สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตสารโมนาโคลินบนอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Monascus purpureus*

นางสาวดวงใจ สิทธิพล
นางสาวปริศนา ขัตติยศ
นางสาวอัจฉริยา วิเชียรแลง

ปพ.
ต1ม7
2551

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 104446
วัน,เดือน,ปี - 2 พ.ย. 2552

b 12140533
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The monacolin production on solid cultivation by *Monascus purpureus*

Miss Duangai Sittipol

Miss Prissana Katthiyos

Miss Achariya Wichainlang

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตสารโมนาโคลินบนอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Monascus purpureus*

The monacolin production on solid cultivation by *Monascus purpureus*

ชื่อนักศึกษา นางสาว ดวงใจ สิทธิพล รหัส 48050842

นางสาว ปริศนา ขัตติยศ รหัส 48050847

นางสาว อัจฉริยา วิเชียรแลง รหัส 48050859

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2551

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์	

(ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม)

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตสารโมนาโคลินบนอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Monascus purpureus*
	The monacolin production on solid cultivation by *Monascus purpureus*
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ดวงใจ สิทธิพล รหัส 48050842
	นางสาว ปริศนา ขัตติยศ รหัส 48050847
	นางสาว อัจฉริยา วิเชียรแลง รหัส 48050859
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2551
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้เชื้อเริ่มต้นชนิดเป็นเส้นใยเชื้อรา และชนิดสารละลายสปอร์ พบว่าต่างก็ให้การเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้เชื้อเริ่มต้นชนิดเส้นใยเชื้อรา เนื่องจากการเตรียมเชื้อสามารถทำได้ง่าย อีกทั้งยังสามารถขยายปริมาตรการเตรียมได้ การเตรียมเชื้อเริ่มต้นสามารถทำได้โดยเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลว SS เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งให้การเจริญอยู่ในระยะที่เซลล์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว โดยอาศัยการวัดปริมาณเอนอะซิทิลกลูโคซามีน การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตสารโมนาโคลิน การสะสมกลูโคส และการผลิตรงควัตถุสี เมื่อเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง ซึ่งการศึกษาความชื้นเริ่มต้นเตรียมได้โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 14.5 19.5 และ 24.5 มิลลิลิตร ลงไปบนอาหารแข็ง ในสภาวะก่อน หรือหลังจากนำเมล็ดข้าวฆ่าเชื้อ ผลการทดลองพบว่าในสัปดาห์ที่ 4 ของการเจริญบนอาหารแข็ง ซึ่งเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 14.5 มิลลิลิตร มีค่าความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 46.53 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างสารโมนาโคลินสูงสุด 3.77 หน่วยที่การดูดกลืนแสง 238 นาโนเมตรต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และปริมาณสีสูงสุด 17.44 หน่วยการดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตรต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการเพิ่มความชื้นเริ่มต้น ทำให้การผลิตสารโมนาโคลิน และสารสีมีค่าลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The monacolin production on solid cultivation by *Monascus purpureus*
Students	Miss Duangai Sittipol Student ID 48050842
	Miss Prissana Katthiyos Student ID 48050847
	Miss Achariya Wichainlang Student ID 48050859
Degree	Bachelor of Science
Major	Industrial Microbiology
Academic Year	2008
Advisor	Asst. Prof. Dr. Somchai Krairak

ABSTRACT

The monacolin production by *Monascus purpureus* was studied for the optimal culture conditions in solid state fermentation. The effect of inoculums types was examined among spore suspension and mycelium form. It was found that both 2 types of inoculums showed the same results on *Monascus* growth and monacolin production on solid state fermentation. Thus, the mycelium form was selected due to the large scale propagation. The inoculums was prepared by *M. purpureus* cultivation in SS medium for 4-day. The growth of *M. purpureus* was measured by N-acetyl glucosamine assay method. The result showed that 4-day of cultivation presented growth status at mid-log phase. After then, the effect of moisture content on monacolin production, glucose accumulation and pigment production was performed. The moisture content in solid state fermentation was prepared by water addition of 14.5 ml, 19.5 ml and 24.5 ml earlier or later rice grain sterilization. The result was observed on 4-week of solid state fermentation. The 14.5 ml of water addition gave the initial moisture contain of 46.53% presented the maximal monacolin production (3.77 U_{238nm} / g-dry sample weight) and pigment production (17.44 U_{500nm} / g-dry sample weight). It was concluded that the higher moisture content the lower monacolin and pigment productions.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่อง การผลิตสารโมนาโคลินบนอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Monascus purpereus* ซึ่งโครงงานพิเศษฉบับนี้จะไม่สามารถสำเร็จบรรลุจุดประสงค์ไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี และ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา และความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ตลอดจนกรุณาช่วยตรวจแก้ไขงานวิจัยนี้ให้สมบูรณ์ ซึ่งทางคณะผู้จัดทำมีความซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิก - คืนสารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และอุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำในเรื่องต่าง ๆ รวมไปถึงคุณป้าแม่บ้านที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ในการทำการทดลอง

ขอกราบขอบคุณบิดา มารดา ตลอดจนญาติพี่น้องทุก ๆ คน ที่คอยเป็นกำลังใจให้ความช่วย เหลือ และให้คำปรึกษาต่าง ๆ ในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาในเรื่องต่าง ๆ ตลอดมา และคอยให้ความช่วยเหลือในการทดลอง อีกทั้งให้ยืมอุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ในการทดลอง

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงงานพิเศษฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจ หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใดคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

นางสาว ดวงใจ สิทธิพล
นางสาว ปริศนา ขัตติยศ
นางสาว อัจฉริยา วิเชียรแลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	3
1.6 การวิเคราะห์	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส	5
2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาและการสืบพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส	6
2.3 ความสัมพันธุ์ระหว่างสารโมนาโคลิน และ คลอเรสเตอรอล	7
2.3.1 คุณสมบัติสารโมนาโคลิน	7
2.3.2 ประวัติในการศึกษาสารโมนาโคลิน	8
2.3.3 การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา	9
2.3.4 กระบวนการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน	10
2.3.5 กลไกการทำงานของโมนาโคลิน	10
2.3.6 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา	12
2.3.7 กลไกการออกฤทธิ์	13
2.3.8 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน	15
2.3.9 ขนาดยาและการจัดเตรียมยา	16
2.3.10 ประโยชน์ในการรักษา	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ และเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ	17
2.5 ผลิตภัณฑ์อื่นที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส	17
2.6 การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง	18
2.6.1 สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส	18
2.6.2 สับสเตรท	18
2.6.3 พีเอช	19
2.6.4 อุณหภูมิ	19
2.6.5 อัตราส่วนของก๊าซ	19
2.6.6 ความชื้น	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	21
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	21
3.1.1 *Monascus purpureus*	21
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	21
3.2.1 SS (soybran starch)	21
3.2.2 ข้าวเสาไห้	21
3.3 อุปกรณ์	21
3.4 วิธีการทดลอง	21
3.4.1 เชื้อราโมแนสคัส	21
3.4.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว SS	22
3.4.3 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง	22
3.5 การวิเคราะห์ผล	24
3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณเอน- อะซิทิลกลูโคซามีน ด้วยวิธีทางเคมี (NAG Assay)	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง	25
3.5.3 การหาน้ำหนักแห้งของข้าวแดง	25
3.5.4 การสกัดสารสี	25
3.5.5 การหาพีเอชของข้าว	25
3.5.6 การวิเคราะห์สารโมนาโคลิน	25
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	25
4.1 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลว SS	26
4.2 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารแข็ง	27
4.2.1 ศึกษาและเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อโดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นสารละลายสปอร์และเส้นใย	27
4.2.2 ศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็งโดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็น เส้นใย อายุ 4 วัน 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	39
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก ก	46
ภาคผนวก ข	48
ภาคผนวก ค	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

Figure 1 Struce of Monacolin 7

Figure 2 Compare struature between Lovastatin (A) and Compactin (B) 8

Figture 3 The Lovastatin biosynthesis 10

Figure 4 A : Pathway of cholesterol biosynthesis. The rate-limiting step is 11
3-hydroxy-3- methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase activity
B : Statin-mediated effects in endothelial cells and other tissues

Figure 5 Several statins are administered in active acid form that can bind to 12
HMG-CoA reductase. Lovastatin are administered in lactone form and
must first undergo conversion to active acid form to produce their
clinical effects

Figure 6 Similality structure of Lovastatin and HMG – CoA 13

Figure 7 Lipid transport and pharmacotherapeutic agents in hyperlipidemia. 14
BA: bile acid; Chol: cholesterol; Chylo: chylomicron; Chylo rem:
chylomicron remnant; FA: fatty acid; HDL: high-density lipoprotein;
HMG-CoA: hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase; LDL:
low-density lipoprotein; LPL: lipoprotein lipase; TG: triglyceride;
VLDL: very low-density lipoprotein

Figure 4.1 The growth of M. pupereus on SS medium 27

Figure 4.2 **A** : The moisture content (◆) and pH (■) profile during the 29
solid state fermentation of *M.purpereus* using spore suspension
as inoculum
B : The effect of inoculum spore suspension on pigment production (□)
monacolin production (▲) and glucose accumulation (10^2) (◇) in
the solid state fermentation by *M. purpereus*

Figure 4.3 **A** : The moisture content (◆) and pH (■) profile during the 30
solid state fermentation of *M.purpereus* using mycelium as inoculum
B : The effect of inoculum mycelium on pigment production (□)
monacolin production (▲) and glucose accumulation (10^2) (◇)
in the solid state fermentation by *M. purpereus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
Figure 4.4	**A :** The effect of initial moisture content (◆) and pH (■ profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day **B :** The effect of initial on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day	33
Figure 4.5	**A :** The effect of initial moisture content (◆) and pH (■) profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day **B :** The effect of initial on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day	34
Figure 4.6	**A :** The effect of initial moisture content (◆) and pH (■) profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day **B :** The effect of initial on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day	35
Figure 4.7	**A :** The effect of initial moisture content (◆) and pH (■) profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day **B :** The effect of initial on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day	36
Figure 4.8	**A :** The effect of initial moisture content (◆) and pH (■)	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

B : The effect of initial on pigment production ( ) monacolin production ( ) and glucose accumulation (10^2) ( ) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

Figure 4.9 **A** : The effect of initial moisture content ( ) and pH ( ) profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day 38

B : The effect of initial on pigment production ( ) monacolin production ( ) and glucose accumulation (10^2) ( ) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

Figure B.1 Stadard curve of glucose 49

Figure B.2 Standard curve of NAG51

Figure C.1 The red rice product after 4-week cultivation by *M. purpureus* in solid state fermentation with rotated incubation 53

Figure C.2 The red rice production by solid state fermentation of *M. purpureus* at (A) 0-week, (B) 1- week, (C) 2- week and (D) 4-week of cultivation in rotated bottle 53

Figure C.3 The growth of *M. purpureus* on the surface of rice grain at (A) 1-week, (B) 2-week,(C) 3-week and (B) 4-week of solid state cultivation in rotated bottle 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
Table 1	Phamacutical value of monacolin	15
Table 3.1	The amount of inoculum types (mycelium and spore suspension) and water adding for on solid state fermentation by *M. purpureus*	23
Table 3.2	The effect of intitial water on solid state fermentation by *M. purpureus* with 1.0% of inoculum size and 4-day of cultivation	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ในปัจจุบันโรคหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจตีบตันเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประเทศไทย และของเนื่องจากมีภาวะระดับไขมันในเลือดผิดปกติ (Dyslipidemia) เป็นปัจจัยการเสี่ยงโรค (Risk factor) อย่างหนึ่งของการเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ การมีระดับไขมันสูงในเลือดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือด ทำให้มีความยืดหยุ่นน้อย และหนาขึ้นจนเกิดสภาพของหลอดเลือดแข็ง และตีบ (Atherosclerosis) เป็นผลให้เกิดลิ่มเลือดขึ้นในหลอดเลือดหรือในหัวใจ (Thrombosis) จากนั้นเกิดเนื้อตายเนื่องจากขาดการไหลเวียนของโลหิต (Infarction) ตามมา (จันทนี, 2545) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญในปัจจุบัน

ไขมันในโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงข้อหนึ่งของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ การเปลี่ยนแปลงอาหาร และการออกกำลังกายสามารถลดระดับไขมันในเลือดได้ ถ้าหากระดับคลอเลสเตอรอล (Cholesterol) ในเลือดสูง ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดแดงมีลักษณะเป็นคราบ (Plaque) ทำให้หลอดเลือดแดงแคบลง ส่งผลให้หลอดเลือดแข็ง และตีบ (Atherosclerosis) โดยก่อให้เกิดอาการเจ็บหน้าอกเนื่องจากหัวใจขาดเลือด หรือ อัมพฤกษ์ หากคราบไขมันหลุดจากผนังหลอดเลือดแล้วไปอุดตันในเส้นเลือด จะทำให้เกิดอาการหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (Stroke) เพื่อแก้ปัญหาการเกิดโรคดังกล่าว จึงมีการศึกษาผลิตยาลดระดับไขมันในเลือดซึ่งนับวันจะมีความสำคัญ และมีความจำเป็นมากขึ้น ซึ่งยาที่ลดระดับไขมันในเลือดมีหลายชนิด เช่น Niasin, Bezafibrate, Gemfibrozil และกลุ่มสแตติน (Statins) เป็นต้น โดยยากลุ่มสแตตินมีความสำคัญในการออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลในตับ ซึ่งยับยั้งการทำงานของตัวควบคุมการสร้างคลอเลสเตอรอล (Rate controlling enzyme) ให้ลดลง ทำให้ไขมันบางชนิดในเลือด คือ Low-density lipoproteins (LDL) ซึ่งเป็นไขมันชนิดไม่ดี ถ้ามีมากจะทำให้เกิดหลอดเลือดแดงตีบได้ โดยพาคลอเลสเตอรอลจากตับไปสู่ร่างกาย ถ้ามีคลอเลสเตอรอล และไขมันไปเกาะอยู่ตามผนังของหลอดเลือดจะส่งผลให้ลดการไหลเวียนของเลือดในร่างกาย ทำให้ออกซิเจนที่ไปเลี้ยงหัวใจ สมอง และส่วนต่างๆ ของร่างกายลดลงตามไปด้วย แต่ถ้ามีคลอเลสเตอรอล และไขมันในเลือดต่ำจะเป็นการช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจ การไหลเวียนโลหิตในหลอดเลือด ปวดเค้นอก สมองขาดเลือด และหัวใจวายได้ จึงศึกษาการผลิตยาให้ได้มากที่สุด ในเวลาที่รวดเร็ว และลงทุนต่ำ การสกัดยากลุ่มนี้ได้จากเชื้อรา เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราโมแนสคัสเป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตสารยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอล เช่น *M.ruber* ผลิตสารซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลโดยมีชื่อเรียกต่างกันไป ได้แก่ monacolin J, monacolin K, monacolin L, monacolin M และ monacolin X เป็นต้น (Endo และคณะ, 1985; Endo และคณะ, 1986; Komagata และคณะ, 1989) ในทางการค้าจะเรียกสารนี้ว่าโลวาสแตติน (Lovastatin) มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3 – hydroxyl – 3 – Mehylglutareylcoenzyme A (HMG-CoA) reductase ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสร้างคลอเลสเตอรอลในกระบวนการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล ดังนั้นคุณสมบัติการออกฤทธิ์จึงส่งผลโดยตรงต่อการลดปริมาณคลอเลสเตอรอล ในผู้ป่วยที่มีปริมาณคลอเลสเตอรอลชนิด LDL ในเลือดสูง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นเริ่มต้น และการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัส

1.2.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าพีเอช สี และการสร้างสารโมนาโคลิน ของเชื้อราโมแนสคัส

1.2.3 ศึกษา และเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราโมแนสคัส และผลิตสารโมนาโคลิน โดยใช้เชื้อเริ่มต้นจากสารละลายสปอร์ และเส้นใยเชื้อรา

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการเจริญ และการสร้างสารโมนาโคลินบนอาหารแข็งในสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความชื้นเริ่มต้น ปริมาณเชื้อเริ่มต้น อายุของเชื้อ น้ำตาลีดิวซ์ พีเอช สี และการเติมน้ำที่ระยะเวลาต่างๆ ระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารแข็ง

1.4.2 เข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเส้นใย และสารโมนาโคลิน

1.4.3 เป็นการตรวจหาสภาวะเบื้องต้นในการผลิตสารโมนาโคลินเพื่อใช้ในการทดสอบกับสารมาตรฐานต่อไป

1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1.5.1 เชื้อราโมแนสคัส

นำเชื้อ *M. purpureus* มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง MYS ที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 10 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการศึกษาต่อไป

1.5.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว SS

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว SS นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำไปวิเคราะห์เอนอะซิทิลกลูโคซามีน แล้วนำมาสร้างกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

1.5.3 การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง

1.5.3.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นสำหรับศึกษาการเจริญบนอาหารแข็ง

นำเชื้อราโมแนสคัสที่มีอายุ 7 - 10 วัน มาเลี้ยงในอาหารเหลว SS บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเจริญในระยะที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

นำเชื้อราโมแนสคัสที่มีอายุ 10 วัน บนอาหารวุ้นเอียงมาทำเป็นสารละลายสปอร์ โดยเติมสารละลาย 0.1% Tween แล้วนำมานับสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer) ให้มีปริมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

1.5.3.2 ศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่บ่มบนเครื่องหมุนขวด โดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นเส้นใยและสารละลายสปอร์

นำข้าว 50 กรัม แช่น้ำ 2 ชั่วโมง แล้วสะเด็ดน้ำ 30 นาทีก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นจึงลงเชื้อเริ่มต้น แล้วนำไปบ่มบนเครื่องหมุนขวด และตั้งทิ้งไว้ วิเคราะห์ผลความชื้น พีเอช สารสี ปริมาณกลูโคส และสารโมนาโคลิน ที่เวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.3.3 ศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารโมนาโคลินของเชื้อรา โมแนสคัสบนอาหารแข็ง

นำข้าว และน้ำกลั่นไปฆ่าเชื้อแยกกัน ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเทน้ำลงในข้าว นำไปหมุนบนเครื่องหมุนขวด 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงลงเชื้อเริ่มต้น และบ่มบนเครื่อง หมุนขวด 1 คืน แล้วจึงเก็บตัวอย่างข้าวเพื่อหาความชื้นเริ่มต้น พีเอช สารสี สารโมนาโคลิน และความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.6 การวิเคราะห์

ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำไปวิเคราะห์การเจริญของเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง พีเอช น้ำตาลรีดิวซ์ สารสี ความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์สารโมนาโคลินเบื้องต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎี และหลักการ

2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัสสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (Alexopoulos และ Mims , 1979)

Class Ascomycetes
Subclass Plectomycetidae
Order Eurtials
Genus *Monascus*

โดยแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ตามความแตกต่างทางสรีรวิทยา และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ *M. pilosus, M. purpureus , M. rubber* (Hawksworth และ Pitt , 1983) และ *M. floridanus* (Bridge และ Hawksworth , 1985 ; Barnard และ Cannon , 1987) เจริญได้ดีบนอาหารแข็งในรูปข้าวแดง (Angkak) เพื่อใช้ปรุงแต่งสีในไวน์ การผลิตเต้าหู้ยี้ ใช้ถนอมอาหารประเภทเนื้อ ใช้รักษาโรครวมทั้งใช้เป็นสีผสมในอาหาร ยา และ เครื่องสำอาง ต่อมาผลิตเป็นการค้าในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน จีน (Hendry และ Houghton , 1992) และเยอรมัน (Guth , 2005)

ในปี 1920 Church รายงานถึงการทดลองแยกสายพันธุ์ที่ได้จากข้าวแดงของประเทศจีน จนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่สร้างสารสีแดงคือ *M. purpureus* ต่อมา Palo และคณะ (1960) ได้ทดลองใช้เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ผลิตข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอสมควร และสามารถนำข้าวแดงมาใช้เป็นสีผสมอาหารได้โดยตรง ภายหลังจึงมุ่งความสนใจไปที่การผลิตสารต่าง ๆ โดยการเจริญบนอาหารเหลว (Submerged cultivation) (Lin ,1973) ทำให้มีรายงานการผลิตสีในอาหารเหลวต่าง ๆ มากมาย (Shephed และ Carels , 1983 ; Yoshimaru และคณะ , 1975 ; Shin และคณะ, 1998 ; บุษบา และ วรรณภา , 2527 ; Lee และคณะ , 1992)

เชื้อราโมแนสคัสนอกจากสร้างสารสีแล้ว ยังสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด สาร monascidin A จากเชื้อรา *M. purpureus* (Wong และ Bau , 1977) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร ได้แก่ *Bacillus* sp. *Streptococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ เอทธานอล สารโมนาโค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ลักษณะสันฐานวิทยา และการสืบพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส (บุษบา , 2542)

เชื้อราโมแนสคัส *(Monascus* spp.) เคยจัดอยู่ใน Family Aspergillaceae Order Plectascales แต่ปัจจุบันอยู่ใน Family Monascaceae Class Ascomycetes Subclass Plectomycetidae Order Eurotiales เส้นใยมีผนังกั้น มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย และมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือม่วง

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้างโคนิเดีย (Conidia) ที่พัฒนามาจากโคนิดิโอฟอร์ (Conidiophore) จะสร้างโคนิเดีย รูปร่างกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือหลายโคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่อยู่ที่ปลายเส้นใย โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจจะมีสีแดงหรือสีน้ำตาลอ่อน (Ainswarth และคณะ , 1973 ; Hawksworth และ Pitt , 1983) โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้น (Septate) หรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ ถ้ามีขนาดยาวจะมีผนังกั้น 2 - 6 อัน เป็นสายตรงหรือขดเป็นเกลียว และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออายุมากขึ้น การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร เช่น C medium เหมาะสมสำหรับการเกิดโคนิเดียของโมแนสคัส นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีกหลายๆ ประการ เช่น อายุสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ระดับพีเอช ความเข้มแสงและอุณหภูมิ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35 องศาเซลเซียส มักพบการงอกของโคนิเดียภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อได้รับความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม จึงแทงปลายเส้นใยออกจากสปอร์ (Germ tube) ขึ้นมา 1 เส้น หรือ 2 เส้น หรือบางครั้งอาจมีมากถึง 6 เส้น

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราโมแนสคัสคล้าย ๆ กับเชื้อราอื่นใน Class Ascomycetes มีการสร้างเพอริทีเซียม (Perithecium) หรือคลิสโททีเซียม (Cleistothecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (Ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้าน (stalk) (Von Arx , 1974) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (Homothallic) โดยการสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิด คือ แอนเทอริเดียม (Antheridium) และแอสโคโกเนียม (Ascogonium) เกิดการหลอมรวมกัน (Fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วจึงจะมีการขยายผนังเซลล์รวมออก และพัฒนาไปเป็นแอสโคคาร์ปขึ้นในที่สุด ซึ่งภายในแอสโคคาร์ปมีแอสโคสปอร์ (Ascospores) มากมาย โดพบ 2 – 8 แอสโคสปอร์ จะบรรจุรวมอยู่ภายในแอสคัส (Ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ความสัมพันธุ์ระหว่างสารโมนาโคลิน และ คลอเลสเตอรอล (Alberts และคณะ , 1998)

2.3.1 คุณสมบัติสารโมนาโคลิน

โมนาโคลินหรือที่รู้จักทั่วไปในทางการค้าว่า โลวาสแตติน มีระบบการเรียกชื่อ (IUPAC) ว่า [8 - [2 - (4 – hydroxyl – 6 – oxo – oxan – 2 - yl)ethyl] - 3, 7 – dimethy l - 1, 2, 3, 7, 8, 8a – hexahydronaphthalen – 1 - yl] 2 - methylbutanoate ($C_{24}H_{36}O_5$) มวลโมเลกุล 404.54 กรัมต่อโมล นำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางยา ดังนี้ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) น้อยกว่า 5% การจับโปรตีนในกระแสเลือด (Binding protein) มีมากกว่า 95% กระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ยาออกฤทธิ์ต่อตับ (CYP3A substrate) ส่วนค่าครึ่งชีวิต (Half life) เท่ากับ 1.1-1.7 ชั่วโมง เมื่อรับประทานยาไม่มีผลกระทบ (negligible) ต่อการขับถ่าย (Excretion) ซึ่งตรวจพบเพียง 10 % Urine และ 83 % feces ในการขับถ่าย (Fig.1)

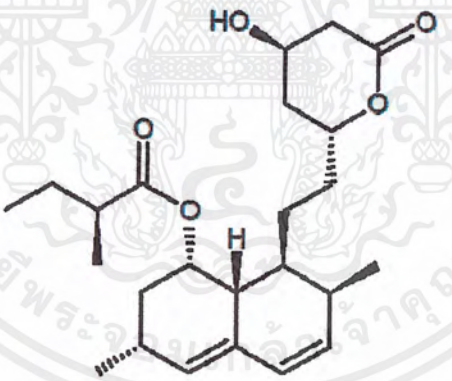


Figure 1 The structure of Lovastatin

ที่มา : Mohan A. Dhale และคณะ , 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ประวัติในการศึกษาสารโมนาโคลิน

โมนาโคลิน สกัดแยกได้จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* และจัดเป็นสแตตินตัวแรกที่ได้รับอนุญาติโดยองค์การอาหารและยา ของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration หรือ FDA) และเป็นผลผลิตทางธรรมชาติ ที่ได้ปริมาณสูง จากเชื้อรา เช่น *Pleurotus ostreatus* และ *Pleurotus* spp. (Bobek และคณะ , 1998)

ในปี 1970 ค้นพบว่า สารคอมแพคติน (Compactin) และโมนาโคลิน (Lovastatin) เป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง 3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล และใช้คุณสมบัตินี้มาพัฒนาศักยภาพของยาสำหรับลดคลอเลสเตอรอลชนิด LDL (Vederas และคณะ , 1985)

ในปี 1976 Endo ได้พบสารคอมแพคตินหรือในทางการค้าเรียกว่า เมวาสแตติน (Mevastatin) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *P.citrium* ได้ทำการวิจัยพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์เป้าหมายและลดการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล จึงเป็นผู้เริ่มทำให้มีการค้นคว้า และศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้ง HMG CoA reductase ในธรรมชาติจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และค้นพบเมแทบอลิซึมของ สารโมนาโคลินที่แยกได้จากเชื้อราในเวลาต่อมา โครงสร้างสารโมนาโคลินเสถียรและคงตัว แตกต่างกับ สารคอมแพคติน ที่ปรากฏในลักษณะ 6 alphamethyl group ในรูปของ hexahydronaphthalene ring (Fig.2)

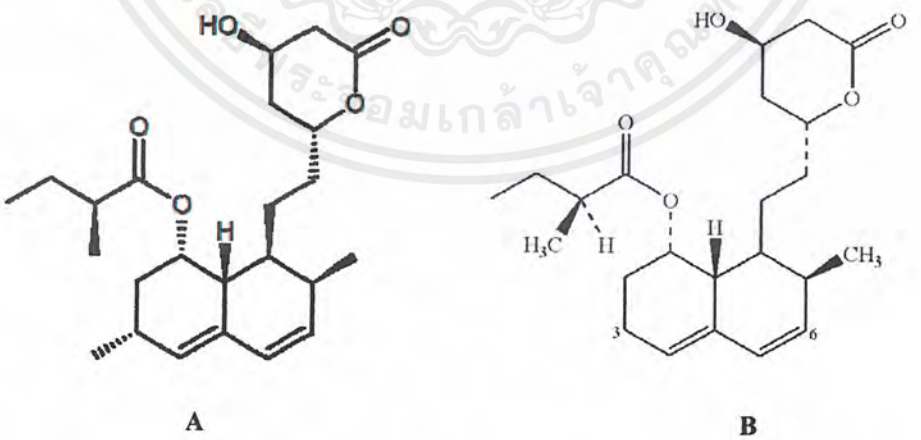


Figure 2 The structural comparison between Lovastatin (A) and Compactin (B)

ที่มา : Mohan A. Dhale และคณะ , 2007 และ Belo และคณะ , 1993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม ในปี 1980 พบว่าสารคอมแพคติน มีความเป็นพิษในสัตว์ เพราะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันระหว่าง คอมแพคติน และโมนาโคลิน ยากต่อการตรวจสอบ (ดังแสดงในรูปที่ 2) การศึกษาทางแพทย์เกี่ยวกับสารโมนาโคลิน ได้ถูกระงับชั่วคราว จึงเปลี่ยนไปศึกษาเรื่องผลกระทบของสารที่มีต่อสัตว์ทดลอง

ในปี 1982 มีการศึกษาระดับห้องปฏิบัติการเพื่อสำรวจคุณสมบัติเกี่ยวกับสารโมนาโคลิน ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *A. Terreus* พบว่าในคนไข้ภาวะเสี่ยง สารโมนาโคลินนี้สามารถลดคลอเลสเตออลชนิด LDL ได้ และเมื่อสนับสนุนการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อสัตว์ทดลองปรากฏว่าไม่มีฤทธิ์เป็นพิษ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการศึกษาสารคอมแพคติน ดังนั้นจึงได้ดำเนินงานวิจัยทางการแพทย์ต่อไป

สารนี้ได้รับรองประสิทธิภาพโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ในปี 1987 พบว่าปริมาณของสารโมนาโคลิน ที่อยู่ในแต่ละผลิตภัณฑ์ปริมาณ 80 มิลลิกรัม สามารถลด LDL ได้ถึง 40% ซึ่งมีระดับการออกฤทธิ์ดีกว่ายาลดคลอเลสเตอรอลชนิดอื่นๆ คุณสมบัติทางยามีผลกระทบน้อยมาก ง่ายต่อการรักษาคนไข้จึงเป็นที่ยอมรับอย่างรวดเร็ว แต่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ทรานอะมิเนส (Transaminase) ในตับ และมีผลต่อกล้ามเนื้อด้วย

ในปี 1998 องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา สั่งห้ามขายอาหารเสริมที่มีส่วนผสมของข้าวแดงจากการหมักโดยใช้ยีสต์เป็นหัวเชื้อ ภายหลังพบว่ามีส่วนประกอบของโมนาโคลินในอาหารเสริม จึงมีข้อโต้แย้งว่าอาหารเสริม มีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติทางยา

2.3.3 การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าปัจจัยเสี่ยงหลักของโรคหลอดเลือดหัวใจ คือการมีระดับไขมันสูงในเลือดทำให้ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดจึงมีความยืดหยุ่นน้อยและหนาขึ้นจนเกิดสภาพของหลอดเลือดแข็งและตีบ ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดหลอดเลือดแข็ง เกี่ยวข้องกับตัวพาไขมันไปตามเส้นเลือดซึ่งเรียกว่า ไลโพโปรตีน (Lipoprotein) มี 2 ชนิด คือ

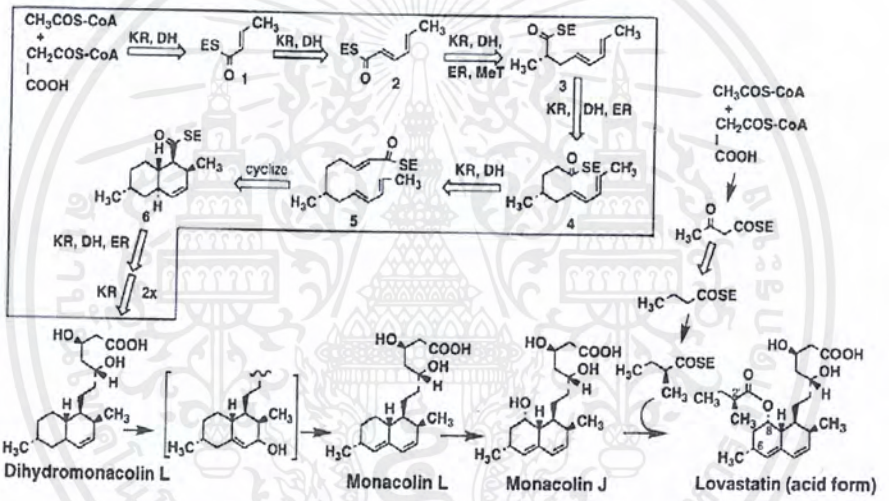
Low-density lipoproteins (LDL) ซึ่งจะพาคลอเลสเตอรอล จากตับไปสู่ร่างกาย LDL เป็นไขมันที่ก่อให้เกิดพิษหากมีมากจะทำให้เกิดหลอดเลือดแดงตีบได้ง่าย

High-density lipoproteins (HDL) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประโยชน์ โดยพาคลอเลสเตอรอล จากร่างกายเข้าสู่ตับ หากมี HDL ในปริมาณสูงส่งผลให้เกิดโรคหลอดเลือดน้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ LDL -C (Low density lipoprotein cholresterol) ซึ่งเป็นไลโพโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีในตับมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่พาคลอเลสเตอรอลจากตับไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 กระบวนการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน

สารโมนาโคลินประกอบด้วยโพลีคีไทด์ 2 สายจากอนุพันธ์ของอะซีเตต โดยโพลีคีไทด์สายแรก อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น Dihydromonacolin L monacolin L และ monacolin J ตามลำดับ ส่วนโพลีคีไทด์สายที่สอง อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์แล้วเชื่อมต่อกับโพลีคีไทด์สายแรกในรูป monacolin J โดยพันธะเอสเทอร์แล้วได้สารโลวาสแตตินในรูปกรด (acid form) (Fig. 3) สารประกอบนี้สร้างโดย *A. terreus* (Hendrickson , 1999)



Figture 3 The Lovastatin biosynthesis

ที่มา : Hirama , 1982 : Hirama , 1983

2.3.5 กลไกการทำงานของโมนาโคลิน (จันทนี , 2545)

สารโมนาโคลินสามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase อย่างจำเพาะ โดยที่เอนไซม์ HMG-CoA reductase จะใช้เป็นตัวกลางในการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นเมวาโลเนต (Mevalonate) และสังเคราะห์เป็นคลอเลสเตอรอลต่อไป (Alberts , 1998) สารโลวาแตตินจะขัดขวางการสร้างคลอเลสเตอรอล โดยการไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase จึงทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอล(Fig. 4) สารโมนาโคลินไม่แสดงฤทธิ์ทางยาในรูปโครงสร้างปกติ แต่เมื่อโครงสร้างถูกสลายด้วยน้ำ (Hydrolysis) เป็น β-hydroxy acid จะทำให้สารออกฤทธิ์ได้ในร่างกาย (Fig. 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

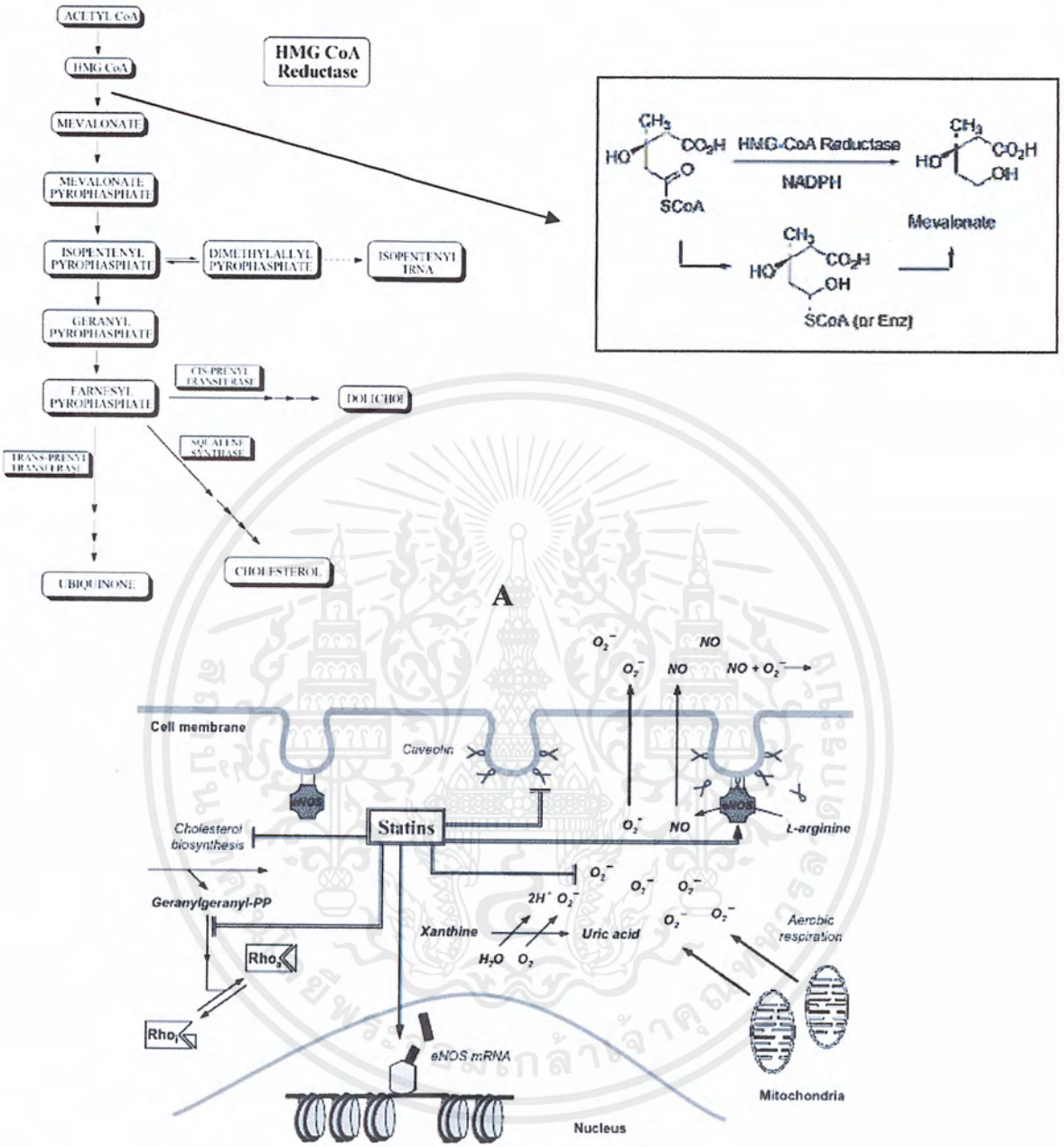


Figure 4 A : Pathway of cholesterol biosynthesis. The rate-limiting step is 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase activity

B : Statin-mediated effects in endothelial cells and other tissues

ที่มา : A : Goldstein JL และคณะ , 1990

B : Laufs U และคณะ , 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

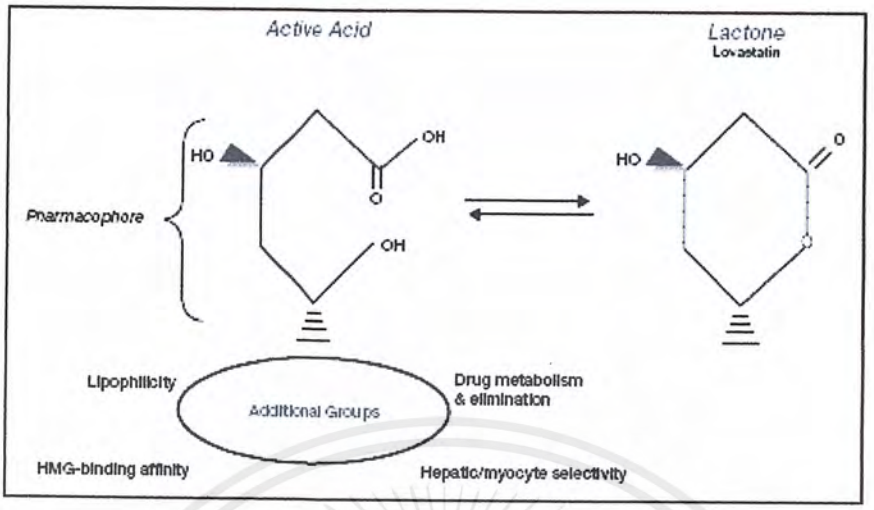


Figure 5 Several statins are administered in active acid form that can bind to HMG-CoA reductase. Lovastatin are administered in lactone form and must first undergo conversion to active acid form to produce their clinical effects.
ที่มา : Azie , 1998

2.3.6 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา (จันทนี , 2545)

สารประกอบไขมันในเลือดจะประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) คลอเลสเตอรอลอิสระ (Free cholresterol) คลอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (Cholresterol ester) และฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ซึ่งไขมันเหล่านี้ไม่สามารถรวมกับน้ำได้ จึงต้องรวมกับโปรตีน (Apoprotein) และไหลเวียนตามกระแสเลือดในรูปของไลโพโปรตีน เมื่อในเลือดมีสารเหล่านี้ในความเข้มข้นสูง จำเป็นต้องใช้ยาลดไขมันมาควบคุมระดับไขมันในเลือด

ยาลดไขมันในเส้นเลือด (Antihyperlipidaemic drug) มีอยู่หลายชนิด แต่ละชนิดมีคุณสมบัติและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน ได้แก่

1. nicotinic acid ได้แก่ niacin (Vitamin B_3)
2. fibric acid derivative หรือ fibrate ได้แก่ bezafibrate , gemfibrozil , fenofibrate
3. bile acid sequestrants ได้แก่ cholestyramine และ cholestipol
4. statin (hydroxy-methylglutaryl-coenzymeA(HMG-CoA)reductase inhibitor)
5. miscellaneous ได้แก่ probucol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารโมนาโคลินหรือโลวาสแตติน เป็นยาในกลุ่มสแตติน ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (HMG-CoA reductase inhibitor) ยากลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ HMG-CoA (Fig. 6) จะออกฤทธิ์ยับยั้งแบบผันกลับได้โดยไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Reversible competitive inhibitor) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ตัวอย่างยากลุ่มสแตตินได้แก่ Pravastatin , Fluvastatin และ Atorvastatin เป็นต้น ปัจจุบันอาจกล่าวได้ว่ายาในกลุ่มสแตตินนี้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลด LDL- C

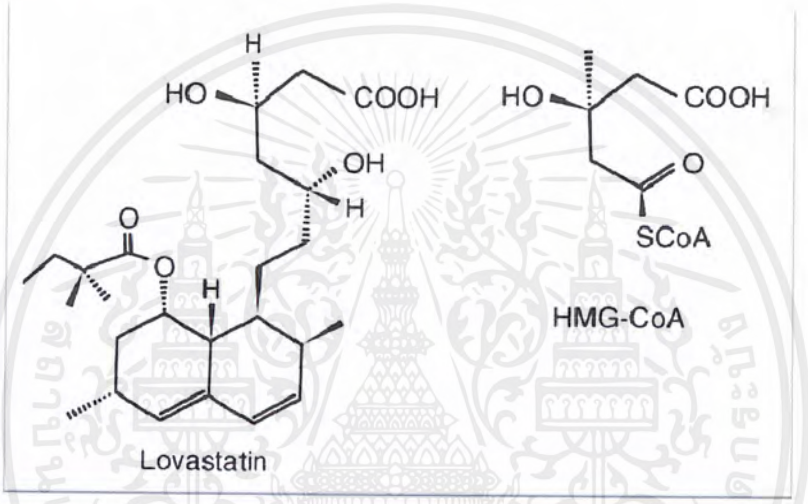


Figure 6 Similality structure of Lovastatin and HMG – CoA

ที่มา : Ryan และคณะ , 1999

2.3.7 กลไกการออกฤทธิ์

ยากลุ่มโมนาโคลินออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลในตับ โดยเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (3-hydroxyl 3-methylglutaryl-coenzyme A) ซึ่งเป็น ตัวควบคุมการสร้างคลอเลสเตอรอล (Rate controlling enzyme) ให้ลดลง ผลที่ตามมาคือ ทำให้มีการเพิ่มปริมาณของตัวรับไลโพโปรตีน (LDL receptor) ที่ผนังเซลล์ของตับ เพื่อที่จะเพิ่มการจับ LDL จากเลือดทำให้ LDL-C ลดลง (Fig. 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

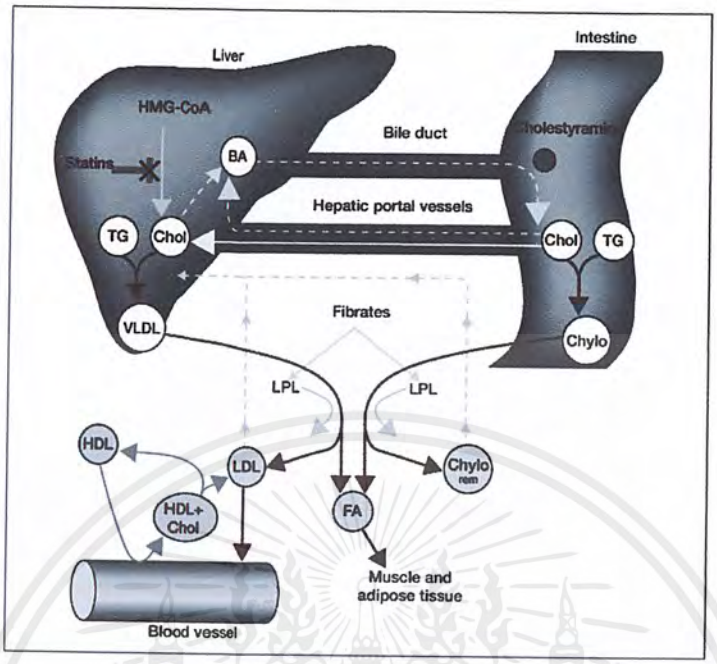


Figure 7 Lipid transport and pharmacotherapeutic agents in hyperlipidemia. BA: bile acid; Chol: cholesterol; Chylo: chylomicron; Chylo rem: chylomicron remnant; FA: fatty acid; HDL: high-density lipoprotein; HMG-CoA: hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase; LDL: low-density lipoprotein; LPL: lipoprotein lipase; TG: triglyceride; VLDL: very low-density lipoprotein.

ที่มา : Ryan TJ และคณะ , 1999

โดยในทางคุณสมบัติทางเภสัชจลศาสตร์ พบว่าสารโมนาโคลินไม่สามารถแสดงฤทธิ์ได้ในรูปปกติ (Prodrugs) จำเป็นต้องเปลี่ยนเป็นยาในรูปแบบที่ออกฤทธิ์ได้ (Active drugs) ยาในกลุ่มนี้จะเกิดกระบวนการภายหลังจากที่รับประทานยาเข้าสู่ร่างกาย และมีการขจัดผ่านทางตับก่อนที่ยาจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตและออกฤทธิ์ (First-pass metabolism) สูง พบว่าปริมาณยาเพียง 5-20 % ของขนาดยาที่เข้ากระแสเลือด และจับกับโปรตีนในเลือดสูงถึง 95% ระดับยาในเลือดจะออกฤทธิ์สูงสุดภายในเวลา 1-4 ชั่วโมง หลังการรับประทานอาหาร 70% ของยากลุ่มนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงแล้วถูกขับออกทางตับ คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีดังนี้

1. สามารถลด LDL-C ได้ 20 - 55% ขึ้นกับขนาดของยาที่ใช้ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อคลอเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งจะเกิดขึ้น 4 - 6 สัปดาห์ภายหลังการรับประทานยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในผู้ป่วยที่มีระดับของไตรกลีเซอไรด์ ในเลือดสูงกว่า 250 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ได้ 20-40 % โดยเฉพาะการใช้ขนาดยาที่มีความเข้มข้นสูง (High potency statins) ซึ่งได้แก่ simvastatin และ atovastatin ดังนั้นอัตราการลดไตรกลีเซอไรด์จึงขึ้นกับขนาดของยาเช่นกัน

3. สามารถเพิ่มระดับ HDL-C (High density lipoprotein - cholresterol) ได้ 5-10 % โดยแสดงความสามารถในการออกฤทธิ์ยาในกลุ่มสแตติน ได้ดังตารางที่ 1

Table 1 Phamacutical value of monacolin

Drug	Absolute Bioavailability(%)	Excretion	Half- life (t1/2 hr)	Protein binding (%)	Cytochome(CYP) P450 substate
Atorvastatin	14	<2%(urine)	14	≥ 98	CYP3A4
Cerivastatin	60	24% (urine) 70% (feces)	2-3	> 99	CYP3A4
Fluvastatin	24	<6% (urine) 90% (feces)	<1	98	CYP2C9
Lovastatin	< 5	10% (urine) 83% (feces)	3-4	> 95	CYP3A4
Pravastatin	17	20% (urine) 70% (feces)	1.8	50	-
Simvastatin	< 5	13% (urine) 60% (feces)	3	95	CYP3A4

ที่มา : (จันทนี , 2545)

2.3.8 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน

1. ผลกระทบต่อตับทำให้เอนไซม์ทรานอะมิเนส ในกระแสเลือดมีการทำงานเพิ่มขึ้นราว3 เท่าของค่าปกติ พบได้ประมาณ 1 เปอร์เซ็นซึ่งมักจะเป็นแบบชั่วคราว และไม่ทำให้เกิดพิษต่อตับ ดังนั้นจึงควรวัดการทำงานของเอ็นไซม์อะมิโนทรานสเฟอเรส(Aminotransferase) ก่อนให้ยาและทุก 2-4 เดือน และควรหยุดใช้ยาเมื่อกิจกรรมของเอนไซม์อะมิโนทรานสเฟอเรสเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 3 เท่าของค่าปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลกระทบต่อกล้ามเนื้อ อาการที่ไม่พึงประสงค์ที่พบรองลงมาคือ กิจกรรม creatine kinase (CK) สูงขึ้น โดยเอนไซม์ตัวนี้เร่งการขนย้ายหมู่ฟอสเฟตจาก creatine phosphate ไปยัง Adenosine diphosphate (ADP) และในขั้นสุดท้ายได้ Adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ เอนไซม์ CK มีเฉพาะในกล้ามเนื้อ และพบได้บ้างในเนื้อเยื่อสมอง กระบวนการอิเล็คโตรโฟลิซิสสามารถแยกเอนไซม์ CK ได้อย่างน้อย 3 ตัว โดยที่ CK จากกล้ามเนื้อลายและสมองมีเพียงกลุ่มเดียวแต่ต่างตำแหน่งกัน ส่วน CK จากกล้ามเนื้อหัวใจจะให้ 2 กลุ่มโดยที่กลุ่มหนึ่งคล้ายกับของกล้ามเนื้อลาย ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งอยู่ระหว่าง CK ของกล้ามเนื้อลายและของเนื้อเยื่อสมอง เมื่อพบว่ากิจกรรมของ CK ในซีรั่มสูงกว่าปกติ โดยจะเริ่มเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 3 – 6 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดใน 24 - 36 ชั่วโมง มีผลทำให้หัวใจวายได้ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจภาวะของหัวใจวาย เมื่อเริ่มรู้สึกว่ามีการเจ็บหน้าอก แต่เอนไซม์ตัวนี้จะถูกกำจัดออกจากพลาสม่าได้โดยเร็ว จึงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้กลับสู่สภาวะปกติได้ภายในเวลาเพียง 3 วัน โดยเมื่อเทียบกับเอ็มไซม์ตัวอื่น เช่น SGOT LDH เป็นต้น และอาจทำให้เกิดความผิดปกติของกล้ามเนื้อ (Myopathy) โดยเฉพาะเมื่อใช้ยากลุ่มนี้ร่วมกับยาลดไขมันในเลือดกลุ่ม fibric acid derivatime และ nicotinic acid ส่วนยาอื่นๆ ที่จะมีผลทำให้อาการไม่พึงประสงค์ต่อกล้ามเนื้อถ้าให้ร่วมกับยาในกลุ่มสแตติน ได้แก่ ยาที่ถูกเมทาบอไลส์โดย Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4 (CYP3A4) เช่นเดียวกับสแตติน ได้แก่ erythromycin itraconazole ดังนั้นจึง ควรวัดกิจกรรมของเอนไซม์นี้ และโดยเฉพาะผู้ป่วยที่รับประทานยาสแตตินร่วมกับยาเหล่านี้จะต้องลดขนาดยาสแตตินลง ไม่ให้ยามากกว่า 25 เปอร์เซ็นของขนาดสูงสุดที่ใช้ในการรักษา

2.3.9 ขนาดยาและการจัดเตรียมยา

โมนาโคลิน เป็นยาเม็ด 10, 20, 40 มิลลิกรัม รับประทาน วันละ 1-2 ครั้ง ถ้ารับประทานวันละ 1 ครั้งให้รับประทานยาก่อนอาหารเย็น ถ้าหากรับประทานยา 2 ครั้ง ก็ให้รับประทานก่อนอาหารมื้อเช้า และมื้อเย็น ขนาดการใช้ยาขึ้นกับแพทย์สั่ง

2.3.10 ประโยชน์ในการรักษา

ใช้กับผู้ป่วยที่มีคลอเลสเตอรอลสูงทุกชนิดซึ่งอาจใช้ตัวยับยั้งรีดักเตสเพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับยาอื่น ได้แก่ bile acid-binding resins หรือ nicotinic acid ซึ่งจะต้องระมัดระวังเรื่องของปฏิกิริยาสัมพันธ์ของยาที่อาจทำให้เกิดกล้ามเนื้อผิดปกติได้ ยาในกลุ่มสแตติน สามารถลดอัตราของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ และ อัตราการตายในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีระดับไขมันสูงขณะเดียวกันยากลุ่มนี้ยังมีบทบาทในป้องกันปฐมภูมิ (Primary prevention)สำหรับผู้ป่วยที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ และเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ (สมชาย, 2536)

สารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสจัดเป็นสารเมตาบอไลท์ประเภททุติยภูมิ (Hassan , 2001) ซึ่งไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับหน้าที่เมตาบอลิซึมที่สำคัญๆ ของสิ่งมีชีวิตที่สร้างขึ้นมา ลักษณะประการหนึ่งของสารประกอบชนิดนี้ คือ การสร้างสารหลังจากช่วงการเจริญผ่านไปแล้ว การแยกจากกันระหว่างการเจริญของเซลล์กับการสร้างสารทุติยภูมิ ในบางครั้งก็ใช้เป็นคำจำกัดความของสารทุติยภูมิ แต่กลไกการสร้างดังกล่าวไม่สามารถยึดเป็นหลักในการจัดจำแนกได้ เพราะว่าในบางกรณีสารทุติยภูมิสามารถสังเคราะห์ในระหว่างการเจริญ Bu'Lock (1974) และ Bajpai และ Rueb (1981) สารทุติยภูมิอยู่ในผลิตภัณฑ์หลักประเภทที่ 3 ตามการแบ่งประเภทของผลิตภัณฑ์หลักจากกระบวนการหมัก ดังนี้

1. ผลิตภัณฑ์หลักจากเมตาบอลิซึมแบบปฐมภูมิโดยตรง
2. ผลิตภัณฑ์หลักจากเมตาบอลิซึมแบบปฐมภูมิโดยอ้อม
3. ผลิตภัณฑ์หลักที่ไม่เกี่ยวกับการเมตาบอลิซึม

2.5 ผลิตภัณฑ์อื่นที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

Kranz และคณะ (1992) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* สร้าง methyl ketone ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสใน blue cheese ได้ดีใกล้เคียงกับ *P. roquefortii* เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นกรดไขมันสายสั้น ๆ ข้าวหมักสีแดง (red fermented rice :RFR) เป็นที่รู้จักในด้านยาสำหรับการรักษาการย่อยอาหาร และการหมุนเวียนโลหิตในประเทศจีน และมีการบริโภคเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพกันอย่างมาก (Sung , 1966 ; Chen , 1982 ; Hu , 1997; Wang และคณะ , 1999) Haws และคณะ (1959) พบโครงสร้างของรูโบรพังตาติน (Rubropunctatin , $C_{21}H_{22}O_5$) ซึ่งเป็นสารสีส้ม และสารสีเหลืองโมนาสซิน (Monascin, $C_{21}H_{26}O_5$) ที่แยกได้จากเชื้อรา *M. rubropunctatus* Sâto Fielding และคณะ (1960, 1961) ศึกษาการสร้างสารสีที่ Nishikawa แยกได้จาก *M. purpureus* Went คือ โมนาสโครูบริน (Monascorubrin, $C_{23}H_{23}O_5$) และ โมนาสโคฟลาวิน (Monascoflavin) หรือ โมนาสซิน Nakanishi (1959) แสดงให้เห็นว่าโมนาสโครูบรามีน (Monascorubramine) และรูโบรพังเตตามีนเปลี่ยนมาจากโมนาสโครูบริน และรูโบรพังตาติน (สีส้ม) ตามลำดับ Hiroi และคณะ (1975) ศึกษาโครงสร้างของสารสี 2 ชนิด คือ โมนาสโครู- บริน (สีส้ม) และรูโบพังเตตามีน (สีม่วง) Manchand และคณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

104446

2.6 การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง (บุษบา, 2542)

เชื้อราที่เจริญบนข้าวสามารถปล่อยสารสีออกมานอกเซลล์ได้มาก ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี จึงสร้างสารสีได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่นิยมใช้หมักข้าวแดง ได้แก่ *M. purpureus* และ *M. anka* ซึ่งการผลิตข้าวแดงให้ได้คุณภาพดีขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญหลายประการที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์เชื้อรา สภาวะเลี้ยงเชื้อ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และค่าพีเอช เป็นต้น

2.6.1 สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส

โดยทั่วไปเชื้อราโมแนสคัส เมื่อเจริญบนเม็ดข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั่วทั้งผิวหน้า และทะลุเข้าไปภายในเมล็ดข้าวนั้นก็จะมีการสร้างสารสีได้ภายหลังจากการบ่มได้นาน 3 วัน สารสีเหล่านี้เมื่อมีการนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าสารสีแดงทั่วไปจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 420 และ 500 นาโนเมตร บางสายพันธุ์ที่ให้สีข้าวแดงหรือ อังคัก เป็นสีแดงสด หรือแดงเข้ม จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สูงกว่าที่ 420 นาโนเมตร เช่น ที่พบในสายพันธุ์ของ *M. purpureus* หรือ *M. anka* แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงเข้มคล้ำ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร เป็นต้น เช่น สายพันธุ์ *M. barkeri* หรือ *M. kaoliamg*

2.6.2 สับสเตรท

สับสเตรทที่ใช้ในการหมักสีโมแนสคัสแบบแห้งนั้นปกติจะเป็นข้าว หรือเมล็ดธัญพืชอื่นๆ ได้แก่

2.6.2.1 ข้าว Polo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสร้างสารสีของ *M. purpureus* และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอังคัก มีดังต่อไปนี้ ความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชระหว่าง 3.0-7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่สายพันธุ์ข้าวเหนียวให้ผลไม่ดีนัก บุษบา (2518) ได้ทดลองการสร้างสารสีของ *M. purpureus* โดยใช้สภาวะการผลิต ข้าวแดงของ Palo และคณะ (1960) มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ต่างๆของไทย พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวพันธุ์หอมมะลิให้สีเข้มใกล้เคียงกัน แต่ข้าวเหนียวกลับให้กลิ่นหอมมากกว่าข้าวหอมมะลิ กลิ่นหอมดัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2.2 เมล็ดธัญพืชและอื่นๆ พลายแก้วและบุษบา (2534) ได้ศึกษาแหล่งสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสีโมแนสคัสเปรียบเทียบกับการผลิตสีบนเมล็ดข้าวโดยใช้ข้าวโพด มันเทศ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง ขนมปังแทนเมล็ดข้าวต่อการเจริญ การสร้างสี และการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliamg* พบว่าขนมปังให้ค่าสีแดงมากที่สุด ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Lin และ Iizuka (1982) รองลงมาได้แก่ มันฝรั่ง และปลายข้าวหอมมะลิ นอกนั้นสีไม่ดีนัก ส่วนการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliamg* พบว่าถั่วเหลืองให้ปริมาณสปอร์สูงสุด รองลงมาได้แก่ ถั่วเขียว ขนมปัง และปลายข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ ส่วนธัญพืชอื่นๆ ให้ผลการสร้างสีไม่ดีนัก Rashbaum และ Yueh (1983) ทดลองใช้ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และข้าวบาร์เล่ย์เป็นสับสเตรทแทนข้าวพบว่าได้ผลดีเช่นกัน

2.6.3 พีเอช

Palo (1960) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสีแดงได้ดีที่พีเอชระหว่าง 3.0-7.5 พลายแก้วและบุษบา (2534) พบว่าสภาวะเป็นกรดไม่มีผลต่อการสร้างสีเหลืองของ *M. barkeri*

2.6.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีอยู่ที่ระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส โดยบุษบา (2518) พบว่าอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แต่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

2.6.5 อัตราส่วนของก๊าซ

Han และ Mudgett (1992) รายงานเป็นครั้งแรกของสัดส่วนระหว่างก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลต่อการผลิตข้าวแดงด้วย โดยพบว่าความดันก๊าซออกซิเจนต่อ ความดันคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.50 ต่อ 0.02 บรรยากาศ (atm) จะมีผลดีต่อการสร้างสีแดงของอังคักมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.6 ความชื้น

Palo และคณะ (1960) รายงานเป็นครั้งแรกว่าความชื้นต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการสร้างสีของ *M. purpureus* เชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงของ *M. purpureus* K001 บนเมล็ดข้าว คือ 60.0 เปอร์เซ็นต์ การเขย่าหรือให้อากาศช่วยให้เชื้อราสร้างสารสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวมีเพียงพอต่อการสร้างสารสีอยู่แล้ว รัตนา (2528) พบว่าการหมักข้าวแดงในสภาพที่มีความชื้นสูงมากไป เชื้อราโมแนสคัสจะสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูง เกิดการสะสมกลูโคสยับยั้งการสร้างสารสีได้

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

Han (1990) คัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. จำนวน 13 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 125 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาการสร้างสารสีบนข้าว พบว่า *M. purpureus* ATCC 16365 สร้างสารสีดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5.0-6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Chiu และ Chan (1992) ศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* บนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือชานอ้อย โดยเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อบนขวดหมุน (Roller bottle) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที กับตั้งทิ้งไว้เฉย ๆ พบว่าการใช้ระบบขวดหมุน เชื้อราจะสร้างสารสีแดงและสารสีเหลืองได้ดีกว่าตั้งทิ้งไว้เฉย ๆ ประมาณ 2-3 เท่า แต่ก็ยังให้สารสีน้อยกว่าในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยกลูโคส เปปโตน และยีสต์เอกซ์แทรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Monascus purpureus*

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 SS (Soybran starch)

3.2.2 ข้าวเสาไห้

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.3.2 ขวดเตรียมอาหาร

3.3.3 จานเพาะเชื้อ

3.3.4 หม้อนึ่งความดัน

3.3.5 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

3.3.6 เครื่องหมุนขวด

3.3.7 เครื่องชั่งสารพิกัด 4 ตำแหน่ง

3.3.8 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

3.3.9 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 เชื้อราโมแนสคัส

เชื้อ *M.purpureus* จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง MYS ที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร MYS ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว SS

นำชิ้นเชื้อที่เจริญบนอาหาร MYS agar อายุ 10 - 14 วัน จำนวน 4 ชิ้นใส่ลงในอาหารเหลว SS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 15 ฟลาสก์ บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อราโมแนสคัสด้วยวิธีเอนอะซิทิลกลูโคซามีน

3.4.3 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

3.4.3.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นสำหรับลงเชื้อบนอาหารแข็ง

ใช้เส้นใยเป็นเชื้อเริ่มต้นโดยนำชิ้นเชื้อที่เจริญบนอาหา MYS agar อายุ 10 - 14 วัน จำนวน 4 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลว SS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วันใช้สารละลายสปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้นโดยนำเชื้อราโมแนสคัสที่มีอายุ 7 - 10 วันบนอาหารวุ้นเอียงมาทำเป็นสารละลายสปอร์โดยเติม 0.1% Tween 80 และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำมานับสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer) ให้มีปริมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในตารางที่ 3.1)

3.4.3.2 ศึกษา และเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อโดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นสารละลายสปอร์และเส้นใย

นำข้าว 50 กรัม แช่น้ำ 2 ชั่วโมงแล้วสะเด็ดน้ำ 30 นาที (นิสา, 2537) ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 4 ขวด ทิ้งไว้ให้เย็นจึงลงเชื้อ ขวดที่ 1 และ 2 ใช้สารละลายสปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว ส่วนขวดที่ 3 และ 4 ใช้เส้นใยเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว โดยมีความชื้นเริ่มต้น 15 มิลลิลิตร แล้วนำ ไปบ่มบนเครื่องหมุนขวด ที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์เพื่อนำไปวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้น พีเอช กลูโคอะไมเลส และสารสีที่เวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3.1 The amount of inoculum types (mycelium and spore suspension)and water adding for on solid state fermentation by *M. purpureus*

No. and Inoculum	Initial water amount (ml.)	Amount of inoculum (ml.)	Inoculum age (day)	Total water amount (ml.)
mycelium				
1*	14.5	0.5	4	15
2**	14.5	0.5	4	15
spore suspension				
3*	14.5	0.5	10	15
4**	14.5	0.5	10	15

* before water addition

** after water addition

3.4.3.3 ศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมและมีความสัมพันธ์ต่อการสร้างสารสีกลูโคส เปอร์เซ็นต์ความชื้น สารโมนาโคลิน และพีเอช ของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็งโดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็น เส้นใย อายุ 4 วัน 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว

เชื้อเริ่มต้นเป็นเส้นใย นำข้าว 50 กรัม จำนวน 12 ขวดแบ่งเป็น 2 ชุดๆ ละ 6 ขวด ชุดที่ 1 เติมน้ำลงข้าวก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยแบ่งย่อยเป็น 3 ชุด ชุดละ 2 ขวด ชุดที่ 1.1 เติมน้ำ 14.5 มิลลิลิตร ชุดที่ 1.2 เติมน้ำ 19.5 มิลลิลิตร และชุดที่ 1.3 เติมน้ำ 24.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปหมุน 12 ชั่วโมง และชุดที่ 2 นำข้าว 50 กรัมและน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงปิเปตน้ำลงในข้าว โดยแบ่งย่อยเป็น 3 ชุด ชุดละ 2 ขวด ชุดที่ 2.1 เติมน้ำ 14.5 มิลลิลิตร ชุดที่ 2.2 เติมน้ำ 19.5 มิลลิลิตร และชุดที่2.3 เติมน้ำ 24.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมลงไปในเมล็ดข้าว ทำ 2 ซ้ำ โดยใช้เชื้อเริ่มต้นอายุ 4 วัน ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว (ตารางที่ 3.2) แล้วนำไปบ่มบนเครื่องหมุนขวดที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3.2 The effect of intitial water on solid state fermentation by *M. purpureus* with 1.0% of inoculum size and 4-day of cultivation

No.	Initial water amount (ml.)	Amount of inoculum (ml.)	Inoculum age (day)	Total water amount (ml.)
1	14.5	0.5	4	15
2	14.5	0.5	4	15
3	19.5	0.5	4	20
4	19.5	0.5	4	20
5	24.5	0.5	4	25
6	24.5	0.5	4	25

No. 1-3 before water addition

No. 4-6 after water addition

3.5 การวิเคราะห์ผล

3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณเอน- อะซิทิลกลูโคซามีนด้วยวิธีทางเคมี (NAG Assay) (Jeuniaux. 1966)

ทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมโพแทสบอร์เรตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ต้มเป็นเวลา 3 นาที ลดอุณหภูมิโดยแช่น้ำแข็งทันที เติมสารละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำร้อน (water bath) เป็นเวลา 20 นาที ปีเปตสารละลายที่ได้ ใส่ในไมโครเพลท (micro plate) หลุมละ 300 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณเอน - อะซิทิลกลูโคซามีน ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การหาน้ำหนักแห้งของข้าวแดง

เก็บตัวอย่างข้าวแดงประมาณ 2 กรัม ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้อบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำออกมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ และ ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของข้าว

3.5.3 การวิเคราะห์กลูโคส

ตัวอย่างของข้าวประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์จากนั้นเติมน้ำกลั่น พีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1 : 10 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson

3.5.4 การสกัดสารสี

สกัดสารสีที่ได้จากการหมักของเชื้อราโมแนสคัสด้วยเอทานอลเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปิดปากฟลาสก์ให้สนิทแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 – 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสีที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร วิธีวิเคราะห์ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.5.5 การหาพีเอชของข้าว

นำตัวอย่างของข้าวประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติมน้ำกลั่น พีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1 : 10 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 - 2 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดพีเอช ด้วยเครื่องวัดพีเอช

3.5.6 การวิเคราะห์สารโมนาโคลินด้วยวิธีเบื้องต้น (Min Li และคณะ, 2006)

โดยนำตัวอย่างข้าว 50 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติมเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาทีเวลา 2 นาที แล้วนำส่วนใสไปวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหาร SS

เชื้อราโมแนสคัสสามารถเจริญ และสร้างสารสีได้ทั้งบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว ซึ่งการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวจะให้อัตราการเจริญและการสร้างสารสีเร็วกว่าบนอาหารแข็ง สามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น พีเอช อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ง่าย ซึ่งการทดลองนี้เลี้ยงในอาหาร SS medium เป็นสูตรอาหารที่ให้ปริมาณสารสีได้ดีพอสมควร ประกอบด้วยแป้งถั่วเหลือง และแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้ cock borrow ตัดชิ้นเชื้อที่เจริญบนอาหาร MYS agar จำนวน 4 ชิ้น เป็นเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 7 แล้วนำไปวิเคราะห์การเจริญด้วยวิธีเอนอะซิทิลกลูโคซามีน

เชื้อราโมแนสคัสสามารถสร้างสารสีได้ดีในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลัง และแป้งถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและแหล่งพลังงาน การเจริญของเชื้อราบนอาหาร SS มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีลักษณะเป็นก้อน (pellet) เมื่อวิเคราะห์การเจริญด้วยวิธีเอนอะซิทิลกลูโคซามีน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร อัตราการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสเมื่อครบ 7 วัน สามารถวัดการเจริญได้ดังนี้ 4.37, 7.69, 9.59, 20.75, 27.53, 41.11, 44.41, และ 45.41 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากผลการทดลองต้องการเชื้อเริ่มต้นสภาวะกระตุ้นจึงใช้วันที่ 4 เป็นเชื้อเริ่มต้น (Fig 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

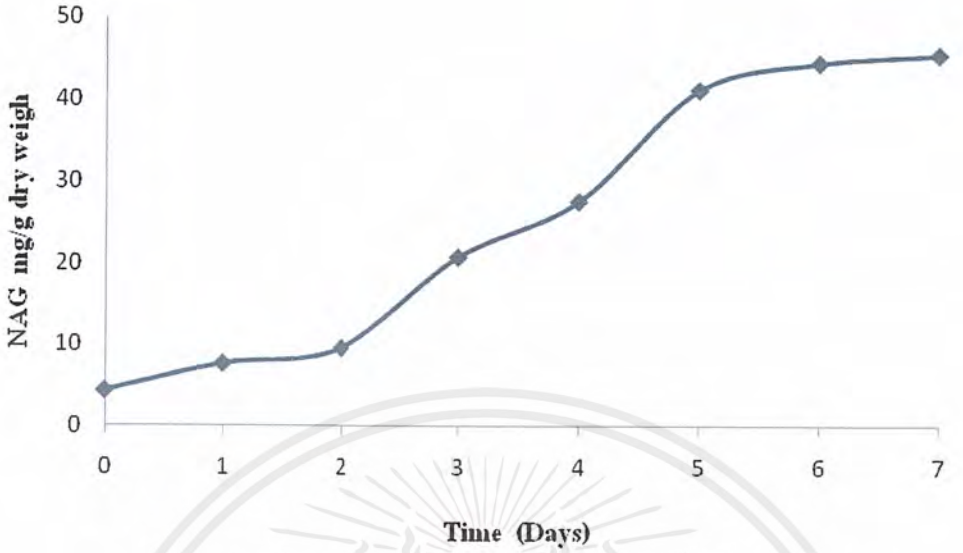


Figure 4.1 The growth of *M. pupureus* on SS medium

4.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง

4.2.1 ศึกษาและเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อโดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นสารละลายสปอร์และเส้นใย โดยนำข้าว 50 กรัม แช่น้ำ 2 ชั่วโมงแล้วสะเด็ดน้ำ 30 นาที ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 4 ขวด ทิ้งไว้ให้เย็นจึงลงเชื้อ ขวดที่ 1 และ 2 ใช้สารละลายสปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว ส่วนขวดที่ 3 และ 4 ใช้เส้นใยเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว โดยมีความชื้นเริ่มต้น 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องหมุนขวดที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างสัปดาห์ที่ 0 – 4 เพื่อนำไปวิเคราะห์พีเอช เปอร์เซ็นต์ความชื้น น้ำตาลกลูโคส สารสี และโมนาโคลิน

จากการทดลองเมื่อใช้สารละลายสปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.46 – 6.11 เมื่อนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นความชื้นประมาณ 45 – 67 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคส ได้ปริมาณ 10.87 – 116.28 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนการวิเคราะห์สารสีได้ประมาณ 0.002 – 16.004 U_{500nm}ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และวิเคราะห์สารโมนาโคลินได้ปริมาณ 0.003 – 3.739 U_{238nm}ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อใช้เส้นใยเป็นเชื้อเริ่มต้น ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.46 – 6.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้นประมาณ 46 – 60 เปอร์เซ็นต์ และวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคส ได้ปริมาณ 9.647 – 143.090 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนการวิเคราะห์สารสีได้ประมาณ 0.002 – 17.438 U_{500nm} ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และวิเคราะห์สารโมนาโคลินได้ปริมาณ 0.011 – 3.774 U_{238nm}ต่อกรัมน้ำหนักแห้งจากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบผลกาวิเคราะห์ ปริมาณกลูโคส สารสี และโมนาโคลิน ของเชื้อเริ่มต้นระหว่างเส้นใย และสปอร์ โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 15 มิลลิลิตร พบว่าผลการวิเคราะห์มีแนวโน้มในทางเดียวกันคือ ค่าพีเอชจะลดลงเมื่อเชื้อมีอายุเพิ่มขึ้น ส่วนเปอร์เซ็นต์ความชื้น ปริมาณกลูโคส สารสี และโมนาโคลิน จะเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้ออายุมากขึ้น ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความชื้น ปริมาณกลูโคส สารสี และโมนาโคลิน การใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นเส้นใย มีค่าใกล้เคียงกับการใช้เชื้อเริ่มต้นที่เป็นสารละลายสปอร์ จึงใช้เส้นใยเป็นเชื้อเริ่มต้น เนื่องจากการเตรียมเชื้อสามารถทำได้ง่าย อีกทั้งยังสามารถขยายปริมาตรการเตรียมได้ด้วย (Fig 4.2 – 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

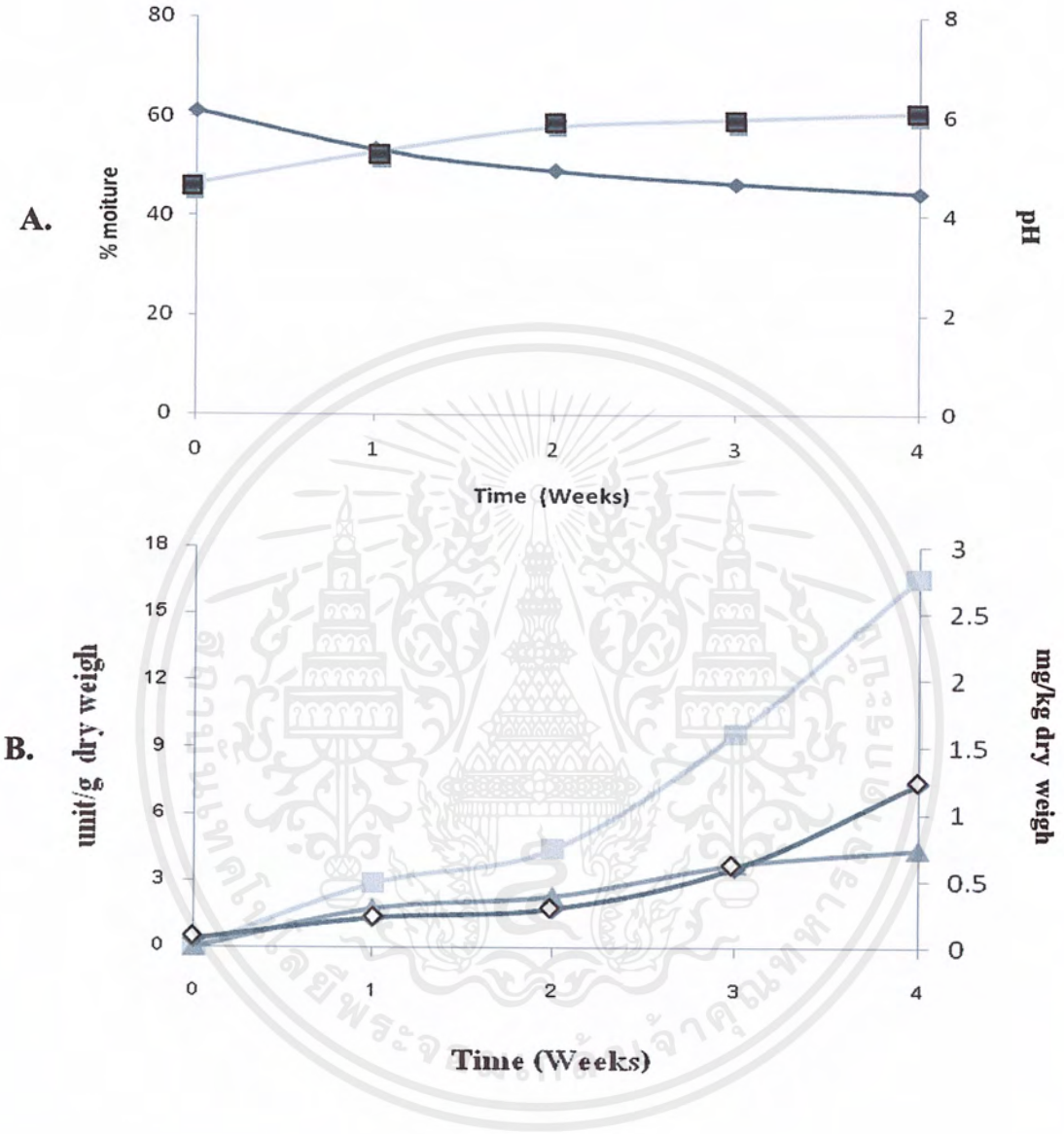


Figure 4.2 **A :** The moisture content (◆) and pH (■) profile during the solid state fermentation of *M.purpereus* using spore suspension as inoculum

B : The effect of spore suspension as inoculum on pigment production (❑) monacolin production (▲) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

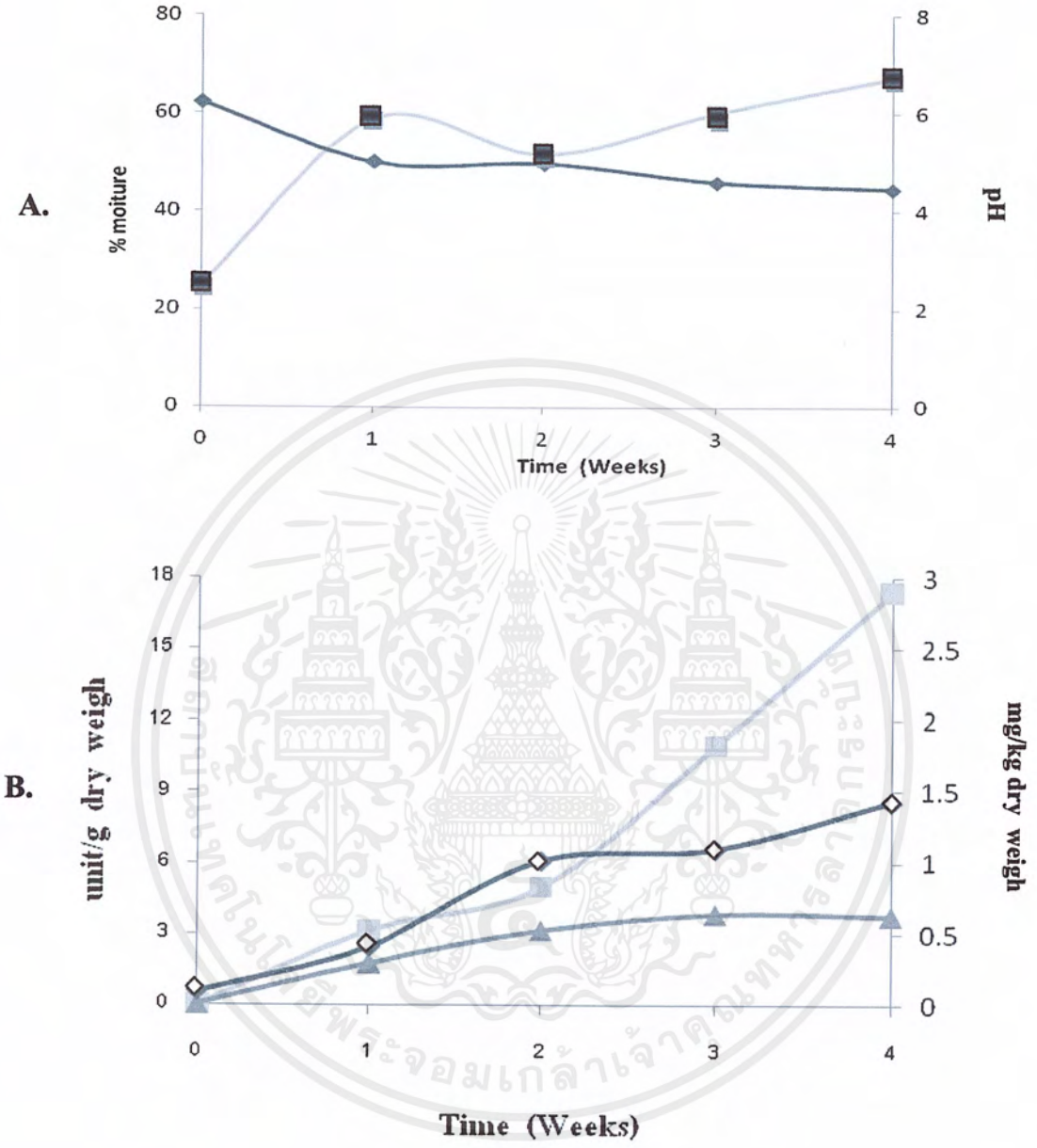


Figure 4.3 **A :** The moisture content (◆) and pH (■) profile during the solid state fermentation of *M.purpereus* using mycelium as inoculum

B : The effect of mycelium as inoculum on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็งโดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็น เส้นใย อายุ 4 วัน 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว

จาก 4.2.1 พบว่าการใช้เส้นใยเป็นเชื้อเริ่มต้นผลิตสารได้ดีกว่าใช้สปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น จึงใช้เส้นใยเป็นเชื้อเริ่มต้นเพื่อศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต่างๆโดยนำข้าว 50 กรัม จำนวน 12 ขวดแบ่งเป็น 2 ชุดๆ ละ 6 ขวด ชุดที่ 1 ซึ่งเป็นชุดควบคุมโดยเติมน้ำลงข้าวก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยแบ่งย่อยเป็น 3 ชุด ชุดละ 2 ขวด ชุดที่ 1.1 เติมน้ำ 14.5 มิลลิลิตร ชุดที่ 1.2 เติมน้ำ 19.5 มิลลิลิตร และชุดที่ 1.3 เติมน้ำ 24.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปหมุน 12 ชั่วโมง และชุดที่ 2 นำข้าว 50 กรัมและน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงปิเปตน้ำลงในข้าว โดยแบ่งย่อยเป็น 3 ชุด ชุดละ 2 ขวด ชุดที่ 2.1 เติมน้ำ 14.5 มิลลิลิตร ชุดที่ 2.2 เติมน้ำ 19.5 มิลลิลิตร และชุดที่2.3 เติมน้ำ 24.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมลงไปในเมล็ดข้าว ทำ 2 ซ้ำ โดยใช้เชื้อเริ่มต้นอายุ 4 วัน ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องหมุนขวดที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างข้าวสัปดาห์ละ 1 ครั้งมาหาความชื้นเริ่มต้น พีเอช สารสี กลูโคอะไมเลส และสารโมนาโคลิน

จากการทดลองพบว่า เมื่อนำขวดข้าวที่เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 14.5 19.5 และ 24.5 มิลลิลิตร ที่ลงเชื้อเริ่มต้นแล้ว บ่มบนเครื่องหมุนขวดเป็นเวลา 1 คืน จะได้ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 46.53, 47.46 และ 51.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการสร้าง สารสี กลูโคส และสารโมนาโคลิน สำหรับการสร้างสารสีบนข้าวของเชื้อราโมแนสคัส พบว่าเชื้อราโมแนสคัสสร้างสารสีในปริมาณมากขึ้นเมื่อเชื้ออายุ 4 สัปดาห์ ที่การเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 14.5 มิลลิลิตร มีความชื้นเริ่มต้น 46.53 เปอร์เซ็นต์ให้ปริมาณสารสี เท่ากับ 17.44 U_{500nm}ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งให้ปริมาณสารสีมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่ 19.5 มิลลิลิตร มีค่าความชื้นเริ่มต้น 47.46 เปอร์เซ็นต์จะให้ปริมาณสารสี เท่ากับ 13.04 U_{500nm} ต่อกรัมน้ำหนักแห้งและ ที่การเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 24.5 มิลลิลิตรมีค่าความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 51.21 เปอร์เซ็นต์จะให้ปริมาณสารสี เท่ากับ 9.45 U_{500nm}ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณสารสีจะเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อราอายุเพิ่มขึ้นและความชื้นเริ่มต้น 14.5 19.5 และ 24.5 มิลลิลิตรปริมาณสารสีจะน้อยลงตามลำดับ

ส่วนการวัดกลูโคส พบว่าการวัดปริมาณกลูโคสที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆในสัปดาห์ที่ 4 ให้ปริมาณกลูโคสมากที่สุด ดังนี้ ที่การเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 14.5, 19.5 และ 24.5 มิลลิลิตร วัดปริมาณกลูโคสได้ดังนี้ 143.09, 179.36, และ 186.61 มิลลดกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองของพลายแก้ว และ บุษบา (2534) พบว่าพันธุ์ข้าวที่เหมะสมต่อการผลิตข้าวแดง คือ พันธุ์หอมมะลิ นอกจากนี้ยังมีอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการหมักข้าวแดง คือ ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม ในกรณีที่มีความชื้นเริ่มต้นต่ำเกินไป จะทำให้เชื้อรามีการเจริญน้อย เป็นเหตุให้การสร้างสารสีน้อยไปด้วย แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงเกินไปจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอมิเลส ทำให้มีปริมาณกลูโคสสูงเกินไป จนเกิดการยับยั้งการสร้างสารสีของเชื้อรา แต่ส่งเสริมการสร้างเอทานอลแทน (Lotong และ Suwanarit 1990) ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องปรับให้เมล็ดข้าวมีความชื้นที่เหมาะสมต่อการหมักข้าวแดง

จากการวัดสารโมนาโคลินด้วยวิธีเบื้องต้น ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอล 100% เป็นตัวสกัดซึ่งจะมีผลทำให้เปบไทด์ตกตะกอนเหลือเพียงอะมิโนอิสระ พบว่าการวัดปริมาณสารโมนาโคลินที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ ในสัปดาห์ที่ 4 ให้ปริมาณสารโมนาโคลินมากที่สุด ดังนี้ ที่ความชื้นเริ่มต้น 14.5, 19.5 และ 24.5 มิลลิลิตร วัดปริมาณสารโมนาโคลินได้ดังนี้ 3.77, 1.87 และ 1.58 U_{238}ต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ปริมาณสารโมนาโคลินจะเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อราอายุเพิ่มขึ้นและความชื้นเริ่มต้น 14.5, 19.5 และ 24.5 มิลลิลิตร ปริมาณสารโมนาโคลินจะลดลงตามลำดับ ในกรณีการวัดสารโมนาโคลินเบื้องต้นอาจจะมีกรดอะมิโนบางตัวที่มีวงแหวนอะโรมาติก ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตแฟน ที่สามารถดูดกลืนความยาวคลื่นที่ 238 นาโนเมตรได้ จึงควรมีการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC เพื่อได้ข้อมูลที่ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

พีเอชของข้าวที่มีปริมาตรน้ำเริ่มต้น 14.5, 19.5 และ 24.5 มิลลิลิตร พบว่าวัดพีเอชของข้าวอยู่ในช่วง 6.21 – 4.24 ซึ่งพีเอชเริ่มต้นมีค่าประมาณ 6 และลดลงในสัปดาห์ต่อมาถึงสัปดาห์ที่ 4 พบว่าปริมาตรน้ำเริ่มต้น 14.5, 19.5 และ 24.5 มิลลิลิตร มีพีเอช เท่ากับ 4.43, 4.33 และ, 4.24 ซึ่งค่าพีเอชมีค่าลดลงตามลำดับ (Fig 4.4 – 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

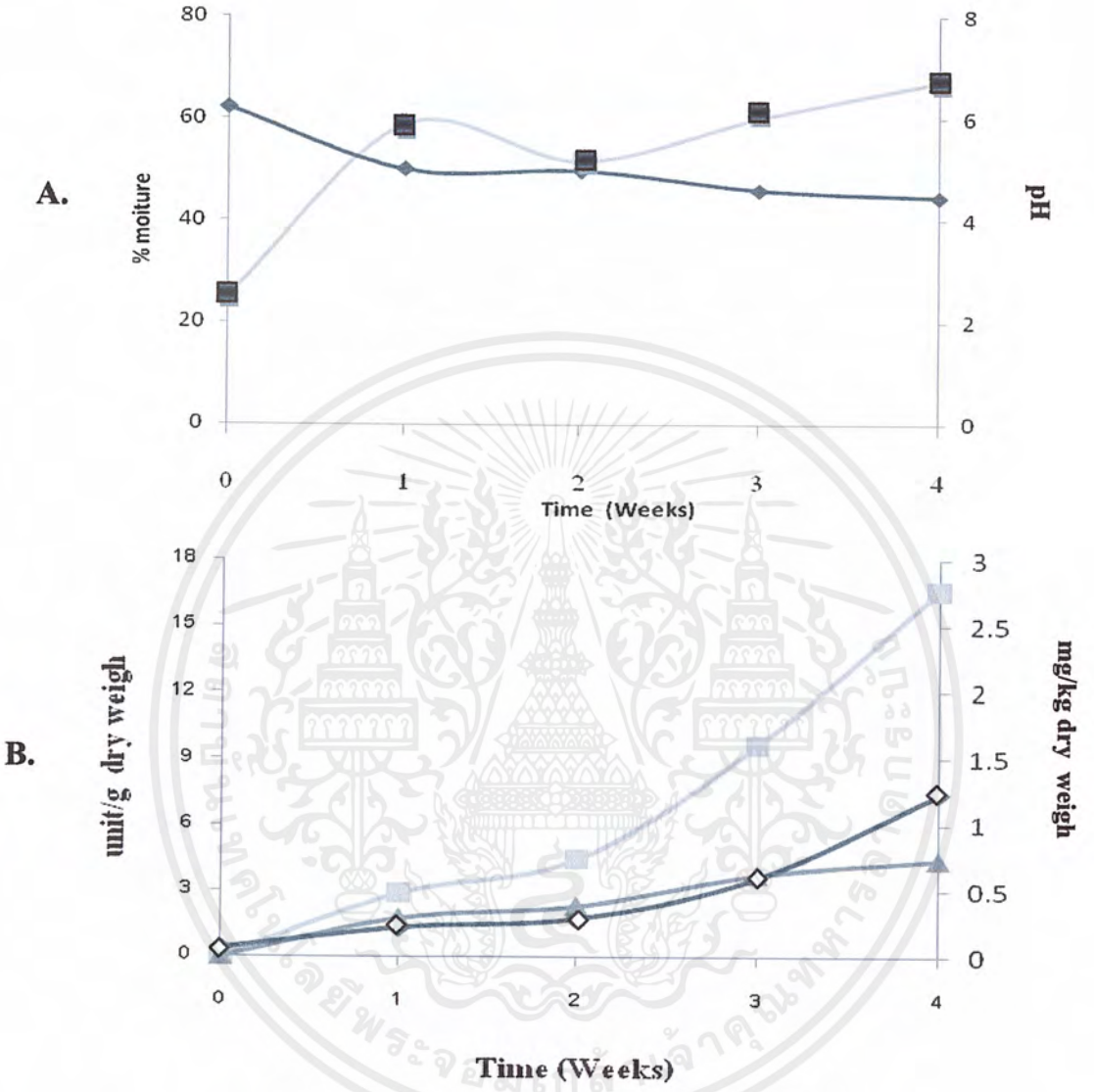


Figure 4.4 **A** : The effect of initial moisture content (◆) and pH (■) profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

B : The effect of initial moisture content on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

Remark; the 14.5 ml of distilled water was added to the rice grain and sterilization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

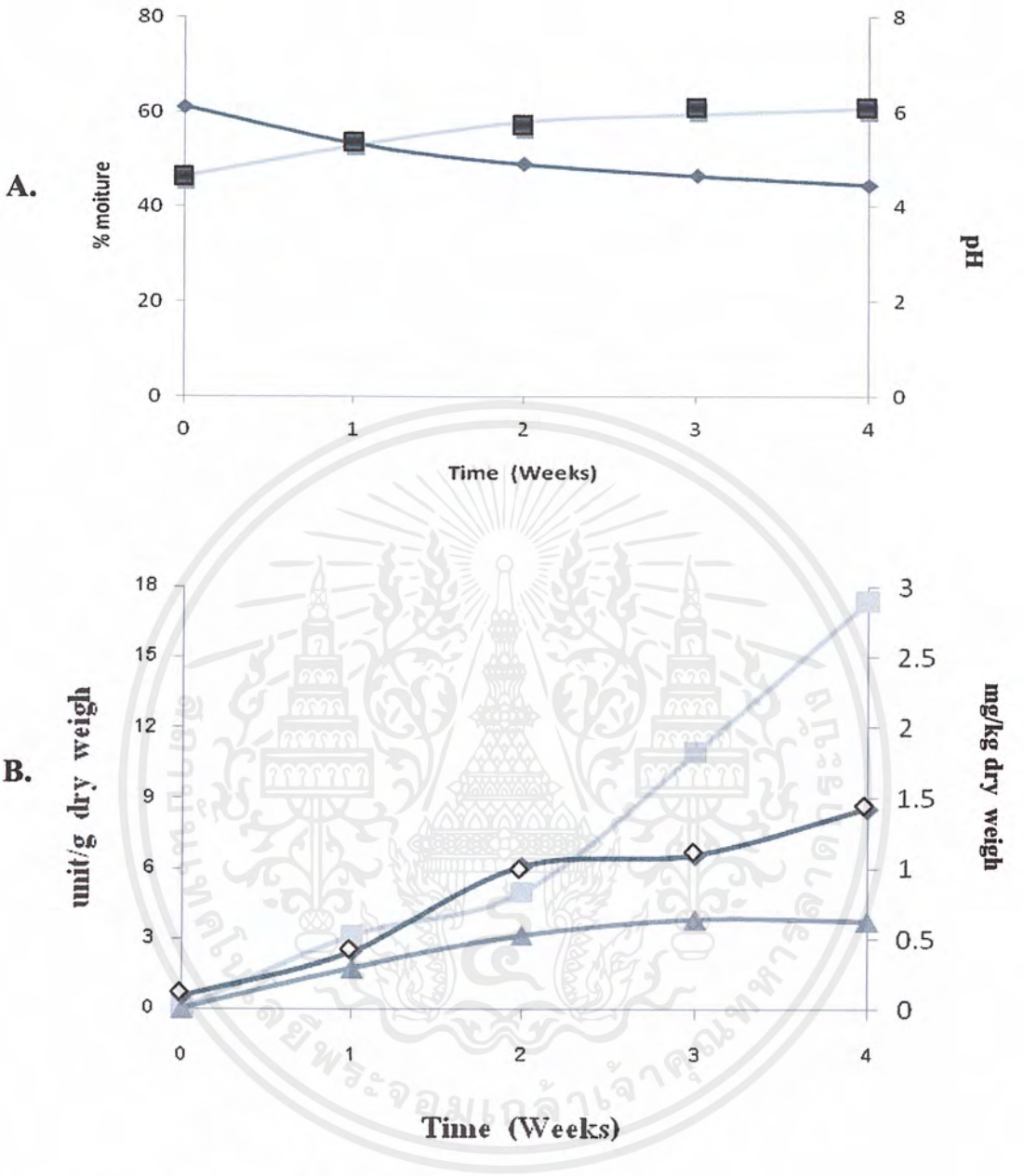


Figure 4.5 **A :** The effect of initial moisture content (◆) and pH (■) profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

B : The effect of initial moisture content on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

Remark; the 19.5 ml of distilled water was added to the rice grain and sterilization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

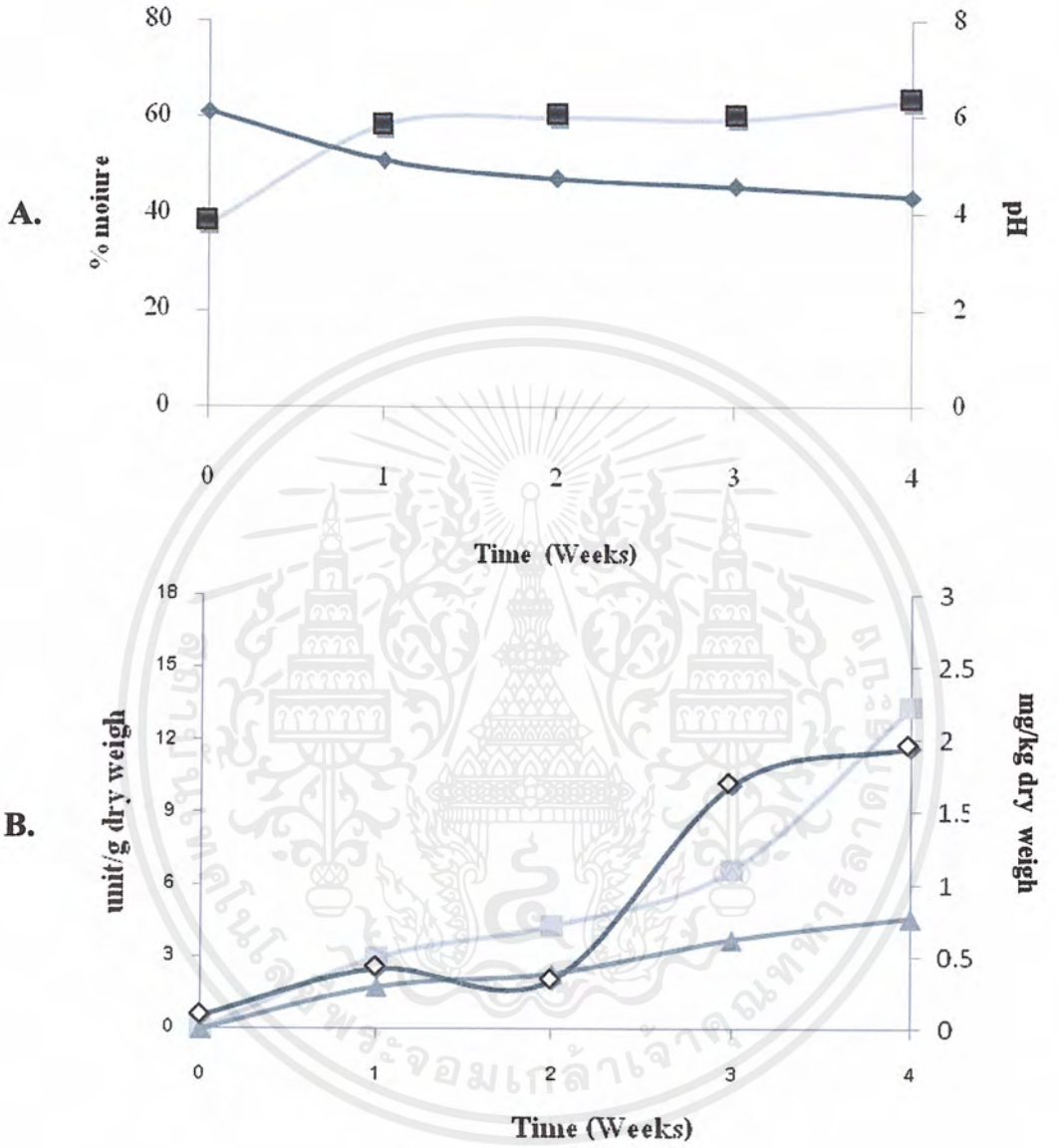


Figure 4.6 **A** : The effect of initial moisture content (◆) and pH (■) profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

B : The effect of initial moisture content on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

Remark; the 24.5 ml of distilled water was added to the rice grain and sterilization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

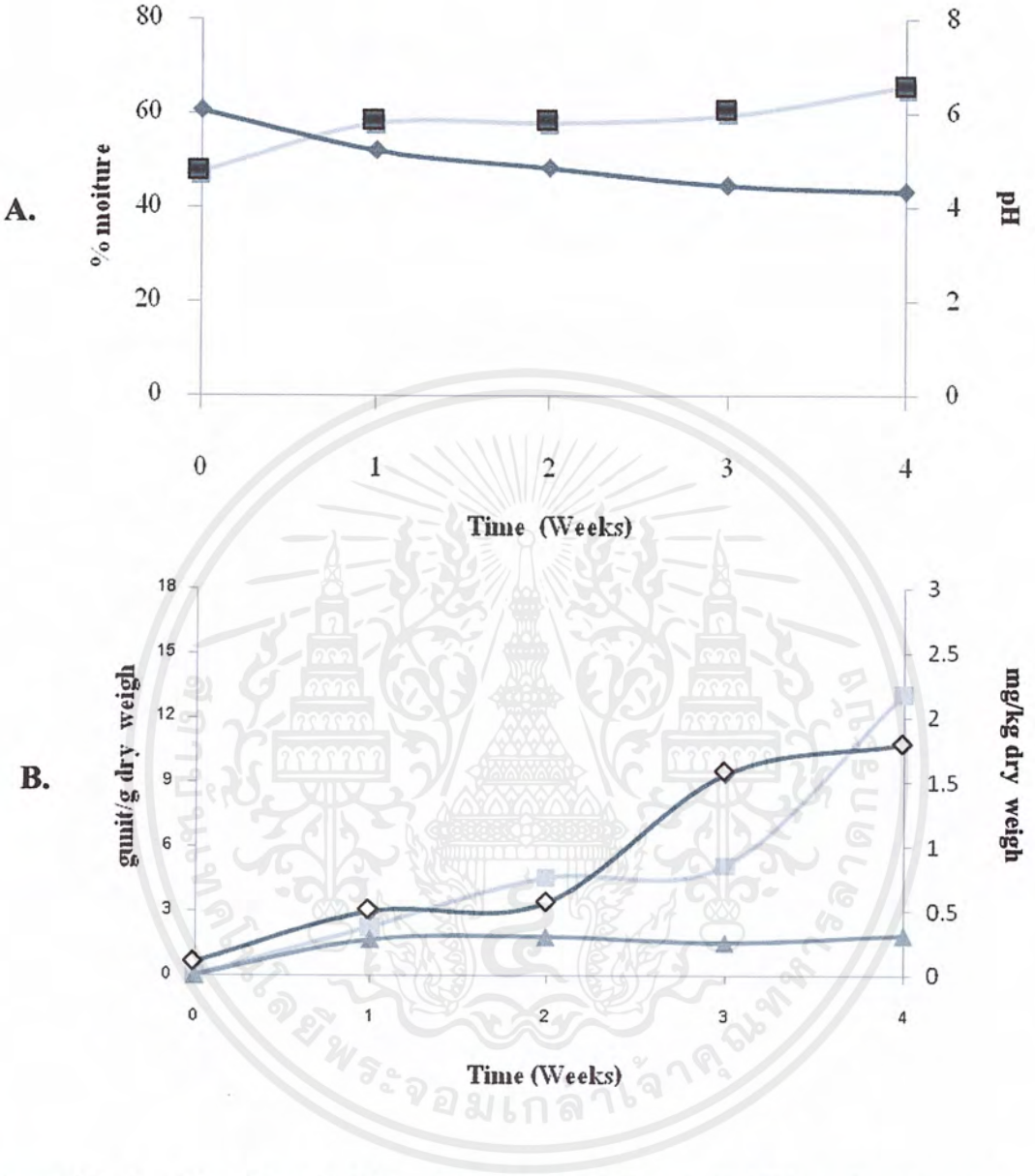


Figure 4.7 **A :** The effect of initial moisture content (◆) and pH (■) profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

B : The effect of initial moisture content on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

Remark; the 14.5 ml of distilled water and the rice grain were sterilized and then mixed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

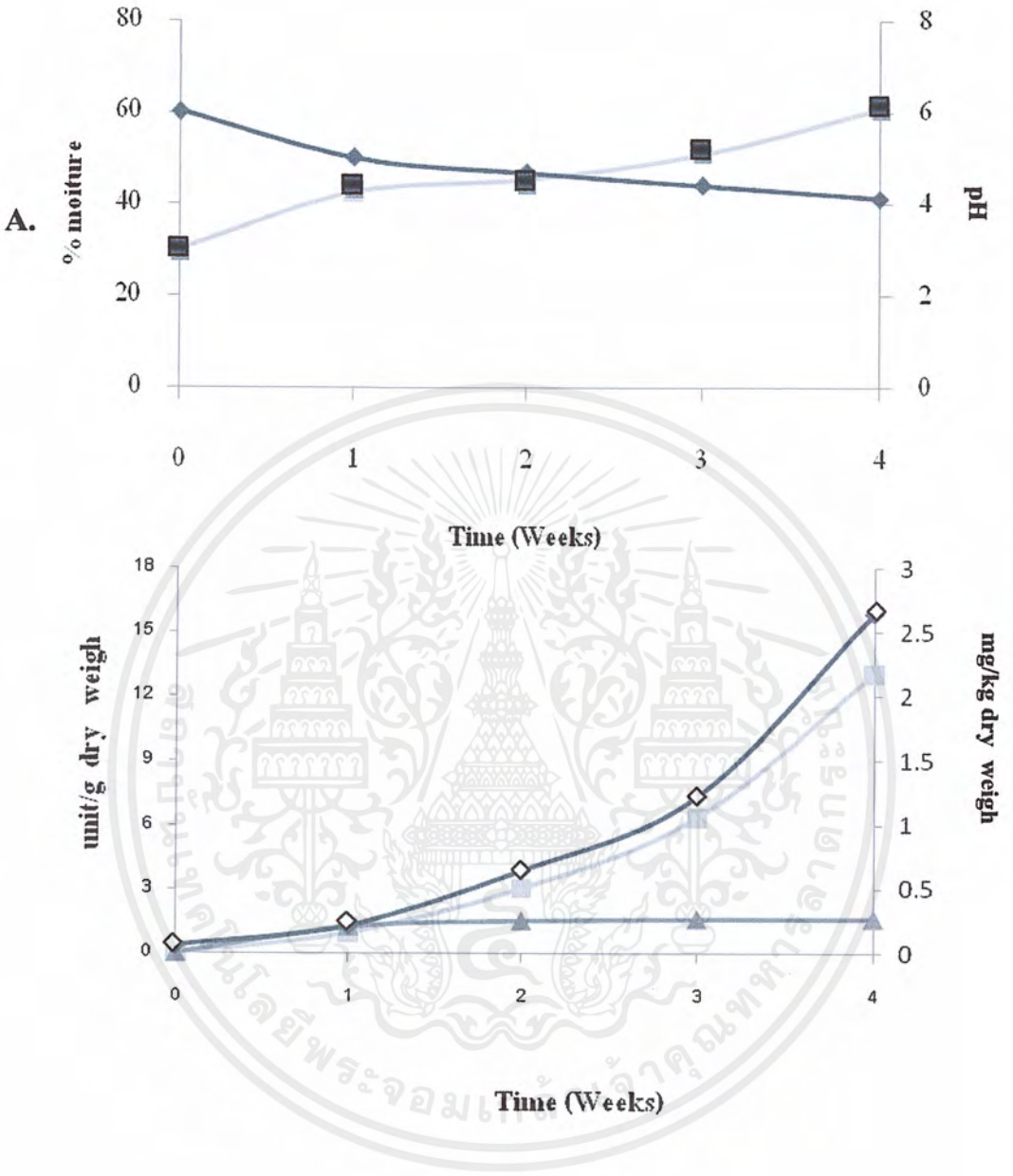


Figure 4.8 **A :** The effect of initial moisture content (◆) and pH (■) profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

B : The effect of initial moisture content on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

Remark; the 19.5 ml of distilled water and the rice grain were sterilized and then mixed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

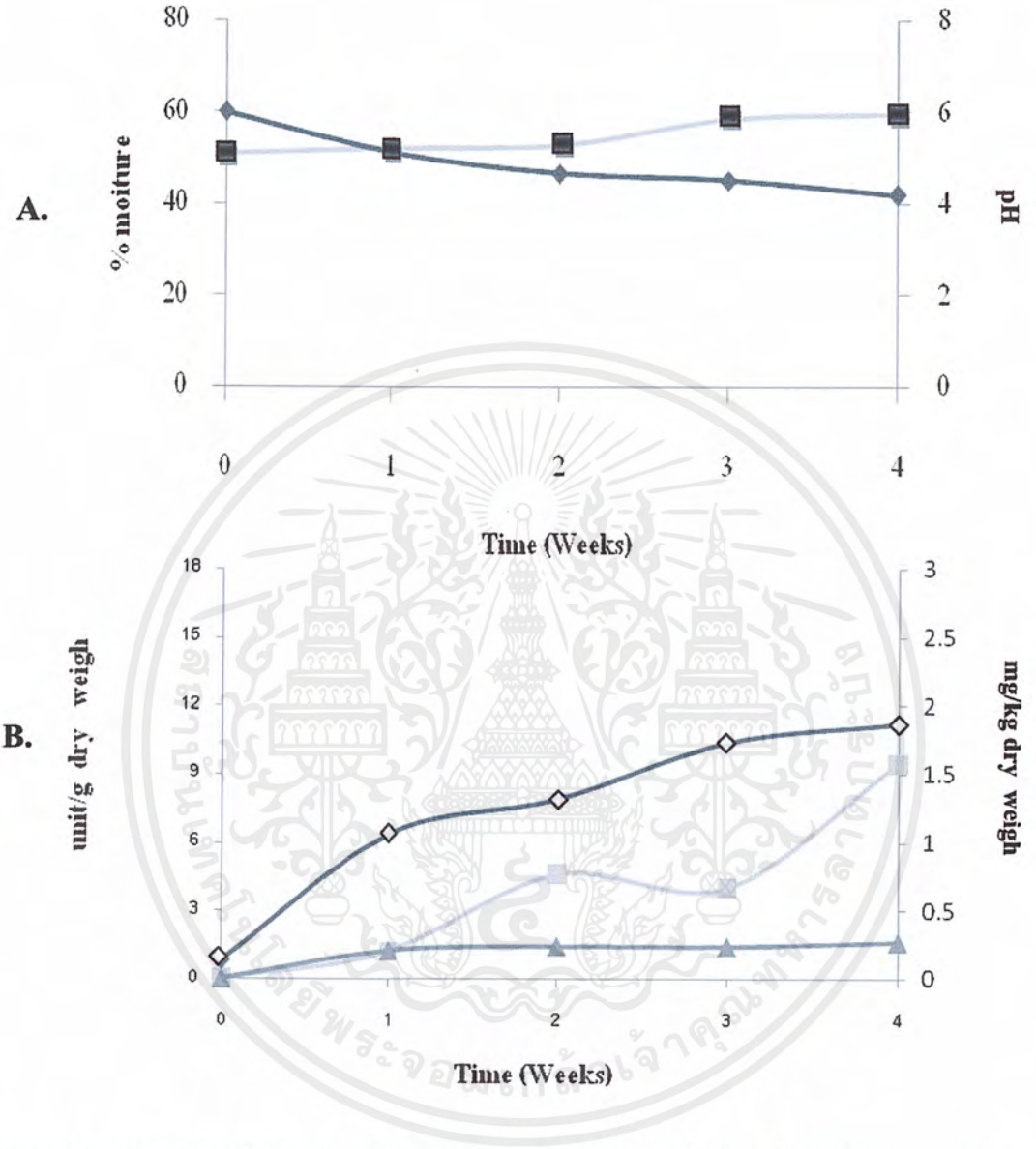


Figure 4.9 **A :** The effect of initial moisture content (◆) and pH (■) profile on solid state fermentation of *M.purpereus* by using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

B : The effect of initial moisture content on pigment production (□) monacolin production (△) and glucose accumulation (10^2) (◇) in the solid state fermentation by *M. purpereus* using 1.0 % mycelium inoculums with 4-day

Remark; the 24.5 ml of distilled water and the rice grain were sterilized and then mixed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การผลิตสีผสมอาหารจากเชื้อรา *Monascus purpureus* โดยลักษณะสัณฐานวิทยาของการเจริญบนอาหารแข็ง MYS พบว่าสร้างเส้นใยสีขาวฟู เมื่ออายุมากขึ้นสีของเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีแดงทั่วทั้งโคโลนี จากนั้นจึงนำเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็ง MYS อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 14 วัน มาลงเชื้อในอาหารเหลว SS ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อราในสภาวะกระตุ้น สำหรับใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็งเพื่อผลิตสารต่างๆ ผลวิเคราะห์การเจริญด้วยวิธีวัดปริมาณเอนอะซิทิลกลูโคซามีน พบว่าเชื้อราโมแนสคัสให้การเจริญอย่างรวดเร็วในวันที่ 4 มีค่า 0.6115 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และให้การเจริญสูงสุดในวันที่ 5 -7 ดังนั้นจึงใช้เชื้อราที่เจริญในอาหารเหลว SS เป็นเวลา 4 วัน เป็นเชื้อเริ่มต้นเพื่อการศึกษาการเจริญบนอาหารแข็งต่อไป

ผลการเจริญบนอาหารแข็งโดยใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนอาหารเหลว SS อายุ 4 วัน เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นสารละลายสปอร์ ที่ปริมาตร 1.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว และบ่มบนเครื่องหมุนขวดเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นเส้นใยเชื้อราให้การผลิตสารสี (17.438 และ 16.004 U_{500nm}ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และกลูโคส (143.090 และ 116.28 มิลลิกรัมกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) สูงกว่าการใช้เชื้อเริ่มต้นเป็นสารละลายสปอร์ ตามลำดับ ขณะที่การผลิตสารโมนาโคลินโดยใช้เชื้อเริ่มต้นทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน (3.774 และ 3.739 U_{238nm}ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปของเส้นใยเชื้อราที่เจริญในอาหารเหลว SS และสารละลายสปอร์ ต่างก็ให้การเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้เชื้อเริ่มต้นชนิดเส้นใยจากการเจริญในอาหารเหลวเป็นเวลา 4 วัน สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป สาเหตุที่เลือกใช้เชื้อเริ่มต้นชนิดนี้เนื่องจากการเตรียมเชื้อสามารถทำได้ง่าย อีกทั้งยังสามารถขยายปริมาตรการเตรียมได้ จึงใช้เส้นใยเชื้อราอายุ 4 วัน 1.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวเป็นเชื้อเริ่มต้นในเลี้ยงบนอาหารแข็งเพื่อผลิตสาร และนำมาทดสอบวิธีการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อในปริมาตรต่างๆแก่เมล็ดข้าว

ศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็งโดยมีเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเท่ากับ 14.5, 19.5 และ 24.5 มิลลิลิตร พบว่าการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 14.5 มิลลิลิตร และ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว คิดเป็นความชื้นเริ่มต้น 46.53 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างสารสีสูงสุด เท่ากับ 17.44 U_{500nm}ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในสัปดาห์ที่ 4 และยังให้ค่าสารโมนาโคลินสูงสุดด้วย เท่ากับ 3.77 U_{238nm}ต่อกรัมน้ำหนักแห้งใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการวิเคราะห์ค่าต่างๆ พบว่า การเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 14.5 มิลลิลิตรจะให้ค่าสารสี สารโมนาโคลินมากที่สุด ในขณะที่การเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 24.5 มิลลิลิตรจะให้ค่าการสะสมกลูโคสสูงสุด ส่วนความชื้นเริ่มต้นมีผลต่อการผลิตสารต่างๆดังนี้ คือเมื่อความชื้นเริ่มต้นเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่ากลูโคสเพิ่มขึ้น ค่าสารสี สารโมนาโคลิน และพีเอชลดลง และในทางกลับกันเมื่อความชื้นเริ่มต้นลดลงส่งผลให้ค่ากลูโคสลดลง ค่าสารสี สารโมนาโคลิน และพีเอชเพิ่มขึ้น การเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 14.5 มิลลิลิตรจะให้ค่าสารสี สารโมนาโคลินมากที่สุด ในขณะที่การเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 24.5 มิลลิลิตรจะให้ค่าการสะสมกลูโคสสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จันทนี อิทธิพานิชพงศ์. 2545. ยาลดไขมันในเลือด. เภสัชวิทยา 1คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์แทกซ์แอนด์เจอนัล. กรุงเทพฯ : 187-196.

เชิดชัย เชี่ยวธีรกุล, ประสิทธิ์ แซ่ลี้ และปนัดดา แซ่อึ้ง. 2519. สีแดงจากข้าว (อั้งคัก). วารสารอาหาร 8(1) : 51-55.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์ . 2546 . จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม . ครั้งที่ 3 .กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นิสา บุตรดา . 2537 . การกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส กบ. 11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสีและเปรียบเทียบสมบัติบางประการกับสายพันธุ์พ่อแม่ สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดง และสีเหลือง . วิยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุษบา ยงสมิทธ์ . 2534 . การปรับปรุงด้านปริมาณและคุณภาพของการผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลัง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

วรรณภา ทาบโลกา, บุษบา ยงสมิทธ์ . 2527 . การศึกษาการใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตสีผสมอาหารและเอนไซม์ย่อยแป้งโดยราโมแนสคัสในสภาพ submerged culture. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมชาย ไกรรักษ์. 2536. ศักยภาพของเชื้อราโมแนสคัสกลายพันธุ์ชนิดใหม่ ในการผลิตสีเหลืองธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

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

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

Azie end Afrika Bron: Schroder. 1998. Departement Voor de Kwaliteit van dierlijke producten Aspergillus, Penicillium, Monascus en Byssochlamys, die beginnen te groeien wanneer

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Bobek P, Ozdín L, Galbavý S (1998). Dose- and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) in rats. *Nutrition*. 14(3): 282–6.

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

Chiu, S.W. and S.M. Chan. 1992. Production of pigments by *Monascus purpureus* using sugar-cane bagasse in roller bottle cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. 8 : 68-70.

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

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

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

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

Endo, A. & Hasumi, K. (1997). Mevinic acids. In *Fungal Biotechnology*, pp. 162-172. Edited by T. Anke. Weinheim: Chapman & Hall.

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

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

Fink-Gremmels J, Leirtner L. 1989 .Biologische wirkung von *Monascus purpureus*. Fleischwirtschraft; 69 (1): 115-22.c

Han, O. H. 1990a. Optimization of *Monascus* pigment production in solid-state fermentation, pp. 260-263. *In* G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (eds.). Natural Food Colorants. Blackie and Son., New York. 280 p.

Hassan H. Peter N. and Philippe D. 2001. Lovastatin Biosynthesis by Aspergillus terreus in a Chemically Defined Medium. Applied and Environmental Microbiology. 67(6): 2596-2602.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

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

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

Jeuniax , C. Chitinases. NEUFELD, E.F. and GINSBURG, V. eds. Complex Carbohydrates. Methods in Enzymology. Academic Press, *Inc*. New York. 1966. 8 : 644-650.

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

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

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

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.nts of tofunyu. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 62 : 1201-1205.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Rashbaum SA and EMY Barrington. 1983. Natural red coloring prepared from an oat substrate. US Patent 4418081.102

Roitelman, J., Olender, E.H., Bar-Nun, S., Dunn, W.A., Simoni, R.D. 1992. Immunological Evidence for 8 Spans in the Membrane Domain of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase. Implications for Enzyme Degradation in the Endoplasmic Reticulum. J. Cell Biol. 117 : 959-973.

A. J. Ryan, H. Smith, and W. B. Whalley.1999.glucosylmonascorubramine from Monascus ruber and occurrence of electron donor-acceptor complexes in these red.

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

S. Guth, M. Kémeny, M. Habermeyer and D. Wolf. 2005. Toxicological evaluation of red mould rice.

Shin1, M.J. Whitcombe2 and E.N. Vulfson2. 1998. Binding properties of an aminostyrene-based polymer imprinted with glutamylated monascus pigments. 13: 665–669.

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

Tang, Y., Wang, C. C., Watanbe, K., Xie, X., Wojcicki, W. A. 2006. Biosynthesis of Lovastatin Analogs with Broadly Specific Acyltransferase. *Chemistry and Biology*. 13: 1161–1169.

Vederas J.C,Moore, R. N., Bigam, G., Chan, K. J. 1985. Biosynthesis of the Hypocholesterolemic agent Mevinolin by Aspergillus terreus. Determination of the origin of carbon, Hydrogen and Oxygen by 13C NMR and mass Spectrometry". *J. Am. Chem. Soc.*(107) : 3694–3701.

Vederas, J. C., Witter, D. J. 1996. Putative Diels-Alder Catalyzed Cyclization during the Biosynthesis of Lovastatin. *J. Org. Chem* 61 (8): 2613–2623.

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

Wang, X. S., Diener, K., Manthey, C. L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C. N., Chan-Hui, P. Y., Mantlo, N., *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 23668-23674.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

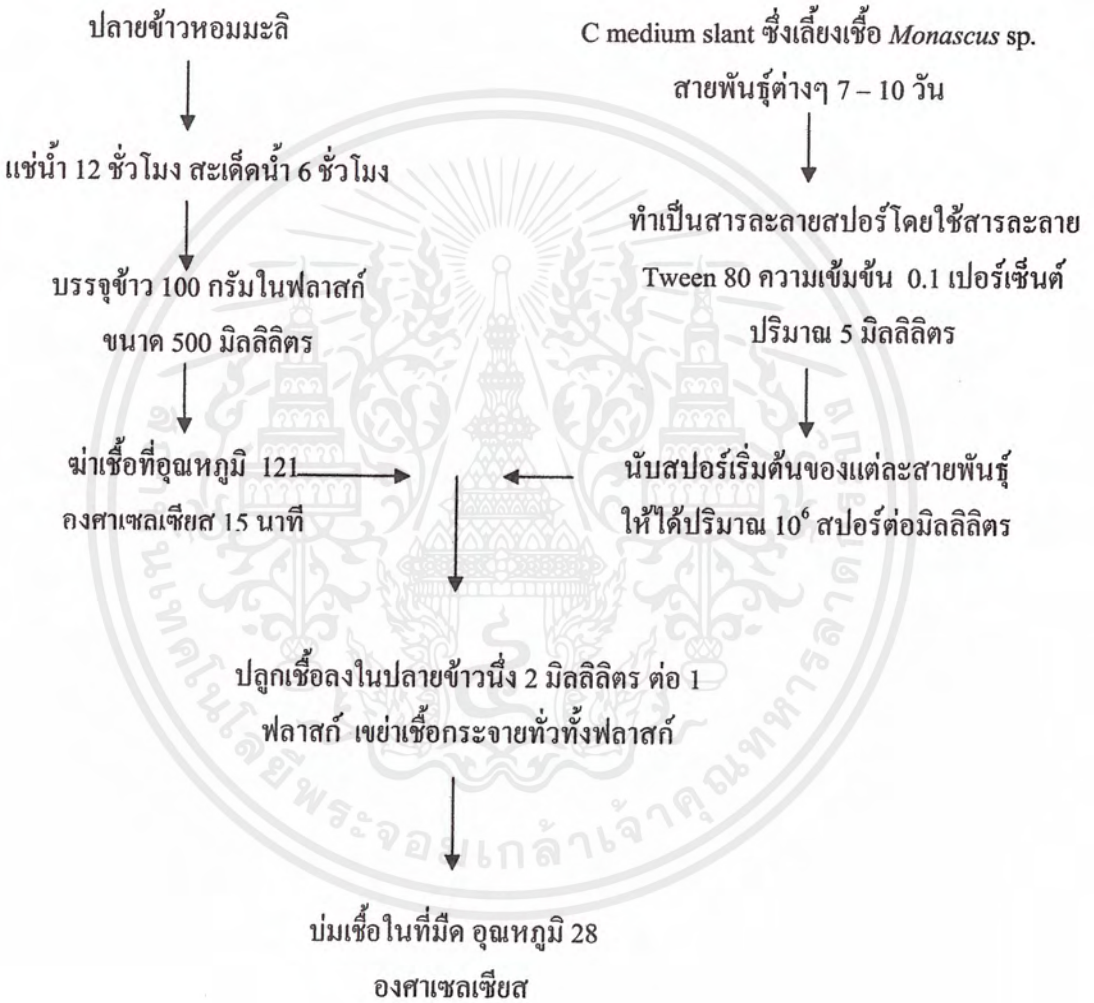
Yoshimura, M., S. Yamanaka, K. Mitsugi and Y. Hirose. 1975. Production of *Monascus* pigment in submerged culture. Agr. Biol. Chem. 39 : 1789-1795.

Tanya V. Rasheva, Trayana S. Nedeva, Jean-Noel Hallet and Anna V. Kujumdzieva. 2004. Antonie van Leeuwenhoek. 83(4) : 333-340

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
กรเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

1. การทำข้าวแดง (นิสา , 2537)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อาหาร MYS (Malt yeast extract starch agar)

เปปโตน	5.0 กรัม
ยีสต์สกัด	3.0 กรัม
มอลต์สกัด	3.0 กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	20.0 กรัม
วุ้น	12-15 กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร SS (Soy bran starch)

แป้งมันสำปะหลัง	30 กรัม
แป้งถั่วเหลือง	40 กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
สารเคมี และวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การหาน้ำหนักแห้ง (dry cell weight)

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

1.2. นำตัวอย่างข้าวประมาณ 1 – 2 กรัม ใส่จานอะลูมิเนียมที่อบไว้แล้ว

1.3. นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อบจนได้น้ำหนักคงที่ใช้เวลาประมาณ 12 – 24 ชั่วโมง

1.4. นำออกมาใส่โถอบแห้ง 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

1.5. นำไปอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักจานอะลูมิเนียมมาหักออกเป็นค่าน้ำหนักแห้ง

2. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ใช้วิธีการเดียวกับการหาน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อได้น้ำหนักแห้งแล้ว ให้นำมาหักออกจากน้ำหนักตัวอย่างก่อบอบ ก็จะได้ค่าความชื้นของตัวอย่าง นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

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

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ของ Nelson Somogyi (Nelson, 1944)

2.1 สารเคมี

2.1.1 Copper reagent

เตรียมสารละลายละลาย $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71 กรัม และโซเดียมโปรแทสเซียมทาร์เทรต 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 นอมอล จำนวน 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 10.0 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ทำให้ร้อน เติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1.0 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนกรองออกก่อนนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

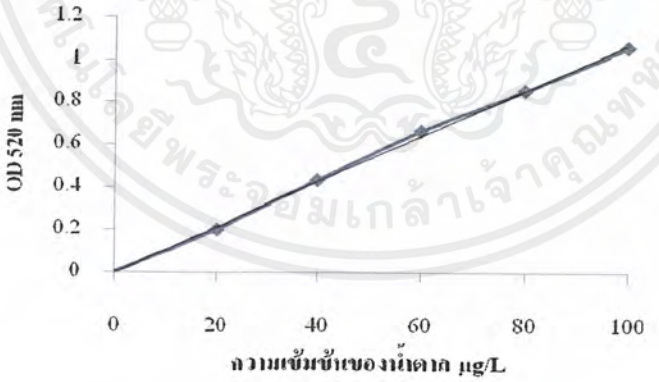
2.1.2 Nelson reagent

เตรียมโดยละลาย $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติม $Na_2AsO_4.7H_2O$ 6 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นลงไป คนให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนกรองออกก่อนนำไปใช้

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคส (analytical grade glucose) โดยอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำเป็นสารละลาย ความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุสารละลายแต่ละความเข้มข้นในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม Copper reagent 1.0 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยใช้น้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลกลูโคสและค่าความขุ่น



สมการเส้นตรง (Y) = 0.0107X + 0.0005

R^2 = 0.999

Figure B.1 Stadard curve of glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 ถึง 100 ไมโครกรัม จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดสอบ นำไปวิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสข้างต้น คำนวณปริมาณน้ำตาลตัวอย่างในจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

4. การวิเคราะห์ปริมาณแอน- อะซิทิลกลูโคซามีนด้วยวิธีทางเคมี (NAG Assay) (Jeuniaux. 1966)

3.1 สารเคมี

3.1.1 สารละลายโพแทสบอร์เรตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.1 โดยละลายบอร์ริก 49.464 กรัมด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตรในขวดปรับปริมาตร

เตรียมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.0 โมลาร์ โดยละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 56.11 กรัมด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตรในขวดปรับปริมาตร

นำสารละลายบอร์ริก เข้มข้น 0.8 โมลาร์ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ จนได้พีเอช 9.1

3.1.2 สารละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์

เตรียมโดยละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ 10.0 กรัมในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยอะซิติเข้มข้น(Glacial acetic acid) 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

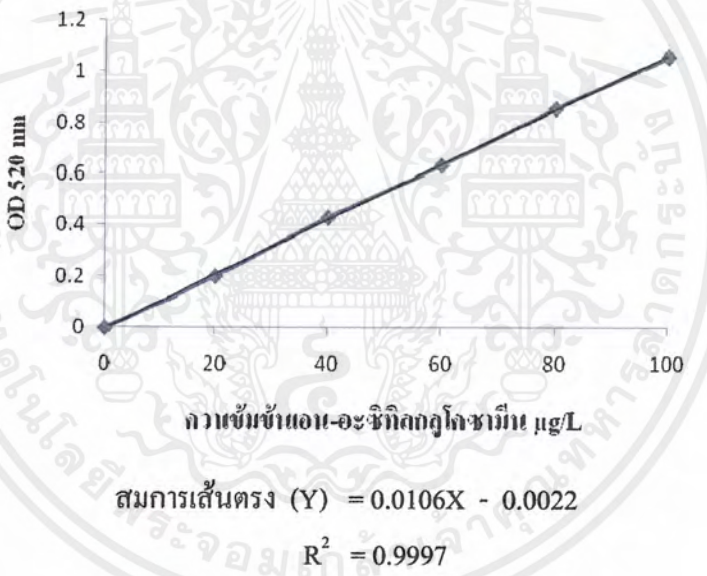
3.2 การวิเคราะห์ปริมาณแอน- อะซิทิลกลูโคซามีนด้วยวิธีทางเคมี (NAG Assay)

ทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมโพแทสบอร์เรตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ต้มเป็นเวลา 3 นาที ลดอุณหภูมิโดยแช่น้ำแข็งทันที เติมสารละลายพารา-ไดเมทิลอะมิโนเบนซอลดีไฮด์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำร้อน (water bath) เป็นเวลา 20 นาที ปิเปตสารละลายที่ได้ ใส่ในไมโครเพลท (micro plate) หลุมละ 300 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณแอน- อะซิทิลกลูโคซามีน ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมกราฟมาตรฐานของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน

1. เตรียมสารละลายเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งเอน-อะซิทิลกลูโคซามีน 20.42 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานขากข้อ 1 แต่ละชนิดด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์
3. วิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง
4. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (แกน Y)



สมการเส้นตรง (Y) = 0.0106X - 0.0022

R^2 = 0.9997

Figure B.2 Standard curve of NAG

5. วิธีวิเคราะห์สารสี

สกัดสารสีที่ได้จากการหมักข้าวของเชื้อราโมแนสคัสด้วยเอทานอลเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปิดปากฟลาสก์ให้สนิทแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 – 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสีที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สามารถคำนวณได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างคำนวณหาสารสี

เก็บตัวอย่างข้าว 1 กรัม สกัดสารสีเอททานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ที่ค่าการเจือจาง 20 เท่า วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.693 ABS ส่วนข้าวที่สกัดสีแล้วนำไปอบแห้งและชั่งน้ำหนักแห้งได้ 0.4749 กรัม สามารถนำมาคำนวณปริมาณสารสีได้ดังนี้

ปริมาณสี	20 X 0.693	=	13.86 unit/ml.
ปริมาณสารสีทั้งหมด	40 X 13.86 unit.ml./ml.	=	554.4 unit
น้ำหนักแห้ง 0.4749 กรัม		ได้สารสี	554.4 unit
ในข้าว 1 กรัมมีสารสีทั้งหมด		=	1167.4037 U/g-dry weight

6. การหาพีเอชของข้าว

นำตัวอย่างของข้าวประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติมน้ำกลั่นพีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1 : 10 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดพีเอช ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

7. การวิเคราะห์สารโมนาโคลินด้วยวิธีเบื้องต้น Min Li และคณะ (2006)

นำตัวอย่างข้าว 50 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลองจากนั้นเติมเอทานอล 100 เปอร์เซ็น 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาทีเวลา 2 นาที แล้วนำส่วนใสไปวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

รูปภาพแสดงการทดลอง

Figure C.1 The red rice product after 4-week cultivation by *M. purpureus* in solid state fermentation with rotated incubation

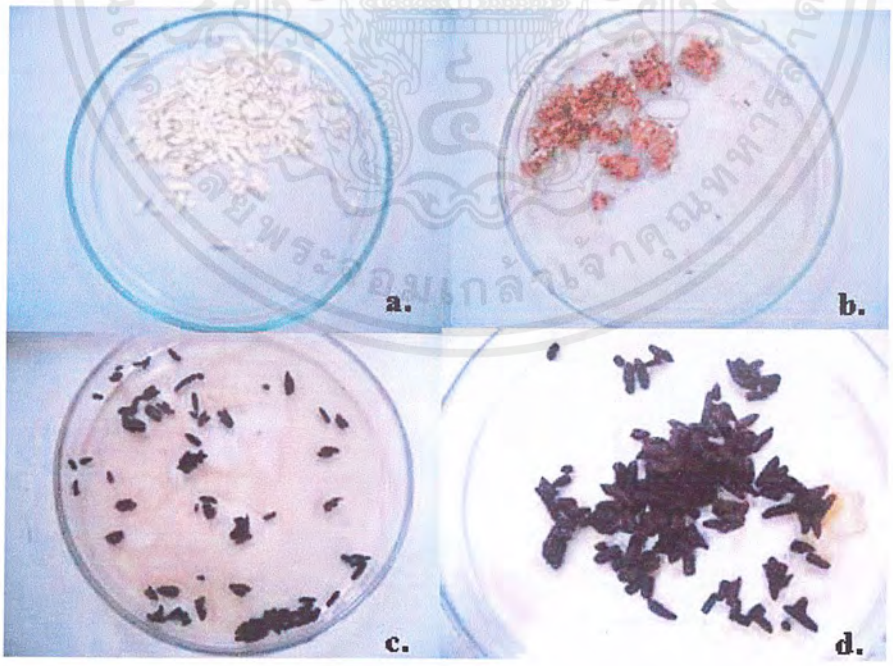


Figure C.2 The red rice production by solid state fermentation of *M. purpureus* at (A) 0-week, (B) 1- week, (C) 2- week and (D) 4-week of cultivation in rotated bottle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

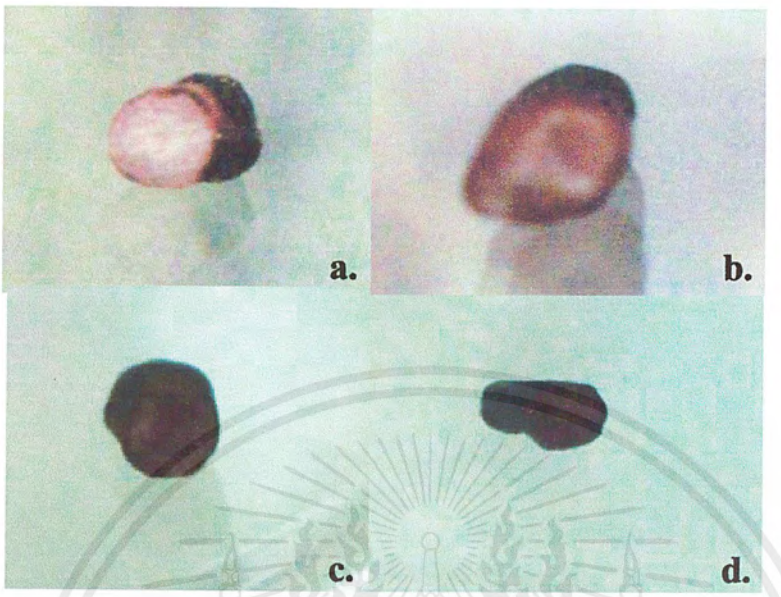


Figure C.3 The growth of *M. purpureus* on the surface of rice grain at (A) 1-week, (B) 2-week, (C) 3-week and (B) 4-week of solid state cultivation in rotated bottle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้