บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

คัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ด้วยวิธี natural selection เพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดี บนอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์อน เพื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว มาใช้เพื่อศึกษาการผลิตโมนาโคลินบนอาหารแข็งธัญพืชต่างๆ

3.2 สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

Monacolin K (sigma-aldrish) citrinin (sigma-aldrish) และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ต่างๆ มีคุณภาพระดับ analytical grade ข้าวเสาไห้ (ตราไก่แจ้) ข้าวหอมมะลิ และธัญพืชต่างๆ หาได้จากร้านค้าทั่วไป อาหารเหลว SS medium ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง และแป้งถั่วเหลือง 30 กรัม และ 40 กรัม (ตามลำดับ) ในน้ำกลั่น 1000 มล. สำหรับอาหารแข็ง MYS agar ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 10 กรัม เปปโตน 5 กรัม ยีสต์สกัด 3 กรัม และมอลต์สกัด 3 กรัม และวุ้น 15 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มล.

3.3 การวิเคราะห์

เปอร์เซ็นต์ความชื้นตัวอย่าง คำนวณจาก (W-D)/D x 100 เมื่อ W และ D หมายถึง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง (หลังจากอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่) ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปริมาณ Monacolin K ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วยสัดส่วนตัวอย่าง : ethyl acetate ที่ 1 ต่อ 10 (ดัดแปลงจาก Yu and Zhu, 1998 และ Zhang and Liu, 1999) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายมาผสมกับสารละลาย Na2CO3 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง จนพีเอชสารละลายเป็นกลาง จึงนำไประเหยที่ความดันต่ำ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วละลายด้วยเมธานอล แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ส่วนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทำได้โดยนำตัวอย่างที่เชื้อ *Monascus* sp. เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยนำตัวอย่างประมาณ 3 - 5 กรัมน้ำหนักสด มาผสมกับสารละลายเอทานอล 20 มล. ในฟลาสก์ แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียล) แล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนใสสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโมนาโคลินด้วยเครื่อง HPLC (Shizumasu) ต่อกับตัวตรวจวัดชนิด UV-visible spectrophotometer (UV; SPD-10 A VP) (ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร) และคอลัมน์ μBondapakTM C18 (3.9 x 300 mm.) โดยใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) acetonitrile ความเข้มข้น 55 เปอร์เซ็นต์ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที (LC-10 AD VP)

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสวัด Somogyi – nelson (Nelson, 1944) นำตัวอย่างเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญบนอาหารธัญพืช มาผสมกับน้ำกลั่น แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์ citrinin เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ โดยนำตัวอย่าง 30 กรัม มาอบแห้ง แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างประมาณ 2.5 กรัม ใส่ฟลาสต์ขนาด 250 มล. ที่มีสารสกัด (acetonitrile : 4% aqueous KC1 (9 : 1) ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณ 20 มล. แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนใสไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (evaporator) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาละลายด้วย Chloroform ปริมาตร 2.5 มล. สารละลายที่ได้นำมาจุดลงบน TLC plates โดยใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย tolune : ethylacetate : chloroform (80:70:50) และ 1 มล. ของสารละลายกรดฟอร์มิก (formic acid) ความเข้มข้น 90 % จากนั้นนำ TLC ไปสังเกตุด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

การวัดสารสีแดง นำตัวอย่างจากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารธัญพืช มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วนำส่วนใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (บุษบา, 2000)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 เชื้อ *Monascus* sp. SS14 ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อราโมแนสคัสที่คัดแยกได้จากงานวิจัยที่ผ่านมา และเก็บรักษาไว้ รวมทั้งการคัดเลือกใหม่จากธรรมชาติ มาทดสอบการเจริญบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังเส้น ข้าว และธัญพืชชนิดต่างๆ

3.4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโมแนสคัส

นำจุลินทรีย์ ซึ่งมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ การย้อมสีเซลล์แฟกเจลลา และการใช้สารประกอบซัลเฟอร์ พร้อมศึกษาลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.3 ศึกษาการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งข้าวหอมมะลิในสภาวะวางฟลาสก์นิ่ง

การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง เพื่อผลิตโมนาโคลิน ด้วยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะหยุดนิ่ง และใช้เชื้อเริ่มต้น 2 ชนิด ได้แก่

3.4.3.1 เชื้อเริ่มต้นในรูปของสารละลายสปอร์

นำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงบนอาหาร MYS agar ที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใช้ cock borrow ขนาด 0.5 ซม. ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญจำนวน 1 ชิ้น ใส่ในหลอดอาหารหลอดอาหารวุ้นเอียง (MYS slant) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 5 มล. เพื่อเตรียมสารละลายสปอร์ความเข้มข้น $1*10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นต่อไป

3.4.3.2 เชื้อเริ่มต้นในรูปของเส้นใยเชื้อรา

นำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงบนอาหาร MYS agar ที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใช้ cock borrow ขนาด 0.5 ซม. ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญจำนวน 4 ชิ้น ใส่ในฟลาสก์ (ขนาด 250 มล.) ที่บรรจุอาหารเหลว SS medium ปริมาตร 75 มล. (ประกอบด้วยประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 3.0 เปอร์เซ็นต์ และแป้งถั่วเหลือง 4.0 เปอร์เซ็นต์) แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำสารละลายเส้นใยปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นต่อไป

เตรียมอาหารธัญพืชสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) ที่มีข้าวหอมมะลิเป็นองค์ประกอบ โดยนำข้าวไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 6 12 18 และ 24 ชม. แล้วนำไปสะเด็ดน้ำเป็นเวลา 2 ชม. นำข้าวที่เตรียมปริมาณ 100 ก. ได้ไปบรรจุฟลาสก์ (ปริมาตร 250 มล.) แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นใส่เชื้อเริ่มต้น (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ที่เป็นสารละลายสปอร์ และสารละลายเส้นใย ลงในฟลาสก์เชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์ความชื้น ปริมาณสารสี ปริมาณโมนาโคลิน และพีเอชในอาหารแข็งตามลำดับ

3.4.4 ศึกษาการการสร้างโมนาโคลินบนอาหารธัญพืชในสภาวะนิ่ง

นำเชื้อเริ่มต้นในรูปของสารละลายเซลล์ (โดยวิธี 3.4.3.2) เพื่อใช้ศึกษาการเจริญและการผลิตโมนาโคลิน บนอาหารธัญพืช ได้แก่ มันสำปะหลังเส้น แห้ว มันฝรั่ง มันแกว (ขนาดประมาณ 1 ตารางเซ็นติเมตร) ข้าวเหนียว ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต และข้าวเจ้าเสาไห้ ในสภาวะหมุนขวด บรรจุธัญพืช (ได้แก่ มันสำปะหลังเส้น แห้ว มันฝรั่ง มันแกว) แต่ละชนิดปริมาณ 50 กรัม ลงในขวดเตรียมอาหารขนาด 200 มล. ส่วนข้าวเหนียว ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวเจ้าเสาไห้ และข้าวหอมมะลิ นำไปแช่น้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วสะเด็ดน้ำนาน 30 นาที จากนั้นจึงนำมา 50 กรัม ไปบรรจุในขวดเตรียมอาหาร อาหารแข็งธัญพืชทั้งหมดนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในอาหารธัญพืช แล้วนำไปเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาหร์ วิเคราะห์ปริมาณความชื้น สารสี และสารโมนาโคลินที่เชื้อราโมแนสคัสผลิตได้

3.4.4 ศึกษาการผลิตโมนาโคลินบนอาหารแข็งข้าวเสาไห้ในสภาวะหมุนขวด

เตรียมอาหารข้าวเสาไห้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) ด้วยวิธีต่างๆ โดยนำข้าวไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 2 ชม. สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 30 นาที บรรจุข้าว 50 กรัม ในขวดเตรียมอาหารปริมาณ 200 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เปรียบเทียบกับการนำข้าวปริมาณ 50 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหาร แล้วไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นจึงใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 5 10 15 20 และ 25 มล. ลงไปในข้าวปลอดเชื้อ และนำไปวางบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 12 ชม. เพื่อให้น้ำซึมเข้าเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง นำเชื้อเริ่มต้นในรูปสารเส้นใย (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงในขวดบรรจุธัญพืช แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4

สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความชื้น ปริมาณสารสี ปริมาณโมนาโคลิน และพีเอชในอาหารแข็ง ตามลำดับ

3.4.5 ศึกษาการผลิตโมนาโคลินบนอาหารข้าวเสาไห้ปริมาตรต่างๆ ในสภาวะหมุน

เตรียมอาหารข้าวเสาไห้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) โดยนำข้าวปริมาณ 50 100 200 500 และ 1000 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหารขนาด 200 มล. 500 มล. 1 ลิตร 2 ลิตร และ 5 ลิตร ตามลำดับ แล้วไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นจึงใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 15 30 60 150 และ 300 มล. ลงไปในข้าวปลอดเชื้อ และนำไปวางบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 12 ชม. เพื่อให้น้ำซึมเข้าเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง นำเชื้อเริ่มต้นในรูปสารเส้นใย (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงในขวดบรรจุธัญพืช แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความชื้น ปริมาณสารสี ปริมาณโมนาโคลิน และพีเอชในอาหารแข็ง ตามลำดับ

3.4.6 ศึกษาการเจริญและการผลิตโมนาโคลินในอาหารแข็ง 100 กรัม และ 1000 กรัม ที่เวลาต่างๆ

เตรียมอาหารข้าวเสาไห้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) โดยนำข้าวปริมาณ 50 และ 1000 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหารขนาด 200 มล. และ 5 ลิตร แล้วไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 และ 45 นาที ตามลำดับ จากนั้นจึงใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 15 และ 300 มล. ลงไปในข้าวปลอดเชื้อ นำไปวางบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 12 ชม. เพื่อให้น้ำซึมเข้าเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง นำเชื้อเริ่มต้นในรูปสารเส้นใย (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงในขวดบรรจุธัญพืช แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความชื้น ปริมาณสารสี ปริมาณโมนาโคลิน และพีเอชในอาหารแข็ง ตามลำดับ

3.4.7 ศึกษาการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมัยเลส และการสะสมกลูโคสระหว่างการเจริญ และการสร้างโมนาโคลินของโมแนสคัส

นำตัวอย่างเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญบนอาหารข้าวเสาไห้ปริมาณ 50 และ 1000 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหารขนาด 200 มล. และ 5 ลิตร มาศึกษาการสร้างเอนไซม์

กลูโคอะมัยเลย และการสะสมน้ำตาลกลูโคส โดยวัดกิจกรรมเอนไซม์ในสาระลายอะซิเตต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียน เป็นเวลา 30 นาที

3.4.8 ศึกษาการสร้างซิตรินินในอาหารแข็ง

นำตัวอย่างเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญบนอาหารธัญพืชต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาวัดปริมาณซิตรินิน ด้วยเทคนิค TLC