บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีทดลอง

3.1 วัสดุสำหรับการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

- *Monascus purpureus* FTCMU; ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- *Monascus ruber* TISTR 3006 ; ศูนย์จุลินทรีย์, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.1.2 อาหารแข็ง

- ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท (ร้านทรัพย์ไพศาล, เชียงใหม่)
- Potato Dextrose Agar (Difco, France)

3.1.3 อาหารเหลวสังเคราะห์

- ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Di-potassium hydrogen phosphate; K_2HPO_4 , Merck, Germany)
- โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate; KH_2PO_4 M&B, USA)
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (Magnesium sulfate heptahydrate; $MgSO_4.7H_2O$, Merck, Germany)
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (Calcium chloride dihydrate; $CaCl_2.2H_2O$, Merck, Germany)
- เฟอร์รัสซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต (Ferrous sulfate heptahydrate; $FeSO_4 . 7H_2O$, May &Baker, England)
- ซิงค์ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต (Zinc sulfate heptahydrate; $ZnSO_4.7H_2O$, Fluka, Switzerland)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- แมงกานีสซัลเฟต เตตราไฮเดรต (Manganese sulfate tetrahydrate; $MnSO_4.4H_2O$, Merck, Germany)
- คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต (Copper chloride dihydrate; $CuCl_2.2H_2O$, Merck, Germany)
- กรดบอริค (Boric acid; H_3BO_3, Merck, Germany)
- แอมโนเนียม โมลิบเดต (Ammonium molybdate; $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, Merck, Germany)
- น้ำตาลกลูโคส (Glucose; Merck, Germany)
- น้ำตาลแลคโตส (Lactose; Difco Laboratory, USA)
- กรดกลูตามิค (L-Glutamic acid monosodium salt monohydrate; Fluka, Switzerland)
- ฮีสติดีน (L-histidine; Fluka, Switzerland)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส

3.2.1 อุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเหลวสังเคราะห์

- ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
- สำลี
- อะลูมิเนียมฟอล์ย (Diamond, USA)
- กระบอกตวง 100 มิลลิลิตร
- ตะเกียงบุนเสน
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave: Gallenkamp, England)
- เครื่องเขย่า (Shaker : Gallenkamp, England)

3.2.2 อุปกรณ์สำหรับเตรียมข้าว

- ถุงโพลิโพรไพลีน ขนาด 8 x 12 นิ้ว (Polypropylene bag 8” x 12”)
- คอขวดพลาสติก
- สำลี
- เครื่องชั่งทศนิยม 1 ตำแหน่ง
- ตะเกียงบุนเสน
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave: Gallenkamp, England)
- อะลูมิเนียมฟอล์ย (Diamond, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 วัสดุและอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์กระบวนการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส

3.3.1 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (ColorQuest II, Hunter Laboratory Inc., USA)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, ThermoSpectronic Biomate 5, England)
- เครื่องวัดค่าการละลายของออกซิเจน (Dissolved Oxygen Meter 9300)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Gallenkamp, England)

3.3.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางเคมี

- pH meter (ยี่ห้อ WTW pH 537, Germany)
- เตาอบลมร้อน (Hot air oven, Haereous, England)
- เตาเผา (Muffle Furnance: Gallenkamp, England)
- เครื่องย่อยโปรตีน (Tecator, Sweden)
- เครื่องกลั่นโปรตีน (2100 Kjeltec Distillation Unit; Foss Tecator, Sweden)
- โกร่งหิน (สำหรับบดข้าว)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Sartorius รุ่น A120S, Germany)
- กระดาษกรอง (“Whatman” เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร)
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask)
- บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์แก้วขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)
- ปิเปตแบบ measuring pipette ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร

3.3.3 สารเคมี

- กรดบอริก (Boric acid ; H_3BO_3, Merck, Germany)
- กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid ; H_2SO_4, Merck, Germany)
- คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate ; $CuSO_4.5H_2O$, Merck, Germany)
- ซิลิเนียมไดออกไซด์ (Selenium dioxide ; SeO_2, J.T. Baker, USA)
- เมทธิลเรด (Methyl red ; $(CH_3)_2NC_6H_4N$, May&Baker, USA)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH, J.T. Baker, USA)
- เอทานอล (Ethanol, Lab-Scan Ltd., Ireland)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.4 เครื่องประมวลผลข้อมูล

- เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล
- โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel 97 (Microsoft corp., USA)
- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.0.7 (SPSS Inc., USA)

3.4 แผนการทดลอง

แบ่งออกเป็น 2 ตอน คือ

3.4.1 การทดลองตอนที่ 1 ศึกษาผลของกลูโคส และ/หรือ แลคโตส และโมโนโซเดียมกลูตาเมท (monosodium glutamate) หรือฮีสติดีน (L-histidine) ในอาหารเหลวสังเคราะห์ (Chemically Defined Medium) ต่อการผลิตรงควัตถุสีแดงและซิตรินิน โดยเชื้อรา *Monascus purpureus* FTCMU และ *Monascus ruber* TISTR 3006

การทดลองใช้สูตรอาหารเหลวสังเคราะห์พื้นฐาน (Basal medium) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของแต่ละการทดลองจะมีแหล่งคาร์บอน คือกลูโคส และ/หรือ แลคโตส และแหล่งไนโตรเจน คือโมโนโซเดียมกลูตาเมท หรือฮีสติดีน ในปริมาณที่แตกต่างกันตามแผนการทดลองดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารเหลวสังเคราะห์ตามแผนการทดลอง

อาหารเหลว	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน
สูตร 1	กลูโคส 20 กรัม/ลิตร	โมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร
สูตร 2	กลูโคส 20 กรัม/ลิตร	ฮีสติดีน 12.5 กรัม/ลิตร
สูตร 3	แลคโตส 45 กรัม/ลิตร	โมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร
สูตร 4	แลคโตส 45 กรัม/ลิตร	ฮีสติดีน 12.5 กรัม/ลิตร
สูตร 5	กลูโคส 20 กรัม/ลิตร+ แลคโตส 20 กรัม/ลิตร	โมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร
สูตร 6	กลูโคส 20 กรัม/ลิตร + แลคโตส 20 กรัม/ลิตร	ฮีสติดีน 12.5 กรัม/ลิตร
สูตร 7	กลูโคส 45 กรัม/ลิตร	โมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร
สูตร 8	กลูโคส 45 กรัม/ลิตร	ฮีสติดีน 12.5 กรัม/ลิตร

ดัดแปลงจาก : Hajjaj H. และคณะ (2001)

หมายเหตุ : อาหารเหลวสังเคราะห์สูตร 1-6 ใช้เชื้อรา *M. purpureus* FTCMU
อาหารเหลวสังเคราะห์สูตร 7 และ 8 (ชุดเปรียบเทียบ 1 และ 2)
ใช้เชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 เพื่อเปรียบเทียบการสร้างซิตรินิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยง

1. การเตรียมเชื้อตั้งต้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเก็บรักษาและเตรียมเชื้อตั้งต้น (mother culture)

(ดัดแปลงจาก Hajjaj H. และคณะ, 2001)

1.1 เชื้อ *Monascus purpureus* FTCMU และ *Monascus ruber* TISTR 3006 จะถูกเก็บรักษาบน slant culture ของอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 4^{O}ซ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 8 วัน ที่ 30^{O}ซ

1.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.1 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30^{O}ซ นาน 8 วัน

2. อาหารเหลวสังเคราะห์ (Chemically Defined Medium)

สูตรอาหารประกอบด้วย

- แหล่งคาร์บอน	ตามแผนการทดลอง (ตารางที่ 3.1)	
- แหล่งไนโตรเจน	ตามแผนการทดลอง (ตารางที่ 3.1)	
- K_2HPO_4	5.0	กรัม
- KH_2PO_4	5.0	กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม
- $FeSO_4 . 7H_2O$	0.2	กรัม
- $ZnSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
- $MnSO_4.4H_2O$	0.1	กรัม
- $CaCl_2.2H_2O$	20.0	มิลลิกรัม
- $CuCl_2.2H_2O$	5.0	มิลลิกรัม
- H_3BO_3	11.0	มิลลิกรัม
- $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	5.0	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ได้	1.0	ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมอาหารเหลวสังเคราะห์ตามสูตร ปรับค่าพีเอช 6.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 N ถ่ายอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลี และหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอล์ยอีกครั้ง นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปฆ่าเชื้อที่ 121^{O}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที วางทิ้งไว้ให้เย็น

2.1 ถ่ายเชื้อ *Monascus purpureus* FTCMU ที่ได้จากข้อ 1.2 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดตรงบริเวณปลายเส้นใย (ขอบนอกของเส้นใย) ให้ได้พื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ใส่เชื้อลงในอาหารเหลวสูตร 1 ถึง 6 จากนั้นเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เขย่าอาหารด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที (rpm) นาน 20 วัน

2.2 ถ่ายเชื้อ *Monascus ruber* TISTR 3006 ที่ได้จากข้อ 1.2 ลงในอาหารเหลวสูตร 7 และ 8 (ชุดเปรียบเทียบ) โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1

เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี วิเคราะห์ปริมาณซิตรินินที่ระยะเวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน

3.4.1.2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของอาหารเหลวสังเคราะห์ระหว่างการหมัก

- ปริมาณรงควัตถุสีแดงวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Petra J. และคณะ, 1994)
- ปริมาณสีแดงวัดด้วยเครื่องวัดสีระบบ Hunter Lab (ColorQuest II (HunterLab, 1997)
- ค่าพีเอช (ตามวิธี AOAC, 1995)
- มวลชีวภาพ (biomass) (Petra J. และคณะ , 1994)
- ออกซิเจนที่ละลายในอาหาร โดยใช้เครื่อง Dissolved Oxygen Meter 9300 (Jenway)

(รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ข หน้า 103, 105, 109)

3.4.1.3 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของอาหารเหลวสังเคราะห์ระหว่างการหมัก

- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar as glucose) ที่เหลืออยู่ในอาหาร โดยวิธี DNS method (Miller G.L., 1959)
- ปริมาณไนโตรเจน (Kjeldahl Method, % nitrogen; AOAC, 1995)

(รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ข หน้า 100, 103)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินจากอาหารเหลวสังเคราะห์ระหว่างการหมัก

(ดัดแปลงจาก Blanc P.J. และคณะ, 1995b)

(I) วัสดุอุปกรณ์

- TLC Plate ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร เคลือบ Silica gel 60 (Merck , Germany)

- เครื่อง Automatic TLC Sampler III Version 2.72 (CAMAG, Switzerland) (รูปที่ ก-6 ภาคผนวก ก)
- เครื่องควบคุมการไหลของน้ำยาบนแผ่น TLC อัตโนมัติ (Automatic Development Chamber ADC 20x20, Switzerland) (รูปที่ ก-7 ภาคผนวก ก)
- เครื่อง Scanner 3 (CAMAG, Switzerland) (รูปที่ ก-8 ภาคผนวก ก)
- เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต (UV lamp)

(II) สารเคมี

- ซิตรินินมาตรฐาน 5 มิลลิกรัม (Sigma, USA)
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform ; $CHCl_3$;Lab-Scan Ltd., Ireland)
- เฮกเซน (n-hexane ; Lab-Scan Ltd., Ireland)
- อะซิโตไนโตรล์ (Acetonitrile ; Lab-Scan Ltd., Ireland)
- กรดออกซาลิก (Oxalic acid ; Merck, Germany)
- เมทานอล (Methanol, Lab-Scan Ltd., Ireland)

(III) วิธีการวิเคราะห์

(a) การสกัดซิตรินิน

กรองอาหารเหลวสังเคราะห์ ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ตวงส่วนใสที่กรองได้ปริมาณ 25 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอช < 5.5 ด้วยกรดซัลฟูริก (50:50 v/v) จากนั้นถ่ายตัวอย่างลงในกรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) 25 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น ทำการสกัดโดยเขย่าเบาๆ ประมาณ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น (ประมาณ 10 นาที) สกัดซ้ำอีกครั้ง จากนั้นถ่ายสารละลายชั้นล่างลงในบิกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร ระเหยแห้งสารละลายโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ดูดควัน ละลายสารสกัดด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร เทใส่ขวดไวเอิล (vial) ขนาด 1 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น เก็บในช่องแช่แข็ง (-18^{O}ซ) ก่อนนำไปวัดปริมาณซิตรินิน โดยเครื่อง High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

(b) การเตรียมซิตรินินมาตรฐาน

- เตรียมซิตรินินความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้านส่วน (ละลายซิตรินินมาตรฐาน 5 มิลลิกรัม ในเมทานอล ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10 มิลลิลิตร)
- ปิเปตซิตรินินความเข้มข้น 500 ส่วนต่อล้านส่วน ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร) จะได้ซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ส่วนต่อล้านส่วน เทใส่ขวดไวเอิล (vial) ขนาด 1 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น เก็บในช่องแช่แข็ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(-18^{O}ซ) ก่อนนำไปวัดปริมาณซิตรินิน โดย High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

(c) การวัดปริมาณซิตรินิน โดยวิธี High Performance Thin Layer Chromatography

(1) การเตรียมแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC)

นำแผ่นกระจก TLC ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร เคลือบ Silica gel 60 (Merck , Germany) ใส่ในโถแก้วทรงสี่เหลี่ยม ที่มีกรดออกซาลิก 10% ละลายในเมทานอล จำนวน 100 มิลลิลิตร เพื่อให้สารละลายเคลื่อนที่ขึ้นไปตามแนวแผ่นกระจกได้ระยะทาง 15 เซนติเมตร (ใช้เวลาประมาณ 30 นาที) นำแผ่นกระจกออกจากโถแก้ว ปล่อยให้แห้งในตู้ดูดควัน เก็บในเดซิเคเตอร์ก่อนใช้งาน

(2) การจุด (spot) ตัวอย่างบนแผ่น TLC ด้วย เครื่อง Automatic TLC Sampler III Version 2.72 (CAMAG, Switzerland)

ใส่ขวดตัวอย่างตามข้อ (a) และสารละลายซิตรินินมาตรฐาน เข้มข้น 100 ส่วนต่อล้านส่วน จากข้อ (b) ในช่องสำหรับใส่ขวดไวเอิล (vial) และวางแผ่น TLC ที่ได้จากข้อ (1) บนตำแหน่งของเครื่องให้พอดี (รูปที่ ก-6 ภาคผนวก ก) จากนั้นปรับตั้งค่าต่างๆ โดยป้อนโปรแกรมผ่านระบบคอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการทำงานของเครื่อง Automatic TLC Sampler III ดังต่อไปนี้

Method	CITRININ.PAM
Method created by	sasitorn
Time	13:10:01
Date	11/04/2003
Analytical and Chromatographic Condition;	
Analysis	citrinin in red rice
Plate material	20 x 20 cm silica gel 60 without fluorescence
Solvent	chloroform:methanol (98:2)
Application parameters;	
Plate size	20 x 20 cm
Application pos x	20.0 mm
Application pos Y	8.0 mm
Number of tracks side 1	14
Number of tracks side 2	0
Distance betw. Tracks	12.3 mm
Application mode	Spraying

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Predosing	Each vial
Spray parameters :	
Band length	6.0 mm
Band velocity	10 mm/s
Start delay	50 ms (millisecond)

Application table (Sequence);

Track	Type	Vial	Application	Index
1	Standard 1	1	500 nL	
2	Analysis a	2	10000 nL	
3	Analysis b	3	10000 nL	
4	Analysis c	4	10000 nL	
5	Analysis d	5	10000 nL	
6	Analysis e	6	10000 nL	
7	Standard 2	1	1000 nL	
8	Analysis f	7	10000 nL	
9	Analysis g	8	10000 nL	
10	Analysis h	9	10000 nL	
11	Analysis i	10	10000 nL	
12	Analysis j	11	10000 nL	
13	Analysis k	12	10000 nL	
14	Standard 3	1	1500 nL	

(3) นำแผ่น TLC จากข้อ (2) ไปแยกด้วยเครื่องควบคุมการไหลอัตโนมัติ (Automatic Development Chamber ADC 20x20, Switzerland)

- เตรียมตัวทำละลายสำหรับแยก คือ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล, 98:2 (v/v) ปริมาณ 24 มิลลิลิตร (สำหรับการแยกตัวอย่าง) ใส่ในช่องภายในเครื่อง และ 100 มิลลิลิตร (สำหรับการ Preconditioning) ใส่ในขวดแก้วด้านข้างเครื่อง (รูปที่ ก-7 ภาคผนวก ก) จากนั้นนำแผ่น TLC จากข้อ (2) ใส่ในช่องสำหรับการแยกสาร (Development)

- ก่อนการใช้เครื่อง จะต้องเลือกโปรแกรมที่ตั้งค่าไว้สำหรับการวิเคราะห์โปรแกรมการแยกสาร (Development) มีข้อมูลการตั้งค่าดังนี้

1. ระยะทาง (run distance / mm) 100 mm
2. ระยะเวลาในการทำให้แผ่นแห้ง (Drying Time / min) 5 min (cold)
3. ระยะเวลาในการทำให้ช่องสำหรับการแยกสาร (Development) 7 min
   อิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย (Preconditioning Time / min)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. Configuration Tank

(4) การสแกนแผ่น TLC

- นำแผ่น TLC จากข้อ (3) ไปส่องภายใต้แสงยูวี เพื่อดูแถบสีของซิตรินินมาตรฐาน (แถบสีเหลืองเรืองแสง) และแถบสีที่แยกได้จากตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบตำแหน่งของแถบสีที่แยกได้ว่าตรงกันหรือไม่

- นำแผ่น TLC ไปวัดปริมาณซิตรินิน โดยวิธี spectrophotodensitometry ภายใต้แสงยูวี (ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร) ด้วยเครื่อง Scanner 3 (CAMAG, Switzerland) โดยนำแผ่น TLC วางชิดขอบกั้นภายในเครื่อง และป้องกันแผ่น TLC ไม่ให้เคลื่อนด้วยแถบแม่เหล็ก ปรับตั้งโปรแกรมผ่านระบบคอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการทำงานของเครื่อง Scanner 3

การตั้งโปรแกรมทำงานของเครื่อง

File names and method text	CITRININ	
Plate size (width x height)	20.0 x 20.0 cm	
Application position Y	8.0	mm
Position of solvent front	100.0	mm
Scan start position Y	6.0	mm
Scan end position Y	110.0	mm
Scan start position X	20.0	mm
Distance between tracks X	12.3	mm
Number of tracks	14	
Track index, track #	1	1abcde2fghijk3
Lamp..	Mercury	
Monochromator bandwidth..	20	nm
Wavelength	360	nm
Slit dimention..	6.0 x 0.45 mm micro	
Data step resolution..	100	μm
Display scaling	1000	AU
Measurement mode..	Fluorescence / Reflection..	
Track optimization..	OFF	

Scanning speed 5 mm/s , optical filter selected:K400

Measurement mode : Automatic The following parameter are used:

- Zero adjust position 6.0 mm at track 1
- Quick scan between 6.0 and 110.0 mm of all tracks
- Analog offset 10% sensitivity : automatic (set:0) (hv:0V)

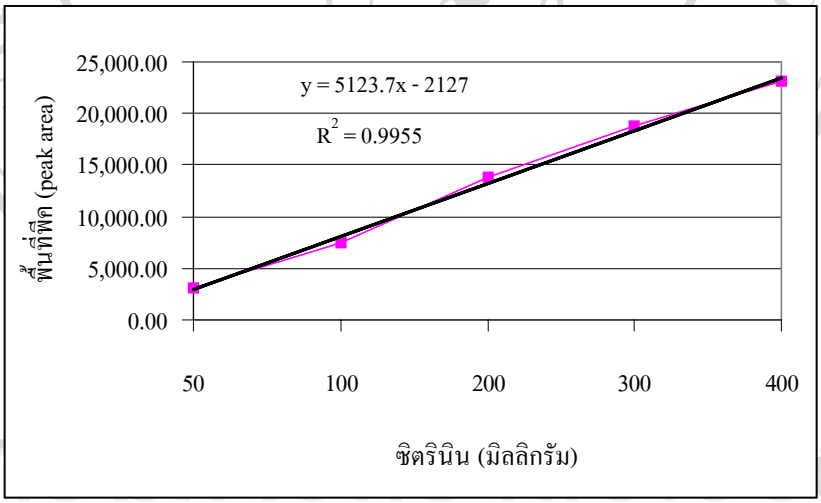
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(5) การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve)

- ทำตามวิธีการข้อ (2), (3) และ (4) โดยใช้สารละลายซิตรินินมาตรฐาน 100 ส่วนต่อล้านส่วน ปริมาณ 500, 1,000, 2,000, 3,000 และ 4,000 นาโนลิตร
- คำนวณพื้นที่พีค (peak area) เทียบกับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน
- สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีค (peak area) (แกน Y) กับ ปริมาณความเข้มข้นของซิตรินิน (มิลลิกรัม) (แกน X)

ตารางที่ 3.2 ตารางการคำนวณปริมาณซิตรินิน

ปริมาณสารละลายซิตรินินมาตรฐาน 100 ppm (นาโนลิตร)	ซิตรินิน (มิลลิกรัม)	พื้นที่พีค (peak area)
500	50	3,160.0
1000	100	7,401.1
2000	200	13,789.0
3000	300	18,782.0
4000	400	23,087.9



รูปที่ 3.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายซิตรินินมาตรฐาน

(6) การคำนวณปริมาณซิตรินิน

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของพีคของสารละลายมาตรฐานซิตรินินที่ความเข้มข้นต่างๆ กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซิตรินิน เป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) (รูปที่ 3.1) จากนั้นแทนค่าพื้นที่ของพีคสารละลายตัวอย่างลงในกราฟมาตรฐาน จะได้ปริมาณซิตรินิน เป็น มิลลิกรัม (mg) หรือ แทนค่าพีค (แกน Y) ในสมการเพื่อคำนวณเป็นปริมาณซิตรินิน (แกน X)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) จากการทดลองอาหารเหลวทั้งหมด 8 สูตร เก็บตัวอย่าง 5 ครั้ง คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 2 ซ้ำ ได้หน่วยการทดลองทั้งหมด 80 หน่วยการทดลอง ข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistic for Window เพื่อทราบความแตกต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรต่อการสร้างรงควัตถุสีแดงและซิตรินิน

3.4.2 การทดลองตอนที่ 2 การทดลองในอาหารแข็งศึกษาผลของโมโนโซเดียมกลูตาเมท (monosodium glutamate) หรือ ฮีสติดีน (L- histidine) ในข้าว ต่อการผลิตรงวัตถุสีแดงและซิตรินิน โดยเชื้อรา *Monascus purpureus* FTCMU และ *Monascus ruber* TISTR 3006

เป็นการทดลองเติมแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมท และ ฮีสติดีนในข้าว ตามแผนการทดลองดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สูตรข้าวตามแผนการทดลอง

ข้าว	เชื้อรา	แหล่งไนโตรเจน
สูตร 1	*M. purpureus* FTCMU	โมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/กิโลกรัม
สูตร 2	*M. purpureus* FTCMU	ฮีสติดีน 12.5 กรัม/กิโลกรัม
สูตร 3	*M. purpureus* FTCMU	ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน
สูตร 4	*M. ruber* TISTR 3006	โมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/กิโลกรัม
สูตร 5	*M. ruber* TISTR 3006	ฮีสติดีน 12.5 กรัม/กิโลกรัม
สูตร 6	*M. ruber* TISTR 3006	ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน

ข้าว : ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท (ดัดแปลงจาก เรณูและคณะ, 2543)

3.4.2.1 การเตรียมข้าวสำหรับผลิตข้าวแดง

เตรียมข้าวโดยใช้ข้าวสารต่อน้ำในอัตราส่วน 1:1 (เตรียมข้าวสุก 1,000 กรัม โดยเตรียมจากชั่งข้าวสาร 500 กรัม เติมน้ำ 500 กรัม) ใส่ในชามสเตนเลสขนาด 8 นิ้ว นำไปนึ่งในลังถึงที่อุณหภูมิ 100^{O}ซ นาน 20 นาที เกลี่ยข้าวให้กระจาย รอให้เย็น ชั่งข้าวสุก 1,000 กรัม เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมท หรือ ฮีสติดีน 12.5 กรัม (ตารางที่ 3.3)โดยค่อยๆ โรยลงในข้าว ขณะเดียวกันใช้ทัพพีคลุกเคล้าให้ทั่วเมล็ดข้าว (ประมาณ 5 นาที) จากนั้นชั่งข้าวสุก 100 กรัม ใส่ในถุงทนร้อน (Polypropylene) ขนาด 8x12 นิ้ว เกลี่ยข้าวให้กระจาย ใส่คอขวดอุดด้วยสำลีแล้วหุ้มด้วยฟอล์ยอีกครั้ง ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่ 121^{O}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที วางทิ้งไว้ให้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2.2 การเพาะเลี้ยง

1. ถ่ายเชื้อ *Monascus purpureus* FTCMU ที่ได้จากข้อ 1.2 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดตรงบริเวณปลายเส้นใย (ขอบนอกของเส้นใย) ให้ได้พื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ใส่เชื้อลงในข้าวสูตร 1-3 จากนั้นเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน

2. ถ่ายเชื้อ *Monascus ruber* TISTR 3006 ที่ได้จากข้อ 1.2 ลงในข้าวสูตร 4-6 โดยทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1

เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี วิเคราะห์ปริมาณซิตรินิน ที่ระยะเวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน

3.4.2.3 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของข้าวระหว่างการหมัก

- ปริมาณสีแดงวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (อ้างอิง Petra J. และคณะ, 1994)
- ปริมาณสีแดงวัดด้วยเครื่องวัดสีระบบ Hunter Lab (ColorQuest II ; Hunter Lab, 1997)
- ค่าพีเอช (AOAC, 1995)

(รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ข หน้า 103, 109)

3.4.2.4 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของข้าวระหว่างการหมัก

- ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (as glucose) ที่เหลืออยู่ในข้าวแดง โดยวิธี DNS method (Miller G.L., 1959)
- ปริมาณไนโตรเจน (Kjeldahl Method, % nitrogen; AOAC, 1995)

(รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ข หน้า 100, 103)

3.4.2.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินของข้าวระหว่างการหมัก (อ้างอิง Blanc P.J. และคณะ, 1995b)

(a) การสกัดซิตรินิน

นำข้าวแดงมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง ชั่งน้ำหนัก 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ถ่ายตัวอย่างลงในกรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) 20 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น ทำการสกัดโดยเขย่าเบาๆ ประมาณ 5 นาที เติมเฮกเซน (n-haxane) 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น (ประมาณ 5 นาที) เขย่าซ้ำอีกครั้ง แยกสารละลายชั้นบนมาเติมน้ำ 40 มิลลิลิตร และปรับพีเอช 4.5 ด้วยกรดซัลฟูริก H_2SO_4 (50:50 v/v) สกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ 5 นาที ตั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้น (ประมาณ 5 นาที) ถ่ายสารละลายชั้นล่างลงในบิกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายจนหมด ที่อุณหภูมิห้อง ภายในตู้ดูดควัน ละลายสารสกัดด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร เทใส่ขวดไวเอิล (vial) ขนาด 1 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น เก็บในช่องแช่แข็ง (-18^{O}ซ) ก่อนนำไปวัดปริมาณซิตรินิน โดยวิธี High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

(b) การเตรียมซิตรินินมาตรฐาน

ปฏิบัติเช่นเดียวกับตัวอย่างอาหารเหลวสังเคราะห์ (ตามข้อ (b) หน้า 42)

(c) การวัดปริมาณซิตรินิน โดยวิธี High Performance Thin Layer Chromatography

ปฏิบัติเช่นเดียวกับตัวอย่างอาหารเหลวสังเคราะห์ (ตามข้อ (c) หน้า 43-46)

3.4.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) จากการทดลองอาหารเหลวทั้งหมด 6 สูตร เก็บตัวอย่าง 5 ครั้ง คือ 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 2 ซ้ำ ได้หน่วยการทดลองทั้งหมด 60 หน่วยการทดลอง ข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistic for Window เพื่อทราบความแตกต่างของข้าวแดงแต่ละสูตรต่อการสร้างรงควัตถุสีแดงและซิตรินิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved