บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีทดลอง

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

- ข้าวเจ้าพิจิตร
- ข้าวซ้อมมือ
- ข้าวหอมมะลิ
- *Monascus purpureus* ATCC 16365; สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- *Monascus purpureus* BCC 6131; สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- *Monascus purpureus* FTCMU; ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- *Monascus purpureus* DMKU; สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์

- ถุงโพลิเอทธิลีน ขนาด 8 × 12 นิ้ว (Polyethylene bag 8" × 12")
- คอขวดพลาสติก
- สำลี
- แท่งเหล็กไร้สนิม (stainless steel) กลวงปลายกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11.5 มิลลิเมตร
- เครื่องชั่งทศนิยม 1 ตำแหน่ง (Chyo, Japan)
- ตะเกียงบุนเสน
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave: Gallenkamp, England)
- อะลูมิเนียมฟอยล์ (Diamond, USA)

2.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (Minolta Camera, CR-300, Japan)
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Labomed, Spectro 22, USA)
- กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร)
- เครื่องปั่น (Imarflex model IF-308, Thailand)
- ถ้วยโลหะพร้อมฝาสำหรับหาความชื้น (Moisture can)
- โถแก้วดูดความชื้น (Desiccator)
- ตู้อบควบคุมอุณหภูมิสำหรับหาความชื้น (Kottermann, model 271, Germany)
- ตะเกียงบุนเสน
- หม้อนึ่งความดัน (Gallenkamp, England)

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- pH meter (Concort, model P800, Belgium)
- โกร่งหิน (สำหรับบดข้าว)
- บีกเกอร์แก้วขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (Pyrex, USA)
- ชุดตรวจวัดสำเร็จรูปสำหรับตรวจซิตรินิน (R-Biopharm GmbH, Ridascreen Fast, Germany)
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precisa, model XT320M, France)
- กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร)
- ไมโครปิเปตขนาด 5, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร(Biohit, Proline, Finland)
- ไมโครทิบขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Scientific Plastic, USA)
- เครื่องเขย่า (Vortex Genie 2, model G-560b, USA)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับตรวจวัดชุดตรวจ ELISA (Bio-Tek Instrument, Biokinetic Reader, USA)
- กล่องบ่มชุด ELISA (Organon Teknika NV, Heating Block Microelisa System, Belgium)
- ขวดแก้วพร้อมจุก (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
- ปิเปตแบบ volumetric pipette ขนาด 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร
- ปิเปตแบบ measuring pipette ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar)

3. สารเคมี

- น้ำกลั่น
- Sodium acetate anhydrous (Fluka, Switzerland)
- Mono sodium glutamate (Merck, Germany)
- Potassium dihydrogen phosphate (M&B, USA)
- Di-potassium hydrogen phosphate (Merck, Germany)
- Magnesium sulfate heptahydrate (Merck, Germany)
- Calcium chloride anhydrous (Merck, Germany)
- Ferrous sulfate heptahydrate (M&B, England)
- Zinc sulfate heptahydrate (Fluka, Switzerland)
- Manganese sulfate monohydrate (Merck, Germany)
- Glucose (Merck, Germany)
- Methanol (Lab-Scan Ltd., Ireland)
- Ethanol (Lab-Scan Ltd., Ireland)
- Ammonium hydroxide (J.T. Baker, Holland)
- Potato Dextrose Agar (Difco, France)
- Amylose (Fluka, Switzerland)
- Sodium hydroxide
- Iodine
- Potassium Iodine
- Glacial acetic acid

4. เครื่องประมวลผลข้อมูล

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

แผนการทดลอง

1. การทดลองศึกษาข้าวแดงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส 4 สายพันธุ์ ในข้าว 3 ชนิด

การทดลองนี้เป็นการศึกษาถึงอิทธิพลของชนิดข้าว และสายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัสต่อคุณสมบัติของข้าวแดงที่ได้หลังการหมัก โดยทำการหาปริมาณอมิโลสในข้าว 3 ชนิด จากนั้นทำการหมักเชื้อราโมแนสคัส 4 สายพันธุ์ คือ *M. purpureus* ATCC 16365, BCC 6131, FTCMU และ DMKU ในข้าว 3 ชนิด คือ ข้าวเจ้าพิจิตร ข้าวหอมมะลิ และข้าวซ้อมมือ จากนั้นทำการตรวจวัดค่าพีเอช ค่าสีแดง และปริมาณซิตรินิน

ก. การเตรียมเชื้อรา

เก็บรักษาเชื้อโดยเขี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ให้เชื้อเจริญที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 3 สัปดาห์ (Blanc และคณะ, 1995(a))

ข. การเตรียมข้าว

ชั่งข้าวสาร 50 กรัม ใส่ในถุงโพลิเอทธิลีน ขนาด 8 × 12 นิ้ว เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร สวมคอขวดพลาสติกที่ปากถุงแล้วปิดฝาด้วยก้อนสำลี หุ้มอีกชั้นด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าในเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง เมื่อถึงกำหนดเวลานำถุงข้าวไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้ถุงข้าวสุกสำหรับเตรียมหมักข้าวแดง (ดัดแปลงจาก เรณู และคณะ, 2543)

ค. การหมักข้าวแดง

นำเชื้อราโมแนสคัสที่เลี้ยงบน PDA ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน มาทำการตัดเจาะด้วยแท่งเหล็กไร้สนิมกลวงปลายกลม ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 11.5 มิลลิเมตร โดยทำการกดตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา จะได้ชิ้นวุ้นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11.5 มิลลิเมตร เปิดฝาถุงข้าวสุกที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการตักชิ้นวุ้นด้วยห่วงเขี่ยเชื้อวางบนข้าวสุกจำนวน 2 ชิ้น ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วันโดยทุกขั้นตอนทำแบบปลอดเชื้อ (ดัดแปลงจาก เรณู และคณะ, 2543) หลังจากนั้นนำข้าวแดงที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอบต่อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้เป็นเมล็ดข้าวแดงอบแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างข้าวแดงที่ได้ไปการตรวจวัดค่าพีเอช ค่าสีแดง และปริมาณซิตรินิน ดังวิธีการต่อไปนี้

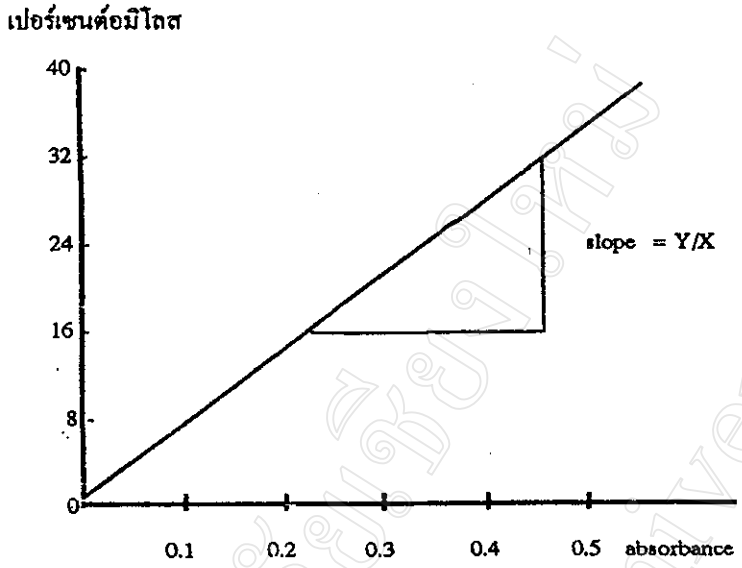
1.1 การหาปริมาณอมิโลส ตามวิธีของ สุนันทา, 2540

วิธีวิเคราะห์

นำข้าวไปบดให้เป็นแป้ง กรองผ่านตะแกรงขนาด 80 เมช (mesh) จากนั้นทำการชั่งแป้งข้าว 0.1 กรัมใส่ในขวดแก้วปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้แป้งกระจาย เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มัล จำนวน 9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นบน magnetic stirrer นาน 10 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เพื่อเป็นสารละลายน้ำแป้ง จากนั้นเตรียมขวดแก้วปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร เติมกรดเกลเซียลอะซิติก 1 นอร์มัล จำนวน 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ทำการดูดสารละลายน้ำแป้ง 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่าปริมาณอมิโลสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การเขียนกราฟมาตรฐาน (standard curve)

ชั่งอมิโลสบริสุทธิ์ 0.04 กรัมใส่ในขวดแก้วปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้แป้งกระจาย เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มัล จำนวน 9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นบน magnetic stirrer นาน 10 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารละลายอมิโลสมาตรฐาน จากนั้นเตรียมขวดแก้วปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด เติมน้ำกลั่นประมาณ 70 มิลลิลิตร เติมกรดเกลเซียลอะซิติก 1 นอร์มัล ปริมาณ 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเติมสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ดูดสารละลายอมิโลสมาตรฐาน ปริมาณ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ด้วย volumetric pipette ใส่ลงในขวดแก้วที่เตรียมไว้ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าปริมาณอมิโลส (แกน y) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน x) โดยค่าปริมาณอมิโลสของสารละลายมาตรฐานเป็น 8, 16, 24, 32 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอมิโลสกับค่า absorbance

1.2 การวัดค่าพีเอช (pH) ตามวิธี AOAC, 1995

นำตัวอย่างข้าวแดง 2 กรัม บดด้วยโกร่งให้ละเอียด ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นบน magnetic stirrer เป็นเวลา 3 นาที นำไปวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ และก่อนใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ทุกครั้งต้องทำการตรวจวัดความถูกต้องของเครื่อง โดยสอบเทียบพีเอชของเครื่องด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และ 4.0 ตามลำดับ

1.3 การวัดค่าสี (ระบบ Hunter Lab)

เตรียมตัวอย่างข้าวแดง โดยใส่ข้าวแดงลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เกลี่ยให้ข้าวแดงกระจายทั่วจาน จากนั้นวัดสีด้วยเครื่อง Minolta Chromameter Minolta CR 300 โดยก่อนใช้เครื่องต้องปรับมาตรฐานของเครื่องวัดสีด้วยแผ่นเทียบมาตรฐานสีขาว (Minolta calibration plate, CR-200 2^0 observer) ทำการวัดสีข้าวแดง 3 จุดของข้าวแดงบนจานอาหาร จุดละ 3 ซ้ำ ค่าที่วัดได้รายงานผลเป็นค่า L, a, b เมื่อ L = the lightness factor (value) และ a, b = the chromaticity coordinate

โดย ค่า L (ความสว่าง) ที่มีค่าใกล้ศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีคล้ำ หากค่า L มีค่าสูงเข้าใกล้ 100 วัตถุจะมีสีขาว สำหรับค่า a (สีแดง-สีเขียว) เมื่อค่าเป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีแดง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว ส่วนค่า b (สีเหลือง-สีน้ำเงิน) เมื่อมีค่าเป็นบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน ทั้งค่า a และ b หากมีค่าเป็นศูนย์ แสดงว่าวัตถุมีสีเทา

1.4 การวัดค่าสี (วิธีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์) (Johns และ Stuart, 1991)

1. นำข้าวแดง 1 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน volumetric flask 100 มิลลิลิตร
2. ทำการแช่เป็นระยะ เพื่อสกัดสีแดงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2
4. นำสารละลายผ่านการกรอง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 500, 470 และ 400 นาโนเมตร สำหรับตรวจวัดค่าสีแดง สีส้ม และสีเหลือง ตามลำดับ โดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์เป็น blank
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการหาค่าสีแดงจาก
   ค่าสีแดง = ค่าการดูดกลืนแสง x 100 x dilution factor (สำหรับตัวอย่างที่มีสีเข้ม)
   โดยค่าสีแดงที่ได้จะมีหน่วยเป็นยูนิตต่อกรัม

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินโดยวิธี ELISA (Abramson และคณะ, 1995)

หลักการ

การตรวจวัดปริมาณซิตรินินจากชุดตรวจวัดสำเร็จรูป ELISA ใช้หลักการของความจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยไมโครเพลทจะเคลือบไว้ด้วยซิตรินิน จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่าง และเติม anti citrinin antibody ซึ่งมีความจำเพาะกับซิตรินิน ระหว่างนี้ซิตรินินที่เคลือบอยู่ที่เพลทกับซิตรินินในสารละลายตัวอย่าง จะแย่งกันจับ anti citrinin antibody ที่เติมลงไป (competitive enzyme immunoassay) หลังผ่านขั้นตอนการล้างจะมีเฉพาะส่วนของ anti citrinin antibody ที่จับอยู่กับซิตรินินบนไมโครเพลทที่ยังคงอยู่ ส่วนสารอื่นๆ จะถูกล้างออกไปหมด จากนั้นเติมแอนติบอดีลำดับที่ 2 ที่ถูกติดไว้กับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในขั้นตอนนี้แอนติบอดีลำดับที่ 2 จะเข้าไปจับกับ anti citrinin antibody ซึ่งจับอยู่กับซิตรินินที่เคลือบไว้บนไมโครเพลท หลังจากทำการล้างส่วนของแอนติบอดีลำดับที่ 2 ที่ไม่ทำปฏิกิริยาจะถูกล้างออกไปหมด จากนั้นเติมสับสเตรทลงไป โดยสับเสตรทที่เติมลงไปจะไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และเปลี่ยนสารละลายที่ไม่มีสีเป็นสารละลายสีน้ำเงิน หลังจากนั้นเติมสารละลายหยุดปฏิกิริยาเพื่อหยุดการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท หลังจากเติมตัวหยุดปฏิกิริยา สารละลายสีน้ำเงินจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นนำไมโครเพลทไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยปริมาณซิตรินินในตัวอย่างจะแปรผกผันกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

การเตรียมตัวอย่าง

ก. ตัวอย่างที่เป็นของแข็ง (ข้าวแดง)

1. ใส่ตัวอย่างข้าวแดงที่บดละเอียด 5 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 12.5 มิลลิลิตร
2. เขย่าเป็นเวลา 3 นาที (ด้วยมือ หรือเครื่องเขย่า)
3. กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1
4. นำของเหลวที่ผ่านกระดาษกรอง 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
5. นำสารละลายที่ได้ไปทดสอบในชุดตรวจซิตรินินสำเร็จรูปต่อไป โดยสารละลายที่ได้จากการสกัดนี้เป็นสารละลายเจือจาง 5 เท่า (dilution factor = 5)

ข. ตัวอย่างที่เป็นของเหลว (น้ำหมัก)

1. ปิเปตตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองซึ่งบรรจุ 7 มิลลิลิตร ของเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
2. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 นาที
3. กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1
4. ปิเปตสารละลายที่ได้ผสมกับน้ำกลั่น และเมทานอล 35 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:1:1
6. นำสารละลายที่ได้ไปทดสอบในชุดตรวจซิตรินินสำเร็จรูปต่อไป โดยสารละลายที่ได้จากการสกัดนี้เป็นสารละลายเจือจาง 10 เท่า (dilution factor = 10)

ขั้นตอนการตรวจวัด

1. ใส่ strip wells ที่ต้องการใช้ลงใน microwell holder แล้วทำการบันทึกตำแหน่งของสารละลายมาตรฐานซิตรินิน และตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดลงบนตารางบันทึกผล (ตารางที่ 3.1)
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานซิตรินินความเข้มข้น 15, 45, 135 และ 405 ppb และสารละลายตัวอย่าง ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ที่ต้องการตรวจวัดลงใน well โดยต้องเปลี่ยนทิปทุกครั้ง
3. เติม anti citrinin antibody ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (18-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที
4. เทของเหลวลงอ่างล้าง เคาะของเหลวออกจากหลุมให้หมด ทำการล้างด้วยน้ำกลั่นโดยใช้กระบอกฉีดน้ำกลั่นล้างแต่ละ well เทน้ำทิ้ง และเคาะเอาของเหลวออก ทำซ้ำ 3 ครั้ง หรือมากกว่า

5. ปิเปต secondary. antibodies labeled with peroxidase (enzyme conjugate) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงแต่ละ well จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง (18-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที

6. ล้างซ้ำตามข้อที่ 4

7. เติม substrate/chromogen 2 หยด (ประมาณ 100 ไมโครลิตร) ลงในแต่ละ well ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการบ่มในกล่องบ่มชุด ELISA (ปลอดแสง) ที่อุณหภูมิห้อง (18-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที

8. เติม stop solution 2 หยด (ประมาณ 100 ไมโครลิตร) ลงในแต่ละ well ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยใช้ air blank (อ่านค่าภายใน 10 นาที)

การคำนวณปริมาณซิตรินิน

สร้างกราฟแบบเซมิล็อกของความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานซิตรินินที่ความเข้มข้นต่างๆ กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซิตรินิน เป็นกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.2) จากนั้นแทนค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง ลงในกราฟมาตรฐาน จะได้ปริมาณซิตรินิน

1.6 ปริมาณความชื้น ตามวิธี AOAC, 1995

การหาปริมาณความชื้นโดยใช้ตู้อบลมร้อน ทำโดยชั่งตัวอย่างข้าวแดงประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงใน moisture can ที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบและปล่อยให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น จากนั้นนำออกมาชั่งน้ำหนัก และทำซ้ำหลายๆ ครั้งจนน้ำหนักที่ได้คงที่ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

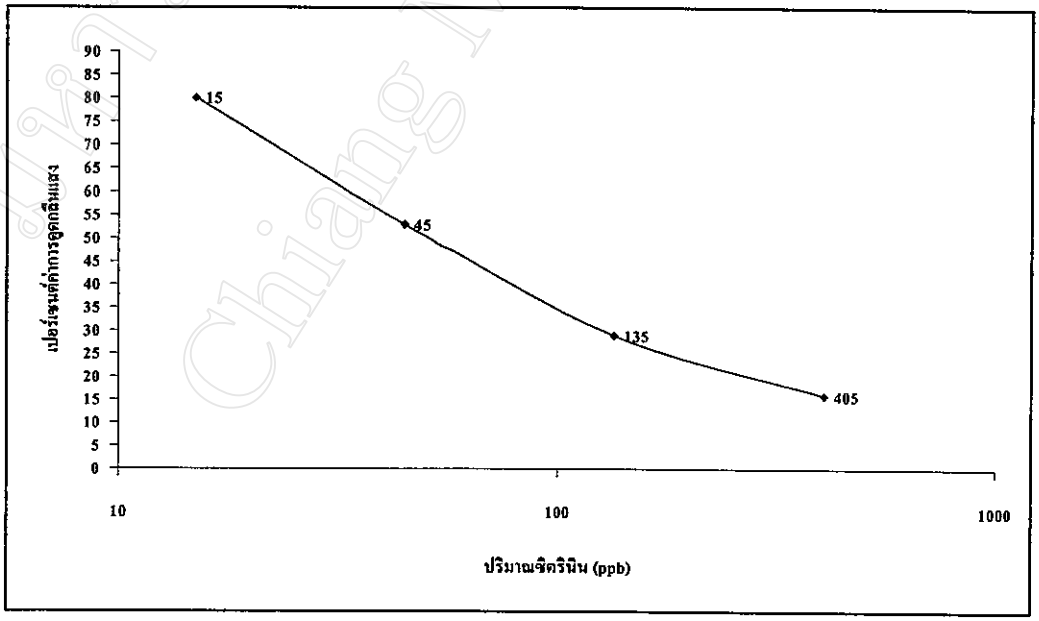
$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้}} \times 100$$

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างตารางบันทึกตำแหน่งการทำ ELISA

Project :.....

Plate No..... Test..... Date.....

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												



รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายซิตรินินมาตรฐาน

2. การปรับปรุงคุณภาพของข้าวแดง

ทำการคัดเลือกชนิดของข้าวที่เหมาะในการผลิตข้าวแดงจากการทดลองที่ 1. เพื่อนำมาทำการปรับปรุงคุณภาพของข้าวแดง โดยในการทดลองนี้มีการเติมโซเดียมอะซิเตตลงในข้าวก่อนทำการหมัก โดยทำการทดลองดังนี้

2.1 การหมักข้าวแดงโดยเชื้อ *M. purpureus* 4 สายพันธุ์ ซึ่งไม่เติมโซเดียมอะซิเตตในข้าวเจ้าพิจิตร

ทำการหมักข้าวแดงตามการทดลองที่ 1. โดยมีการตรวจวัดค่าพีเอช ค่าสีแดง และค่าความชื้นระหว่างการหมักข้าวแดง ในทุก 2 วัน ของการหมัก เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดย

ก. พีเอช ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2

ข. ค่าสีแดง ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.3

ค. ความชื้น ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.6

2.2 การหมักข้าวแดงแบบเติมโซเดียมอะซิเตต

คัดเลือกชนิดของข้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงจากการทดลองที่ 1. จากนั้นทำการหมักข้าวแดงโดยเชื้อรา *M. purpureus* 4 สายพันธุ์ ในข้าวที่มีการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตที่ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 0.005, 0.01, 0.03 และ 0.05 โมลต่อลิตร โดยทำการชั่งโซเดียมอะซิเตตเท่ากับ 0, 0.41, 0.82, 2.46 และ 4.10 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร สำหรับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอะซิเตต 0, 0.005, 0.01, 0.03 และ 0.05 โมลต่อลิตร ตามลำดับ โดยทำการเตรียมข้าวตามแผนการทดลองที่ 1.ข แต่ใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตตที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร แช่ข้าว เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และจากนั้นทำตามขั้นตอนในการทดลองที่ 1. จะได้ข้าวแดงที่หมักโดยเชื้อรา *M. purpureus* 4 สายพันธุ์ ในข้าวที่มีการเติมโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 5 ระดับ จากนั้นนำตัวอย่างข้าวแดงที่ได้ไปตรวจวัดค่าพีเอช ค่าสีแดง และปริมาณซิตรินิน โดย

ก. พีเอช ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2

ข. ค่าสีแดง ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.3 และ 1.4

ค. ซิตรินิน ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.5

3. การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ความชื้น สีแดง และปริมาณซิตรินิน ระหว่างระยะเวลาในการหมักข้าวแดงที่มีการเติมโซเดียมอะซิเตต 5 ระดับ

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา *M. purpureus* 1 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ความชื้น สีแดง และปริมาณซิตรินิน ระหว่างการหมักข้าวแดงที่มีการเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0, 0.005, 0.01, 0.03 และ 0.05 โมลต่อลิตร โดยทำหมักข้าวแดงตามการทดลองที่ 2.2 และมีการตรวจวัด ค่าพีเอช ความชื้น สีแดง และปริมาณซิตรินินระหว่างการหมักทุก 2 วัน ทดลองทำการหมักทั้งสิ้น 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งการตรวจวัดค่าต่างๆ ทำดังนี้

ก. พีเอช ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2

ข. ความชื้น ทำเช่นเดียวกับข่อ 1.6

ค. ค่าสีแดง ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.4

ง. ซิตรินิน ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.5

4. การหมักโดยอาหารเหลวสังเคราะห์

4.1 การเตรียมเชื้อรา

เก็บรักษาเชื้อโดยเขี่ยเชื้อบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ให้เชื้อเจริญที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอใช้ในการทดลองต่อไป ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 3 สัปดาห์ (Blanc และคณะ, 1995(a))

4.2 การเตรียมอาหารเหลวสังเคราะห์

อาหารเหลวสังเคราะห์ประกอบด้วย Monosodium glutamate (MSG) 5 กรัม, K_2HPO_4 5 กรัม, KH_2PO_4 5 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม, $CaCl_2$ 0.5 กรัม, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม, $ZnSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม, $MnSO_4.H_2O$ 0.03 กรัม และ glucose 20 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.5 ด้วย ammonium hydroxide ทำการเตรียมอาหารเหลวตามสูตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร อุดปากขวดด้วยสำลี และปิดทับด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้อาหารเหลวสังเคราะห์เพื่อนำไปผลิตสารสีแดงต่อไป (Blanc และคณะ, 1995(a))

4.3 การหมักสารสีแดง

นำเชื้อรา *M. purpureus* ที่เลี้ยงบน PDA ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน มาทำการตัดด้วยแท่งเหล็กไร้สนิมกลวงปลายกลม ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 11.5 มิลลิเมตร โดยทำการกดตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา จะได้ชิ้นวุ้นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11.5 มิลลิเมตร เปิดจุกสำลีขวดรูปชมพู่ ตักชิ้นวุ้นด้วยห่วงเขี่ยเชื้อใส่ลงในขวดรูปชมพู่จำนวน 2 ชิ้น ทำการหมักโดยหมักทั้งแบบไม่มีการให้อากาศโดยตั้งทิ้งไว้เฉยๆ และแบบให้อากาศโดยทำการเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน (ดัดแปลงจาก Blanc และคณะ, 1995(a)) จากนั้นนำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้ไปทำการตรวจวัดค่าพีเอช ค่าสีแดง และปริมาณซิตรินิน โดย

ก. พีเอช ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2

ข. ค่าสีแดง ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.4

ค. ซิตรินิน ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University