บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบในการหมักแหนมเห็ด
   1.1 เห็ดนางรมฉีกฝอยนึ่งสุก
   1.2 ข้าวเหนียวนึ่งบดละเอียด
   1.3 กระเทียมลอกเปลือกบดละเอียด
   1.4 เกลือป่น
   1.5 ถุงพลาสติกทนร้อน
   1.6 ยางรัด

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ประกอบด้วย
   2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)
      2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Standard plate count agar (Difco laboratory, 1984) สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด
      2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa Sharp (MRS) medium (de Man *et al.*, 1960) สำหรับเพาะเลี้ยงแลคติคแอสิดแบคทีเรีย
   2.2 อาหารที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อจัดจำแนกแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (ภาคผนวก ข)
      2.2.1 อาหารทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากกลูโคส
      2.2.2 อาหารทดสอบออกซิเดชันและเฟอร์เมนเทชัน
      2.2.3 อาหารทดสอบการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟและเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ
      2.2.4 อาหารทดสอบการเคลื่อนที่
      2.2.5 อาหารทดสอบการมีเอนไซม์ย่อยโปรตีน
      2.2.6 อาหาร Simmon citrate agar
      2.2.7 อาหารทดสอบความสามารถในการเฟอร์เมนต์คาร์โบไฮเดรต
      2.2.8 อาหารทดสอบการสร้างเดกซ์แทรน

3. สารเคมี
   3.1 สีย้อม และสารเคมีสำหรับทดสอบทางชีวเคมี (ภาคผนวก ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.1 สีย้อมในการย้อมแกรม

3.1.2 สีย้อมสำหรับย้อมเอนโดสปอร์

3.1.3 สารละลายสำหรับทดสอบการมีเอนไซม์ออกซิเดส

3.1.4 สารละลายสำหรับทดสอบการมีเอนไซม์คะตาเลส

3.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดในรูปกรดแลคติค (ภาคผนวก ค)

4. เครื่องมือ

4.1 เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Sarturius LC 6205) และอย่างหยาบ (BP 31005)

4.2 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (Olympus)

4.3 ตู้ถ่ายเชื้อ (BH 2000)

4.4 ตู้อบอุณหภูมิสูง

4.5 ตู้ควัน

4.6 หม้อนึ่งอัดความดัน (Tomy Seiko : SS-325)

4.7 ไมโครปิเปต ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และ1-5 มิลลิลิตร

4.8 ตู้เย็นเก็บสารเคมีและเชื้อ

4.9 ตู้บ่มเชื้อ

4.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

4.11 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ

4.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

4.13 ไมโครเวฟ

4.14 Spectrophotometer (Shimadzu : UV-2100)

5. อุปกรณ์อื่นๆ

5.1 ปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร

5.2 หลอดทดลอง

5.3 ขวด universal ขนาด 28 มิลลิลิตร

5.4 ขวด Mc Cartney

5.5 ขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร

5.6 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.7 ขวดแก้วรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500, 250 และ 150 มิลลิลิตร

5.8 ปากคีบ

5.9 ห่วงถ่ายเชื้อแบคทีเรีย

5.10 Tip ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแลคติคแอสิดแบคทีเรียในการหมักแหนมเห็ด

เก็บตัวอย่างแหนมเห็ดหลังการหมักที่ชั่วโมง 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48, 60 และ 72 เพื่อวิเคราะห์ทางเคมีและจุลินทรีย์

1.1 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างการหมัก

นำตัวอย่างตามระยะเวลาหมักมาตรวจหากรดแลคติคที่เกิดขึ้น ทำการวิเคราะห์ทางเคมีตามวิธีการ (AOAC, 1984) โดย

1.1.1 วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ชั่งตัวอย่างแหนมเห็ดหนัก 10.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ซึ่งได้มีการปรับค่ามาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐานที่มี pH เท่ากับ 4.00 และ 7.00 ตามลำดับแล้ว

1.1.2 วัดปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติค

ปิเปตสารละลายของตัวอย่างที่ผ่านการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง แล้วจำนวน 10 มิลลิลิตร มาไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล (ที่ผ่านการ Standardized กับสารละลายโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟธาเลต (KHP)) โดยมีสารละลายฟีนอล์ธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ จนได้จุดยุติเป็นสีชมพูอ่อนๆ อย่างถาวร คำนวณหาปริมาณร้อยละของความเป็นกรดทั้งหมดโดยคิดเทียบกับกรดแลคติค ตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

