

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experiment Research) โดยได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอนแรก หาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งเห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดหอมและแปรรูปเป็นเห็ดผง ขั้นตอนที่ 2 วิเคราะห์ผลการทดลอง เพื่อหาค่าประกอบทางเคมีของเห็ดผง และตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เห็ดผงหลังเก็บ 1 เดือน โดยวิธีดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยได้เสนอตามลำดับดังนี้

1. แผนการวิจัย
2. เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย
3. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย
4. วิธีการทดลอง
5. การวิเคราะห์ข้อมูล

#### แผนการวิจัย

การวิจัยเพื่อวิเคราะห์หาค่าประกอบทางเคมีของเห็ดผง และการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เห็ดผงหลังเก็บ 1 เดือน ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Random Design) ในอิทธิพลแบบกำหนด (Fixed Effect Mode) มี 1 ปัจจัย ดังนี้

ตัวอย่างเห็ดมี 4 ชนิด

1. เห็ดฟาง
2. เห็ดนางฟ้า
3. เห็ดหอม

#### เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องสกัดและวิเคราะห์โปรตีน (Kjeldahl)
2. เครื่องกลั่นหาไนโตรเจน (Distillation apparatus)
3. เครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet extractor)
4. เครื่องสกัดเยื่อใย (Fiber extractor)
5. เตาเผาไฟฟ้า (Furnace)

6. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
7. เครื่องบดไฟฟ้า (Philips cucina HRI 757)
8. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
9. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
10. ตู้บ่มเชื้อ
11. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
13. โอดูคความชื้น
14. Extraction Cup
15. กรูชีเบ็ดแก้ว
16. ปิเปต ขนาด 1, 5, 10, 25 มิลลิลิตร
17. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50, 100, 1,000 มิลลิลิตร
18. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250 มิลลิลิตร
19. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250, 500 มิลลิลิตร
20. แห้งแก้ว
21. จานเพาะเชื้อ
22. หลอดฝาเกลียว
23. บิวเรตต์
24. กระจกบดดวง
25. ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อขนาด 8 ออนซ์
26. เครื่องจ่ายสารปริมาตรน้อย ขนาด 1,000 ไมโครลิตร
27. ทิมเบิลกระดาด
28. ขาดั่งและที่จับ
29. กระดาดขังสาร
30. กระดาดกรอง
31. ถาดอะลูมิเนียม
32. ซ้อนตักสาร
33. หลอดหยด
35. มุ้งลวด
36. ผ้าขาวบาง
37. แคลป์ซูลขนาด 2.5 เซนติเมตร

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น ( $H_2SO_4$ )
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
3. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
4. โพแทสเซียมซัลเฟต ( $K_2SO_4$ )
5. คอปเปอร์ซัลเฟต ( $K_2SO_4$ )
6. ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether)
7. สารละลายบอริกอินดิเคเตอร์
8. ออกทานอล ( $C_8H_{17}OH$ )
9. อะซีโตน
10. เอทานอล
11. โซเดียมไบคาร์บอเนต ( $Na_2CO_3$ )
12. โบรโมคลีซอลกรีน (Bromocersol green)
13. เมทิลเรด (Methyl red)
14. บรอมไทมอลบลู (Bromthymol blue)
15. ทริปโตเนน (Tryptone)
16. สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)
17. กลูโคส (Glucose)
18. เดกซ์โทรส (Dextrose)
19. มันฝรั่ง (Potato)
20. ฐัน (Agar)
21. น้ำกลั่น

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่าง

เห็ดที่ใช้ 3 สายพันธุ์ คือ เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และเห็ดหอม ซึ่งจากตลาดสด

มหาสารคาม

นำตัวอย่างเห็ด ที่เป็นดอกเห็ดอย่างสมบูรณ์ขนาดใกล้เคียงกันในแต่ละชนิดมาตัดส่วนที่ติดกับดินหรือวัสดุที่ใช้เพาะทิ้ง ทำความสะอาด ตัดเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร วางเรียงแผ่เป็นชั้นบาง 1 ชั้น บนผ้าขาวบางที่รองด้วยมุ้งลวด และนำไปวางบนถาดอะลูมิเนียม

## 2. หาสภาวะที่เหมาะสมและในการอบแห้ง

นำตัวอย่างเห็ดจากข้อ 1 อบแห้งที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิคงที่ 3 ระดับ คือ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส อบจนกระทั่งสังเกตลักษณะตัวอย่างเห็ดแห้งสนิท จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าที่ระยะเวลา 21 ชั่วโมง ตัวอย่างเห็ดอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีลักษณะแห้งสนิท ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้สภาวะในการอบแห้งตัวอย่างเห็ดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 21 ชั่วโมง และหาปริมาณความชื้นเริ่มต้น

## 3. แปลรูปเป็นเห็ดผง

นำตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 21 ชั่วโมง มาป็นให้ละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า และเก็บตัวอย่างเห็ดผงที่ได้ในขวดแก้วสะอาดปิดฝาให้แน่น บรรจุตัวอย่างเห็ดผงใส่แคปซูลโดยหลักสุขลักษณะที่ดี ผู้บรรจุสวมถุงมือที่สะอาด ใช้ช้อนสะอาดตักเห็ดผงบรรจุให้เต็มแคปซูลพร้อมปิดฝาแคปซูลให้แน่น นำไปใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 8 ออนซ์ พร้อมใส่ของบรรจุสารดูดความชื้น ปิดฝาขวดให้แน่น และปิดทับอีกทีด้วยเทปใสเก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดผง (คัดแปลงจาก : กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2542)

นำตัวอย่างเห็ดผงที่ได้ในข้อ 3 มาวิเคราะห์ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรต

### 4.1 การวิเคราะห์ความชื้น

4.1.1 นำด้วยกระบี่เบืองเคลือบเข้าสู่อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ  $102 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น และนำมาชั่งน้ำหนัก

4.1.2 นำด้วยกระบี่เบืองเคลือบมาเข้าสู่อบไฟฟ้าอีกครั้งที่อุณหภูมิ  $102 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนัก จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

4.1.3 ชั่งตัวอย่างเห็ดผง 3-5 กรัม ใส่ในด้วยกระบี่เบืองเคลือบที่ชั่งน้ำหนักคงที่ และเข้าสู่อบไฟฟ้าที่  $102 \pm 1$  องศาเซลเซียส ตลอดทั้งคืน (12 ชั่วโมง) หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น และนำด้วยกระบี่เบืองมาชั่งน้ำหนัก

4.1.4 นำด้วยกระบี่เบืองเคลือบมาเข้าสู่อบไฟฟ้าอีกครั้งที่  $102 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักจนกระทั่งน้ำหนักคงที่

4.1.5 คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น ร้อยละของน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

- 4) ใช้เครื่องจ่ายสารปริมาตรน้อยขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูดตัวอย่างเจือจาง  $10^{-1}$  มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดฝาเกลียวที่มีน้ำกลั่นอยู่ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง  $10^{-2}$
- 5) ทำให้ตัวอย่างเจือจางต่อไปเป็น  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$
- 6) ใช้เครื่องจ่ายสารปริมาตรน้อยขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูดตัวอย่างที่มีความเจือจาง  $10^{-3}$  ลงในงานเพาะเชื้อ 2 งาน งานละ 1 มิลลิลิตร
- 7) ทำเช่นเดียวกันกับข้อ 6 แต่ใช้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$
- 8) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเทลงในงานเพาะเชื้อประมาณงานละ 10-15 มิลลิลิตร แกว่งงานเพาะเลี้ยงเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างกับวุ้นเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง กลับงานเพาะเลี้ยง และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง
- 9) ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากงานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี และรายงานผลเป็น จำนวน Colony Forming Unit (CFU) ต่อกรัมตัวอย่าง
- 10) คำนวณ จำนวน CFU ต่อกรัมตัวอย่าง

$$\text{CFU} = \text{ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี} \times \text{ระดับความเจือจาง}$$

## 5.2 การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา โดยเทคนิคการ Pour plate

- 1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)
- 2) ทำเช่นเดียวกับ ข้อ 2 - 10 ในหัวข้อ 5.1

### การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลมีดังนี้

1. สถิติพื้นฐานได้แก่
  - 1.1 ค่าเฉลี่ย ( $\bar{X}$ )
  - 1.2 ร้อยละ (%)
  - 1.3 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
2. สถิติที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดผงและจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เห็ดผงต่างชนิดกัน ใช้ F-test สำหรับวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance) ในการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design) เปรียบเทียบความแตกต่างเป็นรายคู่โดย Duncan's Multiple Range Test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