บทที่ 3

อุปกรณ์และขั้นตอนการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง

1. ตู้เพาะเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator) Memmert , B30
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้ไอน้ำ (autoclave) Sanyo, MLS-2400
3. ตู้เขี่ยเชื้อ
4. เครื่องเขย่า (shaker) New Brunswick Scientific
5. ตู้เย็น
6. ขวดสำหรับหมัก
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด Sartorius, A200 S
8. เครื่องแก้วที่จำเป็น เช่นบีกเกอร์ ปิเปต จานเพาะเชื้อ เป็นต้น
9. เครื่องวัดค่า การดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Milton Roy, spectonic 601
10. เครื่อง hand refractometer Atago N1, 0 - 32°Brix
11. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์และอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ขั้นตอนการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างลูกแป้งเหล้าจากแหล่งผลิตและจำหน่ายในประเทศไทย เพื่อนำมาคัดแยกเชื้อราและเชื้อยีสต์ที่จำเป็นต่อการหมักไวน์ข้าวแหล่งลูกแป้งเหล้าคุณภาพดี ได้แก่ อ.เมือง จ.นครสวรรค์ อ.สอง จ.แพร่, อ.เมือง จ.สุโขทัย และ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การคัดแยกเชื้อราและยีสต์

ตัวอย่างที่เก็บได้จากข้อ1นำมาแยกเชื้อราจีนัส Rhizopus และยีสต์จีนัส Saccharomyces ดังนี้

นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียด แล้วจึงนำมาทำให้เจือจางในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีความเจือจางระดับ $1x10^{-2}$ ถึง $1x10^{-3}$ กรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไป streak หรือ spread บนอาหาร YM-agar (ภาคผนวก ข) และอาหาร PDA (ภาคผนวก ข) โดยในจานอาหารที่ต้องการให้เชื้อราเจริญจะเติมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว คือ Cyclohexamide ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับจานอาหารที่ต้องการให้เชื้อยีสต์เจริญจะเติมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ Nystatin ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเชื้อเริ่มเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ จึงแยกเอาเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีต่าง ๆ กัน มาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ถ้าเป็นเชื้อราใช้วิธี slide culture technique โดยใช้เข็มเขี่ยเส้นใยมา inoculate ลงตรงชิ้นอาหาร PDA ที่ตัดเป็นชิ้นลูกเต๋าเล็ก ๆ วางบนแผ่นสไลด์ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำ cover glass ปิดทับบนชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นแล้วใส่สำลีชุบน้ำลงในจานเพาะเชื้อ ปิดฝาจานเพาะเชื้อ โดยแต่ละขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง

เมื่อเชื้อราเจริญและแผ่เส้นใยไปบนแผ่น cover glass ดีแล้วจึงดึงออกมาหยดแอลกอฮอล์ 70% ลงไปเพื่อลงฟองอากาศ เมื่อแอลกอฮอล์ระเหยหมดแล้วจึงหยด lactophenol ลงไป 1 หยดบนแผ่นสไลด์เปล่า จากนั้นนำ cover glass ที่มีเส้นใยเชื้อราติดอยู่ปิดทับลงไป ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ส่องกล้องจุลทัศน์สังเกตุลักษณะของเส้นใยและ rhizoid ถ้าปรากฏจึงเก็บเชื้อราไอโซเลทนั้นเลี้ยงในอาหาร PDA slant เก็บในตู้เย็นเพื่อศึกษาต่อไป สำหรับเชื้อยีสต์นำมา streak บนอาหาร YM-agar เลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่เจริญบนอาหาร นำไปสตรีคซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์คือมีลักษณะโคโลนีเหมือนกันทุกประการบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน ถ่ายเชื้อนั้นเก็บไว้ในอาหาร PDA slant เก็บในตู้เย็นเพื่อศึกษาต่อไป

3. การคัดเลือกเชื้อรา

การคัดเลือกเชื้อรามุ่งคัดเลือกเฉพาะเชื้อราใน Family Mucoraceae โดยเน้นเฉพาะเชื้อราในจีนัส Rhizopus วิธีการคัดเลือกแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

3.1 การคัดเลือกเชื้อราเบื้องต้น (screening) โดยคัดเลือกอย่างหยาบ ๆจากคุณสมบัติทางด้าน liquefaction และ dextrinization ของแป้ง โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว YM broth ที่เติมแป้งข้าวเหนียว 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบรรจุในหลอดเลี้ยงเชื้อหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำหลอดอาหารที่ปลูกเชื้อแล้วบ่มไว้ใน water bath อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมงนำมาเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยแป้งตามวิธีการของ Heseltine (1963) โดยตัดสินจากความขุ่นหรือความใสของน้ำแป้งในหลอดทดสอบ โดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นตรง 3 เส้นด้วยหมึกดำ แต่ละเส้นขนานกันและมีความห่างประมาณ 2 มิลลิเมตร นำไปทาบด้านหลังของหลอดเลี้ยงเชื้อ สังเกตุความใสโดยไม่ต้องเขย่าหลอด ถ้าใสมากจะเห็นเส้นทั้งสามแยกกันอย่างชัดเจน แต่ถ้าใสน้อยกว่าจะดูเหมือนเป็นเส้นเดียว และถ้าขุ่นมากจะมองไม่เห็นเส้นเลย บันทึกค่าความใสด้วยสัญญลักษณ์ ++++, +++, ++, + และ - ตามลำดับมากน้อยของความใสที่สังเกตุได้ และตรวจหาปริมาณแป้งที่เหลือด้วยสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวกหน้า) โดยเขย่าหลอดเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สารละลายแป้งผสมเข้ากันดี ใช้ไมโครปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตรดูดสารละลายในหลอดเลี้ยงเชื้อนั้นไปผสมกับสารละลายไอโอดีนปริมาตร 20 ไมโครลิตรเท่ากัน ตรวจผลที่เกิดขึ้นโดยบันทึกผลเป็น + เมื่อสารละลายเป็นม่วงอ่อน, ++ เมื่อสารละลายเป็นสีน้ำตาล +++ เมื่อสารละลายเป็นสีน้ำตาลอมเขียว, ++++ เมื่อสารละลายเป็นสีเหลืองเช่นเดียวกับสีของสารละลายไอโอดีน คัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ +++ และ ++++ ไว้ศึกษาต่อไป

3.2 การคัดเลือกโดยทดสอบการหมักข้าวเหนียวดำ ดัดแปลงวิธีทดสอบจากมนตรี เชาวน์สังเกตุ (2521) โดยนำเชื้อที่คัดเลือกไว้จากข้อ 3.1 มาคัดเลือกต่อเพื่อให้ได้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการหมักข้าวเหนียวดำให้มีรสหวาน กลิ่นหอม ปริมาณกรดต่ำ โดยนึ่งข้าวเหนียวดำจนสุกแล้วนำมาล้างน้ำจนหมดเมือกเหนียวไม่จับกันเป็นก้อน บรรจุในขวดแก้วขนาด 125 มิลลิลิตรจำนวน 30 กรัม และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

นำเชื้อราที่ต้องการทดสอบมาเตรียมเป็น inoculum โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกับข้อ 3.1 จำนวน 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงถ่ายลงในขวดข้าวเหนียวดำนึ่งที่เตรียมไว้ โดยใช้ทั้งเส้นใย สปอร์และอาหารในหลอดเลี้ยงเชื้อทั้งหมด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน จึงเติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร นำส่วนของเหลวไปวิเคราะห์ดังนี้

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) ด้วยhand refractometer
- ความเป็นกรด (acidity) ตามวิธีของ Amerine, Berg และ Cruess (1979)

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี DNS-method (Miller, 1959)

- ทดสอบกลิ่นรสโดยการดมและชิม

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan' new multiple range test เพื่อคัดเลือกเชื้อราเพียง1เชื้อที่หมักข้าวเหนียวดำแล้วให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์สูง ความเป็นกรดต่ำ มีกลิ่นหอมของข้าวหมัก เพื่อใช้หมักไวน์ข้าวเหนียวดำร่วมกับยีสต์ในการทดลองขั้นต่อไป

4. การคัดเลือกเชื้อยีสต์

คัดเลือกเชื้อยีสต์จีนัส Saccharomyces ที่แยกได้ในข้อ 2 ที่มีประสิทธิภาพเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ดี ทนต่อสภาวะการหมักที่มีแอลกอฮอล์สูง และเมื่อทดลองหมักข้าวเหนียวดำร่วมกับเชื้อราที่คัดเลือกได้ในข้อ 3 แล้ว ได้ไวน์ข้าวเหนียวดำที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูง ความเป็นกรดต่ำ กลิ่นรสดี โดยทดลองดังนี้

4.1 ประสิทธิภาพในการหมักน้ำตาล โดยทดลองหมักในสารละลายน้ำตาลทรายที่มีความเข้มข้น 22°Brix (ภาคผนวก ข) จำนวน 10 มิลลิลิตร ในหลอดเลี้ยงเชื้อและนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 สัปดาห์ ตรวจผลจากปริมาณน้ำตาลที่ลดลงด้วย refractometer

4.2 ประสิทธิภาพในการทนต่อแอลกอฮอล์ โดยทดลองหมักในสารละลายน้ำตาล 10°Brix ที่เติมเอทธิลแอลกอฮอล์ลงไป 15 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ตรวจผลจากปริมาณแกสในหลอดดักแกส (Durham tube)

คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ทดลองตามข้อ 4.1 แล้วมีผลให้ปริมาณน้ำตาลในหลอดทดสอบลดลงเหลือต่ำกว่า 10°Brix และทนต่อสภาวะการหมักที่มีแอลกอฮอล์สูงตามวิธีข้อ 4.2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในขั้นต่อไป

4.3 ประสิทธิภาพในการหมักร่วมกับเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ3โดยนำข้าวเหนียวดำไปชั่งน้ำหนักแล้วแช่น้ำ 12 ชั่วโมง นำมานึ่งให้สุก ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้งจนหมดเมือกเหนียว กรองด้วยผ้าขาวบางทิ้งให้สะเด็ดน้ำ นำไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง แบ่งใส่ขวดหมักขวดละ 100 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่อเย็นจึงถ่ายเชื้อราอายุ 1 สัปดาห์ที่เลี้ยงในอาหาร YM broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงและเชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบอายุ 72 ชั่วโมงซึ่งเตรียมเป็น inoculum ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเช่นกันลงในขวด

หมัก บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงเติมน้ำสะอาดต้มสุกและเย็นแล้วลงไปในขวดหมัก โดยมีอัตราส่วนข้าวเหนียวดำดิบต่อน้ำเป็น1:3ดำเนินการหมักที่อุณหภูมิห้องต่อไปจนครบ14 วัน

ตรวจผลโดยดูดส่วนใสของไวน์ข้าววิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณแอลกอฮอล์ ความเป็นกรด ความเป็นกรดด่าง และทดสอบกลิ่นรสโดยการดมและชิม คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่หมักร่วมกับเชื้อราที่คัดเลือกได้แล้วให้ไวน์ข้าวที่มีแอลกอฮอล์สูง และกลิ่นรสชวนดื่ม เพื่อหมักเปรียบเทียบกับลูกแป้งเหล้าต่อไป

5. การหมักไวน์ข้าวเหนียวดำด้วยเชื้อบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับการหมักด้วยลูกแป้งเหล้า

5.1 การหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ ดำเนินการหมักโดยเชื้อบริสุทธิ์ของราและยีสต์ที่คัดเลือกได้ โดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 4.3 เมื่อหมักครบ 14 วันจึงใช้สายยางดูดส่วนใสของไวน์ข้าวไปวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ปริมาณกรดทั้งหมด ความเป็นกรดด่าง และทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบที่มีความคุ้นเคยกับผลิตภัณฑ์จำนวน 15 คน. โดยใช้แบบทดสอบดังแสดงในภาคผนวก ง. วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design ทดลอง 3 ครั้ง เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan' new multiple range test (สมบูรณ์ สุขพงษ์ และ เปรมใจ ตรีสรานุวัฒนา, 2527 ; สุรพล อุปดิสสกุล, 2523)

5.2 การหมักด้วยลูกแป้งเหล้า นำข้าวเหนียวดำนึ่งสุกและล้างเมือกออกแล้วมาคลุกให้เข้ากันกับลูกแป้งเหล้าประมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวเหนียวดำดิบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน จึงเติมน้ำสะอาดต้มสุกและเย็นแล้วลงไปโดยมีอัตราส่วนข้าวเหนียวดิบต่อน้ำเป็น 1:3 เมื่อหมักครบ 14 วันจึงใช้สายยางดูดส่วนใสมาวิเคราะห์องค์ประกอบของไวน์ข้าวและทดสอบทางประสาทสัมผัสเช่นเดียวกับข้อ 5.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย