การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง ในถังหมักขนาด 20 ลิตร

THE GROWTH OF *MONASCUS* SP. ON SOLID STATE IN A 20 L FERMENTOR

รัตติกูล ศรีอุบล
สุพัชลิตา จงจำ
ไอริณ อุดมพูนสิน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง ในถังหมักขนาด 20 ลิตร

THE GROWTH OF *MONASCUS* SP. ON SOLID STATE IN A 20 L FERMENTOR

รัตติกูล ศรีอุบล

สุพัชลิตา จงจำ

ไอริณ อุดมพูนสิน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE GROWTH OF *MONASCUS* SP. ON SOLID STATE IN A 20 L FERMENTOR

Rattikool Siu-bon

Supatchalita Jongjum

Irin Udomphoonsin

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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็งในถังหมักขนาด 20 ลิตร
The Growth of *Monascus* sp. on Solid State in a 20-L Fermentor

ชื่อนักศึกษา รัตติกูล ศรีอุบล รหัสนักศึกษา 56051056
สุพัชลิตา จงจำ รหัสนักศึกษา 56051060
ไอริณ อุดมพูนสิน รหัสนักศึกษา 56051108

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2559

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

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็งในถังหมักขนาด 20 ลิตร
The Growth of *Monascus* sp. on Solid State in a 20-L Fermentor

ชื่อนักศึกษา รัตติกูล ศรีอุบล รหัสนักศึกษา 56051056
สุพัชลิตา จงจำ รหัสนักศึกษา 56051060
ไอริณ อุดมพูนสิน รหัสนักศึกษา 56051108

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยา อุตสาหกรรม
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2559
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์ U6V1 บนอาหารแข็งด้วยวัสดุหมักข้าวหอมมะลิและข้าวเสาไห้ ตามลำดับ พบว่า ข้าวหอมมะลิให้การผลิตสาร Monacolin K เท่ากับ 0.0317 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง ซึ่งต่ำกว่าข้าวเสาไห้ ที่ผลิตสาร Monacolin K เท่ากับ 0.5537 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง เนื่องจากการเจริญบนวัสดุหมักข้าวหอมมะลิให้การสะสมน้ำตาลปริมาณมาก ซึ่งมีผลยับยั้งการผลิตสาร Monacolin K เมื่อเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทอากาศภายในขวดเลี้ยงเชื้อ จากสัดส่วนระหว่างปริมาณวัสดุหมักต่อปริมาตรขวดเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบว่าที่สัดส่วน 1 ต่อ 5 ให้การผลิตสาร Monacolin K สูงกว่าการใช้สัดส่วน 1:2 แต่ก็ยังคงมีการสะสมน้ำตาลที่ระดับสูง เนื่องจากข้าวหอมมะลิย่อยสลายได้ง่าย การใช้วัสดุหมักเป็นข้าวเสาไห้ จึงมีความเหมาะสมมากกว่า ดังนั้นการผลิตสาร Monacolin K จึงใช้การเจริญบนวัสดุหมักข้าวเสาไห้ ที่บรรจุในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 5 ลิตร 10 ลิตร และ 20 ลิตร ที่มีสัดส่วนระหว่างวัสดุหมักต่อปริมาตรขวดเลี้ยงเชื้อเป็น 1 ต่อ 5 พบว่าการผลิตสาร Monacolin K อยู่ในระดับต่ำ เพราะมีการสะสมน้ำตาล และยังพบการเกาะตัวของเมล็ดข้าวเป็นก้อนขนาดใหญ่ เพราะการเจริญและการยืดยาวของเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 การใช้ขวดเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากขึ้น ยิ่งทำให้การเคลื่อนตัวของเมล็ดข้าวภายในขวดเลี้ยงเชื้อ มีค่าช้าลงสภาวะดังกล่าว ทำให้เส้นใยเชื้อราเจริญยืดยาวขึ้นเพราะแรงเฉือนมีค่าต่ำ

คำสำคัญ : ข้าวเสาไห้ ข้าวหอมมะลิ สภาวะหมุนสลับนิ่ง Monacolin K *Monascus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The Growth of *Monascus* sp. on Solid State in a 20-L Fermentor		
Students	Rattikool	Siu-bon	ID 56051056
	Supatchalita	Jongjum	ID 56051060
	Irin	Udomphoonsin	ID 56051108
Degree	Bachelor of Science		
Major program	Industrial Microbiology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2016		
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 and Hom-ma-li rice as raw material, respectively. It was found that the monacolin K production by cultivation on SSF Hom-ma-li rice gave 0.0317 mg/g-DSW that was lower than Sao-Hai rice (0.5537 mg/g-DSW). Because of the accumulation of high glucose during cultivation on Hom-ma-li rice, that caused the inhibition of monacolin K production. The efficiency of ventilation were studied by ratio of the raw material amount and the volume of cultivated bottle. The result showed that the ratio of 1:5 presented monacolin K production higher than the ratio of 1:2. However, the high level of glucose accumulation was also observed due to the structure of Hom-Ma-Li rice was easily to degradation. Therefore, the monacolin K production with Sao-Hai rice as raw material was more suitable than the one with Hom-ma-li rice. Then Sao-Hai rice was used as raw material for the further studies. The cultivation was carried on 5-L, 10-L and 20-L of culture bottles, respectively by using the ratio rice amount and bottle volume at 1:5. It was found that, the monacolin K production was low because of the high glucose accumulation. The agglutination of raw material was observed due to the *Monascus* sp. U6V1 growth and mycelium extension. The larger diameter of cultivated bottle used the slower movement of rice particle in the cultured bottle created. This situation promoted the mycelium extension because of low shear rate.

Keywords : Sao-Hai rice, Hom-ma-li rice, Monacolin K, *Monascus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยโครงงานพิเศษนี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยตรวจสอบ แก้ไข ข้อบกพร่องของโครงงานพิเศษนี้ ตลอดจนให้ความรู้ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงงานพิเศษนี้

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

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยา ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทำโครงงานพิเศษนี้

ท้ายนี้ ขอกราบขอบคุณพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดูอบรมและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา จนทำให้ผู้ศึกษาประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

รัตติกูล ศรีอุบล
สุพัชลิตา จงจำ
ไอริณ อุดมพูนสิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ 1	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	4
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อรา *Monascus*	5
2.1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาและการสืบพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus*	6
2.2 การเลี้ยงเชื้อ (Fermentation)	7
2.2.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว	8
2.2.2 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง	8
2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง	8
2.3 วัตถุดิบที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง	10
2.3.1 มันสำปะหลัง	10
2.3.2 ประวัติความเป็นมาของข้าว	10
2.3.2.1 ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว	10
2.3.2.2 คุณภาพของเมล็ด (grain quality)	12
2.3.3 ประวัติความเป็นมาของข้าวแดง	13
2.4 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเชื้อรา *Monascus*	14
2.4.1 สารสีจากเชื้อรา *Monascus*	14
2.4.1.1 ประเภทของสารสีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus*	16
2.4.1.2 การใช้ประโยชน์จากสีของเชื้อรา *Monascus*	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสารสีในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* 20
2.4.2 ประวัติการศึกษาสาร Monacolin 23
2.4.2.1 คุณสมบัติสารโมนาโคลินเค (Monacolin K) 24
2.4.2.2 การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา 25
2.4.2.3 กระบวนการสังเคราะห์สาร Monacolin 26
2.4.2.4 กลไกการทางานของสาร Monacolin 27
2.4.2.5 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา 27
2.4.2.6 ประโยชน์ในการรักษา 28
2.4.2.7 กลไกการออกฤทธิ์ 28
2.4.2.8 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน 29
2.4.2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การสังเคราะห์สารสีและ Monacolin K ของเชื้อรา *Monascus* ในข้าวแดง 30
2.5 ซิตรินินในเชื้อรา *Monascus* 36
2.5.1 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน 37
2.5.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus* 39
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 41
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 44
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 44
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 44
3.3 อุปกรณ์ 44
3.4 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Inoculum) 44
3.5 การเตรียมวัสดุหมัก 45
3.6 ศึกษาการผลิต Monacolin K จากเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 45
3.6.1 การผลิต Monacolin k จาก *Monascus* U6V1 บนวัสดุหมักข้าวหอมมะลิและข้าวเสาไห้ ตามลำดับ 45
3.6.2 การเลี้ยง *Monascus* U6V1 ในขวดปริมาตร 1000 และ2000 มิลลิลิตร บนวัสดุหมักข้าวหอมมะลิ 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6.3 ศึกษาปริมาตรขวดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราบนข้าวเสาไห้ เพื่อผลิตสาร Monacolin K 46

3.7 การวิเคราะห์ผล 47

3.7.1 การหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างวัตถุดิบ 47

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และวัด pH 47

3.7.3 การวิเคราะห์สารสี 48

3.7.4 การวิเคราะห์สาร Monacolin 48

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 49

4.1 การผลิต Monacolin K จาก *Monascus* U6V1 บนวัสดุหมักข้าวหอมมะลิและข้าวเสาไห้ ตามลำดับ 49

4.2 การเลี้ยง Monascus sp. U6V1 ในขวดปริมาตร 1000 และ 2000 มิลลิลิตร บนวัสดุหมักข้าวหอมมะลิ 54

4.3 ศึกษาปริมาตรขวดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราบนข้าวเสาไห้เพื่อผลิตสาร Monacolin K 59

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 63

5.1 สรุปผลการวิจัย 63

5.2 ข้อเสนอแนะ 64

บรรณานุกรม 65

ภาคผนวก 75

ภาคผนวกภาค ก สูตรอาหาร 76

ภาคผนวกภาค ข สารเคมี และวิธีวิเคราะห์ทางเคมี 77

ภาคผนวกภาค ค รูปแสดงการทดลอง 83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สายพันธุ์ต่างๆของเชื้อราโมแนสคัส	5
3.1 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง อัตราส่วน 1:3 ชั่วโมง	45
3.2 ปริมาณการเติมข้าวหอมมะลิและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง	46
3.3 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง	47
4.1 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง	51
4.2 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U500/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง โดยการเติมวัสดุหมักชนิดที่แตกต่างกัน	52
4.3 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง	56
4.4 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U500/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวหอมมะลิ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง ในขวดปริมาตร 1000 และ 2000 มิลลิลิตร	57
4.5 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง	60
4.6 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U500/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวเสาไห้ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง ในขวดอาหารที่มีขนาดแตกต่างกัน	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp.	7
2.2 ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว	11
2.3 การเกิดสาร 6-MSA และ orsellinic acid จาก acetyl และ malonyl	15
2.4 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase กับ polyketide synthase	16
2.5 กลไกการสังเคราะห์สารสีส้ม	17
2.6 โครงสร้างของสารสีจาก *Monascus* sp.	18
2.7 โครงสร้างของ Monacolin K หรือ โลวาสแตติน	25
2.8 กระบวนการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน หรือโลวาสแตติน	26
2.9 กระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล เมื่อ HMG-CoA reductase ทำปฏิกิริยายับยั้งการ	27
2.10 โครงสร้างเคมีของซิตรินิน	36
2.11 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน เมื่อ C-1 ( ), C-3 ( ), C-9 (*) และ C-4 ( )	37
4.1 กราฟการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวต่างชนิดกัน ในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร	53
4.2 กราฟการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวหอมมะลิ ในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ตามลำดับ	58
4.3 กราฟการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวเสาไห้ ในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง ในขวดปริมาตร 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร	62
4.4 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (mg/ml)	79
4.5 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสารโลวาสแตติน (mg/ml)	81
4.6 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 อายุ 14 วัน บนอาหาร MYS	83
4.7 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 อายุ 3 วัน บนอาหาร SS	83
4.8 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน	85
4.10 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดปริมาตร 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร ในแต่ละสัปดาห์	87
4.11 ก. แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเมล็ดข้าวหอมมะลิ ข. ภาพตัดขว้างของเมล็ดข้าวหอมมะลิที่มีเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1	89
4.12 ก. แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเมล็ดข้าวเสาไห้ ข. ภาพตัดขว้างของเมล็ดข้าวเสาไห้ที่มีเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1	90
4.13 ก. แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเมล็ดข้าวเสาไห้ ข. ภาพตัดขว้างของเมล็ดข้าวเสาไห้ที่มีเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1	91
4.14 ก. แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเมล็ดข้าวเสาไห้ ข. ภาพตัดขว้างของเมล็ดข้าวเสาไห้ที่มีเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1	92
4.15 เอียงขวดเพื่อดูปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการเติมข้าว	93
4.16 บ่มบนเครื่องหมุนต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว	93
4.17 บ่มบนเครื่องหมุน (สลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง	93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

คนในยุคปัจจุบันให้ความสำคัญกับการดูแลสุขภาพมากขึ้นเรื่อยๆ การดูแลสุขภาพคืออีกหนึ่งกิจกรรมที่ คนรุ่นใหม่วัยหนุ่มสาวหันมาใส่ใจกันมากขึ้น อาจจะด้วยทั้งสื่อโฆษณา ที่เน้นให้เห็นถึงข้อดีและลักษณะของคนที่มีสุขภาพดีจากภายในกระแสเกี่ยวกับการดูแลสุขภาพ ของคนในปัจจุบันมีความแตกต่างจากในอดีตมาก โดยผลวิจัยจาก Mindshare ชี้ให้เห็นว่ากระแสสุขภาพทั่วโลกไม่ได้หยุดแค่เรื่องของการรักษาโรค หรือร่างกายให้สมบูรณ์แข็งแรงเท่านั้น แต่ยังหันมาให้ความสนใจเรื่องของการป้องกัน และดูแลสุขภาพก่อนที่จะมีการเจ็บป่วย (ณัฐธิดา, 2558)

ทุกวันนี้หลายคนอาจจะมีการตื่นตัว และกลัวเรื่องของการแพร่ระบาดของโรคทั้งหลายกันมากขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มโรค Noncommunicable diseases (NCDs) หรือ กลุ่มโรคไม่ติดต่อ เป็นกลุ่มโรคเรื้อรังที่เกิดต่อเนื่องยาวนาน และมีการแสดงอาการของโรคอย่างช้าๆ แตกต่างจากโรคติดเชื้อส่วนใหญ่ที่มีการแสดงอาการของโรคอย่างรวดเร็ว ซึ่งประกอบไปด้วยโรคหลัก คือ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง โรคทางเดินหายใจเรื้อรัง และโรคเบาหวาน เป็นสาเหตุของการ ตายของประชากร 38 ล้านคนทั่วโลกในแต่ละปี หรือ คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 68 ของสาเหตุการตาย ทั้งหมดของประชากรโลก (56 ล้านคนใน พ.ศ. 2555) และมากกว่า 16 ล้านคนเป็นผู้ที่เสียชีวิตในช่วง อายุต่ำกว่า70 ปี หรือเรียกว่าเป็นการตายก่อนวัยอันควร โดยเฉพาะในกลุ่มประเทศที่มีรายได้ต่ำ และปานกลาง มีการตายจากโรคก่อนวัยอันควรนี้มากถึงร้อยละ 82 (สำนักงานพัฒนานโยบายสุขภาพระหว่างประเทศ, 2559)

โรคหัวใจและหลอดเลือด ประกอบด้วย โรคหัวใจขาดเลือดและโรคหลอดเลือดสมอง โรคหัวใจขาดเลือด เกิดจากผนังด้านในของหลอดเลือดมีไขมันสะสม พอกตัวหนาขึ้น หลอดเลือดจะตีบและแข็งตัว จนการไหลเวียนเลือดตีบตันลงไป เลือดไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจลดลง เป็นผลทำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง หรือโรคอัมพฤกษ์ อัมพาต คือ ภาวะที่สมองขาดเลือดไปเลี้ยง ซึ่งเกิดจากหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงสมองตีบตัน หรือแตก จนเกิดการทำลาย หรือตายของเนื้อสมอง (สำนักโรคไม่ติดต่อกรมควบคุมโรค, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาเหตุหรือปัจจัยเสี่ยง โรคหัวใจขาดเลือด และโรคหลอดเลือดสมอง

1. ภาวะความดันโลหิตสูง เกิดจากสภาวะผิดปกติที่มีระดับความดันโลหิตสูงกว่าระดับปกติของคนทั่วไป คือ ค่าความดันโลหิตตั้งแต่ 120/80 มิลลิเมตรปรอทขึ้นไป ถือว่าเป็นสภาวะที่ต้องทำการควบคุม แต่ถ้าวัดความดันโลหิต ได้ค่าตั้งแต่ 140/90 มิลลิเมตรปรอท ขึ้นไป ถือว่ามีภาวะความดันโลหิตสูง

2. โรคเบาหวาน เกิดจากตับอ่อนไม่สามารถสร้างอินซูลินได้เพียงพอ หรือเมื่อร่างกายไม่สามารถใช้อินซูลินที่ผลิตออกมาได้ ทำให้น้ำตาลในเลือดสูงขึ้นอยู่เป็นเวลานาน ระดับน้ำตาลมากกว่าหรือเท่ากับ 126 มิลลิกรัมต่อลิตร (ขณะอดอาหาร 8 ชั่วโมง หรือมากกว่า) ในกรณีที่ระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหารอยู่ในช่วง 100-125 มิลลิกรัมต่อลิตร ถือว่าเป็นกลุ่มเสี่ยงสูงต่อเบาหวาน

3. คอเลสเตอรอลในเลือดสูง หรือไขมันในเลือดผิดปกติ ไขมัน คือ สารอาหารจำเป็นที่ร่างกายใช้เป็นพลังงาน สร้างฮอร์โมน และวิตามินบางชนิด ไขมันในเลือดมาจากอาหารที่เรากินและร่างกายสร้างขึ้น การวัดระดับไขมันในเลือด วัดเป็นระดับคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ (สำนักโรคไม่ติดต่อกรมควบคุมโรค, 2559)

ภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง เป็นสาเหตุหลักในการเกิดโรคดังกล่าวและโรคอื่นๆ อีกหลายโรค เพื่อลดความเสี่ยง และรักษาโรคเหล่านั้น ทำได้โดยการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด เช่น

- การควบคุมอาหาร โดยเลี่ยง หรือจำกัดการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูง
- การเพิ่มการเผาผลาญ และการใช้พลังงานของร่างกาย เช่น การออกกำลังกาย
- เพิ่มการบริโภคอาหารพวกพืชผักผลไม้ ที่มีเส้นใย (Fiber) ให้มาก
- เลิกบุหรี่
- ลดความเครียด ความวิตกกังวล เนื่องจากทำให้ร่างกายผลิตคอเลสเตอรอลขึ้นมาเกินความจำเป็น
- การใช้ยาเพื่อลดการดูดซึมคอเลสเตอรอล จากอาหาร หรือยา ที่เพิ่มการขนส่งคอเลสเตอรอล หรือไตรกรีเซอไรด์ออกจากกระแสเลือด เป็นต้น

การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด หรือการรักษาภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง มักจะมีการตั้งระดับคอเลสเตอรอลเป้าหมาย ที่แตกต่างกันออกไปตามความเสี่ยง ของการเกิดโรคหัวใจ และหลอดเลือด ของแต่ละบุคคล นอกจากนี้ชนิดของคอเลสเตอรอลที่เป็นเป้าหมายหลัก ยังอาจมีความแตกต่างกันไป ตามประเภทยาลดระดับไขมันในเลือดที่ใช้ เช่น หากมีการใช้ยากลุ่ม statin (สแตติน) เช่น simvastatin atorvastatin rosuvastatin pitavastatin หรือ pravastatin และยากลุ่มยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การดูดซึมคอเลสเตอรอล เช่น ezetimibe มักจะมีการใช้ LDL cholesterol เป็นเป้าหมายหลักของการรักษา แต่หากมีการใช้ยาในกลุ่ม fibrates (ไฟเบรด) เช่น fenofibrate หรือ gemfibrozil ระดับไตรกลีเซอไรด์ มักจะถูกใช้เป็นเป้าหมายของการรักษา เป็นต้น แต่อย่างไรก็ดียังมีการใช้คอเลสเตอรอลชนิดอื่นๆ เป็นเป้าหมายในการรักษาร่วมด้วยได้เช่นกัน การรักษาภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง ควรสอบถามแพทย์เกี่ยวกับเป้าหมายของการลดระดับคอเลสเตอรอล ว่าเป็นอย่างไร เพื่อให้สามารถปฏิบัติตนได้อย่างถูกต้อง (สุพรรณิการ์, 2555 ; ศุภทัต, 2559)

ยากลุ่ม statin ซึ่งเป็นยาลดไขมันถูกค้นพบครั้งแรกโดย Dr. Akira Endo ชาวญี่ปุ่น ซึ่งได้รับแรงบันดาลใจจากการค้นพบ penicillin ในเชื้อรา *Penicillium* จึงมีความเชื่อว่า เชื้อราน่าจะสร้างสารที่ยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอล ของแบคทีเรียได้ และอาจนำมาใช้ยับยั้งการสร้างไขมันในคนได้ และในปี ค.ศ.1972 ก็พบสารที่สร้างจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* ที่ขึ้นในตัวอย่างข้าว ที่เก็บจากร้านขายข้าวในเมืองเกียวโต ชื่อว่า compactin หรือ mevastatin ซึ่งสารตัวนี้สามารถยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ในคน และสามารถลดระดับคอเลสเตอรอล ในผู้ป่วยที่ไขมันสูงมากจากกรรมพันธุ์ (Familial hypercholesterolnemia) แต่ก็พบว่าสารตัวนี้ทำให้ตับอักเสบ และมีปัญหากับกล้ามเนื้อผู้ป่วย และมีปัญหาผลแทรกซ้อนอีกหลายอย่าง จนในที่สุด ยาตัวนี้ก็ได้ถูกยุติงานวิจัยลง ต่อมาในปี 1979 Dr. Endo ได้ค้นพบว่าข้าวแดงมีเชื้อรา *Monascus ruber* ซึ่งสามารถสร้างสาร Monacolin K หรือ lovastatin เป็นยาลดไขมันตัวแรกของโลก มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไขมัน ผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA reductase) และ FDA (Food and Drug Administration) อเมริกา ก็ได้ขึ้นทะเบียนยาให้ใช้ได้กับคนทั่วไป ในปี พ.ศ. 2530 ก่อนที่ lovastatin จะได้รับการพัฒนาต่อมาเป็น simvastatin ที่ใช้แพร่หลายในปัจจุบัน (สราวุฒิ, 2558)

Monascus sp. เป็นราที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหมัก มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และยาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากในระหว่างการเจริญของรา มีการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) หลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยเฉพาะสาร Monacolin K ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ในขั้นตอนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย (รัศมี และจารุพงษ์, 2556) ดังนั้นจึงมีการใช้อาหารหมักจากเชื้อรา *Monascus* sp. โดยเฉพาะข้าวแดง หรืออังคัก (Angkak) ในการรักษาโรคคอเลสเตอรอลสูง รวมถึงโรคหัวใจ และหลอดเลือด นอกจากนี้ในระหว่างการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. ยังสร้าง สารสี (Pigments) ซึ่งเป็นสารให้สีธรรมชาติในอาหาร และมีสรรพคุณทางยา ในการลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง ต้านการอักเสบ และมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ในระหว่างการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. พบการสร้างสารซิตรินิน (Citrinin) ซึ่งเป็นสารที่มีพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อตับ และไตของมนุษย์ สาร citrinin สร้างขึ้นจากกระบวนการ polyketide pathway ของรา ซึ่งเป็นกระบวนการเดียวกันกับการสร้างสาร Monacolin K และสารสี ดังนั้นในอาหารหมัก *Monascus* sp. ถึงแม้จะมีสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอยู่มาก แต่มักมีการปนเปื้อนของสาร citrinin ร่วมอยู่ด้วยเสมอ (อุทัยวรรณ และเกตุการ, 2558)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการสร้างสาร Monacolin K ของเชื้อรา *Monascus* sp.

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. โดยการเติมวัสดุหมัก

1.2.3 เพื่อศึกษาขนาดขวดอาหารที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง เชื้อรา *Monascus* sp. ในการผลิตสาร Monacolin K

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการเจริญ การสร้างสารสี และการสร้างสารกลุ่มstatin (Monacolin K) บนอาหารแข็งที่เป็นข้าวโดยการเติมวัสดุหมัก ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp.

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 การนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาใช้ประโยชน์ เช่น ทางการแพทย์ หรืออุตสาหกรรมยา

1.4.2 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้น เพื่อการวิจัยนำไปพัฒนาการผลิตข้าวแดงจากเชื้อรา *Monascus* sp. เพื่อผลิตสารสี และสาร Monacolin K

1.4.3 สามารถปรับปรุง และพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรที่ราคาถูกให้มีมูลค่าที่สูงขึ้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อรา *Monascus* sp.

Monascus sp. เป็นเชื้อราที่ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1884 โดย Van Tieghem แบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยา และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ได้แก่ *M. pilosus*, *M. pupureus*, *M. ruber* และ *M. foridanas* นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อรา *Monascus* ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และสามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง ในรูปของข้าวแดงเพื่อใช้ปรุงแต่งสีในไวน์ เต้าหู้ยี้ ใช้ถนอมอาหารประเภทเนื้อ ใช้รักษาโรค รวมทั้งใช้เป็นสีผสมในอาหารยา และเครื่องสำอาง ต่อมาได้ผลิตเป็นการค้าในประทศญี่ปุ่น ไต้หวัน และจีน

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ต่างๆของเชื้อรา *Monascus*

M. albidus	*M. fuliginosus*	*M. pilosus*	*M. sanguineus*	*M. floridanus*	*M. pallens*
M. albus	*M. kaoliang*	*M. pubigerus*	*M. seroruberces*	*M. bisporus*	*M. paxii*
M. anka	*M. mucoroides*	*M. purpureus*	*M. vitreus*	*M. barkeri*	*M. araneosus*
M. major	*M. purpurescens*	*M. vini*	*M. rubropunctatus*	*M. rubiginosus*	*M.rubiginosus*

ที่มา : จักรพงษ์, 2557

Lin (1973) ได้เริ่มมีการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลว ได้แยกเชื้อราจากข้าวแดงจากประเทศต่างๆ ในแถบเอเชียใต้ และพบว่าเชื้อราเหล่านี้สร้างสารสี ในอาหารเหลวได้ดีเช่นกัน ต่อมาได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารสี โดยใช้วิธีการต่างๆ เช่น ใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) หรือใช้รังสีต่างๆ การใช้เทคนิคโปรโตรพลาสต์ฟิวชั่น การปรับปรุงกรรมวิธีในการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบครั้งคราว (Batch culture) แบบป้อน (Fed-batch culture) และการใช้วิธีการตรึงเซลล์ เชื้อรา *Monascus* sp. นอกจากจะสามารถสร้างสารสีได้แล้วยังสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด ในปี 1977 Wong และ Bau ได้รายงานเป็นครั้งแรกจากเชื้อรา *M. purpureus* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารเช่น *Bacillus* sp. *Streptococcus* sp. และ *Pseudmonas* sp. เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ เอทานอล สารโมนาโคลิน (Monacolin) ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์ คอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และการช่วยในการตกตะกอน (Flocculant) (Fink-Gemmels และ Leistner, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

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

Class Ascomycetes

Subclass Plectomycetidae

Order Eurtials

Genus Monascus

เชื้อรา *M. purpureus* อยู่ใน Class Ascomycetes และมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย และมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วง การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศคือสร้างสปอร์ และการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศโดยการสร้างโคนิเดีย (Conidia) รูปร่างกลมหรือรูปไข่ อาจสร้างหลายโคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่อยู่ที่ปลายเส้นใยโคนิเดียมักไม่มีสีแต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจมีสีแดง หรือน้ำตาลอ่อน

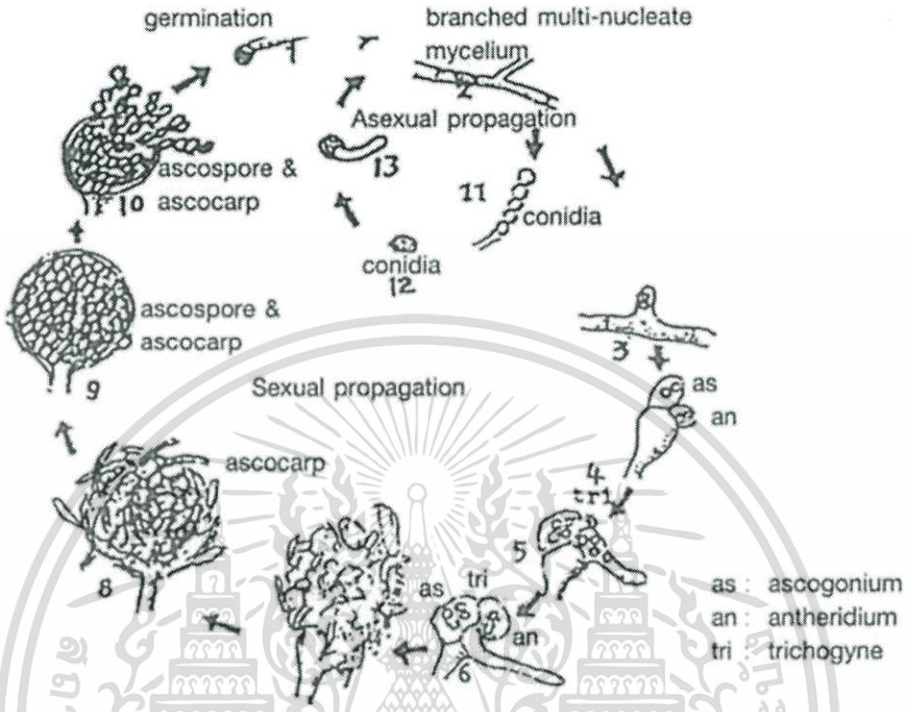
การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Monascus* sp. มีการสร้างพอริทีเซียม (Perithecium) หรือ คลิสโททีเซียม (Cleistothecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (Ascocarp) มีรูปร่างกลมโดยจะเกิดบนก้านชู (Stalk) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ ascocarp เกิดขึ้นบนเส้นใย ซึ่งเป็นแบบโฮโมเทลลิก (Homothallic) เริ่มจากเส้นใยเจริญ และพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Antheridium) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Ascogonium) ซึ่งเจริญอยู่ใต้เส้นใย antheridium เส้นใยบริเวณส่วนบนของ ascogonium จะพัฒนาไปเป็นไตรโคจีน (Trichogyne) เชื่อมต่อกับ antheridium เพื่อให้นิวเคลียสผ่านเข้าไปผสมกับนิวเคลียสของ ascogonium หลังจากผสมแล้ว ascogonium มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากมีการสร้างผนังขึ้นมาล้อมรอบ 1-2 ชั้นก่อนจะพัฒนาไปเป็น ascospores มากมาย เมื่อผนัง ascospores แตกออกก็จะปล่อย ascospores งอกเป็นเส้นใยใหม่ขึ้นระยะเวลา

ในการเกิด ascocarp ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อด้วย การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *M. purpureus* ทำให้ทราบขั้นตอนอย่างละเอียด และพบว่า ascospores ของเชื้อรา *M. purpureus* มีลักษณะเรียบ รูปร่างกลม หรือรี และยังมีการศึกษาการพัฒนาการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวโดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการสร้างโคนิเดียเจริญมาจากโคนิดิโอพอร์ (Conidiophore) โคนิเดียมีลักษณะกลม หรือรูปไข่ อาจมีอันเดียว หรือเกิดติดต่อกันเป็นลูกโซ่ (Hawksworth และ Pitt, 1983) โคนิเดียมักจะไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเกิดสีแดงได้บ้าง โคนิดิโอพอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้น 0-1 ด้าน ถ้ามีขนาดยาวจะมีผนังกั้น 2-6 ด้าน งอกขดเป็นเกลียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออายุมากขึ้น การงอกของโคนิเดียจะมากน้อยขึ้นกับอายุของสปอร์ ความหนาแน่นของ สปอร์ความเป็นกรดด่าง แสง อุณหภูมิ และสารอาหาร ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* sp.

ที่มา : บุษบา (2542)

2.2 การเลี้ยงเชื้อ (Fermentation)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักอาหาร อาจเป็นจุลินทรีย์ที่มาจากธรรมชาติในรูปของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ หรือจุลินทรีย์ผสมที่อยู่ในรูปของเหลว หรือเป็นผงแห้ง กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมัก ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยทั่วไปอาจแบ่งการหมักได้หลายประเภท ขึ้นอยู่กับเกณฑ์พิจารณาที่นำมาใช้แบ่ง ในที่นี้จะขอกล่าวถึงการแบ่งประเภทการหมักตามลักษณะ หรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ การเจริญในอาหารเหลว และการเจริญบนอาหารแข็ง (นันทนา, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (Submerged fermentation, SMF)

กระบวนการหมักในอาหารเหลว เป็นการหมักที่ทำได้ โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลว เช่น กากน้ำตาล และอาหารสังเคราะห์ที่มีสารอาหารที่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ (นันทนา, 2555) ในระหว่างกระบวนการหมัก สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) จะถูกผลิตออกมาผสมกับอาหารเหลว ซับสเตรตจะถูกย่อยอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อแบบนี้จึงต้องการการเติมซับสเตรตอย่างต่อเนื่อง และคงที่ เพื่อให้มีสารอาหารตลอดระยะเวลาการเลี้ยง การเลี้ยงเชื้อแบบนี้เหมาะสมกับจุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย ซึ่งต้องการความชื้นสูง (Subamaniyam และ Vimala, 2012)

2.2.2 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation, SSF)

กระบวนการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง คือการบ่มเพาะ หรือการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ภายใต้การควบคุมสภาวะในการบ่ม โดยมีแนวคิดการใช้ซับสเตรต เป็นของแข็งในกระบวนการหมัก ซึ่งเหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ตัวอย่างซับสเตรตที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ มันสาปะหลัง เมล็ดข้าว เศษไม้ และชิ้นส่วนที่แห้งแล้วของสัตว์ เช่น หนัง และกระดูก ความชื้นมีความจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งความชื้นจะถูกดูดซับ หรือเป็นส่วนประกอบของซับสเตรต ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหาร และจะมีปริมาณน้ำอิสระอยู่น้อยมาก หรือมีเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้น ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ เอนไซม์อุตสาหกรรม เชื้อเพลิง และใช้เติมสารอาหารในอาหารสัตว์ (Bhargav และคณะ, 2008; Bashir และคณะ, 2011)

2.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนอาหารแข็ง

ก) สายพันธุ์ของเชื้อราโดยทั่วไปแล้วเชื้อรา *Monascus* sp. เมื่อเจริญบนเมล็ดข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั้งผิวหน้า และแทรกทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าว นั้นจะมีการสร้างสารสีได้ภายหลังจากการบ่มไปได้นาน 3 วัน สารสีเหล่านี้เมื่อนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่า สารสีแดงทั่วไปจะมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด 2 จุดคือที่ 420 และ 500 nm สายพันธุ์ที่ให้สีข้าวแดงเป็นสีแดง หรือแดงชมพูแก่ จะมีความสูงที่จุด 500 nm เช่น ที่พบในสายพันธุ์ของ *M. purpureus* หรือ *M. anka* แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงคล้ำ

ข) พันธุ์ข้าว Palo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ทีผลต่อกรสร้างสารสีของ *M. purpureus* และพบว่าสภาวะที่เหมาะสม ต่อการผลิตข้าวแดงคือ ความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ pH ระหว่าง 3.0-7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และข้าวที่ใช้ไม่ควรเป็นสายพันธุ์ที่มียางเหนียว โดยเฉพาะข้าวเหนียว หรือข้าวเมล็ดพันธุ์สั้น ซึ่งไม่เหมาะสมในการทำข้าวแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค) การให้อากาศ เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต Hesseltine (1965) พบว่าการเขย่าหรือให้อากาศ ช่วยให้การสร้างสารสีได้ดีและเร็วขึ้น Han และ Mudgett (1992) ได้ศึกษาเพิ่มเติมทำให้ทราบว่า ก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นสูง ทำให้การสร้างสารสี และการเจริญลดลง และไม่สามารถสร้างสารสี และเจริญได้เมื่อมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตั้งแต่ 1.0 ก๊าซออกซิเจนตั้งแต่ 0.2 บรรยากาศ ทำให้การสร้างสารสี และการเจริญเพิ่มขึ้น และเพิ่มสูงสุดเมื่อมีก๊าซออกซิเจนมากกว่า 2.1 บรรยากาศ ความดันออกซิเจนต่อความดันคาร์บอนไดออกไซด์ระดับ 0.50 ต่อ 0.02 บรรยากาศ จะมีผลดีต่อการสร้างสารสีแดงมากที่สุด สภาพที่มีก๊าซออกซิเจนคงที่ที่ 0.50 บรรยากาศ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นสภาพที่ให้การผลิตสารสีสูงสุด

ง) อุณหภูมิ อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ ในกระบวนการเมทาบอลิซึมเพื่อการเจริญเติบโต อุณหภูมิสูงเกินไปทำให้เชื้อเจริญได้ช้า สร้างสารสีในข้าวแดงได้ไม่ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีจะอยู่ระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส

จ) ความชื้น การผลิตข้าวแดงสามารถผลิตได้ที่ความชื้นเริ่มต้นต่ำ ต้องมีการพ่นน้ำเป็นครั้งคราวไปบนเมล็ดข้าวเพื่อควบคุมความชื้น ซึ่งจะช่วยให้เชื้อสร้างสารสีได้ดีขึ้น การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องมีการเติมน้ำระหว่างการบ่ม แต่ความชื้นที่เหมาะสมในการสร้างสารสีสัมพันธ์กับสายพันธุ์ของข้าวด้วยเช่นกัน

ฉ) pH Carels และ Shepherd (1977) พบว่า pH ต่ำมีการสะสมสีส้มเนื่องจากโมนาสโครูริน และรูโบพังทาทิน ที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้น ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนได้ แต่ pH สูงๆ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ จึงให้สีแดงออกมา จากรายงานของ John และ Stuart (1991) ได้ศึกษาปรับ pH ของน้ำให้ได้ 3.0 4.0 6.0 และ 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมล แล้วจึงนำข้าวมาแช่เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่า pH 6 เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* FRR 2190

วรรณภา (2529) ได้ทำการศึกษาพบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. KB 11304 KB 21035 และ KB 20322 ที่ pH เริ่มต้น 7.0 ให้การสร้างสารสีสูงสุด และถ้า pH สุดท้ายค่อนไปทางด่าง จะให้สีแดง แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อ KB 21035 ในสภาพที่เป็นกรด พบการสร้างสีเหลืองดีที่สุด ดังนั้นจึงพบว่า pH ที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 วัตถุดิบที่ใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

2.3.1 มันสำปะหลัง

โดยทั่วไปแป้งประกอบด้วยโมเลกุลโพลีแซคคาไรด์ 2 ชนิด คือ อะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) ซึ่งมีการเรียงตัวต่างกัน โดยที่แบบแรก สายโพลิเมอร์ของอะไมโลส เรียงตัวขนานกันอย่างเป็นระเบียบ และมีอะไมโลส บางส่วนเรียงขนานกับส่วนที่เป็นสายตรงส่วนนอกของอะไมโลเพคติน และยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้โมเลกุลบริเวณนี้จับกันอย่างหนาแน่น และมีแรงยึดเหนี่ยวสูง ส่วนแบบที่สอง โมเลกุลเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ แรงดึงดูดระหว่างสายโพลีเมอร์ ของอะไมโลส และอะไมโลเพคติน ต่ำกว่าแบบแรก ทำให้มีการดูดน้ำได้ดี และพอกตัวได้ง่าย (Schoonhoven, 1974)

2.3.2 ประวัติความเป็นมาของข้าว

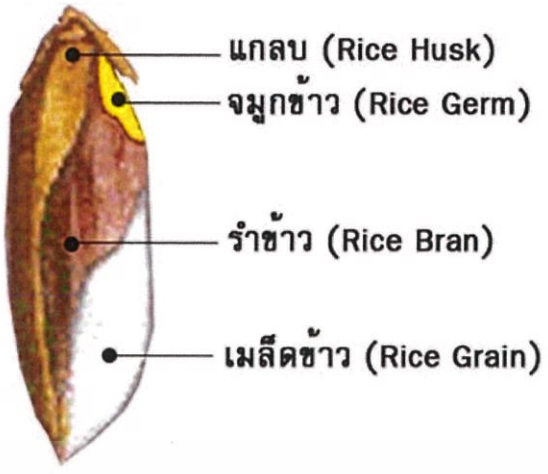
ปัจจุบันการปลูกข้าวในประเทศไทย คงมีเพียงข้าวเมล็ดป้อมที่พบมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ขณะที่ข้าวเมล็ดยาวพบมากในภาคกลาง และภาคใต้ ที่มีความอุดมสมบูรณ์มาก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกข้าว คิดเป็น 45 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศ ส่วนใหญ่ปลูกข้าวหอมมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวคุณภาพดีที่สุดของโลก ข้าวที่ปลูกในพื้นที่แถบนี้ จึงมักปลูกไว้เพื่อขาย รองลงมาคือ ภาคกลางและภาคเหนือ พื้นที่เพาะปลูกเท่ากันประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ทุกวันนี้ไทยเป็น แหล่งปลูกข้าวที่ผลิตออกสู่ตลาดโลกมากที่สุด และเป็นศูนย์กลางของการศึกษาวิจัยพันธุ์ข้าว ซึ่งแสดงให้เห็นถึง บทบาทของผู้สร้างตำนาน แห่งอารยธรรมธัญญาหาร ของมนุษยชาติ

ผลิตภัณฑ์จากข้าวส่งออก ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวอื่นๆ และผลิตภัณฑ์เส้น เช่น เส้นหมี่ และก๋วยเตี๋ยว แม้ว่าปริมาณการส่งออกผลิตภัณฑ์ที่จะมีเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการส่งออกข้าว แต่เมื่อคำนวณเป็นราคาต่อตันพบว่า ผลิตภัณฑ์ข้าวที่แปรรูปมีราคาสูงกว่าข้าวที่ไม่ผ่านการแปรรูป แม้ในกลุ่มข้าวคุณภาพดี ก็ยังคงมีราคาต่ำกว่าราคาผลิตภัณฑ์ ดังนั้นหากสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์ข้าวให้กว้างขวางยิ่งขึ้น ย่อมเป็นการเพิ่มมูลค่าของข้าวให้สูงขึ้น (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2559)

2.3.2.1 ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว

ข้าวเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้า ที่สามารถกินเมล็ดได้ ถือเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่นเดียวกับหญ้า ต้นข้าวมีลักษณะภายนอกบางอย่าง เช่น กาบใบ ลาต้น และรากคล้ายต้นหญ้า เมล็ดข้าว (Rice grain) เป็นผลผลิตชนิด caryopsis เนื่องจากส่วนที่เป็นเมล็ดเดี่ยว (Single seed) ติดแน่นอยู่กับผนังของรังไข่หรือเยื่อหุ้มผล (Pericarp) (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2559) ดังรูปที่ 2.2 เมล็ดข้าวประกอบด้วยส่วนใหญ่ๆ 2 ส่วน คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว

ที่มา : สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว (2559)

ก) ส่วนที่ห่อหุ้ม เรียกกว่า แกลบ

ข) ส่วนที่รับประทานได้เรียกว่า ข้าวกล้อง (Brown rice)

ข้าวกล้องหรือเมล็ดข้าวที่เอาเปลือกออกแล้ว ประกอบด้วย

- เยื่อหุ้มผล (Pericarp หรือ Fruit coat) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้นด้วยกัน epicarp, mesocarp และ endocarp

- เยื่อหุ้มเมล็ด (Tegmen หรือ Seed coat) อยู่ถัดจาก pericarp เข้าไป ประกอบด้วย เนื้อเยื่อสองชั้นเรียงกันเป็นแถว เป็นที่อยู่ของสารประเภทไขมัน

- เยื่ออาลูโรน (Aleurone) อยู่ต่อจากเยื่อหุ้มเมล็ด และคัพภะ (Embryo) อาลูโรนมีโปรตีนสูง นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วย น้ำมัน และเซลลูโลส

- ส่วนที่เป็นแป้ง (Starch endosperm) หรือส่วนที่เป็นข้าวสาร อยู่ชั้นในสุดของเมล็ดประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่ และมีโปรตีนอยู่บ้าง เมล็ดข้าวมีแป้ง 2 ชนิด คือ อะไมโลเพคติน (Amylopectin) และอะไมโลส (Amylose) ส่วนประกอบของแป้งทั้ง 2 ชนิด มีสัดส่วนแตกต่างกันไปตามชนิดข้าว ในข้าวเหนียวจะมี อะไมโลสอยู่ประมาณ 0.0-2.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นอะไมโลเพคติน ข้าวเจ้ามีอะไมโลสมากกว่า คือ ประมาณ 7-33 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักข้าวสาร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.2 คุณภาพของเมล็ด (grain quality)

คุณภาพของเมล็ดแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทด้วยกันคือ คุณภาพเมล็ดทางกายภาพ ซึ่งหมายถึง ลักษณะรูปร่างและขนาดของเมล็ดที่มองเห็นได้ และคุณภาพทางเคมี ซึ่งหมายถึง องค์ประกอบทางเคมีที่รวมกันเป็นเม็ดแป้งของข้าวที่หุงต้มเพื่อบริโภค

ก) คุณภาพเมล็ดทางกายภาพ

เป็นลักษณะที่เกี่ยวกับ ความยาว ความกว้าง และความหนา ของเมล็ดข้าวกล้อง ตลอดจนถึงการมีท้องของข้าวเจ้า นอกจากนี้คุณภาพในการขัดสี เป็นข้าวสารก็ถือว่าเป็นคุณภาพทางกายภาพของเมล็ดด้วย เมล็ดข้าวที่ตลาดต้องการ และถือว่ามีเมล็ดได้มาตรฐาน โดยกำหนดให้เมล็ดข้าวกล้องจะต้องมีความยาวประมาณ 7.0–7.5 มิลลิเมตร ความกว้าง และความหนา ประมาณ 2 มิลลิเมตร และมีหน้าตัดของเมล็ดค่อนข้างกลม เมล็ดข้าวเจ้าเมล็ดจะต้องใส ไม่มีท้อง การมีท้องของเมล็ดข้าวกล้องนั้น ทำให้เมล็ดหักง่ายเมื่อเอาไปสีเป็นข้าวสาร ซึ่งทำให้ได้เมล็ดข้าวสารที่หักมาก ดังนั้น พันธุ์ข้าวที่รัฐบาลไทยส่งเสริมให้ชาวนาปลูก จะต้องมีคุณภาพเมล็ดได้มาตรฐาน ซึ่งเรียกว่า ข้าวพันธุ์ดี

ข) คุณภาพเมล็ดทางเคมี

เป็นลักษณะขององค์ประกอบแป้งในเมล็ดข้าวกล้อง ข้าวเหนียว และข้าวเจ้า แตกต่างกันในชนิดของแป้งที่เป็นองค์ประกอบในเอ็นโดสเปิร์ม เมล็ดข้าวเหนียวประกอบด้วยแป้งชนิดอะไมโลเพคตินเป็นส่วนใหญ่ และมีแป้งอะไมโลสน้อยมาก คือ ประมาณ 7-5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ส่วนเมล็ดข้าวเจ้า ประกอบด้วยแป้งชนิดอะไมโลส ประมาณ 15-30 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ของอะไมโลส ในเมล็ดข้าวเจ้าของพวกอินดิคา (Indica) และจาปอนิคา (Japonica) ก็แตกต่างกันด้วย ข้าวอินดิคา มีแป้งอะไมโลส ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนข้าวพวกจาปอนิคามีเพียง 15-20 เปอร์เซ็นต์ ข้าวไทยที่มีเปอร์เซ็นต์ของแป้งอะไมโลสต่ำ ได้แก่ ข้าวดอกมะลิ 105 (22 เปอร์เซ็นต์) ส่วนข้าวไทยที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งอะไมโลสสูง ได้แก่ กข.1 (30 เปอร์เซ็นต์) เปอร์เซ็นต์แป้งอะไมโลสในเมล็ดของข้าวมีความสัมพันธ์กับคุณภาพในการหุงต้มและการบริโภค ในส่วนของข้าวเหนียวจะมีแป้งอะไมโลสน้อยกว่าข้าวเจ้า ข้าวเหนียวจึงหุงสุกเร็วกว่าข้าวเจ้า และข้าวเหนียวที่หุงสุกแล้วจะเหนียวกว่าข้าวเจ้าด้วย ในจำพวกข้าวเจ้าด้วยกัน เมล็ดของพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งอะไมโลสสูง เมื่อหุงสุกแล้วเมล็ดข้าวสุก จะแข็งกว่าข้าวที่มีปริมาณแป้งอะไมโลสต่ำ ดังนั้นผู้บริโภคที่ชอบรับประทานข้าวที่อ่อนนิ่ม จะต้องเลือกพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งอะไมโลส ประมาณ 20-25 เปอร์เซ็นต์

นอกจากชนิดของแป้งอะไมโลสเพคติน และแป้งอะไมโลส ที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของแป้งเอ็นโดสเปิร์มแล้ว ปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวสารก็มีความสำคัญด้วย เพราะโปรตีนเป็นชนิดของอาหารที่ร่างกายต้องการมาก ปกติเมล็ดข้าวจะมีปริมาณโปรตีนประมาณ 7-10 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และปริมาณของโปรตีนนี้จะผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่ปลูกข้าว เช่น การใส่ปุ๋ยทำให้มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดเพิ่มขึ้น (งามชื่น, 2543)

2.3.3 ประวัติความเป็นมาของข้าวแดง

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์สารสีที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนข้าวนึ่ง ที่รู้จักกันมาช้านานในประเทศแถบตะวันออก เช่น ประเทศจีน ประเทศแถบเอเชียใต้ เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น (Johns และ Stuart, 1991) โดยกำเนิดของข้าวแดงมาจากประทศจีน เชื่อว่าในตำบลหนึ่งมีดินเป็นสีแดง และเมื่อใช้ดินนี้พอกข้าวนึ่งไว้เป็นระยะเวลาหนึ่งจะทำให้ข้าวนึ่งเป็นสีแดง

Smith และ Olive (2003) ในสมัยราชวงศ์ถัง ได้ใช้ข้าวแดงมาเป็นสารเติมแต่งสี และรสชาติในปลา และเนื้อ สมัยราชวงศ์มิงค์ (1368-1644) ได้มีการนำข้าวแดง มาใช้เพื่อปรุงยาจีนโบราณซึ่งได้มีการบันทึกไว้ในตำรายาชื่อ Ben Cao Gang Mu-Dan Shi Bu Yi ข้าวแดงจะออกฤทธิ์ช่วยทำให้ระบบหมุนเวียนในร่างกายดีขึ้น Wu และคณะ (1966) ในประเทศแถบตะวันออกมีการใช้เชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารและเครื่องยาพื้นบ้านมานาน โดยกำหนดชื่อสกุล *Monascus* มานานกว่าร้อยปีใน ยุโรป และอินโดนีเซีย

แต่สำหรับชาวตะวันตก มักรู้จักเชื้อรา *Monascus* sp. ในฐานะเชื้อราปะปนใน ธัญพืช แป้ง หญ้าหมัก และสารอื่นๆ เชื้อราสามารถเจริญบนข้าวนึ่ง ในที่อุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสม โดยย่อยข้าวจนนุ่ม และขณะเดียวกันก็สร้างสีแดงเข้มขึ้น ข้าวแดงมีชื่อรียกต่างๆ กัน เช่น ข้าวแดง (Red rice) ข้าวแดงจากจีน (Chinese red rice) อังคัก (Ang-kak) แอนแคก (Ankak) อังคเวค (Angquac) (Hesseltine, 1965)

ในปี 1920 Church (อ้างอิงโดย บุษบา, 2542) รายงานว่า การผลิตข้าวแดงมีกันมานานแล้วในสาธารณรัฐประชาชนจีน ทดลองลองแยกเชื้อที่ได้จากประเทศจีน จนในที่สุดก็ทราบว่าราที่ให้สีแดงคือ *M. purpureus* (Alexopoulos และ Mims, 1979) ต่อมา Palo และคณะ (1960) นักวิทยาศาสตร์ชาวฟิลิปปินส์ ได้ทดลองใช้เชื้อข้าวแดงนี้ทำข้าวแดง จนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอควร สามารถนำข้าวแดงมาใช้เจือจางสีอาหารได้โดยตรง ภายหลังได้มีการสนใจที่จะศึกษาสายพันธุ์ที่เหมาะสม สำหรับใช้ในสภาพการเจริญในอาหารเหลว ต่อมาก็มีผู้ประสบความสำเร็จในการศึกษาการผลิตสีในอาหารเหลว (Shepherd และ Carels, 1983; Yoshimaru และคณะ, 1975; บุษบา และ วรรณภา, 2527)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

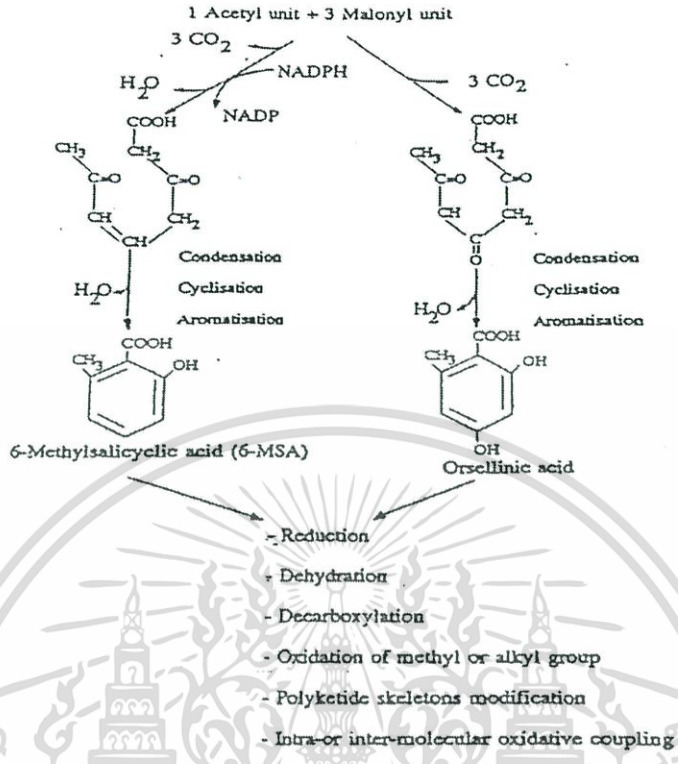
ประเทศจีนได้มีการศึกษา การบริโภคข้าวแดงในคน และสัตว์ พบว่าการบริโภคข้าวแดงในปริมาณ 14-55 กรัมต่อคนต่อวัน สามารถลดความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลได้ 11-32 เปอร์เซ็นต์ และได้ลดความเข้มขนของ Triacylglycerol ได้ 12-19 เปอร์เซ็นต์ (Heber และคณะ, 1999) ในปี 1979 Endo ได้แยกสาร Monacolin K ที่ผลิตได้จาก *Monascus* sp. สารดังกล่าวมีจุดหลอมเหลวที่ 157-159 องศาเซลเซียส มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{36}O_5$ มีค่า LD 50 ในหนูเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักต่อฤทธิ์ Monacolin K จะเป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ HMG CoA reductase (3-Hydroxy-3-Methyglutaryl Coenzyme A) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในตับและเกี่ยวข้องกับสารสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย

2.4 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* sp.

2.4.1 สารสีจากเชื้อรา *Monascus* sp.

สารสีจากเชื้อรา *Monascus* sp. จัดอยู่ในประเภท โพลีคีไทด์ (Polyketde) ที่เกิดจากการรวมตัวของ acetyl 1 หน่วย กับ malonyl 3 หน่วยขึ้นไป ได้เป็นไพร์เมอร์ (Primer) และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา วิถีการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์เหมือนกับกรดไขมัน แต่จะไม่พบสารตัวกลางที่เกิดจากปฏิกิริยาการรีดักชั่น ในการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์นั้น สายของโพลีคีไทด์จะยาวขึ้นตามจำนวนของคาร์บอน 2 หน่วย ที่มาจาก malonyl ที่ถูกเติมเข้าไปในสายไพร์เมอร์เกิดเป็น triketide tetraketide pentaketide และ polyketides ตามลำดับ ต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยา cyclisation และ aromatization ได้เป็นสาร 6-methylsalicylic acid หรือ orsellinic acid ซึ่งเป็นสาร tatraketide เริ่มต้นที่จะนำไปสู่การสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์อื่นๆ ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



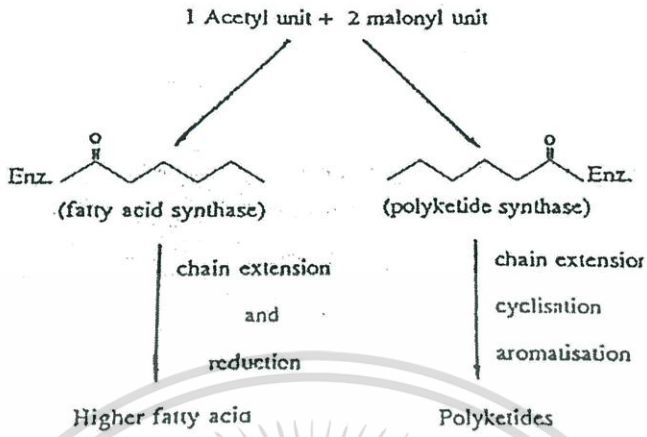
รูปที่ 2.3 การเกิดสาร 6-MSA และ orsellinic acid จาก acety และ malonyl
ที่มา : นิสา (2537)

เมื่อได้สารเริ่มต้นแล้วปฏิกิริยาในลำดับต่อไปที่เกิดขึ้น ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ต่างกันออกไป เช่น อาจมีการเติมหรือดึงออกซิเจนออกจากโครงสร้างของสาร เกิดปฏิกิริยา decarboxylation มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือย้ายหมู่ต่างๆ ภายในโมเลกุลของสาร เกิด intra- หรือ inter- molecular oxidative coupling หรือเกิดพันธะระหว่าง C- หรือ C=O เป็นต้น

สารสีที่สกัดได้จาก *Monascus* sp. เช่น rubropunctation จาก *M. rubropunctatus* monascorbrin จาก *M. purpureus* และ monascin (Monascoflavin) จาก *Monascus* sp. เป็นสารประเภทโพลีคีไทด์ ซึ่งเป็นเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ ที่ผลิตขึ้นมาคล้ายกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน เชื่อว่าเอนไซม์โพลีคีไทด์ที่ใช้สังเคราะห์ สารโพลีคีไทด์เกี่ยวข้องกับยีน ที่สังเคราะห์เอนไซม์ fatty acid synthase อย่างใกล้ชิดเมื่อยีนจำลองตัวเองที่ผิดพลาด ทำให้สูญเสียขั้นตอนรีดักชันไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้เอนไซม์ polyketide synthase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โพลีคีไทด์แทนที่จะเป็น fatty acid synthase ซึ่งมีหน้าที่สังเคราะห์กรดไขมัน ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase กับ polyketide synthase
ที่มา : นิสา (2537)

การสังเคราะห์โพลีคีไทด์ ถูกยับยั้งด้วยแสงสีน้ำเงิน โดยพบว่าแสงสีน้ำเงินจะกระตุ้นให้เชื้อราสร้างโคนิเดีย เบต้าแคโรทีน และกรดไขมัน แทนการสร้างสารโพลีคีไทด์ โดยมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์หรือควบคุมวิถีการสร้างโพลีคีไทด์ การได้รับแสงสีน้ำเงินเป็นเวลาเพียง 2 นาทีก็สามารถยับยั้งการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์ได้แล้ว

2.4.1.1 ประเภทของสารสีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* sp.

เชื้อรา *Monascus* sp. ผลิตสารสีชนิดต่างๆ ดังนี้

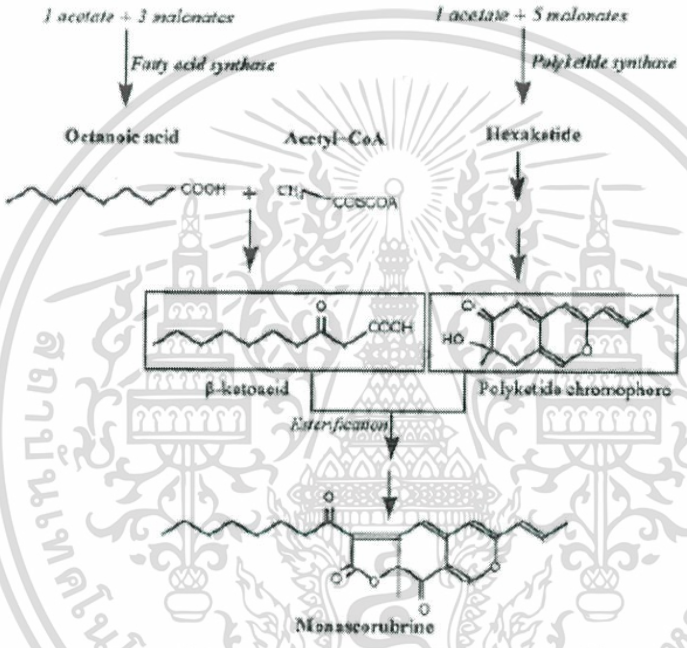
ก) โมนาสโคฟลาวิน (Monascoflavin) แยกได้เป็นครั้งแรกพร้อมกับสารสีโมนาสโครูบริน จากเชื้อรา *M. purpureus wentii* เป็นสารสีในกลุ่มสีเหลือง สูตรโมเลกุลประกอบด้วย $C_{12}H_{26}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 358 ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปคโตรสโคปีดังนี้ λ_{max} 225 228 385 nm มีจุดหลอมเหลว 143-155 องศาเซลเซียส สารสีโมนาสโคฟลาวินเป็นตัวเดียวกันกับสารสีโมนาสซิน (Monascin) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *M. rubignousus* Sato อยู่ในกลุ่มสารสีเหลือง

ข) อังคักฟลาวิน (Ankaflavin) เป็นสารสีในกลุ่มสีเหลืองสูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{30}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 386 มีจุดหลอมเหลว 120-121 องศาเซลเซียส ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปคโตรสโคปีดังนี้ λ_{max} 212 228 382 nm สารสีอังคักฟลาวินมีสูตรโครงสร้างสัมพันธุ์กับสารสีโมนาสซินเช่นเดียวกับสารสีรูโบรพังทาทิน ที่มีสูตรสัมพันธ์กับสารสีโมนาสโครูบริน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค) รูโบรพังทาทิน (Robropunctatin) เป็นสารสีในกลุ่มสีส้ม สูตรโมเลกุลประกอบด้วย $C_{21}H_{22}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 354 สารสีรูโบรพังทาทินสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ สารรูโปรพังทามีน(Robropunctamine) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาต่อได้อีก กับสังกะสีและกรดแอซิติได้สาร อะโปรูโปรพังทามีน (Aporubropunctamine) สารนี้มีผลึกเป็นรูปเข็มสีแดงมีจุดหลอมเหลว 156-157 องศาเซลเซียส

ง) โมนาสโครูบิน (Monascorubrin) เป็นสารสีในกลุ่มสีส้ม สูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{26}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 382 ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปคโตรสโคปีดังนี้ λ_{max} 253 302 352 nm มีจุดหลอมเหลว 134-136 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 2.5



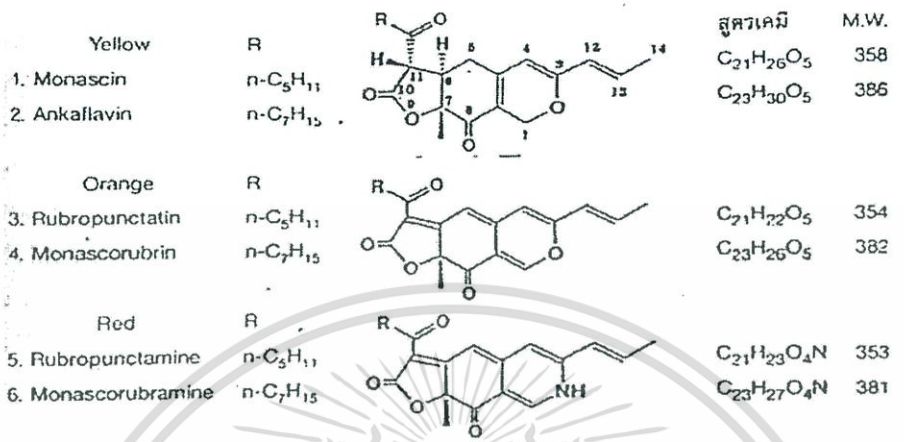
รูปที่ 2.5 กลไกการสังเคราะห์สารสีส้ม
ที่มา : (Hajjaj และคณะ, 2000)

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

ฉ) โมนาสโครูบรามีน (Monascornbramine) เป็นสารสีในกลุ่มสีแดง สูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{27}O_4N$ และน้ำหนักโมเลกุล 381 มีจุดหลอมเหลว 207-208 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารโมนาสโครูบรามีนเกิดจากสารโมนาสโครูริน ทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียม โดยมีโครงสร้างของสารสีจาก *Monascus* sp. ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของสารสีจาก *Monascus* sp.
ที่มา : บุษบา (2542)

2.4.1.2 การใช้ประโยชน์จากสีของเชื้อรา *Monascus*

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า สีผสมอาหารที่ปลอดภัย ควรได้มาจากธรรมชาติ เช่น จากพืช สัตว์ หรือจากจุลลินทรีย์เชื้อราแดง เชื้อรา *Monascus* หลายสายพันธุ์ สามารถผลิตสีได้แต่สายพันธุ์ที่สำคัญคือ *M. purpurescens* จึงมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในประทศไต้หวัน ญี่ปุ่น สหรัฐอมริกา และฝรั่งเศส แต่มีเพียงประเทศญี่ปุ่น ที่อนุญาตให้ใช้สีจาก *M. purpurescens* ได้ถูกต้องตามกฎหมาย แต่ยังมีหลายประเทศในแถบเอเชีย ใช้สีจากเชื้อรานี้เป็นสีผสมอาหาร ถึงแม้ว่ายังไม่มีการอนุญาตให้ใช้ได้ตามกฎหมายก็ตาม *Monascus* มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่ออุตสาหกรรมอาหารโดยใช้เป็นสารให้สี (Colorant) ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น สาเก ไวน์แดง เต้าหู้ยี้ มิโซะ และผลิตภัณฑ์เนื้อ นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์ของ *Monascus* ในเครื่องดื่มไม่มีแอลกอฮอล์จำพวกน้ำหวาน น้ำนมนมเปรี้ยว น้ำผลไม้ และอาหารประเภทโปรตีนจำพวกปลา แป้งแดง ไส้กรอก แฮม เนื้อเทียม ซอสมะเขือเทศ ผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ขนมลูกชุบ ปูเทียม และอื่นๆ (บุษบา, 2540) นอกจากการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารแล้วยัง พบว่า *Monascus* สามารถสร้างสารเมทาบอไลต์ได้หลายชนิดที่น่าสนใจ และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจจำพวก สารกลุ่มเมทาบอไลต์ปฐมภูมิ คือ เอทิลแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ วิตามินบี 2 ไขมัน และกรดไขมัน สารกลุ่มเมทาบอไลต์ทุติยภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ สารปฏิชีวนะโมนาโคลิน สารตกตะกอน ยาลดความดันโลหิต ยาพื้นบ้านของจีนรักษาโรคอาหารไม่ย่อย คูมาริน รักษาโรคด่างขาว โคเอนไซม์ Q10 สารให้กลิ่นหอม สารเองคาแลคโตน และสารยับยั้งการกลายพันธุ์ อีกทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดคือ กลูโคอะมิเลส โปรติเอส แอลฟา-กาแลคโตซิเดส แอลฟา-อะมิเลส และไรโบนิวคลีเอส ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัสในอาหารมากขึ้น (บุษบา, 2540)

ในปี ค.ศ.1992 มีรายงานการใช้ สารสี *Monascus* sp. จำนวนมากกว่า 600 ตัน ในประเทศญี่ปุ่นซึ่งนับเป็นมูลค่าถึง 1,440 ล้านเยน Fabre และคณะ (1993) ได้รายงานว่าการใช้สารสีจาก *M. Ruber* สำหรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอก strasbourgan sausages ทำให้มีลักษณะสีแดงมีความเป็นเนื้อเดียวกัน และกลิ่นเครื่องเทศในไส้กรอกดีขึ้นด้วย Shehata และคณะ (1998) ศึกษาการเติมสารสีจากธรรมชาติ ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแบบ Egyptian fresh beef sausages พบว่า การใช้ข้าวแดงผสมกับไนไตรท์ร่วมกันให้รสชาติที่ดี และสีที่ได้มีความเสถียรมากกว่าใช้ไนไตรท์เพียงอย่างเดียวในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก Andrea และคณะ (2001) ทดลองใช้สีจาก *M. purpureus* ทดแทนการใช้เกลือไนไตรท์กับผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก พบว่า การเติมเกลือไนไตรท์ 10 กรัม/กิโลกรัม ผสมกับสีจาก *Monascus* 0.5 กรัม/กิโลกรัม ในแฮมไก่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจทั้งในด้านสีรสชาติ และลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์

Pattanagul (2002) ศึกษาผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่ทำจากน้ำมันพืช โดยใช้สีจาก *Monascus* sp. ช่วยเพิ่มสีแดง พบว่าไส้กรอกที่พัฒนาได้มีปริมาณคอเลสเตอรอล ต่ำกว่าไส้กรอกที่ขายตามท้องตลาด ในปี ค.ศ.2003 งานวิจัยของ Koehler ได้ทดลองใช้สีจาก *M. purpureus* ผสมในโยเกิร์ตรสผลไม้ และเปรียบเทียบกับสีผสมอาหารที่ใช้อย่างแพร่หลายในทางการค้า โดยวัดค่าสีจาก *M. purpureus* ในโยเกิร์ต ระหว่างการบ่มนมจนเป็นโยเกิร์ต พบว่าให้ค่าใกล้เคียงกับสีของโยเกิร์ตในทางการค้า และไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในระหว่างการเก็บ 21 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณ *Lactobacillus* และ *Streptococcus* เท่ากับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสี ดังนั้นจึงสามารถใช้สารสีจาก *M. purpureus* เป็นสีผสมในโยเกิร์ตรสสตรอเบอร์รี่ได้ (บุษบา และคณะ, 2531)

นอกจากการใช้สีแดงจากเชื้อรา *Monascus* sp. เป็นสีผสมอาหารแล้ว ยังพบว่าสีเหลืองที่มาจากนอกจากการใช้สีแดงจากเชื้อรา *Monascus* sp. เป็นสีผสมอาหารเชื้อรา *Monascus* sp. นั้นจะมีราคาแพงกว่าสีแดงถึง 5 เท่า ที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน แต่ยังมีความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยมากกว่าสีแดง สีของเชื้อรา *Monascus* sp. สามารถใช้สารเคมี เช่น นอร์แมลเฮ็คเซน หรือคลอโรฟอร์ม สกัดสีเหลืองออกมาจากสารสีหมักได้ แต่อันตรายถ้ามีสารเคมีตกค้างที่ใช้สกัด ดั้งนั้น จึงมีนักวิจัยได้ศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. สีเหลืองที่สามารถใช้สับสเตรทราคาถูกที่หาได้ในท้องถิ่น เช่น แป้งมันสำปะหลัง เศษมันฝรั่งที่เหลืองจากการแปรรูปแป้ง ถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือข้าว นำมาใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ในสภาพหมักแห้ง หรือในอาหารเหลว ทำให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาวิชาการ และได้ความรู้การหมักผลิตกัณฑ์จากเชื้อรา เพื่อประโยชน์ของอุตสาหกรรมการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในประเทศ

2.4.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสารสีในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus*

ก. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน Lilly และ Barnett (1962) รายงานว่า ฟรุคโตส กลูโคส และน้ำตาลอินเวอร์ท (Invert sugar) จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการเจริญเติบโตของ *M. purpureus* และเป็นการเพิ่มอัตราการเจริญ ถ้าหากว่ามี ซูโครสกับ ฟรุคโตส หรือกลูโคส ในอาหารจะทำให้อัตราการเจริญสูงขึ้น ถ้าใช้น้ำตาลสองชนิด และดีกว่าน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์เพียงชนิดเดียว Mchan และ Johnson (1970) ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลวที่ มีกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน พบว่า กลูโคสเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญสูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้น 6.25 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Lin (1973) คัดเลือก เชื้อราที่เจริญได้ดีในอาหารเหลวจากโคจิ ที่ใช้ทำเหล้าเกาเหลียง ยังพบว่า *Monascus* F-2 สามารถใช้คาร์บอนเป็นแหล่งอาหารได้หลายชนิด และอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีคือ แป้ง น้ำตาลกาแลคโตส และมอลโตส ตามลำดับ Broder และ Koehler (1980) พบว่าทั้งเชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 สร้างสารสีแดงได้อย่างดีบนอาหารที่มี แป้ง น้ำตาล กาแลคโตส และมอลโตส ตามลำดับ Broder และ Koehler (1980) พบว่าทั้งเชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 สร้างสารสีแดง ได้ดีที่สุดในแหล่งคาร์บอนที่เป็น น้ำตาลมอลโตส เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยสร้างสารสีแดง ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 634 nm รองลงมาเป็นน้ำตาลฟรุคโตส ความเข้มข้น 15.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เชื้อราสร้างสารสีแดง ดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 627 และ 625 nm ตามลำดับ Wong และ Koehler (1981) ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส และการสร้างสารสีของเชื้อรา และแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมไนเตรท ต่อการเจริญ *M. purpureus* M1S พบว่าเมื่อใช้กลูโคส 400 กรัมต่อลิตร จะใช้แอมโมเนียมไนเตรท เพียง 0.5 กรัมต่อลิตร สำหรับการเจริญ และการสร้างสารสี เมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงขึ้น ความต้องการแหล่งไนโตรเจนก็จะมากขึ้นด้วย ในปีเดียวกันพบว่าถ้ามีปริมาณคาร์บอนในอาหารเพิ่มขึ้น ตามความต้องการไนโตรเจน เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้น โดยเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ทดลองมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อใช้กลูโคส 200 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรท 5-10 กรัมต่อลิตร และพบว่าถ้าขาดคาร์บอนในอาหาร จะไปยับยั้งกิจกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์ nitrate reductase และ glutamate dehydrogenase ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมไนโตรเจน และวิถีเมแทบอลิซึม

Lin และ Demin (1991) พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อรา *Monascus* TTWMB6042 ในอาหารเหลวชนิด defined medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์ตริน จะให้การเจริญดีที่สุดรองลงมา ได้แก่ แป้ง กลูโคส มอสโตส และฟรุคโตส แต่ไม่พบการเจริญใน กาแลคโตส เลคโตส และซูโครส

2. แหล่งไนโตรเจน มีผลต่อการเจริญการสร้างสารสี และชนิดของสารสี ที่เชื้อราสร้างขึ้น Lin (1973) พบว่า *Monascus sp.* F-2 ใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิด ในการสร้างสารสีแดง ได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนเปปโตน และยีสต์สกัดไม่เหมาะที่จะเป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับสร้างสารสีแดง เช่นเดียวกับการทดลองของ Su และ Huang (1980) ที่พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงของเชื้อรา Mankav-204 คือ โมโนโซเดียมกลูตาเมต ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Broder และ Koehler (1980) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 สร้างสารสีแดง ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 611 nm ได้ดีที่สุด เมื่อใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

Carels และ Shepherd (1977) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน ต่อการสร้างสารสีและสปอร์ ของเชื้อรา *Monascus* sp. พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยีสต์สกัด หรือไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อราจะผลิตสีแดงที่ pH 6.5 เนื่องจากอาหารนี้มีกรดอะมิโนมากพอ ภายหลังจากที่เชื้อเจริญทำให้ pH สูงขึ้น สารสีสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระ และกรดอะมิโน หรือ NH-group ภายในเส้นใยเปลี่ยนเป็นพวกอนุพันธุ์เอมีนได้ และไม่พบสีส้ม หรือสีเหลือง ส่วนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น โซเดียมไนเตรทจะได้สารสีสีแดง และส้มเนื่องจากอาหารนี้ไม่มีกรดอะมิโนอิสระ ถึงแม้ pH จะสูงขึ้น สารสีจะสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนภายในเส้นใยได้ ทำให้สารสีสีส้มยังเหลืออยู่ ขณะที่อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไนเตรทจะทำให้ pH ลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 2.5 เป็นผลทำให้สารสีที่ผลิตได้ ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ NH-group ภายในเส้นใยได้ผลคือ จะมีการสะสมของ monascorubrin และ rubropunctatin ได้เป็นสีส้ม การเจริญบางสายพันธุ์ในอาหารนี้ได้สารสีเหลือง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ monasconbrin หรือ rubropunctatin กับ hydrogen peroxide ได้เป็น monascin หรือ ankafavin ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 50-100 กรัมต่อลิตร ของแอมโมเนียมไนเตรท จะให้อัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ จะเป็นพิษต่อเซลล์ และการสร้างสารสี เนื่องจากแอมโมเนียมในอาหาร จะไปรีดิวซ์การทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเตรส (Nitrate reductase) ดังนั้นจะเป็นการลดความสามารถในการดูดซึมไนเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่พบว่า แอมโมเนียมไอออน สามารถแพร่กระจายได้เร็วมากกว่าภายในเซลล์ และสังเคราะห์ได้เร็ว ดังนั้นแสดงว่าจะไม่มีผลยับยั้งการเจริญ ถ้าใช้ในปริมาณที่มีความเข้มข้นต่ำๆ

Wong และKoehler (1981) พบว่าไนเตรทกระตุ้นการสร้างสปอร์ ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ขณะที่แอมโมเนียมจะยับยั้งการสร้างสปอร์ ในปีเดียวกัน Wong ได้ทดลอง และพบว่ากลูโคสที่ความเข้มข้นระหว่าง 40-200 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร จะทำให้ *M. purpureus* ผลิตสีแดงได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทสูงมากกว่า 50 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญ และการผลิตสารสี

Lin และ Demain (1991) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB6042 เจริญได้ดีในแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท และโมโนโซเดียมกลูตาเมท ขณะที่สร้างสารสีได้ดีในโมโนโซเดียมกลูตาเมท ความเข้มข้น 1.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ร่วมกับน้ำตาลมอลโตส ความเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์

Yongsmith และคณะ (1993) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ยีสต์สกัด เปโตน และมอลท์เอกซ์แทรค ต่อการเจริญ และการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus sp.* KB10 พบว่าเปปโตน กระตุ้นการสร้างสารสีโดยตรง แต่ยีสต์สกัด ส่งเสริมการเจริญมากกว่าการสร้างสารสี ส่วนมอลท์เอกซ์แทรค มีผลต่อการเจริญ และการสร้างสารสีน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้เปปโตน ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ กรดกลูตามิค ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ สร้างสารสีเหลืองได้สูงถึง 860 หน่วยต่อมิลลิลิตร

3. สารจำเป็นต่อการเจริญ (Growth factor)

Johnson และ Mchan (1975) พบว่าการเติมวิตามิน 5 ชนิด คือ ไพริดิกซีน ไบโอติน ไธอะมีน ไนอะมีน และไรโฟลาวิน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีผลต่อการเจริญ ส่วนกรดอะมิโน และเกลือแร่ ช่วยให้การเจริญเพิ่มขึ้น แต่ยังน้อยกว่าในกรณีที่เติมเปปโตน หรือยีสต์สกัด ในจำนวนเกลือแร่ 5 ชนิดคือ แคลเซียม โมลิบดินัม ทองแดง แมงกานีส และสังกะสี พบว่าสังกะสี 800 ไมโครกรัมต่อลิตร ให้การเจริญดีที่สุด และการเจริญดียิ่งขึ้น เมื่อใช้ร่วมกับกรดอะมิโน ทริฟโตเฟน ลิวซีน กรดแอสปาติก ไทโรซีน ไกลซีน และอีสติดีน เนื่องจากสังกะสีช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน โดยไปลดค่า conversion efficien (น้ำตาลที่ถูกใช้ไปต่อน้ำหนักแห้ง)

4. อุณหภูมิ และpH

Lin (1973) ศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารที่อุณหภูมิ 27-40 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นตั้งแต่ 2-10 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ 32 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงมากกว่า 37 องศาเซลเซียส การสร้างสารสีจะลดลง ส่วน pH ที่เหมาะสมคือ 6.0 รองลงมาคือ 5.0 และ 7.0 ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลง pH ในขณะเลี้ยงเชื้อรา ขึ้นอยู่กับชนิดของเหล่งไนโตรเจน ถ้า pH เป็นกลางจะสร้างสารสีแดง แต่ถ้า pH เป็นกรดจะเปลี่ยนเป็นสร้างสารสีส้ม นอกจากนี้ที่ pH เป็นกรดยังทำให้การสร้างโคนิเดียลดลง แต่การสร้างสารสีจะสูงขึ้น เนื่องจากที่ pH ต่ำกลูโคส และฟอสเฟต ถูกใช้ไปในการสร้างเซลล์เป็นจำนวนมาก จึงเหลือเพียงเล็กน้อยสำหรับสร้างโคนิเดีย

Su และ Huang (1980) พบว่าเชื้อรา *M. anka* V-204 สร้างสารสีดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ และ pH มีผลน้อยมากต่อการเจริญของคลิสโททีเซียม และโคนิเดียคือ 28-30 และ 35-40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะยับยังการสร้างสปอร์อย่างสมบรูณ์

Yongsmith และคณะ (1993) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 สร้างสารสีเหลือง ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 330 nm ได้ดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส รองลงมาคืออุณหภูมิ 31 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยอาหารมี pH เริ่มต้นเป็น 2.5 ส่วนอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 40 องศาเซลเซียส และ pH 4.0 ตามลำดับ

2.4.2 สาร Monacolin K

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

ในปี 1970 พบว่า สารคอมแพคติน (Compactin) และโลวาสแตติน (Lovastatin) เป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutarly Coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล และใช้คุณสมบัตินี้มาพัฒนาศักยภาพของยา สำหรับลดคอเลสเตอรอลชนิด LDL (Moore และคณะ, 1985)

ในปี 1976 Endo ได้พบสารคอมแพคติน หรือในทางการค้าเรียกว่า เมวาสแตติน (Mevastatin) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *P. citrinum* ได้ทำการวิจัยพบว่า มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ และลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล จึงเป็นผู้ริเริ่มทำให้มีการค้นคว้า และศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase ในธรรมชาติจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และค้นพบเมแทบอลิซึมของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Monacolin ที่แยกได้จากเชื้อรา ในเวลาต่อมาโครงสร้าง Monacolin เสถียร และคงตัว แตกต่างกับสารคอมแพคตินที่ปรากฏ ในลักษณะ 6- alphamethyl ในรูปวงแหวน hexahydronaphthalene

อย่างไรก็ตามในปี 1980 พบว่า สารคอมแพคตินมีความเป็นพิษในสัตว์ เพราะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันระหว่างคอมแพคติน และ Monacolin ยากต่อการตรวจสอบ การศึกษาทางการแพทย์เกี่ยวกับสาร Monacolin ได้ถูกระงับชั่วคราว จึงเปลี่ยนไปศึกษาเรื่องผลกระทบของสารที่มีต่อสัตว์ทดลอง

ในปี 1982 มีการศึกษาระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อสำรวจคุณสมบัติเกี่ยวกับสาร Monacolin ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *A. terreus* พบว่าสาร Monacolin นี้สามารถลดคอเลสเตอรอลชนิด Low-density lipoproteins (LDL) พบว่าในคนไข้ภาวะเสี่ยง และเมื่อการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อสัตว์ทดลอง ปรากฏว่าไม่มีฤทธิ์เป็นพิษ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการศึกษาสารคอมแพคติน ดังนั้นจึงได้ดำเนินงานวิจัยทางการแพทย์ต่อไป

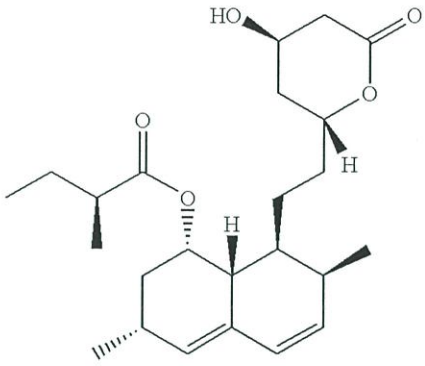
สารนี้ได้รับรองประสิทธิภาพโดยองค์การอาหารและยา ของสหรัฐอเมริกา ในปี 1987 พบว่าปริมาณของสาร Monacolin ที่อยู่ในแต่ละผลิตภัณฑ์ปริมาณ 80 มิลลิกรัม สามารถลด LDL ได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีระดับการออกฤทธิ์ที่ดีกว่ายาลดคอเลสเตอรอลชนิดอื่นๆ คุณสมบัติทางยามีผลกระทบน้อยมากง่ายต่อการรักษา คนไข้จึงเป็นที่ยอมรับอย่างรวดเร็ว แต่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ ทรานอะมิเนส (Transaminase) ในตับ และมีผลต่อกล้ามเนื้อ

ในปี 1998 องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา สั่งห้ามขายอาหารเสริมที่มีส่วนผสมของข้าวแดงจากการหมักโดยใช้ยีสต์เป็นหัวเชื้อภายหลังพบว่ามีส่วนประกอบของ Monacolin ในอาหารเสริมจึงมีข้อโต้แย้งว่าอาหารเสริม มีสาระสำคัญที่มีคุณสมบัติทางยา

2.4.2.1 คุณสมบัติสารโมนาโคลินเค (Monacolin K)

Monacolin K เป็นสารกลุ่มสแตตินได้จากเชื้อราเส้นใย (Filament) ได้จากกระบวนการเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ได้สารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนผ่านวิธี polyketide pathway เชื้อรา *M. ruber, P. brevicompactum* และ *A. terreus* สามารถผลิตโลวาสแตติน (Lovastatin) ที่มีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.7 โมนาโคลิน เจ (Monacolin J) โมนาโคลิน แอล (Monacolin L) และเมวาสแตติน (Mevastatin) พบว่าสารกลุ่มนี้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase: mevalonate : NADH+ oxidoreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์กระตุ้นการเปลี่ยน HMG-CoA ให้เป็นเมวาโลเนต (Mevalonate) เพื่อใช้ในกระบวนการสร้างคอเลสเตอรอล (Haijaj และคณะ, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 โครงสร้างของ Monacolin K หรือ โลวาสแตติน
ที่มา : Dhale และคณะ (2007)

Monacolin หรือที่รู้จักทั่วไปในทางการค้าว่า โลวาสแตติน มีระบบการเรียกชื่อ (UPAC) ว่า [8-2-(4-hydroxy-6-oxo-oxan-2-ylethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]2-methylbutanoate ($C_{24}H_{36}O_5$) มวลโมเลกุล 404.54 กรัมต่อโมล นำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางยาดังนี้ ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (Bioavailability) น้อยกว่าร้อยละ 5 การจับโปรตีนในกระแสเลือด (Binding protein) มีมากกว่าร้อยละ 95 ยาออกฤทธิ์ต่อตับ (CYP3A substrate) มีค่าครึ่งชีวิต (Half life) 1.1-1.7 ชั่วโมงเมื่อรับประทานยาไม่มีผลกระทบ (Nagligible) ต่อการขับถ่าย (Excretion) ซึ่งตรวจพบเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ของปัสสาวะ และ 83 เปอร์เซ็นต์ของอุจจาระ ในการขับถ่าย (Haijaj และคณะ, 2001)

2.4.2.2 การค้นพบทางชีวเคมีและทางชีววิทยา

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าปัจจัยเสี่ยงหลักของโรคหลอดเลือดหัวใจคือการที่ระดับไขมันสูงในเลือด ทำให้ไขมันเกาะติดผนังหลอดเลือด จึงมีความยืดหยุ่นน้อย และหนาขึ้นจนเกิดสภาพของหลอดเลือดแข็ง และตีบ ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดหลอดเลือดแข็งเกี่ยวข้องกับตัวพาไขมันไปตามเส้นเลือด ซึ่งรียกว่า ไลโพโปรตีน (Lipoprotein) มี 2 ชนิดคือ

- Low-density lipoproteins (LDL) ซึ่งจะพาคอเลสเตอรอลจากตับไปสู่ร่างกาย LDL เป็นไขมันที่ก่อให้เกิดพิษ หากมีมากจะทำให้เกิดหลอดเลือดแดงตีบได้ง่าย

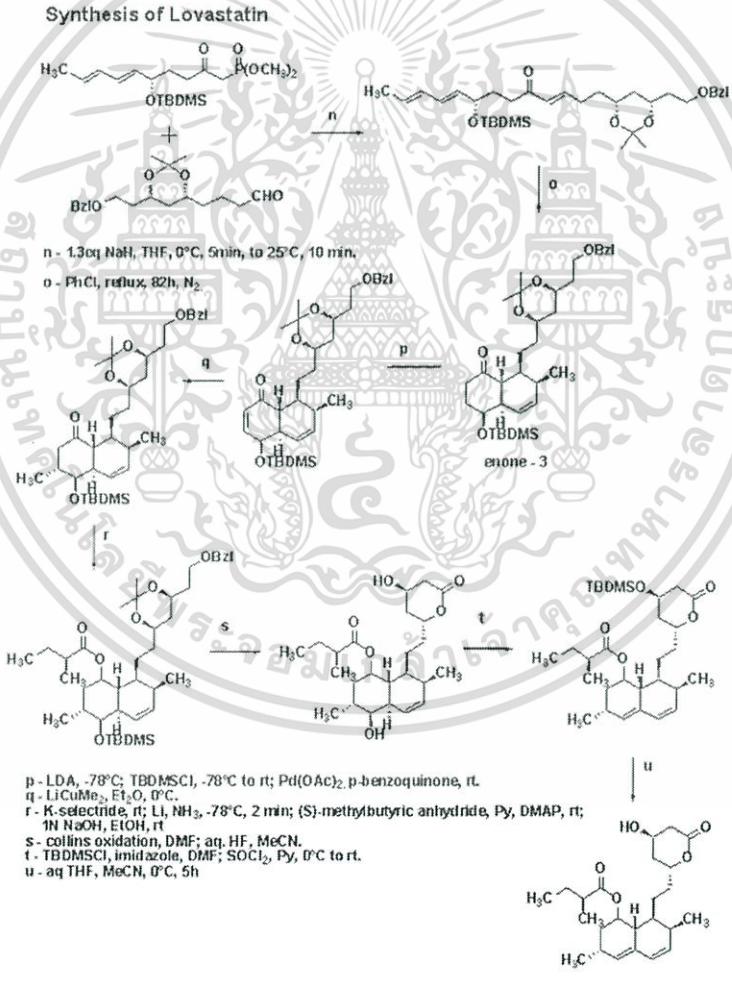
- High-density lipoproteins (HDL) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประโยชน์โดยพาคอเลสเตอรอลจากร่างกายเข้าสู่ตับ หากมี HDL ในปริมาณสูงส่งผล ให้เกิดโรคหลอดเลือดน้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ LDL-C (Low density lipoprotein cholesterol) ซึ่งเป็นไลโพโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดหนึ่งที่มีในตับมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่พาคอเลสเตอรอลจากตับไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อเนื้อเยื่อต้องการใช้คอเลสเตอรอล ซึ่งเป็นจุดที่สำคัญที่ต้องลดระดับคอเลสเตอรอลอลส่วนเกินในร่างกาย โดยรักษาให้ร่างกายทำงานเป็นปกติอยู่เสมอ (Alberts, 1998)

2.4.2.3 กระบวนการสังเคราะห์สาร Monacolin

Monacolin ประกอบด้วยโพลีคีไทด์ 2 สายจากอนุพันธ์ของอะซีเตต โดยโพลีคีไทด์สายแรก อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น Dihydromonacolin L Monacolin L และ Monacolin J ตามลำดับ ส่วนโพลีคีไทด์สายที่ 2 อะซิเตตมีการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์แล้วเชื่อมต่อกับโพลีคีไทด์สายแรกในรูป Monacolin J โดยพันธะเอสเทอร์แล้วได้ สารโลวาสแตตินในรูปกรด (Acid form) ดังแสดงในรูปที่ 2.8 สารประกอบนี้สร้างโดย *A. terreus* (Hendrickson และคณะ, 1999)



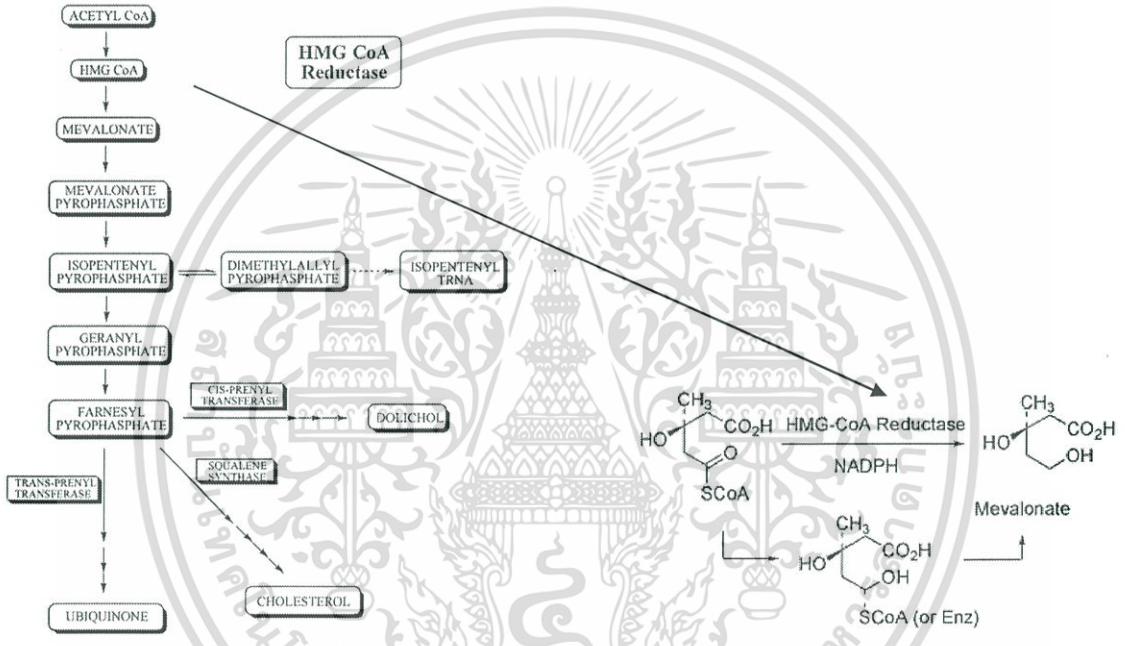
รูปที่ 2.8 กระบวนการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน หรือโลวาสแตติน

ที่มา : Crasto (2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.4 กลไกการทางานของสาร Monacolin (จันทนี, 2545)

สาร Monacolin สามารถยับยั้ง HMG-CoA reductase อย่างจำเพาะ โดยที่เอนไซม์ HMG-CoA reductase จะใช้เป็นตัวกลาง ในการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลง เป็นเมวาโลเนต (Mevalonate) และสังเคราะห์เป็นคอเลสเตอรอลต่อไป (Alberts, 1998) สารโลวาสแตตินจะขัดขวางการสร้าง คอเลสเตอรอลโดยการไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ดังแสดงในรูปที่ 2.9 จึงทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอล สาร Monacolin ไม่แสดงฤทธิ์ทางยาในรูปโครงสร้างปกติ แต่เมื่อโครงสร้างถูกย่อยสลาย (Hydrolysis) เป็น β-hydroxy acid จะทำให้สารออกฤทธิ์ ในร่างกายได้



รูปที่ 2.9 กระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล เมื่อ HMG-CoA reductase ทำปฏิกิริยายับยั้งการเกิดคอเลสเตอรอล

ที่มา : Goldstein และคณะ (1973)

2.4.2.5 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา (จันทนี, 2545)

สารประกอบไขมันในเลือดจะประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) คอเลสเตอรอลอิสระ (Free cholesterol) คอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (Cholesterol ester) และฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ซึ่งไขมันเหล่านี้ ไม่สามารถรวมกับน้ำได้ จึงต้องรวมกับโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Apoprotein) และไหลเวียนตามกระแสเลือด ในรูปของไลโพโปรตีน เมื่อในเลือดมีสารเหล่านี้ในความเข้มข้นสูง จำเป็นต้องใช้ยาลดไขมัน มาควบคุมระดับไขมันในเลือด

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 Monacolin หรือ โลวาสแตติน เป็นยาในกลุ่มสแตตินที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (HMG-CoA reductase inhibitor) ยากลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ HMG-CoA จะออกฤทธิ์ยับยั้ง แบบผันกลับได้โดยไปแย่งจับบริเวณเร่ง (Reversible competitive inhibitor) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ตัวอย่าง ยากลุ่มสแตติน ได้แก่ Pravastatin, Fluvastatin และ Atorvastatin เป็นต้น ปัจจุบันอาจกล่าวได้ว่ายาในกลุ่มสแตตินนี้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลด LDL-คอเลสเตอรอล

2.4.2.6 ประโยชน์ในการรักษา

ใช้กับผู้ป่วยที่มีคอเลสเตอรอลสูงทุกชนิด ซึ่งอาจใช้ตัวยับยั้งรีดักเทสเพียงชนิดเดียว หรือ ใช้ร่วมกับยาอื่น ได้แก่ Bile acid-bindig resins หรือ Nicotinic acid ซึ่งต้องระมัดระวังเรื่องของปฏิกิริยาสัมพันธ์ของยา ที่อาจทำให้เกิดกล้ามเนื้อผิดปกติได้ ยาในกลุ่มสแตตินสามารถลดอัตราของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ และอัตราการตาย ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจที่มีระดับไขมันสูง ขณะเดียวกันยากลุ่มนี้ ยังมีบทบาทในการป้องกันปฐมภูมิ (Primary prevention) สำหรับผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ ได้แก่ ผู้ที่มีไขมันในเลือดสูง กับการมีโรคความดันโลหิตสูง หรือเบาหวาน เป็นต้น

2.4.2.7 กลไกการออกฤทธิ์

กระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในมนุษย์นั้น ต้องผ่านขั้นตอนต่างๆ หลายขั้นตอนโดยขั้นตอนแรก คือ การสร้าง mevalonate โดยการรีดิวซ์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) ซึ่งในขั้นตอนนี้จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ HMG-CoA reductase ในรูปแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ถูกรีดิวซ์ (Reduced form) ของ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADPH^{+}H^{+}$) ในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่ง mevalonate ที่เกิดขึ้นนี้จะถูกเปลี่ยนแปลง โดยเอนไซม์ต่างๆ ในร่างกายอีกหลายขั้นตอน จนเกิดเป็นคอเลสเตอรอลในที่สุด สแตตินออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นที่ตับ และคอเลสเตอรอลที่ผลิตได้คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ ของคอเลสเตอรอลภายในร่างกายทั้งหมด โดยการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase นี้จะถูกยับยั้งได้โดยปริมาณน้ำดีในร่างกาย ระดับ mevalonate และระดับคอเลสเตอรอลในร่างกายเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจถือได้ว่าเอนไซม์ HMG-CoA reductase ถือเป็นเอนไซม์ที่สำคัญ ในกระบวนการการสร้างคอเลสเตอรอลในมนุษย์ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ จะมีผลลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดลงได้

การออกฤทธิ์ของ สแตตินแต่ละชนิดนั้น จะมีความจำเพาะแตกต่างกันไป ในแง่ของความสามารถในการเข้าจับกับเอนไซม์ หรือระยะเวลาที่จับกับเอนไซม์ ซึ่งจะเกิดขึ้นได้โดยทันทีเมื่อยาเข้าสู่ภายในเซลล์ตับ การยับยั้งการสร้างคอเลสเตอรอล จะส่งผลให้เกิดการลดลงระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ทำให้ร่างกายขาดแคลนคอเลสเตอรอล เป็นผลให้รบกวนทำงานของยีนหลากหลายยีนในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SREBP ซึ่งเป็นโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากยีน ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างจำพวกคอเลสเตอรอล โดยการรบกวนการทำงานของยีนนี้ จะทำให้เกิดสร้างตัวรับ LDL ที่ผิวเซลล์ตับให้มีจำนวนเพิ่มขึ้น และผลจากการที่มีตัวรับ LDL เพิ่มขึ้นนี้จะทำให้ LDL ถูกเก็บเข้าสู่เซลล์ตับมากขึ้น เป็นผลให้ระดับ LDL ในกระแสเลือดลดลงได้ในที่สุด โดยผลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเหล่านี้จะเห็นผลได้ชัดเจนภายหลัง 2 สัปดาห์แรกของการใช้ยา และจะเห็นผลได้อย่างเต็มที่หลังจากการรับประทานยาครั้งแรก 6 สัปดาห์ (จันทนี, 2545)

2.4.2.8 ผลกระทบจากการใช้ยากลุ่มสแตติน

ยากลุ่มสแตติน ส่งผลกระทบต่อการทำงานของตับ โดยพบว่าผู้ป่วยมีการทำงานของเอนไซม์ทรานอะมิเนส เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าของค่าที่พบในคนปกติ พบได้ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมักจะเป็นแบบชั่วคราว และไม่ทำให้เกิดพิษต่อตับ ดังนั้นจึงควรวัดการทางานของเอนไซม์อะมิโนทรานสเฟอเรส (Aminotransferase) ก่อนให้ยา และทุก 2-4 เดือน และควรหยุดใช้ยา เมื่อกิจกรรมของเอนไซม์ อะมิโนทรานสเฟอเรสเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 3 เท่าของค่าปกติ

ผลกระทบต่อกล้ามเนื้อ อาการที่ไม่พึงประสงค์ที่พบรองลงมาคือ กิจกรรม Creatine kinase (CK) สูงขึ้น โดยเอนไซม์ตัวนี้เร่งการขนย้ายหมู่ฟอสเฟตจาก Creatine phosphate ไปยัง Adenosine diphosphate (ADP) และในขั้นสุดท้ายได้ Adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ เอนไซม์ CK มีเฉพาะในกล้ามเนื้อ และพบได้บ้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเนื้อเยื่อสมองกระบวนการอิเล็คโตรโฟลิซิส สามารถแยกเอนไซม์ CK ได้อย่างน้อย 3 ตัว โดยที่ CK จากกล้ามเนื้อลาย และสมองมีเพียงกลุ่มเดียว แต่ต่างตำแหน่งกัน ส่วน CK จากกล้ามเนื้อหัวใจจะให้ 2 กลุ่มโดยที่กลุ่มหนึ่งคล้ายกับของกล้ามเนื้อลาย ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งอยู่ระหว่าง CK ของกล้ามเนื้อลายและของเนื้อเยื่อสมอง

เมื่อพบว่ากิจกรรมของ CK ในซีรั่มสูงกว่าปกติ โดยจะเริ่มเริ่มเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 3-6 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดใน 24-36 ชั่วโมง มีผลทาให้หัวใจวายได้ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจภาวะของหัวใจวาย เมื่อเริ่มรู้สึกว่ามีการเจ็บหน้าอก แต่เอนไซม์ตัวนี้จะถูกกาจัดออกจากพลาสมา (Plasma) ได้โดยเร็ว จึงพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้ กลับสู่สภาวะปกติได้ภายในเวลาเพียง 3 วัน โดยเมื่อเทียบกับเอนไซม์ตัวอื่น เช่น SGOT LDH เป็นต้น และอาจทำให้เกิดความผิดปกติของกล้ามเนื้อ (Myopthy) โดยเฉพาะเมื่อใช้ยากลุ่มนี้ร่วมกับยาลดไขมันในเลือดกลุ่ม Fibric acid derivatime และ Nicotinic acid ส่วนยาอื่นๆ ที่จะมีผลทำให้อาการไม่พึงประสงค์ต่อกล้ามเนื้อ ถ้าให้ร่วมกับยาในกลุ่มสแตติน ได้แก่ ยาที่ถูกเมทาบอไลต์โดย Cytochrom P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 4 (CYP3A4) เช่นเดียวกับสแตติน ได้แก่ Erythromycin itraconazole ดังนั้นจึงควรวัดกิจกรรมของเอนไซม์นี้ และโดยเฉพาะผู้ป่วยที่รับประทานยาสแตตินร่วมกับยาเหล่านี้ จะต้องลดขนาดยาสแตตินลง ไม่ให้ยามากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของขนาดสูงสุดที่ใช้ในการรักษา

2.4.2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ การสังเคราะห์สารสีและ Monacolin K ของเชื้อรา *Monascus* ในข้าวแดง

กระบวนการผลิตข้าวแดงแบบดั้งเดิม ใช้วิธีการการหมักแบบอาหารแข็ง โดยการหมักแบบอาหารแข็งนั้น หมายถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง ในสภาวะที่ไม่มีน้ำอิสระ (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 ทั้งนี้จากปัจจัยที่ได้กล่าวมาข้างต้นมีผู้ศึกษาความเหมาะสม และอิทธิผลของปัจจัยดังกล่าวในหลายกรณีด้วยกัน ซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

ก) อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราตระกูล *Monascus* มีค่าประมาณ 28-32 องศาเซลเซียส โดยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุดที่ 15-18 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเช่น *M. purpureus* CBS 109.7 พบว่า อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เหมาะสมต่อการเจริญ อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ต่ำที่สุด และอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 34, 18 และ 46 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สารสี มีค่าอยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส (Carvalho และคณะ, 2003)

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

นอกจากนั้นหลายๆ งานวิจัยได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต Monacolin K จาก *Monascus* sp. ตัวอย่างเช่น Su และคณะ (2003) ทาการทดลองเลี้ยงเชื้อ *M. Purpureus* CCRC 31615 ที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า รา *Monascus* sp. สามารถผลิต Monacolin K ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่การผลิต Monacolin K ลดลงอย่างมาก และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 25 และ 37 องศาเซลเซียส

ข) ความชื้น

ความชื้นเริ่มต้นของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ มีอิทธิพลต่อการเจริญ และการผลิตสารทุติยภูมิ เช่น การผลิตสารสีของราในกระบวนการหมัก แบบอาหารแข็งอย่างมีนัยสำคัญ 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* sp. ควรมีค่าประมาณ 56 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า pH เริ่มต้น 6.0 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเหมาะสมต่อการเจริญของราเข้าไปถึงกลางเมล็ดข้าว และเชื้อราสามารถสร้างสีส้ม-แดงได้ในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าความชื้นเริ่มต้นของข้าวต่ำกว่า 38 เปอร์เซ็นต์ จะไม่พบเส้นใยของเชื้อราภายหลังการบ่มนานถึง 2 สัปดาห์ และที่ความชื้นเริ่มต้น ของข้าว 38-39.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญของราจำกัดเฉพาะแต่เพียงภายนอกเมล็ดข้าวเท่านั้น และผู้วิจัยเสนอว่าการผลิตสารสีของ *Monascus* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ควรใช้ความชื้นเริ่มต้นสูง (ประมาณ 56 เปอร์เซ็นต์) อีกทั้งสามารถเติมน้ำ ในระหว่างหมักข้าว เพื่อให้รามีน้ำเพียงพอสาหรับการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่อย่างไรก็ตาม Teng และ Feldheim (2000) ได้ศึกษาการหมักข้าวเพื่อผลิตสีจากข้าวแดงพบว่า ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการหมักข้าวแดง เพื่อให้ *Monascus* ผลิตสีได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 24 เปอร์เซ็นต์ และการสร้างสารสีของราจะลดลงหากเติมน้ำ ในระหว่างการหมัก ทั้งนี้ Yongsmith และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส และการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* sp. KB9 ด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง 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 (2000) เสนอว่า จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ มีความจำเพาะ หรือชอบที่จะเจริญที่ความชื้นเริ่มต้นต่างกัน ปริมาณน้ำที่มากเกินไปอาจลดความพรุนของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเมล็ดข้าว เป็นสาเหตุให้สารตั้งต้นเกาะกันแน่น ซึ่งเหนี่ยวนำให้การถ่ายเทออกซิเจนลดลง

ค) ค่า pH

Monascus sp. สามารถเจริญได้ในช่วง pH กว้างตั้งแต่ 2.5-8.0 แต่ pH ที่เหมาะสมควรมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0-7.0 อย่างไรก็ตาม pH เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุด สำหรับการเจริญควรมีค่าประมาณ 6.5 นอกจากนี้ pH ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สารสีนั้นมีความแตกต่างกันไป โดยที่ pH ต่ำ (pH 4.0) เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สีเหลือง และ pH ที่สูงกว่า (pH 5.5-7.0) เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สารสีแดง (Chen และ Johns, 1993; Teng และ Feldheim, 2001; Carvalho และคณะ, 2003) ขณะที่ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสาหรับการผลิต Monacolin K ของเชื้อรา *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 โดยหมักข้าวด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 16 วัน pH ถูกปรับด้วย HCl เข้มข้น 1M หรือ NaOH เข้มข้น 1 M จากผลการทดลองพบว่า ที่ 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 *M. pilosus* NCHU M-35 เพาะเลี้ยงในชิ้นวุ้นมะพร้าวในอาหารเหลว pH ถูกปรับด้วย HCl เข้มข้น 1 M หรือ NaOH เข้มข้น 1 M ผลการทดลองพบว่า pH 6.0-7.0 เป็นช่วงที่เหมาะสมสาหรับการผลิต Monacolin K

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง) ปริมาณออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์

Monascus sp. จัดเป็นเชื้อราในกลุ่มต้องการอากาศ (Aerobic fungi) แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนอย่างจำกัด ซึ่งภายใต้สภาวะดังกล่าว *Monascus* sp. จะผลิตเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ในปริมาณสูง แต่สังเคราะห์สารสีได้ในปริมาณต่ำ อย่างไรก็ตาม *Monascus* sp. จะผลิตเอทานอลลดลง และให้สารสีเพิ่มขึ้น เมื่อเจริญภายใต้สภาวะอากาศที่มีองค์ประกอบตามธรรมชาติ (O_2 ประมาณ 0.21-0.5 atm, CO_2 ประมาณ 0.02 atm) (Han และ Mudgett, 1992) หรือมีอัตราการให้อากาศไม่มากเกินไป (aeration rate ~1 NmL/g.min (มิลลิลิตรของอากาศต่อกรัมของข้าวน้ำหนักเปียกต่อนาที) (Carvalho และคณะ, 2006) ทั้งนี้การผลิตสารสีของ *Monascus* sp. จะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสูงมากเกินไป (O_2 ประมาณ 1.2-2.0 atm) (Han และ Mudgett, 1992) หรือมีการถ่ายเทของอากาศสูง (Aeration rate มากกว่า 1 NmL/g.min) (Carvalho และคณะ, 2006) หรือมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบที่สูง (CO_2 มากกว่า 0.02 atm) (Han และ Mudgett, 1992)

Han และ Mudgett (1992) ศึกษาประสิทธิภาพของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีผลต่อการเจริญ และการสังเคราะห์สารสีของ *M. purpureus* ATCC 16365 โดยการเลี้ยงเชื้อบนเมล็ดข้าวในขวดระบบปิด (Closed system) ทดลองเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ATCC 16365 บนข้าว ใน Closed pressure vessels และเปลี่ยนแปลงระดับของออกซิเจนระหว่าง 0.1-2.1 atm ที่คาร์บอนไดออกไซด์คงที่ 0.02 atm พบว่า *Monascus* sp. สามารถผลิตสารสี ได้สูงเมื่อให้ปริมาณออกซิเจนที่ 0.5 atm และการสังเคราะห์สารสีจะลดลง เมื่อปริมาณออกซิเจนสูงถึง 1.2 atm และการสังเคราะห์สารสีจะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ เมื่อปริมาณออกซิเจนเพิ่มขึ้นถึง 2.0 atm

นอกจากนี้จากการทดลองเลี้ยงเชื้อบนข้าว ที่สภาวะออกซิเจนคงที่ที่ 0.21 atm และเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 0.02-1.0 atm พบว่า *Monascus* sp. สามารถสังเคราะห์สารสีได้สูงสุด ที่ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำที่สุดที่ระดับ 0.02 atm และหากเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์สูงถึง 1.0 atm การสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* sp. จะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม Han และ Mudgett (1992) ยังได้เสนอว่า ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สะสม หรือจำกัดปริมาณออกซิเจนในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ จะมีผลต่อการยับยั้ง การสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* sp. บนอาหารแข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระหว่างการเลี้ยงเชื้อควรกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ และเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในระบบ เพื่อให้ *Monascus* sp. สามารถสังเคราะห์สารสีได้สูงสุด

นอกจากนี้ Carvalho และคณะ (2006) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ อัตราการหายใจ และการสังเคราะห์สารสีของ *Monascus* sp. ด้วยกระบวนการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง โดยทดลองเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. LPB 31 บนข้าว ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 8 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และให้อากาศที่อัตรา 0.00-2.00 NmL/g.min (มิลลิลิตรของอากาศต่อกรัมของข้าวน้ำหนักเปียกต่อนาที) พบว่า *Monascus* sp. สามารถผลิตสารสีได้สูงสุด ที่สภาวะ 1 NmL/g.min และจะผลิตสารสีลดลงเมื่ออัตราการให้อากาศต่ำ (น้อยกว่า 1 NmL/g.min) หรือสูงมากเกินไป (มากกว่า 1 NmL/g.min) เนื่องจากภายใต้สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศต่ำ ทำให้อากาศไม่เพียงพอต่อการถ่ายเทของออกซิเจน และการนำออกซิเจนไปใช้ สำหรับกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ อีกทั้งภายใต้สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศสูง จะเกิดการการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึม ของราไปใช้ยังกระบวนการอื่น เช่น การผลิตเอทานอลหรือซิตรินิน ทั้งนี้อากาศเป็นจุดวิกฤตอย่างหนึ่ง สำหรับการผลิตสารสีของ *Monascus* sp. เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความชื้นสัมพัทธ์ หรือการถ่ายเทออกซิเจนเป็นผลต่อการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของเซลล์ ความเข้มข้นของออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมสาหรับการผลิตสารสี มีค่าอยู่ที่องค์ประกอบของอากาศตามธรรมชาติ คือ ออกซิเจน 0.21 atm และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.02 atm

จ) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์สารสี Monacolin K และการเจริญเติบโตของรา *Monascus* sp. ทั้งนี้ชนิดของสารสี และการหลั่งสารสีออกนอกเซลล์ มีความสัมพันธ์กับแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของรา *Monascus sp.* ได้แก่ สารอินทรีย์ เช่น เปปโตน และสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนีย และไนเตรต (Carvalho และคณะ, 2003) โดยเฉพาะโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) ซึ่งมีผลช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์สารสีแดงให้สามารถละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น (Lin, 1973; Johns และ Stuart, 1991; Chen และ Johns, 1993) นอกจากนี้หลายๆ งานวิจัยได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสาร Monacolin K พบว่า แหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียคลอไรด์ ฮิสทิดีน โซเดียมกลูตาเมต และ เปปโทน เหมาะสมต่อการผลิต Monacolin K จาก *Monascus* sp. ขณะที่แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมอะซิเตรต เมไทโอนีน และยูเรีย ไม่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Monacolin K (Lian และคณะ, 2007; Ng และ Shyn, 2004; Wang และคณะ, 2003)

Lin (1973) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน ต่อการสังเคราะห์สารสีของ *M. purpureus* F-2 ด้วยกระบวนการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 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 ไม่เหมาะสมสาหรับการผลิตสารสีแดง ทั้งนี้โมโนโซเดียมกลูตาเมต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสาหรับการเพิ่มการผลิตสารสีแดงมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ความเข้มข้น 1.26 เปอร์เซ็นต์ (Lin และ Demain, 1991) นอกจากนี้กรดอะมิโน เช่น ฮิสทิดีน และเซอรีน ยังช่วยเพิ่มการผลิตสาร สีแดง แต่กรดอะมิโน เช่น ลิวซีน, วาลีน, ไลซีน และเมไทโอนีน มีผลทำให้การผลิตสารสีแดงลดลง (Lin และ Demain, 1994)

อย่างไรก็ตาม Chen และ John (1993) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์ สารสีของ *M. purpureus* UQM 192F (FRR 2190) ด้วยกระบวนการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว โดยเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในแหล่งคาร์บอน กลูโคส และเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่าง เปปโทน แอมโมเนีย และไนเตรต ควบคุม pH 6.5 ตลอดการทดลอง พบว่าเปปโตนสามารถช่วยกระตุ้นให้ เชื้อราสังเคราะห์สารสีแดงได้สูงสุด รองมาคือ แอมโมเนีย และไนเตรต ตามลำดับ

นอกจากนี้ Wang และคณะ (2004) ศึกษาผลของ แหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์ Monacolin K และซิตรินินด้วย *M. purpureus* NTU 601 โดยเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 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* sp. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 9 วัน ผลการทดลองพบว่า เพียงการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถปรับปรุงการผลิต Monacolin K ได้ ขณะที่การผลิต ซิตรินินเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

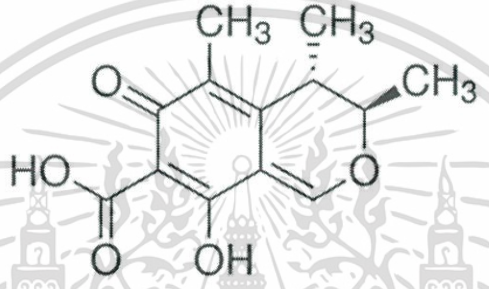
ฉ) วิตามินและแร่ธาตุ

Lin (1973) ศึกษาประสิทธิภาพของวิตามินบี ที่มีผลต่อการสังเคราะห์สารของ *M. purpureus* F-2 พบว่า กรดโฟลิกสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สารได้ แต่วิตามินบีชนิดอื่น อันได้แก่ 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* sp. ได้ นอกจากนี้ Carvalho และคณะ (2003) เสนอว่า ฟอสเฟต เข้มข้นสูง และแมกนีเซียมซัลเฟต มีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์ สารสีของ *M. purpureus* แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันข้าวโพด และโมโนโซเดียมกลูตาเมต จะช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์สารสี ขณะที่การเติม Tween 80 เข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สารสี โดยไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของ *Monascus* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ซิตรินิน (Citrinin) (European Mycotoxin Network, 2002)

ซิตรินินจัดเป็นสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxin) ส่วนใหญ่จะพบจาก *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในธัญพืช ผลไม้ และถั่วคนจะได้รับซิตรินิน จากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน พบครั้งแรกในปี ค.ศ.1931 จากการแยกสารจาก *Penicillium citrinum* ต่อมาในปี ค.ศ. 1951 พบปัญหาข้าวเหลือง "yellow rice problem" ในข้าวที่ประเทศไทยส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น เพราะมีการปนเปื้อนจาก *P. citrinum* และตรวจพบซิตรินิน นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสกุลอื่นที่สามารถสร้างซิตรินินได้ เช่น *A. terreus* *A. canues* และ *A. niveus* เป็นต้น จากรายงานการปนเปื้อนซิตรินิน บนอาหารประเภทต่างๆ โดยเฉพาะอาหารประเภท เมล็ดธัญพืช และอาหารสัตว์ ดังแสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 โครงสร้างเคมีของซิตรินิน
ที่มา : Wu และคณะ (2012)

Sabater-Vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า ซิตรินินมีผลต่อการทำงานของไต และโครงสร้างระดับจุลภาค ซิตรินินจะไปสะสมในไมโตคอนเดรีย และรบกวนระบบการแลกเปลี่ยนอิเล็คตรอนในเซลล์ แต่ไม่มีผลต่อผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การเรียงลำดับของโปรตีน และอาร์เอ็นเอ เมื่อการทำงานของไมโตคอนเดรียผิดปกติไป ทำให้ระดับของไกลโคเจนในตับลดลง และยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอรอลในตับ จากการศึกษาคุณสมบัติของซิตรินิน พบว่าซิตรินินสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่มีผลกระทบต่อไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่ไม่มีการนำสารนี้มาใช้ประโยชน์นอกจากคุณสมบัติการรักษาโรคของข้าวแดงจาก Monacolin K ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับซิตรินินที่สร้างมาจาก *Monascus* sp. พร้อมกับการสร้างสารสี

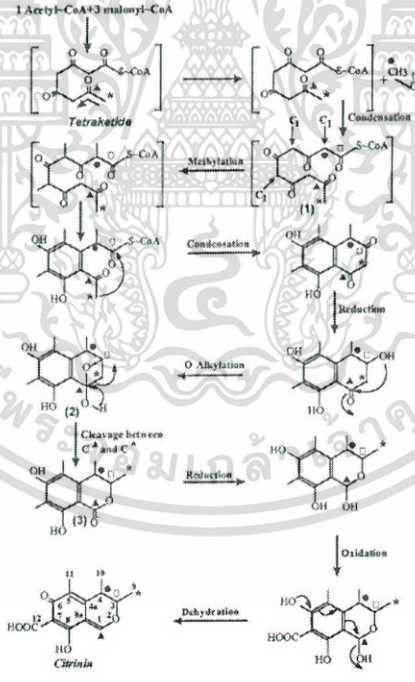
Wong และ Koehler (1983) แสดงให้เห็นว่าสารสีที่ได้สกัดมาจากเชื้อรา *Monascus* sp. มีการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ ต่อมาได้แยกสารประกอบ 2 ตัวจาก *M. purpureus* ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* คือสารสีเหลือง (Monascidin A) และสารสีเหลืองเรืองแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Blance และคณะ (1995) ได้แยกสารโมนาสซิดิน เอ จาก *Monascus* spp. และพิสูจน์ได้ว่าเป็นสารชนิดเดียวกับซิตรินิน โดยใช้วิธี Mass Spectroscopy เพื่อยืนยันโครงสร้างสารดังกล่าว ต่อมา Hajjaj และคณะ (1999) ศึกษากลไกลการสังเคราะห์ ทางชีวภาพของซิตรินินจาก *M. ruber* ATCC 96218 โดยวัดจาก 13C nuclear magnetic Resonance พบว่าการสังเคราะห์ ซิตรินินเกิดจาก tetraketide แทนที่จะสังเคราะห์จาก pentaketide เหมือนกับเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่สามารถสร้างซิตรินินเช่นเดียวกับ กลไกลการสังเคราะห์ซิตรินิน จากเชื้อรา *Monascus* sp.

2.5.1 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน

กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน ต้องใช้วิถีการสังเคราะห์ 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 ตามลาดับ จนได้เป็นซิตรินิน (Hajjaj และคณะ, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน เมื่อ C-1 ( ), C-3 ( ), C-9 (*) และ C-4 ( )
ที่มา : Hajjaj และคณะ (1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิตรินินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 250.25 กรัมต่อโมลมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{13}H_{14}O_5$ มีโครงสร้าง และมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองเลมอน มีจุดหลอมเหลว 175 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ใน โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง โซเดียมคาร์บอเนตโซเดียมอะซิเตต เมทานอล อะซิโตไนไตรท์ เอทานอล และสารละลายอินทรีย์ ที่มีขั้วสลายตัวได้ด้วยแสง (photodecomposition) สารละลายกรดด่าง หรือจากความร้อนมีปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับ เฟอริกคลอไรด์ ไททาเนียมคลอไรด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สีเขียว และสีแดงเข้ม ตามลำดับ

มีการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของซิตรินิน เมื่อทดสอบกับสัตว์ทดลองได้ค่า LD_{50} เท่ากับ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (สำหรับหนูทดลอง) และ 9 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (สำหรับกระต่าย) ซิตรินินทำให้ไตถูกทำลาย และมีฤทธิ์อย่างอ่อนกับตับ เพราะความสามารถกรองไขมันลดลง ผลกระทบอื่นคือ ทำให้เกิดการขยายตัวของ เส้นเลือดก่อให้เกิดการไหลเวียนโลหิตผิดปกติ และทำให้หลอดลมหดตัว

Blance และคณะ (1995) พบว่าสายพันธุ์ของ *Monascus* sp. มีผลต่อการผลิตซิตรินินโดย *M. ruber* (Wild type) จะสามารถผลิตซิตรินินได้มากกว่า *M. purpureus* (Wild type) เมื่อใช้ข้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ศศิธร (2546) ศึกษาผลของ monosodium glutamate และ L-histidine ต่อการผลิตสารสีแดง และซิตรินินในข้าวแดงจากการเพาะเลี้ยง *M. purpureus* FTCMU โดยมีการทดลองผลิตข้าวแดง 3 วิธีดังนี้

ก) วิธีที่ 1 เติม monosodium glutamate 12.5 กรัมต่อกิโลกรัม

ข) วิธีที่ 2 เติม L-histidine 12.5 กรัมต่อกิโลกรัม

ค) วิธีที่3 ไม่มีการเติมกรดอะมิโนใดๆ พบว่าข้าวแดงที่มีการเติม monosodium glutamate ให้ปริมาณสีแดง 126 ยูนิตต่อกรัม และซิตรินิน 900 ppm ส่วนข้าวแดงที่มีการเติม L-histidine ให้ปริมาณสีแดง 150.45 ยูนิตต่อกรัม และซิตรินิน 450 ppm และข้าวแดงที่ไม่ได้มีการเติมกรดอะมิโนให้ปริมาณสีแดง 207.85 ยูนิตต่อกรัม และซิตรินิน 1,119 ppm ดังนั้นการเติม monosodium glutamate และ L-histidine ลงในข้าวแดงมีผลต่อการลดทั้งปริมาณซิตรินินและสารสีแดงที่สร้างโดย *M. purpureus* FTCMU

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus* sp.

การลดปริมาณ การผลิตซิตรินินจากเชื้อรา สามารถปฏิบัติได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธีการกลายพันธุ์การควบคุมองค์ประกอบของอาหาร การควบคุมสภาวะการเลี้ยง หรือวิธีการสกัด ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus* อันได้แก่ ปัจจัยด้านสารอาหาร เช่น แหล่งไนโตรเจน กรดไขมันและ methylketone และปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณออกซิเจน ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งและเหลว สามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

ก) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่ง ในการช่วยลดการผลิตซิตรินิน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสาหรับการลดซิตรินินของ *Monascus* ได้แก่ เมไทโอนีน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต

Blance และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจน (ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และเมไทโอนีน) ต่อการผลิตซิตรินินของ *M. ruber* ATCC 96218 โดยหมักราที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวด้วยแหล่งคาร์บอนเป็นเอทานอล ปรับ pH เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 6.5 ผลการทดลองพบว่า ราสามารถผลิตซิตรินินได้ 100-120 mg/L เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรต และโมโนโซเดียมกลูตาเมต เป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ เมไทโอนีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของซิตรินิน ลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ทั้งนี้การใช้เมไทโอนีน และยูเรีย จะมีผลต่อการลดลงทั้งการสังเคราะห์สารสี และซิตรินินของ *Monascus*

Wang และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตซิตรินิน Monacolin K และ λ-aminobutyric acid (GABA) ของ *M. purpureus* NTU 601 ด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งโดยใช้ แอมโมเนียมคลอไรด์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต เมไทโอนีน และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า เมไทโอนีน และยูเรีย สามารถยับยั้งการผลิตซิตรินิน และ Monacolin K โดยซิตรินินจะลดลงจาก 813 ppb เป็น 55-81 ppb เมื่อใช้ เมไทโอนีนที่ความเข้มข้น 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามความเข้มข้น โมโนโซเดียมกลูตาเมต และแอมโมเนียม-คลอไรด์ ที่ระดับ 1.0 เปอร์เซนต์ สามารถลดการผลิตซิตรินินจาก 813 ppb เป็น 90-98 ซึ่งแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เมไทโอนีน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และ โมโน-โซเดียมกลูตาเมต สามารถยับยั้งการผลิตซิตรินินได้ ตามลำดับ

ข) กรดไขมันและ methylketone

กรดไขมัน เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการยับยั้งการผลิตซิตรินิน กรดไขมันสายยาวปานกลาง (Medium-chain fatty acids) สามารถลดการสร้างซิตรินิน เช่น Octanoic acid, Decanoic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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, 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 ถูกเมทาบอไลต์ด้วยกระบวน β-decarboxylation เปลี่ยนเป็น Methylketones ได้แก่ Heptanone, 2-nonanone และ 2-undecanone ตามลำดับ จากนั้น Methylketones จะเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA ด้วยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Peroxisomal

ทั้งนี้กรดไขมัน สายยาวปานกลาง (Methylketones) ที่เป็นสาเหตุของการยับยั้งการผลิตซิตรินิน เนื่องจากซิตรินิน หรือสารตัวกลางในการสร้างซิตรินิน จะถูกทำลายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ Peroxisome หรือ Peroxisomal enzyme (Peroxidase) จากการเหนี่ยวนา ของกรดไขมันและ Methylketones อย่างไรก็ตามกรดไขมัน สายยาว (C14-C18) หรือ กรดไขมันสายสั้น(C6) จะไม่เปลี่ยนเป็น Methylketones เนื่องจากกรดไขมันดังกล่าวจะถูก ดูดซึมโดยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Mitochondrial จึงเป็นผลให้กรดไขมันทั้งกรดไขมันสายยาว (C14-C18) และ กรดไขมันสายสั้น (C6) ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการผลิตซิตรินินของ *Monascus* sp.

ค) อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์สารทตุยิภูมิของ *Monascus* เช่น ซิตรินิน Monacolin K และ λ-aminobutyric acid (GABA) โดยรา *Monascus* จะผลิตซิตรินินลดลงเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30-34 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตซิตรินินได้สูงขึ้น เมื่อเจริญที่อุณหภูมิต่ำ ประมาณ 26 องศาเซลเซียส (Wang และคณะ, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง) Water activity

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

จ) ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการสังเคราะห์สารสี และซิตรินิน โดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายของปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation และเป็นสารตั้งต้นของ Monooxygenases ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเมทาบอไลต์ของเชื้อรา โดยเฉพาะสารทุติยภูมิ อย่างไรก็ตาม บทบาทของ Monooxygenases ต่อการสังเคราะห์สารสียังไม่มีเป็นที่ทราบแน่ชัด (Hajjaj และคณะ, 1999)

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

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จุลยุทธ และศศิธร (2547) ได้ศึกษาถึงคุณภาพข้าวแดง ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* 4 สายพันธุ์ ในข้าว 3 ชนิด พบว่า ทั้งสายพันธุ์เชื้อรา และ ชนิดข้าว มีผลต่อคุณภาพของข้าวแดงที่ได้หลังการหมัก โดยลำดับ เชื้อรา *M. purpureus* ที่สร้างซิตรินินในปริมาณสูงไปต่ำคือ *M. purpureus* FTCMU, *M. purpureus* ATCC 16365, *M. purpureus* DMKU และ *M. purpureus* BCC 6131 ตามลำดับ ในขณะที่ลำดับชนิดข้าวที่สร้างซิตรินินในปริมาณสูงไปต่ำ คือ ข้าวซ้อมมือ, ข้าวเจ้าพิจิตร และข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ โดยข้าวแดงที่ได้จากการหมักเชื้อรา *M. purpureus* FTCMU ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวซ้อมมือ มีปริมาณซิตรินินสูงที่สุดเท่ากับ 4400 ppm และข้าวแดงที่ได้จากการหมักเชื้อรา *M. purpureus* BCC 6131 ในข้าวหอมมะลิ มีปริมาณซิตรินินต่ำที่สุดเท่ากับ 105 ppm

ในขณะที่ลำดับสายพันธ์เชื้อรา *Monascus* sp. ที่ให้ค่าสีแดงของข้าวแดงจากสูงไปต่ำ คือ *M. purpureus* ATCC 16365, *M. purpureus* DMKU, *M. purpureus* FTCMU และ *M. purpureus* BCC 6131 ตามลำดับ โดยข้าวแดงที่ได้จากการหมักเชื้อรา *Monascus* ATCC 16365 ในข้าวหอมมะลิให้ค่าสีแดงสูงที่สุดเท่ากับ 632.00 ยูนิต/กรัม และข้าวแดงที่ได้จากการหมักเชื้อรา *M. purpureus* BCC 6131 ในข้าวหอมมะลิให้ค่าสีแดงต่ำที่สุดเท่ากับ 11.80 ยูนิต/กรัม และพบว่าเชื้อรา *M. purpureus* BCC 6131 และ *M. purpureus* FTCMU มีการสร้างสีแดงที่ไม่ดี เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนข้าวหอมมะลิ และข้าวหอมมะลิซ้อมมือ และจากผลการทดลองพบว่าเนื่องจากเชื้อรา *M. purpureus* BCC 6131 ให้ปริมาณซิตรินินต่ำที่สุด จึงเหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาสายพันธุ์เพื่อทำการลดปริมาณซิตรินิน โดยอาจใช้วิธีการฉายรังสี เพื่อดูการสร้างซิตรินินของสายพันธุ์กลายหรืออาจมีการปรับเปลี่ยนชนิดของอาหารแข็ง เช่น ธัญพืชต่างๆ เพื่อศึกษาถึงผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณซิตรินินต่อไป

Lin (1973) ศึกษาอุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Monascus* sp. F-2 ต่อการสร้างสารสีในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว โดยทดลองหมักรา *Monascus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของแป้งข้าวที่อุณหภูมิ 27, 32, 37 และ 40 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน พบว่า *Monascus* สามารถการผลิตสีสูงสุดที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และหากอุณหภูมิของสภาวะการหมักสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส จะทำให้ *Monascus* sp. สามารถสร้างสารสีลดลง

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

Babitha และคณะ (2007) ศึกษาการหมักในสภาวะอาหารแข็ง เพื่อผลิตสารสีจาก *Monascus* sp. โดยใช้เมล็ดขนุน ซึ่งเป็นวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดหนึ่งพบว่า จากการใช้เมล็ดขนุนเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสีจาก *M. purpureus* ในสภาวะอาหารแข็งปริมาณสารสีที่พบ 25 ODUnits/กรัมน้ำหนักแห้งของเมล็ดขนุน โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสีจากวัตถุดิบชนิดนี้ ดังนี้ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิในการบ่ม 30องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 9 x10^4 สปอร์กรัมน้ำหนักแห้ง และระยะเวลาการบ่ม 7 วันความคงตัวของ pH ของสารสีที่ได้ค่อนข้างกว้าง จึงเหมาะที่จะนำสารสีที่ได้จากเมล็ดขนุน มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tan และคณะ (2007) ศึกษาผลของการใช้มันเทศ (*Dioscorea alata*) ทดแทนไขมันบางส่วนในกุนเชียง ศึกษาคุณภาพของกุนเชียง จากการทดลองที่ใช้มันเทศทดทนไขมันปริมาณ 0 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่า เมื่อใช้มันเทศในปริมาณสูงขึ้นกุนเชียงที่ได้จะมีความชื้นและความสามารถในการคุ้มน้ำ และ a_w มากขึ้นตามไป ด้วยขณะที่ปริมาณไขมันค่า TBA ลดลง กุนเชียงที่ใช้มันเทศ 5 เปอร์เซ็นต์ ทดแทนไขมันไม่มีความแตกต่างกับกุนเชียงสูตรควบคุมรวม ทั้งนี้มีการยอมรับจากผู้บริโภค ดังนั้นสามารถนำมันเทศมาใช้ในการทดแทนไขมัน ในการผลิตกุนเชียงได้ในระดับ 5 เปอร์เซ็นต์ ของมันเทศ ทำให้กุนเชียงทีผลิตได้มีไขมันน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์

Harsha และคณะ (2013) ได้ทำการวิจัยการผลิตเมวาสเตติน โดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง ที่ใช้คือ กากงาที่เหลือทิ้งจากการสกัดน้ำมันงา โดยใช้เชื้อรา *Pencillium citrinum* MTCC 1256 และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเมวาสเตติน ได้แก่ ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ pH และความชื้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Monascus sp. U6V1 (Krairak และคณะ, 2016)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

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

3.2.2 SS (Soybean starch agar) (ภาคผนวก ก)

3.3.3 วัสดุหมัก ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ (บริษัทสุนทรธัญทรัพย์ จำกัด อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี) และ ข้าวเสาไห้ (บริษัทเอกชัยกรุ๊ป จ.นนทบุรี)

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 Thermo Scientific, USA

3.3.4 เครื่องวัด pH (pH meter)

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

3.3.6 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Eclipse Ci , Japan)

3.3.7. เครื่องแก้ว

3.4 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Preparation)

นำเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MYS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นจึงใช้ cork borer ขนาด 4.0 มิลลิเมตร มาเจาะวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา จำนวน 4 ก้อน นำมาใส่ในอาหารเหลว SS medium ปลอดเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น สำหรับการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเตรียมวัสดุหมัก (ข้าวหอมมะลิและข้าวเสาไห้)

ชั่งข้าว 50 กรัม ลงในขวดเตรียมอาหาร จากนั้นปิดปากขวดด้วยจุกสาลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 23 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวางบนเครื่องเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้ข้าวดูดซึมน้ำ

3.6 ศึกษาการผลิต Monacolin K จากเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1

3.6.1 การผลิต Monacolin k จาก *Monascus* U6V1 บนวัสดุหมัก

การเลี้ยง *Monascus* sp. U6V1 บนอาหารแข็งโดยใช้ข้าวหอมมะลิ และข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมัก (ตามลำดับ) ซึ่งบรรจุข้าว 50 กรัมในขวดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หลังจากทำให้ข้าวปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาทีแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จึงเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องหมุนต่อเนื่อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว แล้วจึงใส่เชื้อเริ่มต้น ปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว แล้วจึงนาไปบ่มบนเครื่องหมุน (สลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง เติมวัสดุหมักครั้งละ 50 กรัมในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 3.1 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ค่า pH น้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และสาร Monacolin K

ตารางที่ 3.1 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่งอัตราส่วน 1:3 ชั่วโมง

ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลาเติมข้าว(วัน)										ปริมาณสุทธิ
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	
ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	500
น้ำ (มิลลิลิตร)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	150

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.2 การเลี้ยง *Monascus* U6V1 ในขวดปริมาตร 1000 และ2000 มิลลิลิตร บนวัสดุหมักข้าวหอมมะลิ

ชั่งข้าวหอมมะลิ 50 กรัม ลงในขวดอาหาร ปริมาตร 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาทีแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (ต่อข้าว 50 กรัม) นำไปบ่มบนเครื่องหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว แล้วลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว นำไปบ่มบนเครื่องหมุน (สลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง เติมวัสดุหมักในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 3.2 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ค่า pH น้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และสาร Monacolin K

ตารางที่ 3.2 ปริมาณการเติมข้าวหอมมะลิและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง

ขนาดขวด (มิลลิลิตร)	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลาเติมข้าว(วัน)										ปริมาณสุทธิ
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	
1000	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	500
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	150
2000	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	500
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	150

3.6.3 ศึกษาปริมาตรขวดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราบนข้าวเสาไห้เพื่อผลิตสาร Monacolin K

การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ในขวดปริมาตร 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุข้าวเสาไห้ 250 กรัม 500 กรัม และ 1000 กรัม แล้วทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วจึงเติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 75 150 และ 300 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปบ่มบนเครื่องหมุนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว แล้วลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว บ่มบนเครื่องหมุนสลับนิ่ง (ในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเลี้ยงเชื้อราครบเวลา 7, 14, และ 21 วัน จึงเติมวัสดุหมักเข้าไปขวดเลี้ยงเชื้อครั้งละ 250 กรัม 500 กรัม และ 1000 กรัม จำนวน 3 ครั้ง ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 3.3) นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ค่า pH น้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และสาร Monacolin K

ตารางที่ 3.3 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร ที่สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง

ขนาดขวด (มิลลิลิตร)	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลาเติมข้าว(วัน)				ปริมาณสุทธิ (กรัม)
		0	7	14	21	
5000	ข้าว (กรัม)	250	250	250	250	1000
	น้ำ (มิลลิลิตร)	75	75	75	75	300
10000	ข้าว (กรัม)	500	500	500	500	2000
	น้ำ (มิลลิลิตร)	150	150	150	150	600
20000	ข้าว (กรัม)	1000	1000	1000	1000	4000
	น้ำ (มิลลิลิตร)	300	300	300	300	1200

3.7 การวิเคราะห์ผล

3.7.1 การหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างวัตถุดิบ

เก็บตัวอย่างประมาณ 1-2 กรัม ใส่จานเพาะเลี้ยงเชื้อที่อบแห้ง และชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำออกมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอนของตัวอย่างและคำนวณหาปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ของวัตถุดิบ

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และวัดค่า pH

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 1 กรัม นำมาผสมกับน้ำกลั่น ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมบนเครื่องผสมสารแนวนอนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 x g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวัด pH และวิเคราะห์หาน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Somogyi – Nelson (1954) ดังแสดงในภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.3 การวิเคราะห์สารสี

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 1 กรัม ผสมกับสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องผสมสารแนวนอน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 x g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดปริมาณของสารสี ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 500 nm ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.7.4 การวิเคราะห์สาร Monacolin K

เก็บตัวอย่างข้าวประมาณ 1 กรัม ผสมกับสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่มี 0.1เปอร์เซ็นต์ orthophosphoric acid (Chegwin-Angarita และคณะ, 2013) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องผสมสารแนวนอน เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 x g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ดังแสดงในภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การผลิต Monacolin K จาก *Monascus* U6V1

การเลี้ยง *Monascus* sp. U6V1 บนอาหารแข็งโดยใช้ข้าวหอมมะลิ และข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมัก (ตามลำดับ) ซึ่งบรรจุข้าว 50 กรัมในขวดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หลังจากทำให้ข้าวปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาทีแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง จึงเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องหมุนต่อเนื่อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว แล้วจึงใส่เชื้อเริ่มต้น ปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว แล้วจึงนำไปบ่มบนเครื่องหมุน (สลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง เติมวัสดุหมักครั้งละ 50 กรัม ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 3.1 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ค่า pH น้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และสาร Monacolin ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1 ตามลำดับ

ผลทดลองการเลี้ยง *Monascus* sp. U6V1 ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง บนวัสดุหมักข้าวหอมมะลิที่บรรจุในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วง 3-9 วันแรกของการเจริญ และให้ปริมาณความชื้นสูงสุดในวันที่ 9 (44.81 เปอร์เซ็นต์) จากนั้น เปอร์เซ็นต์ความชื้นลดลงจนกระทั่งถึงวันที่ 24 ไปจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเคลื่อนที่ของวัสดุหมัก จึงมีการถ่ายเทอากาศได้ดี ส่งผลให้การระเหยเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า pH พบว่าค่อนข้างคงที่ (ในช่วง 4 ถึง 6) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ สำหรับการผลิตสาร Monacolin K ได้ปริมาณสูงสุดที่ 0.0317 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง (ในวันที่ 15 ของการเลี้ยงเชื้อ) แสดงให้เห็นว่าการเติมอาหารทุกๆ 3 วัน ส่งผลให้มีการสะสมน้ำตาลเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจส่งผลยับยั้งการผลิตสารสี และ Monacolin K (ซึ่งจัดเป็นสารทุติยภูมิ) แม้ว่าการเติมวัสดุหมักในช่วง 7-15 วันแรก อาจส่งผลดีต่อการเจริญ และการผลิตผลิตภัณฑ์ แต่ทว่าการเติมอาหารในช่วงท้ายของการเจริญ กลับส่งผลกระทบอย่างมากต่อการผลิตสาร Monacolin K

เมื่อใช้ข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมัก ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 27 วัน พบว่า pH มีค่าเริ่มต้นที่ใกล้เคียงกัน การเจริญในช่วงวันที่ 7-13 ให้ค่า pH ในระดับ 5 ถึง 6 และหลังจากนั้นลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ส่วนปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นและสูงที่สุดในวันที่ 10 (50.71 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นค่อยๆลดลงจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเคลื่อนที่ของวัสดุหมัก จึงมีการถ่ายเทอากาศได้ดี สำหรับการผลิตสารสีพบว่ามีค่าสูงสุดอยู่ที่ 227.21 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง และให้การผลิตสาร Monacolin K ได้ปริมาณที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงสุด อยู่ที่ 0.5537 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนปริมาณน้ำตาลกลูโคสพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. สายพันธุ์ U6V1 โดยใช้ข้าวหอมมะลิและข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมัก พบว่าความชื้นมีความสัมพันธ์กับการเจริญ การผลิตสารสี และปริมาณ Monacolin K โดยพบว่า เมื่อใช้ข้าวหอมมะลิเป็นวัสดุหมักมีปริมาณความชื้นมากกว่าการใช้ข้าวเสาไห้ ซึ่งอาจทำให้เอนไซม์สามารถย่อยข้าวหอมมะลิได้ดีกว่าข้าวเสาไห้ และทำให้มีปริมาณน้ำตาลสูงกว่าวัสดุหมักที่เป็นข้าวเสาไห้ นอกจากนี้ปริมาณสารสี และ Monacolin K จากการเจริญของ *Monascus* sp. สายพันธุ์ U6V1 บนข้าวหอมมะลิ พบว่ามีค่าการเจริญบนวัสดุหมักน้อยกว่าข้าวเสาไห้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lotong และ Suwanarit (1990) ที่พบว่าปริมาณกลูโคสที่สูงขึ้นจะมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี และ Monacolin K

จากการทดลองพบว่า การเลี้ยงเชื้อโดยเติมวัสดุหมักข้าวหอมมะลิในระหว่างการเจริญส่งผลเสียต่อการผลิตสารสี และสาร Monacolin K เนื่องจากข้าวหอมมะลิย่อยสลายได้ง่ายกว่าข้าวเสาไห้ และให้ผลิตภัณฑ์น้ำตาล ซึ่งส่งผลยับยั้งการผลิตสารสี และ Monacolin K ขณะที่การเลี้ยงเชื้อโดยเติมวัสดุหมักเป็นข้าวเสาไห้ พบการย่อยสลายข้าวไปเป็นน้ำตาลน้อยกว่า ทำให้เกิด catabolite repression ต่อการผลิตสารทุติยภูมิน้อยกว่าเมื่อเทียบกับข้าวหอมมะลิ และประสิทธิภาพการถ่ายเทอากาศ ในขวดเลี้ยงเชื้ออยู่ในสภาพจำกัด เนื่องจากสัดส่วนระหว่างปริมาณวัสดุหมักต่อปริมาตรขวดมีค่าต่ำ (ประมาณ 1:2 ซึ่งมาจาก 500 กรัม ต่อ 1000 มิลลิลิตร) ซึ่งเป็นเหตุให้มีการสะสมคาร์บอนไดออกไซด์มากขึ้น จนส่งผลต่อการนำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญทำให้มีการสะสมน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบ ดังนั้นการเพิ่มประวิทธิภาพการถ่ายเทอากาศ น่าจะส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา การทดลองต่อไปจึงใช้สัดส่วนระหว่างวัสดุหมักต่อปริมาตรขวดเลี้ยงเชื้อเป็น 1:2 และ 1:5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

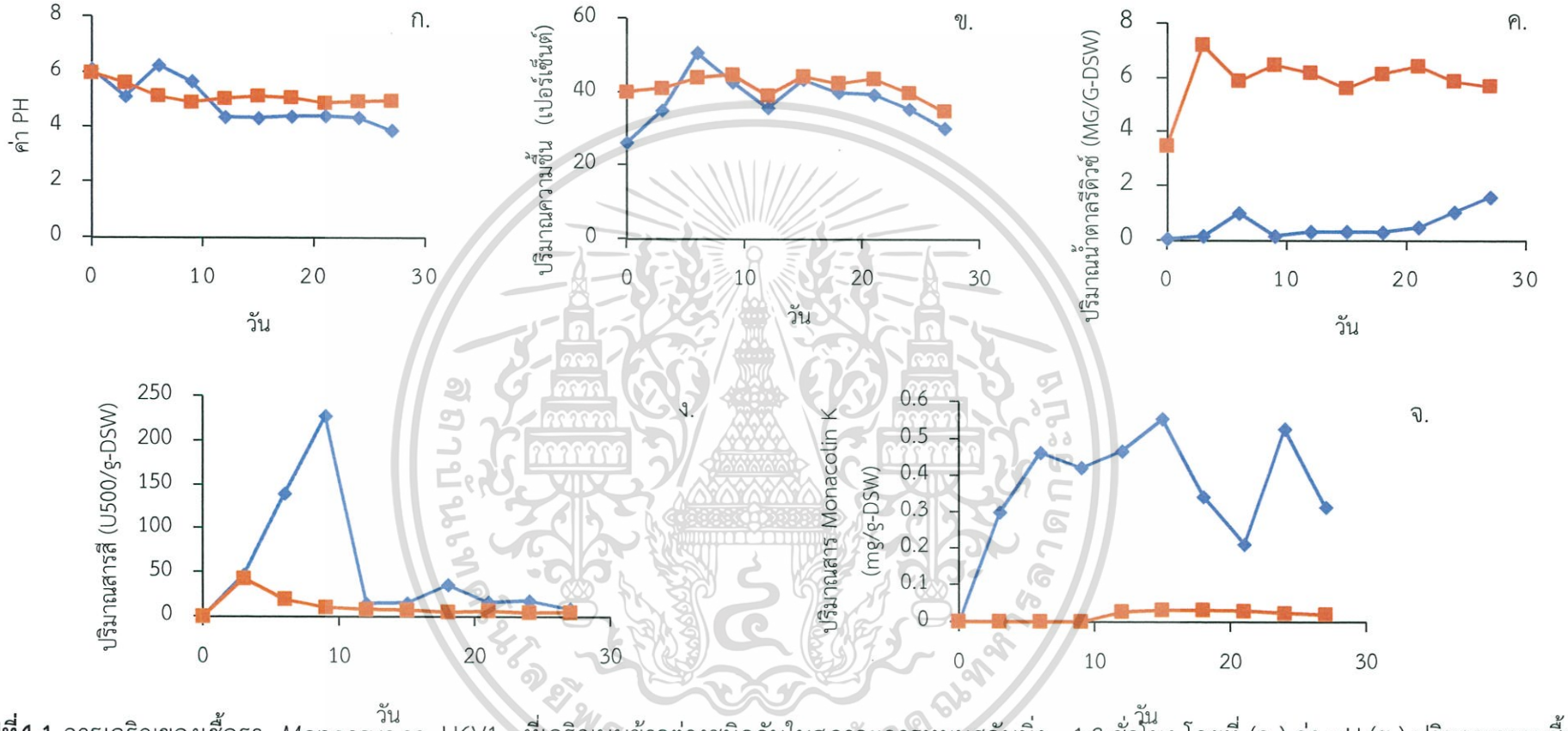
ตารางที่ 4.1 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง

ขนาดขวด (มิลลิลิตร)	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลาเติมข้าว(วัน)										ปริมาณสุทธิ
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	
1000	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	500
	total	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	150

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U500/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ในขวดอาหารขนาด 1000 มิลลิลิตร สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง โดยการเติมวัสดุหมักชนิดที่แตกต่างกัน

วันที่เก็บตัวอย่าง		ค่า pH		ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)		ปริมาณสารสี (U500/g-DSW)		ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)	
เสาไห้	หอมมะลิ	เสาไห้	หอมมะลิ	เสาไห้	หอมมะลิ	เสาไห้	หอมมะลิ	เสาไห้	หอมมะลิ	เสาไห้	หอมมะลิ
0	0	6.10	5.97	25.90	40.00	0.043	3.456	0	0	0	0
3	3	5.11	5.61	34.77	41.03	0.149	7.207	47.04	42.48	0.2986	0
6	6	6.25	5.12	50.71	43.99	0.994	5.880	139.26	19.03	0.4631	0
9	9	5.66	4.89	42.84	44.81	0.161	6.480	227.21	9.92	0.4212	0
12	12	4.34	5.03	35.50	39.09	0.309	6.188	14.35	7.35	0.4672	0.0274
15	15	4.31	5.12	43.54	44.35	0.313	5.615	14.79	6.95	0.5537	0.0317
18	18	4.37	5.06	39.92	42.46	0.304	6.158	35.42	4.61	0.3422	0.0317
21	21	4.38	4.87	39.40	43.72	0.478	6.440	15.86	5.99	0.2119	0.0293
24	24	4.32	4.92	35.34	39.81	1.030	5.881	17.29	3.82	0.5277	0.0234
27	27	3.86	4.95	29.96	34.63	1.580	5.693	8.51	4.21	0.3134	0.0196



รูปที่4.1 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวต่างชนิดกันในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง โดยที่ (ก.) ค่า pH (ข.) ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) (ค.) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-DSW) (ง.) ปริมาณสารสี (U500/g-DSW) และ (จ.) ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ซึ่งแทน ◆ ข้าวเสาไห้ และ ■ ข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ

4.2 การเลี้ยง *Monascus* sp. U6V1 ในขวดปริมาตร 1000 และ 2000 มิลลิลิตร

เพื่อให้การถ่ายเทอากาศในขวดส่งเสริมการเจริญ และการสร้างสาร Monacolin K จึงทดลองใช้ภาชนะเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เพิ่มสัดส่วนระหว่างวัสดุหมักต่อปริมาตรขวด เป็น 1:2 ในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และ 1:5 ในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร โดยชั่งข้าวหอมมะลิ 50 กรัม ลงในขวดอาหาร ปริมาตร 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาทีแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเติมน้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (ต่อข้าว 50 กรัม) นำไปบ่มบนเครื่องหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว แล้วลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว นำไปบ่มบนเครื่องหมุน (สลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง เติมวัสดุหมักในระหว่าง การเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 4.3 และเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ค่า pH น้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และสาร Monacolin K

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าค่า pH ค่อนข้างคงที่ (ในช่วงระดับ 4 ถึง 6) ซึ่งช่วงท้ายของการเลี้ยงจะมีค่า (ในช่วงระดับ 4) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ บุษบา (2542) คือ เชื้อราจะย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นจะย่อยต่อไปจนได้ผลผลิตเป็นกรดอินทรีย์ ปริมาณความชื้นในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร(1:5) มีแนวโน้มต่ำกว่าขวด 1000 มิลลิลิตร (1:2) ในส่วนของปริมาณน้ำตาลมีค่าค่อนข้างสูงตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเทียบกับการใช้ข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมักใน (การทดลองที่ 4.1) ในขณะที่การผลิตสารสีพบว่าขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร มีการผลิตสารสีมากที่สุดในวันที่ 3 คือ 42.48 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง การผลิตสารสีในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร พบว่าสูงสุดในวันที่ 3 ที่ 42.48 หน่วยต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร พบว่ามีปริมาณสารสีค่อนข้างต่ำตลอดการเลี้ยงเชื้อ ส่วนการผลิต Monacolin K ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร มีการผลิตสาร Monacolin K สูงกว่าในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เพียงเล็กน้อย แสดงในรูปที่ 4.2 (จ.)

จากการทดลองพบว่า การใช้ข้าวหอมมะลิเป็นวัสดุหมัก โดยมีสัดส่วนของพื้นที่ภายในขวดเป็น 1:5 ของขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง (อัตราการหมุน 1:3 ชั่วโมง) พบว่าการเลี้ยงเชื้อราในขวดที่มีสัดส่วน 1:5 สามารถให้การผลิตสาร Monacolin K ที่สูงกว่า การเลี้ยงเชื้อราในขวดที่มีสัดส่วน 1:2 แสดงว่า การเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเออากาศมีผลต่อการผลิตสารผลิตภัณฑ์ แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบว่ายังมีปริมาณของน้ำตาลที่สูง เนื่องจากข้าวหอมมะลิจัดเป็นข้าวที่มีอะไมโลสค่อนข้างต่ำ (วิฑูรย์, 2545) ทำให้ข้าวเหนียวนุ่ม ไม่แข็งกระด้าง เหมือนกับข้าวเสาไห้ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์สามารถย่อยข้าวหอมมะลิได้ดีกว่าข้าวเสาไห้ ทำให้มีปริมาณน้ำตาลสูงกว่าวัสดุหมักที่เป็นข้าวเสาไห้ ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่สูงทำให้เกิด catabolite repression ต่อการผลิตสารทุติยภูมิ ดังนั้นการใช้วัสดุหมักเป็นข้าวหอมมะลิจึงไม่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Monacolin K การทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถัดไปจึงกลับไปใช้ข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมัก และเปลี่ยนการให้อาหารจากทุกๆ 3 วัน เป็นทุกๆ 7 วัน เพื่อหวังว่าการย่อยสลายน้ำตาลจะเกิดขึ้นช้าลง และเลี้ยงเชื้อราในขวดปริมาตร 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง (อัตราการหมุน 1:3) โดยมีสัดส่วนวัสดุต่อปริมาตรขวด 1:5 เพื่อดูการถ่ายเทอากาศที่มีผลต่อการผลิตสาร Monacolin K ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

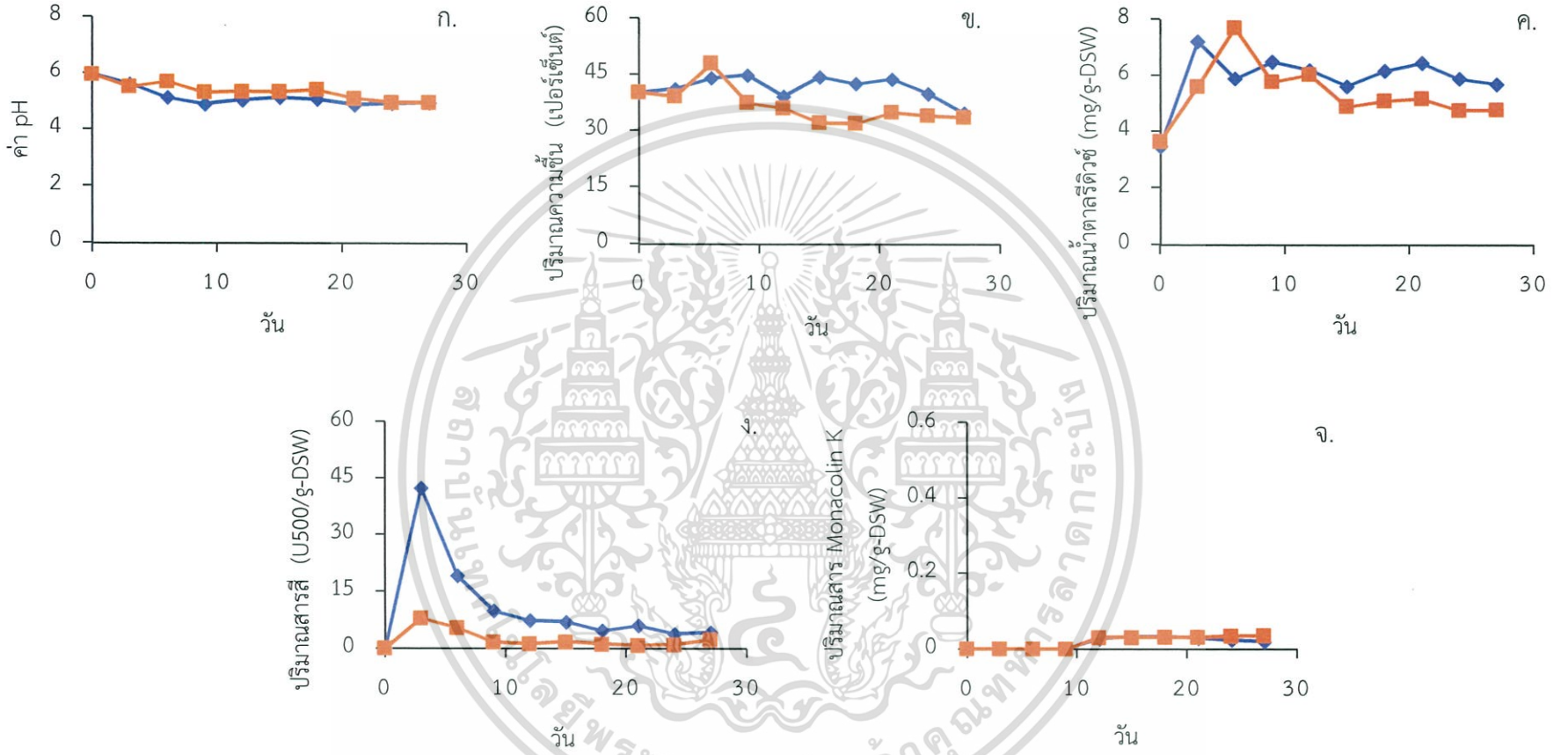
ตารางที่ 4.3 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง

ขนาดขวด (มิลลิลิตร)	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลาเติมข้าว(วัน)										ปริมาณสุทธิ
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	
1000	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	500
	total	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	150
2000	ข้าว(กรัม)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	500
	total	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	150

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U500/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวหอมมะลิ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง ในขวดปริมาตร 1000 และ 2000 มิลลิลิตร

วันที่เก็บตัวอย่าง	ค่า pH		ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)		ปริมาณสารสี (U500/g-DSW)		ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)	
ขนาดขวด	1000	2000	1000	2000	1000	2000	1000	2000	1000	2000
0	5.97	5.95	40.00	40.04	3.456	3.627	0	0	0	0
3	5.61	5.50	41.03	39.02	7.207	5.592	42.48	7.96	0	0
6	5.12	5.69	43.99	47.90	5.880	7.695	19.03	5.37	0	0
9	4.89	5.30	44.81	37.36	6.480	5.763	9.92	1.62	0	0
12	5.03	5.33	39.09	35.88	6.188	6.022	7.35	1.20	0.0274	0.0304
15	5.12	5.32	44.35	31.91	5.615	4.883	6.95	1.72	0.0317	0.0308
18	5.06	5.4	42.46	31.74	6.158	5.081	4.61	1.07	0.0317	0.0310
21	4.87	5.09	43.72	34.82	6.440	5.160	5.99	0.75	0.0293	0.0312
24	4.92	4.95	39.81	33.90	5.881	4.748	3.82	0.98	0.0234	0.0346
27	4.95	4.95	34.63	33.45	5.693	4.753	4.21	2.19	0.0196	0.0360



รูปที่ 4.2 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวหอมมะลิในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง โดยที่ (ก.) ค่า pH (ข.) ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) (ค.) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-DSW) (ง.) ปริมาณสารสี (U500/g-DSW) และ (จ.) ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ซึ่งแทน ◆ ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร และ ■ ขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ตามลำดับ

4.3 ศึกษาปริมาตรขวดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราบนข้าวเสาไห้เพื่อผลิตสาร Monacolin K

เนื่องจากการใช้ข้าวหอมมะลิ เป็นวัสดุหมักไม่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Monacolin K เนื่องจากพบการสะสมน้ำตาลรีดิวซ์ จนไปยับยั้งการผลิตสารผลิตภัณฑ์ จึงทำให้ต้องใช้ข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมัก เพราะคุณสมบัติทางกายภาพที่เป็นเมล็ดข้าวแข็ง และมีองค์ประกอบของอะไมโลสสูงกว่า ซึ่งส่งผลดีต่อการย่อยสลาย ลดการสะสมของกลูโคส และเพื่อป้องกันการสะสมของกลูโคส จึงใช้รูปแบบการเติมข้าวทุกๆ 7 วัน การทดลองจึงทำการเลี้ยง *Monascus* sp. บนอาหารแข็งโดยใช้ข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมักซึ่งบรรจุในขวดปริมาตร 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร หลังจากทำให้ข้าวเสาไห้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อปริมาตร 75 150 และ300 มิลลิลิตร ต่อข้าวเสาไห้ 250 500 และ1000 กรัม ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.5 นำไปบ่มบนเครื่องหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว แล้วลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว บ่มบนเครื่องหมุนสลับนิ่ง (ในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างข้าวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ความชื้น น้ำตาลรีดิวซ์ สารสี และสาร Monacolin K ดังตารางที่ 4.6

ผลการทดลองเลี้ยง *Monascus* sp. U6V1 ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง บนวัสดุหมักข้าวเสาไห้ที่บรรจุในขวดปริมาตร 5000 10000 และ20000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แสดงในรูปที่ 4.5 โดยพบว่าค่า pH ค่อนข้างคงที่ (ในช่วง 4 ถึง 6) ในช่วงสัปดาห์ที่ 1-3 มีปริมาณความชื้นค่อยๆ ลดลง จนถึงสัปดาห์ที่ 4 ความชื้นจึงเพิ่มขึ้นไปจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อรา ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของขวดทั้งสามขนาดอยู่ที่ 3-6 สำหรับการผลิตสารสีพบว่าเชื้อราให้ผลิตสารสีได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 1 (ขวดปริมาตร 5000 มิลลิลิตร) จากนั้นค่อยๆ ลดลงจนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ การผลิตสาร Monacolin K ได้ปริมาณสูงสุดที่ 0.0243 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง (ในสัปดาห์ที่ 4 ของขวดปริมาตร 10000 มิลลิลิตร)

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า การเปลี่ยนสัดส่วนพื้นที่เป็น 1:5 เพื่อที่จะได้ให้อากาศถ่ายเทได้ดีแต่ผลการทดลองพบว่ายังคงมีปริมาณน้ำตาลที่สูง อาจเป็นผลมาจากการใช้ภาชนะเลี้ยงเชื้อในขวดปริมาตรที่ใหญ่ขึ้นเป็น 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และเส้น รอบวงมากขึ้น ทำให้การเคลื่อนที่ของเมล็ดข้าวในภาชนะน้อยลง ปัจจัยนี้ทำให้ค่า shear rate (แรงเฉือน) น้อยลง เส้นใยเชื้อราจึงสามารถเจริญได้ดี และทำให้เมล็ดข้าวเกาะกันเป็นก้อนใหญ่ ขนาดของก้อนข้าวที่เกาะกัน อาจส่งผลให้การส่งผ่านออกซิเจน ในก้อนข้าวลดลง ทำให้เชื้อราเจริญในสภาพไร้อากาศ (แม้ให้สัดส่วน 1:5) โดยสังเกตจากการสร้างแอลกอฮอล์มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

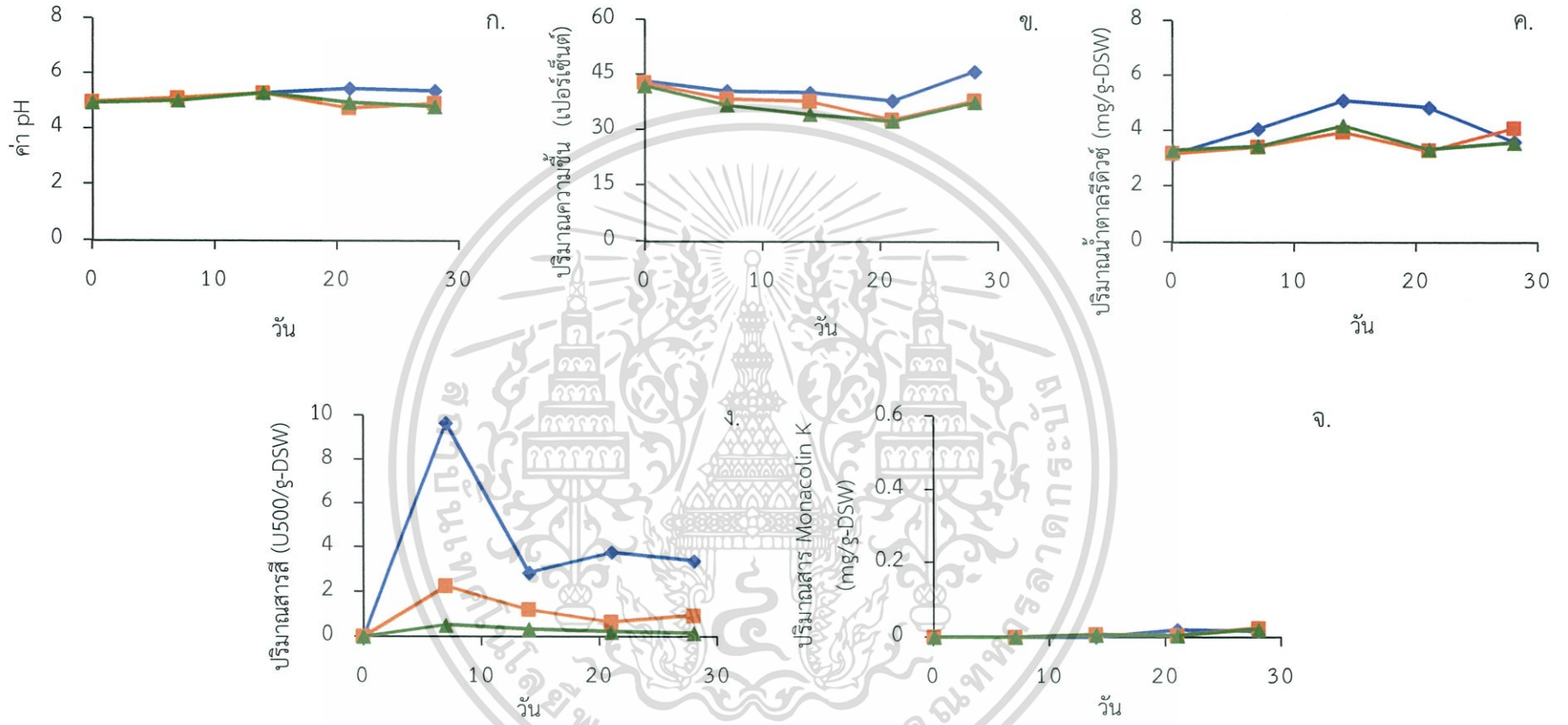
ตารางที่ 4.5 ปริมาณการเติมข้าวและน้ำแต่ละสัปดาห์ ขวดปริมาตร 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง

ขนาดขวด (มิลลิลิตร)	ปริมาณข้าวและน้ำ	ระยะเวลาเติมข้าว(วัน)										ปริมาณสุทธิ
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	
1000	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	500
	total	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	150
2000	ข้าว (กรัม)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	500
	total	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	
	น้ำ (มิลลิลิตร)	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	150

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ธนาคารโลหิตพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 4.6 แสดงค่า pH ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW) ปริมาณสารสี (U500/g-DSW) และปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ในการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวเสาไห้ ภายใต้สภาวะหมุนสลับนิ่ง 1:3 ชั่วโมง ในขวดอาหารที่มีขนาดแตกต่างกัน

วันที่เก็บตัวอย่าง	ค่า pH			ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/g-DSW)			ปริมาณสารสี (U500/g-DSW)			ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW)		
ขนาด	5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
0	4.94	4.95	4.87	43.02	42.61	41.74	3.124	3.153	3.264	0	0	0	0	0	0
7	5.07	5.09	5.00	40.38	38.18	36.57	4.049	3.384	3.410	9.68	2.25	0.51	0	0	0
14	5.27	5.27	5.28	39.95	37.59	34.05	5.078	3.926	4.170	2.84	1.20	0.32	0	0.0074	0.0055
21	5.44	4.73	4.93	37.80	32.59	32.22	4.833	3.254	3.306	3.75	0.65	0.21	0.0192	0.0038	0.0045
28	5.36	4.9	4.79	45.83	37.89	37.42	3.589	4.064	3.549	3.37	0.93	0.15	0.0160	0.0243	0.0214



รูปที่ 4.3 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนข้าวเสาไห้ ในสภาวะการหมุนสลับนิ่ง 1 : 3 ชั่วโมง โดยที่ (ก.) ค่า pH (ข.) ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์) (ค.) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/g-DSW) (ง.) ปริมาณสารสี (U500/g-DSW) และ (จ.) ปริมาณสาร Monacolin K (mg/g-DSW) ซึ่งแทน ◆ ขวดปริมาตร 5 ลิตร ■ ขวดปริมาตร 10 ลิตร และ ▲ ขวดปริมาตร 20 ลิตร ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนอาหารแข็ง บรรจุในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในสภาวะหมุนสลับนิ่งอัตรา 1:3 ชั่วโมง โดยใช้ข้าวหอมมะลิและข้าวเสาไห้เป็นวัสดุหมักตามลำดับ พบว่า วัสดุหมักที่เป็นข้าวเสาไห้สามารถผลิตสาร Monacolin K เท่ากับ 0.5537 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง ซึ่งให้ปริมาณสูงกว่าการใช้วัสดุหมักที่เป็นข้าวหอมมะลิ ที่ผลิตสาร Monacolin K เท่ากับ 0.0317 มิลลิกรัมต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง เนื่องจากข้าวหอมมะลิมีปริมาณความชื้นค่อนข้างมากกว่าข้าวเสาไห้ ทำให้เอนไซม์ย่อยข้าวหอมมะลิได้ดีกว่า ส่งผลให้พบการสะสมปริมาณน้ำตาลสูงกว่าวัสดุหมักที่เป็นข้าวเสาไห้ ซึ่งปริมาณกลูโคสที่สูงขึ้นจะมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี และ Monacolin K จึงคาดว่าอาจเป็นผลเนื่องมาจากกิจกรรมการเจริญของเชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้อย่างเหมาะสม เพราะข้อจำกัดเกี่ยวกับการถ่ายเทอากาศในบริเวณพื้นที่เหนือวัสดุหมัก (head space) วัสดุหมักทั้งหมด (จำนวนกรัมข้าว) ที่บรรจุในขวดเลี้ยงเชื้อ มีค่าสัดส่วนที่ 500 กรัมวัสดุหมัก ต่อปริมาตรขวด 1000 มล. ซึ่งให้ค่าสัดส่วน 1:2 อาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทอากาศ ภายในขวดเป็นไปอย่างจำกัด ทำให้เชื้อราเจริญในสภาพที่มีระดับออกซิเจนต่ำ ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมต่างๆ ของเชื้อ โดยสังเกตได้จากกลิ่นของวัสดุหมัก และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น ดังนั้นในการทดลองต่อมา จึงมุ่งความสนใจไปที่สัดส่วนระหว่างวัสดุหมัก ต่อปริมาตรขวดเลี้ยงเชื้อ เป็นสำคัญ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทอากาศ และส่งเสริมการเจริญ และกิจกรรมต่างๆ ของเชื้อ การทดลองต่อมาจึงศึกษา สัดส่วนของปริมาณข้าวต่อปริมาตรขวด โดยใช้ข้าวหอมมะลิเป็นวัสดุหมัก ใช้สัดส่วน 1:2 และ 1:5 และเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนสลับนิ่ง ที่อัตราการหมุน 1:3 ชั่วโมง เพื่อดูการเติมข้าวต่อปริมาตรขวด และดูการผสมผสานการถ่ายเทอากาศมีผลต่อการผลิตสาร Monacolin K ต่อไป

เมื่อเพิ่มปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายเทอากาศในขวดเลี้ยงเชื้อ โดยใช้สัดส่วนระหว่างวัสดุหมักต่อปริมาตรขวดเลี้ยงเชื้อ ที่ระดับ 1:2 และ 1:5 ตามลำดับ ผลการทดลองผลิตสาร Monacolin K บนวัสดุหมักข้าวหอมมะลิพบว่า ที่สัดส่วนวัสดุหมักต่อปริมาตรข้าว 1:5 มีปริมาณสาร Monacolin K สูงกว่า ที่สัดส่วน 1:2 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทอากาศ ส่งผลให้การสร้างผลิตภัณฑ์สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบการสะสมน้ำตาลรีดิวซ์ในระดับสูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากโครงสร้างของวัสดุหมัก ที่เป็นข้าวหอมมะลิ ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย อะไมโลเพคติน ซึ่งง่ายต่อการย่อยสลาย ทำให้พบการสะสมน้ำตาลในปริมาณสูง จนทำให้ส่งผลยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ในกลุ่มสารทุติยภูมิ จากเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ดังนั้นการทดลองต่อมาจึงจำเป็นต้องเปลี่ยนไปใช้วัสดุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักเป็นข้าวเสาไห้ ซึ่งเป็นข้าวแข็ง (อาจแตกหักได้ง่ายจากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะหมุนสลับนิ่ง) ที่ประกอบด้วยโครงสร้างเป็นอะไมโลส ทำให้ยากต่อการย่อยสลาย แต่ยังคงมุ่งความสนใจไปที่สัดส่วนระหว่างวัสดุหมักต่อปริมาตรขวดเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้เหมาะสมต่อการถ่ายเทอากาศ โดยกำหนดสัดส่วนเป็น 1:5 โดยใช้วัสดุหมัก 1000 2000 และ 4000 กรัม ต่อปริมาตรขวดเลี้ยงเชื้อ 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาการถ่ายเทอากาศที่มีผลต่อการผลิตสาร Monacolin K ต่อไป

ผลทดลองการผลิต Monacolin K จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนวัสดุหมักข้าวเสาไห้ ในสภาวะหมุนสลับนิ่ง พบว่าการใช้วัสดุหมัก 2000 กรัม ต่อปริมาตรขวดเลี้ยงเชื้อ 10000 มิลลิลิตร ให้การผลิตผลิตภัณฑ์สูงที่สุด (0.0243 มิลลิกรัม Monacolin K ต่อกรัมวัสดุหมักแห้ง) แสดงให้เห็นว่าการถ่ายเทอากาศส่งผลดีต่อการเจริญ และกิจกรรมของเชื้อ แต่ผลการทดลองพบว่ายังคงมีปริมาณน้ำตาลที่สูง อาจเป็นผลมาจากการใช้ภาชนะเลี้ยงเชื้อขวดใหญ่ขึ้นเป็น 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และเส้นรอบวงมากขึ้น ทำให้การเคลื่อนที่ของขวดเลี้ยงเชื้อมีค่าช้าลง ดังนั้นเมล็ดข้าวในขวดเลี้ยงเชื้อ จึงเคลื่อนที่น้อยลง ปัจจัยนี้ทำให้ค่า shear rate (แรงเฉือน) ลดลง ดังนั้นเส้นใยเชื้อราจึงสามารถเจริญและยืดยาวได้ดี และทำให้เมล็ดข้าวเกาะกันเป็นก้อนใหญ่ ขนาดของก้อนข้าวที่เกาะกัน อาจส่งผลให้การส่งผ่านออกซิเจนในก้อนข้าวลดลง ทำให้เชื้อราเจริญในสภาพไร้อากาศ โดยสังเกตจากการสร้างแอลกอฮอล์มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า พื้นที่ปากขวดเลี้ยงเชื้ออาจเป็นข้อจำกัดที่สำคัญ ต่อการเคลื่อนที่ของอากาศเข้า และออกจากขวดเลี้ยงเชื้อเช่นกัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ถ้าต้องการตัดปัญหาเรื่องเส้นรอบวงของขนาดขวด ควรเพิ่มความเร็วรอบของการหมุนที่ทำให้การเคลื่อนที่ของข้าวขวดเล็กและขวดใหญ่เท่ากัน
2. ควรศึกษาปริมาณซิตรินินที่เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ผลิตขึ้น เพื่อทราบว่าปริมาณซิตรินิน มีผลต่อการผลิตสาร Monacolin K หรือไม่
3. ควรศึกษาหาวิธีลดการเกาะติดของวัสดุหมักกับผนังของภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา เนื่องจากมีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรกต สุนนทรกุล. 2553. *Monascus* ราแดงที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ. [Online]. Available : http://home.kku.ac.th/uac/journal/year_18_3-4_2553.

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

จักรพงษ์ นิมานะ. 2557. การผลิตสารสีจากจุลินทรีย์. [Online]. Available : http://science.payap.ac.th/blog/2014/05/07/การผลิตสารสีจากจุลินทร/

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

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

ณัฐธิดา ชูมาลัยวงค์. 2558. **กระแส Clean food ของคนรักสุขภาพ.** [Online]. Available : http://www.stou.ac.th/study/sumrit/11-58(500)/page1-11-58(500).html.

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

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

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

บุษบา ยงสมิทธ์, วิเชียร ยงมานิตชัย, สนทนา แสงจันทร์ และชุลี ชัยศรีสุข. 2531. การผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลังเพื่ออุตสาหกรรมหมัก. **รายการวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการแห่งชาติ** กรุงเทพฯ. น. 225

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

บุษบา ยงสมิทธิ์. 2542. **จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สานักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัศมี และจารุพงษ์. (2556). โคเอนไซม์ คิวเท็น : จากเคมีพื้นฐานสู่การประยุกต์ในทางการแพทย์. *ศรีนครินทร์เวชสาร*, 28(4), 589-595.

เรณู ปิ่นทอง และจุลยุทธ บุญสร้างสม. 2546. ผลของสายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* และชนิดของข้าวต่อปริมาณซิตรินินในข้าวแดง. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. กรุงเทพฯ. 34(4-6)

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิฑูรย์ ปัญญากุล. (2545). **ข้าวหอมมะลิอินทรีย์**. กรุงเทพฯ : ทีซีจี พริ้นติ้ง.

ศศิธร ใบผ่อง. 2546. “การผลิตรงควัตถุสีแดงและซิตรินินโดยเชื้อรา *Monascus purpureus* ในข้าวและอาหารเหลวสังเคราะห์.” วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาลัยเชียงใหม่.

ศุภทัต ชุมนุมวัฒน์. 2559. **ไขมันในเลือดสูงกับโรคหลอดเลือด**. [Online]. Available : http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/349/ไขมันในเลือดสูง/

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

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2559. ข้อมูลเกี่ยวกับข้าว. [Online]. Availab : http://www.thairiceexporters. or.th/rice_profile.htm

สราวุฒิ ดำใหม่. 2558. **ยา statin คืออะไร**. [Online]. Available : https://sarawutdammai. Wordpress.com/2025/09/27/ยา-statin-เปลี่ยนโลก/

สำนักงานพัฒนานโยบายสุขภาพระหว่างประเทศ. 2559. **รายงานสถานการณ์โรค NCDs ฉบับที่ 2 "KICK OFF TO THE GOALS"**. 1. นนทบุรี : สำนักงานพัฒนานโยบายสุขภาพระหว่างประเทศ.

สำนักโรคไม่ติดต่อกรมควบคุมโรค. 2559. **คู่มือการประเมินโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด สำหรับอาสาสมัครสาธารณสุข (อสม.)**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักงานกิจการโรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

สุนีย์ เอียดมุสิก. 2557. **การผลิตสารสีและโมนาโคลินเคที่ได้จากการหมักเมล็ดขนุนผง ด้วยเชื้อราโมแนสคัสต่างสายพันธุ์.** [Online]. Available : http://www.thaiscience.info/Article%20for%20ThaiScience/Article/62/1003598.

สุพรรณิการ์ ประทีปจรัสแสง. 2555. **ระดับไขมันคอเลสเตอรอลในเลือด (Total Choresterol).** [Online]. Available : http://www.yaandyou.net/content-view.php?conid=539.

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

อุทัยวรรณ ฉัตรธง และเกตุการ ดาจันทา. 2558. **การสร้างโมนาโคลินเค ซิตรินิน และสารสีในอังคักจากเศษเหลือเสน่ก๋วยเตี๋ยวที่หมักด้วยราโมแนสคัสต่างสายพันธุ์.** [Online]. Available : http://resjournal.kku.ac.th/abstract/19_2_3.pdf.

อุทัยวรรณ ฉัตรธง. 2557. **การสร้างโมนาโคลินเค ซิตรินิน และสารสี ในอังคักจากเศษเหลือเส้นก๋วยเตี๋ยวที่หมักด้วยราโมแนสคัสต่างสายพันธุ์.** [Online]. Available : http://resjournal.kku. ac.th/abstr.act/19_2_3.

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.

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

Babitha, S., Soccol, C.R. and Pandey A., 2007. "Solis-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed." *Bioresource Technology*. 98: 15554-1560

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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.

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

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

Carvalho, J.C., Babitha, Soccol, C.R. 2003. "Production of *Monascus* biopigments: An overview." *Ago Food Industry Hi-trch*, 14, 37-42

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.

Chegwin-Angarita, C. Nieto-Ramirez, I.J. Diaz, G.J. Rocío Rojas L., J. Sepulveda, L. and Atehortúa, L. 2013. "Evaluation of a method using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of statins in macro mycetes of the genus *Pleurotus* cultivated by fermentation processes." *Talanta*. 116(2013) : 56–64.

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

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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) : 1197–1202.67

Endo, A. 1979. "Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus species.*" J Antibiot (Tokyo). Aug;320(8):852-854.

Endo, A. Kuroda, M. and Tanzawa, K. (1976). "Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B, fungal metabolites, having hypocholecterolemic activity." *FEBS Lett*. 72, 323-326

European Mycotoxin Network. 2002. **Citrinin.** [Online]. Available : http://www.lfra.co.uk/eman2/fsheeet9.asp

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

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

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.

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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Han, O.H. and 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.

Harsha, N. Subba, S. Rao, V. Sridevi, MVV. Chandana Lakshmi, and Kanthi, T. Kiran. 2013. "Optimization of Physico Chemical and Nutritional Parameters for the Production of Mevastatin Using Penicillium citrinum MTCC 1256." IOSR Journal of Pharmacy. 3(1) : 40-45.

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

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

John, M. R., and D. M. Stuart. 1991. "Production of pigment by *Monascus purpureus* in solid culture." *J. Ind. Microbiol.* 8, 23-38.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Koehler, P.E. 2003. "Improving Quality, Nutritional content and value of Georgia agricultural products." *Food science and technology*. [online] Available : http/hwww.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/0191610-improving–quality-nutritional-content-and-value-of-georgia-agricultural-products.html

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

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

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.

Lotong, N. and Suwanarit, P. 1990. "Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content" *Journal of Appiled Microbiology*. 68 : 556-570.

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

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.

Moore, R.N. Bigam, G. Chan, J.K. Hogg, A.M. Nakashima, T.T. and Vederas, J.C. 1985. "Biosynthesis of the Hypocholesterolemic agent Mevinolin by *Aspergillus terreus*. Determination of the origin of carbon, Hydrogen and Oxygen by 13C NMR and mass spectrometry"*J.Am. Chem. Soc.* (107): 3694 3701

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Palo, M.A., Vidal-Adeva, L., and Maceda, L. 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.

Pattanagul, P. 2002. "Using of Vegetable Oil, Angkak, Soy Protein Isolate and Tapioca Starch to Improve the Quality of Sausages(Thai)." Thesis for Master of Scicnce, Chiang Mai Univesity, Chiang Mai, Thailand.

Sabater-Vilar, M. Maas, R.F.M. and Fink-Gremmels, J. 1999. " Mutagenicity of commercial fermentation products and the role of citrinin contamination. " *Mutation Research.* 444: 7-16.

Schoonhoven, A.V. 1974. "Resistance to thrips damage in cassava." *Journal of Economic Entomology* 67:728-730.

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

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.

Smith, D.J. and Olive, K.E. 2003. "Chinese red rice-induced myopathy." *The Southern Medical Journal* 96(12) : 1265

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

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tan, K. Shlomi, T. Feizi, H. Ideker, T. and Sharan, R. 2007. "Transcriptional regulation of protein complexes within and across species." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(4) :1283-8

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.

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

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

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

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

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

Wu, X. Yuan, Z. Han, D Qi, T and Lu, Q. 1966. "Report of the excavation at Lantianman locality of Gongwangling in 1965." *vertebrata PalAsiatica* 10:23.30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหาร

1. อาหาร MYS (Malt yeast extract starch agar)

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

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

2. อาหาร SS (Soybean starch medium)

แป้งมันสาปะหลัง	30	กรัม
แป้งถั่วเหลือง	40	กรัม

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น 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

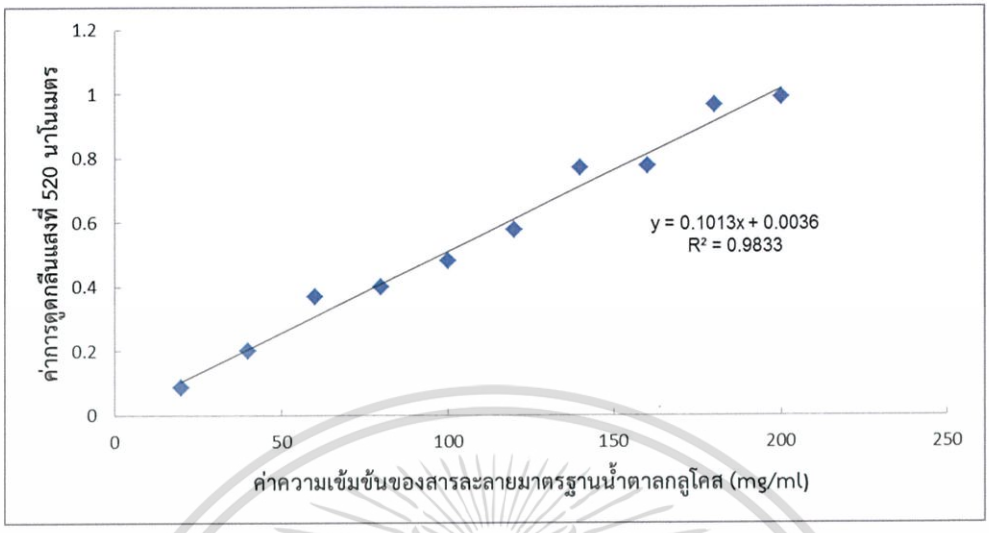
3.2 วิธีการวิเคราะห์

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 นำไปวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 nm เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำตาลกลูโคสและค่าความขุ่น ได้เป็นกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 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 nm สามารถคำนวณได้ดังนี้

<u>ตัวอย่างคำนวณหาสารสี</u>

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ตัวอย่างแห้งหนัก0.9119 กรัม ได้สารสี 0.63 unit

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

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

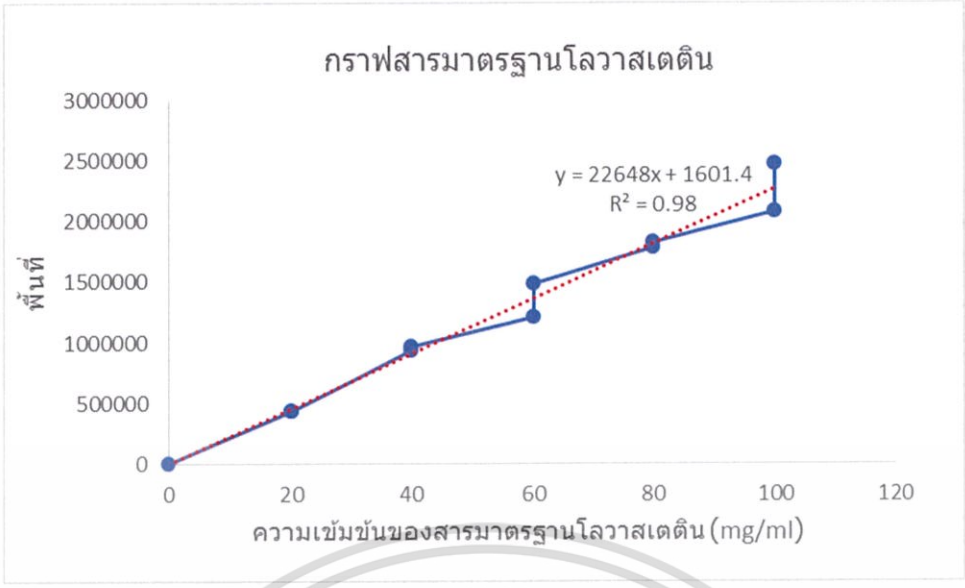
5.1 การวิเคราะห์

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

5.2 การเตรียมสารเมวาสเตตินมาตรฐาน

นำโลวาสเตตินมาตรฐานมาลายในเอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ นำมาเจือจางเป็นความเข้มข้น 20 40 60 80 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาผสมกับสารละลาย Acetonitrile ในอัตราส่วนของสารละลาย Acetonitrile : สารมาตรฐาน (55 : 45) จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน แกน y คือ พื้นที่ใต้กราฟ และแกน x คือ ความเข้มข้นของสาร Monacolin ดังแสดงในรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสารโลวาสแตติน (mg/ml)

5.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำ absolute ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ทำให้เป็น ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ที่มี Orthophosphoric acid 0.1 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างมาผสมสารละลาย Acetonitrile ในอัตราส่วนของสารละลาย Acetonitrile : ตัวอย่าง (55 : 45) จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อวิเคราะห์ นำพื้นที่ใต้กราฟที่เวลาเดียวกับกราฟมาตรฐานไปเทียบเพื่อหาปริมาณของสาร Monacolin

<u>วิธีคำนวณ</u>

Orthophosphoric acid	1	ml	มีเนื้อสาร	1.685	g
Orthophosphoric acid	85	ml	มีเนื้อสาร	$\frac{1.685 \; x \; 85}{1}$	= 143.225 g

เพราะฉะนั้น Orthophosphoric acid 100 ml มีเนื้อสารอยู่ 143.225 g

ต้องการ	143.225	g	ต้องใช้	100	ml
ต้องการ	1	g	ต้องใช้	$\frac{100 \; x \; 1}{143.225}$ = 0.6982	ml

เพราะฉะนั้น ถ้าดูด Orthophosphoric acid 6.982 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 ml ก็จะมีความเข้มข้นของ Orthophosphoric acid เท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

ถ้าต้องการ ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 950 ml โดยใช้ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์

Ethanol	1000	ml
ต้องใช้ Orthophosphoric acid	6.982	ml
Ethanol	950	ml

ต้องใช้ Orthophosphoric acid $\frac{6.82\ x\ 950}{1000}$ = 6.6329 ml

เพราะฉะนั้นดูด Orthophosphoric acid 6.6329 ml ปรับปริมาตรด้วย ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ 950 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

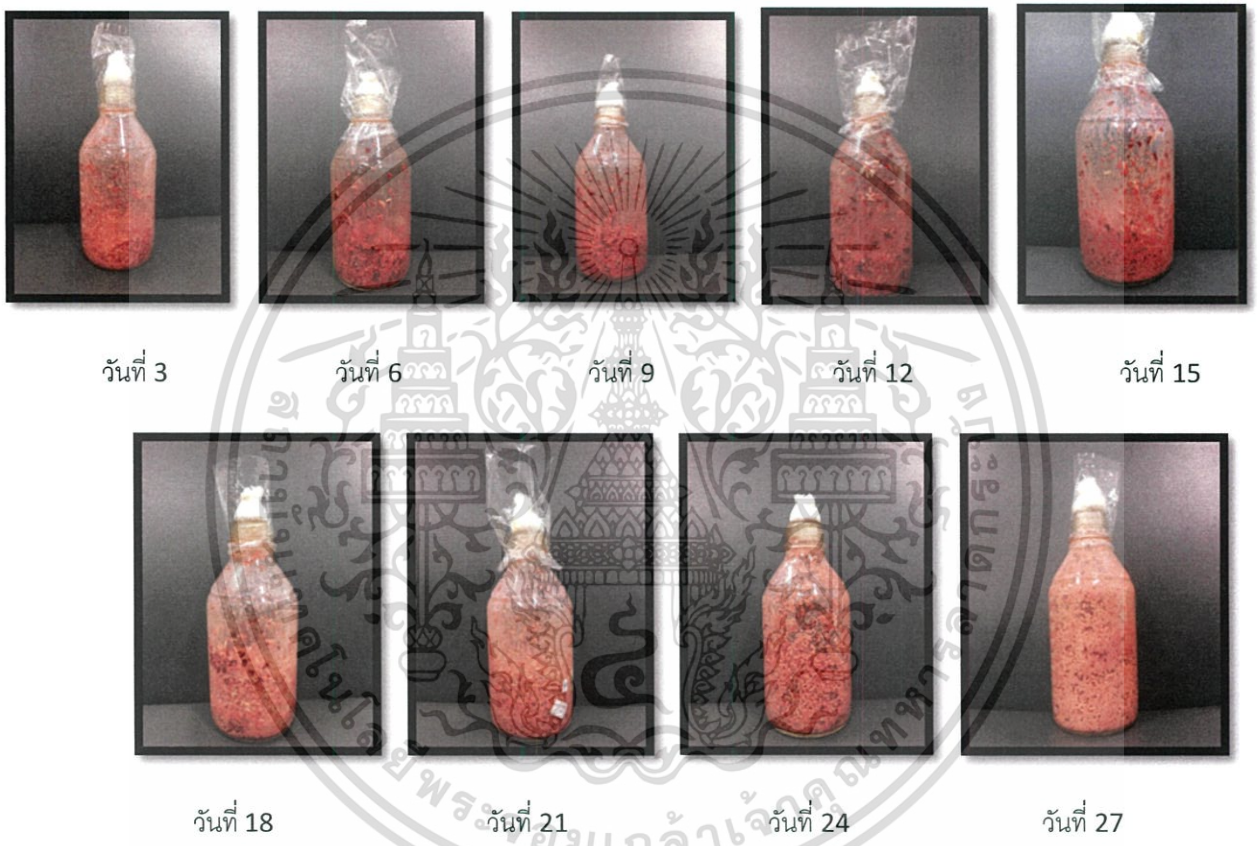
รูปแสดงการทดลอง

รูปที่ 4.6 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 อายุ 14 วัน บนอาหาร MYS

รูปที่ 4.7 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 อายุ 3 วัน บนอาหาร SS

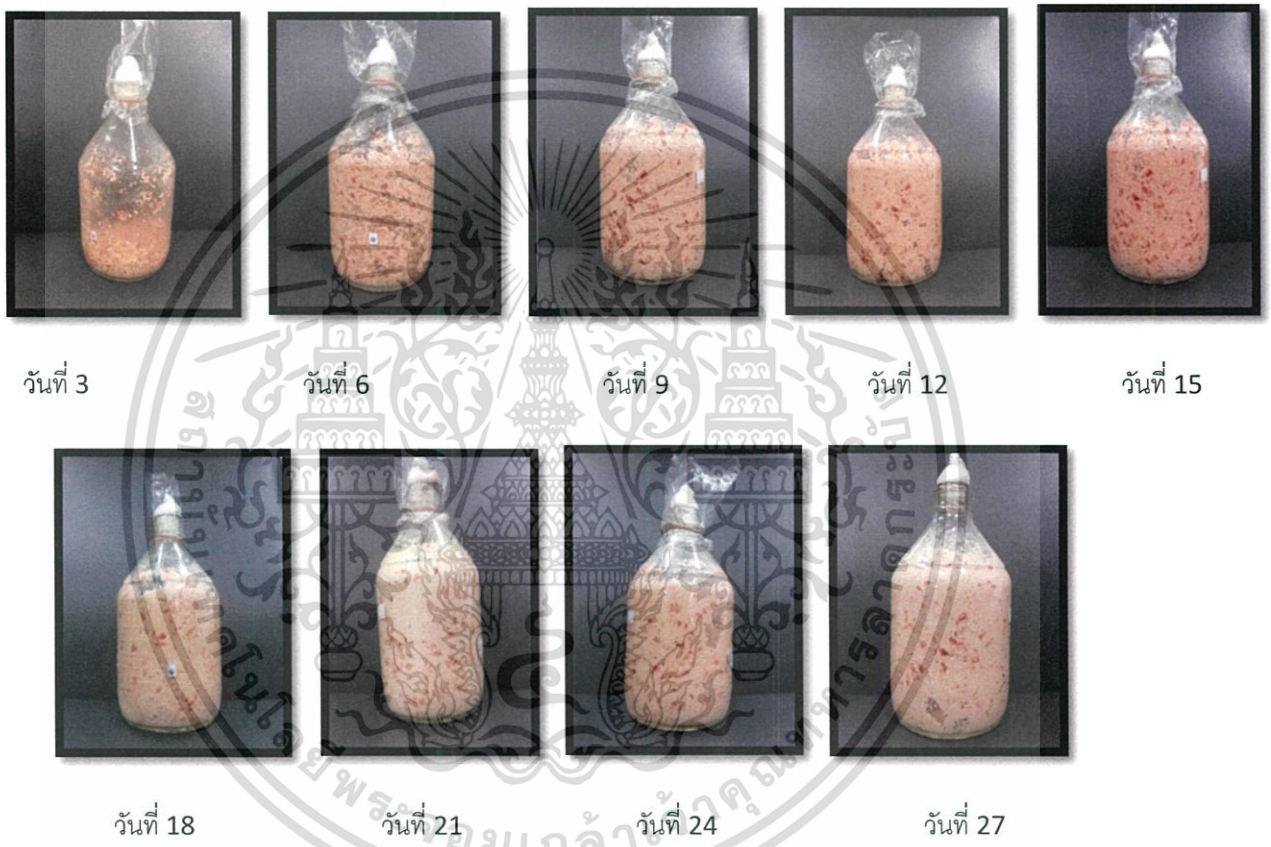
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.8 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน

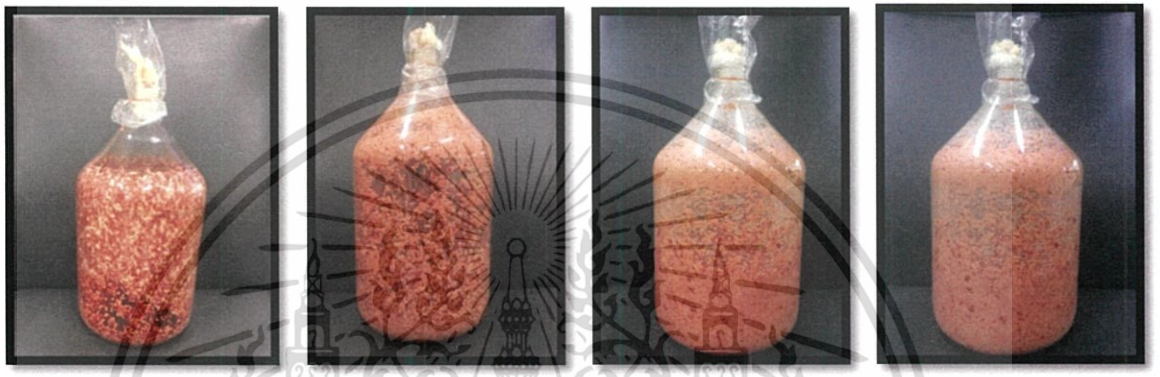
ขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.9 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวหอมมะลิในขวดปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ในแต่ละวัน

ขวดปริมาตร 5000 มิลลิลิตร

สัปดาห์ที่ 1 สัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 3 สัปดาห์ที่ 4



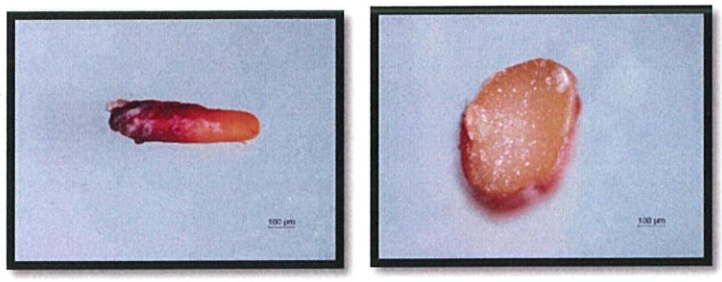
ขวดปริมาตร 10000 มิลลิลิตร

ขวดปริมาตร 20000 มิลลิลิตร สัปดาห์ที่ 1 สัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 3 สัปดาห์ที่ 4

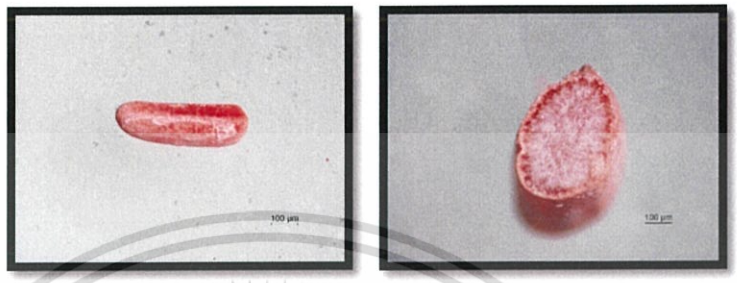
รูปที่ 4.10 เชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 ที่เจริญบนข้าวเสาไห้ในขวดปริมาตร 5000 10000 และ 20000 มิลลิลิตร ในแต่ละสัปดาห์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วันที่ 3

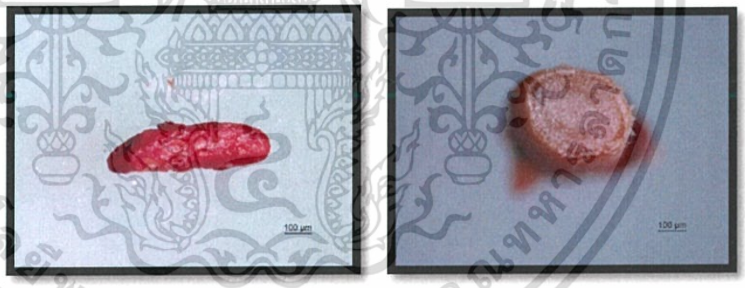


วันที่ 6

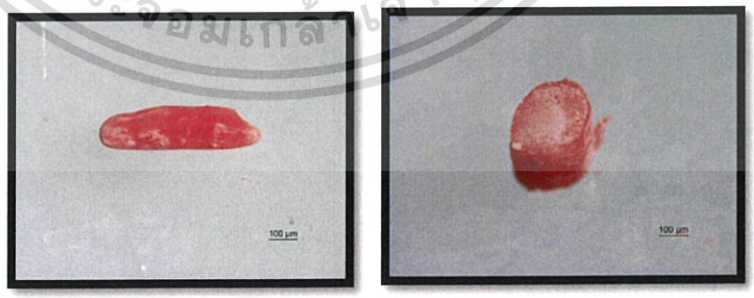


วันที่ 9

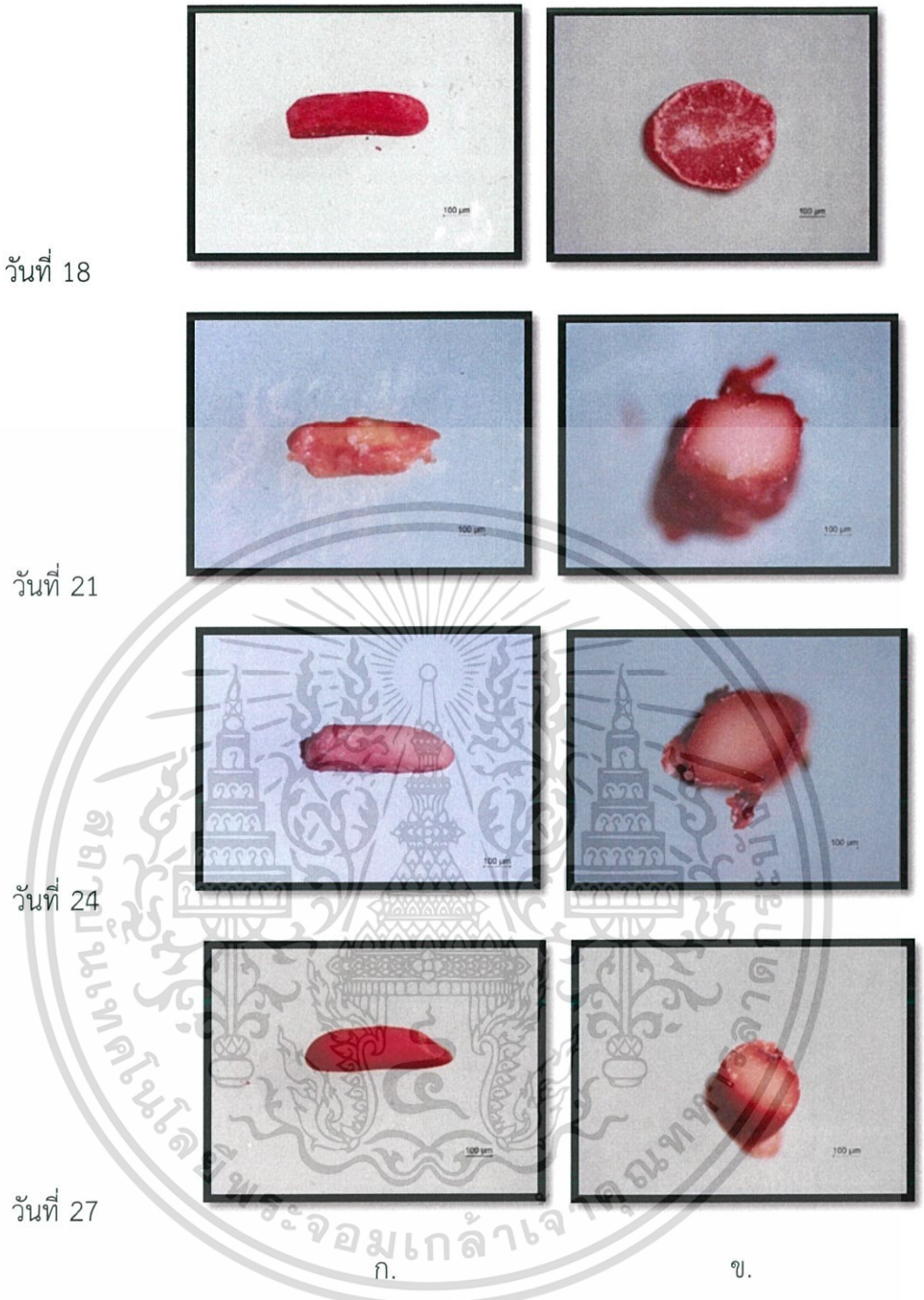
วันที่ 12



วันที่ 15



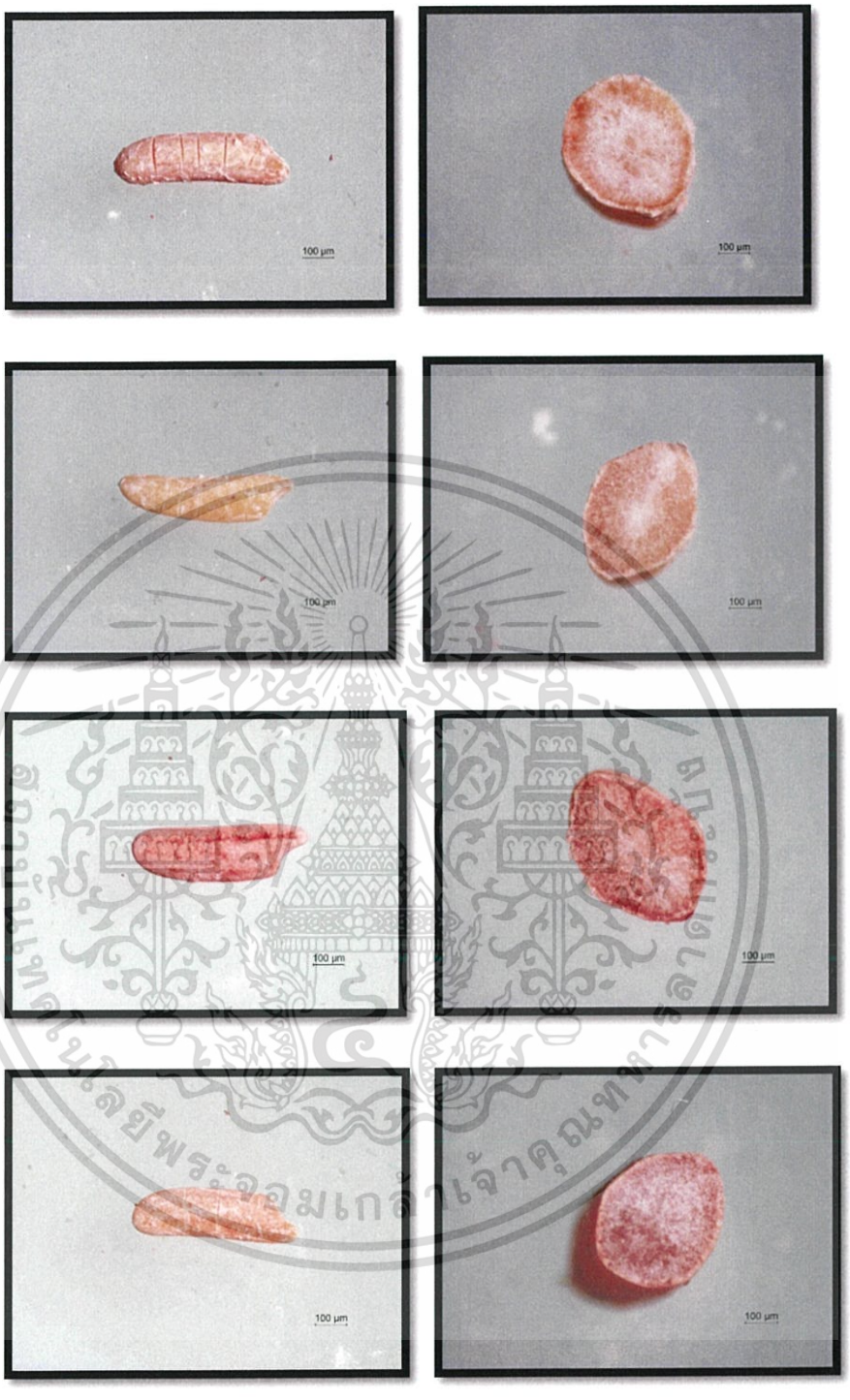
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ก. แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเมล็ดข้าวหอมมะลิ
ข. ภาพตัดขว้างของเมล็ดข้าวหอมมะลิที่มีเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

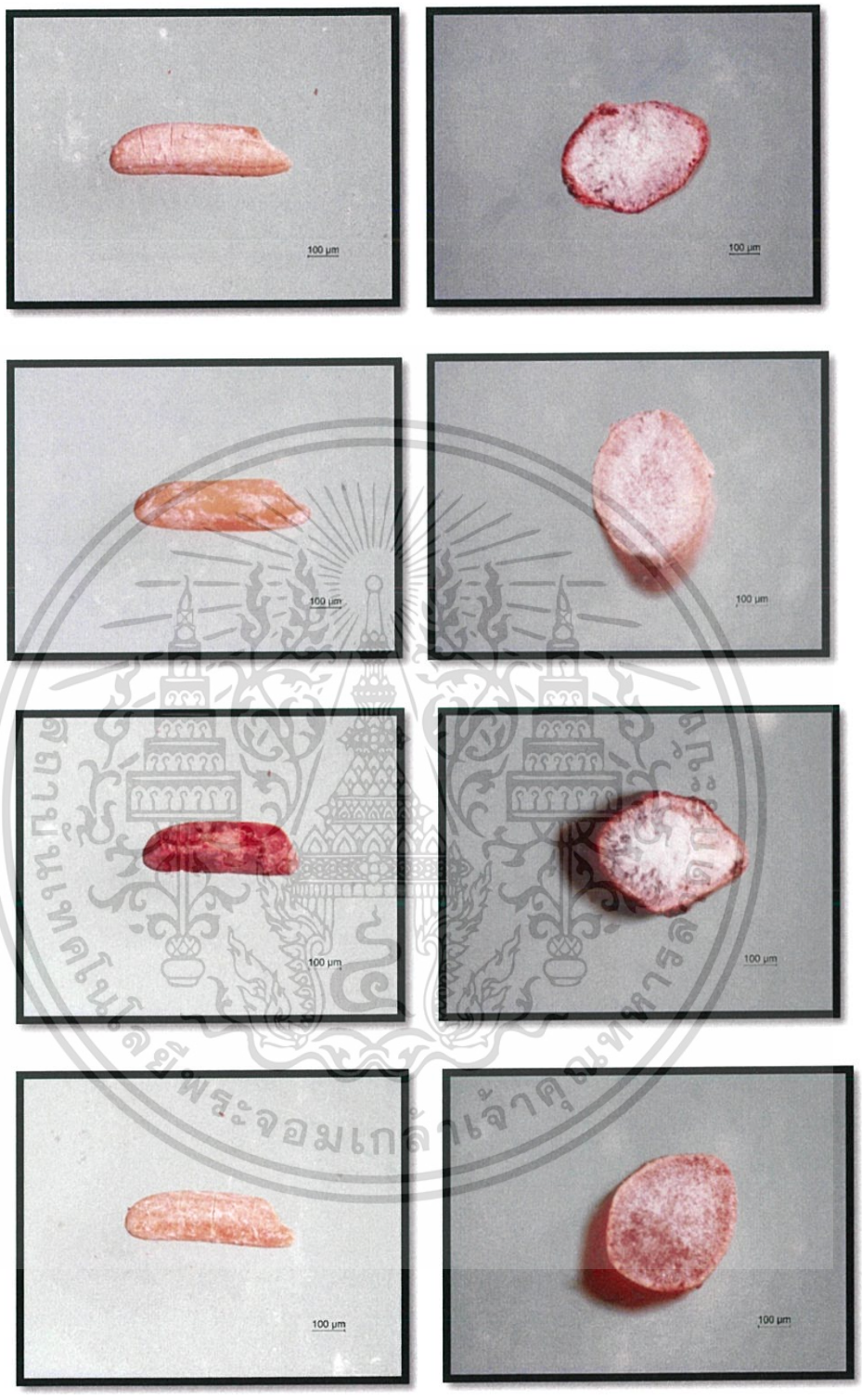
ขวดขนาด 5000 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.12 ก. แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเมล็ดข้าวเสาไห้
ข. ภาพตัดขว้างของเมล็ดข้าวเสาไห้ที่มีเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดขนาด 10000 มิลลิลิตร

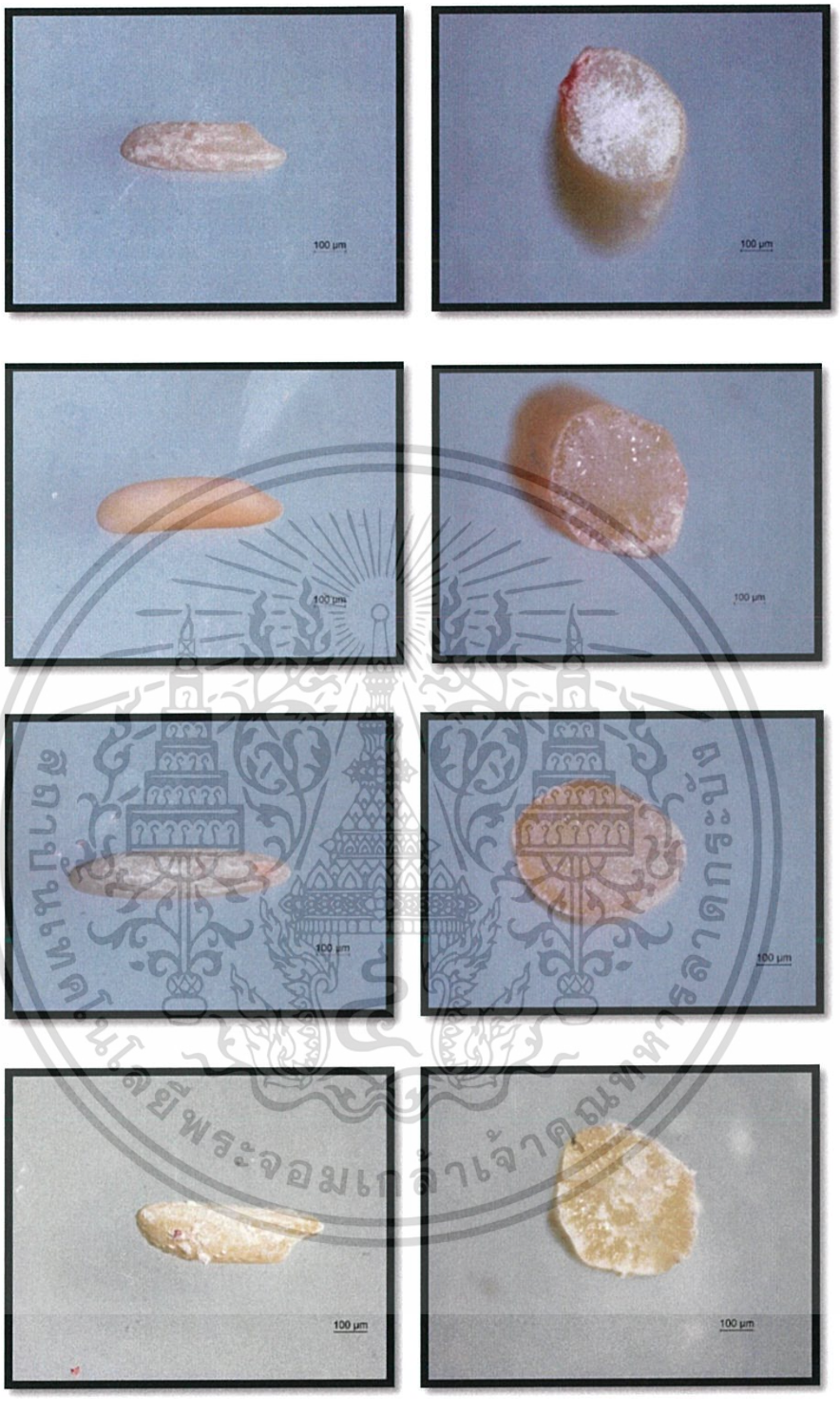


ก. ข.

รูปที่ 4.13 ก. แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเมล็ดข้าวเสาไห้
ข. ภาพตัดขว้างของเมล็ดข้าวเสาไห้ที่มีเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดขนาด 20000 มิลลิลิตร

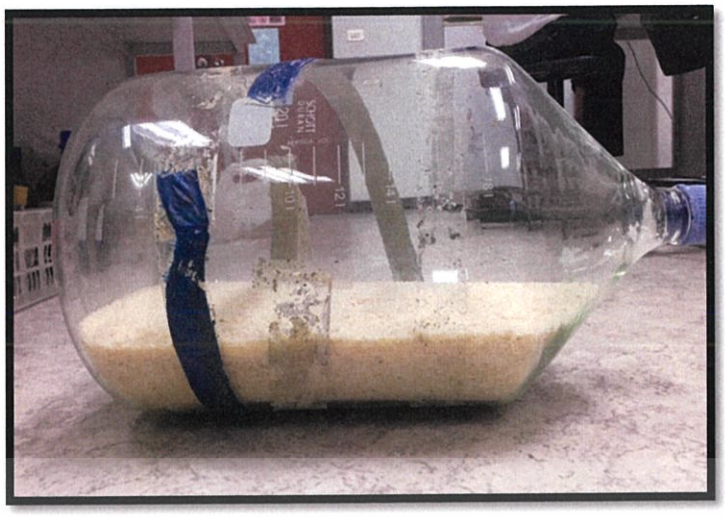


ก. ข.

รูปที่ 4.14 ก. แสดงการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1 บนเมล็ดข้าวเสาไห้

ข. ภาพตัดขวางของเมล็ดข้าวเสาไห้ที่มีเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. U6V1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 เอียงขวดเพื่อดูปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการเติมข้าว

รูปที่ 4.16 บ่มบนเครื่องหมุนต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าว

รูปที่ 4.17 บ่มบนเครื่องหมุน (สลับนิ่งในอัตรา 1 : 3 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้