1.2 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก

1.2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างแหนมเห็ดปริมาณ 11 กรัม ใส่ในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร ภายในบรรจุสารละลายเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 99 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 1: 10 ดูดตัวอย่างที่ความเจือจาง 1: 10 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้ว universal ที่มีสารละลายเปปโตนปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยวิธี elbow

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

action จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจางเป็น 1: 100 ทำเช่นเดียวกันจนได้สารละลายตัวอย่างแหนมเห็ดในระดับความเจือจางต่างๆ

1.2.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total viable count)

ก. ดูดตัวอย่างที่มีความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับๆ ละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร SPC agar ที่หลอมเหลวอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงไปประมาณ 15 มิลลิลิตร เพื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้งหมด และอาหาร MRS agar เพื่อเพาะเลี้ยงแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ข. นับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแลคติคแอสิดแบคทีเรีย จากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30-300 โคโลนี คำนวณเป็นจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อกรัม ของตัวอย่าง แหนมเห็ด

1.2.3 การจัดจำแนกแลคติคแอสิดแบคทีเรียระหว่างการหมัก

เก็บเชื้อจากจานเพาะเชื้อใน MRS agar โดยสุ่มเก็บจากลักษณะของโคโลนีที่เห็นด้วยสายตา นำตัวแทนของกลุ่มๆ ละ 2 โคโลนี มาแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์และเก็บเชื้อใน MRS agar slant เพื่อการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของแบคทีเรียแกรมบวก ตามวิธีใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1986) และ The Genera of Lactic Acid Bacteria (Wood and Holzapfel, 1995) โดยใช้เชื้ออายุ 24 ชั่วโมง จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เพื่อทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้ (ภาคผนวก ข)

ก. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์

ข. การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

ค. การสร้างเอนไซม์คะตาเลส

ง. การทดสอบออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชัน

จ. การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ฉ. ความสามารถในการเคลื่อนที่

ช. การสร้างก๊าซ

ซ. การสร้างสปอร์

ฌ. ความสามารถในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ หรือเฮทเทอโรเฟอร์เมน เททีฟ

ญ. การเจริญที่อุณหภูมิ 10, 15 และ 45 องศาเซลเซียส

ฎ. การเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4, 6.5 และ 18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฎ. การเจริญที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และ 9.6

ฐ. การเจริญบน Simmon Citrate agar

ฑ. การสร้างเดกซ์แทรน

ฒ. การเจริญในอาหารที่มีเอทธานอลร้อยละ 10

ณ. ความสามารถในการใช้สารคาร์โบไฮเดรตบางชนิด เช่น อะราบิโนส ฟรุคโตส แรฟฟีโนส แรมโนส แลคโตส เซลโลไบโอส ซอร์บิทอล เมลลิไซโตส ไซโตส เมลลิไบโอส และ ซูโครส

2. การคัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากแหนมเห็ดในท้องตลาด

ซื้อแหนมเห็ดโดยวิธีการสุ่มจำนวน 15 ตัวอย่าง จากท้องตลาดแหล่งต่างๆ และร้านอาหารมังสะวิรัติ เพื่อแยกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียบนอาหาร MRS agar ตามวิธีการในหัวข้อ 2.2 นำตัวแทนของกลุ่มโคโลนีส่วนใหญ่ที่ปรากฏ ตามระยะเวลาหมักจำนวน 2 โคโลนี มาแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อไว้บน MRS agar slant ในอุณหภูมิตู้เย็น

3. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแหนมเห็ด

นำแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้ มาคัดเลือกชนิดที่เหมาะสมสำหรับการหมัก โดยคำนวณอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง จากความชันของกราฟ

ทำการทดลองโดยการเพาะเลี้ยงแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อจำนวน 1 มิลลิลิตรลงใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MRS broth จำนวน 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ชั่วโมง 0, 3, 6, 9 และ 12 (Nes and Sorheim, 1984) โดยการปิเปตเชื้อจำนวน 10 มิลลิลิตร มาวัดความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ pH meter นำค่าความเป็นกรด-ด่างที่วัดได้มาสร้างกราฟเพื่อหาค่าอัตราการลดลงของความเป็นกรด-ด่าง จากความชันของเส้นกราฟ

4. การใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหนมเห็ด

4.1 การเตรียมเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงแลคติคแอสิดแบคทีเรียใน MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกชนิดที่มีความเหมาะสมสำหรับการหมักจากข้อ 3 ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ 2 ไอโซเลตคือ *Lactobacillus plantarum* 100 และ *Pediococcus pentosaceus* 140 เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยการคำนวณปริมาณเชื้อให้อยู่ในช่วง 5×10^6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cfu/g แหนมเห็ด คำนวณได้จากกราฟการเจริญ (ภาคผนวก จ)(Clarke, 1991; Huang and Lin, 1993; วิเชียร, 2534; พัชรินทร์, 2538) จากนั้นทำการเหวี่ยงแยกน้ำหมักที่คำนวณปริมาณการใช้แล้ว ด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (Bartholomew and Blumer, 1980) ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ

4.2 การทำแหนมเห็ด

วิธีการทำแหนมเห็ดนี้อาศัยส่วนประกอบต่างๆ ที่ดัดแปลงจาก สุนีมาศ (2544) ดังต่อไปนี้

เห็ดนางรมนึ่งสุก	1000	กรัม
กระเทียมลอกเปลือกบดละเอียด	40	กรัม
เกลือป่น	10	กรัม
ข้าวเหนียวนึ่งบด	20	กรัม

ขั้นตอนในการผลิตแหนมเห็ดดำเนินตามแผนภูมิ (รูป 5) เริ่มจากนำเห็ดนางรมมาล้างเอาสิ่งสกปรกที่ติดตรงส่วนโคน และหมวกเห็ดให้สะอาด ฉีกเป็นเส้นตามแนวครีบเห็ดหรือสับหยาบๆ จากนั้นนำไปนึ่งให้สุกด้วยไอน้ำประมาณ 20 นาที เห็ดสุกจะยุบตัวลงราวครึ่งหนึ่ง และมีสีคล้ำลงเล็กน้อย เทเห็ดที่นึ่งสุกแล้วลงในถาด เกลี่ยให้บางเพื่อคลายความร้อนได้เร็วขึ้น จนกระทั่งเห็ดเริ่มเย็นตัวลง บีบน้ำออกหลายๆครั้งด้วยผ้าขาวบางเพื่อให้ปริมาณความชื้นของเห็ดลดลง เติมเกลือ กระเทียม และข้าวเหนียวนึ่งที่บดละเอียดแล้วคลุกเคล้าด้วยกัน จนส่วนผสมทั้งหมดเข้ากันดี นำไปห่อในถุงพลาสติก ห่อละประมาณ 50 กรัม รัดด้วยยางรัดให้แน่น จนแหนมเห็ดอยู่ในสภาพที่มีอากาศน้อยที่สุดซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสำหรับกระบวนการหมัก จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน ก็จะได้เป็นผลิตภัณฑ์แหนมเห็ดเกิดขึ้น

อนึ่งวิธีการห่อแหนมเห็ดที่ขายตามท้องตลาดมี 2 แบบ แบบแรกห่อด้วยถุงพลาสติกเพียงอย่างเดียว หรือห่อทับด้วยใบตองเพิ่มขึ้นอีกชั้นหนึ่ง ลักษณะของการห่อแหนมเห็ดคล้ายกับการห่อแหนมหมู คือเป็นแท่งรูปทรงกระบอก (ภาคผนวก ช)

ผสมส่วนผสมดังกล่าวกับตัวอย่างเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่เกริ่นไว้โดยการใช้เครื่องปั่นผสม นาน 2 นาที จากนั้นบรรจุลงในถุงพลาสติก รัดด้วยยางรัดให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส อุปกรณ์ที่ใช้จะทำการฆ่าเชื้อด้วยน้ำร้อนทุกครั้ง เพื่อทำลายจุลินทรีย์อื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการหมัก ไม่ให้ปนเปื้อนในระหว่างชุดการทดลอง ซึ่งมีทั้งหมด 4 ชุดการทดลอง

ก. ชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

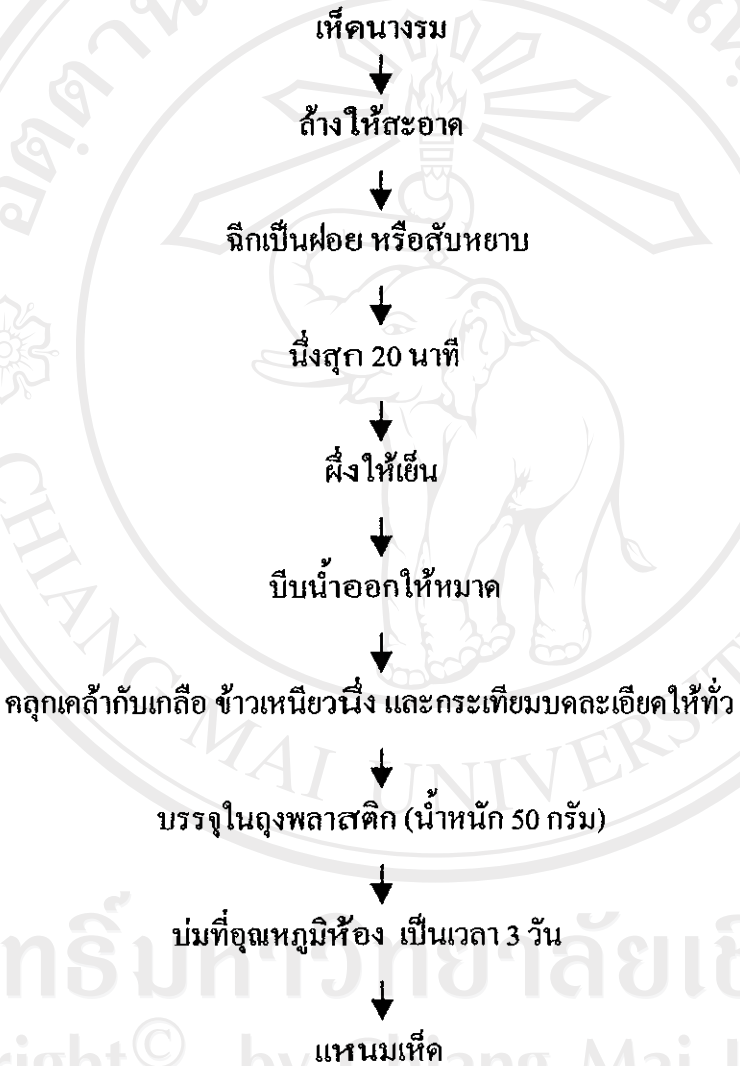
ว379.35
เลขหมู่.....ห127ก.....
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* 100

ค. ชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 140

ช. ชุดการทดลองที่เติมเชื้อผสมของ *Lactobacillus plantarum* 100 และ *Pediococcus pentosaceus* 140 ในอัตราส่วน 1:1 (มีปริมาณเชื้อแต่ละชนิดประมาณ 2.5×10^3 cfu/g)



รูป 5 แผนภูมิของการผลิตแหนมเห็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การวิเคราะห์

4.3.1 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ทำการเก็บตัวอย่างแหนมเห็ดหลังจากการหมักชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 30, 48, 60 และ 72 ในแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้แหนมเห็ดปริมาณ 11 กรัม เจือจางให้ได้สารละลายที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้ SPC agar และ MRS agar ทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งหมด

4.3.2 การวิเคราะห์ทางเคมี

ทำการเก็บตัวอย่างแหนมเห็ดหลังจากการหมักชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 30, 48, 60 และ 72 เพื่อการวิเคราะห์ทางเคมี (AOAC, 1984) ตามวิธีการทดสอบในหัวข้อ 2.1 โดย

ก. วัดความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter

ข. วัดปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติค โดยการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

4.3.3 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ก. การเตรียมแหนมเห็ดเพื่อการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

ประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส ในแหนมเห็ดที่ผ่านการหมักที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน แล้วนำมานึ่งให้สุกที่อุณหภูมิประมาณ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เสนอตัวอย่างให้ผู้ทดสอบชิมโดยวางบนจานพลาสติกที่มีรหัส 3 ตัว โดยทดสอบชิมที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) และแนะนำให้ผู้ทดสอบชิมบ้วนปากด้วยน้ำสะอาดก่อนชิมแต่ละตัวอย่าง

ข. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ทำการประเมินคุณลักษณะโดยวิธีพรรณนาคุณลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative descriptive analysis, QDA) (Stone *et al*., 1974) ในแต่ละลักษณะของผลิตภัณฑ์แหนมเห็ด โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 6 ท่าน ก่อนที่จะทำการทดสอบชิม ผู้ทดสอบทุกท่านจะได้รับการอธิบายให้มีความเข้าใจตรงกันถึงการประเมินค่าคุณสมบัติต่างๆ ของแหนมเห็ด แล้วจึงทำการประเมินคุณภาพในลักษณะต่างๆ (Attributes) ของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ความแน่นเนื้อ (Firmness), การยึดเกาะ (Cohesiveness), รสเปรี้ยว (Sourness), กลิ่นแหนมเห็ด (Flavor) และการยอมรับรวม (Overall acceptability) ทำการวางแผนการทดลองแบบ Randomized Block Design (RBD) 4 ชุดการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Fisher's Least Significant Difference (LSD) test มาทำการวิเคราะห์ รูปแบบการทดสอบแสดงไว้ในภาคผนวก ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved