การผลิตสารสี และซิตรินินจาก *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนอาหารแข็งธัญพืช และในอาหารเหลว

THE PIGMENT AND CITRININ PRODUCTION FROM *Monascus* sp. U6V1 CULTIVATED IN SOLID STATE FERMENTATION AND SUBMERGED FERMENTATION

ธิปไตย ไกรสังเกตุ
สุขสันต์ เอียดวุ่น
อภินันท์ ใจบุญ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE PIGMENT AND CITRININ PRODUCTION FROM *Monascus* sp. U6V1 CULTIVATED IN SOLID STATE FERMENTATION AND SUBMERGED FERMENTATION

THIPPATAI GRAISUNGGATE

SOOKSAN IADWUN

ABHINAN JAIBOON

A SPECIAL PROJECT SUBBITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR

THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตสารสี และซิตรินินจาก *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนอาหารแข็งธัญพืช และในอาหารเหลว

The Pigment and Citrinin Production from *Monascus* sp. U6V1 Cultivated in Solid State Fermentation and Submerged Fermentation

ชื่อนักศึกษา นายธิปไตย ไกรสังเกตุ รหัสนักศึกษา 58050900

นายสุขสันต์ เอียดวุ่น รหัสนักศึกษา 58050994

นายอภินันท์ ใจบุญ รหัสนักศึกษา 58051009

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตสารสี และซิตรินินจาก *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนอาหารแข็งธัญพืช และในอาหารเหลว The pigment and citrinin production from *Monascus* sp. U6V1 cultivated in solid state fermentation and submerged fermentation
ชื่อนักศึกษา	นายธิปไตย ไกรสังเกตุ รหัสนักศึกษา 58050900 นายสุขสันต์ เอียดวุ่น รหัสนักศึกษา 58050994 นายอภินันท์ ใจบุญ รหัสนักศึกษา 58051009
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

การผลิตสารสี และซิตรินินจากเชื้อรากลายพันธุ์ *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนอาหารแข็งธัญพืช และในอาหารเหลว การเจริญบนอาหารแข็งธัญพืช ได้แก่ ข้าวเสาไห้ และข้าวหอมมะลิ เป็นวัสดุหมัก ตามลำดับ โดยศึกษาการแปรผันปริมาณความชื้นเริ่มต้น จากการเติมน้ำที่ปริมาตรแตกต่างกัน เพื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ *Monascus* sp. SS14 ผลการทดลองพบว่าเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้สูงสุดเมื่อเติมน้ำ 10 มิลลิลิตรต่อปริมาณข้าว 50 กรัม โดยเชื้อกลายพันธุ์ *Monascus* sp. U6V1 ผลิตสารสีได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงบนข้าวหอมมะลิ (324.73 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เป็นเวลา 28 วัน และตรวจไม่พบการผลิตซิตรินิน ขณะที่เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่ผลิตสารสีสูงสุด (949.33 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และซิตรินินสูงสุด (0.0039 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) บนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ เป็นเวลา 35 วัน การเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว โดยศึกษาในระดับฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าอาหาร Glucose Peptone และ Gelatinized Starch Peptone ให้ผลการเจริญและผลิตสารสีได้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด (Gelatinized Starch Soybean flour, Raw Starch Peptone, Raw Starch Soybean flour, Glucose Peptone และ Gelatinized Starch Peptone) จึงนำมาศึกษาในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้แก่ ถังหมักแบบพ่นอากาศ และถังหมักแบบกวน พบการเจริญของเชื้อรากลายพันธุ์ U6V1 ในอาหาร Glucose Peptone ด้วยถังหมักแบบพ่นอากาศ ให้การผลิตสารสีสูงสุด (19.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อรากลายพันธุ์ U6V1 ในอาหาร Gelatinized Starch Peptone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยถังหมักแบบกวน ให้การผลิตสารสีเพียง 5.36 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่สามารถตรวจพบการผลิตซิตรินินในทุกการทดลองของการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว การเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งธัญพืช ซิตรินิน ถังหมักแบบพ่นอากาศ ถังหมักแบบถังกวน สารสี *Monascus* sp. U6V1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The pigment and citrinin production from *Monascus* sp. U6V1 cultivated in solid state fermentation and submerged fermentation
Students	Mr. Thippatai Graisunggate ID 58050900
	Mr. Sooksan Iadwun ID 58050994
	Mr. Abhinan Jaiboon ID 58051009
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Asst.Prof.Dr.Somchai Krairak

Abstract

The pigment and citrinin productions from *Monasucus* sp. U6V1 was studies in solid state cultivation and submerged cultivation. For solid state fermentation, the cultivation was examined by Sao-Hai rice and Jasmine rice, respectively. The various moisture contents were studied by adding amount of sterile water for the cultivation of the mutant strain (U6V1) in comparison to the wild type strain (SS14). Both strains showed the maximum growth and pigment production when 10 ml of sterile water was added to the 50 g of substrate. U6V1 gave the maximum pigment production (324.73 U/DSW) and without citrinin production when cultivated in Jasmine rice for 28 days. However, the solid state fermentation of wild type strain (SS14) on Sao-Hai rice gave the maximum pigment (949.33 U/DSW) and citrinin production (0.0039 mg/DSW) for 35 day of cultivation, respectively. At first, the submerged fermentation of both strains was performed by shaking flask (250 ml). It was found that cultivation of both strains in Glucose Peptone medium and Gelatinized Starch Peptone medium gave the highest pigment production and growth than other 5 types of medium (Gelatinized Starch Soybean flour, Raw Starch Peptone, Raw Starch Soybean flour, Glucose Peptone and Gelatinized Starch Peptone) . Later, the submerged fermentation was carried on 5-L airlift fermenter and 5-L stirred tank fermenter, respectively. The results showed that the cultivation of U6V1 in Glucose Peptone medium with airlift fermenter presented the maximum pigment production of 19.58 units/ml on 5 days of cultivation. In case of U6V1 cultivated in Gelatinized Starch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peptone medium with stirred tank fermenter that gave the pigment production about 5.36 units/ml. In all submerged fermentation, the citrinin production was not found.

Keywords : Airlift fermenter, citrinin, *Monascus* sp. U6V1, pigment, solid state fermentation, Stirred tank fermenter, Submerged fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยโครงงานพิเศษนี้ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานพิเศษตลอดจนให้ความรู้ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงงานพิเศษนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการโครงงานพิเศษผู้ตรวจสอบและให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้สำหรับการทำโครงงานพิเศษ

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรม และส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมาจนทำให้ผู้ศึกษาประสบความสำเร็จในชีวิต

ธิปไตย ไกรสังเกตุ
สุขสันต์ เอียดวุ่น
อภินันท์ ใจบุญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อรา *Monascus* sp.	4
2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Monascus*	4
2.3 การสืบพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus*	5
2.3.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction)	5
2.3.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction)	5
2.4 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Monascus*	6
2.4.1 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งธัญพืช (Solid state fermentation)	6
2.4.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (Submerged fermentation)	7
2.5 ข้าว	8
2.6 สารสีจากเชื้อรา *Monascus*	9
2.6.1 ประเภทของสารสีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus*	9
2.6.1.1 กลุ่มสารสีส้ม	10
2.6.1.2 กลุ่มสารสีแดง	10
2.6.1.3 กลุ่มสารสีเหลือง	10
2.6.2 กลไกการสังเคราะห์สารสี	11
2.6.3 การใช้ประโยชน์จากสีของเชื้อรา *Monascus*	13
2.6.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสารสีในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus*	14
2.6.4.1 แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน	15
2.6.4.2 แหล่งไนโตรเจน	15
2.6.4.3 สารจำเป็นต่อการเจริญ (Growth factor)	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.4.4 อุณหภูมิ และพีเอช	17
2.6.4.5 ความชื้น	17
2.6.4.6 ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์	18
2.7 สารโมนาโคลิน เค (Monakolin K)	18
2.7.1 กลไกการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน เค	19
2.7.2 การใช้ประโยชน์ของสารโมนาโคลิน เค	20
2.8 สารซิตรินิน (Citrinin)	20
2.8.1 กลไกการสังเคราะห์สารซิตรินิน	21
2.8.2 การออกฤทธิ์ของสารซิตรินิน	21
2.8.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus* sp.	22
2.8.3.1 แหล่งไนโตรเจน	22
2.8.3.2 กรดไขมันและ methyl ketone	23
2.8.3.3 อุณหภูมิ	24
2.8.3.4 Water activity	24
2.8.3.5 ปริมาณออกซิเจน	24
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	26
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	26
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	26
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ	26
3.4 วิธีการทดลอง	27
3.4.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Inoculum preparation)	27
3.4.2 ศึกษาการเจริญและระยะเวลาในการสร้างสารทุติยภูมิของเชื้อรา *Monascus*	27
3.4.2.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อการผลิตสารสีและสร้างซิตรินินบนอาหารแข็งธัญพืช (Solid state fermentation)	27
3.4.2.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อการผลิตสารสีและสร้างซิตรินินในอาหารเหลว (Submerged fermentation)	28
3.4.3 การวิเคราะห์ผล	28
3.4.3.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* บนอาหารแข็งธัญพืช (Solid state fermentation)	28
3.4.3.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ในอาหารเหลว (Submerged fermentation)	29
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	31

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อผลิตสารสีและซิตรินินบนอาหารแข็งธัญพืช (Solid state fermentation)	31
4.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อผลิตสารสีและซิตรินินในอาหารเหลว (Submerged fermentation)	42
4.2.1 เลี้ยงเชื้อราในฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร	42
4.2.2 เลี้ยงเชื้อราในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) และถังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermenter)	44
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	52
5.1 สรุปผลการวิจัย	52
5.2 ข้อเสนอแนะ	52
บรรณานุกรม	54
ภาคผนวก	61
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร	62
ภาคผนวก ข สารเคมี และวิธีวิเคราะห์ทางเคมี	64
ภาคผนวก ค รูปแสดงการทดลอง	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติของสารสีจากเชื้อรา *Monascus*	11
3.1 ปริมาณน้ำและข้าวก่อนนำไปวางบนเครื่องหมุนเลี้ยงเชื้อ	27
4.1 แสดงปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW) และปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนข้าวเสาไห้ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที ในขวดเตรียมอาหาร	34
4.2 แสดงปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW) และปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนข้าวหอมมะลิ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที ในขวดเตรียมอาหาร	36
4.3 แสดงปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW) และปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวเสาไห้ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที ในขวดเตรียมอาหาร	38
4.4 แสดงปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW) และปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวเสาไห้ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที ในขวดเตรียมอาหาร	40
4.5 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (g/L) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) และปริมาณซิตรินิน (µg/ml) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	43
4.6 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) และปริมาณซิตรินิน (µg/ml) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Glucose Peptone	46
4.7 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) และปริมาณซิตรินิน (µg/ml) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone	48
4.8 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) และปริมาณซิตรินิน (µg/ml) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus*	6
2.2 ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว	8
2.3 โครงสร้างโมเลกุลของอะไมโลส และอะไมโลเพกติน	9
2.4 โครงสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus*	11
2.5 การเกิดสาร 6-MSA และ orsellinic acid จาก acety และ malonyl	12
2.6 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase กับ polyketide synthase	13
2.7 กระบวนการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน หรือโลวาสแตติน	19
2.8 โครงสร้างทางเคมีของซิตรินิน	21
2.9 การสังเคราะห์ซิตรินิน	21
4.1 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที	35
4.2 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที	37
4.3 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที	39
4.4 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที	41
4.5 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (g/L) และปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Glucose Peptone	47
4.6 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (g/L) และปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone	49
4.7 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (g/L) และปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) ในถังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

สีเป็นหนึ่งในคุณลักษณะประการแรกที่ผู้บริโภคใช้ในการตัดสินใจเลือกซื้ออาหาร ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่มีการนำสีมาผสมกับอาหารเพื่อใช้ดึงดูดความสนใจ สร้างสีสันให้สวยงามและเพิ่มความน่ารับประทานมากขึ้น โดยในอดีตอุตสาหกรรมอาหารนิยมใช้สีทางเคมีซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค แต่ด้วยความตระหนักถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคผู้ผลิตอาหารจึงหันมาแสวงหาสีจากธรรมชาติมากขึ้น และใช้สีทางเคมีน้อยลง ซึ่งทางเลือกที่ดีสำหรับอุตสาหกรรมอาหารคือการใช้สีจากธรรมชาติ (Costa และ Vendruscolo, 2017) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสีจากจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่ก่อโรคเป็นสารสีที่สกัดได้ง่ายและให้ปริมาณสารสีที่สูง รวมทั้งยังมีความคงตัวของสารสีที่อุณหภูมิสูงได้ดี (วาลิสา และคณะ, 2558)

Monascus sp. เป็นเชื้อราที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหมัก มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และยาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากในระหว่างการเจริญของรามีการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) หลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกายโดยเฉพาะสารโมนาโคลิน เค (Monacolin K) ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ในขั้นตอนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย จึงมีการใช้ข้าวแดง (Red yeast rice) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนธัญพืช เช่น เมล็ดข้าว (Rosenblitt และคณะ, 2000) เป็นส่วนประกอบในการปรุงแต่งสี และกลิ่นรสในอาหารทดแทนการใช้สารไนเตรตและไนไตรต์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อคุณภาพที่ดีขึ้น เช่น แหนม ไส้กรอก ไส้กรอกอีสาน ซาลามี่ (อาหารพื้นเมืองของยุโรปตอนใต้) เต้าหู้ยี้ และไวน์แดง (Fabre และคณะ, 1993; Hamano และ Kilikian, 2006) ใช้ยืดอายุในการเก็บรักษาของอาหาร (Erdogral และ Azirak, 2004) อีกทั้งยังไม่พบว่าเป็นสารก่อมะเร็งเหมือนสีผสมอาหารที่ใช้สีทางเคมีซึ่งมีองค์ประกอบเป็น coal tar dyes (สีที่เป็นเกลือของโลหะหนัก เช่น โครเมียม ปรอท แคดเมียม ซีลีเนียม สารหนู และตะกั่ว สามารถพบได้ตามธรรมชาติในถ่านหิน แก๊สโซลีน และน้ำมันดิบ) นอกจากสารสีแล้วเชื้อรา *Monascus* ยังผลิตสารอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด เช่น เอนไซม์ โคเอนไซม์ สารปฏิชีวนะ สารลดความดันโลหิต และ methyl ketone (บุษบา, 2542) ทำให้ข้าวแดงได้รับความสนใจมากขึ้นในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ทางยาซึ่งมีสรรพคุณในการช่วยให้ระบบการย่อยและระบบไหลเวียนโลหิตดีขึ้น (Heber และคณะ, 1999) อีกทั้งยังสามารถนำมาใช้รักษาโรคไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) (Wang และคณะ, 2002)

สำหรับคุณภาพของสารสีที่ผลิตได้จะมีความแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสภาวะในการผลิต โดยในปัจจุบันสารสีสามารถผลิตได้ทั้งการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืช (solid state fermentation) เช่น ข้าวแดง หรือการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged fermentation) ซึ่งมีหลายปัจจัยที่ส่งผลกับการผลิตสารสี เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (แหล่งคาร์บอนและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจน) อุณหภูมิ การมีอยู่ของออกซิเจน ความชื้น ความเข้มแสง และค่าพีเอช (Lin และ Demain, 1991; Pastrana และคณะ, 1995; Babitha และคณะ, 2007; Babitha และ Carvalho, 2008; Feng และคณะ, 2012; Meinicke และคณะ, 2012; Vendruscolo และคณะ, 2016)

อย่างไรก็ตามในระหว่างการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. พบการสร้างซิตรินิน (Citrinin) ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อตับและไตของมนุษย์ (hepato-nephrotoxin) โดยจะทำให้ความสามารถในการกรองไขมันลดลง (Shi และ Pan, 2011) สารซิตรินินสร้างขึ้นจากกระบวนการ polyketide pathway ของรา ซึ่งเป็นกระบวนการเดียวกันกับการสร้างสารโมนาโคลิน เค และสารสี ดังนั้นสารสีที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ถึงแม้จะมีสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายอยู่มาก แต่มักมีการปนเปื้อนของสารซิตรินินร่วมอยู่ด้วยเสมอ (Blance และคณะ, 1995; อุทัยวรรณ และ เกตุการ, 2557) เนื่องจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้ในการเจริญของรา *Monascus* sp. มีผลต่อการเกิดสารซิตรินิน (เรณู, 2547)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการผลิตสารสี และซิตรินินจาก *Monascus* sp. U6V1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่สร้างสารโมนาโคลิน เค ได้สูง (ลลิตวดี และคณะ, 2557) ในสภาวะที่แตกต่างกันเพื่อเป็นแนวทางในการนำเชื้อราสายพันธุ์นี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาปริมาณการผลิตสารสี และการสร้างซิตรินินของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืช และในอาหารเหลว

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 โดยการเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืช และในอาหารเหลว เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

12.3 เพื่อศึกษาหาแนวโน้มว่าเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 สร้างซิตรินินได้น้อยกว่า *Monascus* sp. SS14 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ Wild type

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการผลิตสารสี และการสร้างซิตรินินในการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืช และในอาหารเหลวของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1

1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

การดำเนินงานวิจัย แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

1.4.1 การเตรียมเชื้อรา *Monascus sp.* มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการศึกษาต่อไป

1.4.2 ศึกษาการเจริญ และระยะเวลาในการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* บนข้าวเสาไห้ และข้าวหอมมะลิเพื่อให้ทราบลักษณะการเจริญ และระยะเวลาที่เชื้อราสร้างสารสีได้สูงสุด

1.4.3 ศึกษาอัตราการไหลของอากาศ อุณหภูมิ และความเร็วรอบของใบพัดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญ และการสร้างสารสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ การสร้างสารสี และการสร้างสารซิตรินิน โดยเปรียบเทียบระหว่างการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืช และในอาหารเหลว

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ทราบถึงปริมาณการผลิตสารสี และการสร้างซิตรินินของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืช และในอาหารเหลว

1.5.2 ได้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1

1.5.3 ได้ทราบถึงแนวโน้มความเป็นไปได้ว่าเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 สร้างสารสีได้มากกว่าและผลิตสารซิตรินินได้น้อยกว่าเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 อีกทั้งยังสามารถนำเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. ประวัติและความสำคัญของเชื้อรา *Monascus* sp.

เชื้อรา *Monascus* ได้ถูกค้นพบ และตั้งชื่อเป็นสกุล *Monascus* (*Monascus* sp.) อย่างเป็นทางการในปี ค.ศ. 1884 โดย Van Tieghem แบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยาและความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ *M. pilosus*, *M. pupureus*, *M. ruber* (Howksworth และ Pitt, 1983) และ *M. foridanas* (Bridge และ Hawksworth, 1985; Barnard และ Cannon, 1987) และสามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็งในรูปของข้าวแดงเพื่อใช้ปรุงแต่งสีในไวน์ เต้าหู้ยี้ ใช้ถนอมอาหารประเภทเนื้อ ใช้รักษาโรค ใช้เป็นสีผสมในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ต่อมาได้ผลิตเป็นการค้าในประทศญี่ปุ่น ไต้หวัน จีน และเยอรมนี (Kumari และคณะ, 2009)

Church (1920) ได้รายงานการทดลองจากการแยกสายพันธุ์ที่ได้จากข้าวแดงของประเทศจีน จนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่สร้างสารสีแดงคือ *M. purpureus* ต่อมาในปี 1960 Palo และคณะ ได้ใช้เชื้อรา *Monascus* ผลิตข้าวแดงซึ่งสามารถนำข้าวแดงมาใช้เป็นสีผสมอาหารได้โดยตรง

Lin (1973) ได้เริ่มทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวโดยแยกเชื้อราจากข้าวแดงจากประเทศต่าง ๆ ในแถบเอเชียใต้ และพบว่าเชื้อราเหล่านี้สร้างสารสีในอาหารเหลวได้ดีเช่นกัน ต่อมาได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารสี โดยใช้วิธีการต่าง ๆ เช่น ใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) หรือใช้รังสีต่าง ๆ การใช้เทคนิครวมโพรโทพลาสต์ (Protoplast fusion) การปรับปรุงกรรมวิธีในการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบครั้งคราว (Batch culture) แบบป้อน (Fed-batch culture) และการใช้วิธีการตรึงเซลล์ จนกระทั่งปัจจุบันมีการศึกษา และพัฒนาเกี่ยวกับการผลิตสารสีทั้งในวัสดุแห้ง และอาหารเหลวเรื่อยมา เนื่องจากมีการให้ความสำคัญกับการใช้สีผสมอาหารจากธรรมชาติมากขึ้นรวมทั้งสารเมทาบอไลท์อื่น ๆ

ในปี 1977 Wong และ Bau ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่าเชื้อรา *M. purpureus* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร เช่น *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp. และ *Pseudmonas* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ เอทานอล สารโมนาโคลิน เค ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และการช่วยในการตกตะกอน (Flocculant) (Fink-Gremmels และ Leistner, 1989)

2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Monascus*

Alexopoulos และ Mims (1979) ได้มีการจัดทำอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Monascus* spp. ดังนี้

Kingdom Myceteae
Division Amastigomycota
Subdivision Ascomycotina
Family Monascaceae
Class Ascomycetes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Subclass Plectomycetidae
Order Eurotidae
Genus *Monascus*

เชื้อรา *Monascus* เป็นเชื้อราเส้นใยมีผนังกั้น (septate hyphae) มีการแตกแขนงของเส้นใย มักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวอาหารแข็ง ในขณะที่อายุน้อยเส้นใยเป็นสีขาวแต่เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยเป็นสีแดงหรือสีแดงอมม่วง (วาลิสา และคณะ, 2558) เชื้อรา *Monascus* จัดเป็น homothallic fungi นอกจากนี้ยังจัดเป็นพวกเชื้อราที่ทนความแห้ง (xerophilic molds) และทนความร้อน (สุนีย์, 2557)

2.3 การสืบพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus*

การสืบพันธุ์มี 2 แบบ ได้แก่ แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction)

2.3.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction)

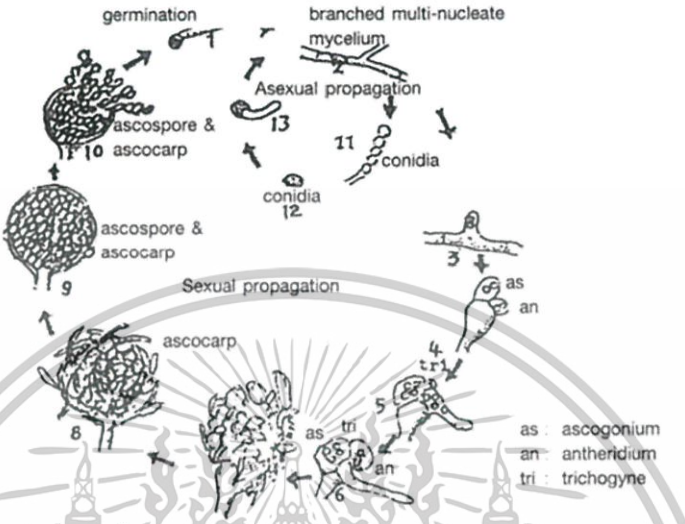
การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเริ่มจากเส้นใยมีการเจริญ และพัฒนาไปเป็นโครงสร้างเซลล์สำหรับสืบพันธุ์ ได้แก่ แอนเทอริเดียม (antheridium) คือโครงสร้างสืบพันธุ์เพศผู้ และแอสโคโกเนียม (ascogonium) คือโครงสร้างสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งเจริญอยู่ใต้แอนเทอริเดียม จากนั้นเส้นใยบริเวณส่วนบนของแอสโคโกเนียมจะพัฒนาต่อไปเป็นโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าไตรโคจีน (trichogyne) เชื่อมต่อบริเวณส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม เพื่อให้นิวเคลียสจากแอนเทอริเดียมผ่านเข้ามาผสมกับนิวเคลียสของแอสโคโกเนียม หลังจากนิวเคลียสผสมกันมีการพัฒนาต่อไปโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) และไมโตซิส (mitosis) แอสโคโกเนียมจะมีการสร้างผนังขึ้นมาล้อมรอบทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น จากนั้นจึงพัฒนาต่อไปเป็นเพอริทีเซียม (perithecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) ทรงกลมเกิดที่ปลายก้านชู (stalk) ในระยะนี้จะมีการสลายไปของผนังแอสคัส (ascus) ที่ห่อหุ้มแอสโคสปอร์ (ascospore) ทำให้เหลือแต่แอสโคสปอร์อยู่ในเพอริทีเซียมแอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคสปอร์แตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์งอกเป็นเส้นใยต่อไป และในแต่ละเพอริทีเซียมจะมีจำนวนของแอสโคสปอร์ออกมาในทิศตรงกันข้ามกับก้านชู ซึ่งระยะเวลาการเกิดแอสโคสปอร์จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ (Hawksworth และ Pitt, 1983; ฉัตรมณี, 2547)

2.3.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ชื่อว่า โคนิเดีย (conidia) บนปลายเส้นใยเรียกว่าโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นตรงหรือขดเป็นเกลียว ขณะเริ่มสร้างโคนิเดียที่บริเวณปลายของเส้นใยจะพองออก จากนั้นมีการสร้างผนังกั้นระหว่างโคนิเดียกับเส้นใยกลายเป็นโคนิเดียอันที่สอง และเป็นเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนในที่สุดได้โคนิเดียที่ต่อกันเป็นสาย ดังนั้นโคนิเดียที่มีอายุมากที่สุดจะอยู่ด้านนอก โดยโคนิเดียแต่ละอันเกิดจากบริเวณ meristematic zone ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ใต้โคนิเดียที่เกิดก่อนหน้าเพื่อใช้ในการสร้างโคนิเดียถัดมาทำให้สายโคนิเดียยาวขึ้น ขณะที่โคนิดิโอฟอร์จะสั้นลง ลักษณะของโคนิเดียจะสั้นลง ลักษณะของโคนิเดียจะเป็นรูปกลมหรือรูปไข่ โคนิเดียมักจะไม่มีสีแต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจเกิดสีแดงได้บ้าง บริเวณฐานของโคนิเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีรอยตัด ผนังเรียบ การงอกของโคดิเนียสามารถกระตุ้นได้ด้วยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด และการงอกของโคนิเดียจะมากน้อยขึ้นกับอายุของสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ พีเอช แสง อุณหภูมิ และสารอาหารด้วย (Hawksworth และ Pitt, 1983; ฉัตรมณี, 2547) แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus*
ที่มา : บุษบา, 2540

2.4 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Monascus*

2.4.1 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งธัญพืช (Solid state fermentation)

การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งธัญพืชเป็นการบ่มเพาะหรือการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้การควบคุมสภาวะในการบ่ม โดยมีแนวคิดในการใช้สับสเตรตที่เป็นของแข็ง ซึ่งเหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ตัวอย่างสับสเตรตที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น มันสำปะหลัง เมล็ดข้าว เศษไม้ และชิ้นส่วนที่แห้งแล้วของสัตว์ (Bhargav และคณะ, 2008)

สิริพร และคณะ (2556) ได้มีศึกษาการเลี้ยงเชื้อราในสภาพหมักแห้ง เชื้อราที่เจริญสามารถสร้างสารสีออกนอกเซลล์ได้มาก ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี จึงสร้างสารสีออกนอกเซลล์ได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว และการปล่อยให้สารสีออกนอกเซลล์ ทำให้ข้าวมีสีแดงทั่วทั้งเมล็ด

ทั้งนี้การผลิตข้าวแดงให้มีคุณภาพที่ดีขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์เชื้อรา สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ความชื้นเริ่มต้น ซึ่งสำคัญมากต่อการเจริญแต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงเกินไปจะทำให้การเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นไปได้ดี จึงมีการสะสมกลูโคสมากขึ้น และนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลแทนการสร้างสารสี ซึ่งปริมาณกลูโคสที่สูงเกินไปจะยับยั้งการสังเคราะห์สารสีได้

Palo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญ และการสร้างสารสีของ *M. purpureus* ที่เพาะเลี้ยงบนข้าว พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงจะต้องมีความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชระหว่าง 3.0-7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และข้าวที่ใช้ไม่ควรเป็นสายพันธุ์ที่มียางเหนียว โดยเฉพาะข้าวเหนียวหรือข้าวเมล็ดพันธุ์สั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hesseltine (1965) ได้รายงานว่าการเขย่าหรือให้อากาศช่วยให้เกิดการสร้างสารสีได้ดี และเร็วมากยิ่งขึ้น เนื่องจากเชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ และในสภาพที่มีก๊าซออกซิเจนคงที่และคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำจะทำให้เกิดการผลิตสารสีที่สูง (Yang และคณะ, 2014) เช่นเดียวกับการรายงานของ Chiu และ Chan (1992) ที่ได้ศึกษาผลของการให้อากาศที่มีต่อการผลิตสีของเชื้อรา *M. purpureus* บนชานอ้อยซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยเปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้กับการเลี้ยงแบบให้มีการหมุนของภาชนะ ซึ่งในการทดลองใช้ขวดเป็นภาชนะ พบว่า การเลี้ยงแบบให้มีการหมุนขวดนั้นเชื้อจะผลิตสีได้ดีกว่าการเลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้ธรรมดา 2-3 เท่า การให้อากาศนั้นเป็นการระบายความร้อน และรักษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์กับออกซิเจน

สำหรับอุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมทาบอลิซึมเพื่อการเจริญเติบโต อุณหภูมิสูงเกินไปทำให้เชื้อเจริญได้ช้า สร้างสารสีในข้าวแดงได้ไม่ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีจะอยู่ระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส

วรรณภา (2529) ได้ทำการศึกษาพบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. KB 11304, KB 21035 และ KB 20322 ที่พีเอชเริ่มต้น 7.0 ให้การสร้างสารสีสูงสุด และถ้าพีเอชสุดท้ายค่อนไปทางด่างจะให้สีแดง แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อ KB 21035 ในสภาพที่เป็นกรดพบการสร้างสีเหลืองดีที่สุด ดังนั้นจึงพบว่าพีเอชที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

2.4.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (Submerged fermentation)

มีการศึกษาเชื้อรา *Monascus* sp. โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะต่าง ๆ ในการเลี้ยง ควบคุมการปนเปื้อน ประหยัดพื้นที่ในการทำงาน และขยายขนาดการหมัก (scale-up) ได้ง่ายกว่าการหมักบนอาหารแข็ง จึงพัฒนาระบบการเลี้ยงเพื่อการเจริญ และการผลิตสีได้ดียิ่งขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน สารที่จำเป็นต่อการเจริญ อุณหภูมิ พีเอช การให้อากาศ (aeration) การกวน (agitation) เป็นต้น

Lin (1973) ได้คัดเลือกเชื้อราที่เจริญได้ดีในอาหารเหลวจากโคจิที่ใช้ทำเหล้าเกาเหลียง พบว่า *Monascus* F-2 สามารถใช้คาร์บอนเป็นแหล่งอาหารได้หลายชนิด และอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสี คือ แป้ง และมอลโตส ตามลำดับ

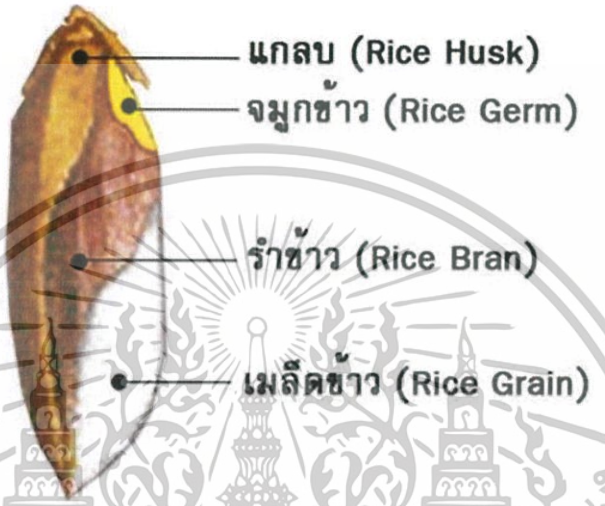
Chen และ John (1994) ได้รายงานว่า หากเลี้ยงเชื้อรา *Monascus purpureus* ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลมอลโตสเป็นองค์ประกอบ สีของอาหารเหลวจะมีสีแดงอย่างรวดเร็ว และชัดเจนกว่า อาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของกลูโคสเป็นหลัก สำหรับการเจริญ และการสร้างสารสี เมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงขึ้นความต้องการแหล่งไนโตรเจนก็จะมากขึ้นเช่นกัน หากขาดแหล่งคาร์บอนในอาหารจะส่งผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ nitrate reductase และ glutamate dehydronase ซึ่งเป็นกลไกควบคุมไนโตรเจน และวิถีเมทาบอลิซึม (Wong และ Koehler, 1981)

Scragg (1991) ได้รายงานว่า การหมักในอาหารเหลว การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการหมักจะต้องการออกซิเจนในรูปที่สามารถละลายในของเหลว (Dissolved oxygen) แต่ออกซิเจนสามารถละลายได้ในสารละลายเพียงบางส่วนจึงต้องเติมอากาศอย่างต่อเนื่อง การถ่ายเทออกซิเจนไปยังเชื้อจุลินทรีย์เริ่มจากออกซิเจนจากฟองอากาศละลายในของเหลว จากนั้นจะถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ข้าว

ข้าวเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้าที่สามารถกินเมล็ดได้ ถือเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกับหญ้า ต้นข้าวมีลักษณะภายนอกบางอย่าง เช่น กาบใบ ลำต้น และรากคล้ายต้นหญ้า เมล็ดข้าว (Rice grain) เป็นผลผลิตชนิด caryopsis เนื่องจากส่วนที่เป็นเมล็ดเดี่ยว (Single seed) ติดแน่นอยู่กับผนังของรังไข่หรือเยื่อหุ้มผล (Pericarp) (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2562) ดังรูปที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของเมล็ดข้าว



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว
ที่มา : สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว (2562)

ก) ส่วนที่ห่อหุ้ม เรียกกว่า แกลบ
ข) ส่วนที่รับประทานได้ เรียกว่า ข้าวกล้อง (Brown rice)
ข้าวกล้องหรือเมล็ดข้าวที่เอาเปลือกออกแล้ว ประกอบด้วย

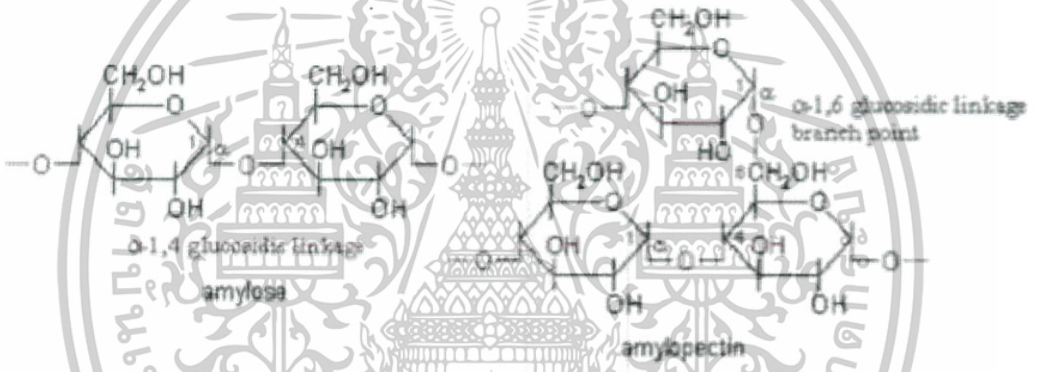
- เยื่อหุ้มผล (Pericarp หรือ Fruit coat) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้นด้วยกัน ได้แก่ epicarp, mesocarp และ endocarp
- เยื่อหุ้มเมล็ด (Tegmen หรือ Seed coat) อยู่ถัดจาก pericarp เข้าไป ประกอบด้วยเนื้อเยื่อสองชั้นเรียงกันเป็นแถวเป็นที่อยู่ของสารประเภทไขมัน
- เยื่ออาลูโรน (Aleurone) อยู่ต่อจากเยื่อหุ้มเมล็ด และคัพภะ (Embryo) อาลูโรนมีโปรตีนสูง นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยน้ำมัน และเซลลูโลส
- ส่วนที่เป็นแป้ง (Starch endosperm) หรือส่วนที่เป็นข้าวสารอยู่ชั้นในสุดของเมล็ดประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่ และมีโปรตีนอยู่บ้าง เมล็ดข้าวมีแป้ง 2 ชนิด คือ อะไมโลเพคติน (Amylopectin) และอะไมโลส (Amylose) ส่วนประกอบของแป้งทั้ง 2 ชนิด มีสัดส่วนแตกต่างกันไปตามชนิดข้าว เช่น ในข้าวเหนียวจะมีอะไมโลสอยู่ประมาณ 0.0-2.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นอะไมโลเพคติน ข้าวเจ้าจะมีอะไมโลสมากกว่า คือ ประมาณ 7-33 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักข้าวสาร
- คัพภะ (Embryo) อยู่ติดกับเอ็นโดสเปิร์ม (Endoperm) ทางด้าน lemma เป็นส่วนที่จะเจริญเป็นต้นอ่อนต่อไป คัพภะประกอบด้วยต้นอ่อน (Plumule) รากอ่อน (Radicle)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เยื่อหุ้มต้นอ่อน (Coleoptile) เยื่อหุ้มรากอ่อน (Coleorhiza) ท่อน้ำท่ออาหาร (Epiblast) และใบเลี้ยง (Scutellum) คัพภะเป็นส่วนที่มีโปรตีน และไขมันสูง

ข้าวเป็นสับสเตรทที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของข้าวก็คือ สตาร์ช (อะไมโลส และอะไมโลเพคติน) โดย Okuno และคณะ (1983) รายงานว่า ในเมล็ดข้าวจะมีปริมาณอะไมโลส 15-30 เปอร์เซ็นต์ และอะไมโลเพคติน 70-85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์จากข้าว หรือแป้งข้าว

สตาร์ชเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งพบมากที่สุดในเนื้อเมล็ดของข้าว (ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์) จึงมีผลต่อคุณภาพของข้าวมากที่สุดเช่นกัน โดยโมเลกุลของสตาร์ชรวมตัวกันเป็นเม็ดสตาร์ช โครงสร้างของเม็ดสตาร์ชประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูแคน 2 ชนิดผสมกัน คือ อะไมโลส (amylose) เป็นพอลิเมอร์สายยาวของ α-(1-4) กลูแคน และอะไมโลเพคติน (amylopectin) เป็นสายแขนงที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูงต่อกันด้วยพันธะ α-(1-4) กลูแคนเป็นสายตรง และมีพันธะ α-(1-6) เป็นสายแขนง (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมเลกุลของอะไมโลส และอะไมโลเพกติน
ที่มา : Tester และคณะ (2004)

2.6 สารสีจากเชื้อรา *Monascus*

2.6.1 ประเภทของสารสีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus*

สารสีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* เป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิจำพวกโพลิคีไทด์ (polyketide) ที่มีกลุ่ม azaphilone เป็นองค์ประกอบ และมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำหรือละลายได้น้อยมาก (Zheng และคณะ, 2009; Dufosse, 2006) สารสี *Monascus* ส่วนใหญ่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล และเมทิลีนคลอไรด์ สามารถแบ่งกลุ่มของสารสี *Monascus* ได้ 3 กลุ่ม ตามสีที่ปรากฏโดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสารพอลีคีไทด์อย่างน้อย 2 ชนิดที่แตกต่างกันตามความยาวของโซ่อะลิฟาติก (aliphatic chains) (Mukherjee และ Singh, 2011)

เชื้อราส่วนใหญ่สร้างสารสีขึ้นภายในเซลล์ ยกเว้นเชื้อราบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารสีและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ได้ ส่วนการสร้างสารสีของ *Monascus sp.* จะสร้างสารสีส้มเป็นเฉดสีแรกโดยกลไกการสังเคราะห์สารสีส้มจะผ่านวิถีการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์ร่วมกับวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน จากนั้นเมื่อสารสีส้มทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน เปปไทด์ โปรตีน หรือกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิวคลีอิก โครงสร้างสารสีส้มจะเปลี่ยนเป็นสารสีแดง และเมื่อสีส้มเกิดปฏิกิริยารีดักชันจะเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสารสีเหลือง (Hajjaj และคณะ, 2000)

2.6.1.1 กลุ่มสารสีส้ม

2.6.1.1.1 รูโบรพังทาทิน (Robropunctatin) เป็นสารสีในกลุ่มสีส้ม สูตรโมเลกุลประกอบด้วย $C_{21}H_{22}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 354 สารสีรูโบรพังทาทินสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้สารรูโบรพังทามีน (Robropunctamine) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาต่อได้อีกกับสังกะสี และกรดแอซิติกได้สารอะโปรูโบรพังทามีน (Aporubropunctamine) สารนี้มีผลึกเป็นรูปเข็มสีแดงมีจุดหลอมเหลว 156-157 องศาเซลเซียส

2.6.1.1.2 โมนาสโครูบิน (Monascorubrin) เป็นสารสีในกลุ่มสีส้ม สูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{26}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 382 ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปคโตรสโคปีคือ λ_{max} 253 302 และ 352 นาโนเมตร มีจุดหลอมเหลว 134-136 องศาเซลเซียส

2.6.1.2 กลุ่มสารสีแดง

2.6.1.2.1 รูโบรพังทามีน (Robropunctamine) เป็นสารสีในกลุ่มสีแดง สูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{26}O_3N$ และน้ำหนักโมเลกุล 353 สารรูโบรพังทามีนเกิดจากสารรูโบรพังทาทินทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียม

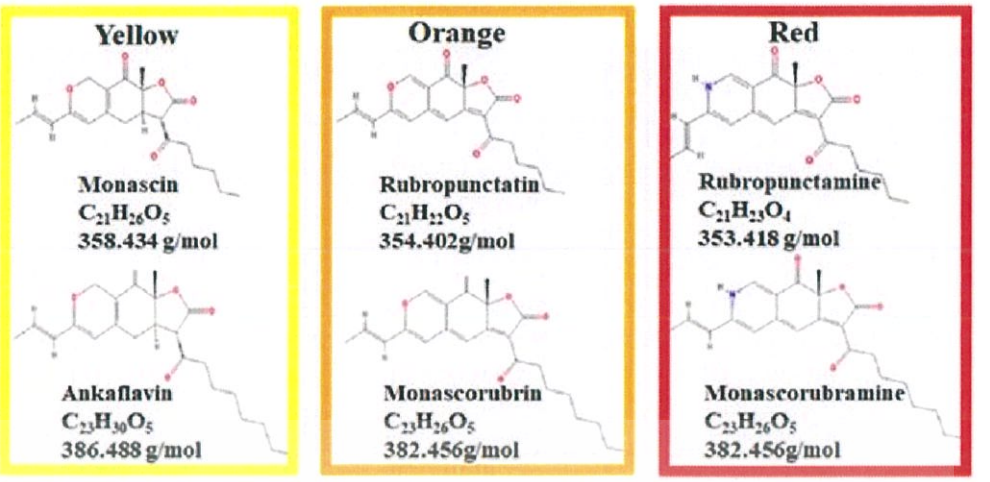
2.6.1.2.2 โมนาสโครูบรามีน (Monascornbramine) เป็นสารสีในกลุ่มสีแดง สูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{27}O_4N$ และน้ำหนักโมเลกุล 381 มีจุดหลอมเหลว 207-208 องศาเซลเซียส สารโมนาสโครูบรามีนเกิดจากสารโมนาสโครูรินทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียม โดยมีโครงสร้างของสารสีจาก *Monascus* sp.

2.6.1.3 กลุ่มสารสีเหลือง

2.6.1.3.1 โมนาสโคฟลาวิน (Monascoflavin) แยกได้เป็นครั้งแรกพร้อมกับสารสีโมนาสโครูบรินจากเชื้อรา *M. purpureus wentii* เป็นสารสีในกลุ่มสีเหลือง สูตรโมเลกุลประกอบด้วย $C_{12}H_{26}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 358 ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปคโตรสโคปีคือ λ_{max} 225 228 และ 385 นาโนเมตร มีจุดหลอมเหลว 143-155 องศาเซลเซียส สารสีโมนาสโคฟลาวินเป็นตัวเดียวกันกับสารสีโมนาสซิน (Monascin) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *M. rubignousus* Sato อยู่ในกลุ่มสารสีเหลือง

2.6.1.3.2 อังคาฟลาวิน (Ankaflavin) เป็นสารสีในกลุ่มสีเหลือง สูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{30}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 386 มีจุดหลอมเหลว 120-121 องศาเซลเซียส ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปคโตรสโคปีคือ λ_{max} 212 228 382 นาโนเมตร สารสีอังคาฟลาวินมีสูตรโครงสร้างสัมพันธ์กับสารสีโมนาสซินเช่นเดียวกับสารสีรูโบรพังทาทินที่มีสูตรสัมพันธ์กับสารสีโมนาสโครูบริน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus*
ที่มา : Chen และ Johns, 1994

วรรณภา (2529) พบว่าสารสีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* โดยผ่านกระบวนการต่าง ๆ คงตัวได้ดีที่พีเอชเป็นกลางถึงด่างเช่นกัน ทนต่ออุณหภูมิน้ำเดือดนาน 15 นาที และคงตัวได้ดีในสารละลายโซเดียมเบนโซเอท กลีเซอรอล น้ำ และกรดอะซิติก คุณสมบัติของสารสีจากเชื้อรา *Monascus* บางประการ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของสารสีจากเชื้อรา *Monascus*

สมบัติ	สีแดง	สีเหลือง
ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด	420 และ 500	330 และ 370
ค่าคงทนต่อพีเอช	4-11	2-11
สารละลาย	เอทานอล น้ำ เมทานอล	เอทานอล น้ำ แอซีโตน
ความคงทนต่อความร้อน	ดีพอใช้	ดีกว่าสีแดง
ความคงทนต่อแสง	พอใช้	ดี
ความปลอดภัย	ดี	ดี

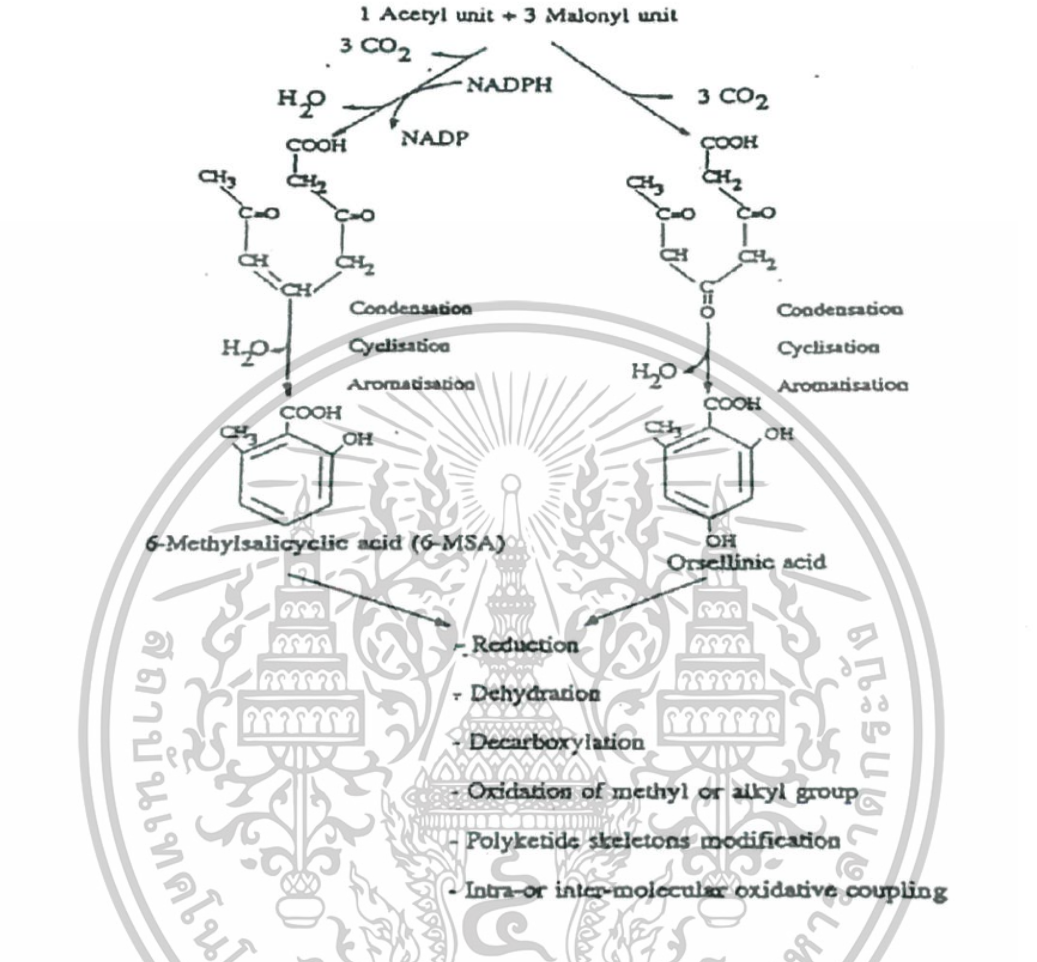
ที่มา : บุษบา และคณะ (2531)

2.6.2 กลไกการสังเคราะห์สารสี

สารสีจากเชื้อรา *Monascus* sp. เกิดจากการรวมตัวของ acetyl 1 หน่วย กับ malonyl 3 หน่วยขึ้นไปได้เป็นไพรเมอร์ (Primer) และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา วิถีการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์เหมือนกับกรดไขมันแต่จะไม่พบสารตัวกลางที่เกิดจากปฏิกิริยาการรีดักชั่น ในการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์นั้นสายของโพลีคีไทด์จะยาวขึ้นตามจำนวนของคาร์บอน 2 หน่วย ที่มาจาก malonyl ที่ถูกเติมเข้าไปในสายไพรเมอร์เกิดเป็น triketide tetraketide pentaketide และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

polyketides ตามลำดับ ต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยา cyclisation และ aromatization ได้เป็นสาร 6-methylsalicylic acid หรือ orsellinic acid ซึ่งเป็นสาร tatraketide เริ่มต้นที่จะนำไปสู่การสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์อื่น ๆ ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 2.5

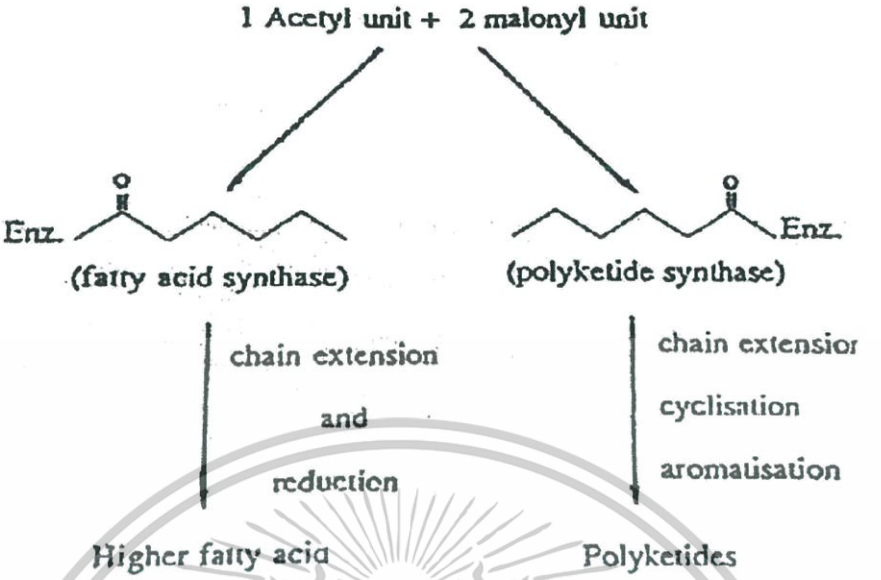


รูปที่ 2.5 การเกิดสาร 6-MSA และ orsellinic acid จาก acety และ malonyl
ที่มา : นิสา (2537)

เมื่อได้สารเริ่มต้นแล้ว ปฏิกิริยาในลำดับต่อไปที่เกิดขึ้นทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ต่างกันออกไป เช่น อาจมีการเติมหรือดึงออกซิเจนออกจากโครงสร้างของสาร เกิดปฏิกิริยา decarboxylation มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือย้ายหมู่ต่าง ๆ ภายในโมเลกุลของสาร เกิด intra- หรือ inter-molecular oxidative coupling หรือเกิดพันธะระหว่าง C- หรือ C=O เป็นต้น

สารสีที่สกัดได้จากเชื้อรา *Monascus* sp. เช่น rubropunctation จาก *M. rubropunctatus* monascorbrin จาก *M. purpureus* และ monascin (Monascoflavin) จาก *Monascus* sp. เป็นสารประเภทโพลีคีไทด์ซึ่งเป็นเมทาบอไลท์ทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นมาคล้ายกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน เชื่อว่าเอนไซม์โพลีคีไทด์ที่ใช้สังเคราะห์สารโพลีคีไทด์ที่เกี่ยวข้องกับยีน สังเคราะห์เอนไซม์ fatty acid synthase อย่างใกล้ชิดเมื่อยีนจำลองตัวเองที่ผิดพลาดทำให้สูญเสียขั้นตอนรีดักชั่นไป ทำให้เอนไซม์ polyketide synthase ทำหน้าที่สังเคราะห์โพลีคีไทด์แทนที่จะเป็น fatty acid synthase ซึ่งมีหน้าที่สังเคราะห์กรดไขมัน ดังแสดงในรูปที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase กับ polyketide synthase
ที่มา : นิสา (2537)

การสังเคราะห์โพลีคีไทด์ถูกยับยั้งด้วยแสงสีน้ำเงิน โดยพบว่าแสงสีน้ำเงินจะกระตุ้นให้เชื้อราสร้างโคนิเดีย เบต้าแคโรทีน และกรดไขมันแทนการสร้างสารโพลีคีไทด์ โดยมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์หรือควบคุมวิถีการสร้างโพลีคีไทด์ การได้รับแสงสีน้ำเงินเป็นเวลาเพียง 2 นาทีก็สามารถยับยั้งการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์ได้แล้ว

Su และ Huang (1980) ได้รายงานว่าสารสีที่เชื้อรา *Monascus* สร้างขึ้นจะมีลักษณะเป็น granular fluid ซึ่งจะถูกขับออกมาตามช่องหรือรอยแตกของผนังเส้นใย ในบางครั้งเมื่อขับออกมาแล้วสารสียังคงติดอยู่กับปลายเส้นใย และสะสมจนมีจำนวนมากก่อนหลุดจากเส้นใย สารสีบางส่วนสะสมอยู่ภายในเส้นใย

2.6.3 การใช้ประโยชน์จากสีของเชื้อรา *Monascus*

เชื้อรา *Monascus* หลายสายพันธุ์สามารถผลิตสีได้ โดยเฉพาะสายพันธุ์ *M. purpurescens* จึงมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในประเทศไต้หวัน ญี่ปุ่น สหรัฐอมริกา และฝรั่งเศส แต่มีเพียงประเทศญี่ปุ่นที่อนุญาตให้ใช้สีจาก *M. purpurescens* ได้ถูกต้องตามกฎหมาย แต่ก็ยังมีหลายประเทศในแถบเอเชียใช้สีจากเชื้อรานี้เป็นสีผสมอาหาร ถึงแม้ว่ายังไม่มีการอนุญาตให้ใช้ได้ตามกฎหมายก็ตาม *Monascus* มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่ออุตสาหกรรมอาหารโดยใช้เป็นสารให้สี (Colorant) ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น สาเก ไวน์แดง เต้าหู้ยี้ มิโซะ และผลิตภัณฑ์เนื้อ นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์ของ *Monascus* ในเครื่องดื่มไม่มีแอลกอฮอล์จำพวกน้ำหวาน น้ำนม นมเปรี้ยว น้ำผลไม้ และอาหารประเภทโปรตีนจำพวกปลา แป้งแดง ไส้กรอก แฮม เนื้อเทียม ซอสมะเขือเทศ ผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ขนมลูกชุบ ปูเทียม และอื่นๆ (บุษบา, 2540)

นอกจากการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารแล้วยังพบว่า *Monascus* สามารถสร้างสารเมทาบอไลต์ได้หลายชนิดที่น่าสนใจ และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ได้แก่ สารกลุ่มเมทาบอไลต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ลบเปลี่ยนเนื้อหาและข้อความส่วนใดส่วนหนึ่งของเอกสารนี้ก่อนได้รับอนุญาต

ปฐมภูมิ คือ เอทิลแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ วิตามินบี 2 ไขมัน และกรดไขมัน สารกลุ่มเมทาบอไลต์ทุติยภูมิ คือ สารปฏิชีวนะโมนาโคลิน สารตกตะกอน ยาลดความดันโลหิต ยาพื้นบ้านของจีนในการรักษาโรคอาหารไม่ย่อย คูมาริน รักษาโรคด่างขาว โคเอนไซม์ Q10 สารให้กลิ่นหอม และสารยับยั้งการกลายพันธุ์ อีกทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดคือ กลูโคอะมิเลส โปรติเอส แอลฟา-กาแลคโตซิเดส แอลฟา-อะมิเลส และไรโบนิวคลีเอส ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อรา *Monascus* ในอาหารมากขึ้น (บุษบา, 2540)

Fabre และคณะ (1993) ได้รายงานว่า การใช้สารสีจาก *M. Ruber* สำหรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอก strasbourg sausages ทำให้มีลักษณะสีแดงมีความเป็นเนื้อเดียวกัน และกลิ่นเครื่องเทศในไส้กรอกดีขึ้นด้วย

Shehata และคณะ (1998) ศึกษาการเติมสารสีจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแบบ Egyptian fresh beef sausages พบว่า การใช้ข้าวแดงผสมกับไนไตรท์ร่วมกันให้รสชาติที่ดี สีที่ได้มีความเสถียรมากกว่าใช้ไนไตรท์เพียงอย่างเดียวในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก

Andrea และคณะ (2001) ทดลองใช้สีจาก *M. purpureus* ทดแทนการใช้เกลือไนไตรท์กับผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก พบว่า การเติมเกลือไนไตรท์ 10 กรัมต่อกิโลกรัม ผสมกับสีจาก *Monascus* 0.5 กรัมต่อกิโลกรัม ในแฮมไก่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจทั้งในด้านสี รสชาติ และลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์

ทศพร (2544) ศึกษาการใช้ข้าวแดงเพื่อปรับปรุงสีในไส้กรอกอิมัลชั่น โดยเปรียบเทียบด้วยการประเมินผลทางประสาทสัมผัสกับไส้กรอกที่ใช้ผงเพรคร้อยละ 0.3 พบว่าข้าวแดงบดละเอียดในระดับร้อยละ 0.6 ของน้ำหนักเนื้อ ผู้ชิมให้รับการยอมรับมากที่สุด ส่วนการใช้สีที่สกัดจากข้าวบดละเอียด พบว่าไส้กรอกจากการใช้สีสกัดจากข้าวแดงบดละเอียดในระดับร้อยละ 0.3, 0.6 และ 0.9 ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องนี้ และการยอมรับโดยรวม และเมื่อเก็บไส้กรอกที่ปรับปรุงสีโดยใช้ข้าวแดงบดละเอียดพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าสี

Broder และ Koehler (1980) ได้ทดลองใช้สีจาก *M. purpureus* ผสมในโยเกิร์ตรสผลไม้และเปรียบเทียบกับสีผสมอาหารที่ใช้อย่างแพร่หลายในทางการค้า โดยวัดค่าสีจาก *M. purpureus* ในโยเกิร์ตระหว่างการบ่มนมจนเป็นโยเกิร์ต พบว่าให้ค่าใกล้เคียงกับสีของโยเกิร์ตในทางการค้า และไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเก็บ 21 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณ *Lactobacillus* และ *Streptococcus* เท่ากับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสี ดังนั้นจึงสามารถใช้สารสีจาก *M. purpureus* เป็นสีผสมในโยเกิร์ตรสสตรอว์เบอร์รีได้ (บุษบา และคณะ, 2531)

2.6.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสารสีในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus*

กระบวนการผลิตข้าวแดงแบบดั้งเดิมใช้วิธีการหมักแบบอาหารแข็ง โดยการหมักแบบอาหารแข็งนั้นหมายถึงการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งในสภาวะที่ไม่มีน้ำอิสระ (Mitchell และ Lonsane, 1992) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การสังเคราะห์สารสีของเชื้อรา *Monascus* ในข้าวแดง ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์ของเชื้อ และสภาวะการเตรียมข้าว เช่น อุณหภูมิ และเวลาในการนึ่งข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นผลจากสภาวะในการผลิตข้าวแดง ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นของข้าว พีเอชปริมาณออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุเสริม เป็นต้น ทั้งนี้จากปัจจัยที่ได้กล่าวข้างต้นได้มีผู้ศึกษาความเหมาะสม และอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าวหลายกรณีด้วยกัน ซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ห้ามมิให้ทำการดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.4.1 แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

Lilly และ Barnett (1962) รายงานว่าฟรุคโตส กลูโคส และน้ำตาลอินเวอร์ท (Invert sugar) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการเจริญเติบโตของ *M. purpureus* และเป็นการเพิ่มอัตราการเจริญ ถ้าหากมีซูโครสกับฟรุคโตสหรือซูโครสกับกลูโคสในอาหารจะทำให้อัตราการเจริญสูงขึ้นซึ่งดีกว่าน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์เพียงชนิดเดียว

Mchan และ Johnson (1970) ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลวที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน พบว่ากลูโคสเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้น 6.25 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Lin (1973) คัดเลือกเชื้อราที่เจริญได้ดีในอาหารเหลวจากโคจิที่ใช้ทำเหล้าเกาเหลียง พบว่า *Monascus* F-2 สามารถใช้คาร์บอนเป็นแหล่งอาหารได้หลายชนิด และอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีคือ แป้ง น้ำตาลกาแลคโตส และมอลโตส ตามลำดับ

Broder และ Koehler (1980) พบว่าทั้งเชื้อรา *M. purpureus* NRRL 2897 สร้างสารสีแดงได้ดีบนอาหารที่มีแป้ง น้ำตาล กาแลคโตส และมอลโตส ตามลำดับ และยังพบอีกว่า เชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 สร้างสารสีแดงได้ดีที่สุดในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลมอลโตสเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยสร้างสารสีแดงดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 634 นาโนเมตร รองลงมาเป็นน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 15.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เชื้อราสร้างสารสีแดงดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 627 และ 625 นาโนเมตร ตามลำดับ

Wong และ Koehler (1981) ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนคือกลูโคส และการสร้างสารสีของเชื้อรา และแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมไนเตรทต่อการเจริญ *M. purpureus* M1S พบว่าเมื่อใช้กลูโคส 400 กรัมต่อลิตร จะใช้แอมโมเนียมไนเตรทเพียง 0.5 กรัมต่อลิตร สำหรับการเจริญ และการสร้างสารสีเมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงขึ้นความต้องการแหล่งไนโตรเจนก็จะมากขึ้นด้วย และพบว่าถ้ามีปริมาณคาร์บอนในอาหารเพิ่มขึ้นความต้องการไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้น โดยเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ทดลองมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อใช้กลูโคส 200 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรท 5-10 กรัมต่อลิตร และพบว่าถ้าขาดคาร์บอนในอาหารจะเกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ nitrate reductase และ glutamate dehydrogenase ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมไนโตรเจน และวิถีเมแทบอลิซึม

Lin และ Demain (1991) พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อรา *Monascus* TTWMB 6042 ในอาหารเหลวชนิด Defined medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์ตรินจะให้การเจริญดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ แป้ง กลูโคส มอสโตส และฟรุคโตส แต่ไม่พบการเจริญในกาแลคโตส แลคโตส และซูโครส

2.6.4.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญ การสร้างสารสี และชนิดของสารสีที่เชื้อราสร้างขึ้น

Lin (1973) ได้รายงานว่า *Monascus* sp. F-2 ใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิดในการสร้างสารสีแดง ได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนเปปโตน และยีสต์สกัดไม่เหมาะที่จะเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับสร้างสารสีแดง เช่นเดียวกับการทดลองของ Su และ Huang (1980) ที่พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงของเชื้อรา Mankav-204 คือ โมโนโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Broder และ Koehler (1980) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 สร้างสารสีแดง การดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 611 นาโนเมตร ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

Carels และ Shepherd (1977) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารสีและสปอร์ของเชื้อรา *Monascus* sp. พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยีสต์สกัดหรือไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อราจะผลิตสีแดงที่พีเอช 6.5 เนื่องจากอาหารนี้มีกรดอะมิโนมากพอภายหลังจากที่เชื้อเจริญทำให้พีเอชสูงขึ้น สารสีสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระ และกรดอะมิโน หรือ NH-group ภายในเส้นใยเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์เอมีนได้ และไม่พบสีส้มหรือสีเหลือง ส่วนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรทจะได้สารสีแดง และสีส้ม เนื่องจากอาหารนี้ไม่มีกรดอะมิโนอิสระถึงแม้พีเอชจะสูงขึ้น สารสีจะสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนภายในเส้นใยได้ทำให้สารสีส้มยังเหลืออยู่ ขณะที่อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไนเตรทจะทำให้พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 2.5 เป็นผลทำให้สารสีที่ผลิตได้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ NH-group ภายในเส้นใยได้ ผลคือจะมีการสะสมของ monascorubrin และ rubropunctatin ได้เป็นสีส้ม การเจริญบางสายพันธุ์ในอาหารนี้ได้สารสีเหลือง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ monasconbrin หรือ rubropunctatin กับ hydrogen peroxide ได้เป็น monascin หรือ ankafavin ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 50-100 กรัมต่อลิตร ของแอมโมเนียมไนเตรทจะให้อัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดแต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อเซลล์ และการสร้างสารสี เนื่องจากแอมโมเนียมในอาหารจะไปรีดิวซ์การทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (Nitrate reductase) ดังนั้นจะเป็นการลดความสามารถในการดูดซึมไนเตรท แต่พบว่า แอมโมนียมไอออนสามารถแพร่กระจายได้เร็วมากกว่าภายในเซลล์ และสังเคราะห์ได้เร็ว ดังนั้น แสดงว่าจะไม่มีผลยับยั้งการเจริญถ้าใช้ในปริมาณที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ

Wong และ Koehler (1981) พบว่า ไนเตรทกระตุ้นการสร้างสปอร์ทั้งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ ขณะที่แอมโมเนียมจะยับยั้งการสร้างสปอร์ และยังรายงานอีกว่าจากการทดลองพบว่ากลูโคสที่ความเข้มข้นระหว่าง 40-200 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร จะทำให้ *M. purpureus* ผลิตสีแดงได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทสูงมากกว่า 50 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญ และการผลิตสารสี

Lin และ Demain (1991) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB 6042 เจริญได้ดีในแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท และโมโนโซเดียมกลูตาเมท ขณะที่สร้างสารสีได้ดีในโมโนโซเดียมกลูตาเมทความเข้มข้น 1.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ร่วมกับน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์

Yongsmith และคณะ (1990) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน และมอลท์เอกซ์แทรค (Malt Extract) ต่อการเจริญ และการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus sp.* KB10 พบว่า เปปโตนสามารถกระตุ้นการสร้างสารสีโดยตรง แต่ยีสต์สกัดส่งเสริมการเจริญมากกว่าการสร้างสารสี ส่วนมอลท์เอกซ์แทรคมีผลต่อการเจริญ และการสร้างสารสีน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.4.3 สารจำเป็นต่อการเจริญ (Growth factor)

Johnson และ McHan (1975) พบว่า การเติมวิตามิน 5 ชนิด คือ ไพริดิกซีน ไบโอติน ไธอะมีน ไนอะมีน และไรโฟลาวินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่มีผลต่อการเจริญ ส่วนกรดอะมิโน และเกลือแร่ช่วยให้การเจริญเพิ่มขึ้น แต่ยังน้อยกว่าการเติมเปปโตนหรือยีสต์สกัด ในจำนวนเกลือแร่ 5 ชนิด คือ แคลเซียม โมลิบดินัม ทองแดง แมงกานีส และสังกะสี พบว่าสังกะสี 800 ไมโครกรัมต่อลิตร ให้การเจริญดีที่สุด และการเจริญดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับกรดอะมิโนทริฟโตเฟน ลิวซีน กรดแอสปาติก ไทโรซีน ไกลซีน และอีสติดีน เนื่องจากสังกะสีช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนโดยจะไปลดค่า conversion efficiency

2.6.4.4. อุณหภูมิ และพีเอช

Lin (1973) ศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารที่อุณหภูมิ 27-40 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 2-10 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีคือ 32 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงมากกว่า 37 องศาเซลเซียส การสร้างสารสีจะลดลง ส่วนพีเอชที่เหมาะสมคือ 6.0 รองลงมาคือ 5.0 และ 7.0 ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงพีเอชในขณะเลี้ยงเชื้อราขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งไนโตรเจน ถ้าพีเอชเป็นกลางจะสร้างสารสีแดงแต่ถ้าพีเอชเป็นกรดจะเปลี่ยนเป็นสร้างสารสีส้ม นอกจากนี้ที่พีเอชเป็นกรดยังทำให้การสร้างโคนิเดียลดลงแต่การสร้างสารสีจะสูงขึ้น เนื่องจากที่พีเอชต่ำกลูโคส และฟอสเฟตถูกใช้ไปในการสร้างเซลล์เป็นจำนวนมากจึงเหลือเพียงเล็กน้อยสำหรับสร้างโคนิเดีย

Su และ Huang (1980) พบว่าเชื้อรา *M. anka* V-204 สร้างสารสีดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ และพีเอชมีผลน้อยมากต่อการเจริญของคลิสโททีเซียม และโคนิเดียคือ 28-30 และ 35-40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะยับยั้งการสร้างสปอร์อย่างสมบูรณ์

Lin และคณะ (1992) ได้รายงานว่าค่าพีเอชที่เป็นกลางจะทำให้เชื้อราผลิตสารสีส้ม (monascorubrin, rubropunctatin) จนถึงสีแดง (monascorubramine, rubropunctamine)

Yongsmith และคณะ (1990) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 สร้างสารสีเหลือง ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ได้ดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส รองลงมาคืออุณหภูมิ 31 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยอาหารมีพีเอชเริ่มต้นเป็น 2.5 ส่วนอุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 40 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.0 ตามลำดับ

Venil และคณะ (2013) พบว่า *Monascus sp.* สามารถเจริญที่อุณหภูมิระหว่าง 25-37 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส

2.6.4.5 ความชื้น

Yongsmith และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* sp. KB9 ด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง โดยทดลองหมักข้าวด้วย *Monascus* sp. KB9 ที่ความชื้นเริ่มต้น 32 35 38 และ 43 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 วัน พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และการสังเคราะห์สารสีมีค่าระหว่าง 32-43 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ความชื้นเริ่มต้นของข้าว 38 เปอร์เซ็นต์จะทำให้ค่าความเข้มสีสูงสุด อย่างไรก็ตาม Yongsmith และคณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังเสนออีกว่าจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะหรือชอบที่จะเจริญที่ความชื้นเริ่มต้นต่างกัน ปริมาณน้ำที่มากเกินไปอาจลดความพรุนของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเมล็ดข้าวเป็นสาเหตุให้สารตั้งต้นเกาะกันแน่นซึ่งเหนี่ยวนำให้การถ่ายเทออกซิเจนลดลง

2.6.4.6 ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์

Monascus จัดเป็นเชื้อราในกลุ่มต้องการอากาศ (Aerobic fungi) แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนอย่างจำกัด ซึ่งภายใต้สภาวะดังกล่าว *Monascus* จะผลิตเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูงแต่สังเคราะห์สารสีในปริมาณต่ำ อย่างไรก็ตาม *Monascus* จะผลิตเอทานอล และสร้างสารสีเพิ่มขึ้นเมื่อเจริญภายใต้สภาวะอากาศที่มีองค์ประกอบตามธรรมชาติ (O_2 ~ 0.21-0.5 atm) (Han และ Mudgett, 1992) หรือมีอัตราการให้อากาศไม่มากเกินไป (aretion rate ~ 1 NmL/g.min (มิลลิลิตรของอากาศต่อกรัมข้าวน้ำหนักเปียกต่อนาที)) (Carvalho และคณะ, 2006) ทั้งนี้การผลิตสารสีของ *Monascus* จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสูงมาเกินไป (O_2 ~ 1.2-2.0 atm) หรือมีการถ่ายเทของอากาศสูง (aretion rate > 1 NmL/g.min) หรือมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบสูง (Han และ Mudgett, 1992; Carvalho และคณะ, 2006)

Han และ Mudgett (1992) ศึกษาประสิทธิภาพของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลต่อการเจริญ และการสังเคราะห์สารสีของ *M. purpureus* ATCC 16365 ใน Closed pressure vessels และเปลี่ยนแปลงระดับออกซิเจนระหว่าง 0.1-2.1 atm ที่คาร์บอนไดออกไซด์คงที่ 0.02 atm พบว่า *Monascus* สามารถผลิตสารสีได้สูง เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ 0.5 atm และการสังเคราะห์สารสีจะลดลงเมื่อปริมาณออกซิเจนสูงถึง 1.2 atm และการสังเคราะห์สารสีจะลดลงเมื่อปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นถึง 0.2 atm

นอกจากนี้จากการทดลองหมักข้าวที่สภาวะออกซิเจนคงที่ที่ 0.21 atm และเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 0.02-1.0 atm พบว่า *Monascus* สามารถสังเคราะห์สารสีได้สูงที่สุดที่ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำที่สุดที่ระดับ 0.02 atm และหากเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์สูงถึง 1.0 atm การสังเคราะห์สารสีจะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม Han และ Mudgett (1992) ยังได้เสนอว่า ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สะสมหรือจำกัดปริมาณออกซิเจนในระหว่างการหมักจะมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* ในอาหารแข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระหว่างการเลี้ยงเชื้อควรกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ และเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในระบบเพื่อให้ *Monascus* สามารถสังเคราะห์สารสีได้สูงสุด

2.7 สารโมนาโคลิน เค (Monakolin K)

สารโมนาโคลิน เค ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา *Monascus* เกิดขึ้นเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1971 โดยนักวิทยาศาสตร์ได้สกัดแยกสารโมนาโคลิน เค จากการหมักด้วยเชื้อสายพันธุ์ *M. ruber* (Shi และ Pan, 2011) ซึ่งสารโมนาโคลิน เค เป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิในกลุ่มสแตตินที่เชื้อรา *Monascus* สร้างขึ้นในระหว่างการหมัก

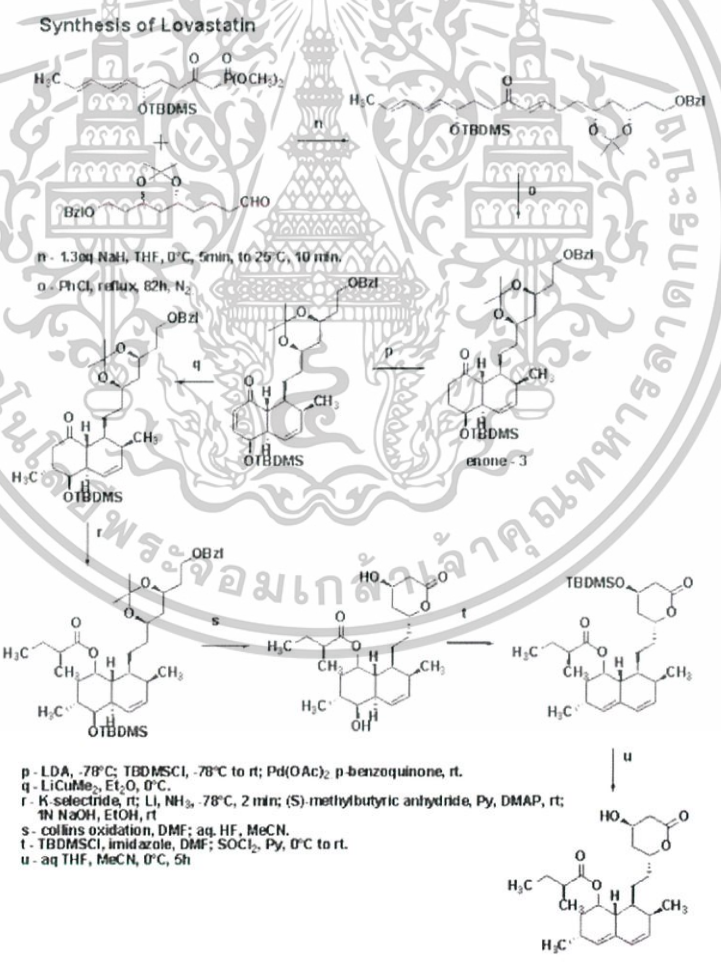
สารโมนาโคลิน เค มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 404.55 กรัมต่อโมล และมีชื่อเรียกหลายชื่อ เมวิโนลิน (mevinolin) เมวาคอร์ (mevacor) เมวินาคอร์ (mevinacor) หรือโลวาสแตติน (lovastatin) พบว่าสารกลุ่มนี้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase: mevalonate :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NADH+ oxidoreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์กระตุ้นการเปลี่ยน HMG-CoA ให้เป็นเมวาโลเนต (Mevalonate) เพื่อใช้ในกระบวนการสร้างคอเลสเตอรอล (Hajjaj และคณะ, 2000)

2.7.1 กลไกการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน เค

สารโมนาโคลิน เค เป็นสารกลุ่มสแตตินได้จากเชื้อราเส้นใย (Filament) ได้จากกระบวนการเมทาบอไลต์ทุติยภูมิ ได้สารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนผ่านวิธี polyketide pathway เชื้อรา *M. ruber, Penicillium brevicompactum* และ *Aspergillus terreus* สามารถผลิตโลวาสแตติน (Lovastatin) โมนาโคลิน เจ (Monacolin J) โมนาโคลิน แอล (Monacolin L) และเมวาสแตติน (Mevastatin) Monacolin ประกอบด้วยโพลีคีไทด์ 2 สายจากอนุพันธ์ของอะซีเตต โดยโพลีคีไทด์สายแรก อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น Dihydromonacolin L Monacolin L และ Monacolin J ตามลำดับ ส่วนโพลีคีไทด์สายที่ 2 อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์แล้วเชื่อมต่อกับโพลีคีไทด์สายแรกในรูป Monacolin J โดยพันธะเอสเทอร์แล้วได้สารโลวาสแตตินในรูปกรด (Acid form) ดังแสดงในรูปที่ 2.7 สารประกอบนี้สร้างโดย *A. terreus* (Hendrickson และคณะ, 1999)



รูปที่ 2.7 กระบวนการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน หรือโลวาสแตติน
ที่มา : Crasto (2016)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 การใช้ประโยชน์ของสารโมนาโคลิน เค

สารโมนาโคลิน เค สามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase อย่างจำเพาะ โดยเอนไซม์ HMG-CoA reductase จะใช้เป็นตัวกลางในการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงเป็นเมวาโลเนต (Mevalonate) และสังเคราะห์เป็นคอเลสเตอรอลต่อไป (Alberts, 1998) สารโลวาสแตตินจะขัดขวางการสร้างคอเลสเตอรอลโดยการไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase จึงทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอล สารโมนาโคลินไม่แสดงฤทธิ์ทางยาในรูปโครงสร้างปกติแต่เมื่อโครงสร้างถูกย่อยสลาย (Hydrolysis) เป็น β-hydroxy acid จะทำให้สารออกฤทธิ์ในร่างกายได้

อุทัยวรรณ และเกตุการ (2557) สารโมนาโคลิน เค มีผลต่อปริมาณคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein cholesterol; LDL-C) เป็นคอเลสเตอรอลที่ไม่ดี (bad Cholesterol) ทำให้เลือดตกตะกอนเป็นลิ่มแล้วเกาะผนังเส้นเลือดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผนังเส้นเลือดภายในหนาขึ้น การไหลเวียนของเลือดไม่สะดวกก่อให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือด ส่วน HDL-C เป็นคอเลสเตอรอลที่ดี (good cholesterol) เนื่องจากนำคอเลสเตอรอลที่ไม่จำเป็นต่อร่างกายกลับไปสู่ตับแล้วขับถ่ายออก กระบวนการนี้เรียกว่า Reverse Transportation of cholesterol ถ้าในร่างกายมีระดับ HDL-C ต่ำกว่า 35 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะมีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคเส้นเลือดในสมองและหัวใจอุดตัน

Wong และคณะ (2000) ได้มีการทดลองให้หนูได้รับข้าวแดงเป็นระยะ 6 เดือนหลังจากนั้นจะวัดปริมาณไขมันในเลือด และตับ พบว่าความเข้มข้นของซีรัมไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอล VLDL-C (very low density lipoprotein cholesterol) และ LDL-C จะลงลดส่วน HDL-C จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากข้าวแดงจะมีสารกลุ่มโมนาโคลินซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล

Jeun และคณะ (2008) ได้ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลโดยใช้สารให้สีเหลืองที่ผลิตจากเชื้อรา *Monascus* ผลการทดลองพบว่าสารสีเหลืองสามารถยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลได้ 36 เปอร์เซ็นต์ สารสีเหลืองนี้สามารถใช้ประโยชน์ในการควบคุมหรือลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดของผู้ป่วยได้

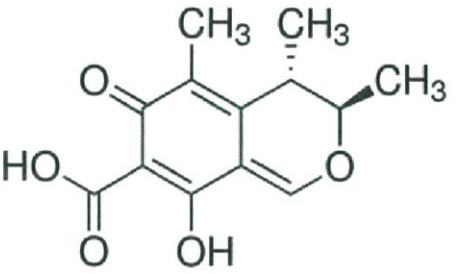
2.8 สารซิตรินิน (Citrinin)

ซิตรินินหรือแอนติไมซิน (antimycin) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{13}H_{14}O_5$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 250.25 กรัมต่อโมล มีชื่อตามระบบ IUPAC คือ (3R, 4S)-4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid มีโครงสร้าง และมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง เลมอน มีจุดหลอมเหลว 175 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้น้อยแต่ละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมอะซิเตต เมทานอล อะซิโตไนไตรท์ เอทานอล สารละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสลายตัวได้ด้วยแสง (photodecomposition) พีเอชของสารละลาย หรือจากความร้อนมีปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีโดยเมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอริกคลอไรด์ ไททาเนียมคลอไรด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สีเขียว และสีแดงเข้มตามลำดับ (Sabater-Vilar และคณะ, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิตรินินจัดเป็นสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxin) ส่วนใหญ่จะพบจาก *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในธัญพืช ผลไม้ และถั่ว พบครั้งแรกในปี ค.ศ.1931 จากการแยกสาร

จาก *Penicillium citrinum* เชื้อรา *Monascus* สร้างซิตรินินขึ้นในวิถีโพลิคีไทด์ (polyketide) ซึ่งเป็นวิถีเดียวกันกับการสร้างสารสี มีสูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.8

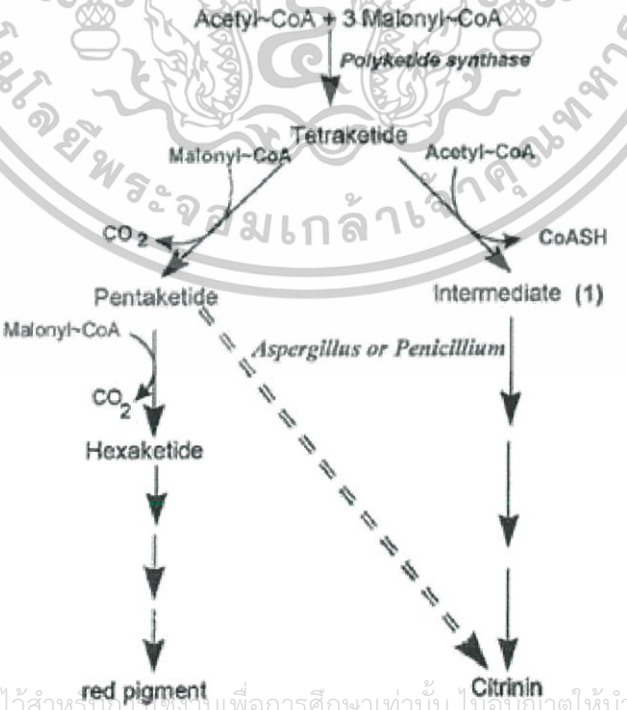


รูปที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของซิตรินิน
ที่มา : Wu และคณะ (2012)

2.8.1 กลไกการสังเคราะห์สารซิตรินิน

Hajjaj และคณะ (1999) ศึกษากลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพของซิตรินินจาก *M. ruber* ATCC 96218 โดยวัดจาก 13C nuclear magnetic resonance พบว่าการสังเคราะห์ซิตรินินเกิดจาก tetraketide แทนที่จะสังเคราะห์จาก pentaketide เหมือนกับเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่สร้างซิตรินินเช่นเดียวกับกลไกการสังเคราะห์ซิตรินินจากเชื้อรา *Monascus* sp.

กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินต้องใช้วิถีการสังเคราะห์ Polyketide โดยมีสารตั้งต้นคือ Tetraketide เกิดจากการปฏิกิริยารวมตัว (Condensation) ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 3 โมเลกุล ผ่าน Polyketide pathway (Hajjaj และคณะ, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.9 การสังเคราะห์ซิตรินิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา : Hajjaj และคณะ (1999)

2.8.2 การออกฤทธิ์ของสารซิตรินิน

ซิตรินินเป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อตับ และไต (hepato-nephrotoxin) (Sabater-Vilar และคณะ, 1999) โดยไปยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของตับ และไต ส่งผลให้โครงสร้างการทำงานผิดปกติ นอกจากนี้ยังมีสมบัติทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้ (Shi และ Pan, 2011)

Sabater-Vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าซิตรินินมีผลต่อการทำงานของไต และโครงสร้างระดับจุลภาค ซิตรินินจะไปสะสมในไมโตคอนเดรีย และรบกวนระบบการแลกเปลี่ยนอิเล็คตรอนในเซลล์แต่ไม่มีผลต่อผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การเรียงลำดับของโปรตีน และอาร์เอ็นเอ เมื่อการทำงานของไมโตคอนเดรียผิดปกติทำให้ระดับของไกลโคเจนในตับลดลง และยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอรอลในตับ จากการศึกษาคุณสมบัติของซิตรินินพบว่าซิตรินินสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่มีผลกระทบต่อไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วย

มีการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของซิตรินินเมื่อทดสอบกับสัตว์ทดลองได้ค่า LD_{50} เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (สำหรับหนูทดลอง) และ 9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (สำหรับกระต่าย) ซิตรินินทำให้ไตถูกทำลาย และมีฤทธิ์อย่างอ่อนกับตับเพราะความสามารถในการกรองไขมันลดลง ผลกระทบอื่นคือทำให้เกิดการขยายตัวของเส้นเลือดก่อให้เกิดการไหลเวียนโลหิตผิดปกติ และทำให้หลอดลมหดตัว

Wong และ Koehler (1981) แสดงให้เห็นว่าสารสีที่ได้จากการสกัดมาจากเชื้อ *Monascus* มีการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ ต่อมาได้แยกสารประกอบ 2 ตัวจาก *M. purpureus* ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* คือสารสีเหลือง (Monascidin A) และสารสีเหลืองเรืองแสง

2.8.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus* sp.

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus* ได้แก่ ปัจจัยด้านสารอาหาร เช่น แหล่งไนโตรเจน กรดไขมัน และ methylketone ปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณออกซิเจน สามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

2.8.3.1 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่สามารถช่วยในการลดการผลิตซิตรินินได้ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการลดซิตรินินของ *Monascus* ได้แก่ เมไทโอนีน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต

Blance และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจน (ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และเมไทโอนีน) ต่อการผลิตซิตรินินของ *M. ruber* ATCC 96218 โดยเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวด้วยแหล่งคาร์บอนเป็นเอทานอล ปรับพีเอชเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 6.5 ผลการทดลองพบว่า ราสามารถผลิตซิตรินินได้ 100-120 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรต และโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามเมื่อใช้เมไทโอนีนเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นของซิตรินินลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ทั้งนี้การใช้เมไทโอนีน และยูเรียจะมีผลต่อการลดลงทั้งการสังเคราะห์สารสีและซิตรินินของ *Monascus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wang และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตซิตรินิน โมนาโคลิน เค และ λ-aminobutyric acid (GABA) ของ *M. purpureus* NTU 601 ด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งโดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต เมไทโอนีน และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า เมไทโอนีน และยูเรีย สามารถยับยั้งการผลิตซิตรินิน และโมนาโคลิน เค โดยซิตรินินลดลงจาก 813 ppb เหลือเพียง 55-81 ppb เมื่อใช้เมไทโอนีนที่ความเข้มข้น 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ และยูเรียเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นโมโนโซเดียมกลูตาเมต และแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการผลิตซิตรินินจาก 813 ppb เป็น 90-98 ซึ่งแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เมไทโอนีน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต สามารถยับยั้งการผลิตซิตรินินได้ ตามลำดับ

2.8.3.2 กรดไขมัน และmethyl ketone

กรดไขมันเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการยับยั้งการผลิตซิตรินิน กรดไขมันสายยาวปานกลาง (Medium-chain fatty acids) สามารถลดการสร้างซิตรินิน เช่น Octanoic acid, Decanoic acid และ Dodecanoic acid อีกทั้งกรดไขมัน Octanoic acid สามารถเพิ่มการผลิตสารสีแดงของ *Monascus* ได้ ซึ่งแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

Hajjaj และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของกรดไขมันต่อการผลิตซิตรินินของรา *M. ruber* ATCC 96218 โดยเติมกรดไขมัน ได้แก่ Hexanoic acid, Octanoic acid, Decanoic acid, Dodecanoic acid, Myristic acid, Stearic acid และ Oleic acid เข้มข้น 1 mM ในอาหารเหลวพบว่า Octanoic acid เป็นกรดไขมันเพียงตัวเดียวที่ส่งเสริมการผลิตสารสีแดงได้ เนื่องจาก Octanoic acid เป็นกรดไขมันตั้งต้นของการสังเคราะห์สารสี นอกจากนี้ Medium-chain fatty acids ได้แก่ Octanoic acid, Decanoic acid และ Dodecanoic acid สามารถยับยั้งการผลิตซิตรินินโดยเฉพาะ Dodecanoic acid ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุด ส่วน Hexanoic acid, Myristic acid, Stearic acid และ Oleic acid ไม่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการผลิตซิตรินิน เนื่องจาก Medium-chain fatty acids (C8-C12) จะถูกดูดซึมโดยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Peroxisomal เปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA หรือกรดไขมันสายยาวปานกลาง ได้แก่ Octanoic acid, Decanoic acid และ Dodecanoic acid ถูกเมทาบอไลต์ด้วยกระบวนการ β-decarboxylation เปลี่ยนเป็น Methylketones ได้แก่ Heptanone, 2-nonanone และ 2-undecanone ตามลำดับ จากนั้น Methylketones จะเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA ด้วยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Peroxisomal

ทั้งนี้กรดไขมันสายยาวปานกลาง (Methylketones) ที่เป็นสาเหตุของการยับยั้งการผลิตซิตรินิน เนื่องจากซิตรินินหรือสารตัวกลางในการสร้างซิตรินินจะถูกทำลายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ Peroxisome หรือ Peroxisomal enzyme (Peroxidase) จากการเหนี่ยวนำของกรดไขมัน และ Methylketones อย่างไรก็ตามกรดไขมันสายยาว (C14-C18) หรือกรดไขมันสายสั้น (C6) จะไม่เปลี่ยนเป็น Methylketones เนื่องจากกรดไขมันดังกล่าวจะถูกดูดซึมโดยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Mitochondrial จึงเป็นผลให้กรดไขมันทั้งกรดไขมันสายยาว (C14-C18) และ กรดไขมันสายสั้น (C6) ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการผลิตซิตรินินของ *Monascus* sp.

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของ *Monascus* เช่น ซิตรินิน โมนาโคลิน เค และ λ-aminobutyric acid (GABA) โดยรา *Monascus* จะผลิตซิตรินินลดลงเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30-34 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตซิตรินินได้สูงขึ้นเมื่อเจริญที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 26 องศาเซลเซียส (Wang และคณะ, 2003)

2.8.3.4 Water activity

Water activity และความชื้นมีอิทธิพลต่อการเจริญ และการผลิตซิตรินินของรา ซึ่งจากงานวิจัยของ Comerio และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของ Water activity (0.800 0.810 0.825 และ 0.885) ต่อการเจริญ และการผลิตซิตรินินของ *Penicillium citrinum* ในข้าวสาลี พบว่าซิตรินินเพิ่มขึ้นเมื่อ Water activity สูงขึ้น โดยที่ Water activity เท่ากับ 0.885 รา *P. citrinum* จะผลิตซิตรินินได้สูงถึง 20,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม แต่ที่สภาวะ Water activity น้อยกว่า 0.810 เชื้อราสามารถเจริญโดยไม่ผลิตซิตรินิน อย่างไรก็ตาม Water activity และความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการลดการผลิตซิตรินินของ *Monascus* sp. ยังไม่มีการแนะนำในเบื้องต้น

2.8.3.5 ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการสังเคราะห์สารสี และซิตรินิน โดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายของปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation และเป็นสารตั้งต้นของ Monooxygenases ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเมทาบอไลต์ของเชื้อราโดยเฉพาะสารทุติยภูมิ (Hajjaj และคณะ, 1999)

Hajjaj และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของการให้ออกซิเจนต่อการสังเคราะห์สารสีแดง และซิตรินินของ *M. ruber* ATCC 96218 ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว โดยแปรผันตามสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนสัมพัทธ์ (rOTC) ที่ระดับ 0.33 1.00 1.48 2.22 3.16 และ 7.07 ผลการทดลองพบว่า การผลิตซิตรินินแปรผันตามการส่งผ่านการถ่ายเทออกซิเจนเมื่อสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนสัมพันธ์มีค่าสูงขึ้น ซึ่งสภาวะดังกล่าวยังพบอัตราการผลิตซิตรินินมีค่ามากกว่าอัตราการผลิตสารสีแดง ในทางตรงกันข้ามเมื่อสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนสัมพัทธ์มีระดับลดลง พบว่าอัตราการผลิตสารสีแดงมีอัตราการผลิตมากกว่าซิตรินิน

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Palo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญ และการสร้างสารสีของ *Monas1995cus purpureus* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงคือความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชอยู่ระหว่าง 3.0-7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

Blance และคณะ (1995) พบว่าสายพันธุ์ของ *Monascus* sp. มีผลต่อการผลิตซิตรินิน โดย *M. ruber* (Wild type) จะสามารถผลิตซิตรินินได้มากกว่า *M. purpureus* (Wild type) เมื่อใช้ข้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

Blance และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตสารสี และสารซิตรินินของเชื้อรา *Monascus* ในอาหารเหลว และอาหารแข็ง โดยพบว่าในข้าวพบการสร้างสารซิตรินินน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่ง *M. purpureus* และ *M. rubber* ผลิตซิตรินินในอาหารเหลวได้ 240 และ 370 mg/l ตามลำดับ ในขณะที่ในข้าวผลิตซิตรินินได้ 100 และ 300 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บุษบา (2518) ได้ทำการทดลองการสร้างสีของ *M. purpureus* โดยใช้สภาวะต่อการผลิตข้าวแดงของ Palo และคณะ (1960) มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ของไทย พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวหอมมะลิให้สีใกล้เคียงกัน แต่ข้าวเหนียวกลับให้กลิ่นหอมมากกว่าข้าวหอมมะลิ ทั้งนี้ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวเจ้าพันธุ์หอมมะลิให้ผลความเข้มของสีใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ญี่ปุ่น ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ ของไทยคือ พันธุ์เสาไห้ พันธุ์ธรรมดา เป็นต้น นั้นล้วนแต่สังเคราะห์สีและหอมน้อยกว่ามาก

จุลยุทธ และศศิธร (2547) ได้ศึกษาถึงคุณภาพข้าวแดง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* 4 สายพันธุ์ ในข้าว 3 ชนิด พบว่า ทั้งสายพันธุ์เชื้อรา และ ชนิดข้าว มีผลต่อคุณภาพของข้าวแดงที่ได้หลังการหมัก โดยลำดับ เชื้อรา *M. purpureus* ที่สร้างซิตรินินในปริมาณสูงไปต่ำคือ *M. purpureus* FTCMU, *M. purpureus* ATCC 16365, *M. purpureus* DMKU และ *M. purpureus* BCC 6131 ตามลำดับ ในขณะที่ลำดับชนิดข้าวที่สร้างซิตรินินในปริมาณสูงไปต่ำ คือ ข้าวซ้อมมือ ข้าวเจ้าพิจิตร และข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ โดยข้าวแดงที่ได้จากการหมักเชื้อรา *M. purpureus* FTCMU ในข้าวซ้อมมือ มีปริมาณซิตรินินสูงที่สุดเท่ากับ 4400 ppm และข้าวแดงที่ได้จากการหมักเชื้อรา *M. purpureus* BCC 6131 ในข้าวหอมมะลิ มีปริมาณซิตรินินต่ำที่สุดเท่ากับ 105 ppm ในขณะที่ลำดับสายพันธ์เชื้อรา *Monascus* sp. ที่ให้ค่าสีแดงของข้าวแดงจากสูงไปต่ำ คือ *M. purpureus* ATCC 16365 *M. purpureus* DMKU *M. purpureus* FTCMU และ *M. purpureus* BCC 6131 ตามลำดับ โดยข้าวแดงที่ได้จากการหมักเชื้อรา *Monascus* ATCC 16365 ในข้าวหอมมะลิให้ค่าสีแดงสูงที่สุดเท่ากับ 632.00 หน่วยต่อกรัม และข้าวแดงที่ได้จากการหมักเชื้อรา *M. purpureus* BCC 6131 ในข้าวหอมมะลิให้ค่าสีแดงต่ำที่สุดเท่ากับ 11.80 หน่วยต่อกรัม และพบว่าเชื้อรา *M. purpureus* BCC 6131 และ *M. purpureus* FTCMU มีการสร้างสีแดงที่ไม่ดี เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนข้าวหอมมะลิ และข้าวหอมมะลิซ้อมมือ และจากผลการทดลองพบว่าเนื่องจาก เชื้อรา *M. purpureus* BCC 6131 ให้ปริมาณซิตรินินต่ำที่สุดจึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาสายพันธุ์เพื่อทำการลดปริมาณซิตรินินต่อไป

Mohd และคณะ (2012) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตสารสีแดงจาก *M. purpureus* โดยใช้ใบพัดแบบเกลียว (Helical ribbon impeller : HRI) ในถังหมักแบบกวน (Stirred tank Fermenter) สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารสีแดงในถังหมักแบบกวนขนาด 2 ลิตร โดยเปรียบเทียบกับการใช้ใบพัดแบบ 6 ใบพัด (six-bladed Rushton turbines : RT) ซึ่งใช้ความเร็วในการกวนที่ความเร็ว 250 rpm และอัตราการไหลของอากาศที่ 2.25 ลิตรต่อนาที (1.5 vvm) พบว่าการใช้ใบพัดแบบเกลียวมีความเข้มของสารสีสุดท้ายอยู่ที่ 24.36 หน่วย ผลผลิตที่ได้ (yield) เท่ากับ 0.47 หน่วยต่อกรัมกลูโคส และการผลิตต่อช่วงเวลา (productivity) ได้เท่ากับ 0.20 หน่วยต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งค่าเหล่านี้สูงกว่าการใช้ใบพัดแบบ 6 ใบพัด ประมาณ 76, 78 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการใช้พลังงานของใบพัดแบบเกลียวมีประสิทธิภาพดีต่อการเพาะเลี้ยง *M. purpureus* เนื่องจากได้ผลผลิตของสารสีต่อพลังงานที่ใช้สูงกว่าการใช้ใบพัดแบบ 6 ใบพัดถึง 2.5 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Monascus* sp. SS14

3.1.2 *Monascus* sp. U6V1 เชื้อรากลายพันธุ์จาก *Monascus* sp. SS14 (wild type)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 MYS (Malt yeast extract agar) (ภาคผนวก ก)

3.2.2 SS (Soybean flour starch agar) (ภาคผนวก ก)

3.2.3 วัสดุหมัก ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ตราข้าวเบญจรงค์ (บริษัท เอเชีย อินเตอร์ ไรซ์ จำกัด อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ) และ ข้าวเสาไห้ ตรารุ้งทิพย์ (บริษัท เอเชีย อินเตอร์ ไรซ์ จำกัด อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ)

3.2.4 Gelatinized Starch Peptone (ภาคผนวก ก)

3.2.5 Gelatinized Starch Soybean flour (ภาคผนวก ก)

3.2.6 Raw Starch Peptone (ภาคผนวก ก)

3.2.7 Raw Starch Soybean flour (ภาคผนวก ก)

3.2.8 Glucose Peptone (ภาคผนวก ก)

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (C20994007894 LP, LC-10ADvp, Shimadzu)

3.3.2 คอลัมน์ μBondapakTM C18 3.9 x 300 มิลลิเมตร (Phenomenex, USA)

3.3.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (UV-1800, shimadzu)

3.3.4 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) (sevencompact pH/Ion S220, Mettler Toledo)

3.3.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany)

3.3.6 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate leader) (FLUOstar Omega, BMG LABTECH)

3.3.7 เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave)

3.3.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (HA-300HIV)

3.3.9 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

3.3.10 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.3.11 ตู้บ่ม (incubator)

3.3.12 เครื่องแก้ว

3.3.13 ถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) (FS-01, FS-V-C Series, Winpact)

3.3.14 ถังหมักแบบถังกวน (stirred tank fermenter) (FS-01, FS-V-B Series, Winpact)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Inoculum preparation)

นำเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์ U6V1 และ *Monascus* sp. SS14 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MYS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นจึงใช้ cork borer ขนาด 4.0 มิลลิเมตร มาเจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา จำนวน 4 ก้อน นำมาใส่ในอาหารเหลว SS medium ปลอดเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น สำหรับการทดลองต่อไป

3.4.2 ศึกษาการเจริญและระยะเวลาในการสร้างสารทุติยภูมิของเชื้อรา *Monascus*

3.4.2.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อการผลิตสารสีและสร้างสารซิตรินินบนอาหารแข็งธัญพืช (Solid state fermentation)

ชั่งข้าว 50 กรัม ลงในขวดเตรียมอาหาร จากนั้นปิดปากขวดด้วยจุกสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตรที่แตกต่างกันคือ 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณน้ำและข้าวก่อนนำไปวางบนเครื่องหมุนเลี้ยงเชื้อ

สายพันธุ์ข้าว	ปริมาณข้าว (กรัม)	ปริมาณน้ำ (มิลลิลิตร)
ข้าวหอมมะลิ	50	5
	50	10
	50	15
	50	20
	50	25
ข้าวเสาไห้	50	5
	50	10
	50	15
	50	20
	50	25

จากนั้นนำไปวางบนเครื่องหมุนเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้ข้าวดูดซึมน้ำแล้วจึงใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องหมุน (สลับนิ่งในอัตรา 15 : 45 นาที) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น น้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และซิตรินิน ดัดแปลงจากวิธีการทำข้าวแดงของบุษบา (2542)

3.4.2.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อการผลิตสารสี และสร้างซิตรินินในอาหารเหลว (Submerged fermentation)

ก. เลี้ยงเชื้อราในฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

เป็นการศึกษาการเจริญ การสร้างสารสี และสารซิตรินินเพื่อเลือกอาหารที่เหมาะสมที่สุดไปศึกษาต่อในถังหมัก (fermenter) โดยทำการใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ Gelatinized Starch Peptone, Gelatinized Starch Soybean flour, Raw Starch Peptone, Raw Starch Soybean flour และ Glucose Peptone (ภาคผนวก ก) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในวันที่ 7 และ 10 มาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และซิตรินิน

ข. เลี้ยงเชื้อราในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter)

ใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลวแตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ Gelatinized Starch Peptone และ Glucose Peptone (ภาคผนวก ก) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และอัตราการไหลของอากาศเท่ากับ 1 vvm เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และซิตรินิน

ค. ถังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermenter) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Krairak และคณะ, 2000

ใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลว Gelatinized Starch Peptone (ภาคผนวก ก) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยจะทำการควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และความเร็วรอบในการหมุนของใบพัด 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และซิตรินิน

3.4.3 การวิเคราะห์ผล

3.4.3.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* บนอาหารแข็งธัญพืช (Solid state fermentation)

ก. การหาปริมาณความชื้นของตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 3-4 กรัม ใส่จานเพาะเลี้ยงเชื้อที่อบแห้ง และทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอนของตัวอย่าง และคำนวณหาปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ของวัตถุดิบ

ข. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และวัดค่าพีเอช

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 2 กรัม นำมาผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมบนเครื่องผสมสารแนวนอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Somogyi –Nelson (1954) ดังแสดงในภาคผนวก ข

ค. การวิเคราะห์สารสี

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 2 กรัม ผสมกับสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องผสมสารแนวนอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดปริมาณของสารสีด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ดังแสดงในภาคผนวก ข

ง. การวิเคราะห์สารซิตรินิน

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 2 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชด้วยกรดออโธฟอสฟอริค (ortho-phosphoric acid) 85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 2.5 นำไปเข้าเครื่องผสมสารแนวนอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดังแสดงในภาคผนวก ข.

3.4.3.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ในอาหารเหลว (Submerged fermentation)

ก. การหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่อบแห้ง และทราบน้ำหนักแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนที่ตกตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้งที่แน่นอนของตัวอย่าง

ข. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และวัดค่าพีเอช

เก็บตัวอย่างประมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Somogyi – Nelson (1954) ดังแสดงในภาคผนวก ข

ค. การวิเคราะห์สารสี

เก็บตัวอย่างประมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดปริมาณของสารสี ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ดังแสดงในภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง. การวิเคราะห์สารซิตรินิน

เก็บตัวอย่างประมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ปรับพีเอชด้วยกรดออโธฟอสฟอริค (ortho-phosphoric acid) 85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 2.5 ในอัตราส่วน 1:1 นำไปเข้าเครื่องผสมสารแนวนอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดังแสดงในภาคผนวก ข.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อผลิตสารสี และซิตรินินบนอาหารแข็งธัญพืช (Solid state fermentation)

การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และ *Monascus* sp. U6V1 บนอาหารแข็งธัญพืช โดยใช้ข้าวเสาไห้ และข้าวหอมมะลิเป็นวัสดุหมัก ซึ่งบรรจุข้าว 50 กรัม ในขวดเตรียมอาหาร จากนั้นปิดปากขวดด้วยจุกสำลี แล้วนำไปทำให้ข้าวปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตรที่แตกต่างกันคือ 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มบนเครื่องหมุนต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว แล้วจึงใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว นำไปบ่มบนเครื่องหมุน (สลับนิ่งในอัตรา 15 : 45 นาที) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น น้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และซิตริน

ผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในสภาวะหมุนสลับนิ่งบนวัสดุหมักข้าวเสาไห้ที่บรรจุในขวดเตรียมอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นค่อย ๆ เพิ่มขึ้นทั้ง 5 สภาวะการเติมน้ำ โดยที่การเติมน้ำเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร มีปริมาณความชื้นสูงสุดในวันที่ 7 (14.77 เปอร์เซ็นต์) และมีความชื้นลดลงจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ สำหรับการเติมน้ำเริ่มต้น 10 15 และ 20 มิลลิลิตร มีปริมาณความชื้นที่ใกล้เคียงกันโดยมีปริมาณความชื้นค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นและมากที่สุดในวันที่ 35 (80.17 78.94 และ 83.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนการเติมน้ำเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร มีความชื้นสูงสุดวันที่ 28 (45.89 เปอร์เซ็นต์) และมีความชื้นลดลงจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ สำหรับการผลิตสารสีพบว่าการเติมน้ำเริ่มต้น 5 10 15 20 และ 25 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดอยู่ที่ 0.66 949.33 59.61 297.62 และ 4.13 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ตามลำดับ และไม่สามารถตรวจพบซิตรินินได้ที่การเติมน้ำเริ่มต้น 5 15 20 และ 25 มิลลิลิตร แต่พบปริมาณซิตรินินสูงสุด 0.0039 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่การเติมน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่ามีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยที่การเติมน้ำเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 35 (0.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่การเติมน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 14 (12.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ที่การเติมน้ำเริ่มต้น 15 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 21 (3.4 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และที่การเติมน้ำเริ่มต้น 20 และ 25 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 28 (3.75 และ 24.33 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ)

เมื่อใช้ข้าวหอมมะลิเป็นวัสดุหมักในการเลี้ยงด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง ด้วยขวดเตรียมอาหารโดยเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 35 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 พบว่าที่การเติมน้ำเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร มีปริมาณความชื้นสูงสุดในวันที่ 7 (14.36 เปอร์เซ็นต์) และมีความชื้นลดลงจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ที่การเติมน้ำเริ่มต้น 10 15 และ 25 มิลลิลิตร ปริมาณความชื้นค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นจนมีความชื้นสูงสุดในวันที่ 35 (77.07 61.71 และ 49.59 เปอร์แซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนการเติมน้ำเริ่มต้น 20 มิลลิลิตร มีปริมาณความชื้นสูงสุดในวันที่ 28 (55.10 เปอร์เซ็นต์) สำหรับการผลิตสารสีพบว่ามีปริมาณสารสีสูงสุด 0.41 398.46 22.34 15.10 และ 3.75 ในการเติมน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ลบรอยน้ำและข้อความนี้ออก ผู้ละเมิดจะต้องรับโทษตามที่กฎหมายกำหนด

เริ่มต้น 5 10 15 20 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่สามารถตรวจพบซิตรินินได้ในทุกสภาวะ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าการเติมน้ำเริ่มต้น 5 และ 25 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 28 (0.2 และ 5.24 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) สำหรับการเติมน้ำเริ่มต้น 10 และ 15 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 7 (9.8 และ 7.52 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) และการเติมน้ำเริ่มต้น 20 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 21 (10.58 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

ผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในสภาวะหมุนสลับนิ่งบนวัสดุหมักข้าวเสาไห้ที่บรรจุในขวดเตรียมอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3 พบว่าที่การเติมน้ำเริ่มต้น 5 และ 25 มิลลิลิตร มีปริมาณความชื้นสูงสุดในวันที่ 14 (14.61 และ 49.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีความชื้นลดลงจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ สำหรับการเติมน้ำเริ่มต้น 10 และ 20 มิลลิลิตร ปริมาณความชื้นค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นจนมีความชื้นสูงสุดในวันที่ 35 (84.49 และ 52.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ในขณะที่การเติมน้ำเริ่มต้น 15 มิลลิลิตร มีปริมาณความชื้นสูงสุดในวันที่ 28 (81.91 เปอร์เซ็นต์) สำหรับการผลิตสารสีพบว่าการเติมน้ำเริ่มต้น 5 10 15 20 และ 25 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดอยู่ที่ 0.40 109.71 64.77 5.03 และ 5.69 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ตามลำดับ และไม่สามารถตรวจพบซิตรินินได้ในทุกสภาวะ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าการเติมน้ำเริ่มต้น 5 และ 25 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 21 (0.25 และ 4.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) ในขณะที่การเติมน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 35 (3.98 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และการเติมน้ำเริ่มต้น 15 และ 20 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 14 (3.48 และ 5.96 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ)

ในขณะที่เมื่อใช้ข้าวหอมมะลิเป็นวัสดุหมักในการเลี้ยงด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ด้วยสภาวะหมุนสลับนิ่งในขวดเตรียมอาหารโดยเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 35 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4 พบว่าที่การเติมน้ำเริ่มต้น 5 และ 25 มิลลิลิตร มีปริมาณความชื้นสูงสุดในวันที่ 14 (19.97 และ 36.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และมีความชื้นลดลงจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ที่การเติมน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร ปริมาณความชื้นค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น และมีความชื้นสูงสุดในวันที่ 35 (78.31 เปอร์เซ็นต์) ส่วนการเติมน้ำเริ่มต้น 15 และ 20 มิลลิลิตร มีปริมาณความชื้นสูงสุดในวันที่ 28 (54.38 และ 34.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) สำหรับการผลิตสารสีพบว่า มีปริมาณสารสีสูงสุด 0.21 324.73 32.51 4.69 และ 3.35 ในการเติมน้ำเริ่มต้น 5 10 15 20 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่สามารถตรวจพบซิตรินินได้ในทุกสภาวะ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าการเติมน้ำเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 35 (0.34 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) สำหรับการเติมน้ำเริ่มต้น 10 และ 15 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุดในวันที่ 7 (8.36 และ 10.24 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) และการเติมน้ำเริ่มต้น 20 และ 25 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 21 (0.3 และ 0.26 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ)

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และ *Monascus* sp. U6V1 บนอาหารแข็งธัญพืชโดยใช้ข้าวเสาไห้ และข้าวหอมมะลิเป็นวัสดุหมัก พบว่าสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และความชื้นมีความสัมพันธ์กับการเจริญ การผลิตสารสี และปริมาณซิตรินินโดยพบว่า จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะหรือชอบที่จะเจริญที่ความชื้นเริ่มต้นต่างกัน ซึ่งหากมีปริมาณน้ำที่มากเกินไปอาจลดความพรุนของสารอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวัสดุหมัก และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเมล็ดข้าวเป็นสาเหตุให้สารตั้งต้นเกาะกันแน่นซึ่งเหนี่ยวนำให้การถ่ายเทออกซิเจนลดลง เมื่อใช้เชื้อราเลี้ยงบนข้าวหอมมะลิซึ่งมีโครงสร้างเป็นอะไมโลเพคตินสูงซึ่งง่ายต่อการย่อยสลาย ความชื้นอาจทำให้เอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

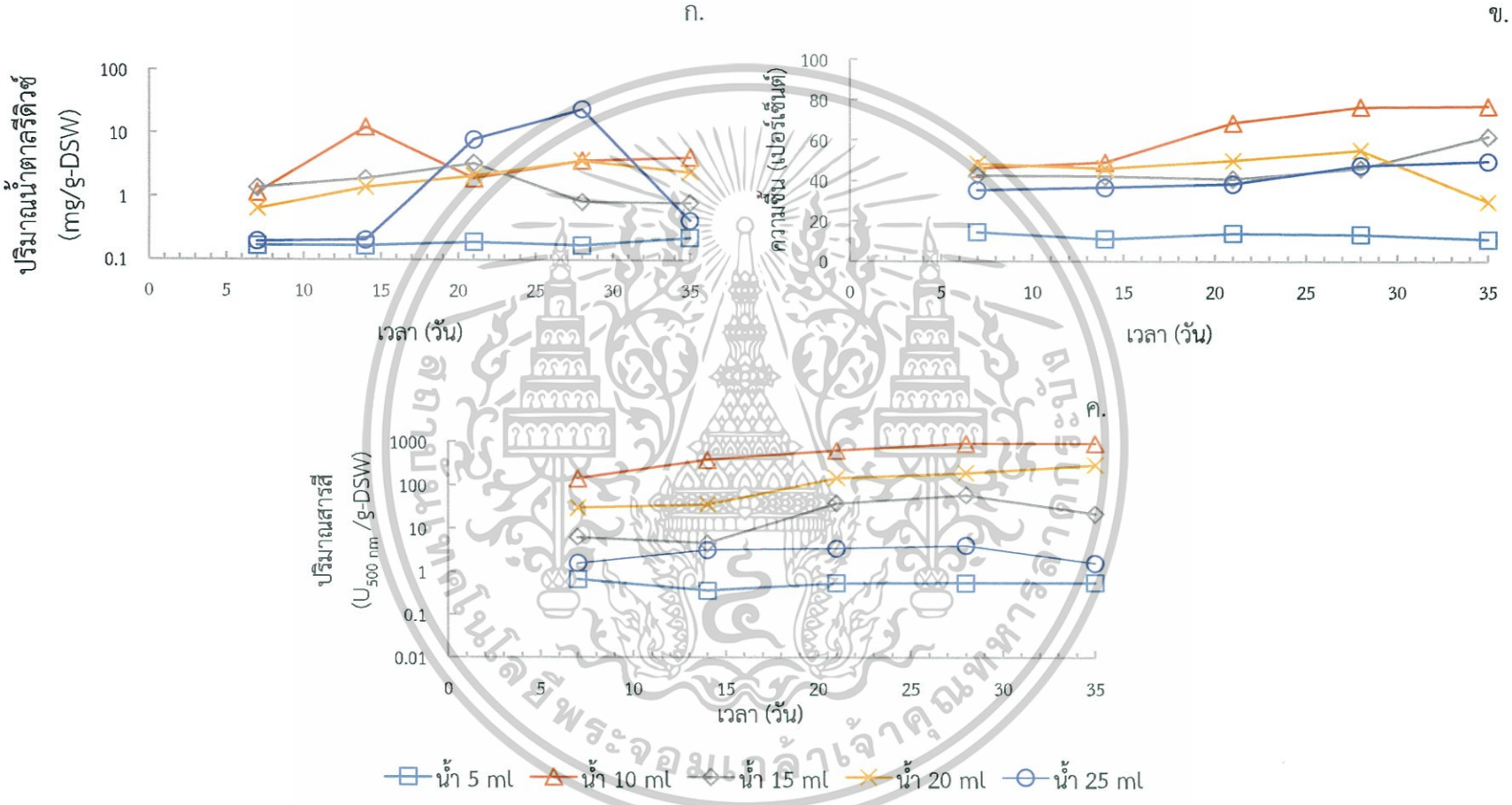
สามารถย่อยข้าวหอมมะลิได้ดีกว่าข้าวเสาไห้ที่มีโครงสร้างเป็นอะไมโลสสูงทำให้มีปริมาณน้ำตาลสูงกว่าข้าวเสาไห้ ซึ่งข้าวเสาไห้ย่อยสลายข้าวไปเป็นน้ำตาลน้อยกว่า ทำให้เกิด catabolite repression ต่อการผลิตสารทุติยภูมิน้อยกว่าเมื่อเทียบกับข้าวหอมมะลิ ทำให้ข้าวหอมมะลิมีโอกาสในการสะสมน้ำตาลมาก และนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลแทนการสร้างสารสี ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่สูงเกินไปจะยับยั้งการสังเคราะห์สารสีได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW) และปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนข้าวเสาไห้ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที ในขวดเตรียมอาหาร

วันที่เก็บตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)					ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)					ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW)					ปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW)				
	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25
7	14.77	47.88	45.32	50.65	31.13	0.16	1.14	1.36	0.65	1.92	0.66	140.85	6.29	29.64	1.56	ND	ND	ND	ND	ND
14	11.16	67.44	61.10	70.43	32.69	0.17	12.46	1.91	1.42	0.2	0.36	385.18	4.56	36.10	3.17	ND	ND	ND	ND	ND
21	14.33	78.32	76.42	78.03	34.29	0.19	1.94	3.4	2.15	7.99	0.55	637.22	38.50	149.14	3.48	ND	ND	ND	ND	ND
28	13.34	80.23	78.53	82.19	45.89	0.17	3.75	0.83	3.75	24.33	0.56	945.52	59.61	195.65	4.13	ND	ND	ND	ND	ND
35	11.71	80.17	78.94	83.21	32.44	0.22	4.25	0.81	2.48	0.42	0.56	949.33	21.94	297.62	1.60	ND	0.0039	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND = Not Detect

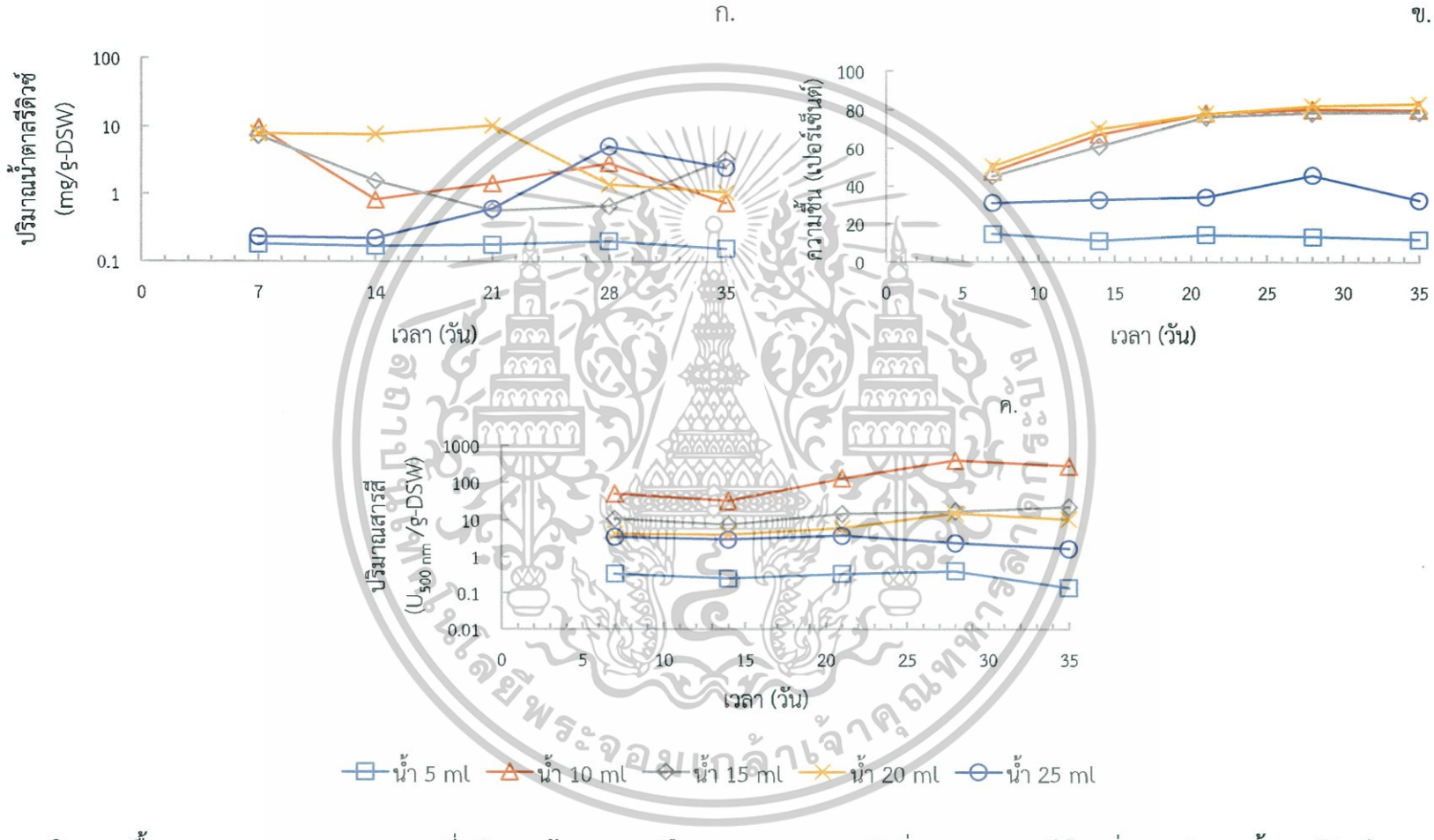


รูปที่ 4.1 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที โดยที่ (ก.) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-DSW) (ข.) ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) และ (ค.) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW)

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW) และปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนข้าวหอมมะลิ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที ในขวดเตรียมอาหาร

วันที่เก็บตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)					ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)					ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW)					ปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW)				
	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25
7	14.36	45.98	42.43	48.39	35.30	0.18	9.8	7.52	8.01	0.23	0.34	49.84	10.55	4.15	3.44	ND	ND	ND	ND	ND
14	10.90	49.04	42.15	46.13	36.66	0.17	0.83	1.59	7.86	0.22	0.25	31.48	7.45	3.93	2.93	ND	ND	ND	ND	ND
21	13.75	68.61	40.76	49.87	38.41	0.18	1.47	0.56	10.58	0.61	0.34	130.82	14.51	5.95	3.75	ND	ND	ND	ND	ND
28	13.18	76.58	45.98	55.10	47.57	0.2	2.96	0.66	1.40	5.24	0.41	398.46	17.07	15.10	2.37	ND	ND	ND	ND	ND
35	10.88	77.07	61.71	29.63	49.59	0.16	0.75	3.42	1.07	2.54	0.14	277.27	22.34	10.39	1.65	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND = Not Detect

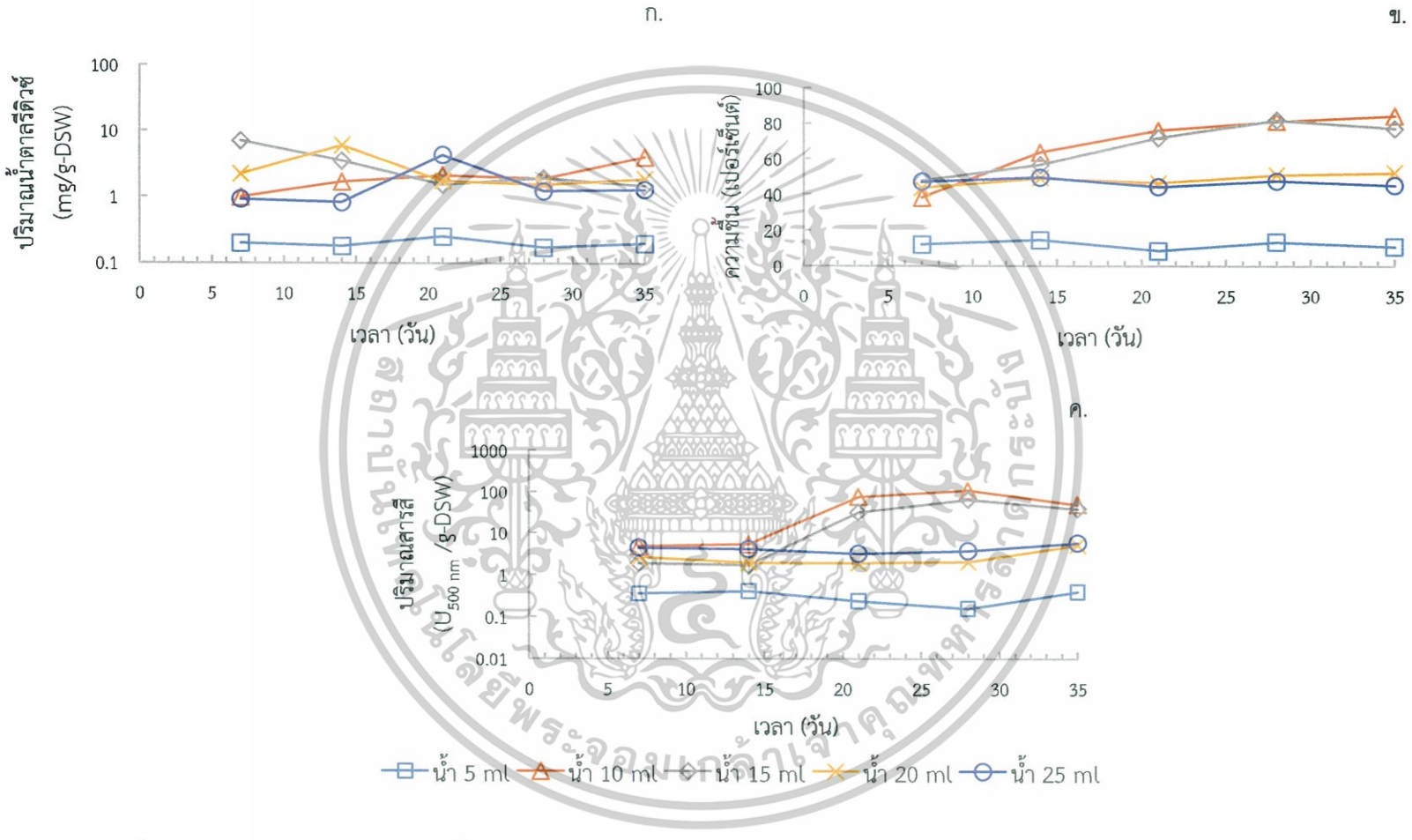


รูปที่ 4.2 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที โดยที่ (ก.) **ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์** (g/g-DSW) (ข.) **ปริมาณความชื้น** (เปอร์เซ็นต์) และ (ค.) **ปริมาณสารสี** ($U_{500\ nm}$/g-DSW)

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW) และปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวเสาไห้ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที ในขวดเตรียมอาหาร

วันที่เก็บตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)					ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)					ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW)					ปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW)				
	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25
7	11.97	38.04	47.82	43.48	47.18	0.2	0.98	6.97	2.2	0.91	0.35	4.65	1.86	2.61	4.34	ND	ND	ND	ND	ND
14	14.61	63.50	56.52	49.15	49.67	0.18	1.66	3.48	5.96	0.82	0.40	5.29	1.66	1.91	4.06	ND	ND	ND	ND	ND
21	8.46	76.08	71.93	46.30	44.31	0.25	2.1	1.52	1.72	4.29	0.23	75.70	31.74	1.88	3.15	ND	ND	ND	ND	ND
28	13.37	81.27	81.91	50.96	47.64	0.17	1.91	1.92	1.53	1.22	0.16	109.71	64.77	2.02	3.68	ND	ND	ND	ND	ND
35	10.85	84.49	77.23	52.25	45.31	0.2	3.98	1.46	1.86	1.28	0.39	49.67	38.63	5.03	5.69	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND = Not Detect

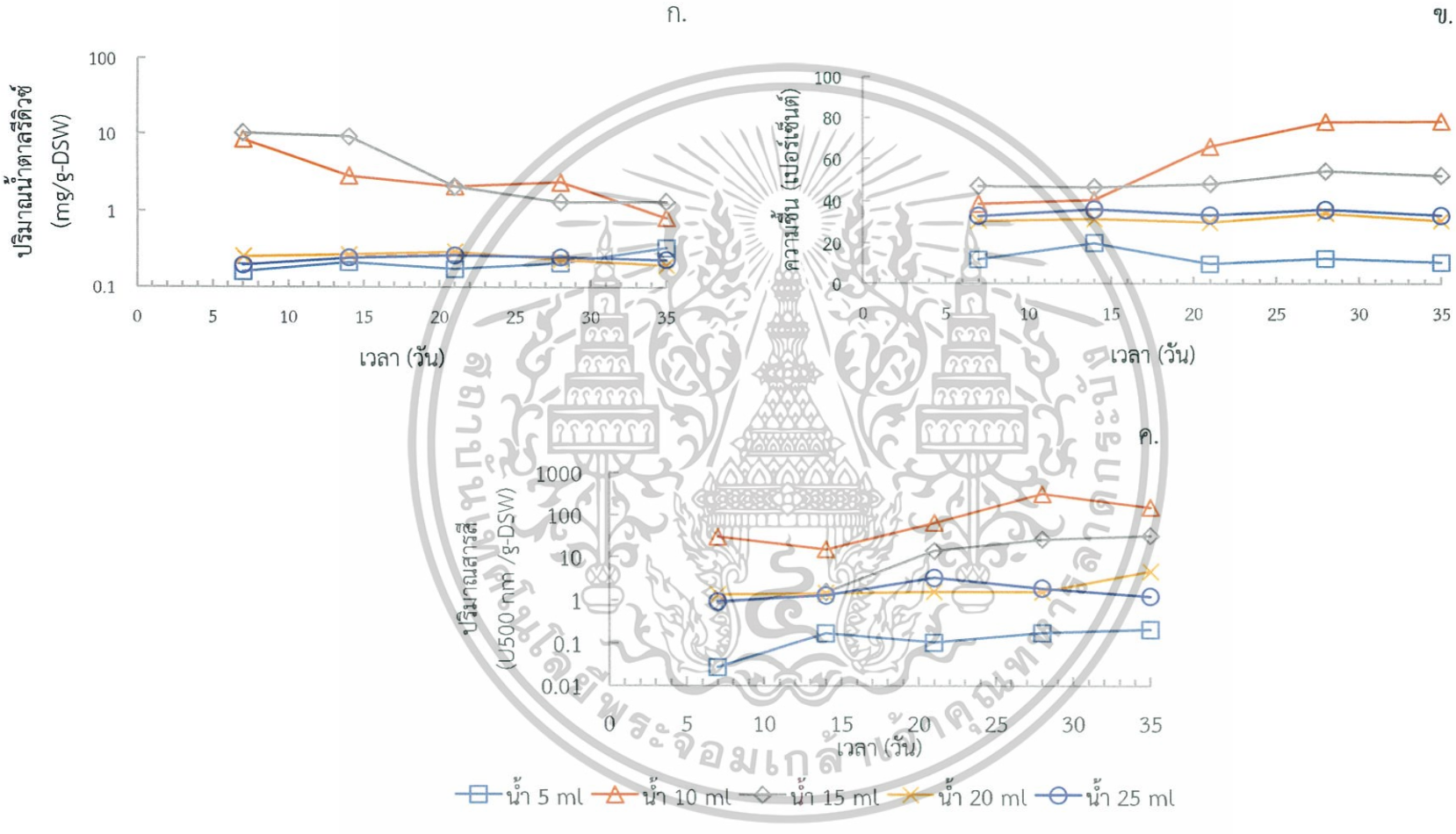


รูปที่ 4.3 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที โดยที่ (ก.) **ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์** (g/g-DSW) (ข.) **ปริมาณความชื้น** (เปอร์เซ็นต์) และ (ค.) **ปริมาณสารสี** ($U_{500\ nm}$/g-DSW)

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW) และปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวเสาไห้ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที ในขวดเตรียมอาหาร

วันที่เก็บตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)					ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)					ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW)					ปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW)				
	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25	5	10	15	20	25
7	11.93	38.69	47.12	30.55	33.03	0.16	8.36	10.24	0.25	0.2	0.03	29.90	0.84	1.35	0.93	ND	ND	ND	ND	ND
14	19.97	40.53	46.63	31.51	36.09	0.21	2.83	9.2	0.27	0.25	0.17	15.18	1.53	1.43	1.30	ND	ND	ND	ND	ND
21	9.80	65.94	48.19	29.87	33.44	0.17	2.08	2.07	0.3	0.26	0.11	65.89	14.06	1.59	3.35	ND	ND	ND	ND	ND
28	12.54	78.06	54.38	34.35	36.06	0.21	2.37	1.32	0.23	0.25	0.18	324.73	26.43	1.55	1.90	ND	ND	ND	ND	ND
35	10.56	78.31	52.25	30.85	33.34	0.34	0.83	1.34	0.2	0.23	0.21	154.97	32.51	4.69	1.23	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND = Not Detect



รูปที่ 4.4 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 15 : 45 นาที โดยที่ (ก.) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-DSW) (ข.) ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) และ (ค.) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/g-DSW)

4.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อผลิตสารสี และซิตรินินในอาหารเหลว (Submerged fermentation)

4.2.1 เลี้ยงเชื้อราในฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในอาหารเหลว โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ Gelatinized Starch Peptone, Gelatinized Starch Soybean flour, Raw Starch Peptone, Raw Starch Soybean flour และ Glucose Peptone ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในวันที่ 7 และ 10 มาวิเคราะห์หาค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และซิตรินิน ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อราในฟลาสก์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 5 ชนิด บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าในวันที่ 7 และ 10 อาหาร Gelatinized Starch Peptone สามารถวัดค่าพีเอชได้ 5.77 และ 6.25 ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดในวันที่ 10 วิเคราะห์ได้ 0.54 กรัมต่อลิตร และปริมาณสารสีมีค่าสูงสุด 39.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนอาหาร Gelatinized Starch Soybean flour วัดค่าพีเอชได้ 7.87 และ 8.6 ในวันที่ 7 และ 10 ตามลำดับ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 7 วิเคราะห์ได้ 3.47 กรัมต่อลิตร และมีค่าลดลงในวันที่ 10 ในขณะที่ปริมาณสารสีมีค่าสูงสุด 7.67 หน่วยต่อมิลลิลิตร สำหรับอาหาร Raw Starch Peptone ในวันที่ 7 วัดค่าพีเอชได้ 8.43 และมีค่าสูงขึ้นเป็น 8.68 ในวันที่ 10 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 7 เช่นเดียวกับปริมาณสารสี สามารถวิเคราะห์ได้ 0.40 กรัมต่อลิตร และ 1.80 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนอาหาร Raw Starch Soybean flour วัดค่าพีเอชในวันที่ 7 และ 10 ได้ 8.46 และ 8.62 ตามลำดับ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในที่ 7 วิเคราะห์ได้ 5.31 กรัมต่อลิตร ในขณะที่มีปริมาณสารสีสูงสุดเพียง 2.41 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสำหรับอาหาร Glucose Peptone วัดค่าพีเอชในวันที่ 7 และ 10 ได้ 5.82 และ 6.25 ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์วิเคราะห์ได้สูงสุด 1.86 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 และปริมาณสารสีวัดได้สูงสุด 44.64 หน่วยต่อมิลลิลิตร และพบว่าทั้ง 5 สภาวะของการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด ไม่สามารถตรวจหาซิตรินินได้

จากผลการทดลอง พบว่าอาหาร Gelatinized Starch Peptone และ Glucose Peptone เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 สามารถเจริญเติบโตได้ดี และผลิตสารสีได้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด โดยแตกต่างจากอาหารที่มี Raw Starch เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีการสร้างเส้นใยของเชื้อราน้อยส่งผลให้มีการสร้างสารทุติยภูมิได้น้อย ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อาหาร Gelatinized Starch Peptone และ Glucose Peptone มาทำการทดลองในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) และถังหมักแบบกวน (Stirred tank fermenter) เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต และผลิตสารทุติยภูมิให้มีปริมาณที่สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (g/L) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) และปริมาณซิตรินิน (µg/ml) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในสภาวะการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

อาหาร	วันที่เก็บตัวอย่าง	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)	ปริมาณสารสี (U_{500nm}/ml)	ปริมาณซิตรินิน (µg/ml)
Gelatinized Starch Peptone	7	5.77	0.32	39.48	ND
	10	6.25	0.29	18.60	ND
Gelatinized Starch Soybean flour	7	7.87	1.94	3.20	ND
	10	8.60	1.36	7.67	ND
Raw Starch Peptone	7	8.43	0.21	1.80	ND
	10	8.67	0.24	1.50	ND
Raw Starch Soybean flour	7	8.46	3.03	2.01	ND
	10	8.62	0.97	2.41	ND
Glucose Peptone	7	5.82	0.98	31.44	ND
	10	6.25	0.87	44.64	ND

หมายเหตุ ND = Not Detect

4.2.2 เลี้ยงเชื้อราในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) และถังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermenter)

เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต และผลิตสารทุติยภูมิให้มีปริมาณที่สูงขึ้น จึงทดลองใช้ภาชนะเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เป็นถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) และถังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone และ Glucose Peptone โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลวแตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ Gelatinized Starch Peptone และ Glucose Peptone ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยมีอุณหภูมิอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และอัตราการไหลของอากาศเท่ากับ 1 vvm สำหรับถังหมักแบบพ่นอากาศ และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ความเร็วรอบในการหมุนของใบพัด 300 รอบต่อนาที สำหรับถังหมักแบบถังกวน แล้วเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และซิตรินิน

ผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ด้วยอาหาร Glucose Peptone ในถังหมักแบบพ่นอากาศ แสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5 พบว่าค่าพีเอชที่วัดได้ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 108 ชั่วโมง จะอยู่ในช่วง 5.77-6.74 โดยค่าพีเอชค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป และในชั่วโมงที่ 108 วัดได้ 5.79 สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 0 วิเคราะห์ได้ 21.10 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มที่ลดลงจนมีปริมาณเหลือ 0.81 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 108 ส่วนปริมาณสารสีเชื้อราสามารถผลิตสารสีได้สูงสุดเท่ากับ 19.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 108 และตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อพบว่าไม่มีการตรวจพบซิตรินิน

เมื่อใช้อาหาร Gelatinized Starch Peptone เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในถังหมักแบบพ่นอากาศ แสดงในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.6 พบว่าตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.05-7.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงจากชั่วโมงที่ 0 ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ 15.47 กรัมต่อลิตร และเริ่มคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 เป็นต้นไป จนวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในชั่วโมงที่ 168 ได้ 1.10 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณสารสีมีค่าสูงสุดวัดได้ 2.98 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 144 และพบว่าไม่มีการตรวจพบซิตรินินตลอดระยะเวลาของเลี้ยงเชื้อ

ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในถังหมักแบบถังกวนด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.7 พบว่าตลอดระยะเวลา 168 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 5.37-8.47 โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในชั่วโมงที่ 0 และค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 เป็นต้นไป จนวิเคราะห์ที่ชั่วโมง 168 ได้ 0.35 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณสารสีมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 108 วัดได้ 5.36 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนซิตรินินไม่มีการตรวจพบตลอดระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลอง พบว่า การใช้อาหาร Glucose Peptone ให้ปริมาณสารสีสูงกว่าอาหาร Gelatinized Starch Peptone สำหรับการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบพ่นอากาศ ซึ่งอาจเกิดจากอาหาร Glucose Peptone มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทำให้เชื้อราสามารถนำไปใช้ได้ง่าย และรวดเร็ว แต่อาหาร Gelatinized Starch Peptone มีองค์ประกอบเป็นแป้ง แม้ว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

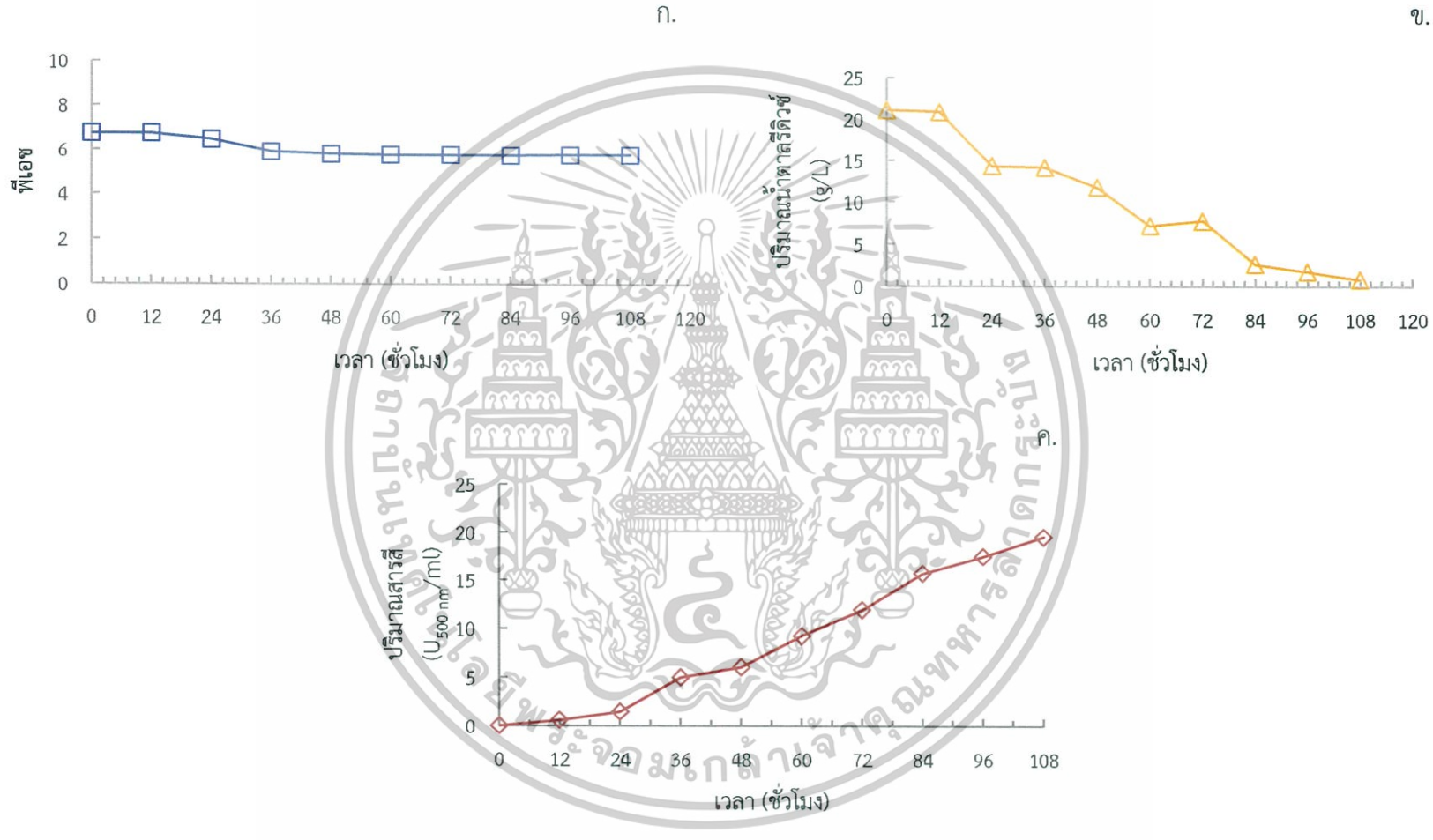
จะผ่านการเจลลาติไนซ์ (gelatinization) มาแล้ว เชื้อก็ยังคงต้องใช้เอนซ์ในการย่อยแป้งบางส่วนอยู่ และด้วยความหนืดของแป้งยิ่งทำให้ยากต่อการเจริญ สังเกตได้จากเส้นใยของเชื้อ และปริมาณสารสีที่เชื้อสร้างระหว่างการเจริญจะช้ากว่าการใช้อาหาร Glucose Peptone ส่วนการใช้ถังหมักแบบถังกวนให้ประสิทธิภาพในการสร้างสารสีของเชื้อราได้ดีกว่าถังหมักแบบพ่นอากาศเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อาหารชนิดเดียวกัน เนื่องจากอาหาร Gelatinized Starch Peptone ค่อนข้างหนืด และส่วนใหญ่จะตกลงสู่ก้นถัง อัตราการให้อากาศที่ 1 vvm อาจไม่เพียงพอต่อการที่จะช่วยพ่นอากาศแล้วทำให้อาหารกระจายไปทั่วถังได้ ทำให้เชื้อราเจริญ และสร้างสารสีได้ช้า แต่ถังหมักแบบถังกวนมีใบพัดที่ช่วยพัดกวนให้เชื้อและอาหารกระจายทั่วทั้งถัง อาจทำให้เชื้อสามารถใช้อาหารและเจริญได้ดีกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) และปริมาณซิตรินิน (µg/ml) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Glucose Peptone

ชั่วโมงที่เก็บตัวอย่าง	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)	ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml)	ปริมาณซิตรินิน (µg/ml)
0	6.74	21.10	0.00	ND
12	6.74	20.90	0.60	ND
24	6.47	14.33	1.44	ND
36	5.91	14.16	5.03	ND
48	5.81	11.74	6.08	ND
60	5.78	7.18	9.25	ND
72	5.78	7.79	11.93	ND
84	5.77	2.64	15.72	ND
96	5.79	1.74	17.50	ND
108	5.79	0.81	19.58	ND

หมายเหตุ ND = Not Detect

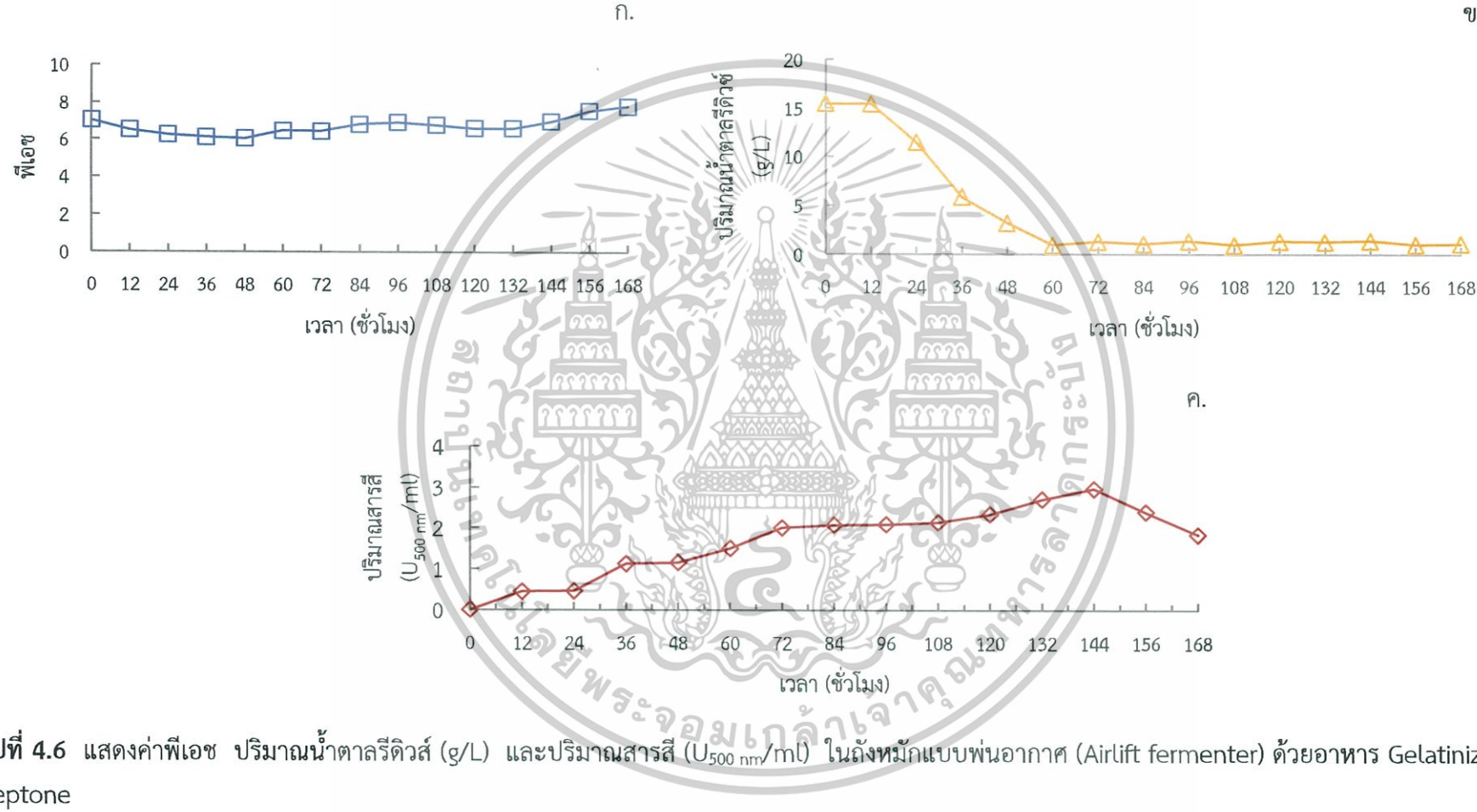


รูปที่ 4.5 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (g/L) และปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Glucose Peptone

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) และปริมาณซิตรินิน (µg/ml) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone

ชั่วโมงที่เก็บตัวอย่าง	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)	ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml)	ปริมาณซิตรินิน (µg/ml)
0	7.03	11.62	0.00	ND
12	6.50	15.44	0.45	ND
24	6.25	11.46	0.46	ND
36	6.12	5.85	1.12	ND
48	6.05	3.21	1.15	ND
60	6.47	0.96	1.50	ND
72	6.44	1.29	2.01	ND
84	6.81	1.08	2.08	ND
96	6.92	1.34	2.09	ND
108	6.77	0.97	2.15	ND
120	6.60	1.34	2.35	ND
132	6.59	1.28	2.72	ND
144	6.97	1.41	2.98	ND
156	7.56	1.02	2.40	ND
168	7.80	1.10	1.84	ND

หมายเหตุ ND = Not Detect

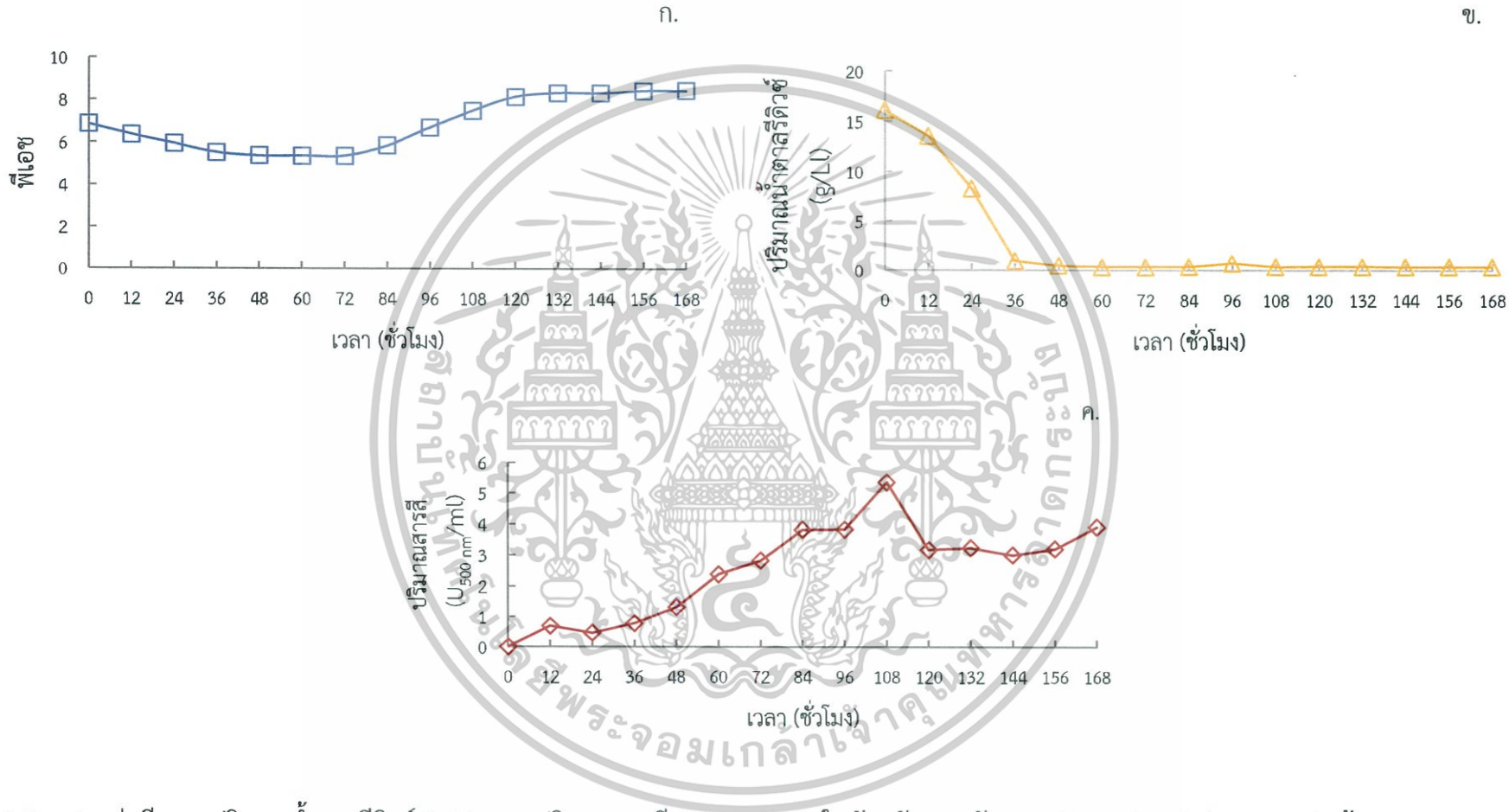


รูปที่ 4.6 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (g/L) และปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) และปริมาณซิตรินิน (µg/ml) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone

ชั่วโมงที่เก็บตัวอย่าง	ค่าพีเอช	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L)	ปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml)	ปริมาณซิตรินิน (µg/ml)
0	6.86	16.09	0.58	ND
12	6.37	13.55	0.69	ND
24	5.95	8.31	0.46	ND
36	5.52	0.93	0.78	ND
48	5.38	0.45	1.31	ND
60	5.37	0.33	2.38	ND
72	5.37	0.33	2.82	ND
84	5.86	0.36	3.82	ND
96	6.72	0.73	3.83	ND
108	7.50	0.36	5.36	ND
120	8.17	0.36	3.18	ND
132	8.35	0.38	3.24	ND
144	8.34	0.35	3.01	ND
156	8.46	0.35	3.20	ND
168	8.47	0.35	3.90	ND

หมายเหตุ ND = Not Detect



รูปที่ 4.7 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (g/L) และปริมาณสารสี ($U_{500\ nm}$/ml) ในถังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และ *Monascus* sp. U6V1 บนอาหารแข็งธัญพืชที่บรรจุในขวดเตรียมอาหาร ในสภาวะหมุนสลับนิ่งอัตรา 15 : 45 นาที โดยใช้ข้าวหอมมะลิและข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมักตามลำดับ และเติมน้ำเริ่มต้นที่ปริมาตรแตกต่างกัน ได้แก่ 5 10 15 20 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์จะผลิตสารสีได้สูงสุดที่การเติมน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน โดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ผลิตสารสีสูงสุดเมื่อเลี้ยงบนข้าวเสาไห้วัดได้ 949.33 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พบปริมาณซิตรินินสูงสุด 0.0039 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ผลิตสารสีสูงสุดเมื่อเลี้ยงบนข้าวหอมมะลิสามารถวัดได้ 324.73 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในอาหารเหลว ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าอาหาร Glucose Peptone และ Gelatinized Starch Peptone ผลิตสารสีสูงสุดได้ 44.64 และ 39.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดี และผลิตสารสีได้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด ดังนั้นการทดลองต่อมาจึงเลือกใช้อาหาร Gelatinized Starch Peptone และ Glucose Peptone มาทำการทดลองในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) และถังหมักแบบกวน (Stirred tank fermenter) เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต และผลิตสารทุติยภูมิให้มีปริมาณที่สูงขึ้น พบว่าเมื่อใช้อาหาร Gelatinized Starch Peptone และ Glucose Peptone มาทำการทดลองในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm พบว่า ถังหมักแบบพ่นอากาศที่ใช้อาหาร Glucose Peptone มีปริมาณสารสีสูงสุด 19.58 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการใช้อาหาร Gelatinized Starch Peptone ในขณะที่เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อราในถังหมักแบบถังกวน โดยใช้ความเร็วรอบของใบพัด 300 รอบต่อนาที ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone พบว่ามีปริมาณสารสีสูงสุด 5.36 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงด้วยถังหมักแบบพ่นอากาศในอาหารชนิดเดียวกัน และในทุกสภาวะไม่พบปริมาณซิตรินิน แต่จากผลการทดลองยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อราสายพันธุ์ U6V1 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างซิตรินิน เนื่องจากสารสีที่นำมาวิเคราะห์อาจเป็นสารที่เชื้อสร้าง และหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ แต่ซิตรินินเชื้ออาจจะสร้าง และอยู่ภายในเซลล์ไม่ได้หลั่งออกมาด้วยจึงทำให้ไม่มีการตรวจพบการสร้างซิตรินิน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *Monascus* sp. U6V1 และ *Monascus* sp. SS14 เกี่ยวกับการสร้างซิตรินินต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาการผลิตสารสีจากเชื้อรา *Monascus* ในถังหมัก ควรศึกษาปัจจัยอื่นๆ เช่น อัตราการไหลของอากาศ ความเร็วรอบในการหมุนของใบพัด หรือขนาดของถังหมักที่เหมาะสมให้มากยิ่งขึ้นเพื่อให้ได้ปริมาณสารทุติยภูมิที่สูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จุลยุทธ บุญสร้างสม และศศิธร ใบผ่อง. 2547. “การผลิตข้าวแดงที่ปลอดภัยเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร.” ใน เรณู ปิ่นทอง. **โครงการผลิตข้าวแดงที่ปลอดภัยเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร.** มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ฉัตรมณี จอมคำสิงห์. (2547). “การผลิตสีเหลืองของเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M 10.2 จากแป้งมันสำปะหลังโดยการหมักแบบ Constantly Fed-batch Culture.” วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทศพร นามโฮ่ง. 2544. “การใช้ข้าวแดงเพื่อปรับปรุงสีในไส้กรอกอิมัลชั่น.” คณะเทคโนโลยีการอาหาร วิทยาเขตพระนครศรีอยุธยาหันตรา สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, พระนครศรีอยุธยา.

นิสา บุตรดา. 2537. “การกลายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* sp.11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสี และเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการกับสายพันธุ์พ่อแม่ สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดง และสีเหลือง”. วิทยานิพนธ์ มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2518. “ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตข้าวแดงโดยเชื้อรา *Monascus*.” **บทปฏิบัติการในวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุษบา ยงสมิทธ์, วิเชียร ยงมานิตชัย, สนทนา แสงจันทร์ และชุลี ชัยศรีสุข. 2531. “การผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลังเพื่ออุตสาหกรรมหมัก.” **รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ**, กรุงเทพฯ หน้า 225.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. **จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุษบา ยงสมิทธ์. 2542. **จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรณู ปิ่นทอง. 2547. “การผลิตข้าวแดงที่ปลอดภัยเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร.” *วารสารวิทยาศาสตร์*. 322-337.

ลลิตวดี ตันต๋ำ, วนิดา เขียวจันทร์ และวรางคณา รัตนะกรี. 2557. “การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 เพื่อเพิ่มผลผลิต Monacolin.” วิทยานิพนธวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกลาเจาคุณทหารลาดกระบัง

วาลิสา เมืองแมน, ปัญญรัตน์ ปัณฑุกำพล และอลิษา สุนทรวัฒน์. 2558. “การผลิตสารสีของเชื้อรา *Monascus sp.* โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร : รำข้าวหรือกากถั่วเหลือง.” *วารสารวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ*. 1(2) : 45-55.

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. “ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของ *Monascus* ที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุนีย์ เอียดมุสิก. 2557. “การใช้ประโยชน์เหลือทิ้งทางการเกษตรจากการหมักด้วยเชื้อรา *Monascus*.” *KKU Res. J.* 19(1) : 92-106.

สุนีย์ เอียดมุสิก, วิจิตรา สานพภา และณัฐธยาน์ ชูสุข. 2557. “การผลิตสารสีและโมนาโคลิน เค ที่ได้จากการหมักเมล็ดขนุนผง ด้วยเชื้อรา *Monascus* ต่างสายพันธุ์.” *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*. 24(2) : 364-373

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิริพร อักษร, วงเดือน บุตรหนัน และปาริยา ณ นคร. 2556. "ความคงตัวของสีแดงที่สกัดได้จากการเลี้ยงราที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว." *Thai Journal of science and Technology*. 2(3) : 45-52.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2562. "องค์ความรู้เรื่องข้าว." [Online]. Available : www.brrd.in.th/rkb/index.php.html.

อุทัยวรรณ ฉัตรธง และเกตุการ ดาจันทา. 2557. "การสร้างโมนาโคลิน ซิตรินิน และสารสีในอังคักจากเศษเหลือเส้นก๋วยเตี๋ยวที่หมักด้วยรา *Monascus* ต่างสายพันธุ์." KKU Res.j. 2557. 19(2) : 215- 222.

Alberts, A.W. 1998. "Discovery, Biochemistry and Biology oh Lovastatin." *American Journal of Cadiology*. 62 : 10-15.

Alexopoulos, C.J. and C.W., Mims. 1979. **Introductory Mycology**. New York : John Wiley and Son.

Andrea, B., Dionyz, M., Anna, L. and Monika, P. 2001. "Utilization of *Monascus purpureus* in the Production of Foods of Animal Origin, Bull." *Vet. Inst. Pulawy*. 45 : 111-116.

Babitha, S. and Carvalho, J.C., 2008. "Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation." *World J. Microbiol. Biotechnol*. 24 : 2671–2675.

Babitha, S., Soccol, C.R., Pandey, A., 2007. " Solid state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed." *Bioresour. Technol*. 98 : 1554–1560.

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

Bhargav, S., Panda, BP., Ali, M. and S, Javed. 2008. "Solid State Fermentation : An Overview." *Chemical and biochemical engineering quarterly*. 22(1) : 375-380.

Blance, P.J., Loret, M.O. and Goma, G. 1995. "Production of citrinin by variour species of Monacolin." *Biotech Letters*. 17(3) : 291-294.

Blance, P.J., Loret, M.O. and Goma, G. 1997. "Pigments and citrinin production during cultures of *Monascus* in liquid and solid media." *Biotech Letters*. 393-406.

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

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

Carvalho, J.C., Pandey, A., Oishi, B.O., Brand, D., Rodriguez, J.A. and Soccol, C.R. 2006. " Relation between growth, respirometric analysis and pigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. " *Biochemical Engineering Journal*. 29 : 262-269.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Chen, M.H. and Johns, M.R., 1994. " Effect of pH and Nitrogen Source on Pigment Production by *Monascus purpureus.*" *Enzyme and Microbial Technology.* 16(7) : 584-590.

Chui, S.W. and Chan, S.M. 1992. " Production of pigment by *Monascus purpureus* using sugar-cane bagasse in roller bottle cultures." *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 8(1) : 68-70

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

Comerio, R., Fernandez, P. and V.G. Vaamonde. 1998. "Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat." *Int. J. Food Microbiol.* 42 : 219-223.

Costa, J. and Vendruscolo F. 2017. "Production of red pigments by *Monascus ruber* CCT 3802 using lactose as a substrate." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 11 : 50-55.

Crasto, A.M. 2016. **Lovastatin** [Online]. Available : https://newdrugapprovals.org/2016/08/07/lovastatin/

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

Dufosse, L. 2006. "Microbial production of food grade pigments." *Food technol Biotech.* 44 : 313-321.

Erdogral, O. and S. Azirak. 2004. "Review of the red yeast rice (*Monascus purpureus*)." *Turkish Electron J Biotechnol.* 2 : 37-49.

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

Feng, Y., Shao, Y., Chen, F., 2012. " *Monascus* pigments – mini-review." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 : 1421–1440.

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 amd son., New York. 280 p.

Hamano, P.S. and B.V. Kilikian. 2006. "Production of red pigments by *Monascus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ruber in culture media containing corn steep liquor." *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 22(4) : 443-449.

Han, O.H. and Mudgett, R.E. 1992. " Effect of oxygen and carbondioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid-state fermentations." *Biotechnology progress*. 8 : 5010-5017.

Hajjaj, H., Kla, A. O'Loret, M. Goma, G.,Blanc, P.J. and Francois, J. 1999. "Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance." *Appl Environ Microbiol*. 65 : 311-314.

Hajjaj, H., Klaebe, A., Goma, G., Blance, P.J., Barbier, E. and J. Francois. 2000. "Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fugus *Monascus ruber*." *Appl. Environ. Microbiol*. 66(3) : 1120-1125.

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

Hendrickson, L., Davis, C. R., Roach, C., Nguyen, D. K., Aldrich, T., McAda, P. C., and C. D. Reeves. 1999. " Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: 68 characterization of blocked mutant, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene." *Chem. Biol*. 6 : 429-439.

Hesseltine, C.W. 1965. "A millienium of fungi, food and fermentation." *Mycologia*. 57 : 179-181.

Howksworth, D.L. and Pitt, J.I. 1983. "A newtaxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters." Australian Journal of Botany. 31 : 51-61.

Kumari, M. Akhilender Naidu, S. Vishwanatha, K. Narasimhamurthy and G. Vijayalakshmi. 2009. " Safety evaluation of *Monascus purpureus* red mould rice in albino rats." *Food and Chemical Toxicology*. 47 : 1739–1746.

Jeun, J., Jung, H., Kim, J.H., Kim, Y.O., Youn, S.H., Shin, C.S. 2008. " Effect of the *Monascus* pigment threonine derivative on regulation of the cholesterol level in mice." *Food chemistry*. 107 : 1078-1085.

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

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.

Lin, C.F. 1973. "Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of pigment in a submerged culture." *Journal* of *Fermentation Technology*. 51(6) : 407-414.

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

Lin, T.F., Yakushijin, K. Buchi, G.H. and Demain A.L. 1992. "Formation of water-soluble *Monascus* pigments by biological and semisynthetic processes." *J Ind Microbiol*. 9 : 173-179.

Lilly, V.G. and Barnett, H.L. 1962. "The utilization of sucrose and its constituent sugars by *Monascus purpureus*." *Proc. W. Va. Acad. Sc.* 24 : 27-32.

Mchan, F. and G.T. Johnson. 1970. "Zinc and amino acid : important components of a medium promoting growth of *Monascus purpureus*." *Mycologia*. 62 : 1019-1031.

Meinicke, R.M., Vendruscolo, F., Moritz, D.E., Oliveira, D., Schimidell, W., Samohyl, R.W., Ninow, J.L., 2012. "Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruber* in submerged fermentation." *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 1 : 238–242.

Mitchell, D.A. and Lonsane B.K. 1992. "Definition, characteristics and potential." In Doelle,H.W., Mitchell, D.A. and Rolz, C.E., eds. Solid Substrate Cultavation. London : **Elsevier Science Publishers Ltd.** 1-13.

Mohd, S.M., Rosfarizan, M., Musaalbakri, A.M. and Arbakariya B.A. 2012. "Enhancement of Red Pigment Production by *Monascus purpureus* FTC 5391 through Retrofitting of Helical Ribbon Impeller in Stirred-Tank Fermenter." *Food and Bioprocess Technology*. 5(1) : 88-91.

Mukherjee, D and Singh, S.k. 2011. "Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation." *Process Biochem*. 46 : 188-92.

Okuno, K., H., Fuwa and M., Yano. 1983. "A new mutant gene lowering amylase content in endosperm starch of rice." *Jpn.J.Breed*. 33 : 387-394.

Palo, M.A., Vidal-Adeva, L., and Maceda, L. 1960. "Study on Ang-Kak and its Production." *Philippine Journal of Science*. 89 : 1-22.

Pastrana, L., Blanc, P.J., Santerre, A.L., Loret, M.O., Goma, G., 1995. "Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source." *Process Biochem*. 30 : 333–341.

Pattanakul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A. and Leksawasdi N. 2007. "Review of angkak production (*Monascus* purpureus)." *Chiang Mai J Sci*. 34 : 319-328.

Rosenblitt, A., Agosin, E., Delgado, J. and P.C Ricardo. 2000. "Solid substrate fermentation of *Monascus purpureus*: growth, carbon balance, and consistency analysis." *Biotechnology Progress*. 16 : 152-162.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sabater-Vilar, M., Mass, R.F.M. and Fink, G.J. 1999. " Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination." *Mutat Res.* 444 : 7-16.

Scragg, A.H. 1991. " Bioreactor in Biotechnology : A Practical Approach." Ellis Horwood, New York. 112-125.

Shehata, H.A., Buckenhueskes, H. J. and El-Zoghbis M.S. 1998. "Color optimization of Egyptian fresh beef sausage by natural colorants." *Fleischwirtschaft.* 78(1) : 68- 71.

Shi, Y.C., Pan T.M. 2011. "Beneficial effects of *Monascus purpureus* NTU 568 – fermented products : A review." *Appl Microbiol Biot.* 90 : 1207-1217.

Su, Y.C. and Huang, J.H., 1980. " Fermentative production of anka-pigments (*Monascus* pigments)." *Proceedings of the National Science Council, Republic of China.* 4(2) : 201- 215.

Tester, R.F., J., Karkalas and X. Qi. 2004 "Starch-composition, fine structure ans architecture." *Journal of cereal Science.* 39 : 151-165.

Vendruscolo, F., Bühler, R.M.M., Carvalho, J.C., Oliveira, D., Moritz, D.E., Schmidell, W., Ninow, J.L., 2016. " Monascus: a reality on the production and application of microbial pigments." *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178 : 211–223.

Venil, C.K., Zakaria, Z.A. and Ahmad W.A. 2013. "Bacteria pigment and their application." *Process Biochem.* 48 : 1065-1079.

Wang, S-L., Hsiao, W-J. and Chang, W-T. 2002. "Purification and Characterization of an antimicrobial Chitinase Extracellularly Produced by *Monascus purpureus* CCRC 31499 in a Shrimp and Shell Powder Medium." *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50 : 2249-2255.

Wang, J.J., Lee, C.L. and T.M. Pan. 2003. " Improvement of monacolin K, aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 30(11) : 669-676.

Wong, H.C. and Koehler, P.E. 1981. "Production and Isolation of and antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production." *J.Food sci.* 46 : 589-592.

Wong, H.C. and Koehler, P.E. 1983. "Production of red water-soluble *Monascus* pigment." *Journal of Food Science.* 48 : 1200-1203.

Wong, H.C. and Y.S. Bau. 1977. "Pigmentation and Antibacterual Activity of Fast-Neutron and X-ray Induced Strains of *M. purpureus*, Wert." *Plant Physicl.* 60 : 578-581

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wong, I.K., Lin-Shiau, S.Y., Chen, P.C. and Lin, J,.K. 2000. "Hypertriglyceridemic effect of anka (a fermented rice product of *Monascus* spp.) in rat." *J. Agric. Food Chem.* 48 : 3183-3189.

Wu, T.S. Yang, J.J. Yu, F.Y. and Liu, B.H. 2012. "Evaluation of nephrotoxic effects of mycotoxins, citrinin and patulin, on zebrafish (Danio rerio) embryos." *Food and Chemical Toxicology.* 50(12) : 4398-4404.

Xu, B.J., Wang, Q.J., Lee, J.H., Jia, X.Q. and Sung, C.K. 2003. "HPLC Analysis of Cirinin in Red Yeast Rice" . *Food Science Biotechnol.* 12(4) : 376-380.

Yang, J., Chen, Q., Wang, W., Hu, J., Hu, C., 2014. " Effect of oxygen supply on *Monascus* pigments and citrinin production in submerged fermentation." *Journal of Bioscience and Bioengineering 2014.* 119(5) : 564-569.

Yongsmith, B., Chitradon, L., Krairak, S., Tabloka, W. and Bavavoda, R. 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. 1999. Fermentative microbiology of vitamins and pigments. Bangkok Kasetsart University.

Zheng, Y., Xin, Y. and Guo, Y. 2009. "Study on the fingerprint profile of *Monascus* products with HPLC-FD." *PAD and MS Food chem.* 113 : 705-711.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

1. อาหาร MYS (Malt yeast extract starch agar)

Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
Agar	12	กรัมต่อลิตร
แป้งมันสำปะหลัง	10	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 ในกรณีที่สารละลายยาก สามารถนำไปต้มซึ่งความร้อนจะทำให้ละลายได้ง่ายขึ้น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร SS (Soybean Starch medium) ตามวิธีของ Yongsmith และคณะ, 1990

แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม
แป้งถั่วเหลือง	40	กรัม

นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 ในกรณีที่สารละลายยาก สามารถนำไปต้มซึ่งความร้อนจะทำให้ละลายได้ง่ายขึ้น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Glucose Peptone medium ตามวิธีของ Krairak และคณะ, 1999

กลูโคส	30	กรัม
Peptone	40	กรัม

นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Gelatinized Starch Peptone medium โดยดัดแปลงจากวิธีของ Krairak และคณะ, 1999

แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม
Peptone	40	กรัม

นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 สามารถนำไปต้มซึ่งความร้อนจะทำให้ละลายได้ง่ายขึ้นจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Gelatinized Starch Soybean flour medium โดยดัดแปลงจากวิธีของ Yongsmith และคณะ, 1990

แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม
แป้งถั่วเหลือง	40	กรัม

นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 สามารถนำไปต้มซึ่งความร้อนจะทำให้ละลายได้ง่ายขึ้นจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Raw Starch Peptone medium โดยดัดแปลงจากวิธีของ Krairak และคณะ, 1999

แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม
Peptone	40	กรัม

นำแป้งมันสำปะหลังไปอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และละลาย Pentone ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำ Peptone ที่ละลายแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมกัน

7. Raw Starch Soybean flour medium โดยดัดแปลงจากวิธีของ Yongsmith และคณะ, 1990

แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม
แป้งถั่วเหลือง	40	กรัม

นำแป้งมันสำปะหลังไปอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และละลายแป้งถั่วเหลืองด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำแป้งถั่วเหลืองที่ละลายแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์

1. การหาน้ำหนักแห้ง (dry cell weight)

1.1. การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* บนอาหารแข็งธัญพืช

1.1.1 นำจานเลี้ยงเชื้ออบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

1.1.2 นำตัวอย่างข้าวประมาณ 3-4 กรัม ใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบ

1.1.3 นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อบจนได้น้ำหนักคงที่โดยใช้เวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง

1.1.4 นำออกมาใส่โถดูดความชื้น 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งหาน้ำหนัก

1.1.5 อบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักจานเพาะเชื้อมาลบออกได้เป็นค่าน้ำหนักแห้ง

1.2. การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ในอาหารเหลว

1.2.1 นำหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

1.2.2 ดูดตัวอย่างประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดที่ผ่านการอบ

1.2.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วนำส่วนที่ตกตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง อบจนได้น้ำหนักคงที่โดยใช้เวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง

1.2.4 นำออกมาใส่โถดูดความชื้น 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งหาน้ำหนัก

1.2.5 อบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักหลอดปั่นเหวี่ยงตกตะกอนมาลบออกได้เป็นค่าน้ำหนักแห้ง

2. การหาปริมาณความชื้น

นำจานเลี้ยงเชื้ออบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน นำตัวอย่างข้าวประมาณ 3-4 กรัม ใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบไว้แล้ว นำเข้าตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อบจนได้น้ำหนักคงที่ใช้เวลาอบประมาณ 4-5 ชั่วโมง นำออกมาใส่โถดูดความชื้น 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักนำไปอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักจานเพาะเชื้อมาลบออกได้เป็นค่าน้ำหนักแห้งเมื่อได้น้ำหนักแห้งแล้วนำมาลบออกจากน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ จะได้ค่าความชื้นของตัวอย่าง นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณความชื้น

น้ำหนักจานเพาะเชื้อ = 97.846 กรัม
น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ = 3.916 กรัม
น้ำหนักจานเพาะเชื้อหลังอบ = 100.175 กรัม
ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ = 2.329 กรัม

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

$$= \frac{3.916-2.329}{3.916} \times 100$$

$$= 40.526$$

ดังนั้น ตัวอย่างมีปริมาณความชื้น 40.526 เปอร์เซ็นต์

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ของ Somogyi-Nelson (1954)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส ไซโลส โดยมีการทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์เกิดสีโมลิบดินัมบลู (Molybdenum blue) ดังปฏิกิริยา

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

$Cu_2O + H_2SO_4 \longrightarrow 2Cu^{+}$

$2Cu^{+} + MoO_4^{2+} \longrightarrow 2Cu^{2+}$ + Molybdenum blue

3.1 สารเคมี

Copper reagent

เตรียมสารละลาย $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71 กรัม และโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 40 กรัม ละลาย ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 นอมอล จำนวน 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจากนั้นทำให้ร้อน เติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชาแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้าหากมีตะกอนให้กรองออกก่อนนำไปใช้

Nelson reagent

เตรียมสารละลาย $(NH4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 50 กรัม ละลายสารในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วเติม $Na_2AsO_4 \cdot 7H_2O$ 6 กรัม จากนั้นเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองตะกอนออกก่อนนำไปใช้

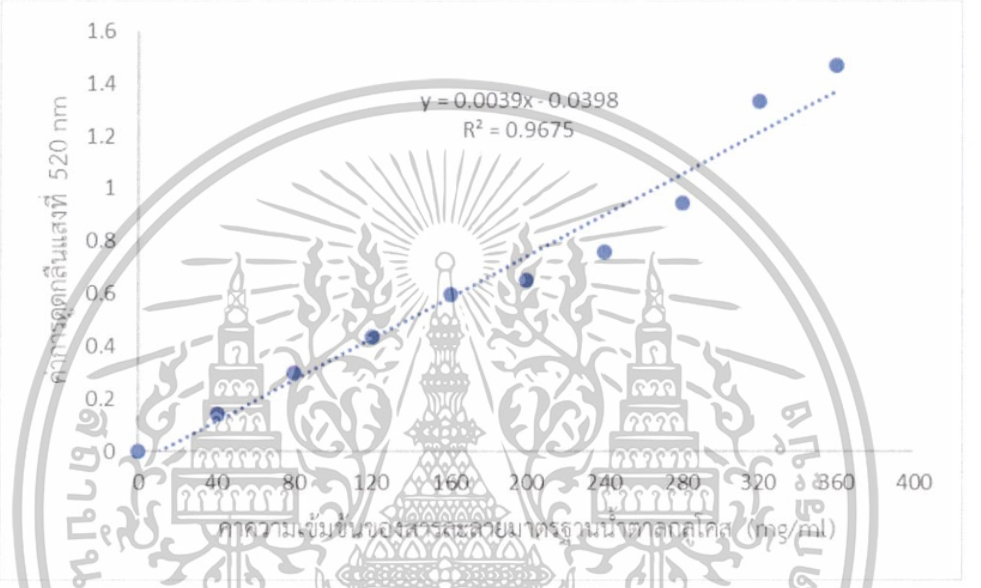
3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคส (Analytical grade glucose) โดยอบที่อุณหภูมิ 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำเป็นสารละลายความเข้มข้น 40 80 1200 160 200 240 280 320 และ 360 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายแต่ละความเข้มข้นในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม Copper reagent 1.0 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยใช้น้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 520 nm เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลกลูโคสและค่าความขุ่น ได้เป็นกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)

3.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างสารละลายที่เตรียมไว้จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำไปวิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสข้างต้น คำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

4. วิธีวิเคราะห์สารสี

4.1. การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* บนอาหารแข็งธัญพืช

สกัดสารสีที่ได้จากการหมักข้าวของเชื้อรา *Monascus* ด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 บนเครื่องสกัด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสีที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สามารถคำนวณได้ดังนี้

<u>ตัวอย่างคำนวณหาสารสี</u>

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 2 กรัม สกัดสารสีเอทานอลร้อยละ 50 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.526 ABS โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการเจือจางจำนวน 5 เท่า ส่วนตัวอย่างข้าวที่นำสกัดสีคิดเป็นน้ำหนักแห้งได้ 0.974 กรัม สามารถนำมาคำนวณปริมาณสารสีได้ดังนี้

ปริมาณสี 0.526 × 5 = 2.63 unit/ml.

ปริมาณสารสีทั้งหมด (10+2.039) × 2.63 unit.ml/ml. = 31.66257 unit

ตัวอย่างแห้งหนัก 0.974 กรัม ได้สารสี 31.66257 unit

ในข้าว 1 กรัมน้ำหนักแห้งมีสารสีทั้งหมด = 32.50777 $U_{500\ nm}$/g-DSW

4.2. การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ในอาหารเหลว

เก็บตัวอย่างจากการเลี้ยงในอาหารเหลวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สามารถคำนวณได้ดังนี้

ตัวอย่างคำนวณหาสารสี

นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.48 ABS โดยทำการเจือจางจำนวน 3 เท่า สามารถนำมาคำนวณปริมาณสารสีได้ดังนี้

ปริมาณสี 0.48 × 3 = 1.44 unit/ml.

5. การวิเคราะห์ซิตรินินด้วยเครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Xu และคณะ, 2003

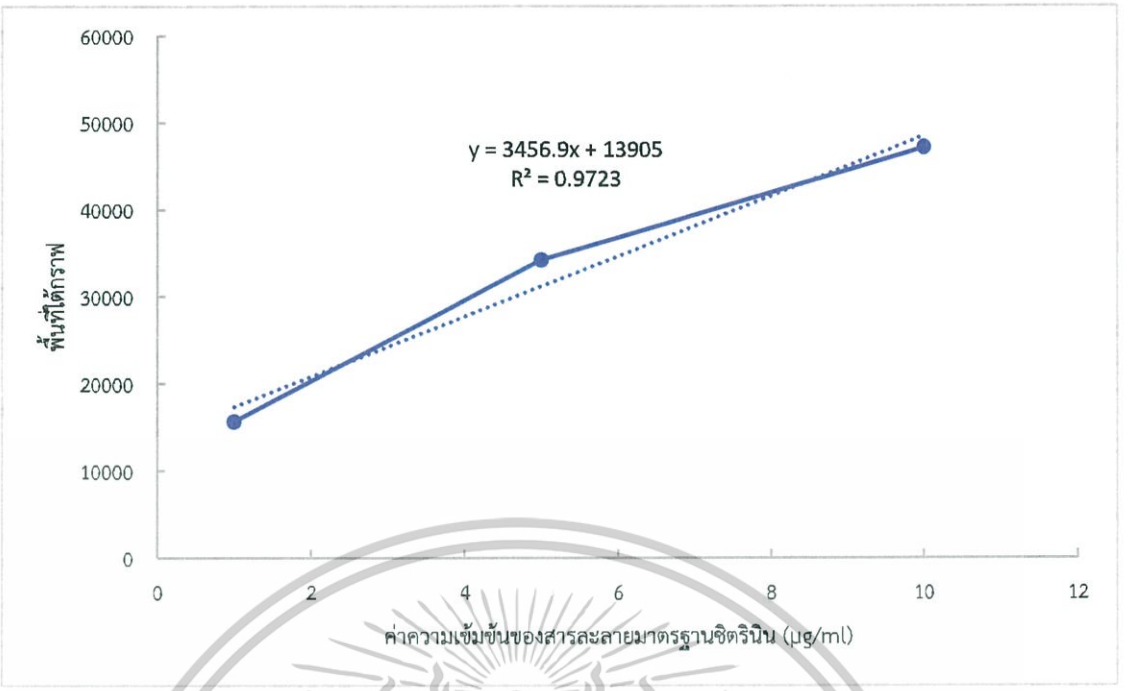
5.1 การวิเคราะห์

นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดจากก่อนหน้ามาใช้วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Shimadzu, c20994007894 LP, LC-10ADvp) คอลัมน์ μ BondapakTM C18 3.9 × 300 มิลลิเมตร (Phenomenex, USA) และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร (UV detector SPD-10A vp) โดยใช้ส่วนที่เคลื่อนที่เป็นสารละลายอะซิโตไนไตรท์ (Acetonitrile) ความเข้มข้นร้อยละ 55 แล้วนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐานซิตรินิน

5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานซิตรินิน

นำสารละลายซิตรินินมาตรฐานมาละลายในเอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ นำมาเจือจางเป็นความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 1 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับสารละลายอะซิโตไนไตรท์ในอัตราส่วนของสารละลาย อะซิโตไนไตรท์ : สารมาตรฐาน 55 : 45) จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน สามารถเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานซิตรินินและพื้นที่ใต้กราฟ ได้เป็นกราฟมาตรฐานซิตรินิน ดังแสดงในรูปที่ ข.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานซิตรินิน (µg/ml)

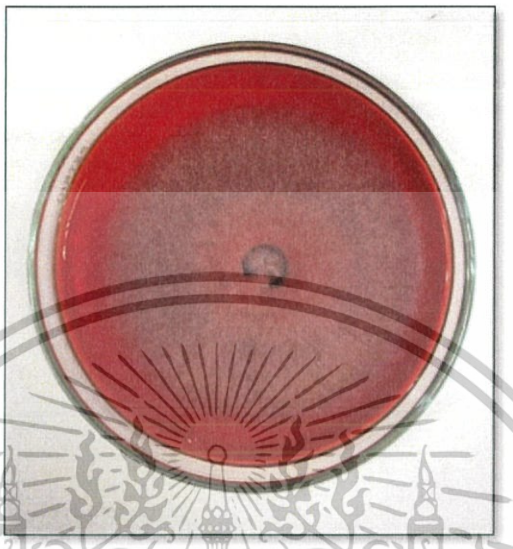
5.3 การเตรียมตัวอย่างสารละลายซิตรินิน

นำเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ทำให้เป็นเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 2.5 ด้วยออโธฟอสฟอริค (Ortho-phosphoric acid) จากนั้นนำตัวอย่างมาผสมสารละลายอะซิโตไนไตรท์ในอัตราส่วน (45 : 55) จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์ปริมาณซิตรินิน นำพื้นที่ใต้กราฟที่เวลาเดียวกับกราฟมาตรฐานไปเทียบเพื่อหาปริมาณของซิตรินิน

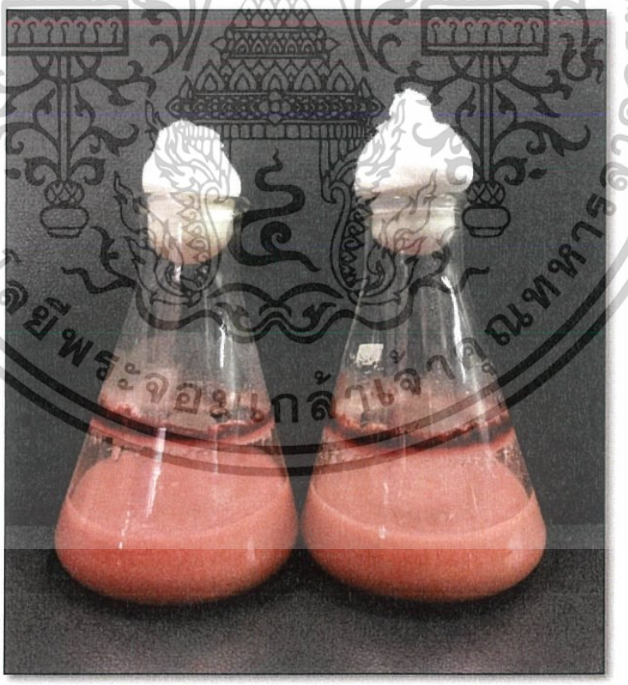
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รูปแสดงการทดลอง

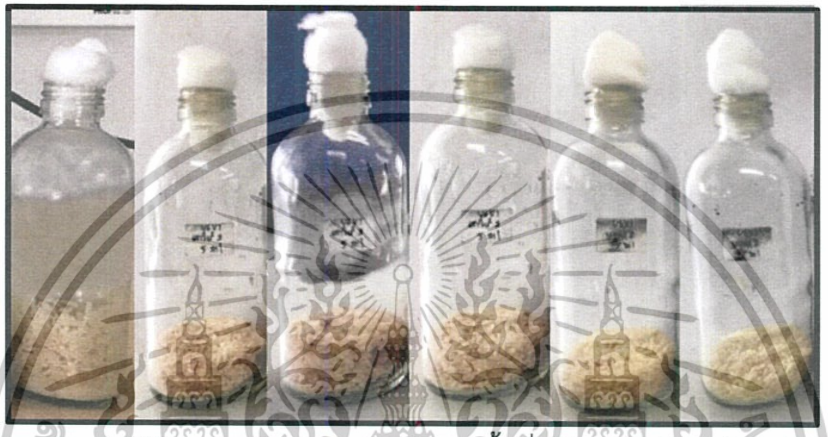


รูปที่ ค.1 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 อายุ 14 วัน บนอาหาร MYS



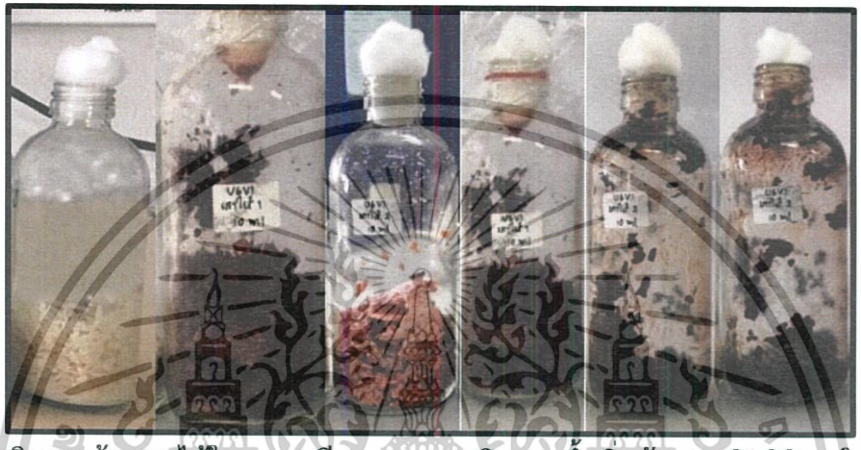
รูปที่ ค.2 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 อายุ 3 วัน ในอาหาร SS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

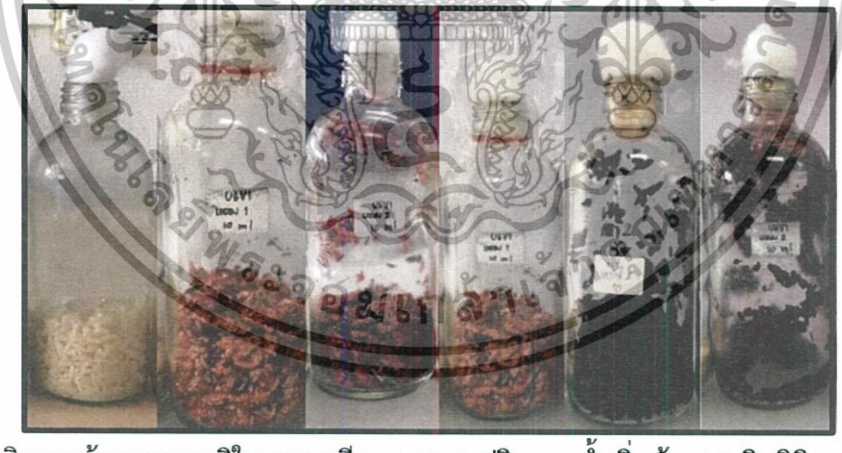


รูปที่ ค.3 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)

รูปที่ ค.4 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)

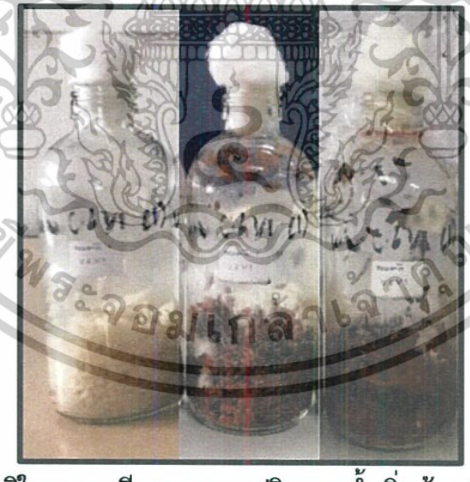


รูปที่ ค.5 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)



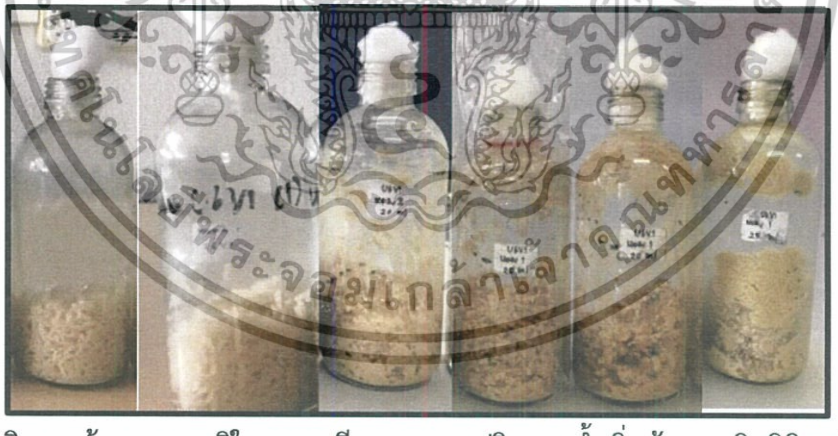
รูปที่ ค.6 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)

รูปที่ ค.7 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 15 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 28 และ 35 ตามลำดับ)

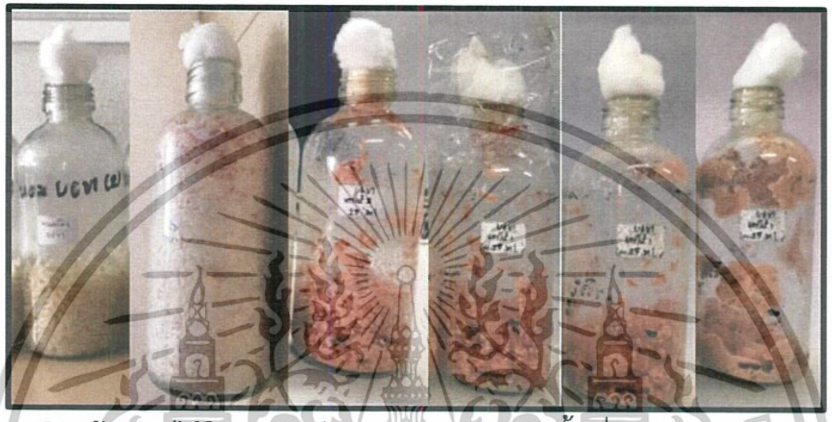


รูปที่ ค.8 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 15 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 28 และ 35 ตามลำดับ)

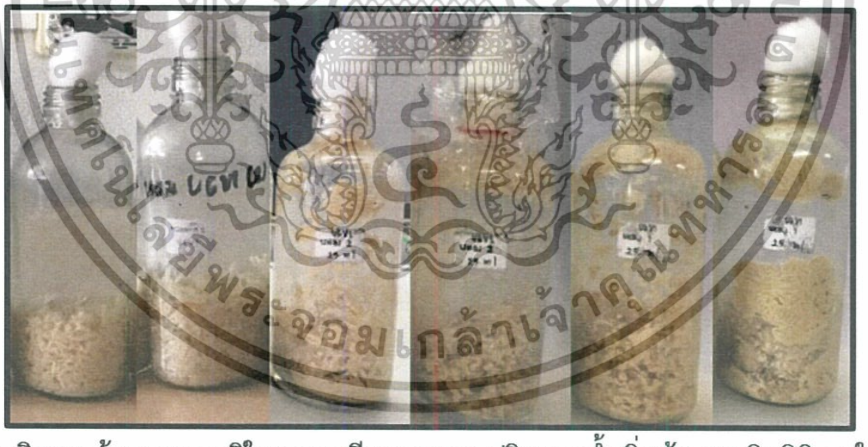
รูปที่ ค.9 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 20 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)



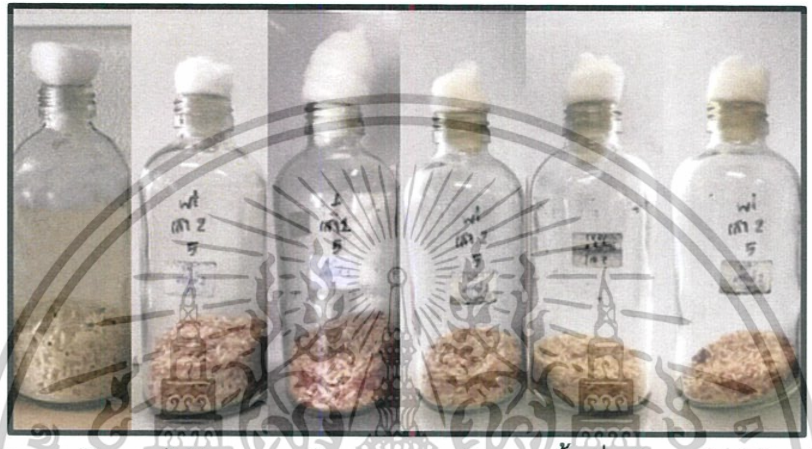
รูปที่ ค.10 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 20 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)



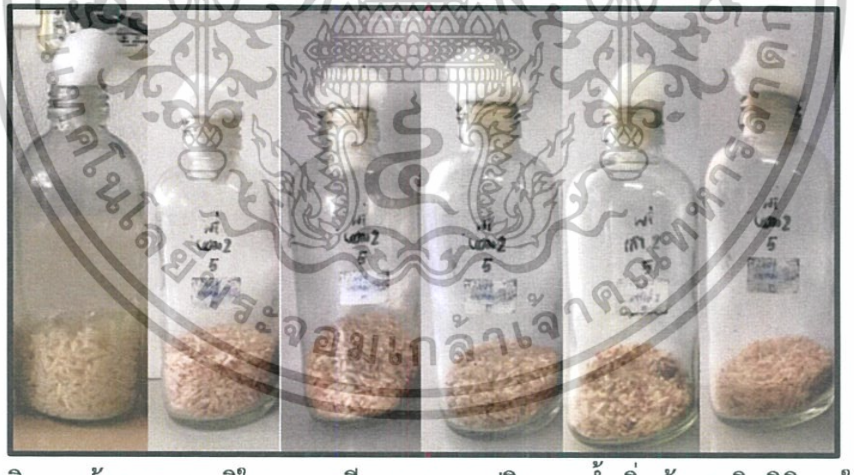
รูปที่ ค.11 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)



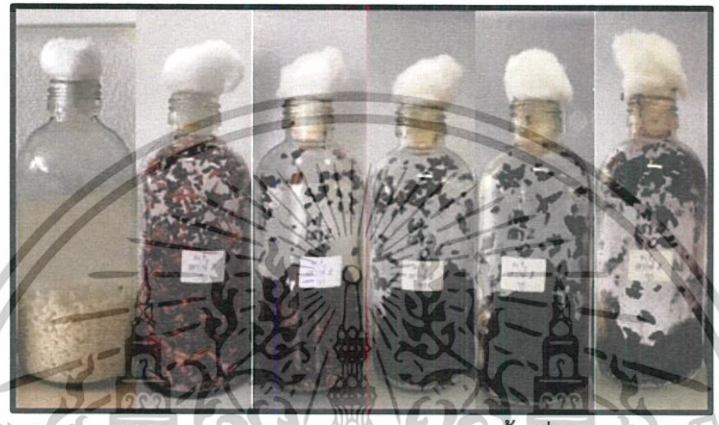
รูปที่ ค.12 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)



รูปที่ ค.13 เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)



รูปที่ ค.14 เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 5 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)



รูปที่ ค.15 เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)

รูปที่ ค.16 เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 10 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)

รูปที่ ค.17 เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 15 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 28 และ 35 ตามลำดับ)

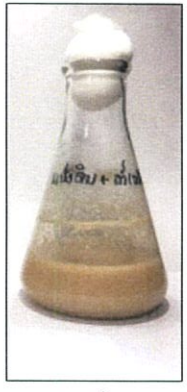
รูปที่ ค.18 เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 15 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 28 และ 35 ตามลำดับ)

รูปที่ ค.19 เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 20 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)

รูปที่ ค.20 เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 20 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)

รูปที่ ค.21 เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ)

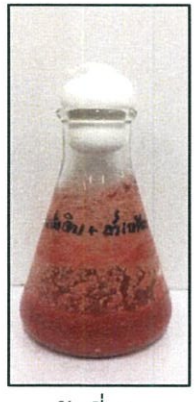
รูปที่ ค.22 เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดเตรียมอาหาร ปริมาตรน้ำเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน (วันที่ 0, 7, 14, 21, 28 และ 35 ตามลำดับ


วันที่ 1

วันที่ 2

วันที่ 3

วันที่ 4


วันที่ 5

วันที่ 6

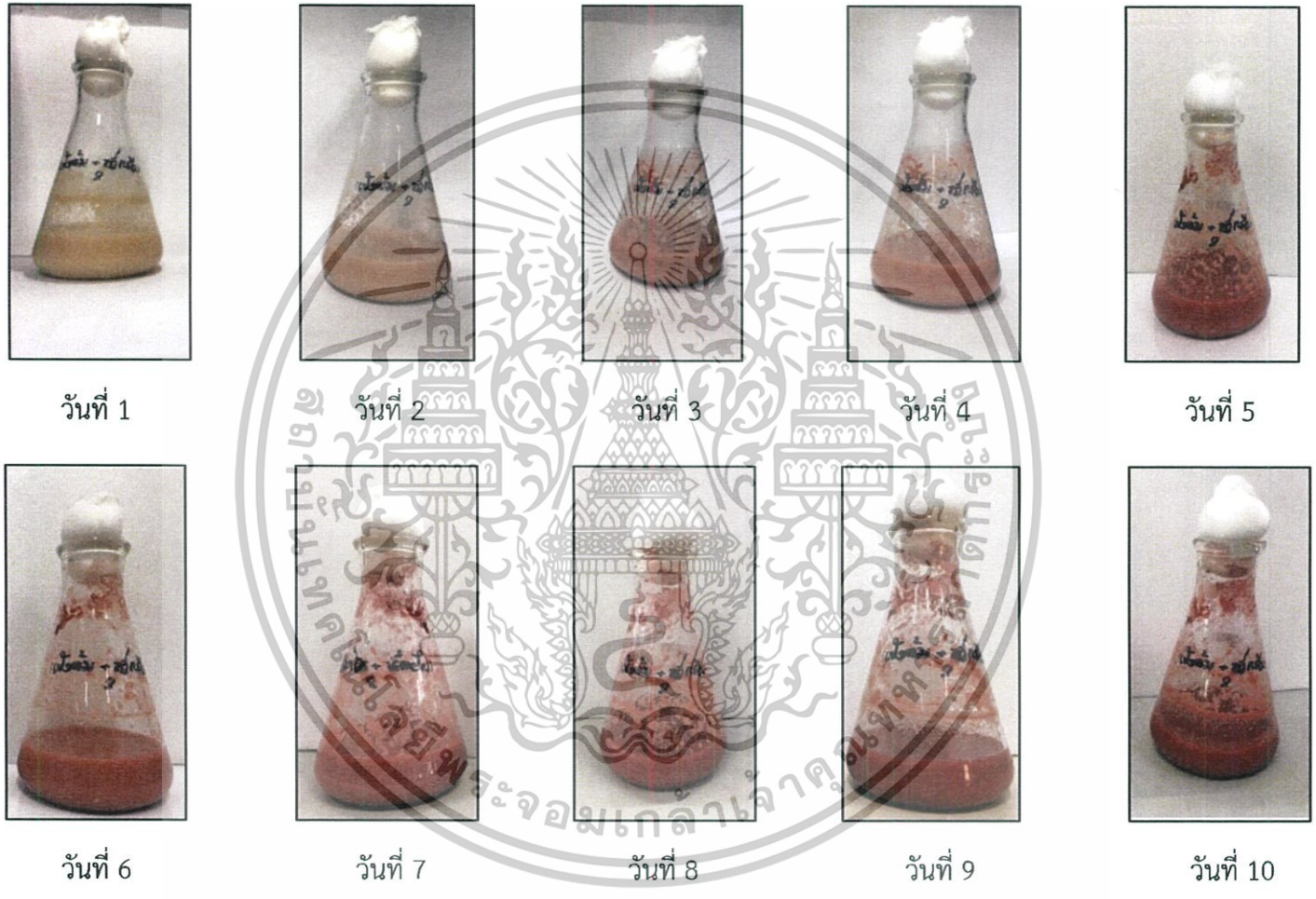
วันที่ 7

วันที่ 8

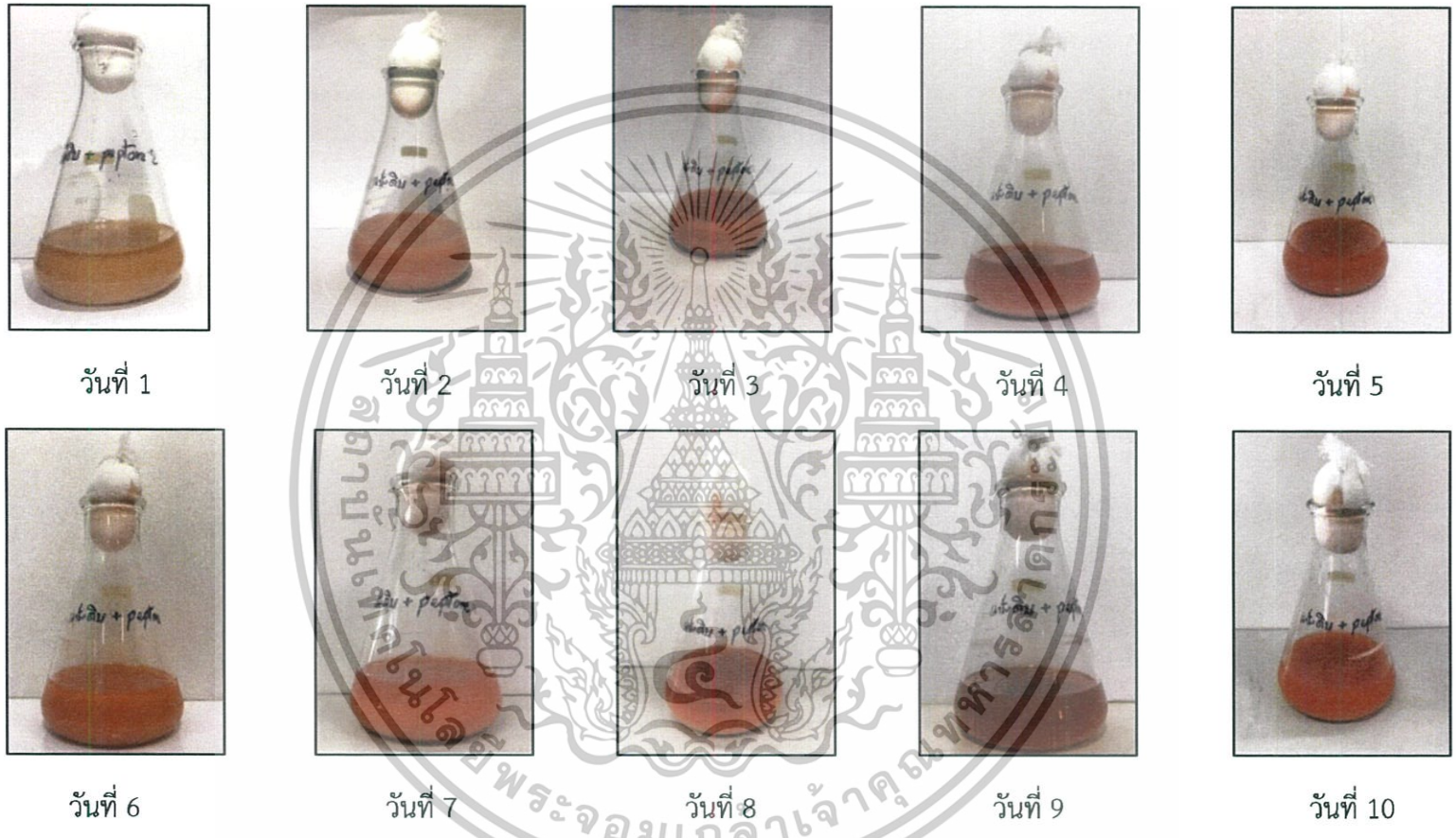
วันที่ 9

วันที่ 10

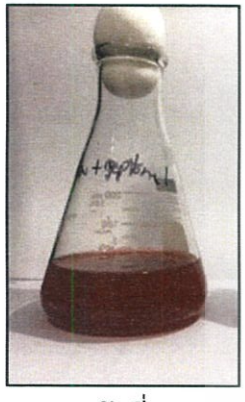
รูปที่ ค.23 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร Raw Starch Soybean flour สภาวะการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในแต่ละเวลา

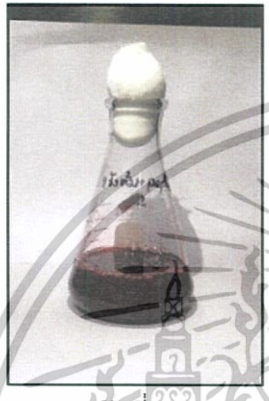


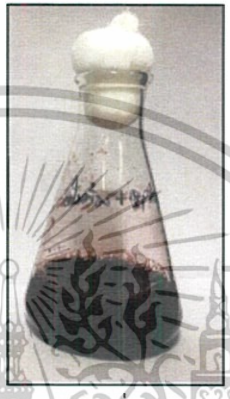
รูปที่ ค.24 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร Gelatinized Starch Soybean flour สภาวะการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในแต่ละเวลา



รูปที่ ค.25 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร Raw Starch Peptone สภาวะการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในแต่ละเวลา

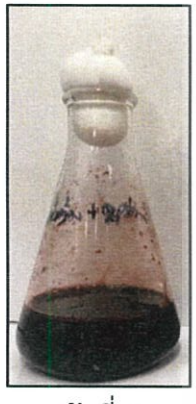

วันที่ 1


วันที่ 2


วันที่ 3

วันที่ 4

วันที่ 5


วันที่ 6

วันที่ 7

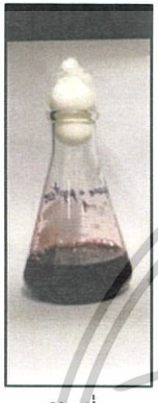
วันที่ 8

วันที่ 9

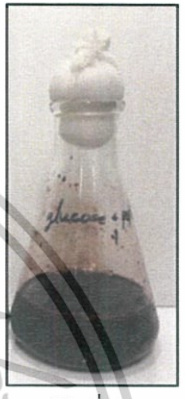
วันที่ 10

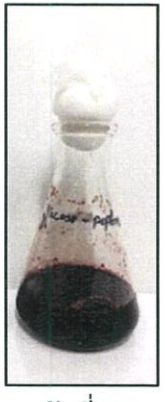
รูปที่ ค.26 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร Gelatinized Starch Peptone สภาวะการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในแต่ละเวลา

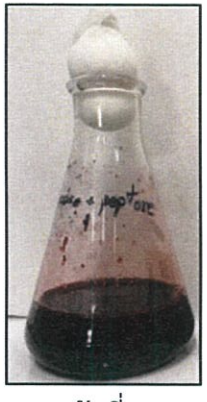
วันที่ 1

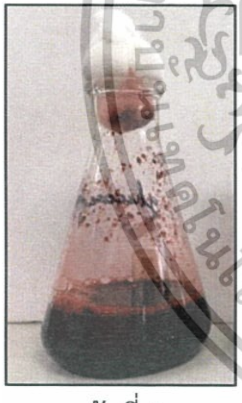

วันที่ 2

วันที่ 3


วันที่ 4


วันที่ 5


วันที่ 6

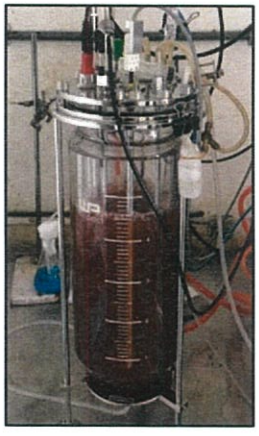

วันที่ 7

วันที่ 8

วันที่ 9

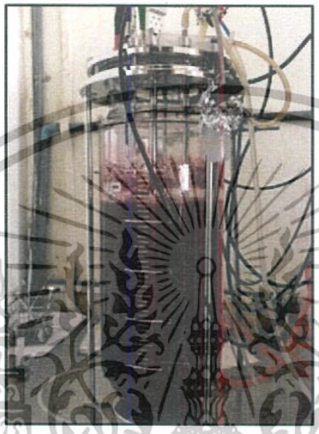
วันที่ 10

รูปที่ ค.27 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร Glucose Peptone สภาวะการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในแต่ละเวลา

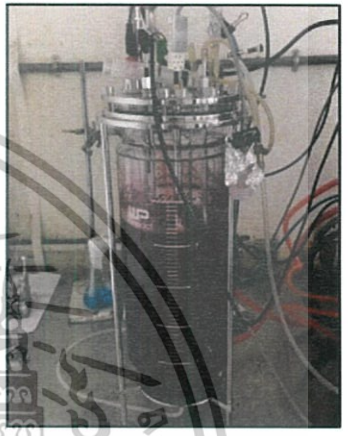


ชั่วโมงที่ 12

ชั่วโมงที่ 24



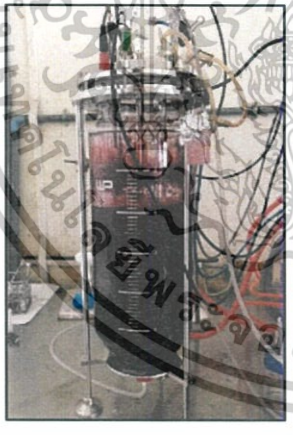
ชั่วโมงที่ 36



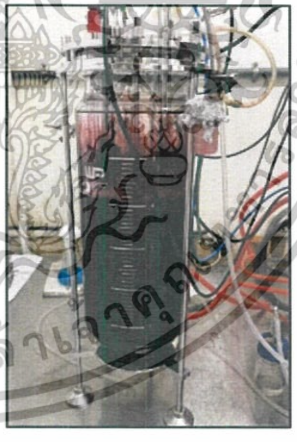
ชั่วโมงที่ 48

ชั่วโมงที่ 60

ชั่วโมงที่ 72



ชั่วโมงที่ 84

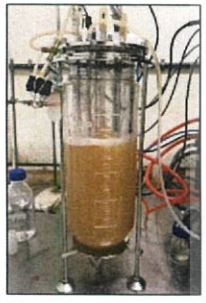


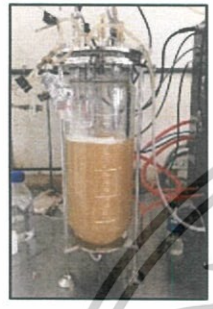
ชั่วโมงที่ 96

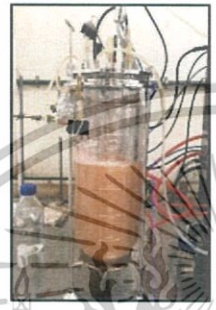
ชั่วโมงที่ 108

รูปที่ ค.28 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Glucose Peptone ในแต่ละเวลา

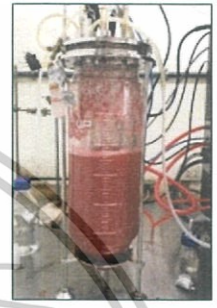
ชั่วโมงที่ 0

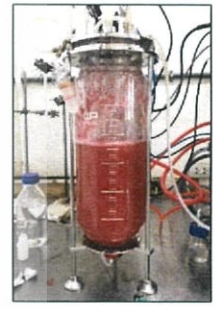

ชั่วโมงที่ 12

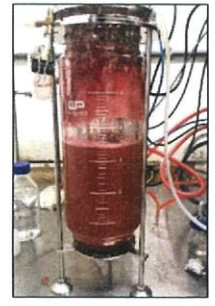

ชั่วโมงที่ 24

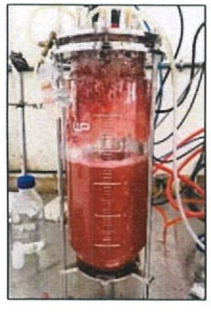

ชั่วโมงที่ 36

ชั่วโมงที่ 48

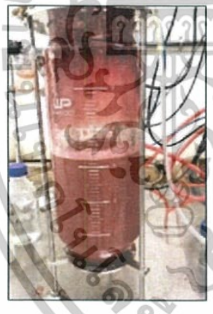

ชั่วโมงที่ 60

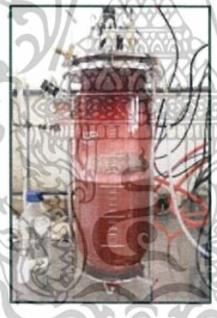

ชั่วโมงที่ 72

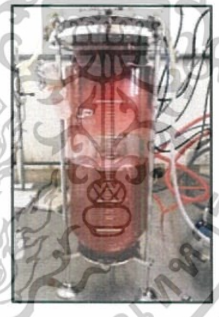

ชั่วโมงที่ 84

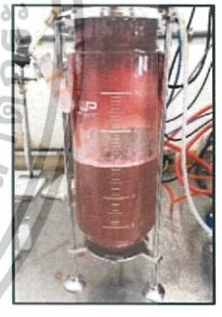

ชั่วโมงที่ 96

ชั่วโมงที่ 108


ชั่วโมงที่ 120


ชั่วโมงที่ 132

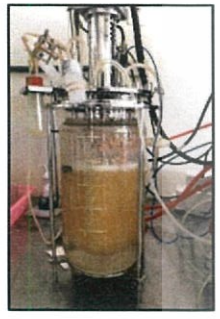

ชั่วโมงที่ 144


ชั่วโมงที่ 156

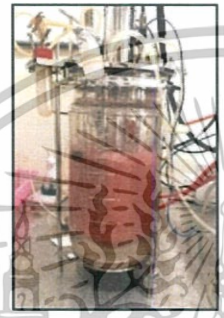
ชั่วโมงที่ 168

รูปที่ ค.29 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญในถังหมักแบบพ่นอากาศ (Airlift fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone ในแต่ละเวลา

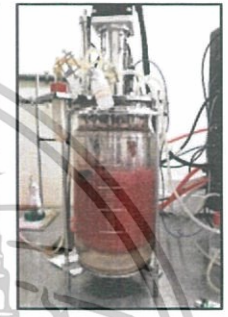
ชั่วโมงที่ 0

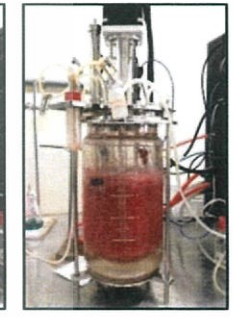

ชั่วโมงที่ 12

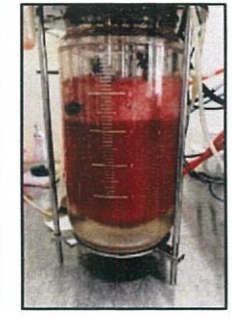
ชั่วโมงที่ 24


ชั่วโมงที่ 36

ชั่วโมงที่ 48


ชั่วโมงที่ 60


ชั่วโมงที่ 72


ชั่วโมงที่ 84

ชั่วโมงที่ 96

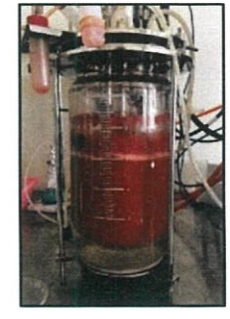
ชั่วโมงที่ 108

ชั่วโมงที่ 120

ชั่วโมงที่ 132

ชั่วโมงที่ 144

ชั่วโมงที่ 156


ชั่วโมงที่ 168

รูปที่ ค.30 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญในถังหมักแบบถังกวน (Stirred tank fermenter) ด้วยอาหาร Gelatinized Starch Peptone ในแต่ละเวลา