

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วิธีการวิจัย

1. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งในเศษข้าวอบกรอบ

นำตัวอย่างเศษข้าวอบกรอบหนัก 30 กรัม จากบริษัทเป๊ปซี่-โคล่า (ไทย) เทรดิง จำกัด จังหวัดลำพูน ไปอบด้วย Hot air oven อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1 วัน จะได้เป็นเศษข้าวอบกรอบที่มีลักษณะแห้งและได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จะได้ตัวอย่างในรูปผง แล้วจึงส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง สถาบันผลิตผลการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

2. การแยก *Monascus* sp. จากข้าวแดง

2.1 แหล่งของข้าวแดงทั้งหมด 15 แหล่ง ได้แก่

1. ร้านชัยอรุณ โอสด นครสวรรค์
2. ร้านสง่าพาณิชย์ นครสวรรค์
3. ร้านมาดีโอสด นครสวรรค์
4. ร้านจีบอั้งต้ง โอสด เชียงใหม่
5. ข้าวแดงจากประเทศฮ่องกงได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.ฉัตรชัย
6. ร้านห่อเอี่ยมฝ่อ เชียงใหม่
7. ร้านหมอทิพย์ ตลาดหัวรอ อูขุขยา
8. ร้านเมืองทองเกสซ์ อูขุขยา
9. ร้านวันชัย โอสด อูขุขยา
10. เขาวราช กรุงเทพมหานคร
11. ร้านกิตติโอสด สิงห์บุรี
12. ร้านบัววันฮั่วต้ง พิษณุโลก

13. รันจวนฮั่วตั้ง พิชญโลก

14. รันมโนราห์ พิชญโลก

15. รันไพศาลชัยโอสธ กำแพงเพชร

16. เชื้อราสายพันธุ์ *Monascus purpureus* TISTR 3385

2.2 ทำการแยกเชื้อราจากข้าวแดงแหล่งต่างๆ โดยใช้ปากกิบ่ม 95% ethanol แล้วฉีกข้าวแดงแล้ววางตรงกลาง potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญแล้ว ใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตรจุ่มแอลกอฮอล์ลงไฟเจาะตัดชิ้นวัณบริเวณปลายเส้นใย แล้วใช้เข็มเย็บปลายของเย็บชิ้นวัณที่ตัดไว้วางตรงกลางอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อราบริสุทธิ์ในอาหารวัณเยียงในขวดฝาเกลียวขนาด 18 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C พร้อมทั้งเก็บเชื้อราไว้ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 3 สัปดาห์

3. การคัดเลือก *Monascus* ที่สามารถผลิตสารสีบนเศษข้าวอบกรอบ

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 2 ทั้งสิ้นจำนวน 15 ไอโซเลท และสายพันธุ์อ้างอิง มาศึกษาการผลิตสารสีแดง สารสีส้ม และสารสีเหลือง โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเศษข้าวอบกรอบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิตสารสีมากที่สุด

3.1 การเตรียมเศษข้าวอบกรอบ (ภาคผนวก ข)

ซึ่งเศษข้าวอบกรอบที่ไม่ปรุงรส 10 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี หุ้มอีกชั้นด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ นำมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (Tomy รุ่น SS-325) ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แช่ในอาหารกระเจียว จะได้เศษข้าวอบกรอบสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อรา

3.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension

เตรียมเชื้อราของแต่ละไอโซเลทในรูปของ spore suspension โดยการเลี้ยงเชื้อราในอาหารวัณเยียง PDA ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้เข็มเย็บเชื้อราที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขูดเบาๆ ให้สปอร์กระจายแล้วนับจำนวนสปอร์โดยใช้ hemacytometer ให้ได้จำนวนสปอร์ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนเศษข้าวอบกรอบ

ใช้ปิเปตดูดเชื้อตั้งคั้นในรูป spore suspension ของเชื้อราแต่ละไอโซเลทจำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในเศษข้าวอบกรอบที่อบฆ่าเชื้อแล้วลงในขวดรูปชมพู่จากข้อ 3.1 ปริมาณความชื้น 28.5% (ภาคผนวก ง) อัตราส่วนของสับสเตรท เศษข้าวอบกรอบ ต่อ ปริมาณน้ำ เท่ากับ 4:1 (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

3.4 การหาค่าสี (Johns and Stuart, 1991)

ชั่งเศษข้าวอบกรอบที่มีเชื้อราแต่ละไอโซเลทเจริญอยู่นัก 0.5 กรัม ใส่หลอดทดสอบขนาด 15×150 มิลลิลิตร เติม 95% ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Reciprocating shaker SO2 ยี่ห้อ Stuart) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (High speed centrifuge ยี่ห้อ Sanyo รุ่น Harrier 18/80) ที่ 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman no.1) นำส่วนสารละลายใส่ไปตรวจวัดค่าสีแดงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สีส้มที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร และสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Spectronic Genesys 20) เมื่อได้ค่าสีแล้วคูณกลับด้วยค่าความเจือจางที่ทำไว้ จากนั้น นำค่าการดูดกลืนแสง และน้ำหนักแห้งไปคำนวณหาปริมาณสารสี หน่วยที่ได้จะเป็นค่าสีต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง (Absorbance unit/g) ทำ blank โดยใช้เศษข้าวอบกรอบ 0.5 กรัม ละลายใน 95% ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำการ set auto zero ในการวัดปริมาณสารสีแดง ส้มและเหลือง

4. การบ่งชี้ชนิดของเชื้อราไอโซเลท NK1

นำเชื้อราไอโซเลท NK1 มาเพาะเลี้ยงบนสไลด์ เพื่อศึกษาคุณลักษณะโครงสร้างภายนอกของเชื้อรา (ภาคผนวก จ) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound microscope ยี่ห้อ Olympus รุ่น CX 31) เช่น สีและลักษณะของโคโลนี รูปร่างของเส้นใยและโคนิเดีย และเพอริทีเซียม นำมาเปรียบเทียบกับลักษณะต่างๆกับหนังสือ Fungi and Food Spoilage (Pitt and Hocking, 1997) นอกจากนี้ทำการทดสอบความสามารถทนเกลือ และ เอทานอล โดยการตัดชิ้นส่วนของเชื้อรา ไอโซเลท NK1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จำนวน 1 ชิ้น เลี้ยงลงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6% (w/v) และอาหาร PDB ที่เติมเอทานอลเข้มข้น 30% (บุษบา, 2540) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7 วัน แล้วสังเกตการเจริญของเชื้อรา

5. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *M. purpurescens* NK1 เพื่อผลิตสารสี

ศึกษาปริมาณเชื้อตั้งต้น ระยะเวลาการหมักแบบแห้ง อุณหภูมิ pH และความชื้นเริ่มต้น (ภาคผนวก ง) ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารสีของ *M. purpurescens* NK1 ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3

5.1 ปริมาณ spore suspension ต่อการผลิตสารสี

เตรียมเศษข้าวอบกรอบหนัก 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพูนขนาด 125 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลง เตรียมเชื้อตั้งต้นของ *M. purpurescens* NK1 ในรูป spore suspension เช่นเดียวกับข้อ 3(ข) โดยใส่ลงในขวดรูปชมพูนขนาด 125 มิลลิลิตร ในปริมาตรที่แตกต่างกัน คือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร (คิดเป็น 0%, 10%, 20%, 30%, 40% และ 50% ตามลำดับ) โดยแต่ละปริมาตรทำการทดลอง 3 ซ้ำ ปริมาณความชื้นเริ่มต้น 28.5% บ่มที่อุณหภูมิห้อง (26-28 °C) เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบปริมาณการผลิตสารสีในแต่ละปริมาณ spore suspension เพื่อหาปริมาณ spore suspension ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของ *M. purpurescens* NK1 จากนั้นนำไปวัดค่าสีตามวิธีในข้อ 3.4

5.2 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *M. purpurescens* NK1 ต่อการผลิตสารสีต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยง *M. purpurescens* NK1 บนอาหารแข็งเศษข้าวอบกรอบ 10 กรัม ในขวดรูปชมพูนขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อตั้งต้นในรูปของ spore suspension 30% (3 มิลลิลิตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28±2 °C) ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 14 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน แล้วนำมาหาค่าสีแดง สีส้ม และสีเหลือง โดยวิธีการเดียวกับข้อ 3.4

5.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสี

ทำการเพาะเลี้ยง *M. purpurescens* NK1 บนเศษข้าวอบกรอบหนัก 10 กรัม ใช้เชื้อตั้งต้นในรูปของ spore suspension 30% (3 มิลลิลิตร) โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ คือ อุณหภูมิห้อง (28 °C), 25 °C, 30 °C, 37 °C และ 45 °C ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน แล้วนำมาหาค่าสีแดง สีส้ม และสีเหลือง โดยวิธีการเดียวกับข้อ 3.4

5.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสี

ทำการเพาะเลี้ยง *M. purpurescens* NK1 โดยใช้เชื้อตั้งต้นแบบ spore suspension 30% (3 มิลลิลิตร) บนอาหารแข็งเศษข้าวอบกรอบ 10 กรัม ปริมาณความชื้น 28.5% ระยะเวลาเพาะเลี้ยง

10 วัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ด้วย 0.1 M NaOH และ 0.1 M HCl แล้วนำมาหาค่าสีแดง สีส้ม และสีเหลือง โดยวิธีการเดียวกับข้อ 3.4

5.5 ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสี

ทำการเพาะเลี้ยง *M. purpurescens* NK1 โดยใช้เชื้อตั้งต้นแบบ spore suspension 30% (3 มิลลิลิตร) บนอาหารแข็งเศษข้าวอบกรอบ 10 กรัม ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 10 วัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C โดยปรับความชื้นเริ่มต้น ดังนี้ 33%, 50% และ 60% ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วนำมาหาค่าสีแดง สีส้ม และสีเหลือง โดยวิธีการเดียวกับข้อ 3.4

6. การหาร้อยละผลผลิตของผลิตภัณฑ์ (ภาคผนวก ก)

นำเศษข้าวอบกรอบที่บดด้วยโกร่งหินให้เป็นผงละเอียดและเศษข้าวอบกรอบราแดงที่หมักด้วย *M. purpurescens* NK1 อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาชั่งน้ำหนักและคำนวณหาค่าผลได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์ (Percentage yield)

7. การศึกษาจำนวนสปอร์ของ *M. purpurescens* NK1 ที่เก็บรักษาในรูปผงข้าวอบกรอบเชื้อราแดง

นำข้าวอบกรอบราแดงไปอบแห้งที่ Hot air oven อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วบดด้วยโกร่งหิน ให้ละเอียดจนเป็นผง จากนั้นทำการนับสปอร์ที่มีชีวิตของ *Monascus* sp. NK1 ด้วยวิธีการ dilution spread plate โดยทำการเจือจางเชื้อ 10 เท่า (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และทำการเพาะเชื้อแต่ละระดับการเจือจางลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เมื่อสปอร์ของ *Monascus* sp. NK1 เจริญบนจานอาหารแล้ว ทำการคำนวณหาจุลินทรีย์ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง

8. การวิเคราะห์ปริมาณซิทรินิน (citrinin) และโมนาโคลิน เค (monacolin K)

8.1 วิธีการสกัดสารซิทรินินและโมนาโคลิน เค (Sung *et al.*, 2006)

นำข้าวกรอบราแดงที่บดละเอียดหนัก 1 กรัม ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 68% ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 40 °C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20 °C และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman no.1) หลังจากนั้นนำไประเหยแห้งด้วย vacuum oven ที่ 50 °C นำส่วนที่อบแห้งละลายด้วย 50% acetonitrile ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่าน nylon membrane ขนาด 0.45 มิลลิเมตร เก็บใส่ขวดเก็บสาร (Agilent vials) ขนาด

1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณโมนาโคลินและซิทรีนินด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography รุ่น Agilent 1100) ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบอาหาร บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด จ.เชียงใหม่

8.2 สภาพของเครื่อง HPLC

นำของเหลวจากการเตรียมในข้อ 8.1 ฉีดผ่านเครื่อง HPLC สำหรับ mobile phase ที่ใช้ได้แก่ สารละลายประกอบด้วย 0.1% trifluoroacetic acid และ acetonitrile (40:60 v/v) ใช้คอลัมน์ zorbax SB C₁₈ (Agilent technologies USA) ขนาด 150 × 4.6 มิลลิเมตร อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที และใช้ Diode array detector ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร

9. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารสีจาก *Monascus purpureus* NK1

9.1 การศึกษาความคงทนต่อความร้อน

สกัดสีออกจากผงข้าวกรอบราดแดง ด้วยสารละลาย ethanol 95% กรองเอาเฉพาะสารละลายสีออกมาใส่หลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร (12×75 mm) แล้วนำมาต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 60 นาที วัดปริมาณความเข้มของสีแดง สีส้ม และสีเหลือง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 500, 470 และ 400 นาโนเมตร ตามลำดับ ในหลอดทดสอบทุกๆ 10 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ตามลำดับ

9.2 การศึกษาความคงทนต่อความเป็นกรดและด่าง

สกัดสีออกจากผงข้าวกรอบราดแดง ด้วยสารละลาย 95% ethanol กรองเอาเฉพาะสารละลายสีออกมาใส่หลอดทดลอง แล้วนำมาปรับให้เป็น pH 4 และ pH 11 ด้วย 0.1 N HCl หรือ 0.5 N NaOH วัดปริมาณความเข้มของสีแดง สีส้มและสีเหลือง โดยวิธีการเดียวกับข้อ 9.1