สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสร้างสารโมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว โดยใช้ข้าวเสาไห้เป็นแหล่งคาร์บอน

The Monacolin production by solid-state cultivation and submerged cultivation of *Monascus purpureus* using Sao-Hai polished rice as C-source

T130316

นางสาวชุติมา โฉมขวัญ

นางสาวณัฐสิญา อัครศิวานนท์

นายนิทัศน์ สุวรรณประเสริฐ

วพ.
2557
1555

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน. 130316
วัน,เดือน,ปี. 4 ส.ค. 2557

b 12581914
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The monacolin production by solid-state cultivation and submerged cultivation of *Monascus purpureus* using Sao-Hai polished rice as C-source

MISS CHUTHIMA CHOMEKHWAN

MISS NUTSIYA ASKARASIWANON

MISTER NITHAT SUWANPRASERT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การสร้างสารโมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว โดยใช้ข้าวเสาไห้เป็นแหล่งคาร์บอน

The monacolin production by solid-state cultivation and submerged cultivation of *Monascus purpureus* using Sao-Hai polished rice as C-source

ชื่อนักศึกษา

นางสาวชุติมา	โฉมขวัญ	52050302
นางสาวณัฐสิญา	อัครศิวานนท์	52050313
นายนิทัศน์	สุวรรณประเสริฐ	52050334

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2555

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การสร้างสาร โมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว โดยใช้ข้าวเสาไห้เป็นแหล่งคาร์บอน		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวชุติมา	โฉมขวัญ	52050302
	นางสาวณัฐสิญา	อัครศิวานนท์	52050313
	นายนิทัศน์	สุวรรณประเสริฐ	52050334
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์		

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Monacolin จากเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารแข็งข้าวเสาไห้ โดยกำหนดค่าความชื้นเริ่มต้นที่แตกต่างกัน พบว่าสภาวะที่ 3.1 สามารถผลิตสารสีได้มากที่สุด สามารถผลิตสารสีได้ปริมาณ 4.2 $U_{500\ nm}$ ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งได้จากการเก็บตัวอย่างในวันที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่มีการพบสาร Monacolin คือ สภาวะที่ 3.3 ที่มีความชื้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์และสามารถผลิตสาร Monacolin ปริมาณ 1.78 มิลลิโมลาร์ต่อกรัมสับสเตรท ในวันที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ การศึกษาการผลิต Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญในอาหารเหลวข้าวเสาไห้ และข้าวกล้องหอมมะลิ พบว่าสามารถผลิตสาร Monacolin ในปริมาณ 0.217 มิลลิโมลาร์ และ 0.249 มิลลิโมลาร์ (ตามลำดับ) การผลิตสาร Monacolin จากเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง ให้ผลดีกว่า การเจริญในอาหารเหลว ที่ใช้แหล่งคาร์บอนเดียวกันแต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญในอาหารเหลวต่อไป

คำสำคัญ : *Monascus purpureus*, Monacolin, ข้าวเสาไห้, ข้าวกล้องหอมมะลิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The monacolin production by solid-state cultivation and submerged cultivation of *Monascus purpureus* using Sao-Hai polished rice as C-source	
Students	MissChuthima	Chomekhwan
	MissNutsiya	Askarasiwanon
	MisterNithat	Suwanprasert
Degree	Bachelor of Science	
Major Program	Biotechnology	
Academic Year	2012	
Advisor	Asst. Prof.Dr. Somchai Krairak	

ABSTRACT

The monacolin production by *M. purpureus* was studied by various initial moisture contents forthe optimal condition in solid state fermentation. It was found that condition 3.1 presented the maximal amount of pigment production (4.2 $U_{500\ nm}$/g-DS) at 30-day of cultivation. In case of condition 3.3, the maximal monacolin production was found at 1.78 mM/g-DS) with moisture content of 60% on 15-day of cultivation. The monacolin production by *M. purpureus* was also studied in submerged fermentation. It was found that the cultivation with Sao Hai Rice medium and Thai Hom Mali Brown Rice medium presented the maximal monacolin production of 0.217 mM and 0.249 mM, respectively. In comparison, the monacolin production by solid state fermentation was higher that one with submerged fermentation. However, the optimal condition for submerged fermentation could be further studied.

Keywords : *Monascus purpureus*, Monacolin, Sao-Hai polished rice, Thai Hom Mali Brown Rice

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่อง การศึกษาสาร Monacolin จากการหมักเชื้อรา *Monascus purpureus* บนอาหารแข็งและในอาหารเหลวซึ่งโครงงานพิเศษฉบับนี้จะไม่สามารถสำเร็จบรรลุจุดประสงค์ไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา และความช่วยเหลือในทุกๆด้าน ตลอดจนกรุณาช่วยแก้ไขงานวิจัยนี้ให้สมบูรณ์ ซึ่งทางคณะผู้จัดทำมีความซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิก-คืนสารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำในเรื่องต่างๆ รวมไปถึงคุณป้าแม่บ้านที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่างๆ ในการทำการทดลอง

ขอกราบขอบคุณบิดา มารดา ตลอดจนญาติพี่น้องทุกๆท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาต่างๆ ในการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ ตลอดมา อีกทั้งยังให้ยืมอุปกรณ์ และสารเคมี ต่างๆในการทดลอง

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงงานพิเศษฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจหรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

นางสาวชุติมา โฉมขวัญ
นางสาวณัฐสิญา อัครศิวานนท์
นายนิทัศน์ สุวรรณประเสริฐ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		II
กิตติกรรมประกาศ		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		VIII
สารบัญรูป		IX
บทที่ 1 บทนำ		1
1.1	ความสำคัญและที่มาโครงการพิเศษ	1
1.2	วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	3
1.3	ขอบเขตโครงงานพิเศษ	3
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ		4
2.1	โรคหลอดเลือดหัวใจ	4
2.2	คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา	5
	2.2.1 กลไกการออกฤทธิ์	6
	2.2.2 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสเตติน	7
	2.2.3 ปริมาณยาและการจัดเตรียมยา	9
	2.2.4 ประโยชน์ในการรักษา	9
2.3	ประวัติความเป็นมาของข้าวแดง	9
2.4	ลักษณะรูปร่างของเชื้อรา *Monascus* spp.	11
2.5	สายพันธุ์ต่างๆของเชื้อรา *Monascus* spp.	13
2.6	คุณสมบัติและโครงสร้างของรงควัตถุจากเชื้อรา *Monascus* spp.	15
2.7	ประโยชน์ของสารที่สร้างจากเชื้อรา *Monascus* spp.	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

		หน้า
2.7.1	โมนาโคลิน เค (Monacolin K)	21
2.7.2	ประวัติในการศึกษาสารโลวาสแตติน	22
2.7.3	การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา	23
2.7.4	กระบวนการสังเคราะห์สารโลวาสแตติน	24
2.7.5	กลไกการทำงานของโลวาสแตติน	25
2.8	ซิตรินิน (Citrinin)	27
2.8.1	คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ	27
2.8.2	การศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษ	28
2.8.3	ความเสถียร (Stability)	29
2.8.4	ซิตรินินจากเชื้อรา *Monascus* spp.	29
2.9	ความสัมพันธ์ระหว่างเมตาบอลิซึมปฐมภูมิและเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ	31
2.10	ผลิตภัณฑ์อื่นที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* spp.	31
2.11	การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* spp. บนอาหารแข็ง	32
2.11.1	สายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* spp.	32
2.11.2	ซับสเตรท	33
2.11.3	พีเอช	33
2.11.4	อุณหภูมิ	34
2.11.5	อัตราส่วนของก๊าซ	34
2.11.6	ความชื้น	34
บทที่ 3วิธีดำเนินงานวิจัย		36
3.1	เชื้อจุลินทรีย์	36
3.2	อาหารเลี้ยงเชื้อ	36
3.3	อาหารที่ใช้ทดสอบการผลิต Monacolin	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

		หน้า
3.4	อุปกรณ์	36
3.5	เครื่องมือ	37
3.6	วิธีการทดลอง	37
	3.6.1 เชื้อรา *M. purpureus*	37
	3.6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	37
	3.6.2.1 MYS Agar	37
	3.6.2.2 SS medium	38
	3.6.3 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น	38
	3.6.4 การเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารแข็ง (Solid state cultivation)	38
	3.6.5 การเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลว (Submerged cultivation)	40
3.7	การวิเคราะห์	41
	3.7.1 การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส	41
	3.7.2 การหาปริมาณความชื้นของตัวอย่าง	41
	3.7.3 การสกัดสารสี	42
	3.7.4 การวิเคราะห์สาร Monacolin โดย HPLC	42
บทที่ 4	**ผลการวิจัยและอภิปรายผล**	43
4.1	การผลิต Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง	43
	4.1.1 ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตสาร Monacolin	43
4.2	ศึกษาการผลิตสาร Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารเหลว	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.2.1 ศึกษาปริมาณข้าวต่อการเจริญของเชื้อ *M. purpureus* ในอาหารเหลว 52

4.2.2 ศึกษาผลของ Tween80 ต่อการเจริญของเชื้อ *M. purpureus* ในอาหารเหลว 54

บทที่ 5 สรุปผลวิจัย 56

ข้อเสนอแนะ 57

เอกสารอ้างอิง 58

ภาคผนวก ก. 67

ภาคผนวก ข. 70

ภาคผนวก ค. 76

ภาคผนวก ง. 78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ค่าทางเภสัชพลศาสตร์ของยาในกลุ่มสแตติน	8
2.2	สายพันธุ์ต่างๆของเชื้อรา *Monascus* spp.	13
2.3	สารเมแทบอไลต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อรา *M. purpureus*	20
3.1	สภาวะต่างๆที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ	40
4.1	แสดงการเติมน้ำในข้าวเสาไห้ที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ	43
4.2	แสดงการผลิตสาร Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารข้าวเสาไห้	52
4.3	แสดงการผลิตสาร Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลวที่มีปริมาณข้าว 3 กรัมและเติม Tween80 ที่มีปริมาณแตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตร	54
ค.1	กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวัดโดยวิธี Somagyi - Nelson ที่ความยาวคลื่น520 นาโนเมตร	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของโลวาสแตติน และ HMG - CoA	6
2.2	วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* spp.	12
2.3	โครงสร้างเคมีของรงควัตถุหรือสารสีที่แยกได้จาก *Monascus* sp.	16
2.4	กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงที่ละลายน้ำได้ โดยเชื้อรา *Monascus rubber*	17
2.5	โครงสร้างของ Monacolin K หรือ โลวาสแตติน	21
2.6	โครงสร้างของสาร Lovastatin (A) และ Compactin (B)	23
2.7	กระบวนการสังเคราะห์สารโลวาสแตติน	24
2.8	**A**: กระบวนการในการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล เมื่อ HMG-CoA reductase ทำปฏิกิริยายับยั้งการเกิดคลอเลสเตอรอล	26
	B: ผลของยาที่เป็นตัวกลางในเซลล์ Endothelial และเนื้อเยื่ออื่นๆ	26
2.9	โครงสร้างของซิตรินิน	27
4.1	การเจริญของเชื้อรา *M. Purpureus* บนอาหารข้าวเสาไห้ ในสภาวะที่ 1 โดยเติมน้ำปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อโดยแสดง (■) ปริมาณสารสี และ (●) ปริมาณความชื้น ที่เวลาต่างๆ	44
4.2	การเจริญของเชื้อรา *M. Purpureus* บนอาหารข้าวเสาไห้ ในสภาวะที่ 2.1 โดยเติมน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่สองอีก 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อโดยแสดง (■) ปริมาณสารสี และ (●) ปริมาณความชื้น ที่เวลาต่างๆ	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.3	การเลี้ยงเชื้อรา *M. Purpureus* บนอาหารแข็ง ในสภาวะที่ 2.2 เติมน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่สองเพิ่มอีก 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ (■) ปริมาณสารสี (●) ปริมาณความชื้น	46
4.4	การเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* บนอาหารแข็ง ในสภาวะที่ 2.3 เติมน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่สองเพิ่มอีก 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 9 ของการ เลี้ยงเชื้อ (■) ปริมาณสารสี (●) ปริมาณความชื้น	47
4.5	การเจริญของเชื้อรา *M. Purpureus* บนอาหารข้าวเสาไห้ ในสภาวะที่ 3.1 เติมน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่ 2 และ 3 เพิ่มอีก 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 3 และ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตามลำดับ) โดยแสดง (■) ปริมาณสารสี และ (●) ปริมาณความชื้น ที่เวลาต่างๆ	48
4.6	การเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* บนอาหารข้าวเสาไห้ ในสภาวะที่ 3.2 เติมน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 อีก 5 มิลลิลิตร ใน วันที่ 3 และ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตามลำดับ) โดยแสดง (■) ปริมาณสารสี และ (●) ปริมาณความชื้น ที่เวลาต่างๆ	49
4.7	การเจริญของเชื้อรา *M. Purpureus* บนอาหารข้าวเสาไห้ ในสภาวะที่ 3.3 เติมน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 อีก 5 มิลลิลิตร ใน วันที่ 3 และ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตามลำดับ) โดยแสดง (■) ปริมาณสารสี และ (●) ปริมาณความชื้น ที่เวลาต่างๆ	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.8	กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารแข็งข้าวเสาไห้ สภาวะที่ 1 เติมน้ำครั้งแรก 15 มิลลิลิตร (▲), สภาวะที่ 2.1 เติมน้ำครั้งแรก 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่สองวันที่ 3 (△), สภาวะที่ 2.2 เติมน้ำครั้งแรก 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่สองในวันที่ 6 (○), สภาวะที่ 2.3 เติมน้ำครั้งแรก 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่สองในวันที่ 9 (●), สภาวะที่ 3.1 เติมน้ำครั้งแรก 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่ 2 และ 3 ในวันที่ 3 และ 6 (□), สภาวะที่ 3.2 เติมน้ำครั้งแรก 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่ 2 และ 3 ในวันที่ 3 และ 9 (■), สภาวะที่ 3.3 เติมน้ำครั้งแรก 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่ 2 และ 3 ในวันที่ 3 และ 12(✳)	51
4.9	แสดงลักษณะของเส้นใยที่มีปริมาณข้าวแตกต่างกัน (A) ข้าว 3 กรัม, (B) ข้าว 5 กรัม, (C) ข้าว 10 กรัม และ (D) ข้าว 15 กรัม	53
ก.1	การเตรียมข้าวเสาไห้ให้มีปริมาณเป็น 50 กรัม (อาหารแข็ง), และ ปริมาณเป็น 3 กรัม (อาหารเหลว)	68
ก.2	การเตรียมข้าวกล้องหอมมะลิให้มีปริมาณเป็น 50 กรัม (อาหารแข็ง), และ ปริมาณเป็น 3 กรัม (อาหารเหลว)	69
ข.1	กราฟมาตรฐาน Monacolin วัดโดยเครื่องHPLC	75
ค.1	กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวัดโดยวิธี Somagyi Nelson ที่ความยาวคลื่น520 นาโนเมตร	77
ง.1	เชื้อรา *M. purpureus* อายุ 7 วัน บนอาหาร MYS	78
ง.2	เชื้อรา *M. purpureus* อายุ 0 วัน บนอาหาร MYS เป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อ *M. purpureus*	78
ง.3	เชื้อรา *M. purpureus* อายุ 14 วัน บนอาหาร MYS	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่		หน้า
ง.4	เชื้อรา *M. purpureus* ในอาหาร SS broth เขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 4 วัน	78
ง.5	การเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารแข็ง บ่มบนเครื่องหมุนขวดที่อุณหภูมิห้อง	79
ง.6	แสดงการสกัดสารสีและสาร Monacolin ที่มีการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารแข็ง	79
ง.7	การเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลว อายุ 14 วัน เขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส	80
ง.8	ตัวอย่างเมล็ดข้าวเสาไห้และข้าวกล้องหอมมะลิที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงเชื้อ *M. purpureus* ในอาหารแข็งและอาหารเหลว	80
ง.9	การเก็บตัวอย่างการเลี้ยงเชื้อ *M. purpureus* ในอาหารแข็ง	80
ง.10	การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสด้วย วิธี Somogyi – Nelson	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาโครงการพิเศษ

โรคหัวใจ (Heart disease) หรือ โรคที่เกิดกับหัวใจ ซึ่งมีได้หลายโรค แต่ที่พบบ่อยที่สุด เป็นปัญหาทางสาธารณสุข และเป็นสาเหตุการเสียชีวิต ได้สูงติด 1 ใน 4 ของสาเหตุการเสียชีวิตของประชาชนเกือบทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย คือ โรคหัวใจที่เกิดจากโรคของหลอดเลือดหัวใจ หรือ ที่เรียกว่า โรคหลอดเลือดหัวใจ (Coronary artery disease หรือ Coronary heart disease)

โรคหลอดเลือดหัวใจ คือ โรคเกิดจากหลอดเลือดหล่อเลี้ยงหัวใจ ซึ่งมีชื่อเรียกว่า Coronary artery ตีบแคบเล็กลง หรือ ตีบตัน จึงส่งผลให้กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด หรือ กล้ามเนื้อหัวใจตาย หัวใจจึงทำงานผิดปกติ ส่งผลถึงอวัยวะต่างๆขาดเลือดไปด้วย จึงเกิดมีอาการต่างๆได้มากมาย

โรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นโรคของผู้ใหญ่ตั้งแต่วัยหนุ่มสาว ไปจนถึงในผู้สูงอายุ โดยพบได้สูงตั้งแต่อายุ 40 ปีขึ้นไป ในช่วงวัยเจริญพันธ์ พบโรคหลอดเลือดหัวใจในผู้ชายได้สูงกว่าในผู้หญิง แต่หลังจากหมดประจำเดือนถาวรแล้ว ทั้งผู้หญิงและผู้ชายมีโอกาสเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจได้ใกล้เคียงกัน

คลอเรสเตอรอลจะถูกนำพาไปในหลอดเลือดในรูปของอนุภาคเล็กๆ (Particles) ที่มีขนาดและความหนาแน่น (Density) ต่างๆ กันพร้อมๆ กับโปรตีนที่มีความเกี่ยวโยงกับคลอเรสเตอรอล คือ lipoproteins ซึ่งคลอเรสเตอรอลจึงแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ LDL cholesterol, HDL cholesterol คลอเลสเตอรอล(Cholesterol) เป็นทั้งสาร สเตอรอยด์ (Steroid) ลิปิด (Lipid) และ แอลกอฮอล์ (Alcohol) พบใน ผนังเซลล์(Cell membrane) ของทุกเนื้อเยื่อในร่างกาย ถูกขนส่งในกระแสเลือดของสัตว์ คอเลสเตอรอลส่วนใหญ่ไม่ได้มากับอาหารแต่จะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในร่างกาย จะสะสมอยู่มากในเนื้อเยื่อของอวัยวะที่สร้างมันขึ้นมาเช่น ตับ ไขสันหลัง (Spinal cord) สมอง และ ผนังหลอดเลือดแดง (Atheroma) คอเลสเตอรอลมีบทบาทในกระบวนการทางชีวเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากมาย เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (Cardiovascular disease) และภาวะคลอเลสเตอรอลในเลือดสูง

ไขมันในโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงข้อหนึ่งของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ การเปลี่ยนแปลงอาหาร และการออกกำลังกายสามารถลดระดับไขมันในหลอดเลือดได้ ถ้าหากคลอเลสเตอรอล ในเลือดสูง ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดแดง มีลักษณะเป็นคราบ (Plaque) ทำให้หลอดเลือดแดงแคบลงส่งผลให้หลอดเลือดแข็ง และตีบ (Atherosclerosis) โดยก่อให้เกิดอาการเจ็บหน้าอกเนื่องจากหัวใจขาดเลือด หรือ อัมพฤกษ์ หากคราบไขมันหลุดจากผนังหลอดเลือดแล้วไปอุดตันในเส้นเลือดจะทำให้เกิดอาการหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (Stroke) เพื่อแก้ ปัญหาการโรคดังกล่าว จึงมีการศึกษาผลิตยาลดระดับไขมันในเลือดซึ่งนับวันจะมีความ สำคัญ และมีความจำเป็นมากขึ้น ซึ่งยาที่ลดระดับไขมันมีหลายชนิด เช่น Niasin Bezafibrate Gemfibrozil และกลุ่มสแตติน (Statins) เป็นต้น โดยยากลุ่มสแตตินมีความสำคัญในการออกฤทธิ์ โดยยับยั้งการทำงานของตัวควบคุมการสร้างคลอเลสเตอรอล (Rate controlling enzyme) ให้ลดลง ทำให้ไขมันบางชนิดในเลือด คือ Low-density lipoproteins (LDL) ซึ่งเป็นไขมันชนิดไม่ดี ถ้ามีมากจะทำให้เกิดหลอดเลือดตีบได้ โดยพาคลอเลสเตอรอลจากตับไปสู่ร่างกาย ถ้ามีคลอเลสเตอรอล และไขมันไปเกาะอยู่ตามผนังของหลอดเลือด จะส่งผลให้ลดการไหลเวียนของเลือดในร่างกาย ทำให้ออกซิเจนที่ไปเลี้ยงหัวใจ สมอง และส่วนต่างๆ ของร่างกายลดลงตามไปด้วย แต่ถ้ามีคลอเลสเตอรอล และไขมันในเลือดต่ำจะเป็นการช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจ การไหลเวียนโลหิตในหลอดเลือด ปวดเค้นอก สมองขาดเลือด และหัวใจวายได้ จึงศึกษาการผลิตยาให้ได้มากที่สุด ในเวลาที่รวดเร็ว และลงทุนต่ำ โดยสกัดยากลุ่มนี้ได้จากเชื้อรา เช่น *Aspergillus terreus,Penicillium citrinum* (Armstrong และคณะ2005) และ *Monascus* sp. (Endo, 1992)

เชื้อรา Monascus (*Monascus* spp.) จัดอยู่ใน Kingdom Myceteae, Division Amastigomycota, Subdivision Ascomycotina, Family Monascaceae, Class Ascomycetes,Subclass Plectomycetidae, Order Eurotiales (Alexopoulos และ Mims, 1979; Hawksworth และคณะ1995) เส้นใยมีผนังกั้น (Septate) มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ (Sexual) และไม่อาศัยเพศ (Asexual) เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย และมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวอาหารแข็ง เมื่อเริ่มงอกเส้นใยมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือสีแดงอมม่วง เจริญได้ดีบนอาหารแข็งในรูปของข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แดง (อังคัก) เชื้อรา *Monascus* spp. จัดเป็นพวกเชื้อราโฮโมแทลลิก (Homothallic fungi) (Alexopoulos และ Mims, 1979) นอกจากนี้ยังจัดเป็นพวกเชื้อราที่ทนความแห้ง (Xerophilic molds) และทนความร้อน (Thermophilic molds) (Young, 1930)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตสาร Monacolin จาก *M. purpureus* ในระดับฟลาสก์

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ที่ดีที่สุด

1.2.3เพื่อเปรียบเทียบวัตถุดิบทางการเกษตรระหว่างข้าวเสาไห้ และข้าวกล้องหอมมะลิในการเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* และการผลิตสาร Monacolin

1.2.4เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในข้าวสาวไห้ และข้าวกล้องหอมมะลิ

1.3 ขอบเขตโครงงานพิเศษ

ศึกษาการเจริญ การผลิตสาร Monacolin บนอาหารแข็ง และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่เกี่ยงข้อง ได้แก่ ปริมาณความชื้น น้ำตาลกลูโคส ค่า pH และ ปริมาณสารลดแรงตึงผิว (Tween 80)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* บนข้าวสาวไห้ และข้าวกล้องหอมมะลิ เพื่อให้ได้สาร Monacolin มากที่สุด

1.4.2 ทราบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้น น้ำตาลกลูโคสในระบบ ค่า pH และปริมาณสารลดแรงตึงผิว (Tween 80) ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* เพื่อนำไปใช้ในการผลิตสาร Monacolin

1.4.3 มีความรู้ความเข้าใจในการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* บนข้าวเสาไห้ และข้าวกล้องหอมมะลิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 โรคหลอดเลือดหัวใจ (พวงทอง, 2554)

สาเหตุของโรคหลอดเลือดหัวใจ คือ การมีไขมันจับที่ผนังของหลอดเลือดหัวใจ ที่เรียกว่า พลัค (Plague) จึงส่งผลให้ผนังหลอดเลือดแข็ง หนา ช่องในหลอดเลือดจึงตีบแคบลง และเมื่อพลัคนี้ก่อให้เกิดการอักเสบของผนังหลอดเลือด หรือ ผนังหลอดเลือดบาดเจ็บเสียหาย ร่างกายจะซ่อมแซมผนังส่วนเสียหายโดยการจับตัวเป็นก้อนของเกร็ดเลือด และเม็ดเลือดขาว จึงยิ่งส่งผลให้ช่องในหลอดเลือดตีบแคบลงอีก เลือดจึงหล่อเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจลดลง จึงเกิดเป็นโรค กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และบ่อยครั้ง การซ่อมแซมจากร่างกายนี้ ก่อให้หลอดเลือดถึงอุดตัน จึงส่งผลให้เกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเหตุขาดเลือด ซึ่ง อาจเกิดได้อย่างเฉียบพลัน และเมื่อรุนแรง จะเป็นสาเหตุให้หัวใจหยุดทำงานทันที จึงเสียชีวิตได้ทันที กะทันหัน

นอกจากนั้น หลอดเลือดหัวใจ ยังสามารถบีบหดตัวได้ ดังนั้นเมื่อมีการหดตัวของหลอดเลือด จึงส่งผลให้รูท่อหลอดเลือดตีบแคบลง จึงเกิดภาวะหัวใจขาดเลือดได้ เช่น จากภาวะมีความเครียดสูง เป็นต้น

คลอเรสเตอรอลที่เป็นอนุภาคที่มีความหนาแน่นน้อย (Low density) คือ LDL cholesterol ที่หมายถึงคลอเรสเตอรอลที่เลว "Bad cholesterol" เพราะหากมีปริมาณมากก็หมายถึงความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (Coronary heart disease) เพราะ LDL ที่เป็น Lipoprotein จะไปจับหรือฝังอยู่ในผนังหลอดเลือดจนแข็ง หนา เกิดเป็นสารที่เรียกว่า ก้อนไขมันอุดตัน (Cholesterol plaque) โดยใช้เวลาระยะหนึ่งก้อนพลัคนี้จะทำให้เกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดตีบแคบ กระบวนการนี้เรียกว่า เกิดการแข็งตัวของหลอดเลือด (Atherosclerosis)

คลอเรสเตอรอลที่ถูกนำพาไปในรูปของอนุภาคที่มีความหนาแน่นสูง (High Density) คือ HDL cholesterol ซึ่งจัดเป็นคลอเรสเตอรอลที่ดี "Good cholesterol" เพราะอนุภาคของ HDL cholesterol จะป้องกันกระบวนการที่ทำให้หลอดเลือดแข็งตัว โดยการสกัดคลอเลสเตอรอลที่ฝังตัวในหลอดเลือดและนำไปตัดทิ้งที่ตับ ด้วยเหตุนี้จึงมีการตรวจหาระดับคลอเลสเตอรอลทั้งสองนี้แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำมาเปรียบเทียบ หาอัตราส่วน (LDL/HDL ratios) ที่จะช่วยประเมินปัจจัยเสี่ยง (Risk factors) ต่อหลอดเลือดแข็งตัวดังกล่าว ค่าที่ดีคือ LDL cholesterol มีค่าต่ำ ในขณะที่ HDL cholesterol มีค่าสูง (Low LDL/HDL ratios)

2.2 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา (จันทนี, 2545)

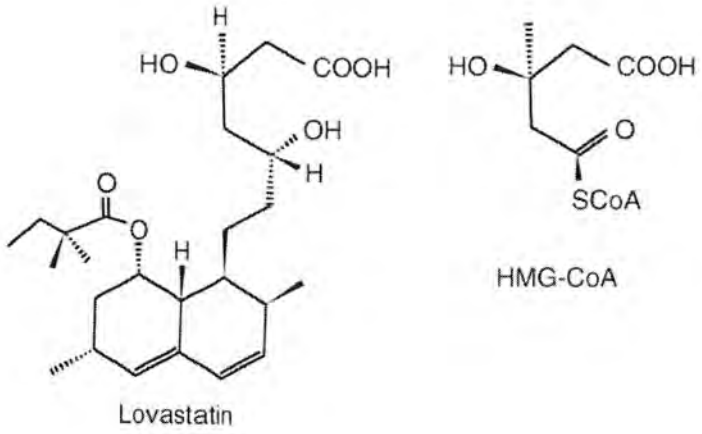
สารประกอบไขมันในเลือดจะประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์ (Triglycride) คลอเลสเตอรอลอิสระ (Free cholresterol) คลอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (Cholresterol ester)และฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) ซึ่งไขมันเหล่านี้ไม่สามารถรวมกับน้ำได้ จึงต้องรวมกับโปรตีน (Apoprotein) และไหลเวียนตามกระแสเลือดในรูปของไลโพโปรตีน เมื่อในเลือดมีสารเหล่านี้ในความเข้มข้นสูง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

ยาลดไขมันในเส้นเลือด (Antihyperlipidaemic drug) มีอยู่หลายชนิด แต่ละชนิดมีคุณสมบัติและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน ได้แก่

1. Nicotinic acid ได้แก่ (Vitamin B3)
2. Fibric acid derivative หรือ Fibrate ได้แก่ bezafibrate, gemfibrozil, fenofibrate
3. Bile acid sequestrans ได้แก่ cholestyramine และ cholestipol
4. Statin (Hydroxyl-metylglutaryl-coenzymeA(HMG-CoA)reductase inhibitor)
5. Miscellaneous ได้แก่ probucol

สารโลวาสแตติน เป็นยาในกลุ่มสแตติน ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (HMG-CoA reductase inhibitor) ยากลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ HMG-CoA ดังรูปที่ 2.1 จะออกฤทธิ์ยับยั้งแบบผันกลับได้โดยไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Reversible competitiveinhibitor) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ตัวอย่างกลุ่มสแตตินได้แก่ Pravastatin, Fluvastatin และ Atorvastatin เป็นต้น ปัจจุบันอาจกล่าวได้ว่ายาในกลุ่มสแตตินนี้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลด LDL-C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของโลวาสแตติน และ HMG-CoA

ที่มา : Ryan TJ และคณะ, 1999

2.2.1 กลไกการออกฤทธิ์

ยากลุ่มสแตตินออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลในตับ โดยเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (3-hydroxyl-3-metylglutaryl-coenzyme A) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสร้างคลอเลสเตอรอล (Rate controlling enzyme) ให้ลดลง ผลที่ตามมาคือ ทำให้มีหารเพิ่มปริมาณของตัวรับไลโพโปรตีน (LDL receptor) ที่ผนังเซลล์ของตับ เพื่อที่จะเพิ่มการจับ LDL จากเลือดทำให้ LDL-C ลดลง

โดยในทางคุณสมบัติทางเภสัชจลศาสตร์ พบว่าสารโลวาสแตตินไม่สามารถแสดงฤทธิ์ได้ในรูปปกติ (Prodrugs) จำเป็นต้องเปลี่ยนเป็นยาในรูปแบบที่ออกฤทธิ์ได้ (Active drugs) ยาในกลุ่มนี้จะเกิดกระบวนการภายหลังจากที่รับประทานยาเข้าสู่ร่างกาย และมีการขจัดยาผ่านตับก่อนที่ยาจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตและออกฤทธิ์ (First-pass metabolism) สูง พบว่าปริมาณยาเพียงร้อยละ 5-20 ของขนาดยาที่เข้ากระแสเลือด และจับกับโปรตีนในเลือดสูงถึงร้อยละ 95 ระดับยาในเลือดจะออกฤทธิ์สูงสุดภายในเวลา 1-4 ชั่วโมง หลังการรับประทานอาหารร้อยละ 70 ของยา

กลุ่มนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงแล้วถูกขับออกทางตับ คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามีดังนี้

1.สามารถลด LDL-C ได้ร้อยละ 20-55 ขึ้นกับขนาดของยาที่ใช้ในระดับความเข้มข้นต่างๆต่อคลอเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งจะเกิดขึ้น 4-6 สัปดาห์ภายหลังการรับประทานยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.สามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในผู้ป่วยที่มีระดับของไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงกว่า 250 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ได้ร้อยละ 20-40 โดยเฉพาะการใช้ขนาดยาที่ความเข้มข้นสูง (High potency statins) ซึ่งได้แก่ Simvastatin และ Atovastatin ดังนั้นอัตรากรลดไตรกลีเซอไรด์จึงขึ้นกับขนาดของยาเช่นกัน

3.สามารถเพิ่มระดับ HDL-C (High density lipoprotein-cholresterol) ได้ร้อยละ 5-10 โดยแสดงความสามารถในการออกฤทธ์ยาในกลุ่มสแตติน ได้ดังตาราง 2.1

2.2.2 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน

(ก) ผลกระทบต่อตับทำให้เอนไซม์ Transaminase ในกระแสเลือดมีการทำงานเพิ่มขึ้นราว 3 เท่าของค่าปกติ พบได้ประมาณร้อยละ 1 ซึ่งมักจะเป็นแบบชั่วคราว และไม่ทำให้เกิดพิษต่อตับ ดังนั้นจึงควรวัดการทำงานของเอนไซม์ Amino transferase เพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 3 เท่าของค่าปกติ

(ข) ผลกระทบต่อกล้ามเนื้อ อาการที่ไม่พึงประสงค์ที่พบรองลงมาคือกิจกรรม Creatine kinase (CK) สูงขึ้น โดยเอนไซม์ตัวนี้เร่งการขนย้ายหมู่ฟอสเฟตจาก Creatine phosphate ไปยัง Adenosine dipfosphate (ADP) และในขั้นสุดท้ายได้ Adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ เอนไซม์ CK มีเฉพาะในกล้ามเนื้อ และพบได้ในบางเนื้อเยื่อสมอง กระบวนอิเล็คโตรโฟซิสสามารถแยกเอนไซม์ CK ได้อย่างน้อย 3 ตัว โดยที่ CK จากกล้ามเนื้อลายและสมองมีเพียงกลุ่มเดียวแต่ต่างตำแหน่งกัน ส่วน CK จากกล้ามเนื้อหัวใจจะให้ 2 กลุ่มโดยที่กลุ่มหนึ่งคล้ายกับของกล้ามเนื้อลาย ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งอยู่ระหว่าง CK ของกล้ามเนื้อลายและเนื้อเยื่อสมอง เมื่อพบว่ากิจกรรมของ CK ในซีรั่มสูงกว่าปกติ โดยจะเริ่มเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 3-6 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดใน 24-36 ชั่วโมง มีผลทำให้หัวใจวายได้ จึงเหมาะที่จะนำมาตรวจภาวะของหัวใจวาย เมื่อเริ่มรู้สึกว่ามีการเจ็บหน้าอก แต่เอนไซม์ตัวนี้จะถูกกำจัดออกจากพลาสม่าได้โดยเร็วจึงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้กลับสู่สภาวะปกติได้ภายในเวลา 3 วัน โดยเมื่อเทียบกับเอนไซม์ตัวอื่น เช่น SGOT LDH เป็นต้น และอาจทำให้เกิดความผิดปกติของกล้ามเนื้อ (Myopathy) โดยเฉพาะเมื่อใช้ยากลุ่มนี้ร่วมกับยาลดไขมันในเลือดกลุ่ม Fibric acid derivativeและ nicotinic acid ส่วนยาอื่นๆ ที่จะมีผลทำให้อาการไม่พึงประสงค์ต่อกล้ามเนื้อถ้าให้ร่วมกับยาในกลุ่มสแตตินได้แก่ ยาที่ถูกเมแทบอไลต์โดย Cytochrom P450 family 3 subfamily A และ polypeptide 4 (CYP3A4) เช่นเดียวกับสแตติน ได้แก่ Eryphromycin Itraconazole ดังนั้นจึง ควรวัดกิจกรรมของเอนไซม์นี้และโดยเฉพาะผู้ป่วยที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รับประทานยาสแตตินร่วมกับยาเหล่านี้จะต้องลดปริมาณยาสแตตินลง ไม่ให้ยามากกว่าร้อยละ 25 ของปริมาณสูงสุดที่ใช้ในการรักษา

ตารางที่ 2.1ค่าทางเภสัชพลศาสตร์ของยาในกลุ่มสแตติน

Drug	Absolute Bioavailability (%)	Excretion	Half-life (t1/2hr)	Protein Binding (%)	Cytochome(CYP) P450 substate
Atorvastattin	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

2.2.3 ปริมาณยาและการจัดเตรียมยา

Monacolin เป็นยาเม็ด 10 20 และ40 มิลลิกรัม รับประทานครั้งละ 1-2 ครั้ง ถ้ารับประทานวันละ 1 ครั้งให้รับประทานยาก่อนอาหารเย็น ถ้าหากรับประทานยา 2 ครั้ง ก็ให้รับประทานก่อนอาหารมื้อเช้าและมื้อเย็น ขนาดการใช้ยาขึ้นกับแพทย์สั่ง

2.2.4 ประโยชน์ในการรักษา

ใช้กับผู้ป่วยที่มีคลอเลสเตอรอลสูงทุกชนิดซึ่งอาจใช้ตัวยับยั้งรีดักเทสเพียงชนิดเดียว หรือใช้ร่วมกับยาชนิดอื่น ได้แก่ Bile acid –binding resins หรือ Nicotinic acid ซึ่งจะต้องระมัดระวังเรื่องของปฏิกิริยาสัมพันธ์ของยาที่อาจทำให้กล้ามเนื้อผิดปกติได้ ยาในกลุ่มสแตตินสามารถลดอัตราของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและอัตราการตายในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจทีมีระดับไขมันสูง ขณะเดียวกันยากลุ่มนี้ยังมีบทบาทในการป้องกันปฐมภูมิ (Primary prevention) สำหรับผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ ได้แก่ ผู้ที่มีไขมันในเลือดสูงกับการมีโรคความดันโลหิตสูงหรือเบาหวาน เป็นต้น

2.3 ประวัติความเป็นมาของข้าวแดง

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์สารสีที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* spp. บนข้าวนึ่ง ที่รู้จักกันมาช้านานในประเทศแถบตะวันออก เช่น ประเทศจีน ประเทศแถบเอเชียใต้ เช่น ใต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ฟิลิปปินส์ และอินโดเนเซีย เป็นต้น (Johns และStuart, 1991) โดยกำเนิดของข้าวแดงมาจากประเทศจีนเชื่อว่าในตำบลหนึ่งมีดินเป็นสีแดงและเมื่อใช้ดินนี้พอกข้าวนึ่งไว้เป็นระยะเวลาหนึ่งจะทำให้ข้าวนึ่งเป็นสีแดง

ในสมัยราชวงศ์ถัง ได้ใช้ข้าวแดงมาเป็นสารเติมแต่งสีและรสชาติในปลาและเนื้อ (Stuart, 1979) สมัยราชวงศ์หมิงค์ (1368-1644) ได้มีการนำข้าวแดงมาใช้เพื่อปรุงยาจีนโบราณซึ่งได้มีการบันทึกไว้ในตำรายาชื่อ Ben Cao Gang Mu-Dan Shi Bu Yi ข้าวแดงจะออกฤทธิ์ช่วยทำให้ระบบหมุนเวียนในร่างกายดีขึ้น (Wu และคณะ, 1966)

ในประเทศแถบตะวันออก มีการใช้เชื่อรา *Monascus* spp. ในอาหารและเครื่องยาพื้นบ้านมานาน มีการให้ชื่อสกุลโมแนสคัส (*Monascus*) มานานกว่าร้อยปี ในยุโรปและอินโดเนเซีย แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับชาวตะวันตก สปีชีส์ต่างๆของเชื้อรา *Monascus* spp. เป็นที่รู้จักกันในฐานะเชื่อราปะปนในธัญพืช แป้ง หญ้าหมักและสารอื่นๆเชื้อรานี้สามารถเจริญบนข้าวนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม 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) รายงานว่าการผลิตข้าวแดงมีกันมานานแล้วในสาธารณรัฐประชาชนจีนและได้มดลองแยกเชื้อที่ได้จากประเทศจีน จนในที่สุดก็ทราบว่าราที่ให้สีแดงคือ *M. purpureus* (Alexopolous และคณะ 1979) ต่อมา (Palo และคณะ1906) นักวิทยาศาสตร์ชาวฟิลิปปินส์ได้ทดลองใช้เชื้อข้าวแดงนี้ทำข้าวแดง จนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอควร สามารถนำข้าวแดงมาใช้เจือสีอาหารได้โดยตรง ภายหลังได้มีการสนใจที่จะศึกษาสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในสภาพการหมักเหลว (Submerged culture) ซึ่งเริ่มโดย (Lin 1973) ต่อมาก็มีผู้ประสบความสำเร็จในการศึกษาการผลิตสีในอาหารเหลว (Shephered และ Carels, 1983;Yoshimaru และคณะ, 1975; บุษบา และ วรรณภา,2527)

ประเทศจีนได้มีการศึกษาการบริโภคข้าวแดงในคนและสัตว์ พบว่าการบริโภคข้าวแดงในปริมาณ 14 – 55 กรัมต่อคนต่อวัน สามารถความเข้มข้นของคลอเลสเตอรอลได้ร้อยละ 11 – 32 และได้ลดความเข้มขนของ Triacylglycerol ได้ร้อยละ 12-19 (Heber และคณะ,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 ในหนูเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวต่อฤทธิ์ Monacolin K จะเป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ HMG CoA reductase (3-Hydroxy -3-Methy glutaryl Coenzyme A) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในตับ และเกี่ยวข้องกับสารสังเคราะห์คลอเลสเตอรอลในร่างกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ลักษณะรูปร่างของเชื้อรา *Monascus* spp.

Monascus spp. เป็นเชื้อราที่ Alrxopoulos และ Mims (1979) จัดอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

Division Asmastigomycota

Subdivision Ascomycetes

Class Ascomycetes

Subclass Plectomycetidae

Order Eurtials

Family Monascacceae

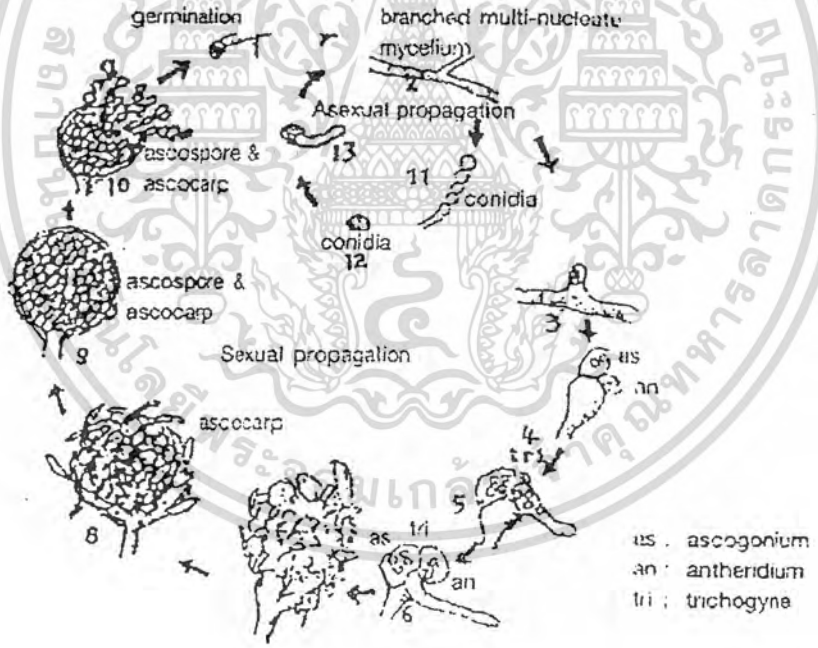
Genus Monascus

Eurotiales เส้นใยมีผนังกั้น มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย และมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นในเมื่ออายุอ่อนมีสีขาวแต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือม่วง

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 เหมาะสมสำหรับการเกิดโคนิเดียของ *Monascus* spp. นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีหลายๆประการ เช่น ยูสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ระดับพีเอช ความเข้มแสงและอุณหภูมิ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35 องศาเซลเซียสมักพบการงอกของโคนิเดียภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อได้รับความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม จึงแทงปลายเส้นใยออกจากสปอร์ (Germ tube) ขึ้นมา 1 เส้น หรือ 2 เส้น หรือบางครั้งอาจมีมากถึง 6 เส้น การงอกของโคนิเดียกระตุ้นด้วยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Monascus* spp. คล้ายๆกับเชื้อราอื่นใน Class Ascomycetes มีการสร้างเพอริทีเซียม (Perithecium) หรือคลิสโททิเซียม (Cleistothecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (Ascocarp) มีรูปร่างกลม ซึ่งจะเกิดบนก้าน (Stalk) (Von Arx , 1974) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (Homothallic) โดยการสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิด คือ แอนเทอริเดียม (Antherridium) และแอสโคโกเนียม (Ascogonium) เกิดการรวมกัน (Fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียมแล้วจึงจะมีการขยายผนังเซลล์รวมออก และพัฒนาเป็นแอสโคคาร์ปในที่สุด ซึ่งภายในมีแอสโคสปอร์ (Ascorpores) มากมาย โดยพบ 2 – 8 แอสโคสปอร์ จะบรรจุรวมอยู่ภายในแอสคัส (Ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์งอกออกมาจากนั้นจงเริ่มต้นการเจริญใหม่ต่อไปดังวัฏจักรของเชื้อราชนิดนี้แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus*spp.

ที่มา : บุษบา ยงสมิทธิ์ (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 สายพันธุ์ต่างๆของเชื้อรา *Monascus* spp. (บุษบา, 2542)

ปี ค.ศ. 1884 Van Tieghem ได้แยก ให้ชื่อเชื้อรา *Monascus* spp. และแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ *M. mucoroides* และ *M. rubber*ต่อมาปี ค.ศ. 1895Went ได้แยกชนิดสำคัญคือ *M. purpureus* จากข้าวแดง หรือ อังคัก ในปี ค.ศ. 1930 ได้มีการแยกเชื้อและจัดจำแนกสปีชีส์อย่างชัดเจนรวมเป็น 5 สปีชีส์ดังนี้ *M. purpureus*, *M. barkeriDangeard*, *M. oleipiedallu*, *M. mucoroides* และ *M. rubber* van Tieghern ปัจจุบันมีการรวบรวมเชื้อรานี้กว่า 20 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.2 จัดแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* spp. ตามสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

ตารางที่ 2.2 สายพันธุ์ต่างๆของเชื้อรา *Monascus* spp.

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. songuineus	*M. rubopunctatus*	*M. serorubercens*	*M. vini*

ที่มา : lizuka and Lin (1981) ;Hawksworth and Pitt (1983) ; Nishikawa และคณะ (1988)

เชื้อรา *Monascus* spp. ทั้ง 4 ชนิด คือ *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. rubber* และ *M. floridanus* นอกจากจะแตกต่างกันด้านลักษณะทางสรีระวิทยาแล้ว ทางด้านวิทยาเอนไซม์ยังต่างกันอีกด้วย โดยเชื้อราในกลุ่ม *M. pilosus* พบกิจกรรมเอนไซท์ β-galactosidase และ α-glucosidase *M. purpureus* พบกิจกรรมเอนไซม์ Polypectase และพบเอนไซม์ Cellulase ใน *M. rubber* (Bridge และ Hawksworth, 1985) ส่วน *M. floridanus* เป็นชนิดเดียวที่พบกิจกรรมเอนไซม์ Trypsinase แต่ไม่พบเอนไซม์ Valine arylamidase เหมือนชนิดอื่น ส่วน Nishikawa

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1988)ได้พบว่าเชื้อรา *Monascus* spp.ชนิดต่างๆส่วนใหญ่จะมีเอนไซม์Proteaseทั้ง 2 แบบ ต่อมา Nishikawa and Lizuka (1993)ได้เสนอความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Monascus* spp. ชนิดต่างๆ โดยใช้หลักการวิเคราะห์ด้วยวิธี Acrylamide gel eletrophoresis สามารถแบ่งเชื้อรานี้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และชนิดที่เกี่ยวข้องโดยอาศัยความเหมือนกันของวิทยาเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์ Esterase, Lactate dehydrogenase และAlcohol dehydrogenase ในประเทศอิรักมีรายงานพบชนิดใหม่ของเชื้อรา *Monascus* spp. คือ *M. pallen* และ *M. sanguencus* (Cannon และคณะ 1995) เทคนิคทางพันธุกรรมได้ถูกนำมาในการจำแนกชนิดของเชื้อราข้าวแดง เริ่มโดยคณะวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ชุลี, 2536; กมลนันท์ และคณะ, 2540 ; เสาวนิตย์ และคณะ, 2540)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1959 Nishikawa ได้เสนอความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ต่างๆของเชื้อรา *Monascus* spp. โดยใช้หลักการวิเคราะห์ Acrylamide gel eletrophoresis 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* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *M. pubigerus, M. fuliginoosus, M. vitreus, M. serobesce* และ *M. pilosus* ชนิดที่เกี่ยวข้องโดยอาศัยความเหมือนของวิทยาเอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์ EsteraseLactate, dehydrogenase และ Glucose-6-phosphate dehydrogenase

ในปี 1920 Church (อ้างอิงโดยบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) รายงานถึงการทดลองแยกสายพันธุ์ที่ได้จากข้าวแดงของประเทศจีนจนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่สร้างสีแดงคือ *M. purpureus* ต่อมา Palo และคณะ (1906) ได้ทดลองใช้เชื้อรา *M. Purpureus* สายพันธุ์ผลิตข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอสมควร และสามารถนำข้าวแดงมาใช้เป็นสีผสมอาหารโดยตรง ภายหลังจึงมุ่งความสนใจไปที่การผลิตสารต่างๆ โดยการเจริญบนอาหารเหลว (Lin, 1973) ทำให้มีรายงานการผลิตสีในอาหารเหลวต่างๆ มากมาย (Shephed และ Carel, 1983 ; Yoshimaru และคณะ, 1975 ; Shin และคณะ,2007 ; บุษบาและวรรณภา, 2527 ; Lee และคณะ, 2009)

เชื้อรา *M. Purpureus* นอกจากจะสร้างสารสีแล้ว ยังสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด สาร Monascidin A จากเชื้อรา *M. purpureus* (Wong และ Bau, 1977) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร ได้แก่ *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp. และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

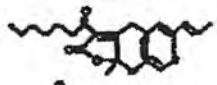
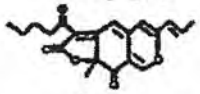
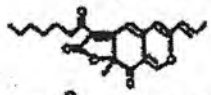
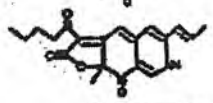
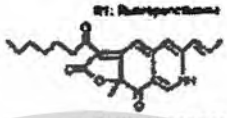
Psuedomonas sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ Coenzyme เอทานอล สาร Monacolin ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และสารช่วยในการตกตะกอน (Flocculant) อีกด้วย (Fink-Gremmels และ Leistner, 1989)

2.6 คุณสมบัติและโครงสร้างของรงควัตถุจากเชื้อรา *M. purpureus* (อรัญและคณะ, 2530)

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

เชื้อรา *M. purpureus* สามสารถสร้างรงควัตถุ ประกอบด้วยสีส้ม 2 ชนิดคือ โมแนสโครูบริน (Monascorubrin) และรูโบรพังตาติน (Rubropunctatin) สีเหลือง 2 ชนิด คือ โมนาสซิน (Monascin) และรูโบรพังตามีน (Rubropunctamin) โครงสร้างหลักของรงควัคถุเหล่านี้ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยเชื่อว่า โมนาสโครูบรามีน (Monascorubramine) และรูโบรพังตามีน เป็นสารอนุพันธุ์ของโมนาสโครูบรินและรูโบรพังตาตินตามลำดับ ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีเอมีน (Amine) สีส้มที่ผลิตโดยเชื้อรา *M. purpureus* ละลายน้ำได้ยาก แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีกรดอะมิโนผ่านทางการสังเคราะห์โพลิเมอร์แบบวงแหวนและการจัดเรียงตัวใหม่จะได้เป็นสารละลายน้ำได้ดีขึ้น นอกจากสามารถละลายน้ำ ยังละลายในน้ำมัน ทนต่อการทำละลายด้วยความร้อนและความคงตัวในค่าพีเอช 2-10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

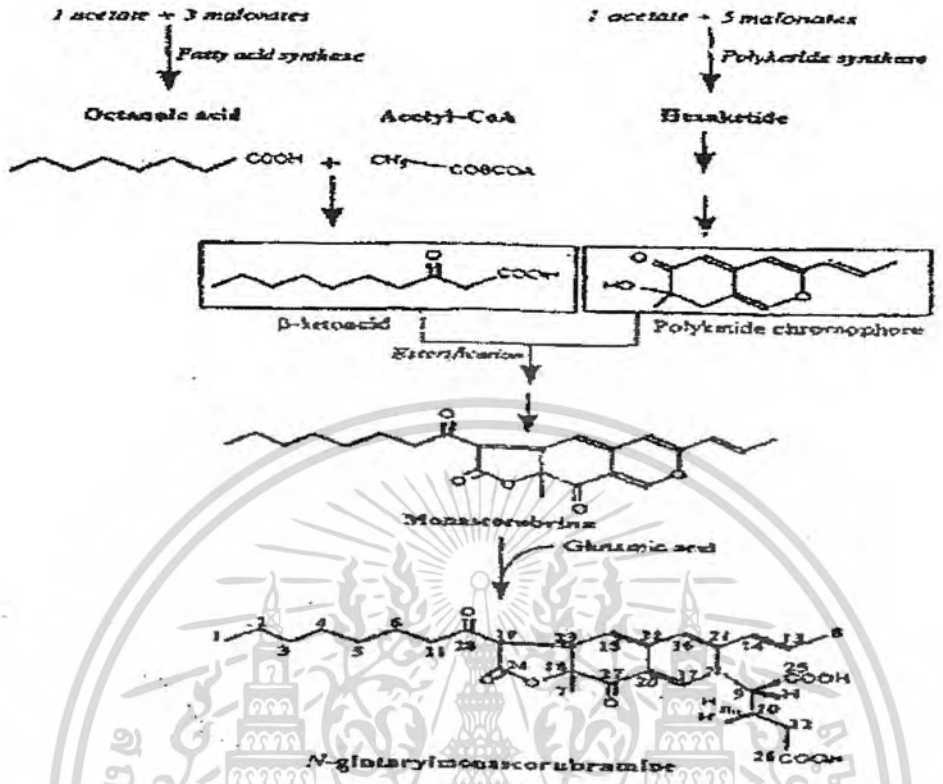
รูปที่ 2.3 โครงสร้างเคมีของรงควัตถุหรือสารสีที่แยกได้จาก *Monascus* sp.

ที่มา : บุษบา ยงสมิทธ์ (2542)

กลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพของรงควัตถุสีต่างๆ จากเชื้อรา *M. purpureus* เกิดจากการรวมตัวของอะซิเตต (Acetate)1 โมลกับมาโลเนต (Malonate) 5 โมล เป็นสารประกอบ Hexaketide chromophore ผ่านวิถีโพลีคีไทด์ เมื่อกรดไขมันสายขนาดกลาง (Medium-chain fatty acid, C_6–C_{18}) ที่สังเคราะห์กรดไขมัน เช่น กรดออกตาโนอิก (Octanoic acid) ทำปฏิกิริยาทรานส์ – เอสเทอร์ริฟิเคชั่น (Trans-esterification) กับโครโมฟอร์ (Chromophore) ได้เป็นรงควัตถุสีส้มโมนาสโครูบริน (หรือ รูโบรพังตาติน เกิดจากปฏิกิริยากับกรดเฮกซาโนอิก) เมื่อสีส้มถูกรีดิวซ์ จะได้สีเหลืองในขณะที่สีแดงเกิดปฏิกิริยา Amonation ของสีส้มกับ NH_3 รงควัตถุยังคงอยู่ภายในเซลล์เมื่อเกิดปฏิกิริยากับหมู่ NH_2 ของกรดอะมิโนทำให้ละลายน้ำได้ เช่น โมนาสโครูบรินทำปฏิกิริยากับกรดกลูตามิก เกิดเป็นสารประกอบ *N* – glutarylmonascorubramine แสดงดังรูปที่ 2.4 (Hajjai และคณะ, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.4 กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงที่ละลายน้ำได้ โดยเชื้อรา *Monascus rubber*

ที่มา : Hajjai 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 ปริมาณธาตุอาหารต่างๆที่มีในข้าวมีเพียงพอต่อการเจริญและการสร้างสารสีโดยเชื้อรา *M. purpureus* ควรใช้อุณหภูมิระหว่าง 30-34 องศาเซลเซียส ควรใช้ข้าวโดยไม่ปรับพีเอช และควรมีความชื้นของบรรยากาศสูงกว่าร้อยละ 74

บุษบาและคณะ (1994) ศึกษาการผลิตรงควัตถุสีเหลืองในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *Monascus* sp. ที่กลายพันธุ์ โดยวัดปริมาณสีเหลืองด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร แทน 420 และ 500 นาโนเมตร ซึ่งใช้สำหรับการวัดปริมาณสีแดงที่ได้จากสายพันธุ์พ่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

130316

แม่ ส่วนสภาวะในการผลิตสีเหลืองสูงสุดเป็นสภาวะเดียวกับสายพันธุ์พ่อแม่ ผลคือปริมาณสีเหลืองและเอนไซม์ Amilytic enzyme เพิ่มขึ้นถึง 10 เท่า

European (2002) ศึกษาการสร้างรงควัตถุจากเชื้อรา *M. purpureus* DSM 1379 จากการวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid) โดยหาความสัมพันธ์ของรงควัตถุที่เชื้อผลิตได้ คือ โมนาสโครูบรามิน (Monascorubramin) และรูโบรพังตามิน (Rubropunctatin) กับปริมาณกรดอะมิโนอิสระในข้าว วัดปริมาณสีแดงที่ค่าการดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตร เทียบกับระยะเวลาการหมัก 11 วันใน 5 วัน วันแรกสีแดงเกิดน้อย และค่อยๆเพิ่มจนสูงสุดในวันที่ 9 ของการทดลอง จากนั้นค่อยๆลดลง การวัดปริมาณกรดอะมิโน 6 ชนิดเทียบกับเวลา ได้แก่ วาลีน (Valine) เมไทโอนีน (Methionine) ไอโซลูซีน (Isoleusine) ไกลซีน (Glycine) กรดกลูตามิก (Glutamic acid) และอะลานีน (Alanine) พบว่าปริมาณกรดอะมิโนเริ่มเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 5 และ มีแนวโน้มลดลงแบบเอกโพเนนเชียลจนต่ำสุดในวันที่ 9 และค่อยๆสูงขึ้นจนถึงวันที่ 11 สรุปได้ว่ากรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับรงควัตถุสีแดง ในกระบวนการเมทาบอลิซึมครั้งที่สองของเชื้อ *M. purpureus* ปฏิกิริยา shift base formation เพราะปริมาณรงควัตถุสีแดงเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระในข้าวลดลง

Teng และ Feldheim (2001) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของข้าวระหว่างกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *M. purpureus* เพื่อผลิตอังคักและรงควัตถุ การวัดการเจริญของเชื้อราไม่สามารถทำได้โดยตรง จึงต้องใช้วิธีอ้อมโดยวัดปริมาณแป้งที่เหลือปริมาณโปรตีนทั้งหมด และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช จากการทดลองพบว่า ช่วง 5 วันแรกปริมาณแป้งโปรตีนทั้งหมด และค่าพีเอชลดลง เพราะมีการเมแทบอไลต์ และเชื้อเจริญอย่างรวดเร็ว ช่วงนี้ปริมาณสีมีน้อยมากจากนั้นระหว่างวันที่ 5-15 ของการหมัก ปริมาณแป้งยังคงลดลงเรื่อยๆ ค่าพีเอชลดลงต่ำสุด เพราะแป้งเป็นองค์ประกอบหลักในข้าว และค่าพีเอชลดลงยืนยันในกระบวนการเมแทบอไลต์ของเชื้อราส่วนปริมาณโปรตีนทั้งหมดเพิ่มขึ้นเพราะโปรตีนในข้าวลดลง และจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น ช่วงนี้มีการผลิตรงควัตถุเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักมากกว่า 15 วัน ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อเริ่มหมด เชื้อหยุดการเจริญและหยุดการสร้างสี ปริมาณรงควัตถุสีเหลืองคงที่ ในขณะที่ปริมาณรงควัตถุสีส้มลดลงในอัตรา 3.6 มิลลิลิตรต่อกรัมต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yongsmith และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของการผลิตรงควัตถุโดยเชื้อรา *Monascus* spp.ในพบว่าการเติมกรดอะมิโน 20 ชนิด เปรียบเทียบกับ NH_4NO_3วัดค่าสี Lab chroma และ Hue พบว่าการเติมกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดอนุพันธ์ของรงควัตถุสีแดงทำให้สีแดงจาก *Monascus* spp.มีเฉดสีแตกต่างกัน สีแดงที่ได้จะมีเฉดสีส้มไปจนถึงสีม่วงแดง ซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของกรดอะมิโน ส่วนค่าสีเหลืองและสีส้มไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเติมกรดอะมิโนแตกต่างกัน

เรณู และคณะ (2543) ได้ทดลองเติมอังคักเพื่อเพิ่มสีในไส้กรอกหมูพบว่าปริมาณอังคักที่เหมาะสมในสูตรไส้กรอกเท่ากับร้อยละ 15 และการเติมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองอาจช่วยเพิ่มคุณลักษณะด้านความเป็นเนื้อเดียวกัน และความฉ่ำน้ำในไส้กรอกสูงขึ้น

เชื้อรา *Monascus* spp. หลายสายพันธุ์สามารถผลิตสีได้ แต่สายพันธุ์ที่สำคัญคือ *M. purpureus* จึงมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในประเทศไต้หวัน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และฝรั่งเศส เพื่อแยกสีให้ได้ปริมาณมากและมีคุณภาพ ประเทศญี่ปุ่นเป็นเพียงประเทศเดียวที่ได้อนุญาตให้ใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* ถูกต้องตามกฎหมาย แต่ยังมีหลายประเทศในแถบเอเชียใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* เป็นสีผสมอาหาร ถึงแม้ว่ายังไม่มีการอนุญาตให้ใช้ได้ตามกฎหมายก็ตาม M. sabeter –Vilar และคณะ (1999)ได้ศึกษาการใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* เพื่อเพิ่มสีให้กับผลิตภัณฑ์เนื้อแทนการใช้วัตถุเจือปนที่มีใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ E-249 (เกลือไนไตรท์) E-252 (โพแตสเซียทไนเตรต) และ E-120 (โคชินีล) นอกจากนั้นยังได้มีการใช้สีจากเชื้อรา *Monascus* spp. เพื่อเพิ่มสีให้กับเครื่องมือ และลูกกวาด

Andrea B. และคณะ (2001) ศึกษาการใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* ทดแทนการใช้เกลือกับไนไตรท์กับผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก โดยทดลองเติมสีจากเชื้อรา *M. purpureus*0.5 กรัมต่อกิโลกรัมและ 0.75 กรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (เกลือไนไตรท์ 20 กรัมต่อกิโลกรัม) ผลการทดลองพบว่า การเติมเกลือไนไตรท์ 10 กรัมต่อกิโลกรัม ผสมกับสีจาก*M. purpureus* 0.5 กรัมต่อกิโลกรัม ในแฮมไก่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจทั้งในด้านสี รสชาติ และลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fabre C.E. และคณะ (1993)ได้ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตรงควัตถุสีแดงจากเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลวและนำไปเป็นวัตถุเจือปนในอาหาร โดยใช้แอลกอฮอล์ 20 กรัมต่อกิโลกรัม และกลูตาเมท 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ภายหลังจากการสกัดและทำให้บริสุทธิ์จึงนำสีไปละลายน้ำ ยังได้ศึกษาถึงความคงตัวของสีในสารละลายและใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อ (ไส้กรอกและ pats) โดยจะเก็บที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน พบว่ามีความเสถียรร้อยละ 92-98 และยังมีการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส เพื่อจะใช้สีจาก *M. purpureus* ทดแทนสีที่เกิดจากการใช้เกลือไนไตรท์หรือโคชินีล

2.7 ประโยชน์ของสารที่สร้างจากเชื้อรา *M. purpureus.*

การศึกษาต่อๆมาได้พบสารเมแทบอไลต์หลายชนิดที่น่าสนใจ และมีค่าทางเศรษฐศาสตร์จากเชื้อรา *M. purpureu s*ดังรวบรวมในตาราง 2.3

ตารางที่ 2.3สารเมแทบอไลต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อรา *M. purpureus*

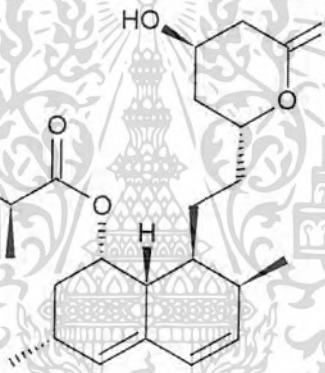
เอนไซม์	เมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolites)	เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary matabolites)
1.กลูโคอะมิเลส 2.โปรติเอส 3.แอลฟา กาแลคโตซิเดส 4.แอลฟา – อะมิเลส 5.ไรโบนิวคลีเอส	1.แอทิลแอลกอฮอล์ 2.กรดอินทรีย์ 3.วิตามินบี 2 4.ไขมัน 5.กรดไขมัน	1.สารสี (แดง,เหลือง,ส้ม) 2.สารปฏิชีวนะ 3.สารลดโคเลสเตอรอล หรือ Monacolins 4.สารตกตะกอน (Fllocculants) 5.ยาลดความดันโลหิต 6.ยาพื้นบ้านของจีนโรคอาหารไม่ย่อย,โรคบิด,กล้ามเนื้อฟกช้ำ 7.คูราริน (Coumarin) รักษาโรคด่างขาว 8.สารถนอมอาหารประเภทเนื้อ 9.โคเอนไซม์ Q_{10} 10.สารให้กลิ่นหอม (Methyl ketones) 11.สารยับยั้งการกลายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก บุษบา ยงสมิทธ์ (2542)

2.7.1 โมนาโคลิน เค (Monacolin K)

โมนาโคลิน เค เป็นสารกลุ่มสแตตินได้จากเชื้อราที่มีฟิลาเมนต์ (Filament) เกิดโดยกระบวนการเมแทบอไลต์ครั้งที่ 2ได้สารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนผ่านวิธี Polyketide pathway เชื้อรา *M. ruber, P.brevicompactum* และ *A. terreus* สามารถผลิตโลวาสแตติน (Lovastatin) โมนาโคลิน เจ (Monacolin J) โมนาโคลิน แอล (Monacolin L) และเมวาสแตติน (Mevastatin) พบว่า สารกลุ่มนี้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์HMG– CoA reductase: mevalonate : NADH + oxidoreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์กระตุ้นการเปลี่ยน HMG – CoA ให้เป็นเมวาโลเนต (Mevalonate) เพื่อใช้ในกระบวนการสร้างโคเลสเตอรอล (Hajjaj และคณะ,2001)



รูปที่ 2.5โครงสร้างของ Monacolin K หรือ โลวาสแตติน

ที่มา Dhale M.A. และคณะ, 2007

Monacolin หรือที่รู้จักทั่วไปในทางการค้าว่า โลวาสแตติน มีระบบการเรียกชื่อ (IUPAC) ว่า [8-[2-(4-hydroxy-6-oxo-oxan-2-yl)ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]2-methylbutanoate ($C_{24}H_{36}O_5$) มวลโมเลกุล 404.54 กรัมต่อโมล นำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางยาดังนี้ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) น้อยกว่าร้อยละ 5 การจับโปรตีนในกระแสเลือด (Binding protein) มีมากกว่าร้อยละ 95 กระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ยาออกฤทธิ์ต่อตับ (CYP3A substrate) ส่วนค่าครึ่งชีวิต (Half life) 1.1-1.7 ชั่วโมง เมื่อรับประทานยาไม่มีผลกระทบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Nagligible) ต่อการขับถ่าย (Excretion) ซึ่งตรวจพบเพียงร้อยละ 10 ของ Urine และ ร้อยละ 83 ของ feces ในการขับถ่าย

2.7.2 ประวัติในการศึกษาสารโลวาสแตติน

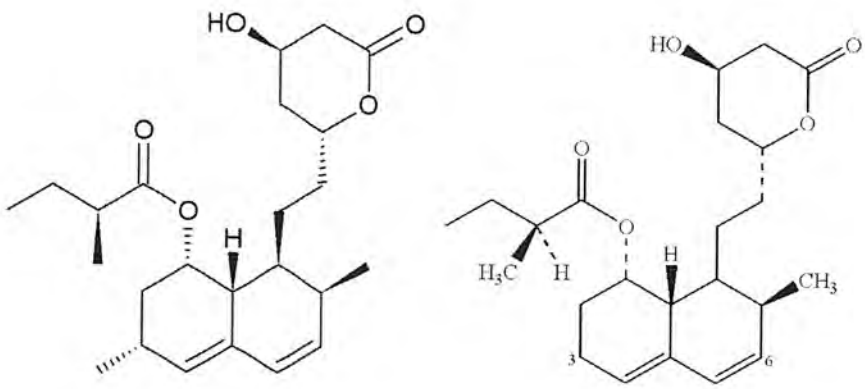
โลวาสแตติน สกัดแยกได้จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* และจัดเป็นสแตตินตัวแรกที่ได้รับอนุญาติโดยสหรัฐอเมริกา (Food and drug Administration หรือ FDA) และเป็นผลผลิตทางธรรมชาติ ที่ได้ปริมาณสูง จากเชื้อรา เช่น *Pleurotus ostreatus* และ *Pleurotus spp.* (Bobek และคณะ, 1998)

ในปี 1970 ค้นพบว่า สารคอมแพคติน (Compactin) และโลวาสแตติน เป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง 3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG – CoA reductase) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล และใช้คุณสมบัตินี้มาพัฒนาศักยภาพของยาสำหรับลดคลอเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล (Vederas และคณะ, 1985)

ในปี 1976 Endo ได้พบสารคอมแพคตินหรือในทางการค้าเรียกว่า เมวาสแตติน (Mevastatin) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *P. citrium* ได้ทำการวิจัยพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์เป้าหมายและลดการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล จึงเป็นผู้ริเริ่มทำให้มีการค้นคว้า และศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้ง HMG CoA reductase ในธรรมชาติจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆและค้นพบเมทาบอลิซึมของสารโลวาสแตตินที่แยกได้จากเชื้อราในเวลาต่อมา โครงสร้างสารโลวาสแตตินเสถียรและคงตัวแตกต่างกับสารคอมแพคตินที่ปรากฏในลักษณะ 6 alphamethyl group ในรูปของ Hexahydronaphthalene ring

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(I)



A B

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของสาร Lovastatin (A) และ Compactin (B)

ที่มา : Dhalel M.A. และคณะ, 2007 : Belo และคณะ 1993

อย่างไรก็ตาม ในปี Endo, A. 1980 พบว่าสาคอมแพคตินมีความเป็นพิษในสัตว์เพราะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันระหว่าง คอมแพคติน และ โมนาโคลิน ยากต่อการตรวจสอบ การศึกษาทางแพทย์ในเรื่องสารโลวาสแตติน ได้ระงับชั่วคราว จึงเปลี่ยนไปศึกษาเรื่องผลกระทบของสารที่มีต่อสัตว์ทดลอง

ในปี Hirama 1982 ในระดับห้องปฏิบัติการได้มีการสำรวจคุณสมบัติเกี่ยวกับสารโลวาสแตตินซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *A. terreus* พบในคนไข้ภาวะเสี่ยง สาร Monacolin นี้สามารถลดคลอเรสเตอรอลชนิดแอลดีแอลได้และเมื่อมีการสนับสนุนการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อสัตว์ทดลองปรากฏว่าไม่มีฤทธิ์เป็นพิษ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการศึกษาสารคอมแพคติน ดังนั้นจึงได้ดำเนินการวิจัยทางการแพทย์ต่อ

2.7.3 การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา

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

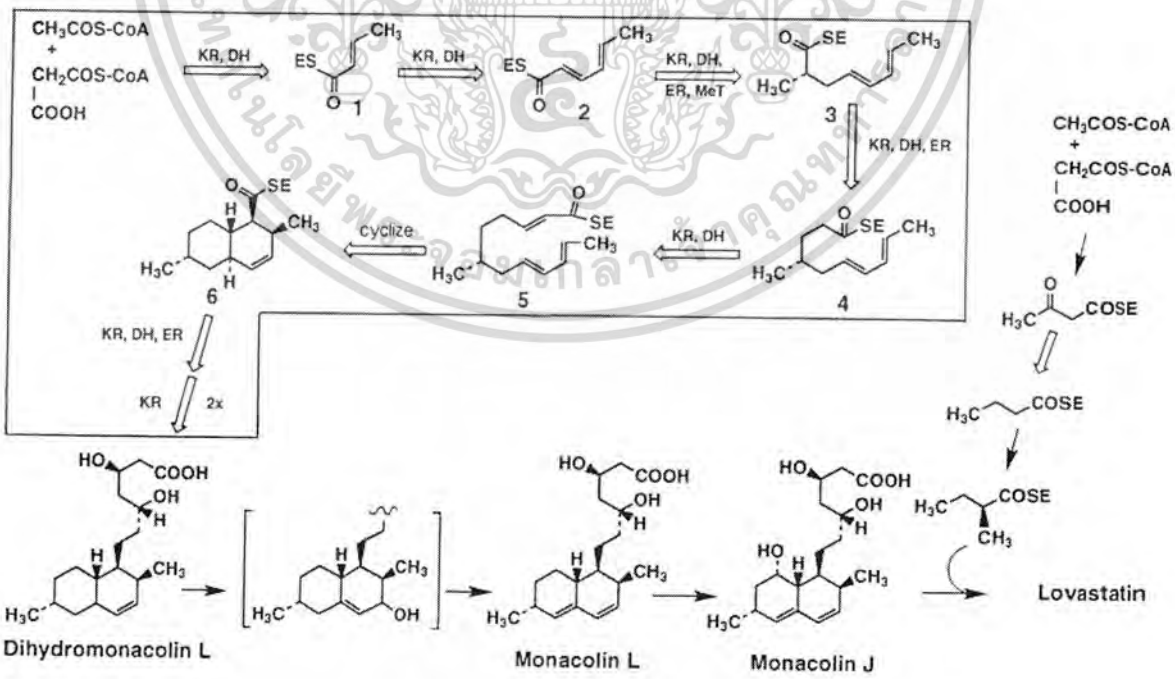
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) Low-density lipoprotein (LDL) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประโยชน์ โดยพาคลอเลสเตอรอลจากตับไปสู่ร่างกาย LDL เป็นไขมันที่ก่อให้เกิดพิษหากมีมากจะทำให้เกิดหลอดเลือดแดงตีบได้ง่าย

2) High-density lopoprotine (HDL) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประโยชน์ โดยพาคลอเลสเตอรอล จากร่างกายเข้าสู่ตับ หากมี HDL ในปริมาณสูงส่งผลต่อให้เกิดโรคหลอดเลือดน้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ LDL – C (Low-density lipoprotein cholresterol) ซึ่งเป็นไลโพโปรตีน ชนิดหนึ่งที่มีในตับมากถึงร้อยละ 70 ทำหน้าที่พาคลอเลสเตอรอลจากตับไปยังเนื้อเยื่อต่างๆเมื่อเนื้อเยื่อต้องการใช้คลอเลสเตอรอล ซึ่งเป็นจุดสำคัญที่ต้องลดระดับคลอเลสเตอรอลส่วนเกินในร่างกาย โดยรักษาให้ร่างกายทำงานเป็นปกติอยู่เสมอ (Alberts และคณะ , 1998)

2.7.4 กระบวนการสังเคราะห์สารโลวาสแตติน

สารโลวาสแตตินประกอบด้วยโพลีคีไทด์ 2 ประเภท สายจากอนุพันธ์ของอะซีเตต โดยโพลีคีไทด์สายแรกอะซีเตตมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น Dihydromonacolin L monacolin L และ Monacolin J ตามลำดับ ส่วนโพลีคีไทด์สายที่สองอะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์แล้วเชื่อมต่อกับโพลีคีไทด์สายแรกในรูป Monacolin J โดยพันธะเอสเทอร์แล้วด้านโลวาสแตตินในรูปกรด (Acid form) สารประกอบนี้สร้างโดย *A. terreus* (Hendrickson 1999)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

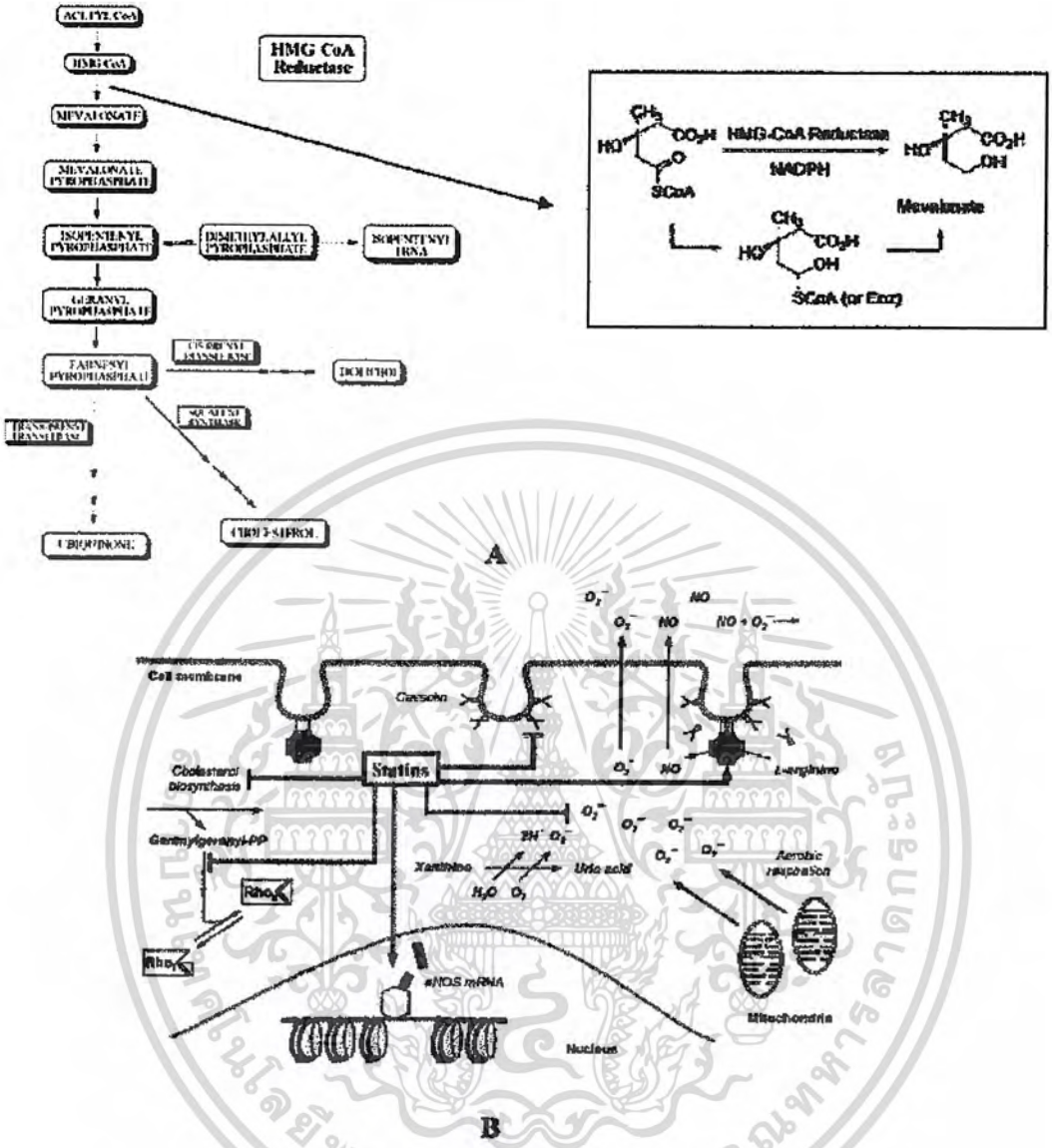
รูปที่ 2.7กระบวนการสังเคราะห์สารโลวาสแตติน

ที่มา: Hirama , 1982 : Hirama , 1983

2.7.5 กลไกการทำงานของโลวาสแตติน (จันทนี, 2545)

สารโลวาสแตตินสามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase อย่างจำเพาะ โดยที่เอนไซม์ HMG-CoA reductase จะใช้เป็นตัวกลางในการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นเมวาโลเนต (Mevalonate) และสังเคราะห์เป็นคลอเลสเตอรอลต่อไป (Alberts, 1998) สารโลวาสแตตินจะขัดขวางการสร้างคลอเลสเตอรอล โดยการไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase จึงทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลดังรูปที่ 2.8สารโลวาสแตตินไม่แสดงฤทธิ์ทางยาในรูปโครงสร้างปกติ แต่เมื่อโครงสร้างถูกสลายด้วยน้ำ (Hydrolysis) เป็น β-hydroxy acid จะทำให้สารออกฤทธิ์ได้ในร่างกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8A: กระบวนการในการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล เมื่อ HMG-CoA reductase ทำปฏิกิริยายับยั้งการเกิดคลอเลสเตอรอล

B: ผลของยาที่เป็นตัวกลางในเซลล์ endothelial และเนื้อเยื่ออื่นๆ

ที่มา : A: Goldstein JL และคณะ,1973, **B**: Laufs u และคณะ, 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

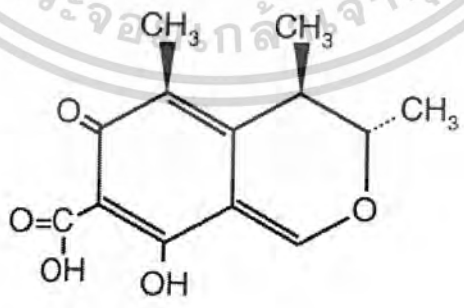
2.8 ซิตรินิน (Citrinin) (European Mycotoxin Network, 2002)

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

ซิตรินินพบครั้งแรกโดยการแยกจากเชื้อรา *Penicilium citrinum* ในปี 1931 ต่อมาในปี 1951 พบปัญหาข้าวเหลือง "Yellow rice problem" ในข้าวที่ประเทศไทยส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น เพราะมีการปนเปื้อนจากเชื้อรา *Penicilium citrinum* และตรวจพบซิตรินิน จากนั้นพบว่าเชื้อรา *Penicilium* สายพันธุ์อื่นสามารถสร้างซิตรินิน เนื่องจากเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารพิษชื่อโอคราท๊อกซิน เอ (Ochratoxin A,OTA) พบในธัญพืชทั่วไป เช่น ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ จึงไม่ใช่เรื่องแปลกที่พบทั้ง โอคราท๊อกซิน เอ และซิตรินินพร้อมกัน แต่มีการศึกษาเกี่ยวกับซิตรินิน น้อยกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะไม่บ่อยครั้งที่สามารถตรวจพบซิตรินิน เนื่องจากอาจสลายไปในระหว่างขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสกุลอื่นที่สร้างซิตรินิน เช่น *A. terreus A. carnues* และ *A. niveus*ช่วงแรกของการศึกษาพบว่าซิตรินินมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Antibacterial) แต่ยังมีผลกระทบต่อไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงไม่ได้มีการนำสารนี้มาใช้ประโยชน์

2.8.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

ซิตรินิน มีชื่อเรียกตามระบบ IUPAC คือ (3R, 4S) – 4, 6-dihydro-8-hydroxyl-3,4,5,-trimetyl-6-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 โครงสร้างของซิตรินิน

ที่มา : M.Sabater – Vilar และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิตรินิน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 250 กรัม มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{13}H_{14}O_5$มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองเลมอน มีจุดหลอมเหลว 172 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมอะซิเตด เมทานอลอะซิโตไนไตร์ท เอทานอล และสารละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว สารละลายตัวได้ด้วยแสง (Photodecomposition) สารละลายกรดหรือด่างหรือความร้อนสามารถเกิดสีน้ำตาลเมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอริคคลอไรด์ สีเขียวกับไททาเนียมคลอไรด์ สีแดงคล้ำกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และด่าง ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สามารถทำให้เกิดคีเลต (Chelate) กับ โมโนอะซิเตด (Mono-acetate) ไดเอทิล (Diethyl) เมทิลเอสเทอร์ (Methyl ester) และอนุพันธ์ไดไฮโดร (Dihydro derivatives) M.Sabater – Vilar และคณะ (1999)

2.8.2 การศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษ

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

ซิตรินินจะเสริมฤทธิ์กับโอคราท๊อกซิน เอ และเป็นพิษกับระบบประสาทของหมู เกิดในประเทศเดนมาร์ค สวีเดน นอร์เวย์ และไอร์แลนด์ ซิตรินินเป็นสารพาต่อตับและไต (Hepatonephrotoxin) พบในเชื้อราสายพันธุ์ทั่วไป และยังเกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิด Endemic balkan nephropathy ในคนเหมือนกับโอคราท๊อกซิน เอ และสารพิษอื่นๆ ที่มีลักษณะคล้ายกัน แต่อย่างไรก็ตามซิตรินินไม่อันตรายรุนแรงต่อคน เพราะความไม่เสถียรในระหว่างกระบวนการแปรรูป แต่จะมีผลโดยตรงต่อสัตว์ที่บริโภคธัญพืชที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปใดเลย

มีรายงานการปนเปื้อนลงในอาหารประเภทต่างๆ โดยเฉพาะอาหารประเภทเมล็ดธัญพืช และอาหารสัตว์ M.sabater Vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าซิตรินินมีผลต่อการทำงานของไตและซิตรินินจะไปสะสมในไมโตคอนเดรีย และรบกวนระบบการแลกเปลี่ยนอิเล็คตรอนในเซลล์ โดยขึ้นกับค่าพีเอช แต่ไม่มีผลกระทบต่อผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งสังเคราะห์ DNA การเรียงลำดับของโปรตีนและ RNA เมื่อการทำงานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโตคอนเดียผิดปกติไป ทำให้ระดับไกลโคเจนในตับลดลง และยับยั้งการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอรอลในตับ

2.8.3 ความเสถียร (Stability)

ซิตรินินสลายตัวได้ที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส ในสภาวะปราศจากน้ำ (Anhydrous) แต่จะสลายที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ในสภาวะชื้นปานกลาง (Semi-moist) ดังนั้นความเป็นพิษจะลดลงเมื่อได้รับความร้อนรวมกับความชื้น จากการศึกษายังพบอีกว่า ซิตรินินสลายได้ในขั้นตอนการทำเบียร์ ถึงร้อยละ 90 โดยผ่านกระบวนการการงอก (Germination) การผสม (Mash) และการทำน้ำเบียร์ (Wort) และยังมีการใช้กรดโพรพิโอนิค (Propionic acid) กับข้าวบาร์เลย์เพื่อทำลายซิตรินินในระหว่างการเก็บรักษา (Wu และคณะ, 1974)

2.8.4 ซิตรินินจากเชื้อรา *Monascus* spp.

นอกจากคุณสมบัติในการรักษาโรคของข้าวแดงโมนาโคลิน เค ได้มีผลงานวิจัยหลายฉบับได้ศึกษาเกี่ยวกับซิตรินินที่สร้างจากเชื้อราสกุล *Monascus* spp. พร้อมกับสร้างรงควัตถุ Wong และ Bau (1977) Wong และ Koehler (1981) Fink-Gremmels และคณะ (1991) แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างสารที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ในสีที่สกัดได้จาก *Monascus* spp.ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ จากนั้นได้มีการแยกเอาโมนาสซิดิน เอ จาก *Monascus* spp.หลายสายพันธุ์ และบ่งชี้ได้ว่าเป็นสารตัวเดียวกับซิตรินิน (Blanc และคณะ, 1995) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดอาการไตอักเสบและผลิตจากเชื้อราหลายๆชนิด (Wu และคณะ, 1974, M.Sabater-Vilar และคณะ, 1999)

คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ในรงควัตถุจากเชื้อรา *Monascus* spp. ได้ถูกศึกษาจากนักวิจัยหลายคน เช่น Wong และ Koehler (1981) ได้แยกสารประกอบ 2 ตัวจากเชื้อรา *M. purpureus*ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้แก่ สารสีเหลืองซีด คือ โมนาสซิดิน เอ และสารสีเหลืองเรืองแสงที่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของสารประกอบดังกล่าว ต่อมาBlanc P.J. และคณะ (1995)ได้แยกสารโมนาสซิดิน เอ คือซิตรินิน โดยใช้วิธี Mass Spectroscopy เพื่อยืนยันและอธิบายโครงสร้างของสารดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hajjaj และคณะ (1999) ได้ศึกษากลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพของซิตรินิน จาก *Monascus ruber* ATCC 96218 โดยวัดจาก ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance ทดลองโดยวัด [^{13}C] Acetate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการสังเคราะห์ซิตรินินเกิดจาก Tetra-ketide แทนที่จะสังเคราะห์จาก Penta-ketide เหมือนกับเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillium* ที่สามารถสร้างซิตรินินเช่นเดียวกัน กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินจาก *Monascus* spp.

การใช้สีที่ผลิตจาก *Monascus* spp.เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร พบว่าอาจมีปนเปื้อนของซิตรินินด้วย M.Sabater-Vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาดังนี้

1) ตรวจพบซิตรินินในผลิตภัณฑ์จาก *Monascus* spp. ในทางการค้าหรือไม่

2) ซิตรินินหรือสารสกัดจาก *Monascus* spp.มีคุณสมบัติทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutagenic) และปลอดภัยสำหรับใช้ในอาหารหรือไม่ และได้ศึกษาสารสกัดจาก *Monascus* spp. โดย HPLC การทดสอบ Mutagenicity assay ของซิตรินินบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับสารสกัดจาก *Monascus* spp. รวมทั้งศึกษาเชื้อรา *Monascus* spp.สายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างซิตรินินสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทำให้เชื้อรา *Monascus* spp.สร้างซิตรินิน หรือกำจัดซิตรินินออกจากสีของ *Monascus* spp.

Blanc P.J. และคณะ (1995) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสร้างซิตรินินจากเชื้อรา *Monascus* spp. หลายสายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงต่างกัน ทดลองดังนี้

1) ศึกษาสายพันธุ์เชื้อราที่สร้างซิตรินิน พบว่า ซิตรินินที่ได้จากเชื้อรา *M.purpureus* CBS 109.07 (Wild) ผลิตซิตรินินเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในข้าว ส่วนเชื้อรา *Monascus ruber* ATCC 96218 ผลิตซิตรินินมากถึง 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตซิตรินิน โดยเติม ยูเรีย แอมโมเนียม ไนเตรต (NH_4NO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) โมโนโซเดียมกลูตาเมท และเมไทโอนีน โดยใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน หมักโดย *Monascus ruber* พบว่าอาหารที่เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมทตรวจพบปริมาณซิตรินินสูงสุด เท่ากับ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการเติมยูเรียและเมไทโอนีน พบซิตรินินน้อย เท่ากับ 17 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ปริมาณสีแดงที่ได้น้อยเช่นกัน การศึกษานี้ยังไม่ได้ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุและไม่ผลิตซิตรินิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบระหว่างเอทานอลและกลูโคส พบว่าอาหารที่เติมกลูโคส 45 กรัมต่อลิตร และเติมเอทานอล 28 กรัมต่อลิตรมีการผลิตซิตรินินเท่ากับ 226 และ 136 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับและยังพบว่าถ้าในอาหารมีเอทานอลมากกว่า 45 กรัมต่อลิตร จะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Monascus ruber*

2.9 ความสัมพันธ์ระหว่างเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ และเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ (สมชาย, 2536)

สาร Monacolin จากเชื้อรา *Monascus* spp.จัดเป็นสารเมตาบอลิซึมที่สำคัญๆ ของสิ่งมีชีวิตที่สร้างขึ้นมา ลักษณะประการหนึ่งของสารประกอบชนิดนี้ คือ การสร้างสารหลังจากช่วงการเจริญผ่านไปแล้ว การแยกจากกันระหว่างการเจริญของเซลล์กับการสร้างสารทุติยภูมิ ในบางครั้งก็ใช้เป็นคำจำกัดความของสารทุติยภูมิ แต่กลไกการสร้างดังกล่าวไม่สามารถยึดเป็นหลักในการจัดจำแนกได้ เพราะว่าในบางกรณีสารทุติยภูมิสามารถสังเคราะห์ในระหว่างการเจริญ Bu'Lock (1975)และ Bajpai และ Rueb (1981)สารทุติยภูมิอยู่ในผลิตภัณฑ์หลักประเภทที่ 3 ตามการแบ่งประเภทของผลิตภัณฑ์หลังจากกระบวนการหมัก ดังนี้

1. ผลิตภัณฑ์หลักจากเมตาบอลิซึมแบบปฐมภูมิโดยตรง
2. ผลิตภัณฑ์หลังจากเมตาบอลิซึมแบบปฐมภูมิโดยอ้อม
3. ผลิตภัณฑ์หลักไม่เกี่ยวกับเมตาบอลิซึม

2.10 ผลิตภัณฑ์อื่นที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* spp.

Kranz และคณะ (1992) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* สร้าง Methyl ketone ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสใน Blue cheese ได้ดีใกล้เคียงกับ *P. roquefortii* เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ ข้าวหมักสีแดง (Red fermented rice : REF) เป็นที่รู้จักในด้านยาสำหรับการรักษาการย่อยอาหารและการหมุนเวียนโลหิตในประเทศจีนและมีการบริโภคอาหารเสริมเพื่อสุขภาพกันอย่างมาก พบโครงสร้างของรูโบรพังตาติน (Rubropunctatin, $C_{12}H_{22}O_5$) ซึ่งเป็นสารสีส้มและสารสีเหลืองโมนาสซิน (Monascin, $C_{21}H_{26}O_5$) ที่แยกได้จากเชื้อรา *M. rubropunctatus* Sato Fielding และคณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1960, 1961) ศึกษาการสร้างสารสีที่ Nishikawa แยกได้จาก *M. purpureus* Went คือ โมนาสโครูบริน (Monascorubrin, $C_{23}H_{23}O_5$) และ โมนาสโคฟลาวิน (Monascoflavin) หรือ โมนาสซิน Nakanishi (1959) แสดงให้เห็นว่าโมนาสโครูบรามีน (Monascorubramine) และรูโบรพังเตตามีนเปลี่ยนมาจากโมนาสโครูบริน และรูโบรพังตาติน (สีส้ม) ตามลำดับ Hiroi และคณะ (1975) ศึกษาโครงสร้างของสารสี 2 ชนิด คือ โมนาสโครูบริน (สีส้ม) และรูโบพังเตตามีน (สีม่วง) Manchand และคณะ (1973) พบว่าเชื้อรา *Monascus* spp. แต่ละสายพันธุ์ให้สารสีแตกต่างกันออกไปและพบการสร้างสารสีเหลืองตัวใหม่จากเชื้อรา *M.anka* Sweeny และคณะ (1981) สามารถสกัดสารสีจากโคจิของ *M. anka*

2.11 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* spp. บนอาหารแข็ง (บุษบา, 2542)

เชื้อราที่เจริญบนข้าวสามารถปล่อยสารสีออกมานอกเซลล์ได้มาก ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี จึงสร้างสารสีได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เชื้อรา *Monascus* spp. สายพันธุ์ที่นิยมใช้หมักข้าวแดง ได้แก่ *M. purpureus* และ *M. anka* ซึ่งการผลิตข้าวแดงให้ได้คุณภาพดีขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญหลายประการที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* spp. บนอาหารแข็ง ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์เชื้อรา สภาวะเลี้ยงเชื้อ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และค่าพีเอช เป็นต้น

2.11.1 สายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* spp.

โดยทั่วไปเชื้อรา *Monascus* spp. เมื่อเจริญบนเมล็ดข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั่วทั้งผิวหน้าและทะลุเข้าไปภายในเมล็ดข้าวนั้นก็จะมีการสร้างสารสีได้ภายหลังจากการบ่มได้นาน 3 วัน สารสีเหล่านี้เมื่อมีการนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าสารสีแดงทั่วไปจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 420 และ 500 นาโนเมตร บางสายพันธุ์ที่ให้สีข้าวแดงหรือ อังคัก เป็นสีแดงสด หรือแดงเข้ม จะมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สูงกว่าที่ 420 นาโนเมตร เช่น ที่พบในสายพันธุ์ของ *M. purpureus* หรือ *M. anka* แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงเข้มคล้ำโดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรสูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตรสูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร เป็นต้น เช่นสายพันธุ์ *M. barkeri* หรือ *M. kaoliamg*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.2 ซับสเตรท

ซับสเตรทที่ใช้ในการหมักสี *Monascus* spp. แบบแห้งนั้น ปกติจะเป็นข้าวหรือเมล็ดธัญพืชอื่นๆได้แก่

(ก) ข้าว Palo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสร้างสารสีของ *M. purpureus* และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอังคัก มีดังต่อไปนี้ ความชื้นไม่เกินร้อยละ 50 , พีเอชระหว่าง 3.0 – 7.5 , อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่สายพันธุ์ข้าวเหนียวให้ผลไม่ดีนัก บุษบา (2518) ได้ทดลองการสร้างสารสีของ *M. purpureus* โดยใช้สภาวะการผลิต ข้าวแดงของ Palo และคณะ (1960)มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ต่างๆของไทย พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูและข้าวพันธุ์หอมมะลิให้สีเข้มใกล้เคียงกันแต่ข้าวเหนียวกับให้กลิ่นหอมมากกว่าหอมมะลิ กลิ่นหอมดังกล่าวคือกลิ่นของเอสเทอร์และแอลกอฮอล์ปนกัน ทั้งนี้ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวพันธุ์หอมมะลิให้ผลความเข้มข้นของสีใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ญี่ปุ่น ในขณะที่ข้าวพันธุ์อื่นๆของไทยนั้นล้วนแต่ให้สีและความหอมน้อยกว่ามาก

(ข) เมล็ดธัญพืชและอื่นๆ พลายแก้วและบุษบา (2534) ได้ศึกษาแหล่งสับสเตรทชนิดต่างๆต่อการผลิตสี *Monascus* spp. เปรียบเทียบกับการผลิตสีบนเมล็ดข้าวโดยใช้ข้าวโพด มันเทศ มันสัปปะหลัง มันฝรั่ง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง และขนมปังแทนเมล็ดข้าวต่อการเจริญ การสร้างสีและการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliamg* พบว่าขนมปังให้ค่าสีแดงมากที่สุด ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Lin(1973) และ Iizuka (1981) รองลงมาได้แก่มันฝรั่งและปลายข้าวหอมมะลิ นอกนั้นสีไม่ดีนัก ส่วนการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliamg* พบว่าถั่วเหลืองให้ปริมาณสปอร์สูงสุด รองลงมาได้แก่ ถั่วเขียว ขนมปังและปลายข้าวหอมมะลิตามลำดับ ส่วนธัญพืชอื่นๆให้ผลการสร้างสีไม่ดีนัก Rashbaum และ Yueh (1983) ทดลองใช้ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลีและข้าวบาร์เล่ย์ เป็นสับสเตรทแทนข้าวพบว่าได้ผลเช่นกัน

2.11.3 พีเอช

Palo (1960) รายงานว่า *M .purpureus* สร้างสีแดงได้ดีที่พีเอชระหว่าง 3.0 – 7.5 พลายแก้วและบุษบา (2534) พบว่าสภาวะเป็นกรดพบว่าไม่มีผลต่อการสร้างสีเหลืองของ *M. barkeri*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีอยู่ที่ระหว่าง 27 – 30 องศาเซลเซียส โดย บุษบา (2518) พบว่าอุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ Glucoamylase แต่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเชื้อรา *M. purpureus*

2.11.5 อัตราส่วนของก๊าซ

Han และ Mudgett (1992) รายงานเป็นครั้งแรกของสัดส่วนระหว่างก๊าซออกซิเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลต่อการผลิตข้าวแดงด้วย โดยพบว่าความดันก๊าซออกซิเจนต่อ ความดันก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.50 ต่อ 0.02 บรรยากาศ (Atm) จะมีผลต่อการสร้างสี แดงของอังคักมากที่สุด

2.11.6 ความชื้น

Palo และคณะ (1960) เป็นครั้งแรกว่าความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 50 ส่งผลต่อการสร้าง สารสีของ *M. purpureus* เชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสาร สีแดงของ *M. purpureus* K001 บนเมล็ดข้าว คือร้อยละ 60 การเขย่าหรือให้อากาศช่วยให้เชื้อรา สร้างสารสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวมีเพียงพอต่อการ สร้างสารสีอยู่แล้ว รัตนา (2528) พบว่าการหมักข้าวแดงในสภาพที่มีความชื้นสูงมากไปเชื้อรา *M. purpureus* จะสร้างเอนไซม์ Glucoamylase สูงเกิดการสะสมกลูโคสยับยั้งการสร้างสารสีได้

Johns และStuart (1991) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* จะสร้างสารสีได้น้อยเมื่อเลี้ยง เชื้อที่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 38.0 – 39.0 แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงขึ้นเป็นร้อยละ 56.0 และ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 จะสร้างสารสีเป็นไปได้ดี

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

Chiu และChan (1992) ศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* บนวัสดุ เหลือทิ้งทางการเกษตรคือชานอ้อย โดยเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อบนขวดหมุน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Roller Bottle) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที กับตั้งทิ้งไว้เฉยๆ พบว่าการใช้ระบบขวดหมุนเชื้อราจะสร้างสารสีแดงและสารสีเหลืองได้ดีกว่าตั้งทิ้งไว้เฉยๆ ประมาณ 2-3 เท่า แต่ก็ยังทำให้สารสีน้อยกว่าในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยกลูโคสเปปโตนและยีสต์สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *M. purpureus*

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 MYS medium

3.2.2 SS medium

3.3 อาหารที่ใช้ทดสอบการผลิต Monacolin

3.3.1 อาหารสูตรปกติ ประกอบด้วย วัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวเสาไห้ ข้าวกล้องหอมมะลิ เป็นแหล่งคาร์บอน และมีน้ำเป็นองค์ประกอบ

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.2 ขวดเตรียมอาหาร

3.4.3 จานเพาะเชื้อ (Plate)

3.4.4 ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.4.5 บีกเกอร์แก้วขนาด500 และ 1000 มิลลิลิตร (Beaker)

3.4.6 ขวดฝาเกลียวขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร (Duran)

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 ผ้าลินิน

3.4.11 กรวยพลาสติก

3.4.12 ไมโครปิเปต

3.5 เครื่องมือ

3.5.1 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.5.2 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

3.5.3 เครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography)

3.5.4 หม้อนึ่งไอน้ำ (Aotoclave)

3.5.5 ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina airflow)

3.5.6 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

3.5.7 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath)

3.5.8 เครื่องชั่งสารพิกัด 4 ตำแหน่ง

3.5.9 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.5.10 เครื่องเหวี่ยงสารให้ตกตะกอน (Centrifuge)

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 เชื้อรา *M. purpureus*

3.6.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.6.2.1 MYS Agar นำส่วนผสม ซึ่งประกอบด้วย เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร สารสกัดมอลต์ 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร แป้งมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร และ วุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15 กรัมต่อลิตร นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม แล้วใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ในกรณีที่สารละลายยาก สามารถนำไปต้ม ซึ่งความร้อนจะทำให้ละลายได้ง่ายขึ้น นำส่วนผสมที่ได้เทใส่ลงในขวดรูปชมพู นำสำลีมาปิด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำความร้อนสูงที่อุณหภูมิ (auto clave) 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

การเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus*

นำเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญอยู่ มาวางบนอาหาร MYS Agar จากนั้นนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน

3.6.2.2 SS medium ซึ่งประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร และแป้งถั่วเหลือง 40 กรัมต่อลิตร นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม แล้วใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันในกรณีที่สารละลายยาก สามารถนำไปต้ม ซึ่งความร้อนจะทำให้ละลายได้ง่ายขึ้น นำส่วนผสมที่ได้เทใส่ลงในขวดรูปชมพู่ นำสำลีมาปิด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำความร้อนสูงที่อุณหภูมิ (Auto clave) 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3.6.3 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Inoculumn)

นำข้าวแดงที่มีเชื้อรา *M. purpureus* เจริญอยู่ มาวางเลี้ยงบนอาหาร MYS ในจานเพาะเลี้ยงเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลอง ใช้ที่เจาะชิ้นวุ้น (Cork borer) เจาะเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำชิ้นเชื้อจำนวน 4 ชิ้นใส่ลงในอาหารเหลว SS ปริมาตร 75 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จึงเหมาะที่จะใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3.6.4 การทดลองเลี้ยงเชื้อ *M. purpureus* ในอาหารแข็ง (Solid state cultivation)

เพื่อทำการศึกษาว่าข้าวเสาไห้มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารโมนาโคลินของเชื้อรา *M. purpureus* จึงได้นำเอาข้าวเสาไห้มาใช้เป็นอาหารแข็ง โดยชั่งข้าวเสาไห้ปริมาณ 50 กรัมใส่ขวดทรงกลมขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ซึ่งแต่ละขวดจะมีปริมาณน้ำที่เติมแตกต่างกันออกไป โดยแบ่งออกเป็น 3 สภาวะ ดังนี้

1. สภาวะที่ 1 เติมน้ำเริ่มต้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำขวดที่มีข้าวเสาไห้ไปกลิ้งบนเครื่องกลิ้งเพื่อให้ข้าวเสาไห้และน้ำผสมกัน เป็นเวลา 12 ชั่วโมงแล้วจึงทำการลงหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อที่ 3.6.3 ปริมาณ 3% ของปริมาตรทั้งหมด
2. สภาวะที่ 2 เติมน้ำเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตรแล้วนำขวดที่มีข้าวเสาไห้ไปกลิ้งบนเครื่องกลิ้งเพื่อให้ข้าวเสาไห้และน้ำผสมกัน เป็นเวลา 12 ชั่วโมงแล้วจึงทำการลงหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อที่ 3.6.3 ปริมาณ 3% ของปริมาตรทั้งหมดและเติมน้ำครั้งที่ 2 หลังการลงเชื้อในวันที่ 3, 6 และ 9 ตามลำดับ จนมีปริมาตรน้ำสุดท้ายเป็น 15 มิลลิลิตร
3. สภาวะที่ 3 เติมน้ำเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วนำขวดที่มีข้าวเสาไห้ไปกลิ้งบนเครื่องกลิ้งเพื่อให้ข้าวเสาไห้และน้ำผสมกัน เป็นเวลา 12 ชั่วโมงแล้วจึงทำการลงหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อที่ 3.6.3 ปริมาณ 3% ของปริมาตรทั้งหมดและเติมน้ำครั้งที่ 2 หลังการลงเชื้อในวันที่ 3, 3 และ 3 ตามลำดับ และเติมน้ำครั้งที่ 3 หลังการลงเชื้อในวันที่ 6, 9 และ 12 จนมีปริมาตรน้ำสุดท้ายเป็น 15 มิลลิลิตรดังตารางที่ 3.1 ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 สภาวะต่างๆที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

สภาวะ	ปริมาณน้ำเริ่มต้น(มล.) ก่อนการลงเชื้อ 12 ชม.	วันที่เติมน้ำครั้งที่ 2 (5 มล.)หลังการลงเชื้อ	วันที่เติมน้ำครั้งที่ 3 (5 มล.)หลังการลงเชื้อ	ปริมาตรน้ำสุดท้าย(มล.)
1	15	-	-	15
2.1	10	3	-	15
2.2	10	6	-	15
2.3	10	9	-	15
3.1	5	3	6	15
3.2	5	3	9	15
3.3	5	3	12	15

หมายเหตุ : เก็บตัวอย่างแต่ละสภาวะในวันที่ 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30หลังจากวันที่ลงเชื้อ

3.6.5 การทดลองเลี้ยงเชื้อ *M. purpureus* ในอาหารเหลว (Submerged cultivation)

เพื่อทำการศึกษาว่าข้าวเสาไห้มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารโมนาโคลินของเชื้อรา *M. purpureus* จึงได้นำเอาข้าวเสาไห้มาใช้เป็นอาหารเหลว เพื่อเปรียบเทียบกับอาหารแข็ง โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

1) ศึกษาปริมาณข้าวต่อการเจริญของ *M. Purpureus* ในอาหารเหลวนำข้าวเสาไห้มาชั่งปริมาณ 3, 5, 10 และ 15 กรัม ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรและทำการเติมน้ำปริมาณ 100 มิลลิลิตรและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หลังจากนั้นทำการลงหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อที่ 3.6.3 ปริมาณ 3% ของปริมาตรทั้งหมดและนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : เก็บตัวอย่างในวันที่ 3, 7, 9, 12 และ 15 หลังจากวันที่ลงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *M. purpureus* ในอาหารเหลวที่มีปริมาณข้าว 3 กรัมและเติม Tween80 ที่มีปริมาณแตกต่างกันคือ 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตรนำข้าวเสาไห้มาชั่งปริมาณ 3 กรัม ใส่ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรโดยทำการเติมน้ำปริมาณ 150 มิลลิลิตร และเติม tween80 ความเข้มข้น1% ปริมาตร 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตรตามลำดับและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หลังจากนั้นทำการลงหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในหัวข้อที่ 3.6.3 ปริมาณ 3% ของปริมาตรทั้งหมดและนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 5, 10, 14 และ 21 หลังจากวันที่ลงเชื้อ

3.7 การวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่เก็บได้ที่เวลาต่างๆ มาทำการวิเคราะห์ดังนี้

3.7.1 การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อโดยใช้วิธี Somagyi-Nelson

- อาหารแข็ง นำตัวอย่างมา 1 กรัม ใส่ลงไปในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตรที่มีฝาปิดและเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนด้วยเครื่องหมุนเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์น้ำตาลโดยใช้วิธี Somagyi-Nelson

- อาหารเหลว เก็บตัวอย่างมาปริมาณ 3-4 มิลลิลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์น้ำตาลโดยใช้วิธี Somagyi-Nelson

3.7.2 การหาปริมาณความชื้นของตัวอย่าง

- อาหารแข็ง นำตัวอย่างข้าวประมาณ 5-10 เมล็ด มาชั่งน้ำหนัก และหลังจากนั้นนำตัวอย่างข้าวไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 วัน จากนั้นจึงนำออกมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง และคำนวณหาปริมาณความชื้น (ร้อยละ) ของตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.3 การสกัดสารสี

- อาหารแข็ง นำตัวอย่างมา 1 กรัม ใส่ลงไปในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตรที่มีฝาปิดและเติมแอลกอฮอล์เข้มข้น 50% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนด้วยเครื่องหมุนเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.7.4 การวิเคราะห์สารโมนาโคลินโดย HPLC

- อาหารแข็ง นำตัวอย่างมา 1 กรัม ใส่ลงไปในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตรที่มีฝาปิดและเติมแอลกอฮอล์เข้มข้น 50% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนด้วยเครื่องหมุนเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปผสมกับ Acetronitrile เพื่อทำเป็นMobile phase ในอัตราส่วน Acetronitrile : supernatant (55:45) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

- อาหารเหลว นำตัวอย่างที่ได้จากเวลาต่างๆ มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปผสมกับ Acetronitrile เพื่อทำเป็น Mobile phase ในอัตราส่วน Acetronitrile: supernatant (55:45) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การผลิต Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง

4.1.1 ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการผลิตสาร Monacolin

ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการเจริญ และการผลิตสาร Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* บนเมล็ดข้าวเสาไห้ โดยศึกษาบนข้าวเสาไห้ปริมาณ 50 กรัม บรรจุในขวดทรงกลม ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หลังจากอาหารเย็นลงจึงนำมาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณทั้งหมด 15 มิลลิลิตร โดยกำหนดระยะเวลาการเติมน้ำระหว่างการเลี้ยงเชื้อ (ดังตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงการเติมน้ำในข้าวเสาไห้ที่เวลาการเลี้ยงเชื้อต่างๆ

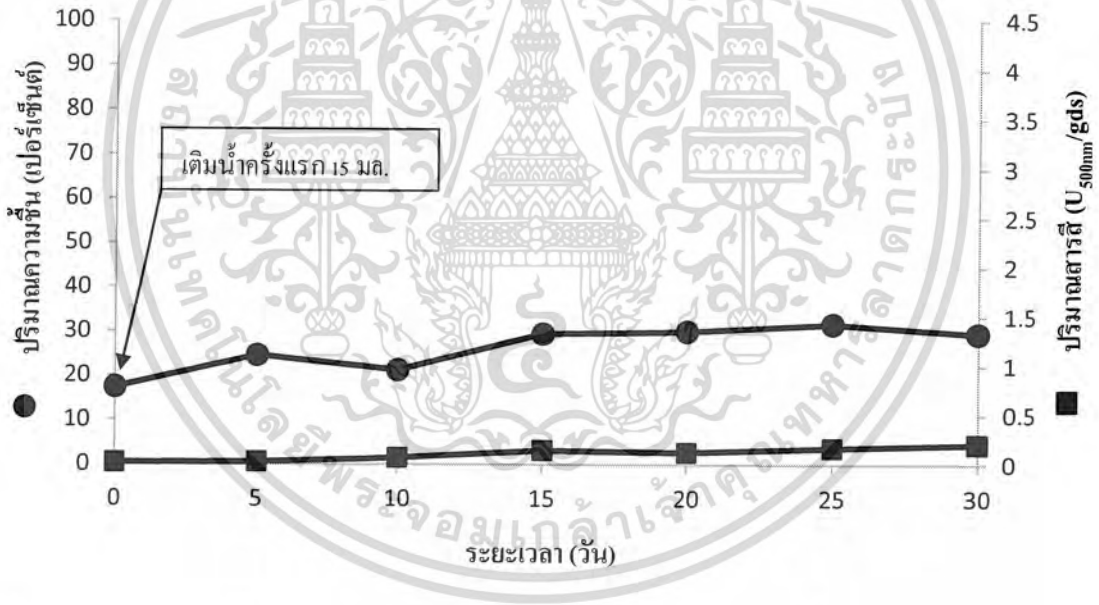
สภาวะ	ปริมาณน้ำเริ่มต้น(มล.) ก่อนการลงเชื้อ 12 ชม.	วันที่เติมน้ำครั้งที่ 2 (5 มล.)หลังการลงเชื้อ	วันที่เติมน้ำครั้งที่ 3 (5 มล.)หลังการลงเชื้อ	ปริมาตรน้ำสุดท้าย(มล.)
1	15	-	-	15
2.1	10	3	-	15
2.2	10	6	-	15
2.3	10	9	-	15
3.1	5	3	6	15
3.2	5	3	9	15
3.3	5	3	12	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : เก็บตัวอย่างแต่ละสภาวะเมื่อเชื้อเจริญเป็นเวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 วันของการเลี้ยงเชื้อ

นำกล้าเชื้อ (โดยเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหาร SS medium เป็นเวลา 3 วัน) ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในขวดเลี้ยงเชื้อ ที่บรรจุข้าวเสาไห้อยู่ จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 30 วัน โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อตามสภาวะที่ 1, 2 และ 3 จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ ค่าความชื้น ปริมาณสารสี ดังแสดงในรูปที่ 4.1-4.7

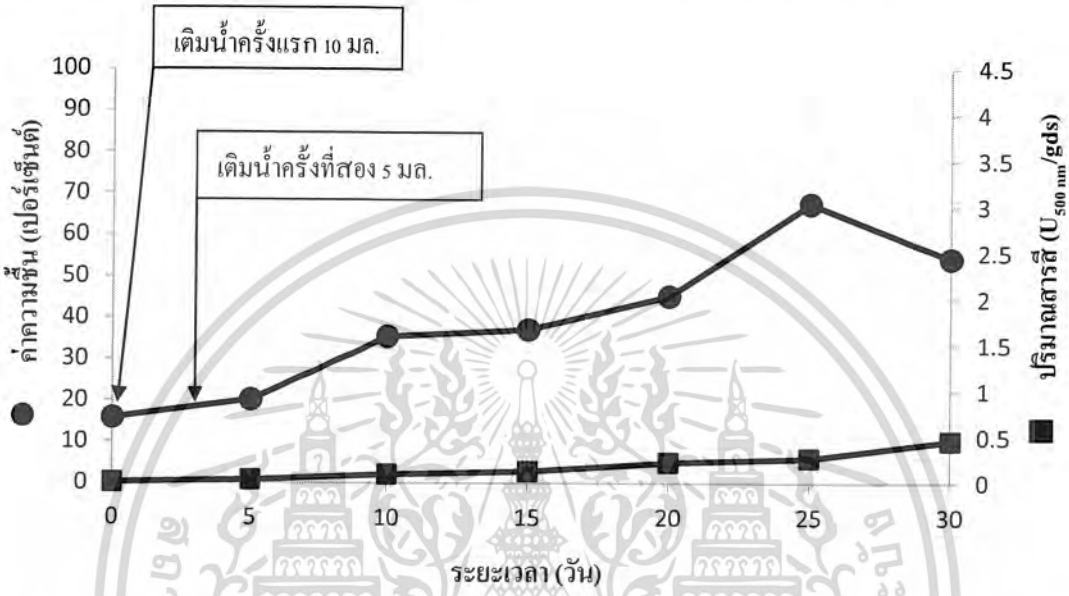
การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ 1 พบความชื้นเริ่มต้นมีค่าประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และคงที่ที่ประมาณ 28 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งวันที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับปริมาณสีแดงโดยพบการสร้างสีเพียงเล็กน้อย (0.2 $U_{500\ nm}$ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ไปจนกระทั่งวันที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ (ดังแสดงในรูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 การเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* บนอาหารข้าวเสาไห้ ในสภาวะที่ 1 โดยเติมน้ำปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อโดยแสดง (■) ปริมาณสารสี และ (●) ปริมาณความชื้น ที่เวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

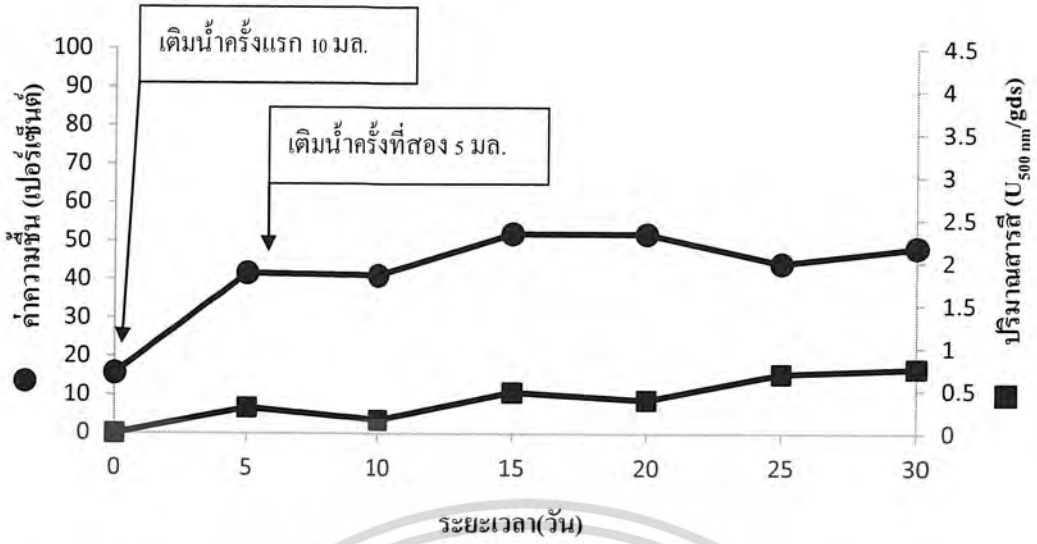
การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ 2.1 พบว่าความชื้นเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (เนื่องจากเติมน้ำกลั่นเพียง 10 มิลลิลิตร) จากนั้นความชื้นเริ่มต้นจึงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อจนมาสูงสุดที่ประมาณ 67 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 25 ของการเจริญ การผลิตสีพบว่าวันที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสูง (0.46 $U_{500\ nm}$ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) มากกว่าสภาวะที่ 1 (ดังแสดงในรูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 การเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* บนอาหารข้าวเสาไห้ ในสภาวะที่ 2.1 โดยเติมน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่สองอีก 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อโดยแสดง (■) ปริมาณสารสี และ (●) ปริมาณความชื้น ที่เวลาต่างๆ

การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ 2.2 พบว่าความชื้นเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (เนื่องจากเติมน้ำกลั่นเพียง 10 มิลลิลิตร) หลังจากเชื้อรา *M. purpureus* เจริญจนถึงวันที่ 6 จึงเติมน้ำอีก 5 มล. ส่งผลให้ความชื้นเริ่มต้นเพิ่มเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นความชื้นจึงเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนมาสูงสุดที่ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (ในวันที่ 20) แล้วความชื้นจึงลดลงเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 30 ของการเจริญ การผลิตสีพบว่าวันที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสูง (0.76 $U_{500\ nm}$ ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) มากกว่าสภาวะที่ 1 (ดังแสดงในรูปที่ 4.3)

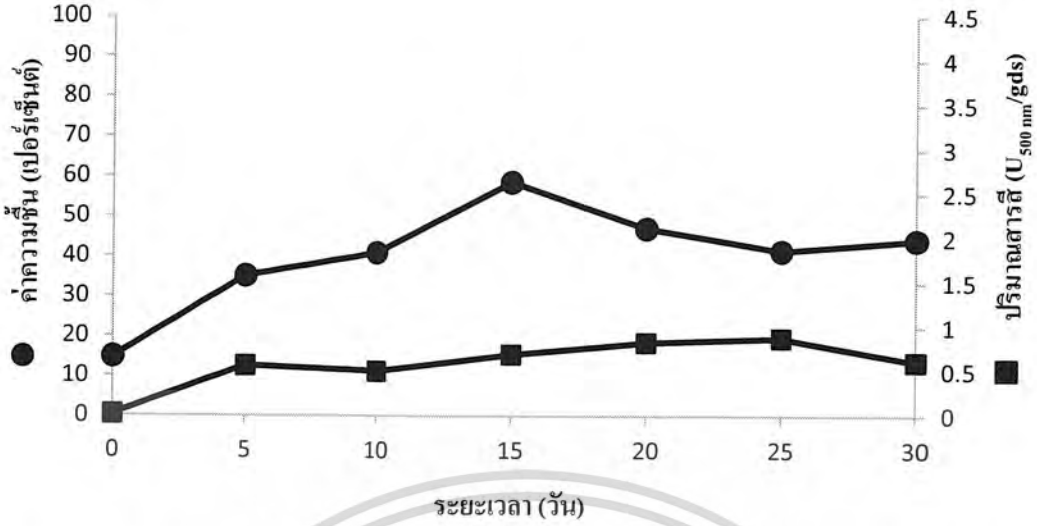
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 การเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* บนอาหารแข็ง ในสภาวะที่ 2.2เติมน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่สองเพิ่มอีก5 มิลลิลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ (■) ปริมาณสารสี (●) ปริมาณความชื้น

การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ 2.3 พบว่าความชื้นเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 15เปอร์เซ็นต์ (เนื่องจากเติมน้ำกลั่นเพียง 10 มิลลิลิตร) จากนั้นความชื้นจึงเพิ่มขึ้นเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงวันที่ 5 - 9 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อเติมน้ำเข้าไปในวันที่ 9 ทำให้ความชื้นเพิ่มเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 15 แล้วจึงลดลงอย่างช้าๆ จนมีความชื้นเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 30 ของการเจริญ ส่วนการผลิตสีพบการสร้างเริ่มตั้งแต่วันที่ 5 (ปริมาณสูงสุด 0.56 $U_{500\ nm}$ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงวันที่ 25 ของการเลี้ยงเชื้อ (ปริมาณสูงสุด 0.88 $U_{500\ nm}$ ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และลดลงเมื่อเชื้อเจริญถึงวันที่ 30 สภาวะนี้ให้การสร้างสีมากกว่าสภาวะที่ 1 (ดังแสดงในรูปที่ 4.4)

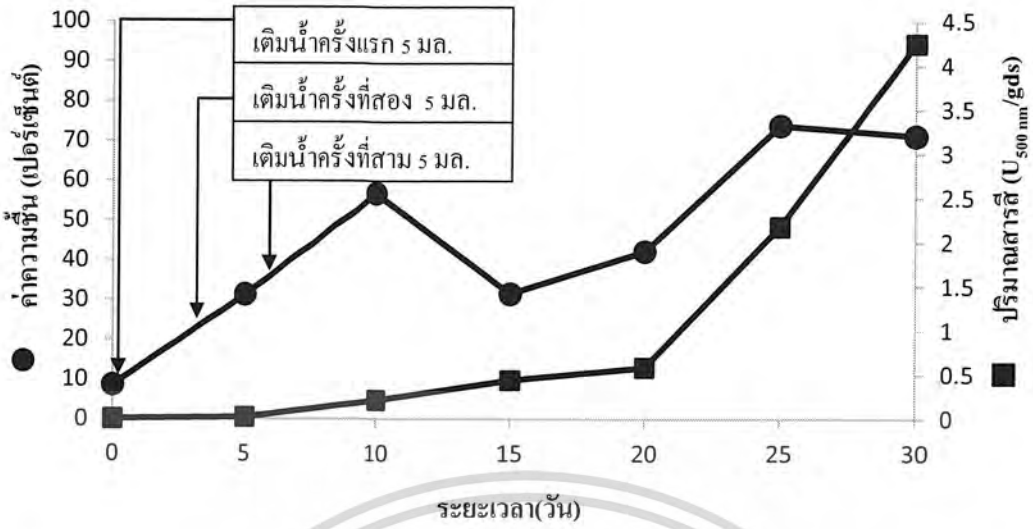
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 การเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* บนอาหารแข็ง ในสภาวะที่ 2.3 เติมน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่สองเพิ่มอีก 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ (■) ปริมาณสารสี (●) ปริมาณความชื้น

การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ 3.1 พบว่าความชื้นเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 8.60 เปอร์เซ็นต์ (เนื่องจากเติมน้ำกลั่นเพียง 5 มิลลิลิตร) จากนั้นจึงเติมน้ำอีก 2 ครั้ง (วันที่ 3 และ 6 ของการเจริญ) ทำให้ความชื้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็น 55 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 10 จากนั้นจึงลดลง แล้วเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสูงสุดที่ 73 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 25 ของการเจริญ แล้วคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่การผลิตสีในช่วงแรกของการเจริญ (0 – 20 วัน) ให้ปริมาณสีน้อยมาก แต่หลังจากนั้น (20 – 30 วัน) พบการสร้างสีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสูงสุดในวันที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ (4.2 $U_{500\ nm}$ ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) มากกว่าสภาวะที่ 1 และ2 (ดังแสดงในรูปที่ 4.5)

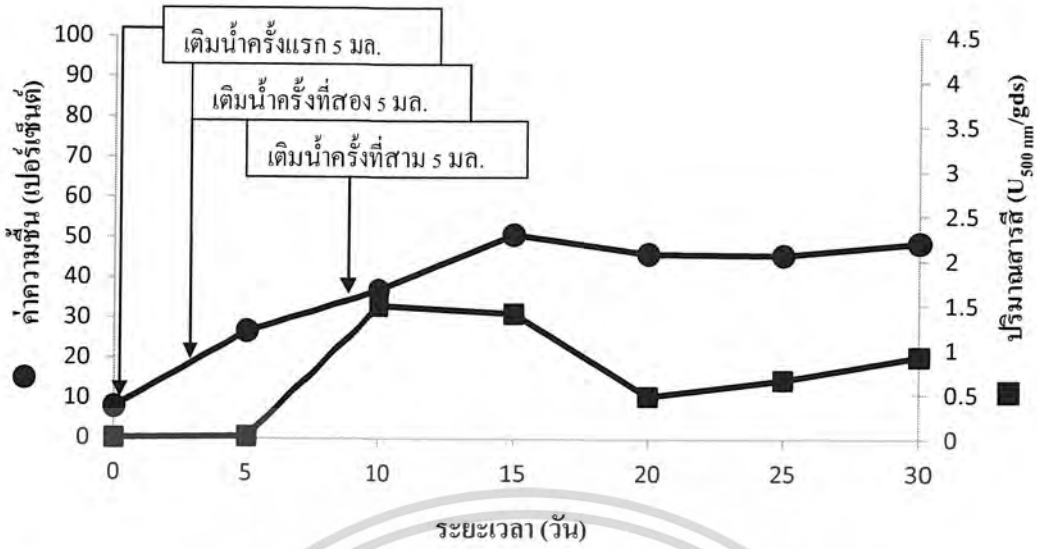
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* บนอาหารข้าวเสาไห้ ในสภาวะที่ 3.1 เติมน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่ 2 และ 3 เพิ่มอีก 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 3 และ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตามลำดับ) โดยแสดง (■) ปริมาณสารสี และ (●) ปริมาณความชื้น ที่เวลาต่างๆ

การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ 3.2 พบว่าความชื้นเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 7.89 เปอร์เซ็นต์ (เนื่องจากเติมน้ำกลั่นเพียง 5 มิลลิลิตร) จากนั้นความชื้นจึงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อเติมน้ำอีก 5 มล. ในวันที่ 3 และ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตามลำดับ) โดยความชื้นยังคงเพิ่มต่อไปจนสูงสุดในวันที่ 15 (50 เปอร์เซ็นต์) แล้วมีปริมาณคงที่ไปจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 30 ส่วนการผลิตสีพบเริ่มต้นในวันที่ 5 (0.02 $U_{500\ nm}$ ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) จากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วไปจนถึงวันที่ 10 (1.49 $U_{500\ nm}$ ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) จากนั้นจึงค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 20 (0.48 $U_{500\ nm}$ ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) แล้วจึงค่อยๆ เพิ่มอย่างช้าๆ ไปจนถึงวันที่ 30 (0.92 $U_{500\ nm}$ ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) (ดังแสดงในรูปที่ 4.6)

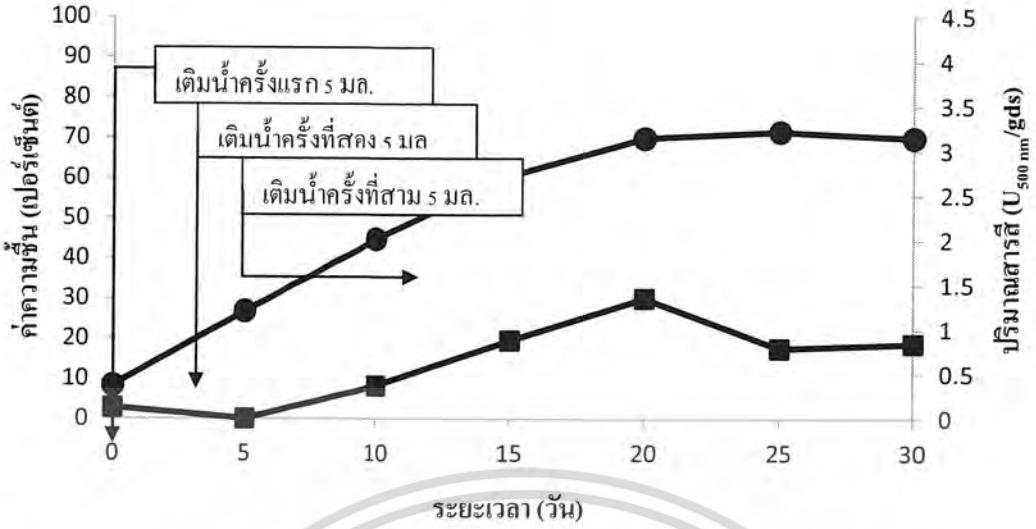
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* บนอาหารข้าวเสาไห้ ในสภาวะที่ 3.2 เติมน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 อีก 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 3 และ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตามลำดับ) โดยแสดง (■) ปริมาณสารสี และ (●) ปริมาณความชื้น ที่เวลาต่างๆ

การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ 3.3 พบว่าความชื้นเริ่มต้นอยู่ที่ประมาณ 8.36 เปอร์เซ็นต์ (เนื่องจากเติมน้ำกลั่นเพียง 5 มิลลิลิตร) จากนั้นความชื้นจึงเพิ่มขึ้นเมื่อเติมน้ำอีก 2 ครั้ง ในวันที่ 3 และ 12 (ตามลำดับ) จนกระทั่งได้ความชื้นสูงสุดในวันที่ 20 ของการเจริญ (70 เปอร์เซ็นต์) แล้วคงที่ไปจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในวันที่ 30 สำหรับการผลิตสีพบว่าเริ่มต้นในวันที่ 5 (0.002 $U_{500\ nm}$ ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) จากนั้นจึงค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 20 ของการเลี้ยงเชื้อ (1.35 $U_{500\ nm}$ ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) แล้วลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

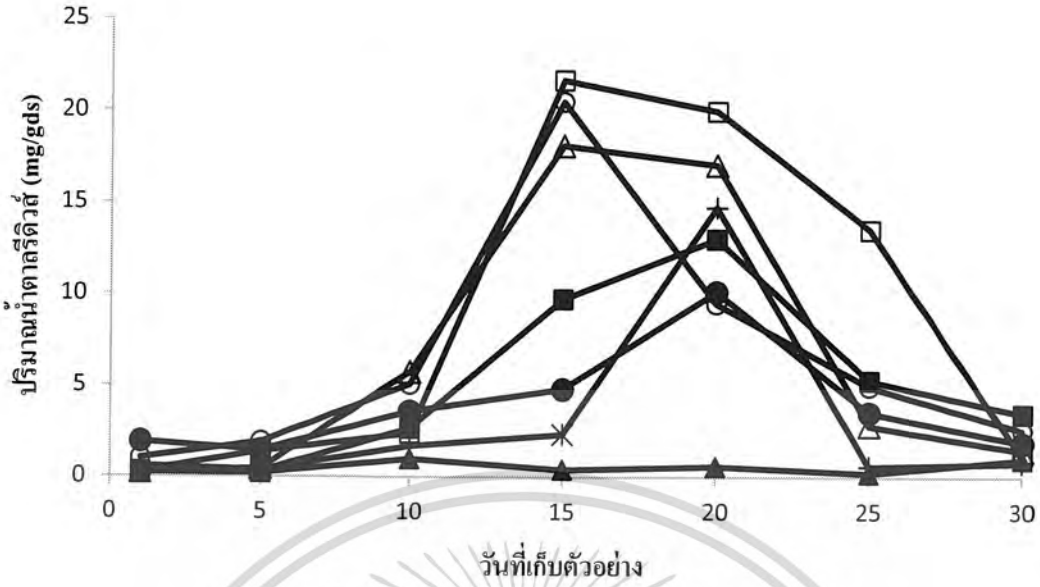


รูปที่ 4.7 การเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* บนอาหารข้าวเสาไห้ ในสภาวะที่ 3.3 เติมน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเติมน้ำครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 อีก 5 มิลลิลิตร ในวันที่ 3 และ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ (ตามลำดับ) โดยแสดง (■) ปริมาณสารสี และ (●) ปริมาณความชื้น ที่เวลาต่างๆ

การเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* ในสภาวะต่างๆ พบการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสแตกต่างกันไป การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ 1 พบปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่ำ อาจเป็นเพราะความชื้นในระหว่างการเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำ ทำให้การเจริญของเชื้อมีจำกัด จึงให้การสร้างสีต่ำ และไม่พบการสร้างสาร Monacolin ส่วนการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ 2.1, 2.2 และ 2.3 พบปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงเมื่อเทียบกับสภาวะที่ 1 อาจเป็นเพราะความชื้นในระหว่างการเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการผลิตสีเพิ่มมากขึ้น และไม่พบการสร้างสาร Monacolin และการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ 3.1, 3.2 และ 3.3 พบปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงคล้ายกับสภาวะที่ 2.1, 2.2 และ 2.3 เพราะมีค่าความชื้นสูงสุด จึงทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี และสามารถผลิตสารสีได้ในปริมาณที่สูง และพบการสร้างสาร Monacolin

จากการทดลอง พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีการเปลี่ยนแปลงตามวันเวลาที่เก็บตัวอย่าง โดยแต่ล่ะสภาวะมีการเปลี่ยนแปลง คือ ในช่วงวันที่ 15-20 จะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุด ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลกลูโคส คือ 0.99, 18.11, 20.51, 10.13, 21.68, 13.01 และ 14.72 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงใน รูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารแข็งข้าวเสาไห้ สภาวะที่ 1 เติมน้ำครั้งแรก 15 มิลลิลิตร (▲), สภาวะที่ 2.1 เติมน้ำครั้งแรก 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่สองวันที่ 3 (△), สภาวะที่ 2.2 เติมน้ำครั้งแรก 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่สองในวันที่ 6 (○), สภาวะที่ 2.3 เติมน้ำครั้งแรก 10 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่สองในวันที่ 9 (●), สภาวะที่ 3.1 เติมน้ำครั้งแรก 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่ 2 และ 3 ในวันที่ 3 และ 6 (□), สภาวะที่ 3.2 เติมน้ำครั้งแรก 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่ 2 และ 3 ในวันที่ 3 และ 9 (■), สภาวะที่ 3.3 เติมน้ำครั้งแรก 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำครั้งที่ 2 และ 3 ในวันที่ 3 และ 12 (✳)

การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งเมล็ดข้าวเสาไห้ พบว่าสภาวะที่ 3.3 เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต Monacolin เนื่องจากปริมาณความชื้นเริ่มต้นเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อรา และแสดงกิจกรรมการสร้างสาร Monacolin ซึ่งพบในปริมาณ 1.78 มิลลิโมลาร์ต่อกรัมสับสเตรท (ดังแสดงในตารางที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงการผลิตสาร Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารข้าวเสาไห้

สภาวะ	วันที่เก็บตัวอย่าง						
	0	5	10	15	20	25	30
1	-	-	-	-	-	-	-
2.1	-	-	-	-	-	-	-
2.2	-	-	-	-	-	-	-
2.3	-	-	-	-	-	-	-
3.1	-	-	-	-	-	-	-
3.2	-	-	-	-	-	-	-
3.3	-	-	-	+	-	-	-

หมายเหตุ ; (+) คือสภาวะ และวันที่มีการผลิตสาร Monacolin

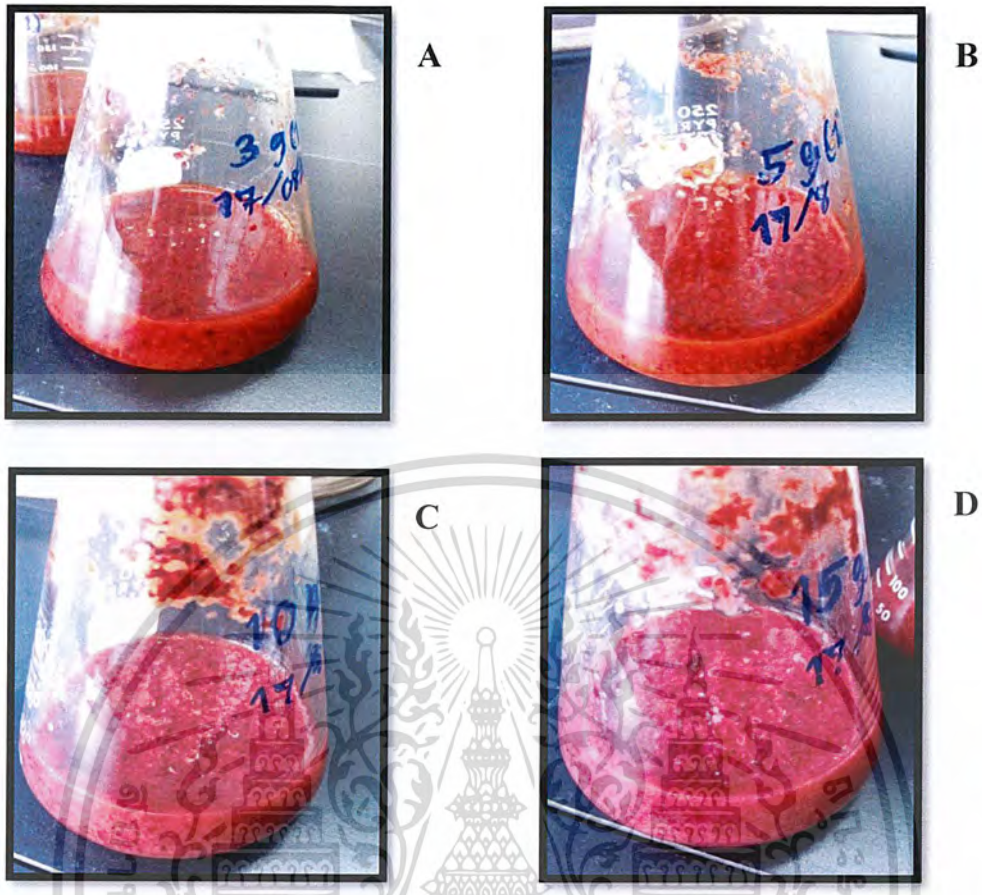
4.2 ศึกษาการผลิตสาร Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารเหลว

การผลิต Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* สามารถกระทำได้โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว ซึ่งกลุ่มผู้วิจัยต้องการเปรียบเทียบเชื้อรา *M. Purpureus* ที่สามารถเจริญในอาหาร โดยกำหนดให้มีองค์ประกอบชนิดเดียวกันกับการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งเมล็ดข้าวเสาไห้ ดังนั้นจึงใช้เพียงเมล็ดข้าวเสาไห้ ผสมในน้ำกลั่นเท่านั้น จึงศึกษาการเจริญของเชื้อรา *M. Purpureus* และการผลิต Monacolin ในอาหารเหลว ที่สภาวะต่างๆ ดังต่อไปนี้

4.2.1 ศึกษาปริมาณข้าวต่อการเจริญของ *M. purpureus* ในอาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยปริมาณข้าวเสาไห้ 3,5,10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และใส่เชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแสดงผลการเจริญของเชื้อดังรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของเส้นใยที่มีปริมาณข้าวแตกต่างกัน (A) ข้าว 3 กรัม, (B) ข้าว 5 กรัม, (C) ข้าว 10 กรัม และ (D) ข้าว 15 กรัม

จากการทดลองพบว่าปริมาณข้าวที่แตกต่างกันมีผลให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง และตามปริมาณข้าวที่เพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณเซลล์สูงสุดคือ 12.65, 24.35, 29 และ 33.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าข้าวปริมาณ 15 กรัมมีปริมาณเส้นใยของเชื้อราอยู่อย่างหนาแน่น ซึ่งอาจทำให้มีผลต่อการสร้างสาร Monacolin เพราะจะมีความหนืดเพิ่มมากขึ้น ทำให้อัตราการถ่ายเทอากาศเป็นไปได้ไม่ดี และข้าวปริมาณ 3 กรัมมีปริมาณเส้นใยที่ไม่มากจนเกินไปจึงเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการสร้างสาร Monacolin แต่การทดลองนี้ไม่พบการผลิตสาร Monacolin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ศึกษาผลของ Tween80 ต่อการเจริญของเชื้อ *M. purpureus* ในอาหารเหลว

จากการทดลองที่ 4.2.1 พบว่าไม่สามารถผลิตสาร Monacolin ได้ เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวส่งผลให้เซลล์ไม่หลั่งสารออกมาภายนอกจึงได้ทำการเติม Tween80 ลงไปในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตร ซึ่งผลการทดลองพบว่าการเติม Tween80 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร สามารถพบสาร Monacolin ซึ่ง Tween80 อาจส่งผลให้เชื้อสามารถหลั่งสาร Monacolin ได้ และพบสาร Monacolin ในปริมาณ 0.217 มิลลิโมลาร์ (ในอาหารเหลวข้าวเสาไห้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) และ 0.249 มิลลิโมลาร์ (ในอาหารเหลวข้าวกล้องหอมมะลิปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ดังแสดงใน ตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงการผลิตสาร Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลวที่มีปริมาณข้าว 3 กรัมและเติม Tween80 ที่มีปริมาณแตกต่างกันคือ 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 และ 10 มิลลิลิตร

ปริมาณ Tween80	วันที่เก็บตัวอย่าง				
(มิลลิลิตร)	0	5	10	14	21
ข้าวเสาไห้					
0.5	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
ข้าวกล้องหอมมะลิ					
0.5	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+
5	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ ;(+) คือสภาวะ และวันที่มีการผลิตสาร Monacolin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัย

จากผลการทดลองศึกษาการเจริญของ *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารแข็งโดยกำหนดปริมาณความชื้นเริ่มต้น พบว่าสภาวะที่สามารถผลิตสารสีได้มากที่สุดคือ สภาวะที่ 3.1 ที่มีค่าความชื้นประมาณ 73 เปอร์เซ็นต์ และสามารถผลิตสารสีได้ปริมาณ 4.2 U_{500} nm ต่อกรัมน้ำหนังแห้งซึ่งได้จากการเก็บตัวอย่างในวันที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่มีการพบสาร Monacolin คือ สภาวะที่ 3.3 ที่มีความชื้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์และสามารถผลิตสาร Monacolin ปริมาณ 1.78 มิลลิโมลาร์ต่อกรัมสับสเตรท ในวันที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาการผลิต Monacolin ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่เจริญบนอาหารเหลว เพื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งว่ามีการเจริญเติบโตและผลิตสาร Monacolin แตกต่างกันอย่างไร จึงทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเหลวที่มีปริมาณข้าวแตกต่างกันคือ 3,5,10 และ 15 กรัม ปรากฏว่าการเจริญเติบโตของเชื้อรามีการเจริญของเส้นใยจำนวนมากเมื่อมีปริมาณข้าวมากจึงทำให้ความหนืดของอาหารเพิ่มมากขึ้นและมีผลต่อการถ่ายเทของอากาศ ส่งผลให้เชื้อราไม่สามารถผลิตสาร Monacolinได้ เราจึงสนใจข้าวที่ปริมาณ 3 กรัม เพราะมีปริมาณเส้นใยที่ไม่มากจนเกินไป จึงทำให้ปัจจัยต่างๆมีความเหมาะสมและสามารถทำให้เชื้อรามีการผลิตสาร Monacolin ขึ้น เราจึงใช้ข้าวปริมาณ 3 กรัมในการทดลองต่อไป

จากการทดลองพบว่าการเติม Tween80 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร ทำให้พบสาร Monacolinในอาหารเหลว ซึ่ง Tween80 อาจส่งผลให้เชื้อสามารถหลั่งสาร Monacolinได้ และพบสาร Monacolin ในปริมาณ 0.217 มิลลิโมลาร์ (ในข้าวเสาไห้) และ 0.249 มิลลิโมลาร์ (ในข้าวกล้องหอมมะลิ)

การศึกษาการเปรียบเทียบการผลิตสาร Monacolin บนอาหารแข็งและในอาหารเหลวพบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* บนอาหารแข็งสามารถผลิตสาร Monacolin ได้มากกว่าการเลี้ยงเชื้อรา *M. Purpureus* ในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. การลงเชื้อ SS medium ลงในอาหารแข็งควรลงเชื้อให้กระจายและทั่วบริเวณของข้าว เพื่อที่เชื้อจะได้ใช้ข้าวในการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่
2. ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อความแม่นยำควรทำการวิเคราะห์หาปริมาณเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนด้วยวิธีทางเคมี (NAG Assay)
3. ในการทดลองในแต่ละครั้งควรทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อเพิ่มค่าความมั่นใจว่าผลการทดลองมีความถูกต้องและแม่นยำ
4. การวิเคราะห์สาร Monacolin ด้วยเครื่อง HPLC ควรทำการฉีดตัวอย่างแต่ละตัวอย่างอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อความแม่นยำของผลการทดลอง
5. ควรศึกษาปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม เช่น pH, อุณหภูมิ, อัตราส่วนของแก๊ส(สัดส่วนของก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลนันท์ หลักรอด, ชุลี ชัยศรีสุข และ บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. การวิเคราะห์ยีโนมของราข้าวแดง (*Monascus spp.)* โดยการใช้เทคนิคการสุ่มขยายชิ้นดีเอนเอ (RAPD) บทคัดย่อ การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 หน้า 121.

กังสดาลย์ บุญปราบ. 2538. การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวแดง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

กังสดาลย์ บุญปราบ, พูลพิไล สุวรรณฤทธิ์ และ นภา โล่ห์ทอง. 2539. การคัดเลือก Glucose derepression mutants เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวแดงและกลไกควบคุมการสร้างสีของเชื้อกลายพันธุ์. รายงานเรื่องเต็ม การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 34. สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 37-45.

กิ่งจันทร์ จูมพลหล้า. 2544. การผลิตไคติเนสของเชื้อราที่ทนอุณหภูมิโดยวิธีการหมักในสภาพอาหารแข็ง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

กำเนิด สุภัณวงษ์, จงจินต์ ศิวะศิลปะ, ฉัตรชัย กิติพรชัย, มรกต สุกโชติรัตน์, วัณชัย สนธิไชย, อภิญญา ผลิโกมล และอุราภรณ์ สะอาดสุด. 2523. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

จันทนี อิทธิพานิชพงศ์. 2545. ยาลดไขมันในเลือด. เภสัชวิทยา 1 คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์แพทซ์แอนด์เจอนัล. กรุงเทพ : 187-196.

ชุลี ชัยศรีสุข. 2536 การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของราข้าวแดง *Monascus sp.* KB6SR.เพื่อใช้เป็นแหล่งโครโมโซมที่คงสภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์ มก. 11 (3) : 122-129

เชิดชัย เชียวธีรกุล, ประสิทธิ์ แซ่ลี้ และ ปนัดดา แซ่อึ้ง. 2519. สีแดงจากข้าว (อังคัก) วารสารอาหาร. 8 : 55.

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

นพกาญจน์ รัตนกิจ. 2543. การผลิตไคติเนสจากเชื้อราด้วยวิธีการหมักในสภาพของแข็งโดยใช้เปลือกกุ้งและข้าวโพดหมัก. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

นิสา บุตรดา. 2537. การกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส กบ. 11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสีและเปรียบเทียบสมบัติบางประการกับสายพันธุ์พ่อแม่ สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดง และสีเหลือง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุษบา ยงสมิทธ์. 2534. การปรับปรุงด้านปริมาณและคุณภาพของการผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลัง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

บุษบา ยงสมิทธ์. 2518. ปัจจัยต่างที่มีต่อการผลิตข้าวแดงโดยเชื้อราโมแนสคัส. บทปฏิบัติการในวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 2.

บุษบา ยงสมิทธ์ และ วรรณภา ลาบโลภา. 2527. การใช้ประโยชน์แป้งมันสำปะหลังในการผลิตสีผสมอาหาร และเอนไซม์ย่อยแป้ง โดยเชื้อราโมแนสคัสในสภาพหมักเปียก. รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 22. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 451-452.

บุษบา ยงสมิทธ์ และ วรรณภา ลาบโลภา. 2528. สีผสมอาหารจากมันสำปะหลังโดยเชื้อราโมแนสคัส. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์.). 19 (1) : 45-50.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

พลายแก้ว ไชยเบญจรงค์ และ บุษบา ยงสมิทธ์. 2534. การศึกษาเบื้องต้นการผลิตโคจิสีแดงของโมแนสคัส เตรียมจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ. รายงานการประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 29. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 283-292.

พวงทอง ไกรพิบูลย์. 2554. บทความเรื่องโรคหลอดเลือดหัวใจ. วว.รังสีรักษา และเวชศาสตร์นิวเคลียร์

รัตนา สุขสวรรค์. 2524. ข้าวแดงสีธรรมชาติสำหรับใช้ผสมอาหาร วารสารวิทยาสาตร์. 35:336-337.

เรณูปิ่นทอง ลักขณา,รุจนะไกรกานต์และพัชรีย์พัฒนากุล. 2543. การผลิตใส้กรอกหมูโดยใช้อังคักช่วยเพิ่มสี. วารสารแก่นเกษตร. 28(2): 89-96

ศุลิเชษฐ์ ทองกล่ำ. 2538. ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังและ avicel จำนวนเซลล์เริ่มต้นของ *Candida sp.*และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส. ปัญหาทางชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

สมบัติ ใจคำ. 2550. เทคนิคและวิธีการทางจุลชีววิทยา 1. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เสาวนิตย์ ชอบบุญ, ชุลี ชัยศรีสุข และ บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. การวิเคราะห์ยีโนมของราข้าวแดงโดยการตรวจจำนวนและขนาดของโครโมโซมด้วยกระแสไฟฟ้าสลับทิศทาง. บทคัดย่อการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35. หน้า 212

อรัญ หันพงศ์กิตติกุล, เมธินี เหว่เจริญ และ เรณู ปิ่นทอง. 2530. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตข้าวแดงโดย*Monascus purpureus*. วารสารเกษตร. 4 (2) : 125-128

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.

Andrea, B., Dionyz, M., Anna, L., Monika, P. 2001. Utilization of Monascus purpureus in the production of foods of animal origin. Bulletin of the Veterinary Institute, Pulawy 45: 111-116.

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

Armstrong E, J, Safo P, K,Sacks F, M.pharmacology of cholesterol and lipoprotein metabolism. In: Golon D, Tashjian A, JR, Armstrong E, Galanter J, Armstrong A. Arnaout R, eds. Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadephia: Lippincott Williams&Wilkins; 2005:357-73

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

Bajpai, R.K. and M. Rueb. 1981. Evaluation of feeding strategies in carbon regulated secondary metabolite production through mathematical. Biotech. Bioeng. 23: 717-738.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blanc P.J., Loret M.O., and Goma G., Production of citrinin by various species of Monascus, Biotech Letters., 1995; 17(3): 291-294.

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

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

Bu'Lock, J. D. (1975), Secondary metabolism in fungi and its relationships to growth and development. In: *The Filamentous Fungi*, v. 1, *Industrial Mycology*, Edward Arnold Ltd., London.

Cannon PF, Abdullah SK, Abbas BA (1995). Two new species of Monascus from Iraq, with a key to known species of the genus. Mycological Research 99: 659662

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

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

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

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

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

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

Endo,A. and Hasumi, K. (1997). Mevinic acids. In Fungi Biotechnology,PP. 162-172. Edited by T. Anke. Weinheim:Chapman & Hall. Endo A. (1992), The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. J.Lipid Res. **33**, 1569-1582.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Endo A., Kuroda M., and Tanzawa K. (1976), Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B, fungal metabolites, having hypocholecterolemic activity FEBS Lett. **72**, 323-326.

Fabre, C.E., Santerre, A.L., Loret, M.O., Baberian, R., Pareilleux, A., Goma, G., Blanc, P.J. 1993. Production and food application of the red pigments of Monascus ruber. Journal of Food Science 58: 1099-1110.

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

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

Fink-Gremmel J, Leirtner L. 1991. Biologische wirkung von *Monascus purpureus*. Fleischwirtschraft; 69(1):115-22.c

Goldstein JL, Brown MS (October 1973). "Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70 (10): 2804–2808.

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

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

Hajjai, H., Klaébé, A., Goma, G., Blanc, P., Barbier E. and Francois, J. (2000) Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus Monascus ruber. Applied and Environmental Microbiology 66: 1120-1125.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hajjai, H., Klaébé, A., Loret, M.O., Goma, G., Blanc, P.J. and Francois, J. (1999) Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus Monascus ruber as revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance. Applied and Environmental Microbiology 65: 311-314.

Hawksworth, D.L. and Pitt, J.I. (1983) A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters.*Australian Journal of Botany* 31, 51–61.

Heber D., Yip I., Ashley J.M., Elashoff D.A., Elashoff R.M., and Go V.L.W., Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement1-4, Am J. Clin Nutr., 1999; 69:231-236

Hesseltine C.W., A millennium of fungi, food and fermentation, Mycologia., 1965; 57: 149-197

Hirama ,M., and M. Vet.1982. Sythesis 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. Trtrahedron 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. Hajjaj H., Niederberger P., and Duboc Ph. (2001). Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2596-2602.

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.

Iizuka, H. and C.F. Lin. 1981. On the genus Monascus of Asia and its specific characteristics. Advances Biochem. 2: 555-561.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Laufs U, La-Fata V, Plutzky J, Liao JK, Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. Circulation 1998, 97:1129–1135

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

Lee, Y.L., Yang, J.H. and Mau, J.L. 2009. Antioxidant properties of ethanolic and methanolic extracts from monascus-fermented soybeans. Journal of FoodBiochemistry 33: 707–727.

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.

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

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

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

Shepherd D, Carels M (1983) Product formation and differentiation in fungi. In: Smith JE (ed) Fungal differentiation. Dekker, New York, p 513-515

Shin, C.S. Kim, J.H., Kim, H.J., Park, H.W., Youn, S.H., and Choi, D.Y 2007. Development of inhibitors against lipase and alpha-glucosidase from derivatives of monascus pigments. FEMS Microbiology Letters 276(1): 93-98.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sweeny, J.G., M.C. Estrada-Valdes, G.A. Iacobucci, H. Sato and S. Sakamura. 1981. Photoprotection of the red pigment 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.

Van Tieghem, P. (1884). Monascus, genre nouveau de l'ordre des Ascomycetes. Bull. Soc. Bot, 31, 226-231.

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 *Penicilhm 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 PlaAsiatica 10:23-30

Wong HC, Lin YC, Koehler PE (1981). Regulation of growth and pigmentation of Monascus purpureus by carbon and nitrogen concentrations. Mycologia 73: 649-654.

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

Yoshimura, M.; Yamanada, S.; Mitsugi, K. e Hirose, Y. (1975), Production of *Monascus*-Pigment in a Submerged Culture. *Agricultural Biology and Chemistry*, v. 39, p. 1789-1795.

Young, E.M. 1930. Physiological studies in relation to the taxonomy of *Monascus* spp. Trans.Wis. Acad. Sci. Art. Lett. 25: 227-244.

Yongsmith, B., S. Krairak and R. Bavavoda. 1994. Production of yellow pigment in submerged culture of a mutant of Monascus spp. J. Ferment. Bioeng. 78:223-228.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

European Mycotoxin Network. (2002). Citrinin. [online]. Available

http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheet9.asp. [2002,March 18].

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

[Online] :http://www.pharmacy.cmu.ac.th/dic/newsletter/newpdf/newsletter8_4/HYPERCHO.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหาร

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	15	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

3.อาหารที่ใช้ทดสอบการผลิตโมนาโคลิน

3.1 อาหารสูตรปกติ

วัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวเสาไห้ ข้าวกล้องหอมมะลิ ปริมาณ อาหารแข็ง 50 กรัม, อาหารเหลว 3 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำ อาหารแข็ง 15 มิลลิลิตร, อาหารเหลว 75 มิลลิลิตร (ฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร) และอาหารเหลว 150 มิลลิลิตร (ฟลาสก์ 500 มิลลิลิตร)

นำวัตถุดิบทางการเกษตรและน้ำผสมลงในภาชนะที่เตรียมไว้ขนาดต่างๆ โดยใช้วัตถุดิบหนึ่งชนิดต่อหนึ่งฟลาสก์ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จะได้เป็นอาหารข้าวเสาไห้และข้าวกล้องหอมมะลิ

การเตรียมวัตถุดิบทางการเกษตร

วัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวเสาไห้และข้าวกล้องหอมมะลิ ดังรูปที่ ก.1 และ รูป ก.2

รูปที่ ก.1 การเตรียมข้าวเสาไห้ให้มีปริมาณเป็น 50 กรัม (อาหารแข็ง), และ ปริมาณเป็น 3 กรัม (อาหารเหลว)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ก.2 การเตรียมข้าวกล้องหอมมะลิให้มีปริมาณเป็น 50 กรัม (อาหารแข็ง), และปริมาณเป็น 3 กรัม (อาหารเหลว)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1.การหาน้ำหนักแห้ง (Dry cell weigh) (นิสา, 2537)

1.1 นำหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 105 มิลลิลิตรอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง (desiccators) แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

1.2 นำตัวอย่างข้าวประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนตริฟิวส์ที่อบไว้แล้ว

1.3 นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อบจนได้น้ำหนักคงที่ใช้เวลาประมาณ 3 วัน

1.4 นำออกมาใส่โถอบแห้ง 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

1.5 นำไปชั่งน้ำหนักซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักหลอดเซนตริฟิวส์มาหักออกเป็นค่าน้ำหนักแห้ง

2.การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ใช้วิธีการเดียวกันกับการหาน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อได้น้ำหนักแห้งแล้ว ให้นำมาหักออกจากน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ ก็จะได้ค่าความชื้นของตัวอย่าง นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

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

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณความชื้น

น้ำหนักจานเพาะเชื้อ = 87.9164 กรัม

น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ = 1.8764 กรัม

หลังจากอบแล้วนำมาชั่ง = 89.6393 กรัม

ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ = 1.7229 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{จากสูตร ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ - น้ำหนักแห้ง} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

$$= \frac{1.8764 - 1.7229 \times 100}{1.8764}$$

$$= 8.1806$$

ดังนั้น ตัวอย่างมีปริมาณความชื้นร้อยละ 8.1806

3.การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) ด้วยวิธี Somagyi – Nelson

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส ไซโลส โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ เกิดสีโมลิบดีนัมบลู ดังปฏิกิริยา

1) $2Cu^{2+}$ + reducing sugar $\longrightarrow$ CuO_2

2) $CuO + H_2SO_4 \longrightarrow 2Cu^{+}$

3) $2Cu^{+} + MoO_4^{2+} \longrightarrow 2Cu^{2+}$ + molybdenum blue

สารเคมี

1. Somagyi Reagent

Solution I: ประกอบด้วย

Sodium potassium tartrate	12 g
Na_2CO_3 (anhydrous)	24 g
$NaHCO_3$	16 g
Na_2SO_4 canhydrous	144 g
น้ำกลั่น	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร)

Solution II: ประกอบด้วย

$CuSo_4 \cdot 5H_2O$	4 g
Na_2SO_4 (anhydrous)	36 g
น้ำกลั่น	200 ml

เตรียม Somagyi Reagent โดยผสม Solution I4 ส่วนกับ Solution II1 ส่วน

2. Nelson Reagent

2.1) สารละลาย Ammonium molybdate $(NH_4)_6\ Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 42 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี

2.2) ละลาย Sodium arsenate (Na_2NAsO_4) 3.5762 กรัม (หรือ $Na_2NAsO_4 \cdot 7H_2O$ 3 กรัม) ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.3) เติมสารละลายข้อ 2.2) ลงในสารละลายข้อ 2.1) ผสมให้เข้ากันดี แล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37° C

วิธีการเตรียม

1.ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสความเข้มข้น 15-150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือ ตัวอย่างที่เจือจางที่เหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบขนาดกลาง

2.เติม Somagyi Reagent1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันที

3.เติม Somagyi Reagent1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

4.เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blank เติมน้ำกลั่นแทนตัวอย่างแล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2-4 เปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน (ไซโลสหรือกลูโคส)

วิธีการวิเคราะห์

1.การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคส (Analytical grade glucose) โดยอบที่อุณหภูมิ 70° C เป็นเวลา 1 คืน ก่อนนำมาทำเป็นสารละลาย ความเข้มข้น 20 40 60 80 100 120 140 160 และ 180 ไมโครกรัมต่อลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุสารละลายแต่ละความเข้มข้นในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบเติม Copper reagent 1.0 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยใช้น้ำเย็นจัด เติม Nelson Reagent 1.0 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลกลูโคสและค่าความขุ่นได้เป็นกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสดังภาพผนวก ค.

2.การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างที่มีน้ำตาลกลูโคส จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ นำไปวิเคราะห์ตามวิธีการข้างต้น คำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

4.วิธีวิเคราะห์สารสี

สกัดสารสีที่ได้จากการหมักข้าวของเชื้อรา Monascus ด้วยเอทานอลเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปิดปากหลอดเซนตริฟิวส์ให้สนิทแล้วไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสีที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สามารถคำนวณได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างคำนวณหาสารสี

เก็บตัวอย่างข้าว 1 กรัม สกัดสารสีด้วยเอทานอล 50 เปอรเซ็นต์ ปริมาณ 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ที่ค่าการเจือจาง 20 เท่า วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.693 ABS ส่วนข้าวที่สกัดแล้วนำไปอบแห้งและชั่งน้ำหนักแห้งได้ 0.4749 กรัม สามารถนำมาคำนวณปริมาณสารสีได้ดังนี้

ปริมาณสี	20X0.693	=	13.86 unit/ml.
ปริมาณสีทั้งหมด	40X13.86 unit/ml./ml.	=	554.4 unit
น้ำหนักแห้ง 0.4749 กรัม		ได้สารสี	554.4 unit
ในข้าว 1 กรัมมีสารสีทั้งหมด		=	1167.4037 U/g-dry weight

5.การวิเคราะห์สารโมนาโคลินด้วยเครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography)

5.1 วิเคราะห์ด้วย SHIMADZU HPLC ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร ด้วยคอลัมน์ μBondapak ^{TM} C_{18} (3.9×300 nm) Colum Part No. WET 027324 Mobile phase ที่ใช้ คือ Acetonitrile : Water (55:45) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

5.2 การเตรียมสารโมนาโคลินมาตรฐาน

5.2.1 นำโมนาโคลินมาตรฐานมาละลายในเอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ มีความเข้มข้น 640 มิลลิโมลาร์

5.2.2 นำมาเจือจางเป็นความเข้มข้น 320 160 106.67 80 64 มิลลิโมลาร์

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

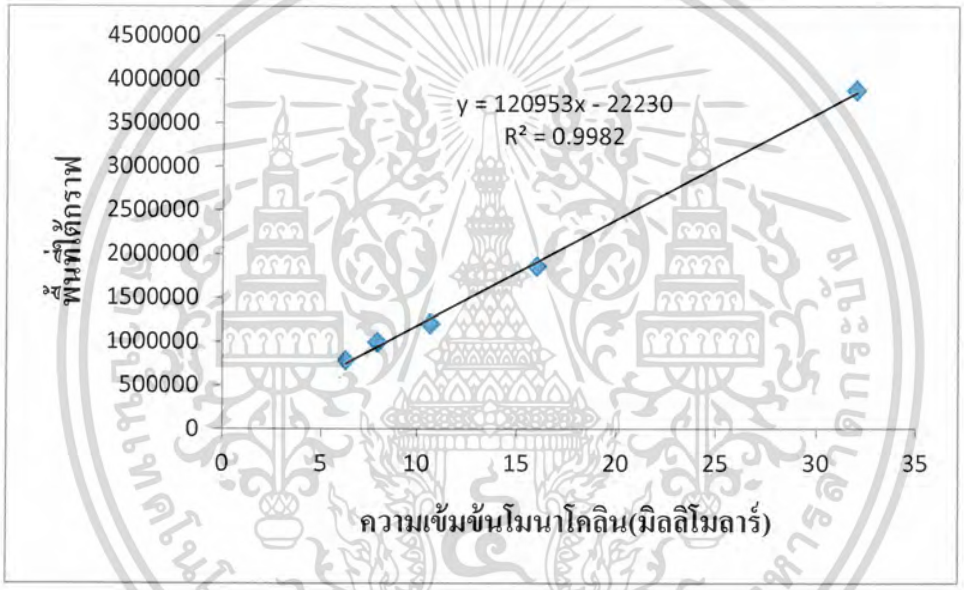
5.2.4 นำพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

5.3.1 นำตัวอย่างที่ผ่านการ Screen ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตรมาผสมอะซิโตไนไตรท์ในอัตราส่วนของ อะซิโตไนไตรท์ : ตัวอย่าง (55:45) จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์

5.3.2 นำพื้นที่ใต้กราฟที่เวลาเดียวกับกราฟมาตรฐานไปเทียบเพื่อหาปริมาณของโมนาโคลิน



รูปที่ ข.1กราฟมาตรฐานโมนาโคลินวัดโดยใช้เครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง

สมการ y = 12095x – 22230

ให้ y = ค่าพื้นที่ใต้กราฟ

ให้ x = ความเข้มข้นของโมนาโคลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

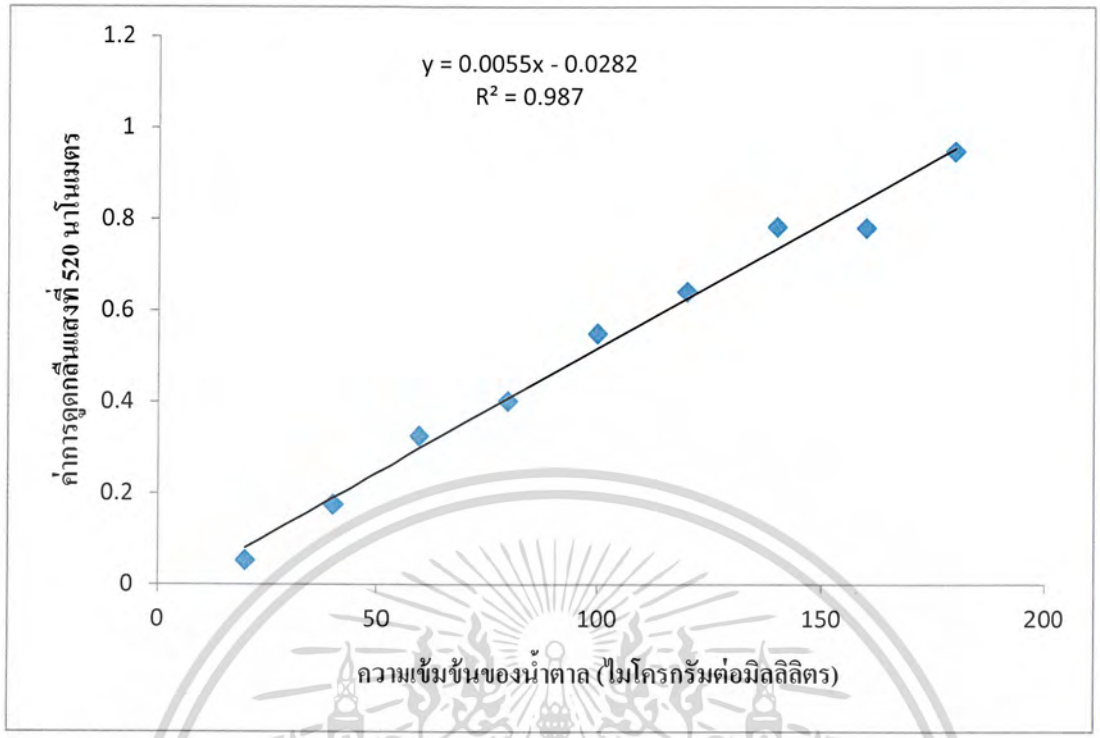
ภาคผนวก ค.

กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ ค.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรกับความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (µg/ml)	ค่า OD_{520}ครั้งที่ 1	ค่า OD_{520}ครั้งที่ 2	ค่า OD_{520}เฉลี่ย
0	Blank	Blank	Blank
20	0.055	0.0051	0.0530
40	0.176	0.175	0.1755
60	0.329	0.333	0.3260
80	0.399	0.406	0.4025
100	0.571	0.530	0.5505
120	0.652	0.631	0.6415
140	0.770	0.798	0.784
160	0.778	0.785	0.7815
180	0.930	0.968	0.9490

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวัดโดยวิธี Somagyi Nelson ที่ความยาวคลื่น520 นาโนเมตร

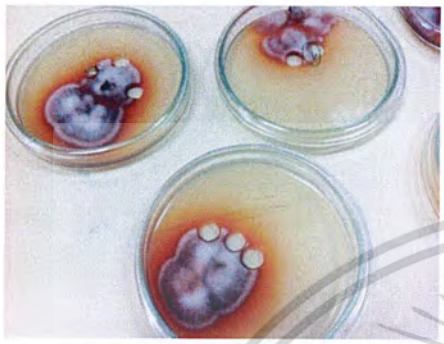
สมการเส้นตรง (Y) = 0.005x – 0.028

R^2 = 0.987

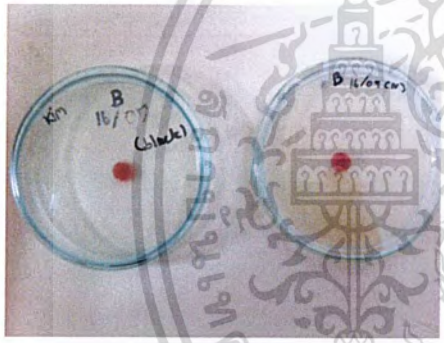
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

รูปภาพแสดงการทดลอง



รูปที่ ง.1 เชื้อรา *M. purpureus*อายุ 7 วัน บนอาหาร MYS



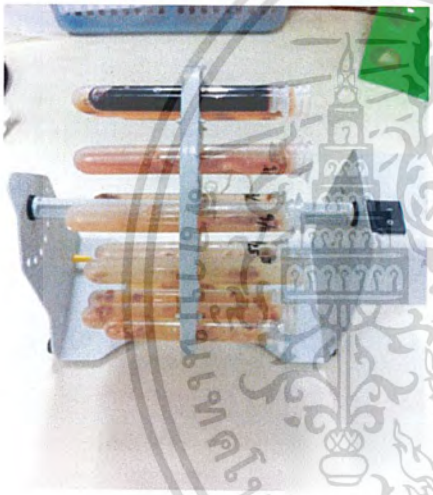
รูปที่ ง.2 เชื้อรา *M. purpureus*อายุ 0 วัน บนอาหาร MYS เป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อ *M. purpureus*

รูปที่ ง.3 เชื้อรา *M. purpureus*อายุ 14 วัน บนอาหาร MYS

รูปที่ ง.4 เชื้อรา *M. purpureus* ในอาหาร SS broth เขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีที่ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 4 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ง.5 การเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ใน อาหาร แข็ง บ่มบนเครื่องหมุนขวดที่ อุณหภูมิห้อง

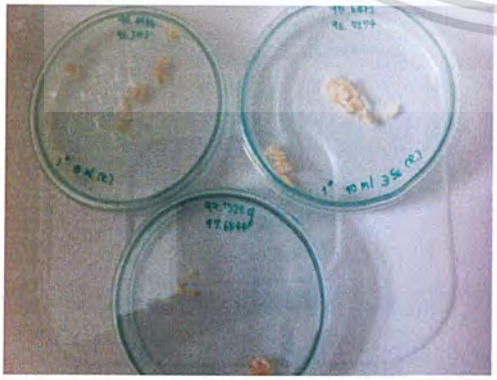


รูปที่ ง.6 แสดงการสกัดสารสีและ สารโมนาโคลิน ที่มีการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

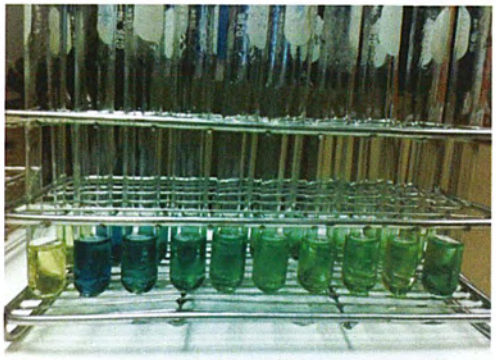
รูปที่ ง.7 การเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลว อายุ 14 วัน เขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส

รูปที่ง.8 ตัวอย่างเมล็ดข้าวเสาไห้และข้าวกล้องหอมมะลิที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงเชื้อ *M. purpureus* ในอาหารแข็งและอาหารเหลว



รูปที่ ง.9 การเก็บตัวอย่างการเลี้ยง เชื้อ *M. purpureus* ในอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง.10 การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส
ด้วย วิธี Somogyi - Nelson

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้