การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็งแบบเติมวัสดุหมัก

THE CULTIVATION OF *MONASCUS* SP. ON SOLID STATE FERMENTATION WITH RAW MATERIAL ADDITION

กนกพร เกตุแก้ว
กฤษณุ สุชดี
ณัฏฐริกา ก้อนมณี

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็งแบบเติมวัสดุหมัก

THE CULTIVATION OF *MONASCUS* SP. ON SOLID STATE FERMENTATION WITH RAW MATERIAL ADDITION

T149046

กนกพร เกตุแก้ว
กฤษณุ สุขดี
ณัฏฐริกา ก้อนมณี

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 149046
วัน,เดือน,ปี 27 ส.ค. 2560

b 12879885
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE CULTIVATION OF *MONASCUS* SP. ON SOLID STATE FERMENTATION WITH RAW MATERIAL ADDITION

KANOKPORN KETKAEW
KRITSANU SUKDEE
NATTHARIKA KONMANEE

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็งแบบเติมวัสดุหมัก

The Cultivation of *Monascus* sp. on Solid State Fermentation with Raw Material Addition

ชื่อนักศึกษา นางสาวกนกพร เกตุแก้ว

นายกฤษณุ สุขดี

นางสาวณัฏฐริกา ก้อนมณี

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2558

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็งแบบเติมวัสดุหมัก

ชื่อนักศึกษา นางสาวกนกพร เกตุแก้ว รหัสนักศึกษา 55051222

นายกฤษณุ สุขดี รหัสนักศึกษา 55051232

นางสาวณัฏฐริกา ก้อนมณี รหัสนักศึกษา 55051273

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์ U6V1 บนอาหารแข็งด้วยวัสดุหมักข้าวเสาไห้ ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง ให้การผลิตสาร Monacolin K (0.5103 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง) มากกว่าการเลี้ยงเชื้อในสภาวะหยุดนิ่ง (0.4371 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง) จึงนำมาศึกษาผลของขนาดภาชนะเลี้ยงเชื้อ (ขนาด 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร, ตามลำดับ) ต่อการผลิตเมวาสเตติน ซึ่งพบว่าการเลี้ยงในสภาวะหมุนสลับนิ่งด้วยขวดขนาด 500 มิลลิลิตร ให้การผลิตโมนาโคลินสูงที่สุด (0.5103 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง) ในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นจึงศึกษาผลของปริมาณวัสดุหมักข้าว (500 กรัม) ในภาชนะเลี้ยงเชื้อ และการเติมวัสดุหมักข้าวในระหว่างการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารโมนาโคลิน พบว่าการเติมวัสดุหมักแบบปริมาณสัปดาห์ละ 150 กรัม เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ให้ผลการผลิตโมนาโคลินสูงสุด (0.5727 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สุดท้ายจึงทดสอบการเลี้ยงเชื้อในภาชนะขนาด 1000 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่อัตราการหมุนสลับนิ่งแตกต่างกัน พบว่าการเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ที่สัดส่วนการหมุนต่อหยุดนิ่งเป็น 1 : 3 ให้การผลิตสาร Monacolin K สูงสุด (0.2746 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง) ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 เมื่อวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจากปริมาณ N-acetyl glucosamine พบว่าเชื้อราให้การเจริญสูงสุดตั้งแต่สัปดาห์แรกของการเลี้ยงเชื้อ และไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงไปจนสิ้นสุดการเจริญ

คำสำคัญ : ข้าวเสาไห้ สภาวะหมุนสลับนิ่ง Monacolin K

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The Cultivation of *Monascus* sp. on Solid State Fermentation with Raw Material Addition
Students	Miss Kanokporn Ketkaew ID 55051222 Mr. Kritsanu Sukdee ID 55051232 Miss Nattharika Konmanee ID 55051273
Degree	Bachelor of Science
Major program	Industrial Microbiology
Academic Year	2015
Advisor	Asst.Prof.Dr.Somchai Krairak

Abstract

The *Monascus* sp.U6V1 was cultivated for Monacolin K production by solid state fermentation (SSF) on Sao Hai Rice as raw material. It was found that the Monacolin K production by SSF with rotating state and static state condition gave higher than one with static condition at 0.5103 mg/g-DSW and 0.4371 mg/g-DSW, respectively. Then, the effect of container volume on Monacolin K production was observed at 200 250 500 and 1000 ml, respectively. The results showed that the 500-ml bottle container presented the maximum Monacolin K production (0.5103 mg/g-DSW) within 3 weeks of cultivation. Furthermore, the final volume (500 g) and various amount of raw material additional were performed. It was concluded that 3 times of 150-g interval addition per week gave the maximal Monacolin production (0.5727 mg/g-DSW) for 4 weeks of cultivation. Finally, the SSF was observed in 1000-ml, 2000-ml and 5000-ml bottle container with various ratio of rotating state and static state culture condition. The results showed that the cultivation of SSF with 2000-ml bottle with 1:3 ratio of rotating state and static state condition indicated the maximal amount of Monacolin K (0.2746 mg/g-DSW) at 2-week cultivation. Moreover, the fungus growth was analyzed by N-acetyl glucosamine examination, it was noted that maximal growth was found at the first week of cultivation and almost stable until the end of cultivation.

Keywords : Sao Hai Rice, Rotating and static condition, Monacolin K

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยโครงงานพิเศษนี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานพิเศษนี้ตลอดจนให้ความรู้ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงงานพิเศษนี้

ขอกราบของพระคุณ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี กรรมการโครงงานพิเศษ ผู้ตรวจสอบและให้ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทำโครงงานพิเศษนี้

ท้ายนี้ ขอกราบขอบคุณพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดูอบรมและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา จนทำให้ผู้ศึกษาประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

กนกพร เกตุแก้ว

กฤษณุ สุขดี

ณัฏฐริกา ก้อนมณี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎี และหลักการ	
2.1 ข้าว	3
2.1.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว	3
2.1.2 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของข้าว	4
2.2 ประวัติความเป็นมาของข้าวแดง	6
2.3 เชื้อรา *Monascus*	7
2.3.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อรา *Monascus*	7
2.3.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา และการสืบพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus*	8
2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างสาร Monacolin และคอเลสเตอรอล	9
2.4.1 คุณสมบัติสาร Monacolin	9
2.4.2 ประวัติการศึกษาสาร Monacolin	10
2.4.3 การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา	11
2.4.4 กระบวนการสังเคราะห์สาร Monacolin	12
2.4.5 กลไกการทำงานของสาร Monacolin	12
2.4.6 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา	12
2.4.7 กลไกการออกฤทธิ์	13
2.4.8 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน	14
2.4.9 ขนาดยาและการจัดเตรียมยา	15
2.4.10 ประโยชน์ในการรักษา	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์สารสีและ Monacolin K ของเชื้อรา *Monascus* ในข้าวแดง 16
2.5 คุณสมบัติ และโครงสร้างของสารสีจากเชื้อรา *Monascus* 21
2.5.1 สารสีของ *Monascus* 21
2.5.2 กลไกการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* 21
2.6 ซิตรินิน (Citrinin) 23
2.6.1 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน 23
2.6.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus* 24
2.7 สภาวะการเลี้ยงเชื้อ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ 27
2.7.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง 27
2.7.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว 28
2.8 การเลี้ยงเชื้อ (Fermentation) 29
2.8.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 29
2.8.2 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง 29
2.8.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมักบนอาหารแข็ง 30
2.8.4 การเติมอากาศ 33
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 33
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 35
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 35
3.3 อุปกรณ์ 35
3.4 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Inoculum) 35
3.5 การเตรียมวัสดุหมัก (ข้าวเสาไห้) 35
3.6 วิธีการทดลอง 36
3.6.1 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อผลิตสาร Monacolin K ในสภาวะและปริมาตรขวดที่แตกต่างกัน 36
3.6.2 ศึกษาหาปริมาณการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เพื่อการผลิตสาร Monacolin K 37
3.6.3 ศึกษาการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่อัตราการหมุนแตกต่างกัน 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.7 การวิเคราะห์ผล	40
3.7.1 การหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างวัตถุดิบ	40
3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	40
3.7.5 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน	41
บทที่ 4 ผลการวิจัย และอภิปรายผล	
4.1 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 เพื่อผลิตสาร Monacolin K ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่งและสภาวะหยุดนิ่งในขวดอาหารที่มีปริมาตรที่แตกต่างกัน	42
4.2 ศึกษาหาปริมาณการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตรเพื่อการผลิตสาร Monacolin K	47
4.3 ศึกษาการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่อัตราการหมุนแตกต่างกัน	54
4.3.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในขวดอาหารปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง	54
4.3.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในขวดอาหารปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที	57
บทที่ 5 สรุปผลวิจัย และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	62
5.2 ข้อเสนอแนะ	63
บรรณานุกรม	64
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร	72
ภาคผนวก ข สารเคมี และวิธีวิเคราะห์ทางเคมี	73
ภาคผนวก ค รูปแสดงการทดลอง	79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ค่าทางเภสัชพลศาสตร์ของยาในกลุ่มสแตติน	14
3.1 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ ขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหยุดนิ่ง	36
3.2 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะอัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)	37
3.3 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะอัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)	38
3.4 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะอัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)	38
3.5 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร อัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)	39
3.6 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร อัตราการหมุนสลับนิ่ง (30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที)	40
4.1 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงสภาวะหยุดนิ่งและสภาวะหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง	43
4.2 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะอัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)	49
4.3 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะอัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)	49
4.4 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง โดยการเติมวัสดุหมักปริมาตรที่แตกต่างกัน	50
4.5 แสดงปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) กับปริมาณกลูโคซามีน (mg/g-DSW) จากการศึกษาปริมาณการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เพื่อการผลิตสาร Monacolin K ที่ให้ผลผลิตที่สูง	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.6 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) โดยการเติมข้าวเสาไห้ปริมาณที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ในขวดอาหารขนาด 2000 มิลลิลิตร และ 5000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง 55

4.7 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) โดยการเติมข้าวเสาไห้ปริมาณที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที 58

4.8 แสดงปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) กับปริมาณกลูโคซามีน (mg/g-DSW) จากเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในขวดอาหารปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง และในขวดอาหาร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว	4
2.2 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp.	9
2.3 โครงสร้างทางเคมีของ Lovastatin	10
2.4 โครงสร้างของสารโลวาสแตติน (A) และ สารคอมแพคติน (B)	11
2.5 กลไกการสังเคราะห์สารสีส้ม	22
2.6 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน เมื่อ C-1 (▲) , C-3 (□), C-9 (*) และ C-4 (●)	24
4.1 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในสภาวะหยุดนิ่ง	44
4.2 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง	45
4.3 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่มีการเติมข้าวเสาไห้และน้ำในปริมาณที่แตกต่างกัน ในขวดอาหารปริมาตร 1000 มิลลิลิตร	52
4.4 กราฟแสดงปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) และปริมาณกลูโคซามีน (mg/g-DSW) ของเชื้อรา *M. purpureus* U6V1 ที่สภาวะการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เพื่อการผลิตสาร Monacolin K	53
4.5 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 โดยการเติมข้าวเสาไห้ปริมาณที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดอาหารขนาด 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง	56
4.6 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 โดยการเติมข้าวเสาไห้ปริมาณที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที	59
4.7 กราฟแสดงปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) กับปริมาณกลูโคซามีน (mg/g-DSW) โดยที่ (ก) ขวดอาหารปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง และ (ข) ขวดอาหาร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที	61
4.8 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)	75
4.9 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสารเมวาสแตติน (mg/ml)	76
4.10 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น N-acetyl glucosamine (μg/ml)	78
4.11 กราฟน้ำหนักเส้นใย (กรัม) ต่อปริมาณ N-acetyl glucosamine (กรัม)	78
4.12 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 อายุ 14 วัน บนอาหาร MYS	79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.13 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 อายุ 3 วัน บนอาหาร SS	79
4.14 ก. การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในสภาวะหยุดนิ่ง ข. การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง	80
4.15 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดปริมาตร 1000 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ในแต่ละสัปดาห์	81
4.16 ก. แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเมล็ดข้าวเสาไห้ ข. ภาพตัดขว้างของเมล็ดข้าวเสาไห้ที่มีเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1	82
4.17 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเครื่องหมุน	83
4.18 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 โดยการวางไว้ในสภาวะหยุดนิ่ง	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ในปัจจุบันนั้นประเทศไทยได้ถูกจัดอันดับให้เป็นประเทศที่มีการส่งออกข้าวปริมาณมากเป็นอันดับ 1 ของโลก (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2558) แต่ในทางกลับกันการส่งออกผลิตภัณฑ์ข้าวนั้นกลับมีเพียงเล็กน้อย (งามชื่น, 2543) ซึ่งผลิตภัณฑ์ข้าวที่ไทยมีการส่งออกนั้นได้แก่ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว และผลิตภัณฑ์เส้นต่างๆ เช่น เส้นหมี่และเส้นก๋วยเตี๋ยว ถึงแม้ว่าปริมาณการส่งออกผลิตภัณฑ์ข้าวที่จะมีเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณการส่งออกข้าว แต่เมื่อคำนวณเป็นราคาต่อตัน พบว่าผลิตภัณฑ์ข้าวมีราคาที่สูงกว่าข้าวอย่างเด่นชัด โดยมีราคา 22,000 บาท/ตัน ในขณะที่ข้าวไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปมีราคาเพียง 13,500 บาท/ตัน (กรมการค้าภายในกระทรวงพาณิชย์, 2558) แม้ในกลุ่มข้าวคุณภาพก็ยังคงมีราคาที่ต่ำกว่าราคาผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการเพิ่มมูลค่าของข้าวโดยอาศัยการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากข้าวจึงเป็นปัญหาเร่งด่วน และจำเป็นต้องได้รับการพัฒนาต่อยอด เพื่อสร้างเทคโนโลยีของเราเองอย่างยั่งยืน ซึ่งการแปรรูปข้าวไปเป็นข้าวแดงนอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรแล้ว ยังสามารถปรับปรุงคุณภาพชีวิตที่เกี่ยวกับโรคหัวใจ และโรคความดันโลหิต เนื่องจากข้าวแดงมีสารออกฤทธิ์บางประการ

ข้าวแดง (Red yeast rice) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักข้าวด้วยรา *Monascus* sp. (Rosenblitt และคณะ, 2000) โดยมีการบริโภคมานับพันปีในเขตแถบทวีปเอเชีย เช่น ประเทศจีน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย และฟิลลิปินส์ เป็นต้น ประโยชน์ของข้าวแดงนั้นมีหลายประการด้วยกัน ซึ่งในอดีตนิยมใช้ข้าวแดงเป็นวัตถุปรุงแต่งสีและกลิ่นรสในอาหาร เช่น เนื้อ ปลา ไวน์ข้าวแดง เต้าหู้จีน และใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาของอาหาร เป็นต้น (Erdogral และ Azirak, 2004) นอกจากนี้ข้าวแดงยังสามารถใช้ประโยชน์เพื่อเป็นยาพื้นบ้าน เช่น บำรุงไหลเวียนโลหิต ช่วยลดอาการอาหารไม่ย่อย ท้องอืดหรือมีลมในกระเพาะ และกล้ามเนื้อฟกช้ำ เป็นต้น (Wild และคณะ, 2002) ปัจจุบันมีการผลิตข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรม เพื่อเป็นสีผสมอาหารจากธรรมชาติ ซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้สีแดงจากสีสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมอาหารและใช้สำหรับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง นอกจากนี้ในหลายๆประเทศได้แปรรูปข้าวแดงเป็นอาหารเสริม โดยมีคุณสมบัติช่วยลดคอเลสเตอรอลและช่วยป้องกันโรคหัวใจ เป็นต้น เนื่องจากข้าวแดงประกอบไปด้วยสาร Monacolin K ทั้งนี้ประเทศที่เป็นผู้ผลิตข้าวแดงรายใหญ่คือ จีน และญี่ปุ่น ตัวอย่างเช่นบริษัท Nanjing Tianshu Food Ingredients Supermarket Co., Ltd ของประเทศจีนนั้นสามารถผลิตข้าวแดงได้สูงถึงปีละ 50 ตัน อีกทั้งการบริโภคสีจาก *Monascus* ในประเทศญี่ปุ่นพบว่า ปี ค.ศ. 1981 มีการบริโภคสารสีของ *Monascus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นจำนวน 100 ตัน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยปี ค.ศ. 1992 มีการบริโภคเพิ่มขึ้นถึง 600 ตัน คิดเป็นเงินมูลค่าประมาณ 12 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ (Carvalho และคณะ, 2003)

ข้าวแดงที่ใช้บริโภคในประเทศไทย ส่วนมากได้มาจากการนำเข้าจากประเทศจีน และญี่ปุ่น โดยมีราคาสูงถึงกิโลกรมละ 300-400 บาท ในรูปของอาหารเสริมในรูปของแคปซูล และสารให้สี (สุรัตน์, 2551) ขึ้นอยู่กับคุณภาพมีบางส่วนที่ผลิตได้เองภายในประเทศ โดยสาเหตุที่กระบวนการหมักข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก เนื่องจากยังขาดความรู้ความเข้าใจพื้นฐานของกระบวนการหมักข้าวแดง อีกทั้งยังขาดความเข้าใจถึงกลไกการเจริญ และการสังเคราะห์สารสีของเชื้อรา *Monascus* ทำให้ข้าวแดงที่ผลิตได้นั้นมีปริมาณ Monacolin K ต่ำ และพบว่าการผลิตข้าวแดงมีปัญหาสำคัญคือ มีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรา *Monascus* คือ ซิตรินิน (Citrinin) ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อการทำลายระบบไต (Blanc และคณะ, 1995) นอกจากข้าวแดงซึ่งเป็นข้าวที่หมักด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. นี้แล้วยังมีการใช้พืชผลทางการเกษตรชนิดอื่นเป็นวัสดุหมักอีกด้วย เช่น ลูกเดือย (Pattanagul และคณะ, 2008) กลอย (Ritmungkrin, 2004) และมันฝรั่ง (Yongsmith และ Tabloka, 1985) จากเหตุผลดังกล่าวจึงเป็นแนวคิดที่จะนำเชื้อรา *Monascus* sp. มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญบนอาหารแข็งโดยการเติมวัสดุหมัก เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าข้าวไทยและยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพต่อการผลิตสาร Monacolin K ในข้าวแดงให้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นด้วยนั่นเอง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการสร้างสาร Monacolin K ของเชื้อรา *Monascus* sp.

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. โดยการเติมวัสดุหมัก

1.2.3 เพื่อศึกษาอัตราส่วนในการเติมวัสดุหมักกับขวดอาหารที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในการผลิตสาร Monacolin K

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการเจริญ การสร้างสารสี และการสร้างสาร Monacolin K บนอาหารแข็งโดยการเติมวัสดุหมัก ในสภาวะที่เมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp.

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถปรับปรุงและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรที่ราคาถูกให้มีมูลค่าที่สูงขึ้นได้

1.4.2 การนำผลิตภัณฑ์ที่ผลิตมาใช้ประโยชน์ เช่น ทางการแพทย์ หรืออุตสาหกรรมยา

1.4.3 สามารถพัฒนาศักยภาพของการนำเชื้อรา *Monascus* sp. ไปใช้ผลิตสารที่มีประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะประเทศในแถบภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารหลักมากกว่าในภูมิภาคอื่นๆ ของโลก การผลิต การบริโภค และการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงอยู่ในทวีปเอเชีย ซึ่งข้าวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภคภายในประเทศ สำหรับประเทศไทยนั้นข้าวถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยเป็นทั้งอาหารหลักและแหล่งที่มาของเงินตราต่างประเทศ ประเทศไทยมีการปลูกข้าวเป็นอันดับที่ 6 และส่งออกข้าวเป็นอันดับ 1 ของโลก (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2558) โดยในปี พ.ศ. 2558 ปริมาณการส่งออกข้าวของไทยประมาณ 1.34 ล้านตัน (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2558) โดยประเทศที่มีบทบาทในการส่งออกข้าวรองจากประเทศไทยได้แก่ เวียดนาม สหรัฐอเมริกา ปากีสถาน อินเดีย และกัมพูชา ตามลำดับ คิดเป็นมูลค่าการส่งออกในปี พ.ศ. 2558 ประมาณ 703 ล้านเหรียญสหรัฐฯ (22,854 ล้านบาท) ราคาส่งออกเฉลี่ยตันละ 525 เหรียญสหรัฐฯ (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2558)

2.1.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

ข้าวเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้าที่สามารถกินเมล็ดได้ ถือเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกับหญ้า ต้นข้าวมีลักษณะภายนอกบางอย่าง เช่น กาบใบ ลำต้น และรากคล้ายต้นหญ้า เมล็ดข้าว (Rice grain) เป็นผลผลิตชนิด Caryopsis เนื่องจากส่วนที่เป็นเมล็ดเดี่ยว (Single seed) ติดแน่นอยู่กับผนังของรังไข่หรือเยื่อหุ้มผล (Pericarp) ดังรูปที่ 2.1 เมล็ดข้าวประกอบด้วยส่วนใหญ่ๆ 2 ส่วน คือ

ก) ส่วนที่ห่อหุ้ม เรียกกว่า แกลบ (Hull)

ข) ส่วนที่รับประทานได้ เรียกว่า ข้าวกล้อง (Brown rice)

ข้าวกล้องหรือเมล็ดข้าวที่เอาเปลือกออกแล้ว ประกอบด้วย

- เยื่อหุ้มผล (Pericarp หรือ Fruit coat) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้นด้วยกัน คือ Epicarp, Mesocarp และ Endocarp

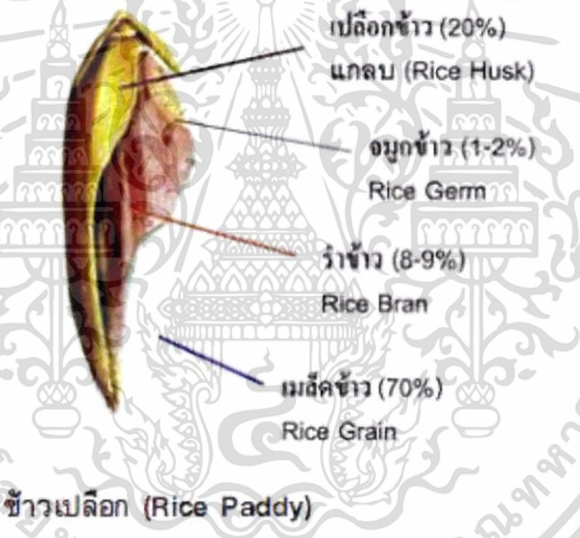
- เยื่อหุ้มเมล็ด (Tegmen หรือ Seed coat) อยู่ถัดจาก Pericarp เข้าไป ประกอบด้วยเนื้อเยื่อสองชั้นเรียงกันเป็นแถวเป็นที่อยู่สารประเภทไขมัน

- เยื่ออาลูโรน (Aleurone) อยู่ต่อจากเยื่อหุ้มเมล็ดห่อหุ้ม ข้าวสาร (Starchy endosperm) และคัพภะ (Embryo) เยื่ออาลูโรนมีโปรตีนสูง นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วย น้ำมัน และเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ส่วนที่เป็นแป้ง (Starch endosperm) หรือส่วนที่เป็นข้าวสาร อยู่ชั้นในสุดของเมล็ด ประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่ และมีโปรตีนอยู่บ้าง แป้งในเมล็ดข้าวมี 2 ชนิด คือ อะไมโลเพคติน (Amylopectin) และ อะไมโลส (Amylose) ส่วนประกอบของแป้งทั้ง 2 ชนิด มีสัดส่วนแตกต่างกันไปตามชนิดข้าว ในข้าวเหนียวจะมีอะไมโลสอยู่ประมาณ 0-2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นอะไมโลเพคติน ข้าวเจ้ามีอะไมโลสมากกว่า คือ ประมาณ 7-33 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักข้าวสาร

- คัพภะ (Embryo) อยู่ติดกับเอ็นโดสเปิร์ม (Endoperm) ทางด้าน lemma เป็นส่วนที่จะเจริญเป็นต้นต่อไป คัพภะประกอบด้วย ต้นอ่อน (Plumule) รากอ่อน (Radicle) เยื่อหุ้มต้นอ่อน (Coleoptile) เยื่อหุ้มรากอ่อน (Coleorhiza) ท่อน้ำท่ออาหาร (Epiblast) และใบเลี้ยง (Scutellum) คัพภะเป็นส่วนที่มีโปรตีนและไขมันสูง



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว
ที่มา : สำนักวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าว, 2559

2.1.2 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของข้าว

ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ห่อหุ้ม เมล็ดและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในเมล็ด

<u>คุณสมบัติทางเคมี</u> สามารถจำแนกได้ดังนี้

- ระยะการฟักตัวของข้าว (Domancy period) เป็นระยะที่ข้าวไม่เกิดการงอก เมื่อนำไปเพาะชำ ระยะนี้มีเวลา 3-6 สัปดาห์หลังการเก็บเกี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- คุณภาพการหุงต้ม (Cooking) และการบริโภค (Eating qualities) ระยะเวลาหุงต้ม และการขยายตัวของข้าวสุก ขึ้นอยู่กับปริมาณหรืออัตราส่วนของอะไมโลส ข้าวที่มีปริมาณของ อะไมโลสต่ำ เมื่อหุงสุกแล้วทิ้งไว้ให้เย็นจะไม่แข็งมากเหมือนข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูง

- ความแก่ของข้าว (Aging) เมื่อนำข้าวเก่าเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลาประมาณ 3 เดือน ที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพทั้งด้านการหุงต้ม และการขัดสี ข้าวเก่าจะมีการพองตัวและดูดซึมน้ำในขณะหุงต้มมากขึ้น มีลักษณะร่วนไม่ติดกันและมีความต้านทานต่อการแตกหักในขณะขัดสีได้สูงกว่าข้าวใหม่

<u>คุณสมบัติทางกายภาพของข้าว</u> เป็นคุณสมบัติที่สามารถมองเห็นได้หรือชั่งตวงวัดได้ ซึ่งสามารถจำแนกได้ดังนี้

- สีของเปลือกข้าว (Husk color) เมื่อข้าวสุก สีของเปลือกจะเป็นสีเหลืองทอง น้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม สีเปลือกของข้าวในประเทศไทย จะมี 2 สี คือ สีฟาง และน้ำตาล

- สีของข้าวกล้อง (Pericarp color) สีของเม็ดข้าวกล้องจะแสดงออกที่เยื่อหุ้มผล มีสีต่างๆกัน ตั้งแต่ ขาว แดง น้ำตาลเข้ม น้ำตาลเทา ถ้าสีดังกล่าวมีความเข้มจะต้องใช้เวลาในการขัดสีนานและใช้แรงกดสูงเพื่อทำให้ชั้นของรำหลุดออกเป็นผลทำให้ข้าวเกิดการแตกหักได้

- น้ำหนักเมล็ด (Grain weight) น้ำหนักของเมล็ดจะแปรไปตามขนาด และรูปร่างของเมล็ด ความชื้น ชนิดของดิน การใส่ปุ๋ย และสภาพภูมิอากาศ

- น้ำหนักจำเพาะ (Specific weight) เป็นน้ำหนักของเมล็ดต่อหน่วยปริมาตร ขึ้นอยู่กับชนิดของเมล็ดพันธุ์ ความชื้น สิ่งเจือปน

- ขนาดรูปร่างของเมล็ด (Grain dimension) จะแตกต่างไปตามสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และวิธีการเพาะปลูก รูปร่างของเมล็ดเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าว ได้แก่ ความยาว ความกว้าง ความหนา เมล็ดข้าวสามารถจำแนกตามความยาวของเมล็ดได้ 4 ขนาด คือ เมล็ดยาวมาก (มากกว่า 7.50 มิลลิเมตร) เมล็ดยาว (6.61-7.50 มิลลิเมตร) เมล็ดยาวปานกลาง (5.50-6.60 มิลลิเมตร) และเมล็ดสั้น (5.50 มิลลิเมตร) รูปร่างของเมล็ดจะประเมินจากอัตราส่วนความยาวกับความกว้าง ซึ่งแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ เมล็ดเรียว (มีอัตราส่วนความยาวกับความกว้างมากกว่า 3) เมล็ดปานกลาง (มีอัตราส่วนระหว่าง 2.1-3) และเมล็ดป้อม (มีอัตราส่วนน้อยกว่า 2) ส่วนความยาวของเมล็ดข้าวจะเป็นความยาวที่วัดจากเมล็ดข้าวกล้อง

- ลักษณะท้องไข่ (Chalkiness) เป็นลักษณะที่ไม่ต้องการทำให้ข้าวดูไม่สวยงาม และมีคุณภาพในการสีต่ำ สีแล้วหักมาก ท้องไข่ในเมล็ด หมายถึง จุดขาวขุ่นคล้ายชอล์ก เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อชั้นแป้งของเมล็ดแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

1) ท้องไข่ที่เกิดขึ้นตรงกลางของชั้นแป้ง

2) ท้องไข่ที่เกิดขึ้นด้านข้าง หรือด้านท้องของเมล็ดด้านเดียวกับเยื่อเจริญ

3) ท้องไข่ที่เกิดขึ้นด้านหลังของเมล็ด ด้านตรงข้างกับเยื่อเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ลักษณะการดูด/คายความร้อน (Hygroscopic) เมล็ดข้าวส่วนใหญ่ประกอบด้วยแป้งและโปรตีนซึ่งเป็นสารที่ดูดความชื้นได้ดี ทำให้เมล็ดข้าวมีการขยายตัว และมีการหดตัวเมื่อเอาความชื้นออก

- มุมชั้นของกองข้าว (Angle of repose) เมื่อเทข้าวให้รวมเป็นกองบนพื้นราบ เมล็ดจะกองเป็นรูปกรวยคว่ำอยู่บนพื้น มุมชั้นระหว่างพื้นราบที่ทำกับผิวของกรวยคือมุมชันของกองเมล็ด ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเรียบที่ผิวของเมล็ด

- มุมเสียดทานหรือมุมไหลของเมล็ด (Angle of friction) เป็นมุมชันที่เมล็ดชั้นบางเริ่มไหลลงจากภาชนะ โดยปกติมุมเสียดทานของเมล็ดพืชหาได้โดยเอาเมล็ดกองเป็นชั้นบางๆ บนแผ่นโลหะที่มีความยาวพอสมควร จากนั้นยกปลายอีกด้านหนึ่งให้ทำมุมกับพื้นระนาบ จนกระทั่งเมล็ดเริ่มไหลลงด้านล่างด้วยแรงดึงดูดของโลก

2.2 ประวัติความเป็นมาของข้าวแดง

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์สารสีที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* บนข้าวนึ่ง ที่รู้จักกันมาช้านานในประเทศแถบตะวันออก เช่น ประเทศจีน ประเทศแถบเอเชียใต้ ไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น (Johns และ Stuart, 1991) โดยกำเนิดของข้าวแดงมาจากประเทศจีนเชื่อว่าในตำบลหนึ่งมีดินเป็นสีแดง และเมื่อใช้ดินนี้พอกข้าวนึ่งไว้ในระยะเวลาหนึ่งจะทำให้ข้าวนึ่งเป็นสีแดง

ในสมัยราชวงศ์ถัง (800 AD) ได้ใช้ข้าวแดงมาเป็นสารเติมแต่งสี และรสชาติในปลา และเนื้อ สมัยราชวงศ์หมิงค์ (1368-1644) ได้มีการนำข้าวแดงมาใช้เพื่อปรุงยาจีนโบราณซึ่งได้มีการบันทึกไว้ในตำรายาชื่อ Ben Cao Gang Mu-Dan Shi Bu Yi ข้าวแดงจะออกฤทธิ์ช่วยทำให้ระบบหมุนเวียนโลหิตในร่างกายดีขึ้น (Smith และ Olive , 2003)

ในประเทศแถบตะวันออก มีการใช้เชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหาร และเครื่องยาพื้นบ้านมานาน มีการให้ชื่อสกุล *Monascus* มานานกว่าร้อยปีในยุโรป และอินโดนีเซีย แต่สำหรับชาวตะวันตก สปีชีส์ต่างๆ ของเชื้อรา *Monascus* เป็นที่รู้จักในฐานะเชื้อราปะปนในธัญพืชแป้ง ไซเลส และสารอื่นๆ เชื้อรานี้สามารถเจริญบนข้าวนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสมโดยย่อยข้าวจนนุ่ม และขณะเดียวกันก็สร้างสีแดงเข้มขึ้น ข้าวแดงที่มีชื่อเรียกต่างๆกัน เช่น ข้าวแดง (Red rice), ข้าวแดงจากจีน (Chinese red rice), อังคัก (Ang-kak), แอนแคก (Ankak), อังคเวค (Angquac), เบนนิ-โคจิ (Beni-koji) และอกา-โคจิ (Aka - koji)

ในปี 1920 Church รายงานว่าการผลิตข้าวแดงมีกันมานานแล้วในสาธารณรัฐประชาชนจีน และได้ทดลองแยกเชื้อที่ได้จากประเทศจีนจนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่ให้สีแดง คือ *Monascus pupurescens* มีชื่อเดิมคือ *Monascus purpureus* (Alexopolous และคณะ, 1996) ต่อมา (Palo และคณะ, 1960) นักวิทยาศาสตร์ชาวฟิลิปปินส์ได้ทดลองใช้เชื้อข้าวแดงนี้ทำข้าวแดงจนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอควร สามารถนำข้าวแดงมาใช้เจือสีอาหารได้โดยตรง (Su และ Wong,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1983) ภายหลังได้มีการสนใจที่จะศึกษาสายพันธุ์เชื้อราที่เหมาะสมสำหรับใช้การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (Submerged culture) ซึ่งเริ่มโดย Lin (1973) ต่อมาก็มีผู้ประสบความสำเร็จในการศึกษาการผลิตสีในอาหารเหลว (Shephered และ Carels, 1983; Yoshimura และคณะ, 1975; บุษบา และวรรณภา, 2527)

ประเทศจีนได้มีการศึกษาการบริโภคข้าวแดงในคนและสัตว์ พบว่าการบริโภคข้าวแดงในปริมาณ 14-55 กรัมต่อคนต่อวัน สามารลดความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลได้ 11-32 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของ Triacylglycerol ได้ 12-19 เปอร์เซ็นต์ (Heber และคณะ, 1999) ในปี 1979 Endo ได้แยกสาร Monacolin K ที่ผลิตได้จาก *Monascus* sp. สารดังกล่าวมีจุดหลอมเหลวที่ 157-159 องศาเซลเซียส มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{36}O_5$ (น้ำหนักโมเลกุล 404) มีค่า LD_{50} ในหนูเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรมน้ำหนักตัว ฤทธิ์ของสาร Monacolin K จะเป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ HMG-CoA reductase (3-Hydroxy -3-Methyglutarly Coenzyme A) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในตับและเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย

2.3 เชื้อรา *Monascus*

2.3.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อรา *Monascus*

เชื้อรา *Monascus* สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (Alexopoulos และ Mims, 1979)

Class Ascomycetes
Subclass Plectomycetidae
Order Eurtials
Genus *Monascus*

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

ในปี 1920 Church รายงานถึงการทดลองแยกสายพันธุ์ที่ได้จากข้าวแดงของประเทศจีน จนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่สร้างสารสีแดงคือ *M. purpureus* ต่อมา Palo และคณะ (1960) ได้ทดลองใช้เชื้อรา *Monascus* สายพันธุ์ผลิตข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอสมควร และสามารถนำข้าวแดงมาใช้เป็นสีผสมอาหารได้โดยตรง ภายหลังจึงมุ่งความสนใจไปที่การผลิตสารต่างๆ โดยการเจริญในอาหารเหลว (Submerged cultivation) (Lin, 1973) ทำให้มีรายงานการผลิตสีในอาหารเหลวต่างๆ เป็นจำนวนมาก (Shephered และ Carels, 1983; Yoshimaru และคณะ, 1975;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee และคณะ, 1995) เชื้อรา *Monascus* นอกจากสร้างสารสีแล้ว ยังสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิดสาร Monascidin A จากเชื้อรา *M. purpureus* (Wong และ Bau, 1977) มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร ได้แก่ *Bacillus* sp. *Streptococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ เอทานอล สาร Monacolin (ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และสารช่วยในการตกตะกอน) (Flocculants) อีกด้วย (Fink-Gemmels และ Leistner, 1989)

2.3.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา และการสืบพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* (บุษบา, 2540)

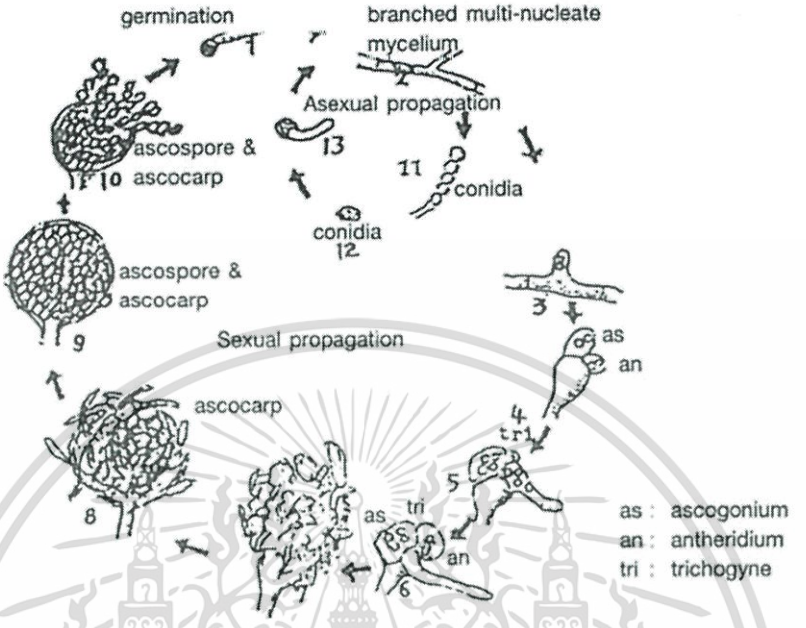
เชื้อรา *Monascus* sp. เคยจัดอยู่ใน Family Aspergillaceae Order Plctascales แต่ปัจจุบันอยู่ใน Family Monascaceae Class Ascomycetes Subclass Plectomcetidae Order Eurotiales เส้นใยมีผนังกั้น มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย และมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือม่วง

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้างโคนิเดีย (Conidia) ที่พัฒนามาจากโคนิดิโอฟอร์ (Conidiophore) จะสร้างโคนิเดีย รูปร่างกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือหลายโคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่อยู่ที่ปลายเส้นใย โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจจะมีสีแดงหรือสีน้ำตาลอ่อน (Ainswarth และคณะ, 1973 ; Hawksworth และ Pitt, 1983) โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้น (Septate) หรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ ถ้ามีขนาดยาวจะมีผนังกั้น 2-6 อัน เป็นสายตรงหรือขดเป็นเกลียว และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออายุมากขึ้น การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร เช่น C medium เหมาะสมสำหรับการเกิดโคนิเดียของ *Monascus* นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีกหลายๆ ประการ เช่น อายุสปอร์ ความแน่นของสปอร์ ระดับ pH ความเข้มแสงและอุณหภูมิ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35 องศาเซลเซียส มักพบการงอกของโคนิเดียภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อได้รับความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม จึงแทงปลายเส้นใยออกจากสปอร์ (Germ tube) ขึ้นมา 1 เส้น หรือ 2 เส้น หรือบางครั้งอาจมีมากถึง 6 เส้น (Wong และ Bau, 1978)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Monascus* คล้ายๆกับเชื้อราอื่นใน Class Ascomycetes มีการสร้างเพอริทีเชียม (Perithecium) หรือคลิสโททีเชียม (Cleisothecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (Ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้าน (Stalk) (Von Arx, 1974) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (Homothallic) โดยการสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิด คือ แอนเทอริเดียม (Antheridium) และแอสโคโกเนียม (Ascogonium) เกิดการหลอมรวมกัน (Fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วจึงจะมีการขยายผนังเซลล์รวมออกและพัฒนาไปเป็นแอสโคคาร์ปขึ้นในที่สุด ซึ่งภายใน แอสโคคาร์ปมีแอสโคสปอร์ (Ascospores) มากมาย โดยพบ 2-8 แอสโคสปอร์ จะบรรจุรวมอยู่ภายในแอสคัส (Ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออก ก็จะปล่อยแอสโคสปอร์งอกออกมาจากนั้นจึงเริ่มต้นการเจริญใหม่ต่อไป ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp.

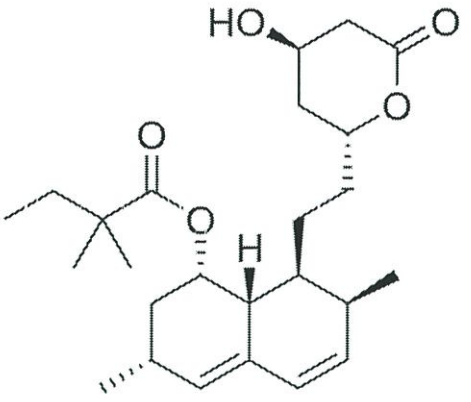
ที่มา : บุษบา, 2542

2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างสาร Monacolin และคอเลสเตอรอล (Alberts และคณะ, 1998)

2.4.1 คุณสมบัติสาร Monacolin

Monacolin หรือที่รู้จักทางการค้าว่า Lovastatin ระบบการเรียกชื่อ (IUPAC) [8-[2-(4-hydroxy-6-oxo-oxan-2-yl)ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]-2-methylbutanoate มวลโมเลกุล 404.54 กรัมต่อโมล ดังรูปที่ 2.3 นำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางยาดังนี้ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ การจับโปรตีนในกระแสเลือด (Binding protein) มีมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ กระบวนการเมแทบอลิซึม ยาออกฤทธิ์ต่อตับ (CYP3A substrate) ส่วนครึ่งชีวิต (Half life) เท่ากับ 1.1-1.7 ชั่วโมง เมื่อรับประทานยาไม่มีผลกระทบ (Negligible) ต่อการขับถ่าย (Excretion) ซึ่งตรวจพบเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ในปัสสาวะ และ 83 เปอร์เซ็นต์ ในอุจจาระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของ Lovastatin
ที่มา : Dhale และคณะ, 2007

2.4.2 ประวัติการศึกษาสาร Monacolin

โมนาโคลินที่สกัดแยกได้จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* และจัดเป็นสแตตินตัวแรกที่ได้รับอนุญาตโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration หรือ FDA) และเป็นผลผลิตทางธรรมชาติที่ได้รับปริมาณสูงจากเชื้อรา เช่น *Pleurotus ostreatus* และ *Pleurotus* spp. (Bobek และคณะ, 1998)

ในปี 1970 ค้นพบว่า สารคอมแพคติน (Compactin) และโมนาโคลิน (Lovastatin) เป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutarly Coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล และใช้คุณสมบัตินี้มาพัฒนาศักยภาพของยาสำหรับลดคอเลสเตอรอลชนิด LDL (Vedera และคณะ, 1985)

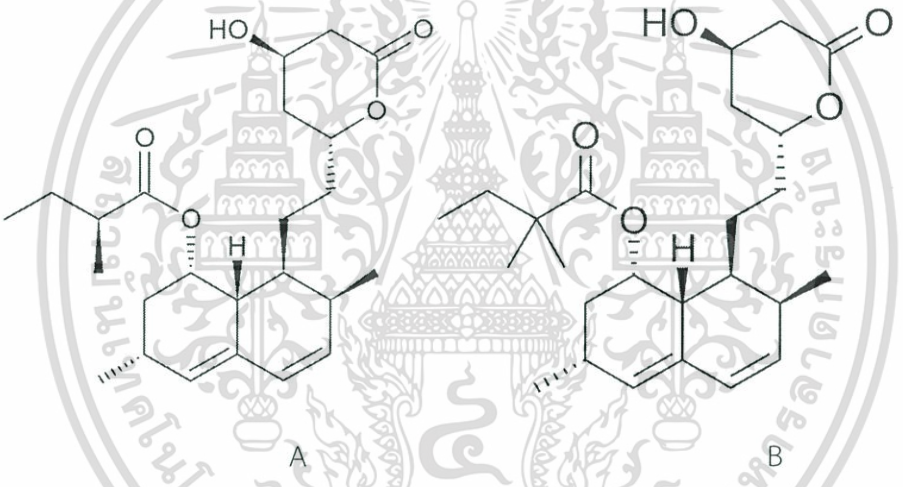
ในปี 1976 Endo ได้พบสารคอมแพคตินหรือในทางการค้าเรียกว่า เมวาสแตติน (Mevastatin) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *P. Citrinum* ได้ทำการวิจัยพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์เป้าหมาย และลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล จึงเป็นผู้ริเริ่มทำให้มีการค้นคว้า และศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase ในธรรมชาติจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และค้นพบเมแทบอลิซึมของสาร Monacolin ที่แยกได้จากเชื้อราในเวลาต่อมาโครงสร้างโมนาโคลินเสถียรและคงตัวแตกต่างกับสารคอมแพคตินที่ปรากฏในลักษณะ 6 alphamethyl group ในรูปของ hexahydronaphthalene ring

อย่างไรก็ตามในปี 1980 พบว่าสารคอมแพคตินมีความเป็นพิษในสัตว์เพราะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันระหว่างคอมแพคติน และ Monacolin ดังรูปที่ 2.4 ยากต่อการตรวจสอบ การศึกษาทางการแพทย์เกี่ยวกับสาร Monacolin ได้ถูกระงับชั่วคราวจึงเปลี่ยนไปศึกษาเรื่องผลกระทบของสารที่มีต่อสัตว์ทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี 1982 มีการศึกษาระดับห้องปฏิบัติการเพื่อสำรวจคุณสมบัติเกี่ยวกับสาร Monacolin ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *A. terreus* พบว่าในคนไข้ภาวะเสี่ยง สาร Monacolin นี้สามารถลดคอเรสเตอรอลชนิด LDL ได้ และเมื่อสนับสนุนการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อสัตว์ทดลอง ปรากฏว่าไม่มีฤทธิ์เป็นพิษซึ่งมีความสัมพันธ์กับการศึกษาสารคอมแพคติน ดังนั้น จึงได้ดำเนินงานวิจัยทางการแพทย์ต่อไป

สารนี้ได้รับรองประสิทธิภาพโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ในปี 1987 พบว่าปริมาณของสาร Monacolin ที่อยู่ในแต่ละผลิตภัณฑ์ปริมาณ 80 มิลลิกรัม สามารถลด LDL ได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีระดับการออกฤทธิ์ที่ดีกว่ายาลดคอเลสเตอรอลชนิดอื่นๆ คุณสมบัติทางยามีผลกระทบน้อยมากง่ายต่อการรักษาคนไข้จึงเป็นที่ยอมรับอย่างรวดเร็ว แต่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ ทรานอะมิเนส (Transaminase) ในตับ และมีผลต่อกล้ามเนื้อ



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของสารโลวาสแตติน (A) และ สารคอมแพคติน (B)

ที่มา : Dhale และคณะ, 2007 ; Belo และคณะ, 1993

ในปี 1998 องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา สั่งห้ามขายอาหารเสริมที่มีส่วนผสมของข้าวแดงจากการหมักโดยใช้ยีสต์เป็นหัวเชื้อภายหลังพบว่ามีส่วนประกอบของ Monacolin ในอาหารเสริม จึงมีข้อโต้แย้งว่าอาหารเสริม มีสาระสำคัญที่มีคุณสมบัติทางยา

2.4.3 การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าปัจจัยที่เสี่ยงหลักของโรคหลอดเลือดหัวใจคือ การมีระดับไขมันสูงในเลือดทำให้ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือดจึงมีความยืดหยุ่นน้อยและหนาขึ้นจนเกิดสภาพของหลอดเลือดแข็งและตีบ ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดหลอดเลือดแข็ง เกี่ยวข้องกับตัวพาไขมันไปตามเส้นเลือดซึ่งเรียกว่า ไลโพโปรตีน (Lipoprotein) มี 2 ชนิดคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Low-density lipoprotein (LDL) ซึ่งจะพาคอเลสเตอรอลจากตับไปสู่ร่างกาย LDL เป็นไขมันที่ก่อให้เกิดพิษหากมีมากจะทำให้เกิดหลอดเลือดแดงตีบได้ง่าย

- High-density lipoproteins (HDL) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประโยชน์โดยพาคอเลสเตอรอลจากร่างกายเข้าสู่ตับ หากมี HDL ในปริมาณสูงส่งผลให้เกิดโรคหลอดเลือดน้อยลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ LDL-C (Low density lipoprotein cholesterol) ซึ่งเป็นไลโพโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีในตับมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่พาคอเลสเตอรอลจากตับไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อเนื้อเยื่อต้องการใช้คอเลสเตอรอล ซึ่งเป็นจุดสำคัญที่ต้องลดระดับคอเลสเตอรอลส่วนเกินในร่างกายโดยรักษาให้ร่างกายทำงานเป็นปกติอยู่เสมอ (Alberts และคณะ, 1998)

2.4.4 กระบวนการสังเคราะห์สาร Monacolin

สาร Monacolin ประกอบด้วยโพลีคีไทด์ 2 สายจากอนุพันธ์ของอะซีเตต โดยโพลีคีไทด์สายแรก อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น Dihydromonacolin L Monacolin L และ Monacolin J ตามลำดับ ส่วนโพลีคีไทด์สายที่สองอะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์แล้วเชื่อมต่อกับโพลีคีไทด์สายแรกในรูป Monacolin J โดยพันธะเอสเทอร์แล้วได้สารโลวาสแตตินในรูปกรด (Acid form) สารประกอบนี้สร้างโดย *A. terreus* (Hendrickson และคณะ, 1999)

2.4.5 กลไกการทำงานของสาร Monacolin (จันทนี, 2545)

สาร Monacolin สามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase อย่างจำเพาะโดยที่เอนไซม์ HMG-CoA reductase จะใช้เป็นตัวกลางในการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงเป็นเมวาโลเนต (Mevalonate) และสังเคราะห์เป็นคอเลสเตอรอลต่อไป (Alberts, 1998) สารโลวาสแตตินจะขัดขวางการสร้างคอเลสเตอรอลโดยการไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase จึงทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอล สาร Monacolin ไม่แสดงฤทธิ์ทางยาในรูปโครงสร้างปกติ แต่เมื่อโครงสร้างถูกสลายด้วยน้ำ (Hydrolysis) เป็น β-hydroxy acid จะทำให้สารออกฤทธิ์ได้ในร่างกาย

2.4.6 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา (จันทนี, 2545)

สารประกอบไขมันในเลือดจะประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) คอเลสเตอรอลอิสระ (Free cholesterol) คอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (Cholesterol ester) และฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ซึ่งไขมันเหล่านี้ไม่สามารถรวมกับน้ำได้จึงต้องรวมกับโปรตีน (Apoprotein) และไหลเวียนตามกระแสเลือดในรูปของไลโพโปรตีน เมื่อในเลือดมีสารเหล่านี้ในความเข้มข้นสูงจำเป็นต้องใช้ยาลดไขมันมาควบคุมระดับไขมันในเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาลดไขมันในเส้นเลือด (Antihyperlipidemic drug) มีอยู่หลายชนิด แต่ละชนิดมีคุณสมบัติและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน ได้แก่

ก) Nicotinic acid ได้แก่ niacin (Vitamin B 3)

ข) Fibric acid derivative หรือ fibrate ได้แก่ bezafibrate, gemfibrozil, fenofibrate

ค) Bile acid sequestrants ได้แก่ cholestymine และ cholestipol

ง) Statin (chlorofo-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor)

จ) Miscellaneous ได้แก่ probucol

สาร Monaclin หรือโลวาสแตติน เป็นยาในกลุ่มสแตตินที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (HMG-CoA reductase inhibitor) ยากลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ HMG-CoA จะออกฤทธิ์ยับยั้งแบบผันกลับได้โดยไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Reversible competitive inhibitor) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ตัวอย่างยา กลุ่มสแตติน ได้แก่ Pravastatin, Fluvastatin และ Atorvastatin เป็นต้น ปัจจุบันอาจกล่าวได้ว่ายาในกลุ่มสแตตินนี้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลด LDL-C

2.4.7 กลไกการออกฤทธิ์

ยากลุ่ม Monacolin ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอลในตับ โดยเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (3-hydroxyl 3-methylglutaryl Coenzyme A) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการสร้างคอเลสเตอรอล (Rate controlling enzyme) ให้ลดลง ผลที่ตามมา คือทำให้มีการเพิ่มปริมาณของตัวรับไลโพโปรตีน (LDL receptor) ที่ผนังเซลล์ตับเพื่อที่จะเพิ่มการจับ LDL จากเลือดทำให้ LDL-C ลดลง

โดยในทางคุณสมบัติทางเภสัชจลศาสตร์ พบว่าสาร Monacolin ไม่สามารถแสดงฤทธิ์ได้ในรูปปกติ (Prodrugs) จำเป็นต้องเปลี่ยนเป็นยาในรูปแบบที่ออกฤทธิ์ได้ (Active drugs) ยาในกลุ่มนี้จะเกิดกระบวนการภายหลังจากที่รับประทานยาเข้าสู่ร่างกาย และมีการขจัดผ่านทางตับ ก่อนที่ยาจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตและออกฤทธิ์ (First-pass metabolism) สูง พบว่าปริมาณยาเพียง 5-20 เปอร์เซ็นต์ ของขนาดยาที่เข้ากระแสเลือด และจับกับโปรตีนในเลือดสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ระดับยาในเลือดจะออกฤทธิ์สูงสุดภายในเวลา 1-4 ชั่วโมง หลังการรับประทานอาหาร 70 เปอร์เซ็นต์ ของยากลุ่มนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงแล้วถูกขับออกทางตับ คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก) สามารถลด LDL-C ได้ 20-55 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับขนาดยาที่ใช้ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อคอเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งจะเกิดขึ้น 4-6 สัปดาห์ภายหลังการรับประทานยา

ข) สามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในผู้ป่วยที่มีระดับของไตรกลีเซอไรด์ ในเลือดสูงกว่า 250 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ได้ 20-40 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะการใช้ขนาดยาที่มีความเข้มข้นสูง (High potency statins) ซึ่งได้แก่ Simvastatin และ Atovastatin ดังนั้นอัตราการลดไตรกลีเซอไรด์จึงขึ้นกับขนาดของยาเช่นกัน

ค) สามารถเพิ่มระดับ HDL-C (High density lipoprotein-cholesterol) ได้ 5-10 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงความสามารถในการออกฤทธิ์ยาในกลุ่มสแตติน ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ค่าทางเภสัชพลศาสตร์ของยาในกลุ่มสแตติน

Drug	Absolute Bioavailability (%)	Excretion	Half-life (t1/2 hr)	Protein binding (%)	Cytochome (CYP) P450 substate
Atorvastatin	14	<2% (urine)	14	≥98	CYP3A$
Cerivastatin	60	24% (urine) 70% (feces)	2-3	>99	CYP3A4
Fluvastatin	24	<6% (urine) 90% (feces)	<1	98	CYP2C9
Lovastatin	<5	10% (urine) 83% (feces)	3-4	>95	CYP3A4
Pravastatin	17	20% (urine) 70% (feces)	1.8	50	-
Simvastatin	<5	13% (urine) 60% (feces)	3	95	CYP3A4

ที่มา : (จันทนี, 2545)

2.4.8 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน

ผลกระทบต่อตับทำให้เอนไซม์ทรานอะมิเนส ในกระแสเลือดมีการทำงานเพิ่มขึ้นราว 3 เท่าของค่าปกติ พบได้ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมักจะเป็นแบบชั่วคราว และไม่ทำให้เกิดพิษต่อตับ ดังนั้นจึงควรวัดการทำงานของเอนไซม์อะมิโนทรานสเฟอเรส (Aminotransferase) ก่อนให้ยา และทุก 2-4 เดือน และควรหยุดใช้ยาเมื่อกิจกรรมของเอนไซม์อะมิโนทรานสเฟอเรสเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 3 เท่าของค่าปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลกระทบต่อกล้ามเนื้อ อาการที่ไม่พึงประสงค์ที่พบรองลงมาคือ กิจกรรม Creatine kinase (CK) สูงขึ้น โดยเอนไซม์ตัวนี้เร่งการขนย้ายหมู่ฟอสเฟตจาก Creatine phosphate ไปยัง Adenosine diphosphate (ADP) และในขั้นสุดท้ายได้ Adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ เอนไซม์ CK มีเฉพาะในกล้ามเนื้อและพบได้บ้างในเนื้อเยื่อสมองกระบวนการอิเล็คโตรโฟลิซิสสามารถแยกเอนไซม์ CK ได้อย่างน้อย 3 ตัว โดยที่ CK จากกล้ามเนื้อลายและสมองมีเพียงกลุ่มเดียวแต่ต่างตำแหน่งกัน ส่วน CK จากกล้ามเนื้อหัวใจจะให้ 2 กลุ่มโดยที่กลุ่มหนึ่งคล้ายกับของกล้ามเนื้อลาย ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งอยู่ระหว่าง CK ของกล้ามเนื้อลายและของเนื้อเยื่อสมอง เมื่อพบว่ากิจกรรมของ CK ในซีรั่มสูงกว่าปกติ โดยจะเริ่มเริ่มเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 3-6 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดใน 24-36 ชั่วโมง มีผลทำให้หัวใจวายได้ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจภาวะของหัวใจวายเมื่อเริ่มรู้สึกว่ามีการเจ็บหน้าอก แต่เอนไซม์ตัวนี้จะถูกกำจัดออกจากพลาสมา (plasma) ได้โดยเร็ว จึงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้กลับสู่สภาวะปกติได้ภายในเวลาเพียง 3 วัน โดยเมื่อเทียบกับเอนไซม์ตัวอื่น เช่น SGOT LDH เป็นต้น และอาจทำให้เกิดความผิดปกติของกล้ามเนื้อ (Myopthy) โดยเฉพาะเมื่อใช้ยากลุ่มนี้ร่วมกับยาลดไขมันในเลือดกลุ่ม Fibric acid derivatime และ Nicotinic acid ส่วนยาอื่นๆ ที่จะมีผลทำให้อาการไม่พึงประสงค์ต่อกล้ามเนื้อถ้าให้ร่วมกับยาในกลุ่มสแตตินได้แก่ ยาที่ถูกเมแทบอไลต์โดย Cytochrom P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 4 (CYP3A4) เช่นเดียวกับสแตติน ได้แก่ Erythromycin itraconazole ดังนั้นจึงควรวัดกิจกรรมของเอนไซม์นี้ และโดยเฉพาะผู้ป่วยที่รับประทานยาสแตตินร่วมกับยาเหล่านี้จะต้องลดขนาดยาสแตตินลงไม่ให้ยามากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของขนาดสูงสุดที่ใช้ในการรักษา

2.4.9 ขนาดยาและการจัดเตรียมยา

Monacolin เป็นยาเม็ด 10, 20 และ 40 มิลลิกรัม รับประทานยาวันละ 1-2 ครั้ง ถ้ารับประทานวันละ 1 ครั้งให้รับประทานยาก่อนอาหารเย็น ถ้าหากรับประทานยา 2 ครั้ง ก็ให้รับประทานก่อนอาหารมื้อเช้า และมื้อเย็น ขนาดการใช้ยาขึ้นกับแพทย์สั่ง

2.4.10 ประโยชน์ในการรักษา

ใช้กับผู้ป่วยที่มีคอเลสเตอรอลสูงทุกชนิดซึ่งอาจใช้ตัวยับยั้งรีดักเทสเพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับยาอื่น ได้แก่ Bile acid-bindig resins หรือ Nicotinic acid ซึ่งต้องระมัดระวังเรื่องของปฏิกิริยาสัมพันธ์ของยาที่อาจทำให้เกิดกล้ามเนื้อผิดปกติได้ ยาในกลุ่มสแตตินสามารถลดอัตราของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ และอัตราการตายในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีระดับไขมันสูง ขณะเดียวกันยากลุ่มนี้ยังมีบทบาทในการป้องกันปฐมภูมิ (Primary prevention) สำหรับผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจได้แก่ ผู้ที่มีไขมันในเลือดสูงกับการมีโรคความดันโลหิตสูงหรือเบาหวาน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การสังเคราะห์สารสีและ Monacolin K ของเชื้อรา *Monascus* ในข้าวแดง

กระบวนการผลิตข้าวแดงแบบดั้งเดิมใช้วิธีการการหมักแบบอาหารแข็ง โดยการหมักแบบอาหารแข็งนั้น หมายถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งในสภาวะที่ไม่มีน้ำอิสระ (Mitchell และ Lonane, 1992) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การสังเคราะห์สารสี และ Monacolin K ของเชื้อรา *Monascus* ในข้าวแดง ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์ของ *M. purpureus* และสภาวะการเตรียมข้าว เช่น อุณหภูมิ และเวลาในการนึ่งข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นผลจากสภาวะในการผลิตข้าวแดงได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นของข้าว ความเป็น pH ของข้าว ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุเสริม เป็นต้น ทั้งนี้จากปัจจัยที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น มีผู้ศึกษาความเหมาะสมและอิทธิผลของปัจจัยดังกล่าวแล้วในหลายกรณีด้วยกันซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

ก) อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราตระกูล *Monascus* มีค่าประมาณ 28-32 องศาเซลเซียส โดยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุดที่ 15-18 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเช่น *M. purpureus* CBS 109.7 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ต่ำที่สุด และอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 34, 18 และ 46 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สารสีมีค่าอยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส (Carvalho และคณะ, 2003)

Lin (1973) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Monascus* sp. F-2 ต่อการสร้างสารสีในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว โดยทดลองหมักรา *Monascus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของแป้งข้าว ที่อุณหภูมิ 27, 32, 37 และ 40 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน พบว่า *Monascus* สามารถการผลิตสีสูงสุดที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และหากอุณหภูมิของสภาวะการหมักสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส จะทำให้ *Monascus* สามารถสร้างสารสีลดลง อีกทั้งยังเสนอว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของรา โดยรา *Monascus* สามารถเจริญที่อุณหภูมิระหว่าง 25-37 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส

นอกจากนั้นหลายๆ งานวิจัยได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต Monacolin K จาก *Monascus* sp. ตัวอย่างเช่น Su และคณะ (2003) ทำการทดลองหมัก *M. purpureus* CCRC 31615 ที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า รา *Monascus* สามารถผลิตMonacolin K ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่การผลิต Monacolin K ลดลงอย่างมาก เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 25 และ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ข) ความชื้น

ความชื้นเริ่มต้นของสารอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิ เช่น การผลิตสารสีของราในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ Johns และ Stuart (1991) ได้ศึกษาการสร้างสีของ *M. purpureus* FRR 2190 ในอาหารแข็ง (glucose-peptone media) โดยทดลองหมักข้าวด้วย *M. purpureus* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 16 วัน และเตรียมข้าวที่มีความชื้นเริ่มต้นระหว่าง 15-56 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความชื้นเริ่มต้นของข้าวที่เหมาะสมต่อการสร้างสีของ *Monascus* ควรมีค่าประมาณ 56 เปอร์เซ็นต์ และ มีค่า pH เริ่มต้น 6.0 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเหมาะสมต่อการเจริญของราเข้าไปถึงกลางเมล็ดข้าว และราสามารถสร้างสีส้ม-แดงได้ในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าความชื้นเริ่มต้นของข้าวต่ำกว่า 38 เปอร์เซ็นต์ จะไม่พบเส้นใยของราภายหลังการบ่มนานถึง 2 สัปดาห์ และที่ความชื้นเริ่มต้นของข้าว 38-39.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญของราจำกัดเฉพาะแต่เพียงภายนอกเมล็ดข้าวเท่านั้น และผู้วิจัยเสนอว่าการผลิตสารสีของ *Monascus* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งควรใช้ความชื้นเริ่มต้นสูง (~ 56 เปอร์เซ็นต์) อีกทั้งสามารถเติมน้ำ ในระหว่างหมักข้าว เพื่อให้รามีน้ำเพียงพอสำหรับการเจริญ

แต่อย่างไรก็ตาม Teng และ Feldheim (2000) ได้ศึกษาการหมักข้าวเพื่อผลิตสีจากข้าวแดงพบว่า ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการหมักข้าวแดง เพื่อให้ *Monascus* ผลิตสีได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 24 เปอร์เซ็นต์ และการสร้างสารสีของราจะลดลงหากเติมน้ำ ในระหว่างการหมัก ทั้งนี้ Yongsmith และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* sp. KB9 ด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง โดยทดลองหมักข้าวด้วย *Monascus* sp. KB9 ที่ความชื้นเริ่มต้น 32 35 38 และ 43 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 วัน พบว่า ความชื้นเริ่มต้นมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และการสังเคราะห์สารสี ซึ่งความชื้นเริ่มต้นของข้าวที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* sp. KB9 มีค่าระหว่าง 32-43 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ความชื้นเริ่มต้นของข้าว 38 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่าความเข้มสีสูงสุด อย่างไรก็ตาม Yongsmith และคณะ เสนอว่าจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะหรือชอบที่จะเจริญที่ความชื้นเริ่มต้นต่างกัน ปริมาณน้ำที่มากเกินไปอาจลดความพรุนของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเมล็ดข้าว เป็นสาเหตุให้สารตั้งต้นเกาะกันแน่น ซึ่งเหนี่ยวนำให้การถ่ายเทออกซิเจนลดลง

ค) ค่า pH

ราตระกูล *Monascus* สามารถเจริญได้ในช่วง pH กว้างตั้งแต่ 2.5-8.0 แต่ pH ที่เหมาะสมควรมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0-7.0 อย่างไรก็ตาม pH เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญควรมีค่าประมาณ 6.5 นอกจากนี้ pH ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สารสีนั้นมีความแตกต่างกันไป โดยที่ pH ต่ำ (pH 4.0) เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สีเหลือง และ pH ที่สูงกว่า (pH 5.5-7.0) เหมาะสมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

149046

การสังเคราะห์สารสีแดง (Chen และ Johns, 1993; Teng และ Feldheim, 2001; Carvalho และคณะ, 2003) ขณะที่ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิต Monacolin K ของรา *Monascus* มีค่าอยู่ระหว่าง 5.5-7.0 (Lian และคณะ, 2007; Ng และ Shyu, 2004; Panda และคณะ, 2010)

Johns และ Stuart (1991) ศึกษาค่า pH เริ่มต้นของข้าวที่ระดับ 3.4 6.0 และ 7.0 ต่อการสร้างสีของ *M. purpureus* FRR 2190 โดยหมักข้าวด้วย *Monascus* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 16 วัน pH ถูกปรับด้วย HCl เข้มข้น 1M หรือ NaOH เข้มข้น 1 M จากผลการทดลองพบว่าที่ pH เริ่มต้น 3.4 6.0 และ 7.0 เหมาะสมต่อการสร้างสีเหลือง ส้ม แดง ตามลำดับ และที่ pH เริ่มต้น 6.0 *M. purpureus* FRR 2190 สามารถผลิตสีทั้งสามสีได้สูงสุด

นอกจากนั้น Ng และ Shyu (2004) ศึกษาผลของ pH ต่อการผลิต Monacolin K จาก Monascus-natacomplex ซึ่ง *M. ruber* CCRC 31532 หรือ/และ *M. pilosus* NCHU M-35 เพาะเลี้ยงในชิ้นวุ้นมะพร้าวในอาหารเหลว pH ถูกปรับด้วย HCl เข้มข้น 1 M หรือ NaOH เข้มข้น 1 M ผลการทดลองพบว่า pH 6.0-7.0 เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการผลิต Monacolin K

ง) ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์

ราตระกูล *Monascus* จัดเป็นเชื้อราในกลุ่มต้องการอากาศ (Aerobic fungi) แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนอย่างจำกัด ซึ่งภายใต้สภาวะดังกล่าว *Monascus* จะผลิตเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูง แต่สังเคราะห์สารสีได้ในปริมาณต่ำ อย่างไรก็ตาม *Monascus* จะผลิตเอทานอลลดลงและให้สารสีเพิ่มขึ้น เมื่อเจริญภายใต้สภาวะอากาศที่มีองค์ประกอบตามธรรมชาติ (O_2~0.21-0.5 atm, CO_2~0.02 atm) (Han และ Mudgett, 1992) หรือมีอัตราการให้อากาศไม่มากเกินไป (aeration rate ~1 NmL/g.min (มิลลิลิตรของอากาศต่อกรัมของข้าวน้ำหนักเปียกต่อนาที)) (Carvalho และคณะ, 2006) ทั้งนี้การผลิตสารสีของ *Monascus* จะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสูง มากเกินไป (O_2~1.2-2.0 atm) (Han และ Mudgett, 1992) หรือมีการถ่ายเทของอากาศสูง (aeration rate > 1 NmL/g.min) (Carvalho และคณะ, 2006) หรือมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบสูง (CO_2 > 0.02 atm) (Han และ Mudgett, 1992)

Han และ Mudgett (1992) ศึกษาประสิทธิภาพของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์สารสีของ *M. purpureus* ATCC 16365 โดยการเลี้ยงเชื้อบนเมล็ดข้าวในขวดระบบปิด (Closed system) ทดลองหมักข้าวด้วย *M. purpureus* ATCC 16365 ใน Closed pressure vessels และเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจนระหว่าง 0.1-2.1 atm ที่คาร์บอนไดออกไซด์คงที่ 0.02 atm พบว่า *Monascus* สามารถผลิตสารสีได้สูง เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ 0.5 atm และการสังเคราะห์สารสีจะลดลงเมื่อปริมาณออกซิเจนสูงถึง 1.2 atm และการสังเคราะห์สารสีจะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์เมื่อปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นถึง 2.0 atm

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้จากการทดลองหมักข้าวที่สภาวะออกซิเจนคงที่ที่ 0.21 atm และเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 0.02-1.0 atm พบว่า *Monascus* สามารถสังเคราะห์สารสีได้สูงสุดที่ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำที่สุดที่ระดับ 0.02 atm และหากเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์สูงถึง 1.0 atm การสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* จะถูกยับยั้งโดยสมบรูณ์ อย่างไรก็ตาม Han และ Mudgett (1992) ยังได้เสนอว่า ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สะสมหรือจำกัดปริมาณออกซิเจนในระหว่างการหมักจะมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* ในอาหารแข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระหว่างการเลี้ยงเชื้อควรกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์และเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในระบบ เพื่อให้ *Monascus* สามารถสังเคราะห์สารสีได้สูงสุด

นอกจากนี้ Carvalho และคณะ (2006) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญอัตราการหายใจ และการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง โดยทดลองหมัก *Monascus* sp. LPB 31 ในข้าวที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 8 วัน ภายในคอลัมน์ และให้อากาศที่อัตรา 0.00-2.00 NmL/g.min (มิลลิลิตรของอากาศต่อกรัมของข้าวน้ำหนักเปียกต่อนาที) พบว่า *Monascus* สามารถผลิตสารสีได้สูงสุด ที่สภาวะ 1 NmL/g.min และจะผลิตสารสีลดลงเมื่ออัตราการให้อากาศต่ำ (น้อยกว่า 1 NmL/g.min) หรือสูงมากเกินไป (มากกว่า 1 NmL/g.min) เนื่องจากภายใต้สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศต่ำ ทำให้อากาศไม่เพียงพอต่อการถ่ายเทของออกซิเจนและการนำ ออกซิเจนไปใช้สำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ อีกทั้งภายใต้สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศสูง จะเกิดการการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึมของราไปใช้ยังกระบวนการอื่น เช่น การผลิตเอทานอลหรือซิตรินิน ทั้งนี้อากาศเป็นจุดวิกฤตอย่างหนึ่งสำหรับการผลิตสารสีของ *Monascus* เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความชื้นสัมพัทธ์หรือการถ่ายเทออกซิเจนเป็นผลต่อการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของเซลล์ ความเข้มข้นของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารสีมีค่าอยู่ที่องค์ประกอบของอากาศตามธรรมชาติ คือ ออกซิเจน 0.21 atm และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.02 atm

จ) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์สารสี Monacolin K และการเจริญเติบโตของรา *Monascus* ทั้งนี้ชนิดของสารสีและการหลั่งสารสีออกนอกเซลล์มีความสัมพันธ์กับแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของรา *Monascus* ได้แก่ สารอินทรีย์ เช่น เปปโตน และสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย และไนเตรต (Carvalho และคณะ, 2003) โดยเฉพาะโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) ซึ่งมีผลช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์สารสีแดงให้สามารถละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น (Lin, 1973; Johns และ Stuart, 1991; Chens และ Johns, 1993) นอกจากนี้หลายๆ งานวิจัยได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสาร Monacolin K พบว่าแหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียคลอไรด์ ฮิสทิดีน โซเดียมกลูตาเมต และเปปโทน เหมาะสมต่อการผลิต Monacolin K จาก *Monascus* sp. ขณะที่แอมโมเนียมไนเตรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอมโมเนียมอะซิเตรต เมไทโอนีน และยูเรีย ไม่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Monacolin K (Lian และคณะ, 2007; Ng และ Shyn, 2004; Wang และคณะ, 2003)

Lin (1973) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์สารสีของ *M. purpureus* F-2 ด้วยกระบวนการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ในฟลาสก์ ที่ความเร็วรอบ 160 rpm แหล่งไนโตรเจนจะเติมที่อัตราส่วน 13.0 มิลลิกรัมต่อกลูโคสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ 50 มิลลิลิตร พบว่า โมโนโซเดียมกลูตาเมต โซเดียมไนเตรต และโพแทสเซียมไนเตรต เหมาะสมสำหรับการผลิตสารสีแดง ในทางตรงกันข้ามสารอินทรีย์ เช่น เปปโตน และ สารสกัดยีสต์ ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารสีแดง ทั้งนี้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการผลิตสารสีแดงมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 1.26 เปอร์เซ็นต์ (Lin และ Demain, 1991) นอกจากนี้กรดอะมิโน เช่น ฮิสทิดีน และเซอรีน ยังช่วยเพิ่มการผลิตสารสีแดง แต่กรดอะมิโน เช่น ลิวซีน, วาลีน, ไลซีน และเมไทโอนีน มีผลทำให้การผลิตสารสีแดงลดลง (Lin และ Demain, 1994)

อย่างไรก็ตาม Chen และ John (1993) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์สารสีของ *M. purpureus* UQM 192F (FRR 2190) ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว โดยหมักรา *Monascus* ในแหล่งคาร์บอนกลูโคส และเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่างเปปโทน แอมโมเนีย และไนเตรต ควบคุม pH 6.5 ตลอดการทดลอง พบว่าเปปโตนสามารถช่วยกระตุ้นให้ราสังเคราะห์สารสีแดงได้สูงสุด รองมาคือ แอมโมเนีย และไนเตรต ตามลำดับ

นอกจากนี้ Wang และคณะ (2004) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์ Monacolin K และซิตรินินด้วย *M. purpureus* NTU 601 โดยเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 0.1 เปอร์เซ็นต์, เมไทโอนีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ , ยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ , โมโนเดียมกลูตาเมต 1.0 เปอร์เซ็นต์ ลงในข้าว จากนั้นทำการหมักข้าวด้วย *Monascus* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 9 วัน ผลการทดลองพบว่า เพียงการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถปรับปรุงการผลิต Monacolin K ได้ ขณะที่การผลิตซิตรินินเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

ฉ) วิตามินและแร่ธาตุ

Lin (1973) ศึกษาประสิทธิภาพของวิตามินบีที่มีผลต่อการสังเคราะห์สารของ *M. purpureus* F-2 พบว่ากรดโฟลิกสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สารได้ แต่วิตามินบีชนิดอื่นอันได้แก่ PABA (กรดพารา-แอมิโนเบนโซอิก), Thaiamine (วิตามินบี 1), Biotin (วิตามินบี 7), Ca-pantothenate (วิตามินบี 5), Riboflavin (วิตามินบี 2), Niacin (วิตามินบี 3) และ Pyridoxine (วิตามินบี 6) ไม่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ Carvalho และคณะ (2003) เสนอว่า ฟอสเฟตเข้มข้นสูงและแมกนีเซียมซัลเฟตมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์สารสีของ *M. purpureus* แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันข้าวโพด และโมโนโซเดียมกลูตาเมตจะช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์สารสี ขณะที่การเติม Tween 80 เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สารสี โดยไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของ *Monascus*

2.5 คุณสมบัติและโครงสร้างของสารสีจากเชื้อรา *Monascus*

2.5.1 สารสีของ *Monascus*

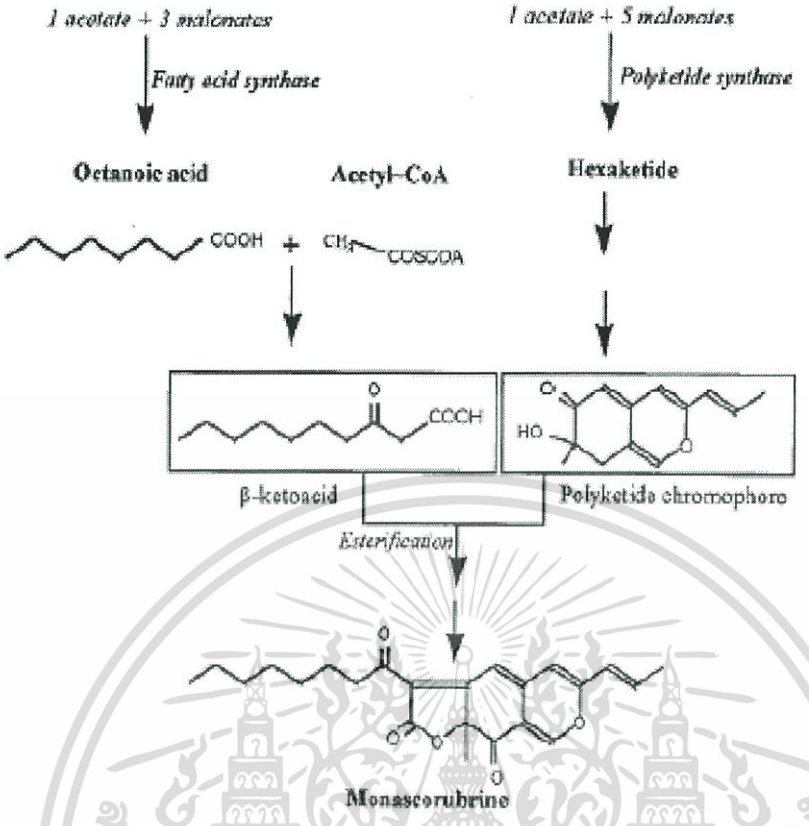
สารสีหรือเม็ดสีจากรา *Monascus* เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) โครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่ม Azaphilones หรือ Aminophilones (Erdogral และ Azirak, 2004) กลไกการผลิตเป็นแบบพร้อมการเจริญ และไม่พร้อมการเจริญ (Mix type: Growth-assosiated and non growth-associated) ทั้งนี้รา *Monascus* สามารถผลิตสารสีหรือเม็ดสีอิสระ (Free form) ได้ 6 ชนิด แบ่งตามลักษณะปรากฏของสีได้เป็น 3 ประเภทคือ สีเหลือง ส้ม และแดง โดยสีเหลืองประกอบด้วย Monascin และ Ankaflavin สีส้มประกอบด้วย Rubrapunctatin และ Monascorubrine และสีแดงประกอบด้วย Rubropunctamine และ Monascorubramine (Lin, 1973)

2.5.2 กลไกการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus*

ก) สารสีส้ม

สารสีส้มมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน (Intracellular lipophilic pigments) หรือละลายน้ำ ได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งกลไกการสังเคราะห์สารสีส้มนั้นจะต้องใช้ทั้งวิถีการสังเคราะห์ Polyketide และกรดไขมันร่วมกัน โดย Hexaketide คือสารตั้งต้นของโครงสร้างหลักที่มีคุณสมบัติการให้สี (Chromophore structure) ซึ่งสังเคราะห์ผ่าน Polyketide pathway โดย Hexaketide เกิดจากปฏิกิริยา Condensation ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 5 โมเลกุล จากนั้น Hexaketide เกิดปฏิกิริยา Methylation และ Hydroxylation จนกลายเป็น Polyketide chromophore ตามลำดับ ส่วนวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันจะผลิตกรดไขมันขนาดกลางที่มีจำนวนคาร์บอน 6 หน่วย (Hexanoic acid) หรือ 8 หน่วย (Octanoic acid) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา Condensation ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 3 โมเลกุล ผ่าน Fatty acid Pathway จากนั้นทั้งสองส่วนมาเชื่อมต่อกันด้วยปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (tran-esterification) ได้สารสีส้มคือ Rubrapunctatin และ Monascorubrine ตามลำดับ ดังรูปที่ 2.5 (Hajjaj และคณะ, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 กลไกการสังเคราะห์สารสีส้ม

ที่มา : Hajjaj และคณะ (2000)

ข) สารสีแดง

การสังเคราะห์สารสีแดงเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสีส้ม และหมู่เอมีน โดยไนโตรเจนจากกรดอะมิโน โปรตีน เปปไทด์ หรือกรดนิวคลิอิกจะเข้าแทนที่ Pyronoid oxygen atom ของเม็ดสีส้มด้วยปฏิกิริยา Schiff base formation และ Dehydration เปลี่ยนแปลงโครงสร้างเม็ดสีจาก Rubropunctatin หรือ Monascorubrin เป็น Rubropunctamine หรือ Monascorubramine ตามลำดับ อีกทั้งการมีองค์ประกอบของอะมิโนในโครงสร้างสีแดง ทำให้สีแดงมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ (Extracellular hydrophilic pigments) (Hajjaj และคณะ, 1997; Hajjaj และคณะ, 2000; Carvalho และคณะ, 2003)

ค) สารสีเหลือง

กลไกการสังเคราะห์สารสีเหลืองยังไม่มีใครอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่มีทฤษฎีที่มีความเป็นไปได้อยู่ 2 ทฤษฎี คือ ทฤษฎีที่ 1 ระบุว่าสารสีส้มคือ Rubropunctatin หรือ Monascorubrin เกิดปฏิกิริยา Reduction กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้สารสีเหลืองคือ Monascin และ Ankaflavin ตามลำดับ (Hajjaj และคณะ, 1997) ส่วนอีกทฤษฎีหนึ่งระบุว่า การสังเคราะห์สารสีเหลืองนั้นเกิดจากกระบวนการทางชีวภาพของรา *Monascus* เอง (Yongsmith และคณะ, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

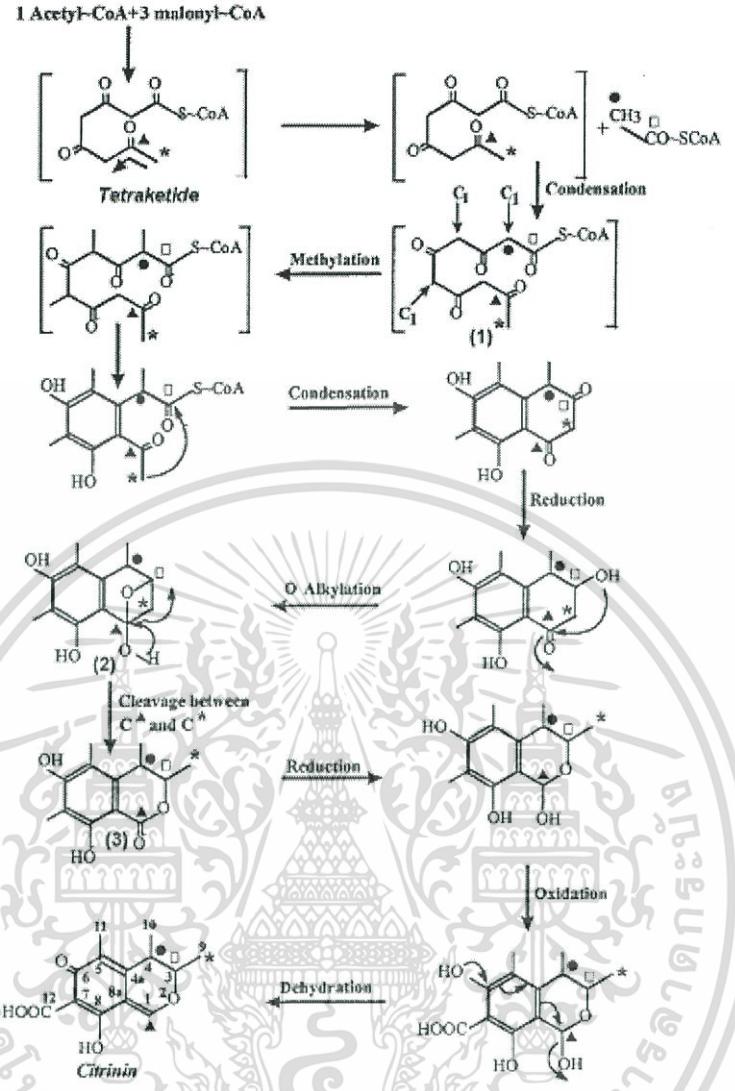
2.6 ซิตรินิน (Citrinin)

ซิตรินิน (Citrinin) หรือโมนาสซิดิน เอ (Monascidin A) เป็น Mycotoxin ที่ถูกผลิตโดยรา *Monascus*, *Penicillium citrinum* และ *Aspergillus* sp. สารนี้มีพิษต่อระบบประสาท ไต และตัวอ่อนในครรภ์ของหนู (Hajjaj และคณะ, 1999) และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Streptococcus lactis* และ *Pseudomonas fluorescens* (Blance และคณะ, 1995) ทั้งนี้ซิตรินินพบมากใน ธัญญาพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ มอลต์ แอปเบิ้ล ชีส และข้าวแดง ซึ่งในสหรัฐอเมริกามีรายงานการปนเปื้อนซิตรินินที่พบในข้าวแดงประมาณ 0.47-11.82 ไมโครกรัมต่อแคปซูล ในประเทศจีนประมาณ 0.2-140 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และในไต้หวัน และจีนประมาณ 4.2-25.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Xu และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตามข้อกำหนดของการปนเปื้อนของซิตรินินในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมไม่ควรเกิน 0.2 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในประเทศญี่ปุ่น และประเทศไต้หวัน ตามลำดับ ทั้งนี้มีหลายวิจัยซึ่งศึกษาถึงการควบคุมปริมาณความเข้มข้นของซิตรินินในข้าวแดง

2.6.1 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน

กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินต้องใช้วิถีการสังเคราะห์ Polyketide โดยมีสารตั้งต้นคือ Tetraketide เกิดจากการปฏิกิริยารวมตัว (Condensation) ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 3 โมเลกุล ผ่าน Polyketide pathway จากนั้นเกิดปฏิกิริยา Methylation, Condensation, Reduction, O-alklyation, Cleavage ระหว่าง C-1 และ C-9, Oxidation และ Dehydration ตามลำดับ จนได้เป็นซิตรินิน (Hajjaj และคณะ, 1999) ดังรูปที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน เมื่อ C-1 (▲), C-3 (□), C-9 (*) และ C-4 (●)
ที่มา : Hajjaj และคณะ (1999)

2.6.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus*

การลดปริมาณการผลิตซิตรินินจากเชื้อราสามารถปฏิบัติได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธีการกลายพันธุ์การควบคุมองค์ประกอบของอาหาร การควบคุมสภาวะการเลี้ยง หรือวิธีการสกัด ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus* อันได้แก่ ปัจจัยด้านสารอาหาร เช่น แหล่งไนโตรเจน กรดไขมันและ Methylketone และปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณออกซิเจน ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งและเหลว สามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการช่วยลดการผลิตซิตรินิน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการลดซิตรินินของ *Monascus* ได้แก่ เมไทโอนีน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์และโมโนโซเดียมกลูตาเมต

Blance และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจน (ยูเรีย แอมไมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และเมไทโอนีน) ต่อการผลิตซิตรินินของ *M. ruber* ATCC 96218 โดยหมักราที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวด้วยแหล่งคาร์บอนเป็นเอทานอล ปรับ pH เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 6.5 ผลการทดลองพบว่า ราสามารถผลิตซิตรินินได้ 100-120 mg/L เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตและโมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามเมื่อใช้เมไทโอนีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของซิตรินินลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ทั้งนี้การใช้เมไทโอนีนและยูเรียจะมีผลต่อการลดลงทั้งการสังเคราะห์สารสีและซิตรินินของ *Monascus*

Wang และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตซิตรินิน Monacolin K และ γ-aminobutyric acid (GABA) ของ *M. purpureus* NTU 601 ด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งโดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต เมไทโอนีนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า เมไทโอนีน และยูเรียสามารถยับยั้งการผลิตซิตรินิน และ Monacolin K โดยซิตรินินจะลดลงจาก 813 ppb เป็น 55-81 ppb เมื่อใช้เมไทโอนีนที่ความเข้มข้น 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ และยูเรียเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นโมโนโซเดียมกลูตาเมต และแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ระดับ 1.0 เปอร์เซนต์ สามารถลดการผลิตซิตรินินจาก 813 ppb เป็น 90-98 ซึ่งแหล่งไนโตรเจนได้แก่ เมไทโอนีน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต สามารถยับยั้งการผลิตซิตรินินได้ ตามลำดับ

ข) กรดไขมันและ Methylketone

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

Hajjaj และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของกรดไขมันต่อการผลิตซิตรินินของรา *M. ruber* ATCC 96218 โดยเติมกรดไขมัน ได้แก่ Hexanoic acid, Octanoic acid, Decanoic acid, Dodecanoic acid, Myristic acid, Stearic acid และ Oleic acid เข้มข้น 1 mM ในอาหารเหลว พบว่า Octanoic acid เป็นกรดไขมันเพียงตัวเดียวที่ส่งเสริมการผลิตสารสีแดงได้ เนื่องจาก Octanoic acid เป็นกรดไขมันตั้งต้นของการสังเคราะห์สารสี นอกจากนี้ Medium-chain fatty acids ได้แก่ Octanoic acid, Decanoic acid และ Dodecanoic acid สามารถยับยั้งการผลิตซิตรินิน โดยเฉพาะ Dodecanoic acid ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุดส่วน Hexanoic acid,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Myristic acid, Stearic acid และ Oleic acid ไม่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการผลิตซิตรินิน เนื่องจาก Medium-chain fatty acids (C8-C12) จะถูกดูดซึมโดยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Peroxisomal เปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA หรือ กรดไขมันสายยาวปานกลาง ได้แก่ Octanoic acid, Decanoic acid และ Dodecanoic acid ถูกเมแทบอไลต์ด้วยกระบวน β-decarboxylation เปลี่ยนเป็น Methylketones ได้แก่ Heptanone, 2-nonanone และ 2-undecanone ตามลำดับ จากนั้น Methylketones จะเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA ด้วยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Peroxisomal

ทั้งนี้ กรดไขมันสายยาวปานกลาง (Methylketones) ที่เป็นสาเหตุของการยับยั้งการผลิตซิตรินิน เนื่องจากซิตรินินหรือสารตัวกลางในการสร้างซิตรินินจะถูกทำลายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ Peroxisome หรือ Peroxisomal enzyme (peroxidase) จากการเหนี่ยวนำ ของกรดไขมันและ Methylketones อย่างไรก็ตามกรดไขมันสายยาว(C14-C18) หรือ กรดไขมันสายสั้น(C6) จะไม่เปลี่ยนเป็น Methylketones เนื่องจากกรดไขมันดังกล่าวจะถูกดูดซึมโดยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Mitochondrial จึงเป็นผลให้กรดไขมันทั้งกรดไขมันสายยาว (C14-C18) และ กรดไขมันสายสั้น (C6) ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการผลิตซิตรินินของ *Monascus*

ค) อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของ *Monascus* เช่น ซิตรินิน Monacolin K และ γ- aminobutyric acid (GABA) โดยรา *Monascus* จะผลิตซิตรินินลดลง เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30-34 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตซิตรินินได้สูงขึ้น เมื่อเจริญที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 26 องศาเซลเซียส (Wang และคณะ, 2003)

ง) Water activity

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

จ) ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการสังเคราะห์สารสีและซิตรินิน โดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายของปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation และเป็นสารตั้งต้นของ Monooxygenases ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเมแทบอไลต์ของเชื้อรา โดยเฉพาะสารทุติยภูมิ อย่างไรก็

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามบทบาทของ Monooxygenases ต่อการสังเคราะห์สารสียังไม่มีเป็นที่ทราบแน่ชัด (Hajjaj และคณะ, 1999)

Hajjaj และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของการให้ออกซิเจน ต่อการสังเคราะห์สารสีแดง และซิตรินินของ *M. ruber* ATCC 96218 ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว โดยแปรผันตามสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนสัมพัทธ์ (rOTC) ที่ระดับ 0.33 1.00 1.48 2.22 3.16 และ 7.07 ผลการทดลองพบว่า การผลิตซิตรินินแปรผันตามการส่งผ่านการถ่ายเทออกซิเจน เมื่อสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนสัมพันธ์มีค่าสูงขึ้น ซึ่งสภาวะดังกล่าวยังพบอัตราการผลิตซิตินินมีค่ามากกว่าอัตราการผลิตสารสีแดง ในทางตรงกันข้าม เมื่อสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนสัมพัทธ์มีระดับลดลง พบว่าอัตราการผลิตสารสีแดงมีอัตราการผลิตมากกว่าซิตินิน

2.7 สภาวะการเลี้ยงเชื้อและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อรา *Monascus* sp. เกิดทั้งในสภาพการเจริญบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ซึ่งการเลี้ยงบนอาหารแข็ง เชื้อราไม่เจริญเกาะติดตามถังหมักขณะกวนหรือหมุนให้อากาศ แต่ข้อเสีย ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวนาน ส่วนการเลี้ยงในอาหารเหลว มีข้อดี คือ ใช้เวลาในการเก็บเกี่ยวสั้น แต่มักพบปัญหาการเจริญของเชื้อราที่ผนัง แกนกวน และฝาถังหมัก เรียกว่า Wall growth (สมชาย, 2536)

2.7.1 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 pH 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, 2534)

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 เปอร์เซ็นต์ในถุงพลาสติกสามารถทำให้เชื้อรา *Monascus* sp. ผลิตข้าวแดงได้ดีที่สุด เนื่องจากที่เปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำเกินไปเชื้อจะเจริญได้น้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และผลิตสีลดลง แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงเกินไปจะไปเพิ่มการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส 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 ขณะที่พลายแก้วและบุษบา (2534) 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

สำหรับ pH ในการเลี้ยงเชื้อรานั้นส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง pH ค่อนไปทางกรดโดย Palo และคณะ (1960) รายงานว่า *M. purpureus* สามารถผลิตสีแดงได้ดีที่ pH 3.0-7.5 ต่อมา Han (1990) พบว่า *M. purpureus* ATCC 16365 ผลิตสีแดงได้ดีที่ pH เริ่มต้น 5.0-6.0 ซึ่งใกล้เคียงกับ Johns และ Stuart (1991) พบว่า pH เริ่มต้น 6.0 เหมาะต่อการผลิตสีแดงของ *M. purpureus* FRR 2190

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

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

มีการศึกษาเชื้อรา *Monascus* sp. โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวอย่างกว้างขวางเนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ในการเลี้ยงควบคุมการปนเปื้อนประหยัดพื้นที่ในการทำงานและขยายขนาดการหมัก (scale-up) ได้ง่ายกว่าการหมักบนอาหารแข็ง (Johns และ Stuart,1991) จึงพัฒนาระบบการเลี้ยงเพื่อการเจริญและการผลิตสีได้ดียิ่งขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว ได้แก่ แหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน แหล่งไนโตรเจนสารที่จะเป็นต่อการเจริญ อุณหภูมิ pH การให้อากาศ (aeration) และการกวน (agitation) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 การเลี้ยงเชื้อ (Fermentation)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักอาหาร อาจเป็นจุลินทรีย์ที่มาจากธรรมชาติในรูปของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ หรือจุลินทรีย์ผสมที่อยู่ในรูปของเหลวหรือเป็นผงแห้ง กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมัก ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยทั่วไปอาจแบ่งการหมักได้หลายประเภท ขึ้นอยู่กับเกณฑ์พิจารณาที่นำมาใช้แบ่ง ในที่นี้จะขอกล่าวถึงการแบ่งประเภทการหมักตามลักษณะหรือ ปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ การหมักในอาหารเหลว และการหมักบนอาหารแข็ง (นันทนา, 2555)

2.8.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (Submerged fermentation, Smf)

กระบวนการหมักในอาหารเหลวเป็นการหมักที่ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลว เช่น กากน้ำตาล และอาหารสังเคราะห์ที่มีสารอาหารที่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ (นันทนา, 2555) ในระหว่างกระบวนการหมัก สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) จะถูกผลิตออกมาผสมกับอาหารเหลว ซับสเตรตจะถูกย่อยอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการหมักแบบนี้จึงต้องการการเติมซับสเตรตอย่างต่อเนื่องและคงที่เพื่อให้มีสารอาหารตลอดระยะเวลาการหมัก การหมักแบบนี้เหมาะสมกับจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียซึ่งต้องการความชื้นสูง (Subamaniyam และ Vimala, 2012)

2.8.2 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation, SSF)

กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง คือการบ่มเพาะ หรือการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ภายใต้การควบคุมสภาวะในการบ่ม โดยมีแนวคิดการใช้ซับสเตรตเป็นของแข็งในกระบวนการหมักซึ่งเหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ตัวอย่างซับสเตรตที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น มันสำปะหลัง เมล็ดข้าว เศษไม้ และชิ้นส่วนที่แห้งแล้วของสัตว์ เช่น หนัง และกระดูก ความชื้นมีความจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งความชื้นจะถูกดูดซับหรือเป็นส่วนประกอบของซับสเตรต ซึ่ง ทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารและจะมีปริมาณน้ำอิสระอยู่น้อยมากหรือมีเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้น ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ เอนไซม์อุตสาหกรรม เชื้อเพลิง และใช้เติมสารอาหารในอาหารสัตว์ (Bhargav และคณะ, 2008; Bashir และคณะ, 2011)

ข้อดีของกระบวนการหมักบนอาหารแข็งเมื่อเทียบกับการหมักในอาหารเหลว

- มีสภาวะในการหมักเหมือนกับสิ่งแวดล้อมซึ่งเหมาะกับพฤติกรรมของเชื้อรา ซึ่งเป็นจุลินทรีย์หลักที่ใช้ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง

- ซับสเตรตที่ใช้ในการหมักมีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อรา

- กระบวนการหมักบนอาหารแข็งโดยส่วนมากใช้พลังงานน้อย เช่น การเติมอากาศ การกวนเชิงกล เป็นต้น ในการหมักบางกรณีนั้นไม่ต้องการ จึงสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ (Bashir และคณะ, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมักบนอาหารแข็ง

การเลือกตัวแปรที่เหมาะสมถือเป็นกุญแจสำคัญในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ประกอบไปด้วยกายภาพ เคมี และชีวเคมี เช่น ขนาดอนุภาค ความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรต ค่า pH เริ่มต้น อุณหภูมิการบ่ม ระยะเวลาการหมัก การเติมอากาศ และแหล่งอาหาร เป็นต้น (Manpreet และคณะ, 2005)

ก) ค่า pH

แม้ว่าค่า pH จะเป็นตัวแปรที่สำคัญตัวแปรหนึ่ง แต่การวัดและควบคุมค่า pH ในระหว่างกระบวนการหมักแบบแห้งนั้นไม่นิยมกระทำ ความสามารถทำให้เป็นกลาง และซับสเตรตบางตัวจะช่วยให้ไม่ต้องมีการควบคุมค่า pH ระหว่างการหมัก จุดเด่นของวิธีนี้ได้แก่ ใช้การปรับค่า pH เริ่มต้นของซับสเตรตที่ช่วง 4.5-5.0 ในระหว่างทำให้ชื้นด้วยน้ำให้ได้ระดับค่า pH ที่ต้องการ วิธีการอื่นนอกเหนือจากวิธีนี้ ในการต้านทานความเป็นกรดในซับสเตรตที่หมักเมื่อใช้เกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน คือ การใช้ยูเรียเพื่อให้ได้ปริมาณไนโตรเจนอย่างน้อย 40 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และวิธีนี้จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อรา อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่บริเวณใดๆ ที่จับตัวเป็นก้อน ทำให้จุลินทรีย์สร้างฟิล์มบน ซับสเตรต และไม่สามารตรวจสอบได้ ทำให้ได้ผลผลิตจากการหมักต่ำในถังหมักที่ไม่มีการกวนที่ผลิตขึ้นมีผลทำให้ค่า pH ต่ำลงไปอีก และมีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์อื่นในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ (จุฬารัตน์, 2547)

ข) อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็งมีการสร้างความร้อนประมาณ 100-300 กิโลจูลต่อกิโลกรัมของน้ำหนักเซลล์ ดังนั้นจึงต้องออกแบบการหมักเพื่อแก้ปัญหาความร้อนสะสม ซึ่งทำให้กิจกรรม และการเจริญของเชื้อใช้เวลานานขึ้น

ส่วนประกอบที่แตกต่างกันเป็นอุปสรรคต่อการถ่ายเทความร้อน เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทและการนำความร้อนลดลง อุณหภูมิสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเพราะมีน้ำน้อยในการถ่ายเทความร้อน หรือในทางตรงกันข้ามค่าความจุความร้อนจำเพาะของมวลที่ใช้ในการหมักมีค่าต่ำกว่าน้ำ ดังนั้นการผลิตความร้อนต้องทำให้กระจายอย่างรวดเร็ว เพราะส่วนมากจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็งเป็นจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเจริญอยู่ระหว่าง 20-40 องศาเซลเซียส และการเจริญสูงสุดต้องไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส (Manpreet และคณะ, 2005)

ค) อากาศ

การเจริญของจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนในการเจริญมากน้อยแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับกระบวนการออกซิเดชัน และรีดักชัน จุลินทรีย์บางชนิดต้องการออกซิเจนในการสร้างพลังงานระดับเซลล์ในรูปของ ATP ในขณะที่บางชนิดสามารถสร้างพลังงานระดับเซลล์โดยไม่ต้องการออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการหายใจ แต่อาจแบ่งเชื้อเราเป็นกลุ่มต่างๆ ตามความต้องการออกซิเจนในการเจริญ ดังนี้

- Obligate aerobic fungi เชื้อรากลุ่มนี้จะถูกยับยั้งการเจริญหรือตาย ถ้ามีออกซิเจนไม่เพียงพอ

- Obligate fermentative fungi สามารถเจริญได้ดีทั้งในที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่จะได้พลังงานส่วนใหญ่จากกระบวนการหมัก

- Obligate anaerobic fungi ต้องการสภาพแวดล้อมที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมาก เชื้อรากลุ่มนี้ไม่สามารถดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนได้ (มยุรา และคณะ, 2554)

ง) Water activity (aw)

น้ำบริสุทธิ์มีค่า a_w = 1.00 และจะลดลงเมื่อมีการเติมตัวถูกละลาย แบคทีเรียจะเจริญที่ค่า a_w สูง ในขณะที่เชื้อรา และยีสต์บางชนิดสามารถโตได้ที่ปริมาณ a_w ต่ำได้ จึงเหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง

อย่างไรก็ตามปริมาณความชื้นของซับสเตรตที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อราอยู่ระหว่าง 40-80 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ซับสเตรตที่แตกต่างกันความชื้นที่เหมาะสมก็จะเปลี่ยนแปลงไป

ค่า a_w ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น เกลือ น้ำตาล เป็นต้น ค่า a_w ที่เหมาะสมในกระบวนการหมักนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยในการหมักด้วย เช่น อัตราการกวน อุณหภูมิระหว่างการหมัก เป็นต้น (Manpreet และคณะ, 2005)

จ) แหล่งพลังงาน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดได้พลังงานในการดำรงชีวิตแตกต่างกันไป จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้จะได้พลังงานจากแสงอาทิตย์ในขณะที่จุลินทรีย์พวกเคมโมออกแกโนโทร (Chemoorganotroph) จะได้พลังงานจากการออกซิไดซ์สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นพวกเคมโมออแกโนโทรป ซึ่งโดยทั่วไปได้พลังงานจากสารประกอบคาร์บอน เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน และจุลินทรีย์บางชนิดใช้มีเทน หรือเมทานอลเป็นแหล่งพลังงานได้

แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์

กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณมากและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งจากธัญพืชชนิดต่างๆ แป้งมันฝรั่ง และ แป้งมันสำปะหลัง นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ เมล็ดข้าวบาร์เลย์ กากน้ำตาล หางนม กากถั่วเหลือง น้ำมันพืช สารอื่นๆ ที่มีคาร์บอนเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และอัลเคน ก็สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมการหมักได้ด้วย แม้ว่าสารเหล่านี้จะมีราคาแพงกว่าคาร์โบไฮเดรต แต่สามารถผลิตได้ในรูปที่บริสุทธิ์ และเมื่อใช้เป็นซับสเตรตในกระบวนการหมักจะทำให้กระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตและการทำให้บริสุทธิ์ง่ายขึ้น

แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ บางชนิดจะต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้อุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท เป็นต้น สำหรับแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะพวกเชื้อที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดอะมิโน จะเจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีกรดอะมิโนชนิดที่จำเป็นเท่านั้น แต่เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นโดยทั่วไปจึงนิยมใช้กรดอะมิโนจากสารประกอบเชิงซ้อน เช่น การผลิตไลซีนจะใช้โปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเซทเป็นแหล่งเมไทโอนีน และทรีโอนีน เป็นต้น วัตถุดิบอื่นๆ ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง กากปลา และยีสต์สกัด เป็นต้น

แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญซึ่งตามปกติจะต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แคลเซียมและคลอรีน นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุที่มีความจำเป็นแต่ต้องการในปริมาณน้อย (Trace elements) ได้แก่ โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส โมลิบดินัม และสังกะสี ซึ่งความเข้มข้นของแรธาตุเหล่านี้จะมีผลโดยตรงต่อการผลิตสารบางชนิดของจุลินทรีย์ เช่น สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เป็นต้น แต่โดยทั่วไปจะพบแร่ธาตุในส่วนหลังนี้ในปริมาณเพียงพออยู่แล้วในวัตถุดิบที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แป้งข้าวโพด กากน้ำตาล ฯลฯ ยกเว้นการเตรียมอาหารสังเคราะห์ จึงจำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงไปในอาหารโดยตรง

แหล่งวิตามิน

วิตามินเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต วิตามินเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (Growth factor) และทำหน้าที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ (Coenzyme) ทำให้สิ่งมีชีวิตเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ จุลินทรีย์บางชนิดจะสังเคราะห์วิตามินลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้ออาทิ ไทอะมีน ไรโบเฟลวิน ไบโอติน กรดนิโคตินิค เป็นต้น แหล่งวิตามินที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ ได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากธรรมชาติ ในกรณีที่แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนที่เลือกใช้นั้นขาดวิตามินบางชนิดที่จุลินทรีย์ต้องการ อาจแก้ปัญหาได้โดยการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เลือกใช้นั้นขาดวิตามินบางชนิดที่จุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการ อาจแก้ปัญหาได้โดยการใช้แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนหลายชนิดผสมกัน เพื่อให้ได้วิตามินครบถ้วน (จุฬารัตน์, 2547)

2.8.4 การเติมอากาศ (Aeration)

ออกซิเจนมีความสำคัญสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรย์ ที่ต้องการออกซิเจน ปริมาณออกซิเจนจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญ และการผลิตสารเมแทบอไลต์ อัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนที่ต้องการ เพื่อการเจริญและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ (จุฬารัตน์, 2547)

ก) การเติมอากาศในการหมักแบบอาหารเหลว

การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการหมักในอาหารเหลวต้องการออกซิเจนในรูปที่สามารถละลายในของเหลว (Dissolved oxygen) แต่ออกซิเจนสามารถละลายในสารละลายได้เพียงบางส่วน จึงต้องการเติมอากาศอย่างต่อเนื่อง การถ่ายเทออกซิเจนไปยังเชื้อจุลินทรีย์เริ่มจากออกซิเจนจากฟองอากาศละลายในของเหลว จากนั้นจะถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ (Scragg, 1991)

ข) การเติมอากาศในการหมักบนอาหารแข็ง

การเติมอากาศมีความสำคัญในการถ่ายเทความร้อนและความชื้น รวมถึงการนำคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเกิดจากการหายใจของเชื้อจุลินทรีย์ออกจากซับสเตรต การเพิ่มความดันไอของออกซิเจนอาจทำให้การผลิตผลิตภัณฑ์บางชนิดเพิ่มขึ้น การเติมอากาศจำเป็นมากในการหมักบนอาหารแข็งที่มีความหนาแน่นของซับสเตรตมาก เนื่องจากมีการสะสมของความร้อนมาก และการเคลื่อนที่ของก๊าซและความชื้นต่ำ อัตราการเติมอากาศที่แตกต่างกันที่ใช้เป็นแบบอย่างในการหมักอยู่ในช่วง 0.05-0.2 ลิตรต่อกิโลกรัมต่อนาที นอกจากนี้การกวนเป็นครั้งคราวจะทำให้การถ่ายเทออกซิเจนดีขึ้น และทำให้อนุภาคของซับสเตรตกระจายตัวไม่อัดแน่น (Chisti,1999)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง สายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อรา *Monascus* sp. ปี ค.ศ.. 1884 Van Tieghem ได้แยกและให้ชื่อเชื้อรา *Monascus* sp.และแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ *Monascus mucoroides* และ *Monascus rubber* ต่อมาปี ค.ศ. 1985 Went ได้แยกสายพันธุ์สำคัญ คือ *Monascus purpureus* จากข้าวแดง

Harsha และคณะ (2013) ได้ทำการวิจัยการผลิตเมวาสเตตินโดยการเลี้ยงบนอาหารแข็งที่ใช้ คือ กากงาที่เหลือทิ้งจากการสกัดน้ำมันงา โดยใช้เชื้อรา *Pencillium citrinum* MTCC 1256 และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตติน ได้แก่ ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ pH และความชื้น

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wang และคณะ (2004) ได้ผลิตสารลดคอเลสเตอรอลในกลุ่มสแตติน โดยใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* NTU 601 บนอาหารแข็งได้แก่ ข้าว พบว่าสามารถผลิตสารลดคอเลสเตอรอลได้สูงสุด 526.29 ppm

Palo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญ และการสร้างสารสีของ *Monascus purpureus* และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดง มีดังต่อไปนี้ ความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ pH ระหว่าง 3.0-7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่สายพันธุ์ข้าวเหนียวให้ผลไม่ดีนัก

Han และ Mudgett (1992) ศึกษาประสิทธิภาพของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์สารสีของ *M. purpureus* ATCC 16365 โดยการเลี้ยงเชื้อบนเมล็ดข้าวในขวดระบบปิด (Closed system) ทดลองหมักข้าวด้วย *M. purpureus* ATCC 16365 ใน Closed pressure vessels และเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจนระหว่าง 0.1-2.1 atm ที่คาร์บอนไดออกไซด์คงที่ 0.02 atm พบว่า *Monascus* สามารถผลิตสารสีได้สูง เมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ 0.5 atm และการสังเคราะห์สารสีจะลดลงเมื่อปริมาณออกซิเจนสูงถึง 1.2 atm และการสังเคราะห์สารสีจะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์เมื่อปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นถึง 2.0 atm

บุษบา (2518) ได้การทดลองการสร้างสีของ *Monascus purpureus* โดยใช้สภาวะต่อการผลิตข้าวแดงของ Palo และคณะ(1960) มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ของไทย พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวหอมมะลิให้สีเข้มใกล้เคียงกัน แต่ข้าวเหนียวกลับให้กลิ่นหอมมากกว่าข้าวหอมมะลิ ทั้งนี้ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูและข้าวเจ้าพันธุ์หอมมะลิให้ผลความเข้มของสีใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ญี่ปุ่น ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์อื่นๆ ของไทยคือ พันธุ์เสาไห้ พันธุ์ธรรมดา ฯลฯ นั้นล้วนแต่สังเคราะห์สีและความหอมน้อยกว่ามาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Monascus sp. U6V1

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 MYS (Malt yeast extract agar)

3.2.2 SS (Soybean starch agar)

3.3.3 วัสดุหมัก ได้แก่ ข้าวเสาไห้ (ตรา ไก่แจ้)

3.3 อุปกรณ์

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

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

3.3.3 เครื่องวัดความเข้มของแสง (Spectrophotometer) รุ่น Helios Gamma ยี่ห้อ Thermoscientific

3.3.4 เครื่องวัด pH (pH meter)

3.3.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.6 กล้องจุลทรรศน์

3.4 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Inoculum)

นำเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เก็บรักษามาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MYS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นจึงใช้ Cork borer ขนาด 4.0 มิลลิเมตร มาเจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา จำนวน 4 ก้อน เพื่อใส่ในอาหารเหลว SS medium ปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลองต่อไป

3.5 การเตรียมวัสดุหมัก (ข้าวเสาไห้)

ชั่งข้าวเสาไห้ 50 กรัม ลงในขวดเตรียมอาหาร จากนั้นปิดปากขวดด้วยจุกสาลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อผลิตสาร Monacolin K ในสภาวะและปริมาตรขวดที่แตกต่างกัน

3.6.1.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ที่สภาวะหยุดนิ่ง ในขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร

ชั่งข้าวเสาไห้ 50 กรัม ลงในขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว จากนั้นทำการลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว แล้วนำไปบ่มโดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเติมข้าวเสาไห้พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างข้าวสัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยมีปริมาณการเติมข้าวแต่ละสัปดาห์มีดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ ขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหยุดนิ่ง

ขวด (มิลลิลิตร)	ปริมาณข้าวและ น้ำ	ระยะเวลา(สัปดาห์)				ปริมาณสุทธิ
		0	1	2	3	
200	ข้าว (กรัม)	50	-	-	-	50
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	-	-	-	15
250	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	200
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	-	-	-	15
500	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	200
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	-	-	-	15
1000	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	200
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	-	-	-	15

3.6.1.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ในสภาวะหมุนที่อัตราการหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง ในขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร

ชั่งข้าวเสาไห้ 50 กรัม ลงในขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว จากนั้นทำการลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องหมุนโดยจะทำการหมุนสลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเติมข้าวเสาไห้พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างข้าวสัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยมีปริมาณการเติมข้าวแต่ละสัปดาห์มีดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะอัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)

ขวด (มิลลิลิตร)	ปริมาณข้าวและ น้ำ	ระยะเวลา(สัปดาห์)				ปริมาณสุทธิ
		0	1	2	3	
200	ข้าว (กรัม)	50	-	-	-	50
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	-	-	-	15
250	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	200
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	-	-	-	15
500	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	200
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	-	-	-	15
1000	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	200
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	-	-	-	15

3.6.2 ศึกษาหาปริมาณการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เพื่อการผลิตสาร Monacolin K

ชั่งข้าวเสาไห้ 50 กรัม ลงในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด และ 100 กรัม จำนวน 1 ขวด นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว แล้วทำการลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว นำไปบ่มบนเครื่องหมุนโดยจะทำการหมุนสลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเติมข้าวเสาไห้พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างข้าวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยมีปริมาณการเติมข้าวแต่ละสัปดาห์ดังตารางที่ 3.3 และ 3.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะอัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)

ขวดที่	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลา (วัน)									
		0	7	10	13	16	19	22	25	28	35
1	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

ตารางที่ 3.4 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะอัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)

ขวดที่	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลา (สัปดาห์)						ปริมาณสุทธิ
		0	1	2	3	4	5	
2	ข้าว (กรัม)	50	100	100	100	100	-	450
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	30	30	30	30	-	135
3	ข้าว (กรัม)	50	150	150	150	-	-	500
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	45	45	45	-	-	150
4	ข้าว (กรัม)	50	200	200	-	-	-	450
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	60	60	-	-	-	135
5	ข้าว (กรัม)	100	100	100	100	100	-	500
	น้ำ (มิลลิลิตร)	30	30	30	30	30	-	150

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6.3 ศึกษาการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่อัตราการหมุนแตกต่างกัน

3.6.3.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ในขวดอาหารปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง

ชั่งข้าวเสาไห้ 50 กรัม ลงในขวดปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว แล้วทำการลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องหมุนโดยจะทำการหมุนสลับนิ่งในอัตรา 1:3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเติมข้าว เสาไห้และน้ำพร้อมทั้งเก็บตัวอย่างข้าวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยมีปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร อัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)

ขวด (มิลลิลิตร)	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลา(สัปดาห์)						ปริมาณสุทธิ
		0	1	2	3	4	5	
2000	ข้าว (กรัม)	50	150	150	150	-	-	500
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	30	30	30	-	-	105
5000	ข้าว (กรัม)	50	150	150	150	-	-	500
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	30	30	30	-	-	105

3.6.3.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ในขวดอาหารปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที

ชั่งข้าวเสาไห้ 50 กรัม ลงในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว แล้วทำการลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว แล้ว นำไปบ่มที่เครื่องหมุนโดยจะหมุนสลับนิ่งในอัตรา 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเติมข้าวเสาไห้และน้ำพร้อมทั้งเก็บตัวอย่างข้าวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยมีปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ดังตารางที่ 3.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.6 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร อัตราการหมุนสลับนิ่ง (30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที)

ขวด (มิลลิลิตร)	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลา(สัปดาห์)						ปริมาณสุทธิ
		0	1	2	3	4	5	
1000	ข้าว (กรัม)	50	150	150	150	-	-	500
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	30	30	30	-	-	105

3.7 การวิเคราะห์ผล

3.7.1 การหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างวัตถุดิบ

เก็บตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม ใส่จานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้อบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำออกมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่างและคำนวณหาปริมาณความชื้น(เปอร์เซ็นต์)ของวัตถุดิบ

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 1 กรัม สกัดด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บนเครื่องสกัด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Somogyi –Nelson (1954) ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.7.3 การวิเคราะห์สารสี

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 1 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บนเครื่องสกัด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสีที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.7.4 การวิเคราะห์สาร Monacolin K

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 1 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บนเครื่องสกัด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสีที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดังแสดงในภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.5 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วมาบดละเอียด ชั่งตัวอย่างปริมาณ 1-2 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงมาปรับ pH ของสารละลายให้เป็นกลาง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน ด้วยวิธีของ Morgan – Elson ดังแสดงในภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 เพื่อผลิตสาร Monacolin K ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่งและสภาวะหยุดนิ่งในขวดอาหารที่มีปริมาตรที่แตกต่างกัน

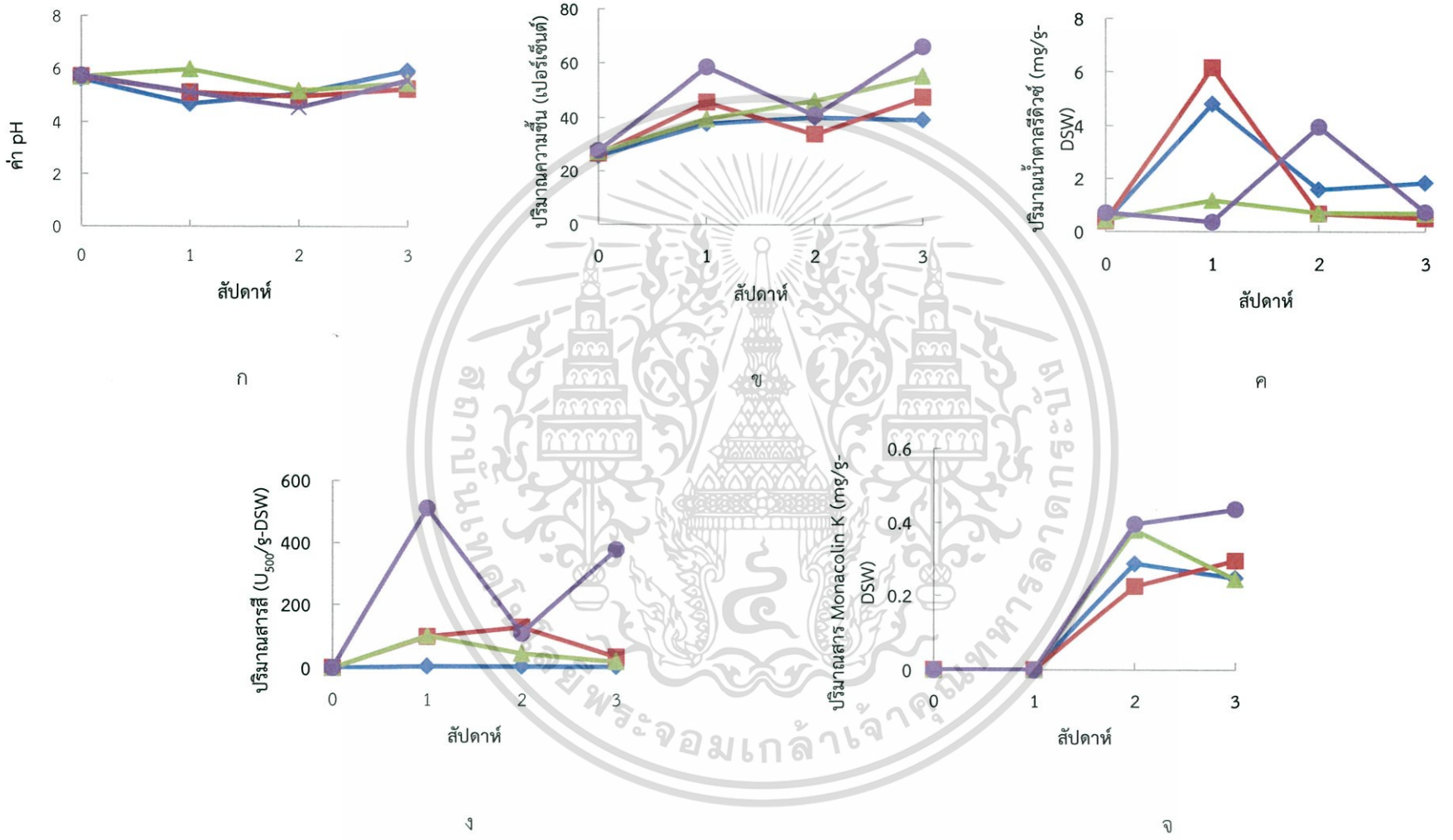
การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* บนอาหารแข็งโดยใช้ข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมัก เลี้ยงในสภาวะหมุนสลับนิ่งและสภาวะหยุดนิ่ง โดยทั้งสองสภาวะนี้จะเลี้ยงในขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร ตามลำดับ หลังจากทำให้ข้าวเสาไห้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาทีแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องหมุน 12 ชั่วโมง จากนั้นลงเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว ขวดที่เลี้ยงในสภาวะหมุนสลับนิ่งจะนำไปบ่มบนเครื่องหมุนโดยจะทำการหมุนสลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนขวดที่เลี้ยงในสภาวะหยุดนิ่งจะนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเช่นเดียวกัน และการเลี้ยงทั้งสองสภาวะจะทำการเติมข้าวเสาไห้และน้ำกลั่น พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างข้าวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำมาวิเคราะห์ค่า pH ปริมาณความชื้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสี และปริมาณสาร Monacolin K ดังแสดงในตารางที่ 4.1 รูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.2 ตามลำดับ

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนอาหารแข็งโดยใช้ข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมักในสภาวะหยุดนิ่ง ที่ขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร (ตามลำดับ) พบว่ามีค่า pH ในทุกปริมาตรขวดค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สัปดาห์ ส่วนปริมาณความชื้นเริ่มต้นทุกปริมาตรขวดมีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยค่าความชื้นจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงสัปดาห์แรก และสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ถึง 66.00 เปอร์เซ็นต์ ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะหยุดนิ่ง เชื้อไม่เกิดการเคลื่อนที่ ทำให้การถ่ายเทอากาศไม่เหมาะสมส่งผลให้การระเหยของน้ำเกิดได้น้อย ซึ่งพบว่าปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เชื้อราเจริญได้ดี และยังสามารถผลิตสารสีรวมถึงสาร Monacolin ได้ในปริมาณที่สูงที่สุด คือ 512.49 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง และ 0.4371 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตรอีกด้วย ส่วนปริมาณน้ำตาลกลูโคส จะเห็นว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลมีค่าสูงขึ้น ส่งผลให้การผลิตสารสี และสาร Monacolin ลดลง อาจเป็นเพราะปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีผลต่อการยับยั้งการผลิตสารเมแทบอไลต์

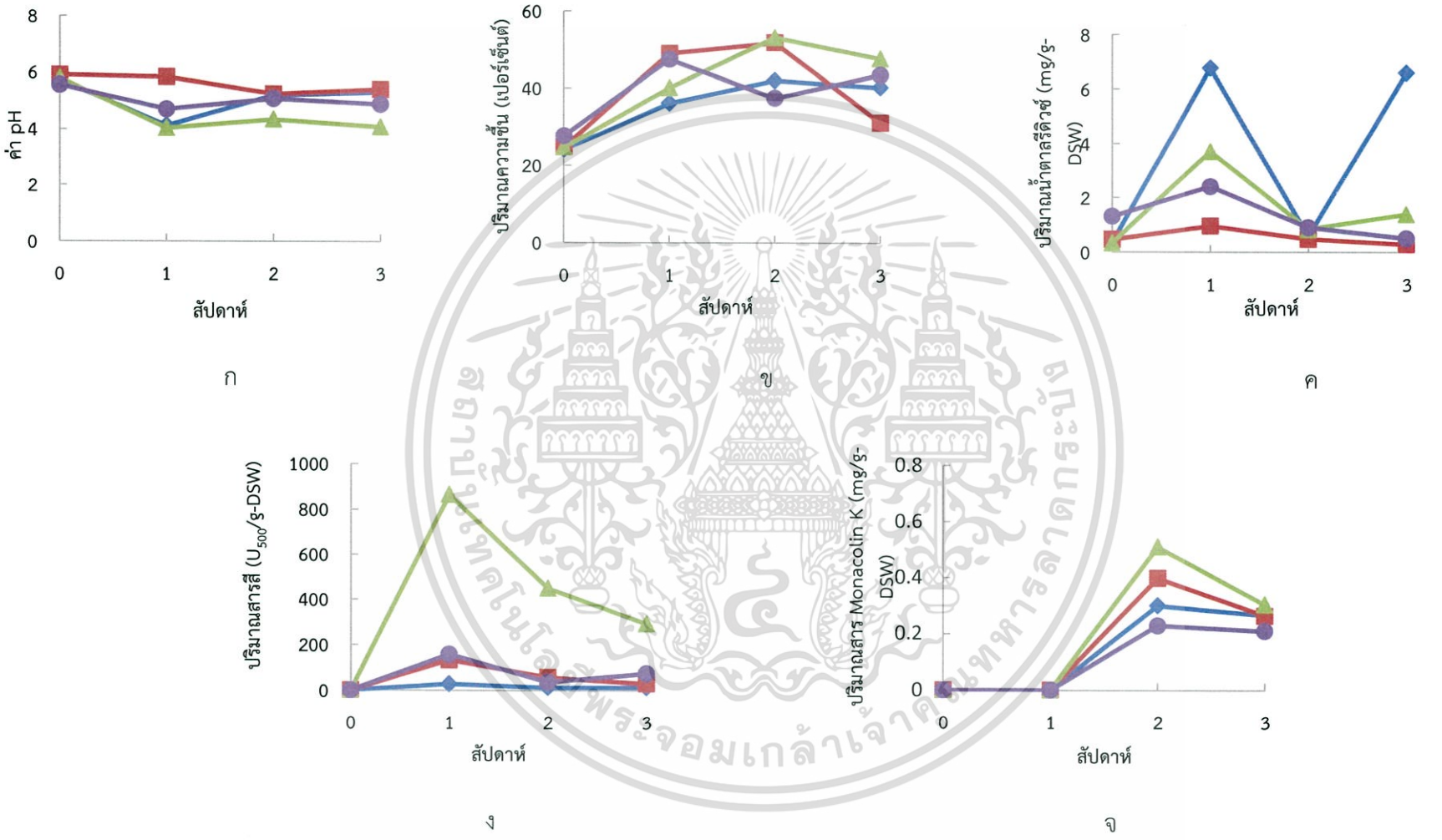
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ใน การเลี้ยงสภาวะหยุดนิ่งและสภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง

		สภาวะหยุดนิ่ง					สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง				
ขวด (มิลลิลิตร)	สัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง	ค่า pH	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)	ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW)	ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)	ค่า pH	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)	ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW)	ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)
200	0	5.62	25.64	0.4	0	0	5.71	24.11	0.3	0	0
	1	4.69	37.82	4.8	5.75	0	4.11	36.08	6.8	27.51	0
	2	5.08	40.10	1.6	5.93	0.2881	5.18	41.92	0.6	11.66	0.3003
	3	5.91	39.29	1.8	5.91	0.2482	5.29	40.17	6.6	12.19	0.2657
250	0	5.70	26.48	0.4	0	0	5.89	24.75	0.5	0	0
	1	5.12	45.68	6.1	98.71	0	5.82	48.90	0.9	132.89	0
	2	4.97	33.90	0.7	128.84	0.2251	5.22	51.73	0.5	56.35	0.3986
	3	5.25	47.67	0.5	36.28	0.2962	5.39	31.13	0.3	29.53	0.2641
500	0	5.69	27.08	0.4	-	0	5.77	24.67	0.3	0	0
	1	5.97	39.52	1.2	101.69	0	4.02	40.01	3.7	864.56	0
	2	5.18	46.29	0.7	46.33	0.3806	4.33	53.05	0.8	448.99	0.5103
	3	5.47	55.27	0.7	21.04	0.2449	4.07	47.61	1.4	292.04	0.3041
1000	0	5.73	27.67	0.7	0	0	5.54	27.68	1.3	0	0
	1	5.13	58.37	0.3	512.49	0	4.68	47.39	2.4	157.92	0
	2	4.55	40.93	4.0	109.70	0.3969	5.06	37.38	0.9	35.61	0.2290
	3	5.56	66.00	0.7	379.49	0.4371	4.87	43.37	0.5	74.13	0.2091



รูปที่ 4.1 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในสภาวะนิ่ง โดยที่ (ก) ค่า pH (ข) ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์ความชื้น) (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) (ง) ปริมาณสารสี (U500/g-DSW) และ (จ) ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ซึ่งแทน ◆ ขวดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ■ ขวดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ▲ ขวดปริมาตร500 มิลลิลิตร และ ● ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง โดยที่ (ก) ค่า pH (ข) ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์ความชื้น) (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-DSW) (ง) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และ (จ) ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ซึ่งแทน ◆ ขวดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ■ ขวดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ▲ ขวด 500 มิลลิลิตร และ ● ขวด1000 มิลลิลิตร ตามลำดับ

ส่วนผลการทดลองในสภาวะหมุนสลับนิ่งที่ปริมาตรขวด 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร (ตามลำดับ) พบว่า ค่า pH ในทุกปริมาตรขวดมีค่าเริ่มต้นที่ใกล้เคียงกันในช่วงสัปดาห์แรก และเริ่มมีค่าคงที่จนถึงสัปดาห์ที่ 3 ส่วนปริมาณความชื้นในขวด 200 250 และ 500 มิลลิลิตร (ตามลำดับ) มีค่าความชื้นเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 คือ 53.05 เปอร์เซ็นต์ ในขวดปริมาตร 500 มิลลิลิตร แต่มีปริมาณความชื้นที่น้อยกว่าสภาวะหยุดนิ่ง เนื่องจากการหมุนขวดทำให้การถ่ายเทอากาศในขวดและการระเหยของน้ำเกิดขึ้นได้ดียิ่งขึ้น เช่นเดียวกับปริมาณสารสี และสาร Monacolin ที่พบว่ามีค่าสูงสุดที่ขวดปริมาตรเดียวกัน คือ 864.56 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง และ 0.5103 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลกลูโคสพบว่ามีค่าลดลงในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการเลี้ยงเชื้อราที่สภาวะหยุดนิ่งที่พบว่า เมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น ส่งผลให้การผลิตสารสีและสาร Monacolin มีปริมาณลดลง

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนอาหารแข็ง ทั้งสองสภาวะพบว่าปริมาณความชื้นของข้าวเสาไห้ภายในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อรา การผลิตสารสีและปริมาณสาร Monacolin โดยพบว่าในสภาวะการเลี้ยงแบบหยุดนิ่ง มีการผลิตสาร Monacolin สูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 ส่วนสภาวะหมุนสลับนิ่ง พบว่ามีการผลิตสาร Monacolin สูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 โดย ปริมาณสาร Monacolin ที่พบคือ 0.4371 และ 0.5103 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง และมีค่าปริมาณความชื้นที่ 66.00 และ 53.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากปริมาณความชื้นจะมีผลต่อการผลิตสาร Monacolin แล้ว ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูงขึ้นระหว่างการเลี้ยงเชื้อนั้นมีผลต่อการผลิตสารสีและสาร Monacolin เนื่องจากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์เพื่อออกมาย่อยน้ำตาลบนเมล็ดข้าว ส่งผลให้มีการผลิตสารเมแทบอไลต์ได้ในปริมาณที่ลดลง

จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Monacolin K คือสภาวะหมุนสลับนิ่งที่สามารถให้ปริมาณสาร Monacolin ได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อราที่สภาวะหยุดนิ่ง เนื่องจากการเลี้ยงข้าวบนเครื่องหมุนทำให้เชื้อราได้รับอากาศอย่างทั่วถึง แต่ก็จะเกิดการระเหยของน้ำทำให้ข้าวมีปริมาณความชื้นที่ลดลง ดังนั้นในการทดลองถัดไปจึงนำสภาวะที่หมุนสลับนิ่งมาทำการศึกษาเพื่อหาปริมาณการเติมข้าวและน้ำที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ เพื่อการผลิตสาร Monacolin ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาหาปริมาณการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เพื่อการผลิตสาร Monacolin K

การศึกษาครั้งนี้จะทำการเลี้ยงเชื้อราที่สภาวะหมุนสลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด โดยหลังจากทำให้ข้าวเสาไห้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาทีแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตรต่อข้าวเสาไห้ 50 กรัม นำไปบ่มบนเครื่องหมุน 12 ชั่วโมง แล้วลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว นำไปบ่มบนเครื่องหมุนโดยจะทำการหมุนสลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งแต่ละขวดจะมีการเติมปริมาณข้าวเสาไห้และน้ำกลั่นในแต่ละสัปดาห์ที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างข้าวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยข้าวเสาไห้ที่เติมทั้งหมดจะมีปริมาณไม่เกิน 1 ใน 2 ของปริมาตร นำมาวิเคราะห์ค่า pH ปริมาณความชื้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสี และปริมาณสาร Monacolin K ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.3 ตามลำดับ

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติมปริมาณข้าวเสาไห้ในขวดที่มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ที่มีปริมาตรแตกต่างกัน โดยเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นระหว่างการเจริญของเชื้อราบนอาหารในขวดการทดลองที่ 1 2 3 และ 5 มีค่าปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 3 จากนั้นจะลดลงช่วงสัปดาห์ที่ 4 จนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งอาจเป็นเพราะมีการถ่ายเทอากาศได้ดี แต่การเจริญของเชื้อราบนอาหารในการทดลองที่ 4 มีปริมาณความชื้นที่ลดลงในสัปดาห์ที่ 1 จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 5 และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อราพบว่าการทดลองที่ 3 มีปริมาณค่าความชื้นที่สูงกว่าทุกขวด ในขณะที่การเปลี่ยนแปลง pH พบว่า การทดลองทั้ง 5 การทดลอง pH ลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 1 โดย pH ต่ำสุดอยู่ที่ 3.17 จากนั้นก็จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ส่วนการผลิตสารสี พบว่าเชื้อราที่เจริญบนอาหารในการทดลองที่ 1 มีการผลิตสารสีได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 ของการเจริญ ในขณะที่การทดลองที่ 2 3 4 และ 5 มีการผลิตสารสีลดลงอย่างช้าๆ และมีความเข้มข้นของสารสีลดลง ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณข้าวที่เติมมีมากเกินไป ทำให้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสะสมที่สูงขึ้น เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตสารสี และสาร Monacolin เนื่องจากเชื้อราจะต้องสร้างเอนไซม์เพื่อออกมาย่อยน้ำตาลกลูโคสจึงทำให้มีการสร้างสารเมแทบอไลต์ได้ในปริมาณที่ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นจากสัปดาห์แรกจนกระทั่งสัปดาห์สุดท้ายในการทดลองที่ 3 โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงที่สุด และส่งผลให้การผลิตสาร Monacolin ในสัปดาห์สุดท้ายลดลงเช่นเดียวกัน แต่ในสัปดาห์ที่ 4 พบว่ามีปริมาณสาร Monacolin ที่สูงสุด จึงได้นำมาวิเคราะห์การเจริญในรูปของปริมาณกลูโคซามีนเทียบกับปริมาณสาร Monacolin ดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4 ตามลำดับ พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 เชื้อให้การเจริญมีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 1.5730 และ 2.0725 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าหากเชื้อเจริญมาก จะส่งผลให้การผลิตสาร Monacolin ได้ลดลง ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ พานิดา (2012) ได้ทำการวิจัยการเพิ่มมูลค่าข้าว โดยนำปลายข้าวมาผลิตสาร Monacolin โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์กลายสีเหลือง (*Monascus kaoliang* KB20M10.2) พบว่า สามารถผลิตสาร Monacolin ได้เท่ากับ 2,126 และ 1,754 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนมีค่าเท่ากับ 4,854.04 และ 5,567.30 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

จากผลทดลองข้างต้นพบว่า การทดลองที่ 3 มีสภาวะการเติมปริมาณข้าวเสาไห้ในแต่ละสัปดาห์ที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Monacolin K มากที่สุด ซึ่งให้ปริมาณสาร Monacolin เท่ากับ 0.5727 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง ในสัปดาห์ที่ 4 แต่พบการผลิตสารสีลดลงอย่างช้าๆ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณข้าวที่เติมมีมากเกินไป ทำให้การผสมผสานและการถ่ายเทอากาศลดลง มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสะสมที่สูงขึ้น เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตสารสีและสาร Monacolin ในส่วนของการทดลองถัดไปจึงได้ให้นำปริมาณข้าว และน้ำที่เหมาะของการทดลองที่ 3 นี้ มาทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อราในขวดอาที่มีปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง และขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อดูการผสมผสานและการถ่ายเทอากาศที่มีผลต่อการผลิตสาร Monacolin K ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะอัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)

การทดลอง	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลา (วัน)									
		0	7	10	13	16	19	22	25	28	35
1	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15

ตารางที่ 4.3 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ที่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะอัตราการหมุนสลับนิ่ง (1 : 3 ชั่วโมง)

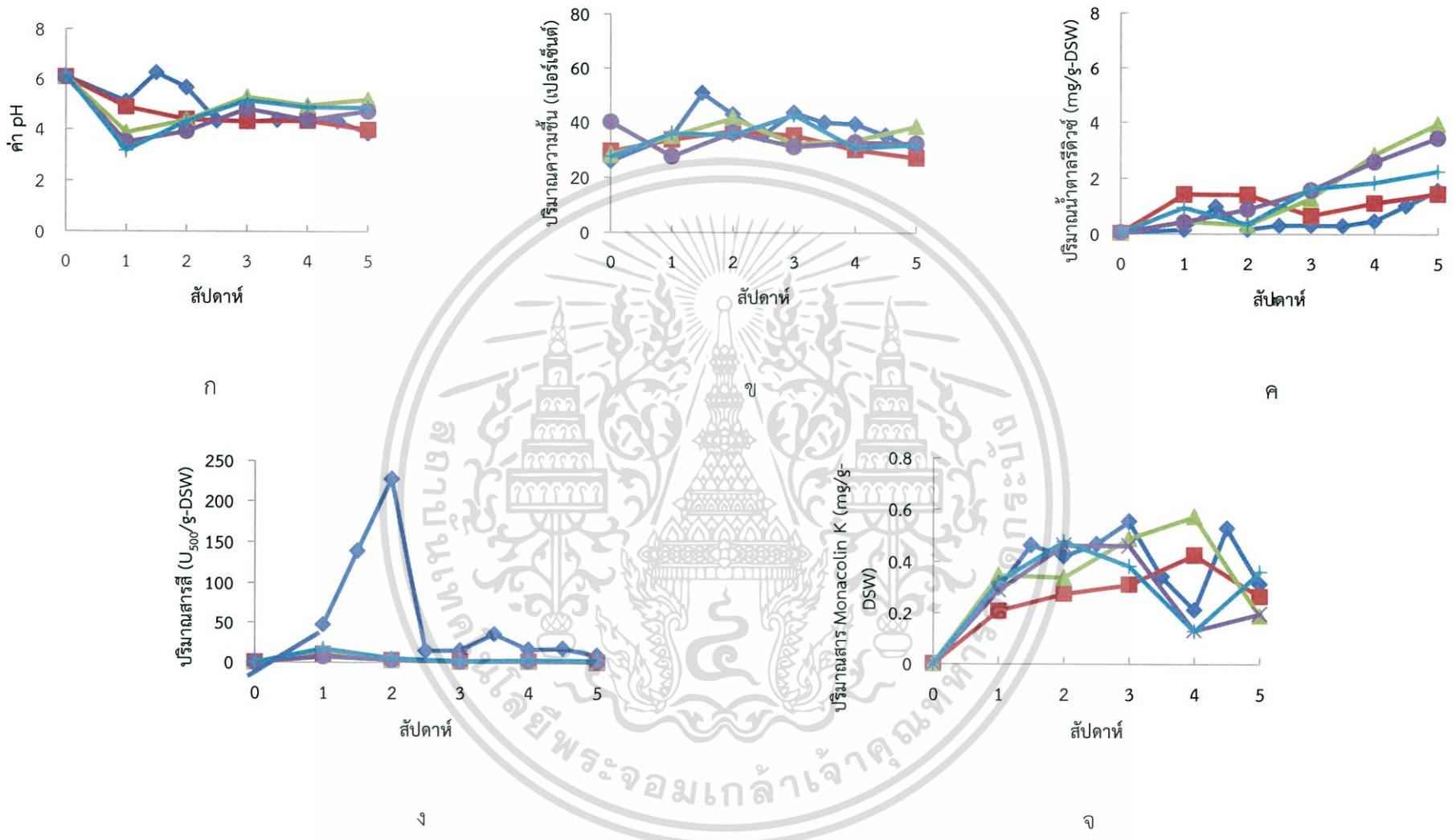
การทดลอง	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลา (สัปดาห์)					
		0	1	2	3	4	5
2	ข้าว (กรัม)	50	100	100	100	100	-
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	30	30	30	30	-
3	ข้าว (กรัม)	50	150	150	150	-	-
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	45	45	45	-	-
4	ข้าว (กรัม)	50	200	200	-	-	-
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	60	60	-	-	-
5	ข้าว (กรัม)	100	100	100	100	100	-
	น้ำ (มิลลิลิตร)	30	30	30	30	30	-

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง โดยการเติมวัสดุหมักปริมาตรที่แตกต่างกัน

การทดลองที่	วัน/สัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง	ค่า pH	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)	ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW)	ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)
1	0	6.10	25.90	0.043	0	0
	7	5.11	34.77	0.149	47.04	0.2986
	10	6.25	50.71	0.994	139.26	0.4631
	13	5.66	42.84	0.161	227.21	0.4212
	16	4.34	35.50	0.309	14.35	0.4672
	19	4.31	43.54	0.313	14.79	0.5537
	22	4.37	39.92	0.304	35.42	0.3422
	25	4.38	39.40	0.478	15.86	0.2119
	28	4.32	35.34	1.030	17.29	0.5277
	35	3.86	29.96	1.580	8.51	0.3134
2	0	6.08	29.37	0.031	0	0
	1	4.88	33.63	1.430	9.90	0.2076
	2	4.39	36.73	1.420	2.43	0.2750
	3	4.32	35.25	0.669	1.25	0.3114
	4	4.34	30.09	1.130	1.20	0.4250
	5	3.99	27.22	1.460	0.41	0.2645

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง โดยการเติมวัสดุหมักปริมาตรที่แตกต่างกัน

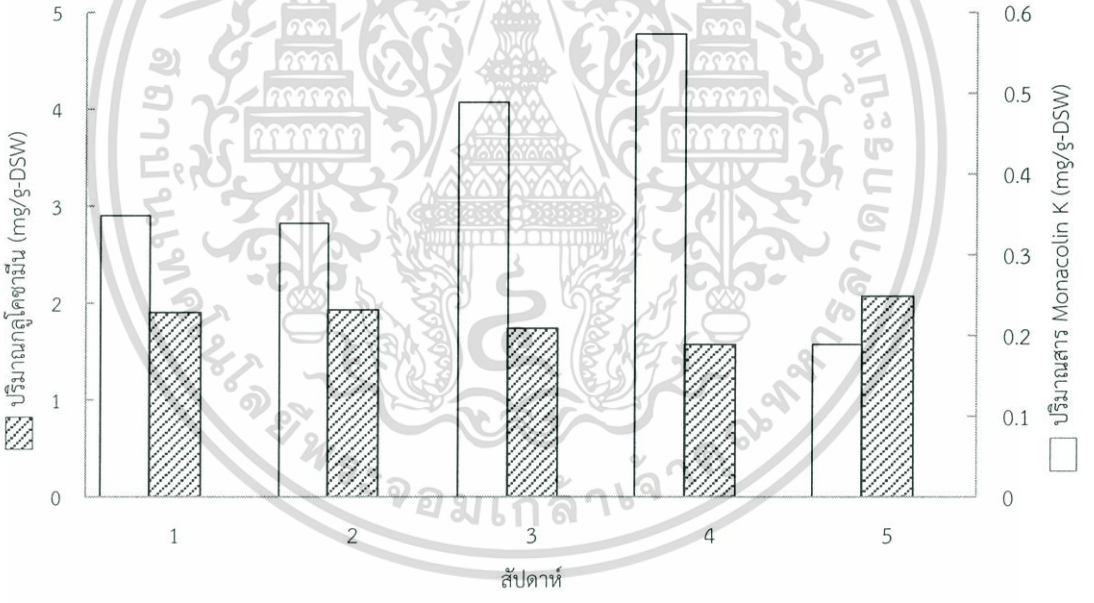
การทดลองที่	วัน/สัปดาห์ที่เก็บตัวอย่าง	ค่า pH	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)	ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW)	ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)
3	0	6.10	28.05	0.037	0	0
	1	3.87	34.92	0.455	14.59	0.3482
	2	4.36	41.48	0.326	2.36	0.3389
	3	5.29	32.17	1.290	1.58	0.4883
	4	4.95	33.42	2.850	1.41	0.5727
	5	5.19	38.58	3.960	1.56	0.1889
4	0	6.07	40.02	0.057	0	0
	1	3.49	27.54	0.434	7.01	0.2893
	2	3.92	36.17	0.890	2.99	0.4625
	3	4.82	31.08	1.590	1.12	0.4612
	4	4.37	32.72	2.600	2.02	0.1299
	5	4.72	32.34	3.450	1.52	0.1962
5	0	6.16	27.45	0.033	0	0
	1	3.17	35.91	0.955	16.80	0.3218
	2	4.32	35.31	0.354	4.94	0.4769
	3	5.16	42.69	1.630	1.66	0.3829
	4	4.88	30.76	1.860	2.82	0.1276
	5	4.87	32.00	2.260	2.48	0.3603



รูปที่ 4.3 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่การเติมข้าวเสาไห้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในขวดอาหารปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยที่ (ก) ค่า pH (ข) ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์ความชื้น) (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-DSW) (ง) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และ (จ) ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ซึ่งแทน ◆ การทดลองที่ 1 ■ การทดลองที่ 2 ▲ การทดลองที่ 3 ● การทดลองที่ 4 และ + การทดลองที่ 5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) กับปริมาณกลูโคซามีน (mg/g-DSW) จากการศึกษาปริมาณการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เพื่อการผลิตสาร Monacolin K ที่ให้ผลผลิตที่สูง

การทดลองที่ให้ปริมาณสาร Monacolin K สูงสุด	สัปดาห์ที่	ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)	ปริมาณกลูโคซามีน (mg/g-DSW)
การทดลองที่ 3	1	0.3482	1.9027
	2	0.3389	1.9289
	3	0.4883	1.7387
	4	0.5727	1.5730
	5	0.1889	2.0725



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) และปริมาณกลูโคซามีน (mg/g-DSW) ของเชื้อรา *Monascus* sp.U6V1 ที่สภาวะการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เพื่อการผลิตสาร Monacolin K

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษาการเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่อัตราการหมุนแตกต่างกัน

4.3.1 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus sp. U6V1* ในขวดอาหารปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง

ชั่งข้าวเสาไห้ 50 กรัม ลงในขวดอาหารปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ทำให้ข้าวเสาไห้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาทีแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องหมุน 12 ชั่วโมง แล้วลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว นำไปบ่มบนเครื่องหมุนโดยจะทำการหมุนสลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยจะมีการเติมข้าวเสาไห้สัปดาห์ละ 150 กรัม และเติมน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร จนมีปริมาณสุทธิ 500 กรัม ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละสัปดาห์เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสี และปริมาณสาร Monacolin K ดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5 ตามลำดับ

หลังจากเติมข้าวเสาไห้ที่ปลอดเชื้อจนมีปริมาณสุทธิ 500 กรัม ในขวดปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร พบว่า ค่า pH ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 pH จะลดลงอย่างรวดเร็วอยู่ที่ 4.52 และ 4.43 ตามลำดับ จากนั้น pH ค่อยๆเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณความชื้นระหว่างการเจริญบนอาหารของเชื้อราในขวดปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร มีการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกัน แต่การเจริญบนอาหารในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร จะมีความชื้นในช่วงสัปดาห์ที่ 2 สูงกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะในขวดปริมาตร 5000 มิลลิลิตร มีการถ่ายเทอากาศและการผสมผสานได้ดี ในขณะที่การผลิตสารสี พบว่า เชื้อราที่เจริญบนอาหารในขวดปริมาตร 5000 มิลลิลิตร สามารถผลิตสารสีได้ดีและให้ปริมาณสูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 ของการเจริญ ซึ่งในทางกลับกันเชื้อราที่เจริญบนอาหารในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร มีการผลิตสารสีได้น้อย อาจเกิดจากการที่มีปริมาณความชื้นที่มากเกินไปและยังส่งผลให้มีการสร้างน้ำตาลกลูโคสสะสมในระบบมากเกินไป จนไปยับยั้งการผลิตสารสีของเชื้อรา แต่ในการผลิตสาร Monacolin K แสดงให้เห็นว่าในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร มีการผลิตสาร Monacolin สูงกว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 3 จากนั้นจะค่อยๆเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ และในขวดปริมาตร 5000 มิลลิลิตร พบว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 2 มีการผลิตสาร Monacolin อย่างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง จากนั้นเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 และค่อยๆ ลดลงจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อรา

จากผลการทดลอง พบว่า การเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมและมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงระหว่าง 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Monacolin K โดยให้ปริมาณสาร Monacolin ได้สูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และ 5 ของการเจริญ มีค่า 0.2746 และ 0.1303 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ

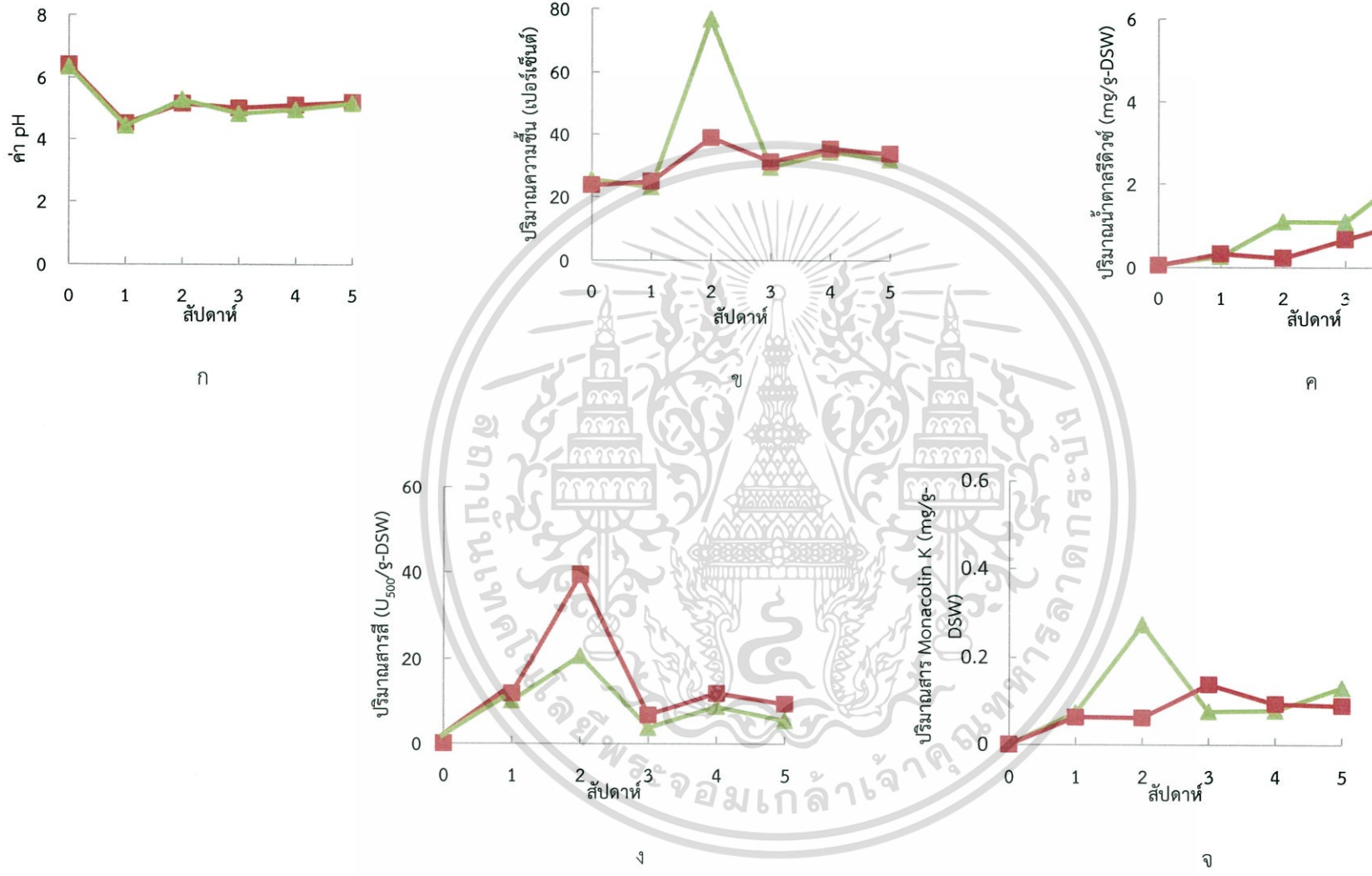
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มพื้นที่ภายในภาชนะที่มากขึ้นจะส่งผลต่อการถ่ายเทอากาศและการผสมผสานภายในภาชนะที่ดีขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิสูงตามเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4.6 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) โดยการเติมข้าวเสาไห้ปริมาณที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดอาหารขนาด 2000 มิลลิลิตร และ 5000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง

ขวด	สัปดาห์ที่	สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง				
		ค่า pH	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาล (mg/g-DSW)	ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW)	ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)
2000 ml	0	6.41	25.48	0.049	-	-
	1	4.52	23.01	0.258	10.03	0.0723
	2	5.16	76.64	1.091	20.68	0.2746
	3	5.02	29.35	1.086	3.68	0.0755
	4	5.12	34.29	2.233	8.67	0.0774
	5	5.21	31.82	3.302	5.40	0.1303
5000 ml	0	6.34	23.65	0.041	-	-
	1	4.43	24.84	0.32	11.84	0.0624
	2	5.29	38.91	0.218	39.47	0.0609
	3	4.83	31.16	0.665	6.75	0.1378
	4	4.96	35.33	1.089	11.90	0.0930
	5	5.17	33.74	3.612	9.38	0.0889

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 โดยการเติมข้าวเสาไห้ปริมาณที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดอาหารขนาด 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง โดยที่ (ก) ค่า pH (ข) ปริมาณความชื้น (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ (ง) ปริมาณสารสี โดยที่แทน ▲ ขวด 2000 มิลลิลิตร และ ■ ขวด 5000 มิลลิลิตร

4.3.2 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในขวดอาหารปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที

ชั่งข้าวเสาไห้ 50 กรัม ลงในขวดอาหารปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ทำให้ข้าวเสาไห้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาทีแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องหมุน 12 ชั่วโมง แล้วลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว นำไปบ่มบนเครื่องหมุนโดยจะทำการหมุนสลับนิ่งในอัตราการหมุน 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยจะมีการเติมข้าวเสาไห้สัปดาห์ละ 150 กรัม และเติมน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร จนมีปริมาณสุทธิ 500 กรัม ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละสัปดาห์เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณสารสี และปริมาณสาร Monacolin K ดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.6 ตามลำดับ

หลังจากเติมข้าวเสาไห้ที่ปลอดเชื้อจนมีปริมาณสุทธิ 500 กรัม ในขวดอาหารปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าปริมาณความชื้นระหว่างการเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งมีการเปลี่ยนแปลงที่คงที่ โดยในสัปดาห์ที่ 1 ปริมาณความชื้นจะลดลง จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงสัปดาห์สุดท้ายของการเจริญ ขณะที่การเปลี่ยนแปลงของ pH ในการเจริญของเชื้อราบนอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วอยู่ที่ประมาณ 4.41 แล้ว pH จะเพิ่มขึ้นแบบคงที่อย่างช้าๆ สำหรับการผลิตสารสี พบว่าเชื้อราสามารถผลิตสารสีได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 และจะลดลงอย่างต่อเนื่อง อาจเป็นเพราะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสะสมมากจนทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตสารสี ซึ่งจะเห็นได้จากการสะสมปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูง เนื่องจากเชื้อราไม่ได้นำไปใช้สำหรับกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ ในขณะที่การผลิตสาร Monacolin K มีการเปลี่ยนแปลงที่เพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 และจะลดลงในสัปดาห์ที่ 4 แล้วเพิ่มขึ้นในสัปดาห์สุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อรา

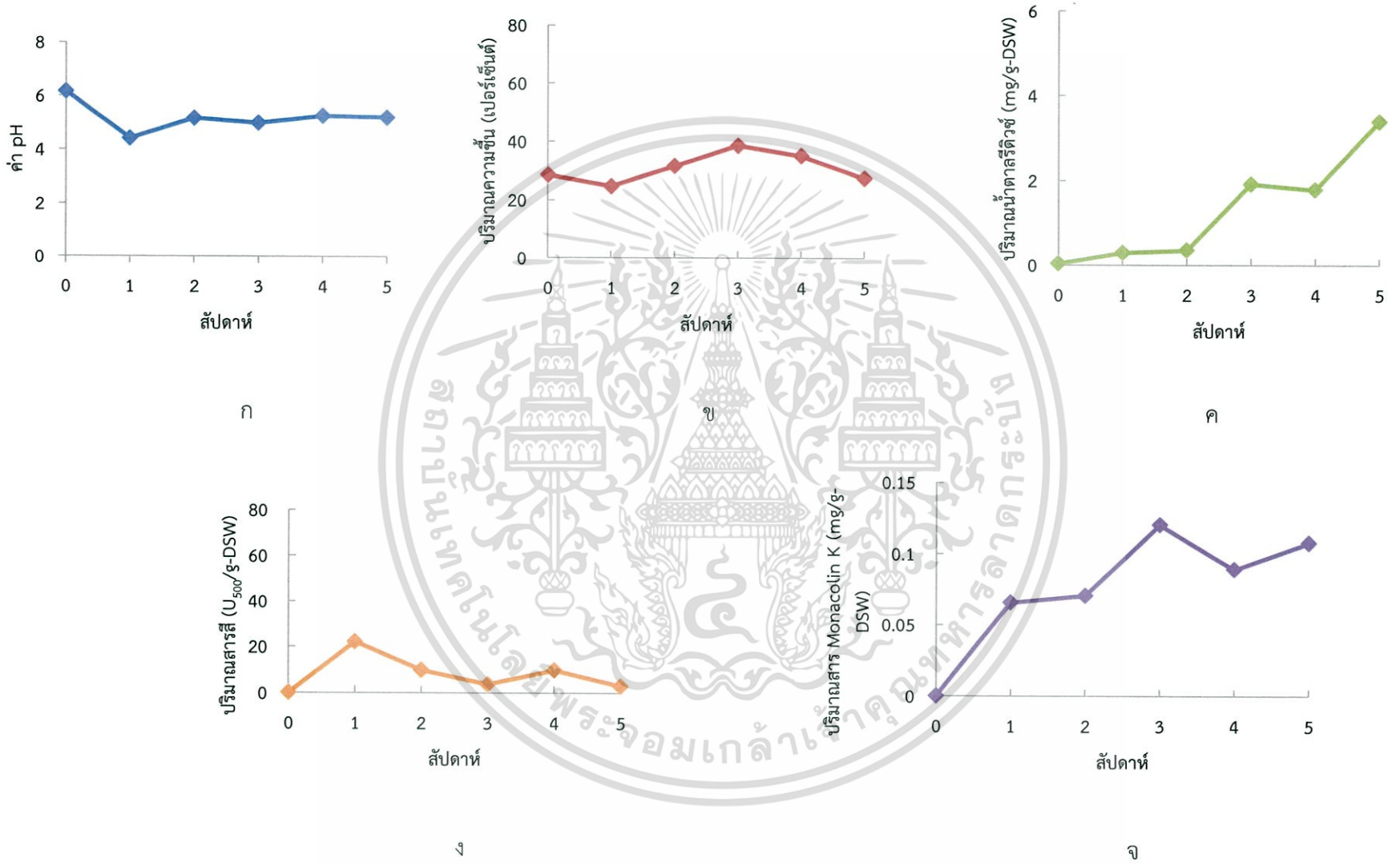
จากผลการทดลองพบว่า การผลิตสาร Monacolin K ในสภาวะการหมุนสลับนิ่งในอัตรา 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที ให้ปริมาณสาร Monacolin K มากที่สุดเท่ากับ 0.1201 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง ในสัปดาห์ที่ 3 และมีปริมาณความชื้นที่สูง ซึ่งส่งผลให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง จนไปยับยั้งการผลิตสารสีของเชื้อรา ทำให้ในสัปดาห์ที่ 3 มีปริมาณสารสีที่น้อย จากการทดลองของพลายแก้ว และ บุษบา (2534) พบว่า ปัจจัยที่สำคัญต่อการหมักข้าวแดงคือ ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม ในกรณีที่มีความชื้นเริ่มต่ำเกินไป จะทำให้เชื้อรามีการเจริญน้อยเป็นเหตุให้การผลิตสารสีน้อยไปด้วย แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงเกินไปจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ทำให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงเกินไป จนเกิดการยับยั้งการผลิตสารสีของเชื้อรา แต่ส่งเสริมการสร้างเอทานอลแทน (Lotong และ Suwanarit, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) โดยการเติมข้าวเสาไห้ปริมาณที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที

ขวด	สัปดาห์ที่	สภาวะหมุน 30 นาที:1 ชั่วโมง 30 นาที				
		ค่า pH	ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาล (mg/g-DSW)	ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW)	ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)
1000 ml	0	6.16	28.55	0.032	-	-
	1	4.41	24.72	0.288	22.05	0.0655
	2	5.17	31.62	0.346	9.84	0.0705
	3	4.99	38.66	1.917	3.68	0.1201
	4	5.26	35.16	1.781	9.85	0.0889
	5	5.21	27.47	3.389	2.98	0.1075

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



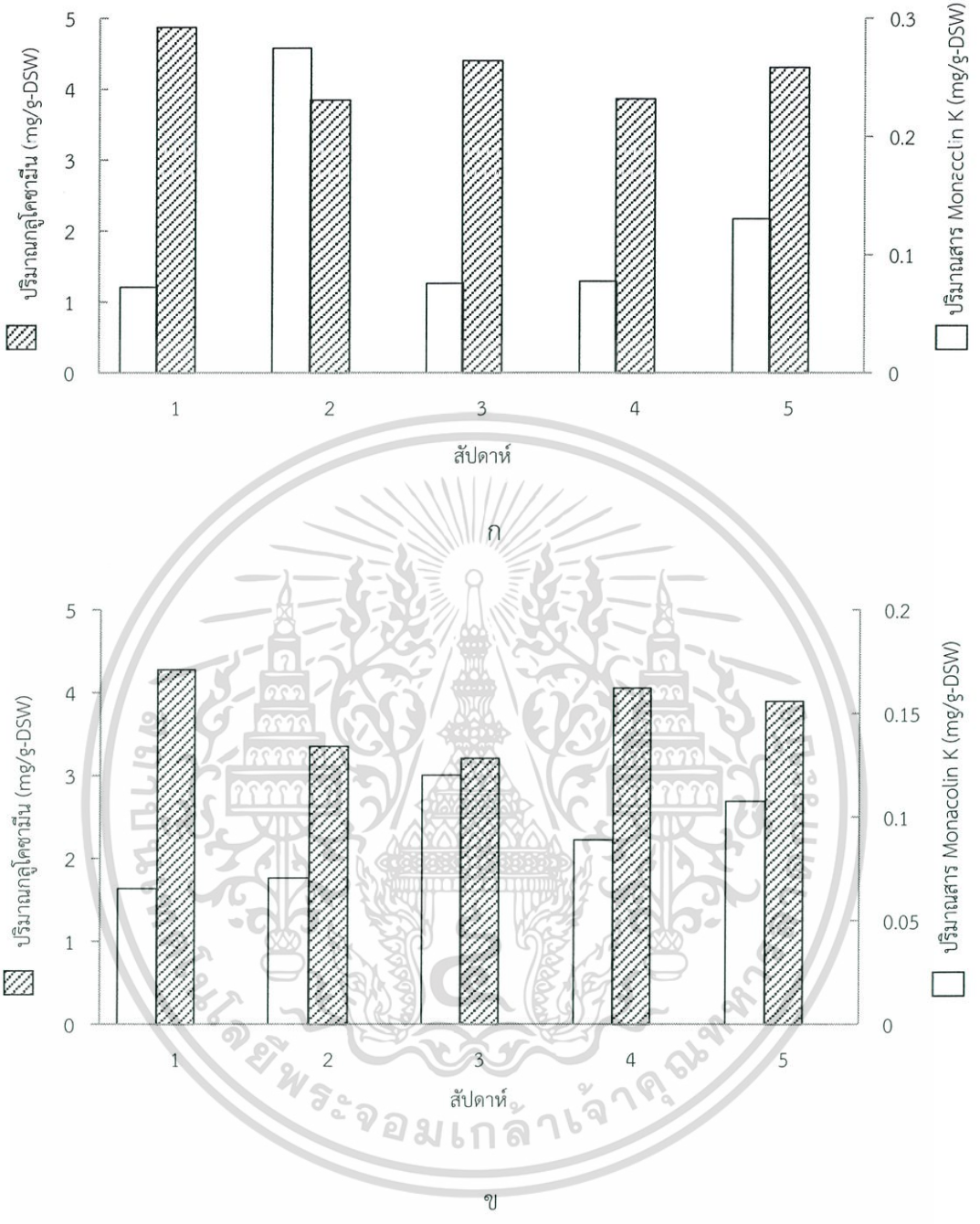
รูปที่ 4.6 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 โดยการเติมข้าวเสาไห้ปริมาณที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที โดยที่ (ก) ค่า pH (ข) ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) (ค) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-DSW) (ง) ปริมาณสารสี (U_{500}/g-DSW) และ (จ) ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ตามลำดับ

จากการทดลองเติมข้าวเสาไห้ที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ ในขวดปริมาตร 1000 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่อัตราการหมุนแตกต่างกัน เพื่อผลิตสาร Monacolin K พบว่า ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในขวดอาหารปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง ขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ให้ปริมาณสาร Monacolin K ที่สูงกว่าขวดปริมาณ 5000 มิลลิลิตร และในขวดอาหารปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที ให้ปริมาณสาร Monacolin K สูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งเมื่อนำขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ที่อัตราการหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง และขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่อัตราการหมุนสลับนิ่ง 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที มาวิเคราะห์การเจริญในรูปของปริมาณกลูโคซามีนเปรียบเทียบกับปริมาณสาร Monacolin K ดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.7 ตามลำดับ พบว่า ปริมาณของสาร Monacolin K ของขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร มีค่าสูงสุด 0.2746 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง มีเชื้อเจริญ เท่ากับ 3.8472 มิลลิกรัมกลูโคซามีนต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง และขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร การหมุนสลับนิ่ง 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที มีปริมาณของสาร Monacolin K เท่ากับ 0.1201 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง และมีเชื้อเจริญ เท่ากับ 3.2081 มิลลิกรัมกลูโคซามีนต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) กับปริมาณกลูโคซามีน (mg/g-DSW) จากเลี้ยงเชื้อรา *Monascus sp. U6V1* ในขวดอาหารปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง และในขวดอาหาร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที

ขวดที่ให้ปริมาณสาร Monacolin K สูงสุด	สัปดาห์ที่	ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)	ปริมาณกลูโคซามีน (mg/g-DSW)
ขวด 2000 มิลลิลิตร (1 : 3 ชั่วโมง)	1	0.0723	4.8704
	2	0.2746	3.8472
	3	0.0755	4.3988
	4	0.0774	3.8629
	5	0.1303	4.3048
ขวด 1000 มิลลิลิตร (30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที)	1	0.0655	4.2796
	2	0.0705	3.3545
	3	0.1201	3.2081
	4	0.0889	4.0558
	5	0.1075	3.8974

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) กับปริมาณกลูโคซามีน (mg/g-DSW) โดยที่ (ก) ขวดอาหารปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง และ (ข) ขวดอาหาร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนอาหารแข็งโดยใช้ข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมัก ในสภาวะหยุดนิ่งและสภาวะหมุนสลับนิ่งในขวดปริมาตร 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสาร Monacolin K ได้แก่ ขวดปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่งสามารถให้ปริมาณสาร Monacolin เท่ากับ 0.5103 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อราที่สภาวะหยุดนิ่งที่มีการผลิตสาร Monacolin เท่ากับ 0.4371 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องหมุนจะทำให้เชื้อราได้รับอากาศอย่างทั่วถึง แต่ก็จะเกิดการระเหยของน้ำทำให้ข้าวมีปริมาณความชื้นที่ลดลง ดังนั้นในการทดลองถัดไปจึงนำสภาวะที่หมุนสลับนิ่งมาทำการศึกษาเพื่อหาปริมาณการเติมข้าวและน้ำที่เหมาะสมในแต่ละสัปดาห์ต่อไป

จากการเลี้ยงเชื้อราที่สภาวะหมุนสลับนิ่งในอัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จำนวน 5 การทดลอง โดยในแต่ละการทดลองจะมีปริมาณการเติมข้าวและน้ำแตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์ จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณการเติมข้าว และน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในการผลิตสาร Monacolin K มากที่สุด ได้แก่ การทดลองที่ 3 ซึ่งมีการเติมวัสดุหมักแบบปริมาณสัปดาห์ละ 150 กรัม เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ให้ปริมาณสาร Monacolin เท่ากับ 0.5727 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง ในสัปดาห์ที่ 4 แต่กลับพบว่าการผลิตสารสีมีปริมาณลดลงอย่างช้าๆ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณข้าวที่เติมมีมากเกินไป ทำให้การผสมผสาน และการถ่ายเทอากาศลดลง มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสะสมที่สูงขึ้น เป็นผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตสารสีและสาร Monacolin ในส่วนของการทดลองถัดไปจึงได้ให้นำปริมาณข้าว และน้ำที่เหมาะของการทดลองที่ 3 นี้มาทำการศึกษาการเลี้ยงเชื้อราในขวดอาหารที่มีปริมาตร 1000 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ที่อัตราการหมุนแตกต่างกัน เพื่อดูการผสมผสาน และการถ่ายเทอากาศที่มีผลต่อการผลิตสาร Monacolin K ต่อไป

จากการเลี้ยงเชื้อราในขวดอาหารที่มีปริมาตร 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง และขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราการหมุน 30 นาที : 1 ชั่วโมง 30 นาที พบว่า การเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร อัตราการหมุน 1 : 3 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงระหว่าง 70 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการผลิตสาร Monacolin K โดยให้ปริมาณสาร Monacolin ได้สูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 2 เท่ากับ 0.2746 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มพื้นที่ภายในภาชนะ จะส่งผลต่อการถ่ายเทอากาศ และการผสมผสานภายในภาชนะได้ดีขึ้น แต่พบว่าในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ขวดที่มีปริมาตรใหญ่ จะทำให้มีพื้นที่สำหรับข้าวไปเกาะยังบริเวณของผนังขวดได้มากขึ้น ส่งผลให้เมล็ดข้าวที่เกาะผนังขวดไม่เกิดการเคลื่อนที่ จึงทำให้เชื้อเจริญได้ไม่ดี และผลิตสารทุติยภูมิได้ในปริมาณที่น้อยกว่าในการทดลองก่อนหน้านี้

ทั้งนี้จากการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อราในรูปของปริมาณกลูโคซามีนเทียบกับปริมาณสาร Monacolin พบว่าเชื้อราให้การเจริญสูงสุดตั้งแต่สัปดาห์แรกของการเลี้ยงเชื้อ และไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงไปจนสิ้นสุดการเจริญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหากเชื้อเจริญมาก จะส่งผลให้การผลิตสาร Monacolin ได้ลดลง ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ พานิดา (2012) ได้ทำการวิจัยการเพิ่มมูลค่าข้าว โดยนำปลายข้าวมาผลิตสาร Monacolin โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์กลายสีเหลือง (*Monascus kaoliang* KB20M10.2) พบว่า สามารถผลิตสาร Monacolin ได้เท่ากับ 2,126 และ 1,754 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนมีค่าเท่ากับ 4,854.04 และ 5,567.30 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาปริมาณซิตรินินที่เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 มีการสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญของเชื้อว่า ปริมาณของซิตรินินมีผลต่อการผลิตสาร Monacollin K หรือไม่

2. ควรหาวิธีลดการเกาะติดของวัสดุหมักกับผนังของภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา เนื่องจากมีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิ

3. ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 มีการผลิตแอลกอฮอล์ขึ้น ดังนั้นควรศึกษาเพิ่มเติมว่า ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เชื้อผลิตขึ้นนั้นจะส่งผลต่อการผลิตสาร Monacolin K หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์. 2558. การส่งออกข้าวไทยสูงสุดเป็นประวัติการณ์ในปี 257. [Online]. Available : http://www.dft.go.th/Default.aspx?tabid= 320&ctl= DetailUserContent&mid=668&contentID=6313

กรมการค้าภายใน กระทรวงพาณิชย์. 2558. รายงานราคาข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าว. [Online]. Available : http://www.dit.go.th/contentmain.asp?typeid=4

งามชื่น คงเสรี. 2543. "คุณภาพและการตรวจสอบข้าวหอมมะลิไทย." ***วารสารวิชาการ สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.***

จันทนี อิทธิพานิชพงศ์. 2545. **ยาลดไขมันในเลือด**. เภสัชวิทยา 1 คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : แทกซ์แอนด์เจอนัล.

จุฬารัตน์ ครองแถว. 2547 การผลิตต้นเชื้อรา *Rhizopu oligosporus* โดยวิธีการหมักแบบแห้งในถังแพคเบด วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมอาหารบัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

บุษบา ยงสมิทธ์. 2518. ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตข้าวแดงโดยเชื้อราโมแนสคัส. **บทปฏิบัติการในวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**.กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

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

นันทนา สีสุข. 2555 วิทยาศาสตร์สำหรับเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. กรุงเทพมหานคร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิสา บุตรดา. 2537. "การกลายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส กบ.11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสี และเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการกับสายพันธุ์พ่อแม่ สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดง และสีเหลือง". วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พานิดา ทองประดิษฐ์. 2012. "การผลิตข้าวน้ำตาลทองจากปลายข้าวหมักด้วยเชื้อราสร้างสารสีเหลือง." หน้า 579-582. **งานประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 2**. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

มยุรา ศรีกัลยานุกูล, ฐปน ชื่นบาล, ศิราภรณ์ ชื่นบาล และไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน. 2554. “การผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อราจากน้ำทิ้งโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ.” **รายงานวิจัยทุนอุดหนุนจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร**. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สมชาย ไกรรักษ์. 2536. ศักยภาพของเชื้อราโมแนสคัสกลายพันธุ์ชนิดใหม่ในการผลิตสีเหลืองธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2558. ปริมาณการส่งออกข้าวประจำปี 2558. [Online]. Availab : http://www.thairiceexporters.or.th/export%20by%20country%202016.html

สุรัตน์ อัตตะ. 2551. โมนาโคลิน เค สกัดจากข้าวไทย ต่อยอดงานวิจัยลดไขมันในคน. [Online]. Available : http://www.Komchadluek.net/detail/20091201/39431

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าวกรมการข้าว. 2559. องค์ความรู้เรื่องข้าว. [Online]. Available : www.brrd.in.th/rkb/index.php.htm

Ainswarth, G.C., Sparrow F.K. and A.S. Sussman. 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 C.W., Mims. 1979. **Introductory Mycology**. New York : John Wiley and Son.

Alexopoulos, CJ., Mims, CW., and Blackwell, M. 1996. Introductory mycology. 4th ed. New York : John Wiley & Sons. 868.

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

Bashir, M., Ldi, Aet., and A, Umaral. 2011. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications. An overview. *Research in Biotechnology* 2(6) : 21-26.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

Chen, M.H. and M.R. Johns. 1993. Effect of pH and nitromgen source on pigment production by *Monascus purpureus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 40 : 132-138

Chisti, Y. 1999. Solid substrate fermentations, enzyme production, food enrichment. 2446 - 2462. In Flickinger MC, Drew SW, editors. Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation. vol. 5. New York : Wile.

Chiu, S.W. and S.M. Chan. 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.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Fink-Gremmels J. and L. Leirtner. 1989. Biologische wirkung von *Monascus purpureus*. *Fleischwirtschraft*; 69(1) : 115-22.

Hajjaj, H., Klaebe, A., Loret, M.O., Tzedakis, T., Goma, G. and P.J. Blanc. 1997. Production and identification of N-glucosyl rubropunctamine and N-glucosylmonascorubra mine from *Monascus ruber* and the occurrence of electron donor-acceptor complexes in these red pigments. *Appl Environ Microbiol*. 63 : 2671–2678.

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

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

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

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

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

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

Hendrickson, L., Davis, C. R., Roach, C., Nguyen, D. K., Aldrich, T., McAda, P. C., and C.D. Reeves. 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

characterization of blocked mutant, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem. Biol*. 6 : 429-439.

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

Lain, X., Wang, C., and K. Guo. 2007. Identification of new red pigments produced by *Monascus ruber*. *Dyes and Pigments* . 73(1) : 121–125.

Lee Y.K., Chen D.C., Somchai C., Seki T. and T. Yoshida. 1995. Production of Monascus Pigments by a Solid-Liquid State Culture Method. *Journal of Fermentation andBioencineering*. 79(5) : 516-518.

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.

Lin, T.F. and A.L. Demain. 1991. Effect of nutrition to *Monascus* sp. on formation of red pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36 : 70-75.

Lin, TF. and A.L. Demain 1994. Leucine interference in the production of water-soluble red *Monascus* pigments. *Arch Microbiol*. 162 : 114–119.

Ng and Shyu. 2004. Development and production of cholesterol-lowering Monascus-nata complex. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 20 : 875–879.

Mahesh, N., Balakumar, S., Indumathi, P., Ayyadurai, A., and R, Vivek. 2012. Production and Optimization of Mevastatin using *Penicillium citrinum* NCIM 768. *J Microbial Biochem Technol*. 4(1) : 001-004 .

Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S. and U.C. Banerjee. 2005. Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malays. J. Microbiol*. 1 : 1–9.

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

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

Panda, B.P., Javed, S. and M. Ali. 2010. Optimization of fermentation parameters for higher lovastatin production in red mold rice through Co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. *Food Bioprocess Technol*. 3 : 373–378.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Ritmungkrin B. 2004. Improvement of *Monascus purpureus* by mutation for the pigments production in solid state using wide Yam [BSc research]. Bangkok : Chandrakasem Rajabhat University; Thai.

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

Subramaniyam R. and R. Vimala. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. International journal of science and nature. 3(3): 480-486.

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

Shepherd, D. and M. Carels. 1983. Product formation and differentiation in fungi. pp. 515-535. In J.E. Smith (ed.). Fungal Diferentiation, Marcel Dekker, inc., New York.

Su, Y.C. and W.H. Wong. 1983. Chinese red rice: Anka, pp.547-553 In K.H. Steinkraus, R.E. Cullen, C.S. Pederson, L.F. Nellis and B.K. Gavitt (eds.) Handbook of Indigenous Fermented Foods, Marcel Dekker, New York.

Su, Y.-C., Wang, J.-J., Lin, T.-T. and T.M. Pan. 2003. Production of the secondary metabolites gamma- aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 30(1) : 41–46.

Teng, S.S. and W. Feldheim. 2000. The fermentation of rice for anka pigment production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 25(3) : 141-146.

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

Vederas, J.C., Moore, R.N., Bigam, G. and K.J. Chan. 1985. Biosynthesis of the hypocholesterolemic agent mevionlin by *Aspergill terreus*. Determination of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the origin of carbon, hydrogen and oxygen by 13C NMR and mass spectrometry. *J Am Chem Soc*. 107(12) : 3694-701.

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

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

Wang, J.J., Lee, C.L., and T.M. Pan. 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

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

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

Xu, B., Jia, X., Gu, L. and C. Sung. 2006. Review on the qualitative & quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. *Food Control*. 17(4) : 271–285.

Xu, K., Xu, X., Fukao, T., Canlas, P., Maghirang, R., Heuer, S., Ismail, A.M., Bailey-Serres, J., Ronald, P.C. and D.J. Mackill. 2006. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. Nature, in press.

Yongsmith, B., Tabloka, W.; Yongmanitchai, W. and R. Bavavoda. 1993. Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus*sp. KB 10 grown on cassava medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9 : 85-90.

Yongsmith, B., Kitprechavanich, V., Chitradon, L.; Chaisrisook, C. and N. Budda. 2000. Color mutants from *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10(1-3) : 263-272.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหาร

1. อาหาร MYS (Malt yeast extract starch agar)

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

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

2. อาหาร SS (Soybean starch medium)

แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม
แป้งถั่วเหลือง	40	กรัม

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

สารเคมี และวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การหาน้ำหนักแห้ง (dry cell weight)

1.1 นำจานเชื้อออบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง (desiccators) แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

1.2 นำตัวอย่างข้าวประมาณ 1-2 กรัม ใส่จานเพาะเชื้อที่อบไว้แล้ว

1.3 นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อบจนได้น้ำหนักคงที่ใช้เวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง

1.4 นำออกมาใส่โถอบแห้ง 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

1.5 นำไปอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักจานเพาะเชื้อมาหักออกเป็นค่าน้ำหนักแห้ง

2. การหาปริมาณความชื้น

ใช้วิธีการเดียวกับการหาน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อได้น้ำหนักแห้งแล้ว ให้นำมาหักออกจากน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ ก็จะได้ค่าความชื้นของตัวอย่าง นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

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

<u>ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณความชื้น</u>

น้ำหนักจานเพาะเชื้อ = 87.9164 กรัม

น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ = 1.8764 กรัม

หลังจากอบแล้วนำมาชั่ง = 89.6393 กรัม

ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ = 1.7229 กรัม

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

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

$$= 1.8764$$

ดังนั้น ตัวอย่างมีปริมาตรความชื้นร้อยละ 8.1806

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ของ Somogyi –Nelson (1954)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส ไซโลส โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ เกิดสีโมลิบดินัมบลู (Molybdrnum blue) ดังปฏิกิริยา

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

3.1 สารเคมี

3.1.1 Copper reagent

เตรียมสารละลาย $Na_2HPO_4 . 12H_2O$ 71 กรัม และโซเดียมโปรแทสเซียมทาร์เทรต 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 นอมอล จำนวน 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย $CuSO_4 . 5H_2O$ 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ทำให้ร้อน เติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนกรองออกก่อนนำมาไปใช้

3.1.2 Nelson reagent

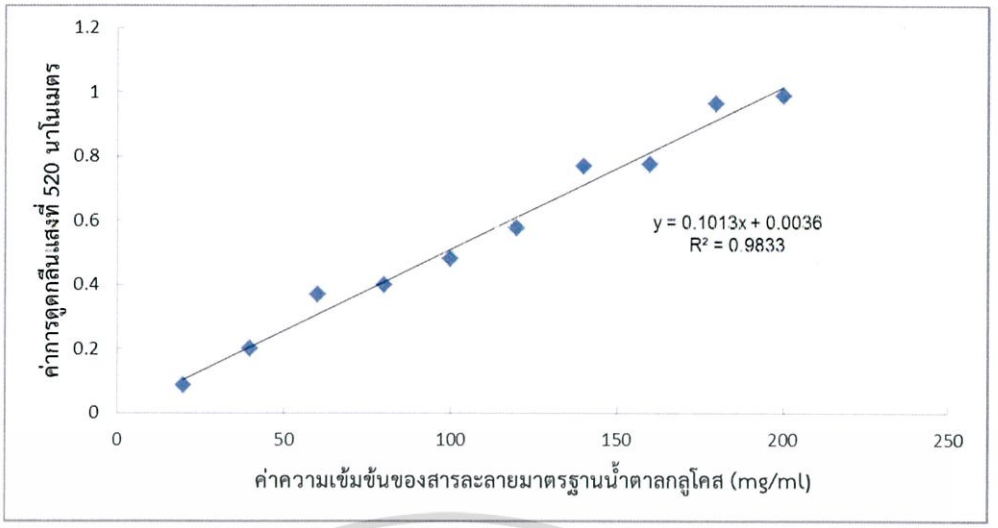
เตรียมสารละลาย $(NH_4)_6Mo_7O_{24} . 4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติม $Na_2AsO_4 . 7H_2O$ 6 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นลงไป คนให้เข้ากัน จากนั้นเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมากรองเอาตะกอนออกก่อนนำไปใช้

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคส (Analytical grade glucose) โดยอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำเป็นสารละลายความเข้มข้น 20 40 60 80 100 120 140 160 และ 180 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายแต่ละความเข้มข้นในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเปรียบเทียบ เติม Copper reagent 1.0 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยใช้น้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลกลูโคสและค่าความขุ่น ได้เป็นกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ดังรูปที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)

3.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ นำไปวิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสข้างต้น คำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคสของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

4. วิธีวิเคราะห์สารสี

สกัดสารสีที่ได้จากการหมักข้าวของเชื้อราโมแนสคัสด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 บนเครื่องสกัด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสีที่สกัดได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สามารถคำนวณได้ดังนี้

ตัวอย่างคำนวณหาสารสี

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 1 กรัม สกัดสารสีเอทานอลร้อยละ 50 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.063 ABS ส่วนตัวอย่างข้าวที่นำสกัดสีคิดเป็นน้ำหนักแห้งได้ 0.99119 กรัม สามารถนำมาคำนวณปริมาณสารสีได้ดังนี้

ปริมาณสี	0.063 × 1	=	0.063	unit/ml.
ปริมาณสารสีทั้งหมด	10 ×0.063 unit.ml/ml.	=	0.63	unit

ตัวอย่างแห้งหนัก 0.9119 กรัม ได้สารสี 0.63 unit

ในข้าว 1 กรัมน้ำหนักแห้งมีสารสีทั้งหมด = 0.6909 U_{500nm}/g-DSW

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

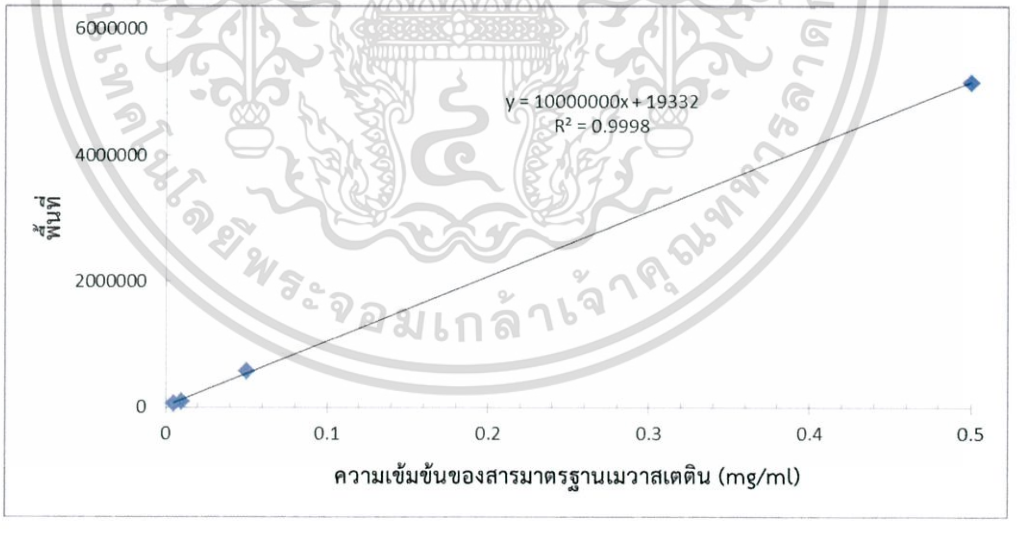
5. การวิเคราะห์สาร Monacolin K ด้วยเครื่องแยกสารในสถานะของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography)

5.1 การวิเคราะห์

นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC (Shimadzu, C20994007894 LP,LC-10ADvp) คอลัมน์ μBondapakTM C18 3.9 x 300 มิลลิเมตร (Water, USA) และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร (UV detector SPD-10A vp) โดยใช้ส่วนเคลื่อนที่เป็นสารละลาย acetonitrile ความเข้มข้นร้อยละ 55 แล้วนำมาเทียบกับสารละลายมาตรฐานเมวาสเตติน (Sigma, USA)

5.2 การเตรียมสารเมวาสเตตินมาตรฐาน

นำเมวาสเตตินมาตรฐานมาลายในเอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ นำมาเจือจางเป็นความเข้มข้น 320 160 106.67 80 64 มิลลิโมลาร์ นำสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับสารละลาย Acetonitrile ในอัตราส่วนของสารละลาย Acetonitrile : สารมาตรฐาน (55 : 45) จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน แกน y คือ พื้นที่ใต้กราฟ และแกน x คือ ความเข้มข้นของสาร Monacolin ดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสารเมวาสเตติน (mg/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาผสมสารละลาย Acetonitrile ในอัตราส่วนของสารละลาย Acetonitrile : ตัวอย่าง (55 : 45) จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์ นำพื้นที่ใต้กราฟที่เวลาเดียวกับกราฟมาตรฐานไปเทียบเพื่อหาปริมาณของสาร Monacolin

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

6.1 สารเคมี

6.1.1 สารละลาย Acetyl acetone reagent เป็นสารละลาย 4 เปอร์เซ็นต์ของ Acetylacetone ใน 1.25 โมลาร์ Na2CO3 ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

6.1.2 Erhlick's reagent ละลาย Para – Dimethylaminobenzaldehyde 1.6 กรัม ในส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 30 มิลลิลิตร และเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร สามารถเก็บในตู้เย็นได้นาน 2 – 3 วัน

6.1.3 สารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride ละลาย glucosamine hydrochloride 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

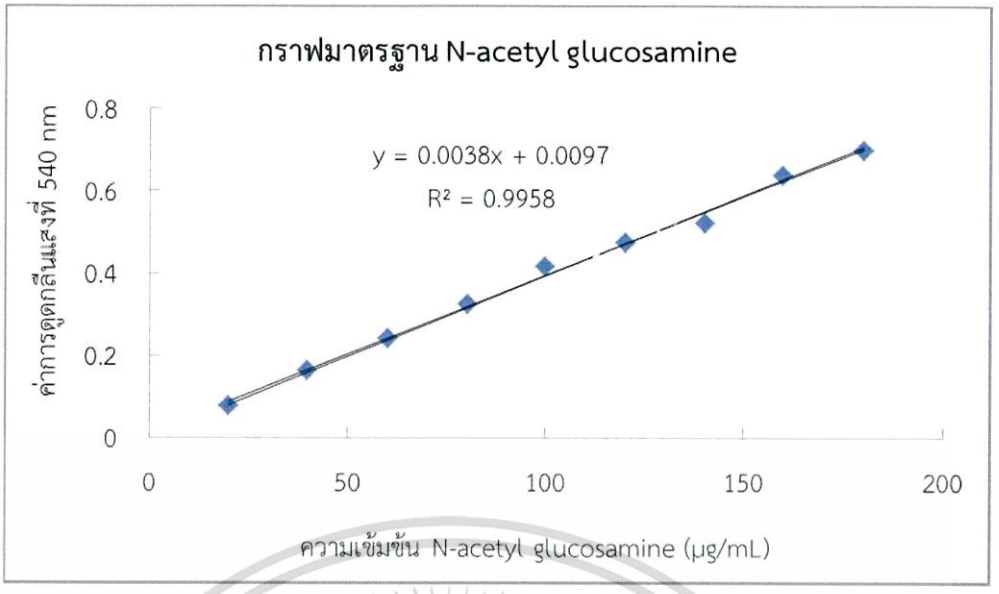
6.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วมาบดละเอียด ปริมาณ 1.5 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปรับ pH ของสารละลายให้เป็นกลาง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วนาส่วนใสไปวิเคราะห์หา ปริมาณ glucosamine

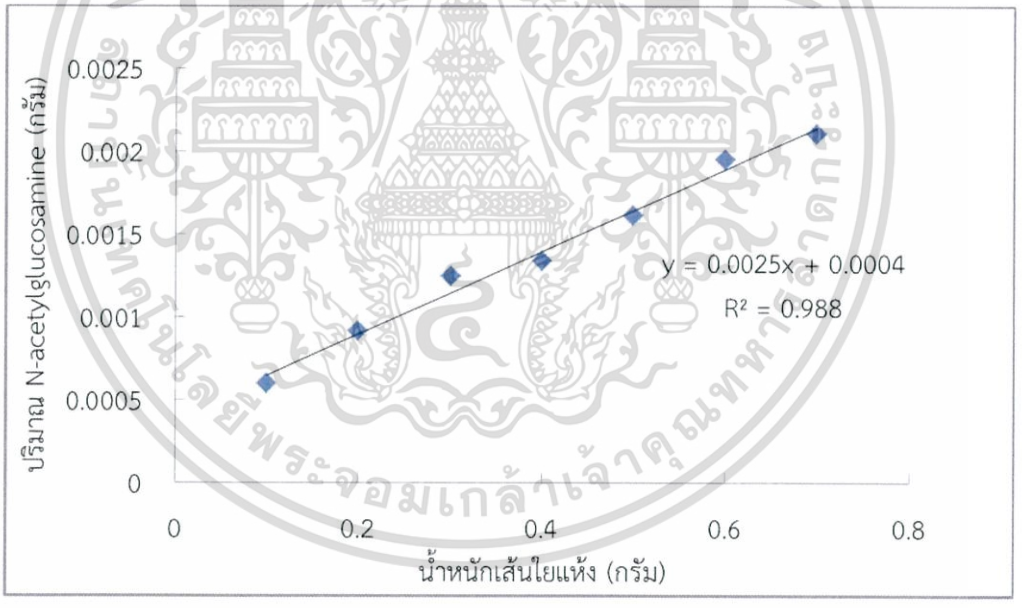
6.3 วิธีการวิเคราะห์

หากราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-180 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย acetyl acetone 1 มิลลิลิตร ต้มในน้าเดือด 20 นาที เติมเอทานอล เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Erhlick's reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณ glucosamine โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.10 และ 4.11 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น N-acetyl glucosamine (µg/ml)



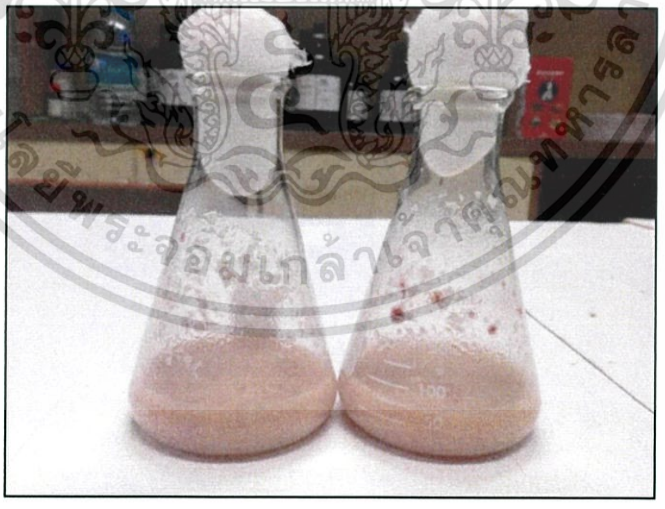
รูปที่ 4.11 กราฟน้ำหนักเส้นใย (กรัม) ต่อปริมาณ N-acetylglucosamine (กรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รูปแสดงการทดลอง

รูปที่ 4.12 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 อายุ 14 วัน บนอาหาร MYS



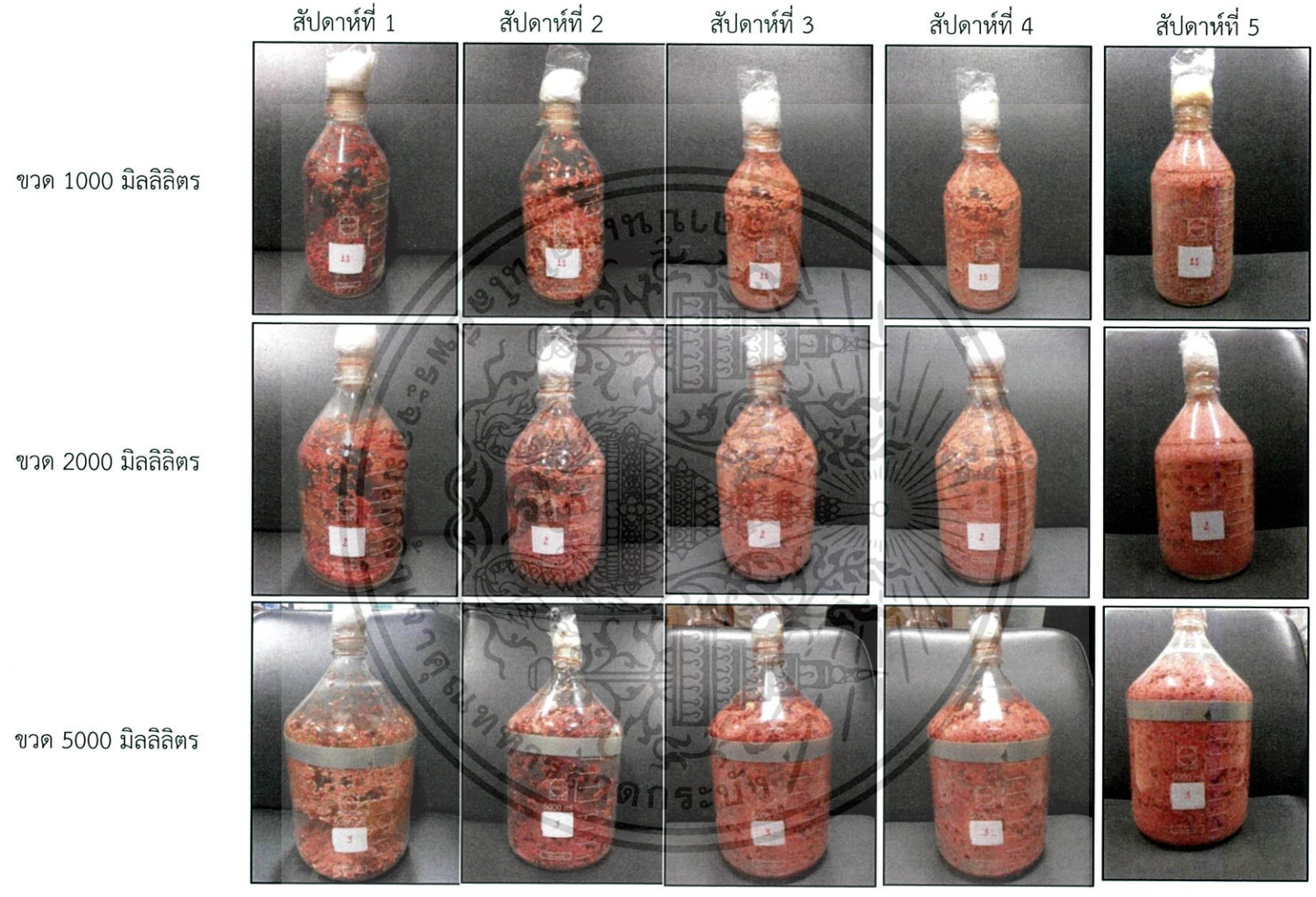
รูปที่ 4.13 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 อายุ 3 วัน บนอาหาร SS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

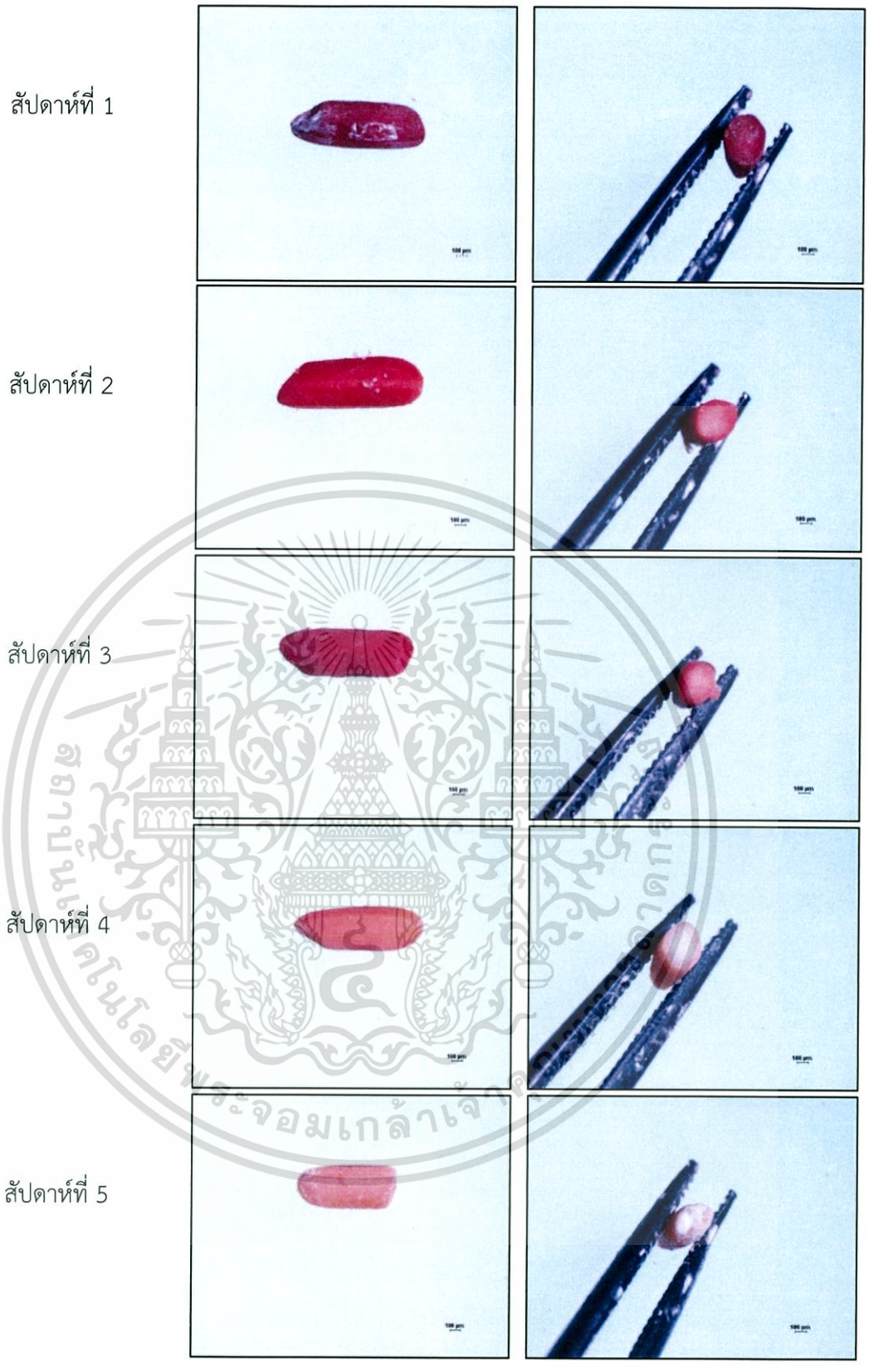
รูปที่ 4.14 ก. การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในสภาวะหยุดนิ่ง

ข. การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดปริมาตร 1000 2000 และ 5000 มิลลิลิตร ในแต่ละสัปดาห์

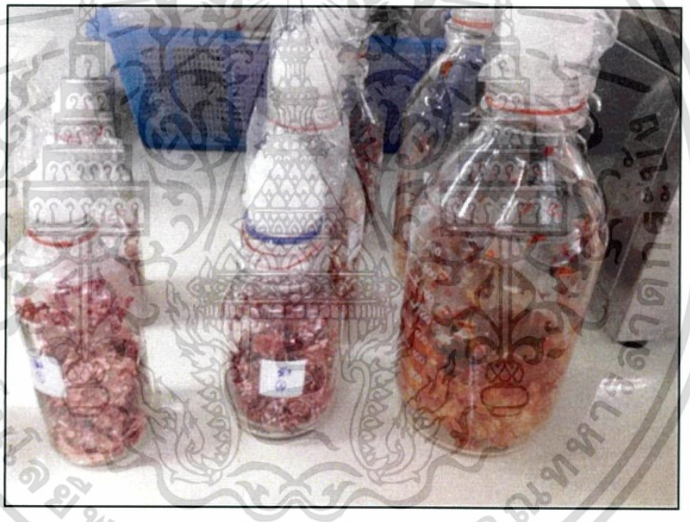


รูปที่ 4.16 ก. แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเมล็ดข้าวเสาไห้

ข. ภาพตัดขวางของเมล็ดข้าวเสาไห้ที่มีเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.17 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเครื่องหมุน



รูปที่ 4.18 การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 โดยการวางไว้ในสภาวะหยุดนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้