บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

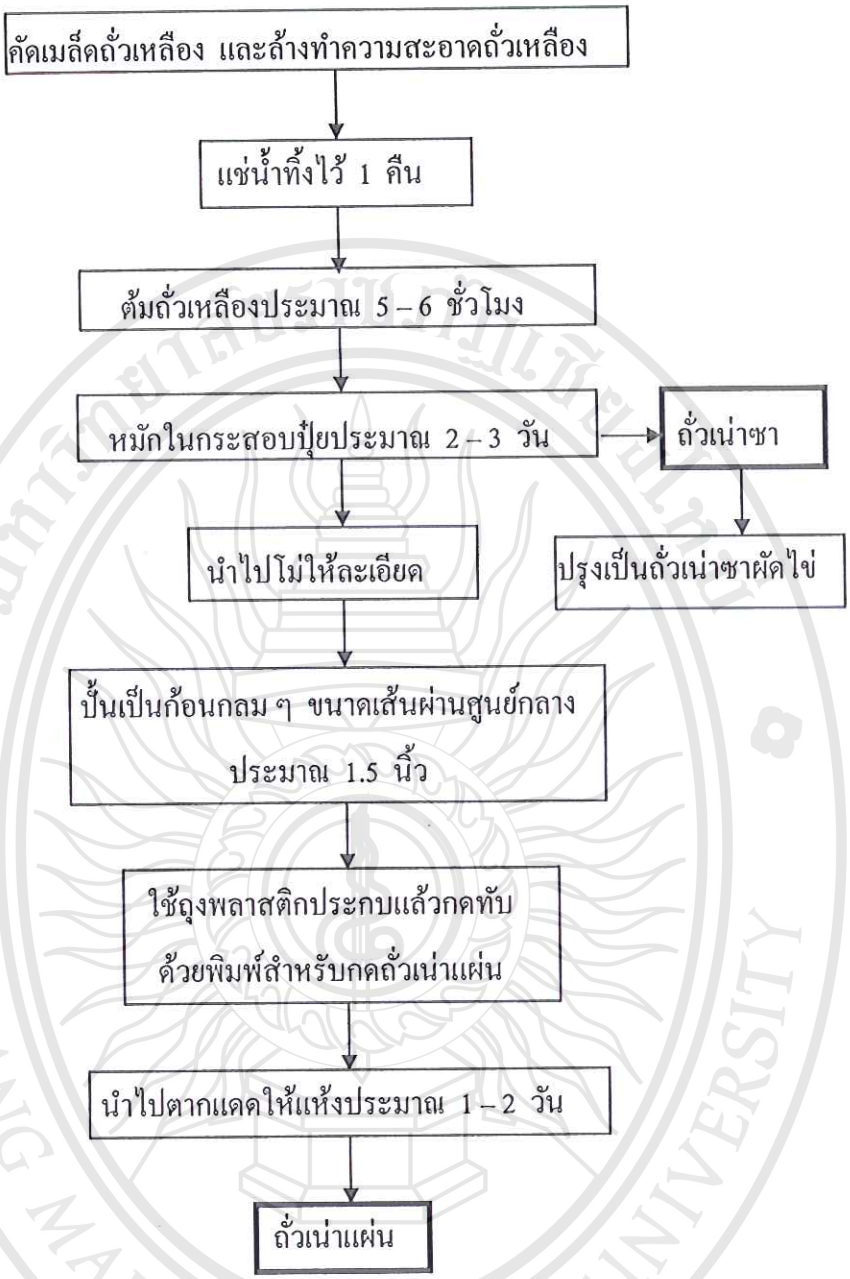
การศึกษากรรมวิธีในการผลิต การบริโภคถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน คือ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดลำพูน จังหวัดลำปาง จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดแพร่ จังหวัดน่าน และจังหวัดพะเยา ตั้งแต่เดือนสิงหาคม-กันยายน พ.ศ. 2554 โดยใช้วิธีการลงพื้นที่ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่น และสัมภาษณ์ตัวแทนกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่าแผ่นในเขตพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน โดยเลือกศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่น และสัมภาษณ์ตัวแทนกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่าแผ่น 1 อำเภอต่อ 1 จังหวัด ได้แก่ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย อำเภอเชียงม่วน จังหวัดพะเยา อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน อำเภอนาน้อย จังหวัดน่าน อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ และอำเภอลี้ จังหวัดลำพูน จากนั้นจึงได้เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นในเขตพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน โดยเลือกเก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นมา 3 แหล่งจาก 3 อำเภอของแต่ละจังหวัดมาทดลองแยกเชื้อ หลังจากจัดกลุ่มเชื้อแล้วจึงได้ทดสอบกระบวนการหมักของเชื้อแต่ละกลุ่ม ซึ่งได้ทดลองหมักทั้งเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม และในระหว่างการหมักก็ได้มีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น การวัดการเปลี่ยนแปลงค่า pH ระหว่างการหมัก การวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสทั้งโดยวิธี disk diffusion method และ วิธี Azocasein เพื่อที่จะคัดเลือกเชื้อที่มีกระบวนการหมักดีที่สุดมาหมักเป็นถั่วเน่าแผ่นเพื่อควบคุมคุณภาพในการผลิตถั่วเน่าแผ่นให้สม่ำเสมอ และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค จากนั้นจึงได้นำถั่วเน่าแผ่นที่ทำขึ้นในห้องปฏิบัติการมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ 2 รูปแบบ คือ ถั่วเน่าผงบรรจุขวด และน้ำพริกถั่วเน่าทรงเครื่อง โดยการนำถั่วเน่าแผ่นมาย่างไฟให้หอมจนสีของถั่วเน่าแผ่นเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทองมาโขลกให้ละเอียด บรรจุลงในขวดที่ปราศจากความชื้น ก็จะได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของถั่วเน่าผงบรรจุขวด สำหรับน้ำพริกถั่วเน่าทรงเครื่อง มีส่วนประกอบ คือ ถั่วเน่าแผ่นเป็นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ทอดให้สุก 200 กรัม กระเทียมเจียว 100 กรัม หอมแดงเจียว 100 กรัม พริกป่น 30 กรัม และกุ้งแห้งทอด 100 กรัม คลุกเคล้าส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน บรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ที่ปราศจากความชื้น ก็จะได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของน้ำพริกถั่วเน่าทรงเครื่อง จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าแผ่นทั้ง 2 รูปแบบมาตรวจสอบความชอบโดยรวมของผู้บริโภคต่อไป

ตอนที่ 1 ศึกษากรรมวิธีการผลิตถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน

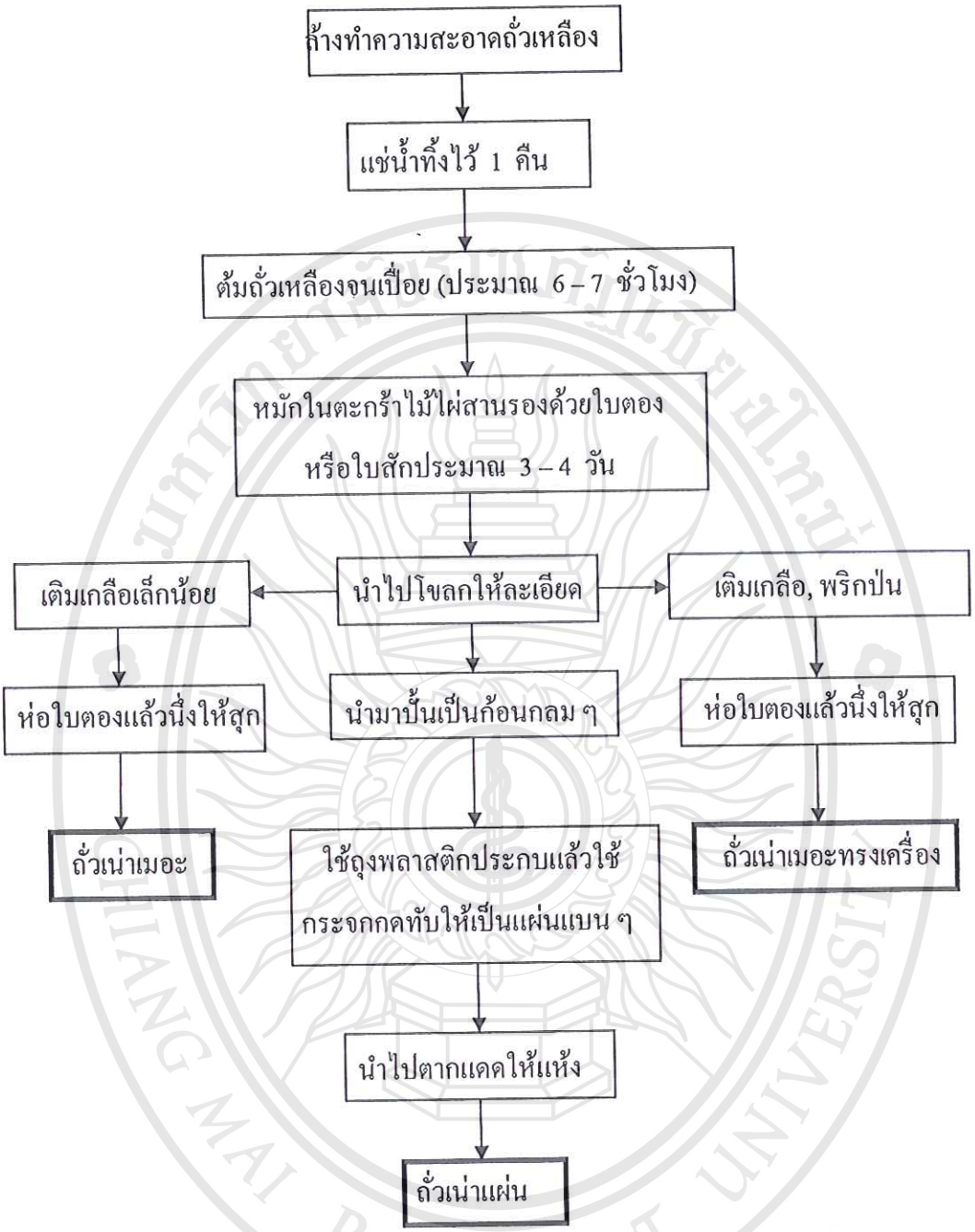
จากการศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่น ในเขตพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน และการสัมภาษณ์กลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่าแผ่นผลจากการลงพื้นที่ พบว่าใช้วิธีการหมักถั่วเน่าโดยวิธีธรรมชาติ คือปล่อยให้เชื้อขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยทั่วไปกรรมวิธีในการผลิตและการบริโภคถั่วเน่าในพื้นที่ต่าง ๆ มีความแตกต่างกันออกไปบ้างขึ้นอยู่กับภูมิปัญญาในท้องถิ่นของแต่ละจังหวัด ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 - 4.8 จากการลงพื้นที่ศึกษาพบว่ากลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่าแผ่นในเขตพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบนส่วนมากจะใช้ถั่วเหลืองสำหรับการหมักถั่วเน่า จะมีเพียงผู้ผลิตถั่วเน่าแผ่นในอำเภอเชียงม่วน จังหวัดพะเยาเท่านั้นที่ใช้ถั่วลิสงหมักถั่วเน่าแทนถั่วเหลือง โดยตัวแทนกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่าแผ่นอำเภอเชียงม่วนให้เหตุผลว่าการนำถั่วลิสงมาหมักเป็นถั่วเน่าจะให้รสชาติ และกลิ่นของถั่วเน่าที่ดีกว่าถั่วเน่าที่ทำจากถั่วเหลือง ซึ่งในแง่คุณค่าทางโภชนาการจะพบว่าในถั่วเหลืองจะมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม วิตามินบี 1 และ วิตามินบี 2 ที่สูงกว่าถั่วลิสง แต่ในถั่วลิสงจะมีพลังงาน ไขมัน และเหล็กสูงกว่าถั่วเหลือง กลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่าแผ่นในบางจังหวัดอาจใช้ถั่วเหลืองล้วนสำหรับการหมักถั่วเน่าและไม่ใส่สารเพิ่มรสชาติอย่างอื่น ในขณะที่กลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่าแผ่นในบางจังหวัดจะมีการเติมพริก ข่า และกระเทียมเพื่อเป็นการเพิ่มรสชาติถั่วเน่า ซึ่งทำให้ถั่วเน่าแผ่นของแต่ละจังหวัดในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบนมีลักษณะของแผ่นถั่วเน่า สี และรสชาติที่แตกต่างกันออกไปดังตารางที่ 4.2 สำหรับพฤติกรรมการกินถั่วเน่าของประชาชนในเขตพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบนนั้นสามารถนำถั่วเน่ามากินได้หลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นการนำถั่วเน่าที่เป็นเมล็ดที่ผ่านการหมักแล้ว หรือที่ชาวบ้านเรียกกันว่าถั่วเน่าเซานำมาผัดกับไข่ การนำถั่วเน่าที่ผ่านการหมักแล้วมาห่อใบตองแล้วนำไปนึ่งหรือย่างไฟ ชาวบ้านจะเรียกกันว่าถั่วเน่าเมอะ ซึ่งมีทั้งถั่วเน่าเมอะแบบธรรมดาและถั่วเน่าเมอะทรงเครื่อง วิธีการกินคือใช้จิ้มกินกับข้าวเหนียว และสุดท้ายคือถั่วเน่าแผ่นหรือที่ชาวบ้านเรียกกันว่าถั่วเน่าแค็ป สามารถนำมาย่างไฟกินกับข้าวเหนียวได้ทันทีหรืออาจนำมาย่างไฟแล้วโขลกให้เป็นผงเก็บไว้สำหรับใช้ปรุงรสอาหารชนิดอื่นก็ได้

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบกรรมวิธีการผลิตถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน

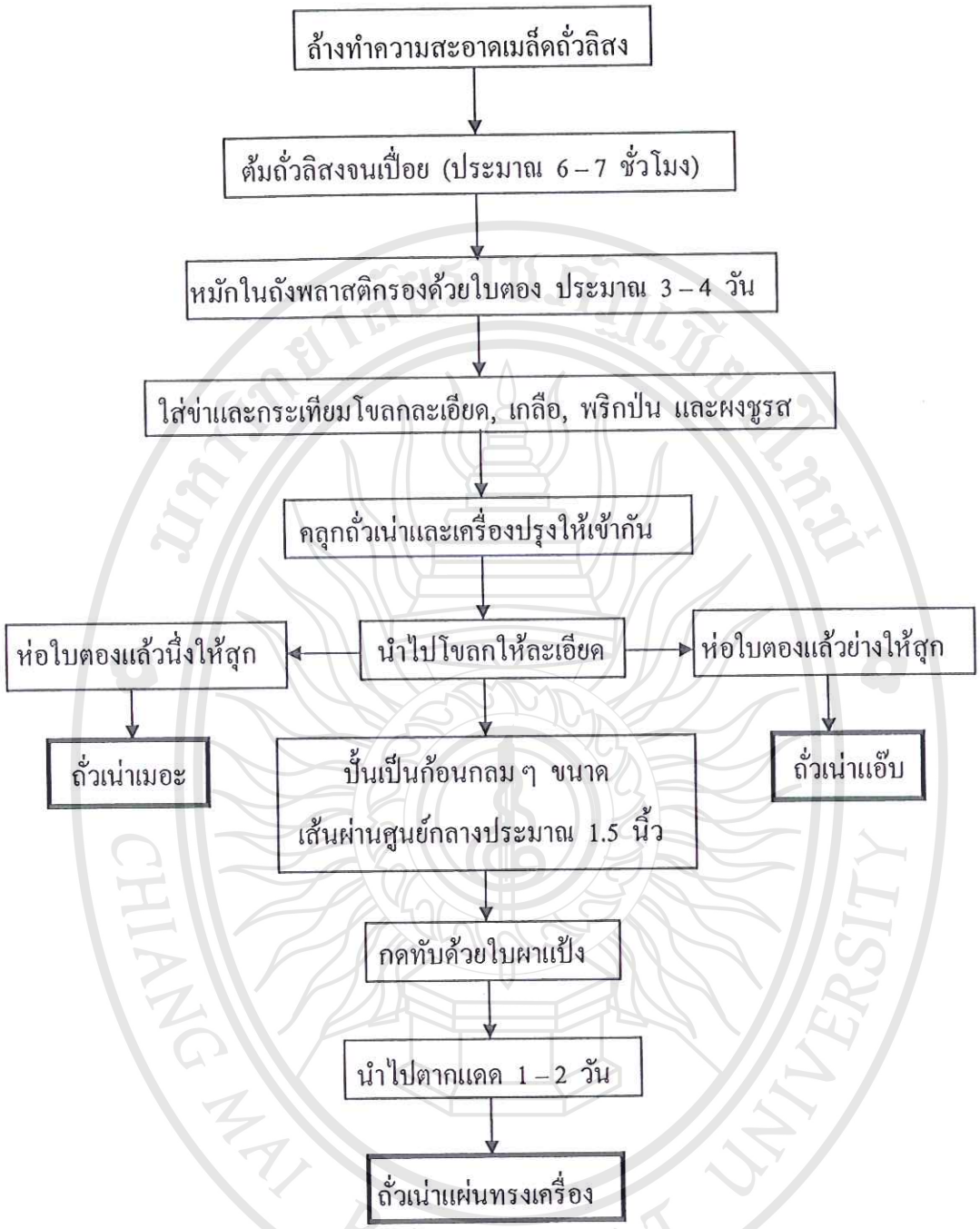
จังหวัด / ข้อมูลเปรียบเทียบ	เชียงใหม่	เชียงราย	พะเยา	ลำปาง	แม่ฮ่องสอน	น่าน	แพร่	ลำพูน
ถั่วที่ใช้ในการทำถั่วเน่า	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	ถั่วลิสง	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง
ระยะเวลาในการแช่ถั่ว	1 คืน	1 คืน	ไม่แช่	3 – 4 ชั่วโมง	1 คืน	1 คืน	1 คืน	1 คืน
ระยะเวลาในการต้มถั่ว	5 – 6 ชั่วโมง	6 – 7 ชั่วโมง	6 – 7 ชั่วโมง	5 – 6 ชั่วโมง	3 – 4 ชั่วโมง	6 – 7 ชั่วโมง	4 – 6 ชั่วโมง	5 – 6 ชั่วโมง
ภาชนะที่ใช้ในการหมักถั่วเน่า, ระยะเวลาในการหมัก	หมักในกระสอบปุ๋ย 2-3 วัน	หมักในตะกร้าไม้ไผ่สาน 3 – 4 วัน	หมักในถังพลาสติก 3 – 4 วัน	หมักในตะกร้าไม้ไผ่สาน 2 – 4 วัน	หมักในตะกร้าไม้ไผ่สาน 3 – 4 วัน	หมักในตะกร้าไม้ไผ่สาน 3 – 4 วัน	หมักในตะกร้าไม้ไผ่สาน 3 – 4 วัน	หมักในตะกร้าพลาสติกสาน 3 - 4 วัน
การปรุงรสเพิ่มเติม	ไม่ปรุงรส	เติมเกลือ พริกป่น	ใส่ข่าแลกระเทียม เกลือ พริกป่น และผงชูรส	เติมเกลือ พริกป่น	เติมเกลือ พริกขี้หนู ข่า ตะไคร้	เติมเกลือแกง พริกแห้ง และหอมแดง	เติมพริก เกลือ	ใส่พริกป่น เกลือ และข่าโขลกละเอียด
การขึ้นรูปเป็นแผ่น	กดทับด้วยพิมพ์สำหรับกดถั่วเน่าแผ่น	ใช้กระจกกดทับให้เป็นแผ่น	กดทับด้วยใบผาแป้ง	ใช้ขวดแก้วหรือแก้วน้ำกลิ้งทับให้เป็นแผ่น	ใช้ไม้กดทับให้เป็นแผ่น	กดทับด้วยใบผาแป้ง	ใช้ไม้กดทับให้เป็นแผ่น	กดทับด้วยใบทองกวาว
การทำแห้งถั่วเน่าแผ่น	ตากแดดประมาณ 1 – 2 วัน	ตากแดดประมาณ 1 – 2 วัน	ตากแดดประมาณ 1 – 2 วัน	ตากแดดประมาณ 1 – 2 วัน	ตากแดดประมาณ 2 – 3 วัน	ตากแดดประมาณ 1 – 2 วัน	ตากแดดประมาณ 1 – 2 วัน	ตากแดดประมาณ 1 – 2 วัน
รูปแบบของถั่วเน่า	ถั่วเน่าซา ถั่วเน่าแผ่น	ถั่วเน่าเมอะ ถั่วเน่าเมอะทรงเครื่อง ถั่วเน่าแผ่น	ถั่วเน่าเมอะ ถั่วเน่าแอ๊บ ถั่วเน่าแผ่น	ถั่วเน่าเมอะ ถั่วเน่าเมอะทรงเครื่อง ถั่วเน่าแผ่น	ถั่วเน่าห่อ ถั่วเน่าทรงเครื่อง ถั่วเน่าแผ่น	ถั่วเน่าเมอะทรงเครื่อง ถั่วเน่าแผ่นทรงเครื่อง	ถั่วเน่าแอ๊บ ถั่วเน่าแผ่น	ถั่วเน่าเมอะ ถั่วเน่าแผ่นทรงเครื่อง



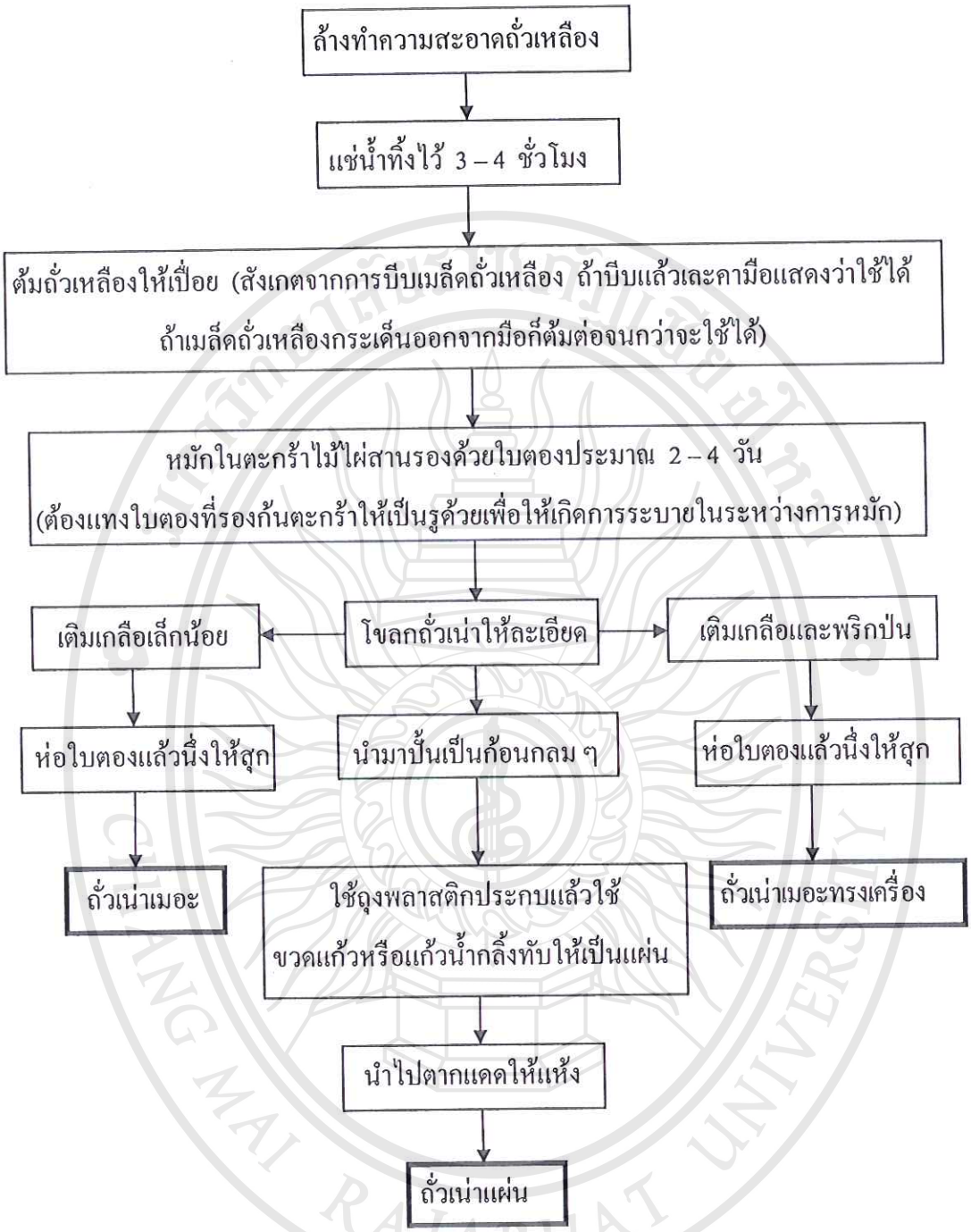
ภาพที่ 4.1 กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าของกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่า อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่



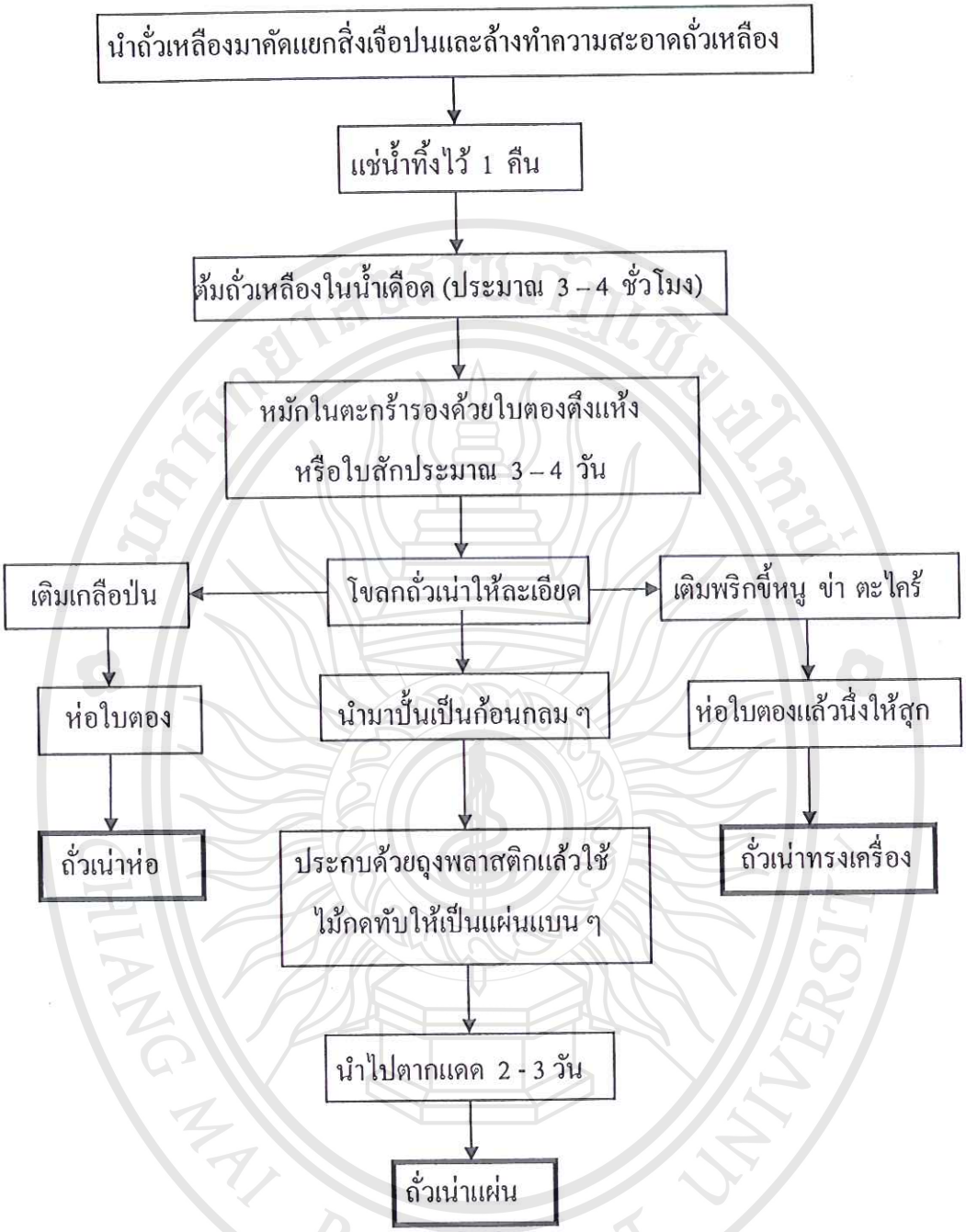
ภาพที่ 4.2 กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าของกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่า อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย



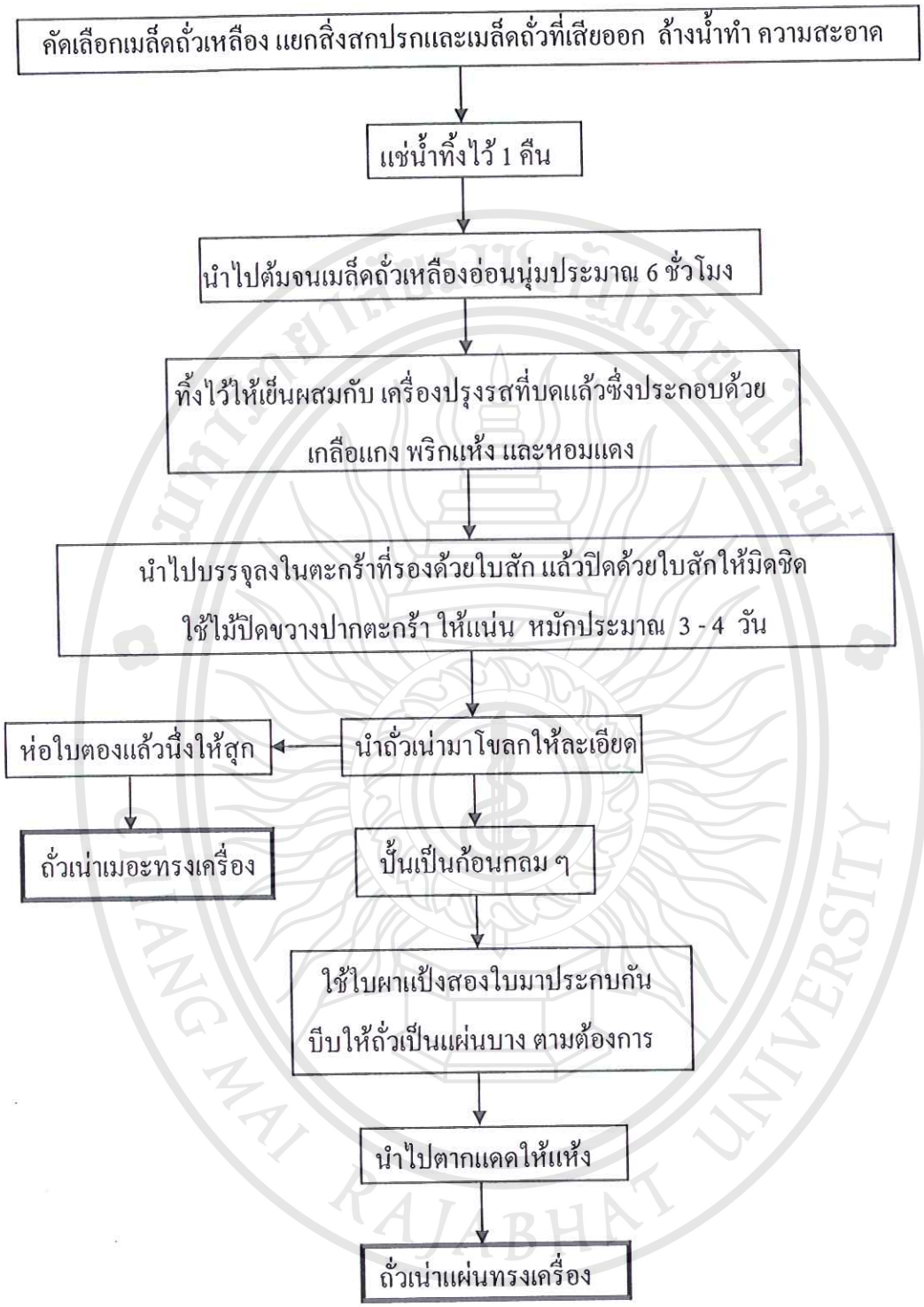
ภาพที่ 4.3 กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าของกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่า อำเภอเชียงม่วน จังหวัดพะเยา



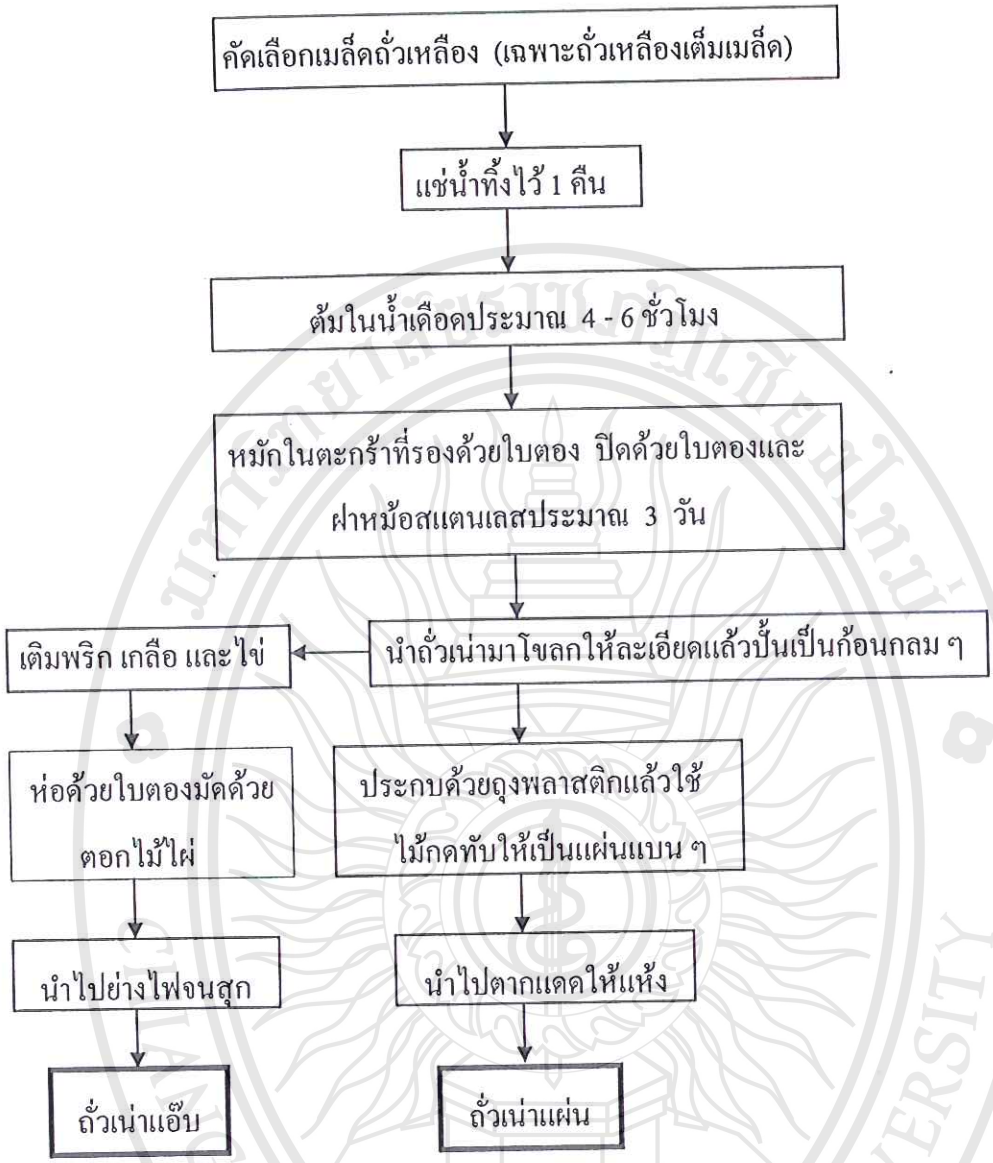
ภาพที่ 4.4 กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าของกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่า อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง



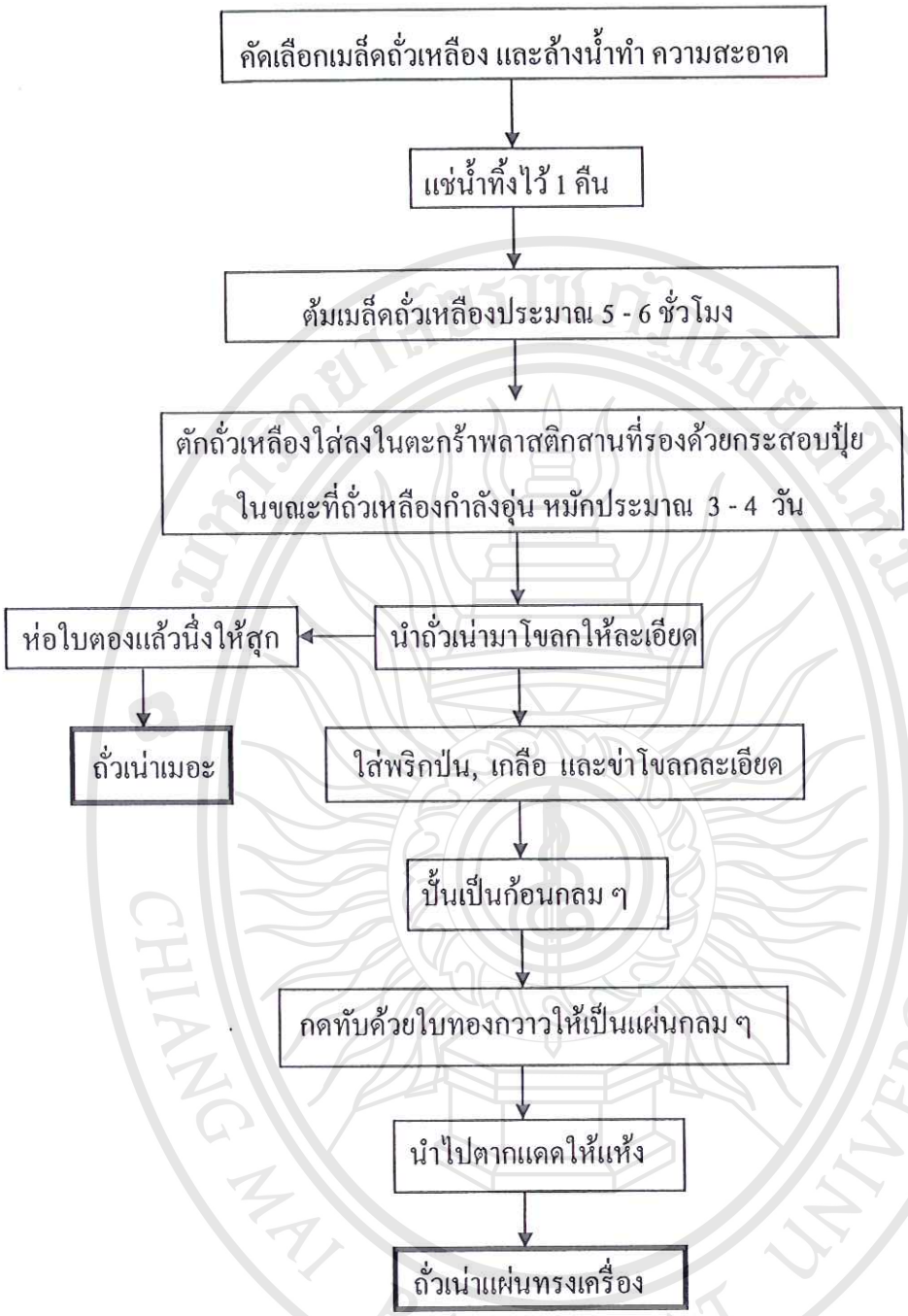
ภาพที่ 4.5 กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าของกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่า อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน



ภาพที่ 4.6 กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าของกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่า อำเภอนาน้อย จังหวัดน่าน

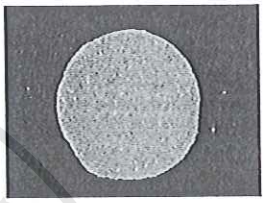
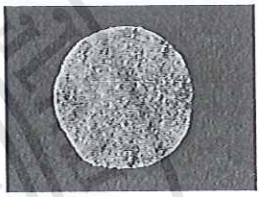
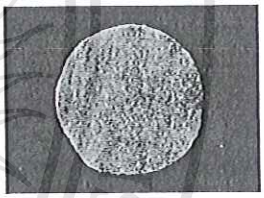
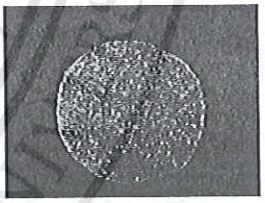
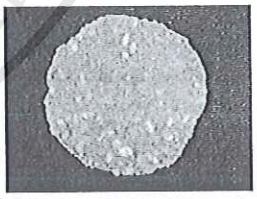
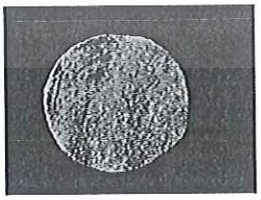
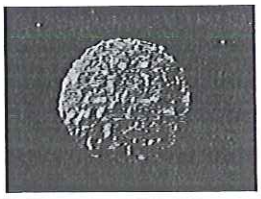


ภาพที่ 4.7 กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าของกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่า อำเภอเมือง จังหวัดแพร่



ภาพที่ 4.8 กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าของกลุ่มผู้ผลิตถั่วเน่า อำเภอลี้ จังหวัดลำพูน

ตาราง 4.2 เปรียบเทียบลักษณะแผ่นและสีของถั่วเน่าแผ่นในเขตพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน

แหล่งที่มาของถั่วเน่า	ลักษณะสี	ลักษณะกลิ่น	ลักษณะแผ่นของถั่วเน่า	รูปภาพของถั่วเน่าแต่ละแหล่ง
1. อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่	สีน้ำตาลทอง	กลิ่นหอมอ่อน ๆ	เป็นแผ่นกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ซม. เนื้อถั่วเน่าละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน	
2. อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย	สีน้ำตาลทองอ่อน	กลิ่นหอมอ่อน ๆ	เป็นแผ่นกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 ซม. เนื้อถั่วเน่าค่อนข้างเนียนละเอียด	
3. อำเภอเชียงม่วน จังหวัดพะเยา	สีน้ำตาลเข้ม	กลิ่นหอม	เป็นแผ่นกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 ซม. เนื้อถั่วเน่าไม่ค่อยละเอียด	
4. อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง	สีน้ำตาลอ่อน	กลิ่นหอมฉุน	เป็นแผ่นกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ซม. เนื้อถั่วเน่าละเอียด	
5. อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน	สีน้ำตาลเข้ม	กลิ่นหอมฉุน	เป็นแผ่นกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 ซม. เนื้อถั่วเน่าค่อนข้างละเอียด	
6. อำเภอนาน้อย จังหวัดน่าน	สีน้ำตาลทองเข้มจัด	กลิ่นหอมอ่อน ๆ	เป็นแผ่นกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 ซม. เนื้อถั่วเน่าไม่ค่อยละเอียด	
7. อำเภอเมือง จังหวัดแพร่	สีน้ำตาลทองเข้ม	กลิ่นหอมอ่อน ๆ	เป็นแผ่นกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ซม. เนื้อถั่วเน่าค่อนข้างละเอียด	
8. อำเภอลี้ จังหวัดลำพูน	สีน้ำตาลเข้มจัด	กลิ่นค่อนข้างฉุน	เป็นแผ่นกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ซม. เนื้อถั่วเน่าค่อนข้างหยาบ	

ตอนที่ 2 การแยกเชื้อและคัดเลือกแบคทีเรียจากถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน

จากการเก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นในเขตพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบนมาแยกเชื้อสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 261 ไอโซเลต ดังตาราง 4.3 เมื่อนำโคโลนีที่เลี้ยงบน nutrient agar slant มาตรวจสอบโดยการย้อมสีแกรม แล้วตรวจดูลักษณะรูปร่างของเซลล์และการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นรูปท่อนย้อมติดสีแกรมบวก เมื่อนำแบคทีเรียมาจำแนกกลุ่มสามารถแยกได้เป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 (I1) จะมีลักษณะรูปแท่งไม่มีเอนโดสปอร์ย้อมติดสีแกรมบวก กลุ่มที่ 2 (I2) มีลักษณะรูปแท่งมีเอนโดสปอร์ย้อมติดสีแกรมบวก กลุ่มที่ 3 (I3) มีลักษณะเป็นรูปแท่งเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย ย้อมติดสีแกรมบวก และกลุ่มที่ 4 (I4) มีลักษณะเป็นรูปแท่งอ้วนสั้นคล้ายรูปไข่ (oval shaped) ย้อมติดสีแกรมบวก ดังตาราง 4.4 และภาพภาคผนวก ง โดยลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่าแผ่นในเขตพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบนทั้ง 4 กลุ่มมีลักษณะที่คล้ายกับเชื้อ *Bacillus* โดยเชื้อกลุ่ม I1 I2 และ I3 เป็นรูปแท่ง (rod shaped) ส่วนเชื้อกลุ่ม I4 จะเป็นรูปแท่งอ้วนสั้น (Cocco-bacilli) ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน ย้อมติดสีแกรมบวก เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์

ตารางที่ 4.3 แบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่าแต่ละจังหวัดจำนวน 261 ไอโซเลต

กลุ่มเชื้อที่พบ (จำนวนไอโซเลต) / จังหวัด	I1	I2	I3	I4	รวม
เชียงใหม่	13	18	4	6	41
เชียงราย	10	15	3	4	32
พะเยา	9	16	0	5	30
ลำปาง	11	13	0	4	28
แม่ฮ่องสอน	12	21	3	4	40
น่าน	10	17	0	5	32
แพร่	11	14	0	5	30
ลำพูน	11	12	2	3	28
รวม	87	126	12	36	261

ตารางที่ 4.4 ลักษณะของเซลล์และการติดสีแกรมของแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่า 261 ไอโซเลต

ลักษณะของเซลล์แบคทีเรียและการติดสีแกรม	จำนวนไอโซเลต
รูปแท่งไม่มีเอนโดสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก	87
รูปแท่งมีเอนโดสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก	126
รูปแท่งเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย ย้อมติดสีแกรมบวก	12
รูปรูปแท่งอ้วนสั้นย้อมติดสีแกรมบวก	36

2.1 การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นที่จะใช้หมักถั่วเน่า

หลังจากที่ได้นำเชื้อทั้ง 4 กลุ่มคือเชื้อ I1 I2 I3 และ I4 มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 12 24 และ 36 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเชื้อที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว YM ทุก ๆ 12 ชั่วโมงมา spread plat และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นจึงนำมานับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องมือนับโคโลนี พบว่าชั่วโมงที่ 24 มีการเจริญของเซลล์แบคทีเรียที่น่าพึงพอใจที่สุดโดยให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU/ml จึงได้นำเชื้อทั้ง 4 กลุ่มคือเชื้อ I1, I2, I3 และ I4 มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมา spread plat และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวน colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องมือนับ colony พบว่าแต่ละเชื้อมีอัตราการเจริญบนอาหารแข็งที่แตกต่างกันดังตารางที่ 4.5 โดยเชื้อ I1 มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 85×10^8 เชื้อ I2 มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 51×10^8 เชื้อ I3 มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 75×10^8 และเชื้อ I4 มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 206×10^8 ดังตารางที่ 4.2 จากนั้นจึงทำการเทียบอัตราส่วนของเชื้อทุกเชื้อให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 1×10^8 เพื่อที่จะได้นำเอาเชื้อดังกล่าวไปใช้ในการทดสอบหมักถั่วเน่าโดยการใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ต่อไป

ตารางที่ 4.5 จำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

กลุ่มเชื้อ	จำนวนเซลล์เริ่มต้น (CFU/ml)
I1	85×10^8
I2	51×10^8
I3	75×10^8
I4	206×10^8

2.2 การทดสอบหมักถั่วเน่าโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์

ในการทดสอบหมักถั่วเน่าโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์ในครั้งนี้ได้ทดลองหมักทั้งแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม โดยนำเชื้อทั้ง 4 กลุ่มที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 10^8 CFU/ml มาทดสอบหมักถั่วเน่าโดยใช้เชื้อเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมดังนี้ I1, I2, I3, I4, I1 + I2, I1 + I3, I1 + I4, I2 + I3, I2 + I4, I3 + I4, I1 + I2 + I3, I1 + I2 + I4, I2 + I3 + I4, I1 + I2 + I3 + I4 และ Control (ปล่อยให้เชื้อขึ้นเองตามธรรมชาติ) จากนั้นทดสอบหมักถั่ว 20 กรัมในขวดรูปชมพู่ แล้วใส่เชื้อบริสุทธิ์ลงไป 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง หลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องและเก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและเมื่อสังเกตลักษณะของถั่วที่เติมเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักในชั่วโมงที่ 24 ถั่วเน่าเริ่มเปื่อยยุ่ยและมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ ตามลักษณะกลิ่นเฉพาะของถั่วเน่า และเริ่มมีเส้นใยสีขาวของเชื้อมาปกคลุม ในชั่วโมงที่ 48 สังเกตได้ว่าถั่วเน่าจะมีกลิ่นหอมตามลักษณะกลิ่นเฉพาะตัวของถั่วเน่า ถั่วเน่าจะเปื่อยยุ่ยและมีเส้นใยสีขาวมาปกคลุมโดยรอบ และในชั่วโมงที่ 72 ถั่วเน่าจะเริ่มมีกลิ่นหอมฉุน เมล็ดถั่วเปื่อยยุ่ยมาก และมีน้ำสีน้ำตาลลักษณะหนืด ๆ คล้าย ๆ กับคาราเมลไหลออกมาปกคลุมโดยรอบเมล็ดถั่ว ดังภาคผนวก จ

2.3 การวัดค่า pH ระหว่างการทดสอบหมักถั่วเน่า

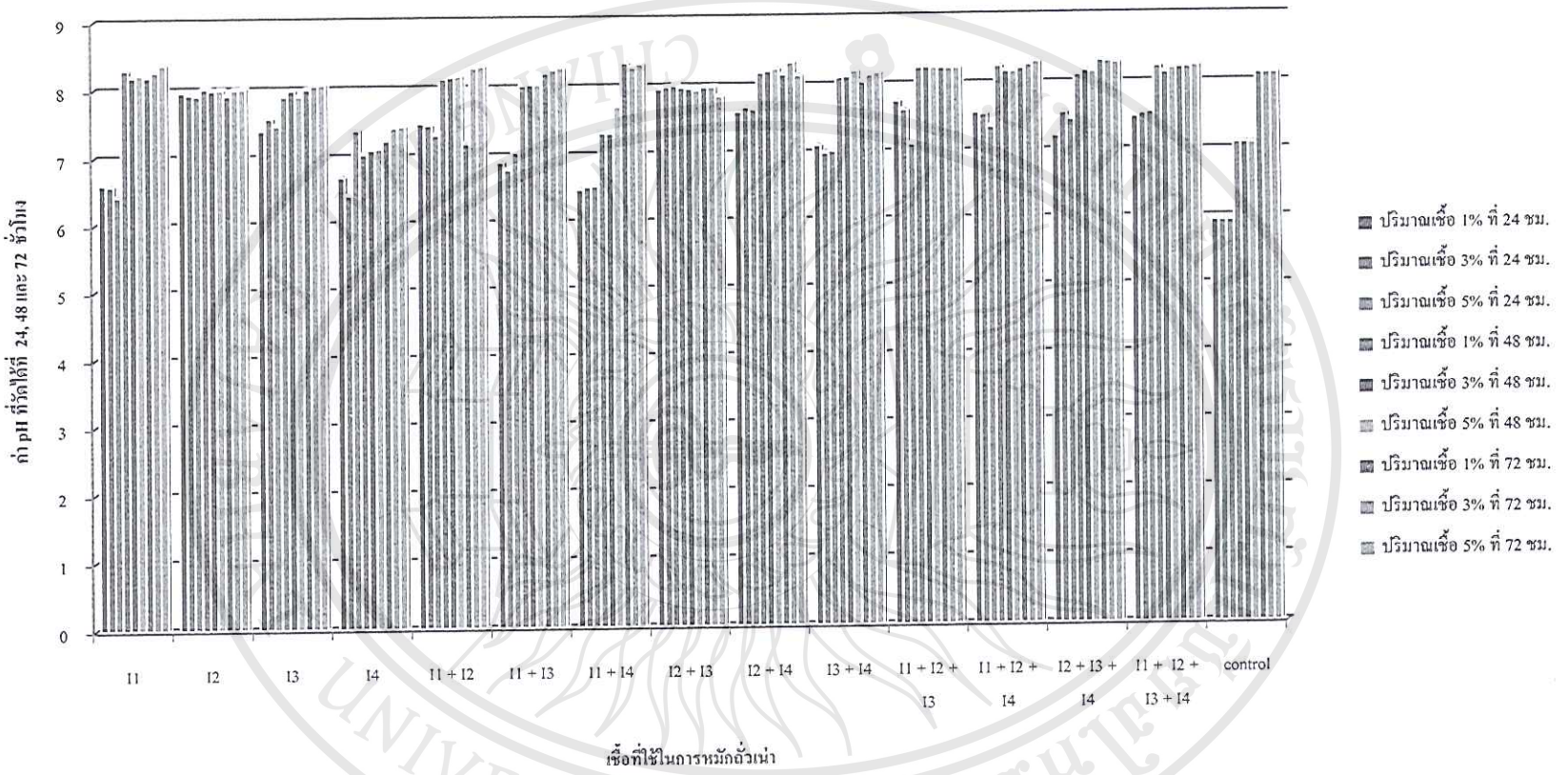
ในระหว่างการหมักถั่วเน่าเชื้อแบคทีเรียจะทำการย่อยสลายสารอาหารที่มีอยู่ในถั่วเหลือง โดยเฉพาะสารอาหารประเภทโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนและสารแอมโมเนีย ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรด – ด่าง หรือค่าพีเอช (pH) มีค่าสูงขึ้น ดังนั้นเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการนำมาหมักเป็นถั่วเน่าจะต้องมีค่า pH ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากการทดสอบหมักถั่วเน่าโดยใส่เชื้อบริสุทธิ์ลงไป 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง หลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และได้เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาวัดค่า pH พบว่ามีค่า pH อยู่ในช่วง5.96 – 8.35 ซึ่งค่า pH ของถั่วเน่าที่หมักด้วยเชื้อ I1 + I4 ที่ใส่เชื้อบริสุทธิ์ลงไป 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง และหมักที่ 72 ชั่วโมงมีค่า pH เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 8.35 และสังเกตได้ว่าค่า pH ของถั่วเน่าจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการทำงานของโปรติเอสทำให้เกิดแอมโมเนียที่เป็นด่าง เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าค่า pH ของถั่วเน่าที่หมักที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยใส่ปริมาณเชื้อที่ 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลืองมีความแตกต่างกันอย่างมนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.9 จากการวัดค่า pH ระหว่างการทดสอบหมักถั่วเน่าในครั้งนี้พบว่าเกือบทุกกลุ่มเชื้อมีค่า pH ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงได้คัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการหมักถั่วเน่าโดยการทดสอบผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยคัดเลือกจากขนาดวงใสบนอาหารแข็ง Skim milk ที่กว้างที่สุด และคัดเลือกจากคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Azocasein โดยคัดเลือกเชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดมาหมักเป็นถั่วเน่าแผ่นเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าแผ่นต่อไป

ตารางที่ 4.6 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่วัดได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 24 ชั่วโมง			ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 48 ชั่วโมง			ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 72 ชั่วโมง		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%	1%	3%	5%
I1	6.71 ± 0.01^{c}	6.59 ± 0.10^{c}	6.43 ± 0.01^{c}	8.31 ± 0.01^{i}	8.21 ± 0.01^{fgh}	8.24 ± 0.00^{g}	8.20 ± 0.02^{de}	8.28 ± 0.03^{ef}	8.31 ± 0.04^{h}
I2	7.97 ± 0.04^{i}	7.94 ± 0.00^{i}	7.92 ± 0.00^{i}	8.03 ± 0.01^{e}	8.00 ± 0.01^{cd}	8.01 ± 0.00^{de}	7.92 ± 0.02^{b}	8.01 ± 0.06^{b}	8.02 ± 0.01^{c}
I3	7.40 ± 0.08^{f}	7.58 ± 0.03^{gh}	7.47 ± 0.03^{g}	7.91 ± 0.01^{d}	7.99 ± 0.02^{cd}	7.91 ± 0.01^{c}	8.01 ± 0.04^{c}	8.07 ± 0.03^{bc}	8.08 ± 0.03^{cd}
I4	6.71 ± 0.06^{c}	6.43 ± 0.02^{b}	6.40 ± 0.01^{b}	7.05 ± 0.04^{a}	7.11 ± 0.06^{a}	7.13 ± 0.05^{a}	7.15 ± 0.0.4^{a}	7.43 ± 0.02^{a}	7.45 ± 0.06^{a}
I1 + I2	7.49 ± 0.02^{fg}	7.46 ± 0.01^{f}	7.32 ± 0.00^{f}	8.15 ± 0.01^{fg}	8.17 ± 0.01^{fg}	8.19 ± 0.01^{fg}	7.19 ± 0.01^{a}	8.31 ± 0.03^{ef}	8.33 ± 0.01^{h}
I1 + I3	6.92 ± 0.04^{d}	6.81 ± 0.04^{d}	7.06 ± 0.04^{de}	8.04 ± 0.02^{e}	8.05 ± 0.01^{de}	8.06 ± 0.01^{e}	8.22 ± 0.00^{h}	8.27 ± 0.01^{ef}	8.30 ± 0.00^{h}
I1 + I4	6.49 ± 0.03^{b}	6.53 ± 0.04^{bc}	6.54 ± 0.01^{c}	7.33 ± 0.03^{c}	7.32 ± 0.02^{c}	7.72 ± 0.01^{b}	8.36 ± 0.01^{f}	8.30 ± 0.00^{ef}	8.35 ± 0.00^{h}
I2 + I3	7.97 ± 0.00^{i}	8.00 ± 0.03^{i}	8.02 ± 0.13^{j}	7.99 ± 0.00^{e}	7.97 ± 0.00^{c}	7.95 ± 0.01^{cd}	7.99 ± 0.00^{bc}	8.00 ± 0.02^{b}	7.86 ± 0.00^{b}
I2 + I4	7.62 ± 0.04^{gh}	7.69 ± 0.02^{h}	7.66 ± 0.01^{h}	8.20 ± 0.01^{fg}	8.22 ± 0.04^{gh}	8.26 ± 0.01^{g}	8.17 ± 0.01^{de}	8.35 ± 0.01^{f}	8.16 ± 0.00^{de}
I3 + I4	7.12 ± 0.00^{c}	7.01 ± 0.00^{c}	7.04 ± 0.02^{d}	8.12 ± 0.02^{f}	8.13 ± 0.03^{ef}	8.15 ± 0.05^{f}	8.05 ± 0.05^{c}	8.16 ± 0.02^{cd}	8.19 ± 0.06^{ef}
I1 + I2 + I3	7.76 ± 0.06^{h}	7.63 ± 0.00^{gh}	7.13 ± 0.02^{c}	8.26 ± 0.01^{gh}	8.26 ± 0.03^{g}	8.32 ± 0.02^{g}	8.25 ± 0.02^{e}	8.25 ± 0.00^{de}	8.25 ± 0.01^{fgh}
I1 + I2 + I4	7.58 ± 0.10^{g}	7.56 ± 0.02^{fg}	7.37 ± 0.01^{f}	8.27 ± 0.03^{fg}	8.19 ± 0.01^{fgh}	8.19 ± 0.02^{fg}	8.23 ± 0.00^{e}	8.30 ± 0.00^{def}	8.31 ± 0.00^{h}
I2 + I3 + I4	7.23 ± 0.02^{e}	7.57 ± 0.07^{gh}	7.47 ± 0.10^{g}	8.13 ± 0.01^{fg}	8.19 ± 0.02^{fgh}	8.18 ± 0.01^{fg}	8.34 ± 0.00^{f}	8.33 ± 0.02^{ef}	8.31 ± 0.03^{h}
I1 + I2 + I3 + I4	7.50 ± 0.07^{fg}	7.55 ± 0.03^{h}	7.57 ± 0.10^{h}	8.25 ± 0.02^{hi}	8.15 ± 0.00^{fg}	8.20 ± 0.01^{fg}	8.23 ± 0.01^{e}	8.24 ± 0.01^{de}	8.27 ± 0.00^{gh}
Control	5.96 ± 0.07^{a}	5.96 ± 0.07^{a}	5.96 ± 0.07^{a}	6.93 ± 0.32^{b}	6.93 ± 0.32^{a}	6.93 ± 0.32^{a}	8.14 ± 0.04^{d}	8.14 ± 0.04^{c}	8.14 ± 0.04^{de}

* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อทดสอบโดยวิธี one way ANOVA (Duncan's test)

ภาพที่ 4.9 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่วัดได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์



2.4 การทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็ง Skim milk โดยวิธี disk diffusion method

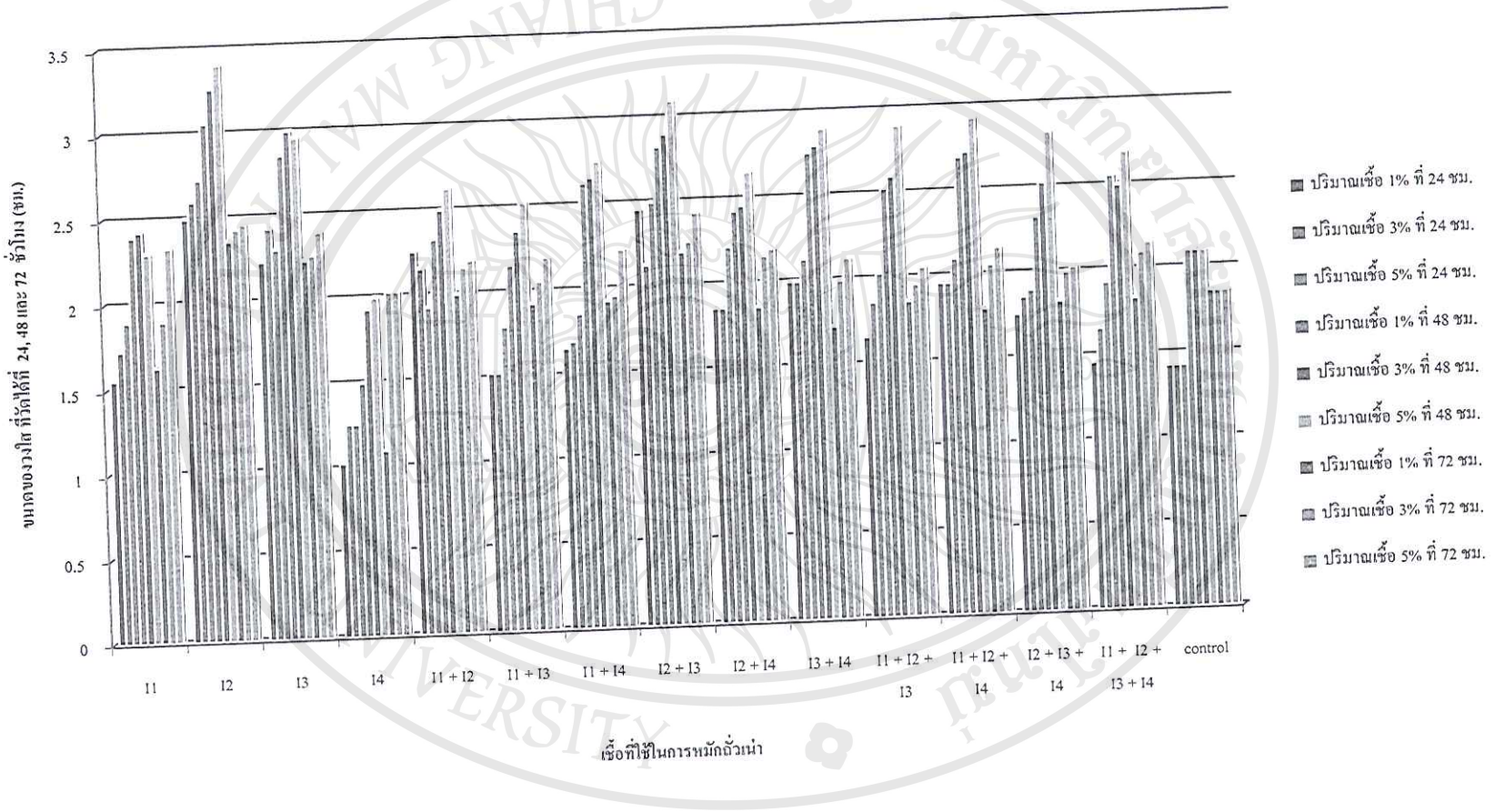
เอนไซม์โปรติเอส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายสารอาหารประเภทโปรตีน มีความสำคัญในการย่อยอาหารจำพวกโปรตีนให้ได้เป็นกรดอะมิโน ดังนั้นเชื้อที่มีวงใสบนอาหารแข็ง Skim milk กว้างก็จะมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงตามไปด้วย จากการทดสอบหมักถั่วเน่าโดยใส่เชื้อบริสุทธิ์ลงไป 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง หลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และได้เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาวัดขนาดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง Skim milk พบว่าขนาดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง Skim milk มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสตั้งแต่ 1.03 – 3.40 เซนติเมตร โดยขนาดความกว้างของวงใสของถั่วเน่าที่หมักด้วยเชื้อกลุ่ม I2 ที่ใส่เชื้อบริสุทธิ์ลงไป 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง หมักที่ 48 ชั่วโมงมีขนาดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง Skim milk สูงสุดที่ 3.40 ± 0.05 เซนติเมตร เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าขนาดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง Skim milk ของถั่วเน่าที่หมักที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยใส่ปริมาณเชื้อที่ 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลืองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.10 จึงได้คัดเลือกเชื้อกลุ่ม I2 ที่ใส่เชื้อบริสุทธิ์ลงไป 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง หมักที่ 48 ชั่วโมงมาหมักเป็นถั่วเน่าแผ่นเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าแผ่นต่อไป

ตารางที่ 4.7 ขนาดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง Skim milk ที่วัดได้หลังจากเก็บตัวอย่างถั่วเน่าหมักที่เวลา 24, 48 และ 72ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อ เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	ขนาดความกว้างของวงใสที่ 24 ชั่วโมง (cm)			ขนาดความกว้างของวงใสที่ 48 ชั่วโมง (cm)			ขนาดความกว้างของวงใสที่ 72 ชั่วโมง (cm)		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%	1%	3%	5%
I1	1.56 ±0.03^{bc}	1.73 ±0.18^{bcd}	1.90 ±0.25^{b}	2.40 ± 0.10^{bcde}	2.43 ± 0.06^{cd}	2.30 ± 0.05^{ab}	1.63 ± 0.14^{b}	1.90 ± 0.05^{ab}	2.33 ± 0.03^{cdef}
I2	2.50 ±0.05^{f}	2.60 ± 0.11^{g}	2.73 ± 0.08^{e}	3.06 ± 0.14^{f}	3.26 ± 0.03^{h}	3.40 ± 0.05^{f}	2.36 ± 0.03^{e}	2.43 ± 0.06^{d}	2.46 ± 0.03^{f}
I3	2.23 ±0.14^{def}	2.43 ± 0.03^{fg}	2.30 ±0.17^{cd}	2.86 ± 0.14^{ef}	3.00 ± 0.05^{fg}	2.96 ± 0.08^{de}	2.23 ± 0.12^{de}	2.26 ± 0.12^{cd}	2.40 ± 0.11^{def}
I4	1.03 ±0.08^{a}	1.26 ± 0.18^{a}	1.26 ±0.06^{a}	1.50 ± 0.25^{a}	1.93 ± 0.03^{a}	2.00 ± 0.11^{a}	1.10 ± 0.10^{a}	2.03 ± 0.03^{abc}	2.03 ± 0.03^{ab}
I1 + I2	2.26 ±0.08^{ef}	2.16 ± 0.18^{ef}	1.93 ±0.06^{b}	2.33 ± 0.17^{bcd}	2.50 ± 0.15^{cde}	2.63 ± 0.08^{bcd}	2.00 ± 0.05^{cd}	2.16 ± 0.12^{bc}	2.20 ± 0.11^{bcdef}
I1 + I3	1.53 ±0.03^{bc}	1.53 ± 0.13^{abc}	1.80 ±0.10^{b}	2.16 ± 0.14^{bc}	2.36 ± 0.23^{bc}	2.53 ± 0.20^{bc}	1.93 ± 0.06^{bcd}	2.06 ± 0.12^{abc}	2.20 ± 0.05^{bcdef}
I1 + I4	1.66 ±0.12^{bc}	1.70 ± 0.10^{bcd}	1.86 ±0.17^{b}	2.63 ± 0.12^{cdef}	2.66 ± 0.14^{cdef}	2.76 ± 0.03^{cde}	1.93 ± 0.12^{bcd}	1.96 ± 0.03^{ab}	2.23 ± 0.12^{bcdef}
I2 + I3	2.46 ±0.08^{f}	2.13 ± 0.08^{ef}	2.50 ±0.05^{de}	2.83 ± 0.08^{ef}	2.90 ± 0.05^{efg}	3.10 ± 0.05^{ef}	2.20 ± 0.15^{de}	2.26 ± 0.03^{cd}	2.43 ± 0.13^{ef}
I2 + I4	1.86 ±0.14^{bcde}	1.86 ± 0.08^{cde}	2.22 ±0.14^{bc}	2.43 ± 0.06^{bcde}	2.46 ± 0.03^{cd}	2.66 ± 0.14^{bcd}	1.86 ± 0.03^{bc}	2.16 ± 0.08^{bc}	2.20 ± 0.05^{bcdef}
I3 + I4	2.00 ±0.23^{cde}	2.00 ± 0.05^{de}	2.13 ±0.17^{bc}	2.76 ± 0.03^{def}	2.80 ± 0.00^{defg}	2.90 ± 0.10^{cde}	1.73 ± 0.08^{bc}	2.00 ± 0.10^{abc}	2.13 ± 0.12^{abcd}
I1 + I2 + I3	1.66 ±0.16^{bc}	1.86 ± 0.03^{cde}	2.03 ±0.12^{bc}	2.53 ± 0.17^{bcde}	2.60 ± 0.05^{cdef}	2.90 ± 0.11^{cde}	1.86 ± 0.12^{bc}	1.96 ± 0.03^{ab}	2.06 ± 0.03^{abc}
I1 + I2 + I4	1.96 ±0.08^{cde}	1.96 ± 0.12^{de}	2.10 ±0.05^{bc}	2.70 ± 0.10^{def}	2.73 ±0.06^{defg}	2.93 ± 0.03^{cde}	1.80 ± 0.11^{bc}	2.06 ± 0.05^{abc}	2.16 ± 0.12^{bcde}
I2 + I3 + I4	1.76 ±0.08^{bcd}	1.86 ± 0.03^{cde}	1.90 ±0.05^{b}	2.33 ± 0.20^{bcd}	2.53 ± 0.06^{cde}	2.83 ± 0.12^{cde}	1.83 ± 0.12^{bc}	2.00 ± 0.05^{abc}	2.03 ± 0.06^{ab}
I1 + I2 + I3 + I4	1.46 ±0.13^{ab}	1.66 ± 0.66^{bcd}	1.93 ±0.03^{b}	2.56 ± 0.14^{bcde}	2.50 ± 0.05^{cde}	2.70 ±0.30^{bcde}	1.83 ± 0.06^{bc}	2.10 ± 0.10^{abc}	2.16 ± 0.03^{bcde}
Control	1.43 ±0.24^{ab}	1.43 ±0.24^{ab}	1.43 ±0.24^{a}	2.10 ± 0.05^{b}	2.10 ± 0.05^{ab}	2.10 ± 0.05^{a}	1.86 ± 0.06^{bc}	1.86 ± 0.06^{a}	1.86 ± 0.06^{a}

* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อทดสอบโดยวิธี one way ANOVA (Duncan's test)

ภาพที่ 4.10 ขนาดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง Skim milk ที่วัดได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์



2.5 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Azocasein

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีน แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสขึ้นได้ โดยเฉพาะระหว่างกระบวนการหมัก (Fermentation) ซึ่งหากว่ามีเอนไซม์โปรติเอสสูงก็จะทำให้กระบวนการหมักเสร็จสมบรูณ์ได้เร็วขึ้น ดังนั้นเชื้อที่มีกิจกรรมโปรติเอสสูงก็จะสามารถเร่งกระบวนการหมักเสร็จสมบรูณ์ได้เร็วขึ้นเช่นกัน หลังจากวัดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง Skim milk และเลือกเก็บเฉพาะเชื้อที่มีความกว้างของวงใสตั้งแต่ 2.5 เซนติเมตร มาทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Azocasein พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของถั่วเน่าที่หมักด้วยเชื้อ I2 ที่ใส่เชื้อบริสุทธิ์ลงไป 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง และหมักที่ 48 ชั่วโมงมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ 0.89 ± 0.00 U และพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสอยู่ระหว่าง 0.34 – 0.89 U เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของถั่วเน่าที่หมักที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยใส่ปริมาณเชื้อที่ 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลืองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.8 จึงได้คัดเลือกเชื้อ I2 ที่ใส่เชื้อบริสุทธิ์ลงไป 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง และหมักที่ 48 ชั่วโมงมาหมักเป็นถั่วเน่าแผ่นเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าแผ่นต่อไป

ตารางที่ 4.8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการทดสอบด้วยวิธี Azocasien เมื่อหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่มีความกว้างของวงใสบนอาหารแข็ง Skim milk ตั้งแต่ 2.5 เซนติเมตรมาทดสอบ)

เชื้อ	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ 24 ชั่วโมง (U)			ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ 48 ชั่วโมง (U)			ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ 72 ชั่วโมง (U)		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%	1%	3%	5%
I1	-**	-**	-**	-**	-**	-**	-**	-**	-**
I2	0.75 ± 0.00^{b}	0.81 ± 0.00^{b}	0.81 ± 0.00^{c}	0.87 ± 0.01^{c}	0.87 ± 0.00^{h}	0.89 ± 0.00^{i}	-**	-**	-**
I3	-**	-**	-**	0.54 ± 0.00^{d}	0.55 ± 0.00^{h}	0.54 ± 0.00^{f}	-**	-**	-**
I4	-**	-**	-**	-**	-**	-**	-**	-**	-**
I1 + I2	-**	-**	-**	-**	0.54 ± 0.00^{fg}	0.55 ± 0.00^{f}	-**	-**	-**
I1 + I3	-**	-**	-**	-**	-**	0.56 ± 0.00^{g}	-**	-**	-**
I1 + I4	-**	-**	-**	0.39 ± 0.00^{bc}	0.40 ± 0.00^{d}	0.38 ± 0.00^{c}	-**	-**	-**
I2 + I3	-**	-**	0.77 ± 0.00^{b}	0.38 ± 0.01^{b}	0.37 ± 0.00^{a}	0.37 ± 0.00^{b}	-**	-**	-**
I2 + I4	-**	-**	-**	-**	-**	0.35 ± 0.00^{a}	-**	-**	-**
I3 + I4	-**	-**	-**	0.39 ± 0.00^{b}	0.38 ± 0.00^{bc}	0.34 ± 0.00^{a}	-**	-**	-**
I1 + I2 + I3	-**	-**	-**	0.35 ± 0.00^{a}	0.38 ± 0.00^{b}	0.37 ± 0.01^{b}	-**	-**	-**
I1 + I2 + I4	-**	-**	-**	0.34 ± 0.00^{a}	0.46 ± 0.00^{e}	0.75 ± 0.00^{h}	-**	-**	-**
I2 + I3 + I4	-**	-**	-**	-**	0.40 ± 0.00^{cd}	0.45 ± 0.00^{e}	-**	-**	-**
I1 + I2 + I3 + I4	-**	-**	-**	0.39 ± 0.00^{b}	0.39 ± 0.00^{bc}	0.40 ± 0.0^{cd}	-**	-**	-**
Control	0.62 ± 0.00^{a}	0.62 ± 0.00^{a}	0.62 ± 0.00^{a}	0.40 ± 0.00^{c}	0.40 ± 0.00^{d}	0.40 ± 0.00^{d}	-**	-**	-**

* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อทดสอบโดยวิธี one way ANOVA (Duncan's test)

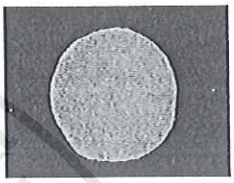
** หมายถึงเชื้อที่มีความกว้างของวงใสบนอาหารแข็ง Skim milk ไม่ถึง 2.5 เซนติเมตร จึงไม่ได้นำมาทดสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอด้วยวิธี Azocasien

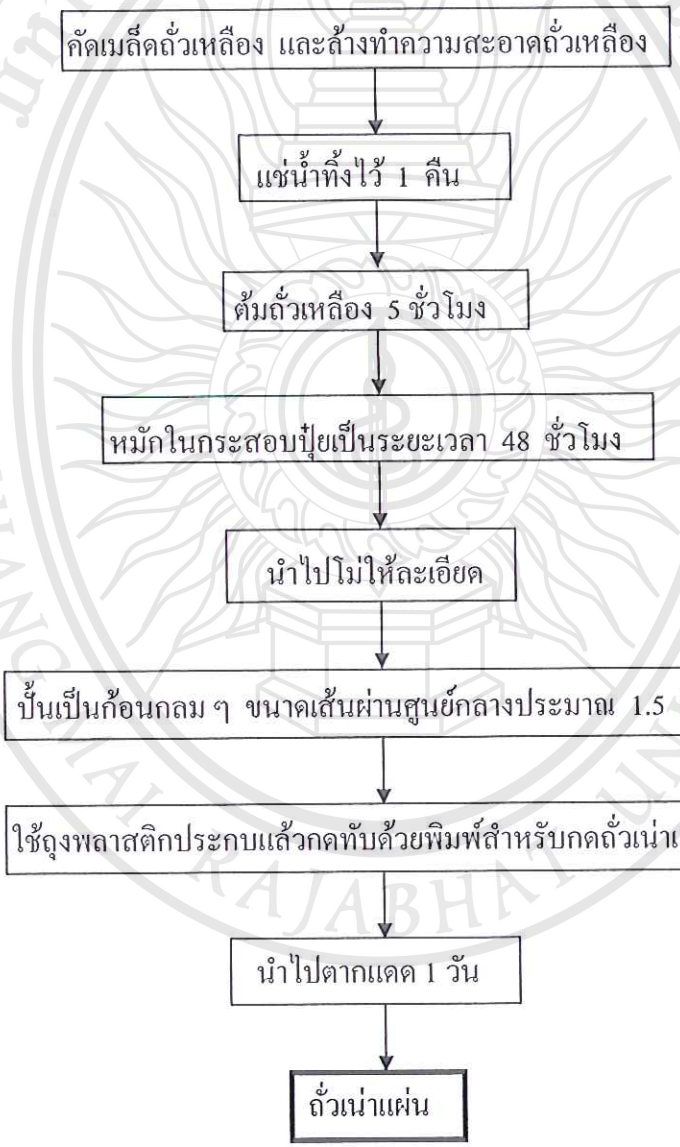
*** หมายเหตุ ในชั่วโมงที่ 72 ไม่มีเชื้อที่มีความกว้างของวงใสบนอาหารแข็ง Skim milk เกิน 2.5 เซนติเมตร จึงไม่ได้แสดงตารางค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการทดสอบด้วยวิธี Azocasien

2.6 การทำถั่วเน่าแผ่น

หลังจากได้เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน คือ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดลำพูน จังหวัดลำปาง จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดแพร่ จังหวัดน่าน และจังหวัดพะเยา มาแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ทั้งสิ้น 261 ไอโซเลต จึงได้นำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรีย พบว่าสามารถจัดจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก (I1) จะมีลักษณะรูปท่อนไม่มีเอนโดสปอร์ย้อมติดสีแกรมบวก กลุ่มที่ 2 (I2) มีลักษณะรูปท่อนมีเอนโดสปอร์ย้อมติดสีแกรมบวก กลุ่มที่ 3 (I3) มีลักษณะเป็นรูปท่อนเรียงต่อกันเป็นเส้นสาย ย้อมติดสีแกรมบวก และกลุ่มที่ 4 (I4) มีลักษณะเป็นรูปกลมย้อมติดสีแกรมบวก เมื่อนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็ง Skim milk และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Azocasein พบว่าถั่วเน่าที่หมักด้วยเชื้อ I2 ที่ใส่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักของถั่วเหลือง และบ่มที่ 48 ชั่วโมงมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็ง Skim milk สูงที่สุด วัดขนาดความกว้างของวงใสได้ 3.40 เซนติเมตร และเมื่อทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Azocasein ก็พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ 0.89 ± 0.00 U นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์ I2 ที่ใส่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักของถั่วเหลืองและบ่มที่ระยะ 48 ชั่วโมง ให้ผลการหมักที่น่าพึงพอใจที่สุด เนื่องจากการหมักในชั่วโมงที่ 48 ถั่วเน่าจะมีกลิ่นหอมตามลักษณะกลิ่นเฉพาะตัวของถั่วเน่า จะมีการเปื่อยยุ่ยและมีเส้นใยสีขาวมาปกคลุมโดยรอบซึ่งเป็นลักษณะที่ดีและเหมาะสมสำหรับการนำเอาไปทำถั่วเน่าแผ่น จึงได้คัดเลือกเชื้อ I2 ใส่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักของถั่วเหลืองและบ่มที่ระยะ 48 ชั่วโมงมาหมักเป็นถั่วเน่าและทำเป็นถัวเน่าแผ่นเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าแผ่นต่อไป ซึ่งการทำถั่วเน่าแผ่นในห้องปฏิบัติการมีวิธีการดังภาพที่ 4.11 และมีลักษณะเนื้อสัมผัส สี และกลิ่นตรงตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนคือลักษณะทั่วไปของแผ่นถั่วเน่าต้องมีขนาดใกล้เคียงกัน แห้ง และอาจแตกหักได้บ้างเล็กน้อย สีของถั่วเน่าแผ่น ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของแผ่นถั่วเน่า และกลิ่นของถั่วเน่าแผ่นจะต้องมีกลิ่นตามธรรมชาติของแผ่นถั่วเน่า ปราศจากกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นหืน กลิ่นอับ ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 คุณภาพถั่วเน่าแผ่นที่ทำขึ้นในห้องปฏิบัติการ

ลักษณะเนื้อสัมผัส	ลักษณะสี	ลักษณะกลิ่น	รูปภาพประกอบ
เนื้อถั่วเน่าละเอียด	สีน้ำตาลทอง	กลิ่นหอมอ่อน ๆ ตามลักษณะกลิ่นของถั่วเน่าแผ่น	



ภาพที่ 4.11 กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นโดยใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

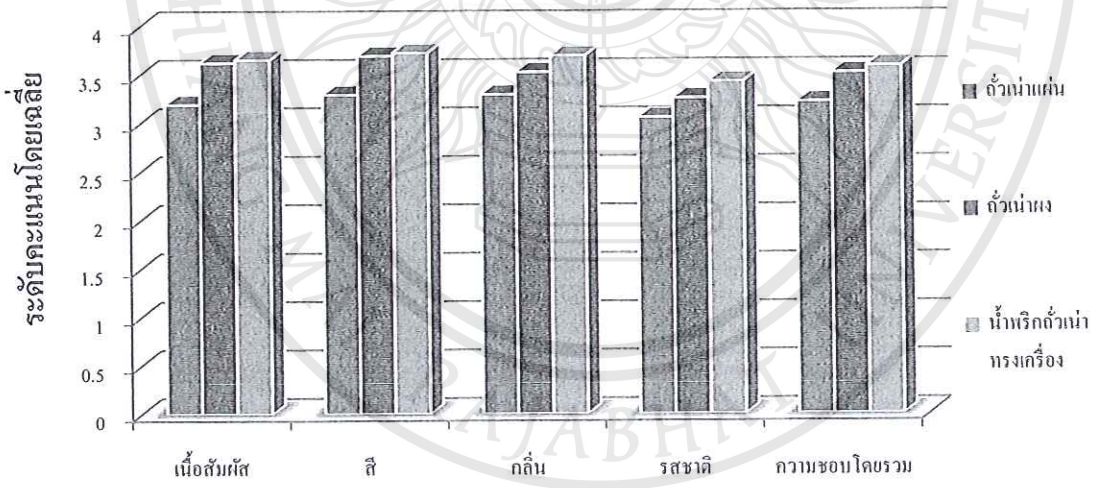
ตอนที่ 3 การนำถั่วเน่าแผ่นมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์และการประเมินความชอบของผลิตภัณฑ์

เมื่อได้ถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตจากเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้คัดเลือกว่าดีที่สุดแล้ว โดยลักษณะทั่วไปของแผ่นถั่วเน่าต้องมีขนาดใกล้เคียงกัน แห้ง มีสีที่ดีตามธรรมชาติของแผ่นถั่วเน่า และมีกลิ่นตามธรรมชาติของแผ่นถั่วเน่า ปราศจากกลิ่นหืนและกลิ่นอับจึงได้นำถั่วเน่าแผ่นมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ 2 รูปแบบ คือ ถั่วเน่าผงบรรจุขวด และน้ำพริกถั่วเน่าทรงเครื่อง หลังจากที่ได้นำถั่วเน่าแผ่นมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว จึงได้ทำการการตรวจสอบความชอบโดยรวมของผู้บริโภคโดยใช้ประชาชนทั่วไปจำนวน 30 คน ซึ่งบริโภคถั่วเน่าในชีวิตประจำวันอยู่แล้วเป็นผู้ชิม และประเมินความชอบรูปแบบของผลิตภัณฑ์ ตามเกณฑ์การประเมินตามรูปแบบของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.) โดยในการประเมินความชอบของผลิตภัณฑ์ในครั้งนี้ได้ใช้ผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าแผ่น 3 รูปแบบด้วยกันคือ ถั่วเน่าแผ่น ถั่วเน่าผง และน้ำพริกถั่วเน่าทรงเครื่อง โดยผู้ทำการประเมินทั้ง 30 คน จะทำการประเมินทางด้านเนื้อสัมผัส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าแผ่นทั้ง 3 รูปแบบ จากการประเมินความชอบผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าแผ่นทั้ง 3 รูปแบบ พบว่า กลุ่มผู้ประเมินชอบน้ำพริกถั่วเน่าทรงเครื่องมากที่สุด รองลงมาได้แก่ ถั่วเน่าผง และถั่วเน่าแผ่นตามลำดับ โดยมีระดับคะแนนเฉลี่ยที่ 3.59 ± 0.37, 3.52 ± 0.31 และ 3.22 ± 0.48 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.12

ตารางที่ 4.10 ระดับคะแนนการประเมินความชอบ (sensory test) ทางเนื้อสัมผัส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม ของผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าแผ่นทั้ง 3 รูปแบบคือ ถั่วเน่าแผ่น, ถั่วเน่าผง และน้ำพริกถั่วเน่าทรงเครื่อง

ผลิตภัณฑ์	การประเมินความชอบ (sensory test)				
	เนื้อสัมผัส	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบโดยรวม
ถั่วเน่าแผ่น	3.20 ± 0.12^{a}	3.30 ± 0.14^{a}	3.30 ± 0.15^{a}	3.06 ± 0.17^{a}	3.22 ± 0.48^{a}
ถั่วเน่าผง	3.63 ± 0.11^{b}	3.70 ± 0.08^{b}	3.53 ± 0.14^{ab}	3.70 ± 0.09^{b}	3.52 ± 0.31^{b}
น้ำพริกถั่วเน่าทรงเครื่อง	3.66 ± 0.08^{b}	3.73 ± 0.08^{b}	3.70 ± 0.09^{b}	3.43 ± 0.13^{b}	3.59 ± 0.37^{b}

* ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อทดสอบโดยวิธี one way ANOVA (Duncan's test)



ภาพที่ 4.12 การประเมินความชอบ (sensory test) ทางเนื้อสัมผัส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม ของผลิตภัณฑ์จากถั่วเน่าประเภทต่างๆ