บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 เชื้อ *B. subtilis* TN51 ได้รับจาก ผศ.ดร. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย

3.1.2 แป้งสาลีเอนกประสงค์ (ตราเซอรี่ฟ้า, บริษัทคิงส์ มิลลิง จำกัด)

3.1.3 แป้งข้าวเจ้า (ตรานิวเกรด, บริษัทไทยวาฟูดโปรดักส์ จำกัด (มหาชน))

3.1.4 แป้งถั่วเหลืองชนิดที่มีไขมันเต็ม (full-fat soy flour) (ตราดอยคำ, บริษัทดอยคำผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด)

3.2 สารเคมี

3.2.1 เปปโตน (Merck, Germany)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (Merck, Germany)

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (Merck, Germany)

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) (Merck, Germany)

3.2.5 น้ำตาลซูโครส (ตรามิตรผล, บริษัทน้ำตาลมิตรผล จำกัด)

3.2.6 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4) (Merck, Germany)

3.2.7 ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (K_2HPO_4) (Rankem, India)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ KERN ; ALJ 220 - 4NM)

3.3.2 เครื่อง Water activity meter (Decagon Devices, Inc., Aqualab 4TE, USA)

3.3.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven : Memmert UM400, Germany)

3.3.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer : UV-VIS Model UV - 1700, USA)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

3.4 ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งระเบียบวิธีวิจัยออกเป็น 3 ตอน รายละเอียดของระเบียบวิธีวิจัยมีดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษากระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

1.1 ศึกษากระบวนการเตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อชนิดผงแห้ง

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อผงแห้งดังนี้

1.1.1 ศึกษาชนิดของแป้งที่เหมาะสมในการเตรียมสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

(1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง

ศึกษาหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนการทำเป็นผง โดยผันแปรชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง 3 ชนิด คือ แป้งถั่วเหลืองชนิดที่มีไขมันเต็ม แป้งข้าวเจ้า และแป้งสาลี เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน (basal medium, BSM) (ตาราง 7) ในอัตราร้อยละ 20

ตาราง 7 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
น้ำตาล ซูโครส	10
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5
ปรับ pH = 7 ฆ่าเชื้อใน autoclave นาน 15 นาที	

ที่มา: Farzana, Shah, Butt, & Awan (2005)

(2) การเตรียมเชื้อ *B. subtilis* TN51

เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryticase soy broth (TSB) อีกครั้ง บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ได้กล้าเชื้อที่นำไปทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

(3) การทดสอบการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง

เติมกล้าเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ (2) อัตราร้อยละ 2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งทั้ง 3 สูตร รวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน (BSM) เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำการตรวจนับ Total viable count และ Spore count ตามวิธีของ AOAC (2000) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range tests (DMRT) ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.1.2 ศึกษาปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในการเตรียมสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เตรียมอาหารเหลวจากแป้งชนิดที่คัดเลือกจากการทดลองตอนที่ 1.1.1 ผันแปรระดับของแป้งที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน 3 ระดับ คือร้อยละ 30 40 และ 50 เติมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 (วิธีการเตรียมกล้าเชื้อทำเช่นเดียวกับตอนที่ 1.1.1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งในอัตราร้อยละ 2 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำการตรวจนับ Total viable count และ Spore count ตามวิธีของ AOAC (2000) เหมือนการทดลองตอนที่ 1.1.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.1.3 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาการหมักที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้ง

ทำการเตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ตามวิธีการที่แสดงในตอนที่ 1.1.1 และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งที่คัดเลือกจากตอนที่ 1.1.1 และ 1.1.2 เติมกล้าเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากแป้งในอัตราร้อยละ 2 ผันแปรอุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างหลังการบ่มเพาะเชื้อนาน 0 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง เพื่อตรวจวิเคราะห์ Total viable count (AOAC, 2000) และ Spore count (AOAC, 2000) วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.2 ศึกษากระบวนการผลิตกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ชนิดผงแห้งจากแป้ง

(1) เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ตามวิธีที่คัดเลือกจากข้อ 1.1

(2) เตรียมแป้งปลอดเชื้อ (ชนิดเดียวกับที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว) ด้วยวิธีการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งภายใต้ความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และการอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

(3) เติมแป้งในข้อ (2) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในข้อ (1) ในอัตรา 1:1 เพื่อลดความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและปรับสภาวะให้เกิดการหมักแบบ solid state fermentation ในตู้บ่มอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแป้งมาอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนได้ค่า water activity ลดลงต่ำกว่า 0.6 และบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น ได้ผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* ทำการตรวจนับ Total viable count, Spore count และ ความชื้น ตามวิธีของ AOAC (2000) วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตอนที่ 2 ศึกษาอายุการเก็บรักษาผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ผลิตผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 ด้วยวิธีการที่ได้จากการทดลองตอนที่ 1 บรรจุในภาชนะบรรจุ 2 ชนิด คือ ถุงพลาสติกใส (Polyethylne, PE) และถุงอลูมิเนียมฟอยล์ (ชนิด PETNPP มี 3 ชั้นประกอบไปด้วย Polyethylene Terphthalate (PET) ความหนา 12 μm ชั้นกลางเป็น Nylon ความหนา 15 μm และชั้นในสุดเป็น Polypropylene ความหนา 70 μm) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส ศึกษาการเหลือรอดของแบคทีเรีย โดยสุ่มผงกล้าเชื้อทุก 15 วัน จนครบ 3 เดือน เพื่อตรวจนับ Total viable count, Spore count และ Yeast and mould และตรวจวิเคราะห์ค่าความชื้น ตามวิธีของ AOAC (2000) วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

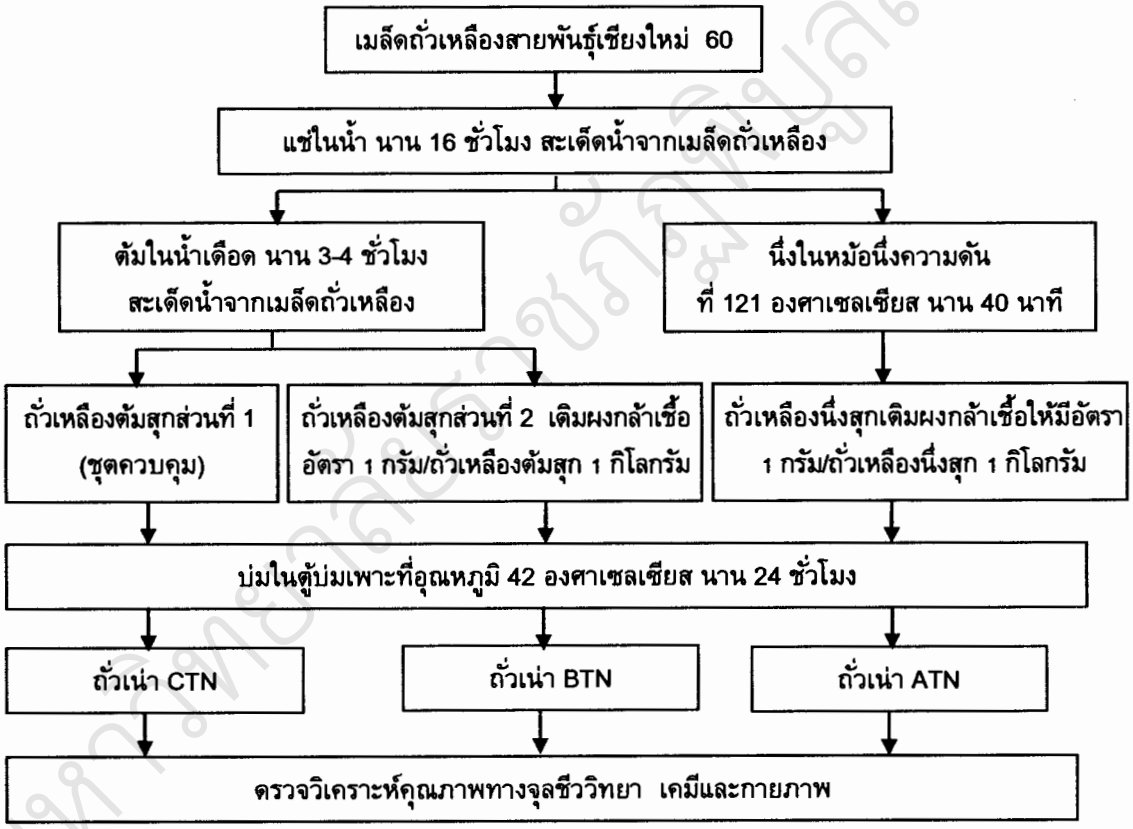
ตอนที่ 3 ศึกษาวิธีการหมักถั่วเน่าด้วยผงกล้าเชื้อเปรียบเทียบกับถั่วเน่าที่ผลิตด้วยวิธีพื้นบ้าน

3.1 การเตรียมถั่วเหลือง

แช่เมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในน้ำ นาน 16 ชั่วโมง หลังสะเด็ดน้ำแบ่งถั่วเหลืองออกเป็น 2 ส่วน โดยนำถั่วเหลืองส่วนที่ 1 ต้มในน้ำเดือดนาน 4 ชั่วโมง และส่วนที่ 2 นึ่งให้สุกในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที (Dajanta, Chukeatirote, & Apichartsrangkoon, 2011)

3.2 การหมักถั่วเหลือง

แบ่งถั่วเหลืองต้มสุกจากข้อ 3.1 ออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ปล่อยให้ถั่วเหลืองต้มสุกเกิดการหมักเองตามธรรมชาติตามวิธีพื้นบ้าน (ชุดควบคุม) สำหรับถั่วเหลืองต้มส่วนที่ 2 และถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งในหม้อนึ่งความดันนำไปเติมผงกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากการทดลองตอนที่ 1 ในอัตรา 1 กรัม/ถั่วเหลืองสุก 1 กิโลกรัม บรรจุถั่วเหลืองที่เติมกล้าเชื้อแล้วในกล่องพลาสติกปลอดเชื้อและบ่มในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แสดงแผนผังการทดลองในภาพ 5 วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย DMRT ที่ $P \leq 0.05$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพ 5 แผนผังวิธีการผลิตถั่วเน่าจากผงกล้าเชื้อบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับวิธีพื้นบ้าน

หมายเหตุ CTN คือ ถั่วเน่าที่หมักด้วยวิธีพื้นบ้าน

BTN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองต้มสุกหมักด้วยผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51

ATN คือ ถั่วเน่าที่ผลิตจากถั่วเหลืองนึ่งสุกในหม้อนึ่งความดันหมักด้วยผงกล้า เชื้อ *B. subtilis* TN51

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

ตรวจวิเคราะห์คุณภาพถั่วเน่า ดังนี้

1. คุณภาพทางจุลชีววิทยา
   1.1 Total viable count (AOAC, 2000)
   1.2 Spore count (AOAC, 2000)
   1.3 Yeast and mould (AOAC, 2000)
   1.4 Coliform (AOAC, 2000)
   1.5 *Escherichia coli* (AOAC, 2000)
   1.6 *Bacillus cereus* (AOAC, 2000)
   1.7 *Staphylococcus aureus* (AOAC, 2000)
2. คุณภาพทางเคมีและกายภาพ
   2.1 Colour L a* b* วัดด้วยเครื่องวัดสี Minolta
   2.2 pH value (AOAC, 2000)
   2.3 Total sugar ด้วย Dinitrosalicylic reagent method (Miller, 1959)
   2.4 Reducing sugar ด้วย Dinitrosalicylic reagent method (Miller, 1959)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม