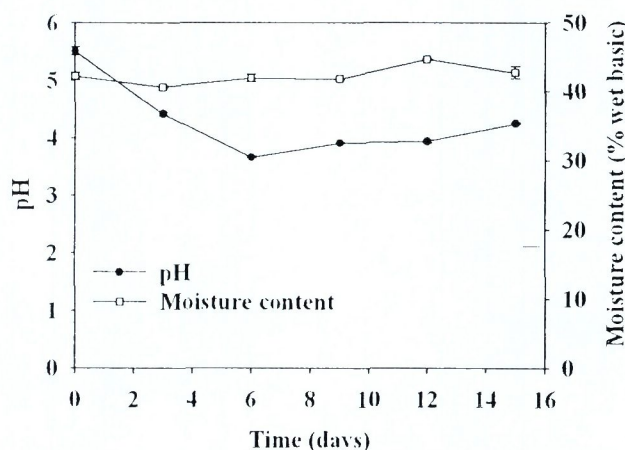


บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิจาก *M. purpureus* ในข้าวแดง ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม (Basal medium)

การทดลองนี้ได้ทำการเลี้ยงรา *M. purpureus* TISTR 3541 ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม (Basal medium) โดยไม่มีการเติมสารอาหารใดๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการเลี้ยงที่ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 40% ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 15 วัน จากการทดลอง พบว่าข้าวแดงมีความชื้นอยู่ระหว่าง 41-45% (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุจากราตระกูล *Monascus* (Yongsmith และคณะ, 2000; Carvalho และคณะ, 2003)

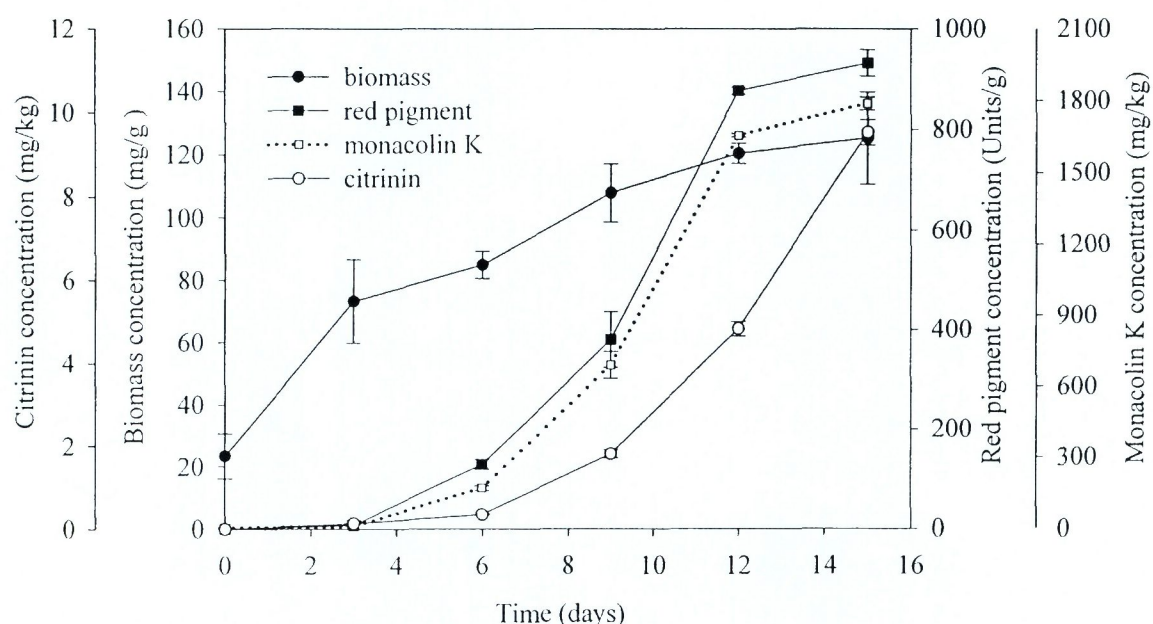
เมื่อพิจารณาผลของความเป็นกรด-ด่าง พบว่าข้าวแดงมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงในระหว่างการหมักตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 6 และเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนมีค่าสุดท้ายเท่ากับ 4.25 (รูปที่ 3) ทั้งนี้การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงแรกของการหมัก เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของกรดออร์แกนิก ซึ่งสังเคราะห์จาก Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) ขณะที่การเพิ่มขึ้นของค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงหลังการหมัก เป็นผลจากแอมโมเนีย ซึ่งผลิตจากกระบวนการ Deamination (Deacon, 2006)



รูปที่ 3 ความชื้นและความเป็นกรด-ด่างของข้าวแดงในระหว่างการหมัก

ผลของปริมาณชีวมวล และสารทุติยภูมิ ได้แก่โมนาโคลิน เค ซิตรีนิน และรงควัตถุ แสดงดังรูปที่ 4 โดยรา *Monascus* มีปริมาณชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 122.56 mg biomass/g substrate dry weight ที่เวลาการหมักนาน 15 วัน และมีปริมาณโมนาโคลิน เค และรงควัตถุ ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง เท่ากับ 1800 mg/kg sdw, 1100, 700 and 900 OD units/g sdw ตามลำดับ อย่างไรก็ตามข้าวแดงมีปริมาณซิตรีนินสูงถึง 9.53 mg/kg sdw ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ข้าวแดงที่ผลิตตามวิธีการแบบดั้งเดิมมีปริมาณโมนาโคลิน เค และรงควัตถุต่ำ ขณะที่ปริมาณซิตรีนินสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องปรับปรุงคุณภาพของข้าวแดง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการลดปริมาณซิตรีนิน เพื่อให้ข้าวแดงปลอดภัยต่อการบริโภค โดยขั้นตอนแรกของงานวิจัยคือ การหาปัจจัยสำคัญจากปัจจัยทาง

กายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค เรงควัตถุและซิตรีนินของ *M. purpureus* ด้วยวิธี Fractional-factorial design



รูปที่ 4 ปริมาณชีวมวล โมนาโคลิน เค ซิตรีนิน และรงควัตถุสีแดง จาก *M. purpureus* ด้วยวิธีการหมักแบบดั้งเดิม

4.2 ผลการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรีนินจาก *M. purpureus* ด้วยวิธี Fraction factorial design (FFD)

เพื่อศึกษาปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีที่ส่งผลต่อการผลิตรงควัตถุและสาร โมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรีนินอย่างมีนัยสำคัญ จึงได้ทำการกรองปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรงควัตถุและสาร โมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรีนินจาก *M. purpureus* โดยใช้แผนการทดลองแบบ FFD ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 ซึ่งจากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และการประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการเจริญของ *Monascus* และการผลิตรงควัตถุ สาร โมนาโคลิน เค และสารซิตรีนิน แสดงดังตารางที่ 7 ถึง 12

