สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแข็ง

The monacolin production by the solid state cultivation of *Monascus* sp

ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

และ

ผศ. นิสา ไกรรักษ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

QCH
ส2397า
2554

สจหมู่
เลขทะเบียน 140542
วัน.เดือน.ปี - 9 ก.พ. 2559

b 12741747
i

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554
คณะวิทยาศาสตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแข็ง

ชื่อโครงการ(ภาษาอังกฤษ) The monacolin production by the solid state cultivation of *Monascus* sp

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2554 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 266,400 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2554

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย

นาย สมชาย ไกรรักษ์ (หัวหน้าโครงการ)

หน่วยงาน สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520, kksomcha@kmitl.ac.th

นาง นิสา ไกรรักษ์ (ผู้วิจัยร่วม)

หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131, nisa@buu.ac.th

คำสำคัญ (Keywords) *Monascus* แป้งมันสำปะหลัง โมนาโคลิน ซิตรินิน

บทคัดย่อ

Monascus sp. SS14 คัดแยกด้วยวิธีคัดเลือกตามธรรมชาติบนอาหารที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน นำมาศึกษาการสร้างโมนาโคลินด้วยการเจริญบนอาหารแข็ง การใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปเส้นใยเชื้อราให้ผลดีกว่าเชื้อเริ่มต้นในรูปสารละลายสปอร์ เนื่องจากเส้นใยเจริญได้ทันที และขยายกำลังการผลิตได้ง่าย การเจริญของเชื้อราบนวัสดุข้าวเสาไห้ให้ผลดีเนื่องจากมีการถ่ายเทอากาศ และการผสมผสานดี ต่างจากการเจริญบนมันสำปะหลัง และมันเทศ ซึ่งพบการจับตัวเป็นก้อนแข็ง และอัดแน่น การเตรียมข้าวสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 โดยนำข้าวไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 15 มิลลิลิตร ให้ผลดีต่อการผลิตโมนาโคลิน เนื่องจากความชื้นเริ่มต้นเหมาะสม และส่งผลดีต่อการถ่ายเทอากาศและการผสมผสาน การเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. SS14 บนอาหารข้าวปริมาณ 1000 กรัม พบปัญหาการสะสมกลูโคส ความชื้น และการจับเกาะของเมล็ดข้าวที่ผิวหน้าภาชนะ เนื่องจากการถ่ายเทอากาศมีค่าต่ำ ควรใช้ระบบให้อากาศในระหว่างเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบการสร้างซิตรินินเมื่อเลี้ยงเชื้อบนข้าวปริมาณ 50 100 และ 200 กรัมเนื่องกิจกรรมของเชื้อมีค่ามาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Abstract

The *Monascus* sp. SS14 was selected by natural selection with medium containing cassava starch as carbon source. The monacolin production was studied on solid state fermentation. The mycelium suspension was used as inoculums that indicated higher cell growth than one with spore suspension as inoculums due to the immediate extension of fungal mycelium. The cultivation on Sao-Hai rice gave the suitable growth because of ventilation and mixing. On the other hand, growth on cassava chip and sweet potato chip presented the densely clump of material. The preparation of rice medium for solid state fermentation of *Monascus* sp. SS14 was done by sterilization of raw Sao-Hai rice at 121°C for 15 min. and then added with 15-ml of sterilize distilled water. This method showed the suitable of rice characteristic for ventilation and mixing. The cultivation of *Monascus* sp. SS14 on 1000 g of rice medium presented the accumulation of glucose, high moisture content and the attachment of rice on container surface due to the low ventilation. The aeration system should be necessary for high volume cultivation. The citrinin production was observed in the cultivation of 50, 100 and 200 g of rice because of high cell activities.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย "การผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแข็ง" ดำเนินงานไปได้ด้วยดีโดยได้รับความสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ นอกจากนี้ยังขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร. บุษบา ยงสมิทธิ์ ที่เสียสละเวลาอันมีค่า และให้คำแนะนำ ชี้แนะ จนทำให้งานวิจัยนี้ดำเนินไปได้อย่างดี ขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความสะดวกในการทำวิจัย และในทุกๆ ด้านจนงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

ผศ. นิสา ไกรรักษ์

(คณะผู้วิจัย)

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค

สารบัญ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์.....3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 3
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน.....4
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ 5
2.1 เชื้อราโมแนสคัส 6
2.2 ความสัมพันธุ์ระหว่างสารโมนาโคลิน และ คลอเลสเตอรอล.....8
2.3 การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา 10
2.4 กระบวนการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน 10
2.5 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา 11
2.6 กลไกการออกฤทธิ์ 13
2.7 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน 15
2.8 ประโยชน์ในการรักษา 16
2.9 ความสัมพันธ์ระหว่างเมแทบอลิซึมปฐมภูมิ และเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ 16
2.10 การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง.....17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 19
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 19
3.2 สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ 19
3.3 การวิเคราะห์.....19
3.4 วิธีการทดลอง.....21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล.....25
4.1 เชื้อจุลินทรีย์.....25
4.2 ศึกษาการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งข้าวหอมมะลิในสภาวะวางฟลาสก์นิ่ง.....26
4.2 ศึกษาการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งธัญพืชในสภาวะนิ่ง.....28
4.4 ศึกษาการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งข้าวเสาไห้ในสภาวะหมุนขวด.....29
4.5 ศึกษาการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งข้าวเสาไห้ปริมาณต่างๆ ในสภาวะหมุนขวด.....30
4.6 ศึกษาการเจริญและการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งข้าวเสาไห้ปริมาณ 100 กรัม และ 1000 กรัม ในสภาวะหมุนขวด.....32
4.7 ศึกษาการสร้างซิตรินินในอาหารข้าวเสาไห้ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวด.....34
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....35
5.1 สรุปผลการทดลอง.....35
5.2 ข้อเสนอแนะ.....37
เอกสารอ้างอิง.....38
ภาคผนวก ก.....44
ภาคผนวก ข.....46
ภาคผนวก ค.....51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1.1 โครงสร้างโมนาโคลินชนิดต่างๆ 3

ตารางที่ 2.1 ระดับการออกฤทธิ์ของโมนาโคลิน 15

ตารางที่ 4.1 การผลิตโมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในสภาวะนิ่ง 28

ตารางที่ 4.2 การสร้างโมนาโคลิน และซิตรินิน ในสัปดาห์ที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ บนข้าวเสาไห้ ปริมาณ 50 กรัม 100 กรัม 200 กรัม 500 กรัม และ 1000 กรัม ตามลำดับ 34

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ Lovastatin 8
ภาพที่ 2.2 เปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีระหว่าง Lovastatin (A)
และ Compactin (B) 9
ภาพที่ 2.3 กระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ Lovastatin 11
ภาพที่ 2.4 A วิถีการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอลทางชีวภาพ ซึ่งกิจกรรมของ
เอนไซม์ 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase
เป็นขั้นตอนควบคุมอัตราเร็วการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล
B : สารตัวกลางสแตตินมีผลโดยตรงต่อ Endothelial cells และเนื้อเยื่อต่างๆ 12
ภาพที่ 2.5 สเตตินชนิดต่างๆ ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายจะอยู่ในรูปของกรดที่ทำงานได้
(active acid form) จึงสามารถยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase
ขณะที่ Lovastatin ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายจะอยู่ในรูปของแลกโตน (lactone form)
จึงต้องเปลี่ยนรูปไปเป็นกรดก่อน จึงสามารถออกฤทธิ์เพื่อเข้าจับกับเอนไซม์ได้ 12
ภาพที่ 2.6 ความคล้ายคลึงระหว่างโครงสร้าง Lovastatin และ HMG – CoA 13
ภาพที่ 2.7 การขนส่งไขมัน และเภสัชวิทยาของระดับไขมันในเลือด 14
ภาพที่ 4.1 การคัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร 25
ภาพที่ 4.2 การผลิตโมนาโคลินองเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนอาหารข้าว*หอมมะลิ*
โดยใช้เชื้อเริ่มต้นสารละลายสปอร์ (A) และเส้นใยเชื้อรา (B) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 27
ภาพที่ 4.3 แสดงการผลิตโมนาโคลินโดยการเลี้ยงเชื้อราบนข้าวเสาไห้ที่เตรียมด้วย
วิธีการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเข้าไปหลังจากนำข้าวเสาไห้ไปผ่านการฆ่าเชื้อ
โดยตรง 30
ภาพที่ 4.4 แสดงการเลี้ยงเชื้อบนวัตถุดิบข้าวเสาไห้ที่บรรจุปริมาณต่างกัน โดยเลี้ยงเชื้อ
ในสภาวะหมุนขวด 31
ภาพที่ 4.5 แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็งข้าวเสาไห้
ปริมาณ 100 กรัม และ 1000 กรัม ในสภาวะหมุนขวดด้วยความเร็ว 5-7 รอบต่อนาที
ที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยวิเคราะห์ปริมาณ
โมนาโคลินด้วยวิธี HPLC 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาพที่ ค-1 ลักษณะเชื้อเริ่มต้นในรูปของเส้นใยเชื้อรา โดยเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในอาหารเหลว SS medium บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน....51
ภาพที่ ค-2 การเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวดบนเครื่องหมุน....51
ภาพที่ ค-3 ลักษณะการเจริญของเชื้อราบนธัญพืชมันสำปะหลัง และมันฝรั่ง ซึ่งพบการเกาะตัวเป็นก้อนอันแน่น....52
ภาพที่ ค-4 แสดงการเจริญของเชื้อบนข้าว (A) สัปดาห์ที่ 1 (B) สัปดาห์ที่ 2 (C) สัปดาห์ที่ 3 และ (D) สัปดาห์ที่ 4....52
ภาพที่ ค-5 แสดงการแทงเส้นใยเชื้อราเข้าไปยังภายในของเมล็ดข้าว ในกรณีที่เชื้อเจริญในสภาวะเหมาะสม....53
ภาพที่ ค-6 แสดงเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในขวดที่บรรจุข้าวปริมาณ 50 กรัม และเติมน้ำ 20 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์....53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

ในปัจจุบันโรคหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจตีบตันเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประเทศไทย และของโลก เนื่องจากมีภาวะระดับไขมันในเลือดผิดปกติ (Dyslipidemia) เป็นปัจจัยการเสี่ยงโรค (Risk factor) อย่างหนึ่งของการเกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ การมีระดับไขมันสูงในเลือดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือด ทำให้มีความยืดหยุ่นน้อย และหนาขึ้น จนเกิดสภาพของหลอดเลือดแข็ง และตีบ (Atherosclerosis) เป็นผลให้เกิดลิ่มเลือดขึ้นในหลอดเลือดหรือในหัวใจ (Thrombosis) จากนั้นเกิดเนื้อตายเนื่องจากขาดการไหลเวียนของโลหิต (Infarction) ตามมา (จันทนี, 2545) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญในปัจจุบัน

ไขมันในโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงข้อหนึ่งของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ การเปลี่ยนแปลงอาหาร และการออกกำลังกายสามารถลดระดับไขมันในเลือดได้ ถ้าหากระดับคลอเลสเตอรอล (Cholesterol) ในเลือดสูง ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดแดงมีลักษณะเป็นคราบ (Plaque) ทำให้หลอดเลือดแดงแคบลง ส่งผลให้หลอดเลือดแข็ง และตีบ (Atherosclerosis) โดยก่อให้เกิดอาการเจ็บหน้าอกเนื่องจากหัวใจขาดเลือด หรือ อัมพฤกษ์ หากคราบไขมันหลุดจากผนังหลอดเลือดแล้วไปอุดตันในเส้นเลือด จะทำให้เกิดอาการหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (Stroke) เพื่อแก้ปัญหาการเกิดโรคดังกล่าว จึงมีการศึกษาผลิตยาลดระดับไขมันในเลือดซึ่งนับวันจะมีความสำคัญ และมีความจำเป็นมากขึ้น ซึ่งยาที่ลดระดับไขมันในเลือดมีหลายชนิด แบ่งออกได้เป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่

กลุ่ม Bile Acid Sequestrants เช่น Cholestyramine และ Colesevelam ลดระดับโคเลสเตอรอลลง 7-25 % แอล-ดี-แอล โคเลสเตอรอลลง 11-36 % มีผลต่อ เอช-ดี-แอล และไตรกลีเซอไรด์ลดลงเล็กน้อย

กลุ่ม Niasin ได้แก่ Nicotinic acid หรือ Niacin สามารถลดไขมันในเลือดได้ทั้งโคเลสเตอรอล และ ไตรกลีเซอไรด์ สามารถเพิ่มไขมัน เอช-ดี-แอล ได้มากที่สุดในบรรดายาที่มีอยู่ แต่ไม่เป็นที่นิยมใช้ เนื่องจากผลแทรกซ้อนจากยามีมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กลุ่ม Fibrates เช่น Gemfibrozil Bezafibrate Fenofibrate ได้ผลดีในการลดไขมันไตรกลีเซอไรด์ ลดลงได้ 20-40 % ขึ้นกับขนาดยา ลดโคเลสเตอรอลได้น้อยมาก (8-10 %)

กลุ่มอื่นๆ เช่น Orilstat เป็นยาที่ใช้ลดน้ำหนัก ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการดูดซึมของไขมันที่รับประทานเข้าไปในลำไส้

และกลุ่มสแตติน (Statins) เช่น Fluvastatin Atorvastatin Pravastatin Simvastatin Cerivastatin และ Rosuvastatin ยากลุ่มนี้เป็นกลุ่มเด่นมากในการลดไขมันโคเลสเตอรอล โดยสามารถลดระดับโคเลสเตอรอล และ แอล-ดี-แอล โคเลสเตอรอล ได้ดีมาก (25-40 %) เพิ่มเอช-ดี-แอล 6-10 % ลดไตรกลีเซอไรด์ได้ 10-20 % และยังส่งผลดีต่อหลอดเลือดแดงเพราะกลไกการลดไขมันไม่มีผลต่อผนังหลอดเลือด

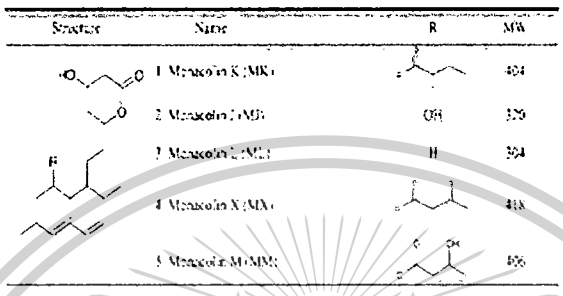
ยาในกลุ่มสแตตินมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลในตับ ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ควบคุมอัตราการสร้างคลอเลสเตอรอล (Rate controlling enzyme) ให้ลดลง ทำให้ไขมันบางชนิดในเลือด คือ Low-density lipoproteins (LDL) ซึ่งเป็นไขมันชนิดไม่ดี ถ้ามีมากจะทำให้เกิดหลอดเลือดแดงตีบได้ โดยพาคลอเลสเตอรอลจากตับไปสู่ร่างกาย ถ้ามีคลอเลสเตอรอล และไขมันไปเกาะอยู่ตามผนังของหลอดเลือดจะส่งผลให้ลดการไหลเวียนของเลือดในร่างกาย ทำให้ออกซิเจนที่ไปเลี้ยงหัวใจ สมอง และส่วนต่างๆ ของร่างกายลดลงตามไปด้วย แต่ถ้ามีคลอเลสเตอรอล และไขมันในเลือดต่ำจะเป็นการช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจ การไหลเวียนโลหิตในหลอดเลือด ปวดเค้นอก สมองขาดเลือด และหัวใจวายได้ จึงศึกษาการผลิตยาให้ได้มากที่สุด ในเวลาที่รวดเร็ว และลงทุนต่ำ การสกัดยากลุ่มนี้ได้จากเชื้อรา เช่น *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrinum* (Alberts และคณะ, 1980 และ Alberts, 1988) และ *Monascus* sp. (Endo, 1992) เป็นต้น

โมแนสคัสเป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตสารยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอล ตัวอย่างเช่น M. ruber ซึ่งผลิตสารมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลโดยมีชื่อเรียกต่างกันไป ได้แก่ monacolin J, monacolin K, monacolin L, monacolin M และ monacolin X เป็นต้น (Endo และคณะ, 1985; Endo และคณะ, 1986; Komagata และคณะ, 1989) (ตารางที่ 1.1) ในทางการค้าจะเรียกสารนี้ว่าโลวาสแตติน (Lovastatin) มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3 – hydroxyl – 3 – methyl-glutareyl coenzyme A (HMG-CoA) reductase ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสร้างคลอเลสเตอรอล ในกระบวนการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล ดังนั้นคุณสมบัติการออกฤทธิ์จึงส่งผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

โดยตรงต่อการลดปริมาณคลอเลสเตอรอลในผู้ป่วยที่มีปริมาณคลอเลสเตอรอลชนิด LDL ในเลือดสูง

ตารางที่ 1.1 โครงสร้างโมนาโคลินชนิดต่างๆ



ที่มา ; Li และคณะ, 2004

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาคัดเลือกเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่กลุ่มผู้วิจัยคัดแยกและเก็บรักษา รวมถึงการคัดแยกจากธรรมชาติ และปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีความสามารถใช้แป้ง หรือข้าว สำหรับการเจริญ และการผลิตโมนาโคลิน

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตโมนาโคลิน บนอาหารแข็งที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร

3. ศึกษาการออกฤทธิ์ของยาเบื้องต้น และผลข้างเคียง

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตโมนาโคลิน บนอาหารแข็งที่บรรจุในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

นำเชื้อราโมแนสคัสที่กลุ่มผู้วิจัยเก็บรวบรวม มาคัดแยกหาสายพันธุ์ที่ผลิตโมนาโคลินแต่ไม่สร้างสารซิตรินิน (citrinin) จากนั้นนำเชื้อมาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ผลิตสารโมนาโคลินในปริมาณเพิ่มขึ้น โดยใช้แป้ง (มันเส้น) และข้าว เป็นแหล่งอาหาร เชื้อราโมแนสคัสที่คัดแยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

นำมาศึกษาการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตโมนาโคลิน ได้แก่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น รูปแบบการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ความชื้น การผสมผสาน อุณหภูมิ เป็นต้น โดยสภาวะเลี้ยงเชื้อที่ดีต้องปราศจากการสร้าง และสะสมสารซิตรินิน โมนาโคลินที่ผลิตได้จะนำมาศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ 3 – hydroxyl – 3 – Methy lglutareyl coenzyme A (HMG-CoA) reductase และการออกฤทธิ์ของสาร สุดท้ายจึงขยายขนาดการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ถังหมัก 5.0 ลิตร ที่บรรจุแป้ง (มันเส้น) หรือข้าว ที่ปริมาณต่างๆ

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

คัดแยกเชื้อ *Monascus* sp. ที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน นำเชื้อราที่คัดแยกด้วยวิธี natural selection มาศึกษาลักษณะและสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์ เชื้อราที่แยกได้นำมาศึกษาการสร้างโมนาโคลิน โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง (solid state fermentation) ที่เป็นวัสดุทางการเกษตร เลือกวัสดุทางการเกษตรที่เชื้อราเจริญได้ดีที่สุด มาศึกษาการเจริญในสภาวะต่างๆ ได้แก่ ผลกระทบจากชนิดของเชื้อเริ่มต้น (inoculumn) ความชื้นเริ่มต้น วิธีเตรียมวัสดุทางการเกษตรอย่างเหมาะสม การเจริญในสภาวะนิ่ง และสภาวะหมุนขวด เพิ่มปริมาณอาหารจาก 50 กรัม ไปจนถึง 1000 กรัม และขนาดของขวดเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างผลิตภัณฑ์

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดแยกเชื้อราโมแนสคัสที่สามารถเจริญได้ดีบนแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลัง โครงการวิจัยนี้มุ่งผลสำเร็จไปที่การนำความรู้เบื้องต้นจากการเลี้ยงเชื้อโมแนสคัสบนอาหารแข็งเพื่อผลิตสารโมนาโคลินในฟลาสก์เลี้ยงเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร และในภาชนะขนาด 5.0 ลิตร โดยประยุกต์ใช้ประสบการณ์จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลวด้วยถังหมักขนาด 5.0 – 20.0 ลิตร และบนอาหารแข็งด้วยถังหมักขนาด 5.0 ถึง 10.0 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

การเพิ่มขึ้นของระดับคลอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ มีผลทำให้ปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดแดงสูงมากขึ้น สารลดระดับไขมันที่มีผลยับยั้งโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG coenzyme A reductase จัดเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจกว่ายาชนิดอื่นที่นำมาใช้รักษาอาการระดับคลอเลสเตอรอลในเลือดสูง รวมไปถึงการควบคุมอาหารที่รับประทาน หรืออาหารเสริม ข้าวแดง (ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนเมล็ดข้าว) เป็นผลิตภัณฑ์ทางอาหารที่สามารถใช้ลดระดับไขมันในเลือด ซึ่งได้ทดลองแล้วทั้งในสัตว์ และมนุษย์ (Wang และคณะ, 1997; Li และคณะ, 1998; Heber และคณะ, 1999) ข้าวแดง หรืออังคัก (ในภาษาจีน) มีการใช้อย่างแพร่หลายในประเทศจีนมานานกว่าพันปีแล้ว โดยนำไปใช้ในแง่เป็นอาหาร ยาช่วยย่อยอาหาร และการไหลเวียนโลหิต งานวิจัยในปัจจุบันเผยให้เห็นองค์ประกอบหลักในข้าวแดงที่ได้จากการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสบนเมล็ดข้าว มีสารออกฤทธิ์ทางยา ได้แก่ สารประกอบโมนาโคลินชนิดต่างๆ (Ma และคณะ, 2000 และ Hebers และคณะ, 2001) ซึ่งสารดังกล่าวพบว่าให้ผลลดระดับคลอเลสเตอรอล (Endo, 1979, 1980, 1985; Endo และคณะ, 1976, 1985 ; Brown และคณะ, 1976) โมนาโคลินสร้างขึ้นระหว่างการเจริญของโมแนสคัสในระยะคงที่ (stationary phase) โดยจัดเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดทุติยภูมิ (secondary metabolite) กลุ่มผู้วิจัยรายงานการวิจัยก่อนหน้า (Yongsmith และคณะ, 1990, 1994, 2004 ; Kriarak และคณะ, 1991, 1999, 2000) ศึกษาการเจริญและการสร้างสารสีผสมอาหาร ซึ่งมีลักษณะการเจริญ และกระบวนการสร้างที่คล้ายกัน จึงสามารถนำความรู้ความเข้าใจจากการทดลองก่อนหน้า มาประยุกต์ใช้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโมนาโคลินบนอาหารแข็ง เทคโนโลยีการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นจากในอดีต โดยหันไปศึกษาการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ซึ่งทำได้ง่าย แต่ก็มีข้อจำกัดในแง่ของอุปกรณ์ที่มีราคาแพง สำหรับเทคโนโลยีการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง สามารถทำได้ง่ายเนื่องจากใช้เทคโนโลยีไม่ซับซ้อน และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตในอุตสาหกรรมระดับเล็ก-กลาง (SME) อีกทั้งประเทศไทยมีผลผลิตธัญพืชทางการเกษตรหลายชนิดที่มีราคาถูก จึงสามารถนำมาเพิ่มมูลค่า เพื่อใช้ทั้งภายในประเทศ และการส่งออก จะช่วยยกระดับคุณภาพชีวิตในแง่ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดเนื่องจากภาวะระดับคลอเลสเตอรอลสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2.1 เชื้อราโมแนสคัส

ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัสสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (Alexopoulos และ Mims , 1979)

Class Ascomycetes

Subclass Plectomycetidae

Order Eurtials

Genus *Monascus*

โมแนสคัสแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ตามความแตกต่างทางสรีรวิทยา และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ *M. pilosus, M. purpureus, M. ruber* (Hawksworth และ Pitt, 1983) และ *M. floridanus* (Bridge และ Hawksworth, 1985 และ Barnard และ Cannon, 1987) เจริญได้ดีบนอาหารแข็งในรูปข้าวแดง (Ang-kak) เพื่อใช้ปรุงแต่งสีในไวน์ การผลิตเต้าหู้ยี้ ใช้ถนอมอาหารประเภทเนื้อ ใช้รักษาโรครวมทั้งใช้เป็นสีผสมในอาหาร ยา และ เครื่องสำอาง ต่อมาผลิตเป็นการค้าในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน จีน และเยอรมัน (Hendry และ Houghton, 1992 ; Kumari และคณะ , 2009)

ในปี 1920 Church รายงานถึงการทดลองแยกสายพันธุ์ที่ได้จากข้าวแดงของประเทศจีน จนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่สร้างสารสีแดงคือ *M. purpureus* ต่อมา Palo และคณะ (1960) ได้ทดลองใช้เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ผลิตข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอสมควร และสามารถนำข้าวแดงมาใช้เป็นสีผสมอาหารได้โดยตรง ภายหลังจึงมุ่งความสนใจไปที่การผลิตสารต่าง ๆ โดยการเจริญบนอาหารเหลว (Submerged cultivation) (Lin,1973) ทำให้มีรายงานการผลิตสีในอาหารเหลวต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก (Shephered และ Carels, 1983 ; Yoshimaru และคณะ, 1975 ; Lee และคณะ , 1995)

เชื้อราโมแนสคัสนอกจากสร้างสารสีแล้ว ยังสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด สาร monascidin A จากเชื้อรา *M. purpureus* (Wong และ Bau , 1977) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร ได้แก่ *Bacillus* sp. *Streptococcus* sp. และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Pseudomonas sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ เอทธานอล สารโมนาโคลิน ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และสารช่วยในการตกตะกอน (Flocculants) อีกด้วย (Fink-Gremmels และ Leistner, 1989)

ลักษณะสันฐานวิทยา และการสืบพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส

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

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

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

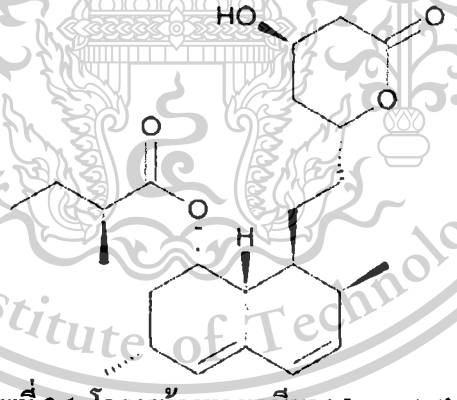
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สปอร์ จะบรรจุรวมอยู่ภายในแอสคัส (Ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์งอกออกมา จากนั้นจึงเริ่มต้นการเจริญใหม่ต่อไป

2.2 ความสัมพันธุ์ระหว่างสารโมนาโคลิน และ คลอเลสเตอรอล (Alberts และคณะ, 1998)

คุณสมบัติสารโมนาโคลิน

โมนาโคลินหรือที่รู้จักทางการค้าว่า โลวาสแตติน ระบบการเรียกชื่อ (IUPAC) [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) น้อยกว่า 5% การจับโปรตีนในกระแสเลือด (Binding protein) มีมากกว่า 95% กระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ยาออกฤทธิ์ต่อตับ (CYP3A substrate) ส่วนค่าครึ่งชีวิต (Half life) เท่ากับ 1.1-1.7 ชั่วโมง เมื่อรับประทานยาไม่มีผลกระทบ (Negligible) ต่อการขับถ่าย (Excretion) ซึ่งตรวจพบเพียง 10 % ในปัสสาวะ และ 83 % ในอุจจาระ (ภาพที่ 2.1)



<u>ภาพที่ 2.1</u> โครงสร้างทางเคมีของ Lovastatin

ที่มา : Dhale และคณะ, 2007

ประวัติในการศึกษาสารโมนาโคลิน

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

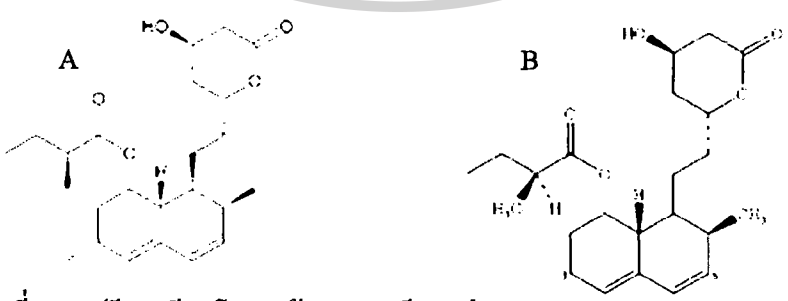
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

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

ในปี 1976 Endo และคณะ ได้พบสารคอมแพคตินหรือในทางการค้าเรียกว่า เมวาสแตติน (Mevastatin) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *P. citrium* ได้ทำการวิจัยพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์เป้าหมาย และลดการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล จึงเป็นผู้ริเริ่มทำให้มีการค้นคว้า และศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้ง HMG CoA reductase ในธรรมชาติจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และค้นพบเมแทบอลิซึมของ สารโมนาโคลิน (ภาพที่ 2.2A) ที่แยกได้จากเชื้อราในเวลาต่อมา โครงสร้างสารโมนาโคลินเสถียรและคงตัว แตกต่างกับสารคอมแพคตินที่มีกลุ่ม alphamethyl ในโครงสร้างวงแหวน hexahydronaphthalene

อย่างไรก็ตามในปี 1980 พบว่าสารคอมแพคติน มีความเป็นพิษในสัตว์ เพราะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันระหว่าง คอมแพคติน และโมนาโคลิน ยากต่อการตรวจสอบ (ดังแสดงในรูปที่ 2.2B) การศึกษาทางแพทย์เกี่ยวกับสารโมนาโคลิน ได้ถูกระงับชั่วคราว จึงเปลี่ยนไปศึกษาเรื่องผลกระทบของสารที่มีต่อสัตว์ทดลอง

ในปี 1982 มีการศึกษาระดับห้องปฏิบัติการเพื่อสำรวจคุณสมบัติเกี่ยวกับสารโมนาโคลิน ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *A. terreus* พบว่าในคนไข้ภาวะเสี่ยง สารโมนาโคลินนี้สามารถลดคลอเลสเตออลชนิด LDL ได้ และเมื่อสนับสนุนการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อสัตว์ทดลอง ปรากฏว่าไม่มีฤทธิ์เป็นพิษ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการศึกษาสารคอมแพคติน ดังนั้นจึงได้ดำเนินงานวิจัยทางการแพทย์ต่อไป



<u>ภาพที่ 2.2</u> เปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีระหว่าง Lovastatin (A) และ Compactin (B)

ที่มา : Dhale และคณะ (2007) และ Belo และคณะ (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

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

ในปี 1998 องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา สั่งห้ามขายอาหารเสริมที่มีส่วนผสมของข้าวแดงจากการหมักโดยใช้ยีสต์เป็นหัวเชื้อ ภายหลังพบว่ามีส่วนประกอบของโมนาโคลินในอาหารเสริม จึงมีข้อโต้แย้งว่าอาหารเสริม มีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติทางยา

2.3 การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา

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

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

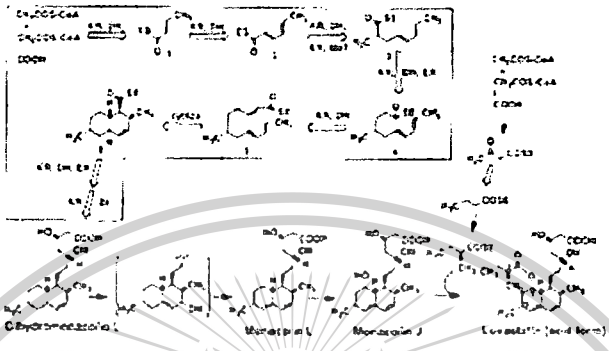
- High-density lipoproteins (HDL) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประโยชน์ โดยพาคลอเลสเตอรอล จากร่างกายเข้าสู่ตับ หากมี HDL ในปริมาณสูงส่งผลให้เกิดโรคหลอดเลือดน้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ LDL -C (Low density lipoprotein cholresterol) ซึ่งเป็นไลโพโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีในตับมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่พาคลอเลสเตอรอลจากตับไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อเนื้อเยื่อต้องการใช้คลอเลสเตอรอล ซึ่งเป็นจุดสำคัญที่ต้องลดระดับคลอเลสเตอรอลส่วนเกินในร่างกายโดยรักษาให้ร่างกายทำงานเป็นปกติอยู่เสมอ (Alberts และคณะ, 1998)

2.4 กระบวนการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน

สารโมนาโคลินประกอบด้วยโพลีคีไทด์ 2 สายจากอนุพันธ์ของอะซีเตต โดยโพลีคีไทด์สายแรก อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น Dihydromonacolin L monacolin L และ monacolin J ตามลำดับ ส่วนโพลีคีไทด์สายที่สอง อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เชื่อมต่อกับโพลีคีไทด์สายแรกในรูป monacolin J โดยพันธะเอสเทอร์แล้วได้สารโลวาสแตตินในรูปกรด (acid form) (ภาพที่ 2.3) สารประกอบนี้สร้างโดย *A. terreus* (Hendrickson, 1999)



ภาพที่ 2.3 กระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของ Lovastatin

ที่มา : Hirama (1982) และ Hirama (1983)

กลไกการทำงานของโมนาโคลิน (จันทนี, 2545)

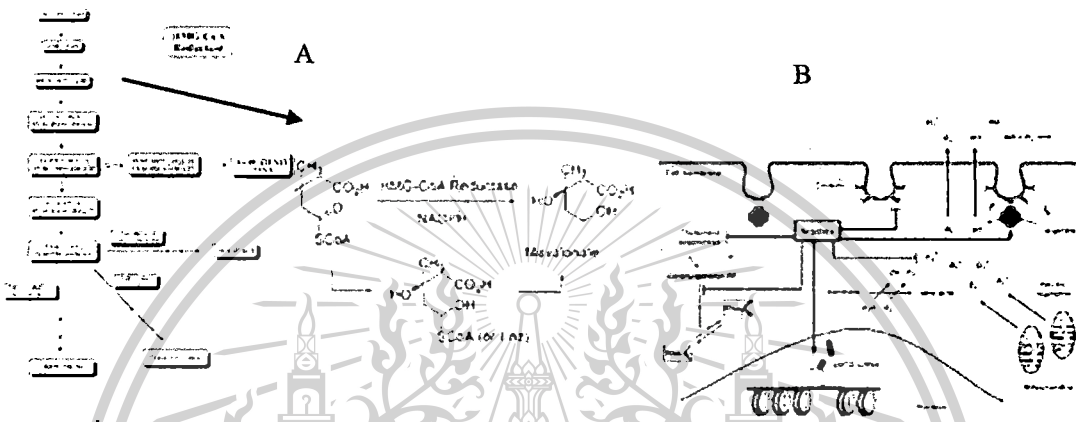
สารโมนาโคลินสามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase อย่างจำเพาะ โดยที่เอนไซม์ HMG-CoA reductase จะใช้เป็นตัวกลางในการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นเมวาโลเนต (Mevalonate) และสังเคราะห์เป็นคลอเลสเตอรอลต่อไป (Alberts, 1998) สารโลวาแตตินจะขัดขวางการสร้างคลอเลสเตอรอล โดยการไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase จึงทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอล (ภาพที่ 2.4) สารโมนาโคลินไม่แสดงฤทธิ์ทางยาในรูปโครงสร้างปกติ แต่เมื่อโครงสร้างถูกสลายด้วยน้ำ (Hydrolysis) เป็น β-hydroxy acid จะทำให้สารออกฤทธิ์ได้ในร่างกาย (ภาพที่ 2.5)

2.5 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา (จันทนี , 2545)

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

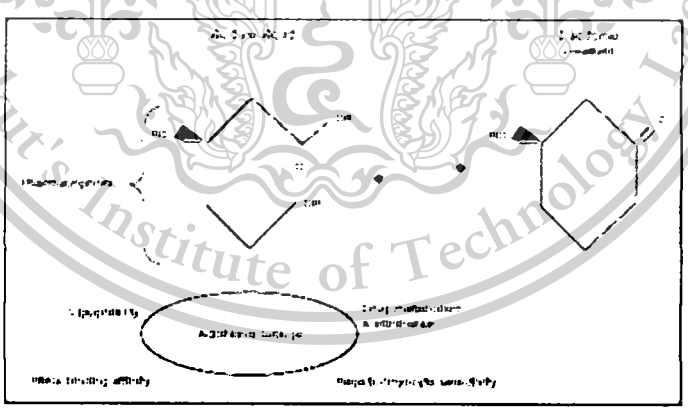
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ยาลดไขมันในเส้นเลือด (Antihyperlipidaemic drug) มีอยู่หลายชนิด แต่ละชนิดมีคุณสมบัติและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน ได้แก่



ภาพที่ 2.4 A วิถีการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอลทางชีวภาพ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase เป็นขั้นตอนควบคุมอัตราเร็วการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอล

B : สารตัวกลางสแตตินมีผลโดยตรงต่อ Endothelial cells และเนื้อเยื่อต่างๆ



ภาพที่ 2.5 สเตตินชนิดต่างๆ ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายจะอยู่ในรูปของกรดที่ทำงานได้ (active acid form) จึงสามารถยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ขณะที่ Lovastatin ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายจะอยู่ในรูปของแลกโตน (lactone form) จึงต้องเปลี่ยนรูปไปเป็นกรดก่อน จึงสามารถออกฤทธิ์เพื่อเข้าจับกับเอนไซม์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

1. nicotinic acid ได้แก่ niacin (Vitamin B_3)

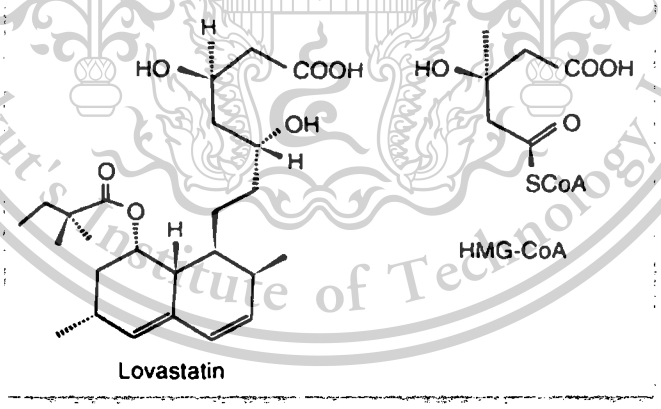
2. fibric acid derivative หรือ fibrate ได้แก่ bezafibrate , gemfibrozil , fenofibrate

3. bile acid sequestrants ได้แก่ cholestyramine และ cholestipol

4. statin (hydroxy-methylglutaryl-coenzymeA(HMG-CoA)reductase inhibitor)

5. miscellaneous ได้แก่ probucol

สารโมนาโคลินหรือโลวาสแตติน เป็นยาในกลุ่มสแตติน ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (HMG-CoA reductase inhibitor) ยากลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายกับ HMG-CoA (ภาพที่ 2.6) จะออกฤทธิ์ยับยั้งแบบผันกลับได้โดยไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Reversible competitive inhibitor) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ตัวอย่างยากลุ่มสแตติน ได้แก่ Pravastatin , Fluvastatin และ Atorvastatin เป็นต้น ปัจจุบันอาจกล่าวได้ว่ายาในกลุ่มสแตตินนี้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลด LDL- C



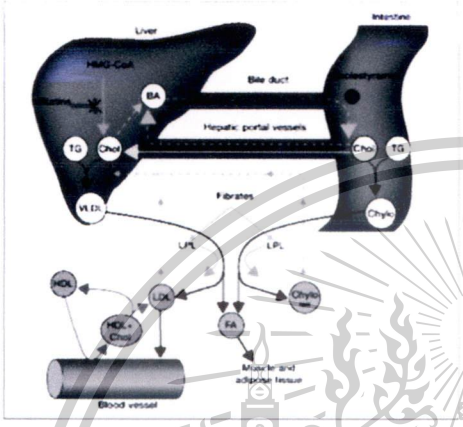
ภาพที่ 2.6 ความคล้ายคลึงระหว่างโครงสร้าง Lovastatin และ HMG – CoA

2.6 กลไกการออกฤทธิ์

ยากลุ่มโมนาโคลินออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างคลอเลสเตอรอลในตับ โดยเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (3-hydroxyl 3-methyl-glutaryl-coenzyme A) ซึ่งเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตัวควบคุมการสร้างคลอเลสเตอรอล (Rate controlling enzyme) ให้ลดลง ผลที่ตามมา คือ ทำให้มีการเพิ่มปริมาณของตัวรับไลโพโปรตีน (LDL receptor) ที่ผนังเซลล์ของตับ เพื่อที่จะเพิ่มการจับ LDL จากเลือดทำให้ LDL-C ลดลง (ภาพที่ 2.7)



<u>ภาพที่ 2.7</u> การขนส่งไขมัน และเภสัชวิทยาของระดับไขมันในเลือด

BA: bile acid; Chol: cholesterol; Chylo: chylomicron; Chylo rem: chylomicron remnant; FA: fatty acid; HDL: high-density lipoprotein; HMG-CoA: hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase; LDL: low-density lipoprotein; LPL: lipoprotein lipase; TG: triglyceride; VLDL: very low-density lipoprotein.

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3. สามารถเพิ่มระดับ HDL-C (High density lipoprotein - cholresterol) ได้ 5-10 % โดยแสดงความสามารถในการออกฤทธิ์ยาในกลุ่มสแตติน ได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ระดับการออกฤทธิ์ของโมนาโคลิน

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

ที่มา : จันทนี, 2545

2.7 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน

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

2. ผลกระทบต่อกล้ามเนื้อ อาการที่ไม่พึงประสงค์ที่พบรองลงมาคือ กิจกรรม Creatine kinase (CK) สูงขึ้น โดยเอนไซม์ตัวนี้เร่งการขนย้ายหมู่ฟอสเฟตจาก Creatine phosphate ไปยัง Adenosine diphosphate (ADP) และในขั้นสุดท้ายได้ Adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งเป็นแหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

พลังงานที่สำคัญ เอนไซม์ CK มีเฉพาะในกล้ามเนื้อ และพบได้บ้างในเนื้อเยื่อสมอง กระบวนการอิเล็คโตรโฟลิซิสสามารถแยกเอนไซม์ CK ได้อย่างน้อย 3 ตัว โดยที่ CK จากกล้ามเนื้อลายและสมองมีเพียงกลุ่มเดียวแต่ต่างตำแหน่งกัน ส่วน CK จากกล้ามเนื้อหัวใจจะให้ 2 กลุ่มโดยที่กลุ่มหนึ่งคล้ายกับของกล้ามเนื้อลาย ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งอยู่ระหว่าง CK ของกล้ามเนื้อลายและของเนื้อเยื่อสมอง เมื่อพบว่ากิจกรรมของ CK ในซีรั่มสูงกว่าปกติ โดยจะเริ่มเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 3 – 6 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดใน 24 - 36 ชั่วโมง มีผลทำให้หัวใจวายได้ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจภาวะของหัวใจวาย เมื่อเริ่มรู้สึกว่ามีการเจ็บหน้าอก แต่เอนไซม์ตัวนี้จะถูกกำจัดออกจากพลาสม่าได้โดยเร็ว จึงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้กลับสู่สภาวะปกติได้ภายในเวลาเพียง 3 วัน โดยเมื่อเทียบกับเอนไซม์ตัวอื่น เช่น SGOT LDH เป็นต้น และอาจทำให้เกิดความผิดปกติของกล้ามเนื้อ (Myopathy) โดยเฉพาะเมื่อใช้ยากลุ่มนี้ร่วมกับยาลดไขมันในเลือดกลุ่ม Fibric acid derivatime และ Nicotinic acid ส่วนยาอื่นๆ ที่จะมีผลทำให้อาการไม่พึงประสงค์ต่อกล้ามเนื้อถ้าให้ร่วมกับยาในกลุ่มสแตติน ได้แก่ ยาที่ถูกเมแทบอไลส์โดย Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4 (CYP3A4) เช่นเดียวกับสแตติน ได้แก่ Erythromycin Itraconazole ดังนั้นจึงควรวัดกิจกรรมของเอนไซม์นี้ และโดยเฉพาะผู้ป่วยที่รับประทานยาสแตตินร่วมกับยาเหล่านี้จะต้องลดขนาดยาสแตตินลง ไม่ให้ยามากกว่า 25 เปอร์เซ็นของขนาดสูงสุดที่ใช้ในการรักษา

2.8 ประโยชน์ในการรักษา

ใช้กับผู้ป่วยที่มีคลอเลสเตอรอลสูงทุกชนิดซึ่งอาจใช้ตัวยับยั้งรีดักเตสเพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับยาอื่น ได้แก่ Bile acid-binding resins หรือ Nicotinic acid ซึ่งจะต้องระมัดระวังเรื่องของปฏิกิริยาสัมพันธ์ของยาที่อาจทำให้เกิดกล้ามเนื้อผิดปกติได้ ยาในกลุ่มสแตตินสามารถลดอัตราของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ และ อัตราการตายในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีระดับไขมันสูงขณะเดียวกันยากลุ่มนี้ยังมีบทบาทในป้องกันปฐมภูมิ (Primary prevention) สำหรับผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคเลือดหัวใจ ได้แก่ ผู้ที่มีไขมันในเลือดสูงกับการมีโรคความดันโลหิตสูงหรือเบาหวาน เป็นต้น

2.9 ความสัมพันธ์ระหว่างเมแทบอลิซึมปฐมภูมิ และเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ

สารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสจัดเป็นสารเมแทบอไลท์ประเภททุติยภูมิ (Hassan, 2001) ซึ่งไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับหน้าที่เมแทบอลิซึมที่สำคัญๆ ของสิ่งมีชีวิตที่สร้างขึ้นมา ลักษณะประการหนึ่งของสารประกอบชนิดนี้ คือ การสร้างสารหลังจากช่วงการเจริญผ่านไปแล้ว การแยกจากกันระหว่างการเจริญของเซลล์กับการสร้างสารทุติยภูมิ ในบางครั้งก็ใช้เป็นคำจำกัดความของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สารทุติยภูมิ แต่กลไกการสร้างดังกล่าวไม่สามารถยึดเป็นหลักในการจัดจำแนกได้ เพราะว่าในบางกรณีสารทุติยภูมิสามารถสังเคราะห์ในระหว่างการเจริญ สารทุติยภูมิอยู่ในผลิตภัณฑ์หลักประเภทที่ 3 ตามการแบ่งประเภทของผลิตภัณฑ์หลักจากกระบวนการหมัก ดังนี้

1. ผลิตภัณฑ์หลักจากเมแทบอลิซึมแบบปฐมภูมิโดยตรง
2. ผลิตภัณฑ์หลักจากเมแทบอลิซึมแบบปฐมภูมิโดยอ้อม
3. ผลิตภัณฑ์หลักที่ไม่เกี่ยวกับการเมแทบอลิซึม

ผลิตภัณฑ์อื่นที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

Kranz และคณะ (1992) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* สร้าง Methyl ketone ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสใน Blue cheese ได้ดีใกล้เคียงกับ *P. roquefortii* เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นกรดไขมันสายสั้น ๆ ข้าวหมักสีแดง (Red fermented rice: RFR) เป็นที่รู้จักในด้านยาสำหรับการรักษาอาการอาหารไม่ย่อย และการหมุนเวียนโลหิตในประเทศจีน และมีการบริโภคเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพกันอย่างมาก (Wang และคณะ, 2002) Haws และคณะ (1959) พบโครงสร้างของรูโบรพังตาติน (Rubropunctatin, $C_{21}H_{22}O_5$) ซึ่งเป็นสารสีส้ม และสารสีเหลืองโมนาสซิน (Monascin, $C_{21}H_{26}O_5$) ที่แยกได้จากเชื้อรา *M. rubropunctatus* Sâto Fielding และคณะ (1961) ศึกษาการสร้างสารสีที่ Nishikawa แยกได้จาก *M. purpureus* Went คือ โมนาสโครูบริน (Monascorubrin, $C_{23}H_{23}O_5$) และ โมนาสโคฟลาวิน (Monascoflavin) หรือ โมนาซิน Nakanishi และคณะ (1959) แสดงให้เห็นว่าโมนาสโครูบรามีน (Monascorubramine) และรูโบรพังเตตามีนเปลี่ยนมาจากโมนาสโครูบริน และรูโบรพังตาติน (สีส้ม) ตามลำดับ Hiroi และคณะ (1975) ศึกษาโครงสร้างของสารสี 2 ชนิด คือ โมนาสโครูบริน (สีส้ม) และรูโบพังเตตามีน (สีม่วง) Manchand และคณะ (1973) พบว่าเชื้อราโมแนสคัสแต่ละสายพันธุ์ให้สารสีแตกต่างกันออกไปและพบการสร้างสารสีเหลืองตัวใหม่จากเชื้อรา *M. anka* Sweeny และคณะ (1981) สามารถสกัดสารสีจากโคจิของ *M. anka*

2.10 การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง (บุษบา, 2542)

เชื้อราที่เจริญบนข้าวสามารถปล่อยสารสีออกมานอกเซลล์ได้มาก ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี จึงสร้างสารสีได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่นิยมใช้หมักข้าวแดง ได้แก่ *M. purpureus* และ *M. anka* ซึ่งการผลิตข้าวแดงให้ได้คุณภาพดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.
140542

ขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญหลายประการที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์เชื้อรา สภาวะเลี้ยงเชื้อ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และค่าพีเอช เป็นต้น โดยทั่วไปสายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัสเจริญบนเมล็ดข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั่วทั้งผิวหน้า และทะลุเข้าไปภายในเมล็ดข้าวนั้นก็จะมีการสร้างสารผลิตภัณฑ์ได้ภายหลังจากการบ่มได้นาน 3 วัน สารเหล่านี้เมื่อมีการนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าสารสีแดงทั่วไปจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 420 และ 500 นาโนเมตร บางสายพันธุ์ที่ให้สีข้าวแดงหรือ อังคัก เป็นสีแดงสด หรือแดงเข้ม จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สูงกว่าที่ 420 นาโนเมตร เช่น ที่พบในสายพันธุ์ของ *M. purpureus* หรือ *M. anka* แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงเข้มคล้ำ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร เป็นต้น เช่น สายพันธุ์ *M. barkeri* หรือ *M. kaoliamg*

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

คัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ด้วยวิธี natural selection เพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดี บนอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว มาใช้เพื่อศึกษาการผลิตโมนาโคลินบนอาหารแข็งธัญพืชต่างๆ

3.2 สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

Monacolin K (sigma-aldrish) citrinin (sigma-aldrish) และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ต่างๆ มีคุณภาพระดับ analytical grade ข้าวเสาไห้ (ตราไก่แจ้) ข้าวหอมมะลิ และธัญพืชต่างๆ หาได้จากร้านค้าทั่วไป อาหารเหลว SS medium ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง และแป้งถั่วเหลือง 30 กรัม และ 40 กรัม (ตามลำดับ) ในน้ำกลั่น 1000 มล. สำหรับอาหารแข็ง MYS agar ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 10 กรัม เปปโตน 5 กรัม ยีสต์สกัด 3 กรัม และมอลต์สกัด 3 กรัม และวุ้น 15 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มล.

3.3 การวิเคราะห์

เปอร์เซ็นต์ความชื้นตัวอย่าง คำนวณจาก (W-D)/D x 100 เมื่อ W และ D หมายถึง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง (หลังจากอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่) ตามลำดับ

การวิเคราะห์ปริมาณ Monacolin K ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วยสัดส่วนตัวอย่าง : ethyl acetate ที่ 1 ต่อ 10 (ดัดแปลงจาก Yu and Zhu, 1998 และ Zhang and Liu, 1999) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายมาผสมกับสารละลาย Na2CO3 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง จนพีเอชสารละลายเป็นกลาง จึงนำไประเหยที่ความดันต่ำ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วละลายด้วยเมธานอล แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ส่วนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทำได้โดยนำตัวอย่างที่เชื้อ *Monascus* sp. เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยนำตัวอย่างประมาณ 3 - 5 กรัมน้ำหนักสด มาผสมกับสารละลายเอทานอล 20 มล. ในฟลาสก์ แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียล) แล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนใสสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโมนาโคลินด้วยเครื่อง HPLC (Shizumasu) ต่อกับตัวตรวจวัดชนิด UV-visible spectrophotometer (UV; SPD-10 A VP) (ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร) และคอลัมน์ μBondapakTM C18 (3.9 x 300 mm.) โดยใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) acetonitrile ความเข้มข้น 55 เปอร์เซ็นต์ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที (LC-10 AD VP)

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสวัด Somogyi – nelson (Nelson, 1944) นำตัวอย่างเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญบนอาหารธัญพืช มาผสมกับน้ำกลั่น แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์ citrinin เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ โดยนำตัวอย่าง 30 กรัม มาอบแห้ง แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างประมาณ 2.5 กรัม ใส่ฟลาสต์ขนาด 250 มล. ที่มีสารสกัด (acetonitrile : 4% aqueous KC1 (9 : 1) ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณ 20 มล. แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนใสไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (evaporator) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาละลายด้วย Chloroform ปริมาตร 2.5 มล. สารละลายที่ได้นำมาจุดลงบน TLC plates โดยใช้สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย tolune : ethylacetate : chloroform (80:70:50) และ 1 มล. ของสารละลายกรดฟอร์มิก (formic acid) ความเข้มข้น 90 % จากนั้นนำ TLC ไปสังเกตุด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

การวัดสารสีแดง นำตัวอย่างจากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารธัญพืช มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชม. นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วนำส่วนใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (บุษบา, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 เชื้อ *Monascus* sp. SS14 ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

นำเชื้อราโมแนสคัสที่คัดแยกได้จากงานวิจัยที่ผ่านมา และเก็บรักษาไว้ รวมทั้งการคัดเลือกใหม่จากธรรมชาติ มาทดสอบการเจริญบนอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง มันสำปะหลังเส้น ข้าว และธัญพืชชนิดต่างๆ

3.4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโมแนสคัส

นำจุลินทรีย์ ซึ่งมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ การย้อมสีเซลล์แฟกเจลลา และการใช้สารประกอบซัลเฟอร์ พร้อมศึกษาลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.3 ศึกษาการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งข้าวหอมมะลิในสภาวะวางฟลาสก์นิ่ง

การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง เพื่อผลิตโมนาโคลิน ด้วยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะหยุดนิ่ง และใช้เชื้อเริ่มต้น 2 ชนิด ได้แก่

3.4.3.1 เชื้อเริ่มต้นในรูปของสารละลายสปอร์

นำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงบนอาหาร MYS agar ที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใช้ cock borrow ขนาด 0.5 ซม. ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญจำนวน 1 ชิ้น ใส่ในหลอดอาหารหลอดอาหารวุ้นเอียง (MYS slant) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 5 มล. เพื่อเตรียมสารละลายสปอร์ความเข้มข้น $1*10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นต่อไป

3.4.3.2 เชื้อเริ่มต้นในรูปของเส้นใยเชื้อรา

นำเชื้อรา *Monascus* sp. มาเลี้ยงบนอาหาร MYS agar ที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใช้ cock borrow ขนาด 0.5 ซม. ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญจำนวน 4 ชิ้น ใส่ในฟลาสก์ (ขนาด 250 มล.) ที่บรรจุอาหารเหลว SS medium ปริมาตร 75 มล. (ประกอบด้วยประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 3.0 เปอร์เซ็นต์ และแป้งถั่วเหลือง 4.0 เปอร์เซ็นต์) แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำสารละลายเส้นใยปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เตรียมอาหารธัญพืชสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) ที่มีข้าวหอมมะลิเป็นองค์ประกอบ โดยนำข้าวไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 6 12 18 และ 24 ชม. แล้วนำไปสะเด็ดน้ำเป็นเวลา 2 ชม. นำข้าวที่เตรียมปริมาณ 100 ก. ได้ไปบรรจุฟลาสก์ (ปริมาตร 250 มล.) แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นใส่เชื้อเริ่มต้น (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ที่เป็นสารละลายสปอร์ และสารละลายเส้นใย ลงในฟลาสก์เชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์ความชื้น ปริมาณสารสี ปริมาณโมนาโคลิน และพีเอชในอาหารแข็งตามลำดับ

3.4.4 ศึกษาการการสร้างโมนาโคลินบนอาหารธัญพืชในสภาวะนิ่ง

นำเชื้อเริ่มต้นในรูปของสารละลายเซลล์ (โดยวิธี 3.4.3.2) เพื่อใช้ศึกษาการเจริญและการผลิตโมนาโคลิน บนอาหารธัญพืช ได้แก่ มันสำปะหลังเส้น แห้ว มันฝรั่ง มันแกว (ขนาดประมาณ 1 ตารางเซ็นติเมตร) ข้าวเหนียว ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต และข้าวเจ้าเสาไห้ ในสภาวะหมุนขวด บรรจุธัญพืช (ได้แก่ มันสำปะหลังเส้น แห้ว มันฝรั่ง มันแกว) แต่ละชนิดปริมาณ 50 กรัม ลงในขวดเตรียมอาหารขนาด 200 มล. ส่วนข้าวเหนียว ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวเจ้าเสาไห้ และข้าวหอมมะลิ นำไปแช่น้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วสะเด็ดน้ำนาน 30 นาที จากนั้นจึงนำมา 50 กรัม ไปบรรจุในขวดเตรียมอาหาร อาหารแข็งธัญพืชทั้งหมดนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในอาหารธัญพืช แล้วนำไปเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาหร์ วิเคราะห์ปริมาณความชื้น สารสี และสารโมนาโคลินที่เชื้อราโมแนสคัสผลิตได้

3.4.4 ศึกษาการผลิตโมนาโคลินบนอาหารแข็งข้าวเสาไห้ในสภาวะหมุนขวด

เตรียมอาหารข้าวเสาไห้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) ด้วยวิธีต่างๆ โดยนำข้าวไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 2 ชม. สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 30 นาที บรรจุข้าว 50 กรัม ในขวดเตรียมอาหารปริมาณ 200 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เปรียบเทียบกับการนำข้าวปริมาณ 50 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหาร แล้วไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นจึงใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 5 10 15 20 และ 25 มล. ลงไปในข้าวปลอดเชื้อ และนำไปวางบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 12 ชม. เพื่อให้น้ำซึมเข้าเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง นำเชื้อเริ่มต้นในรูปสารเส้นใย (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงในขวดบรรจุธัญพืช แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความชื้น ปริมาณสารสี ปริมาณโมนาโคลิน และพีเอชในอาหารแข็ง ตามลำดับ

3.4.5 ศึกษาการผลิตโมนาโคลินบนอาหารข้าวเสาไห้ปริมาตรต่างๆ ในสภาวะหมุน

เตรียมอาหารข้าวเสาไห้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) โดยนำข้าวปริมาณ 50 100 200 500 และ 1000 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหารขนาด 200 มล. 500 มล. 1 ลิตร 2 ลิตร และ 5 ลิตร ตามลำดับ แล้วไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นจึงใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 15 30 60 150 และ 300 มล. ลงไปในข้าวปลอดเชื้อ และนำไปวางบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 12 ชม. เพื่อให้น้ำซึมเข้าเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง นำเชื้อเริ่มต้นในรูปสารแขวนลอยใย (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงในขวดบรรจุธัญพืชแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความชื้น ปริมาณสารสี ปริมาณโมนาโคลิน และพีเอชในอาหารแข็ง ตามลำดับ

3.4.6 ศึกษาการเจริญและการผลิตโมนาโคลินในอาหารแข็ง 100 กรัม และ 1000 กรัม ที่เวลาต่างๆ

เตรียมอาหารข้าวเสาไห้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) โดยนำข้าวปริมาณ 50 และ 1000 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหารขนาด 200 มล. และ 5 ลิตร แล้วไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 และ 45 นาที ตามลำดับ จากนั้นจึงใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 15 และ 300 มล. ลงไปในข้าวปลอดเชื้อ นำไปวางบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 12 ชม. เพื่อให้น้ำซึมเข้าเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง นำเชื้อเริ่มต้นในรูปสารแขวนลอยใย (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงในขวดบรรจุธัญพืช แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความชื้น ปริมาณสารสี ปริมาณโมนาโคลิน และพีเอชในอาหารแข็ง ตามลำดับ

3.4.7 ศึกษาการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมัยเลส และการสะสมกลูโคสระหว่างการเจริญ และการสร้างโมนาโคลินของโมแนสคัส

นำตัวอย่างเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญบนอาหารข้าวเสาไห้ปริมาณ 50 และ 1000 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหารขนาด 200 มล. และ 5 ลิตร มาศึกษาการสร้างเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กลูโคอะมัยเลย และการสะสมน้ำตาลกลูโคส โดยวัดกิจกรรมเอนไซม์ในสาระลายอะซิเตต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียน เป็นเวลา 30 นาที

3.4.8 ศึกษาการสร้างซิตรินินในอาหารแข็ง

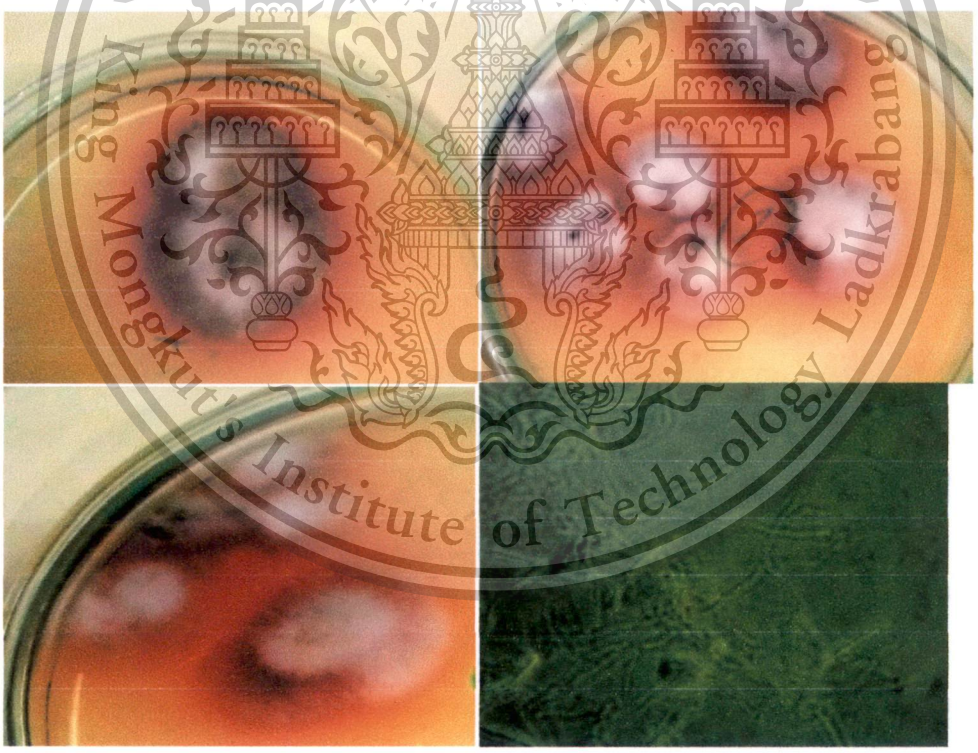
นำตัวอย่างเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญบนอาหารธัญพืชต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาวัดปริมาณซิตรินิน ด้วยเทคนิค TLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 4
ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล

4.1 เชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อรา *Monascus* sp. มาคัดแยกด้วยอาหารแข็ง MYS agar และSS agar เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบบ natural selection โดยสังเกตโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็วในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน งานวิจัยนี้มุ่งไปที่เชื้อจากธรรมชาติที่สามารถผลิตสารยับยั้งคลอเรสเตอรอล (anti-cholesterol) หรือ โมนาโคลิน (monacolin) จากนั้นนำมาศึกษาการสร้างผลิตภัณฑ์โดยอาศัยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (solid state fermentation) ลักษณะสัญฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดแยกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังแสดงในภาพที่ 4.1



<u>ภาพที่ 4.1</u> การคัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

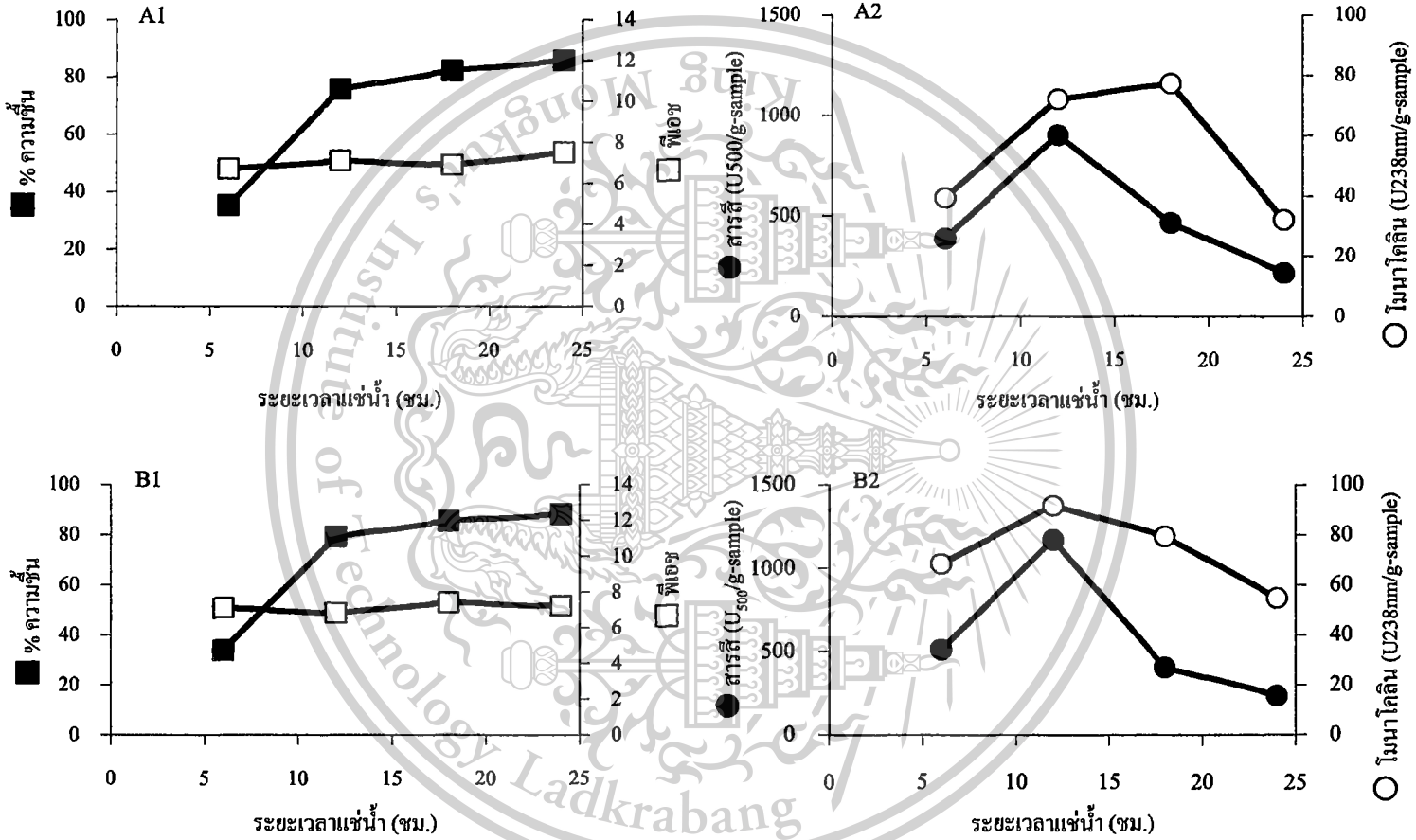
4.2 ศึกษาการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งข้าวหอมมะลิในสภาวะวางฟลาสก์นิ่ง

การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง เพื่อผลิตโมนาโคลิน ด้วยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะหยุดนิ่ง และใช้เชื้อเริ่มต้น 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อเริ่มต้นในรูปของสารละลายสปอร์ ($1*10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 3.0 เปอร์เซ็นต์ และ เชื้อเริ่มต้นในรูปของเส้นใยเชื้อรา ปริมาตร 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในอาหารข้าวหอมมะลิปลอดเชื้อ ซึ่งเตรียมได้โดยแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 6 12 18 และ 24 ชม. แล้วนำไปสะเด็ดน้ำเป็นเวลา 2 ชม. แล้วนำข้าวสะเด็ดน้ำปริมาณ 100 กรัม บรรจุฟลาสก์ (ปริมาตร 250 มล.) แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำเชื้อราไปบ่มที่ที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ภาพ 4.2-A1 และ 4.2-A2 แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปสารละลายสปอร์ พบว่าเมื่อให้ระยะเวลาการแช่ข้าวนานขึ้น ทำให้ข้าวดูดซับน้ำมากขึ้น ส่งผลดีการเจริญของเชื้อรา แต่ระยะเวลาแช่น้ำ 6 ชั่วโมง ข้าวดูดซับน้ำเพียงเล็กน้อย ทำให้เมื่อสิ้นสุดการเจริญในสัปดาห์ที่ 4 มีความชื้นเพียง 35.17 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้เชื้อราเจริญช้า เมื่อระยะเวลาการแช่ข้าวนานขึ้น เมล็ดข้าวจึงดูดซับน้ำมากขึ้น ส่งผลให้การเจริญในสัปดาห์ที่ 4 มีระดับความชื้นในข้าวแดงประมาณ 75-85 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาแช่ข้าวมากกว่า 12 ชั่วโมง ส่งผลให้เมล็ดข้าวดูดซับน้ำมากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการโครงสร้างเมล็ดข้าวหลังการฆ่าเชื้อ ทำให้เมล็ดข้าวเจลาติไนซ์มาก เส้นใยเชื้อราจึงแทรกเข้าไปในเนื้อขาวไม่ดี เพราะการแพร่ของอากาศมีค่าต่ำ สภาพดังกล่าวทำให้การสร้างสารสี และโมนาโคลินมีค่าต่ำกว่า ระยะเวลาแช่ข้าว 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าถ้าระยะเวลาแช่ข้าวนานขึ้น จำเป็นต้องสะเด็ดน้ำนานขึ้น เพื่อกำจัดน้ำส่วนเกิน หรือที่ยังติดค้างบนผิวหน้าเมล็ดข้าว ภาพที่ 4.2-B1 และ 4.2-B2 แสดงการใช้เชื้อเริ่มต้นจากเส้นใยเชื้อรา พบว่ามีรูปแบบคล้ายกันกับการใช้สารละลายสปอร์เป็นเชื้อเริ่มต้น แต่ให้การเจริญเร็วกว่า เนื่องจากเส้นใยเริ่มเจริญได้ทันที ไม่ต้องเสียเวลาในการงอกของสปอร์

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปของสารละลายสปอร์ และเส้นใยเชื้อรา ให้ผลใกล้เคียงกัน จึงเลือกใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปแบบเส้นใย สำหรับการทดลองต่อไป เนื่องจากขั้นตอนการเตรียมทำได้ง่าย ขยายกำลังการผลิตได้ง่าย อีกทั้งลักษณะเส้นใยมีการกระจายตัว ไม่เกาะกันเป็นก้อน pellet การเลี้ยงเชื้อในสภาวะหยุดนิ่ง อาจส่งผลดีต่อการยืดยาวของเส้นใย แต่มีปัญหาเรื่องการผสมผสาน และการถ่ายเทอากาศ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงหันไปใช้วิธีเลี้ยงเชื้อแบบหมุนขวด เพื่อให้มีการผสมผสานตลอดเวลา และเพื่อป้องกันการฉีกขาดของเส้นใย จึงใช้การหมุนที่ความเร็วต่ำ ประมาณ 5-7 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาพที่ 4.2 การผลิตโมนาโคลินองเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนอาหารข้าวหอมมะลิ โดยใช้เชื้อเริ่มต้นสารละลายสปอร์ (A) และเส้นใยเชื้อรา (B) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.2 ศึกษาการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งธัญพืชในสภาวะนิ่ง

การผลิตโมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็งธัญพืชชนิดต่างๆ โดยใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปของสารละลายเซลล์ ใส่ในอาหารธัญพืช ได้แก่ มันสำปะหลัง แห้ว มันฝรั่ง มันแกว (ขนาดประมาณ 1 ตารางเซ็นติเมตร) ข้าวเหนียว ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต และข้าวเจ้าเสาไห้ ในสภาวะนิ่ง บรรจุธัญพืชแต่ละชนิดปริมาณ 50 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล. นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การผลิตโมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในสภาวะนิ่ง

ธัญพืช	เปอร์เซ็นต์ความชื้น (สัปดาห์ที่ 4)	ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/กรัม-ตัวอย่าง)	ปริมาณสารโมนาโคลิน ($U_{238\ nm}$/กรัม-ตัวอย่าง)
ข้าวเหนียว	40.72	2.51	78.75
ข้าวเสาไห้	75.69	9.33	132.77
ข้าวบาร์เล่ย์	42.81	0.52	118.33
ข้าวโอ๊ต	30.41	1.98	106.41
มันสำปะหลัง	62.59	2.17	141.38
มันฝรั่ง	64.83	2.83	76.69
มันแกว	73.18	45.89	37.84
แห้ว	68.84	3.39	85.71

การเลี้ยงเชื้อบนธัญพืชพบว่าลักษณะการจับตัวของธัญพืชแต่ละชนิดมีผลต่อการเจริญอย่างมาก เช่น การเจริญบนมันสำปะหลัง พบการจับเป็นก้อน จับตัวกันแน่น ไม่แยกออกจากกัน มีการเจริญของเส้นใยที่ผิวหน้า เช่นเดียวกับการเจริญบนมันฝรั่ง ข้าวเหนียวมีการจับเป็นก้อน และเชื้อเจริญหนาแน่นที่ภายนอก เมื่อนำมาเขย่าทำให้ก้อนข้าวจับตัวแน่นมากขึ้น ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์ มีลักษณะร่วน และเชื้อเจริญน้อย แต่พบปริมาณโมนาโคลินมาก อาจเนื่องจากความคลาดเคลื่อนในการวัดด้วยสเปกโตโฟโตมิเตอร์ มันแกว และแห้ง พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้ประมาณ 2-3 สัปดาห์ มีน้ำแยกตัวออกอยู่ที่ด้านล่างของฟลาสก์ เมื่อพิจารณาจากลักษณะธัญพืชหลังการเลี้ยงเชื้อ พบว่าข้าวเสาไห้มีลักษณะกระจายตัวดี แต่มีการแตกหักของเมล็ดข้าวเนื่องจากการเขย่าฟลาสก์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เกิดการกระจาย และถ่ายเทอากาศ อีกทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ให้การสร้างโมนาโคลินเป็นลำดับที่ 2 รองจากมันสำปะหลัง แต่การเจริญบนมันสำปะหลัง พบการเกาะตัวเป็นก้อนนิ่ม และแน่น ทั่วทั้งภาชนะ ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ข้าวเสาไห้เป็นวัตถุดิบสำหรับการเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวด

4.4 ศึกษาการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งข้าวเสาไห้ในสภาวะหมุนขวด

ผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่าการเตรียมวัตถุดิบข้าว สำหรับการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งมีความยุ่งยาก และเสียเวลา จึงหันมาศึกษาวิธีเตรียมข้าวโดยไม่ต้องผ่านการแช่ แต่นำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน จากนั้นจึงนำมาผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ปริมาณต่างๆ แล้วนำไปวางบนเครื่องหมุน เพื่อให้เมล็ดข้าวผสมคลุกเคล้า และดูดซับน้ำอย่างทั่วถึง การทำแบบนี้สามารถควบคุมปริมาณความชื้นเริ่มต้นได้ตามความต้องการ และประหยัดเวลา ความซับซ้อนในการเตรียมวัตถุดิบ

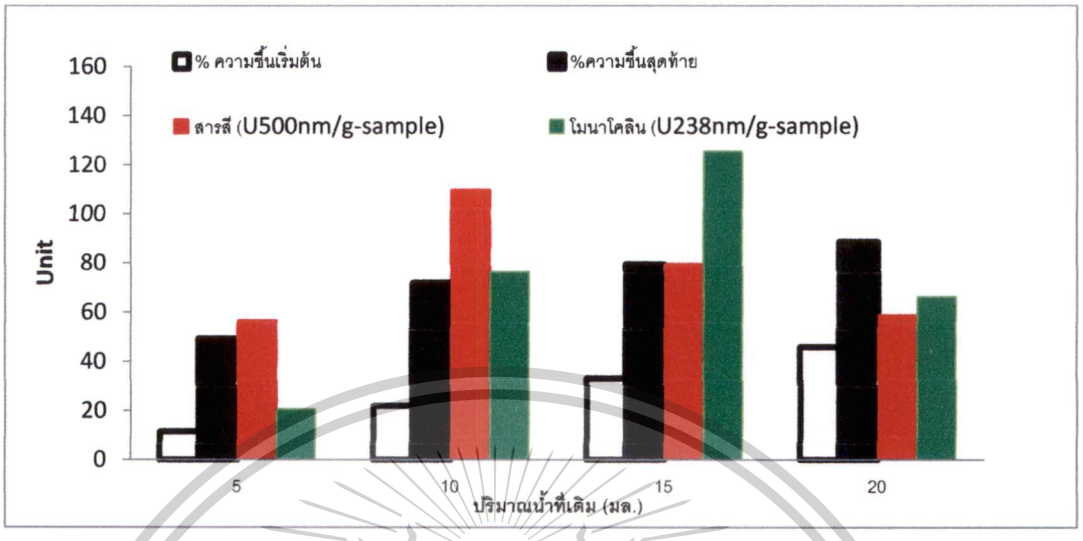
เตรียมอาหารข้าวเสาไห้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่

ก. นำข้าวไปแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 2 ชม. สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 30 นาที บรรจุข้าว 50 กรัม ในขวดเตรียมอาหารปริมาณ 200 มล. แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ข. นำข้าวปริมาณ 50 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหาร แล้วไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นจึงใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 5 10 15 20 และ 25 มล. ลงไปในข้าวปลอดเชื้อ (ตามลำดับ) แล้วนำไปวางบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 12 ชม. เพื่อให้น้ำซึมเข้าเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง

ใส่ชื้อเริ่มต้นในรูปสารแขวนลอยสปอร์ (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงในขวดบรรจุข้าวเสาไห้ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาพที่ 4.3 แสดงการผลิตโมนาโคลินโดยการเลี้ยงเชื้อราบนข้าวเสาไห้ที่เตรียมด้วยวิธีการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเข้าไปหลังจากนำข้าวเสาไห้ไปผ่านการฆ่าเชื้อโดยตรง

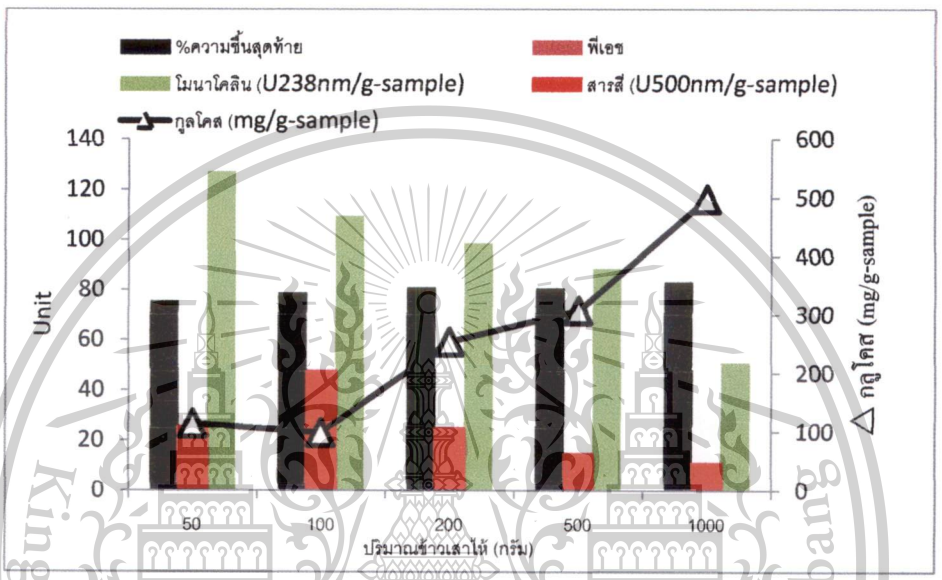
ผลการทดลองพบว่า การเติมน้ำเข้าไปในข้าวเสาไห้ปลอดเชื้อที่ปริมาตร 5 10 15 และ 20 มิลลิลิตร ทำให้ความชื้นเริ่มต้นมีค่าเป็น 11.55 21.98 33.17 และ 45.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อในสัปดาห์ที่ 4 พบความชื้นอยู่ที่ 49.27 71.92 79.51 และ 88.64 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการเติมน้ำกลั่น 20 มล. ส่งผลให้ความชื้นเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น และส่งผลให้การสร้างสารสี และโมนาโคลิน ลดลงอย่างมาก เนื่องจากผิวหน้าเมล็ดข้าวมีน้ำจับอยู่ ทำให้อากาศแทรกเข้าไปภายในเมล็ดข้าวลดลง ขณะที่การเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร มีปริมาณน้อยเกินไป จึงมีระดับความชื้นต่ำ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 4 สัปดาห์ การเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 และ 15 มิลลิลิตร ทำให้มีความชื้นเหมาะสม โดยพบการสร้างสารสีสูงสุด และโมนาโคลินสูงสุด ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสภาวะการเลี้ยงเชื่อต่างกัน ส่งผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์จากเชื้อรา *Monascus* sp. หรืออาจเป็นเพราะการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ทั้ง 2 ชนิด ใช้สารตั้งต้นชนิดเดียวกัน ทำให้เกิดการนำไปใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ในสภาวะต่างกันก็เป็นได้

4.5 ศึกษาการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งข้าวเสาไห้ปริมาณต่างๆ ในสภาวะหมุนขวด

เตรียมอาหารข้าวเสาไห้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) โดยนำข้าวปริมาณ 50 100 200 500 และ 1000 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหารขนาด 200 มล. 500 มล. 1 ลิตร 2 ลิตร และ 5 ลิตร ตามลำดับ แล้วไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นจึงใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 15 30 60 150 และ 300 มล. ลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ในข้าวปลอดเชื้อ และนำไปวางบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 12 ชม. เพื่อให้น้ำซึมเข้าเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นในรูปสารเส้นใย (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงในขวดบรรจุข้าวเสาไห้ปริมาณต่างๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.4



<u>ภาพที่ 4.4</u> แสดงการเลี้ยงเชื้อบนวัตถุดิบข้าวเสาไห้ที่บรรจุปริมาณต่างกัน โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวด

ผลการทดลองพบว่าเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 4 สัปดาห์ ทุกการทดลองมีความชื้นสุดท้ายในระดับเดียวกัน แต่ในขวดที่บรรจุข้าวเสาไห้ 1000 กรัม พบว่าเมล็ดข้าวเกาะที่ผิวขวดเป็นแผ่นแข็ง และพบการแยกตัวของน้ำ ทำให้การผสมผสาน และการถ่ายเทอากาศลดลง พร้อมทั้งมีการสะสมกลูโคสสูงมาก อาจเป็นผลมาจากน้ำที่แยกตัวออกมาก ซึ่งอาจส่งผลต่อการสร้างโมนาโคลิน นอกจากนี้ยังได้กลิ่นแอลกอฮอล์อีกด้วย ปัจจัยดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อการสร้างโมนาโคลินลดลง การเพิ่มปริมาณข้าวเสาไห้ ส่งผลให้มีการสะสมกลูโคสเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจส่งผลยับยั้งการผลิตสารสี และโมนาโคลิน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพื้นที่ภายในภาชนะส่งผลต่อการถ่ายเท และการผสมผสาน จึงจำเป็นต้องมีระบบให้อากาศร่วมในการเลี้ยงเชื้อด้วย เพราะการถ่ายเทอากาศเข้าและออกจากขวดด้วยวิธีปกติ อาจไม่เพียงพอต่อการเจริญ และกิจกรรมของเชื้อรา

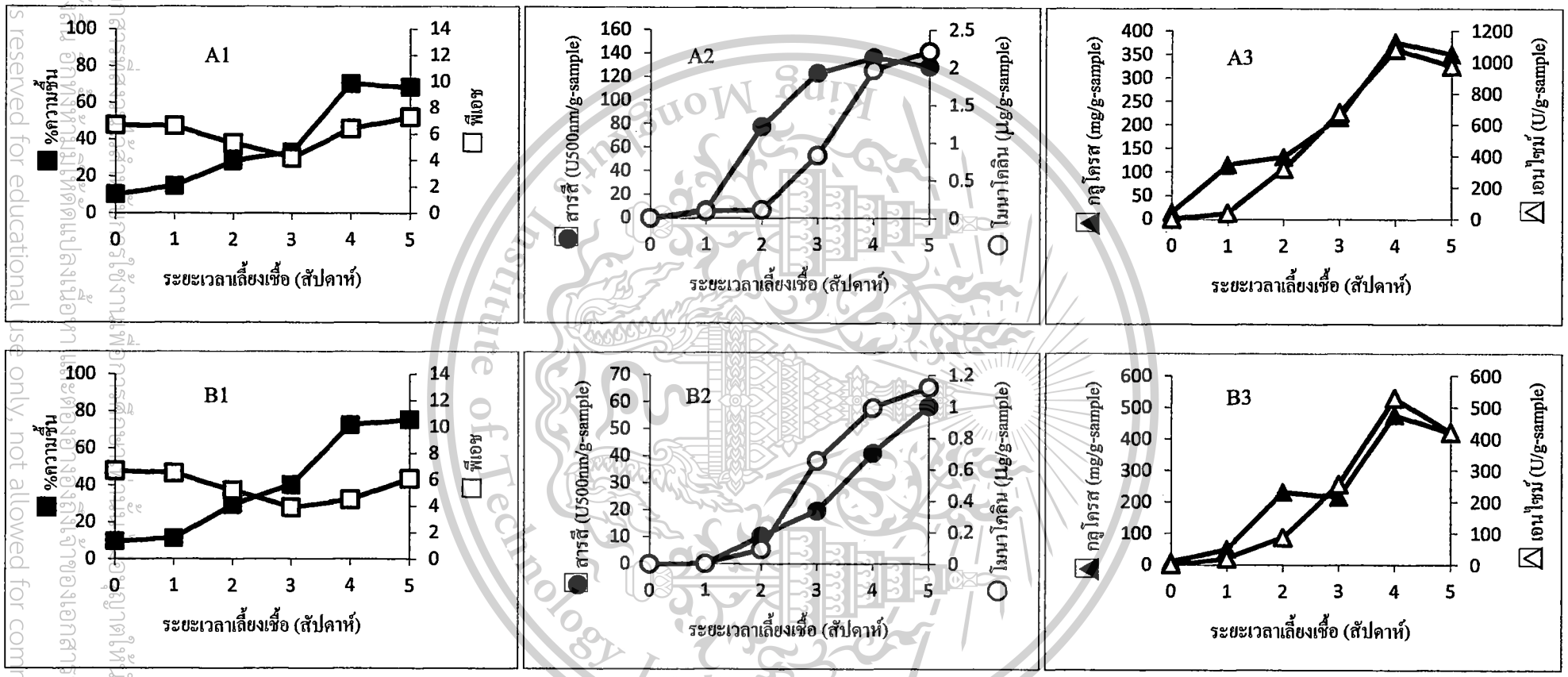
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

4.6 ศึกษาการเจริญและการสร้างโมนาโคลินในอาหารแข็งข้าวเสาไห้ปริมาณ 100 กรัม และ1000 กรัม ในสภาวะหมุนขวด

เตรียมอาหารข้าวเสาไห้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) โดยนำข้าวปริมาณ 50 และ 1000 กรัม บรรจุในขวดเตรียมอาหารขนาด 200 มล. และ 5 ลิตร แล้วไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 และ 45 นาที ตามลำดับจากนั้นจึงใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 15 และ 300 มล. ลงไปในข้าวปลอดเชื้อ นำไปวางบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 12 ชม. เพื่อให้น้ำซึมเข้าเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง นำเชื้อเริ่มต้นในรูปสารเส้นใย (ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงในขวดบรรจุธัญพืช แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง (32-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ความชื้น ปริมาณสารสี ปริมาณโมนาโคลิน (ด้วยวิธี HPLC) และพีเอชในอาหารแข็ง พร้อมทั้งวัดกิจกรรมเอนไซม์อะมัยเลสในสาระลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียน เป็นเวลา 30 นาที ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.5

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงความชื้นระหว่างการเจริญบนอาหารปริมาณ 100 กรัม และ 1000 กรัม มีรูปแบบคล้ายกัน แต่การเจริญบนอาหาร 1000 กรัม มีความชื้นสูงกว่า อาจเป็นเพราะการถ่ายเททำได้จำกัด ขณะที่การเปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่อเจริญบนอาหาร 1000 กรัม พบว่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว และไปอยู่ที่ประมาณ 3.9 จากนั้นก็เพิ่มขึ้นอย่างช้า ซึ่งต่างจากการเจริญบนอาหารปริมาณ 100 กรัม ที่พบว่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็นกลางในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ของการเจริญ การสร้างสารสี พบว่าเชื้อราเจริญบนอาหารปริมาณ 100 กรัม ได้อย่างดี และให้สารสีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ของการเจริญ ขณะที่เชื้อราเจริญบนอาหารปริมาณ 1000 กรัม ให้การสร้างสารสีช้า และมีความเข้มข้นต่ำ ซึ่งอาจเป็นผลจากข้าวบางส่วนเกาะติดที่พื้นผิวขวดเลี้ยงเชื้อ และมีการแยกตัวของน้ำ สอดคล้องกับการสร้างโมนาโคลิน พบว่าการเจริญบนอาหาร 100 กรัม ให้ความเข้มข้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 ของการเจริญ และมีค่าเป็น 2 เท่าของการเจริญบนอาหารปริมาณ 1000 กรัม การเจริญบนอาหารปริมาณ 100 กรัม พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์สูง แต่ปริมาณกลูโคสสะสมพบว่ามีค่าน้อย อาจเป็นเพราะเชื้อราเจริญได้ดี และนำกลูโคสไปใช้สำหรับกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ ขณะที่การเจริญบนอาหารปริมาณ 1000 กรัม พบกิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่า และมีการสะสมกลูโคสสูง จึงส่งผลต่อการสร้างสารทุติยภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาพที่ 4.5 แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็งข้าวเสาไห้ ปริมาณ 100 กรัม และ 1000 กรัม ในสภาวะหมุนขวดด้วยความเร็ว 5-7 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยวิเคราะห์ปริมาณโมนาโคลินด้วยวิธี HPLC

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

4.7 ศึกษาการสร้างซิตรินินในอาหารข้าวเสาไห้ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวด

นำตัวอย่างเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนอาหารข้าวเสาไห้ปริมาณ 50 100 200 500 และ 1000 กรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาตรวจสอบปริมาณซิตรินินโดยวิธีเชิงคุณภาพ (quanlitative) บนแผ่น TLC ดังแสดงผลในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การสร้างโมนาโคลิน และซิตรินิน ในสัปดาห์ที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อบนข้าวเสาไห้ ปริมาณ 50 กรัม 100 กรัม 200 กรัม 500 กรัม และ 1000 กรัม ตามลำดับ

ปริมาณข้าว กรัม	ปริมาณโมนาโคลิน (μg/g-sample)	การตรวจสอบซิตรินิน (yellow fluorescent)
50	2.11	+
100	1.96	+
200	1.67	+
500	1.23	-
1000	0.99	-

การวิเคราะห์ citrinin เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อสัปดาห์ที่ 4 นำสารละลายที่สกัดได้ไปหยดลงบน TLC plates หลังจากนำไปวางในโถแก้วที่มีสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย tolune : ethylacetate : chloroform (80:70:50) และ 1 มล. ของสารละลายกรดฟอร์มิก (formic acid) ความเข้มข้น 90 % จนกระทั่งระยะทางที่สารละลายเคลื่อนถึงด้านบนของ TLC จึงนำไปทำให้แห้ง แล้วสังเกตุด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่า การเจริญบนข้าวปริมาณ 50 กรัม 100 กรัม และ 200 กรัม มีวงสีเหลืองเรืองแสง ที่ตำแหน่งเดียวกับสารซิตรินินมาตรฐาน (ตัวควบคุม) (ไม่สามารถถ่ายภาพได้ เพราะวงสีเหลือง มีลักษณะจางมาก) ขณะที่การเจริญบนข้าวปริมาณ 500 กรัม และ 1000 กรัม ไม่พบวงสีเหลืองเรืองแสงดังกล่าว อาจเป็นเพราะเชื้อราเจริญช้า หรือมีกิจกรรมการสร้างสารทุติยภูมิต่ำ จึงไม่สามารถตรวจสอบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

นำเชื้อรา *Monascus* sp. มาคัดแยกบนอาหารวุ้น MYS agar และSS agar เพื่อหาสายพันธุ์ที่เจริญเร็ว ด้วยวิธี natural selection สังเกตโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็วในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Monascus* sp SS14 เจริญดีที่สุดบนอาหาร SS agar งานวิจัยนี้มุ่งไปที่เชื้อจากธรรมชาติที่สามารถผลิตสารยับยั้งคลอเรสเตอรอล (anti-cholesterol) หรือโมนาโคลิน (monacolin)

แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปสารละลายสปอร์เปรียบเทียบกับเชื้อเริ่มต้นในรูปเส้นใย พบว่าการใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปเส้นใยให้การแจริญดีกว่าเล็กน้อย นอกจากนี้การใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปแบบเส้นใย สามารถเตรียม และขยายกำลังการผลิตได้ง่าย อีกทั้งลักษณะเส้นใยมีการกระจายตัว ไม่เกาะกันเป็นก้อน การเลี้ยงเชื้อในสภาวะหยุดนิ่งอาจส่งผลดีต่อการยืดยาวของเส้นใย แต่มีปัญหาเรื่องการผสมผสาน และการถ่ายเทอากาศ

การเลี้ยงเชื้อบนธัญพืชพบว่าลักษณะการจับตัวของธัญพืชแต่ละชนิดมีผลต่อการเจริญอย่างมาก เช่น การเจริญบนมันสำปะหลัง และมันฝรั่ง มีการจับเป็นก้อน จับตัวกันแน่น ไม่แยกออกจากกัน มีการเจริญของเส้นใยที่ผิวหน้า ข้าวเหนียวมีการจับเป็นก้อน และเชื้อเจริญหนาแน่นที่ภายนอก และเมื่อนำมาเขย่าทำให้ก้อนข้าวจับตัวแน่นมากขึ้น มันแกว และแห้ว พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้ประมาณ 2-3 สัปดาห์ มีน้ำแยกตัวออกอยู่ที่ด้านล่างของฟลาสก์ เมื่อพิจารณาจากลักษณะธัญพืชหลังการเลี้ยงเชื้อ พบว่าข้าวเสาไห้มีลักษณะกระจายตัวดี แต่สร้างโมนาโคลินเป็นลำดับที่ 2 รองจากมันสำปะหลัง

หลังจากนำข้าวเสาไห้ 50 กรัมไปฆ่าเชื้อ แล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 15 มิลลิลิตร มีค่าความชื้นเริ่มต้น และสิ้นสุด (สัปดาห์ที่ 4) เป็น 33.17 เปอร์เซ็นต์ และ 79.51 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการสร้างโมนาโคลินดีที่สุด การเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้ผลดีต่อการสร้างสี แต่ถ้าเติมน้ำน้อยกว่า (5 มิลลิลิตร) ส่งผลให้ความชื้นเริ่มต้นต่ำ เชื้อราจึงเจริญช้า การเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อมาก (20 มิลลิลิตร) ทำให้ความชื้นเริ่มต้นสูงมาก จนเชื้อเจริญไม่ดี เนื่องจากการส่งผ่านอากาศ และการผสมผสาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

การเลี้ยงเชื้อในขวดอาหารที่บรรจุข้าวเสาไห้ 100 กรัม พบว่าเชื้อราให้การเจริญดี และการสร้างโมนาโคลินสูงกว่า การเลี้ยงเชื้อในขวดที่บรรจุข้าวเสาไห้ 1000 กรัม เนื่องจากการถ่ายเทอากาศ และการผสมผสานดี เมล็ดข้าวกระจายตัวดี และไม่พบการจับเกาะที่ผิวภาชนะ ขณะที่การเจริญบนอาหารปริมาณ 1000 กรัม พบว่าเมล็ดข้าวจับเกาะที่ผิวภาชนะ อีกทั้งการถ่ายเทอากาศไม่ค่อยดี โดยพบการสะสมแอลกอฮอล์อีกด้วย การเลี้ยงเชื้อในขวดที่บรรจุอาหารจำนวนมาก อาจจำเป็นต้องมีระบบให้อากาศ และควบคุมความชื้น ด้วย ซึ่งน่าจะส่งผลดีต่อการเลี้ยงเชื้อ

การวิเคราะห์ citrinin หลังจากเชื้อราเจริญบนข้าวเสาไห้ ที่ปริมาณต่างๆ เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 4 พบวงสีเหลืองเรืองแสงอัลตร้าไวโอเลต ในตัวอย่างข้าวจากการเจริญบนข้าวปริมาณ 50 กรัม 100 กรัม และ 200 กรัม อาจเป็นเพราะเชื้อราเจริญได้ดี จึงอาจมีกิจกรรมการสร้างซิตรินิน ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไปเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างโมนาโคลิน แต่สภาวะนั้นยับยั้งหรือไม่มีการสร้างซิตรินิน ขณะที่การเจริญบนข้าวปริมาณ 500 กรัม และ 1000 กรัม ไม่พบวงสีเหลืองเรืองแสงดังกล่าว อาจเป็นเพราะเชื้อราเจริญช้า หรือมีกิจกรรมการสร้างสารทุติยภูมิต่ำ จึงไม่สามารถตรวจสอบได้

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวดแบบต่างๆ และระยะเวลาการหมุน เพื่อให้เส้นใยเชื้อราได้รับผลกระทบน้อยที่สุด

2. การเลี้ยงเชื้อในบนอาหารปริมาณมากจำเป็นต้องได้รับอากาศ และการถ่ายเทอย่างเหมาะสม และควรป้องกันการระเหยในกรณีให้อากาศเข้าสู่ระบบ

3. ปริมาณโมนาโคลินที่ผลิตได้ มีปริมาณน้อย ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปใช้บริโภคอย่างต่อเนื่อง โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการย่อยสลายไขมัน หรือการทำงานของ HMG CoA reductase ซึ่งจำเป็นต้องทดสอบผลกระทบดังกล่าว และระยะเวลาการได้รับข้าวแดง

4. ควรศึกษาการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ HMG CoA reductase และผลกระทบของซิตรินินต่อไป

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เอกสารอ้างอิง

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

นิสา บุตรดา. 2537. การกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส กบ.11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสีและ เปรียบเทียบสมบัติบางประการกบสายพันธุ์พอแมสายพันธุกลายพันธุสีแดงและสีเหลือง . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Alberts, A.W., J. Kuron, V. Hunt, J. Huff, J. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch and J. Springer. 1980. Mevinolin : a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzymeA reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 : 3957-3961.

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

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

Bacha, H.R., Hadidane, E.E., Creppy, C., Regnault, F. Ellouzi and G. Dircheimer. 1988. Monitoring and identification of fungal toxins in food products, animal feed and cereals in Tunisia. *Jour. Stored Prod. Res.* 24(4): 199-206.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

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

Bobek P, Ozdín L, Galbavý S. 1998. Dose- and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. *Nutrition*. 14(3): 282–286.

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

Brown, A.G., T.C. Smale, T.J. King, R. Hasenkamp and R.H. Thompson. 1976. Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabilite from *Penicillium brevicompactum*. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1165– 1169.

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

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

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

Endo, A. 1985. Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. *J. Med. Chem.* 28; 401–405.

Endo, A., D. Komagata and H. Shimada. 1976. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme a reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 72; 323–326.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

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

Gimeno, A. and M.L. Martins. 1983. Rapid thin layer chromatography determination of patulin, citrinin, and aflatoxin in apples and pears and their juices and jams. *Jour. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66(1): 85-91.

Hassan H. Peter N. and D. Philippe. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6): 2596-2602.

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

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

Hebers, D., A. Lembertas, Q.Y. Lu, S.S. Bowrman and V.L.W. Go. 2001. An Analysis of Nine Proprietary Chinese Red Yeast Rice Dietary Supplements: Implications of Variability in Chemical Profile and Contents. *J. Alter. Compl. Med.* 7 (2); 133–139.

Heber, D., I. Yip, J.M. Ashley, D.A. Elashoff, R.M. Elashoff and V.L.W. Go. 1999. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am. J. Clinical Nutrition*, 69: 231 - 236.

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.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

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

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

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.

Krairak, S., B. Yongsmith and S. Sirirote. 1991. Effect of impeller type on growth and morphology of *Monascus* sp. 20M10.2 cultivation in a fermenter. *K.U. Sci. J.* 9 (1-2-3); 10-20.

Krairak, S., Yamamura, K., Nakajima, M., Shimizu, H. and Shioya, S. 1999. On-line monitoring of fungal cell concentration by dielectric spectroscopy. *J. Biotech*., 69; 115-123.

Krairak, S., Yamamura, K., Irie, R., Nakajima, M., Shimizu, M., Chim-anage, P., Yongsmith, B. and Shioya, S. 2000. Maximizing yellow pigment production in fed-batch culture of *Monascus* sp. *J. Biosci. Bioengi.* 90 (4); 363-367.

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

Kumari, H.P.M., K. Akhilender Naidu, S. Vishwanatha, K. Narasimhamurthy, G. Vijayalakshmi. 2009. Safety evaluation of *Monascus* purpureus red mould rice in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (8) ; 1739-1746

Lee, C.L., H.K. Hung, J.J. Wang and T.M. Pan. 2007. Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU 568 under dioscorea medium through the mediation of pH value and ethanol addition. *J Agric Food Chem.*, 8; 55 (16): 6493-6502.

Lee, Y.K., D.C. Chen, S. Chauvatcharin, T. Seki and T. Yoshida. 1995. Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method. *J. Ferment. Bioengi.*, 79 (5); 516-518.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Li, C., Y. Zhu, Y. Wang, J.S. Zhu, J. Chang, D. Kritchevsky. 1998. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr. Res.* 18 (1); 71–81.

Li, Y.G., F. Zhang, Z.T. Wang and Z.B. Hu. 2004. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 1101–1112.

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

Ma, J.Y., Y.G. Li, Q. Ye, J. Li, Y.J. Hua, D.J. Ju. 2000. Constituents of Red Yeast Rice, a Traditional Chinese Food and Medicine. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5220–5225.

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.

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

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation fo the Somogyi Method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153; 375-380.

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Wang, J., Z. Lu, J. Chi, W. Wang, M. Su, W. Kou, P. Yu, L. Yu, L. Chen, J.S. Zhu, J. Chang. 1997. Multicenter clinical trial of the serum lipid-lowering effects of a *Monascus purpureus* (red yeast) rice preparation from traditional Chinese medicine. *Curr. Ther. Res.* 58 (12); 964–978.

Wang, S.L., Y.H. Yen, W.J. Tsiao, W.T. Chang, C.L. Wang. 2002. Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (3) ; 337-344.

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

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

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

Yongsmith, B., S. Krairak and R. Bavavoda. 1994. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp. *J. Ferment. Bioeng.* 78 (3), 223-228.

Yongsmith, B., S. Krairak and N. Budda. 2004. Fermentation of *Monascus* yellow pigments in solid and submerged state system. International Symposium on Oriental *Monascus* 2004. Nov, 26-30, University of Technology, Hangzhou, China. p. 109-114.

Yu, J. and C.R. Zhu. 1998. Determination and effects of the cholesterol biosynthetic inhibitor produced by *Monascus*. *J. Capital. Univ. Med. Sci.*, 19:19-22.

Zhang, J.G. and W.H. Liu. 1999. Determination of lovastatin in capsule by UV spectrophotometry. *Chin. J. Biochem. Pharm.*, 20: 152-158.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมข้าว สำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (นิสา, 2537)

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MYS agar (วรรณภา, 2529)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

วุ้น 12-15 กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวมเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเหลว SS medium (วรรณภา, 2529)

ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch)	3.0 เปอร์เซ็นต์
แป้งถั่วเหลือง	4.0 เปอร์เซ็นต์

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8-7.0 ต้มแป้งมันสำปะหลังให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารวุ้นใช้ผสมวุ้นปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์

1. การหาน้ำหนักแห้ง (นิสา, 2537)

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

1.2. นำตัวอย่างวัตถุดิบทางการเกษตรประมาณ 22.5 กรัม ใส่ฟอยด์ที่อบไว้แล้ว

1.3. นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อบจนได้น้ำหนักคงที่ใช้เวลาประมาณ 12 – 24 ชั่วโมง

1.4. นำออกมาใส่โถอบแห้ง 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

1.5. นำไปอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักฟอยด์มาหักออกเป็นค่าน้ำหนักแห้ง

2. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ใช้วิธีการเดียวกับการหาน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อได้น้ำหนักแห้งแล้ว ให้นำมาหักออกจากน้ำหนักตัวอย่างก่อบอบ ก็จะได้ค่าความชื้นของตัวอย่าง นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

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

3. การคำนวณหาสารสี (วรรณภา, 2529)

นำตัวอย่างประมาณ 1 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเหมาะสม แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์สารโมนาโคลินด้วยเครื่อง spectrophometer (ดัดแปลงจาก Yu and Zhu, 1998 และ Zhang and Liu, 1999)

นำตัวอย่างมาสกัดด้วยสัดส่วนระหว่างตัวอย่าง ต่อ ethyl acetate ที่ 1 ต่อ 10 แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ผสมกับสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง จนพีเอชสารละลายเป็นกลาง จึงนำไประเหยที่ความดันต่ำ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำของเหลวข้นที่ได้มาละลายด้วยเมทานอล แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นเหมาะสม

5. การวิเคราะห์สารโมนาโคลินด้วยเครื่อง HPLC (ดัดแปลงจาก Lee และคณะ, 2007)

5.1 วิเคราะห์ด้วย HPLC (LC-10 AD VP, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร (spectrophotometer-UV; SPD-10 A VP) ด้วยคอลัมน์ μBondapak TM C18 (3.9x300 mm) ส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้ คือสารละลาย Acetonitrile ความเข้มข้น 55 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

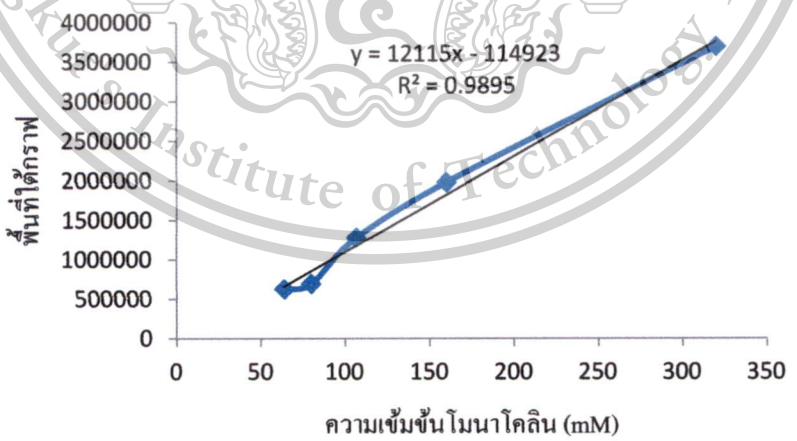
5.2 การเตรียมสารโมนาโคลินมาตรฐาน

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



ภาพที่ ข-1 กราฟมาตรฐานโมนาโคลินและพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จาก HPLC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

7. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีการ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)

7.1 สารเคมี

7.1.1 สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ชั่งน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียดให้ได้ปริมาณ 1.0 กรัม ใส่ในฟลาสก์ปรับปริมาตร ให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (สารละลายมาตรฐานกลูโคส) จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 ถึง 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.1.2 สารละลาย Somogyi แบ่งการเตรียมออกเป็น 2 ส่วน

7.1.2.1 ละลายโปแตสเซียม-โซเดียมทาร์เตรท 12 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัม ในน้ำกลั่นต้ม ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติม $CuSO_4.5H_2O$ 4 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร กวนให้สารละลายผสมกัน จากนั้นเติม $NaHCO_3$ 16 กรัม

7.1.2.2 ละลาย anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด ทิ้งไว้ให้เย็น

นำสารละลายในข้อ 7.1.2.2 เติมลงในสารละลาย 7.1.2.1 ปรับปริมาตรให้ครบเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

7.1.3 สารละลาย Nelson แบ่งการเตรียมออกเป็น 2 ส่วน

7.1.3.1 ละลาย ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร

7.1.3.2 ละลาย $Na_2HAsO_4.7H_2O$ 3 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร

นำสารละลายในข้อ 7.1.3.2 เติมลงในสารละลาย 7.1.2.1 ปรับปริมาตรให้ครบเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา สารละลายนี้ต้องเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

7.2 การวิเคราะห์

7.2.1 สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 20 – 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.2.2 ใส่สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ

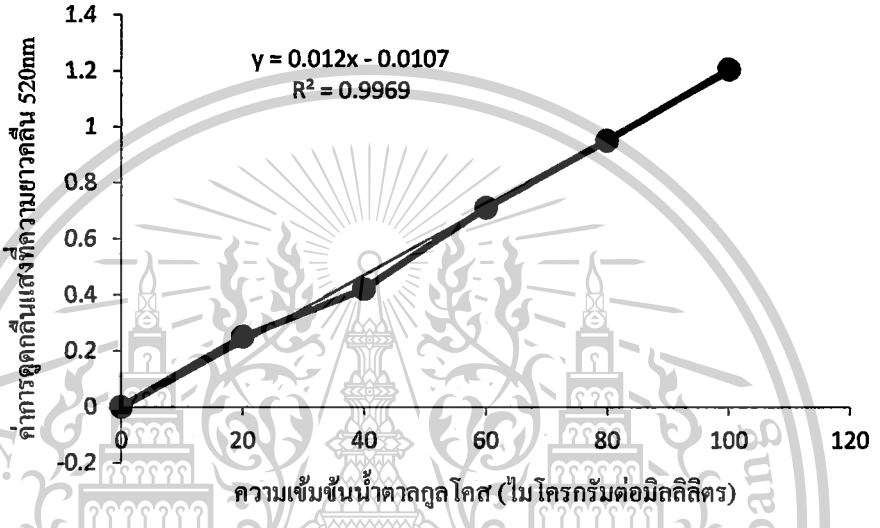
7.2.3 เติมสารละลาย Somogyi ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

7.2.4 เติมสารละลาย Nelson ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

7.2.5 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นน้ำตาล

7.2.6 สำหรับตัวอย่างที่จะหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ก็วิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 7.2.2 – 7.2.5 ถ้าตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลสูง ก็ต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้ และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ กราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายกลูโคสมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสง

86. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (วรรณภา, 2529)

8.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

8.1.1 เตรียม acetate buffer พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A และ B ให้ได้พีเอชตามต้องการ โดยสารละลาย A : 0.2 M acetic acid (เตรียมโดยละลาย Acetic acid 11.55 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) และสารละลาย B : 0.2 M sodium acetate (เตรียมโดยละลาย CH_3COONa 16.4 กรัม หรือ $CH_3COONa.3H_2O$ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) หลังจากผสมสารละลายทั้ง 2 จนได้พีเอช 4.5 แล้ว นำมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นเป็น 50 มิลลิโมลาร์ เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

8.1.2 เตรียมสับสเตรท (น้ำแป้ง) สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ นำแป้งน้ำหนัก 1.0 กรัม มาละลายในสารละลาย acetate buffer พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 80 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้แป้งละลาย แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

8.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์

8.2.1 นำสารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเจือจางด้วย สารละลาย acetate buffer พีเอช 4.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ

8.2.2 เติมสารละลายสับสเตรท ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

8.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

8.2.4 หยดปฏิกิริยาด้วยการนำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

8.2.5 นำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Nelson-Somogyi ต่อไป

การหากิจกรรมเอนไซม์ คำนวณได้จากปริมาณน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครกรัม ในเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40

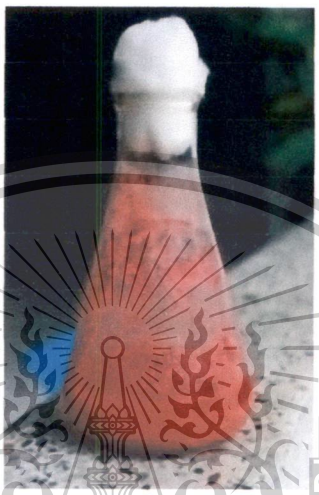
7. การวิเคราะห์ citrinin (ดัดแปลงจากวิธีของ Gimeno and Martins, 1983 และ Bacha และคณะ, 1988)

โดยนำตัวอย่าง 30 กรัม มาอบแห้ง แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นนำผงตัวอย่างประมาณ 2.5 กรัม ใส่ฟลาสต์ขนาด 250 มล. ที่มีสารสกัด ปริมาณ 20 มิลลิลิตร (acetonitrile (9 ส่วน) : 4% aqueous KC1 (1 ส่วน) ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนใสไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (evaporator) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำของเหลวข้นมาละลายด้วย Chloroform ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นำมาจุดลงบน TLC plates () แล้วนำไปแช่ในสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย tolune : ethylacetate : chloroform (80:70:50) และ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดฟอร์มิก (formic acid) ความเข้มข้น 90 % หลังจากส่วนเคลื่อนที่เดินทางไปจนสุดขอบด้านบนของ TLC แล้วจึงนำไปอบแห้ง แล้วจึงสังเกตุด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ซึ่งซิตรินินแสดงเป็นวงสีเหลืองเรืองแสง โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานซิตรินิน ทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันผลด้วยการพ่นสารละลาย aluminium chloride (2 กรัม $AlCl_3.6H2O$ ในเอทานอล 100 มล.) บนแผ่น TLC แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปสังเกตุใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 365 นาโนเมตร พบว่าวงสีเหลืองเรืองแสง (ของซิตรินิน) กลายเป็นวงสีฟ้าเรืองแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก ค.

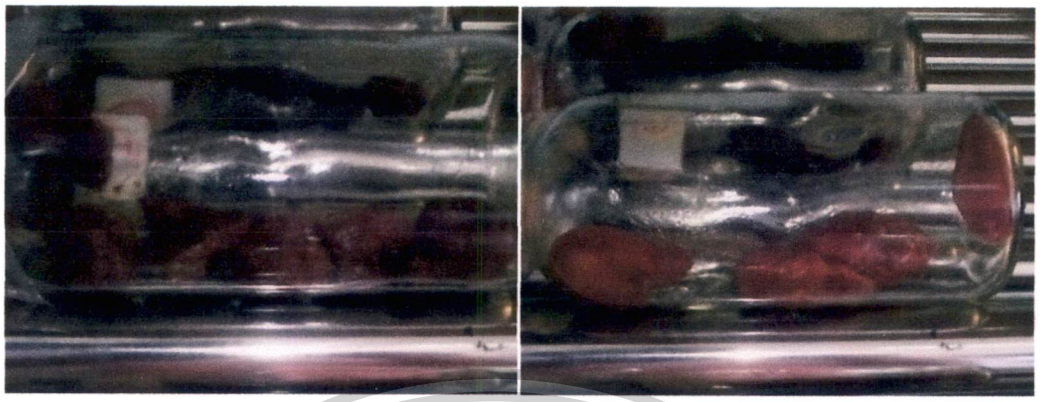
รูปภาพแสดงการทดลอง



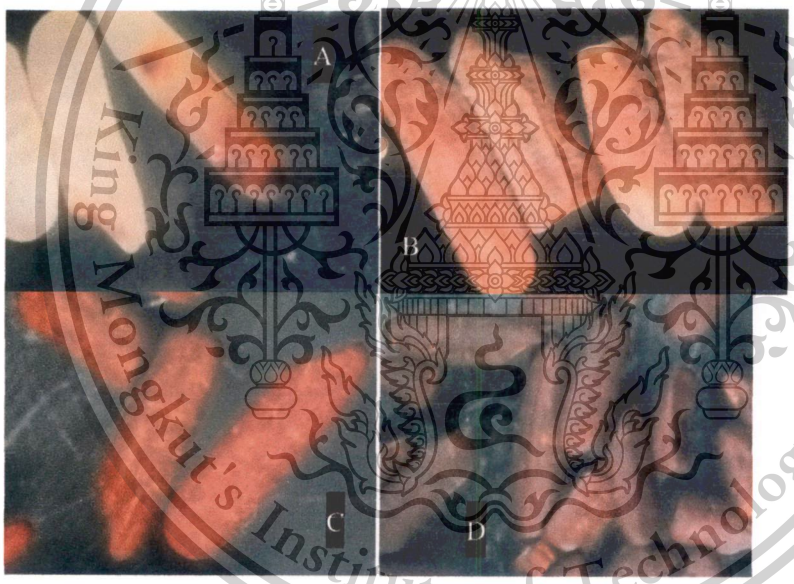
ภาพที่ ค-1 ลักษณะเชื้อเริ่มต้นในรูปของเส้นใยเชื้อรา โดยเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในอาหารเหลว SS medium บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

ภาพที่ ค-2 การเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวดบนเครื่องหมุน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



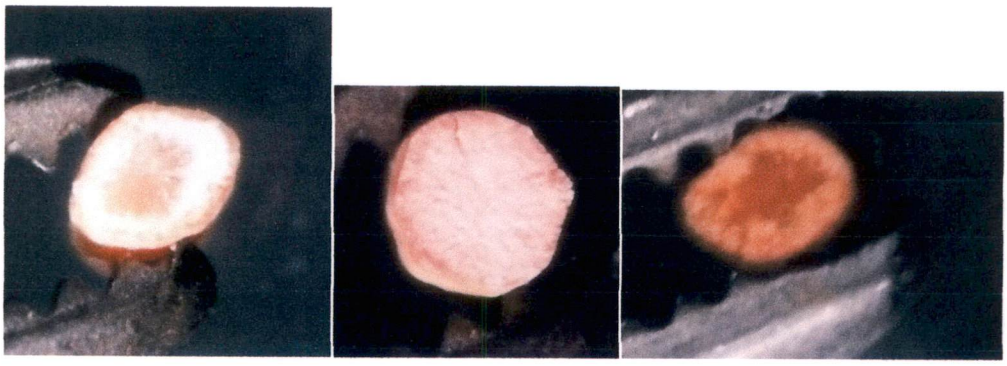
ภาพที่ ค-3 ลักษณะการเจริญของเชื้อราบนธัญพืชมันสำปะหลัง และมันฝรั่ง ซึ่งพบการเกาะตัวเป็นก้อนอันแน่น



ภาพที่ ค-4 แสดงการเจริญของเชื้อบนข้าว (A) สัปดาห์ที่ 1 (B) สัปดาห์ที่ 2 (C) สัปดาห์ที่ 3 และ (D) สัปดาห์ที่ 4

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.
Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาพที่ ค-5 แสดงการแทงเส้นใยเชื้อราเข้าไปยังภายในของเมล็ดข้าว ในกรณีที่เชื้อเจริญในสภาวะเหมาะสม

ภาพที่ ค-6 แสดงเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในขวดที่บรรจุข้าวปริมาณ 50 กรัม และเติมน้ำ 20 มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.