เอกสารอ้างอิง

จันทนี อิทธิพานิชพงศ์. 2545. ยาลดไขมันในเลือด. เภสัชวิทยา. คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์แทกซ์แอนด์เจอนัล. กรุงเทพฯ : 187-196.

นิสา บุตรดา. 2537. การกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส กบ.11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสีและ เปรียบเทียบสมบัติบางประการกบสายพันธุ์พอแมสายพันธุกลายพันธุสีแดงและสีเหลือง . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุษบา ยงสมิทธ์ . 2542 . จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี . ครั้งที่ 2 . กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Alberts, A. W. 1998. Discovery, Biochemistry and Biology of Lovastatin. *The American Journal of Cardiology* 62: 10J–15J.

Alberts, A.W., J. Kuron, V. Hunt, J. Huff, J. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch and J. Springer. 1980. Mevinolin : a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzymeA reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 : 3957-3961.

Alexopoulos, C.J. and C.W. Mims. 1979. Introductory Mycology. John Wiley & Son Inc. New York. 632 p.

Ainswarth, G.C., F.K. Sparrow and A.S. Sussman. 1973. The Fungi. Vol. IV A. Academic Press Inc., New York. 621 p.

Bacha, H.R., Hadidane, E.E., Creppy, C., Regnault, F. Ellouzi and G. Dircheimer. 1988. Monitoring and identification of fungal toxins in food products, animal feed and cereals in Tunisia. *Jour. Stored Prod. Res.* 24(4): 199-206.

Barnard, E.L. and P.F. Cannon. 1987. A new species of *Monascus* from pine tissues in Florida. *Mycologia.* 79 (3): 479-484.

Belo, R.S., J.C. Jamieson and J. A. Wright. 1993. Studies on the effect of mevinolin (lovastatin) and mevastatin (compactin) on the fusion of L6 myoblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 126(2): 159-167

Bobek P, Ozdín L, Galbavý S. 1998. Dose- and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. *Nutrition*. 14(3): 282–286.

Bridge, P.D. and D.L. Hawksworth. 1985. Biochemical tests as an aid to the identification of *Monascus* species. *Letters Appl. Microbiol.*, 1 : 25-29.

Brown, A.G., T.C. Smale, T.J. King, R. Hasenkamp and R.H. Thompson. 1976. Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabilite from *Penicillium brevicompactum*. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1165– 1169.

Dhale, M.A., S. Divakar, S. Umesh Kumar and G. Vijayalakshmi. 2007. Isolation and characterization of dihydromonacolin-MV from *Monascus purpureus* for antioxidant properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73(5) : 1197 – 1202.

Endo, A. 1979. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Antibiot.* 32 (8); 852–854.

Endo, A. 1980. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Antibiot.* 33; 334–336.

Endo, A. 1985. Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. *J. Med. Chem.* 28; 401–405.

Endo, A., D. Komagata and H. Shimada. 1976. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme a reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 72; 323–326.

Endo, A., K. Hasumi, A. Yamada, R. Shimoda, and H. Takeshima. 1986. The synthesis of compactin (ML-236B) and monacolin K in fungi. *J. Antibiot.* 39, 1609–1610.

Endo, A., Y. Negishi, T. Iwashita, K. Mizukawa, and K. Hirama. 1985. Biosynthesis of ML-236B (compactin) and monacolin K. *J Antibiot* 38; 444–448.

Fielding, B.C., J.S.E. Holker, D.F. Jone, A.D.G. Powell, K.W. Richman, A. Robertson and W.B. Whalley. 1961. The Chemistry of fungal. part XXXIX. The structure of monascin. *J. Chem. Soc.* 4579-4589.

Fink-Gremmels, J. and L. Leistner. 1989. *Monascus* product, pp. 260-263. *In* G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (eds.). *Natural Food Colorants.* Blackie and Son., New York. 280 p.

Gimeno, A. and M.L. Martins. 1983. Rapid thin layer chromatography determination of patulin, citrinin, and aflatoxin in apples and pears and their juices and jams. *Jour. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66(1): 85-91.

Hassan H. Peter N. and D. Philippe. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6): 2596-2602.

Hawksworth, D.L. and J.I. Pitt. 1983. A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. *Austl. J. Bot.* 31 : 51-61.

Haws, E.J., J.S.E. Holker., A. Kelly, A.D.G. Powell and A. Robertson. 1959. The chemistry of fungi part XXXVII. The structure of rubropunctatin. *J. Chem. Soc.* 3598-3610.

Hebers, D., A. Lembertas, Q.Y. Lu, S.S. Bowrman and V.L.W. Go. 2001. An Analysis of Nine Proprietary Chinese Red Yeast Rice Dietary Supplements: Implications of Variability in Chemical Profile and Contents. *J. Alter. Compl. Med.* 7 (2); 133–139.

Heber, D., I. Yip, J.M. Ashley, D.A. Elashoff, R.M. Elashoff and V.L.W. Go. 1999. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am. J. Clinical Nutrition*, 69: 231 - 236.

Hendrickson, L., C.R. Davis, C. Roach, D.K. Nguyen, T. Aldrich, P.C. McAda, and C.D. Reeves. 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* : characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem. Biol.* 6:429–439.

Hendry, G.A.F. and J.D. Houghton. 1992. Natural Food Colorants. Blackie and Son., New York. 280 p.

Hirama, M. and M. Iwashita. 1983. Synthesis of Mevinolin starting from naturally occurring building blocks and using an asymmetry inducing reaction. *Tetrahedron Lett.* 24 : 1811–1812.

Hirama, M. and M. Vet. 1982. Synthesis of Compactin starting from naturally occurring building blocks and using an asymmetry inducing reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 104: 4251.

Hiroi T., T. Shima, T. Suzuki, M. Tsukioka, and O. Naghir. 1975. Hyperpigment-productive mutant of *Monascus anka* for solid culture. *Agr. Biol. Chem.* 43; 1975-1976.

Krairak, S., B. Yongsmith and S. Sirirote. 1991. Effect of impeller type on growth and morphology of *Monascus* sp. 20M10.2 cultivation in a fermenter. *K.U. Sci. J.* 9 (1-2-3); 10-20.

Krairak, S., Yamamura, K., Nakajima, M., Shimizu, H. and Shioya, S. 1999. On-line monitoring of fungal cell concentration by dielectric spectroscopy. *J. Biotech.*, 69; 115-123.

Krairak, S., Yamamura, K., Irie, R., Nakajima, M., Shimizu, M., Chim-anage, P., Yongsmith, B. and Shioya, S. 2000. Maximizing yellow pigment production in fed-batch culture of *Monascus* sp. *J. Biosci. Bioengi.* 90 (4); 363-367.

Kranz, C., C. Panitz and B. Kunz. 1992. Biotransformation of free fatty acid in mixtures to methyl ketones by *Monascus purpureus*. *Appl. Micro. Biotechnol.* 36; 436-439.

Kumari, H.P.M., K. Akhilender Naidu, S. Vishwanatha, K. Narasimhamurthy, G. Vijayalakshmi. 2009. Safety evaluation of *Monascus* purpureus red mould rice in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (8) ; 1739-1746

Lee, C.L., H.K. Hung, J.J. Wang and T.M. Pan. 2007. Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU 568 under dioscorea medium through the mediation of pH value and ethanol addition. *J Agric Food Chem.*, 8; 55 (16): 6493-6502.

Lee, Y.K., D.C. Chen, S. Chauvatcharin, T. Seki and T. Yoshida. 1995. Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method. *J. Ferment. Bioengi.*, 79 (5); 516-518.

Li, C., Y. Zhu, Y. Wang, J.S. Zhu, J. Chang, D. Kritchevsky. 1998. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr. Res.* 18 (1); 71–81.

Li, Y.G., F. Zhang, Z.T. Wang and Z.B. Hu. 2004. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 1101–1112.

Lin, C.F. 1973. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. *J. Ferment. Technol.* 51 (6); 407-414.

Ma, J.Y., Y.G. Li, Q. Ye, J. Li, Y.J. Hua, D.J. Ju. 2000. Constituents of Red Yeast Rice, a Traditional Chinese Food and Medicine. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5220–5225.

Manchand, P.S., W.B. Whalley and F.C. Chen. 1973. Isolation and structure of ankaflavin : a new pigment from *Monascus anka*. *Phytochemistry*, 12 : 2531-2532.

Nakanishi, K., M. Ohashi., S. Kumasaki and S. Yamamura. 1959. Monascorubrin structure of monascorubrin and monascamine. *J. Am. Chem. Soc.* 81: 6339-6340.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation fo the Somogyi Method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153; 375-380.

Palo, M.A.L., Vidal-Adeva and M.M. Leticia. 1960. A study on angkak and its production. Philippenes *J. Sci.* 89 : 1-19

Shephered, D. and M. Carels. 1983. Product formation and differentiation in fungi, pp. 315-535. *In* J.E. Smith (ed.). Fungal Differentation. Marcel Dekker, Inc., New York.

Sweeny, J.G., M.C. Estrada-Valdes, G.A. Iacobucci, H. Sato and S. Sakamura. 1981. Photoprotection of the red pigments of *Monascus anka* in aqueous media by 1,4,6-trihydroxy-naphthalene. *J. Agric. Food. Chem.* 29: 1189-1193.

Von Arx, J.A. 1974. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. *J. Crammer, Verlag.* 315 p.

Wang, J., Z. Lu, J. Chi, W. Wang, M. Su, W. Kou, P. Yu, L. Yu, L. Chen, J.S. Zhu, J. Chang. 1997. Multicenter clinical trial of the serum lipid-lowering effects of a *Monascus purpureus* (red yeast) rice preparation from traditional Chinese medicine. *Curr. Ther. Res.* 58 (12); 964–978.

Wang, S.L., Y.H. Yen, W.J. Tsiao, W.T. Chang, C.L. Wang. 2002. Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (3) ; 337-344.

Wong, H.C. and Bau, Y.S. 1977. Pigmentation and Antibacterial Activity of Fast–Neutron and X-ray Induced Strains of *M. purpureus*. *Wert. Plant Physiol.*, 60, 578.

Yoshimura, M., S. Yamanaka, K. Mitsugi and Y. Hirose. 1975. Production of *Monascus* pigment in submerged culture. *Agr. Biol. Chem.* 39 : 1789-1795.

Yongsmith, B., L. Chitradon, S. Krairak, W. Tabloka, and R. Bavavoda. 1990. Cassava fermentation of yellow pigment and amylolytic enzymes of a mutant of *Monascus* spp. in submerge cultivation. *Microbial Utilization of Renewable Resources.* 7 : 354-363.

Yongsmith, B., S. Krairak and R. Bavavoda. 1994. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp. *J. Ferment. Bioeng.* 78 (3), 223-228.

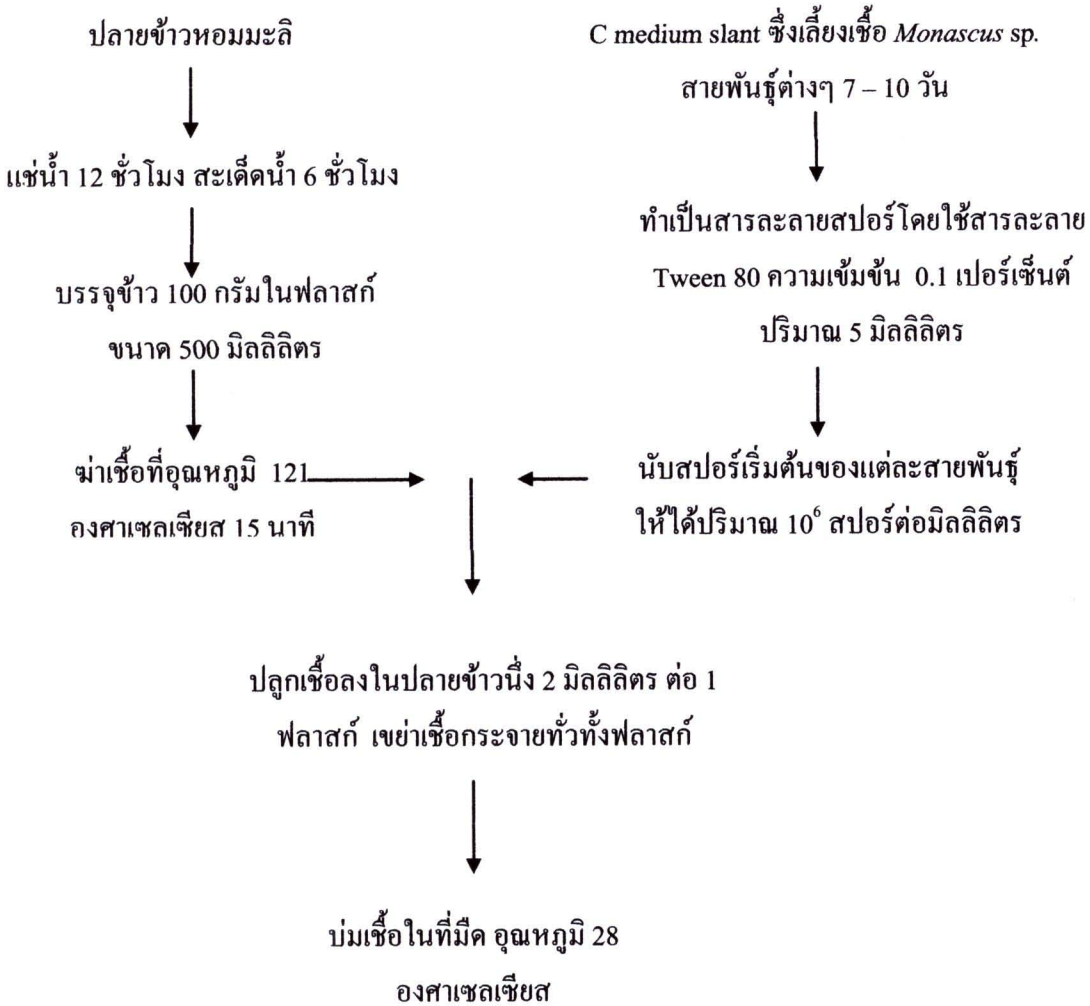
Yongsmith, B., S. Krairak and N. Budda. 2004. Fermentation of *Monascus* yellow pigments in solid and submerged state system. International Symposium on Oriental *Monascus* 2004. Nov, 26-30, University of Technology, Hangzhou, China. p. 109-114.

Yu, J. and C.R. Zhu. 1998. Determination and effects of the cholesterol biosynthetic inhibitor produced by *Monascus*. *J. Capital. Univ. Med. Sci.*, 19:19-22.

Zhang, J.G. and W.H. Liu. 1999. Determination of lovastatin in capsule by UV spectrophotometry. *Chin. J. Biochem. Pharm.*, 20: 152-158.

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมข้าว สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (นิสา, 2537)



2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MYS agar (วรรณภา, 2529)

เปปโตน	5.0	กรัม
ยีสต์สกัด	3.0	กรัม
มอลต์สกัด	3.0	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	20.0	กรัม

วุ้น 12-15 กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวมเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเหลว SS medium (วรรณภา, 2529)

ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch)	3.0 เปอร์เซ็นต์
แป้งถั่วเหลือง	4.0 เปอร์เซ็นต์

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8-7.0 ต้มแป้งมันสำปะหลังให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารวุ้นใช้ผสมวุ้นปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์

1. การหาน้ำหนักแห้ง (นิสา, 2537)

1.1. นำฟอยด์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง (desiccator) แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

1.2. นำตัวอย่างวัตถุดิบทางการเกษตรประมาณ 22.5 กรัม ใส่ฟอยด์ที่อบไว้แล้ว

1.3. นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อบจนได้น้ำหนักคงที่ใช้เวลาประมาณ 12 – 24 ชั่วโมง

1.4. นำออกมาใส่โถอบแห้ง 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

1.5. นำไปอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักฟอยด์มาหักออกเป็นค่าน้ำหนักแห้ง

2. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ใช้วิธีการเดียวกับการหาน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อได้น้ำหนักแห้งแล้ว ให้นำมาหักออกจากน้ำหนักตัวอย่างก่อบอบ ก็จะได้ค่าความชื้นของตัวอย่าง นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

3. การคำนวณหาสารสี (วรรณภา, 2529)

นำตัวอย่างประมาณ 1 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเหมาะสม แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์สารโมนาโคลินด้วยเครื่อง spectrophometer (ดัดแปลงจาก Yu and Zhu, 1998 และ Zhang and Liu, 1999)

นำตัวอย่างมาสกัดด้วยสัดส่วนระหว่างตัวอย่าง ต่อ ethyl acetate ที่ 1 ต่อ 10 แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายมา

ผสมกับสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง จนพีเอชสารละลายเป็นกลาง จึงนำไประเหยที่ความดันต่ำ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำของเหลวข้นที่ได้มาละลายด้วยเมทานอล แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นเหมาะสม

5. การวิเคราะห์สารโมนาโคลินด้วยเครื่อง HPLC (ดัดแปลงจาก Lee และคณะ, 2007)

5.1 วิเคราะห์ด้วย HPLC (LC-10 AD VP, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร (spectrophotometer-UV; SPD-10 A VP) ด้วยคอลัมน์ μBondapak TM C18 (3.9x300 mm) ส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้ คือสารละลาย Acetonitrile ความเข้มข้น 55 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

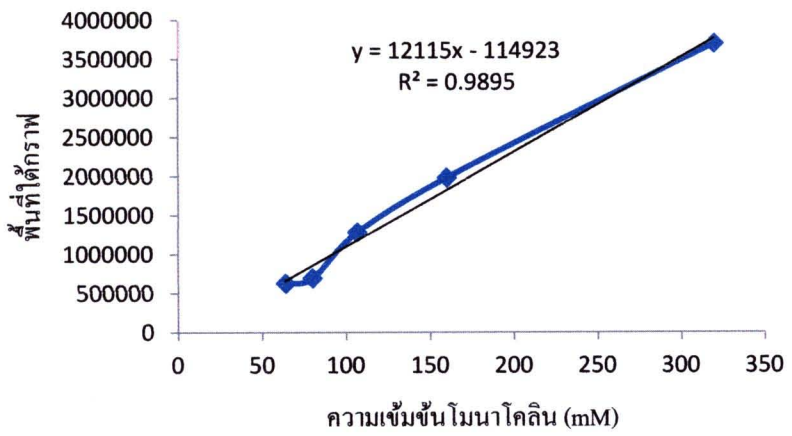
5.2 การเตรียมสารโมนาโคลินมาตรฐาน

5.2.1 นำโมนาโคลินมาตรฐานมาละลายในเอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มข้น 640 มิลลิโมลาร์

5.2.2 นำมาเจือจางเป็นความเข้มข้น 320 160 106.67 80 64 มิลลิโมลาร์

5.2.3 นำสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น มาผสมกับอะซิโตไนไตรท์ในอัตราส่วนของ อะซิโตไนไตรท์ : สารมาตรฐาน (55:45) จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์

5.2.4 นำพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ข-1 กราฟมาตรฐานโมนาโคลินและพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จาก HPLC

7. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีการ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)

7.1 สารเคมี

7.1.1 สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ชั่งน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดให้ได้ปริมาณ 1.0 กรัม ใส่ในฟลาสก์ปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (สารละลายมาตรฐานกลูโคส) จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 ถึง 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.1.2 สารละลาย Somogyi แบ่งการเตรียมออกเป็น 2 ส่วน

7.1.2.1 ละลายโปแตสเซียม-โซเดียมทาร์เตรท 12 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัม ในน้ำกลั่นต้ม ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติม $CuSO_4.5H_2O$ 4 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กวนให้สารละลายผสมกัน จากนั้นเติม $NaHCO_3$ 16 กรัม

7.1.2.2 ละลาย anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด ทิ้งไว้ให้เย็น

นำสารละลายในข้อ 7.1.2.2 เติมลงในสารละลาย 7.1.2.1 ปรับปริมาตรให้ครบเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

7.1.3 สารละลาย Nelson แบ่งการเตรียมออกเป็น 2 ส่วน

7.1.3.1 ละลาย ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร

7.1.3.2 ละลาย $Na_2HAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ 7.1.3.2 เติมลงในสารละลาย 7.1.2.1 ปรับปริมาตรให้ครบเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 20 – 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

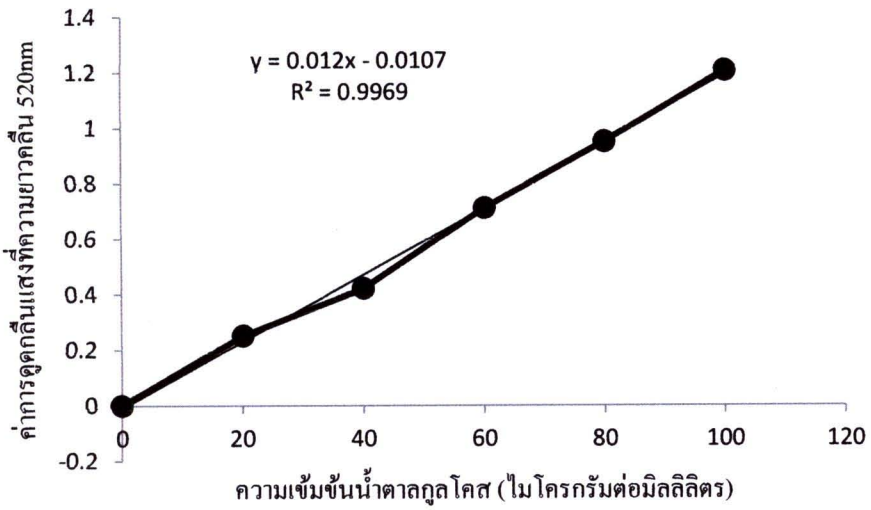
7.2.2 ใส่สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ

7.2.3 เติมสารละลาย Somogyi ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

7.2.4 เติมสารละลาย Nelson ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที

7.2.5 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นน้ำตาล

7.2.6 สำหรับตัวอย่างที่จะหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ก็วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 7.2.2 – 7.2.5 ถ้าตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลสูง ก็ต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้ และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ กราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายกลูโคสมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสง

86. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (วรรณภา, 2529)

8.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

8.1.1 เตรียม acetate buffer พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ โดยสารละลาย A : 0.2 M acetic acid (เตรียมโดยละลาย Acetic acid 11.55 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) และสารละลาย B : 0.2 M sodium acetate (เตรียมโดยละลาย CH_3COONa 16.4 กรัม หรือ $CH_3COONa.3H_2O$ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) หลังจากผสมสารละลายทั้ง 2 จนได้พีเอช 4.5 แล้ว นำมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นเป็น 50 มิลลิโมลาร์ เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

8.1.2 เตรียมสับสเตรท (น้ำแป้ง) สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ นำแป้งน้ำหนัก 1.0 กรัม มาละลายในสารละลาย acetate buffer พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 80 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้แป้งละลาย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

8.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์

8.2.1 นำสารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเจือจางด้วย สารละลาย acetate buffer พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ

8.2.2 เติมสารละลายสับสเตรท ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

8.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

8.2.4 หยดปฏิกิริยาด้วยการนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

8.2.5 นำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Nelson-Somogyi ต่อไป

การหากิจกรรมเอนไซม์ คำนวณได้จากปริมาณน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครกรัม ในเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40

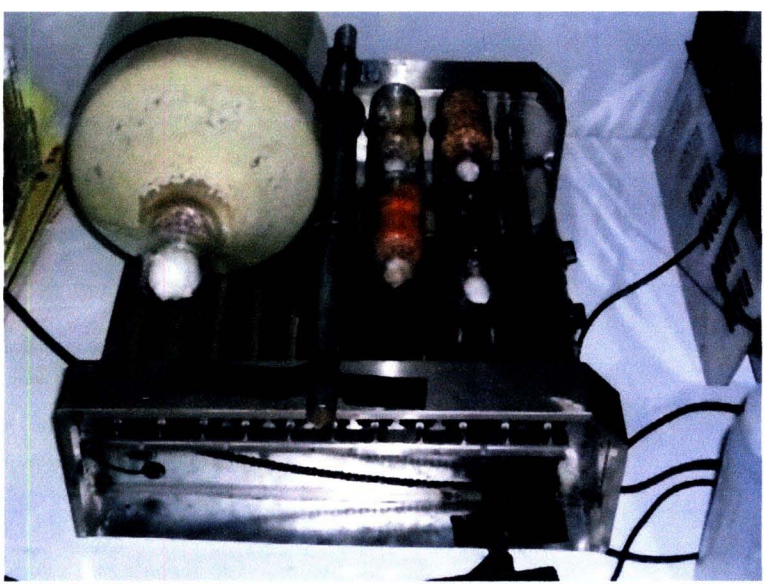
7. การวิเคราะห์ citrinin (ดัดแปลงจากวิธีของ Gimeno and Martins, 1983 และ Bacha และคณะ, 1988)

โดยนำตัวอย่าง 30 กรัม มาอบแห้ง แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นนำผงตัวอย่างประมาณ 2.5 กรัม ใส่ฟลาสต์ขนาด 250 มล. ที่มีสารสกัด ปริมาณ 20 มิลลิลิตร (acetonitrile (9 ส่วน) : 4% aqueous KC1 (1 ส่วน) ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนใสไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (evaporator) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำของเหลวข้นมาละลายด้วย Chloroform ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำมาจุดลงบน TLC plates () แล้วนำไปแช่ในสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย tolune : ethylacetate : chloroform (80:70:50) และ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดฟอร์มิก (formic acid) ความเข้มข้น 90 % หลังจากส่วนเคลื่อนที่เดินทางไปจนสุดขอบด้านบนของ TLC แล้วจึงนำไปอบแห้ง แล้วจึงสังเกตุด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ซึ่งซิตรินินแสดงเป็นวงสีเหลืองเรืองแสง โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานซิตรินิน ทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันผลด้วยการพ่นสารละลาย aluminium chloride (2 กรัม $AlCl_3.6H2O$ ในเอทานอล 100 มล.) บนแผ่น TLC แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปสังเกตุใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 365 นาโนเมตร พบว่าวงสีเหลืองเรืองแสง (ของซิตรินิน) กลายเป็นวงสีฟ้าเรืองแสง

ภาคผนวก ค.

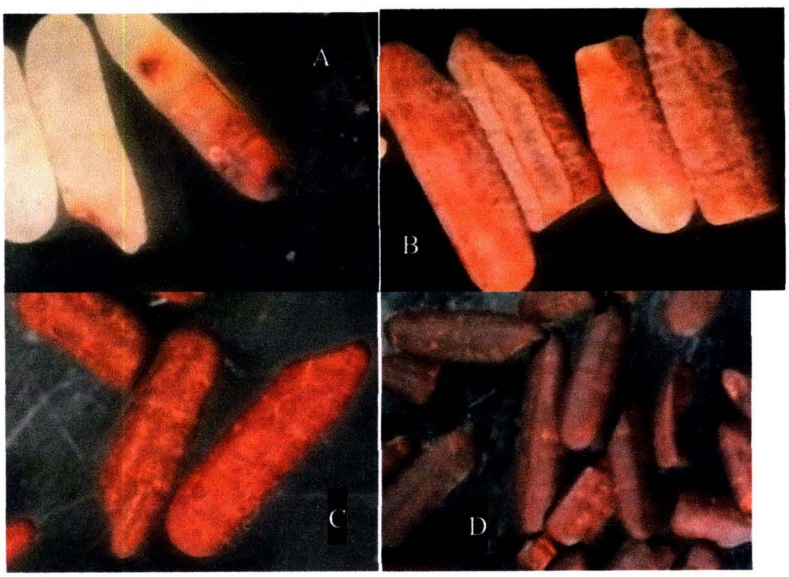
รูปภาพแสดงการทดลอง

<u>ภาพที่ ค-1</u> ลักษณะเชื้อเริ่มต้นในรูปของเส้นใยเชื้อรา โดยเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ใน อาหารเหลว SS medium บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



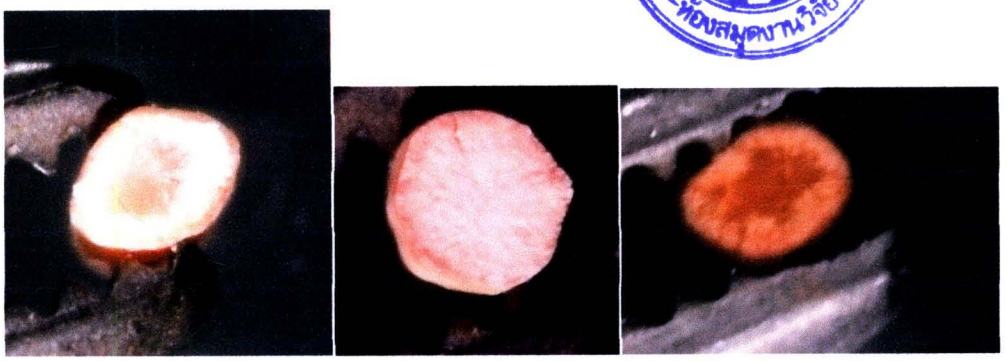
<u>ภาพที่ ค-2</u> การเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวดบนเครื่องหมุน

ภาพที่ ค-3 ลักษณะการเจริญของเชื้อราบนธัญพืชมันสำปะหลัง และมันฝรั่ง ซึ่งพบการเกาะตัวเป็นก้อนอันแน่น



ภาพที่ ค-4 แสดงการเจริญของเชื้อบนข้าว (A) สัปดาห์ที่ 1 (B) สัปดาห์ที่ 2 (C) สัปดาห์ที่ 3 และ (D) สัปดาห์ที่ 4

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



<u>ภาพที่ ค-5</u> **แสดงการแทงเส้นใยเชื้อราเข้าไปยังภายในของเมล็ดข้าว ในกรณีที่เชื้อเจริญในสภาวะเหมาะสม**

<u>ภาพที่ ค-6</u> **แสดงเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในขวดที่บรรจุข้าวปริมาณ 50 กรัม และเติมน้ำ 20 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์**