

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัสดุอุปกรณ์

#### 1. วัสดุดิบ

- 1.1 ถั่วเหลืองพันธุ์ เชียงใหม่ 60
- 1.2 ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6
- 1.3 แป้งสาลี (ตราว่าว)
- 1.4 เกลือเม็ด

#### 2. จุลินทรีย์

*A. oryzae* M-01 คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เก็บรักษาบน PDA slant ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

#### 3. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

- 3.1 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CO 11, Japan)
- 3.2 กล้องจุลทรรศน์ 3 มิติ (SZ-ST Olympus, Japan)
- 3.3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Polyscience 8306, U.S.A)
- 3.4 ตู้บ่มเชื้อ (Heraeus B12, Germany)
- 3.5 ตู้อบลมร้อน (WTB Binder BD 115, Germany)
- 3.6 ตู้อบสูญญากาศ (WTB binder 78532 TUTTLINGEN/GERMANY)
- 3.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Sorvall RC 5C , U.S.A)
- 3.8 เครื่องย่อยบดอาหาร (Seward stomacher 400, England)
- 3.9 เครื่องวัดค่าสี (Juki Tri-Stimulus Colorimeter JC801, Japan)
- 3.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Bio-tek , U.S.A.)
- 3.11 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Metrohm 744 , Switzerland)
- 3.12 เครื่องผสม (Vortex: Genie 2<sup>TM</sup> G-560E, U.S.A )
- 3.13 เครื่องชั่งขนาด 1 กิโลกรัม (Kitchen scale, Thailand)
- 3.14 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius LA 230S, Germany )

- 3.15 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius BP 610, Germany)
- 3.16 เทอร์โมคัปเปิล (Thermocouple: Yokogawa 2544 model, Japan)
- 3.17 หม้อนิ่งความดันไอชนิดใช้ไฟฟ้า (Hirayama HV 50, Japan)
- 3.18 หม้อนิ่งความดันไอ (All Americans)
- 3.19 Hand-Held refractomete (Brix 0-32%) (Atago)
- 3.20 Hand-Held refractometer (Salt 0-28%) (Atago)
- 3.21 แผ่นให้ความร้อนพร้อมระบบกวน (Morat M22/1)
- 3.22 ขวดวัดปริมาตรขนาด 5 10 25 50 100 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.23 บีกเกอร์ขนาด 50 100 250 600 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.24 กระจกตวงขนาด 50 100 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.25 ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.26 หลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิลิตร
- 3.27 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 0.2 ,1 และ 5 มิลลิลิตร
- 3.28 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 3.29 กระดาษกรอง (Whatman No.1)

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 4.1 Agar (Union science, Thailand)
- 4.2 Yeast extract (Merck)
- 4.3 Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) (Merck)
- 4.4 Peptone (Difco)
- 4.5 Plate Count Agar (Merck)

#### 5. สารเคมี

- 5.1 Calcium chloride (Ajax)
- 5.2 Casein from Bovine milk (Fluka)
- 5.3 Calcium carbonate (วิทยาศาสตร์)
- 5.4 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Fluka)
- 5.5 D-Glucose (Merck)
- 5.6 Ethanol (Merck)

- 5.7 Ferrous sulphate (Merck)
- 5.8 Folin-Ciocalteu phenol reagent (Merck)
- 5.9 Glacial acetic (Lab-Scan)
- 5.10 Glycine (Ajax)
- 5.11 Hydrochloric acid (Merck)
- 5.12 Hydrindantin (Aldrich)
- 5.13 Maltose (Ajax)
- 5.14 Ninhydrin (Fluka)
- 5.15 O-phenanthroline (Fisher scientific)
- 5.16 Phenolphthalein (Ajax)
- 5.17 Potassium chloride (Ajax)
- 5.18 Potassium chromate (Fisher scientific)
- 5.19 Potassium dichromate (Fisher scientific)
- 5.20 Potassium dihydrogen phosphate (Merck)
- 5.21 Potassium hydrogenphthalate (Ajax)
- 5.22 Potassium persulphate (Ajax)
- 5.23 Potassium sodium tartrate (Ajax)
- 5.24 Silver nitrate (Merck)
- 5.25 Sodium carbonate (Merck)
- 5.26 Sodium chloride (Merck)
- 5.27 Sodium hydroxide (Merck)
- 5.28 Sodium hydrogen phosphate (Merck)
- 5.29 Sodium tartrate (Fluka)
- 5.30 Sodium acetate (Merck)
- 5.31 Starch soluble (BDH)
- 5.32 Sulfuric acid 98% (Merck)
- 5.33 Trichloroacetic acid (Merck)
- 5.34 Tyrosine (Fluka)
- 5.35 Tween 80 (Merck)

## วิธีการวิจัย

### ตอน 1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุภาคสีขาวในเต้าเจี้ยว

#### 1. ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสปอร์ของ *A. oryzae* M-01

1.1 นำรำข้าวและข้าวเจ้าอย่างละ 20 กรัม ใส่ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงบนข้าวแล้วคลุกผสมให้ทั่วถึง อุดคอกขวดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงใส่สปอร์ซัสเพนชัน (spores suspension) ของเชื้อ *A. oryzae* M-01 ที่มี tween 80 ผสมอยู่ร้อยละ 0.1 ปริมาตร 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนได้ความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 6 บดข้าวให้มีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องปั่นผสม (Waring blender) ที่ปราศจากเชื้อ นำผงสปอร์ที่ได้ไปวิเคราะห์

##### 1.1.1 ปริมาณสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

โดยการใช้ counting chamber (Neubauer)

##### 1.1.2 ปริมาณสปอร์ที่รอดชีวิต (AOAC, 1995)

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม นำมาทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรม จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการ spread plate บนอาหาร DRBC (ภาคผนวก ง)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 2. กิจกรรมของราในระหว่างการหมักโคจิ

##### 2.1 อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างในโคจิถั่วเหลือง

นำถั่วเหลืองมาแช่น้ำนานประมาณ 12 ชั่วโมง ชัดดูเพื่อทำให้เปลือกถั่วเหลืองบางส่วนหลุดลอกออกประมาณร้อยละ 40-60 ต้มให้สุก แล้วทิ้งให้สะเด็ดน้ำบนตะกร้าพลาสติก ถ้วยถั่วเหลืองลงสู่ภาชนะที่เป็นโลหะ แล้วเติมแป้งสาลีที่มีผงสปอร์ผสมอยู่ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักน้ำหนักน้ำหนัก) ในปริมาณร้อยละ 50 (น้ำหนักน้ำหนักน้ำหนัก) ของน้ำหนักถั่วเหลืองแห้ง คลุกส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปโรยลงบนถั่วเหลืองสุกในภาชนะโลหะ แล้วนำไปเกลี่ยลงในตะกร้าพลาสติกชนิดโปร่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 28 เซนติเมตร และมีผ้าขาวบางกรูอยู่ด้านใน ปรับความสูงของกองถั่วเหลืองประมาณ 2.5 และ 5.0 เซนติเมตร แล้วปิดทับหน้าด้วยผ้าขาวบาง บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 72 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ดังนี้คือ

##### 2.1.1 วัดอุณหภูมิใจกลางแผ่น โคจิ จำนวน 3 แห่ง ด้วยเทอร์โมคัปเปิล

##### 2.1.2 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร กวนผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำของเหลวส่วนใสมาทำการวัดค่าความเป็นกรด-เบส ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

## 2.2 กิจกรรมเอนไซม์ในโคจิวเหือง

### 2.2.1 กิจกรรมอะไมเลส (Nahar et al., 2008)

ชั่งตัวอย่างหนัก 5 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 0.1 M acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำของผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารสกัดเอนไซม์ที่เป็นส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปิดปากหลอดแล้วนำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ที่ความยาวช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานที่ใช้มอลโทสเป็นค่าอ้างอิง (ภาคผนวก ค)

### 2.2.2 กิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 ; Folin and Ciocalteu, 1929)

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 50 มิลลิโมล potassium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำของผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารสกัดเอนไซม์ที่เป็นส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย casein ร้อยละ 0.65 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม TCA 110 มิลลิโมล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มต่อไปที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แยกของเหลวที่เป็นส่วนใส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่สารละลาย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย Folin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานที่ใช้ไทโรซีนเป็นค่าอ้างอิง (ภาคผนวก ค)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



### 3.2.3 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

## 3.3 กิจกรรมเอนไซม์

### 3.3.1 กิจกรรมอะไมเลส (Nahar et al., 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1

### 3.3.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

ชั่งตัวอย่างหนัก 10 กรัม ใส่ลงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำของผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำของเหลวที่เป็นส่วนใส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดแล้วนำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ที่ความยาวช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร

### 3.3.3 กิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 ; Folin and Ciocalteu, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2

### 3.3.4 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด โดยวิธี photometric ninhydrin

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลาย เอทานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำของผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารสกัดที่เป็นส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย นินไฮดริน (ninhydrin colour reagent) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแล้วผสมให้เข้ากัน นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทิ้งให้เย็นต่อจากนั้นเติมสารละลาย stabilizing solvent (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานที่ใช้ไกลซีนเป็นค่าอ้างอิง (ภาคผนวก ก)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

## 3.4 สีของเต้าเจี้ยว

### 3.4.1 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

นำส่วนใสของตัวอย่างไปวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดค่าสี (ภาคผนวก ข)  
ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.5 การเกิดอนุภาคสีขาวในระหว่างการหมักโมโรมิ

จากการสังเกตการเกิดอนุภาคสีขาวในเต้าเจี้ยวในระหว่างการหมักถึงหมักด้วยตาเปล่า

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.6 ผลของการหมักโมโรมิระยะเวลาสั้นต่อการเกิดอนุภาคสีขาว

นำเต้าเจี้ยวที่มีอายุการหมัก 4 สัปดาห์ มาต้มให้เดือดนาน 30 นาที บรรจุใส่ขวดที่ผ่านการลวกด้วยน้ำเดือดแล้วทำแห้ง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง สุ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 วัน นาน 15 วัน เพื่อทำการวิเคราะห์

3.6.1 จำนวนพื้นที่ที่พบอนุภาคสีขาวที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว

นำตัวอย่างเต้าเจี้ยว มาสังเกตลักษณะปรากฏ วิเคราะห์จำนวนอนุภาคสีขาว โดยไม่มีการเทตัวอย่างออก ทำการแบ่งพื้นที่ผิวขวดออกเป็นตารางเล็กๆ ขนาด (กว้างxยาว) เท่ากับ 0.5x0.5 เซนติเมตร คิดเป็นพื้นที่ โดยใช้แผ่นพลาสติกใสเป็นอุปกรณ์สำหรับขีดเส้นตาราง แล้วนำไปหุ้มที่ผิวขวดด้านนอก นับจำนวนช่องที่มีอนุภาคสีขาวปรากฏอยู่ คำนวณหาร้อยละของจำนวนช่องที่ตรวจพบอนุภาคสีขาว ทำการตรวจนับ 5 ขวด และทำขวดละ 3 ซ้ำ

3.6.2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (AOAC, 1995)

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม นำมาทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรม จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการ pour plate บนอาหาร PCA (ภาคผนวก ง)

3.6.3 กิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 ; Folin and Ciocalteu, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2

3.6.4 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด โดยวิธี photometric ninhydrin

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4

3.6.5 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

3.6.6 การทดสอบทางประสาทสัมผัส แบบ Ranking for preference  
ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.7 ผลของระยะเวลาในการฆ่าเชื้อเต้าเจี้ยวต่อการเกิดอนุภาคสีขาว

นำเต้าเจี้ยวที่มีอายุการหมัก 8 สัปดาห์ มาต้มให้เดือดนาน 20 30 และ 40 นาที บรรจุใส่ขวดที่ผ่านการลวกด้วยน้ำเดือดและแห้ง สุ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 วัน นาน 15 วัน เพื่อวิเคราะห์

เต้าเจี้ยว

#### 3.7.1 จำนวนพื้นที่ที่พบอนุภาคสีขาวที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวผลิตภัณฑ์

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

#### 3.7.2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2

#### 3.7.3 กิจกรรมโปรตีนเอส (Anson, 1938 ; Folin and Ciocalteu, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2

#### 3.7.4 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด โดยวิธี photometric ninhydrin

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4

#### 3.7.5 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

#### 3.7.6 การทดสอบทางประสาทสัมผัส แบบ Ranking for preference

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.6

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.8 ผลของการการเจือจางเต้าเจี้ยวต่อการเกิดอนุภาคสีขาว

นำเต้าเจี้ยวที่มีอายุการหมัก 8 สัปดาห์ มาต้มให้เดือดนาน 20 30 และ 40 นาที การเจือจางเต้าเจี้ยว โดยเติมน้ำสะอาดที่ต้มสุกแล้ว 0.5 เท่าของน้ำหนักรับเต้าเจี้ยว บรรจุใส่ขวดที่ผ่านการลวกด้วยน้ำเดือดแล้วและแห้ง สุ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 วัน นาน 15 วัน เพื่อวิเคราะห์

#### 3.8.1 จำนวนพื้นที่ที่พบอนุภาคสีขาวที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวเต้าเจี้ยว

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

#### 3.8.2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2

#### 3.8.3 กิจกรรมโปรตีนเอส (Anson, 1938 ; Folin and Ciocalteu, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2

#### 3.8.4 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด โดยวิธี photometric ninhydrin

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.3.4

3.8.5 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

3.8.6 การทดสอบทางประสาทสัมผัส แบบ Ranking for preference

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.6

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.9 ผลของสัดส่วนของแข็งและของเหลวในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวต่อการเกิดอนุภาค สีขาว

นำตัวอย่างเต้าเจี้ยว มาสังเกตลักษณะปรากฏ วิเคราะห์จำนวนอนุภาคสีขาว และ ปริมาณของแข็งและของเหลวต่อบรรจุภัณฑ์ สังเกตลักษณะปรากฏของเนื้อเต้าเจี้ยวในขวด และทำการหาสัดส่วนของของแข็งต่อของเหลว

3.9.1 โดยการเทเต้าเจี้ยวผ่านกระชอน แล้วปล่อยให้ไว้นานประมาณ 5 นาที นำเนื้อเต้าเจี้ยวที่แยกออกได้ไปทำการชั่งพร้อมกับน้ำ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 4. อนุภาคสีขาวในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่วางจำหน่ายในท้องตลาด

4.1 คุณลักษณะและสัดส่วนของแข็งและของเหลวของเต้าเจี้ยว

นำตัวอย่างเต้าเจี้ยวที่จำหน่ายในท้องตลาดจำนวน 10 สูตร มาสังเกตลักษณะปรากฏ วิเคราะห์จำนวนอนุภาคสีขาว และปริมาณของแข็งและของเหลวต่อบรรจุภัณฑ์ พบว่าเต้าเจี้ยวแต่ละยี่ห้อจะมีลักษณะปรากฏที่แตกต่างกัน 2 ประเภท คือ เต้าเจี้ยวที่มีเมล็ดถั่วกระจายตัวทั่วทั้งบรรจุภัณฑ์ มีลักษณะขุ่นเนื่องจากส่วนที่เป็นของเหลวมีน้อย และมีการใช้แป้งเป็นส่วนผสมมาก และอีกลักษณะคือเมล็ดถั่วลอยตัวอยู่ในของเหลวที่มีปริมาณแตกต่างกัน เนื่องจากมีแป้งเป็นส่วนประกอบน้อยกว่า นำเต้าเจี้ยวที่วางจำหน่ายในท้องตลาด โดยเลือกใช้ตัวอย่างที่มีส่วนผสมแตกต่างกัน 10 สูตร เพื่อทำการวิเคราะห์

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 จำนวนพื้นที่ที่พบอนุภาคสีขาวทั้งหมดที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวของเนื้อเต้าเจี้ยว  
วิธีการเช่นเดียวกับ ข้อ 3.6.1

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.3 สัดส่วนของของแข็งและของเหลวของเต้าเจี้ยว

วิธีการเช่นเดียวกับ ข้อ 3.9.1

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.4 ชนิดปริมาณของอนุภาคสีขาว

นำผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่วางจำหน่ายในท้องตลาดมา 10 สูตร เพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณอนุภาคสีขาวแต่ละชนิดโดยไม่มีการเทตัวอย่างออก การแบ่งพื้นที่ผิวขวดแก้วเพื่อคำนวณปริมาณของอนุภาคสีขาว ทำวิธีการเช่นเดียวกับ ข้อ 3.6.1

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

## 5. การระบุชนิดของอนุภาคสีขาว

5.1 โครงสร้างทางกายของอนุภาคสีขาว

เทเต้าเจี้ยวออกจากขวด แล้วทำการแยกอนุภาคสีขาวออกโดยการใช้พายโลหะและปากคีบ รวบรวมจำนวนจุดขาวที่ได้ ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ กล้องจุลทรรศน์ชนิด 3 มิติ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) เพื่อศึกษาส่วนประกอบของอนุภาคสีขาว ทำการล้างอนุภาคสีขาวเพื่อกำจัดเกลือและสิ่งปนเปื้อนต่างๆ ปล่อยให้แห้ง แล้วนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด 3 มิติ และกล้องจุลทรรศน์ แล้วจึงนำทดสอบคุณสมบัติทางเคมี ดังต่อไปนี้คือ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.2 การทดสอบแป้งในอนุภาคสีขาว

ทำการหยดสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ค) จำนวน 1-2 หยด ลงบนตัวอย่างอนุภาคสีขาวที่ทำความสะอาดแล้ว ปล่อยให้แห้งสักพักหนึ่ง สังเกตปฏิกิริยาการเกิดเป็นสีม่วงหรือสีม่วงน้ำเงิน ทำการทดลองกับอนุภาคสีขาวที่มีลักษณะแตกต่างกัน 3 ประเภท

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.3 การทดสอบการละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (ดัดแปลงจาก Flegel, 1981)

ชั่งอนุภาคสีขาวน้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 นอร์มัล (1N HCl) แล้วนำไปกวนผสมด้วยเครื่องกวนผสม นานไม่น้อยกว่า 15 นาที  
ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.4 ทดสอบการวัดค่าดูดกลืนแสงส่องกราด

ชั่งอนุภาคสีขาวน้ำหนักประมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 1 นอร์มัล (1N HCl) แล้วนำไปกวนผสมด้วยเครื่องกวนผสม นานไม่น้อยกว่า 15 นาที นำไปกรองบนกระดาษกรอง นำส่วนที่ใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสง  
ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

## ตอนที่ 2 การผลิตเต้าเจี้ยวรสเค็มน้อย

### 1. การเตรียมโคจิจ้าวเหนียว

#### 1.1 ระยะเวลาในการนึ่งข้าวเหนียวที่มีผลต่อสมบัติโคจิจ

ชั่งข้าวเหนียวหนัก 500 กรัม แห่น้ำประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปนึ่งให้สุกนาน 20 30 40 และ 50 นาที ล้างข้าวเหนียวและทิ้งให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที รองข้าวเหนียวมีอุณหภูมิลดลง แล้วจึงเติมแป้งข้าวเจ้า ปริมาณร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ของน้ำหนักข้าวเหนียวแห้ง ซึ่งในแป้งมีผงสปอร์ของรา *A. oryzae* M-01 ผสมอยู่ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ถ่ายข้าวเหนียวลงในตะกร้าพลาสติกชนิดโปร่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 28 เซนติเมตร และมีผ้าขาวบางกรออยู่ด้านใน โดยปรับให้กองข้าวเหนียวมีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และปิดคลุมผิวหน้าด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ดังนี้คือ

##### 1.1.1 วัดอุณหภูมิของโคจิจำนวน 3 แห่ง ด้วยเทอร์โมคัปเปิล

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.1.1

##### 1.1.2 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.1.2

##### 1.1.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.3.2

1.1.4 กิจกรรมอะไมเลส (Nahar et al., 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.2.1

1.1.5 กิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 ; Folin and Ciocalteu, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.2.2

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

## 1.2 ความหนาของข้าวเหนียวที่มีผลต่อสมบัติโคจิ

ชั่งข้าวเหนียวหนัก 800 1100 และ 1400 กรัม แช่น้ำประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปนึ่งตามเวลาที่เหมาะสมในข้อ 2.1 ล้างข้าวเหนียวและทิ้งให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที ร่อนข้าวเหนียวมีอุณหภูมิลดลง แล้วจึงเติมแป้งข้าวเจ้า ปริมาณร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ของน้ำหนักข้าวเหนียวแห้ง ซึ่งในแป้งมีผงสปอร์ของรา *A. oryzae* M-01 ผสมอยู่ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ถ่ายข้าวเหนียวลงในตะกร้าพลาสติกชนิดโปร่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 28 เซนติเมตร และมีผ้าขาวบางกรุอยู่ด้านใน โดยปรับให้ชั้นข้าวเหนียวมีความหนาประมาณ 5 7 และ 9 เซนติเมตร และปิดคลุมผิวหน้าด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ดังนี้คือ

1.2.1 วัดอุณหภูมิของโคจิจำนวน 3 แห่ง ด้วยเทอร์โมคัปเปิล

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.1.1

1.2.2 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.1.2

1.2.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.3.2

1.2.4 กิจกรรมอะไมเลส (Nahar et al., 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.2.1

1.2.5 กิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 ; Folin and Ciocalteu, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.2.2

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

## 2. การหมักโมโรมิ

2.1 ปริมาณโคจิที่เหมาะสมต่อการหมักโมโรมิ

ชั่งโคจิข้าวเหนียวที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดจากข้อ 2 ผสมกับถั่วเหลืองคั่วสุกในปริมาณร้อยละ 30 40 และ 50 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในถังพลาสติกขนาด 14 ลิตร เติมน้ำเกลือที่มี

ความเข้มข้นร้อยละ 18 (วัดค่า Hand-Held refractometer (Salt 0-28%) (Atago)) ในอัตราส่วน โคจิ และถั่วเหลืองต่อน้ำเกลือ เท่ากับ 2ต่อ1 คลุกให้ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดฝาถังตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 สัปดาห์ โดยทำการคนตัวเชื้อทุกวันใน 2 สัปดาห์แรก และคนวันเว้นวันในสัปดาห์ถัดไปจนสิ้นอายุการหมัก สุ่มเก็บตัวอย่างตัวเชื้อทุก ๆ สัปดาห์เพื่อทำการวิเคราะห์

2.1.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.1.2

2.1.2 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (ตัดแปลงจาก Mohr, 1980)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.2.1

2.1.3 วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกด้วยวิธีการ Titration (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.2.1

2.1.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.3.2

2.1.5 กิจกรรมอะไมเลส (Nahar et al., 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.2.1

2.1.6 กิจกรรมโพรทีเอส (Anson, 1938 ; Folin and Ciocalteu, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.2.2

2.1.7 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (โดยวิธี photometric ninhydrin)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.3.4

2.1.8 ปริมาณอัลทอกอฮอลล์ (Amerine and Ough, 1974; AOAC, 1990)

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร ถ่ายตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วก้นกลมของชุดกลั่น เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วทำการกลั่นที่อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส เก็บของเหลวที่กลั่นได้ให้มีปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ปิดปากฟลasks ด้วยจุกยาง แล้วนำไปวางไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำตัวอย่างมาใส่สารละลาย 1,10-ฟีแนนโทรีนเฟอร์รัสซัลเฟต (ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตร ไตเตรทด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก ก) จนถึงจุดยุติ โดยสังเกตจากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว แล้วหยดสารละลาย 1,10-ฟีแนนโทรีนเฟอร์รัสซัลเฟตอีก 3 หยด ไตเตรทต่อจนถึงจุดยุติโดยสังเกตจากสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียว เป็นสีน้ำตาลม่วง แล้วคำนวณปริมาณอัลทอกอฮอลล์

2.1.9 ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.1.1

2.1.10 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.2.2

2.1.11 ค่าสี (colorimeter : tri-stimulus colorimeter)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.4.1

2.1.12 การทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Ranking for preference

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.6.6

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.2 ความเข้มข้นน้ำเกลือที่เหมาะสมต่อการหมักโมโรมิ

เตรียมโคจิข้าวเหนียวที่ให้ผลลัพท์ที่ดีที่สุดจากข้อ 2 มาผสมกับถั่วเหลืองต้มสุก ในอัตราส่วนที่ให้ผลลัพท์ที่ดีที่สุดจากข้อ 3.1 ในถังพลาสติกขนาด 14 ลิตร เติมน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 13 และ 16 (วัดค่า Hand-Held refractometer (Salt 0-28%) (Atago)) ในอัตราส่วนโคจิและถั่วเหลืองต้มสุก:น้ำเกลือ เท่ากับ 2:1 คลุกให้ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดฝาถังตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 สัปดาห์ โดยทำการคนเข้าเจียวทุกวันใน 2 สัปดาห์แรก และคนวันเว้นวันในสัปดาห์ถัดไปจนสิ้นอายุการหมัก สุ่มเก็บตัวอย่างเข้าเจียวทุก ๆ สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์

2.2.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.1.2

2.2.2 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (ดัดแปลงจาก Mohr, 1980)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.1.2

2.2.3 วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกด้วยวิธีการ Titration (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.2.1

2.2.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.3.2

2.2.5 กิจกรรมอะไมเลส (Nahar et al., 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.2.1

2.2.6 กิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 ; Folin and Ciocalteu, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 2.2.2

2.2.7 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (โดยวิธี photometric ninhydrin)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.3.4

2.2.8 ปริมาณอัลทอกฮอลล์ (Amerine and Ough, 1974; AOAC, 1990)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.8

2.2.9 ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.1.1

2.2.10 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก โดยวิธี (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.2.2

2.2.11 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.4.1

2.2.12 การทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Ranking for preference

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.6.6

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2.3 ผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว

นำเต้าเจี้ยวที่มีครบอายุการหมัก 12 สัปดาห์ มาต้มให้เดือดนาน 30 นาที บรรจุใส่ขวดแก้ว เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 สัปดาห์ นาน 6 สัปดาห์ เพื่อทำการวิเคราะห์

2.3.1 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.6.2

2.3.2 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.4.1

2.3.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส แบบ Ranking for preference

วิธีการเช่นเดียวกับตอนที่ 1 ข้อ 3.6.6

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