



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา	จุลชีววิทยา
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	การศึกษาลักษณะเฉพาะของการผลิตสีเหลืองและเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของสายพันธุ์มิวแทนต์และฟิวแซนที่ได้จากสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองและสีขาวของ <i>Monascus Kaoliang</i> KB9 Characterization of Yellow Pigments and Glucoamylase Production of Mutants and Fusants Derived from <i>Monascus kaoliang</i> KB9 Yellow Mutant and White Mutant
نامผู้วิจัย	นางสาวพานิดา ทองประดิษฐ์
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	(ศาสตราจารย์บุษบา ขงสมิทธิ์, Dr.Eng.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สาวิตร ตระกูลนาคีเลื่อมใส, Dr.Eng.)
หัวหน้าภาควิชา	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา ลีสุข, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาลักษณะเฉพาะของการผลิตสีเหลืองและเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของสายพันธุ์
มิวแทนต์และฟิวแซนต์ที่ได้จากสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองและสีขาวของ *Monascus kaoliang* KB9

Characterization of Yellow Pigments and Glucoamylase Production of Mutants and Fusants
Derived from *Monascus kaoliang* KB9 Yellow Mutant and White Mutant

โดย

นางสาวพานิดา ทองประดิษฐ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พานิดา ทองประดิษฐ์ 2557: การศึกษาลักษณะเฉพาะของการผลิตสีเหลืองและเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของสายพันธุ์มิวแตนต์และฟิวแซนท์ที่ได้จากสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองและสีขาวของ *Monascus kaoliang* KB9 ปรินญาวิทยาศาสตร์มหบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์บุษบา ขงสมิทธิ์, Dr. Eng. 159 หน้า

เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 (*Monascus kaoliang* KB20M10.2) มีความสามารถในการสร้างสารสีเหลืองใหม่ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นเดี่ยว 370 นาโนเมตร สารลดคอเลสเตอรอลหรือสารโมนาโคลิน เค และสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารประกอบฟีนอลได้ แต่เจริญช้าและผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งกลูโคอะมิเลสต่ำ ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการทำให้โปรโตพลาสต์มิวเดชั่นและโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นระหว่างสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองที่เจริญช้าและสายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวที่เจริญเร็ว แต่ไม่สร้างสารโมนาโคลิน เค ได้สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ 2 สายพันธุ์ (U2.3 และ U2.5) และฟิวแซนท์ 16 สายพันธุ์ (F7 F10 F19 F20 F21 F26 F27 F31 F35 F36 F38 F39 F41 F43 F45 และ F47) เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ดังกล่าวทั้งหมดจึงถูกนำมาศึกษาการหมักแบบเหลวและแบบแข็ง พบว่า เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ (U2.3 และ U2.5) และฟิวแซนท์ (F7 และ F10) สามารถเจริญ ผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และผลิตสีได้สูงกว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ขณะที่ฟิวแซนท์ F43 ที่ผลิตสีได้ต่ำกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 แต่เจริญและผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงสุดในกลุ่ม 6 สายพันธุ์นี้

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแบบแข็งบนปลายข้าวหอมมะลิ พบว่า ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและสีเหลืองของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 23-26 องศาเซลเซียส เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ สร้างสีที่ดูดกลืนแสงความยาวคลื่นผสม 320 370 และ 500 นาโนเมตร

ยิ่งกว่านั้นเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์ยังสามารถสร้างสารโมนาโคลิน เค และสารต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย โดยสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ U2.3 และ U2.5 สร้างสารโมนาโคลิน เค ได้สูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ส่วนสายพันธุ์ U2.3 U2.5 F7 และ F10 สามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2

ผลิตภัณฑ์ข้าวหมักที่ได้ถูกทดสอบความคงตัวในขั้นตอนการเก็บรักษา ซึ่งพบว่า ปริมาณสารสี ของข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 คงตัวเมื่อผ่านการนิ่งมาเชื้อที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อหยุดการเจริญ การอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และการเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องหรือตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส)

Panida Thongpradis 2014: Characterization of Yellow Pigments and Glucoamylase Production of Mutants and Fusants Derived from *Monascus kaoliang* KB9 Yellow Mutant and White Mutant. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Professor Busaba Yongsmith, Dr.Eng. 159 pages.

Monascus kaoliang yellow mutant (KB20M10.2) can produce the innovative single yellow pigments absorbance at 370 nm, anticholesterol agent or monacolin K and antioxidant or phenolic compounds but it shows slow growth and low glucoamylase. Improvement of yellow pigment producing *Monascus* sp. KB20M10.2 had been carried out by techniques of protoplast mutation and protoplast fusion between slow-growing yellow mutant and fast-growing non-monacolin K producing white mutant. As a result, 2 UV mutants (U2.3 and U2.5) and 16 fusants (F7, F10, F19, F20, F21, F26, F27, F31, F35, F36, F38, F39, F41, F43, F45 and F47) have been selected for further studies on their physiological fermentation using solid as well as submerged cultures. The results showed protoplast mutants (U2.3 and U2.5) and fusants (F7 and F10) could grow and produce glucoamylase and pigments higher than *M. kaoliang* KB20M10.2. While fusant F43 produced pigment lower than *M. kaoliang* KB20M10.2 but showed its highest growth and glucoamylase activity among these 6 strains used.

The optimal conditions for solid fermentation on broken-milled rice were studied. The results showed that 38% initial moisture, initial pH 5 and 35 °C incubation temperature were the best conditions for growth, glucoamylase and yellow pigment production of various *M. kaoliang* strains used. In addition, at low temperature about 23-26 °C *M. kaoliang* showed multippeak absorbance at 320, 370 and 500 nm.

Moreover, *M. kaoliang* protoplast mutants and fusants produced monacolin K and antioxidant compounds. Protoplast mutants U2.3 and U2.5 could produce monacolin K while U2.3 U2.5 F7 and F10 had antioxidant activities and total phenolic compound higher than *M. kaoliang* KB20M10.2

Ready-to-use product of fermented rice was examined for subsequent processing of storage stability. The results showed that the amount of pigments in fermented rice were quite stable by steaming at 100 °C 20 min for growth inactivation, drying at 60 °C overnight and storing in the room temperature or the refrigerator (2-4 °C).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ยงสมิทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือ แนะนำ แก้ไขปัญหาวิทยานิพนธ์ สนับสนุนเงินทุนวิจัยและค่าใช้จ่ายส่วนตัว ตลอดระยะเวลาที่ศึกษา ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สาวิตร ตระกูลน่านเลื่อมใส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวิช ประธานกรรมการสอบ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติและศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อนที่สนับสนุนทุนในการทำงานวิจัยประกอบการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้า อันนำไปสู่กระบวนการความคิด วางแผน แก้ไขในการวิจัยให้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณบุคลากรเจ้าหน้าที่ และเพื่อนๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน รวมทั้งบุคคลที่ไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ในระหว่างการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อพนม ทองประดิษฐ์ คุณแม่อำพร ขำภักย์ ที่เป็นผู้ส่งเสริมและสนับสนุนทุนทรัพย์จนสำเร็จการศึกษา ขอกราบขอบพระคุณคุณย่าพรม ใจใหญ่ ที่เป็นที่พักทางจิตใจ และขอขอบคุณญาติพี่น้องทุกท่าน

พานิดา ทองประดิษฐ์

มกราคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	116
สรุป	116
ข้อเสนอแนะ	117
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	118
ภาคผนวก	137
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	138
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี และการวิเคราะห์ผล	142
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	154
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	159

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ขนาดโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนท์สีขาวรหัส KB20M1 โปรีโตพลาสติกมิวแตนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นชนิดต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน	41
2	ขนาดโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนท์สีขาวรหัส KB20M1 โปรีโตพลาสติกมิวแตนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น MY บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส), 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	43
3	การศึกษาเปอร์เซ็นต์ของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการสกัดสีจากข้าวหมัก	50
4	ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โดยใช้เครื่อง temperature gradient	52
5	ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2	100
6	ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรีโตพลาสติกมิวแตนท์ U2.3	101
7	ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรีโตพลาสติกมิวแตนท์ U2.5	102
8	ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F7	103
9	ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F10	104
10	ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F43	105
11	ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ และวิตามินซี	107

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ค่า EC50 และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ และวิตามินซี	109
13	ค่าสีของข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ	112
14	ค่าสีของข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 หลังนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที	113
15	ค่าสีของข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 หลังนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที	114
16	ค่าสีของข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 หลังนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที	115
ตารางผนวกที่		
ค1	ขนาดโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โพรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น MY ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน	155
ค2	ขนาดโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โพรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น MY ที่เติมเอทานอล และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน	156

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วงจรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัส	6
2	โครงสร้างทางเคมีของสารสีที่แยกได้จากเชื้อราโมแนสคัส	9
3	H-NMR spectrum และสูตรโครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่ ที่ได้จากเชื้อรา <i>Monascus</i> sp. KB10M10.2	10
4	โครงสร้างทางเคมีของสารสีเหลืองและเส้นทางชีวสังเคราะห์ที่แยกได้จาก <i>Monascus kaoliang</i> KB20M10.2 ที่เลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิ	11
5	โครงสร้างทางเคมีของสารสีแดง (R3) และสีเหลือง (R4) ที่แยกได้จาก <i>Monascus purpureus</i> HP14	12
6	โครงสร้างทางเคมีของสารสีแดงชนิดใหม่จาก <i>Monascus ruber</i> 102W	12
7	เส้นทางชีวสังเคราะห์สารสีของเชื้อราโมแนสคัส	15
8	โครงสร้างทางเคมีของกรดไคเมอรูมิกแยกได้จาก <i>M. anka</i>	25
9	ลักษณะโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2, มิวแตนต์สีขาวยรหัส KB20M1, โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และ ฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น MY บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	44
10	โคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2, มิวแตนต์สีขาวยรหัส KB20M1, โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ (U2.3 และ U2.5) และฟิวแซนต์ (F7 F10 และ F43) บนอาหารวุ้น C-medium GYP MYS และ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	44
11	เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ มิวแตนต์สีขาวยรหัส KB20M1, มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2, โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ และฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเติม เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ลงในอาหารวุ้น MY บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2, มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1, โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ และฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเติมเอทานอลลงใน อาหารวุ้น MY และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน	48
13	ข้าวหมกด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน (ก) และ 20 วัน (ข)	55
14	เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เพาะเลี้ยง ในอาหารเหลว SS เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน (ก) และ 20 วัน (ข)	57
15	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์ สีเหลืองรหัส KB20M10.2 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	58
16	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีขาว รหัส KB20M1 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	58
17	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์ มิวแตนต์ U2.3 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	59
18	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์ มิวแตนต์ U2.5 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F7 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	60
20	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F10 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	60
21	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F19 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	61
22	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F20 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	61
23	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F21 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	62
24	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F26 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F27 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	63
26	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F31 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	63
27	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F35 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	64
28	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่ เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F36 บน ปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	64
29	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F38 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	65
30	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F39 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
31	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F41 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	66
32	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F43 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	66
33	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F45 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	67
34	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี ร้อยละความชื้น และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F47 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	67
35	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	68
36	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
37	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มีวแทนท์ U2.3 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	69
38	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มีวแทนท์ U2.5 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	69
39	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F7 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	70
40	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F10 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	70
41	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F19 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	71
42	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F20 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
43	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F21 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	72
44	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F26 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	72
45	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F27 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	73
46	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F31 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	73
47	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F35 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	74
48	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F36 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
49	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F38 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	75
50	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F39 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	75
51	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F41 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	76
52	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F43 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	76
53	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F45 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	77
54	ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ค่าสี และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่าง การเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F47 ในอาหารเหลว SS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)	77

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
55	ปริมาณกลูโคซามีนของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรีโดพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 33.06 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน	78
56	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2, มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1, โปรีโดพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนปลายข้าวหอมมะลิความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 33.06 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน	79
57	ค่าสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2, มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1, โปรีโดพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนปลายข้าวหอมมะลิความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 33.06 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน	80
58	ปริมาณกลูโคซามีนของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2, มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1, โปรีโดพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาทีบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน	81
59	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2, มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1, โปรีโดพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาทีบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน	82
60	ค่าสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2, มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1, โปรีโดพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาทีบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน	83

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
61	ความยาวคลื่นที่สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลือง รหัส KB20M10.2 โพรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ดูดกลืน เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้องและ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน	87
62	ความยาวคลื่นที่สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลือง รหัส KB20M10.2 โพรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ดูดกลืน เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน (ก) และ 20 วัน (ข)	88
63	ข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) 28-32 องศาเซลเซียส (ข) 35 องศาเซลเซียส (ค) และ 40 องศาเซลเซียส (ง)	88
64	สารสีที่สกัดได้จากข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลือง รหัส KB20M10.2 ด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์	89
65	ปริมาณกลูโคซามีนของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ ฟิเอชเริ่มต้น 6 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	89
66	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ ฟิเอชเริ่มต้น 6 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	90
67	ค่าสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ ฟิเอชเริ่มต้น 6 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	90
68	ปริมาณกลูโคซามีนของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ ฟิเอชเริ่มต้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	91
69	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ ฟิเอชเริ่มต้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	91

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
70	ค่าสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	92
71	ปริมาณกลูโคซามีนของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน	92
72	กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา	93
73	ค่าสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน	93
74	ปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และค่าสี จากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ พีเอชเริ่มต้น 6 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	94
75	ปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และค่าสี จากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน	94
76	ปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และค่าสี จากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5 และบ่มอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน	95
77	ค่าสีที่ความยาวคลื่น 320 370 และ 500 นาโนเมตร จากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน	95

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
78	ค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว SS ติดต่อกัน 5 ครั้ง บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	98
79	ปริมาณสาร โมโนโคลิน เค ในสารสกัดข้าวหมกด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ	110
ภาพผนวกที่		
ข1	กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส	146
ข2	กราฟมาตรฐานของกลูโคซามีน	148
ข3	กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก	152
ข4	กราฟมาตรฐานของสารโมโนโคลิน เค	153
ค1	ความสามารถในการยับยั้ง DPPH ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ	157
ค2	ความสามารถในการยับยั้ง DPPH ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ และวิตามินซี	158

**การศึกษาลักษณะเฉพาะของการผลิตสีเหลืองและเอนไซม์กลูโคอะมิเลส
ของสายพันธุ์มิวแทนต์และฟิวแซนท์ที่ได้จากสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองและสีขาว
ของ *Monascus kaoliang* KB9**

**Characterization of Yellow Pigments and Glucoamylase Production of
Mutants and Fusants Derived from *Monascus kaoliang* KB9 Yellow Mutant
and White Mutant**

คำนำ

ในประเทศแถบตะวันออกมีการนำเชื้อราโมแนสคัสซึ่งเป็นราเส้นสาย มาใช้ประโยชน์เป็นเวลามากกว่าพันปี โดยใช้เป็นยารักษาโรคพื้นบ้านของจีน (Wong, 1982) และใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง (Lin and Iizuka, 1982) แรกเริ่มเชื้อราโมแนสคัสเป็นที่รู้จักว่าปนเปื้อนมากับข้าวพิษแป้ง ไซเลจ และอื่นๆ (Lin, 1973; Young 1930) ซึ่งเชื้อรานี้สามารถผลิตสีได้เมื่อเจริญบนข้าวนี้ โดยเฉพาะโทนสีแดง สีส้ม และสีเหลือง สีที่เกิดขึ้นนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ใช้ทำข้าวแดง (Palo *et al.*, 1960), ข้าวน้ำตาลเหลือง (Yongsomth *et al.*, 2000; Yongsomth *et al.*, 2013), ไวน์แดง, เหล้าเกาหลียง (Hesseltine, 1965), เต้าหู้ยี้, ปลาหมึก, กะปิ และปลาแป้งแดง (จินดาร์ตัน, 2522) นอกจากนี้เชื้อราโมแนสคัสยังสามารถผลิตสารที่เป็นประโยชน์ชนิดอื่นๆ อีก เช่น เอนไซม์ต่างๆ (บุษบา และวรรณภา, 2527; Iizuka and Mineki, 1977; Iizuka and Mineki, 1978), เอทานอล (Han, 1990), สารปฏิชีวนะ (Wong and Bau, 1977; Wong and Koehler, 1981), สารให้กลิ่นรส (Palo *et al.*, 1960; Kranz *et al.*, 1992), สารลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด (Endo, 1979) และสารลดอาหารประเภทเนื้อ (Hendry and Houghton, 1992) เป็นต้น

เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 (สมชาย, 2536) และสายพันธุ์มิวแทนต์สีขาวรหัส KB20M1 (นิสา, 2537) ต่างเกิดจากการปรับปรุงสายพันธุ์พ่อแม่สีแดงรหัส KB9 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ได้สายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สามารถผลิตสีเหลืองที่ดูคลีนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตรในปริมาณสูง แต่การเจริญช้ากว่าสายพันธุ์มิวแทนต์สีขาวรหัส KB20M1 ซึ่งขาดความสามารถในการผลิตสี แต่มีการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสที่สูงกว่า ดังนั้น วรวรรณ (2550) จึงได้มีการปรับปรุงการเจริญและการผลิตสีเหลืองของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลือง โดยการใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์มิวเตชันและเทคนิคโปรโตพลาสต์ฟิวชัน การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาต่อเนื่องเพื่อติดตาม

ตรวจสอบโดยละเอียดเกี่ยวกับสมบัติและศักยภาพของเชื้อราโมแนสค์ผลิตสีเหลืองสายพันธุ์
โปรโตพลาสต์มีวแทนท์และฟิวแซนท์ไอโซเลตต่างๆ เพื่อที่จะพัฒนาการผลิตสีเหลืองธรรมชาติ
และสารเสริมสุขภาพๆ เพื่อการประยุกต์ใช้ต่อไป



วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาเซลล์เชื้อราโมแนสค์ที่ให้สีเหลือง สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนต์และโปรโตพลาสต์ฟิวแซนต์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ได้แก่ สายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลือง (KB20M10.2) และมิวแทนต์สีขาว (KB20M1)
2. เพื่อศึกษาความคงตัวทางพันธุกรรมของเชื้อราโมแนสค์สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนต์และฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น
3. เพื่อศึกษาการเจริญ การสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส การผลิตสีเหลือง การต้านอนุมูลอิสระ และการสร้างโมนาโคลิน เค โดยการหมักแบบเหลวและแบบแข็งของเชื้อราโมแนสค์สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนต์และฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น
4. เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ ความชื้น และพีเอชต่อการเจริญและการผลิตสีเหลืองของเชื้อราโมแนสค์สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนต์และโปรโตพลาสต์ฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

การตรวจเอกสาร

1. ความเป็นมาและบทบาทของเชื้อราโมแนสคัส

ในปี ค.ศ. 1884 van Tieghem ค้นพบ และตั้งชื่อสกุลโมแนสคัส (*Monascus* sp.) (Carels and Shepherd, 1975) แต่การใช้ประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัสได้มีมามากกว่าพันปีแล้ว โดยเฉพาะในประเทศแถบเอเชีย ซึ่งใช้เป็นยาพื้นบ้านของจีน (Wong and Koehler, 1981; Chen and Tseng, 1989) สีส้มอาหารและเครื่องดื่มน้ำ (Su *et al.*, 1973; Hosono *et al.*, 1977; Yamanaka *et al.*, 1978; Wasilewski, 1979) สารแต่งกลิ่นรสในอาหารประเภทเนื้อและไวน์ (Fabre *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1973) เหล้าเกาหลี (Hesseltine, 1965; Lin, 1975) และเต้าหู้ยี้ (Tsai *et al.*, 1978) นอกจากนี้เชื้อราโมแนสคัสยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม ได้แก่ ไรโบนิวคลีเอส, (Yasuda *et al.*, 1995) โลเปส, แอลฟา-กลูโคซิเดส, อะมิเลส, กลูโคอะมิเลส (Iizuka and Mineki, 1977; Yongsmith *et al.*, 2000) และโปรติเอส (Tsai *et al.*, 1978) รวมทั้งสามารถสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ (Wong and Bau, 1977; Wong and Koehler, 1981; Chen and Tseng, 1989) และสารลดระดับคอเลสเตอรอล (Endo, 1979) ได้ด้วย เชื้อราโมแนสคัสสามารถผลิตสีได้เมื่อเจริญบนข้าวเหนียวที่อุณหภูมิ ความชื้น และพีเอชที่เหมาะสม นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถเจริญบนถั่วเหลือง ข้าวสาลี และถั่วลิสงได้ด้วย (Leistner, 1986) ข้าวแดงมีชื่อเรียกอื่นๆ อีก ได้แก่ ข้าวแดงจากจีน (Chinese red rice), อังกัก (ang-kak), แอนกัก (ankak), แองกา (anka), อังควาค (angquac), เบนิ-โคจิ (beni-koji) และอะกา-โคจิ (aka-koji) (Hesseltine, 1965)

เชื้อราโมแนสคัสสามารถผลิตสีหลักได้ 3 โทนีส์ ได้แก่ สีเหลือง (monascin และ ankaflavin) สีส้ม (monascorubrin และ rubropunctatin) และสีแดง (monascorubramine และ rubropunctamine) ดังภาพที่ 2 นอกจากนี้ ได้มีรายงานพบสารสีใหม่ๆ ดังปรากฏในภาพที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 สีที่ผลิตได้จากเชื้อราโมแนสคัสนั้นเป็นสีธรรมชาติที่สามารถใช้ผสมลงในอาหารได้โดยตรง (Palo *et al.*, 1960) ดังนั้น จึงมีการศึกษาและพัฒนาการผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสอย่างต่อเนื่อง เพื่อทดแทนการใช้สีสังเคราะห์ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

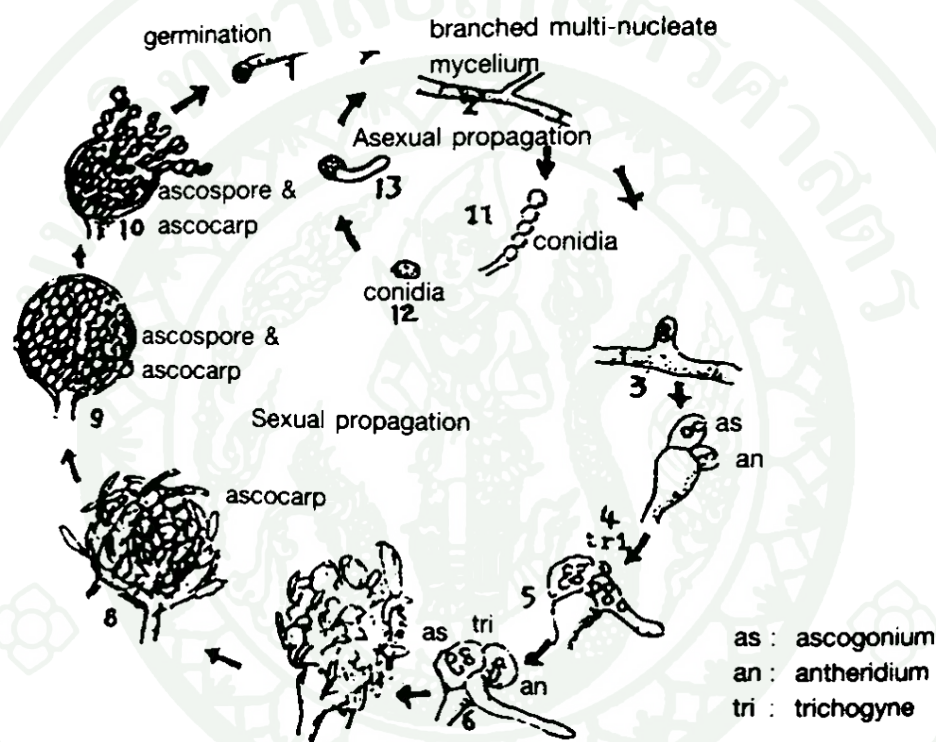
2. ลักษณะรูปร่างของเชื้อราโมนาสคัส

เชื้อราสกุลโมนาสคัส (*Monascus* spp.) จัดอยู่ในวงศ์ (Family) *Monascaceae* กลุ่ม (Class) *Ascomycetes* กลุ่มย่อย (Subclass) *Plectomycetidae* อันดับ (Order) *Eurotiales* (Hawksworth *et al.*, 1995) เส้นใยมีผนังกัน (septate) มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายและมักเจริญแบบซิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแห้ง เส้นใยเมื่ออายุน้อยจะมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วง

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการสร้างโคนิเดีย (conidia) เจริญมาจากโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) โคนิเดียมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือเกิดติดต่อกันเป็นลูกโซ่ (Hawksworth and Pitt, 1983) โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเกิดสีแดงได้บ้าง โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจไม่มีหรือมีผนังกัน 1 ด้าน ถ้ามีขนาดยาวจะมีผนังกัน 2 - 6 ด้าน เป็นสายตรงหรือคดเป็นเกลียว และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออายุแก่ขึ้น การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร เช่น C Medium (Hiroi *et al.*, 1979) เหมาะสำหรับการเกิดโคนิเดียของโมนาสคัส นอกจากนั้น ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีกหลายประการ เช่น อายุของสปอร์, ความหนาแน่นของสปอร์, ความเป็นกรด - ด่าง, แสง และอุณหภูมิ โดยทั่วไปโคนิเดียจะงอกภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมด้วยการสร้าง germ-tube ขึ้นมา 1 อัน หรือ 2 อัน หรือบางทีอาจมีได้ถึง 6 อัน ซึ่งการงอกของโคนิเดีย กระตุ้นได้ด้วยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด (Wong and Bau, 1977)

ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราโมนาสคัสคล้ายกับเชื้อราอื่นใน Class *Ascomycetes* มีการสร้างเพอริทีเซียม (perithecium) (บางรายงานใช้คลิสโตทีเซียม (cleistothecium)) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้าน (stalk) (Kolotila 1978; Kolotila 1980; Smith, 1969; Von Arx, 1970) ที่มีหรือไม่มีผนังกันก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมทัลลิก (homothallic) โดยการสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิด คือ เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เรียกว่า แอนเทอริเดียม (antheridium) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย เรียกว่า แอสโคโกเนียม (ascogonium) เซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเกิดการฟิวชัน (fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วจึงมีการวิวัฒนาการต่อไปคือ แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ตามมาด้วยไมโทซิส มี daughter nuclei จากการแบ่งตัว มีการขยายผนังเซลล์รวมออกเรียกว่า การสร้างแอสโคคาร์ปขึ้นในที่สุด (Carels and Shepherd, 1975; Kolotila *et al.*, 1978) ภายในเพอริทีเซียมมีแอสโคสปอร์ (ascospores) มากมาย โดยแอสโคสปอร์จำนวน 2 - 8 รวมอยู่ภายในแอสคัส

(ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์ออกมาเป็นเส้นไหมขึ้น ซึ่งระยะเวลาการเกิดแอสโคสปอร์จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร และสภาพที่ใช้เลี้ยงเชื้อ โดยขณะที่เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลวจะเริ่มพบเพอริทีเซียมได้เมื่อเวลาผ่านไป 24 - 48 ชั่วโมง แล้วจึงพัฒนาไปเป็นแอสโคสปอร์อย่างสมบูรณ์ เมื่อเลี้ยงเชื้อผ่านไปได้ 96 ชั่วโมง (Cerels and Shepherd, 1975; Kolotila *et al.*, 1978; Su and Huang, 1980)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัส

ที่มา: บุญบา (2542)

3. สารสีและชีวสังเคราะห์จากเชื้อราโมแนสคัส

สารสีที่ผลิตจากเชื้อราโมแนสคัสจัดเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งไม่จำเป็นต่อการเจริญและการสืบพันธุ์ของเชื้อรา (Turner, 1971; Bajpai and Reub, 1981) โดยพบมีทั้งการสร้างขึ้นควบคู่ไปกับการเจริญ (growth associated) (Lin, 1973) และการสร้างหลังจากที่เชื้อราหยุดการเจริญ (non-growth associated) (วรรณภา, 2529) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา

ส่วนประกอบของอาหาร และสภาวะในการเพาะเลี้ยง สีดังกล่าวมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารในกลุ่มอะซาฟิโลน (azaphilone) เช่น sclerotiorin (Nakanishi *et al.*, 1959)

Haws *et al.* (1959) พบโครงสร้างของสารสีแดงที่แยกได้จาก *M. rubropunctatus* Sato มีชื่อว่า รูโบรพังกาติน (rubropunctatin; $C_{21}H_{22}O_5$) เมื่อสารนี้อยู่ในสารละลายแอมโมเนียจะอยู่ในรูป nitrogen analogue เรียกว่า รูโบรพังกามีน (rubropunctamine; $C_{21}H_{23}O_4N$) ซึ่งมีสีม่วง ส่วน Nakanishi *et al.* (1959) ศึกษาโครงสร้างของโมนาสโครูบริน (monascorubrin) และโมนาสคามีน (monascamine) จาก *M. purpureus* พบว่า โมนาสดามีนเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างโมนาสโครูบรินกับแอมโมเนีย ขณะที่โมนาสโครูบรามีน (monascorubramine) และรูโบรพังกามีนเปลี่ยนมาจากโมนาสโครูบรินและรูโบรพังกาตินซึ่งมีสีส้ม ตามลำดับ ต่อมา Hiroi *et al.* (1975) ศึกษาโครงสร้างของสารสี 2 ชนิด คือ โมนาสดโครูบริน (สีส้ม) และรูโบรพังกามีน (สีม่วง)

Fielding *et al.* (1961) ศึกษาโครงสร้างสีเหลืองจากเชื้อราโมแนสคัส พบว่า สารสีเหลืองที่เชื้อราสร้าง คือ โมนาสซินหรือโมนาสโคฟลาวิน (monascin หรือ monascoflavin; $C_{21}H_{26}O_5$) นอกจากนี้ยังสามารถแยกโมนาสซินและรูโบรพังกาตินได้จาก *M. rubropunctatus* Sato แยกโมนาสซินและโมนาสโครูบรินได้จาก *M. purpureus* Went และแยกโมนาสซินได้จาก *M. rubiginosus* Sato

Kurono *et al.* (1963) ใช้ไอโซโทปติดตามการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส พบว่า เชื้อราสร้างสารสี 2 ชนิด คือ โมนาสดโครูบริน และโมนาสโคฟลาวิน ซึ่งกลไกการสังเคราะห์สารสีทั้งสองสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และมาจากสารเริ่มต้นที่เป็นโพลีคีโตเมทิลลิน (polyketomethylene) เหมือนกัน แต่ต่างกันที่ความยาวของสายโพลีคีโตเมทิลลิน และตำแหน่งที่จะมารวมกันเท่านั้น

Manchand *et al.* (1973) พบว่า เชื้อราโมแนสคัสแต่ละสายพันธุ์ให้สารสีที่แตกต่างกันออกไปโดยที่ *M. rubropunctatus* Sato สร้างสารรูโบรพังกาตินและโมนาสซิน *M. purpureus* สร้างสารโมนาสโครูบรินและโมนาสซิน ส่วน *M. rubiginosus* สร้างโมนาสซินเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบการสร้างสารสีเหลืองตัวใหม่จากเชื้อรา *M. anka* ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับโมนาสซิน มีชื่อว่า อังกาฟลาวิน

Sweeny *et al.* (1981) ใช้สารเคมีต่างๆ สกัดสารสีจากโคจิกของ *M. anka* ได้ 3 กลุ่ม 6 ชนิด ประกอบด้วย กลุ่มที่หนึ่งสีเหลือง ได้แก่ โมนาสซิน และอังคาฟลาวิน กลุ่มที่สองสีส้ม ได้แก่ รูโบรฟังกาติน และโมนาสโครูบริน และกลุ่มที่สามสีแดง ได้แก่ รูโบรฟังกาไมน และโมนาสโครูบราไมน ซึ่งเป็นอนุพันธ์เอมีนของสีส้ม

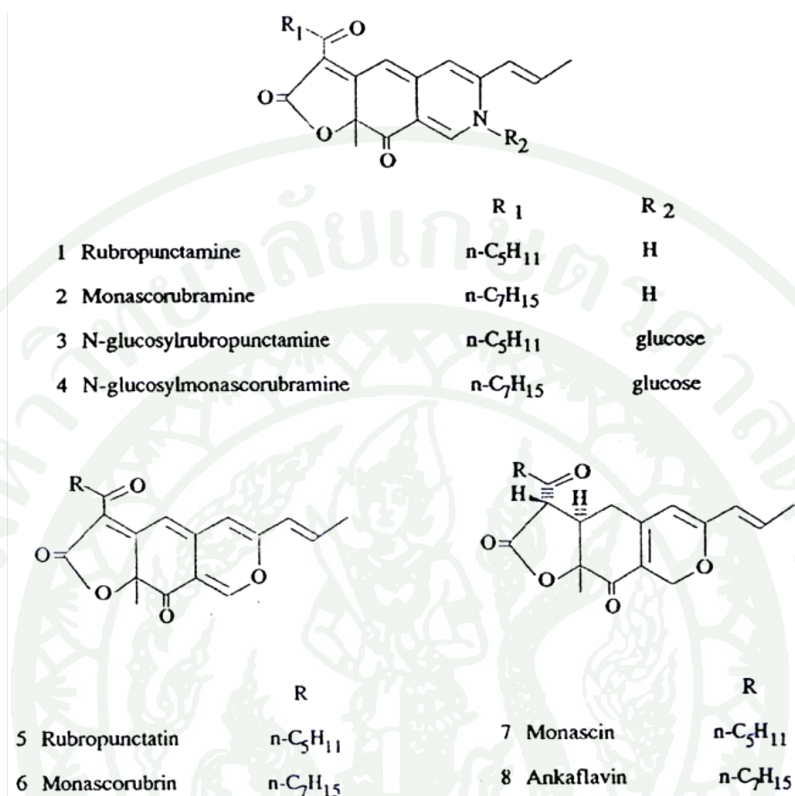
Kyoko *et al.* (1992) เสนอว่าแซนโทโมนาสซิน เอ (xanthomonasin A: $C_{21}H_{24}O_7$) เป็นสารสีเหลืองบริสุทธิ์ ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร โครงสร้างเคมี ประกอบด้วยโครงสร้างคาร์บอนชนิดใหม่ คือ ฟุราโนไอโซฟทาไลด์ (furanisophthalide) ซึ่งสกัดด้วยวิธีเคมีแยกได้จากอาหารเหลวหมักด้วยสายพันธุ์มิวแตนต์ของ *M. anka*

Yongsmith *et al.* (1993) ผลิตสารสีเหลืองดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง เปปโตน และกรดกลูตามิกที่พีเอชเริ่มต้น 2.5 และเมื่อสกัดสารสีเหลืองนี้ด้วยวิธีทางเคมีจนได้สารสีเหลืองบริสุทธิ์ ใช้ชื่อว่า yellow pigment II ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{22}H_{23}O_5$ (ภาพที่ 3)

Jongrungruangchok *et al.* (2004) พบโครงสร้างสีเหลืองตัวใหม่ของ *M. kaoliang* KB20M10.2 ซึ่งเป็นมิวแตนต์สีเหลืองที่เลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิ จากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (dichloromethane; CH_2Cl_2) แล้วแยกสารสีโดยใช้ Sephadex LH-20 และ Si gel chromatography พบสารสีเหลืองใหม่ ได้แก่ โมนาสคูโซน เอ (monascusone A; $C_{13}H_{18}O_5$) และโมนาสคูโซน บี (monascusone B; $C_{17}H_{18}O_5$) FK17-P2b2 และที่รู้จักกันแล้วคือ โมนาสซิน (monascin) โดยสารสีเหลืองชนิดใหม่และเก่าเหล่านี้ได้มีการศึกษาว่าพบมีเส้นทางเคมีสังเคราะห์แสดงไว้ดังภาพที่ 4

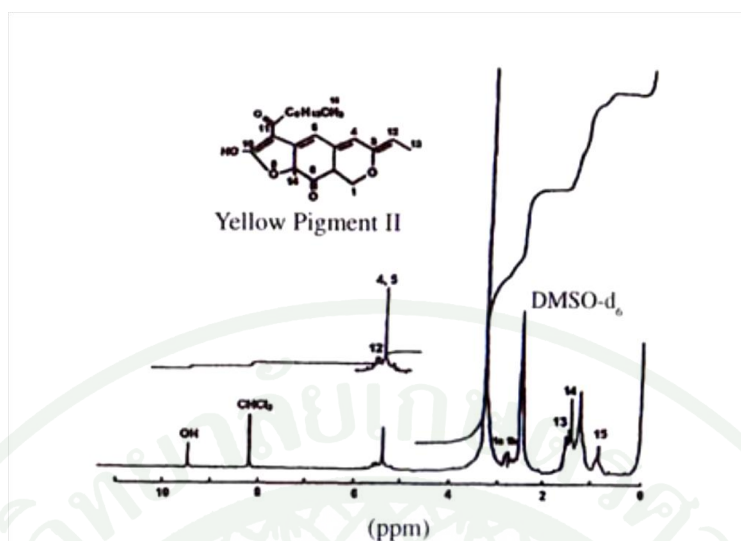
Campoy *et al.* (2006) พบโครงสร้างสีแดงและสีเหลืองตัวใหม่ผลิตโดย *M. purpureus* HP14 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมกรดเฮกซะ โนอิก (hexanoic acid) แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) ที่ใช้ photodiode detector ที่ความยาวคลื่น 520 และ 390 นาโนเมตร ตามลำดับ โครงสร้างสี 2 โครงสร้างจากจำนวนที่พบทั้งหมด 5 โครงสร้าง ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย Nuclear magnetic resonance (NMR) ตัวแรก คือ R3 มีชื่อโครงสร้างทางเคมีว่า 9-hexanoyl-3-(2-hydroxypropyl)-6a-methyl-9,9a-dihydro-6H-furo[2,3-h] isochromene-6,8-(6aH)-dione ตัวที่สองคือ Y3 มีชื่อโครงสร้างทางเคมีว่า 4-[2,4-dihydroxy-6-(3-

hydroxybutanethioxy)-3-methyl-phenyl][3,4-dihydroxy-3,6-dimethylheptanoic acid และพบว่าทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถละลายน้ำได้ดี



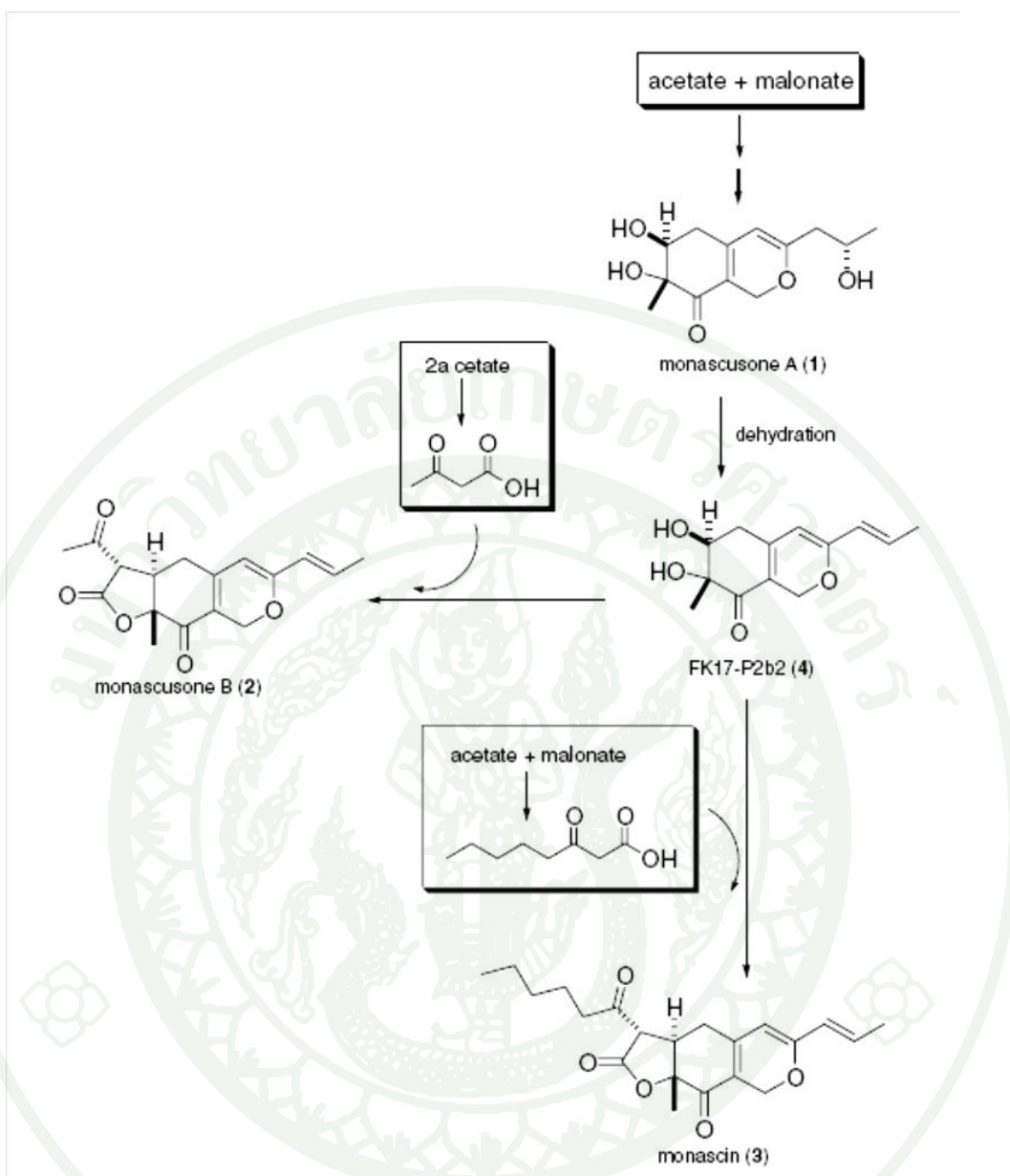
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารสีที่แยกได้จากเชื้อราโมแนสคัส

ที่มา: Sweeny *et al.* (1981)



ภาพที่ 3 Proton Nuclear Magnetic Resonance (H-NMR) spectrum และสูตรโครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่ที่ได้จากเชื้อรา *Monascus kaoliang* KB10M10.2

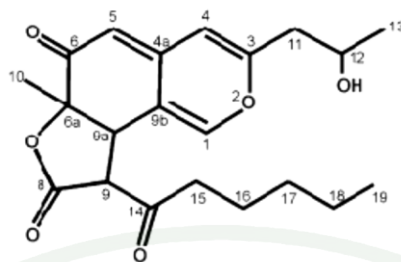
ที่มา: Yongsmith *et al.* (1993)



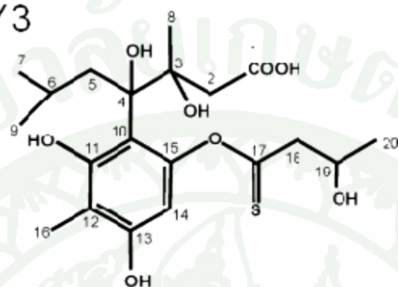
ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของสารสีเหลืองชนิดต่างๆ และเส้นทางเคมีสังเคราะห์ที่แยกได้จาก *Monascus kaoliang* KB20M10.2 ที่เลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิ

ที่มา: Jongrungruangchok *et al.* (2004)

R3

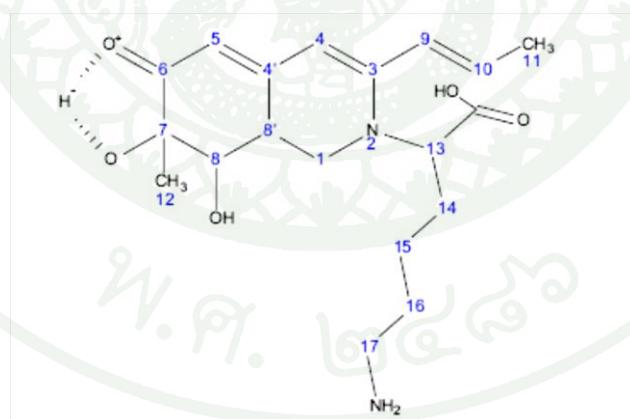


Y3



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารสีแดง (R3) และสีเหลือง (R4) ที่แยกได้จาก *Monascus purpureus* HP14

ที่มา: Campoy *et al.* (2006)



ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของสารสีแดงชนิดใหม่จาก *Monascus ruber* 102W

ที่มา: Lian *et al.* (2007)

3.1 ชีวสังเคราะห์การเกิดสีของเชื้อราโมแนสคัส

สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสเป็นสารประเภทโพลีคีไทด์ (polyketide) ที่เกิดจากการรวมตัวของอะซีเตต (acetate) 1 โมเลกุล กับมาโลเนต (malonate) 5 โมเลกุล โดยเอนไซม์โพลีคีไทด์ซินเทส (polyketide synthase) เกิดเป็นเฮกซะคีไทด์โครโมฟอร์ (hexaketide chromophore) โดยกระบวนการจะดำเนินต่อไปเรื่อยๆ จนได้โพลีคีไทด์โครโมฟอร์ (polyketide chromophore) ซึ่งจะมารวมกับกรดไขมันขนาดกลาง เช่น กรดออกตะโนอิก (octanoic acid) ที่ถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชัน (trans-esterification) เกิดเป็นสารสีส้ม คือ โมนาสโครูบริน หรือรูโบรพังกาติน ถ้ากรดไขมันที่ทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันกับโพลีคีไทด์โครโมฟอร์เป็นกรดเฮกซะโนอิก จากนั้นสารสีส้มโมนาสโครูบรินจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันแล้วได้เป็นสารสีเหลือง คือ อังกาฟลาวิน (หรือได้สารสีเหลืองโมนาสซินจากสารสีส้มรูโบรพังกาติน) ในขณะที่สารสีแดงซึ่งได้แก่ โมนาสโครูบรามิน และรูโบรพังกามินเกิดจากสารสีส้มทำปฏิกิริยาอะมิเนชัน (amination) กับแอมโมเนีย (Kurono *et al.*, 1963; Turner, 1971; Manchand and Whalley, 1973; Hajjaj *et al.*, 2000) ดังภาพที่ 7

Feilding *et al.* (1961) พบว่า เชื้อราโมแนสคัสสร้างได้เฉพาะสีส้มและสีเหลืองเท่านั้น ขณะที่สีแดงเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสีส้มและสีเหลือง

Carels and Shepherd (1977) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส พบว่า เชื้อราสามารถสังเคราะห์สารสีส้มโมนาสโครูบรินหรือรูโบรพังกาตินเท่านั้น ส่วนสีอื่นเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพการเลี้ยงเชื้อ โดยสีแดงเกิดจากสีส้มที่เชื้อสังเคราะห์ได้แล้วทำปฏิกิริยากับ $-NH_2$ group ของกรดอะมิโนได้เป็นโมนาสโครูบรามินหรือรูโบรพังกามิน ส่วนสีเหลืองนั้นสันนิษฐานว่าเกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของสารสีส้มกลายเป็นโมนาสซินหรืออังกาฟลาวิน

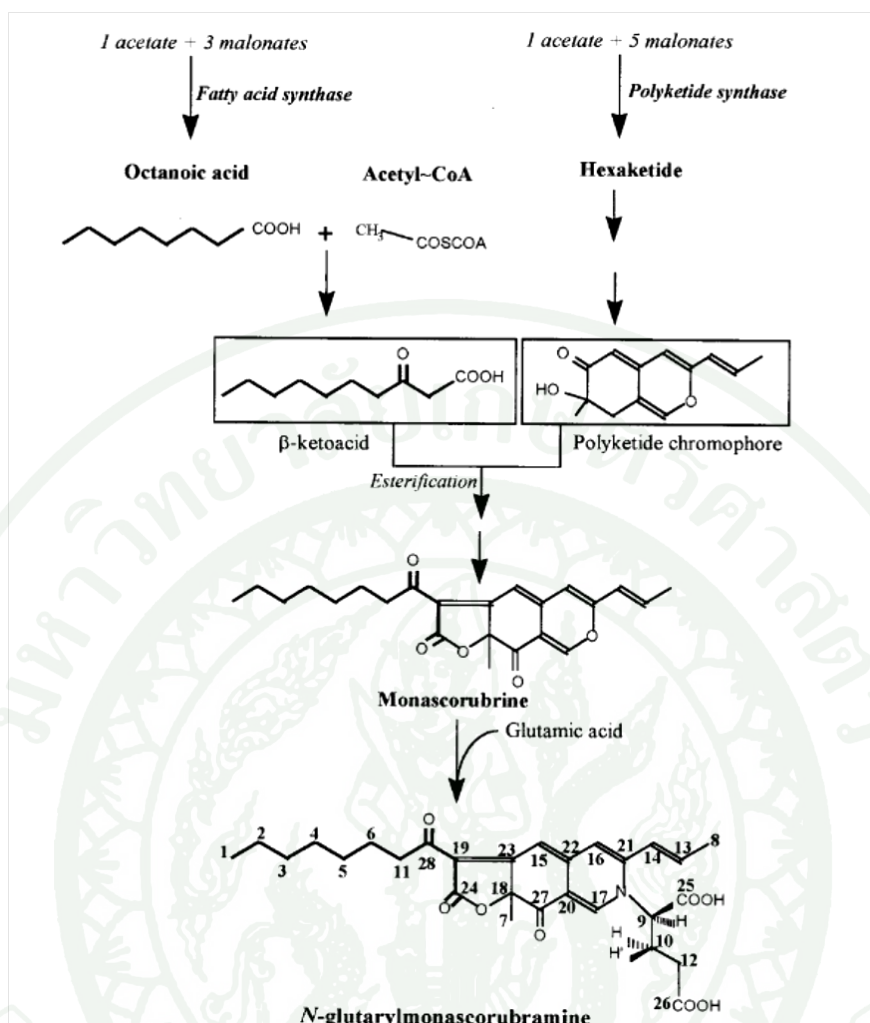
Broder และ Koehler (1980) ศึกษาคุณสมบัติของสารสีแดงที่ได้จากเชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 พบว่า เมื่อเชื้อราสร้างสารสี และปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ สารสีจะจับกับโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น คุณสมบัติของสารสีจึงขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่สารสีจับอยู่นั่นเอง และเมื่อนำสารสีมาทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่สารสีจับอยู่นั่นเอง ได้เป็นสารเชิงซ้อนดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแตกต่างกันไป โดยสารสีที่จับอยู่กับอะจิโน

(arginine pigment complex), โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate pigment complex), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin pigment complex) และไกลซีน (glycine pigment complex) สามารถดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 588, 603, 599 และ 596 นาโนเมตร ตามลำดับ สารเชิงซ้อนทั้ง 4 ชนิด มีลักษณะเป็นผลึกสีแดง เมื่อนำมาละลายน้ำจะมีปริมาณสารสี 20 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 80 เปอร์เซ็นต์

Yongsmith *et al.* (1990) และสมชาย (2536) พบว่า เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ KB20M10.2 ซึ่งเป็นมิวแทนต์ที่ผลิตสีเหลือง สามารถผลิตสีเหลืองออกมาได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเป็นกลางและมีหมู่เอมีนจากกรดอะมิโนมากเกินไปในการทำปฏิกิริยา

Zhou *et al.* (2009) พบว่า *M. anka* mutant สามารถผลิตสารสีเหลืองดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 และ 510 นาโนเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยเปปโตน แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) พบว่า สามารถผลิตสารสีเหลืองได้สูง

ดังนั้น อาจสรุปได้ว่ากลไกการผลิตสีอาจมีปัจจัยอื่นๆ เกี่ยวข้อง ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น



ภาพที่ 7 เส้นทางชีวสังเคราะห์สารสีของเชื้อราโมแนสคัส

ที่มา: Hajjaj *et al.* (2000)

3.2 สมบัติในการละลายของสีจากเชื้อราโมแนสคัส

Su and Huang (1980) ศึกษาสมบัติการละลายของสีจากเชื้อรา *M. anka* V-204 พบว่าสามารถละลายได้ดีในเอทานอล แต่ละลายได้น้อยมากในน้ำ นอกจากนี้ สีของตัวทำละลายที่ต่างกันยังส่งผลให้สีที่สกัดได้แตกต่างกันด้วย เมื่อแยกสีออกจากเส้นใยและนำมาทำปฏิกิริยากับโปรตีนจากเป็ดตัวเหลือง จะได้สารประกอบเชิงซ้อนสีแดงเข้มซึ่งสามารถละลายน้ำได้ดี

Sweeny *et al.* (1981) ทำให้สารสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัสเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ดีขึ้น คือ N-glucosylrubropunctamine และ N-glucosylmonascorubramine

Lin and Iizuka (1982) ทดลองเลี้ยงเชื้อรา *M. kaoliang* R-10847 บนอาหารแข็ง mantou meal เพื่อศึกษาการสร้างสารสีออกนอกเซลล์ พบว่า เชื้อราจะเริ่มต้นสร้างสีและปล่อยออกมาในวันที่ 2 ของการเจริญ พร้อมกับสารที่มีลักษณะหนืดชนิดหนึ่ง (viscous substance) ทำให้สารสีเกาะติดอยู่กับเส้นใย และสะสมเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งเส้นใยแตกจึงหลุดออกมาและไม่พบการสะสมสารสีภายในเส้นใย นอกจากนี้ ยังพบว่าการชักนำให้เชื้อราเกิดการผ่าเหล่าเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีรอยร้าวของผนังเส้นใยมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อราสร้างสารสีได้ดีขึ้น เนื่องจากมีความสมดุลระหว่างการสังเคราะห์สารสี และการปล่อยออกจากเส้นใย การเติม Tween 80 ปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (วรรณภา, 2529; สมชาย, 2536; Chiu and Poon, 1993) หรือปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (วรรณภา, 2529) ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยให้การปล่อยสารสีออกจากเส้นใยเพิ่มขึ้น

Wong and Koehler (1983) ทำให้สารสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัสสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น โดยนำสีมาทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ได้แก่ กรดอะมิโนอะซิติก (aminoacetic acid), กรดอะมิโนเบนโซอิก (aminobenzoic acid), กรดกลูตามิก (glutamic acid) และเจลาติน (gelatin) ซึ่งสารเหล่านี้ไม่ก่อให้เกิดอันตรายและราคาถูก

Hajjaj *et al.* (1997) ศึกษาสมบัติการละลายน้ำของสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส พบว่าสีจากเชื้อราดังกล่าวละลายน้ำได้น้อยมาก แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายไม่มีขั้ว เมื่อสีที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีน ซึ่งมีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ พวกรโพรตีน กรดอะมิโน และน้ำตาลอะมิโน (amino sugar) จะสามารถเกิดเป็นโครงสร้างที่อยู่ในรูปละลายน้ำได้

3.3 ความคงตัวของสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส

Su and Huang (1980) พบว่า สารสีจาก *M. anka* V-204 ไวต่อแสงเมื่อละลายในน้ำ แต่ถ้าละลายในเอทานอลจะสามารถคงตัวต่อแสงได้มากขึ้น และสามารถคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้เมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่มีค่าพีเอชเป็นกลางหรือเบส

Sweeny *et al.* (1981) ค้นพบสารที่สามารถป้องกันการสลายตัวของสีแดงจากแสงแดด คือ สาร quercetin-5'-sulfonic acid ที่พีเอช 2.8, สาร 6-hydroxy-1,4-naphthoquinone ที่พีเอช 6.0 และสาร 1,4,6-trihydroxynaphthalene ที่พีเอช 2.8 และ 6.0

Wong and Koehler (1983) พบว่า เมื่อนำสีจากเชื้อรามาทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน-และกรดอะมิโนเบนโซอิก จะได้สารประกอบเชิงซ้อนของสีทำให้สีมีความคงตัวต่ออนุมูลอิสระ พีเอช และแสงอัลตราไวโอเล็ตได้ดีขึ้น โดยสามารถคงตัวทั้งที่พีเอชเป็นกลาง และเป็นด่าง และคงตัวต่อแสงอัลตราไวโอเล็ตได้มากกว่า 80% หลังจากได้รับแสงนาน 36 ชั่วโมง

วรรณภา (2529) พบว่า สีแดงจากเชื้อรา *Monascus* sp. KB9 จะคงตัวตั้งแต่พีเอชเป็นกลางจนถึงด่าง มีความคงตัวที่อุณหภูมิน้ำเดือดนาน 15 นาที และคงตัวในตัวอย่างกลีเซอรอลเข้มข้น 50 และ 75เปอร์เซ็นต์ ส่วนสีเหลืองของเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2 จะคงตัวที่พีเอช 4 - 11 คงตัวที่อุณหภูมิน้ำเดือดนานถึง 120 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที คงตัวได้ดีในที่มีแสงและอนุมูลอิสระ โดยไม่ลดปริมาณสีเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 วัน คงตัวต่อการละลายในตัวทำละลายโซเดียมเบนโซเอท 1.0 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล น้ำ และกรดอะซิติกความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

นิสา (2537) ศึกษาความคงตัวของสีแดงที่ได้จากโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ KB9 และมิวแตนต์ KB10M16 และสีเหลืองที่ได้จากโมแนสคัสมิวแตนต์ KB20M10.2 ในอาหารเหลว SS พบว่า สีแดงนั้นคงตัวได้ดีที่พีเอช 5-10 คงตัวได้ดีในสารละลายเอทานอล น้ำกลั่น และกลีเซอรอล และสูญเสียความคงตัวเกือบทั้งหมดในสารละลายกรด นอกจากนี้ สีแดงที่ละลายอยู่ในสารละลายเบสจะคงตัวต่ออนุมูลอิสระต่างๆ ได้ดี ส่วนสีเหลืองนั้นคงตัวได้ดีในช่วงพีเอช 3 - 12 คงตัวได้ดีในน้ำกลั่น สารละลายเอทานอล และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ คงตัวได้ในสารละลายกรด แต่คงตัวในสารละลายเบสได้ต่ำกว่าสีแดง ทั้งนี้สีแดงและสีเหลืองสามารถทนต่ออนุมูลอิสระ 100 องศาเซลเซียส อนุมูลอิสระปาสเจอร์ไรซ์ และสเตอริไรซ์ได้ดี แต่คงตัวต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ต่ำ ส่วนการเก็บสีทั้งแดงและเหลืองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือเก็บในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง (30 - 32 องศาเซลเซียส) สีจะมีความคงตัวดีกว่าเก็บในที่ที่มีแสงที่อุณหภูมิเดียวกัน

4. การปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส

Lin and Suen (1973) ใช้สาร N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ปรับปรุงพันธุ์เชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ได้เชื้อรากลายพันธุ์ R-1 และ S-11 สามารถสร้างสีแดง และสีเหลืองเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิม 4.9 และ 7.0 เท่า ตามลำดับ

Hiroi *et al.* (1979) นำเชื้อรา *M. anka* มาผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์ครั้งแรกด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถสร้างสารสีเพิ่มขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่า สายพันธุ์กลายที่ได้สามารถสร้างสารสีเพิ่มขึ้น 4 - 7 เท่า และเมื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่สองด้วยสาร NTG พบว่า สายพันธุ์กลาย UN2604-4 และ UN202-13 สามารถสร้างสีในการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งได้เพิ่มขึ้น 17.7 และ 21.4 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่

Lin and Iizuka (1982) ศึกษาการผลิตสีออกนอกเซลล์ของเชื้อกลายพันธุ์ *M. kaoliang* sp. nov. ซึ่งได้จากการกลายพันธุ์ของเชื้อ *M. kaoliang* F-2 (ATCC 26264) พบว่า เชื้อกลายพันธุ์สามารถผลิตสีได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งในหมั่นโถ (mantou) หรือแป้งชาละเปา และจะผลิตสีออกมานอกเซลล์ร่วมกับสารที่มีความหนืด การผลิตสีของเชื้อกลายพันธุ์จะสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 100 เท่า และเปลี่ยนจากผลิตสีส้มเป็นสีแดงเข้ม แต่เชื้อกลายพันธุ์จะสูญเสียความสามารถในการสร้างสปอร์ ทำให้อัตราการเจริญลดลง ขนาดและปริมาณของโคนิเดียก็ลดลงด้วย

สุภาพร (2531) ศึกษาการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา (γ -rays) สาร Ethyl-methanesulfonate (EMS) และสาร NTG จากเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ คือ *Monascus* sp. KB11304 ได้เชื้อรากลายพันธุ์ KBN4069 และ KBU2069 สร้างสีแดงเพิ่มขึ้นเป็น 118.2 และ 108.6 U/ml เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ซึ่งให้สีแดงเพียง 100.8 U/ml เท่านั้น และยังพบการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเพิ่มขึ้น ซึ่งมีส่วนส่งเสริมการสร้างสีของเชื้อรา

Yongsmith *et al.* (1990) ปรับปรุงเชื้อรากลายพันธุ์ *Monascus* sp. KB10M16 ที่สร้างสีแดงด้วยแสงอัลตราไวโอเลต แล้วได้สายพันธุ์ KB20M10.2 ที่สามารถสร้างสีเหลืองได้ดีเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 3.0 - 7.0 โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง หรือแป้งถั่วเหลือง หรือข้าวเป็นสับสเตรต และสร้างสีเหลืองโดยตรงที่ค่าดูดกลืนแสง 330 - 370 นาโนเมตร

Kiyohara *et al.* (1990) ใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์ฟิวชันเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anka* MAK1 (*arg*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสีแดงได้สูง แต่เจริญเติบโตช้า ดังนั้น จึงทำโปรโตพลาสต์ฟิวชันกับเชื้อรา *Aspergillus oryzae* AOK1 (*met, thr*) ซึ่งเจริญเติบโตเร็ว โดยเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยใช้เอนไซม์ Usukizyme เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อรา *M. anka* MAK1 และเอนไซม์ Usukizyme เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ NovoZym234 เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อรา *A. oryzae* AOK1 จากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปหลอมรวมกัน โดยบ่มกับ polyethylene glycol (PEG) 6000 เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ฟิวชันที่ได้จะถูกนำมาทำให้มีโครโมโซม 2 ชุด (diploid) ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียสมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ 2 เท่า และพบว่า มี 1 ฟิวชันที่มีความคงตัวทางฟีโนไทป์ เจริญได้เร็วกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ และสามารถสร้างเอทานอลเร็วกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ นอกจากนี้ ยังสามารถสร้างเอนไซม์อะมิเลส โปรติเอส และกรดโคจิก (kojic acid) ได้อีกด้วย

Park *et al.* (1991) เหนียวนาให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา *Monascus* sp. KS2 โดยใช้สาร NTG ผลจากการเหนียวนาได้มีวแตนท์ *Monascus* sp. SUR37 ซึ่งสามารถผลิตสีแดงและสีเหลืองได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ 2.4 และ 1.6 เท่า ตามลำดับ แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน คือ แป้งข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และมีโมโนโซเดียมกลูตาเมต ความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน สภาพในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของมีวแตนท์ คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.0

Kim *et al.* (1993) รายงานว่า *M. anka* 732Y3 เป็นมีวแตนท์ที่ได้จากการเหนียวนาให้เชื้อรา *M. anka* KFCC11832 เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ *M. anka* KFCC11832 พบว่า *M. anka* 732Y3 มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมากกว่า การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แต่มีวแตนท์ 732Y3 สามารถผลิตสีแดงได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 10 เท่า

กังสดาลย์ และคณะ (2540) ปรับปรุงสายพันธุ์ *Monascus* sp. NP1 ให้มีสมบัติที่ทนต่อการกดกระบวนการผลิตสีโดยกลูโคส (glucose derepression) ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต และคัดเลือกมีวแตนท์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ได้มีวแตนท์ที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดง 2 สายพันธุ์ คือ R8 และ R53 โดยผลิตสีแดงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ 2.54 และ 2.47 เท่า ตามลำดับ

Lalithakumari (2000) เสนอว่า โดยทั่วไปการเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเตชันของเชื้อราเส้นสาย จะใช้สปอร์เพื่อความสะดวกและง่ายในการสัมผัสกับสิ่งก่อกลายพันธุ์ แต่สำหรับราเส้นสายที่ไม่มีการสร้างสปอร์ในวงจรชีวิต การเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเตชันจะเกิดความยุ่งยาก ดังนั้น จึงดัดแปลงใช้ โปรโตพลาสต์ของราเส้นสายไปเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเตชัน ตัวอย่างเช่น นำโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ไปเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเตชัน โดยใช้สาร Ethylmethanesulfonate (EMS) เพื่อให้ *R. solani* สามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อรา bavistin

Wang *et al.* (2004) สามารถปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus purpureus* NTU 601 สร้างโมนาโคลิน เค (monacolin K), gamma-aminobutyric acid (GABA) และซิตรีนิน (citrinin) ได้ โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต สาร EMS และ NTG เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์และคัดเลือก สายพันธุ์ที่สร้างซิตรีนินต่ำ จากการทดลองสามารถคัดเลือกสายพันธุ์มิวแทนท์ 11 สายพันธุ์ ที่สร้างซิตรีนินอยู่ในช่วง 0.16 - 0.73 ppm ซึ่งต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ผลิตได้ 1.08 ppm จัดเป็นการปรับปรุงสายพันธุ์ให้ลดสารพิษซิตรีนิน ซึ่งเป็นอันตรายต่อดับและไตด้วย

Yang *et al.* (2005) คัดเลือกสายพันธุ์ *Monascus* sp. ที่ได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเตชัน ด้วยคลื่นอัลตราโซนิค ทำให้ได้มิวแทนท์ที่สามารถผลิตสี และ โมนาโคลิน เค ได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม 29.74 และ 39.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

วรรณ (2550) ทำโปรโตพลาสต์ฟิวชันระหว่างเชื้อโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลือง รหัส KB20M10.2 สามารถผลิตสีเหลืองที่ดูดกลืนแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร ในปริมาณสูงแต่มีการเจริญช้า และสายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 ซึ่งขาดความสามารถในการผลิตสี แต่มีการเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่สูง เตรียมโปรโตพลาสต์โดยใช้ cellulase : chitinase : lyticase ในอัตราส่วน 40 : 1 : 1 และเหนี่ยวนำให้เกิดการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์โดยใช้ PEG 6000 เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ผลจากการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชันสามารถคัดแยกฟิวแซนท์ได้ 15 ไอโซเลต และพบว่า 6 ไอโซเลตที่สามารถผลิตสีเหลืองได้สูงกว่าสายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2

Zhi *et al.* (2007) ทำโปรโตพลาสต์ฟิวชันระหว่าง *A. terreus* CA99 สามารถสร้าง โมนาโคลิน เค (monacolin K) ได้ในปริมาณมาก และ *M. anka* M-3 ซึ่งสร้างโมนาโคลิน เค ได้น้อย โดยเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยเอนไซม์ lywallzyme เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์, snailase เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และ cellulase เข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์ของสายพันธุ์พ่อแม่เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต แล้วจึงหลอมรวมโปรโตพลาสต์โดยใช้ PEG 6000 เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการหลอมรวมโปรโตพลาสต์และเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ สามารถคัดแยกฟิวแซนท์ได้ 363 ไอโซเลต และมี 10 ไอโซเลตที่สามารถสร้างโมนาโคลิน เค ได้สูงกว่า *M. anka* M-3 ประมาณ 1.6 เท่า

งานวิจัยทางด้านการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัสโดยวิธีชักนำให้เกิดการกลายใน ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้อการควบคุม ของ ศ.ดร.บุษบา ขงสมิทธิ์ เป็นงานต่อเนื่องเริ่มจากสุภาพร (2531) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลาย ของเชื้อรา *Monascus* sp. KB9 ด้วยรังสีแกมมา, รังสีอัลตราไวโอเลต, สาร EMS และสาร NTG จนได้มิวแทนต์ KBN4069 และ KBU2069 ซึ่งสามารถผลิตสีแดงได้ 118.2 และ 108.6 หน่วยต่อ มิลลิลิตรตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่ผลิตสีแดงได้ 100.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมิวแทนต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้เพิ่มขึ้นอีกด้วย ต่อมาคณะวิจัยได้ทำ การปรับปรุงการผลิตสีแดงให้เพิ่มสูงขึ้นโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 10 นาที ทำให้ได้ เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์ KB10M16 ซึ่งสามารถผลิตสีแดงที่ดูคลิ่นแสงสูงสุดที่ ความยาวคลื่น 420 และ 500 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 2 เท่า ภายหลัง Yongsmith *et al.* (1990) และ สมชาย (2536) ปรับปรุงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์ KB10M16 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 20 นาที ทำให้ได้มิวแทนต์ตัวใหม่ที่ผลิตสีเหลืองที่ดูคลิ่นแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเดียว ที่ 370 นาโนเมตร คือ เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์ KB20M10.2 ซึ่งสามารถผลิตสีเหลืองได้ ดีในอาหารเหลว SS ที่พีเอชเป็นกลาง (Yongsmith *et al.*, 1994) และในอาหารแข็ง คือ ปลายข้าวหอมมะลิ (Yongsmith *et al.*, 2000) ต่อมานิสา (2537) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Monascus kaoliang* KB9 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 20 นาที ทำให้ได้มิวแทนต์ KB20M1 ที่ ไม่ผลิตสีแต่สามารถเจริญได้เร็ว สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และแอลฟาอะมิเลสได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอทานอลได้โดยตรง (สุพัฒน์, 2552)

5. เอนไซม์จากเชื้อราโมแนสคัส

Iizuka and Mineki (1977) ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสจากเชื้อรา *Monascus kaoliang* nov. sp. F-1 โดยทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน และอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่า มีเอนไซม์ 2 รูป คือ GA-I และ GA-II ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4.8×10^4 และ 6.8×10^4 คาลตัน ตามลำดับ มีค่า isoelectric point เท่ากัน คือ 4.0 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำ

ปฏิกิริยาของ GA-I และ GA-II คือ อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 และ 4.7 ตามลำดับ นอกจากนี้ GA-I จะทนต่อยูเรียและกัวนิดินได้ดีกว่า GA-II แต่ทนอุณหภูมิสูงได้ต่ำกว่า Iizuka and Mineki (1978) ได้ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรต พบว่า ทั้ง GA-I และ GA-II สามารถย่อยอะไมโลเพคติน (amylpectin), อะไมโลส (amylose), แป้ง (soluble starch), ไกลโคเจน (glycogen), มอลโตไตรโอส (maltotriose) และมอลโตส (maltose) ได้ดี แต่ไม่สามารถย่อยไอโซมอลโตส (isomaltose) ได้ นอกจากนี้ GA-II สามารถย่อยแป้งดิบจากข้าวสาลี ข้าวโพด มันฝรั่งหวาน และมันฝรั่งได้ดีกว่า GA-I

Bridge and Hawksworth (1985) ทดลองใช้เอนไซม์ในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อโมแนสคัส แต่ละสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป *M. purpureus* พบกิจกรรมของเอนไซม์ polypectase ปริมาณมากเมื่อเลี้ยงเชื้อพีเอช 6 ในขณะที่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์นี้ในสายพันธุ์อื่นหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่วนสายพันธุ์ *M. ruber* มีกิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลส ในขณะที่ไม่พบในสายพันธุ์อื่นเช่นกัน

Tsai *et al.* (1978) และ Nishikawa *et al.* (1988) รายงานว่า เชื้อราโมแนสคัสสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ได้แก่ ชนิด A สร้าง acid proteinase ชนิด B สร้าง alkaline proteinase และชนิด C สร้างทั้ง acid และ alkaline proteinase เอนไซม์ส่วนใหญ่จัดอยู่ในชนิด B รองลงมา ได้แก่ ชนิด A และ C ตามลำดับ ในปี 1989 Aso *et al.* พบว่า alkaline proteinase จากเชื้อราโมแนสคัสมีคุณสมบัติเป็น serine proteinase ถูกยับยั้งโดยphenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ 9

ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Liang *et al.* (2006) ยังศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์และอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน พบว่า เอนไซม์โปรติเอสมีน้ำหนักโมเลกุล 40,000 ดาลตัน พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 7 - 9 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีความคงตัวที่พีเอช 5 - 9 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Wong *et al.* (1986) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์แอลฟาไกลโคไลติกจาก *M. pilosus* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สร้างภายในเซลล์ พบว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นตัวแทนเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ และเมื่อทำให้บริสุทธิ์ พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 150,000 ดาลตัน พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 4.5 - 5.0 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งโดยอูออน ของปรอท เงิน และทองแดง

นอกจากกาแลคโตสแล้วยังมีน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์พวกเมลไบโอส (melibiose) ราฟฟิโนส (raffinose) และสตาชิโอซ (stachyose) เป็นสับสเตรตของเอนไซม์นี้ด้วย

Yongsmith *et al.* (1990) ศึกษาเอนไซม์ย่อยแป้งจากเชื้อรา *M. kaoliang* KB20M10.2 โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีมันสำปะหลังเป็นสับสเตรต พบว่า มีทั้งเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และแอลฟาอะมิเลส ซึ่งฟิเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมของกลูโคอะมิเลสและแอลฟาอะมิเลส คือ 4.7 และ 4.5 ที่ 65 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์แอลฟาอะมิเลสจะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์กลูโคอะมิเลสทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่า โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ยังคงมีกิจกรรมเหลือถึง 75 เปอร์เซ็นต์ แต่จะสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน ขณะที่ นิสา (2537) พบว่า เชื้อรา *M. kaoliang* KB20M1 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ KB9 ซึ่งผลิตสีแดง มีวุ้นที่สีแดงปฐมภูมิ KB10M16 และมีวุ้นที่สีเหลืองทุติยภูมิ KB20M10.2

Wong-Leung *et al.* (1993) พบว่า เชื้อราโมแนสคัสสามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาแกลคโคซิเดส ย่อยสลายวัสดุเหลือใช้จากโรงงานแปรรูปถั่วเหลืองและอ้อย โดยฟิเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 4.5 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีน้ำตาลราฟฟิโนสเป็นตัวเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์

Yasuda *et al.* (1995) ศึกษาเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากเชื้อรา *Monascus* sp. No. 3403 เมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์พบว่า เอนไซม์นั้นมีองค์ประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรต 5 เปอร์เซ็นต์ สับสเตรตที่ดีที่สุดคือ homopolyadenylic acid และทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ฟิเอชเท่ากับ 4.2 อุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส

Wang *et al.* (2002) พบว่า *M. purpureus* CCRC31499 สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเอสได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีผงของเปลือกกุ้งและปูที่เป็นของทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เมื่อทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไคตินเอสจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 81,000 ดาลตัน ทำปฏิกิริยาได้ดีที่ฟิเอช 7 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์สามารถคงตัวอยู่ได้ที่ฟิเอช 6 - 8 มีเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) เป็นตัวกระตุ้น และถูกยับยั้งด้วยไอออนของปรอท

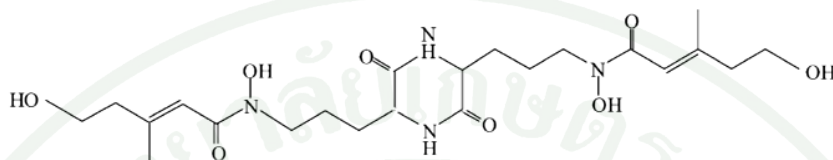
Liu *et al.* (2004) ศึกษาการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซิเปปติเดส (carboxypeptidase) จาก *M. purpureus* IFO4478 เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 132,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ 64,000 และ 67,000 ดาลตัน มี isoelectric point เท่ากับ 3.67 ทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่พีเอช 4 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมี piperastatinA, diisopropylfluoride phosphate (DEF), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), chymostatin และ *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB) เป็นตัวยับยั้ง

6. สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายโรค ได้แก่ มะเร็ง, ภาวะผนังเส้นโลหิตแดงหนาและความอืดหยุ่นน้อยลง, ไขข้ออักเสบ และข้ออักเสบรูมาตอยด์ และมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคที่มีการทำลายของเซลล์ประสาทในสมอง รวมทั้งความแก่ชรา (Hollman *et al.*, 1996; Aruoma, 1997; Meyer *et al.*, 1998) ซึ่งโรคต่างๆ เหล่านี้เป็นโรคที่มีความรุนแรง ดังนั้น ในปัจจุบันจึงมีผู้สนใจศึกษาด้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากธรรมชาติเพื่อป้องกันหรือยับยั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน มีรายงานจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าสามารถพบสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ได้มากในผัก (Hertog *et al.*, 1993; Furuta *et al.*, 1997; Gazzani *et al.*, 1998; Vinson *et al.*, 1998) และผลไม้ (Wang *et al.*, 1999; Kalt *et al.*, 1999)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าสามารถพบสารต้านอนุมูลอิสระได้ในข้าวหมักจากเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Agaricus blazei*, *Cordyceps sinensis*, *Monascus ruber* และ *Phellinus linteus* โดยข้าวหมักจากเชื้อราโมแนสคัสแสดงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด (Yoon *et al.*, 2008) ส่วน Yang *et al.* (2005) หมักเชื้อราโมแนสคัสโดยใช้ข้าวขาวและข้าวกล้องเป็นสับสเตรต สกัดข้าวหมักจากเชื้อราโมแนสคัสด้วยเมทานอล พบว่า ข้าวขาวที่หมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสแสดงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีกำจัดอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และข้าวขาวและข้าวกล้องที่หมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกันเมื่อวิเคราะห์ความสามารถจับไอออนของเหล็ก (ferrous ion chelating ability) Lee *et al.* (2007) แสดงให้เห็นว่า ถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการลดทอนฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ (reducing power) และความสามารถจับไอออนของเหล็ก (ferrous ion chelating ability)

สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสส์ดังกล่าว ได้แก่ กรดไดเมอร์มิก (dimerumic acid) (Tiara *et al.*, 2002), แทนนิน (tannin), สารประกอบฟีนอล และไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) (Aniya *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2003; Akihisa *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006)



ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของกรดไดเมอร์มิกแยกได้จาก *M. anka*

ที่มา: Tiara *et al.*, 2002

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 เชื้อรา *Monascus kaoliang* KB20M10.2 เป็นเชื้อราไมวเดนที่ผลิตสีเหลืองได้ทุกสภาพพีเอชหรือสูตรอาหาร ซึ่งได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันครั้งที่สองจากมิวเดนที่สีแดง KB10M16 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 20 นาที ผู้ทำการแยกได้คือ นายสมชาย ไกรรักษ์ (สมชาย, 2536)

1.2 เชื้อรา *Monascus kaoliang* KB20M1 เป็นเชื้อราไมวเดนที่ไม่ผลิตสี โคโลนีมีสีขาว ได้จากการชักนำให้เกิดมิวเตชันจากสายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 20 นาที ผู้ทำการแยกได้คือ นางสาวนิตา บุตรดา (นิตา, 2537)

1.3 เชื้อรา *Monascus kaoliang* สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวเดน (U2.3 และ U2.5) และฟิวแซนซ์ต่างๆ (F7, F10, F19, F20, F26, F27, F31, F35, F36, F38, F39, F41, F43, F45 และ F47) ที่ได้จากการทำโปรโตพลาสต์มิวเตชัน และโปรโตพลาสต์ฟิวชัน ตามลำดับ จากมิวเดนที่ข้างต้นข้อ 1.1 และ 1.2 ผู้ทำการแยกได้คือ นางสาววรวรรณ กลิ่นสุภา (วรวรรณ, 2550)

เชื้อจากข้อ 1.1 1.2 และ 1.3 ได้รับจาก ศาสตราจารย์ ดร.บุญบา ขงสมิทธิ์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารวุ้น MY (Malt extract yeast extract agar) สำหรับเตรียมกล้าเชื้อและเก็บรักษาเชื้อรา (ภาคผนวก ก ข้อ 1)

2.2 อาหารวุ้น C-medium agar (Hiroi *et al.*, 1979) สำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อราโมแนสคัส (ภาคผนวก ก ข้อ 3)

2.3 อาหารวุ้น SS (Starch soybean agar) medium (วรรณภา, 2529) สำหรับการผลิตสี และศึกษาการเจริญของเชื้อรา (ภาคผนวก ก ข้อ 4)

2.4 อาหารวุ้น MYS (Malt yeast extract starch agar) (วรรณภา, 2529) GYP (Glucose yeast extract peptone agar) และ PDA (Potato dextrose agar) สำหรับใช้ศึกษาลักษณะการเจริญ (ภาคผนวก ก ข้อ 2, 5 และ 6 ตามลำดับ)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

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

3.2 เครื่อง spectrophotometer รุ่น UV-visible spectrophotometer UV-1700 ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

3.3 เครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่มี Rotor เป็นแบบ swinging bucket ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Gallenkamp ประเทศอังกฤษ

3.5 Water bath shaker รุ่น MM-10 ผลิตภัณฑ์ของบริษัท TAITEC

3.6 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ประกอบด้วย

3.6.1 SHIMADZU LC-10AT VP LIQUID -CHROMATOGRAPH,

3.6.2 FCV-10AL VP pump,

3.6.3 LCD Analytical spectroMonitor 3100 detector ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร

3.6.4 LDC Analytical CI-4100 integrator

วิธีการ

1. ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

1.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสเมื่อเจริญบนอาหารวุ้น

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 โปรีโตพลาสติกมิวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารวุ้น MYS, MY, SS, PDA, GYP และ C-medium แบบ point inoculation บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) ศึกษาลักษณะของโคโลนีและเส้นใย การสร้างสปอร์ และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่เวลาต่างๆ

1.2 ผลของอุณหภูมิต่อลักษณะโคโลนี และอัตราการเจริญของเชื้อราโมแนสคัส เมื่อเจริญบนอาหารวุ้น MY

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 โปรีโตพลาสติกมิวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารวุ้น MY บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 20, 25, 28 - 32 (อุณหภูมิห้อง), 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ศึกษาผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1

1.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 โปรีโตพลาสติกมิวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารวุ้น MYS, MY, SS, PDA, GYP และ C-medium โดยวิธี slide culture บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน ศึกษาลักษณะ ปริมาณ และขนาดของเส้นใย โคนิเดีย และคลิสโตที่เชื่อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. ศึกษาความคงตัวทางพันธุกรรม (genetic stability) ของสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแทนต์สีขาวรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับมิวแทนต์ และฟิวแซนท์ สายพันธุ์ต่างๆ

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนต์สีขาวรหัส KB20M1 โพรโตพลาสต์มิวแทนต์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารวุ้น MY แบบ point inoculation คือ การใช้ชิ้นเชื้อที่เจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 มิลลิเมตร จำนวน 1 ชิ้น วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส นาน 7 - 10 วัน จากนั้นใช้ cork borer เจาะเส้นใยบริเวณของโคโลนี นำชิ้นเชื้อมาจำนวน 5 ชิ้น โดย 4 ชิ้นแรก ใส่ในอาหารเหลว SS ที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 บรรจุอาหารปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 1) น้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ข ข้อ 6) พีเอชสุดท้าย (ภาคผนวก ข ข้อ 7) และความยาวคลื่นแสงสูงสุด (λ_{max}) ส่วนชิ้นเชื้อที่เหลืออีก 1 ชิ้น นำไปวางบนอาหารวุ้น MY และบ่มเชื้อที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 7 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี สังเกตลักษณะเส้นใย และการสร้างสปอร์ของเชื้อรา ใช้ cork borer เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนี นำชิ้นเชื้อ 4 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลว SS อีก 1 ชิ้น วางบนอาหารวุ้น MY ทำเช่นนี้ 5 ครั้งติดต่อกัน

3. ศึกษา fermentation time-course ของการหมักแบบเปียกในอาหารเหลว SS และการหมักแบบแข็งบนปลายข้าวหอมมะลิของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนต์สีขาวรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

3.1 ศึกษา Fermentation time-course ของการหมักแบบเปียกในอาหารเหลว SS ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนต์สีขาวรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

3.1.1 ศึกษาการเจริญ การผลิตสี และการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนต์สีเหลือง KB20M10.2 มิวแทนต์สีขาว KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแตนท์ สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารวุ้น MY บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะขึ้นวุ้นบริเวณขอบของโคโลนีจำนวน 4 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลว SS พีเอช 7.0 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าสี (ภาคผนวก ข ข้อ 6) พีเอชสิ้นสุด (ภาคผนวก ข ข้อ 7) ปริมาณของ กลูโคซามีน (ภาคผนวก ข ข้อ 2) และกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

3.1.2 ศึกษาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงสูงสุดของสีจากเชื้อราโมแนสคัส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 แต่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีที่ผลิตจากเชื้อราโมแนสคัสฟิวแซนท์สายพันธุ์ใหม่ที่ได้ในวันสุดท้ายของการหมักในแต่ละความยาวคลื่นสูงสุดเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ซึ่งสามารถวัดค่าสีได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร

3.2 ศึกษา Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนปลายข้าวหอมมะลิของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแตนท์สีขาวรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับมิวแตนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ใหม่ที่ได้

3.2.1 ศึกษาการเจริญ การผลิตสี และการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแตนท์สีขาวรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแตนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนท์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารวุ้นเยือก C-medium ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ทำสารละลายสปอร์ด้วย tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยให้มีจำนวนของสปอร์อยู่ประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ใช้สารละลายสปอร์จำนวน 2 เปอร์เซ็นต์เป็นเชื้อเริ่มต้น ถ่ายลงในปลายข้าวหอมมะลิที่เตรียมตามภาคผนวก ก ข้อ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 20 วัน เพื่อ

นำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (ภาคผนวก ข ข้อ 5) ค่าสี (ภาคผนวก ข ข้อ 6) พีเอชสิ้นสุด (ภาคผนวก ข ข้อ 7) กรองแยกเซลล์ด้วยผ้าขาวบาง อบแห้ง และชั่งน้ำหนักเทียบกับปริมาณ กลูโคซามีน (ภาคผนวก ข ข้อ 2) และกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

3.2.2 ศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดจากสีของเชื้อราโมแนสคัส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 แต่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีที่ผลิตจากเชื้อราโมแนสคัสฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ในวันสุดท้ายของการหมัก ในแต่ละความยาวคลื่นสูงสุดเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ซึ่งสามารถวัดค่าสีสูงสุดที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร

4. ศึกษาความสามารถในการทนเกลือและแอลกอฮอล์

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารวุ้น MY บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบของโคโลนีจำนวน 1 ชิ้น วางลงบนเพลทอาหารวุ้น MY ซึ่งเติมเกลือ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือแอลกอฮอล์ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส สังเกตลักษณะโคโลนีและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

5. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมัก

5.1 ศึกษาการเจริญ และการผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารวุ้น MY บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบของโคโลนีจำนวน 2 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลว MY ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดรูปตัวแอล (L) บ่มในเครื่อง temperature

gradient ที่อุณหภูมิ 10 - 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าสี (ภาคผนวก ข ข้อ 6) และพีเอชสิ้นสุด (ภาคผนวก ข ข้อ 7)

5.2 ศึกษาการเจริญ การผลิตสี และการผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ตั้งต้นมีวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มีวแทนท์สีขาวยรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มีวแทนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมีวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มีวแทนท์สีขาวยรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มีวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหาร วุ้นเยือก C-medium ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ทำสารละลายสปอร์ด้วย tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยให้มีจำนวนของสปอร์อยู่ประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ใช้สารละลายสปอร์จำนวน 2 เปอร์เซ็นต์เป็นเชื้อเริ่มต้น ถ้ายกลงในปลายข้าวหอมมะลิที่เตรียมตาม ภาคผนวก ก ข้อ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 28 - 32, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (ภาคผนวก ข ข้อ 5) ค่าสี (ภาคผนวก ข ข้อ 6) พีเอชสิ้นสุด (ภาคผนวก ข ข้อ 7) และกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

5.3 ศึกษาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดจากสีของเชื้อราโมแนสคัส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.2 แต่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสีที่ผลิตจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มีวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อครบ 1 และ 2 สัปดาห์ ในแต่ละความยาวคลื่นสูงสุดเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นมีวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ซึ่งสามารถวัดค่าสีสูงสุดที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร

6. ศึกษาแนวทางการเพิ่มการสร้างสปอร์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมีวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มีวแทนท์สีขาวยรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มีวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อหมักแบบแข็งโดยใช้สับเตรตต่างๆ

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมีวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มีวแทนท์สีขาวยรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มีวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหาร วุ้นเยือก C-medium ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน ทำสารละลายสปอร์ด้วย tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยให้มีจำนวนของสปอร์อยู่ประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ใช้สารละลายสปอร์จำนวน 2 เปอร์เซ็นต์เป็นเชื้อเริ่มต้น ถ้ายกลงในปลายข้าวหอมมะลิ, ถั่วเหลือง, ถั่วเขียว, มันสำปะหลัง และมันฝรั่ง ที่เตรียมตาม ภาคผนวก ก ข้อ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 20 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (ภาคผนวก ข ข้อ 5) ค่าสี (ภาคผนวก ข ข้อ 6) ฟิเอชสีสูงสุด (ภาคผนวก ข ข้อ 7) และกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 1)

7. ศึกษาผลของสับสเตรตต่อการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลือง รหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ลงบนอาหารวุ้น MY เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 มิลลิเมตร ใส่เชื้อ 4 ชิ้น ลงในอาหารเหลว PDB หรือ PDB ที่ไม่เติมเดกซ์โตรส หรือ PDB ที่เปลี่ยนจากมันฝรั่งเป็นข้าว หรือ PDB ที่เปลี่ยนจากมันฝรั่งเป็นข้าวและไม่เติมเดกซ์โตรส ปริมาตร 75 มิลลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 และ 28 - 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (ภาคผนวก ข ข้อ 1) น้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ข ข้อ 6) ฟิเอชสุดท้าย (ภาคผนวก ข ข้อ 7) และความยาวคลื่นแสงสูงสุด (λ_{max})

8. ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

เตรียมข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ บนปลายข้าวหอมมะลิ ตามภาคผนวก ก ข้อ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างทุกวัน จนครบ 20 วัน จากนั้นเตรียมตัวอย่างและนำมาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีต่างๆ (ภาคผนวก ข ข้อ 7) ได้แก่ การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สาร DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals) (Chang *et al.*, 2001) (ภาคผนวก ข ข้อ 7.1) ความสามารถจับไอออนของเหล็ก (ferrous ion chelating ability) (Dinis *et al.*, 1994) (ภาคผนวก ข ข้อ 7.2) และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Singleton and Rossi. 1965) (ภาคผนวก ข ข้อ 7.3)

9. ศึกษาความสามารถในการสร้างโมนาโคลิน เค ของสารสกัดจากข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M11 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ (Ganrong *et al.*, 2003)

เตรียมข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ บนปลายข้าวหอมมะลิ ตามภาคผนวก ก ข้อ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ โมนาโคลิน เค โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) (ภาคผนวก ข ข้อ 10)

10. ศึกษาการสกัดสารสีออกจากข้าวน้ำตาลเหลือง (นิสา, 2537)

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 บนปลายข้าวหอมมะลิ ตามภาคผนวก ก ข้อ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน นำมาบด แล้วชั่งให้ได้น้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำทำละลายปริมาตร 39 มิลลิลิตร ชนิดต่างๆ ได้แก่ เอทานอลความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, และ 100 เปอร์เซ็นต์ เมทานอลความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองและวัดปริมาณสารสีที่ความยาวคลื่นต่างๆ

11. ศึกษาความคงตัวของสารสีในข้าวน้ำตาลเหลืองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส บนอาหารแข็ง

เตรียมข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 บนปลายข้าวหอมมะลิ ตามภาคผนวก ก ข้อ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน

11.1 ความคงตัวของข้าวน้ำตาลเหลืองต่ออุณหภูมิในการนึ่งมาเชื้อ (Autoclave)

ใส่ข้าวน้ำตาลเหลือง 20 กรัม ในถุงพลาสติกขนาด 5 × 8 นิ้ว ทดสอบความคงตัวที่ อุณหภูมิในการนึ่งมาเชื้อต่างๆ ดังนี้ นำไปนึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที วัดปริมาณสีเปรียบเทียบกับปริมาณสารสีเริ่มต้น

11.2 ความคงตัวของข้าวเหลืองน้ำตาลต่อแสง

ใส่ข้าวน้ำตาลเหลือง 20 กรัม ในถุงพลาสติกใสขนาด 5×8 นิ้ว นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 11.1 จากนั้นนำไปเก็บในที่ต่างๆ ได้แก่

11.2.1 เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)

11.2.2 เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)

11.2.3 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วัดปริมาณสารสีหลังจากเก็บน้ำสีในสภาวะต่างๆ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน เปรียบเทียบกับปริมาณสารสีเริ่มต้น

12. ศึกษาความคงตัวของน้ำสีเหลืองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสค์บนอาหารแข็ง (นิสา, 2537)

เตรียมข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสค์สายพันธุ์ตั้งต้นมวดแตงที่สีเหลืองรหัส KB20M10.2 บนปลายข้าวหอมมะลิ ตามภาคผนวก ก ข้อ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 28 - 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน นำมาบดแล้วชั่งให้ได้น้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลอ้อยเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 39 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองและวัดปริมาณสารสีที่ความยาวคลื่นต่างๆ

12.1 ความคงตัวของน้ำสีต่ออุณหภูมิ

ใส่น้ำสีปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบขนาด 25×200 มิลลิเมตร นำไปทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ อุณหภูมิ 20, 40 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที วัดปริมาณสีเปรียบเทียบกับปริมาณสารสีเริ่มต้น

12.2 ความคงตัวของน้ำสีต่อแสง

ใส่น้ำสีปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบขนาด 25×200 มิลลิเมตร นำไปเก็บในที่ต่างๆ ดังนี้

- 12.2.1 เก็บในที่มืด/ไม่มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)
- 12.2.2 เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)
- 12.2.3 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วัดปริมาณสารสีหลังจากเก็บข้าวหมักในสภาวะต่างๆ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน
เปรียบเทียบกับปริมาณสารสีเริ่มต้น

13. การวิเคราะห์

13.1 การวิเคราะห์สี

โดยสกัดข้าวหมัก 1 กรัม ด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ 39 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (รายละเอียดดังในภาคผนวก ข ข้อ 6)

13.2 การวิเคราะห์เอนไซม์กลูโคอะมิเลส (นิสา, 2537; กังสดาลย์, 2538)

สกัดเอนไซม์จากข้าวหมักโดยใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 วิเคราะห์เอนไซม์โดยใช้ copper reagent และ Nelson reagent นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 20 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รายละเอียดดังในภาคผนวก ข ข้อ 1)

13.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนเพื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อราในการหมักแข็ง (Morgan - Elson ของ Van de Loo, 1976)

เตรียมตัวอย่างจากอาหารแข็ง วิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน โดยใช้อะซิติลอะซิโตน เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และ Ehrlick's reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณกลูโคซามีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ glucosamine hydrochloride ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รายละเอียดดังในภาคผนวก ข ข้อ 2)

13.4 การนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemocytometer (Towsend and Lindrend, 1953)

นับจำนวนสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับสปอร์ที่อยู่แต่ละช่องใหญ่และที่อยู่ระหว่างขอบของช่องใหญ่ทางด้านล่างและด้านขวา ตามแนวทแยงมุมซ้ายและขวารวม 9 ช่อง

$$\text{จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร} = \text{สปอร์เฉลี่ยที่ได้} \times 2.5 \times 10^5$$

13.5 การหาน้ำหนักแห้ง (นิสา, 2537)

13.5.1 การหาน้ำหนักแห้งจากตัวอย่างอาหารเหลว

นำตัวอย่างปริมาณ 100 มิลลิลิตร มากรองด้วยผ้าลินิน 2 ชั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปใส่กระตงอะลูมิเนียม นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 98 - 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 - 24 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักโดยอบจนได้น้ำหนักแห้งคงที่

13.5.2 การหาน้ำหนักแห้งจากข้าวหมัก

นำตัวอย่างข้าวประมาณ 5 กรัม ใส่กระตงอะลูมิเนียม นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง นำมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก ส่วนการหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นทำได้โดย

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

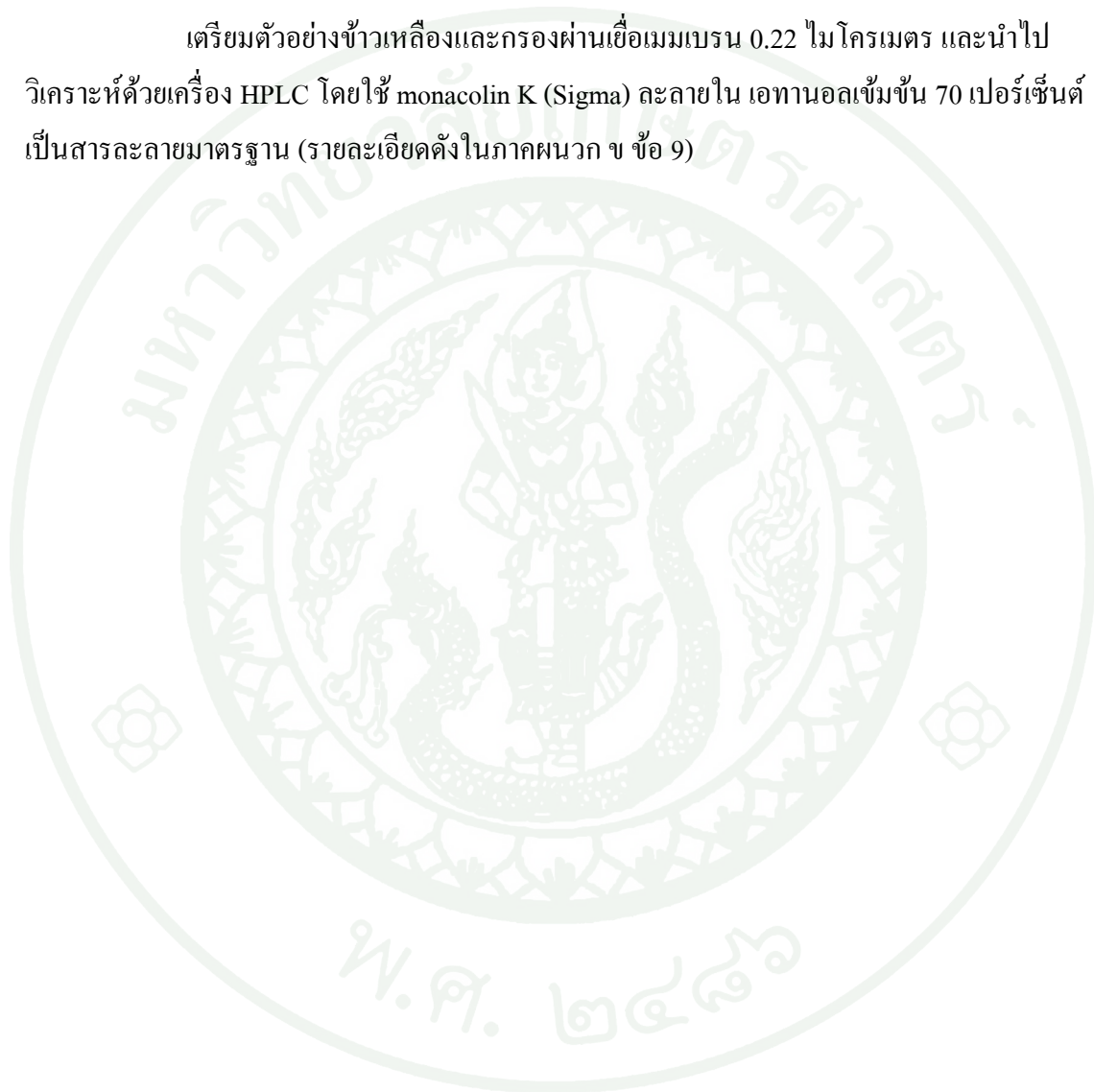
13.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

13.6.1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สาร DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals) (Chang *et al.*, 2001) รายละเอียดดังภาคผนวก ข ข้อ 8.1

13.6.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Singleton and Rossi. 1965)
รายละเอียดดังภาคผนวก ข ข้อ 8.2

13.7 การวิเคราะห์ปริมาณโมนาโคลิน เค (Ganrong *et al.*, 2003)

เตรียมตัวอย่างข้าวเหลืองและกรองผ่านเยื่อเมมเบรน 0.22 ไมโครเมตร และนำไป
วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ monacolin K (Sigma) ละลายใน เอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์
เป็นสารละลายมาตรฐาน (รายละเอียดดังในภาคผนวก ข ข้อ 9)



ผลและวิจารณ์

1. ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาของเซลล์ของเชื้อราโมแนสคัส

1.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสเมื่อเจริญบนอาหารวุ้น

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้น มีวุ้นแดนที่สีขาวรหัส KB20M1 มีวุ้นแดนที่สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ส่วนโปรโตพลาสต์มีวุ้นแดนที่ 2 สายพันธุ์ คือ U2.3 และ U2.5 และโปรโตพลาสต์ฟิวแซนท์สายพันธุ์ใหม่ที่ได้อีก 16 สายพันธุ์ คือ F7, F10, F19, F20, F21, F26, F27, F31, F35, F36, F38, F39, F41, F43, F45 และ F47 เมื่อเจริญบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด คือ MY, MYS, C-medium, SS, GYP และ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า มีการเจริญแตกต่างกันตามสายพันธุ์ และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่า เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มีวุ้นแดนที่สีขาวรหัส KB20M1 มีการเจริญบนอาหารวุ้น MY, MYS, SS, GYP และ PDA คล้ายคลึงกัน คือ ลักษณะเส้นใยมีสีขาว ฟูเป็นปุยหนาแน่น มีรอยพับตามแนวรัศมีรอบๆ โคโลนี ขอบของโคโลนีเรียบ แต่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จะมีเส้นใยส่วนที่เรียบไปกับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าเส้นใยที่ฟู และพบลักษณะพิเศษเพิ่มเติมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ตรงที่เส้นใยมีการชูยกสูงขึ้นจากแนวระนาบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ C-medium เส้นใยมีสีขาวหนาแน่น ในโคโลนีจะมีทั้งฟูเป็นปุยและเรียบแบนติดไปกับผิวหน้าของอาหาร ขอบของโคโลนีหยัก

ส่วนเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มีวุ้นแดนที่สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์-มีวุ้นแดนที่ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ใหม่ทั้ง 18 สายพันธุ์ มีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดเหมือนกัน โดยการเจริญบนอาหาร MY MYS จะใกล้เคียงกันคือลักษณะเส้นใยหนาแน่น เรียบติดไปกับผิวหน้าของอาหาร ขอบของโคโลนีเรียบ โคโลนีมีสีส้มเหลือง และสีส้มเหลืองที่ผลิตได้จะแพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่การเจริญบนอาหารวุ้น PDA นั้น สีของโคโลนีจะเป็นสีส้มอมเหลือง และขอบโคโลนีไม่เรียบ และผลิตสีเหลืองแพร่ออกมาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการเจริญบนอาหารวุ้น C-medium โคโลนีมีสีส้มเหลือง เส้นใยเจริญอย่างหนาแน่น เรียบติดไปกับผิวหน้าของอาหารขอบของโคโลนีหยักเล็กน้อย สีที่ผลิตได้เป็นสีส้มเหลืองจะแพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนการเจริญบนอาหาร SS นั้นโคโลนีจะมีสีส้มแดง เส้นใยหนาแน่น เรียบติดไปกับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ขอบของโคโลนีเรียบ และผลิตสีส้มแดงแพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่เลี้ยงบนอาหาร GYP เชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์จะสร้างเส้นใยหนาแน่น ฟูเล็กน้อย บริเวณศูนย์กลางซึ่ง

เป็นเส้นใยที่มีอายุมากจะมีสีส้มแดงเข้ม แต่สีของเส้นใยจะอ่อนลงตามลำดับ รอบนอกของโคโลนีนั้นจะมีสีอ่อนที่สุดคือเป็นสีส้มอ่อนเกือบขาว มีการเกิดรอยพับตามแนวรัศมีเป็นแฉกค่อนข้างถี่ ขอบของโคโลนีเรียบ มีการผลิตสีส้มเหลืองแพร่ออกมาในอาหาร เช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ

เมื่อศึกษาการเจริญโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MY, MYS, C-medium, SS, GYP และ PDA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) จะเริ่มมองเห็นการเจริญของเชื้อราทั้ง 20 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเวลาผ่านไปขนาดของโคโลนีจะขยายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีขาวรหัส KB20M1 สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดได้ดีกว่าเชื้อที่สามารถผลิตสีเหลืองได้ทั้ง 19 สายพันธุ์ ส่วนเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มิวแตนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ใหม่ที่ได้ สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร C-medium มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 50 - 62 มิลลิเมตร เชื้อราที่มีการเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ C-medium คือ F7, F20 และ F21 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 62.77, 61.42, 61.37 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ GYP, MY, PDA, MYS และ SS ตามลำดับ เชื้อราโมแนสคัสที่เจริญได้ดีบนอาหาร GYP คือ F20 และ F36 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 61.73 และ 61.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ เชื้อราโมแนสคัสที่เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MY คือ F10 และ F20 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 53.17 และ 53.48 มิลลิเมตร เชื้อราโมแนสคัสที่เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA คือ F31 และ F36 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 46.97 และ 46.27 มิลลิเมตร ตามลำดับ เชื้อราโมแนสคัสที่เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYS คือ F7 และ F10 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 43.03 และ 44.17 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อราโมแนสคัสที่เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SS คือ F7 F20 และ F27 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 31.27 31.78 และ 31.08 มิลลิเมตร ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ขนาดโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2
 มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ
 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวันชนิดต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิอุณหภูมิห้อง
 (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

เชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ (มิลลิเมตร)					
	C-medium	GYP	MY	PDA	MYS	SS
KB20M1	63.81	62.55	57.20	56.43	58.62	54.00
KB20M10.2	55.26	56.07	46.27	45.28	52.39	30.74
U2.3	50.08	53.10	50.10	42.33	37.70	29.58
U2.5	52.08	44.07	45.47	45.42	35.73	29.62
F7	62.77	54.08	51.71	42.97	43.03	31.27
F10	60.42	50.73	53.17	41.83	44.17	28.67
F19	57.73	55.17	50.40	42.02	40.30	29.68
F20	61.42	61.73	53.48	33.27	41.93	31.08
F21	61.37	50.80	48.27	44.00	40.30	27.68
F26	56.57	50.08	47.83	40.32	37.95	30.13
F27	55.85	52.47	52.13	40.65	41.88	31.78
F31	56.30	43.80	48.00	46.97	31.95	28.30
F35	56.25	51.10	49.30	40.90	40.45	29.43
F36	54.90	61.63	51.85	46.27	39.78	30.82
F38	59.47	51.78	49.05	40.82	41.18	26.35
F39	59.33	52.55	49.52	40.02	36.82	27.43
F41	57.92	50.08	50.63	39.72	38.70	30.17
F43	50.28	46.82	42.83	40.32	35.30	28.57
F45	53.62	51.77	47.87	39.43	37.05	28.60
F47	56.55	54.15	48.58	39.53	39.70	29.40

1.2 ผลของอุณหภูมิต่อลักษณะโคโลนี และอัตราการเจริญของเชื้อราโมแนสคัส เมื่อเจริญบนอาหารวุ้น

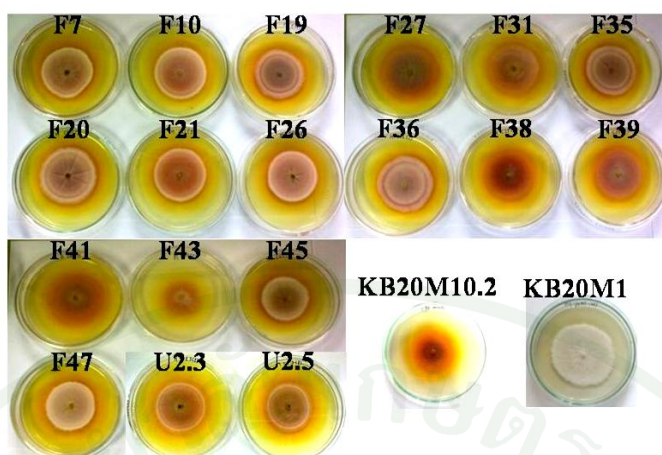
จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีขาว รหัส KB20M1 มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ และฟิวแซนท์ สายพันธุ์ต่างๆ 18 สายพันธุ์ คือ U2.3, U2.5, F7, F10, F19, F20, F21, F26, F27, F31, F35, F36, F38, F39, F41, F43, F45 และ F47 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MY บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส), 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เชื้อราโมแนสคัสทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 - 40 องศาเซลเซียส

โคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) ลักษณะเส้นใยมีสีขาว ฟูเป็นปุยหนาแน่น มีรอยพับตามแนวรัศมีรอบๆ โคโลนี ขอบของโคโลนีเรียบ แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส ขนาดโคโลนีจะเล็กกว่าที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ลักษณะเส้นใยมีสีขาว ฟูเป็นปุยหนาแน่น มีรอยพับตามแนวรัศมีรอบๆ โคโลนีเช่นเดียวกับเมื่อบ่มที่อุณหภูมิอื่นๆ แต่ขอบของโคโลนีจะหยัก (ตารางที่ 2) แต่เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

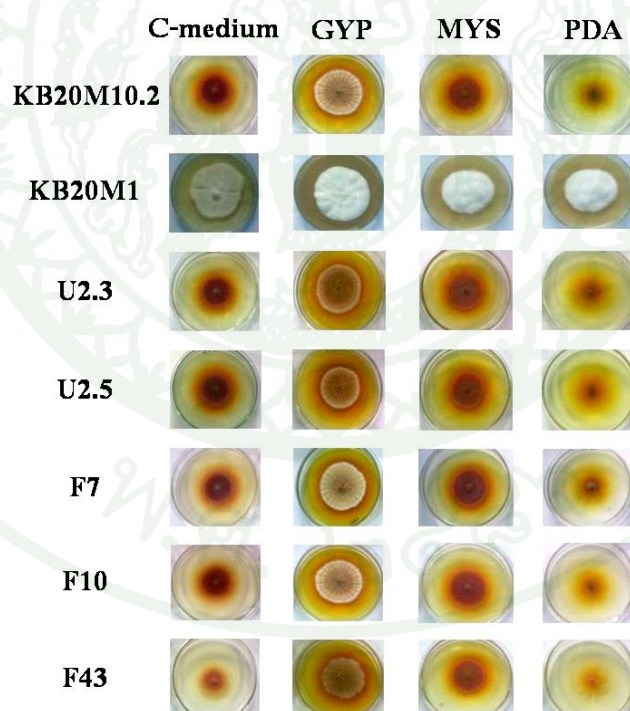
โคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ใหม่ต่างๆ 18 สายพันธุ์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 28 - 32 องศาเซลเซียส ลักษณะเส้นใยหนาแน่น เรียบติดไปกับผิวหน้าของอาหาร ขอบของโคโลนีเรียบ โคโลนีมีสีส้มเหลือง และสีส้มเหลืองที่ผลิตได้จะแพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส ขนาดโคโลนีจะเล็กกว่าที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ลักษณะเส้นใยหนาแน่น เรียบติดไปกับผิวหน้าของอาหาร ขอบของโคโลนีหยัก ตรงกลางโคโลนีมีสีส้มเหลือง สีดกลั่นออกมาจนขาว และสีส้มเหลืองที่ผลิตได้จะแพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่พบการเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2 ขนาดโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มีวแดนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2
 มีวแดนท์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มีวแดนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ
 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น MY ป่มที่อุณหภูมิ 20, 25, อุณหภูมิห้อง
 (28 - 32 องศาเซลเซียส), 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ต่างๆ	ขนาดโคโลนี (มิลลิเมตร)				
	20°ซ	25°ซ	28-32°ซ	35°ซ	40°ซ
KB20M10.2	13.10	30.15	51.65	52.97	36.40
KB20M1	13.60	29.65	57.45	59.22	34.30
U2.3	11.05	27.55	47.90	50.65	30.25
U2.5	12.40	25.35	49.35	54.40	29.10
F7	16.75	33.70	55.45	57.85	37.35
F10	17.40	31.45	53.20	54.85	31.60
F19	15.15	31.05	51.65	53.60	32.25
F20	13.20	35.45	56.50	57.15	33.45
F21	12.75	34.00	52.85	54.30	32.70
F26	12.55	30.00	49.30	52.40	29.15
F27	16.60	28.10	50.90	53.85	29.95
F31	10.65	27.05	48.75	54.07	30.00
F35	15.10	33.45	50.10	51.87	31.60
F36	11.50	39.05	53.75	55.15	27.55
F38	14.05	32.25	49.80	56.45	35.90
F39	17.55	35.05	47.50	51.27	37.55
F41	14.35	28.20	48.95	58.60	32.40
F43	8.05	27.20	47.50	53.37	29.20
F45	8.25	31.35	50.25	53.65	30.50
F47	15.65	27.95	50.85	54.80	35.60



ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2
มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ
เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น MY บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



ภาพที่ 10 โคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2
มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ (U2.3 และ U2.5) และฟิวแซนท์
(F7, F10 และ F43) บนอาหารวุ้น C-medium, GYP, MYS และ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง
เป็นเวลา 7 วัน

2. ศึกษาความสามารถในการทนเกลือและแอลกอฮอล์

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ใหม่ที่ได้ 18 สายพันธุ์ คือ U2.3, U2.5, F7, F10, F19, F20, F21, F26, F27, F31, F35, F36, F38, F39, F41, F43, F45 และ F47 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MY ที่ไม่เติม หรือเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ บ่มอุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร MY ที่ไม่เติม หรือเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ลักษณะเส้นใยมีสีขาว ฟูเป็นปุยหนาแน่น มีรอยพับตามแนวรัศมีรอบๆ โคโลนี ขอบของโคโลนีเรียบ แต่มีขนาดแตกต่างกัน ส่วนสายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ใหม่ที่ได้ 18 สายพันธุ์ ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร MY ที่ไม่เติมหรือเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ โคโลนีจะมีเส้นใยหนาแน่น เรียบติดไปกับผิวหน้าของอาหาร ขอบของโคโลนีเรียบ โคโลนีมีสีส้มเหลือง และสีส้มเหลืองที่ผลิตได้จะแพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ขนาดของโคโลนีและสีที่แพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงเมื่อเปอร์เซ็นต์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น ส่วนบนอาหาร MY ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์

8 เปอร์เซ็นต์ เชื้อไม่สามารถเจริญได้เลย

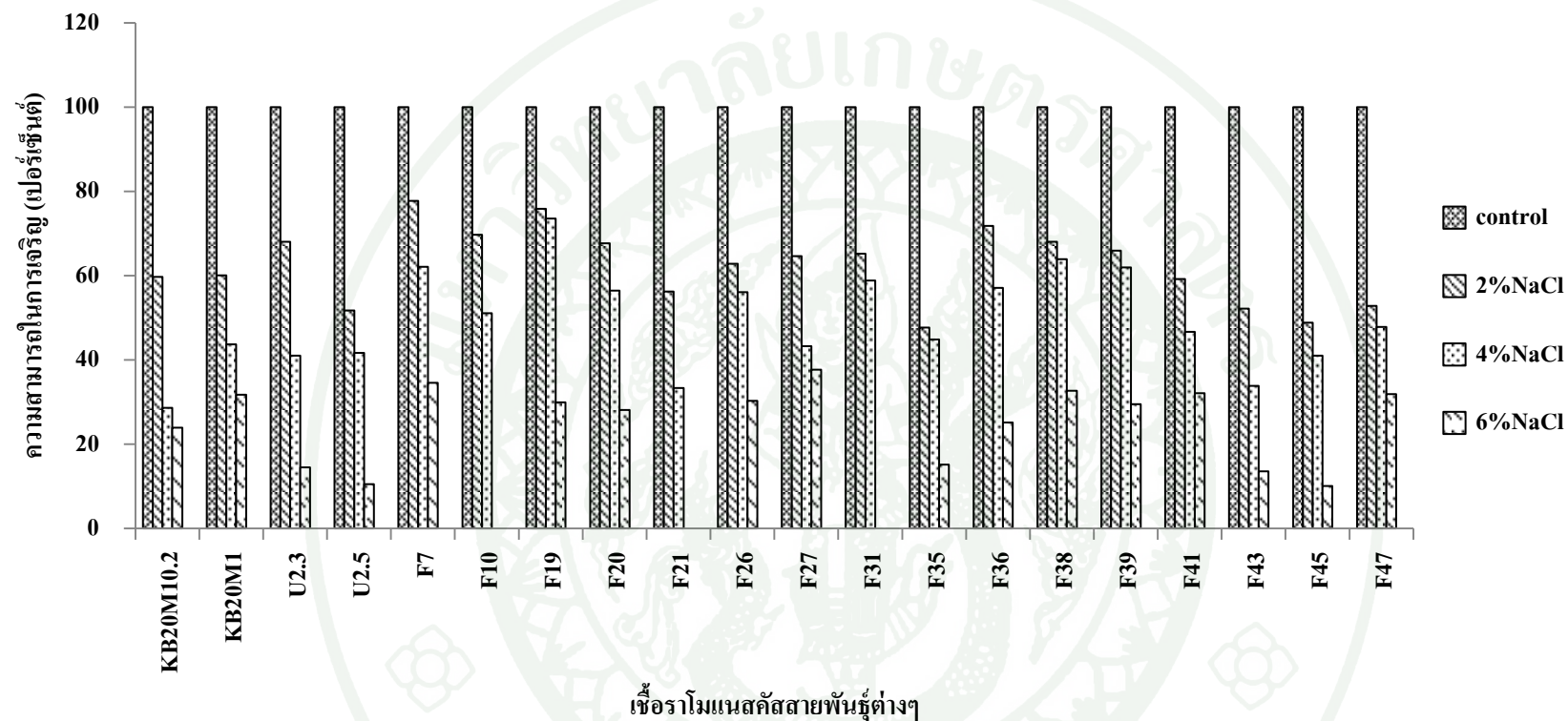
เมื่อเปรียบเทียบขนาดโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสทั้งหมด ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 11 พบว่า เชื้อรามีแนวโน้มในการทนเกลือได้ใกล้เคียงกัน โดยขนาดโคโลนีบนอาหาร MY ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ลดลง 65 - 76 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ control ยกเว้น F35, F43, F45, U2.3 และ U2.5 ซึ่งมีแนวโน้มในการทนเกลือได้ต่ำกว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์อื่น ขนาดโคโลนีบนอาหาร MY ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ลดลง 84.88, 86.45, 89.9, 85.54 และ 89.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และนอกจากนี้ ยังมีเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ 3 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถเจริญได้อาหาร MY ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ F10, F21 และ F31

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ 18 สายพันธุ์ คือ U2.3, U2.5, F7, F10, F19, F20, F21, F26, F27, F31, F35, F36, F38, F39, F41, F43, F45 และ F47 เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MY ที่ไม่เติม หรือเติมเอทานอล 2, 4, 6 และ 8

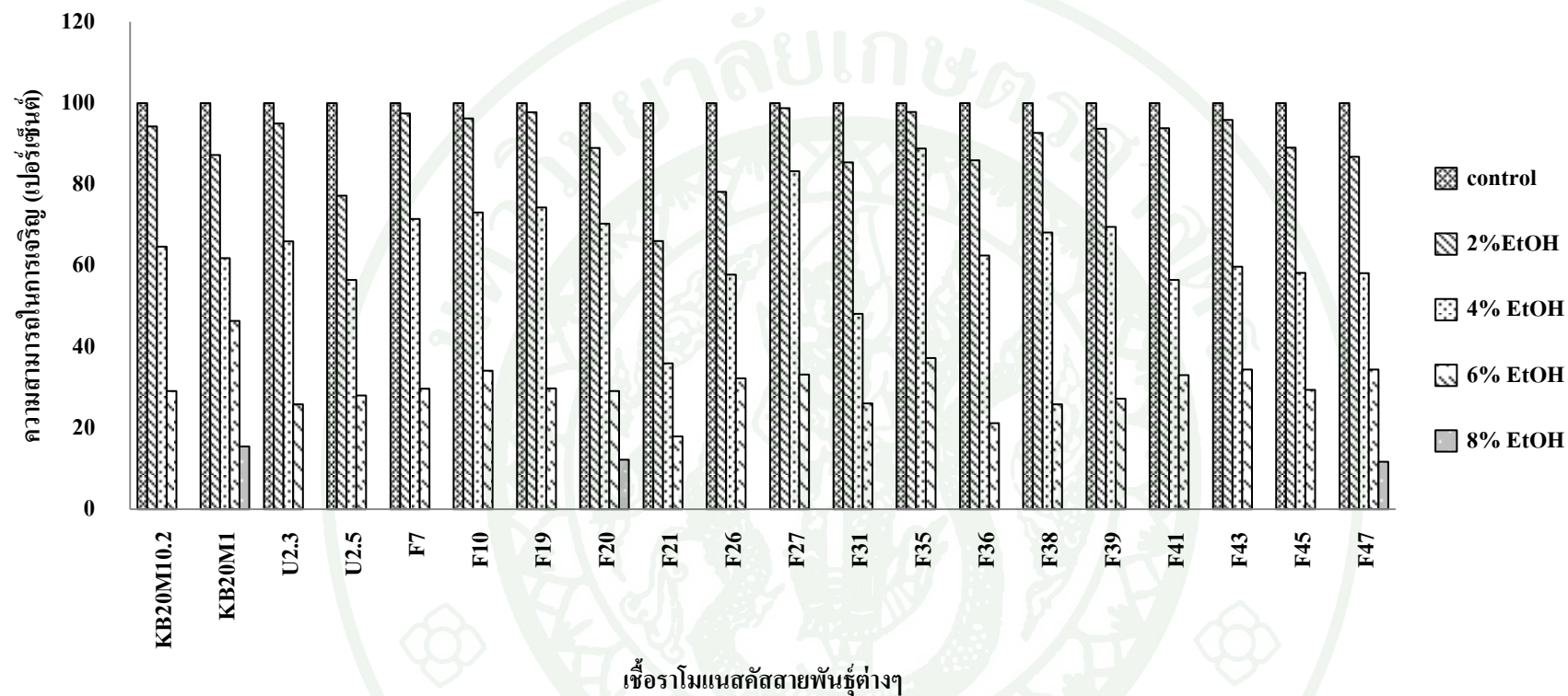
เปอร์เซ็นต์ บ่มอุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 ที่สามารถเจริญได้บนอาหาร MY ที่ไม่เติม หรือเติม เอทานอล ลักษณะเส้นใยมีสีขาว พูเป็นปุยหนาแน่น มีรอยพับตามแนวรัศมีรอบๆ โคลินี ขอบของ โคลินีเรียบ แต่มีขนาดแตกต่างกัน ส่วนสายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ใหม่ที่ได้ 18 สายพันธุ์ ที่สามารถเจริญได้บน อาหาร MY ที่ไม่เติม หรือเติมเอทานอล โคลินีจะมีเส้นใยหนาแน่น เรียบติดไปกับผิวหน้าของ อาหาร

ขอบของโคลินีเรียบ โคลินีมีสีส้มเหลือง และสีส้มเหลืองที่ผลิตได้จะแพร่ออกมาในอาหารเลี้ยง เชื้อ แต่ขนาดของโคลินีและสีที่แพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงเมื่อเปอร์เซ็นต์ของ เอทานอลเพิ่มสูงขึ้น ส่วนบนอาหาร MY ที่เติมเอทานอล 8 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงเส้นใยสีขาวปกคลุม ขึ้นเชื้อที่วางลงไปบนเพลทอาหารและไม่สามารถวัดขนาดโคลินีได้ ยกเว้น F20, F47 และมิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 ที่สามารถวัดขนาดโคลินีได้ สุพัฒน์ (2552) ได้รายงานการใช้ สายพันธุ์ KB20M1 ผลิตเอทานอลจากข้าวเหนียวได้สูงสุดถึง 8 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 10 วัน

เมื่อเปรียบเทียบขนาดโคลินีของเชื้อราโมแนสคัสทั้งหมด ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 12 พบว่า เชื้อราโมแนสคัสที่สามารถทนแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุด คือ F20, F47 และสายพันธุ์มิวแทนท์ สีขาวรหัส KB20M1 สามารถเจริญได้บนอาหาร MY ที่เติมเอทานอล 8 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขนาด โคลินีลดลงเท่ากับ 87.73, 86.78 และ 80.42 ตามลำดับ ส่วนเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์อื่นมี แนวโน้มในการทนแอลกอฮอล์ได้ใกล้เคียงกัน ขนาดโคลินีบนอาหาร MY ที่เติมเอทานอล 6 เปอร์เซ็นต์ ลดลง 63 - 74 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ control ยกเว้น F21 ซึ่งทนเกลือได้ ต่ำกว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์อื่น ขนาดโคลินีบนอาหาร MY ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ลดลง 82.04 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 11 เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์ที่สีขาวรหัส KB20M1 มิวแตนต์ที่สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวชันที่สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาณ 0 - 6 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารวุ้น MY บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 12 เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M10.2 มิวแทนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแทนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆเมื่อเติมเอทานอลปริมาณ 0 - 8 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารวุ้น MY และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

3. ศึกษาการสกัดสารสีออกจากข้าวเหลืองโมแนสค์ส (นิสา, 2537)

เมื่อใช้น้ำกลั่นหรือแอลกอฮอล์ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ สกัดข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสค์สายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ทั้งน้ำกลั่นและแอลกอฮอล์สามารถสกัดสีออกจากข้าวหมักได้เช่นเดียวกัน แต่สีที่สกัดออกมาได้มีปริมาณเข้มข้นแตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 โดยแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถสกัดสีออกมาได้ปริมาณมากที่สุด เวลาในการสกัด 3 และ 9 ชั่วโมงให้ค่าสีใกล้เคียงกัน คือ 1,038.861 และ 1,096.906 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อสกัดข้าวหมักด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ยังให้ค่าความยาวคลื่นสูงสุดใกล้เคียงกับ 370 นาโนเมตร ซึ่งต่างจากการใช้น้ำหรือเอทานอลต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่าความยาวคลื่นห่างจาก 370 นาโนเมตร ส่วนเอทานอล 60, 70, 80, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ความยาวคลื่นสูงสุดใกล้เคียงกับ 370 นาโนเมตรเช่นเดียวกับเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้ค่าสีต่ำกว่าการสกัดด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ในการทดลองต่อไปจะใช้เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายในการสกัดสีออกจากข้าวหมัก

ตารางที่ 3 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมในการสกัดสีจากข้าวหมัก

ตัวทำละลาย	เวลาที่ใช้ในการสกัด					
	3 ชั่วโมง			9 ชั่วโมง		
	ความยาวคลื่นสูงสุด	ค่าสีที่ความยาวคลื่นสูงสุด (หน่วย/กรัม/น้ำหนักรแห้ง)	ค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (หน่วย/กรัม/น้ำหนักรแห้ง)	ความยาวคลื่นสูงสุด	ค่าสีที่ความยาวคลื่นสูงสุด (หน่วย/กรัม/น้ำหนักรแห้ง)	ค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (หน่วย/กรัม/น้ำหนักรแห้ง)
น้ำกลั่น	362.5	794.773	781.378	364.5	769.471	763.518
เอทานอล 10%	366.5	727.798	721.844	366.5	754.588	751.611
เอทานอล 20%	364.5	851.330	846.865	366.5	823.051	820.075
เอทานอล 30%	366.5	885.562	882.585	366.5	866.213	863.237
เอทานอล 40%	368	961.467	957.002	366	973.374	970.397
เอทานอล 50%	369	1,040.349	1,038.861	369	1,096.906	1,096.906
เอทานอล 60%	369	945.095	945.095	369	928.724	925.747
เอทานอล 70%	369	951.049	949.5602	369	1,010.582	1,009.094
เอทานอล 80%	369	948.072	946.584	369	952.537	949.560
เอทานอล 90%	369	834.958	833.470	369	879.608	878.120
เอทานอล 95%	369	894.492	894.492	369	955.5136	954.0252

4. ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมักเหลวโดยใช้เครื่อง temperature gradient

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนทีสที่เหล็องรหัส KB20M10.2 ลงในอาหารเหลว MY แล้วนำไปบ่มในเครื่อง temperature gradient เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4 ที่อุณหภูมิ 23 - 39.5 องศาเซลเซียส เชื้อราเริ่มมีการเจริญตั้งแต่วันแรก จะเห็นลักษณะเป็น pellet กลมๆ และเริ่มมีการสร้างสีตั้งแต่วันที่ 3 ส่วนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 23 องศาเซลเซียส เชื้อรามีการเจริญเพียงเล็กน้อยจนไม่เจริญ และที่อุณหภูมิสูงกว่า 41 - 43.5 องศาเซลเซียส เชื้อรามีการเจริญใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 - 39.5 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส เชื้อราเจริญน้อยลงจนไม่เจริญ จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสีเมื่อบ่มในเครื่อง temperature gradient คือที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 0.065 กรัมต่อหลอด แต่ได้ค่าสี 30.55 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ค่าสีสูงสุดที่ 61.90 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่น้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 0.0605 กรัมต่อหลอด แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อราสามารถสร้างสีได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 28 - 32.5 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ต้องทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนทีสที่เหล็องรหัส KB20M10.2 เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิต่อไป

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัส
สายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โดยใช้เครื่อง temperature gradient

หลอดที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/หลอด)	ความยาวคลื่นสูงสุด (นาโนเมตร)	ค่าสี (หน่วยต่อมิลลิเมตร)
1	9	0.0030	-	-
2	12	0.0045	-	-
3	14.5	0.0060	-	-
4	16.5	0.0060	-	-
5	18	0.0075	-	-
6	19.5	0.0165	370	3.215
7	21	0.0355	370	16.250
8	23	0.0430	370	24.075
9	24	0.0475	370	21.875
10	26	0.0455	370	25.100
11	27	0.0575	370	25.95
12	28	0.0605	370	61.900
13	30	0.0590	370	41.800
14	31	0.0530	370	46.300
15	32.5	0.0575	370	58.050
16	34	0.0650	370	30.550
17	35.5	0.0510	370	29.225
18	37	0.0640	370	25.200
19	38	0.0555	370	13.425
20	39.5	0.0550	370	4.360
21	41	0.0525	-	-
22	42	0.0580	-	-
23	43.5	0.0520	-	-
24	45	0.0325	-	-
25	47	0.0235	-	-
26	49	0.0180	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

หลอดที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักแห้ง (กรัม/หลอด)	ความยาวคลื่นสูงสุด (นาโนเมตร)	ค่าสี (หน่วยต่อมิลลิเมตร)
27	51	0.0160	-	-
28	53	0.0090	-	-
29	56	0.0060	-	-
30	58	0.0055	-	-

5. Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนปลายข้าวหอมมะลิและการหมักแบบเปียกในอาหารเหลว SS ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนท์สีเข้วรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

5.1 Fermentation time-course ของการหมักแบบแข็งบนปลายข้าวหอมมะลิของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนท์สีเข้วรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

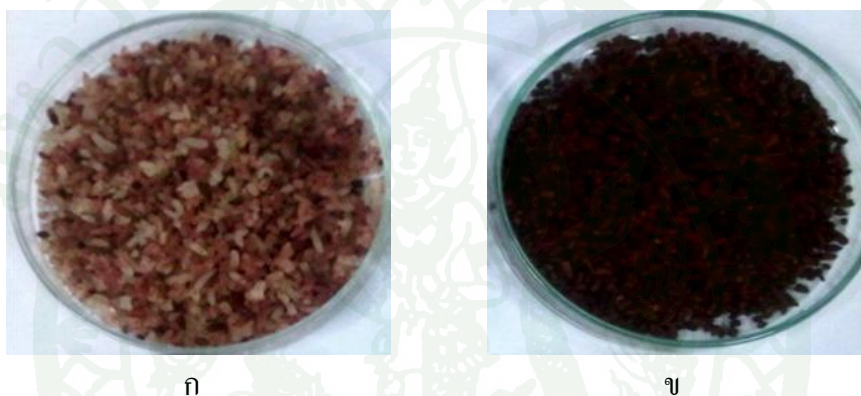
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนท์สีเข้วรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนปลายข้าวหอมมะลิที่มีความชื้นเริ่มต้น 33.06 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 13) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 15 ถึงภาพที่ 34 เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ เริ่มเจริญและสร้างสีวันที่ 3 ของการหมัก จนกระทั่งวันที่ 10 ของการหมัก เส้นใยเจริญปกคลุมและแทงเข้าไปในเมล็ดข้าวอย่างสม่ำเสมอ และหมักต่อจนครบ 20 วัน ข้าวหมักมีพีเอชสุดท้ายอยู่ในช่วง 4.0 - 5.6 และความชื้นสุดท้ายของข้าวหมักอยู่ในช่วง 41 - 43 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นฟิวแซนท์สายพันธุ์ F43 มีความชื้นสุดท้ายสูงถึง 55.81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเข้วรหัส KB20M1 เริ่มเจริญตั้งแต่วันแรกของการหมัก จนกระทั่งวันที่ 7 ของการหมัก เส้นใยจะเจริญปกคลุมและแทงเข้าไปในเมล็ดข้าวอย่างสม่ำเสมอ ความชื้นสุดท้ายประมาณ 69.61 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวัดการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสโดยหาปริมาณกลูโคซามีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา พบว่า เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ มีปริมาณกลูโคซามีน

เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 ของการหมัก จนกระทั่งวันที่ 8 ของการหมัก มีปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุด และหลังจากนั้นจะค่อนข้างคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก โดยสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 และสีขาวรหัส KB20M1 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 4,900.865 และ 7,007.768 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณลิกกับสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ และฟิวแซนต์ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 55 สายพันธุ์ที่มีปริมาณกลูโคซามีนสูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ได้แก่ F43, F21, U2.5, U2.3, F20, F10 และ F7 ซึ่งมีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 5,983.35, 5,470.10, 5,401.81, 5,386.92, 5,371.54, 5,319.95 และ 5,222.21 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนต์ดังกล่าว มีปริมาณกลูโคซามีนสูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ในปริมาณ 22.09, 12.37, 10.22, 9.92, 9.60, 8.55 และ 6.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เริ่มสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสตั้งแต่วันที่ 2 ของการหมัก เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 6 - 8 ของการหมัก จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 9 และค่อยๆ ลดลงจนกระทั่งกิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการหมักเมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส พบว่า สายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 สร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 178,625 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สร้างเอนไซม์ได้ 52,000 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสกับสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนต์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 56 สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ได้แก่ F43, F10, F7, U2.3, U2.5 และ F47 โดยสร้างเอนไซม์ได้ 96,375, 66,500, 65,450, 58,450, 55,550 และ 55,350 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนต์ดังกล่าวสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ในปริมาณ 85.34, 27.88, 25.87, 12.40, 6.83 และ 6.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์เหล่านี้ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงและมีปริมาณกลูโคซามีนมากกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ก็ยังต่ำกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 จึงอาจกล่าวได้ว่าทั้ง 7 สายพันธุ์ มีกิจกรรมเอนไซม์อยู่ในช่วงระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้นทั้งสอง

เชื้อราโมแนสคัสทุกสายพันธุ์ยกเว้นสายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 เริ่มผลิตสีตั้งแต่วันที่ 3 ของการหมัก และสร้างสีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งวันสุดท้ายของการหมัก ค่าสีที่ความยาวคลื่นสูงสุด 370 นาโนเมตร ของข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้น

มิวแคนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เท่ากับ 1,312.93 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกับสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแคนท์และฟิวแซนท์ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 57 เชื้อที่สร้างสีได้สูงกว่าสายพันธุ์มิวแคนท์สีเหลือง ได้แก่ F10 สร้างสีได้ถึง 1,725.92 หน่วยต่อกรัม น้ำหนักแห้งสูงกว่าสายพันธุ์มิวแคนท์สีเหลือง KB20M10.2 31.46 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังมีฟิวแซนท์สายพันธุ์อื่นที่สามารถสร้างสีได้สูงกว่าสายพันธุ์มิวแคนท์สีเหลือง ได้แก่ U2.5, F7, U2.3 และ F47 สร้างสีได้เท่ากับ 1,695.12, 1,627.62, 1,573.96 และ 1,402.32 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เท่ากับ 29.11, 23.97, 19.88 และ 6.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์มิวแคนท์สีขาวรหัส KB20M1 ไม่สามารถสร้างสีเหลืองได้



