



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

.....  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬชีววิทยา)

.....  
ปริญญา

.....  
จุฬชีววิทยา

.....  
สาขา

.....  
จุฬชีววิทยา

.....  
ภาควิชา

เรื่อง การสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลบนมันสำปะหลังโดยเชื้อราโมแนสคัสด้วยวิธีหมักแบบแข็ง

Production of Pigments and Anti-cholesterol Agent by *Monascus* sp. on Cassava Solid Culture

นามผู้วิจัย นายชยุต ขรรัมย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(.....  
ศาสตราจารย์บุษบา ยงสมิทธิ์, Dr.Eng. ....)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(.....  
อาจารย์เจษฎา โพธิรัตน์, Ph.D. ....)

หัวหน้าภาควิชา

(.....  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D. ....)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....  
(.....  
รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. ....)

.....  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลบนมันสำปะหลังโดยเชื้อราโมแนสคัส  
ด้วยวิธีหมักแบบแข็ง

Production of Pigments and Anti-cholesterol Agent by *Monascus* sp. on Cassava Solid Culture

โดย

นายชยุต ขรรัมย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)  
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุด ขร รมย์ 2557: การสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลบนมันสำปะหลังโดย  
เชื้อราโมแนสคัสด้วยวิธีหมักแบบแข็ง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)  
สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์  
บุษบา ขงสมิทธิ์, Dr.Eng. 145 หน้า

การผลิต “มันก่ำ” โดยการหมักแป้งมันสำปะหลังด้วยเชื้อราโมแนสคัสเพื่อเป็นแหล่งของ  
สารธรรมชาติสีแดงและสารลดคอเลสเตอรอลได้ถูกวิจัยและพัฒนาขึ้นมา โดยมีการคัดเลือก  
สายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการหมักแป้งมันสำปะหลังซึ่งก็พบว่าสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16  
ให้การเจริญ การสร้างสีและสารลดคอเลสเตอรอลได้ดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ฯลฯ มันสำปะหลังเมื่อ  
ถูกแปรรูปเพื่อให้เหมาะสมต่อการหมักพบว่ามันขึ้นลูกเต๋าด้านขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ซม.<sup>3</sup> เหมาะสมต่อ  
การหมักของเชื้อราสายพันธุ์ KB10M16 มากกว่า กากมัน หรือมันบดจากเครื่อง การปรับให้มันขึ้น  
มีความชื้นเริ่มต้น 50-55% ก่อนการปลดเชื้อจะเป็นวิธีที่ดีกว่าปลดเชื้อแล้วเติมน้ำที่หลัง  
สารโมโนโซเดียมกลูตาเมตพบว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่เพิ่มสารสี และสารลดคอเลสเตอรอลได้  
สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เช่น แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์: ยูเรีย แป้งถั่วเหลือง สารสกัดยีสต์  
สารสกัดเนื้อ สารสกัดมอลต์ และเปปโตเน; แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ ,  
 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$  ขณะที่สาร  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  ยังยั้งการเจริญ การผลิตสี และ  
สารลดคอเลสเตอรอลของเชื้อราโมแนสคัส ภายใตสภาวะที่เหมาะสมใช้หัวเชื้อสปอร์ 2 เพอร์เซ็นต์  
(ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ในการหมักมันเส้น 100 กรัมในพลาสติก 500 มล. พบว่าได้ค่าสีส้ม แดง และ  
สารลดคอเลสเตอรอล 1,411 หน่วย/กรัมแห้ง ( $A_{420}$ ), 943 หน่วย/กรัมแห้ง ( $A_{500}$ ) และ 11,271 พีพีเอ็ม  
ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อขยายการหมักเป็น 10 กิโลกรัมในถังโคจิสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้  
ในปริมาณใกล้เคียงกันกับในพลาสติกแต่ใช้เวลาหมักสั้นกว่าแต่ต้องใช้หัวเชื้อสปอร์บนเมล็ดข้าว  
จำนวน 10 เพอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Chayut Kharuram 2014: Production of Pigments and Anti-cholesterol Agent by *Monascus* sp. on Cassava Solid Culture. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Professor Busaba Yongsmith, Dr.Eng. 145 pages.

Developing the natural red pigments and anti-cholesterol agent production using low cost cassava solid culture of *Monascus* sp. (MON KUM) was investigated. Selection of *Monascus* mold on cassava chips solid-culture was preliminary carried out. We found that a red mutant strain, KB 10M16, gave better growth, pigmentation and anti-cholesterol production than its wild type strain did. Cassava cubes were also found better substrate for this *Monascus* fermentation than the cassava pulp and mashed cassava. Soaking the cassava cubes of  $0.5 \times 0.5 \times 0.5 \text{ cm}^3$  in excess water to obtain 50-55% initial moisture content prior sterilization was found more practical than water addition to the sterilized cassava cubes. Monosodium glutamate was found the best nitrogen source for pigment and anti-cholesterol production amongst the other nitrogen sources (organic sources: urea, soybean, yeast extract, beef extract, malt extract and peptone, inorganic sources:  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$ ) while  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  showed inhibition on *Monascus* growth, pigments and anti-cholesterol agent production. Under the optimization of fermentation conditions with 2 % (v/w) spore suspension inoculum, the maximum yields of orange red pigments and anti-cholesterol agents reached 1,411 U/gdw ( $A_{420}$ ), 943 U/gdw ( $A_{500}$ ) and 11,271 ppm, respectively. It was noteworthy that the scaling-up of 10 kg of cassava cubes solid culture in the koji chamber gave almost similar results but in a shorter time by using rice inoculum at 10 % (w/w).

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.บุญมา ยงสมิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือ แนะนำ แก้ไขปัญหาวิทยานิพนธ์ สนับสนุนเงินทุน  
วิจัยและค่าใช้จ่ายส่วนตัว ตลอดระยะเวลาที่ศึกษา และขอกราบขอบพระคุณ ดร.เจษฎา โพธิ์รัตน์  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณ  
รศ. ดร. วราวุฒิ คุรุส่ง ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์  
ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์จัญญ์ เจตนะจิตร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยและ  
พัฒนาการผลิต “มันสำปะหลังหมักแห้งด้วยเชื้อราโมแนสคัส” ที่ให้ความรู้ คำปรึกษาและ  
ข้อเสนอแนะ และขอกราบขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ  
(สวทช.) ที่สนับสนุนทุนในการทำงานวิจัยประกอบการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้า อันนำไปสู่  
กระบวนการความคิด วางแผน แก้ไขในการวิจัยให้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณบุคลากรเจ้าหน้าที่ และ  
เพื่อนๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งบุคคลที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ที่ได้  
ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ในระหว่างการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่สมศรี พิศภิรมย์ พี่อาพร ขรรค์มัย และคุณอาเบญจมาศ ชาวนา  
ที่เป็นผู้ส่งเสริม และสนับสนุนทุนทรัพย์จนสำเร็จการศึกษาเบื้องต้น และขอขอบคุณญาติพี่น้องทุก  
ท่าน

ชยุต ขรรค์มัย

มิถุนายน 2557

## สารบัญ

## หน้า

|                                              |     |
|----------------------------------------------|-----|
| สารบัญ                                       | (1) |
| สารบัญตาราง                                  | (2) |
| สารบัญภาพ                                    | (4) |
| คำนำ                                         | 1   |
| วัตถุประสงค์                                 | 3   |
| การตรวจเอกสาร                                | 4   |
| อุปกรณ์และวิธีการ                            | 46  |
| อุปกรณ์                                      | 46  |
| วิธีการ                                      | 48  |
| ผลและวิจารณ์                                 | 54  |
| ผล                                           | 54  |
| วิจารณ์                                      | 114 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ                            | 118 |
| สรุป                                         | 118 |
| ข้อเสนอแนะ                                   | 119 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง                         | 120 |
| ภาคผนวก                                      | 132 |
| ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ               | 133 |
| ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี และการวิเคราะห์ผล | 136 |
| ประวัติการศึกษาและการทำงาน                   | 145 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                                      | หน้า |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | สายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสที่สามารถผลิตโมนาโคลิน เค                                                                                                                                                                 | 17   |
| 2        | ลักษณะประจำพันธุ์มันสำปะหลัง                                                                                                                                                                                         | 41   |
| 3        | ปริมาณการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังต่อพื้นที่ในปีเพาะปลูก 2006 -2011                                                                                                                                                      | 53   |
| 4        | องค์ประกอบภายในหัวมันสำปะหลังสด                                                                                                                                                                                      | 44   |
| 5        | องค์ประกอบในเนื้อมันสำปะหลัง                                                                                                                                                                                         | 45   |
| 6        | Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนกากมันของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง รหัส 10M16                                                                                                                    | 60   |
| 7        | Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนมันเส้นของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง รหัส 10M16                                                                                                                   | 61   |
| 8        | Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนหัวมันขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง รหัส 10M16                                                                                 | 62   |
| 9        | Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนหัวมันขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง รหัส 10M16                                                                                 | 64   |
| 10       | Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนหัวมันขนาด 1.0×1.0×1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง รหัส 10M16                                                                                 | 65   |
| 11       | ความชื้นเริ่มต้นและสารสีที่ได้จากหมักของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16 นาน 7 วัน จากการทดลองที่ 2.3.1 ที่แช่น้ำนาน 3 ชั่วโมง                                                                              | 68   |
| 12       | ความชื้นเริ่มต้นและสารสีที่ได้จากหมักของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16 จากการฟัรริทเม้นต์ขึ้นมันด้วยการนึ่งไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที                                                          | 69   |
| 13       | ความชื้นเริ่มต้นของมันสดบดที่ผสมรำละเอียดที่ 4 8 12 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ได้จากการเติมน้ำ 10 20 และ 30 มิลลิลิตร                                                                                                  | 76   |
| 14       | ความชื้นเริ่มต้นของมันสดบดที่ผสมรำละเอียดที่ 4 8 12 เปอร์เซ็นต์ที่ได้จากการแช่น้ำเพื่อปรับความชื้นเริ่มต้น                                                                                                           | 77   |
| 15       | ความชื้นเริ่มต้นและสารสีที่ได้จากหมักของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16 บนขึ้นมันบดที่ได้จากการนึ่งไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ที่ให้เย็นวัน 12 ชั่วโมง ที่ผสมรำละเอียดที่ 4 8 12 15 เปอร์เซ็นต์ | 84   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                               | หน้า |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 16       | ความชื้นเริ่มต้นและสารสีที่ได้จากหมักของเชื้อราโมแนสค์สายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16 บนชั้นมันบดที่ได้จากการนึ่งไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทิ้งให้เย็น 12 ชั่วโมง ที่ผสมรำผสมที่ 4 8 12 15 เปอร์เซ็นต์ | 85   |
| 17       | ความชื้นของสับสเตรทหมักด้วยเชื้อราโมแนสค์ 10M16 เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อของการหมักโคจิจุ 10 กิโลกรัม                                                                                                          | 103  |
| 18       | จำนวนสปอร์ (สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) จากสับสเตรทหมักด้วยเชื้อราโมแนสค์ 10M16 เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อการหมักโคจิจุ 10 กิโลกรัม                                                                                | 104  |
| 19       | การศึกษาปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลในระดับขยาย                                                                                                                       | 106  |
| 20       | วิธีการผสมหัวเชื้อที่ 10 เปอร์เซ็นต์กับชั้นมันปลอดเชื้อ ในการหมักในระดับโคจิ 10 กิโลกรัม                                                                                                                      | 108  |
| 21       | วิธีการปรับความชื้นให้เหมาะสมในระหว่างการหมักในถังโคจิ 10 กิโลกรัม                                                                                                                                            | 110  |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                              | หน้า |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | วงจรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัส                                                                                                                                                                                  | 6    |
| 2      | แสดงลักษณะของเชื้อราโมแนสคัสได้กลิ้งจุลทรรศน์                                                                                                                                                                | 7    |
| 3      | โครงสร้างทางเคมีของสารสีที่แยกได้จากเชื้อราโมแนสคัส                                                                                                                                                          | 10   |
| 4      | H-NMR spectrum และสูตรโครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่ที่ได้จากเชื้อรา <i>Monascus</i> sp. KB10                                                                                                                | 11   |
| 5      | โครงสร้างทางเคมีของสารสีเหลืองและเส้นทางชีวสังเคราะห์ที่แยกได้จาก <i>M. kaoliang</i> KB20M10.2 ที่เลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิ                                                                                    | 11   |
| 6      | โครงสร้างทางเคมีของสารสีแดง (R3) และสีเหลือง (Y3) ที่แยกได้จาก <i>M. purpureus</i> HP14                                                                                                                      | 12   |
| 7      | เส้นทางชีวสังเคราะห์สารสีของเชื้อราโมแนสคัส                                                                                                                                                                  | 13   |
| 8      | โครงสร้างทางเคมีของ (ก) monacolin (ข) citrinin                                                                                                                                                               | 18   |
| 9      | การเรียงลำดับความสัมพันธ์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ใช้เป้งมันสำปะหลังได้ดีที่ใช้ในการทดลองซึ่งได้จากห้องปฏิบัติการของ ศ. ดร.บุญบา ยงสมิทธิ์                                                              | 29   |
| 10     | กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลสจากชิ้นมันหมักขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่แช่น้ำ 3 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายสีแดง (10M16) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส) | 56   |
| 11     | ปริมาณกลูโคซามีนจากชิ้นมันหมักขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แช่น้ำ 3 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายสีแดง (10M16) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส)            | 56   |
| 12     | ชิ้นมันหมักเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส)                                                                                                                                               | 57   |
| 13     | ค่าสีที่ A <sub>420</sub> จากชิ้นมันหมักขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แช่น้ำ 3 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายสีแดง (10M16) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส)  | 57   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                | หน้า |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 14     | ค่าสีที่ $A_{500}$ จากชั้นมันหมักขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แช่น้ำ 3 ชั่วโมง ของของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายสีแดง (10M16) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส)        | 58   |
| 15     | ปริมาณสาร โมนาโคลิน เค จากชั้นมันหมักขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แช่น้ำ 3 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดง (10M16) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส) | 58   |
| 16     | ขั้นตอนการฟัฟริทเทเมนต์ของหัวมันสำปะหลังสดโดยใช้เครื่องบด                                                                                                                                                                      | 66   |
| 17     | ลักษณะของมันบดที่ได้จากหัวสดและหัวสดนึ่งไอน้ำ                                                                                                                                                                                  | 67   |
| 18     | การเตรียมมันสำปะหลังสดผสมรำละเอียด                                                                                                                                                                                             | 71   |
| 19     | มันสำปะหลังสดที่ผ่านความร้อนไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีแล้วทำการบดกับรำละเอียด                                                                                                                                       | 73   |
| 20     | มันสดที่ผ่านความร้อนไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วบดผสมกับรำหยาบแล้วบดอีกครั้ง                                                                                                                                     | 74   |
| 21     | ลักษณะของมันแห้งที่เติมน้ำ 10 20 และ 30 มิลลิลิตร ของมันที่ผสมรำละเอียด 0 4 8 และ 12 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที                                                           | 75   |
| 22     | ลักษณะผลการผสมรำละเอียดในชั้นมันนึ่งบด 2 ครั้งทำแห้งแล้วมาแช่น้ำ                                                                                                                                                               | 82   |
| 23     | ลักษณะผลการผสมรำหยาบในชั้นมันนึ่งบด 2 ครั้ง ทำแห้งแล้วนำมาแช่น้ำ                                                                                                                                                               | 83   |
| 24     | เปรียบเทียบการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส 2 สายพันธุ์ในรูปแบบการปรับความชื้นเริ่มต้นต่างกัน                                                                                                                                      | 87   |
| 25     | เปรียบเทียบสภาพในการหมักโดยการแช่ชั้นมันหมักในน้ำนาน 1 2 และ 3 ชั่วโมง                                                                                                                                                         | 89   |
| 26     | เปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และปกลูโคซามีน ของชั้นมันหมักที่แช่น้ำนาน 1 2 และ 3 ชั่วโมง                                                                                                                              | 90   |
| 27     | ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการสร้างสีของมันหมัก                                                                                                                                                                                   | 91   |

### สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                      | หน้า |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 28     | สารลดคอเลสเตอรอลที่ถูกสร้างระหว่างการหมักของไขมันที่แช่น้ำ 1 2 และ 3 ชั่วโมง                                                                                                         | 92   |
| 29     | ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ของไขมันหมักที่แช่ด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ในโตรเจนอินทรีย์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง 10M16                                                   | 94   |
| 30     | ปริมาณกลูโคซามีนของไขมันหมักที่แช่ด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ในโตรเจนอินทรีย์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง 10M16                                                                       | 95   |
| 31     | ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการสร้างสีของไขมันหมัก ค่าสีที่ $A_{420}$ ระหว่างการหมักของไขมันที่แช่น้ำผสมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 2 ชั่วโมงของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง 10M16   | 95   |
| 32     | ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการสร้างสีของไขมันดำ ค่าสีที่ $A_{500}$ ระหว่างการหมักของไขมันที่แช่น้ำผสมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 2 ชั่วโมงของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง 10M16     | 96   |
| 33     | สารลดคอเลสเตอรอลที่ถูกสร้างระหว่างการหมักของไขมันที่แช่น้ำผสมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 2 ชั่วโมงของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง 10M16                                               | 96   |
| 34     | ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ของไขมันหมักที่แช่ด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ในโตรเจนอินทรีย์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง 10M16                                                   | 99   |
| 35     | ปริมาณกลูโคซามีนของไขมันหมักที่แช่ด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ในโตรเจนอินทรีย์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง 10M16                                                                       | 99   |
| 36     | ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการสร้างสีในไขมันดำ ค่าสีที่ $A_{420}$ ระหว่างการหมัก ของไขมันที่แช่น้ำผสมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์นาน 2 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง 10M16 | 100  |
| 37     | ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการสร้างสีในไขมันดำ ค่าสีที่ $A_{500}$ ระหว่างการหมัก ของไขมันที่แช่น้ำผสมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์นาน 2 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง 10M16 | 100  |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่            |                                                                                                                                                                                                                         | หน้า |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 38                | สารลดคอเลสเตอรอลที่ถูกสร้างระหว่างการหมักของไขมันที่แช่ในน้ำผสม<br>แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ 2 ชั่วโมงของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง<br>10M16                                                                        | 101  |
| 39                | ลักษณะของ Koji chamber                                                                                                                                                                                                  | 111  |
| 40                | การหมักไขมันสำปะหลังในระดับโคจิ 10 กิโลกรัมโดยใช้หัวเชื้อ 10<br>เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)                                                                                                                         | 112  |
| 41                | การเปรียบเทียบไขมันหมักขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แช่น้ำ<br>หรือน้ำสารละลาย monosodium glutamate ( 4 เปอร์เซ็นต์) นาน 2 ชั่วโมง<br>หมักในพลาสติกหรือ koji chamber จู 10 กิโลกรัม                              | 112  |
| 42                | การเปรียบเทียบปริมาณโมนาโคลิน เค ที่ได้จากไขมันหมักขนาด<br>0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แช่น้ำหรือน้ำสารละลาย monosodium<br>glutamate ( 4 เปอร์เซ็นต์) นาน 2 ชั่วโมงหมักในพลาสติกหรือ koji chamber จู<br>10 กิโลกรัม | 113  |
| <b>ภาพผนวกที่</b> |                                                                                                                                                                                                                         |      |
| ข1                | กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส                                                                                                                                                                                              | 139  |
| ข2                | กราฟมาตรฐานของกลูโคซามีน                                                                                                                                                                                                | 141  |
| ข3                | กราฟมาตรฐานของสารโมนาโคลิน เค                                                                                                                                                                                           | 144  |

## การสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลบนมันสำปะหลังโดยเชื้อราโมแนสคัส ด้วยวิธีหมักแบบแข็ง

### Production of Pigments and Anti-cholesterol Agent by *Monascus* sp. on Cassava Solid Culture

#### คำนำ

เชื้อราโมแนสคัส (*Monascus*) ถูกนำมาใช้หมักเพื่อนำมาใช้ในอาหารมากกว่าหนึ่งพันปีในประเทศจีน โดยเชื้อราโมแนสคัสถูกจัดอยู่ในแฟมิลี Monascaceae ออเดอร์ Eurotiales เชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ที่น่าสนใจหลายชนิดเช่น สารสี (สีแดง, เหลือง, ส้ม) สารแอนติออกซิแดนซ์ สารแอนติคาร์ซิโนเจน และสารลดปริมาณคอเลสเตอรอล หรือโมนาโคลินส์

นักวิจัยหลายแห่งได้ทดลองเพื่อการผลิตสารเมแทบอไลต์จากการหมักเชื้อราโมแนสคัสทั้งแบบเปียกและแบบแข็ง บุญบาและวรรณภา (2518) ได้รายงานเป็นครั้งแรกในประเทศไทยเรื่องการผลิตสารสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัสที่คัดแยกได้ภายในประเทศโดยวิธีการหมักแบบเหลว (submerged fermentation) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต เพราะราคาถูกและสามารถหาได้ง่ายภายในประเทศ ได้สารสีที่ปลอดภัยและสามารถนำไปใช้ในการเป็นสีผสมในอาหารและเครื่องดื่มได้ ภายหลังได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์โมแนสคัสดังกล่าวโดยวิธีการกลายพันธุ์ ได้สายพันธุ์กลายสีแดง (red mutant) สายพันธุ์กลายสีเหลือง (yellow mutant) (Yongsmith *et al.*, 1994) และสายพันธุ์กลายสีขาว (white mutant) เมื่อนำมาหมักบนเมล็ดข้าวเปรียบเทียบกับการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส พบว่าสายพันธุ์กลายสีขาว (KB20M1) สร้างเอนไซม์สูงสุดมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) สายพันธุ์กลายสีแดง (KB10M16) และสายพันธุ์กลายสีเหลือง (20M10.2) ตามลำดับ (Yongsmith *et al.*, 2000) ต่อมา Chayawat *et al.* (2008) รายงานเพิ่มเติมการหมักเชื้อราโมแนสคัสโดยวิธีหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) โดยใช้ปลายข้าวหอมมะลิเป็นสับสเตรทนั้นนอกจากได้สารสีที่มีสีแดงเข้มแล้วยังพบว่าบางสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสที่ใช้ในการทดลองสามารถผลิตสารลดคอเลสเตอรอลได้ในปริมาณสูงอีกด้วย โดยสายพันธุ์ KB9 ได้ค่าสูงสุดมากกว่าสายพันธุ์กลายสีแดง และสายพันธุ์กลายสีเหลืองตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์กลายสีขาวไม่สามารถสร้างสารลดคอเลสเตอรอลได้ ปัจจุบันผลิตภัณฑ์หมักจากเชื้อราชนิดนี้ได้นำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพในประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศในทวีปเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น ไต้หวัน จีน เกาหลี ไทย ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย (Wang and Lins, 2007) รวมทั้งมีการใช้

สับสเตรทหลากหลาย เช่น เมล็ดขนุน หรือ corncobs ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาหมักแข็งโดยเชื้อราโมแนสคัส (Babitha *et al.*, 2007; Velmurugan *et al.*, 2011) ราคาข้าวในปัจจุบันมีราคาสูงขึ้นมาก ผู้ทดลองจึงได้ทดลองหาแหล่งสับสเตรทใหม่เพื่อนำมาใช้ทดแทนเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตสารเมแทบอลิต์ที่สนใจดังกล่าว

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีราคาต่ำและมีมากในประเทศไทยโดยมีแป้งเป็นส่วนประกอบหลักถึง 75-80 เปอร์เซ็นต์ จึงเหมาะนำมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการหมักเพื่อผลิตสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลได้ นอกจากนั้นยังอาจเป็นการแก้ปัญหาอาหารสัตว์ที่มีแนวโน้มแพงขึ้นได้เนื่องจากสามารถนำมันสำปะหลังหมักที่ได้ไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์ทดแทนข้าวโพด ซึ่งปัจจุบันมีการนำข้าวโพดที่เป็นส่วนประกอบหลักในอาหารสัตว์ ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ไปใช้ผลิตเป็นพลังงานทดแทน จึงเป็นสาเหตุให้ข้าวโพดมีราคาสูงขึ้นมา เกษตรกรจึงจำเป็นต้องหาพืชชนิดอื่นมาทดแทน

ทางสถาบันหลวงสุวรรณ วาจากกลกิจ กำแพงแสน ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ประสบความสำเร็จในการใช้กากมัน/มันเส้นเป็นแหล่งพลังงานทดแทนข้าวโพดในอัตรา 50 เปอร์เซ็นต์ในอาหารไก่เนื้อ และ 15-20% ในอาหารไก่ไข่ โดยไม่มีความแตกต่างด้วยการผลิตสัตว์จากกลุ่มควบคุม แต่ยังพบและเป็นปัญหาคือ เนื้อไก่และไข่แดงที่ได้จะมีสีซีดกว่ากลุ่มควบคุม ทำให้การยอมรับของผู้บริโภคลดลง อนึ่งบางพื้นที่ต้องการสีเนื้อไก่/หรือสีขาไก่ให้เข้มกว่าปกติ เช่น จีนตอนใต้ (ทราบข้อมูลจากการติดต่อของนักวิชาการไทยที่ไปปฏิบัติหน้าที่ของบริษัท ซีพี ที่เลี้ยงไก่เนื้อ ที่ประเทศจีน ณ มณฑลยูนนาน)

การวิจัยครั้งนี้จึงต้องการศึกษาความเป็นไปได้เกี่ยวกับสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการใช้มันสำปะหลังในการสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลจากเชื้อราโมแนสคัสโดยวิธีหมักแข็ง

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลจากเชื้อราโมแนสคัสโดยวิธีหมักแข็งบนมันสำปะหลังและการเพิ่มขนาดการหมัก โดย

1. คัดเลือกสายพันธุ์โมแนสคัสที่ใช้ขึ้นมันสำปะหลังได้ดีและสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลได้สูง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสีและสารลดคอเลสเตอรอลของสายพันธุ์ที่คัดได้ในระดับฟลask
3. ทดลองขยายการหมักในถังโคจิ 10 กิโลกรัม

## การตรวจเอกสาร

### 1. ความเป็นมาและลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัสได้ถูกค้นพบและได้รับการตั้งชื่อเป็นสกุลโมแนสคัส (*Monascus* sp.) อย่างเป็นทางการเมื่อ ค.ศ. 1884 โดย van Tieghem (Carels and Shepherd, 1975) แต่การใช้ประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัสนั้น ได้มีมาเป็นระยะเวลานานแล้ว โดยเฉพาะในประเทศจีน ในการผลิตเป็นข้าวแดง (red rice) (Church, 1920) ได้จากการหมักข้าวที่นึ่งแล้วบ่มด้วยเชื้อราโมแนสคัสที่อุดมภูมิและความชื้นที่เหมาะสม เชื้อนี้ก็จะสามารถเจริญและผลิตสีแดงบนเมล็ดข้าว นอกจากนี้ยังมีประเทศไต้หวัน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ที่รู้จักใช้ประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัส โดยนำมาทำเป็นสีผสมอาหาร เครื่องดื่ม และทำยารักษาโรคพื้นบ้าน (Wong and Koehler, 1981) ในขณะที่ประเทศแถบซีกโลกตะวันตกรู้จักเชื้อราโมแนสคัสในฐานะเป็นเชื้อราที่ปะปนอยู่ในเมล็ด ธัญพืช แป้ง และไซเลจ (Iizuka and Lin, 1981) ซึ่งข้าวแดงยังมีชื่อเรียกอื่นๆ อีกได้แก่ ข้าวแดงจากจีน (Chinese red rice) อังกัก (ang-kak) แอนคัก (ankak) แองคา (anka) อังกเวค (angquac) เบนี-โคจิ (beni-koji) และอะกา-โคจิ (aka-koji) (Hesseltine, 1965)

ดังนั้นบทบาทส่วนใหญ่ของเชื้อราโมแนสคัสนั้นมาจากคุณสมบัติพิเศษที่สามารถผลิตสีในโทนสีแดง ส้ม และเหลืองได้ โดย Palo *et al.* (1960) ได้ทดลองใช้เชื้อข้าวแดงนี้ทำข้าวแดงจนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพ สามารถนำเอาข้าวแดงมาเจือสีในอาหารได้โดยตรง ในเวลาต่อมาได้มีการศึกษาเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในสภาพหมักเปียก (submerged culture) ครั้งแรกโดย Lin (1973) จนกระทั่งปัจจุบันก็ยังมีการศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับการผลิตสีทั้งในสภาพหมักแห้งและหมักเปียกเรื่อยมา เนื่องจากการหันมาให้ความสำคัญกับการใช้สีผสมอาหารจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้นรวมทั้งสารเมแทบอไลต์อื่นๆ อีกด้วย

## 1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

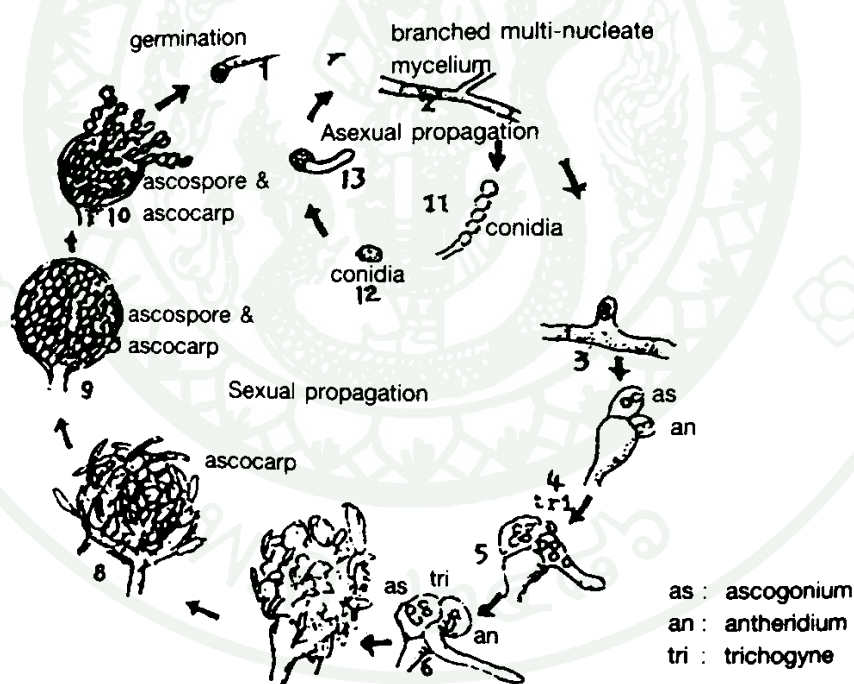
เชื้อราโมแนสคัส (*Monascus* spp.) จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Ascomycetes กลุ่ม (Class) Ascomycetes กลุ่มย่อย (Subclass) Plectomycetidae อันดับ (Order) Eurotiales (Hawksworth *et al.*, 1995) เส้นใยมีผนังกัน (septate hyphae) และแตกออกเป็นแขนงมากมาย ในขณะที่อายุน้อย เส้นใยจะเห็นเป็นสีขาวแต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดง เจริญเติบโตบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวัฏ การสืบพันธุ์มีทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual) และไม่อาศัยเพศ (asexual)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเกิดบนเส้นใยซึ่งเป็นโฮโมทัลลิก (homothallic) เริ่มจากการที่เส้นใยเจริญแล้วพัฒนาไปเป็นโครงสร้างเซลล์สำหรับสืบพันธุ์ได้แก่ แอนเทอริเดียม (antheridium) คือ โครงสร้างสืบพันธุ์เพศผู้ และแอสโคโกเนียม (ascogonium) คือ โครงสร้างสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งเจริญอยู่ใต้แอนเทอริเดียม จากนั้นเส้นใยบริเวณส่วนบนของแอสโคโกเนียม จะพัฒนาต่อไปเป็นโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า trichogyne ไปเชื่อมต่อบริเวณส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม เพื่อให้นิวเคลียสจากแอนเทอริเดียมผ่านเข้ามาผสมกับนิวเคลียสของแอสโคโกเนียม หลังจากนิวเคลียสผสมกันแล้วมีการพัฒนาต่อไปโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) และไมโทซิส (mitosis) แอสโคโกเนียมจะมีการสร้างผนังขึ้นมาล้อมรอบทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น จากนั้นจึงพัฒนาต่อไปเป็นเพอริทีเซียม (perithecium) หรือในบางรายงานอาจใช้ว่า คลิสโตทีเซียม (cleistothecium) ซึ่งเป็น แอสโคคาร์ป (ascocarp) ทรงกลมเกิดที่ปลายก้านชู (stalk) ในระยะนี้จะมีการสลายไปของผนังของแอสคัส (ascus) ที่ห่อหุ้มแอสโคสปอร์ (ascospore) ทำให้เหลือแต่แอสโคสปอร์ซึ่งส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นรูปไข่อาจมีสีน้ำตาล แดง ส้ม หรือ ไม่มีสี อยู่ในเพอริทีเซียม และในแต่ละเพอริทีเซียมก็จะมีจำนวนของแอสโคสปอร์ต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ผนังของเพอริทีเซียมจะแตกออกเพื่อปลดปล่อยแอสโคสปอร์ออกมาในทิศทางกันข้ามกับก้านชู ซึ่งระยะเวลาการเกิดแอสโคสปอร์จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร และสถานะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ โดยขณะที่เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลวจะเริ่มพบเพอริทีเซียมได้เมื่อเวลาผ่านไป 24 ถึง 48 ชั่วโมง แล้วจึงพัฒนาไปเป็นแอสโคสปอร์อย่างสมบูรณ์ เมื่อเลี้ยงเชื้อผ่านไปได้ 96 ชั่วโมง (Carels and Shepherd, 1975; Su and Huang, 1980)

ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้น จะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่าโคนิเดีย บนปลายเส้นใยเฉพาะที่เรียกว่า โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นตรงหรือคด เป็นเกลียว ขณะเริ่มสร้างโคนิเดียที่บริเวณปลายของเส้นใยจะพองออก จากนั้นจะสร้างผนังกัน

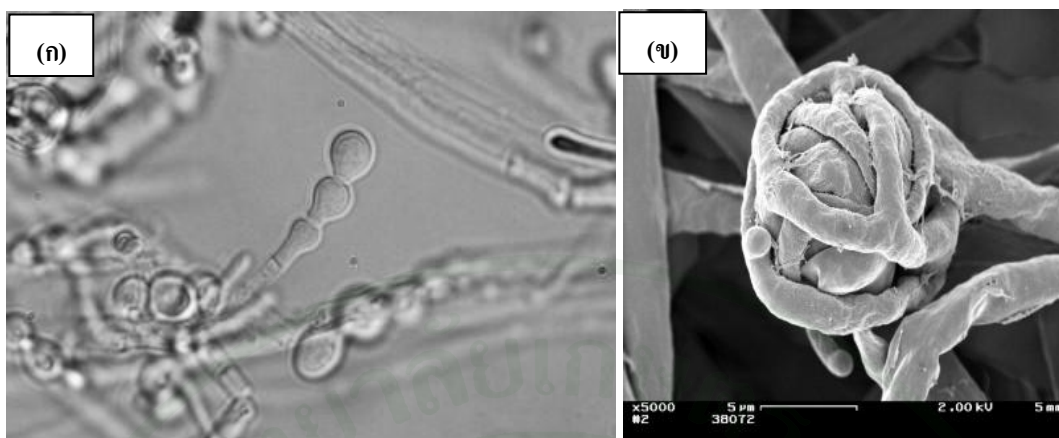
ระหว่างโคนิดีกับเส้นใย ต่อมาเส้นใยได้โคนิดีแรกจะมีการพองตัวแล้วสร้างผนังกันระหว่างโคนิดีกับเส้นใยอีกกลายเป็นโคนิดีอันที่สอง และเป็นเช่นนี้ไปเรื่อยๆจนในที่สุดได้โคนิดีที่ต่อกันเป็นสาย ดังนั้นโคนิดีที่อายุมากที่สุดจะอยู่ด้านนอกสุด โคนิดีแต่ละอันเกิดจากบริเวณ meristematic zone ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ได้โคนิดีที่เกิดก่อนหน้านั้น เพื่อใช้สร้างโคนิดีอันถัดมา ทำให้สายโคนิดียาวขึ้น ขณะที่โคนิดีโอฟอร์จะสั้นลง ลักษณะของโคนิดีจะเป็นรูปกลมหรือรูปไข่ บริเวณฐานของโคนิดีจะมีรอยตัด ผนังเรียบ ไม่มีสี แต่อาจมีสีแดงหรือน้ำตาลอ่อนได้ ถ้าเชื้อรามีอายุมากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2

ปัจจัยที่กำหนดการงอกของโคนิดีให้เป็นเส้นใยว่ามากหรือน้อย ได้แก่ อายุของโคนิดี ความหนาแน่นของโคนิดี พีเอชและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิและแสง (Cole and Kendrick, 1968; Ainswarth *et al.*, 1973; Wong and Bau, 1978)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัส

ที่มา: บุญบา (2542)



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของเชื้อราโมแนสคัสได้ก่ล้องจุลทรรศน์ (ก) โคโคนิเดีย โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ข) คลิสโตทีเซียม โครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ที่มา: Wang and Lin (2007)

## 2. การผลิตสารโพลีคีไทด์เมแทบอไลต์จากเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัสสามารถผลิตสารทุติยภูมิเมแทบอไลต์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ ประกอบไปด้วยสารสี และโมนาโคลินส์ ซึ่งสังเคราะห์ได้จากวิถีโพลีคีไทด์ในเชื้อราโมแนสคัสปีชีส์ (Simpson, 1986)

จากการศึกษาของ Hadfield *et al.* (1967) และ Turner (1971) นำเสนอภาพแสดงสมมติฐานการสังเคราะห์สารของสารสี ซึ่ง Hajjaj *et al.* (2000) อธิบายว่าเริ่มจากการรวมตัวกันของ 1 โมลของ acetyl-CoA กับ 5 โมลของ malonyl-CoA นำไปสู่การสร้าง แกน hexaketide โดย polyketide synthase จากนั้นสายโซ่ของกรดไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น octanoic acid ซึ่งได้จากวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันนั้นจะมารวมตัวกันกับ hexaketide โดยปฏิกิริยา transesterification กลายเป็นสารสีส้ม monascorubrin ( หรือ rubropunctation จาก transesterification กับกรด hexaolic) จากการสังเกตของการทดลอง isotope-labeling นั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส และ โมนาโคลินส์ เค นั้นถูกสร้างมาจากเอนไซม์โพลีคีไทด์ที่เหมือนกัน (Turner and Aldridge, 1983)

## 2.1 สมบัติของสีจากเชื้อราโมแนสคัสและการสังเคราะห์สี

### 2.1.1 สีจากเชื้อราโมแนสคัส

สีที่ผลิตจากเชื้อราโมแนสคัสจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งไม่จำเป็นต่อการเจริญและการสืบพันธุ์ของเชื้อรา (Turner, 1971) โดยมีทั้งสร้างขึ้นควบคู่ไปกับการเจริญ (growth associated) (Lin, 1973) และสร้างหลังจากที่เชื้อราหยุดการเจริญ (non-growth associated) (วรรณภา, 2529) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา ส่วนประกอบของอาหาร และสภาพการเลี้ยงเชื้อ สีดังกล่าวมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม azaphilone เช่น sclerotiorin และ rotiorin (Nakanishi *et al.*, 1959)

Haws *et al.* (1959) พบว่าสีแดงจากเชื้อรา *Monascus rubropunctatus* Sato ที่เลี้ยงในอาหารเหลว Czapek Dox เมื่อนำมาสกัดด้วย light petroleum และอีเทอร์ (ether) จะได้สารสีส้มของ rubropunctatin ( $C_{21}H_{22}O_5$ ) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายแอมโมเนียแล้วได้สารสีม่วงของ rubropunctamine ( $C_{21}H_{23}O_4$ ) นอกจากนี้ยังพบสารสีเหลืองของ monascin ( $C_{21}H_{26}O_5$ ) Nakanishi *et al.* (1959) ทำการศึกษาโครงสร้างของสาร monascorubrin ( $C_{23}H_{26}O_5$ ) ซึ่งแยกได้จาก *M. purpureus* โดยนำมาทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียจะได้สาร monascamine ( $C_{23}H_{27}O_4N$ ) และเมื่อรวมกับสังกะสีจะเปลี่ยนเป็น monascaminone

Fielding *et al.* (1961) ทำการศึกษาโครงสร้างสีจากเชื้อราโมแนสคัส พบว่าสารสีเหลืองที่เชื้อสร้างคือ monascin หรือ monascoflavin นอกจากนี้ยังสามารถแยก monascin และ rubropunctatin ได้จาก *M. rubropunctatus* Sato แยก monascin และ monascorubrin ได้จาก *M. purpureus* Went และแยก monascin ได้จาก *M. rubiginosus* Sato นอกจากนี้ Manchand and Whalley (1973) ทำการแยกสีจาก *M. anka* Sato และพบสารสีเหลืองคือ ankaflavin ซึ่งมีโครงสร้างใกล้เคียงกับ monascin

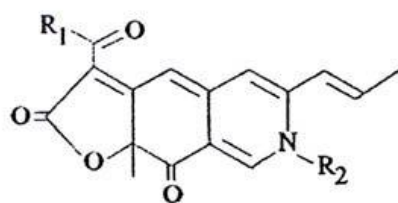
Sweeny *et al.* (1981) ได้แบ่งชนิดของสีบริสุทธิ์ที่เชื้อราผลิตออกมาได้เป็น 3 กลุ่ม ที่ได้จากการสกัดสีของ *M. anka* จากข้าวแดงให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ สารสีแดง ประกอบด้วย rubropunctamine และ monascorubramine สารสีส้ม ประกอบด้วย rubropunctatin และ monascorubrin และสารสีเหลือง ประกอบด้วย monascin และ ankaflavin ซึ่งสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 3 Yongsmith *et al.* (1993) พบโครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 ในอาหารเหลวที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง เปปโตน และ กรดกลูตามิก เป็นส่วนประกอบ ที่พีเอชเริ่มต้น 2.5 โดยสารสีเหลืองนี้ใช้ชื่อว่า yellow pigment II ซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร มีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_{22}H_{23}O_5$  แสดงดังภาพที่

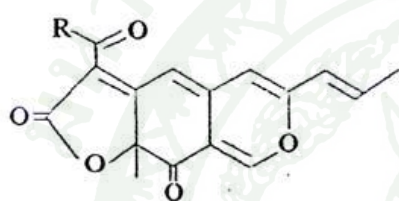
4

Jongrungruangchok *et al.* (2004) พบโครงสร้างสีเหลืองตัวใหม่ของ *M. kaoliang* KB20M10.2 ซึ่งเป็นมิวแทนต์สีเหลืองที่เลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิ จากการสกัดด้วย  $CH_2Cl_2$  แล้ว แยกสารสีโดยใช้ Sephadex LH-20 และ Si gel chromatography สีเหลืองใหม่ที่พบ ได้แก่ monacusone A ( $C_{13}H_{18}O_5$ ) และ monascusone B ( $C_{17}H_{18}O_5$ ) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างด้วย NMR แล้วมีโครงสร้างดังภาพที่ 5

Campoy *et al.* (2006) พบโครงสร้างสีแดงและสีเหลืองตัวใหม่ผลิตโดย *M. purpureus* HP14 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติม hexanoic acid แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ใช้ photodiode detector ที่ความยาวคลื่น 520 และ 390 นาโนเมตรตามลำดับ โครงสร้างสี 2 โครงสร้าง จากจำนวนที่พบทั้งหมด 5 โครงสร้าง ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย NMR ตัวแรกคือ R3 มีชื่อ โครงสร้างทางเคมีว่า 9-hexanoyl-3-(2-hydroxypropyl)-6a-methyl-9,9a-dihydro-6H-furo[2,3-h] isochromene-6,8-(6aH)-dione ตัวที่สองคือ Y3 มีชื่อ โครงสร้างทางเคมีว่า 4-[2,4-dihydroxy-6-(3-hydroxybutanethioxy)-3-methyl-phenyl]3,4-dihydroxy-3,6-dimethylheptanoic acid ดังภาพที่ 6 ทั้งสองตัวนี้สามารถละลายน้ำได้ดี



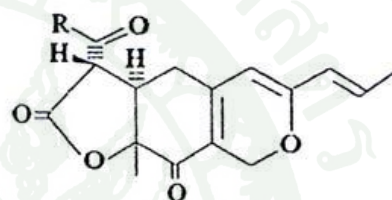
|                              | R <sub>1</sub>                   | R <sub>2</sub> |
|------------------------------|----------------------------------|----------------|
| 1 Rubropunctamine            | n-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> | H              |
| 2 Monascorubramine           | n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> | H              |
| 3 N-glucosylrubropunctamine  | n-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> | glucose        |
| 4 N-glucosylmonascorubramine | n-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> | glucose        |



5 Rubropunctatin

6 Monascorubrin

R  
n-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>  
n-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>



7 Monascin

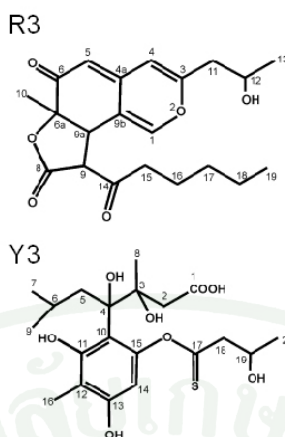
8 Ankaflavin

R  
n-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>  
n-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>

ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสารสีที่แยกได้จากเชื้อราโมแนสคัส

ที่มา: Sweeny *et al.* (1981)





