

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ถั่วเหลืองนับเป็นพืชเศรษฐกิจของไทย และเป็นพืชที่สามารถใช้ทำอาหารได้หลายชนิด อีกทั้งยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ราคาถูก มีวิธีการเตรียมง่าย เป็นพืชมีเมล็ด ถั่วเหลืองของไทยปลูกกันมากในแถบภาคเหนือ และภาคกลางตอนบน ถั่วเน่าเป็นอาหารหมักพื้นบ้านที่ให้คุณค่าทางโภชนาการสูงประเภทหนึ่ง มีกระบวนการผลิตและมีลักษณะคล้ายนัตโต แต่จะแตกต่างกันตรงที่เชื้อที่ใช้ในการหมัก โดยถั่วเน่าจะเกิดการหมักด้วยเชื้อผสม ดังนั้นจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมามีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกันตรงที่ถั่วเน่าไม่เหนียวหนืด ซึ่งก็อาจจะมีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อกระบวนการหมัก ทั้งเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ถั่วเหลือง และสภาวะการหมักล้วนแล้วแต่มีความสำคัญในการหมัก และยังส่งผลถึงคุณค่าทางโภชนาการที่มีในถั่วเน่าอีกด้วย (พิชามญช์, 2545) จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักถั่วเน่าอยู่ในสกุล *Bacillus subtilis* (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532) ส่วนกระบวนการหมักถั่วเน่า และแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายอาหารชนิดต่างๆ ในถั่วเหลืองมีลักษณะที่ดีหลายประการกล่าวคือ เกิดเป็นสารให้กลิ่นรสที่ดี ย่อยสลายโครงสร้างที่ไม่พึงประสงค์ ช่วยเก็บรักษาคุณภาพผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสารอาหาร และช่วยให้ร่างกายดูดซึมได้ง่าย (เกรียงศักดิ์, 2531) ดังนั้นการใช้ภูมิปัญญาท้องถิ่นของชาวบ้านกับการนำเอาความรู้ในห้องปฏิบัติการมาประยุกต์กันใช้ร่วมกัน โดยวิธีการใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวมาหมักถั่วเน่าตามวิธีภูมิปัญญาชาวบ้านก็คงจะเป็นผลดีไม่น้อยสำหรับการยกระดับและคุณภาพของถั่วเน่า เพื่อพัฒนาคุณภาพถั่วเน่าแผ่นซึ่งเป็นอาหารพื้นบ้านของภาคเหนือตอนบน ซึ่งการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์ในการผลิตถั่วเน่าแผ่นนี้ก็เพื่อที่จะได้ควบคุมคุณภาพในการผลิตถั่วเน่าแผ่นให้สม่ำเสมอ และมีความปลอดภัยกับผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนากรรณวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์แบบมีส่วนร่วมของชุมชน
2. เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติคุณภาพถั่วเน่าแผ่นจากกรรมวิธีโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้านและการใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้ถั่วเน่าแผ่นที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ และปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์
2. ได้ถั่วเน่าแผ่นที่เป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปเป็นอาหารเชิงอุตสาหกรรมต่อไป
3. เพื่อส่งเสริม และสนับสนุนภูมิปัญญาชาวบ้านให้มีสืบต่อไป

1.4 สมมุติฐานของการวิจัย

การทำถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่วิจัย ใช้การหมักแบบธรรมชาติและมีเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักหลายตัว

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 ขอบเขตพื้นที่

ลงพื้นที่สำรวจการทำถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตจากกรรมวิธีโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้านและเก็บตัวอย่างถั่วเน่าในพื้นที่ บ้านต้นขาม หมู่ 5 ต.ขี้เหล็ก อ.แม่อรมิ จ.เชียงใหม่

1.5.2 ขอบเขตประชากร

ถั่วเน่าแผ่นที่ผลิตจากกรรมวิธีโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้าน

1.5.3 ขอบเขตเนื้อหา

1) จัดประชุมแบบมีส่วนร่วมของชุมชนในตำบลขี้เหล็ก อำเภอแม่อรมิ จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อหาแนวทางในการผลิตถั่วเน่าแผ่นให้มีคุณภาพระหว่างวิธีการโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้านและการใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

2) การคัดแยกเชื้อ โดยการนำเอาถั่วเน่าที่ได้เก็บตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหาร NB และนำไปแช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาลงบนอาหาร NA ทำการแยกเชื้อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อที่จะได้จำแนกได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มใดเก็บเชื้อที่แยกได้เป็น stock culture สำหรับการทดลองต่อไป

3) การทดลองหมักถั่วเน่า โดยวิธีการเติมเชื้อ *Bacillus subtilis* 1%, 3% และ 5% โดยปริมาตรต่อน้ำหนักของถั่วเหลือง

4) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีระหว่างการผลิตถั่วเน่า โดยทำการวัดปริมาณของจุลินทรีย์และค่า pH และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอส โดยวิธี azocasein

5) การทำถั่วเน่าแผ่น

6) การตรวจสอบความชอบโดยรวมของผู้บริโภคโดยใช้คนในชุมชนเป็นผู้ชิม

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

1.6.1 เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่ผลิตจากกรรมวิธีโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้าน

1.6.2 แยกเชื้อจากถั่วเน่าที่ผลิตจากกรรมวิธีโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้านที่ได้เก็บตัวอย่างมา ได้แก่

- 1) ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 2 วัน (บดละเอียด)
- 2) ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 3 วัน (บดละเอียด)
- 3) ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 3 วัน (เป็นเม็ด)
- 4) ถั่วเน่าในรูปของถั่วเน่าแผ่นที่ผ่านการหมักนาน 2 วัน
- 5) ถั่วเน่าในรูปของถั่วเน่าแผ่นที่ผ่านการหมักนาน 3 วัน

1.6.3 ศึกษาการทดสอบการหมักถั่วเน่า โดยวิธีการเติมเชื้อ *Bacillus subtilis* 1%, 3% และ 5% โดยปริมาตรต่อน้ำหนักของถั่วเหลือง เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการทำถั่วเน่าแผ่น

1.6.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีระหว่างการผลิตถั่วเน่า โดยทำการวัดปริมาณของ จูลินทรีย์ และวัดค่า pH ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี azocasein

1.6.5 การทำถั่วเน่าแผ่น โดยการคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมสำหรับการทำถั่วเน่าแผ่นที่สุด ซึ่งจะพิจารณาจากขั้นตอนของการทดลองหมักโดยวิธีการเติมเชื้อ *Bacillus subtilis* 1%, 3% และ 5% โดยปริมาตรต่อน้ำหนักของถั่วเหลือง แล้วคัดเลือกสูตรที่ดีที่สุด 7 สูตรมาทำเป็นถั่วเน่าแผ่น

1.6.6 การตรวจสอบความชอบโดยรวมของผู้บริโภคโดยใช้คนในชุมชนเป็นผู้ชิม จำนวน 25 - 30 คนตรวจสอบกลิ่น, สี, รสชาติ และเนื้อสัมผัสโดยรวมของถั่วเน่าแผ่น โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แล้ววิเคราะห์หาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ 2 - test และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Anova (Analysis of variance)

1.7 ตัวแปรที่ต้องการศึกษา

1. ตัวแปรต้น คือ การแยกเชื้อจุลินทรีย์ผสมที่มีอยู่ในถั่วเน่าที่ผลิตจากกรรมวิธีโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้านให้กลายเป็นเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

2. ตัวแปรตาม คือ ถั่วเน่าแผ่นที่มีคุณภาพ สะอาด และปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยการผลิตถั่วเน่าแผ่นที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์

3. ตัวแปรควบคุม คือ ปริมาณเชื้อที่ใช้สำหรับการหมักถั่วเน่า ปริมาณของถั่วเหลืองที่ใช้ในการหมัก สภาพแวดล้อมในการหมักถั่วเน่า ได้แก่ อุณหภูมิ และช่วงเวลา

1.8 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ถั่วเน่า หมายถึง อาหารหมักพื้นบ้านทางภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยที่ทำจากถั่วเหลือง โดยที่ถั่วเน่าจะเกิดการหมักด้วยเชื้อผสม นอกจากนี้ถั่วเน่าสามารถที่จะแปรรูปเป็นถั่วเน่าแผ่น ถั่วเน่าซา ถั่วเน่าห่อ และถั่วเน่าทรงเครื่อง

2. คุณภาพ หมายถึง การผลิตถั่วเน่าที่มีความสม่ำเสมอ สะอาด และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

3. คัดแยกเชื้อ หมายถึง การคัดแยกเชื้อจากถั่วเน่าซึ่งเป็นเชื้อผสมให้กลายเป็นเชื้อบริสุทธิ์

4. เชื้อบริสุทธิ์ หมายถึง เชื้อที่ผ่านกระบวนการคัดแยกเชื้อให้กลายเป็นเชื้อบริสุทธิ์ และมีความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พื้นที่ศึกษา

ตำบลจี้เหล็ก ตั้งอยู่ทางทิศเหนือของที่ว่าการอำเภอแม่ริม ห่างจากที่ว่าการอำเภอแม่ริมประมาณ 9 กิโลเมตร ห่างจากศูนย์ราชการเชียงใหม่ประมาณ 17 กิโลเมตร) การติดต่อระหว่างอำเภอและตำบลใกล้เคียง ใช้ทางหลวงแผ่นดินหมายเลข 107 (เชียงใหม่-ฝาง) และถนนลาดยาง รพช. ส่วนถนนเชื่อมระหว่างหมู่บ้าน - ตำบล ส่วนใหญ่เป็นถนนลาดยางซึ่งสร้างด้วยงบประมาณของเทศบาลตำบล องค์การบริหารส่วนจังหวัดเชียงใหม่ กรมโยธาธิการ และโครงการพัฒนาจังหวัด อาณาเขตของตำบลจี้เหล็ก

ทิศเหนือ ติดต่อกับองค์การบริหารส่วนตำบลจี้เหล็ก อำเภอแม่แตง
ทิศใต้ ติดต่อกับองค์การบริหารส่วนตำบลสันป่า อำเภอแม่ริม
ทิศตะวันออก ติดต่อกับแม่น้ำปิง และองค์การบริหารส่วนตำบลแม่แฝกใหม่ อำเภอสันทราย
ทิศตะวันตก ติดต่อกับองค์การบริหารส่วนตำบลสะลง และองค์การบริหารส่วนตำบลห้วยทราย อำเภอแม่ริม

ตำบลจี้เหล็ก มีพื้นที่รับผิดชอบประมาณ 46.6 ตารางกิโลเมตร หรือ 29,131 ไร่ ลักษณะพื้นที่ของตำบลจี้เหล็กเป็นพื้นที่ราบลุ่มแม่น้ำปิง ลักษณะดินร่วนปนดินเหนียว เหมาะสำหรับการเพาะปลูก พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ทำนา และปลูกกล้วยหลังจากการเก็บเกี่ยวข้าว ลักษณะภูมิอากาศตำบลจี้เหล็กมี 3 ฤดู คือ ฤดูร้อน ช่วงเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม, ฤดูฝน ช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม และฤดูหนาว ช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ตำบลจี้เหล็กมีจำนวนหมู่บ้าน 8 หมู่บ้าน ได้แก่

หมู่ที่ 1 บ้านจี้เหล็กน้อย	เป็นหมู่บ้านเร่งรัดพัฒนาอันดับ 3
หมู่ที่ 2 บ้านสันคะยอม	เป็นหมู่บ้านเร่งรัดพัฒนาอันดับ 3
หมู่ที่ 3 บ้านห้วยน้ำริน	เป็นหมู่บ้านเร่งรัดพัฒนาอันดับ 3
หมู่ที่ 4 บ้านซาง	เป็นหมู่บ้านเร่งรัดพัฒนาอันดับ 3
หมู่ที่ 5 บ้านต้นขาม	เป็นหมู่บ้านเร่งรัดพัฒนาอันดับ 3
หมู่ที่ 6 บ้านจี้เหล็กหลวง	เป็นหมู่บ้านเร่งรัดพัฒนาอันดับ 3

หมู่ที่ 7 บ้านปากทางสะลวง เป็นหมู่บ้านเร่งรัดพัฒนาอันดับ 3

หมู่ที่ 8 บ้านพนาวัดย์ เป็นหมู่บ้านเร่งรัดพัฒนาอันดับ 3

ตำบลจีเหล็กมีประชากรทั้งสิ้น 7,418 คน แยกเป็นชาย 3,615 คน แยกเป็นหญิง 3,803 คน (ข้อมูลจากทะเบียนบ้าน ณ เดือนตุลาคม 2552) ประชากรส่วนใหญ่ในเขตองค์การบริหารส่วนตำบลจีเหล็กมีอาชีพเกษตรกรรม รับจ้างทั่วไป และค้าขาย อาชีพหลัก ได้แก่ เกษตรกรรม จำนวน 675 ครัวเรือน, รับจ้าง จำนวน 912 ครัวเรือน, ค้าขาย จำนวน 112 ครัวเรือน และอื่นๆ จำนวน 74 ครัวเรือน อาชีพเสริม ได้แก่ ทำตุ๊กตา จำนวน 30 ครัวเรือน, ทำถั่วเน่าแผ่น จำนวน 30 ครัวเรือน และ เลี้ยงวัวขุน จำนวน 31 ครัวเรือน

2.2 ถั่วเน่า

ถั่วเน่า เป็นอาหารที่ชาวบ้านทางภาคเหนือตอนบนของไทยนิยมรับประทานในครัวเรือนและทำเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายตามท้องตลาด ถั่วเน่าจัดเป็นแหล่งอาหารโปรตีนสำคัญชนิดหนึ่งและเป็นการถนอมอาหารให้มีอายุการเก็บยาวนานขึ้น ถั่วเน่าเป็นอาหารหมักจากถั่วเหลือง มีลักษณะคล้ายนัตโต (Natto) ของประเทศญี่ปุ่น ใช้เป็นเครื่องปรุงรสแทนกะปิ ส่วนใหญ่ใช้เติมในซุปรัก หรือนำมาห่อใบตอง นึ่งหรือปิ้งพอสุกรับประทานกับข้าวเหนียว นอกจากนี้ถั่วเน่ายังใช้ในอาหารมังสวิรัต เพื่อเพิ่มรสชาติอาหารให้กลมกล่อมยิ่งขึ้น (อารีและปิติ, 2550)

2.3 วัตถุดิบที่สำคัญในการทำถั่วเน่า

ถั่วเหลืองนับเป็นพืชเศรษฐกิจของไทย และเป็นพืชที่สามารถใช้ทำอาหารได้หลายชนิด อีกทั้งยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ราวคาถูก มีวิธีการเตรียมง่าย เป็นพืชมีเมล็ด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Glycine max* (L) Merrill จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae, Subfamily Papilionoideae ในภาษาไทยมีชื่อเรียกกันหลายชื่อ เช่น ถั่วพระเหลือง ถั่วแระ ถั่วหนัง ถั่วแม่ตาย และถั่วเน่า ถั่วเหลืองนั้นเป็นพืชดั้งเดิมในภูมิภาคเอเชีย เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น รวมทั้งประเทศไทย มีลักษณะเป็นพุ่มตรงมีใบมาก แต่บางพันธุ์จะเป็นเถาเลื้อยเล็กน้อย มีความสูงตั้งแต่ 30-120 เซนติเมตร มีขนสีน้ำตาลยาวขนาด 1 มิลลิเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.0025 มิลลิเมตร ปรากฏที่ใบ ลำต้น และฝัก เมล็ดของถั่วเหลืองมีสีเหลืองสีครีม มีขนาดน้ำหนักราว 0.01-0.2 กรัม สีของเปลือกมีอยู่หลายชนิด เช่น สีเหลือง ซึ่งมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมทั่วไป ใบเลี้ยงมี 2 ใบ อยู่ภายใต้เปลือก มักมีสีเหลืองและสีเขียว ถั่วเหลืองที่ปลูกจะมีอายุเก็บเกี่ยวในช่วง 90-120 วัน (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527) ถั่วเหลืองของไทยปลูกกันมากในแถบภาคเหนือ และภาคกลางตอนบน ซึ่งจังหวัดที่มีผลผลิตถั่วเหลืองมาก ได้แก่ เชียงใหม่, กำแพงเพชร, แพร่, เชียงราย, ตาก, สุโขทัย, อุตรดิตถ์, ลำปาง, แม่ฮ่องสอน, เพชรบูรณ์ และนครสวรรค์ เป็นต้น โดยพันธุ์ถั่วเหลืองที่นิยมปลูก

จะเป็นพันธุ์ที่ได้รับการส่งเสริมจากหน่วยงานราชการเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ ส.จ.1, ส.จ.2, ส.จ.3, ส.จ. 4 และ ส.จ. 5 เป็นต้น (ส.จ. ย่อมาจากสถานีกลีกรรมแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่) (ภานุวรรณ และคณะ, 2543)

2.4 ถั่วเน่าและกรรมวิธีการผลิตถั่วเน่า

ถั่วเน่าเป็นอาหารหมักพื้นบ้านที่ให้คุณค่าทางโภชนาการสูงประเภทหนึ่ง มีกระบวนการผลิตและมีลักษณะคล้ายนม แต่จะแตกต่างกับนมที่เชื้อที่ใช้ในการหมัก โดยถั่วเน่าจะเกิดการหมักด้วยเชื้อผสม ดังนั้นจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมามีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกับนมที่ถั่วเน่าไม่เหนียวหนืด ซึ่งก็อาจจะมีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อกระบวนการหมัก ทั้งเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ถั่วเหลือง และสภาวะการหมักแล้วแต่มีความสำคัญในการหมัก และยังส่งผลถึงคุณค่าทางโภชนาการที่มีในถั่วเน่าอีกด้วย (พิชามญชุ์, 2545) จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักถั่วเน่าอยู่ในสกุล *Bacillus subtilis* (วรารุณี และรุ่งนภา, 2532) โดยแบคทีเรียดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการหมัก กล่าวคือ ผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย (proteolytic enzyme) ย่อยสลายสารต่างๆ ในถั่วเหลืองได้ จากการศึกษาพบว่าถั่วเน่าของชาวบ้านในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน มีแบคทีเรีย 10^8 ถึง 10^{10} เซลล์ต่อกรัม ตัวอย่างถั่วเน่าเมื่อทำการแยกให้บริสุทธิ์และจำแนกแล้ว พบว่าเป็นสกุล *Bacillus* spp. โดยพบเชื้อ *B. subtilis* มากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบคุณลักษณะของแบคทีเรียชนิดนี้กับเชื้อ *B. subtilis* varnatto พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากทั้งลักษณะทางสัณฐานและทางสรีรวิทยา รวมทั้งการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายชนิดต่างๆ

นอกจากนี้ถั่วเน่ายังเป็นอาหารหมักพื้นบ้านที่ใช้ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ ซึ่งในถั่วเหลืองนั้นจะประกอบไปด้วยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต อีกทั้งยังประกอบไปด้วยเกลือแร่ที่สำคัญต่างๆ เช่น โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม กำมะถัน และเหล็ก วิตามินที่มีในถั่วเหลืองได้แก่ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และไนอะซิน

ส่วนกระบวนการหมักถั่วเน่า และแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายอาหารชนิดต่างๆ ในถั่วเหลืองมีลักษณะที่ดีหลายประการกล่าวคือ เกิดเป็นสารให้กลิ่นรสที่ดี ย่อยสลายโครงสร้างที่ไม่พึงประสงค์ ช่วยเก็บรักษาคุณภาพผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสารอาหาร และช่วยให้ร่างกายดูดซึมได้ง่าย นอกจากนี้การหมักถั่วเหลืองจะได้สารประกอบจำพวก ester เป็นส่วนประกอบของ ethyl, isobutyl และ isoamyl ester ของ isobutyric, a-methylbutyric, isovaleric และ tiglic acids ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของกรดไขมัน และนอกจากนี้ยังมีสารให้กลิ่นฉุน เช่น 2-heptanone phytanin benzaldehyde (เกรียงศักดิ์, 2531)

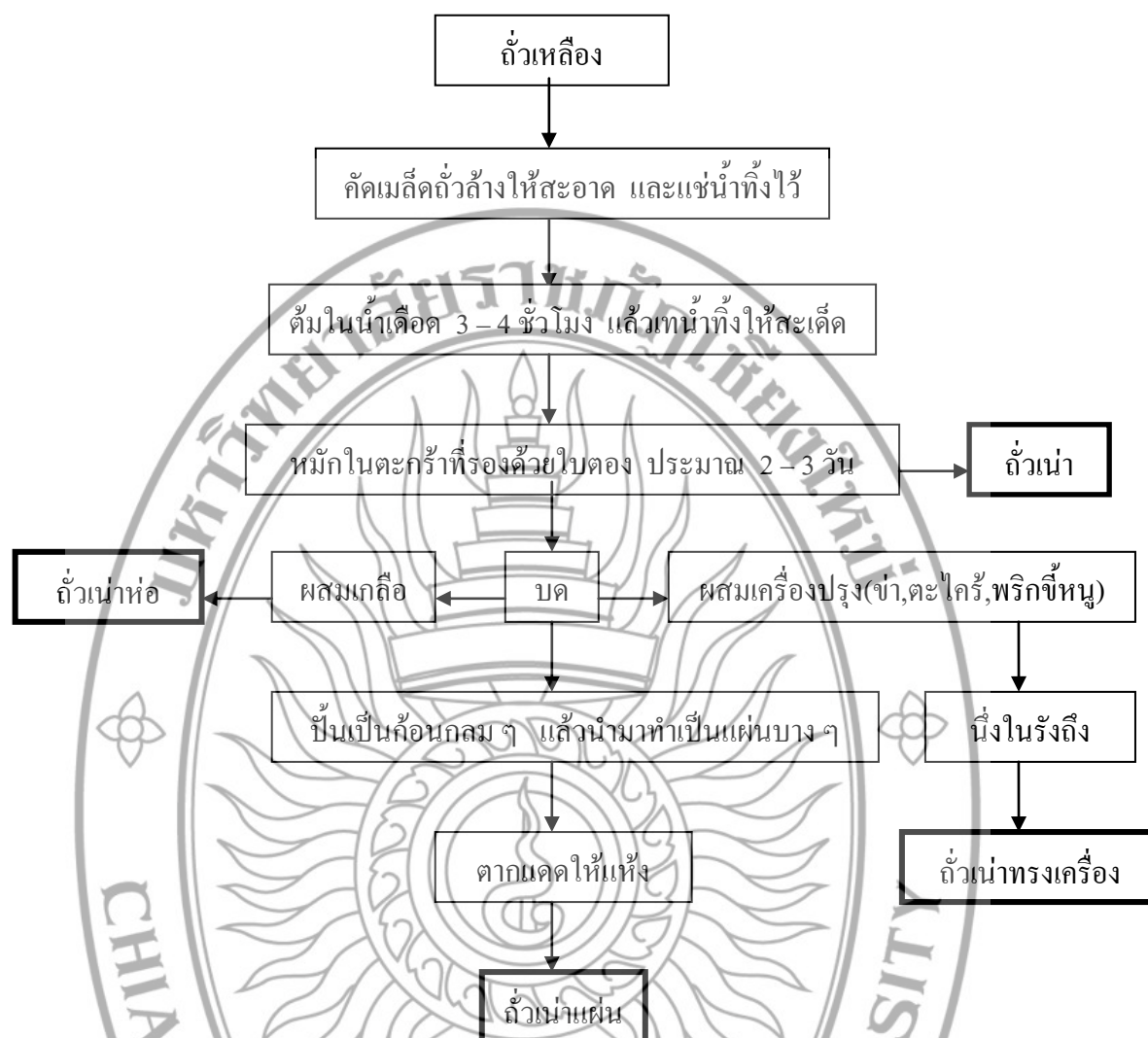
กรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าตามวิธีพื้นบ้านมี 6 ขั้นตอน ดังนี้ (รสวิไล, 2526)

1. ล้างถั่วเหลืองให้สะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก
2. ต้มถั่วเหลืองนาน 3-4 ชั่วโมง คอยเติมน้ำให้ท่วมเมล็ดถั่วเสมอ (อัตราส่วนถั่วเหลือง 1 ลิตร ต่อน้ำ 2 ลิตร) หลังจากต้มถั่วแล้วตักออกผึ่งให้แห้ง
3. ทำการหมักโดยเตรียมตะกร้ารองด้วยใบตอง แล้วนำถั่ววางบนใบตองปิดทับด้วยใบตองอีกชั้นหนึ่ง เพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้น และป้องกันเชื้อรา
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน
5. บดถั่วเน่า เติมเกลือ หรืออาจจะเติมสารที่ทำให้รสชาดีดี เช่น จิง ข่า พริกแดง ห่อด้วยใบตองแล้วนำไปนึ่งหรือย่าง วิธีนี้สามารถเก็บรักษาถั่วเน่าได้นาน 2 วัน
6. หรือนำถั่วเน่ามาทำเป็นแผ่นแบนตากแดดให้แห้งจะเก็บได้นาน เรียกเป็นภาษาเหนือว่า “ถั่วเน่าแปบ” โดยมีวิธีการทำคือ

6.1 บดถั่วเน่าให้ละเอียดแล้วนำมาทำเป็นแผ่นบางๆ ลักษณะกลมใช้ใบตอง “หูก” โดยใบหนึ่งวางอยู่บนฝ่ามือซ้ายใช้สองมือวางประกบกันจนแบนราบ ซึ่งมีลักษณะคล้ายมะม่วงกวน

6.2 นำไปตากแดด 1 วัน เก็บไว้ในที่แห้ง

โดยระหว่างขั้นตอนกระบวนการหมักนี้จะทำให้เราได้ถั่วเน่าหลายประเภท คือ ถั่วเน่าชา, ถั่วเน่าห่อ, ถั่วเน่าทรงเครื่อง และถั่วเน่าแผ่น ดังแผนภาพที่ 1.1



แผนภาพที่ 1.1 กระบวนการผลิตถั่วเน่า (ดัดแปลงจากจุฑารัตน์, 2544)

2.5 วิธีการปรุงถั่วเน่าประเภทต่างๆ

ถั่วเน่าสามารถที่จะแปรรูปเป็นถั่วเน่าแผ่น, ถั่วเน่าชา, ถั่วเน่าห่อ และถั่วเน่าทรงเครื่อง มีวิธีการปรุงอาหารได้ดังนี้

1. ถั่วเน่าแผ่น เป็นเครื่องปรุงหลักของของแกลบประเภทผักและพืชต่างๆ ส่วนแกลบหรืออาหารประเภทเนื้อและปลาไม่นิยมใส่ถั่วเน่าเพราะกลิ่นถั่วเน่าแผ่นไม่เหมาะสมกับรสชาติของแกลบเนื้อและปลา ส่วนใหญ่ใช้ถั่วเน่าแผ่นปรุงเป็นน้ำพริกในรูปต่างๆ เช่น น้ำพริกผอง (ผง) เป็นน้ำพริกที่นำเครื่องปรุง คือ ถั่วเน่าแผ่นบั้งให้สุก โขลกรวมกับพริก เกลือ และปลาหยวกหรือกุ้ง ลักษณะเป็นผงละเอียดรับประทานกับข้าวหรือเป็นเครื่องปรุงแกลบต่างๆ น้ำพริกน้อก เช่นเดียวกับน้ำพริกผงแต่เพิ่มหอมแดงซอยบางๆ ผักชีและใบหอม ใส่น้ำเย็นที่สะอาดคนให้เข้ากันเป็นลักษณะข้นๆ ส่วนน้ำพริกอุ๊บ (อบ) ลักษณะการปรุงขั้นตอนเหมือนน้ำพริกผงเพียงแต่ใช้หมูสามชั้นสับละเอียดแทนปลานำมาผัดในน้ำมันพอเครื่องปรุงทุกอย่างจะเค็มหอมแดงซอยและมะเขือเทศหั่นเป็นชิ้นคนให้ทั่วปิดฝาอบไว้เพื่อให้มีกลิ่นหอมขกลบรับประทานกับผักสดหรือผักนึ่ง ลักษณะคล้ายกับน้ำพริกอ่องเพียงแต่มีการอบให้สุกให้มีกลิ่นหอมมีน้ำคลุกคลีก็รับประทานได้

2. ถั่วเน่าชา ลักษณะเป็นเมล็ดถั่วเน่าที่หมักแล้วยังไม่ได้บดสามารถนำมาปรุงเป็นอาหารได้หลายอย่าง เช่น ยำถั่วเน่าชา เครื่องปรุงมีถั่วเน่าชา, มะเขือเทศ, พริกสด, ต้นหอมผักชี เกลือป่น และน้ำมัน นำมาคลุกเคล้ากันอาจจะมีการโรยหน้าเพื่อเพิ่มความอร่อยของอาหาร และยังมีถั่วเน่าชาผัดใส่ไข่ เครื่องปรุงมีถั่วเน่าชา, หอมแดงซอย, มะเขือเทศ, พริกสด, ตะไคร้, ต้นหอมผักชี, ไข่ และน้ำมัน นำมาผัดรวมกันก็จะได้ถั่วเน่าชาผัดใส่ไข่

3. ถั่วเน่าห่อ ลักษณะถั่วเน่าที่หมักแล้วบดละเอียดผสมเกลือ แล้วห่อด้วยใบตองนำไปปิ้งไฟรับประทานกับข้าว

4. ถั่วเน่าทรงเครื่อง ลักษณะคล้ายกับถั่วเน่าห่อแต่มีการโขลกกับเครื่องปรุง คือ พริกขี้หนูสด, ตะไคร้, กระเทียม, เกลือ และข่าให้ละเอียด ใส่ถั่วเน่าหมักที่บดละเอียดแล้วโขลกรวมกับกับเครื่องปรุง นำมาห่อโดยใช้ใบตองห่อจากนั้นนำไปนึ่งหรือปิ้งไฟรับประทานกับข้าวเหนียวร้อนๆ (จุฑารัตน์, 2544)

2.6 คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเน่า

จากผลการศึกษาของกองโภชนาการ กรมอนามัย พบว่าถั่วเน่ามีคุณค่าทางอาหารดังตารางที่ 1

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการ

สารอาหารและพลังงาน	ถั่วเน่าเปียก (fermented soybean, wet)	ถั่วเน่าแห้ง (fermented soybean, dried)
พลังงาน (หน่วยแคลอรี)	152.0	388.0
ความชื้น (ร้อยละ)	61.8	12.0
โปรตีน (กรัม)	17.9	43.9
ไขมัน	6.6	17.6
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	5.3	13.5
เส้นใย (กรัม)	3.8	8.4
เถ้า (กรัม)	4.6	4.6
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	98.0	292.0
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	223.0	5.0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	6.1	21.1
วิตามินเอ (I.U.)	328.0	283.0
วิตามินบี 1 (มิลลิกรัม)	0.04	0.06
วิตามินบี 2 (มิลลิกรัม)	0.45	0.73
ไนอะซิน (มิลลิกรัม)	1.60	1.50
วิตามินซี	0.00	0.00

หมายเหตุ : * หมายถึงคำนวณจากส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัม

ที่มา : กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2537)

จากตารางที่ 2.1 จะเห็นได้ว่าบรรดาสารอาหารทั้งหลายในถั่วเหลืองมีโปรตีนอยู่ในปริมาณที่สูง ซึ่งจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนต่อไป นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่อยู่ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองจะช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่าย และเป็นประโยชน์มากขึ้น อีกทั้งยังช่วยทำลายสารพิษที่มีอยู่ในเมล็ดถั่วเหลืองให้สลายไป

ตารางที่ 2.2 ปริมาณกรดอะมิโนในถั่วเหลืองและถั่วเน่า

กรดอะมิโน*	ถั่วเหลืองคัดแยกเปลือก	ถั่วเหลืองต้ม	ถั่วเน่าหมัก 2 วัน	ถั่วเน่า
Lysine	4.8	12.1	5.7	6.7
Histidine	2.8	5.6	2.5	3.1
Arginine	8.0	6.6	7.5	6.4
Asparagine	12.5	10.7	12.5	11.0
Threonine	4.7	3.6	4.3	4.1
Serine	3.9	4.3	3.5	3.9
Glutamic acid	18.7	15.8	19.9	18.8
Proline	6.3	4.7	3.8	3.8
Glycine	4.0	4.1	4.0	4.4
Alanine	4.1	4.5	4.2	4.2
Valine	6.0	5.2	5.8	6.1
Methionine	1.8	2.3	2.5	2.4
Isoleucine	5.0	4.6	5.1	5.3
Leucine	8.1	6.8	8.0	8.5
Tyrosine	3.8	3.9	4.2	4.6
Phenylalanine	5.7	5.3	6.4	6.4

หมายเหตุ : * หมายถึง หน่วยเป็นกรัมต่อ 100 กรัมถั่วเหลือง

ที่มา : Marie-Paule (1985)

2.7 ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองอื่นๆ ที่มีลักษณะคล้ายถั่วเน่า

นัตโต (Natto) คือผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่น ซึ่งแบ่งเป็นสามชนิด ได้แก่ ฮิโตะฮิกินัตโต โดยกิวารินัตโต และฮามานัตโต นัตโตที่มีการผลิตและเป็นที่นิยมมากที่สุด ได้แก่ ฮิโตะฮิกินัตโต ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมักได้แก่ *Bacillus natto* (สายพันธุ์หนึ่งของ *Bacillus subtilis*) การผลิตเริ่มโดยแช่ถั่วให้อุ่นน้ำ นึ่งหรือต้มให้สุก เมื่อถั่วเย็นลงถึงประมาณ 45 องศาเซลเซียส ใส่กล้าเชื้อ *Bacillus natto* ซึ่งอยู่ในรูปสปอร์ แบ่งบรรจุภาชนะ เช่น กล่องหรือถุงพลาสติกขนาดประมาณ 50 – 100 กรัม เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อนี้อยู่ระหว่าง 40 – 42 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงต้องบ่มไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวประมาณ 18 – 20 ชั่วโมง แบคทีเรียจะเจริญสร้างเมือกเหนียว ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์โกลูตามิกและพอลิเมอร์ของฟรุคโตส (fructan) ทำให้เมล็ดถั่วพกคลุมไปด้วยเมือกเหนียวเหล่านี้ ชาวญี่ปุ่นบริโภคนัตโตกับข้าวหรือนำไปปรุงกับอาหารชนิดอื่น (พิชามญชุ์, 2545)

มิโซ (Miso) เป็นอาหารหมักของชาวญี่ปุ่น ซึ่งมีการผลิตกันมากกว่า 500,000 ตันต่อปี การผลิตมิโซ ทำโดยใช้ถั่วเหลืองต้มผสมกับแป้งเชื้อโคจิ (Koji) ซึ่งเตรียมจากข้าวและเชื้อ *Aspergillus oryza* ผสมเกลือประมาณ 10 – 20 เปอร์เซ็นต์ นำมาบดด้วยค้อนแล้วปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 สัปดาห์ และหมักต่อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 เดือน

เทมเป้ (Tempeh) เป็นอาหารของชาวอินโดนีเซีย ซึ่งเตรียมโดยแช่ถั่วเหลืองทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตลอคคั้น และเอาเปลือกออก ต้มถั่วเหลืองประมาณ 20 นาที เอน้ำออกปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมเชื้อ *Rhizopus oligosporus* หรือ *R. stolonifer* หรือ *A. oryza* หรือ *R. arrhizus* นำไปบรรจุในภาชนะและอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 32 องศาเซลเซียส นาน 20 – 22 ชั่วโมง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตัดเป็นแผ่นบางๆ แช่น้ำเกลือตากให้แห้ง นำมาทอดรับประทาน (เกรียงศักดิ์, 2531)

คินีมา (Kinema) เป็นอาหารพื้นเมืองทำจากถั่วเหลืองหมักของชาวเนปาลและอินเดีย นิยมบริโภคทางตะวันตกของเบงกอลและในรัฐสิมขงของประเทศอินเดีย วิธีทำคินีมา คือ นำถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาด แช่เอาไว้หนึ่งคืน จากนั้นนำมาต้มประมาณ 90 นาที นำมาบดแล้วห่อด้วยใบตอง ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการหมักประมาณ 1 – 3 วัน ในที่มีอุณหภูมิอบอุ่นประมาณ 25 – 30 องศาเซลเซียส หลังจากผ่านไป 12 ชั่วโมงจะเห็นบริเวณผิวจะเป็นเมือก วิธีรับประทานจะต้องนำไปทอดหรือใส่แกงเพื่อเพิ่มรสชาติ

นอกจากนี้ยังมีอาหารที่ทำจากถั่วเหลืองหมักที่มีลักษณะคล้ายถั่วเน่า คือ schuidouchi ในประเทศจีน dawadawa และ iru ในแอฟริกาตะวันตก เป็นต้น (พิชามญชุ์, 2545)

2.8 แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการหมักถั่วเน่า

การผลิตถั่วเน่าเป็นภูมิปัญญาชาวบ้าน ถือเป็นองค์ความรู้ที่ควบคู่มาอยู่กับท้องถิ่นที่สืบทอดต่อกันมา จากการศึกษากรรมวิธีการหมักถั่วเน่ามักประสบปัญหาคุณภาพไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากชาวบ้านไม่มีการควบคุมคุณภาพในการหมัก โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีบทบาทการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบให้มีลักษณะของผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ โดยการทำงานที่จำเพาะของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น และเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารของวัตถุดิบให้มากยิ่งขึ้นอีกด้วย อีกทั้งยังช่วยสร้างรสชาติที่ส่งเสริมให้อาหารมีรสชาติที่ดี และช่วยทำลายส่วนประกอบที่ไม่ต้องการในอาหารให้หมดไป ซึ่งนับได้ว่าเป็นการถนอมอาหารให้มีการเน่าเสียช้าลง แบบประหยัดพลังงาน เมื่อเปรียบเทียบกับ การแช่เย็นและการฉายรังสี (พิชามญช์, 2545)

แบคทีเรียบาซิลลัสเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างของเซลล์เป็นรูปแท่งตรงขนาด 0.5-2.5x1.2-10 mm เรียงตัวกันเป็นคู่หรือเส้นสาย หรือเป็นวงกลมหรือสี่เหลี่ยม ติดสีกรัมบวกมี endospore รูปไข่ กลม หรือทรงกระบอก เป็น aerobic หรือ facultative anaerobic bacteria เป็นพวก chemoorganotrophs สามารถเกิดกระบวนการหมักหรือ กระบวนการหายใจเคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เลวร้ายได้เช่น ทนความร้อน pH และทนความเค็ม ได้ดี ให้ผล catalase test เป็นบวก แบคทีเรียในจินัสนี้สามารถพบได้หลายๆ แห่งบางสายพันธุ์อาจก่อให้เกิดโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลังหรือพวกไม่มีกระดูกสันหลัง *Bacillus subtilis* เป็น aerobic หรือ facultative anaerobic bacteria สร้าง catalase มี endospore ซึ่งทำให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่ดีได้ ไม่ทำให้เกิดโรค ติดสีกรัมบวก รูปแท่งตรงมี flagella แบบ peritrichous เจริญได้ดีที่ pH 5.5-8.5 สร้าง Hydrolytic enzyme ที่สลาย polysaccharide, nucleic acid และ lipid โดยใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและตัวให้อิเล็กตรอนมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน บทบาทสำคัญของเชื้อตัวนี้ในการหมักคือการปล่อยเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีน (ภาณุวรรณ, 2543)

จากการศึกษาของ Marie-Paul (1985) ได้ศึกษากระบวนการทำถั่วเน่าของชาวบ้านทางภาคเหนือตอนบนของไทย และศึกษาลักษณะต่างๆ ของถั่วเน่า โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง สามารถสร้างสปอร์ได้ ซึ่งก็คือเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยสามารถแยกได้ 2 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบนำเอาแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตมาทำให้บริสุทธิ์ และนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก พบว่าสามารถทำให้เกิดเชื้อถั่วเน่าได้เป็นอย่างดี ส่วนการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี พบว่าถั่วเน่ามีโปรตีนและไขมันในปริมาณที่สูง และถั่วเน่าที่ทำเป็นแผ่นแล้วนำไปตากแดดสามารถเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องได้เป็นเวลานาน เช่นเดียวกับการวิจัยของพิชามญช์ (2545) ได้ทำการแยกแบคทีเรียจำนวน 40 ไอโซเลต ถั่วเน่าที่ผลิตในเขตจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย พบว่า 26 ไอโซเลต อยู่ในจินัส *Bacillus*

ในปี 2538 ภาควิชาจุลชีววิทยาได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในถั่วเหลืองหมักของไทย พบว่าแบคทีเรียหลายชนิดที่เกี่ยวข้องตั้งแต่เริ่มการหมักจะพบเชื้อ *Bacillus* spp. และแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม เมื่อครบระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต โดยพบเชื้อ *Bacillus* spp. 2 ไอโซเลต (สามารถสร้างกรดเองได้) แกรมบวก รูปแท่ง เมื่อนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยพิจารณาจากการสร้างวงใสในอาหารแข็ง skim milk แล้วทำการคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลต และพบว่า *Bacillus* spp. No.1 มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง เช่นเดียวกันกับภาควิชาและคณะ (2543) พบว่าสามารถแยกเชื้อสร้างสปอร์จากถั่วเน่าที่ได้จาก 6 จังหวัดภาคเหนือตอนบนของไทยทั้งหมด 82 ไอโซเลต แล้วนำแบคทีเรียสร้างสปอร์ดังกล่าวมาทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งพบว่าสามารถแยกเชื้อ *B. subtilis* ได้ 39 ไอโซเลต จากนั้นนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยพิจารณาจากการสร้างวงใสในอาหารแข็ง skim milk ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 18 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *B. subtilis* 38 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โดยวิธี azocasein พบว่าเชื้อ *B. subtilis* 38 มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 47 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเอนไซม์จะเสียสภาพการทำงาน โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะถูกยับยั้งด้วย 1,10-phenanthroline แสดงว่าไอโซเลต 38 นี้เป็นชนิด metalloprotease เป็นส่วนมาก จากนั้นได้นำไอโซเลต 38 ไปเป็นเชื้อตั้งต้นในการหมัก โดยแบ่งเป็น 2 วิธี คือ หมักแบบนัตโด และหมักแบบถั่วเน่า แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทั้งสองวิธี โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นในการหมักเท่ากับ 7×10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า pH ที่ 45 องศาเซลเซียสมีค่าสูงสุด การหมักนัตโดและถั่วเน่าใช้เวลา 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่าเชื้อ *Bacillus* 38 เป็นสปอร์เกือบทั้งหมด และจากการทดลองทางสถิติ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความพอใจทางประสาทสัมผัสทั้ง 2 ด้าน คือ สี และกลิ่น พบว่าผู้ทดสอบมีความพึงพอใจในถั่วหมักแบบถั่วเน่า ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมากที่สุด (Chantawannakul, 2002)

จากการศึกษาแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการหมักถั่วเน่าทั้งหมดข้างต้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีบทบาทในการหมักถั่วเน่าส่วนใหญ่จะอยู่ในจีนัส *Bacillus* อาจมีแบคทีเรียชนิดอื่นๆ รวมอยู่ด้วย

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1993 Sarkar พบว่าในการหมักถั่วเหลืองแบบพื้นบ้านของภาคเหนือและแบบ นัตโตพบว่า ในช่วงเวลาการหมัก 12 ชั่วโมงแรก pH จะมีค่าสูงสุด และจะเริ่มคงที่เนื่องจากการทำงานของโปรติเอสทำให้เกิดแอมโมเนียที่เป็น ค่า ซึ่งในช่วงการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแบบ log phase และมีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสเป็นปริมาณมากค่า pH ก็จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตามลักษณะ growth curve คล้ายกับการวัดค่าของ Suberu et al. (1996)

ในปี 2544 จุฑารัตน์ได้ทำการศึกษาเรื่องการผลิตและการบริโภคถั่วเน่าของกลุ่มไทยใหญ่ อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน ด้านการพิจารณาเบื้องต้นในการเลือกซื้อถั่วเน่าแผ่น พบว่า กลุ่มตัวอย่างร้อยละ 36.5 เลือกซื้อถั่วเน่าแผ่นโดยพิจารณาจากลักษณะเป็นแผ่นกลม ๆ เนื้อถั่วเน่าละเอียดเป็นลึงแรก และร้อยละ 35.2 เลือกซื้อถั่วเน่าแผ่นโดยพิจารณาสีของถั่วเน่า สีที่ดีคือต้องมีสีน้ำตาลเข้ม ร้อยละ 20.1 เลือกซื้อถั่วเน่าแผ่นโดยพิจารณาการบรรจุในถุงพลาสติกใสปิดสนิท และพบว่ากลุ่มตัวอย่างส่วนน้อยเลือกซื้อถั่วเน่าโดยพิจารณาจากกลิ่นของถั่วเน่าหมักและอื่น ๆ โดยมีค่าร้อยละ 4.7 และ 3.6 ตามลำดับ

และในปี 2005 เอกชัย และคณะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของกลุ่มจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีระหว่างการผลิตถั่วเน่า จากการทดลองพบว่าในระหว่างการหมักถั่วเน่ามีการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา ผลผลิตทั้งหมดมีค่า pH สูงขึ้น ชนิดของแบคทีเรียที่พบมากจะอยู่ในจีนัส *Bacillus* นอกจากนี้ยังพบ *Lactobacillus* ด้วย สำหรับกิจกรรมทางชีวเคมี พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (protease) และเอนไซม์อะไมเลส (amylase) มีค่าเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในช่วง 60 ถึง 72 ของการหมักตามลำดับ สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส (phytases) จะอยู่ระหว่าง 114.7 - 152.6 U ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (lipase) อยู่ระหว่าง 0.78 - 1.31 U ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Inatso et al. (2006) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์อะไมเลส สารยับยั้งลิซินเอ็นเอที (subtilisin NAT) หรือเอนไซม์นัตโตไคเนส (notokinase) และแกมมาโพลีกลูตามิกแอซิด (gamma-polyglutamic acid; PGA) และพบว่า มีประสิทธิภาพในการผลิตสาร subtilisin NAT ได้ดีกว่าสายพันธุ์ *B. subtilis* ที่แยกได้จากนัตโตถั่วเหลืองที่หมักของประเทศญี่ปุ่น ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้มีความสำคัญทางด้านการผลิตเอนไซม์จากอาหาร และผลิตสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพในอนาคต

นอกจากนี้มีถิลา และคณะ (2548) ได้ศึกษาเรื่องกิจกรรมของเอนไซม์ในทางเดินอาหารปลาทอง *Carassius auratus* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์โปรติเอสที่ pH 5, 6, 7, 8 และ 9 มีค่าใกล้เคียงกัน ($P > 0.05$) โดยปลาทองขนาดเล็กมีค่าอยู่ในช่วง 0.56 - 0.76 unit/mg protein ส่วนปลาทองขนาดกลางมีค่าอยู่ในช่วง 2.45 - 3.59 unit/mg protein ส่วนปลาทองขนาดใหญ่มีค่าอยู่ในช่วง 4.12 - 5.39 unit/mg protein และเมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ไลเปสและ

อะไมเลสของปลาทอง 3 ขนาดที่ pH 7 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักปลา โดยที่ pH 7 ปลาขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีค่า 0.64 ± 0.23 , 3.59 ± 2.12 และ 4.47 ± 1.30 unit/mg protein ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีค่า 0.60 ± 0.29 , 4.23 ± 1.24 และ 8.38 ± 3.79 unit/mg protein ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์สมีค่า 2.46 ± 0.86 , 8.53 ± 0.99 และ 14.83 ± 4.85 unit/mg protein ตามลำดับ

เกตุการ และคณะ (2550) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาเชิงเปรียบเทียบของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* ที่แยกได้จากถั่วเน่า จำนวน 171 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อไอโซเลตที่ TN51 และ TN69 มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด เมื่อใช้อาหารที่มีเคซีนเป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ (เส้นผ่านศูนย์กลางของวงไลเท่ากับ 2.73 และ 2.65 เซนติเมตร) และได้ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มเติม โดยใช้อาหารที่มีสารตั้งต้นเป็นโปรตีนชนิดต่างๆ กัน ได้แก่ casein agar, skim milk agar และ soy protein hydrolysate agar ผลการทดลองที่ได้ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต TN51 และน้ำเลี้ยงเชื้อมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด

อมรรัตน์ (2551) ได้ทำการศึกษาเรื่องการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดยรา *Aspergillus oryzae* 3087 บนอาหาร KMP และ อาหารที่มีส่วนผสมของปลาป่นกับโมลาส พบว่าเมื่อเลี้ยงรา *A. oryzae* 3087 ในอาหารเหลวเคเอ็มพี-สูตร 1 โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นรูปแบบสปอร์และเพลเล็ต เราสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงสุด 181.3 และ 76.9 Unit/mL ที่ชั่วโมง 48 ทั้งสองรูปแบบตามลำดับ และพบว่าเมื่อเลี้ยงรา *A. oryzae* 3087 ในอาหารเหลวเคเอ็มพี-สูตร 2 โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นในรูปแบบสปอร์และเพลเล็ตเราสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงสุด 29.5 และ 13.7 Unit/mL ที่ชั่วโมงที่ 96 ทั้งสองรูปแบบตามลำดับ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

- 1) กระบอกฉีดน้ำ
- 2) กระบอกตวง ขนาด 10 มล.
- 3) กระบอกตวง ขนาด 250 มล.
- 4) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- 5) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 6) หัวงูเขี้ยว
- 7) ซ้อนตักสาร
- 8) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 9) ตะแกรงโลหะ
- 10) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
- 11) ตู้เขี้ยว
- 12) ถังพลาสติก
- 13) แท่งแก้วคนสาร
- 14) บีกเกอร์ ขนาด 50 มล.
- 15) บีกเกอร์ ขนาด 250 มล.
- 16) บีกเกอร์ ขนาด 500 มล.
- 17) บีกเกอร์เหล็ก ขนาด 1000 มล.
- 18) บีกเกอร์เหล็ก ขนาด 2000 มล.
- 19) ปิเปต ขนาด 1 มล.
- 20) ปิเปต ขนาด 5 มล.
- 21) ไมโครปิเปต ขนาด 20-200 ไมโครลิตร
- 22) ไมโครปิเปต ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
- 23) ทริปเหลือง
- 24) ทริปฟ้า
- 25) ลูกยางแดงสำหรับดูดปิเปต

- 26) หม้อนึ่งความดันไอ
- 27) ตู้บ่มเชื้อ
- 28) หลอดทดลอง
- 29) หลอด centrifuge ขนาด 10 มล.
- 30) Shaker
- 31) เครื่อง centrifuge (high speed)
- 32) เครื่อง centrifuge (small)
- 33) แอปเพนคโรป
- 34) จานเพาะเชื้อ
- 35) Hemocytometer
- 36) แผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์
- 37) หลอดหยด
- 38) กระบอกน้ำกลั่น
- 39) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล.
- 40) สำลี
- 41) อะลูมิเนียมฟลอยด์
- 42) กล้องจุลทรรศน์
- 43) ถ้วยเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
- 44) หม้อสำหรับแช่และต้มถ้วยเหลือง
- 45) เตาแก๊ส
- 46) ตะแกรงสำหรับสะเด็ดน้ำ
- 47) กระสอบสำหรับหมักถั่วเน่า
- 48) เครื่องไม้อัด
- 49) พิมพ์กดถั่วเน่า
- 50) ไม้ไผ่สานสำหรับตากถั่วเน่า
- 51) ถังพลาสติกสำหรับเก็บถั่วเน่า
- 52) ตัวอย่างถั่วเน่าจากชาวบ้าน ตำบลจี้เหล็ก อำเภอแมริม จังหวัดเชียงใหม่
- 53) Hot plate
- 54) เครื่อง spectrophotometer

3.1.2 สารเคมี

- 1) น้ำกลั่น
- 2) น้ำ DI
- 3) Beef extract
- 4) Peptone
- 5) พงู้น
- 6) Trichloroacetic acid
- 7) Tris (hydroxyl methyl) aminomethane
- 8) azocasiene
- 9) ไฮโดรคลอริก (HCl)
- 10) สีย้อม Safranin
- 11) สีย้อม Iodine
- 12) สีย้อม Deodorizer
- 13) สีย้อม Crystal violet

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย

1) ลงพื้นที่ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่น

ลงพื้นที่ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้าน ในเขตพื้นที่ชุมชนในตำบลขี้เหล็ก อำเภอแม่อรม จังหวัดเชียงใหม่ แล้วทำการเก็บตัวอย่างถั่วเน่า โดยเลือกเก็บตัวอย่างถั่วเน่าดังนี้ คือ

- ก. ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 2 วัน (บดละเอียด)
- ข. ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 3 วัน (บดละเอียด)
- ค. ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 3 วัน (เป็นเมล็ด)
- ง. ถั่วเน่าในรูปของถั่วเน่าแผ่นที่ผ่านการหมักนาน 2 วัน
- จ. ถั่วเน่าในรูปของถั่วเน่าแผ่นที่ผ่านการหมักนาน 3 วัน

2, การแยกเชื้อบริสุทธิ์

- 1) เตรียมอาหาร NA, NB, และ NA Slant ตวงอาหาร NB ใส่ใน flask ขนาด 250 ml. ในปริมาตร 90 ml. ชั่งถั่วเน่า 10 กรัม ใส่ใน flask ที่เตรียมอาหารไว้ นำไปแช่เย็นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 2) ตระเชื้อที่เลี้ยงได้จากใน flask 1 loop นำมาลากบนอาหาร NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 3) เลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่ต่างกันมา มาลากซ้ำบนอาหาร NA จากนั้นใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำมาเก็บไว้ในอาหาร NA Slant เป็น stock culture สำหรับการทดลองต่อไป
- 4) การให้รหัสเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บมาดังนี้
 - ก. ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 2 วัน (บดละเอียด) ให้รหัสเป็น KL2D
 - ข. ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 3 วัน (บดละเอียด) ให้รหัสเป็น KL3D
 - ค. ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 3 วัน (เป็นเม็ด) ให้รหัสเป็น KLS3D
 - ง. ถั่วเน่าในรูปของถั่วเน่าแผ่นที่ผ่านการหมักนาน 2 วัน ให้รหัสเป็น KLP2D
 - จ. ถั่วเน่าในรูปของถั่วเน่าแผ่นที่ผ่านการหมักนาน 3 วัน ให้รหัสเป็น KLP3D
- 5) ตระเชื้อจาก stock culture มา 1 loop วางลงบนสไลด์ ที่หยดน้ำกลั่นไว้แล้ว เชียให้เชื้อกระจายตัว นำสไลด์มาผ่านไฟโดยใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 6) หยดย้อม Safranin ลงบนสไลด์ 1-2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 20 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น
- 7) หยด Iodine ลงบนแผ่นสไลด์ทิ้งไว้ 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น
- 8) หยด Deodorizer ลงบนแผ่นสไลด์ทิ้งไว้ 20 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น
- 9) หยด Crystal violet ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ จากนั้นนำแผ่นสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์บันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.2 การทดสอบหมักถั่วเน่าโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์และเชื้อผสม

1. การเตรียมถั่วเน่า

- 1) นำถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาดคัดเลือกล้างเจือปนออกให้หมด จากนั้นนำถั่วเหลืองมาแช่น้ำ คั้น
- 2) ต้มถั่วเหลืองนาน 3-4 ชั่วโมง คอยเติมน้ำให้ท่วมเมล็ดถั่วเสมอ หลังจากต้มถั่วแล้วตักออกผึ่ง ให้แห้ง

- 3) ชั่งถั่วเหลืองที่ต้มและสะเด็ดน้ำแล้ว 20 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 ml.
- 4) นำถั่วใน flask ไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 5) เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมเชื้อ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีถั่วเหลืองอยู่ 1 เปอร์เซ็นต์, 3 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง
- 6) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาวัดค่า pH, นับจำนวนเซลล์, ทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี azocasein

2. การวัดค่า pH ระหว่างการทดสอบหมักถั่วเน่า

- 1) ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 90 ml ใส่ใน flask
- 2) เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ชั่งมา 1 กรัม ใส่ลงในขวดน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากัน
- 3) วัดไปวัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter

3. การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย

- 1) แตะเชื้อจากตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มา 1 loop วางลงบนแผ่นสไลด์ Hemacytometer ที่หยดน้ำกลั่นไว้แล้วเขย่าให้เชื้อกระจายตัว นำแผ่นสไลด์มาผ่านไฟโดยใช้ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 2) ย้อมเซลล์โดยใช้ Crystal violet หยดทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น
- 3) หยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ แล้วปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการนับเซลล์ตามช่องของแผ่นสไลด์ Hemacytometer

4. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี azocasein

- 1) เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาชั่งให้ได้ 1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 ml เขย่าให้เข้ากัน เก็บเอาส่วนที่เป็นน้ำและเซลล์แบคทีเรียไว้ทดสอบต่อไป
- 2) นำน้ำและเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากข้อ 5.1 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเชื้อที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที
- 3) คูณเอาส่วนใสไปทดสอบโดยวิธี azocasein (Huang, 2006)

- 4.3.1 นำเอาส่วนใสที่ดูดได้จากข้อ 5.2 มา 100 μ l ผสมกับ azocasein 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน Tris-HCl buffer pH 7.2 ปริมาตร 400 μ l จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
- 4.3.2 จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 1 ml ทิ้งให้ตกตะกอนเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
- 4.3.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที
- 4.3.4 ดูค่าส่วนใสที่ได้ปริมาตร 1 ml ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 440 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer และกำหนดค่าให้ unit enzyme ของโปรตีนมีค่าเท่ากับ ค่าดูดกลืนแสงที่ 0.01 ที่ 440 nm

5. การทำถั่วเน่าแผ่น

- 1) นำถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาดคัดเลือกล้างเจือปนออกให้หมด จากนั้นนำถั่วเหลืองมาแช่น้ำ 1 คืน
- 2) ต้มถั่วเหลืองนาน 3-4 ชั่วโมง คอยเติมน้ำให้ท่วมเมล็ดถั่วเสมอ หลังจากต้มถั่วแล้วตักออกผึ่งให้แห้ง
- 3) ชั่งถั่วเหลืองที่ต้มและสะเด็ดน้ำแล้ว 500 กรัม บรรจุลงในกระสอบที่ตัดเย็บมาสำหรับการหมักถั่วเน่าโดยเฉพาะ นำไปนึ่งมาเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 4) เมื่อทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมเชื้อ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีถั่วเหลืองอยู่ 1 เปอร์เซ็นต์, 3 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง
- 5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตได้ว่าถั่วเน่าจะเริ่มมีการเปื่อยยุ่ยอาจมีเส้นใยสีขาวเกิดขึ้น และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของถั่วเน่า
- 6) นำถั่วเน่าไปไม่ให้ละเอียด นวดให้เข้ากัน จากนั้นปั้นเป็นก้อนกลมๆ โดยให้ได้น้ำหนัก 15 กรัมต่อก้อน
- 7) จากนั้นกดทับด้วยแม่พิมพ์ให้เป็นแผ่น แล้วนำไปตากแดด 1-2 แดดให้แห้ง
- 8) เก็บถั่วเน่าแผ่นที่แห้งแล้วใส่ถุงพลาสติกเพื่อรอการวิเคราะห์ความชอบโดยรวมของผู้บริโภคต่อไป

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การตรวจสอบความชอบโดยรวมของผู้บริโภคโดยใช้คนในชุมชนเป็นผู้ชิม จำนวน 25-30 คนโดยการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ตรวจสอบความชอบโดยรวมในด้านกลิ่นของถั่วเน่าแผ่น สีของถั่วเน่าแผ่น รสชาติของถั่วเน่าแผ่น และเนื้อสัมผัสโดยรวมของถั่วเน่าแผ่น แล้ววิเคราะห์หาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ 2 – test และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Anova (Analysis of variance)



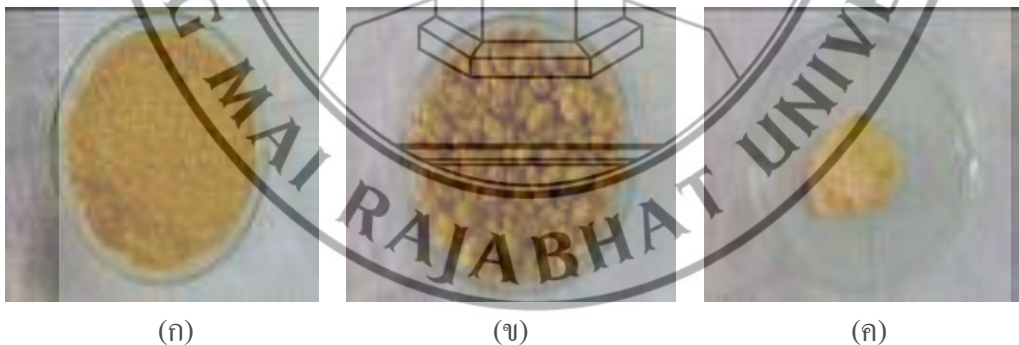
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย

4.1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

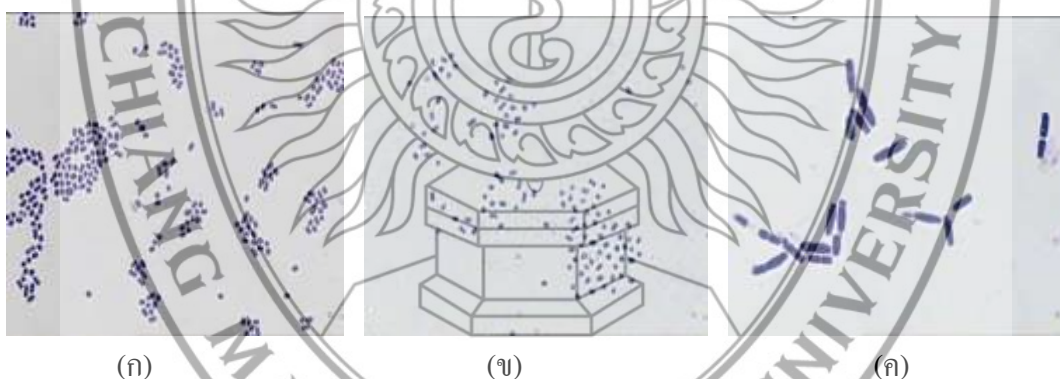
ผลจากการลงพื้นที่ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้าน และการสัมภาษณ์กลุ่มชาวบ้านในเขตพื้นที่ชุมชนตำบลชีเหล็ก อำเภอมะริม จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าชาวบ้านใช้วิธีการหมักถั่วเน่าโดยวิธีธรรมชาติ คือปล่อยให้เชื้อขึ้นเองตามธรรมชาติแล้วจึงเก็บหัวเชื้อถั่วเน่าที่ได้ไว้สำหรับการนำไปหมักถั่วเน่าใหม่ในครั้งต่อไป โดยชาวบ้านในเขตพื้นที่ชุมชนตำบลชีเหล็ก จะใช้ถั่วเหลืองล้วนสำหรับการหมักถั่วเน่า และไม่ใส่สารเพิ่มรสชาติอย่างอื่น เช่น พริก ข่า ดังที่ชุมชนอื่นทำ พฤติกรรมการกินถั่วเน่าของชาวชุมชนตำบลชีเหล็กนั้นสามารถนำถั่วเน่ามากินได้หลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นการนำถั่วเน่าที่เป็นเมล็ดที่ผ่านการหมักแล้ว หรือที่ชาวบ้านเรียกกันว่าถั่วเน่าเขามาผัดกับไข่, การนำถั่วเน่าที่ผ่านการหมักแล้วมาห่อใบตองแล้วนำไปนึ่งหรือย่างไฟ ชาวบ้านจะเรียกกันว่าถั่วเน่าเมอะ วิธีการกินคือใช้จิ้มกินกับข้าวเหนียว และสุดท้ายคือถั่วเน่าแผ่นหรือที่ชาวบ้านเรียกกันว่าถั่วเน่าแคล สามารถนำมาย่างไฟกินกับข้าวเหนียวได้ทันทีหรืออาจนำมาย่างไฟแล้วโขลกให้เป็นผงเก็บไว้สำหรับใช้ปรุงรสอาหารอย่างอื่นก็ได้ โดยการเก็บตัวอย่างถั่วเน่าได้เลือกเก็บตัวอย่างเป็นถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 2 และ 3 วัน (บดละเอียด), ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 3 วัน (เมล็ด) และถั่วเน่าในรูปของถั่วเน่าแผ่นที่ผ่านการหมักนาน 2 และ 3 วัน ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของถั่วเน่าที่เก็บตัวอย่างมาจาก ต.ชีเหล็ก อ.มะริม จ.เชียงใหม่ (ก) ถั่วเน่าชนิดแผ่น (ข) ถั่วเน่าชนิดที่เมล็ด และ(ค) ถั่วเน่าที่บดแล้ว

4.1.2 ผลการคัดแยกเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

เมื่อได้ทำการคัดแยกเชื้อจนได้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบว่าพบจำนวนเชื้อทั้งสิ้น 19 ไอโซเลต โดยที่ถั่วเน่าผ่านกระบวนการหมักแล้ว 2 วัน (บค) และถั่วเน่าแผ่นที่ผ่านการหมัก 2 วัน สามารถแยกเชื้อได้ 3 ไอโซเลต ลักษณะของเชื้อตัวแรกจะมีลักษณะเป็นท่อนต่อกัน, เชื้อตัวที่ 2 มีลักษณะเป็นทรงกลม และเชื้อตัวที่ 3 มีลักษณะ ทรงกลมเรียงต่อกันเป็นท่อนทั้ง 3 ไอโซเลต ย้อมติดสีแกรมบวก ส่วนถั่วเน่าผ่านกระบวนการหมักแล้ว 3 วัน (บค) และถั่วเน่าแผ่นที่ผ่านการหมัก 3 วัน สามารถแยกเชื้อได้ 4 ไอโซเลต ซึ่งเชื้อตัวแรกจะมีลักษณะเป็นท่อนต่อกัน, ตัวที่ 2 มีลักษณะเป็นทรงกลม, ตัวที่ 3 มีลักษณะทรงกลมเรียงต่อกันเป็นท่อนและตัวที่ 4 มีลักษณะเป็นท่อน ทั้ง 4 ไอโซเลตย้อมติดสีแกรมบวก ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักแล้ว 3 วัน (เมล็ด) สามารถแยกเชื้อได้ 5 ไอโซเลต โดย เชื้อตัวแรกจะมีลักษณะเป็นท่อนต่อกัน, ตัวที่ 2 มีลักษณะเป็นทรงกลม, ตัวที่ 3 มีลักษณะทรงกลมเรียงต่อกันเป็นท่อน, ตัวที่ 4 มีลักษณะเป็นท่อน และตัวที่ 5 มีลักษณะเป็นแท่ง ทั้ง 5 ไอโซเลตย้อมติดสีแกรมบวก ดังภาพที่ 4.2 โดยสรุปแล้วตัวอย่างถั่วเน่าจากตำบลห้วยเหล็ก อำเภอแม่อริม จังหวัดเชียงใหม่ สามารถพบเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่น่าจะเหมาะสมสำหรับการหมักถั่วเน่าทั้งสิ้น 5 ไอโซเลต จึงได้กำหนดรหัสเชื้อ ดังนี้ ไอโซเลตที่ 1 เป็นเชื้อ A, ไอโซเลตที่ 2 เป็นเชื้อ B, ไอโซเลตที่ 3 เป็นเชื้อ C, ไอโซเลตที่ 4 เป็นเชื้อ D และไอโซเลตที่ 5 เป็นเชื้อ E



ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีแบคทีเรียที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ก) แบบเป็นท่อน
(ข) ทรงกลม และ(ค) รูปแท่ง

4.2 การทดสอบหมักถั่วเน่าโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์

ในการทดลองหมักถั่วเน่าได้ทดลองหมักทั้งสิ้น 15 สูตร คือสูตร A, B, C, D, E, AB, AC, AD, AE, BC, BD, BE, CD, CE และ DE หลังจากทดสอบหมักถั่วเน่าใน flask โดยที่ใส่เชื้อบริสุทธิ์ลงไป 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าในชั่วโมงที่ 24 ถั่วเน่าเริ่มเปื่อยยุ่ยและมีกลิ่นหอมอ่อนๆ ตามลักษณะกลิ่นเฉพาะของถั่วเน่า และเริ่มมีเส้นใยสีขาวของเชื้อมาปกคลุม เนื่องจากแบคทีเรียเริ่มมีการผลิตเอนไซม์มาย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในถั่วเหลือง จึงทำถั่วเหลืองเริ่มเปื่อยยุ่ย และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของถั่วเน่าเกิดขึ้น และในชั่วโมงที่ 48 สังเกตได้ว่าถั่วเน่าจะมีกลิ่นหอมตามลักษณะกลิ่นเฉพาะตัวของถั่วเน่า ถั่วเน่าจะเปื่อยยุ่ยและมีเส้นใยสีขาวมาปกคลุมโดยรอบ ซึ่งในชั่วโมงที่ 48 นี้แบคทีเรียยังผลิตเอนไซม์มาย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองอย่างต่อเนื่องจึงทำให้ถั่วเหลืองเปื่อยยุ่ยมากขึ้น และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของถั่วเน่าแรงขึ้น แต่ในชั่วโมงที่ 72 ถั่วเน่าจะเริ่มมีกลิ่นหอมฉุน เมล็ดถั่วเปื่อยยุ่ยมาก และมีน้ำสีน้ำตาลลักษณะหนืดๆ คล้ายๆ กับคาราเมลไหลออกมาปกคลุมโดยรอบเมล็ดถั่วดังภาพที่

4.3 โดยสาเหตุที่ถั่วเน่าที่ผ่านกระบวนการหมักหลังจากชั่วโมงที่ 72 เป็นต้นไปเริ่มมีกลิ่นหอมฉุน เมล็ดถั่วเปื่อยยุ่ยมาก และมีน้ำสีน้ำตาลลักษณะหนืดๆ คล้ายๆ กับคาราเมลไหลออกมาปกคลุมโดยรอบเมล็ดถั่ว ก็เนื่องจากว่าแป้งในถั่วเหลืองมีน้อยลง แต่แบคทีเรียยังคงผลิตเอนไซม์มาย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้ถั่วเหลืองหนืดมากขึ้น และมีกลิ่นฉุนแรง ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เหมาะสมสำหรับการนำมาทำถั่วเน่าแผ่น หลังจากนั้นจึงได้คัดเลือกสูตรของถั่วเน่าที่ให้ผลการหมักที่ดีที่สุดซึ่งสังเกตได้จากการทดลองหมักมา 7 สูตร คือ สูตร A, AB, AC, AD, AE, C และ CE โดยที่พิจารณาการคัดเลือกจากถั่วเน่าทั้ง 7 สูตรดังกล่าวมีการเปื่อยยุ่ย และเริ่มมีเส้นใยสีขาวของเชื้อมาปกคลุมได้เร็วกว่าถั่วเน่าหมักสูตรอื่นๆ นอกจากนั้นยังมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของถั่วเน่า และพบว่าการหมักถั่วเน่าที่ได้ใส่เชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลืองที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมงเหมาะสมสำหรับการหมักถั่วเน่าที่สุด เนื่องจากว่าหลังจากชั่วโมงที่ 48 แล้วอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจะช้าลงเรื่อยๆ และมีกิจกรรมเอนไซม์ที่ต่ำลงเรื่อยๆ เช่นกัน



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 4.3 ลักษณะของถั่วเน่าหมัก (ก) ชั่วโมงที่ 24 (ข) ชั่วโมงที่ 48 (ค) ชั่วโมงที่ 72

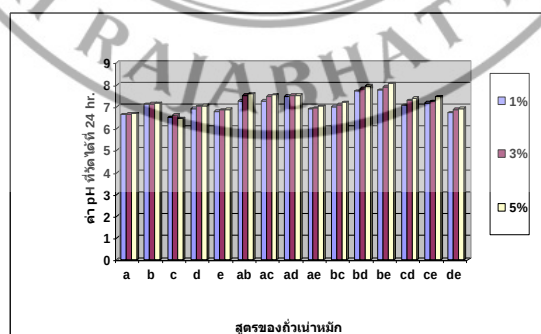
4.3 การวัดค่า pH ระหว่างการทดสอบหมักถั่วเน่า

จากการทดสอบหมักถั่วเน่า และได้เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาวัดค่า pH พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ที่ ปริมาณเชื้อ 1 % BE วัดค่า pH ได้สูงสุดรองลงมา ได้แก่ เชื้อ BD, AD, AC, AB, CE, B, CD, BC, D, AE, E, DE, A และ C วัดค่า pH ได้ 7.75 ± 0.03 , 7.71 ± 0.07 , 7.46 ± 0.05 , 7.26 ± 0.08 , 7.25 ± 0.09 , 7.17 ± 0.01 , 7.11 ± 0.04 , 7.06 ± 0.16 , 7.00 ± 0.04 , 6.92 ± 0.11 , 6.89 ± 0.13 , 6.78 ± 0.28 , 6.71 ± 0.01 , 6.62 ± 0.07 และ 6.49 ± 0.05 ตามลำดับ ที่ปริมาณเชื้อ 3 % BE วัดค่า pH ได้สูงสุดรองลงมา ได้แก่ BD, AD, AB, AC, CD, CE, B, BC, D, AE, DE, E, A และ C วัดค่า pH ได้ 7.90 ± 0.06 , 7.82 ± 0.02 , 7.52 ± 0.11 , 7.51 ± 0.10 , 7.47 ± 0.03 , 7.27 ± 0.14 , 7.24 ± 0.16 , 7.12 ± 0.05 , 7.09 ± 0.04 , 7.01 ± 0.13 , 6.94 ± 0.06 , 6.87 ± 0.16 , 6.84 ± 0.06 , 6.66 ± 0.18 และ 6.61 ± 0.06 ตามลำดับ และที่ปริมาณเชื้อ 5% BE วัดค่า pH ได้สูงสุดรองลงมา ได้แก่ BD, AB, AC, AD, CE, CD, B, C B, D, AE, DE, E, A และ C วัดค่า pH ได้ 8.05 ± 0.12 , 7.95 ± 0.05 , 7.57 ± 0.11 , 7.53 ± 0.07 , 7.52 ± 0.12 , 7.45 ± 0.21 , 7.38 ± 0.10 , 7.19 ± 0.07 , 7.14 ± 0.07 , 7.04 ± 0.04 , 7.01 ± 0.19 , 6.91 ± 0.26 , $6.86 \pm$, 6.67 ± 0.21 และ 6.46 ± 0.11 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.1 และ แผนภาพที่ 4.4 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่วัดได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 24 ชั่วโมง ($\pm$ S.D.)		
	1%	3%	5%
A	6.62 $\pm$ 0.07 ^{ab}	6.66 $\pm$ 0.18 ^{ab}	6.67 $\pm$ 0.21 ^{ab}
B	7.11 $\pm$ 0.04 ^{efg}	7.12 $\pm$ 0.05 ^{ef}	7.14 $\pm$ 0.07 ^{def}
C	6.49 $\pm$ 0.05 ^a	6.61 $\pm$ 0.06 ^a	6.46 $\pm$ 0.11 ^a
D	6.92 $\pm$ 0.11 ^{cde}	7.01 $\pm$ 0.13 ^{cde}	7.04 $\pm$ 0.07 ^{cd}
E	6.78 $\pm$ 0.28 ^{bcd}	6.84 $\pm$ 0.06 ^{bc}	6.86 $\pm$ 0.26 ^{bc}
AB	7.25 $\pm$ 0.09 ^{gh}	7.51 $\pm$ 0.10 ^h	7.57 $\pm$ 0.11 ^g
AC	7.26 $\pm$ 0.08 ^{gh}	7.47 $\pm$ 0.03 ^{gh}	7.53 $\pm$ 0.07 ^g
AD	7.46 $\pm$ 0.05 ^h	7.52 $\pm$ 0.11 ^h	7.52 $\pm$ 0.12 ^g
AE	6.89 $\pm$ 0.13 ^{cde}	6.94 $\pm$ 0.06 ^{cde}	7.01 $\pm$ 0.04 ^{cde}
BC	7.00 $\pm$ 0.04 ^{def}	7.09 $\pm$ 0.04 ^{def}	7.19 $\pm$ 0.04 ^{ef}
BD	7.71 $\pm$ 0.07 ⁱ	7.82 $\pm$ 0.02 ⁱ	7.95 $\pm$ 0.05 ^h
BE	7.75 $\pm$ 0.03 ⁱ	7.90 $\pm$ 0.06 ⁱ	8.05 $\pm$ 0.12 ^h
CD	7.06 $\pm$ 0.16 ^{efg}	7.27 $\pm$ 0.14 ^{fgh}	7.38 $\pm$ 0.10 ^{fg}
CE	7.17 $\pm$ 0.24 ^{fg}	7.24 $\pm$ 0.30 ^{ef}	7.45 $\pm$ 0.21 ^g
DE	6.71 $\pm$ 0.01 ^{bc}	6.87 $\pm$ 0.16 ^{bcd}	6.91 $\pm$ 0.19 ^{cd}

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



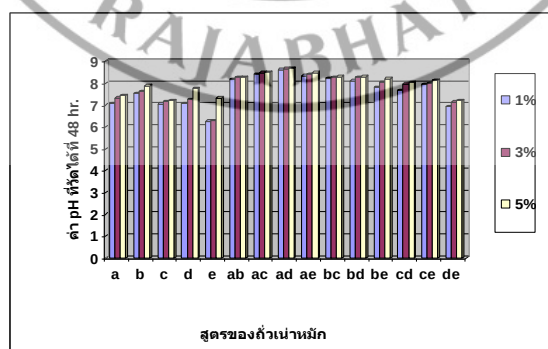
ภาพที่ 4.4 แผนภาพแสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่วัดได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

ในชั่วโมงที่ 48 ที่ปริมาณเชื้อ 1% พบว่า AD วัดค่า pH ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ AC, AE, BC, AB, BD, CE, BE, CD, B, D, A, C, DE และ E วัดค่า pH ได้ 8.61 ± 0.06 , 8.39 ± 0.30 , 8.34 ± 0.07 , 8.22 ± 0.08 , 8.16 ± 0.13 , 8.10 ± 0.09 , 7.95 ± 0.16 , 7.80 ± 0.20 , 7.68 ± 0.07 , 7.54 ± 0.17 , 7.08 ± 0.05 , 7.06 ± 0.03 , 7.04 ± 0.10 , 6.93 ± 0.32 และ 6.25 ± 0.06 ตามลำดับ ที่ปริมาณเชื้อ 3 % AD วัดค่า pH ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ AC, AE, BD, BC, AB, BE, CE, CD, B, A, D, C, DE และ E วัดค่า pH ได้ 8.66 ± 0.08 , 8.48 ± 0.03 , 8.40 ± 0.05 , 8.28 ± 0.02 , 8.26 ± 0.05 , 8.26 ± 0.31 , 8.02 ± 0.03 , 7.99 ± 0.16 , 7.96 ± 0.03 , 7.61 ± 0.02 , 7.32 ± 0.10 , 7.25 ± 0.09 , 7.17 ± 0.05 , 7.14 ± 0.03 และ 6.28 ± 0.08 ตามลำดับ และที่ปริมาณเชื้อ 5% AD วัดค่า pH ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ AC, AE, BD, BC, AB, BE, CE, CD, B, D, A, E, C และ DE วัดค่า pH ได้ 8.67 ± 0.06 , 8.51 ± 0.10 , 8.44 ± 0.16 , 8.29 ± 0.04 , 8.29 ± 0.03 , 8.28 ± 0.06 , 8.20 ± 0.04 , 8.13 ± 0.10 , 8.04 ± 0.08 , 7.87 ± 0.16 , 7.75 ± 0.06 , 7.43 ± 0.12 , 7.32 ± 0.03 , 7.21 ± 0.16 และ 7.20 ± 0.25 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.2 และ แผนภาพที่ 4.5 เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่วัดได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 48 ชั่วโมง ($\pm$ S.D.)		
	1%	3%	5%
A	7.06 $\pm$ 0.03 ^b	7.32 $\pm$ 0.10 ^b	7.43 $\pm$ 0.12 ^b
B	7.54 $\pm$ 0.17 ^c	7.61 $\pm$ 0.02 ^c	7.87 $\pm$ 0.16 ^{cd}
C	7.04 $\pm$ 0.10 ^b	7.17 $\pm$ 0.05 ^b	7.21 $\pm$ 0.16 ^a
D	7.08 $\pm$ 0.05 ^b	7.25 $\pm$ 0.09 ^b	7.75 $\pm$ 0.06 ^c
E	6.25 $\pm$ 0.06 ^a	6.28 $\pm$ 0.08 ^a	7.32 $\pm$ 0.03 ^{ab}
AB	8.16 $\pm$ 0.13 ^{efg}	8.26 $\pm$ 0.31 ^c	8.28 $\pm$ 0.06 ^{fg}
AC	8.39 $\pm$ 0.30 ^{gh}	8.48 $\pm$ 0.03 ^{fg}	8.51 $\pm$ 0.10 ^{hi}
AD	8.61 $\pm$ 0.06 ^h	8.66 $\pm$ 0.08 ^g	8.67 $\pm$ 0.06 ⁱ
AE	8.34 $\pm$ 0.07 ^{efg}	8.40 $\pm$ 0.05 ^{ef}	8.47 $\pm$ 0.16 ^{gh}
BC	8.22 $\pm$ 0.08 ^{efg}	8.26 $\pm$ 0.05 ^c	8.29 $\pm$ 0.03 ^{fg}
BD	8.10 $\pm$ 0.09 ^{ef}	8.28 $\pm$ 0.02 ^e	8.29 $\pm$ 0.04 ^{fg}
BE	7.80 $\pm$ 0.20 ^{cd}	8.02 $\pm$ 0.03 ^d	8.20 $\pm$ 0.04 ^{ef}
CD	7.68 $\pm$ 0.07 ^{cd}	7.96 $\pm$ 0.30 ^d	8.04 $\pm$ 0.08 ^{de}
CE	7.95 $\pm$ 0.16 ^{de}	7.99 $\pm$ 0.16 ^d	8.13 $\pm$ 0.10 ^{ef}
DE	6.93 $\pm$ 0.32 ^b	7.14 $\pm$ 0.03 ^b	7.20 $\pm$ 0.25 ^a

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



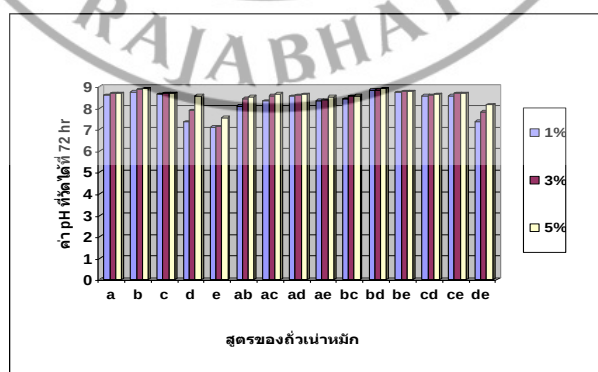
ภาพที่ 4.5 แผนภาพแสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่วัดได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

และในชั่วโมงที่ 72 พบว่าที่ปริมาณเชื้อ 1 % BD วัดค่า pH ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ B, BE, C, A, CD, CE, AD, BC, AE, AC, AB, DE, D และ E วัดค่า pH ได้ 8.83 ± 0.09 , 8.75 ± 0.01 , 8.71 ± 0.07 , 8.64 ± 0.32 , 8.60 ± 0.05 , 8.57 ± 0.03 , 8.56 ± 0.02 , 8.55 ± 0.04 , 8.40 ± 0.20 , 8.35 ± 0.03 , 8.32 ± 0.07 , 8.08 ± 0.04 , 7.37 ± 0.22 , 7.34 ± 0.09 และ 7.11 ± 0.04 ตามลำดับ ที่ปริมาณเชื้อ 3 % B วัดค่า pH ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ BD, BE, A, C, CE, AD, CD, AC, BC, AB, AE, D, DE และ E วัดค่า pH ได้ 8.85 ± 0.16 , 8.84 ± 0.02 , 8.77 ± 0.06 , 8.69 ± 0.04 , 8.68 ± 0.04 , 8.67 ± 0.06 , 8.59 ± 0.02 , 8.59 ± 0.03 , 8.56 ± 0.09 , 8.55 ± 0.07 , 8.44 ± 0.19 , 8.36 ± 0.07 , 7.89 ± 0.01 , 7.71 ± 0.36 และ 7.12 ± 0.09 ตามลำดับ และที่ปริมาณเชื้อ 5% B และ BD วัดค่า pH ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ BE, A, C, CE, AC, CD, AD, D, BC, AE, AB, DE และ E วัดค่า pH ได้ 8.89 ± 0.10 , 8.89 ± 0.02 , 8.78 ± 0.06 , 8.69 ± 0.14 , 8.68 ± 0.03 , 8.68 ± 0.06 , 8.66 ± 0.10 , 8.64 ± 0.02 , 8.62 ± 0.09 , 8.56 ± 0.62 , 8.56 ± 0.09 , 8.53 ± 0.19 , 8.52 ± 0.12 , 8.15 ± 0.15 และ 7.55 ± 0.36 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3 และ แผนภาพที่ 4.6 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เช่นเดียวงานวิจัยของ Sarkar ในปี 1993 พบว่าในช่วงเวลาการหมัก 12 ชั่วโมงแรก pH จะมีค่าสูงสุด และ จะเริ่มคงที่เนื่องจากการทำงานของโปรตีนทำให้เกิดแอมโมเนียที่เป็น ด่าง ซึ่งเป็นช่วงการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแบบ log phase

ตารางที่ 4.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่วัดได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 72 ชั่วโมง ($\pm$ S.D.)		
	1%	3%	5%
A	8.60 ± 0.05^{ef}	8.69 ± 0.04^{ef}	8.69 ± 0.14^{cd}
B	8.75 ± 0.01^{fg}	8.85 ± 0.16^f	8.89 ± 0.10^e
C	8.64 ± 0.32^{fg}	8.68 ± 0.04^{def}	8.68 ± 0.03^{cd}
D	7.34 ± 0.09^b	7.89 ± 0.01^b	8.56 ± 0.62^c
E	7.11 ± 0.04^a	7.12 ± 0.09^a	7.55 ± 0.36^a
AB	8.08 ± 0.04^c	8.44 ± 0.19^{cd}	8.52 ± 0.12^c
AC	8.32 ± 0.07^d	8.56 ± 0.09^{cde}	8.66 ± 0.10^{cd}
AD	8.55 ± 0.04^{ef}	8.59 ± 0.02^{cde}	8.62 ± 0.09^c
AE	8.35 ± 0.03^{de}	8.36 ± 0.07^c	8.53 ± 0.19^c
BC	8.40 ± 0.20^e	8.55 ± 0.07^{cde}	8.56 ± 0.09^c
BD	8.83 ± 0.09^g	8.84 ± 0.02^f	8.89 ± 0.02^e
BE	8.71 ± 0.07^{fg}	8.77 ± 0.06^{ef}	8.78 ± 0.06^{de}
CD	8.57 ± 0.03^{ef}	8.59 ± 0.03^{cde}	8.64 ± 0.02^{cd}
CE	8.56 ± 0.02^{ef}	8.67 ± 0.06^{def}	8.68 ± 0.06^{cd}
DE	7.37 ± 0.22^b	7.81 ± 0.36^b	8.15 ± 0.15^b

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



ภาพที่ 4.6 แผนภาพแสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่วัดได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

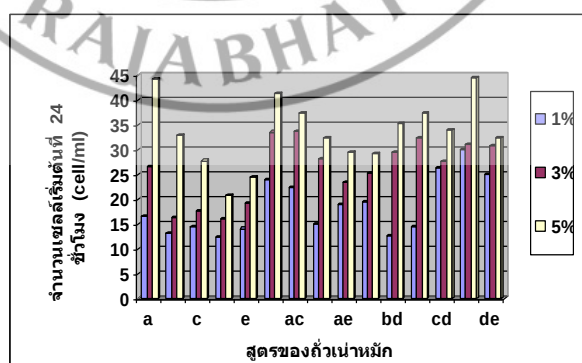
4.4 การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย

จากการทดสอบหมักถั่วเน่า และได้เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาทำการวัดจำนวนเซลล์ พบว่าในชั่วโมงที่ 24 ที่ปริมาณเชื้อ 1 % CE นับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ CD, DE, AB, AC, BC, AE, A, AD, BE, C, B, BD, E และ D นับจำนวนเซลล์ได้ $29.26 \times 10^7 \pm 0.24$, $26.24 \times 10^7 \pm 0.48$, $24.96 \times 10^7 \pm 0.56$, $24.00 \times 10^7 \pm 0.39$, $22.40 \times 10^7 \pm 1.52$, $19.52 \times 10^7 \pm 1.26$, $18.88 \times 10^7 \pm 0.31$, $16.64 \times 10^7 \pm 0.35$, $15.10 \times 10^7 \pm 1.11$, $14.40 \times 10^7 \pm 0.75$, $13.96 \times 10^7 \pm 0.48$, $13.12 \times 10^7 \pm 0.52$, $12.98 \times 10^7 \pm 0.71$, $12.63 \times 10^7 \pm 0.85$ และ $12.32 \times 10^7 \pm 1.04$ ตามลำดับ ที่ปริมาณเชื้อ 3 % AC นับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ AB, BE, DE, CE, BD, AD, CD, A, BC, AE, E, C, B และ D นับจำนวนเซลล์ได้ $35.49 \times 10^7 \pm 1.74$, $34.33 \times 10^7 \pm 1.11$, $32.77 \times 10^7 \pm 3.67$, $31.24 \times 10^7 \pm 2.40$, $31.04 \times 10^7 \pm 1.47$, $29.44 \times 10^7 \pm 1.40$, $28.16 \times 10^7 \pm 1.12$, $28.15 \times 10^7 \pm 0.78$, $26.66 \times 10^7 \pm 1.21$, $24.88 \times 10^7 \pm 1.24$, $23.36 \times 10^7 \pm 2.17$, $19.20 \times 10^7 \pm 0.77$, $17.07 \times 10^7 \pm 1.29$, $16.32 \times 10^7 \pm 0.79$ และ $16.00 \times 10^7 \pm 1.51$ ตามลำดับ และที่ปริมาณเชื้อ 5% CE นับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ A, AB, BE, AC, BD, CD, AD, DE, B, AE, BC, C, E และ D นับจำนวนเซลล์ได้ $44.48 \times 10^7 \pm 0.69$, $44.16 \times 10^7 \pm 1.07$, $41.40 \times 10^7 \pm 1.59$, $37.45 \times 10^7 \pm 2.20$, $37.36 \times 10^7 \pm 2.32$, $35.26 \times 10^7 \pm 2.49$, $34.54 \times 10^7 \pm 1.36$, $32.32 \times 10^7 \pm 1.56$, $32.32 \times 10^7 \pm 1.60$, $30.49 \times 10^7 \pm 1.44$, $29.44 \times 10^7 \pm 7.66$, $29.12 \times 10^7 \pm 0.78$, $27.76 \times 10^7 \pm 2.53$, $25.08 \times 10^7 \pm 0.45$ และ $21.24 \times 10^7 \pm 2.43$ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4 และแผนภาพที่ 4.7 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4.4 จำนวนของเซลล์แบคทีเรียที่นับได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	ปริมาณเชื้อ (cell/ml) ($\pm$ S.D.)		
	1%	3%	5%
A	$16.64 \times 10^7 \pm 0.35^c$	$26.66 \times 10^7 \pm 1.21^{de}$	$44.16 \times 10^7 \pm 1.07^g$
B	$13.12 \times 10^7 \pm 0.52^{abc}$	$16.32 \times 10^7 \pm 0.79^{ab}$	$30.49 \times 10^7 \pm 1.44^{cd}$
C	$13.96 \times 10^7 \pm 0.48^{bcd}$	$17.07 \times 10^7 \pm 1.29^{ab}$	$27.76 \times 10^7 \pm 2.53^{bc}$
D	$12.32 \times 10^7 \pm 1.04^a$	$16.00 \times 10^7 \pm 1.51^a$	$21.24 \times 10^7 \pm 2.43^a$
E	$12.63 \times 10^7 \pm 0.85^{ab}$	$19.20 \times 10^7 \pm 0.77^b$	$25.08 \times 10^7 \pm 0.45^{ab}$
AB	$24.00 \times 10^7 \pm 0.39^h$	$34.33 \times 10^7 \pm 1.11^h$	$41.40 \times 10^7 \pm 1.59^{fg}$
AC	$22.40 \times 10^7 \pm 1.52^g$	$35.49 \times 10^7 \pm 1.74^h$	$37.36 \times 10^7 \pm 2.32^{ef}$
AD	$15.10 \times 10^7 \pm 1.11^d$	$28.16 \times 10^7 \pm 1.12^{ef}$	$32.32 \times 10^7 \pm 1.56^{cd}$
AE	$18.88 \times 10^7 \pm 0.31^f$	$23.36 \times 10^7 \pm 2.17^c$	$29.44 \times 10^7 \pm 7.66^{bc}$
BC	$19.52 \times 10^7 \pm 1.26^f$	$24.88 \times 10^7 \pm 1.24^{cd}$	$29.12 \times 10^7 \pm 0.78^{bc}$
BD	$12.98 \times 10^7 \pm 0.71^{abc}$	$29.44 \times 10^7 \pm 1.40^{ef}$	$35.26 \times 10^7 \pm 2.49^{de}$
BE	$14.40 \times 10^7 \pm 0.75^{cd}$	$32.77 \times 10^7 \pm 3.67^{gh}$	$37.45 \times 10^7 \pm 2.20^{ef}$
CD	$26.24 \times 10^7 \pm 0.48^i$	$28.15 \times 10^7 \pm 0.78^{ef}$	$34.54 \times 10^7 \pm 1.36^{de}$
CE	$29.86 \times 10^7 \pm 0.24^j$	$31.04 \times 10^7 \pm 1.47^{fg}$	$44.48 \times 10^7 \pm 0.69^g$
DE	$24.96 \times 10^7 \pm 0.56^{hi}$	$31.24 \times 10^7 \pm 2.40^{fg}$	$32.32 \times 10^7 \pm 1.60^{cd}$

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



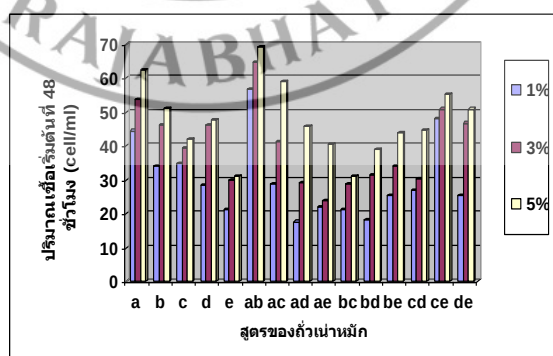
ภาพที่ 4.7 แผนภาพแสดงจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่นับได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

ในชั่วโมงที่ 48 ที่ปริมาณเชื้อ 1% พบว่า AB นับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ CE, A, C, B, CD, AC, BE, DE, D, AE, E, BC, BD และ AD นับจำนวนเซลล์ได้ $53.70 \times 10^7 \pm 0.79$, $48.00 \times 10^7 \pm 2.49$, $44.48 \times 10^7 \pm 0.63$, $34.88 \times 10^7 \pm 2.90$, $33.92 \times 10^7 \pm 6.44$, $27.54 \times 10^7 \pm 1.37$, $26.22 \times 10^7 \pm 1.07$, $25.28 \times 10^7 \pm 0.50$, $25.28 \times 10^7 \pm 0.94$, $24.64 \times 10^7 \pm 1.80$, $22.08 \times 10^7 \pm 1.38$, $21.20 \times 10^7 \pm 1.28$, $20.39 \times 10^7 \pm 0.92$, $18.94 \times 10^7 \pm 0.78$ และ $17.60 \times 10^7 \pm 1.50$ ตามลำดับ ที่ปริมาณเชื้อ 3 % AB นับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ A, CE, DE, B, D, AC, C, BE, BD, CD, E, AD, BC และ AE นับจำนวนเซลล์ได้ $64.64 \times 10^7 \pm 3.90$, $53.76 \times 10^7 \pm 1.25$, $50.88 \times 10^7 \pm 4.68$, $46.72 \times 10^7 \pm 3.88$, $46.08 \times 10^7 \pm 0.24$, $46.08 \times 10^7 \pm 2.33$, $41.36 \times 10^7 \pm 0.89$, $39.36 \times 10^7 \pm 5.84$, $33.92 \times 10^7 \pm 3.10$, $31.28 \times 10^7 \pm 2.05$, $30.40 \times 10^7 \pm 1.13$, $29.84 \times 10^7 \pm 3.92$, $29.28 \times 10^7 \pm 1.30$, $27.80 \times 10^7 \pm 5.47$ และ $24.00 \times 10^7 \pm 1.76$ ตามลำดับ และที่ปริมาณเชื้อ 5% AB นับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ A, AC, CE, B, DE, D, AD, CD, BE, C, AE, BD, BC และ E นับจำนวนเซลล์ได้ $69.12 \times 10^7 \pm 5.95$, $62.50 \times 10^7 \pm 1.26$, $58.88 \times 10^7 \pm 1.23$, $55.39 \times 10^7 \pm 0.97$, $51.20 \times 10^7 \pm 4.17$, $50.88 \times 10^7 \pm 1.75$, $47.68 \times 10^7 \pm 1.57$, $45.76 \times 10^7 \pm 0.47$, $44.80 \times 10^7 \pm 4.41$, $43.77 \times 10^7 \pm 1.39$, $41.90 \times 10^7 \pm 1.22$, $40.64 \times 10^7 \pm 2.58$, $39.04 \times 10^7 \pm 4.66$, $31.04 \times 10^7 \pm 5.04$ และ $30.96 \times 10^7 \pm 2.37$ ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ดังตารางที่ 4.5 และแผนภาพที่ 4.8

ตารางที่ 4.5 จำนวนของเซลล์แบคทีเรียที่นับได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	ปริมาณเชื้อ (cell/ml) ($\pm$ S.D.)		
	1%	3%	5%
A	$44.48 \times 10^7 \pm 0.63^g$	$53.76 \times 10^7 \pm 1.25^g$	$62.50 \times 10^7 \pm 1.26^h$
B	$33.92 \times 10^7 \pm 6.44^f$	$46.08 \times 10^7 \pm 0.24^{ef}$	$51.20 \times 10^7 \pm 4.17^{ef}$
C	$34.88 \times 10^7 \pm 2.90^f$	$39.36 \times 10^7 \pm 5.84^{cd}$	$41.90 \times 10^7 \pm 1.22^{bc}$
D	$24.64 \times 10^7 \pm 1.80^{cde}$	$46.08 \times 10^7 \pm 2.33^{ef}$	$47.68 \times 10^7 \pm 1.57^d$
E	$21.20 \times 10^7 \pm 1.28^{abc}$	$29.84 \times 10^7 \pm 3.92^{ab}$	$30.96 \times 10^7 \pm 2.37^a$
AB	$53.70 \times 10^7 \pm 0.79^h$	$64.64 \times 10^7 \pm 3.90^h$	$69.12 \times 10^7 \pm 5.95^i$
AC	$26.22 \times 10^7 \pm 1.07^e$	$41.36 \times 10^7 \pm 0.89^{de}$	$58.88 \times 10^7 \pm 1.23^{gh}$
AD	$17.60 \times 10^7 \pm 1.50^a$	$29.28 \times 10^7 \pm 1.30^{ab}$	$45.76 \times 10^7 \pm 0.47^{cde}$
AE	$22.08 \times 10^7 \pm 1.38^{bcde}$	$24.00 \times 10^7 \pm 1.76^a$	$40.64 \times 10^7 \pm 2.58^{bc}$
BC	$20.39 \times 10^7 \pm 0.29^{ab}$	$27.80 \times 10^7 \pm 5.47^{ab}$	$31.04 \times 10^7 \pm 5.04^a$
BD	$18.94 \times 10^7 \pm 0.78^{ab}$	$31.28 \times 10^7 \pm 2.05^b$	$39.04 \times 10^7 \pm 4.66^b$
BE	$25.28 \times 10^7 \pm 0.50^{de}$	$33.92 \times 10^7 \pm 3.10^{bc}$	$43.77 \times 10^7 \pm 1.39^{bcd}$
CD	$27.54 \times 10^7 \pm 1.37^c$	$30.40 \times 10^7 \pm 1.13^b$	$44.80 \times 10^7 \pm 4.41^{cde}$
CE	$48.00 \times 10^7 \pm 2.49^g$	$50.88 \times 10^7 \pm 4.68^{fg}$	$55.39 \times 10^7 \pm 0.97^{fg}$
DE	$25.28 \times 10^7 \pm 0.94^{de}$	$46.72 \times 10^7 \pm 3.88^{ef}$	$50.88 \times 10^7 \pm 1.95^{ef}$

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



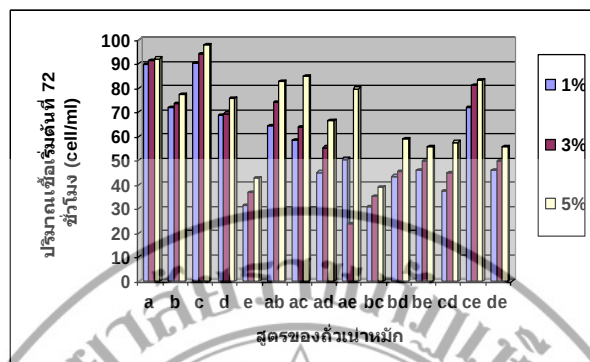
ภาพที่ 4.8 แผนภาพแสดงจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่นับได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

และในช่วงโม่งที่ 72 พบว่าที่ ปริมาณเชื้อ 1 % C นับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ A, B, CE, D, AB, AC, AE, BE, DE, AD, BD, CD, E และ BC นับจำนวนเซลล์ได้ $90.24 \times 10^7 \pm 1.67$, $89.60 \times 10^7 \pm 0.36$, $72.00 \times 10^7 \pm 3.72$, $72.00 \times 10^7 \pm 1.44$, $68.48 \times 10^7 \pm 1.04$, $64.38 \times 10^7 \pm 0.46$, $58.42 \times 10^7 \pm 0.61$, $50.56 \times 10^7 \pm 0.79$, $45.76 \times 10^7 \pm 0.28$, $45.76 \times 10^7 \pm 0.54$, $45.12 \times 10^7 \pm 0.87$, $43.52 \times 10^7 \pm 0.45$, $37.28 \times 10^7 \pm 0.79$, $31.52 \times 10^7 \pm 0.74$ และ $31.04 \times 10^7 \pm 0.53$ ตามลำดับ ที่ปริมาณเชื้อ 3 % C นับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ A, CE, AB, B, D, AC, AE, AD, BE, DE, BD, CD, E และ BC นับจำนวนเซลล์ได้ $94.08 \times 10^7 \pm 3.37$, $91.20 \times 10^7 \pm 0.72$, $80.96 \times 10^7 \pm 2.70$, $74.24 \times 10^7 \pm 2.25$, $73.2 \times 10^7 \pm 0.14$, $69.44 \times 10^7 \pm 1.34$, $64.00 \times 10^7 \pm 0.51$, $57.92 \times 10^7 \pm 1.01$, $55.36 \times 10^7 \pm 0.75$, $49.60 \times 10^7 \pm 1.79$, $49.60 \times 10^7 \pm 2.24$, $45.44 \times 10^7 \pm 1.18$, $44.80 \times 10^7 \pm 0.65$, $36.72 \times 10^7 \pm 2.26$ และ $35.20 \times 10^7 \pm 3.15$ ตามลำดับ และที่ปริมาณเชื้อ 5% C นับจำนวนเซลล์ได้สูงสุดรองลงมาได้แก่ A, AC, CE, AB, AE, B, D, AD, BD, CD, BE, DE, E และ BC นับจำนวนเซลล์ได้ $97.92 \times 10^7 \pm 1.22$, $92.61 \times 10^7 \pm 1.26$, $84.80 \times 10^7 \pm 1.23$, $83.20 \times 10^7 \pm 0.97$, $82.88 \times 10^7 \pm 5.95$, $79.68 \times 10^7 \pm 2.58$, $77.44 \times 10^7 \pm 4.17$, $75.52 \times 10^7 \pm 1.57$, $66.28 \times 10^7 \pm 0.47$, $58.88 \times 10^7 \pm 4.66$, $57.60 \times 10^7 \pm 4.41$, $55.68 \times 10^7 \pm 1.39$, $55.68 \times 10^7 \pm 1.75$, $42.88 \times 10^7 \pm 2.37$ และ $38.72 \times 10^7 \pm 5.04$ ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ดังตารางที่ 4.6 และแผนภาพที่ 4.9

ตารางที่ 4.6 จำนวนของเซลล์แบคทีเรียที่นับได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	ปริมาณเชื้อ (cell/ml) ($\pm$ S.D.)		
	1%	3%	5%
A	$89.60 \times 10^7 \pm 0.36^g$	$91.20 \times 10^7 \pm 0.72^i$	$92.16 \times 10^7 \pm 1.26^i$
B	$72.00 \times 10^7 \pm 3.72^f$	$73.28 \times 10^7 \pm 0.14^g$	$77.44 \times 10^7 \pm 4.17^{ef}$
C	$90.24 \times 10^7 \pm 1.67^g$	$94.08 \times 10^7 \pm 3.37^i$	$97.92 \times 10^7 \pm 1.22^i$
D	$68.48 \times 10^7 \pm 1.04^{ef}$	$69.44 \times 10^7 \pm 1.34^{fg}$	$75.52 \times 10^7 \pm 1.57^e$
E	$31.52 \times 10^7 \pm 0.74^a$	$36.72 \times 10^7 \pm 2.26^a$	$42.88 \times 10^7 \pm 2.37^e$
AB	$64.38 \times 10^7 \pm 0.46^{de}$	$74.24 \times 10^7 \pm 2.25^{gh}$	$82.88 \times 10^7 \pm 5.95^{fg}$
AC	$58.42 \times 10^7 \pm 0.61^d$	$64.00 \times 10^7 \pm 0.51^{ef}$	$84.80 \times 10^7 \pm 1.23^g$
AD	$45.12 \times 10^7 \pm 0.87^c$	$55.36 \times 10^7 \pm 0.75^{cd}$	$66.28 \times 10^7 \pm 0.47^c$
AE	$50.56 \times 10^7 \pm 0.79^c$	$57.92 \times 10^7 \pm 1.01^{de}$	$79.68 \times 10^7 \pm 2.58^{efg}$
BC	$31.04 \times 10^7 \pm 0.53^a$	$35.20 \times 10^7 \pm 3.15^a$	$38.72 \times 10^7 \pm 5.04^a$
BD	$43.52 \times 10^7 \pm 0.45^{bc}$	$45.44 \times 10^7 \pm 1.18^b$	$58.88 \times 10^7 \pm 4.66^b$
BE	$45.76 \times 10^7 \pm 0.28^c$	$49.60 \times 10^7 \pm 1.79^{bc}$	$55.68 \times 10^7 \pm 1.39^b$
CD	$37.28 \times 10^7 \pm 0.79^{ab}$	$44.80 \times 10^7 \pm 0.65^b$	$57.60 \times 10^7 \pm 4.41^b$
CE	$72.00 \times 10^7 \pm 1.44^f$	$80.96 \times 10^7 \pm 2.70^h$	$83.20 \times 10^7 \pm 0.97^{fg}$
DE	$45.76 \times 10^7 \pm 0.54^c$	$49.60 \times 10^7 \pm 2.24^{bc}$	$55.68 \times 10^7 \pm 1.75^b$

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



ภาพที่ 4.9 แผนภาพแสดงจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่นับได้หลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

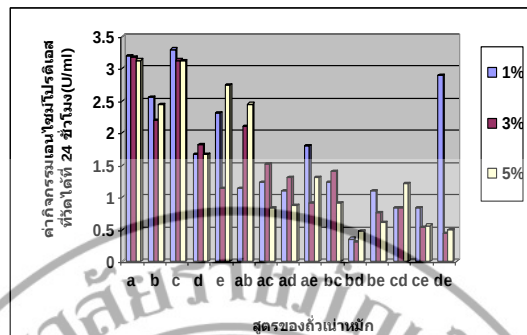
4.5 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี azocasein

หลังจากเก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยวิธี azocasein แล้วพบว่าในชั่วโมงที่ 24 ที่ปริมาณเชื้อ 1 % A มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดรองลงมาได้แก่ C, B, E, AE, D, AC, BC, AB, AD, BD, CD, CE, BD และ DE วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ 3.30 ± 0.11 , 3.20 ± 0.08 , 2.56 ± 0.21 , 2.30 ± 0.01 , 1.80 ± 0.03 , 1.67 ± 0.01 , 1.23 ± 0.01 , 1.21 ± 0.01 , 1.13 ± 0.04 , 1.10 ± 0.01 , 1.10 ± 0.01 , 0.86 ± 0.01 , 0.83 ± 0.01 , 0.37 ± 0.01 และ 0.29 ± 0.01 U/ml ตามลำดับ ที่ปริมาณเชื้อ 3 % C มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดรองลงมาได้แก่ A, B, AB, D, AC, BC, AD, E, AE, CD, BE, CE, DE และ BD วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ 3.18 ± 0.08 , 3.13 ± 0.25 , 2.20 ± 0.24 , 2.10 ± 0.01 , 1.81 ± 0.05 , 1.51 ± 0.01 , 1.40 ± 0.01 , 1.30 ± 0.45 , 1.13 ± 0.01 , 0.91 ± 0.01 , 0.83 ± 0.03 , 0.76 ± 0.01 , 0.56 ± 0.01 , 0.43 ± 0.04 และ 0.30 ± 0.01 U/ml ตามลำดับ และที่ปริมาณเชื้อ 5% C มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดรองลงมาได้แก่ A, E, B, AB, D, AE, CD, BC, AD, AC, BE, CE, DE และ BD วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ 3.18 ± 0.25 , 3.13 ± 0.27 , 2.73 ± 0.12 , 2.43 ± 0.07 , 2.43 ± 0.01 , 1.67 ± 0.02 , 1.30 ± 0.01 , 1.21 ± 0.01 , 0.91 ± 0.01 , 0.87 ± 0.01 , 0.83 ± 0.01 , 0.61 ± 0.01 , 0.56 ± 0.01 , 0.50 ± 0.02 และ 0.47 ± 0.01 U/ml ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตารางที่ 4.7 และแผนภาพที่ 4.10

ตารางที่ 4.7 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (U/ml) ($\pm$ S.D.)		
	1%	3%	5%
A	3.20 ± 0.11^h	3.18 ± 0.25^i	3.13 ± 0.27^g
B	2.56 ± 0.26^g	2.20 ± 0.24^h	2.43 ± 0.07^e
C	3.30 ± 0.08^h	3.13 ± 0.08^i	3.18 ± 0.25^g
D	1.67 ± 0.03^d	1.81 ± 0.05^g	1.67 ± 0.02^d
E	2.30 ± 0.21^f	1.13 ± 0.01^{de}	2.73 ± 0.12^f
AB	1.13 ± 0.01^c	2.10 ± 0.01^h	2.43 ± 0.01^e
AC	1.23 ± 0.01^c	1.51 ± 0.01^f	0.83 ± 0.01^b
AD	1.10 ± 0.04^c	1.30 ± 0.45^{ef}	0.87 ± 0.01^b
AE	1.80 ± 0.01^e	0.91 ± 0.01^{cd}	1.30 ± 0.01^c
BC	1.21 ± 0.01^c	1.40 ± 0.01^f	0.91 ± 0.01^b
BD	0.37 ± 0.01^a	0.30 ± 0.01^a	0.47 ± 0.01^a
BE	1.10 ± 0.01^c	0.76 ± 0.01^{bc}	0.61 ± 0.01^a
CD	0.86 ± 0.01^b	0.83 ± 0.03^c	1.21 ± 0.01^c
CE	0.83 ± 0.01^b	0.56 ± 0.01^{ab}	0.56 ± 0.01^a
DE	0.29 ± 0.01^a	0.43 ± 0.04^a	0.50 ± 0.02^a

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



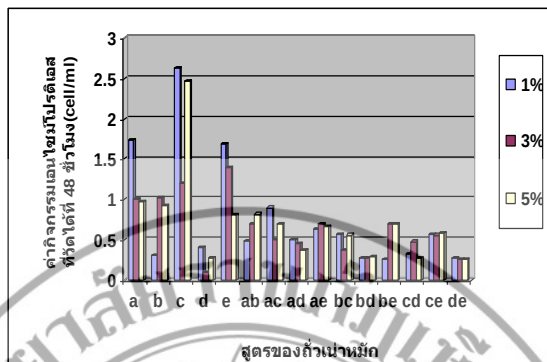
แผนภาพที่ 4.10 แผนภาพแสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสหลังจากหมักทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

ในชั่วโมงที่ 48 ที่ปริมาณเชื้อ 1% พบว่า C มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดรองลงมาได้แก่ A, E, AC, AE, BC, CE, AD, AB, D, CD, B, BD, DE และ BE วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ 2.62 ± 0.01 , 1.71 ± 0.12 , 1.69 ± 0.01 , 0.90 ± 0.01 , 0.63 ± 0.01 , 0.57 ± 0.01 , 0.57 ± 0.01 , 0.50 ± 0.01 , 0.49 ± 0.01 , 0.41 ± 0.01 , 0.32 ± 0.01 , 0.31 ± 0.01 , 0.28 ± 0.01 , 0.27 ± 0.01 และ 0.26 ± 0.01 U/ml ตามลำดับ ที่ปริมาณเชื้อ 3 % E มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดรองลงมาได้แก่ C, B, A, AB, AE, BE, CE, AC, CD, AD, BC, BD, DE และ D วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ 1.39 ± 0.01 , 1.10 ± 0.01 , 1.02 ± 0.01 , 1.00 ± 0.01 , 0.70 ± 0.01 , 0.70 ± 0.01 , 0.70 ± 0.01 , 0.56 ± 0.01 , 0.50 ± 0.01 , 0.48 ± 0.14 , 0.46 ± 0.01 , 0.37 ± 0.01 , 0.27 ± 0.01 , 0.26 ± 0.01 และ 0.10 ± 0.01 U/ml ตามลำดับ และที่ปริมาณเชื้อ 5% C มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดรองลงมาได้แก่ A, B, AB, E, AC, BE, AE, CE, BC, AD, BD, D, CD และ DE วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ 2.47 ± 0.01 , 0.98 ± 0.01 , 0.92 ± 0.01 , 0.82 ± 0.01 , 0.81 ± 0.01 , 0.70 ± 0.01 , 0.70 ± 0.01 , 0.66 ± 0.01 , 0.59 ± 0.01 , 0.56 ± 0.01 , 0.37 ± 0.01 , 0.29 ± 0.01 , 0.28 ± 0.01 , 0.27 ± 0.01 และ 0.26 ± 0.01 U/ml ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตารางที่ 4.8 และแผนภาพที่ 4.11

ตารางที่ 4.8 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (U/ml) ($\pm$ S.D.)		
	1%	3%	5%
A	1.71 ± 0.12^i	1.00 ± 0.01^g	0.98 ± 0.01^l
B	0.31 ± 0.01^{bc}	1.02 ± 0.01^g	0.92 ± 0.01^k
C	2.62 ± 0.01^j	1.10 ± 0.01^i	2.47 ± 0.01^m
D	0.41 ± 0.01^d	0.10 ± 0.01^c	0.28 ± 0.01^{bc}
E	1.69 ± 0.01^i	1.39 ± 0.01^h	0.81 ± 0.01^j
AB	0.49 ± 0.01^e	0.70 ± 0.01^f	0.82 ± 0.01^j
AC	0.90 ± 0.01^h	0.50 ± 0.01^{cd}	0.70 ± 0.01^i
AD	0.50 ± 0.01^e	0.46 ± 0.01^c	0.37 ± 0.01^d
AE	0.63 ± 0.01^g	0.70 ± 0.01^f	0.66 ± 0.01^g
BC	0.57 ± 0.01^f	0.37 ± 0.01^b	0.56 ± 0.01^e
BD	0.28 ± 0.01^{ab}	0.27 ± 0.01^a	0.29 ± 0.01^c
BE	0.26 ± 0.01^a	0.70 ± 0.01^f	0.70 ± 0.01^h
CD	0.32 ± 0.01^c	0.48 ± 0.14^c	0.27 ± 0.01^{ab}
CE	0.57 ± 0.01^f	0.56 ± 0.01^{dc}	0.59 ± 0.01^f
DE	0.27 ± 0.01^a	0.26 ± 0.01^a	0.26 ± 0.01^a

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



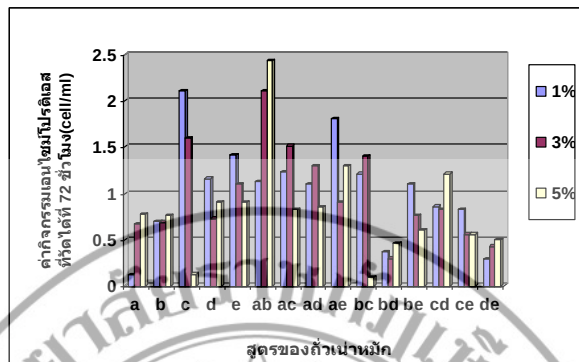
ภาพที่ 4.11 แผนภาพแสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสหลังจากหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

และในชั่วโมงที่ 72 พบว่าที่ปริมาณเชื้อ 1 % C มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดรองลงมาได้แก่ AE, E, A, AC, BC, D, AB, AD, BE, CD, CE, B, BD และ DE วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ 2.10 ± 0.01 , 1.80 ± 0.01 , 1.41 ± 0.01 , 1.38 ± 0.01 , 1.23 ± 0.01 , 1.21 ± 0.01 , 1.16 ± 0.01 , 1.13 ± 0.01 , 1.10 ± 0.04 , 1.10 ± 0.01 , 0.86 ± 0.01 , 0.70 ± 0.01 , 0.38 ± 0.01 , 0.37 ± 0.01 และ 0.29 ± 0.01 U/ml ตามลำดับ ที่ปริมาณเชื้อ 3% AB มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดรองลงมาได้แก่ C, AC, BC, AD, E, AE, CD, BE, D, B, A, CE, DE และ BD วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ 2.10 ± 0.01 , 1.60 ± 0.01 , 1.51 ± 0.01 , 1.40 ± 0.01 , 1.30 ± 0.45 , 1.10 ± 0.01 , 0.91 ± 0.01 , 0.83 ± 0.03 , 0.76 ± 0.01 , 0.73 ± 0.01 , 0.69 ± 0.01 , 0.67 ± 0.01 , 0.56 ± 0.01 , 0.43 ± 0.04 และ 0.30 ± 0.01 U/ml ตามลำดับ และที่ปริมาณเชื้อ 5% AB มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดรองลงมาได้แก่ AE, CD, E, BC, D, AD, AC, A, B, BE, CE, DE, BD และ C วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ 2.43 ± 0.01 , 1.30 ± 0.01 , 1.21 ± 0.01 , 0.91 ± 0.01 , 0.91 ± 0.01 , 0.90 ± 0.01 , 0.87 ± 0.01 , 0.83 ± 0.01 , 0.77 ± 0.01 , 0.76 ± 0.01 , 0.61 ± 0.01 , 0.56 ± 0.01 , 0.50 ± 0.02 , 0.46 ± 0.01 และ 0.13 ± 0.01 U/ml ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.9 และแผนภาพที่ 4.12 เนื่องจากบทบาทของเอนไซม์โปรติเอสในกระบวนการหมักถั่วเน่าคือย่อยโปรตีนที่มีในถั่วเหลือง (ภาณุวรรณ, 2543) จึงมีผลทำให้ถั่วเหลืองมีการเปื่อยยุ่ย และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของถั่วเน่าออกมา นั่นก็หมายความว่าเชื้อตัวใดที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงก็ย่อมเป็นผลดีต่อกระบวนการหมักถั่วเน่ามากขึ้น

ตารางที่ 4.9 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการหมักถั่วเน่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

เชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (U/ml) ($\pm$ S.D.)		
	1%	3%	5%
A	1.38 ± 0.01^h	0.67 ± 0.01^{cd}	0.77 ± 0.01^e
B	0.70 ± 0.01^c	0.69 ± 0.01^{cd}	0.76 ± 0.01^e
C	2.10 ± 0.01^k	1.60 ± 0.01^i	0.13 ± 0.01^j
D	1.16 ± 0.01^f	0.73 ± 0.01^{cde}	0.90 ± 0.01^g
E	1.41 ± 0.01^i	1.10 ± 0.01^{fg}	0.91 ± 0.01^g
AB	1.13 ± 0.01^f	2.10 ± 0.01^j	2.43 ± 0.01^k
AC	1.23 ± 0.01^g	1.51 ± 0.01^i	0.83 ± 0.01^f
AD	1.10 ± 0.04^e	1.30 ± 0.45^{gh}	0.87 ± 0.01^f
AE	1.80 ± 0.01^j	0.91 ± 0.01^{ef}	1.30 ± 0.01^i
BC	1.21 ± 0.01^g	1.40 ± 0.01^{hi}	0.91 ± 0.01^g
BD	0.37 ± 0.01^b	0.30 ± 0.01^a	0.46 ± 0.01^a
BE	1.10 ± 0.01^e	0.76 ± 0.01^{cde}	0.61 ± 0.01^d
CD	0.86 ± 0.01^d	0.83 ± 0.03^{de}	1.21 ± 0.01^h
CE	0.83 ± 0.01^d	0.56 ± 0.01^{bc}	0.56 ± 0.01^c
DE	0.29 ± 0.01^a	0.43 ± 0.04^{ab}	0.50 ± 0.02^b

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



ภาพที่ 4.12 แผนภาพแสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสหลังจากหมักกัวเนนิกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์

4.6 การทำถั่วเน่าแผ่น

จากการทดสอบทำถั่วเน่าแผ่น ซึ่งคัดเลือกมา 7 สูตร คือ สูตร A, AB, AC, AD, AE, C และ CE พบว่าสูตร A, AB และ AE มีลักษณะผิวสัมผัส, สี, กลิ่น และรสชาติดีที่สุด รองลงมาคือสูตร AC, C และ CE ส่วนสูตร AD นั้นลักษณะแผ่นมีการแตกหัก สีน้ำตาลจางๆ ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ดี มีกลิ่นหอมของถั่วเน่าอ่อนๆ และมีรสชาติค่อนข้างจืดไม่เหมือนสูตรอื่นๆ ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงลักษณะของถั่วเน่าแผ่นทั้ง 7 สูตร

สูตร	สี	กลิ่น	เนื้อสัมผัส	รูปภาพประกอบ
A	น้ำตาลทอง	กลิ่นหอม	เนียนละเอียด	
AB	น้ำตาลทอง	กลิ่นหอม	เนียนละเอียด	
AC	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นหอม	เนียนละเอียด	
AD	น้ำตาลอ่อน	กลิ่นหอม	ไม่ค่อยเนียนละเอียด	
AE	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นหอม	เนียนละเอียด	
C	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นหอม	ค่อนข้างเนียนละเอียด	
CE	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นหอม	ค่อนข้างเนียนละเอียด	

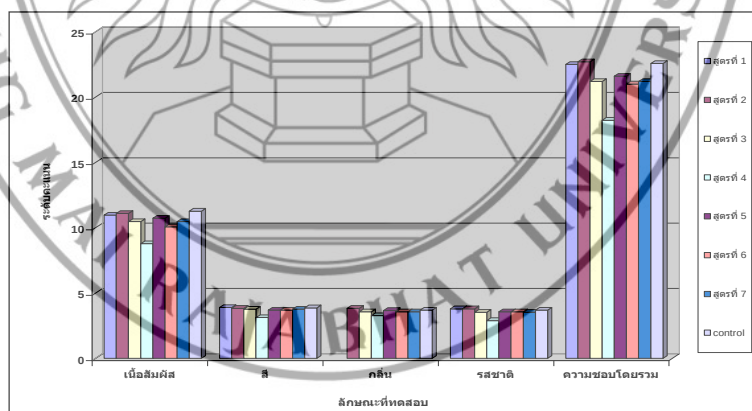
4.7 การประเมินความชอบ (sensory test)

หลังจากที่ได้ทำถั่วเน่าแผ่นทั้ง 7 สูตรแล้ว จึงได้นำถั่วเน่าทั้ง 7 สูตรและสูตร control ซึ่งเป็นสูตรที่ชาวบ้านผลิตขึ้นโดยใช้วิธีการตามภูมิปัญญาชาวบ้าน ไปให้ชาวบ้านในพื้นที่ (บ้านต้นขาม) หมู่ที่ 5 ตำบลจี้เหล็ก อำเภอแม่อรม จังหวัดเชียงใหม่) จำนวนทั้งสิ้น 30 คน ประเมินความชอบ (sensory test) ทางเนื้อสัมผัส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวมของถั่วเน่า เพื่อเปรียบเทียบกับถั่วเน่าแผ่นที่ทำโดยภูมิปัญญาชาวบ้านโดยที่กำหนดให้ สูตร A เป็นสูตรที่ 1, AB เป็นสูตรที่ 2, AC เป็นสูตรที่ 3, AD เป็นสูตรที่ 4, AE เป็นสูตรที่ 5, C เป็นสูตรที่ 6, CE เป็นสูตรที่ 7 และ control เป็นสูตรที่ 8 และจากการประเมินความชอบ พบว่าสูตร control มีเนื้อสัมผัสดีที่สุดในกลุ่มสูตร AB, A, AE, AC, CE, C และ AD ตามลำดับ โดยมีระดับคะแนนอยู่ที่ 11.27 ± 1.72 , 11.10 ± 1.15 , 10.97 ± 1.42 , 10.73 ± 1.43 , 10.47 ± 1.47 , 10.47 ± 1.87 , 10.07 ± 1.89 และ 8.78 ± 2.43 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ การประเมินความชอบทางด้านสีของถั่วเน่าแผ่น พบว่าสูตร A มีสีที่ดีที่สุดในกลุ่มถั่วเน่าแผ่น ต่อมาคือสูตร control, AB, AC, CE, AE, C และ AD ตามลำดับ โดยมีระดับคะแนนอยู่ที่ 3.90 ± 0.30 , 3.87 ± 0.34 , 3.83 ± 0.46 , 3.77 ± 0.50 , 3.77 ± 0.50 , 3.70 ± 0.53 , 3.70 ± 0.59 และ 3.13 ± 1.04 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ การประเมินความชอบทางด้านกลิ่นของถั่วเน่าแผ่นพบว่าสูตร A และ AB มีกลิ่นที่ดีที่สุดในกลุ่มถั่วเน่าแผ่น ต่อมาคือสูตร control, AE, AC, C, CE และ AD ตามลำดับ โดยมีระดับคะแนนอยู่ที่ 3.83 ± 0.59 , 3.83 ± 0.46 , 3.73 ± 0.58 , 3.67 ± 0.66 , 3.57 ± 0.72 , 3.57 ± 0.77 , 3.57 ± 0.72 และ 3.27 ± 0.98 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ การประเมินความชอบทางด้านรสชาติของถั่วเน่าแผ่น พบว่าสูตร A และ AB มีรสชาติที่ดีที่สุดในกลุ่มถั่วเน่าแผ่น ต่อมาคือสูตร control, AE, C, AC, CE และ AD ตามลำดับ โดยมีระดับคะแนนอยู่ที่ 3.80 ± 0.48 , 3.80 ± 0.48 , 3.70 ± 0.81 , 3.57 ± 0.72 , 3.57 ± 0.81 , 3.53 ± 0.62 , 3.53 ± 0.81 และ 2.90 ± 1.02 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ การประเมินความชอบโดยรวมของถั่วเน่าแผ่น พบว่าชาวบ้านชอบสูตร AB ที่สุด ต่อมาคือสูตร control, A, AE, AC, CE, C และ AD ตามลำดับ โดยมีระดับคะแนนอยู่ที่ 22.70 ± 1.60 , 22.57 ± 2.20 , 22.50 ± 2.08 , 21.60 ± 2.82 , 21.20 ± 2.46 , 21.20 ± 3.20 , 21.00 ± 3.25 และ 18.23 ± 4.71 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ดังตารางที่ 4.11 และ แผนภาพที่ 4.13

ตารางที่ 4.11 การประเมินความชอบ (sensory test) ทางเนื้อสัมผัส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม ของ ถั่วเน่าแผ่นสูตรต่างๆ

สูตรที่	การประเมินความชอบ (sensory test) ($\pm$ S.D.)				
	เนื้อสัมผัส	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบโดยรวม
1	10.97 $\pm$ 1.42 ^{bc}	3.90 $\pm$ 0.30 ^b	3.83 $\pm$ 0.59 ^b	3.80 $\pm$ 0.48 ^b	22.50 $\pm$ 2.08 ^b
2	11.10 $\pm$ 1.15 ^c	3.83 $\pm$ 0.46 ^b	3.83 $\pm$ 0.46 ^b	3.80 $\pm$ 0.48 ^b	22.70 $\pm$ 1.60 ^b
3	10.47 $\pm$ 1.47 ^{bc}	3.77 $\pm$ 0.50 ^b	3.57 $\pm$ 0.72 ^{ab}	3.53 $\pm$ 0.62 ^b	21.20 $\pm$ 2.46 ^b
4	8.78 $\pm$ 2.43 ^a	3.13 $\pm$ 1.04 ^a	3.27 $\pm$ 0.98 ^a	2.90 $\pm$ 1.02 ^a	18.23 $\pm$ 4.71 ^a
5	10.73 $\pm$ 1.43 ^{bc}	3.70 $\pm$ 0.53 ^b	3.67 $\pm$ 0.66 ^b	3.57 $\pm$ 0.72 ^b	21.60 $\pm$ 2.82 ^b
6	10.07 $\pm$ 1.89 ^b	3.70 $\pm$ 0.59 ^b	3.57 $\pm$ 0.77 ^{ab}	3.57 $\pm$ 0.81 ^b	21.00 $\pm$ 3.25 ^b
7	10.47 $\pm$ 1.87 ^{bc}	3.77 $\pm$ 0.50 ^b	3.57 $\pm$ 0.72 ^{ab}	3.53 $\pm$ 0.81 ^b	21.20 $\pm$ 3.20 ^b
control	11.27 $\pm$ 1.72 ^c	3.87 $\pm$ 0.34 ^b	3.73 $\pm$ 0.58 ^b	3.70 $\pm$ 0.81 ^b	22.57 $\pm$ 2.20 ^b

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



แผนภาพที่ 4.13 แผนภาพแสดงการประเมินความชอบ (sensory test) ทางเนื้อสัมผัส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม ของถั่วเน่าแผ่นสูตรต่างๆ

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและอภิปรายผล

จากการลงพื้นที่ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่น โดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้าน และการสัมภาษณ์กลุ่มชาวบ้านในเขตพื้นที่ชุมชนตำบลขี้เหล็ก อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่พบว่าชาวบ้านใช้วิธีการหมักถั่วเน่าโดยวิธีธรรมชาติ คือปล่อยให้เชื้อขึ้นเองตามธรรมชาติแล้วจึงเก็บหัวเชื้อถั่วเน่าที่ได้ไว้สำหรับการนำไปหมักถั่วเน่าใหม่ในครั้ง ส่วนผลการคัดแยกเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แบคทีเรียที่พบทั้งหมดมีอยู่ 5 ไอโซเลต โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบจะมีลักษณะเป็นท่อน, ทรงกลม, ทรงกลมต่อกัน, เป็นแท่งต่อกัน และเป็นแท่ง ข้อมติคสีแกรมบวก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Marie-Paul (1985) ที่ได้ศึกษากระบวนการทำถั่วเน่าของชาวบ้านทางภาคเหนือทางตอนบนของไทย พบว่าจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกระบวนการหมักเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง สามารถสร้างสปอร์ได้ ซึ่งก็คือเชื้อ *B. subtilis* นอกจากนี้ในปี 2538 ภาณุวรรณ ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในถั่วเหลืองหมักของไทย พบว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่เกี่ยวข้องตั้งแต่เริ่มการหมักคือเชื้อ *Bacillus* spp.

จากการทดสอบหมักถั่วเน่าในชั่วโมงที่ 24 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง พบว่าถั่วเน่าเริ่มเปื่อยยุ่ยและมีกลิ่นหอมอ่อนๆ ตามลักษณะกลิ่นเฉพาะของถั่วเน่า และเริ่มมีเส้นใยสีขาวของเชื้อมาปกคลุม ในชั่วโมงที่ 48 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง สังเกตได้ว่าถั่วเน่าจะมีกลิ่นหอมตามลักษณะกลิ่นเฉพาะตัวของถั่วเน่า ถั่วเน่าจะเปื่อยยุ่ยและมีเส้นใยสีขาวมาปกคลุมโดยรอบ และในชั่วโมงที่ 72 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อน้ำหนักถั่วเหลือง ถั่วเน่าจะเริ่มมีกลิ่นหอมฉุน เมล็ดถั่วเปื่อยยุ่ยมาก และมีน้ำสีน้ำตาลลักษณะหนืดๆ คล้ายกับคาราเมลไหลออกมาปกคลุมโดยรอบเมล็ดถั่ว เนื่องจากว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์มาย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองอย่างต่อเนื่องจึงทำให้ถั่วเหลืองเปื่อยยุ่ย และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของถั่วเน่าเกิดขึ้น แต่หลังจากชั่วโมงที่ 72 เป็นต้นไปโปรตีนในถั่วเหลืองมีน้อยลงแต่แบคทีเรียยังสร้างเอนไซม์มาย่อยโปรตีนอย่างต่อเนื่องจึงทำให้ถั่วเน่ามีความหนืดมาก และมีกลิ่นฉุนซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เหมาะสมสำหรับการทำถั่วเน่าแผ่น

จากการทดลองวัดค่า pH พบว่าหลังจากที่ได้ทดลองหมักถั่วเน่าเป็นระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงค่า pH จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ ซึ่งค่า pH ที่วัดได้ระหว่างการทดลองจะอยู่ในช่วง 6.25 – 8.89 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sarkar ในปี 1993 ที่ได้ศึกษาการหมักถั่วเหลืองแบบพื้นบ้านของภาคเหนือและแบบนัตโต พบว่าในช่วงเวลาการหมัก 12 ชั่วโมงแรก pH จะมีค่าสูงสุด และจะเริ่มคงที่ เนื่องจากการทำงานของโปรติเอสทำให้เกิดแอมโมเนียที่เป็นด่าง ซึ่งเป็นช่วงการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแบบ log phase และมีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสเป็นปริมาณมากค่า pH ก็จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตามลักษณะ growth curve สำหรับการศึกษาคูสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี azocasein พบว่าหลังจากใช้เชื้อที่แยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลตจากตัวอย่างถั่วเน่าที่ผลิตโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้านมาทดสอบหมักถั่วเน่า และได้ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจะอยู่ระหว่าง 0.25 – 3.29 unit/ml ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Inatso et al. (2006) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์อะไมเลส สารยับยั้งลิซินเอ็นเอที (subtilisin NAT) หรือเอนไซม์นัตโตไคเนส (notokinas) และแกมมาโพลีกลูตามิกแอซิด (gamma-polyglutamic acid; PGA)

และเมื่อนำถั่วเน่าแผ่นการประเมินความชอบโดยรวมของถั่วเน่าแผ่น โดยที่ประเมินความชอบจากเนื้อสัมผัส สี กลิ่น และรสชาติ พบว่าชาวบ้านชอบสูตร AB มากที่สุด ซึ่งเป็นสูตรที่หมักโดยการเติมเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ไอโซเลตที่ 1 และเชื้อมาจุลินทรีย์บริสุทธิ์ไอโซเลตที่ 2 ต่อมาคือสูตร control, A, AE, AC, CE, C และ AD ตามลำดับ โดยมีระดับคะแนนอยู่ที่ 22.70 ± 1.60 , 22.57 ± 2.20 , 22.50 ± 2.08 , 21.60 ± 2.82 , 21.20 ± 2.46 , 21.20 ± 3.20 , 21.00 ± 3.25 และ 18.23 ± 4.71 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับจุฑารัตน์ (2544) ได้ทำการศึกษาเรื่องการผลิตและการบริโภคถั่วเน่าของกลุ่มไทยใหญ่ อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน ด้านการพิจารณาเบื้องต้นในการเลือกซื้อถั่วเน่าแผ่น พบว่ากลุ่มตัวอย่าง เลือกซื้อถั่วเน่าแผ่นโดยพิจารณาจากลักษณะเป็นแผ่นกลม ๆ เนื้อถั่วเน่าละเอียดเป็นสิ่งแรก รองลงมาคือพิจารณาสีของถั่วเน่า, พิจารณาการบรรจุในถุงพลาสติกใสปิดสนิท, พิจารณาจากกลิ่นของถั่วเน่าหมักและอื่น ๆ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการคัดแยกเชื้อจากถั่วเน่าหลาย ๆ แหล่ง เพราะอาจพบเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่สภาวะเวลาการหมักให้สั้นลง หรืออาจทำให้ถั่วเน่ามีลักษณะกลิ่นที่ดีขึ้น

5.2.2 ควรมีการพัฒนาถั่วเน่าแผ่นให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคนรู้จัก และรับประทานกันมากขึ้น เช่น ทำถั่วเน่าแผ่นให้อยู่ในรูปถั่วเน่าผง มีการบรรจุในภาชนะที่สวยงามและพกพาได้ง่ายเป็นต้น