สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตสารยับยั้งคลอเลสเตอรอลจากเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญในอาหารเหลวที่มีมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

The anti- cholesterol production by the cultivation of *Monascus* sp. in submerged fermentation with cassava chip as carbon source

T122371

จิราพร จันพราม
ลักษมี แซ่เฮ้ง
สาวิตรี เหมือนถม

เลขหมู่ 0504
เลขทะเบียน 122371
วัน, เดือน, ปี 12 ก.ย. 2555

b 12487340
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The anti- cholesterol production by the cultivation of *Monascus* sp. in submerged fermentation with cassava chip as carbon source

JIRAPORN JANPRAM
LAKSAMEE SAE – HENG
SAWITRI MUENTHOM

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN BIOTECHNOLOGY PROGRAM

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตสารยับยั้งคลอเลสเตอรอลจากเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญในอาหารเหลวที่มีมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

The anti- cholesterol production by the cultivation of *Monascus* sp. in submerged fermentation with cassava chip as carbon source

ชื่อนักศึกษา นางสาวจิราพร จันพราม

นางสาวลักษมี แซ่เฮ้ง

นางสาวสาวิตรี เหมือนถม

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2554

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตสารยับยั้งคลอเลสเตอรอลจากเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญในอาหารเหลวที่มีมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน The anti- cholesterol production by the cultivation of *Monascus* sp. in submerged fermentation with cassava chip as carbon source
ชื่อนักศึกษา	นางสาวจิราพร จันพราม นางสาวลักษมี แซ่เฮ้ง นางสาวสาวิตรี เหมือนถม
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2554
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษาทดลองผลิตสารยับยั้งคลอเลสเตอรอลจากเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญในอาหารเหลว โดยใช้เชื้อเริ่มต้นชนิดเป็นเส้นใยเชื้อรา ที่เลี้ยงในอาหาร SS เป็นเวลา 3 วัน เชื้ออยู่ในระยะ mid – log phase เจริญได้รวดเร็ว และไม่มีการสร้างสารโมนาโคลิน นำเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง และแห้ว ผลการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน พบว่าในอาหารสูตรปกติ ที่มีมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนมีการผลิตสารโมนาโคลินสูงที่สุด (0.057 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร) มีน้ำตาลที่ละลายน้ำเท่ากับ 28.13 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้อาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนพบว่า เมื่อใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ให้การผลิตสารโมนาโคลินเพิ่มขึ้นเป็น 0.092 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร มีน้ำตาลที่ละลายน้ำลดต่ำลงจากเดิมเป็น 5.45 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าอาหารที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนสามารถให้การผลิตสารโมนาโคลินได้สูงกว่าอาหารสูตรปกติถึง 61.40 เปอร์เซ็นต์ และลดระดับน้ำตาลที่ละลายน้ำลงถึง 80 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ *Monascus* sp. สารโมนาโคลิน มันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The anti- cholesterol production by the cultivation of *Monascus* sp. in submerged fermentation with cassava chip as carbon source
Students	Jiraporn Janpram Laksamee Sae-heng Sawitri Muenthom
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2011
Advisor	Asst. Prof. Dr. Somchai Krairak

ABSTRACT

The anti-cholesterol production by the *Monascus* sp. cultivation in submerged medium was studied.The inoculums was prepared by the cultivation of *Monascus* sp. in SS medium for 3 days in which mid-log phase state. The inoculums, as mycelium form, presented active cell without monacolin production. The 3-percentage of inoculums was transferred to the cereal broth for growth and monacolin production. The cereal broth contained cassava chip, yam bean, sweet potato, potato and water-chesnut as carbon source, respectively. It was found that for 14-day of cultivation, the cassava chip broth (cassava starch as C-source) gave the maximum monacolin production and the amount of soluble sugar were 0.0057 mmol/ml and 28.13 g/l, respectively. In case of cassava chip broth with nitrogen source supplementation was studied. The maximum monacolin production was increased to 0.0092 mmol/ml while the soluble starch was low about 5.45 g/l. It was concluded that the supplementation of nitrogen source induced the monacolin production up to 61.40%. The level of soluble sugar concentration was reduced to 80 percent.

Keyword : *Monascus* sp. , monacolin , cassava chip

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ไม่สามารถสำเร็จลุล่วงได้ หากไม่ได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำจากบุคคลต่างๆ ดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาของคณะผู้จัดทำที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำและความช่วยเหลือด้วยความกรุณา ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ต่างๆแก่คณะผู้จัดทำ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี และ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ซึ่งตรวจสอบและชี้แนะในการแก้ไขปริญญานิพนธ์ให้มีความเรียบร้อยและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาชีววิทยาทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการเพื่อทำการทดลองต่างๆ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการยืมใช้เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สุดท้ายนี้ ผู้จัดทำต้องขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยสนับสนุน และคอยเป็นกำลังใจอยู่เคียงข้างพร้อมทั้งคอยให้คำสั่งสอนแนะนำผู้จัดทำอยู่เสมอ

นางสาวจิราพร จันพราม

นางสาวลักษมี แซ่เฮ้ง

นางสาวสาวิตรี เหมือนถม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		II
กิตติกรรมประกาศ		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		VII
สารบัญรูป		VIII
บทที่ 1 บทนำ		**1**
1.1	ความสำคัญและที่มาของโครงงาน	1
1.2	วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	3
1.3	ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ		**5**
2.1	ประวัติความเป็นมาของข้าวแดง	5
2.2	ลักษณะและรูปร่างของเชื้อราโมแนสคัส	6
2.3	สายพันธุ์ต่างๆของเชื้อราโมแนสคัส	8
2.4	คุณสมบัติและโครงสร้างของรงควัตถุจากเชื้อราโมแนสคัส	10
2.5	ประโยชน์ของสารที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส	14
2.5.1	โมนาโคลิน เค	15
2.5.2	ประวัติในการศึกษาสารโมนาโคลิน	16
2.5.3	การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา	17
2.5.4	กระบวนการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน	18
2.5.5	กลไกการทำงานของสารโมนาโคลิน	18
2.5.6	คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา	20
2.5.7	กลไกการออกฤทธิ์	21
2.5.8	ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน	23
2.5.9	ขนาดยาและการจัดเตรียมยา	23
2.5.10	ประโยชน์ในการรักษา	24
2.6	ซิตรินิน	24
2.6.1	คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ	25
2.6.2	การศึกษาเกี่ยวกับการเป็นพิษ	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	2.6.3 ความเสถียร	26
	2.6.4 ซิตรินินจากเชื้อราโมแนสคัส	26
2.7	ความสัมพันธ์ระหว่างเมตาบอลิซึมปฐมภูมิและเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ	29
2.8	ผลิตภัณฑ์อื่นที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส	29
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย		**31**
3.1	เชื้อจุลินทรีย์	31
3.2	อาหารเลี้ยงเชื้อ	31
	3.2.1 MYS medium	31
	3.2.2 SS medium	31
3.3	อาหารที่ใช้ทดสอบการผลิตสารโมนาโคลิน	31
	3.3.1 อาหารสูตรปกติ	31
	3.3.2 อาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน	31
3.4	อุปกรณ์	31
3.5	วิธีการทดลอง	32
3.6	การวิเคราะห์	33
	3.6.1 การหาน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบทางการเกษตร	33
	3.6.2 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ในอาหารโดยใช้ฟีนอลซัลฟูริก	33
	3.6.3 การวิเคราะห์สารโมนาโคลินโดย HPLC	34
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล		**35**
4.1	ศึกษาการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสในอาหาร SS medium	35
4.2	ศึกษาการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสในวัตถุดิบทางการเกษตร	37
	4.2.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสในอาหารสูตรปกติ	37
	4.2.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน	38
4.3	ศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารของวัตถุดิบทางการเกษตร	40
	4.3.1 ศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปกติ	40
	4.3.2 ศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
4.4	ศึกษาการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสที่เจริญในวัตถุดิบทางการเกษตร	42
4.4.1	ศึกษาการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสในอาหารสูตรปกติ	42
4.4.2	ศึกษาการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน	43
4.5	ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสและลักษณะวัตถุดิบทางการเกษตรที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน	45
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ		**48**
เอกสารอ้างอิง		**51**
ภาคผนวก ก		**55**
ภาคผนวก ข		**58**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สายพันธุ์ต่างๆของเชื้อราโมแนสคัส	8
2.2	สารเมตาบอไลท์ที่มีประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัส	14
2.3	ค่าทางเภสัชพลศาสตร์ของยาในกลุ่มสแตติน	22
4.1	ลักษณะวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารสูตรปกติและอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1.1	โครงสร้างทางเคมีของ sterane	2
1.2	โครงสร้างทางเคมีของ cholesterol	2
2.1	วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* spp.	7
2.2	โครงสร้างเคมีของรงควัตถุหรือ pigment ที่แยกได้จาก *Monascus* sp.	10
2.3	กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงที่ละลายน้ำได้ โดยเชื้อรา *Monascus rubber*	11
2.4	โครงสร้างของโมนาโคลิน เค หรือโลวาสแตติน	15
2.5	โครงสร้างของสาร Lovastatin (A) และ Compactin (B)	16
2.6	กระบวนการสังเคราะห์สารโลวาสแตติน	18
2.7	A:กระบวนการในการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอลเมื่อHMG – CoA ทำปฏิกิริยายับยั้งการเกิดคลอเลสเตอรอล B:ผลของยาที่เป็นตัวกลางในเซลล์ endothelial และเนื้อเยื่ออื่น ๆ	19
2.8	ยาที่ถูกทำให้อยู่ในรูปกรดเมื่อรวมกับ HMG - CoA reductase โลวาสเตติน จะถูกทำให้อยู่ในรูปแลกโตนและต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปกรดเพื่อใช้ในงานด้านคลินิก	20
2.9	โครงสร้างของโลวาสเตตินและ HMG – CoA	21
2.10	โครงสร้างของซิตรินิน	25
2.11	กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินโดยเชื้อรา *Monascus ruber*	27
2.12	กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินและรงควัตถุสีแดง โดยเชื้อรา *Monascus ruber*	28
4.1	การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว SS medium เป็นเวลา 7 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้ง (A) น้ำตาลที่ละลายน้ำ (B) พีเอช (C) และสารสี (D) ศึกษาการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสในวัตถุดิบทางการเกษตร	36
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นธัญพืชชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลา 7 วัน (□) และ 10 วัน (■) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ องศาเซลเซียส	38 30
4.3	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวธัญพืชเสริมแหล่งไนโตรเจน เป็นระยะเวลา 7 วัน (□) และ 10 วัน (■) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.4	ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ละลายน้ำในระหว่างเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวมันสำปะหลัง (◯), มันแกว (●) , มันเทศ (□) , มันฝรั่ง(■) , แห้วดิบสับ (△) , แห้วต้มสับ (▲) , แห้วต้มหั่น (◇) เป็นเวลา 14 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	41
4.5	ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ละลายน้ำในระหว่างเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว มันสำปะหลัง (◯), มันแกว (●) , มันเทศ (□) , มันฝรั่ง(■) , แห้วดิบสับ (△) ,แห้วต้มสับ (▲) , แห้วต้มหั่น (◇) เสริมแหล่งไนโตรเจน เป็นเวลา 14 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	42
4.6	การผลิตโมนาโคลินของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวธัญพืช เป็นเวลา 14 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	43
4.7	การผลิตสารโมนาโคลินของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวธัญพืช เสริมแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 14 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	44
ก.1	การเตรียมธัญพืชให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร	57
ก.2	การเตรียมธัญพืชโดยสับแบบหยาบ	57
ข.1	กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมดวัดโดยวิธีของ Dubois ด้วยฟีนอล-ซัลฟูริก	60
ข.2	กราฟมาตรฐานโมนาโคลินวัดโดยใช้เครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงาน

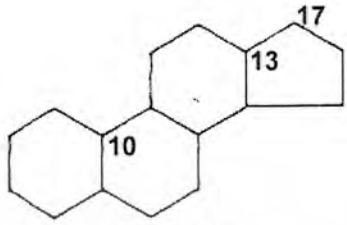
ในปัจจุบันโรคหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจตีบตันเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประเทศไทย และเนื่องจากมีภาวะระดับไขมันในเลือดผิดปกติ (Dyslipidemia) เป็นปัจจัยการเสี่ยงโรค (Risk factor) อย่างหนึ่งของการเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ การมีระดับไขมันสูงในเลือดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือด ทำให้มีความยืดหยุ่นน้อย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

ไขมันในโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงข้อหนึ่งของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ การเปลี่ยนแปลงอาหารและการออกกำลังกายสามารถลดระดับไขมันในเลือดได้ ถ้าหากระดับคลอเลสเตอรอล (Cholesterol) ในเลือดสูง ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดแดงมีลักษณะเป็นคราบ (Plaque) ทำให้หลอดเลือดแดงแคบลง ส่งผลให้หลอดเลือดแข็ง และตีบ (Atherosclerosis) โดยก่อให้เกิดอาการเจ็บหน้าอกเนื่องจากหัวใจขาดเลือดหรือ 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 แต่ถ้ามีคลอเลสเตอรอลและไขมันในเลือดต่ำจะเป็นการช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจ การไหลเวียนโลหิตในหลอดเลือด ปวดเค้นอก สมองขาดเลือด และหัวใจวายได้ จึงศึกษาการผลิตยาให้ได้มากที่สุด ในเวลาที่รวดเร็ว และลงทุนต่ำ การสกัดยากลุ่มนี้ได้จากเชื้อรา เช่น *Aspergillus terreu* ,*Penicillium citrinum* (Merck และ Co, 1976) และ *Monascus* sp. (Endo, 1992) เป็นต้น

คลอเลสเตอรอล เป็นสารในกลุ่มสเตียรอยด์มีโครงสร้างเป็น 4 ring ดังรูป 1.1 โดยมีส่วนที่เป็นนิวเคลียส คือ Perhydrocyclopentanophenanthrene

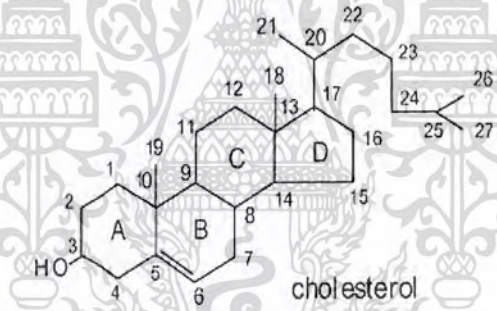
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Cyclopentanoperhydrophenanthrene) คลอเลสเตอรอลประกอบด้วยคาร์บอน 27 อะตอม และมีส่วนที่เป็นโพลาร์ คือ หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติเป็น secondary alcohol และมีพันธะคู่ระหว่างคาร์บอน 5 - 6 ด้วย ดังรูป 1.2



รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของ sterane

ที่มา : [Online] : http://www.cyberlipid.org/simple/simple0008.html



รูปที่ 1.2 โครงสร้างทางเคมีของ cholesterol

ที่มา : สมเกียรติ .(2550)

คลอเลสเตอรอลพบมากในเนื้อเยื่อของคนและสัตว์ ผู้ใหญ่จะมีประมาณ 150 กรัม เป็นสารเริ่มต้นของการสร้างกรดน้ำดี ฮอร์โมนของต่อมหมวกไตและโกแนด รวมทั้งวิตามินดีด้วย นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการรักษาโครงสร้างโดยเฉพาะอย่างยิ่งของเซลล์และภายในเซลล์ การมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 ทำให้สามารถสร้างเป็นเอสเทอร์และกรดไขมันได้ ในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่คลอเลสเตอรอลจะอยู่ในรูปอิสระ แต่ในพลาสมา 60 - 70% จะเป็นรูปเอสเทอร์โดยมีเอนไซม์ Lecithin : Cholesterol acyl transferase (LCAT) ช่วยนำกรดไขมันจากตำแหน่งที่ 2 ของเลซิทิน (Lecithin) ส่วนใหญ่ได้แก่ กรดลิโนเลอิค มาให้คลอเลสเตอรอลกลายเป็น cholesteryllinoleate และพบว่าคลอเลสเตอรอลที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดูดซึมผ่านลำไส้เล็กจะสร้างเป็นเอสเทอร์โดยรวมกับกรดโอเลอิคแล้วรวมอยู่ในไคโลไมครอน และไลโปโปรตีน ที่สร้างจากเซลล์ลำไส้ แล้วถูกนำต่อไปยังตับ

ไตรกลีเซอไรด์ มักได้จากข้าว แป้ง น้ำตาล ผลไม้ และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ สารเหล่านี้เปลี่ยนแปลงในตับและร่างกายหลายขั้นตอนคลอเลสเตอรอลที่ได้จากอาหารและตับสร้างขึ้นมาส่วนใหญ่จะรวมอยู่ในสารไขมันความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein) เรียกย่อๆว่า แอลดีแอล (LDL)

เชื้อราโมแนสคัส (*Monascus* spp.) จัดอยู่ในวงศ์ Monascaceae กลุ่ม (Class) Ascomycetes กลุ่มย่อย (Subclas) Plectomyetidae อันดับ (Order) Eurotiales (Alexopoulos และ Mims , 1979; Hawksworth และคณะ , 1995) เส้นใยมีผนังกั้น (septate) มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (sexual) และไม่มีเพศ (asexual) เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย และมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือสีม่วง เชื้อราโมแนสคัสเป็นเชื้อราที่สามารถผลิตสารยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลเช่น *M. ruber* ผลิตสารซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลโดยมีชื่อเรียกต่างกันไป ได้แก่ monacolin J monacolin K monacolin L monacolin M และ monacolin X เป็นต้น (Endo และ คณะ, 1985; Endo และคณะ, 1986; Komagata และคณะ, 1989) ในทางการค้าจะเรียกสารนี้ว่า โลวาสเตติน (Lovastain) มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3 – hydroxy – 3 –Methyl glutaryl Coenzyme A (HMG – CoA reductase) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสร้างคลอเลสเตอรอลในกระบวนการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล ดังนั้นคุณสมบัติการออกฤทธิ์จึงส่งผลโดยตรงต่อการลดปริมาณ คลอเลสเตอรอลในผู้ป่วยที่มีปริมาณคลอเลสเตอรอลชนิด LDL ในเลือดสูง

1.2วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสในระดับฟลาสก์

1.2.2 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมดระหว่างเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารของวัตถุดิบทางการเกษตร

1.2.3 เพื่อศึกษาวัตถุดิบทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสในระดับฟลาสก์

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 ศึกษาข้อมูลในการผลิตสารโมนาโคลินโดยเชื้อราโมแนสคัส

1.3.2 เพื่อศึกษาการผลิตสารโมนาโคลินโดยเชื้อราโมแนสคัสในวัตถุดิบทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.3 เพื่อศึกษาการใช้น้ำตาลจากแหล่งคาร์บอนของเชื้อราโมแนสคัสโดยศึกษาน้ำตาลทั้งหมด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 มีความรู้เกี่ยวกับการผลิตสารโมนาโคลิน โดยเชื้อรา *Monascus* sp.

1.4.2 มีความรู้ความเข้าใจในการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารของวัตถุดิบทางการเกษตร

1.4.3 ทราบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เชื้อราโมแนสคัสนำไปใช้ในการผลิตสารโมนาโคลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ประวัติความเป็นมาของข้าวแดง

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์สารสีที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนข้าวนึ่ง ที่รู้จักกันมาช้านานในประเทศแถบตะวันออก เช่น ประเทศจีน ประเทศแถบเอเชียใต้ เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น (Johns and Stuart , 1991) โดยกำเนิดของข้าวแดงมาจากประเทศจีนเชื่อว่าในตำบลหนึ่งมีดินเป็นสีแดงและเมื่อใช้ดินนี้พอกข้าวนึ่งไว้ในระยะเวลาหนึ่งจะทำให้ข้าวนึ่งเป็นสีแดง

ในสมัยราชวงศ์ถัง (800 AD) ได้ใช้ข้าวแดงมาเป็นสารเติมแต่งสีและรสชาติในปลาและเนื้อ (Stuart , 1979) สมัยราชวงศ์หมิงค์ (1368-1644) ได้มีการนำข้าวแดงมาใช้เพื่อปรุงยาจีนโบราณซึ่งได้มีการบันทึกไว้ในตำรายาชื่อ Ben Cao Gang Mu-Dan Shi Bu Yi ข้าวแดงจะออกฤทธิ์ช่วยทำให้ระบบหมุนเวียนโลหิตในร่างกายดีขึ้น (Wu *at al.*,1966)

ในประเทศแถบตะวันออก มีการใช้เชื้อรา *Monascus* spp. ในอาหารและเครื่องยาพื้นบ้านมานาน มีการให้ชื่อสกุลโมแนสคัส (*Monascus*) มานานกว่าร้อยปี ในยุโรปและอินโดนีเซีย แต่สำหรับชาวตะวันตก สปีชีส์ต่างๆ ของเชื้อราโมแนสคัสเป็นที่รู้จักในฐานะเชื้อราปะปนในธัญพืช แป้ง ไซเลจ และสารอื่นๆ เชื้อรานี้สามารถเจริญบนข้าวนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม โดยย่อยข้าวจนนุ่ม และขณะเดียวกันก็สร้างสีแดงเข้มขึ้น ข้าวแดงมีชื่อเรียกต่างๆกัน เช่นข้าวแดง (red rice) ข้าวแดงจากจีน (Chinese red rice) อังคัก (ang - kak) , แอนแคก (ankak) อังคเวค (angquac) เบนนิ-โคจิ (beni - koji)และอกา-โคจิ (aka - koji) (Hesseltine , 1965)

ในปี 1920 Church (อ้างอิงโดยบุษบา ยงสมิทธ์ , 2542) รายงานว่าการผลิตข้าวแดงมีกันมานานแล้วในสาธารณรัฐประชาชนจีนและได้ทดลองแยกเชื้อที่ได้จากประเทศจีน จนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่ให้สีแดง คือ *Monascus purpurescens* มีชื่อเดิม *Monascus purpureus* (Alexopolous *et al.*,1996) ต่อมา Palo *et al.*,(1906) นักวิทยาศาสตร์ชาวฟิลิปปินส์ได้ทดลองใช้เชื้อข้าวแดงนี้ทำข้าวแดง จนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอควร สามารถนำข้าวแดงมาใช้เจือสีอาหารได้โดยตรง (Su and Wong , 1983) ภายหลังได้มีการสนใจที่จะศึกษาสายพันธุ์เชื้อราที่เหมาะสมสำหรับใช้ในสภาพการหมักเหลว (submerged culture) ซึ่งเริ่มโดย Lin (1973) ต่อมาก็มีผู้ประสบความสำเร็จในการศึกษาการผลิตสีในอาหารเหลว (Shephered and Carels , 1983; Yoshimura *et al.*, 1975; บุษบา และ วรรณภา,2527)

ประเทศจีนได้มีการศึกษาการบริโภคข้าวแดงในคนและสัตว์ พบว่าการบริโภคข้าวแดงในปริมาณ 14 - 55 กรัมต่อคนต่อวัน สามารถลดความเข้มข้นของคลอเลสเตอรอลได้ร้อยละ 11 - 32 และลดความเข้มของ Triacylglycerol ได้ร้อยละ 12-19 (Heber et al.,1999) ในปี 1979 Endo ได้แยกสารโมนาโคลิน เค (Monacolin K) ที่ผลิตได้จาก *Monascus* spp. สารดังกล่าว มีจุดหลอมเหลวที่ 157-159 องศาเซลเซียส มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{36}O_5$ (MW 404) มีค่า LD_{50} ในหนู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อฤทธิ์ของสารโมนาโคลิน เค จะเป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ HMG CoA reductase (3-Hydroxy -3-Methy glutaryl Coenzyme A) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในตับ และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอลในร่างกาย

2.2 ลักษณะรูปร่างของเชื้อรา *Monascus* spp.

Monascus spp. เป็นเชื้อราที่ Alrxopoulos และ Mims (1979) จัดอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

Division Asmastigomycota

Subdivision Ascomycetes

Class Ascomycetes

Subclass Plectomycetidae

Order Eurtials

Family Monascacceae

Genus *Monascus*

Eurotiales เส้นใยมีผนังกั้น มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย และมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาวแต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือม่วง

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้างโคนิเดีย (Conidia) ที่พัฒนามาจากโคนิดิโอฟอร์ (Conidiophore) จะสร้างโคนิเดียรูปร่างกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือหลายโคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่อยู่ที่ปลายเส้นใย โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจจะมีสีแดงหรือสีน้ำตาลอ่อน (Ainswarth และคณะ , 1973 ; Hawksworth และ Pitt , 1983) โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้น (Septate) หรือไม่มีผนังกั้น(Non Septate) ก็ได้ ถ้ามีขนาดยาวจะมีผนังกั้น 2 – 6 อัน เป็นสายตรงหรือขดเป็นเกลียวและเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออายุมากขึ้น 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 การงอกของโคนิเดียกระตุ้นด้วยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราโมแนสคัสคล้าย ๆ กับเชื้อราอื่นใน Class Ascomycetes มีการสร้างเพอริทีเชียม (Perithecium) หรือคลิสโททีเชียม (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 โดยพบ 2 – 8 แอสโคสปอร์ จะบรรจุรวมอยู่ภายในแอสคัส (Ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์งอกออกมาจากนั้นจึงเริ่มต้นการเจริญใหม่ต่อไปดังวัฏจักรของเชื้อราชนิดนี้แสดงดัง รูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* spp.

ที่มา : บุษบา ยงสมิทธิ์ (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สายพันธุ์ต่างๆของเชื้อราโมแนสคัส (บุษบา , 2542)

ปี ค.ศ. 1884 Van Tieghem ได้แยกและให้ชื่อเชื้อราโมแนสคัสและแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ *M. mucoroides* และ *M. rubber* ต่อมาปี ค.ศ. 1895 Went ได้แยกชนิดสำคัญคือ *M. purpureus* จากข้าวแดง หรือ อังคัก ในปี ค.ศ.1930 ได้มีการแยกเชื้อและจัดจำแนกสปีชีส์อย่างชัดเจนรวมเป็น 5 สปีชีส์ดังนี้ *M. purpureus* , *M. barkeri* Dangeard , *M. olei* Piedallu , *M. mucoroides* และ *M. rubber* van Tieghem ปัจจุบันมีการรวบรวมเชื้อรานี้กว่า 20 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.1 จัดแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส ตามสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ต่างๆของเชื้อราโมแนสคัส

M. albidus	*M. albus*	*M. anka*	*M. araneosus*
M. barkeri	*M. bisporus*	*M. floridanus*	*M. fuliginsus*
M. kaoliang	*M. major*	*M. mucoroides*	*M. olei*
M. paxii	*M. pallens*	*M. pilosus*	*M. pubigerus*
M. purpureus	*M. purpurescens*	*M. rubber*	*M. rubiginosus*
M. sanguineus	*M. rubropunctatus*	*M. serorubercens*	*M. vini*

ที่มา : Iizuka and Lin (1981) ; Hawksworth and Pitt (1983) ; Nishikawa *et al.* (1998)

เชื้อราโมแนสคัสทั้ง 4 ชนิด คือ *M. pilosus* , *M. purpureus* , *M. ruber* และ *M. floridanus* นอกจากจะแตกต่างกันด้านลักษณะทางสรีระวิทยาแล้ว ทางด้านวิทยาเอนไซม์ยังต่างกันอีกด้วย โดยเชื้อราในกลุ่ม *M. pilosus* พบกิจกรรมเอนไซม์ β-galactosidase และ α - glucosidase *M. purpureus* พบกิจกรรมเอนไซม์โพลีเปคเตส (polypectase) และพบเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสใน *M. rubber* (Bridge และ Hawksworth , 1985) ส่วน *M. floridanus* เป็นชนิดเดียวที่พบกิจกรรมเอนไซม์ trypsinase แต่ไม่พบเอนไซม์ valine arylamidase เหมือนชนิดอื่น (Bridge and Hawksworth, 1985 ; Barnard and Cannon, 1987) ส่วน Nishikawa (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้พบว่าเชื้อราโมแนสคัสชนิดต่างๆส่วนใหญ่จะมีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสมากกว่าแอซิด-โปรตีเอสและมีน้อยชนิดที่มีเอนไซม์โปรตีเอสทั้ง 2 แบบต่อมา NishikawaandLizuka (1993) ได้เสนอความสัมพันธ์ของเชื้อราโมแนสคัสชนิดต่างๆโดยใช้หลักการวิเคราะห์โดยวิธี acrylamidegel-electrophoresis สามารถแบ่งเชื้อรานี้เป็น 2 กลุ่มใหญ่และชนิดที่เกี่ยวข้องโดยอาศัยความเหมือนกันของวิทยาเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์เอสเทอเรส แลคเตตดีไฮโดรจีเนส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ในประเทศอิรักมีรายงานพบชนิดใหม่ของเชื้อราโมแนสคัส คือ *M. pallens* และ *M. sanguencus* (Cannon *et al.*,1995) เทคนิคทางพันธุกรรมได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อราข้าวแดง เริ่มโดยคณะวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ชุลี , 2536 ; กมลนันท์และคณะ, 2540 ; เสาวนิตย์และคณะ, 2540)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1993 Nishikawa และ Lizuka ได้เสนอความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ต่างๆของเชื้อราโมแนสคัส โดยใช้หลักการวิเคราะห์ acrylamide gel electrophoresis สามารถแบ่งเชื้อรานี้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่ 1 ได้แก่ *M. anka* , *M. rubiginosus* , *M. kaoliang* , *M. anka var. rubellus, M. purpureus, M. albidus var. glaber, M. major* , *M. rubber* , *M. albidu* และ *M. araneosus* และ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *M. pubigerus* , *M. fuliginoosus* , *M. vitreus* , *M. serobescen* และ *M. pilosus* และ ชนิดที่เกี่ยวข้องโดยอาศัยความเหมือนกันของวิทยาเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์เอสเทอเรส แลคเตตดีไฮโดรจีเนส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และกลูโคส-6-ฟอสเฟตไฮโดรจีเนส

ในปี 1920 Church รายงานถึงการทดลองแยกสายพันธุ์ที่ได้จากข้าวแดงของประเทศจีน จนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่สร้างสีแดงคือ *M. purpureus* ต่อมา Palo และคณะ (1906) ได้ทดลองใช้เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ผลิตข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอสมควร และสามารถนำข้าวแดงมาใช้เป็นสีผสมอาหารโดยตรง ภายหลังจึงมุ่งความสนใจไปที่การผลิตสารต่างๆโดยการเจริญบนอาหารเหลว (Submerged cultivation) (Lin , 1973) ทำให้มีรายงานการผลิตสีในอาหารเหลวต่างๆ มากมาย (Shephed และ Carel , 1983 ; Yoshimaru และคณะ , 1975 ; Shin และคณะ,1998 ; บุษบาและวรรณภา , 2527 ; Lee และคณะ , 1992)

เชื้อราโมแนสคัสนอกจากจะสร้างสารสีแล้ว ยังสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด สาร monascidin A จากเชื้อรา *M. purpureus* (Wong และ Bau , 1977) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร ได้แก่ *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ เอทธานอล สารโมนาโคลิน ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และสารช่วยในการตกตะกอน (Flocculant) อีกด้วย (Fink - Gremmels และ Leistner , 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 คุณสมบัติและโครงสร้างของรงควัตถุจากเชื้อราโมแนสคัส (อรัญและคณะ , 2530)

การสร้างรงควัตถุโดยเชื้อรา *M. purpureus* พบว่าการสร้างสารสีเกิดภายในเส้นใย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเช่น Potato Dextrose Agar (PDA) หรือ Sabouraud Agar (SA) จะสังเกตเห็นหลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 40-48 ชั่วโมง และถูกขับออกมาจากภายนอกในรูปรงควัตถุที่เป็นของเหลวทางรูเปิดทางปลายเส้นใย ทำให้เห็นเป็นโคโลนีสีแดง

เชื้อราโมแนสคัสสามารถสร้างรงควัตถุ ประกอบด้วยสีส้ม 2 ชนิดคือ โมนาสโครูบริน (monascorubrin) และรูโบรพังตาติน (rubropunctatin) สีเหลือง 2 ชนิด คือ โมนาสซิน (monascin) และรูโบรพังตามีน (rubropunctamine) โครงสร้างหลักของรงควัตถุเหล่านี้ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยเชื่อว่า โมนาสโครูบรามีนและรูโบรพังตามีน เป็นสารอนุพันธุ์ของโมนาสโครูบรินและรูโบรพังตาตินตามลำดับ ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีเอมีน (amine) สีส้มที่ผลิตโดยเชื้อราโมแนสคัสละลายน้ำได้ยาก แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีกรดอะมิโน ผ่านทางring- opening และ Schiff rearrangement จะได้เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีขึ้น นอกจากสามารถละลายน้ำ ยังละลายในน้ำมัน ทนต่อการทำละลายด้วยความร้อนและความคงตัวในค่าพีเอช 2 - 10

Yellow	**R**		**สูตรเคมี**	**MW**
1.Monascin	n-C_5H_{11}		$C_{21}H_{26}O_5$	358
2.Ankaflavin	n-C_7H_{15}		$C_{23}H_{30}O_5$	386
Orange	**R**			
3.Rubropunctatin	n-C_5H_{11}		$C_{21}H_{22}O_5$	354
4.Monascorubrin	n-C_7H_{15}		$C_{23}H_{26}O_5$	382
Red	**R**			
5.Rubropunctamine	n-C_5H_{11}		$C_{21}H_{23}O_4$	353
6.Monascorubramine	n-C_7H_{15}		$C_{23}H_{27}O_4$	381

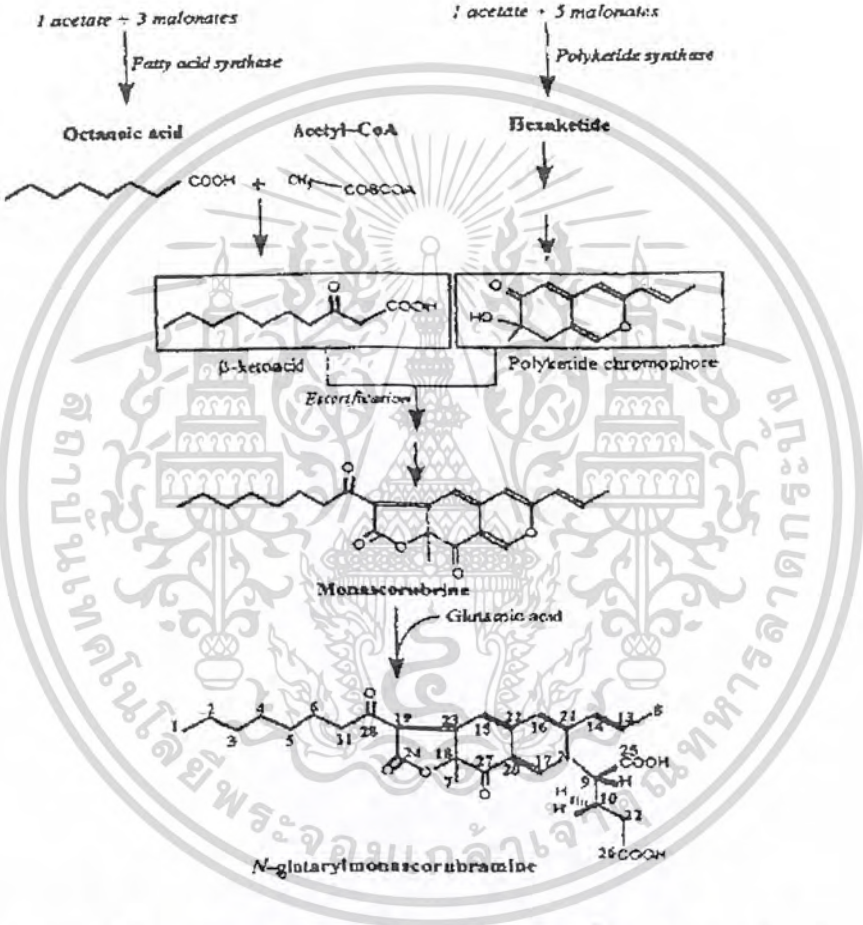
รูปที่ 2.2 โครงสร้างเคมีของรงควัตถุหรือ pigment ที่แยกได้จาก *Monascus* sp.

ที่มา : บุษบา ยงสมิทธ์ (2542)

กลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพของรงควัตถุสีต่างๆ จากเชื้อราโมแนสคัส เกิดจากการรวมตัวของอะซิเตต (acetate) 1 โมล กับมาโลเนต (malonate) 5 โมล เป็นสารประกอบ hexaketide chromophore ผ่านวิถีโพลีคีไทด์ เมื่อกรดไขมันสายขนาดกลาง (medium-chain fatty acid,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C_6 - C_{18}) ที่สังเคราะห์กรดไขมัน เช่น กรดออกตาโนอิก (octonoic acid) ทำปฏิกิริยาทรานส์ – เอสเทอร์ริฟิเคชัน (trans-esterification) กับโครโมฟอร์ (chromophore) ได้เป็นรงควัตถุสีส้มโมนาสโครูบริน (หรือ รูโบรพังตาติน เกิดจากปฏิกิริยากับกรดเฮกซาโนอิก) เมื่อสีส้มถูกรีดิวซ์ จะได้ สีเหลือง ในขณะที่สีแดงเกิดปฏิกิริยา amination ของสีส้มกับ NH_3 รงควัตถุยังคงอยู่ภายในเซลล์เชื้อราเพราะมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (hydrophobicity) และถูกขับออกมานอกเซลล์เมื่อเกิดปฏิกิริยากับหมู่ NH_2 ของกรดอะมิโนทำให้ละลายน้ำได้ เช่น โมนาสโครูบรินทำปฏิกิริยากับกรดกลูตามิก เกิดเป็นสารประกอบ *N* - glutarylmonascorubramine แสดงดังรูปที่ 2.3 (Hajjaj และคณะ, 2000)



รูปที่ 2.3 กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงที่ละลายน้ำได้ โดยเชื้อรา *Monascus rubber*

ที่มา : Hajjaj และคณะ (2000)

อรัญและคณะ (2530) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีต่อการผลิตข้าวแดง โดยใช้เชื้อรา *M. purpureus* CMU – KU เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสีได้ดีที่สุด โดยใช้ข้าวต่อน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 หรือ 3 : 4 จะช่วยให้เชื้อราสร้างสารสีได้ดีที่สุด ข้าวพันธุ์เหลือง 148 เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงมากที่สุด การสีข้าวก็มีผลต่อการผลิตข้าวแดง โดยข้าวที่สีแล้วขัด 3 นาที จะให้สีดีที่สุด ปริมาณธาตุอาหารต่างๆที่มีในข้าวมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียงพอต่อการเจริญและการสร้างสารสีโดยเชื้อรา *M. purpureus* ควรใช้อุณหภูมิระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส ควรใช้ข้าวโดยไม่ปรับค่าพีเอช และควรมีความชื้นของบรรยากาศสูงกว่าร้อยละ 74

บุษบาและคณะ (1994) ศึกษาการผลิตรงควัตถุสีเหลืองในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *Monascus* sp. ที่กลายพันธุ์ โดยวัดปริมาณสีเหลืองด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตรแทน 420 และ 500 นาโนเมตร ซึ่งใช้สำหรับการวัดปริมาณสีแดงที่ได้จากสายพันธุ์พ่อแม่ ส่วนสภาวะในการผลิตสีเหลืองสูงสุดเป็นสภาวะเดียวกับสายพันธุ์พ่อแม่ ผลคือปริมาณสีเหลือง และเอนไซม์อะมิไลติก (amilytic enzyme) เพิ่มขึ้นถึง 10 เท่า

Jo Dussa และคณะ (1998) ศึกษาการสร้างรงควัตถุจากเชื้อรา *M. purpureus* DSM 1379 จากการวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) โดยหาความสัมพันธ์ของรงควัตถุที่เชื้อผลิตได้ คือ โมนาสโครูบรามิน (monascorubramin) และรูโบรพังตาติน (rubropunctatin) กับปริมาณกรดอะมิโนอิสระในข้าว วัดปริมาณสีแดงที่ค่าการดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตร เทียบกับระยะเวลาการหมัก 11 วันใน 5 วันวันแรกสีแดงเกิดน้อย และค่อยๆเพิ่มจนสูงสุดในวันที่ 9 ของการทดลอง จากนั้นค่อยๆลดลง การวัดปริมาณกรดอะมิโน 6 ชนิดเทียบกับเวลา ได้แก่ วาลีน (valine) เมไทโอนีน (methionine) ไอโซลูซีน (isoleusine) ไกลซีน (glycine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) และอะลานีน (alanine) พบว่าปริมาณกรดอะมิโนเริ่มเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 และมีแนวโน้มลดลงแบบเอกโพเนนเชียลจนต่ำสุดในวันที่ 9 และค่อยๆสูงขึ้นจนถึงวันที่ 11 สรุปได้ว่ากรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับสร้างรงควัตถุสีแดง ในกระบวนการเมตาบอลิซึมครั้งที่สองของเชื้อ *M. purpureus* ปฏิกิริยา shift base formation เพราะปริมาณรงควัตถุสีแดงเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระในข้าวลดลง

Teng และ Feldheim (2001) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของข้าวระหว่างกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *Monascus purpureus* เพื่อผลิตอังคักและรงควัตถุ การวัดการเจริญของเชื้อราไม่สามารถทำได้โดยตรง จึงต้องใช้วิธีอ้อมโดยวัดปริมาณแป้งที่เหลือปริมาณโปรตีนทั้งหมดและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช จากการทดลองพบว่า ช่วง 5 วันแรกปริมาณแป้งโปรตีนทั้งหมดและค่าพีเอชลดลง เพราะมีการเมตาบอไลท์และเชื้อเจริญอย่างรวดเร็ว ช่วงนี้ปริมาณสีมีน้อยมากจากนั้นระหว่างวันที่ 5- 15 ของการหมัก ปริมาณแป้งยังคงลดลงเรื่อยๆ ค่าพีเอชลดลงต่ำสุดเพราะแป้งเป็นองค์ประกอบหลักในข้าวและค่าพีเอชลดลงยืนยันในกระบวนการเมตาบอไลท์ของเชื้อรา ส่วนปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มาจากโปรตีนที่มีอยู่ในข้าวและโปรตีนที่มาจากเซลล์เชื้อรา) เพิ่มขึ้นเพราะโปรตีนในข้าวลดลงและจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น ช่วงนี้มีการผลิตรงควัตถุเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักมากกว่า 15 วัน ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อเริ่มหมด เชื้อหยุดการเจริญและหยุดการสร้างสี ปริมาณรงควัตถุสีเหลืองคงที่ ในขณะที่ปริมาณรงควัตถุสีส้มลดลงในอัตรา 3.6 มิลลิลิตรต่อกรัมต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hee Young Jung และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของการผลิตรงควัตถุ โดยเชื้อโมแนสคัสในอาหารเหลวที่เติมกรดอะมิโน 20 ชนิด เปรียบเทียบกับ $NH_4 NO_3$ วัดค่าสี L a b chroma และ hue พบว่าการเติมกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดอนุพันธ์ของรงควัตถุสีแดงทำให้สีแดงจากโมแนสคัสมีเฉดสีแตกต่างกัน สีแดงที่ได้จะมีเฉดสีส้มไปจนถึงสีม่วงแดง ซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของกรดอะมิโน ส่วนค่าสีเหลืองและสีส้มไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเติมกรดอะมิโนแตกต่างกัน

เรณูและคณะ (2543) ได้ทดลองเติมอังคักเพื่อเพิ่มสีในไส้กรอกหมูพบว่าปริมาณอังคักที่เหมาะสมในสูตรไส้กรอกเท่ากับร้อยละ 15 และการเติมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองอาจช่วยเพิ่มคุณลักษณะด้านความเป็นเนื้อเดียวกันและความฉ่ำน้ำในไส้กรอกให้สูงขึ้น

พัชรีย์ (2545) ได้ศึกษาการผลิตอังคักจากข้าวสายพันธุ์ต่างกัน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวช้อมมือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท ข้าวหอมมะลิแม่จัน และข้าวหอมมะลิสุรินทร์ พบว่าพันธุ์ข้าวมีผลต่อค่าสี b (yellowness) และค่า h (hue) value ที่ต่ำสุดจะให้ค่าสีแดงสูงที่สุด จากการทดลองข้าวพันธุ์ชัยนาทจะให้ค่า h value เป็นเกณฑ์ ค่า h value ที่ต่ำสุดจะให้ค่าสีแดงสูงที่สุด จากการทดลองข้าวพันธุ์ชัยนาทจะให้ค่า h value ต่ำสุดหรือให้สีแดงสูงสุด

เชื้อราโมแนสคัสหลายสายพันธุ์สามารถผลิตสีได้ แต่สายพันธุ์ที่สำคัญคือ *M. purpureus* จึงมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในประเทศไต้หวัน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และฝรั่งเศส เพื่อแยกสีให้ได้ปริมาณมากและมีคุณภาพ ประเทศญี่ปุ่นเป็นเพียงประเทศเดียวที่ได้อนุญาตให้ใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* ได้ถูกต้องตามกฎหมาย แต่ยังมีหลายประเทศในแถบเอเชียใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* เป็นสีผสมอาหาร ถึงแม้ว่ายังไม่มีการอนุญาตให้ใช้ได้ตามกฎหมายก็ตาม M. Sabater-Vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาการใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* เพื่อเพิ่มสีให้กับผลิตภัณฑ์เนื้อแทนการใช้วัตถุเจือปนที่มีใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ E-249 (เกลือไนไตรท์) E-252 (โพแตสเซียมไนเตรต) และ E-120 (โคชินีล) นอกจากนั้นยังได้มีการใช้สีจากเชื้อราโมแนสคัสเพื่อเพิ่มสีให้กับเครื่องมือและลูกกวาด

Andrea B. และคณะ (2001) ศึกษาการใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* ทดแทนการใช้เกลือไนไตรท์กับผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก โดยทดลองเติมสีจากเชื้อรา *M. purpureus* 0.5 กรัมต่อกิโลกรัม และ 0.75 กรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (เกลือไนไตรท์ 20 กรัมต่อกิโลกรัม) ผลการทดลองพบว่า การเติมเกลือไนไตรท์ 10 กรัมต่อกิโลกรัม ผสมกับสีจากโมแนสคัส 0.5 กรัม ต่อกิโลกรัมในแฮมไก่ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจทั้งในด้านสี รสชาติ และลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์

Frbre C.E. และคณะ (2002) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตรงควัตถุสีแดงจากเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลวและนำไปเป็นวัตถุเจือปนในอาหาร โดยใช้แอลกอฮอล์ 20กรัมต่อกิโลกรัมและ กลูตาเมท 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายหลังจากการสกัดและทำให้บริสุทธิ์จึงนำสีไปละลายน้ำ ยังได้ศึกษาถึงความคงตัวของสีในสารละลายและใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อ (ไส้กรอกและ pats) โดยจะเก็บที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่ามีความเสถียรร้อยละ 92-98 และยังมีการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส เพื่อจะใช้สีจากโมแนสคัสทดแทนสีที่เกิดจากการใช้เกลือไนไตรท์หรือโคชินีล

2.5 ประโยชน์ของสารที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส

การศึกษาต่อๆมาได้พบสารเมตาบอไลท์หลายชนิดที่น่าสนใจ และมีค่าทางเศรษฐกิจจากเชื้อราโมแนสคัสดังรวบรวมในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สารเมตาบอไลท์ที่มีประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัส

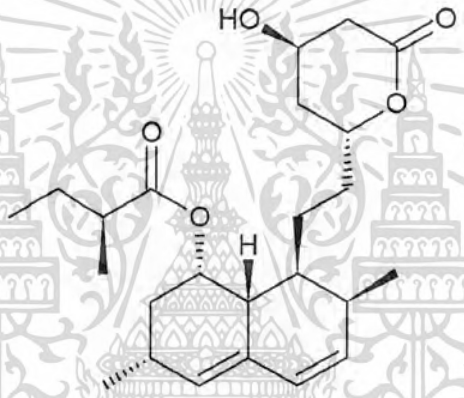
เอนไซม์	เมตาบอไลท์ปฐมภูมิ (Primary metabolites)	เมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites)
1. กลูโคอะมิเลส	1. แอทิลแอลกอฮอล์	1. สารสีแดง, เหลือง, ส้ม
2. โปรตีเอส	2. กรดอินทรีย์	2. สารปฏิชีวนะ
3. แอลฟา กาแลคโต ซิเดส	3.วิตามินบี 2	3.สารลดคลอเลสเตอรอล หรือ Monacolin
		4. สารตกตะกอน
4. แอลฟา - อะมิเลส	4. ไขมัน	5. ยาลดความดันโลหิต
5. ไรโบนิวคลีเอส	5. กรดไขมัน	6. ยาพื้นบ้านของจีนโรคอาหารไม่ย่อย, โรคบิด,กล้ามเนื้อฟกช้ำ
		7. คูราริน (coumarin) รักษาโรคด่างขาว
		8. สารถนอมอาหารประเภทเนื้อ
		9. โคเอนไซม์ Q_{10}
		10. สารให้กลิ่นหอม (methyl ketones)
		11. สารยับยั้งการกลายพันธุ์

ที่มา : ดัดแปลงมาจากบุษบา ยงสมิทธ์ (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 โมนาโคลิน เค (Monacolin K)

โมนาโคลิน เค (สารยับยั้งโคเลสเตอรอล) เป็นสารกลุ่มสแตตินได้จากเชื้อราที่มีฟิลาเมนต์ (filament) เกิดโดยกระบวนการเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ ได้สารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนผ่านวิถีโพลีคีไทด์ (polyketide pathway) เชื้อรา *M. rubber, P. brevicompactum* และ *A. terreus* สามารถผลิตโลวาสแตติน (Lovastatin) (รูปที่ 2.4) โมนาโคลิน เจ (Monacolin J) โมนาโคลิน แอล (Monacolin L) และเมวาสแตติน (Mevastatin) พบว่า สารกลุ่มนี้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์ เอ (HMG – CoA reductase) : mevalonate : NADP + oxidoreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์กระตุ้นการเปลี่ยน HMG - CoA ให้เป็นเมวาโลเนต (mevalonate) เพื่อใช้ในกระบวนการสร้างโคเลสเตอรอล (Hajjaj และคณะ,2001)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของโมนาโคลิน เค หรือโลวาสแตติน

ที่มา M.A.Dhale และคณะ, 2007

โมนาโคลินหรือที่รู้จักทั่วไปในทางการค้าว่า โลวาสแตติน มีระบบการเรียกชื่อ (IUPAC) ว่า [8-[2-(4-hydroxy-6-oxo-oxan-2-yl)ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8ahexahydronaphthalen-1-yl]2-methylbutanoate ($C_{24}H_{36}O_5$) มวลโมเลกุล 404.54 กรัมต่อโมล นำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางยา ดังนี้ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) น้อยกว่า 5% การจับโปรตีนใน กระแสเลือด (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

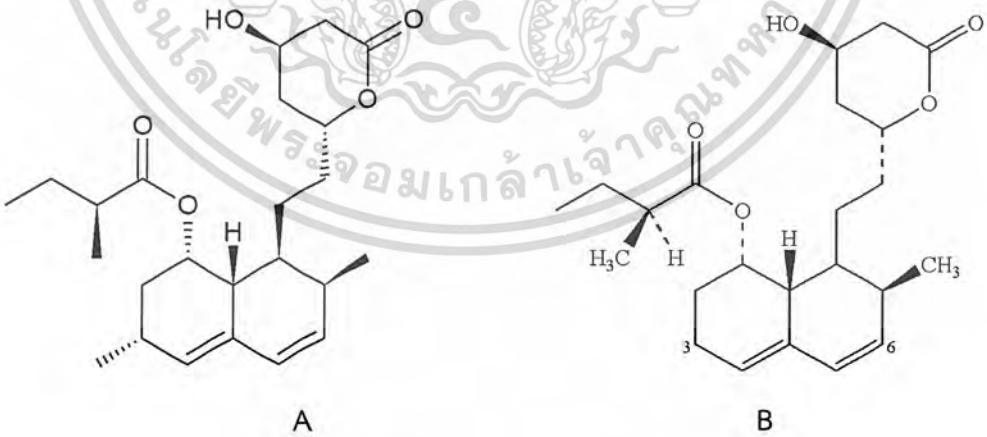
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 ประวัติในการศึกษาสารโมนาโคลิน

โมนาโคลิน (รูปที่ 2.5) สกัดแยกได้จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* และจัดเป็นสแตตินตัวแรกที่ได้รับอนุญาตโดยองค์การอาหารและยา ของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration หรือ FDA) และเป็นผลผลิตทางธรรมชาติ ที่ได้ปริมาณสูงจากเชื้อรา เช่น *Pleurotus ostreatus* และ*Pleurotus* spp. (Bobek และคณะ, 1998)

ในปี 1970ค้นพบว่า สารคอมแพคติน (Compactin) (รูปที่ 2.5) และโมนาโคลิน (Lovastatin) เป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง 3-hydroxy-3-methyl glutaryl Coenzyme A reductase (HMG - CoA reductase) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล และใช้คุณสมบัตินี้มาพัฒนาศักยภาพของยาสำหรับลดคลอเลสเตอรอลชนิด LDL (Vederas และคณะ, 1985)

ในปี 1976 Endo ได้พบสารคอมแพคตินหรือในทางการค้าเรียกว่า เมวาสแตติน (Mevastatin) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *P. Citrinum* ได้ทำการวิจัยพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์เป้าหมาย และลดการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล จึงเป็นผู้เริ่มทำให้มีการค้นคว้า และศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้ง HMG CoA reductase ในธรรมชาติจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และค้นพบเมแทบอลิซึมของสารโมนาโคลินที่แยกได้จากเชื้อราในเวลาต่อมาโครงสร้างสารโมนาโคลินเสถียรและคงตัวแตกต่างกับ สารคอมแพคตินที่ปรากฏในลักษณะ 6 alphamethyl group ในรูปของ hexahydronaphthalene ring



A B

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของสาร Lovastatin (A) และ Compactin (B)
ที่มา : M.A.Dhale และคณะ, 2007 : Belo และคณะ, 1993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อย่างไรก็ตาม ในปี 1980 พบว่าสารคอมแพคติน มีความเป็นพิษในสัตว์เพราะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันระหว่างคอมแพคติน และโมนาโคลินยากต่อการตรวจสอบ การศึกษาทางแพทย์เกี่ยวกับสารโมนาโคลิน ได้ถูกระงับชั่วคราวจึงเปลี่ยนไปศึกษาเรื่องผลกระทบของสารที่มีต่อสัตว์ทดลอง

ในปี 1982 มีการศึกษาระดับห้องปฏิบัติการเพื่อสำรวจคุณสมบัติเกี่ยวกับสารโมนาโคลิน ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา*A. terreus* พบว่าในคนไข้ภาวะเสี่ยง สารโมนาโคลินนี้สามารถลดคลอเลสเตอรอลชนิด LDL ได้ และเมื่อสนับสนุนการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อสัตว์ทดลอง ปรากฏว่าไม่มีฤทธิ์เป็นพิษ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการศึกษาสารคอมแพคติน ดังนั้น จึงได้ดำเนินงานวิจัยทางการแพทย์ต่อไป

สารนี้ได้รับรองประสิทธิภาพโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ในปี 1987 พบว่าปริมาณของสารโมนาโคลินที่อยู่ในแต่ละผลิตภัณฑ์ปริมาณ 80 มิลลิกรัม สามารถลดLDL ได้ถึง 40 % ซึ่งมีระดับการออกฤทธิ์ดีกว่ายาลดคลอเลสเตอรอลชนิดอื่นๆ คุณสมบัติทางยามีผลกระทบน้อยมาก ง่ายต่อการรักษาคนไข้จึงเป็นที่ยอมรับอย่างรวดเร็ว แต่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ทรานอะมิเนส (Transaminase) ในตับ และมีผลต่อกล้ามเนื้อด้วย

ในปี 1998 องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา สั่งห้ามขายอาหารเสริมที่มีส่วนผสมของข้าวแดงจากการหมักโดยใช้ยีสต์เป็นหัวเชื้อ ภายหลังพบว่ามีส่วนประกอบของโมนาโคลินในอาหารเสริม จึงมีข้อโต้แย้งว่าอาหารเสริม มีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติทางยา

2.5.3 การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าปัจจัยเสี่ยงหลักของโรคหลอดเลือดหัวใจ คือ การมีระดับไขมันสูงในเลือดทำให้ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดจึงมีความยืดหยุ่นน้อยและหนาขึ้นจนเกิดสภาพของหลอดเลือดแข็งและตีบ ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดหลอดเลือดแข็ง เกี่ยวข้องกับตัวพาไขมันไปตามเส้นเลือดซึ่งเรียกว่า ไลโพโปรตีน (Lipoprotein) มี 2 ชนิดคือ

- Low-density lipoproteins (LDL) ซึ่งจะพาคลอเลสเตอรอล จากตับไปสู่ร่างกาย LDL เป็นไขมันที่ก่อให้เกิดพิษหากมีมากจะทำให้เกิดหลอดเลือดแดงตีบได้ง่าย

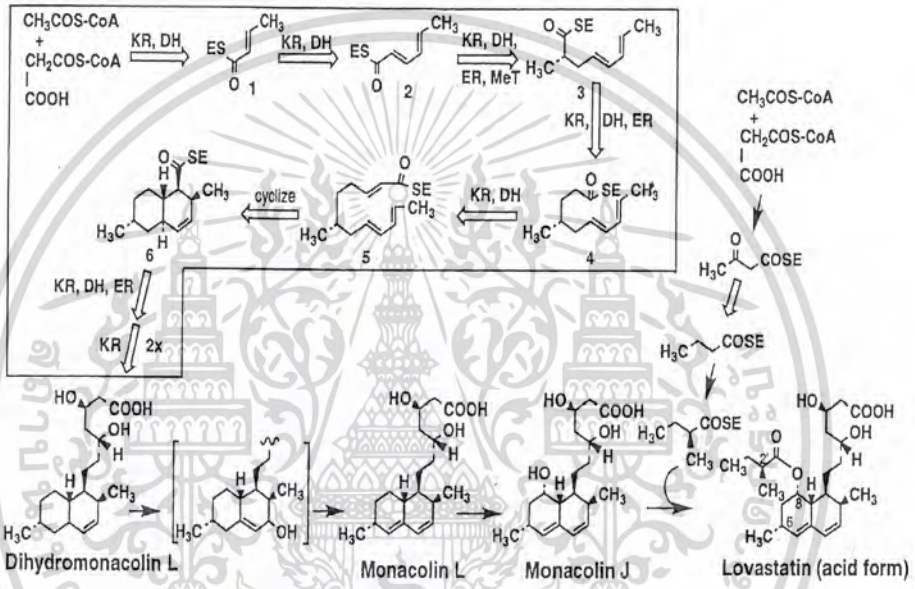
- High-density lipoproteins (HDL) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประโยชน์โดยพาคลอเลสเตอรอล จากร่างกายเข้าสู่ตับ หากมี HDL ในปริมาณสูงส่งผลให้เกิดโรคหลอดเลือดน้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ LDL – C (Low density lipoprotein cholesterol) ซึ่งเป็นไลโพโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีในตับมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่พาคลอเลสเตอรอลจากตับไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อเนื้อเยื่อต้องการใช้ คลอเลสเตอรอล ซึ่งเป็นจุดสำคัญที่ต้องลดระดับคลอเลสเตอรอลส่วนเกินในร่างกายโดยรักษาให้ร่างกายทำงานเป็นปกติอยู่เสมอ (Alberts และคณะ, 1998)

122371

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 กระบวนการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน

สารโมนาโคลินประกอบด้วยโพลีคีไทด์ 2 สายจากอนุพันธ์ของอะซีเตต โดยโพลีคีไทด์สายแรก อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น Dihydromonacolin L monacolin L และ monacolin J ตามลำดับ ส่วนโพลีคีไทด์สายที่สอง อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์แล้วเชื่อมต่อกับโพลีคีไทด์สายแรกในรูป monacolin J โดยพันธะเอสเทอร์แล้วได้สารโลวาสแตตินในรูปกรด (acid form) (รูปที่ 2.6) สารประกอบนี้สร้างโดย *A. terreus* (Hendrickson , 1999)



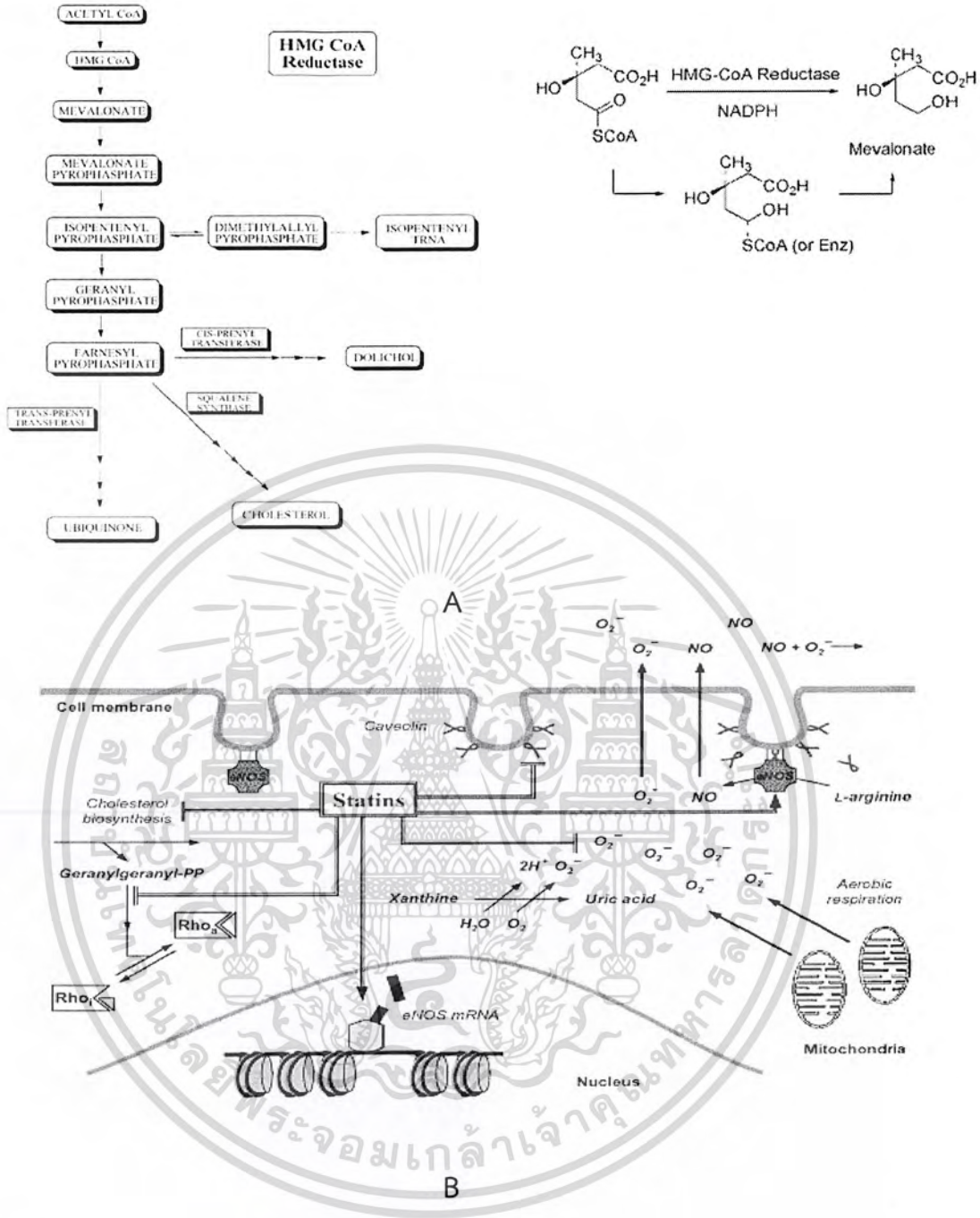
รูปที่ 2.6 กระบวนการสังเคราะห์สารโลวาสแตติน

ที่มา : Hirama , 1982 : Hirama , 1983

2.5.5 กลไกการทำงานของสารโมนาโคลิน (จันทนี , 2545)

สารโมนาโคลินสามารถยับยั้งHMG-CoA reductase อย่างจำเพาะโดยที่เอนไซม์ HMG - CoA reductase จะใช้เป็นตัวกลางในการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นเมวาโลเนต(Mevalonate) และสังเคราะห์เป็นคลอเลสเตอรอลต่อไป (Alberts , 1998) สารโลวาสแตตินจะขัดขวางการสร้างคลอเลสเตอรอลโดยการไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ HMG - CoA reductase จึงทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอล (รูปที่ 2.7) สารโมนาโคลินไม่แสดงฤทธิ์ทางยาในรูปโครงสร้างปกติ แต่เมื่อโครงสร้างถูกสลายด้วยน้ำ (Hydrolysis) เป็น β - hydroxy acid จะทำให้สารออกฤทธิ์ได้ในร่างกาย (รูปที่ 2.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



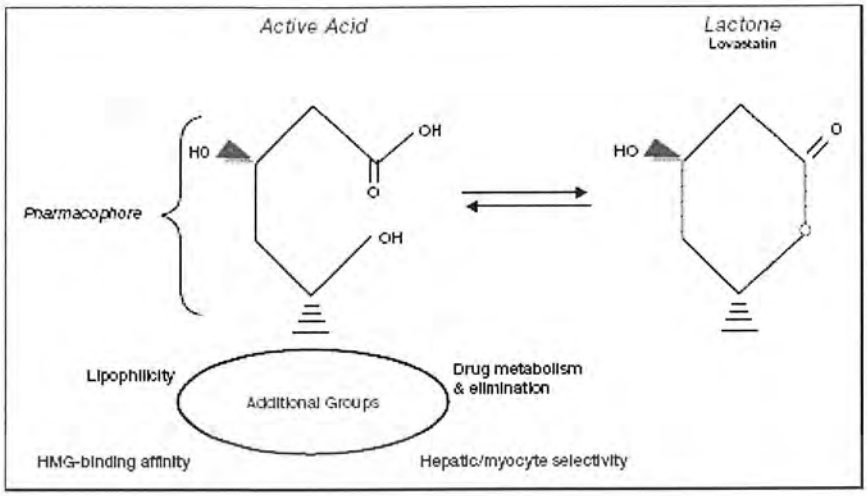
รูปที่ 2.7 A :กระบวนการในการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล เมื่อ HMG - CoA ทำปฏิกิริยายับยั้งการเกิดคลอเลสเตอรอล

B : ผลของยาที่เป็นตัวกลางในเซลล์ endothelial และเนื้อเยื่ออื่น ๆ

ที่มา : A : Goldstein JL และคณะ , 1990

B : Laufs U และคณะ , 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ยาที่ถูกทำให้อยู่ในรูปกรดเมื่อรวมกับ HMG - CoA reductase โลวาสแตตินจะถูกทำให้อยู่ในรูปแลกโตนและต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปกรดเพื่อใช้ในงานด้านคลินิก

ที่มา : Azie , 1998

2.5.6 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา (จันทนี , 2545)

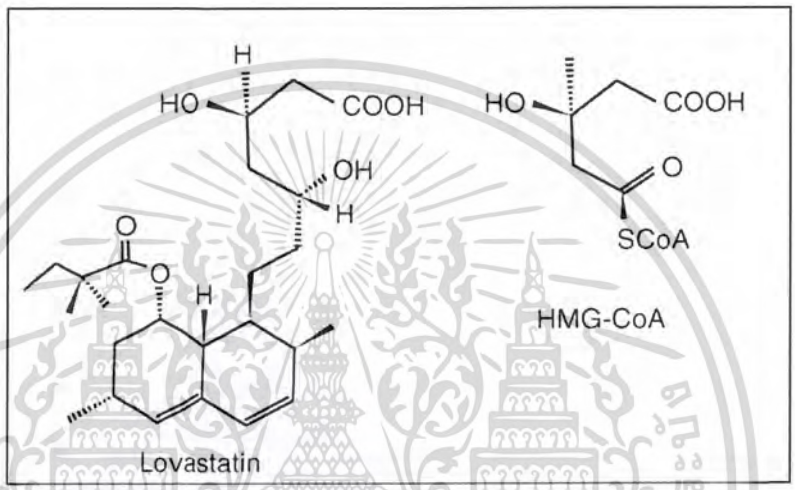
สารประกอบไขมันในเลือดจะประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) คลอเลสเตอรอล-อิสระ (Free cholesterol) คลอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (Cholesterol ester) และฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ซึ่งไขมันเหล่านี้ไม่สามารถรวมกับน้ำได้ จึงต้องรวมกับโปรตีน (Apoprotein) และไหลเวียนตามกระแสเลือดในรูปของไลโพโปรตีน เมื่อในเลือดมีสารเหล่านี้ในความเข้มข้นสูง 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 (chlorofo-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 (รูปที่ 2.9) จะออกฤทธิ์ยับยั้งแบบผันกลับได้โดยไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Reversible competitive inhibitor) ของเอนไซม์ HMG - CoA reductase ตัวอย่างยากลุ่มสแตตินได้แก่ Pravastatin , Fluvastatin และ Atorvastatin เป็นต้น ปัจจุบันอาจกล่าวได้ว่ายาในกลุ่ม สแตตินนี้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลด LDL- C



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของโลวาสแตตินและ HMG - CoA

ที่มา : Ryan และคณะ , 1999

2.5.7 กลไกการออกฤทธิ์

ยากลุ่มโมนาโคลินออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลในตับ โดยเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG - CoA reductase (3-hydroxyl 3-methyl glutaryl Coenzyme A) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสร้างคลอเลสเตอรอล (Rate controlling enzyme) ให้ลดลง ผลที่ตามมา คือ ทำให้มีการเพิ่มปริมาณของตัวรับไลโพโปรตีน (LDL receptor) ที่ผนังเซลล์ของตับ เพื่อที่จะเพิ่มการจับ LDL จากเลือดทำให้ LDL -C ลดลง

โดยในทางคุณสมบัติทางเภสัชจลศาสตร์ พบว่าสารโมนาโคลินไม่สามารถแสดงฤทธิ์ได้ในรูปปกติ (Prodrugs) จำเป็นต้องเปลี่ยนเป็นยาในรูปแบบที่ออกฤทธิ์ได้ (Active drugs) ยาในกลุ่มนี้จะเกิดกระบวนการภายหลังจากที่รับประทานยาเข้าสู่ร่างกาย และมีการขจัดผ่านทางตับ ก่อนที่ยาจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตและออกฤทธิ์ (First-pass metabolism) สูง พบว่าปริมาณยาเพียง 5-20% ของขนาดยาที่เข้ากระแสเลือด และจับกับโปรตีนในเลือดสูงถึง 95% ระดับยาในเลือดจะออกฤทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงสุดภายในเวลา 1-4 ชั่วโมง หลังการรับประทานอาหาร 70% ของยากลุ่มนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงแล้วถูกขับออกทางตับ คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มีดังนี้

1. สามารถลด LDL - C ได้ 20 – 55% ขึ้นกับขนาดของยาที่ใช้ ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อ คลอเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งจะเกิดขึ้น 4 – 6 สัปดาห์ภายหลังการรับประทานยา

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

3. สามารถเพิ่มระดับ HDL - C (High density lipoprotein – cholesterol) ได้ 5 - 10% โดยแสดงความสามารถในการออกฤทธิ์ยาในกลุ่มสแตติน ได้ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ค่าทางเภสัชพลศาสตร์ของยาในกลุ่มสแตติน

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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.8 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน

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

2.5.8.2. 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 แต่เอนไซม์ตัวนี้จะถูกกำจัดออกจากพลาสมา (plasma)ได้โดยเร็ว จึงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้กลับสู่สภาวะปกติได้ภายในเวลาเพียง 3 วัน โดยเมื่อเทียบกับเอนไซม์ตัวอื่น 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) เช่น เดียวกับสแตติน ได้แก่ erythromycin itraconazole ดังนั้นจึงควรวัดกิจกรรมของเอนไซม์นี้ และโดยเฉพาะผู้ป่วยที่รับประทานยาสแตตินร่วมกับยาเหล่านี้จะต้องลดขนาดยาสแตตินลง ไม่ให้ยามากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของขนาดสูงสุดที่ใช้ในการรักษา

2.5.9 ขนาดยาและการจัดเตรียมยา

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.10 ประโยชน์ในการรักษา

ใช้กับผู้ป่วยที่มีคลอเลสเตอรอลสูงทุกชนิดซึ่งอาจใช้ตัวยับยั้งรีดักเตสเพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับยาอื่น ได้แก่ bile acid-binding resins หรือ nicotinic acid ซึ่งจะต้องระมัดระวังเรื่องของปฏิกิริยาสัมพันธ์ของยาที่อาจทำให้เกิดกล้ามเนื้อผิดปกติได้ ยาในกลุ่มสแตติน สามารถลดอัตราของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ และ อัตราการตายในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีระดับไขมันสูงขณะเดียวกันยากลุ่มนี้ยังมีบทบาทในการป้องกัน ปฐมภูมิ (Primary prevention) สำหรับผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ ได้แก่ ผู้ที่มีไขมันในเลือดสูงกับการมีโรคความดันโลหิตสูงหรือเบาหวาน เป็นต้น

2.6 ซิตรินิน (citrinin) (European Mycotoxin NetworK , 2002)

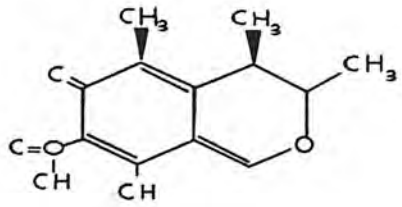
ซิตรินิน เป็นสารพิษจากเชื้อรา ส่วนใหญ่จะพบจากเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร ประเภทธัญพืช ผลไม้ และถั่ว คนจะได้รับซิตรินินจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเข้าไป

ซิตรินินพบครั้งแรกโดยการแยกจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* ในปี 1931 ต่อมาในปี 1951 พบปัญหาข้าวเหลือง " yellow rice problem " ในข้าวที่ประเทศไทยส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น เพราะมีการปนเปื้อนจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* และตรวจพบซิตรินิน จากนั้นพบว่าเชื้อรา *Penicillium* สายพันธุ์อื่นสามารถสร้างซิตรินิน เนื่องจากเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารพิษชื่อ โอคราท๊อกซิน เอ (Ochratoxin A,OTA) พบในธัญพืชทั่วไป เช่น ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ จึงไม่ใช่เรื่องแปลกที่พบทั้ง โอคราท๊อกซิน เอ และซิตรินินพร้อมกัน แต่มีการศึกษาเกี่ยวกับซิตรินินน้อยกว่า ซึ่งอาจเพราะไม่บ่อยครั้งที่สามารถตรวจพบซิตรินิน เนื่องจากอาจสลายไปในระหว่างขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสกุลอื่นที่สร้าง ซิตรินิน เนื่องจากสลายไปในระหว่างขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสกุลอื่นที่สร้าง ซิตรินิน เช่น *A. terreu A. carnues* และ *A. terreus* ช่วงแรกของการศึกษาพบว่าซิตรินินมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antibacterial) แต่ยังมีผลกระทบต่อไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงไม่ได้มีการนำสารนี้มาใช้ประโยชน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

ซิตรินินมีชื่อเรียกตามระบบ IUPAC คือ (3R , 4S) – 4 , 6-dihydro-8-hydroxyl-3,4,5-trimetyl-6-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 โครงสร้างของซิตรินิน

ที่มา : M. Sabater – Vilar และคณะ (1999)

ซิตรินิน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 250 กรัม มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{13}H_{14}O_5$ มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม สีเหลืองเลมอน มีจุดหลอมเหลว 172 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมอะซิเตต เมทานอล อะซิโตไนไตร์ท เอทานอล และสารละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว สารละลายตัวได้ด้วยแสง (photodecomposition) สารละลายกรดหรือด่างหรือความร้อนสามารถเกิด สีน้ำตาลเมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอริคคลอไรด์ สีเขียวกับไททาเนียมคลอไรด์ สีแดงคล้ำกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และด่าง ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สามารถทำให้เกิดคีเลต (chelate) กับ โมโนอะซิเตต (mono-acetate) ไดเอทิล (diethyl) เมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) และอนุพันธ์ไดไฮโดร (dihydro derivatives)

2.6.2 การศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษ

ซิตรินินเมื่อทดสอบกับสัตว์ทดลอง ได้ค่า LD_{50} 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (สำหรับกระต่าย) ซิตรินินทำให้ไตถูกทำลายและมีฤทธิ์อย่างอ่อนกับตับ เพราะความสามารถกรองไขมัน (fatty filtration) ลดลง ผลกระทบอื่นคือ ทำให้เกิดการขยายตัวของเส้นเลือดก่อให้เกิดการไหลเวียนโลหิตผิดปกติ และทำให้หลอดลมหดตัว

ซิตรินินจะเสริมฤทธิ์กับโอคราท็อกซิน เอ และเป็นพิษกับระบบประสาทของหมู เกิดในประเทศเดนมาร์ค สวีเดน นอร์เวย์ และไอร์แลนด์ ซิตรินินเป็นสารพิษต่อตับและไต (hepato nephrotoxin) พบใน เชื้อราสายพันธุ์ทั่วไป และยังเกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิด endemic Balkan nephropathy ในคนเหมือนกับโอคราท็อกซิน เอ และสารพิษอื่นๆ ที่มีลักษณะคล้ายกัน แต่อย่างไรก็ตามซิตรินินไม่อันตรายรุนแรงต่อคน เพราะความไม่เสถียรในระหว่างกระบวนการแปรรูป แต่จะมีผลโดยตรงต่อสัตว์ที่บริโภคธัญพืชที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปใดเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีรายงานการปนเปื้อนลงในอาหารประเภทต่างๆโดยเฉพาะอาหารประเภทเมล็ดธัญพืชและอาหารสัตว์ M. Sabater - vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าซิตรินินมีผลต่อการทำงานของไตและ ultra-structure ซิตรินินจะไปสะสมในไมโตคอนเดรียและรบกวนระบบการแลกเปลี่ยนอิเล็คตรอนในเซลล์ โดยขึ้นกับค่าพีเอช แต่ไม่มีผลกระทบต่อผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA การเรียงลำดับของโปรตีนและ RNA เมื่อการทำงานของไมโตคอนเดรีย ผิดปกติไป ทำให้ระดับไกลโคเจนในตับลดลง และยับยั้งการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอรอลในตับ

2.6.3 ความเสถียร (stability)

ซิตรินิน สลายตัวได้ที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส ในสภาวะปราศจากน้ำ (anhydrous) แต่จะสลายที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ในสภาวะชื้นปานกลาง (semi-moist) ดังนั้นความเป็นพิษจะลดลงเมื่อได้รับความร้อนรวมกับความชื้น จากการศึกษายังพบอีกว่า ซิตรินินสลายได้ในขั้นตอนการทำเบียร์ ถึงร้อยละ 90 โดยผ่านกระบวนการการงอก (germination) การผสม (mash) และการทำน้ำเบียร์(wort) และยังมีการใช้กรดโพรพิโอนิค (popionic acid) กับข้าวบาร์เลย์เพื่อทำลายซิตรินินในระหว่างการเก็บรักษา

2.6.4 ซิตรินินจากเชื้อราโมแนสคัส

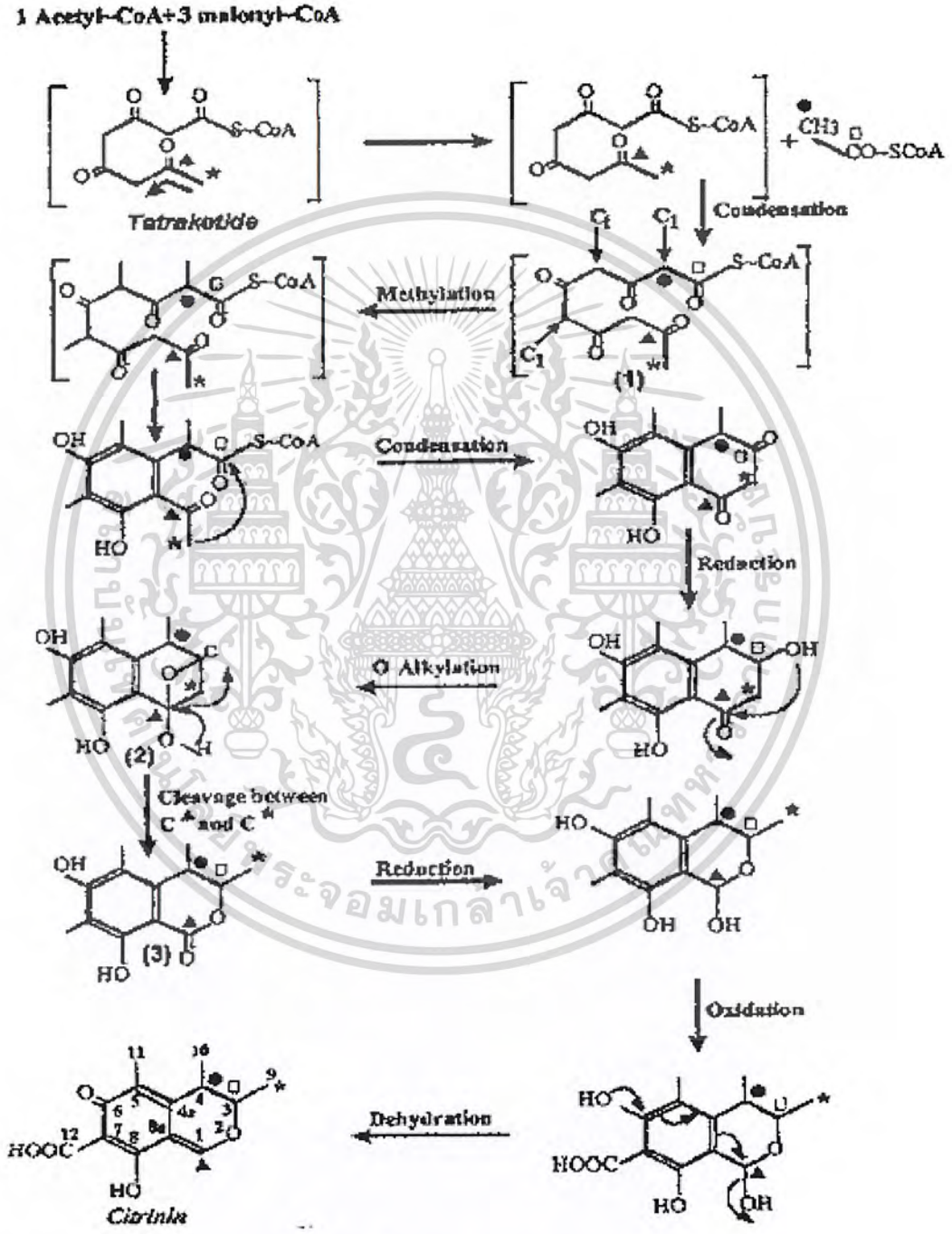
นอกจากคุณสมบัติในการรักษาโรคของข้าวแดงจากโมนาโคลิน เค ได้มีผลงานวิจัยหลายฉบับได้ศึกษาเกี่ยวกับซิตรินินที่สร้างจากเชื้อราสกุลโมแนสคัส พร้อมกับสร้างรงควัตถุ Wong และ Bau (1977) Wong และ Koehler (1981) Fink-Gremmels และคณะ (1991) แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างสารที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ในสีที่สกัดจากโมแนสคัสซึ่งสนับสนุนงานวิจัยของ Ober และ Kunz (1989) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ จากนั้นได้มีการแยกเอา โมนาสซิดิน เอ จากโมแนสคัสหลายสายพันธุ์ และบ่งชี้ได้ว่าเป็นสารตัวเดียวกับซิตรินิน (Blanc และคณะ , 1995 inpress) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดอาการไตอักเสบและผลิตจากเชื้อราหลายๆชนิด (Wu และคณะ, 1974 , M. sabater - vilar และคณะ, 1999)

คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ในรงควัตถุจากเชื้อราโมแนสคัส ได้ถูกศึกษาจากนักวิจัยหลายคน เช่น Wong และ Koehler (1981) ได้แยกสารประกอบ 2 ตัวจากเชื้อรา *M. purpureus* ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้แก่ สารสีเหลืองซีด คือ โมแนสซิดิน เอ และ สารสีเหลืองเรืองแสงที่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของสารประกอบดังกล่าว ต่อมา Blanc P.J. และคณะ (1995b) ได้แยกสารโมนาสซิดิน เอ คือซิตรินิน โดยใช้วิธี Mass Spectroscopy เพื่อยืนยันและอธิบายโครงสร้างของสารดังกล่าว

Hajjaj และคณะ (1999) ได้ศึกษากลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพของซิตรินิน จาก *Monascus ruber* ATCC 96218 โดยวัดจาก ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance ทดลองโดย วัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

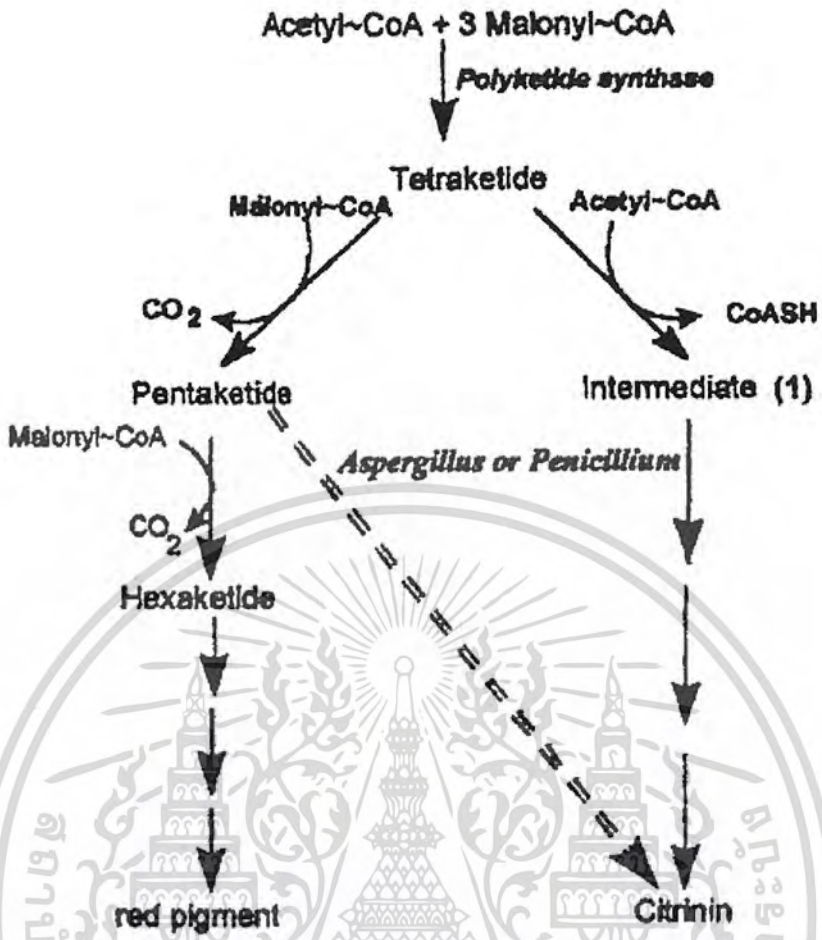
[^{13}Cacetate] ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการสังเคราะห์ซิตรินินเกิดจาก tetraketide แทนที่จะสังเคราะห์จาก pentaketide เหมือนกับเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่สามารถสร้างซิตรินินเช่นเดียวกัน กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินจากโมแนสคัส แสดงในรูป 2.11 และ 2.12



รูป 2.11 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินโดยเชื้อรา *Monascus ruber*

ที่มา : Hajjaj และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูป 2.12 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินและรงควัตถุสีแดง โดยเชื้อรา *Monascus ruber*

(เส้นประ แสดงกลไกการสังเคราะห์ซิตรินินโดยเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus*)

ที่มา : Hajjaj และคณะ (1999)

การใช้สีที่ผลิตจากโมแนสคัสเป็นวัตถุเจือปนในอาหาร พบว่าอาจมีปนเปื้อนของซิตรินินอยู่ ด้วย M. Sabater – Vilar และคณะ(1999) ได้ศึกษาดังนี้ 1) ตรวจพบซิตรินินในผลิตภัณฑ์จากโมแนสคัสในทางการค้าหรือไม่ 2) ซิตรินิน และหรือ สารสกัดจากโมแนสคัส มีคุณสมบัติทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenic) และปลอดภัยสำหรับใช้ในอาหารหรือไม่ และได้ศึกษาสารสกัดจากโมแนสคัส โดย HPLC การทดสอบ mutagenicity assay ของซิตรินินบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับสารสกัดจากโมแนสคัส รวมทั้งศึกษาเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างซิตรินินสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทำให้เชื้อราโมแนสคัสสร้าง ซิตรินิน หรือกำจัดซิตรินินออกจากสีของโมแนสคัส

Blanc P.J. และคณะ (1995a) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสร้างซิตรินินจากเชื้อราโมแนสคัสหลายสายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงต่างกัน ทดลองดังนี้ 1) ศึกษาสายพันธุ์เชื้อราที่ไม่สร้างซิตรินิน พบว่า ซิตรินินที่ได้จากเชื้อรา *M. purpureus* CBS 109.07 (wild) ผลิต ซิตรินิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้าว ส่วนเชื้อรา *Monascus ruber* ATCC 96218 ผลิต ซิตรินินมากถึง 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม 2) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการการผลิตซิตรินิน โดยเติมยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)โมโนโซเดียมกลูตาเมทและเมไทโอนีน โดยใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน หมักโดย *Monascus ruber* พบว่าอาหารที่เติม โมโนโซเดียมกลูตาเมท ตรวจพบปริมาณซิตรินินสูงสุด เท่ากัน 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเติมยูเรียและเมไทโอนีน พบซิตรินินน้อยเท่ากับ 17 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ปริมาณสีแดงที่ได้น้อยเช่นกัน การศึกษานี้ยังไม่ได้ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุและไม่ผลิตซิตรินิน 3) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบระหว่าง เอทานอลกับกลูโคส พบว่าอาหารที่เติมกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร และเติมเอทานอล 28 กรัมต่อลิตรมีการผลิตซิตรินินเท่ากับ 226 และ 136 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับและยังพบว่าถ้าในอาหารมีเอทานอลมากกว่า 45 กรัมต่อลิตร จะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Monascus ruber*

2.7 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

2.8 ผลิตภัณฑ์อื่นที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

Kranz และคณะ (1992) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* สร้าง methyl ketone ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสใน blue cheese ได้ดีใกล้เคียงกับ *P. roquefortii* เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นกรดไขมันสายสั้น ๆ ข้าวหมักสีแดง (red fermented rice : RFR) เป็นที่รู้จักในด้านยาสำหรับการรักษา การย่อยอาหาร และการหมุนเวียนโลหิตในประเทศจีน และมีการบริโภคเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพกันอย่างมาก (Sung , 1966 ; Chen , 1982 ; Hu , 1997; Wang และคณะ , 1999) Haws และคณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(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) แสดงให้เห็นว่า โมนาสโครูบรามีน (Monascorubramine) และรูโบรพังเตตามีนเปลี่ยนมาจากโมนาสโครูบริน และรูโบรพังตาติน (สีส้ม) ตามลำดับ Hiroi และคณะ (1975) ศึกษาโครงสร้างของสารสี 2 ชนิด คือ โมนาสโครูบริน (สีส้ม) และรูโบพังเตตามีน (สีม่วง) Manchand และคณะ (1973) พบว่าเชื้อราโมแนสคัสแต่ละสายพันธุ์ให้สารสีแตกต่างกันออกไปและพบการสร้างสารสีเหลืองตัวใหม่จากเชื้อรา *M. anka* Sweeny และคณะ (1981) สามารถสกัดสารสีจากโคจิของ *M. anka*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Monascus* sp.

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 MYS medium

3.2.2 SS medium

3.3 อาหารที่ใช้ทดสอบการผลิตสารโมนาโคลิน

3.3.1 อาหารสูตรปกติ ประกอบด้วย วัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้ว เป็นแหล่งคาร์บอนและมีน้ำเป็นองค์ประกอบ

3.3.2 อาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน คือ อาหารสูตรปกติที่เติม เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร สารสกัดมอลต์ 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.2 ขวดเตรียมอาหาร

3.4.3 จานเพาะเชื้อ

3.4.4 ปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.4.5 บีกเกอร์แก้วขนาด 500 มิลลิลิตร

3.4.6 ขวดฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร

3.4.7 หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร

3.4.8 ที่เจาะวุ้น (cork borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร

3.4.9 ตะเกียงบุนเสน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.10 เตาอบลมร้อน

3.4.11 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.4.12 เครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography)

3.4.13 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.4.14 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar airflow)

3.4.15 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

3.4.16 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

3.4.17 เครื่องชั่งสารพิกัด 4 ตำแหน่ง

3.4.18 ผ้าลินิน

3.4.19 กรวยพลาสติก

3.4.20 ไมโครปิเปต

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 เชื้อรา *Monascus* sp. ได้มาจากการทดลองก่อนหน้านี้

3.5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.5.2.1 MYS Agar ซึ่งประกอบด้วย เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร สารสกัดมอลต์ 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร แป้งมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร และ วุ้น 12 กรัมต่อลิตร

การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp.

นำข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus* sp. เจริญอยู่ มาวางบนอาหาร MYS Agar จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน

3.5.2.2 SS medium ซึ่งประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร และ แป้งถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร

บรรจุส่วนประกอบนี้ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ใน SS medium

นำเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เลี้ยงบนอาหาร MYS Agar มาเจาะด้วย cork borer จำนวน 4 ชิ้น จากนั้นนำมาลงในฟลาสก์ที่บรรจุ SS medium ที่เย็นแล้ว และนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (mycelium inoculum)

3.5.2.3 อาหารที่ใช้ทดสอบการผลิตสารโมนาโคลิน

นำธัญพืช 3 ชนิด ได้แก่ มันสำปะหลัง มันเทศ และ มันฝรั่ง มาเตรียมให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์ - เซนติเมตร ส่วนแห้วจะแบ่งออกเป็นต้มและดิบ โดยแห้วต้มจะนำมาเตรียมสองแบบ คือ แบบแรก นำมาเตรียมให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และแบบที่สองนำมาสับแบบหยาบ ส่วนแห้วดิบและมันแกว จะนำมาสับแบบหยาบเท่านั้น วัตถุดิบที่ได้ทั้งหมดจะใช้ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงในอาหารสูตรปกติและอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในวัตถุดิบทางการเกษตร

นำเชื้อรา *Monascus* sp. จากข้อ 3.5.2.2 มา 3 เปอร์เซ็นต์ลงในฟลาสก์ที่มีวัตถุดิบทางการเกษตรในข้อ 3.5.2.3 จากนั้นนำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วันและ กรองในวันที่ 7 และ 10

3.6 การวิเคราะห์

ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ดังนี้

3.6.1 การหาน้ำหนักแห้งของวัตถุดิบทางการเกษตร

นำตัวอย่างวัตถุดิบทางการเกษตรประมาณ 22.5 กรัม ใส่ในฟอยด์ที่ได้อบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำออกมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ และ ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัตถุดิบทางการเกษตร

3.6.2 การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ฟีนอลซัลฟูริก

3.6.2.1 การทำกราฟมาตรฐาน

ชั่งแป้งที่ผ่านการอบแห้ง 1 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแป้งมาตรฐานความเข้มข้น 10000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายแป้งมาตรฐานความเข้มข้น 10000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายแป้งมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ แล้วเติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด

3.6.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

นำตัวอย่างที่เก็บในเวลาต่างๆไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน นำผลที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

3.6.3 การวิเคราะห์สารโมนาโคลินโดย HPLC

นำตัวอย่างที่เก็บในเวลาต่างๆไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารโมนาโคลินโดยใช้เครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง (HPLC) ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร μBondapak™ C_{18} (3.9 x 300 mm.) mobile phase ที่ใช้ คือ acetonitrile : water (55 : 45) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

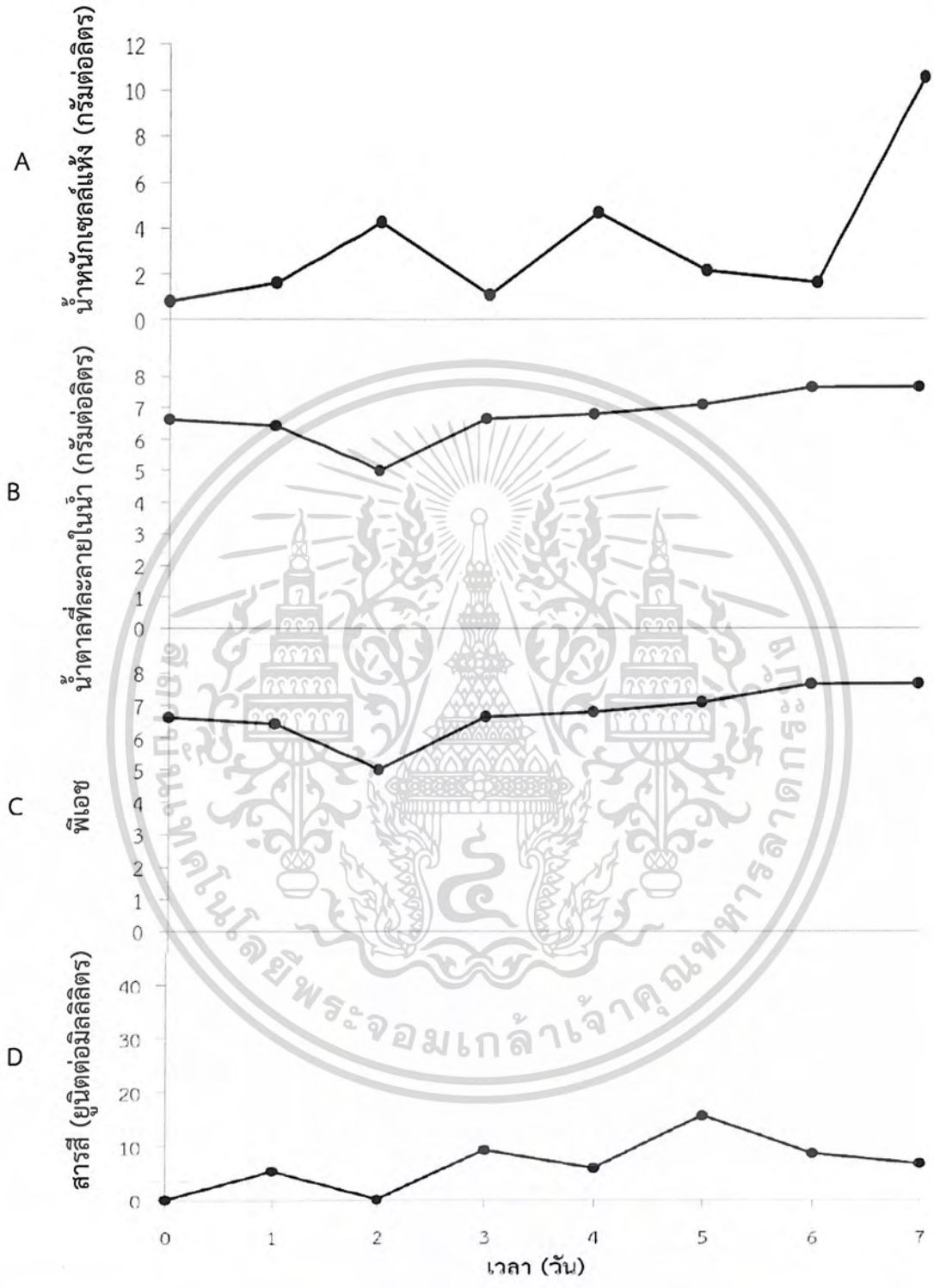
4.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหาร SS medium

เชื้อรา *Monascus* sp. สามารถเจริญ และสร้างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิได้ทั้งบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว ซึ่งการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวจะให้สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิได้เร็วกว่าบนอาหารแข็ง สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น พีเอช อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ง่าย ซึ่งการทดลองนี้เลี้ยงในอาหาร SS medium เป็นสูตรอาหารที่เส้นใยมีการกระจายตัวได้ดีพอสมควร ประกอบด้วยแป้งถั่วเหลือง และแป้งมันสำปะหลัง เป็นเชื้อเริ่มต้น โดยใช้ cock borow ตัดชิ้นเชื้อที่เจริญบนอาหาร MYS agar จำนวน 4 ชิ้น ลงในอาหาร SS medium เพื่อกระตุ้นการเจริญของเชื้อ โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ แล้วนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสารสี น้ำหนักแห้ง โมนาโค-ลิน พีเอช น้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ในอาหาร

การทดลองพบว่า เชื้อรา*Monascus* sp. สามารถเจริญในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังและแป้งถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ การเจริญของเชื้อรา มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน คือเส้นใยมีขนาดเล็กกระจายตัว ไม่พบ pellet การสร้างสารสี พบว่ามีการผลิตได้ดีที่สุดในวันที่ 5 เท่ากับ 15.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.0 – 7.65 การเจริญของเชื้อให้น้ำหนักแห้งของเส้นใยเพิ่มขึ้นในวันที่ 0 ถึง 2 จากนั้นลดลงในวันที่ 3 มีค่าเท่ากับ 1.07 กรัมต่อลิตร และมีการเจริญเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 จากนั้นก็ลดลงอีกในวันที่ 5 และ 6 ซึ่งในวันที่ 7 เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นสูงสุด มีค่าเท่ากับ 10.53 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อพบว่า น้ำตาลในวันที่ 1 มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 และลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 4 จากนั้นเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 และลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 6 และ 7 ส่วนโมนาโคลินไม่พบในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว SS medium ในเวลา 7 วัน

ผลการทดลอง แสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าในวันที่ 1 ถึง 2 เชื้อมีการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยคาร์โบไฮเดรตและมีการใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารในการเจริญ ในวันที่ 3 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารน้อย เชื้อจึงมีปริมาณลดลง จากนั้นวันที่ 4 เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นทำให้มีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารลดลง ในวันที่ 5 เชื้อมีการเจริญได้น้อย จะเห็นได้ว่ามีน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารมาก จากนั้นในวันที่ 6 และ 7 น้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง ขณะที่เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากมีการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ การทดลองได้นำเชื้อที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 วันไปเป็นเชื้อเริ่มต้นเนื่องจากเชื้ออยู่ในระยะ mid-log phase จึงมีการปรับตัวได้ดีและสามารถเจริญได้รวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว SS medium เป็นเวลา 7 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้ง (A) น้ำตาลที่ละลายน้ำ (B) พีเอช (C) และสารสี (D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ในวัตถุดิบทางการเกษตร

4.2.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารสูตรปกติ

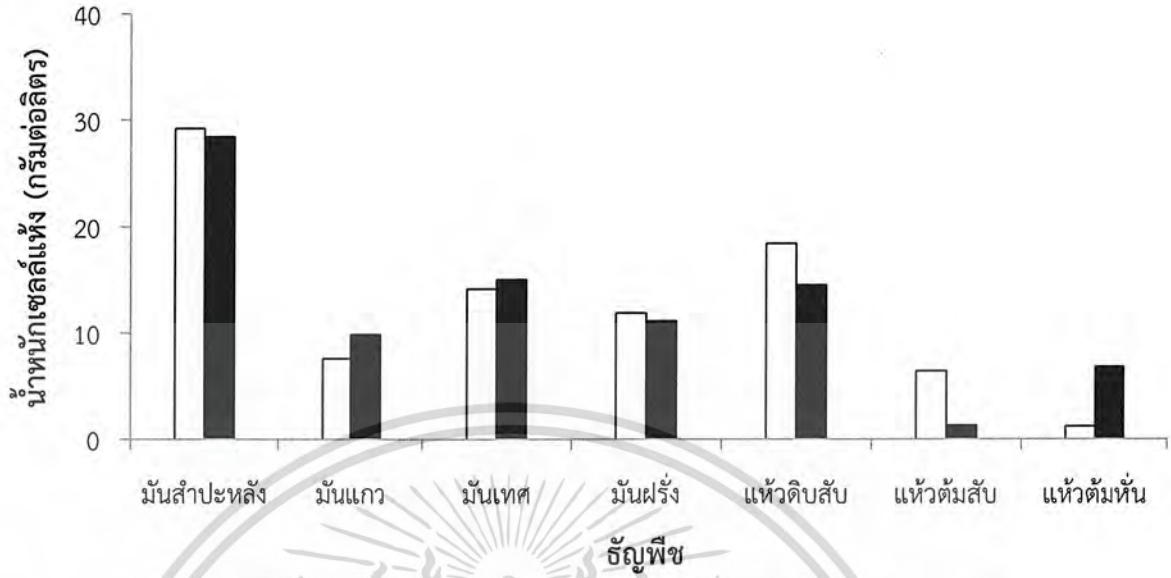
นำวัตถุดิบทางการเกษตร 3 ชนิด ได้แก่ มันสำปะหลัง มันเทศ และ มันฝรั่ง มาเตรียมให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนแห้วจะแบ่งออกเป็นต้มและดิบ โดยแห้วต้มจะนำมาเตรียมสองแบบ คือแบบแรกนำมาเตรียมให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และแบบที่สองนำมาสับแบบหยาบ ส่วนแห้วดิบและมันแกว จะนำมาสับแบบหยาบเท่านั้น วัตถุดิบทางการเกษตรที่ได้ทั้งหมดจะใช้ 22.5 กรัม และเติมน้ำปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

นำเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหาร SS medium มา 3 เปอร์เซ็นต์ลงในฟลาสก์ที่มีวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดจากนั้นนำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ น้ำหนักแห้ง น้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ในอาหาร และสารโมนาโคลิน

การทดลองพบว่าเมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิด ในอาหารสูตรปกติ ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้วดิบสับ แห้วต้มสับ และแห้วต้มหั่น เมื่อนำมากรองในวันที่ 7 ได้น้ำหนักแห้งดังนี้ 29.20 7.60 14.16 11.87 18.40 6.40 และ 1.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และนำมากรองในวันที่ 10 ได้น้ำหนักแห้งดังนี้ 28.43 9.84 15.04 11.13 14.49 1.27 และ 6.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารมันสำปะหลังสามารถเจริญได้ดีที่สุด ทั้งวันที่ 7 และ 10 เนื่องจากในมันสำปะหลังมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในปริมาณมากกว่าในวัตถุดิบชนิดอื่นอีก 4 ชนิด เนื่องจากเชื้อราสามารถปล่อยเอนไซม์มาย่อยคาร์โบไฮเดรตเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล เชื้อจึงสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ ส่วนในอาหารมันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้วดิบสับ และแห้วต้มสับ มีการเจริญได้ไม่แตกต่างกัน ทั้งวันที่ 7 และ 10 เช่นกัน เนื่องจากมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตไม่แตกต่างกัน แต่ในอาหารแห้วดิบสับมีการเจริญได้ดีกว่าอาหารแห้วต้มสับ และแห้วต้มหั่น เนื่องจากในแห้วดิบสับมีการเจลาติไนซ์น้อยกว่าแห้วต้มสับและแห้วต้มหั่น การส่งผ่านของอากาศจึงเข้าไปได้ดี เชื้อจึงมีการเจริญได้ดีกว่า แต่อาหารแห้วต้มสับกับอาหารแห้วต้มหั่นนั้น มีการเจริญที่ตรงข้ามกันคือในวันที่ 7 อาหารแห้วต้มสับ มีการเจริญได้ดีกว่า เนื่องจากวัตถุดิบมีพื้นที่ผิวมากทำให้เชื้อสามารถสร้างเส้นใยเข้าไปเจริญในวัตถุดิบได้มาก วัตถุดิบจึงมีปริมาณลดลงทำให้เชื้อมีการเจริญลดลงในวันที่ 10 ขณะที่ในวันที่ 10 อาหารแห้วต้มหั่นมีการเจริญได้ดีกว่าในอาหารแห้วต้มสับ เนื่องจากในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อ เชื้อยังไม่สามารถสร้างเส้นใยเจริญเข้าไปในวัตถุดิบได้ แต่เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น จนในวันที่ 10 เชื้อจะสร้างเส้นใยเจริญเข้าไปในวัตถุดิบและเส้นใยที่อยู่รอบนอกจะหลุดสลายออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



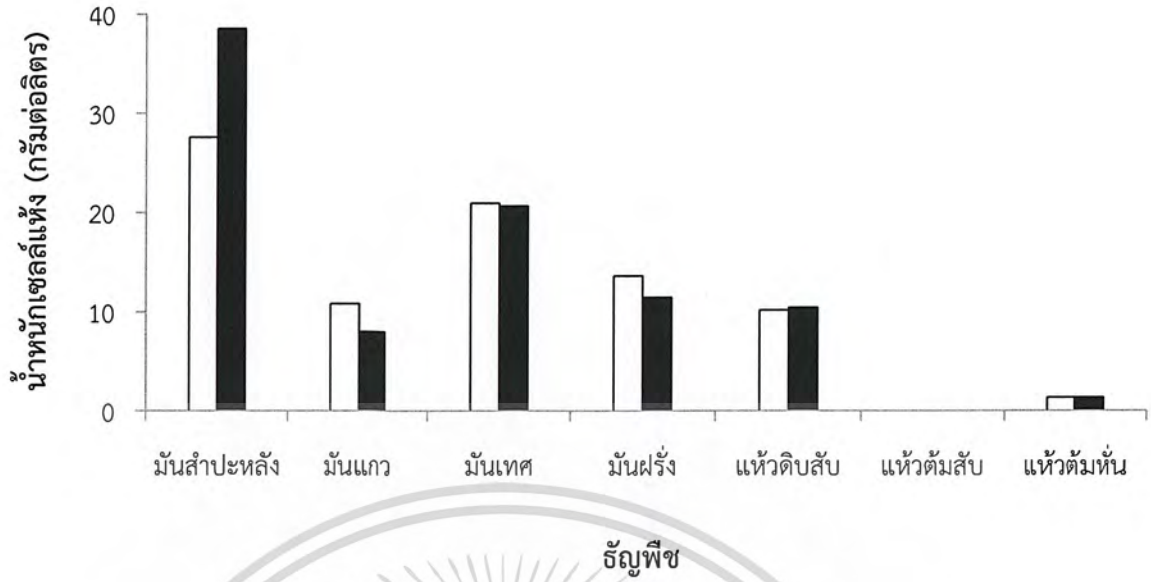
รูปที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นธัญพืชชนิดต่างๆ ที่ระยะเวลา 7 วัน (□) และ 10 วัน (■) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.2.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน

การทดลองพบว่าเมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้วดิบสับ และแห้วต้มหั่น ในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน (เปปโตน สารสกัดยีสต์ และสารสกัดมอลต์ เท่ากับ 5.0 3.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อวัดน้ำหนักแห้งในวันที่ 7 มีค่าเป็น 27.54 10.80 20.93 13.60 10.13 และ 1.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่การเจริญในวันที่ 10 ได้น้ำหนักแห้ง เท่ากับ 38.52 7.96 20.63 11.44 10.40 และ 1.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. สามารถเจริญได้ดีที่สุด ในอาหารมันสำปะหลังทั้งวันที่ 7 และ 10 เนื่องจากในมันสำปะหลังมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในปริมาณมากกว่าในวัตถุดิบชนิดอื่นอีก 4 ชนิด เนื่องจากเชื้อราสามารถปล่อยเอนไซม์มาย่อยคาร์โบไฮเดรตเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล เชื้อจึงสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ ส่วนในอาหารมันแกว มันเทศ มันฝรั่ง และแห้วดิบสับ มีการเจริญได้ไม่แตกต่างกันในวันที่ 7 และ 10 เช่นกัน เนื่องจากมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตไม่แตกต่างกันและในอาหารแห้วต้มหั่น มีการเจริญได้น้อยกว่าอาหารแห้วดิบสับ เนื่องจากมีการเจลาติไนซ์มาก การส่งผ่านของอากาศจึงไม่ดีนัก เชื้อจึงมีการเจริญได้น้อยลง และอาหารแห้วต้มหั่นนี้มีการเจริญของเชื้อน้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวธัญพืชเสริมแหล่งไนโตรเจน เป็นระยะเวลา 7 วัน (□) และ 10 วัน (■) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารสูตรปกติกับอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน สามารถสรุปได้ว่า เชื้อมีการเจริญได้ไม่แตกต่างกันในวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด ดังนั้นการเสริมแหล่งไนโตรเจนจึงไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

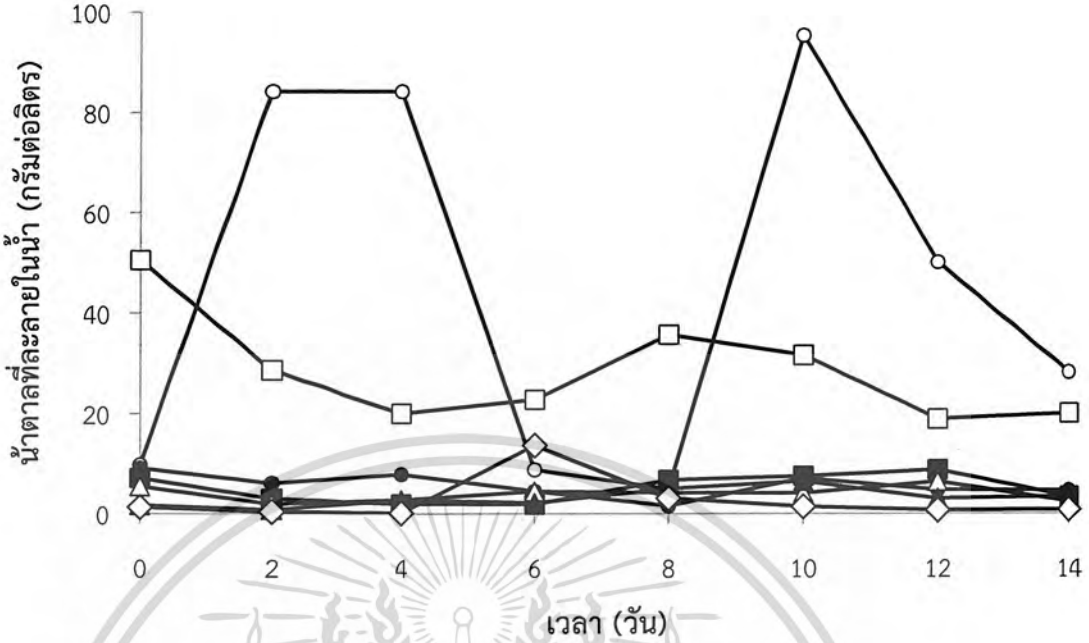
4.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารของวัตถุดิบทางการเกษตร

4.3.1 ศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปกติ

การทดลอง พบว่าเมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้วดิบสับ แห้วต้มสับ และแห้วต้มหั่น ในอาหารสูตรปกติ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ในอาหารในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในวันที่ 14 มีค่าดังนี้ 28.13 4.61 20.03 3.39 2.38 3.43 และ 0.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.4 ในอาหารมันสำปะหลังเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณน้ำตาลน้อย เนื่องจากส่วนใหญ่เป็นพอลิเมอร์น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ และยังคงอยู่รวมตัวเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่ ไม่ละลายน้ำ แต่ในวันที่ 2 ถึง 4 จะมีปริมาณน้ำตาลในอาหารมากเนื่องจากเชื้อเริ่มปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยคาร์โบไฮเดรต แต่นำไปใช้ในการเจริญได้น้อย จากนั้นปริมาณน้ำตาลลดลงในวันที่ 6 ถึง 8 แสดงว่าเชื้อมีการนำน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารไปใช้ในการเจริญ แต่ในวันที่ 10 น้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยวัตถุดิบที่เหลืออยู่อีก และนำไปใช้ในการเจริญ น้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารจึงลดลงในวันที่ 12 ถึง 14 อาหารมันเทศ พบว่าวันที่ 0 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารสูงเนื่องจาก มีองค์ประกอบของน้ำตาลสูงกว่าวัตถุดิบชนิดอื่นและมีการนำไปใช้ในการเจริญ น้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารจึงลดลง แต่เมื่อน้ำตาลลดลงถึงระดับหนึ่งเชื้อจะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยวัตถุดิบอีกเพื่อนำไปใช้ในการเจริญ ส่วนในวัตถุดิบทางการเกษตรที่เหลือคือ มันฝรั่ง มันแกวและแห้ว จะมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบค่อนข้างน้อยจึงมีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารค่อนข้างต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



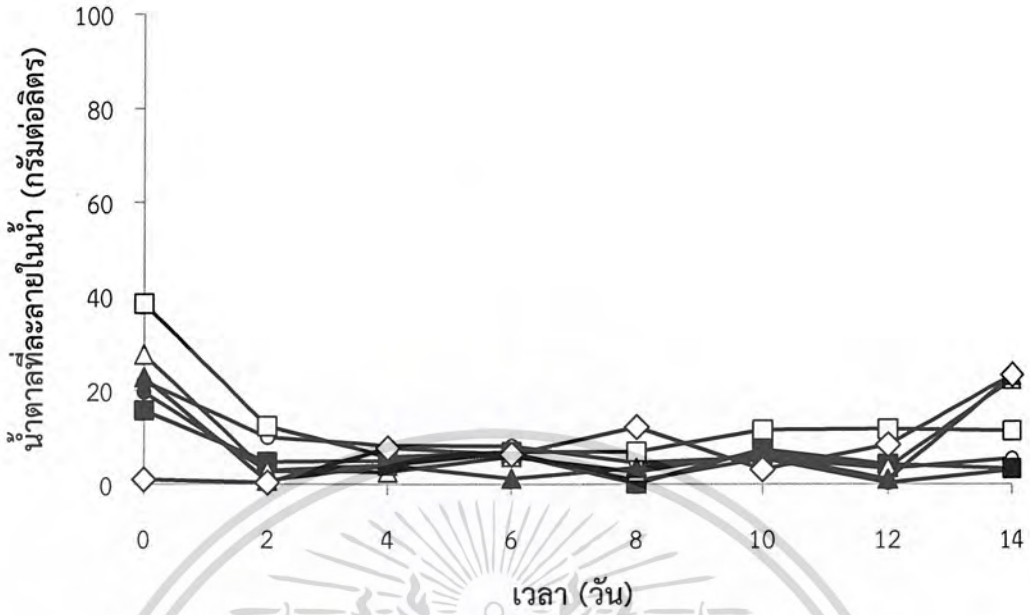
รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ละลายน้ำในระหว่างเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวมันสำปะหลัง (◯), มันแกว (●) , มันเทศ (□) , มันฝรั่ง (■) , แห้วดิบสับ (△) , แห้วต้มสับ (▲) , แห้วต้มหั่น (◇) เป็นเวลา 14 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.3.2 ศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน

การทดลองแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าเมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้วดิบสับ แห้วต้มสับ และแห้วต้มหั่น ในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ในอาหารระหว่างการเลี้ยงเชื้อวันที่ 14 มีค่าดังนี้ 5.45 2.98 11.30 3.26 22.20 23.06 และ 23.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่า เนื่องจากอาหารมีการเติมแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำตาลมอลโตส จึงทำให้มีน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารเริ่มต้นวันที่ 0 มีปริมาณมาก เชื้อจึงสามารถนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญได้ทันที น้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารจึงมีปริมาณลดลง และสะสมอยู่ในอาหารค่อนข้างต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ละลายน้ำในระหว่างเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวมันสำปะหลัง (◯), มันแกว (●) , มันเทศ (□) , มันฝรั่ง (■) , แห้วดิบสับ (△), แห้วต้มสับ (▲) , แห้วต้มหั่น (◇) เสริมแหล่งไนโตรเจน เป็นเวลา 14 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

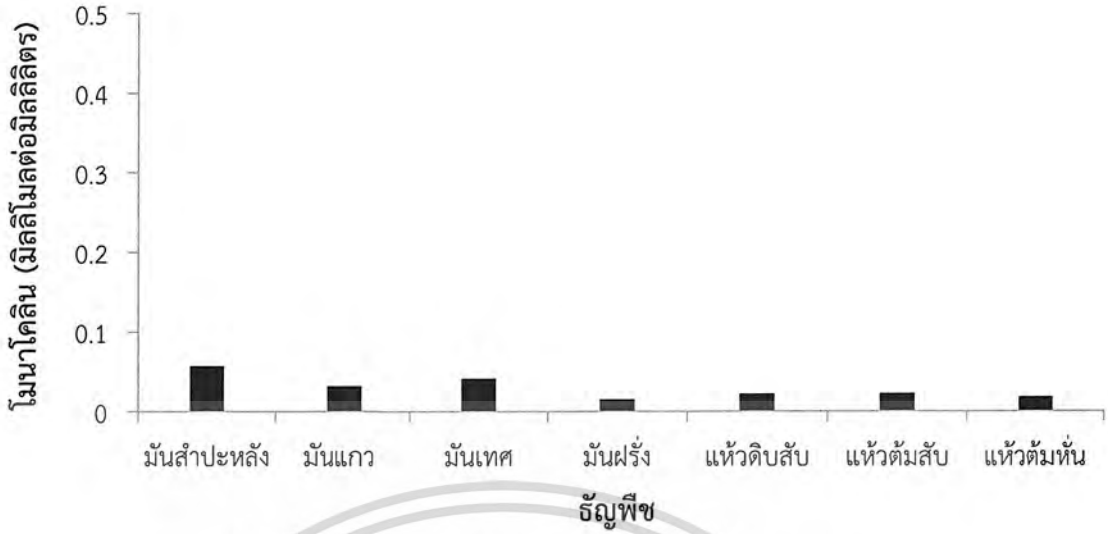
4.4 ศึกษาการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญในวัตถุดิบทางการเกษตร

4.4.1 ศึกษาการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารสูตรปกติ

การทดลองแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่าเมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดในอาหารสูตรปกติ ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้วดิบสับ แห้วต้มสับ และแห้วต้มหั่น เมื่อนำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสผสมกับอะซิโตไนไตรท์ที่อัตราส่วน ส่วนใส : อะซิโตไนไตรท์ (45 : 55) วิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าปริมาณสารโมนาโคลินที่ได้จากการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน มีค่าเท่ากับ 0.057 0.032 0.041 0.016 0.022 0.022 และ 0.018 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่า ในอาหารมันสำปะหลังมีการผลิตสารโมนาโคลินได้สูงสุด รองลงมาเป็นอาหารมันเทศและมันแกว ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



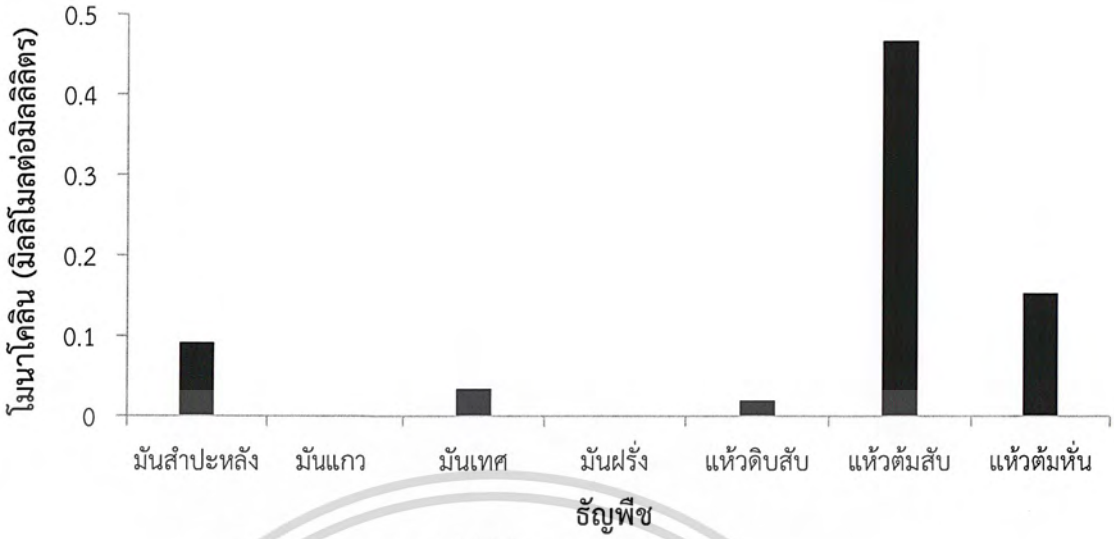
รูปที่ 4.6 การผลิตโมนาโคลินของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวธัญพืช เป็นเวลา 14 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.4.2 ศึกษาการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน

การทดลองแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าเมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้วดิบสับ แห้วต้มสับ และแห้วต้มหั่น เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าปริมาณสารโมนาโคลินที่ได้จากการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน จะพบใน มันสำปะหลัง มันเทศ แห้วดิบสับ แห้วต้มสับ และแห้วต้มหั่น มีค่าเท่ากับ 0.092 0.034 0.020 0.467 และ 0.153 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนในมันแกวและมันฝรั่งไม่พบว่ามีการหลั่งสารโมนาโคลินออกมาเนื่องจาก แหล่งไนโตรเจนที่เสริมไปอาจมีผลไปยับยั้งไม่ให้มีการผลิตสารโมนาโคลิน

ผลการทดลองพบว่า แห้วต้มสับมีการผลิตสารโมนาโคลินได้สูงสุด รองลงมาเป็นแห้วต้มหั่น และมันสำปะหลัง ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 การผลิตสารโมนาโคลินของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวธัญพืชเสริมแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 14 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

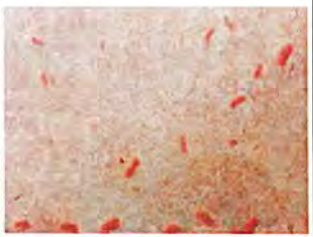
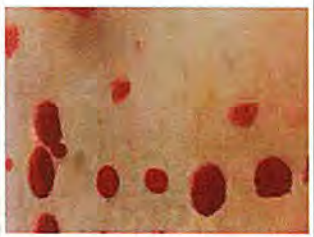
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. และลักษณะวัตถุดิบทางการเกษตรที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 เมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้วดิบสับ แห้วต้มสับ และแห้วต้มหั่นในอาหารสูตรปกติและสูตรที่เสริมแหล่งไนโตรเจน เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน นำเส้นใยมากระจายตัวในน้ำ และสังเกตลักษณะของ pellet จะพบว่ามีลักษณะต่างๆดังนี้ ท่อนสั้นๆ (cylindrical form) เส้นด้าย (thread – like form) และทรงกลม (spherical form)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารสูตรปกติและอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน

วัตถุดิบทางการเกษตร	อาหารสูตรปกติ		รูปแสดงลักษณะ pellet	อาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน		รูปแสดงลักษณะ pellet
	ลักษณะ pellet	ลักษณะที่สังเกตได้		ลักษณะ pellet	ลักษณะที่สังเกตได้	
มันสำปะหลัง	มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ(cylindrical form) เป็นส่วนใหญ่และ มีลักษณะเป็นทรงกลม(spherical form) เล็กน้อย	วัตถุดิบถูกย่อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 8 จึงมีความหนืดเพิ่มขึ้น และค่อยๆลดลงในวันที่ 12 จนถึงวันที่ 14		มีลักษณะเป็นเส้นด้าย (thread – like form) เป็นส่วนใหญ่	วัตถุดิบถูกย่อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 จึงมีความหนืดเพิ่มขึ้น	
มันแกว	มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ(cylindrical form) เป็นส่วนใหญ่	วัตถุดิบถูกย่อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยเล็กน้อยจนถึงวันที่ 8 จึงมีความหนืดเพิ่มขึ้น และค่อยๆลดลงในวันที่ 12 จนถึงวันที่ 14		มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ (cylindrical form) เป็นส่วนใหญ่	วัตถุดิบถูกย่อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยเล็กน้อยจนถึงวันที่ 8 จึงมีความหนืดเพิ่มขึ้น และค่อยๆลดลงในวันที่ 12 จนถึงวันที่ 14	
มันเทศ	มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ(cylindrical form) เป็นส่วนใหญ่และมีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical form) เล็กน้อย	วัตถุดิบถูกย่อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยและค่อยๆเพิ่มขึ้น จึงมีความหนืดเพิ่มขึ้น จนถึงวันที่ 14		มีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical form) เป็นส่วนใหญ่และมีลักษณะเป็นเส้นด้าย (thread – like form) เล็กน้อย	วัตถุดิบถูกย่อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยและค่อยๆเพิ่มขึ้น จึงมีความหนืดเพิ่มขึ้น จนถึงวันที่ 14	

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ลักษณะวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารสูตรปกติและอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน.

วัตถุดิบทางการเกษตร	อาหารสูตรปกติ		รูปแสดงลักษณะ pellet	อาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน		รูปแสดงลักษณะ pellet
	ลักษณะ pellet	ลักษณะที่สังเกตได้		ลักษณะ pellet	ลักษณะที่สังเกตได้	
มันฝรั่ง	มีลักษณะเป็นเส้นด้าย(thread – like form)เป็นส่วนใหญ่และมีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical form)เล็กน้อย	วัตถุดิบถูกย่อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยและค่อยๆ เพิ่มขึ้น จึงมีความหนืดเพิ่มขึ้น จนถึงวันที่ 14		มีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical form) เป็นส่วนใหญ่และมีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ (cylindrical form) เล็กน้อย	วัตถุดิบถูกย่อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยและค่อยๆ เพิ่มขึ้น จึงมีความหนืดเพิ่มขึ้น จนถึงวันที่ 14	
แห้วดิบสับ	มีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical form) เป็นส่วนใหญ่	วัตถุดิบถูกย่อยเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยเล็กน้อยจนถึงวันที่ 4 และเกิด pellet เล็กน้อย จนถึงวันที่ 14 จึงมีความหนืดน้อย		มีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical form) เป็นส่วนใหญ่	วัตถุดิบถูกย่อยเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยเล็กน้อยจนถึงวันที่ 4 และเกิด pellet เล็กน้อย จนถึงวันที่ 14 จึงมีความหนืดน้อย	
แห้วต้มสับ	มีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ (cylindrical form) เป็นส่วนใหญ่ และมีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical form) เล็กน้อย	วัตถุดิบถูกย่อยเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยเล็กน้อยจนถึงวันที่14 จึงมีความหนืดน้อย และพบ pellet น้อยมาก		มีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical form) เป็นส่วนใหญ่และมีลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ (cylindrical form) เล็กน้อย	วัตถุดิบถูกย่อยเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยเล็กน้อยจนถึงวันที่ 14 จึงมีความหนืดน้อย และพบ pellet น้อยมาก	
แห้วต้มหั่น	ไม่พบ pellet เพราะเชื้อเจริญคลุมผิวหน้า จึงนำมาผ่าดูการเจริญเข้าไปของเส้นใย วันที่ 7 และ 10 มีขนาดคือ 1 และ 1.2 มิลลิเมตรตามลำดับ	วัตถุดิบถูกย่อยเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยเล็กน้อยจนถึงวันที่14		ไม่พบ pellet เพราะเชื้อเจริญคลุมผิวหน้า จึงนำมาผ่าดูการเจริญเข้าไปของเส้นใย วันที่ 7 และ 10 มีขนาดเท่ากันคือ 1 มิลลิเมตร	วัตถุดิบถูกย่อยเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 2 เกิดเป็นเส้นใยเล็กน้อยจนถึงวันที่ 14	

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว SS medium เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งเชื้ออยู่ในระยะ mid-log phase และมีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (inoculums) เนื่องจากสามารถเจริญได้ทันทีเมื่อนำมาใส่ในอาหารเพื่อทดสอบการเจริญ และการผลิตผลิตภัณฑ์ในลำดับต่อไป แตกต่างจากการใช้สารละลายสปอร์ (spore suspension) เป็นเชื้อเริ่มต้น เพราะต้องเสียเวลาระหว่างการงอกเส้นใย (germination) การใช้เส้นใยเป็นเชื้อเริ่มต้นนอกจากมีข้อดีในด้านการปรับตัว และสามารถเจริญได้รวดเร็วแล้ว ยังสามารถเตรียมได้ง่าย และเพิ่มปริมาตรเชื้อเริ่มต้นสำหรับใช้เพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ผลการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ใน SS medium ที่เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ไม่พบการสร้างสารโมนาโค-ลิน อาจเป็นเพราะสารโมนาโคลินที่เชื้อผลิตยังมีปริมาณน้อย และสะสมอยู่ภายในเซลล์ อีกทั้งสภาพแวดล้อมภายนอกยังไม่เหมาะสม หรือเอื้ออำนวยต่อการหลั่งออกนอกเซลล์ มีแนวโน้มว่าระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อนานขึ้นเป็น 10 ถึง 14 วัน อาจมีการหลั่งสารโมนาโคลินออกนอกเซลล์ ดังการทดลองที่ศึกษาในขั้นถัดไป

จากผลการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดเมื่อนำมาวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักเซลล์แห้ง และโมนาโคลิน โดยมีอาหารสูตรปกติ และอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน เป็นเวลา 14 วัน พบว่าในอาหารมันสำปะหลังมีการผลิตสารโมนาโคลินได้สูงสุดในวันที่ 14 เชื้อมีการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและผลิตสารโมนาโคลิน ทำให้น้ำตาลที่เหลือในอาหารลดลงในวันที่ 14 อาหารมันเทศมีการผลิตสารโมนาโคลินได้เป็นอันดับที่สอง อาหารมันแกวมีการผลิตสารโมนาโคลินได้เป็นอันดับที่สาม มีการนำน้ำตาลไปใช้ในระหว่างการเจริญและผลิตสารโมนาโคลิน อาหารมันฝรั่ง แห้วดิบสับ แห้วต้มสับและแห้วต้มหั่น มีการผลิตสารโมนาโคลินได้ปริมาณที่ใกล้เคียงกัน มีการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและผลิตสาร โมนาโคลินได้ใกล้เคียงกัน ระดับของน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารจึงไม่แตกต่างกันมาก ส่วนในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจนพบว่าในอาหารมันสำปะหลัง แห้วต้มสับ และแห้วต้มหั่น จะพบว่ามีการผลิตสารโมนาโคลินเพิ่มขึ้น แสดงว่าไนโตรเจนมีผลไปกระตุ้นการผลิตสารโมนาโคลินให้เพิ่มสูงขึ้น ในอาหารมันเทศและแห้วดิบสับเมื่อมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนจะพบว่ามีการผลิตสารโมนาโคลินลดน้อยลง แสดงว่าไนโตรเจนมีผลไปลดการผลิตสารโมนาโคลิน ส่วนในอาหารมันแกวและมันฝรั่งไม่พบการผลิตสารโมนาโคลิน แสดงว่าไนโตรเจนมีผลไปยับยั้งการผลิตสารโมนาโคลิน เมื่อวิเคราะห์ระดับน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารทุกชนิดที่เสริมแหล่งไนโตรเจนจะพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปได้ว่า น้ำตาลมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา*Monascus* sp. และการผลิตสารโมนาโคลิน เมื่อมีน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารปริมาณน้อย เชื้อจะมีการผลิตสารโมนาโคลินได้น้อย เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการผลิตสารโมนาโคลินโดยมีวัตถุดิบทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารสูตรปกติ และ อาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน จะพบว่ามันสำปะหลังที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน มีปริมาณสารโมนาโคลินสูงสุด ซึ่งมากกว่าที่เลี้ยงในอาหารสูตรปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาความหนืดของอาหารเหลวที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในวันที่ 7 และ วันที่ 10 เพื่อตรวจสอบการย่อยสลายตัวเอง หรือการหลั่งสารออกนอกเซลล์

2. การแยกเส้นใยออกจาก pellet ไม่สามารถแยกได้อย่างแท้จริง เนื่องจากใช้การแยกด้วยสายตา

3. ควรมีการใช้ โปรแกรม Image analysis ในการวิเคราะห์รูปภาพ

4. ตัวอย่างอาจมีการเจือจางมากเกินไปทำให้ข้อมูลบางอันไม่ครบถ้วน

5. จากการทดลองพบว่าสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่ผลิตได้นั้นเป็นสารที่หลั่งภายในเซลล์ ต้องมีการทำให้เซลล์แตกก่อนจึงจะพบสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ จากผลที่ได้จะพบสารในวันที่ 14 เนื่องจากเซลล์ได้แตกในระหว่างการเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

นิสา บุตรดา. 2537. การกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส กบ.11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสี และเปรียบเทียบสมบัติบางประการกบ.สายพันธุ์พ่อแม่สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดงและสีเหลือง . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ .

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

เรณู ปิ่นทอง, ลักษณา รุจนะไกรกานต์ และ พัชรีย์ พัฒนากุล "การผลิตไส้กรอกหมู โดยใช้อังคักช่วยเพิ่มสี" วารสารแก่นเกษตร ฉบับที่ 2(2528) อ้างถึงใน ดารณี วโรดมวิจิตร. "การลดไขมันในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแฟรงค์เฟอร์เตอร์โดยใช้สารทดแทนไขมันจำพวกคาร์โบไฮเดรต" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544. หน้า 7.

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

วรรณภา ทาบโลกา . 2529 . ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์. 2550. คลอเลสเตอรอล. พิมพ์ครั้งที่ 5.หมอชาวบ้าน. กรุงเทพฯ

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

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.

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

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

Chun-Lin Lee, Hsi-Kai Hung, Jyh-Jye Wang and Tzu-Ming Pan. 2007. Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU 568

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

under dioscorea medium through the mediation of pH value and ethanol addition. National Taiwan University, Taipei, Taiwan.

Dubois M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-356.

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 K. Hirama .1985. Biosynthesis of ML-236B (compactin) and monacolin K. J Antibiot 38, 444–448.

Endo, A., Hasumi, K., Yamada, A., Shimoda, R. and H. Takeshima. 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. The structure of monascin. J. Chem. Soc. 1961 : 4579-4589.

Fink-Gremmels, J., Dresel, J. and L. Leistner .1991. Use of Monascus extracts as an alternative to nitrite in meat products. **Fleischwirtschaft**, 71, 329-331

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Hirama, M.and Iwashita.1983. Synthesis of Mevilonin 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

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.

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. Appl Microbiol Biotechnol (2007) 73:1197–1202.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nishikawa K., Ohashi M., Kumasaki S. and S. Yamamura. 1988. Monascorubrin structure of monascorubrin and monascamine. J. Am. Chem. Soc. 81 : 6339-6340.

Palo, M.A.L., Vidal-Adeva and M.M. Leticia. 1906. A study on angkak and its production. Philippenes J. Sci. 89 : 1-19

Sabater-Vilar M., Roel F.M. and J. Fink-Gremmels. 1999. Mutagenicity of commercial fermentation products and the role of citrinin contamination. Mutation Research 444 ; 7-16.

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

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

Teng, S. S. and W. Feldheim. 2001. Anka and anka pigment production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.26: 280-282.

Vederas JC, Moore RN, Bigam G and KJ Chan.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 (12): 3694–701.

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

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

Wu, M.T., Ayres, J.C. and P.E. Koehler .1974. Production of citrinin by Penicihm uiridicatrrm on counby-cured ham. Appl. Microbial. 27, 427-428

Wu X., Yuan Z., Han D., Qi T, and Q.Lu .1966. Report of the excavation at Lantian man locality of Gongwangling in 1965. Vertebrata PalAsiatica 10:23-30

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

[Online] : http://www.cyberlipid.org/simple/simple0008.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.อาหาร MYS (Malt yeast extract starch) (วรรณภา, 2529)

เปปโตน	5.0	กรัม
ยีสต์สกัด	3.0	กรัม
มอลต์สกัด	3.0	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	10.0	กรัม
วุ้น	12.0	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร SS (starch soybean) (วรรณภา, 2529)

แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม
แป้งถั่วเหลือง	40	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.อาหารที่ใช้ทดสอบการผลิตโมนาโคลิน

3.1 อาหารสูตรปกติ

วัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้ว ปริมาณ 22.5 กรัม

น้ำ 75 มิลลิลิตร

นำวัตถุดิบทางการเกษตรและน้ำผสมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้วัตถุดิบหนึ่งชนิดต่อหนึ่งฟลาสก์ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จะได้เป็นอาหารมันสำปะหลัง อาหารมันแกว อาหารมันเทศ อาหารมันฝรั่ง และอาหารแห้ว

3.2 อาหารที่เสริมแหล่งไนโตรเจน

วัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ มันฝรั่ง แห้ว ปริมาณ 22.5 กรัม

เปปโตน	5	กรัม
สารสกัดมอลต์	3	กรัม
สารสกัดยีสต์	3	กรัม
น้ำ	75	มิลลิลิตร

นำวัตถุดิบทางการเกษตรและส่วนผสมข้างต้นกับน้ำผสมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้วัตถุดิบหนึ่งชนิดต่อหนึ่งฟลาสก์ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จะได้เป็นอาหารมันสำปะหลัง อาหารมันแกว อาหารมันเทศ อาหารมันฝรั่ง และอาหารแห้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมวัตถุดิบทางการเกษตร

วัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ มันสำปะหลัง มันเทศ มันฝรั่ง และแห้วต้ม มาเตรียมให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ดังแสดงใน รูปที่ ก.1

รูปที่ ก.1 การเตรียมธัญพืชให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร

ส่วนมันแกว แห้วดิบและแห้วต้มจะนำมาสับแบบหยาบ ดังแสดงใน รูปที่ ก.2

รูปที่ ก.2 การเตรียมธัญพืชโดยสับแบบหยาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) (นิสา, 2537)

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

1.2. นำตัวอย่างวัตถุดิบทางการเกษตรประมาณ 22.5 กรัม ใส่ฟอยด์ที่อบไว้แล้ว

1.3. นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อบจนได้น้ำหนักคงที่ใช้เวลาประมาณ 12 – 24 ชั่วโมง

1.4. นำออกมาใส่โถอบแห้ง 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

1.5. นำไปอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักฟอยด์มาหักออกเป็นค่าน้ำหนักแห้ง

2. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ใช้วิธีการเดียวกับการหาน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อได้น้ำหนักแห้งแล้ว ให้นำมาหักออกจากน้ำหนักตัวอย่างก่อบอบ ก็จะได้ค่าความชื้นของตัวอย่าง นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

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

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois, 1956)

สารเคมี

1. ฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

1.1 ชั่งฟีนอล 5 กรัม

1.2 ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 95 มิลลิลิตร

1.3 ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารละลายแป้งมาตรฐาน 10000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1 ชั่งแป้ง 1 กรัม

2.2 ละลายด้วยน้ำกลั่น

2.3 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์

วิธีการวิเคราะห์

1. การทำกราฟมาตรฐาน

1.1 นำสารละลายแป้งมาตรฐานความเข้มข้น 10000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 ปิเปตสารละลายแป้งมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

1.3 เติม 5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายฟีนอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.4 เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.5 ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง

1.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของสารละลายแป้ง

2. หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง

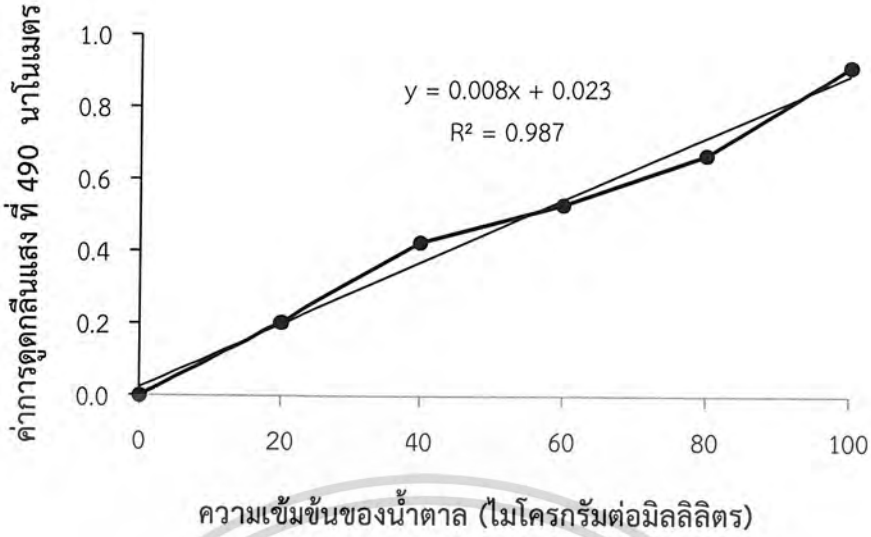
2.1 นำตัวอย่างมาทำการเจือจางเป็นลำดับขั้น ขั้นละ 10 เท่า (serial dilution)

2.2 ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร) =

$$\frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร) x (อัตราการเจือจาง)}}{\text{(ความชันของกราฟมาตรฐาน) X 100}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลวัดโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

สมการเส้นตรง (Y) = 0.008x + 0.023

R^2 = 0.987

4. การวิเคราะห์สารโมนาโคลินด้วยเครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography) (ดัดแปลงจาก Chun-Lin Lee, 2007)

4.1 วิเคราะห์ด้วย SHIMADZU HPLC ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร ด้วยคอลัมน์ μBondapak ^{TM} C_{18} (3.9x300 mm) mobile phase ที่ใช้ คือ Acetonitrile : Water (55:45) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

4.2 การเตรียมสารโมนาโคลินมาตรฐาน

4.2.1 นำโมนาโคลินมาตรฐานมาละลายในเอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มข้น 640 มิลลิโมลาร์

4.2.2 นำมาเจือจางเป็นความเข้มข้น 320 160 106.67 80 64 มิลลิโมลาร์

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

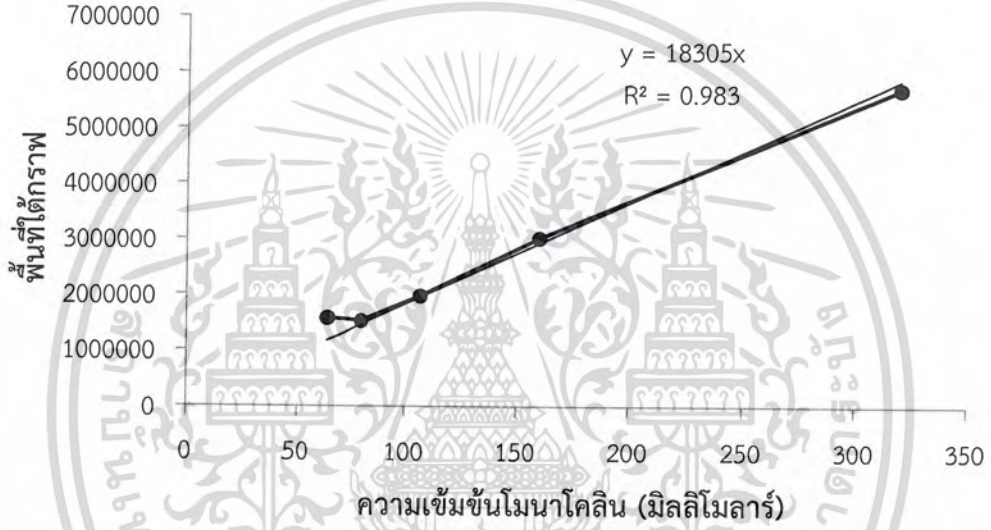
4.2.4 นำพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.3.1 นำตัวอย่างที่ผ่านการ screen ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร มาผสมอะซิโตไนไตรท์ในอัตราส่วนของ อะซิโตไนไตรท์ : ตัวอย่าง (55:45) จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์

4.3.2 นำพื้นที่ใต้กราฟที่เวลาเดียวกับกราฟมาตรฐานไปเทียบเพื่อหาปริมาณของโมนาโคลิน



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานโมนาโคลินวัดโดยใช้เครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง

สมการ $y = 18305x$

ให้ y = ค่าพื้นที่ใต้กราฟ

ให้ x = ความเข้มข้นของโมนาโคลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้