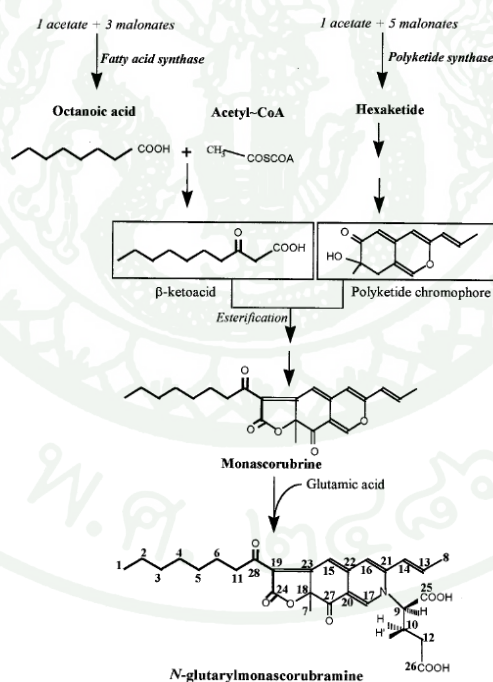
ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของสารสีแดง (R3) และสีเหลือง (Y3) ที่แยกได้จาก *M. purpureus* HP14

ที่มา: Campoy *et al.* (2006)

### 2.1.2 การสังเคราะห์สารสีของเชื้อราโมแนสคัส

สีจากเชื้อราโมแนสคัสเป็นสารประเภท polyketide ซึ่งเกิดจากการรวมกันระหว่าง อะซีเตต (acetate) 1 โมเลกุลกับมาโลเนต (malonate) 5 โมเลกุล โดยเอนไซม์ polyketide synthase เกิดเป็น hexaketide chromophore โดยกระบวนการจะดำเนินต่อไปเรื่อยๆจนได้ polyketide chromophore ซึ่งจะมารวมกับกรดไขมันขนาดกลาง (medium-chain fatty acid) เช่น octanoic acid ที่ถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (fatty acid biosynthetic pathway) โดยปฏิกิริยา trans-esterification เกิดเป็นสารสีส้ม คือ monascorubrin (หรือได้ rubropunctatin ถ้ากรดไขมันที่ทำปฏิกิริยา trans-esterification กับ polyketide chromophore เป็น hexanoic acid) จากนั้นสารสีส้ม monascorubrin จะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) แล้วได้เป็นสารสีเหลือง คือ ankaflavin (หรือได้สารสีเหลือง monascin จากสารสีส้ม rubropunctatin) ในขณะที่สารสีแดงซึ่งได้แก่ monascorubramine และ rubropunctamine เกิดจากสารสีส้มทำปฏิกิริยา amination กับ  $\text{NH}_3$  units (Kurono *et al.*, 1963; Turner, 1971; Manchand and Whalley, 1973; Hajaj *et al.*, 2000) ดังแสดงในภาพที่ 7

Carels and Shepherd (1977) ศึกษาการสังเคราะห์สีของเชื้อราโมแนสคัส พบว่าเชื้อราสามารถสังเคราะห์สารสีส้ม monascorubrin หรือ rubropunctatin ได้เท่านั้น ส่วนสีอื่นเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพการเลี้ยงเชื้อ โดยสีแดงเกิดจากสีส้มที่เชื้อสังเคราะห์ได้แล้วทำปฏิกิริยากับหมู่  $-NH_2$  ของกรดอะมิโน ได้เป็น monascorubramine หรือ rubropunctamine ส่วนสีเหลืองนั้น สันนิษฐานว่าเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของสารสีส้มกลายเป็น monascin หรือ ankaflavin แต่ Feilding *et al.* (1961) พบว่าเชื้อราโมแนสคัสสร้างได้เฉพาะสีส้มและสีเหลืองเท่านั้น ขณะที่สีแดงเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสีส้มและสีเหลือง ฉะนั้นเมื่อนำสีมาสกัดตรวจดูด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ได้ multi-peaks ที่ 400 และ 500 นาโนเมตรโดยทั่วไป แต่จากการทดลองของ Yongsmith *et al.* (1990) และสมชาย (2536) พบว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ KB20M10.2 ซึ่งเป็นมิวแทนท์ที่ผลิตสีเหลืองที่ single peak ที่ 370 นาโนเมตร สามารถผลิตสีเหลืองออกมาได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฟือซเป็นกลางและมีหมู่เอมีนจากกรดอะมิโนมากเกินไปในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นอาจสรุปได้ว่ากลไกการผลิตสีอาจมีปัจจัยอื่น ๆ เกี่ยวข้องได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น



ภาพที่ 7 เส้นทางชีวสังเคราะห์สารสีของเชื้อราโมแนสคัส

ที่มา: Hajjaj *et al.* (2000)

### 2.1.3 ความปลอดภัยของสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

บุษบา และวรรณภา (2528) ศึกษาความปลอดภัยของสีจากเชื้อราโมแนสคัส โดยทำการวิเคราะห์หาโลหะหนักได้แก่ โครเมียม ตะกั่ว และสารหนูในสารสี พบว่าไม่มี โลหะหนักทั้ง 3 ชนิด และเมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษในไขไก่ฟักเทียบกับการฉีดด้วยน้ำกลั่น ตามวิธีของ AOAC พบว่าไขไก่ฟักที่ถูกฉีดด้วยน้ำสีมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับไขไก่ฟักควบคุม ซึ่งฉีดด้วยน้ำกลั่น ต่อมาบุษบา และคณะ (2531) ได้ทดสอบความเป็นพิษของสีที่ได้จากเชื้อรา โมแนสคัสต่อการฟักตัวของไขไก่ต่อการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมของเม็ดเลือดขาวและต่อ หนูทดลอง ผลพบว่าสีไม่มีพิษต่อการฟักตัวของไขไก่ ต่อการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมของเม็ดเลือด ขาว และไม่พบความผิดปกติใดๆ ในหนูทดลอง ซึ่งตรงกับการทดสอบความเป็นพิษของสีจาก เชื้อราโมแนสคัสในหนูทดลอง นอกจากนี้ รวัช และคณะ (2530) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบผล ระหว่างสีปองโซ 4 อาร์ ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์กับสีจากเชื้อราโมแนสคัสในการแสดงออกต่อ โครโมโซมพบว่าสีปองโซ 4 อาร์ ทำให้โครโมโซมของคนเกิดความผิดปกติสูงถึง ร้อยละ 28.64 ขณะที่สีจากเชื้อราโมแนสคัสไม่ทำให้โครโมโซมของคนผิดปกติ Izawa *et al.* (1997) สกัดสีแดง และสีเหลืองที่ได้จาก *M. anka* และ *M. purpureus* ที่ใช้เป็นสีผสมอาหารมาทดสอบโดยใช้ Ames test ว่ามีความสามารถในการเป็นสารที่ก่อให้เกิด มิวเตชันหรือไม่ ผลปรากฏว่าสีที่นำมาทดสอบ ไม่มีความเป็นมิวตาเจน นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งกิจกรรมของ 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b] indole [Try-P-2(NHOH)] ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของสารมิวตาเจนในกลุ่ม heterocyclic amine ได้อีกด้วย เช่นเดียวกับการทดลองของ Watanabe *et al.* (1999) ที่พบว่าสีผสมอาหารสีแดง และสีเหลืองของเชื้อราโมแนสคัสนั้นสามารถทำให้ Trp-P-2(NHOH) เสื่อมสภาพได้บางส่วนหรือ ส่วนใหญ่นั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของสี และงานวิจัยของ Kruawan *et al.* (2005) ตรวจพบสมบัติของสี ที่มีฤทธิ์ต้านการก่อให้เกิดมิวเตชันในปฏิกิริยาของไนโตรที่และอะมิโนไพรีนในเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์พ่อแม่ KB13.1 สายพันธุ์มิว-แดนที่สีแดง KB10M16 และสายพันธุ์มิวแดนที่สีเหลือง KB20M10.2 แต่ยังไม่ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสี

## 2.2 สารต้านคอเลสเตอรอล (โมนาโคลิน เค)

### 2.2.1 การผลิตสารลดปริมาณคอเลสเตอรอล (โมนาโคลิน เค)

โมนาโคลิน เค (Monacolin K) ( $C_{24}H_{46}O_3$ ) คือสารโพลีคีไตด์ที่ถูกคัดแยกครั้งแรกจากเชื้อราสกุลโมแนสคัส โดยพบว่าเป็นสารที่มีโครงสร้างเคมีเดียวกับ lovastatin (Endo, 1979, 1980) โมนาโคลิน เค เป็นชนิดหนึ่งของสารในกลุ่มโมนาโคลิน (Ma *et al.*, 2000) ที่มีอย่างน้อย 6 ชนิด ชื่อว่า monacolin J, K, L และ X, dihydromonacolin K, และ dihydromonacolin L (Endo *et al.*, 1985 a,b)

มีการศึกษาวิธีสำหรับการวิเคราะห์หา lovastatin และ statin จากตัวอย่างโดยอาศัยพื้นฐานการวิเคราะห์จาก High-performance liquid chromatography (HPLC) และ LC-MS

Li *et al.* (2004) ได้พัฒนาวิธี chemical fingerprint-profiling method โดยใช้ HPLC โดยใช้ photodiode array (PDA) detector และ tandem mass spectrometry (MS/MS) โดยวิธีนี้ได้ fingerprint profile ที่มีสารประกอบกลุ่มโมนาโคลินส์ 14 ชนิด ประกอบด้วย Monacolin K (mevinolin), J, L, M, และ X และกลุ่ม hydroxyl acid โดยรู้จักกันในชื่อ dehydromonacolin K, dihydromonacolin L, compactin, และ a-hydroxy-3, 5-dihydromonacolin L ในเชื้อราโมแนสคัสสปีชีส์ ดังแสดงในภาพที่ 8 และอีกวิธีการตรวจปริมาณโมนาโคลินโดย Li *et al.* (2005) โดยใช้ reversed phase HPLC (RP-HPLC) ใช้ PDA detector ปรากฏรูปแบบฟิสิกส์ทั้งหมด 7 พีก หลักๆ ของกลุ่มโมนาโคลิน วิธีนี้ใช้  $C_{18}$  reverse-phase column โดยใช้ linear gradient ของ 0.1 เปอร์เซ็นต์ของ trifluoroacetic acid และ acetonitrile เป็น mobile phase ตั้งค่า detection wavelength ไว้ที่ 237 นาโนเมตร Li *et al.* (2005) ได้ใช้วิธีนี้สำหรับการศึกษาความคงตัวของโมนาโคลิน เค ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ต่างกัน ผลการทดลองพบว่าโมนาโคลินนั้นไวต่อแสงและความร้อน

โมนาโคลินจะสลายตัวอย่างมีนัยสำคัญภายใต้สภาวะที่มีความชื้นและอุณหภูมิสูง (ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ที่ 60 องศาเซลเซียส) และที่มีแสง โดยโมนาโคลิน เค และกลุ่ม hydroxyl acid form ของโมนาโคลิน เค จะ dehydrated และเปลี่ยนไปเป็น dehydromonacolin K ที่อุณหภูมิสูง (80 องศาเซลเซียส) ขณะที่ monacolin K, J และ L จะเปลี่ยนไปเป็นกลุ่ม hydroxyl acid form ที่เกี่ยวข้องที่สภาวะความชื้นสูง (ความชื้นสัมพัทธ์ 92.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)

โมแนสค์บางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิตโมนาโคลิน เค (ตารางที่ 1) ซึ่งสารสีจากโมแนสค์และโมนาโคลิน เค มีการผลิตโดยเอนไซม์ที่คล้ายหรือเป็นชนิดเดียวกัน (Turner and Aldridge, 1983) โดยความสามารถในการผลิตโมนาโคลิน เค ของเชื้อราโมแนสค์นั้นสามารถทำนายได้จากสีของเส้นใยได้

Response surface methodology (RSM) ถูกนำมาใช้โดย Chang *et al.* (2002) โดยศึกษาผลของอาหารที่ประกอบด้วยข้าวและกลีเซอรอลซับซ้อนในการผลิตโมนาโคลิน เค โดย *M. ruber* โดยวิธีผสมการหมักแบบแข็ง (หรือหมักแบบเปียก) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยสภาวะที่ดีที่สุด (กรัมต่อลิตร) โดยใช้ แป้งข้าว 34.4 กรัม เปปโตเน 10.8 กรัม กลูโคส 129 กรัม  $\text{KNO}_3$  85.0 กรัม  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.0 กรัม และกลีเซอรอล 36.4 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยสูตรนี้สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้ 157 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังการเลี้ยงเชื้อได้ 10 วัน

จากการศึกษาของ Miyake *et al.* (2006) พบว่า *M. pilosus* ต้องการความเข้มข้นของเปปโตเนอินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อการผลิตโมนาโคลิน เค ให้ได้ปริมาณมากๆ โดยได้ทำการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-glycerol-peotone (GGP) ที่มี กลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล 7 เปอร์เซ็นต์ เปปโตเน 3.8 เปอร์เซ็นต์  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 เปอร์เซ็นต์ และ  $\text{NaNO}_3$  0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยสูตรอาหารนี้ *M. pilosus* MK-1 สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้มากที่สุด

สำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค ในผลิตภัณฑ์ข้าวหมักโดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม Wang and Lin (2007) ได้พัฒนากระบวนการหมักได้สำเร็จโดยเลี้ยงเชื้อที่มีการผลิตซิทรินิน (citrinin) ต่ำ มีโมนาโคลิน เค สูง ในสายพันธุ์ *M. puepuewaua* บนข้าวโดยใช้ ratory vessel โดยให้มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นน้อยที่สุดเพราะโมแนสค์มีอัตราการเจริญช้า กล่าวโดยสรุปคือ ใช้ข้าวที่นึ่งสุกแล้วปลูกเชื้อด้วย *M. purpureus* โดยให้หัวเชื้อปริมาณ 100 สปอร์ต่อกิโลกรัมข้าวดิบ บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันจนกระทั่งข้าวหนึ่งเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม โดยข้าวแดงที่ใช้เป็น “seed koji” และใช้ seed koji ไปผสมกับข้าวหนึ่งใหม่โดยใช้อัตราส่วน 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวหนึ่งเสร็จ ซึ่งการแช่ข้าวในน้ำสองครั้งและเลี้ยงเชื้อ 6 วัน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตข้าวหมักโมแนสค์ได้สีแดงดี

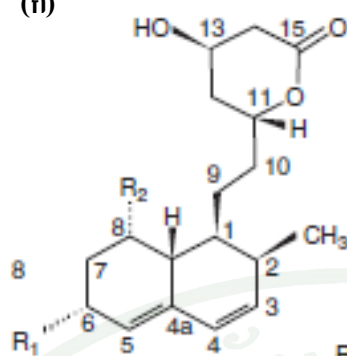
ซึ่งการสร้างสรรค์ทุติยภูมิเมทาบอไลต์ของเชื้อราโมแนสคัสปีชี่นั้นมีผลจากสถานะการเลี้ยงเชื้อ Lee *et al.* (2006) ใช้ มันเทศ (*Ipomoea batatas*) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) และ กลอย (*Dioscorea batatas*) มาเป็นสับสเตรทตัวเลือกที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค ผลการทดลองพบว่า *M. purpureus* NTU 301 นั้นใช้กลอยเป็นสับสเตรทได้ดีและสามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้ถึง 2,584 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งได้มากถึง 5.37 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผลของการใช้ข้าวเป็นสับสเตรทสำหรับการเก็บผลิตภัณฑ์ข้าวแดงผง นั้นพบว่าสถานะที่ให้ปริมาณโมนาโคลินลดลงคือ การเก็บที่ความชื้นและอุณหภูมิสูง (ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ 60 องศาเซลเซียส) และที่ที่มีแสงแดด ดังนั้นข้อแนะนำควรเก็บโมนาโคลินส์ไว้ที่เย็นและห่างไกลแสง (Li *et al.*, 2005)

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสที่สามารถผลิตโมนาโคลิน เค

| สายพันธุ์                   | การผลิตโมนาโคลิน เค | อ้างอิง                   |
|-----------------------------|---------------------|---------------------------|
| <i>M. ruber</i>             | 17.4 มก./ล.         | Endo, 1979                |
| <i>M. purpureus</i> NTU 601 | 0.53 มก./ล.         | Wang <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>M. ruber</i>             | 2.5-3.0 มก./ล.      | Wei <i>et al.</i> , 2004  |
| <i>M. pilosus</i>           | 2.52 มก./ ล.        | Cheen and Hu, 2005        |
| <i>M. purpureus</i> NTU 301 | 2.584 มก./ ล.       | Lee <i>et al.</i> , 2006  |
| <i>M. pilosis</i> MK-1      | 725 มก./ ล.         | Miyake และคณะ, 2006       |

ที่มา: Wang and Lin (2007)

(ก)

Mevinolin  
(monacolin K)CH<sub>3</sub>

Monacolin L

CH<sub>3</sub>

Monacolin J

CH<sub>3</sub>

Monacolin X

CH<sub>3</sub>

Monacolin M

CH<sub>3</sub>Compactin  
(ML-236B)

H

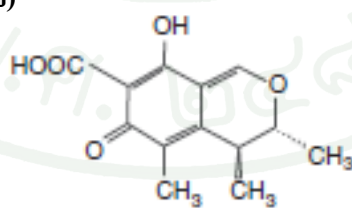
ML-236A

H

ML-236C

H

(ข)



Citrinin

ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ (ก) monacolin (ข) citrinin

ที่มา: Wang and Lin (2007)

### 3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและผลิตเมแทบอลิต์ของเชื้อราโมแนสคัส

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา สภาพการเลี้ยงเชื้อ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Carels and Shepherd, 1977)

#### 3.1 ชนิดของเชื้อราโมแนสคัส

Bridge and Hawksworth (1985) ได้จำแนกเชื้อราโมแนสคัสออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* และ *M. floridanus* โดยอาศัยความแตกต่างทางด้านสรีรวิทยาและการผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งในปัจจุบันได้มีการรวบรวมสายพันธุ์ของเชื้อราชนิดนี้กว่า 20 สายพันธุ์แล้ว (บุษบา, 2542)

ราข้าวแดงที่ใช้กันสมัยก่อนเป็นเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ป่า (wild type) ต่อมาทำการแยกเชื้อ จัดจำแนก และคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสีได้ดี โดยราข้าวแดงที่แยกได้ครั้งแรกจาก Chinese anka นั้นเป็น *M. purpureus* ต่อมาได้จัดจำแนกราข้าวแดงจากหลายประเทศแถบเอเชียตามระบบใหม่ โดยเน้นที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีได้เป็น 12 สายพันธุ์ (Iizuka and Lin, 1981) จนในปัจจุบันนี้มีสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสมากกว่า 20 สายพันธุ์แล้ว ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ก็จะให้ผลสีที่แตกต่างกันไป เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่นิยมใช้หมักข้าวแดง คือ *M. purpureus* และ *M. anka* (บุษบา, 2542) งานวิจัยในระยะต่อมาเป็นการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มการเจริญและเพิ่มความสามารถในการผลิตสี ตลอดจนการได้สีที่ต่างออกไปจากสายพันธุ์เดิมโดยใช้วิธีชักนำให้เกิดมิวเตชัน (สุภาพร, 2531; Lin and Suen, 1973; Hiroi et al., 1979; Lin and Iizuka, 1981; Yongsmith et al., 1990) นอกจากนี้ Kiyohara et al. (1990) มีการใช้เทคนิคขั้นสูงคือ โพรโทพลาสต์ฟิวชันระหว่างเชื้อรา *M. anka* กับ *Aspergillus oryzae* ซึ่งจัดเป็นการปรับปรุงสายพันธุ์อีกวิธีหนึ่ง

### 3.2 สภาพที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 3.2.1 การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง (solid cultivation)

การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสโดยการหมักแบบอาหารแข็ง เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้กันในการผลิตสีโดยเฉพาะประเทศจีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น อินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพของข้าวที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัส ได้แก่ สับสเตรต ความชื้น อุณหภูมิ พีเอช และอากาศ เป็นต้น สับสเตรตที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสที่ใช้ทั่วไปและทำเป็นการค้า ได้แก่ ข้าว

ซึ่ง Palo *et al.* (1960) ได้ปรับปรุงคุณภาพของข้าวแดงโดยทดลองใช้สายพันธุ์และสับสเตรตที่เหมาะสม ได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพ สามารถนำข้าวแดงนั้นมาเจือสีในอาหารได้ นอกจากนี้ยังมีสับสเตรตอื่นๆอีกเช่น ขนมอบ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง มันฝรั่ง มันเทศ และมันสำปะหลัง (พลาญแก้ว และ บุษบา, 2534ก) ความชื้นเริ่มต้นในการเลี้ยงนั้นมีความสำคัญมากต่อการเจริญ ชนิดและปริมาณ ของสารสีของเชื้อรา

Palo *et al.* (1960) พบว่าที่ความชื้นต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้การผลิตสี ของข้าวแดงที่ดี ต่อมาเจดชัย และคณะ (2519) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงของ *M. purpureus* K001 บนเมล็ดข้าวคือ 60 เปอร์เซ็นต์ Lotong and Suwanarit (1990) ทดลองเลี้ยง *Monascus* sp. NP1 เพื่อศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสบนข้าวหนึ่ง พบว่าที่ความชื้น 32.6 เปอร์เซ็นต์ในถุงพลาสติก สามารถทำให้เชื้อราโมแนสคัสผลิตข้าวแดงได้ดีที่สุด เนื่องจากที่เปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำเกินไปเชื้อจะเจริญได้น้อยและผลิตสีแดง แต่ถ้าวความชื้นเริ่มต้นสูงเกินไปจะไปเพิ่มการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสมากขึ้น ซึ่งกลูโคสนี้จะถูกใช้ในการผลิตเอทานอลแทนสี ดังนั้นถ้าปริมาณกลูโคสสูงเกินไปก็จะไปยับยั้งการผลิตสี

Han (1990) ได้ทำการคัดเลือก *Monascus* sp. จำนวน 13 สายพันธุ์ จากจำนวนทั้งหมด 125 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาการผลิตสีบนเมล็ดข้าว พบว่า *M. purpureus* ATCC 16365 ผลิตสีแดงได้ดีเมื่อความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ส่วน Johns and Stuart (1991) พบว่าที่ความชื้นเริ่มต้น 56 เปอร์เซ็นต์ *M. purpureus* FRR 2190 สามารถผลิตสีแดงออกสู่ภายนอกเซลล์ได้มากที่สุด ขณะที่ปลายแก้ว และ บุษบา (2534ข) พบว่าความชื้นเริ่มต้นประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงของ *M. kaoliang* และสีเหลืองของ *M. barkari* ส่วนนิตา (2537) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. KB11304 และ KB10M16 ที่ผลิตสีแดง และ KB20M10.2 ที่ผลิตสีเหลืองบนปลายข้าวหอมมะลิ พบว่าเชื้อราทั้งสามสายพันธุ์ผลิตสีได้ดีที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์

สำหรับฟิเอร์ในการเลี้ยงเชื้อรานั้นส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงฟิเอร์ก่อนไปทางกรด โดย Palo *et al.* (1960) รายงานว่า *M. purpureus* สามารถผลิตสีแดงได้ดีที่ฟิเอร์ 3 - 7.5 ต่อมา Han (1990) พบว่า *M. purpureus* ATCC 16365 นั้นผลิตสีแดงได้ดีที่ฟิเอร์เริ่มต้น 5-6 ซึ่งใกล้เคียงกับ Johns and Stuart (1991) ที่พบว่าฟิเอร์เริ่มต้น 6.0 เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงของ *M. purpureus* FRR 2190

ส่วนการให้อากาศ เชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าการเลี้ยง *M. purpureus* K001 โดยมีการเขย่าหรือให้อากาศจะช่วยให้เชื้อราผลิตสีแดงได้ดีและเร็วขึ้นเช่นเดียวกับ Chiu and Chan (1992) ศึกษาผลของการให้อากาศที่มีต่อการผลิตสีของเชื้อรา *M. purpureus* บนขานอ้อยซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร โดยเปรียบเทียบการเลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้กับการเลี้ยงแบบให้มีการหมุนของภาชนะ ซึ่งในการทดลองใช้ขวดเป็นภาชนะ พบว่าการเลี้ยงแบบให้มีการหมุนขวดนั้นเชื้อจะผลิตสีได้ดีกว่าการเลี้ยงแบบตั้งทิ้งไว้ธรรมดา 2-3 เท่า การให้อากาสนั้นเป็นการระบายความร้อนและรักษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับออกซิเจน

### 3.3 การเลี้ยงเชื้อโมแนสคัสในอาหารเหลว (submerged cultivation)

มีการศึกษาเชื้อราโมแนสคัสโดยการเลี้ยงในอาหารเหลวอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะต่างๆในการเลี้ยง ควบคุมการปนเปื้อน ประหยัดพื้นที่ในการทำงานและขยายขนาดการหมัก (scale-up) ได้ง่ายกว่าการหมักบนอาหารแข็ง (Carels and Shepherd, 1977, 1978, 1979; Broder and Koehler, 1980) จึงมีการพัฒนาระบบการเลี้ยงเพื่อการเจริญและการผลิตสีได้ดียิ่งขึ้น ปัจจุบันที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว ได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แหล่งไนโตรเจน สารที่จำเป็นต่อการเจริญ อุณหภูมิ ฟิเอร์ การให้อากาศ (aeration) และการกวน (agitation) เป็นต้น

Lin (1973) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อราโมแนสคัสที่เจริญได้ดีในอาหารเหลวจากหัวเชื้อที่ใช้ทำเห็ดเหียง พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างสีของ *Monascus* sp. F-2 คือ แป้งข้าวเจ้า มอลโตส และกาแลคโตส ตามลำดับ

ค.ศ. 1980 Broder and Koehler พบว่า *M. purpureus* NRRL2897 ผลิสีแดงได้ดีที่สุดในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลมอลโตสเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นน้ำตาลฟรุคโตสเข้มข้น 15.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในปีต่อมา

Wong *et al.* (1981) ศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสีของ *M. purpureus* N11S พบว่าเมื่อใช้กลูโคส 40 กรัมต่อลิตร จะใช้แอมโมเนียมไนเตรด 0.5 กรัมต่อลิตร การเจริญในสภาพที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูงเพียงอย่างเดียว จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรดซึ่งไม่เหมาะต่อการผลิตสี เนื่องจากเชื้อราต้องการอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

Lin and Demain (1991) พบการสร้างสีแดงของ *Monascus* sp. TTWMB6042 ดีที่สุดในอาหารเหลว เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นเด็คตริน (dextrin) รองลงมาคือ แป้ง กลูโคส มอลโตส และฟรุคโตสตามลำดับ ส่วนบุษบา และ วรรณภา (2528) ได้ศึกษาการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยใช้เชื้อราโมแนสคัส 15 สายพันธุ์ในการทดลองพบว่า *Monascus* sp. KB11304 ผลิสีแดงได้ดีที่สุดในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และได้ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของ *Monascus* sp. KB11304, KB21035 และ KB20322 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน พบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของ *Monascus* sp. KB11304 KB21035 และ KB20322 คือ 3.0 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดค่าสีแดงได้ 98 70 และ 51 หน่วยต่อมิลลิเมตรตามลำดับ

สมชาย (2536) พบว่า *Monascus* sp. KB20M10.2 ที่ผลิตสีเหลือง สามารถเจริญได้ดีที่สุดในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่คือ แลคโตส และซูโครส แต่สามารถผลิตสีได้ดีในน้ำตาลหลายโมเลกุล เช่น แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวเจ้า soluble starch และแป้งมันสำปะหลังเป็นต้น เมื่อเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสีเหลืองคือ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชเป็นกลาง และนิสา (2537) พบว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 สามารถเจริญและผลิตสีแดงได้ดีที่สุดในแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่เป็นน้ำตาล

กลูโคส ส่วนมิวแทนทีสีขาว KB20M1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดในแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานที่เป็นกลูโคส และมอลโตส ในอาหาร defined medium ที่พีเอช 7.0

ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับแหล่งไนโตรเจนนั้น Lin (1973) พบว่า *Monascus* sp. F-2 สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิดในการผลิตสีแดง ได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต ส่วนเปปโตนและยีสต์เอกซ์แทรค ไม่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อให้เชื้อผลิตสีแดง เช่นเดียวกับการทดลองของ Su and Huang (1980) ที่พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงของ *M. anka* V-204 คือ โมโนโซเดียมกลูตาเมต เช่นเดียวกับ Lin and Demain (1991) ที่พบว่า โมโนโซเดียมกลูตาเมต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงของ *Monascus* sp. TTWMB6042 ส่วน แอมโมเนียมคลอไรด์เหมาะสมต่อการเจริญ ขณะที่ Broder and Koehler (1980) พบว่าเมื่อใช้ ยีสต์เอกซ์แทรค เข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับ *M. purpureus* NRRL2897 โดย เชื้อจะผลิตสีแดงที่มีความบริสุทธิ์ของสี 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 611 นาโนเมตรได้ดีที่สุด ส่วน Wong *et al.* (1981) พบว่าโซเดียมไนเตรตหรือโพแทสเซียมไนเตรต เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตรนั้นเหมาะสมต่อการผลิตสีมากที่สุด แต่ถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 10 กรัมต่อ ลิตรจะก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์และยังยับยั้งการผลิตสีแดงของเชื้อรา วรรณภา (2529) พบว่า แป้งถั่วเหลืองความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงของ *Monascus* sp. KB11304 ขณะที่เปปโตนที่ความเข้มข้นเดียวกันจะมีผลต่อการเจริญ ส่วนยีสต์เอกซ์แทรคจะมีผลต่อการเจริญ และการผลิตสี เช่นเดียวกับสุภาพร (2531) ที่พบว่าแป้งถั่วเหลืองเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เหมาะต่อ การผลิตสีแดงของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 และมิวแตนท์ KBU2069 ส่วน แป้งถั่วเหลืองเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์เหมาะกับการผลิตสีแดงของมิวแตนท์ KBN4069 สำหรับแหล่ง ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เปปโตน ยีสต์เอกซ์แทรค แอมโมเนียมซัลเฟต และโมโนโซเดียมกลูตาเมตตามลำดับ สมชาย (2536) ศึกษา แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสีเหลืองของเชื้อราโมแนสคัสมิวแตนท์ KB20M10.2 พบว่า แหล่งไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ที่ให้สีเหลืองได้ดีที่สุดคือ โพแทสเซียมไนเตรต แคลเซียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจน ประเภทสารอินทรีย์ที่ให้สีเหลืองสูงสุดได้แก่ แป้งถั่วเหลือง รองลงมาคือ เปปโตน ยีสต์เอกซ์แทรค และ มอลท์เอกซ์แทรค ตามลำดับ ขณะที่นิสา (2537) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสีแดงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรของเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 คือ แอมโมเนียมอะซิเตต ส่วนมิวแตนท์สีขาว KB20M1 จะสามารถเจริญ ได้ดีในแหล่งไนโตรเจนที่เป็น แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรต และโมโนโซเดียมกลูตาเมตได้

ใกล้เคียงกัน ต่อมา Yongsomth et al. (1993) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนใน *Monascus* sp. KB10 พบว่าเปปโตโนมีผลต่อการผลิตสี ส่วนยีสต์เอกซ์แทรกมีผลต่อการเจริญมากกว่าการผลิตสี และมอลท์เอกซ์แทรกมีผลต่อการเจริญและการผลิตสีน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้เปปโตโนเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับกรดกลูตามิกเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์จะสามารถเพิ่มการผลิตสีเหลืองได้สูงกว่า 2 เท่าของการใช้เปปโตโนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว

ในส่วนผลของสารที่จำเป็นต่อการเจริญ (growth factor) McHan and Johnson (1970) พบว่าการเติมวิตามิน 5 ชนิดคือ ไพริดอกซิน (pyridoxin) ไบโอติน (biotin) ไธอะมีน (thiamine) ไนอะซิน (niacin) และไรโบฟลาวิน (riboflavin) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek Dox นั้นไม่มีผลกระตุ้นการเจริญของเชื้อราโมแนสคัส แต่การเติมกรดอะมิโนและเกลือแร่จะช่วยให้การเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยสังกะสี 800 ไมโครกรัมต่อลิตรจะให้การเจริญดีกว่าแคลเซียม โมลิบดีนัม ทองแดง และแมงกานีส นอกจากนี้เชื้อราจะเจริญได้ดี ยิ่งขึ้นเมื่อเติมสังกะสี 800 ไมโครกรัมต่อลิตร ร่วมกับกรดอะมิโน ได้แก่ ทริปโตเฟน 0.086 กรัมต่อลิตร ลิซีน 0.53 กรัมต่อลิตร กรดแอสปาดิก 0.845 กรัมต่อลิตร ไทโรซีน 0.26 กรัมต่อลิตร ไกลซีน 2.42 กรัมต่อลิตร และฮิสตามีน 0.143 กรัมต่อลิตร แต่ขณะเดียวกันถ้าเติมสังกะสีความเข้มข้นสูงเกินไปจะเป็นพิษต่อเซลล์ (Bau and Wong, 1979) Lin and Demain (1991) พบว่าฟอสเฟตความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ขึ้นไป มีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัส ส่วนแมกนีเซียมซัลเฟตเข้มข้น 16 มิลลิโมลาร์ จะทำให้การผลิตสีเพิ่มขึ้น สำหรับแมกนีเซียมซัลเฟตและเฟอร์รัสซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.018 และ 0.036 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับจะช่วยส่งเสริมการเจริญและการผลิตสี

ส่วนสภาวะอื่นๆนอกเหนือจากองค์ประกอบของอาหารมีการศึกษาโดย Lin (1973) ทำการศึกษาการผลิตสีของ *Monascus* sp. F-2 ในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวเจ้า (rice powder) เป็นองค์ประกอบ แล้วเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ในฟลาस्कโดยทดสอบที่อุณหภูมิช่วง 27 – 40 องศาเซลเซียส ฟิเอร์เริ่มต้นตั้งแต่ 2-10 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสีได้แก่ 32 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงเกิน 37 องศาเซลเซียสการผลิตสีจะลดลง ส่วนค่าฟิเอร์ที่เหมาะสมคือ ฟิเอร์ 6.0 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Manandhar and Apinis (1971) ที่เชื้อราจะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิช่วง 30 - 37 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงของฟิเอร์ขณะที่เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสจะไปมีผลต่อการผลิตสีในอาหารเหลว ถ้าฟิเอร์เป็นกลางเชื้อจะผลิตสีแดง แต่ถ้าฟิเอร์เป็นกรดเชื้อจะผลิตสีส้ม นอกจากนี้ที่ฟิเอร์เป็นกรดจะทำให้การสร้างโคโคนิเดียลดลง แต่การผลิตสีจะสูงขึ้นเนื่องจากที่ฟิเอร์ต่ำกลูโคสและฟอสเฟตจะถูกนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ จึงเหลือเพียงเล็กน้อยสำหรับสร้างโคโคนิเดีย (Carels and Shepherd, 1977, 1978, 1979) Su and Huang (1980) ศึกษาปัจจัย

ที่ทำให้ *M. anka* V-204 ผลิตสีได้ดีที่สุด พบว่าอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.0 จะผลิตสีได้ดีที่สุด Yongsomsmith *et al.* (1993) รายงานเป็นครั้งแรกว่า *Monascus* sp. KB10 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ป่าและสร้างสีแดงในสภาวะปกตินั้น สามารถผลิตสีเหลืองที่สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 330 หรือ 370 นาโนเมตรได้ที่พีเอชเริ่มต้น 2.5 หรือ 4.5 ตามลำดับ ผลิตสีเหลืองได้สูงสุดในอาหารเหลวพีเอชเริ่มต้น 2.5 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 ตามลำดับ

Hamdi *et al.* (1996) ศึกษาการให้อากาศในการเลี้ยงเชื้อ *M. purpureus* CBS10907 ในน้ำลูกแพรเจี๊ยะงา ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 พบว่าการให้อากาศในถังหมักจะไปมีผลต่อการใช้น้ำตาล การเกิดเอทานอล และการผลิตสีของเชื้อรา

Wu *et al.* (2000) ทำการเลี้ยง *M. purpureus* CCRC31615 ในอาหารที่ใช้แป้งข้าวเจ้าเป็นสับสเตรตในการหมักเปียก โดยพบว่าถังหมักแบบใช้ใบพัดนั้นไม่เหมาะต่อการเลี้ยงเชื้อจึงทดลองทำในถังหมักแบบพ่นอากาศ (bubble column) ต่อมาจึงได้พัฒนาไปใช้ถังหมักแบบพ่นอากาศร่วมกับ wire-mesh draft tube และเพิ่มการให้อากาศ พบว่าการใช้ถังหมักแบบดังกล่าวสามารถให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้ถังหมักแบบพ่นอากาศธรรมดาถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะเดียวกัน

#### 4. เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ใช้มันสำปะหลังได้ดีในห้องปฏิบัติการ ภายใต้การควบคุมของ ศ. ดร. บุญบา ยงสมิทธิ์

บุญบา และ วรณภา (2529) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อราโมแนสคัสจากตัวอย่างเห็ดหูหนูขาวแดง รวม 13 ตัวอย่าง ได้เชื้อราโมแนสคัส ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ เชื้อราโมแนสคัสจากประเทศญี่ปุ่น 8 สายพันธุ์ และราแดงจากภาควิชาจุลชีววิทยา 1 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 49 สายพันธุ์ในสภาพ submerged culture ทำการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตสีแดงเข้ม วัดได้ในช่วง 12-26 หน่วยที่ O.D. 550 นาโนเมตร เป็นจำนวน 12 สายพันธุ์ หลังจากนั้นนำมาศึกษาต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MY ที่ดัดแปลงโดยมีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลเด็กโทน สามารถคัดเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตสีแดงนอกเซลล์ได้ดีไว้ 1 สายพันธุ์ คือ *Monascus* sp. KB 11304 ได้สีแดงเข้มในช่วง 36.68 หน่วยที่ O.D. 550 nm และสายพันธุ์ที่มีเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงคือ *Monascus* sp. KB 20322 และ *Monascus* sp. KB 21035 ได้กิจกรรมเอนไซม์ 1,911.91 และ 1,889.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมตามลำดับ ในขณะที่ *Aspergillus awamori* NSW-1 (reference culture) ผลิตได้สูงสุดที่ 1,636.36 หน่วยต่อมิลลิกรัม

ต่อมา สุภาพร (2531) นำ *Monascus* sp. KB11304 มาทำการกลายพันธุ์โดยการใส่แสงอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา สาร Ethylmethanesulfonate (EMS) และ N-methy-N'-nitrosoguanidine (NTG) ได้ทั้งหมด 324 สายพันธุ์ เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสีแดงนอกเซลล์และเอนไซม์ย่อยแป้งในอาหารที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 3 เปอร์เซ็นต์ แป้งถั่วเหลือง 4 เปอร์เซ็นต์และเติม Tween 80  $1.33 \times 10^{-2}$  มิลลิลิตรต่อลิตร pH เริ่มต้น 7.0 เชื้อเริ่มต้นอายุ 10 วัน จำนวน 4 ชั่น บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน พบว่า มิวแทนต์ที่ได้จากการชักนำโดยแสงอุลตราไวโอเลต นาน 20 นาที และสาร NTG ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม นาน 40 นาที คือ *Monascus* sp. KBU 2069 และ *Monascus* sp. KBN 4096 ตามลำดับ เป็นมิวแทนต์ที่มีความสามารถทั้งการผลิตสีแดงนอกเซลล์ และการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงกว่าสายพันธุ์ KB 11304 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดิมนำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญกับการสร้างสีและเอนไซม์ย่อยแป้งในอาหารที่เหมาะสม พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 7 วัน สายพันธุ์ KB 11304 สามารถสร้างสีได้สูงสุด 100.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ KBU 2069 และ KBN 4096 สามารถสร้างสีได้สูงสุด 123.0 และ 136.6 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งวัดในรูปของกิจกรรมเอนไซม์ พบว่าสายพันธุ์ KB 11304, KBU 2069 และ KBN 4096 สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงสุด 17,884.39 39,518.04 และ 22,694.59 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 6 วัน การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ KBU 2069 การเจริญของเส้นใยมีลักษณะฟูมากกว่าอีก 2 สายพันธุ์อย่างชัดเจน และการสร้างโคนิเดียลดลงอย่างมาก เส้นใยมีลักษณะฟูมากกว่าอีก 2 สายพันธุ์ มีลักษณะการเจริญคล้ายกัน แต่สายพันธุ์ KBN 4096 มีการเจริญช้ากว่าสายพันธุ์เดิมมาก ในการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเส้นใยและสปอร์ของสายพันธุ์ KBU 2069 มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ KB 11304 และสายพันธุ์ KBN 4096 โดยพื้นผิวของเส้นใยและสปอร์มีลักษณะเป็นลายคล้ายเม็ดทรายเกาะติดอยู่ ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ มีลักษณะพื้นผิวของเส้นใยและสปอร์เป็นรอยริ้วๆ

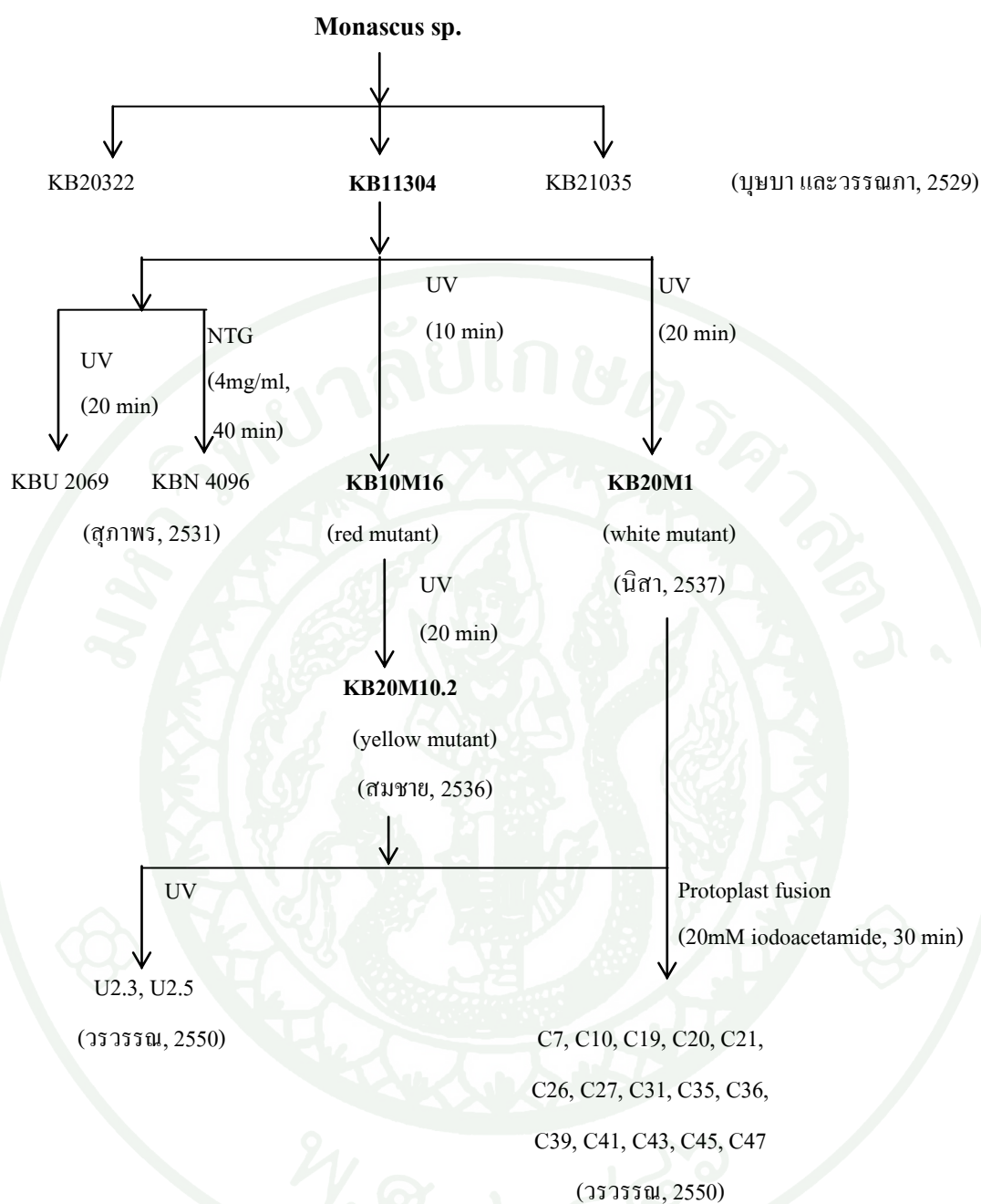
สมชาย (2536) นำเชื้อ *Monascus* sp. KB 11304 มาปรับปรุงพันธุ์โดยฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 10 นาที ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสายพันธุ์ KB 10M16 ซึ่งผลิตสีแดงได้สูงขึ้น เมื่อนำสายพันธุ์นี้มาชักนำกลายพันธุ์อีกครั้งโดยฉายแสงอุลตราไวโอเลต เป็นเวลา 20 นาที ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่คือ *Monascus* sp. KB 20M10.2 สร้างสีเหลือง (ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด 370 นาโนเมตร) แทนที่จะสร้างสีแดง (ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด 420 และ 500 นาโนเมตร) ในอาหารที่มี pH เป็นกลาง

นิสา (2537) ได้ทำการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์พ่อแม่ KB 11304 โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 20 นาที ได้สายพันธุ์ *Monascus* sp. KB20M1 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารสี และได้ทดลองเปรียบเทียบสมบัติบางประการกับสายพันธุ์พ่อแม่ (KB 11304) สายพันธุ์กลายสีแดง (KB 10M16) และสีเหลือง (KB20M10.2) ทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ความสามารถในการสร้างสารสี เอนไซม์ เอทานอล และสารต่อต้านแบคทีเรีย รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติของน้ำที่พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ KB20M1 ให้ลักษณะการเจริญเป็นเส้นใยฟู พบรอยพับรอบโคโลนีชัดเจน เจริญได้ดีบนอาหาร PDA มีเส้นใยขาวอมบาง และสร้างสปอร์ปริมาณมาก เช่นเดียวกับสายพันธุ์พ่อแม่ ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ KB10M16 และ KB20M10.2 ต่างมีลักษณะการเจริญเป็นเส้นใยสั้นติดผิวหน้าอาหารวัน พบรอยพับรอบโคโลนีเมื่ออายุน้อยๆ เจริญได้ดีบนอาหาร PDA ให้เส้นใยอ้วนสั้น และสร้างสปอร์จำนวนน้อย

เชื้อราสายพันธุ์ KB11304 และ KB20M1 เจริญได้ดีในอาหารเหลว SS MYS และ defined medium แต่อีกสองสายพันธุ์ที่เหลือนั้นเจริญ และสร้างสารสีได้ดีในอาหาร SS และ MYS medium แต่เจริญน้อยมากในอาหาร defined medium กรณีเลี้ยงเชื้อราบนปลายข้าวหอมมะลิ พบว่าเชื้อราสร้างสารสีได้ดีในสัปดาห์ความชื้นเริ่มต้น 38.0 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราสายพันธุ์ KB20M1 สร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และแอลฟาอะมิเลสได้ดีที่สุด แต่สร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ดีใกล้เคียงกับสายพันธุ์ KB20M10.2 และสร้างเอทานอล และสารต่อต้านแบคทีเรียได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่น

วรวรรณ (2550) ได้ปรับปรุงการเจริญและการผลิตสีเหลืองของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์ที่สีเหลืองคือ KB20M10.2 โดยใช้เทคนิคโพรโตพลาสต์มิวเตชันและโพรโตพลาสต์ฟิวชัน พบว่าการทำโพรโตพลาสต์มิวเตชัน ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต สาร ethylmethanesulfonate และสาร N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine ได้มิวแตนท์สีเหลืองใหม่ทั้งหมด 235 ไอโซเลตแต่มี 2 ไอโซเลตที่ได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตคือ U2.3 และ U2.5 ที่คงตัวและผลิตสีเหลืองที่มีความยาวคลื่น 370 นาโนเมตรได้สูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลือง KB20M10.2 เท่ากับ 6.59 และ 20.73 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สายพันธุ์ที่ปรับปรุงใหม่ทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกับสายพันธุ์เดิม แต่มีการใช้แหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสีต่างกัน นอกจากนี้ได้ทำการโพรโตพลาสต์ฟิวชันระหว่างเชื้อราโมแนสคัสมิวแตนท์สีเหลือง KB20M10.2 ซึ่งเป็น adenine auxotroph ที่เจริญเข้ากับมิวแตนท์สีขาว KB20M1 ซึ่งเป็น prototroph ที่เจริญเร็ว ผลปรากฏว่าโคโลนีที่ขึ้นบน selective medium (MM) นั้นเป็นโคโลนีสีขาวทั้งหมดทำให้ยากต่อการจำแนกฟิวแซนท์จากอาหารวัน MM ได้ จึงได้ทดลองพัฒนาเทคนิคโพรโตพลาสต์ฟิวชันโดยนำมิวแตนท์

สีกาว KB20M1 มาบ่มด้วยสารละลาย iodoacetamide เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ นาน 30 นาที เพื่อยับยั้งกิจกรรมของไฮโดรพลาสซึม แล้วนำมาหลอมรวมกับโพรโตพลาสต์ของมิวแดนที่สีเหลือง KB20M10.2 ซึ่งการบ่มโพรโตพลาสต์ด้วยสารละลาย iodoacetamide ก่อนทำฟิวชันจะทำให้ฟิวแซนท์เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหาร MM ได้ เมื่อทำการคัดเลือกโคโลนีสีเหลืองจำนวน 53 ไอโซเลตพบว่า มี 15 ไอโซเลตได้แก่ C7, C10, C19, C20, C21, C26, C27, C31, C35, C36, C39, C41, C43, C45 และ C47 ที่มีลักษณะของโคโลนีบนอาหารวุ้น SS และ GYP แปลกไปจากสายพันธุ์มิวแดนที่สีเหลือง KB20M10.2 เมื่อศึกษาการผลิตสี กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันมี 1 ไอโซเลตคือ C43 ที่สามารถเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์มิวแดนที่สีเหลือง KB20M10.2 และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอต่อน้ำหนักแห้งพบว่า มี 2 ไอโซเลต คือ C7 กับ C10 ที่มีปริมาณดีเอ็นเอสูงกว่าสายพันธุ์มิวแดนที่สีเหลือง KB20M10.2 แต่น้อยกว่ามิวแดนที่สีกาว KB20M1 ในขณะที่ไอโซเลตที่เหลืองทั้งหมดมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแม่



**ภาพที่ 9** การเรียงลำดับความสัมพันธ์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังได้ดีที่ใช้ในการทดลองซึ่งได้จากห้องปฏิบัติการของ ศ. ดร.บุษยา ขงสมิทธิ์

#### 4.1 การศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีในการหมักแบบเปียก (submerged fermentation) ของเชื้อราโมแนสคัสที่ได้

วรรณภา (2529) ได้ศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงของเชื้อราแดงในการหมักแบบเปียก พบว่า *Monascus* sp. KB201035 ผลิตสีแดงได้สูงสุด วัดสีได้ด้วยความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร มีค่า O.D. เท่ากับ 86.7 หน่วย เมื่อเลี้ยงในอาหารซึ่งประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ เปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมไนเตรด 0.2 เปอร์เซ็นต์ tween 80  $4 \times 10^{-4}$  มิลลิตรต่อลิตร บรรจุอาหาร 25 มิลลิตรในพลาสติกขนาด 250 มิลลิตร โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10 วัน จำนวน 4 ช้อน จากอาหาร MY agar บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ส่วน *Monascus* sp. 11304 ผลิตสีแดงได้สูงสุด ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรมีค่า O.D. 118 หน่วย เมื่อเลี้ยงในอาหารซึ่งประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 3 เปอร์เซ็นต์ แป้งถั่วเหลือง 4 เปอร์เซ็นต์ ฟิเชอร์เริ่มต้น 7.0 tween 80  $1.3 \times 10^{-2}$  มิลลิตรต่อลิตร บรรจุอาหาร 75 มิลลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น อายุ 10 วัน จำนวน 4 ช้อน จากอาหาร MYS agar บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน *Monascus* sp. KB20322 ผลิตสีแดงได้สูงสุด ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร มีค่า O.D. เท่ากับ 77.2 หน่วย เมื่อเลี้ยงในอาหารซึ่งประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 2.5 เปอร์เซ็นต์ เปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์แอกซ์แทรค 0.5 เปอร์เซ็นต์ โปแตสเซียมไนเตรด 0.1 เปอร์เซ็นต์ ฟิเชอร์เริ่มต้น 7.0 tween 80  $2 \times 10^{-4}$  มิลลิตรต่อลิตร บรรจุอาหาร 50 มิลลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิตร ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นอายุ 10 วัน จำนวน 4 ช้อน จากอาหาร MYS agar บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

สุภาพร (2531) ได้ศึกษาสภาพการหมักเพื่อการผลิตสีของมิวแคนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมในเฟอร์เมนเตอร์ และในพลาสติกโดยใช้ข้าวแดง 3 เปอร์เซ็นต์เป็นก้นเชื้อ ปรับ pH เริ่มต้นใน optimized medium เป็น 4.5 การหมักในเฟอร์เมนเตอร์มีอัตราการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที ในวันแรก และปรับเป็น 500 รอบต่อนาที ในวันที่ 2,3 การให้อากาศเป็น 0.75 vvm อุณหภูมิในการหมัก 30 องศาเซลเซียส หมักเป็นเวลา 7 วัน ส่วนการหมักพลาสติกเขย่าบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วันเช่นกันการหมักในเฟอร์เมนเตอร์พบว่าสายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์ KB11304 สามารถผลิตสีแดงนอกเซลล์ได้สูงสุด 106.8 หน่วยต่อ มิลลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 6 วัน ส่วนสายพันธุ์ KBU 2069 และ KBN 4069 ผลิตสีแดงนอกเซลล์ได้ สูงสุด 118.8 และ 145.4 หน่วยต่อมิลลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 4 และ 7 วัน ตามลำดับ และสำหรับ

การหมักในฟลาस्कโดยใช้ข้าวแดง 3 เปอร์เซ็นต์เป็นกล้าเชื้อ พบว่าสายพันธุ์ KBN 4069 มีการผลิตสีได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 7 วัน วัดค่าสีได้ 138.4 หน่วยต่อมิลลิเมตร ขณะที่สายพันธุ์ KB 11304 ผลิตสีได้สูงสุด 62.6 หน่วยต่อมิลลิเมตร และสายพันธุ์ KBU 2069 ผลิตสีแดงได้สูงสุด 62.0 หน่วยมิลลิเมตร

นิสา (2537) พบว่า *Monascus* sp. 11304 สามารถสร้างสารสีได้ดีในอาหาร SS และ MYS medium

ในการศึกษาการผลิตสารสีเหลืองจากเชื้อราโมแนสคัส วรรณภา (2529) พบว่า *Monascus* sp. KB 21035 ผลิตสีเหลืองได้สูงสุดในอาหาร optimized medium ของการผลิตสีแดง แต่ปรับพีเอชเริ่มต้น 2.5 สามารถวัดปริมาณสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร มีค่า O.D. เท่ากับ 33.5 หน่วย เมื่อบ่มครบ 7 วัน ส่วน *Monascus* sp. KB11304 ผลิตสีเหลืองได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MYS โดยปรับสภาพอื่นๆ เหมือน optimized medium ยกเว้นพีเอชเริ่มต้น มีค่า 3.0 จะได้ปริมาณสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร มีค่า O.D. เท่ากับ 14.03 หน่วย และ *Monascus* sp. KB20322 ผลิตสีเหลืองได้พอควรในอาหารเหลว MYS โดยปรับสภาพอื่นๆ เหมือน optimized medium ยกเว้นพีเอชเริ่มต้น 2.0 ได้ปริมาณสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตรมีค่า O.D. เท่ากับ 6.06 หน่วย

สมชาย (2536) และ Somchai (2000) ได้ศึกษาการสร้างสีเหลืองเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2 ในสภาวะอาหารที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลืองประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 3.0 แป้งถั่วเหลือง 5.0 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ Tween 80 เท่ากับ 13.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตันเชื้ออายุ 3 วัน ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากเดิมที่เคยใช้โคจิข้าวเหลืองอายุ 4 สัปดาห์ ปริมาณ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และพบว่าเชื้อราเจริญเป็น pellet ลักษณะรูปเข็มให้การสร้างสีดีกว่ารูปทรงกลมและรูป thread like การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2 แบบให้อาหาร (fed batch cultivation) จะให้การสร้างสีเหลืองสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบเบ็ดเสร็จ (batch cultivation) โดยการเลี้ยงเชื้อให้อาหารสูตรปรับปรุงที่มีปริมาตรเริ่มต้น 2 ใน 3 เมื่อเชื้อราเจริญได้ 2 วัน จึงให้อาหารอีก 1 ใน 3 ทำให้เชื้อสร้างสีเพิ่มขึ้นเป็น 959 หน่วยต่อมิลลิเมตร ในวันที่ 9 ของการเจริญการผลิตสีในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้ใบกวนแบบ propeller ร่วมกับ draft tube พบลักษณะการไหลของของเหลวเป็นแบบ axial flow มีผลให้เชื้อราเจริญเป็น wall growth ลดลงทำให้การสร้างสีเพิ่มมากขึ้น

นิสา (2537) พบว่า *Monascus* sp. KB20M10.2 สามารถสร้างสารสีได้ดีในอาหาร SS และ MYS medium

พงศ์พงา (2547) นำเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2 มาศึกษาพบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CPMY และเติมต้นเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญและการผลิตสีเหลืองดีที่สุด สำหรับอาหาร CPMY นี้ประกอบด้วยเปปโตนิ ยีสต์เอกซ์แทรค และ มอลต์เอกซ์แทรค อย่างละ 20 กรัมต่อลิตร และมีแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร และเมื่อทดลองโดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จด้วยอาหาร CPMY 3.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 7.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm และ อัตราการกวน 300 – 800 รอบต่อนาที พบว่าลักษณะการเจริญจะอยู่ในช่วงเพิ่มจำนวน (logarithmic phase) ประมาณ 42 ชั่วโมง และอัตราการผลิตสีจะเพิ่มขึ้นมาก เมื่อเหลือปริมาณสับสเตรทในน้ำหมักต่ำ ซึ่งจะอยู่ในช่วงที่การเจริญคงที่ (stationary phase) โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.168 ต่อชั่วโมง มีอัตราการผลิตสีจำเพาะ 398.24 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อชั่วโมง และผลิตสีได้สูงสุด 274.80 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 93 และเมื่อทดลองเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวด้วยวิธี constantly fed-batch เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสีเหลืองจากเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2 เนื่องจากสามารถควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะให้ใกล้เคียงกับค่าที่ต้องการได้ง่าย โดยขั้นแรกจะเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จในอาหาร CPMY แล้วจึงเติมอาหารชนิดเดียวอัตราการการเติมอาหารคงที่ และติดตามการเจริญระหว่างเพาะเลี้ยงด้วยพารามิเตอร์ 2 ค่า ที่ทดลองแล้วว่ามีความสัมพันธ์กันโดยตรง คือความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เชื้อผลิตขึ้นและน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ยังได้ทดลองเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้โดยควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะที่ค่าต่างๆ กัน พบว่าเชื้อที่มีอัตราการเจริญจำเพาะ 0.024 ต่อชั่วโมง จะมีอัตราการผลิตสีจำเพาะ 675.74 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งเซลล์ต่อชั่วโมง และผลิตสีได้สูงสุด 362.40 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จประมาณ 1.5 เท่า

ฉัตรมณี (2549) ทำการทดลองศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2 และการผลิตสี คือ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลาย (DO) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสี คือ 70 เปอร์เซ็นต์ ของสภาวะอากาศอิ่มตัว ดังนั้นจึงมีการทดลองหมักแบบเบ็ดเสร็จเพื่อหาอัตราส่วนที่ดีที่สุดขององค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงทั้งในฟลาस्कและถังหมัก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง (C) เปปโตนิ (P) มอลต์เอกซ์แทรค (M) และยีสต์เอกซ์แทรค (Y) ในปริมาณ

ต่างๆ กัน ผลการทดลองพบว่า สูตรอาหาร CPMY7 (30:7:10:10) เหมาะสมสำหรับการสร้างสี ในขณะที่สูตรอาหาร CPMY14 (30:20:20:20) เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตสีในขั้นต่อไป โดยการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch ซึ่งการหมักจะต้องเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยใช้อาหาร CPMY14 และหมักด้วยวิธีเบ็ดเสร็จเป็นขั้นตอนแรกและมีสารอาหารใกล้เคียงเดิมอาหาร CPMY7 ลงไปด้วยอัตราการเจือจาง (D) เท่ากับ 0.03 ต่อชั่วโมง ซึ่งวิธีนี้สามารถผลิตสีได้ 5411.52 หน่วยต่อกรัมกลูโคส หรือประมาณ 5953 หน่วยต่อกรัมของแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งการผลิตสีเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าของการเลี้ยงเชื้อโดยอาหาร CPMY14 แต่เพียงชนิดเดียว และการเติมอาหารด้วยอัตราการเจือจางที่ดีที่สุดคือ 0.03 ต่อชั่วโมง และได้ศึกษาเบื้องต้นเพื่อพิสูจน์สมมติฐานเกี่ยวกับผลของ C/N ratio ต่อการหมักของเชื้อรา สายพันธุ์นี้พบว่า ที่อัตราส่วนค่าเช่นที่ 75 จะทำให้ชะลอการเจริญและการผลิตสี

#### 4.2 การศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีในการหมักแบบแข็ง ของเชื้อรา โมแนสกลัสที่ได้

พลายแก้ว และบุษบา (2533) ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นโคจิเชื้อราแดงของเชื้อ *M. kaoliang* ที่หมักได้จากวัตถุดิบจำพวกคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เช่น ปลายข้าว เมล็ดข้าวโพด ข้าวฟ่าง ขนมันบึง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว มันเทศ มันสำปะหลัง และมันฝรั่ง พบว่าชนิดของวัตถุดิบเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการเจริญ การสร้างสี และการสร้างสปอร์ของเชื้อ *M. kaoliang* การหมักนาน 12 วัน เชื้อราสีสามารถใช้น้ำมันบึงเป็นสับสเตรทได้ดีและให้ค่าสีมากที่สุดคือ 862 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่าง และยังให้สปอร์มากพอสมควรถึง  $2.2 \times 10^7$  สปอร์ต่อกรัมซึ่งส่วนใหญ่เป็นแอสโคสปอร์ รองลงมาคือมันฝรั่งและปลายข้าว โดยให้ค่าสีเท่ากับ 502 และ 314 หน่วยตามลำดับ ส่วนการสร้างสปอร์พบว่าสามารถสร้างสปอร์บนถั่วเหลืองได้ดีที่สุด โดยให้จำนวนสปอร์เท่ากับ  $5.45 \times 10^7$  สปอร์ต่อกรัม รองลงมาคือถั่วเขียว ให้จำนวนสปอร์เท่ากับ  $4.35 \times 10^7$  สปอร์ต่อกรัม ซึ่งจำนวนสปอร์จากถั่วเหลืองและถั่วเขียวที่นับได้มีสูงมาก ส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดเป็นสปอร์แบบโคนิเดีย ส่วนในปลายข้าวจะพบแอสโคสปอร์เป็นส่วนใหญ่ พบโคนิเดียบ้างในปริมาณน้อย ปริมาณสปอร์ที่นับได้เท่ากับ  $1.49 \times 10^7$  สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่าง สำหรับมันฝรั่งซึ่งสร้างได้สีรองจากขนมันบึง แต่ไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้เป็นสับสเตรทเพื่อการผลิตสีหรือสร้างสปอร์ เพราะขาดคุณสมบัติ porosity หลังจากการนำมาแช่น้ำทำให้มีความชื้นเริ่มต้นสูงมาก ทำให้ออกซิเจนกระจายได้ไม่ทั่วถึง ทั้งยังประสบปัญหาการปนเปื้อนง่ายและผลิตสปอร์ได้ที่ผลิตได้ต่ำ (ศุภพงษ์, 2529)

พลายแก้ว (2533) ได้ทำการศึกษาผลของความชื้นต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีแดงบนปลายข้าวหอมมะลิพบว่า ความชื้นที่ได้จากการแช่ปลายข้าวในระยะเวลา 8-10 ชั่วโมงเหมาะสมต่อการสร้างสปอร์มากที่สุดโดยให้จำนวนสปอร์ในช่วง  $1.35 - 1.60 \times 10^7$  สปอร์ต่อกรัม เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 30 วัน ส่วนการผลิตสีแดงวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรพบว่าผลิตสีมีความแตกต่างกันน้อยมากในแต่ละระยะเวลาในการแช่ปลายข้าวและจะมีอัตราการผลิตสีเพิ่มเมื่อเวลาบ่มนานขึ้น การสะเด็ดน้ำประมาณ 5 นาที (ความชื้นเริ่มต้น 41 เปอร์เซ็นต์) ให้ค่าสีในวันที่ 24 ของการบ่มเท่ากับ 4,227 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ยิ่งสะเด็ดน้ำทิ้งไว้นานการผลิตสีจะลดลงเพราะเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นลดลง ทำให้อัตราการผลิตสีลดลงไปด้วย

นิสา (2537) พบว่า *Monascus* sp. KB11304 สามารถสร้างสารสีได้ดีเมื่อเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38.0 เปอร์เซ็นต์

Chayawat (2009) พบว่า *M. kaoliang* KB9 และ สายพันธุ์กลายสีแดง (KB10M16) สามารถสร้างสีแดงได้ดีในอาหารวุ้น MYS, GYP และ PDA และทำการศึกษาการผลิตสารสีแดงบนปลายข้าวหอมมะลิพบว่าเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตสารสีได้ดี โดยเชื้อราสายพันธุ์ KB9 สามารถสร้างสีได้สูงในสถานะที่ความชื้นสัมพัทธ์ 64 เปอร์เซ็นต์ ณ อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) หมักนาน 5 สัปดาห์ มีค่าสีที่ O.D.400 เท่ากับ 4,834 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และที่ O.D.500 เท่ากับ 4,640 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และยังสร้างสารลดคอเลสเตอรอลได้อีกด้วย

Subsaendee (2014) ทำการศึกษาการหมักแป้งในระดับพลาสติกและระดับถังโคจิโดยใช้ *M. purpureus* TISTR3179 (สายพันธุ์พ่อแม่ หรือ KB9) การหมักในระดับพลาสติกใช้ปลายข้าว 100 กรัม ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิเมตร พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) pH เป็นกลางให้ค่าสีสูงที่สุด ค่าสีที่  $A_{420}$  และ  $A_{500}$  เท่ากับ 3,571.97 และ 2,697.71 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ แต่เมื่อความชื้นเริ่มต้น 41 – 43 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) สารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิจะลดลง (80 – 90%) แต่ปริมาณชีวมวลของเชื้อยังคงเท่าเดิม ในการหมักระดับโคจินา 10 และ 50 กิโลกรัม โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการหมักในระดับพลาสติก พบว่าให้ปริมาณสารสีมากขึ้น 2 เท่า และใช้เวลาในการหมักน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับหมักในระดับพลาสติก

พลายแก้ว (2533) พบว่าเมื่อแช่ปลายข้าวนาน 9 ชั่วโมงสะอาดขึ้นนาน 1 ชั่วโมงเหมาะสำหรับการสร้างสีเหลืองของเชื้อรา *M. barkari* และได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการแช่ปลายข้าวในสารละลายกรดกับการแช่ในน้ำ พบว่าการผลิตสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก มีค่าเท่ากับ 8,949 และ 8,499 หน่วยตามลำดับ จำนวนสปอร์ที่ได้ คือ  $6.0 \times 10^6$  สปอร์ต่อกรัม ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสปอร์แบบโคนิเดีย และพบว่าการเติมกรดในปริมาณพอเหมาะ ( 11 มิลลิตรในสับสเตรท 35 กรัม) จะทำให้มีการผลิตสีมากกว่าการแช่ปลายข้าวในสารละลายกรดมีค่าเท่ากับ 8,946 และ 8,641 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และสร้างสปอร์ (โคนิเดีย) เท่ากับ  $7.64 \times 10^6$  และ  $6.9 \times 10^6$  สปอร์ต่อกรัมตามลำดับ

นิสา (2537) พบว่า *Monascus* sp. KB20M10.2 สามารถสร้างสารสีได้ดีเมื่อเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38.0 เปอร์เซ็นต์

Yongsmith *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารสีเหลืองจาก *Monascus* sp. KB20M10.2 บนปลายข้าวหรือพืชเกษตรอื่นๆ พบว่าเมื่อหมักบนข้าวจะได้ข้าวหมักสีเหลือง สีเหลืองส้ม และสีแทน (สีน้ำตาล) โดยข้าวที่หมักจะแตกต่างกันโดยสาเหตุหลักจะมาจากการเตรียมข้าวที่ใช้ในการหมัก สายพันธุ์ของข้าว pH เริ่มต้น และความชื้นเริ่มต้น โดยค่าสีเหลืองที่วัดได้มากที่สุดเท่ากับ 2,000 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อหมักที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 วัน

Chayawat *et al.* (2009) พบว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่สร้างสีเหลืองจะสร้างสีส้มเข้มในอาหารวุ้น MYS, GYP และ PDA

Yongsmith *et al.* (2013) พบว่าเมื่อหมักบนข้าวหอมมะลิเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการหมักของเชื้อรา *Monascus* sp. TISTR 3179 (สายพันธุ์สร้างสีเหลือง หรือ *Monascus* sp. KB20M10.2) ดีกว่าการหมักด้วยข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง มันฝรั่ง มันเทศ และหัวมันสำปะหลัง โดยความชื้นและอุณหภูมิในการหมักเป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่สำคัญสำหรับการผลิตสีในเจดสีเหลืองอ่อน เหลืองส้ม และสีน้ำตาลทอง โดยข้าวหมักสีน้ำตาลทองให้ค่าสีเหลืองมีค่าสูงที่สุดภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้น 42 เปอร์เซ็นต์ และใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 7 วัน 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) โดยให้ค่าการผลิต (ค่าผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรท) ของสีเหลืองที่  $A_{370}$  เท่ากับ 2,224.63 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

พานิดา (2556) พบว่า เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ (U2.3 และ U2.5) และฟิวแซนท์ (F7 F10 และ F43) สามารถเจริญผลิตสีได้สูงกว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ยกเว้นฟิวแซนท์ F43 ผลิตสีได้ต่ำกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแบบแข็งบนปลายข้าวหอมมะลิ พบว่าความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 อุณหภูมิประมาณ 23 – 26 องศาเซลเซียส เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ สร้างสีที่ดูคล้ำแสงความยาวคลื่น 320 370 และ 500 นาโนเมตร ซึ่งมีโทนสีแดง

4.3 การหมักเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังได้ดีในห้องปฏิบัติการเพื่อการผลิตสารเมแทบอลิไต์อื่นๆ

Chayawat *et al.* (2009) ได้ทำการหมักแบบแข็งบนปลายข้าวเพื่อการผลิตสารลดคอเลสเตอรอลซึ่งตรวจด้วยเครื่อง HPLC (ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงวิธีการให้เหมาะสมกับการทดลอง) โดยสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายสีแดง (KB10M16) พบว่าสามารถผลิตสารลดคอเลสเตอรอลได้ในปริมาณสูง ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ที่สร้างสีเหลืองและสายพันธุ์สีขาว อีกทั้งได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพิ่มเติมของสายพันธุ์ KB9 พบว่าเมื่อหมักในสภาวะที่ความชื้นสัมพัทธ์ 64 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง (28 – 30 องศาเซลเซียส) นาน 5 สัปดาห์ สามารถผลิตสารลดคอเลสเตอรอลเท่ากับ 17,892 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Subseandee (2014) ได้ศึกษาการผลิตสารลดคอเลสเตอรอลจากเชื้อรา *M. purpureus* TISTR3179 โดยการหมักบนปลายข้าวหอมมะลิในระดับพลาสติก ซึ่งใช้ข้าว 100 กรัมในพลาสติก ขนาด 500 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ pH เป็นกลาง ให้ปริมาณสารลดคอเลสเตอรอลมากที่สุดเท่ากับ 13,536.61 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักแห้ง ในการหมักระดับโคจขนาด 10 และ 50 กิโลกรัมซึ่งใช้สภาวะที่เหมาะสมได้จากการหมักในระดับพลาสติก พบว่าให้ปริมาณสารลดคอเลสเตอรอลมากขึ้น 2 และ 4 เท่าตามลำดับ และใช้เวลาในการหมักน้อยลง

พานิดา (2556) ได้ศึกษาการหมักแบบแข็งบนข้าวด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์พบว่าสามารถสร้างสารลดคอเลสเตอรอล (โมนาโคลิน เค) ได้ โดยสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ U2.3 และ U2.5 สร้างสาร โมนาโคลิน เค ได้สูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2

สุพัฒน์ (2552) ได้ทำการศึกษาเป็นรายแรกเกี่ยวกับการผลิตไวน์ข้าวไรย์สดี โดยเชื้อราอาหารสายพันธุ์เชื้อรา *M. kaoliang* KB20M1 เป็นเชื้อราสายพันธุ์กลายสีขาว มีความสามารถสร้างเอทานอลได้โดยตรงจากการหมักข้าวเหนียว เชื้อรานี้สร้างเอนไซม์ กลูโคอะมิเลสออกมาย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้กลายเป็นเอทานอล ซึ่งการสร้างสารเหล่านี้เกิดขึ้นพร้อมกันในลักษณะที่เรียกว่า parallel fermentation อีกทั้งการสร้างสารเมแทบอไลต์เหล่านี้ได้ถูกสร้างพร้อมกับการเจริญของเซลล์ ในลักษณะ growth association และการสร้างเอทานอลของเชื้อรา *M. kaoliang* KB20M1 นี้สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีอากาศถ่ายเทและอับอากาศ สภาวะที่เหมาะสมต่อการให้กลิ่นและรสชาติของไวน์ข้าวคือ ใช้ข้าวเหนียวพันธุ์เขียวจูเอรียมโดยแบบล้างยาง ความชื้นเริ่มต้น 56.55 เปอร์เซ็นต์ สภาพการหมักแบบมีอากาศ ปริมาณกล้าเชื้อ 4 เปอร์เซ็นต์ หมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 6.578 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 12 ของการหมัก ซึ่งให้กลิ่นและรสชาติดีและนุ่มนวลที่สุด ส่วนสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิตเอทานอล คือใช้ข้าวเหนียวพันธุ์เขียวจูเอรียมโดยแบบล้างยาง ปริมาณความชื้นเริ่มต้น 56.55 เปอร์เซ็นต์ สภาพการหมักแบบมีอากาศ ปริมาณกล้าเชื้อ 8 เปอร์เซ็นต์ หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 8.586 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 8 ของการหมัก ในขณะที่สภาวะที่ดีที่สุดในการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและน้ำตาลกลูโคส คือใช้ข้าวเหนียวพันธุ์เขียวจูเอรียมโดยแบบล้างยาง ความชื้นเริ่มต้น 56.55 เปอร์เซ็นต์ สภาพการหมักแบบมีอากาศ ปริมาณกล้าเชื้อ 4 เปอร์เซ็นต์ หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยให้กิจกรรมกลูโคอะมิเลสสูงสุดที่ 23,853.25 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และน้ำตาลกลูโคส 180.74 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 6 ของการหมัก จากการวิเคราะห์ชนิดของสารระเหยในไวน์ข้าวพบว่าสารระเหย 8 ชนิดในไวน์ข้าว ได้แก่กรดอะซิติก, เอทานอล, 1-โพรพานอล, ไอโซบิวทิล แอลกอฮอล์, 1-บิวทานอล, กรดไอโซบิวทริก, กรดบิวทาโนอิก และ เบนซีนเอทานอล ซึ่งสารที่ให้กลิ่นหอมเฉพาะตัวของไวน์ข้าวนี้คือ ไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ และเบนซีนเอทานอล โดยที่ไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์เป็นสารที่ให้กลิ่นของแอลกอฮอล์และกลิ่นไวน์ ส่วน เบนซีนเอทานอลเป็นสารให้กลิ่นดอกไม้ และที่สำคัญตรวจไม่พบสารเมทานอลในไวน์ข้าวนี้ ซึ่งเป็นสารพิษที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย

ทิพย์รัตน์ (2552) ทำการทดลองศึกษาผลของการเสริมข้าวแดงจากเชื้อราโมแนสคัส ต่อคุณลักษณะทางการให้ไข่ คุณภาพไข่ คอเลสเตอรอลในไข่แดงและในเลือด HDL-C ไตรกลีเซอไรด์ โปรตีน และอัลบูมินในเลือด การทดลองแรกใช้ไข่ไก่พันธุ์ทางการค้าจำนวน 360 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม แล้วเปรียบเทียบการเสริมข้าวแดงจากเชื้อราโมแนสคัส 4 ระดับ คือ 0.25 0.50 1.25 และ 2.50 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร กับอาหารสูตรควบคุม และอาหารสูตรควบคุมเสริมสารสี

ทางการค้าเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับการเสริมข้าวแดงจากเชื้อราโมแนสคัส 2.50 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร มีสีไข่แดงเข้มที่สุด ( $P<0.01$ ) ทั้งยังพบว่าปริมาณคอเลสเตอรอลในซีรัมของไก่กลุ่มที่ได้รับการเสริมข้าวแดงจากเชื้อราโมแนสคัสทุกระดับแตกต่างกับไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม และสูตรอาหารควบคุมเสริมสารสีทางการค้า ( $P<0.01$ ) นอกจากนี้ปริมาณคอเลสเตอรอลในไข่แดงของไก่กลุ่มที่ได้รับการเสริมข้าวแดงจากเชื้อราโมแนสคัส 0.50 1.25 และ 2.50 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร มีความแตกต่างกับไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมและอาหารสูตรควบคุมเสริมสารสีทางการค้า ( $P<0.05$ ) แต่ไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักไข่ ฮอฟฟิยูนิต ปริมาณอาหารที่กิน ปริมาณอาหารที่กินต่อน้ำหนักไข่ 1 กิโลกรัม ความหนาเปลือกไข่ และเปอร์เซ็นต์เปลือกไข่ อย่างไรก็ตาม ไก่ที่ได้รับการเสริมข้าวแดงจากเชื้อราโมแนสคัส 2.50 เปอร์เซ็นต์ในอาหารมีเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักไข่ขาวสูงที่สุด ( $P<0.05$ ) การทดลองที่ 2 ได้ปรับระดับการเสริมข้าวแดงจากเชื้อราโมแนสคัสเป็น 0.15 0.50 0.85 และ 1.20 เปอร์เซ็นต์ในอาหารพบว่าการเสริมข้าวแดงจากเชื้อราโมแนสคัสให้ผลสอดคล้องกับการทดลองแรก นอกจากจะส่งผลให้คอเลสเตอรอลในเลือดต่ำลงแล้ว ยังทำให้ ไตรกลีเซอไรด์ในเลือดต่ำลง ทั้งยังส่งผลให้ปริมาณโปรตีน และอัลบูมินในเลือดเพิ่มขึ้นด้วย

#### 4.4 การศึกษาความคงทนของสีและสารที่ได้จากการผลิตของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ใช้แปรงมันสำปะหลังได้ดี

วรรณภา (2529) นำสีแดงสดจาก *Monascus* sp. KB21035 วัดที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 86.53 หน่วย มีความคงตัวต่อพีเอช 7 – 11 ปริมาณค่าสีลดลง 0.69 - 6.74 เปอร์เซ็นต์เมื่อเก็บไว้ 3 วัน สีมี่ความคงตัวต่ออุณหภูมิน้ำเดือดนาน 15 นาที เมื่อเก็บไว้ที่ตู้เย็นจะมีความคงตัวพอควร ละลายได้ในตัวทำละลาย เมทานอล และ เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ และมีความคงตัวดีในตัวทำละลาย กลีเซอรอล น้ำ และ โซเดียมเบนโซเอท 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำสีจาก *Monascus* sp. KB11304 ที่มีค่าสีเท่ากับ 94.33 หน่วย มีความคงตัวต่อพีเอช 6.0 - 11.58 ปริมาณค่าสีลดลง 3.89-7.90 เปอร์เซ็นต์เมื่อเก็บไว้ 3 วัน มีความคงตัวต่ออุณหภูมิน้ำเดือดนาน 10 นาที อุณหภูมิ 71-7 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อเก็บไว้ที่ที่มีแสง มีด อุณหภูมิห้องและตู้เย็น และมีความคงตัวดีในตัวทำละลายกลีเซอรอลและน้ำ ส่วนสีจาก *Monascus* sp. KB 20322 มีค่าสีเท่ากับ 72.67 หน่วย มีความคงตัวต่อพีเอช 4-8 ปริมาณค่าสีลดลง 7.57-9.79 เปอร์เซ็นต์เมื่อเก็บไว้ 3 วัน มีความคงตัวต่ออุณหภูมิน้ำเดือดนาน 10 นาที เมื่อเก็บไว้ที่ตู้เย็นจะมีความคงตัวดีพอสมควร ละลายได้ดีในตัวทำละลายเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ และมีความคงตัวในตัวทำละลายกลีเซอรอลและน้ำ

นิสา (2537) พบว่าน้ำสีแดงที่ได้จากสายพันธุ์พ่อแม่ และ KB10M16 คงตัวได้ที่ pH 5.0 - 10.0 คงตัวได้ดีในสารละลายเอทานอล น้ำกลั่น และกลีเซอรอล ส่วนน้ำสีเหลืองจากสายพันธุ์ KB20M10.2 คงตัวได้ดีที่พีเอช 3.0 - 12.0 คงตัวได้ในน้ำกลั่น สารละลายเอทานอล และโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้งน้ำสีแดงและน้ำสีเหลืองคงตัวได้ดีต่ออุณหภูมิน้ำเดือด อุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ และสเตอริไรซ์ แต่ไม่คงตัวต่อแสงอัลตราไวโอเลต น้ำสีคงตัวที่สุดเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือเก็บในที่มืด

น้ำสีเหลืองสดจาก *Monascus* sp. KB21035 ที่มีค่าสี 34.40 หน่วย มีความคงตัวดีที่พีเอช 4 - 11 เมื่อเก็บไว้ 3 วัน ความคงตัวดีต่ออุณหภูมิน้ำเดือดนาน 10 นาที และ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อเก็บไว้ที่มีแสง มืด และอุณหภูมิห้อง จะมีความคงตัวดีขึ้นละลายได้ดีในตัวทำละลาย เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และมีความคงตัวดีในตัวทำละลายโซเดียมเบนโซเอท 1 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล น้ำ และกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำสีเหลืองจาก *Monascus* sp. KB11304 ที่มีค่าสี 8.93 หน่วยมีความคงตัวต่อพีเอช 4.98-7.0 เมื่อเก็บไว้ 3 วัน ความคงตัวดีต่ออุณหภูมิน้ำเดือดนาน 60 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อเก็บไว้ที่มีมืด อุณหภูมิห้อง และตู้เย็น จะมีความคงตัวดีขึ้น ละลายได้ดีในตัวทำละลายเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ และมีความคงตัวดีในตัวทำละลายโซเดียมเบนโซเอท 1 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ และส่วนน้ำสีจาก *Monascus* sp. KB20322 มีค่าสี 2.59 หน่วย มีความคงตัวดีต่อพีเอช 7-10 เมื่อเก็บไว้ 3 วัน ความคงตัวต่ออุณหภูมิน้ำเดือดนาน 60 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อเก็บไว้ที่ตู้เย็น อุณหภูมิห้อง ที่มีมืด และที่มีแสง จะมีความคงตัวดีพอควร ละลายได้ดีในตัวทำละลาย เอทานอล 25 เปอร์เซ็นต์ และมีความคงตัวดีในตัวทำละลายโซเดียมเบนโซเอท 1 เปอร์เซ็นต์ และมีการศึกษาความเป็นพิษของน้ำสีแดงที่ได้จากเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ และน้ำสีเหลืองจาก *Monascus* sp. KB21035 โดยวิธีฉีดน้ำสีเข้าไขไก่ฟัก เพื่อศึกษาการอยู่รอดของไข่ไก่ฟัก พบว่าความเข้มข้นของสีที่ระดับเจือจาง 2 เท่า และ 5 เท่าไม่เป็นพิษต่อไข่ไก่ฟักเมื่อเทียบกับ control

## 5. ข้อมูลพื้นฐานมันสำปะหลัง

### 5.1 การจัดกลุ่ม

ถิ่นกำเนิดของมันสำปะหลังอาจกล่าวได้ว่าอยู่ในอเมริกาใต้ บราซิล/เม็กซิโก มีการเรียกกันตามรากศัพท์ภาษาอังกฤษ ฝรั่งเศส สเปน โปรตุเกส เช่น cassava, mandioca, yucca, tapioca และ manioc ในทางพฤกษศาสตร์จัดมันสำปะหลังเป็นพืชในวงศ์ (Class) ใบเลี้ยงคู่ (Dicotyledoneae) ตระกูล (Family) Euphobiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz. (แต่เดิมมีการใช้ชื่อว่า *Manihot utilissima* Pohl.)

### 5.2 สายพันธุ์

สถาบันที่ทำการรวบรวมพันธุ์มันสำปะหลังตามมาตรฐานของ IBPG (International Board for Plant Genetic Resources) มีที่

- ศูนย์เกษตรเขตร้อนนานาชาติ (Centro Internacional de Agricultura Tropical: CIAT) ประเทศโคลอมเบีย
- สถาบันเกษตรเขตร้อนนานาชาติ (International Institute of Tropical Agricultural : IITA) ประเทศไนจีเรีย

สำหรับงานด้านปรับปรุงพันธุ์ของประเทศไทย มีหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง คือ

- กรมวิชาการเกษตร สถานีทดลองพืชไร่ห้วยโป่ง จังหวัดระยอง
- ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถานีวิจัยศรีราชา จังหวัดชลบุรี
- มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลัง ซึ่งสถานีบำรุงพันธุ์ อยู่จังหวัดนครราชสีมา

สำหรับประเทศไทยมีพันธุ์ที่ควรกล่าวถึง 9 พันธุ์ด้วยกัน คือ ระยอง 1 ระยอง 2 ระยอง 3 ระยอง 5 ระยอง 60 ระยอง 90 เกษตรศาสตร์ 50 ศรีราชา 1 พันธุ์ห่านาที่ และ พันธุ์ห้วยบง ซึ่งกรมส่งเสริมการเกษตร (2537) ได้รวบรวมลักษณะพันธุ์ดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะประจําพันธุ์นํ้าปลาหลัง

| ลักษณะพันธุ์           | ระยะของ 1            | ระยะของ 2                | ระยะของ 3          | ระยะของ 5          | ระยะของ 60         | ระยะของ 90       | เกษตรศาสตร์            | ศรียาชา         | หน้าที             | ห่วยบง          |
|------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
|                        |                      |                          |                    |                    |                    |                  | 50                     | 1               |                    | 80              |
| สีต้น                  | เขียวเงิน            | นํ้าตาล<br>อ่อน          | นํ้าตาล<br>อ่อน    | นํ้าตาลอม<br>เขียว | นํ้าตาล<br>อ่อน    | นํ้าตาลอม<br>ส้ม | เขียวเงิน              | เขียวเงิน       | นํ้าตาลอม<br>เขียว | เขียวเงิน       |
| สีก้านใบ               | เขียวปนม่วง          | เขียวอม<br>ม่วงปน<br>แดง | เขียวอ่อน<br>ปนแดง | แดงเข้ม            | เขียวอ่อน          | เขียวอ่อน        | เขียวอมม่วง            | เขียวปน<br>ม่วง | แดงเข้ม            | *               |
| สียอดอ่อน              | ม่วง(มีขน<br>เล็ก ๆ) | เขียวอ่อน                | ม่วงอ่อน           | เขียวอม<br>นํ้าตาล | เขียวอม<br>นํ้าตาล | เขียวอ่อน        | ม่วง (ไม่มีขน<br>อ่อน) | เขียวปน<br>ม่วง | เขียวอ่อน          | เขียวอ่อน       |
| ความสูงต้น<br>(ซม.)    | 200-300              | 180-220                  | 130-180            | 170-220            | 175-250            | 160-220          | 200-300                | 231             | 250-350            | *               |
| ระดับการแตก<br>กิ่งแรก | สูง                  | ค่อนข้าง<br>สูง          | ต่ำ                | สูง                | ค่อนข้าง<br>สูง    | สูง              | สูง                    | สูง             | สูง                | ต่ำ             |
| จำนวนแตกกิ่ง           | น้อย                 | ปานกลาง                  | มาก                | น้อย               | ปานกลาง            | มาก              | น้อย                   | น้อย            | น้อย               | น้อย            |
| สีเปลือกหัว            | นํ้าตาลอ่อน          | นํ้าตาล                  | นํ้าตาล            | นํ้าตาลอ่อน        | นํ้าตาล            | นํ้าตาล          | นํ้าตาลอ่อน            | ขาวนวล          | นํ้าตาลเข้ม        | นํ้าตาล<br>อ่อน |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| ลักษณะพันธุ์     | ระยะง 1      | ระยะง 2    | ระยะง 3      | ระยะง 5 | ระยะง 60 | ระยะง 90 | เกษตรศาสตร์ | ศรียาชา | ห่านที่       | ห้วยบง |
|------------------|--------------|------------|--------------|---------|----------|----------|-------------|---------|---------------|--------|
|                  |              |            |              |         |          |          | 50          | 1       |               | 80     |
| สีเนื้อหัว       | ขาว          | เหลืองอ่อน | ขาว          | ขาวครีม | ขาว      | ขาว      | ขาว         | ครีม    | ขาว           | ขาว    |
| ผลผลิต (ตัน/ไร่) | 3.22         | 3.00       | 2.73         | 4.02    | 3.52     | 3.65     | 3.67        | *       | 2-3 (สภาพไร่) | 5.03   |
| เปอร์เซ็นต์แป้ง  | 18.3 (ฤดูฝน) | 14         | 23 (ฤดูฝน)   | 22.3    | 18.5     | 23.7     | 23.3        | 21.9    | 14 (สภาพสวน)  | 27.3   |
|                  | 24 (ฤดูแล้ง) |            | 24 (ฤดูแล้ง) |         |          |          |             |         |               |        |
| อายุการเก็บรักษา | 30           | *          | 30 (ลำต้น)   | *       | 30       | 15       | 30          | *       | *             | *      |

\*ไม่มีรายงาน

ที่มา: คัดแปลงจากกรมส่งเสริมการเกษตร (2537); วิจารณ์และคณะ (2553)

จากการรายงานการสำรวจของสมาคมการค้ามันสำปะหลัง (2556) พบว่าในประเทศไทยมีการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังได้ประมาณ 20 กว่าล้านตันต่อปี โดยคิดเฉลี่ยได้ประมาณ 3 ตันต่อไร่ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณการเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังต่อพื้นที่ในปีเพาะปลูก 2006 -2011

| ปี      | พื้นที่ทำการเก็บเกี่ยว (ไร่) | ผลได้ต่อไร่ (ตัน/ไร่) | ผลผลิตทั้งหมด (ตัน) |
|---------|------------------------------|-----------------------|---------------------|
| 2006/07 | 7,201,243                    | 3.668                 | 26,411,233          |
| 2007/08 | 7,397,098                    | 3.401                 | 25,155,797          |
| 2008/09 | 8,292,146                    | 3.628                 | 30,088,024          |
| 2009/10 | 7,302,839                    | 3.013                 | 22,005,740          |
| 2010/11 | 7,096,173                    | 3.088                 | 21,912,416          |
| 2011/12 | 7,911,323                    | 3.362                 | 26,604,090          |
| 2012/13 | 8,138,953                    | 3.474                 | 28,275,565          |
| 2013/14 | 7,982,594                    | 3.601                 | 28,745,903          |

หมายเหตุ เริ่มต้นทำการสำรวจในเดือน กันยายน 2010      1 Hectare = 6.25 ไร่

ที่มา: สมาคมการค้ามันสำปะหลัง (2556)

ราคาสำหรับมันสำปะหลังในปัจจุบัน (กันยายน 2556) พบว่ามีราคาแพงขึ้นโดยราคาในประเทศหัวมันสด มันเส้นและแป้งมันสำปะหลัง อยู่ที่ประมาณ 3,000 8,000 และ 16,000 บาทต่อตัน ส่วนราคาส่งออกมันเส้น และแป้งมันสำปะหลังอยู่ที่ประมาณ 275 และ 550 ดอลลาร์สหรัฐต่อตัน (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, 2556)

### 5.3 องค์ประกอบของห้วมัน

มันสำปะหลังเป็นพืชที่เก็บอาหารไว้ในราก เมื่อมีการสร้างอาหารจากใบและส่วนที่เป็นสีเขียวเนื่องจากมีคลอโรฟิลล์จะสะสมในรูปของคาร์โบไฮเดรตคือ แป้ง ไว้ในราก ความสามารถในการสร้างและสะสมแป้งในรากมีความแตกต่างกันบ้าง เนื่องจากสายพันธุ์ของมันสำปะหลัง อายุเก็บเกี่ยว ปริมาณน้ำฝนในช่วงแรกก่อนการเก็บเกี่ยว และปัจจัยอื่นๆ จึงทำให้ส่วนประกอบของห้วมันอาจจะแตกต่างกันไป โดยทั่วไปห้วมันสำปะหลังที่มีอายุ 12 เดือน ที่ได้รับปริมาณน้ำฝนเพียงพอ และไม่มีฝนตกชุกขณะเก็บเกี่ยว จะมีส่วนประกอบแสดงได้ในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 องค์ประกอบภายในห้วมันสำปะหลังสด

| องค์ประกอบในห้วมัน | ปริมาณ (ต่อ 100 กรัมน้ำหนักห้วมัน) |
|--------------------|------------------------------------|
| น้ำ                | 60.21-75.32                        |
| เปลือก             | 4.08-14.08                         |
| เนื้อ (แป้ง)       | 25.87-41.88                        |
| ไซยาไนด์ (ppm)     | 2.85-39.27                         |

ที่มา: มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (2556)

### ตารางที่ 5 องค์ประกอบในน้ำมันสำปะหลัง

| องค์ประกอบในน้ำมัน        | ปริมาณ (ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งน้ำมัน) |
|---------------------------|----------------------------------------|
| แป้ง                      | 71.9-85.0                              |
| โปรตีน                    | 1.57-5.78                              |
| เยื่อใย                   | 1.77-3.98                              |
| เถ้า                      | 1.20-2.80                              |
| ไขมัน                     | 0.06-0.43                              |
| คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่แป้ง | 3.59-8.66                              |

**ที่มา:** มุขนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (2556)

จะเห็นว่า องค์ประกอบส่วนใหญ่ในรากนั้น นอกจากน้ำแล้วคือแป้ง ซึ่งมีถึงร้อยละ 70 – 80 จึงถือว่ามันสำปะหลังเป็นพืชที่เป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงานกับคนและสัตว์ได้ดีที่สุด โดยปกติหัวมันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้งสูง ปริมาณน้ำจะน้อยและความหนาแน่นของหัวจะมีสูง ฉะนั้นในการตรวจสอบหรือวัดปริมาณแป้ง (เชื้อแป้ง) อย่างเร็วที่นิยมทำกันคือการตรวจสอบความหนาแน่น โดยการชั่งน้ำหนักหัวมันในน้ำ ถ้าน้ำหนักหัวมันในน้ำน้อยแสดงว่าหัวมันมีปริมาณน้ำมากและมีการแป้งน้อย ในกรณีกลับกันถ้าน้ำหนักในน้ำมากแสดงว่าหัวมันมีปริมาณน้ำน้อยและมีแป้งมาก

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อราโมแนสคัส 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์รหัส KB9 (สายพันธุ์พ่อแม่) และสายพันธุ์กลายรหัส KB10M16 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผ่านการปรับปรุงโดยใช้ UV mutagenesis ได้รับจากศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ขงสมิทธิ์

#### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารวุ้น MY (Malt extract yeast extract agar) สำหรับการเก็บรักษาและการถ่ายเชื้อรา (ภาคผนวก ก)

2.2 อาหารวุ้น C-medium agar (Hiroi *et al.*, 1979) สำหรับการสร้างโคนเดี่ยวของเชื้อราโมแนสคัส (ภาคผนวก ก)

#### 3. มันทำปะหลังที่ใช้เป็นวัตถุดิบ

3.1 กากมันได้รับจากศูนย์มันสำปะหลัง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

3.2 มันเส้นหรือมันขึ้นคละพันธุ์นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ซม<sup>3</sup> และขนาด  $1.0 \times 1.0 \times 1.0$  ซม<sup>3</sup>

3.3 หัวมันบด ทดลองใช้ทั้งหัวมันสดและหัวมันสดหนึ่ง นำมาบดด้วยเครื่องบดหมูมีทั้งผสมและไม่ผสมรำข้าวเพื่อให้ลักษณะและผิวสัมผัสของสับสเตรตดีขึ้น

วัตถุดิบทั้ง 3 ชนิดนำมาอบแห้งก่อนนำไปทดลองหมักต่อไป

#### 4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

4.1 เครื่องเขย่า (shaker) ระบบหมุนวน (rotary shaker) ผลิตภัณฑ์ของบริษัท New Brunswick Scientific Co, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา รุ่น G10 rotary shaker

4.2 เครื่อง spectrophotometer รุ่น UV-visible spectrophotometer UV-1700 บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

4.3 เครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่มี rotor เป็นแบบ swinging bucket บริษัท Gallenkamp ประเทศ  
อังกฤษ

4.4 Water bath shaker รุ่น MM-10 บริษัท TAITEC

4.5 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ประกอบด้วย

4.5.1 SHIMADZU LC-10AT VP LIQUID –CHROMATOGRAPH

4.5.2 FCV-10AL VP pump

4.5.3 LCD Analytical spectroMonitor 3100 detector ความยาวคลื่น 238

นาโนเมตร

4.5.4 LDC Analytical CI-4100 integrator

4.6 Koji chamber (ขนาดจุ 10 กิโลกรัม)

4.7 กล้องจุลทรรศน์แบบ Light microscope บริษัท Nikon ประเทศญี่ปุ่น

4.8 เครื่อง Water bath ผลิตภัณฑ์ของบริษัท LAUDA ประเทศญี่ปุ่น

4.9 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ผลิตภัณฑ์ของบริษัทชานโย ประเทศญี่ปุ่น

4.10 ถังคลุกเชื้อ

4.11 พลาสติกขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex ประเทศเยอรมัน

## วิธีการ

ในงานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วนดังนี้

### 1. การคัดเลือกเชื้อราโมแนสคัสเพื่อการผลิตสีและสารลดคอเลสเตอรอล

ทำการคัดเลือกเชื้อราโมแนสคัส 2 สายพันธุ์ที่สร้างสีแดงได้สูงคือ สายพันธุ์ KB9 (สายพันธุ์พ่อแม่) และสายพันธุ์ KB10M16 (สายพันธุ์กลายสีแดง) โดยทดลองหมักในชั้นมันขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่แช่น้ำนาน 3 ชั่วโมง สะเด็ดน้ำ 15 นาที แล้วบรรจุลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร พลาสติกละ 100 กรัม ปิดด้วยจุกสำลีทั้งหมดนำไปนึ่งปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ลงเชื้อตามวิธีของนิสา (2537) โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์หัวเชื้อ  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ทำการหมัก โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 วัน แล้ววิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น พีเอช ตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ตรวจสอบปริมาณกลูโคซามีน สารสีและวัดสารลดคอเลสเตอรอล (ภาคผนวก ข)

### 2. การศึกษาการพรีทรีทเมนต์ตัวอย่างมันสำปะหลังสำหรับการใช้เป็นสับสเตรทที่เหมาะสมในการหมักเพื่อการผลิตสีและการผลิตสารลดคอเลสเตอรอล

2.1 นำรูปแบบตัวอย่างมันสำปะหลังคือ กากมัน มันเส้น (มันแผ่น) และหัวมันสดตัดเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋ขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร นำมาให้ความชื้นโดยแช่น้ำ 3 ชั่วโมง สะเด็ดน้ำ 15 นาที แล้วบรรจุลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร พลาสติกละ 100 กรัม ปิดด้วยจุกสำลีทั้งหมดนำไปนึ่งปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ลงเชื้อทำการหมัก โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 วันแล้ววิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น พีเอช สารสี (ภาคผนวก ข)

2.2 ขนาดมันขึ้น นำขึ้นมันขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  และ  $1.0 \times 1.0 \times 1.0$  ลูกบาศก์เซนติเมตร มาแช่น้ำตามการทดลองที่ดัดแปลงจาก นิสา (2537) โดยการแช่น้ำนาน 3 ชั่วโมง สะเด็ดน้ำ 15 นาที แล้วบรรจุลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร พลาสติกละ 100 กรัม ปิดด้วยจุกสำลีทั้งหมดนำไปนึ่งปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ลงเชื้อ ทำการหมักโดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 วันแล้ววิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น พีเอช สารสี (ภาคผนวก ข)

## 2.3 เครื่องมือตัดชิ้นมัน (มันบด)

ในการทดลองนั้นในการเตรียมมันชิ้นลูกเต๋า (cube) จากหัวมันสด สำหรับการทดลองจะต้องใช้แรงงานคนสำหรับการเตรียมเพื่อให้ได้ขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งเป็นงานที่ต้องใช้แรงงานและเวลาค่อนข้างมากเพื่อให้เพียงพอสำหรับการทดลองในแต่ละสภาวะที่ต้องการศึกษา ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาทดลองใช้เครื่องมือ (เครื่องบดชิ้นมันให้เป็นเส้น) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

### 2.3.1 การศึกษาลักษณะของชิ้นมันที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเป็นสับสเตรทสำหรับการหมัก

#### 2.3.1.1 นำหัวมันสำปะหลังสดมาตัดเป็นแว่น

2.3.1.2 นำมันสำปะหลังที่ตัดแล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปบดโดยเครื่องบดทันที ส่วนที่สองนำไปปั่นโดยเครื่องปั่นความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 15 และ 20 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดทันที

2.3.1.3 นำมันที่บดแล้วไปอบให้แห้งเพื่อเก็บไว้สำหรับการใช้ในการทดลอง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

### 2.3.2 การศึกษาวิธีการต่อเนื่องที่เหมาะสมหลังจากการใช้มันนึ่งก่อนการบดด้วยเครื่องบด

2.3.2.1 นำมันบดที่นึ่งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากการทดลองที่ 2.3.1.2 แบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปบดด้วยเครื่องบดมันทันที ส่วนที่สองตั้งทิ้งไว้ให้เย็นตัวลงข้ามคืนนาน 12 ชั่วโมงแล้วนำมาบดด้วยเครื่องบด

2.3.2.2 นำมันที่บดแล้วไปอบให้แห้งเพื่อเก็บไว้สำหรับการใช้ในการทดลอง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

2.3.3 การศึกษาผลของการผสมรำละเอียดหรือรำหยาบ (รำผสม) การทดลองนี้วัตถุประสงค์เพื่อพิจารณาความเป็นไปได้ในการปรับปรุงรูปลักษณะของมันบดที่ได้จากชิ้นมันสด (ต่อจากการทดลอง 2.3.2) โดยการผสมรำละเอียดหรือรำหยาบ (รำผสมของรำละเอียด แกลบ และปลายข้าวหัก) เข้าไปเพื่อลดน้ำในระบบ รวมทั้งช่วยเสริมแหล่งไนโตรเจน จากการทดลองได้แยกเป็นสองแบบคือ

### 2.3.3.1 การศึกษาผลของการผสมรำละเอียดหรือรำหยาบ (รำผสม) ในชั้นมัน

สด

2.3.3.1.1 นำชั้นมันสดที่ได้จากการทดลองที่ 2.3.1.1 แบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำผสมกับรำละเอียดที่ 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) แล้วไปบดด้วยเครื่องบด จากนั้นนำมันที่บดแล้วไปอบให้แห้งเพื่อเก็บไว้สำหรับการทดลองที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

2.3.3.1.2 นำชั้นมันสดส่วนที่สองนำมาบดด้วยเครื่องบดก่อนแล้ว ผสมกับรำละเอียดที่ 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) แล้วนำมาบดซ้ำ นำมันที่บดแล้วไปอบให้แห้งเพื่อเก็บไว้สำหรับการทดลองที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

2.3.3.2 การศึกษาผลของการผสมรำละเอียดและรำหยาบในชั้นมันหนึ่งที่ผ่านมา การให้ความร้อนไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปลดปล่อยไอน้ำชื้น

2.3.3.2.1 นำชั้นมันสดที่ผ่านมาให้ความร้อนไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปลดปล่อยไอน้ำชื้นนำมาบด แบ่งเป็นสองส่วน

2.3.3.2.2 นำมันที่ผ่านการบดส่วนแรกมาผสมรำละเอียด 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) แล้วบดซ้ำ จากนั้นนำมันที่บดแล้วไปอบให้แห้งเพื่อเก็บไว้สำหรับการทดลองที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

2.3.3.2.3 นำมันที่ผ่านการบดส่วนที่สองมาผสมรำหยาบ 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) แล้วบดซ้ำ จากนั้นนำมันที่บดแล้วไปอบให้แห้งเพื่อเก็บไว้สำหรับการทดลองที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

2.3.4 การศึกษาวิธีการให้ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับชั้นมันสำปะหลังสด ที่ผ่านการอบแห้งจากการทดลองที่ 2.3.3.1 สำหรับการหมักในระดับพลาสติก

2.3.4.1 นำมันบดแห้งที่ได้จากการทดลองที่ 2.3.3.1 มาศึกษาวิธีการ ให้ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการหมักในระดับพลาสติก โดยแบ่งเป็นสองส่วน

2.3.4.2 ส่วนแรกนำชั่ง 50 กรัมในพลาสติกขนาด 500 มิลลิตรแล้วเติมน้ำ ปริมาตร 10 20 และ 30 มิลลิตร ปิดจุกสำลีแล้วนำไปนั่งมาเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.3.4.3 ส่วนที่สองไปแช่น้ำ 1 2 และ 3 ชั่วโมง สะเด็ดน้ำนาน 15 นาที ชั่ง 50 กรัมในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.3.5 การศึกษาวิธีการให้ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับเส้นมันนิ่งบด  
จากการทดลองที่ 2.3.3.2 สำหรับการหมักในระดับพลาสติก

นำมันบดที่ได้จากการทดลองที่ 2.3.3.2 มาแช่น้ำนาน 15 30 45 และ 60 นาที สะเด็ดน้ำ 15 นาที ชั่ง 100 กรัมในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

### 3. การศึกษาสถานะการผลิตและสารลดคอเลสเตอรอลในระดับพลาสติก

3.1 การศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมในการสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอล  
นำรูปแบบของมันสำปะหลังที่เหมาะสม นำมาแช่น้ำ 1 2 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ สะเด็ดน้ำ 15 นาทีแล้วบรรจุลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร พลาสติกละ 100 กรัม ปิดด้วยจุกสำลี ทั้งหมดนำไปนึ่งปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ลงเชื้อ ทำการหมักโดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 วันแล้ววิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น พีเอช ตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ตรวจสอบปริมาณกลูโคซามีน สารสีและวัดสารลดคอเลสเตอรอล (ภาคผนวก ข)

3.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอล  
นำสถานะที่เหมาะสม จากข้อ 3.1 เติมแหล่งไนโตรเจนลงในน้ำซึ่งจะแยกเป็น 2 ส่วนคือ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์สาร (organic nitrogen source) ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ของ urea, soybean powder, yeast extract, malt extract, peptone และ monosodium glutamate แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen source) ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ของ  $C_6H_{17}N_3O_7$ ,  $NaNO_3$ ,  $NH_4NO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NH_4Cl$  และ  $CH_3COONH_4$  จากนั้นแช่เย็น 2 ชั่วโมงแล้วนำมาสะเด็ดน้ำ 15 นาที แล้วบรรจุลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร พลาสติกละ 100 กรัม ปิดด้วยจุกสำลีทั้งหมดนำไปนึ่งปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ลงเชื้อทำการหมักโดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 3 วันแล้ววิเคราะห์ตามข้อที่ 3.1

#### 4. การศึกษาสภาวะการผลิตสีและสารลดคอเลสเตอรอลในระดับขยาย 10 กิโลกรัม

4.1 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์ในระดับหมักขึ้นมันขนาด 10 กิโลกรัม โดยทำตาม การทดลองของพลายแก้ว (2534ก) เลือกใช้ข้าวหอมมะลิที่แช่น้ำนาน 3 ชั่วโมง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง แช่น้ำนาน 9 ชั่วโมง ข้าวฟ่างต้มให้สุกประมาณ 15 นาที ขึ้นมันสำปะหลังที่แช่น้ำนาน 2 ชั่วโมง ตัวอย่างทั้งหมดนำมาสะเด็ดน้ำนาน 15 นาที แล้วชั่ง 100 กรัม ใส่ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ

4.2 การศึกษาวิธีการปลอดเชื้อสับสเตรทที่ใช้ในการหมักระดับโคจิ 10 กิโลกรัม โดยนำมันขึ้นมันขนาดที่เหมาะสม 10 กิโลกรัมมาเตรียมตามการทดลองที่เหมาะสมในระดับพลาสติก แล้ว แล้วแบ่งออกใส่ถุงพลาสติก ดังนี้ ถุงหละ 10 กิโลกรัม 1 ถุง 5 กิโลกรัม 2 ถุง 2 กิโลกรัม 5 ถุง และ 1 กิโลกรัม ก่อนการนำไปนึ่งด้วยความดันไอน้ำเพื่อทำการปลอดเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปขึ้นมันที่ปลอดเชื้อแล้ววางบนอาหารวุ้น NA และ PDA

4.3 การศึกษาความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตสารสีและ สารลดคอเลสเตอรอลในระดับขยาย โดยนำผลของข้อที่ 4.1 และ 4.2 เปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ของหัวเชื้อที่ 2 4 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักมันสำปะหลังที่ปลอดเชื้อแล้ว

4.4 ศึกษาวิธีการผสมหัวเชื้อเริ่มต้นและสับสเตรทที่ปลอดเชื้อแล้วโดยใช้ความเข้มข้น หัวเชื้อที่เหมาะสมของข้อที่ 4.3 โดย

4.4.1 เทสับสเตรทที่ปลอดเชื้อแล้วรวมกันทั้งหมดแล้วผสมหัวเชื้อเริ่มต้นแล้วใส่ใน ถังโคจิ

4.4.2 แบ่งหัวเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในข้อ 4.3 ให้มีปริมาณเท่ากันๆ ตามสัดส่วนของถุงขึ้นมันสับสเตรทปลอดเชื้อตามข้อที่ 4.2 แล้วผสมกันจากนั้นเทใส่ในถังโคจิ

4.4.3 แบ่งหัวเชื้อเริ่มต้นที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในข้อ 4.3 ให้มีปริมาณเท่ากันๆ ตามสัดส่วนของถุงขึ้นมันสับสเตรทปลอดเชื้อตามข้อที่ 4.2 แล้วผสมในแต่ละถุง หมักในถุงไว้ 3 วัน แล้วเทใส่ในถังโคจิ

4.5 ศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารสีและสารลดคอเลสเทอรอลในระดับโคจิ 10 กิโลกรัม

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมบนอาหารวุ้น CPDA (cassava potato dextrose agar) โดยได้ทำการปรับปรุงสูตรอาหารให้คล้ายกับการเจริญบนไขมันสำปะหลัง โดยไขมันสำปะหลัง 200 กรัม แทนมันฝรั่งต้มให้ให้สุกแล้วกรองเอาสารสกัดไขมันสำปะหลัง จากนั้นใส่ dextrose 20 กรัม วุ้น 20 กรัม เติมน้ำ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

ในการศึกษาพีเอชของอาหารที่เหมาะสมนั้นจะทำการปรับพีเอชของอาหาร CPDA ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 3 5 7 9 และน้ำประปา (พีเอชประมาณ 6)

การศึกษอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสในอาหารวุ้น CPDA ที่มีพีเอชเหมาะสมมาบ่มที่อุณหภูมิ 20 30 35 37 45 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 31 – 33 องศาเซลเซียส)

โดยจะทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเพื่อติดตามการเจริญและสังเกตการสร้างสีแดงรอบโคโลนี

4.6 ศึกษาวิธีการปรับความชื้นให้เหมาะสมในระหว่างการหมักในถังโคจิ 10 กิโลกรัม โดยทำการเติมน้ำปริมาตร 10 ลิตร 1 ครั้งต่อวัน หรือ 2 ครั้งต่อวัน

4.7 ศึกษาการใช้สารปฏิชีวนะและสารเคมีที่เหมาะสมสำหรับการหมักในระดับถังโคจิ 10 กิโลกรัม ในการทดลองนี้เลือกใช้ streptomycin ที่ความเข้มข้น 50 100 200 300 500 พีพีเอ็ม และ KMS (potassium metabisulfite) เข้มข้น 50 100 200 300 พีพีเอ็ม โดยทำการคลุกผสมกับไขมันที่ปลอดเชื้อแล้ว ก่อนผสมกับหัวเชื้อเริ่มต้น

4.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในระดับขยาย โดยทำตามการทดลองข้อ 4.6 มาทำ แล้วนำมาวิเคราะห์สารสีและสารลดคอเลสเทอรอล

## ผลและวิจารณ์

### ผล

#### 1. การคัดเลือกเชื้อราโมแนสคัสเพื่อการผลิตสีและสารลดคอเลสเตอรอล

คัดเลือกเชื้อราโมแนสคัสที่มีความสามารถในการผลิตสีและสารลดคอเลสเตอรอล จาก 2 สายพันธุ์คือ เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ดั้งเดิม (KB9) และสายพันธุ์รหัส KB10M16 ซึ่งเป็น red mutant ของรหัส KB9 โดยทดลองหมักในชั้นมันขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่แช่น้ำนาน 3 ชั่วโมง (ความชื้นเริ่มต้น 49.6 เปอร์เซ็นต์) พบว่าสายพันธุ์ KB10M16 ให้กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลสตั้งแต่วันที่ 3 ของการหมักและมากที่สุดในวันที่ 6 มากกว่าสายพันธุ์ KB9 ซึ่งลักษณะการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสทั้งสองสายพันธุ์คล้ายกัน โดยได้ค่าสูงสุดในวันที่ 6 และลดลงเรื่อยๆ ตลอดการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 9

การเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์บนชั้นมันสำปะหลังพบว่าสายพันธุ์ KB9 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) เจริญได้เร็วกว่าสายพันธุ์ KB10M16 แต่ภายหลังวันที่ 12 ของการหมักสายพันธุ์ KB10M16 เจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์ KB9 โดยติดตามปริมาณกลูโคซามีน ในชั้นมันที่หมักจากสายพันธุ์ KB9 โดยพบปริมาณกลูโคซามีนตั้งแต่วันที่ 3 พบมากจนถึงวันที่ 9 ส่วนวันที่ 12 ถึงสิ้นสุดการหมัก ปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (คงที่) ดังแสดงในภาพที่ 10 ชั้นมันหมักจากสายพันธุ์ KB10M16 ให้ปริมาณกลูโคซามีนได้สูงกว่าสายพันธุ์ KB9 แต่หลังจากวันที่ 12 ถึงสิ้นสุดการหมัก พบว่ามีปริมาณกลูโคซามีนมีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ KB9

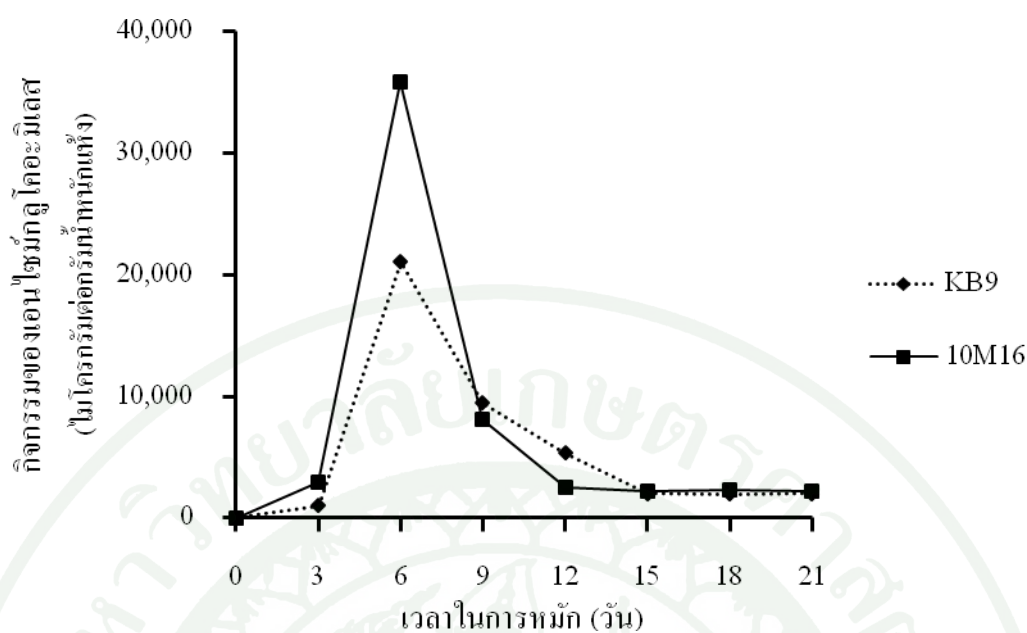
ชั้นมันหมักจากสายพันธุ์ KB10M16 พบว่าในวันที่ 3 ของการหมักสามารถมองเห็นสีในชั้นมันหมักด้วยตาเปล่าอย่างชัดเจนมากกว่าสายพันธุ์ KB9 ดังแสดงในภาพที่ 11 และจากการสกัดสีจากชั้นมันหมักแล้ววัดค่าสีที่  $A_{420}$  และ  $A_{500}$  พบว่าค่าสีที่ได้จากชั้นมันหมักที่หมักด้วยสายพันธุ์ KB10M16 ให้ค่าสีที่มากกว่าชั้นมันหมักจากสายพันธุ์ KB9 โดยเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์เริ่มสร้างสารสีในวันที่ 3 ของการหมักและสร้างมากขึ้นตลอดการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 12 และ 13

การผลิตสารโมนาโคลิน เคในชั้นมันหมักพบว่าในชั้นมันหมักจากสายพันธุ์ KB10M16 มีปริมาณมากกว่าที่พบในชั้นมันหมักจากสายพันธุ์ KB9 โดยทั้งสองสายพันธุ์เริ่มมีการผลิตสารนี้ในวันที่ 9 ของการหมัก สายพันธุ์ KB10M16 พบว่ามีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 15 ของการหมักและลดลงในวันที่ 18 และ 21 ซึ่งเป็นปริมาณที่มากกว่าสายพันธุ์ KB9 ที่พบสูงสุดวันที่ 15 เช่นกัน แต่มีปริมาณคงที่ตลอดการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 14

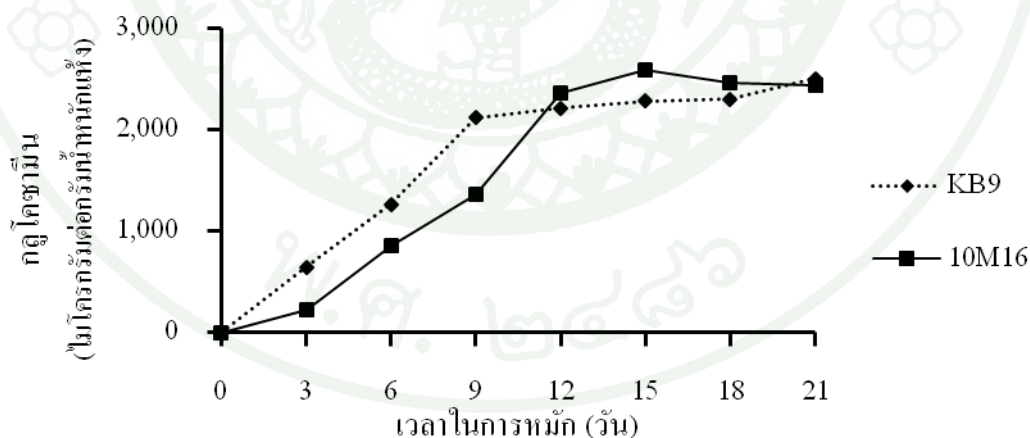
จากการทดลองพบว่ารูปแบบของกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลสที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ KB9 และ KB10M16 ลดลงหลังจากวันที่ 6 ของการหมักเนื่องจากเอนไซม์กลูโคอะมิเลสถูกยับยั้งแบบ catabolic repression โดยช่วงแรกของการเจริญ (0 – 6 วันของการหมัก) เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเพื่อย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูง แต่เมื่อมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสมากเพียงพอแล้ว น้ำตาลกลูโคสจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเอง ทำให้ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำลงมากในวันที่ 9 ของการหมัก นอกจากนี้พบปริมาณกลูโคซามีน องค์ประกอบของโคคินซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อราที่มีปริมาณมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อราโมแนสคัสได้ใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญสร้างเป็นองค์ประกอบของเซลล์ รวมถึงการผลิตสารเมแทบอไลต์อื่นๆ อีกด้วย

สารสีและสารลดคอเลสเทอรอลที่ได้จากการหมักโดยเชื้อราโมแนสคัส พบว่าอัตราการผลิตจะเพิ่มขึ้นหลังวันที่ 9 ของการหมัก แสดงให้เห็นว่าทั้งสารสีและสารลดคอเลสเทอรอลเป็นสารที่สร้างขึ้นโดยไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อ (non-growth association) และถูกจัดว่าเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เนื่องจากพบว่าการสร้างภายหลังจากที่เชื้อราเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) แล้ว

ในการทดลองการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัสที่สามารถผลิตสารสีและสารลดคอเลสเทอรอลบนชั้นมันสำปะหลังที่แช่น้ำนาน 3 ชั่วโมงที่คัดเลือกนี้ พบว่าสายพันธุ์ KB10M16 พบกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ปริมาณกลูโคซามีน สารสี และสาร โมนาโคลิน เค มากกว่าสายพันธุ์ KB9 จึงเลือกใช้สายพันธุ์ KB10M16 ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลสจากชั้นมันหมักขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่แช่น้ำ 3 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายสีแดง (KB10M16) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส)



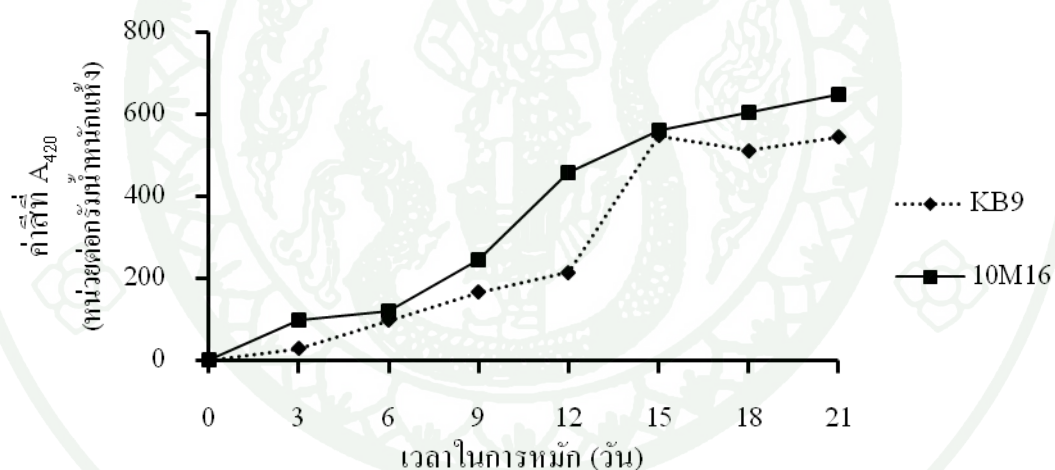
ภาพที่ 11 ปริมาณกลูโคซามีนจากชั้นมันหมักขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แช่น้ำ 3 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายสีแดง (KB10M16) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส)



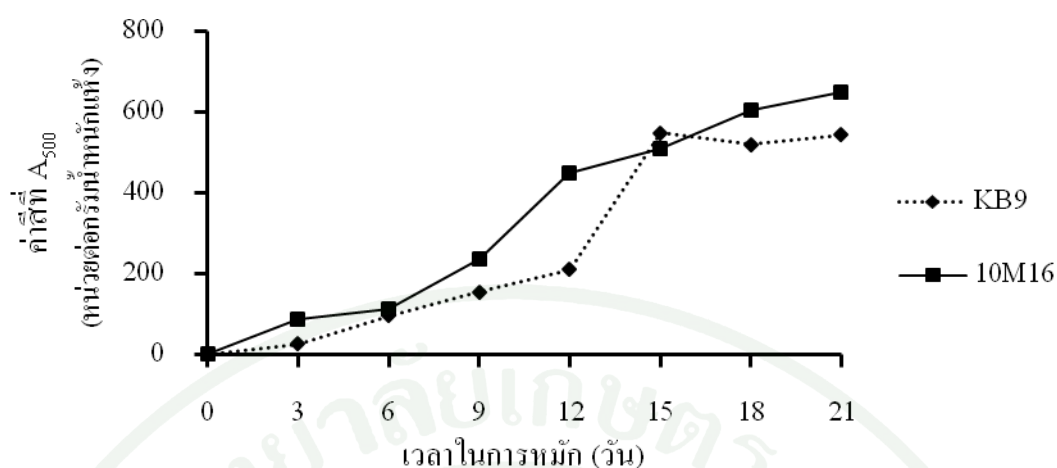
ภาพที่ 12 ขึ้นมันหมักเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส)

(ก) ขึ้นมันหมักด้วยเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9)

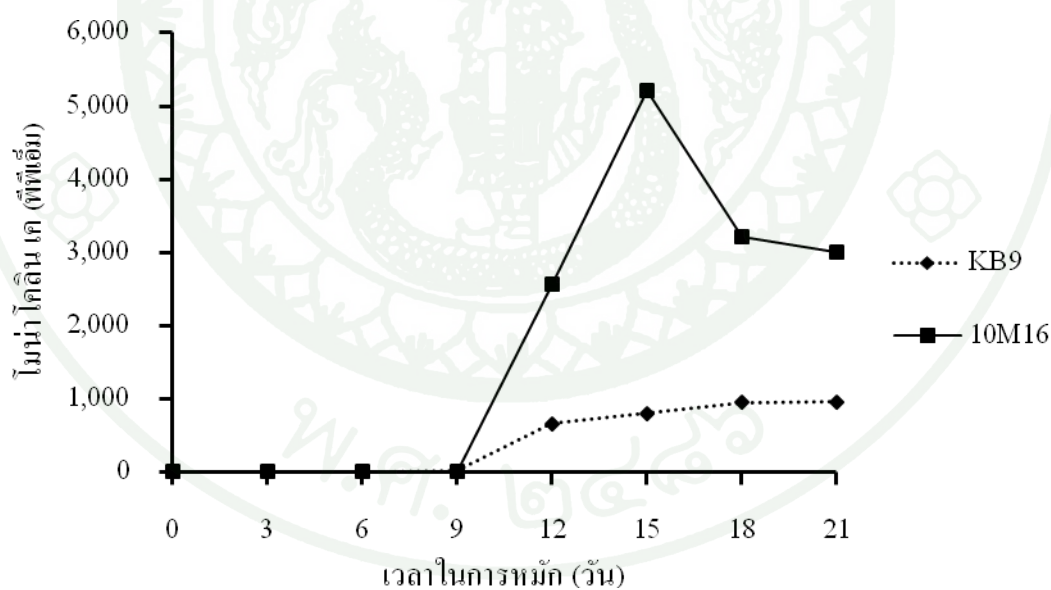
(ข) ขึ้นมันหมักด้วยเชื้อราสายพันธุ์กลายสีแดง (KB10M16)



ภาพที่ 13 ค่าสีที่  $A_{420}$  จากขึ้นมันหมักขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แช่น้ำ 3 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายสีแดง (KB10M16) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส)



ภาพที่ 14 ค่าที่  $A_{500}$  จากชิ้นหมักขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แช่น้ำ 3 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายสีแดง (KB10M16) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส)



ภาพที่ 15 ปริมาณสารโมโนโคลลิน เค จากชิ้นหมักขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่แช่น้ำ 3 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายสีแดง (KB10M16) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-31 องศาเซลเซียส)

## 2. การศึกษาการพรีพรีทเมนต์ตัวอย่างมันสำปะหลังสำหรับการใช้เป็นสับสเตรทที่เหมาะสมในการหมักเพื่อการผลิตสีและการผลิตสารลดคอเลสเตอรอล

### 2.1 ลักษณะ (กากมัน, มันเส้น, หัวมัน) และสายพันธุ์มัน

ในการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ทั้งหัวมันและมันเส้นที่เตรียมจากการตัดชิ้นมันให้มีขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนความชื้นไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อรา และยังเป็นการกำจัดไซยาไนด์ ที่มีอยู่ในหัวมันสำปะหลังสดโดยธรรมชาติอยู่แล้ว และทั้งนี้ไม่ได้เฉพาะเจาะจงสายพันธุ์สำปะหลังที่ใช้ในการทดลอง สำหรับมันเมล็ดไม่สามารถนำมาใช้ในการทดลองได้ เนื่องจากไม่สามารถติดต่อแหล่งของมันเมล็ดได้

รูปแบบมันสำปะหลังที่ใช้หมักในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองรูปแบบของมันสำปะหลังในการหมักโดยใช้แบบกากมัน มันเส้น (หัวมันที่ถูกตัดเป็นแว่นๆ แล้วตากแห้งได้มาจากลานมัน) และมันชื้นซึ่งตัดหัวมันสดเป็นลูกเต๋าในห้องปฏิบัติการ โดยผลการทดลองพบว่าหลังจากการหมักด้วยเชื้อราสายพันธุ์กลายสีเดงนั้นเป็นเวลา 3 วัน มันชื้นที่มีขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร มีการสร้างสีได้ดีกว่ามันเส้นและกากมัน และเมื่อเปรียบเทียบกับมันเส้นพบว่ามันเส้นมีลักษณะจับกันเป็นก้อนภายหลังการผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำมีผลทำให้การสร้างสารสีได้น้อยลงเนื่องจากการถ่ายเทของความร้อนและการไหลเวียนของอากาศในพลาสติกด้อยลง ส่วนกากมันหมักพบว่าสารสีมีปริมาณน้อยมาก และเมื่อนำกากมันหมักไปสกัดสารสีแล้วพบว่าสกัดสารสีออกได้น้อยมาก ดังนั้นจึงเลือกใช้มันชื้นขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 6 Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนกากมันของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง รหัส KB10M16

| วันที่ | ความชื้น<br>(เปอร์เซ็นต์) | พีเอช | กลูโคซามีน<br>(ไมโครกรัมต่อกรัม<br>น้ำหนักแห้ง) | กิจกรรมเอนไซม์<br>กลูโคอะมิเลส<br>(หน่วยต่อไมโครกรัมสับสเตรทต่อนาที) | สี<br>(หน่วยต่อกรัมน้ำหนัก<br>แห้ง) | โมนาโคลิน เอ<br>(พีพีเอ็ม) |
|--------|---------------------------|-------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
|        |                           |       |                                                 | $A_{420}$                                                            | $A_{500}$                           |                            |
| 0      | 60.3                      | 6.2   | 0.0                                             | 0.0                                                                  | 0.0                                 | NA                         |
| 3      | 62.4                      | 6.1   | 52.6                                            | 24.6                                                                 | 0.0                                 | NA                         |
| 6      | 63.5                      | 6.1   | 55.1                                            | 124.6                                                                | 0.0                                 | NA                         |
| 9      | 66.4                      | 5.9   | 102.6                                           | 112.3                                                                | 2.6                                 | NA                         |
| 12     | 66.5                      | 6.2   | 100.4                                           | 50.6                                                                 | 3.4                                 | NA                         |
| 15     | 70.2                      | 6.0   | 95.3                                            | 46.2                                                                 | 4.0                                 | NA                         |
| 18     | 70.3                      | 6.0   | 93.2                                            | 42.5                                                                 | 3.9                                 | NA                         |
| 21     | 69.2                      | 6.1   | 96.6                                            | 44.3                                                                 | 4.4                                 | NA                         |

หมายเหตุ NA "ไม่" ได้ทำการวิเคราะห์

ตารางที่ 7 Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนมันเส้นของเชื้อราโมแนสซิสสายพันธุ์กลายสีแดง รหัส KB10M16

| วันที่ | ความชื้น<br>(เปอร์เซ็นต์) | พีเอช | กลูโคซามีน<br>(ไมโครกรัมต่อกรัม<br>น้ำหนักแห้ง) | กิจกรรมเอนไซม์<br>กลูโคอะมิเลส<br>(หน่วยต่อไมโครกรัมสับสเตรตต่อ<br>นาที) | สี<br>(หน่วยต่อกรัมน้ำหนัก<br>แห้ง) | โมนาโคลิน เค<br>(พีพีเอ็ม) |
|--------|---------------------------|-------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
|        |                           |       |                                                 | $A_{420}$                                                                | $A_{500}$                           |                            |
| 0      | 70.2                      | 6.2   | 0.0                                             | 0.0                                                                      | 0.0                                 | NA                         |
| 3      | 70.6                      | 6.1   | 20.4                                            | 259.6                                                                    | 0.0                                 | NA                         |
| 6      | 71.6                      | 6.0   | 369.4                                           | 1,278.9                                                                  | 0.0                                 | NA                         |
| 9      | 72.4                      | 5.8   | 406.5                                           | 299.3                                                                    | 6.9                                 | NA                         |
| 12     | 70.5                      | 5.7   | 505.9                                           | 274.6                                                                    | 102.9                               | NA                         |
| 15     | 70.2                      | 5.6   | 510.4                                           | 228.6                                                                    | 115.9                               | NA                         |
| 18     | 70.3                      | 5.7   | 507.4                                           | 230.7                                                                    | 132.7                               | NA                         |
| 21     | 76.3                      | 5.7   | 513.6                                           | 211.9                                                                    | 159.6                               | NA                         |

หมายเหตุ NA ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

**ตารางที่ 8** Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนหัวมันขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง รหัส KB10M16

| วันที่ | ความชื้น<br>(เปอร์เซ็นต์) | พีเอช | กลูโคซามีน<br>(ไม่โครกรั่มต่อกรั่ม<br>น้ำหนักแห้ง) | กิจกรรมเอนไซม์<br>กลูโคอะมิเลส<br>(หน่วยต่อไมโครกรั่มสับสเตรทต่อ<br>นาที) | สี<br>(หน่วยต่อกรัมน้ำหนัก<br>แห้ง) | โมนาโคลิน เค<br>(พีพีเอ็ม) |
|--------|---------------------------|-------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
|        |                           |       |                                                    | $A_{420}$                                                                 | $A_{500}$                           |                            |
| 0      | 49.6                      | 6.2   | 0.0                                                | 0.0                                                                       | 0.0                                 | NA                         |
| 3      | 50.4                      | 6.1   | 647.9                                              | 2,962.3                                                                   | 86.4                                | NA                         |
| 6      | 53.6                      | 6.1   | 1,268.6                                            | 55,870.6                                                                  | 112.6                               | NA                         |
| 9      | 53.9                      | 5.9   | 3,124.7                                            | 12,063.8                                                                  | 236.8                               | NA                         |
| 12     | 52.7                      | 5.7   | 3,214.1                                            | 3,489.5                                                                   | 459.3                               | NA                         |
| 15     | 52.1                      | 5.4   | 3,289.0                                            | 2,214.2                                                                   | 521.3                               | NA                         |
| 18     | 53.0                      | 5.4   | 3,304.1                                            | 2,289.4                                                                   | 537.1                               | NA                         |
| 21     | 52.1                      | 5.4   | 3,507.0                                            | 2112.0                                                                    | 551.3                               | NA                         |

หมายเหตุ NA ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

## 2.2 ขนาดมันขึ้น

ในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ขึ้นมันขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  และ  $1.0 \times 1.0 \times 1.0$  ลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่าขึ้นมันหมักขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร พบกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลสมากกว่าขึ้นมันหมักขนาด  $1.0 \times 1.0 \times 1.0$  ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยมันหมักทั้งสองขนาดมีรูปแบบการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสคล้ายกันคือพบในวันที่ 3 และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 6 ของการหมักและลดลงจนจบการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 9 และ 10

ปริมาณกลูโคซามีนจากขึ้นมันหมักขนาด ขนาด  $1.0 \times 1.0 \times 1.0$  ลูกบาศก์เซนติเมตร มากกว่าขึ้นมันหมักขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร ในวันที่ 12 ของการหมักเท่ากับ 3,469.1 และ 3,316.4 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยพบว่าขึ้นมันหมักทั้งสองขนาดพบปริมาณกลูโคซามีนคล้ายกันคือ เริ่มพบในวันที่ 3 สูงสุดในวันที่ 12 และมีปริมาณคงที่ตลอดการหมัก แสดงในตารางที่ 9 และ 10

