# การคัดเลือกเชื้อรากลายพันธุ์ *Monascus* sp. ที่มีศักยภาพการผลิตสารสี

# The isolation of high efficiency pigment production of *Monascus* sp. mutants

ณัฐพิชชา พงษ์เจริญ
บุศรินทร์ ศรีสม

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# The isolation of high efficiency pigment production of *Monascus* sp. mutants

Natpidcha Pongcharoen
Bussarin Srisom

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | การคัดเลือกเชื้อรากลายพันธุ์ *Monascus* sp. ที่มีศักยภาพการผลิตสารสี<br>The isolation of high efficiency pigment production of *Monascus* sp. mutants |
| **ชื่อนักศึกษา** | นางสาวณัฐพิชชา พงษ์เจริญ รหัสนักศึกษา 57050685<br>นางสาวบุศรินทร์ ศรีสม รหัสนักศึกษา 57050716 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา |
| **ปีการศึกษา** | 2560 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ |

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

| คณะกรรมการสอบ | ลายมือชื่อ |
|---|---|
| ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี<br>ประธานกรรมการ | |
| ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์<br>กรรมการ | |
| ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์<br>กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา | |

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อโครงงานพิเศษ** | การคัดเลือกเชื้อรากลายพันธุ์ *Monascus* sp. ที่มีศักยภาพการผลิตสารสี<br>The isolation of high efficiency pigment production of *Monascus* sp. Mutants |
| **ชื่อนักศึกษา** | นางสาวณัฐพิชชา พงษ์เจริญ รหัสนักศึกษา 57050685<br>นางสาวบุศรินทร์ ศรีสม รหัสนักศึกษา 57050716 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) |
| **ภาควิชา** | ชีววิทยา |
| **ปีการศึกษา** | 2560 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ |


**บทคัดย่อ**

นำเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 (สายพันธุ์พ่อแม่) ชักนำการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต สามารถแยกเชื้อรากลายพันธุ์ได้ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ คือ 0M1, 3M1, 3M2, 3M3, 6M1, 6M2, 9M1, 9M2, 9M3, 9M4, 12M1, 12M2, 15M1, 15M2, 18M1, 18M2, 24M1, 24M2, 30M1 และ 30M2 เมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และเชื้อกลายพันธุ์ มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่ ให้โคโลนีขนาดใหญ่กว่าเชื้อรากลายพันธุ์ทุกสายพันธุ์ จากนั้นจึงนำเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 20 สายพันธุ์ มาศึกษาการเจริญ การสร้างสารสี และการสร้างซิตรินิน ในอาหารเหลว SS และบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ เปรียบเทียบสายพันธุ์พ่อแม่ ผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว SS เชื้อกลายพันธุ์ 12M1 ให้การสร้างสีสูงสุด 1899.67 $U_{500nm}$ ต่อกรัมเซลล์แห้ง และเชื้อกลายพันธุ์ 0M1, 3M1, 3M3 และ 18M2 ไม่พบการสร้างซิตรินิน ขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่สร้างสารสี และซิตรินิน 389.94 $U_{500nm}$ ต่อกรัมเซลล์แห้ง และ 0.0018 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ส่วนการเจริญบนอาหารแข็งข้าวเสาไห้ พบว่าสายพันธุ์ 9M2 ให้การสร้างสารสีสูงสุด 30.45 $U_{500nm}$ ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และเชื้อกลายพันธุ์ทุกสายพันธุ์ไม่พบการสร้างซิตรินิน ขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่สร้างสารสี 8.42 $U_{500nm}$ ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และไม่พบการสร้างซิตรินิน


**คำสำคัญ** : *Monascus* sp., สารสี, ซิตรินิน, กลายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| Title | The isolation of high efficiency pigment production of *Monascus* sp. Mutants |
| Students | Miss Natpidcha Pongcharoen Student ID 57050685 |
| | Miss Bussarin Srisom Student ID 57050716 |
| Degree | Bachelor of Science (Biotechnology) |
| Department | Biology |
| Faculty | Science |
| University | King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) |
| Academic Year | 2017 |
| Advisor | Assoc. Prof. Dr. Somchai Krairak |


## Abstract


The induced mutation by UV radiation was applied on *Monascus* sp. SS14, wild type. The 20 isolates (0M1, 3M1, 3M2, 3M3, 6M1, 6M2, 9M1, 9M2, 9M3, 9M4, 12M1, 12M2, 15M1, 15M2, 18M1, 18M2, 24M1, 24M2, 30M1 and 30M2) were retrieved. All of isolated mutants and wild type were cultivated on MYS agar. It was found that the wild type gave the largest colony among them. Furthermore, all 20 isolates and wild type were examined for the growth, pigment and citrinin production on submerged cultivation (SS medium) and solid state cultivation (Sao-Hai rice). In submerged cultivation in SS medium, the isolate 12M1 gave the maximum pigment production (1899.67 $U_{500nm}$/g-DCW). On the other hand, citrinin production was not found in the cultivation of Isolate 0M1, 3M1 and 18M2. While, the wild type cultivation produced pigment (389.94 $U_{500nm}$/g-DCW) and citrinin (0.0018 mg/g-DCW). In case of solid state cultivation on Sao-Hai rice, the isolate 9M2 presented maximum pigment production (30.45 $U_{500nm}$/g-DSW). Meanwhile, the citrinin formation was not found in the solid state cultivation of all mutants. However, the solid state cultivation of wild type showed the pigment production of 8.42 $U_{500nm}$/g-DSW and absented citrinin formation.


**Keywords :** *Monascus* sp., pigment, citrinin, mutation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งได้สำเร็จด้วยความอนุเคราะห์และการช่วยเหลือจากผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ เกี่ยวกับการทำงาน การตรวจทาน ตลอดจนชี้แนะข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น พร้อมทั้งช่วยชี้แนวทางในการแก้ไขปัญหา แก่คณะผู้จัดทำ เพื่อให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่สละเวลาในการตรวจสอบ แก้ไขและให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ แก่โครงงานพิเศษฉบับนี้ ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและถ่ายทอดความรู้ต่าง ๆ ที่ทำให้โครงงานพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจน บุคลากร และพี่นักวิทยาศาสตร์ประจำภาคชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ สำหรับการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ณัฐพิชชา พงษ์เจริญ
บุศรินทร์ ศรีสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ฌ
**บทที่ 1 บทนำ** ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญปัญหา ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย ..... 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย ..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 2
**บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** ..... 3
2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 3
2.2 ประวัติการใช้เชื้อรา *Monascus* sp. ..... 3
2.3 การจัดจำแนกเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 4
2.4 ลักษณะและรูปร่างเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 4
2.5 สารสีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 6
2.6 สารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 7
2.6.1 กลไกการสังเคราะห์สารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 7
2.6.1.1 สารสีแดง ..... 7
2.6.1.2 สารสีส้ม ..... 7
2.6.1.3 สารสีเหลือง ..... 8
2.7 อนุพันธุ์ประเภทต่าง ๆ จากเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 9
2.8 การใช้ประโยชน์สีจากเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 9
2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว (Submerged cultivation) และบนอาหารแข็งธัญพืช (Solid state cultivation) ..... 10
2.9.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว ..... 10
2.9.1.1 แหล่งคาร์บอน ..... 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.9.1.2 แหล่งไนโตรเจน ..... 11
2.9.1.3 อุณหภูมิ ..... 13
2.9.1.4 ระยะเวลากับการผลิตสารสีและการเจริญของเซลล์ ..... 14
2.9.1.5 พีเอช ..... 14
2.9.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็งเมล็ดธัญพืช ..... 15
2.9.2.1 สายพันธุ์เชื้อรา ..... 15
2.9.2.2 สับสเตรต ..... 15
2.9.2.3 พีเอช ..... 16
2.9.2.4 อัตราส่วนของก๊าซ ..... 16
2.9.2.5 อุณหภูมิ ..... 17
2.9.2.6 ความชื้น ..... 17
2.10 การแยกสารสี ..... 18
2.11 ซิตรินิน ..... 19
2.11.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ ..... 19
2.11.2 การศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษ ..... 20
2.11.3 ความเสถียร ..... 21
2.11.4 ซิตรินินจากเชื้อรา *Monascus* spp. ..... 21
2.12 การกลายพันธุ์ ..... 22
2.12.1 ผลของสารก่อการกลายพันธุ์ ..... 23
2.12.2 รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และการกลายพันธุ์ ..... 23
2.12.3 การเกิด Thymine dimer ..... 25
2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 26
**บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย** ..... 29
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ ..... 29
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ ..... 29
3.3 อุปกรณ์ ..... 29
3.4 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น ..... 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. โดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต ..... 30
3.6 การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว SS ..... 30
3.7 การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ ..... 30
3.7.1 การเตรียมเชื้อราเริ่มต้น ..... 30
3.7.2 การเตรียมวัสดุหมัก ..... 30
3.8 การวิเคราะห์ผลของเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 31
3.8.1 การวิเคราะห์ผลในสภาวะการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว SS ..... 31
3.8.1.1 การหาน้ำหนักแห้ง ..... 31
3.8.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสี ..... 31
3.8.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) ..... 31
3.8.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณซิตรินิน ..... 31
3.8.2 การวิเคราะห์ผลในสภาวะการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ ..... 32
3.8.2.1 การหาปริมาณความชื้น ..... 32
3.8.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสี ..... 32
3.8.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) และวัดค่าพีเอช ..... 32
3.8.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณซิตรินิน ..... 32
**บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล** ..... 33
4.1 ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. โดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต ..... 33
4.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อรา Monascus sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ ..... 33
4.3 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ในอาหารเหลว SS ..... 34
4.4 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์บนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ ..... 36
**บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ** ..... 40
5.1 สรุปผลการวิจัย ..... 40
5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย ..... 41
5.3 ข้อเสนอแนะ ..... 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

เอกสารอ้างอิง..... 42
ภาคผนวก .... ..... 48
ภาคผนวก ก ..... 49
ภาคผนวก ข ..... 50
ภาคผนวก ค..... 57




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


**ตารางที่** **หน้า**

2.1 สารเมตาบอไลท์ที่มีประโยชน์จากเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 9

2.2 การใช้ประโยชน์จากเชื้อรา *Monascus* sp. ..... 10

4.1 แสดงขนาดโคโลนีของ *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ ..... 33

4.2 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสี และปริมาณซิตรินินของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ ในอาหารเหลว SS ..... 35

4.3 แสดงค่าพีเอช เปอร์เซ็นต์ความชื้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสี และปริมาณซิตรินินของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์บนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ ..... 37


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


| รูปที่ | หน้า |
|---|---|
| 2.1 ลักษณะการเจริญของ *Monascus* sp. บนอาหารวุ้น | 4 |
| 2.2 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp. | 5 |
| 2.3 การเกิด 6-MSA และ orsellinic จาก Acetyl unit และ Malonyl unit | 6 |
| 2.4 กลไกการสังเคราะห์สารสีส้ม | 8 |
| 2.5 การแยกสารสีบริสุทธิ์จากผงข้าวแดง | 18 |
| 2.6 โครงสร้างของซิตรินิน | 19 |
| 2.7 การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตของ DNA | 24 |
| 2.8 การเกิด Thymine dimer ชักนำโดยรังสีอัลตราไวโอเลตเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเบส Thymine 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันทำให้ DNA มีรูปร่างผิดปกติแบบ distortion ขึ้น | 24 |
| 4.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ | 51 |
| 4.2 กราฟมาตรฐานซิตรินินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ | 55 |
| 4.3 เชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS เป็นเวลา 7 วัน | 57 |
| 4.4 เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 0M, 3M1, 3M2 และ 3M3 ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS เป็นเวลา 7 วัน | 57 |
| 4.5 เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 6M1, 6M2, 9M1, 9M2, 9M3, 9M4, 12M1 และ 12M2 ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS เป็นเวลา 7 วัน | 58 |
| 4.6 เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 15M1, 15M2, 18M1, 18M2, 24M1, 24M2, 30M1 และ 30M2 ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS เป็นเวลา 7 วัน | 59 |
| 4.7 เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 0M, 3M1, 3M2, 3M3, 6M1, 6M2, 9M1 และ 9M2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว SS เป็นเวลา 7 วัน | 60 |
| 4.8 เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 9M3, 9M4, 12M1, 12M2, 15M1, 15M2, 18M1 และ 18M2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว SS เป็นเวลา 7 วัน | 61 |
| 4.9 เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 24M1, 24M2, 30M1, และ 30M2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว SS เป็นเวลา 7 วัน | 62 |
| 4.10 เชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ เป็นเวลา 28 วัน | 62 |
| 4.11 เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 0M, 3M1, 3M2, 3M3, 6M1, 6M2, 9M1 และ 9M2 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ เป็นเวลา 28 วัน | 63 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.12 เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 9M3, 9M4, 12M1, 12M2, 15M1, 15M2, 18M1 และ 18M2 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ เป็นเวลา 28 วัน..... 64

4.13 เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 24M1, 24M2, 30M1, และ 30M2 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ เป็นเวลา 28 วัน..... 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

การกลายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติและเกิดจากการชักนำให้เกิดขึ้นโดยมีปัจจัยมาจากการใช้รังสีหรือสารเคมี ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจีโนไทป์ (genotype) สิ่งมีชีวิตที่ได้อาจมีทั้งลักษณะที่ดีขึ้นหรือเลวลง ในปัจจุบันกระบวนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ดังนั้นจึงนำกระบวนการกลายพันธุ์มาปรับใช้ปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน เช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* เพื่อทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสเพิ่มมากขึ้น (Navalaninen, 1981) หรือการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 เพื่อทำให้เกิดการผลิตสารสีได้มากขึ้นในการเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Lin และ Iizuka, 1982) เป็นต้น

ในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้สีผสมอาหารกันอย่างแพร่หลาย เพื่อตกแต่งสีสันของอาหารให้น่ารับประทานมากขึ้น เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมขนมหวาน อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ ฯลฯ ในปัจจุบันผู้บริโภคหันมานิยมใช้สารสีที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น เนื่องจากมีความปลอดภัยมากกว่าสารสีที่ได้จากสารเคมี สารสีที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ สารสีที่ได้จากจุลินทรีย์หรือจากพืชและสัตว์ ซึ่งสารสีที่ได้จากจุลินทรีย์นั้นมีข้อดีกว่าสีที่ได้จากพืชในแง่ของปริมาณการผลิตสามารถปรับปรุงการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสีได้มากกว่า โดยไม่ต้องใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงมาก เนื่องจากจากจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็วและสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโดยการชักนำให้เพิ่มการสร้างสารสีด้วยวิธีทางพันธุกรรมได้ง่าย (กังสดาร, 2538) เช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี (NTG) ได้ทำการชักนำกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในการเลี้ยงบนอาหารแข็ง พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 สามารถสร้างสารสีแดงและสีเหลืองเพิ่มมากขึ้น (Lin และ Iizuka, 1982) เป็นต้น

เชื้อรา *Monascus* sp. เป็นเชื้อราที่มีการศึกษากันมาก ซึ่งมีความสามารถในการผลิตสารสีที่นำมาใช้ในการผสมอาหารได้และมีความปลอดภัย นอกจากนี้สารสีที่เชื้อราผลิตขึ้นบางชนิดยังมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญหรือเป็นประโยชน์ต่อร่างการมนุษย์ (บุษบา, 2540)

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา *Monascus* sp. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารสี โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 (สายพันธุ์พ่อแม่)
2) ศึกษาการเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างสารสีแดงระหว่างเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ โดยใช้อาหารที่แตกต่างกัน
3) ศึกษาการสร้างสารซิตรินินของเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่กับเชื้อกลายพันธุ์

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ศึกษาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 โดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตที่เวลาแตกต่างกัน
2) เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างสารสีแดงระหว่างเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ ซึ่งเปรียบเทียบที่เวลาต่าง ๆ โดยวัดด้วยเครื่องวัดความเข้มของแสง (Spectrophotometer) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตร และเปรียบเทียบอาหารที่แตกต่างกันระหว่างอาหารเหลว (SS medium) และอาหารแข็งธัญพืช (ข้าวเสาไห้)
3) ศึกษาการสร้างสารซิตรินินของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และกลายพันธุ์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้สายพันธุ์กลายที่อาจมีคุณสมบัติในการผลิตสารสีแดงเพิ่มมากขึ้น
2) ได้ทราบสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและผลิตสารสีแดงได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อรา *Monascus* sp.

*Monascus purpureus* เป็นเชื้อราที่พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1884 โดย Van Tieghem แบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยาและความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ *Monascus pilosus, Monascus purpureus, Monascus ruber* และ *Monascus floridanas* สามารถเจริญได้ดีในอาหารแข็ง (ข้าวแดง) เพื่อใช้ในการปรุงแต่งสีไวน์ เต้าหู้ยี้ ใช้ในการถนอมอาหารประเภทเนื้อ ใช้ในการรักษาโรค รวมทั้งเป็นสีผสมอาหาร และเครื่องสำอาง ต่อมาผลิตเพื่อใช้ในทางการค้าในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวันและจีน

*Monascus barkari* ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ที่รู้จักกันดีในประเทศจีนว่า Samau ต่อมาเริ่มมีการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว ในปี ค.ศ. 1973 โดย Lin ได้แยกเชื้อราจากข้าวแดงจากต่างประเทศต่าง ๆ ในแถบเอเชียใต้ และพบว่าเชื้อราเหล่านี้สร้างสีในอาหารเหลวได้เช่นกัน

ต่อมาได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการสร้างสารสีเพิ่มมากขึ้น โดยใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) หรือใช้รังสีต่าง ๆ

## 2.2 ประวัติการใช้เชื้อรา *Monascus* sp.

การใช้เชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารและยาพื้นบ้านในประเทศตะวันออก มีมานานเป็นเวลาหลายร้อยปีในยุโรปและอินโดนีเซีย แต่สำหรับชาวตะวันตกเชื้อรา *Monascus* sp. กลับเป็นที่รู้จักกันในฐานะเชื้อราปะปนในธัญพืช ธัญพืชหมัก (Silage) และสารอื่น ๆ เชื้อรานี้สามารถเจริญบนข้าวนึ่ง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมโดยย่อยข้าวจนข้าวนุ่ม ในขณะเดียวกันก็สร้างสีแดงเพิ่มขึ้น ข้าวแดงมีชื่อเรียกต่าง ๆ กันมากมาย คือ ข้าวแดง (Red rice) ข้าวแดงจากจีน (Chinese red rice) อังคัก (Ang-kak) แอนแคก (Ankak) แองคา (Anka) อังคเวค (Aangquac) เบนนิ-โคจิ (Beni-koji) และอกา-โคจิ (Aka-koji)

การผลิตข้าวแดงมีมานานในประเทศจีน และทดลองแยกเชื้อที่ได้จากประเทศจีนจนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่ให้สีแดง คือ *M. purpureus* ต่อมาได้มีการทดลองใช้เชื้อข้าวแดงทำการปรับปรุงจนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพพอควร โดยใช้เชื้อราแดงและสับสเตรท (Substrate) ที่เหมาะสม ภายหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มีการสนใจที่จะศึกษาสายพันธุ์ราที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (Submerged cultivation) ต่อมามีผู้ประสบผลสำเร็จในการผลิตสีในอาหารเหลว

## 2.3 การจัดจำแนกเชื้อราโมแนสคัส (*Monascus* sp.)

อาณาจักร : Fungi

วงศ์ : *Monascaceae*

กลุ่ม : *Ascomycetes*

กลุ่มย่อย : *Plectomycetidae*

อันดับ : *Eurotiales*

จีนัส : *Monascus*

รูปที่ 2.1 ลักษณะการเจริญของ *Monascus* sp. บนอาหารวุ้น

ที่มา : จักรพงษ์ (2557)

## 2.4 ลักษณะและรูปร่างเชื้อรา *Monascus* sp.

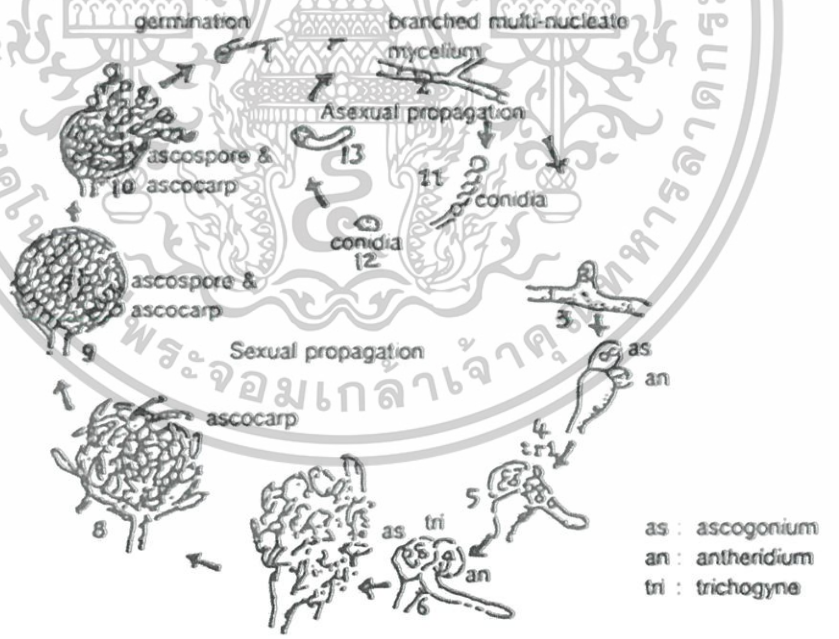
เชื้อรา *Monascus* sp. เส้นใยจะมีผนังกั้น (Septate) มีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย และมักจะเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ (Sexual) และไม่อาศัยเพศ (Asexual) เส้นใยเมื่ออายุอ่อนจะมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วง

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual Reproduction) จะมีโคนิดิโอฟอร์ (Conidiophore) ทำหน้าที่สร้างโคนิเดีย (Conidia) โดยโคนิเดียมีลักษณะเป็นทรงกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือติดต่อกันเป็นลูกโซ่ก็ได้ โคนิเดียมักจะไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีแดง การงอกของโคนิเดียจะมากขึ้นหรือน้อยลงนั้น ขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร อายุของสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง แสงและอุณหภูมิ โดยทั่วไปโคนิเดียจะงอกภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อมีอุณหภูมิและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความชื้นที่เหมาะสมด้วยการสร้างท่องอก (Germ-tube) ขึ้นมา 1 อันหรือ 2 อัน หรือบางครั้งอาจสร้างมากกว่า 6 อัน ซึ่งการงอกของโคนิเดียนั้นสามารถกระตุ้นได้ด้วยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual Reproduction) ของเชื้อรา *Monascus* sp. คล้ายกับเชื้อราอื่นในกลุ่ม *Ascomycetes* คือ มีการสร้างเพอริทีเซียม (Perithecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (Ascocarp) มีรูปร่างลักษณะกลม สร้างบนก้าน (Stalk) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ โดยแอสโคคาร์ปจะเกิดขึ้นบนเส้นใย ซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (Homothallic) โดยมีการสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิด คือ แอนทอริเดียม (Antheridium) และแอสโคโกเนียม (Ascogonium) เกิดการหลอมรวมเซลล์ (Fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม จะมีการวิวัฒนาการต่อไปอีก คือ แบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (Meiosis) ตามมาด้วยไมโตซีส (Mitosis) และมีนิวเคลียสลูก (Daughter nuclei) จากการแบ่งตัวมีการขยายผนังเซลล์รวมออกและเกิดการสร้างแอสโคคาร์ปที่เรียกว่า เพอริทีเซียม ซึ่งภายในเพอริทีเซียมนั่นจะมีแอสโคสปอร์ (Ascospores) มากมาย โดยแอสโคสปอร์รวมอยู่ภายในแอสคัส (Ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์ออกมาเพื่อให้งอกเป็นเส้นใหม่ขึ้น วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp. แสดงดังรูปที่ 2.2



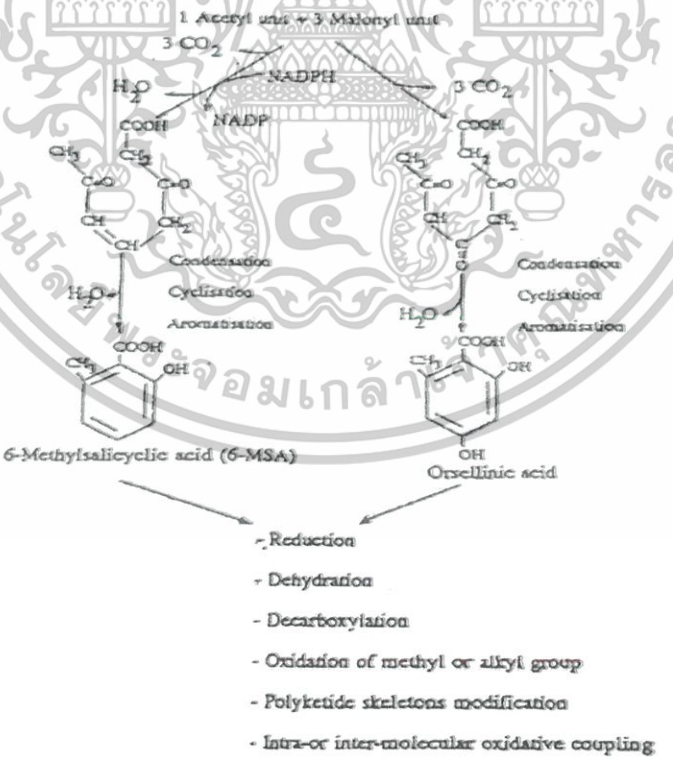

**รูปที่ 2.2** วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp.

ที่มา : บุษบา (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 สารสีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* sp.

สารสีจากเชื้อรา *Monascus* sp. จัดอยู่ในประเภทโพลีคีไทด์ (Polyketide) เกิดจากการรวมตัวกัน (Condensation) ของ Acetyl unit 1 หน่วย กับ Malonyl unit 3 หน่วยขึ้นไป ได้เป็นสารตั้งต้น (Primer) ละปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ในการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์นั้น สายของโพลีคีไทด์จะยาวขึ้นตามจำนวนของคาร์บอน 2 หน่วย ที่มาจาก Malonyl unit ที่ถูกเติมเข้าไปในสายไพร์เมอร์เกิดเป็น Triketide Tetraketide Pentaketide และ Polyketides ตามลำดับ ต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยาที่มีโครงสร้างเป็นรูปวงแหวน (Cyclization) และเกิดปฏิกิริยาที่เปลี่ยนไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ได้ต่อกันเป็นวงให้เป็นวง (Aromatization) ได้เป็นสาร 6-Methylsalicylic acid หรือ Orsellinic acid ซึ่งเป็นสารTatraketide เริ่มต้นที่จะนำไปสู่การสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์อื่น ๆ ต่อไป เมื่อได้สารเริ่มต้นแล้วปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อไปขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ เช่น อาจมีการเติมหรือดึงออกซิเจนออกจากโครงสร้างของสาร เกิดปฏิกิริยา Decarboxylation มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือย้ายหมู่ต่าง ๆ ภายในโมเลกุลของสาร (Inter-molecular) หรือเกิดปฏิกิริยาคู่ควบ (Oxidative coupling) ระหว่างพันธะ C-C หรือ C=O เป็นต้น แสดงดังรูปที่ 2.3




**รูปที่ 2.3** การเกิด 6-MSA และ orsellinic จาก Acetyl unit และ Malonyl unit
ที่มา : นิสา (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 สารสีของเชื้อรา *Monascus* sp.

สารสีหรือเม็ดสีจากเชื้อรา *Monascus* sp. เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) โครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่ม Azaphilones หรือ Aminophilones กลไกการผลิตเป็นแบบสัมพันธ์กับการเจริญ (Growth-associated) และไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (Non growth-associated) ทั้งนี้เชื้อรา *Monascus* sp. สามารถผลิตสารสีหรือเม็ดสีอิสระ (Free form) ได้ 6 ชนิด แบ่งตามลักษณะปรากฏของสีได้เป็น 3 ประเภท คือ สีแดง สีส้ม และสีเหลือง โดยสีแดงประกอบด้วยรูโบรบังทามีน (Rubropunctamine) ($C_{21}H_{23}O_4N$) และโมนาสโครูบรามีน (Monascorubramine) ($C_{23}H_{27}O_4N$) สีส้มประกอบด้วยรูโบรบังทาทิน (Rubropunctatin) ($C_{21}H_{22}O_5$) และโมนาสโครูบิน (Monascorubrine) ($C_{23}H_{26}O_5$) สีเหลืองประกอบด้วยโมนาสซิน (Monascin) ($C_{21}H_{26}O_5$) และอังคักฟลาวิน (Ankaflavin) ($C_{23}H_{30}O_5$)

### 2.6.1 กลไกการสังเคราะห์สารสีของเชื้อรา *Monascus* sp.

#### 2.6.1.1 สารสีแดง

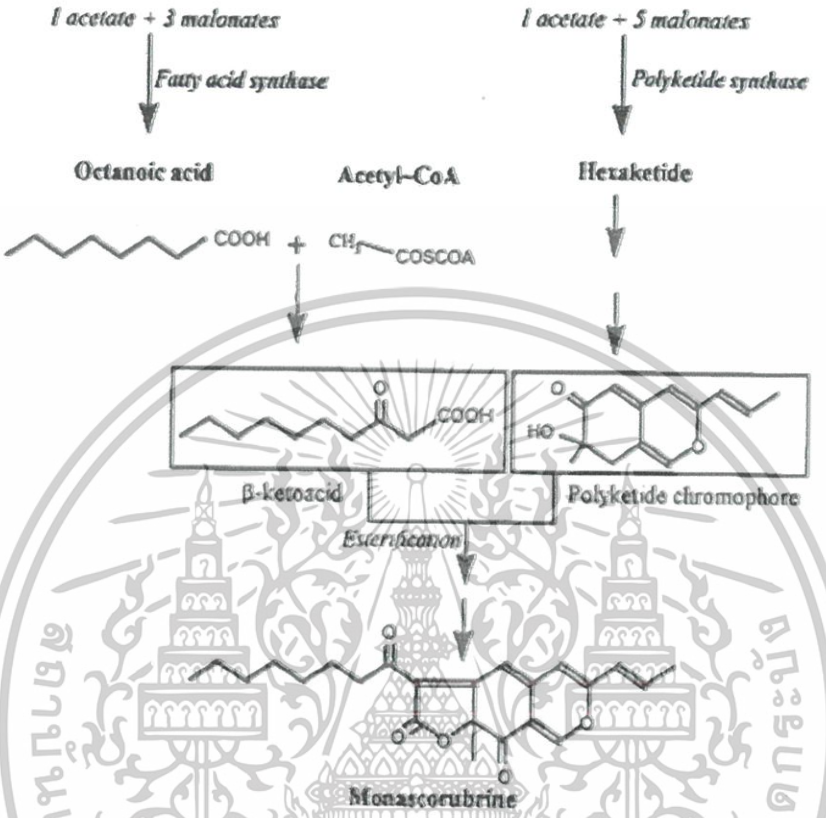
การสังเคราะห์สารสีแดงเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสีส้มและหมู่เอมีน โดยไนโตรเจนจากกรดอะมิโน โปรตีน เปปไทด์ หรือกรดนิวคลีอิกจะเข้าแทนที่ Pyronoid oxygen atom ของสารสีส้มด้วยปฏิกิริยา Schiff base formation และ Dehydration เปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารสีจาก Rubropunctatin หรือ Monascorubrin เป็น Rubropunctamine หรือ Monascorubramine ตามลำดับ อีกทั้งการมีองค์ประกอบของอะมิโนในโครงสร้างสีแดงทำให้สีแดงมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ (Extracellular hydrophilic pigments)

#### 2.6.1.2 สารสีส้ม

สารสีส้มมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน (Intracellular lipophilic pigments) หรือละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งกลไกการสังเคราะห์สารสีส้มนั้นจะต้องใช้ทั้งวิถีการสังเคราะห์ Polyketide และกรดไขมันร่วมกัน โดย Hexaketide คือ สารตั้งต้นของโครงสร้างหลักที่มีคุณสมบัติในการให้สี (Chromophore structure) ซึ่งจะสังเคราะห์ผ่าน Polyketide pathway โดย Hexaketide เกิดจากปฏิกิริยา Condensation ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 5 โมเลกุล จากนั้น Hexaketide เกิดปฏิกิริยา Methylation และ Hydroxylation จนกลายเป็น Polyketide chromophore ตามลำดับ ส่วนวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันจะผลิตกรดไขมันขนาดกลางที่มีจำนวนคาร์บอน 6 หน่วย (Hexanoic acid) หรือ 8 หน่วย (Octanoic acid) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา Condensation ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Malonyl-CoA 3 โมเลกุล ผ่าน Fatty acid pathway จากนั้นทั้งสองส่วนมาเชื่อมต่อกันด้วยปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (tran-esterification) จึงได้สารสีส้มคือ Rubrapunctatin และ Monascorubrine ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 2.4




รูปที่ 2.4 กลไกการสังเคราะห์สารสีส้ม

ที่มา : Hajjaj และคณะ (2000)

2.6.1.3 สารสีเหลือง

กลไกการสังเคราะห์สารสีเหลืองยังไม่มีใครอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่มีทฤษฎีที่มีความเป็นไปได้อยู่ 2 ทฤษฎี คือ ทฤษฎีที่ 1 ระบุว่าสารสีส้ม คือ Rubropunctatin หรือ Monascorubrin เกิดปฏิกิริยาปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้สารสีเหลือง คือ Monascin และ Ankaflavin ตามลำดับ ส่วนอีกทฤษฎีหนึ่งระบุว่าการสังเคราะห์สารสีเหลืองนั้นเกิดจากกระบวนการทางชีวภาพของเชื้อรา *Monascus* sp. เอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7 อนุพันธุ์ประเภทต่าง ๆ จากเชื้อรา *Monascus* sp.

การศึกษาต่อ ๆ มาได้พบสารเมตาบอไลท์หลายชนิดที่น่าสนใจ และมีค่าทางเศรษฐศาสตร์จากเชื้อรา *Monascus* sp. ดังตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1** สารเมตาบอไลท์ที่มีประโยชน์จากเชื้อรา *Monascus* sp.

| เอนไซม์ (Enzyme) | เมตาบอไลท์ปฐมภูมิ (Primary metabolites) | เมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) |
|---|---|---|
| 1. กลูโคอะมิเลส | 1. กรดอินทรีย์ | 1. สารสี (แดง,ส้ม,เหลือง) |
| 2. โปรติเอส | 2. ไขมัน | 2. สารปฏิชีวนะ |
| 3. แอลฟากาแลคโตซิเดส | 3. เอทิลแอลกอฮอล์ | 3. สารลดโคเลสเตอรอล หรือ monacolins |
| 4. แอลฟา-อะมิเลส | 4. กรดไขมัน | 4. สารตกตะกอน (flocculants) |
| 5. ไรโบนิวคลีเอส | | 5. ยาลดความดันโลหิต (antihypertensives) |
| | | 6. ยาพื้นบ้านของจีนรักษาโรคอาหารไม่ย่อย,โรคบิด,กล้ามเนื้อฟกช้ำ |
| | | 7. คูมาริน (coumarin) รักษาโรคด่างขาว |
| | | 8. สารถนอมอาหารประเภทเนื้อ |
| | | 9. โคเอนไซม์ $Q_{10}$ |
| | | 10. วิตามินบี 2 |
| | | 11. สารยับยั้งการกลายพันธุ์ |

ที่มา : ดัดแปลงมาจากบุษบา (2542)

## 2.8 การใช้ประโยชน์สีจากเชื้อรา *Monascus* sp.

การใช้ประโยชน์ของสีธรรมชาติชนิดนี้มีมานานกว่าพันปีในประเทศจีน และมีรายงานกล่าวถึง ดังตารางที่ 2.2 สิทธิบัตรการใช้ประโยชน์สีจากเชื้อรา *Monascus* sp. มีมากกว่า 50 ฉบับ จดในประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส และเยอรมัน ในขณะที่ระหว่างปี ค.ศ. 1971 พบเพียง 39 ฉบับ โดยจดในญี่ปุ่น 30 ฉบับ สหรัฐอเมริกา 4 ฉบับ และยุโรป 5 ฉบับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.2** การใช้ประโยชน์จากเชื้อรา *Monascus* sp.

| การใช้ประโยชน์ | ชนิด |
|---|---|
| 1. เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ | - สาเก (sake หรือ rice wine)<br>- ไวน์แดง<br>- เหล้าจีน |
| 2. เครื่องดื่มไม่มีแอลกอฮอล์ | - น้ำหวาน<br>- น้ำผลไม้<br>- นม นมเปรี้ยว |
| 3. อาหาร | - แยมถั่วเหลือง (bean jam)<br>- เต้าหู้ยี้ (Chinese cheese หรือ sufu)<br>- เนื้อเทียม (artificial meat products)<br>- ไส้กรอก (sausages)<br>- แฮม (ham)<br>- ซอสมะเขือเทศ (ketchup) |
| 4. อื่น ๆ | - โคจิ ซีอิ๊ว<br>- ยาเม็ดและยาน้ำ<br>- เครื่องยาจีน<br>- เครื่องสำอาง<br>- Aperitifs ขนมต่าง ๆ<br>- ผ้าไหมและรังไหม |

**ที่มา** : ดัดแปลงจากบุษบา (2542)

## 2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสีของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว (Submerged cultivation) และบนอาหารแข็งธัญพืช (Solid state cultivation)

### 2.9.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสีของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว

#### 2.9.1.1 แหล่งคาร์บอน

Lin (1973) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารเหลวที่มีคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่าแป้งละลายน้ำ (Soluble starch) กาแลคโทส และมอลโทส เหมาะสมกับการผลิตสี ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lin และ Demain (1991) พบว่าเมื่อใช้ Defined medium เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งจะเหมาะสมต่อการสร้างสีของเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB 6042 ได้แก่ มอลโทส กลูโคส และฟรุคโทส ตามลำดับ ในขณะที่การเจริญของเชื้อรานี้จะดีในแป้ง กลูโคส และมอลโทส ตามลำดับ แต่ไม่พบการเจริญในกาแลคโทส แลคโทส และซูโครส

Chiu และ Chan (1992) พบว่าเติมน้ำมันข้าวโพด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสังเคราะห์เพื่อเลี้ยง *M. purpureus* จะช่วยให้ค่าสีที่ได้เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า แต่การเจริญของเชื้อราจะลดลงครึ่งหนึ่ง

Chen และ John (1994) พบว่าถ้าเลี้ยง *M. purpureus* ในอาหารที่มีคาร์บอนเข้มข้นสูง 50 กรัม/ลิตร ในสภาพไร้อากาศจะมีการสร้างเอทานอลเกิดขึ้น

บุษบา และ วรรณภา (2527) ได้รายงานเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลังในการผลิตสีจากเชื้อรา *Monascus* sp. โดยได้ทำการคัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี

**2.9.1.2 แหล่งไนโตรเจน**

Lin (1973) พบว่า *Monascus* sp. F-2 สามารถผลิตสีได้ดีในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารไนเตรท และกลูตาเมต ส่วนแหล่งสารอินทรีย์ที่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารสี ได้แก่ เปปโตน และสารสกัดยีสต์

Carels และ Shepherd (1977) พบว่าสารสีส้ม Monascorubrine และ Rubrapunctatin สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางชีวภาพ ส่วนสีอื่น ๆ เช่น สีแดงและสีเหลือง เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยขึ้นกับสภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อเมื่อแหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดยีสต์ จะผลิตสีแดงอย่างเดียวเนื่องจากอาหารจะมีกรดอะมิโนมากพอเมื่อเชื้อเจริญจะทำให้พีเอชสูงขึ้น สารสีสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระและกรดอะมิโนหรือ NH-group ภายในเส้นใย เปลี่ยนเป็นกลุ่มสารอนุพันธุ์เอมีนได้และไม่พบสีส้มหรือสีเหลือง ส่วนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรตจะได้สีแดงและสีส้ม อาหารนี้จะไม่มีกรดอะมิโนอิสระ ถึงแม้พีเอชจะสูงขึ้น สารสีจะสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนหรือ NH-group ภายในเส้นใยได้เท่านั้น จึงทำให้สารสีส้มยังเหลืออยู่ ขณะที่อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไนเตรต จะทำให้พีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้สารสีที่ผลิตได้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ NH-group ภายในเส้นใยได้ ผลที่เกิดขึ้นคือจะมีการสะสมของ Monascorubrine และ Rubrapunctatin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้สารสีส้ม สารสีเหลืองสามารถเกิดขึ้น โดยการเกิดออกซิเดชันของ Monascorubrine หรือ Rubrapunctatin กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เป็น Monascin หรือ Ankaflavin

Wong และคณะ (1981) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนสำคัญต่อการสร้างสารสี กลูโคสที่มีความเข้มข้นระหว่าง 40-200 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมไนเตรตที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 กรัม/ลิตร จะทำให้ *M. purpureus* ผลิตสารสีแดงได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตสูงกว่า 50 กรัม/ลิตร จะยับยั้งการเจริญและการผลิตสี

Yongsmith และคณะ (1993) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ สารสกัดยีสต์, เปปโตน และสารสกัดมอลต์ต่อการเจริญและการสร้างสีเหลืองของเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 พบว่าเปปโตนมีผลโดยตรงต่อการกระตุ้นการสร้างสารสี แต่สารสกัดยีสต์ส่งเสริมการเจริญมากกว่าการสร้างสารสี ส่วนสารสกัดมอลต์มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารสีน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อใช้เปปโตนเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ กับกรดกลูตามิกเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จะสร้างสารสีเหลืองสูงสุด เมื่อมีพีเอชเป็นกรด

Lin และ Demain (1994) พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และโมโนโซเดียมกลูตาเมตเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB 6042 ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสี คือ โมโนโซเดียมกลูตาเมต ที่ความเข้มข้น 1.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ร่วมกับมอลโทสเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์

Juzlova และคณะ (1994) รายงานถึงการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* CCM8152 ในอาหารเหลวสังเคราะห์ พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการสังเคราะห์สารสีส้ม ในขณะที่สารประเภทกรดอะมิโนช่วยในการสังเคราะห์สารสีแดงและสีเหลือง นอกจากนี้มีการเลี้ยงเชื้อรา 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกใช้มอลโทสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนขั้นที่ 2 ใช้เอทานอลจะทำให้เชื้อราสามารถใช้ในการสังเคราะห์สารสีได้ดีขึ้น

วรรณภา (2529) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงของเชื้อรา *Monascus* sp. โดยศึกษาเชื้อรา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. purpureus* KB21035, KB11304 และ KB20322 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใช้มันสำปะหลังได้ดี การผลิตสารสีแดงในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเปปโตนและแป้งถั่วเหลืองที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่าสายพันธุ์ KB21035 และ KB20322 ผลิตสารสีแดงได้น้อยกว่า ในอาหารที่มีแป้งถั่วเหลืองน้อยกว่าเปปโตน ขณะที่สายพันธุ์ KB11304 ผลิตสารสีแดงได้ดี ในอาหารที่มีแป้งถั่วเหลืองมากกว่าเปปโตน ซึ่งเป็นรายงานแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีการใช้ถั่วเหลืองไขมันเต็ม (full fat soy flour) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลดีต่อการผลิตสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp.

สมชาย (2536) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลืองของเชื้อราสายพันธุ์กลาย *Monascus* sp. KB20M10.2 พบว่าแหล่งไนโตรเจนประเภทสาร อนินทรีย์ที่ให้สารสีเหลืองได้ดีที่สุด คือ โพแทสเซียมไนเตรต แคลเซียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต ตามลำดับ ซึ่งโพแทสเซียมไนเตรตจะให้สารสีเหลือง 216 หน่วย/มิลลิลิตร ส่วนแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ที่ให้สารสีเหลืองสูงสุด คือ แป้งถั่วเหลือง เปปโตน สารสกัดเนื้อ สารสกัดยีสต์ และสารสกัดมอลต์ ซึ่งจะให้สารสีเหลืองเท่ากับ 674.2, 434.7, 392.5, 211.7 และ 20.7 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ และศึกษาความเข้มข้นของแป้งถั่วเหลืองที่เหมาะสม พบว่าความเข้มข้นที่ให้สารสีเหลืองสูงสุด คือ 5.0, 4.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การใช้แป้งถั่วเหลืองเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 3.0 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการผลิตสารสีเหลืองของ *Monascus* sp. KB20M10.2

**2.9.1.3 อุณหภูมิ**

Manandhar และ Apinis (1971) ศึกษาอัตราส่วนการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. 37 สายพันธุ์บนอาหาร malt extract agar พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ คือ 45 องศาเซลเซียส การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญโดยทั่วไปที่อุณหภูมิ 25 และ 40 องศาเซลเซียส จะเจริญช้า ส่วนที่อุณหภูมิ 18 และ 45 องศาเซลเซียส จะเจริญช้ามาก การสร้างสารสีจะสร้างได้ดีที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส

Lin (1973) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารเหลว นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 27, 32, 37 และ 40 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 3 วัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการสร้างสารสีได้ดีที่สุดคือ 32 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 27 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิมากกว่า 32 องศาเซลเซียส จะทำให้ผลิตสีลดลงอย่างรวดเร็ว

Lee และคณะ (2002) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ที่สามารถสร้างสีแดงและสารโมนาโคลิน เค (Monacolin K) ได้ในปริมาณที่สูง โดยที่อาหารเหลวใส่เชื้อราลงในถัง 5 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วัน นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และใช้ HPLC วิเคราะห์ปริมาณสารโมนาโคลิน เค พบว่าในอาหารเหลวมีสารโมนาโคลิน เค ต่ำ (5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และยังพบอีกว่าความชื้นและปริมาณอากาศมีผลต่อการผลิตสีและสารโมนาโคลิน เค

**2.9.1.4 ระยะเวลากับการผลิตสีและการเจริญของเซลล์**

Lin (1973) ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารเหลวซึ่งมีผงข้าว 5 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4.7H_2O$ เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ $KH_2PO_4$ เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ บรรจุอาหาร 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 5 วัน พบว่าการผลิตสีมีความสัมพันธ์กับการเจริญ

Kim และคณะ (2002) ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมลักษณะสัณฐานวิทยาและการสร้างสารสีแดงของเซลล์ *Monascus* sp. โดยเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากนั้นเพิ่มขนาดเป็น 300 ลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 350 รอบ/นาที หรือน้อยกว่า พบว่าเกิดการรวมกันของเส้นใยไมซีเลียม ให้ปริมาณสีแดงเท่ากับ 37.5 ยูนิต (OD Units) ซึ่งเส้นใยที่มีลักษณะยาวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น และให้ผลเช่นเดียวกับการเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจาก 350 เป็น 700 รอบ/นาที วัดปริมาณสีแดงสูงสุดเท่ากับ 220 ยูนิต เมื่อเซลล์มีเส้นใยไมซีเลียมเป็นสายสั้นลง เนื่องจากเกิดความเสียหายจากแรงเฉือนที่เขย่าความเร็วรอบ 500 รอบ/นาที

**2.9.1.5 พีเอช**

Lin (1973) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 2.0-10.0 เชื้อรา *Monascus* sp. F-2 จะมีการผลิตสีสูงสุดในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 และพีเอชสุดท้ายของอาหารหลังการบ่มลดลงเป็น 5.8 เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน เชื้อราส่วนใหญ่จะผลิตสีแดงได้มากกว่าเมื่อมีพีเอชต่ำกว่า 6.0 เมื่อบ่มเป็นเวลานาน 17 วัน โดยเชื้อรา *M. purpureus*

Yongsmith และคณะ (1993) ได้ศึกษาเชื้อรา *M. barkari* KB10 สามารถสร้างสีเหลืองได้ดีในอาหารที่มีพีเอชต่ำ 2.5-4.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.9.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสีของเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็งธัญพืช

#### 2.9.2.1 สายพันธุ์เชื้อรา

เชิดชัย และคณะ (2519) ได้ศึกษาเชื้อราทั้งหมด 4 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* K 001 ให้สีแดงเข้มกว่าตัวอื่น ๆ

อรัญ และคณะ (2530) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสีของอังคัก จากการทดสอบ *M. purpureus* 9 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่ให้สีแดงได้สูงสุด ได้แก่ *M. purpureus* CMU-KU รองลงมาคือ *M. purpureus* TISTR 3090 และ *M. purpureus* CMU-FST ตามลำดับ

#### 2.9.2.2 สับสเตรต

- ข้าว

บุษบา (2518) ได้ทดลองการสร้างสีของเชื้อรา *M. purpureus* กับข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ของไทย พบว่าข้าวจ้าวพันธุ์หอมมะลิและข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูให้สีเข้มใกล้เคียงกันแต่ข้าวเหนียวให้กลิ่นหอมมากกว่าข้าวหอมมะลิ และข้าวจ้าวพันธุ์หอมมะลิและข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูให้ผลความเข้มของสีใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ญี่ปุ่น ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ ของไทย คือ พันธุ์เสาไห้ พันธุ์ธรรมดา ฯลฯ นั้นล้วนแต่ให้สีและความหอมน้อยกว่ามาก

เชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวมีเพียงพอต่อการสร้างสารสี จึงไม่จำเป็นต้องเติมเปปโตน

อรัญ และคณะ (2531) รายงานว่าปริมาณอะไมโลส ในเมล็ดข้าวที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตข้าวแดงแตกต่างกันไปด้วย พบว่าพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูงกว่า 24 เปอร์เซ็นต์ เช่น พันธุ์เหลือง 148 กข23 กข25 เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงมากกว่าพันธุ์ กข7 และขาวดอกมะลิ 105

พัชรีย์ (2545) ศึกษาพันธุ์ข้าว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้ามหอมมะลิแม่จัน ข้าวหอมมะลิสุรินทร์ ข้าวซ้อมมือ และข้าวจ้าวชัยนาท พบว่าข้าวจ้าวชัยนาทให้สีแดงมากที่สุด จึงนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเพื่อเติมแต่งสีให้กับไส้กรอก

จุลยุทธ (2546) ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ต่อการสร้างซิตรินินใน ข้าวแดง ได้แก่ ข้าว 3 ชนิด และเชื้อรา *M. purpureus* 4 สายพันธุ์ ผลของการเติมโซเดียมอะซิเตต และเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวแบบให้อากาศและไม่ให้อากาศต่อการสร้างซิตรินินและสารสีแดง พบว่าชนิดของข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสต่างกันและสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. purpureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีผลต่อสารสีแดงและซิตินินในข้าวแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ในข้าวหอมมะลิที่หมักโดยใช้เชื้อรา *M. purpureus* ATCC 16365 จะให้ค่าสีแดงสูงสุดที่ 623 ยูนิต/กรัม ในข้าวช้อมมือข้าวเจ้าพิจิตร และข้าวหอมมะลิที่หมักโดยเชื้อรา *M. purpureus* FTCMU ให้ปริมาณซิตรินินสูงสุดเท่ากับ 4,400, 2,200 และ 950 ppm ตามลำดับ

**- เมล็ดธัญพืช และอื่น ๆ**

พลายแก้ว และบุษบา (2534) ได้ศึกษาแหล่งสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสีของเชื้อรา *Monascus* sp. เปรียบเทียบกับการผลิตบนข้าว โดยใช้เมล็ดข้าวโพด มันเทศ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ถั่วเขียว ข้าวฟ่าง ขนมปัง แทนข้าวต่อการเจริญ การสร้างสารสี และการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* พบว่าขนมปังให้ค่าสีแดงมากที่สุด รองลงมาคือมันฝรั่ง และปลายข้าวหอมมะลิ นอกนั้นให้สีไม่ดีนัก ส่วนการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* พบว่าถั่วเหลืองให้ปริมาณสปอร์สูงสุด รองลงมาคือ ถั่วเขียว ขนมปัง และปลายข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ

**2.9.2.3 พีเอช**

Johns และ Stuart (1991) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสารสีได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 6.0 เมื่อเทียบกับพีเอช 3.4 และ 7.0

Teng และ Feldheim (2001) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของข้าวในระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อรา *M. purpureus* เพื่อผลิตอังคักและสารสี จากการทดลองพบว่าช่วง 5 วันแรก มีค่าพีเอชลดลง และมีปริมาณสีน้อยมาก ช่วง 5-15 วัน ของการหมักปริมาณสตาร์ช (Starch) ลดลงเรื่อย ๆ ค่าพีเอชลดลงต่ำสุด

พลายแก้ว และบุษบา (2534) พบว่าสภาวะเป็นกรดไม่มีผลต่อการสร้างสีเหลืองของ *M. baikari*

**2.9.2.4 อัตราส่วนของก๊าซ**

Han และ Mudgett (1992) เป็นคนแรกที่รายงานว่าสัดส่วนของแก๊สออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ มีส่วนต่อการผลิตข้าวแดงด้วย โดยพบว่าความดันแก๊สออกซิเจนต่อความดันคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.50 ต่อ 0.02 บรรยากาศ (atm) จะมีผลดีต่อการสร้างสีแดงของอังคักมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.9.2.5 อุณหภูมิ**

บุษบา (2542) พบว่าที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส แต่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสีของเชื้อรา *Monascus* sp.

**2.9.2.6 ความชื้น**

Lotong และ Suwanarit (1990) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงของเชื้อรา *Monascus* sp. NP 1 คือ 32.6 เปอร์เซ็นต์ แต่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 39.6 เปอร์เซ็นต์ อัตราการสร้างสีจะลดลง ความชื้นต่ำเกินไปทำให้เชื้อราเจริญได้ไม่ดี ส่งผลให้การสร้างสีไม่ดีด้วย ความชื้นสูงเกินไปเกิดการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสมาก เกิดการสะสมกลูโคสมายับยั้งการสร้างสี จึงได้พัฒนาสายพันธุ์กลายที่ทนต่อกลูโคสได้สูง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ในการผลิตข้าวแดง

Lee และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ที่สามารถสร้างสีแดงและสารโมนาโคลิน เค ได้ในปริมาณที่สูง ได้นำเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารแข็ง คือ Tsai-Lai rice บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีความชื้นสัมพัทธ์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าจากเชื้อรา *Monascus* sp. 72 สายพันธุ์ สายพันธุ์ *M. purpureus* M15 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่ดีที่สุดในอาหารแข็งสามารถผลิตสีแดงได้มีค่าสีแดง (color value 12) และโมนาโคลิน เค (4 มิลลิกรัม/กรัม)

เชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าความชื้นที่ 60 เปอร์เซ็นต์ นั้นให้ผลดีเมื่อมีการเขย่าหรือการให้อากาศช่วยให้เชื้อราสร้างสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น

รัตนา (2528) พบว่าการหมักข้าวแดงที่มีความชื้นสูงมากไปนั้น เชื้อราจะสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงแต่สร้างสีน้อยลง

พลายแก้ว และบุษบา (2534) ศึกษาวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสีของ *M. kaoliang* ที่ให้สีแดง โดยศึกษาเวลาที่ใช้ในการแช่ข้าวและเวลาสะเด็ดน้ำ และของ *M. barkari* ที่ให้สีเหลืองในสภาพเป็นกรด พบว่าถ้าใช้เวลาแช่ข้าวนาน 8 ชั่วโมง และสะเด็ดน้ำ 5-10 นาที ทำให้ข้าวมีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการสร้างสีแดงของ *M. kaoliang* และสีเหลืองของ *M. barkari* นอกจากนั้นยังพบเพิ่มเติมว่าการแช่ข้าวในน้ำนานเกินไป ทำให้เมล็ดข้าวเกาะกัน และข้าวที่ผึ่งลมมากเกินไป ทำให้ผิวหน้าแห้งเกินไป ไม่เป็นผลดีต่อการสร้างสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.10 การแยกสารสี

วิธีการสกัดสีออกจากเส้นใยนั้นจะแตกต่างกันออกไปทั้งในด้านการใช้ตัวทำละลาย (Solvent) เป็นตัวสกัดและปริมาณความเข้มข้นของสารตัวทำละลายที่ใช้สกัด

Broder และ Kehler (1980) ทดลองใช้เมทานอล (Methanol) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เอทานอล (Ethanol) และอะซิโตน (Acetone) ในการสกัดสีออกจากเส้นใย พบว่าเมทานอลสกัดสีได้ดีที่สุด ซึ่งสีที่สกัดได้จะมีค่าการดูดกลืนแสงเด่นอยู่ 2 สี ที่ความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร (สีเหลือง) และ 500 นาโนเมตร (สีแดง)

Lin (1973) ใช้เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดสีออกจากเส้นใย นำเอาส่วนใสที่กรองได้ไปวัดค่าสีด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

Lin และ Lizuka (1982) มีการวัดค่าสีที่ละลายน้ำได้ (Water soluble) และสีที่ละลายน้ำรวมทั้งละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ได้ด้วย นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และ 500 นาโนเมตร

Sweeny และคณะ (1981) ประสบความสำเร็จจากการแยกสีบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ จากข้าว แสดงดังขั้นตอนต่าง ๆ แสดงในภาพที่ 2.5

ภาพที่ 2.5 การแยกสารสีบริสุทธิ์จากผงข้าวแดง
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Sweeny และคณะ (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

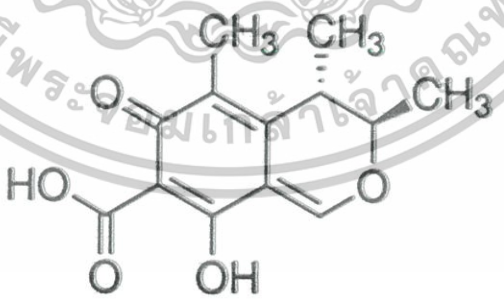
## 2.11 ซิตรินิน (Citrinin)

ซิตรินินเป็นสารพิษจากเชื้อรา ส่วนใหญ่จะพบจากเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่ปนเปื้อนในอาหารประเภทธัญพืช ผลไม้ และถั่ว คนจะได้รับซิตรินินจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเข้าไป

ซิตรินินพบครั้งแรกโดยการแยกจากเชื้อรา *Penicilium citrinum* ในปี 1931 ต่อมาในปี 1951 พบปัญหาข้าวเหลือง "Yellow rice problem" ในข้าวที่ประเทศไทยส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น เพราะมีการปนเปื้อนจากเชื้อรา *Penicilium citrinum* และตรวจพบซิตรินิน จากนั้นพบว่าเชื้อรา *Penicilium* สายพันธุ์อื่นสามารถสร้างซิตรินิน เนื่องจากเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารพิษชื่อโอคราท๊อกซิน เอ (Ochratoxin A, OTA) พบในธัญพืชทั่วไป เช่น ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ จึงไม่ใช่เรื่องที่แปลกที่พบทั้งโอคราท๊อกซิน เอ และซิตรินินพร้อมกัน แต่มีการศึกษาเกี่ยวกับซิตรินินน้อยกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะไม่บ่อยครั้งที่สามารถตรวจพบซิตรินิน เนื่องจากอาจสลายไปในระหว่างขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสกุลอื่นที่สร้างซิตรินิน เช่น *Aspergillus terreus, Aspergillus carnues* และ *Aspergillus niveus* ช่วงแรกของการศึกษาพบว่าซิตรินินมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Antibacterial) แต่ยังมีผลกระทบต่อไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจึงไม่ได้มีการนำสารนี้มาใช้ประโยชน์

### 2.11.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

ซิตรินิน มีชื่อเรียกตามระบบ IUPAC คือ (3R, 4S) – 4,6-dihydro-8-hydroxyl-3,4,5,-trimetyl-6-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid มีโครงสร้าง แสดงดังรูป 2.6




**รูปที่ 2.6** โครงสร้างของซิตรินิน

ที่มา : Sabater-Vilar และคณะ (1999)

ซิตรินิน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 250 กรัม มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{13}H_{14}O_5$ มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองเลมอน มีจุดหลอมเหลว 172 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้เล็กน้อย แต่ละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมอะซิเตด เมทานอลอะซิโตไนไตร์ท เอทานอล และสารละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว สารละลายตัวได้ด้วยแสง (Photodecomposition) สารละลายกรดหรือด่างหรือความร้อนสามารถเกิดสีน้ำตาล เมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอริคคลอไรด์ สีเขียวกับไททาเนียมคลอไรด์ สีแดงคล้ำกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และด่าง ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สามารถทำให้เกิดคีเลต (Chelate) กับโมโนอะซิเตด (Mono-acetate) ไดเอทิล (Diethyl) เมทิลเอสเทอร์ (Methyl ester) และอนุพันธ์ไดไฮโดร (Dihydro derivatives)

**2.11.2 การศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษ**

ซิตรินินเมื่อทดสอบกับสัตว์ทดลอง ได้ค่า $LD_{50}$ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (สำหรับกระต่าย) ซิตรินินทำให้ไตถูกทำลายและมีฤทธิ์อย่างอ่อนกับตับ เพราะความสามารถกรองไขมัน (Fatty filtration) ลดลงผลกระทบอื่นคือทำให้เกิดการขยายตัวของเส้นเลือดก่อให้เกิดการไหลเวียนโลหิตผิดปกติและทำให้หลอดลมหดตัว

ซิตรินินจะเสริมฤทธิ์กับโอคราท็อกซิน เอ และเป็นพิษกับระบบประสาทของหมู เกิดในประเทศเดนมาร์ก สวีเดน นอร์เวย์ และไอร์แลนด์ ซิตรินินเป็นสารพิษต่อตับและไต (Hepatonephrotoxin) พบในเชื้อราสายพันธุ์ทั่วไป และยังเกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิด Endemic Balkan nephropathy ในคนเหมือนกับโอคราท็อกซิน เอ และสารพิษอื่น ๆ ที่มีลักษณะคล้ายกัน แต่อย่างไรก็ตามซิตรินินไม่อันตรายรุนแรงต่อคน เพราะความไม่เสถียรในระหว่างกระบวนการแปรรูป แต่จะมีผลโดยตรงต่อสัตว์ที่บริโภคธัญพืชที่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปใดเลย

มีรายงานการปนเปื้อนลงในอาหารประเภทต่าง ๆ โดยเฉพาะอาหารประเภทเมล็ดธัญพืชและอาหารสัตว์

Sabater-Vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าซิตรินินมีผลต่อการทำงานของไต ซิตรินินจะไปสะสมในไมโตคอนเดรีย และรบกวนระบบการแลกเปลี่ยนอิเล็คตรอนในเซลล์ โดยขึ้นกับค่าพีเอช แต่ไม่มีผลกระทบต่อผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA การเรียงลำดับของโปรตีนและ RNA เมื่อการทำงานของไมโตคอนเดรียผิดปกติไป ทำให้ระดับกลไกลโคเจนในตับลดลง และยับยั้งการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอรอลในตับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.11.3 ความเสถียร (Stability)**

ซิตรินินสลายตัวได้ที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส ในสภาวะปราศจากน้ำ (Anhydrous) แต่จะสลายที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ในสภาวะชื้นปานกลาง (Semi-moist) ดังนั้นความเป็นพิษจะลดลงเมื่อได้รับความร้อนรวมกับความชื้น

Wu และคณะ (1974) จากการศึกษายังพบอีกว่า ซิตรินินสลายได้ในขั้นตอนการทำเบียร์ ถึงร้อยละ 90 โดยผ่านกระบวนการการงอก (Germination) การผสม (Mash) และการทำน้ำเบียร์ (Wort) และยังมีการใช้กรดโพรพิโอนิค (Propionic acid) กับข้าวบาร์เลย์เพื่อทำลายซิตรินินในระหว่างการเก็บรักษา

**2.11.4 ซิตรินินจากเชื้อรา *Monascus* spp.**

นอกจากคุณสมบัติในการรักษาโรคข้าวแดงโมนาโคลิน เค ได้มีผลงานวิจัยหลายฉบับได้ศึกษาเกี่ยวกับซิตรินินที่สร้างจากเชื้อราสกุล *Monascus* spp. พร้อมกับสร้างสารสี

Wong และ Bau (1977) Wong และ Koehler (1981) แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างสารสีที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ในสีที่สกัดได้จาก *Monascus* spp.

Blanc และคณะ (1995) ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราบางสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ จากนั้นได้มีการแยกเอาโมนาสซิดิน เอ จาก *Monascus* spp. หลายสายพันธุ์ และบ่งชี้ได้ว่าเป็นสารตัวเดียวกับซิตรินิน ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดอาการไตอักเสบและผลิตจากเชื้อราหลาย ๆ ชนิด

คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ในสารสีจากเชื้อรา *Monascus* spp. ได้ศึกษาจากนักวิจัยหลายคน เช่น

Wong และ Koehler (1981) ได้แยกสารประกอบ 2 ตัว จากเชื้อรา *M. purpureus* ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้แก่ สารสีเหลืองชีด คือ โมนาสซิดิน เอ และสารสีเหลืองเรืองแสงที่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของสารประกอบดังกล่าว

Blanc และคณะ (1995) ได้แยกสารโมนาสซิดิน เอ คือ ซิตรินิน โดยใช้วิธี Mass Spectroscopy เพื่อยืนยันและอธิบายโครงสร้างสารดังกล่าว

Hajjaj และคณะ (1999) ได้ศึกษากลไกลการสังเคราะห์ทางชีวภาพของซิตรินินจาก *M. ruber* ATCC 96218 โดยวัดจาก $^{13}C$ Nuclear Magnetic Resonance ทดลองโดยวัด [$^{13}C$] Acetate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าการสังเคราะห์ซิตรินินเกิดจาก Tetra-ketide แทนที่จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์จาก Penta-ketide เหมือนกับเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillum* ที่สามารถสร้างซิตรินินเช่นเดียวกัน กลไกลการสังเคราะห์ซิตรินินจาก *Monascus* spp.

การใช้สีที่ผลิตจาก *Monascus* spp. เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร พบว่าอาจมีปนเปื้อนของซิตรินินด้วย

Sabater-Vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาการตรวจหาซิตรินินจากผลิตภัณฑ์จากเชื้อรา *Monascus* spp. ในทางการค้า และศึกษาคุณสมบัติของซิตรินินหรือสารสกัดจากเชื้อรา *Monascus* spp. สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutagenic) และปลอดภัยสำหรับใช้ในอาหารหรือไม่ พบว่าเมื่อวิเคราะห์โดยใช้ HPLC การทดสอบ Mutagenicity assay ของซิตรินินบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับสารสกัดจาก *Monascus* spp. รวมทั้งศึกษาเชื้อรา *Monascus* spp. สายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างซิตรินินสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทำให้เชื้อรา *Monascus* spp. สร้างซิตรินินหรือกำจัดซิตรินินออกจากสารสีของ *Monascus* spp.

Blanc และคณะ (1995) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสร้างซิตรินินจากเชื้อรา *Monascus* spp. หลายสายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาะการเลี้ยงต่างกัน ศึกษาสายพันธุ์เชื้อราที่สร้างซิตรินิน พบว่าซิตรินินที่ได้เชื้อรา *M. purpurrus* CBS 109.07 (Wild) ผลิตซิตรินินเท่ากับ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในข้าว ส่วนเชื้อรา *M. ruber* ATCC 96218 ผลิตซิตรินินมากถึง 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตซิตรินิน โดยเติมยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต ($NH_4NO_3$) แอมโนเนียมคลอไรด์ ($NH_4Cl$) โมโนโซเดียมกลูตาเมท และเมไทโอนีน โดยใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน หมักโดย *M. ruber* พบว่าอาหารที่เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตตรวจพบปริมาณซิตรินินสูงสุด เท่ากับ 120 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนการเติมยูเรียและเมไทโอนีนพบซิตรินินน้อย เท่ากับ 17 และ 0 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ แต่ปริมาณสีแดงที่ได้น้อยเช่นกัน การศึกษานี้ยังไม่ได้ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีและไม่ผลิตซิตรินิน และศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบระหว่างเอทานอลและกลูโคส พบว่าอาหารที่เติมกลูโคส 45 กรัม/ลิตร และเติมเอทานอล 28 กรัม/ลิตร มีการผลิตซิตรินิน เท่ากับ 226 และ 136 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับและยังพบว่าถ้าในอาหารมีเอทานอลมากกว่า 45 กรัม/ลิตร จะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. ruber*

## 2.12 การกลายพันธุ์ (Mutation)

การกลายพันธุ์ หมายถึง การเปลี่ยนแปลงอย่างกระทันหันของสารพันธุกรรม ซึ่งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของหน่วยควบคุมลักษณะ (Gene) จากอัลลีลหนึ่งไปเป็นอีกอัลลีลหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือการขาดหาย (Deletion) หรือการเพิ่มขึ้นมา (Duplication) ของส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซม และสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งชีวิตนั้นมีจีโนไทป์ (Genotype) เปลี่ยนแปลงไปสามารถทดสอบได้ในระดับโมเลกุล

**2.12.1 ผลของสารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen)**

เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารก่อการกลายพันธุ์ เข้าไปอาจก่อให้เกิดลักษณะ 3 ชนิด ได้แก่

1. Physiological damage (Primary injury)
2. Factor mutation (Point mutation หรือ mutation)
3. Chromosome mutation (chromosome aberration)

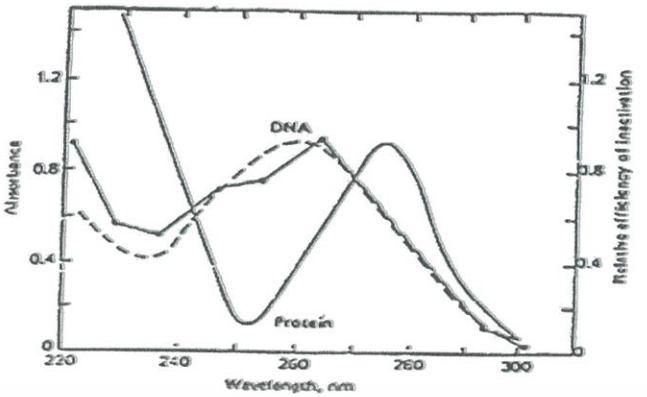
Factor mutation และ Chromosome mutation สามารถถ่ายทอดลักษณะจากพ่อแม่ไปยังลูกหลานต่าง ๆ ได้ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ ส่วน Physiological damage จะเกิดขึ้นและแสดงในรุ่นพ่อแม่เท่านั้น ในแบบของ Factor mutation ถ้าไม่สามารถเห็นได้ในรุ่นพ่อแม่ แต่ถ้ามี haploid gamete ซึ่งกลายพันธุ์ไปแล้วสามารถทดสอบได้

ผลของการกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิด ขึ้นอยู่กับอัตราของสารก่อการกลายพันธุ์ทำการทดลองใช้การกลายพันธุ์ทางสรีรวิทยา (Physiological) และการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรม (Chromosome mutation) พบว่ารังสีแกมมาจะมีผลในเชิงการลดการอยู่รอดและการเจริญมากกว่าสารก่อการกลายพันธุ์อื่น ๆ เมื่ออัตราการใช้สารก่อการกลายพันธุ์สูงและการใช้ปริมาณรังสีสูง จะทำให้เกิดอันตรายกับโครโมโซม ส่วนรังสีอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดการกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (Chromosome mutation) น้อยและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Genetic variation) การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตนั้นจะมีผลทำให้ได้ลักษณะใหม่ที่ดีขึ้นหรือเลวลงก็ได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการค้นคว้าและศึกษาการกลายพันธุ์ด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและวงจรชีวิตสั้น ทำให้ระยะเวลาสั้นมากขึ้น

**2.12.2 รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และการกลายพันธุ์**

รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นรังสีที่มีพลังงานไม่เพียงพอที่จะชักนำให้เกิดกระบวนการไอออไนเซชัน (Ionization) แต่พบว่าเบส Purine และ Pyrimidine สามารถดูดกลืนรังสีชนิดนี้ได้ แสดงดังรูปที่ 2.7

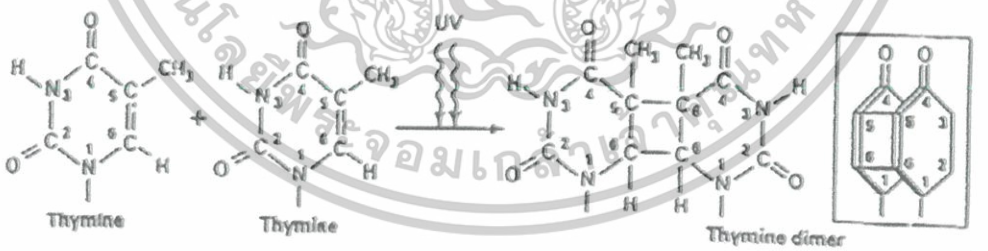
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 2.7 การดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตของ DNA

ที่มา : วรวุฒิ (2541)

เนื่องจากรังสีนี้มีพลังงานต่ำจึงสามารถทะลุผ่านเนื้อเยื่อบาง ๆ ได้ โดยปกติสามารถผ่านได้เพียงผิวเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง อย่างไรก็ตามรังสีอัลตราไวโอเลตนับเป็นสารก่อการกลายพันธุ์สำหรับสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเซลล์เดียว ซึ่ง DNA มีการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลต สูงสุดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าการกลายพันธุ์เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นปฏิภาคโดยตรงกับการดูดกลืนแสง รังสีอัลตราไวโอเลตของเบส Purine และเบส Pyrimidine ผลที่เกิดขึ้นจากรังสีอัลตราไวโอเลต มี 2 ประการ คือ ทำให้เกิด Pyrimidine hydrate และ Pyrimidine dimer แต่ต่อมามีการชี้ให้เห็นว่าการเกิด Thymine dimer เป็นผลหลักของการกลายพันธุ์จากรังสีอัลตราไวโอเลต




**รูปที่ 2.8** การเกิด Thymine dimer ชักนำโดยรังสีอัลตราไวโอเลตเกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างเบส Thymine 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันทำให้ DNA มีรูปร่างผิดปกติแบบ distortion ขึ้น

ที่มา : วรวุฒิ (2541)

ผลของรังสีอัลตราไวโอเลตต่อ DNA คือทำให้เกิดพันธะเคมีที่ผิดปกติระหว่างเบส Purine ที่อยู่ข้างเดียวกันในสาย DNA หรือระหว่างเบส Purine ตรงข้ามกันของสาย DNA ผลส่วนมากเกิดขึ้นกับThymine บนสายเดียวกันหรือตรงข้ามกันของ DNA อาจเกิดเป็น Thymine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dimer เป็นต้น การเกิดพันธะที่ผิดปกติเช่นนี้มีผลกระทบต่อการจับคู่ปกติของ Thymine กับเบส Adenine ในสาย DNA ตรงข้ามกัน สาย DNA อาจเกิดเป็น loop และทำให้พันธะคู่เบส T=A ในสายตรงข้ามอ่อนตัวลง

### 2.12.3 การเกิด Thymine dimer

เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากการเกิด Dimer เป็นเหตุให้เกิดการชะงักของกระบวนการจำลองตัว และมีโอกาสเกิดความผิดพลาดขึ้นขณะที่มีการซ่อมแซม (Repair) ของ DNA

ความสัมพันธ์ของอัตราการเกิดการกลายพันธุ์และปริมาณของรังสีอัลตราไวโอเลตขึ้นอยู่กับชนิดของการกลายพันธุ์สิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม พบว่าจำนวนการกลายพันธุ์ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่เกิดจากการชักนำโดยรังสีอัลตราไวโอเลตสามารถลดลง โดยการให้แสงที่มองเห็น (Visible light) ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการ Repair แบบ Photoreaction

รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นรังสีที่มีความสำคัญต่อการชักนำทำให้เกิดการกลายพันธุ์ แต่มีความรุนแรงน้อยกว่ารังสีเอกซ์ เนื่องจากรังสีนี้มีความยาวคลื่นยาวจึงมีพลังงานน้อย รังสีอัลตราไวโอเลตไม่สามารถทะลุทะลวงเนื้อเยื่อได้ดีเช่นเดียวกับรังสีเอกซ์ แต่มีความสำคัญเบส Purine และ Pyrimidine สามารถดูดกลืนรังสีนี้ได้ดี เบส Thymine และ Cytosine เมื่อได้รับรังสีนี้แล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและกลายพันธุ์ขึ้นในที่สุด เช่น เกิด Thymine dimer ทำให้สาย DNA มีรูปร่างที่ผิดปกติและไปกีดขวางการจำลองตัวเอง ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของรังสีอัลตราไวโอเลต และการเกิดการกลายพันธุ์ไม่ได้เป็นลักษณะเส้นตรงดังที่เกิดขึ้นกับรังสีเอกซ์ หลักฐานการศึกษาหลาย ๆ อย่างชี้ให้เห็นว่าผลของรังสีอัลตราไวโอเลตต่อการเกิดการกลายพันธุ์ไม่ได้เกิดขึ้นโดยตรงแต่เป็นผลขั้นแรก และอาจเป็นผลต่อเอนไซม์ในเซลล์จนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA

รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ DNA ในขณะที่เกิดการจำลองตัวเอง กล่าวคืออาจเกิดความผิดพลาดขึ้นระหว่างที่มีการนำเบสเข้าสู่ DNA เนื่องจากการที่ Dimer ของเบสไปกีดขวางการจำลองของตัวเอง ในการศึกษาการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นจากรังสีอัลตราไวโอเลตในไวรัส Bacteriophage พบว่าการเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่เกิดการกลายพันธุ์จากเบส Cytosine ไปเป็น Thymine เมื่อนำเอาสายพันธุ์กลายนี้ไปรับรังสีอัลตราไวโอเลตปรากฏว่าสามารถกลับกลายเป็น Wild type ได้

ถึงแม้ว่ารังสีเอกซ์เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ ชนิดแรกที่ค้นพบ ตั้งแต่ปี 1920 แต่ข้อมูลของผลกระทบจากรังสีเอกซ์มีน้อยกว่ารังสีอัลตราไวโอเลต เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเลตศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ง่ายกว่าจากการศึกษาร่วมกันระหว่างวิธีทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ทำให้เข้าใจถึงผลของรังสีอัลตราไวโอเลตต่อกระบวนการทางเอนไซม์ตลอดจนกระบวนการ Repair ได้เป็นอย่างดี พบว่ารังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สามารถใช้ฆ่าเชื้อได้คุณสมบัติของรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นรังสีที่มีความยาวคลื่นสูงและมีพลังงานต่ำทำให้สามารถผ่านของแข็งได้ไม่ดีเท่ากับพวกที่มีพลังงานสูง หรือความยาวคลื่นสั้น เช่น รังสีเอกซ์ และรังสี Ionizing ดังนั้น รังสีอัลตราไวโอเลต จึงมีประสิทธิภาพสำหรับผิวเซลล์บาง ๆ หรือเซลล์ที่กระจายตัวอยู่ รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถชักนำให้เกิดความเสียหายของเซลล์ได้มากมาย แต่ที่รู้จักกันดี คือ Pyrimidine dimer ของ DNA กล่าวคือ เบส Pyrimidine ในสาย DNA เดียวกันอยู่ใกล้ชิดกันและสร้างพันธะระหว่างคาร์บอน-คาร์บอนของเบสที่ติดกัน การเกิด Thymine dimer การเกิด Dimerization ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนตัวลงและอาจทำให้เกิดการขาดออกจากกันจนเป็น Cross-linkage ระหว่างเบสที่ติดกันบนสาย DNA เดียวกัน สาเหตุใหญ่ของการเกิด lethal effect เนื่องจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตเกิดจากการที่ DNA ไม่สามารถจำลองตัวเอง ภายหลังจากการเกิด Dimerization ระหว่างเบสบนสาย DNA เดียวกันนั่นเอง

Sekine และคณะ (1969) ได้ทดลองการใช้รังสีเอกซ์ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Aspergillus sojae* K.S. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ทำให้โปรติเอสเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นมากกว่า 2 เท่าของ Wild type

Hiroi และคณะ (1979) ได้ทดลองใช้รังสีอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา *M. anka* โดยคัดเลือกสายพันธุ์สามารถสร้างสารสีเพิ่มขึ้นบนอาหารเหลว พบว่าสายพันธุ์กลายสามารถสร้างสารสีเพิ่มขึ้น 4-7 เท่า

## 2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Lin (1973) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารเหลว นำไปเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 27, 32, 37 และ 40 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 3 วัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการสร้างสารสีได้ดีที่สุดคือ 32 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 27 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิมากกว่า 32 องศาเซลเซียส จะทำให้ผลิตสีลดลงอย่างรวดเร็ว

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาเพราะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ที่สามารถสร้างสีแดงและสารโมนาโคลิน เค ได้ในปริมาณสูงโดยทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและอาหารเหลว เริ่มจากเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ใน Modified rice broth เป็นเวลา 7 วันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเชื้อรามาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งคือ Tsai-Lai rice บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส มีความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 7 วัน ในอาหารเหลวใส่เชื้อราลงในถัง 5 ลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วัน นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณสีแดงและใช้ HPLC วิเคราะห์ปริมาณสารโมนาโคลิน เค พบว่าจากเชื้อรา *Monascus* sp. 72 สายพันธุ์ สายพันธุ์ *M. purpureus* M15 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่ดีที่สุดในอาหารแข็งสามารถผลิตสีแดงได้ มีค่าสีแดง (color value 12) และสารโมนาโคลิน เค (4 มิลลิกรัม/กรัม) ส่วนในอาหารเหลวมีสารโมนาโคลิน เค ต่ำ (5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และยังพบอีกว่าความชื้นและปริมาณอากาศมีผลต่อการผลิตสีและสารโมนาโคลิน เค

วรวุฒิ (2541) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา *M. purpureus* โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ช่วงเวลาแตกต่างกัน คือ 0, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30 และ 60 นาที สามารถแยกเชื้อรากลายพันธุ์ได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ คือ CU21, CU22, CU31, CU51 และ CU101 ซึ่งเชื้อรากลายพันธุ์ทั้งหมดที่ได้มีการสร้างคลิสโททีเซีย หนาแน่นขึ้น สีเข้มขึ้น แต่มีการสร้างโคนิเดียน้อยลง เส้นใยมีลักษณะยาวเล็ก นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อรากลายพันธุ์ CU21, CU22, CU31, CU51 และ CU101 มีการเจริญเพิ่มขึ้น มีการผลิตสารสีแดงและสารสีเหลืองเพิ่มขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดงและสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 500 และ 400 นาโนเมตร ตามลำดับ ยกเว้นเชื้อรากลายพันธุ์ CU21 ที่มีการผลิตสารสีแดงและสารสีเหลืองลดลง

รัตติกูล และคณะ (2559) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์ U6V1 บนอาหารแข็งด้วยวัสดุหมักข้าวหอมมะลิและข้าวเสาไห้ ตามลำดับ พบว่า ข้าวหอมมะลิให้การผลิตสาร Monacolin K เท่ากับ 0.0317 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง ซึ่งต่ำกว่าข้าวเสาไห้ ที่ผลิตสาร Monacolin K เท่ากับ 0.5537 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง เนื่องจากการเจริญบนวัสดุหมักข้าวหอมมะลิให้การสะสมน้ำตาลปริมาณมาก ซึ่งมีผลยับยั้งการผลิตสาร Monacolin K เมื่อเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทอากาศภายในขวดเลี้ยงเชื้อ จากสัดส่วนระหว่างปริมาณวัสดุหมักต่อปริมาตรขวดเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบว่าที่สัดส่วน 1:5 ให้การผลิตสาร Monacolin K สูงกว่าการใช้สัดส่วน 1:2 แต่ก็ยังคงมีการสะสมน้ำตาลที่ระดับสูง เนื่องจากข้าวหอมมะลิย่อยสลายได้ง่าย การใช้วัสดุหมักเป็นข้าวเสาไห้ จึงมีความเหมาะสมมากกว่า ดังนั้นการผลิตสาร Monacolin K จึงใช้การเจริญบนวัสดุหมักข้าวเสาไห้ ที่บรรจุในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 5, 10 และ 20 ลิตร ที่มีสัดส่วนระหว่างวัสดุหมัก/ปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดเลี้ยงเชื้อเป็น 1:5 พบว่าการผลิตสาร Monacolin K อยู่ในระดับต่ำ เพราะมีการสะสมน้ำตาล และยังพบการเกาะตัวของเมล็ดข้าวเป็นก้อนขนาดใหญ่ เพราะการเจริญและการยืดยาวของเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 การใช้ขวดเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากขึ้น ยิ่งทำให้การเคลื่อนตัวของเมล็ดข้าวภายในขวดเลี้ยงเชื้อ มีค่าช้าลงสภาวะดังกล่าว ทำให้เส้นใยเชื้อราเจริญยืดยาวขึ้นเพราะแรงเฉือนมีค่าต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

## 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

*Monascus* sp. SS14 (สายพันธุ์พ่อแม่)

## 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

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

3.2.2 SS medium (ภาคผนวก ก)

3.2.3 ข้าวเสาไห้ (ตรารุ้งทิพย์ บริษัท เอเชีย อินเตอร์ ไรซ์ จำกัด)

## 3.3 อุปกรณ์

3.3.1 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse Ci, Japan)

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

3.3.3 คอลัมน์ μBondapakTM C18 3.9 x 300 มิลลิเมตร (Water, USA)

3.3.4 เครื่องวัดความเข้มของแสง (Spectrophotometer) รุ่น Helios Gamma ยี่ห้อ Thermo Scientific, USA

3.3.5 เครื่องวัด pH (pH meter) (ยี่ห้อ Seven Compact รุ่น S220-Kit)

3.3.6 เครื่องเขย่า (Shaker) (ยี่ห้อ Gallenkamp)

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

3.3.8 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) (ยี่ห้อ Heal Force รุ่น Alpha Clean 1300)

3.3.9 Magnetic stirrer (รุ่น IKA C-MAG HS 7 stirrer)

3.3.10 เครื่องแก้ว

## 3.4 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่ มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ใช้ Cork borer ขนาด 4.0 มิลลิเมตร มาเจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อรา จำนวน 1 ก้อน นำมาวางบนอาหารวุ้น MYS ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน

## 3.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. โดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

นำเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS ในหลอดเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน เติม Tween 80 เข้มข้น 0.1% ให้ได้สารละลายสปอร์เข้มข้น $10^6$-$10^8$ สปอร์/มิลลิลิตร นำสารละลายสปอร์ใส่จานเพาะเลี้ยงเชื้อไปวางในตู้ปลอดเชื้อ โดยวางห่างจากรังสีอัลตราไวโอเลต 30 เซนติเมตร ใช้ magnetic stirrer ในการปั่นกวนสารละลายสปอร์ ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 และ 42 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไป Spread plate บนอาหารวุ้น MYS นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนี โดยใช้ Cork borer ขนาด 4.0 มิลลิเมตร มาเจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา จำนวน 1 ก้อน นำมาวางบนอาหารวุ้น MYS นำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน และวัดขนาดโคโลนี โดยดัดแปลงมาจากวิธีของวรวุฒิ (2541)

## 3.6 การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว SS

นำเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ ที่มีอายุ 7 วัน มาเจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนี โดยใช้ Cork borer ขนาด 4.0 มิลลิเมตร จำนวน 4 ก้อน นำมาใส่ในอาหารเหลว SS ปริมาตร 80 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

## 3.7 การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้

### 3.7.1 การเตรียมเชื้อราเริ่มต้น

นำเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ ที่มีอายุ 7 วัน มาเจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนี โดยใช้ Cork borer ขนาด 4.0 มิลลิเมตร จำนวน 4 ก้อน นำมาใส่ในอาหารเหลว SS ปริมาตร 80 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

### 3.7.2 การเตรียมวัสดุหมัก

ชั่งข้าวเสาไห้ 50 กรัม ลงในขวดเลี้ยงเชื้อจากนั้นปิดปากขวดด้วยจุกสำลี แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ใส่น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลอดเชื้อ 15 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องหมุนต่อเนื่อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องหมุน (สลับนิ่งในอัตราส่วน 1:3) เป็นเวลา 28 วัน โดยดัดแปลงมาจากวิธีของบุษบา (2542)

## 3.8 การวิเคราะห์ผลของเชื้อรา *Monascus* sp.

### 3.8.1 การวิเคราะห์ผลในสภาวะการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว SS

นำเชื้อรากลายพันธุ์ที่เลี้ยงในอาหาร SS เป็นเวลา 7 วัน มากรองด้วยผ้าลินิน นำส่วนใสที่กรองได้ไปวัดค่าพีเอช และวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ

#### 3.8.1.1 การหาน้ำหนักแห้ง (Dry cell weight)

นำตัวอย่างเส้นใยที่ได้จากการกรองใส่ฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักแล้วไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง นำออกมาใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งที่คงที่ และคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้ง

#### 3.8.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสี

นำส่วนใสที่กรองได้ไปเจือจางด้วยเอทานอลร้อยละ 50 วิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

#### 3.8.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส)

นำส่วนใสที่กรองได้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Somogyi-Nelson (1952) ดังแสดงในภาคผนวก ข

#### 3.8.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณซิตรินิน

นำส่วนใสที่กรองได้ไปผสมด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำไปผสมกับอะซิโตไนไตท์ (อัตราส่วน 65:35) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Xu และคณะ (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.8.2 การวิเคราะห์ผลในสภาวะการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้**

**3.8.2.1 การหาปริมาณความชื้น**

นำตัวอย่างข้าวแดงประมาณ 1-2 กรัม ใส่จานเพาะเลี้ยงเชื้ออบแห้งที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง นำออกมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งที่คงที่ และคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้ง

**3.8.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสี**

นำตัวอย่างข้าวแดงประมาณ 2 กรัม ผสมกับเอทานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

**3.8.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) และวัดค่าพีเอช**

นำตัวอย่างข้าวแดงประมาณ 2 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าพีเอชและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi–Nelson (1952) ดังแสดงในภาคผนวก ข

**3.8.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณซิตรินิน**

นำตัวอย่างข้าวแดงประมาณ 2 กรัม ผสมกับเอทานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำไปผสมกับอะซิโตไนไตท์ (อัตราส่วน 65:35) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Xu และคณะ (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4

# ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

## 4.1 ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. โดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 (สายพันธุ์พ่อแม่) โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต เก็บตัวอย่างที่เวลาแตกต่างกัน คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 และ 42 นาที นำตัวอย่างไป Spread plate บนอาหารวุ้น MYS นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นการเลือกโคโลนี มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS นำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสามารถแยกเชื้อรากลายพันธุ์ได้ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 0M1, 3M1, 3M2, 3M3, 6M1, 6M2, 9M1, 9M2, 9M3, 9M4, 12M1, 12M2, 15M1, 15M2, 18M1, 18M2, 24M1, 24M2, 30M1 และ 30M2

## 4.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS เป็นเวลา 7 วัน พบว่าขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เท่ากับ 4.58 เซนติเมตร ซึ่งมีขนาดโคโลนีใหญ่กว่าเชื้อรากลายพันธุ์ทุกสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** แสดงขนาดโคโลนีของ *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์

| สายพันธุ์ | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร) |
|---|---|
| Wide type | 4.58 |
| 0M1 | 3.73 |
| 3M1 | 3.93 |
| 3M2 | 4.10 |
| 3M3 | 4.16 |
| 6M1 | 4.16 |
| 6M2 | 4.13 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ต่อ)

| สายพันธุ์ | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร) |
|---|---|
| 9M1 | 4.34 |
| 9M2 | 4.50 |
| 9M3 | 3.98 |
| 9M4 | 4.50 |
| 12M1 | 3.85 |
| 12M2 | 4.08 |
| 15M1 | 4.38 |
| 15M2 | 3.98 |
| 18M1 | 4.10 |
| 18M2 | 4.21 |
| 24M1 | 3.80 |
| 24M2 | 3.46 |
| 30M1 | 3.75 |
| 30M2 | 3.60 |

## 4.3 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ในอาหารเหลว SS

นำเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ ที่มีอายุ 7 วัน มาเลี้ยงในอาหารเหลว SS ปริมาตร 80 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเส้นใยมีการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนและมีการสร้างสารสีเกิดขึ้น จากนั้นจึงทำการกรองแยกเส้นใยออกเพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้งและนำส่วนใสมาวัดค่าพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสี และปริมาณซิตรินิน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.2** แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสี และปริมาณซิตรินินของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ ในอาหารเหลว SS

| สายพันธุ์ | ค่าพีเอช | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/L) | ปริมาณสารสี ($U_{500nm}$/g-DCW) | ปริมาณซิตรินิน (mg/g-DCW) |
|---|---|---|---|---|
| Wide type | 7.90 | 0.2774 | 389.94 | 0.0018 |
| 0M1 | 8.17 | 0.4948 | 1516.88 | N/A |
| 3M1 | 6.78 | 0.1980 | 220.78 | N/A |
| 3M2 | 7.55 | 0.4263 | 713.42 | 0.0105 |
| 3M3 | 8.46 | 0.2535 | 1108.75 | N/A |
| 6M1 | 7.76 | 0.7861 | 1811.03 | 0.0350 |
| 6M2 | 7.22 | 0.5307 | 1080.35 | 0.0566 |
| 9M1 | 7.63 | 0.6937 | 1863.47 | 0.6348 |
| 9M2 | 7.69 | 0.4448 | 745.20 | 0.2428 |
| 9M3 | 7.31 | 0.5339 | 926.71 | 0.0541 |
| 9M4 | 7.26 | 0.4448 | 879.70 | 0.0457 |
| 12M1 | 6.97 | 0.6763 | 1899.67 | 4.7468 |
| 12M2 | 7.74 | 0.4252 | 892.85 | 0.0505 |
| 15M1 | 7.285 | 0.4687 | 855.17 | 0.0294 |
| 15M2 | 7.15 | 0.8980 | 1888.67 | 0.0826 |
| 18M1 | 7.415 | 0.5252 | 1134.82 | 0.5910 |
| 18M2 | 6.895 | 0.4665 | 851.24 | N/A |
| 24M1 | 7.70 | 0.4241 | 1139.30 | 0.2158 |
| 24M2 | 7.59 | 0.3067 | 1045.54 | 0.0103 |
| 30M1 | 7.13 | 0.6220 | 1088.71 | 0.7261 |
| 30M2 | 7.30 | 0.7633 | 1023.93 | 0.2687 |

หมายเหตุ : N/A หมายถึง ตรวจไม่พบซิตรินิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการวัดค่าพีเอช พบว่าค่าพีเอชของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ อยู่ในช่วง 6.75-8.46 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ จิราพร และคณะ (2554) ที่พบว่าค่าพีเอชที่อยู่ในช่วง 5.0-7.65 เหมาะสมต่อการสร้างสารสีมากที่สุด

การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi–Nelson พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์มีการสะสมน้ำตาลค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อำพรรณ และ ธีระดา (2554) ที่พบว่าปริมาณของกลูโคสนั้นมีส่วนช่วยในการส่งเสริมในการสร้างสารสี

สารสีที่เชื้อราสร้างขึ้น สามารถหลั่งออกนอกเซลล์ได้ (Extracellular pigment) เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารสีด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร พบว่าเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ให้ปริมาณสารสี 389.94 $U_{500nm}$ ต่อกรัมเซลล์แห้ง ซึ่งน้อยมากเมื่อเทียบกับเชื้อรากลายพันธุ์ เชื้อรากลายพันธุ์ที่ให้ปริมาณสารสีสูงที่สุด คือ สายพันธุ์ 12M1, 15M2, 9M1 และ 6M1 เท่ากับ 1899.67, 1888.67, 1863.47 และ 1811.03 $U_{500nm}$ ต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วรวุฒิ (2541) ที่พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ให้ปริมาณสารสีมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่

จากการทดลองเมื่อนำปริมาณซิตรินินที่ได้จากการวิเคราะห์ HPLC มาคำนวณหาปริมาณซิตรินินที่ได้ต่อกรัมเซลล์แห้ง พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์สายพันธุ์ 12M1 มีปริมาณซิตรินินมากที่สุด เท่ากับ 4.7468 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ส่วนสายพันธุ์ที่มีปริมาณซิตรินินน้อยที่สุด คือสายพันธุ์พ่อแม่เท่ากับ 0.0018 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง และเชื้อกลายพันธุ์สายพันธุ์ 0M1 3M1 3M3 และ 18M2 ไม่พบการสร้างซิตรินิน ซึ่งมีรายงานการปนเปื้อนของซิตรินินในอังคักที่มีจำหน่ายทางการค้าในประเทศจีนและไต้หวันอยู่ในช่วง 4.2-25.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม Shu และ Lin (2002) และในสหรัฐอเมริกาพบการปนเปื้อนของซิตรินินในอังคักบรรจุแคปซูลอยู่ในช่วง 0.47-11.82 มิลลิกรัม/กิโลกรัม Herber และคณะ (2001) ดังนั้นปริมาณซิตรินินที่ได้จากเชื้อรากลายพันธุ์ จึงจัดว่าอยู่ในความปลอดภัยในการใช้งานเมื่อเปรียบเทียบกับสินค้าที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด

## 4.4 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์บนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้

การเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. บนอาหารแข็งธัญพืช โดยใช้ข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมัก บรรจุข้าว 50 กรัม ในขวดเลี้ยงเชื้อ (ขวดลิสเตอร์รีน) นำข้าวไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น ที่อุณหภูมิห้องเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องบ่มแบบหมุน (หมุนสลับนิ่งในอัตราส่วน 1:3) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าวแล้วจึงใส่เชื้อเริ่มต้น ปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องบ่มแบบหมุน (หมุนสลับนิ่งในอัตรา 1:3) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 28 วัน จากนั้นนำไปวัดค่าพีเอช วิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสี และปริมาณซิตรินิน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

**ตารางที่ 4.3** แสดงค่าพีเอช เปอร์เซ็นต์ความชื้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสี และปริมาณซิตรินินของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์บนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้

| สายพันธุ์ | ค่าพีเอช | เปอร์เซ็นต์ความชื้น | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) | ปริมาณสารสี ($U_{500nm}$/g-DSW) | ปริมาณซิตรินิน (mg/g-DSW) |
|---|---|---|---|---|---|
| Wide type | 8.11 | 51.01 | 0.20 | 8.42 | N/A |
| 0M1 | 7.25 | 54.94 | 3.92 | 9.38 | N/A |
| 3M1 | 6.95 | 41.55 | 6.24 | 18.97 | N/A |
| 3M2 | 6.84 | 47.48 | 2.68 | 19.70 | N/A |
| 3M3 | 5.07 | 32.21 | 59.24 | 10.32 | N/A |
| 6M1 | 5.02 | 33.20 | 99.34 | 20.38 | N/A |
| 6M2 | 5.08 | 32.71 | 55.29 | 13.95 | N/A |
| 9M1 | 4.82 | 30.70 | 84.36 | 28.50 | N/A |
| 9M2 | 4.81 | 29.41 | 112.64 | 30.45 | N/A |
| 9M3 | 7.46 | 62.26 | 1.86 | 6.35 | N/A |
| 9M4 | 7.42 | 63.12 | 1.63 | 7.21 | N/A |
| 12M1 | 4.82 | 32.12 | 96.62 | 7.98 | N/A |
| 12M2 | 4.87 | 31.89 | 88.27 | 14.78 | N/A |
| 15M1 | 7.20 | 62.79 | 3.13 | 4.04 | N/A |
| 15M2 | 7.26 | 68.09 | 1.90 | 6.83 | N/A |
| 18M1 | 7.25 | 58.63 | 2.28 | 5.21 | N/A |
| 18M2 | 5.65 | 48.18 | 3.10 | 6.03 | N/A |
| 24M1 | 7.28 | 55.89 | 3.77 | 5.63 | N/A |
| 24M2 | 5.59 | 49.18 | 2.16 | 5.57 | N/A |
| 30M1 | 7.36 | 52.23 | 2.75 | 9.99 | N/A |
| 30M2 | 7.28 | 62.06 | 1.02 | 7.54 | N/A |

หมายเหตุ : N/A หมายถึง ตรวจไม่พบซิตรินิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการวัดค่าพีเอช พบว่าค่าพีเอชของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์อยู่ในช่วง 4.81-8.11 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Palo (1960) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสารสีแดงได้ในพีเอช ระหว่าง 3.0-7.5

การศึกษาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นอยู่ที่ 51.01 เชื้อรากลายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นอยู่ในช่วง 30-60 ซึ่งมีรายงานของ Lee และคณะ (2002) ที่พบว่าปริมาณความชื้นของวัตถุดิบก่อนหมักมีผลต่อประสิทธิภาพในการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. ซึ่งอาหารที่มีความชื้นเริ่มต้นสูงทำให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสับสเตรตได้เร็วขึ้น มีผลต่อการเจริญและการสร้างสร้างสีในวัสดุหมัก แต่ถ้าความชื้นน้อยเกินไปจะส่งผลต่อการเจริญและการสร้างสารสีที่ต่ำด้วย

การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somogyi–Nelson พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์สะสมน้ำตาลค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของรัตติกูล และคณะ (2559) ที่พบว่าการเจริญบนวัสดุหมักข้าวเสาไห้มีการสะสมน้ำตาลปริมาณสูง

การศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารสีจากข้าวแดง โดยนำข้าวไปสกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่ให้ปริมาณสารสี 8.42 $U_{500nm}$ ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ซึ่งน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเชื้อรากลายพันธุ์ เชื้อรากลายพันธุ์ที่ให้ปริมาณสารสีสูงที่สุด คือ สายพันธุ์ 9M2 และ 9M1 เท่ากับ 30.45 และ 28.50 $U_{500nm}$ ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ กังสดาลย์ และคณะ (2538) พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ สามารถให้ปริมาณสารสีได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินในข้าวแดงนั้นจากการศึกษาตรวจไม่พบซิตรินิน

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่ โดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต ส่วนใหญ่แล้วการกลายพันธุ์ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงจากสายพันธุ์พ่อแม่ จะได้ในลักษณะที่ดีขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากช่วงเวลาที่ฉายรังสี เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ ที่เวลา 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 และ 30 นาที เป็นช่วงเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตในอัตราที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอกของ (phenotype) ที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์พ่อแม่ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นนั้นอาจไปมีผลเกี่ยวข้องกับบางขั้นตอนของการเจริญและกระบวนการสร้างสารสีของเชื้อรา ทำให้เชื้อรากลายพันธุ์มีการสร้างสารสีที่เพิ่มขึ้น และมีการเจริญที่ต่างไปจากสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดี และการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้นอาจจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ดีขึ้นหรือเลวลงก็ได้ ซึ่งสอดคล้องกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของ วรวุฒิ (2541) ที่พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ทั้งหมดที่ได้มีการสร้างคลิสโททีเซีย หนาแน่นขึ้น สีเข้มขึ้นแต่มีการสร้างโคนิเดียน้อยลง เส้นใยมีลักษณะยาวเล็ก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ CU21, CU22, CU31, CU51 และ CU101 มีการเจริญเพิ่มขึ้น มีการผลิตสารสีแดงและสารสีเหลืองเพิ่มขึ้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดงและสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 500 และ 400 นาโนเมตร ตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่ โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต เก็บตัวอย่างที่เวลาแตกต่างกัน คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39 และ 42 นาที สามารถแยกเชื้อรากลายพันธุ์ได้ทั้งหมด 20 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 0M1, 3M1, 3M2, 3M3, 6M1, 6M2, 9M1, 9M2, 9M3, 9M4, 12M1, 12M2, 15M1, 15M2, 18M1, 18M2, 24M1, 24M2, 30M1 และ 30M2

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ พบว่าขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่มีขนาดโคโลนีใหญ่กว่าเชื้อรากลายพันธุ์ทุกสายพันธุ์

จากศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ในอาหารเหลว SS พบว่าค่าพีเอชของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์อยู่ในช่วง 6.75-8.46 การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์มีการสะสมน้ำตาลค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ การวิเคราะห์ปริมาณสารสี พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ที่ให้ปริมาณสารสีสูงที่สุด คือ สายพันธุ์ 12M1 เท่ากับ 1899.67 $U_{500nm}$ ต่อกรัมเซลล์แห้ง ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณซิตรินิน พบว่าอยู่ในช่วง 0.0018-4.7468 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์บนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ พบว่าค่าพีเอชของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่และเชื้อกลายพันธุ์ อยู่ในช่วง 4.81-8.11 การศึกษาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความชื้นอยู่ในช่วง 30-60 การศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์สะสมน้ำตาลค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ การศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารสี พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ที่ให้ปริมาณสารสีสูงที่สุด คือ สายพันธุ์ 9M2 เท่ากับ 30.45 $U_{500nm}$ ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และตรวจไม่พบปริมาณซิตรินิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณผลิตซิตรินินในข้าวแดง ด้วยเครื่อง HPLC นั้น พบว่าไม่สามารถตรวจพบปริมาณซิตรินินได้ เนื่องมาจากขั้นตอนในทำนั้นอาจเจือจางมากเกินไปจนทำให้เครื่อง HPLC ไม่สามารถวิเคราะห์หรือตรวจพบปริมาณซิตรินินได้

## 5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรากลายพันธุ์เพิ่มเติม เพื่อจะได้ทราบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปจากเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่อย่างไร

2. ควรศึกษาการตรวจวัดพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสีและปริมาณซิตรินินในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เพื่อจะได้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการลดปริมาณซิตรินินจากเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว เช่น การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ที่สามารถลดปริมาณซิตรินิน หรือการหาอัตราการกวนให้อากาศที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

กังสดาลย์ บุญปราบ. 2538. **การคัดเลือกเชื้อรากลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวแดง**. วิทยานิพนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

จักรพงษ์ นิมานะ. 2557. **การผลิตสารสีจากจุลินทรีย์**. เข้าถึงได้จาก : http: / / science. payap. ac. th/ blogs/ chakkraphong/ 2014/ 05/ 07 วันที่สืบค้น 25 มิถุนายน 2561.

จิราพร จันพราม, ลักษมี แซ่เฮ้ง และสาวิตรี เหมือนถม. 2554. **การผลิตสารยับยั้งคอลเรสเอตรอลจากเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญในอาหารเหลวที่มีมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน.** คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จุลยุทธ บุญสร้างสม. 2546. **การลดซิตรินินในข้าวแดง**. วิทยานิพนธ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

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

นิสา บุตรรัตน์. 2537. **การกลายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* กบ.11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสีและเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการกับสายพันธุ์สายพันธุ์พ่อแม่ สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดงและสีเหลือง**. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุษบา ยงสมิทธิ์. 2518. ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตข้าวแดงโดยเชื้อรา *Monascus*. **บทปฏิบัติการในวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. **จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุษบา ยงสมิทธิ์. 2542. **จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี.** ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุษบา ยงสมิทธิ์ และวรรณภา ลาบโลภา. 2527. การใช้ประโยชน์แป้งมันสาปะหลังในการผลิตสีผสมอาหารและเอนไซม์ย่อยแป้ง โดยเชื้อรา *Monascus* ในสภาพหมักเปียก.**รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 22**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 451-452.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พัชรี พัฒนกุล. 2545. **ผลของสายพันธุ์เชื้อโมแนสคัสและสารอาหารต่อการผลิตอังคักลูกเดือย.** วิทยานิพนธ์ คณะเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พลายแก้ว ไชยเบญจรงค์ และบุษา ยงสมิทธ์. 2534. การศึกษาเบื้องต้นการผลิตโคจิสีแดงของ *Monascus* เตรียมจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ. **รายงานประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 29.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 283-292.

รัตติกูล ศรีอุบล สุพัชลิตา จงจำ และไอริณ อุดมพูนสิน 2559. **การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็งในถังหมักขนาด 20 ลิตร**. ปริญญานิพนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

รัตนา สุขสรรค์. 2524. "ข้าวแดงสีธรรมชาติสำหรับใช้ผสมอาหาร." วารสารวิทยาศาสตร์. 35 : 336-337.

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. **ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก**. วิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2541. รังสี UV และมิวเตชัน. **เอกสารประกอบการสอนเรื่องมิวเตชัน.** ภาควิชาพฤกษาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศศิธร ใบผ่อง. 2546. **การผลิตรงควัตถุสีแดงและซิตรินินโดยเชื้อรา *Monascus purpureus* ในข้าวและอาหารเหลวสังเคราะห์.** สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาลัยเชียงใหม่.

สมชาย ไกรรักษ์. 2536. **ศักยภาพของเชื้อรา *Monascus* กลายพันธุ์ชนิดใหม่ในการผลิตสีเหลืองธรรมชาติ**. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรัญ หันพงศ์กิตติกุล, เมธินี เหว่เจริญ และเรณู ปิ่นทอง. 2530. "ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตข้าวแดงโดย *Monascus purpurues.*" วารสารเกษตร 4(2) : 125-128.

อรัญ หันพงศ์กิตติกุล เมธินี เหว่ซึ่งเจริญ และเรณู ปั้นทอง. 2531. **ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตข้าวแดงโดย *Monascus purpureus***. วารสารเกษตร. 4(2) : 125-128.

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ **และธีระดา ตั้งประเสริฐพงศ์**. 2554. "การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสีแดงของ ***Monascus*** spp. ที่คัดแยกจากข้าวแดง." วารสารเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยสยาม. ปีที่ 6 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2553-พฤษภาคม 2554.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blance, P.J. Laussac, J.P. Le Bars, J. Le Bars, P. Loret, M.O. Pareilleux, A. Prome, D. Prome, J.C. Santerre, A.L. and Goma, G. 1995. **Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin.** Int. J. Food Microbiology. 27 : 201-213.

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

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, J. R. 1994. "Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpurues.*" Emzyme and microbial technol. 16(7) : 584-590.

Chui, S. W. and Chen, S. M. 1992. "Production of pigments by *Monascus purpurues* using sugarcane bagasse in roller bottle cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8(1) : 68-70.

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

Hajjaj, H. Klaebe, A. Loret, M. Goma, O. Blanc, P.J. and Francois, J. 1999. "Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by C13 nuclear magnetic resonance." **Applied and Enviromental Microbiology.** 65 : 311-314.

Hajjaj, H.Niederberger, P. and Duboc, P. 2001. "Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium." **Appl Environ Microbiol.** 67(6) : 2596-602

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Heber, D. Lembertas, A. Lu, Q.Y. Bowerman, S. and Go, V.L.W. 2001. **An analysis of nine proprietary Chinese red yeast rice dietary supplements: implications of variability in chemical profile and contents**. J Altern Complem Med. 7 : 133-139.

Hiroi, T. Shima, T. and Ogasanara, N. 1979. " Hyperpigment productive mutant of *Monascus anka* for solid culture." Arg. Biol. Chen. 43(9) : 1975-1976.

Johns, M.R. and Stuart, D.M. 1991. "Production of Pigments by *Monascus purpureus* in Solid Culture." J. Ind. Microbiol. 8 : 23-28

Juzlova, P. Martinkova, L. Lozinski, J. and Machek, F. 1994. **Ethanol as substrate for pigment Production by fungus *Monascus purpureus***. Enzyme and Microbial technology. 16(11) : 996-1001.

Kim, H.J. Kim, J.H. Oh, H.J. and Shin, C.S. 2002. "Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation." Process Biochemistry. 38 : 649-655.

Lee, B.K. Piao, H.Y. and Chung, W.J. 2002. **Production of red pigments by *Monascus purpureusin* solid-state culture.** Biotechnology Bioprocess Eng. 7 : 21-25.

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

Lin, C.F. and Lizuka, H. 1982. " Production of extracellular pigment by a mutation of *Monascus kaoliang* sp. Nov." Appl. Environ. Microbiol. 43(3) : 617-676.

Lin, C.F. and Demain, A.L. 1991. **Effect of nutrition of *Monascus sp.* On formation of red pigment**. Applied Microbiology and Biotechnology. 36 : 70-75.

Lotong, N. and Suwannarit, P. 1990. **Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content**. J. Appl. Bacteriol. 68 : 565-570.

Manandhar, K. L. and Apinis, A. E. 1971. **Temperture relatiom in *Monascus*.** Trans Br. Mycol. Soc. 57(3) : 465-472.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Navalainen, K.M.H. 1981. "Induction, isolation and characterization of Aspergillus Niger mutant strain producing elevated level of B-galactocidase." Appl. Environ. Microbiol. 41 : 593-596.

Sabater-Vilar, M. Maas, R.F. and Fink-Gremmels, J. 1999. **Mutagenicity of commercial Monascus fermentation products and the role of citrinin contamination.** เข้าถึงได้จาก : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477335 วันที่สืบค้น 25 มิถุนายน 2561.

Sekine, H. Nasuno, S. and Iguchi, N. 1969. "Isolating of highty protiolytic mutants from *Aspergillus sojae.*" Arg. Biol. Chen. 33 : 1477-1482.

Somogyi, M. 1952. Note on Sugar Determination. Journal of Biological Chemistry. 195 : 19-23.

Su, Y.C. Wang, J.J. Lin, T.T. and Pan, T.M. 2003. **Production of the secondary metabolites γ-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*.** J Ind Microbiol Biotechnol. 30 : 41-46.

Shu, P.Y. and Lin, C.H. 2002. "Simple and sensitive determination of citrinin in *Monascus* by GC-selected ion monitoring mass spectrometry." Anal Sci. 18 : 283-287.

Sweeny. J.G. Estrada-Valdes, M.C. Lacobucci, G.A. Sato, H. and Sakamura, S. 1981. **Photoprotection of the red pigment of *Monascus anka* in Aqueous Medai by 1, 4, 6-Trihydroxynaphthalene.** J. Agric. Food chem., 29(6) : 1189-1193.

Teng, S.S. and Feldheim, W. 2001. "Anka and Anka pigment production." Journal of industrial Microbiology and Biotechnology. 26(5) : 280-282.

Wong, H.C. and Bau, Y.S. 1977. "Pigmentation and Antibacterial activity of Fast-neutron and X-ray Induced Strains of *Monascus purpurues*, Wert." Plant Physiol. 60 : 578.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wong, H.C. Lin, Y.C. and Koehler, P.E. 1981. "Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentration." Mycologai. 73 : 649-654.

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*. Vol. 12, No. 4, pp. 376-380

Yongsmith, B. Tabloka, W. Yongmanitchai, W. and Bavavoda, R. 1993. "Culture condition for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB. 10 grown on cassava medium." World journal of Microbiology and Biotechnology. 9(1) : 85-90.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก

# สูตรอาหาร

## 1. อาหาร MYS (Malt yeast extract starch agar)

| | | |
|---|---|---|
| Peptone | 5 | กรัม |
| Yeast extract | 3 | กรัม |
| Malt extract | 3 | กรัม |
| แป้งมันสาปะหลัง | 10 | กรัม |
| วุ้น | 12-15 | กรัม |

นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 ในกรณีที่สารละลายยาก สามารถนำไปต้มซึ่งความร้อนจะทำให้ละลายได้ง่ายขึ้น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 2. อาหาร SS (Soybean starch medium)

| | | |
|---|---|---|
| แป้งมันสำหลัง | 30 | กรัม (ตราปลาไทย 5 ดาว บริษัท อี.ที.ซี. เอ็ยบตงจั่น จำกัด) |
| แป้งถั่วเหลือง | 40 | กรัม (ตราดอยคำ บริษัท ดอยคำผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด) |

นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 ในกรณีที่สารละลายยาก สามารถนำไป ต้มให้ความร้อน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข

# สารเคมี และวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

## 1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ ของ Somogyi-Nelson (1952)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส ไซโลส โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ เกิดสีโมลิบดินัมบลู (Molybdrnum blue) ดังปฏิกิริยา

1. $2Cu_2+$ + reducing sugar $\longrightarrow$ $CuO_2$
2. $CuO + H_2SO_4$ $\longrightarrow$ $2Cu^+$
3. $2Cu^+ + MoO^{+4}$ $\longrightarrow$ $2Cu^{2+}$ + molybdenum blue

### 1.1 สารเคมี

#### 1.1.1 Copper reagent

เตรียมสารละลาย $Na_2HPO_4.12H_2O$ 71 กรัม และโซเดียมโปรแทสเซียม-ทาร์เทรต 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล จำนวน 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ให้ความร้อน จากนั้นเติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรสุดท้าย เท่ากับ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง มีตะกอนกรองออกก่อนนำมาไปใช้

#### 1.1.2 Nelson reagent

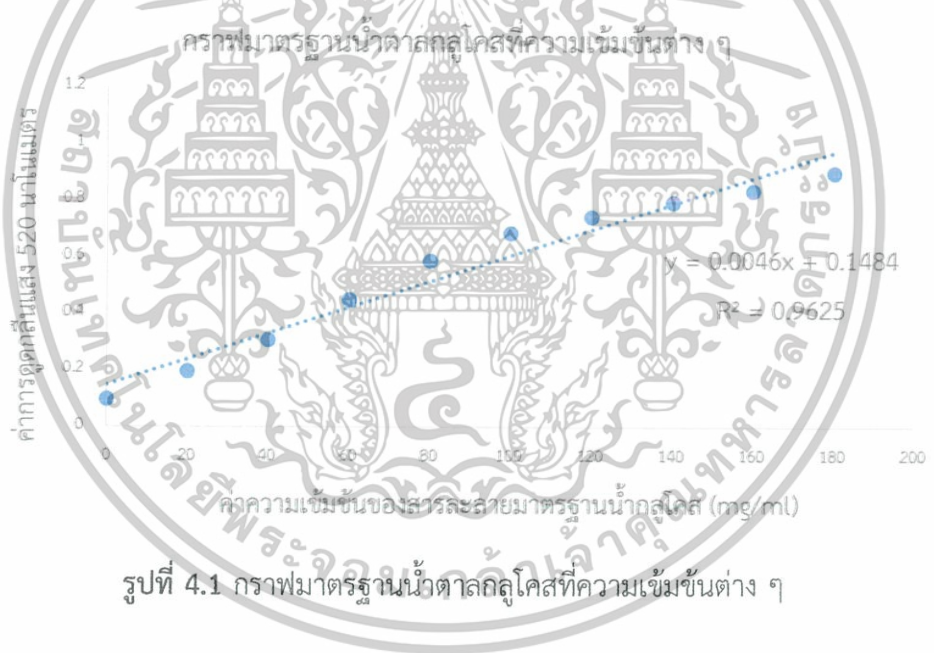
เตรียมสารละลาย $(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร และเติม $Na_2AsO_4.7H_2O$ 6 กรัม คนให้เข้ากัน จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24ชั่วโมง แล้วนำมากรองเอาตะกอนออกก่อนนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วิธีการวิเคราะห์

1.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคส (Analytical grade glucose) โดยอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาทำเป็นสารละลายความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 และ 180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายแต่ละความเข้มข้นในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเปรียบเทียบ เติม Copper reagent 1.0 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันที โดยใช้น้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสง ได้เป็นกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ 4.1




รูปที่ 4.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

1.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ นำไปวิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสข้างต้น คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลว SS

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสหาได้จากสมการในกราฟ คือ $y = 0.0046x + 0.1484$

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเจือจาง 20 เท่า มีค่า OD = 0.276

จาก $y = 0.0046x + 0.1484$

แทนค่า $y = 0.2205$ ลงในสมการ $y = 0.0046x + 0.1484$

จะได้ $0.276 = 0.0046x + 0.1484$

$$x = \frac{0.276 - 0.1484}{0.0046}$$

$x = 27.74$

∴ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเจือจาง 10 เท่า มีค่าเท่ากับ 277.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 0.2774 กรัมต่อลิตร

ตัวอย่างคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสหาได้จากสมการในกราฟ คือ $y = 0.0046x + 0.1484$

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเจือจาง 1 เท่า มีค่า OD = 0.607

จาก $y = 0.0046x + 0.1484$

แทนค่า $y = 0.607$ ลงในสมการ $y = 0.0046x + 0.1484$

จะได้ $0.607 = 0.0046x + 0.1484$

$$x = \frac{0.607 - 0.1484}{0.0046}$$

$x = 99.70$

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ระดับความเจือจาง 1 เท่า มีค่าเท่ากับ 99.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 22.0966 x 99.7 = 209.03 ไมโครกรัม

ตัวอย่างมีน้ำหนักแห้ง 1.0695 กรัม ได้ปริมาณน้ำตาล 209.03 ไมโครกรัม

∴ ถ้าน้ำหนักแห้ง 1 กรัม มีปริมาณน้ำตาล 195.45 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง หรือ 0.20 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง

## 2. วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสี

สกัดสารสีที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารสีที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หาค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สามารถคำนวณได้ดังนี้

ตัวอย่างคำนวณหาปริมาณสารสีในอาหารเหลว SS

เก็บตัวอย่างสารสีปริมาตร 9 มิลลิลิตร สกัดสารสีเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร (ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 50) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.434 ABS ส่วนปริมาณอาหารเหลว 80 มิลลิลิตร ตัวอย่างเส้นใยที่นำคิดเป็นน้ำหนักแห้งได้ 1.7808 กรัม สามารถนำมาคำนวณปริมาณสารสีได้ดังนี้

ปริมาณสารสี 0.434 ที่ OD 500 นาโนเมตร

เจือจางที่ 20 เท่า $20 \times 0.434 = 8.68$ unit

ปริมาณสารสีทั้งหมด $80 \times 8.68 = 694.4$ unit

ตัวอย่างมีน้ำหนักแห้ง 1.7808 กรัม ได้สารสี 694.4 unit

ถ้าน้ำหนักแห้ง 1 กรัม จะมีสารสี 389.94 $U_{500nm}$ ต่อกรัมเซลล์แห้ง

ตัวอย่างคำนวณหาปริมาณสารสีบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้

เก็บตัวอย่างข้าวแดง 2.0641 สกัดสารสีเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.402 ABS ตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1.0529 กรัม สามารถนำมาคำนวณปริมาณสารสีได้ดังนี้

ปริมาณสารสี ที่การเจือจาง 0.402 ที่ OD 500 นาโนเมตร

ปริมาณสารสีทั้งหมด $22.06 \times 0.402 = 8.87$ unit

ตัวอย่างมีน้ำหนักแห้ง 1.0529 กรัม ได้สารสี 8.87 unit

ถ้าน้ำหนักแห้ง 1 กรัม จะมีสารสี 8.42 $U_{500nm}$ ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง

## 3. การหาน้ำหนักแห้ง (dry cell weight)

3.1 นำจานเพาะเลี้ยงเชื้ออบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccators) แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

3.2 นำตัวอย่างข้าวประมาณ 1-2 กรัม ใส่จานเพาะเชื้อที่อบไว้แล้ว

3.3 นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อบจนได้น้ำหนักคงที่ใช้เวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง

3.4 นำออกมาใส่โถอบแห้ง 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

3.5 นำไปอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักจานเพาะเชื้อมาหักออกเป็นค่าน้ำหนักแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4. การหาปริมาณความชื้น

ใช้วิธีการเดียวกับการหาน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อได้น้ำหนักแห้งแล้ว ให้นำมาหักออกจากน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ ก็จะได้ค่าความชื้นของตัวอย่าง นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

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

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณความชื้น

น้ำหนักจานเพาะเชื้อ = 89.8251 กรัม

น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ = 1.0020 กรัม

น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ = 0.4909 กรัม

จากสูตร ปริมาณความชื้น $= \frac{1.0020 - 0.4909}{1.0020} \times 100$

$= 51.01\%$

## 5. การวิเคราะห์ซิตรินินด้วยเครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography) ดัดแปลงวิธีของ Xu และคณะ (2003)

### 5.1 การเตรียมโมบายเฟส

1. น้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ (DI) ไปต้มประมาณ 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. นำอะซิโตนไนไตรด์ 35 เปอร์เซ็นต์ (350 มิลลิลิตร) ผสมกับน้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต้มแล้ว 65เปอร์เซ็นต์ (650 มิลลิลิตร)

3. กรองด้วย 0.45 ไมโครเมตร membrane filter ใส่ขวดดูแรนที่เท่าปริมาตรของสารละลาย

4. นำไปไล่ฟองอากาศด้วยเครื่อง degas ประมาณ 20-30 วินาที ห้ามนานเกินไปเพื่อป้องกันการระเหยของอะซิโตนไนไตรด์

5. นำไปกรองด้วย 0.45 ไมโครเมตร membrane filter อีกครั้ง

6. นำไปใช้กับเครื่อง HPLC

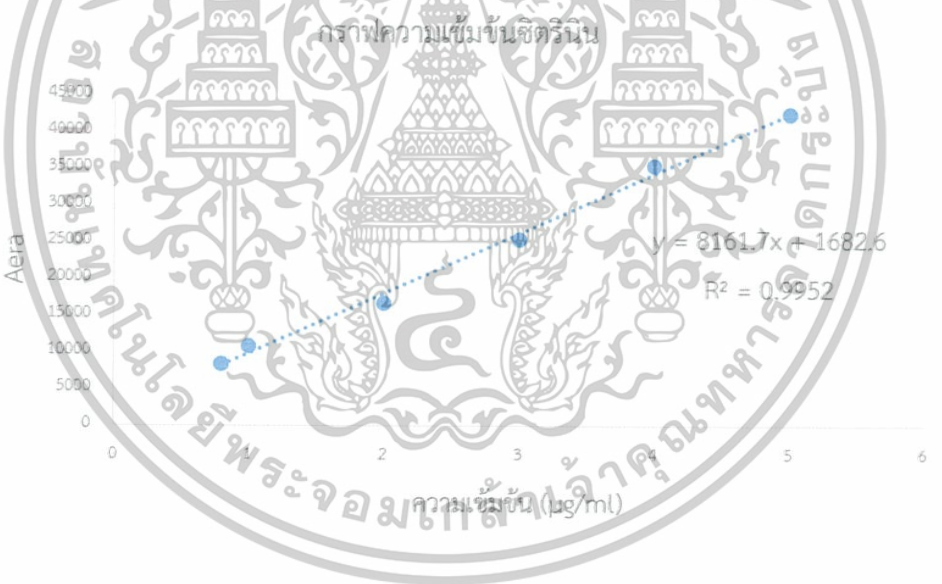
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**5.2 การเตรียมสารตัวอย่าง**

นำส่วนใสที่กรองได้ไปผสมกับเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำไปผสมกับอะซิโตไนไตท์ (อัตราส่วน 65:35) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

**5.3 การเตรียมสารมาตรฐานซิตรินิน**

นำสารละลายซิตรินินมาตรฐานที่ละลายในเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์มาเจือจางด้วยน้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.8, 1, 2, 3, 4 และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปกรองด้วย 0.45 ไมโครเมตร membrane filter แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณซิตรินินในตัวอย่างต่อไป กราฟมาตรฐานซิตรินินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 4.2




**รูปที่ 4.2** กราฟมาตรฐานซิตรินินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างคำนวณหาปริมาณซิตรินินในอาหารเหลว SS

ปริมาณซิตรินินหาได้จากสมการในกราฟ คือ $y = 8161.7x + 1682.6$

ปริมาณซิตรินินที่เวลา 19.898 นาที มีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 1854

จาก $y = 8161.7x + 1682.6$

แทนค่า $y = 1854$ ลงในสมการ $y = 8161.7x + 1682.6$

จะได้ $1854 = 8161.7x + 1682.6$

$$x = \frac{1854 - 1682.6}{8161.7}$$

$x = 0.02$

ปริมาณซิตรินินที่ระดับความเจือจาง 2 เท่า มีค่าเท่ากับ 0.004 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณซิตรินินทั้งหมด $80 \times 0.004 = 3.20$ ไมโครกรัม

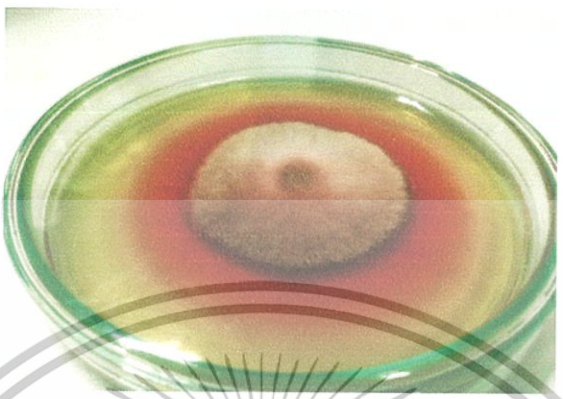
ตัวอย่างมีน้ำหนักแห้ง 1.7808 กรัม ได้ปริมาณซิตรินิน 3.20 ไมโครกรัม

∴ ถ้าน้ำหนักแห้ง 1 กรัม มีปริมาณซิตรินิน 1.7969 ไมโครกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง หรือ 0.0018 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง

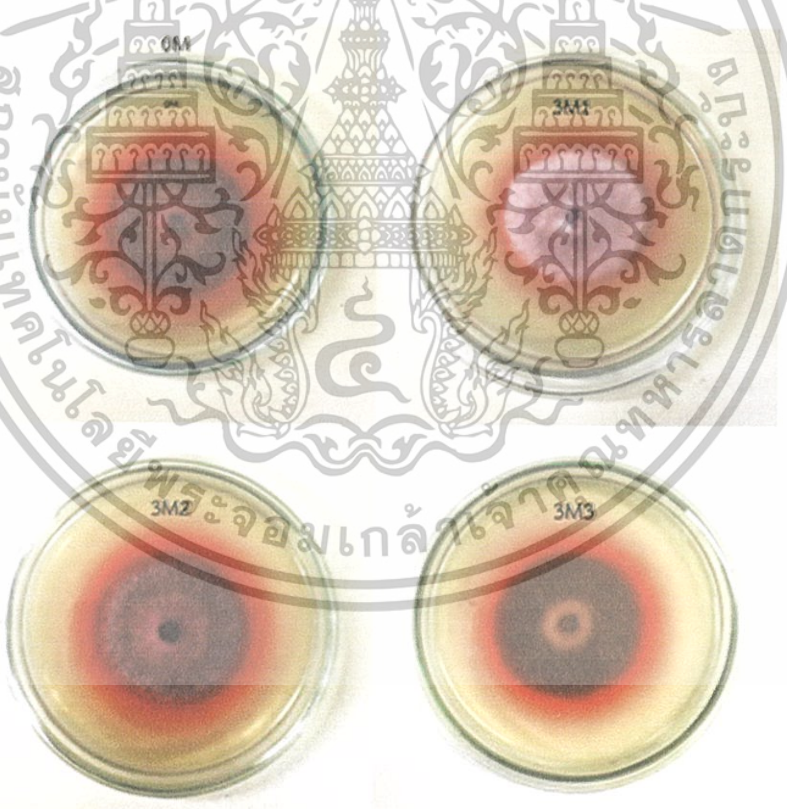
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค

# รูปแสดงผลการทดลอง

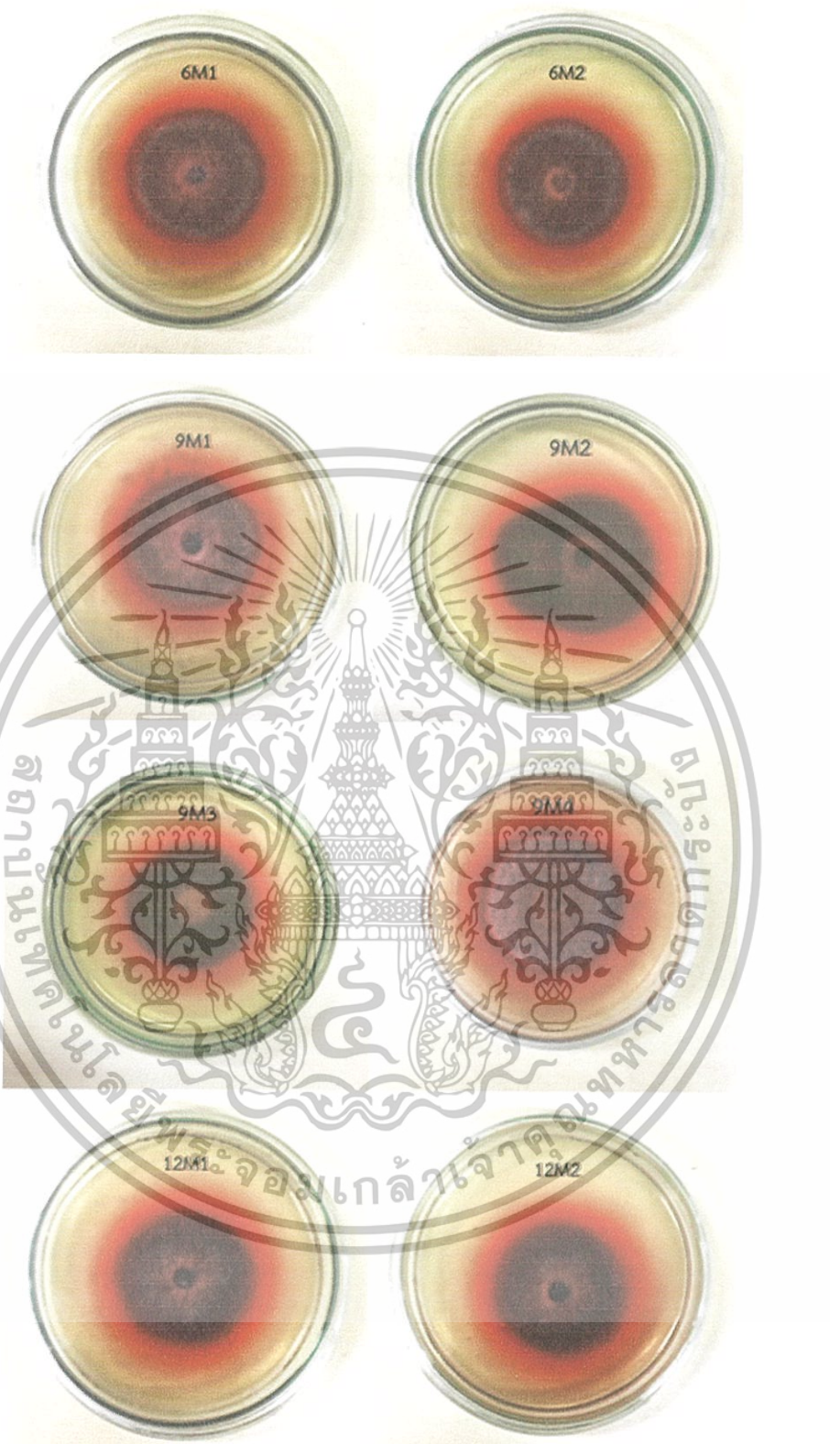


**รูปที่ 4.3** เชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS เป็นเวลา 7 วัน



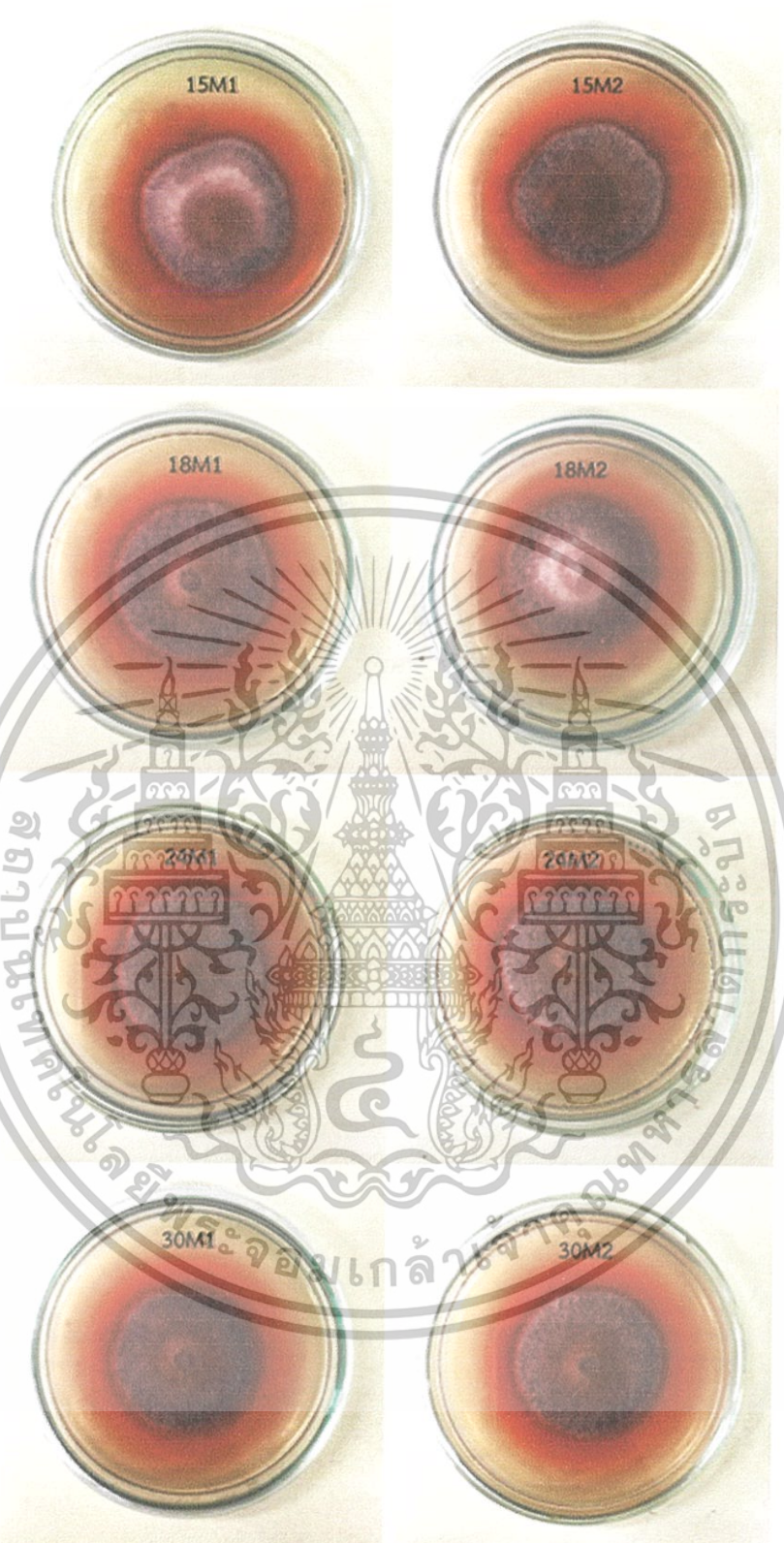

**รูปที่ 4.4** เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 0M1, 3M1, 3M2 และ 3M3 ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



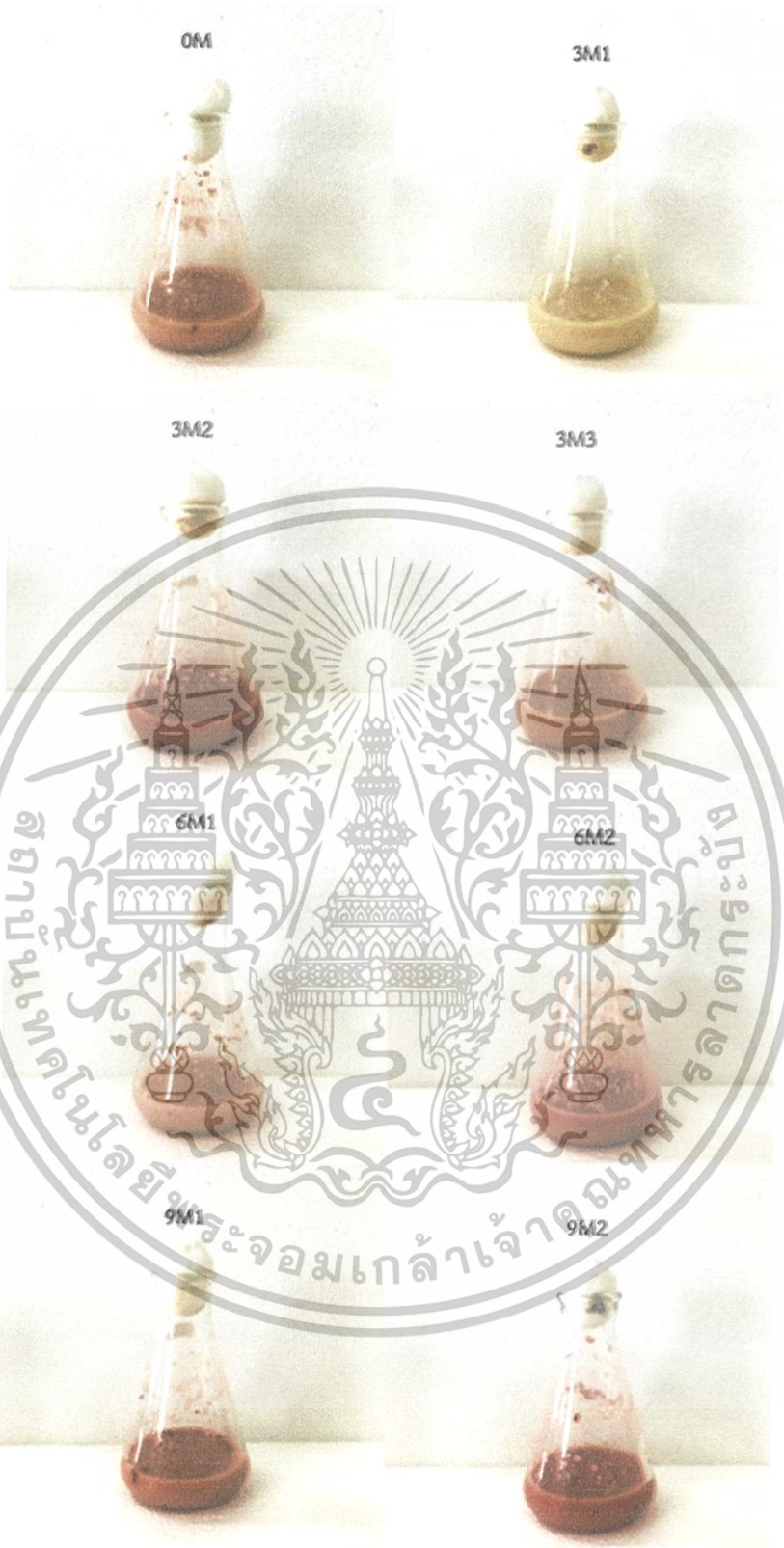

**รูปที่ 4.5** เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 6M1, 6M2, 9M1, 9M2, 9M3, 9M4, 12M1 และ 12M2 ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.6** เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 15M1, 15M2, 18M1, 18M2, 24M1, 24M2, 30M1 และ 30M2 ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

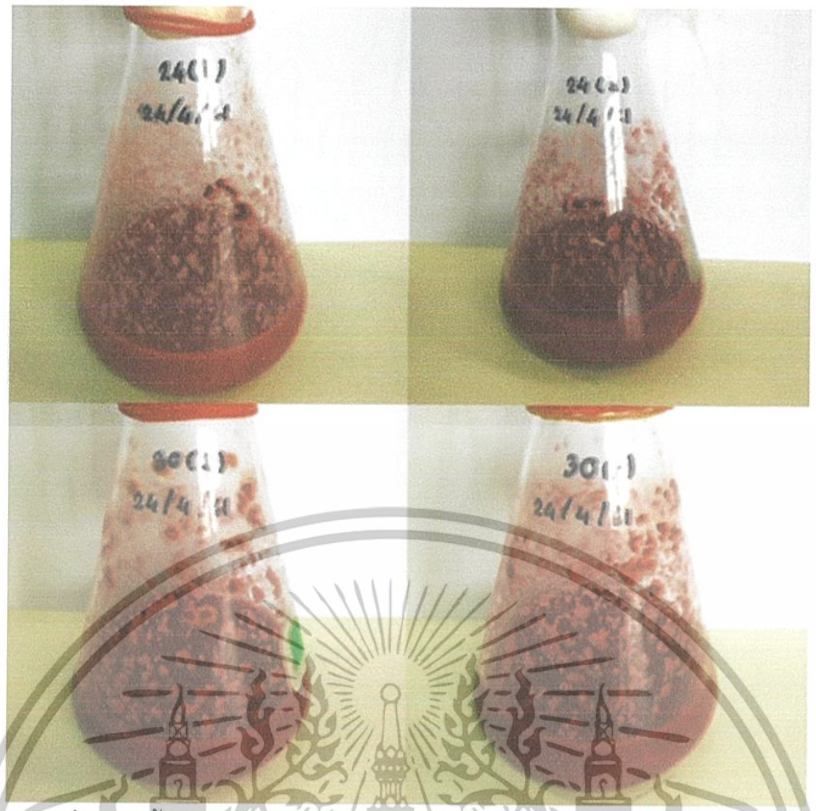



**รูปที่ 4.7** เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 0M1, 3M1, 3M2, 3M3, 6M1, 6M2, 9M1 และ 9M2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว SS เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 4.8** เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 9M3, 9M4, 12M1, 12M2, 15M1, 15M2, 18M1 และ 18M2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว SS เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 24M1, 24M2, 30M1, และ 30M2 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว SS เป็นเวลา 7 วัน

**รูปที่ 4.10** เชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์พ่อแม่ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ เป็นเวลา 28 วัน

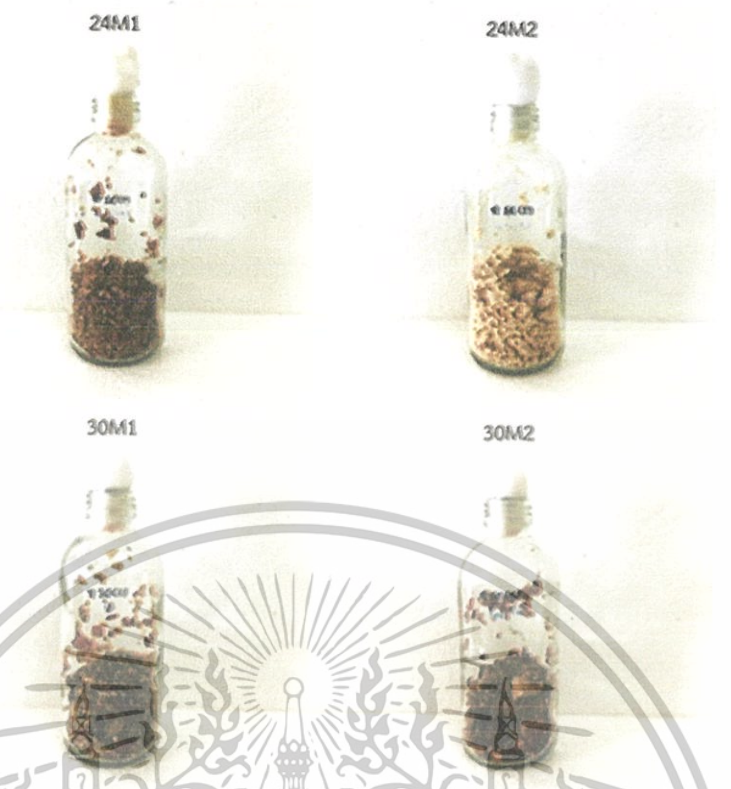
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 4.11** เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 0M1, 3M1, 3M2, 3M3, 6M1, 6M2, 9M1 และ 9M2 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ เป็นเวลา 28 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 4.12** เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 9M3, 9M4, 12M1, 12M2, 15M1, 15M2, 18M1 และ 18M2 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ เป็นเวลา 28 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.13** เชื้อรา *Monascus* sp. กลายพันธุ์สายพันธุ์ 24M1, 24M2, 30M1, และ 30M2 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งธัญพืชข้าวเสาไห้ เป็นเวลา 28 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้