จากตารางที่ 7 พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *Monascus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.5$) คือ อุณหภูมิ ความชื้น และระยะเวลาการหมัก ด้วยผลเชิงบวกต่อการเจริญ จากตารางที่ 8 พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารโมนาโคลิน เค อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ NaNO_3 เมไทโอนีน กลีเซอรอล อุณหภูมิ และระยะเวลาการหมัก ขณะที่ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารซิตรีนินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ระยะเวลาการหมัก (ตารางที่ 9) จากตารางที่ 10 พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรงควัตถุสีแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ NaNO_3 กลีเซอรอล และระยะเวลาการหมัก ขณะที่ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรงควัตถุสีส้มและสีเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ NaNO_3 เมไทโอนีน กลีเซอรอล และระยะเวลาการหมัก (ตารางที่ 11 และ 12) ทั้งนี้ NaNO_3 เมไทโอนีน กลีเซอรอล และอุณหภูมิ ให้ผลเชิงลบ ขณะที่ระยะเวลาการหมักให้ผลเชิงบวกต่อการผลิตโมนาโคลิน เค เรงควัตถุ และซิตรีนิน ดังนั้นปัจจัยสำคัญ อันได้แก่ NaNO_3 เมไทโอนีน กลีเซอรอล อุณหภูมิ และระยะเวลา

การหมัก จะถูกนำไปศึกษาหาค่าที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการผลิตโมนาโคลิน เค รงควัตถุ และลดปริมาณซิ
ตรินิน โดยใช้ Response surface method แบบ Central composite design

ตารางที่ 5 ผลปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารโมนาโคลิน เค และซิตรินิน
ตามการทดลอง FFD

Trial No.	Response ($\pm$ Standard deviation)		
	Biomass	Monacolin K	Citrinin
	(mg/g substrate dry weight)	(mg/kg substrate dry weight)	(μ g/kg substrate dry weight)
1	501.01 $\pm$ 57.39	930.58 $\pm$ 8.33	65.29 $\pm$ 24.82
2	397.23 $\pm$ 21.40	1129.09 $\pm$ 65.78	169.88 $\pm$ 35.61
3	411.70 $\pm$ 37.76	192.84 $\pm$ 8.96	19.75 $\pm$ 16.22
4	215.06 $\pm$ 8.94	141.42 $\pm$ 7.29	9.64 $\pm$ 1.32
5	381.61 $\pm$ 75.65	145.34 $\pm$ 3.74	17.05 $\pm$ 0.41
6	412.06 $\pm$ 12.75	47.21 $\pm$ 5.48	7.50 $\pm$ 2.84
7	388.86 $\pm$ 10.93	1286.98 $\pm$ 85.38	1192.98 $\pm$ 84.62
8	429.37 $\pm$ 11.09	53.69 $\pm$ 4.28	20.79 $\pm$ 1.70
9	504.72 $\pm$ 12.03	201.19 $\pm$ 1.89	39.46 $\pm$ 22.51
10	413.31 $\pm$ 35.81	128.87 $\pm$ 3.81	25.85 $\pm$ 10.97
11	412.147 $\pm$ 15.76	37.64 $\pm$ 3.55	14.18 $\pm$ 5.20
12	396.94 $\pm$ 14.98	745.12 $\pm$ 42.64	37.71 $\pm$ 9.06
13	191.11 $\pm$ 21.98	17.96 $\pm$ 2.22	10.31 $\pm$ 0.94
14	538.76 $\pm$ 27.33	146.73 $\pm$ 3.07	8.14 $\pm$ 0.08
15	270.29 $\pm$ 23.74	547.21 $\pm$ 10.66	80.00 $\pm$ 3.28
16	537.87 $\pm$ 9.12	72.45 $\pm$ 3.73	77.70 $\pm$ 37.69
17	582.08 $\pm$ 26.44	91.24 $\pm$ 0.06	245.32 $\pm$ 24.17
18	541.00 $\pm$ 32.61	144.15 $\pm$ 7.02	357.21 $\pm$ 59.79
19	620.64 $\pm$ 28.87	280.62 $\pm$ 10.59	269.66 $\pm$ 28.99
20	572.85 $\pm$ 5.26	365.59 $\pm$ 11.41	487.39 $\pm$ 104.08
21	561.13 $\pm$ 34.81	315.85 $\pm$ 0.84	260.29 $\pm$ 27.63
22	538.85 $\pm$ 11.01	425.21 $\pm$ 22.83	253.63 $\pm$ 40.88

ตารางที่ 6 ผลปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีต่อการผลิตรงควัตถุ ตามการทดลอง FFD

Trial No.	Response ($\pm$ Standard deviation)		
	Yellow pigment	Orange pigment	Red pigment
	(units/g substrate dry weight)	(units/g substrate dry weight)	(units/g substrate dry weight)
1	690.82 $\pm$ 13.18	311.73 $\pm$ 3.75	421.01 $\pm$ 6.66
2	523.14 $\pm$ 9.82	321.81 $\pm$ 3.74	471.41 $\pm$ 4.54
3	160.24 $\pm$ 1.75	72.58 $\pm$ 0.79	95.49 $\pm$ 0.60
4	58.37 $\pm$ 0.45	28.60 $\pm$ 0.13	36.50 $\pm$ 0.14
5	74.35 $\pm$ 0.56	44.96 $\pm$ 0.18	65.72 $\pm$ 0.19
6	74.59 $\pm$ 0.54	41.35 $\pm$ 0.21	58.47 $\pm$ 0.63
7	483.97 $\pm$ 0.86	294.20 $\pm$ 2.82	392.21 $\pm$ 4.34
8	130.38 $\pm$ 0.61	76.40 $\pm$ 0.64	108.58 $\pm$ 0.97
9	236.44 $\pm$ 6.63	123.09 $\pm$ 3.91	171.23 $\pm$ 5.02
10	75.46 $\pm$ 0.83	50.48 $\pm$ 0.84	73.46 $\pm$ 0.76
11	58.03 $\pm$ 0.41	30.34 $\pm$ 0.36	38.95 $\pm$ 0.74
12	280.04 $\pm$ 0.59	130.57 $\pm$ 0.86	168.98 $\pm$ 1.59
13	10.34 $\pm$ 0.10	5.25 $\pm$ 0.08	6.85 $\pm$ 0.18
14	173.15 $\pm$ 1.75	102.17 $\pm$ 1.62	138.82 $\pm$ 1.65
15	233.18 $\pm$ 5.32	125.50 $\pm$ 3.27	169.13 $\pm$ 4.50
16	165.87 $\pm$ 8.47	85.80 $\pm$ 5.83	116.12 $\pm$ 10.35
17	366.43 $\pm$ 11.85	254.08 $\pm$ 4.97	359.45 $\pm$ 11.37
18	293.64 $\pm$ 10.01	201.09 $\pm$ 6.87	292.45 $\pm$ 9.59
19	280.70 $\pm$ 0.84	167.05 $\pm$ 0.55	239.20 $\pm$ 1.20
20	312.43 $\pm$ 3.17	169.63 $\pm$ 1.75	235.65 $\pm$ 1.81
21	296.78 $\pm$ 3.40	184.75 $\pm$ 1.97	264.52 $\pm$ 3.81
22	293.87 $\pm$ 2.32	172.22 $\pm$ 1.10	245.36 $\pm$ 1.72

ตารางที่ 7 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการเจริญของ *Monascus* ตาม FFD

Variable	Variable code	Effect (Ex _i)	Coefficient	SE- coefficient	t values	p-level
Constant			400.13	10.48	38.20	0.000
MSG	X ₁	34.89	17.45	10.48	1.67	0.140
Ammonium chloride	X ₂	-34.70	-17.35	10.48	-1.66	0.142
Peptone	X ₃	-12.77	-6.39	10.48	-0.61	0.561
Sodium nitrate	X ₄	16.03	8.02	10.48	0.77	0.469
Methionine	X ₅	-6.67	-3.33	10.48	-0.32	0.760
Ethanol	X ₆	9.87	4.93	10.48	0.47	0.652
Glucose	X ₇	43.81	21.90	10.48	2.09	0.075
Glycerol	X ₈	-13.60	-6.80	10.48	-0.65	0.537
Octanoic acid	X ₉	-32.40	-16.20	10.48	-1.55	0.166
Dodecanoic acid	X ₁₀	-10.83	-5.42	10.48	-0.52	0.621
Temperature	X ₁₁	136.65	68.33	10.48	6.52	0.000
Moisture content	X ₁₂	92.26	46.13	10.48	4.40	0.003
Incubation period	X ₁₃	60.41	30.20	10.48	2.88	0.024
Center point			169.30	20.06	8.44	0.000

ตารางที่ 8 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการผลิตโมนาโคลิน เค ตาม FFD

Variable	Variable code	Effect (Ex_i)	Coefficient	SE- coefficient	<i>t</i> values	<i>p</i> -level
Constant			364.0	46.18	7.88	0.000
MSG	X_1	-111.8	-55.9	46.18	-1.21	0.265
Ammonium chloride	X_2	41.2	20.6	46.18	0.45	0.669
Peptone	X_3	-148.6	-74.3	46.18	-1.61	0.152
Sodium nitrate	X_4	-253.7	-126.8	46.18	-2.75	0.029
Methionine	X_5	-283.7	-141.8	46.18	3.07	0.018
Ethanol	X_6	195.1	97.5	46.18	2.11	0.073
Glucose	X_7	62.3	31.1	46.18	0.67	0.522
Glycerol	X_8	-359.0	-179.5	46.18	-3.89	0.066
Octanoic acid	X_9	-62.2	-31.1	46.18	-0.67	0.522
Dodecanoic acid	X_{10}	-151.0	-75.5	46.18	-1.64	0.146
Temperature	X_{11}	-307.6	-153.8	46.18	-3.33	0.013
Moisture content	X_{12}	184.1	92.0	46.18	1.99	0.086
Incubation period	X_{13}	359.6	179.8	46.18	3.89	0.006
Center point			-93.5	88.43	-1.06	0.325

ตารางที่ 9 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการผลิตซีตรินินตาม FFD

Variable	Variable code	Effect (E_{x_i})	Coefficient	SE- coefficient	<i>t</i> values	<i>p</i> -level
Constant			112.26	35.78	3.14	0.016
MSG	X_1	-135.23	-67.61	35.78	-1.89	0.101
Ammonium chloride	X_2	138.66	69.33	35.78	1.94	0.094
Peptone	X_3	129.09	64.54	35.78	1.80	0.114
Sodium nitrate	X_4	-151.19	-75.60	35.78	-2.11	0.073
Methionine	X_5	-135.65	-67.83	35.78	-1.90	0.100
Ethanol	X_6	164.29	82.15	35.78	2.30	0.055
Glucose	X_7	157.73	78.86	35.78	2.20	0.063
Glycerol	X_8	-155.29	-77.65	35.78	-2.17	0.067
Octanoic acid	X_9	126.33	63.17	35.78	1.77	0.121
Dodecanoic acid	X_{10}	-155.04	-77.52	35.78	-2.17	0.067
Temperature	X_{11}	-161.33	-80.66	35.78	-2.25	0.059
Moisture content	X_{12}	136.59	68.29	35.78	1.91	0.098
Incubation period	X_{13}	193.46	96.73	35.78	2.70	0.030
Center point			199.99	68.52	2.92	0.022

ตารางที่10 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการผลิตรวงควัตดูสีแดงตาม FFD

Variable	Variable code	Effect (Ex _i)	Coefficient	SE- coefficient	<i>t</i> values	<i>p</i> -level
Constant			158.31	17.66	8.96	0.000
MSG	X ₁	-23.53	-11.77	17.66	-0.67	0.527
Ammonium chloride	X ₂	-35.13	-17.56	17.66	-0.99	0.353
Peptone	X ₃	-52.64	-26.32	17.66	-1.49	0.180
Sodium nitrate	X ₄	-95.73	-47.87	17.66	-2.71	0.030
Methionine	X ₅	-72.47	-36.24	17.66	-2.05	0.079
Ethanol	X ₆	53.57	26.79	17.66	1.52	0.173
Glucose	X ₇	41.12	20.56	17.66	1.16	0.283
Glycerol	X ₈	-120.09	-60.04	17.66	-3.40	0.011
Octanoic acid	X ₉	-30.72	-15.36	17.66	-0.87	0.413
Dodecanoic acid	X ₁₀	-42.87	-21.43	17.66	-1.21	0.264
Temperature	X ₁₁	-29.45	14.72	17.66	-0.83	0.432
Moisture content	X ₁₂	51.34	25.67	17.66	1.45	0.189
Incubation period	X ₁₃	164.17	82.09	17.66	4.65	0.002
Center point			114.46	33.82	3.38	0.012

ตารางที่ 11 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการผลิตรวงควัตถุสีส้มตาม FFD

Variable	Variable code	Effect (Ex_i)	Coefficient	SE- coefficient	<i>t</i> values	<i>p</i> -level
			115.30	12.32	9.36	0.000
MSG	X_1	-21.31	-10.65	12.32	-0.87	0.416
Ammonium chloride	X_2	-19.61	-9.80	12.32	-0.80	0.452
Peptone	X_3	-36.70	-18.35	12.32	-1.49	0.180
Sodium nitrate	X_4	-67.30	-33.65	12.32	-2.73	0.029
Methionine	X_5	-58.70	-29.35	12.32	-2.38	0.049
Ethanol	X_6	38.06	19.03	12.32	1.55	0.166
Glucose	X_7	27.14	13.57	12.32	1.10	0.307
Glycerol	X_8	-87.51	-43.76	12.32	-3.55	0.009
Octanoic acid	X_9	-18.67	-9.33	12.32	-0.76	0.473
Dodecanoic acid	X_{10}	-29.00	-14.50	12.32	-1.18	0.277
Temperature	X_{11}	-19.74	-9.87	12.32	-1.80	0.449
Moisture content	X_{12}	42.52	21.26	12.32	1.73	0.128
Incubation period	X_{13}	116.65	58.32	12.32	4.74	0.002
Center point			76.17	23.58	3.23	0.014

ตารางที่ 12 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการผลิตรวงกล้วยสีเหลืองตาม FFD

Variable	Variable code	Effect (E_{X_i})	Coefficient	SE- coefficient	<i>t</i> values	<i>p</i> -level
Constant			214.27	24.01	8.92	0.000
MSG	X_1	-58.30	-29.15	24.01	-1.21	0.264
Ammonium chloride	X_2	-36.03	-18.01	24.01	-0.75	0.478
Peptone	X_3	-92.09	-46.04	24.01	-1.92	0.097
Sodium nitrate	X_4	-120.42	-60.21	24.01	-2.51	0.041
Methionine	X_5	-129.09	-64.55	24.01	-2.69	0.031
Ethanol	X_6	55.11	27.56	24.01	1.15	0.289
Glucose	X_7	14.78	7.39	24.01	0.31	0.767
Glycerol	X_8	-158.92	-79.46	24.01	-3.31	0.013
Octanoic acid	X_9	-24.18	12.09	24.01	-0.50	0.630
Dodecanoic acid	X_{10}	-16.89	-8.45	24.01	-0.35	0.735
Temperature	X_{11}	-6.17	-3.08	24.01	-0.13	0.901
Moisture content	X_{12}	97.43	48.71	24.01	2.03	0.082
Incubation period	X_{13}	206.27	103.13	24.01	4.30	0.004
Center point			93.04	45.98	2.02	0.083

4.3 ผลการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุและสารโมโนโคลิน เค และลดปริมาณซิทรีนินจาก *M. purpureus* โดยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Central composite design (CCD)

การทดลองโดยวิธี CCD ศึกษา 5 ปัจจัย คือ NaNO_3 เมไทโอนีน กลีเซอรอล อุณหภูมิ และระยะเวลาการหมัก ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 13 และ 14 จะเห็นได้ว่าปริมาณชีวมวลแปรผันอยู่ระหว่าง 340-900 mg/g substrate dry weight ขณะที่สารโมโนโคลิน เค รงควัตถุสีแดง สีส้ม สีเหลือง และซิทรีนินแปรผันอยู่ระหว่าง 56-7000 mg/kg, 190-1750 units/g, 140-1300 units/g, 200-2500 units/g, 0.006-0.9 mg/kg substrate dry weight ตามลำดับ ซึ่งจากการวิเคราะห์การถดถอยของข้อมูล (Regression analysis) สำหรับการเจริญและผลิตสารโมโนโคลิน เค รงควัตถุ และซิทรีนิน แสดงดังตารางที่ 15 ถึง 20 โดยสามารถสร้างสมการอันดับที่สอง (Second order polynomial) ได้ดังสมการที่ 1 ถึง 6

$$Y_{1(\text{mg/kg})} = 3521.6 - 594.3x_4 - 466.5x_5 - 176.5x_8 - 1253.4x_{11} + 686x_{13} - 198.2x_4x_5 + 163x_4x_8 + 210.9x_4x_{11} - 117.1x_4x_{13} + 121.1x_5x_8 + 282.7x_5x_{11} - 168.2x_5x_{13} + 334x_8x_{11} + 227.7x_8x_{13} - 854x_{11}x_{13} + 181.9x_4^2 - 147.6x_5^2 - 343.7x_8^2 - 720.8x_{11}^2 - 530.8x_{13}^2 \quad (1)$$

$$Y_{2(\text{units/g})} = 859.2 - 145.9x_4 - 59.4x_5 - 43.6x_8 - 218.8x_{11} + 169.1x_{13} - 12.7x_4x_5 + 36.4x_4x_8 + 4.2x_4x_{11} + 6.1x_4x_{13} + 35.5x_5x_8 + 51.3x_5x_{11} - 12.2x_5x_{13} + 64.3x_8x_{11} + 27.2x_8x_{13} - 209.8x_{11}x_{13} + 64.3x_4^2 - 37.1x_5^2 - 27.7x_8^2 - 152.6x_{11}^2 - 78.186x_{13}^2 \quad (2)$$

$$Y_{3(\text{units/g})} = 1031.1 - 116.3x_4 - 60.1x_5 - 21.0x_8 - 149.7x_{11} + 144.8x_{13} + 1.9x_4x_5 + 15.2x_4x_8 - 10.54x_4x_{11} - 11.5x_4x_{13} + 11.1x_5x_8 + 29.5x_5x_{11} - 26.5x_5x_{13} + 59.2x_8x_{11} + 33.5x_8x_{13} - 146.4x_{11}x_{13} - 32.7x_4^2 - 112.4x_5^2 - 100.0x_8^2 - 198.0x_{11}^2 - 140.1x_{13}^2 \quad (3)$$

$$Y_{4(\text{units/g})} = 1154.9 - 202.2x_4 - 121.4x_5 - 65.2x_8 - 356.1x_{11} + 273.9x_{13} - 48.6x_4x_5 + 38.2x_4x_8 + 18.9x_4x_{11} - 14.5x_4x_{13} + 36.9x_5x_8 + 70.6x_5x_{11} - 27.5x_5x_{13} + 118.0x_8x_{11} + 73.3x_8x_{13} - 294.1x_{11}x_{13} + 96.0x_4^2 - 31.6x_5^2 - 25.3x_8^2 - 216.3x_{11}^2 - 101.3x_{13}^2 \quad (4)$$

$$Y_{5(\text{mg/kg})} = 0.0366 + 0.0019x_4 - 0.0512x_5 - 0.0096x_8 - 0.920x_{11} + 0.0741x_{13} - 0.0414x_4x_5 + 0.0519x_4x_8 - 0.0242x_4x_{11} + 0.0432x_4x_{13} - 0.0439x_5x_8 + 0.0668x_5x_{11} - 0.0532x_5x_{13} - 0.0339x_8x_{11} + 0.0412x_8x_{13} - 0.0805x_{11}x_{13} + 0.0115x_4^2 + 0.0049x_5^2 + 0.0556x_8^2 + 0.0092x_{11}^2 + 0.0222x_{13}^2 \quad (5)$$

$$Y_{6(\text{mg/g})} = 496.6 + 27.2x_4 + 0.47x_5 - 14.6x_8 + 86.9x_{11} + 57.3x_{13} - 0.6x_4x_5 - 4.3x_4x_8 - 0.12x_4x_{11} + 4.7x_4x_{13} + 32.3x_5x_8 + 19.3x_5x_{11} + 34.6x_5x_{13} + 58.0x_8x_{11} + 4.7x_8x_{13} - 22.0x_{11}x_{13} + 6.0x_4^2 + 5.0x_5^2 + 69.4x_8^2 - 4.2x_{11}^2 + 34.4x_{13}^2 \quad (6)$$

เมื่อ Y_1 คือ ปริมาณโมโนโคลิน เเค (mg/kg substrate dry weight), Y_2 , Y_3 และ Y_4 ปริมาณความเข้มสีแดง สีส้ม และสีเหลือง (OD units/g substrate dry weight), Y_5 คือปริมาณซิดรีนิน (mg/kg substrate dry weight), Y_6 คือปริมาณชีวมวล (mg/g substrate dry weight) และ x_4 คือ coded variable ของ NaNO_3 , x_5 คือ coded variable ของเมไทโอนีน, x_8 คือ coded variable ของกลีเซอรอล, x_9 คือ coded variable ของอุณหภูมิ และ x_{11} คือ coded variable ของระยะเวลาการหมัก

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) (ตารางที่ 21-26) p_{model} ของแบบจำลองการถดถอยสำหรับผลิตโมโนโคลิน เเค รงควัตถุสีแดง สีส้ม สีเหลือง สารซิดรีนินและปริมาณชีวมวลมีค่าเท่ากับ 0.039, 0.026, 0.013, 0.039, 0.033, 0.022 ซึ่งหมายความว่าสมการอันดับที่สองมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หรือสมการอันดับที่สองมีความเพียงพอสำหรับการทำนายบนพื้นผิวดตอบสนอง นอกจากนี้แบบจำลองของการผลิตโมโนโคลิน เเค รงควัตถุสีแดง สีส้ม สีเหลือง สารซิดรีนินและปริมาณชีวมวล มีค่า $R^2 = 0.838, 0.845, 0.874, 0.838, 0.853$ and 0.859 ตามลำดับ แสดงว่าแบบจำลองการผลิตโมโนโคลิน เเค รงควัตถุสีแดง สีส้ม สีเหลือง สารซิดรีนิน และปริมาณชีวมวลสามารถอธิบายความผันแปรของข้อมูลได้ 83.8%, 84.5%, 87.4%, 83.8%, 85.3% และ 85.9% ตามลำดับ ค่าที่ทำนายได้จากสมการถูกนำไปสร้างกราฟ Response surface plot (รูปที่ 5) ซึ่งผลจากการคำนวณด้วย Polynomial models พบว่าค่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโมโนโคลิน เเค รงควัตถุ และลดปริมาณซิดรีนิน คือ NaNO_3 0.01% (w/w) เมไทโอนีน 0.14% (w/w) กลีเซอรอล 2% (v/w) ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 16 วัน ซึ่งสามารถปรับปรุงการผลิตโมโนโคลิน เเค จากวิธีการหมักแบบดั้งเดิมที่ความเข้มข้น 1800 mg/kg เป็น 6500 mg/kg โดยเพิ่มขึ้น 3.6 เท่า และรงควัตถุสีแดง สีส้ม และสีเหลือง เพิ่มขึ้นจาก 900 units/g เป็น 1500 units/g, 700 units/g เป็น 1100 units/g และ 1100 units/g เป็น 2200 units/g โดยเพิ่มขึ้น 1.67, 1.57 และ 2 เท่า ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้นของซิดรีนินลดลงจาก 9.53 mg/kg เป็น 0.14 mg/kg ซึ่งลดลง 68 เท่า

เมื่อทดสอบหมักข้าวแดงตามวิธี Optimization ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลิน เเค รงควัตถุสีแดง สีส้ม สีเหลือง และซิดรีนินได้ 5900 mg/kg, 1200 units/g, 900 units/g, 1700 units/g, 0.26 mg/kg ตามลำดับ โดยโมโนโคลิน เเค และรงควัตถุเพิ่มขึ้น 3.28 และ 1.28-1.54 เท่า ตามลำดับ ขณะที่ซิดรีนินลดลง 36.65 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหมักแบบดั้งเดิม

ตารางที่ 13 ผลของการการเจริญและการผลิตสารโมนาโคลิน เค และซิตรีนิน จาก *Monascus* ตามการทดลอง CCD

Trial No.	Response ($\pm$ Standard deviation)					
	Biomass		Monacolin K		Citrinin	
	(mg/g substrate dry weight)		(mg/kg substrate dry weight)		(mg/kg substrate dry weight)	
1	665.51	$\pm$ 49.82	3144.32	$\pm$ 87.03	0.0931	$\pm$ 0.0029
2	668.15	$\pm$ 48.54	7182.66	$\pm$ 84.03	0.3613	$\pm$ 0.0022
3	382.27	$\pm$ 22.68	1401.16	$\pm$ 68.80	0.1450	$\pm$ 0.1684
4	489.32	$\pm$ 7.51	5427.74	$\pm$ 129.41	0.9308	$\pm$ 0.0880
5	728.72	$\pm$ 5.18	270.18	$\pm$ 11.08	0.0164	$\pm$ 0.0023
6	745.72	$\pm$ 11.51	161.41	$\pm$ 9.10	0.0105	$\pm$ 0.0077
7	743.86	$\pm$ 5.98	252.21	$\pm$ 5.40	0.0154	$\pm$ 0.0025
8	695.06	$\pm$ 21.59	289.95	$\pm$ 12.39	0.0159	$\pm$ 0.0005
9	430.95	$\pm$ 20.78	2956.65	$\pm$ 0.77	0.1146	$\pm$ 0.0005
10	672.71	$\pm$ 27.62	3954.62	$\pm$ 275.76	0.1493	$\pm$ 0.0151
11	341.49	$\pm$ 30.58	451.33	$\pm$ 34.68	0.0051	$\pm$ 0.0030
12	521.20	$\pm$ 1.451	4868.42	$\pm$ 59.06	0.1835	$\pm$ 0.0165
13	652.88	$\pm$ 13.27	157.46	$\pm$ 4.017	0.0144	$\pm$ 0.0042
14	708.67	$\pm$ 30.88	56.73	$\pm$ 5.12	0.0104	$\pm$ 0.0008
15	733.94	$\pm$ 10.55	184.50	$\pm$ 23.19	0.0179	$\pm$ 0.0008
16	888.44	$\pm$ 27.16	173.00	$\pm$ 24.98	0.0058	$\pm$ 0.0013
17	423.52	$\pm$ 9.57	661.32	$\pm$ 28.76	0.0115	$\pm$ 0.0004
18	756.93	$\pm$ 19.64	2244.38	$\pm$ 47.94	0.2778	$\pm$ 0.0691
19	698.14	$\pm$ 43.40	2051.50	$\pm$ 98.12	0.4736	$\pm$ 0.1008
20	761.93	$\pm$ 14.94	2351.59	$\pm$ 51.51	0.0827	$\pm$ 0.0044
21	345.44	$\pm$ 13.65	1253.25	$\pm$ 49.57	0.1756	$\pm$ 0.0137
22	525.57	$\pm$ 22.88	132.89	$\pm$ 2.57	0.0096	$\pm$ 0.0006
23	427.67	$\pm$ 74.45	4453.29	$\pm$ 53.85	0.1105	$\pm$ 0.0089
24	517.48	$\pm$ 32.75	1518.33	$\pm$ 135.87	0.0402	$\pm$ 0.0041
25	395.98	$\pm$ 33.09	6997.12	$\pm$ 6.29	0.1801	$\pm$ 0.0268
26	556.98	$\pm$ 46.35	1610.07	$\pm$ 25.62	0.0231	$\pm$ 0.0041

ตารางที่ 13 (ต่อ) ผลของการการเจริญและการผลิตสารโมนาโคลิน เค และซิตรีนิน จาก *Monascus* ตามการทดลอง CCD

Trial No.	Response ($\pm$ Standard deviation)		
	Biomass (mg/g substrate dry weight)	Monacolin K (mg/kg substrate dry weight)	Citrinin (mg/kg substrate dry weight)
27	432.38 $\pm$ 18.38	2775.16 $\pm$ 28.24	0.0124 $\pm$ 0.0009
28	468.29 $\pm$ 41.22	3267.31 $\pm$ 101.99	0.0817 $\pm$ 0.0073
29	533.42 $\pm$ 29.82	3486.67 $\pm$ 47.27	0.0260 $\pm$ 0.0007
30	548.67 $\pm$ 31.45	2763.82 $\pm$ 34.70	0.0234 $\pm$ 0.0030
31	505.96 $\pm$ 22.81	2924.59 $\pm$ 94.91	0.0220 $\pm$ 0.0012
32	579.29 $\pm$ 18.83	2362.60 $\pm$ 51.44	0.0162 $\pm$ 0.0070

ตารางที่ 14 ผลของการผลิตรงควัตถุ สีเหลือง ส้ม และแดง จาก *Monascus* ตามการทดลอง CCD

Trial No.	Response ($\pm$ Standard deviation)								
	Yellow pigment			Orange pigment			Red pigment		
	(Units/g substrate dry weight)			(Units/g substrate dry weight)			(Units/g substrate dry weight)		
1	1156.60	$\pm$	20.12	520.52	$\pm$	10.35	720.41	$\pm$	15.97
2	2462.09	$\pm$	25.10	1268.11	$\pm$	14.24	1676.58	$\pm$	12.37
3	580.48	$\pm$	9.08	331.54	$\pm$	4.06	465.63	$\pm$	3.05
4	1919.43	$\pm$	30.53	982.46	$\pm$	14.79	1270.35	$\pm$	20.52
5	490.51	$\pm$	9.74	355.52	$\pm$	11.67	502.30	$\pm$	13.58
6	282.30	$\pm$	3.20	183.92	$\pm$	2.41	230.38	$\pm$	1.90
7	260.16	$\pm$	2.72	176.61	$\pm$	1.30	237.23	$\pm$	1.30
8	453.87	$\pm$	16.99	453.87	$\pm$	16.99	300.65	$\pm$	12.35
9	1057.44	$\pm$	30.78	466.17	$\pm$	13.87	665.68	$\pm$	20.10
10	1645.62	$\pm$	36.08	823.91	$\pm$	13.94	1116.37	$\pm$	18.98
11	233.00	$\pm$	0.62	144.57	$\pm$	0.31	217.59	$\pm$	0.84
12	1762.92	$\pm$	38.73	851.69	$\pm$	14.76	1138.79	$\pm$	15.82
13	200.24	$\pm$	1.18	139.48	$\pm$	0.79	189.01	$\pm$	0.83
14	337.67	$\pm$	12.81	229.74	$\pm$	9.45	290.80	$\pm$	11.92
15	362.58	$\pm$	2.53	266.26	$\pm$	1.56	367.36	$\pm$	2.01
16	296.11	$\pm$	1.21	190.77	$\pm$	0.76	249.96	$\pm$	1.65
17	376.15	$\pm$	0.64	220.61	$\pm$	0.62	310.08	$\pm$	1.49
18	1253.96	$\pm$	15.31	666.42	$\pm$	13.94	884.82	$\pm$	14.39
19	1069.13	$\pm$	9.15	582.46	$\pm$	7.97	775.40	$\pm$	9.13
20	1169.11	$\pm$	19.39	625.42	$\pm$	8.45	823.47	$\pm$	12.05
21	458.18	$\pm$	14.42	262.22	$\pm$	3.32	386.62	$\pm$	2.27
22	252.15	$\pm$	1.35	161.723	$\pm$	0.91	212.87	$\pm$	2.12
23	1395.11	$\pm$	50.07	625.16	$\pm$	19.39	826.03	$\pm$	6.61
24	792.60	$\pm$	10.19	483.43	$\pm$	9.28	697.49	$\pm$	11.64
25	2438.88	$\pm$	1.80	1305.96	$\pm$	2.39	1749.06	$\pm$	5.21
26	769.86	$\pm$	6.52	440.20	$\pm$	18.31	586.02	$\pm$	9.33

ตารางที่ 14 (ต่อ) ผลของการผลิตรงควัตถุ สีเหลือง ส้ม และแดง จาก *Monascus* ตามการทดลอง CCD

Trial No.	Response ($\pm$ Standard deviation)					
	Yellow pigment		Orange pigment		Red pigment	
	(Units/g substrate dry weight)		(Units/g substrate dry weight)		(Units/g substrate dry weight)	
27	997.33	$\pm$ 9.63	997.33	$\pm$ 9.63	731.12	$\pm$ 6.37
28	1200.33	$\pm$ 4.77	1200.33	$\pm$ 4.77	937.35	$\pm$ 3.81
29	1284.53	$\pm$ 13.44	1284.53	$\pm$ 13.45	937.06	$\pm$ 12.06
30	1081.80	$\pm$ 33.46	1081.80	$\pm$ 33.46	820.83	$\pm$ 23.11
31	1254.23	$\pm$ 30.42	697.09	$\pm$ 16.30	877.09	$\pm$ 22.65
32	980.30	$\pm$ 18.49	980.30	$\pm$ 18.49	749.77	$\pm$ 12.84

ตารางที่15 ผลการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) ของ CCD สำหรับการเจริญของ *Monascus*

Parameter	Coefficients	Standard error	t level	p-level
Intercept	496.62	36.36	13.660	0.000
time	57.35	18.61	3.083	0.010
glycerol	-14.59	18.61	-0.784	0.449
temperature	86.91	18.61	4.671	0.001
methionine	0.47	18.61	0.025	0.980
NaNO ₃	27.21	18.61	1.462	0.172
time*time	34.44	16.83	2.046	0.065
glycerol*glycerol	69.39	16.83	4.123	0.002
temp*temp	-4.24	16.83	-0.252	0.806
methionine*methionine	5.03	16.83	0.299	0.771
NaNO ₃ * NaNO ₃	6.00	16.83	0.357	0.728
time*glycerol	4.70	22.79	0.206	0.840
time*temp	-22.04	22.79	-0.967	0.354
time*methionine	34.62	22.79	1.519	0.157
time* NaNO ₃	4.70	22.79	0.206	0.840
glycerol*temp	58.02	22.79	2.546	0.027
glycerol*methionine	32.34	22.79	1.419	0.184
glycerol* NaNO ₃	-4.35	22.79	-0.191	0.852
temp*methionine	19.34	22.79	0.849	0.414
temp* NaNO ₃	-0.12	22.79	-0.005	0.996
methionine* NaNO ₃	-0.59	22.79	-0.026	0.980

ตารางที่16 ผลการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) ของ CCD สำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค

Parameter	Coefficients	Standard error	t-level	p-level
Constant	3521.6	550.0	6.403	0.000
time	686.0	281.5	2.437	0.033
glycerol	-176.5	281.5	-0.627	0.543
temperature	-1253.4	281.5	-4.453	0.001
methionine	-466.5	281.5	-1.657	0.126
NaNO ₃	-594.3	281.5	-2.111	0.058
time*time	-530.8	254.6	-2.085	0.061
glycerol*glycerol	-343.7	254.6	-1.350	0.204
temperature*temperature	-720.8	254.6	-2.831	0.016
methionine*methionine	-147.6	254.6	-0.580	0.574
NaNO ₃ * NaNO ₃	181.9	254.6	0.714	0.490
time*glycerol	227.7	344.7	0.660	0.523
time*temperature	-854.0	344.7	-2.477	0.031
time*methionine	-168.2	344.7	-0.488	0.635
time* NaNO ₃	-117.1	344.7	-0.340	0.740
glycerol*temperature	334.0	344.7	0.969	0.353
glycerol*methionine	121.2	344.7	0.352	0.732
glycerol* NaNO ₃	163.0	344.7	0.473	0.645
temperature*methionine	282.7	344.7	0.820	0.430
temperature* NaNO ₃	210.9	344.7	0.612	0.553
methionine* NaNO ₃	-198.2	344.7	-0.575	0.577

ตารางที่17 ผลการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) ของ CCD สำหรับการผลิตชิตรีนิน

Parameter	Coefficients	Standard error	t-level	p-level
Constant	0.0366	0.0491	0.746	0.471
time	0.0741	0.0251	2.948	0.013
glycerol	-0.0096	0.0251	-0.385	0.707
temperature	-0.0920	0.0251	-3.661	0.004
methionine	-0.0512	0.0251	-2.036	0.067
NaNO ₃	0.0019	0.0251	0.076	0.941
time*time	0.0222	0.0227	0.978	0.349
glycerol*glycerol	0.0556	0.0227	2.446	0.032
temperature*temperature	0.0092	0.0227	0.406	0.692
methionine*methionine	0.0049	0.0227	0.217	0.832
NaNO ₃ * NaNO ₃	0.0115	0.0227	0.505	0.623
time*glycerol	0.0412	0.0308	1.339	0.207
time*temperature	-0.0805	0.0308	-2.616	0.024
time*methionine	-0.0532	0.0308	-1.729	0.112
time* NaNO ₃	0.0432	0.0308	1.403	0.188
glycerol*temperature	-0.0339	0.0308	-1.102	0.294
glycerol*methionine	-0.0439	0.0308	-1.425	0.182
glycerol* NaNO ₃	0.0519	0.0308	1.686	0.120
temperature*methionine	0.0668	0.0308	2.169	0.053
temperature* NaNO ₃	-0.0242	0.0308	-0.788	0.447
methionine* NaNO ₃	-0.0414	0.0308	-1.347	0.205

ตารางที่18 ผลการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) ของ CCD สำหรับการผลิตตรงควัตถุสีแดง

Parameter	Coefficients	Standard error	t-level	p-level
Constant	859.2	104.4	8.232	0.000
time	169.1	53.4	3.165	0.009
glycerol	-43.6	53.4	-0.817	0.431
temperature	-218.8	53.4	-4.096	0.002
methionine	-59.4	53.4	-1.112	0.290
NaNO ₃	-145.9	53.4	-2.732	0.020
time*time	-78.186	48.3	-1.618	0.134
glycerol*glycerol	-27.7	48.3	-0.573	0.578
temperature*temperature	-152.6	48.3	-3.159	0.009
methionine*methionine	-37.109	48.3	-0.768	0.459
NaNO ₃ * NaNO ₃	64.3	48.3	1.332	0.210
time*glycerol	27.2	65.4	0.416	0.686
time*temperature	-209.8	65.4	-3.207	0.008
time*methionine	-12.2	65.4	-0.187	0.855
time* NaNO ₃	6.1	65.4	0.093	0.928
glycerol*temperature	64.3	65.4	0.983	0.347
glycerol*methionine	35.5	65.4	0.542	0.598
glycerol* NaNO ₃	36.4	65.4	0.556	0.589
temperature*methionine	51.3	65.4	0.784	0.449
temperature* NaNO ₃	4.2	65.4	0.064	0.950
methionine* NaNO ₃	-12.7	65.4	-0.194	0.850

ตารางที่19 ผลการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) ของ CCD สำหรับการผลิตตรงกวัดสุสีส้ม

Parameter	Coefficients	Standard error	t level	p-level
Constant	1031.1	90.03	11.453	0.000
time	144.8	46.07	3.143	0.009
glycerol	-21.0	46.07	-0.455	0.658
temperature	-149.7	46.07	-3.250	0.008
methionine	-60.1	46.07	-1.305	0.218
NaNO ₃	-116.3	46.07	-2.525	0.028
time*time	-140.1	41.68	-3.362	0.006
glycerol*glycerol	-100.0	41.68	-2.399	0.035
temperature*temperature	-198.0	41.68	-4.751	0.001
methionine*methionine	-112.4	41.68	-2.697	0.021
NaNO ₃ * NaNO ₃	-32.7	41.68	-0.785	0.449
time*glycerol	33.5	56.43	0.593	0.565
time*temperature	-146.4	56.43	-2.595	0.025
time*methionine	-26.5	56.43	-0.470	0.647
time* NaNO ₃	-11.5	56.43	-0.204	0.842
glycerol*temperature	59.2	56.43	1.049	0.317
glycerol*methionine	11.1	56.43	0.197	0.848
glycerol* NaNO ₃	15.2	56.43	0.269	0.793
temperature*methionine	29.5	56.43	0.523	0.611
temperature* NaNO ₃	-10.5	56.43	-0.187	0.855
methionine* NaNO ₃	1.9	56.43	0.034	0.974

ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) ของ CCD สำหรับการผลิตตรงควัตถุสีเหลือง

Parameter	Coefficients	Standard error	t-level	p-level
Constant	1154.9	168.41	6.858	0.000
time	273.9	86.18	3.179	0.009
glycerol	-65.2	86.18	-0.756	0.465
temperature	-356.1	86.18	-4.132	0.002
methionine	-121.4	86.18	-1.409	0.186
NaNO ₃	-202.2	86.18	-2.346	0.039
time*time	-101.3	77.96	-1.299	0.220
glycerol*glycerol	-25.3	77.96	-0.324	0.752
temperature*temperature	-216.3	77.96	-2.774	0.018
methionine*methionine	-31.3	77.96	-0.405	0.693
NaNO ₃ * NaNO ₃	96.0	77.96	1.232	0.244
time*glycerol	73.3	105.55	0.695	0.502
time*temperature	-294.1	105.55	-2.787	0.018
time*methionine	-27.5	105.55	-0.261	0.799
time* NaNO ₃	-14.5	105.55	-0.137	0.893
glycerol*temperature	118.0	105.55	1.118	0.287
glycerol*methionine	36.9	105.55	0.350	0.733
glycerol* NaNO ₃	38.2	105.55	0.362	0.724
temperature*methionine	70.6	105.55	0.669	0.517
temperature* NaNO ₃	18.9	105.55	0.179	0.861
methionine* NaNO ₃	-48.6	105.55	-0.460	0.654

ตารางที่ 21 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณชีวมวลของ *Monascus*

Mode	Sum of squares	d.f.	Mean of squares	F	P	R ²
Regression	557763	20	27888	3.39	0.022	0.859
Residual error	91388	11	8308			
Lack of fit	76773	6	12795	4.38	0.063	
Pure error	14615	5	2923			
Total	649151	31				

ตารางที่22 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตสารโมนาโคลิน เค

Mode	Sum of squares	d.f.	Mean of squares	<i>F</i>	<i>P</i>	R^2
Regression	107980932	20	5399047	2.84	0.039	0.838
Residual error	20916696	11	1901518			
Lack of fit	20833727	6	3472288	209.25	0.000	
Pure error	82969	5	16594			
Total	128897627	31				

ตารางที่23 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตซิดรีนิน

Mode	Sum of squares	d.f.	Mean of squares	<i>F</i>	<i>P</i>	R^2
Regression	0.90777	20	0.045388	2.99	0.033	0.845
Residual error	0.16675	11	0.015159			
Lack of fit	0.16346	6	0.027244	41.38	0.000	
Pure error	0.00329	5	0.000658			
Total	1.07452	31				