ภาพที่ 13 ข้ามหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแคนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน (ก) และ 20 วัน (ข)

5.2 Fermentation time-course ของการหมักแบบเปียกในอาหารเหลว SS ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ดั้งเดิมมิวแคนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแคนท์สีขาวรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแคนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

เมื่อเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแคนท์มิวแคนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแคนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆในอาหารเหลว SS ซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานและมีแป้งข้าวเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ฟิเออร์เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน (ภาพที่ 14) เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อนำมาวิเคราะห์การเจริญโดยวัดจากปริมาณกลูโคซามีนการผลิตสีการผลิตอินซูลินกลูโคสและฟิเออร์สิ้นสุด ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 35 ถึงภาพที่ 54

เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โพรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์เริ่มมีการเจริญตั้งแต่วันที่ 1 ของการหมักและจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 6 - 7 ของการหมัก ซึ่งวัดได้จากปริมาณกลูโคซามีน จากนั้นปริมาณกลูโคซามีนค่อนข้างคงที่จนกระทั่งวันสุดท้ายของการหมัก ลักษณะของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว SS ในวันที่ 1 - 3 ของการหมัก จากนั้นจะมีลักษณะเป็นเส้นใยสานกันไปมาและมีเพเลตทรงกลมเล็กน้อย เมื่อวัดปริมาณกลูโคซามีนของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 และมิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 พบว่า เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ มีปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดเท่ากับ 32,660 และ 42,430 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกลูโคซามีนกับสายพันธุ์โพรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 58 สายพันธุ์ที่มีปริมาณกลูโคซามีนสูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ได้แก่ F43, F10, F19, F20 และ F7 ซึ่งมีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 39,010, 35,710, 35,530, 34,890, และ 33,960 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ในปริมาณ 20.92, 10.69, 10.14, 8.15 และ 5.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เริ่มสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสตั้งแต่วันที่ 2 ของการหมัก เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 6 - 8 ของการหมัก จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 9 และค่อยๆ ลดลงจนกระทั่งกิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างคงที่จนถึงวันสุดท้ายของการหมักเมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส พบว่า สายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 สร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 24,350.87 หน่วยต่อมิลลิกรัม ส่วนสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สร้างเอนไซม์ได้ 12,883.78 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสกับสายพันธุ์โพรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 59 สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ได้แก่ F43, F10, F7, U2.3, U2.5 และ F36 โดยสร้างเอนไซม์ได้ 20,122.98, 15,927.72, 14,445.57, 14,169.76, 13,722.42 หน่วยต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ในปริมาณ 56.19, 23.63, 12.12, 9.98, 6.11 และ 2.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงและมีปริมาณกลูโคซามีนมากกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ก็ยังต่ำกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1

เชื้อราโมแนสคัสทุกสายพันธุ์ยกเว้นสายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 เริ่มผลิตสีเหลืองตั้งแต่วันที่ 2 ของการหมัก และสร้างสีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งวันสุดท้ายของการหมัก ค่าสีที่ความยาวคลื่นสูงสุด 370 นาโนเมตร ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแตนต์สีเหลือง

รหัส KB20M10.2 เท่ากับ 426.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสีกับสายพันธุ์ โพรโตพลาสต์มิวแทนต์และฟิวแซนต์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 60 เชื้อที่สร้างสีได้สูงกว่า สายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลือง ได้แก่ U2.3 สร้างสีได้ 502.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ มิวแทนต์สีเหลือง KB20M10.2 17.75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังมีฟิวแซนต์สายพันธุ์อื่นที่ สามารถสร้างสีได้สูงกว่าสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลือง ได้แก่ U2.5, F10, F7, F35, F36 และ F26 สร้าง สีได้เท่ากับ 476.5, 469.0, 455.5, 438.0, 438.0 และ 432.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ สีเหลืองรหัส KB20M10.2 11.72, 9.96, 6.80, 2.70, 2.70 และ 1.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์มิวแทนต์สีขาวรหัส KB20M1 ไม่สามารถสร้างสีได้

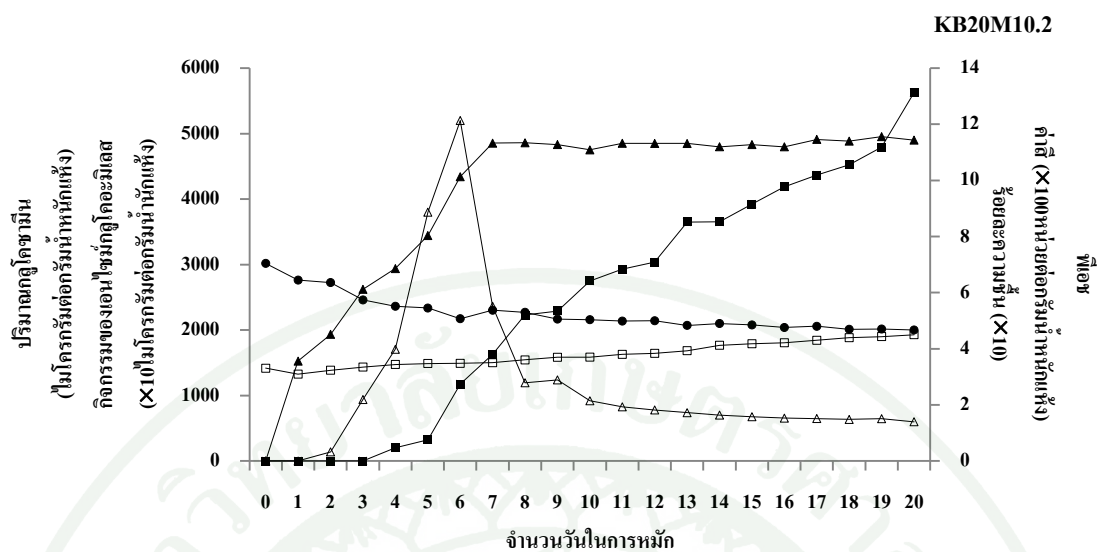


ก

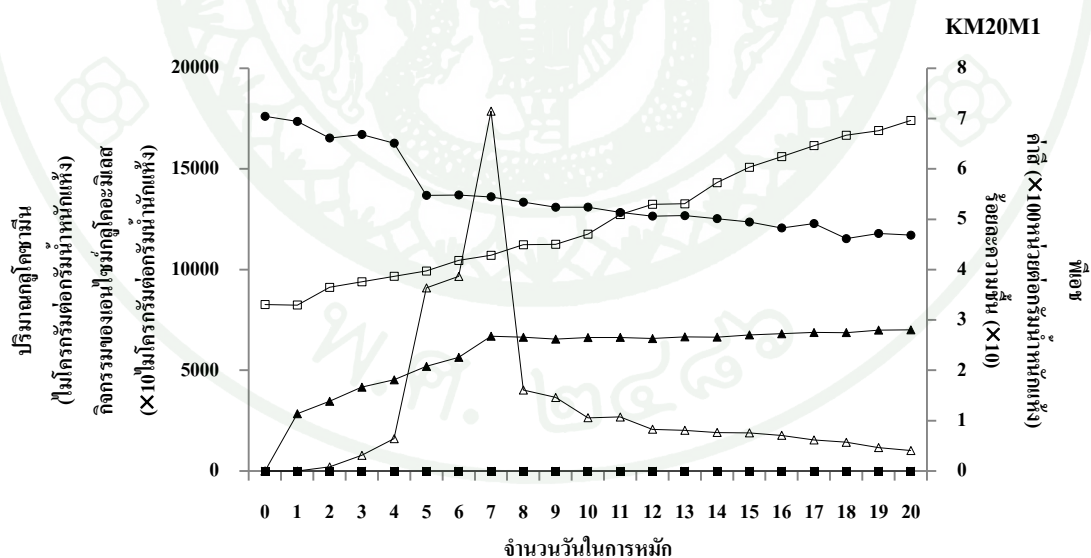


ข

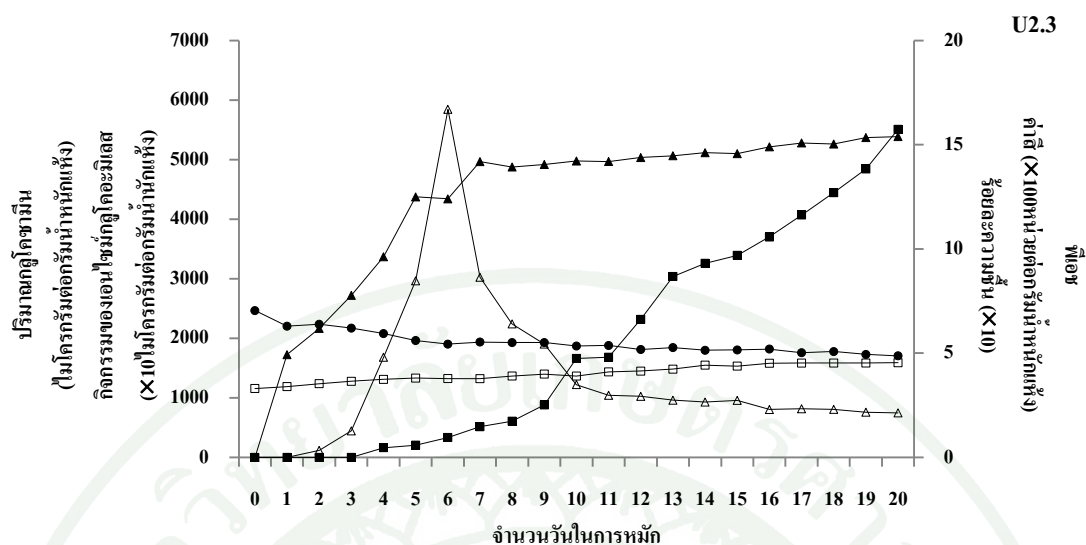
ภาพที่ 14 เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว SS เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน (ก) และ 20 วัน (ข)



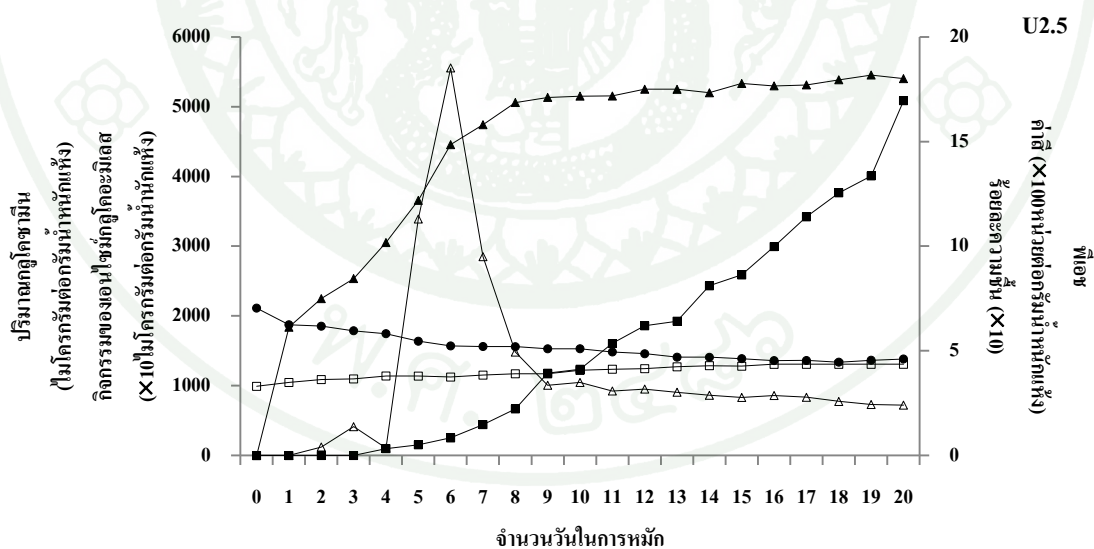
ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิเดส (△) ค่าพีเอช (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



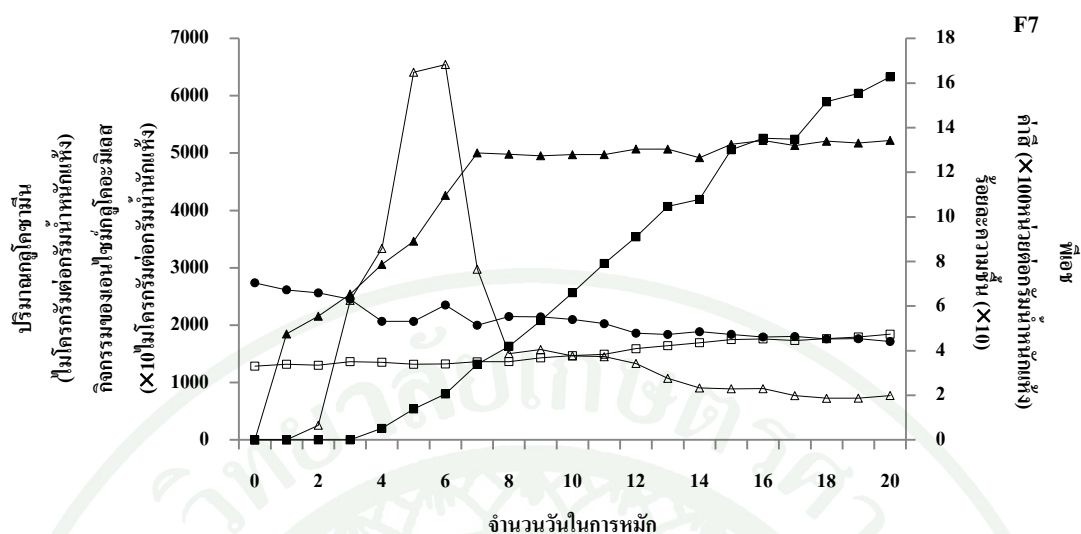
ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิเดส (△) ค่าพีเอช (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



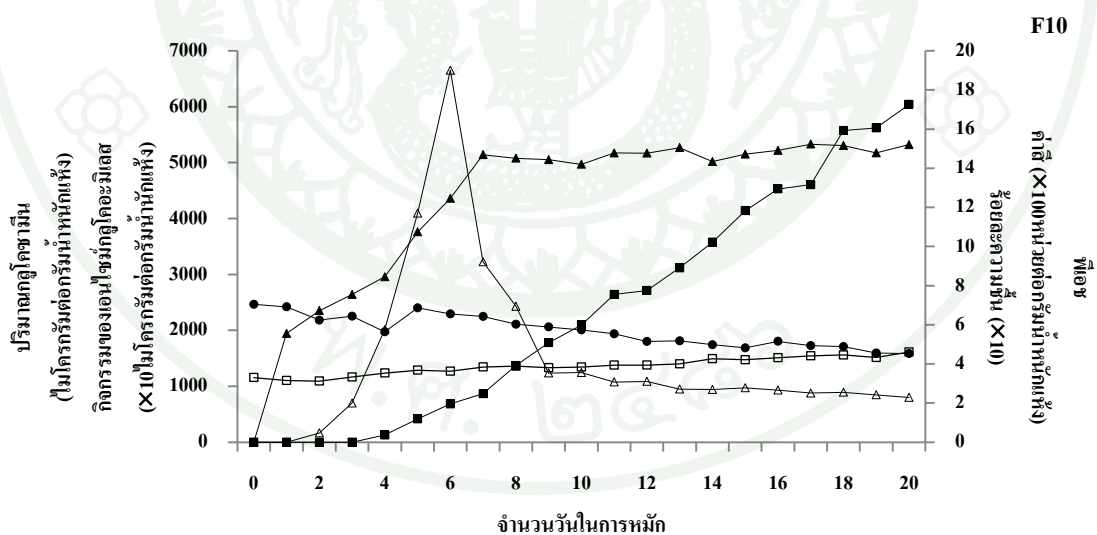
ภาพที่ 17 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคส (△) ค่าพีเอช (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ U2.3 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



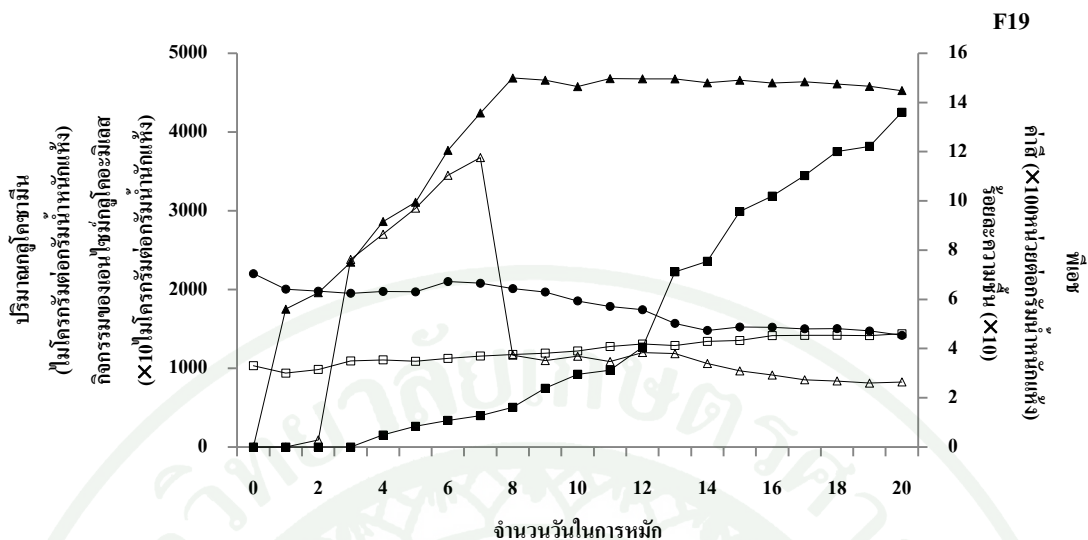
ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคส (△) ค่าพีเอช (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ U2.5 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



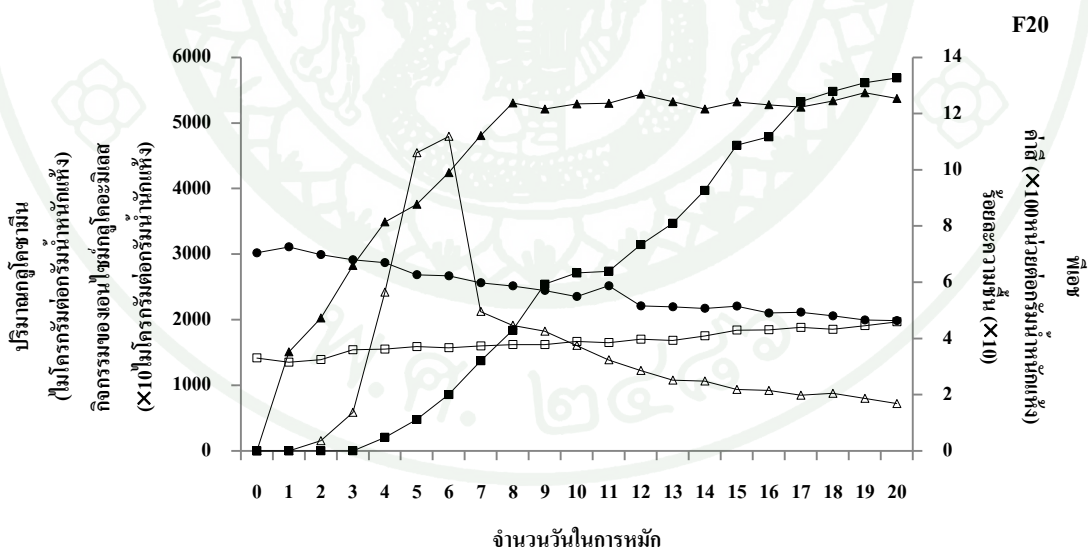
ภาพที่ 19 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคมิเลส (△) ค่า pH (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F7 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



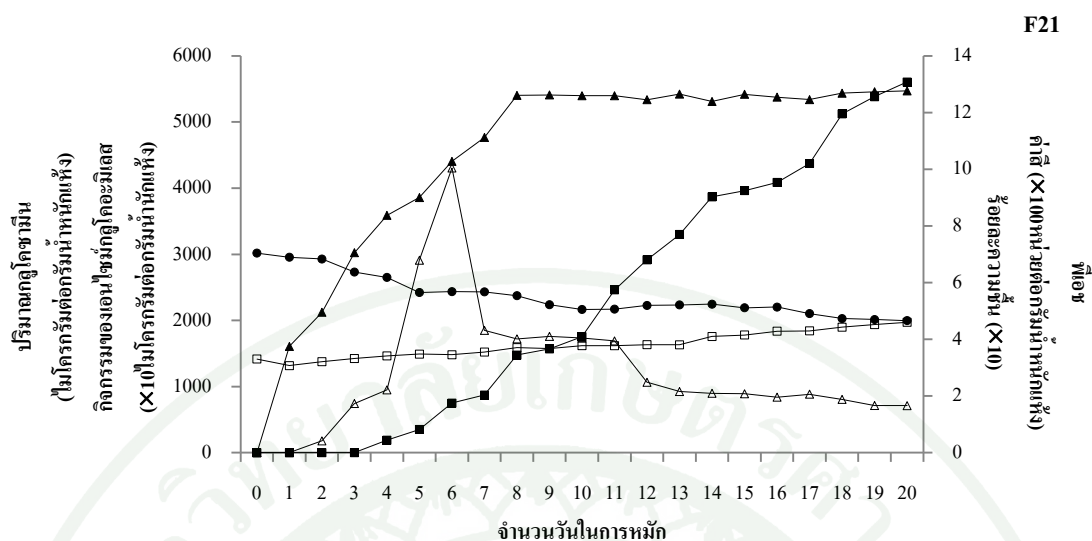
ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคมิเลส (△) ค่า pH (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F10 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



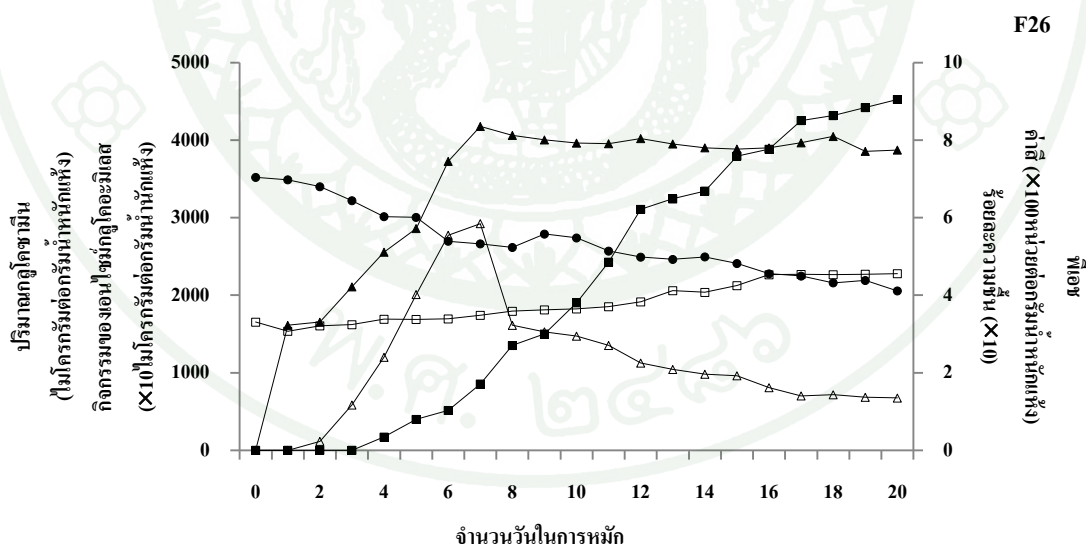
ภาพที่ 21 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิเลส (△) ค่าสี (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F19 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



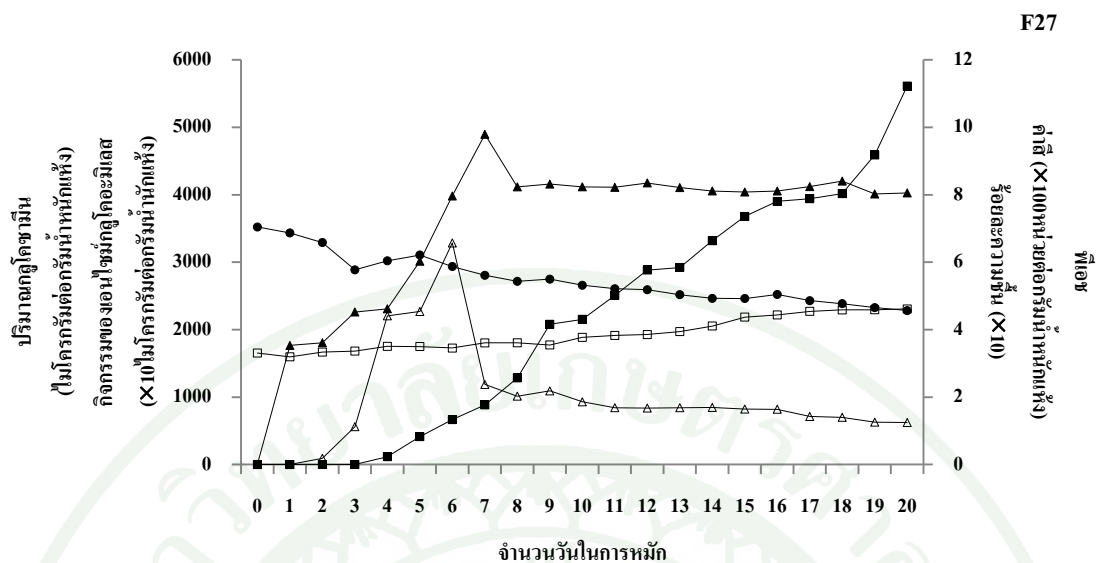
ภาพที่ 22 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิเลส (△) ค่าสี (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F20 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



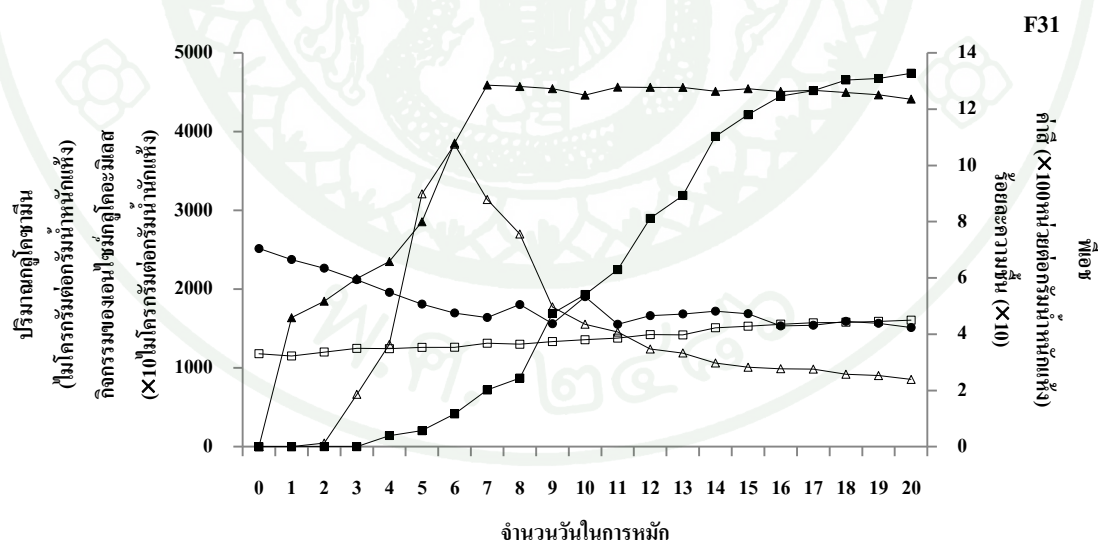
ภาพที่ 23 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณปุ๋ยยูเรีย (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (△) ค่าสี (■) ร้อยละความชื้น (□) และฟีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F21 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



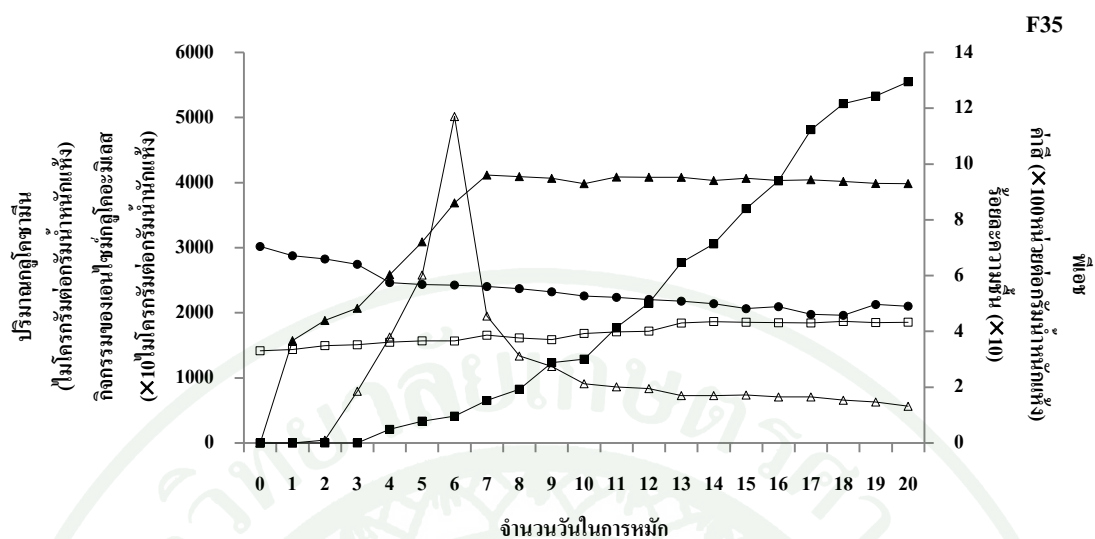
ภาพที่ 24 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณปุ๋ยยูเรีย (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (△) ค่าสี (■) ร้อยละความชื้น (□) และฟีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F26 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



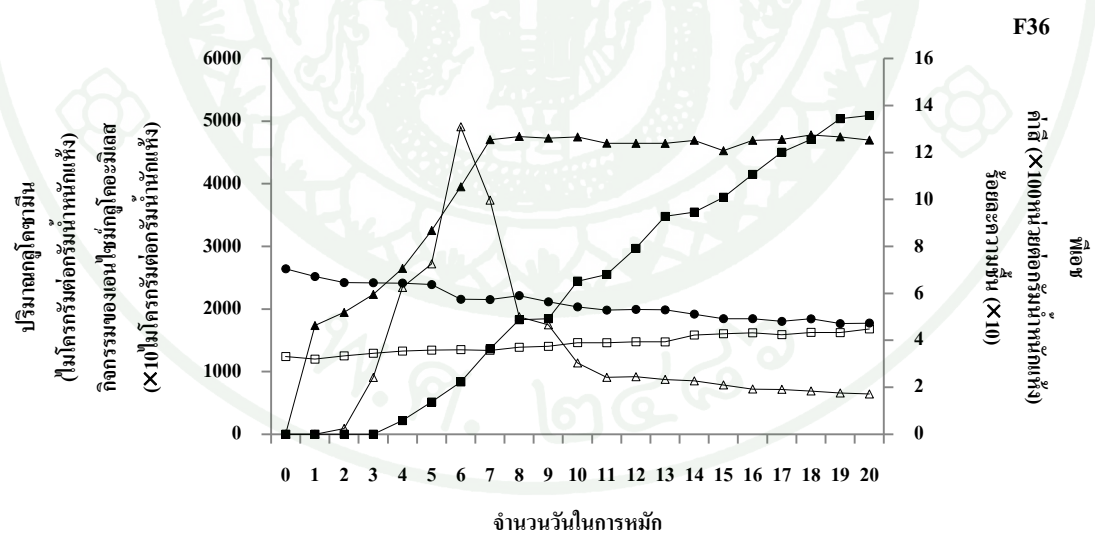
ภาพที่ 25 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณธาตุโพแทสเซียม (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคส (△) ค่าสี (■) ร้อยละความชื้น (□) และฟอสเฟต (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F27 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



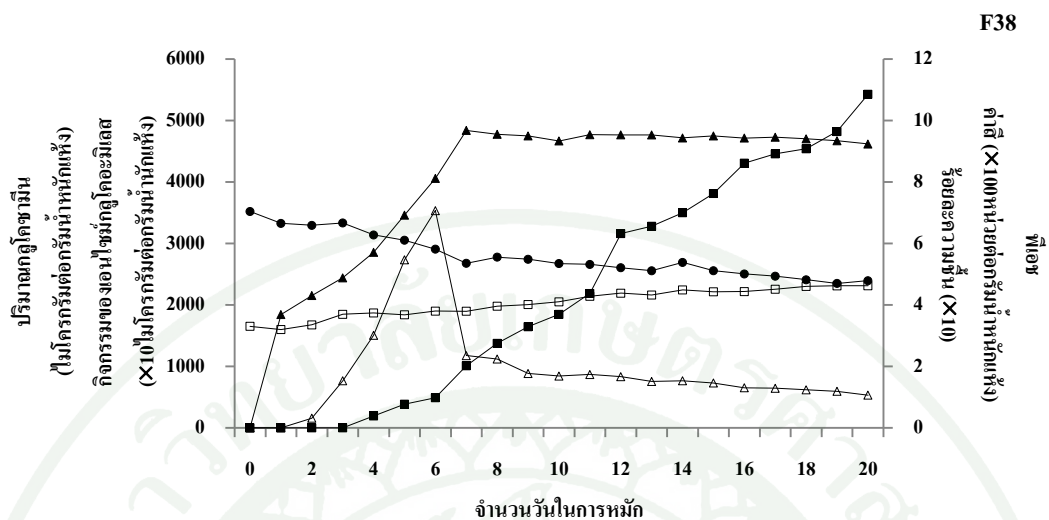
ภาพที่ 26 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณธาตุโพแทสเซียม (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคส (△) ค่าสี (■) ร้อยละความชื้น (□) และฟอสเฟต (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F31 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



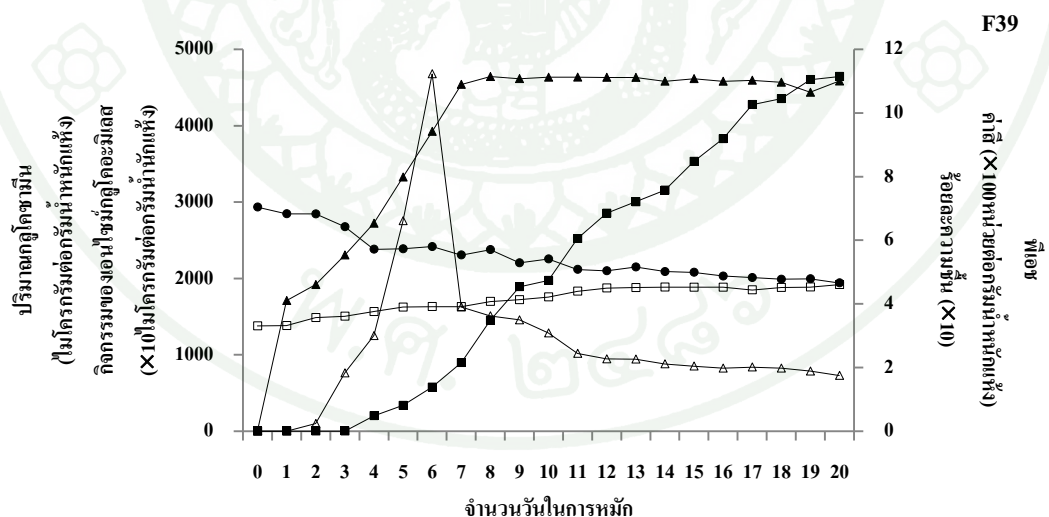
ภาพที่ 27 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูตาไมน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคส (△) ค่าสี (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F35 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



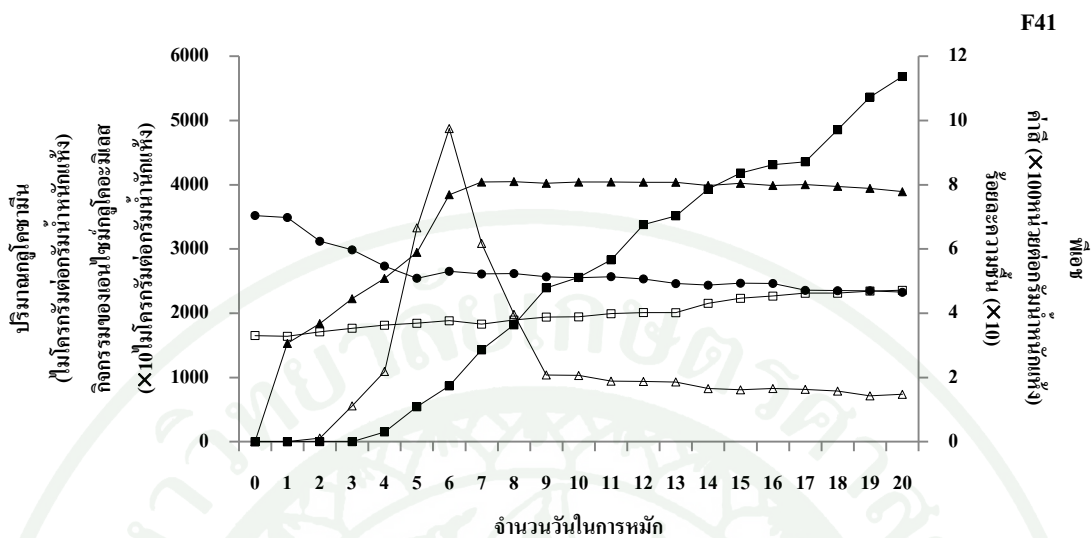
ภาพที่ 28 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูตาไมน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคส (△) ค่าสี (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F36 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



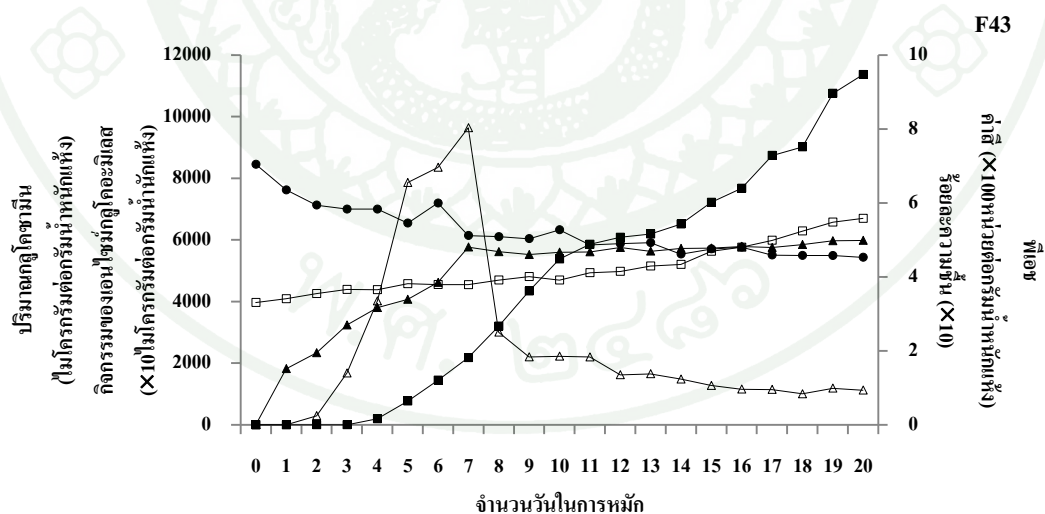
ภาพที่ 29 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคส (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคส (△) ค่าสี (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F38 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



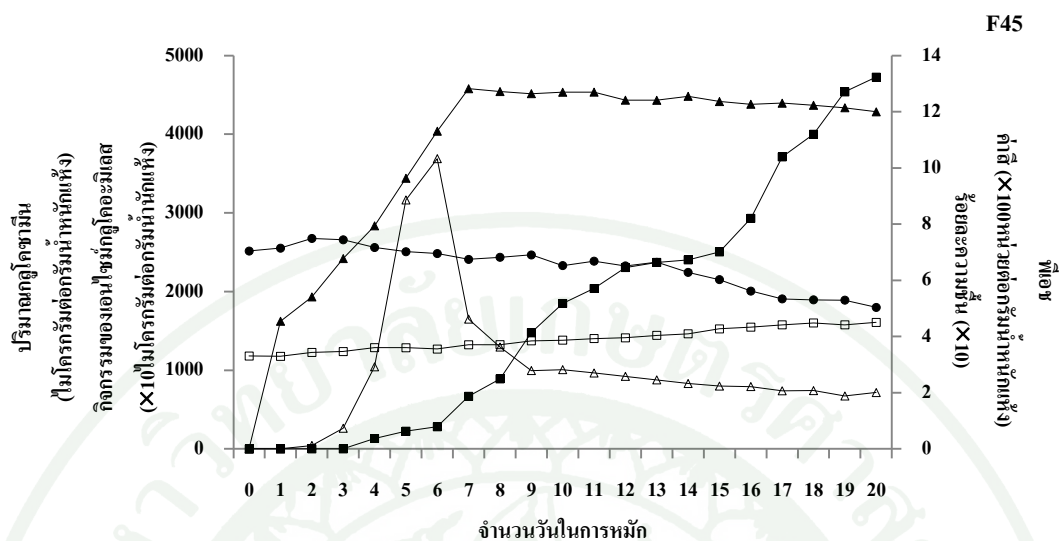
ภาพที่ 30 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคส (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคส (△) ค่าสี (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F39 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



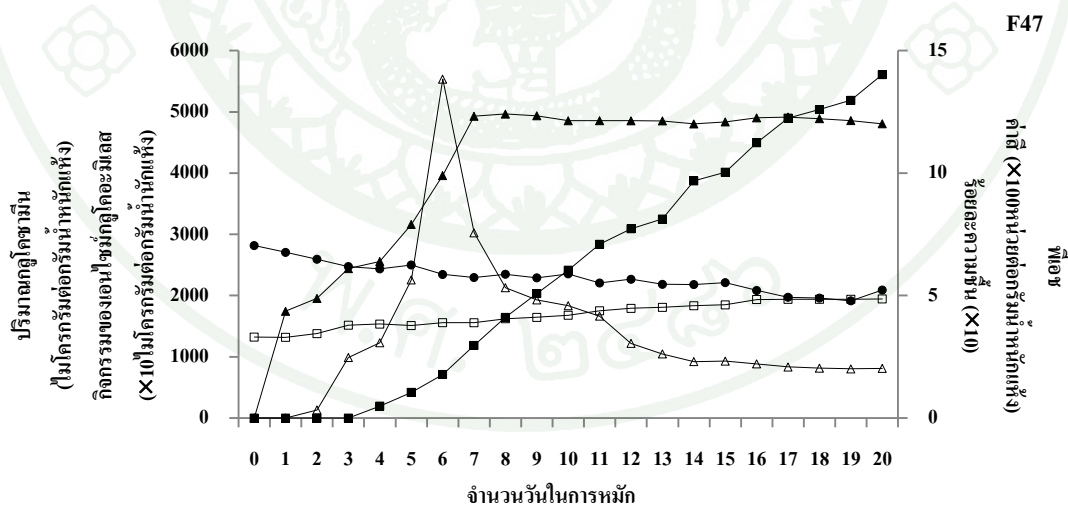
ภาพที่ 31 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณยูเรีย (▲) กิจกรรมของเอนไซม์ (△) ค่าซี (■) ร้อยละความชื้น (□) และฟอสฟอรัส (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F41 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



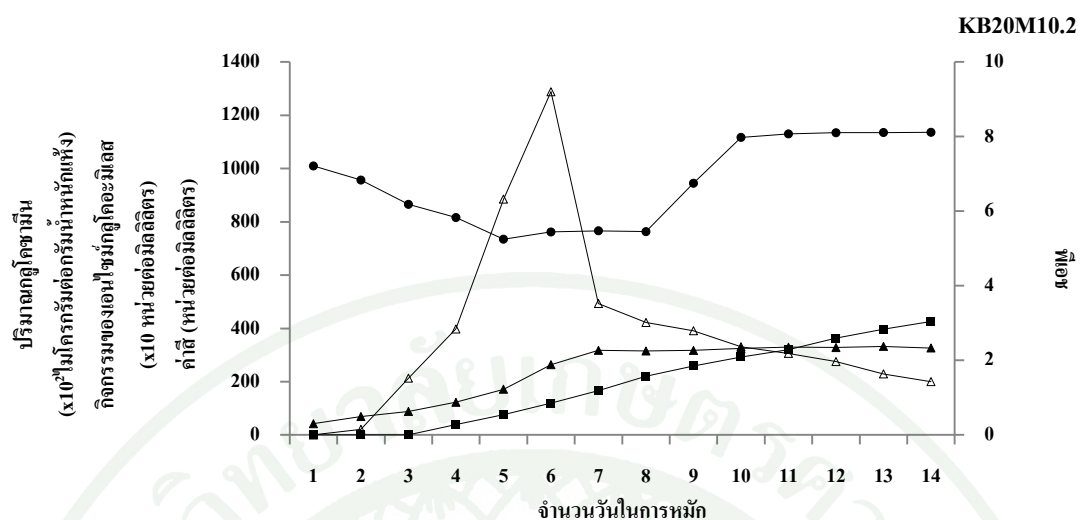
ภาพที่ 32 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณยูเรีย (▲) กิจกรรมของเอนไซม์ (△) ค่าซี (■) ร้อยละความชื้น (□) และฟอสฟอรัส (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F43 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



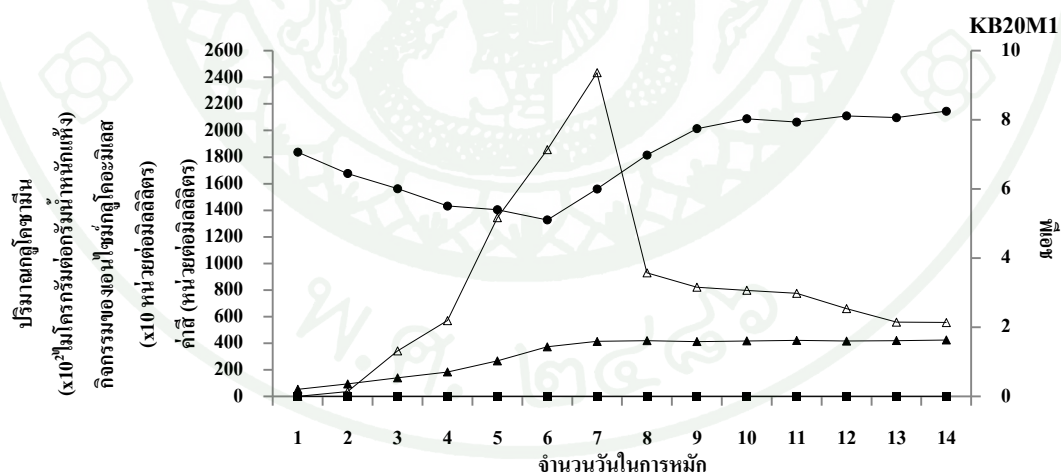
ภาพที่ 33 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซามิเลส (△) ค่าพีเอช (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F45 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



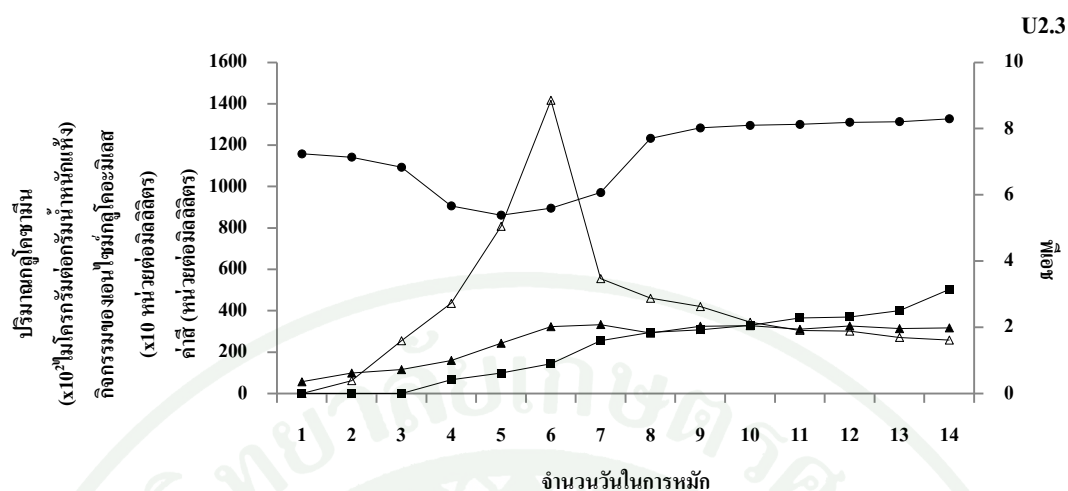
ภาพที่ 34 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซามิเลส (△) ค่าพีเอช (■) ร้อยละความชื้น (□) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F47 บนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



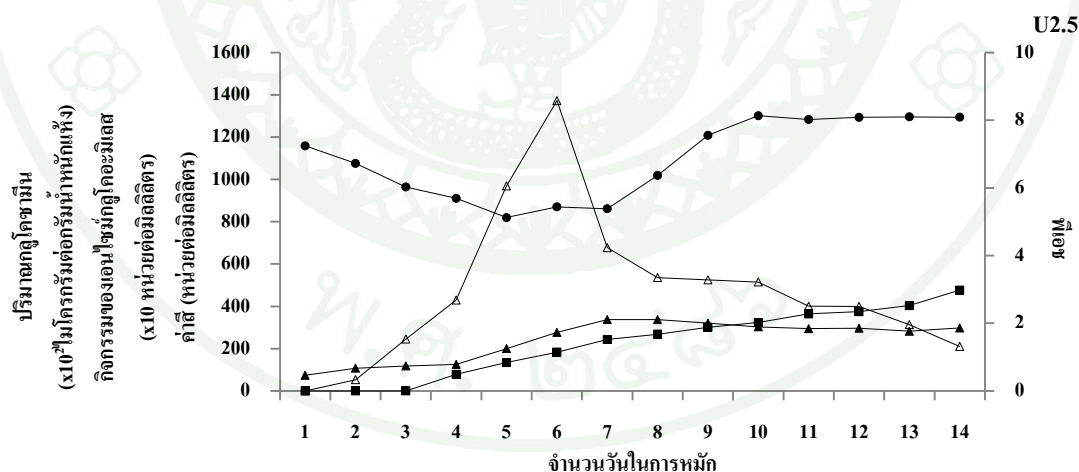
ภาพที่ 35 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซามิเลส (△) ค่า pH (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



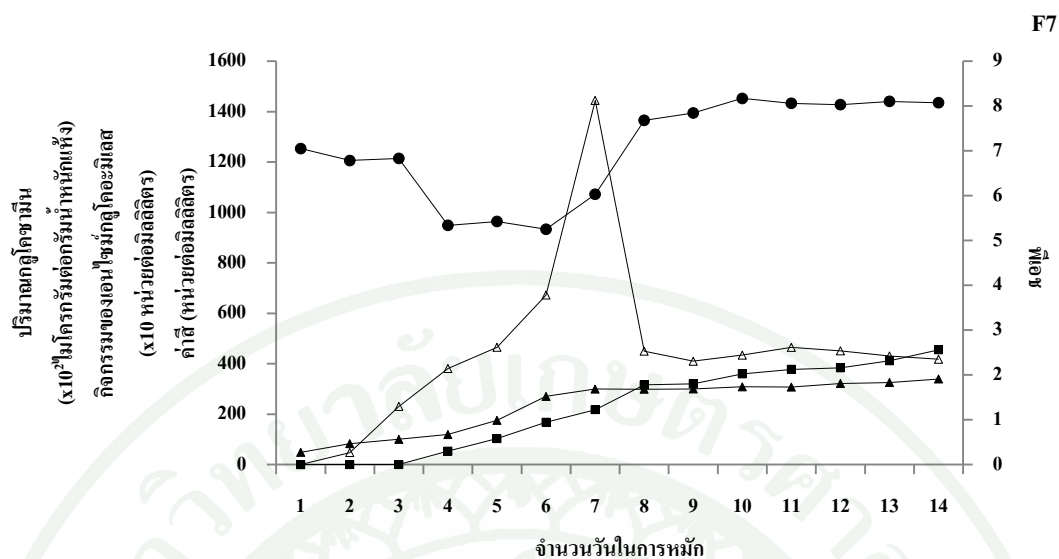
ภาพที่ 36 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซามิเลส (△) ค่า pH (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนท์สีขาวรหัส KB20M1 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



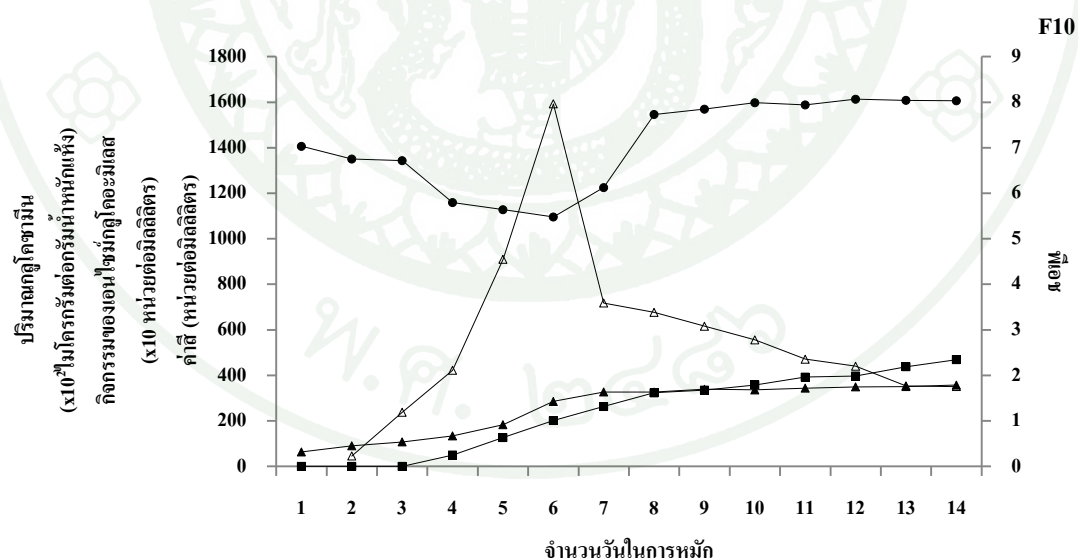
ภาพที่ 37 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มีวแทนท์ U2.3 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



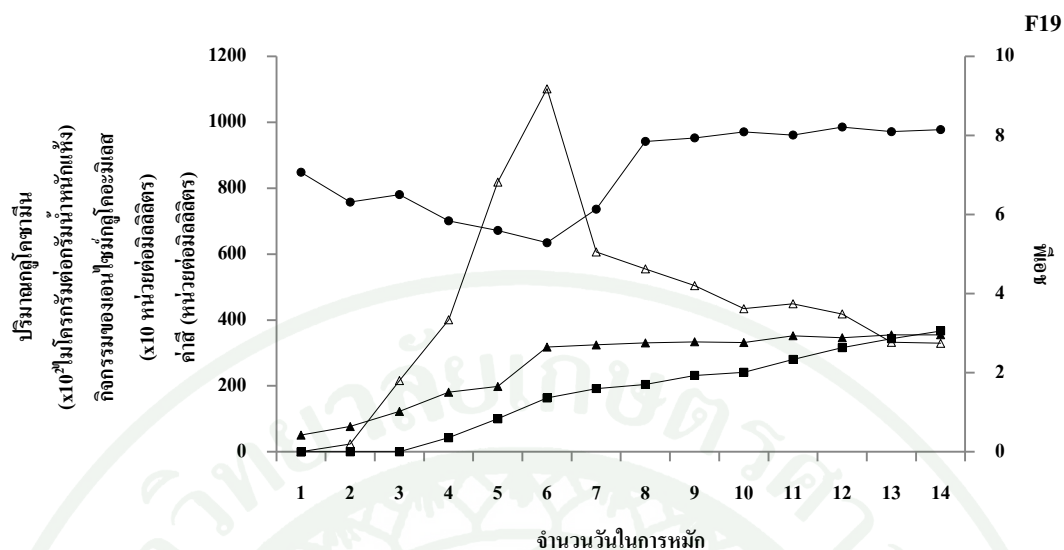
ภาพที่ 38 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มีวแทนท์ U2.5 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



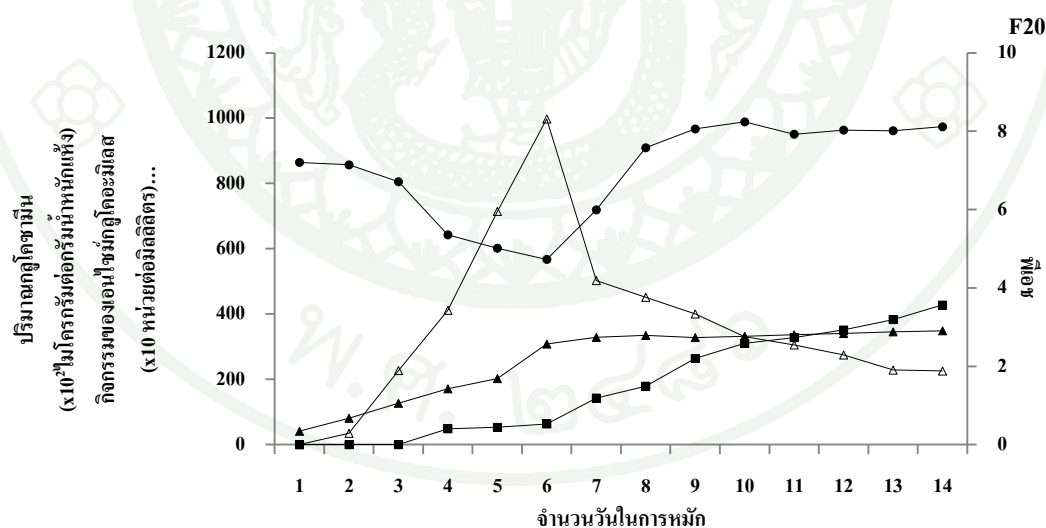
ภาพที่ 39 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซามิเลส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F7 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



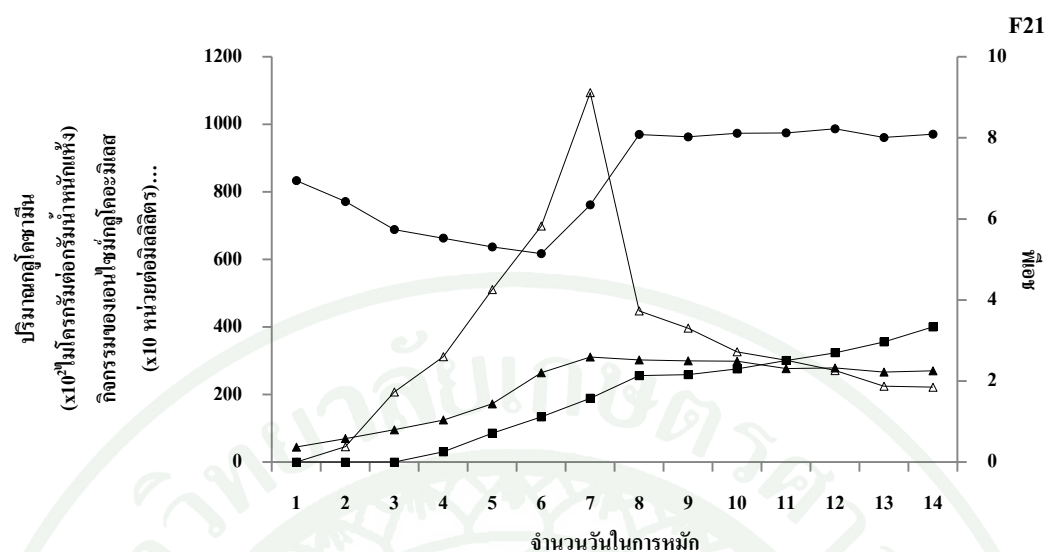
ภาพที่ 40 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซามิเลส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F10 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



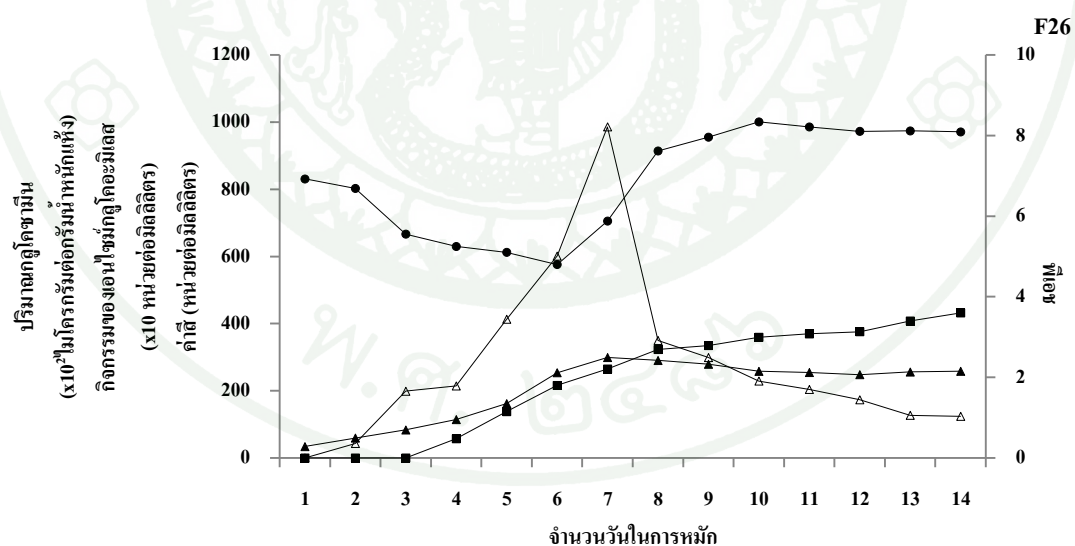
ภาพที่ 41 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิเดส (△) ค่า pH (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F19 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



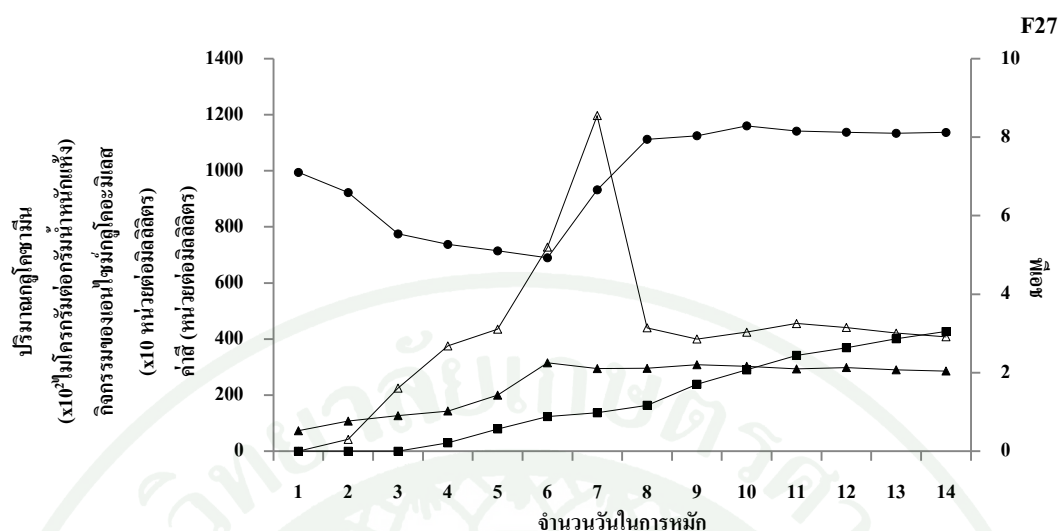
ภาพที่ 42 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิเดส (△) ค่า pH (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F20 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



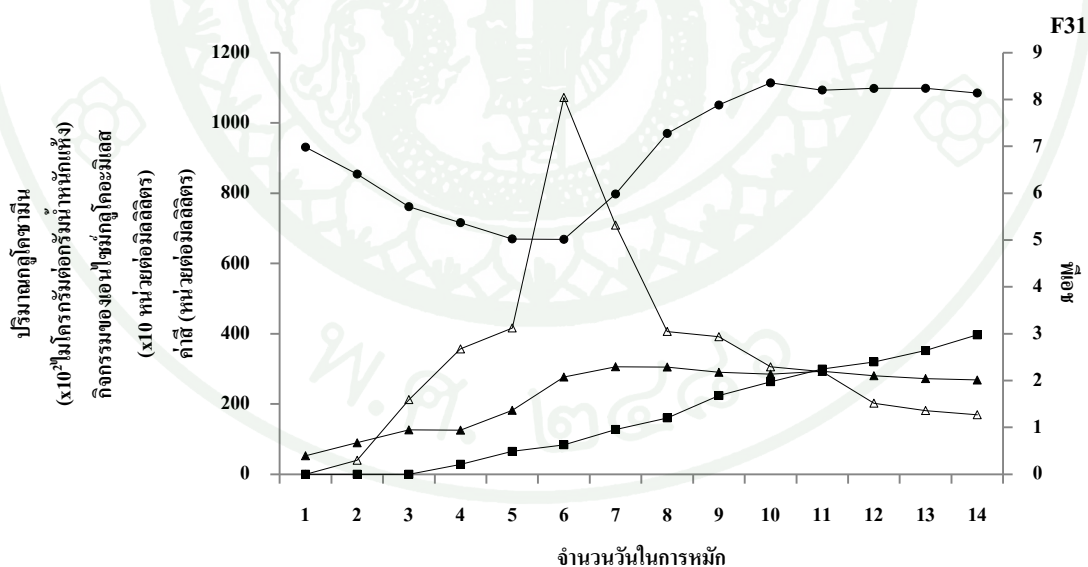
ภาพที่ 43 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิเดส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F21 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



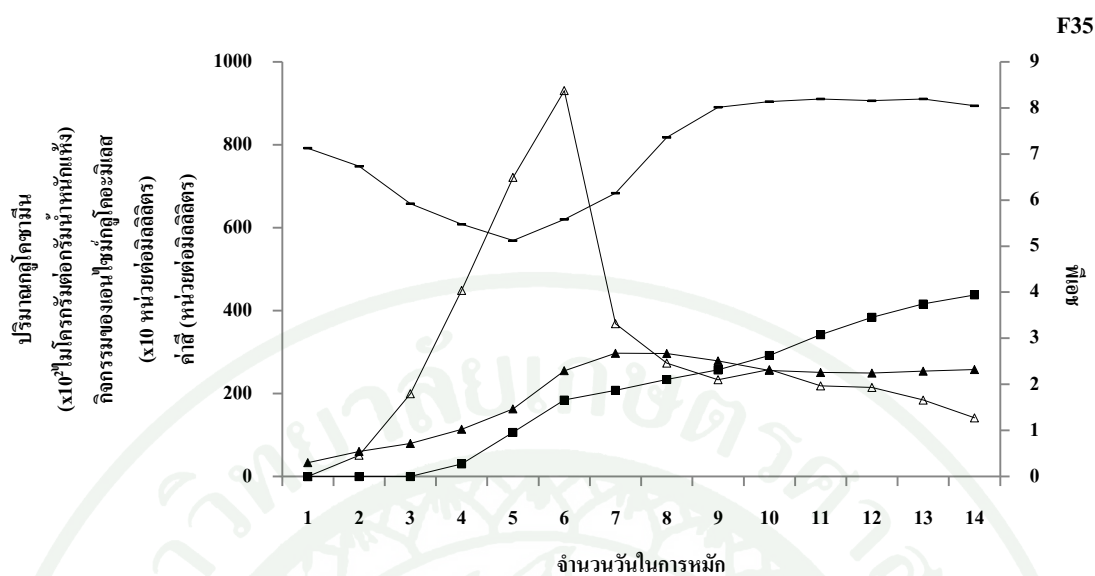
ภาพที่ 44 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิเดส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F26 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



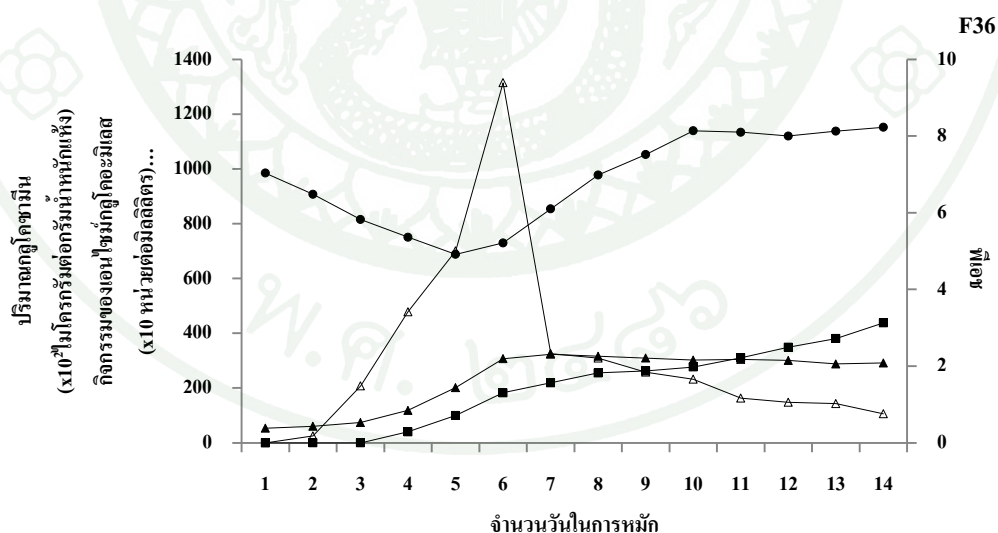
ภาพที่ 45 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (△) ค่า pH (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F27 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



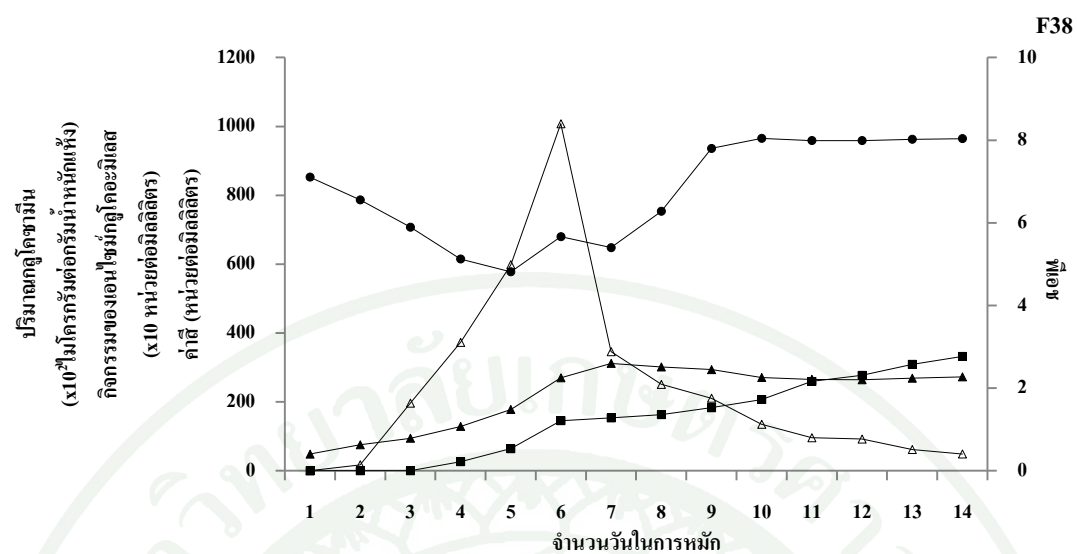
ภาพที่ 46 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (△) ค่า pH (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F31 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



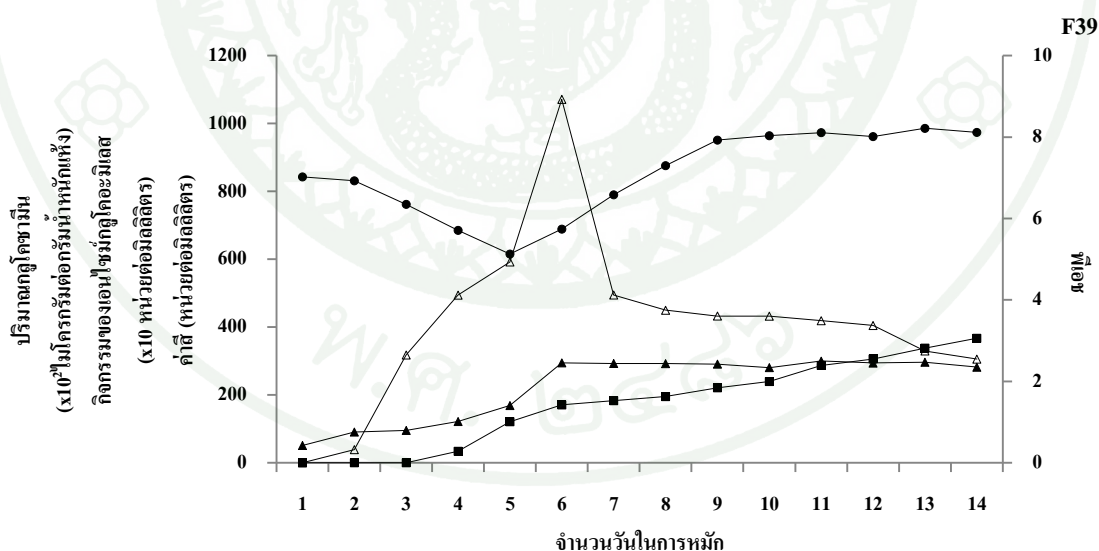
ภาพที่ 47 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณแอมโมเนีย (▲) กิจกรรมของเอนไซม์ (x10⁴) และค่า pH (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F35 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



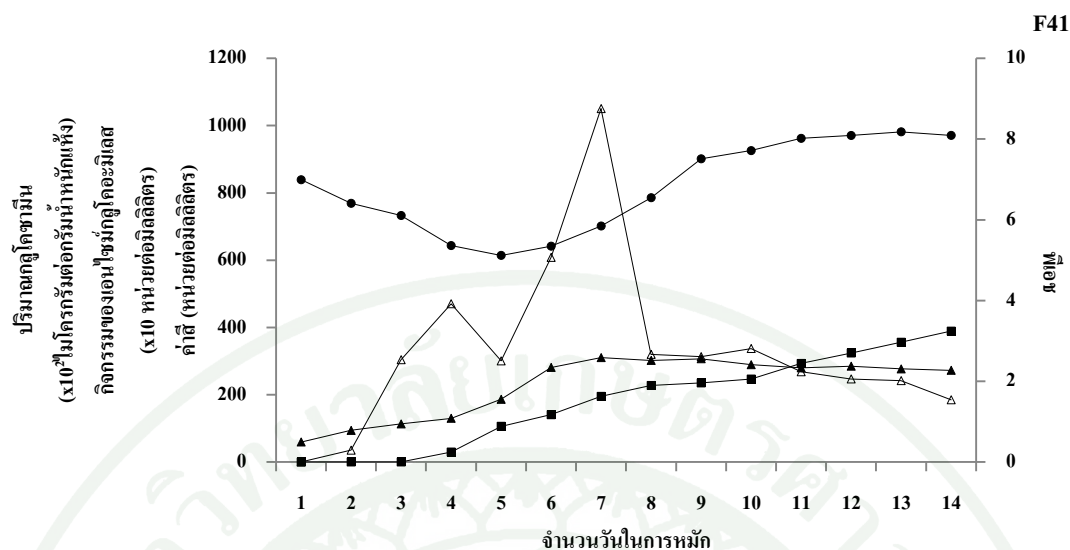
ภาพที่ 48 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณแอมโมเนีย (▲) กิจกรรมของเอนไซม์ (x10⁴) และค่า pH (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F36 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



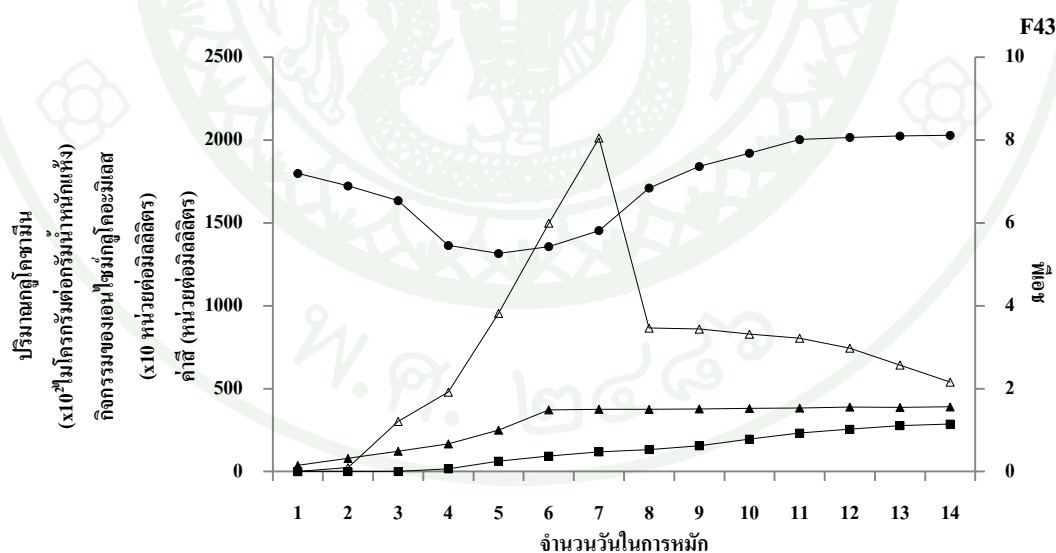
ภาพที่ 49 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซามิเนส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F38 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



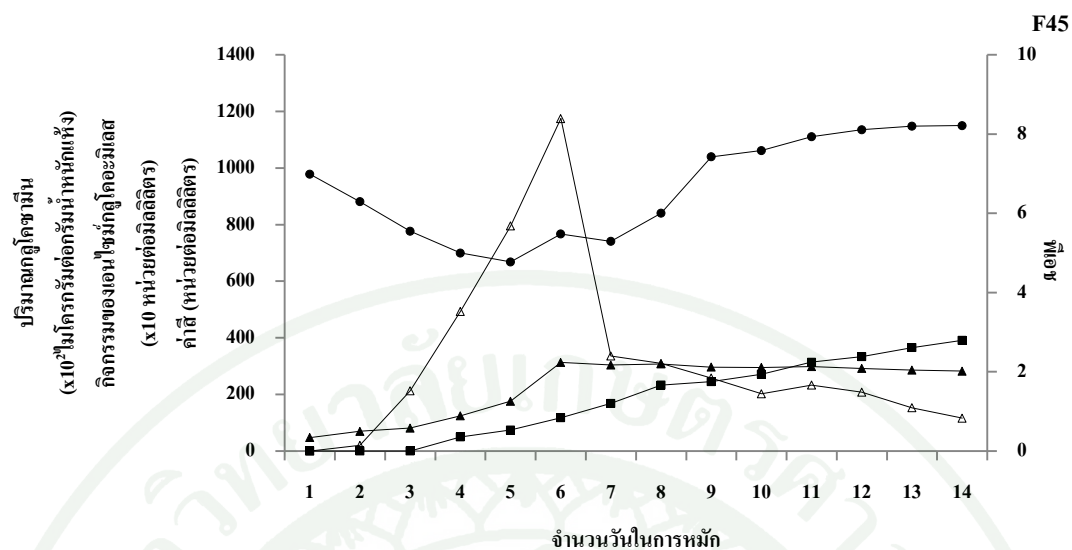
ภาพที่ 50 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซามิเนส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F39 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



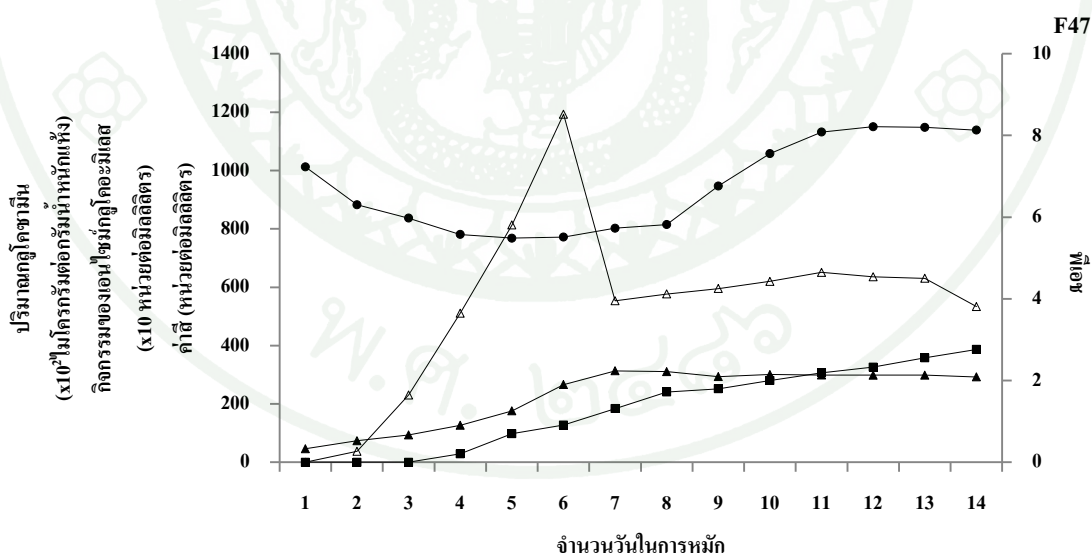
ภาพที่ 51 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F41 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



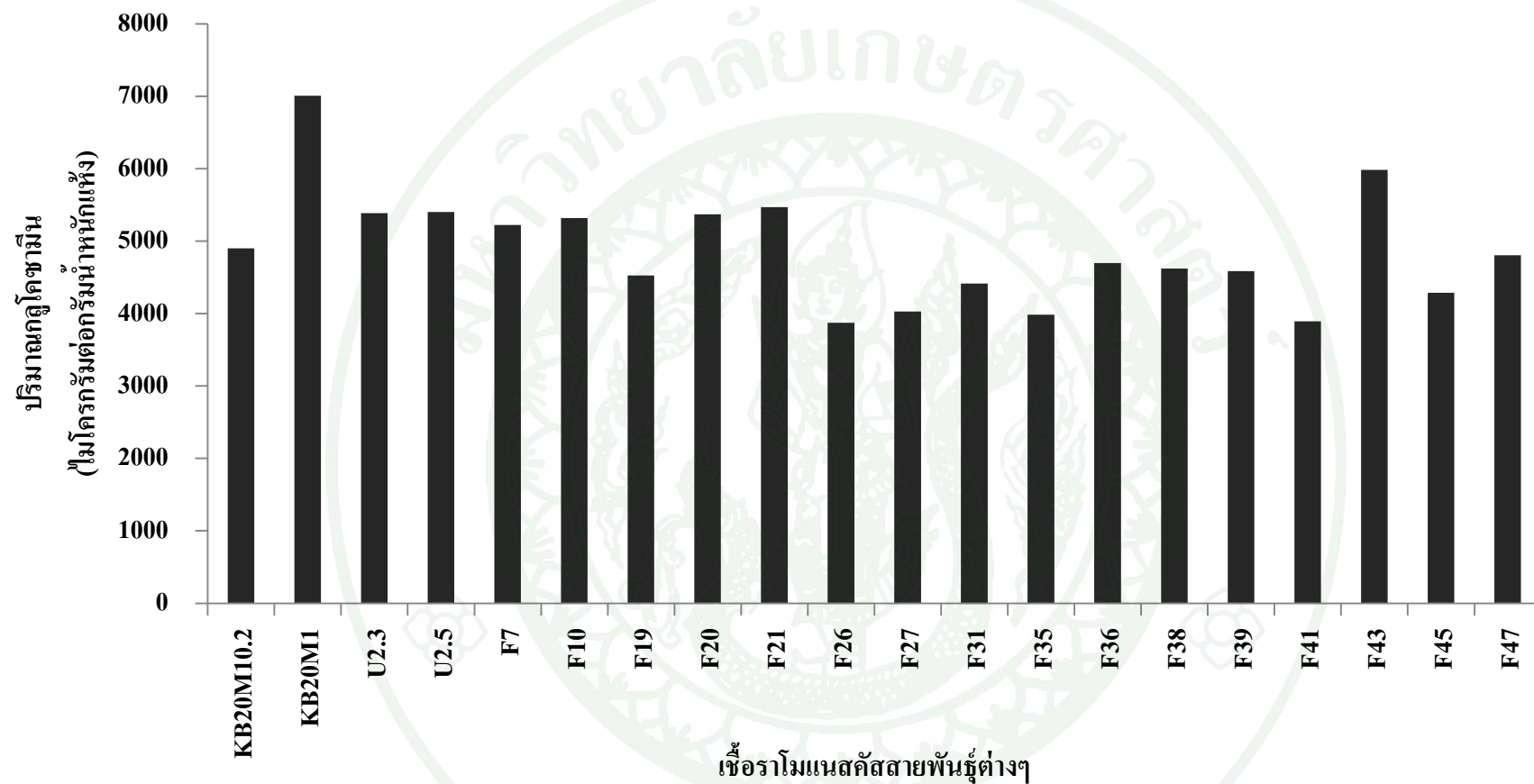
ภาพที่ 52 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F43 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



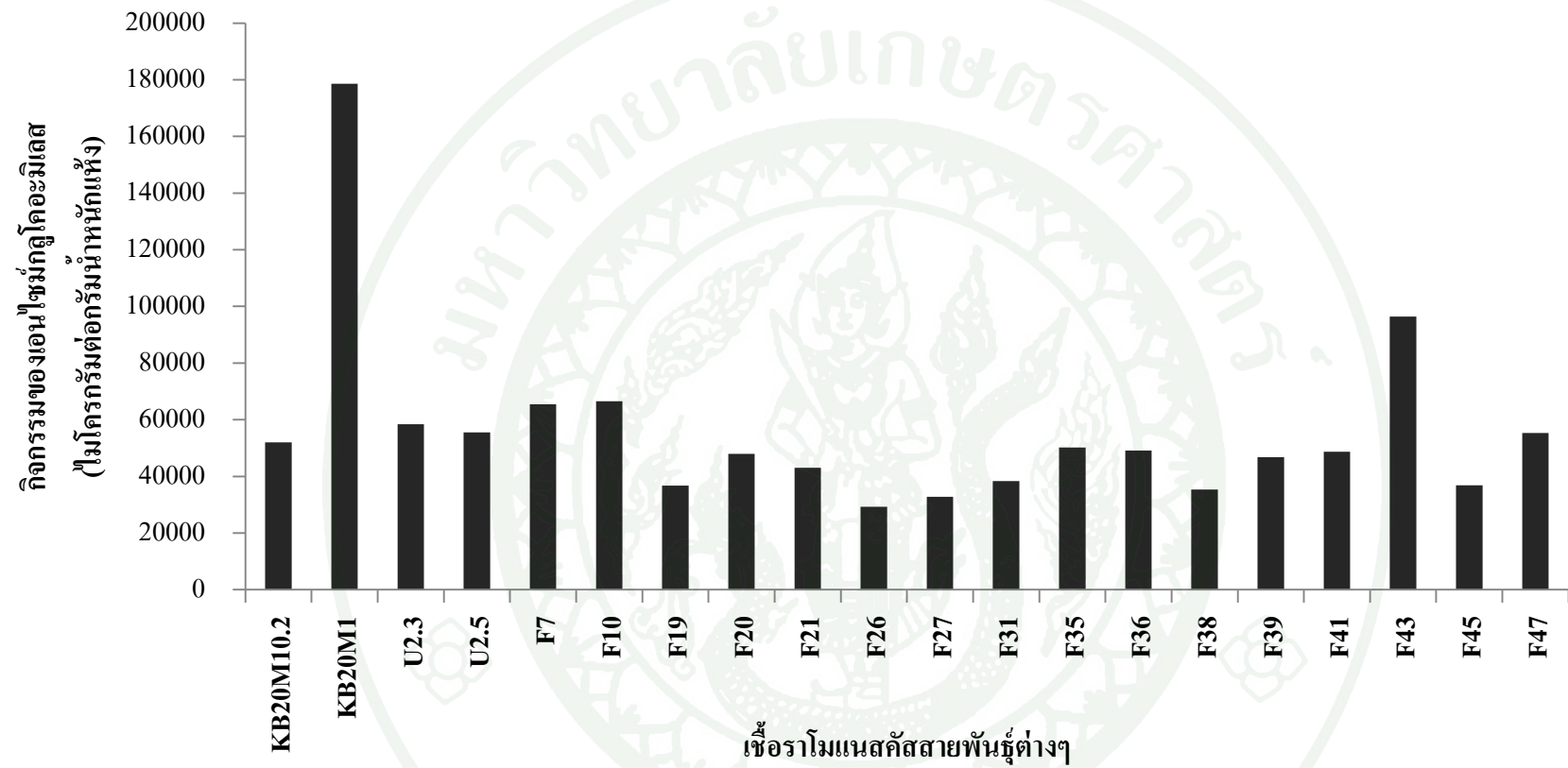
ภาพที่ 53 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F45 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



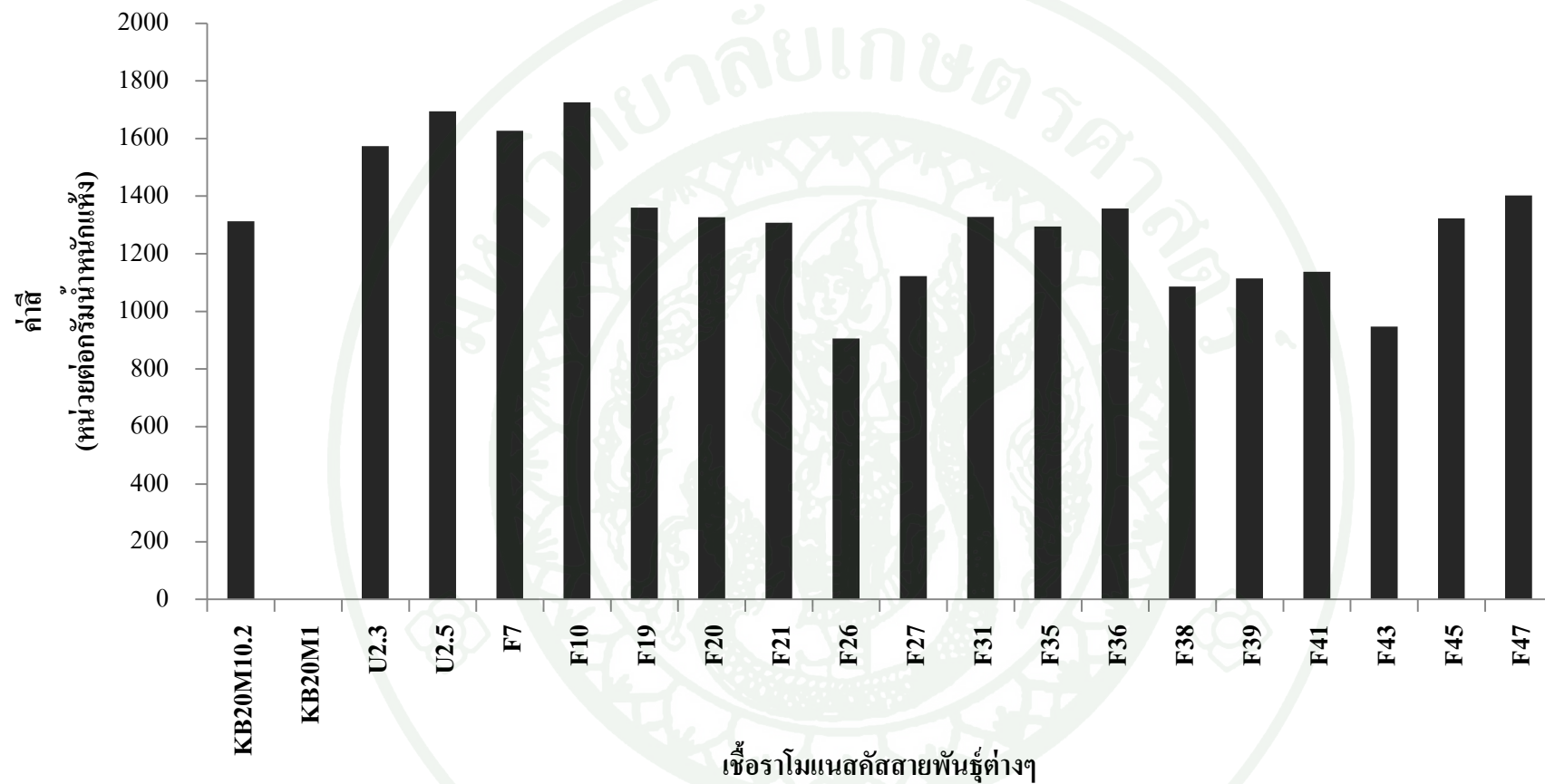
ภาพที่ 54 ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญโดยวิเคราะห์จากปริมาณกลูโคซามีน (▲) กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (△) ค่าสี (■) และพีเอช (●) ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเลี้ยง เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F47 ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส)



ภาพที่ 55 ปริมาณคลอโรฟิลล์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแทนต์และ
ฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 33.06 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน



ภาพที่ 56 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M10.2 มิวแตนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวเชนต์สายพันธุ์ต่างๆ บนปลายข้าวหอมมะลิความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 33.06 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน



ภาพที่ 57 ค่าสีเหลืองของข้าวโมเนสส์สายพันธุ์มีวแดนที่สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มีวแดนที่สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มีวแดนที่และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ บนปลายข้าวหอมมะลิความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 33.06 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน



ภาพที่ 58 ปริมาณกลูโคซา민ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์ที่สี่เหลี่ยมรหัส KB20M10.2 มิวแตนท์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนท์และ
ฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาทีบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน



ภาพที่ 59 กิจกรรมของเอนไซม์กนูโคอะมิเลสของเชื้อราโมแนสส์สายพันธุ์มิวแตนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M10.2 มิวแตนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาทีบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน



ภาพที่ 60 ค่าสีของเชื่อกาโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนท์สีขาวรหัส KB20M1 โปรีโตพลาสติกมิวแตนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาทีบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน

6. ผลของความชื้นเริ่มต้น พีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิในการบ่มต่อการหมักแบบแข็งของ เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิ

6.1 ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อการหมักแบบแข็ง

เมื่อศึกษาผลของความชื้นต่อการหมักแบบแข็งด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ปลายข้าวหอมมะลิเป็นสับสเตรตแช่น้ำ 3 ชั่วโมง สะเด็ดน้ำ 10 นาที และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วทำการปรับความชื้นโดยเติมน้ำกลั่นมาเชื้อปริมาณ 0, 5, 10 และ 15 มิลลิลิตร จะได้ความชื้นเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 32, 35, 38 และ 41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลจากการศึกษา พบว่า ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยวัดจากปริมาณกลูโคซามีนกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและการผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ คือ 38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 41, 35 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 65 ถึง 67)

เมื่อความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 38 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัสKB20M10.2 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 5,671.805 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 44,036.246 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 1,673.764 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง สายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 7,733.185 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 128,660.98 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ U2.3 และ U2.5 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 6,108.417 และ 6,271.663 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 45,361.396 และ 44,168.796 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 1,400.377 และ 1,459.077 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และสายพันธุ์ฟิวแซนท์ที่สามารถเจริญ มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และผลิตสีได้สูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ได้แก่ F7, F10 และ F43 โดยฟิวแซนท์สายพันธุ์ F7 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 6,413.15 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 54,045.997 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 2,220.62 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ฟิวแซนท์สายพันธุ์ F10 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 5,990.893 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 55,508.429 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ

ค่าสีเท่ากับ 2,115.791 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ฟิวแซนท์สายพันธุ์ F43 มีปริมาณกลูโคซามีนมากกว่าที่ 6,908.762 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์ กลูโคอะมิเลสมากกว่าที่ 87,390.1 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่ค่าสีต่ำกว่าที่ 1,388.57 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

6.2 ผลของฟิเอชของน้ำแช่ข้าวต่อการหมักแบบแข็ง

เมื่อศึกษาผลของความชื้นต่อการหมักแบบแข็งด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนท์สีขาวรหัส KB20M1 โพรโตพลาสต์มิวแตนท์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ปลายข้าวหอมมะลิเป็นสับสเตรต แชน้ำที่ปรับฟิเอชด้วย สารละลายกรดไฮโดรคลอริกและ/หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้มี ฟิเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3, 5, 7, 9 และ 11 ผลจากการศึกษา พบว่า ฟิเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยวัดจากปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและการผลิตสีของเชื้อรา โมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ คือ ฟิเอช 5 รองลงมาคือ 7, 3, 9 และ 11 ตามลำดับ (ภาพที่ 68 ถึง 70)

เมื่อฟิเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 5,319.336 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของ เอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 45,335.01 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 1,552.33 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง สายพันธุ์มิวแตนท์สีขาวรหัส KB20M1 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 7,489.95 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 129,959.7 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนสายพันธุ์โพรโตพลาสต์มิวแตนท์ U2.3 และ U2.5 มีปริมาณ กลูโคซามีนเท่ากับ 5,755.948 และ 5,919.194 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 46,660.16 และ 45,467.56 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนัก แห้ง ตามลำดับ และค่าสีเท่ากับ 1,978.95 และ 1,737.65 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และ สายพันธุ์ฟิวแซนท์ที่สามารถเจริญ มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และผลิตสีได้สูงกว่าสาย พันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ได้แก่ F7, F10 และ F43 โดยฟิวแซนท์สายพันธุ์ F7 มี ปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 6,060.681 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์ กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 55,344.76 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 2,099.19 หน่วยต่อ กรัมน้ำหนักแห้งฟิวแซนท์สายพันธุ์ F10 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 5,638.424 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 56,807.19 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 2,194.36 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งและ ฟิวแซนท์สายพันธุ์ F43 มีปริมาณ

กลูโคซามีนเท่ากับ 6,556.293 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส เท่ากับ 56,807.19 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 967.14 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพีเอชเริ่มต้นของปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 7 เชื่อสามารถเจริญและสร้าง เอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้ใกล้เคียงกับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 เช่นกัน ส่วนการผลิตสีนั้นค่าสีที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกันทุกพีเอช แต่เจดสีหลังจากสกัดออกมามีความแตกต่างกัน

6.3 ผลของอุณหภูมิในการบ่มต่อการหมักแบบแข็ง

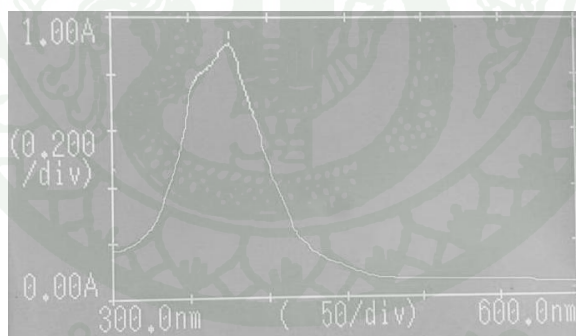
เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการบ่มต่อการหมักแบบแข็งด้วยเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์มิวแตนต์ที่สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์ มิวแตนต์และฟิวแซนต์สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเป็นสับสเตรตความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 20, 25, 28 - 32, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ผลจากการศึกษา พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มต่อการเจริญโดยวัดจาก ปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและการผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ต่างๆ คือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ อุณหภูมิห้องและ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 20 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อราโมแนสคัสไม่สามารถเจริญบนปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้ (ภาพที่ 71 ถึง 73)

เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์ที่สีเหลือง รหัส KB20M10.2 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 4,409.213 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 49,755.99 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 1,726.28 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง สายพันธุ์มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 มีปริมาณกลูโคซามีน เท่ากับ 7,065.353 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 155,370.27 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแตนต์ U2.3 และ U2.5 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 5,492.281 และ 5,162.274 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 55,631.23 และ 51,259.91 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 1,890.483 และ 1,821.174 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และสายพันธุ์ฟิวแซนต์ ที่สามารถเจริญ มีกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และผลิตสีได้สูงกว่าสายพันธุ์มิวแตนต์ สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ได้แก่ F7, F10 และ F43 โดยฟิวแซนต์สายพันธุ์ F7 มีปริมาณ กลูโคซามีนเท่ากับ 5,299.538 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส เท่ากับ 47,724.66 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 2,037.132 หน่วยต่อกรัมน้ำหนัก

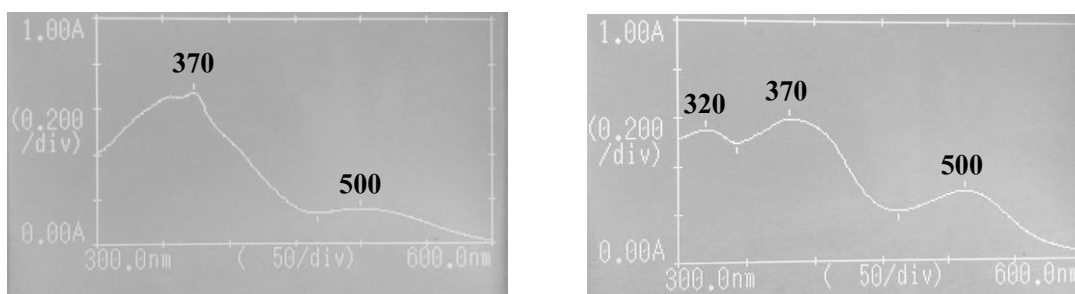
แห้ง ฟิวแซนท์สายพันธุ์ F10 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 5,402.366 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 50,436.35 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 2,223.598 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และฟิวแซนท์สายพันธุ์ F43 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 6,026.524 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 63,732.14 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และค่าสีเท่ากับ 1,418.561 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

นอกจากนี้ ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โพรโตพลาสต์มิวแตนต์ 2 สายพันธุ์ และฟิวแซนท์ 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างสีที่ความยาวคลื่น 320 และ 500 นาโนเมตร ร่วมกับสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตรด้วย (ภาพที่ 62) ทำให้สารสีที่สกัดออกมามีชมพูอมแดงดังภาพที่ 63 และ 64

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสีเหลืองได้ ถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิเนื่องจากเมื่ออุณหภูมิต่ำเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ สร้างสารสีแดงด้วย หรืออาจกล่าวได้ว่าการสร้างสารสีแดงถูกควบคุมด้วยปัจจัยภายนอก แต่การสร้างสารสีเหลืองถูกควบคุมด้วยปัจจัยภายในหรือยีนของเชื้อราโมแนสคัส



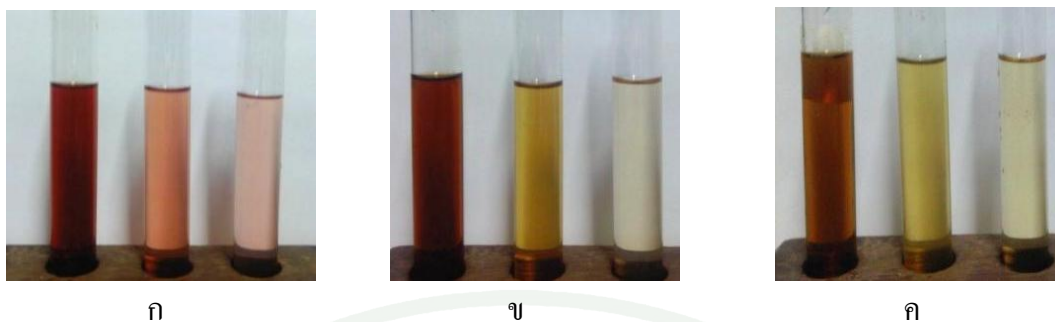
ภาพที่ 61 ความยาวคลื่นแสงที่สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โพรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ดูดกลืน เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิห้องและ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน



ภาพที่ 62 ความยาวคลื่นแสงที่สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปไรโดพลาสติกมิวแตนต์ และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ ดูดกลืนเมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน (ก) และ 20 วัน (ข)



ภาพที่ 63 ข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) 28 - 32 องศาเซลเซียส (ข) 35 องศาเซลเซียส (ค) และ 40 องศาเซลเซียส (ง)

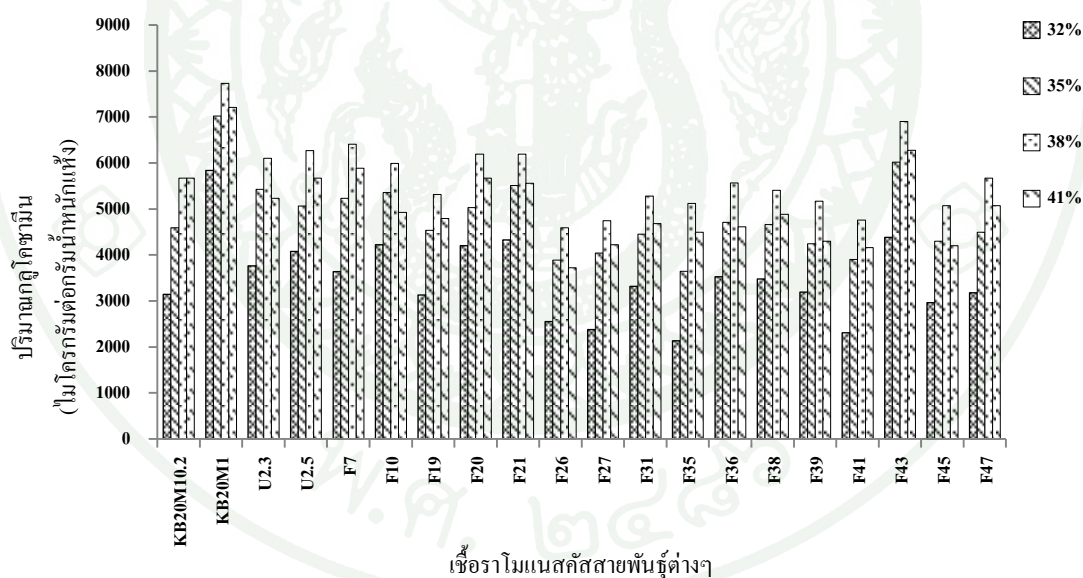


ภาพที่ 64 สารสีที่สกัดได้จากข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มีวแทนทีสีเหลืองรหัส KB20M10.2 ด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์

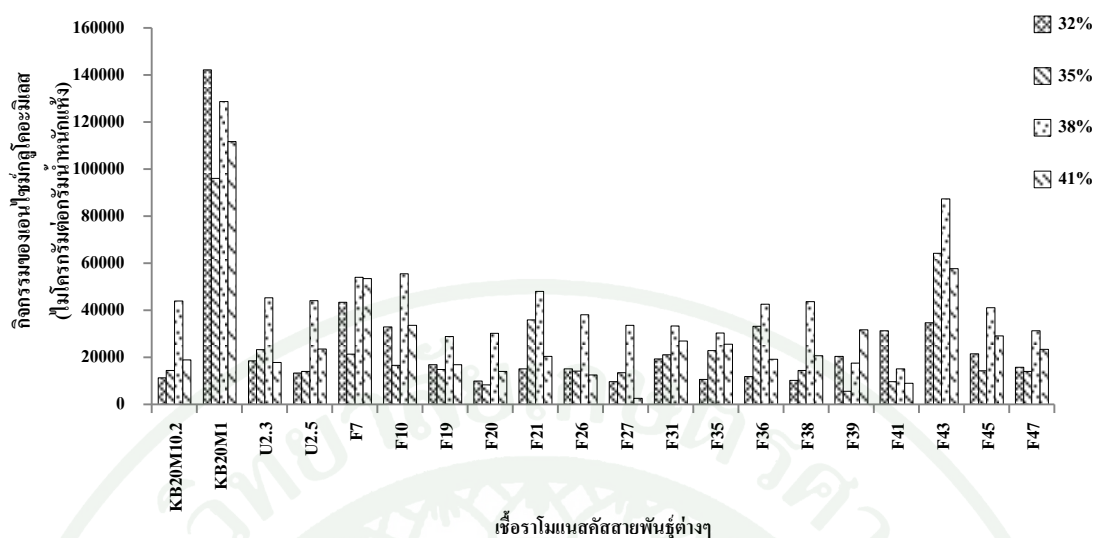
(ก) ข้าวหมักบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เจือจาง 40, 400 และ 800 เท่า ตามลำดับ

(ข) ข้าวหมักบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เจือจาง 40, 400 และ 800 เท่า ตามลำดับ

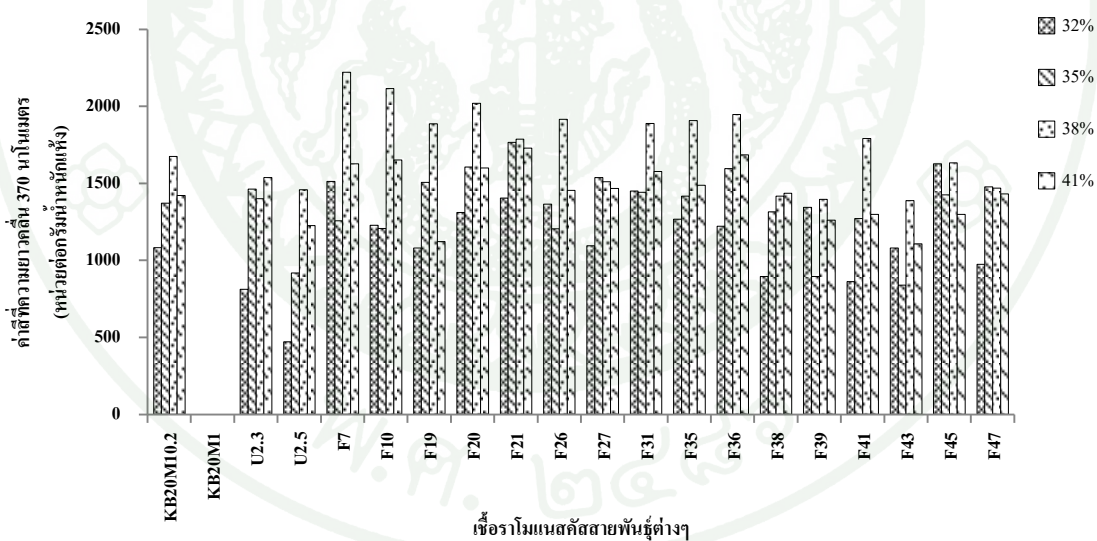
(ค) ข้าวหมักบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เจือจาง 40, 400 และ 800 เท่า ตามลำดับ



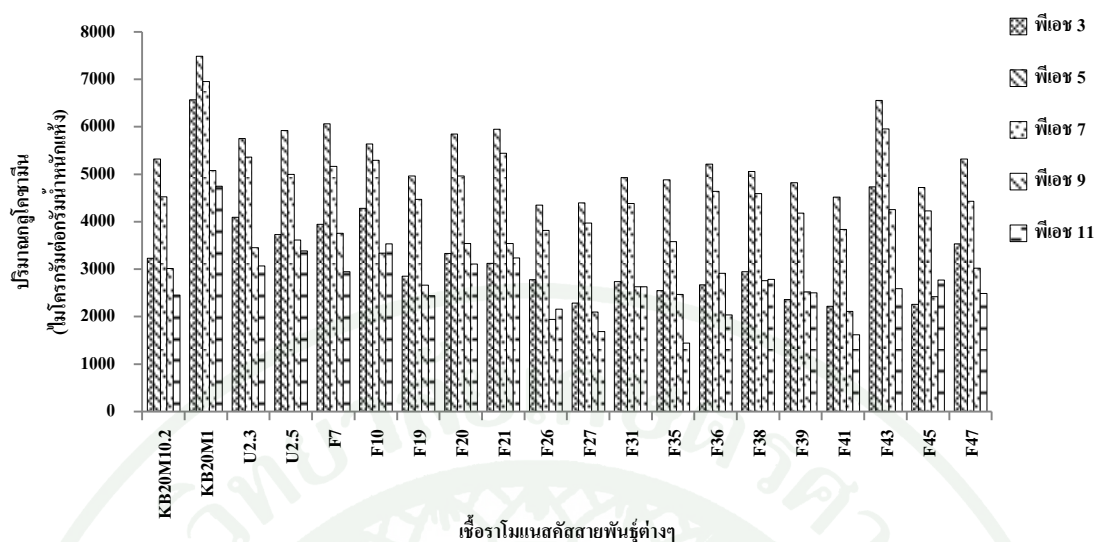
ภาพที่ 65 ปริมาณกรดอะมิโนของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ ฟิเอชเริ่มต้น 6 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน



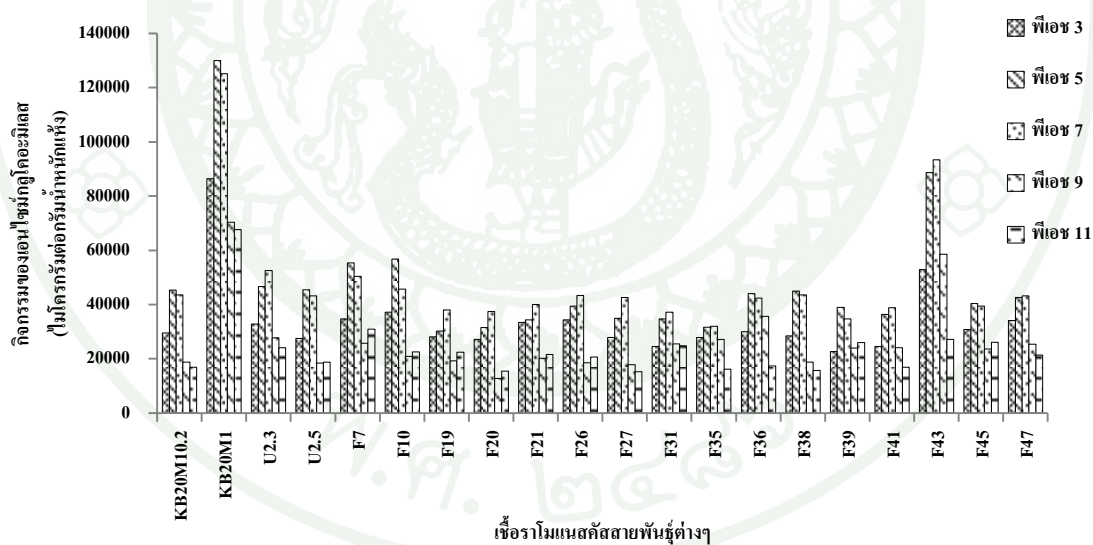
ภาพที่ 66 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิเลสของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ พีเอชเริ่มต้น 6 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน



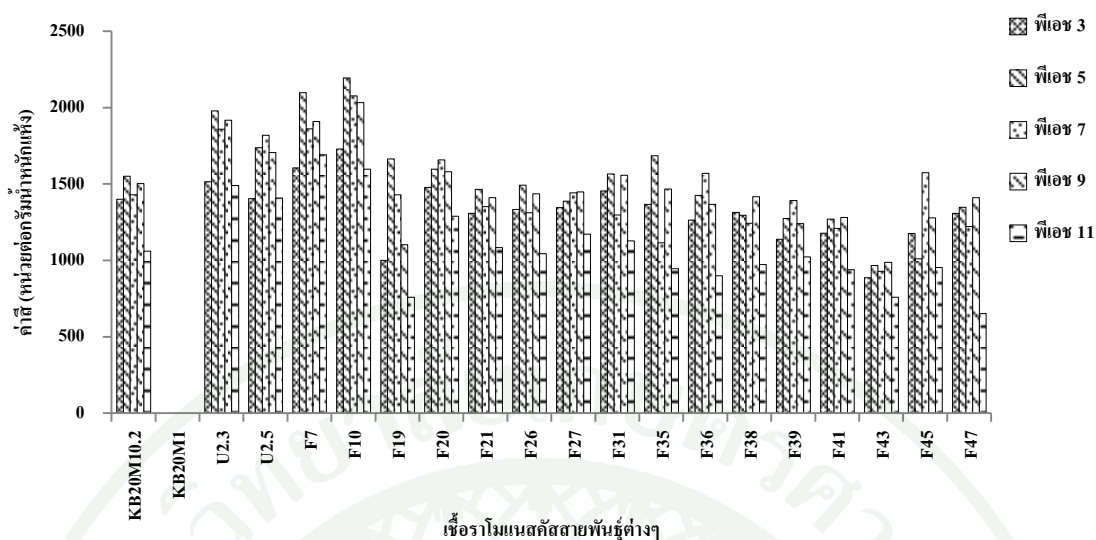
ภาพที่ 67 ค่า pH ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ พีเอชเริ่มต้น 6 และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน



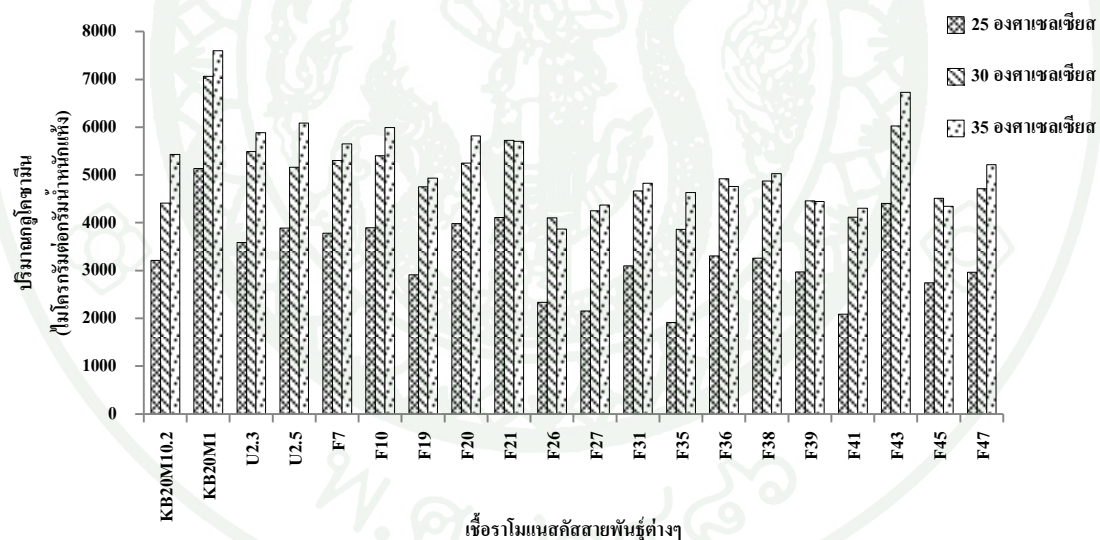
ภาพที่ 68 ปริมาณกลูโคซามีนของเชื้อราโมแนสค์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ ฟิเอชเริ่มต้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน



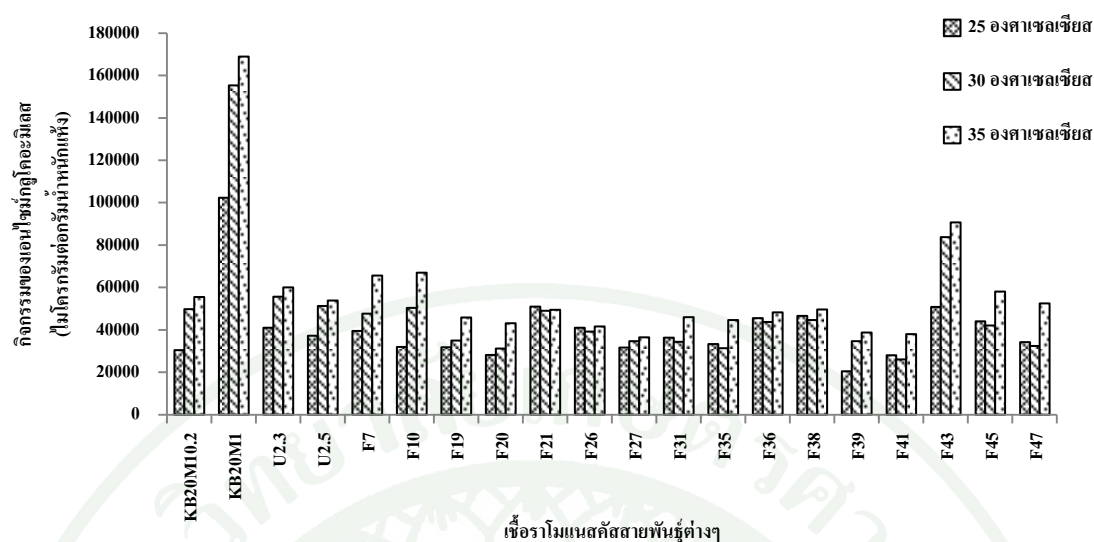
ภาพที่ 69 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซามิเนสของเชื้อราโมแนสค์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ ฟิเอชเริ่มต้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน



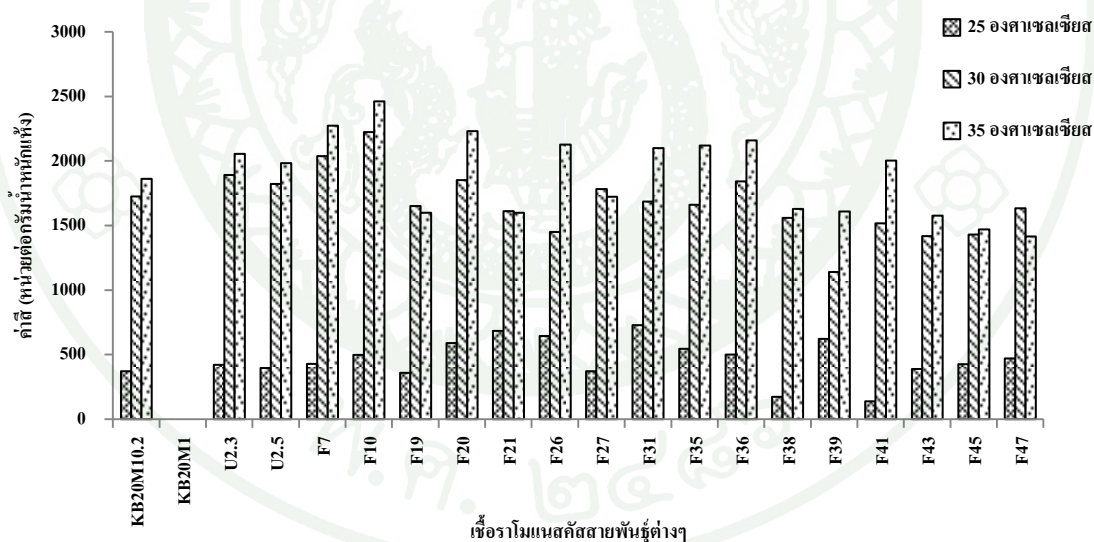
ภาพที่ 70 ค่าสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ ฟิเอชเริ่มต้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน



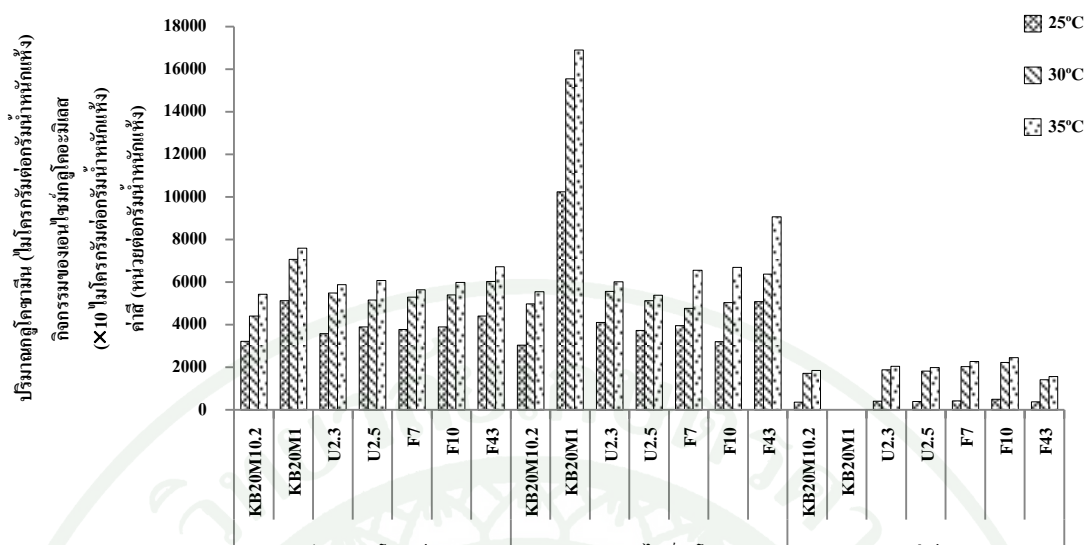
ภาพที่ 71 ปริมาณกลูโคซามินของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ ฟิเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน



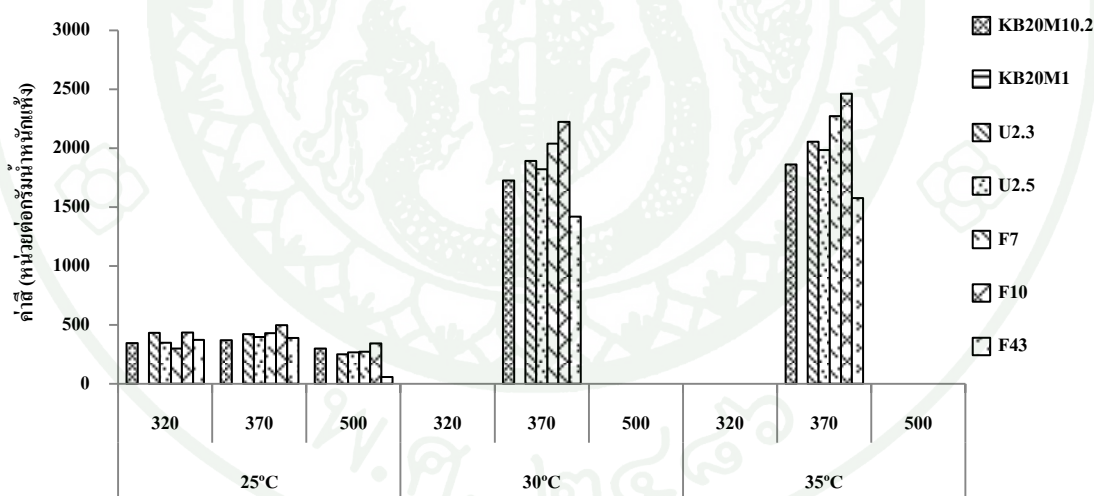
ภาพที่ 72 กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสไมเลสของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน



ภาพที่ 73 ค่าสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน



ภาพที่ 76 ปริมาณกลูโคซามีน กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคซิเลส และค่าสี จากเชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5 และบ่มอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 20 วัน



ภาพที่ 77 ค่าสีที่ความยาวคลื่น 320, 370 และ 500 นาโนเมตร จากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิที่ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน

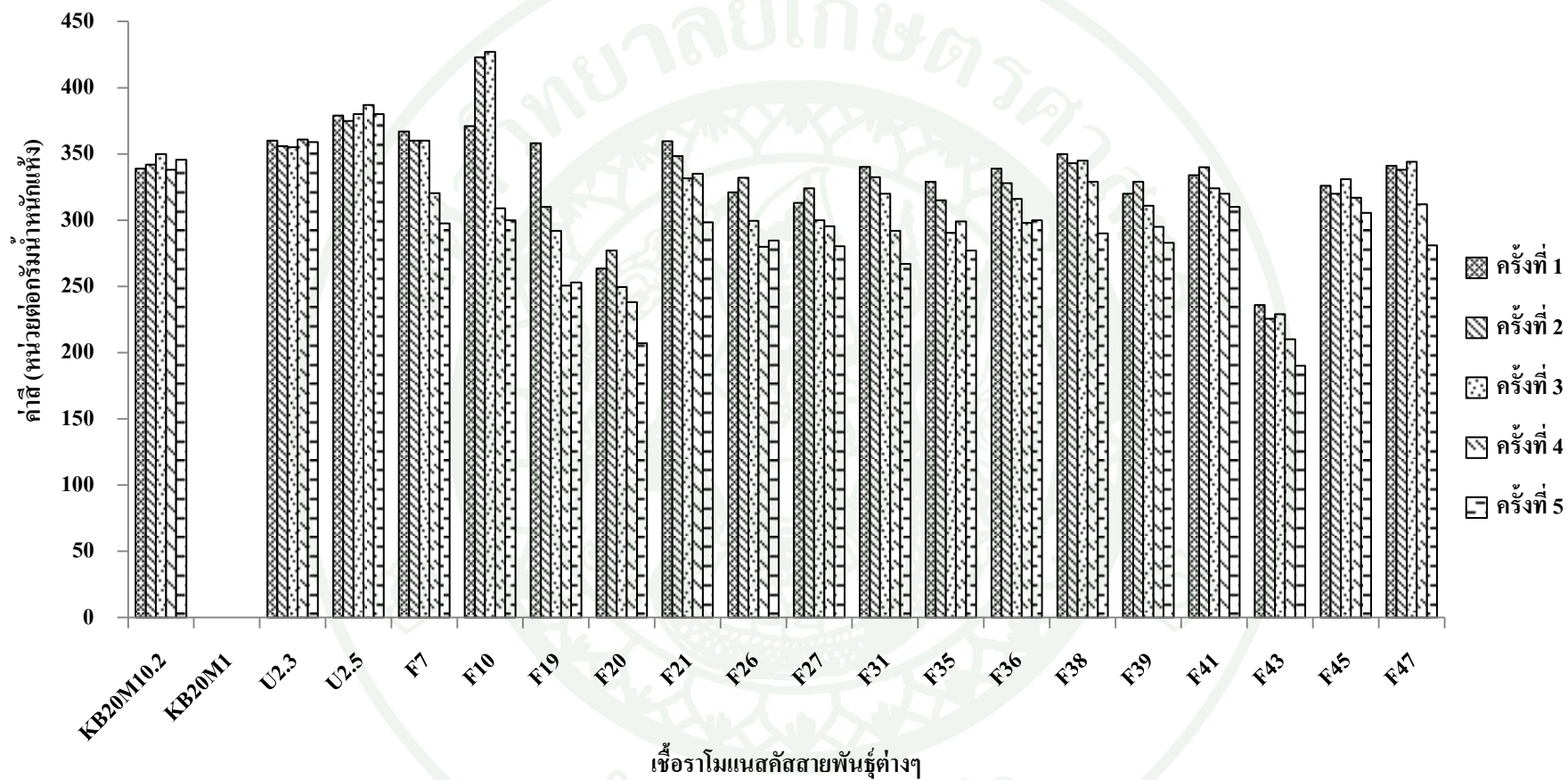
7. ศึกษาความคงตัวของสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สายพันธุ์มิวแทนต์สีขาวรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับมิวแทนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

นำเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแทนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ 18 สายพันธุ์ คือ U2.3, U2.5, F7, F10, F19, F20, F21, F26, F27, F31, F35, F36, F38, F39, F41, F43, F45 และ F47 มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น MY แบบ point inoculation บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer เจาะเส้นใยบริเวณขอบของโคโลนีจำนวน 5 ชิ้น โดยที่ 4 ชิ้นแรกใส่ในอาหารเหลว SS พีเอช 7.0 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน ส่วนอีก 1 ชิ้นที่เหลือ นำไปวางบนอาหารวุ้น MY แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สำหรับใช้ในการทดสอบครั้งต่อไป เมื่อครบ 7 วัน จะทำการทดสอบความคงตัวของสายพันธุ์ โดยใช้ cork borer เจาะเส้นใยบริเวณขอบของโคโลนี 5 ชิ้น มาทำดั่งวิธีที่กล่าวมาข้างต้นอีก 4 ครั้งติดต่อกัน เชื้อราโมแนสคัสทุกสายพันธุ์เริ่มมีการเจริญตั้งแต่วันที่ 2 ของการหมัก สังเกตได้จากชั้นเชื้อที่ไล่ลงไปเริ่มมีเส้นใยเจริญเป็นเพลเลตขนาดเล็กและเริ่มมีการผลิตสีออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนต์ จำนวน 2 ไอโซเลตที่ได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดมิวเตชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ให้ค่าสีสูงกว่าสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ความยาวคลื่นสูงสุดและค่าสีที่วัดได้ทั้ง 5 ครั้ง ของมิวแทนต์ทั้งสองไอโซเลตเท่ากับ 370 นาโนเมตร เช่นเดียวกับเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โดยมิวแทนต์ U2.3 และ U2.5 สามารถผลิตสีได้สูงกว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 อาจเป็นไปได้ว่ามิวแทนต์ทั้งสองเกิดมิวเตชันในส่วนที่เพิ่มอัตราการหลั่งสารสีออกจากเส้นใยได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม จึงไม่เกิดการกดของสารเมแทบอไลต์ทำให้การผลิตเกิดอย่างต่อเนื่อง (Lin and Iizuka, 1982) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนต์มีความคงตัวทางพันธุกรรมเช่นเดียวกับสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2

ส่วนเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ 16 สายพันธุ์ พบว่า ความยาวคลื่นสูงสุดและค่าสีที่วัดได้ทั้ง 5 ครั้ง ของมิวแทนต์ทั้งสองไอโซเลตเท่ากับ 370 นาโนเมตร เช่นเดียวกับเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 3 พบว่าสายพันธุ์ฟิวแซนท์เหล่านี้เจริญได้ช้าลง สังเกตได้จากการเกิดเพลเลตและการผลิตสีช้าลง (ภาพที่ 78) ซึ่งต่างจากสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 และโปรโตพลาสต์มิวแทนต์สายพันธุ์ U2.3 และ U2.5 ที่สามารถเจริญและผลิตได้ใกล้เคียงกันตลอดการเพาะเลี้ยงทั้ง 5 ครั้ง

แต่อย่างไรก็ตาม อาจปรับปรุงสายพันธุ์ฟิวแซนต์เหล่านี้ให้มีความคงตัวสูงขึ้น โดยการฉายรังสี อัลตราไวโอเลตซ้ำอีกครั้ง (Kiyohara *et al.*, 1990)





ภาพที่ 78 ค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว SS ติดต่อกัน 5 ครั้ง บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

8. แนวทางการเพิ่มการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสค์สายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนท์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อหมักแบบแข็งโดยใช้สับเตรตต่างๆ

เมื่อศึกษาแนวทางการเพิ่มสปอร์ของเชื้อราโมแนสค์สายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ และฟิวแซนท์ ได้แก่ U2.3, U 2.5, F7, F10 และ F43 โดยใช้ ธัญพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ ปลายข้าวหอมมะลิ, ข้าวหอมมะลิเมล็ดเต็ม, เมล็ดข้าวโพด, มันเทศ, มันสำปะหลัง, มันฝรั่ง, ถั่วเขียว, ถั่วเหลือง, ขนมน้ำผึ้ง และลูกเดือยเป็นสับเตรต ความชื้นเริ่มต้นของ สับเตรตแต่ละชนิดเท่ากับ 40.07, 47.14, 43.63, 34.39, 35.87, 59.45, 61.28, 58.72, 45.96, 32.47, และ 51.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พีเอชเริ่มต้น 6.42, 7.04, 6.59, 7.11, 7.46, 7.01, 6.33, 6.51, 6.18, 6.95 และ 7.18 ตามลำดับ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 สายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 สามารถสร้างโคนิเดียได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ถั่วเขียวและถั่วเหลือง ตามลำดับ โดยมีจำนวนโคนิเดียเท่ากับ 40.9×10^6 และ 37.2×10^6 สปอร์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง ตามลำดับ ส่วนสับเตรตที่ทำให้สายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ผลิตสีได้สูงที่สุดคือ มันฝรั่งและปลายข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนท์และฟิวแซนท์สามารถสร้างโคนิเดียและสีได้สูงบนสับเตรตชนิดเดียวกันกับสายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ดังแสดงในตารางที่ 5, 6, 7, 8, 9 และ 10

ตารางที่ 5 ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2

สับสเตรต	เปอร์เซ็นต์ความชื้น		พีเอช		ค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	จำนวนสปอร์ ($\times 10^6$ สปอร์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง)
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด		
ถั่วเขียว	40.07	50.85	6.42	5.88	103.67	40.9
ถั่วเหลือง	47.14	55.66	7.04	6.13	151.82	37.2
ขนมปัง	43.63	56.93	6.59	5.54	739.46	19.5
ปลายข้าวหอมมะลิ	34.39	46.11	7.11	5.02	859.24	13.1
ข้าวหอมมะลิเมล็ดเต็ม	35.87	49.17	7.46	5.41	1000.12	15.65
มันฝรั่ง	59.45	68.32	7.01	7	1230.94	3.9
มันเทศ	61.28	75.36	6.33	5.96	349.58	1.8
มันสำปะหลัง	58.72	69.21	6.51	6.47	406.38	2.4
เมล็ดข้าวโพด	45.96	57.39	6.18	6.34	97.37	1.2
ข้าวฟ่าง	32.47	42.88	6.95	6.08	118.26	4
ลูกเดือย	51.29	60.74	7.18	6.43	493.87	8.6

ตารางที่ 6 ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ B2.3

สับสเตรต	เปอร์เซ็นต์ความชื้น		ฟิเอย		ค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	จำนวนสปอร์ ($\times 10^6$ สปอร์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง)
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด		
ถั่วเขียว	40.07	52.18	6.42	5.19	229.17	47.8
ถั่วเหลือง	47.14	56.99	7.04	5.44	286.32	43.8
ขนมปัง	43.63	58.26	6.59	4.85	862.96	26.4
ปลายข้าวหอมมะลิ	34.39	47.44	7.11	4.33	984.74	19.7
ข้าวหอมมะลิเมล็ดเต็ม	35.87	50.5	7.46	4.72	1125.62	22.55
มันฝรั่ง	59.45	69.65	7.01	6.31	1356.44	10.5
มันเทศ	61.28	76.69	6.33	5.27	484.08	8.7
มันสำปะหลัง	58.72	70.54	6.51	5.78	531.88	9
เมล็ดข้าวโพด	45.96	58.72	6.18	5.65	222.87	8.1
ข้าวฟ่าง	32.47	44.21	6.95	5.39	243.76	10.9
ลูกเดือย	51.29	62.07	7.18	5.74	628.37	15.2

ตารางที่ 7 ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสส์สายพันธุ์โปรโตพลาสต์มิวแทนท์ U2.5

สับสเตรต	เปอร์เซ็นต์ความชื้น		พีเอช		ค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	จำนวนสปอร์ ($\times 10^6$ สปอร์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง)
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด		
ถั่วเขียว	40.07	52.94	6.42	5.96	198.93	44.3
ถั่วเหลือง	47.14	56.75	7.04	6.21	256.08	39.9
ขนมปัง	43.63	59.02	6.59	5.62	832.72	22.9
ปลายข้าวหอมมะลิ	34.39	47.2	7.11	5.1	954.5	15.8
ข้าวหอมมะลิเมล็ดเต็ม	35.87	51.26	7.46	5.49	1095.38	19.1
มันฝรั่ง	59.45	69.41	7.01	7.08	1326.2	6.6
มันเทศ	61.28	76.45	6.33	6.04	453.84	5.2
มันสำปะหลัง	58.72	71.3	6.51	6.55	501.64	5.1
เมล็ดข้าวโพด	45.96	58.48	6.18	6.42	192.63	4.6
ข้าวฟ่าง	32.47	43.97	6.95	6.16	213.52	7.4
ลูกเดือย	51.29	62.83	7.18	6.51	598.13	11.3

ตารางที่ 8 ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พีวแซนท์ F7

สับสเตรต	เปอร์เซ็นต์ความชื้น		พีเอช		ค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	จำนวนสปอร์ ($\times 10^6$ สปอร์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง)
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด		
ถั่วเขียว	40.07	52.99	6.42	6.79	267.42	46.6
ถั่วเหลือง	47.14	59.2	7.04	7.34	324.57	42.6
ขนมปัง	43.63	59.07	6.59	6.45	901.21	25.2
ปลายข้าวหอมมะลิ	34.39	48.25	7.11	5.93	1022.99	18.5
ข้าวหอมมะลิเมล็ดเต็ม	35.87	52.71	7.46	6.62	1165.87	21.35
มันฝรั่ง	59.45	70.46	7.01	7.91	1394.69	9.3
มันเทศ	61.28	77.5	6.33	6.87	522.33	7.5
มันสำปะหลัง	58.72	72.75	6.51	7.68	570.13	7.8
เมล็ดข้าวโพด	45.96	59.53	6.18	7.25	261.2	6.9
ข้าวฟ่าง	32.47	45.02	6.95	6.99	282.01	9.7
ลูกเดือย	51.29	64.28	7.18	7.64	646.62	14

ตารางที่ 9 ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พีวแซนท์ F10

สับสเตรต	เปอร์เซ็นต์ความชื้น		พีเอช		ค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	จำนวนสปอร์ ($\times 10^6$ สปอร์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง)
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด		
ถั่วเขียว	40.07	53.98	6.42	5.01	256.15	40.4
ถั่วเหลือง	47.14	60.89	7.04	5.26	313.3	38.7
ขนมปัง	43.63	60.06	6.59	5.67	889.94	19
ปลายข้าวหอมมะลิ	34.39	49.94	7.11	4.15	1011.72	12.6
ข้าวหอมมะลิเมล็ดเต็ม	35.87	53.7	7.46	4.54	1152.6	17.15
มันฝรั่ง	59.45	72.15	7.01	6.13	1383.42	3.4
มันเทศ	61.28	78.49	6.33	5.09	511.06	3.3
มันสำปะหลัง	58.72	73.74	6.51	5.6	558.86	1.9
เมล็ดข้าวโพด	45.96	61.22	6.18	5.47	249.85	2.7
ข้าวฟ่าง	32.47	46.01	6.95	5.21	270.74	3.5
ลูกเดือย	51.29	65.97	7.18	5.56	655.35	10.1

ตารางที่ 10 ผลของสับสเตรตที่ใช้ในการหมักต่อการสร้างสปอร์และผลิตสีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F43

สับสเตรต	เปอร์เซ็นต์ความชื้น		พีเอช		ค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	จำนวนสปอร์ ($\times 10^6$ สปอร์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง)
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด		
ถั่วเขียว	40.07	57.79	6.42	5.97	71.89	56.1
ถั่วเหลือง	47.14	60.6	7.04	6.22	110.58	50.5
ขนมปัง	43.63	61.87	6.59	5.63	607.68	34.7
ปลายข้าวหอมมะลิ	34.39	53.05	7.11	5.11	498.46	28.4
ข้าวหอมมะลิเมล็ดเต็ม	35.87	54.11	7.46	5.5	648.88	29.8
มันฝรั่ง	59.45	75.26	7.01	7.09	789.7	19.2
มันเทศ	61.28	80.3	6.33	6.05	247.8	17.0
มันสำปะหลัง	58.72	76.15	6.51	6.56	335.14	15.7
เมล็ดข้าวโพด	45.96	62.33	6.18	5.43	55.59	15.4
ข้าวฟ่าง	32.47	47.82	6.95	6.17	56.48	18.3
ลูกเดือย	51.29	67.68	7.18	5.52	352.63	21.8

9. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนต์สีเข้วรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

เมื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ มิวแทนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 มิวแทนต์สีเข้วรหัส KB20M1 โปรโตพลาสต์มิวแทนต์ (U2.3 และ U2.5) และฟิวแซนท์ F7, F10 และ F43 เมื่อเพาะเลี้ยงบนปลายข้าวหอมมะลิความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน สกัดสารออกจากข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำไปเจียวบนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดไปทำปฏิกิริยากับสาร DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเปรียบเทียบกับวิตามินซี (positive control) ดังตารางที่ 11 และเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากค่า EC50 (50% Effective Concentration) หมายถึงความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ถ้าค่า EC50 ต่ำแสดงว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี จากผลการศึกษาพบว่า สายพันธุ์โมแนสคัสที่ใช้หมักข้าวแล้วได้สารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดจะมีค่า EC50 ต่ำที่สุด ได้แก่ F10 รองลงมาได้แก่ U2.3, F7, U2.5, KB20M10.2, F43, KB20M1 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า EC50 เท่ากับ 0.550, 0.576, 0.743, 0.836, 0.931, 1.43 และ 2.163 ตามลำดับ (ตารางที่ 12) และเมื่อวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า สายพันธุ์ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดได้แก่ U2.3 รองลงมาคือ F10, U2.5, F7, KB20M10.2, F43, KB20M1 ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

สารต้านอนุมูลอิสระที่เชื้อราโมแนสคัสสร้างขึ้น คือ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) หรือสารประกอบฟีนอล (Aniya *et al.*, 2000; Tiara *et al.*, 2002) ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระหรือ DPPH เพื่อทำให้อนุมูลอิสระไม่ว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาดังนั้น ถ้าเชื้อราโมแนสคัสมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงแสดงว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงเช่นกัน

ตารางที่ 11 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ และวิตามินซี

สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH
KB20M10.2	0.500	38.10
	0.625	42.20
	0.800	45.71
	1.250	60.65
	2.500	89.50
KB20M1	0.500	15.42
	0.625	18.90
	0.800	22.24
	1.250	30.87
	2.500	56.98
U2.3	0.500	46.23
	0.625	50.33
	0.800	57.84
	1.250	70.78
	2.500	102.63
U2.5	0.500	38.63
	0.625	43.11
	0.800	50.45
	1.250	64.08
	2.500	96.19
F7	0.500	41.61
	0.625	46.09
	0.800	53.43
	1.250	65.06
	2.500	95.17

ตารางที่ 11 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH
F10	0.500	44.64
	0.625	52.74
	0.800	61.25
	1.250	73.19
	2.500	111.04
F43	0.500	19.65
	0.625	26.75
	0.800	33.26
	1.250	47.20
	2.500	80.05
วิตามินซี	0.002	22.13
	0.004	46.21
	0.006	69.05
	0.008	92.71
	0.01	113.17

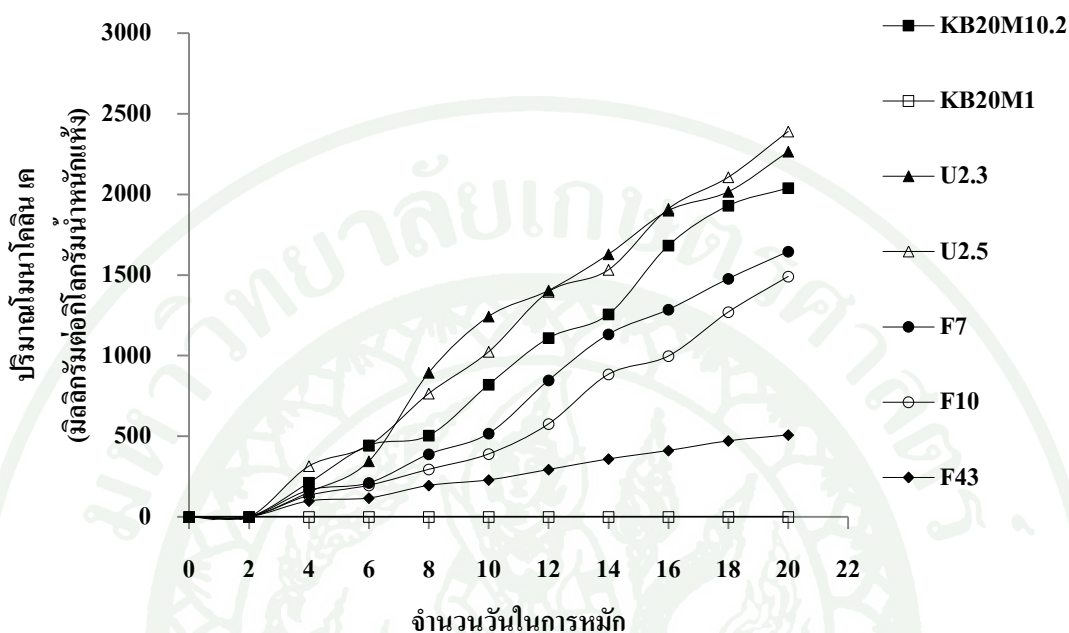
ตารางที่ 12 ค่า EC50 และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ และวิตามินซี

สายพันธุ์เชื้อรา โมแนสคัส	EC50 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
KB20M10.2	0.931	12.3
KB20M1	2.163	6.8
U2.3	0.576	18.7
U2.5	0.836	15.0
F7	0.743	14.9
F10	0.550	17.6
F43	1.430	8.3
Vitamin C	0.00437	27.5

10. ความสามารถในการสร้างโมนาโคลิน เค ของสารสกัดจากข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ตั้งต้นมิวแทนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M10.2 มิวแทนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M1 เปรียบเทียบกับโปรโตพลาสต์มิวแทนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์ต่างๆ

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ บนปลายข้าวหอมมะลิความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5 และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน พบว่า เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ เริ่มมีการเจริญตั้งแต่วันที่ 3 ของการหมัก สังเกตได้เริ่มมีเส้นใยสีน้ำตาลแดงปกคลุมเมล็ดข้าว ยกเว้นเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M1 เริ่มมีการเจริญตั้งแต่วันที่ 2 ของการหมัก สังเกตได้จากเริ่มมีเส้นใยสีขาวปกคลุมเมล็ดข้าว เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแทนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มิวแทนต์ (U2.3 และ U2.5) และฟิวแซนท์ F7, F10 และ F43 สร้างโมนาโคลินได้ตั้งแต่วันที่ 4 ของการหมัก จากนั้นปริมาณโมนาโคลินเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งวันสุดท้ายของการหมัก (ภาพที่ 79) เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่สร้างโมนาโคลินได้สูงที่สุด คือ สายพันธุ์มิวแทนต์สี่เหลี่ยมรหัส U2.5 รองลงมา คือ U2.3, KB20M10.2, F7, F10 และ F43 ตามลำดับ โดยสร้างโมนาโคลินได้เท่ากับ 2,390.22, 2,265.56, 2,039.16, 1,645.07, 1,490.52 และ 508.19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์มิวแทนต์สี่เหลี่ยมรหัส KB20M1 ไม่สามารถสร้างสารโมนาโคลินได้เลย แต่การพัฒนาสายพันธุ์นี้ได้สายพันธุ์

ลูกผสมหรือฟิวแซนทีนั้น มีส่วนเสริมการสร้างสรรค์โมนาโคลิน เค ได้ นอกเหนือจากการเสริมสร้าง การเจริญ การสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และการสร้างสีเหลืองให้มากขึ้น



ภาพที่ 79 ปริมาณสาร โมนาโคลิน เค ในสารสกัดข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ

11. ศึกษาความคงตัวของสารสีในข้าวเหลืองต่อการนึ่ง การอบแห้ง อุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษา

กรรมวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่พร้อมใช้ภายหลังจากระบวนการหมักข้าวแดง เช่น กระบวนการนึ่งปลอดเชื้อ สารสีจะถูกทำลายถึง 30.57 และ 5.41 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการสเตอริไรซ์ และพาสเจอไรซ์ (Nimnoi and Lumyong, 2009) เพื่อศึกษาความคงตัวของสารสีในข้าวเหลืองหมักในพลาสติก ขนาด 500 มิลลิลิตร ระยะหมักนาน 20 วัน เมื่อนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 และ 20 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที พบว่าปริมาณสารสีลดลง เมื่อใช้อุณหภูมิและเวลานึ่งฆ่าเชื้อนานขึ้น โดยเปรียบเทียบสารที่คงเหลือกับตัวอย่างข้าวแดงสด ซึ่งไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่าที่ 13 ถึงตารางที่ 16 ระยะเวลานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำข้าวเหลืองไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) ยังพบการงอกของเชื้อรา เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 20 นาที ทำให้สามารถฆ่าเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ หลังจากเก็บข้าวเหลืองไว้ ไม่พบการงอกของเส้นใยเชื้อราอีกเลย แต่เมื่อเพิ่ม

อุณหภูมิและเวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อจะทำให้สารสีลดลง หลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อได้ทำการทดลองเก็บข้าวเหลืองไว้ที่อุณหภูมิห้องที่มีแสง ไม่มีแสง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งแบบอบแห้งและไม่อบแห้ง เปรียบเทียบกับข้าวเหลืองที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเมื่อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ค่าสีลดลงไปประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 20 นาที ค่าสีลดลงไปประมาณ 69 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ค่าสีลดลงไปประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิในการเก็บหลังการฆ่าเชื้อพบว่า อุณหภูมิในการเก็บไม่มีผลต่อความคงตัวของสารสี



ตารางที่ 13 ค่าสีของข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อ

จำนวนวันในการเก็บ	ค่าสี (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)					
	อบแห้ง			ไม่อบแห้ง		
	อุณหภูมิห้องมีแสง	อุณหภูมิห้องไม่มีแสง	อุณหภูมิ 4°C	อุณหภูมิห้องมีแสง	อุณหภูมิห้องไม่มีแสง	อุณหภูมิ 4°C
10 วัน	1,726.83	1,853.29	1,694.58	1,734.27	1,843.56	1,794.06
20 วัน	1,682.05	1,811.25	1,826.34	1,801.34	1,732.34	1,756.89
30 วัน	1,800.31	1,694.38	1,725.16	1,683.91	1,821.28	1,684.00
40 วัน	1,745.20	1,735.47	1,743.02	1,799.85	1,655.83	1,809.81
50 วัน	1,643.28	1,754.75	1,827.74	1,783.73	1,712.66	1,690.60

ตารางที่ 14 ค่าสีของข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 หลังนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

จำนวนวันในการเก็บ	ค่าสี (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)					
	อบแห้ง			ไม่อบแห้ง		
	อุณหภูมิห้องมีแสง	อุณหภูมิห้องไม่มีแสง	อุณหภูมิ 4°C	อุณหภูมิห้องมีแสง	อุณหภูมิห้องไม่มีแสง	อุณหภูมิ 4°C
10 วัน	678.40	665.60	640.80	658.81	622.99	679.40
20 วัน	650.80	637.60	676.00	683.88	698.21	643.28
30 วัน	664.00	652.00	690.40	635.52	635.52	610.75
40 วัน	619.00	642.00	620.00	620.90	635.82	683.58
50 วัน	683.20	637.60	638.40	679.40	654.93	640.00

ตารางที่ 15 ค่าสีของข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 หลังนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

จำนวนวันในการเก็บ	ค่าสี (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)					
	อบแห้ง			ไม่อบแห้ง		
	อุณหภูมิห้องมีแสง	อุณหภูมิห้องไม่มีแสง	อุณหภูมิ 4°C	อุณหภูมิห้องมีแสง	อุณหภูมิห้องไม่มีแสง	อุณหภูมิ 4°C
10 วัน	525.60	575.52	504.80	504.80	572.54	517.61
20 วัน	583.60	527.16	551.60	586.40	573.13	510.75
30 วัน	584.80	550.15	501.60	581.60	534.03	532.24
40 วัน	554.00	525.37	559.00	522.00	571.64	577.61
50 วัน	521.60	531.04	591.20	524.80	558.51	562.69

ตารางที่ 16 ค่าสีของข้าวหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 หลังนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

จำนวนวันในการเก็บ	ค่าสี (หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)					
	อบแห้ง			ไม่อบแห้ง		
	อุณหภูมิห้องมีแสง	อุณหภูมิห้องไม่มีแสง	อุณหภูมิ 4°C	อุณหภูมิห้องมีแสง	อุณหภูมิห้องไม่มีแสง	อุณหภูมิ 4°C
10 วัน	352.54	382.40	360.00	401.49	346.87	277.01
20 วัน	399.70	320.40	321.20	324.18	329.55	342.09
30 วัน	397.91	331.20	356.40	309.85	336.72	340.30
40 วัน	326.87	348.00	371.00	314.93	386.57	370.15
50 วัน	397.01	226.40	345.60	349.85	308.66	364.18

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการทดลองทั้งหมด พบว่า เชื้อราโปรโตพลาสต์มีวแคนท์ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ U2.3 และ U2.5 และ โปรโตพลาสต์ฟิวแซนท์ 16 สายพันธุ์ ได้แก่ F7, F10, F19, F20, F21, F26, F27, F31, F35, F36, F38, F39, F41, F43, F45 และ F47 สามารถเจริญ ผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และ สารสีเหลืองที่ดูดกลืนแสงความยาวคลื่นสูงสุด 370 นาโนเมตร โดยไม่ขึ้นกับสูตรอาหารและพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว SS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) และหมักบนปลายข้าวหอมมะลิ เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่เจริญ ผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส และสีได้สูงกว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มีวแคนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 คือ U2.3, U2.5, F7, F10 และ F43 ยกเว้นสายพันธุ์ฟิวแซนท์ F43 สร้างสีได้ต่ำกว่า สายพันธุ์มีวแคนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง แต่อย่างไรก็ตาม โปรโตพลาสต์มีวแคนท์และฟิวแซนท์ดังกล่าวยังเจริญและผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสต่ำกว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มีวแคนท์สีขาวรหัส KB20M1

2. ปัจจัยที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ บนปลายข้าวหอมมะลิ คือ ความชื้นเริ่มต้น พีเอชเริ่มต้น และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม เมื่อทำการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ ความชื้นเริ่มต้น 38 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นของน้ำแช่ข้าว 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่สภาวะดังกล่าวจะทำให้เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มีวแคนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2, KB20M1, U2.3, U2.5, F7, F10 และ F43 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 4,409.213, 7,065.353, 5,492.281, 5,162.274, 5,299.538, 5,402.366, 6,026.524 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสเท่ากับ 49,755.99, 155,370.27, 55,631.23, 51,259.91, 47,724.66, 50,436.35 และ 63,732.14 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และสีเหลืองดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 370 นาโนเมตร 1,726.28, 1,890.483, 1,821.174, 2,037.132, 2,223.598 และ 1,418.561 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

3. สับสเตรดที่เหมาะสมต่อการสร้างโคนิดีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มีวแคนท์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โปรโตพลาสต์มีวแคนท์ และฟิวแซนท์ คือ ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ส่วนสับสเตรดที่เหมาะสมต่อการสร้างสี คือ มันฝรั่ง และปลายข้าวหอมมะลิ

4. เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 โพรโตพลาสต์มิวแตนต์ และฟิวแซนท์สามารถสร้างสารลดคอเลสเตอรอลหรือสารโมนาโคลิน เค รวมทั้งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกได้ด้วย

5. การเก็บเกี่ยวหลังจากกระบวนการหมักข้าว ควรฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเก็บข้าวหมักอบแห้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือ 4 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเก็บข้าวหมักมากที่สุด

ข้อเสนอแนะ

1. เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ฟิวแซนท์ยังมีความคงตัวต่ำกว่าสายพันธุ์โพรโตพลาสต์มิวแตนต์ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงติดต่อกันหลายครั้ง แต่เชื้อราโมแนสคัสเหล่านี้มีความสามารถในการเจริญและผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและสารสีได้สูงกว่าเชื้อราโมแนสคัสตั้งต้นสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2 ดังนั้น จึงควรหาวิธีปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ ฟิวแซนท์ดังกล่าวเพื่อให้มีความคงตัวดีขึ้น

2. เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองและสีขาว เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *Monascus kaoliang* KB9 ซึ่งสายพันธุ์นี้ไม่สร้างสารพิษ (บุญบา, 2542) แต่อย่างไรก็ตามก่อนนำสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลือง มิวแตนต์สีขาว โพรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์ไปใช้ประโยชน์ ควรทดสอบสารพิษที่เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ อาจสร้างขึ้นมา เนื่องจากสายพันธุ์เหล่านี้ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ซึ่งอาจไปส่งผลกระทบต่อกลุ่มยีนโพลีคีไทด์ ซึ่งเป็นกลุ่มของยีนที่สร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของเชื้อราโมแนสคัส ได้แก่ สารสี โมนาโคลิน เค และสารพิษชิตรินิน (Shimizu *et al.*, 2005)

3. เชื้อราโมแนสคัสเป็นเชื้อราที่สามารถผลิตสารที่มนุษย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายชนิด เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมทั้งทางด้านอาหารและไม่ใช่ว่าทางด้านอาหาร ดังนั้น จึงน่าสนใจถ้าหากจะทำการศึกษเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเชื้อราตัวนี้ เพื่อจะได้สามารถรู้ถึงการทำงานของยีนที่ควบคุมการผลิตเมแทบอลิท์ที่สำคัญ เพื่อจะได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ได้ถึงระดับยีน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กังสดาลย์ ศรแก้ว. 2538. การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กังสดาลย์ บุญปราบ, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ และ นภา โล่ห์ทอง. 2540. การคัดเลือก Glucose derepression mutants เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวแดงและกลไกควบคุมการสร้างสีของเชื้อรากลายพันธุ์. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์.) 31: 317-326.
- จินดารัตน์ นิตวัฒน์พงษ์. 2522. การศึกษาจุลินทรีย์วิทยาอาหารหมักพื้นเมือง: ไตปลาและปลาแป้งแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ฐิติ ชัยศรีสุข. 2536. การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของราข้าวแดง (*Monascus* sp. KB6SR) เพื่อใช้เป็นแหล่งโครโมโซมที่คงสภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์ มก. 11(3): 122-129.
- นิสา บุตรดา. 2537. การกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส กบ.11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสีและเปรียบเทียบสมบัติบางประการกับสายพันธุ์พ่อแม่สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดงและสีเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุษบา ยงสมิทธิ์ และ วรณภา ทาบโลกา. 2527. การใช้ประโยชน์แป้งมันสำปะหลังในการผลิตสีผสมอาหารและเอนไซม์ย่อยแป้งโดยเชื้อราโมแนสคัสในสภาพหมักเปียก, น. 451-452. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 22. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- _____. 2542. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พลายแก้ว ไชยเบญจรงค์ และ บุษบา ยงสมิทธิ์. 2534ก. การศึกษาเบื้องต้นการผลิตโคจิสีแดงของโมแนสคัสเตรียมจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ, น. 277-282. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วรวรรณ กลิ่นสุภา. 2550. การปรับปรุงการเจริญและการผลิตสีเหลืองโดยใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์มิวเตชันและฟิวชันของมิวแทนต์สีเหลืองและมิวแทนต์สีขาวของ *Monascus* sp. KB11304. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมชาย ไกรรักษ์. 2536. ศักยภาพของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ชนิดใหม่ ในการผลิตสีเหลืองธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สาวิตรี ลีมทอง. 2540. โปรโตพลาสต์ฟิวชันของจุลินทรีย์ เอกสารประกอบการสอนวิชาอีสต์และอีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุพัฒน์ รัตนนาวัฒน์. 2552. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไวน์ข้าวโดยเชื้อราสายพันธุ์สีขาว *Monascus kaoliang* KB20M1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุภาพร จันทศิริโพธา. 2531. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราแดงเพื่อเพิ่มความสามารถการผลิตสีโดยวิธีการกลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Akihisa, T., S. Mafune, M. Ukiya, K. Yasukawa, T. Suzuki, H. Tokuda, N. Tanabe and T. Fukuoka. 2004. (+)- and (-)-*syn*-2-isobutyl-4-methylazetidine-2,4-dicarboxylic acids from the extract of *Monascus pilosus* - fermented rice (red-mold rice). **J. Nat. Prod.** 67: 479-480.
- _____, H. Tokuda, K. Yasukawa, M. Ukiya, A. Kiyota, N. Sakamoto, T. Suzuki, N. Tanabe, H. Nishino. 2005. Azaphilones, furanoisophthalides and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. **J. Agric. Food. Chem.** 53:562–565.

- Aniya, Y., T. Yokomakuro, M. Yonamine, K. Shimada, T. Nagamine, M. Shimabukuro and H. Gibo. 1999. Screening of antioxidant action of various molds and protection of *Monascus anka* against experimentally induced liver injuries of rats. **Gen. Pharma.** 32: 225-231.
- _____, I.I. Ohtani, T. Higa, C. Miyagi, H. Gibo, M. Shimabukuro, H. Nakanishi and J. Taira. 2000. Dimerumic acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. **Free Radic. Biol. Med.** 28:999-1004.
- Anne, J., H. Eyssen and P. De Somer. 1974. Formation and regeneration of *Penicillium chrysogenum* protoplasts. **Arch. Microbiol.** 98(2): 159-166.
- _____, and J. F. Peberdy. 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. **J. Gen. Microbiol.** 92: 413-417.
- Aruoma, O., J. Spencer, D. Warren, P. Jenner, J. Butler and B. Halliwell. 1997. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. **Food Chem.** 60: 149-156.
- Aso, K., Y. Suzuki, F. Kato, J. Nishikawa and H. Iizuka. 1989. Comparative electrophoresis and some properties of alkaline proteinases produced by *Monascus* spp. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 35: 281-288.
- Bajpai, R. K. and M. Reub. 1981. Evolution of feeding strategies in carbon regulated secondary metabolite production through mathematical. **Biotechnol. Bioeng.** 23 : 717-738.
- Bau, Y.S. and H.C. Wong. 1979. Zinc effects on growth, pigmentation and antibacterial activity of *Monascus purpureus*. **Physiol. Plant.** 46: 63-67.

- Blanc, P.J., M.O. Loret and G. Goma. 1995a. Production of citrinin by various species of *Monascus*. **Biotechnol. Lett.** 17: 291-294.
- Blanc, P.J., J.P. Laussac, J.Le. Bars, P.Le. Bars, M.O. Loret, A. Pareilleux, D.Prome, J.C. Prome, A.L. Santerre and G. Goma. 1995b. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. **Int. J. Food Microbiol.** 27: 201-213.
- Bradshaw, R.E., K.U. Lee and J.F. Peberdy. 1983. Aspects of genetic interaction in hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. **J. Gen. Microbiol.** 129: 3525-3533.
- Bridge, P.D. and D.L. Hawksworth. 1985. Biochemical tests as an aid to the identification of *Monascus* species. **Lett. Appl. Microbiol.** 1: 25-29.
- Broder, C.U. and P.E. Koehler. 1980. Pigment produced by *Monascus purpureus* with regard to quality. **J. Food Sci.** 45: 576-579.
- Campoy, S., A. Rumero, J.F. Martin and P. Liras. 2006. Characterization of an hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. **Appl. Microbial and Cell Physiol.** 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.

- Chang, S.T., J.H. Wu, S.Y. Wang, P.L. Kang, N.S. Yang and L.F. Shyur. 2001. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confuse* bark and heartwood. **J. Agr. Food Chem.** 49: 3420-3424.
- 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: 331-337.
- Chen, M.T. and Y.Y. Tseng. 1989. Efficacy of antimicrobial substances from *Monascus* metabolites on preservation of meat. In **35th International Congress of Meat Science and Technology Proceeding**, 2: 483-485. Copenhagen.
- Chiu, S.W. and Y.K. Poon. 1993. Submerged production of *Monascus* pigments. **Mycologia** 85(2): 214-218.
- Corner, B.E. and R.T. M. Poulter. 1989. Interspecific complementation analysis by protoplast fusion of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* adenine auxotrophs. **J. Bacteriol.** 171(6): 3586-3589.
- de Richard, M.S. and H.R. de van Broock. 1984. Protoplast fusion between a petite strain of *Candida utilis* and *Saccharomyces cerevisiae* respiratory competent cells. **Curr. Microbiol.** 10: 117-120.
- de Vries, O.M.H. and J.G.H. Wessels. 1972. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic preparation from *Trichoderma viride*. **J. Gen. Microbiol.** 73: 13-22.
- Dhitaphichit, P. and C. Pornsuriya. 2000. Protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus djamor*. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 27(5): 975-982.

- Dinis, T.C.P., V.M.C. Madeira and L.M. Almeida. 1994. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. **Arch. Biochem. Biophys.** 315: 161–169.
- Endo, A. 1979. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent. **J. Antibiot.** 32(8): 852-854
- Fabre, C. E., Santerre, A. L., Loret, M. O., Baberiam, R., Pareilleux, A., Goma, G., Blanc, P. J. 1993. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. **J. Food Sci.** 58: 1099-1110.
- Farahnak, F., T. Seki, D.D.Y. Ryu and D. Ogrydziak. 1986. Construction of lactose – assimilating and high – ethanol producing yeast by protoplast fusion. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 362-367.
- Ferenczy, L., F. Kevei and M. Szegedi. 1975. High-frequency fusion of fungal protoplasts. **Experientia.** 31(9): 1028-1030.
- 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
- Fontana, J. D, Gebara M, Blumel M, Schineider H, Mackenzie CR and Fohnson KG. 1988. α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods Enzymol.** 160: 560-571.
- Furuta, S., Y. Nishiba and I. Suda. 1997. Fluorometric assay for screening antioxidative activity of vegetables. **J. Food Sci.** 62: 526-528.

- Ganrong, X., Yue, C., Yun, C., Xiaorong, L., and L. Xing. 2003. Production of monacolin K in solid-state fermentation of *Monascus* sp. 9901 that does not produce citrinin. **Paper Presented at the Poster Session of the 1th International Symposium and Workshop on Insight into the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food Safety.** Bangkok, Thailand.
- Gazzani, C., A. Papetti, G. Massolini and M. Daglia. 1998. Anti- and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. **J. Agri. Food Chem.** 46: 4118-4122.
- Gibson, R.K. and J.F. Peberdy. 1972. Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. **J. Gen. Microbiol.** 72: 529-538.
- Gold, M.H., T.M. Cheng and M. Alic. 1983. Fermentation, fusion, and regeneration of protoplasts from wild-type and auxotrophic strains of the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 46(1): 260-263.
- Gunashree, B.S. and G. Venkateswaran. 2010. Enhanced phytase production through interspecific protoplast fusion of *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 auxotrophic mutants. **Enzyme Microb. Tech.** 46(7): 562-567.
- Hajjaj, H., A. Klaebe, 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.
- _____, A. Klaebe, M. O. Loret, G. Goma and P. J. Blanc. 1997. Production and identification of *N*-glucosylrubropunctamine and *N*-glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and the occurrence of electron donor-acceptor complexes in these red pigments. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 2671-2678.

- Han, O. 1990. **Optimization of *Monascus* pigment production in solid-state fermentation.**
Ph.D. Thesis, University of Massachusetts, Amherst.
- Hashiba, T. and M. Yamada. 1984. Intraspecific protoplast fusion between auxotrophic mutant
Of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**. 74(4): 398-400.
- Hawksworth, D. L. and J. I. Pitt. 1983. A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural
and microscopical characters. **Aust. J. Bot.** 31: 51-61.
- _____, Kirk, P. M., Sutton, B. C. and Pegler, D. N. 1995. **Ainsworth and Bisby's Dictionary
of the Fungi**. 8th ed. CAB International. P.290
- Haws, E. J., J. S. E. Holker, K. Powell and A. Roberson. 1959. The chemistry of fungi part
XXXVII the structure of rubropunctatin. **J. Chem. Soc.** 1959: 3598-3610.
- Hendry, G. A. F. and J. D. Houghton. 1992. **Natural Food Colorants**. Blackie and Son., New
York. 280 p.
- Hertog, M.G.L., E.J.M. Feskens, P.C.H. Hollman, M.B. Katan and D. Kromhout. 1993. Dietary
antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study.
Lancet. 342: 1007-1011.
- Hesseltine, C. W. 1965. A millienium of fungi, food and fermentation. **Mycologia**. 57; 179-
181.
- Hiroi, T., T. Shima and N. Ogasanara. 1979. Hyperpigment-productive mutant of *Monascus*
anka for solid culture. **Agr. Biol. Chem.** 43(9): 1975-1976.
- Hollman, P., M. Hertog and M. Katan. 1996. Analysis and health effects of flavonoids. **Food
Chem.** 57: 43-46.

- Hosono, A., D. Ezoe, K. Shimada, J.I. Itoh, T. Hiroi, T. Shima and F. Tokita. 1977. Basic studies on the utilization of *Monascus anka* and red pigment produced by this strain. **Jap. J. Dairy Food Sci.** 26: A93-9.
- Iizuka, H. and S. Mineki. 1977. Studies on the genus *Monascus*, I. purification and properties of two forms of glucoamylase from *Monascus kaoliang* NOV.SP.F1. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 23: 271-230.
- _____ and S. Mineki. 1978. Studies on the genus *Monascus*, II. substrate specificity of two Glucoamylase obtained from *Monascus kaoliang* F-1. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 24: 185-192.
- _____ and C. F. Lin. 1981. On the genus *Monascus* of Asia and its specific characteristics. **Advances in Biotechnology** 2. 555-561.
- Jackson, C.W. and J.B. Heale. 1987. Parasexual crosses by hyphal anastomosis and protoplast fusion in the entomopathogen *Verticillium lecanii*. **J. Gen. Microbiol.** 133: 3537-3547.
- 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.
- Kakar, S.N. and P.T. Magee. 1982. Genetic analysis of *Candida albicans*: identification of different isoleucine-valine methionine and arginine alleles by complementation. **J. Bacteriol.** 151(3): 1247-1252.
- Kalt, W.,C.F. Forney, A. Martin and R.L. Prior. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **J. Agri. Food Chem.** 47: 4638-4644.

- Kevei, F. and J.F. Peberdy. 1977. Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosa* by fusion of somatic protoplasts. **J. Gen. Microbiol.** 102: 255-262.
- Kirimura, K., T. Yaguchi and S. Usami. 1986. Intraspecific protoplast fusion of citric acid-producing strains of *Aspergillus niger*. **J. Ferment. Technol.** 64(6): 473-479.
- _____, T. Sato, N. Nakanishi, M. Terada and S. Usami. 1997. Breeding of starchutilizing and Itaconic-acid-producing koji molds by interspecific protoplast fusion between *Aspergillus terreus* and *Aspergillus usamii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 127-131.
- 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. Microbiol. Biotechnol.** 33: 671-676.
- Kolotila, M. P., Hollingsworth P. J. and Volz, P. A. 1978. Surface features of *Monascus ruber* van Tieghem cleistothecia. **Bot. Gaz.** 139(2): 256-260.
- Kolotila, M. P. and Volz, P. A. 1980. Nitrogen sources and cleistothecial production of *Monascus ruber* van Tieghem. **Phytologia.** 45: 438-441.
- Krairak, S., K. Yamamura, R. Iric, M. Nakajima, H. Shimizu, P. Chim-anage, B. Yongsmith and S. Shioya. 1994. Maximizing yellow pigment production in fed-batch culture of *Monascus* sp. **J. Biosci Bioeng.** 90(4): 363-367.
- Kranz, C., C. Panitz and B. Kunz. 1992. Biotransformation of free fatty acid in mixtures to methyl ketones by *Monascus purpureus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36 : 436-439.
- Kurono, M., K. Nakanishi, K. Shindo, and M. Tada. 1963. Monascorubrin and monascoflavin. **Chem. Pharm. Bull. Tokyo.** 11: 358-362.

Kyoko Sato, Satoshi Iwakami, Yukihiro Goda, Emi Okuyama, Kunitoshi Yoshihira, Takahiko Ichi, Yoshinobu Otake, Hiroshi Noguchi and Ushio Sankawa. 1992. Novel natural colorants from *Monascus anka* U-1. **Heterocycles**. 34(11): 2057-2060.

Lalithakumari, D. 2000. **Fungal protoplast: a biotechnological tool**. Science Publishers, Inc. India. 184 p.

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 anti-inflammation agent-monascin. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72: 1254–1262.

Lee, Y. L., J. H. Yang and J. L. Mau. 2007. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. **Food Chem.** 106: 1128-1137.

Lian, X., C. Wang and K. Guo. 2007. Identification of new red pigments produced by *Monascus ruber*. **Dyes Pigments**. 73: 121-125.

Liang, T.W., J.J. Lin, Y.H. Yen, C.L. Wang and S.L. Wang. 2006. Purification and characterization of a protease extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. **Enzyme Microb. Tech.** 38: 74-80.

Lin, C. F. 1973. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigment in a submerged culture. **J. Ferment. Technol.** 51: 407-414.

_____. 1975. Studies on the *Monascus* isolated from the starter of kaoliang brandy. **Chin. J. Microbiol.** 8: 52-60.

_____ and H. Iizuka. 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.** 43(3): 671-676.

- Lin, C. F. and S. J. Suen. 1973. Isolation hyperpigment-productive mutants of *Monascus* sp.F-2. **J. Ferment. Technol.** 51(10): 757-759.
- Liu, F., S. Tachibana, T. Taira, M. Ishihara, F. Kato and M. Yasuda. 2004. Purification and characterization of a high molecular mass serine carboxypeptidase from *Monascus pilosus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 31: 572-580.
- Manchand, P.S. and W. B. Whalley. 1973. Isolation and structure of ankaflavin: a new pigment from *Monascus anka*. **Phytochem.** 12 : 2531-2532.
- Maraz, A. and J. Subik. 1981. Transmission and recombination of mitochondrial genes in *Sacharomyces cerevisiae* after protoplast fusion. **Mol. Gen. Genet.** 181: 131-133.
- Meyer, A., M. Heinomen and E. Frankel. 1998. Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chem.** 61: 71-75.
- Mullis, K.B., Faloona, F. A., Scharf, S., Saiki, R. G., Horn, G. and Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Sym.** 51: 263-273.
- Navig, D. O., Jackson, D. A. and Taylor, J. W. 1987. Random fragment hybridization analysis of evolution in the genus *Neurospora*: the status of four-spored strains. **Evolution.** 41: 1003-1021.
- Nakanishi, K., M. Ohashi, S. Kumasaki and Yamamura. 1959. Structure of monascorubrin and monascamine. **J. Am. Chem. Soc.** 81: 6339-6340.

- Nishikawa, J., Y. Watanabe, J. Kashimura, K. Aso and H. Iizuka. 1988. Characterization of extracellular proteinases of the genus *Monascus* by their pH-activity profiles. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 34: 467-473.
- Ogawa, K., H. Ohara and N. Toyama. 1988a. Intraspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* by protoplast fusion. **Agr. Biol. Chem.** 52(2): 337-342.
- _____, H. Ohara and N. Toyama. 1988b. Interspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. **Agr. Biol. Chem.** 52(8): 1985-1991.
- _____, M. Tsuchimochi, K. Taniguchi and S. Nakatsu. 1989. Interspecific hybridization of *Aspergillus usamii* mut. *Shirousamii* and *Aspergillus niger* by protoplast fusion. **Agr. Biol. Chem.** 53(11): 2873-2880.
- _____, N. Yoshida, W. Gesnara, C.A. Omumasaba and C. Chamuswarng. 2000. Hybridization and breeding of the binomyl resistant mutant, *Trichoderma harzianum* antagonized to phytopathogenic fungi by protoplast fusion. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 64(4): 833-836.
- Palo, M. A. L., Vidal-Adeva and M. M. Leticia. 1960. Study on ang-kak and its production. **Philipp. J. Sci.** 89: 1-22.
- Park, H.E., C.H. Kim and K. H. Min. 1991. Isolation of pigment-producing mutants from *Monascus* sp. KS2 and optimization of cultural conditions. **Kor. J. Mycol.** 19(2): 120-127.
- Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414.

- Poulter, R., K. Jeffery, M.J. Hubbard, M.G. Shepherd and P.A. Sullivan. 1981. Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. **J. Bacteriol.** 146(3): 833-840.
- Shimizu, T., H. Kinoshita, S. Ishihara, K. Sakai, S. Nagai and T. Nihira. 2005. Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 71(7): 3453-3457.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A.Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. **Am. J. Enol. Viticult.** 16: 144-158.
- Smith, G. 1969. **Introduction to industrial Mycology.** Edward Arnold Ltd. London.
- Smitha, C. V. R., R. Rao and R. Agrawal. 2003. Enhanced production of verbenol, a highly valued food flavourant, by an intergeneric fusant strain of *Aspergillus niger* and *Penicillium digitatum*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 37: 145-147.
- Su, Y. C. and Huang, J. H. 1980. Fermentative production of anka-pigments (*Monascus* pigments). **Proc. Natl. Sci. Counc. ROC.** 4(2): 201-215.
- Su, Y. C., J. J. Wang, T. T. Lin and T. M. Pan. 2003. Production of the secondary metabolism β -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 30: 41-46.
- _____, W.L. chen and Y.H. Lee. 1973. Studies on the anka pigment product by a mutant of *Monascus anka*. **Memorial Collect of Agriculture.** National Taiwan University. 14: 41-56.

- Suarez, T., M Orejas and A. P. Eslava. 1985. Isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces blakesleeanus* spheroplasts. **Experiment Mycol.** 9: 203-211.
- Sweeny, J. G., M. C. Estrada-Valdes, G. A. Iacobucci, H. Sato and S. Sakamura. 1981. Photoprotection of the red pigment of *Monascus anka* in aqueous media by 1, 4, 6-trihydroxy-naphthalene. **J. Agr. Food. Chem.** 29: 1189-1193.
- Taira, J., C. Miyagi and Y. Aniya. 2002. Dimerumic acid as an antioxidant from mold, *Monascus anka*: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and heme protein-mediated oxidation. **Biochem. Pharmacol.** 63: 1019-1026.
- Turner, W. B. 1971. **Fungal metabolites.** Academic press, London. 466 p.
- Tsai, M. S., T. H. Hseu and M. S. Shen. 1978. Purification and characterization of an acid protease from *Monascus kaoliang*. **Int. J. Peptide Res.** 12(5): 293-302.
- Ushijima, S., T. Nakadai and K. Uchida. 1990. Breeding of new koji-molds through interspecific hybridization between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* by protoplast fusion. **Agr. Biol. Chem.** 54(7): 1667-1676.
- Van de Loo, H. M. 1976. An improved method for the quantitative determination of hexosamine according to Elson and Morgan. **Anal. Biochem.** 76: 556-560.
- Vinson, J.A., Y. Hao and S.K. Zubic. 1998. Food antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **J. Agr. Food Chem.** 46: 3630-3634.
- Von Arx, J. A. 1970. **The genera of fungi sporulating in pure culture.** J. Crammer, Verlag.
- Wang, H., M.G. Nair, G.M. Strasburg, A.M. Booren and J.I. Gray. 1999. Novel antioxidant compounds from tart cherries (*Prunus cerasus*). **J. Nat. Prod.** 62: 86-88.

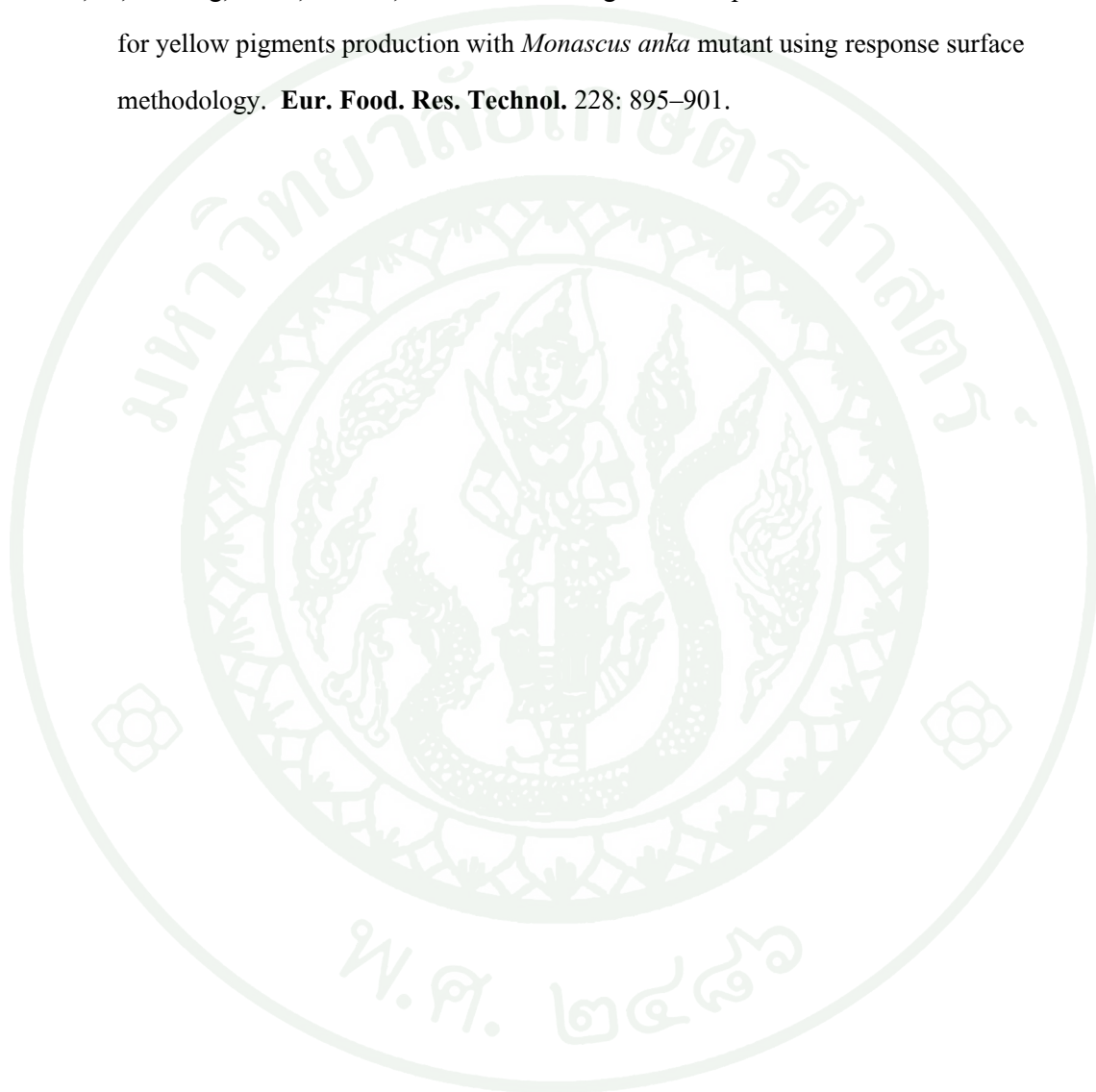
- Wang, J. J., C. L. Lee and T.M. Pan. 2004. Modified mutation for screening low citrinin-producing strains of *Monascus purpureus* on rice culture. **J. Agric. Food Chem.** 52: 6977-6982.
- Wang, S.L., W.J. Hsiao and W.T. Chang. 2002. Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. **J. Agr. Food Chem.** 50: 2249-2255.
- Wasilewski, S. 1979. An attempt to use monascorubrine as sausage colorant. **Eur. Meet. Meat Res. Workers, Proc.**, Vol.25, 12.2:1-2.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** 18: 7213-7218.
- Wilson, J. J., G. G. Khachatourians and W. M. Ingledew. 1982. Protoplast fusion in the yeast, *Schwanniomyces alluvius*. **Mol. Gen. Genet.** 186: 75-100.
- Wong, H. C. 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.
- _____ and P. E. Koehler. 1981. Production and isolation of antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. **J. Food Sci.** 46: 589-592.
- Wong, H. C. 1982. Antibiotic and pigment production by *Monascus purpureus*. Ph.D. Thesis, University of Georgia Athens. Cited by T. F. Lin and A. L. Demain. 1991. Effect of Nutrition of *Monascus* sp. On formation of red pigment. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36: 70-75.

- Wong, H. C., C.A. Hu, H.L. Yeh, W. Su, H.C. Lu and C.F. Lin. 1986. Production, purification and characterization of α -galactosidase from *Monascus pilosus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 52(5): 1147-1152.
- Wong-Leung, Y.L., W.F. Fong and W.L. Lam. 1993. Production of α -galactosidase by *Monascus* grown on soybean and sugarcane wastes. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 9: 529-533.
- Yamanaka, S., E. Shimizu and K. Takinami. 1978. Production and properties of *Monascus* pigment for coloring foodstuff. **Abstracts, 5th Int. Congr. Food Sci. Technol., Kyoto, Japan, Sept. 17-22.** p.238.
- Yang, S., H. Zhang, Y. Li, J. Qian and W. Wang. 2005. The ultrasonic effect on biological characteristics of *Monascus* sp. **Enzyme Microb. Tech.** 37: 139-144.
- Yang J.H., Y.H. Tseng, Y.L. Lee and J.L. Mau. 2005. Antioxidant properties of methanolic extracts from monascus rice. **Food Sci. Technol.** 39: 740-747.
- Yasuda, M., K. Ikehara, S. Tawata, N. Kobamoto and S. Toyama. 1995. Purification and properties of a ribonuclease from a species of the genus *Monascus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 59(2): 327-328.
- 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. **Microbial Utilization of Renewable Resources.** 7: 354-363.
- Yongsmith, B., 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.

- Yongsmith, B., S. Krairak and R. Bavavoda. 1994. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp. **J. Ferment. Bioeng.** 78(3): 223-228.
- _____, V. Kitprechavanich, L. Chitradon, C. Chaisrisook and N. Budda. 2000. Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. **J. Mol. Catal. B: Enzymc.** 10(1-3): 263-272.
- _____, 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. **App. Microbiol. Biotechnol.** 97: 8895–8902.
- Yoon M.R., S.H. Nam and M.Y. Kang. 2008. Antioxidative and antimutagenic activities of 70% ethanolic extracts from four fungal mycelia-fermented specialty rices. **J. Clin. Biochem. Nutr.** 43: 118–125.
- Young, E. M. 1930. Physiological studies in relation to the taxonomy of *Monascus* species. **Trans. Wis. Acad. Sci. Arts and Lett.** 227-244.
- Zhang, Y., S. M. Lin, Y. J. Zhu, C. J. Liu, Y. Dong, F. F. Li, G. F. Wu, H. Y. Wang and J. H. Zhang. 2006. Protoplast fusion between *Geotrichum candidum* and *Phanerochaete chrysosporium* to produce fusants for corn stover fermentation. **Biotechnol. Lett.** 28: 1351-1359.
- Zhao, J. and S.T. Chang. 1996. Intergeneric hybridization between *Pleurotus ostreatus* and *Schizophyllum commune* by PEG-induced protoplast fusion. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 12: 573-578.
- Zhao, J. and S.T. Chang. 1997. Interspecific hybridization between *Volvariella volvacea* and *Volvariella combycina* by PEG-induced protoplast fusion. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 145-151.

Zhi, C., W. Lin, P. Yu and Y. Song. 2007. Enhancement of monacolin K production via intergeneric protoplast fusion between *Aspergillus terreus* and *Monascus anka*. **Prog. Nat. Sci.** 17(6): 703-707.

Zhou, B., J. Wang, Y. Pu, M. Zhu, S. Liu and S. Liang. 2009. Optimization of culture medium for yellow pigments production with *Monascus anka* mutant using response surface methodology. **Eur. Food. Res. Technol.** 228: 895-901.







สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารจะถูกนึ่งภายใต้ความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1. MY (Malt yeast extract) agar

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2. MYS (Malt yeast extract starch) agar (วรรณภา, 2529)

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

3. C-medium (Hiroi *et al.*, 1979)

Sucrose	10.0	กรัม
KH_2PO_4	0.1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05	กรัม
NaNO_3	0.2	กรัม
KCl	0.05	กรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001	กรัม

Yeast extract	0.3	กรัม
Casamino acid	0.5	กรัม
Agar	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4. SS (Starch-soybean flour agar) (วรรณภา, 2529)

แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม
แป้งถั่วเหลือง	40	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
Tween 80	1.33	มิลลิกรัม
Agar	15	กรัม

ปรับ pH ของอาหารให้เป็นกลาง

5. GYP (Glucose yeast extract peptone agar)

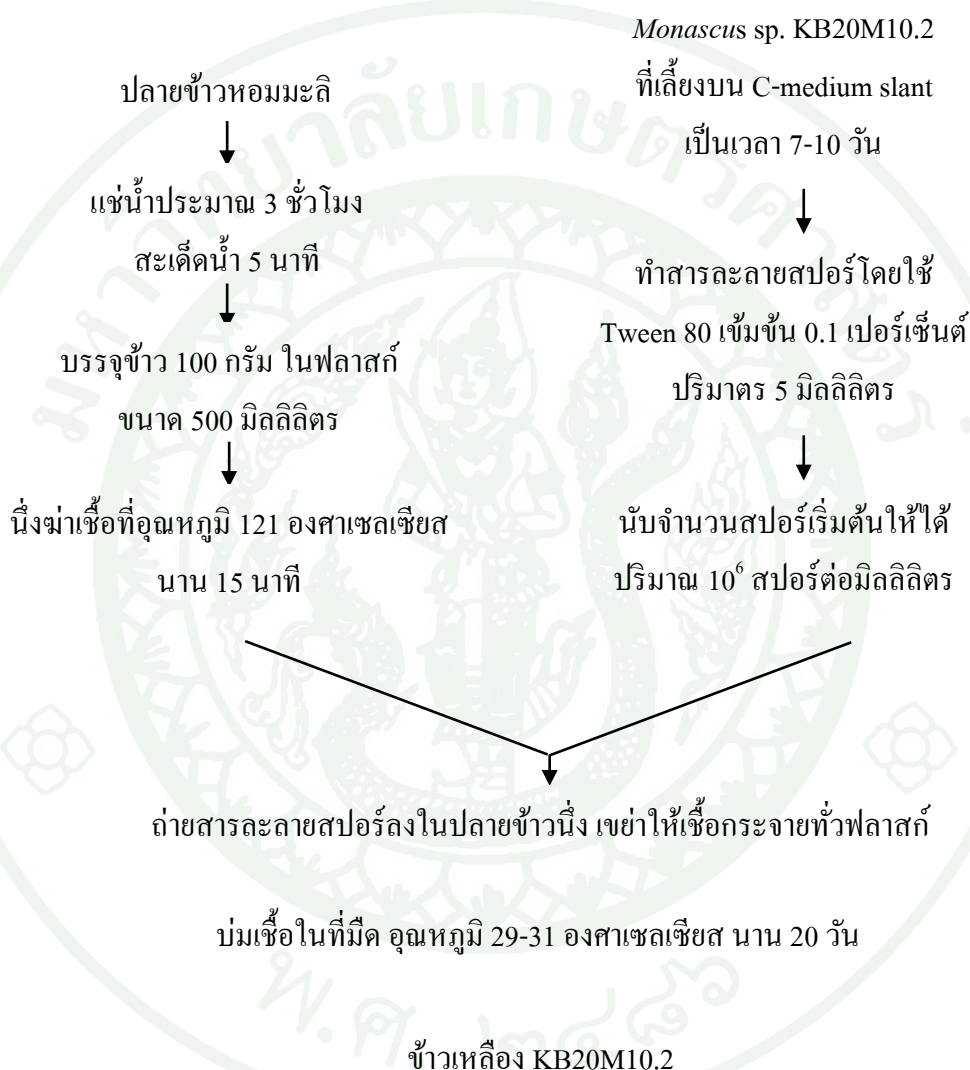
Glucose	40	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

6. PDA (Potato dextrose agar)

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

เตรียมโดยหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที นำมากรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมาเติม dextrose และ agar ผสมให้ละลายเข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

7. การทำข้าวเหลือง (นิสา, 2537)





1. การวิเคราะห์ความสามารถในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase activity) (Nelson, 1944)

1.1 สารเคมี

1.1.1 การเตรียม acetate buffer โดยวิธีของ Walpole (1914) เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการก็จะได้ acetate buffer ที่มี pH ตามที่ต้องการ

Stock solution

สารละลาย A คือ 0.2 M CH_3COOH (11.5 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิกรัม)

สารละลาย B คือ 0.2 M CH_3COONa หรือ $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ โดยละลาย 16.4 กรัม หรือ 27.2 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิกรัม

A (มิลลิกรัม)	B (มิลลิกรัม)	pH	A (มิลลิกรัม)	B (มิลลิกรัม)	pH
46.3	3.7	3.6	20.0	30.0	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			

X มิลลิกรัมของสารละลาย A + Y มิลลิกรัมของสารละลาย B จะทำให้เป็น 100 มิลลิกรัม

ในทางปฏิบัติค่าพีเอชที่ได้อาจคลาดเคลื่อนไปบ้าง จึงต้องวัดพีเอชเพื่อเป็นการตรวจสอบ ถ้าค่าคลาดเคลื่อนให้ปรับพีเอชจนได้ค่าที่ต้องการ 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 และโซเดียมโปแตสเซียมคาร์เตท 40 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล จำนวน 100 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 80 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ทำให้อุ่น เติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ละลายให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนกรองก่อนนำไปใช้

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 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติม $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นลงไป คนให้เข้ากัน เก็บในขวดสีน้ำตาล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนนำไปใช้

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 บรรจุสารละลายแต่ละความเข้มข้นในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำใหเย็นทันที โดยแช่น้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัด O.D. ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่า O.D.

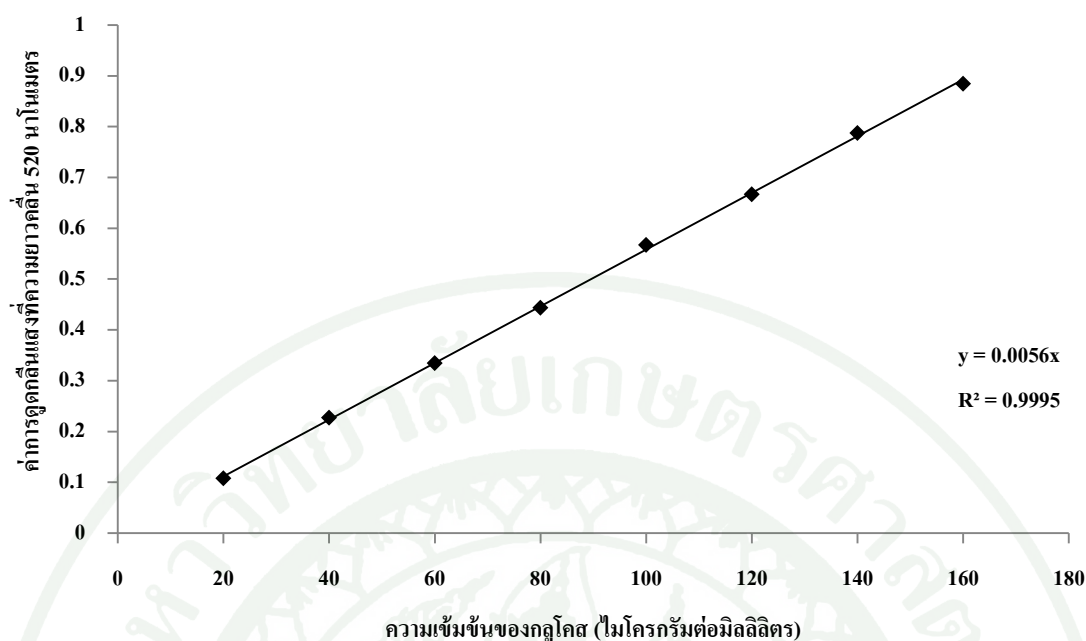
1.2.2 การวิเคราะห์ความสามารถของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา

ใช้ปิเปตดูดสับสเตรต (แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ใน acetate buffer 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 ต้มจนเดือด) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เดิมสารละลาย เอนไซม์ที่เจือจางเหมาะสมแล้วจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม copper reagent ลงไป 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันที โดยแช่น้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัด O.D. ด้วย เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำไปคำนวณน้ำตาลที่เกิดขึ้นใน ตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส จะได้เป็นค่า RS1 อีกส่วนหนึ่งต้มทำลาย ความสามารถของเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาทีก่อน แล้วจึงเติมสับสเตรตในปริมาตรเท่ากัน วัดค่า O.D. แล้วนำไปอ่านค่าในกราฟมาตรฐาน จะได้เป็นค่า RS0

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

1 unit ของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 นาที

ในกรณีที่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส เป็นข้าวหมก จะมีวิธีการสกัดเอนไซม์กลูโคอะมิเลสจากตัวอย่าง คือ ชั่งข้าวปริมาณ 20 กรัม เติม acetate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในถุงพลาสติกใสไม่ เคยผ่านการใช้งานขนาด 8 x 12 นิ้ว นำไปตีปั่นด้วยเครื่องสโม่กเชอร์ (Laboratory blender stomacher 400) เป็นเวลา 10 วินาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 12 ชั่วโมง นำมา กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่ในภาชนะที่วางถาดน้ำแข็งที่เย็นจัด นำส่วนใสที่ได้ไป วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ตามวิธีข้างต้น (ดัดแปลงจากกังสดาลย์, 2538)



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 เปอร์เซ็นต์ ของ acetylacetone ใน 1.25 โมลาร์ Na_2CO_3 ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

2.1.2 Ehrlick's reagent ละลาย para – dimethylaminobenzaldehyde 1.6 กรัม ใน ส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 30 มิลลิลิตร และเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร สามารถเก็บในตู้เย็นได้นาน 2 – 3 วัน

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

2.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์

2.2.1 นำตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาอบแห้ง (หรือถ้าตัวอย่างเป็นของแข็ง นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วมาบดละเอียด ปริมาณ 0.25 กรัม) เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง

2.2.2 กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

2.2.3 ดูดส่วนใส 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 แล้วนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน

2.3 วิธีการวิเคราะห์

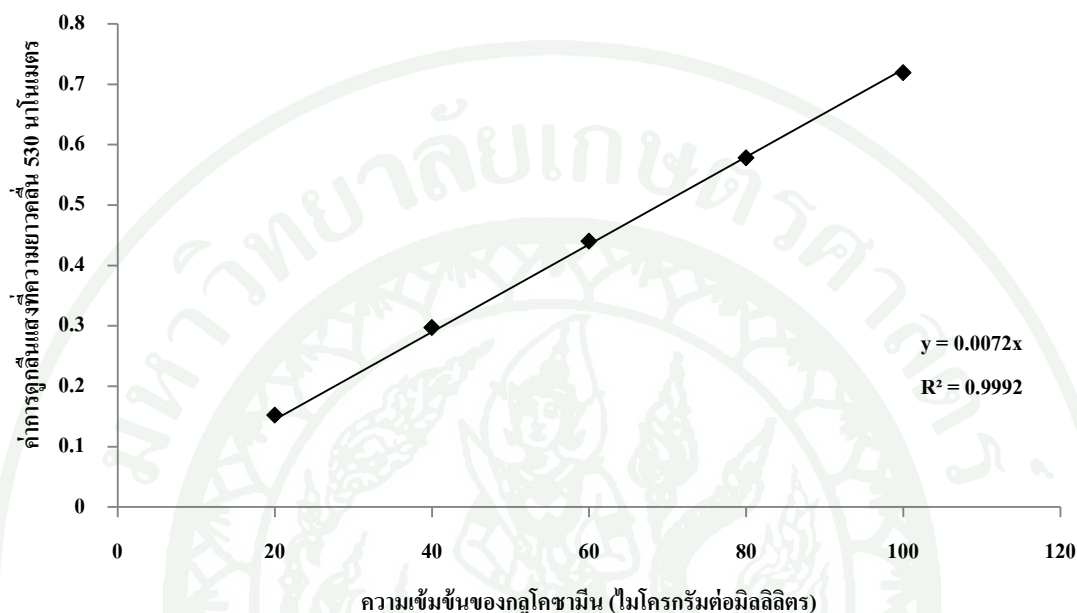
2.3.1 หากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐาน glucosamine hydrochloride ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3.2 ใส่สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ

2.3.3 เติมสารละลาย acetyl acetone 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 20 นาที

2.3.4 เติมเอทานอล เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร

2.3.5 เติมสารละลาย Ehrlich's reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณกลูโคซามีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานของกลูโคซามีน

3. การนับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemocytometer (ตามวิธีของ Townsend and Lindrend, 1953)

3.1 ทำความสะอาดสไลด์และกระจกปิดสไลด์ของ haemocytometer ให้สะอาด วางกระจกปิดสไลด์ให้อยู่ตรงกลางสไลด์ หยดสารละลายสปอร์แต่ละที่ขอบของกระจกปิดสไลด์ให้สารละลายสปอร์แทรกไปอยู่ระหว่างกระจกปิดสไลด์กับสไลด์จนเต็มพอดี

3.2 นำไปนับจำนวนสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับสปอร์ที่อยู่แต่ละช่องใหญ่และที่อยู่ระหว่างขอบของช่องใหญ่ทางด้านล่างและด้านขวา ตามแนวทแยงมุมซ้ายและขวารวม 9 ช่อง

3.3 คำนวณจำนวนสปอร์

ขนาดความลึกของ haemocytometer	=	0.1	มิลลิเมตร
ขนาดของพื้นที่แต่ละช่องใหญ่	=	0.04	ตารางมิลลิเมตร
เพราะฉะนั้น ปริมาตรของแต่ละช่องใหญ่	=	0.0004	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
ดังนั้น จำนวนสปอร์ต่อมิลลิเมตร	=	สปอร์เฉลี่ยที่ได้ $\times 2.5 \times 10^5$	

4. การหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) (นิสา, 2537)

4.1 นำกระเพาะอะลูมิเนียม อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง (desiccator) แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งที่แน่นอนของกระเพาะ

4.2 นำตัวอย่างปริมาณ 100 มิลลิเมตร มากรองด้วยผ้าลินิน 2 ชั้น ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปใส่กระเพาะอะลูมิเนียมที่อบไว้

4.3 นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 98 – 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 – 24 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักโดยอบจนได้น้ำหนักแห้งคงที่

4.4 นำค่าน้ำหนักแห้งของกระเพาะมาหักออกจากน้ำหนักแห้งของกระเพาะ + น้ำหนักของเซลล์แห้ง จะได้ผลเป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์ใน 100 มิลลิเมตร

5. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของข้าว

5.1 นำกระเพาะอะลูมิเนียมอบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักของกระเพาะที่แน่นอน

5.2 นำตัวอย่างข้าวประมาณ 5 กรัม ใส่กระเพาะอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแล้วจากข้อ 5.1

5.3 นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

5.4 นำแกมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

5.5 นำไปอบฆ่าจนได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำค่าน้ำหนักของกระทงอะลูมิเนียมจากข้อ 5.14 มาลบออกจากค่าน้ำหนักที่ได้ จะได้เป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์จากข้าวตัวอย่าง 5 กรัม

ส่วนการหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นนั้นก็ใช้วิธีเดียวกับการหาน้ำหนักแห้ง โดยเมื่อได้น้ำหนักของเซลล์จากข้อ 5.5 แล้ว ก็นำมาคำนวณดังนี้

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

6. การประมาณค่าสีที่ผลิตได้จากเชื้อราโมแนสคัส (ดัดแปลงจากสุภาพร, 2531)

เชื้อราโมแนสคัสที่เลี้ยงในอาหาร SS medium เป็นเวลา 7 วัน นำมา 100 มิลลิลิตร กรองผ่านผ้าลินิน 2 ชั้น ได้ส่วนน้ำสีออกมาเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำสีด้านบนไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนใสซึ่งนำไปวัดค่าสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร ถ้าค่าสีเกิน 0.2 – 0.5ให้นำมาเจือจางด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม แล้วคำนวณกลับโดยคูณกับความเจือจางที่ทำไว้เป็นหน่วยของสีต่อมิลลิลิตร

ส่วนการสกัดและวัดสีจากตัวอย่างข้าว ทำโดยนำตัวอย่างข้าวมาบดให้พอข้าวแตก ชั่งมา 1 กรัม ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นหรือเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 39 มิลลิลิตร (เท่ากับทำ dilution 1/40) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุนวนด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายใส่ลงในหลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางด้วยเอทานอล 10 30 50 70 90 หรือ 99.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำไปวัดค่าสีที่ความยาวคลื่น 370 และ 500 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการวัดค่าสีของสีเหลืองและสีแดง ตามลำดับ โดยให้ค่า OD อยู่ในช่วง 0.2 – 0.5 แล้วคำนวณหาค่าสีโดยคูณกับส่วนกลับของจำนวนเท่าของการเจือจาง จะได้หน่วยของค่าสีต่อน้ำหนักเปียก 1 กรัม แล้วจึงเทียบกลับให้เป็นหน่วยของค่าสีต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ต่อไป

7. การวัดพีเอชของตัวอย่างข้าว

นำตัวอย่างข้าวที่ต้องการวัดพีเอชมาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 ผสมให้เข้ากันแล้ว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วผสมให้เข้ากันอีกครั้งก่อนนำไปวัดพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช

8. การเตรียมสารสกัดข้าวหมักจากเชื้อราโมแนสคัสและการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

นำตัวอย่างข้าวเหลืองไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และบดให้ละเอียด การสกัดข้าวเหลืองทำได้โดยชั่งข้าวหมักที่ผ่านการอบแห้งและบดแล้ว 1 กรัม เติมน้ำ deionised นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 4 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลองต่อไป

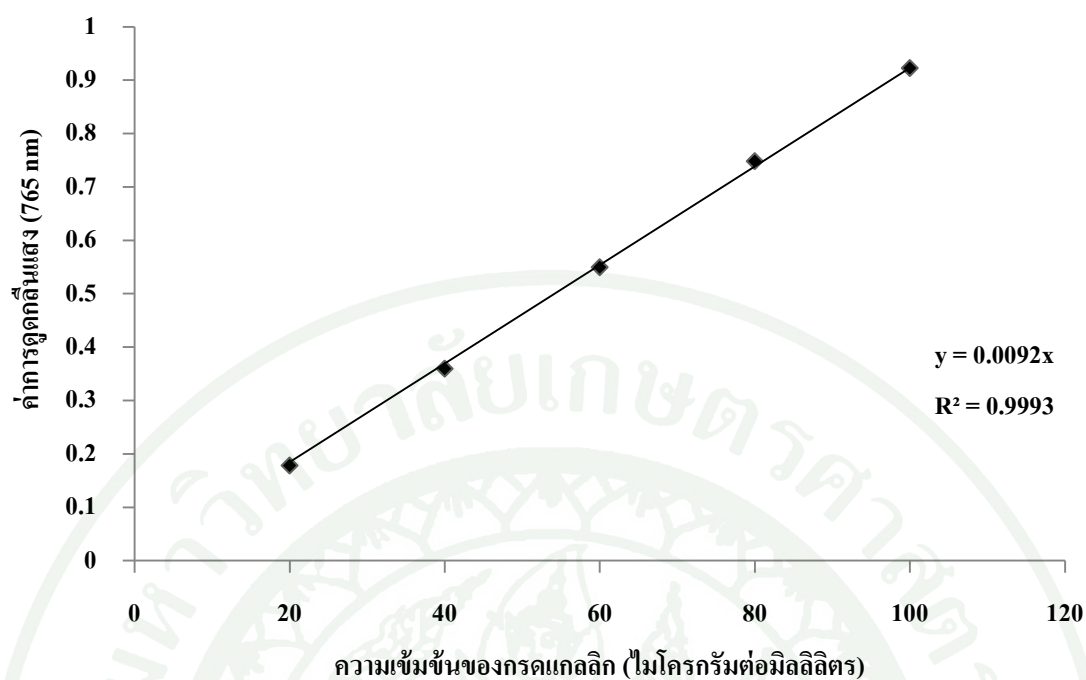
8.1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สาร DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals) (Chang *et al.*, 2001)

ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ 0.3 มิลลิลิตร และสารสกัดหรือน้ำ (control) 0.15 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 500 ppm) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงเปรียบเทียบกับ control ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ค่าการดูดกลืนแสงลดลง} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ } control - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ } control} \times 100$$

8.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Singleton and Rossi, 1965)

ผสมสารสกัด 0.05 มิลลิลิตร folin reagent 0.25 มิลลิลิตร โซเดียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์ 0.25 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารละลายมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

9. วิเคราะห์ปริมาณโมนาโคลิน เค (Ganrong *et al.*, 2003)

9.1 ชั่งข้าวแดงบดละเอียด 0.5 กรัม ละลายในเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

9.2 บ่มใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

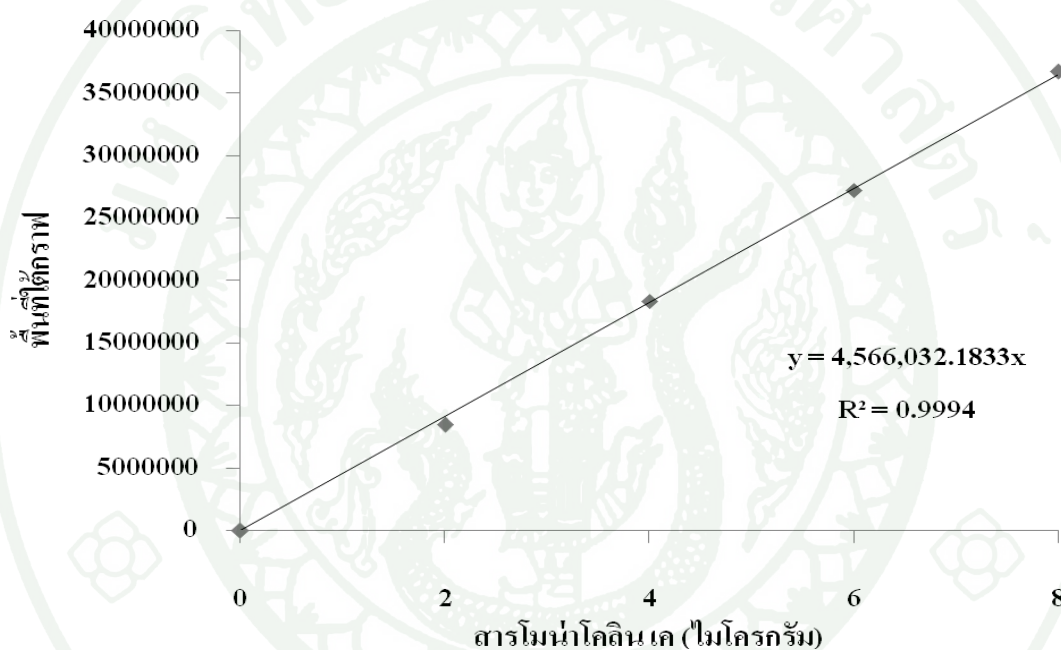
9.3 นำมากรองผ่านเยื่อเมมเบรน 0.22 ไมโครเมตร

9.4 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

9.5 Monacolin K (Sigma) ละลายใน เอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน

9.6 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

ใช้เครื่อง HPLC ที่ประกอบด้วย SHIMADZU LC-10AT VP LIQUID - CHROMATOGRAPH, FCV-10AL VP pump, LCD Analytical spectroMonitor 3100 detector set at 238 นาโนเมตร และ LDC Analytical CI-4100 integrator. Chromatography columns Pursuit C18, 5 ไมโครเมตร, 250×4.6 มิลลิเมตร ต่อกับ guard column (MetaGuard Pursuit 4.6 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร C18) และปริมาณฉีด 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ใช้ acetonitrile : water อัตราส่วน 65: 35 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อัตราการไหล เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส



ภาพผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐานของสารโมโนโคลิน เค

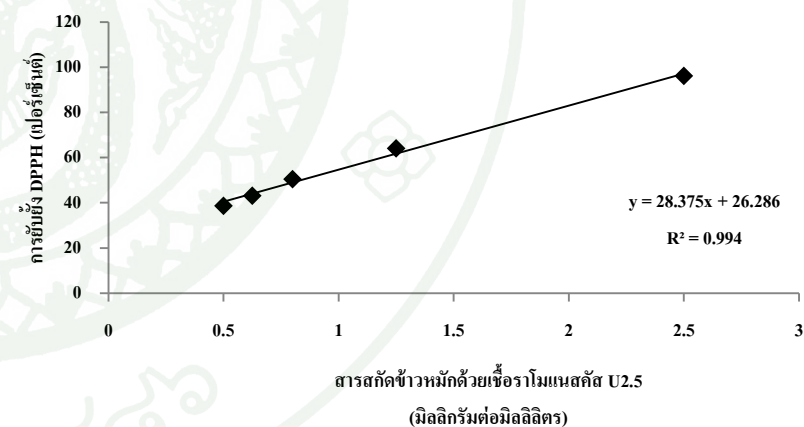
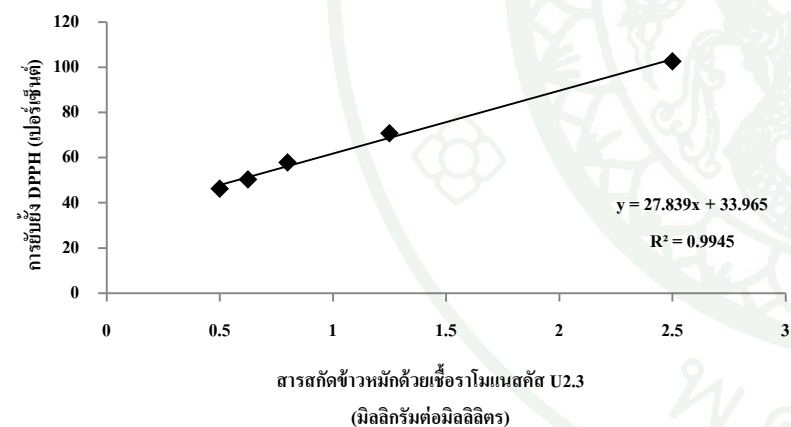
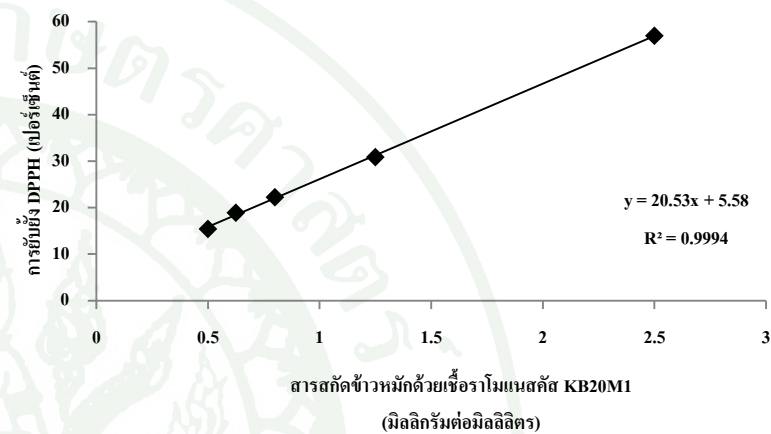
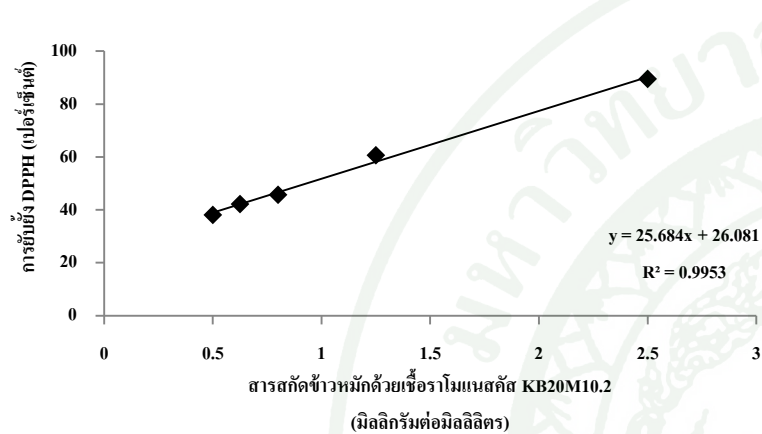


ตารางผนวกที่ ค1 ขนาดโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.2
 มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โปรีโตพลาสติกมิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์
 ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น MY ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ และบ่มที่
 อุณหภูมิห้อง (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

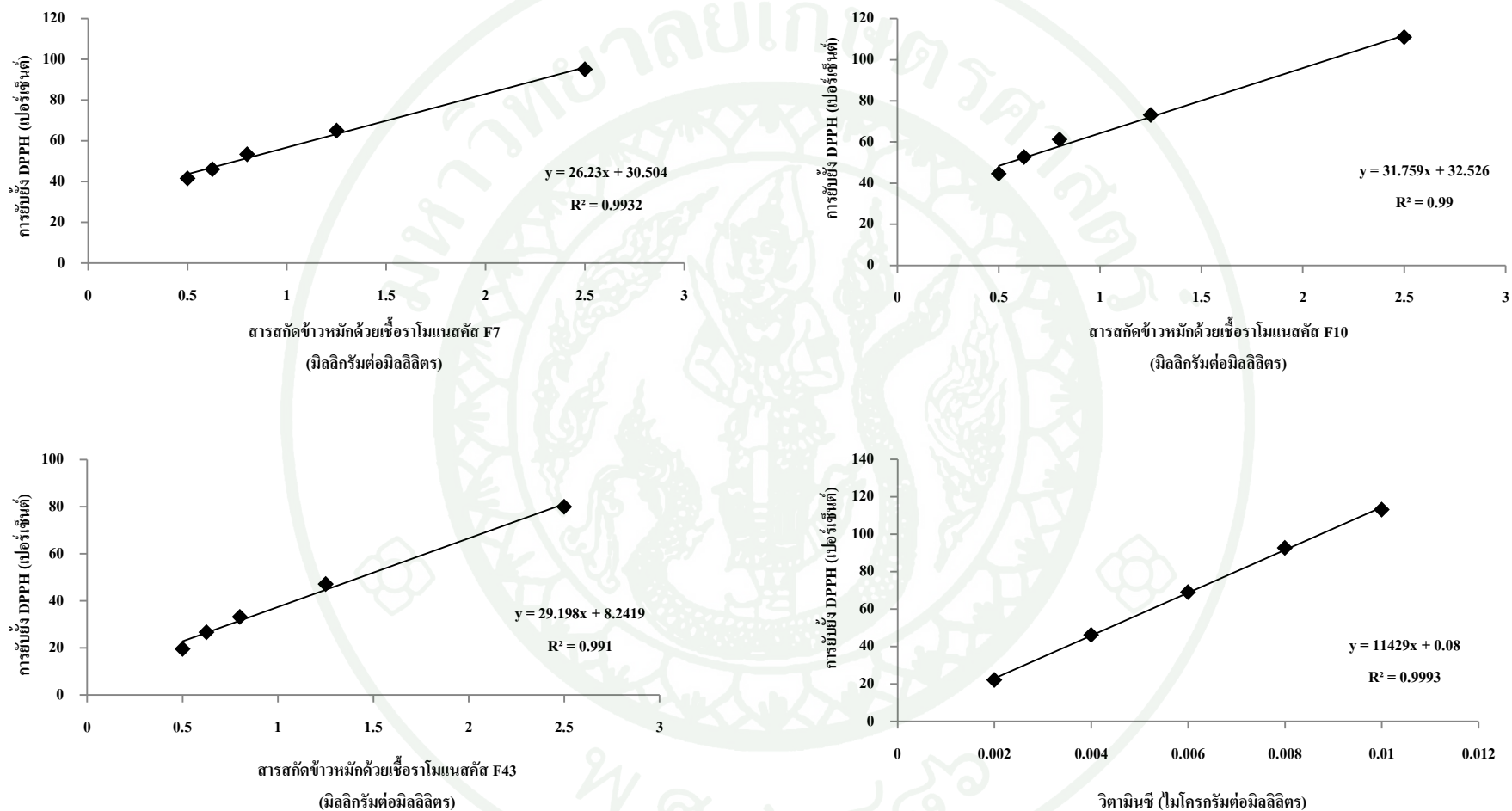
เชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ต่างๆ	ขนาดโคโลนี (มิลลิเมตร)				
	control	2%NaCl	4%NaCl	6%NaCl	8%NaCl
KB20M10.2	50.55	30.20	14.45	12.10	0
KB20M1	56.85	34.15	24.85	18.05	0
U2.3	44.95	30.60	18.45	6.50	0
U2.5	48.00	24.85	20.00	5.05	0
F7	56.65	44.05	35.20	19.60	0
F10	52.00	36.25	26.55	0.00	0
F19	52.40	39.75	38.55	15.70	0
F20	56.80	38.45	32.05	15.95	0
F21	63.75	35.85	21.25	0.00	0
F26	46.25	29.05	25.95	14.00	0
F27	51.35	33.20	22.2	19.35	0
F31	45.90	29.95	27.00	0.00	0
F35	49.60	23.65	22.25	7.50	0
F36	56.10	40.30	32.05	14.10	0
F38	48.20	32.80	30.80	15.75	0
F39	47.60	31.40	29.50	14.05	0
F41	47.65	28.20	22.25	15.30	0
F43	42.45	22.15	14.35	5.75	0
F45	52.95	25.85	21.70	5.35	0
F47	53.75	28.40	25.70	17.15	0

ตารางผนวกที่ ค2 ขนาดโคโลนีของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์มิวแตนต์สีเหลืองรหัส KB20M10.
 มิวแตนต์สีขาวรหัส KB20M1 โพรโตพลาสต์มิวแตนต์และฟิวแซนท์สายพันธุ์
 ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น MY ที่เติมเอทานอล และบ่มที่อุณหภูมิห้อง
 (28 - 32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน

เชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ต่างๆ	ขนาดโคโลนี (มิลลิเมตร)				
	control	2%EtOH	4%EtOH	6%EtOH	8%EtOH
KB20M10.2	50.55	47.65	32.70	14.70	0
KB20M1	56.85	49.60	35.15	26.35	8.80
U2.3	44.95	42.70	29.65	11.60	0
U2.5	48.00	37.05	27.10	13.45	0
F7	56.65	55.20	40.50	16.80	0
F10	52.00	50.05	38.00	17.75	0
F19	52.40	51.20	38.95	15.60	0
F20	56.80	50.55	39.95	16.55	6.95
F21	63.75	42.10	22.90	11.45	0
F26	46.25	36.15	26.70	14.90	0
F27	51.35	50.70	42.75	17.05	0
F31	45.90	39.20	22.10	11.95	0
F35	49.60	48.50	44.05	18.45	0
F36	56.10	48.20	35.05	11.90	0
F38	48.20	44.65	32.85	12.45	0
F39	47.60	44.60	33.10	12.95	0
F41	47.65	44.70	26.90	15.75	0
F43	42.45	40.70	25.35	14.60	0
F45	52.95	47.15	30.80	15.55	0
F47	53.75	46.65	31.25	18.50	6.30



ภาพผนวกที่ ค1 ความสามารถในการยับยั้ง DPPH ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ



ภาพผนวกที่ ค2 ความสามารถในการยับยั้ง DPPH ของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ และวิตามินซี

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวพานิดา ทองประดิษฐ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	17 ธันวาคม 2530
สถานที่เกิด	เขตสายไหม จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
ตำแหน่งปัจจุบัน	Territory Manager
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท เอ็กโคแลบ จำกัด
การนำเสนอผลงาน	การประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 21-23 ธันวาคม 2555 เสนอเรื่อง การผลิตข้าวน้ำตาลทองจากปลายข้าวหมักด้วยเชื้อราสร้างสารสีเหลือง หน้า 579-582.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยระดับปริญญาโท โดยการสนับสนุนจากศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน ภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยแห่งชาติ