บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตถั่วเหลือง หมัก

- ถั่วเหลืองดิบ (ตราไร่ทิพย์ บริษัท ไร่ทิพย์ จำกัด นนทบุรี ประเทศไทย)

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตถั่วเหลืองหมัก

- กระติ๊บไม้ไผ่ขนาดกลาง (ตลาด วโรรส เชียงใหม่ ประเทศไทย)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Semi-accurate balance, Mettler-Toledo: Model BB120 Switzerland)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Heraeus: Model D-6450 Hanau, Germany)
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave, HIRAYAMA:Model HA300 MN, Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert Model UNB400, USA)
- ผ้าขาวบาง
- สำลี

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH-meter, Horiba F-22, Japan)
- เครื่องปั่น (Blender, National: MX-T700 GN, Taiwan)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Semi-accurate balance, Mettler-Toledo: Model BB120 Switzerland)
- เครื่องวัดค่าสี (Chroma Meter, Konica Minolta: Model CR-410, Japan)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Shimadzu Model: UV-160, Japan)
- กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Anaerobic jar (Merck, Germany)
- Anaerocult C (Merck, Germany)
- HPLC column, Inersil C18 size 250x4.6 mm., 5.0 uM
- Disposable syringe, size 5 ml
- Disposable Nylon membrane 0.45 um Disc, Ligand Co.Ltd, Thailand
- Disposable glove
- Volumetric Flask, Size 5, 10 and 50 ml
- LC vial with septa cap, Size 2 ml, Restek, Thailand
- Mobile Phase Filtering Set
- Nylon membrane 0.45 um, for mobile phase preparation, Millipore
- Aqueous membrane 0.45 um, for mobile phase preparation, Millipore
- Pasture pipette
- Automatic pipette 10, 20, 100, 200 ul (Gilson, France)
- Loop
- Test tube
- Petri dish

3.1.4 สารเคมี

- Acetonitrile, HPLC grade (JT Bakers, USA)
- Daidzein (Sigma, USA)
- Genistein (Sigma, USA)
- Flavones (Fluka, USA)
- Acetic acid, Analytical grade (JT Baker, USA)
- Hydrochloric acid, Analytical grade (JT Baker, USA)
- Ethanol (Scharlau Chemie SA, Spain)
- Crystal violet (Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Iodine (Merck, Germany)
- Safranin (Merck, Germany)
- Nutrient agar (Difco, USA)
- Nutrient broth (Difco, USA)
- Bacto Agar (Difco, USA)
- Soluble Starch (Merck, Germany)
- Bacto Peptone (Difco,USA)
- Potassium Monohydrogen Phosphate (Merck, Germany)
- Potassium Dihydrogen Phosphate (Merck, Germany)

3.1.5 เครื่องประมวลผลทางสถิติ

- เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล
- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.0
- โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel
- โปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert version 7.0.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ขั้นตอนการหมักถั่วเหลืองแบบพื้นบ้าน (ภาณุวรรณ, 2543)

นำถั่วเหลืองมาแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน โดยใส่น้ำปริมาณมากจนท่วมถั่วเหลือง

↓

นำถั่วเหลืองมาต้มเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง

↓

เทน้ำและสะเด็ดน้ำทิ้ง

↓

นำกระติ๊บมาต้มในน้ำเดือดและสะเด็ดน้ำให้แห้ง

↓

นำถั่วเหลืองมาใส่กระติ๊บไม้ไผ่ที่รองด้วยใบตองที่ผ่านการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ70 แล้ว

↓

หมักไว้ 3-4 วันจะได้ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักพื้นบ้าน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.1 ขั้นตอนการหมักถั่วเหลืองโดยวิธีการใช้เชื้อบริสุทธิ์

นำถั่วเหลืองมาต้มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใส่น้ำจนท่วมถั่วเหลือง

↓

เทน้ำออกและสะเด็ดน้ำทิ้ง

↓

นำถั่วเหลืองที่สะเด็ดน้ำใส่ถุงพลาสติก และทิ้งให้เย็น

↓

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้แล้วใส่ในถุงพลาสติกที่มีถั่วเหลืองต้มแล้ว

↓

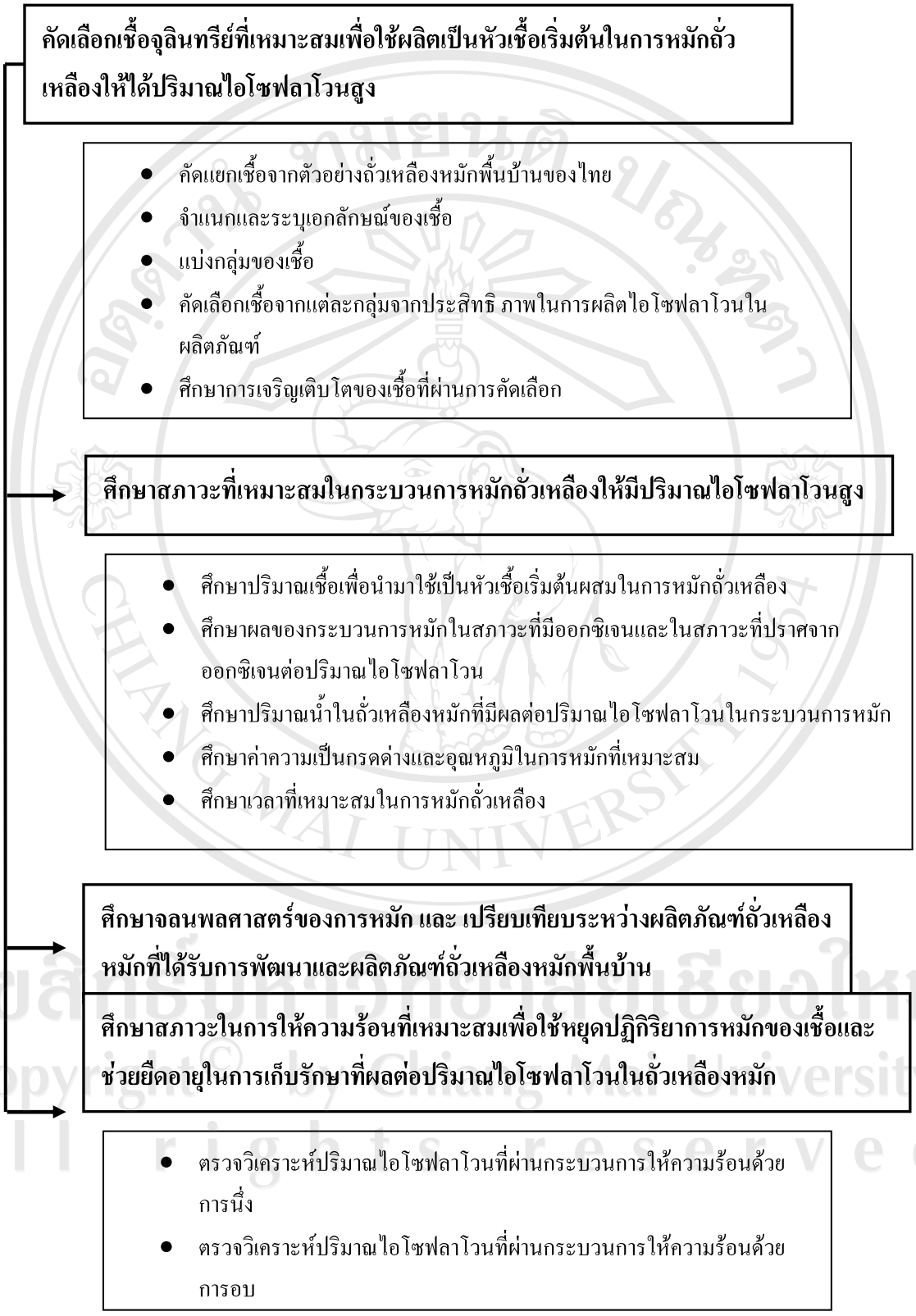
เขย่าถุงพลาสติกเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายตัวและผสมกับถั่วเหลืองทั่วถึง และปิดปากถุงด้วยจุกสำลี

↓

หมักไว้ 3 คืนจะได้ผลิตภัณฑ์ถั่วชีวภาพตามที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แผนผังแสดงภาพรวมของวิธีการทดลอง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 1 จำแนกเชื้อที่เป็นเชื้อหลัก (เชื้อ *Bacillus* spp.) ในการหมักถั่วเหลืองจากแหล่งถั่วหมักตามธรรมชาติ

นำถั่วเน่าที่ได้จากแหล่งผลิตใน 8 จังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทย (เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แม่ฮ่องสอน เชียงราย แพร่ พะเยา และน่าน) มาทำการแยกเชื้อทั้งหมดโดยวิธีการ Pour plate โดยนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ Streak plate จากนั้นนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะรูปร่างและเอนโดสปอร์ เมื่อได้เชื้อลักษณะที่ต้องการแล้วจึงนำไปทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกให้ได้สายพันธุ์ที่จะใช้ในการหมัก (วิวิทย์, 2546)

การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)

ในการจำแนกเชื้อ *Bacillus* spp. จะต้องทำการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะทางชีวเคมีของเชื้อดังตาราง 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงคุณลักษณะทางด้านฟีโนไทป์ซึ่งใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่สร้างเอนโดสปอร์

(1) Allantoin or urate required	positive	*Bacillus fastidiosus*
	negative	2
(2) Catalase	positive	3
	negative	20
(3) Voges–Proskauer	positive	4
	negative	11
(4) Growth in anaerobic agar	positive	5
	negative	10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) แสดงคุณลักษณะทางด้านฟีโนไทป์ซึ่งใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่สร้างเอนโดสปอร์

(5) Growth at 50 °C	positive	6
	negative	7
(6) Growth in 7% NaCl	positive	*Bacillus licheniformis*
	negative	*Bacillus coagulans*
(7) Acid and gas from glucose	positive	*Paenibacillus polymyxa*
	negative	8
(8) Reduction of NO_3^- to NO_2^-	positive	9
	negative	*Paenibacillus alvei*
(9) Parasporal body in sporangium	positive	*Bacillus thuringiensis*
	negative	37
(10) Hydrolysis of starch	positive	*Bacillus subtilis*
	negative	*Bacillus pumilus*
(11) Growth at 65 °C	positive	32
	negative	12
(12) Hydrolysis of starch	positive	13
	negative	17
(13) Acid and gas from glucose	positive	*Paenibacillus macerans*
	negative	14
(14) Width of rod $\geq$1.0 µm	positive	34
	negative	15
(15) Growth at pH 6.8	positive	16
	negative	*Bacillus alcalophilus*
(16) pH in VP broth < 6.0	positive	28
	negative	26

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) แสดงคุณลักษณะทางด้านฟีโนไทป์ซึ่งใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่สร้างเอนโดสปอร์

(17) Growth in 10% NaCl	positive	*Bacillus pasteurii*
	negative	18
(18) Growth in anaerobic agar	positive	*Brevibacillus laterosporus*
	negative	19
(19) Acid from glucose	positive	30
	negative	24
(20) Growth at 65°C	positive	33
	negative	21
(21) Growth in anaerobic agar	positive	22
	negative	*Bacillus azotoformans*
(22) Decomposition of casein	positive	35
	negative	23
(23) Parasporal body in sporangium	positive	*Paenibacillus popilliae*
	negative	35
(24) Growth at 50 °C	positive	*Bacillus badius*
	negative	25
(25) Growth at 5 °C	positive	*Bacillus insolitus*
	negative	*Bacillus sphaericus*
(26) Acid from arabinose	positive	*Bacillus lentus*
	negative	27
(27) Growth at 5 °C	positive	30
	negative	31
(28) Growth at 5 °C	positive	*Paenibacillus macquariensis*
	negative	29

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) แสดงคุณลักษณะทางด้านฟีโนไทป์ซึ่งใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งที่สร้างเอนโดสปอร์

(29) Growth in 10% NaCl	positive	*Virgibacillus pantothenticus*
	negative	*Bacillus circulans*
(30) Hydrolysis of urea	positive	*Bacillus globisporus*
	negative	*Bacillus marinus*
(31) pH in VP broth > 7	positive	*Brevibacillus brevis*
	negative	*Bacillus firmus*
(32) Hydrolysis of starch	positive	33
	negative	*Bacillus schlegelii*
(33) Growth at pH 6.8	positive	*Bacillus stearothermophilus*
	negative	*Alicyclobacillus acidocaldarius*
(34) Growth in anaerobic agar	positive	*Bacillus thuringiensis*
	negative	*Bacillus megaterium*
(35) Growth in 10% NaCl	positive	*Bacillus pasteurii*
	negative	36
(36) Growth at 40 °C	positive	*Paenibacillus larvae*
	negative	*Paenibacillus lentimorbus*
(37) Colony rhizoidal	positive	*Bacillus mycoides*
	negative	38
(38) Cells motile	positive	*Bacillus cereus*
	negative	*Bacillus anthracis*

ที่มา : Claus and Berkeley, 1986; Slepecky and Hemphill, 1992; Euzeby, 1997.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 คัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมในการหมักและศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้

การทดลองที่ 2.1 คัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมในการหมัก

เพื่อคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างไอโซฟลาโวนมาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักถั่วเหลือง จึงทำการทดลองโดยใช้เชื้อที่ได้ทำการจำแนกจากการทดลองที่ 1 มาทำการหมักถั่วเหลืองโดยมีขั้นตอนดัดแปลงตามวิธีพื้นบ้าน เริ่มต้นจากการต้มถั่วเหลืองเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการสะเด็ดน้ำออก ใส่ในถุงพลาสติก ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นลงในอุณหภูมิห้อง ทำการเติมเชื้อบริสุทธิ์ลงไปปิดปากถุงด้วยสำลีและหมักไว้ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จึงนำตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนและคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถผลิตไอโซฟลาโวนได้ในปริมาณมากที่สุดมาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ

เพื่อให้ทราบระยะเวลาในการเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ที่เหมาะสม โดยทำการหาระยะเวลาที่เชื้อแต่ละชนิดว่ามีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงต้นของระยะการเจริญแบบคงที่ (Early stationary phase) ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการนำมาผลิตเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ (คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2543)

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจะนำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจากการทดลองที่ 2.1 มาทำการศึกษา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient broth เป็นระบบในการศึกษาจากนั้นทำการวัดค่าความขุ่น ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Shimadzu Model: UV-160, Japan) ที่ 620 nm และวัดปริมาณของเชื้อทุกๆ 3 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้จะนำไปทำการวาดกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (Growth curve) จากนั้นจึงทำการคำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ (Specific growth rate) และช่วงเวลาที่เชื้อสามารถแบ่งตัวจากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์ (Generation time)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ศึกษาสภาวะการหมักที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมัก

ทำการศึกษาสภาวะซึ่งมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการหมักที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนในผลิตภัณฑ์ โดยทำการแปรผันสภาวะการหมักที่คาดว่าจะส่งผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนได้แก่ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ ปริมาณออกซิเจน ปริมาณความชื้น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่างและ เวลาในการหมัก โดยวางแผนการทดลอง เพื่อทำการศึกษาในรายละเอียดของปัจจัยหลักที่มีผลกระทบต่อปริมาณไอโซฟลาโวนและทำการศึกษาในรายละเอียดของปัจจัยดังกล่าวในลำดับต่อมา และหาข้อสรุปถึงสภาวะการหมักที่เหมาะสมที่สุดที่ส่งผลให้ปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมักมีปริมาณสูงที่สุด

การทดลองที่ 3.1 การศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักถั่วเหลืองที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

การศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมักถั่วเหลืองที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวนได้ทำการศึกษาโดยทำการวางแผนการทดลองแบบ 2^3 Factorial Experiment in Central Composite Design (CCD) (ไพโรจน์, 2547) โดยทำการ แปรผันปริมาณเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว 3 เชื้อ คือ *Bacillus subtilis* THUANAOLG01 *Bacillus subtilis* NATTOCR04 และ *Bacillus megaterium* PY03 ดังตารางที่ 3.2 -3.3 ข้อมูลทั้งหมดจะทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-expert version 7.0.0 (Statease Inc., USA)

ตารางที่ 3.2 ระดับความเข้มข้นในการทดลองหาปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ที่เหมาะสม

เชื้อ	ระดับต่ำ (ร้อยละ)	ระดับสูง(ร้อยละ)
***B. subtilis* THUANAOLG01**	0.1	10.0
***B. subtilis* NATTOCR04**	0.1	10.0
***B. megaterium* PY03**	0.1	10.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณเชื้อ (ร้อยละ)

ภาพที่ 3.1 แผนภาพแสดงรหัสในแต่ละระดับความเข้มข้นเพื่อทำการการศึกษาปริมาณเชื้อ

ตารางที่ 3.3 แผนการทดลองการแบบ 2^3 Factorial Experiment in Central Composite Design (CCD) ในการศึกษาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมต่อการหมักถั่วเหลือง

สิ่งทดลอง	แผนการทดลอง(รหัส)			ส่วนประกอบ (ร้อยละ) โดยใช้หัวเชื้อที่มีความเข้มข้นที่ 10^8 CFU/ml		
				B. subtilis THUANAOLG01	*B. subtilis* NATTOCR04	*B. megaterium* PY03
(1)	-1	-1	-1	2.0	2.0	2.0
a	+1	-1	-1	8.0	2.0	2.0
b	-1	+1	-1	2.0	8.0	2.0
ab	+1	+1	-1	8.0	8.0	2.0
c	-1	-1	+1	2.0	2.0	8.0
ac	+1	-1	+1	8.0	2.0	8.0
bc	-1	+1	+ 1	2.0	8.0	8.0
abc	+1	+1	+1	8.0	8.0	8.0
-αa	- α	0	0	0.1	5.0	5.0
+αa	+ α	0	0	10.0	5.0	5.0
-αb	0	- α	0	5.0	0.1	5.0
+αb	0	+ α	0	5.0	10.0	5.0
-αc	0	0	- α	5.0	5.0	0.1
+αc	0	0	+ α	5.0	5.0	10.0
Cp1	0	0	0	5.0	5.0	5.0
Cp2	0	0	0	5.0	5.0	5.0
Cp3	0	0	0	5.0	5.0	5.0
Cp4	0	0	0	5.0	5.0	5.0
Cp5	0	0	0	5.0	5.0	5.0
Cp6	0	0	0	5.0	5.0	5.0

***ความหมาย** รหัสปัจจัยแต่ละรหัสเป็นดังนี้ : -1 = ระดับต่ำ , +1 = ระดับสูง, 0 = ระดับกึ่งกลาง, -α = ระดับที่ห่างจากจุดกึ่งกลางเป็นลบ 1.414 เท่า และ + α = ระดับที่ห่างจากจุดกึ่งกลางเป็นบวก1.414 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3.2 การศึกษาปริมาณออกซิเจนในการหมักถั่วเหลืองที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

เพื่อทำการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนในกระบวนการหมักที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมัก โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) (ไพโรจน์, 2547) ซึ่งทำการแปรผันการหมักที่สภาวะมีอากาศและในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)

การทดลองที่ 3.3 การศึกษาปริมาณน้ำที่ใช้ในการหมักถั่วเหลืองที่มีผลต่อปริมาณไอโซฟลาโวน

ในการศึกษาปริมาณน้ำได้วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) (ไพโรจน์, 2547) โดยการแปรผันปริมาณน้ำทั้งหมด 4 ระดับ คือ ปริมาณน้ำ (Water content) ที่ร้อยละ60 ร้อยละ70 ร้อยละ80 และ ร้อยละ 90 (% wet basis) ข้อมูลที่ได้จะนำทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) ซึ่งผลการทดลองนี้ทำให้ทราบถึงปริมาณน้ำที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถผลิตถั่วเหลืองหมักที่มีปริมาณไอโซฟลาโวนสูงที่สุด

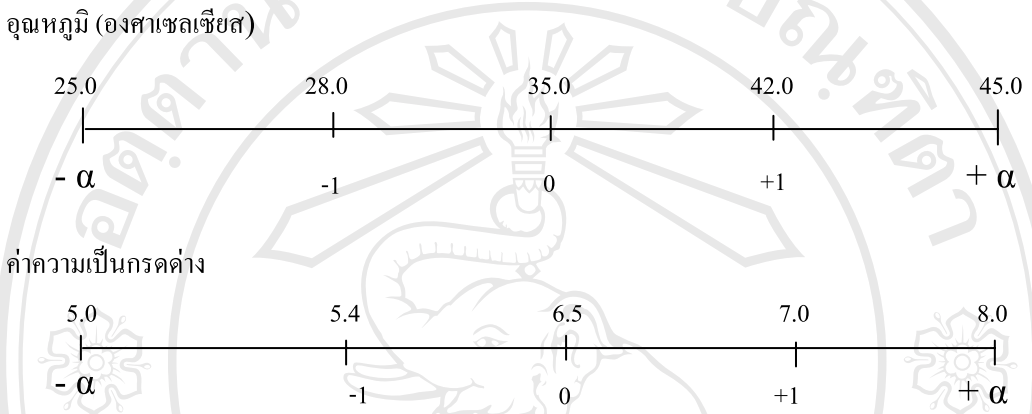
การทดลองที่ 3.4 การศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการหมักถั่วเหลือง

เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่อปริมาณไอโซฟลาโวน โดยทำการหมักถั่วเหลืองตามแผนการทดลองแบบ2^2 Factorial Experiment in Central Composite Design (CCD) (ไพโรจน์, 2547) ดังตารางที่ 3.5 ซึ่งมีการแปรผันอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างดังตารางที่ 3.4 ค่าตอบสนอง คือปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอินและปริมาณไอโซฟลาโวนรวมจากถั่วเหลืองหมัก และข้อมูลทั้งหมดจะทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design-expert version 7.0.0 (Statease Inc., USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.4 ระดับต่ำและสูงของปัจจัยในการศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

ปัจจัย	ระดับต่ำ	ระดับสูง
อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส
ค่าความเป็นกรดด่าง	5.0	8.0



ภาพที่ 3.2 แผนภาพแสดงรหัสในแต่ละระดับอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่ใช้ทำการทดลอง

ตารางที่ 3.5 แผนการทดลองการแบบ Central Composite Design (CCD) ในการศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

สิ่งทดลอง	แผนการทดลอง (รหัส)		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าความเป็นกรดด่าง
(1)	-1	-1	28.0	5.4
a	+1	-1	42.0	5.4
b	-1	+1	28.0	7.0
ab	+1	+1	42.0	7.0
$-\alpha_a$	$-\alpha$	0	25.0	6.5
$+\alpha_a$	$+\alpha$	0	45.0	6.5
$-\alpha_b$	0	$-\alpha$	35.0	5.0
$+\alpha_b$	0	$+\alpha$	35.0	8.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.5 (ต่อ) แผนการทดลองการแบบ Central Composite Design (CCD) ในการศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

สิ่งทดลอง	แผนการทดลอง (รหัส)		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าความเป็นกรดด่าง
Cp1	0	0	35.0	6.5
Cp2	0	0	35.0	6.5
Cp3	0	0	35.0	6.5

***ความหมาย** รหัสปัจจัยแต่ละรหัสเป็นดังนี้ : -1 = ระดับต่ำ , +1 = ระดับสูง, 0 = ระดับกึ่งกลาง, $-\alpha$ = ระดับที่ห่างจากกึ่งกลางเป็นลบ1.414 เท่า และ + α = ระดับที่ห่างจากกึ่งกลางเป็นบวก 1.414 เท่า

3.5 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในกระบวนการหมักถั่วเหลือง

เพื่อศึกษาผลของเวลาในการหมักถั่วเหลืองของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกต่อปริมาณไอโซฟลาโวน จึงทำการหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างถั่วเหลืองหมักเพื่อทำการตรวจวัดปริมาณไดซิอิน เจนิสทิอิน และไอโซฟลาโวนรวม ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลาทั้งหมด 168 ชั่วโมง จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวาดกราฟ และช่วงเวลาในการหมักที่มีปริมาณไอโซฟลาโวนสูงที่สุดจะเป็นเวลาในการหมักถั่วเหลืองที่เหมาะสมที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 4 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมัก (Kinetic fermentation) และ เปรียบเทียบคุณภาพของถั่วเหลืองที่หมักด้วยการใช้เชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น และ วิธีพื้นบ้าน

ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมัก (Kinetic fermentation) และ วิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองทั้งก่อนหมักและหลังหมักโดยกระบวนการหมักแบบพื้นบ้านและกระบวนการผลิตที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เพื่อทำการเปรียบเทียบคุณภาพดังนี้

สมบัติทางเคมี	ปริมาณไอโซฟลาโวน (Murphy *et al*., 2002)	โดยเครื่อง HPLC
	ค่าความเป็นกรดด่าง (Horiba F-22, Japan)	โดยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง
สมบัติทางกายภาพ	ค่าสี L* a *b* (Konica Minolta CR-410, Japan)	โดยเครื่องวัดสี

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลกระทบของความร้อนที่มีต่อปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมักหลังจากผ่านกระบวนการนึ่งและอบแห้ง

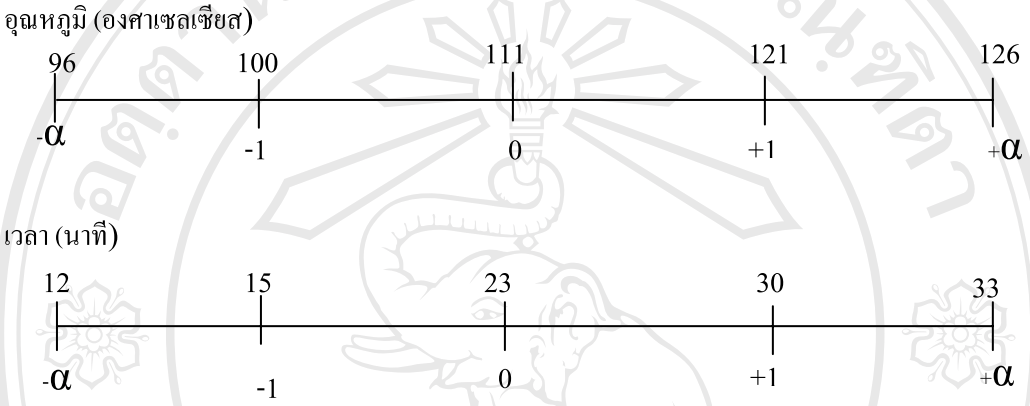
การทดลองที่ 5.1 ศึกษาผลกระทบของความร้อนในกระบวนการนึ่งต่อปริมาณสารไอโซฟลาโวน ในถั่วเหลืองหมัก

วางแผนการทดลองโดยทำการผันแปรปัจจัยด้านอุณหภูมิเป็น 2 ระดับ คือ 100 องศาเซลเซียส และ 121 องศาเซลเซียส และเวลาในการนึ่ง 2 ระดับ เป็นเวลา 15 นาที และ 30 นาที วางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial Experiment in Central Composite Design (CCD) (ไพโรจน์, 2547) ทำการวัดปริมาณไอโซฟลาโวนโดยเน้นไปที่โครงสร้างแบบ Aglycones 2 ชนิด คือ ไดซิอิน และเจนิสทิอิน ในถั่วเหลืองหมักเป็นค่าตอบสนองของการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.6 ระดับต่ำและสูงของปัจจัยในการศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

ปัจจัย	ระดับต่ำ	ระดับสูง
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	100	121
เวลา (นาที)	15	30



ภาพที่ 3.3 แผนภาพแสดงรหัสในแต่ละระดับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ทำการทดลอง

ตารางที่ 3.7 สิ่งทดลองของการศึกษาอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการนึ่ง

สิ่งทดลอง	แผนการทดลอง (รหัส)		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
(1)	-1	-1	100	15
a	+1	-1	121	15
b	-1	+1	100	30
ab	+1	+1	121	30
- αa	- α	0	96	23
+ αa	+ α	0	126	23
- αb	0	- α	111	12
+ αb	0	+ α	111	33

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.7 (ต่อ) สิ่งทดลองของการศึกษาอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการนึ่ง

สิ่งทดลอง	แผนการทดลอง (รหัส)		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
Cp1	0	0	111	23
Cp2	0	0	111	23
Cp3	0	0	111	23
Cp4	0	0	111	23
Cp5	0	0	111	23
Control	Control (ถั่วเหลืองหมัก)			

***ความหมาย** รหัสปัจจัยแต่ละรหัสเป็นดังนี้ : -1 = ระดับต่ำ , +1 = ระดับสูง, 0 = ระดับกึ่งกลาง, $-\alpha$ = ระดับที่ห่างจากจุดกึ่งกลางเป็นลบ 1.414 เท่า และ $+\alpha$ = ระดับที่ห่างจากจุดกึ่งกลางเป็นบวก1.414 เท่า

การทดลองที่ 5.2 ศึกษาผลกระทบของความร้อนในกระบวนการอบแห้งต่อปริมาณสารไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมัก

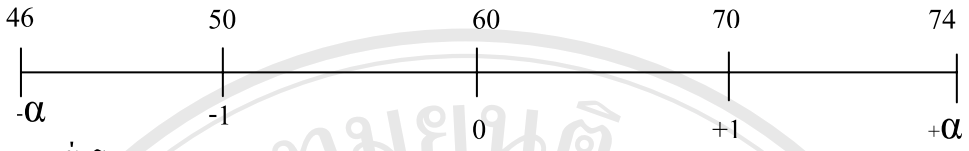
วางแผนการทดลองด้วยการผันแปรอุณหภูมิและเวลาในการอบแห้งถั่วเหลืองหมัก 2 ระดับ คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการอบแห้ง 2 ระดับ คือ 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ 2^2 Factorial Experiment in Central Composite Design (CCD) (ไพโรจน์, 2547) โดยวัดปริมาณไอโซฟลาโวนในถั่วเหลืองหมักเป็นค่าตอบสนองของการทดลอง

ตารางที่ 3.8 ระดับต่ำและสูงของปัจจัยในการศึกษาอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม

ปัจจัย	ระดับต่ำ	ระดับสูง
อุณหภูมิ	50 องศาเซลเซียส	70 องศาเซลเซียส
เวลา (ชั่วโมง)	12	24

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)



เวลา (ชั่วโมง)

ภาพที่ 3.4 แผนภาพแสดงรหัสในแต่ละระดับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ทำการทดลอง

ตารางที่ 3.9 สิ่งทดลองของการศึกษาอุณหภูมิและเวลาในกระบวนการอบแห้ง

สิ่งทดลอง	แผนการทดลอง (รหัส)		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)
(1)	-1	-1	50	12
a	+1	-1	70	12
b	-1	+1	50	24
ab	+1	+1	70	24
- αa	- α	0	46	18
+ αa	+ α	0	74	18
- αb	0	- α	60	10
+ αb	0	+ α	60	27
Cp1	0	0	60	18
Cp2	0	0	60	18
Cp3	0	0	60	18
Cp4	0	0	60	18
Cp5	0	0	60	18
control	Control (ถั่วเหลืองหมักนึ่ง)			

***ความหมาย** รหัสปัจจัยแต่ละรหัสเป็นดังนี้ : -1 = ระดับต่ำ , +1 = ระดับสูง, 0 = ระดับกึ่งกลาง, -α = ระดับที่ห่างจากจุดกึ่งกลางเป็นลบ 1.414 เท่า และ + α = ระดับที่ห่างจากจุดกึ่งกลางเป็นบวก1.414 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved