สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส จากกากมันสำปะหลัง

T033510

นายเทพปัญญา เจริญรัตน์
นางสาวอรวรรณ เตมีเจตน์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2541

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 33510
วัน, เดือน, ปี 13 ส.ค. 2542

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of Environmental Factors for Producing Pigment of *Monascus* sp. from Tapioca Solid Waste.

Mr. Theppanya Charoenrat

Miss. Orawan Temeejate

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส จากกากมันสำปะหลัง

โดย นายเทพปัญญา เจริญรัตน์
นางสาวอรวรรณ เตมีเจตน์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ
ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรบัณฑิต

---------- หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

---------- ประธานกรรมการ
(รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

---------- กรรมการ
(ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

---------- กรรมการ
(อาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส
จากกากมันสำปะหลัง

ผู้เสนอ นายเทพปัญญา เจริญรัตน์ รหัส 38054332

นางสาวอรวรรณ เตมีเจตน์ รหัส 38054378

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ

ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

การทดลองครั้งนี้สามารถแยกเชื้อราโมแนสคัส(*Monascus* sp.) จากเต้าหู้ยี้แดงที่ขายในท้องตลาดได้สามสายพันธุ์ สายพันธุ์ที่หนึ่ง(สายพันธุ์ A)สามารถผลิตสารสีแดง ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สายพันธุ์ที่สอง(สายพันธุ์ B)สามารถผลิตสารสีแดง ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร และสายพันธุ์ที่สาม(สายพันธุ์ C)สามารถผลิตสารสีเหลือง ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร พบว่าสายพันธุ์ B ที่ผลิตสารสีแดงสามารถเจริญเติบโตได้ดี และผลิตสารสีได้ในปริมาณสูงที่สุด จึงนำเฉพาะสายพันธุ์ B มาทำการศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีในกากมันสำปะหลัง โดยปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่แหล่งไนโตรเจน และปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส ซึ่งทำการควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็น 32 องศาเซลเซียส และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.8 พบว่าอาหารที่มีกากมันสำปะหลัง 90 เปอร์เซ็นต์ และกากถั่วเหลือง 10 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีการปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมต่อการผลิตสารสีแดงสูงที่สุด โดยให้ปริมาณสารสี 255.60 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 12 ของการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project Title Optimization of Environmental Factors for Producing Pigment of *Monascus* sp. from the Tapioca Solid Waste.

Student Mr. Theppanya Charoenrat

Miss Orawan Temeejate

Department Applied Biology

Special Project Advisor Mr. Mongkol Phensaijai

Asst. Prof. Dr. Nuanphan Naranong

Academic year 1998

ABSTRACT

Three strains of *Monascus* were isolated from sufu purchased from local market. Strains A and B produced red pigment with λmax 500 whereas strain C produced yellow pigment with λmax 370 . Topioca solid waste was used as a substrate for the production of red pigment in solid state fermentation by *Monascus* strain B. Optimal conditions for the high yield of red pigment production were 90 % (w/w) topioca solid waste as sole C - source , 10 % (w/w) solid soy bean waste as sole C - source , 50 % moisture content and an initial pH of 5.8 . *Monascus* strain B was cultured for 12 days at 32°c which gave the highest yield of red pigment of 255.60 units per gram dry weight.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และได้เสร็จลุล่วงมาได้ คณะผู้จัดทำใคร่ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ และ ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ได้สละเวลาให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ และความสะดวกต่างๆ รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขทั้งทางด้านวิชาการและภาษาให้แก่โครงงานฉบับนี้ และกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ผู้เป็นประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้กรุณาช่วยตรวจทานโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ที่ช่วนแนะนำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ อีกทั้งเจ้าหน้าที่ทางห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ได้กรุณาให้ความสะดวก ในการยืมอุปกรณ์ และเบิกสารเคมี และที่จะขาดเสียไม่ได้ คือความอำนวยต่อวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ กากมันสำปะหลัง จากโรงโม่สหมิตรแป้งมัน และแหล่งไนโตรเจน จากวนิดาฟาร์ม จึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ บิดามารดา เพื่อนๆ และรุ่นน้องทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือทุกท่าน

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง	37
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	59
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก ก	67
ภาคผนวก ข	69
ภาคผนวก ค	70
ภาคผนวก ง	71
ภาคผนวก จ	82
ภาคผนวก ฉ	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 กิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกันในเชื้อราโมแนสคัสแต่ละกลุ่ม	7
ตารางที่ 2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส	45
ตารางที่ 3 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยสารละลายซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	49
ตารางที่ 4 ผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส	53
ตารางที่ 5 แสดงองค์ประกอบของสีที่สกัดได้	57
ตารางที่ 1ง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง(OD_{500}) กับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส	72
ตารางที่ 2ง ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในวัตถุดิบ	74
ตารางที่ 3ง ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในวัตถุดิบ	77
ตารางที่ 1จ การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส(ตารางข้อมูลดิบของตารางที่ 2)	82
ตารางที่ 2จ การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยสารละลายซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์(ตารางข้อมูลดิบของตารางที่ 3)	83
ตารางที่ 3จ การศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส (ข้อมูลดิบตารางที่ 4)	84
ตารางที่ 1ฉ การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) ของตารางที่ 2	86
ตารางที่ 2ฉ การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ(ใช้การคำนวณแบบ DMRT) ของตารางที่ 2	86
ตารางที่ 3ฉ การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) ของตารางที่ 3	87
ตารางที่ 4ฉ การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ(ใช้การคำนวณแบบ DMRT) ของตารางที่ 3	88
ตารางที่ 5ฉ การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) ของตารางที่ 4	89
ตารางที่ 6ฉ การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ(ใช้การคำนวณแบบ DMRT) ของตารางที่ 4	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase กับ polyketide syntase 14

รูปที่ 2 แสดงการเกิดสาร 6 – MSA และOrsellinic acid จาก malonyi unit 15

รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างทางโมเลกุลของสารสีที่สกัดได้จากข้าวแดง ซึ่งเกิดจากการเจริญของ *M. anka* 17

รูปที่ 4 แสดง H - NMR และสูตรโครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่ที่ได้จาก *Monascus* sp. KB10 เปรียบเทียบกับสารสีเหลืองของ monascin 18

รูปที่ 5 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส 19

รูปที่ 6 ตัวอย่างเต้าหู้ยี้แดงที่ใช้ในการแยกเชื้อ 24

รูปที่ 7 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง 26

รูปที่ 8 หัวเชื้อสำหรับเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B 30

รูปที่ 9 เครื่องหมุนเหวี่ยง(Centrifuge) ใช้ในการแยกสีที่สกัดได้ 35

รูปที่ 10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง(Spectrophotometer) 36

รูปที่ 11 โหลแก้วสำหรับศึกษาองค์ประกอบของสี(TLC chamber) 38

รูปที่ 12 การเก็บรักษาเชื้อราโมแนสคัสทั้ง 3 สายพันธุ์ 40

รูปที่ 13 การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ A B และ C บนอาหาร PDAเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน 41

รูปที่ 14 การเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง ซึ่งถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ A , B ,และ C เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน 42

รูปที่ 15 การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B บนอาหาร PDA , MY ,และMYS เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน 43

รูปที่ 16 การศึกษาการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B ที่วันที่ 3 , 5 ,และ 7 ของการเพาะเลี้ยง บนอาหาร MY 44

รูปที่ 17 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ต่อปริมาณสีที่ผลิตขึ้น(หน่วย/กรัมน้ำหนักแห้ง) โดยเชื้อราโมแนสคัส เมื่อปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 18 การเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ B ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงบนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ และเติมแหล่งไนโตรเจน 47

รูปที่ 19 ลักษณะของกากมันสำปะหลังและสีที่สกัดได้ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ และเติมแหล่งไนโตรเจน 48

รูปที่ 20 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ต่อปริมาณสีที่ผลิตขึ้น(หน่วย/กรัมน้ำหนักแห้ง) โดยเชื้อราโมแนสคัส เมื่อควบคุมพีเอชด้วยซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ 50

รูปที่ 21 การเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ B ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงบนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมพีเอชด้วย ซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเติมแหล่งไนโตรเจน 51

รูปที่ 22 ลักษณะของกากมันสำปะหลังและสีที่สกัดได้ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมพีเอชด้วย ซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเติมแหล่งไนโตรเจน 52

รูปที่ 23 แสดงผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่ใช้ต่อปริมาณสีที่ผลิตขึ้น(หน่วย/กรัม-น้ำหนักแห้ง) โดยเชื้อราโมแนสคัส เมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแห่งไนโตรเจน 54

รูปที่ 24 การเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ B ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงบนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยเติมกากถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 55

รูปที่ 25 ลักษณะของกากมันสำปะหลังและสีที่สกัดได้ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยเติมกากถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 56

รูปที่ 26 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสี โดยวิธีThin - Layer Chromatography (TLC) 58

รูปที่ 1ง กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 2ง เครื่องย่อยโปรตีน(Digester) 78

รูปที่ 3ง ชุดกลั่น (Distilling unit) 79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

การใช้เชื้อราโมแนสคัส(*Monascus* sp.) ในอุตสาหกรรมการหมักสำหรับการเตรียมข้าวแดงเพื่อใช้เติมในอาหาร และยาพื้นบ้านในประเทศตะวันออกมีมานานหลายร้อยปีแล้ว(Wong,1982) เช่น ในประเทศจีนใช้ทำเต้าหู้ยี้แดง เหล้าแดงที่ชื่อว่าอันจู(Anchu) ในประเทศฟิลิปปินส์จะใช้ข้าวแดงที่บดละเอียดแล้วผสมลงในอาหาร เพื่อให้มีสีสวยงาม และมีกลิ่นหอมน่ารับประทาน ในประเทศไทยนิยมใช้ข้าวแดงผสมยาจีนกันมาก เนื่องจากข้าวแดงมีธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามินบีอยู่ด้วย ซึ่งมากกว่าข้าวสุกที่กินกันอยู่ตามปกติถึง 185 เท่า นอกจากนี้ข้าวแดงยังถูกใช้ในการประกอบอาหารต่าง ๆ เช่น หมูแดง เป็นต้น

มีการบันทึกไว้ว่าการผลิตข้าวแดงมีมานานมากแล้วในสาธารณรัฐประชาชนจีน และได้มีการทดลองแยกเชื้อจากข้าวแดงของประเทศจีน จนในที่สุดก็ทำให้ทราบว่าเชื้อที่ให้สีแดง คือ *Monascus purpureus* (Church, 1920) ข้าวแดงมีชื่อเรียกต่าง ๆ กันมากมาย คือ ข้าวแดง(red rice) ข้าวแดงจีน(chinese red rice) อังคัง(ang-kak) แอนแคก(ankak) แองคา(anka) อังคเวค (angquac) เบนนิโคจิ(beni-koji) อกาโคจิ(aka-koji) ซึ่งเตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus purpureus* ลงในข้าวที่หุงสุกแล้ว หมักเป็นเวลาประมาณ 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการอบแห้งโดยใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนแห้งจะได้ข้าวแดงที่สามารถเก็บไว้ได้นาน(บุษบา, 2540)

พบว่า *Monascus purpureus* บางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีคุณสมบัติเหมาะต่อการใช้ผลิตข้าวแดง กล่าวคือ สามารถผลิตสารสีได้ในปริมาณมากตามต้องการ ในปัจจุบันมีการค้นพบเชื้อในสกุลนี้อีกหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารสี เช่น *Monascus kaoliang* , *Monuscus anka* โดย *Monascus kaoliang* สายพันธุ์ดั้งเดิมจะเหมาะสำหรับการหมักในสภาพอาหารเหลว สำหรับ *Monuscus anka* สายพันธุ์กลายจะมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสารสี และสามารถนำไปใช้ในการผลิตข้าวแดงได้(บุษบา, 2540)

สารสีที่สกัดได้จากเชื้อราโมแนสคัส เป็นสารประเภท Polyketides ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) โดยผลิตขึ้นมาคล้ายกับเส้นทางการผลิตกรดไขมัน (Fatty acid pathway)(บุษบา , 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sweeny และคณะ (1981) สามารถสกัดสารจากโคจิของเชื้อรา *Monascus anka* ได้ 6 ชนิด คือ Monascin และAnkaflavin มีสีเหลือง Rubropunctatin และMonascorubrin มีสีส้ม Rubropunctamide และMonascorubramine มีสีแดง

ต่อมา Yongsmith(1993) พบสารสีเหลืองที่มีโครงสร้างทางเคมีแบบใหม่แตกต่างจาก Monascin และAnkaflavin ซึ่งมีผู้เคยรายงานไว้ก่อนโดยให้ชื่อว่า Yellow pigment II

พบว่าในสภาวะการหมักจริงจะมีสารสีหลายชนิดที่เกิดขึ้นปนกันอยู่ขึ้นกับว่าจะมีสารสีใดมากหรือน้อย เชื้อราโมแนสคัส โดยมากจะสร้างสารสีแล้วสะสมไว้ภายในเส้นใย แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่สร้างสารสีแล้วปล่อยออกมานอกเส้นใยซึ่งเป็นลักษณะที่ต้องการ นอกจากความสามารถในการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส ยังสามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น กลูโคอะไมเลส โปรติเอส แอลฟา-อะไมเลส(บุษบา และวรรณภา, 2527) และยังพบว่าสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) และสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) เช่น เอสเทอร์ สารปฏิชีวนะ(นิสา, 2537) วิตามินบี (รัตนา , 2524)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาการหมักเชื้อราโมแนสคัส ในอาหารเหลว ซึ่งอาจจะเป็นการหมักแบบแบช (Batch culture) แบบป้อนอาหารเป็นระยะ (Fed - batch culture) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้ผลเป็นอย่างดี(บุษบา และวรรณภา, 2527)

จากความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส จากกากมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือจากการผลิตแป้งมันสำปะหลัง อีกทั้งยังมีราคาถูก มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัสที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้แดงที่แยกได้ขายตามท้องตลาด โดยมุ่งเน้นในการหาแหล่งไนโตรเจน และปริมาณความชื้นที่เหมาะสมในการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส จากกากมันสำปะหลัง
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส จากกากมันสำปะหลัง

1.2 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

โครงงานนี้มุ่งศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส จากกากมันสำปะหลัง ได้แก่ แหล่งไนโตรเจน และความชื้น โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบถึงอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส จากกากมันสำปะหลัง
2. เพื่อเป็นการนำกากมันที่เป็นของเหลือทิ้งกลับมาใช้ให้เป็นประโยชน์
3. เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่า หรือลดต้นทุนในการผลิตสีผสมอาหารจากธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัสจัดอยู่ใน Class Ascmycetes Subclass Plectomycetidae Order Euruals (Alexolpoulos และ Mims ,1979) ค้นพบครั้งแรกในปี คศ.1884 โดย Van Tieghem ในการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ *Monascus pilosus* *Monascus purpureus* *Monascus ruber* (Hawksworth และ Pitt ,1983) และ*Monascus floridanus* (Bridge และ Hawksworth ,1985 ; Bamard และ Cannon, 1987) เจริญได้ดีบนอาหารแข็งในรูปของข้างแดง (อั้งคัก) เพื่อใช้ปรุงแต่งสีในไวน์ เต้าหู้ยี้ ใช้ถนอมอาหารประเภทเนื้อ ใช้รักษาโรครวมทั้งใช้สีผสมในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ต่อมาผลิตเป็นการค้าในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน และจีน(Hendry และ Houghton , 1992) เริ่มมีการทดลองเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลวในปี 1973 โดย Lin ได้แยกเชื้อราจากข้าวแดงจากประเทศต่าง ๆ ในแถบเอเชียใต้ และพบว่าเชื้อราเหล่านี้สร้างสารสีในอาหารเหลวได้ดีเช่นกัน

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารสี จึงทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราด้วยวิธีการต่างๆ เช่น ใช้สารก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) หรือใช้รังสีต่างๆ (Wong และ Bau ,1977 ; Hiroi และคณะ , 1979 ;Yongsmith และคณะ ,1990) การใช้เทคนิคโปรโตรพลาสต์ฟิวชัน การปรับปรุงกรรมวิธีในการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบเบ็ดเสร็จ(batch culture) แบบป้อนอาหารเป็นระยะ(fed-batch culture)(สมชาย,2536) และใช้วิธีการตรึงเซลล์ (Evans และ Wang,1984)

เชื้อราโมแนสคัสนอกจากสร้างสารสีแล้ว ยังสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด ในปี 1977 Wong และBau ได้รายงานเป็นครั้งแรกถึงการค้นพบสารต่อต้านแบคทีเรียจากเชื้อรา *M. purpureus* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร *เช่น Bacillus* sp. *Streptococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น สารนี้มีชื่อว่า monascidin A นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ เอทานอล สารโมนาโคลิน (monacolins) ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และสารช่วยในการตกตะกอน(flocculant)อีกด้วย

2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัสจัดอยู่ใน Class Ascomycetes สร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ เส้นใยแตกแขนงมาก และมีผนังกั้น เส้นใยจะมีสีแดงเมื่อเชื้ออายุมากขึ้น การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะสร้างโคนิเดียรูปร่างกลมหรือรูปไข่ อาจมี 1 หรือหลายโคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่อยู่ที่ปลายเส้นใย โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจมีสีแดงหรือสีน้ำตาลอ่อน (Hawksworth และPitt,1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการอธิบายว่าโคนิเดียของเชื้อรา *M. ruber* เกิดจากเส้นใยที่เรียกว่า conidiophores ซึ่งอาจมีลักษณะเป็นเส้นใยตรง ๆ หรือโค้งงอก็ได้ เมื่อเริ่มสร้างโคนิเดียปลายเส้นใยจะพองออกอย่างรวดเร็ว แล้วสร้างผนังกั้นได้เป็นโคนิเดียอันที่สอง เป็นเช่นนี้เรื่อยๆ จนได้โคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่ ลักษณะของโคนิเดียจะมีความยาวตั้งแต่ 5 -12 ไมครอน และกว้าง 4 -12 ไมครอน มีรอยตัดที่ฐานกว้างประมาณ 2 - 3.6 ไมครอน ผนังเรียบไม่มีสีถึงสีน้ำตาลอ่อนโคนิเดียแต่ละอันเกิดจากบริเวณ meristematic zone ซึ่งถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อโคนิเดียที่เกิดขึ้นก่อนเสร็จสมบูรณ์ โดยบริเวณดังกล่าวอยู่ใต้โคนิเดียที่เกิดขึ้นก่อนหน้าเพื่อใช้สร้างโคนิเดียอันถัดมา สายของโคนิเดียจะยาวขึ้น ขณะที่ conidiophore สั้นลง

เชื้อราโมแนสคัสสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยสร้าง perithecium หรือ cleistothecium บนก้านชู(stalk) มีลักษณะเป็น homothallic เริ่มจากเส้นใยเจริญและพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้(antheridium) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย(ascogonium) ซึ่งเจริญอยู่ใต้เส้นใย antheridium เส้นใยบริเวณส่วนบนของ ascogonium จะพัฒนาไปเป็น trichogyne เชื่อมต่อกับ antheridium เพื่อให้นิวเคลียสผ่านเข้าไปผสมกับนิวเคลียสของ ascogonium หลังจากผสมกันแล้ว ascogonium มีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากมีการสร้างผนังขึ้นมาล้อมรอบ 1 - 2 ชั้น ก่อนจะพัฒนาไปเป็น perithecium หรือ cleistothecium เมื่อถึงขั้นนี้ผนังของ asci จะสลายไป พบแต่ ascospore จำนวนแตกต่างกันออกมาในทิศทางตรงกันข้ามกับก้านชู ระยะเวลาการเกิด ascospore ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ จะเริ่มพบ cleistothecium ในอาหารเหลวเมื่อเชื้อราอายุ 24 ถึง 48 ชั่วโมง และพัฒนาไปเป็น ascospore อย่างสมบูรณ์ เมื่ออายุการเลี้ยงเชื้อได้ 96 ชั่วโมง (Carels Spepherd,1975)

Lin (1973) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ R-1 และ S-11 ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *Monascus* sp. F-2 ด้วยสาร NTG จะสร้างสารสีแดง และสีเหลืองได้ดี แต่เจริญช้าและสร้างสปอร์น้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 33.3 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Lin และIizuka (1982) ที่พบว่าการเจริญของ *M. kaoliang* สายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้ดี จะขาดคุณสมบัติในการสร้าง ascospore และ perithecia สร้างโคนิเดียขนาดเล็ก และจำนวนน้อยกว่าสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้ต่ำ

Wong และ Bau (1978) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์กลายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารสีหรือสร้างได้เพียงเล็กน้อย จะเจริญได้เร็วกว่าพันธุ์พ่อแม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร malt extract agar จะสร้างโคนิเดียจำนวนมากและสร้าง cleistothecium ที่ไม่สร้าง ascospore เรียกว่า protocleistothecium ขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่สร้าง cleistothecium ที่สมบูรณ์ ได้จำนวนมาก สำหรับลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารสีจะมีผนังหนามากและแตกแขนงน้อย ส่วนสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้ดีจะมีเส้นใยที่บอบบาง และแตกแขนงมาก

Hawkwort และPitt(1983) แบ่งเชื้อราโมแนสคัสออกเป็น 3 กลุ่ม คือ *M. pilosus* *M. purpureus* และ *M. ruber* โดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ Czapek

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

yeast extract agar(CYA) malt extract agar (MEA) และ 25 เปอร์เซ็นต์ glycerol nitrate agar (G25N) ที่อุณหภูมิต่างๆ และลักษณะการเจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อราทั้ง 3 กลุ่มเจริญในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ได้ดีกว่าสารอนินทรีย์ ต้องการอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกันไป โดยเชื้อราในกลุ่ม *M. pilosus* เจริญบนอาหาร CYA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่า 37 องศาเซลเซียส ส่วน *M. purpureus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิทั้งสองได้ดีใกล้เคียงกัน *M. pilosos* มีลักษณะต่างจาก *M.ruber* คือสร้างสารสีแดงบนโคโลนี โคนิเดียต่อกันเป็นสายสั้นๆ สร้าง *cleistothecia* ไม่มีสีขนาดเล็กกว่า และ *ascospore* มีขนาดสั้นและแคบกว่า สำหรับ *M. ruber* คือสร้างสารสีแดงบนโคโลนี โคนิเดียต่อกันเป็นสายสั้นๆ สร้าง cleistothecia ไม่มีสีขนาดเล็กกว่า และ ascospore มีลักษณะสั้นและแคบกว่า สำหรับ *M. ruber* สร้างสีน้ำตาลอ่อนบางโคโลนี โคนิเดียมีลักษณะกลมต่อกันเป็นสายยาว และสร้าง cleistothecia สีน้ำตาล ส่วน *M. purpureus* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้ช้ากว่า *M. ruber* และ *M. pilosus* ขณะที่สร้างสีส้มหรือแดงบนอาหาร CYA และ MEA และสร้าง ascospore ได้มากกว่า *M. ruber*

ต่อมา Barnard และ Cannon(1987) พบเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ใหม่จากเนื้อเยื่อของต้นสน ในรัฐฟลอริดา มีลักษณะแตกต่างจากสายพันธุ์ทั้งสามที่กล่าวมาข้างต้น ให้ชื่อเชื้อราสายพันธุ์ใหม่นี้ว่า *M. floridanus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีลักษณะทั่วไปใกล้เคียงกับ *M.ruber* มากที่สุด แต่เจริญได้ช้าและสร้างโคนิเดียขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น

เชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์คือ *M. pilosus* *M. purpureus* *M. ruber* และ *M. floridanus* นอกจากจะแตกต่างกันทางด้านสรีรวิทยาแล้ว ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยังต่างกันอีกด้วย เชื้อราที่อยู่ในกลุ่มของ *M. pilosus* จะพบกิจกรรมเอนไซม์ β-galactosidase และα-glucosidase เชื้อราในกลุ่ม *M. purpureus* พบกิจกรรมเอนไซม์ polypectase แต่พบเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสได้เฉพาะในกลุ่มของ *M. ruber* เท่านั้น ส่วน *M. floridanus* เป็นสายพันธุ์เดียวที่พบกิจกรรมเอนไซม์ trypsin แต่ไม่พบเอนไซม์ valine arylamidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเชื้อรากลุ่มอื่น (Bridge และ Harksworth ,1985 ; Barnard และ Cannon, 1987) (ตารางที่1)

สมชาย(2536) เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายพันธุ์ KB20M10.2 ซึ่งสร้างสารสีเหลืองได้ที่พีเอชเป็นกลาง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 ซึ่งสร้างสารสีแดง บนอาหารแข็ง 4 ชนิด คือ PDA GYP SS และYM agar พบว่าสายพันธุ์พ่อแม่เจริญได้เร็ว และให้เส้นใยลักษณะฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด ขณะที่เชื้อรากลายพันธุ์ KB20M10.2 เจริญช้าสร้างเส้นใยสั้นๆ ติดกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบการเจริญน้อยมากบนอาหาร PDA agar ส่วนการเจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ ให้ลักษณะการเจริญ ขนาดของเส้นใย โคนิเดีย และ cleistothecium ใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่1 กิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกันในเชื้อราโมแนสคัสแต่ละกลุ่ม

กิจกรรมเอนไซม์	*M. floridanus*	*M. pilosus*	*M. purpureus*	*M. ruber*
Valine aryamidase	-	+	+	+
Cystine arylamidase	-	-	+	-
Trypsinase	+	-	-	-
α-galactosidase	-	+	-	+
β-galactosidase	-	+	-	-
α-glucosidase	-	+	-	-
Polypectase pH 6.0	-	-	+	-
Cellulose hydrolysis	-	-	-	+

ใช้ API ZYM *strip tests* ทดสอบกับเชื้อราที่มีอายุ 14 วัน

ที่มา : Bridge และ Hawsworth (1985)

2.3 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส

2.3.1 การเลี้ยงเชื้อราในสภาพหมักแห้ง(*solid cultivation*)

ข้าวแดงหรือฮั้งคัก เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนข้าวนึ่งรู้จักกันมาช้านานในประเทศจีน และประเทศแถบเอเชียใต้ เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น เชื้อราที่เจริญบนข้าวสามารถ สร้างสีออกมานอกเซลล์ได้มาก ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี จึงสร้างสารสีออกมานอกเซลล์ได้มาก ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสร้างสารสีได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว(Johnsและ Stuart, 1991) ซึ่ง Palo และคณะ (1960) ได้ปรับปรุงคุณภาพของข้าวแดง โดยใช้เชื้อราแดงและสับสเตรทที่เหมาะสม ในปี 1982 Lin และ Lizuka ศึกษาการสร้างสารสีนอกเซลล์ของเชื้อรากลายพันธุ์ *M. kaoliang* R - 1087 สร้างสารสีได้ดีมากบนอาหารแข็งเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะ mantou meal ให้ปริมาณสารสีสูงสุด 3852.8 และ 4816.9 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่ให้ปริมาณสารสีเพียง 62.2 และ 47.4 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งที่ความยาวคลื่น 400 และ 500 นาโนเมตร ตามลำดับ การสร้างสารสีนอกเซลล์ได้มากขึ้นเป็นผลมาจากความสามารถในการปล่อยสารสีออกนอกเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ และสมดุลกับสารสีที่สังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์

การผลิตข้าวแดงให้มีคุณภาพดีขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญหลายประการ ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์เชื้อรา และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ความชื้นเริ่มต้นของข้าวสำคัญมากต่อการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเพื่อประโยชน์ทางการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดและปริมาณของสารสีที่เชื้อราสร้างขึ้น ความชื้นเริ่มต้นที่ต่ำเกินไปทำให้เชื้อราเจริญและให้สารสีลดลง แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงเกินไปทำให้การเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นไปได้ดี จึงมีการสะสมกลูโคสมากขึ้น และนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลแทนสารสี นั่นคือปริมาณกลูโคสที่สูงเกินไปจะยับยั้งการสังเคราะห์สารสีนั่นเอง ซึ่ง Lontong และ Suwanarit (1990) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงของเชื้อรา *Monascus* sp. NP1 ในถุงพลาสติกคือ 32.6 เปอร์เซ็นต์ และที่ความชื้นเริ่มต้น 39.6 เปอร์เซ็นต์ และที่ความชื้นเริ่มต้น 39.6 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้การสร้างสารสีลดลง

Johns และ Stuart(1991) พบว่า *M. purpureus* จะสร้างสารสีได้น้อยเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 38.0 - 39.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงขึ้นเป็น 56.0 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 การสร้างสารสีจะเป็นไปได้ดี

Chiu และ Chan(1992) ศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* บนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ ชานอ้อย โดยเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อบนขวดหมุน(roller bottle) ความเร็ว 2 รอบต่อนาที กับตั้งทิ้งไว้เฉยๆ พบว่าการใช้ระบบขวดหมุน เชื้อราจะสร้างสารสีแดงและสารสีเหลืองได้ดีกว่าตั้งทิ้งไว้เฉยๆ ประมาณ 2 - 3 เท่า แต่ก็ยังให้สารสีน้อยกว่าในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยกลูโคส เปปโตน และยีสต์เอกซ์แทรค นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมน้ำมันข้าวโพดปริมาตร 0.6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว ทำให้การสร้างสารสีนอกเซลล์เพิ่มขึ้น 2 เท่า แต่การเจริญลดลง

รัตนาภรณ์ (2531) พบว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีผลในการยับยั้งการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยทำการเติมซิเตรตบัฟเฟอร์ลงในข้าวเพื่อควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง

เชิดชัย และคณะ(2519) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงของ *M. purpureus* K001 บนเมล็ดข้าว คือ 60.0 เปอร์เซ็นต์ การเขย่าหรือให้อากาศช่วยให้เชื้อราสร้างสารสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวมีเพียงพอต่อการสร้างสารสีอยู่แล้ว การเติมเปปโตนเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนไม่มีผลใดๆต่อการสร้างสารสีเลย

พลายแก้ว และบุษบา(2534) ศึกษาผลของวัตถุดิบจำพวกคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ต่อการเจริญ การสร้างสารสี และการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *M. kaoliang* พบว่าขนมปังให้ปริมาณสารสีมากที่สุดเท่ากับ 862 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่าง และสร้างสปอร์ได้ดีพอสมควรส่วนมันฝรั่งและปลายข้าวพันธุ์ดอกมะลิให้ปริมาณสารสีได้ดีรองลงมา เท่ากับ 502 และ317 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างตามลำดับ สำหรับการสร้างสปอร์ดีที่สุดเมื่อใช้ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบรองลงมาคือ ถั่วเขียวและขนมปัง ต่อมาได้ศึกษาสภาพของวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. kaoliang* ซึ่งเป็นสายพันธุ์สร้างสารสีแดงดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร พบว่าเมื่อใช้เวลาแช่ข้าวนาน 9 ชั่วโมง และสะเด็ดน้ำเป็นเวลา 5-10 นาที ทำให้ข้าวมีความชื้นเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดง สารสีเหลือง และสร้างสปอร์ของเชื้อรามากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าการแช่ข้าวในสารละลายกรด ไม่มีผลต่อการสร้างสารสีเหลืองหรือสร้าง สปอร์ของเชื้อรา *M. barkari* (พลายแก้ว และ บุษชา, 2534 II)

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อราในสภาพหมักเปียก(submerged cultivation) ต้องปัจจัยต่างๆดังนี้

2.3.2.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.2.1.1 แหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน

ในปี 1973 Lin คัดเลือกเชื้อราที่เจริญได้ดีในอาหารเหลวจากโคจิที่ใช้ทำเหล้าเกา เหลียง พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 สร้างสารสีได้ดี เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้ง น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลกาแลคโตส ตามลำดับ

Su และ Huang(1980) พบว่า *M. anka* V-204 ให้ปริมาณสารสีต่อน้ำหนักแห้งสูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในแป้งข้าวเจ้า 5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสีส่วนใหญ่จะเก็บไว้ในเซลล์เท่ากับ 109.0 หน่วยมิลลิลิตร มีเพียง 9.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ปล่อยออกนอกเซลล์

Broder และKoehler(1980) พบว่าทั้งเชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 สร้างสารสีแดงได้ดีที่สุด ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลมอลโตสเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ โดยสร้างสารสีแดงดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 634 นาโนเมตร รองลงมาเป็นน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 15.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราสร้างสารสีแดงดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 627 และ 625 นาโนเมตร ตามลำดับ

Wong และKoehler(1981) ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส และแหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมไนเตรท ต่อการเจริญ และการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* N11S พบว่าเมื่อใช้กลูโคส 40.0 กรัมต่อลิตร จะใช้แอมโมเนียไนเตรตเพียง 0.5 กรัมต่อลิตร สำหรับการเจริญและการสร้างสารสี เมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงขึ้น ความต้องการแหล่งไนโตรเจนก็จะมากขึ้นด้วย

Lin และDemain(1991) พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB6042 ในอาหารเหลวชนิด defined medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์ตรินจะให้การเจริญดีที่สุด รองลงมาได้แก่ แป้ง กลูโคส มอลโตส และฟรุคโตส แต่ไม่พบการเจริญใน กาแลคโตส แลคโตส และซูโครส ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีคือมอลโตส กลูโคส และฟรุคโตส ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ 10.0เปอร์เซ็นต์

Yongsmith และคณะ(1993) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 ซึ่งสร้างสารสีเหลืองได้ดีที่พีเอชเริ่มต้น 2.5 เจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ แต่สร้างสารสีเหลืองดีที่สุดเท่ากับ 78 และ 74 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 4.0 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วรรณภา(2529) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. KB21035 KB20322 และKB11304 สร้างสารสีแดงนอกเซลล์ได้ดีเท่ากับ 70.07 51.30 และ98.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 2.0 2.5 และ3.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับต่อมาสุภาพร(2531) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* sp. KB11304 โดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และรังสีต่างๆ พบเชื้อรากลายพันธุ์ KBU2069 และKBN4069 สามารถสร้างสารสีแดงได้ดีขึ้น และเมื่อศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงตั้งแต่ 0 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ KBN4069 ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ ในการสร้างสารสีแดงได้ดีเช่นเดียวกับสายพันธุ์พ่อแม่ KB11034 ขณะที่เชื้อรากลายพันธุ์ KBU2069 สร้างสารสีแดงได้ใกล้เคียงกันที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 3.0 และ 4.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์บนอาหารวุ้น minimal medium คือ แซคคาโรส มอลโตส และแป้งมันสำปะหลัง แต่เจริญได้เพียงเล็กน้อยในกาแลคโตส

สมชาย(2536) คัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2 ที่สร้างสารสีเหลืองในอาหารพีเอชเป็นกลาง พบว่าเจริญได้ดีในน้ำตาลทรายโมเลกุลคู่ เช่น แลคโตส หรือซูโครส แต่สร้างสารสีเหลืองได้ดีในน้ำตาลหลายโมเลกุล เช่น แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวเจ้า soluble starch และแป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น เมื่อเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลือง คือ 3.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 4.0 เปอร์เซ็นต์

2.3.2.1.2แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญ การสร้างสารสี และชนิดของสารสีที่เชื้อราสร้างขึ้น Lin (1973) พบว่า *Monascus* sp.F-2 ใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิดในการสร้างสารสีแดง ได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนเปปโตนและยีสต์เอกซ์แทรคไม่เหมาะจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับสร้างสารสีแดง เช่นเดียวกับการทดลองของ Su และ Huang (1980) ที่พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงของเชื้อรา *M. anka* V-204 คือ โมโนโซเดียมกลูตาเมท ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Broder และ Koechler (1980) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 สร้างสารสีแดงดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 611 นาโนเมตร ได้ดีที่สุด เมื่อใช้ยีสต์เอกซ์แทรคความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

Carels และ Shepherd(1977) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารสี และสปอร์ของเชื้อราโมแนสคัส จำนวน 39 สายพันธุ์ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยีสต์เอกซ์แทรค หรือไนเตรท ที่พีเอชของการเจริญเป็น 6.5 เชื้อราจะสร้างสารสีแดง แต่สร้างสารสีแดงเมื่อแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนีย หรือแอมโมเนียมไนเตรท และพีเอชหลังการเจริญเป็น 2.5 ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.0 -10.0 กรัมต่อลิตร แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อเซลล์ และการสร้างสารสี (Wong และKoehler , 1981) ไนเตรทกระตุ้นการสร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ ขณะที่แอมโมเนียมยับยั้งการสร้างสปอร์

Yongsmith และคณะ(1993) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ ยีสต์เอกซ์แทรค เปปโตน และ มอลท์เอกซ์แทรค ต่อการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 พบว่าเปปโตนกระตุ้นการสร้างสารสีโดยตรง แต่ยีสต์เอกซ์แทรคส่งเสริมการเจริญมากกว่าการสร้างสารสี ส่วนมอลท์เอกซ์แทรคมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารสีน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของวรรณภา(2529) และสมชาย(2536) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้ เปปโตนความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกรดกลูตามิค ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ สร้างสารสีเหลืองได้สูงถึง 86.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ขณะที่สร้างสารสีเหลืองเพียง 40.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว

วรรณภา(2529) ศึกษาการสร้างสารสีแดงของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ KB20135 KB11304 และKB20322 ในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ พบว่าเปปโตนให้สารสีแดงสูงที่สุด รองลงมาคือโปแตสเซียมไนเตรท ส่วนโซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียให้สารสีแดงน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบการสร้างสารสีแดงในแหล่งไนโตรเจนที่เป็น เปปโตน และแป้งถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสายพันธุ์ KB21035 และKB20322 ใช้แป้งถั่วเหลืองในการสร้างสารสีแดงได้น้อยกว่าเปปโตน ขณะที่สายพันธุ์ KB11304 ใช้แป้งถั่วเหลืองในการสร้างสารสีแดงได้ดีกว่าเปปโตน

สุภาพร(2531) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 และเชื้อรากลายพันธุ์ KBU2069 และKBN4069 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแป้งถั่วเหลืองความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 และเชื้อรากลายพันธุ์ KBU2069 สร้างสารสีแดงนอกเซลล์ได้ดีในแป้งถั่วเหลืองความเข้มข้น 4.0 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดปริมาณสารสีได้ 96.4 และ 104.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สมชาย(2536) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลืองของเชื้อราโมแนส-คัสสายพันธุ์ KB20M10.2 พบว่าแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอนินทรีย์ที่ให้สารสีเหลืองได้ดีที่สุด คือ โปแตสเซียมไนเตรท เท่ากับ 21.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือแคลเซียมไนเตรท แอมโมเนียมไน-เตรท และโซเดียมไนเตรท ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ที่ให้สารสีเหลืองสูงที่สุด เท่ากับ 674.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร คือ แป้งถั่วเหลือง รองลงมาเป็นเปปโตน บีฟเอกซ์แทรค ยีสต์เอกซ์แทรค และมอลท์เอกซ์แทรค ได้ปริมาณสารสีเหลือง 434.7 392.5 211.7 และ20.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าแป้งถั่วเหลืองความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลืองมากที่สุด รองลงมา คือความเข้มข้น 4.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.1.3 สารจำเป็นต่อการเจริญ(growth factor)

Johnson และMchan ,1975 พบว่าการเติมวิตามิน 5 ชนิด คือ ไพริดอก ซีน ไบโอติน ไธอะมีน ไนอะมีน และไรโบฟลาวิน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek Dox ไม่มีผลกระตุ้นการเจริญ ส่วนกรดอะมิโน และเกลือแร่ช่วยให้การเจริญเพิ่มขึ้น แต่ยังน้อยกว่าในกรณีที่เติมเปปโตน หรือ ยีสต์เอกซ์แทรค ในจำนวนโลหะ 5 ชนิดคือ แคลเซียม โมลิบดินัม ทองแดง แมงกานีส และ สังกะสี พบว่าสังกะสี 800 ไมโครกรัมต่อลิตร ให้การเจริญดีที่สุดและ การเจริญดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับ กรดอะมิโน ทริฟโต เฟน ลิวซีน กรดแอสปาติก ไทโรซีน ไกลซีน และฮีสติดีน เนื่องจากสังกะสี ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนโดยไปลดค่า economic coefficient (น้ำตาลที่ถูกใช้ไปต่อน้ำหนักแห้ง) จาก 13.1 เหลือเพียง 6.1 นอกจากจะช่วยในการเจริญแล้วสังกะสียัง มีผลต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์อื่นๆ โดยสังกะสีที่ความเข้มข้น 1×10^{-3} โมลาร์ จะกระตุ้นการสร้าง สารสี และสารต่อต้านแบคทีเรีย แต่ถ้าความเข้มข้นสูงขึ้นเป็น 2×10^{-3} โมลาร์ จะเป็นพิษต่อเซลล์ (Wong และ Bau ,1977)

Lin(1973) ศึกษาผลของวิตามินซีที่มีต่อการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 พบว่าวิตามินบีกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสารสีได้ดีขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรด ฟอลิคส่วนสุภาพร(2531) พบว่าเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ ต้องการวิตามินต่างกันไป *Monascus* sp. KB11304 ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ ต้องการไรโบฟลาวินในการเจริญ ขณะที่เชื้อรากลายพันธุ์ต้องการ ไบโอตินมากกว่าไรโบฟลาวิน

2.3.2.2 อุณหภูมิ และพีเอช

Lin(1973) ศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 27 - 40 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 2 - 10 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีคือ 32 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงมากกว่า 37 องศาเซลเซียส การสร้างสารสีจะลดลง ส่วนพีเอชที่ เหมาะสมคือ pH 6.0 รองลงมาคือ pH 5.0 และ pH 7.0 ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงพีเอชในขณะเลี้ยงเชื้อรา ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งไนโตรเจน ถ้าพีเอชเป็น กลางเชื้อจะสร้างสารสีแดง แต่ถ้าพีเอชเป็นกรดจะเปลี่ยนเป็นสร้างสารสีส้ม นอกจากนี้ที่พีเอชเป็นกรด ยังทำให้การสร้างโคนิเดียลดลง แต่การสร้างสารสีจะสูงขึ้น เนื่องจากที่พีเอชต่ำ กลูโคส และฟอสเฟต ถูกใช้ไปในการสร้างเซลล์เป็นจำนวนมาก จึงเหลือเพียงเล็กน้อยสำหรับสร้างโคนิเดีย (Carels และ Shepherd , 1977)

Su และ Huang(1980) พบว่าเชื้อรา *Monascus anka* V-204 สร้างสารสีดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิและพีเอชมีผลน้อยมากต่อการเจริญของ cleistothecium และ conidia คือ 28 - 30 และ 35 - 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะยับยั้งการสร้างสปอร์อย่างสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yongsmith และคณะ(1993) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 สร้างสารสีเหลืองดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ได้ดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ อุณหภูมิ 31 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับโดยอาหารมีพีเอชเริ่มต้นเป็น 2.5 ส่วนอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 40 องศาเซลเซียส และ พีเอช 4.0 ตามลำดับ

วรรณภา(2529) พบว่า *Monascus* sp. KB21035 KB11304 และ KB20322 สร้างสารสีแดงนอกเซลล์ได้ดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เท่ากับ 24.3 68.3 และ 39.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ที่พีเอชต่ำกว่า 3.0 จะสร้างสารสีเหลืองโดยสายพันธุ์ KB21035 สร้างสารสีเหลืองที่พีเอช 2.5 ได้ดีที่สุด

สุภาพร(2531) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ KB11304 และเชื้อรากลายพันธุ์ KBU2069 และ KBN4069 บนอาหาร MYS agar พบว่าสายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 35 และ37 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับเชื้อรากลายพันธุ์ KBU2069 ส่วนเชื้อรากลายพันธุ์ KBN4069 เจริญได้ดี ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิอื่นเจริญได้น้อยมากเมื่อเทียบกับอีกสองสายพันธุ์

สมชาย(2536) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลืองของเชื้อรา กลายพันธุ์ KB20M10.2 คือ 28 องศาเซลเซียส และ พีเอช 7.0 ขณะที่พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็น 4.0

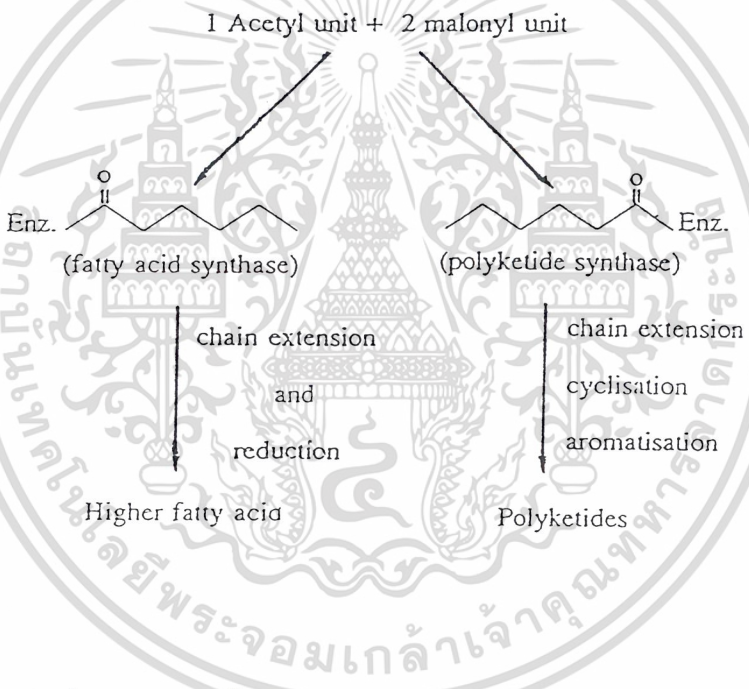
2.4 <u>สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส</u>

2.4.1 สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสเป็นสารประเภท polyketide ที่เกิดจากการรวมตัว (condensation) ของ acetyl unit 1 หน่วย กับ malonyl unit 3 หน่วย ขึ้นไป ได้เป็น primer หรือ starter และปล่อย CO_2 ออกมา วิถีการสังเคราะห์สาร polyketides เหมือนกับกรดไขมันแต่จะไม่พบสารตัวกลางที่เกิดจากปฏิกิริยาการรีดักชัน ในการสังเคราะห์สาร polyketides นั้นสายของ polyketides จะยาวขึ้นตามจำนวนของคาร์บอน 2 หน่วยที่มาจาก malony unit ที่ถูกเติมเข้าไปในสาย primer เกิดเป็น triketide tetraketide pentaketide และ polyketide ตามลำดับ ต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยา cyclisation และaromatisation ได้เป็นสาร 6 - methylsalicylic acid หรือ orsellinic acid ซึ่งเป็นสาร tatraketide เริ่มต้นที่จะนำไปสู่การสังเคราะห์สารpolyketides อื่นๆต่อไป เมื่อได้สารเริ่มต้นแล้วปฏิกิริยาที่จะเกิดขึ้นต่อไป ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์นั้นๆ เช่น อาจมีการเติม หรือดึงออกซิเจนออกจากโครงสร้างของสาร เกิดปฏิกิริยา decarboxylation มีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปหรือยักย้ายหมู่ต่าง ๆ ภายในโมเลกุลของสาร เกิด intra- หรือinter- molecular oxidative coupling หรือให้เกิดพันธะระหว่าง C-C หรือ C=O เป็นต้น (แสดงในภาพที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

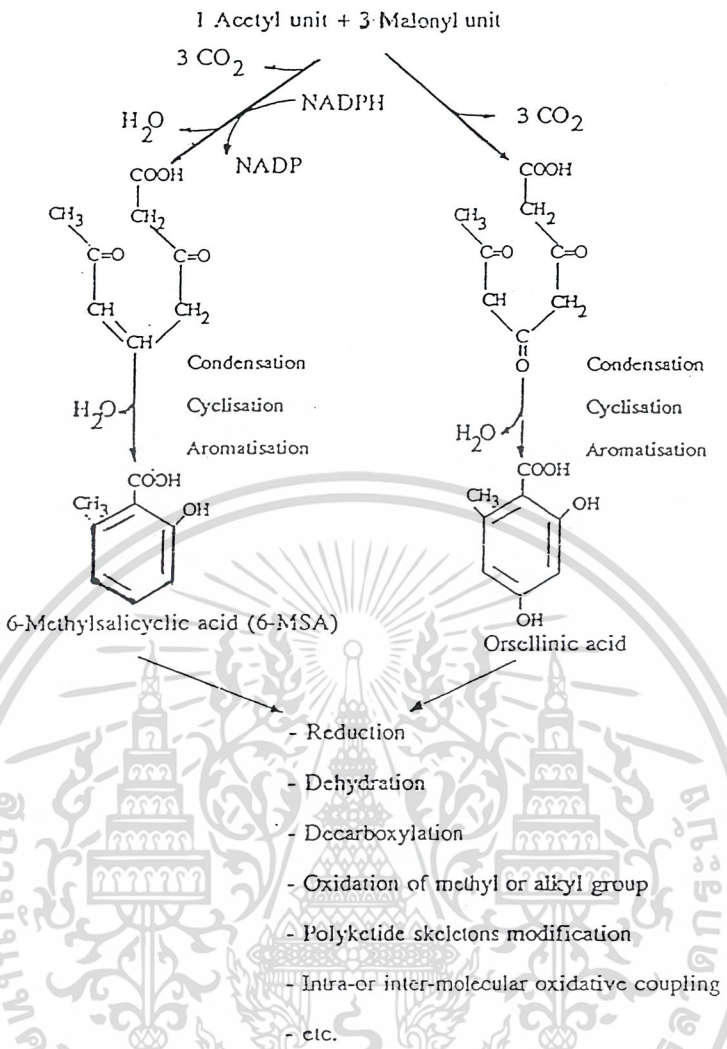
เชื่อว่า polyketide synthase เป็นเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์สาร polyketide ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ fatty acid synthase อย่างใกล้ชิด จากการจำลองตัวเองที่ผิดพลาดของยีนทำให้สูญเสียขั้นตอนรีดักชันไป ทำให้เอนไซม์polyketide synthase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สาร polyketide แทนที่จะเป็น fatty acid synthase ซึ่งมีหน้าที่สังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองแสดงในภาพที่ 2

การสังเคราะห์ polyketide ถูกยังยั้งด้วยแสงสีน้ำเงิน โดยพบว่าแสงสีน้ำเงินจะกระตุ้นให้เชื้อราสร้างโคนีเดีย β - carotene และกรดไขมัน แทนสาร polyketide โดยไปมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์หรือควบคุมวิถีการสร้างสารpolyketide การได้รับแสงสีน้ำเงินในเวลาเพียง 2 นาที ก็สามารถ ยับยั้งการสังเคราะห์สาร polyketideได้แล้ว



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase กับ polyketide syntheses
ที่มา : นิสา(2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 :แสดงการเกิดการ 6-MSA และ Orsekkubuc acid จาก acetyl และ malonyl unit

ที่มา : นิสา(2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 สารสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสเป็นสารเมแทบอไลทต์ทุติยภูมิ(secondary metabolite) ที่เชื้อราสร้างขึ้นพร้อมๆกับการเจริญ(growth associated) หรือสร้างหลังจากการเจริญหยุดลงแล้ว (non-growth awscociated) มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม azaphilones เช่น sclerotionrin และ rotiorin (Nakanishi และ คณะ,1959)

Haws และ คณะ(1959) พบว่าเมื่อนำเส้นใยที่ได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus rubropunctatus* Sato ในอาหารเหลว Czapek Dox อายุ 14 - 20 วัน มาสกัดด้วย light petroleum และ ether ได้สารสีส้มของ rubropunctatin($C_{21}H_{22}O_5$) และสารสีเหลืองของ monascin($C_{21}H_{26}O_5$) สารสีส้ม rubropunctatin ละลายในสารละลายอินทรีย์เกือบทุกชนิด แต่ไม่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ที่อุณหภูมิต่ำ และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายแอมโมเนียจะได้สารสีม่วงของ *rubropunctatamine*($C_{21}H_{23}O_4N$) ที่ละลายในแอลกอฮอล์ได้ดีที่สภาวะเป็นด่าง แต่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ที่สภาวะเป็นกรด และไม่ละลายในน้ำ เมื่อนำมาทำให้เกิดการรีดักชันด้วยผงสังกะสีจะได้สารไม่มีสีของ aporubropunctatamine

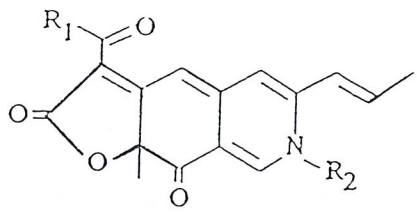
Nakamishi และคณะ(1959) นำสารสี monascorubrin ($C_{23}H_{26}O_5$) ที่แยกได้จากเชื้อรา *M. purpureus* มาทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียจะได้สาร monascamine ($C_{23}H_{27}O_4N$) ซึ่งเมื่อรวมกับสังกะสีจะเปลี่ยนเป็น monascaminone

Manchand และ คณะ(1973) พบว่าเชื้อราโมแนสคัสแต่ละสายพันธุ์ให้สารสีแตกต่างกันออกไป *M. rubropunctatus* Sato สร้างสาร rubropunctatus และ monascin เท่านั้น และ พบการสร้างสารสีเหลืองตัวใหม่จากเชื้อรา *M. anka* มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ monascin มีชื่อว่า ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$) ต่อมาในปี 1981 Sweeny และคณะ ได้ใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ สกัดสารสีออกจากข้าวแดง ซึ่งเกิดจากการเจริญของเชื้อรา *M. anka* พบสารสี 3 กลุ่ม คือสารสีแดง ประกอบด้วย rubropunctamine และ monocorubramine สารสีส้มประกอบด้วย rubropunctatin และ monascorubrin และสารสีเหลืองประกอบด้วย monascin และ ankaflavin โครงสร้างโมเลกุลของสารสีทั้ง 3กลุ่ม แสดงในภาพที่ 3

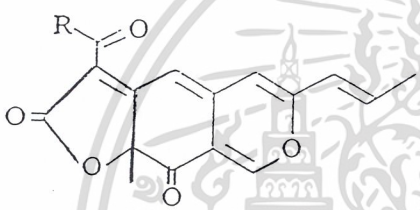
Yongsmith และคณะ(1993) พบโครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง เปปโตน และกรดกลูตามิคที่พีเอชเริ่มต้น 2.5 KB10 สารสีเหลืองดังกล่าวดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 372 และมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{22}H_{23}O_5$ โครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่นี้แสดงในภาพที่ 4

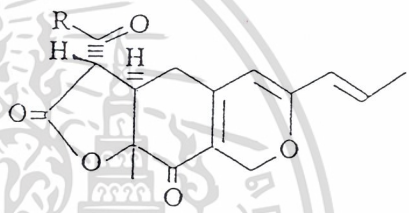
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



		R_1	R_2
1	Rubropunctamine	$n\text{-}C_5H_{11}$	H
2	Monascorubramine	$n\text{-}C_7H_{15}$	H
3	N-glucosylrubropunctamine	$n\text{-}C_5H_{11}$	glucose
4	N-glucosylmonascorubramine	$n\text{-}C_7H_{15}$	glucose





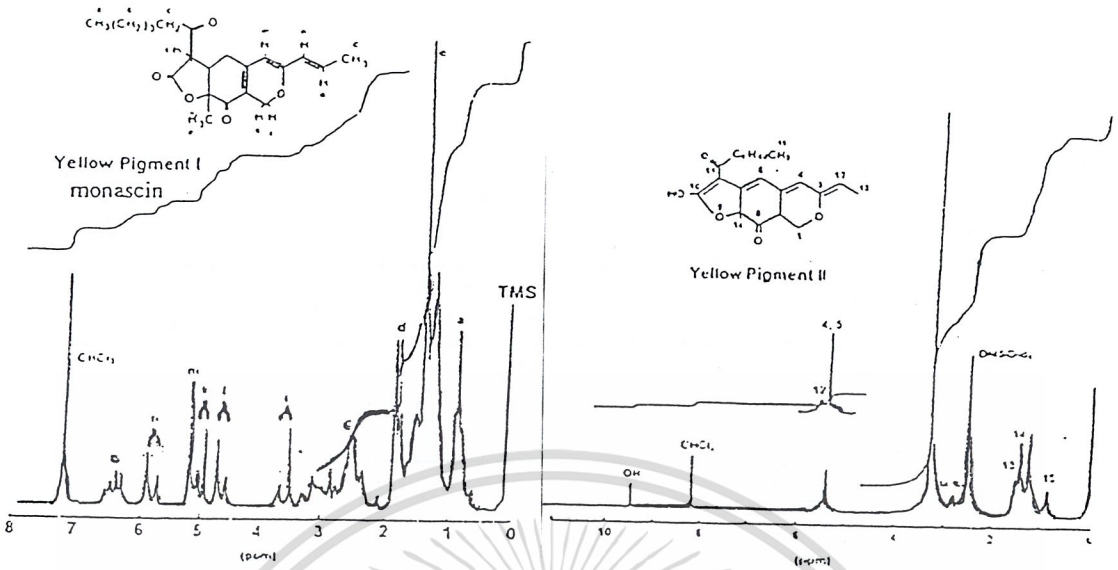
		R			R
5	Rubropunctatin	$n\text{-}C_5H_{11}$	7	Monascin	$n\text{-}C_5H_{11}$
6	Monascorubrin	$n\text{-}C_7H_{15}$	8	Ankaflavin	$n\text{-}C_7H_{15}$

ภาพที่ 3:แสดงโครงสร้างทางโมเลกุลของสารสีที่สกัดได้จากข้าวแดง ซึ่งเกิดจากการเจริญของ*M. anka.*

ที่มา : Sweeny และคณะ(1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

33510

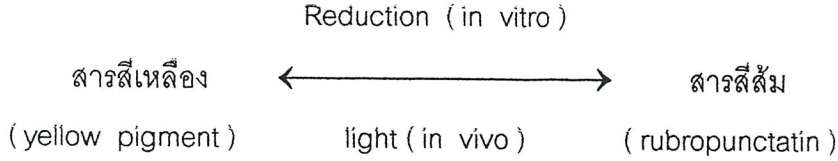


ภาพที่ 4 แสดง H-NMR spectrum และสูตรโครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่ที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* sp. *KB10* เปรียบเทียบสารสีเหลืองของmonascin

ที่มา : Yongsmith และคณะ (1993)

Wong และBau(1978) ศึกษาผลของแสงต่อการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส พบว่าแสงอุลตราไวโอเลต และสารบางอย่างที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. กระตุ้นให้เชื้อราสายพันธุ์ ที่สร้างสารสีได้น้อย หรือไม่สร้างสารสีเลย(albino mutant) สร้างสารสีได้ดีขึ้น ในขณะเดียวกันก็ยับยั้งการสร้างสีในสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้สูงๆ แสงสีขาว แสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงกระตุ้นการสร้างสารสีเหลือง แต่ไม่มีผลต่อสารสีแดง ทั้งนี้เนื่องจากสารสีเหลืองทำหน้าที่เป็นตัวรับแสง (photoreceptor) ซึ่งอาจเป็นสารเริ่มต้น หรือสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์สารสีก็เป็นได้ สารสีเหลืองนี้สามารถถูกออกซิไดซ์ไปเป็นสารสีส้ม คือ rubropunctatin ได้ในหลอดทดลอง และปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดย้อนกลับได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง ดังแสดงในภาพที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส
ที่มา : Wong และ Bau (1978)

Broder และKoehler(1980) ศึกษาคุณสมบัติของสารสีแดงที่ได้จากเชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 พบว่าเมื่อเชื้อราสร้างสารสีและปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นคุณสมบัติของสารสีจึงขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่สารสีจับอยู่นั่นเอง และเมื่อนำสารสีมาทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้เป็นสารเชิงซ้อนดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแตกต่างกันไป โดยสารสีที่จับอยู่กับอาจินีน(arginine pigment complex) โมโนโซเดียมกลูตาเมท(Monosodium glutamate pigment complex) โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน(bovine serum albumin pigment) และไกลซีน(glycine pigment complex) ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 588 603 599 และ596 นาโนเมตร ตามลำดับ สารเชิงซ้อนทั้ง 4 ชนิดมีลักษณะเป็นผลึกสีแดง เมื่อนำมาละลายน้ำจะมีปริมาณสารสี 20 เปอร์เซ็นต์และโปรตีน 80 เปอร์เซ็นต์

Carels และShepherd(1977) พบว่าการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งไนโตรเจน และพีเอชเริ่มต้นของการเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อแหล่งไนโตรเจนเป็นไนเตรท พีเอช 6.5 เชื้อราจะสร้างสารสีแดงซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีน(NH group) ของกรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ กับสารสีส้ม monascorubrinหรือ rubropunctatin ที่เชื้อราสังเคราะห์ขึ้น ปฏิกิริยานี้ไม่เกิดขึ้นที่ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรด จึงพบเฉพาะสารสีส้มที่เชื้อราสังเคราะห์ขึ้นเท่านั้น ส่วนสารสีเหลือง monascin และankaflavin นั้นสันนิษฐานว่าได้มาจากการถูกออกซิไดซ์ของสารสีส้ม ขณะที่ Fielding และคณะ(1961) รายงานว่าเชื้อราโมแนสคัสสังเคราะห์ได้ทั้งสารสีส้ม และสีเหลืองเฉพาะสารสีแดงเท่านั้นที่เกิดจากปฏิกริยาทางเคมี ข้อสันนิษฐานดังกล่าวต่างจากการทดลองของ Yongsmith และคณะ(1990) และ สมชาย(2536) ที่พบว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายพันธุ์ KB20M10.2 สร้างสารสีเหลืองได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเป็นกลาง และมีหมู่เอมีนจากกรดอะมิโนเหลือเพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา ดังนั้นการสร้างสารสีเหลืองจึงน่าจะมีปัจจัยอื่นๆ เกี่ยวข้องนอกเหนือจากไนโตรเจน และพีเอชเริ่มต้นดังที่มีรายงานมาก่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รัตนาภรณ์(2531) พบว่าสารสีแดงที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสหลายสายพันธุ์ จากข้าวสุก มีสีที่เป็นองค์ประกอบ 4 สี คือ สีเหลือง สีส้ม สีม่วง และสีแดง โดยสัดส่วนขององค์ประกอบต่างๆ ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อรา และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

2.4.3 การปล่อยสารสีออกจากเส้นใยของเชื้อราโมแนสคัส

Su และHuang(1980) กล่าวว่าสารสีที่เชื้อราโมแนสคัสสร้างขึ้นจะมีลักษณะเป็น granular fluid ซึ่งจะถูกขับออกมาตามช่องหรือรอยแตกของผนังเส้นใย ในบางครั้งเมื่อขับออกมาแล้วสารสียังคงติดอยู่กับปลายเส้นใย และสะสมจนมีจำนวนมากก่อนหลุดจากเส้นใย สารสีบางส่วนสะสมอยู่ภายในเส้นใยด้วย

Lin และLizuka(1982) ทดลองเลี้ยงเชื้อรา *M. kaoliang* R-10847 บนอาหารแข็ง mantou meal เพื่อศึกษาการสร้างสารสีนอกเซลล์ พบว่าเชื้อราจะเริ่มต้นสร้างสารสีและปล่อยออกมาในวันที่ 2 ของการเจริญ พร้อมกับสารที่มีลักษณะหนืดชนิดหนึ่ง (viscous substance) ทำให้สารสีเกาะติดอยู่กับเส้นใย และสะสมเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งเส้นใยแตกจึงหลุดออกมา ไม่พบการสะสมสารสีภายในเส้นใย

Lin และLizuka(1982) พบว่าการชักนำให้เชื้อราเกิดการผ่าเหล่าเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีรอยรั่ว(leakage) ของผนังเส้นใยมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อราสร้างสารสีได้ดีขึ้น เนื่องจากมีความสมดุลย์ระหว่างการสังเคราะห์สารสี และการปล่อยออกจากเส้นใย การเติม Tween 80 ปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ(วรรณภา, 2529 ; สมชาย, 2536) หรือปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ(วรรณภา, 2529) ก็เป็นอีกวิธีที่ช่วยให้การปล่อยสารสีออกจากเส้นใยเพิ่มขึ้น

2.4 <u>เอนไซม์จากเชื้อราโมแนสคัส</u>

Iizuka และMineki(1977) ศึกษาคุณสมบัติและการทำให้เอนไซม์กลูโคอะมิเลส บริสุทธิ์ โดยพบเอนไซม์ 2 รูปแบบ คือ GA-I และGA-II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4.8 $\times 10^4$และ 6.8 $\times 10^4$ ตามลำดับ มีค่า Isoelectric point เท่ากัน คือ 4.0 พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ GA-I และGA-II คือ 4.5 และ4.7 อุณหภูมิ 50 และ60 องศาเซลเซียส GA-I จะสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ขณะที่ GA-II คงทนต่ออุณหภูมิได้ดีกว่าโดยจะสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส GA-I จะทนต่อ ยูเรียและกัวนิดีนได้ดีกว่า GA-II ต่อมาในปี 1978 Iizuka และ Mineki ได้ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท พบว่าทั้ง GA-I และ GA-II ย่อยอะมิโลเปคติน อะมิโลส soluble starch ไกลโคเจน มอลโตไตรโอส และมอลโตส ได้ดี แต่ไม่ย่อยไอโซมอลโตส นอกจากนี้ยังพบว่า GA-II ย่อยแป้งดิบจากข้าวสาลี ข้าวโพด มันฝรั่งได้ดีกว่า GA-I การย่อย soluble starch ของเอนไซม์ทั้งสองจะได้ผลผลิตเป็น β- anomer glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yongsmith และคณะ(1990) ศึกษาเอนไซม์ย่อยแป้งจากเชื้อรา *M. kaoliang* สายพันธุ์กลายพันธุ์ KB20M10.2 พบว่ามีทั้งกลูโคสอะมิเลส และแอลฟาอะมิเลส ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของกลูโคอะมิเลส และแอลฟาอะมิเลส คือ 4.7 และ 4.5 ที่อุณหภูมิ 65 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์แอลฟาอะมิเลสจะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ส่วนกลูโคอะมิเลสทนต่ออุณหภูมิได้ดีกว่า โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ยังมีกิจกรรมเอนไซม์เหลือถึง 75 เปอร์เซ็นต์ แต่สูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน

Wong และคณะ(1986) พบว่าเอนไซม์ α - galactosidase จากเชื้อรา *M. pilosus* เป็นเอนไซม์ที่สร้างภายในเซลล์ มีกาแลคโตสเป็นตัวชักนำ(inducer) ให้สร้าง เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 150,000 ทำปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 4.5 - 5.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และถูกยับยั้งโดยอิออนของปรอท เงิน และทองแดง เมื่อนำมาศึกษาทางจลศาสตร์โดยใช้สับสเตรทเป็น p - nitophenyl - α - D - galactoside ได้ค่า K_m เท่ากับ 0.8 มิลลิโมลาร์ และ V_{max} เท่ากับ 39 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนไซม์นี้สามารถย่อยน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์พวกเมลิไบโอส ราฟฟิโนส และสตาไคโอสได้ด้วย

เชื้อราโมแนสคัสแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสได้แก่กลุ่ม A สร้างเฉพาะ acid proteinase กลุ่ม B สร้างเฉพาะ akaline proteinase และกลุ่ม C สร้างได้ทั้ง akaline proteinase เชื้อราโมแนสคัสส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่ม B รองลงมาคือกลุ่ม A และ C ตามลำดับ สำหรับ alkaline proteinase มีคุณสมบัติเป็น serine proteinsse ทำปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วย phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) ส่วน acid proteinase มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ penicillopepsin แต่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทน้อยกว่า ทำปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 4.8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถูกยับยั้งด้วยสาร N - acetyl - L - phenylalanyl - L - 3,5 -diiodotyrosine (Nishikawa และ คณะ ,1988)

2.6 <u>ผลิตภัณฑ์อื่นที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส</u>

นอกจากสารสีแล้วเชื้อราโมแนสคัสยังสร้างผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด โดยในปี 1977 Wong และ Bau รายงานครั้งแรกถึงการค้นพบสารต่อต้านแบคทีเรีย(antibacterial agent) ที่มีชื่อว่า monascidin A จากเชื้อรา *M. purpureus* ต่อมาในปี 1981 Wong และKoehler ได้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสารดังกล่าว พบว่าอาหารเหลวที่ประกอบด้วยยีสต์เอกซ์แทรค 1.2 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 10.0 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการสร้างสารต่อต้านแบคทีเรีย monascidin A ที่สุด โดยเชื้อราเริ่มสร้างสาร และปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 10 และสร้างสารได้สูงสุดในวันที่ 15 - 17 ของการเจริญ นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายโซเดียมอะซิเตท และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังกะสีความเข้มข้น 0.005 และ 1 x 10^{-3} โมลาร์ กระตุ้นให้เชื้อราสร้างสารได้ดีขึ้น แต่ถ้าความเข้มข้นของโซเดียมอะซิเตทสูงเป็น 0.04 โมลาร์ และยับยั้งการสร้างสารได้อย่างสมบูรณ์ จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างสารสี และสารต่อต้านแบคทีเรีย พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้ดีจะสร้างสารต่อต้านแบคทีเรียได้ดีด้วย ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารสีก็จะไม่สร้างสารต่อต้านแบคทีเรีย

Lumyong และคณะ(1990) คัดเลือกเชื้อราโมแนสคัส 40 สายพันธุ์ จากแหล่งต่างๆ เพื่อศึกษาการสร้างกรดอินทรีย์ พบว่า *Monascus araneosus* AHU 9087 สร้างกรดแอล-มาลิคได้ดีที่สุด ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส 10.0 เปอร์เซนต์ มอลท์แอกซ์แทรคหรือถั่วเหลืองบด 0.025 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ 37 องศาเซลเซียส

Kranz และคณะ(1992) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* สร้าง methyl ketone ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสใน blue cheese ได้ดีใกล้เคียงกับ *Penicillium roqueforii* เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ

2.7 <u>คุณสมบัติของสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส</u>

Su และHuang(1980) ศึกษาคุณสมบัติของสารสีจากเชื้อรา *M. anka* V-204 พบว่าละลายได้ดีในเอทานอล แต่ละลายได้เล็กน้อยในน้ำ สารสีในตัวทำละลายพีเอชต่างกันจะได้เฉดสีแตกต่างกันดังนี้ ที่พีเอช 3.0 - 4.0 จะเป็นสีส้ม พีเอช 5.0 - 6.0 เป็นสีแดง และที่พีเอช 7.0 -9.0 จะเป็นสีม่วงแดง เมื่อแยกสารสีจากเส้นใยมาทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ได้จากแป้งถั่วเหลืองจะได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดงเข้ม ละลายในน้ำได้ดี สารสีจะไวต่อแสงเมื่อละลายในน้ำ แต่จะทนต่อแสงมากขึ้นเมื่อละลายในเอทธานอล และทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้ดีเมื่ออยู่ในตัวทำละลายพีเอชเป็นกลาง หรือเบส

Sweeny และคณะ(1981) ทดสอบคุณสมบัติของสารสีโดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นคือ N-glucosylrubropunctamine และ N-glucosylmonascorunramine พบว่าสารทั้งสองคงสภาพต่อแสงแดดได้ดีขึ้นเมื่อเติมสาร quercetin - 5' - sulfonic acid สำหรับพีเอช 2.8 6 -hydroxy - 1, 4 - naphthoquinone สำหรับพีเอช 6.0 และ 1, 4, 6 - trihydroxynaphthalene ใช้ได้ดีทั้งพีเอช 2.8 และ 6.0 เป็นสารป้องกันการสลายตัวของสารสีจากแสงแดด

Wong และ Koehler(1983) นำสารสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัสมาทำปฏิกิริยากับสารที่ไม่เป็นอันตรายและมีราคาถูกเพื่อให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น พบว่าสาร aminoacetic acid และ aminobenzoic acid ใช้กับสารสีแดงได้ดี สารเชิงซ้อนที่ได้คงตัวที่พีเอช 9.2 และพีเอช 7.0 มากกว่าที่พีเอช 3.0 เมื่ออยู่ในตัวทำละลายพีเอชเป็นกลางหรือด่าง จะทนความร้อน และแสงอุลตราไวโอเลตได้ดี โดยเหลือสารสีมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับแสงอุลตราไวโอเลตนาน 36 ชั่วโมง ส่วนวรรณภา(2528) พบว่าน้ำสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัสโดยผ่านกระบวนการใดๆ คงตัวได้ดีที่พีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นกลางถึงด่างเช่นกัน ทนต่ออุณหภูมิน้ำเดือดนาน 15 นาที และคงตัวได้ดีในสารละลายโซเดียมเบนโซเอท กลีเซอรอล กลีเซอรอล น้ำและกรดอะซิติค

บุษบา และวรรณภา(2528) ได้ศึกษาความปลอดภัยของสารสีจากเชื้อราโมแนสคัสโดยวิเคราะห์หาโลหะหนัก เช่น โครเมียม ตะกั่ว สารหนู ในน้ำสี พบว่าไม่มีโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดปะปนอยู่ในน้ำสีเลย และเมื่อนำไปฉีดทดสอบความเป็นพิษในไข่ไก่ฟักเปรียบเทียบกับการฉีดด้วยน้ำกลั่นตามวิธีของ AOAC พบว่าไข่ไก่ฟักที่ผ่านการฉีดด้วยน้ำสีมีอัตราการรอดเท่ากับไข่ไก่ฟักควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำกลั่น

บุษบา และคณะ(2531) พบว่าน้ำสีจากเชื้อราโมแนสคัสไม่เป็นอันตรายใดๆ ต่อไข่ไก่ฟัก ไม่ทำให้โครโมโซมเม็ดเลือดขาวของคนเปลี่ยนแปลง และไม่เป็นพิษต่อหนูทดลองที่ได้รับสารสีในอัตรา 0.02 0.10 และ2.00 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ธวัช และคณะ(2530) เปรียบเทียบผลของสีปองโซ 4 อาร์ ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์และสารสีจากเชื้อราโมแนสคัสต่อความผิดปกติของโครโมโซมของคน พบว่าสีปองโซ 4 อาร์ ทำให้โครโมโซมผิดปกติสูงถึงร้อยละ 28.64 ขณะที่สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสไม่ทำให้โครโมโซมผิดปกติแต่อย่างใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อราโมแนสคัส

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อราโมแนสคัสที่ใช้ คือ เต้าหู้ยี้แดง

รูปที่ 6 : ตัวอย่างเต้าหู้ยี้แดงที่ใช้ในการแยกเชื้อ

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการแยกเชื้อราโมแนสคัสจากตัวอย่างเต้าหู้ยี้แดง ใช้อาหารวุ้นเอียง YM บ่มเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 5 วัน แยกเชื้อจนบริสุทธิ์แล้วเก็บรักษาไว้ใช้ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อราโมแนสคัส ใช้อาหารวุ้นเอียง MY บ่มเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 10 วัน เก็บรักษาเชื้อโดยเทน้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิดทับที่ผิวหน้า เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารชนิดต่างๆ ใช้อาหาร 3 ชนิด คือ อาหาร YM อาหาร YMS อาหาร PDA บ่มเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน
4. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาเอนไซม์ในการย่อยสลายแป้งที่สร้างแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ ใช้อาหาร YMS บ่มเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน
5. อาหารสำหรับทำหัวเชื้อเพื่อเตรียมสปอร์แขวนลอย ใช้ข้าวสารนึ่งสุกความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน
6. อาหารกากมันสำปะหลังสำหรับทดลองเพื่อหาแหล่งไนโตรเจน และความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

อาหารทุกสูตร ส่วนประกอบและวิธีการเตรียมถูกแสดงไว้ในภาคผนวก ก.

3.3 สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร
   1.1 เปปโตน
   1.2 กลูโคส
   1.3 ยีสต์สกัด
   1.4 มอลต์สกัด
   1.5 แป้งมันสำปะหลัง
   1.6 มันฝรั่ง
   1.7 กากมันสำปะหลัง
      จาก โรงโม่สหมิตรแป้งมัน
         บ้านเลขที่ 101 หมู่ 4 ต.บางละมุง อ.บางละมุง จ.ชลบุรี
   1.8 ข้าวสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารเคมีที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน

2.1 กากถั่วเหลือง

2.2 กากปาล์มน้ำมัน

2.3 รำข้าว

2.4 ใบกระถินบด

จาก วนิดาฟาร์ม

บ้านเลขที่ 31/1 หมู่ 8 ต.บางละมุง อ.บางละมุง จ.ชลบุรี

รูปที่ 7 : วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

ก. กากมันสำปะหลัง

ข. รำข้าว

ค. กากถั่วเหลือง

ง. ใบกระถินบด

จ. กากปาล์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารเคมีสำหรับเตรียมซิเตรต - ฟอสเฟต บัฟเฟอร์

3.1 กรดซิตริก

3.2 $Na_2HPO_4 . 7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4 . 12H_2O$

4. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัดและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสี

4.1 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

4.2 เอ็น - เฮกเซน

4.3 เบนซีน

4.4 น้ำกลั่น

4.5 แผ่น TLC

5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณแป้ง โดยวิธี สารละลายฟีนอล - กรดซัลฟิวริก

5.1 กลูโคส ชนิด เกรดวิเคราะห์

5.2 กรดซัลฟิวริกเข้มข้นและกรดซัลฟิวริก 2 โมลาร์

5.3 ฟีนอล

6. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด (Total Protein) โดยวิธีของ เจลดาล์ (Kjeldehl)

6.1 K_2SO_4

6.2 $CuSO_4 . 5H_2O$

6.3 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

6.4 เมธิลเรด และโบรโมครีซอลกรีน

6.5 สารละลายมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล NaOH และ

สารละลายมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล H_2SO_4

6.6 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

6.7 NaOH

6.8 กรดบอร์ริก

6.9 Na_2CO_3 ที่ปราศจากน้ำ

3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Kjeldahl tube 800 มล.
2. glass bead
3. บีกเกอร์ 1,000 มล., 2,000 มล.
4. ปิเปตต์ 5 มล., 10 มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ขวดวัดปริมาตร 100 มล., 500 มล., 1,000 มล.
6. ฟลาสก์ขนาด 250 มล.
7. กระบอกตวงขนาด 100 มล.
8. จานเลี้ยงเชื้อ
9. ช้อนตักสาร
10. คิวเวต
11. ขวดสีชา
12. หลอดทดลอง
13. เครื่องบดไฟฟ้า
14. กล้องจุลทรรศน์
15. แท่งแก้วคน
16. เข็มเขี่ยเชื้อ
17. กระดาษกรอง
18. กระจกสไลด์
19. เฮมาไซโตมิเตอร์(Haemacytometer)
20. ถ้วยหาความชื้น (Moisture can)
21. ขวดพลาสติก
22. บิวเรต
23. กรวยแก้ว

3.5 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ แบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
4. เครื่องเขย่าปรับความเร็วได้ (Shaker)
5. ตู้อบ (Hot air oven)
6. เดซิคเคเตอร์ (desiccator)
7. ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar air flow)
8. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
9. ชุดกลั่น (Distilling unit)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. เครื่องย่อย (*Digester*)

11. ตู้เย็น (Refrigerator)

12. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

13. โหลแก้วสำหรับทำ TLC (TLC chamber)

14. เครื่องระเหยด้วยระบบสุญญากาศ(Evaporater)

3.4 วิธีการทดลอง

1.การแยกเชื้อ

ทำการเก็บตัวอย่างที่เป็นแหล่งเชื้อราที่ผลิตสารสีแดง และสีเหลือง ได้แก่ เต้าหู้ยี้แดง นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Cross streak บนอาหารYM agar

2.การเก็บรักษาเชื้อรา

2.1 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อราที่บริสุทธิ์ จากอาหารวุ้น YM ลงในอาหารวุ้นเอียง YM เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน แล้วเททับด้วย *paraffin oil* ที่ปราศจากเชื้อเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์ จากจานอาหารวุ้น MY ลงในข้าวพันธุ์ดอกมะลิที่นึ่งสุกและฆ่าเชื้อแล้วในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แล้วเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 8 : หัวเชื้อสำหรับเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B

3.การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัสเมื่อเจริญบนอาหารวุ้น

3.1 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา โมแนสคัสสายพันธุ์ A , B และ C บนอาหาร PDA

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ A , B และ C บนอาหารวุ้น PDA แบบ Point inoculation บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ศึกษาลักษณะของโคโลนี และเส้นใย การสร้างสารสี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง ซึ่งถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ A B และ C

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ A , B และ C บนอาหารวุ้น YMS แบบ Point *inoculation* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และวัดขนาดของโซนใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นหลังจากเทสารละลายไอโอดีนรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา เป็นการศึกษาการสร้างเอนไซม์แล้วปล่อยออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยแป้ง ของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์

3.3 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B บนอาหาร PDA YM และ YMS

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B บนอาหารวุ้น PDA YM และYMS แบบ Point *inoculation* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ศึกษาลักษณะของโคโลนี และเส้นใย การสร้างสารสี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ B บนอาหารแต่ละชนิด

3.4 ศึกษาการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B บนอาหาร YM ที่วันที่ 3 5 และ7 ของการเพาะเลี้ยง

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B บนอาหารวุ้น YM แบบ Point *inoculation* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 5 และ 7 วัน ศึกษาการสร้างสารสี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ B ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ

หมายเหตุ : จากการศึกษาในข้อ 3.1 และ3.2 พบว่าสายพันธุ์ B สามารถเจริญและสร้างสารสีได้ดีกว่าสายพันธุ์ A และC จึงเลือกใช้สายพันธุ์ B ในการทดลองต่อๆ ไป

4. การเตรียม Spore suspension ของเชื้อราโมแนสคัส

เติมสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 100 มิลลิลิตร ลงในหัวเชื้อจากข้อ 2.2 แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ได้สปอร์แขวนลอยที่สม่ำเสมอ และทำการนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometor (วิธีการแสดงไว้ในภาคผนวก ค.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง

5.1การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

5.1.1 ชั่งกากมันสำปะหลัง 18 กรัม (น้ำหนักแห้ง) และแหล่งไนโตรเจนได้แก่ รำข้าว กากถั่วเหลือง กากปาล์ม และใบกระถินบด 2 กรัม ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการอุดจุกสำลีและฆ่าเชื้อ โดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์เป็นเวลา 20 นาที

5.1.2 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้นของกากมันสำปะหลังหลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

5.1.3 ปรับความชื้นของอาหารที่ได้เป็นร้อยละ 50 ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยเติมน้ำกลั่นให้น้อยกว่าที่ต้องการเติมจริง 1.0 มิลลิลิตร สำหรับเติมสปอร์แขวนลอย เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้อาหารมีความชื้นสม่ำเสมอทั่วทั้งฟลาสก์

5.1.4 เติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราโมแนสคัส 1.0 มิลลิลิตร (ความหนาแน่นประมาณ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ลงในอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1.3 เขย่าให้สปอร์กระจายสม่ำเสมอทั่วฟลาสก์ เลี้ยงเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส

5.1.5 วิเคราะห์ปริมาณสีในวันที่ 0,4 ,6 ,8 ,10 และ12 โดยสกัดตัวอย่าง 0.5 กรัม ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 9.5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกสีสกัดออกจากกากมันด้วยเครื่อง Centrifuge ในอัตราเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวัดปริมาณความเข้มข้นของสีโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณสารสีแดงที่ได้โดยตรงจากค่าการดูดกลืนแสง กำหนดให้มีหน่วยเป็นหน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่ละชนิดของแหล่งไนโตรเจนทำ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยสารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

5.2.1 ชั่งกากมันสำปะหลัง 18 กรัม (น้ำหนักแห้ง) และแหล่งไนโตรเจนได้แก่ รำข้าว กากถั่วเหลือง กากปาล์ม และใบกระถินบด 2 กรัม ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการอุดจุกสำลีและฆ่าเชื้อ โดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์เป็นเวลา 20 นาที

5.2.2 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้นของกากมันสำปะหลังหลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

5.2.3 ปรับความชื้นของอาหารที่ได้เป็นร้อยละ 50 ด้วยสารละลายซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยเติมสารละลายซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์น้อยกว่าที่ต้องการเติมจริง 1.0 มิลลิลิตร สำหรับเติมสปอร์แขวนลอย เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้อาหารมีความชื้นสม่ำเสมอทั่วทั้งฟลาสก์

5.2.4 เติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราโมแนสคัส 1.0 มิลลิลิตร (ความหนาแน่นประมาณ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ลงในอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 5.1.3 เขย่าให้สปอร์กระจายสม่ำเสมอทั่วฟลาสก์ เลี้ยงเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส

5.2.5 วิเคราะห์ปริมาณสีในวันที่ 0 ,4 ,6 ,8 ,10 และ12 โดยสกัดตัวอย่าง 0.5 กรัม ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 9.5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกสีสกัดออกจากกากมันด้วยเครื่อง Centrifuge ในอัตราเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวัดปริมาณความเข้มข้นของสีโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณสารสีแดงที่ได้โดยตรงจากค่าการดูดกลืนแสง กำหนดให้มีหน่วยเป็นหน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่ละชนิดของแหล่งไนโตรเจนทำ 3 ซ้ำ

5.3 การศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

5.3.1 ชั่งกากมันสำปะหลัง 18 กรัม (น้ำหนักแห้ง) และแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณสีสูงสุดจากการทดลองในข้อ 5.1 2 กรัม ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการอุดจุกสำลีและฆ่าเชื้อ โดยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3.2 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้นของกากมันสำปะหลังหลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

5.3.3 ปรับความชื้นของอาหารที่ได้เป็นร้อยละ 40 , 50 , 60 , และ 70 ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยเติมน้ำกลั่นให้น้อยกว่าที่ต้องการเติมจริง 1.0 มิลลิลิตร สำหรับเติมสปอร์แขวนลอย เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้อาหารมีความชื้นสม่ำเสมอทั่วทั้งฟลาสก์

5.3.4 เติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราโมแนสคัส 1.0 มิลลิลิตร (ความหนาแน่นประมาณ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ลงในอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 5.2.3 เขย่าให้สปอร์กระจายสม่ำเสมอทั่วฟลาสก์ เลี้ยงเชื้อที่ 32 องศาเซลเซียส

5.3.5 วิเคราะห์ปริมาณสีในวันที่ 0,4 ,6 ,8 ,10 และ12 โดยสกัดตัวอย่าง 0.5 กรัม ด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 9.5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกสีสกัดออกจากกากมันด้วยเครื่อง Centrifuge ในอัตราเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวัดปริมาณความเข้มข้นของสีโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณสารสีแดงที่ได้โดยตรงจากค่าการดูดกลืนแสง กำหนดให้มีหน่วยเป็นหน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่ละระดับความชื้นทำ 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 9 : เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ใช้ในการแยกสีที่สกัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 10 : เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง(Spectrophotometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

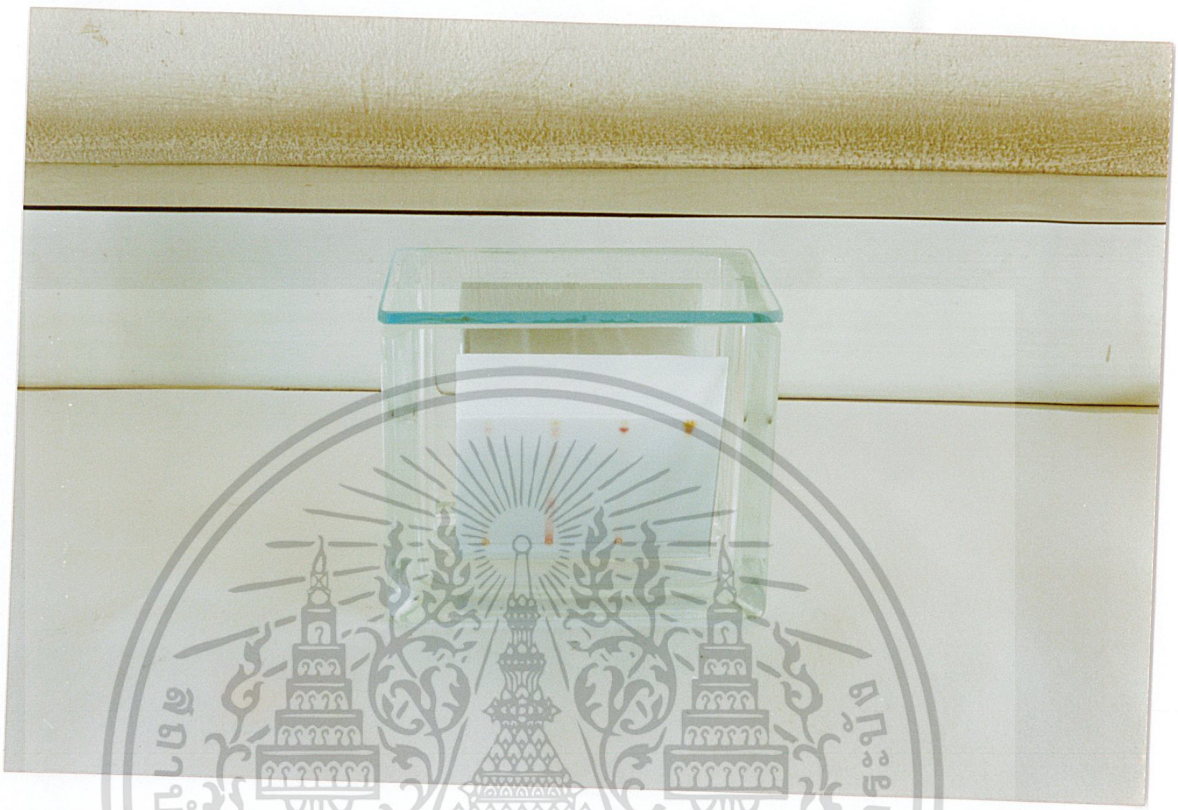
6. **การศึกษาองค์ประกอบของสี โดยวิธี Thin - Layer Chromatography (TLC)**

นำกากมันที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อโมแนสคัสในสภาวะที่มีความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ และเติมแหล่งไนโตรเจน กากถั่วเหลือง 10 เปอร์เซ็นต์ อายุ 12 วัน มาสกัดใน 4 ลักษณะดังนี้

- นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
- นำไปสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ผ่านการอบ
- นำไปสกัดด้วย เอ็น - เฮกเซน โดยไม่ผ่านการอบ
- นำส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วย เอ็น - เฮกเซน มาสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Evaporator ใช้หลอด Capillary ดูดสารสกัดที่ได้มาจุดลงบนแผ่น TLC แล้วนำแผ่น TLC ที่ได้มาใส่ในโหลแก้ว (TLC chamber) ที่มีเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเบนซีน ในอัตราส่วน 1 : 3 เป็น mobile phase สังเกตการแยกสีจนกระทั่งสารที่เป็น mobile phase เคลื่อนที่จนเกือบถึงขอบด้านบนของแผ่น TLC บันทึกระยะทางที่สีชนิดต่าง ๆ เคลื่อนที่ หาค่า Rate of flow (RF) (ดัดแปลงจาก รัตนาภรณ์ , 2531)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 : โหลแก้วสำหรับศึกษาองค์ประกอบของสี (TLC chamber)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. ผลการแยกเชื้อราที่ผลิตสารสีจากเต้าหู้ยี้แดง

จากการทดลองแยกเชื้อราที่ผลิตสารสีแดงและสีเหลืองจากเต้าหู้ยี้ สามารถแยกเชื้อราโมแนสคัสได้สามสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ A B และC โดยสายพันธุ์ A และB จะผลิตสารสีแดง ส่วนสายพันธุ์ C จะผลิตสารสีเหลือง

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัสเมื่อเจริญบนอาหารวุ้น

2.1 ผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา โมแนสคัสสายพันธุ์ A B และ C บนอาหาร PDA เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ A และ B จะย่นตามแนวผ่านศูนย์กลาง แต่โคโลนีของสายพันธุ์ C จะเรียบ

ลักษณะเส้นใยของเชื้อราสายพันธุ์ A จะจับตัวกันค่อนข้างแน่น เชื้อราสายพันธุ์ B จะมีเส้นใยที่จับตัวกันอย่างหลวม ๆ เชื้อราสายพันธุ์ C จะมีลักษณะของเส้นใยที่อัดตัวกันแน่นติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อ

การสร้างสารสีพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ A และ B จะสร้างสารสีแดงแต่สายพันธุ์ C จะสร้างสารสีเหลือง โดยทั้งสามสายพันธุ์จะสร้างสารสีแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์

ขนาดของโคโลนี สายพันธุ์ A จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2.7 เซนติเมตร สายพันธุ์ B จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 3.0 เซนติเมตร สายพันธุ์ C จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2.0 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

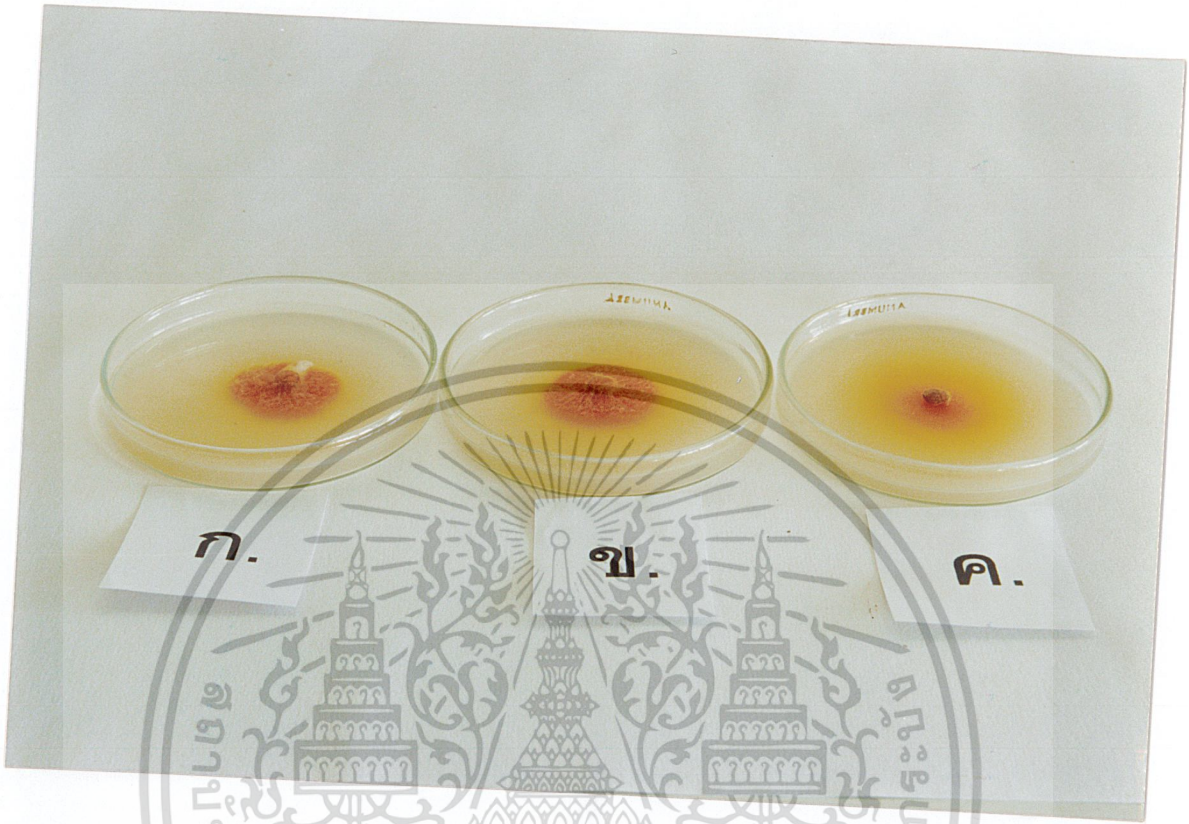
รูปที่ 12 : การเก็บรักษาเชื้อราโมแนสคัสทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ทำการแยกได้จากเต้าหู้ยี้

ก. เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ A ผลิตสารสีแดง

ข. เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B ผลิตสารสีแดง

ค. เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ C ผลิตสารสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 : การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ A B และ C บนอาหาร PDA เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

ก. สายพันธุ์ A ข. สายพันธุ์ B ค. สายพันธุ์ C

2.2 ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง ซึ่งถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

ขนาดของบริเวณสะอาดที่เกิดจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ A มีขนาดประมาณ 4.0 มิลลิเมตร

ขนาดของบริเวณสะอาดที่เกิดจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B มีขนาดประมาณ 5.0 มิลลิเมตร

ขนาดของบริเวณสะอาดที่เกิดจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ C มีขนาดประมาณ 3.5 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 14 : การเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง ซึ่งถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ A , B ,และ C เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

ก. สายพันธุ์ A ข. สายพันธุ์ B ค. สายพันธุ์ C

2.3 ผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา โมแนสคัสสายพันธุ์ B บนอาหาร PDA , YM ,และ YMS เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B ที่เจริญบนอาหาร PDA จะมีลักษณะเป็นรอยย่นตามแนวผ่านศูนย์กลาง โดยรอยย่นจะมีความถี่และละเอียดมากกว่าการเจริญบนอาหาร YM สำหรับการเจริญบนอาหาร YMS โคโลนีจะมีรอยย่นน้อยมาก

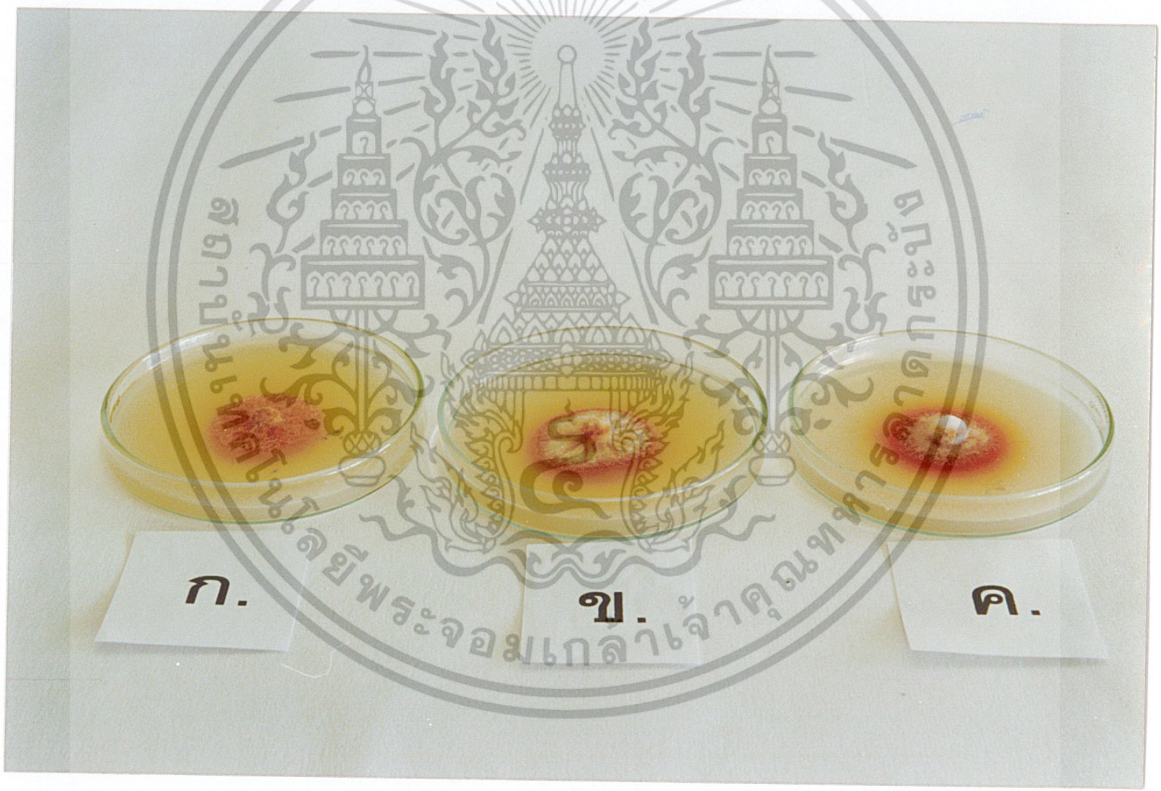
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเส้นใยของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B ที่เจริญบนอาหาร PDA จะจับตัวกันอย่างหลวมๆ และมีสีแดงทั่วทั้งโคโลนี สำหรับการเจริญบนอาหาร YM ,และ YMS เส้นใยจะจับตัวกันแน่น โดยเส้นใยบริเวณผิวของโคโลนีจะมีสีขาวแต่บริเวณที่ยึดเกาะกับอาหารจะมีสีแดง

การสร้างสารสี พบว่าการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B บนอาหาร PDA จะสร้างสารสีแดงแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ได้น้อยมาก บนอาหาร YM จะสร้างสารสีแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ได้มาก สำหรับอาหาร YMS จะสร้างสารสีแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ได้มากที่สุด

ขนาดของโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B ที่เจริญ

- บนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.0 เซนติเมตร
- บนอาหาร YM มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.0 เซนติเมตร
- บนอาหาร YMS มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.9 เซนติเมตร



รูปที่ 15 : การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B บนอาหาร PDA , YM ,และ YMS เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

ก. อาหาร PDA ข. อาหาร YM ค. อาหาร YMS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

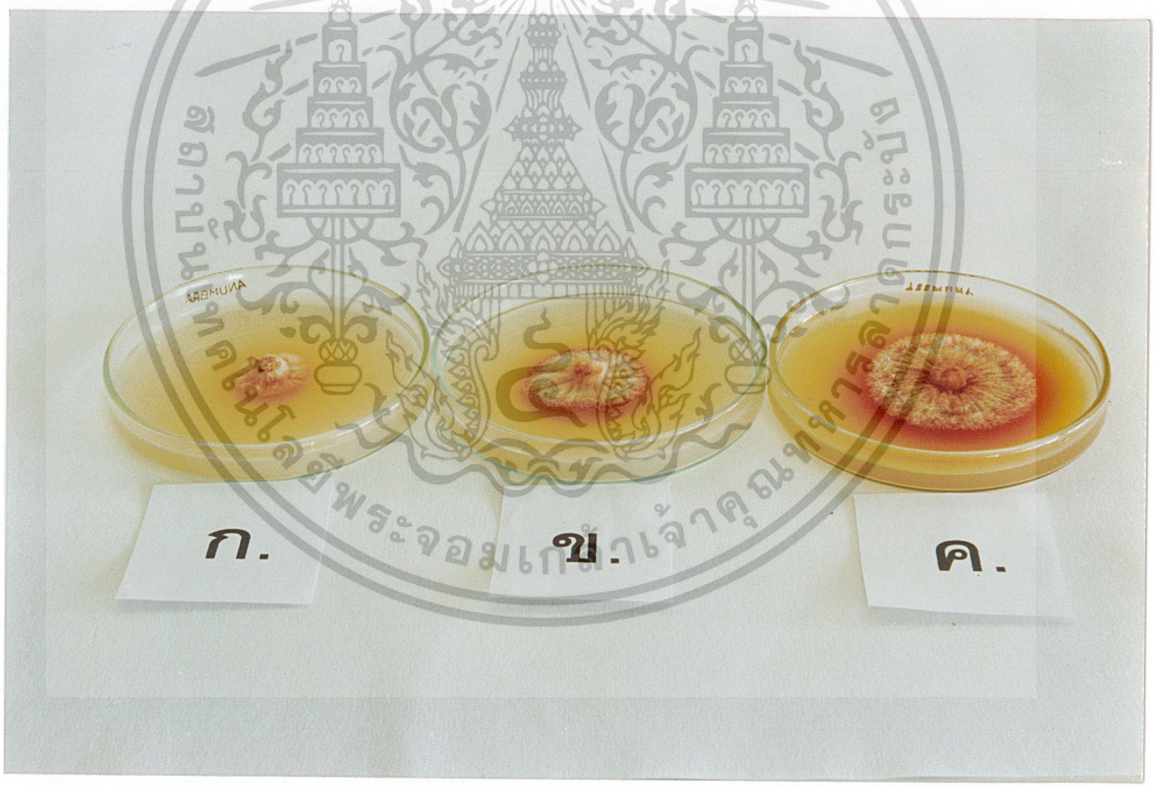
2.4 ผลการศึกษาการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B ที่วันที่ 3 , 5 ,และ 7 ของการเพาะเลี้ยง บนอาหาร YM

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B ที่เจริญบนอาหาร YM ในวันที่ 3 และ 5 จะไม่แตกต่างกัน แต่ในวันที่ 7 ลักษณะของโคโลนีจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ บริเวณขอบของโคโลนีเส้นใยจะจับตัวกันอย่างหลวมๆ สำหรับบริเวณกลางโคโลนีเส้นใยจะจับตัวกันแน่นและเกิดรอยย่น

การสร้างสารสีพบว่าจะเริ่มมีการสร้างตั้งแต่วันที่ 3 และจะเห็นได้อย่างชัดเจนในวันที่ 5 ว่ามีการปล่อยสารสีออกมานอกเซลล์

ขนาดของโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B ที่

- วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.7 เซนติเมตร
- วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.0 เซนติเมตร
- วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4.3 เซนติเมตร



รูปที่ 16 : การศึกษาการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ B ที่วันที่ 3 , 5 , และ 7 ของการเพาะเลี้ยง บนอาหาร YM

ก. วันที่ 3 ข. วันที่ 5 ค. วันที่7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง

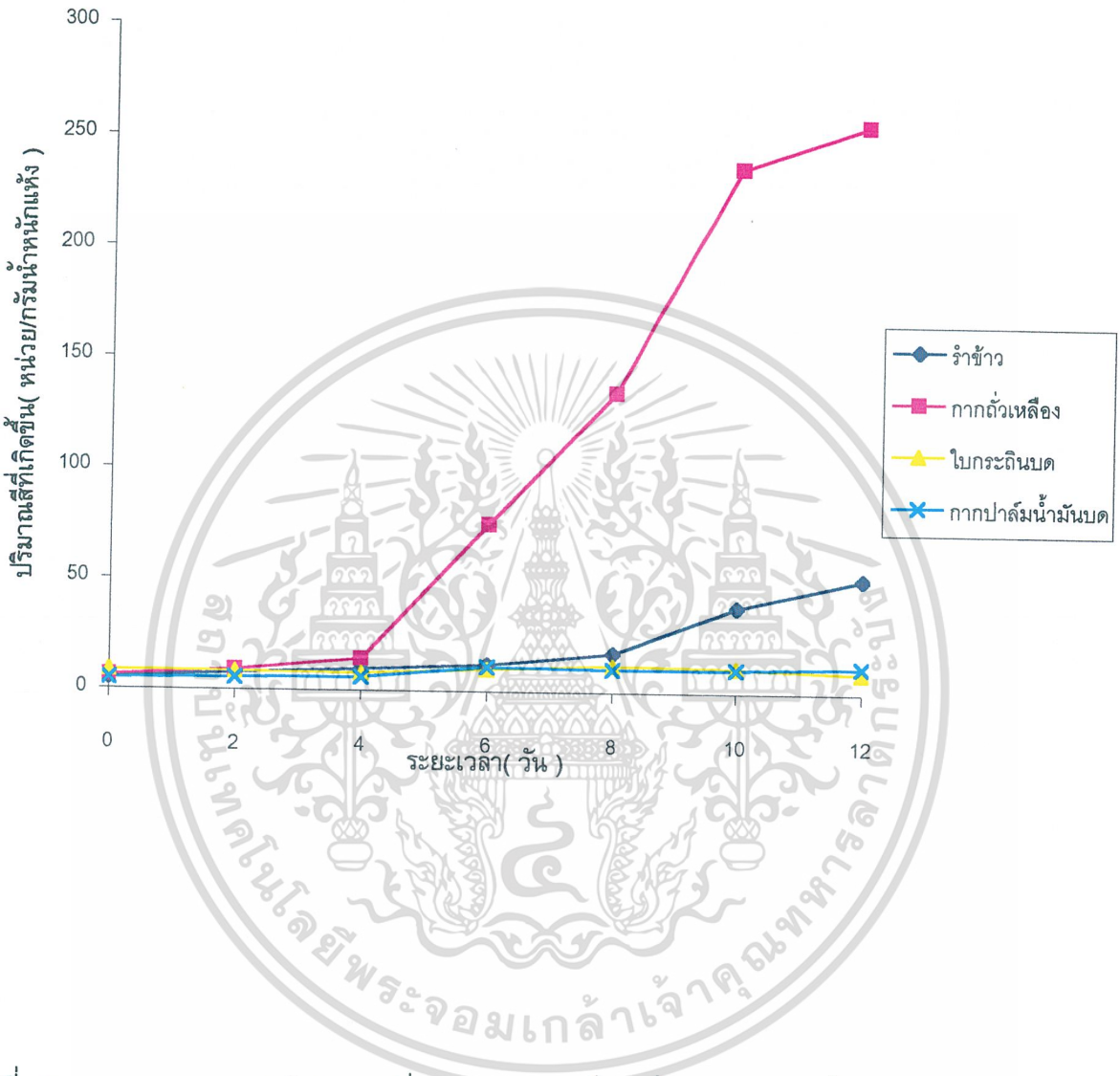
3.1 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนส-คัส

จากการทดลองหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ตามเอกสารอ้างอิง พบว่ากากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างสารสี ซึ่งจะให้ผลผลิตสูงถึง 255 หน่วย/กรัมน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบ รองลงมาคือ รำข้าว กากปาล์ม และใบกระถินบดตามลำดับ โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยการคำนวณแบบ DMRT พบว่าการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ผลแตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ แต่แหล่งไนโตรเจนรำข้าว กากปาล์ม และใบกระถินบดจะให้ผลไม่แตกต่างกัน ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 0.05

ตารางที่ 2 : แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง	ปริมาณสี(หน่วย)ที่ได้เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น			
	รำข้าว	กากถั่วเหลือง	ใบกระถินบด	กากปาล์ม
วันที่ 0	5.1779	6.1180	8.6526	4.9186
วันที่ 2	7.7031	9.2243	8.3538	5.7738
วันที่ 4	9.8402	14.3802	8.0896	6.0736
วันที่ 6	12.0903	75.3860	9.9504	11.2995
วันที่ 8	17.5613	134.9207	12.2072	10.5967
วันที่ 10	38.5546	236.1931	11.1267	10.7532
วันที่ 12	51.5190	255.6003	9.0404	11.8419

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 : แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ต่อปริมาณสีที่ผลิตขึ้น(หน่วย/กรัมน้ำหนักแห้ง) โดยเชื้อราโมแนสคัส เมื่อปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 18 : การเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อรา โมแนสคัส สายพันธุ์ B ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงบนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ และเติมแหล่งไนโตรเจน

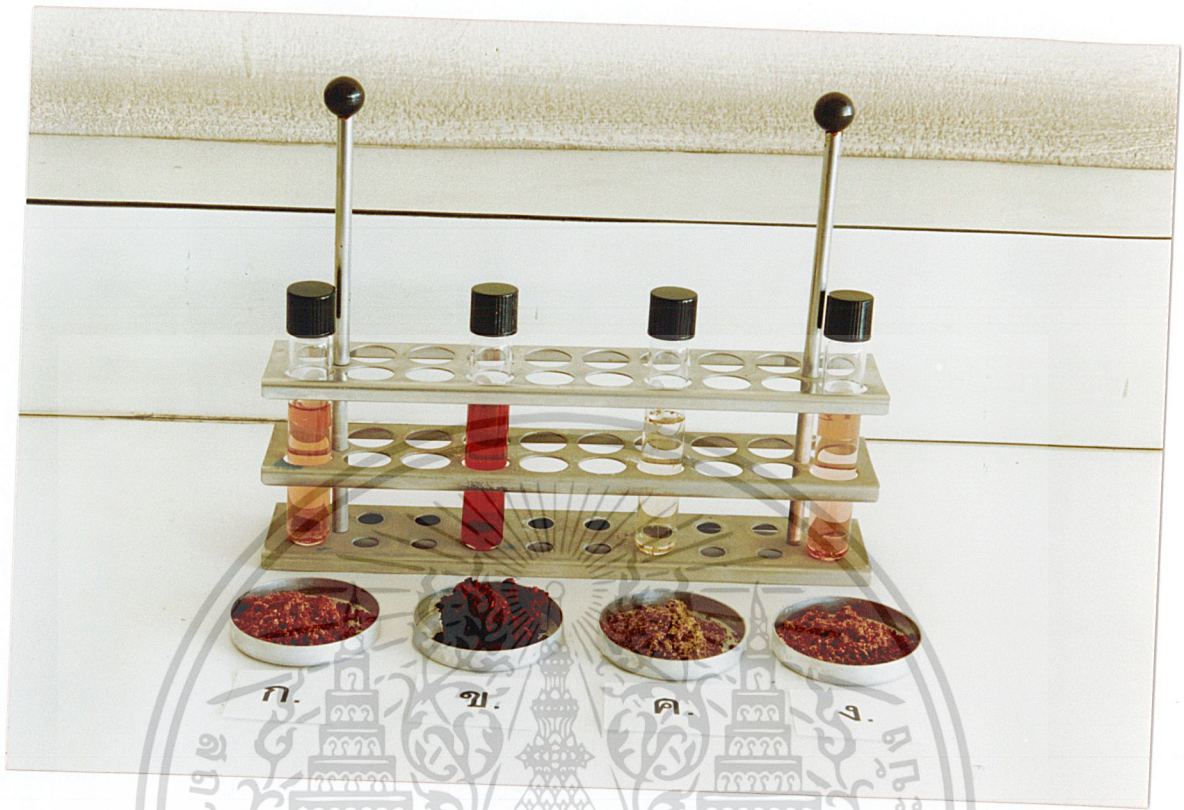
ก. รำข้าว 2 เปอร์เซ็นต์

ข. กากถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์

ค. ใบกระถินบด 2 เปอร์เซ็นต์

ง. กากปาล์ม 2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่19 : ลักษณะของกากมันสำปะหลังและสีที่สกัดได้ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ และเติมแหล่งไนโตรเจน

ก. รำข้าว 2 เปอร์เซ็นต์

ข. กากถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์

ค. ใบกระถินบด 2 เปอร์เซ็นต์

ง. กากปาล์ม 2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนส-คัส โดยควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยสารละลายซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

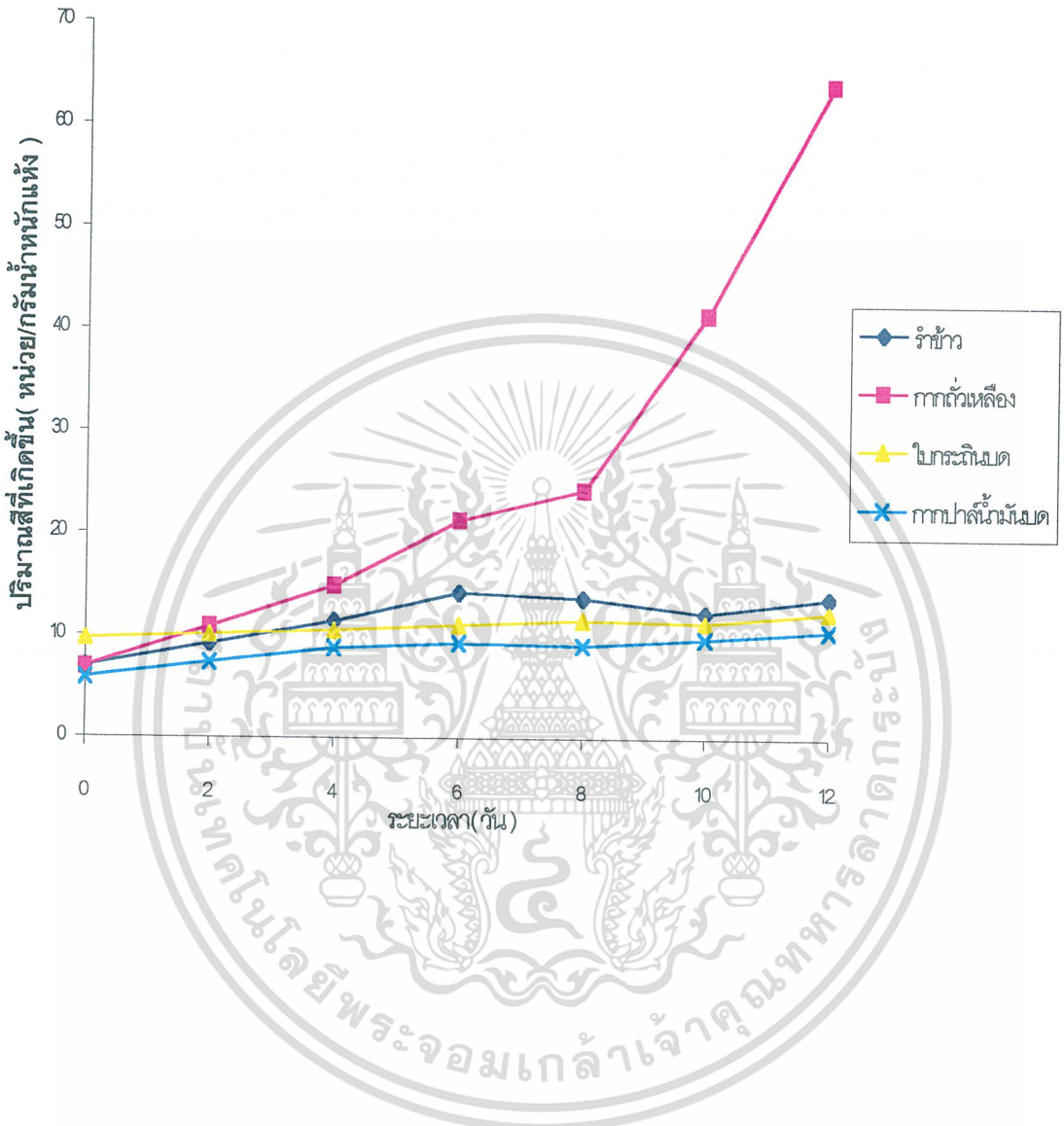
จากการทดลองหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ตามเอกสารอ้างอิง พบว่าในระหว่างการหมักพีเอชจะสูงขึ้นจนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเป็นด่าง ซึ่งจากผลการทดลองของ Lin (1973) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสอยู่ในช่วง 5 - 7 จึงทำการทดลองซ้ำอีกครั้งโดยควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่ากากถั่วเหลืองก็ยังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างสารสี ซึ่งจะให้ผลผลิต 63.78 หน่วย/กรัมน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบ รองลงมาคือ รำข้าว ใบกระถินบด และกากปาล์มตามลำดับ โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยการคำนวณแบบ DMRT พบว่าการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ผลแตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 0.01 สำหรับแหล่งไนโตรเจนรำข้าว ให้ผลแตกต่างจากกากปาล์ม และใบกระถินบดจะให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่กากปาล์ม และใบกระถินบดจะให้ผลไม่แตกต่างกัน ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 0.05

จากผลการทดลองข้อที่ 2.1 และ2.2 พบว่าซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีผลทำให้การผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัสลดลง

ตารางที่ 3 : แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยสารละลายซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง	ปริมาณสี(หน่วย)ที่ได้เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น			
	รำข้าว	กากถั่วเหลือง	ใบกระถินบด	กากปาล์ม
วันที่ 0	6.9762	6.8497	9.6770	5.8655
วันที่ 2	9.2072	10.8695	10.0938	7.3439
วันที่ 4	11.4382	14.8894	10.5107	8.8224
วันที่ 6	14.2018	21.3115	11.0358	9.3307
วันที่ 8	13.6957	24.2586	11.5425	9.0922
วันที่ 10	12.2835	41.3725	11.3146	9.7770
วันที่ 12	13.7470	63.7878	12.3537	10.5681

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 : แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ต่อปริมาณสีที่ผลิตขึ้น(หน่วย/กรัมน้ำหนักแห้ง) โดยเชื้อราโมแนสคัส เมื่อควบคุมพีเอชด้วย ซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 21 : การเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อรา โมแนสคัส สายพันธุ์ B ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงบนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมพีเอชด้วย ซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเติมแหล่งไนโตรเจน

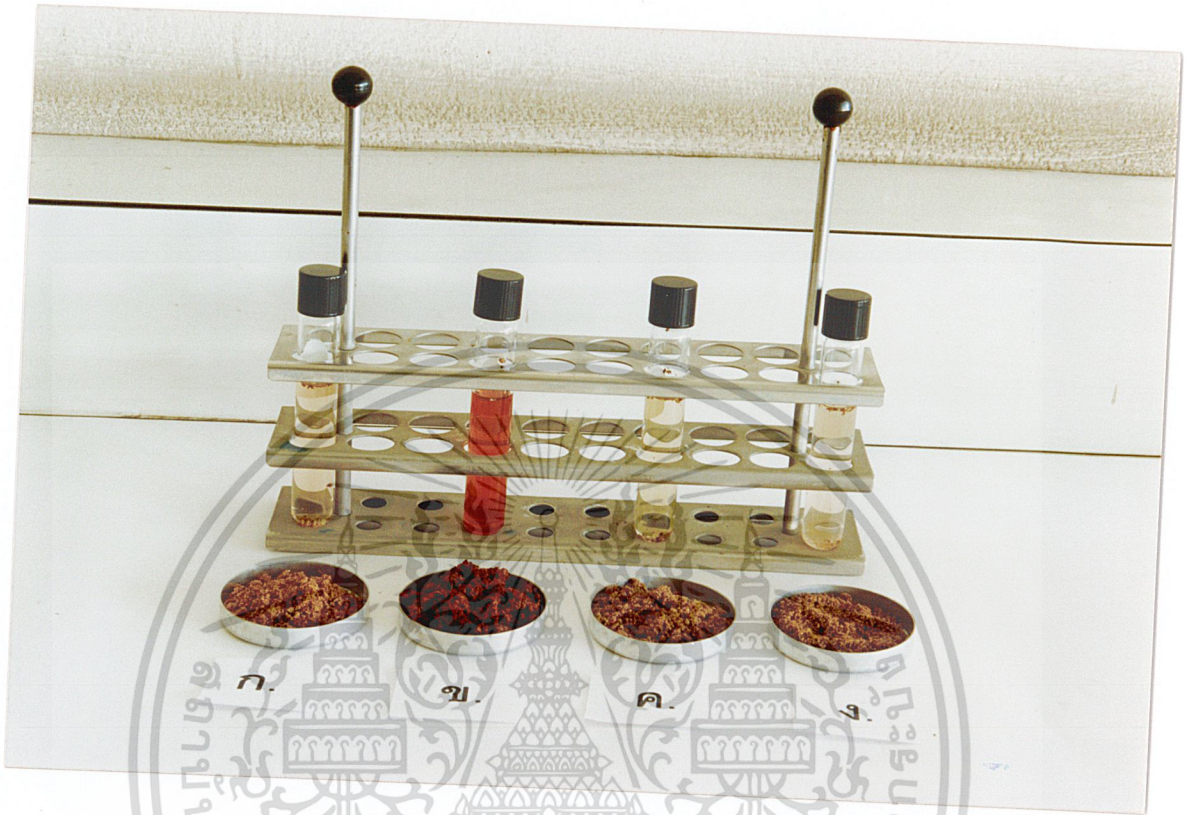
ก. รำข้าว 2 เปอร์เซ็นต์

ข. กากถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์

ค. ใบกระถินบด 2 เปอร์เซ็นต์

ง. กากปาล์ม 2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 22 : ลักษณะของกากมันสำปะหลังและสีที่สกัดได้ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมพีเอชด้วย ซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเติมแหล่งไนโตรเจน

ก. รำข้าว 2 เปอร์เซ็นต์

ข. กากถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์

ค. ใบกระถินบด 2 เปอร์เซ็นต์

ง. กากปาล์ม 2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

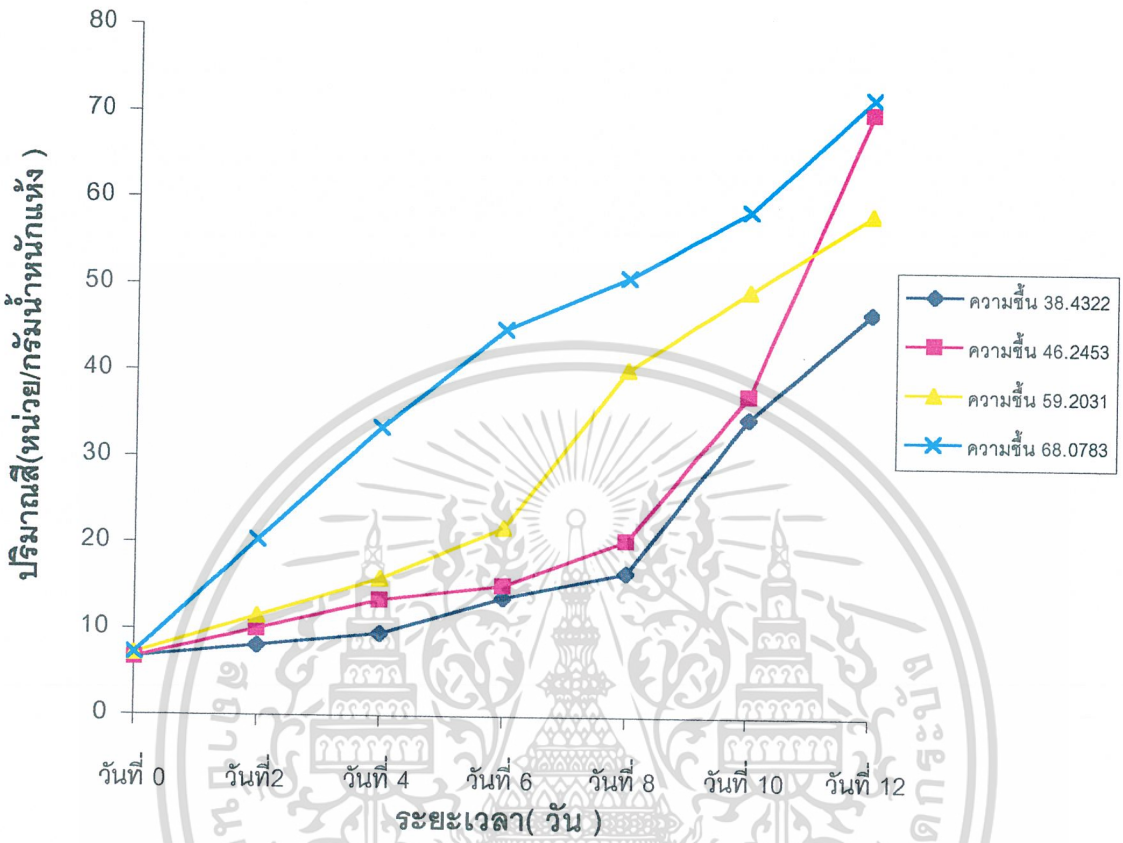
3.3 ผลการศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

จากการทดลองหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ตามเอกสารอ้างอิง ทั้งที่มีการควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และไม่ควบคุม พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดคือกากถั่วเหลืองในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จึงเลือกกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนในการหาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาที่ระดับความชื้น 40 50 60 และ70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตสารสีสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ที่ความชื้นเริ่มต้น 50 60 และ40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งที่ระดับความชื้นเริ่มต้น 70 และ50 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจากที่ระดับความชื้นเริ่มต้น 60 และ40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยการคำนวณแบบ DMRT ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 0.05

ตารางที่ 4 : แสดงผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง	ปริมาณสี(หน่วย)ที่ได้เมื่อปรับความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ			
	40	50	60	70
วันที่ 0	6.6792	6.6697	7.1588	7.2667
วันที่ 2	8.1022	10.0569	11.5190	20.3425
วันที่ 4	9.5252	13.4441	15.8793	33.4184
วันที่ 6	13.7287	15.1099	21.8289	44.8374
วันที่ 8	16.6950	20.4147	40.2592	50.9146
วันที่ 10	34.6478	37.2946	49.3405	58.6558
วันที่ 12	46.8854	70.0562	58.2799	71.7591

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 23 : แสดงผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่ใช้ต่อปริมาณสีที่ผลิตขึ้น(หน่วย/กรัมน้ำหนักแห้ง) โดยเชื้อราโมแนสคัส เมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 24 : การเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ B ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงบนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยเติมกากถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น

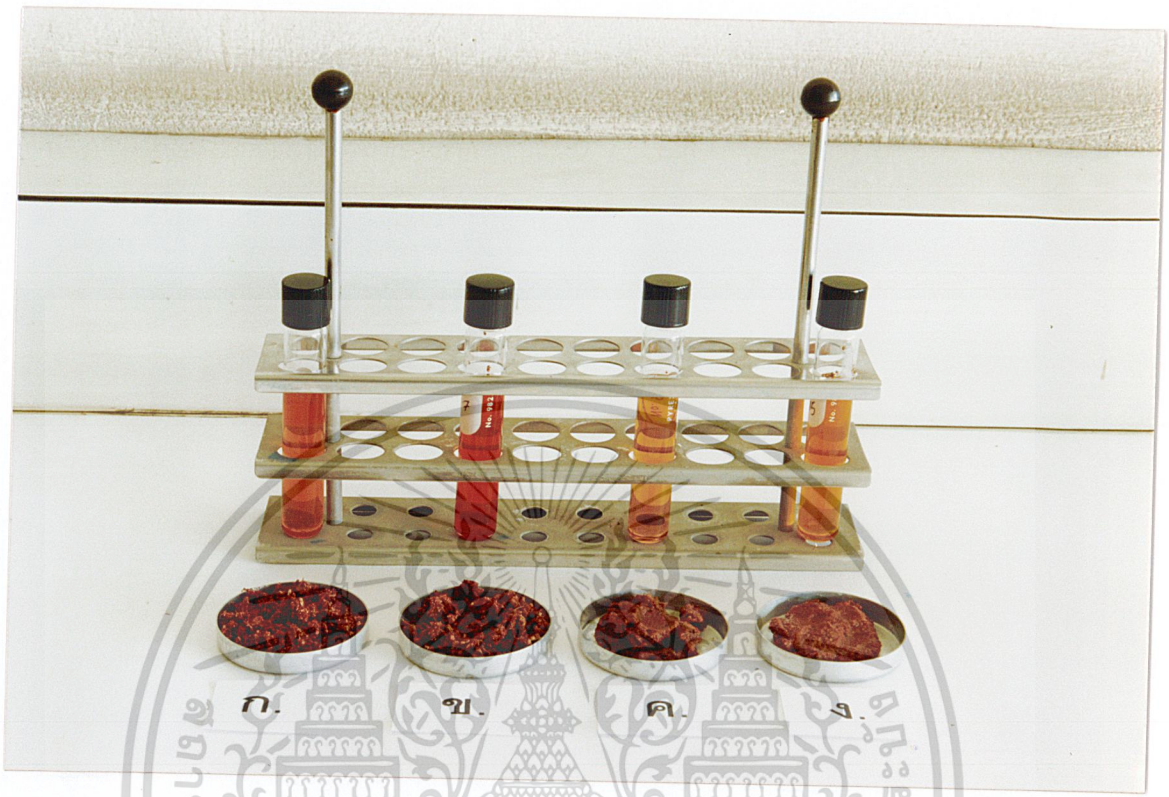
ก. 40 เปอร์เซ็นต์

ข. 50 เปอร์เซ็นต์

ค. 60 เปอร์เซ็นต์

ง. 70 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 25 : ลักษณะของกากมันสำปะหลังและสีที่สกัดได้ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง โดยเติมกากถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น

ก. 40 เปอร์เซ็นต์

ข. 50 เปอร์เซ็นต์

ค. 60 เปอร์เซ็นต์

ง. 70 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ผลการศึกษาองค์ประกอบของสี โดยวิธี Thin - Layer Chromatography (TLC)

จากการทดลองพบว่าสีที่ได้จากการนำกากมันที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อโมแนสคัสในสภาวะที่มีความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ และเติมแหล่งไนโตรเจน กากถั่วเหลือง 10 เปอร์เซ็นต์ อายุ 12 วัน แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบของสีได้สีที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด 4 สี ดังตาราง

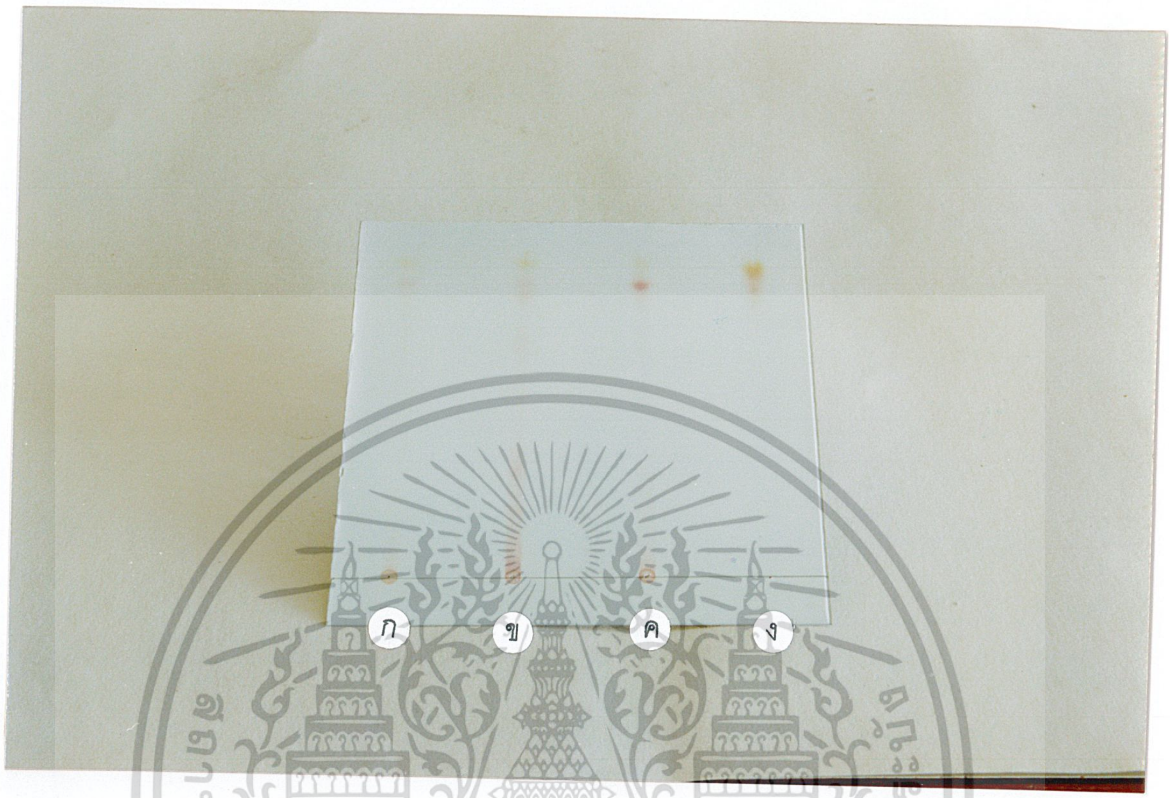
ตาราง 5 : แสดงองค์ประกอบของสีที่สกัดได้

สีที่เป็นองค์ประกอบ	Rate of flow(RF)
เหลือง	0.89
ส้ม	0.79
ม่วง	0.32
แดง	0.19

โดยเมื่อทำการสกัดใน 4 ลักษณะจะให้ผล ดังนี้

- นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จะให้สีที่เป็นองค์ประกอบ 2 สี คือ สีเหลือง และสีส้ม
- นำไปสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ผ่านการอบ จะให้สีที่เป็นองค์ประกอบ 4 สี คือ สีเหลือง สีส้ม สีม่วง และสีแดง
- นำไปสกัดด้วย เอ็น - เฮกเซน โดยไม่ผ่านการอบ จะให้สีที่เป็นองค์ประกอบ 2 สี คือ สีเหลือง และสีส้ม
- นำส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วย เอ็น - เฮกเซน มาสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จะให้สีที่เป็นองค์ประกอบ 3 สี คือ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 26 : การวิเคราะห์องค์ประกอบของสี โดยวิธีThin - Layer Chromatography (TLC) เมื่อทำการสกัดใน 4 ลักษณะ ดังนี้

ก. นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จะให้สีที่เป็นองค์ประกอบ 2 สี คือ สีเหลือง และสีส้ม

ข. นำไปสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ผ่านการอบ จะให้สีที่เป็นองค์ประกอบ 4 สี คือ สีเหลือง สีส้ม สีม่วง และสีแดง

ค. นำไปสกัดด้วย เอ็น - เฮกเซน โดยไม่ผ่านการอบ จะให้สีที่เป็นองค์ประกอบ 2 สี คือ สีเหลือง และสีส้ม

ง. นำส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วย เอ็น - เฮกเซน มาสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ จะให้สีที่เป็นองค์ประกอบ 3 สี คือ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง

1.1 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโม-แนสคัส

จากผลการทดลองหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ตามเอกสารอ้างอิง ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้แก่ รำข้าว กากถั่วเหลือง ใบกระถินบด กากปาล์ม พบว่ากากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างสารสี รองลงมาคือ รำข้าว กากปาล์ม และใบกระถินบดตามลำดับ โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยการคำนวณแบบ DMRT พบว่าการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ผลแตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ แต่แหล่งไนโตรเจนรำข้าว กากปาล์ม และใบกระถินบดจะให้ผลไม่แตกต่างกัน ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 0.05

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าถั่วเหลืองสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารสีโดยเชื้อราโมแนสคัสได้ดีที่สุดจากแหล่งไนโตรเจนที่ทำการศึกษาทั้งหมด เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสนับสนุนผลการทดลองของ วรรณภา(2529) และสมชาย(2536)

1.2 สรุปผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโม-แนสคัส โดยควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยสารละลายซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

จากผลการทดลองหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ตามเอกสารอ้างอิง และควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่ากากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างสารสี รองลงมาคือ รำข้าว ใบกระถินบด และกากปาล์มตามลำดับ โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยการคำนวณแบบ DMRT พบว่าการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ผลแตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 0.01 สำหรับแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนจากรำข้าว ให้ผลแตกต่างจากกากปาล์ม และใบกระถินบดจะให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่กากปาล์ม และใบกระถินบดจะให้ผลไม่แตกต่างกัน ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 0.05

จากผลการทดลองในข้อที่ 2.1 และ2.2 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบระหว่างการใช้ซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในการควบคุมพีเอชและไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีผลทำให้การผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัสลดลง

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ น่าจะเป็นสารที่มีส่วนในการยับยั้งการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส ซึ่งสนับสนุนผลการทดลองของรัตนาภรณ์(2531) จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส อย่างไรก็ตามกากถั่วเหลืองที่ถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารสีโดยเชื้อราโมแนสคัสยังให้ผลผลิตสารสีสูงที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3 สรุปผลการศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

จากผลการทดลองหาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าปริมาณความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตสูงที่สุดรองลงมาคือ 50 40 และ60 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณความชื้นที่ใช้ทั้ง 50 และ70 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจากที่ระดับความชื้นเริ่มต้น 60 และ40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยการคำนวณแบบ DMRT ที่ระดับความน่าเชื่อถือ 0.05

เมื่อทำการพิจารณาการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสที่ระดับความชื้น 40 50 60 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณสีที่ผลิตขึ้นในช่วงแรกจะผลิตขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงปริมาณสีจึงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ที่ระดับความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ การสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสในช่วงแรกจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แล้วจะสร้างสารสีเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยเท่านั้นในช่วงหลัง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากที่ระดับความชื้นเริ่มต้นพอเหมาะเชื้อราโมแนสคัสจะสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งออกมาช้าๆ ทำให้ได้กลูโคสออกมาไม่มากจนเกิดการยับยั้งการสร้างสารสี ซึ่งตรงข้ามกับที่ระดับความชื้นเริ่มต้นสูงๆ เชื้อราโมแนสคัสจะสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งออกมาอย่างรวดเร็วทำให้เกิดการสร้างสารสีในช่วงแรก และการสร้างสารสีจะน้อยลงเมื่อมีปริมาณกลูโคสสะสมอยู่มากเกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จนเกิดการยับยั้งการสร้างสารสี ซึ่งเป็นไปตามผลการทดลองของ Lotong และ Suwannarit (1990)

แต่จากการทำการทดลองพบว่าที่ระดับความชื้นเริ่มต้น 70 เปอร์เซ็นต์ จะมีความยุ่งยากในการศึกษา และสามารถเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ง่ายกว่าที่ระดับความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นจึงเลือกระดับความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในการผลิตสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน

2. **สรุปผลการศึกษาองค์ประกอบของสีโดยวิธี** Thin - Layer Chromatography(TLC)

จากผลการทดลองพบว่าสีที่ได้จากการนำกากมันที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อโมแนสคัสในสภาวะที่มีความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ และเติมแหล่งไนโตรเจน กากถั่วเหลือง 10 เปอร์เซ็นต์ อายุ 12 วัน แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบของสีได้สีที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมด 4 สี คือ สีเหลือง สีส้ม สีม่วง และสีแดง เป็นไปตามผลการทดลองของ รัตนาภรณ์(2531) ซึ่งเมื่อนำกากมันที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ สีที่ได้จะมีองค์ประกอบทั้ง 4 สี แต่เมื่อนำกากมันที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อมาทำการอบที่ 60 องศาเซลเซียสแล้วจึงสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ สีที่ได้จะมีองค์ประกอบเพียง 2 สี คือ สีเหลืองและสีส้ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสีแดงและสีม่วงน่าจะถูกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและสีส้ม โดยจะพบว่าสีที่เป็นองค์ประกอบทุกสีจะสามารถละลายได้ในเอทานอลในปริมาณที่แตกต่างกัน แต่เมื่อใช้ เอ็น - เฮกเซน เป็นตัวทำละลายจะมีเฉพาะสีเหลืองและสีส้มเท่านั้นที่ละลายได้

3. **ข้อเสนอแนะเพื่อพัฒนาการทดลอง** ซึ่งอาจนำไปสู่การใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสีจากเชื้อราโมแนสคัสให้มีคุณภาพสูงขึ้น

จากการศึกษาพบว่ากากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองมีความสกปรกมาก จึงทำให้เกิดปัญหาเรื่องการปนเปื้อนสูง จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาวิธีการปรับปรุงคุณภาพวัตถุดิบขั้นต้น(pre - treatment) ก่อนที่จะนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เกิดความเหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสมากที่สุด แต่เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เชิดชัย เชียวธีรกุล ประสิทธิ์ แซ่ลี้ และปนัดดา แซ่อึ้ง. 2519. สีแดงจากข้าว(อังคัก) วารสารอาหาร 8:51-55.

ธวัช ขนบดี ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ นิตยา เลาหจินดา และอารีย์ เสือก้อน. 2530. เปรียบเทียบการทดสอบผลของสีผสมอาหารในกลุ่มอะโซบางชนิด และสีที่ได้จากการหมักเชื้อราโมแนสคัสในโครโมโซมของคน. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 25. สาขาสิ่งแวดล้อม. น. 1-45.

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา.โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สจล. กรุงเทพฯ.

นิสา บุตรดา. 2537. การศึกษาเปรียบเทียบสมบัติบางประการของเชื้อรากลายพันธุ์สีแดง สีเหลือง และไม่สร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส กบ. 11304. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บุษบา ยงสมิทธ์ และวรรณภา ทาบโลกา. 2527. การใช้ประโยชน์แป้งมันสำปะหลังในการผลิตสีผสมอาหารและเอนไซม์ย่อยแป้งโดยเชื้อราโมแนสคัสในสภาพหมักเปียก รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 22. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ น. 451-452.

บุษบา ยงสมิทธ์ และวรรณภา ทาบโลกา.2528. สีผสมอาหารจากมันสำปะหลังโดยเชื้อราโมแนสคัส. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์.). 19(1) : 45-50.

บุษบา ยงสมิทธ์ วิเชียร ยงมานิตชัย สนทนา แสงจันทร์ และชุลี ชัยศรีสุข. 2531. การผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลังเพื่ออุตสาหกรรมหมัก. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กรุงเทพฯ. 225 น.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี น. 197-242.

พลายแก้ว ไชยเบญจรงค์ และบุษบา ยงสมิทธ์. 2534 I. การศึกษาเบื้องต้นการผลิตโคจิสีแดงของโมแนสคัส เตรียมจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ. รายงานการประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 29, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น. 277-282.

พลายแก้ว ไชยเบญจรงค์ และบุษบา ยงสมิทธ์. 2534 II. ผลของการปรับวัตถุดิบต่อคุณภาพของอั้งก๊ก รายงานการประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 29 , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. น. 283-292.

รัตนา สุขสรรค์.2524.ข้าวแดงสีธรรมชาติสำหรับใช้ผสมอาหาร วารสารวิทยาศาสตร์. 35: 336-337.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ . 2531 . การคัดเลือกสายพันธุ์ *Monascus purpureus* ที่เหมาะสมในการผลิตสี.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท , มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ , เชียงใหม่.

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ.

สุภาพร จันทร์ศิริโพธา. 2531. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราแดงเพื่อเพิ่มความสามารถการผลิตสีโดยวิธีการกลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ.

สมชาย ไกรรักษ์. 2536. ศักยภาพของเชื้อราโมแนสคัสกลายพันธุ์ชนิดใหม่ในการผลิตสีเหลืองธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ.

Alexopoulous C.J. and C.W.Mims. 1979. Introductory Mycology. John Wiley and Sons, Inc., New York.

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

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

Broder, C.U. and P.E. Koehler. 1980. Pigments produced by *Monascus purpureus* with regard to quality. J. Food Sci. 45 : 578-579.

Carels, M. and D. Shepherd. 1975. Sexual reproduction cycle of *Monascus sp.* in submerged shaker culture. J. Bact. 122 (1) : 288-294.

Carels, M. and D. Shepherd. 1977. The Effect of different nitrogen source on pigment production and sporulation on *Monascus sp.* in submerged shaken culture. Can. J. Microbiol. 23 : 1360-1372.

Chiu,S.W. and S.M. Chan. 1992. Production of pigment by Monascus purpureus using sugar - cane bagasse in roller bottle cultures. 8 : 68 - 70.

Church, M.B. 1920. Laboratory experiments on the manufacture of Chinese ang – kak in the United States. The Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 12 : 45-46.

Evans, P.J. and H.Y. Wang. 1984. Pigment production from immobilized *Monascus* utilizing polymeric resin adsorbtion. Appl. Environ. Microbiol. 47 (6) : 1323-1326.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 Fungi. Part XXXIX. The Structure of Monascin. J. Chem. Soc. 1961 : 4579-4589.

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

Haws, EJ., 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. 1959 : 3598-3610.

Hendry, G.A.F. and J.D. Houghton. 1992. Natural Food Colorants. Blackie, Glasgow and London.

Hiroi, T.,T. Shima, T. Susuki, M. Tsukioka and N.Ogasawara. 1979. Hyperpigment productive mutant of *Monascus anka* for solid culture. Agri. Biol. Chem. 43 : 1975.

Iizuka, H. and S. Mineki. 1977. Studies on the genus *Monascus*, I purification and properties of two forms of glucoamylase from *Monascus kaoliang* NOV.S.P.E.1. J.Gen. Appl. Microbiol. 23 : 217-230.

Iizuka, H. and S. Mineki. 1978. Studies on the genus *Monascus*, II substrate specificity of two glucoamylase obtained from *Monascus kaoliang* F-1. J. Gen. Appl. Microbiol. 24 : 185-192.

Johns, M.R. and D.M. Stuart. 1991. Production of pigment by *Monascus purpureus* in solid culture. J. of Industrail Microbiology. 8 : 23-28.

Johnson, G.T. and F. McHan. 1975. Some effect of Zinc on the utilization of carbon source by *Monascus purpureus*. Mycologia. 67 : 806-816.

Kranz, C., C.panitz and B.Kunz. 1992. Biotransformation of free fatty acids in mixtures to methyl ketones by *Monascus purpureus*. Appl. Microbiol Biotechnol. 36 : 436-439.

Lin, T.F. and A.L. Demain. 1991. Effect of nutrition of *Monascus sp.* on formation of red pigments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 70-75.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lin, C.F. and H. Iizuka. 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang sp.* nov. Appl. Environ. Microbiol. 43 (3) : 671-676.

Lotong N. and P. Suwannarit. 1990. Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content. J. Appl. Bacteriol. 68 : 565-570.

Lumyong. S., S. Takao and F. Tomita. 1990. Organic acid production by *Monascus araneosus* AHU 9087. Microbial Utilization of Renewable Resources. 7 : 166-174.

Manandhar, K.L. and A.E. Apinis. 1971. Temperature relation in *Monascus.* Trans Br. Mycol. Soc. 57 (3) : 465-472.

Manchand, P.S., W.B. Whally and F.H. Chen. 1973. Isolation and structure of ankaflavin : A new pigment from *Monascus anka.* Phytochem. 12 : 2531-2532.

Nakamishi, K., M. Ohashi, S. Kumasaki and S. Yamamura. 1959. Structure of monascorubrin and monascamine. J. Am. Chem. Soc. 81 : 6339-6340.

Nishikawa, J., Y. Watanabe, J. Kashimura, K. Aso and H. Iizuka. 1988. Characterization of extracellular proteinases of the genus *Monascus* by their pH-activity profiles. J. Gen. Appl. Microbiol. 34 : 467-473.

Palo, M.A. , L. Vidal-Adeva and L. Maceda. 1960. Study on ang-kak and its production. Philipp. J. Sci. Soc. 89 : 1-22.

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- trihydroxynaphthalene, J. Agric. Food Chem. 29 (6) : 1189-1193.

Su, Y-C. and J.H. Huang. 1980. Fermentative production of anka-pigments (*Monascus* pigments.) Proc. Natl. Sci. Counc. ROC. 4 (2) : 201-215.

Van Tieghem, P. 1884. *Monascus,* genre nouvau de l' order des Ascomycetes. Bull. Soc. Bot. France, 31 : 226-231.Wong, H.C. and P.E. Koehler. 1981. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus.* and its relationship to pigment production. J. Fd. Sci. 46 : 589-592.

Wong, H.C., C.A. Hu. H.L. Yeh. W. Su. H.C. Lu. And C.F. Lin. 1986. Production, and characterization of α-galactosidase from *Monascus pilosus.* Appl. Environ. Microbiol. 52 (5) : 1147-1152.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wong, H.C. and Y.S. Bau. 1977. Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron and X-rays induced strains of *Monascus purpureus*. Went. Plant Physiol. 60 : 578-581.

Wong, H.C. and V.S. Bau. 1978. A comparision of conidial and ascospore germination of *Monascus purpureus*. Trans. Br. Mycol Soc. 70 (2) : 277-282.

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

Yongsmith, B. 1993. Potentials of *Monascus* molds on production of yellow pigments. Invited paper in International Symposium of the 20th Anniversary of Intern. Post – Graduate Univ. Course in Microbiology. September 20-22, 1993. Osaka, Japan. pp. 155-163.

Yongsmith, B., W. Tabloka, W. Yongmanichai, and P., Bavavoda. 1993. Culture condition for yellow pigment production of *Monascus sp.* KB10 grown in cassava medium. World J. Microbiol. Biotechnol. 9 : 85-90.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. อาหาร YM (malt yeast extract agar)

เปปโตน	5.0 กรัม
ยีสต์สกัด	3.0 กรัม
มอลต์สกัด	3.0 กรัม
กลูโคส	10.0 กรัม
วุ้น	15.0 กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำจนได้ปริมาตรรวมเป็น 1000.0 มล. ปรับพีเอช เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร YMS (malt yeast extract starch agar)

เปปโตน	5.0 กรัม
ยีสต์สกัด	3.0 กรัม
มอลต์สกัด	3.0 กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	20.0 กรัม
วุ้น	15.0 กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำจนได้ปริมาตรรวมเป็น 1000.0 มล. ปรับพีเอช เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร PDA (potato dextrose agar)

มันฝรั่งหั่นเป็นรูปลูกบาศก์ขนาด 0.5 ซม.	250.0 กรัม
เด็กโตรส	20.0 กรัม
วุ้น	20.0 กรัม

นำมันฝรั่ง 250.0 กรัมที่เตรียมไว้เติมน้ำกลั่น 1000.0 มล. เป็นเวลา 15 - 20 นาที กรองเอาแต่ส่วนที่เป็นน้ำ เติมส่วนประกอบที่เหลือ ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1,000.0 มล. ปรับพีเอชเป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารกากมันสำปะหลัง

แบ่งเป็น 2 แบบ คือ

4.1 ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

ชั่งกากมันสำปะหลัง 20.0 กรัมน้ำหนักแห้ง ใส่ขวดรูปกรวยขนาด 250 มล.

4.2 มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

ชั่งกากมันสำปะหลัง 18.0 กรัมน้ำหนักแห้ง และแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ กากถั่วเหลือง กากปาล์ม รำข้าว และใบกระถินบด 2.0 กรัมใส่ขวดรูปกรวยขนาด 250 มล.

นำอาหารที่เตรียมไว้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที อาหารที่เตรียมยังไม่ผ่านการปรับความชื้นก่อนใช้ต้องทำการปรับความชื้นตามที่ต้องการเสียก่อน

5. ข้าวนึ่งสุก

นำข้าวสารมานึ่งโดยใช้

ข้าวสาร 20.0 กรัม

น้ำกลั่น 20.0 มล.

นำข้าวสารและน้ำใสลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มล. ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ ช.
การหาความชื้นของกากมันสำปะหลัง

การหาความชื้นเริ่มต้น

1. นำถ้วยวิเคราะห์ความชื้นมาทำเครื่องหมาย แล้วนำไปอบที่ 105.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรืออบที่ 80 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำมาใส่ไว้ในเดซิก-เคเตอร์รอจนเย็น ทำการชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เพื่อหาน้ำหนักของถ้วยแต่ละใบ จดบันทึกข้อมูล
2. ชั่งกากมันประมาณ 5 กรัมใส่ในถ้วยวิเคราะห์ความชื้นที่ทำการหาน้ำหนักของถ้วยไว้แล้ว นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เพื่อหาน้ำหนักที่แน่นอน
3. นำถ้วยวิเคราะห์ความชื้นจากข้อ 2 ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรืออบที่ 80 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำมาใส่ไว้ในเดซิกเคเตอร์รอจนเย็น ทำการชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เพื่อหาน้ำหนักของถ้วยแต่ละใบ จดบันทึกข้อมูล
4. ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น โดยใช้สูตรดังนี้

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

การหาความชื้นเมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

1. ทำการทดลองเหมือนการหาความชื้นเริ่มต้นแต่ใช้กากมันสำปะหลัง 20.0 กรัม ในขวดรูปกรวยขนาด 250 มล. ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยจะทำการทดลอง 5 ครั้ง แต่ละครั้งจะทำ 3 ซ้ำ (เป็นการนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง แต่ละครั้งจะทำ 3 ขวด)
2. ทำการวิเคราะห์ว่าแต่ละครั้งของการนึ่งฆ่าเชื้อมีผลทำให้ความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไปเท่ากันหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ ค.
การนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

ตามวิธีของ Towsend และ Lindrend ,1953 (รัตนาภรณ์ , 2531)

1.1 ทำความสะอาดสไลด์ และ Cover grass ของ Haemacytometer วาง Cover grass ให้อยู่กึ่งกลางสไลด์ ปิเปตสปอร์แขวนลอยแตะที่ขอบ Cover grass ให้สปอร์แขวนลอยแทรกเข้าไปอยู่ระหว่าง Cover grass และสไลด์จนเต็ม

1.2 นำไปนับจำนวนด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับสปอร์ที่อยู่ในแต่ละช่องเล็ก และอยู่ระหว่างเส้นทางด้านล่าง และด้านขวาตามแนวทแยงมุมซ้าย และขวารวม 9 ช่อง

1.3 คำนวณจำนวนสปอร์

ความลึกของ Haemacytometer ที่ใช้ = 0.1 มิลลิเมตร

ขนาดพื้นที่ของแต่ละช่องเล็ก = 0.0025 ตารางมิลลิเมตร

ดังนั้นปริมาตรของแต่ละช่องเล็ก = 0.00025 ลูกบาศก์เมตร

จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร = สปอร์เฉลี่ย X 4 X 10^5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ ง.
การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์ทางเคมี

1.การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามวิธีฟีนอล - กรดซัลฟิวริก

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

นำกลูโคสชนิดเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade glucose) อบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่งโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ก่อนนำมาเตรียม สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 และ120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.1.2 กรดซัลฟิวริก 2 โมลาร์

1.1.3 สารละลายจากการย่อยตัวอย่างที่เป็นของแข็งด้วย กรดซัลฟิวริก 2 โมลาร์

เตรียมโดยชั่งตัวอย่างที่ต้องการศึกษา 1 กรัม ใส่ในหลอดทำลองแล้ว เติมกรดซัลฟิวริก 2 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา ครึ่งชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำ ส่วนใสไปใช้ ในการวิเคราะห์

1.1.4 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

1.1.5 สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยละลายฟีนอล 5 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล.

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารมาตรฐานที่ใช้

1.2.2 ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อยตัวอย่างของแข็ง 1.0 มล. ใส่ใน หลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอล 1.0 มล. ผสมให้เข้ากัน

1.2.3 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5.0 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10นาที ที่ 30 องศาเซลเซียส

1.2.4 นำไปแช่ในน้ำเย็น เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

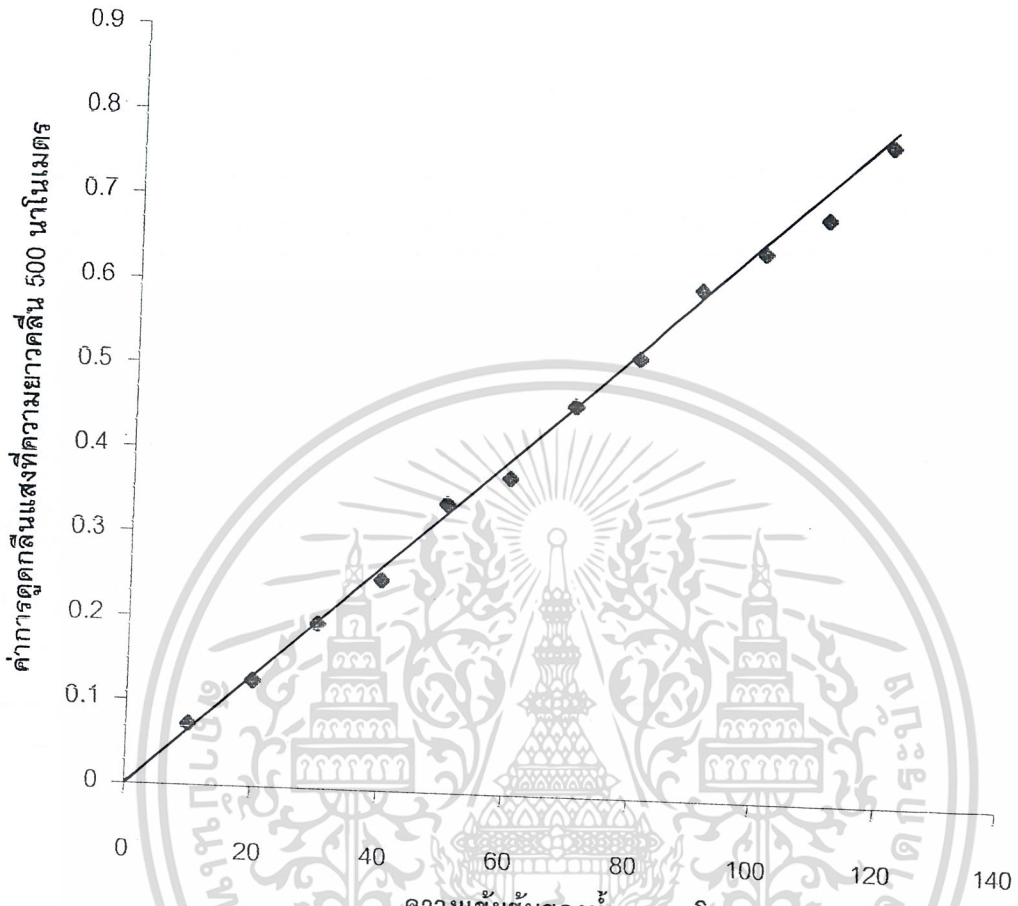
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.5 นำค่าที่ได้จากน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานมาเขียนเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส จะได้กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับตัวอย่าง

ตารางที่ 1ง : แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง(OD_{500})กับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	OD_{500}
10	0.073
20	0.126
30	0.196
40	0.250
50	0.342
60	0.375
70	0.463
80	0.521
90	0.605
100	0.650
110	0.692
120	0.780

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1ง : กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2ง : แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในวัตถุดิบ ตามวิธีฟีนอล - กรดซัลฟิวริก

ตัวอย่าง	OD_{500}	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
กากมันสำปะหลัง	0.316	49.50
รำข้าว	0.238	36.50
กากถั่วเหลือง	0.141	17.50
ใบกระถินบด	0.082	12.50
กากปาล์ม	0.202	31.00

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด(Crude protein) ตามวิธีของเจลดาล์ (Kjeldahl method)

2.1 การเตรียมสารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 %

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4,000 กรัม ในน้ำกลั่น 10 ลิตร

- กรดบอริก 4 % ผสมกับบรอมครีซอล กรีน และ เมทิล เรด

ละลายกรดบอริก 400 กรัม ในน้ำกลั่น 6 ลิตร นำไปตั้งบนhot plate ต้มจนสารละลายหมด เติมน้ำกลั่นที่ร้อน 3 ลิตร ทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมบรอมครีซอล กรีน 100 มิลลิลิตร และเมทิล เรด 70 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนเป็น 10 ลิตร คนให้เข้ากันดี

ดูดสารละลายกรดบอริก มา 25 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสก์ เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายในฟลาสก์ยังคงเป็นสีแดง ให้ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งกลายเป็นสีม่วงเทา คำนวณปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่จำเป็นต้องเติมลงในกรดบอริก 10 ลิตร

มิลลิลิตร ของ1.0 M Alkali = มิลลิลิตร ของการไตเตรต × 40

เติมปริมาณที่คำนวณได้ของสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ลงในสารละลายกรดบอริก ผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กรดไฮโดรคลอริก 0.2นอร์มอล

เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 17 มิลลิลิตรใส่ในขวดวัดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นอยู่ประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร หาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล หรือ Na_2CO_3 0.2 นอร์มอล

- Na_2CO_3 0.2 นอร์มอล

นำ anhydrous Na_2CO_3 ประมาณ 10 กรัม บดด้วยครกให้เป็นผงละเอียด จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 265 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง หรือ อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์

ชั่ง Na_2CO_3 ที่อบแล้ว 1.06 กรัม (จดน้ำหนักที่แน่นอนไว้) ละลายในน้ำกลั่น ใส่ในขวดวัดปริมาตรเพื่อปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

คำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลาย } Na_2CO_3 \text{ (เป็นนอร์มอล)} = \frac{\text{น้ำหนัก } Na_2CO_3 \times 2 \times 1,000}{106 \times 100}$$

การทำ Standardize กรดไฮโดรคลอริก 0.2นอร์มอล (เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอน)

1. ปิเปต สารละลาย Na_2CO_3 ที่เตรียมไว้ 25 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร

2. หยด เมทิล ออเรนทจ์ 2 หยดเพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ จะได้สารละลายสีเหลือง

3. ใส่กรดไฮโดรคลอริกที่ต้องการทราบความเข้มข้นในบิวเรต

4. นำ สารละลาย Na_2CO_3 ที่อยู่ในฟลาสก์มาไทเทรตกับ กรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีจำปา จดปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้

5. นำไปให้ความร้อน จนเดือดน้อย ๆ เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าสารละลายเปลี่ยนกลับไปเป็นสีเหลืองอีก ให้ทิ้งไว้จนเย็น แล้วนำมาไทเทรตต่อจนถึงจุดยุติอีก

6. นำปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรตได้มารวมกัน

7. ทำซ้ำเพื่อหาความเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณ

$$N\ (HCl) = \frac{\text{มิลลิลิตร } Na_2CO_3 \times N\ (Na_2CO_3)}{\text{มิลลิลิตร HCl}}$$

2.2 วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 0.9 – 1.0 กรัม ใส่ลงในกระดาษกรองแล้วใส่ลงใน digestion tube

2. ใส่ K_2SO_4 3.9 กรัม และ $CuSO_4 . 5H_2O$ 0.4 กรัม

3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตรเขย่าเบา ๆ

4. นำ digestion tube วางลงในเครื่องย่อย ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส แล้วเปิดเครื่องดูดควัน

5. ย่อยเป็นเวลา 50 นาที จนได้สารละลายในสีเขียวหรือสีฟ้า นำออกจากเครื่องย่อย ตั้งทิ้งไว้ในเครื่องดูดควัน เพื่อให้หมดควัน เติมน้ำลงในdigestion tube พอประมาณ แล้วนำไปเข้าเครื่องกลั่น

6. เปิดก๊อกน้ำเพื่อหล่อเย็นเครื่องควบแน่นและเปิดpower ของเครื่องกลั่น (Kjeltec)

7. กดปุ่ม Alkali = 2-3 ครั้ง จนแน่ใจว่าในท่อด่างไม่มีฟองอากาศหลงเหลืออยู่

8. warm เครื่องกลั่นโดยใช้ฟลาสก์และ digestion tube เปล่า เปิด steam กลั่นเป็นเวลา 5 นาที

9. เปิด steam นำ digestion tube และฟลาสก์ ออกจากเครื่องกลั่น

10. Set Alkali = 2 Delay time = 0.2 Steam = 3.6

11. นำฟลาสก์ซึ่งมี กรดบอริก 4% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปตั้งบน platform ของเครื่องกลั่น กดปุ่ม Auto ยก platform ขึ้นเพื่อให้ digestion tube จุ่มลงในสารละลาย ปิด Safty door เครื่องจะทำงานโดยมีน้ำกลั่นลงมาเจือจางสารตัวอย่างแล้วตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 % ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นsteam จะทำงาน

12. เมื่อกลั่นจนเสร็จแล้วนำฟลาสก์และ digestion tube ออกจากเครื่องกลั่นแล้วทำการกลั่นตัวอย่างใหม่ต่อไป

13. นำฟลาสก์ ซึ่งมี distillate เป็นสารละลายสีเขียวไปไทเทรตกับกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณ

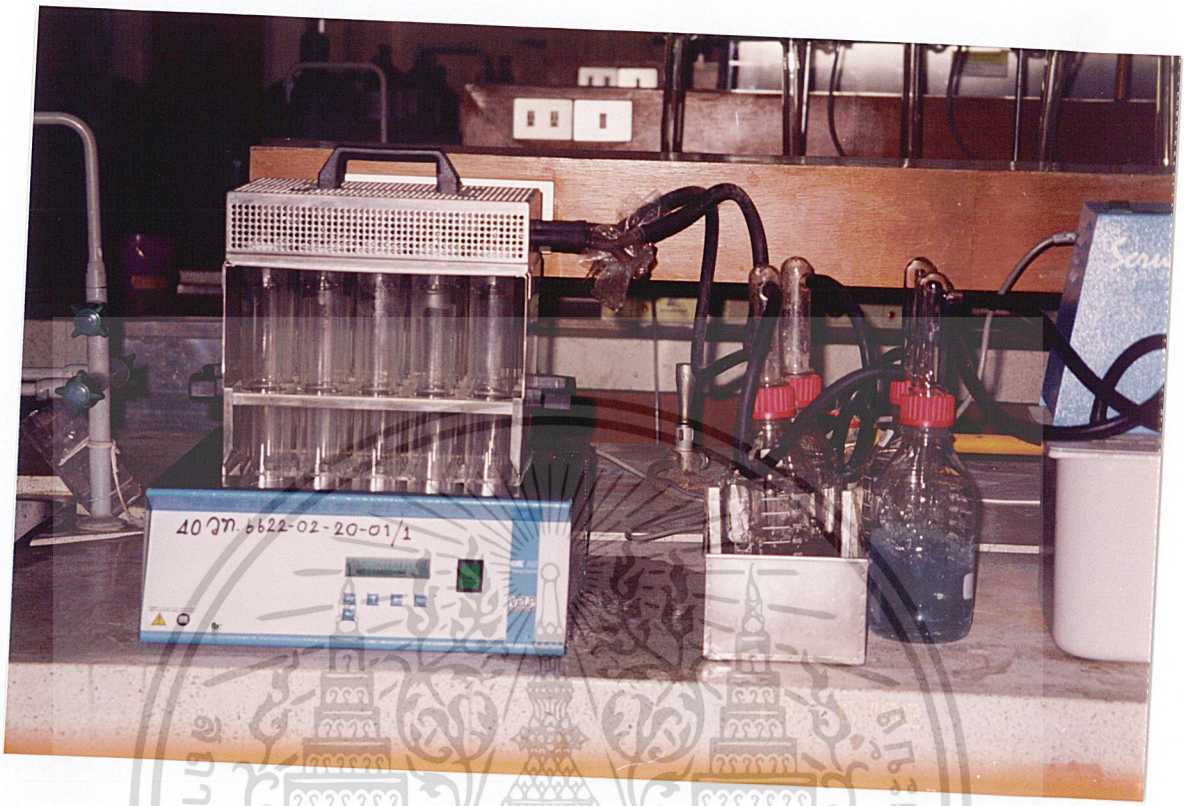
$$\% \text{ ไนโตรเจน} = \frac{0.401 \times (\text{มิลลิลิตร HCl} - \text{blank}) \times N\ (HCl)}{\text{จำนวนกรัมของตัวอย่าง}}$$

$$\% \text{ โปรตีน} = \% \text{ ไนโตรเจน} \times 6.25$$

ตารางที่ 3ง : แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดในวัตถุดิบ ตามวิธี เจลดาล์

ตัวอย่าง	ปริมาณไนโตรเจน(%)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด(%)
กากมันสำปะหลัง	0.2257	1.4108
รำข้าว	1.5679	9.7991
กากถั่วเหลือง	5.5334	34.5836
ใบกระถินบด	1.3068	8.1674
กากปาล์ม	2.1840	13.6540

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2ง : เครื่องย่อยโปรตีน(Digester)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3ง : ชุดกลั่น (Distilling unit)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเตรียมสารละลาย ซิเตรต - ฟอสเฟต บัฟเฟอร์

3.1 เตรียมสารละลายกรดซิตริก 1 โมลาร์ โดยละลายกรดซิตริก 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร(สารละลาย A)

3.2 เตรียมสารละลาย dibasic sodium phosphate โดยละลาย $Na_2HPO_4 . 7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร(สารละลาย B)

ผสมสารละลาย A ปริมาตร X มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร Y มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

X(มล.)	Y(มล.)	พีเอช
44.6	5.4	2.6
42.2	7.8	2.8
39.8	10.2	3.0
37.7	12.3	3.2
35.9	14.1	3.4
33.9	16.1	3.6
32.3	17.7	3.8
30.7	19.3	4.0
29.4	20.6	4.2
27.8	22.2	4.4
26.7	23.3	4.6
25.2	24.8	4.8
24.3	25.7	5.0
23.3	26.7	5.2
22.2	27.8	5.4
21.0	29.0	5.6
19.7	30.3	5.8
17.9	32.1	6.0
16.9	33.1	6.2
15.4	34.6	6.4
13.6	36.4	6.6
9.1	40.9	6.8
6.5	43.6	7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การวัดพีเอชตัวอย่างที่เป็นของแข็ง

นำตัวอย่างของแข็งที่ต้องการวัดพีเอช มาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 10 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดพีเอช ด้วยเครื่องวัดพีเอช(pH meter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ จ.
ตารางข้อมูลดิบ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง

ตารางที่ 1จ. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส
(ข้อมูลดิบของตารางที่ 2)

เวลาที่เพาะเลี้ยง	ปริมาณสี(หน่วย)ที่ได้เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น											
	รำข้าว			กากถั่วเหลือง			ใบกระถินบด			กากปาล์ม		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 0	4.9948	5.7668	4.7721	6.1549	5.9940	6.2052	8.7293	8.4663	8.7623	4.8752	5.0636	4.8169
วันที่ 2	9.4804	6.0169	7.6119	7.8079	12.9142	6.9508	8.6616	8.1272	8.2727	5.5533	6.5511	5.2170
วันที่ 4	13.9661	6.8575	8.6969	11.8631	21.8345	9.4430	7.6292	8.8571	7.7832	6.2314	6.3721	5.6172
วันที่ 6	19.9511	7.7816	8.5383	22.7172	23.7204	179.7204	8.40040	11.3988	10.0483	16.4855	10.0707	7.3423
วันที่ 8	29.8115	13.4746	9.3977	111.9428	69.8711	222.9481	10.5663	11.4305	14.6249	16.5866	8.4062	6.7973
วันที่ 10	52.4180	51.4164	11.8295	195.9439	170.8348	341.8007	10.7714	12.3162	10.2925	15.4980	8.3764	8.3853
วันที่ 12	84.2521	55.5491	14.7558	210.0191	189.8581	366.9237	10.8822	8.1647	8.0744	17.7141	8.9551	8.8565

ตารางที่ 2จ. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส
โดยควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยสารละลายซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
(ข้อมูลดิบของตารางที่ 3)

เวลาที่เพาะเลี้ยง	ปริมาณสี(หน่วย)ที่ได้เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น											
	รำข้าว			กากถั่วเหลือง			ใบกระถินบด			กากปาล์ม		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 0	6.3788	7.5013	7.0484	7.0595	6.8984	6.5909	9.3375	9.7147	9.9787	5.7321	6.4980	5.3662
วันที่ 2	9.5623	9.6421	8.4169	12.7175	10.3158	9.5751	9.9030	10.1499	10.2285	7.7235	7.3457	6.9625
วันที่ 4	12.7459	11.7830	9.7855	18.3756	13.7333	12.5594	10.4686	10.5852	10.4783	9.7149	8.1935	8.5588
วันที่ 6	14.5441	15.0904	12.9709	24.4354	18.6401	20.8589	11.2165	11.4613	10.4296	9.6876	8.8643	9.4402
วันที่ 8	15.6467	12.9235	12.5168	26.5529	23.5591	22.6637	13.0338	11.5206	10.0731	9.0732	7.5529	9.7504
วันที่ 10	13.5472	10.3765	12.9267	39.8075	52.9756	31.3345	11.6835	10.6691	11.5913	9.8036	8.9990	10.5283
วันที่ 12	13.9484	11.2271	16.0654	65.8307	88.6668	71.6056	10.7536	13.1932	13.1142	10.9046	8.4445	12.3549

ตารางที่ 3จ. การศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส
(ข้อมูลดิบของตารางที่ 4)

เวลาที่เพาะเลี้ยง	ปริมาณสี(หน่วย)ที่ได้เมื่อให้ความชื้นเริ่มต้นเป็นร้อยละ											
	40			50			60			70		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
วันที่ 0	7.8482	6.1132	6.0761	7.1419	5.8264	7.0407	7.0583	7.2042	7.2138	7.6983	7.4134	6.6884
วันที่ 2	8.7770	8.7415	6.7880	10.5309	9.2599	10.3797	11.4401	10.5292	12.5875	18.1593	16.6891	26.1791
วันที่ 4	9.7058	11.3698	7.5000	13.9200	12.6934	13.7187	15.8220	13.8543	17.9613	28.6203	25.9648	45.6699
วันที่ 6	14.3431	14.6327	12.2103	16.7582	13.3087	15.2628	16.5142	23.2447	25.7276	48.9655	32.3058	53.2407
วันที่ 8	13.6348	18.0968	18.3534	22.4978	19.0249	19.7214	18.9021	34.4202	67.4552	51.5215	39.7791	61.4600
วันที่ 10	32.4550	30.8523	40.6360	32.1966	36.7566	42.9306	29.2498	55.1896	63.5821	63.7658	41.6145	70.5871
วันที่ 12	48.5407	25.0283	67.0871	71.6056	59.5934	76.3687	36.1150	83.5997	55.1249	90.4254	63.2588	61.5930

ภาคผนวกที่ ฉ.
การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารกากมันสำปะหลัง

1. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

1.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA)

การวางแผนการทดลองจะใช้การวางแผนการทดลองแบบ RCB (Randomized complate block design)

จำนวนซ้ำ = 3 Treatment = 4 x 7

แหล่งไนโตรเจน = 4

1.รำข้าว 3.กากถั่วเหลือง

2.ใบกระถินบด 4.กากปาล์ม

วันที่ทำการเก็บผลการทดลอง

1.วันที่ 0 5.วันที่ 8

2.วันที่ 2 6.วันที่ 10

3.วันที่ 4 7.วันที่ 12

4.วันที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1ฉ : การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) ของตารางที่ 2

Source of variation(SV)	d.f.	s.s.	m.s.	F ratio	F tabular	
					1%	5%
Replication	2	5688.3273	2844.1636	2.43^{ns}		
Treatment	27	346325.4140	12826.8672	10.96**	1.9725	1.6188
N-source (N)	3	134004.9343	44668.3114	38.18**	4.0250	2.7150
Day (D)	6	73106.5555	12184.4259	10.42**	3.0275	2.2050
N x D	18	139213.9241	7734.1069	6.61**	2.1625	1.7300
Error	54	63172.6445	1169.8638			
Total	83	415186.3857				

** Significant at 1% level ^{ns} non-significant

1.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ใช้การคำนวณแบบ DMRT

ตารางที่ 2ฉ : การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ใช้การคำนวณแบบ DMRT ของตารางที่ 2

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	แหล่งไนโตรเจนที่ใช้				
	รำข้าว	ถั่วเหลือง	ใบกระถิน	กากปาล์ม	D-mean
0	5.1780 a	6.1180 d	8.6520 a	4.9190 a	6.2170
2	7.7030 a	9.2240 d	8.3540 a	5.7740 a	7.7640
4	9.8400 a	14.3800 dd	8.0900 a	6.0730 a	9.5960
6	12.0900 a	75.3860 c	9.9490 a	11.3000 a	27.1810
8	17.5620 a	134.9210 b	12.2070 a	10.5970 a	43.8220
10	38.5550 a	236.1930 a	11.1270 a	10.7530 a	74.1570
12	51.5190 a	255.6000 a	9.0400 a	11.8420 a	82.0000
N - mean	20.3500	104.5460	9.6310	8.7510	35.8200

In a column , means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส โดยควบคุมพีเอชที่ 5.8 ด้วยสารละลายซิเตรต - ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA)

การวางแผนการทดลองจะใช้การวางแผนการทดลองแบบ RCB (Randomized complate block design)

จำนวนซ้ำ = 3 Treatment = 4 x 7

แหล่งไนโตรเจน = 4

1.รำข้าว 3.กากถั่วเหลือง

2.ใบกระถินบด 4.กากปาล์ม

วันที่ทำการเก็บผลการทดลอง

1.วันที่ 0 5.วันที่ 8

2.วันที่ 2 6.วันที่ 10

3.วันที่ 4 7.วันที่ 12

4.วันที่ 6

ตารางที่ 3ฉ : การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) ของตารางที่ 3

Source of variation(SV)	d.f.	s.s.	m.s.	F ratio	F tabular	
					1%	5%
Replicatiom	2	95.6848	47.8424	<1		
Treatment	27	7682.9132	284.5523	5.74**	1.9725	1.6188
N-source (N)	3	3084.4231	1028.1410	20.73**	4.0250	2.7150
Day (D)	6	1797.5246	299.5874	6.04**	3.0275	2.2050
N x D	18	2800.9655	155.6092	3.14**	2.1625	1.7300
Error	54	2677.6198	49.5856			
Total	83					

** Significant at 1% level , * Significant at 5% , ^{ns} not significant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ใช้การคำนวณแบบ DMRT

ตารางที่ 4ฉ : การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ใช้การคำนวณแบบ DMRT ของตารางที่ 3

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	แหล่งไนโตรเจนที่ใช้				
	รำข้าว	ถั่วเหลือง	ใบกระถิน	กากปาล์ม	D-mean
0	6.9760 b	6.8497 e	9.6773 a	5.8653 a	7.3421
2	9.2070 ab	10.8697 de	10.0940 a	7.3443 a	9.3788
4	11.4383 ab	14.8893 d	10.5107 a	8.8227 a	11.4153
6	14.2017 a	21.3113 c	11.0360 a	9.3307 a	13.9699
8	13.6960 a	24.2587 c	11.5427 a	8.7920 a	14.5723
10	12.2837 ab	41.3730 b	11.3147 a	9.7770 a	18.6871
12	13.7467 a	75.3680 a	12.3537 a	10.5683 a	28.0092
N - mean	11.6499	27.8457	10.9327	8.6429	14.7678

In a column , means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมนาสคัส

3.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA)

การวางแผนการทดลองจะใช้การวางแผนการทดลองแบบ RCB (Randomized complate block design)

จำนวนซ้ำ = 3 Treatment = 4 x 7

ความชื้นเริ่มต้น= 4

1. 40 % 3. 60 %

2. 50 % 4. 70 %

วันที่ทำการเก็บผลการทดลอง

1.วันที่ 0 5.วันที่ 8

2.วันที่ 2 6.วันที่ 10

3.วันที่ 4 7.วันที่ 12

4.วันที่ 6

ตารางที่ 5ฉ : การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ(ANOVA) ของตารางที่ 4

Source of variation(SV)	d.f.	s.s.	m.s.	F ratio	F tabular	
					1%	5%
Replicatiom	2	796.7286	398.3643	4.16*		
Treatment	27	34353.2774	1272.3436	13.27**	1.9725	1.6188
Moisture (M)	3	5334.5774	1778.1925	18.55**	4.0250	2.7150
Day (D)	6	26580.9504	4430.1584	46.21**	3.0275	2.2050
M x D	18	2437.7496	135.4305	1.41^{ns}	2.1625	1.7300
Error	54	5177.2179	95.8744			
Total	83	40327.2239				

** Significant at 1% level , ^{ns} not significant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ใช้การคำนวณแบบ DMRT

ตารางที่ 6ฉ : การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ใช้การคำนวณแบบ DMRT ของตารางที่ 4

วันที่ทำการเพาะเลี้ยง	ปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่ใช้				
	40%	50%	60%	70%	D-mean
0	6.6733 b	6.6667 c	7.1533 c	2.2600 e	6.9383f
2	8.0967 b	10.0500 c	11.5133 c	20.3333 de	12.4983ef
4	9.5200 b	13.4400 c	15.8767 c	33.4153 cd	18.0625de
6	13.7267 b	15.1033 c	21.8233 c	44.8333 bc	23.8717cd
8	16.6900 b	20.4100 bc	40.2567 b	50.9167 bc	32.0683c
10	34.6433 a	37.2300 b	49.3333 ab	58.6500 ab	44.9642b
12	46.8800 a	69.1833 a	58.2733 a	71.7533 a	61.5225a
M - mean	19.4614	24.5833	29.1757	41.0229	28.5608

In a column , means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้