บรรณานุกรม

กนกศรี สมฤทธิ์. 2550. การคัดกรองแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากถั่วเหลืองหมักอาหารพื้นบ้านในภาคเหนือ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการถั่วเหลือง. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2527. ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทย พฤศจิกายน.

กัญจนา ธีระกุล และคณะ. 2536. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์ .2531. การวิเคราะห์สารให้กลิ่นของถั่วเน่า. รายงานการวิจัยทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ และ อัญชลี อ่อนเจริญ. 2543. การศึกษาเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักถั่วเหลืองแบบพื้นบ้านในภาคเหนือ. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นันทฤทธิ์ โชคถาวร. 2550. *ชีวเคมีและโภชนศาสตร์ของวิตามิน*. โรงพิมพ์ตันหยงก๊อปปี้แอนด์คอมพ์ เชียงใหม่.

ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล. 2551. *วิศวกรรมแปรรูปอาหาร*. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. *อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ*. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร, คนึงกานต์ กลั่นบุศย์, อัญชลี อ่อนเจริญ และสายสมร ลำยอง. 2543. การศึกษาถั่วหมักอาหารพื้นบ้านในภาคเหนือ. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มาลี หมวกกุล และคณะ. 2547. การพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตถั่วเน่าในจังหวัดเชียงราย. รายงานการวิจัยภาคเหนือตอนบน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา.

รังสินี โสธรวิทย์. 2550. *เคมีและจุลชีววิทยาเบื้องต้นของอาหาร*. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

รสวิไล มอท. 2526. ถั่วเน่าแคปอาหารพื้นเมืองของไทยใหญ่. แม่บ้าน.

รัศมีกร สิงห์เจริญ. 2544. การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียทนร้อนจากถั่วเน่าที่สามารถผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิก. วิทยานิพนธ์วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. 2527. ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สยามออฟเซ็ท.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549. *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่ม 19. 2540. *การถนอมอาหารโดยการทำให้แห้ง. ". [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK19/chapter3/t19-3-l4.html (16 กุมภาพันธ์ 2553).*

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2547. *เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม*. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เสาวนีย์ จักรพิทักษ์. 2542. *หลักโภชนาการปัจจุบัน*. พิมพ์ครั้งที่ 9. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. กรุงเทพฯ.

พิชามญชุ์ น้อยสุวรรณ. 2545. การผลิตกรดแกมมาพอลิกลูตามิกโดย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ถั่วเน่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พิชญา บุญประสม, กัมปนาท บำรุงกิจ, อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล และ ศรายุทธ์ สมประสงค์. 2547. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งสมุนไพรโดยใช้ตู้อบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์. รายงานฉบับสมบูรณ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พันพงศ์ เลขะกุล. 2548. การศึกษาเอนไซม์บางชนิดจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ TK8 และ MR10 บนอาหารแข็งรำสกัดน้ำมัน. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพฯ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ไพโรจน์ วงศ์พุทธสิน. 2543. การกำจัดสีน้ำเสียกากน้ำตาลโดยเชื้อ *Bacillus* sp. ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิสูงและไร้อากาศ. ปัญหาพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพฯ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อิ่มเอิบ พันสด.·2549. *"บทเรียนบนเครือข่ายอินเตอร์เน็ต บทที่ 9 หลักการถนอมเนื้อสัตว์". [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.nsru.ac.th/e-learning/meattech/lesson/less9_2.html (26 มกราคม 2553).*

AOAC. (1980). *Official methods of analysis (13th ed.).* Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

Amoa-Awua, W.K., Terlabie, N.N. and Sakyi-Dawson, E. 2006. Screening of 42 *Bacillus* isolates for ability to ferment soybeans into dawadawa. *International Journal of Food Microbiology.*, 106: 343 – 347.

Aslim, B. 2002. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Journal of Biology.*, 26: 41-48.

Atil, H. and Unver, Y. 2000. A different approach of experimental design: Taguchi method. *Pakistan Journal of Biological Sciences.*, 3(9): 1538-1540.

Bailey, W.R and Scott, E.G. 1966. *Diagnostic microbiology.* 2nd ed. The C.V. Mosby Co., Saint Louis.

Barreiro, J.A., Milano, M. and Sandoval, A.J. 1997. Kinetics of colour change of double concentrated tomato paste during thermal treatment. *Journal of Food Engineering.*, 33: 359-371.

Bayram, M., Kaya, A. and Oner, M.D. 2004. Changes in properties of soaking water during production of soy-bulgur. *Journal of Food Engineering.*, 61: 221–230.

Bechoff, A., Dufour, D., Dhuique-Mayer, C., Marouze, C., Reynes, M. and Westby, A. 2009. Effect of hot air, solar and sun drying treatments on provitamin A retention in orange-fleshed sweetpotato. *Journal of Food Engineering.*, 92: 164–171.

Beuchat, L. R. 1983. Influence of water activity on growth, metabolic activities, and survival of yeasts and molds. *Journal of Food Protection.*, 46: 135-141.

Blazevic, D.J. and Ederer, G.M. 1975. *Principle of biochemical test in diagnostic microbiology.* John Wiley and Sons, New York.

Bridson, E.Y. 1998. *The oxoid manual.* 8th ed. Oxoid Ltd., England.

Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E. and Lumyong, S. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia.*, 28: 241- 245.

Chen, H.H., Hernandez, C.E. and Huang, T.C. 2005. A study of the drying effect on lemon slices using a closed-type solar dryer. *Solar Energy.*, 78: 97–103.

Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.*, 2: 82-100.

Cheong, H.S., Choi, H., Kang, O.J. Manochai, B. and Hong, J.H. 2005. Nutritional quality of fermented soy foods in Thailand. *Journal of Food Science Nutrition.*, 10: 262-266.

Chin, H.B. 1985. *Method of vitamin assay*. 4th ed. New York: John Wiley and Sons.

Chukeatirote, E., Chainun, C., Siengsubchart, A., Moukamnerd, C., Chantawannakul, P., Lumyong, S., Boontim, N. and Thakang, P. 2006. Microbiological and biochemical changes in *Thua nao* fermentation. *Research Journal of Microbiology.*, 1: 38-44.

Chukeatirote, E. and Thakang, P. 2006. Chemical composition of *thua nao*-a fermented soybean food of Northern Thailand. *Chiang Mai Journal of Science.*, 33(2): 243-245.

Chung, L. and Chung, S.J. 2007. Cross-cultural comparisons among the sensory characteristics of fermented soybean using Korean and Japanese descriptive analysis panels. *Journal of Food Science.*, 72(9): 676-688.

Chunhachart, O., Itoh, T., Sukchotiratana, M., Tanimoto, H., and Tahara, Y. 2006. Characterization of γ-glutamyl hydrolase produced by *Bacillus* sp. isolated from Thai Thua-nao. *Bioscience Biotechnolology and Biochemistry.*, 70: 2779–2782.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology.*, 71: 1–20.

Cooper, K.E. 1963. The theory of antibiotic inhibition zones. In: *Analytical Microbiology* (Edited by Kavanagh F). Academic Press, New York.

Dakwa, S., Sakyi-Dawson, E., Diako, C., Annan, N.T. and Amoa-Awua, W.K. 2005. Effect of boiling and roasting on the fermentation of soybeans into dawadawa (soy-dawadawa). *International Journal of Food Microbiology.*, 104: 69– 82.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal.*, 16: 1058–1071.

Herbert, MD, JD. 1987. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin B-12 in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition.*, 45: 671-678.

Hernandez, J.L., Adris, J. and de Rank A.F. 1981. Predigested soybeans. World Conderence on Soya Processing and Utilization. JAOCS March. 510-511.

Hesseltine, C.W. and Wang, H.L. 1980. The importance of tradition fermentation foods. *Journal of Bioscience.*, 30: 402-404.

Inatsu, Y., Nakamura, N., Yuriko, Y., Fushimi, T., Watanasiritum, L. and Kawamoto, S. 2006. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. *Letters in Applied Microbiology.*, 43: 237–242.

Karabuluta, I., Topcub, A., Durana, A., Turanb, S. and Ozturk, B. 2007. Effect of hot air drying and sun drying on color values and beta-carotene content of apricot (*Prunus armenica* L.). *LWT.*, 40: 753–758.

Kim, Y., Cho, J.Y., Kuk, J.H., Moon, J.H., Cho, J.I., Kim, Y.C. and Park, K.H. 2004. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, ChungkookJang. *Journal of Microbiology.*, 48: 312-317.

Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review.*, 12: 39–85.

Krier, F., Revol-Junelles, A.M., Germain, P. 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Applied in Microbiology and Biotechnology.*, 50: 359–363.

Kungsadalaumpai, A. 2005. (March, 11). Healthy food: Soybean. (Online). Available URL: *http://www.pharm.chula.ac.th/clinic101_5/article/soy.html.*

Leejeerajumnean, A., Duckham, S. C., Owens, J. D. and Ames, J. M. 2001. Volatile compounds in *Bacillus*-fermented soybeans. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 81: 525-529.

Leejeerajumnean, A. 2003. Thua nao: alkali fermented soybean from *B. subtilis*. *Silpakorn University International Journal.*, 3: 277-292.

Liem, I.T.H., Steinkraus, K.H. and Cronk, T.C. 1977. Production of vitamin B12 in tempeh, a fermented soybean food. *Journal of Applied Environmental and Microbiology.*, 34: 773-776.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, N.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry.*, 193: 265-275.

Marie-Paul, D.W. 1985. *Preparation and composition of soybean products in Northern Thailand.* University of Ghent-Belgium. Belgium.

Martens, J.H., Barg. H., Warren, M.J. and Jahn, D. 2002. Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 58: 275–285.

Motta, A.S. and Brandelli, A. 2008. Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*, 24:641–646.

Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Pfaller, M.A. 2007. *Manual of Clinical Microbiology* 9th edition. ASM Press, Washington DC.

Nagal, S. and Jain, P.C. 2010. Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers. *Brazilian Journal of Microbiology.*, 41: 196-200.

Navarrete-Bolan, J.L., Nez-Islas, H.J., Botella-Alvarez, E. and Rico-Martianez, R. 2003. Mixed culture optimization for marigold flower ensilage via experimental design and response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 51: 2206-2211.

Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H., 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 70: 113–128.

Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I.B., Megraud, F. and Urdaci, M.C. 2001. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 Is Due to secretion of antibiotics. *Journal of Antimicrobial Agent and Chemotherapy.*, 45: 3156-3161.

Nicholas, D.J.D. 1952. The use of fungi for determining trace metals in biological materials. *Journal of Analyst.*, 77: 629-642.

Norris, J.R., Berkerley, R.C.W., Logan, N.A., O' Donnell, A.G. 1973. *In the prokaryotes handbook on habitats isolation and identification of bacteria* (Eds. Tarr, P.M., Stolp, H., Truper, G.H., Balows, A. and Schlegel, G.H.). Vol II Spinger-Verlag. Berlin Heidelberg. New York.

Oamen, E.E., Hansen, A.P. and Swartzel, K.R. 1989. Effect of ultra-high temperature steam injection processing and aseptic storage on labile water-soluble vitamins in milk. *Journal of Dairy Science.*, 72: 614-619.

Okeke, M.I., Iroegbu, C.U., Eze, E.N., Okoli, A.S. and Esimone, C.O. 2001. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. *The Journal of Ethnopharmacology.*, 78: 119–127.

Omafuvbe, B. O. 2006. Effect of salt on the fermentation of soybean (*Glycine max*) into daddawa using *Bacillus subtilis* as starter culture. *African Journal of Biotechnology.*, 5(10): 1001-1005.

Oskouie, S.F.G., Tabandeh, F., Yakhchali, B. and Eftekhar, F. 2007. Enhancement of alkaline protease production by *Bacillus clausii* using Taguchi experimental design. *African Journal of Biotechnology.*, 6(22): 2559-2564.

Ouoba, L.I.I., Thorsen, L., Varnam, A.H. 2008. Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments. *International Journal of Food Microbiology.*, 124: 224–230.

Pan, Z., Tangratanavalee, W. 2003. Characteristics of soybeans as affected by soaking conditions. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 36: 143–151.

Raux, E., Lanois, A., Warren, M.J., Rambach, A. and Thermes, C. 1998. Cobalamin (vitamin B_{12}) biosynthesis: identification and characterization of a *Bacillus megaterium cobl* operon. *Biochemical Journal.*, 335: 159-166.

Phister, T.G., O'Sullivan, D.J. and Mckay, L.L. 2004. Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. strain CS93 isolated from pozal, a maxican fermented maize dough. *Journal of Applied Environmental and Microbiology.*, 70: 631-634.

Renner, E. 1979. Nutritional and biochemical characteristics of UHT milk. *in* Conference on UHT processing and aseptic packaging of milk and milk products. North Carolina State Univ., Raleigh. p. 21-52.

Rohde, P.A. 1967. *BBL manual of product and laboratory procedures*. 5th ed., Division of Becton, Deckinson and Co., Maryland.

Sandel, M.K. and McKillip, J.L. 2004. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control.*, 15: 5–10.

Santong, K., Naorungrote, S., Bangrak, P., Chunglok, W. and Lertcanawanichakul, M. 2008. Screening, identification and antibacterial activities of effective thermotolerant *Bacillus* spp. strains isolated from raw milk. *Walailak Journal of Science and Technology.*, 5: 39-46.

Sarkar, P.K., Cook, P.E. and Owens, J.D. 1993. *Bacillus* fermentation of soybeans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*, 9: 295-299.

Sarkar, P.K., Jones, L.J., Craven, G.S., Somerset, S.M. and Palmer, C. 1997. Amino acid profiles of kinema, a soybean-fermented food. *Food Chemistry.*, 59: 69–75.

Scott, A.L. 2003. Discovering Nature's Diverse Pathways to Vitamin B12: A 35-year odyssey. *The Journal of Organic Chemistry.*, *68*: 2529-2539.

Shih, I.L., Kuo, C.Y., Hsieh, F.C., Kao, S.S. and Hsieh, C. 2008. Use of surface response methodology to optimize culture conditions for iturin A production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers.*, 39: 635–643.

Sinnecker, P., Gomez, M.S.O., Areoas, J.A.G. and Lanfer-Marquez, U.M. 2002. Relationship between color (instrumental and visual) and chlorophyll contents in soybean seeds during ripening. *Journal of Agricultural Food Chemistry.*, 50: 3961-3966.

Skerman, V.B.D. 1967. *A guide to the identification of the genera of bacteria.* The William and Wilkin Company. Baltimore.

Sugawara, E., Ito, T., Odagiri, S., Kubota, K. and Kobayashi, A. 1985. Comparison of compositions of odor components of natto and cooked soybeans. *Agricultural and Biological Chemistry.*, 49: 311-317.

Sugawara, E., Suzuki, T. and Yoshida, Y. 1998. The comparison of pyrazine compounds in Non-Salted fermented soybean products. *Food Science and Technology International, Tokyo.*, 4(1): 85-88.

Sundhagul, M., Smanmathuroj, P., Bhodacharoen, W. 1972. Thua-nao: A fermented soybean food of northern Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science.*, 5: 43-56.

Suppadit, T., Sangla, L. and Pintasean, S. 2005. A Study on productive process and quality of fermented soybean (Thua - Nao) in the upper north of Thailand. Journal of Agriculture and Rural Development in The Tropics and Subtropics. p. 1-8.

Tamang, J.P. and S. Nikkuni. 1998. Effect of temperatures during pure culture fermentation of Kinema. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*, 14: 847-850.

Tangjitjaroenkun, J., V. Kitprechavanit, S. Suthirawut, P. Chimanake, W. Praprirong, W. Krusong and B. Yongsmith. 2003. Improvement of high vitamin B_{12} Thua Nao by mixed culture of soybean oligosaccharide utilizing bacteria and yeasts. *Kasetsart Journal (Natural Science).*, 38(1): 123-130.

Terlabie, N.N., Sakyi-Dawson, E. and Amoa-Awua, W.K. 2006. The comparative ability of four isolates of *Bacillus subtilis* to ferment soybeans into dawadawa. *International Journal of Food Microbiology.*, 106: 145 – 152.

Watanabe, F. 2007. Vitamin B12 Sources and Bioavailability. *Journal of Experimental Biology and Medicine.*, 232:1266-1274.

Woo, I.M., Rhee, I.K. and Park, H.D. 2000. Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall Structure. *Applied and Environmental Microbiology.*, 66(5): 2243–2247.

Yilmaz, M., Soran, H. and Beyatli, Y. 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus spp.* strains isolated from the soil. *Microbiological Research.*, 161: 127—131.

Zhou, J., Liu, X., Huang, K., Dong, M. and Jiang, H. 2007. Application of the mixture design to design the formulation of pure cultures in Tibetan kefir. *Agricultural Sciences in China.*, 6: 1383-1389.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารทุกชนิดใช้ผสมกับน้ำกลั่น 1 l และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นแต่อาหารที่บอกไว้เฉพาะ

1. Skim milk agar (ภาณุวรรณ และคณะ, 2543)

Skim milk	10 g
Sodium azide	0.2 g
Agar	20 g

ต้ม agar ให้ละลาย ทิ้งไว้ให้เย็นตัวลงพอสมควรเติม skim milk และ sodium azide ลงไป ผสมให้เข้ากันเทอาหารที่เตรียมได้ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

2. Nutrient broth (NB) (กนกศรี, 2550)

Beef extract	3 g
Peptone	5 g

สำหรับ Nutrient agar (NA) เตรียมได้โดยการเติม Agar ลงไปในอัตราส่วน 15 g/l

3. MR-VP medium (Rohde, 1967)

Peptone	7 g
Potassium phosphate	5 g
Dextrose	5 g
pH	6.9

4. Nitrate broth (Nitrate reduction test medium) (Skerman, 1967)

Potassium nitrate	0.2 g
Peptone	5 g
pH	7.3-7.4

5. Starch agar (Bridson, 1998)

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Soluble starch	10 g
Agar	15 g
pH	6.8-7.0

5. Fermentation carbohydrate medium (ดวงพร, 2537)

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Glucose	10 g
Bromothymol blue 1.6%	4 ml
pH	6.8-7.0

ควรเตรียมหลอดทดสอบที่ใส่หลอดดักก๊าซไว้ แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 150°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงเติมน้ำตาลใส่หลอดละประมาณ 6 ml จากนั้นนำไป นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แล้วรีบยกออกมาแช่ในน้ำเย็น ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. Phosphate buffer 0.05 M pH 7.0 (พันพงศ์, 2548)

Solution A: KH_2PO_4	9.073 g/l
Solution B: $Na_2HPO_4 . 2H_2O$	11.87 g/l
น้ำกลั่น	1 l

ผสม Solution A จำนวน 41.3 ml กับ Solution B จำนวน 58.7 ml จะได้ Phosphate buffer pH 7.0 จำนวน 100 ml

2. 0.9% physiological saline solution (AOAC, 1980)

ละลาย NaCl 9 กรัม ในน้ำกลั่น 1 l เตรียมใส่หลอดละประมาณ 10 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3. Vitamin B_{12} stock solution (100 ng/ml) (AOAC, 1980)

ชั่ง USP cyanocobalamin 10 mg ละลายใน 25% ethanol 500 ml จากนั้นดูดสารละลายมา 5 ml เจือจางใน 25% ethanol อีก 1 l เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 10°C

4. Vitamin B_{12} intermediate solution (1 ng/ml) (AOAC, 1980)

ทำการเจือจาง โดยดูด vitamin B_{12} stock solution ปริมาตร 10 ml ละลายใน 25% ethanol ปริมาตร 2 l เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 10°C

5. Vitamin B_{12} working solution (0.025 ng/ml) (AOAC, 1980)

ทำการเจือจาง โดยดูด vitamin B_{12} intermediate solution ปริมาตร 5 ml ละลายในน้ำกลั่น 200 ml (ให้ทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์)

6. 3% Hydrogen peroxide solution (Bridson, 1998)

Hydrogen peroxide (H_2O_2)	3 g (คำนวณจากฉลากข้างขวด)
น้ำกลั่น	100 ml

7. Voges-Proskauer test solution (Bridson, 1998)

Solution A: α-napthol	10 g
Ethanol 95%	100 ml (เก็บในขวดสีชา)
Solution B: KOH	20 g
น้ำกลั่น	100 ml (เก็บในขวดสีชา)

8. 1.6% bromothymol blue solution (Bridson, 1998)

Bromothymol blue	1.6 g
Ethyl alcohol	100 ml

9. Nitrate reagent (Bailey and Scott, 1966)

Solution A: 8 g ของ sulfanilic acid ใน acetic acid 5N ปริมาตร 1 l

Solution B: 5 g ของ α-naphthylamine ใน acetic acid 5N ปริมาตร 1 l

ภาคผนวก ค

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

Simplified key for the tentative identification of typical strains of *Bacillus* species

(Norris *et al,* 1973)

1. Catalase: positive _____ 2
2. Voges-Proskauer: positive _____ 3
   negative _____ 10
3. Growth in anaerobic agar: positive _____ 4
   negative _____ 9
4. Growth at 50°C: positive _____ 5
   negative _____ 6
5. Growth in 7% NaCl: positive _____ *B. lichenformis*
   negative _____ *B. coagulans*
6. Acid and gas from glucose (inorganic N): positive _____ *B. polymyxa*
   negative _____ 7
7. Reduction of nitrate (NO_3) to NO_2: positive _____ 8
   negative _____ *B. alvei*
8. Parasporal body in sporangium: positive _____ *B. thuringiensis*
   negative _____ *B. cereus*
9. Hydrolysis of starch: positive _____ *B. subtilis*
   negative _____ *B. pumilus*
10. Growth at 65°C: positive _____ *B. stearothermophilus*
    negative _____ 11
11. Hydrolysis of starch: positive _____ 12
    negative _____ 15

12. Acid and gas from glucose (inorganic N): positive _____ *B. macerans*
negative _____ 13

13. Width of rod 1.0 μm or greater: positive _____ *B. megaterium*
negative _____ 14

14. pH in VP broth < 6.0: positive _____ *B. circulans*
negative _____ *B. firmus*

15. Growth in anaerobic agar: positive _____ *B. laterosporus*
negative _____ 16

16. Acid from glucose (inorganic N): positive _____ *B. brevis*
negative _____ *B. sphaericus*

17. Growth at 65°C: positive _____ *B. stearothermophilus*
negative _____ 18

18. Decomposition of casein: positive _____ *B. larvae*
negative _____ 19

19. Parasporal body in sporagium: positive _____ *B. popilliae*
negative _____ *B. lentimorbus*

วิธีการที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียบางประการ

1. การทดสอบแคตาเลส (catalase test) (Blazevic and Ederer, 1975)

เอนไซม์แคตาเลส เป็นเอนไซม์ที่มีฮีมาทิน (hematin) เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ชนิดนี้สามารถละลายสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (H_2O_2) ให้เป็นออกซิเจน และน้ำ ดังสมการ

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

ในการทดสอบต้องใช้เชื้อที่อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เพราะเอนไซม์แคตาเลสจะมีอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้นการอ่านผลลบผิดพลาดสามารถเกิดขึ้นได้ถ้าใช้เชื้ออายุมาก ข้อควรระวังอีกอย่างคือ ห้ามเอาเชื้อที่เลี้ยงบน blood containing medium เพราะในอาหารนี้จะมีเอนไซม์แคตาเลสอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งจะก่อให้เกิดฟองก๊าซออกซิเจนอย่างรุนแรง และจะทำให้เชื้อกระเด็นโดนผู้ทดสอบได้

วิธีการทดสอบ

Tube test

1. ปลูกเชื้อลงในอาหารวุ้นที่เอียง บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. เติม 1 ml ของ 3% H_2O_2 เอียงให้ไหลไปมาบนผิวอาหาร

Plate test (slide method)

1. หยด 3% H_2O_2 1 หยด ลงบนสไลด์
2. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อลงไปผสมให้เข้ากันกับ 3% H_2O_2

ผลบวก (+) เกิดฟองก๊าซ

ผลลบ (-) ไม่เกิดฟองก๊าซ

2. การทดสอบ VP (Voges-Proskauer test) (Blazevic and Ederer, 1975)

แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสารบิวทิลีนไกลคอล (butylene glycol) และเอทานอล (ethanol) ด้วยขบวนการบิวทิลีนไกลคอลเฟอร์เมนเตชัน (butylene glycol fermentation) ของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะมีสารอะซิทิลเมททิลคาบินอล (acetyl methyl carbinol) หรือสารอะซิโตอิน (acetoin) เกิดขึ้นในปฏิกิริยา

วิธีการทดสอบ

Barritt's Method

1. ปลูกเชื้อลงใน MR-VP medium บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 มา 1 ml ใส่ในหลอดทดสอบที่สะอาด
3. เติม 0.6 ml ของ 5% α-naphthol solution
4. เติม 0.2 ml ของ 40% KOH เขย่าให้เข้ากัน

ผลบวก (+) สีแดง ภายใน 5 นาที

ผลลบ (-) สีเหลือง

3. การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในสภาพไร้ออกซิเจน (ภาณุวรรณ และคณะ, 2543)

บ่มเชื้อลงบนอาหาร nutrient agar 1 ชุด และนำไปบ่มใน anaerobic jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกชุดหนึ่งเป็นชุดควบคุม โดยบ่มในสภาวะที่มีอากาศชุดที่บ่มใน anaerobic jar ใช้ Anaerocult®A เติมน้ำจนท่วมก่อนใช้งาน แล้วรีบใส่ใน jar ทันที จากนั้นใช้ redox indicator คือ resazulin เป็นตัวบ่งชี้สภาพไร้ออกซิเจน โดยถ้ามีออกซิเจน จะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีชมพู ถ้าไม่มีออกซิเจนจะเป็นสีขาว บ่มเชื้อใน anaerobic jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

4. การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่าง ๆ (กัญจนา และคณะ, 2536)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเจริญได้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ แตกต่างกัน จึงนำมาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียเป็นกลุ่มต่าง ๆ เช่น mesophile, psychrophile และ thermophile

วิธีการทดสอบ

1. เขี่ยเชื้อลงในอาหาร nutrient broth หรือ nutrient agar
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิตามต้องการ
3. ตรวจผลทุกวันจนครบ 7 วัน โดยดูจากความขุ่น และรอยขีด (streak)

ผลบวก (+) เกิดความขุ่น หรือเกิดรอยขีด (streak)

ผลลบ (-) ไม่เกิดความขุ่น หรือไม่เกิดรอยขีด (streak)

5. การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในโซเดียมคลอไรด์ (Blazevic and Ederrer, 1975)

การทดสอบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพื่อศึกษาการนำโซเดียมคลอไรด์ไปใช้ และระดับความทนเกลือได้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

วิธีการทดสอบ

1. เขี่ยเชื้อลงใน nutrient broth ที่มี NaCl 5, 7 และ 10%
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. สังเกตความขุ่น แสดงว่าเชื้อเจริญได้

ผลบวก (+) ขุ่น

ผลลบ (-) ไม่ขุ่น

6. การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (กัญจนา และคณะ, 2536)

คาร์โบไฮเดรตเป็นสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างโดยทั่วไป คือ CH_2O มีขนาดของโมเลกุลตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่เมื่อพิจารณาถึงสูตรโครงสร้าง พบว่าสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ตั้งแต่พวก disaccharide ขึ้นไป ถ้าหากแบคทีเรียจะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ จะต้องเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เพอร์มิเอส (permeases) มาย่อยสลายให้เป็นโมเลกุลเล็กก่อน จึงจะสามารถนำเข้าสู่ภายในเซลล์ได้ และแบคทีเรียจะมีความสามารถแตกต่างกันไปในการนำคาร์โบไฮเดรตไปใช้ ดังนั้นจึงสามารถใช้คุณสมบัตินี้ในการจัดแบ่งประเภท และชนิดของแบคทีเรียได้ซึ่งในที่นี้ใช้กลูโคสเป็นสารที่ทดสอบ

วิธีการทดสอบ

1. ปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร fermentation carbohydrate medium
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
3. ตรวจผลโดยดูการเปลี่ยนสีของอาหาร และดูการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ผลบวก (+)

1. อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ไม่มีก๊าซในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้เฉพาะกรด

2. อาหารมีสีเหลือง และก๊าซในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าเชื้อหมักคาร์โบไฮเดรตแล้วได้กรดและก๊าซ

ผลลบ (-)

อาหารไม่เปลี่ยนสี คือ เป็นสีเขียวเหมือนเดิม แสดงว่าเชื้อไม่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้

7. การทดสอบการลดออกซิเจนของไนเตรท (กัญจนา และคณะ, 2536; Blazevic and Ederer, 1975)

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการที่จะนำไนเตรทไปใช้ด้วยการลดอะตอมของออกซิเจนในสารประกอบไนเตรท ซึ่งมี 2 วิธี วิธีแรกโดยขบวนการแอสซิมิเลชัน (assimilation) ซึ่งเป็นขบวนการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นแอมโมเนีย แล้วแอมโมเนียจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน และสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ โดยมีไนไตรท์เป็น intermediate อีกวิธี

หนึ่งคือ ขบวนการดิสซิมิเลชัน (dissimilation) หรือขบวนการเรสไปเรชัน (respiration) ซึ่งเป็นขบวนการของไนเตรท หรือไนไตรท์ ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในภาวะที่ไร้ออกซิเจน หรือมีออกซิเจนน้อย สามารถเกิดขึ้นได้กับ anaerobic bacteria เรียก nitrate respiration ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตเป็นก๊าซไนโตรเจนหรือไนตรัสออกไซด์ ทั้ง 2 ขบวนการนี้เกิดเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (nitrate reductase) หรือไนเตรเทส (nitratase)

การสลายตัวของไนเตรท เมื่อเชื้อเจริญเติบโตในอาหาร nutrient broth ที่มีโพแทสเซียมไนเตรท 0.1% เราสามารถทดสอบไนไตรท์ที่เกิดขึ้น โดยหยด sulfanilic acid ก่อน และตามด้วย α-naphthylamine การรวมตัวระหว่าง sulfanilic acid และไนไตรท์ จะได้ diazonium salt (diazotized sulfanilic acid) ซึ่งจะรวมตัวกับ α-naphthylamine เกิดสีแดงของ water-soluble azo dye

ถ้าไม่เกิดสีแดง แสดงว่าไนเตรทอาจถูกรีดิวซ์เป็นแอมโนเนียหรือเป็นกรดไนตรัส (nitrous acid) โดยกระบวนการเดนิตริ-ฟิเคชัน (denitrification) หรือไนเตรทไม่ถูกรีดิวซ์ จึงทดสอบต่อโดยใช้ผงสังกะสี ซึ่งจะรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ ทำให้เกิดสีแดง

ก๊าซที่เกิดขึ้นสามารถใช้หลอดดักก๊าซใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีก๊าซจะเกิดช่องว่างภายในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าเป็นบวก (สำหรับการรีดิวซ์ไนเตรท ในกรณีของพวก nonfermenter) แต่ถ้าเป็นพวก fermenter จะสร้างก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จึงจำเป็นต้องเติมสังกะสี (Zn) ระยะเวลาในการบ่ม 48 ชั่วโมง ก็เพียงพอ ถ้าต้องการตรวจสอบผลให้เร็วให้ใช้เชื้อในปริมาณมากลงใน nitrate broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C หลังจาก 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลที่ได้

วิธีการทดสอบ

1. เขี่ยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหาร nitrate broth
2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. หยด sulfanilic acid
4. หยด α-naphthylamine
5. ถ้าเกิดสีแดงปนตะกอน แสดงว่า ผลการทดสอบเป็นบวก
6. ถ้าไม่เกิดสีแดง ให้เติมผงสังกะสีลงไป

ผลบวก (+) ไม่เกิดสี เนื่องจากไนเตรทถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรท์ และกรดไนตรัส nitrous acid (N_2)

ผลลบ (-) ถ้าเกิดสีแดง

8. การทดสอบการย่อยแป้ง (กัญจนา และคณะ, 2536)

แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ในการย่อยแป้งได้

วิธีการทดสอบ

อาหารที่ใช้ทดสอบต้องมี soluble starch 0.2% เป็นองค์ประกอบ

1. ปลูกเชื้อลงในอาหาร บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสม จะมีการเจริญเติบโตของเชื้อเกิดขึ้น
2. หยดสารละลายไอโอดีน 2 - 3 หยด ลงในอาหารเหลว อ่านผลทันที

ผลบวก (+) ไม่มีการเปลี่ยนสี

ผลลบ (-) สีน้ำเงิน

3. ถ้าเป็น plate หรือ slant เทน้ำยาไอโอดีนราด

ผลบวก (+) อาหารเป็นสีน้ำเงิน แต่บริเวณรอบ ๆ โคโลนีไม่มีสี

ผลลบ (-) เป็นสีน้ำเงินหมด

หมายเหตุ: สารละลายไอโอดีน อาจใช้ gram's iodine แต่นิยมใช้ lugol's iodine

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry

1. การทำกราฟมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin)

เตรียม stock solution 1,000 µg/ml (ชั่ง BSA 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 10 ml) จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA เข้มข้น 0.0 – 0.3 mg/ml นำสารละลายที่เตรียมได้ 0.25 ml เติม reagent C 2.5 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเติม folin reagent 0.25 ml ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm (A_{750}) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm (A_{750}) กับความเข้มข้นของ BSA

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

เจือจางตัวอย่างที่ได้ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจำนวน 0.25 ml เติม reagent C 2.5 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเติม folin reagent 0.25 ml ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm (A_{750}) เทียบปริมาณโปรตีนที่ได้กับกราฟมาตรฐาน BSA

3. สารเคมีทดสอบปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry *et al.*,1951)

Reagent A:

- 2% (w/v) Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH

Na_2CO_3	2.0 %
NaOH	0.1 M

ชั่ง NaOH 0.4 g ละลายในน้ำกลั่นเติม Na_2CO_3 2 g ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

Reagent B:

$CuSO_4 . 5H_2O$	0.5 %
Na-K tartrate	1.0 %

ชั่ง Na-K tartrate 1 g ละลายในน้ำกลั่น เติม $CuSO_4$ $5H_2O$ 0.5 g ปรับปริมาตรเป็น 100 ml

Reagent C:

Reagent A	50 ml
Reagent B	1 ml

ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

Reagent D:

Folin-ciocalteau reagent

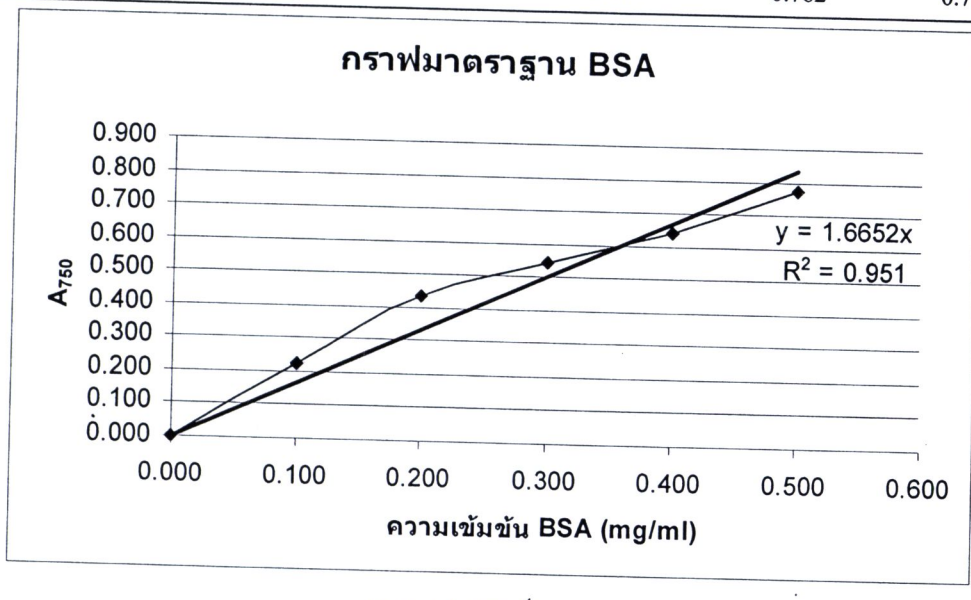
น้ำกลั่น

เจือจาง Folin-ciocalteau reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

4. กราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA

ตาราง ง.1 ค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ BSA (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm (A_{750})			
	1	2	3	เฉลี่ย
0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.100	0.223	0.223	0.230	0.225
0.200	0.418	0.439	0.443	0.433
0.300	0.548	0.550	0.539	0.546
0.400	0.646	0.623	0.648	0.639
0.500	0.784	0.778	0.762	0.775



ภาพ ง.1 กราฟมาตรฐาน BSA

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีสิบสองโดยวิธี Bioassay

1. การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินบีสิบสอง

1. เตรียม vitamin B_{12} working standard ความเข้มข้น 0.0250 ng/ml โดยทำการเจือจางด้วยการดูด vitamin B_{12} intermediate solution ปริมาตร 5 ml แล้วละลายในน้ำกลั่น 200 ml (ให้ทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะทำการวิเคราะห์) (ภาคผนวก ข)

2. เตรียมหลอดมาตรฐาน ดังนี้

0 (blank ที่ไม่ใส่เชื้อ), 0 (blank ที่ใส่เชื้อ), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ml ของ vitamin B_{12} working standard solution ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้หลอดละ 5 ml และเติม B_{12} LL assay medium หลอดละ 5 ml ตามลำดับ

3. ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 5 นาที

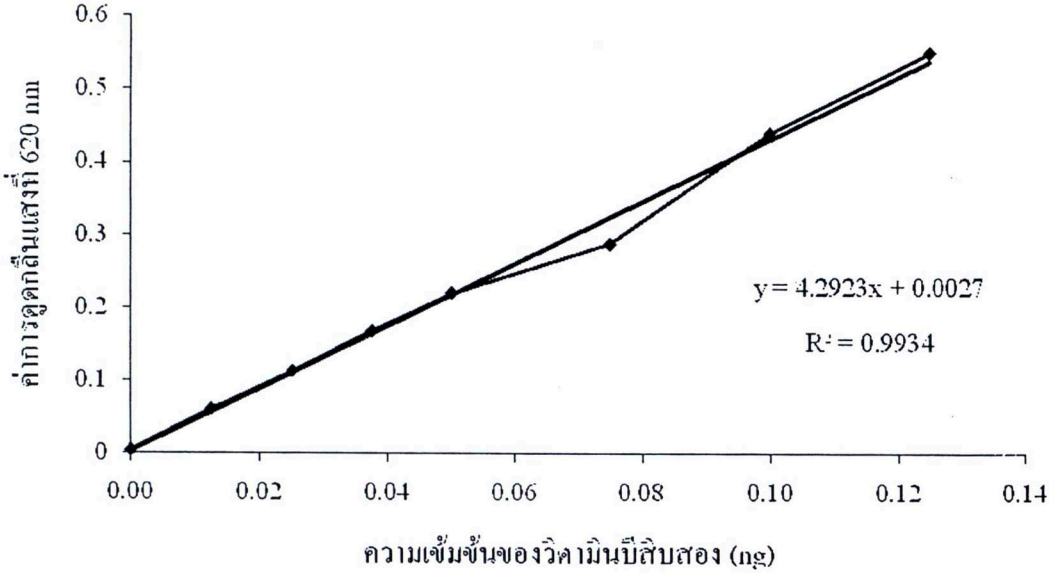
4. ทำการหยด inoculum ของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* TISTR 785 ปริมาตร 10 µl ลงในหลอดมาตรฐานแต่ละหลอด จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

5. ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm โดยใช้ 0 (blank ไม่ใส่เชื้อ) เป็น blank ได้ดังตารางที่ จ.1

ตารางภาคผนวก จ.1 ค่าดูดกลืนแสงของวิตามินบีสิบสองที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (กนกศรี, 2550)

ลำดับที่	ปริมาณวิตามินบีสิบสอง (ml)	ความเข้มข้น (ng) ของวิตามินบีสิบสองในแต่ละหลอด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm
1	0.0	0.0000	0.0042
2	0.5	0.0125	0.0610
3	1.0	0.0250	0.1131
4	1.5	0.0375	0.1680
5	2.0	0.0500	0.2200
6	3.0	0.0750	0.2878
7	4.0	0.1000	0.4412
8	5.0	0.1250	0.5504

6. นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณวิตามินบีสิบสองกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm



ภาพ จ.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินบีสิบสอง (กนกศรี, 2550)

2. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีสิบสองด้วยวิธี Bioassay (AOAC, 1980)

2.1 การเตรียม Stock culture ของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* TISTR 785

ทำการถ่ายเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* TISTR 785 ที่ได้จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งอยู่ในรูป freeze dry ทำการละลายเชื้อลงในอาหาร MRS broth (Labscan, Ireland) และเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร MRS agar (Labscan, Ireland) โดยกระจายเชื้อบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C พร้อมทั้งทำการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน glycerol 50% ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 การเตรียม Inoculum ของเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 785

ทำการถ่ายเชื้อ *L. delbrueckii* TISTR 785 จาก stock culture (ขั้นตอน 2.1) ปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เซลล์ที่ได้นำไปกระจายใน saline solution (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง นำเซลล์ที่ได้ไปกระจายใน saline solution ดังกล่าวอีก 10 ml เซลล์ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงครั้งที่สองนี้ให้นำมากระจายใน saline

solution ปริมาตร 20 ml แล้วปรับความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 nm ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 (ควรทำ inoculum ใหม่ทุกครั้งที่จะทำการวิเคราะห์)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีสิบสอง

นำสารละลายส่วนใสจากตัวอย่างถั่วเน่ามาเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้หลอดละ 5 ml สำหรับหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นปริมาตร 5 ml (blank) จากนั้นจึงเติมด้วย B_{12} LL assay medium (Fluka, Germany) หลอดละ 5 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการถ่าย inoculum ปริมาตร 10 µl (จากขั้นตอน 2.2) ลงในหลอดทดลองที่ทำการวิเคราะห์ทุกหลอด และหลอด blank ที่ใส่เชื้อ (ยกเว้นหลอด blank ที่ไม่ใส่เชื้อ) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหลอดควบคุม และหลอดวิเคราะห์แต่ละหลอด มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณวิตามินบีสิบสอง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณวิตามินบีสิบสอง และความขุ่นหรือการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. delbrueckii* (ภาพ จ. 1)

ภาคผนวก ฉ

ข้อมูลผลการทดลอง

ตาราง ฉ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของขนาดวงใสต่อเชื้อก่อโรค *S. aureus* ของสารสกัดจากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Response: S.aureus

ANOVA for Mixture Linear Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	289.95	3	96.65	11.56	0.0003	significant
Linear Mixture	*289.95*	3	*96.65*	*11.56*	*0.0003*	
Residual	125.43	15	8.36			
Cor Total	415.38	18				

Std. Dev.	2.89	R-Squared	0.6980
Mean	10.11	Adj R-Squared	0.6376
C.V.	28.59	Pred R-Squared	0.3484
PRESS	270.67	Adeq Precision	10.166

ตาราง ฉ.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Response: pH

ANOVA for Mixture Quadratic Model

Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F	
Model	0.25	9	0.028	3.25	0.0469	significant
Linear Mixture	*0.12*	3	*0.041*	*4.79*	*0.0292*	
AB	*1.280E-003*	1	*1.280E-003*	*0.15*	*0.7070*	
AC	*2.449E-003*	1	*2.449E-003*	*0.29*	*0.6045*	
AD	*8.164E-003*	1	*8.164E-003*	*0.96*	*0.3528*	
BC	*8.092E-005*	1	*8.092E-005*	*9.517E-003*	*0.9244*	
BD	*0.050*	1	*0.050*	*5.92*	*0.0378*	
CD	*0.064*	1	*0.064*	*7.50*	*0.0229*	
Residual	0.077	9	8.503E-003			
Cor Total	0.33	18				

Std. Dev.	0.092	R-Squared	0.7649
Mean	8.09	Adj R-Squared	0.5297
C.V.	1.14	Pred R-Squared	-2.0739
PRESS	1.00	Adeq Precision	6.682

ตาราง ฉ.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการทำแห้งและเวลาที่ใช้ในการทำแห้งกับปริมาณโปรตีนของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Dependent Variable: protein

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	133830.162	8	16728.770	88.661	.000
Intercept	7232318.228	1	7232318.228	38330.563	.000
method	39162.140	2	19581.070	103.778	.000
time	92194.745	2	46097.373	244.311	.000
method * time	2473.277	4	618.319	3.277	.035
Error	3396.290	18	188.683		
Total	7369544.681	27			
Corrected Total	137226.453	26			

a R Squared = .975 (Adjusted R Squared = .964)

ตาราง ฉ.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการทำแห้งและเวลาที่ใช้ในการทำแห้งกับปริมาณวิตามินบีสิบสองของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Dependent Variable: b12

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4.250(a)	8	.531	2.339	.047
Intercept	91.518	1	91.518	402.927	.000
method4rep	1.418	2	.709	3.122	.060
time4rep	.197	2	.099	.434	.652
method4rep * time4rep	2.635	4	.659	2.900	.041
Error	6.133	27	.227		
Total	101.900	36			
Corrected Total	10.383	35			

a R Squared = .409 (Adjusted R Squared = .234)

ตาราง ฉ.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการทำแห้งและเวลาที่ใช้ในการทำแห้งกับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในหน่วย log cfu/g dry weight ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Dependent Variable: logcfu

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.037	8	.130	8.978	.000
Intercept	2366.470	1	2366.470	163990.655	.000
method3rep	.327	2	.164	11.332	.001
time3rep	.375	2	.187	12.991	.000
method3rep * time3rep	.335	4	.084	5.795	.004
Error	.260	18	.014		
Total	2367.766	27			
Corrected Total	1.296	26			

a R Squared = .800 (Adjusted R Squared = .711)

ตาราง ฉ.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการทำแห้งและเวลาที่ใช้ในการทำแห้งกับค่า pH ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Dependent Variable: pH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.506(a)	8	.438	4639.912	.000
Intercept	916.919	1	916.919	9708553.471	.000
Method	.374	2	.187	1982.353	.000
Time	3.042	2	1.521	16105.647	.000
Method * Time	.089	4	.022	235.824	.000
Error	.001	9	9.44E-005		
Total	920.426	18			
Corrected Total	3.507	17			

a R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

ตาราง ฉ.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการทำแห้งและเวลาที่ใช้ในการทำแห้งกับค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ (a_w) ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Dependent Variable: aw

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.077(a)	8	.010	54.281	.000
Intercept	13.834	1	13.834	77815.125	.000
method2rep	.006	2	.003	16.125	.001
time2rep	.068	2	.034	191.625	.000
method2rep * time2rep	.003	4	.001	4.688	.025
Error	.002	9	.000		
Total	13.913	18			
Corrected Total	.079	17			

a R Squared = .980 (Adjusted R Squared = .962)

ตาราง ฉ.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการทำแห้งและเวลาที่ใช้ในการทำแห้งกับปริมาณความชื้นของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Dependent Variable: moisture

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2403.625(a)	8	300.453	46.882	.000
Intercept	17591.878	1	17591.878	2745.004	.000
method2rep	1.346	2	.673	.105	.901
time2rep	2339.751	2	1169.875	182.545	.000
method2rep * time2rep	62.528	4	15.632	2.439	.123
Error	57.678	9	6.409		
Total	20053.181	18			
Corrected Total	2461.303	17			

a R Squared = .977 (Adjusted R Squared = .956)

ตาราง ฉ.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการทำแห้งและเวลาที่ใช้ในการทำแห้งกับการสูญเสียน้ำหนักของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Dependent Variable: weightloss

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2921.067(a)	8	365.133	175.971	.000
Intercept	66910.294	1	66910.294	32246.558	.000
method3rep * time3rep	40.216	4	10.054	4.845	.008
method3rep	19.138	2	9.569	4.612	.024
time3rep	2861.713	2	1430.857	689.583	.000
Error	37.349	18	2.075		
Total	69868.710	27			
Corrected Total	2958.416	26			

a R Squared = .987 (Adjusted R Squared = .982)

ตาราง ฉ.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการทำแห้งและเวลาที่ใช้ในการทำแห้งกับค่าความสว่าง (L*) ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Dependent Variable: L*

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	795.386(a)	8	99.423	29.970	.000
Intercept	16275.688	1	16275.688	4906.158	.000
method2rep * time2rep	8.823	4	2.206	.665	.632
method2rep	3.502	2	1.751	.528	.607
time2rep	783.061	2	391.530	118.023	.000
Error	29.857	9	3.317		
Total	17100.930	18			
Corrected Total	825.242	17			

a R Squared = .964 (Adjusted R Squared = .932)

ตาราง ฉ.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการทำแห้งและเวลาที่ใช้ในการทำแห้งกับค่าความเป็นสีแดง (a*) ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Dependent Variable: a *

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	163.383(a)	8	20.423	72.376	.000
Intercept	948.737	1	948.737	3362.195	.000
method2rep * time2rep	1.620	4	.405	1.435	.299
method2rep	1.804	2	.902	3.197	.089
time2rep	159.959	2	79.979	283.436	.000
Error	2.540	9	.282		
Total	1114.659	18			
Corrected Total	165.922	17			

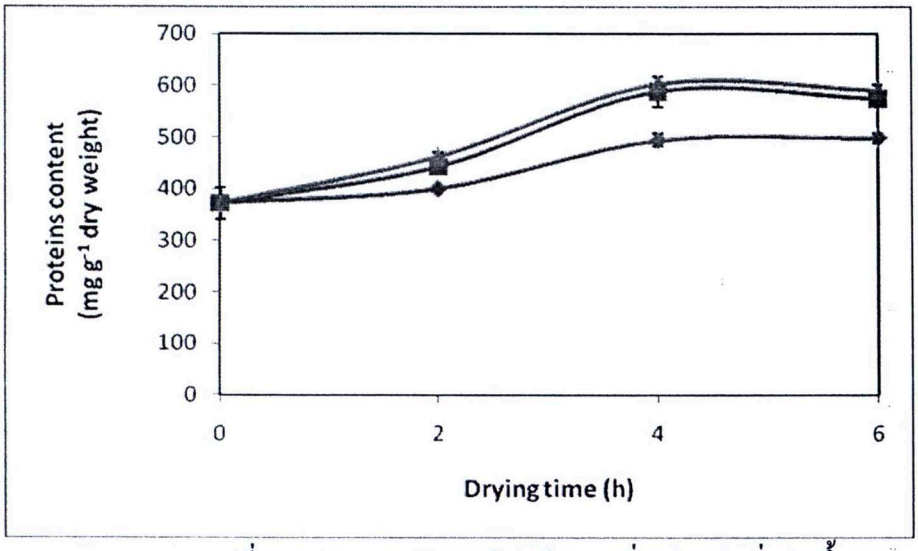
a R Squared = .985 (Adjusted R Squared = .971)

ตาราง ฉ.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของวิธีการทำแห้งและเวลาที่ใช้ในการทำแห้งกับค่าความเป็นสีเหลือง (b*) ของถั่วเน่าที่ผลิตขึ้น

Dependent Variable: b *

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	721.263(a)	8	90.158	143.300	.000
Intercept	1656.193	1	1656.193	2632.406	.000
method2rep	3.442	2	1.721	2.735	.118
time2rep	712.121	2	356.060	565.934	.000
method2rep * time2rep	5.701	4	1.425	2.265	.142
Error	5.662	9	.629		
Total	2383.119	18			
Corrected Total	726.926	17			

a R Squared = .992 (Adjusted R Squared = .985)

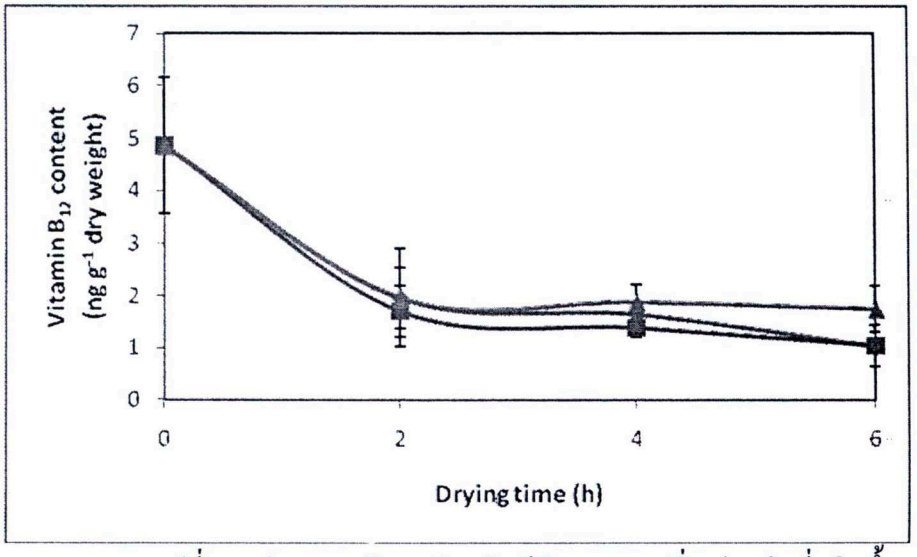


ภาพ ฉ.1 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นในระหว่างการทำแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ

= การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์

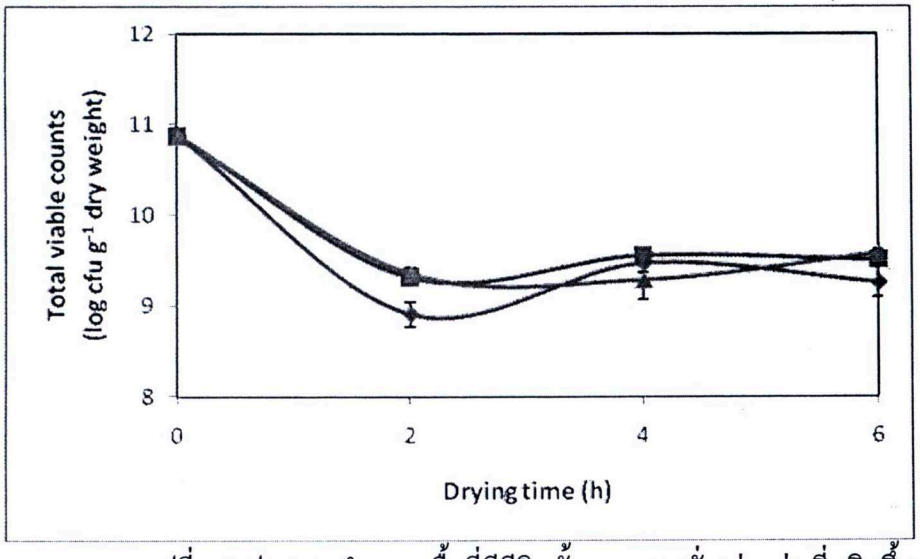


ภาพ ฉ.2 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณวิตามินบีสิบสองของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นในระหว่างการทำแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ

= การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์

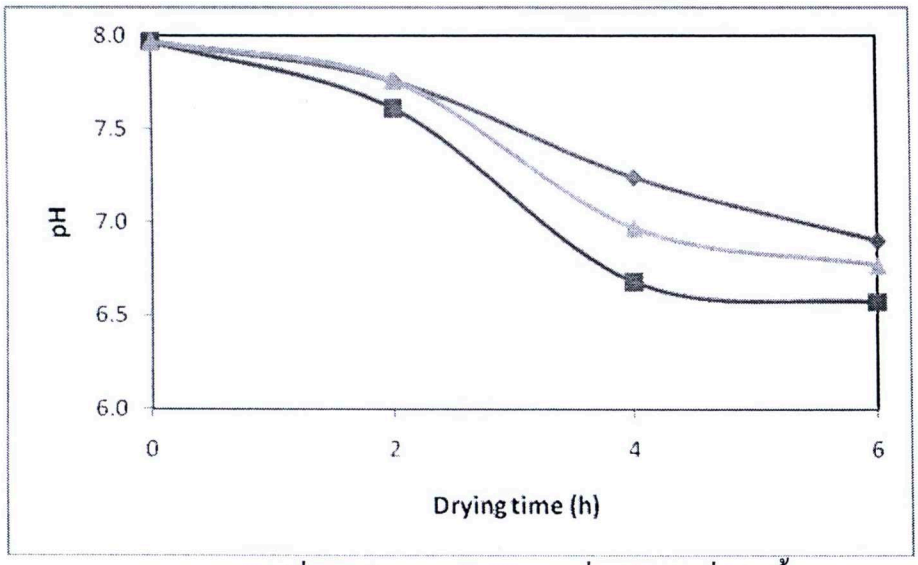


ภาพ ฉ.3 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นในระหว่างการทำแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ

= การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์

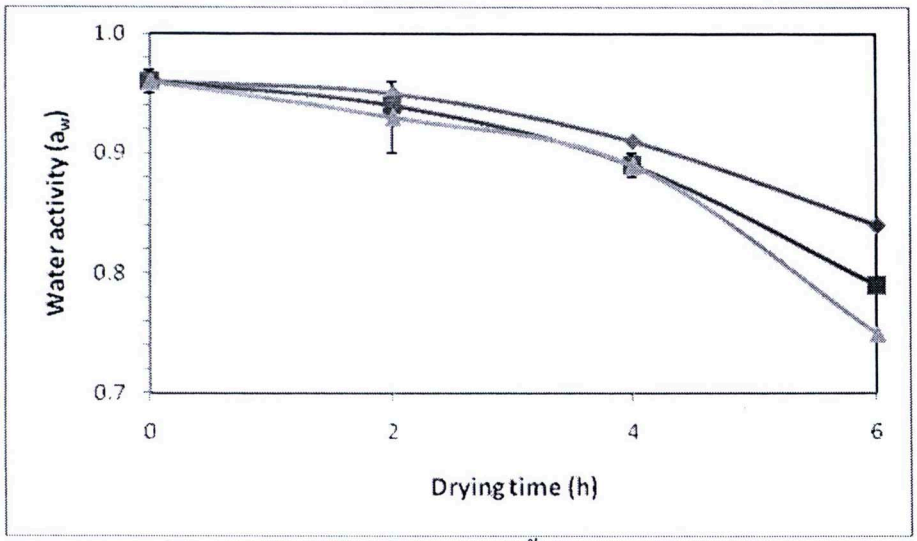


ภาพ ฉ.4 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นในระหว่างการทำแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ

= การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์

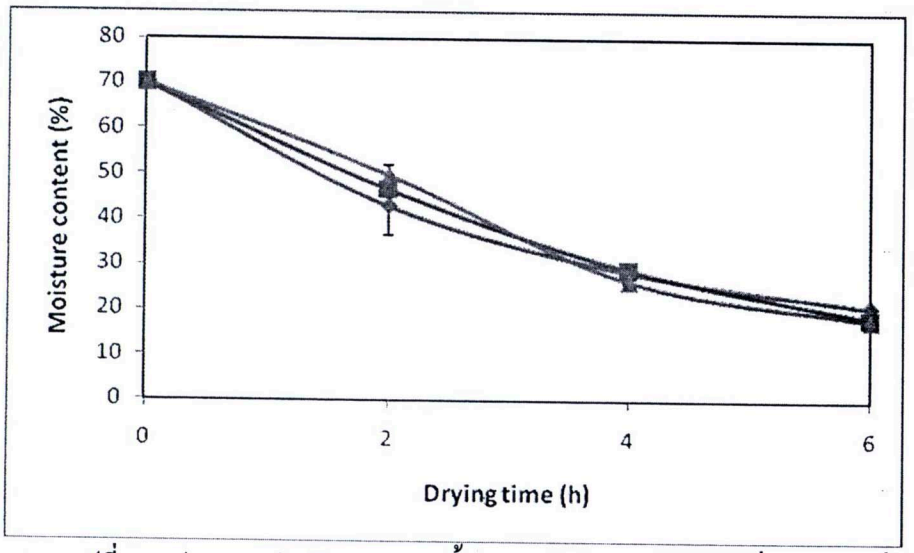


ภาพ ฉ.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าวอเตอร์แอกทิวิตี้ (Water activity, a_w) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นในระหว่างการทำแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ

= การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์

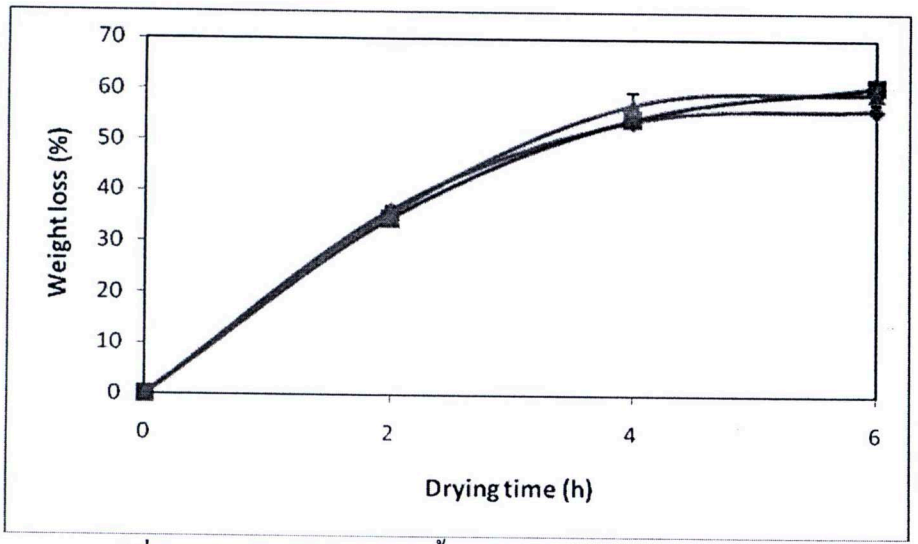


ภาพ ฉ.6 การเปลี่ยนแปลงของค่าปริมาณความชื้น (Moisture content) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นในระหว่างการทำแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ

= การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์

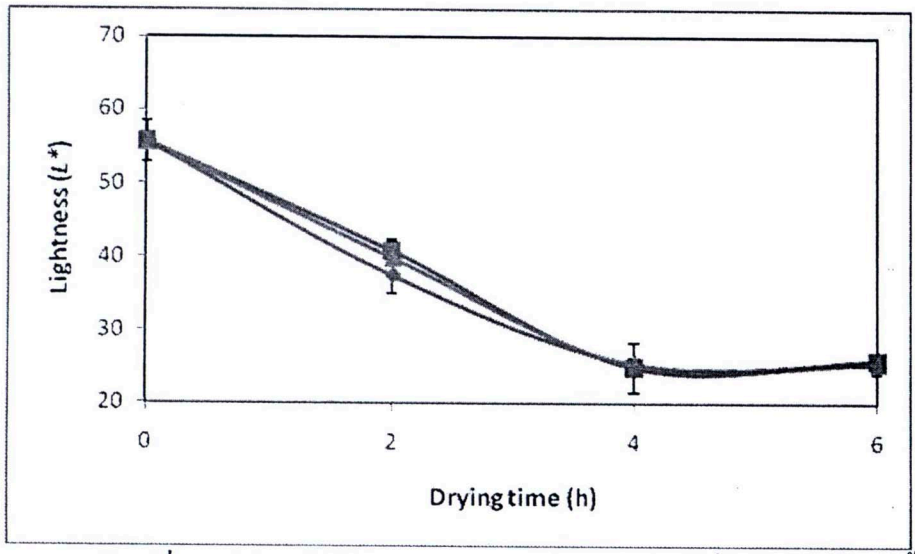


ภาพ ฉ.7 การเปลี่ยนแปลงของการสูญเสียน้ำหนัก (Weight loss) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นในระหว่างการทำแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ

= การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์

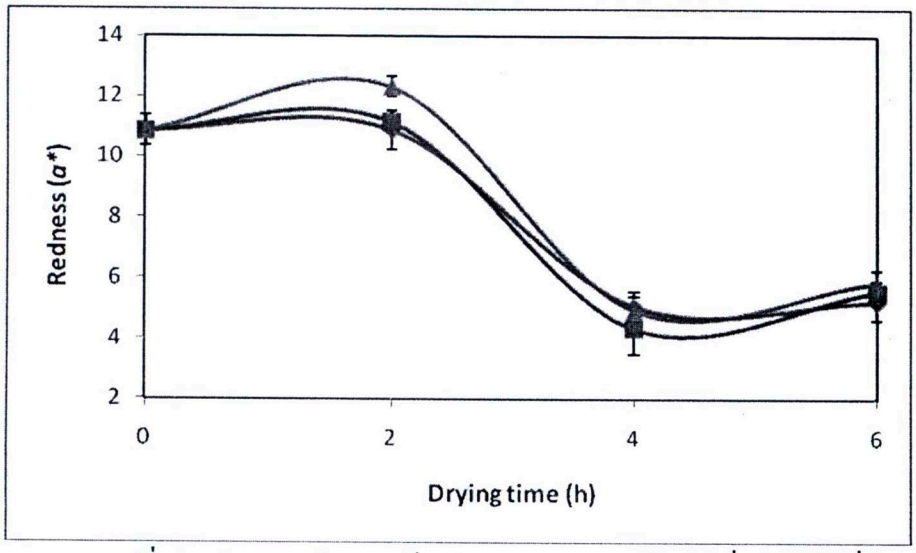


ภาพ ฉ.8 การเปลี่ยนแปลงของค่าความสว่าง (Lightness, L*) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้น ในระหว่างการทำแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ

= การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์

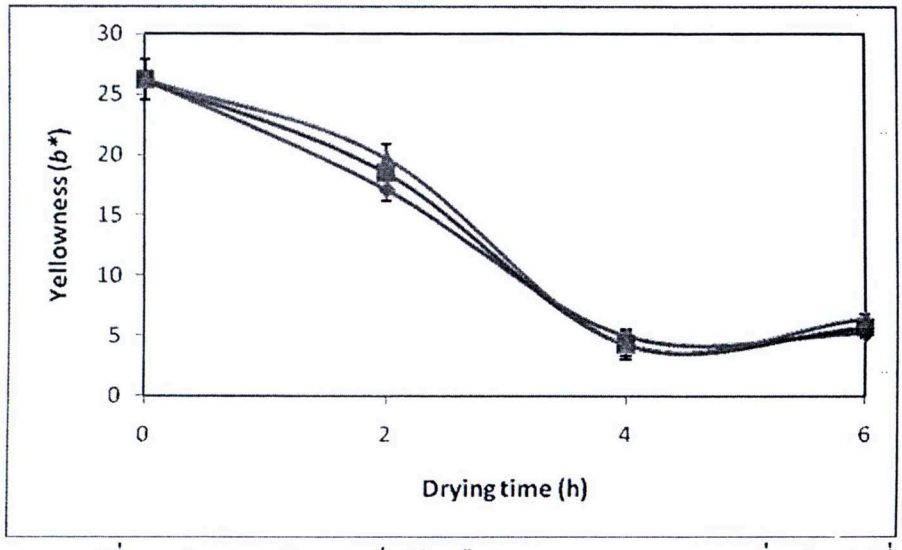


ภาพ ฉ.9 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นสีแดง (Redness, a*) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้น ในระหว่างการทำแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ

= การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์



ภาพ ฉ.10 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นสีเหลือง (Yellowness, b*) ของถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตขึ้นในระหว่างการทำแห้งที่ระยะเวลาต่างๆ

= การทำแห้งด้วยการตากแดดโดยตรง

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°C

= การทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์

ภาคผนวก ช
วิธีการคำนวณ

1. การคำนวณปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951)

ยกตัวอย่างเช่น วัดค่า A_{750} ของตัวอย่างได้ X หน่วย และสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน BSA คือ y = 1.6652x (mg/ml) ดังนั้น ปริมาณโปรตีนในหน่วย mg/ml ของตัวอย่างเท่ากับ

$$\textbf{Soluble proteins (mg/ml)} = \frac{\textbf{X * ค่าการเจือจาง}}{\textbf{1.6652}}$$

หากต้องการคำนวณเป็น mg/g ก็นำค่าที่คำนวณได้จากสมการข้างต้นมาคูณปริมาตร หรือการเจือจางที่ได้จากการละลายตัวอย่างจากของแข็งโดยน้ำหนักให้เป็นของเหลว (ml) หารด้วยจำนวนตัวอย่างในหน่วยกรัม (g)

2. การปริมาณวิตามินบีสิบสองโดยวิธี Bioassay (AOAC, 1980)

ตัวอย่างเช่น วัดค่า OD_{620} ของตัวอย่างที่ลบค่า blank ของค่า OD_{620} จากเชื้อทดสอบ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* แล้วได้ X หน่วย โดยใช้ปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ Y ml และสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายวิตามินบีสิบสอง คือ y = 4.2923x + 0.0027 (ng) ดังนั้นปริมาณวิตามินบีสิบสองของตัวอย่างในหน่วย ng/ml เท่ากับ

$$\textbf{Vitamin } B_{12} \textbf{ (ng/ml)} = \frac{\textbf{(X – 0.0027)}}{\textbf{4.2923}} * \frac{\textbf{1 (ml)}}{\textbf{Y}}$$

หากต้องการคำนวณเป็น ng/g ก็ทำเช่นเดียวกันกับการคำนวณปริมาณโปรตีนในหน่วย mg/g คือ นำค่าที่คำนวณได้จากสมการข้างต้นมาคูณปริมาตรที่ได้จากการละลาย หรือการเจือจางที่ได้จากการละลายตัวอย่างจากของแข็งโดยน้ำหนักให้เป็นของเหลว (ml) หารด้วยจำนวนตัวอย่างในหน่วยกรัม (g)

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

วิธีการที่ใช้สเกลความชอบแบบ 9 Hedonic scale

ชื่อผู้ทดสอบชิมผลิตภัณฑ์ ..... **เพศ** ( ) ชาย ( ) หญิง

ชื่อผลิตภัณฑ์ "ถั่วเน่าย่าง"

จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่จัดให้ ขอให้ท่านทดสอบชิมแล้วให้คะแนนตามลำดับความชอบในแต่ละลักษณะคุณภาพโดยทำเครื่องหมาย X หรือ O ล้อมรอบตัวเลขคะแนนตามลำดับความชอบจาก 1-9 ดังนี้

9 ชอบมากที่สุด 6 ชอบเล็กน้อย 3 ไม่ชอบปานกลาง

8 ชอบมาก 5 บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ 2 ไม่ชอบมาก

7 ชอบปานกลาง 4 ไม่ชอบเล็กน้อย 1 ไม่ชอบมากที่สุด

(เพื่อให้ท่านสามารถชิมอย่างมีประสิทธิภาพ กรุณาดื่มน้ำก่อนที่จะชิมตัวอย่างถัดไป)

ตัวอย่างถั่วเน่าหมายเลข .....**259**.....

ลักษณะปรากฏ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
กลิ่น	1	2	3	4	5	6	7	8	9
สี	1	2	3	4	5	6	7	8	9
รสชาติ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
การยอมรับรวม	1	2	3	4	5	6	7	8	9

ตัวอย่างถั่วเน่าหมายเลข .....**268**.....

ลักษณะปรากฏ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
กลิ่น	1	2	3	4	5	6	7	8	9
สี	1	2	3	4	5	6	7	8	9
รสชาติ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
การยอมรับรวม	1	2	3	4	5	6	7	8	9

ตัวอย่างถั่วเน่าหมายเลข .....**298**.....

ลักษณะปรากฏ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
กลิ่น	1	2	3	4	5	6	7	8	9
สี	1	2	3	4	5	6	7	8	9
รสชาติ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
การยอมรับรวม	1	2	3	4	5	6	7	8	9

ตัวอย่างถั่วเน่าหมายเลข .....**323**.....

ลักษณะปรากฏ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
กลิ่น	1	2	3	4	5	6	7	8	9
สี	1	2	3	4	5	6	7	8	9
รสชาติ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
การยอมรับรวม	1	2	3	4	5	6	7	8	9

ตัวอย่างถั่วเน่าหมายเลข .....**387**.....

ลักษณะปรากฏ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
กลิ่น	1	2	3	4	5	6	7	8	9
สี	1	2	3	4	5	6	7	8	9
รสชาติ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
การยอมรับรวม	1	2	3	4	5	6	7	8	9

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล	นายพันพงศ์ เลขะกุล
วัน เดือน ปีเกิด	25 เมษายน 2527
การศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษา ในปี พ.ศ. 2544 จากโรงเรียนสรรพวิทยาคม จังหวัดตาก สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ในปี พ.ศ. 2549 วิชาเอกเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผลการวิจัย	นำเสนอผลงานวิจัยในหัวข้อเรื่อง “Differences of some nutritional and physical properties of Northern Thai-Style Fermented Soybeans (*Thua-nao*) dried by three different methods” ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ “Food Innovative Asia Conference 2010: Indigenous Food Research and Development to Global Market” ระหว่างวันที่ 17-18 มิถุนายน 2553 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติ BITEC, กรุงเทพมหานคร