ± 0.24 b	54.21 ± 1.36 c	24.88 ± 3.49 c	4.33 ± 0.86 b	4.28 ± 0.92 c
	6	6.57 ± 0.01 a	0.79 ± 0.00 ab	18.43 ± 0.35 a	60.85 ± 1.13 a	25.91 ± 0.28 c	5.55 ± 0.37 b	5.72 ± 0.38 c
การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์	2	7.76 ± 0.00 h	0.93 ± 0.03 de	49.92 ± 2.22 c	35.54 ± 1.60 d	39.89 ± 2.18 b	12.33 ± 0.33 a	19.74 ± 1.15 b
	4	6.97 ± 0.01 e	0.89 ± 0.01 cd	26.61 ± 0.61 ab	57.17 ± 2.24 abc	25.17 ± 0.66 c	4.94 ± 0.64 b	4.29 ± 1.27 c
	6	6.77 ± 0.00 c	0.75 ± 0.00 a	18.06 ± 0.11 a	59.63 ± 2.17 ab	25.54 ± 1.47 c	5.85 ± 0.41 b	6.47 ± 0.42 c
Drying methods		**	**	Ns	*	Ns	Ns	Ns
Drying times		**	**	**	**	**	**	**
Drying methods X Drying times		**	*	Ns	**	Ns	Ns	Ns

หมายเหตุ : a-i แสดงความมีนัยสำคัญระหว่างชุดการทดลองเมื่อทดสอบโดยใช้ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$)

* แสดงความมีนัยสำคัญของปัจจัยที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P < 0.05$); ** แสดงความมีนัยสำคัญของปัจจัยที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 99% ($P < 0.01$); Ns แสดงว่าปัจจัยนั้นไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ

พบว่า วิธีการทำแห้งและระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อการสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) จากน้ำหนักเริ่มต้นของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ) และมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างวิธีการทำแห้งและระยะเวลาในการทำแห้ง ($P < 0.01$) โดยมีแนวโน้มในการสูญเสียน้ำหนักที่ใกล้เคียงกันในแต่ละชุดการทดลอง และภายหลังจากการทำแห้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง การสูญเสียน้ำหนักของถั่วเน่าแผ่นในแต่ละชุดการทดลองมีค่าที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ในด้านคุณลักษณะทางด้านสีของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นพบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อค่าความสว่าง (Lightness, L*) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) โดยค่า L* มีค่าลดลงมากที่สุดในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการทำแห้ง และเริ่มคงที่เมื่อผ่านชั่วโมงที่ 4 ของการทำแห้ง โดยที่เวลา 6 ชั่วโมงของการทำแห้ง ค่า L* ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อค่าความเป็นสีแดง (Redness, a*) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) โดยค่า a* มีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วง 2 ชั่วโมงแรกของการทำแห้ง แล้วจึงลดลงมากที่สุดในระหว่างชั่วโมงที่ 2 และ 4 หลังจากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 6 ของการทำแห้ง โดยที่เวลา 6 ชั่วโมงของการทำแห้งค่า a* ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อค่าความเป็นสีเหลือง (Yellowness, b*) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และพบว่ามีแนวโน้มในการลดลงเช่นเดียวกันกับค่า L* โดยมีค่าลดลงมากที่สุดในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการทำแห้ง หลังจากนั้นพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยที่เวลา 6 ชั่วโมงของการทำแห้ง ค่า b* ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

4.3 การเปรียบเทียบคุณลักษณะของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นกับถั่วเน่าจากแหล่งผลิตถั่วเน่า

การเปรียบเทียบคุณลักษณะของถั่วเน่าแบบเปียก (wet type) ที่ใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสม (Opt_{mixed3}) และระดับของปัจจัยด้านการผลิตถั่วเน่าที่เหมาะสม ($Opt_{process1}$) และถั่วเน่าแบบแห้ง (dry type) ที่ผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กับถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นจากแหล่งผลิตถั่วเน่าพบว่า

ในถั่วเน่าแบบเปียก พบว่า $Opt_{process1}$ มีปริมาณโปรตีนสูงสุด (371.84 mg/g wet weight) รองลงมา คือ MCG (356.89 mg/g wet weight) แต่เมื่อทดสอบความแตกต่างทางสถิติแล้ว พบว่าถั่วเน่าเปียกทั้งสองดังกล่าวมีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตาราง 33)

ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* พบว่า สารสกัดจากถั่วเน่าจากแหล่งผลิต (MCG, KM_{1day} และ KM_{2day}) ไม่พบวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรคดังกล่าวได้ แต่สารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น (Opt_{mixed3} และ $Opt_{process1}$) สามารถสร้างวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* ได้ (14.67 mm และ 14.33 mm ตามลำดับ) (ตาราง 33)

ปริมาณวิตามินบีสิบสอง พบว่าถั่วเน่าจากแหล่งผลิต MCG มีปริมาณวิตามินบีสิบสองสูงที่สุด (5.57 ng/g wet weight) รองลงมาคือ $Opt_{process1}$ (4.86 ng/g wet weight) แต่เมื่อทดสอบความแตกต่างทางสถิติแล้ว ถั่วเน่าเปียกทั้งสองมีปริมาณวิตามินบีสิบสองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตาราง 33)

ตาราง 33 เปรียบเทียบคุณค่าทางด้านโภชนาการ และคุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus* ของถั่วเน่าแบบเปียกที่ผลิตขึ้นกับถั่วเน่าจากแหล่งผลิตถั่วเน่า

ถั่วเน่าแบบเปียก	คุณค่าทางด้านโภชนาการ		ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* ของสารสกัดจากถั่วเน่า (mm)*
	ปริมาณโปรตีน (mg/g wet weight)	ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ng/g wet weight)	
Opt_{mixed3}	306.99 ± 19.61 b	3.66 ± 0.86 ab	14.67 ± 1.04 a
$Opt_{process1}$	371.85 ± 30.14 a	4.86 ± 1.29 a	14.33 ± 1.15 a
KM_{1day}	172.23 ± 3.60 c	2.09 ± 1.37 b	NI
KM_{2day}	334.01 ± 5.69 ab	4.69 ± 1.29 a	NI
MCG	356.89 ± 6.45 a	5.56 ± 1.02 a	NI

หมายเหตุ: * เป็นขนาดวงใสที่รวมขนาดความกว้างของหลุมที่มี Ø เท่ากับ 6 mm; NI = ไม่พบวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรค; a-b แสดงความมีนัยสำคัญระหว่างชุดการทดลองเมื่อทดสอบโดยใช้ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$)

Opt_{mixed3} = ถั่วเน่าแบบเปียกที่ผลิตขึ้นจากการใช้อัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสม

$Opt_{process1}$ = ถั่วเน่าแบบเปียกที่ผลิตขึ้นจากการใช้ระดับของปัจจัยด้านการผลิตที่เหมาะสม

MCG = ถั่วเน่าแบบเปียกจากแหล่งผลิตถั่วเน่า อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่

KM_{1day} = ถั่วเน่าแบบเปียกที่หมักเป็นเวลา 1 วัน จากแหล่งผลิตถั่วเน่า อ.ป่าซาง จ.ลำพูน

KM_{2day} = ถั่วเน่าแบบเปียกที่หมักเป็นเวลา 2 วัน จากแหล่งผลิตถั่วเน่า อ.ป่าซาง จ.ลำพูน

เมื่อทำการเปรียบเทียบคุณค่าทางด้านปริมาณโปรตีนของถั่วเน่าแบบแห้งพบว่า ถั่วเน่าแผ่นแบบแห้งที่ผลิตขึ้นโดยผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (SD_6) มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (591.82 mg/g dry weight) รองลงมาคือ C_{TP} (549.66 mg/g dry weight) ในขณะที่ $KM_{product}$ มีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด (278.17 mg/g dry weight) (ตาราง 34)

ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* พบว่าไม่มีสารสกัดจากถั่วเน่าแบบแห้งที่ผลิตขึ้นและถั่วเน่าจากแหล่งผลิตใดที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus* ได้ (ตาราง 34)

ปริมาณวิตามินบีสิบสอง พบว่า KM_{dry} มีปริมาณวิตามินบีสิบสองสูงที่สุด (2.62 ng/g dry weight) ในขณะที่ถั่วเน่าแบบแห้ง SD_6, C_{TP} และ $KM_{product}$ มีปริมาณวิตามินบีสิบสองที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบความแตกต่างทางสถิติแล้วพบว่า ถั่วเน่าแบบแห้งทั้งหมดมีปริมาณวิตามินบีสิบสองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตาราง 34)

ตาราง 34 การเปรียบเทียบคุณค่าทางด้านโภชนาการและคุณสมบัติของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *S. aureus* ของถั่วเน่าแบบแห้งที่ผลิตขึ้นกับถั่วเน่าจากแหล่งผลิตถั่วเน่า

ถั่วเน่าแบบเปียก	คุณค่าทางด้านโภชนาการ		ขนาดของวงใสต่อเชื้อก่อโรค
	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณวิตามินบีสิบสอง	*S. aureus* ของสารสกัดจากถั่วเน่า
	(mg/g dry weight)	(ng/g dry weight)	(mm)*
SD_6	591.82 ± 10.13 a	1.74 ± 0.45 a	NI
C_{TP}	549.66 ± 6.37 b	1.57 ± 0.55 a	NI
KM_{dry}	342.12 ± 15.95 c	2.62 ± 0.83 a	NI
$KM_{product}$	278.17 ± 4.20 d	1.71 ± 0.49 a	NI

หมายเหตุ: * เป็นขนาดวงใสที่รวมขนาดความกว้างของหลุมที่มี Ø เท่ากับ 6 mm; NI = ไม่พบวงใสในการยับยั้งเชื้อก่อโรค; a-d แสดงความมีนัยสำคัญระหว่างชุดการทดลองเมื่อทดสอบโดยใช้ Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$)

SD_6 = ถั่วเน่าแบบแห้งที่ผลิตขึ้นและผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

C_{TP} = ถั่วเน่าแบบแห้งที่มีจำหน่ายในตลาดต้นพยอม อ.เมือง จ.เชียงใหม่

KM_{dry} = ถั่วเน่าแบบแห้งที่ผ่านการทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง จากแหล่งผลิตถั่วเน่า อ.ป่าซาง จ. ลำพูน

$KM_{product}$ = ถั่วเน่าเจทรงเครื่อง ที่ขายเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเน่า จากแหล่งผลิตถั่วเน่า อ.ป่าซาง จ.ลำพูน