

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 ตัวอย่างลูกแป้ง

ลูกแป้งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นตัวอย่างลูกแป้งเหล้าที่ได้จากร้านค้าในตลาดและแหล่งผลิตลูกแป้งเหล้าโดยตรงในอำเภอต่างๆ 13 แห่ง และ 1 กิ่งอำเภอของจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งได้แก่ อำเภอเมือง ฝาง แม่สาย ไชยปราการ เชียงดาว แม่ริม สันทราย สันกำแพง สันป่าตอง หางดง จอมทอง ดอยเต่า แม่แจ่ม สารภี และกิ่งอำเภอแม่วาง ดงภาคผนวก ก

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast extract – malt extract broth (YM broth)
Yeast extract – malt extract agar (YM agar)
Yeast extract peptone dextrose broth (YPD broth)
Yeast extract peptone dextrose agar (YPD agar)
Yeast extract peptone dextrose broth (YPD broth) + 20% glucose
Potato dextrose agar (PDA)
Starch agar
Starch broth

3.1.3 สารเคมี

Yeast extract
Malt extract
Peptone
Agar
Glucose
Iodine
Potassium dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4)
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)

Potassium chloride (KCl)

Magnesium sulphate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Ferus Sulphate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Soluble starch

Phosphate buffer (pH 6.9)

Hydrocloric (HCl)

95% แอลกอฮอล์ (alcohol)

น้ำกลั่น (distill water)

3.1.4 อุปกรณ์

หลอดทดลอง (Test tube)

จานเพาะเชื้อ (Petridish)

แท่งแก้วคน (Stirrer)

ขวดดิวแรน (Duran bottle)

บีกเกอร์ (Beaker)

ช้อนตักสาร (Spatula)

ที่ตั้งหลอดทดลอง (Rack)

ปากคีบ (Forcep)

กระดาษทิชชู (Tissue paper)

กระดาษอลูมิเนียม (Aluminium foil)

สำลี (Cotton)

ตะกร้าใส่ของ (Basket)

ไมโครปิเปต (Micro pipette)

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ปิเปตทิป (Pipette tip)

หลอดหยด (Dropper)

ขวดรูปชมพู่ (Flask)

ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)

กระบอกตวง (Cylinder)

แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader)

แท่งแก้วคนสาร (Stirer)

หยอดหยด (Dropper)

nylon filter 0.45 ไมโครลิตร

หลอดปั่นเหวี่ยง

เข็มเขี่ยเชื้อ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

ขวดน้ำกลั่นและน้ำกลั่น

คิวเวท

สไลด์และกระจกปิดสไลด์

3.1.5 เครื่องมือ

หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

ตู้นมเชื้อ (Incubator)

ตู้เย็น (Refrigerator)

เครื่องชั่งอย่างหยาบ (Analytical balance)

ฮอตเพลต (Hot plate)

เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vortex mixer)

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubator)

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultraviolet visible spectrophotometer)

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

เครื่องชั่งสาร (Analytical balance)

เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (gas chromatography)

เครื่องวัดดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

เครื่องผสมสาร (Vertex mixer)

กล้องจุลทรรศน์

สไลด์นับเซลล์ (hemacytometer)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การแยกเชื้อยีสต์และเชื้อราจากลูกแบ่งเหล้า

แยกและคัดเลือกเชื้อยีสต์และราจากลูกแบ่งเหล้า ด้วยวิธี dilution plate technique ดังในภาคผนวก จ โดยนำตัวอย่างลูกแบ่งที่บดละเอียด 1 กรัม ใส่ลงในฟลasks ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YM broth (pH 3.5-3.8) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแยกโคโลนีของเชื้อยีสต์และราโดยวิธี spread plate technique บนอาหาร YM agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วคัดเลือกและแยกโคโลนีเชื้อยีสต์และรา ที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยนำโคโลนีของเชื้อยีสต์ไปเลี้ยงบนอาหาร YM agar และนำโคโลนีของเชื้อราไปเลี้ยงในอาหาร PDA ซ้ำ 2 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นถ่ายเชื้อราที่แยกได้ลงในอาหาร PDA slant แล้วเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การทดสอบคุณสมบัติการย่อยแป้งของเชื้อรา

ถ่ายเชื้อราลงในอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ก้านหลอด pasture pipette เจาะเชื้อราบน plate เป็นชั้นๆ แล้วถ่ายเชื้อลงใน strach agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาทดสอบการย่อยสลายแป้งโดยวาดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมเชื้อราแล้วทิ้งไว้ 10 นาที เทสารละลายไอโอดีนออกวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส จากการย่อยสลายแป้งของเชื้อรา ดังแสดงในภาคผนวกที่ ข

3.2.3 การทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง

นำ crude enzyme 1.0 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลอง (reaction mixture) ที่มีสับสเตรท คือ 1%(w/v) soluble starch จากนั้นบ่มหลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม DNS 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในน้ำเย็น 15 นาที แล้วจึงเติมน้ำกลั่นอีกหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาณน้ำตาลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยวิธีของ Alli และคณะ (1998) ดังแสดงในภาคผนวก ก และ ภาคผนวก ข

3.2.4 การศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์จากการหมักเชื้อยีสต์

ถ่ายเชื้อยีสต์จาก PDA slant ลงบนอาหาร YPD Agar บ่มไว้ในที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมา 1 หลบ ใส่ลงในฟลasks ขนาด 125 มิลลิลิตร

ที่มีอาหารเหลว YPD broth ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มไว้บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับปริมาตรให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^7 CFU/ml โดยการนับจำนวนเชื้อโดย heamacytometer ดังแสดงในภาคผนวก ฅ แล้วเติม กล้าเชื้อปริมาตร 5 % (v/v) ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YPD broth + 20% glucose ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างส่งวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ด้วย เครื่อง gas chromatography โดยปิเปตตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ ปรับ ปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้น ปิเปต มา 5 มิลลิลิตร เติม internal standard 5 มิลลิลิตร เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองก่อน ดูดมา 1 ไมโครลิตร ฉีดเข้า เครื่อง GC เพื่อหาปริมาณแอลกอฮอล์จากพื้นที่ใต้กราฟ (area peak)

3.2.5 จัดจำแนกและระบุสกุลของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลูกแบ่ง

นำเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสและยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้ใน 5 อันดับแรก รวม ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ส่งตรวจสอบเพื่อจัดจำแนกและระบุสกุลของเชื้อจุลินทรีย์ ณ ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่