บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและวัสดุอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

- เชื้อราสายพันธุ์ *Monascus purpureus* FTCMU (ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
- เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus terreus* TISTR 3109 (ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

3.1.2 สารที่ใช้เตรียมเชื้อเริ่มต้น

- Potato Dextrose Agar (Difco, France)

3.1.3 วัตถุดิบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง

- ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท (ตลาดช้างเผือก, จังหวัดเชียงใหม่)

3.1.4 วัตถุดิบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว

- 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)
- เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (Ferrous sulfate heptahydrate; $FeSO_4.7H_2O$, May&Baker, England)
- ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (Zinc sulfate heptahydrate; $ZnSO_4.7H_2O$, Fluka, Switzerland)
- แมงกานีสซัลเฟตเตตราไฮเดรต (Manganese sulfate tetrahydrate; $MnSO_4.4H_2O$, Merck, Germany)
- แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (Calcium chloride dehydrate; $CaCl_2.2H_2O$, Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต (Copper chloride dehydrate; $CuCl_2.2H_2O$, Merck, Germany)
- กรดบอริก (Boric acid; H_3BO_3, Merck, Germany)
- แอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate; $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, Merck, Germany)

3.1.5 แหล่งคาร์บอนที่ใช้เติมในอาหารเหลว

- น้ำตาลกลูโคส (D(+)-Glucose-Monahydrat, $C_6H_{12}O_6.H_2O$, Merck, Germany)
- น้ำตาลแลคโตส (Lactose, $C_6H_{12}O_6.H_2O$, Merck, Germany)

3.1.6 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เติมในอาหารเหลวและอาหารแข็ง

- กรดกลูตามิค (L-Glutamic acid Monosodium salt; $C_5H_8NNaO_4.H_2O$, Fluka, Switzerland)
- ฮิสติดีน (L-Histidine; $C_6H_9N_3O_2$, Fluka, Switzerland)

3.1.7 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

- ถุงโพลิเอทธิลีน ขนาด 8 นิ้ว x 12 นิ้ว (Polyethylene bag)
- คอขวด
- สำลี
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- อะลูมิเนียมฟอยล์ (Diamond, USA)
- หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave, Gallenkamp, England)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Gallenkamp, England)
- เครื่องเขย่า (shaker, Gallenkamp, England)

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (ColorQuest II, Hunter Laboratory Inc., USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Gallenkamp, England)
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Thermospectronic Biomate 5, England)
- เครื่องกรองสูญญากาศ (Vacuum pump, Thomass, USA)

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Haereous, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เตาเผาเถ้า (Muffle Furnance, Gallenkamp, England)
- เครื่องวัดออกซิเจน (Dissolved oxygen meter, Jenway; model 9300)
- โถดูดความชื้น (Anaerobic jars, Merck, Germany)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance, Sartorious: Model A120S, Germany)
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (Microprocessor pH-meter, WTW: Model pH 537, Germany)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Gallenkamp, England)
- เครื่องกรองสูญญากาศ (Vacuum pump, Thomass, USA)
- ชุดย่อยโปรตีน (Digestion unit, Tecator, Sweden)
- ชุดกลั่นโปรตีน (2100 Kjeitec Distillation Unit; Foss Tecator, Sweden)
- โกร่งหิน (สำหรับบดข้าว)
- กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร)

3.2.3 สารเคมี

- กรดบอริก (Boric acid; H_3BO_3, Merck, Germany)
- กรดซัลฟูริค (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)
- แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydromate ; NH_4OH, Merck, Germany)
- เอทานอล (Ethanol, Lab-Scan, Ireland)

3.3 เครื่องประมวลผลทางสถิติ

- เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล
- โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft excel 97 (Microsoft corp., USA)
- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.0 (SPSS Inc., USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

547,869
ท116ส
ค.2
เลขหมู่.....
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.4 แผนการทดลอง

การทดลองได้แบ่งออกเป็น 2 ตอนคือ

ตอนที่ 1 ในอาหารเหลวแบบสังเคราะห์ (Chemically defined medium) ศึกษาผลของกลูโคส (glucose) และ/หรือแลคโตส (lactose) และโมโนโซเดียมกลูตาเมท (monosodium glutamate)หรือฮีสติดีน (histidine) ต่อการผลิตรงควัตถุสีแดง และโมนาโคลิน เค โดยเชื้อรา *Monascus purpureus* FTCMU และ *Aspergillus terreus* TISTR 3109