ค่าสีของขึ้นมันหมักทั้งสองขนาดพบว่าเริ่มมีการผลิตในวันที่ 3 ของการหมัก ที่  $A_{420}$  ขึ้นมันหมักขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่ามีค่าสีมากกว่าในวันที่ 21 ของการหมักเท่ากับ 553.3 และ 523.3 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งและเช่นเดียวกันกับที่  $A_{500}$  พบว่าในวันที่ 21 ของการหมักจะมีปริมาณมากกว่าเท่ากับ 398.2 และ 315.4 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ

ลักษณะหลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำก่อนการหมักพบว่าขึ้นมันขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตรเหมาะสำหรับการทดลอง หากทำให้มีชิ้นส่วนที่เล็กลงไปอีก เมื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ พบว่าขึ้นมันจะเกาะกันเป็นก้อนไม่เหมาะสมต่อการนำไปทำการเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีปัญหาในการไหลเวียนของอากาศและความร้อนที่เกิดขึ้นจากการเจริญของเชื้อรา แต่หากขึ้นมันมีขนาดใหญ่กว่า  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร จะต้องใช้เวลานานขึ้นในการหมักเพื่อที่เชื้อราจะเจริญได้เต็มขึ้นมัน

**ตารางที่ 9** Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนหัววันขนาด 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของเชื้อรา โมนัสต์สสายพันธุ์กลายสีแดง รหัส KB10M16

| วันที่ | ความชื้น<br>(เปอร์เซ็นต์) | พีเอช | กลูโคซามีน<br>(ไม่โครกรัมต่อกรัม<br>น้ำหนักแห้ง) | กิจกรรมเอนไซม์<br>กลูโคอะมิเลส<br>(หน่วยต่อไมโครกรัมสับสเตรทต่อ<br>นาที) | สี<br>(หน่วยต่อกรัมน้ำหนัก<br>แห้ง) | โมนาโคลิน เค<br>(พีพีเอ็ม) |
|--------|---------------------------|-------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
|        |                           |       |                                                  | $A_{420}$                                                                | $A_{500}$                           |                            |
| 0      | 49.6                      | 6.0   | 0.0                                              | 0.0                                                                      | 0.0                                 | NA                         |
| 3      | 51.6                      | 5.7   | 622.5                                            | 3,041.3                                                                  | 76.2                                | NA                         |
| 6      | 53.2                      | 5.3   | 1,068.6                                          | 55,001.6                                                                 | 110.0                               | NA                         |
| 9      | 53.9                      | 5.5   | 3,124.7                                          | 12,658.9                                                                 | 350.4                               | NA                         |
| 12     | 52.7                      | 5.7   | 3,316.4                                          | 3,480.6                                                                  | 498.6                               | NA                         |
| 15     | 53.4                      | 5.5   | 3,301.6                                          | 2,199.6                                                                  | 522.6                               | NA                         |
| 18     | 52.7                      | 5.4   | 3,298.7                                          | 2,200.0                                                                  | 524.6                               | NA                         |
| 21     | 53.1                      | 5.4   | 3,314.6                                          | 1,987.4                                                                  | 553.3                               | NA                         |

หมายเหตุ NA ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

**ตารางที่ 10** Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนหัวมันขนาด 1.0×1.0×1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ของเชื้อราโมแนสซิสสายพันธุ์กลายสีแดง รหัส KB10M16

| วันที่ | ความชื้น<br>(เปอร์เซ็นต์) | พีเอช | กลูโคซามีน<br>(ไมโครกรัมต่อกรัม<br>น้ำหนักแห้ง) | กิจกรรมเอนไซม์<br>กลูโคอะมิเลส<br>(หน่วยต่อไมโครกรัมสับสเตรทต่อ<br>นาที) | สี<br>(หน่วยต่อกรัมน้ำหนัก<br>แห้ง) | โมนาโคลิน เค<br>(พีพีเอ็ม) |
|--------|---------------------------|-------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
|        |                           |       |                                                 | $A_{420}$                                                                | $A_{500}$                           |                            |
| 0      | 50.4                      | 6.2   | 0.0                                             | 0.0                                                                      | 0.0                                 | NA                         |
| 3      | 51.0                      | 6.1   | 600.2                                           | 3,124.6                                                                  | 56.3                                | NA                         |
| 6      | 54.6                      | 6.3   | 1,096.2                                         | 57,320.1                                                                 | 99.5                                | NA                         |
| 9      | 55.1                      | 5.9   | 3,214.6                                         | 21,063.2                                                                 | 322.8                               | NA                         |
| 12     | 56.6                      | 5.5   | 3,469.1                                         | 3,408.1                                                                  | 450.6                               | NA                         |
| 15     | 55.9                      | 5.5   | 3,436.8                                         | 2,212.5                                                                  | 499.7                               | NA                         |
| 18     | 55.1                      | 5.4   | 3,488.6                                         | 2,285.3                                                                  | 500.3                               | NA                         |
| 21     | 56.2                      | 5.5   | 3,284.6                                         | 2,214.8                                                                  | 523.4                               | NA                         |

หมายเหตุ NA ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

### 2.3 เครื่องมือตัดชิ้นมัน (มันบด)

สภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาการใช้เครื่องมือบดชิ้นมัน ดังแสดงในภาพที่ 16 (ง) ดังกล่าวมีดังต่อไปนี้ และในการบดชิ้นมันด้วยเครื่องบดดังแสดงในภาพที่ 16



(ก)



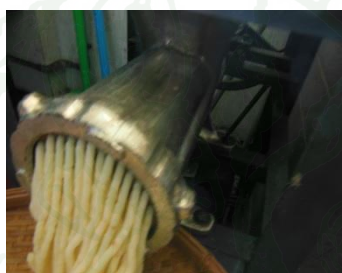
(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)



(ซ1)

(ซ2)

(ซ3)



(ช)

ภาพที่ 16 แสดงขั้นตอนการพิธีกรรมของหัวมันสำปะหลังสดโดยใช้เครื่องบด

(ก) – (ค) การตัด ปอกเปลือก และหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็กเพื่อใส่ลงในเครื่องบด

(ง) เครื่องบด (จ) – (ช) ลักษณะของชิ้นมันบดตลอดเปลือก (ซ1) มันบดพร้อมเปลือก

(ซ2) มันบดเฉพาะเปลือก (ซ3) ชิ้นมันบดที่ออกมาจากเครื่องบด

(ช) การอบมันบดให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

### 2.3.1 การศึกษาลักษณะของไขมันที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเป็นสับสเตรทสำหรับการหมัก

จากการทดลองพบว่าไขมันสำปะหลังที่ผ่านการนึ่งมาเชื่อมด้วยหม้อนึ่ง ความดันไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส 10 นาทีนั้นเมื่อนำไปบดด้วยเครื่องบดแล้วให้เส้นสายไขมันออกมาในลักษณะที่ต้องการดังแสดงในภาพที่ 17 (ข) คือมีลักษณะเป็นเส้น (เพื่อป้องกันการจับกันเป็นก้อน หรือหลอมรวมกัน) เมื่อเปรียบเทียบกับกรให้ความร้อนในสภาวะอื่นๆ ส่วนไขมันสำปะหลังสดนั้นเมื่อนำไปบดด้วยเครื่องดังกล่าวโดยตรงจะมีลักษณะเนื้อมันและไม่เป็นเส้นดังแสดงในภาพที่ 17 (ก) เนื่องจากว่า ไขมันสดนั้นมีน้ำอยู่มาก (70 - 80 เปอร์เซ็นต์) และแบ่งเป็นแบ่งคิบทำให้เมื่อนำไปเข้าเครื่องบดแล้วไม่ออกเป็นเส้นและไขมันสดแข็งมากทำให้ติดอยู่ในเครื่องบด



ภาพที่ 17 ลักษณะของมันบดที่ได้จากหัวสดและหัวสดนึ่งไอน้ำ

- (ก) ไขมันสดผ่านการบดด้วยเครื่องบด
- (ข) ไขมันที่ผ่านการนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนการบดด้วยเครื่องบด

### 2.3.2 การศึกษาวิธีการต่อเนื่องที่เหมาะสมหลังจากการใช้น้ำมันก่อนการบดด้วยเครื่องบด

ผลการทดลองพบว่าเมื่อปล่อยให้ไขมันสำปะหลังนิ่งให้เย็นลงค้างคืน (12 ชั่วโมง) แล้วนำมาบดจะได้มันบดที่มีลักษณะเป็นเส้นไม่จับกันระหว่างเส้นหลังการบดซึ่งแตกต่างกับไขมันที่ผ่านการนึ่งไอน้ำแล้วนำไปเข้าเครื่องบดทันทีขณะร้อน ได้สายมันเส้นที่มีลักษณะเหนียวติดกัน เมื่อนำไปบดแห้ง (60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง) และนำกลับมาแช่น้ำอีกเพื่อควบคุมความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมในวัตถุดิบ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำอีกครั้งก่อนการหมักในระดับพลาสติก จะเกิดการจับกันเป็นก้อนทำให้การเจริญและสร้างสีได้ไม่ดี

จากการทดลองพบว่าหลังจากแช่น้ำนาน 3 ชั่วโมงเพื่อเตรียมความชื้นเริ่มต้นสำหรับการหมักพบว่ามันบดจากหัวสดมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเท่ากับ 72.4 เปอร์เซ็นต์ มากกว่ามันบดที่ผ่านการนึ่งไอน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 11 และเมื่อหมักนาน 7 วันพบว่าการสร้างสารที่  $A_{420}$  และ  $A_{500}$  เท่ากับ 5.7 และ 3.4 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้ง สำหรับมันบดที่ผ่านการนึ่งไอน้ำ พบว่ามีความชื้นเริ่มต้นอยู่ในช่วง 55 – 58 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากที่หมักนาน 7 วัน พบว่าการสร้างสารที่  $A_{420}$  มีปริมาณเท่าๆกัน ที่ 20 - 24 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้ง และสารสีที่  $A_{500}$  มีค่า 17 – 18 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

**ตารางที่ 11** ความชื้นเริ่มต้นและสารสีที่ได้จากหมักของเชื้อราโมแนสส์สายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16 นาน 7 วัน จากการทดลองที่ 2.3.1 ที่แช่น้ำนาน 3 ชั่วโมง

| สถานะ | อุณหภูมิที่ใช้ในการนึ่งไอน้ำ (องศาเซลเซียส) | เวลาที่ใช้ในการนึ่งไอน้ำ (นาทีก) | ความชื้นเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์) | สารสีเมื่อหมัก 7 วัน (หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้ง) |           |
|-------|---------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|
|       |                                             |                                  |                                | $A_{420}$                                       | $A_{500}$ |
| ขึ้น  | สด                                          | -                                | -                              | 5.7                                             | 3.4       |
| มัน   | นึ่ง                                        | 110                              | 10                             | 24.1                                            | 18.6      |
|       |                                             |                                  | 15                             | 23.9                                            | 18.0      |
|       |                                             |                                  | 20                             | 24.7                                            | 17.3      |
|       |                                             | 121                              | 15                             | 20.7                                            | 18.3      |

**ตารางที่ 12** ความชื้นเริ่มต้นและสารสีที่ได้จากหมักของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16 จากการพรีทรีทเม้นต์ไขมันด้วยการนึ่งไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

| สภาวะ              | ความชื้นเริ่มต้น<br>(เปอร์เซ็นต์) | สารสีเมื่อหมัก 7 วัน<br>(หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) |           |
|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------|-----------|
|                    |                                   | $A_{420}$                                         | $A_{500}$ |
| บดทันที            | 57.1                              | 25.2                                              | 19.1      |
| ทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง | 57.3                              | 24.3                                              | 20.4      |

จากการทดลองพบว่าหลังจากนำมันบดที่เตรียมจากการนำไขมันที่นึ่งด้วยไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วมาบดทันที (ขณะร้อน) หลังผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อเตรียมการหมัก พบว่า มีความชื้นเริ่มต้น 57.1 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งใกล้เคียงกับมันบดที่มีการตั้งทิ้งไว้ให้เย็น 12 ชั่วโมงแล้วนำมาบดมีความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 57.3 เปอร์เซ็นต์ และหมักนาน 7 วันพบว่า มีการสร้างสารสีที่  $A_{420}$  และ  $A_{500}$  มีค่าใกล้เคียงกันที่ 25.2 และ 24.3 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งสำหรับสเปกตรัมของ  $A_{420}$  และ 19.1 และ 20.4 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งสำหรับสเปกตรัมของ  $A_{500}$  ตามลำดับ

แม้ว่าการทดลอง 2.3.2 จะเน้นว่ามันนึ่งด้วยไอน้ำดีกว่ามันสดแต่เมื่อพิจารณาการประหยัดพลังงาน ก็ยังต้องพิจารณาการพรีทรีทเม้นต์มันสดต่อไป

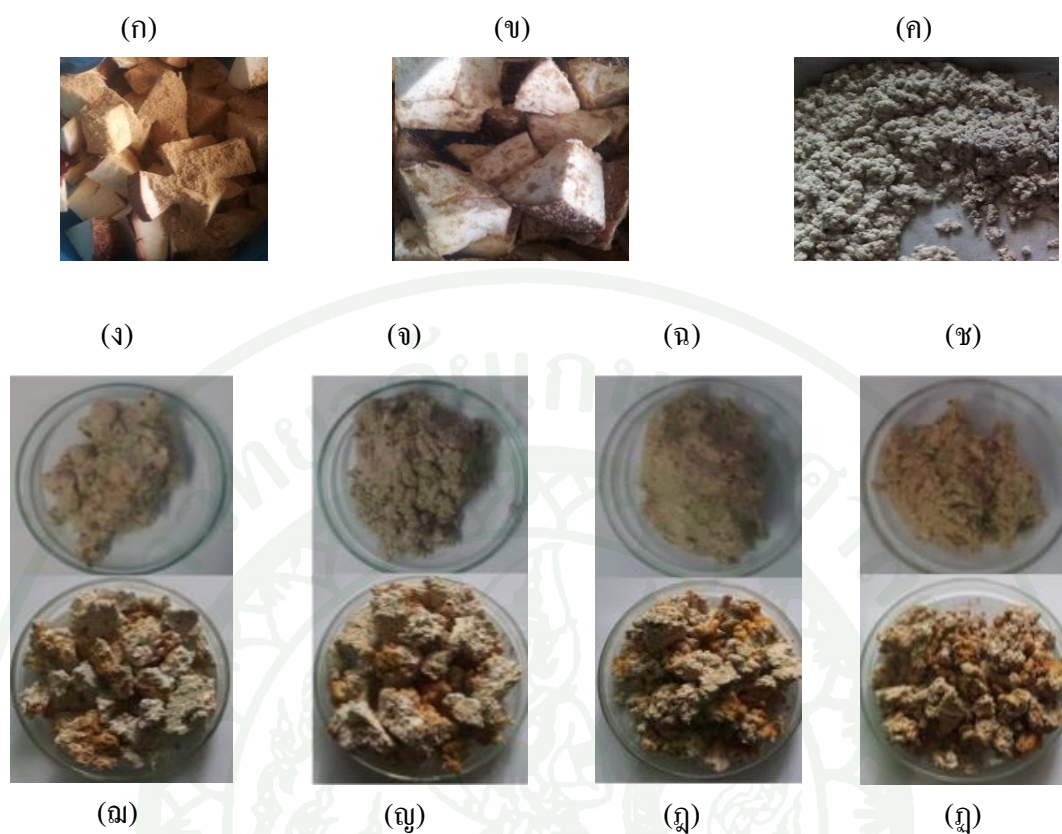
### 2.3.3 การศึกษาผลของการผสมรำละเอียดหรือรำหยาบ (รำผสม)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพิจารณาความเป็นไปได้ในการปรับปรุงรูปลักษณ์ของมันบดที่ได้จากชั้นมันสด (ต่อจากการทดลอง 2.3.2) โดยการผสมรำละเอียดหรือรำหยาบ (รำผสมของรำละเอียด แกลบ และปลายข้าวหัก) เข้าไปเพื่อลดน้ำในระบบ รวมทั้งช่วยเสริมแหล่งไนโตรเจน จากการทดลองได้แยกเป็นสองแบบคือ

#### 2.3.5.1 การศึกษาผลของการผสมรำละเอียดหรือรำหยาบ (รำผสม) ในชั้นมันสด

ผลการทดลองพบว่า เมื่อผสมรำละเอียดกับชั้นมันสดแล้วบด พบว่าลักษณะของมันที่บดได้นั้นยังคงละเอียดและมีน้ำอยู่มาก เนื่องจากรำที่ใส่เข้าไปนั้นจะไปจับที่ผิวด้านนอกของชั้นมันสดเท่านั้น และเมื่อบดชั้นมันสดนั้นแล้วน้ำที่มีอยู่ในชั้นมันสดยังเหลืออยู่ และรำนั้นยังติดที่เครื่องบดเป็นปริมาณมากอีกด้วย

ส่วนการนำชั้นมันสดมาบดก่อนหนึ่งครั้งแล้วจึงผสมรำในเปอร์เซ็นต์ต่างๆ กัน แล้วทำการบดครั้งที่สอง พบว่าได้ลักษณะของมันบดเป็นเส้นดีขึ้น สาเหตุอาจเนื่องมาจากรำไปผสมกับมันที่บดและจับกับโมเลกุลของน้ำในระบบได้มากขึ้นทำให้ปริมาณน้ำอิสระลดลง ลักษณะของมันบดจึงเป็นเส้นดีขึ้นและดีกว่าแบบแรกที่มีการผสมรำก่อนการบด จากนั้นเมื่อนำมันบดที่ได้ไปทำแห้งพบว่ามันน้ำหนักที่เบา หักได้ง่าย ดังภาพที่ 18 (ฉ – จ) หลังจากที้นำมันบดที่แห้งแล้วไปแช่น้ำเพื่อควบคุมความชื้นที่เหมาะสมพบว่ามันบดที่ได้นั้นและ แยกออกจากกันไม่เป็นลักษณะเส้น ตกตะกอนอยู่กันภาชนะที่ใช้แช่เนื่องจากชั้นมันสำปะหลังที่นำมาบดผสมกับรำนั้นเป็นหัวมันสดไม่ได้ผ่านความร้อน (หนึ่ง) ซึ่งเป้งภายในหัวมันยังเป็นแป้งดิบโดยจะไม่จับกับรำที่ใช้ผสมเพิ่มเข้าไปหลังจากนำไปแช่น้ำจึงหลุดออกจากกันแล้วตกตะกอนอยู่กันภาชนะดังกล่าว เพราะการนำหัวมันสำปะหลังมาตัดเป็นชิ้นแล้วบดทันทีโดยไม่ผ่านการนึ่งก่อนการบดไม่เหมาะสมด้วยเหตุผลดังกล่าว



ภาพที่ 18 การเตรียมมันสำปะหลังสดผสมรำละเอียด

(ก), (ข) ลักษณะชิ้นมันสดก่อนผสม

(ค) ลักษณะของมันสำปะหลังที่ผสมรำละเอียดแล้วบด (แบบที่ 1)

(ง) – (จ) มันสำปะหลังสดบด 1 ครั้งผสมกับรำละเอียดที่ 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับก่อนบดซ้ำ (แบบที่ 2)

(ฉ) – (ง) ลักษณะของมันที่ผ่านวิธีการแบบที่ 2 แล้วนำไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

การทดลองที่ 2.3.3 โดยใช้รำหยาบผสมมันสดนั้นได้ผลลัพธ์ดีกว่าการผสมรำละเอียดกับมันสด

### 2.3.3.2 การศึกษาผลของการผสมรำละเอียดและรำหยาบในชั้นมันนิ่งที่ผ่าน การให้ความร้อนไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปล่อยไว้ข้ามคืน

ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำชั้นมันสดที่ผ่านการให้ความร้อนมาบดแล้ว ผสมกับรำทั้งสองที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ พบว่ารำมีส่วนที่ทำให้เมื่อบดเสร็จแล้วออกมาเป็นเส้นได้ดี แต่เมื่อเปอร์เซ็นต์ของรำมากขึ้นจะพบว่ามันบดจะขาดเป็นเส้นเนื่องมาจากปริมาณของรำมากขึ้นไป แย่งจับน้ำอิสระในระบบ และเนื่องจากรำเองไม่เกาะติดกัน เนื้อมันสำปะหลังที่นิ่งผ่านความร้อน จะเหนียวจับกันเนื่องจากเกิดการเจลาติไนซ์ ทำให้เม็ดแป้งสุก และเมื่อทิ้งไว้ให้เย็นจะเกิดการจับกันของแป้งอีกครั้งทำให้เกิดความเหนียวและจับกันเป็นเส้น เมื่อเปอร์เซ็นต์ของรำมากมาผสม (ซึ่งปกติรำจะไม่จับกันเหนียว) จะมาจับกับเนื้อแป้ง ทำให้มันบดผสมรำไม่จับกันเป็นเส้นเหนียว และอีกทั้งเมื่อเปอร์เซ็นต์รำมากขึ้น เส้นเกิดการหักหรือขาดเป็นท่อนเล็กๆ อีกด้วย โดยรำหยาบจะเกิดได้มากกว่ารำละเอียดเนื่องจากรำหยาบมีส่วนผสมทั้งปลายข้าว แกลบ และรำข้าว โดยส่วนผสมนี้ทำให้เกิดการหักเป็นท่อน ส่วนรำละเอียดจะมีเฉพาะรำข้าวเท่านั้นทำให้เนื้อของมันที่บดได้ผสมรำละเอียดจะดูเป็นเนื้อเดียวกันมากกว่า จึงได้นำศึกษาวิธีการให้ความชื้นและควบคุมความชื้นในการหมักต่อไป ดังภาพที่ 19 (ผสมรำละเอียด) ภาพที่ 20 (ผสมรำหยาบ)



ภาพที่ 19 มันสำปะหลังสดที่ผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีแล้วทำการบดกับรำละเอียด

(ก) มันสำปะหลังสดที่ผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บด 1 ครั้ง

(ข) มันสำปะหลังสดที่ผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บด 2 ครั้ง

(ค) – (จ) มันสำปะหลังที่ผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บดครั้งที่ 1 ผสมรำละเอียด 4, 8, 12, 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับแล้ว บดครั้งที่ 2

(ข) มันสำปะหลังอบแห้งที่ผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บด 1 ครั้ง

(ข) มันสำปะหลังอบแห้งที่ผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บด 2 ครั้ง

(ณ) – (ญ) มันสำปะหลังอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ภายหลังผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บดครั้งที่ 1 ผสมรำละเอียด 4 8 12 15 ตามลำดับแล้วบดครั้งที่ 2



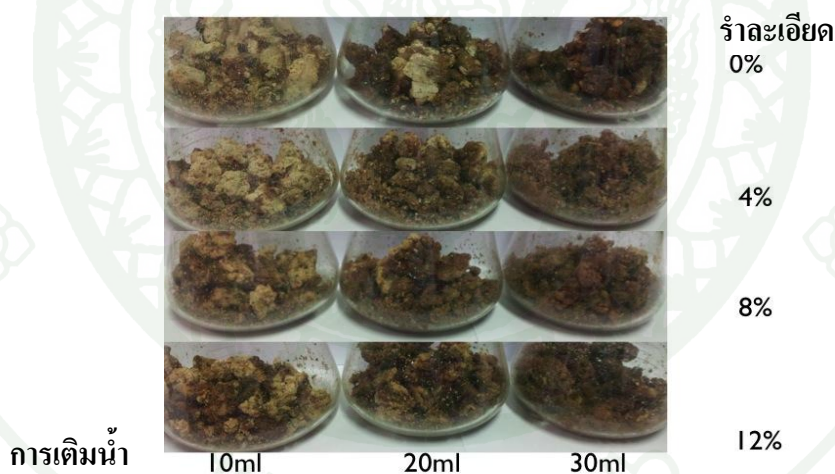
ภาพที่ 20 มันทดที่ผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วผสมกับร่ายาแล้วบดอีกครั้ง

(ก) – (ง) มันทดที่ผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บดครั้งที่ 1 ผสมร่ายา 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วบดซ้ำ

(จ) – (ง) มันทดที่ผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ภายหลังการผ่านความร้อน ไอ้น้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บดครั้งที่ 1 ผสมร่ายา 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับแล้วบดซ้ำ

#### 2.3.4 การศึกษาวิธีการให้ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับชั้นมันสำปะหลังสดที่ผ่านการอบแห้งจากการทดลองที่ 2.3.3.1 สำหรับการหมักในระดับฟลอสก์

ผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการเติมน้ำลงบนมันบดแห้ง การทดลองที่ 2.3.1 พบว่าเมื่อปริมาณน้ำมากขึ้นเปอร์เซ็นต์ความชื้นมากขึ้นเป็นลำดับดังแสดงในตารางที่ 13 ส่วนการเติมน้ำ 30 มิลลิลิตรลงไปบนมันบดแห้งจากการทดลองที่ 2.3.3.1 แล้วทำการนึ่งไอน้ำเพื่อปลดเชือกก่อนการหมัก พบว่ามันบดที่ได้จับกันเป็นก้อนดังแสดงในภาพที่ 21 ซึ่งเป็นลักษณะอันไม่พึงประสงค์ในการหมัก เพราะทำให้การไหลเวียนของอากาศ ความร้อนนั้นไม่ดี ส่วนในสภาวะที่ 2.3.2 เมื่อแช่น้ำในระยะเวลาตั้งแต่ 60 120 และ 180 นาที โดยความชื้นมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่าเส้นมันบดแห้งที่ได้จะหลุดออกจากกัน แล้วตกตะกอนอยู่ที่ก้นภาชนะที่ทำการแช่ ซึ่งหลังจากนึ่งไอน้ำเพื่อปลดเชือกก่อนการหมักพบว่าจับกันเป็นก้อน เพราะฉะนั้นทั้งการทดลอง ที่ 2.3.1 และ 2.3.2 จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส เพื่อการผลิตสารสีและสารลดคอเลสเตอรอล



ภาพที่ 21 ลักษณะของมันแห้งที่เติมน้ำ 10 20 และ 30 มิลลิลิตร ของมันที่ผสมร้อยละเยือก 0 4 8 และ 12 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

**ตารางที่ 13** ความชื้นเริ่มต้นของมันสดบดที่ผสมรำละเอียดที่ 4 8 12 เปอร์เซ็นต์ที่ได้จากการเติมน้ำ 10 20 และ 30 มิลลิลิตร

| สภาวะ                       | ปริมาณรำละเอียด<br>(เปอร์เซ็นต์) | ปริมาณน้ำที่เติม<br>(มิลลิลิตร) | ความชื้นเริ่มต้น<br>(เปอร์เซ็นต์) |
|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| ผสมรำละเอียดแล้วบด          | 0                                | 10                              | 15.7                              |
|                             |                                  | 20                              | 35.2                              |
|                             |                                  | 30                              | 37.9                              |
|                             | 4                                | 10                              | 18.2                              |
|                             |                                  | 20                              | 31.4                              |
|                             |                                  | 30                              | 41.2                              |
|                             | 8                                | 10                              | 18.9                              |
|                             |                                  | 20                              | 29.4                              |
|                             |                                  | 30                              | 36.1                              |
|                             | 12                               | 10                              | 15.4                              |
|                             |                                  | 20                              | 27.1                              |
|                             |                                  | 30                              | 31.4                              |
| บดแล้วผสมรำละเอียดแล้วบดซ้ำ | 0                                | 10                              | 12.3                              |
|                             |                                  | 20                              | 27.4                              |
|                             |                                  | 30                              | 29.6                              |
|                             | 4                                | 10                              | 15.1                              |
|                             |                                  | 20                              | 25.4                              |
|                             |                                  | 30                              | 27.9                              |
|                             | 8                                | 10                              | 16.2                              |
|                             |                                  | 20                              | 26.1                              |
|                             |                                  | 30                              | 30.4                              |
|                             | 12                               | 10                              | 17.2                              |
|                             |                                  | 20                              | 26.9                              |
|                             |                                  | 30                              | 32.5                              |

ตารางที่ 14 ความชื้นเริ่มต้นของมันสดบดที่ผสมรำละเอียดที่ 4 8 12 เปอร์เซ็นต์ที่ได้จากการแช่น้ำ เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้น

| สภาวะ              | ปริมาณรำละเอียด<br>(เปอร์เซ็นต์) | เวลาในการแช่น้ำ<br>(นาที) | ความชื้นเริ่มต้น<br>(เปอร์เซ็นต์) |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| ผสมรำละเอียดแล้วบด | 0                                | 15                        | 65.7                              |
|                    |                                  | 30                        | 71.2                              |
|                    |                                  | 45                        | 72.4                              |
|                    |                                  | 60                        | 71.6                              |
|                    |                                  | 120                       | 74.3                              |
|                    |                                  | 180                       | 76.2                              |
|                    | 4                                | 15                        | 64.9                              |
|                    |                                  | 30                        | 70.6                              |
|                    |                                  | 45                        | 71.3                              |
|                    |                                  | 60                        | 74.2                              |
|                    |                                  | 120                       | 75.3                              |
|                    |                                  | 180                       | 75.1                              |
|                    | 8                                | 15                        | 65.0                              |
|                    |                                  | 30                        | 71.5                              |
|                    |                                  | 45                        | 73.1                              |
|                    |                                  | 60                        | 75.6                              |
|                    |                                  | 120                       | 71.2                              |
|                    |                                  | 180                       | 74.9                              |
|                    | 12                               | 15                        | 66.2                              |
|                    |                                  | 30                        | 74.2                              |
|                    |                                  | 45                        | 72.3                              |
|                    |                                  | 60                        | 73.4                              |
|                    |                                  | 120                       | 73.6                              |
|                    |                                  | 180                       | 75.6                              |

ตารางที่ 14 (ต่อ)

| สภาวะ                           | ปริมาณ<br>รำละเอียด<br>(เปอร์เซ็นต์) | เวลาในการแช่น้ำ<br>(นาที) | ความชื้นเริ่มต้น<br>(เปอร์เซ็นต์) |
|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| บดแล้วผสมรำละเอียด<br>แล้วบดซ้ำ | 0                                    | 15                        | 63.1                              |
|                                 |                                      | 30                        | 69.2                              |
|                                 |                                      | 45                        | 70.6                              |
|                                 |                                      | 60                        | 72.1                              |
|                                 |                                      | 120                       | 72.8                              |
|                                 |                                      | 180                       | 75.3                              |
|                                 | 4                                    | 15                        | 67.4                              |
|                                 |                                      | 30                        | 69.8                              |
|                                 |                                      | 45                        | 69.6                              |
|                                 |                                      | 60                        | 72.4                              |
|                                 |                                      | 120                       | 73.2                              |
|                                 |                                      | 180                       | 75.9                              |
|                                 | 8                                    | 15                        | 70.6                              |
|                                 |                                      | 30                        | 72.6                              |
|                                 |                                      | 45                        | 74.9                              |
|                                 |                                      | 60                        | 75.8                              |
|                                 |                                      | 120                       | 76.3                              |
|                                 |                                      | 180                       | 76.1                              |
|                                 | 12                                   | 15                        | 70.2                              |
|                                 |                                      | 30                        | 73.4                              |
|                                 |                                      | 45                        | 70.6                              |
|                                 |                                      | 60                        | 77.1                              |
|                                 |                                      | 120                       | 75.3                              |
|                                 |                                      | 180                       | 75.6                              |

### 2.5.5 การศึกษาวิธีการให้ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับเส้นมันนึ่งบด จากการทดลองที่ 2.3.3.2 สำหรับการหมักในระดับพลาสติก

ในการศึกษาการสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลโดยใช้มันสำปะหลังเป็นสับสเตรทหลักในการหมักนั้น รูปแบบของมันสำปะหลังที่ใช้ และความชื้น เป็นสิ่งที่จำเป็นต้องทำการศึกษาเพื่อให้เหมาะสำหรับการเจริญและการสร้างสารที่ต้องการโดยถึงขั้นตอนนี้ได้เลือกการศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในการหมักโดยการแช่น้ำให้มีความชื้นที่พอเหมาะและสภาพลักษณะของมันสำปะหลังที่ได้จากการบดผสมรำต้องไม่ละเอียด เพราะเมื่อผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำแล้ว จะต้องไม่เกาะกันเป็นก้อน ซึ่งทำให้การไหลเวียนของอากาศและการถ่ายเทความร้อนในระหว่างการหมักไม่ดี ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลลดลงอีกด้วย โดยลักษณะที่ต้องการต้องยังคงเป็นลักษณะเส้นหรือท่อนหลังการแช่น้ำ ไม่จับกันเป็นก้อนและมีความชื้นเริ่มต้นที่ต้องการประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าเส้นสายมันบดที่ผสมกับรำละเอียดที่ 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ แช่นานาน 15 30 45 และ 60 นาที พบว่าลักษณะยังเป็นเส้น ยกเว้นแช่นานาน 60 นาทีของทุกเปอร์เซ็นต์รำละเอียดที่เริ่มมีการหลุดของรำละเอียดออกมา ดังภาพที่ 22 (ก - ข) และหลังจากนำไปนึ่งไอน้ำเพื่อทำการปลอดเชื้อแล้วหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้น จากการทดลองพบว่าเมื่อเวลาในการแช่น้ำมากขึ้น ความชื้นที่ได้ก็ต่างกันไป และลักษณะของสับสเตรทที่ได้ก็ต่างกัน โดยจะพบว่ามันสำปะหลังบดผสมกับรำละเอียดเมื่อมีเปอร์เซ็นต์ของรำละเอียดมากขึ้นความชื้นจะลดลง ความชื้นของมันสำปะหลังบดผสมรำละเอียดที่ 4 เปอร์เซ็นต์ จะมากกว่ามันสำปะหลังบดผสมรำละเอียดที่ 8 เปอร์เซ็นต์ทุกเวลาการแช่น้ำ ต่างจากมันสำปะหลังบดผสมรำละเอียดที่ 12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ 15 นาทีความชื้นจะต่ำกว่ามันสำปะหลังบดผสมรำละเอียดที่ 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่แช่น้ำที่ 30 – 60 นาที จะมีความชื้นมากกว่ามันสำปะหลังบดผสมรำละเอียดที่ 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมันสำปะหลังบดผสมรำละเอียดที่ 15 เปอร์เซ็นต์นั้น พบว่าความชื้นมากกว่ามันสำปะหลังบดผสมรำละเอียดที่ 4 8 และ 12 เปอร์เซ็นต์ในทุกระยะเวลาการแช่น้ำดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16

การทดลองแช่มันสำปะหลังกับรำสดดังแสดงในตารางที่ 16 เมื่อแช่น้ำที่ 15 30 45 และ 60 นาที พบว่าลักษณะของสายมันสำปะหลังบดผสมกับรำสดที่ 4 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังแช่น้ำยังคงความเป็นเส้นหรือท่อนได้ถึงนาที่ที่ 45 ขณะที่มันสำปะหลังบดผสมกับรำสดที่ 8 เปอร์เซ็นต์ต่ออยู่ที่นาที่ที่ 30 ส่วนมันสำปะหลังบดผสมกับรำสดที่ 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์เพียงแค่

15 นาที หลังจากนั้นทุกสภาวะรำกับมันสำปะหลังบดจะหลุดออกจากกัน แล้วตักตะกอนอยู่ใต้กัน ภาชนะ ไม่เป็นลักษณะเส้นหรือท่อนดังภาพที่ 23 (ก-ข) และเมื่อนำไปนึ่งไอน้ำเพื่อให้ปลอดเชื้อ และหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น พบว่าความชื้นจะเพิ่มขึ้นเมื่อเปอร์เซ็นต์ของรำผสมเพิ่มขึ้นดังภาพที่ 20 ซึ่งตรงข้ามกับการผสมกับรำละเอียดสาเหตุอันเนื่องมาจากรำผสมสามารถดูดซับน้ำได้ดีกว่า รำละเอียด ถึงแม้เมื่อเปอร์เซ็นต์รำผสมมากขึ้นลักษณะหลังการบดแล้วแช่น้ำจะหลุดออกมาจาก สายมันเส้น ตักตะกอนอยู่ใต้กันภาชนะที่ใช้แช่และเลาะก็ตาม ซึ่งมันบดและรำผสมต่างดูดซับน้ำ ส่งผลความชื้นมากกว่ามันผสมกับรำละเอียด

การศึกษารุ่นนี้ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเปอร์เซ็นต์ความชื้นของมัน สำปะหลังบดที่บดเพียงหนึ่งครั้งและสองครั้งเพราะจำนวนครั้งการบดอาจมีผลต่อความชื้นในการ ทดลองด้วย จึงทำการเปรียบเทียบเช่นเดียวกับการทดลองอื่นๆ โดยแช่น้ำที่ 15 30 45 และ 60 นาที พบว่ามันบดสองครั้งจะมีความชื้นมากขึ้นเมื่อเวลาการแช่น้ำมากขึ้น แต่จะน้อยกว่าทุกสภาวะ การแช่เมื่อเปรียบเทียบกับบดเพียงครั้งเดียว อาจเพราะการบดจะทำให้ละอองไมสที่หลุดออกจาก เม็ดแป้งหลังจากการให้ความร้อนไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เป็นอุณหภูมิที่เกิด การเจลาติไนซ์จับกันเองได้ทำให้เกิดการเหนียว เมื่ออบแห้งและนำมาแช่น้ำในระยะเวลาดังกล่าว ทำให้การดูดน้ำเข้าไปได้น้อยกว่าการบดเพียงครั้งเดียว

**การทดลองพรีทรีทเมนต์ของมันสำปะหลังเลือกใช้มันหนึ่งบด ผสมรำ ละเอียดเปอร์เซ็นต์ต่างๆบดซ้ำ แล้วอบแห้งให้เป็นสับสเตอร์กตั้งต้นของการหมัก โดยจะต้อง พิจารณา ความชื้นเริ่มต้นจากการแช่น้ำต่อไป และเมื่อพิจารณาลักษณะของเส้นมันผสมรำพร้อมใช้ หลังการปลอดเชื้อและการทำให้แห้งแล้วเพื่อให้มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 40-55 เปอร์เซ็นต์ ที่เชื้อราแดงจะเจริญได้ สภาวะที่สนใจมีดังต่อไปนี้**

1. มันบดที่ผสมรำละเอียด 4 เปอร์เซ็นต์ แช่น้ำ 60 นาที
2. มันบดที่ผสมรำละเอียด 8 เปอร์เซ็นต์ แช่น้ำ 60 นาที
3. มันบดที่ผสมรำละเอียด 12 เปอร์เซ็นต์ แช่น้ำ 60 นาที
4. มันบดที่ผสมรำละเอียด 15 เปอร์เซ็นต์ แช่น้ำ 45 60 นาที
5. มันบดที่ผสมรำผสม 4 เปอร์เซ็นต์ แช่น้ำ 15 30 45 นาที
6. มันบดที่ผสมรำผสม 8 เปอร์เซ็นต์ แช่น้ำ 15 30 นาที
7. มันบดที่ผสมรำผสม 12 เปอร์เซ็นต์ แช่น้ำ 15 นาที

## 8. มัณบดที่ผสมรำผสม 15 เปอร์เซนต์ แชน้ำ 15 นาที

การทดลองหมักมัณบดจากที่ได้เลือกมาทั้ง 8 ข้อ มีทั้งหมด 12 การทดลอง ผลการทดลองหมักโดยค่าสีมีดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16 ซึ่งมัณบดที่ได้จากการนึ่งไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ที่งไว้ให้เย็น 12 ชั่วโมง ที่ผสมรำละเอียดนั้น พบว่าค่าสีที่  $A_{420}$  มากที่สุดที่เปอร์เซนต์รำละเอียดที่ 15 เปอร์เซนต์ แชน้ำนาน 60 นาที รองลงมาคือ มัณบดที่รำละเอียด 4 8 และ 12 เปอร์เซนต์ ที่เวลาการแชน้ำเท่ากัน รำละเอียด 15 เปอร์เซนต์ ที่แชนาน 45 นาที มีค่าเท่ากับ 78.2 50.7 48.5 48.0 และ 47.3 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ และที่  $A_{500}$  มีค่าเท่ากับ 63.4 32.9 30.2 29.0 และ 28.6 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ

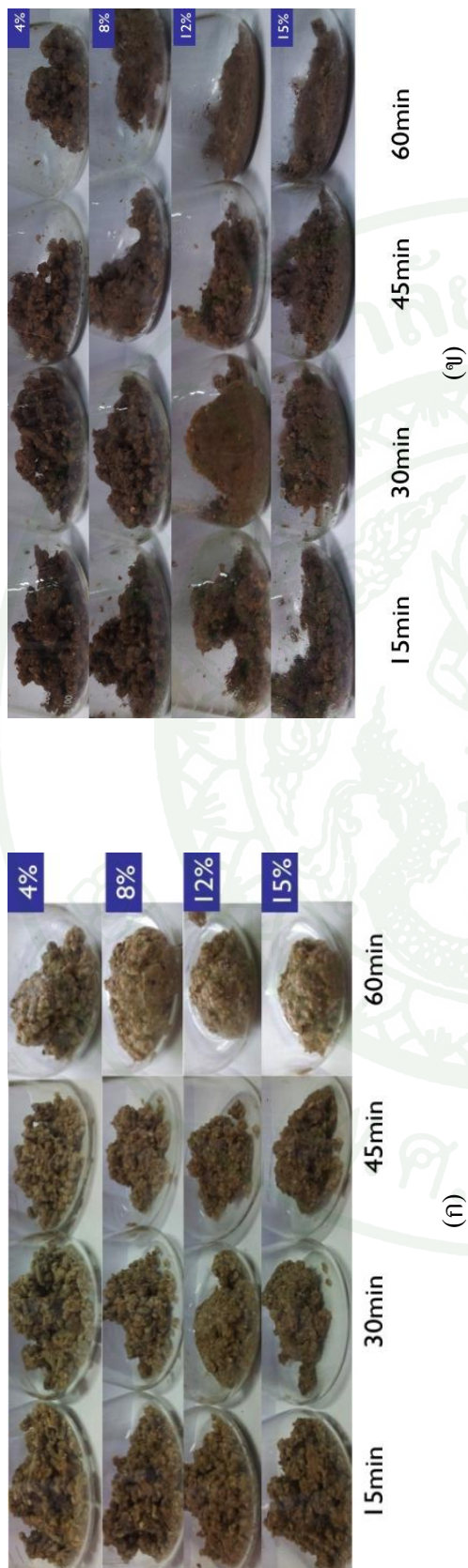
สำหรับมัณบดที่ได้จากการนึ่งไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ที่งไว้ให้เย็น 12 ชั่วโมง ที่ผสมรำผสมนั้น พบว่าค่าสีที่  $A_{420}$  มากที่สุดที่เปอร์เซนต์รำผสมที่ 15 เปอร์เซนต์ แชน้ำนาน 60 นาที รองลงมาคือที่รำผสม 12 เปอร์เซนต์ แชน้ำนาน 60 นาที ที่รำผสม 8 เปอร์เซนต์ แชน้ำนาน 30 15 นาที ที่รำผสม 4 เปอร์เซนต์ แชน้ำนาน 45 30 และ 15 นาที มีค่าเท่ากับ 122.1 120.4 117.7 98.2 96.2 88.7 และ 80.3 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ และที่  $A_{500}$  มีค่าเท่ากับ 99.2 87.3 73.8 72.4 82.1 52.4 และ 50.2 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ



ภาพที่ 22 ลักษณะผลการผสมรำละเอียดในชั้นมันนึ่งบด 2 ครั้งทำแห้งแล้วมาแช่น้ำ

(ก) มันสำปะหลังที่ผ่านความร้อนไอน้ำ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บดผสมรำละเอียดที่ 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ทำแห้งแล้วนำมาแช่น้ำที่ เวลา 15 30 45 และ 60 นาที

(ข) มันสำปะหลังที่ผ่านความร้อนไอน้ำ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที บดผสมรำละเอียดที่ 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ทำแห้งแล้วนำมาแช่น้ำที่ เวลา 15 30 45 และ 60 นาที ที่ผ่านการนี้้งแช่ด้วยความดันไอน้ำ



ภาพที่ 23 ลักษณะผลการผสมร่ายยาในชั้นมันนึ่งบด 2 ครั้ง ทำแห้งแล้วนำมาแช่น้ำ

(ก) มันสำปะหลังที่ผ่านความร้อน 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีบดผสมร่ายยาที่ 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่น้ำที่เวลา 15 30 45 และ 60 นาที

(ข) มันสำปะหลังที่ผ่านความร้อน 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีบดผสมร่ายยาที่ 4 8 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่น้ำที่เวลา 15 30 45 และ 60 นาทีที่ผ่านการนึ่งแช่ด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส

**ตารางที่ 15** ความชื้นเริ่มต้นและสารสีที่ได้จากหมักของเชื้อราโมแนสส์สายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16 บนชั้นมันบดที่ได้จากการนึ่งไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ที่ให้เย็นวัน 12 ชั่วโมง ที่ผสมรำละเอียดที่ 4 8 12 15 เปอร์เซ็นต์

| ปริมาณ<br>รำละเอียด<br>(เปอร์เซ็นต์) | เวลาในการ<br>แช่มันบด<br>(นาที) | ความชื้นเริ่มต้น<br>(เปอร์เซ็นต์) | สารสี<br>(หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง) |                  |
|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------|
|                                      |                                 |                                   | A <sub>420</sub>                    | A <sub>500</sub> |
| 4                                    | 15                              | 34.2                              | NA                                  | NA               |
|                                      | 30                              | 35.7                              | NA                                  | NA               |
|                                      | 45                              | 43.6                              | NA                                  | NA               |
|                                      | <b>60</b>                       | <b>51.2</b>                       | <b>50.7</b>                         | <b>32.9</b>      |
| 8                                    | 15                              | 29.2                              | NA                                  | NA               |
|                                      | 30                              | 30.4                              | NA                                  | NA               |
|                                      | 45                              | 37.6                              | NA                                  | NA               |
|                                      | <b>60</b>                       | <b>48.2</b>                       | <b>48.5</b>                         | <b>30.2</b>      |
| 12                                   | 15                              | 23.8                              | NA                                  | NA               |
|                                      | 30                              | 38.1                              | NA                                  | NA               |
|                                      | 45                              | 31.9                              | NA                                  | NA               |
|                                      | <b>60</b>                       | <b>49.3</b>                       | <b>48.0</b>                         | <b>31.3</b>      |
| 15                                   | 15                              | 35.0                              | NA                                  | NA               |
|                                      | 30                              | 39.2                              | NA                                  | NA               |
|                                      | <b>45</b>                       | <b>46.6</b>                       | <b>47.3</b>                         | <b>28.6</b>      |
|                                      | <b>60</b>                       | <b>57.9</b>                       | <b>78.2</b>                         | <b>63.4</b>      |

**ตารางที่ 16** ความชื้นเริ่มต้นและสารสีที่ได้จากหมักของเชื้อราโมแนสค์สสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16 บนชิ้นมันบดที่ได้จากการนึ่งไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ที่ให้เย็น 12 ชั่วโมง ที่ผสมรำผสมที่ 4 8 12 15 เปอร์เซ็นต์

| ปริมาณ<br>รำผสม<br>(เปอร์เซ็นต์) | เวลาในการ<br>แช่มันบด<br>(นาที) | ความชื้นเริ่มต้น<br>(เปอร์เซ็นต์) | สารสี<br>(หน่วยต่อกรัมสับสเตรทแห้ง) |                  |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------|
|                                  |                                 |                                   | A <sub>420</sub>                    | A <sub>500</sub> |
| 4                                | 15                              | 40.6                              | 80.3                                | 50.2             |
|                                  | 30                              | 43.1                              | 88.7                                | 52.4             |
|                                  | 45                              | 52.4                              | 96.6                                | 82.1             |
|                                  | 60                              | 57.3                              | NA                                  | NA               |
| 8                                | 15                              | 43.6                              | 98.2                                | 72.4             |
|                                  | 30                              | 52.4                              | 117.7                               | 73.8             |
|                                  | 45                              | 60.8                              | NA                                  | NA               |
|                                  | 60                              | 63.7                              | NA                                  | NA               |
| 12                               | 15                              | 53.1                              | 120.4                               | 87.3             |
|                                  | 30                              | 61.8                              | NA                                  | NA               |
|                                  | 45                              | 62.7                              | NA                                  | NA               |
|                                  | 60                              | 68.1                              | NA                                  | NA               |
| 15                               | 15                              | 50.8                              | 122.1                               | 99.2             |
|                                  | 30                              | 61.7                              | NA                                  | NA               |
|                                  | 45                              | 59.1                              | NA                                  | NA               |
|                                  | 60                              | 61.4                              | NA                                  | NA               |

จากการทดลองที่ 2 พบว่าเมื่อนำไปหมักด้วยเชื้อราโมแนสค์สสายพันธุ์ KB10M16 พบว่าเมื่อหมักบนชิ้นมันขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตรนั้นมีค่าสีสูงที่สุดทั้งสองความยาวคลื่นที่สนใจ ซึ่งมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับหมักบนรูปแบบมันอื่นๆ ดังที่ได้กล่าวมาในข้างต้น ผู้ทดลองจึงเลือกชิ้นมันขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร เพื่อใช้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสีและสารลดคอเลสเตอรอลในการหมักในระดับฟลasksต่อไป

### 3 การศึกษาภาวะการผลิตสีและสารลดคอเลสเตอรอลในระดับฟลาสก์

#### 3.1 การศึกษาความขึ้นเริ่มต้นที่เหมาะสมในการสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอล

จากการศึกษาวิธีการให้ความขึ้นเริ่มต้นที่เหมาะสมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการหมักในระดับฟลาสก์ 100 กรัม พบว่าการเอาน้ำขึ้นมันมาแช่น้ำก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำแล้วจึงหมัก เชื้อราโมแนสค์สามารถสร้างสีโดยมองเห็นได้ภายในเวลา 3 วันของการหมักดีกว่าวิธีการเติมน้ำภายหลังการนึ่งปลอดเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 24 เนื่องในการแช่ขึ้นมันในน้ำก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำนั้นทำให้ขึ้นมันสามารถดูดน้ำเข้าไปในขึ้นมันทั้งก้อน อีกทั้งการแช่น้ำก่อนการนึ่งปลอดเชื้อวิธีนี้ยังสามารถชะล้างเศษผงแป้งที่เกิดจากกระบวนการเตรียมขึ้นมันให้หลุดออกไป เพราะผงแป้งนี้จะเป็นปัญหาอย่างมากในการหมัก เพราะเมื่อได้รับความร้อนขึ้นจากการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำจะจับตัวกันกับขึ้นมันแล้วทำให้เกิดเป็นก้อน หรือเมือกเหนียว ทำให้ไม่เหมาะสำหรับการผลิตสารสี ส่วนการเติมน้ำภายหลังการนึ่งปลอดเชื่อนั้นพบว่าขึ้นมันจะไม่สามารถดูดน้ำเข้าไปได้ทั่วทั้งก้อน อีกทั้งการนึ่งฆ่าเชื้อขึ้นมันก่อนเติมน้ำดังกล่าวนี้พบว่า แป้งที่ยังเคลือบขึ้นมันอยู่ก่อนจะสามารถดูดซับไอน้ำจากกระบวนการนึ่งไอน้ำได้ และทำให้ผงแป้งเหล่านี้สุก ส่วนภายในบริเวณขึ้นมันที่ไม่มีน้ำซึมเข้าไปจะแห้งกว่าปกติ ทำให้เชื้อราโมแนสค์เจริญได้ไม่ดีและไม่สม่ำเสมอ และซ้วยังมีปัญหามาจากผงแป้งที่ทำให้จับเป็นก้อนที่ก้นฟลาสก์อีกด้วย เพราะฉะนั้นจึงเลือกการปรับความขึ้นเริ่มต้นด้วยการแช่ขึ้นมันในน้ำก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ



เติมน้ำภายหลังการการนึ่งฆ่าเชื้อ

แช่น้ำ 2 ชั่วโมงก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ

**ภาพที่ 24** เปรียบเทียบการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส 2 สายพันธุ์ในรูปแบบการปรับความชื้นเริ่มต้นต่างกัน

จากการทดลองพบว่าขึ้นมันที่แช่น้ำนาน 1 2 และ 3 ชั่วโมงมีค่าความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 47.9 49.2 และ 52.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 25 (ก) และพีเอชเริ่มต้น 6.4 6.2 และ 6.3 ตามลำดับ ซึ่งพีเอชจะลดลงถึงพีเอช ประมาณ 5 ในวันที่ 6 และจะคงที่ตลอดประมาณพีเอช 5 ตลอดการทดลองดังแสดงในภาพที่ 25 (ข)

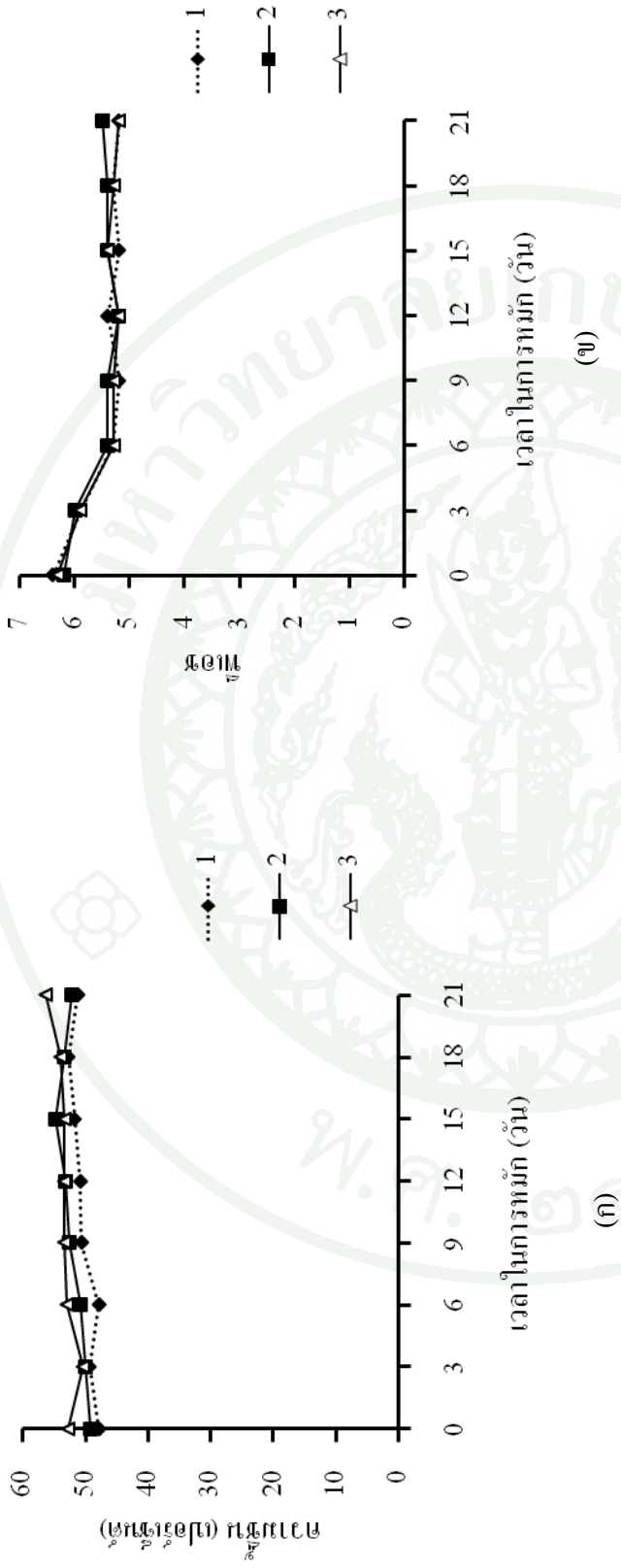
ขึ้นมันหมักที่แช่น้ำที่ 3 ชั่วโมงให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลสในวันที่ 6 สูงที่สุด รองลงมาคือที่แช่น้ำนาน 2 และ 1 ชั่วโมงโดยมีค่าเท่ากับ 25,716.3 24,136.4 และ 20,145.1 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ โดยทั้งรูปแบบการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสมีรูปแบบคล้ายกันทั้งหมดคือลดลงตลอดระยะเวลาการหมักดังแสดงในภาพที่ 26 (ก)

ขึ้นมันหมักที่แช่น้ำที่ 3 ชั่วโมงพบปริมาณกลูโคซามีนในวันที่ 9 มากที่สุด รองลงมาคือที่แช่น้ำนาน 2 และ 1 ชั่วโมงโดยมีค่าเท่ากับ 2,762.1 2,569.7 และ 1,024.4 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ โดยพบว่าปริมาณกลูโคซามีนของขึ้นมันหมักที่แช่น้ำนาน 2 และ 3 ชั่วโมงเมื่อเวลาการหมักมากขึ้นปริมาณลดลงเล็กน้อย ซึ่งต่างจากขึ้นมันหมักที่แช่น้ำนาน 1 ชั่วโมงที่มีปริมาณมากขึ้นจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 26 (ข)

จากการศึกษาที่ใช้ในการพบว่าเมื่อแช่น้ำที่ 1 2 และ 3 ชั่วโมง ในวันที่ 21 ของการหมักพบว่าขึ้นมันหมักที่แช่น้ำนาน 3 ชั่วโมงให้ค่าสีมากที่สุด รองลงมาคือขึ้นมันหมักที่แช่น้ำนาน 2 และ 1 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 695.4 567.6 และ 376.7 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งที่  $A_{420}$  ตามลำดับ และที่  $A_{500}$  มีค่าเท่ากับ 623.6 504.6 และ 329.6 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และจาก

การทดลองพบว่าในวันที่ 18 ของการหมักพบว่าชั้นมันหมักที่แช่น้ำนาน 2 และ 3 ชั่วโมงมีปริมาณสีค่าใกล้เคียงกันทั้งสองความยาวคลื่นสูงสุดที่สนใจ ดังแสดงในภาพที่ 27 (ก) และ (ข) ส่วนชั้นมันที่แช่น้ำนาน 1 ชั่วโมงพบว่าที่เวลาการหมัก 9 วันมีปริมาณสารสีทั้งสองความยาวคลื่นสูงสุดมากกว่าชั้นมันหมักที่แช่น้ำนาน 2 และ 3 ชั่วโมง แต่ค่าสีลดลงเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 18 ซึ่งต่ำกว่าค่าสีของชั้นมันหมักที่แช่น้ำนาน 2 และ 3 ชั่วโมงในเวลาการหมักเท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 27 (ก) และ (ข)

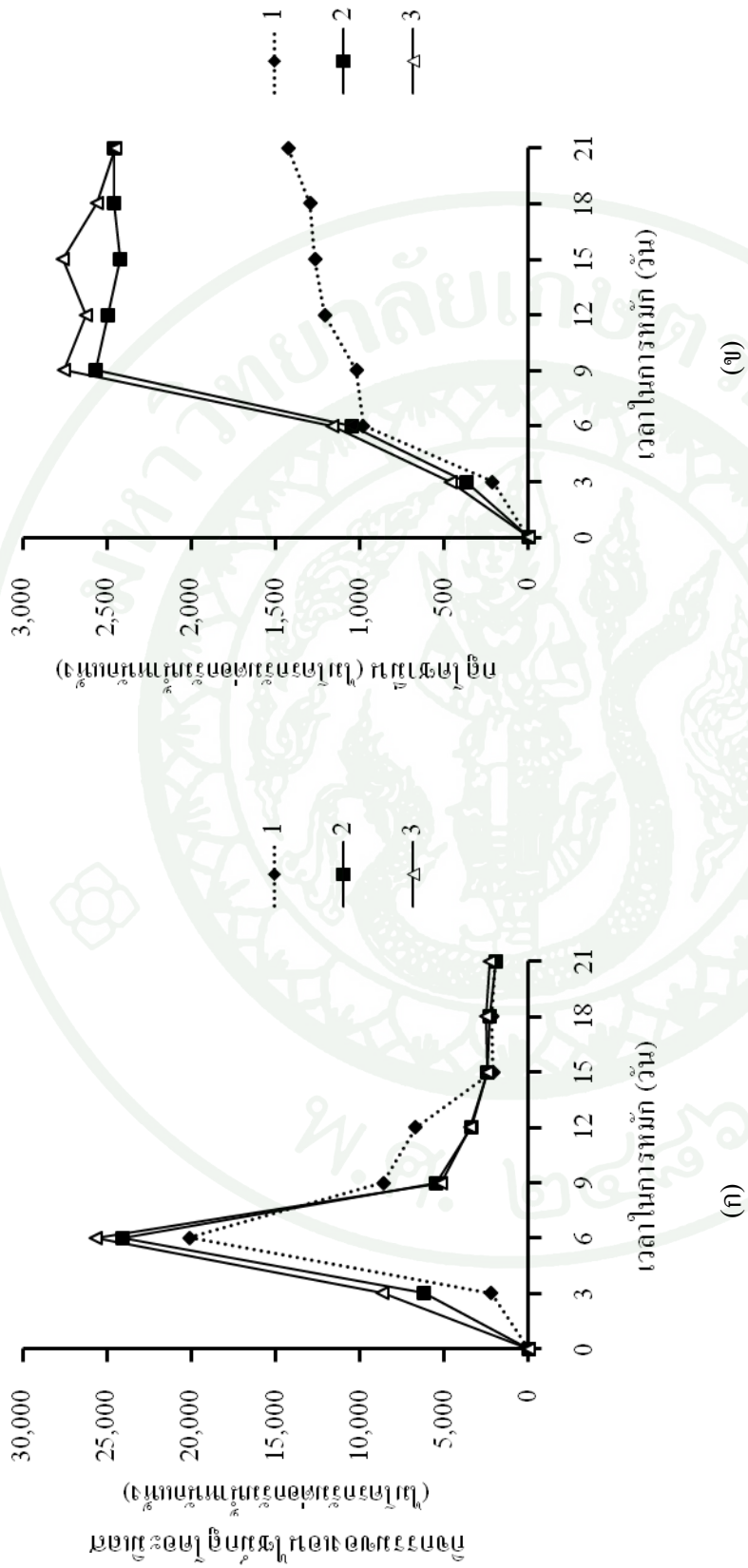
สำหรับการสร้างสารลดคอเลสเตอรอลพบว่าการสร้างในวันที่ 9 และมีการสร้างอย่างรวดเร็วในวันที่ 12 ของการทดลองถึงวันที่ 15 หลังจากนั้นพบว่าปริมาณสารลดคอเลสเตอรอลมีการลดลงในทุกสภาวะการเลี้ยง โดยในการแช่น้ำ 2 ชั่วโมงจึงเหมาะสมสำหรับการสร้างสีและสารลดคอเลสเตอรอลดังภาพที่ 28



ภาพที่ 25 เปรียบเทียบสภาพในการหมักโดยการแลกเปลี่ยนน้ำใน 12 และ 3 ชั่วโมง

(ก) ความเข้มข้นของน้ำหมักที่ผ่านการแลกเปลี่ยนน้ำใน 12 และ 3 ชั่วโมง

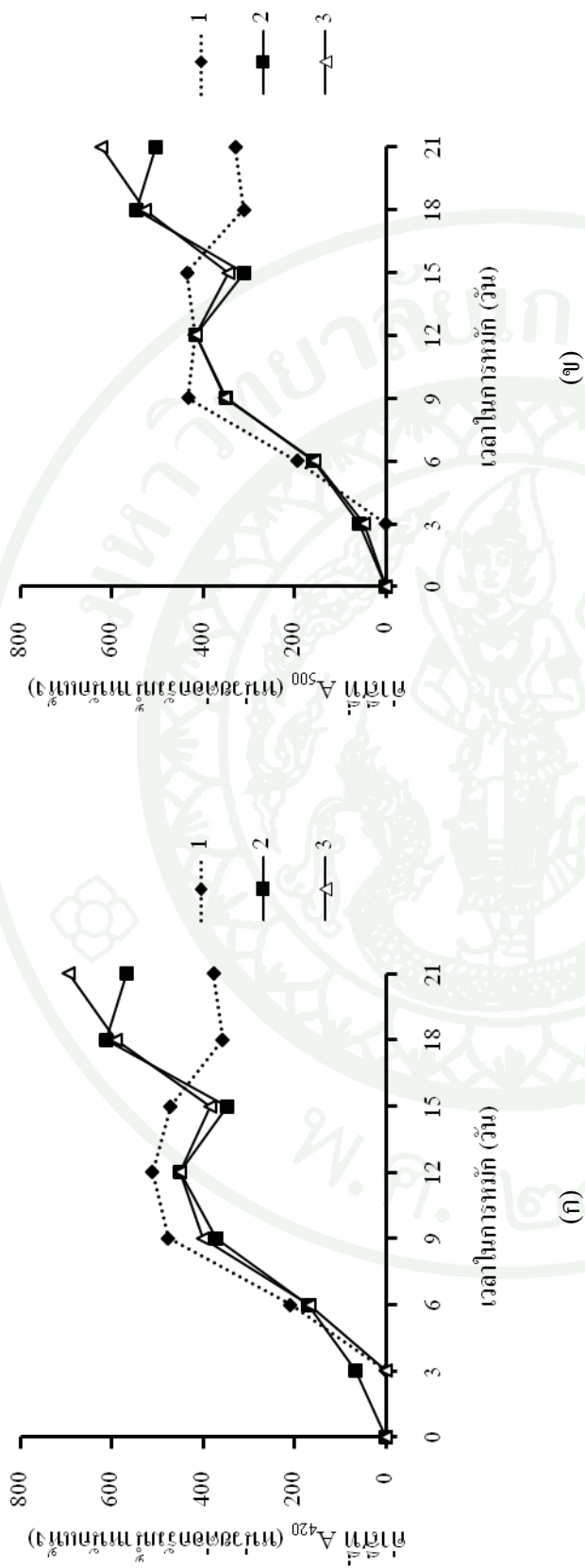
(ข) ปริมาณของน้ำหมักที่ผ่านการแลกเปลี่ยนน้ำใน 12 และ 3 ชั่วโมง



ภาพที่ 26 เปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์กลูโคสและกลูโคสโคโคซีน ของชีวมวลที่แช่นาน 12 และ 3 ชั่วโมง

(ก) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสโคโคซีนที่ผ่านการแช่นาน 12 และ 3 ชั่วโมง

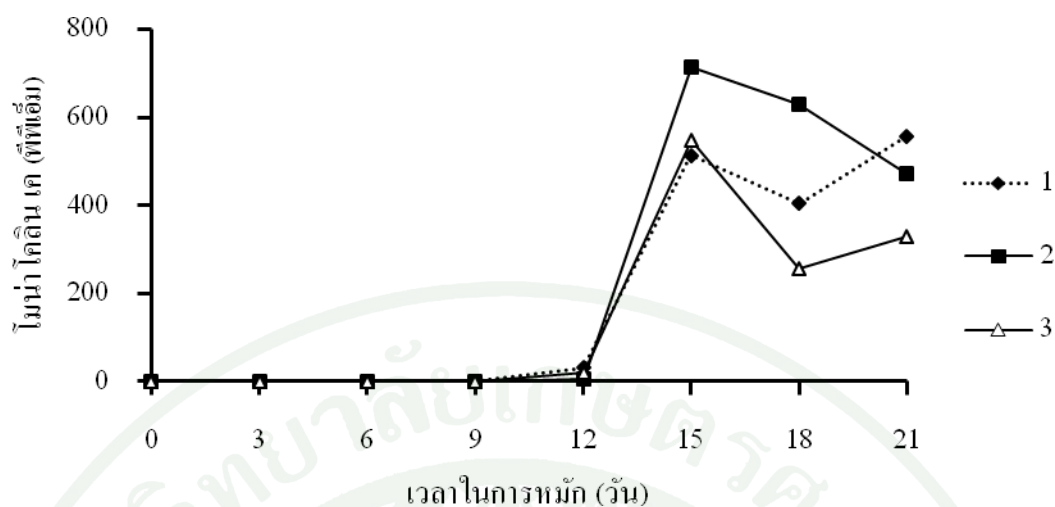
(ข) ปริมาณกลูโคสโคโคซีนที่ผ่านการแช่นาน 12 และ 3 ชั่วโมง



ภาพที่ 27 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการสร้างสีของหมัก

(ก) ค่าสีที่  $A_{420}$  ระหว่างการหมักของชิ้นมันผ่านการแช่น้ำ 12 และ 3 ชั่วโมง

(ข) ค่าสีที่  $A_{500}$  ระหว่างการหมักของชิ้นมันที่แช่น้ำ 12 และ 3 ชั่วโมง



ภาพที่ 28 สารลดคอเลสเตอรอลที่ถูกสร้างระหว่างการหมักของชั้นมันที่แช่น้ำ 1 2 และ 3 ชั่วโมง

สรุปแล้วความชื้นเริ่มต้นของมันลูกเต้าแช่น้ำ 1 2 และ 3 ชั่วโมง มีความชื้นเริ่มต้น 47.9 49.2 และ 52.9 เปอร์เซ็นต์ความล้าดับ โดยที่ความชื้นเริ่มต้น 52.9 เปอร์เซ็นต์เหมาะต่อการสร้าง เอนไซม์กลูโคอะมิเลสและการสร้างสี ขณะที่ความชื้นเริ่มต้น 49.2 เปอร์เซ็นต์เหมาะต่อการสร้าง สารลดคอเลสเตอรอล (โมนาโคลิน) ได้เลือกความชื้นเริ่มต้นโดยการแช่น้ำนาน 2 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า มีปริมาณสีในวันที่ 18 ใกล้เคียงกันกับการแช่น้ำนาน 3 ชั่วโมงซึ่งเป็นการประหยัดเวลาในการทำ การทดลอง และระยะการแช่ชั้นมันในน้ำนาน 2 ชั่วโมงให้ปริมาณโมนาโคลิน เค มากที่สุดอีกด้วย

### 3.3 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส สารสีและสารลดคอเลสเตอรอล

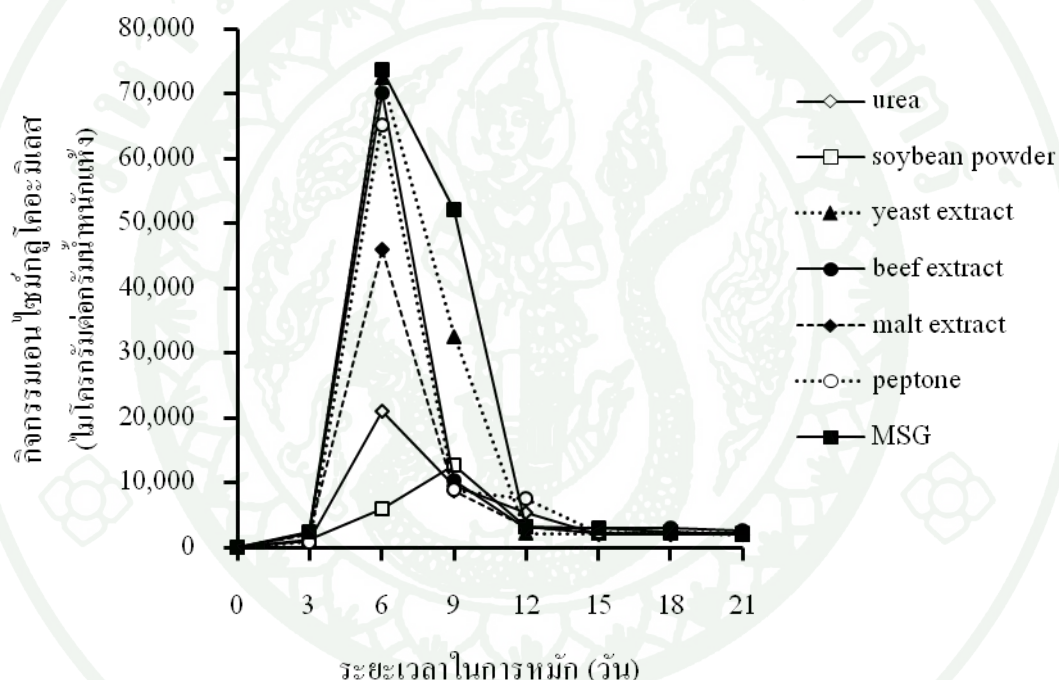
3.3.1 จากการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสร้างสารสีและสารลดคอเลสเตอรอล พบว่าชิ้นมันเมื่อแช่น้ำที่ผสมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ พบกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูงสุดในวันที่ 6 ซึ่งชิ้นมันหมักที่ผสมกับ monosodium glutamate ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด รองลงมาคือชิ้นมันหมักที่ผสมกับ yeast extract, beef extract, peptone, malt extract, urea และ soybean powder เท่ากับ 73,698.2 72,560.3 70,012.3 65,240.6 45,890.0 21,063.9 และ 5,890.0 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ แต่ชิ้นมันหมักแช่น้ำที่ผสม soybean power เพียงตัวอย่างเดียวที่พบกิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูงที่สุดในวันที่ 9 มีค่าเท่ากับ 12,684.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งแต่ก็ยังมีค่าน้อยกว่าชิ้นมันหมักที่แช่ด้วยสารไนโตรเจนอินทรีย์อื่นๆ โดยรูปแบบการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสจะคล้ายกันคือพบลดลงเรื่อยๆ ภายหลังได้ค่าสูงสุดตลอดการหมักดังแสดงในภาพที่ 29

ชิ้นมันเมื่อแช่น้ำที่ผสมกับ monosodium glutamate ให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดในวันที่ 9 ของการหมัก เท่ากับ 5,896.2 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เป็นค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะแช่น้ำผสมกับแหล่งไนโตรเจนอื่นซึ่งมีปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดในวันที่ 12 ของการหมักโดยพบว่ารูปแบบกลูโคซามีนที่พบจะคล้ายๆ กันทุกสถานะคือมีค่าสูงสุดวันที่ 12 แล้วมาน้อยดังนี้ yeast extract, peptone, malt extract, urea และ soybean powder มีค่าเท่ากับ 5,234.7 3,208.3 2,489.7 2,364.2 และ 2,214.4 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ และจะคงที่หรือลดลงเล็กน้อยตลอดการหมักดังแสดงในภาพที่ 30

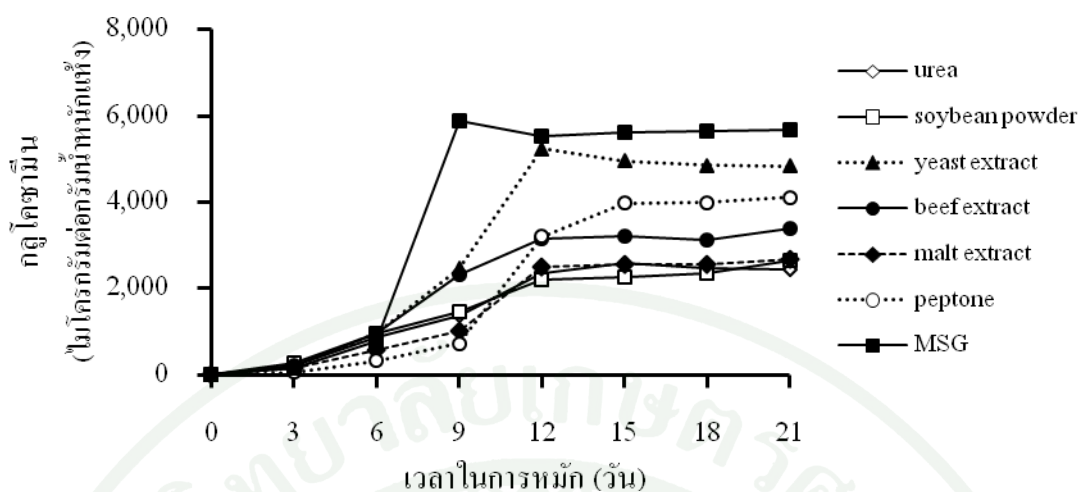
ชิ้นมันเมื่อแช่น้ำที่ผสมกับ monosodium glutamate พบว่าค่า  $A_{420}$  มีการสร้างสารสีอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 12 ของการหมัก และสร้างเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงสิ้นสุดการหมักแต่มีอัตราการสร้างที่ลดลง แต่ที่  $A_{500}$  พบว่าการสร้างสารสีอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 – 6 ของการทดลองและค่อนข้างคงที่ไปตลอดการทดลอง โดยในวันที่ 21 ของการหมักมีค่าสีที่  $A_{420}$  และ  $A_{500}$  เท่ากับ 1,410.5 และ 942.6 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 31 และ 32

นอกจากนี้ monosodium glutamate ยังเหมาะสำหรับการสร้างสารลดคอเลสเตอรอลมากกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่นๆ โดยเริ่มมีการสร้างในวันที่ 9 เพิ่มขึ้นในอัตราที่รวดเร็วถึงวันที่ 12 และจะมีอัตราลดลงจนจบการหมัก สารโมโนโคลีนที่มากที่สุดพบในวันที่ 21 ของการหมักเท่ากับ 11,270.5 พีพีเอ็ม ดังแสดงในภาพที่ 33

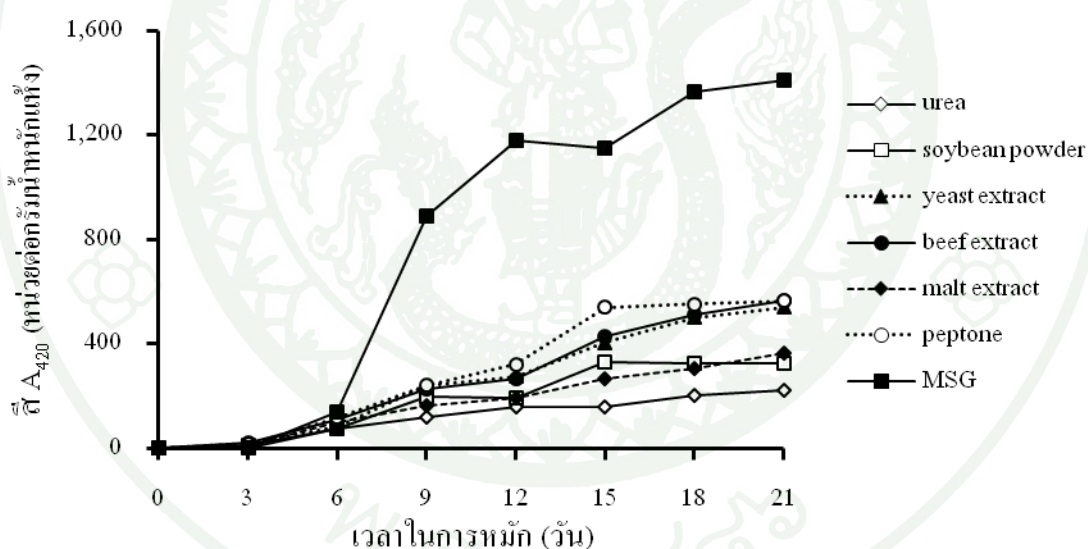
Monosodium glutamate เป็นสารอินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนได้ เชื้อราโมแนสคัสสามารถใช้ในการเจริญและผลิตสารเมแทบอลิไทต์ได้มากกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ



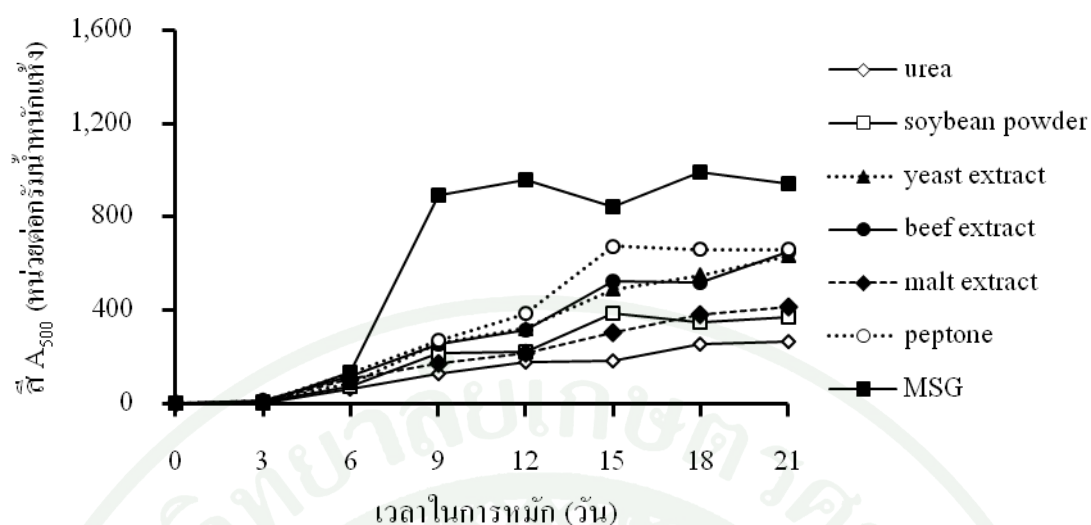
ภาพที่ 29 แสดงปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ของชั้นน้ำมันหมักที่แช่ด้วยไนโตรเจนอินทรีย์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16



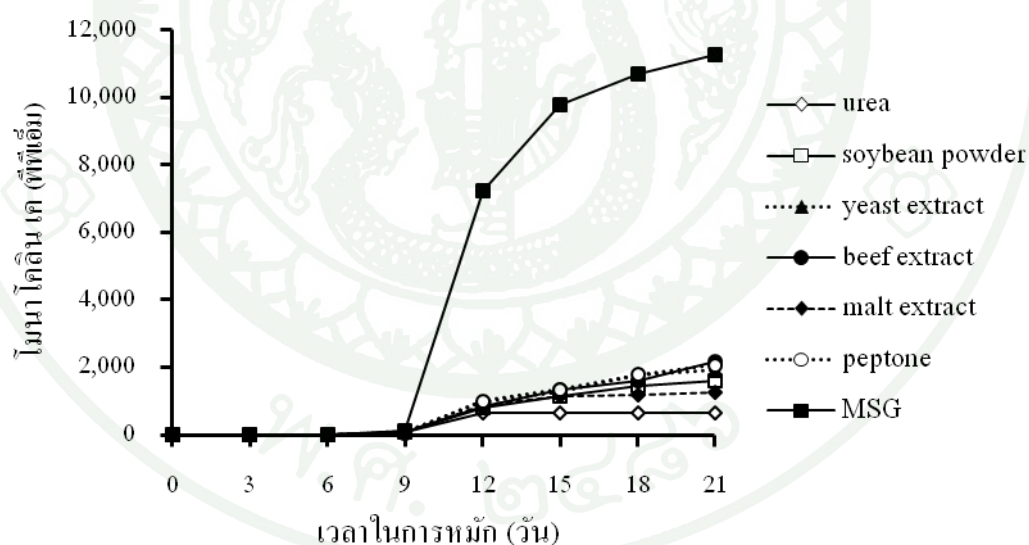
ภาพที่ 30 แสดงปริมาณกลูโคซามีนของชั้นมันหมักที่แช่ด้วยไนโตรเจนอินทรีย์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16



ภาพที่ 31 ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการสร้างสีของมันหมัก ค่าสีที่  $A_{420}$  ระหว่างการหมักของชั้นมันที่แช่น้ำผสมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 ชั่วโมงของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16



ภาพที่ 32 ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการสร้างสีของมัยค้ำ ค่าสีที่  $A_{500}$  ระหว่างการหมักของชิ้นมันที่แช่น้ำผสมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 2 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16



ภาพที่ 33 สารคอเลสเตอรอลที่ถูกสร้างระหว่างการหมักของชิ้นมันที่แช่น้ำผสมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 2 ชั่วโมงของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16

3.3.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสร้างสีและสารลดคอเลสเตอรอลโดยการแช่หมักขึ้นในน้ำ ที่ผสม 4 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ นาน 2 ชั่วโมงของ  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  และ  $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$  สะเด็ดน้ำ 15 นาที ชั่ง 100 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) และปลูกเชื้อโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง ศึกษาการสร้างสีและสารลดคอเลสเตอรอล

จากการทดลองพบว่าเมื่อหมักขึ้นมันที่เชื้อสารละลายอินทรีย์ 4 เปอร์เซนต์ พบกิจกรรมเอนไซม์กลูโคสอะมิเลสสูงสุดในวันที่ 6 ของการหมัก ซึ่งขึ้นมันหมักแช่ในสารละลาย  $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$  ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด รองลงมาคือ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  และ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  มีค่าเท่ากับ 37,869.0 33,896.1 28,143.2 27,051.3 และ 12,364.1 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งตามลำดับ โดยรูปแบบของการผลิตเอนไซม์กลูโคสอะมิเลสจะคล้ายๆ กันคือพบกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสอะมิเลสมากที่สุดวันที่ 6 ของการหมัก และลดลงเรื่อยๆ จนถึงสิ้นสุดการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 34

ขึ้นมันหมักเมื่อนำมาศึกษาปริมาณกลูโคซามีนพบว่าปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดในวันที่ 12 ของการหมัก ซึ่งขึ้นมันหมักที่แช่ใน  $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$  ให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงสุด รองลงมาคือ  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  และ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  มีเท่ากับ 3,796.2 3,701.8 3,526.1 และ 3,004.6 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งตามลำดับ และจะลดลงเล็กน้อยหรือมีค่าคงที่ไปจนถึงสิ้นสุดการหมัก ขึ้นมันหมักที่แช่ในสารละลาย  $\text{NH}_4\text{Cl}$  พบว่ามีการอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูโคซามีนมากที่สุดในวัน 9 ของการหมัก (2,230.7 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง) แล้วเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (คงที่) จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 35

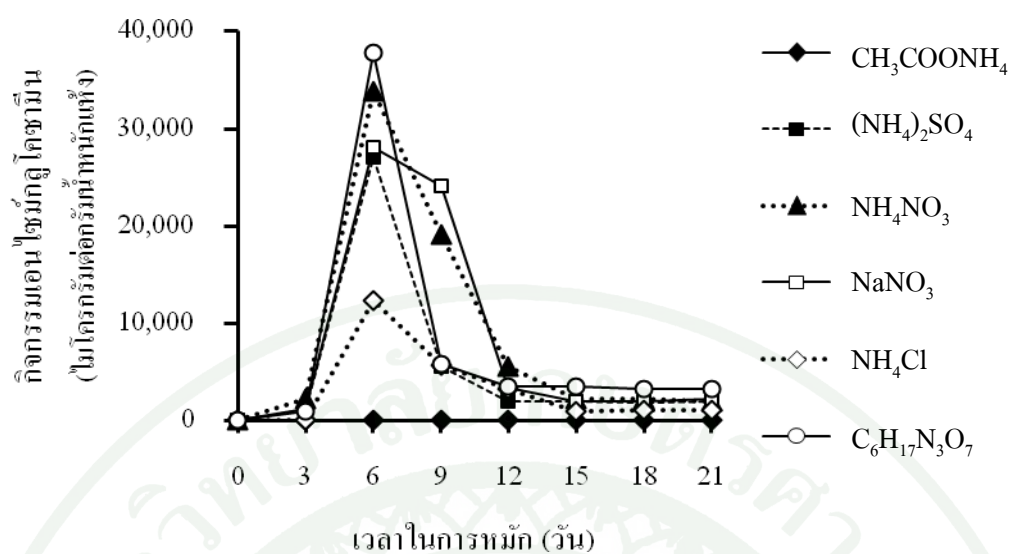
จากผลการทดลองพบว่าเมื่อแช่หมักสำเร็จแล้วกับสารละลายอินทรีย์ เริ่มมีการสร้างสีในวันที่ 3 และสร้างอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 6 – 9 ของการทดลอง หลังจากนั้นจะมีการสร้างสีเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดการทดลอง โดยในวันที่ 9 ขึ้นมันสำเร็จที่แช่ด้วยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ให้ค่าสีที่  $A_{420}$  และ  $A_{500}$  มากที่สุด รองลงมาคือ  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  และ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  มีค่าเท่ากับ 505.1 392.6 368.4 271.1 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้งตามลำดับ และค่าสีที่  $A_{500}$  เท่ากับ 398.0 313.5 297.3 169.2 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้งตามลำดับ แต่ขึ้นมันหมักที่แช่ในสารละลาย  $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$  จะพบว่าทั้งค่าสีที่  $A_{420}$  และ  $A_{500}$  ถูกสร้างเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงสิ้นสุดการหมัก (วันที่ 21) และยังพบว่ามีความมากที่สุดในทุกสภาวะการแช่ในสารละลายที่เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ มีค่าเท่ากับ 682.1 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้งที่  $A_{420}$  และ 803.9 หน่วยต่อกรัม

น้ำหนักแห้งที่  $A_{500}$  ดังแสดงในภาพที่ 36 และ 37

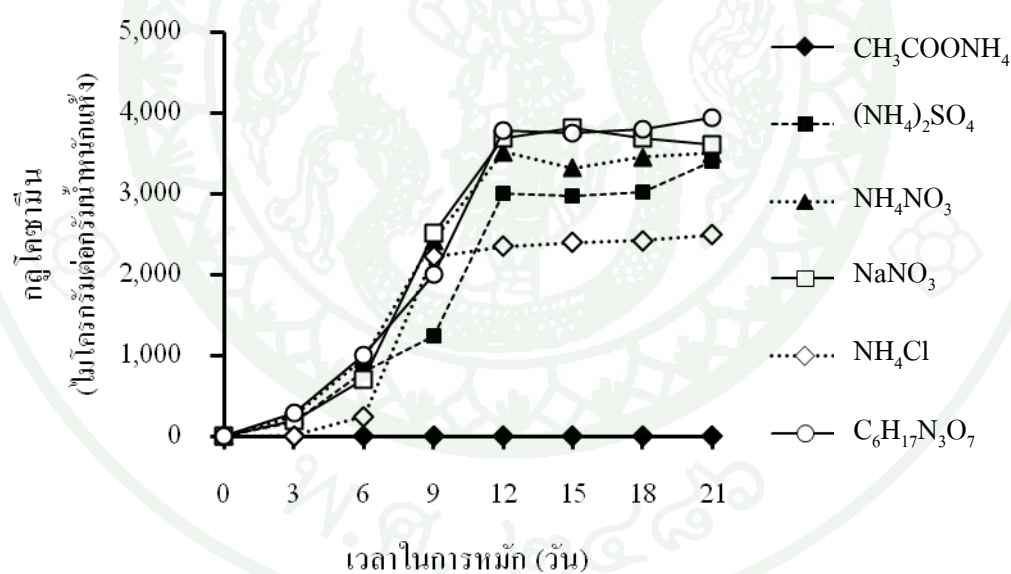
สำหรับการสร้างสารลดคอเลสเตอรอลเมื่อแช่ขึ้นมันสำปะหลังกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์พบว่าเมื่อเวลาการหมักมากขึ้น โดยเมื่อทำการศึกษาศักดิ์สารลดคอเลสเตอรอลที่ได้จากขึ้นมันที่แช่ด้วยแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ดีที่สุด (7,290.8 พีพีเอ็ม) ซึ่ง  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  พบว่าในวันที่ 21 มีค่าปริมาณโมนาโคลิน เค ใกล้เคียงกัน (7,246.8 พีพีเอ็ม) แต่สังเกตในวันที่ 18 จะยังสร้างได้น้อยกว่าสภาวะที่ใช้  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  เป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ซึ่งในวันที่ 18 สามารถสร้างสูงขึ้น และค่อนข้างคงที่ถึงวันที่ 21 ของการทดลองดังแสดงในภาพที่ 38

เป็นที่น่าสังเกตว่าการแช่ขึ้นมันในแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และปริมาณกลูโคซามีนและจากการศึกษาการสร้างสารสำคัญในขึ้นมันหมักแล้วไม่พบการสร้างสียาสีและสารลดคอเลสเตอรอลดังกล่าว

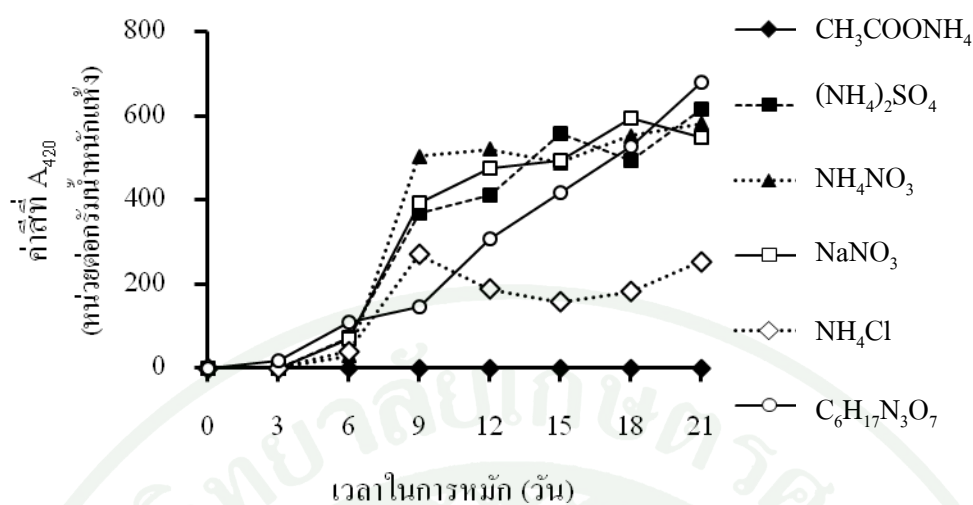
จากการทดลองหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสีและสารลดคอเลสเตอรอลของขึ้นมันที่หมักโดยเชื้อราโมแนสกลัสสายพันธุ์กลายสีแดงพบว่าขึ้นมันสำปะหลังขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตรแช่น้ำที่ผสม monosodium glutamate 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงพบว่าเมื่อสกัดสารสีที่  $A_{420}$  และ  $A_{500}$  และสารลดคอเลสเตอรอล (โมนาโคลิน เค) มีค่ามากที่สุด จึงใช้สภาวะนี้ในการทดลองต่อไป



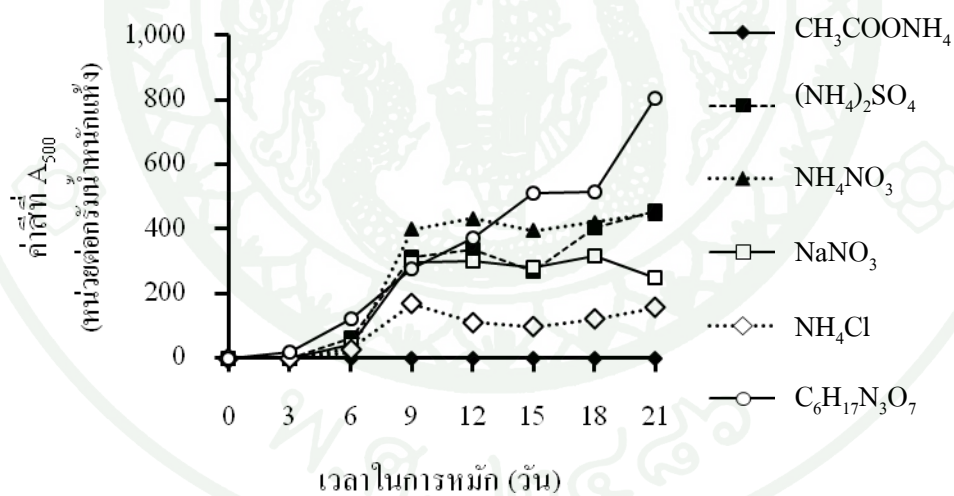
ภาพที่ 34 ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ของชั้นมันหมักที่แช่ด้วยไนโตรเจนอนินทรีย์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16



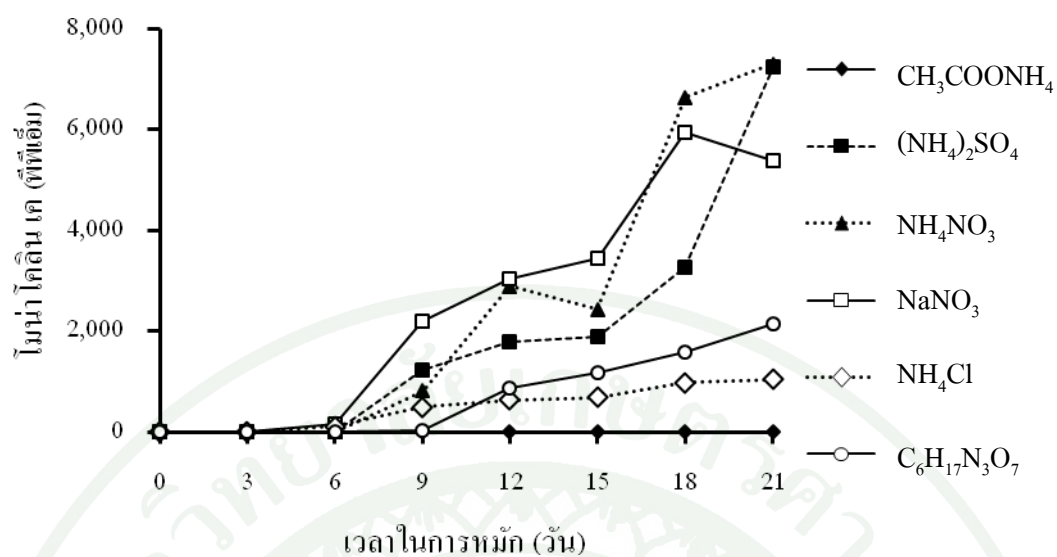
ภาพที่ 35 ปริมาณกลูโคซามีนของชั้นมันหมักที่แช่ด้วยไนโตรเจนอนินทรีย์เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16



ภาพที่ 36 ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการสร้างสีในมันสำปะหลัง ค่าสีที่  $A_{420}$  ระหว่างการหมักของชิ้นมันสำปะหลังที่แช่น้ำผสมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์นาน 2 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16



ภาพที่ 37 ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการสร้างสีในมันสำปะหลัง ค่าสีที่  $A_{500}$  ระหว่างการหมักของชิ้นมันสำปะหลังที่แช่น้ำผสมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์นาน 2 ชั่วโมง ของเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16



ภาพที่ 38 สารลดคอเลสเตอรอลที่ถูกสร้างระหว่างการหมักของไขมันที่แช่ในน้ำผสมแหล่ง  
ไนโตรเจนอินทรีย์ 2 ชั่วโมงของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายสีแดง KB10M16

#### 4 การศึกษาภาวะการผลิตสีและสารลดคอเลสเตอรอลในระดับขยาย 10 กิโลกรัม

##### 4.1 การศึกษารูปแบบของหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลในระดับขยาย

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์พร้อมใช้ในหมักระดับโคจิ 10 กิโลกรัม เนื่องจากในการทดลองในระดับขยาย การใช้หัวเชื้อในรูปแบบสารละลายสปอร์ไม่เหมาะสมเนื่องจากมีความยุ่งยากหลายขั้นตอนในการเตรียมรวมทั้งปริมาตรของสารละลายสปอร์ที่ใช้นั้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นของสับสเตรทเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากต้องใช้สารละลายสปอร์ปริมาณมากเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์ตามที่ต้องการ ( $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ผู้วิจัยได้ทำเลือกสับสเตรทที่เป็นธัญพืชมาทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ ปลายข้าวหอมมะลิ ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่างนก และขึ้นมันสำปะหลัง โดยตามวิธีของ พลอยแก้ว (2534) ผลการทดลองพบว่าเชื้อราโมแนสคัสมีการผลิตสปอร์ที่เป็นโคนิเดียได้ดีในถั่วเขียวและปลายข้าวหอมมะลิ โดยสปอร์จะเริ่มมีการสร้างในวันที่ 3 ของการทดลองและสร้างมากที่สุดในวันที่ 7 ของการทดลองโดยจำนวนโคนิเดียที่สามารถสร้างได้เท่ากับ  $1.6$  และ  $1.4 \times 10^8$  สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ส่วนในถั่วเหลือง ข้าวฟ่างนก และขึ้นมันสำปะหลังสร้างโคนิเดียได้น้อยกว่าเท่ากับ  $3.2$   $1.9$  และ  $1.2 \times 10^6$  สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ และยังพบว่าปลายข้าวหอมมะลิจึงมีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (คลิสโดทีเซียม) เริ่มสร้างในวันที่ 5 และสร้างมากขึ้นเรื่อยๆ รองลงมาคือขึ้นมันสำปะหลัง ข้าวฟ่างนก ถั่วเขียว และถั่วเหลือง โดยในวันที่ 7 ของการทดลองมีการสร้างคลิสโดทีเซียมเท่ากับ  $12.1$   $5.7$   $3.6$   $1.4$  และ  $1.2 \times 10^4$  สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณสปอร์ทั้งสองชนิดในปลายข้าวหอมมะลิมักพบว่ามีปริมาณสปอร์มากที่สุดจึงเลือกนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักระดับขยายโคจิ 10 กิโลกรัมต่อไป

ตารางที่ 17 ความชื้นของสับสเตรทหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัส KB10M16 เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อของการหมักโคจิจู 10 กิโลกรัม

| สับสเตรท        | ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)<br>เวลาในการหมัก (วัน) |      |      |      |
|-----------------|-----------------------------------------------|------|------|------|
|                 | 0                                             | 3    | 5    | 7    |
| ปลายข้าวหอมมะลิ | 35.6                                          | 36.7 | 37.4 | 39.4 |
| ถั่วเขียว       | 58.6                                          | 59.8 | 60.1 | 62.3 |
| ถั่วเหลือง      | 70.1                                          | 69.9 | 73.4 | 75.5 |
| ข้าวฟ่างนก      | 43.2                                          | 47.4 | 49.1 | 50.6 |
| ขึ้นมันดำปะหลัง | 50.6                                          | 51.0 | 51.2 | 51.8 |

**ตารางที่ 18** จำนวนสปอร์ (สปอร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) จากสับสเตรทหมักด้วยเชื้อราโคมเนสส์ KB10M16 เพื่อนำมาให้เป็นหัวเชื้อการหมักโคจิจุ 10 กิโลกรัม

| สับสเตรท        | เวลา (วัน) |                |                   |                |                   |                   |                   |                   |         |                |
|-----------------|------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------|----------------|
|                 | 0          |                | 3                 |                | 5                 |                   | 7                 |                   |         |                |
|                 | Conidia    | Cleistothecium | Conidia           | Cleistothecium | Conidia           | Cleistothecium    | Conidia           | Cleistothecium    | Conidia | Cleistothecium |
| ปลายข้าวหอมมะลิ | 0          | 0              | $3.5 \times 10^4$ | 0              | $1.2 \times 10^6$ | $4.7 \times 10^3$ | $1.4 \times 10^8$ | $1.2 \times 10^5$ |         |                |
| ถั่วเขียว       | 0          | 0              | $4.5 \times 10^4$ | 0              | $1.7 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^3$ | $1.6 \times 10^8$ | $1.4 \times 10^4$ |         |                |
| ถั่วเหลือง      | 0          | 0              | $2.6 \times 10^3$ | 0              | $1.8 \times 10^5$ | $2.7 \times 10^2$ | $3.2 \times 10^6$ | $1.2 \times 10^4$ |         |                |
| ข้าวฟ่างนกอ     | 0          | 0              | $1.9 \times 10^3$ | 0              | $1.1 \times 10^5$ | $3.5 \times 10^2$ | $1.9 \times 10^6$ | $3.6 \times 10^4$ |         |                |
| ชันมันสำปะหลัง  | 0          | 0              | $1.8 \times 10^3$ | 0              | $2.2 \times 10^4$ | $3.3 \times 10^3$ | $1.2 \times 10^6$ | $5.7 \times 10^4$ |         |                |

#### 4.2 การศึกษาวิธีการปลอดเชื้อสับสเตรทที่ใช้ในการหมักระดับโคจิ 10 กิโลกรัม

จากการทดลองเมื่อนำขึ้นมันมาทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำเพื่อการปลอดเชื้อพบว่า การทดลองที่แบ่งขึ้นมันหมักใส่ถุง ถุงละ 1 และ 2 กิโลกรัมต่อถุง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นบนอาหาร NA และ PDA ส่วนขึ้นมันหมักที่แบ่งใส่ถุง 5 และ 10 กิโลกรัมต่อถุง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อพบว่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นบนอาหาร NA และ PDA เมื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าเป็นแบคทีเรียมีลักษณะท่อนยาว สร้างเอนโดสปอร์ติดสีแกรมบวก เป็นลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และยังพบเชื้อราเจริญบนอาหาร PDA เมื่อพิจารณาสีของโคโคนีมี 2 ชนิดได้แก่ เชื้อราที่โคโคนีมีสีเขียว และสีดำ โดยเชื้อราที่มีโคโคนีสีเขียว เมื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบโครงสร้างโคนิเดีย เส้นใยมีผนังกัน เป็นลักษณะของเชื้อรา *Aspergillus* sp. และเชื้อราโคโคนีสีดำพบโครงสร้าง sporangium เส้นใยไม่มีผนังกัน เป็นลักษณะของเชื้อรา *Rhizopus* sp. จากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนขึ้นมันสับสเตรทนี้อาจเนื่องมาจาก ถุงที่บรรจุขึ้นมัน 5 และ 10 กิโลกรัมต่อถุงนั้นมีความจุมากและขนาดใหญ่เกินไป ทำให้ความร้อนขึ้นในระบบการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ทั่วทั้งถุงแล้วไม่สามารถฆ่าเชื้อในขึ้นมันสับสเตรทได้หมดทำให้พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นดังกล่าว สำหรับขึ้นมันที่บรรจุใส่ 2 กิโลกรัมต่อถุงนั้นถูกเลือกใช้ในการทดลองต่อไปเนื่องจากเป็นปริมาณที่เหมาะสม และประหยัดการใช้ถุงพลาสติกกว่าการใช้ 1 กิโลกรัมต่อถุง

#### 4.3 การศึกษาปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตสารสีและสารลด

คอเลสเตรอลในระดับขยาย โดยนำผลของข้อที่ 4.1 และ 4.2

ในการศึกษาการหมักในระดับถึงโคจิ 10 กิโลกรัมนี้ ทำการผสมหัวเชื้อกับขึ้นมันปลอดเชื้อในภาชนะอื่นก่อนแล้วเทลงในถังโคจิ จากนั้นปล่อยให้สปอร์เชื้อราโมแนสค์งอกและให้เส้นใยเจริญอยู่ภายในถึงเป็นเวลา 3 วันแล้วจึงสามารถเปิดฝาถังหมักโคจิ จากการศึกษาปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตสารสีและสารลดคอเลสเตรอลครั้งนี้พบว่าในวันที่ 3 ของการหมักที่ปริมาณหัวเชื้อ 2 4 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีความชื้นเท่ากับ 56.2 39.5 และ 35.7 เปอร์เซ็นต์ลำดับ และเมื่อเวลาในการหมักมากขึ้นพบว่าที่ปริมาณหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆ อาจเนื่องมาจากเป็นปริมาณหัวเชื้อที่น้อยเกินไปไม่เหมาะสมสำหรับการหมักในขนาดใหญ่ 10 กิโลกรัม ส่วนที่หัวเชื้อเริ่มต้น 4 พบว่าเมื่อเวลาในการหมักนานขึ้นความชื้นจะลดลง โดยวันที่ 4 ของการหมักพบว่าขึ้นมันหมักมีลักษณะแห้งมีการปนเปื้อนของเชื้อราอื่น และ

หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์มีความชื้นลดลงเช่นกันเดียว และพบการปนเปื้อนของเชื้อราอื่นในวันที่ 5 ของการหมัก ดังแสดงในตารางที่ 19

เชื้อราโมแนสส์สายพันธุ์กลายสีเดงนี้ เป็นสายพันธุ์ที่ด้อยความสามารถสร้างแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ หรือสารเมแทบอลิท์อื่นๆ ที่ช่วยในการป้องกันตัวเองและลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นต่างจากสายพันธุ์ KB9 (Subseandee, 2014) จึงต้องเลือกใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ปริมาณสูงเพื่อเป็นการช่วยลดปัญหาดังกล่าว และทำให้สามารถทำการหมักต่อไปได้ จึงเลือกใช้หัวเชื้อที่ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ในการทดลองต่อไป

**ตารางที่ 19** การศึกษาปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลในระดับขยาย

| หัวเชื้อ<br>(เปอร์เซ็นต์) | ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)<br>เวลาในการหมัก (วัน) |      |      |        |        |        |
|---------------------------|-----------------------------------------------|------|------|--------|--------|--------|
|                           | 0                                             | 3    | 4    | 5      | 6      | 7      |
| 2                         | 54.7                                          | 56.2 | CB   | CB, CF | CB, CF | CB, CF |
| 4                         | 55.2                                          | 39.5 | CF   | CF     | CF     | CF     |
| 10                        | 55.1                                          | 35.7 | 30.3 | CF     | CF     | CF     |

หมายเหตุ CB ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย

CF ปนเปื้อนด้วยเชื้อราอื่น

#### 4.4 ศึกษาวิธีการผสมหัวเชื้อเริ่มต้นและสับเตรทที่ปลอดเชื้อแล้วโดยใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อที่เหมาะสมของข้อที่ 4.3

ในการศึกษาการหมักในระดับ 10 กิโลกรัม ได้สภาวะเริ่มต้นคือเมื่อแช่ขึ้นมันสำปะหลังในสารละลาย monosodium glutamate 4 เปอร์เซ็นต์ แล้วสะเด็ดน้ำ 15 นาที จากนั้นแบ่งใส่ถุง ถุงละ 2 กิโลกรัม ทั้งหมด 5 ถุง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำเพื่อปลอดเชื้อ จากนั้นผสมหัวเชื้อข้าวหมักที่หมักนาน 5 – 7 วัน ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยได้ทำการศึกษาวิธีการผสมหัวเชื้อเริ่มต้นกับขึ้นมันที่ปลอดเชื้อ จากนั้นปล่อยให้สปอร์เชื้อราโมแนสคัส งอกเส้นใยและเจริญ 3 วัน พบว่าในวันที่ 3 ของการหมักขึ้นมันในถังโคจิ 10 กิโลกรัมที่ได้จากการเตรียมจากวิธีข้อ 4.4.1 และ 4.4.2 นั้นขึ้นขึ้นมันหมักมีลักษณะแห้ง ความชื้นมีค่าประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาในการหมักมากขึ้นความชื้นมีค่าลดลงอีกในวันที่ 5 ของการหมักพบการเจริญของเชื้อราอื่นซึ่งเป็นเชื้อราชนิดเดียวกับที่พบในการทดลองที่ 4.2 โดยสาเหตุหลักในการปนเปื้อนด้วยเชื้อราอื่นคือ ความชื้นที่ต่ำเกินไป ซึ่งเป็นความชื้นที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสบนขึ้นมันสำปะหลัง แต่เชื้อราอื่นที่ปะปนกลับสามารถเจริญได้ดีกว่า

และในขั้นตอนการงอกและการเจริญของเส้นใยของเชื้อราโมแนสคัสเกิดกระบวนการหายใจและกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ เพื่อการเจริญของเส้นใย ซึ่งในกระบวนการหมักนั้นจะมีความร้อนสะสมเพิ่มขึ้น ทำให้ความชื้นในขึ้นมันหมักลดลงและในการทดลองนี้ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมักสูงมากถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้กิจกรรมในเซลล์ต่างๆ เกิดได้อย่างรวดเร็วทำให้สูญเสียความชื้นได้อย่างรวดเร็ว ขึ้นมันจึงแห้งไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อราโมแนสคัส ดังตารางที่ 20

ส่วนการผสมหัวเชื้อตามข้อที่ 4.3 นั้นพบว่า หลังจากปล่อยให้สปอร์เชื้อราโมแนสคัสงอกและเจริญในถุงพลาสติกเป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สาเหตุอาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการผสมหัวเชื้อกับขึ้นมันที่ปลอดเชื้อแล้ว ซึ่งมีหลายขั้นตอนทำให้ง่ายต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น และอีกทั้งอุณหภูมิภายในถุงพลาสติกที่ขึ้นมันได้ถูกผสมกับหัวเชื้อแล้ว ในระหว่างการหมักจะมีอุณหภูมิสะสมสูงถึงประมาณ 45 – 50 องศาเซลเซียส และความชื้นของขึ้นมันหมักในถุงพลาสติกค่อนข้างสูงทำให้มี *Bacillus* sp. เจริญได้ง่ายและรวดเร็วทำให้เกิดการเน่าเสียของขึ้นมันหมัก รวมทั้งขึ้นมันสับเตรทที่ใช้ในการหมักเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่อุดมสมบูรณ์สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์อื่นอีกด้วย

จากการทดลองพบว่าวิธีการผสมหัวเชื้อที่เหมาะสมในระดับการหมัก 10 กิโลกรัม คือเมื่อนำไขมันสัตว์สดประมาณหนึ่งมาเช็ดด้วยหมอนึ่งความดันไอน้ำโดยแบ่งเป็นถุง ถุงละ 2 กิโลกรัม ทั้งหมด 5 ถุง จากนั้นเทรวมกันให้มีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียสแล้วคลุกกับหัวเชื้อ ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เพื่อเร่งการงอกของสปอร์เชื้อราโมแนสคัส แล้วเทรวม ลงในถังโคจิ แล้วปิดฝาไว้ 3 วันเพื่อให้สปอร์เชื้อราไ้งอกและเส้นใยเจริญได้ ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสม และง่ายกว่าการแบ่งหัวเชื้อแล้วผสมทีละถุง แล้วค่อยมาเทรวมกัน โดยวิธีนี้จะง่ายต่อการปนเปื้อน จากจุลินทรีย์อื่นมากกว่าอีกด้วย

ตารางที่ 20 วิธีการผสมหัวเชื้อที่ 10 เปอร์เซ็นต์กับไขมันปลอดเชื้อ ในการหมักในระดับโคจิ 10 กิโลกรัม

| วิธีการผสมหัวเชื้อกับไขมันปลอดเชื้อ                            | ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)<br>เวลาในการหมัก (วัน) |      |      |    |    |    |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------|------|----|----|----|
|                                                                | 0                                             | 3    | 4    | 5  | 6  | 7  |
| เทรวมกันทุกถุงแล้วผสมหัวเชื้อ                                  | 55.4                                          | 35.7 | 33.1 | CF | CF | CF |
| ผสมหัวเชื้อแต่ละถุงแล้วเทรวมกัน                                | 55.2                                          | 35.2 | 32.3 | CF | CF | CF |
| ผสมหัวเชื้อแต่ละถุงแล้วหมักไว้ 3 วัน จากนั้นเทใส่<br>ในถังโคจิ | 55.4                                          | CB   | -    | -  | -  | -  |

หมายเหตุ CB ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย

CF ปนเปื้อนด้วยเชื้อราอื่นๆ

#### 4.5 ศึกษาฟิเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตสารสีและสารลดคอเลสเทอรอลในระดับโคจิ 10 กิโลกรัม

จากการทดลองพบว่าฟิเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างสปีบนอาหาร CPDA ของเชื้อราโมแนสคัสคือ ฟิเอช 5 และน้ำประปา (ฟิเอชประมาณ 6) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน โดยโคโลนีมีขนาดใหญ่ที่สุดในวันที่ 5 ของการบ่ม และพบสีแดงที่สร้างออกมาบนอาหารเลี้ยงยูน มีปริมาณมากที่สุดเช่นกัน จึงเลือกฟิเอชฟิเอชประมาณ 5 – 6 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือที่ 35 องศาเซลเซียสพบว่ามีขนาดของโคโลนีใหญ่ที่สุด ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสีคืออุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส จึงใช้เป็นพารามิเตอร์ในการทดลองการหมักในระดับโคจิ 10 กิโลกรัมต่อไป

#### 4.6 ศึกษาวิธีการปรับความชื้นให้เหมาะสมในระหว่างการหมักในถังโคจิ 10 กิโลกรัม โดยทำการเติมน้ำปริมาตร 10 ลิตร 1 ครั้งต่อวัน หรือ 2 ครั้งต่อวัน

จากการทดลองข้อ 4.4 พบว่าปัญหาสำคัญในการทดลองคือความชื้นต่ำเกินไป ทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อราอื่นได้ ผู้ทดลองเลยได้ศึกษาการปรับความชื้นให้เหมาะสมระหว่างการหมัก โดยความชื้นที่ต้องการคือประมาณ 50 – 55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความชื้นที่เชื้อราโมแนสคัสเหมาะสำหรับการเจริญและการผลิตสารสีและสารเมแทบอลิท์อื่นๆ โดยได้ทำการทดลองดังข้อที่ 4.5 พบว่า ความชื้นเริ่มต้นของการหมักประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ของการหมักพบว่าในสภาวะที่ไม่ได้เติมน้ำ เติมน้ำ 10 ลิตร 1 ครั้งต่อวัน และ 2 ครั้งต่อวันพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเท่ากับ 32.1 47.3 และ 55.7 ตามลำดับ โดยสภาวะเติมน้ำ 10 ลิตร 2 ครั้งต่อวันนั้นที่มีความชื้นที่ต้องการ แต่เมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 5 ของการหมักพบว่า สภาวะที่เติมน้ำ 10 ลิตร 1 ครั้งต่อวัน และ 2 ครั้งต่อวัน มีความชื้น 50.6 และ 60.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนสภาวะที่ไม่ได้เติมน้ำพบการปนเปื้อนของเชื้อราอื่น และเมื่อเวลาในการหมักมากขึ้นความชื้นของขึ้นมันหมักมากขึ้นไปด้วยในแต่วิธีการเติมน้ำ โดยจากการทดลองสามารถเลือกวิธีการปรับความชื้นให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเพื่อการผลิตสีและสารลดคอเลสเทอรอลคือ ในวันที่ 3 และ 4 ของการหมัก ปรับอุณหภูมิของถังหมักที่ 35 องศาเซลเซียสแล้วคลุกขึ้นมันหมักเพื่อให้เกิดการระบายความร้อนในถังโคจิ แล้วเติมน้ำ 10 ลิตร 2 ครั้งต่อวัน ในวันที่ 5 เป็นต้นไป ให้ปรับอุณหภูมิในถังหมักที่ 30 องศาเซลเซียส คลุกแล้วเติมน้ำ 10 ลิตร 1 ครั้งต่อวัน ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 วิธีการปรับความชื้นให้เหมาะสมในระหว่างการหมักในถังโคจิ 10 กิโลกรัม

| วิธีการปรับความชื้น              | ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)  |      |      |      |      |      |
|----------------------------------|-------------------------|------|------|------|------|------|
|                                  | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) |      |      |      |      |      |
|                                  | เวลาในการหมัก (วัน)     |      |      |      |      |      |
|                                  | 35                      | 30   |      |      |      |      |
|                                  | 0                       | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    |
| 1. ไม่เติมน้ำ                    | 55.4                    | 32.1 | 32.5 | CF   | CF   | CF   |
| 2. เติมน้ำ 10 ลิตร 1 ครั้งต่อวัน | 55.3                    | 47.3 | 45.2 | 50.6 | 55.4 | 54.2 |
| 3. เติมน้ำ 10 ลิตร 2 ครั้งต่อวัน | 54.9                    | 55.7 | 54.7 | 60.2 | 66.8 | 69.1 |

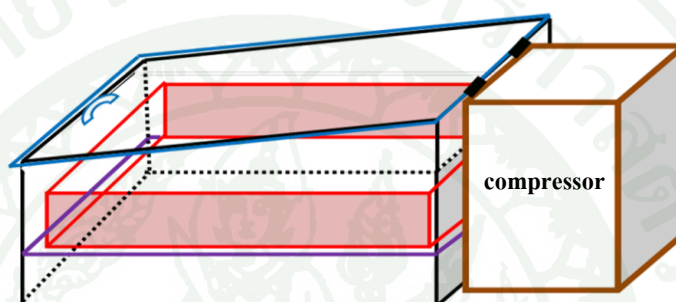
หมายเหตุ CF ปนเปื้อนด้วยเชื้อราอื่น

#### 4.7 ศึกษาการใช้สารปฏิชีวนะและสารเคมีที่เหมาะสมสำหรับการหมักในระดับถังโคจิ 10 กิโลกรัม

เมื่อนำสารละลายสารปฏิชีวนะ streptomycin และ KMS เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ พบว่าชั้นมันสำปะหลังปลอดเชื้อจะดูดเอาสารละลายของสารปฏิชีวนะเข้าไปในชั้นมันหมด ทำให้ไม่สามารถคลุกหรือผสมได้ทั่วทุกชั้น เมื่อนำไปหมักยังก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่ผิวนอก แต่ถ้าต้องการสารละลายของสารปฏิชีวนะให้ทั่วถึงจะต้องใช้สารละลายปริมาณมาก ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความชื้นของชั้นมันหมักสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อราโมแนสคัส และไม่สามารถแช่ชั้นมันหมักกับสารละลายสารปฏิชีวนะได้เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมสับสเตรทจะต้องทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ทำให้ฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะและสารเคมีถูกทำลายด้วยความร้อน

#### 4.8 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักแข็งด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. KB10M16 ใน koji chamber

ในการหมักโคจิ 10 กิโลกรัมในระบบกึ่งปิดเชื้อดังแสดงในภาพที่ 37 และ 38 พบว่าต้องใช้หัวเชื้อข้าวหมักถึง 10 เปอร์เซ็นต์ หากใช้หัวเชื้อต่ำกว่านั้นจะพบปัญหาการปะปนของเชื้อราและแบคทีเรียสูงมากและหมักได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์ จึงนำผลการทดลองเปรียบเทียบการหมักในระดับฟลask ก่อนและหลังปรับสภาวะที่เหมาะสม ดังภาพที่ 39 - 40

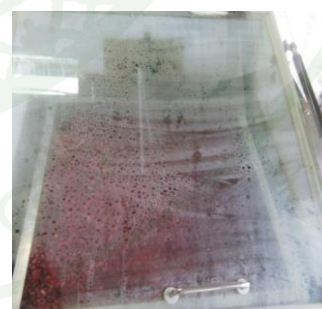


ภาพที่ 39 ลักษณะของ Koji chamber

ที่มา: Subsaendee *et al.*, (2013)



(ก)

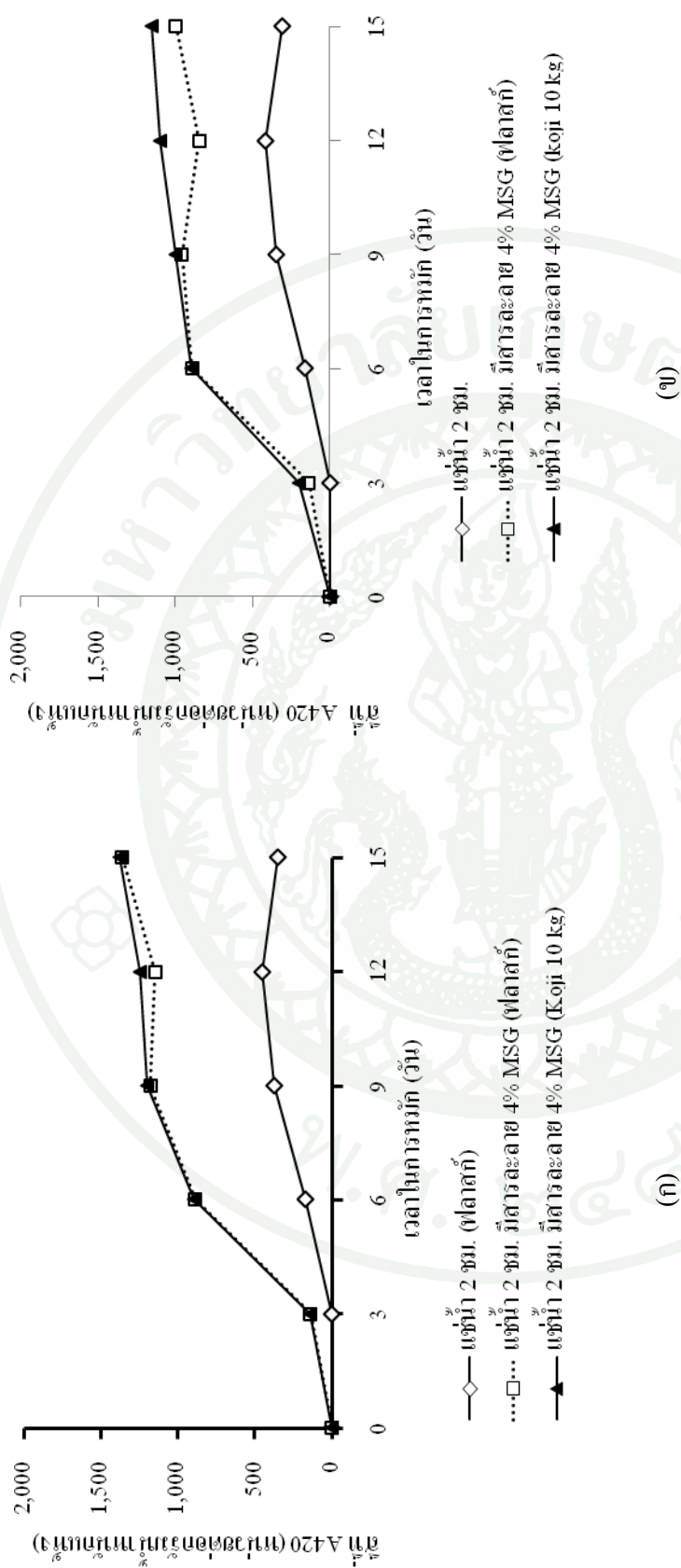


(ข)

ภาพที่ 40 การหมักขึ้นมันสำปะหลังในระดับโคจิ 10 กิโลกรัมโดยใช้หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

(ก) 3 วันแรกของการหมัก

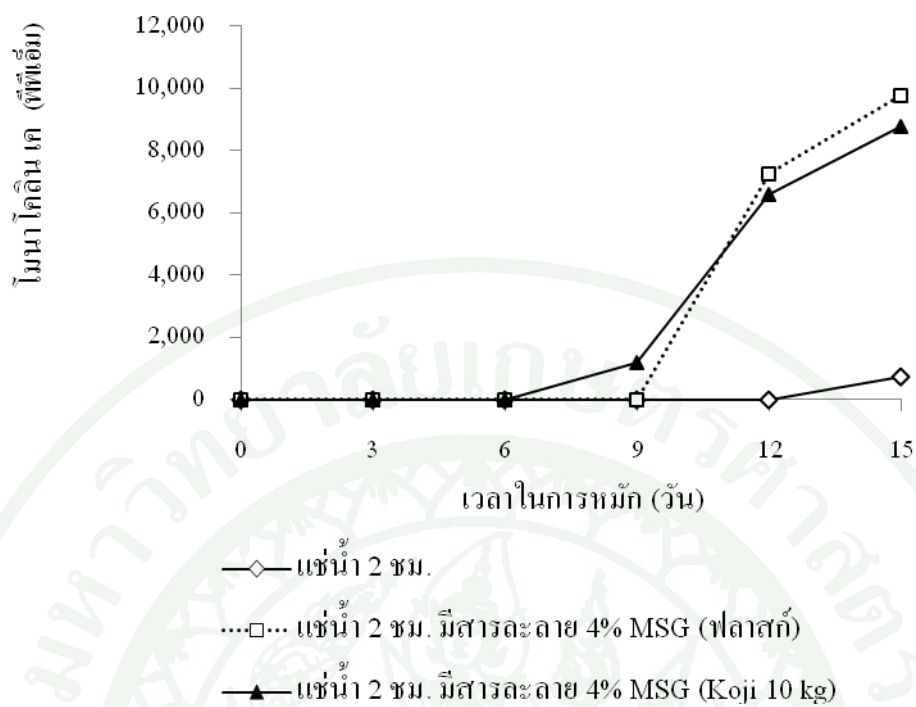
(ข) วันสุดท้ายของการหมัก (15 วัน)



ภาพที่ 41 การเปรียบเทียบเส้นกราฟการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 0.5x0.5x0.5 บนพลาสติกและ 4% MSG (4 เปอร์เซ็นต์) นาน 2 ชั่วโมง

(ก) ค่า A<sub>420</sub>

(ข) ค่า A<sub>500</sub>



**ภาพที่ 42** การเปรียบเทียบปริมาณ โมโนโคลิโน เด ที่ได้จากชิ้นมันหมักขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตรที่แช่น้ำหรือน้ำสารละลาย monosodium glutamate ( 4 เปอร์เซ็นต์) นาน 2 ชั่วโมงหมักในพลาสติกหรือ koji chamber จู 10 กิโลกรัม

## วิจารณ์

การวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเพื่อการผลิตสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลที่ใช้เทคโนโลยีการหมักแข็งด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์เฉพาะที่ไขมันสำปะหลังเป็นสับสเตรท เป็นการลดต้นทุนในการผลิตโดยใช้พืชเกษตรที่มีราคาต่ำกว่าข้าว เริ่มต้นด้วยการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัสที่ต้องใช้ในการทดลองโดยได้เลือก 2 สายพันธุ์คือ โมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ (KB9) และสายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดง KB10M16 ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถหมักข้าว สับสีแดงและกลูโคอะมิเลสได้ดี (Yongsmith *et al.*, 2000) แต่เชื้อสายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดงสามารถสร้างสีแดงบนชิ้นมันสำปะหลังได้ดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ภายใน 3 วันจึงได้เลือกนำมาใช้ในการทดลอง ขณะที่ Carvalho *et al.*, (2007) ได้ทดลองใช้เชื้อ *M. purpureus* LPB-31 ผลิตสีจากการหมักแข็งบนมันสำปะหลังรูปลักษณะต่างๆ คือ cassava meat, cassava starch, cassava flour และ cassava bagasse พบว่าได้ค่าสีแดงของ  $A_{500}$  มากน้อยดังนี้ 119.6, 98.1, 38.5 และ 15.7 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ สำหรับมันสำปะหลังที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้จำเพาะเจาะจงสายพันธุ์มันสำปะหลัง โดยรูปแบบของมันสำปะหลังที่นำมาทดลองเพื่อเปรียบเทียบได้แก่ หัวมัน มันเส้น และกากมัน พบว่ามันเส้นและหัวมันสดตัดเป็นลูกเต๋า (มันชิ้น) หมักโดยเชื้อราโมแนสคัสให้สีมากกว่ากากมันหมัก โดยที่พบว่ากากมันหมักเมื่อนำมาสกัดสีแล้วพบว่าสกัดสีได้ยาก สาเหตุเนื่องจากมีหน่วยของแป้งที่หลุดออกมาปนอยู่เมื่อนำไปให้ความร้อนขึ้นปลดเชื้อเกิดการจับตัวกันเป็นก้อนทำให้ยากต่อการไหลผ่านของออกซิเจน การระบายความร้อน และการขนส่งต่างๆ ภายในกระบวนการหมัก รวมทั้งการแช่ชิ้นมันสำปะหลังในน้ำปริมาณมากเกินไปแล้วปล่อยให้สะเด็ดน้ำจะพบการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์รหัส 10M16 ดีกว่าการเติมน้ำลงไปโดยตรง ในชิ้นมันปลดเชื้อแล้วในการหมักระดับฟลask

จึงได้เลือกมันชิ้นมาทำการทดลองต่อและยังพบอีกว่ารูปแบบมันชิ้นแบบชิ้นที่หั่นเป็นลูกเต๋ารูปขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อนำมาหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสแล้วให้สารสีและสารลดคอเลสเตอรอลมากกว่ามันเส้นที่หั่นเป็นแว่น และมากกว่ามันชิ้นที่เป็นลูกเต๋ารูปขนาดเล็กกว่า  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร เนื่องจากมันชิ้นลูกเต๋ารูปขนาดเล็กกว่านั้นเมื่อทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อความดันไอน้ำมันชิ้นขนาดเล็กดังกล่าวจะจับกันเป็นก้อนทำให้เชื้อราโมแนสคัสเจริญได้ไม่เหมาะสม เนื่องจากขาดการไหลเวียนของอากาศและการถ่ายเทความร้อนในระบบถ้ำมันชิ้นลูกเต๋าที่มีขนาดใหญ่กว่า  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร เชื้อราโมแนสคัสต้องใช้เวลาในการเจริญนานขึ้นจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดลอง จึงได้นำมันชิ้นขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตรมาทำการวิจัยต่อเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในระดับฟลaskพบว่าชิ้นมันแช่น้ำที่ 2 ชั่วโมง (ความชื้น

เริ่มต้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์) พบว่าเหมาะต่อการผลิตสีและผลิตสารลดเคอเลสเตอรอล โดยแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลคือ monosodium glutamate เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ โดยเมื่อบ่ม ณ อุณหภูมิห้อง (28 – 31 องศาเซลเซียส) นาน 21 วันของการเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อสามารถสร้างสารสีที่  $A_{420}$  และ  $A_{500}$  เท่ากับ 1,411 และ 943 หน่วยสีต่อกรัมแห้งสับสเตรทและสารลดคอเลสเตอรอล เท่ากับ 11,271 พีพีเอ็ม

จึงนับว่าการศึกษาเป็นครั้งแรกที่มีรายงานการใช้ขึ้นมันหมักเป็นแหล่งสารสีรวมทั้งสารลดคอเลสเตอรอลจากเชื้อราสกุล *Monascus* ได้ แต่รูปแบบของมันขึ้นลูกเต๋าด้านขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร นั้นต้องใช้แรงงานและเวลานานมากผู้ทดลองจึงได้หาวิธีการเตรียมสับสเตรท (pretreatment) อันสำหรับการขยายหมักระดับ 10 กิโลกรัม เพื่อลดปัญหาดังกล่าวโดยผู้วิจัยได้เลือกใช้เครื่องบด (mashing machine) แทน และเนื่องจากไม่สามารถที่จะรอให้การทดลองในระดับฟ्लाสก์เสร็จเป็นลำดับแรกได้จึงได้ทำการวิจัยควบคู่กับวิธีการ pretreatment ของสับสเตรทที่นำมาทดลองควบคู่กันไป โดยวิธีการที่เหมาะสมที่สุดคือนำหัวมันสดล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นนำไปนึ่งด้วยไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วปล่อยให้เย็น 12 ชั่วโมง (ข้ามคืน) แล้วนำมาบดด้วยเครื่องบดจากนั้นผสมรำแล้วบดซ้ำ นำไปทำแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นการหมักแล้วนำมาแช่น้ำให้มีความชื้นเริ่มต้น 50-55 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที รวมทั้งการเลือกชนิดของรำหยาบหรือรำละเอียดมาผสมให้สมบัติกายภาพดีขึ้น และส่วนผสมที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสเพื่อผลิตสารสีและสารลดคอเลสเตอรอลโดยพิจารณาลักษณะของมันเป็นท่อนหรือชิ้น หลังนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำและความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม แล้วทำการศึกษาในระดับฟ्लाสก์และระดับขยายการหมัก 10 กิโลกรัมซึ่งได้ใช้เวลาศึกษาค่อนข้างมากแต่สุดท้ายต้องเลือกมันขึ้นขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตรที่ให้ผลผลิตภักซ์สูงสุดมา ใช้งานในถัง koji chamber ขนาดหมัก 10 กิโลกรัมต่อไป

### ผลการขยายการเตรียมหัวเชื้อ (สปอร์ปริมาณมากจากการหมักใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ)

ผลการทดลองผลิตหัวเชื้อพร้อมใช้ในการหมักระดับโคจิ 10 กิโลกรัม เนื่องจากในการทดลองในระดับขยายการใช้หัวเชื้อในรูปแบบสารละลายสปอร์ไม่เหมาะสมเนื่องจากมีความยุ่งยากหลายขั้นตอนในการเตรียมรวมทั้งปริมาตรของสารละลายสปอร์ที่ใช้นั้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของสับสเตรทเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากต้องใช้สารละลายสปอร์ปริมาตรมากเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์ตามที่ต้องการ ( $10^6$  สปอร์/มิลลิลิตร) ดังนั้นจึงได้ทำเลือกสับสเตรทที่เป็นธัญพืชมาทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ ปลายข้าวหอมมะลิ ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่างนก และขึ้นมันสำปะหลัง โดยตามวิธีของ พลายแก้ว (2534) ผลการทดลองพบว่าเชื้อราโมแนสค์มีการผลิตสปอร์ที่เป็นโคโคนีเดียได้ดีในถั่วเขียวและปลายข้าวหอมมะลิ โดยสปอร์จะเริ่มมีการสร้างในวันที่ 3 ของการทดลองและสร้างมากที่สุดในวันที่ 7 ของการทดลองโดยจำนวนโคโคนีเดียที่สามารถสร้างได้เท่ากับ  $1.6$  และ  $1.4 \times 10^8$  สปอร์/กรัมสับสเตรทเปียกตามลำดับ ส่วนในถั่วเหลือง ข้าวฟ่างนก และขึ้นมันสำปะหลังสร้างโคโคนีเดียได้น้อยกว่าโดยได้  $3.2$ ,  $1.9$  และ  $1.2 \times 10^6$  สปอร์ต่อกรัมสับสเตรทเปียกตามลำดับ และยังพบว่าปลายข้าวหอมมะลิมีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (คลิสโตทีเซียม) เริ่มสร้างในวันที่ 5 และสร้างมากขึ้นเรื่อยๆ รองลงมาคือ ขึ้นมันสำปะหลัง ข้าวฟ่างนก ถั่วเขียว และถั่วเหลือง โดยในวันที่ 7 ของการทดลองมีการสร้างคลิสโตทีเซียมเท่ากับ  $12.1$   $5.7$   $3.6$   $1.4$  และ  $1.2 \times 10^4$  สปอร์ต่อกรัมสับสเตรทเปียกตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณสปอร์ทั้งสองชนิดในปลายข้าวหอมมะลิมักพบว่ามีปริมาณสปอร์มากที่สุดจึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักระดับขยายโคจิ 10 กิโลกรัมต่อไป

การขยายการหมัก “มันก่ำ” ในระดับ 10 กิโลกรัมต่อครั้ง ผลการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มระดับขยายการหมักมันก่ำในระดับ 10 กิโลกรัมต่อครั้งโดยการหมักกึ่งการปลอดเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นปลายข้าวหอมมะลิตาย 7 วัน โดยได้ทำการทดลองใช้หัวเชื้อที่ 2.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยพบว่าที่หัวเชื้อ 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ จะมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราชนิดอื่น โดย *Bacillus* sp. จะปนเปื้อนในได้ง่ายเนื่องจากสับสเตรทที่ใช้เป็นมันสำปะหลังซึ่งมีแป้งเป็นส่วนประกอบหลัก แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งในช่วงแรกของการหมักอุณหภูมิในถังหมักจะสูงถึง 39 - 42 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นผลมาจากการสะสมความร้อนจากการเจริญของเชื้อราโมแนสค์แต่เป็นอุณหภูมิที่ *Bacillus* sp. เจริญได้ดีและยังมีการปนเปื้อนเชื้อราเขียวอีกด้วยเนื่องจากขึ้นมันหมักจะแห้ง (ความชื้นต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเวลาการหมักมากขึ้นทำให้เชื้อราเขียวสามารถเจริญและแพร่กระจายคลุมขึ้นมันได้เร็วกว่าเชื้อราโมแนสค์ ดังนั้นจึงทำการสเปรย์น้ำขึ้นมันหมักให้มีความชื้นประมาณ 50 - 55

เปอร์เซ็นต์ สำหรับการให้หัวเชื้อที่ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราโมแนสคัสสามารถเจริญได้ดีสามารถผลิตได้ดีและปัญหาการปนเปื้อนลดลง แต่หัวเชื้อที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ยังไม่เหมาะสมในการทำ การหมักในระดับใหญ่ ปัจจุบันผู้วิจัยทำการทดลองใช้ antibiotic (streptomycin 50 พีพีเอ็ม) มา ทดลองเพื่อควบคุมแบคทีเรียและปรับปรุงวิธีการรดน้ำเพื่อป้องกันเชื้อราเขียว และพยายามใช้ ปริมาณหัวเชื้อน้อยลงอยู่ที่ 2-5 เปอร์เซ็นต์ แต่สภาวะการหมักในถังโคจิจุ 10 กิโลกรัมได้พบว่า เหมาะสมกับการหมักข้าวแดง (Subsaendee *et al.*, 2013) แต่ขึ้นมันสำปะหลังที่มีความชื้น 50 – 55 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าข้าวหมักที่มีความชื้นเริ่มต้นเพียง 38 – 42 เปอร์เซ็นต์ และยิ่งกว่านั้นมัน สำปะหลังที่มีโปรตีนต่ำ จำเป็นต้องแช่น้ำละลายในโตรเจนอินทรีย์ (4 เปอร์เซ็นต์ ของ monosodium glutamate) 2 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อหมักในถัง โคจิซึ่งมีระบบกึ่งปลอดเชื้อ (semi-sterilized) ที่ต้องมีการสเปรย์น้ำและพ่นอากาศเป็นระยะๆ เพื่อ ควบคุมอุณหภูมิหมัก 30-35 องศาเซลเซียส และควบคุมความชื้นของมันขึ้นและการคลุกเคล้า สับสเตรท ด้วยความระมัดระวังอย่างเต็มที่ แต่ยากที่จะหมักนานกว่า 15 วันได้เพราะจะพบเชื้อ ปะปนและแมลงหวี่ แต่อย่างไรก็ตามการหมักขึ้นมันระดับ 10 กิโลกรัมในโคจิด้วยหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ นานประมาณ 15 วัน ก็ได้ค่าสีและค่าสารลดคอเลสเทอรอลในระดับ 1,380 หน่วยต่อ กรัม น้ำหนักแห้ง ที่  $A_{420}$  1,150 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้งที่  $A_{500}$  และสารลดคอเลสเทอรอล 8,799 พีพีเอ็ม

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

จากการศึกษาวิจัยในเรื่องนี้สรุปได้ว่า

1. เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์เฉพาะเท่านั้นที่จะสามารถเจริญและหมักแข็ง  
ไขมันสำปะหลังได้สารสีส้ม แดง และสารลดคอเลสเตอรอลได้ ในที่นี้คือสายพันธุ์ KB10M16
2. ไขมันสำปะหลังลักษณะไขมันลูกเต๋าด้านขนาด  $0.5 \times 0.5 \times 0.5$  ลูกบาศก์เซนติเมตร (ที่ความชื้น  
เริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำมาหมักจะได้ค่าสีและสาร โมโนโคลิโนเล สูงกว่ากากมันหรือมันบด
3. สารไนโตรเจนอินทรีย์ monosodium glutamate ที่ระดับ 4 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมต่อ  
การเร่งการสร้างสีและโมโนโคลิโนเล
4. การเตรียมหัวเชื้อเพื่อการหมักระดับขยาย พบว่าปลายเมล็ดข้าวหอมมะลิเป็นสับสเตรท  
ให้จำนวนสปอร์ทั้งในรูปของโคนิเดียและคลีสโทที่เชื่อมในปริมาณสูงกว่า ถั่วเขียว ถั่วเหลือง  
ข้าวฟ่างนกก และไขมันสำปะหลัง
5. การหมักโคจิเป็นระบบกึ่งปลอดเชื้อในระดับ 10 กิโลกรัมที่มีการขยายถึง 100 เท่า  
จากการหมักระดับ 100 กรัมในพลาสติกที่เป็นระบบปลอดเชื้อสมบูรณ์ จึงยังมียุทธการหมักขยาย  
ปัจจุบันยังต้องใช้หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์อยู่เพราะเชื้อราโมแนสคัสเป็นสายพันธุ์ที่เจริญช้ากว่า  
ตัวปลอมปนทั้งหลาย แต่อย่างไรก็ตามถึง koji chamber ต้องปรับปรุงให้มีระบบ automated  
machine ที่มีการควบคุมระบบให้ดีขึ้น

### ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาการหมักมันสำปะหลังรูปแบบต่างๆ โดยต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการเตรียมสับสเตรทหมักให้ปลอดเชื้อ แต่ปัญหาหลักคือเมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าวมีผลทำให้ลักษณะของมันสำปะหลังที่เลือกมาศึกษานั้นจับกันเป็นก้อนกลมหรือเหนียวติดกัน เนื่องจากการใช้ความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิสูงมาก (121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) ทำให้หน่วยของแป้งในสับสเตรทหรือที่ติดอยู่รอบสับสเตรทเกิดการเจลาติไนท์ (แป้งสุก) เมื่ออุณหภูมิลดลงจะเกิดการจับตัวกันของอะมิโลสรวมกันเป็นก้อนกลมดังกล่าว ควรมีการศึกษาวิธีการปลอดเชื้อวิธีอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น การปลอดเชื้อโดยใช้โอโซน (ozone) หรือการปลอดเชื้อโดยใช้แอลกอฮอล์อิมเมอร์ส เพื่อเป็นการป้องกันปัญหาการทำแป้งให้สุกดังกล่าวต่อไป
2. ในการทดลองการหมักในระดับโคจิ 10 กิโลกรัม จำเป็นต้องมีการเติมน้ำเพื่อคงความชื้นในถังหมักให้เท่ากับ 50 – 55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายต่อการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์อื่นๆ รวมถึงการผสมคลุกเชื้อเพื่อการระบายความร้อนระหว่างการหมักด้วย ควรมีการออกแบบหรือพัฒนาลังหมักให้มีระบบที่ควบคุมแบบอัตโนมัติทั้งระบบ

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2537. พันธุ์ลำปะหลังและลักษณะประจำพันธุ์. ห้างหุ้นส่วนสามัญนิติบุคคลเจียฮั่ว, กรุงเทพฯ. 23 น.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2550. เทคโนโลยีของแป้ง. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 303 น.
- ฉัตรมณี จอมคำสิงห์. 2547. การผลิตสีเหลืองของเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2 จากแป้งมันสำปะหลังโดยการหมักแบบ Constantly fed-batch culture. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เชิดชัย เชี่ยวธีรกุล, ประสิทธิ์ แซ่ลี และ ปณิดา แซ่อึ้ง. 2519. สีแดงจากข้าว(อังกัก). วารสารอาหาร. 8(1): 51-55.
- ทิพย์รัตน์ ดนตรี. 2552. การเสริมข้าวแดงจากเชื้อราโมแนสคัส (*Monascus kaoliang* KB9) สายพันธุ์ที่เสริมสีไข่แดงและให้สารลดคอเลสเตอรอลต่อคุณลักษณะทางการให้ไข่และคุณภาพไข่ในไก่ไข่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธวัช ขนบดี, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, นิตยา เลหาจินดา และ อารี เสือก้อน. 2530. เปรียบเทียบการทดสอบผล ของสีผสมอาหารในกลุ่มอะโซบางชนิดและสีที่ได้จากการหมักเชื้อรา *Monascus* sp. ในโคโรโมโซมของคน, น. 1-15. ใน รายงานประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 25 สาขาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิตา บุตรดา. 2537. การกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส กบ.11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสีและเปรียบเทียบสมบัติบางประการกับสายพันธุ์พ่อแม่ สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดงและสีเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุษบา ยงสมิทธิ์. 2542. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 287 น.

บุษบา ขงสมิทท์ และ วรณภา ทาบโลกา. 2528. สีส้มอาหารจากมันสำปะหลังโดยเชื้อรา  
โมแนสคัส. วิทยาศาสตร์เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 19: 45-50.

\_\_\_\_\_, วิเชียร ขงมานิตชัย, สันทนา แสงจันทร์ และ ชุติ ชัยศรีสุข. 2531. การผลิตสีผสม  
อาหารจากมันสำปะหลังเพื่ออุตสาหกรรมการหมัก. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เสนอต่อ  
สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

พงษ์พะงา จางบัว. 2547. การเจริญและการผลิตสีเหลืองของเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2  
จากแป้งมันสำปะหลัง โดยวิธีการหมักแบบครึ่งคราว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พลายแก้ว ไชยเบญจรงค์ และ บุษบา ขงสมิทท์. 2534ก. การศึกษาเบื้องต้นการผลิตโคจิสีแดงของ  
โมแนสคัสเตรียมจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ, น. 277-282. ใน รายงานการประชุมวิชาการของ  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

\_\_\_\_\_. 2534ข. การศึกษาการปรับสภาพของวัตถุดิบต่อคุณภาพการหมักข้าวแดง, น. 283-291.  
ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29.  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย ในพระราชูปถัมภ์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา  
ฯ สยามบรมราชกุมารี. 2556. องค์ประกอบมันสำปะหลัง. แหล่งที่มา:  
<http://www.tapiocathai.org/D.html>, 5 กันยายน 2556.

วิจารณ์ วิชชุกิจ, เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, เอ็จ สโรบล, จำลอง เจียมจันรจจา, ประภาส  
ช่างเหล็ก และกัลลัณรงค์ ศรีรอด. 2553. มันสำปะหลังพันธุ์ใหม่....ห้วยบง 80. แหล่งที่มา:  
[www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch53/group6/vicharn/index\\_04.html](http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch53/group6/vicharn/index_04.html)--Untitled Document,  
14 มิถุนายน 2557.

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมัน  
สำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรวรรณ กลิ่นสุภา. 2550. การปรับปรุงการเจริญและการผลิตสีเหลืองโดยใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์  
 มิวเตชันและฟิวชันของมิวเทนที่สีเหลืองและมิวเทนที่สีขาวของ *Monascus* sp. KB11304.  
 วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมชาย ไกรรักษ์. 2536. ศักยภาพของเชื้อราโสมแมสส์กลายพันธุ์ชนิดใหม่ในการผลิตสีเหลือง  
 ธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมาคมการค้ามันสำปะหลัง. 2556. **Cassava crop survey**. แหล่งที่มา:  
[http://www.ttta-tapioca.org/web2/ta\\_crop.php](http://www.ttta-tapioca.org/web2/ta_crop.php), 5 กันยายน 2556.

สุพัฒน์ รัตนธนาวัฒน์. 2552. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไวน์ข้าวโดยเชื้อรากลายพันธุ์  
 สีขาว *Monascus kaoliang* KB20M1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภาพร จันทรศิริโพธา. 2531. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราแดงเพื่อเพิ่มความสามารถการผลิตสีโดย  
 วิธีการกลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ainswarth, G.C., F.K. Sparrow and A.S. Sussman. 1973. **The fungi. Vol IVA**. Academic Press,  
 Inc., New York. 621 p.

Babitha, S., C. R. Soccol, and A. Pandey. 2007. Solid-state fermentation for the production of  
*Monascus* pigments from jackfruit seed. **Bioresource Technol.** 98(8): 1554-1560.

Balogopalan, C., G. Padmaja, S. K. Nanda, and S. N. Moorthy. 1988. Cassava in Food, Feed, and  
 Industry. CRC Press, Inc., Florida. 205 p.

Bau, Y. S. and H.C. Wong. 1979. Zinc effects on growth, pigmentation and antibacterial activity  
 of *Monascus purpureus*. **Physiologia Plantarum** 46: 63-67.

Beynum, C.M.A. and J.A. Roels. 1985. Starch Conversion Technology. Marcel Dekker,  
 Inc., New York. p. 19.

- Bridge, P.D. and D.L. Hawksworth. 1985. Biochemical tests as an aid to the identification of *Monascus* species. **Letters in Appl. Microbiol.** 1: 25-29.
- Broder, C. U. and P.E. Koehler. 1980. Pigment production by *Monascus purpureus* with regard to quality and quantity. **J. Food. Sci.** 45: 567-569.
- Campoy, S., A. Rumero, J.F. Martin and P. Liras. 2006. Characterization of a hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70:488-496.
- Carels, M. and D. Shepherd. 1975. Sexual reproduction cycle of *Monascus* sp. in submerged shaken culture. **J. Bacteriol.** 122(1): 288-294.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1977. The effect of different nitrogen source on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged, shaken culture. **Can. J. Microbiol.** 23: 1360-1372.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1978. The effect of pH and amino acid on condition and pigment production of *Monascus major* ATCC 16362 and *Monascus rubiginosus* ATCC 16367 in submerged shaken culture. **Can. J. Microbiol.** 24: 1346-1357.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1979. The effect of change in pH on phosphate and potassium uptake by *Monascus rubiginosus* ATCC 16367 in submerged shaken culture. **Can. J. Microbiol.** 25: 1484-1488.
- Carvalho, J. C. C., B.O. Oishi, A.L. Woiciechowski, A. Pandey, S. Babitha and C.R. Soccol. 2007. Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents. **Indian J. Biotechnol.** 6: 194-199.

- Chang, Y. N., Y.C. Lin, C.C. Lee, B.L. Liu, and Y.M. Tzeng. 2002. Effect of rice-glycerol complex medium on the production of Lovastatin by *Monascus ruber*. **Folia Microbiol. (Praha)** 47(6): 677-684.
- Chayawat, J., S. Jareonkitmongkol, A. Songsasen., S. Isariyodom, B. Yongsmith. 2008. Rice solid fermentation of monacolins and pigments by *Monascus kaoliang* KB9 and its color mutants. **J. Biotechnol.** 136: S750.
- Chen, F. and X. Hu. 2005. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. **Int. J. Food Microbiol.** 103(3): 331-337.
- Chiu, S.W. and S.M. Chan. 1992. Production of pigments by *Monascus purpureus* using sugar-cane bagasse in roller bottle cultures. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 8: 68-70.
- Church, M.B. 1920. Laboratory experiments on the manufacture of Chinese ang-kak in the United States. **J. Indust. Eng. Chem.** 12: 45-46.
- CIAT. 1990. Annual Report 1990. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Cole, G.T. and W.B. Kendrick. 1968. Conidium ontogeny in hyphomycetes. The imperfect state of *Monascus ruber* and its meristem arthrospores. **Can. J. Bot.** 46: 987-992.
- Endo, A. 1979. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. **J. Antibiot.** 32: 852-854.
- Endo, A. 1980. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. **J. Antibiot.** 33: 334-336.
- \_\_\_\_\_, Hasumi, K., T. Nakamura, M. Kunishima, and M. Masuda. 1985. Dihydromonacolin L and monacolin X, new metabolites which inhibit cholesterol biosynthesis. **J. Antibiot.** (Tokyo) 38(3): 321-327.

- Endo, A., Hasumi, K. and S. Negishi. 1985. Monacolin J and L, new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus rubber*. **J. Antibiot.** (Tokyo) 38(3): 420-422.
- Fielding, B.C., J.S.E. Holker, D.F. Jone, A.D.G. Powell, K.W. Richman, A. Robertson and W.B. Whalley. 1961. The chemistry of fungi. Part XXXIX. The structure of monascin. **J. Chem. Soc.** 1961: 4579-4589.
- Gomez, G., J. Santos and M. Valdivieso. 1985. Utilization of caasava roots and products in animal feeding. Pp. 715-745. In J.H. Cock and J.A. Reyes (Eds.) *Cassava: Research, Production and Utilization*. Centro International de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Grace, M.R. 1977. *Cassava Processing*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 155 p.
- Hadfield, J.R., J.S.E. Holker, and D.N. Stanway. 1967. The biosynthesis of fungal metabolites. Part II. The  $\beta$ -oxo-lactone equivalents in rubropunctatin and monascuorubrin. **J. Chem. Soc. Sect. C**. 10: 751-755.
- Hajjaj, H., A. Klæbe, G. Goma, P.J. Blanc, E. Barbier and J. Francois. 2000. Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(3): 1120-1125.
- Hamdi, M., P.J. Blanc and G. Goma. 1996. Effect of aeration conditions on the production of red pigments by *Monascus purpureus* growth on prickly pear juice. **Process Biochem.** 31: 543-547.
- Han, O.H. 1990. Optimization of *Monascus* pigment production in solid-state fermentation, pp. 260-263. In G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (eds). **Natural Food Colourants**. Blackie and Son., New York. 280 p.

- Haws, E.J., J.S.E. Holker., A. Kelly, A.D.G. Pwell and A. Robertson. 1959. The chemistry of Fungi. Part XXXVII. The Structure of Rubropunctatin. **J. Chem. Soc.** 3598-3610.
- Hesseltine, C. W. 1965. A millenium of fungi, food and Fermentation. **Mycologia** 57: 179-181.
- Hiroi, T, T. Shima, T. Susuki, M. Tsukioka and N. Ogasawara. 1979. Hyperpigment productive mutant of *Monascus anka* for solid culture. **Agri. Biol. Chem.** 43: 1975.
- Iizuka, H. and C.F. Lin. 1981. On the genus *Monascus* of Asia and its specific characteristics. **Advances Biochem.** 2: 555-561.
- Izawa, S., N. Harada, T. Watanabe, N. Kotokawa, A. Yamamoto, H. Hayatsu and S. Arimoto-Kobayashi. 1997. Inhibitory effects of food-coloring agents derived from *Monascus* on the mutagenicity of heterocyclic amines. **J. Agric. Food Chem.** 45(10): 3980-3984.
- Johns, M.R. and D.M. Stuart. 1991. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. **J. Indust. Microbiol.** 8: 23-28.
- Jongrungruangchok, S., P. Kittakoop, B. Yongsmith, R. Bavavoda, S. Tanasupawat, N. Lartpornmatulee and Y. Thebtaranonth. 2004. Azaphilone pigments from a yellow mutant of the fungus *Monascus kaoliang*. **Phytochem.** 65: 2569-2575.
- Kiyohara, H., T. Watanabe, J. Imai, N. Takizawa, T. Hatta, K. Nagao and A. Yamamoto. 1990. Intergeneric hybridization between *Monascus anka* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. **Appl. Microbial Biotechnol.** 33: 671-676
- Kruawan, K., K. Kangsadalampai, B. Yongsmith and T. Sriyapai. 2005. Effect of *Monascus* colourants on the mutagenicity of nitrite treated 1- aminopyrene using Ames test. **Thai J. Pharma. Sci.** 29(1-2): 29-41.

- Kurono, M., K. Nakanishi, K. Shindo, and M. Tada. 1963. Biosynthesis of monascorubrin and monascoflavin. **Chem. Pharm. Bull. Tokyo** 11: 359-362
- Lee, C. L., J.J. Wang, S.L. Kuo, and T.M. Pan. 2006. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent-monacolin K and antiinflammation agent-monascin. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72: 1254-1262.
- Li, Y.G., H. Liu and Z.T. Wang. 2005. A validated stability-indicating HPLC with photodiode array detector (PDA) method for the stress tests of *Monascus purpureus*-fermented rice, red yeast rice. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 39(1-2): 82-90.
- \_\_\_\_\_, F. Zhang, Z.T. Wang and Z.B. Hu. 2004. Identification and chemical profiling of monascolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 35(5): 1101-1112.
- Lin, C.F. 1973. Isolation and cultural of *Monascus* sp. for production of pigment. **J. Ferment. Technol.** 51(6): 407-414.
- \_\_\_\_\_ and H. Iizuka. 1981. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.** 43(3): 671-676.
- \_\_\_\_\_ and S.J.T. Suen. 1973. Isolation of hyperpigment-productive mutants of *Monascus* sp-F-2. **J Ferment Technol** . 51:757-759.
- Lin, T.F. 1991. Studies on the formation of *Monascus* red pigments. **Ph. D. Thesis**, Massachusetts Institute of Techonology, USA.
- \_\_\_\_\_ and A.L. Demain. 1991. Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. **Appl. Microb. Biotechnol.**, 36:70 – 75.

- Lotong, N., P. Suwanarit. 1990. Fermentation of angkak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content. **J. Applied Micro.** 68 (6), 565–570.
- Ma., J., Y. Li, Q. Ye, J. Li, Y. Hua, D. Ju, D. Zhang, R. Copper and M. Chang. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. **J. Agric. Food Chem.** 48: 5220-5225.
- Machand, P.S. and W.B. Whally. 1973. Isolation and structure of ankaflavin: a new pigment from *Monascus anka*. **Phytochemistry.** 12: 2531-2532.
- McHan, F. and G.T. Johnson. 1970. Zinc and amino acids : Important components of a medium promoting growth of *Monascus purpureus*. **Mycologia.** 62(5): 1018-1031.
- Manandhar, K.L., and A.E. Apinis. 1971. Temperature relation in *Monascus* . **Trans Br. Mycol. Soc.** 57 (3): 465-472
- Miyake, T., K. Uchitomi, M.Y. Zhang, I. Kono, N. Nozaki, H. Sammoto and K. Inagaki. 2006. Effects of the principal nutrients on lovastatin production by *Monascus pilosus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 70(5): 1154-1159.
- Nakanishi, K., M. Ohashi, S. Kumasaki and S. Yamamura. 1959. Structure of monascorubrin and monascamine. **J. Am. Chem. Soc.** 81: 6339-6340.
- O'Brien, G.M., A.J. Taylor and N.H. Pouler. 1991. Improved enzymatic assay for cyanogens in fresh and processed cassava. **J. Sci. Food. Agri.** 56, 277-289.
- Palo, M.A., L. Vidal-Adeva and M.M. Leticia. 1960. Study on ang-kak and its production. **Philipp. J. Sci.** 89: 1-22.
- Shepherd, D. and M. Carels. 1983. Product formation and differentiation in fungi. In **“Fungal Differentiation”** (J. E. Smith, ed.), pp. 515-535. Marcel Dekker, New York.

- Shipman, L. 1976. Manufacture of tapioca, arrowroot and sago starches. In **R.L. Whistler and E.F. Paschall (Eds.). Starch : Chemistry and Technology Vol. II.** Academic Press, Inc., New York. pp.103-109.
- Simpson, T.J. 1986. Studies of polyketide chain-assembly processes, mycotoxins and phycotixins. In **“Mycotoxins and Phycotoxins”** (P. S. Steyn and R. Vleggaar, eds.), pp. 85-96. Elsevier, Amsterdam, the Natherlands.
- Sriroth, K., K. Piyachomkwan, S. Chotineerarat, R. Chollakup, V. Santisopasri, and C.G. Oates. 1998c. Impact of drought during early growth on cassava starch quality. In **Fourth International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network.** November 2-6, 1998. Bahia, Brazil.
- Sriroth, K., S. Wanlapatit, K. Piachomkwan, and C.G. Oates. 1999a. Improved cassava starch granule stability in the presence of sulphur dioxide. **Starch/Starke.** 50 (11-12): 466-473.
- Subsaendee, T., V. Kitpreechavanich, and B. Yongsmith. 2014. Growth, glucoamylase, pigments and monacolin K production on rice solid culture in flask and koji chamber using *Monascus purpureus* TISTR 3179. **Chiang Mai J. Sci.** 41:1-15
- Su, Y.C. and J.H. Huang. 1980. Fermentative production of anka-pigments (*Monascus* pigments). **Proc. Nat. Sci. Counc. Roc.** 4(2): 201-215.
- Sweeny, J.G., M.C. Estrada-Valdes, Ga.A. Iacobucci, H. Sato and S. Sakamura. 1981. Photoprotection of the red pigments of *Monascus anka* in aqueous media by 1,4,6-tridroxynaphthalene, **J. Agric. Food Chem.** 29 (6) : 1189-1193
- Turner, W.B. 1971. Fungal Metabolites. **Academic press, London.** 466 p.
- \_\_\_\_\_ and D.C. Aldridge. 1983. **“Fungal Metabolites II,”** pp. 55-223. Academic Press, New York.

- Velmurugan, P., H. Hyun, B. Vellingiri, K.K. Seralathan, L. Kui-Jae, L. Sang-Myung, C. Jong-Chan, J.S. Patrick and O. Byung-Teak. 2011. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. **J. Bios. Bioeng.** 112(6):590-594.
- Wang, J.J., C.L. Lee, and T.M. Pan. 2003. Improvement of monacolin K, gamma-aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 30(11): 669-676.
- \_\_\_\_\_, T.H. and T.F. Lin. 2007. *Monascus* rice products. **Advances in Food and Nutrition Research.** 53: 123-159.
- Watanabe, T., T.K. Mazumder, A. Yamamoto, S. Nagai, S. Arimoto-Kobayashi, H. Hayatsu and S. Terabe. 1999. A simple and rapid method for analyzing the *Monascus* pigment-mediated degradation of mutagenic 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole by in-capillary micellar electrokinetic chromatography. **Mut. Res./Gene. Toxicol. and Envi. Mutag.** 444: 75-83.
- Wei, P.L., L.P. Zhou and P.L. Cen. 2004. Solid-state Fermentation for lovastatin production by *Monascus rubber*. **Food and Fermentation Ind.** 30(4): 32-35 (in Chinese).
- Wong H.C. and P.E. Koehler. 1981. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. **J. Food Sci.** 46:589-592.
- \_\_\_\_\_, and Y.S. Bau. 1977. Pigmentation and antibacterial activity of fast-neutron and X-ray induced strains of *Monascus purpureus* Went. **Plant Physiol.** 60: 578-581.
- Wu, W.T., Wang, P.M., Chang, Y.Y., Huang, T.K. and Chien, Y.H. 2000. Suspended rice particles for cultivation of *Monascus purpureus* in a tower-type bioreactor. **Appl. Micobiol. Biot.** 53(5): 542-544.

- Yongsmith, B., L. Chitradon, S. Krairak, W. Tabloka and R. Bavavoda. 1990. Cassava fermentation of yellow pigments and amylolytic enzymes of a mutant of *Monascus* spp. in submerge cultivation. **Micro. Utilization of Renewable Resource**. 7: 354-363.
- \_\_\_\_\_, B., P. Thongpradis, W. Klinsupa, W. Chantrapornchai and V. Haruthaithanasan. 2013. Fermentation and quality of yellow pigments from golden brown rice solid culture by a selected *Monascus* mutant. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 97: 8895-8902.
- Yongsmith, B., V. Kitprechavanich, L. Chitradon, C. Chaisrisook and N. Budda. 2000. Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylase on rice solid culture. **J. Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 10: 263-272.
- \_\_\_\_\_ and W. Tabloka. 1985. Food colors fermentation from cassava by *Monascus* sp. **Kasetsart J. Natural Science**. 19(1): 45-50.
- \_\_\_\_\_, W. Yongmanitchai and R. Bavavoda. 1993. Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB10 grown on cassava medium. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 9: 85-90.





ภาคผนวก ก  
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหล่านี้หนึ่งมาเชื่อได้ความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที  
ยกเว้นอาหารบางชนิดที่ระบุไว้โดยเฉพาะ

### 1. C medium (Hiroi *et al.*, 1979)

|                                      |       |           |
|--------------------------------------|-------|-----------|
| Sucrose                              | 10    | กรัม      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0.1   | กรัม      |
| MgSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O  | 0.05  | กรัม      |
| NaNO <sub>3</sub>                    | 0.2   | กรัม      |
| KCl                                  | 0.05  | กรัม      |
| FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O | 0.001 | กรัม      |
| Yeast extract                        | 0.3   | กรัม      |
| Casamino acid                        | 0.5   | กรัม      |
| Agar                                 | 2.0   | กรัม      |
| น้ำกลั่น                             | 100   | มิลลิลิตร |

### 2. MY (Malt Yeast Agar)

|                  |       |           |
|------------------|-------|-----------|
| Peptone          | 5     | กรัม      |
| Yeast extract    | 3     | กรัม      |
| Malt extract     | 3     | กรัม      |
| Dextrose         | 10    | กรัม      |
| Agar             | 20    | กรัม      |
| H <sub>2</sub> O | 1,000 | มิลลิลิตร |

### 3. MYS (Malt-yeast extract-starch-agar) (วรรณภา, 2529)

|                 |      |           |
|-----------------|------|-----------|
| Peptone         | 5.0  | กรัม      |
| Yeast extract   | 3.0  | กรัม      |
| Malt extract    | 3.0  | กรัม      |
| แป้งมันสำปะหลัง | 20.0 | กรัม      |
| Agar            | 15.0 | กรัม      |
| น้ำกลั่น        | 1000 | มิลลิลิตร |

### 4. PDA (Potato dextrose agar)

|          |       |           |
|----------|-------|-----------|
| มันฝรั่ง | 200.0 | กรัม      |
| Dextrose | 20.0  | กรัม      |
| Agar     | 15.0  | กรัม      |
| น้ำกลั่น | 1000  | มิลลิลิตร |

โดยหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดพอสมควรประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที นำมากรอง เอาเฉพาะส่วนน้ำมาเติมน้ำตาล dextrose และ agar ผสมให้ละลายเข้ากันปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### 5. GYP (Glucose yeast extract peptone agar)

|               |      |           |
|---------------|------|-----------|
| Glucose       | 40.0 | กรัม      |
| Yeast extract | 10.0 | กรัม      |
| Peptone       | 5.0  | กรัม      |
| Agar          | 15.0 | กรัม      |
| น้ำกลั่น      | 1000 | มิลลิลิตร |



## การเตรียมสารและการวิเคราะห์ผล

1. การวิเคราะห์หาความสามารถในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (glucoamylase activity) (นิตา, 2537)

### 1.1 สารเคมี

1.1.1 การเตรียม acetate buffer โดยวิธีของ Walpole (1914) เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการก็จะได้ acetate buffer ที่มีพีเอชตามที่ต้องการ

สารละลาย A คือ 0.2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (11.5 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)  
สารละลาย B คือ 0.2 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  หรือ  $\text{CH}_2\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  โดยละลาย 16.4 กรัมหรือ 27.2 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

X มิลลิลิตรของสารละลาย A + Y มิลลิลิตรของสารละลาย B เจือจางให้เป็น 100 มิลลิลิตร

| A<br>(มิลลิลิตร) | B<br>(มิลลิลิตร) | pH  | A<br>(มิลลิลิตร) | B<br>(มิลลิลิตร) | pH  |
|------------------|------------------|-----|------------------|------------------|-----|
| 46.3             | 3.7              | 3.6 | 20.0             | 300              | 4.8 |
| 44.0             | 6.0              | 3.8 | 14.6             | 35.4             | 5.0 |
| 41.0             | 9.0              | 4.0 | 10.5             | 39.5             | 5.2 |
| 36.8             | 13.2             | 4.2 | 8.8              | 41.2             | 5.4 |
| 30.5             | 19.5             | 4.4 | 4.8              | 45.2             | 5.6 |
| 25.5             | 24.5             | 4.6 |                  |                  |     |

ในทางปฏิบัติค่าพีเอชที่ได้จากคลาดเคลื่อนไปบ้าง จึงต้องวัดพีเอชเพื่อเป็นการตรวจสอบถ้าคลาดเคลื่อนให้ปรับพีเอชจนได้ค่าที่ต้องการ โดยใช้สารละลาย A หรือ B เติมลงไป

### 1.1.2 Copper reagent

เตรียมโดยละลาย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71 กรัม และโซเดียมโปรแตสเซียมคาร์เตรท 40 กรัม ในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 นอร์มอล จำนวน 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสาร  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ทำให้อุ่น เติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนก่อนนำไปใช้

### 1.1.3 Nelson reagent

เตรียมโดยละลาย  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  จำนวน 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติม  $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นลงไป คนให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอน ให้กรองก่อนนำไปใช้

## 1.2 วิธีการวิเคราะห์

### 1.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

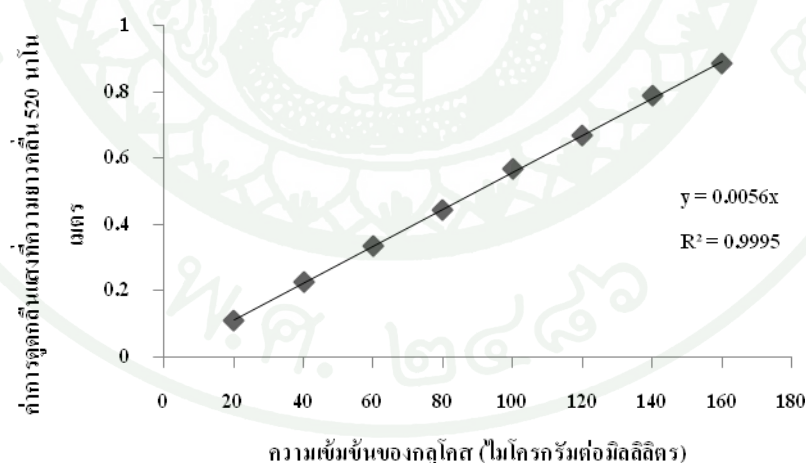
เตรียมสารละลายกลูโคส (analytical grade glucose) โดยอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำเป็นสารละลายความเข้มข้น 20 40 60 80 100 120 140 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น บรรจุสารละลายแต่ละความเข้มข้นในหลอดทดสอบ หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันที โดยแช่ในน้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัด O.D. ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่า O.D.

### 1.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถของเอ็นไซม์ในการทำปฏิกิริยา

โดยใช้ปเปตต์ดูดสับสเตรท (แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ใน acetate buffer 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 ต้มจนเดือด) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบเติมสารละลายเอ็นไซม์ที่เจือจางเหมาะสมแล้วจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม copper reagent ลงไป 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันที โดยแช่ในน้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัด O.D. ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำไปคำนวณน้ำตาลที่เกิดขึ้นในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส จะได้เป็น RS1 อีกส่วนหนึ่งต้มทำลายความสามารถของเอ็นไซม์เป็นเวลา 15 นาทีก่อนแล้วจึงเติมสับสเตรทในปริมาณเท่ากัน วัดค่า O.D. แล้วนำไปอ่านค่าในกราฟมาตรฐาน จะได้เป็นค่า RS0

$$\text{กิจกรรมของเอ็นไซม์} = \text{RS1} - \text{RS0}$$

1 unit ของเอ็นไซม์คือ ปริมาณเอ็นไซม์ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 นาที



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (ตามวิธี Morgan-Elson ของ Van de Loo, 1976)

### 2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลาย Acetyl acetone reagent เป็นสารละลาย 4% ของ acetylacetone ใน 1.25 โมลาร์  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

2.1.2 Ehrlich's reagent ละลาย para-dimethylaminobenzaldehyde 1.6 กรัม ในส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริก 30 มิลลิลิตร และเอธานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 30 มิลลิลิตร สามารถเก็บในตู้เย็นได้นาน 3 วัน

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

### 2.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ (Cochran และ Vercellotti, 1987)

2.2.1 น้ำตัวอย่างปริมาตร 5 กรัม มาอบแห้ง เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

2.2.2 กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

2.2.3 คูด่วนใส 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

2.2.4 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.2.5 ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลาง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

2.2.6 กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วนำส่วนใสไป

### 3. วิเคราะห์หาปริมาณ glucosamine

#### 3.1 วิธีการวิเคราะห์

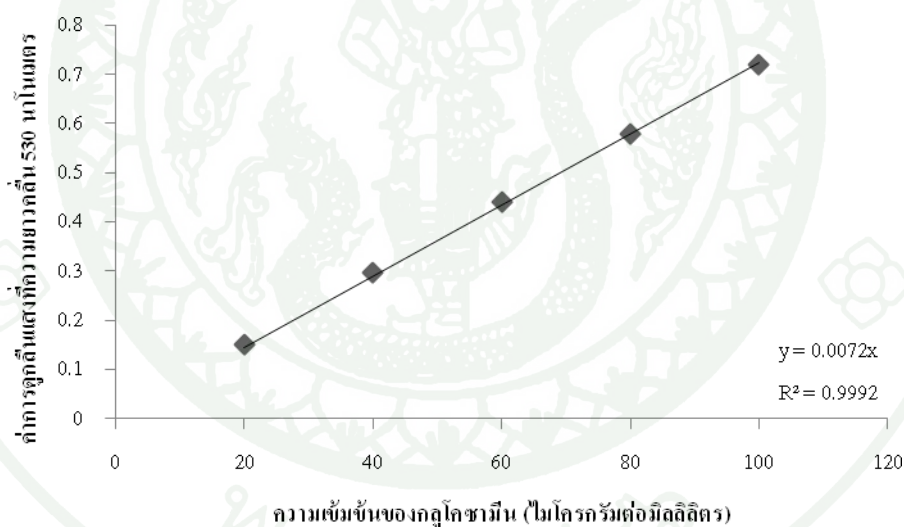
3.1.1 หากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.2 ใส่สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง

3.1.3 เติมสารละลาย acetyl acetone 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 20 นาที

3.1.4 เติมเอธานอล เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร

3.1.5 เติมสารละลาย Ehrlick's reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณ glucosamine โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานของกลูโคซามีน

#### 4. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

ใช้วิธีเดียวกับการหาน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อได้น้ำหนักแห้งแล้วให้นำมาหัก ออกจากน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ ก็จะได้ค่าความชื้นของตัวอย่าง นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักแห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

#### 5. การวัดพีเอชของตัวอย่างที่เป็นของแข็ง

นำตัวอย่างที่ต้องการวัดพีเอช มาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดพีเอช ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter)

#### 6. การนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemocytometer (ตามวิธีของ Towsen และ Lindrend. 1953)

เจ็ดสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ของ haemocytometer ให้สะอาดวางกระจกปิดสไลด์ให้อยู่ตรงกลางสไลด์ ปิดเปิดสารละลายสปอร์แต่ละที่ขอบ cover glass ให้สารละลายแทรกเข้าไประหว่างกระจกปิดสไลด์จนเต็มพอดี นำไปนับจำนวนสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับสปอร์ที่อยู่ในแต่ละช่องเล็ก และอยู่ระหว่างเส้นทางด้านล่าง และด้านขวาตามแนวทแยงมุมซ้าย และขวารวม 9 ช่อง

การคำนวณจำนวนสปอร์

|                                      |   |                                          |
|--------------------------------------|---|------------------------------------------|
| ขนาดความลึกของ haemocytometer ที่ใช้ | = | 0.1 มิลลิเมตร                            |
| ขนาดพื้นที่ของแต่ละช่องเล็ก          | = | 0.0025 ตารางมิลลิเมตร                    |
| เพราะฉะนั้น ปริมาตรของแต่ละช่องเล็ก  | = | 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร                |
| จำนวนสปอร์ต่อมิลลิเมตร               | = | สปอร์ที่เฉลี่ยได้ $\times 4 \times 10^5$ |

## 7. การศึกษาโมนาโคลินส์ เค (ตามวิธี Chayawat, 2009)

### 7.1 การทำกราฟมาตรฐานโมนาโคลินส์ เค (สารลดคอเลสเตอรอล)

การเตรียมสารละลายโมนาโคลินส์ โดยใช้ 0.0017g ละลายใน 1 มิลลิลิตรเอทานอลบริสุทธิ์ (99.8%) แล้วจึงนำสารละลายมาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 200 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาฉีดด้วยเครื่อง HPLC เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการค่าพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของสารละลายโมนาโคลินส์ เค

### 7.2 การสกัดมันหมักเพื่อตรวจหาโมนาโคลินส์ เค (สารลดคอเลสเตอรอล)

ชั่งตัวอย่างมัน 0.5 กรัม ใส่ เอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์จำนวน 25 มิลลิลิตร นำไปแช่ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 1 รอบ แล้วกรองด้วย Cellulose acetate filter (pore size 0.22 ไมโครเมตร) 1 รอบ ใส่ขวดสีชา แล้วนำไปฉีด HPLC

### 7.3 การคำนวณค่าโมนาโคลินส์ เค จากตัวอย่างมันที่สกัดได้

7.3.1 ฉีดตัวอย่างแล้วนำค่าพื้นที่ใต้กราฟมาเทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐานของโมนาโคลินส์ เคโดยเอาค่าพื้นที่ใต้กราฟหารด้วยค่าความชันของสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของโมนาโคลินส์ เค จะได้ค่าเป็นไมโครกรัม (A)

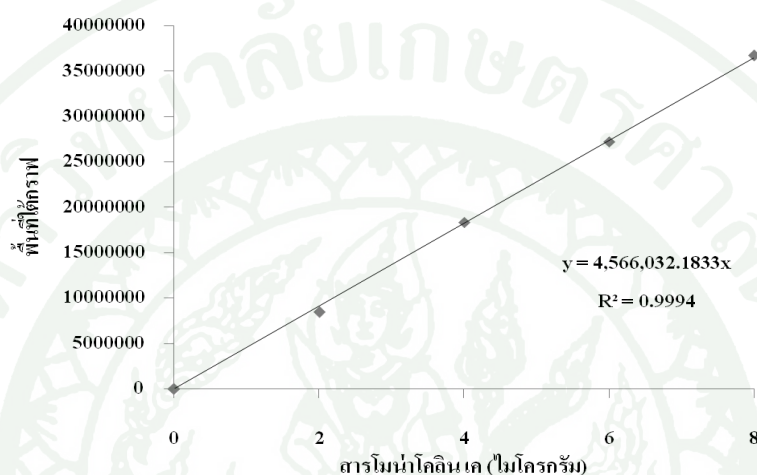
7.3.2 จากการสกัดตัวอย่างใช้ 0.5 กรัมต่อ 25 มิลลิลิตรของ 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอลฉีดตัวอย่างได้ค่า (A) ดังนั้น 25.5 มิลลิลิตร ได้ค่า

$$\frac{A \times 25.5 \text{ มิลลิลิตร} \times 1000 \text{ ไมโครลิตร}}{20 \text{ ไมโครลิตร}}$$

7.3.3 เมื่อนำค่าที่ได้มาหารด้วยค่าน้ำหนักแห้งจะได้ค่าโมนาโคลินส์ เคต่อ 1 กรัม น้ำหนักของตัวอย่างแห้ง

7.3.4 เทียบค่าปริมาณโมนาโคลินส์ เค เป็นหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยนำค่าที่ได้ในข้อ 4.3.3 มาคูณกับ 1000 กรัม เพราะฉะนั้นได้ค่า โมนาโคลินส์ เคมีหน่วยเป็น ไมโครกรัม

7.3.5 แต่ถ้าเป็นกรณีของตัวอย่างเปือกต้องนำเปอร์เซ็นต์ความชื้นมาคิดด้วยโดยให้คิดต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้งเสียก่อน แล้วค่อยทำตามข้อ 4.3.4



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของสารโมนาโคลิน เค

#### 8. การศึกษาสารสี (ตามวิธี Yongsmith, 1985 และ Chayawat, 2008)

ใช้ตัวอย่างเปือก 1 กรัมใส่ลงพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70% 39 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วย rotating shaker ความเร็วรอบ 300 ppm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman No.4 แล้วทำการเจือจางให้เหมาะสม นำวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ( Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1700 PharmaSpec) วัดค่า lamda max ( $\lambda_{\max}$ ) ของตัวอย่าง ที่ 420 และ 500 nm ( Yongsmith, 1985 ) โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คูณกับค่าการเจือจางแล้วคิดเป็น หน่วยสีต่อน้ำหนักแห้ง (Unit/gdw)

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ – นามสกุล       | นายชยุต ขรรัมย์                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| วัน เดือน ปี ที่เกิด | 19 กันยายน 2530                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| สถานที่เกิด          | อำเภอสนม จังหวัดสุรินทร์                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| ประวัติการศึกษา      | ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)<br>มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ.2553)                                                                                                                                                                                                                                                       |
| ที่อยู่ปัจจุบัน      | 89 หมู่ 5 ตำบลสนม อำเภอสนม จังหวัดสุรินทร์ 32160                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ | ศ.ดร.นุสบา ขงสมิทธิ์<br>และโครงการวิจัยเรื่อง การวิจัยและพัฒนการผลิต<br>“มันก่ำ” (มันสำปะหลังหมักแข็งโดยเชื้อราโมแนสคัส)<br>จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี<br>แห่งชาติ (สวทช.)                                                                                                                                           |
| การนำเสนอผลงาน       | <b>Kharuram. D., C. Pothiratana, C. Chettanachitara and<br/>B. Yongsmith. 2013. Pigments and Anti-cholesterol<br/>Agent Fermentation of <i>Monascus</i> sp. on Cassava Chips<br/>Solid Culture. In proceeding of TSB International<br/>Forum 2013. August 28-30, 2013, held on BITEC<br/>Bangna, Bangkok, Thailand. pp 3 – 6.</b> |