บทที่ 3 วัฤดิบและวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อราและการเก็บรักษา

เชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3541 ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เก็บไว้ที่ 4 °C บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ถ่ายเชื้อทุก 1 เดือน

3.2 การผลิตข้าวแดง

งานวิจัยนี้ใช้ข้าวพันธุ์เสาไห้เป็นอาหารแข็งสำหรับหมักรา *M. purpureus* โดยขั้นตอนการผลิตข้าวแดง (Johns และ Stuart, 1991) ได้แก่

1) แช่ข้าวในน้ำกลั่นปริมาณมากเกินพอ นาน 1 ช.ม.
2) เทน้ำออก แล้วชั่งข้าวใส่ภาชนะ
3) เติมน้ำกลั่นในข้าวเพื่อปรับความชื้นของข้าวให้ได้ตามต้องการ
4) นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที
5) ทิ้งให้เย็น ใส่หัวเชื้อข้าวแดง ในอัตราส่วน 3% (w/w)
6) บ่มที่ 30 °C นาน 15 วัน
7) อบแห้งที่ 50 °C นาน 24 ช.ม.
8) ร่อนผ่านตะแกรง 80 mesh

หมายเหตุ วิธีการเตรียมหัวเชื้อข้าวแดง (Seed culture)

หัวเชื้อข้าวแดงเตรียมโดยเติมสารละลายสปอร์ที่ความเข้มข้นประมาณ 2×10^7 spores/ml ปริมาณ 5% (v/w) ลงในข้าว 50 g ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงเชื้อที่ 30 °C นาน 7 วัน จากนั้นบดหยาบและเก็บรักษาที่ 4 °C นานประมาณ 1-2 เดือน

3.3 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรินินจาก *M. purpureus* ด้วยวิธี Fraction factorial design (FFD)

ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรินิน ของ *M. purpureus* ด้วยวิธี Fractional factorial design โดยคัดเลือกปัจจัยทั้งจากสภาวะแวดล้อมและแหล่งอาหาร ซึ่งปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมที่คาดว่าเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรินิน ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และระยะเวลาการหมัก ปัจจัยทางแหล่งอาหารประกอบด้วย แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน และกรดไขมันได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เปปโทน โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) เมไทโอนีน กลูโคส เอทานอล กลีเซอรอล กรดออกทาโนอิก และกรดโดเดคคาโนอิก ดังนั้นตัวแปรอิสระทั้งหมดมี 13 ตัวแปร โดยตัวแปรอิสระจะถูกเข้ารหัสให้อยู่ในช่วงระดับสูง (1) และระดับต่ำ (-1) ดังนั้นตัวแปรที่ถูกเข้ารหัสจะมีค่าดังตารางที่ 1

ใช้แผนการทดลองแบบเศษส่วนเชิงแฟคทอเรียลแบบสองระดับ (Fractional Ffactorial design, FFD) โดยออกแบบการทดลองด้วย Resolution III ด้วย design 1/512 fraction ของเศษส่วนเชิงแฟคทอเรียลแบบสองระดับ ดังนั้นมีจำนวนการทดลองเท่ากับ 16 ชุดการทดลอง (2^{13-9}) และเสริมที่จุดศูนย์กลาง 6 ครั้ง ทำให้ได้ 22 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 2) โดยที่การทดลองที่ 1-16 เป็นการทดลองเชิงแฟคทอเรียลและการทดลองที่ 17-22 แทนด้วยระดับศูนย์ทุกปัจจัยเอาไว้ใช้ในการคำนวณค่าผิดพลาดที่เกิดจากการทดลองและทำให้สามารถตรวจสอบความพอเพียงของแบบจำลองกำลังหนึ่งได้ ทั้งนี้มีดัชนีชี้วัดได้แก่ การเจริญของเชื้อรา (Aidoo และคณะ, 1981) การสังเคราะห์รงควัตถุ (Johns และ Stuart, 1991) ปริมาณโมนาโคลิน เค (Lee และคณะ, 2006) และซิตรินิน (Lee และคณะ, 2006) ทั้งนี้จะคัดเลือกปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรินินที่มีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าหรือเท่ากับ 95% มาทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวผลตอบ (Response Surface Methodology, RSM) แบบ Central composite design (CCD)

ตารางที่1 ความเข้มข้นของแต่ละตัวแปรที่ระดับต่างๆ ใน Fractional factorial design สำหรับการผลิตรงควัตถุ สารโมนาโคลิน เค และการลดปริมาณซิตรินินด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง

Variable	Variable code	Level		
		-1	0	+1
Monosodium glutamate (MSG) (%w/w)	X_1	0.1	0.4	0.7
Ammonium chloride (NH_4Cl) (%)	X_2	0.1	0.3	0.5
Peptone (%)	X_3	0.1	0.55	1.0
Sodium nitrate ($NaNO_3$) (%)	X_4	0.01	0.155	0.3
Methionine (%)	X_5	0.01	0.255	0.5
Ethanol (%)	X_6	0.1	0.4	0.7
Glucose (%)	X_7	0.1	1.05	2.0
Glycerol (%v/w)	X_8	0.5	2.25	4.0
Octanoic acid (%)	X_9	0	0.25	0.5
Dodecanoic acid (%)	X_{10}	0	0.25	0.5
Temperature (°C)	X_{11}	25	30	35
Moisture content (%)	X_{12}	35	40	45
Cultivation time (days)	X_{13}	10	13	16

ตารางที่2 Fractional factorial design matrix สำหรับการประเมินปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตรงควัตถุ สารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรินินของ *M. purpureus*

	Components												
Run	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}	X_{13}
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
2	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
3	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
4	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
5	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
6	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
8	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
9	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
11	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
12	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
13	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
14	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

เมื่อ $X_1,\ldots,X_{13}$ คือ independent variable

3.4 การศึกษาเพื่อหาเหมาะสมในการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรินิน ด้วยวิธี Response surfaces method (RSM)

นำปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรินิน 5 ปัจจัย คือ $NaNO_3$ เมไทโอนีน กลีเซอรอล อุณหภูมิและระยะเวลาการหมัก มาศึกษาหาเหมาะสมในการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรินิน ด้วยวิธี Response surfaces method แบบ Central composite design (CCD) แต่ละตัวแปรถูกศึกษาที่ 5 ระดับ (ตารางที่ 3) โดยมีจำนวนชุดการทดลอง 32 การทดลอง (ตารางที่ 4)

ทั้งนี้มีดัชนีชี้วัดการเจริญของเชื้อราเป็นปริมาณชีวมวล (Glucosamine) (Aidoo และ คณะ, 1981) อีกทั้งวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสี (Pigments concentration) (Johns และ Stuart, 1991) ปริมาณโมนาโคลิน เค (Monacolin K concentration) (Lee และคณะ, 2006) และความเข้มข้นของซิตรินิน (Citrinin concentration) (Lee และคณะ, 2006) ตามลำดับ

ตารางที่3 ความเข้มข้นตัวแปรตามแผนการทดลอง Central composite design สำหรับการผลิตรงควัตถุ สารโมนาโคลิน เค และการลดปริมาณซิตรินิน

Variable	Symbol of variable	Level of variable				
		-2	-1	0	1	2
Sodium nitrate (% w/w)	X_4	0	0.12	0.24	0.36	0.48
Methionine (% w/w)	X_5	0	0.07	0.14	0.21	0.28
Glycerol (% w/w)	X_8	0	1	2	3	4
Temperature ($^{\circ}$C)	X_{11}	22	25	28	31	34
Cultivation time (days)	X_{13}	10	13	16	19	22

ตารางที่4 Central composite design matrix สำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุ สารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรินินของ *M. purpureus*

No.	ระยะเวลาการหมัก (days)	กลีเซอรอล (%)	อุณหภูมิ (^{o}C)	เมไทโอนีน (%)	NaNO3 (%)
1	13	1	25	0.12	0.21
2	19	1	25	0.12	0.07
3	13	3	25	0.12	0.07
4	19	3	25	0.12	0.21
5	13	1	31	0.12	0.07
6	19	1	31	0.12	0.21
7	13	3	31	0.12	0.21
8	19	3	31	0.12	0.07
9	13	1	25	0.36	0.07
10	19	1	25	0.36	0.21
11	13	3	25	0.36	0.21
12	19	3	25	0.36	0.07
13	13	1	31	0.36	0.21
14	19	1	31	0.36	0.07
15	13	3	31	0.36	0.07
16	19	3	31	0.36	0.21
17	10	2	28	0.24	0.14
18	22	2	28	0.24	0.14
19	16	0	28	0.24	0.14
20	16	4	28	0.24	0.14
21	16	2	22	0.24	0.14
22	16	2	34	0.24	0.14
23	16	2	28	0	0.14
24	16	2	28	0.48	0.14
25	16	2	28	0.24	0
26	16	2	28	0.24	0.28
27	16	2	28	0.24	0.14
28	16	2	28	0.24	0.14
29	16	2	28	0.24	0.14
30	16	2	28	0.24	0.14
31	16	2	28	0.24	0.14
32	16	2	28	0.24	0.14

3.5 การศึกษาการผลิตข้าวแดงตาม Optimization method ในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 L

การทดลองนี้จะฆ่าเชื้อข้าวด้วย Autoclave และฆ่าเชื้อถังเปล่านาน 3 ช.ม. โดยทำการทดลองดังนี้

1) แช่ข้าว 5 kg ในน้ำให้มากเกินพอ นานประมาณ 1 ช.ม.

2) เทน้ำทิ้ง แล้วชั่งข้าวใส่ถุง ถุงละ 100 g

3) เติม Optimization nutrients broth ซึ่งประกอบด้วย กลีเซอรอล 2% (v/w), โซเดียมไนเตรท 0.01% (w/w), เมไทโอนีน 0.14% (w/w) ปริมาณ 28 ml ลงในข้าว 100 g

4) ฆ่าเชื้อข้าวที่ 121 °C นาน 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็น

5) จากนั้นเติม Red Koji 3% (w/w) ลงในข้าว และคลุกให้เข้ากัน

6) ภายหลังจากฆ่าเชื้อถังหมัก เทข้าวแดงที่เตรียมไว้แล้วลงในถัง โดยเลี้ยงที่ 25-30 °C หมุนถังที่ความเร็วรอบ 0.2 รอบต่อนาที (rpm) และให้ความเร็วอากาศขาเข้าประมาณ 0.1-2 m/s

7) ตัวอย่างจะถูกสุ่มเก็บทุกวันระหว่างการหมัก เพื่อวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 1995), ความเป็นกรด-ด่าง (Johns และ Stuart, 1991), ปริมาณชีวมวล (Aidoo และ คณะ, 1981) การสังเคราะห์รงควัตถุ (Johns และ Stuart, 1991) ปริมาณโมนาโคลิน เค (Lee และคณะ, 2006) และซิตรินิน (Lee และคณะ, 2006)

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบเศษส่วนเชิงแฟคทอเรียลแบบสองระดับ และแผนการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Minitab version 16