ก. อาหารเหลว (อาหารสูตรที่1- 8)

1. การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

1.1 อาหารเหลวสูตรที่ 1- 6 เตรียมได้ดังนี้

1.1.1 เลี้ยงเชื้อ *Monascus purpureus* บน potato dextrose agar (PDA) slants ในหลอดทดลอง บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C นาน 8 วัน

1.1.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.1.1 ลง PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C นาน 8 วัน

1.1.3 ตัด PDA ที่มีเชื้อเจริญอยู่บริเวณปลายเส้นใยในข้อ 1.1.2 ประมาณ 1x1 ซม. ใส่ลงในอาหารเหลวตามสูตรในตารางที่ 3.1

1.2 อาหารเหลวสูตรที่ 7 และ 8 ซึ่งเป็นชุดควบคุมเตรียมได้ดังนี้

1.2.1 เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus terreus* TISTR 3109 บน potato dextrose agar (PDA) slants ในหลอดทดลอง บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C นาน 8 วัน

1.2.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.2.1 ลงใน PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C นาน 8 วัน

1.2.3 ตัด PDA ที่มีเชื้อเจริญอยู่บริเวณปลายเส้นใยในข้อ 1.2.2 ประมาณ 1x1 ซม. ใส่ลงในอาหารเหลวตามสูตรในตารางที่ 3.1

2. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์แบบเหลว (Chemically defined medium)

(ดัดแปลงจาก Hajjaj *et al.*, 2001)

อาหารเหลวสูตรที่ 1- 8

2.1 สูตรอาหารเหลวพื้นฐานประกอบด้วย

-	K_2HPO_4	5.0	กรัม
-	KH_2PO_4	5.0	กรัม
-	$MgSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- $FeSO_4 . 7H_2O$ 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

การทดลองใช้สูตรอาหารเหลวพื้นฐานที่มีการเติมกลูโคสและ/หรือแลคโตส และเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมทหรือฮิสติดีน ในปริมาณที่แตกต่างกันตามตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงแผนการทดลองสูตรอาหารเหลวที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน

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

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hajjaj *et al.* (2001)

หมายเหตุ :1) อาหารเหลวสูตรที่ 1-6 ใช้เชื้อ *Monascus purpureus* FTCMU

2) อาหารเหลวสูตรที่ 7 และ 8 ใช้เชื้อ *Aspergillus terreus* TISTR 3109 เป็นชุดควบคุม

2.2 ชั่งสารตามสูตรอาหารพื้นฐานตามข้อ 2.1 เติมกลูโคสและ/หรือแลคโตส และเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมทหรือฮิสติดีน ตามตารางที่ 3.1 แล้วจึงปรับปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1.0 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากตารางที่ 3.1 จะได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อดังต่อไปนี้

- อาหารเหลวสูตรที่ 1 ใช้แหล่งคาร์บอน คือกลูโคส 20 กรัม/ลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนคือ โมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร
- อาหารเหลวสูตรที่ 2 ใช้แหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส 20 กรัม/ลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนคือ ฮิสติดีน 12.5 กรัม/ลิตร
- อาหารเหลวสูตรที่ 3 ใช้แหล่งคาร์บอนคือ แลคโตส 45 กรัม/ลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนคือ โมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร
- อาหารเหลวสูตรที่ 4 ใช้แหล่งคาร์บอนคือ แลคโตส 45 กรัม/ลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนคือ ฮิสติดีน 12.5 กรัม/ลิตร
- อาหารเหลวสูตรที่ 5 ใช้แหล่งคาร์บอนคือ กลูโคสและแลคโตสอย่างละ 20 กรัม/ลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนคือโมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร
- อาหารเหลวสูตรที่ 6 ใช้แหล่งคาร์บอนคือ กลูโคสและแลคโตสอย่างละ 20 กรัม/ลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนคือ ฮิสติดีน 12.5 กรัม/ลิตร
- อาหารเหลวสูตรที่ 7 ใช้แหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส 45 กรัม/ลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนคือ โมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร
- อาหารเหลวสูตรที่ 8 ใช้แหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส 45 กรัม/ลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจนคือ ฮิสติดีน 12.5 กรัม/ลิตร

2.3 ปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 ด้วยกรดเกลือ (HCl 2 N) และโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH 2 N)

2.4 แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จำนวน 100 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร อุดปากขวดด้วยสำลี และปิดทับด้วยอะลูมิเนียมฟอยส์

2.5 ฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที แล้วทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.6 ตัด PDA (potato dextrose agar) ประมาณ 1 x 1 เซนติเมตรที่มีเชื้อ *Monascus purpureus* เจริญอยู่ หลังจากเลี้ยงไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 8 วัน จำนวน 1 ชิ้นต่อ 1 ขวดรูปชมพู่ ลงในอาหารเหลวสูตรที่ 1- 6 ตามที่ได้อธิบายไว้แล้วในข้อ 1.1.1-1.1.3 ที่เตรียมไว้ สำหรับอาหารเหลวสูตรที่ 7 และ 8 ก็ทำเหมือนกันแต่เปลี่ยนเป็นเชื้อ *Aspergillus terreus* TISTR 3109 ตามที่ได้อธิบายไว้แล้วในข้อ 1.2.1-1.2.3 ที่เตรียมไว้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7 หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง พร้อมเขย่าอาหารด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

2.8 เก็บตัวอย่างที่ 0 , 5 , 10 , 15 และ 20 วัน นำมาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

- วิเคราะห์ค่าพีเอช (pH) วัดโดยใช้เครื่อง pH meter ตามวิธีของ AOAC, 1995
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เชื้อใช้ไป (อ้างอิงจาก James and Hall, 1995)
- วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เชื้อใช้ไป ตามวิธีของ AOAC, 1995
- วิเคราะห์ปริมาณมวลชีวภาพของอาหารเหลว (biomass) (อ้างอิงจาก Petra *et al.*, 1994)
-วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลวโดยใช้เครื่องวัด Dissolved oxygen meter, Jenway; model 9300
-วิเคราะห์สีแดงโดยใช้วิธีสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (อ้างอิงจาก Petra *et al.*, 1994)
- วิเคราะห์สีโดยใช้ Hunter Lab (ColorQuest II; Hunter Lab, 1997)
-วิเคราะห์สารโมนาโคลิน เค (Monacolin K) ด้วยเครื่องHPLC (อ้างอิงจาก Friedrich *et al.*,1995)

ตอนที่ 2 ในอาหารแข็ง (ข้าวเจ้านึ่ง) ศึกษาผลของโมโนโซเดียมกลูตาเมท (monosodium glutamate) หรือฮีสติดีน (histidine) ต่อการผลิตรงควัตถุสีแดง และโมนาโคลิน เค โดยเชื้อรา *Monascus purpureus* FTCMU

ข. อาหารแข็ง (อาหารแข็งสูตรที่ 1-3)

1. การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

1.1 อาหารแข็งสูตรที่ 1- 3

1.1.1 เลี้ยงเชื้อ *Monascus purpureus* บน potato dextrose agar (PDA) slants ในหลอดทดลอง บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C นาน 8 วัน

1.1.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.1.1 ลงใน PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C นาน 8 วัน

1.1.3 ตัด PDA ที่มีเชื้อเจริญอยู่บริเวณปลายเส้นใยในข้อ 1.1.2 ประมาณ 1x1 ซม. ใส่ลงในอาหารแข็งตามสูตรในตารางที่ 3.2

2. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์แบบแข็ง ใช้ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท (อ้างอิงจาก พัชรีย์ พัฒนากูล, 2545) อาหารแข็งสูตรที่ 1 – 3

2.1 การเตรียมข้าว - ใช้ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาทนำมาล้างน้ำ 2 ครั้ง แล้วแช่ข้าวในน้ำนาน 30 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 เตรียมแหล่งไนโตรเจนที่จะใช้ตามตารางที่ 3.2 โดยที่

- อาหารแข็งสูตรที่ 1 ใช้แหล่งไนโตรเจนคือโมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/กิโลกรัม
- อาหารแข็งสูตรที่ 2 ใช้แหล่งไนโตรเจนคือ ฮิสติดีน 12.5 กรัม/กิโลกรัม
- อาหารแข็งสูตรที่ 3 ไม่ใช้แหล่งไนโตรเจน

การเตรียมจะต้องเตรียมให้ได้ความเข้มข้นและปริมาณตามต้องการ ใช้ข้าวต่อน้ำที่มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการในอัตราส่วน 1:1 (ข้าวเจ้า 500 กรัม:น้ำที่มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการ 500 มิลลิลิตร จะได้ข้าวสุกประมาณ 1,000 กรัม) นึ่งข้าวในรังถึงนาน 20 นาที แล้วชั่งข้าวสุก 100 กรัม ใส่ลงถุงทนร้อน (Polyethylene) ขนาด 8 x 12 นิ้ว ใส่คอขวดอุดปากด้วยสำลี และปิดทับด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์

ในการทดลองอาหารแข็งที่มีเติมโซเดียมกลูตาเมทหรือฮิสติดีน ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนตามตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงแผนการทดลองสูตรอาหารแข็งที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน

อาหารแข็งสูตรที่	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน
1	ไม่เติม	โมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/กิโลกรัม
2	ไม่เติม	ฮิสติดีน 12.5 กรัม/กิโลกรัม
3	ไม่เติม	ไม่เติม

หมายเหตุ :1) อาหารแข็งสูตรที่ 1-3 ใช้เชื้อ *Monascus purpureus* FTCMU

2.3 เกลี่ยข้าวให้กระจายทั่วก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.4 ตัด PDA (potato dextrose agar) ประมาณ 1 x 1 เซนติเมตรที่มีเชื้อ *Monascus purpureus* เจริญอยู่ หลังจากเลี้ยงไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 °Cนาน 8 วันจำนวน 1 ชิ้นต่อ 1 ถุง ลงในอาหารแข็งสูตรที่ 1-3

2.5 หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 0 , 5 , 10 , 15 และ 20 วัน นำมาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

- วิเคราะห์ค่าพีเอช (pH) วัดโดยใช้เครื่อง pH meter ตามวิธีของ AOAC, 1995
- วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เชื้อใช้ไป (อ้างอิงจาก James and Hall, 1995)
- วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เชื้อใช้ไป ตามวิธีของ AOAC, 1995

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- วิเคราะห์สีแดงโดยใช้วิธีสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (อ้างอิงจาก Petra *et al.*, 1994)
- วิเคราะห์สีโดยใช้ Hunter Lab (ColorQuest II; Hunter Lab, 1997)
- วิเคราะห์สารโมนาโคลิน เค (Monacolin K) ด้วยเครื่องHPLC (อ้างอิงจาก Friedrich *et al.*, 1995)

3.5 การวิเคราะห์สารโมนาโคลิน เค (Monacolin K)

อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

- เครื่อง HPLC (HP 1100 Series, WIM UV/VIS detector, Hewlett-Packard Asia Pacific Limited)
- HPLC Column คือ HiQ sil C18 (4.6 mm. L, 100 Å, 5 µm particle), (KYA Technologies Corp.)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance, Metter-Toledo: Model BB 120, Switzerland)

สารเคมี

- เมทานอล HPLC grade (Methanol, MeOH, Lab-Scan, Ireland)
- สารมาตรฐานโมนาโคลิน เค (จาก *Aspergillus* spp.) (M 2147 Sigma Co.)

การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารโมนาโคลิน เค สำหรับวิเคราะห์

1. ชั่งสารมาตรฐานโมนาโคลิน เค 10 มิลลิกรัมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนลงในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอล HPLC grade และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล เก็บไว้เป็นสต็อก
2. ปิเปตโมนาโคลิน เค ที่เป็นสต็อก ปริมาตร 0.1, 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจะได้โมนาโคลิน เค มาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.25 และ 0.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดูดโมนาโคลิน เค มาตรฐานที่มีระดับความเข้มข้นต่างๆใส่ขวดไวเอิล (vial) แต่ละขวดขนาด 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ปิดฝาให้แน่น แล้วเขียนป้ายชื่อติดที่ขวดไวเอิล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำไปฉีดเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ปริมาตรที่ฉีด 15 ไมโครลิตร) เพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) และจัดทำกราฟมาตรฐานสำหรับการหาความเข้มข้นของสารโมนาโคลิน เค

ตารางที่ 3.3 ค่าความเข้มข้น พื้นที่ใต้กราฟ และเวลา Retention time ของสารโมนาโคลิน เค ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

ความเข้มข้น (mg/ml)	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3		ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ	ค่าเฉลี่ยของเวลา (นาที)
	พื้นที่ใต้กราฟ	เวลา (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ	เวลา (นาที)	พื้นที่ใต้กราฟ	เวลา (นาที)		
0.01	384.11	9.055	392.09	8.996	384.02	8.836	386.74±4.63	8.962±0.11
0.05	1832.56	9.071	1819.98	8.996	1837.85	9.004	1830.13±9.18	9.024±0.041
0.10	3705.48	9.079	3661.81	8.961	3692.91	8.967	3686.73±22.48	9.002±0.066
0.25	8736.73	9.076	8615.64	8.965	8535.96	8.965	8629.44±101.09	9.002±0.064
0.50	18064.8	9.042	18305.7	8.968	18363.8	8.594	18244.77±158.54	8.868±0.240

หมายเหตุ : 1) สารโมนาโคลิน เค ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมาจาก *Aspergillus* spp. (M 2147 Sigma Co.)

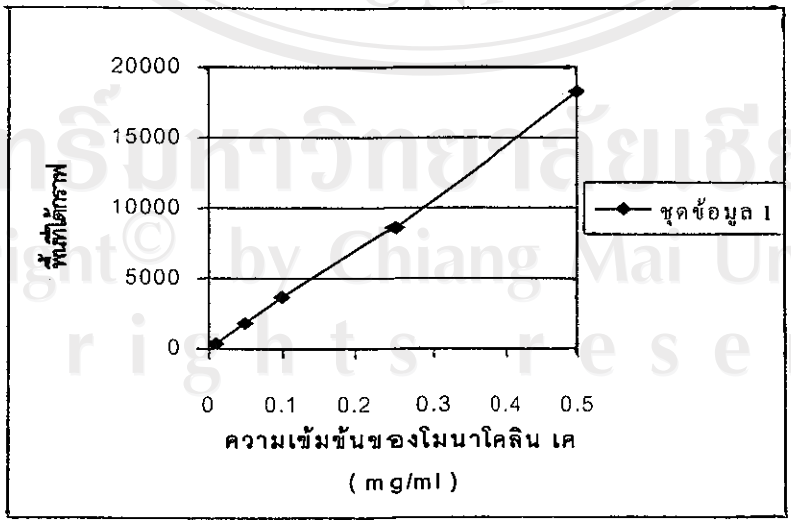
2) สารละลายสต็อก 1.0 mg/ml ในเมทานอล

3) สารละลายใช้งานเท่ากับ 0.01, 0.05, 0.10, 0.25 และ 0.50 mg/ml ในเมทานอล

สมการของกราฟมาตรฐานคือ $Y = 36342.21X - 79.25$

Y หมายถึง พื้นที่ใต้กราฟ

X หมายถึง ความเข้มข้นของสารโมนาโคลิน เค (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



ภาพที่ 3.1 กราฟมาตรฐานของสารโมนาโคลิน เค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างใส่ในหลอดทดลอง (ถ้าตัวอย่างเป็นอาหารเหลวกรองเอาเฉพาะเชื้อมาอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำมาชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1 กรัม แต่ถ้าตัวอย่างเป็นอาหารแข็งนำมาอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำมาชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 0.5 กรัม) จดน้ำหนักตัวอย่างไว้
2. บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยช้อนตักสารสเตนเลสแล้วเติมเมทานอล 5 มิลลิลิตร แล้ววางตัวอย่างทิ้งไว้นาน 10 นาที
3. เขย่าตัวอย่างด้วยมือนาน 3 นาที แล้วจึงนำส่วนที่เป็นของเหลวมากรองผ่านสำลีบริสุทธิ์ (pure cotton wool) เพื่อเอาอนุภาคของเชื้อออกให้ได้เฉพาะสารสกัดใสที่มีสี
4. ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (ปริมาตรที่ฉีด 20-100 ไมโครลิตร ตามที่ระบุในแต่ละการวิเคราะห์)

สภาวะของการวิเคราะห์

- HPLC Column คือ HiQ sil C18 (4.6 mm. L, 100 Å, 5 µm particle), (KYA Technologies Corp.)
- Mobile phase คือ เมทานอล 75%, น้ำ deionized (DI) 25%, อุณหภูมิห้อง
- Flow rate เท่ากับ 1.50 ml/min
- Detector คือ UV 235 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved