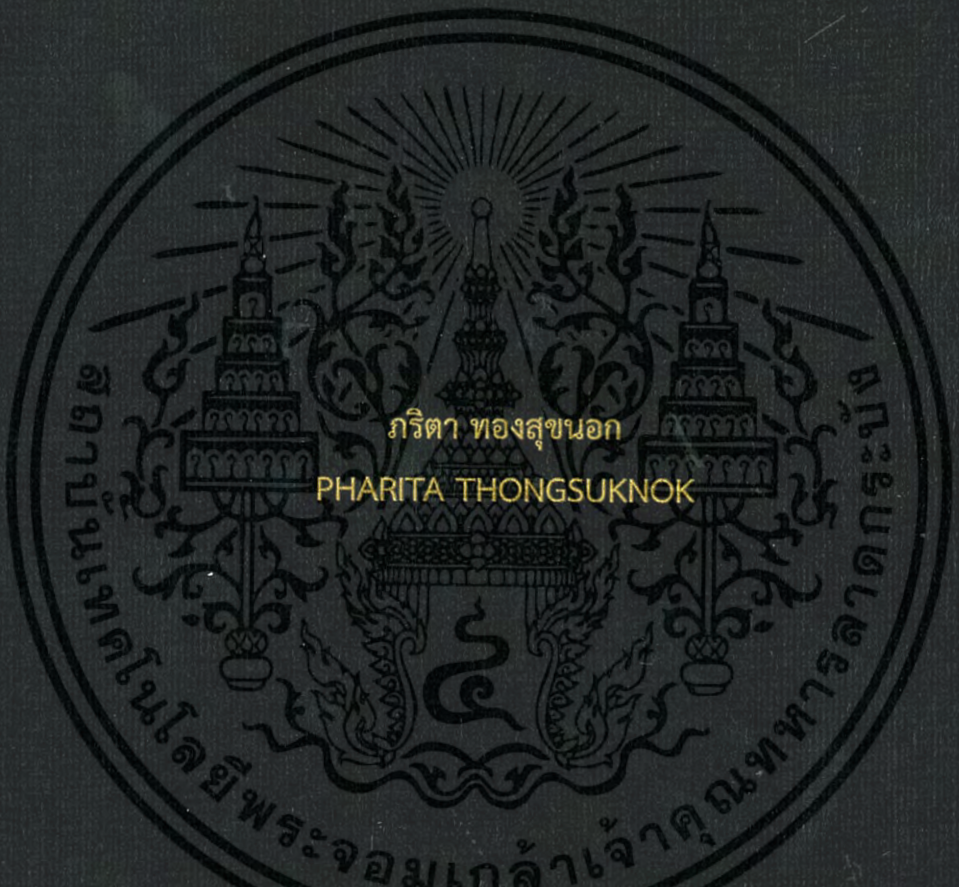
การผลิตสารลดคอเลสเตอรอล (เมวาสเตติน) จากเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์กลาย

PRODUCTION OF CHOLESTEROL-LOWERING AGENT (MEVASTATIN) FROM *MONASCUS* SP. MUTANT



ภริตา ทองสุขนอก

PHARITA THONGSUKNOK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2558

KMITL-2015-SC-M-020-017

การผลิตสารลดคอเลสเตอรอล (เมวาสเตติน) จากเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์กลาย

PRODUCTION OF CHOLESTEROL-LOWERING AGENT (MEVASTATIN) FROM *MONASCUS* SP. MUTANT

ภริตา ทองสุขนอก
PHARITA THONGSUKNOK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2558

KMITL-2015-SC-M-020-017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

127 51 601

PRODUCTION OF CHOLESTEROL-LOWERING AGENT (MEVASTATIN) FROM *MONASCUS* SP. MUTANT

PHARITA THONGSUKNOK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER IN BIOTECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MOUGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2015
KMITL-2015-SC-M-020-017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2015
FACULTY OF SCIENCE
KING MOUGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ "การผลิตสารลดคอเลสเตอรอล (เมวาสเตติน) จากเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์กลาย"
"PRODUCTION OF CHOLESTEROL-LOWERING AGENT (MEVASTATIN) FROM *MONASCUS* SP. MUTANT"

ชื่อนักศึกษา นางสาวภริตา ทองสุขนอก
รหัสประจำตัว 53651506
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมชาย ไกรรักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.สุขใจ ชูจันทร์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง)	
ผศ.ดร.สุดารัตน์ สวนจิตร ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ	
ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	

วัน/ เดือน/ ปี ที่สอบ 8 มิถุนายน พ.ศ. 2558 เวลา 10.00-12.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 อาคารจุฬาภรณ์วลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดษณี ธนะบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
วันที่ 16 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 58

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตสารลดคอเลสเตอรอล (เมวาสเตติน) จากเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์กลาย
ชื่อนักศึกษา	นางสาวภริตา ทองสุขนอก
รหัสประจำตัว	53651506
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

ศึกษาการผลิตสารลดคอเลสเตอรอล (เมวาสเตติน) (ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ในกระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล) จากเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เจริญบนอาหารแข็งโดยใช้วัสดุหมักเป็นธัญพืช ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว ในสภาวะต่างๆ เช่น ความชื้นเริ่มต้น การผสมผสาน (สภาวะนิ่ง หมุนขวดตลอดเวลา และหมุนขวดสลับนิ่ง (ที่ระดับ 1 ต่อ 3 1 ต่อ 6 และ 1 ต่อ 12 ตามลำดับ) และพีเอชเริ่มต้น (3.0 4.5 6.0) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 เจริญในสภาวะนิ่ง บนวัสดุหมักมันแกว และมันสำปะหลัง ให้การผลิตเมวาสเตติน 9.65 และ 9.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตามลำดับ) เมื่อนำแกลบมาผสมกับวัสดุหมัก ทำให้วัสดุหมักกระจายตัวดีขึ้น และส่งผลให้การผลิตเมวาสเตตินในวัสดุหมักมันแกว และมันสำปะหลังผสมแกลบ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มขึ้นเป็น 9.21 และ 11.57 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตามลำดับ) กรณีที่เลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวดสลับนิ่งที่ระดับ 1 ต่อ 3 พบว่าการเจริญในวัสดุหมักมันแกวผสมแกลบ 1.0 เปอร์เซ็นต์ และมันสำปะหลังผสมแกลบ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตเมวาสเตตินสูงสุด 20.65 และ 15.78 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตามลำดับ) ต่อมานำเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ไปผ่านการปรับปรุงพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต สามารถคัดแยกเชื้อราสายพันธุ์กลายบนอาหารวุ้น MYS พีเอชเริ่มต้น 3.0 ได้จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ U2V1 U2V2 U2V3 U2V4 U2V5 U6V1 U10V1 จึงนำมาทดสอบการผลิตสารเมวาสเตตินเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์กลายรหัส U6V1 สามารถผลิตเมวาสเตตินสูงสุดเท่ากับ 31.530 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง บนวัสดุหมักมันสำปะหลังผสมแกลบ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชเริ่มต้น 3.0 ในสภาวะหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์

คำสำคัญ : การผลิตเมวาสเตติน การเจริญบนอาหารแข็ง มันแกว มันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The Title	Production of Cholesterol-lowering Agent (Mevastatin) From *Monascus* sp. Mutant
Student Name	Pharita Thongsuknok
Student ID	53651506
Degree	Master of Science
Department	Biology
Year	2015
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Somchai Krairak

ABSTRACT

The production of cholesterol-lowering agent, mevastatin which is an inhibitor of HMG-CoA reductase in cholesterol biosynthesis, was studied from *Monascus* sp. SS14. The *Monascus* sp. SS14 was cultivated by solid state fermentation with raw materials such as Cassava chip, Jicama (yam bean), Sweet potato and Water chestnut. The culture condition was optimized for the production of mevastatin by initial moisture content, mixing (static condition, continuous rotating condition and interval of rotating and static condition (at level of 1/3, 1/6 and 1/12, respectively) and initial pH (3.0, 4.5 and 6.0 respectively). By static condition, the cultivation of *Monascus* sp. SS14 with Jicama and Cassava chip gave mevastatin at 9.65 and 9.22 mg/g-DSW, respectively. When the 1.0% of rice hull was added, the dispersion of raw materials had been enhancing. Resulting in, the mevastatin production was higher by the cultivations with Jicama and Cassava chip and 1.0% of rice hull (9.21 and 11.57 mg / g-DSW, respectively). In case of cultivation with intervals of rotating and static condition, it was found that, the cultivation by Jicama and Cassava chip with 1.0% of rice hull gave the highest mevastatin production at 20.65 and 15.78 mg/g-DSW, respectively. Furthermore, the strain improvement of *Monascus* sp. SS14 was done by UV-radiations exposure. The 7 mutants, U2V1, U2V2, U2V3, U2V4, U2V5, U6V1 U10V1, were retrieved by MYS agar with initial pH of 3.0. The mevastatin production among 7 mutants and wild type were compared. It was concluded that, the Monascus sp. U6V1 presented the maximum amount of mevastatin (31.530 mg /g-DSW), when cultivated on Cassava chip with 1.0% rice hull at initial pH of 3.0 and the interval of rotating and static condition by 1/3 for 5 weeks.

Keyword : Cassava chip, Jicama, Mevastatin production, Solid State Fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ซึ่งจะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงตามจุดประสงค์ไปได้ด้วยดี หากไม่ได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาของข้าพเจ้าได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำและความรู้ต่างๆแก่ข้าพเจ้า

ขอกราบขอบคุณ รองศาสตราจารย์ สุขใจ ชูจันทร์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบัน ซึ่งตรวจสอบและให้คำแนะนำ ชี้แนะในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความเรียบร้อยและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการเพื่อทำการทดลองต่างๆ รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการยืมใช้เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณนางสาววรรณิสา ปั้นสุข นางสาวอังคนางค์ โสวัจจสตางกูล นางสาวอมรรัตน์ สุวรรณโพธิ์ศรี นางสาววริศรา ลัทธิวงศกร นางสาวจิรารัตน์ จิรานุวัฒน์กุล นางสาวณฐนันทน์ มั่นจีน ที่ค่อยให้คำปรึกษา แก้ไขปัญหาวิทยานิพนธ์ และนางสาวลลิตวดี ตันต๋า นางสาววนิดา เขียวจันทร์ นางสาววรางคณา รัตนะกรี นักศึกษาปริญญาตรี ปีการศึกษา พ.ศ. 2558 ที่ให้ความร่วมมือการปฏิบัติงานเพื่อทำการทดลองในวิทยานิพนธ์นี้

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและญาติพี่น้อง เพื่อนๆ ที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษาตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์นิพนธ์ฉบับนี้และคอยให้กำลังใจอยู่เคียงข้างเสมอมา

นางสาวภริตา ทองสุขนอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูปภาพ ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมา และ ความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตการวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเสียชีวิตจากปัจจัยต่างๆ 4
2.2 ไขมัน (Lipids) 7
2.3 ประโยชน์ของไขมัน 8
2.3.1 ไขมันเป็นสารที่ให้พลังงานสูงสุด 8
2.3.2 ไขมันให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย 9
2.3.3 ร่างกายใช้ไขมันในการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ 9
2.3.4 ไขมันนำมาใช้สร้างเป็นฮอร์โมน 9
2.3.5 ไขมันหน้าที่อื่นๆ 10
2.4 การขนส่งไขมันในเลือด 10
2.5 คอเลสเตอรอล (Cholesterol) 12
2.6 บทบาทของคอเลสเตอรอล 15
2.7 ยาลดคอเลสเตอรอล (เมวาสเตติน) 18
2.8 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มสเตติน 25
2.9 ความเป็นมา และบทบาทของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 27
2.10 สภาวะการเลี้ยงเชื้อและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 30
2.10.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp.
บนอาหารแข็ง (solid-state cultivation) 30
2.10.2 การเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp.
ในอาหารเหลว (submerged cultivation) 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.11 มิวเตชันหรือการกลายพันธุ์ (Mutation) 31
2.11.1 ระดับของมิวเตชัน 31
2.11.2 การเกิดมิวเตชัน 32
2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 33

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 36
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 36
3.3 อุปกรณ์ 37
3.4 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ 37
3.5 การเตรียมวัสดุหมัก (พืชผลทางการเกษตร) เพื่อใช้เป็นอาหารแข็ง 37
3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตติน 37
3.6.1 การเตรียมต้นเชื้อ (inoculum) 37
3.6.2 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง 38
3.6.3 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 38
3.7 การศึกษาการกลายพันธุ์ 38
3.8 การคัดเลือกเชื้อรากลายพันธุ์เบื้องต้น 39
3.8 1 คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายบนอาหาร MYS agar พีเอช 3 39
3.8 2 คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายบนวัสดุหมักอาหารแข็ง 39
3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 39
3.10 การหาสภาวะพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตติน
โดยเชื้อราสายพันธุ์กลาย 39
3.11 การวิเคราะห์ 40
3.11.1 การสกัดเมวาสเตติน 40
3.11.2 การวิเคราะห์เมวาสเตติน 40
3.11.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับการเจริญ 40
3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ 40

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเตรียมวัสดุหมักเพื่อใช้เป็นอาหารแข็งในการเลี้ยงเชื้อรา
Monascus sp. SS14 41
4.2 ศึกษาสภาวะการผลิตเมวาสเตตินโดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และการผลิตเมวาสเตตินบนวัสดุหมักในสภาวะนิ่ง 42
4.2.2 ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมักเพื่อผลิตเมวาสเตตินในสภาวะนิ่ง 44
4.2.3 การเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมักในสภาวะหมุนสลับนิ่ง 45
4.2.4 การเลี้ยงเชื้อ Monascus sp. SS14 ในอาหารเหลว 51
4.3 ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 53
4.3.1 การคัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์กลายบนอาหาร MYS พีเอช 3 54
4.3.2 การคัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์กลาย บนวัสดุหมัก 54
4.4 ลักษณะโคโลนีของ เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์กลายเมื่อเจริญบนอาหารวุ้น 55
4.5 ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตตินจากเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์กลาย บนวัสดุหมัก 59

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ
5.1 สรุปผลการวิจัย 66
5.2 ข้อเสนอแนะ 68

บรรณานุกรม 69

ภาคผนวก
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 75
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ 78
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์เมวาสเตติน 84
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ทางสถิติ 85
ประวัติผู้เขียน 102

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 จำนวนผู้ป่วยในตามกลุ่มโรคที่พบสูงสุด 10 อันดับแรกจำแนกตามเพศ กลุ่มอายุ และ จำนวนวันอยู่รักษาเฉลี่ย อัตราตายต่อประชากร 100,000 คน จำแนกตามสาเหตุที่สำคัญ พ.ศ. 2551-2555 5

2.2 ชนิดของไลโพโปรตีน 11

4.1 ผลการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ 45

4.2 ผลการผลิตเมวาสเตตินที่สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่งที่สัดส่วน 1 ต่อ 3 1 ต่อ 6 และ 1 ต่อ 12 (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับสภาวะการหมุนตลอดเวลา 46

4.3 จากการเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. SS14 เพื่อผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ใช้วัสดุหมักแทนแป้งในอาหารเหลวสูตรต่างๆ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน 52

4.4 ผลการผลิตเมวาสเตตินบนอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์ ที่สภาวะการหมุน 1 ชั่วโมงหยุดหมุน 3 ชั่วโมง 55

4.5 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และสายพันธุ์กลาย ที่ได้บนอาหาร MYS agar ที่เวลา 7 วัน โดยวัดความกว้างของโคโลนี ในหน่วยของเซนติเมตร 56

4.6 การผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น) 59

4.7 การผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนวัสดุหมักที่พีเอชต่างๆ 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 การตีบหรืออุดตันของหลอดเลือด 7
2.2 อนุภาคไลโพโปรตีน 8
2.3 โครงสร้างทางเคมีของสเตอแรน (sterane) 13
2.4 โครงสร้างทางเคมีของคอเลสเตอรอล 14
2.5 ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดแดงมีลักษณะเป็นคราบ (Plaque) 16
2.6 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มสเตติน 20
2.7 โครงสร้างหลักของสารกลุ่มสเตติน 21
2.8 โครงสร้างโซ่ด้านข้างของสารกลุ่มสเตติน 22
2.9 กระบวนการสังเคราะห์เมวาสเตตินทางชีวภาพ 23
2.10 กระบวนการสังเคราะห์เมวาสเตตินทางเคมี 24
2.11 การสังเคราะห์คอเลสเตอรอล 26
2.12 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ HMG-CoA reductase 27
2.13 โครงสร้างของเมวาสเตตินและส่วนที่ไปแย่งจับกับเอนไซม์ HMG-CoA reductase 27
2.14 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp. 29
4.1 ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเมวาสเตติน 42
4.2 การผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ในสภาวะนิ่ง 43
4.3 ลักษณะการจับตัวเป็นก้อนของวัสดุหมัก ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ในสภาวะนิ่ง ที่ไม่ผสมแกลบ 43
4.4 ลักษณะของวัสดุหมัก ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ในสภาวะนิ่งที่ผสมแกลบ 44
4.5 ปริมาณความชื้นของการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมักมันแกว (ก) ไม่เติมแกลบ (ข) เติมแกลบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่สภาวะการเลี้ยงต่างๆ 47
4.6 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมักมันแกว (ก) ไม่เติมแกลบ (ข) เติมแกลบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่ สภาวะการเลี้ยงต่างๆ 47
4.7 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมักมันเทศไม่เติมแกลบ (ก) มันเทศเติมแกลบ (ข) แห้วไม่เติมแกลบ (ค) และแห้วเติมแกลบ (ง) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.8 การกระจายตัวของวัสดุหมักมันแกวที่เติมแกลบ โดยสภาวะหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5 สัปดาห์ 50

4.9 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp SS14 เข้าไปในเนื้อของวัสดุหมักอย่างทั่วถึงของวัสดุหมักมันแกวที่เติมแกลบ 50

4.10 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp SS14 เข้าไปในเนื้อของวัสดุหมักมันเทศ (ก) และแห้ว (ข) ที่เติมแกลบ 51

4.11 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในอาหารเหลวโดยใช้วัสดุหมักมันเทศ (ก) และแห้ว (ข) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน 52

4.12 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp. ที่ผ่านรังสี UV ที่เวลา 0-14 นาที 53

4.13 ผลผลิตที่ได้ (Yield p/x) จากเชื้อรากลายพันธุ์ *Monascus* sp. โดยเปรียบเทียบจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 54

4.14 การศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และเชื้อรา Monascus sp. SS14 สายพันธุ์กลาย ทั้ง 8 สายพันธุ์ บนอาหาร เลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ 57

4.15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า 58

4.16 ความแตกต่างพีเอชของวัสดุหมักมันสำปะหลัง (ก) และมันแกว (ข) ของชุดควบคุมที่สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1/3 และเติมแกลบ โดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 60

4.17 เมวาสเตตินที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆของวัสดุหมักมันสำปะหลัง (ก) และมันแกว (ข) สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1ต่อ 3 ที่ผสมแกลบ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สัปดาห์ที่ 5 โดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 63

4.18 ความแตกต่างพีเอชของวัสดุหมักมันสำปะหลัง (ก) และมันแกว (ข) ที่สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 ที่ผสมแกลบ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเชื้อราสายพันธุ1กลาย U6V1 64

4.19 ปริมาณกลูโคซามีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัม) น้ำหนักแห้งตัวอย่าง ของสายพันธุ1 U6V1 ที่การหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสัปดาห์ที่ 5 ของวัสดุหมักมันสำปะกลังผสมแกลบ 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อัตราการตายในปัจจุบันพบได้หลายสาเหตุ จากสถิติสาเหตุการตายที่สำคัญของคนไทยในช่วงปี พ.ศ. 2551-2555 ซึ่งรายงานโดยกรมการแพทย์กระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2556 จำแนกตามสาเหตุการเสียชีวิต ได้เป็น มะเร็ง และเนื้องอกทุกชนิด (malignant neoplasm, all forms), อุบัติเหตุ และการเป็นพิษ (accident and poisonings), โรคที่เกี่ยวกับหัวใจ (disease of the heart), ความดันเลือดสูง และโรคหลอดเลือดในสมอง (hypertension and cerebrovascular disease), ปอดอักเสบ และโรคที่เกี่ยวกับปอด (pneumonia and other diseases of lung), โรคที่เกี่ยวกับไต (เช่น ไตอักเสบ (nephritis) กลุ่มอาการของไตพิการ (nephrotic syndrome) และไตพิการ (nephosis)), โรคเกี่ยวกับตับ และตับอ่อน (disease of liver and pancrease), การบาดเจ็บจากการฆ่าตัวตาย ถูกฆ่าตาย และอื่นๆ (suicide, homicide and other injury), วัณโรคทุกชนิด (tuberculosis, all forms), เบาหวาน (diabetes mellitus), โรคภูมิคุ้มกันบกพร่องเนื่องจากไวรัส (human immunodeficieney virus (HIV) disease) และอื่นๆ

ปัจจุบันการดูแลสุขภาพมีความสำคัญ โดยแสดงออกในลักษณะของการบริโภค และการออกกำลังกาย เพื่อแก้ปัญหาที่ประชากรส่วนใหญ่ประสบอยู่ หนึ่งในนั้น ได้แก่ โรคอ้วน (obesity) จัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งพบว่าคนที่อยู่ในเมืองที่มีอาหารการกินอุดมสมบูรณ์ประสบกับโรคอ้วน สาเหตุหลักที่ทำให้คนไทยเป็นโรคอ้วนหรือมีน้ำหนักเกินมาจากการขาดการออกกำลังกายและนิสัยการบริโภคที่คำนึงถึงความอร่อยของอาหารมากกว่าคุณภาพของอาหาร โรคอ้วนเป็นสาเหตุสำคัญของโรคเบาหวาน หัวใจ ความดันโลหิตสูง และไขมันในเส้นเลือด ดังนั้นการออกกำลังกายจึงเป็นการป้องกันภาวะโรคอ้วนได้เป็นอย่างดี โรคต่างๆที่กล่าวมาโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันทั้งชนิดเรื้อรัง (chronic ischemic heart disease) และเฉียบพลัน (acute coronary syndrome) มีแนวโน้มที่สูงขึ้นเรื่อยๆ เป็นโรคที่เรื้อรัง และมีอันตรายทำให้ป่วย หรือเสียชีวิต มีผลต่อเศรษฐกิจและสังคมเป็นอย่างมาก ซึ่งโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันมีสาเหตุหลักมาจากพฤติกรรมการบริโภคของคนไทยในปัจจุบัน นิยมการบริโภคอาหารประเภท เช่น ไก่ทอด พิซซ่า เฟรนช์ฟรายส์ แฮมเบอร์เกอร์ รวมถึงขนมปังต่างๆ ซึ่งอาหารเหล่านี้มีน้ำตาลและไขมันในปริมาณที่สูง โดยเฉพาะไขมันอิ่มตัว ไขมันชนิดทรานส์ (trans fat) และการสะสมคอเลสเตอรอล (cholesterol) (กมลา, 2554)

ดังนั้นผู้ป่วยโรคหัวใจ และหลอดเลือด ควรได้รับการดูแลเอาใจใส่ในการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการออกกำลังกาย และโดยเฉพาะอย่างยิ่งคือการบริโภคอาหารอย่างเหมาะสม เพื่อไม่ให้โรคหัวใจลุกลามมากขึ้น การรักษาระดับคอเลสเตอรอลจึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง แต่ผู้ที่มีระดับคอเลสเตอรอลสูงจำเป็นต้องได้รับยาเพื่อลดกิจกรรมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ยาลดคอเลสเตอรอลที่นิยมใช้ในปัจจุบันอยู่ในกลุ่มสเตติน (statin) ซึ่งออกฤทธิ์โดยเข้ารวมตัวกับเอนไซม์ 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymeA reductase หรือ HMG-CoA reductase แบบแข่งขัน ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อกิจกรรมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล (Chen และ Hu, 2005) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยากลุ่มนี้ต้องอยู่ภายใต้การควบคุมของแพทย์อย่างใกล้ชิด เพื่อป้องกันผลกระทบต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตฮอร์โมน และกิจกรรมบางชนิดในร่างกาย ยาในกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์ได้ทั้งกระบวนการทางเคมี และทางชีวเคมี ซึ่งกระบวนการทางเคมีหากบริโภคในปริมาณมากและบ่อยครั้ง จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค อาจมีการสะสมสารพิษในร่างกายอันเกิดจากสารอื่นที่ปะปนมาเนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์ (จุไรรัตน์, 2537) ดังนั้นการสังเคราะห์ทางชีวเคมีจึงมีความปลอดภัยกว่า กระบวนการทางชีวเคมีนิยมใช้จุลินทรีย์ในการผลิต ได้แก่ เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. และ *Monascus* spp. (Liu และคณะ, 2010) ซึ่งเชื้อราโมแนสคัส (*Monascus* sp.) เป็นราที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหมักและมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากในระหว่างการเจริญของราได้มีการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) หลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารลดคอเลสเตอรอล ได้แก่ เมวาสเตติน (mevastatin) โลวาสเตติน (lovastatin) และ โมนาโคลิน (monacolin) เป็นต้น ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-Co A reductase ในขั้นตอนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย ดังนั้นจึงมีการใช้อาหารหมักจากเชื้อรา *Monascus* sp. โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ข้าวแดงหรืออังคัก (angkak) (Endo, 1979) ในการรักษาโรคคอเลสเตอรอลสูง (Wei และคณะ, 2003) นอกจากข้าวแดงซึ่งเป็นข้าวที่หมักด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. แล้วยังมีการใช้พืชผลทางการเกษตรชนิดอื่นเป็นวัสดุหมักอีกด้วย เช่น ลูกเดือย (Pattanagul และคณะ, 2008) กลอย (Ritmungkrin, 2004) และมันฝรั่ง (Yongsmith และ Tabloka, 1985) จึงเป็นแนวคิดที่จะนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญบนอาหารแข็ง และการผลิตสารลดคอเลสเตอรอล (เมวาสเตติน) โดยนำพืชผลทางการเกษตรมาทำให้เกิดประโยชน์สูงสุด ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว มาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการผลิตเมวาสเตติน ในสภาวะการเจริญบนอาหารแข็ง (solid-state fermentation) หรือการเจริญในอาหารเหลว (submerged fermentation) นอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าพืชผลทางการเกษตรแล้ว ยังได้สารลดคอเลสเตอรอลที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. จากทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตสารเมวาสเตตินในปริมาณสูง

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตตินของวัสดุหมักอาหารแข็ง ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และ แห้ว

1.2.3 เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเมวาสเตติน ได้แก่ ความชื้นเริ่มต้น การหมุนผสมผสานเพื่อให้อากาศ และพีเอชเริ่มต้น

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ศึกษาข้อมูลในการผลิตสารเมวาสเตตินโดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14

1.3.2 ศึกษาการผลิตสารเมวาสเตตินโดยเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์กลาย

1.3.3 ศึกษาชนิดของวัสดุหมักอาหารแข็งที่เหมาะสม ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และ แห้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถปรับปรุงและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรที่ราคาถูกให้มีมูลค่าที่สูงขึ้นได้

1.4.2 การนำผลิตภัณฑ์ที่ผลิตมาใช้ประโยชน์ เช่น ทางการแพทย์ หรืออุตสาหกรรมยา

1.4.3 สามารถพัฒนาศักยภาพของการนำเชื้อรา *Monascus* sp. ไปใช้ผลิตสารที่มีประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเสียชีวิตจากปัจจัยต่างๆ

ในปัจจุบันประชากรทั่วโลกมีแนวโน้มอัตราการตายเพิ่มขึ้นอยู่ตลอดเวลา สาเหตุหลักที่มีผลกระทบต่อภาวะการตาย ได้แก่ ความขัดแย้งทางการเมือง และการทหาร วิกฤตการณ์ทางเศรษฐกิจ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเศรษฐกิจสังคม การใช้ชีวิตที่ไม่ถูกสุขภาพ การกลับมาระบาดของโรคติดต่อ เช่น มาลาเรีย วัณโรค และอหิวาตกโรค รวมทั้งการระบาดของโรคเอดส์ (วรชัย, 2554) สำหรับประเทศไทยพบอัตราการตายมีหลายสาเหตุ ซึ่งรายงานสถิติกรมการแพทย์กระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2556 จำแนกตามสาเหตุการเสียชีวิตในช่วงปี พ.ศ. 2551-2555 ตามลำดับ ได้แก่ มะเร็งและเนื้องอกทุกชนิด (malignant neoplasm, all forms), อุบัติเหตุและการเป็นพิษ (accident and poisonings), โรคหัวใจ (disease of the heart), ความดันเลือดสูงและโรคหลอดเลือดในสมอง (hypertension and cerebrovascular disease), ปอดอักเสบและโรคอื่นๆของปอด (pneumonia and other diseases of lung), ไตอักเสบ กลุ่มอาการของไตพิการและไตพิการ (nephritis, nephrotic syndrome and nephosis), โรคเกี่ยวกับตับและตับอ่อน (disease of liver and pancrease), การบาดเจ็บจากการฆ่าตัวตาย ถูกฆ่าตาย และอื่นๆ (suicide, homicide and other injury), วัณโรคทุกชนิด (tuberculosis, all forms), เบาหวาน (diabetes mellitus), โรคภูมิคุ้มกันบกพร่องเนื่องจากไวรัส (human immunodeficieney virus (HIV) disease) และอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 2.1 อย่างไรก็ตามก่อนหน้านี้สถิติการตาย ปี พ.ศ. 2551-2555 ได้มีรายงานจากการสอบสวนสาเหตุการตายจากใบมรณบัตร ปี พ.ศ. 2543 ในบรรดาสาเหตุการตายสามารถระบุโรคได้นั้น โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับแรก ตามมาด้วยการตายจากโรคหัวใจ อุบัติเหตุและการเป็นพิษ ความดันเลือดสูง และโรคหลอดเลือดในสมอง ปอดอักเสบและโรคอื่นๆของปอด เป็นสาเหตุการตายอันดับ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ เมื่อกล่าวถึงประชากรไทยในอดีตสาเหตุการตายมาจากโรคติดเชื้อทั้งสิ้น โรคที่เป็นสาเหตุสำคัญของการตายอยู่ในกลุ่มโรคมาลาเรีย วัณโรค ปลอดอักเสบ โรคติดเชื้อของลำไส้ เป็นต้น แต่เมื่อมีการแพทย์สาธารณสุขเพิ่มขึ้น มีการกำจัดป้องกันควบคุมโรคดีขึ้น โรคเหล่านี้จึงค่อยๆลดลง พร้อมๆกับความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคมประชากรได้มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม โรคติดเชื้อสามารถรักษาหรือควบคุมได้ด้วยยาหรือวัคซีน แต่โรคที่เกิดจากพฤติกรรมได้เพิ่มความรุนแรงมากขึ้น เช่น การไม่ออกกำลังกาย การรับประทานอาหารที่มีไขมัน หรือคอเลสเตอรอลสูง ความเครียด ทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคความดันสูง การพัฒนาทางด้านการคมนาคมขนส่ง ทำให้เกิดอุบัติเหตุมากยิ่งขึ้น เป็นต้น ในอนาคตการตายกลับจะสูงขึ้นจากที่มีผู้สูงอายุเพิ่มขึ้น สำหรับสาเหตุการตายที่สำคัญมีทิศทางการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน คือ การตายจากโรคติดต่อลดลง แต่ปัญหาพฤติกรรมมนุษย์เองกลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น การควบคุมโรคเหล่านี้จึงต้องมุ่งไปที่การเปลี่ยนพฤติกรรมของประชากร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 จำนวนผู้ป่วยในตามกลุ่มโรคที่พบสูงสุด 10 อันดับแรกจำแนกตามเพศ กลุ่ม อายุและจำนวนวันอยู่รักษาเฉลี่ย อัตราตายต่อประชากร 100,000 คน จำแนกตามสาเหตุที่สำคัญ พ.ศ. 2551-2555

กลุ่มสาเหตุ (Cause groups)	ปี พ.ศ.				
	2551	2552	2553	2554	2555
มะเร็งและเนื้องอกทุกชนิด (Malignant neoplasmม all forms)	87.6	88.3	91.2	95.2	98.5
อุบัติเหตุและการเป็นพิษ (Accident and poisonings)	55.1	55.6	51.6	52.8	51.6
โรคหัวใจ (Disease of heart)	29.8	29.0	28.9	31.4	32.9
ความดันเลือดสูงและโรคหลอดเลือดในสมอง (Hypertension and cerebrovascular disease)	24.7	24.7	31.4	33.7	37.4
ปอดอักเสบ กลุ่มอาการของไตพิการและไตพิการ (Nephritis, nephrotic syndrome and nephrosis	22.5	20.8	21.6	23.0	22.9
โรคเกี่ยวกับตับและตับอ่อน (Disease of liver and pancrease)	13.8	13.5	13.8	14.0	14.6
การบาดเจ็บจากการฆ่าตัวตาย ถูกฆ่าตายและอื่นๆ (Suicide, homicide and other injury)	11.0	10.5	11.1	10.6	10.8
วัณโรคทุกชนิด (Tuberculosis, all forms)	7.6	7.2	7.0	7.5	8.3
เบาหวาน (Diabetes mellitus)	12.2	11.1	10.8	11.9	12.1
โรคภูมิคุ้มกันบกพร่องเนื่องจากไวรัส (Human immunodeficieney virus (HIV) disease)	7.4	6.4	5.7	5.9	6.3
อื่น (Other)	333.8	330.9	347.0	331.9	324.5

ที่มา : สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข (2556)

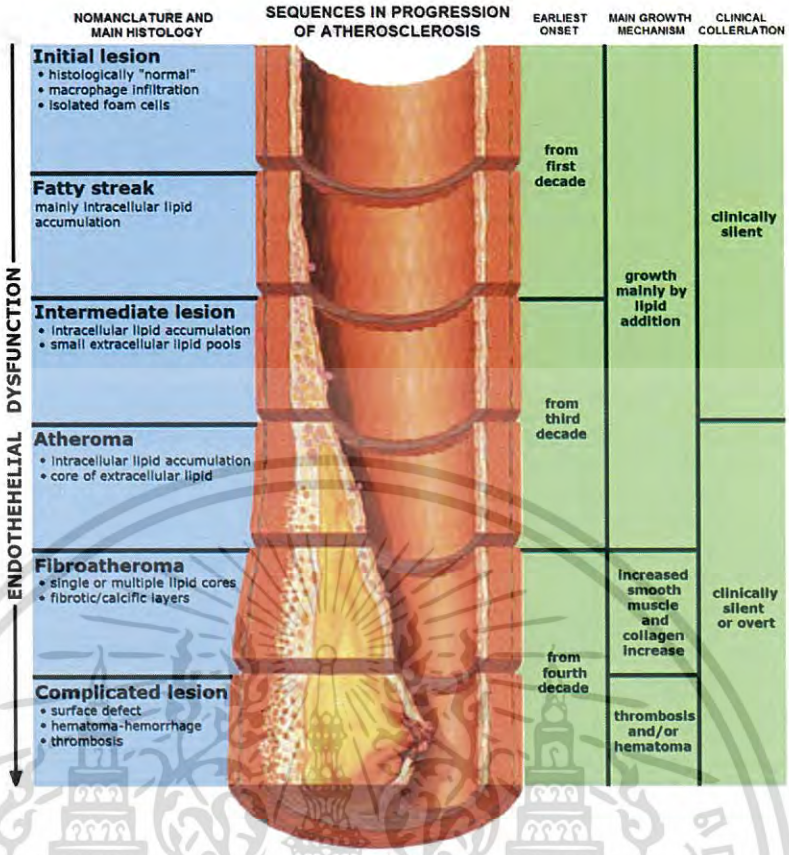
จากตารางที่ 2.1 โรคหัวใจ และโรคหลอดเลือดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญเป็นอันดับต้นๆในประชากรไทย ปิยะมิตร (2554) กล่าวว่า สาเหตุสำคัญมาจากการเสื่อมของผนังหลอดเลือดแดงที่เรียกว่า ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) ทำให้หลอดเลือดแดงตีบ หรืออุดตัน (แสดงดังรูปที่ 2.1) การตีบหรือการอุดตันอย่างเฉียบพลันของหลอดเลือดหัวใจ (acute coronary syndrome) ทำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด หรือตายเฉียบพลัน (acute myocardial infarction) มีแนวโน้มของอุบัติการณ์ที่สูงขึ้นเรื่อยๆ เป็นโรคเรื้อรัง และมีอันตรายทำให้ป่วย หรือเสียชีวิต จึงมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมอย่างมาก ตัวผู้ป่วยย่อมมีความทุกข์ทรมานจากความเจ็บป่วย ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดการเสื่อมของผนังหลอดเลือดหัวใจเป็นสหปัจจัยบางชนิดปรับเปลี่ยน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ได้ เช่น ประวัติการเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือดในครอบครัว บางชนิดปรับเปลี่ยนหรือควบคุมได้ เช่น การสูบบุหรี่ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน ไขมันในเลือดสูง ภาวะอ้วน หรือการไม่ออกกำลังกาย การมีปัจจัยเสี่ยงหลายชนิดรวมกันจะทำให้ความเสี่ยงในการเกิดโรคเพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น การศึกษาพบว่าในชายอายุระหว่าง 30-60 ปี ถ้าหากมีไขมันในเลือดสูง จะมีโอกาสเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจมากกว่าผู้ที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงประมาณ 2 เท่า แต่ถ้าสูบบุหรี่ร่วมกับการมีความดันโลหิตสูงและไขมันในเลือดสูงจะมีโอกาสเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจมากกว่าคนธรรมดาถึง 8.5 เท่า ความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงที่พบบ่อย ระยะเวลาที่มีความดันโลหิตสูง และความรุนแรงมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ การควบคุมความดันโลหิตด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมร่วมกับการใช้ยาจะลดอัตราการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ในปัจจุบันพบว่ามีหลายสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคหัวใจหนึ่งในนั้นก็คือภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ ไม่ว่าจะเป็นระดับ LDL-คอเลสเตอรอล หรือไตรกลีเซอไรด์สูง รวมถึงการมีระดับ HDL-คอเลสเตอรอลต่ำ เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญอันหนึ่ง ซึ่งเป็นปัจจัยที่พบได้มากในประชากรไทย เนื่องจากมีสังคมเมืองขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ การให้ประชากรเข้าใจถึงความสำคัญในการควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย การใช้ยาควบคุมระดับไขมันในกรณีจำเป็น จึงมีความสำคัญอย่างมาก ในการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจในประชากรไทย สาเหตุสำคัญที่เกิดการสะสมคอเลสเตอรอลจำนวนมากในร่างกาย ก็คือ การรับประทานอาหารที่มีไขมันจำนวนมาก พฤติกรรมการไม่ออกกำลังกาย เป็นต้น

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดโรคหัวใจและโรคหลอดเลือดอุดตันที่พบทั่วไป ได้แก่ โรคอ้วน เป็นโรคร้ายที่ทั่วโลกประสบปัญหา อันเกิดจากการที่ร่างกายมีไขมันสะสมมากเกินไปเนื่องจากการเสียสมดุลของพลังงาน พลังงานที่สะสมมีมากกว่าที่ใช้ไป ไขมันเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับร่างกาย เพราะเป็นสารอาหารที่สำคัญในการให้พลังงานต่อชีวิตที่มีประสิทธิภาพสูง สารคาร์โบไฮเดรต (เช่น ข้าว แป้ง น้ำตาล) ปริมาณเท่ากับไขมันจะให้พลังงานน้อยกว่าไขมันปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ไขมันที่สะสมอยู่ที่ผิวหนังทั้งตัวเรา ยังช่วยรักษาความอบอุ่นให้ร่างกายในหน้าหนาว คนเมืองหนาวจึงกินไขมันมากกว่า ในขณะที่คนเมืองร้อนกินคาร์โบไฮเดรตมากกว่าไขมัน (สมเกียรติ, 2550) ร่างกายเก็บพลังงานไว้ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ ไขมันที่ปรากฏอยู่ตามท้อง สะโพก หรือที่ต่างๆ ของร่างกายนั้นล้วนแต่เป็นไตรกลีเซอไรด์ทั้งนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 การตีบหรืออุดตันของหลอดเลือด
ที่มา : Child (2007)

2.2 ไขมัน (lipids) (ชิดพงษ์, 2542)

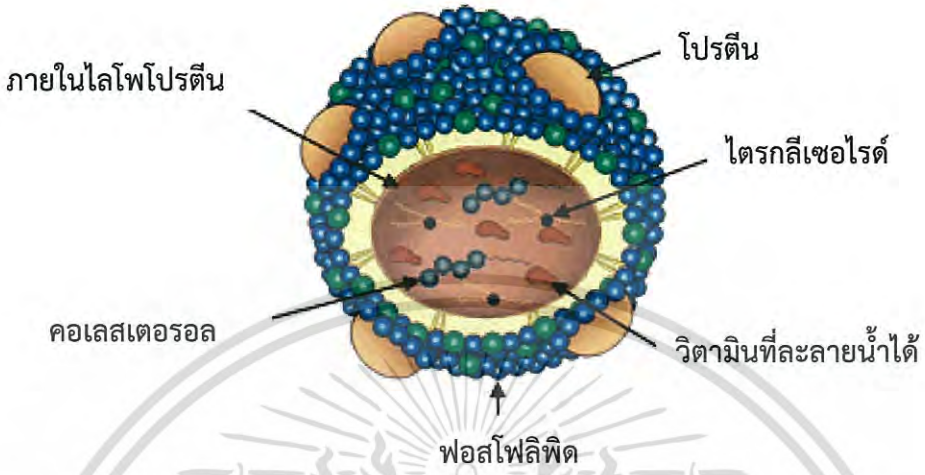
ไขมัน (lipids) หมายถึง สารอินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่ไม่ละลายน้ำ ปรากฏอยู่ในรูปของแข็งและของเหลวทั้งในพืชและสัตว์ซึ่งมนุษย์บริโภคเป็นอาหาร อาหารไขมันที่เราบริโภคส่วนใหญ่อยู่ในรูป “ไตรเอซิลกลีเซอรอล” (triacylglycerol) ซึ่งเรียกว่า “ไตรกลีเซอไรด์” (triglycerride) ไขมันส่วนน้อยจะอยู่ในรูปของสเตอรอล (sterol) ซึ่งนิยมเรียกว่า “คอเลสเตอรอล” (cholesterol) และฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ซึ่งประกอบด้วยเลซิทิน (lecithin) และสฟิงโกลิพิด (sphyngolipid) (ชิดพงษ์, 2542)

ไขมันที่ปรากฏอยู่ในเลือดมนุษย์ส่วนใหญ่ได้จากอาหาร และบางส่วนของร่างกายสังเคราะห์ขึ้นมาเอง ไขมันเหล่านี้มีอยู่ในรูปเอสเทอร์ (ester) ของกรดไขมัน ซึ่งมาจากการรวมตัวของกรดไขมันกับสารอื่น เช่น กรดไขมัน 3 ชนิด รวมตัวกับกลีเซอรอล กลายเป็นไขมัน ไตรกลีเซอไรด์ หรือกรดไขมันรวมตัวกับคอเลสเตอรอล กลายเป็นคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) เป็นต้น กรดไขมันเอสเทอร์ ส่วนใหญ่จะเกาะอยู่กับโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งเป็นตัวพาไขมันไปสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งเรียกว่า ไลโพโปรตีน (lipoprotein) ดังแสดงรูปที่ 2.2 (ชิดพงษ์, 2542)

กรดไขมันในเลือดยังอาจอยู่ในสภาพของไขมันอิสระ (free fatty acid : FFA) ซึ่งร่างกายจะนำไปใช้เป็นพลังงาน ร่างกายสามารถสังเคราะห์กรดไขมันบางอย่างได้โดยใช้สารอะเซทิลโคเอ (acetyl CoA) เป็นต้นกำเนิด แต่กรดไขมันบางชนิดร่างกายไม่สามารถสร้างเองได้ ต้องได้รับจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร จัดเป็นกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid) ได้แก่ กรดไลโนเลอิก (linoleic acid) และกรดแอลฟาไลโนเลนิก (α-linolenic acid) (ชิดพงษ์, 2542)



รูปที่ 2.2 อนุภาคไลโพโปรตีน
ที่มา : ชิดพงษ์ (2542)

ไขมันที่อยู่ในอาหารจะปนกันอยู่ในสัดส่วนที่ต่างกัน อาหารบางชนิดมีไตรกลีเซอไรด์มาก คอเลสเตอรอลน้อย บางชนิดมีคอเลสเตอรอลมาก บางชนิดมีฟอสโฟลิพิดมาก สัดส่วนที่ต่างกันนี้ทำให้ไขมันในอาหารต่างๆ มีความแตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ไขมันที่อยู่ในอาหารยังมีลักษณะต่างกันเพราะส่วนประกอบทางเคมีด้วย เช่น มันหมู และน้ำมันพืช มีคุณสมบัติแตกต่างกันทั้งที่ประกอบด้วยไตรกลีเซอรอลไรด์เป็นส่วนใหญ่เหมือนกัน เพราะส่วนประกอบทางเคมีของ ไตรกลีเซอไรด์ในมันหมูและน้ำมันพืชนั้นแตกต่างกัน ไตรกลีเซอไรด์ที่ปรากฏอยู่ในธรรมชาติมีคุณสมบัติแตกต่างกันหลายประการ เนื่องจากมีความแตกต่างกันที่ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ

2.3 ประโยชน์ของไขมัน

ไขมันเป็นสารประเภทหนึ่ง มีความสำคัญและจำเป็นต่อร่างกาย แต่เนื่องจากผลร้ายของไขมันในร่างกายสูงทำให้เกิดโรคภัยไข้เจ็บจนถึงแก่ชีวิต ทำให้คนกลัวไขมันกันมาก คนส่วนมากจึงมองเห็นแต่โทษเสียจนมองข้างประโยชน์ของไขมันไป ไขมันมีประโยชน์หลายประการ ดังนี้

2.3.1 ไขมันเป็นสารที่ให้พลังงานสูงสุด

ไขมันน้ำหนัก 1 กรัม ให้พลังงาน 9 กิโลแคลอรี่ ในขณะที่คาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในน้ำหนักเท่ากันให้พลังงานเพียง 4 กิโลแคลอรี่ อาหารไขมันส่วนมากจะเป็นไตรกลีเซอไรด์หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งเป็นไขมันที่เซลล์นำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานหลัก (primary source) เพื่อให้พลังงานแก่ร่างกายและเป็นรูปของไขมันที่สะสมในร่างกายได้ไม่มีขีดจำกัด เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองแก่ร่างกายยามที่ร่างกายขาดแคลนพลังงาน (อุษณีย์, 2547) ไตรกลีเซอไรด์ในอาหารไขมันจะถูกย่อยและสลายในลำไส้เล็ก โดยอาศัยกรดน้ำดีทำให้ไขมันกลายเป็นโมเลกุลที่เล็กและเข้ากับน้ำดีเป็นอิมัลชัน (emulsification) เพื่อให้เอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน สามารถเข้าสลายไขมันที่จับกับกลีเซอรอลที่ตำแหน่ง 1 และ 3 ออกไป ได้เป็นกรดไขมัน 2 โมเลกุลและโมโนกลีเซอไรด์ชนิด 2-โมโน-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ หรือนำไปหาประโยชน์ในรูปแบบอื่นใดก็ตาม ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอซิลกลีเซอรอล 1 โมเลกุล กรดไขมันและ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นจะถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็ก ที่เซลล์ของลำไส้เล็ก (enterocytes) จะเกิดการสร้างไตรกลีเซอไรด์ขึ้นมาใหม่ จากโมโนกลีเซอไรด์ที่ดูดซึมเข้ามากับกรดไขมันสายยาว (long chain fatty acid) จากนั้นไตรกลีเซอไรด์โมเลกุลใหม่จะรวมกับโปรตีนชนิดอะโพโปรตีน บี-48 ฟอสโฟลิพิดและคอเลสเตอรอลเพื่อหลั่งออกจากเซลล์ลำไส้เล็ก โมเลกุลที่หลั่งออกมาเป็นลิพิดชนิดไลโพโปรตีน เรียกว่า ไคโลไมครอน (chylomicron) ไคโลไมครอนจะเข้าสู่ระบบโลหิต โดยผ่านทาง thoracic duct เพื่อไปที่เนื้อเยื่อต่างๆโดยเฉพาะไปที่ตับ ไคโลไมครอนจึงเป็นตัวพาลิพิดที่ได้จากอาหาร (exogenous lipid) ไปในกระแสเลือด ขณะที่อยู่ในกระแสเลือด เอนไซม์ไลโพโปรตีนไลเปส (lipoprotein lipase) ที่ผนังของหลอดเลือด จะตัดกรดไขมันของไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในไคโลไมครอนซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ เพื่อให้เซลล์นำออกไปออกซิไดส์เป็นพลังงานโดยขบวนการเบต้าออกซิเดชัน (β-oxidation) ในไมโตคอนเดรีย กรดไขมันที่ผ่านเซลล์เมมเบรนเข้ามาในซัยโตซอล จะเข้าไปในไมโตคอนเดรียโดยอาศัยคาร์นิทีนชัทเทิล (carnitine shuttle) ปฏิกิริยาเบต้าออกซิเดชัน ทำให้กรดไขมันถูกตัดคาร์บอนออกไปจากโมเลกุลทีละ 2 อะตอม ได้เป็นอะเซทิลโคเอ (acetyl CoA) ระหว่างการเกิดปฏิกิริยาจะมี $FADH_2$ และ NADH เกิดขึ้น จากนั้น acetyl CoA จะเข้าทำปฏิกิริยาในวัฏจักรเครปส์ (krebs cycle หรือ TCA cycle) ส่วน $FADH_2$ หรือ NADH จะถูกนำไปถ่ายทอดอิเลคตรอนในขบวนการถ่ายทอดอิเลคตรอน (electron transport chain) และมีพลังงานอิสระสร้างขึ้นมาเก็บในรูป ATP (อุษณีย์, 2547)

2.3.2 ไขมันให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย

พลังงานที่เกิดจากการสลายสารอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งไขมัน จะอยู่ในรูปของความร้อน ความร้อนที่เกิดขึ้นนั้นนอกจากจะทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆในร่างกายแล้ว ยังช่วยรักษาความอบอุ่นภายในไว้ด้วย นอกจากนั้นไขมันที่สะสมอยู่ใต้ผิวหนังยังช่วยเป็นชนวนป้องกันความหนาวเย็นจากภายนอกร่างกายได้ด้วย คนที่อยู่ในภูมิประเทศที่อากาศหนาวเย็นจึงมีไขมันใต้ผิวหนังมากกว่าคนที่อยู่ในเขตที่มีภูมิอากาศร้อน

2.3.3 ร่างกายใช้ไขมันในการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์

ร่างกายของมนุษย์มีเซลล์นับล้านเซลล์เป็นองค์ประกอบ เซลล์แต่ละเซลล์เป็นหน่วยงานสำเร็จรูปในตัวเอง มีเยื่อหุ้มเป็นเอกเทศ เยื่อหุ้มเซลล์นี้เกิดจากไขมันจำพวกฟอสโฟไลปิดเป็นส่วนใหญ่เรียงซ้อนกัน 2 ชั้นโดยหันด้านที่เป็นฟอสเฟสซึ่งเข้ากับน้ำได้ออกมาด้านนอก และส่วนใหญ่ที่เป็นกรดไขมันที่เข้ากับน้ำไม่ค่อยได้เข้าด้านใน นอกจากนั้นยังมีคอเลสเตอรอลและโปรตีนสอดแทรกอยู่ด้วย โปรตีนที่แทรกอยู่ส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เป็นลิ้นปิด-เปิดหรือเป็นตัวรับ เพื่อรับสารจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ หรือขับสารภายในเซลล์ออกมาสู่ภายนอก เพราะฉะนั้นจึงสรุปได้ว่า เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยฟอสโฟไลปิดเป็นส่วนใหญ่ สอดแทรกด้วยคอเลสเตอรอลและโปรตีน ในโมเลกุลฟอสโฟไลปิดและคอเลสเตอรอลเอสเทอร์มีกรดไขมันประกอบอยู่ เพราะฉะนั้นเยื่อหุ้มเซลล์จึงมีกรดไขมันชนิดต่างๆ ประกอบอยู่ กรดไขมันเหล่านี้มาจากการสังเคราะห์ของร่างกายและจากอาหารที่เรารับประทานเข้าไป ดังนั้นส่วนประกอบของอาหารที่รับประทานจึงมีส่วนกำหนดคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย

2.3.4 ไขมันนำมาใช้สร้างเป็นฮอร์โมน

ฮอร์โมนสำคัญที่เกิดจากสารจำพวกไขมัน ได้แก่

ก. ฮอร์โมนเพศ ทั้งฮอร์โมนเพศหญิงและเพศชายล้วนมาจากต้นตอเดียวกัน ได้แก่ คอเลสเตอรอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. ฮอร์โมนจำพวกสเตอรอยด์ สร้างขึ้นมาจากคอเลสเตอรอลเช่นเดียวกัน ทำปฏิกิริยาในการควบคุมร่างกายขณะมีความเครียด

ค. ฮอร์โมนเฉพาะที่ สร้างขึ้นมาจากกรดไขมันที่จำเป็น คือ กรดไขมันพวกโอเมก้า-6 ซึ่งอยู่ในกระบวนการของเกิดลิ่มเลือดและการอักเสบ

2.3.5 ไขมันหน้าที่อื่นๆ

ไขมันทำหน้าที่สำคัญหลายอย่างในร่างกาย ได้แก่ วิตามินที่ละลายในไขมัน คือ วิตามินเอ ดี อี และเค (A, D, E และ K) หรือช่วยในขบวนการถ่ายทอดอิเลคตรอน เช่น ยูบิควิโนน ไขมันเหล่านี้มีองค์ประกอบเป็นหน่วยย่อย เรียกว่า หน่วยย่อยไอโซพรีน (isoprene unit) จึงเรียกสารไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) เป็นลิพิดที่ไม่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ การสังเคราะห์เกิดมาจาก acetyl CoA ในร่างกาย เช่น การสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ วิตามินดีจากคอเลสเตอรอล

2.4 การขนส่งไขมันในเลือด

สารอาหารไขมันที่รับประทานเข้าไป ก่อนที่จะถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เข้าสู่กระแสโลหิตจะถูกย่อยให้เป็นอณูที่เล็กที่สุดเสียก่อน โดยอาศัยน้ำดีจากตับทำให้ไขมันแตกตัว และน้ำย่อยจากตับอ่อนเป็นตัวย่อย การย่อย การดูดซึม และการเคลื่อนไหวไขมันจะง่ายหรือยาก ช้าหรือเร็ว ขึ้นอยู่กับลักษณะทางธรรมชาติของกรดไขมัน 2 ประการ คือ ความสามารถในการละลายน้ำและจุดหลอมเหลว ลักษณะธรรมชาติทั้ง 2 ประการนี้ถูกกำหนดโดยโครงสร้างทางเคมีของกรดไขมัน 2 ประการ คือ

ก. ความยาวของห่วงโซ่ กรดไขมันยิ่งมีคาร์บอนต่อกันมาก ยิ่งละลายน้ำได้น้อยและมีจุดหลอมเหลวเกิดขึ้น ทำให้ไขมันชนิดนั้นอยู่ในสภาพของของเหลวน้อยลง

ข. ความไม่อิ่มตัวของกรดไขมัน กรดไขมันยิ่งมีความไม่อิ่มตัวมาก ยิ่งมีจุดหลอมเหลวต่ำและละลายน้ำได้มากขึ้น ทำให้ไขมันชนิดนั้นอยู่ในสภาพของของเหลวมากกว่าของแข็ง เช่น น้ำมันพืชต่างๆ (ยกเว้นน้ำมันมะพร้าว) ส่วนไขมันสัตว์ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวจึงมักจะอยู่ในสภาพของของแข็งมากกว่า

ลักษณะทางธรรมชาติของกรดไขมันเหล่านี้มีความสำคัญมากในการกำหนดบทบาทของกรดไขมันต่อระบบคอเลสเตอรอลในอนุภาคไลโพโปรตีน ไขมันที่ละลายน้ำได้มากและมีจุดหลอมเหลวต่ำจะถูกเคลื่อนย้ายได้เร็ว เมื่อดูดซึมผ่านผนังลำไส้แล้วก็สามารถเดินทางในกระแสเลือดเข้าสู่ตับโดยตรง คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และไขมันอื่นๆ ทำหน้าที่ขนส่งหรือเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งมีชื่อเรียกต่างๆกันตามความหนาแน่นของอนุภาคไลโพโปรตีนเหล่านั้น (ตารางที่ 2.2) ได้แก่ ไคโลไมครอน (chylomicron) ซากไคโลไมครอน (chylomicron remnants) ไลโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำมาก (very low density lipoprotein : VLDL) ไลโพโปรตีนความแน่นปานกลาง (intermediate-density lipoprotein : IDL) ไลโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein : LDL) และไลโพโปรตีนความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein : HDL)

ไขมันชนิดต่างๆจากอาหารทั้งคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และไขมันอื่นๆ จะถูกเคลื่อนย้ายจากลำไส้ไปสู่เนื้อเยื่อต่างๆ และตับโดยไคโลไมครอน ซึ่งเป็นอนุภาคไลโพโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำมาก เพราะอุดมด้วยไตรกลีเซอไรด์และมีโปรตีนเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น เมื่อไปถึงเนื้อเยื่อตามที่ต่างๆ ไตรกลีเซอไรด์จะถูกแยกเก็บเพื่อนำไปใช้เป็นพลังงาน ส่วนที่เหลือคือ ซากของไคโลไมครอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งอุดมด้วยคอเลสเตอรอลจะถูกนำกลับไปยังตับ เพื่อกำจัดคอเลสเตอรอล โดยเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดี ขับออกทางลำไส้เล็ก

ตารางที่ 2.2 ชนิดของไลโพโปรตีน

ไลโพโปรตีน	ชนิดของไขมันหลัก	อะโพโปรตีน*
ไคโลไมครอน	ไตรกลีเซอไรด์จากอาหาร (80-95%)	A-1, A-2, A-4, B-48, C-1, C-2, C-3
ซากไคโลไมครอน	คอเลสเตอรอลจากอาหาร	B-48, E
VLDL	ไตรกลีเซอไรด์จากตับ (45-65%)	B-100, C, E
DL	คอเลสเตอรอล (45%)	B-100, E, C-1, C-2, C-3
LDL	คอเลสเตอรอล (70%)	B-100
HDL	คอเลสเตอรอล (<25%)	A-1, A-2, A-4, C, E

หมายเหตุ : อะโพโปรตีน คือ โปรตีนที่ถูกสร้างโดยลำไส้หรือตับเพื่อผสมกับไขมันเป็นอนุภาค ไลโพโปรตีน

ที่มา : ชิดพงษ์, (2542)

VLDL ถูกสังเคราะห์โดยตับเพื่อนำไขมันที่ผ่านตับไปยังอวัยวะต่างๆ อนุภาคของ VLDL ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ 45-60 เปอร์เซ็นต์ และคอเลสเตอรอล 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านไปสู่เนื้อเยื่อต่างๆ ไตรกลีเซอไรด์จะถูกสกัดไว้ทำให้อนุภาคของ VLDL มีไตรกลีเซอไรด์น้อยลง จึงมีความหนาแน่นมากขึ้นจึงกลายเป็น LDL ซึ่งมีสัดส่วนของคอเลสเตอรอลสูงขึ้นเป็น 45 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของ LDL จะถูกนำสู่ตับ อีกครึ่งหนึ่งถูกเคลื่อนย้ายต่อไปตามเนื้อเยื่อต่างๆ เพื่อสกัดเอาไตรกลีเซอไรด์ออกไปอีก จนทำให้อนุภาค LDL มีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นเป็น LDL ซึ่งมีสัดส่วนของคอเลสเตอรอลสูงเป็น 70 เปอร์เซ็นต์

ในอนุภาคของ LDL จะมีคอเลสเตอรอลเอสเทอร์อยู่จำนวนมาก จากการคำนวณพบว่า หนึ่งอนุภาค LDL จะมีคอเลสเตอรอลเอสเทอร์อยู่ถึง 1,500 โมเลกุล และกรดไขมันในอนุภาคนี้ส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์ของกรดไลโนเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นชนิดหนึ่ง LDL มีหน้าที่หลายประการด้วยกัน คือ

- นำคอเลสเตอรอลกลับคืนสู่ตับ เพื่อย่อยเป็นกรดน้ำดีและขับออกทางลำไส้เล็ก
- นำคอเลสเตอรออลไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ เพื่อนำไปสร้างเยื่อหุ้มเซลล์
- ควบคุมการสร้างคอเลสเตอรอลตามเนื้อเยื่อต่างๆ ไม่ให้สร้างมากขึ้น

เซลล์ของตับและเนื้อเยื่อต่างๆ จะรับคอเลสเตอรอลจาก LDL ได้ต้องมีตัวรับที่จับโปรตีนของ LDL คือ B-100 ได้ ถ้าตัวรับมีน้อยลงหรือสมรรถภาพในการทำงานลดลง จะทำให้ระดับ LDL ในเลือดสูงขึ้น มีผลให้คอเลสเตอรอลถูกนำพาไปพอกไว้ที่ด้านในผนังหลอดเลือดแดงมากกว่าปกติ เป็นเหตุให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง และโรคเรื้อรังอื่นๆ ตามมาอีกมากมาย

HDL มีหน้าที่ตรงกันข้ามกับ LDL เพราะ HDL มีหน้าที่ในการขนย้ายคอเลสเตอรอลที่สลายออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ที่ตายแล้ว หรือเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีการผลัดเปลี่ยนซึ่งถูกขับเข้าสู่กระแสเลือดนำไปยังตับเพื่อเปลี่ยนเป็น VLDL หรือ LDL เพราะฉะนั้น HDL จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันภาวะหลอดเลือดแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไลโพโปรตีนมีบทบาทในการขนส่งไขมันในกระแสเลือด ในขณะที่อยู่ในกระแสเลือดจะมีเมแทบอลิซึม ได้แก่ HDL ซึ่งนำคอเลสเตอรอลที่สร้างจากเนื้อเยื่อต่างๆ ไปรวมกับกรดไขมันเป็นคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ อาศัยเอนไซม์ LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase) ซึ่งจะสลายกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของฟอสโฟลิพิดใน HDL มารวมกับคอเลสเตอรอลที่ HDL รับมาเป็นคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ ซึ่งคอเลสเตอรอลใน HDL จะถูกส่งให้แก่ VLDL และเกิดการสลายไขมันของไตรกลีเซอไรด์ใน VLDL ออกโดยไลโพโปรตีนไลเปสเพื่อนำเข้าไปในเซลล์ VLDL ที่เสียไตรกลีเซอไรด์ไปจะรับคอเลสเตอรอลเอสเทอร์จาก HDL เข้ามา จะมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นกลายเป็น LDL ซึ่งจะเป็นตัวพาคอเลสเตอรอลเอสเทอร์มาสลายที่ตับหรือที่เซลล์อื่นๆ LDL จึงเป็นตัวพาคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ในร่างกาย

2.5 คอเลสเตอรอล (Cholesterol) (ชิดพงษ์, 2542)

คอเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อชีวิตเรา เพราะคอเลสเตอรอลเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ และจำเป็นต่อการดำรงชีวิตตลอดจนการเจริญเติบโตของเซลล์ นอกจากนี้คอเลสเตอรอลยังเป็นวัตถุดิบที่ร่างกายนำไปใช้ในการสร้างฮอร์โมนจำพวกสเตอรอยด์ ฮอร์โมนเพศ และวิตามินดีอีกด้วย อย่างไรก็ตาม หากระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงมากเกินไป ก็จะก่อให้เกิดผลเสียจากการที่คอเลสเตอรอลพอกตามผนังหลอดเลือดแดง ทำให้หลอดเลือดแดงแข็ง สเตอรอลที่มีความสำคัญมากคือคอเลสเตอรอล สามารถสังเคราะห์ได้ในร่างกายเพื่อนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างผนังเซลล์และไลโพโปรทีน หรือนำไปเปลี่ยนให้เป็นกรดน้ำดี วิตามินดีและสเตียรอยด์ฮอร์โมน ร่างกายต้องการคอเลสเตอรอลในปริมาณที่พอเหมาะประมาณ 1000 – 2000 มิลลิกรัม แต่ละวันควรได้รับคอเลสเตอรอลจากอาหารประดมาณ 300–500 มิลลิกรัม ทั้งนี้ตับจะเป็นโรงงานผลิตคอเลสรอลขนาดใหญ่แก่ร่างกาย คอเลสเตอรอลจำเป็นสำหรับชีวิต คอเลสเตอรอลที่สร้างขึ้นในร่างกายและจากอาหารในสัดส่วนที่เหมาะสม จะเป็นผลดีแก่ร่างกายการทำงานของอวัยวะและระบบต่าง ๆ คอเลสเตอรอลชนิดที่ร่างกายสังเคราะห์ได้เองนั้นจะมีปริมาณลดน้อยลงหากร่างกายได้รับคอเลสเตอรอลจากอาหารมากขึ้น นอกจากนั้นคอเลสเตอรอลส่วนเกินจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดีที่ตับและขับออกทางลำไส้ คอเลดเตอรอลเป็นสารไขมันที่มีโครงสร้างทางเคมีต่างจากไตรกลีเซอไรด์ ในธรรมชาติคอเลสเตอรอลอาจจะอยู่เป็นอิสระหรือปรากฏรวมตัวกับไตรกลีเซอไรด์ก็ได้ เพราะฉะนั้นในอาหารไขมันบางชนิดมีไตรกลีเซอไรด์สูงอาจจะมีคอเลสรอลต่ำ เช่น น้ำมันพืช หรือบางอย่างจะมีไตรกลีเซอไรด์ต่ำแต่คอเลสเตอรอลสูง เช่น ไข่แดง เป็นต้น นอกจากนั้นคุณภาพของกรดไขมันในไตรกลีเซอไรด์ยังมีส่วนกำหนดคอเลสเตอรอลในเลือดได้ด้วย คอเลสเตอรอล เป็นไขมันในเลือดชนิดหนึ่งที่ร่างกายได้มาจากอาหาร และสังเคราะห์เอง เนื่องจากมีความสำคัญต่อร่างกาย คือ ช่วยให้ทารกในครรภ์มีพัฒนาการที่ดี มีผลต่อการเจริญเติบโตของร่างกาย เป็นส่วนประกอบสำคัญของสมองและระบบย่อยอาหาร เป็นองค์ประกอบหลักของฮอร์โมนหลายชนิด รวมทั้งมีความจำเป็นในการสังเคราะห์วิตามิน เป็นต้น (วิลาส, 2551) คอเลสเตอรอลจัดเป็นหนึ่งในสารกลุ่มสเตอรอล (sterol) โดยมีโครงสร้างหลักเป็น สเตอรอยด์ (steroid) และมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group; -OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 จึงเรียกคอเลสเตอรอลว่า 3-β-hydroxy cholesterol ในผู้ที่ไม่สามารถสังเคราะห์คอเลสเตอรอลได้ เช่น ผู้ที่เป็นโรค smith-Lemli-Opitz syndrome ซึ่งเป็นโรคพันธุกรรม โดยมีการกลายพันธ์ของยีน *DHCR-7* ที่โครโมโซม 11q13 (ในปัจจุบันพบรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนนี้มี 105 แบบ) โดยยีน *DHCR-7* เป็นยีนที่ใช้สังเคราะห์

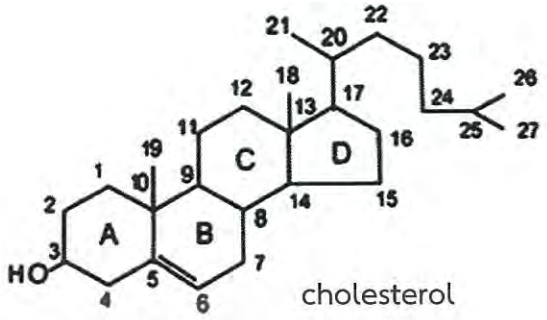
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ 3-β-hydroxysterol-δ7-reductase ซึ่งพบในวิถีสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์คอเลสเตอรอลได้ ทำให้เกิดความผิดปกติในส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น desmosterosis และ lathosterolosis และกลุ่มอาการที่เรียกว่า greenberg dysplasia หรือ hydropsectopic calcification-moth-eaten skeleton dysplasia เป็นต้น (Yu และ Patel, 2005) ร่างกายได้รับคอเลสเตอรอลมาจาก 2 ทาง ได้แก่ 1) สารอาหาร โดยดูดซึมผ่านลำไส้เล็กมายังระบบน้ำเหลือง และเลือด ในรูปของไคโลไมครอน (chylomicron) และ 2) กระบวนการสังเคราะห์โดยเซลล์ตับ แล้วจึงหลั่งอนุภาคไลโพโปรตีน (lipoprotein) ในรูปของ ไขมันความหนาแน่นต่ำมาก (very low density lipoprotein, VLDL) เข้าสู่กระแสเลือดเพื่อขนส่งคอเลสเตอรอล และไขมันอื่นๆ ไปยังเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกาย อย่างไรก็ตามคอเลสเตอรอลส่วนใหญ่ที่เซลล์จะรับมาจากไลโพโปรตีนโดยกลไกที่เรียกว่า เอนโดไซโตซิส (endocytosis) แต่ก็ยังมีกลไกอื่นๆ อีก เช่น การแพร่แบบ spontaneous diffusion (ชัยสิทธิ์, 2557)

คอเลสเตอรอลเป็นสารในกลุ่มสเตอรอยด์ (steroids) ที่มีโครงสร้างเป็น 4 วงแหวน (รูปที่ 2.3) โดยมีส่วน perhydrocyclopentanophenanthrene (cyclopentanohydrophenanthrene) เป็นนิวเคลียส คอเลสเตอรอลประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 27 อะตอม และมีส่วนที่มีขั้ว คือ หมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติเป็นแอลกอฮอล์ชนิดทุติยภูมิ และมีพันธะคู่ระหว่างคาร์บอน 5-6 ด้วยดังรูปที่ 2.4

รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสเตอแรน (sterane)
ที่มา : Leray (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของคอเลสเตอรอล
ที่มา : สมเกียรติ (2550)

คอเลสเตอรอลพบมากในเนื้อเยื่อของคน และสัตว์ ผู้ใหญ่จะมีประมาณ 150 กรัม เป็นสารเริ่มต้นของการสร้างกรดน้ำดี ฮอร์โมนของต่อมหมวกไต และฮอร์โมนเพศ รวมทั้งวิตามินดี นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการรักษาโครงสร้างโดยเฉพาะอย่างยิ่งของเซลล์ และภายในเซลล์ การมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 ทำให้สามารถสร้างเป็นเอสเทอร์ และกรดไขมันได้ ในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่คอเลสเตอรอลจะอยู่ในรูปอิสระ แต่ในพลาสมามีอยู่ 60-70 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นรูปเอสเทอร์ โดยมีเอนไซม์ lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) ช่วยนำกรดไขมันจากตำแหน่งที่ 2 ของเลซิทิน (lecithin) (ส่วนใหญ่ได้แก่ กรดลิโนเลอิก) มารวมกับคอเลสเตอรอล กลายเป็น cholesteryllinoleate และพบว่าคอเลสเตอรอลที่ดูดซึมผ่านลำไส้เล็กจะสร้างเป็นเอสเทอร์ โดยรวมตัวกับกรดโอเลอิกแล้วสะสมอยู่ในไคโลไมครอน และไลโพโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ลำไส้แล้วส่งต่อไปยังตับ (พิไลวรรณ, 2555)

คอเลสเตอรอลในร่างกายมีแหล่งมาจากอาหารและการสังเคราะห์จากอะเซทิลโคเอ ซึ่งได้มาจากเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรท กรดอะมิโนและกรดไขมัน อวัยวะหลักที่สร้างคอเลสเตอรอล คือ ตับ ที่ลำไส้เล็กอาจมีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลได้เช่นกัน ที่ต่อมต่าง ๆ ที่มีการสร้างเตียรอยด์ฮอร์โมนสามารถสร้างคอเลสเตอรอลได้ การสังเคราะห์เกิดในส่วนไซโตซอลของเซลล์ คอเลสเตอรอลเป็นลิพิดที่มีคุณประโยชน์ต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ตามปกติ นอกจากพบในเลือด (10 กรัม) ยังเป็นส่วนหนึ่งของเนื้อเยื่อของเซลล์ ร่างกายมีคอเลสเตอรอลประมาณ 100-150 กรัม คอเลสเตอรอลพบมากที่ไขสัน สมองและใต้ผิวหนัง พบคอเลสเตอรอลในตับอ่อน ปอด ตับไตมากกว่าในกล้ามเนื้อ การมีคอเลสเตอรอลมากในกระแสเลือด อาจเกิดการสะสมที่ผนังหลอดเลือดและเป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดแข็ง

การสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย เริ่มจากการสังเคราะห์หน่วยย่อยไอโซพรีน (isoprene) ขึ้นมาก่อนจากอะซิเตทได้สารตัวกลางสำคัญคือ hydroxyl methyl glutaryl CoA (HMG CoA) มีเอนไซม์สำคัญคือ HMG CoA reductase หลังจากนั้นจึงนำไปสร้างคอเลสเตอรอล เอนไซม์ HMG CoA reductase จะถูกยับยั้งด้วยระบบคอเลสเตอรอลที่เพิ่มขึ้น (feed back inhibition)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 บทบาทของคอเลสเตอรอล (นาทาจิมะ, 2541)

บทบาทของคอเลสเตอรอลในร่างกาย ได้แก่ ใช้เป็นสารตั้งต้นการสร้างฮอร์โมน เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ภาวะที่ร่างกายมีคอเลสเตอรอลไม่เพียงพอ ส่งผลให้ผนังเซลล์อ่อนแอลง ไม่สามารถป้องกันเชื้อโรคได้ตามปกติ ฮอร์โมนในร่างกายสร้างขึ้นจากส่วนต่างๆ ได้แก่ ตับอ่อนสร้างอะดรีนอลฮอร์โมน ต่อมไร้ท่อผลิตฮอร์โมนเพศชายหรือหญิง โดยอาศัยคอเลสเตอรอลทั้งสิ้น

หน้าที่สำคัญประการหนึ่ง ใช้สร้างกรดน้ำดี เมื่อตับสร้างกรดน้ำดีขึ้น จะรวมกับน้ำดีก่อนที่จะถูกส่งต่อไปยังลำไส้ เพื่อเป็นตัวช่วยย่อยและดูดซึมไขมัน แต่ละวันคอเลสเตอรอลถูกใช้เป็นน้ำดีประมาณ 700 มิลลิกรัม หากคอเลสเตอรอลไม่พอ ตับสร้างกรดน้ำดีได้น้อย ทำให้ไขมันในอาหารถูกย่อยไม่หมดและเกิดอาการท้องเสียตามมา กรดน้ำดีที่ใช้แล้วจะถูกขับออกมาพร้อมๆกับกากอาหาร จำนวนคอเลสเตอรอลจึงลดลง การสร้างน้ำดีในครั้งต่อไปต้องนำคอเลสเตอรอลจากส่วนอื่นมาใช้ ในทางตรงข้ามกัน น้ำดีที่ใช้แล้วแต่ไม่ถูกขับออกมา จะกลับเข้าสู่ตับอีกครั้งหนึ่ง เป็นผลให้ตับมีคอเลสเตอรอลมากขึ้น เกิดการสะสมคอเลสเตอรอลในร่างกาย

การที่มีคอเลสเตอรอลสะสมในร่างกายมากเกินไป อันเนื่องจาก คอเลสเตอรอลสร้างขึ้นที่ตับและได้รับจากอาหาร ตับนับว่าเป็นโรงงานผลิตคอเลสเตอรอลที่มีขนาดใหญ่กว่าส่วนอื่นๆในร่างกาย ผลิตได้มากกว่าส่วนอื่นๆ 60-70 เปอร์เซ็นต์ และแต่ละวันควรได้จากอาหารประมาณ 300-500 มิลลิกรัม คอเลสเตอรอลที่ผลิตขึ้นในร่างกายและได้จากอาหารในอัตราส่วนเช่นนี้เป็นผลดีต่อร่างกาย อวัยวะ และระบบต่างๆสามารถทำงานได้เป็นปกติ ถ้าหากร่างกายมีคอเลสเตอรอลสูงเกินไป เกิดอาการหลอดเลือดแดงแข็งตัว อันเป็นสาเหตุของโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดหลอดเลือดหัวใจตีบ

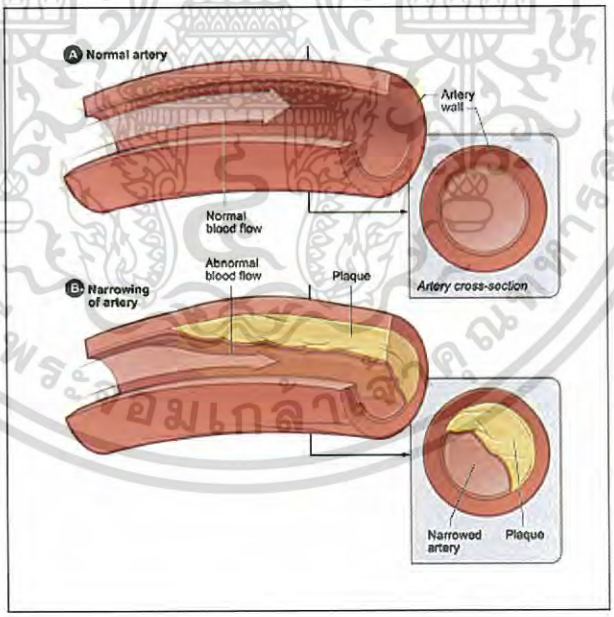
การทานอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงเป็นประจำ ส่งผลให้ร่างกายมีคอเลสเตอรอลสูงเกินไป และจะถูกสะสมอยู่ตามผนังหลอดเลือดแดงด้านใน ผนังด้านในหนาขึ้นเรื่อยๆ หลอดเลือดแดงแข็งตัวมากขึ้น มีแนวโน้มเป็นโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว ทำให้การหมุนเวียนของเลือดติดขัด เลือดไม่สามารถส่งอาหารและออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆ ทำให้เซลล์ตายเกิดปัญหาร้ายแรง เป็นต้นว่า หากเส้นเลือดในสมองตีบ ร่างกายจะเป็นอัมพาต หากเส้นเลือดแดงในหัวใจตีบ เกิดโรคกล้ามหัวใจขาดเลือดเป็นโรคร้ายแรงอย่างหนึ่ง การค้นพบทางชีวเคมี และทางชีววิทยาปัจจุบันเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าปัจจัยเสี่ยงหลักของโรคหลอดเลือดหัวใจ คือการมีระดับไขมันในเลือดสูง ทำให้ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดจึงมีความยืดหยุ่นน้อย และหนาขึ้น จนเกิดสภาพของหลอดเลือดแข็ง และตีบ ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดหลอดเลือดแข็งเกี่ยวข้องกับตัวพาไขมันไปตามเส้นเลือดซึ่งเรียกว่าไลโพโปรตีนมี 2 ชนิดคือ

ก. low-density lipoprotein (LDL) คอเลสเตอรอล หรือ ไขมันที่มีความหนาแน่นต่ำ ไขมันจำพวกคอเลสเตอรอลมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ไม่สามารถอยู่ในกระแสเลือดตลอด จึงเปลี่ยนสภาพเป็นสารตัวใหม่ ชื่อว่า ไลโพโปรตีน ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำง่าย ไลโพโปรตีนมีหลายชนิด แต่ชนิดที่ติดอยู่ตามผนังหลอดเลือดแดง เรียกว่า LDL คอเลสเตอรอล หรือ ไขมันที่มีความหนาแน่นต่ำ LDL มีหน้าที่พาคอเลสเตอรอลตัวสำคัญอื่นๆจากตับไปยังเซลล์ หากร่างกายมี LDL คอเลสเตอรอลไม่เพียงพอ ผนังหลอดเลือดจะบางลง ทำให้การผลิตฮอร์โมนต่างๆลดลงตามมา หากมีปริมาณ LDL คอเลสเตอรอลมากเกินไปจะเปลี่ยนหน้าที่ ทำให้เกิดโรคหลอดเลือดแข็งตัว ซึ่งเกาะอยู่ตามผนังหลอดเลือดแดง จนหลอดเลือดแดงแข็งตัวมากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อทานอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงหรือด้วยสาเหตุใดก็ตาม เป็นเหตุร่างกายขจัด LDL ไม่ทัน LDL สามารถอยู่ในกระแสเลือดนานกว่าเดิมจากสาเหตุบางอย่าง หนึ่งในนั้นคือรวมตัวกับออกซิเจนแล้วจะเกาะตามผนังภายในหลอดเลือดแดงง่ายขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. high-density lipoproteins (HDL) คอเลสเตอรอล หรือ ไขมันที่มีความหนาแน่นสูง ร่างกายสามารถสร้าง HDL ได้ที่ตับและลำไส้เล็ก เป็นไลโพโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีในตับมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Alberts, 1998) มีหน้าที่ลำเลียงคอเลสเตอรอลส่วนที่เหลือใช้จากเซลล์กลับไปยังตับ HDL เมื่อรวมกับคอเลสเตอรอลจะมีขนาดใหญ่ขึ้น และไหลวนเวียนอยู่ในเลือด LDL ได้ชื่อว่าเป็นคอเลสเตอรอลให้โทษ แต่สำหรับ HDL ทำหน้าที่กำจัดคอเลสเตอรอลที่เหลือออกจากผนังหลอดเลือดแดง จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า คอเลสเตอรอลชนิดจำเป็นต่อร่างกายหรือคอเลสเตอรอลชนิดดี ผู้ที่มี HDL ในเลือดเพียงพอ มีโอกาสเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัวน้อยกว่าผู้อื่น แม้ว่าร่างกายจะมี LDL คอเลสเตอรอลสูงกว่าปกติบ้างและเกาะอยู่ตามผนังหลอดเลือดแดงก็ตาม แต่ HDL ยังสามารถดึงออกกลับไปยังตับได้ เมื่อ HDL และ LDL ไม่ได้สัดส่วนกัน หรือจากภาวะในเลือดทำให้ HDL ทำงานไม่สะดวก LDL คอเลสเตอรอลสามารถเกาะตามผนังหลอดเลือดแดงง่ายขึ้น

ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) มักได้จากข้าว แป้ง น้ำตาลผลไม้ และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ สารเหล่านี้เปลี่ยนแปลงในตับและร่างกายหลายขั้นตอน คอเลสเตอรอลที่ได้จากอาหารและตับสร้างขึ้นมา ส่วนใหญ่จะรวมอยู่ในสารไขมันความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein) เรียกย่อๆ ว่า LDL (สมเกียรติ, 2550) ไขมันในโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงข้อหนึ่งของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ การเปลี่ยนแปลงอาหาร และการออกกำลังกายสามารถลดระดับไขมันในเลือดได้ ถ้าหากระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูง ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดแดงมีลักษณะเป็นคราบ (plaque) รูปที่ 2.5 ทำให้หลอดเลือดแดงแคบลง ส่งผลให้หลอดเลือดแข็ง และตีบโดยก่อให้เกิดอาการเจ็บหน้าอก เนื่องจากหัวใจขาดเลือด หรืออัมพฤกษ์



รูปที่ 2.5 ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดแดงมีลักษณะเป็นคราบ (Plaque)
ที่มา : Gary (2014)

การที่ร่างกายเกิดภาวะไขมันสูงในเลือด (hyperlipidemias) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งและตีบตัน (atherosclerosio) พบว่า atherosclerosis คือภาวะที่หลอดเลือดแข็งตัวโดยเกิดจากการมี plaque ที่ผนังด้านในของหลอดเลือดแดง จากการที่คอเลสเตอรอลมีมาก

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเลือดจึงเกิดการตกตะกอนตามผนังหลอดเลือดและมีการสะสมของไขมันที่ผนังหลอดเลือด และเป็นสาเหตุทำให้ลิพิดอื่นๆ สามารถซึมผ่านผนังหลอดเลือดและไปสะสมตามผนังหลอดเลือดมากขึ้น เมื่อเกิดพยาธิสภาพเป็นเวลานานๆ จะมีขบวนการทำให้มีคอลลาเจนและแคลเซียมไปสะสมที่ผนังหลอดเลือดที่มีลิพิดสะสมอยู่ ทำให้ลักษณะของผนังหลอดเลือดแข็งไม่มีความยืดหยุ่นอีกต่อไป การสะสมของลิพิดที่ผนังหลอดเลือดทำให้หลอดเลือดเริ่มตีบตัน การไหลของโลหิตเกิดได้ไม่ดี เนื้อเยื่อเริ่มรับออกซิเจนไม่เต็มที่จึงเกิดภาวะขาดออกซิเจน (tissue ischaemia) ต่อมาเนื้อเยื่อจะตาย (infarction) พบว่าหลอดเลือดที่เกิดได้ง่ายคือหลอดเลือดแดงไปเลี้ยงหัวใจและสมอง ทำให้เกิดเนื้อเยื่อหัวใจตาย (myocardial infarction) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคหัวใจ (coronary heart disease) ถ้าเป็นที่สมองมีโอกาสเกิดอัมพาตหรืออัมพฤกษ์ โรคความจำเสื่อม และโรคสมองอื่นๆ การเกิดหลอดเลือดแข็ง มีความสัมพันธ์กับระดับ LDL ในเลือดที่สูง LDL มีหน้าที่ในการลำเลียงลิพิดโดยเฉพาะคอเลสเตอรอล หากคราบไขมันหลุดจากผนังหลอดเลือด แล้วไปอุดตันในเส้นเลือดจะทำให้เกิดอาการหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (stroke) เพื่อแก้ปัญหาการเกิดโรคดังกล่าวจึงมีการศึกษาผลิตยาลดระดับไขมันในเลือดซึ่งนับวันจะมีความสำคัญ และมีความจำเป็นมากขึ้น ซึ่งยาลดระดับไขมันในเส้นเลือดมีหลายชนิด ได้แก่ niasin bezafibrate gemfibrozil และกลุ่มสเตติน เป็นต้น โดยยากลุ่มสเตตินมีความสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอลในตับ ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ควบคุมการสร้างคอเลสเตอรอล (rate controlling enzyme) ให้ลดลง ทำให้ไขมันบางชนิดในเลือดคือ LDL ซึ่งเป็นไขมันชนิดไม่ดีถ้ามีมากจะทำให้เกิดหลอดเลือดแดงตีบได้ โดยพาคอเลสเตอรอลจากตับสู่ร่างกาย ถ้ามีคอเลสเตอรอล และไขมันไปเกาะอยู่ตามผนังของหลอดเลือด จะส่งผลให้ลดการไหลเวียนของเลือดในร่างกาย ทำให้ออกซิเจนที่ไปเลี้ยงหัวใจสมอง และส่วนต่างๆของร่างกายลดลงตามไปด้วย แต่ถ้ามีคอเลสเตอรอล และไขมันในเลือดต่ำ จะเป็นการช่วยป้องกันการเกิดโรคหัวใจ การไหลเวียนโลหิตในหลอดเลือด จะทำให้ปวดเค้นหน้าอก สมองขาดเลือด และหัวใจวายได้ ความต้องการยากลุ่มนี้จึงเพิ่มขึ้นทุกปี ดังนั้นการศึกษาเพื่อผลิตยาให้ได้มากที่สุด ในเวลาที่รวดเร็ว และลงทุนต่ำ จึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง การผลิตยาจากเชื้อรากลุ่ม *Monascus* sp. ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอล เช่น *M. ruber* ผลิตสารซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอลโดยมีชื่อเรียกต่างกันไป ได้แก่ โมนาโคลิน เจ (monacolin J), โมนาโคลิน แอล (monacolin L), โมนาโคลิน เอ็ม (monacolin M) และโมนาโคลิน เอ็กซ์ (monacolin X) เป็นต้น (Endo และคณะ, 1985)

ในปัจจุบันโรคหลอดเลือดเลี้ยงหัวใจตีบตัน เกิดเนื่องจากมีภาวะระดับไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) เป็นปัจจัยการเสี่ยงโรค (risk factor) อย่างหนึ่งของการเกิดโรคเกี่ยวกับหัวใจ การมีระดับไขมันสูงในเลือดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือดแข็งและตีบ เป็นผลให้เกิดลิ่มเลือดขึ้นในหลอดเลือดหรือในหัวใจ (thrombosis) จากนั้นเกิดเนื้อตาย เนื่องจากขาดการไหลเวียนของโลหิต (infarction) ตามมา (จันทนี, 2545) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญในปัจจุบัน เพื่อแก้ปัญหาเบื้องต้นในการควบคุมคอเลสเตอรอลให้ลดลง นั่นคือการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการบริโภค แต่ในผู้ที่มีระดับคอเลสเตอรอลสูงจำเป็นต้องได้รับยาเพื่อลดกิจกรรมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ยาลดคอเลสเตอรอลที่นิยมใช้ในปัจจุบันอยู่ในกลุ่มสเตติน ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ผลิต ได้แก่ เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* sp. และ *Monascus* sp. (Liu และคณะ, 2010) สามารถสร้างสารทุติยภูมิ กลุ่มเมวาสเตติน โลวาสเตติน และโมนาโคลิน ซึ่งสามารถจับตัวกับเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA reductase หรือ HMG-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CoA reductase แบบแข่งขัน ทำให้กิจกรรมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลลดลง (Chen และ Hu, 2005) ดังนั้นคุณสมบัติการออกฤทธิ์จึงส่งผลโดยตรงต่อการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในผู้ป่วยที่มีปริมาณคอเลสเตอรอลชนิดไขมันความหนาแน่นต่ำในเลือดสูงจะต้องมีการควบคุมการใช้ยา

2.7 ยาลดคอเลสเตอรอล (เมวาสเตติน)

คอเลสเตอรอลเป็นสารประเภทไขมันที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด ช่วยสร้างความ แข็งแรงให้ผนังเซลล์ เป็นสารต้นกำเนิดของน้ำดี และ สเตอรอยด์ฮอร์โมนต่างๆ แต่ถ้ามีมากเกินไป อาจทำให้หลอดเลือดหัวใจอุดตันและทำให้หัวใจล้มเหลว คอเลสเตอรอลจะจับตัวอยู่กับโปรตีน รวมชื่อ ไลโพ-โปรตีน (lipoprotein) ที่สำคัญมี 2 รูปแบบคือ ไลโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำหรือ แอลดีแอล (low density lipoprotein; LDL) และไลโพโปรตีนความหนาแน่นสูงหรือเอชดีแอล (high density lipoprotein; HDL) คอเลสเตอรอลในเลือดสูงทำให้เสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจหรือหลอด เลือดในสมองตีบและแตก (ปนัดดา, 2546) แต่สารลดคอเลสเตอรอลจากเชื้อราโมแนสคัสจะช่วย ควบคุมคอเลสเตอรอลและลดโอกาสเกิดโรคได้ การสังเคราะห์คอเลสเตอรอลเกิดขึ้นในส่วนไซโตพลาซึมของเซลล์ สังเคราะห์ขึ้นใน เนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ตับ ลำไส้เล็ก ต่อมหมวกไตส่วนนอก รวมทั้งระบบสืบพันธุ์ต่างๆ แต่ที่สำคัญและเป็นแหล่งใหญ่ที่สุดที่ทำหน้าที่สังเคราะห์คอเลสเตอรอล คือ ตับ (คิดเป็นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของทั้งหมด) มีสารตั้งต้นคือ อะเซทิลโคเอ (ปนัดดา, 2546)

การควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล จะควบคุมที่ปฏิกิริยาการเปลี่ยน HMG-CoA reductase ซึ่งมีการควบคุมได้ 3 ทาง (ปนัดดา, 2546) ดังนี้

1. ผ่านการควบคุมแบบย้อนกลับเชิงลบ (negative feedback) นั่นคือเมื่อใดก็ตามที่เซลล์มี คอเลสเตอรอลมาก ไม่ว่าจะได้มาจากอาหาร หรือจากการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลที่เพิ่มสูงขึ้น ตลอดจนผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากคอเลสเตอรอล คือ น้ำดี ถ้ามีมากก็จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ HMG-CoA reductase ทำให้เอนไซม์ HMG- CoA reductase มีปริมาณลดลง

2. ผ่านทางฮอร์โมน ฮอร์โมนหลักที่มีบทบาทในการควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล คือ อินซูลิน และกลูคากอน โดยอินซูลินทำให้มีการตัดหมู่ฟอสเฟตออกจากเอนไซม์ HMG- Co A reductase ทำให้ HMG-CoA reductase อยู่ในรูปที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยาจึงกระตุ้นการสังเคราะห์ คอเลสเตอรอล ในขณะที่กลูคากอนจะมีผลตรงข้ามโดยเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ เอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ HMG- CoA reductase อยู่ในรูปเฉื่อย จึงยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล

3. โดยการใช้ยา ยากลุ่มพราวาสเตติน เช่น เมวาสเตติน โลวาสเตติน ซิมวาสเตติน และฟลูวาสเตติน ซึ่งเป็นสเตติน (statins) มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับ HMG- CoA ดังนั้นจึงออกฤทธิ์เป็นสาร ยับยั้งแบบแข่งขันของเอนไซม์ HMG- CoA reductase ทำให้การสังเคราะห์คอเลสเตอรอลลดลง สเตตินเป็นกลุ่มสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิประเภทหนึ่งของเชื้อรา ที่มีความจำเพาะต่อ 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์หลัก และเป็นส่วนที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล โดยโครงสร้างสเตตินอยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปของกรดที่คล้ายคลึงกับ HMG-CoA ที่เป็นสารตั้งต้นโดย ธรรมชาติของปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Manzoni และ Rollini, 2002)

คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา พบว่าสารประกอบไขมันในเลือดจะประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอลอิสระ (free cholesterol) คอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) และฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ซึ่งไขมันเหล่านี้ไม่สามารถรวมกับน้ำได้จึงต้องรวมกับโปรตีน (apoprotein) และไหลเวียนตามกระแสเลือดในรูปของไลโพโปรตีนเมื่อในเลือดมีสารเหล่านี้ที่มีความเข้มข้นสูงจำเป็นต้องใช้ยาลดไขมันมาควบคุมระดับไขมันในเลือด (จันทนี, 2545)

ยาลดไขมันในเลือด (antithyperlipidaemic agent) มีอยู่หลายชนิดแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน (เกษร, 2556) ได้แก่

1. กลุ่ม bile acid sequesterants และ dextrothyroxine ประกอบด้วย cholestyramine, cholestipol, colesvelam และ dextrothyroxine เป็นต้น

2. กลุ่ม HMGRIs (HMG-CoA reductase inhibitors) ตัวอย่างเช่น lovastatin (mevacor), simvastatin (zocor), และ pravastatin (pravachol) เป็นต้น

3. กลุ่ม cholesterol absorption inhibitors ประกอบด้วย ezetimibe และ β-sitosterol เป็นต้น

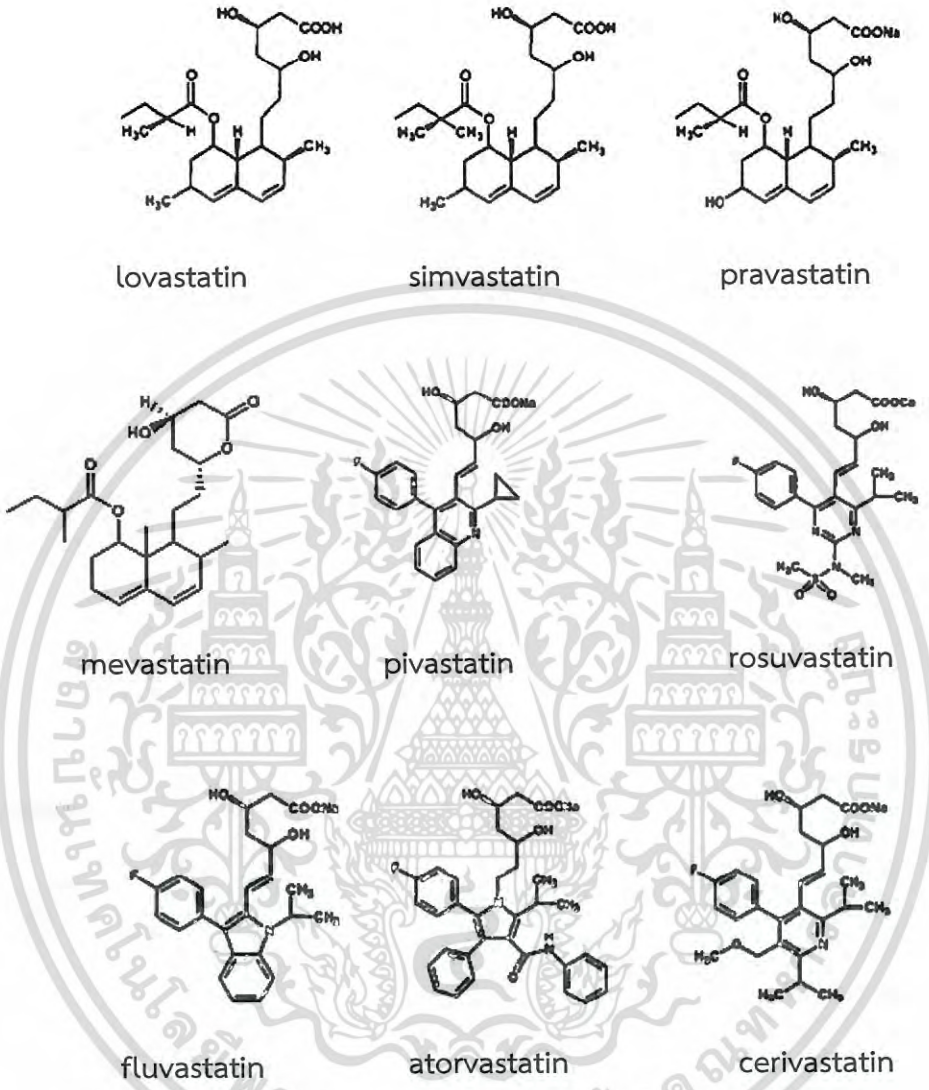
4. กลุ่ม nicotinic acid ได้แก่ niacin (vitamin B3) เป็นต้น

5. กลุ่ม fibrates และ probucol ได้แก่ bezafibrate, gemfibrozil, fenofibrate เป็นต้น

ยาในกลุ่มสเตติน หรือ HMGRIs (Franca, 2008) มีคุณสมบัติลดคอเลสเตอรอล ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1970 มีมูลค่าสูงในอุตสาหกรรมยา สเตตินมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCo-A reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล (Filho, 2010) สารกลุ่มสเตตินประกอบไปด้วยอนุพันธ์จากธรรมชาติ และการสังเคราะห์ ดังแสดงโครงสร้างทางเคมีในรูปที่ 2.6 อนุพันธ์ของสเตตินจากธรรมชาติได้มาจากการหมักของเชื้อรา เช่น pravastatin, simvastatin mevasatin และ lovastatin และอนุพันธ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น fluvastatin, atorvastatin, cerivastatin, rosuvastatin และ pivavastatin เป็นต้น (Cafforio และคณะ, 2005) โครงสร้างของสาร กลุ่มนี้มี closed ring ที่เป็นแลคโตนอยู่ในรูป inactive form หรือ open ring เป็นกรดที่อยู่ในรูป active form ส่วน open ring สามารถยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase มีโครงสร้างเลียนแบบ HMG-CoA เป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนเป็น mevalonic acid (mevalonate) ได้ สารกลุ่มสเตตินมีความสามารถมากกว่า HMG-CoA ถึง 1000 เท่าในการจับกับ HMG-CoA reductase ทำให้มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์นี้ได้มาก สารกลุ่มสเตตินมีกลไกการทำงานคล้ายคลึงกันแตกต่างกันตรงความสามารถในการจับกับเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงยาภายในร่างกาย ขนาดยาที่ใช้ และอาการข้างเคียงจากการใช้ยา สเตตินถือได้ว่าเป็นยาที่มีความปลอดภัยและผู้ใช้ยาสามารถทนยาได้ดี อย่างไรก็ดีผู้ใช้สเตตินอาจพบอาการข้างเคียงได้ อาการข้างเคียงที่พบบ่อยครั้งมักเป็นอาการระบบทางเดินอาหาร เช่น คลื่นไส้อาเจียน อาการข้างเคียงที่นับว่าอันตรายจะเป็นอาการที่ตับและกล้ามเนื้อลาย อาการที่ตับพิจารณาจากระดับเอนไซม์ทรานสแอมิเนส ถ้าเอนไซม์มีค่าสูงกว่าสามเท่าของค่าปกติแสดงว่ายาทำให้เกิดอันตรายต่อตับ โอกาสที่ระดับเอนไซม์จะสูงมีประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของผู้ใช้ยาสเตตินไม่ว่าจะใช้สเตตินชนิดใดและขนาดเท่าใด ระดับเอนไซม์ที่สูงจะลดลงเป็นปกติได้ภายใน 3 เดือน หลังการหยุดยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผู้ใช้สเตตินควรรับการตรวจ การทำงานของตับอย่างสม่าเสมอ ความผิดปกติที่พบคือผู้ใช้ยาจะรู้สึกเมื่อยและปวดกล้ามเนื้อ (เบญจพร, 2012)

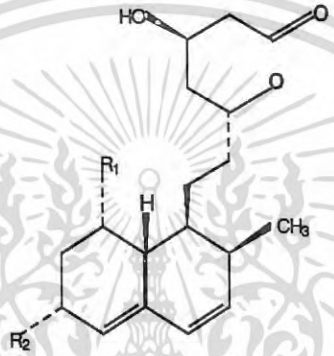


รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มสเตติน
ที่มา : ดัดแปลงจาก เบญจพร (2012)

โครงสร้างเคมีของสารที่ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ได้มีการพัฒนาและปรับปรุงเพื่อใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกา ตัวอย่างเช่น โลวาสเตติน (lovastatin) ซิมวาสเตติน (simvastatin) พราวาสเตติน ฟลูวาสเตติน (fluvastatin) อทอร์วาสเตติน (atrovastatin) และเซอริวาสเตติน (cerivastatin) (Christian และคณะ, 1998) ซึ่งโลวาสเตติน เมวาสเตติน และ พราวาสเตติน โดยส่วนใหญ่สร้างมาจาก *Aspergillus terreus* (Albert และคณะ, 1980) เมวาสตาติน สร้างมาจาก *Penicillium* spp. (Endo และคณะ., 1976) พราวาสเตตินเป็นอนุพันธ์ที่สามารถเกิด จากการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของเมวาสตาตินโดย *Streptomyces carbophilus* (Manzoni และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

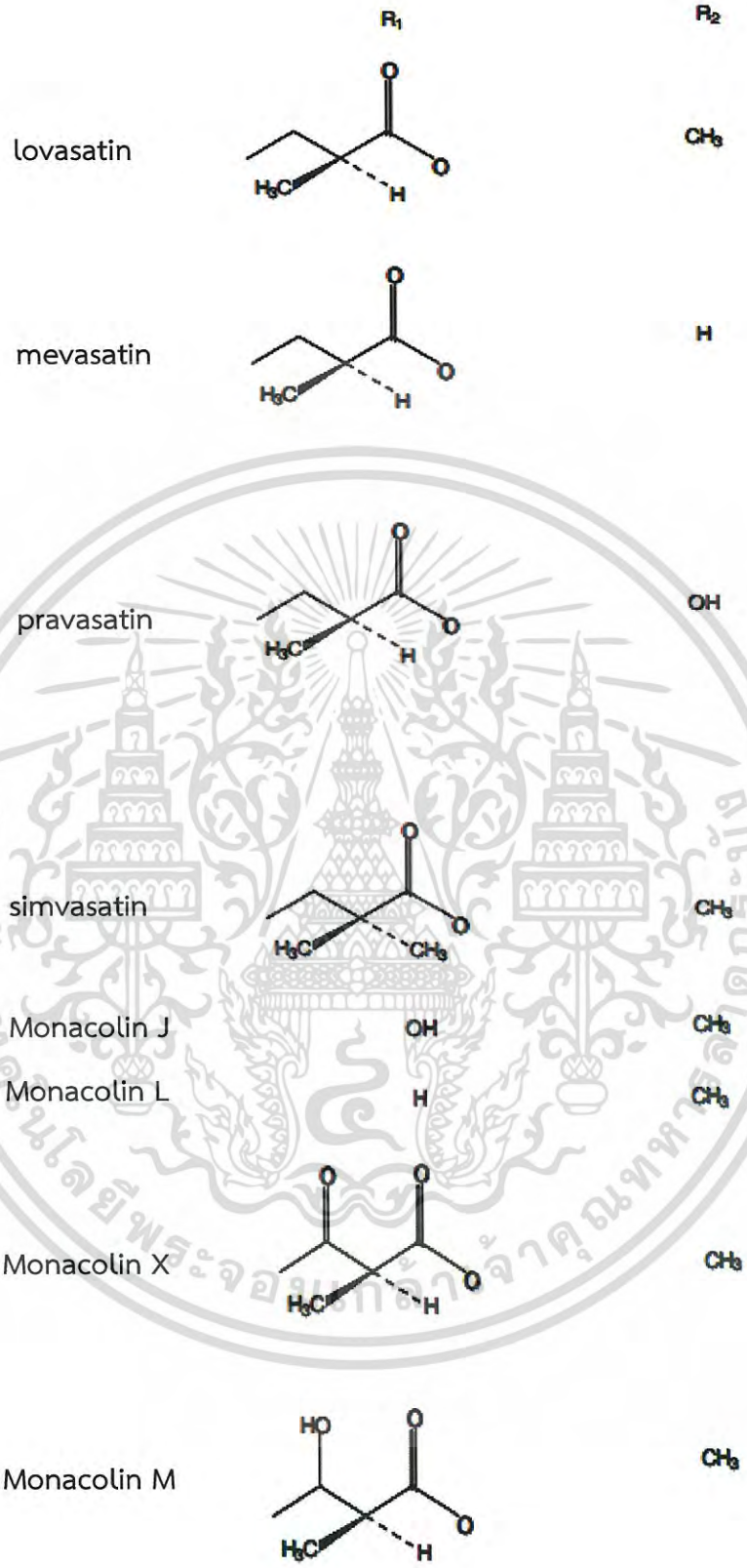
Rollini, 2002) สำหรับซิมวาสเตติน และพราวาสเตติน ถูกสร้างจากกระบวนการกึ่งสังเคราะห์ของซิมวาสเตติน ซึ่งเป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของโลวาสเตติน (lovastatin) ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่บริเวณปลายด้านข้างของโลวาสเตติน ยาในกลุ่มสเตตินมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกันเป็น polyketide ที่เรียกว่า วงแหวน hydroxy-hexahydro naphthalene (แสดงดังรูป 2.7) จะแตกต่างกันที่ห่วงโซ่ด้านข้างที่เชื่อมต่อทำให้สารในกลุ่มสเตตินแตกต่างกัน polyketide เป็นสารประกอบเคมีที่ทำงานร่วมกันกระบวนการทางชีวภาพของการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (Chakravarti และ Sahai, 2004) แสดงดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.7 โครงสร้างหลักของสารกลุ่มสเตติน (naphthalene ring และ beta hydroxylactone)
ที่มา : ดัดแปลงจาก Manzoni และ Rollini (2002)

เมวาสเตติน (หรือ compactin, ML-236B และ CS-500) มีโซ่ด้านข้างเป็นหมู่ methyl butyric และไฮโดรเจน เป็นสารลดคอเลสเตอรอลที่แยกได้จาก *Penicillium citinium* ถูกค้นพบเป็นตัวแรกของยาลดคอเลสเตอรอลในกลุ่มสเตตินใน ปี ค.ศ. 1971 โดย Akira Endo ที่เมือง Sankyo ประเทศญี่ปุ่น (Filho, 2010) ต่อมามีผู้ค้นพบสารที่มีโครางสร้าคล้ายกับ hydroxymethylglutarate (HMG) ซึ่งเป็นสารที่ไปยับยั้งการรวมตัวของอะซิเตท มีชื่อเรียกว่า compatin โดยเมวาสเตตินเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ HMG-Coenzyme A (HMG-CoA) reductase แบบแข่งขัน จึงสามารถจับกับเอนไซม์ได้มากกว่า HMG-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

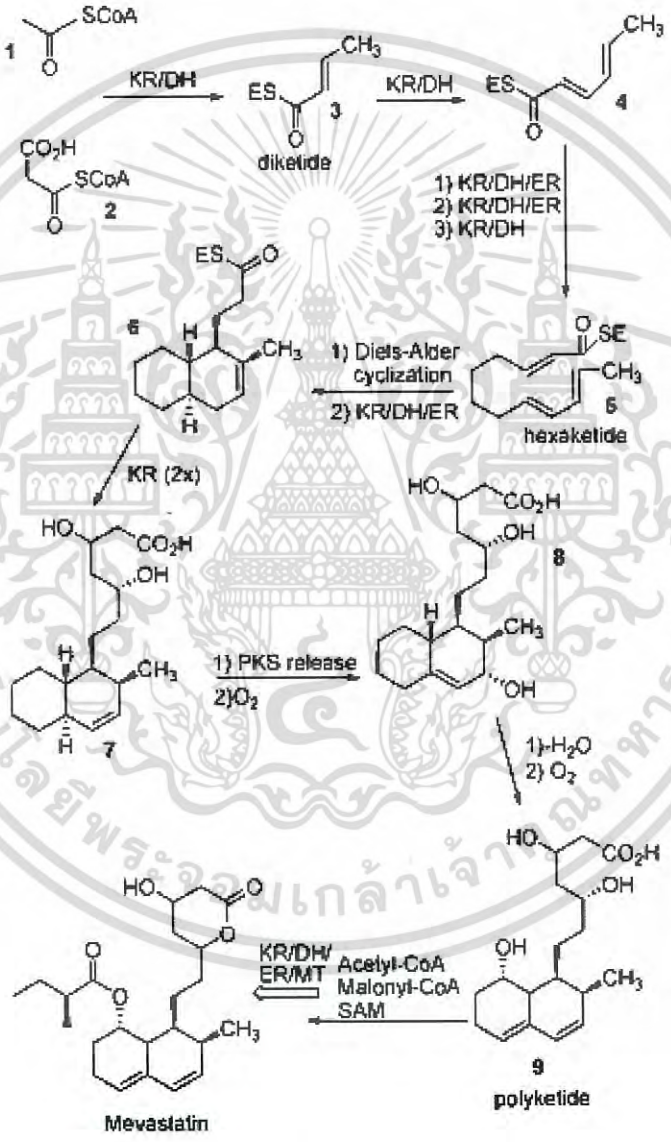


รูปที่ 2.8 โครงสร้างโซ่ด้านข้างของสารกลุ่มสเตติน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Chakravarti และ Sahai (2004)

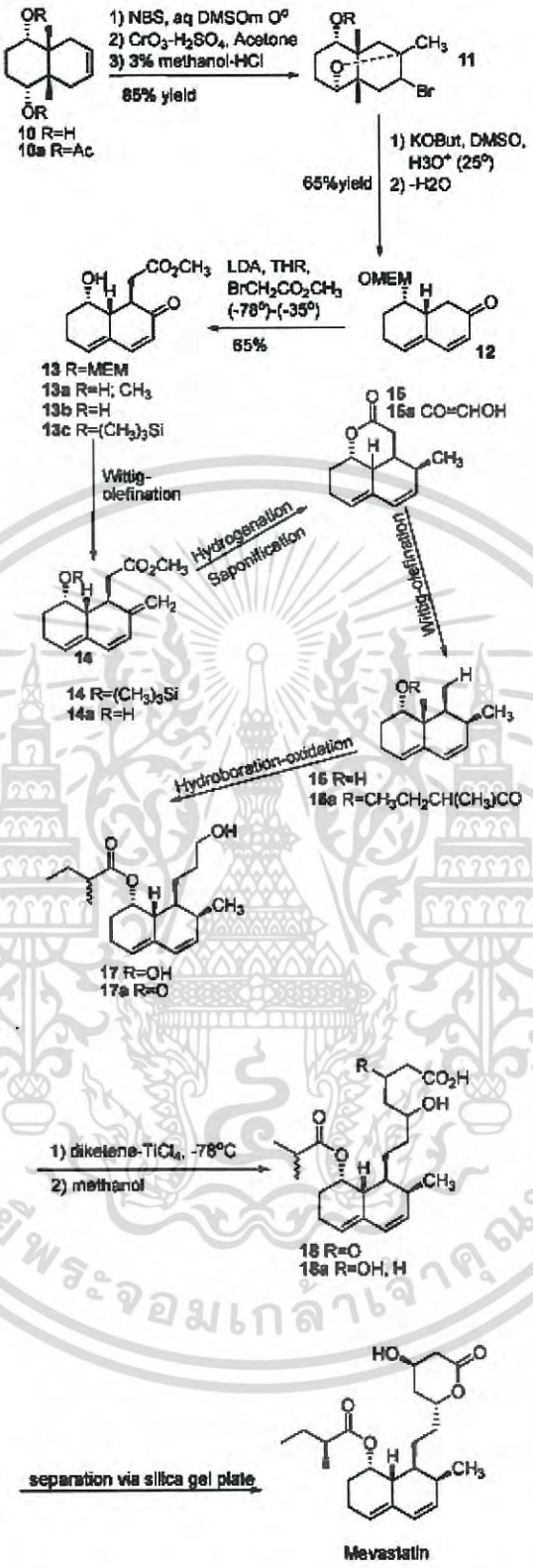
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการสังเคราะห์เมวาสเตติน เกิดขึ้นในวิถี polyketide ของเชื้อรา 2 ชนิด โดยเอนไซม์ polyketide synthases (PKSs) กระบวนการสังเคราะห์เมวาสเตตินเกิดขึ้น 2 แบบ คือ ทางชีวภาพและทางเคมี โดยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพแสดงดังรูปที่ 2.9 การสังเคราะห์เริ่มจาก acetyl CoA และ malonyl-CoA เป็นสารตั้งต้น โดยการทำงานของเอนไซม์ keto reductase (KR) และ dehydratase (DH) โมเลกุลที่เกิดขึ้นคือ diketide และเอนไซม์ Polyketide synthase จะปล่อยหมู่ SE และไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จนกลายเป็น polyketide จากนั้นเปลี่ยนเป็นเมวาสเตตินโดยการทำงานของเอนไซม์หลายตัว และทางเคมีแสดงดังรูปที่ 2.10 โดยผู้ค้นพบการสังเคราะห์คือ Girotra และ Wendler (Unal, 2008)



รูปที่ 2.9 กระบวนการสังเคราะห์เมวาสเตตินทางชีวภาพ
ที่มา : Unal (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 กระบวนการสังเคราะห์เมวาสเตตินทางเคมี

ที่มา : Unal (2008)

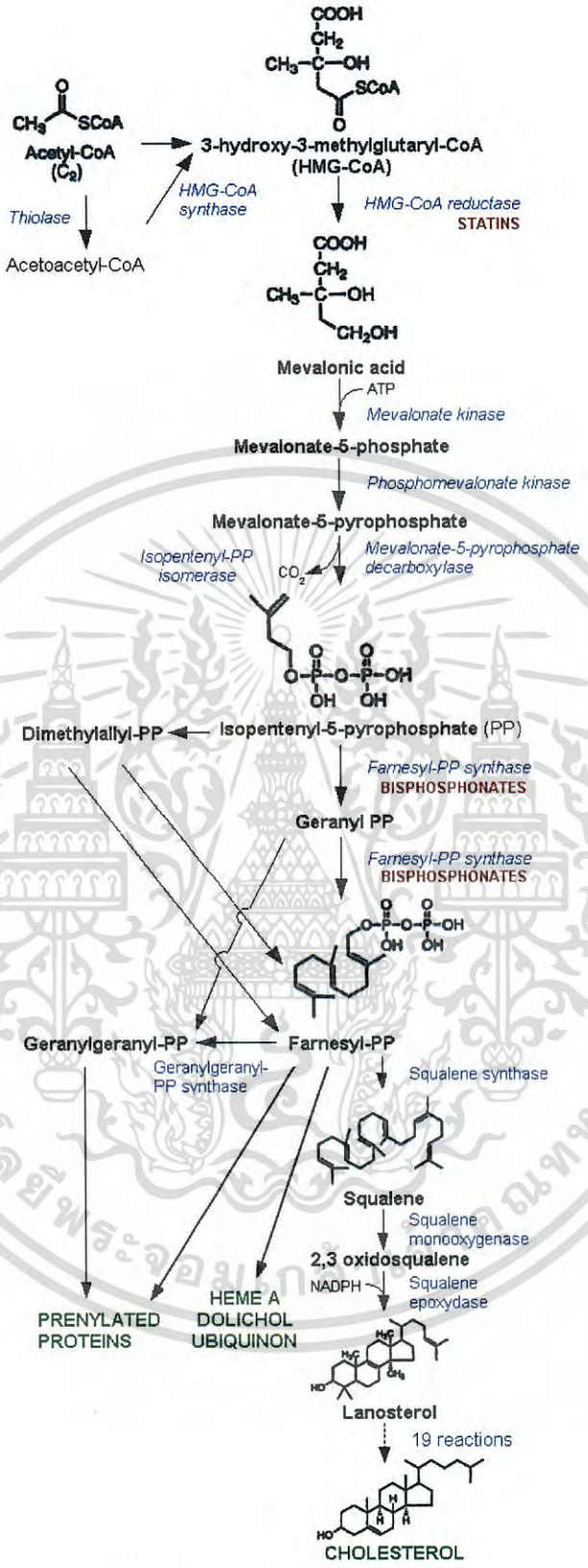
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มสเตติน

HMGRIs ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ให้เป็น mevalonic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลลดลง (ดูรูปที่ 2.11 และ 2.12) ซึ่ง HMGRIs มีสูตรโครงสร้างส่วนที่เป็น iso-butyric acid เหมือน HMG-CoA จึงไปแย่งการทำงานของ HMG-CoA reductase แสดงดังรูปที่ 2.13 ยากลุ่มนี้มีโครงสร้างวงแหวน lactone ring substituted ที่ปลายแขนงของแขน ในโครงสร้างหลัก (naphthalene nucleus) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น prodrug เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกไฮโดรไลส์เป็น acid และ alcohol จึงจะออกฤทธิ์ ตัวอย่างเช่น lovastatin, simvastatin เพราะทำให้มีคุณสมบัติทาง ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ดี เนื่องจากเป็นยารับประทาน (เกษร, 2556) เมื่อ HMG-CoA reductase ถูกยับยั้งมีผลทำให้คอเลสเตอรอลภายในเซลล์ลดลง ตับจะต้องดึงคอเลสเตอรอลจากภายนอกมาใช้โดยการสร้าง LDL-receptor เพิ่มขึ้น และสารตั้งต้นคือ VLDL จะถูกเปลี่ยนเป็น LDL ยากลุ่มนี้เป็นยาที่มีการใช้มากที่สุดในผู้ป่วยภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ เนื่องจากมีประสิทธิภาพลด LDL สามารถลดไตรกลีเซอไรด์และเพิ่มปริมาณ HDL ได้ขึ้นกับตัวยา งานวิจัยต่างๆแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของยาในการลดอัตราการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ลดอัตราการเจ็บป่วยด้วยภาวะของหลอดเลือดหัวใจ เช่น การเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย รวมทั้งลดอัตราการเจ็บป่วย และการตายจากโรคหัวใจและหลอดเลือด อย่างไรก็ตามเพื่อให้ยาออกฤทธิ์ได้ดีผู้ป่วยจำเป็นต้องมีการควบคุมอาหารร่วมไปด้วยเพื่อลดการได้รับคอเลสเตอรอลในปริมาณมากจากอาหาร (exogenous cholesterol)

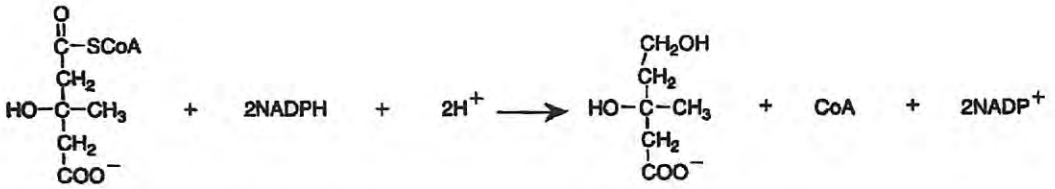
ยาลดคอเลสเตอรอลที่นิยมใช้ในปัจจุบันอยู่ในกลุ่มสเตติน ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ผลิต ได้แก่ เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. และ *Monascus* spp. (Liu และคณะ, 2010) ที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิชนิดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างลดคอเลสเตอรอล ได้แก่ เมวาสเตติน (mevastatin) โลวาสเตติน (lovastatin) และ โมนาโคลิน (monacolin) สารในกลุ่มนี้เข้ารวมตัวกับเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase หรือ HMG-CoA reductase แบบแข่งขันกับกิจกรรมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล (Chen และ Hu, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

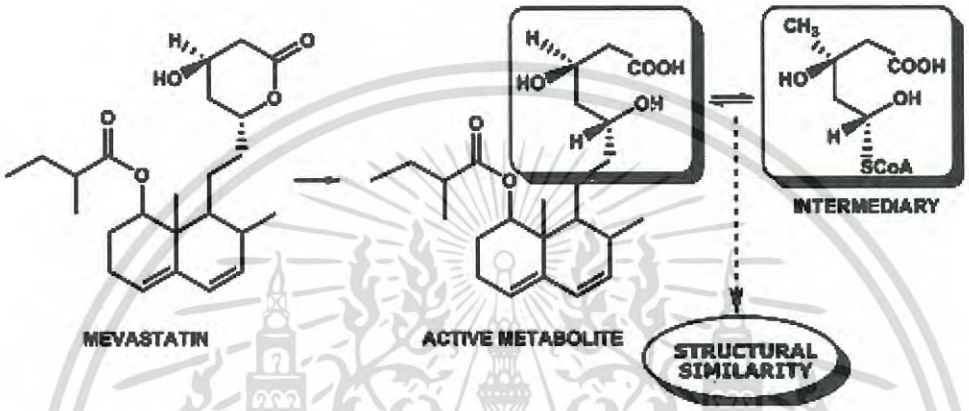


รูปที่ 2.11 การสังเคราะห์คอเลสเตอรอล
ที่มา : ดัดแปลงจาก เกษร (2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ HMG-CoA reductase
ที่มา : เกษร (2556)



รูปที่ 2.13 โครงสร้างของเมวาสเตตินและส่วนที่ไปแย่งจับกับเอนไซม์ HMG-CoA reductase
ที่มา : Filho (2010)

2.9 ความเป็นมา และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Monascus* sp.

เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 (สมชาย และ นิสา, 2554) จากงานวิจัยการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญบนอาหารแข็ง โดยนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาคัดแยกบนอาหารวุ้น MYS agar และ SS agar เพื่อหาสายพันธุ์ที่เจริญเร็ว คัดเลือกด้วยวิธีเลือกตามธรรมชาติ โดยสังเกตโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็วในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 เจริญดีที่สุดบนอาหาร SS agar งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปที่นำเชื้อจากธรรมชาติที่สามารถผลิตสารยับยั้งคอเลสเตอรอล (anti-cholesterol) หรือโมนาโคลิน (manacolin) บนอาหารแข็ง พบว่า เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สามารถผลิตโมนาโคลิน ได้สูงสุด 2.11 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง บนวัสดุหมัก ได้แก่ ข้าวเสาไห้ 50 กรัม ที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

เชื้อรา *Monascus* sp. ถูกค้นพบ และมีการตั้งชื่อสกุล *Monascus* sp. อย่างเป็นทางการให้เป็นที่รู้จักเมื่อ ค.ศ. 1884 โดย van Tieghem (Carels และ Shepherd, 1975) แต่การใช้ประโยชน์จากเชื้อรา *Monascus* sp. นั้นได้มีมาเป็นระยะเวลานานแล้วโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศจีนในรูปของข้าวแดง (red rice) (Church, 1920) ซึ่งได้จากข้าวนึ่งที่บ่มด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. ที่อุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสม เชื้อนี้ก็จะสามารถเจริญ และผลิตสีแดงบนเมล็ดข้าวข้าวแดง ซึ่งมีชื่อเรียกอื่นๆ อีก ได้แก่ ข้าวแดงจากจีน (chinese red rice) อังคัก (ang-kak) แอนคัก (ankak) แองคา (anka) อังคเวค (angquac) เบนิ-โคจิ (beni-koji) และอะกา-โคจิ (aka-koji) เป็นต้น (Hesseltine, 1965) นอกจากนี้ยังมีประเทศไต้หวัน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ก็ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

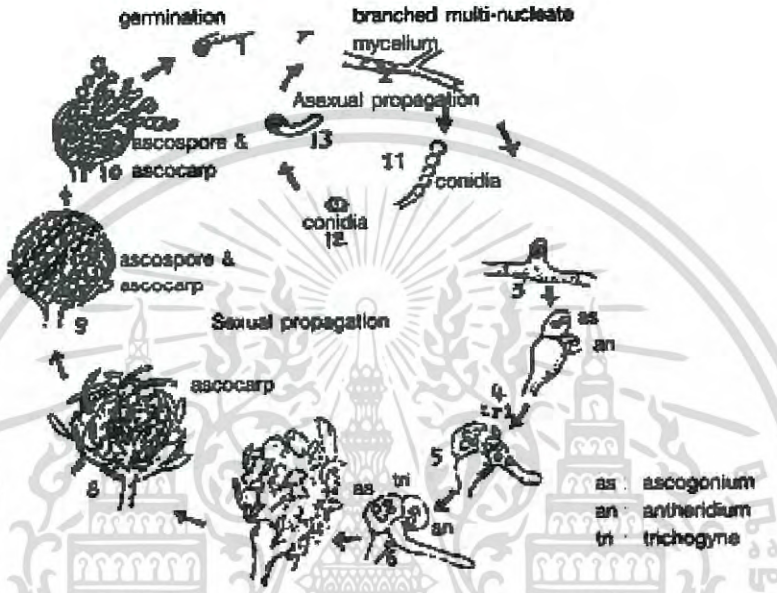
ประโยชน์จากเชื้อรา *Monascus* sp. โดยนำมาทำเป็นสีผสมอาหาร เครื่องดื่ม และยารักษาโรคพื้นบ้าน (Wong และKoehler, 1981) ในขณะที่ประเทศแถบซีกโลกตะวันตกรู้จักเชื้อรา *Monascus* sp. ในฐานะเป็นเชื้อราที่ปะปนอยู่ในเมล็ดธัญพืช (พลาย และ บุษบา. 2534ก) ดังนั้นบทบาทส่วนใหญ่ของเชื้อรา *Monascus* sp. นั้นมาจากคุณสมบัติพิเศษที่สามารถผลิตสีในโทนสีแดง ส้ม และเหลืองได้ โดย Palo และคณะ (1960) ได้ทดลองใช้เชื้อผลิต และได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพสามารถนำข้าวแดงมาเจือสีในอาหารได้โดยตรง ในเวลาต่อมาได้มีการศึกษาเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว (submerged culture) ครั้งแรกโดย Lin (1973) จนกระทั่งปัจจุบันก็ยังมีการศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับการผลิตสีทั้งในสภาพหมักแห้งและหมักเปียกเรื่อยมาเนื่องจากการหันมาให้ความสำคัญกับการใช้สีผสมอาหารจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น เชื้อรา *Monascus* sp. จัดอยู่ใน Class Ascomycetes Subclass Plectomycetidae Order Eurotiales (Alexopoulos และ Mims, 1979) เส้นใยมีผนังกั้น (septate hyphae) และแตกออกเป็นแขนงมากมาย ในขณะที่อายุยังน้อยเส้นใยจะเห็นเป็นสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดง เจริญแนบไปบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น การสืบพันธุ์มีทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual) และไม่อาศัยเพศ (asexual) (Hawksworth และ Pitt, 1983)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเกิดบนเส้นใยซึ่งเป็นโฮโมทัลลิก (homothallic) เริ่มจากการที่เส้นใยเจริญแล้วพัฒนาไปเป็นโครงสร้างเซลล์สำหรับสืบพันธุ์ ได้แก่ แอนเทอริเดียม (antheridium) ได้แก่ เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และแอสโคโกเนียม (ascogonium) ได้แก่ เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียซึ่งเจริญอยู่ใต้แอนเทอริเดียม จากนั้นเส้นใยบริเวณส่วนบนของแอสโคโกเนียมจะพัฒนาต่อไปเป็นโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า trichogyne ไปเชื่อมต่อบริเวณฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียมเพื่อให้นิวเคลียสจากแอนเทอริเดียมผ่านเข้ามาผสมกับนิวเคลียสของแอสโคโกเนียม หลังจากนิวเคลียสมาผสมกันแล้วมีการพัฒนาต่อไปโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (meiosis) และไมโตซีส (mitosis) แอสโคโกเนียมจะมีการสร้างผนังขึ้นมาล้อมรอบทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น จากนั้นจึงพัฒนาต่อไปเป็นเพอริทีเชียม (perithecium) หรือ คลิสโตทีเชียม (cleistothecium) ตามชนิดสายพันธุ์ ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) ทรงกลม เกิดที่ปลายก้านชู (stalk) ในระยะนี้จะมีการสลายไปของผนังของแอสคัส (ascus) ที่ห่อหุ้มแอสโคสปอร์ (ascospore) ทำให้เหลือแต่แอสโคสปอร์ ซึ่งส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล แดง ส้ม หรือไม่มีสี อยู่ในเพอริทีเชียม ซึ่งแต่ละเพอริทีเชียมก็จะมีจำนวนของแอสโคสปอร์ต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าผนังของเพอริทีเชียมจะแตกออก เพื่อปลดปล่อยแอสโค-สปอร์ออกมาในทิศตรงกันข้ามกับก้านชู ซึ่งระยะเวลาการสร้างแอสโคสปอร์จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ โดยขณะที่เลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวจะเริ่มพบเพอริทีเชียมได้เมื่อเวลาผ่านไป 24 ถึง 48 ชั่วโมงแล้วจึงพัฒนาไปเป็นแอสโคสปอร์อย่างสมบูรณ์เมื่อเลี้ยงเชื้อผ่านไปได้ 96 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 2.14 (Su และ Huang, 1980)

ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นจะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่าโคนิเดียบนปลายเส้นใยเฉพาะ ที่เรียกว่า โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) (Ainswarth และคณะ, 1973) ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นตรง หรือขดเป็นเกลียว ขณะเริ่มสร้างโคนิเดียที่บริเวณปลายของเส้นใยจะพองออกจากนั้นจะสร้างผนังกั้นระหว่างโคนิเดียกับเส้นใย ต่อมาเส้นใยใต้โคนิเดียแรกจะมีการพองตัว แล้วสร้างผนังกั้นระหว่างโคนิเดียกับเส้นใยอีกกลายเป็นโคนิเดียอันที่สอง และเป็นเช่นนี้ไปเรื่อยๆจนในที่สุดได้โคนิเดียที่ต่อกันเป็นสาย ดังนั้นโคนิเดียที่อายุมากที่สุดจะอยู่ด้านนอกสุด โคนิเดียแต่ละอันเกิดจากบริเวณ meristematic zone ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ใต้โคนิเดียที่เกิดก่อนหน้านั้น เพื่อใช้สร้างโคนิเดียอันถัดมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้สายโคนิเดียยาวขึ้นขณะที่โคนิดิโอฟอร์จะสั้นลง ลักษณะของโคนิเดียจะเป็นรูปกลม หรือรูปไข่ บริเวณฐานของโคนิเดียจะมีรอยตัดผนังเรียบ ไม่มีสี แต่อาจมีสีแดงหรือน้ำตาลอ่อนได้ถ้าเชื้อรามีอายุมากขึ้น ปัจจัยที่กำหนดการงอกของโคนิเดียไปเป็นเส้นใย ได้ดีหรือไม่ สังเกตุได้จากอายุของโคนิเดีย ความหนาแน่นของโคนิเดีย พีเอช และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ และแสง เป็นต้น (Wong และ Bau, 1978)



รูปที่ 2.14 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp.
ที่มา : บุษบา (2540)

Lin และ Suen (1973) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ R-1 และ S-11 ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *Monascus* spp. F-2 ด้วยสาร NTG จะ สร้างสารสีแดง และสีเหลืองได้ดี แต่เจริญช้าและสร้างสปอร์น้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 33.3 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Lin และ Iizuka (1982) ที่พบว่าการเจริญของ *M. kaoliang* สายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้ดี จะขาดสมบัติในการสร้าง ascospore และ perithecia และสร้างโคนิเดีย ขนาดเล็กในปริมาณต่ำกว่าสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้ต่ำ

Wong และ Bau (1978) ศึกษาสัณฐาน วิทยาของเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์กลาย พบว่าสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารสีหรือสร้างได้เพียงเล็กน้อย จะเจริญเร็วกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร malt extract agar (MEA) จะสร้างโคนิเดียจำนวนมากและสร้าง cleistothecium โดยไม่สร้าง ascospore เรียกว่า protocleistothecium ได้ ขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่ยังคงสร้าง cleistothecium ที่สมบูรณ์ได้จำนวนมาก สำหรับลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารสีจะมีผนังหนามาก และแตกแขนงน้อย ส่วนสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้ดีจะมีเส้นใยที่บอบบาง และแตกแขนงมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hawksworth และ Pitt (1983) แบ่งเชื้อรา *Monascus* spp. ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ *M. pilosus, M. purpureus* และ *M. ruber* โดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ czapek yeast extract agar (CYA), MEA และ 25 เปอร์เซ็นต์ glycerol nitrate agar (G25N) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ และ ลักษณะการเจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อราทั้ง 3 กลุ่มเจริญในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน ประเภทสารอินทรีย์ได้ดีกว่าสารอนินทรีย์ ต้องการอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกันไป โดยเชื้อรา ในกลุ่ม *M. pilosus* เจริญบนอาหาร CYA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่า 37 องศาเซลเซียส ส่วน *M. purpureus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขณะที่ *M. ruber* เจริญที่อุณหภูมิทั้งสอง ได้ใกล้เคียงกัน *M. pilosus* มีลักษณะต่างจาก *M. ruber* คือสร้างสารสีแดงบนโคโลนี โคนิเดียต่อกัน เป็นสายสั้นๆ สร้าง cleistothecia ไม่มีสีขนาดเล็กกว่า และ ascospore มีลักษณะสั้นและแคบกว่า สำหรับ *M. ruber* สร้างสีฟ้าตาลอ่อนบนโคโลนี โคนิเดียมีลักษณะกลม ต่อกันเป็นสายยาว และสร้าง cleistothecia สีน้ำตาล ส่วน *M. purpureus* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ช้ากว่า *M. ruber* และ *M. pilosus* ขณะที่สร้างสีส้มหรือแดงบนอาหาร CYA และ MEA และสร้าง ascospore ได้ มากกว่า *M. ruber*

2.10 สภาวะการเลี้ยงเชื้อและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อรา *Monascus* spp เกิดทั้งในสภาพการเจริญบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ซึ่งการเลี้ยงบนอาหารแข็ง เชื้อราไม่เจริญเกาะติดตามถังหมักขณะกวนหรือหมุนให้อากาศ แต่ข้อเสีย ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวนาน ส่วนการเลี้ยงในอาหารเหลว มีข้อดีคือ ใช้เวลาในการเก็บเกี่ยวสั้น แต่มักพบปัญหาการเจริญของเชื้อราที่ผนัง แกนกวน และฝาถังหมัก เรียกว่า wall growth (สมชาย, 2536)

2.10.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง (solid-state cultivation)

การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. โดยการหมักแบบอาหารแข็งเป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้กันในการผลิตสี โดยเฉพาะประเทศจีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ (Rosenblitt และคณะ, 2000) ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพของข้าวที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. ได้แก่ ซับสเตรต ความชื้น อุณหภูมิ พีเอช และ อากาศ เป็นต้น

ซับสเตรตที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ที่ใช้ทั่วไป และทำเป็นการค้า ได้แก่ ข้าว ซึ่ง Palo และคณะ (1960) ได้ปรับปรุงคุณภาพของข้าวแดงโดยทดลองใช้สายพันธุ์ และซับสเตรตที่เหมาะสม จนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพแล้วนำมาเจือสีในอาหารได้ นอกจากนี้ยังมีซับสเตรตอื่นๆ อีกเช่น ขนมปัง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง มันฝรั่ง มันเทศ และมันสำปะหลัง (พลายแก้ว และ บุษบา, 2534ก)

ความชื้นเริ่มต้นในการเลี้ยงนั้นมีความสำคัญมากต่อการเจริญ ชนิด และปริมาณของสารสีของเชื้อรา Palo และคณะ (1960) พบว่าที่ความชื้นต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้การผลิตสีของข้าวแดงที่ดี ต่อมาเชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงของ *Monascus purpureus* K001 บนเมล็ดข้าวคือ 60 เปอร์เซ็นต์ Lotong และ Suwanarit (1990) ทดลองเลี้ยง *Monascus* sp. NP1 เพื่อศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของเชื้อรา *Monascus* sp. บนข้าวนึ่ง พบว่าที่ความชื้น 32.6 เปอร์เซ็นต์ ในถุงพลาสติกสามารถทำให้เชื้อรา *Monascus* sp. ผลิตข้าวแดงได้ดีที่สุด เนื่องจากที่เปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำเกินไปเชื้อจะเจริญได้น้อย และผลิตสีลดลง แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงเกินไปจะไปเพิ่มการทำงานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์กลูโคอะมิเลส ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสมากขึ้น ซึ่งกลูโคสนี้จะถูกใช้ในการผลิตเอทานอลแทนสี ดังนั้นถ้าปริมาณกลูโคสสูงเกินไปก็จะไปยับยั้งการผลิตสี Han (1990) ได้ทำการคัดเลือก *Monascus* sp. จำนวน 13 สายพันธุ์ จากจำนวนทั้งหมด 125 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาการผลิตสีบนเมล็ดข้าวพบว่า *M. purpureus* ATCC 16365 ผลิตสีแดงได้ดี เมื่อความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วน Johns และ Stuart (1991) พบว่าที่ความชื้นเริ่มต้น 56 เปอร์เซ็นต์ *M. purpureus* FRR 2190 สามารถผลิตสีแดงออกสู่ภายนอกเซลล์ได้มากที่สุด ขณะที่พลายแก้ว และ บุษบา (2534ข) พบว่าความชื้นเริ่มต้นประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารแข็ง ได้แก่ ข้าว เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงของ *M. kaoliang* และสีเหลืองของ *M. barkari* ส่วน นิสา (2537) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. KB11304 และ KB10M16 ที่ผลิตสีแดง และ KB20M10.2 ที่ผลิตสีเหลืองบนปลายข้าวหอมมะลิ พบว่าเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ผลิตสีได้ดีที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์

สำหรับพีเอชในการเลี้ยงเชื้อรานั้นส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงพีเอชค่อนไปทางกรดโดย Palo และคณะ (1960) รายงานว่า *M. purpureus* สามารถผลิตสีแดงได้ดีที่พีเอช 3.0-7.5 ต่อมา Han (1990) พบว่า *M. purpureus* ATCC 16365 ผลิตสีแดงได้ดีที่พีเอชเริ่มต้น 5.0-6.0 ซึ่งใกล้เคียงกับ Johns และ Stuart (1991) พบว่าพีเอชเริ่มต้น 6.0 เหมาะต่อการผลิตสีแดงของ *M. purpureus* FRR 2190

ส่วนการให้อากาศ เชิดชัย และ คณะ (2519) พบว่าการเลี้ยง *Monascus purpureus* K001 โดยมีการเขย่าหรือให้อากาศ จะช่วยให้เชื้อราผลิตสีแดงได้ดี และเร็วขึ้น เช่นเดียวกับ Chiu และ Chan (1992) ศึกษาผลของการให้อากาศที่มีต่อการผลิตสีของเชื้อรา *M. purpureus* บนชานอ้อย ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยเปรียบเทียบการเลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้กับการเลี้ยงแบบให้มีการหมุนของภาชนะ ซึ่งในการทดลองใช้ขวดเป็นภาชนะ พบว่าการเลี้ยงแบบให้มีการหมุนขวดนั้นเชื้อจะผลิตสีได้ดีกว่าการเลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้ธรรมดา 2-3 เท่า การให้อากาศนั้นเป็นการระบายความร้อน และรักษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับออกซิเจน

2.10.2 การเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp.ในอาหารเหลว (submerged cultivation)

มีการศึกษาเชื้อรา *Monascus* sp. โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ในการเลี้ยงควบคุมการปนเปื้อนประหยัดพื้นที่ในการทำงาน และขยายขนาดการหมัก (scale-up) ได้ง่ายกว่าการหมักบนอาหารแข็ง (Johns และ Stuart,1991) จึงพัฒนาระบบการเลี้ยงเพื่อการเจริญและการผลิตสีได้ดียิ่งขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว ได้แก่แหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน แหล่งไนโตรเจนสารที่จำเป็นต่อการเจริญ อุณหภูมิ พีเอช การให้อากาศ (aeration) และการกวน (agitation) เป็นต้น

2.11 มิวเตชันหรือการกลายพันธุ์ (Mutation)

มิวเตชัน หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลักษณะของสารพันธุกรรม ซึ่งลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปนี้สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ (ประดิษฐ์, 2541)

2.11.1 ระดับของมิวเตชัน

แบ่งได้ 2 ระดับคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. มิวเตชันระดับโครโมโซม (chromosome mutation) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือจำนวนของโครโมโซม

ข. มิวเตชันระดับยีน (gene mutation หรือ point mutation) เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีน จากอัลลีลหนึ่งไปยังอีกอัลลีลหนึ่ง ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

- การแทนที่คู่เบส (base-pair substitution) คือการแทนที่คู่เบสในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด 1) ทรานซิชัน (transition) คือการแทนที่เบสพิวรีนชนิดหนึ่งด้วยพิวรีนอีกชนิดหนึ่ง หรือแทนที่เบสไพริมิดินชนิดหนึ่งด้วยเบสไพริมิดินอีกชนิดหนึ่งและ 2) ทรานสเวอร์ชัน (transversion) คือการแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสไพริมิดิน หรือเบสไพริมิดินด้วยเบสพิวรีน

- เฟรมชิฟท์มิวเตชัน (framshift mutation) คือมิวเตชันที่เกิดจากการสูญหายหรือการเพิ่มของนิวคลีโอไทด์ 1 นิวคลีโอไทด์ หรือมากกว่าในสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ทำให้กรอบรหัสของพันธุกรรม (genetic code) เปลี่ยนแปลงไป

2.11.2 การเกิดมิวเตชัน

แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

ก. มิวเตชันที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมเช่นรังสีสารเคมีอุณหภูมิที่มีอยู่เองในธรรมชาติ

ข. มิวเตชันที่เกิดจากการชักนำ (induced mutation) เกิดจากมนุษย์เป็นผู้ใช้สิ่งที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือเรียกอีกอย่างว่ามิวตาเจน (mutagen) ชักนำให้เกิดขึ้นซึ่งมิวตาเจนมีดังนี้

- การกลายพันธุ์ทางกายภาพ (physical mutagen) ได้แก่อุณหภูมิและรังสีต่างๆ ซึ่งรังสีนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอ็กซ์แกมม่า อัลฟา เบต้า อิเล็กตรอน นิวตรอน โปรตอน และอนุภาคอื่นๆ ที่เคลื่อนที่เร็วและมีความสามารถในการทะลุทะลวงสูง ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมและโครมาติด อีกประเภทหนึ่ง คือ รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (non-ionizing radiation) ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต ซึ่งมีความสามารถในการทะลุทะลวงต่ำกว่ารังสีที่ก่อให้เกิดไอออน ซึ่งกรดนิวคลีอิกสามารถดูดซึมรังสีอัลตราไวโอเลต ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธะของเบสพิวรีนและเบสไพริมิดิน แต่พบว่าเบสไพริมิดินมีการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายกว่าเบสพิวรีน โดยที่รังสีอัลตราไวโอเลตจะทำให้ไทมิน 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันบนสายโพลีนิวคลีโอไทด์สายเดียวกันเกิดพันธะต่อกันเป็นไทมินไดเมอร์ (thymine dimer) นอกจากนี้ยังเกิดไซโตซินไดเมอร์ (cytosine dimer) ได้เช่นกัน

- การกลายพันธุ์ทางเคมี (chemical mutagen) ได้แก่ สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสชนิดต่างๆของดีเอ็นเอเช่นสาร 5-bromouracil และ 2-aminopurine มีผลให้เกิดการทรานซิชัน และสารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ ได้แก่ กรดไนตรัสและสารไฮดรอกซีลามิน (hydroxylamine) ทำให้เกิดทรานซิชันนอกจากนี้ยังมีสารที่มีหมู่อัลคีล (alkylating agents) เช่นสารไนโตรเจนมัสตาร์ด (nitrogen mustard) เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methanesulfonate : EMS) และN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) เป็นต้นสารเหล่านี้สามารถทำให้เกิดการทรานซิชันทรานสเวอร์ชันและเฟรมชิฟท์มิวเตชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง

สายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อรา *Monascus* sp. ปี ค.ศ.. 1884 Van Tieghem ได้แยก และให้ชื่อเชื้อรา *Monascus* sp.และแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ *Monascus mucoroides* และ *Monascus rubber* ต่อมาปีค.ศ. 1985 Went ได้แยกสายพันธุ์สำคัญคือ *Monascus purpureus* จากข้าวแดงหรืออังคัก

Harsha และคณะ (2013) ได้ทำการวิจัยการผลิตเมวาสเตตินโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้คือ กากงาที่เหลือทิ้งจากการสกัดน้ำมันงา ใช้เชื้อรา *Pencillium citrinum* MTCC 1256 และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตติน ได้แก่ ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ พีเอช และความชื้น

Mahesh และคณะ (2012) ได้ทำการผลิตเมวาสเตตินบนอาหารแข็ง ได้แก่ ข้าวสาลี โดยใช้เชื้อ *Pencillium citrinum* NCIM 768 พบว่า สามารถผลิตเมวาสเตตินได้เท่ากับ 68.7 มิลลิกรัมต่อลิตร

Wang และคณะ (2004) ได้ผลิตสารลดคอเลสเตอรอลในกลุ่มสเตติน โดยใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* NTU 601 บนาหารแข็งได้แก่ ข้าว พบว่าสามารถผลิตสารลดคอเลสเตอรอลได้สูงสุด 526.29 ppm

Palo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการสร้างสารสีของ *Monascus purpureus* และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอังคัก มีดังต่อไปนี้ ความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอช ระหว่าง3.0-7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่สายพันธุ์ข้าวเหนียวให้ผลไม่ดีนัก บุษบา (2518) ได้การทดลองการสร้างสีของ *Monascus purpureus* โดยใช้สภาวะต่อการผลิตข้าวแดงของ Palo และคณะ(1960) มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ของไทย พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูและข้าวหอมมะลิให้สีเข้มใกล้เคียงกัน แต่ข้าวเหนียวกลับให้กลิ่น หอมมากกว่าข้าวหอมมะลิ กลิ่นหอมดังกล่าว คือ กลิ่นแอสเทอร์และแอลกอฮอล์ปนกัน ทั้งนีข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูและข้าวเจ้าพันธุ์หอมมะลิให้ผลความเข้มของสีใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ญี่ปุ่น ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์อื่นๆ ของไทยคือ พันธุ์เสาไห้พันธุ์รรมดาฯลฯ นั้นล้วนแต่ให้สีและความหอมน้อยกว่ามาก

เมล็ดธัญพืช และอื่น ๆ พลายแก้ว และ บุษบา (2534 ก) ได้ศึกษาแหล่งสับสเตรตชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับการผลิตบนข้าวโดยใช้เมล็ดข้าวโพด มันเทศ มันสำปะหลัง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง และขนมปังต่อการเจริญ

สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส

Wang และคณะ (2004) ได้ผลิตสารลดคอเลสเตอรอลในกลุ่มสเตติน โดยใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* NTU 601 บนาหารแข็งได้แก่ ข้าว โดยทำการกลายพันธุ์เชื้อราโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า *Monascus purpureus* N 301 สามารถผลิตได้เท่ากับ 481.29 ppm และ *Monascus purpureus* N 310 สามารถผลิตได้สูงสุด คือ 526.29 ppm

โดยทั่วไปเชื้อรา *Monascus* sp. เมื่อเจริญบนเมล็ดข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั้งผิวหน้า และแทรกทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าวนั้น ก็จะมีการสร้างสารสีได้ภายหลังจากการบ่มไปได้นาน 3 วัน สารสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหล่านี้ เมื่อมีการนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าสารสีแดงทั่วไปจะมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด 2 จุด ที่ 420 และ 500 นาโนเมตร บางสายพันธุ์ที่ให้สีข้างแดง หรืออังคักเป็นสีแดงสวย หรือแดงชมพูแก่จะมีความโด่ง (peakedness) ของจุด 500 นาโนเมตร สูงกว่าที่ 420 สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร หรือค่าความโด่งที่ 370 สูงกว่า 500 นาโนเมตรเป็นต้น เช่น สายพันธุ์ *Monascus barkari* (พลายแก้ว และ บุษบา,2534ข) หรือ *Monascus kaoliang* (บุษบา และ วรรณภา, 2528)

พีเอช

Palo (1960) รายงานว่า *Monascus purpureus* สร้างสารทุติยภูมิได้ในพีเอช ระหว่าง 3.0-7.5 พลายแก้ว และ บุษบา (2543ข) พบว่าสภาวะเป็นกรดไม่มีผลในเชิงลบต่อการสร้างสีเหลืองของ *Monascus barkari*

Mahesh และคณะ (2012) ผลิตเมวาสเตตินบนอาหารแข็ง ที่รำข้าวสาลี ที่พีเอช 4 สามารถผลิตเมวาสเตตินได้เท่ากับ 68.7 มิลลิกรัมต่อลิตร

อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะต่อการสร้างสารทุติยภูมิจะอยู่ระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส โดย บุษบา (2529) ทราบดีว่าอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส แต่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสี

Mahesh และคณะ (2012) ผลิตเมวาสเตตินบนอาหารแข็ง ได้แก่ รำข้าวสาลี พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้การผลิตเมวาสเตตินสูงสุด คือ 0.0295 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Ganrong และคณะ (2005) ทำการผลิตสารลดคอเลสเตอรอลในกลุ่มสเตติน บนอาหารแข็ง ได้แก่ ข้าว โดยใช้เชื้อรา *Monascus* sp. 9901 พบว่าสามารถผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 11,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ความชื้น

Harsha และคณะ (2013) ได้ทำการวิจัยการผลิตเมวาสเตตินโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้คือ กากงาที่เหลือทิ้งจากการสกัดน้ำมันงา ใช้เชื้อรา *Pencillium citrinum* MTCC 1256 และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตติน ได้แก่ ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ พีเอช และความชื้น พบว่าสามารถผลิตเมวาสเตตินได้สูงสุด 0.0294 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์

Ganrong และคณะ (2005) ทำการผลิตสารลดคอเลสเตอรอลในกลุ่มสเตติน บนอาหารแข็ง ได้แก่ ข้าว โดยใช้เชื้อรา *Monascus* sp. 9901 พบว่าสามารถผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 11,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความชื้น 65 เปอร์เซ็นต์

Palo และคณะ (1960) เป็นคนแรกที่รายงานว่าความชื้น ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีต่อการสร้างสารทุติยภูมิของ *Monascus purpureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีโดยการเขย่า หรือการให้อากาศช่วยให้เชื้อราสร้างสารได้ดีและเร็วขึ้น ซึ่งรัตนา (2528) พบว่าการหมักข้าวแดงในสภาพที่มีความชื้นสูงมากไปนั้น เชื้อรา *Monascus* sp.จะสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงขึ้น แต่สร้างสารสีน้อยลง

Lotong และ Suwanarit (1990) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงในถุงพลาสติกของเชื้อรา *Monascus sp.* NP1 คือ 32.6 เปอร์เซ็นต์ แต่ความชื้นเริ่ม ต้นเท่ากับ 39.6 เปอร์เซ็นต์ นั้น อัตราการสร้างสารสีจะลดลงความชื้นต่ำเกินไปทำให้เชื้อราเจริญได้ไม่ดีส่งผลให้การสร้างสีไม่ดี ความชื้นสูงเกินไป เกิดการเจริญ และการสร้างเอนไซม์กลูโคสอะมิเลทมากเกิดการสะสมกลูโคสยับยั้งการสร้างสารทุติยภูมิได้ จึงพัฒนาสายพันธุ์กลายที่ทนกลูโคสได้สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 (สมชาย และนิสา, 2554) จากงานวิจัยการผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เจริญบนอาหารแข็ง โดยนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาคัดแยกบนอาหารวุ้น MYS agar และ SS agar เพื่อหาสายพันธุ์ที่เจริญเร็ว คัดเลือกด้วยวิธีเลือกตามธรรมชาติโดยสังเกตโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็วในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 เจริญดีที่สุดบนอาหาร SS agar งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปที่นำเชื้อจากธรรมชาติที่สามารถผลิตสารยับยั้งคอเลสเตอรอล (anti-cholesterol) หรือโมนาโคลิน (manacolin) บนอาหารแข็ง พบว่า เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สามารถผลิตโมนาโคลิน ได้สูงสุด 2.11 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่าง บนวัสดุหมัก ได้แก่ ข้าวเสาไห้ 50 กรัม ที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- MYS (Malt yeast extract agar) (ภาคผนวก ก)
- SS (Soybean starch agar) (ภาคผนวก ก)
- GYP (Glucose yeast extract peptone agar) (ภาคผนวก ก)
- PDA (Potato dextrose agar) (ภาคผนวก ก)
- วัสดุหมัก ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว (ภาคผนวก ก)
- สารมาตรฐานเมวาสเตติน (Sigma, USA) (ภาคผนวก ข)
- สารมาตรฐานกลูโคส (ภาคผนวก ข)
- สารละลายเนลสัน (Nelson'reagent) (ภาคผนวก ข)
- สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent) (ภาคผนวก ข)
- Peptone
- yeast extract
- malt extract
- แป้งมันสำปะหลัง
- แป้งถั่วเหลือง
- แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์
- Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์
- para–dimethylaminobenzaldehyde
- กรดไฮโดรคลอริก
- สารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (Shimadzu, C20994007894 LP,LC-10ADvp)
- คอลัมน์ μBondapakTM C18 3.9 x 300 มิลลิเมตร (Water, USA)
- เครื่องวัดความเข้มของแสง (Spectrophotometer) รุ่น Helios Gamma ยี่ห้อ Thermoscientific
- เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
- เตาอบลมร้อน (Hot air oven)
- แท่งแม่เหล็กสาหรับกวนสาร (Magnetic bar)
- เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- กล้องจุลทรรศน์
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer)
- เครื่องชั่งไฟฟ้า

3.4 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 (สมชาย และ นิสา, 2554) เลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง MYS (Malt yeast extract agar slant) เพื่อเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไว้ใช้ในการทดลอง

3.5 การเตรียมวัสดุหมัก (พืชผลทางการเกษตร) เพื่อใช้เป็นอาหารแข็ง

สำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว นำมาล้างน้ำให้สะอาด นำเปลือกออก นำมาหั่นให้ได้ขนาดต่างๆ ได้แก่ หั่นละเอียด (ขนาด 0.1-0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร) หั่นเป็นเส้น และหั่นแบบลูกเต๋า (ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร) แล้วนำวัสดุหมักแต่ละชนิด 50 กรัม ใส่ขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 200 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เขย่าอาหารกระจายตัว เพื่อคัดเลือกขนาดที่เหมาะสมต่อการทดลอง (วัสดุหมักไม่จับตัวเป็นก้อน หรือกระจายตัวได้ดี) หลังจากคัดเลือกขนาดของวัสดุหมักที่เหมาะสม นำวัสดุหมักมาอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ จากนั้นนำวัสดุหมักแต่ละชนิด 50 กรัม ใส่ขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 200 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เขย่าอาหารกระจายตัว เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 5 10 15 และ 20 มิลลิลิตร เพื่อการทดลองหาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตติน

3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตติน

3.6.1 การเตรียมต้นเชื้อ (inoculum)

นำเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ที่เก็บรักษามาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MYS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นจึงใช้ cork borer ขนาด 4.0 มิลลิเมตร มาเจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา จำนวน 4 ก้อน เพื่อใส่ในอาหารเหลว SS medium ปลอดเชื้อปริมาตร 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ที่บรรจุใน ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้เป็นต้นเชื้อสำหรับการทดลองต่อไป

3.6.2 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว ที่ผ่านการหั่นคัดเลือกขนาดที่เหมาะสม นำวัสดุหมักแต่ละชนิด 50 กรัม ใส่ขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 200 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เขย่าอาหารกระจายตัว (ชุดควบคุม) และเปรียบเทียบกับวัสดุหมักแต่ละชนิด 50 กรัม ใส่ขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 200 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เขย่าอาหารกระจายตัว ผสมแกลบที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 0.5 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (ผสมแกลบเพื่อลดความชื้นเริ่มต้น เนื่องจากการอบวัสดุหมักที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดปฏิกิริยา Browing reaction จึงเลือกใช้วัสดุหมักแบบสด) เมื่อเตรียมวัสดุหมักชุดควบคุม และวัสดุหมักที่ผสมแกลบ หลังจากนั้นนำต้นเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว SS medium อายุ 3 วัน ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใส่บนวัสดุหมัก ที่เตรียมได้ จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องหมุนขวด ที่ระยะเวลาการหมุนแตกต่างกัน ได้แก่ หมุน 1 ชั่วโมง หยุดหมุน 3 ชั่วโมง (1 ต่อ 3) หมุน 1 ชั่วโมง หยุดหมุน 6 ชั่วโมง (1 ต่อ 6) และหมุน 1 ชั่วโมง หยุดหมุน 12 ชั่วโมง (1 ต่อ 12) ตามลำดับ โดยใช้ความเร็วรอบการหมุน 7 ถึง 10 รอบต่อนาที และแบบสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน (เป็นเวลา 35 วัน หรือ 5 สัปดาห์) เพื่อวิเคราะห์ การสร้างเมวาสเตติน การสะสมน้ำตาลกลูโคส ความชื้น และพีเอช

3.6.3 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

สำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว ที่ผ่านการหั่นคัดเลือกขนาดที่เหมาะสม นำวัสดุหมักแต่ละชนิดนำมาใช้แทนแป้งที่เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบอาหารเหลว 3 สูตร ได้แก่ อาหารสูตร 3 เปอร์เซ็นต์ (ประกอบด้วย วัสดุหมักแต่ละชนิด 3 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร) อาหารสูตร 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร MYS medium (ประกอบด้วย วัสดุหมักแต่ละชนิดใช้แทนแป้งในสูตรอาหารดังกล่าว 1 เปอร์เซ็นต์ Peptone 0.5 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ malt extract 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร) อาหารสูตร 3 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร SS medium (ประกอบด้วย วัสดุหมักแต่ละชนิดใช้แทนแป้งในสูตรอาหารดังกล่าว 3 เปอร์เซ็นต์ และถั่วเหลือง 4 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร) นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำต้นเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว SS medium อายุ 3 วัน ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์ เติมในอาหารเหลวที่เตรียมได้ จากนั้นนำไปเขย่า โดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 7 10 และ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ เพื่อวิเคราะห์ การสร้างเมวาสเตติน การสะสมน้ำตาลกลูโคส และพีเอช

3.7 การศึกษาการกลายพันธุ์

นำเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในอาหาร MYS slant มาเติม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปลอดเชื้อ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร นับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer (ตามวิธีของ Towsend และ Lindrend, 1953) เจือจางสารสปอร์แขวนลอยจนได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำสารสปอร์แขวนลอยมา 15 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อแล้วผ่านรังสียูวี (UV) โดยใส่แท่งแม่เหล็กสำหรับกวนสาร (Magnetic bar) ในจานเพาะเชื้อเพื่อให้สปอร์กระจายตัวอยู่ทั่วจานเพาะเชื้อ กวนโดยใช้เครื่องกวนสารละลาย (Magnetic stirrer) โดยวาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จานเพาะเชื้อห่างจากหลอด UV 50 เซนติเมตร (ดัดแปลงจาก Wang และคณะ, 2004) โดยจะเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 นาที เริ่มจากที่ 0 นาที ถึง 14 นาที เก็บตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร นำมาใส่บนอาหาร MYS agar ทำการ spread plate นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนโคโลนีเพื่อหาอัตราการอยู่รอด

3.8 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายเบื้องต้น

3.8.1 คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายบนอาหาร MYS agar พีเอช 3

นำเชื้อราสายพันธุ์กลายมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MYS agar พีเอช 3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำเพลทที่เชื้อราเจริญมาสกัด โดยแบ่งการสกัดออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่เป็นวุ้นที่อยู่ใต้เส้นใยเชื้อราและวุ้นรอบนอกโคโลนีทั้งเพลท (เพื่อศึกษาการหลั่งสารออกนอกเซลล์) และ ส่วนของเส้นใยเชื้อรา (เพื่อศึกษาการหลั่งสารภายในเซลล์) มาสกัดโดยเติมเอทธานอล เปอร์เซ็นต์ 50 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 7-10 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสเพื่อวิเคราะห์เมวาสเตติน ส่วนตะกอนเติมน้ำ 150 มิลลิลิตร นำไปต้มให้วุ้นละลาย กรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำไปอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักเซลล์ เพื่อคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลาย

3.8.2 คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายบนวัสดุหมักอาหารแข็ง

นำเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกเบื้องต้นมาเลี้ยงบนวัสดุหมักอาหารแข็งที่หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตติน (ดูข้อ 3.6) เพื่อคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่สร้างเมวาสเตตินได้สูงกว่าเชื้อรา *Monascus* sp. SS14

3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp SS14 และสายพันธุ์กลาย บนอาหารวุ้น MYS SS GYP และ PDA agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะของโคโลนีและเส้นใย

3.10 การหาสภาวะพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตตินโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Desige ; CRD) มีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ นำเชื้อรา *Monascus* sp SS14 และสายพันธุ์กลาย มาเลี้ยงบนวัสดุหมักที่คัดเลือกดังข้อ 3.6 โดยวัสดุหมักแต่ละชนิด 50 กรัม นำมาแช่สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอชเริ่มต้น 3.0 4.5 และ 6.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาสะเด็ดน้ำเป็นเวลา 30 นาที นำวัสดุหมักแต่ละชนิด 50 กรัม ผสมแกลบ 1 เปอร์เซ็นต์ ใส่ขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 200 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เขย่าอาหารกระจายตัว เลี้ยงบนเครื่องหมุนขวดที่ระยะเวลาการหมุน 1 ต่อ 3 โดยใช้ความเร็วรอบการหมุน 7 ถึง 10 รอบต่อนาที และแบบสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมแกลบ) เพื่อวิเคราะห์ การสร้างเมวาสเตติน การสะสมน้ำตาลกลูโคส การสร้างสี ความชื้น และพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 การวิเคราะห์

3.11.1 การสกัดเมวาสเตติน (ดัดแปลงจาก Ganrong และคณะ, 2003)

นำตัวอย่าง 0.5 กรัม มาสกัดเมวาสเตตินด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสเพื่อวิเคราะห์เมวาสเตติน

3.11.2 การวิเคราะห์เมวาสเตติน

นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Shimadzu, C20994007894 LP,LC-10ADvp) คอลัมน์ μBondapak^{TM} C_{18} 3.9 x 300 มิลลิเมตร (Water, USA) และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร (UV detector SPD-10A vp) โดยใช้ส่วนเคลื่อนที่เป็นสารละลาย acetonitrile ความเข้มข้น 55 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐานเมวาสเตติน (Sigma, USA) (การเตรียมสารละลายมาตรฐานเมวาสเตติน ภาคผนวก ข)

3.11.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับการเจริญ

การวิเคราะห์ความชื้น (ภาคผนวก ข) ปริมาณการสะสมน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข) สารสี (ภาคผนวก ข) ปริมาณกลูโคซามีน (ภาคผนวก ข) และพีเอช

3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Desige ; CRD) มีจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี Duncan โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.5 for Windows Evaluation version ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเตรียมวัสดุหมักเพื่อใช้เป็นอาหารแข็งในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14

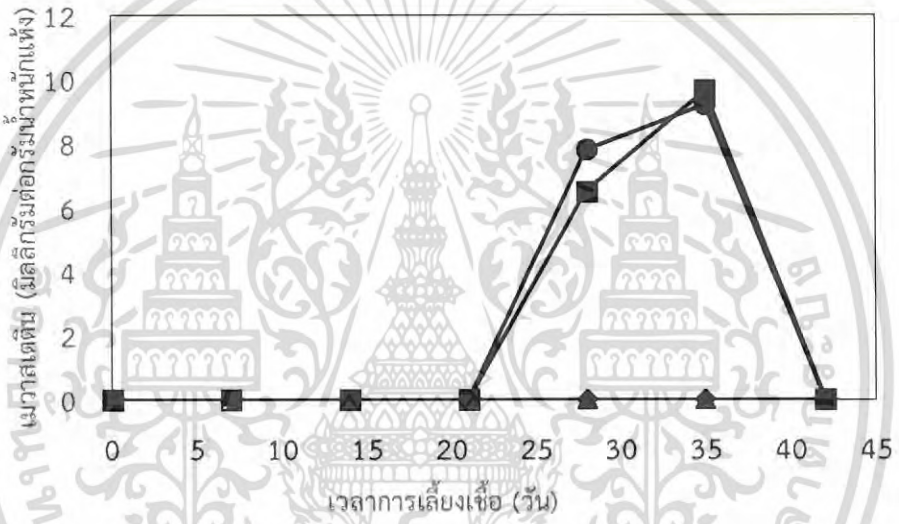
วัสดุหมักที่นำมาทดลองเป็นพืชผลทางการเกษตรชนิดหัว ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว นำมาหั่นให้มีขนาดที่เหมาะต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิววัสดุหมัก และง่ายต่อการกระจายตัวต่อการผสมผสาน ทำให้เชื้อเจริญ และผลิตสารเมวาสเตตินได้สูงขึ้น โดยหั่นวัสดุหมัก 3 แบบ ได้แก่ หั่นละเอียด (ขนาดประมาณ 0.1-0..5 ลูกบาศก์เซนติเมตร) หั่นเป็นเส้น และหั่นแบบลูกเต๋า (ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร) จากการทดลองหาขนาดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ โดยนำวัสดุหมักขนาดต่างๆชั่งน้ำหนัก 50 กรัม ใส่ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าวัสดุหมักของแต่ละชนิดที่หั่นละเอียดและหั่นเป็นเส้น เมื่อนำมาเขย่าวัสดุหมักมีลักษณะจับตัวเป็นก้อนเดียวขนาดใหญ่ ลักษณะจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาเลี้ยงเชื้อ ส่วนวัสดุหมักขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีลักษณะกระจายตัวดีกว่าการหั่นแบบ 2 ชนิด จึงนำขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาเป็นอีกหนึ่งสภาวะการทดลอง แต่เนื้อวัสดุหมักมีความชื้นสะสมค่อนข้างสูง จึงต้องควบคุมความชื้นให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมของการเจริญ จึงนำวัสดุหมักไปอบที่อุณภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนวัสดุหมักแห้งและน้ำหนักคงที่ (ประมาณ 12 ชั่วโมง) จากนั้นนำวัสดุหมักที่อบแห้งมาชั่งน้ำหนัก 50 กรัม ใส่ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อปริมาตร 5 10 15 20 มิลลิลิตร เพื่อควบคุมความชื้นเริ่มต้น ให้เป็นไปตามที่กำหนดในปริมาณต่างๆ พบว่าหลังการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป แล้วปล่อยให้วัสดุหมักดูดซับน้ำเข้าไปอย่างสมบูรณ์ แต่ปรากฏว่าวัสดุหมักมีการเปลี่ยนแปลงจากสีขาวไปเป็นสีน้ำตาล ซึ่งอาจเป็นผลมาจากผลการได้รับความร้อนจะมีการสูญเสียน้ำ (dehydration) มีการสลายตัว (degradation) และมีการรวมตัวกัน (condensation) ของหมู่อะมิโน กับสารประกอบรีดิวซิง และพัฒนาเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลือง ถึงสีน้ำตาลและน้ำตาลแดง การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดของอาหารแต่ละชนิดเมื่อได้รับความร้อนจะทำให้มีทั้งสี กลิ่น และรสชาติเกิดขึ้นแตกต่างกัน และปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงและจะผันแปรตาม ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ ทำให้กรดอะมิโนไลซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นทั้งที่อยู่ในรูปอิสระและที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของโปรตีนลดน้อยลง ดังนั้นการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลแบบนี้จะทำให้คุณค่าทางโภชนาการของอาหารลดลงด้วย จึงทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้ (นิธิยา, 2549) ดังนั้นการเตรียมวัสดุหมักโดยการอบเพื่อควบคุมความชื้นเริ่มต้นจึงไม่สามารถทำได้ จึงจำเป็นต้องเตรียมวัสดุหมักในสภาพสด นำมาหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาสภาวะการผลิตเมวาสเตตินโดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14

4.2.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และการผลิตเมวาสเตตินบนวัสดุหมักในสภาวะนิ่ง

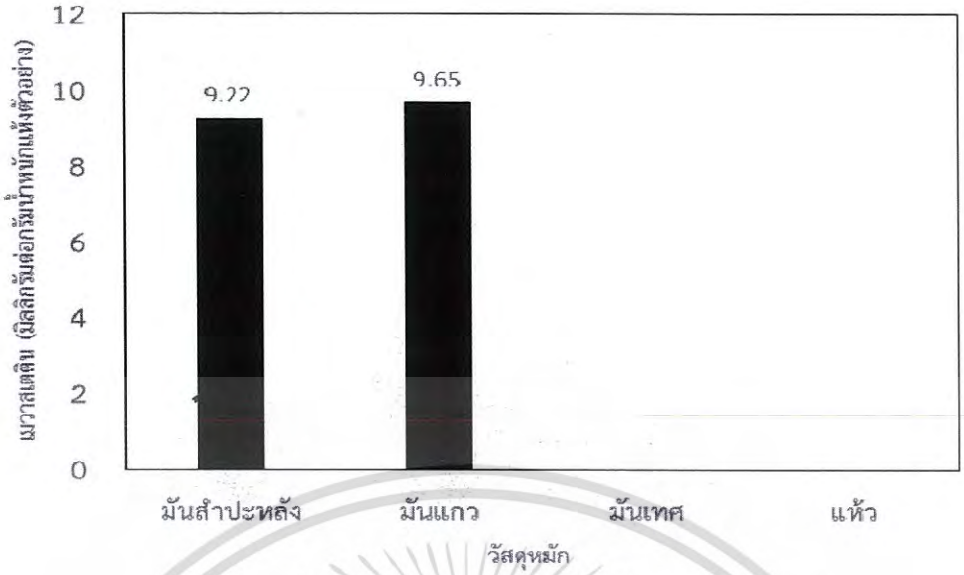
การเลี้ยงเชื้อราบนวัสดุหมักมันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว ในสภาวะนิ่ง (เขย่าทุกๆ 24 ชั่วโมง) วัสดุหมัก 50 กรัม ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถตรวจพบเมวาสเตตินในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ซึ่งสัปดาห์ที่ 5 พบการผลิตเมวาสเตตินสูงที่สุด (รูปที่ 4.1) แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นการผลิตเมวาสเตตินลดลง อาจเนื่องมาจากเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการตายหรือสารอาหารในการเจริญลดลง (Harsha, 2013) จากงานวิจัยของสมชาย และนิสา (2554) พบการผลิตสารลดคอเลสเตอรอลในกลุ่มสเตตินสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 โดยเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ได้แก่ ข้าวเสาไห้



รูปที่ 4.1 ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp SS14 เพื่อผลิตเมวาสเตตินบนวัสดุหมัก (●) มันสำปะหลัง (■) มันแกว (▲) มันเทศ และ (◆) แห้ว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเมวาสเตตินในสภาวะนิ่งผลการทดลอง (รูปที่ 4.2) พบว่า การเจริญบนวัสดุหมักมันแกวให้ปริมาณเมวาสเตตินเท่ากับ 9.65 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ในสัปดาห์ที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ขณะที่วัสดุหมักมันสำปะหลังให้ผลผลิตเท่ากับ 9.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ส่วนวัสดุหมักมันเทศ และแห้ว ไม่พบการผลิตเมวาสเตติน การเลี้ยงในสภาวะนิ่งในช่วงแรกของการเลี้ยงเชื้อ มันสำปะหลัง และมันแกว ก้อนวัสดุหมักกระจายตัวได้ เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 3 เชื้อรามีกระบวนการเมแทบอลิซึมเพิ่มขึ้น ทำให้ความชื้นในขวดเพิ่ม รวมทั้งวัสดุหมักค่อนข้างสด และมีการเขย่าผสมผสานค่อนข้างน้อย วัสดุหมักที่อยู่ด้านล่างก้นขวดเริ่มเกาะตัวเป็นก้อน และมีน้ำสะสมที่ก้นขวด วัสดุหมักจึงจับตัวเป็นก้อนขนาดใหญ่ (รูปที่ 4.3) ส่งผลต่อการถ่ายเทอากาศขณะทำการเลี้ยงเชื้อ อาจเป็นผลมาจากวัสดุหมักมีปริมาณความชื้นค่อนข้างสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ในสภาวะนิ่ง

รูปที่ 4.3 ลักษณะการจับตัวเป็นก้อนของวัสดุหมัก ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ในสภาวะนิ่งที่ไม่ผสมแกลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมักเพื่อผลิตเมวาสเตตินในสภาวะนิ่ง

อิทธิพลของความชื้นเริ่มต้นในวัสดุหมักสด อาจส่งผลต่อการเจริญและการผลิตเมวาสเตติน เนื่องจากวัสดุหมักสดมีความชื้นเริ่มต้นสูง เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงนำแกลบมาเติมลงในวัสดุหมักเพื่อลดความชื้นในวัสดุหมัก โดยใช้แกลบน้ำหนักต่างๆ ได้แก่ 0.5 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่า วัสดุหมักที่เติมแกลบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความชื้นไม่แตกต่างจากวัสดุหมักสด แต่เมื่อเพิ่มปริมาณแกลบเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ความชื้นลดลง แต่แกลบเกาะกับวัสดุหมักจนทั่วผิวหน้าวัสดุหมัก ทำให้เชื้อเจริญเข้าไปภายในวัสดุหมักไม่ดีนัก ขณะที่การใช้วัสดุหมักผสมแกลบ 1 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.4) ทำให้ความชื้นเริ่มต้นของวัสดุหมักลดลง และเป็นตัวผยุงไม่ให้วัสดุหมักเกาะตัวกันเป็นก้อน ซึ่งส่งผลเสียต่อการผสมผสาน และการเจริญของเชื้อรา

รูปที่ 4.4 ลักษณะของวัสดุหมัก ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ในสภาวะนิ่งที่ผสมแกลบ

การผสมแกลบ 1 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในวัสดุหมัก พบว่าการเจริญบนวัสดุหมักมันแกว และมันแกวผสมแกลบ ให้การผลิตเมวาสเตตินมีปริมาณใกล้เคียงกัน อาจเป็นเพราะวัสดุหมักมันแกวมีปริมาณความชื้นสูง ดังตารางที่ 4.1 เห็นได้จากความชื้นเริ่มต้นของมันแกวที่ไม่ผสมแกลบมีค่า 86.04 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อผสมแกลบลงไปมีค่า 80.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากงานวิจัย Ganrong (2005) ทำการผลิตสารลดคอเลสเตอรอล ด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. 9901 บนอาหารแข็ง พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารอยู่ในช่วง 60-70 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งพบปริมาณน้ำสะสมอยู่ที่ด้านล่างของขวดเลี้ยงเชื้อ ขณะที่การเจริญบนมันสำปะหลังให้การผลิตเมวาสเตตินเท่ากับ 9.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง แต่เมื่อผสมแกลบพบการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมวาสเตตินเพิ่มขึ้นเท่ากับ 11.57 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งให้การผลิตเพิ่มขึ้น 25.48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับไม่ผสมแกลบ อาจเป็นผลเนื่องจากแกลบสามารถดูดซับน้ำ ทำให้ความชื้นเริ่มต้นจากไม่ผสมแกลบ (82.01 เปอร์เซ็นต์) ลดลงเป็น 79.88 เปอร์เซ็นต์ (ตามลำดับ) และความชื้นสุดท้ายของการเลี้ยงที่สามารถผลิตเมวาสเตตินได้สูงสุด ในสัปดาห์ที่ 5 คือ 60.45 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Harsha (2013) ได้ทดลองผลิตเมวาสเตตินโดยใช้กากงาที่เหลือจากการสกัดน้ำมันงามาใช้เป็นอาหารแข็ง พบว่าการผลิตเมวาสเตตินสูงสุดคือ 0.0294 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.1 ผลการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์

วัสดุหมัก	สภาวะนิ่ง			
	ไม่ผสมแกลบ		ผสมแกลบ	
	เมวาสเตติน	ความชื้นเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	เมวาสเตติน	ความชื้นเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)
มันสำปะหลัง	9.22 ± 0.77^{b}	82.01	11.57 ± 1.08^{a}	79.88
มันแกว	9.65 ± 0.32^{b}	86.04	9.21 ± 0.66^{b}	80.06
มันเทศ	N/A	85.59	N/A	79.98
แห้ว	N/A	75.86	N/A	68.02

หมายเหตุ N/A หมายถึง ตรวจไม่พบเมวาสเตติน

^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่งที่ไม่ผสมแกลบ มันแกวให้การผลิตเมวาสเตตินสูงกว่ามันสำปะหลัง หลังจากที่มีการเติมแกลบมันสำปะหลังผลิตได้สูงกว่ามันแกว แสดงว่าปริมาณน้ำในมันสำปะหลังมีน้อยกว่ามันแกว ดังนั้นการผสมแกลบ 1.0 เปอร์เซ็นต์ จึงเพียงพอต่อการดูดซับน้ำในมันสำปะหลัง ทำให้ความชื้นอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ส่งผลให้การผลิตเมวาสเตตินเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการเลี้ยงแบบสภาวะนิ่ง วัสดุหมักส่วนใหญ่จับตัวเป็นก้อนถึงแม้จะผสมแกลบ เนื่องจากอากาศถ่ายเทไม่ทั่วถึง และมีน้ำที่ก้นขวด จึงต้องทำให้น้ำระเหยตลอดเวลาเพื่อเป็นการระบายความชื้นในขวดอันเกิดจากเชื้อมีการหายใจที่ทำให้ความชื้นเพิ่มขึ้น ในการทดลองขั้นต่อมาจึงต้องหาสภาวะการหมุนขวดที่เหมาะสม

4.2.3 การเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมักในสภาวะหมุนสลับนิ่ง

การผสมผสานทำให้การแลกเปลี่ยนออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ และการถ่ายเทความร้อน ซึ่งส่งผลดีต่อการเจริญ และการผลิตผลิตภัณฑ์ แต่อย่างไรก็ตามการผสมผสานอาจส่งผลให้เส้นใยเชื้อราฉีกขาดเนื่องจากแรงเฉือน ดังนั้นจึงเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งในสภาวะหยุดนิ่ง และการเลี้ยงเชื้อบนวัสดุหมักในสภาวะหมุนขวดที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างเมวาสเตติน การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งในสภาวะหมุนขวดสลับหยุดนิ่ง คือ หมุนตลอดเวลา การหมุนขวด 1 ชั่วโมง หยุดหมุน 3 ชั่วโมง (1 ต่อ 3) หมุนขวด 1 ชั่วโมง หยุดหมุน 6 ชั่วโมง (1 ต่อ 6) และ หมุนขวด 1 ชั่วโมง หยุดหมุน 12 ชั่วโมง (1 ต่อ 12) โดยใช้วัสดุหมักต่างๆ ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และ แห้ว โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ แสดงผลการทดลองในตารางที่ 4.2 การเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนสลับนิ่ง พบว่าการเจริญของ *Monascus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

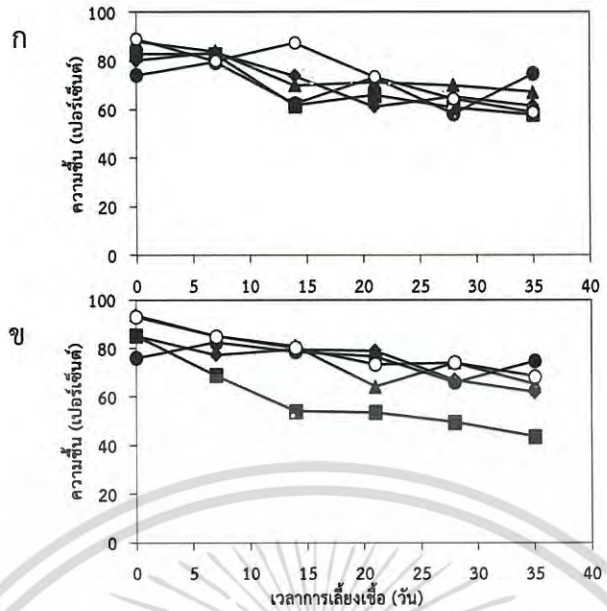
sp. SS14 ที่สภาวะการหมุนสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 3 ให้การผลิตเมวาสเตตินได้ดีที่สุด ในสภาวะการหมุนต่างๆ มีการถ่ายเทอากาศทำให้ความชื้นที่อยู่ในวัสดุหมักระเหยออก ทำให้มันแกวที่ผสมแกลบให้การผลิตเมวาสเตตินที่ปริมาณ 20.66 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ซึ่งสามารถผลิตเมวาสเตตินเพิ่มขึ้นจากที่ไม่ผสมแกลบ 28.64 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่ในมันสำปะหลังตัววัสดุหมักมีความชื้นที่ต่ำกว่ามันแกว เมื่อมีการหมุนให้อากาศจึงทำให้ความชื้นระเหยออกความชื้นจึงลดลงต่ำมาก ความชื้นอาจไม่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตตินจึงทำให้มันแกวผลิตเมวาสเตตินได้สูงกว่า ส่วนวัสดุหมักมันเทศ และแห้ว นอกจากการถ่ายเทอากาศจะเป็นปัจจัยที่จำเป็นแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่สำคัญ เช่น ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และลักษณะของวัสดุหมัก

ตารางที่ 4.2 ผลการผลิตเมวาสเตตินที่สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่งที่สัดส่วน 1 ต่อ 3 1 ต่อ 6 และ 1 ต่อ 12 (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับสภาวะการหมุนตลอดเวลา

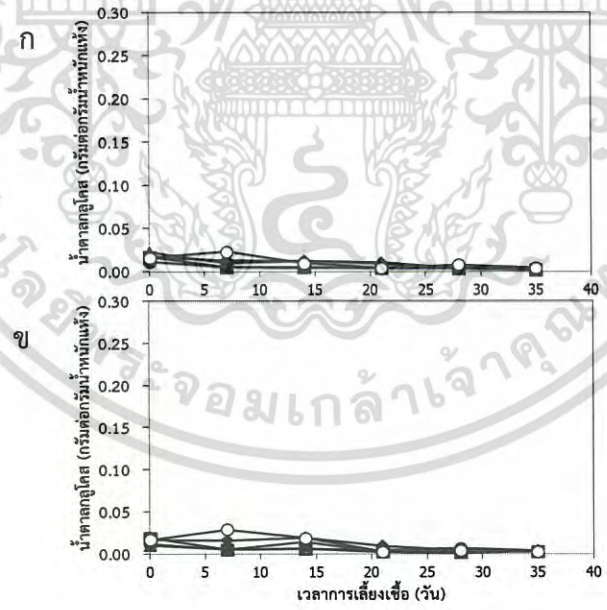
วัสดุหมัก	สภาวะการเลี้ยงเชื้อ (หมุนขวดสลับนิ่ง)							
	หมุนตลอดเวลา		1 ต่อ 3		1 ต่อ 6		1 ต่อ 12	
	ไม่ผสมแกลบ	ผสมแกลบ	ไม่ผสมแกลบ	ผสมแกลบ	ไม่ผสมแกลบ	ผสมแกลบ	ไม่ผสมแกลบ	ผสมแกลบ
สำปะหลัง	8.29±0.75^{l}	15.87±0.14^{c}	19.90±0.09^{b}	12.34±0.16^{gh}	14.57±0.19^{e}	15.30±0.22^{d}	10.45±0.27^{k}	12.23±0.14^{h}
มันแกว	8.32±0.10^{l}	11.09±0.09^{j}	16.06±0.01^{c}	20.66±0.14^{a}	11.65±0.16^{i}	12.99±0.29^{f}	10.10±0.08^{k}	12.77±0.06^{fg}
มันเทศ	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
แห้ว	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

หมายเหตุ 1 ต่อ 3 หมายถึง หมุนขวด 1 ชั่วโมง หยุดหมุน 3 ชั่วโมง
1 ต่อ 6 หมายถึง หมุนขวด 1 ชั่วโมง หยุดหมุน 6 ชั่วโมง
1 ต่อ 12 หมายถึง หมุนขวด 1 ชั่วโมง หยุดหมุน 12 ชั่วโมง
N/A หมายถึง ตรวจไม่พบเมวาสเตติน
^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

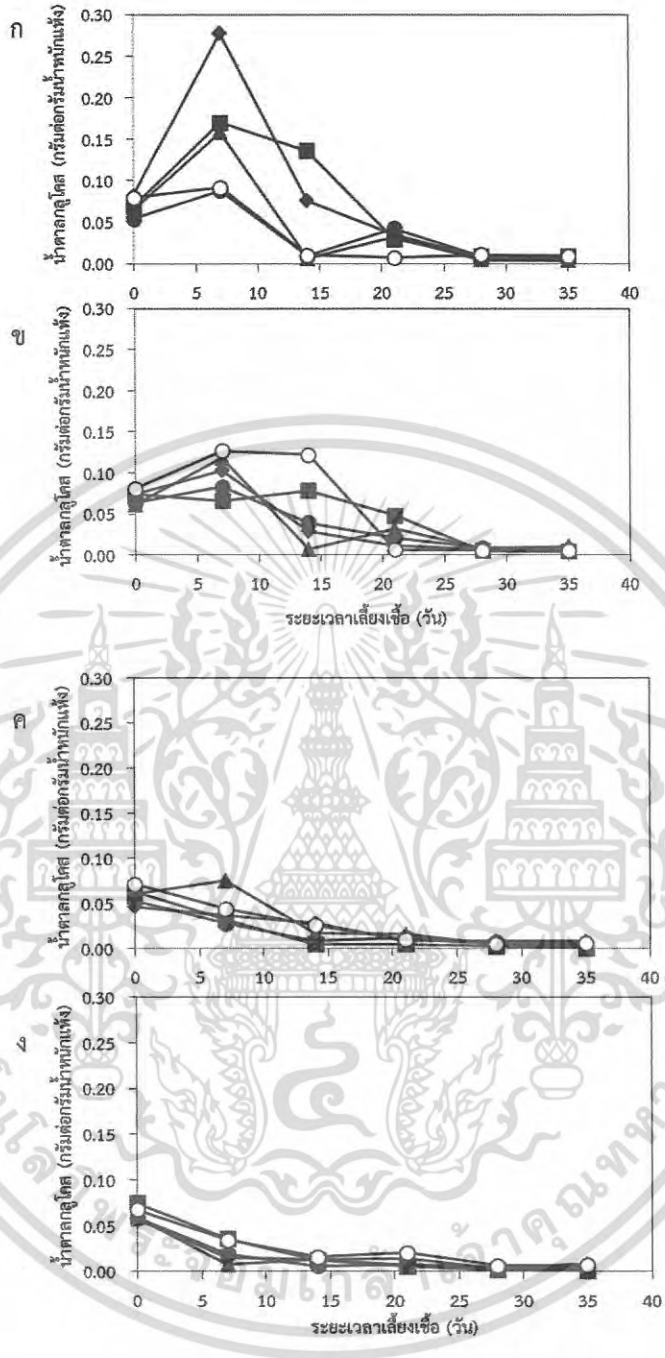


รูปที่ 4.5 ปริมาณความชื้นของการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมักมันแกว (ก) ไม่เติมแกลบ (ข) เติมแกลบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่สภาวะการเลี้ยงต่างๆ (●) สภาวะนิ่ง (■) หมุนตลอดเวลา (▲) หมุนขวดสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 3 (◆) หมุนขวดสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 6 (○) หมุนขวดสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 12



รูปที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมักมันแกว (ก) ไม่เติมแกลบ (ข) เติมแกลบ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่สภาวะการเลี้ยงต่างๆ (●) สภาวะนิ่ง (■) หมุนตลอดเวลา (▲) หมุนขวดสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 3 (◆) หมุนขวดสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 6 (○) หมุนขวดสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนวัสดุหมักมันเทศไม่เติมแกลบ (ก) มันเทศเติมแกลบ (ข) แห้วไม่เติมแกลบ (ค) และแห้วเติมแกลบ (ง) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่สภาวะการเลี้ยงต่างๆ (●) สภาวะนิ่ง (■) หมุนตลอดเวลา (▲) หมุนขวดสลับหยุดนิ่ง แบบ 1 ต่อ 3 (◆) หมุนขวดสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 6 (○) หมุนขวดสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.5 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ปริมาณความชื้น ของวัสดุหมักมันแกว พบว่า การเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวดสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 3 ซึ่งการผลิตเมวาสเตตินสูงที่สุด โดยความชื้นเริ่มต้นก่อนผสมแกลบมีค่า 93.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสมแกลบความชื้นลดลงเป็น 88.14 เปอร์เซ็นต์ การหมุนขวดสลับหยุดนิ่งเส้นใยมีการฉีกขาด โดยการหมุนขวด 1 ชั่วโมง หยุดหมุน 3 ชั่วโมง ความชื้นตลอดการเลี้ยงเชื้ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ในขณะที่การหมุนเลี้ยงเชื้อตลอดเวลา มีความชื้นที่ค่อนข้างต่ำ อันเนื่องมาจากการหมุนตลอดเวลาทำให้อากาศกระจายตัวได้อย่างทั่วถึงจึงทำให้น้ำที่อยู่ในวัสดุหมักระเหยจึงมีความชื้นที่ค่อนข้างต่ำตลอดการเลี้ยงเชื้อ และเส้นใยมีการฉีกขาดอยู่ตลอดเวลา จึงทำให้ปลายเส้นใยอยู่ในช่วง apical growth เป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการเจริญอาจนำความชื้นที่สะสมในวัสดุหมักมาใช้ในการเจริญมากกว่าที่จะผลิตเมวาสเตติน ในขณะที่การหมุนขวดสลับหยุดนิ่งแบบ 1 ต่อ 12 และแบบวางนิ่งมีความชื้นที่ค่อนข้างสูงตลอดการเลี้ยงเชื้อ อันเนื่องมาจากการสะสมของน้ำที่อยู่ในวัสดุหมักและการเจริญของเชื้อที่มีเมแทบอลิซึมการหายใจมากกว่าการหมุนขวดสลับนิ่งแบบชนิดอื่น สังเกตุได้จากความชื้นที่ค่อนข้างสูงกว่าการหมุนแบบอื่น ซึ่งการหมุนที่น้อยเกินไปทำให้อากาศเข้าไปได้น้อย และการผสมแกลบแสดงให้เห็นว่าแกลบสามารถดูดซับความชื้นให้ลดลง และการเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนขวดสลับนิ่ง มีส่วนส่งเสริมให้เกิดการผสมผสาน และกระจายความชื้นของวัสดุหมักอย่างทั่วถึง อย่างไรก็ตาม ความชื้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิต และอีกหนึ่งปัจจัยคือระดับน้ำตาลรีดิวซ์ และลักษณะของการเกาะตัวเป็นก้อนของวัสดุหมัก มีความสำคัญต่อการผลิตเมวาสเตตินด้วย การเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในระดับต่ำ ส่งผลดีต่อการผลิตเมวาสเตตินมันแกวเป็นวัสดุหมักที่ระดับน้ำตาลเหมาะสมต่อการเจริญ (รูปที่ 4.6) มันเทศและแห้ว ไม่สามารถตรวจพบเมวาสเตตินได้ เนื่องมาจากระดับน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในระดับสูง (รูปที่ 4.7) อาจเกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อในการสร้างสาร ซึ่งวัสดุหมักแต่ละชนิดมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน มันเทศ และแห้ว จะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลสูงกว่า มันแกว และมันสำปะหลัง จึงอาจมีผลต่อการผลิตเมวาสเตติน

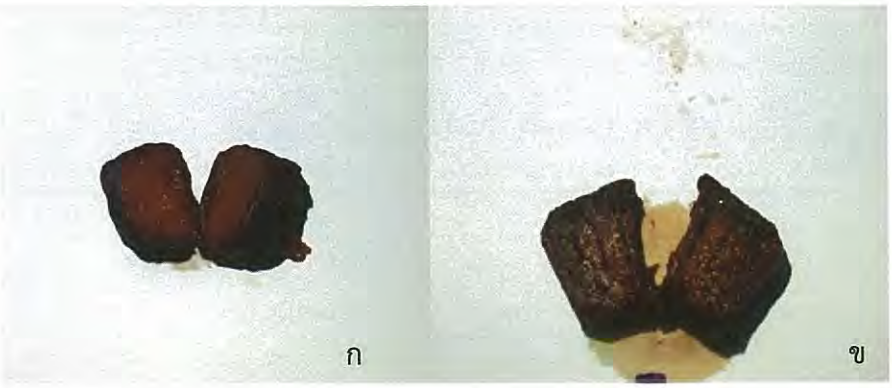
อย่างไรก็ตามการเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนสลับนิ่งทำให้เกิดการผสมผสานดีขึ้น เป็นการระบายความร้อนและรักษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับออกซิเจน (Chiu และ Chan, 1992) อีกทั้งการผสมแกลบสามารถลดการจับตัวเป็นก้อนของวัสดุหมัก (รูปที่ 4.8) โดยพบว่าเส้นใยเชื้อราสามารถเจริญเข้าไปภายในเนื้อวัสดุหมักเมื่อเวลาการเลี้ยงเชื้อนานขึ้น (รูปที่ 4.9) ทำให้การใช้ซับสเตรทดีขึ้นจึงส่งผลดีต่อการผลิตเมวาสเตติน โดยสัปดาห์ที่ 1 และ 2 เชื้อยังไม่สามารถเจริญเข้าไปถึงด้านในของวัสดุหมัก ในสัปดาห์ที่ 3 4 และ 5 เชื้อเจริญได้ทั่ววัสดุหมัก สำหรับวัสดุหมักมันเทศ และแห้ว ค่อนข้างจับตัวเป็นก้อนจึงทำให้เชื้อเจริญเข้าไม่ถึงด้านใน (รูปที่ 4.10) จึงเห็นด้านในของวัสดุหมักค่อนข้างเป็นสีขาว ดังนั้นลักษณะการเจริญของเชื้อราก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการละลายและการส่งผ่านออกซิเจนไปสู่ตัวเซลล์ (Hajjaj และคณะ, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.8 การกระจายตัวของวัสดุหมักมันแกวที่เติมแกลบ โดยสภาวะหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5 สัปดาห์

รูปที่ 4.9 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp SS14 เข้าไปในเนื้อของวัสดุหมักอย่างทั่วถึง ของวัสดุหมักมันแกวที่เติมแกลบ โดยสภาวะหมุนขวดสลับนิ่ง 1/3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp SS14 เข้าไปในเนื้อของวัสดุหมักมันเทศ (ก) และแห้ว (ข) ที่เติมแกลบ โดยสภาวะหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5 สัปดาห์

4.2.4 การเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. SS14 ในอาหารเหลว

วัสดุหมักมีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ Monascus sp. S14 แบบ SSF ดังนั้นการเตรียมวัสดุหมักให้อยู่ในสภาพอาหารเหลว จึงสามารถเปรียบเทียบความแตกต่างในการเจริญ และการผลิตเมวาสเตติน ของเชื้อราแบบ SSF และแบบ SmF การเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. SS14 ในอาหารเหลว 3 ชนิด ที่มีจากพื้นฐานของ

ก. SS medium ซึ่งประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 3 กรัม และแป้งถั่วเหลือง 4 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (สมชาย, 2536) โดยใช้วัสดุหมัก 4 ชนิด เตรียมเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แทนการใช้แป้งมันสำปะหลัง

ข. MYS broth ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 1 กรัม Peptone 0.5 กรัม Yeast extract 0.3 กรัม และ Malt extract 0.3 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยใช้วัสดุหมัก 4 ชนิด เตรียมเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร แทนการใช้แป้งมันสำปะหลัง

ค. อาหารเหลววัสดุหมัก 4 ชนิด เตรียมเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำมา 3 กรัม ไปผสมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำอาหารเหลวแต่ละชนิดปริมาตร 80 มิลลิลิตร มาบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงใส่เชื้อเริ่มต้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่า วัสดุหมักมันสำปะหลัง 3 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตเมวาสเตตินเท่ากับ 11.86 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ มันแกว 3 เปอร์เซ็นต์ (9.12 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.3 อาหารสูตร SS และ MYS ประกอบไปด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นแก่การเจริญของเชื้อ โดยเชื้อจะใช้เพื่อการเจริญเติบโตเป็นส่วนใหญ่ จึงทำให้อยู่ในช่วงที่มีการสร้างสารทุติยภูมิได้น้อย ส่งผลต่อการผลิตเมวาสเตติน

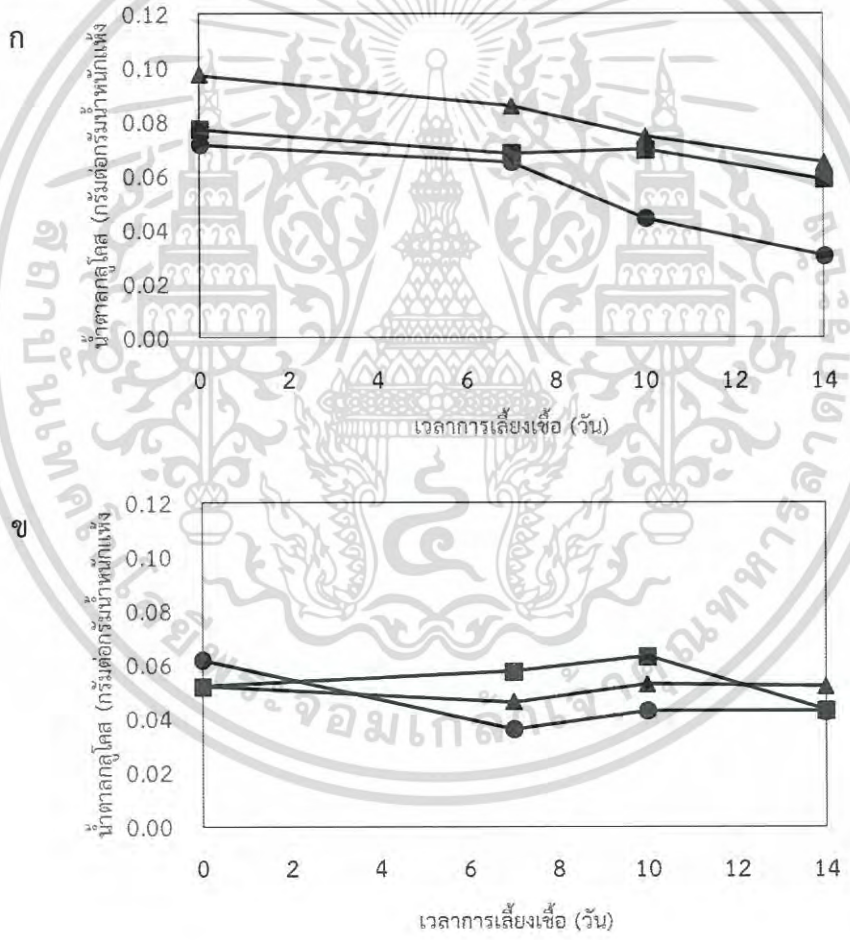
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 จากการเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. SS14 เพื่อผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ใช้วัสดุหมักแทนแป้งในอาหารเหลวสูตรต่างๆ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

วัสดุหมัก	สูตรอาหาร		
	3 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่น	3 เปอร์เซ็นต์ ใน SS	1 เปอร์เซ็นต์ ใน MYS
มันสำปะหลัง	11.86±0.06[a]	7.03±0.78[c]	7.44±0.27[c]
มันแกว	9.12±0.64[b]	5.86±0.22[d]	7.69±0.31[c]
มันเทศ	N/A	N/A	N/A
แห้ว	N/A	N/A	N/A

หมายเหตุ N/A หมายถึง ตรวจไม่พบเมวาสเตติน

[abc] ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



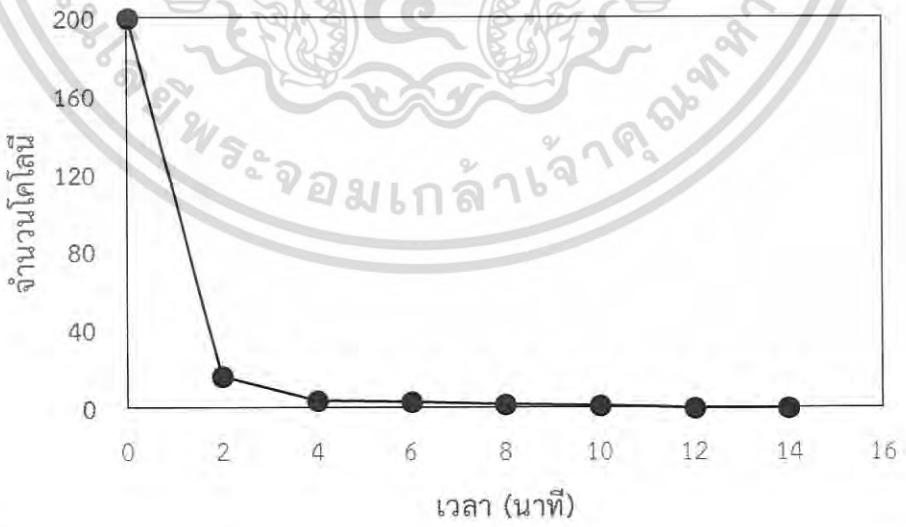
รูปที่ 4.11 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสของการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ในอาหารเหลวโดยใช้วัสดุหมักมันเทศ (ก) และแห้ว (ข) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (●) วัสดุหมัก 3 เปอร์เซ็นต์ (■) SS (▲) MYS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ใช้ มันเทศ และแห้ว แทนแป้งในสูตรอาหารต่างๆเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ซึ่งไม่สามารถตวรจพบเมวาสเตติน จากรูปที่ 4.11 แสดงปริมาณระดับน้ำตาลที่มีปริมาณค่อนข้างสูงซึ่งอาจเป็นผลไปยับยั้งการสร้างสารเมวาสเตตินของเชื้อราได้ (Vining และ Chatterjee, 1982)

4.3 ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* sp. SS14

ศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์ SS14 โดยนำเชื้อรา *Monascus* sp. จาก MYS Slant มาทำสปอร์แขวนลอยโดยใช้ Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีจำนวนสปอร์อยู่ที่ 2.25×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร และทดสอบความทนต่อแสง UV โดยวางห่างจากหลอด UV 50 เซนติเมตร จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 2 นาที จากนาทีที่ 0-14 นาที ผลของรังสีต่อดีเอ็นเอ คือ ทำให้เกิดพันธะเคมีที่ผิดปกติระหว่างเบส purine ที่อยู่ข้างเดียวกันในสายดีเอ็นเอ หรือระหว่างเบส purine ตรงข้ามกันของสายดีเอ็นเอ ผลส่วนมากเกิดขึ้นกับ thymine บนสายเดียวกันหรือตรงกันข้ามกันของดีเอ็นเอ อาจเกิดเป็น thymine dimer เป็นต้น การเกิดพันธะที่ผิดปกติเช่นนี้มีผลกระทบต่อการจับคู่ปกติของ thymine กับเบส adenine ในสายดีเอ็นเอตรงข้าม สายดีเอ็นเออาจเกิดเป็น loop และทำให้พันธะคู่เบส T=A ในสายตรงข้ามอ่อนตัวลง (วราวุฒิ, 2541) จากผลการทดลองพบว่าที่ 0 นาที พบการเจริญของเชื้อ 200 โคโลนี ที่ 2 นาทีพบการเจริญของเชื้อจำนวน 16 โคโลนี นาทีที่ 4 พบการเจริญของเชื้อจำนวน 4 โคโลนี นาทีที่ 6 พบการเจริญของเชื้อจำนวน 3 โคโลนี นาทีที่ 8 พบการเจริญของเชื้อจำนวน 2 โคโลนี นาทีที่ 10 พบการเจริญของเชื้อจำนวน 1 โคโลนี และที่ 12,14 นาที ไม่พบการเจริญของเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 แล้วนำเชื้อทั้งหมด (นาทีที่ 2 ถึง นาทีที่ 10) ที่คัดเลือกได้ 35 สายพันธุ์ เลี้ยงบนอาหาร MYS พีเอช 3 จากงานวิจัยของ Mahesh (2012) พบว่าการผลิตเมวาสเตตินได้ดีจะอยู่ในช่วงพีเอชค่อนข้างเป็นกรด จึงนำมาคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการเจริญในสภาวะที่เป็นกรดได้

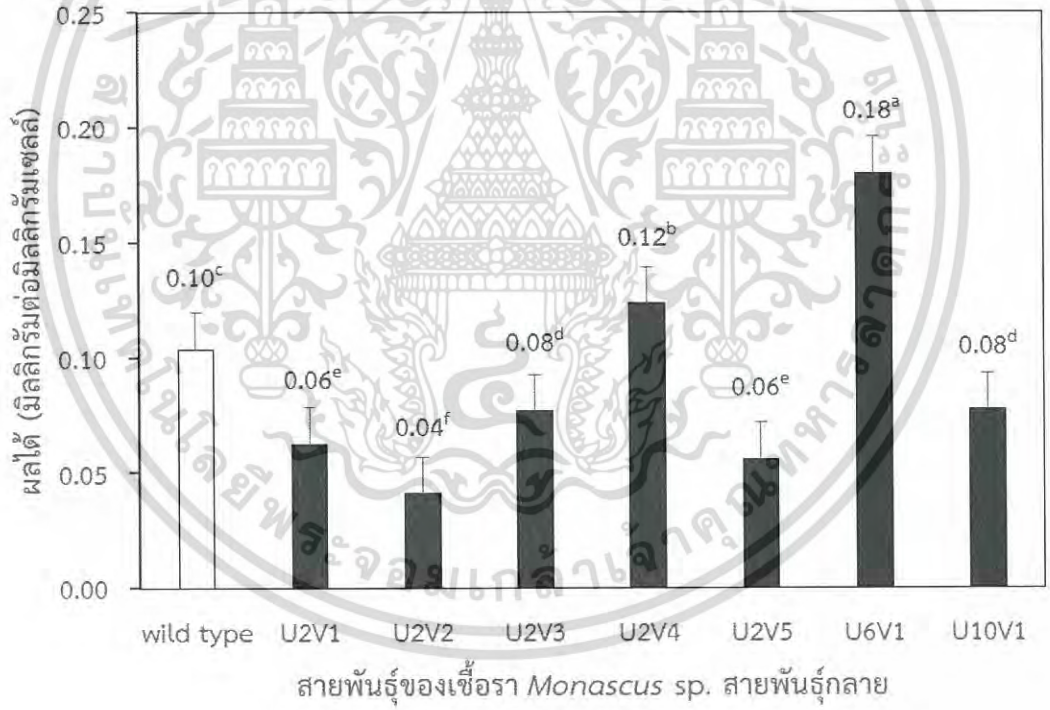


รูปที่ 4.12 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp. ที่ผ่านรังสี UV ที่เวลา 0-14 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1 การคัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์กลาย บนอาหาร MYS พีเอช 3

จากผลการทดลองเมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์กลาย 35 สายพันธุ์ มาคัดเลือกบนอาหาร MYS พีเอช 3 แล้วนำไปสกัดเพื่อหาสายพันธุ์ที่ทนกรดและสร้างเมวาสเตติน พบว่ามี 7 สายพันธุ์ คือ U2V1 U2V2 U2V3 U2V4 U2V5 U6V1 และ U10V1 เมื่อนำมาสกัดโดยนำชิ้นวุ้นและเส้นใยจากอาหาร MYS Agar มาเติมเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปสกัดในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสผสมกับอะซิโตไนไตรท์ที่อัตราส่วน ส่วนใส : อะซิโตไนไตรท์ (45 : 55) วิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าปริมาณสารเมวาสเตตินที่ได้จากการเลี้ยงเป็นเวลา 7-10 วัน ในชิ้นวุ้นของเชื้อรากลายพันธุ์มีค่าเท่ากับ 1.21 1.38 1.18 1.21 1.44 1.24 1.64 และ 1.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำมาคำนวณเพื่อให้ได้ปริมาณสารเมวาสเตตินในหน่วยไมโครกรัม และนำไปคำนวณผลผลิตที่ได้ (Yield) โดยเทียบต่อปริมาณสารเมวาสเตตินต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการทดลองพบว่า สายพันธุ์กลาย U6V1 มีผลผลิตได้สูงสุด คือ มีค่าเท่ากับ 0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ รองลงมาเป็นสายพันธุ์ U2V4 มีค่าเท่ากับ 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4.13 ซึ่งผลการผลิตเมวาสเตตินของสายพันธุ์กลาย U6V1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับทุกสายพันธุ์



รูปที่ 4.13 ผลผลิตที่ได้ ($Y_{p/x}$) จากเชื้อรากลายพันธุ์ และ *Monascus* sp. S14 โดยเปรียบเทียบจากปริมาณเมวาสเตตินต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)

4.3.2 การคัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์กลาย บนวัสดุหมัก

เมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 7 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง ได้แก่ มันสำปะหลัง และมันแกว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 สัปดาห์ ที่การหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 และผสมแกลบ 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์เมวาสเตตินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (HPLC) พบค่า retention time ของเมวาสเตตินมาตรฐาน (standard mevastation, sigma, USA) ที่เวลา 14.347 นาที พบว่าสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารเมวาสเตติน ได้แก่ เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย U6V1 และ U2V4 ซึ่ง สายพันธุ์กลาย U6V1 ผลิตได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 23.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (20.96 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) คิดเป็น 9.71 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับ เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย U2V4 ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) บนอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์ที่สภาวะการหมุน 1 ชั่วโมงหยุดหมุน 3 ชั่วโมง

สายพันธุ์	มันสำปะหลัง		มันแกว	
	หมุน	นิ่ง	หมุน	หมุน
Wild type	20.96±0.26^{b}	19.11±0.14^{e}	19.21±0.10^{e}	19.17±0.08^{e}
U6V1	23.22±0.09^{a}	20.12±0.07^{c}	20.18±0.02^{c}	19.57±0.17^{d}
U2V4	15.62±0.30^{g}	14.32±0.15^{h}	16.11±0.05^{f}	16.42±0.21^{f}
U2V1	N/A	N/A	N/A	N/A
U2V2	N/A	N/A	N/A	N/A
U2V3	N/A	N/A	N/A	N/A
U2V5	N/A	N/A	N/A	N/A
U10V1	N/A	N/A	N/A	N/A

หมายเหตุ N/A หมายถึง ตรวจไม่พบเมวาสเตติน

^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.4 ลักษณะโคโลนีของ เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์กลาย เมื่อเจริญบนอาหารวุ้น

เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร MYS agar เพื่อวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ดังตารางที่ 4.5 พบว่า สายพันธุ์ดั้งเดิม U2V1 U2V2 U2V3 U2V4 U2V5 U6V1 และ U10V1 มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 4.8 3.8 4.1 3.7 4.5 2.8 4.7 และ 3.3 เซนติเมตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ดั้งเดิม U2V4 และ U6V1 มีขนาดค่อนข้างใหญ่แสดงให้เห็นว่าสามารถเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น เมื่อนำมาทดสอบความคงที่การเจริญบนผิวหน้าอาหารของสายพันธุ์กลาย โดยสังเกตจากการถ่ายเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆ เป็นจำนวน 3-4 ซ้ำ พบว่า การเจริญเป็นลักษณะเดียวกันและขนาดเท่ากัน

เมื่อนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์กลายมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังรูปที่ 4.14 จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน สายพันธุ์ดั้งเดิมเส้นใยค่อนข้างฟูจากกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และแพร่ออกรอบข้าง เส้นใยมีลักษณะฟูสม่ำเสมอ ตรงกลางโคโลนีจะมีสีเข้มเนื่องจากเส้ยใยเริ่มแก่ ส่วนปลายเส้นใยจะมีสีอ่อนค่อนไปทางสีขาว เพราะเส้นใยมีอายุน้อย เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

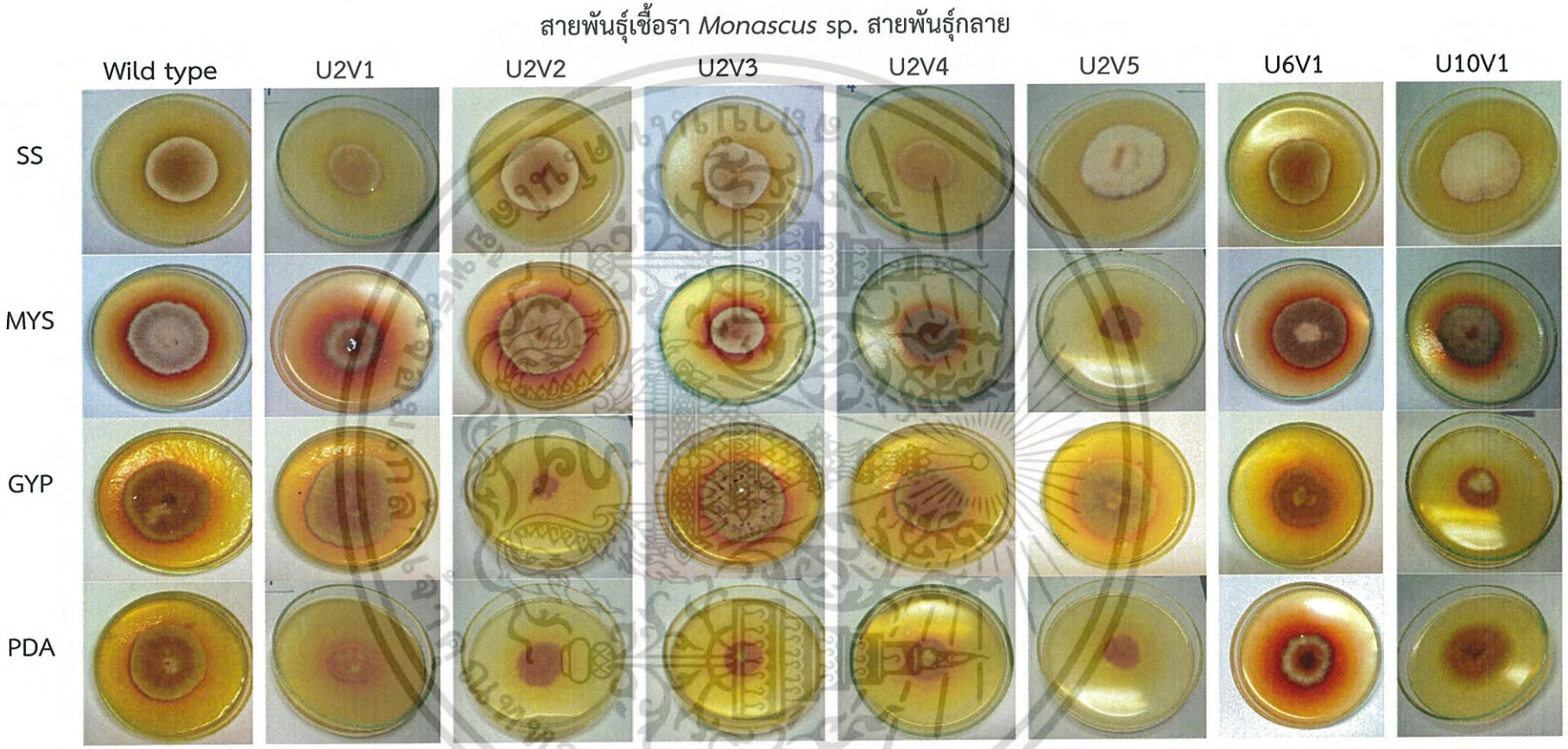
สายพันธุ์กลาย U2V4 และ U6V1 เส้นใยมีลักษณะที่คล้ายกัน คือ เส้นใยฟูราบเรียบไปกับผิวหน้าอาหาร ซึ่งสายพันธุ์กลาย U2V1 U2V2 U2V3 U2V5 และ U10V1 เจริญค่อนข้างช้า บางสายพันธุ์เส้นใยฟูมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

เมื่อนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่าดังรูปที่ 4.15 cleistothecia มีลักษณะค่อนข้างกลม ปลายเส้นใยของแต่ละสายพันธุ์มีความยาวแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ดั้งเดิมและ U6V1 มีความยาวจากปลายเส้นใยจนถึงผนังกั้นเส้นใยมีขนาดใกล้เคียงกัน อาจเกิดเนื่องจากขณะมีการหมุนเส้นใยเกิดการฉีกขาด และการงอกของเส้นใยเกิดขึ้นพร้อมๆกัน ทำให้มีความสามารถในการแทงเข้าไปในวัสดุหมักได้ค่อนข้างดี และตลอดเวลา

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา Monascus sp. SS14 และสายพันธุ์กลาย ที่ได้บนอาหาร MYS agar ที่เวลา 7 วัน โดยวัดความกว้างของโคโลนีในหน่วยของเซนติเมตร

สายพันธุ์	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่เวลา 7 วัน			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
Wild type	4.8	4.8	4.9	4.8
U6V1	3.7	3.9	3.9	3.8
U2V4	4.0	4.1	4.3	4.1
U2V1	3.8	3.7	3.7	3.7
U2V2	4.3	4.6	4.5	4.5
U2V3	2.7	2.8	2.9	2.8
U2V5	4.7	4.7	4.8	4.7
U10V1	3.2	3.3	3.2	3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 การศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์กลาย ทั้ง 8 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

รูปที่ 4.15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตตินจากเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์กลาย เมื่อเลี้ยงบนวัสดุหมัก

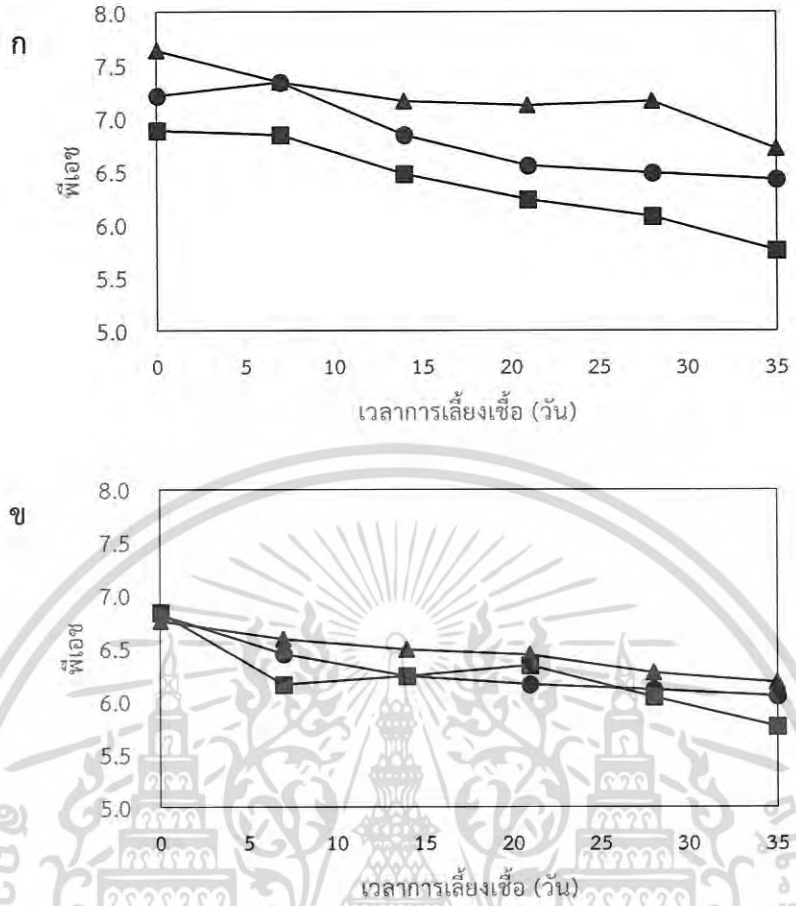
จากการทดลองนำเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และ สายพันธุ์กลาย U2V4 และ U6V1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งมันสำปะหลัง และมันแกว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่สภาวะการหมุนขวดสลับหยุดนิ่ง 1 ต่อ 3 และที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆ (แช่วัสดุหมักในอะซิเตรทบัฟเฟอร์ ได้แก่ พีเอชเริ่มต้น 3.0 4.5 และ 6.0) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่นพีเอชเริ่มต้น 7) ผลการทดลองพบว่า สายพันธุ์กลาย U6V1 ให้การผลิตเมวาสเตตินสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวัสดุหมักมันสำปะหลัง และมันแกว ในสภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 ที่มีการเติมแกลบ การผลิตเมวาสเตตินบนวัสดุหมักมันแกว (23.80 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.6) กับวัสดุหมักมันสำปะหลัง (22.06 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 วัสดุมีความเหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตตินใกล้เคียงกัน นอกจากปัจจัยการหมุนให้อากาศ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตสารเมวาสเตตินแล้ว ยังมีอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมวาสเตติน คือ พีเอช จากรูปที่ 4.16 เห็นได้ว่า พีเอชของการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่นพีเอชเริ่มต้น 7) อยู่ระหว่าง 5.5-8.0 จากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัย Harsha และคณะ (2013) ซึ่งผลิตเมวาสเตตินบนอาหารแข็ง ได้แก่ เนื้อเค้ก โดยกำหนดพีเอชต่างกัน คือ 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ผลการทดลองพบว่า พีเอช 6.0 ให้การผลิตเมวาสเตตินสูงที่สุดคือ 0.0293 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่จากงานวิจัยของ Mahesh และคณะ (2011) พบว่าพีเอชมีผลต่อการขนส่งสารทุติยภูมิที่ผนังเซลล์ จึงทดลองผลิตเมวาสเตติน โดย *Penicillium citrinu* NCIM 768 ที่พีเอช 4.0 สามารถผลิตได้ 68.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นการกำหนดพีเอชเริ่มต้นในสภาวะการเลี้ยงเชื้อจึงเป็นสิ่งสำคัญอีกหนึ่งปัจจัย

ตารางที่ 4.6 การผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)

วัสดุหมัก	สายพันธุ์	เติมแกลบ		ไม่เติมแกลบ	
		หมุน	นิ่ง	หมุน	นิ่ง
มันสำปะหลัง	Wild type	12.79 ± 0.04^{i}	15.85 ± 0.02^{f}	12.72 ± 0.02^{i}	15.82 ± 0.03^{f}
	U6V1	22.07 ± 0.05^{b}	12.99 ± 0.18^{i}	20.83 ± 0.09^{c}	12.89 ± 0.37^{ij}
	U2V4	14.85 ± 0.34^{g}	13.89 ± 0.33^{h}	12.01 ± 0.05^{j}	11.00 ± 0.13^{l}
มันแกว	Wild type	12.97 ± 0.07^{h}	9.19 ± 0.11^{m}	12.97 ± 0.14^{i}	9.29 ± 0.16^{m}
	U6V1	23.80 ± 0.07^{a}	20.11 ± 0.16^{d}	20.78 ± 0.07^{c}	19.01 ± 0.12^{e}
	U2V4	12.83 ± 0.04^{i}	12.41 ± 0.99^{jk}	12.83 ± 0.13^{i}	12.31 ± 0.14^{j}

หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 ความแตกต่างพีเอชของวัสดุหมักมันสำปะหลัง (ก) และมันแกว (ข) ของชุดควบคุม ที่สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1/3 และเติมแกลบ โดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม (●) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์กลาย U2V4 (■) และ U6V1(▲)

ผลการทดลองของพีเอชเริ่มต้นต่างๆ (พีเอชเริ่มต้น 3.0 4.5 และ 6.0) ที่มีผลต่อการผลิตเมวาสเตติน ดังตารางที่ 4.7 พบว่าพีเอชเริ่มต้นของวัสดุหมัก ที่พีเอชเริ่มต้น 3 ให้การผลิตเมวาสเตตินสูงสุด โดยสายพันธุ์กลาย U6V1 บนวัสดุหมักมันสำปะหลัง ที่มีการเติมแกลบ ที่สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 คือสามารถผลิตเมวาสเตตินเท่ากับ 31.530 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถติ ($p \leq 0.05$) กับทุกสภาวะการเลี้ยงเชื้อ 2 สายพันธุ์ (เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ สายพันธุ์กลาย U2V4) พีเอชเริ่มต้น 4.5 ให้การผลิต เมวาสเตตินรองลงมา โดยเชื้อราสายพันธุ์กลาย U6V1 บนวัสดุหมักมันสำปะหลัง ที่ผสมแกลบ 1 เปอร์เซ็นต์ และการหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 คือสามารถผลิตเมวาสเตตินเท่ากับ 30.391 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับการผลิตเมวาสเตตินสูงสุด ส่วนใหญ่การเจริญของเชื้อราจะขึ้นอยู่กับพีเอช ซึ่งพีเอชที่เป็นกรดจะมีผลต่อการขนส่งสารระหว่างผนังเซลล์ จึงมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตสารทุติยภูมิ (Harsha และคณะ, 2013) พีเอชเริ่มต้นที่เป็นกรดจะสามารถผลิตเมวาสเตตินได้ค่อนข้างสูงกว่าพีเอชเริ่มต้นที่เป็นกลาง (แสดงดังรูปที่ 4.17)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

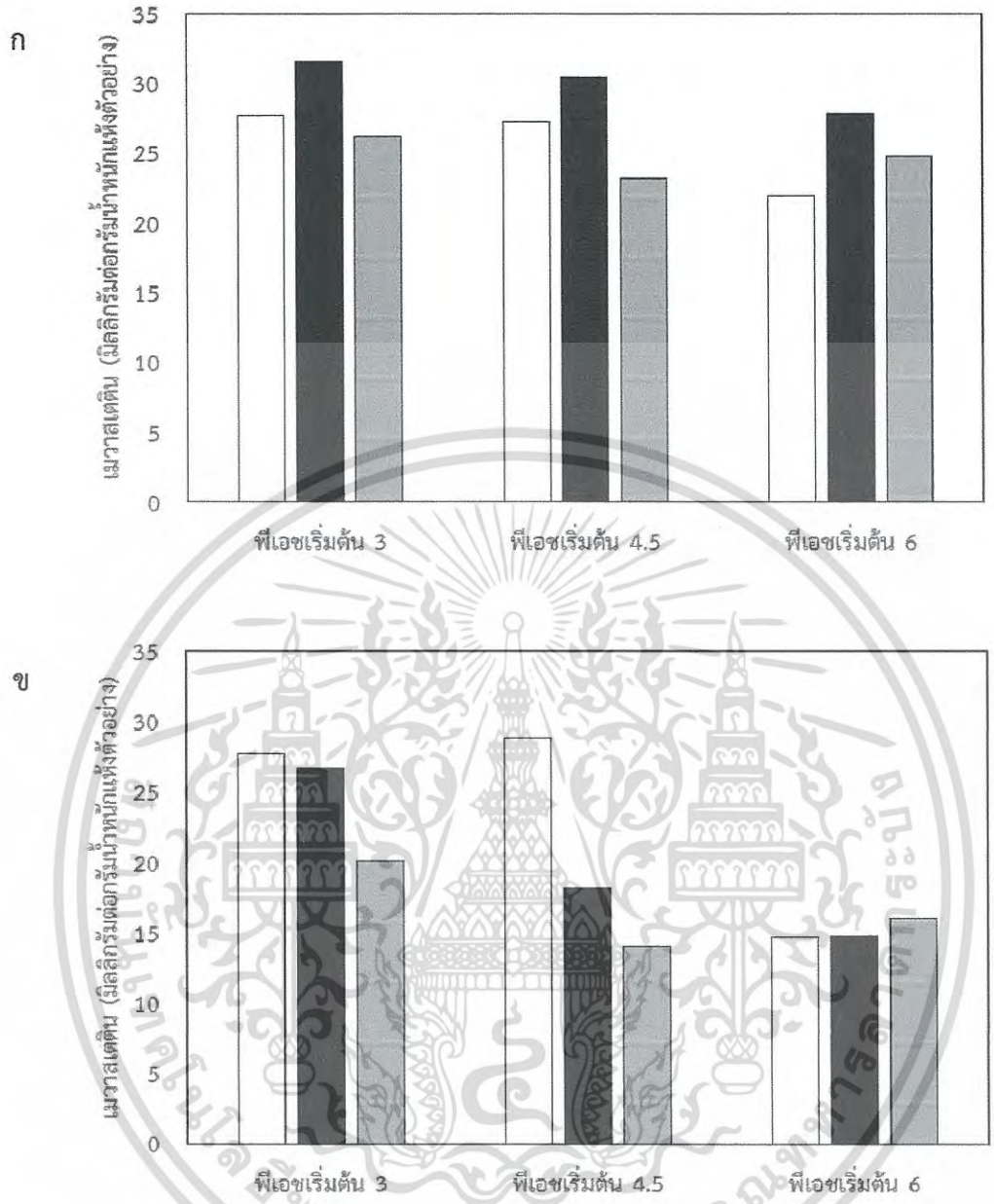
ที่สภาวะการเลี้ยงพีเอชเริ่มต้น 3 สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 ที่มีการเติมแกลบของทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการผลิตเมวาสเตตินได้ดีกว่า พีเอชเริ่มต้น 4.5 และ 6.0 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (รูปที่ 4.18) การควบคุมพีเอชเริ่มต้นเป็นผลดีต่อการผลิตเมวาสตตินเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.15 จะเห็นได้ว่าพีเอชเริ่มต้น 3.0 พีเอชค่อนข้างจะคงที่ตลอดการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mahesh และคณะ (2012) ได้กำหนดพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่ 2-6 บนอาหารแข็งข้าวสาลี โดยใช้เชื้อรา พบว่า ที่พีเอช 4.0 สามารถผลิตเมวาสเตินได้สูงสุข 81.7 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับพีเอชเริ่มต้น 4.5 และ 6.0 พีเอชขณะเลี้ยงค่อนข้างไม่เสถียร อาจส่งผลต่อการผลิตเมวาสเตติน ทำให้ผลิตได้น้อยกว่าพีเอชเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 2 สายพันธุ์ บนวัสดุหมักที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆ

วัสดุหมัก	สายพันธุ์	พีเอชเริ่มต้น											
		3.0				4.5				6.0			
		เติมแกลบ		ไม่เติมแกลบ		เติมแกลบ		ไม่เติมแกลบ		เติมแกลบ		ไม่เติมแกลบ	
		หมุน	นิ่ง	หมุน	นิ่ง	หมุน	นิ่ง	หมุน	นิ่ง	หมุน	นิ่ง	หมุน	นิ่ง
มันสำปะหลัง	Wild type	27.64 ± 0.05^{cd}	11.30 ± 0.03^{vw}	16.96 ± 0.07^{mno}	10.92 ± 0.05^{vwx}	27.24 ± 0.02^{d}	14.37 ± 0.03^{st}	16.43 ± 0.09^{mno}	9.84 ± 0.03^{wx}	21.93 ± 0.06^{j}	15.73 ± 0.01^{opqrs}	17.89 ± 0.04^{lm}	16.88 ± 0.03^{mn}
	U6V1	31.53 ± 0.01^{a}	17.10 ± 0.06^{lmn}	23.77 ± 0.02^{fg}	14.92 ± 0.01^{ts}	30.39 ± 0.17^{b}	20.34 ± 0.03^{j}	22.35 ± 0.17^{hi}	11.42 ± 0.19^{uvw}	27.85 ± 0.26^{cd}	12.28 ± 0.37^{uv}	24.67 ± 0.16^{f}	13.12 ± 0.05^{tu}
	U2V4	26.15 ± 0.09^{de}	20.13 ± 0.15^{jk}	24.49 ± 0.23^{f}	17.02 ± 0.05^{lm}	23.19 ± 0.08^{fh}	18.02 ± 0.09^{kl}	27.17 ± 0.08^{de}	16.88 ± 0.08^{mn}	24.77 ± 0.26^{f}	19.82 ± 0.23^{jk}	24.88 ± 0.46^{f}	17.22 ± 0.09^{lm}
มันแกว	Wild type	27.74 ± 0.29^{cd}	11.15 ± 0.11^{vw}	23.67 ± 0.10^{fg}	13.90 ± 0.16^{stu}	28.81 ± 0.15^{c}	14.64 ± 0.12^{st}	14.31 ± 0.18^{st}	10.69 ± 0.08^{vwx}	14.66 ± 0.21^{st}	13.50 ± 0.05^{tu}	23.83 ± 0.03^{stu}	9.54 ± 0.04^{wx}
	U6V1	26.64 ± 0.13^{de}	16.56 ± 0.16^{mno}	17.33 ± 0.15^{lm}	10.14 ± 0.12^{wx}	18.12 ± 0.06^{kl}	16.18 ± 0.02^{mno}	26.88 ± 0.05^{de}	11.13 ± 0.23^{vw}	14.800 ± 0.03^{st}	11.17 ± 0.25^{v}	26.97 ± 0.09^{de}	13.84 ± 0.08^{stu}
	U2V4	20.06 ± 0.03^{j}	19.81 ± 0.20^{jk}	13.52 ± 0.20^{stu}	18.01 ± 0.17^{kl}	14.03 ± 0.24^{t}	12.11 ± 0.06^{uv}	15.58 ± 0.16^{opqrs}	12.28 ± 0.22^{uv}	16.078 ± 0.01^{mno}	14.72 ± 0.13^{st}	15.72 ± 0.07^{opqrs}	13.22 ± 0.18^{tu}

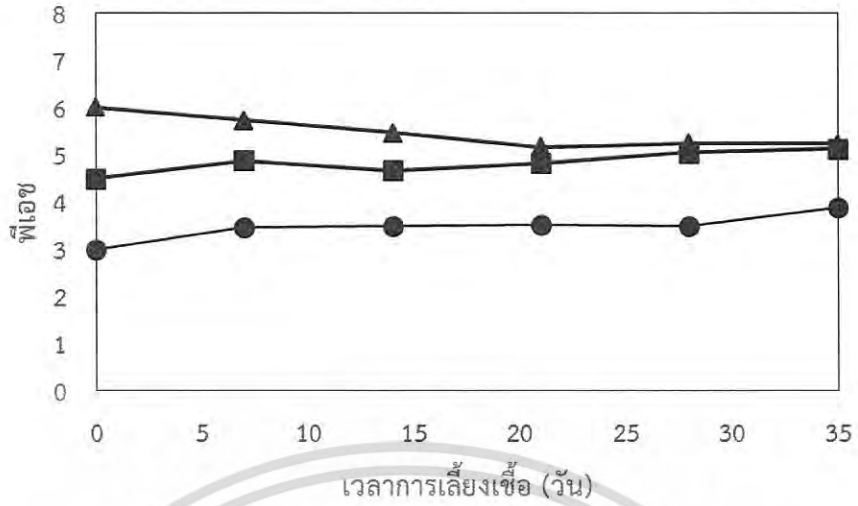
หมายเหตุ ^{abc} ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



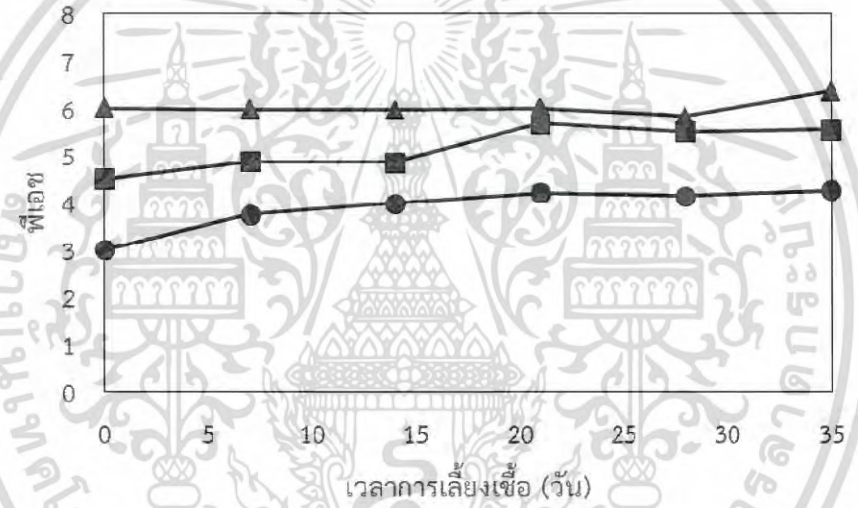
รูปที่ 4.17 เมวาสเตตินที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆของวัสดุหมักมันสำปะหลัง (ก) และมันแกว (ข) สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1ต่อ 3 ที่ผสมแกลบ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สัปดาห์ที่ 5 โดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม (□) สายพันธุ์กลาย U6V1(■) และU2V4 (▣)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก



ข

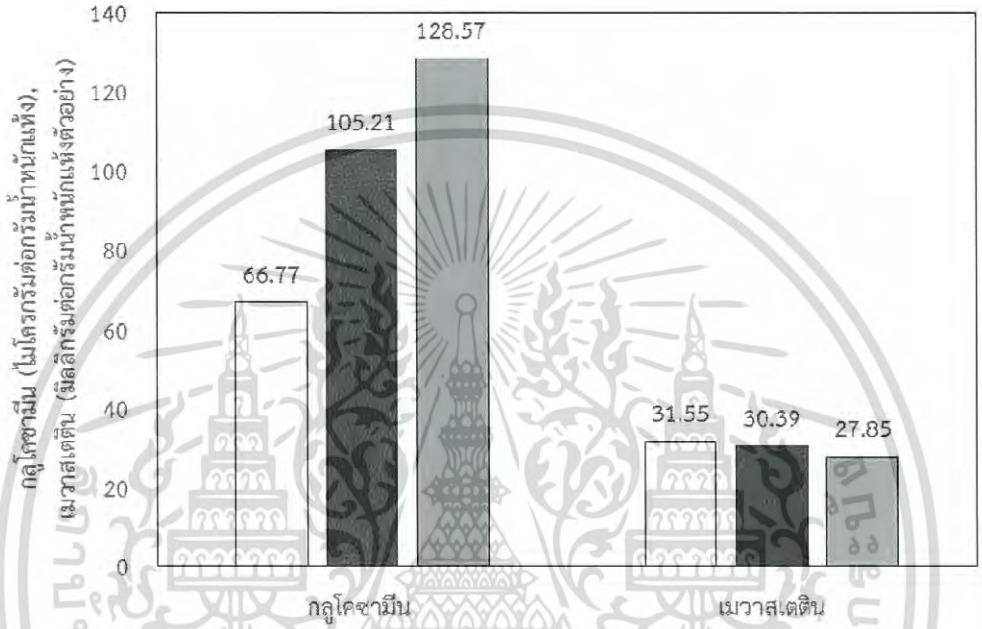


รูปที่ 4.18 ความแตกต่างพีเอชของวัสดุหมักมันสำปะหลัง (ก) และมันแกว (ข ที่สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 ที่ผสมแกลบ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเชื้อราสายพันธุ์กลาย U6V1 ที่พีเอชเริ่มต้น 3.0 (●) พีเอชเริ่มต้น 4.5 (■) และพีเอชเริ่มต้น 6.0 (▲)

เมื่อนำมาวิเคราะห์การเจริญโดยวัดจากปริมาณกลูโคซามีนของเชื้อราสายพันธุ์กลาย U6V1 มีปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และการเจริญเริ่มคงที่มาเรื่อยๆ การผลิตเมวาสเตตินได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 แสดงให้เห็นว่าการผลิตเมวาสเตตินจะเกิดในช่วงที่การเจริญค่อนข้างคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ สิริพร และคณะ (2556) พบว่า การสร้างสารทุติยูมิจะเกิดขึ้นได้ดีและรวดเร็ว ในช่วงระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) เมื่อพิจารณาที่สัปดาห์ที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆ ของสายพันธุ์ U6V1 พบว่ามันสำปะหลัง พีเอชเริ่มต้น 3.0 สามารถผลิตเมวาสเตตินได้สูงที่สุด ซึ่งสามารถวัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 66.77 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ดังรูปที่ 4.19) ในขณะที่ พีเอชเริ่มต้น 4.5 และ 6.0 วัดปริมาณกลูโคซามีนได้เท่ากับ 105.21 และ 128.57 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แสดงให้เห็นว่าปริมาณกลูโคซามีนมากการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมวาสเตติน น้อยลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ พานิดา (2012) ได้ทำการวิจัยการเพิ่มมูลค่าข้าว โดยนำปลายข้าวมาผลิตสารโมนาโคลิน เค โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์กลายสีเหลือง (Monascus kaoliang KB20M10.2) โดยการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV พบว่า 2 สายพันธุ์ที่ผลิตโมนาโคลิน เค ได้ คือ สายพันธุ์กลายสีเหลืองและสายพันธุ์ฟิวแซนท์ สามารถผลิตโมนาโคลิน เค เท่ากับ 2,126 และ 1,754 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 4,854.04 และ 5,567.30 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง



รูปที่ 4.19 ปริมาณกลูโคซามีน (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ของสายพันธุ์ U6V1 ที่การหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สัปดาห์ที่ 5 ของวัสดุหมักมันสำปะกลังผสมแกลบพีเอชเริ่มต้น 3.0 (□) พีเอชเริ่มต้น 4.5 (■) และพีเอชเริ่มต้น 6.0 (□)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การเตรียมวัสดุหมักเพื่อใช้เป็นอาหารแข็งในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 วัสดุหมักที่นำมาใช้ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว นำมาหั่น 3 แบบ คือ หั่นละเอียด ((ขนาดประมาณ 0.1-0..5 ลูกบาศก์เซนติเมตร) หั่นเป็นเส้น และหั่นแบบลูกเต๋า (ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร) พบว่าวัสดุหมักของแต่ละชนิดที่หั่นละเอียดและหั่นเป็นเส้น เมื่อนำมาเขย่าวัสดุหมักมีลักษณะจับตัวเป็นก้อนเดียวขนาดใหญ่ ลักษณะจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาเลี้ยงเชื้อ ส่วนวัสดุหมักขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีลักษณะกระจายตัวดีกว่าการหั่นแบบ 2 ชนิด จึงนำขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาเป็นอีกหนึ่งสภาวะการทดลอง แต่เนื้อวัสดุหมักมีความชื้นสะสมค่อนข้างสูง จึงต้องควบคุมความชื้นให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมของการเจริญ ได้ทำการอบวัสดุหมักที่อุณภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนวัสดุหมักแห้งและน้ำหนักคงที่ (ประมาณ 12 ชั่วโมง) จากนั้นนำวัสดุหมักที่อบแห้งมาชั่งน้ำหนัก 50 กรัม ใส่ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อปริมาตร 5 10 15 20 มิลลิลิตร เพื่อกำหนดความชื้นเริ่มต้นต่างๆ พบว่าเมื่อมีการเติมน้ำลงไปทำให้วัสดุหมักและน้ำที่เติมลงไปมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล ดังนั้นการทดลองเตรียมวัสดุหมักที่เหมาะสมได้แก่ ขนาดวัสดุหมักที่หั่นแบบลูกเต๋า และวัสดุหมักสด อย่างไรก็ตามการผลิตเมวาสเตตินโดยเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 แบบสภาวะนิ่ง วัสดุหมักมีลักษณะค่อนข้างสด ทำให้วัสดุหมักจับตัวเป็นก้อนขนาดใหญ่อีกทั้งมีปริมาณความชื้นค่อนข้างสูง จึงมีปริมาณน้ำสะสมอยู่ด้านล่างขวดจึงนำแกลบมาผสมเพื่อนลดความชื้นเริ่มต้น และลดการจับตัวเป็นก้อน พบว่าวัสดุหมักมันสำปะหลังที่พบว่าการผสมแกลบ (1.0 เปอร์เซ็นต์) ส่งผลให้ความชื้นเริ่มต้นลดลง จึงทำให้การผลิตเมวาสเตตินเพิ่มขึ้นถึง 25.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าที่ความชื้นเริ่มต้นปริมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลดีต่อการผลิตเมวาสเตติน และยังช่วยลดปัญหาการจับตัวของวัสดุหมัก แต่การเลี้ยงแบบสภาวะนิ่งการผสมผสานเกิดขึ้นไม่ดี จึงมีการทดลองหมุนขวดแบบต่างๆ ได้แก่ หมุนตลอดเวลา หมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 หมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 6 และหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 12 พบว่ามันแกวที่เติมแกลบ ให้การผลิตเมวาสเตตินสูงสุดเท่ากับ 20.66 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 ซึ่งการหมุนเป็นการกระจายความชื้นและผสมผสานส่งผลดีต่อการผลิตสารเมวาสเตติน ซึ่งสามารถผลิตเมวาสเตตินเพิ่มขึ้นจากเดิมที่ไม่ผสมแกลบ 28.64 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในสภาวะนิ่ง ซึ่งการถ่ายเทอากาศและความชื้นมีค่าจำกัดกว่าสภาวะหมุนขวดสลับนิ่ง ในช่วงแรกของการทดลองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเมวาสเตติน ได้แก่ ความชื้นเริ่มต้น การหมุนให้อากาศ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวอาจยังไม่เพียงพอต่อการผลิตเมวาสเตตินจึงทำการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตในครั้งนี้ส่วนใหญ่แล้วสายพันธุ์กลายที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงจากสายพันธุ์ดั้งเดิมในลักษณะที่ดีขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากช่วงเวลาที่ฉายรังสี เพื่อชักนำให้เกิดมิวเทชัน คือ ที่เวลา 2-10 นาที เป็นช่วงเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตในอัตราที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดมิวเทชันขึ้น และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมซึ่งไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอก (phenotype) ที่แตกต่างไปจากพ่อแม่ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นนั้นอาจไปมีผลเกี่ยวข้องกับขั้นตอนของการเจริญ และกระบวนการสร้างเมวาสเตตินของเชื้อราเอง ทำให้เชื้อราสายพันธุ์กลาย ที่ได้มีการเจริญเพิ่มขึ้นและการผลิตเมวาสเตติน ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดี ส่วนช่วงเวลาที่ 12 และ 14 นาที นั้นไม่พบการเจริญของเชื้อรา ทั้งนี้อาจเป็นเพราะช่วงเวลาดังกล่าว เป็นช่วงเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตในอัตราที่สูงเกินไป ทหให้เกิดมิวเทชันซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเชื้อราที่ทำให้เชื้อราไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่รอดได้ เพราะการชักนำให้เกิดมิวเทชันนั้นอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ดีหรือไม่ดีก็ได้

จากการกลายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 โดยใช้สปอร์แขวนลอยซึ่งกวนผ่านแสงอัลตราไวโอเลต ห่างจากแหล่งกำเนิดแสง 50 เซนติเมตร ในช่วงเลา 14 นาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 นาที โดยพบว่านาทีที่ 2 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็งวุ้น MYS พีเอช 3 พบว่า มี 7 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญบนอาหาร MYS พีเอช 3 ได้ คือ U2V1 U2V2 U2V3 U2V4 U2V5 U6V1 และ U10V1 โดยสายพันธุ์กลาย U6V1 มีผลผลิตได้สูงสุด คือมีค่าเท่ากับ 0.18 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ รองลงมาเป็นสายพันธุ์ U2V4 มีค่าเท่ากับ 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ซึ่งผลการผลิตเมวาสเตตินของสายพันธุ์กลาย U6V1 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับทุกสายพันธุ์ เมื่อนำ 7 สายพันธุ์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง ได้แก่ มันสำปะหลัง และมันแกว ผสมแกลบ หมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า 2 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารเมวาสเตติน ได้แก่ สายพันธุ์กลาย U6V1 และ U2V4 ซึ่งสายพันธุ์กลาย U6V1 ผลิตได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 23.22 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และผลิตได้สูงกว่าเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 (20.96 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) คิดเป็น 9.71 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาลักษณะสัณฐาน พบว่าการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์กลายมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม เมื่อเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน สายพันธุ์ดั้งเดิมเส้นใยค่อนข้างฟูจากกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และแพร่ออกรอบข้าง เส้นใยมีลักษณะฟูสม่ำเสมอ ตรงกลางโคโลนีจะมีสีเข้มเนื่องจากเส้ยใยเริ่มแก่ ส่วนปลายเส้นใยจะมีสีอ่อนค่อนไปทางสีขาว เพราะเส้นใยมีอายุน้อย สายพันธุ์กลาย U2V4 และ U6V1 เส้ยใยมีลักษณะที่คล้ายกัน คือ เส้นใยฟูราบเรียบไปกับผิวหน้าอาหาร ซึ่งสายพันธุ์กลาย U2V1 U2V2 U2V3 U2V5 และ U10V1 เจริญค่อนข้างช้า บางสายพันธุ์เส้นใยฟูมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม เมื่อวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี พบว่า สายพันธุ์ดั้งเดิม U2V1 U2V2 U2V3 U2V4 U2V5 U6V1 และ U10V1 มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 4.8 3.8 4.1 3.7 4.5 2.8 4.7 และ 3.3 เซนติเมตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการเลี้ยงบนอาหารแข็งมันสำปะหลัง และมันแกว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่สภาวะการหมุนขวดสลับหยุดนิ่ง 1 ต่อ 3 และที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆ (แช่วัสดุหมักในอะซิเตรทบัฟเฟอร์ ได้แก่ พีเอชเริ่มต้น 3.0 4.5 และ 6.0) พบว่าพีเอชเริ่มต้น 3.0 ให้การผลิตเมวาสเตตินสูงสุด โดยสายพันธุ์กลาย U6V1 บนวัสดุหมักมันสำปะหลัง ผสมแกลบ ที่สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 สามารถผลิตเมวาสเตตินเท่ากับ 31.530 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับทุกสภาวะการเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์อื่นๆ และพีเอชเริ่มต้น 4.5 ให้การผลิตเมวาสเตตินรองลงมา โดยสายพันธุ์กลาย U6V1 บนวัสดุหมักมันสำปะหลัง ผสมแกลบ ที่สภาวะการหมุนขวดสลับนิ่ง 1 ต่อ 3 คือสามารถผลิตเมวาสเตตินเท่ากับ 30.391 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับการผลิตเมวาสเตตินสูงสุด สายพันธุ์กลายสามารถผลิตเมวาสเตตินเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม คิดเป็น 14 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆผลการผลิตเมวาสเตตินสูงกว่างานวิจัยของ Harsha (2013) ที่พีเอชเริ่มต้นค่อนข้างเป็นกรดผลิตเมวาสเตตินได้เท่ากับ 0.0293 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาความหนืดของอาหารเหลวที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในวันที่ 7 วันที่ 10 และวันที่ 14 เพื่อตรวจสอบการย่อยตัวเอง หรือการ หลั่งสารออกนอกเซลล์

2. การแยกเส้นใยออกจากชิ้นวุ้นและ pellet ไม่สามารถแยกได้อย่างแท้จริง เนื่องจากใช้การแยกด้วยสายตา เส้นใยอาจติดอยู่กับชิ้นวุ้นบางส่วน

3. ควรศึกษาการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ HMG CoA reductase และผลกระทบของสารพิษที่เกิดจากเชื้อรา *Monascus* sp. คือ ซิตรินิน

4. ประยุกต์ใช้สารเมวาสเตตินที่ผลิตได้ อาจนำไปทดลองกับสิ่งมีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กมลา สดับพจน์. 2554. “ยากับโรคหัวใจและหลอดเลือด.” หน้า 210-216. ใน **การประชุมวิชาการเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ครั้งที่ 9**. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต.

เกษร นันทจิต. 2556. **เคมีของยา : ยาที่ออกฤทธิ์ต่อระบบหัวใจ หลอดเลือด และระบบต่อมไร้ท่อ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ประชากรธุรกิจ.

จันทนี อิทธิพานิชพงศ์. 2545. “ยาลดไขมันในเลือด.” หน้า 187-196. ใน **เภสัชวิทยา 1 คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 4**. กรุงเทพฯ : แทกซ์แอนด์เจอนัล.

จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. 2537. **ภัยมืดจากสารพิษ**. กรุงเทพฯ : เชษฐ สตูดิโอ แอน กราฟิคดีไซน์.

นาทาจะ ฮาจิเมะ. 2541. **อาหารลดคอเลสเตอรอล**. แปลโดย พนิดา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : เยลโล่การพิมพ์.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549. **เคมีอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โอ เอส พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

นิสา บุตรดา. 2537. “การกลายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส กบ.11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสี และเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการกับสายพันธุ์พ่อแม่ สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดง และสีเหลือง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พานิดา ทองประดิษฐ์. 2012. “การผลิตข้าวน้ำตาลทองจากปลายข้าวหมักด้วยเชื้อราสร้างสารสีเหลือง.” หน้า 579-582. ใน **งานประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 2**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พลายแก้ว ไชยเบญจวงศ์ และ บุษบา ยงสมิทธิ์. 2534ก. “การศึกษาการปรับสภาพของวัตถุดิบต่อคุณภาพการหมักข้าวแดง.” หน้า 283-291. ใน **การประชุมวิชาทางการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29**. กรุงเทพฯ : สาขาสิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตร์ อุตสาหกรรมการเกษตร คหกรรมศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ เศษฐศาสตร์ สังคมศาสตร์ มนุษยศาสตร์ สังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พลายแก้ว ไชยเบญจวงศ์ และ บุษบา ยงสมิทธิ์. 2534ข. “การศึกษาเบื้องต้นโคจิเชื้อราแดงโมแนสคัส เตรียมจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ.” หน้า 277-282. ใน **การประชุมวิชาทางการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29.** กรุงเทพฯ : สาขาสิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตร์ อุตสาหกรรมการเกษตร คหกรรมศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ เศษฐศาสตร์ สังคมศาสตร์ มนุษยศาสตร์ สังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิไลวรรณ ศิริพฤกษ์พงษ์. 2555. **ชีวเคมีของลิปิดและโรคหลอดเลือดหัวใจ.** [Online]. Available : http://doc.qa.tu.ac.th.

ชัยสิทธิ์ สิทธิเวช. 2557. “ราฟต์ คาวีโอเล และการขนส่งคอเลสเตอรอลภายในเซลล์.” *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 19(1) : 147-159.

ชิดพงษ์ ไชยวสุ. 2542. **ไขมันฆาตกรหมายเลข 1**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : จูน พับลิชชิ่ง.

เชิดชัย เชี่ยวธีรกุล, ประสิทธิ์ แซ่ลี้ และ ปนัดดา แซ่อึ้ง. 2519. “สีแดงจากข้าว (อั้งคัก).” *วารสารอาหาร*. 8(1) : 51-55.

เบญจพร บุราณรัตน์. 2012. “บทบาทของสารยับยั้งเอนไซม์เฮชเอ็มจีโคเอรีดักเตสในการรักษามะเร็ง.” *วารสารนเรศวรพะเยา*. 5 : 3-16.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บุษบา ยงสมิทธ์. 2529. "การปรับปรุงการผลิตวิตตามินบี 12 ในของเหลือทิ้งจากถั่วเหลือง เพื่ออุตสาหกรรมอาหารสัตว์." หน้า 30. ใน **รายงานวิจัยสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ**. กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ.

ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิต. 2546. **ชีวเคมีทางการแพทย์ : เมตาบอลิซึมของสารอาหารเชิงบูรณาการสำหรับนักศึกษาสายวิทยาศาสตร์การแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : บุ๊คเน็ท.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. **พันธุศาสตร์**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยะมิตร ศรีธารา. 2554. "ยากับโรคหัวใจและหลอดเลือด." หน้า 185-189. ใน **การประชุมวิชาการเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ครั้งที่ 9**. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต.

วิลาส รัตนานุกูล. 2551. **คอเลสเตอรอลภัยร้ายใกล้ตัว.** [Online]. Available : http://biology.ipst.ac.th/?p=840.

วราวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2541. **การชักนำให้เกิดมิวเตชันในรา Monascus purpureus ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต**. [Online]. Available : http://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/6177.

วรชัย ทองไทย. 2554. **การเปลี่ยนแปลงประชากรโลก 2493-2573**. [Online]. Available : http://www2.ipsr.mahidol.ac.th/ConferenceVII/Download/2011-Article-18.

สิริพร อักษร, วงเดือน บุตรหนัน และ ปาริยา ณ นคร. 2556. "ความคงตัวของสีแดงที่สกัดได้จากการเลี้ยงราที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว." *Thai Journal of Science and Technology*. 185-191.

สมชาย ไกรรักษ์, กล้าณรงค์ ศรีรอด, เลอลักษณ์ จิตรดอน, ปราโมทย์ ศิริโรจน์, สาวิตรี ลิ่มทอง และ บุษบา ยงสมิทธ์. 2536. "การเพิ่มผลผลิตสีเหลืองของเชื้อรา *Monascus* sp. 20 M 10.2 ในอาหารแป้งมันสำปะหลัง". หน้ 75-87. ใน **การประชุมวิชาทางการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31**. กรุงเทพฯ : สาขาคหกรรมศาสตร์ วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ อุตสาหกรรมเกษตร เศรษฐศาสตร์ และบริหารธุรกิจ ศึกษาศาสตร์ มนุษยศาสตร์ การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม.

สมชาย ไกรรักษ์ และ นิสา ไกรรักษ์. 2554. "การผลิตสารโมนาโคลินจากเชื้อราโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแข็ง." หน้า 45-49. ใน **รายงานการวิจัยคณะวิทยาศาสตร์.** กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข. 2556. **สรุปสถิติสำคัญ พ.ศ. 2556**.

อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ. 2547. **ชีวเคมีของลิพิดและไลโพโปรตีน**. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่ : ดาวคอมพิวกราฟิก.

Ainswarth, G.C., Sparrow F.K. and Sussman, A.S. 1973. **The Fungi**. New York : Academic Press.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Carels, M. and Shepherd, D. 1975. "Sexual reproduction cycle of *Monascus* sp. in submerged shaken culture." *Journal of Bacteriology*. 122(1) : 288-294.

Carneiro, F. F. A. 2008. "Dicionário Terapêutico Guanabara 2008/2009." **15ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan.** 443

Cafforio, P., Dammacco, F., Gernone, A. and Silvestris, F. 2005. "Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells." *Carcinogenesis*. 26(5) : 83-91.

Chakravarti, R. and Sahai, V. 2004. "Compactin-a review." *Applied microbiology and biotechnology*. 64(5) : 618-624.

Chen, F. and Hu, X. 2005. "Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin." *International journal of Food Microbiology*. 103(3) : 331-337.

Child, G. 2007. **Stages of endothelial dysfunction in atherosclerosis.** [Online]. Available : http://en.wikipedia.org en.wikipedia.

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

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

Endo, A. 1976. "ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinium*." *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. 29(12) : 1346-1348.

Endo, A. 1979. "Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species." *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. 32(8) : 852-854.

Endo, A., Negishi, Y., Iwashita, T., Mizukawa, K. and Hirama, K. 1985. "Biosynthesis of ML-236B (Compactin) and Monacolin K." *Journal of Antibiotics*. 38 : 444-448.

Filho, R.P., Polli, M.C., Filho, S.B., Garcia, M. and Ferreira, E.I. 2010. "Prodrugs available on the Brazilian pharmaceutical market and their corresponding bioactivation pathways." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 46 : 393-420.

Gary, H. 2014. **Atherosclerosis.** [Online]. Available : http://www.nhlbi.nih.gov.

Ganrong, X., Yue, C., Yun, C., Xiaorong, L. and Xing, L. 2003. "Production of Monacolin K in Solid-state Fermentation of *Monascus* sp. 9901 that does not produce citrinin." 1-7. In **Poster Session of the 1st International Symposium and Workshop on Insight into the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food Safety.** Bangkok.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Uribelarrea, J.L., Goma, G. and Loubiere, P. 2000. "Kinetic analysis of red pigment and citrinin by *Monascus rubber* as a function of organic acid accumulation." *Enzyme and Microbial Technology*. 27 : 619–625.

Han, O.H. 1990. "Optimization of *Monascus* pigment production in solid-state Fermentation." 260-263. In **G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (eds). Natural Food Colourants**. New York.: Blackie and Son.

Harsha, N., Subbarao, S., Sridevi, V., Lakshmi, C. MVV. and Kiran, T. K. 2013. "Production of Mevastatin by Solid State Fermentation Using Sesame Oil Cake." *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 4(1) : 429-436.

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

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

Johns, M.R., and Stuart, D.M. 1991. "Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture." *Journal* of *Industrial Microbiology*. 8 : 23-28.

Leray, C. 2014. **Steroids**. [Online]. Available : http://www.cyberlipid.org/index.htm.

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

Liu, D.C., Wu, S. and Tan, F.J. 2010. "Effect of addition of angka rice on the qualities of low-nitrite Chinese sausages." *Food chemistry*. 118(2) : 245-250.

Lotong, N. and Suwanarit, P. 1990. "Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content." *Journal* of *applied bacteriology*. 68 : 565-570.

Mahesh, N., Balakumar, S., Indumathi, P., Ayyadurai, A. and Vivek, R. 2012. "Production and Optimization of Mevastatin using Penicillium citrinum NCIM 768." *Journal of Microbial Biochem Technol*. 4 : 001-004.

Manzoni, M. and Rollini, M. 2002. "Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs." *Journal* of *applied* Microbiology Biotechnolohy. 58 : 555-564.

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

Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A. and Tharatha, S. 2008. "Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by Monascus sp." *Journal Food Microbiol*. 126 : 20–23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ritmungkrin, B. 2004. "Improvement of Monascus purpureus by mutation for the pigments production in solid state using wide Yam." Bangkok : Chandrakasem Rajabhat University.

Rosenblitt, A., Agosin, E., Delgado, J. and Ricardo, P.C. 2000. "Solid Substrate Fermentation of Monascus purpureus: Growth, Carbon Balance, and Consistency Analysis." *Biotechnol. Progress*. 16 : 152-162.

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

Unal Prasad. 2008. **"Almighty" Fungus: The Occurrence, Bioactivity, Biosynthesis, And Synthesis of Mevastatin**. [Online]. Available : http://chemgroups.ucdavis.edu.

Vining, L.C.and Chatterjee, S. 1982. "Secondary Metabolism." 211. In **V. Krumphanzl, B. Sikyta and Vanek, Z. (eds.), Biotechnology**. New York : Academic Press.

Wong, H.C. and Bau, Y.S. 1978. "Pigmentation and Antibacterual Activity of Fast-Neutron and X-ray Induced Strains of *M. purpureus*." *Plant Physiology*. 60 : 578.

Wang, J.J., Lee, C. L., and Pan, T.M. 2004. "Modified mutation method for screening low citrinin-producing strains of Monascus purpureus on rice culture." *Journal of agricultural and food chemistry*. 52(23) : 6977-6982.

Wei, W., Li, C., Wang, Y., Huaide, S., Zhu, J. and Kritchevsky, D. 2003. "Hypolipidemic and anti-atherogenic effects of long-term cholestin (Monascus purpureus-fermented rice, red yeast rice) in cholesterol fed rabbits." *Journal Nutritional Biochem*. 14 : 314-318.

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

Yongsmith, B. and Tabloka. 1985. "Food colors fermentation from cassava by Monascus sp." *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 19(1) : 45-50.

Yu, H. and Patel, S.B. 2005. "Recent insights into the Smith-Lemli-Opitz syndrome." *Clinical Genetic*. 68 : 383-391.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

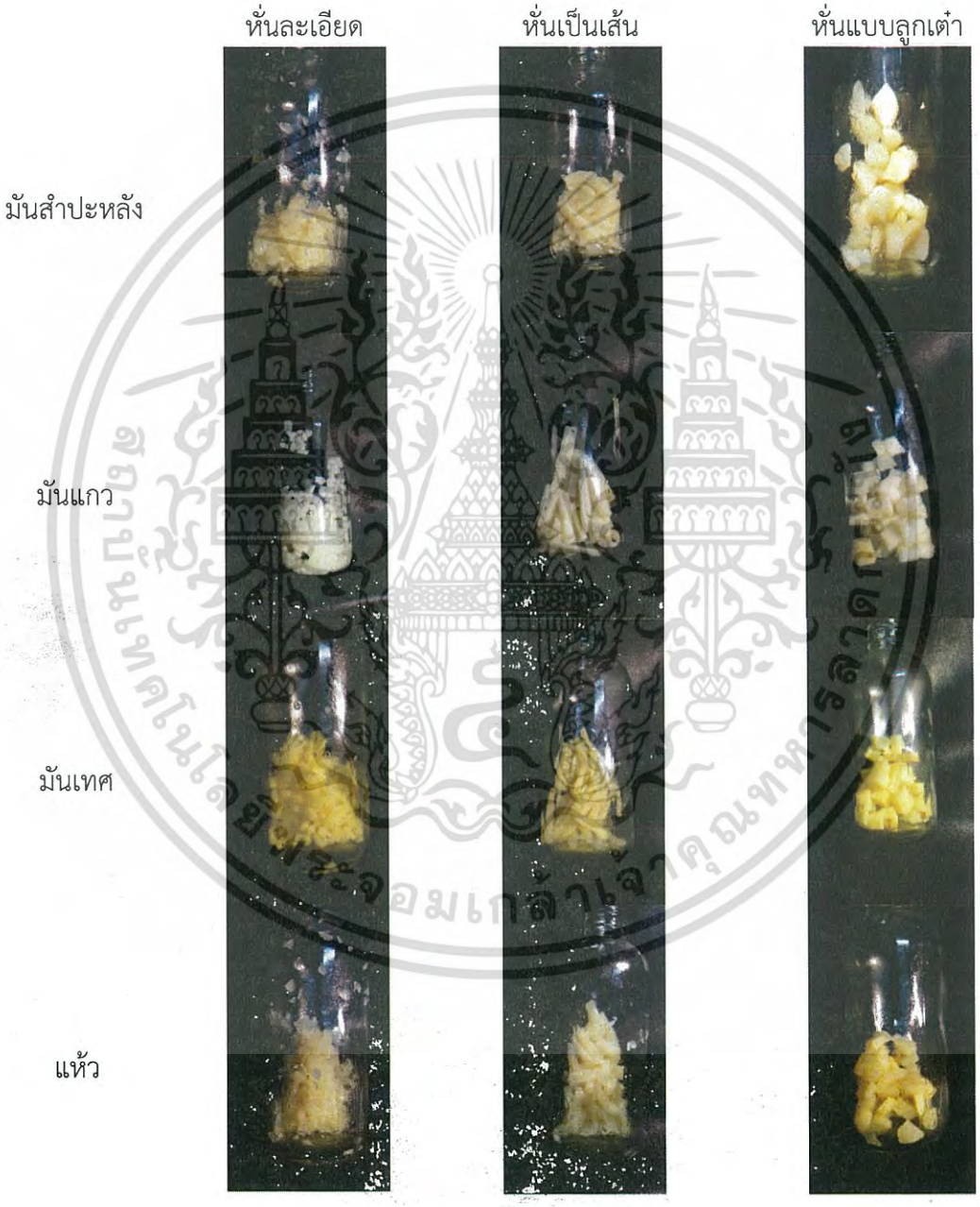
ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมวัสดุหมัก

มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว นำมาล้างน้ำให้สะอาด นำเปลือกออก นำมาหั่นให้ได้ขนาดต่างๆ ได้แก่ หั่นละเอียด (ขนาด 0.1-0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร) หั่นเป็นเส้น และหั่นแบบลูกเต๋า (ขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อาหาร MYS (Malt yeast extract agar)

Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
แป้ง	10	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม แล้วใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ในกรณีที่สารละลายยาก สามารถนำไปต้มซึ่งความร้อนจะทำให้ละลายได้ง่ายขึ้น นำส่วนผสมที่ได้เทลงใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสำลีมาปิด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

หมายเหตุ อาหารเหลว MYS ไม่มีส่วนประกอบวุ้น

3. อาหาร SS (Soybean starch agar)

แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัมต่อลิตร
แป้งถั่วเหลือง	40	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม แล้วใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ในกรณีที่สารละลายยาก สามารถนำไปต้มซึ่งความร้อนจะทำให้ละลายได้ง่ายขึ้น นำส่วนผสมที่ได้เทลงใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสำลีมาปิด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

4. อาหาร GYP (Glucose yeast extract peptone agar)

Glucose	40	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมใส่ลงในบีกเกอร์หรือในภาชนะที่จะผสม แล้วใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ในกรณีที่สารละลายยาก สามารถนำไปต้มซึ่งความร้อนจะทำให้ละลายได้ง่ายขึ้น นำส่วนผสมที่ได้เทลงใส่ในขวดรูปชมพู่ นำสำลีมาปิด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

5. อาหาร PDA (Potato dextrose agar)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที นำมากรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมาเติม dextrose และ agar ผสมให้ละลายเข้ากัน แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอน้ำความร้อนสูงที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi, 1954)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส ไซโลส โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ เกิดสีโมลิบดินัมบลู (Molybdrnum blue) ดังปฏิกิริยา

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

สารเคมี

ก. Somogyi Reagent

Solution I : ประกอบด้วย

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

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 800 มิลลิลิตร)

Solution II : ประกอบด้วย

$CuSO_4.5H_2O$	14	กรัม
Na_2SO_4	36	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

เตรียม Somogyi Reagent โดยผสม สารละลายทั้ง 2 ตัวเข้าด้วยกัน

ข. Nelson Reagent

2.1.สารละลาย ammonium molybdate $(NH_4)_6MO_7O_{24}.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 42 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

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

2.3.เติมสารละลายข้อ 2.2 ลงในสารละลายข้อ 2.1 ผสมให้เข้ากันดีแล้วจึงบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1.ใช้สารละลายกลูโคสหรือไซโลสความเข้มข้น 15-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือ ตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2.เติม Somogyi reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

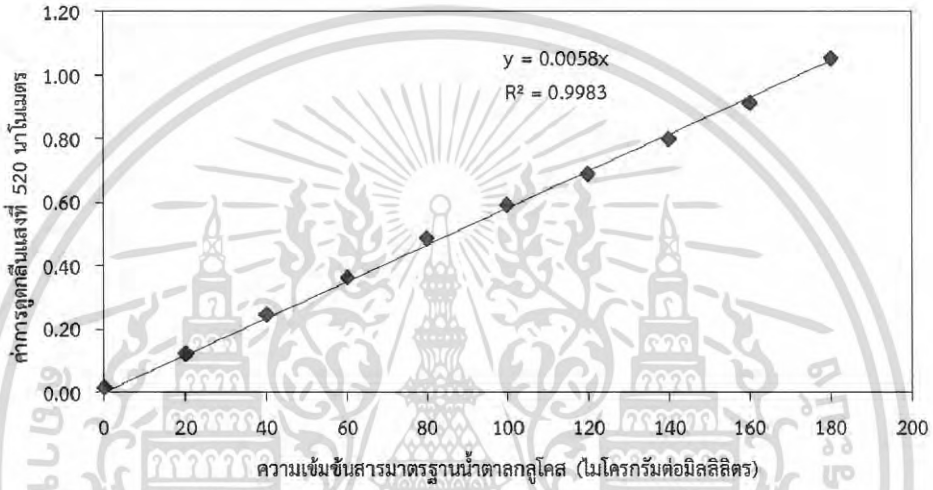
3.เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น
(Blank เติมน้ำกลั่นแทนตังอย่าง แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2-4 เปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลส

ชั่งสารละลายมาตรฐานกลูโคสหรือไซโลสที่อบจนแห้ง 1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด จาก stock solution นำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีกลูโคสหรือไซโลส ความเข้มข้น 0-180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปภาคผนวกที่ ข 1 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

2. วัดความชื้น (AOAC, 1999)

อุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้า
2. ภาชนะหาความชื้น (จานอลูมิเนียม พร้อมฝา)
3. โถดูดความร้อน
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบ ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาชนะหา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความชื้น ซึ่งทราบน้ำหนักแล้วนำไปอบที่ตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น จากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบอีก และกระทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ X 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

3. การวิเคราะห์สารสี (ดัดแปลงจากวิธีของ Lin และ Suen (1973) และ พลายแก้ว, 2531)

อุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เครื่องวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
3. เครื่องชั่ง
4. ช้อนตักสาร
5. ปิเปตขนาด 5 และ10 มิลลิลิตร
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง
7. กระบอกตวง

สารเคมี

1. เอธานอลร้อยละ 50
2. น้ำกลั่น

วิธีการวิเคราะห์

1. ตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมเอธานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
3. นำมาเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตร

ตัวอย่างบางส่วนให้นำมาหาความชื้น โดยอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมงจนได้น้ำหนักคงที่ ไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัม

วิธีคำนวณ

คำนวณได้จาก เอธานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะมีปริมาณสารสีเท่ากับค่าที่เราวัดได้จาก สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่าง 1 กรัม

ตัวอย่างการคำนวณ

เอธานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะมีปริมาณสารสี 1.943 หน่วย

เอธานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะมรปริมาณสารสี 19.43 หน่วย

ดังนั้น ปริมาณสารสีที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เท่ากับ 19.43 หน่วย

น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 0.096 กรัม มีปริมาณสารสี 19.43 หน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารสี 202.396 หน่วย
ดังนั้น เมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้งจะมีปริมาณสารสี 202.396 หน่วยต่อน้ำหนักแห้ง (กรัม)

4. การวิเคราะห์สารเมวาสเตตินด้วยเครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography)

การวิเคราะห์

นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Shimadzu, C20994007894 LP,LC-10ADvp) คอลัมน์ μBondapak^{TM} C_{18} 3.9 x 300 มิลลิเมตร (Water, USA) และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร (UV detector SPD-10A vp) โดยใช้ส่วนเคลื่อนที่เป็นสารละลาย acetonitrile ความเข้มข้นร้อยละ 55แล้วนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐานเมวาสเตติน (Sigma, USA)

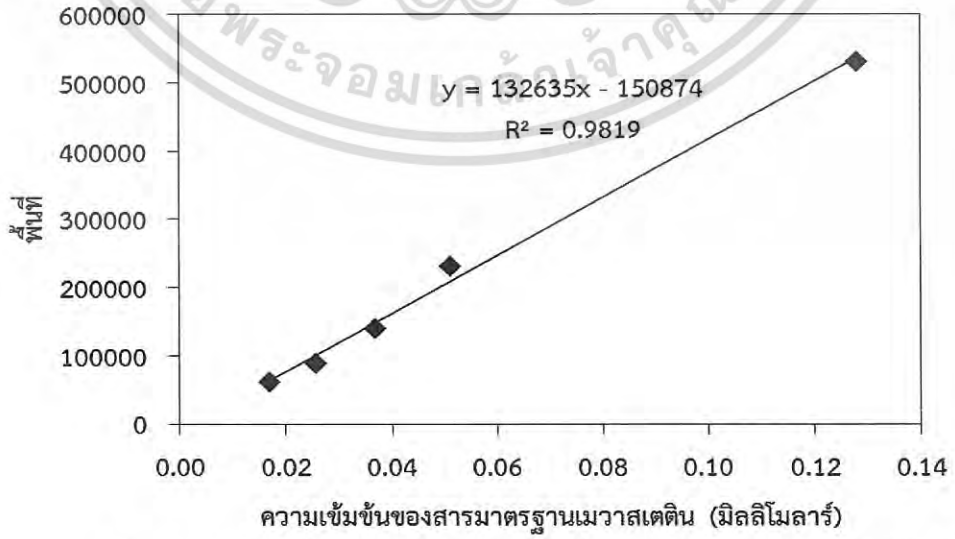
การเตรียมสารเมวาสเตตินมาตรฐาน

1. นำเมวาสเตตินมาตรฐานมาลายในเอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ นำมาเจือจางเป็นความเข้มข้น 0.128 0.051 0.037 0.025 และ 0.017 มิลลิโมลาร์ นำสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับสารละลาย acetonitrile ในอัตราส่วนของสารละลาย acetonitrile: สารมาตรฐาน (55:45) จากนั้น

2. นำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์นำพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน แกน y คือ พื้นที่ใต้กราฟ และแกน x คือ ความเข้มข้นของโมนาโคลิน

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

3. นำตัวอย่างมาผสมสารละลาย acetonitrileในอัตราส่วนของสารละลาย acetonitrile : ตัวอย่าง (55:45) จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์ นำพื้นที่ใต้กราฟที่เวลาเดียวกับกราฟมาตรฐานไปเทียบเพื่อหาปริมาณของ เมวาสเตติน



รูปภาคผนวกที่ ข 2 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเมวาสเตตินระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ

นำพื้นที่ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ มาแทน y ในสมการ y = 132635x – 150874

ตัวอย่างการคำนวณ

พื้นที่จากการวิเคราะห์เมวาเตตินด้วย HPLC ได้เท่ากับ 8673

ดังนั้น นำ 8673 แทนในสมการ จะได้เท่ากับ x = (8673 + 150874)/132635

x = 1.203 คูณด้วยปริมาตรที่นำมาสกัด คือ 10 จะได้เท่ากับ 0.012 มิลลิโมลาร์

ดังนั้น น้ำหนักแห้งตัวอย่าง 0.149 กรัม จะมีเมวาสเตติน 0.012 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักแห้งตัวอย่าง 1 กรัม จะมีเมวาสเตติน 0.081 มิลลิโมลาร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ดังนั้น มีเมวาสเตตินเท่ากับ 0.081 คูณ 390.5 จะได้เท่ากับ 31.631 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำกนักแห้งตัวอย่าง

5. การนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer (ตามวิธีของ Towsend and Lindrend, 1953)

1. ทำความสะอาดสไลด์และ cover slide ของ haemacytometer ให้สะอาด วาง cover slide ให้อยู่ตรงกลางสไลด์ หยดสารละลายสปอร์แตะที่ขอบของ cover slide ให้สารละลายสปอร์แทรกไปอยู่ระหว่าง cover slide กับสไลด์จนเต็มพอดี

2. นำไปนับจำนวนสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับสปอร์ที่อยู่แต่ละช่องใหญ่และที่อยู่ระหว่างเส้นขอบของช่องใหญ่ทางด้านล่างและด้านขวา ตามแนวทแยงมุมซ้ายและขวารวม 9 ช่อง

3. คำนวณจำนวนสปอร์

ขนาดความลึกของ haemacytometer	= 0.1	มิลลิลิตร
ขนาดของพื้นที่แต่ละช่องใหญ่	= 0.04	ตารางมิลลิเมตร
เพราะฉะนั้น ปริมาตรของแต่ละช่องใหญ่	= 0.0004	ลูกบาศก์มิลลิลิตร
ดังนั้น จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร	= สปอร์เฉลี่ยที่ได้ x 2.5 x 10^5	

6. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนตามวิธี Morgan – Elson (Van de Loo, 1976)

สารเคมี

1. สารละลาย Acetyl acetone reagent เป็นสารละลาย 4 เปอร์เซ็นต์ ของ acetylacetone ใน 1.25 โมลาร์ Na_2CO_3 ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

2. Erhlick's reagent ละลาย para – dimethylaminobenzaldehyde 1.6 กรัม ในส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอรกิเข้มข้นปริมาตร 30 มลิลิลิตร และเอธานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร สามารถเก็บในตู้เย็นได้นาน 2 – 3 วัน

3. สารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride ละลาย glucosamine hydrochloride 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

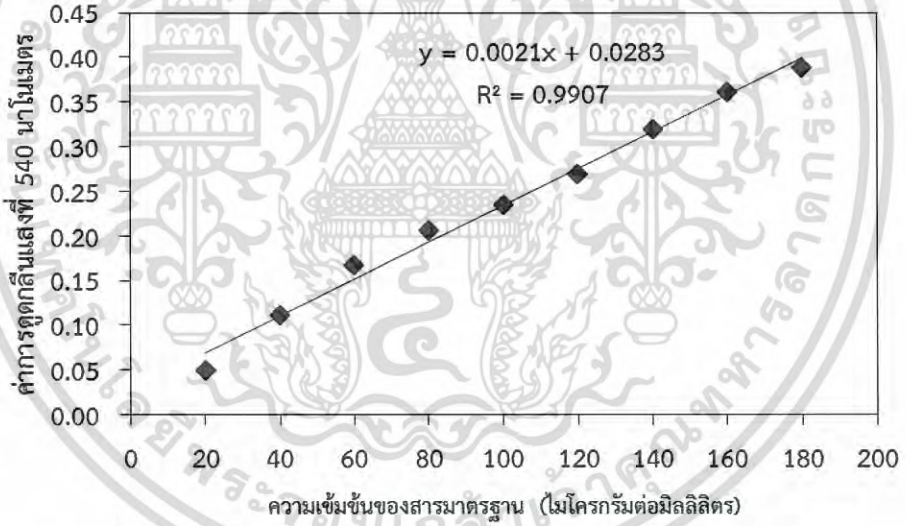
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์

นำตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาอบแห้ง (หรือถ้าตัวอย่างเป็นของแข็ง นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วมาบดละเอียด ปริมาณ 0.25 กรัม) เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลาง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หา ปริมาณ glucosamine

วิธีการวิเคราะห์

หากราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย acetyl acetone 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 20 นาที เติมเอธานอล เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Erhlick's reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณ glucosamine โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน



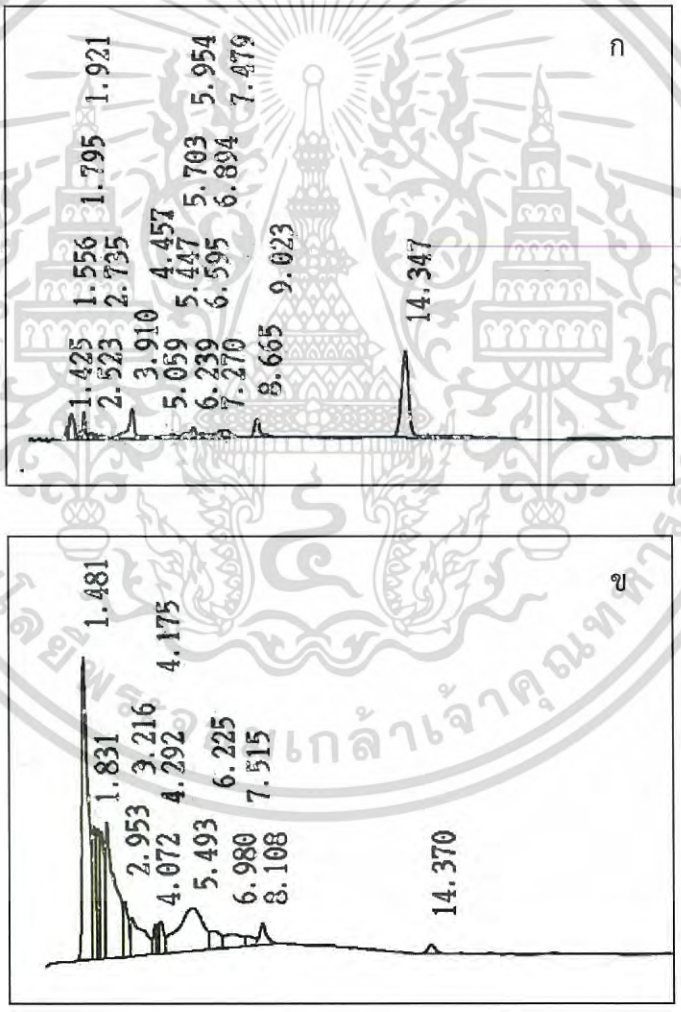
รูปภาคผนวกที่ ข 3 กราฟมาตรฐานของเอน-อะซิทิลกลูโคซามีนระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์เมวาสเตตินโดยใช้ HPLC จากเชื้อรา *Monascus* sp. SS14

วัตถุดิบที่นำมาใช้เป็นวัสดุหมักในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ได้แก่ มันสำปะหลัง มันแกว มันเทศ และแห้ว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ จากนั้นเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์เมวาสเตตินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (HPLC) พบค่า retention time ของเมวาสเตตินมาตรฐาน (standard mevastation, sigma, USA) ที่เวลา 14.347 นาที เปรียบเทียบกับสารที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ซึ่งแสดงค่า retention time ที่เวลา 14.370 นาที เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าสารที่ เชื้อราผลิตได้เป็นชนิดเดียวกัน ค่า retention time ของเมวาสเตตินมาตรฐาน (รูปที่ ก) เปรียบเทียบกับสารที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บน อาหารแข็ง (รูปที่ ข)



รูปภาคผนวกที่ ค 1 retention time ของเมวาสเตตินมาตรฐาน (standard mevastation, sigma, USA) ที่เวลา 14.347 นาที (ก) และretention time ของเมวาสเตตินที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บน อาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ค 1 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลผลิตที่ได้ ($Y_{p/x}$) จากเชื้อรากลายพันธุ์ และ *Monascus* sp. S14 โดยเปรียบเทียบจากปริมาณเมวาสเตตินต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)

sample	Mean	Std. Deviation	N
U10V1	.0771201	.00052910	3
U2V1	.0570500	.00336167	3
U2V2	.0408000	.00608276	3
U2V3	.0765600	.00100000	3
U2V4	.1214233	.00152753	3
U2V5	.0555000	.00360555	3
U6V1	.1812033	.00152753	3
wild typ	.1036100	.00266276	3
Total	.0891583	.04360552	24

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลผลิตที่ได้ ($Y_{p/x}$) จากเชื้อรากลายพันธุ์ และ *Monascus* sp. S14 โดยเปรียบเทียบจากปริมาณเมวาสเตตินต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.044[a]	7	.006	670.061	.000
Intercept	.191	1	.191	20531.279	.000
Isolate	.044	7	.006	670.061	.000
Error	.000	16	9.292E-6		
Total	.235	24			
Corrected Total	.044	23			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 3 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของผลผลิตที่ได้ ($Y_{p/x}$) จากเชื้อรากลายพันธุ์ และ *Monascus* sp. S14 โดยเปรียบเทียบจากปริมาณเมวาสเตตินต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์)

Isolate	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
U2V2	3	.0408000					
U2V5	3		.0555000				
U2V1	3		.0570500				
U2V3	3			.0765600			
U10V1	3			.0771201			
wild typ	3				.1036100		
U2V4	3					.1214233	
U6V1	3						.1812033
Sig.		1.000	.542	.825	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 9.29E-006.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 4 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) บนอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์ที่สภาวะการหมุน 1 ชั่วโมงหยุดหมุน 3 ชั่วโมง

Sample	Mean	Std. Deviation	N
Ca Ro 6m	23.12200	.086418	3
Ca Ro c4	15.30100	.298327	3
Ca Ro wt	20.76533	.262694	3
Ca st 6m	20.07967	.065531	3
Ca st c4	14.15300	.152292	3
Ca st wt	19.07967	.058603	3
Jam Ro 6m	20.15267	.023459	3
Jam Ro c4	16.07700	.048754	3
Jam Ro wt	19.10433	.102007	3
Jam st 6m	19.38200	.169555	3
Jam st c4	16.18533	.213706	3
Jam st wt	19.08133	.082591	3
Total	18.54028	2.519720	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) บนอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์ที่สภาวะการหมุน 1 ชั่วโมงหยุดหมุน 3 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	221.633[a]	11	20.148	830.947	.000
Intercept	12374.708	1	12374.708	510349.282	.000
Sample	221.633	11	20.148	830.947	.000
Error	.582	24	.024		
Total	12596.923	36			
Corrected Total	222.215	35			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 6 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) บนอาหารแข็งโดยเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 และสายพันธุ์กลาย 7 สายพันธุ์ที่สภาวะการหมุน 1 ชั่วโมงหยุดหมุน 3 ชั่วโมง

Sample	N	Subset							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Ca st c4	3	14.15300							
Ca Ro c4	3		15.30100						
Jam Ro c4	3			16.07700					
Jam st c4	3			16.18533					
Ca st wt	3				19.07967				
Jam st wt	3				19.08133				
Jam Ro wt	3				19.10433				
Jam st 6m	3					19.38200			
Ca st 6m	3						20.07967		
Jam Ro 6m	3						20.15267		
Ca Ro wt	3							20.76533	
Ca Ro 6m	3								23.12200
Sig.		1.000	1.000	.403	.857	1.000	.571	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .024.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1135.357[a]	23	49.363	1881.768	.000
Intercept	15528.418	1	15528.418	591954.683	.000
Sample	1135.357	23	49.363	1881.768	.000
Error	1.259	48	.026		
Total	16665.035	72			
Corrected Total	1136.617	71			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 8 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)

Sample	Mean	Std. Deviation	N
Ca H2O add Ro 6m	22.08233	.045960	3
Ca H2O add Ro c4	14.45833	.340484	3
Ca H2O add Ro wt	12.74267	.041041	3
Ca H2O add st 6m	12.78567	.180802	3
Ca H2O add st c4	13.62000	.334830	3
Ca H2O add st wt	15.83067	.020404	3
Ca H2O Ro 6m	20.73600	.091602	3
Ca H2O Ro c4	12.05933	.051791	3
Ca H2O Ro wt	12.69667	.022189	3
Ca H2O st 6m	12.59600	.372641	3
Ca H2O st c4	11.10500	.126361	3
Ca H2O st wt	15.79700	.025515	3
Jam H2O add Ro 6m	20.53900	.211298	3
Jam H2O add Ro c4	12.78600	.040706	3
Jam H2O add Ro wt	12.89200	.069477	3
Jam H2O add st 6m	20.16800	.159765	3
Jam H2O add st c4	12.33767	.099811	3
Jam H2O add st wt	9.13533	.109546	3
Jam H2O Ro 6m	23.04867	.066108	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 8 (ต่อ) แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่ากิจกรรมของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)

Sample	Mean	Std. Deviation	N
Jam H2O Ro c4	11.08800	.132525	3
Jam H2O Ro wt	13.43600	.137851	3
Jam H2O st 6m	19.12567	.119509	3
Jam H2O st c4	12.20100	.138351	3
Jam H2O st wt	9.19200	.156885	3
Total	14.68579	4.001085	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 9 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)

Sample	N	Subset												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Jam H2O add st wt	3	9.13533												
Jam H2O st wt	3	9.19200												
Jam H2O Ro c4	3		11.08800											
Ca H2O st c4	3		11.10500											
Ca H2O Ro c4	3			12.05933										
Jam H2O st c4	3			12.20100										
Jam H2O add st c4	3			12.33767	12.33767									
Ca H2O st 6m	3				12.59600	12.59600								
Ca H2O Ro wt	3					12.69667								

ตารางภาคผนวกที่ ค 9 (ต่อ) แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)

Sample	N	Subset												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Jam H2O add Ro c4	3					12.78600								
Jam H2O add Ro wt	3					12.89200								
Jam H2O Ro wt	3						13.43600							
Ca H2O add st c4	3						13.62000							
Ca H2O add Ro c4	3							14.45833						
Ca H2O st wt	3								15.79700					
Ca H2O add st wt	3								15.83067					
Jam H2O st 6m	3									19.12567				
Jam H2O add st 6m	3										20.16800			

ตารางภาคผนวกที่ ค 9 (ต่อ) แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เชื้อรา *Monascus* sp. SS14 สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย ทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารแข็งชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น)

Sample	N	Subset												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Jam H2O add Ro 6m	3											20.53900		
Ca H2O Ro 6m	3											20.73600		
Ca H2O add Ro 6m	3												22.08233	
Jam H2O Ro 6m	3													23.04867
Sig.		.670	.898	.051	.057	.053	.171	1.000	.800	1.000	1.000	.143	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .026

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

ตารางภาคผนวกที่ ค 10 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์

Sample	Mean	Std. Deviation	N
ca add	11.5700	1.08056	3
ca No ad	9.2200	.77208	3
jam add	9.2100	.66701	3
jam No a	9.6500	.32078	3
Total	9.9125	1.20570	12

ตารางภาคผนวกที่ ค 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	11.368[a]	3	3.789	6.557	.015
Intercept	1179.092	1	1179.092	2040.393	.000
Sample	11.368	3	3.789	6.557	.015
Error	4.623	8	.578		
Total	1195.083	12			
Corrected Total	15.991	11			

a. R Squared = .711 (Adjusted R Squared = .602)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 12 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของการผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) ของเชื้อรา *Monascus* sp. SS14 บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์

Sample	N	Subset	
		1	2
jam add	3	9.2100	
ca No ad	3	9.2200	
jam No a	3	9.6500	
ca add	3		11.5700
Sig.		.515	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .578.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 13 แสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. SS14 เพื่อผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ใช้วัสดุหมักแทนแป้งในอาหารเหลวสูตรต่างๆ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

Sample	Mean	Std. Deviation	N
ca 3%	11.8600	.06083	3
ca MYS	7.4400	.27074	3
ca SS	7.0300	.78000	3
jam 3%	9.1200	.64467	3
jam MYS	7.6900	.31241	3
jam SS	5.8600	.21656	3
Total	8.1667	2.00358	18

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากิจกรรมของการเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. SS14 เพื่อผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ใช้วัสดุหมักแทนแป้งในเหลวสูตรต่างๆ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	65.753[a]	5	13.151	63.351	.000
Intercept	1200.500	1	1200.500	5783.220	.000
Sample	65.753	5	13.151	63.351	.000
Error	2.491	12	.208		
Total	1268.744	18			
Corrected Total	68.244	17			

a. R Squared = .963 (Adjusted R Squared = .948)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค 15 แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของการเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. SS14 เพื่อผลิตเมวาสเตติน (มิลลิกรัมต่อลิตร) ใช้วัสดุหมักแทนแป้งในเหลวสูตรต่างๆ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

Sample	N	Subset			
		1	2	3	4
jam SS	3	5.8600			
ca SS	3		7.0300		
ca MYS	3		7.4400		
jam MYS	3		7.6900		
jam 3%	3			9.1200	
ca 3%	3				11.8600
Sig.		1.000	.117	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .208.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาว ภริตา ทองสุขนอก
วัน เดือน ปีเกิด	3 มกราคม พ.ศ. 2530
ที่อยู่ปัจจุบัน	153/1 หมู่ 2 ตำบล โตนด อำเภอ โนนสูง จังหวัด นครราชสีมา 30160
ประวัติการศึกษา	(พ.ศ. 2552) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 2.76 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	1. ภริตา ทองสุขนอก และ สมชาย ไกรรักษ์. 2557. "การผลิตเวาสเตตินโดยเลี้ยงเชื้อรา Monascus sp. SS14 บนอาหารแข็งในสภาวะนิ่ง และหมุนสลับนิ่ง." หน้า 77-82. ใน **การประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6**. ชลบุรี : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. 2.Thongsuknok P. and Krairak S. 2014. "The production ofcholesterol-lowering agent (mevastatin) by solid-state cultivation of Monascus sp. SS14." 211-214. In **International Bioscience Conference and the 5th International PSU-UNS Bioscience Conference (IBSC2014)**. Phuket : Songkla University.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้