บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
3.1.2 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
3.1.3 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 16 × 150 เซนติเมตร
3.1.4 หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 18 × 150 เซนติเมตร
3.1.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp stainless)
3.1.6 ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)
3.1.7 ทิป (Tip) ขนาด 1 และ 0.1 มิลลิลิตร
3.1.8 ปิเปต (Pipette)
3.1.9 ถุงซิบ ขนาด 16 x 23 เซนติเมตร
3.1.10 กระจกสไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Slide and Cover slip)
3.1.11 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
3.1.12 ช้อนตักสาร (Spatula rod)
3.1.13 กระบอกตวง (Cylinder)
3.1.14 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
3.3.15 บีกเกอร์ (Beaker)
3.3.16 กระบอกฉีดพลาสติกปลอดเชื้อ (Syringe)

3.2 สารเคมีและสีย้อม

3.2.1 กรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
3.2.2 แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์
3.2.3 น้ำยาฆ่าเชื้อเดทตอล
3.2.4 สีย้อม Lactophenol cotton blue

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.3 เครื่องมือ

3.3.1 เครื่องบ่มแบบเขย่า (Incubater Shaker) ยี่ห้อ H1000-M-E รุ่น SI6R-Shaking Incubator
3.3.2 เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex mixer) ยี่ห้อ Vortex Genie2
3.3.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Auto clave) ยี่ห้อ Hiragmaa รุ่น HVE 50
3.3.4 เครื่องอบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น 88-500
3.3.5 เครื่องวัดปริมาตรแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) ยี่ห้อ Pervinumj.sallerondujardinparis
3.3.6 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ยี่ห้อ OLYMPUS
3.3.7 กล้องสเตอริโอ (Stereo microscope) ยี่ห้อ Binocular รุ่น SMZ-10 DIA STAND

3.3.8 ตู้บ่มเชื้อ (Incubater) ยี่ห้อ HOTPACK รุ่น 3103D

3.3.9 เครื่องชั่งไฟฟ้า (Analytical balance) ยี่ห้อ Mettle Toledo รุ่น MS 16023

3.3.10 ตู้แช่เชื้อจุลินทรีย์ (Deep freezer) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น R-Z400R

3.3.11 ตู้แช่อาหารเลี้ยงเชื้อ (Deep freezer) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น SBC-3DB

3.3.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar floe) ยี่ห้อ ISSCO รุ่น ModelBV.124

3.3.13 เตาให้ความร้อน (Hotplate) ยี่ห้อ Rommels bacher

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ (องค์ประกอบแสดงอยู่ในภาคผนวก ก)

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Malt Extract Medium (YM)

3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) agar medium

3.4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract broth (ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์)

3.4.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Carbon fermentation test broth (ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์)

3.5 ตัวอย่าง

สับปะรด มะละกอ และกล้วยหอมจากตลาดเขาไร่ยาในจังหวัดจันทบุรี

3.6 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.6.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์จากผลไม้ในจังหวัดจันทบุรี (ดัดแปลงจากวิธีการของสุมาลี เหลืองสกุล, 2539)

นำตัวอย่างเนื้อผลไม้สุก ได้แก่ สับปะรด มะละกอ และกล้วยหอมอย่างละ 1 กรัม ไปทำการเจือจางในน้ำกลั่นหรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 99 มิลลิลิตร โดยนำไปตีปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใช้ปิเปตดูดปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อไปเจือจางต่อในน้ำกลั่นหรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำต่อไปจนได้ความเจือจางที่ 10^{-5} ดูดตัวอย่างผลไม้แต่ละความเจือจาง ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อทุกความเจือจางทำ 3 ซ้ำ เติมกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อย 10 ในปริมาตร 1.1 มิลลิลิตร ใน PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่หลอมเหลวและปล่อยให้อุณหภูมิให้ลดลงถึง 45 องศาเซลเซียส เพื่อให้อาหารเป็นกรดจะทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ เพื่อนำมาทำการเพาะเชื้อแบบ pour plate เทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่จานเพาะเชื้อทุกจานทันที และเอียงอาหารไปมาให้อาหารเลี้ยงเชื้อกับตัวอย่างผลไม้เข้ากันดีเป็นเนื้อเดียวกัน และปล่อยให้อาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2-5 วัน จากนั้นคัดแยกยีสต์แต่ละไอโซเลทโดยพิจารณาจากลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน นำมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเดิม จากนั้นเก็บรักษายีสต์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งวุ้นเอียง YM ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.6.2 การศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยาของยีสต์ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kurtzman et al., 2011)

1. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์

นำเชื้อยีสต์มาเพาะเลี้ยงให้ได้โคโลนีเดี่ยว โดยนำมาขีดลากแบบไขว้ (Cross streak) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract-malt extract agar (YM) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง โดยสังเกตสีและลักษณะโคโลนีของยีสต์ และจากนั้นถ่ายเชื้อลงใน YM broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เพื่อนำมาศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว รวมทั้งสังเกตลักษณะรูปร่าง การเรียงตัว และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุที่กำลังขยาย 40 - 100x

2. การศึกษาการสร้างแอสโคสปอร์

นำยีสต์มาขีดลากแบบไขว้บนอาหาร 5% malt extract agar จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นตรวจดูการสร้างแอสโคสปอร์ที่เวลา 3, 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน บันทึกผลการสร้างแอสโคสปอร์ในแอสคัส จำนวนและรูปร่าง

3. การศึกษาการสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม

นำเชื้อยีสต์มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยวิธี Dalmau plate technique โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากเป็นเส้นตรง และทำ Point inoculation 2 ตำแหน่ง ในจานเพาะเชื้อเดียวกัน ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อหรือจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 - 10 วัน ตรวจการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์บริเวณที่ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ โดยใช้เลนส์วัตถุที่กำลังขยาย 40-100x

3.6.3 การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส (ดัดแปลงจากวิธีการของ Banett et al., 2000; สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ทำการทดสอบการหมักน้ำตาล โดยนำยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.6.2 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว YM อายุ 24 ชั่วโมง มาทำการเตรียมสารละลายแขวนลอยเซลล์ (Cell suspension) จากนั้นถ่ายเซลล์แขวนลอยปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ปริมาณเซลล์ 10^7 CFU/มิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Yeast extract broth ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) บรรจุอาหารปริมาตร 10 - 15 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร และมีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) ขนาด 6 × 50 เซนติเมตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตผลการหมักโดยพิจารณาการสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส หากยีสต์สามารถผลิตแก๊สได้ในปริมาณสูงจัดว่าเป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอทานอล เนื่องจากแก๊สที่เกิดขึ้นนี้เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักเอทานอล ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์}} 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

ทั้งนี้ยีสต์ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้จะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาความสามารถในการหมักเอทานอลในขั้นต่อไป

3.6.4 การศึกษาการหมักเอทานอลของยีสต์ที่คัดเลือกได้ (ดัดแปลงจากวิธีการของนฤมล โตอ่อน, 2549; สุดารัตน์ แซ่โจว, 2555; Brooks, 2008)

นำยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD อายุ 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ Pasteur pipette ที่ปลอดเชื้อดูดตัวอย่างเชื้อมา 5.0 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหาร Carbon fermentation test broth ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ด้วยเครื่อง Ebulliometer

RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี