บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุ-อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง
2. กระบอกฉีดน้ำ
3. กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร
4. กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
5. กระสอบสำหรับหมักถั่วเน่า
6. กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา ยี่ห้อ NIKON รุ่น ECLIPSE E400
7. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
8. คิวเวท (cuvette)
9. เครื่องเขย่า ยี่ห้อ Heidolph รุ่น UNIMAX 2010
10. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น PG 2002-S
11. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น AG 204
12. เครื่องนับโคโลนี ยี่ห้อ FUNKE รุ่น Colony Star
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Hettich รุ่น MIKRO 20
14. เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Hettich รุ่น UNIERSAL 3241
15. เครื่องโม่ถั่วเน่า
16. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-1601
17. จานอาหารเพาะเชื้อ

18. ช้อนตักสาร
19. ดิจิตอลเวอร์เนีย (digital vernia caliper)
20. ตะเกียงแอลกอฮอล์
21. ตะแกรงโลหะ
22. ตู้เขี่ยเชื้อ
23. ตู้บ่มเชื้อ ยี่ห้อ CONTHERM รุ่น 1200
24. ตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น ULE 500
25. ถุงพลาสติก
26. ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60
27. ที่เจาะกระดาษ
28. แท่งแก้วคนสาร
29. แท่งแก้วสามเหลี่ยม
30. บีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
31. บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
32. บีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร
33. บีกเกอร์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร
34. ปากคีบ (forceps)
35. ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
36. ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร
37. ปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร
38. ผ้าขาวบาง
39. แผงไม้สำหรับตากถั่วเน่า
40. แผ่น Parafilm
41. แม่พิมพ์กดถั่วเน่า
42. ไมโครปิเปตขนาด 25 – 250 ไมโครลิตร
43. ไมโครปิเปตขนาด 250 – 500 ไมโครลิตร

44. ไมโครปิเปตขนาด 500 – 1000 ไมโครลิตร

45. ยางรัด

46. ลูกยางแดงสำหรับดูดปิเปต

47. สไลด์ + แผ่นปิดสไลด์

48. หม้อนึ่งความดัน ยี่ห้อ HIRAYAMA รุ่น HVE-50

49. หม้อนึ่งความดัน ยี่ห้อ TOMY รุ่น SS-325

50. หม้อสำหรับแช่และต้มถั่วเหลือง

51. หลอดทดลอง

52. หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1 มิลลิลิตร (eppendorf tuve)

53. หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 10 มิลลิลิตร

54. ห่วงถ่ายเชื้อ

55. pH meter ยี่ห้อ DENVER รุ่น 21534

สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. ผงวุ้น
3. azocasein
4. Beef extract
5. Crystal violet
6. Deedorizer
7. Iodine
8. Peptone
9. Safranin
10. Trichlroacetic acid (TCA)
11. Tris-Hcl buffer pH 7.2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การลงพื้นที่ศึกษากรรมวิธีในการผลิต การบริโภคถั่วเน่าแผ่นในเขตพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน

ศึกษากรรมวิธีในการผลิต การบริโภคถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน คือ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดลำพูน จังหวัดลำปาง จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดแพร่ จังหวัดน่าน และจังหวัดพะเยา โดยได้เลือกศึกษากรรมวิธีในการผลิต การบริโภคถั่วเน่าแผ่นตามแต่ละจังหวัดดังนี้

จังหวัดเชียงใหม่ ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ อำเภอแม่ริม

จังหวัดเชียงราย ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ อำเภอแม่สรวย

จังหวัดลำพูน ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ อำเภอลี้

จังหวัดลำปาง ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ อำเภอเกาะคา

จังหวัดแม่ฮ่องสอน ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ อำเภอแม่สะเรียง

จังหวัดแพร่ ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ อำเภอเมือง

จังหวัดน่าน ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ อำเภอนาน้อย

จังหวัดพะเยา ศึกษากรรมวิธีในการผลิตถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ อำเภอเชียงม่วน

2. การเก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นและแยกเชื้อแบคทีเรียจากถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน

เมื่อได้ศึกษากรรมวิธีในการผลิต การบริโภคถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบนแล้ว จึงได้เลือกเก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นตามแต่ละจังหวัดดังนี้

จังหวัดเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นจาก อำเภอแม่ริม อำเภอแม่อาย และอำเภอสารภี

จังหวัดเชียงราย เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นจาก อำเภอแม่สรวย อำเภอแม่สาย และอำเภอเวียงป่าเป้า

จังหวัดลำพูน เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นจาก อำเภอเมือง อำเภอลี้ และอำเภอป่าซาง

จังหวัดลำปาง เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นจาก อำเภอเมือง อำเภอเกาะคา และอำเภอห้างฉัตร

จังหวัดแม่ฮ่องสอน เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นจาก อำเภอเมือง อำเภอแม่สะเรียง และ อำเภอปาย

จังหวัดแพร่ เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นจาก อำเภอเมือง อำเภอเด่นชัย และอำเภอหนองม่วงไข่

จังหวัดน่าน เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นจาก อำเภอเมือง อำเภอเชียงกลาง และอำเภอนาน้อย

จังหวัดพะเยา เก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นจาก อำเภอเมือง อำเภอเชียงม่วน และอำเภอเชียงคำ

เมื่อเก็บตัวอย่างถั่วเน่าแผ่นในพื้นที่ 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน จึงได้นำถั่วเน่าแผ่นที่ได้เก็บตัวอย่างมาไปทดลองแยกเชื้อแบคทีเรีย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมอาหารสูตร Nutrient agar (NA), Nutrient broth (NB) และอาหารวุ้นเอียง (NA slant) ตวงอาหารเหลว NB ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรปริมาตร 90 มิลลิลิตร

2. ชั่งถั่วเน่า 10 กรัม แล้วนำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ที่เตรียมอาหารไว้นำไปเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. นำเชื้อที่ได้มาลากลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. นำเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีที่ต่างกันมาลากซ้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บในอาหารวุ้นเอียงเป็น stock culture สำหรับการทดลองต่อไป

5. นำเชื้อบริสุทธิ์มาย้อมแกรมและส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ และบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.1 การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นที่จะใช้หมักถั่วเน่า

2.1.1 ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะเชื้อจาก stock culture มา 1 ลูป ใส่ในอาหารเหลว YM ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำเชื้อไปเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.2 นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวมาเจือจางความให้มีความเข้มข้นที่ 10^7, 10^8 และ 10^9 CFU/ml

2.1.3 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงที่ตำแหน่งตรงกลางจานเพาะเชื้อ ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานจานเพาะเชื้อ

2.1.4 กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.15 สังเกตการเจริญเติบโต ลักษณะของโคโลนี และนับจำนวนโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องมือนับโคโลนี

2.2 การทดสอบหมักถั่วเน่าโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์

2.2.1 นำถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาดคัดเลือกสิ่งเจือปนออกให้หมด แช่น้ำ 1 คืน และต้มถั่วเหลืองนาน 3-4 ชั่วโมง จากนั้นตักออกผึ่งให้แห้ง

2.2.2 ชั่งถั่วเหลืองที่ต้มและสะเด็ดน้ำแล้ว 20 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

2.2.3 เติมเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีเชื้อเริ่มต้นที่ 10^5 ปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์ 3 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

2.2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป

2.3 การวัดค่า pH ระหว่างการทดสอบหมักถั่วเน่า

2.3.1 ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 20 มิลลิลิตร

2.3.2 เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงชั่งมา 1 กรัม ใส่ลง ในบีกเกอร์น้ำกลั่นที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากัน

2.3.3 นำไปวัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter แล้วบันทึกผล

2.4 การทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็ง Skim milk โดยวิธี disk diffusion method

2.4.1 เก็บตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มา 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นนึ่งที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 9 มิลลิลิตร

2.4.2 ใช้ปากคีบ (forceps) คีบกระดาษกรองปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรจุ่มลงในน้ำกลั่น

2.4.3 นำมาวางบนอาหารแข็ง Skim milk ที่เตรียมไว้แล้วกดเบา ๆ ตามที่ตำแหน่งที่ต้องการ

2.4.4 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.4.5 วัดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง Skim milk และเลือกเก็บเฉพาะเชื้อที่มีความกว้างของวงใสตั้งแต่ 2.5 เซนติเมตร มาทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Azocasein ต่อไป

2.5 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธี Azocasein

2.5.1 เตรียม assay mixture ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน ดังนี้

2.5.1.1 blank ซึ่งประกอบด้วยสารผสมของ น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตรและ azocasein 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายในTris-Hcl buffer pH 7.2 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

2.5.1.2 enzyme substrate ซึ่งเตรียมได้ ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างถั่วเน่าที่บ่มไว้มา 1 กรัม ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บเอาส่วนที่เป็นน้ำและเซลล์แบคทีเรียไว้ทดสอบ

2. นำน้ำและเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเชื้อที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. ดูดเอาส่วนใสไปทดสอบโดยวิธี azocasein โดยการดูดเอาส่วนใสมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับ azocasein 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน Tris-Hcl buffer pH 7.2 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

2.5.2 นำ assay mixture (blank และ enzyme substrate) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา30นาที

2.5.3 หยุดปฏิกิริยาด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ Trichlroacetic acid (TCA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรทิ้งให้ตกตะกอนเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

2.5.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที

2.5.5 ดูดเอาส่วนใสที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer และกำหนดค่าให้ unit enzyme ของโปรติเอสมีค่าเท่ากับ ค่าดูดกลืนแสงที่ 0.01 ที่ 440 นาโนเมตร

2.6 การทำถั่วเน่าแผ่น

2.6.1 นำถั่วเหลืองมาล้างทำความสะอาดคัดเลือกสิ่งเจือปนออกให้หมด จากนั้นนำถั่วเหลืองมาแช่น้ำ 1 คืน ต้มถั่วเหลืองนาน 3 - 4 ชั่วโมง ผึ่งให้แห้ง

2.6.2 ชั่งถั่วเหลืองที่สะเด็ดน้ำแล้ว 500 กรัม บรรจุลงในกระสอบที่ตัดเย็บมาสำหรับการหมักถั่วเน่าโดยเฉพาะ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

2.6.3 เติมเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใส่เชื้อปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

2.6.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.6.5 เมื่อถั่วเน่ามีการเปื่อยยุ่ยจะมีเส้นใยสีขาวเกิดขึ้น และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของถั่วเน่า จึงนำถั่วเน่าไปโขลกให้ละเอียด จากนั้นนวดให้เข้ากัน แล้วปั้นเป็นก้อนกลมๆ โดยให้ได้น้ำหนัก 15 กรัมต่อก้อน

2.6.6 กดทับด้วยแม่พิมพ์ให้เป็นแผ่น แล้วนำไปตากแดด 2 วัน เก็บถั่วเน่าแผ่นที่แห้งแล้วใส่ถุงพลาสติกเพื่อรอการวิเคราะห์ความชอบโดยรวมของผู้บริโภคต่อไป

3. การนำถั่วเน่าแผ่นมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.1 การทำถั่วเน่าผงบรรจุขวด โดยมีวิธีการดังนี้

3.1.1 นำถั่วเน่าแผ่นมาย่างไฟให้หอมจนสีของถั่วเน่าแผ่นเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทอง

3.1.2 นำถั่วเน่าแผ่นที่ย่างไฟแล้วมาโขลกให้ละเอียด

3.1.3 บรรจุลงในขวดที่ปราศจากความชื้น

3.2 การทำน้ำพริกถั่วเน่าทรงเครื่อง โดยมีส่วนประกอบและวิธีการดังนี้

1. ถั่วเน่าแผ่นเป็นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ 200 กรัม
2. กระเทียมเจียว 100 กรัม
3. หอมแดงเจียว 100 กรัม
4. พริกป่น 30 กรัม
5. กุ้งแห้งทอด 100 กรัม

3.2.1 นำถั่วเน่าแผ่นที่ตัดเป็นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ไปทอดให้สุก

3.2.2 ตักถั่วเน่าทอดสุกขึ้นสะเด็ดน้ำมัน ทิ้งไว้ให้เย็น

3.2.3 นำถั่วเน่าแผ่นที่ทอดสุกแล้วมาผสมกับกระเทียมเจียว หอมแดงเจียว พริกป่น และกุ้ง แห้งทอด คลุกเคล้าส่วนผสมดังกล่าวให้เข้ากัน

3.2.4 นำน้ำพริกถั่วเหลืองทรงเครื่อง บรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ที่ปราศจากความชื้น

การตรวจสอบความชอบโดยรวมของผู้บริโภคโดยใช้ประชาชนทั่วไปจำนวน 30 คน ซึ่งบริโภคถั่วเน่าในชีวิตประจำวันอยู่แล้วเป็นผู้ชิม และประเมินความชอบรูปแบบของผลิตภัณฑ์ โดยมีการตั้งเกณฑ์การประเมินตามรูปแบบของมาตรฐานผลิตภัณฑ□ชุมชน (มผช.) (ภาคผนวก ฎ)ซึ่งผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดที่ได้ทำขึ้นจะต้องได้รับการประเมินตามเกณฑ์การประเมินตามมาตรฐาน มผช. ดังนี้

ถั่วเน่าแผ่น

1. ตรวจสอบเนื้อสัมผัสโดยรวมของถั่วเน่าแผ่น
2. ตรวจสอบสีของถั่วเน่าแผ่น
3. ตรวจสอบกลิ่นของถั่วเน่าแผ่น
4. ตรวจสอบรสชาติของถั่วเน่าแผ่น

ถั่วเน่าผง

1. ตรวจสอบลักษณะทั่วไปของถั่วเน่าผง
2. ตรวจสอบสีของถั่วเน่าผง
3. ตรวจสอบกลิ่นของถั่วเน่าผง
4. ตรวจสอบรสชาติของถั่วเน่าผง

น้ำพริกถั่วเน่าทรงเครื่อง

1. ตรวจสอบลักษณะทั่วไปของน้ำพริกถั่วเหลืองทรงเครื่อง
2. ตรวจสอบสีของน้ำพริกถั่วเหลืองทรงเครื่อง
3. ตรวจสอบกลิ่นของน้ำพริกถั่วเหลืองทรงเครื่อง
4. ตรวจสอบรสชาติของน้ำพริกถั่วเหลืองทรงเครื่อง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และวิเคราะห์ค่าทางสถิติจะใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of varince (ANOVA) ในการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