บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. **จุลินทรีย์**
    - *S. cerevisiae* TISTR 5048
    - *K. marxainus*
2. **อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา** (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก)
    - YM medium (Yeast Malt) บริษัท Difco
    - Fermentation medium (Barnatt *et al*., 2000)
    - Acetate agar (Kurtzman *et al* .,1998)
    - Gorodkowa's agar (Kurtzman *et al*., 1998)
    - Yeast fermentation medium (YFM) (Banat *et al*., 1992)
    - Yeast carbon base บริษัท Difco
    - Yeast nitrogen base บริษัท Difco
3. **สารเคมี**
    - 3,5-Dinitrosalicylic acid จากบริษัท Riedel-deaën
    - Ammonium sulfate จากบริษัท Merck
    - Diazonium Blue B จากบริษัท Fluka
    - KH_2PO_4 จากบริษัท Merck
    - $MgSO_4.7H_2O$ จากบริษัท Merck
    - Phenol จากบริษัท Merck
    - Potassium nitrate จากบริษัท Merck
    - Potassium tartrate จากบริษัท BDH AnalaR

- Sodium hydroxide จากบริษัท Merck
- Sulphuric acid จากบริษัท Merck

3. น้ำตาล

- D-Cellobiose จากบริษัท Sigma
- D-Xylose จากบริษัท Fluka
- Erythritol จากบริษัท Fluka
- D-Galactose จากบริษัท Difco
- D-Glucose จากบริษัท Merck
- Inositol จากบริษัท Difco
- Lactose จากบริษัท Fluka
- D-Maltose จากบริษัท Fluka
- D-Mannitol จากบริษัท Fluka
- D-Melibiose จากบริษัท Fluka
- Raffinose จากบริษัท Sigma
- Sucrose จากบริษัท Merck
- D-Trehalose จากบริษัท Fluka

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

- เครื่องเขย่า (Vortex Mixer) ของ Sciencefic Industries. Inc. USA.
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-1201V ของ Shimadsu, Japan
- เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิด super speed (Centrifuge) ของ Centaur2, Sunya
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave) ของ Tomy Seilo Co.Ltd, Japan
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ของ Eyela Tokla Rikakikai Co. Ltd, Japan
- ตู้บ่มเชื้อชนิดเขย่า (shaking incubator) ของ Gallekamp
- ตู้ปลอดเชื้อ (larminar airflow cabinet) รุ่น BVT 125 ของ ISSCO, USA
- ตู้อบร้อน (hot air oven) ของ Heraeus GmbH, Germany
- Ebulliometer ของ PER VINUM J. SALLERON DUJARDIN, PARIS

วิธีการทดลอง

1. การแยกยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง

1.1 การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างพืชและดินที่คาดว่าจะมียีสต์ ตัวอย่างดอกไม้และใบไม้จากต้น ผลไม้ซื้อจากตลาดและร้านขายผลไม้ น้ำตาลโตนดซื้อจากแหล่งที่มีการปลูก บรรจุตัวอย่างลงในภาชนะที่สะอาดปลอดเชื้อ พร้อมบันทึกสถานที่และวัน เดือน ปี ที่เก็บ

1.2 วิธีการแยกเชื้อ

1.2.1 ตัวอย่างดอกไม้และใบไม้ ใช้ sterile cotton swab ป้ายเชื้อที่ผิวของตัวอย่าง นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM พีเอช 5.5 ที่บรรจุอยู่ในหลอดขนาด 16×150 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี penicillin ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ นาน 48 ชั่วโมง จุ่มตัวอย่างจากอาหารเหลว 1 loop streak บนอาหารแข็ง YM ที่มี antibiotic ดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายยีสต์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันลงในอาหารแข็ง YM ที่ไม่มี antibiotic โดยวิธีการ streak plate เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2.2 ตัวอย่างผลไม้และน้ำตาลโตนด ใช้ loop ลนไฟฆ่าเชื้อทิ้งให้เย็นจุ่มตัวอย่างผลไม้และน้ำตาลโตนด 1 loop streak บนอาหารแข็ง YM พีเอชเป็น 5.5 ที่มี penicillin ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายยีสต์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันลงในอาหารแข็ง YM ที่ไม่มี antibiotic โดยวิธีการ streak plate เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2.3 ตัวอย่างดินและผลปาล์ม ชั่งตัวอย่างดิน 5 กรัม หรือผลปาล์ม ใช้ที่คีบปราศจากเชื้อคีบเส้นใยผลปาล์ม ใส่ลงในอาหารเหลว YM พีเอช 5.5 บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผสมกับ penicillin ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อให้มีปริมาณมาก ๆ

ถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารชนิดเดิม ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำยีสต์ที่ได้จากการเลี้ยงมาเจือจางด้วยเปปโตน 0.1 % ในระดับ 10^{-1}-10^{-5} ใช้ปิเปตดูดเชื้อที่เจือจางแล้วที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนอาหารแข็ง YM ใช้แท่งแก้ว (spreader)

เกลี่ยเชื้อให้ทั่วอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ย้ายยีสต์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันลงในอาหารแข็ง YM ที่ไม่มี antibiotic โดยวิธีการ streak plate เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

นำยีสต์ที่ได้จากข้อ 1.2.1 1.2.2 และ 1.2.3 มาทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ได้แก่ ขนาด สี ขอบ ผิว และลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อใช้ในการแยกยีสต์ที่มีลักษณะต่างกัน เก็บตัวอย่างยีสต์ที่แยกได้ในอาหารวุ้นเอียง YM (stock medium) โดยเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ละ 2 ซ้ำ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญเต็มที่ เก็บหลอดเชื้อยีสต์ที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ทำการถ่ายเชื้อเดือนละครั้ง

2. การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง

การทดลองใน ข้อ 2.1-2.3 ซึ่งเป็นอาหารเหลว มีวิธีการเตรียมเชื้อโดยเขี่ยเชื้อยีสต์ที่มีการเจริญดีอายุ 48 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียง YM ที่เจริญที่อุณหภูมิ 40 °ซ ลงในอาหารเหลว YM พีเอช 5.5 ที่บรรจุอยู่ในหลอดขนาด 16×150 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยปรับระดับความขุ่นของเชื้อให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในข้อ 2.1 และ ข้อ 2.3 ส่วนในข้อ 2.2 ปรับค่าความขุ่นเป็น 1.0

2.1 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 40 °ซ

นำยีสต์ที่แยกได้ทุกไอโซเลตจากข้อ 1 และยีสต์ที่ใช้เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* มาเตรียมเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อเริ่มต้นที่ต้องการทดสอบ 1 หยด ด้วย sterile pasteur pipette ลงในอาหารเหลว YM พีเอช 5.5 ที่บรรจุอยู่ในหลอดขนาด 16×150 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไอโซเลตละ 2 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ นาน 48 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อจากความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยให้ระดับการเจริญเป็น 3 ระดับ คือ ความขุ่น 0.3-0.5 หมายถึง เจริญน้อย 0.5-1 หมายถึง เจริญดี และความขุ่นมากกว่า 1 หมายถึง เจริญดีมาก

2.2 เปรียบเทียบการหมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครสที่อุณหภูมิสูง

นำยีสต์ที่เจริญดีที่สุดจากข้อ 2.1 และยีสต์ที่ใช้เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* มาการเตรียมเชื้อเริ่มต้น ถ่ายเชื้อเริ่มต้นที่ต้องการทดสอบ 1 หยด ด้วย sterile pasteur pipette ลงในอาหารเหลว Fermentation medium ที่บรรจุอยู่ในหลอดขนาด 16×150 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือซูโครสชนิดละ 2 % เป็นสับสเตรท สายพันธุ์ละ 2 ซ้ำ ในน้ำตาลแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ บันทึกผลปริมาณ

ก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตรจนกระทั่งครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่คัดได้จากการทดลองนี้มาใช้ทดสอบต่อในข้อ 2.3

2.3 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นจากสายพันธุ์ที่คัดได้จากข้อ 2.2 และยีสต์ที่ใช้เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 % (ค่าความขุ่น 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร) ด้วยปิเปตที่ปราศจากเชื้อลงในอาหารเหลว YM พีเอช 5.5 ที่บรรจุอยู่ในหลอดขนาด 16×150 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สายพันธุ์ละ 15 หลอด แบ่งไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 35 40 42 และ 44 °ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) อุณหภูมิละ 3 หลอดต่อสายพันธุ์ นาน 48 ชั่วโมง วัดการเจริญจากค่าความดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำมาหาค่าเฉลี่ย หลังจากนั้นนำเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ มาใช้ทดสอบในการทดลองข้อ 2.4

2.4 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °ซ

การทดลองตั้งแต่ ข้อ 2.4-3.5 ใช้วิธีการเตรียมเชื้อเริ่มต้นดังนี้

ถ่ายเชื้อยีสต์ที่มีการเจริญดีอายุ 48 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียง YM ที่เจริญที่อุณหภูมิ 40 °ซ 1 loop ลงในอาหารเหลว YM พีเอช 5.5 ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปรับปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยถ่ายเชื้อที่คัดได้จากข้อ 2.3 และยีสต์ที่ใช้เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 % ลงในอาหารเหลว Yeast fermentation medium (YFM) (Banat *et al*., 1992) (ภาคผนวก ก) พีเอช 5.5 ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 15 % สายพันธุ์ละ 2 ฟลาสก์ เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ นาน 72 ชั่วโมง บันทึกผลการผลิตเอทานอลและน้ำตาลรีดิวซ์ นำเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอทานอลได้ดี มาทดสอบในการทดลองข้อ 2.5

2.5 การเจริญและผลิตเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่อุณหภูมิ 40 °ซ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยถ่ายเชื้อที่คัดได้จากข้อ 2.4 และยีสต์ที่ใช้เปรียบเทียบ *S. cerevisiae* TISTR5048 ถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 % ลงในอาหาร YFM พีเอช 5.5 ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15 % สายพันธุ์ละ 10 ฟลาสก์ เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ที่เวลา 12 24 48 60 และ 72 ชั่วโมง นำยีสต์มาวัดเจริญที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร วัดปริมาณเอทานอลและ

น้ำตาลรีดิวซ์ ครั้งละ 2 ฟลาสก์ ยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงจากการทดลองนี้นำมาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลต่อไป

3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่คัดเลือกได้

3.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคส กากน้ำตาล และยีสต์สกัด

3.1.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และกากน้ำตาล

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น (วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.4) 10 % ลงในอาหาร YFM ที่บรรจุอยู่ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.5 โดยปรับให้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมดของน้ำตาลกลูโคสและกากน้ำตาลเท่ากับ 10 15 และ 20 % ความเข้มข้นละ 2 ฟลาสก์ เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ วัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง โดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ สาโรจน์ และคณะ (2544) เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณเอทานอล และน้ำตาลทั้งหมด (Dobois *et al*., 1956) (ภาคผนวก ข)

3.1.2 ปริมาณของยีสต์สกัด

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น (เช่นเดียวกับข้อ 2.4) 10 % ลงในอาหาร YFM ที่บรรจุอยู่ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมตามการทดลองข้อ 3.1.1 โดยเติมปริมาณยีสต์สกัด 3 ระดับ ได้แก่ 0.3 0.6 และ 1.0 % พีเอชเริ่มต้น 5.5 ความเข้มข้นละ 2 ฟลาสก์ นำมาเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ วัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วเทียบเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ สาโรจน์ และคณะ (2544) เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณเอทานอล และน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข)

3.2 พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น (เช่นเดียวกับข้อ 2.4) 10 % ลงในอาหาร YFM ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีชนิด ปริมาณแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดที่เหมาะสมตามการทดลองข้อ 3.1 โดยปรับให้มีปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 5.5 และ 6.5 ตามลำดับ พีเอชละ 2 ฟลาสก์ นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ วัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วเทียบเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ สาโรจน์ และคณะ (2544) เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณเอทานอล และน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข)

3.3 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยถ่ายเชื้อเริ่มต้น (เช่นเดียวกับข้อ 2.4) ปริมาณ 5 และ 10 % ลงในอาหาร YFM ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีชนิด ปริมาณแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดที่เหมาะสมตามการทดลองข้อ 3.1 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามข้อ 3.2 ความเข้มข้นละ 2 ฟลาสก์ เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ วัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วเทียบเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ สาโรจน์ และคณะ (2544) เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณเอทานอล และน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข)

3.4 ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น (เช่นเดียวกับข้อ 2.4) ปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ 3.3 ลงในอาหาร YFM ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีชนิด ปริมาณแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดตามการทดลองข้อ 3.1 ปรับพีเอชเริ่มต้นตามข้อ 3.2 เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 150 และ 200 รอบ/นาที ความเร็วรอบละ 2 ฟลาสก์ อุณหภูมิ 40 °ซ วัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วเทียบเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ สาโรจน์ และคณะ (2544) เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณเอทานอล และน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข)

3.5 การเจริญและการผลิตเอทานอลจากสภาวะที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น (เช่นเดียวกับข้อ 2.4) ปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ 3.3 ลงในอาหาร YFM ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีชนิด ปริมาณแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดที่เหมาะสมตามการทดลองข้อ 3.1 ปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมตามข้อ 3.2 เลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่เขย่าความเร็วรอบที่เหมาะสมตามข้อ 3.4 อุณหภูมิ 40 °ซ วัดการเจริญทุก 6 ชั่วโมง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วเทียบเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีของ สาโรจน์ และคณะ (2544) เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดปริมาณเอทานอล และน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959) (ภาคผนวก ข)

4. ศึกษาลักษณะบางประการของเชื้อ MIY1 และ MIY57 เพื่อใช้ในการบ่งชี้ชนิดของยีสต์

4.1. ศึกษาลักษณะทาง microscopic และ macroscopic morphology

4.1.1 ศึกษาลักษณะการเจริญ (Cultural characteristic)

4.1.1.1 ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง (YM agar) โดยการเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนี ได้แก่ สี ขอบ รูปร่าง ความมัน ความด้าน ผิว และลักษณะเป็นเมือก

4.1.1.2 ศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารเหลว (YM broth) โดยการถ่ายเชื้อเริ่มต้นความขุ่น +1 (+1 คือ เมื่อเทียบความขุ่นกับกระดาษที่ขีดเส้นสีดำสามเส้นแต่ละเส้นหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วมองเห็นเส้นชัด) ลงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารว่าลอยเป็นฝ้า (pellicle) หรือเจริญทั่วทั้งหลอด หรือตกตะกอน (flocculation) อยู่ที่ก้นหลอด เมื่อครบเวลา 3 7 และ 21 วัน

4.1.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) ศึกษารูปร่างและขนาดของเซลล์ โดยนำเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง จากอาหารเหลว YM มาทำ wet mount ด้วย methylene blue ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ การวัดขนาดความกว้างทำได้โดยใช้ micrometer วัดเซลล์ไม่น้อยกว่า 20 เซลล์เพื่อหาค่าเฉลี่ย

4.1.3 ศึกษาลักษณะการสืบพันธุ์ (Characteristic of reproduction)

4.1.3.1 ศึกษาการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยนำเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง จากอาหารเหลว YM สังเกตการสืบพันธุ์แบบต่าง ๆ เช่น การแบ่งตัวแบบ Fission การแตกหน่อแบบ unipolar bipolar หรือ multipolar budding โดยการทำ wet mount ด้วย methylene blue ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

4.1.3.2 ศึกษาการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ คือการสร้าง ascospore โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นเอียง YM agar Acetate agar และ Gorodkowa's agar บ่มที่ 30 °ซ ศึกษาดูรูปร่างและจำนวนของแอสโคสปอร์/เซลล์ หลังจากวันที่ 3 และทุกสัปดาห์ จนครบ 6 สัปดาห์

4.2 ศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยา

4.2.1 ศึกษาความสามารถในการหมักน้ำตาล (Fermentation of carbon compound) ตามวิธีของ Kurtzman และคณะ (1998) เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเขี่ยเชื้อ young active culture ของยีสต์อายุ 48 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียงที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 °ซ ลงในอาหารเหลว YM ให้มีความขุ่นของเชื้อเท่ากับ +2 (+2 คือ เมื่อเทียบความขุ่นกับกระดาษที่ขีดเส้นสีดำสามเส้นแต่ละเส้นหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร แล้วมองเห็นเส้นไม่ชัด)

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นที่ต้องการทดสอบ 1 หยด ด้วย sterile pasteur pipette ลงในอาหารเหลว Fermentation medium ที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 21 วัน บันทึกผลการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรด โดยสังเกตการปลี่ยนสี bromothymol blue จากเขียวเข้มเป็นสีเหลือง และวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซโดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร บันทึกผลปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซทุกวัน จนกระทั่งครบ 21 วัน การรายงานผล โดย (+) คือ หมักน้ำตาล ได้ก๊าซเต็มหลอดภายใน 7 วัน (s) : slow positive คือ หมักน้ำตาลได้ก๊าซเต็มหลอดหลังจาก 7 วัน (v) คือ ให้ผลไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และ (–) คือไม่หมักน้ำตาล (Kurtzman *et al*., 1998) น้ำตาลที่ทดสอบ คือ D-Glucose D-Galactose Sucrose D-maltose Lactose D-Trehalose Raffinose D-Melibiose D-Cellobiose และ D-Xylose

4.2.2 ศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาล (Assimilation of carbon compound) ตามวิธีของ Kurtzman และคณะ (1998) เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเขี่ยเชื้อ young active culture ของยีสต์อายุ 48 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียง YM ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ลงในอาหารเหลว YM ปรับความขุ่นของเชื้อเท่ากับ +1 ถ่ายเชื้อที่ต้องการลงในอาหารเหลว yeast nitrogen base ที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ อ่านผลโดยดูความขุ่นของอาหาร โดยการนำกระดาษที่ขีดเป็นเส้นสีดำหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร มาทาบด้านหลังของหลอดทดลอง กรณีที่สังเกตแล้วเห็นเส้นสีดำชัดเจนและอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าเชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลได้ให้เป็น (-) อาหารขุ่นแต่เห็นเส้นชัดแสดงว่ามีการเจริญน้อยให้เป็น +1 ถ้าสังเกตเห็นเส้นราง ๆ แสดงว่าเชื้อเจริญได้ดีให้เป็น +2 และถ้ามองไม่เห็นเส้นแสดงว่าเชื้อเจริญได้ดีมากให้เป็น +3 เปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อเทียบกับหลอดควบคุม (ไม่ใส่แหล่งคาร์บอน) บันทึกความสามารถในการใช้น้ำตาลจนครบ 21 วัน รายงานผล โดย (+) คือ ใช้น้ำตาลได้ ให้ค่าความขุ่น +2 หรือ +3 ภายใน 7 วัน (s) : slow positive คือ ใช้น้ำตาลช้า ให้ค่าความขุ่น +2 หรือ +3 หลังจาก 7 วัน (v) คือ ให้ผลไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และ (–) คือไม่ใช้น้ำตาล (Kurtzman *et al*., 1998) น้ำตาลที่ใช้ทดสอบคือ D-Glucose D-Galactose Sucrose D-maltose Lactose D-Trehalose Raffinose D-Melibiose Inositol D-Cellobiose และ D-Xylose

4.2.3 ศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน (Assimilation of nitrogen compound) ตามวิธีของ Kurtzman และคณะ (1998) เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเขี่ยเชื้อ young active culture ของยีสต์อายุ 48 ชั่วโมง จากอาหารวุ้นเอียง YM ลงในอาหารเหลว yeast carbon base ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน ปรับความขุ่นของเชื้อเท่ากับ +1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 7 วัน เพื่อให้เซลล์ใช้ไนโตรเจนในเซลล์หมด ถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร yeast carbon base ที่มี

แหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบ สังเกตการเจริญทุก 2 วัน บันทึกระดับการเจริญเป็น +3 +2 1+ และ (–) เทียบกับ positive control (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน) และ negative control (อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเฉพาะ yeast carbon base) นาน 21 วัน รายงานผลโดย (+) คือ ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ให้ค่าความขุ่น +2 หรือ +3 ภายใน 7 วัน และ (–) คือไม่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน (Kurtzman *et al*., 1998) แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ทดสอบ คือ potassium nitrate และ sodium nitrite

4.2.4 ศึกษาความสามารถในการย้อมติดสี Diazonium Blue B (Diazonium Blue B reaction) ตามวิธีของ Barnett และคณะ (2000) เตรียมสี Diazonium Blue B โดยชั่ง Diazonium Blue B ในอัตราส่วน 1 มิลลิกรัม มาละลายใน 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ขณะเย็นจัด นำยีสต์ที่เจริญที่อุณหภูมิห้องบนอาหารวุ้นเอียง YM อายุ 10 วัน มาบ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ นาน 16 ชั่วโมง นำสี Diazonium Blue B ที่เตรียมไว้ (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลอง) มาเททับบนเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ถ้าเชื้อที่ทดสอบเปลี่ยนเป็นสีแดงดำภายในเวลา 2 นาที อ่านผลเป็น (+) ยีสต์ดังกล่าวจัดเป็นพวก Basidiomyces แต่ถ้าเชื้อที่ทดสอบไม่เปลี่ยนเป็นสีแดงดำภายในเวลา 2 นาที อ่านผลเป็น (-) ยีสต์ดังกล่าวจัดเป็นพวก Ascomyces

4.2.5. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาด้วยชุดทดสอบ API 20C AUX และ conventional method โดยส่งตัวอย่างตรวจที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

4.3 ศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี DNA sequencing electropherogram โดยการส่งตัวอย่างตรวจที่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล