บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

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 ตู้อบสุญญากาศ (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-เบส (Metrohm 744 , Switzerland)

3.12 เครื่องผสม (Vortex : Genie 2 ™ G-560E, U.S.A)

3.13 เครื่องชั่งขนาด 1 กิโลกรัม (Kitchen scale, Thailand)

3.14 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartoriius LA 230S, Germany)

3.15 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartoriius BP 610, Germany)

3.16 เทอร์โมคัปเปิล (Thermocouple: Yokogawa 2544 model, Japan)

3.17 หม้อนึ่งความดันไอชนิดใช้ไฟฟ้า (Hirayama HV 50. Japan)

3.18 หม้อนึ่งความดันไอ (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 กระบอกตวงขนาด 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 (วิทยาศรม)

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

1. ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสปอร์ของ *A. oryzae*

1.1 นำรำข้าวและข้าวเจ้าอย่างละ 20 กรัม ใส่ในฟลาส์ก ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงบนข้าวแล้วคลุกผสมให้ทั่วถึง อุดคอขวดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงใส่สปอร์ซัสเพนชัน (spores suspension) ของเชื้อ *A. oryzae* 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 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผงสปอร์ที่ได้ไปวิเคราะห์

1.1.1 ปริมาณสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
โดยการใช้ Counting Chamber (Neubauer)

1.1.2 ปริมาณสปอร์ที่รอดชีวิต (AOAC, 2005)
โดยวิธี spread plate บนอาหาร DRBC

2. การเตรียมโคจิข้าวเหนียว

2.1 ระยะเวลาในการนึ่งข้าวเหนียวที่มีผลต่อสมบัติโคจิ

ชั่งข้าวเหนียวหนัก 500 กรัม แช่น้ำประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปนึ่งให้สุกนาน 20 30 40 และ 50 นาที ล้างข้าวเหนียวและทิ้งให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที รอจนข้าวเหนียวมีอุณหภูมิลดลง แล้วจึงเติมแป้งข้าวเจ้า ปริมาณร้อยละ 3 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักข้าวเหนียวแห้ง ซึ่งในแป้งมีผงสปอร์ของรา *A. oryzae* ผสมอยู่ร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ถ่ายข้าวเหนียวลงในตะกร้าพลาสติกชนิดโปร่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 28 เซนติเมตร และมีผ้าขาวบางกรุอยู่ด้านใน โดยปรับให้กองข้าวเหนียวมีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร และปิดคลุมผิวหน้าด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง ดังนี้คือ

2.1.1 วัดอุณหภูมิของโคจิจำนวน 3 แห่ง ด้วยเทอร์โมคัปเปิล

2.1.2 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

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

2.1.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

ชั่งตัวอย่างหนัก 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำของผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำของเหลวที่เป็นส่วนใสปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันปิดปากหลอดแล้วนำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ที่ความยาวช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร

2.1.4 ค่ากิจกรรมอะไมเลส (S. Nahar *et al.*, 2008)

ชั่งตัวอย่างหนัก 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 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

2.1.5 ค่ากิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 และ Folin, 1929)

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 50 มิลลิโมล Potassuim 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 แยกของเหลวที่เป็นส่วนใสปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่สารละลาย Na_2CO_3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย Folin ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้า

กันนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานที่ใช้ไทโรซีนเป็นค่าอ้างอิง

2.2 ความหนาของข้าวเหนียวที่มีผลต่อสมบัติโคจิ

ชั่งข้าวเหนียวหนัก 800 1100 และ 1400 กรัม แช่น้ำประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำไปนึ่งตามเวลาที่เหมาะสมในข้อ 2.1 ล้างข้าวเหนียวและทิ้งให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที รอจนข้าวเหนียวมีอุณหภูมิลดลง แล้วจึงเติมแป้งข้าวเจ้า ปริมาณร้อยละ 3 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของน้ำหนักข้าวเหนียวแห้ง ซึ่งในแป้งมีผงสปอร์ของรา *A. oryzae* ผสมอยู่ร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ถ่ายข้าวเหนียวลงในตะกร้าพลาสติกชนิดโปร่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 28 เซนติเมตร และมีผ้าขาวบางกรุอยู่ด้านใน โดยปรับให้ชั้นข้าวเหนียวมีความหนาประมาณ 5 7 และ 9 เซนติเมตร และปิดคลุมผิวหน้าด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ดังนี้คือ

2.2.1 วัดอุณหภูมิของโคจิ จำนวน 3 แห่งด้วยเทอร์โมคัปเปิล

2.2.2 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2

2.2.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

2.2.4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (S. Nahar *et al.*, 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.5

2.2.5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส (Anson, 1938 และ Folin, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.6

3. การหมักโมโรมิ

3.1 ปริมาณโคจิข้าวเหนียวที่เหมาะสมต่อการหมักโมโรมิ

ชั่งโคจิข้าวเหนียวที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดจากข้อ 2 ผสมกับถั่วเหลืองต้มสุกในปริมาณร้อยละ 30 40 และ 50 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ในถังพลาสติกขนาด 14 ลิตร เติมน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 18 ในอัตราส่วน โคจิและถั่วเหลือง:น้ำเกลือ เท่ากับ 2:1 คลุกให้ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดฝาถังตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 สัปดาห์ โดยทำการคนเต้าเจี้ยวทุกวันใน 2 สัปดาห์แรก และคนวันเว้นวันในสัปดาห์ถัดไปจนสิ้นอายุการหมัก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สุ่มเก็บตัวอย่างเต้าเจี้ยวทุก ๆ สัปดาห์เพื่อทำการวิเคราะห์

3.1.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.

3.1.2 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (ดัดแปลงจาก Mohr, 1999)

ชั่งตัวอย่างในส่วนที่เป็นของเหลว 1 มิลลิลิตรใส่ลงมนขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำของเหลวส่วนใสมาปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย K_2CrO_4 เข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไตเตรทกับสารละลาย $AgNO_3$ (0.1 N) จนถึงจุดยุติ โดยสังเกตจากตะกอนสีแดงอิฐ คำนวณร้อยละของโซเดียมคลอไรด์

3.1.3 วิเคราะห์หาปริมาณกรดด้วยวิธีการ Titration (AOAC, 1995)

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร กวนผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำของเหลวส่วนใสมา ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอฟทาลีนประมาณ 3 หยด ไตรเตรทกับสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 N จนถึงจุดยุติ โดยสังเกตจากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู คำนวณหาปริมาณกรดในรูปของกรดแลคติก

3.1.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

3.1.5 ค่ากิจกรรมอะไมเลส (S. Nahar *et al.*, 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.5

3.1.6 ค่ากิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 และ Folin, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.6

3.1.7 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (โดยวิธี photometric ninhydrin)

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอทธานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำของผสมทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารสกัดที่เป็นส่วนใส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายนินไฮดริน (ninhydrin colour reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแล้วผสมให้เข้ากัน นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทิ้งให้เย็นต่อจากนั้นเติมสารละลาย stabilizing solvent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานที่ใช้ไกลซีนเป็นค่าอ้างอิง

3.1.8 ปริมาณอัลกอฮอล์ (Amerine and Ough, 1974; AOAC, 1990)

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ

กลั่นในขวดปรับปริมาตร ถ่ายตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วก้นกลมของชุดกลั่น เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วทำการกลั่นที่อุณหภูมิ80-85 องศาเซลเซียส เก็บของเหลวที่กลั่นได้ให้มีปริมาตร 40 มิลลิลิตร ในขวดแก้วรูปชมพูขนาด 125 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสก์ด้วยจุกยาง แล้วนำไปวางไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำตัวอย่างมาใส่สารละลาย 1,10-ฟีแนนโทรลีนเฟอรร์รัสซัลเฟต 1 มิลลิลิตร ไตเตรทด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตจนถึงจุดยุติ โดยสังเกตจากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว แล้วหยดสารละลาย 1,10-ฟีแนนโทรลีนเฟอรร์รัสซัลเฟตอีก 3 หยด ไตเตรทต่อจนถึงจุดยุติโดยสังเกตจากสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียว เป็นสีน้ำตาลม่วง แล้วคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์

3.1.9 ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) (AOAC, 2005)

ทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรม จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการ spread plate บนอาหาร DRBC

3.1.10 ปริมาณแลคติค โดยวิธี (AOAC, 1995)

ทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรม จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการ pour plate บนอาหาร GYP

3.1.11 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

นำตัวอย่างไปวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดค่าสี

3.1.12 การทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Ranking for preference

3.2 ความเข้มข้นน้ำเกลือที่เหมาะสมต่อการหมักโมโรมิ

เตรียมโคจิข้าวเหนียวที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดจากข้อ 2 มาผสมกับถั่วเหลืองต้มสุก ในอัตราส่วนที่ให้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดจากข้อ 1.1 ในถังพลาสติกขนาด 14 ลิตร เติมน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 13 และ 16 ในอัตราส่วนโคจิและถั่วเหลืองต้มสุก:น้ำเกลือ เท่ากับ 2:1 คลุกให้ผสมให้เข้ากัน แล้วปิดฝาถังตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 สัปดาห์ โดยทำการคนเต้าเจี้ยวทุกวันใน 2 สัปดาห์แรก และคนวันเว้นวันในสัปดาห์ถัดไปจนสิ้นอายุการหมัก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สุ่มเก็บตัวอย่างเต้าเจี้ยวทุก ๆ สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์

3.2.1 ค่าความเป็นกรด-เบส (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.2

3.2.2 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (ดัดแปลงจาก Mohr, 1999)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.1.2

3.2.3 วิเคราะห์หาปริมาณกรดด้วยวิธีการ Titration (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.1.3

3.2.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.4

3.2.5 ค่ากิจกรรมอะไมเลส (S. Nahar *et al.*, 2008)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.5

3.2.6 ค่ากิจกรรมโปรตีเอส (Anson, 1938 และ Folin, 1929)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1.6

3.2.7 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด โดยวิธี photometric ninhydrin

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.7

3.2.8 ปริมาณอัลกอฮอล์ (Amerine and Ough, 1974; AOAC, 1990)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.8

3.2.9 ปริมาณยีสต์และรา (Yeast and Mold) (AOAC, 2005)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.9

3.2.10 ปริมาณแบคทีเรียแลคติค โดยวิธี (AOAC, 1995)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.10

3.2.11 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.11

3.3 ผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว

นำเต้าเจี้ยวที่มีครบอายุการหมัก 12 สัปดาห์ มาต้มให้เดือดนาน 30 นาที บรรจุใส่ขวดแก้ว เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 สัปดาห์ นาน 6 สัปดาห์ เพื่อทำการวิเคราะห์

3.3.1 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (AOAC, 1995) ทำการเจือจางตัวอย่างแบบอนุกรมจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการ pour plate บนอาหาร PCA

3.3.2 ค่าสี (colorimeter: tri-stimulus colorimeter)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.11

3.3.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส แบบ Ranking for preference

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือสัปดาห์ที่ 6 วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.12