ตารางที่24 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตตรงก้นตุ่มสีแดง

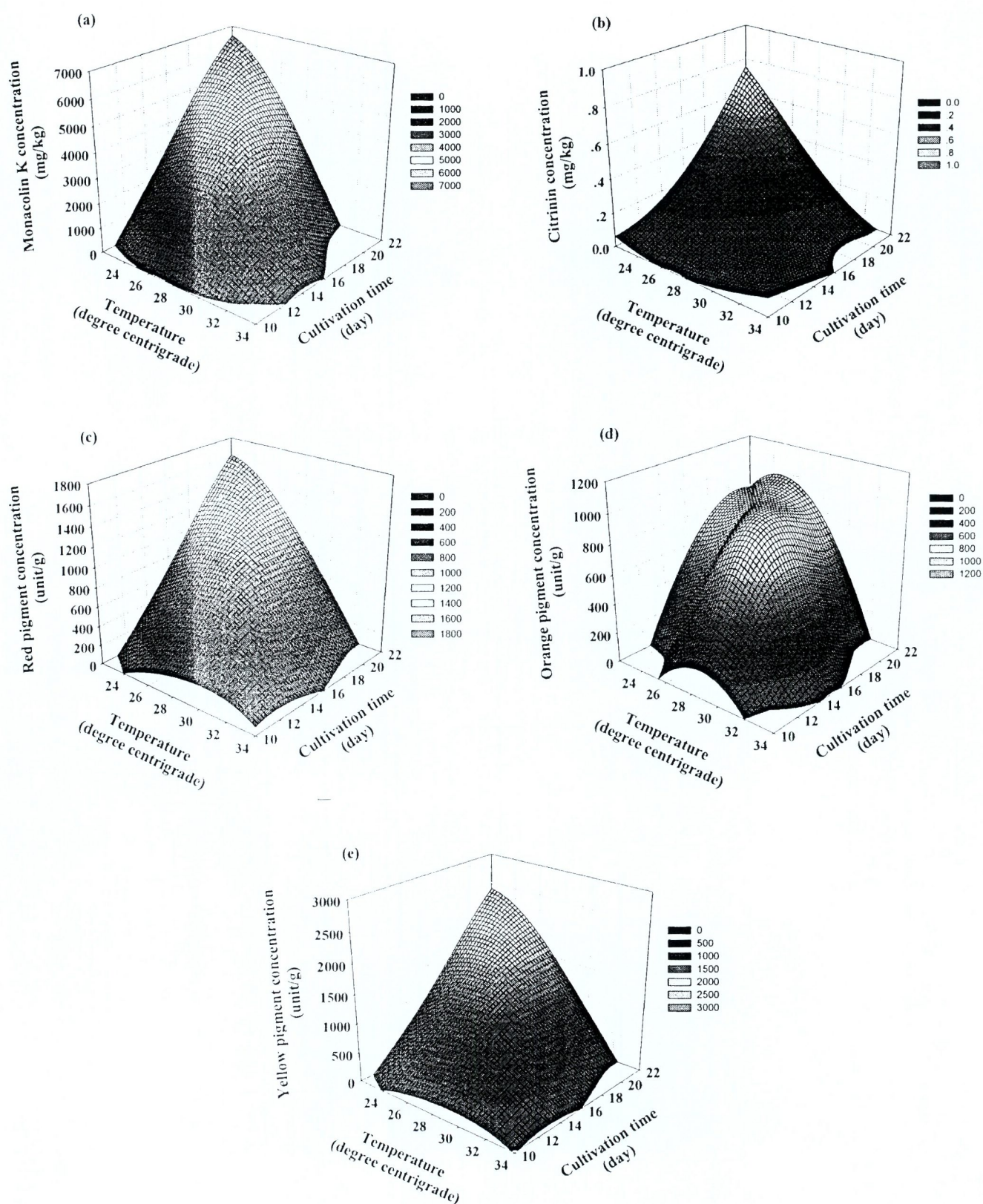
Mode	Sum of squares	d.f.	Mean of squares	<i>F</i>	<i>P</i>	R^2
Regression	4383359	20	219168	3.20	0.026	0.853
Residual error	753294	11	68481			
Lack of fit	712685	6	118781	14.63	0.005	
Pure error	40609	5	8122			
Total	5136653	31				

ตารางที่25 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตตรงก้นตุ่มสีส้ม

Mode	Sum of squares	d.f.	Mean of squares	<i>F</i>	<i>P</i>	R^2
Regression	3876328	20	193816	3.80	0.013	0.874
Residual error	560446	11	50950			
Lack of fit	350226	6	58371	1.39	0.368	
Pure error	210220	5	42044			
Total	4436774	31				

ตารางที่ 26 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตตรงควัตถุสีเหลือง

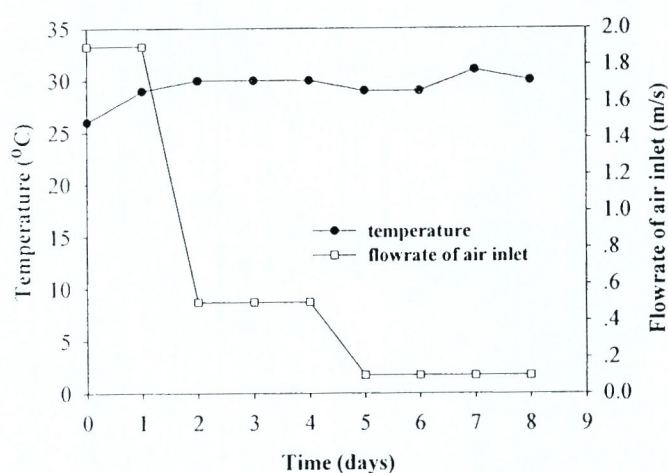
Mode	Sum of squares	d.f.	Mean of squares	<i>F</i>	<i>P</i>	R^2
Regression	10175630	20	508782	2.85	0.039	0.838
Residual error	1960943	11	178268			
Lack of fit	1874405	6	312401	18.05	0.003	
Pure error	86537	5	17307			
Total	12136573	31				



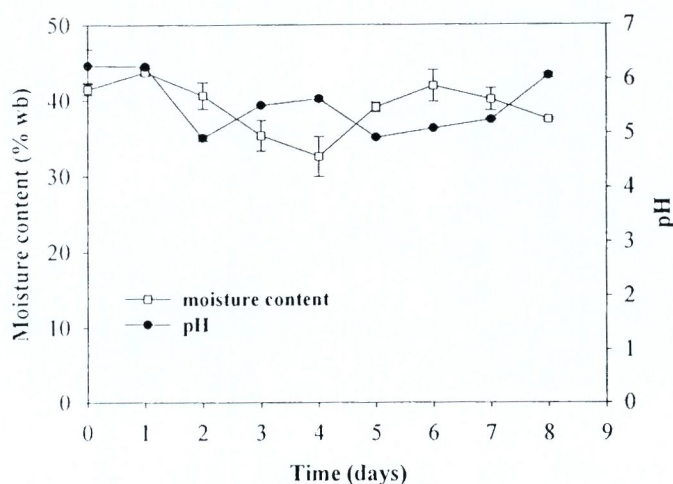
รูปที่ 5 ภาพแสดงพื้นที่การตอบสนองของปริมาณนาโคลิน เค (a), ซิตรีนิน (b), รงควัตถุสีแดง (c), สีส้ม (d) และสีเหลือง (e) ที่ความแตกต่างของอุณหภูมิและระยะเวลาการหมัก

4.4 ผลการศึกษาการผลิตข้าวแดงตาม Optimization method ในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร

การทดลองนี้ศึกษาการผลิตข้าวแดงตาม Optimization method (NaNO_3 0.01% (w/w) เมไทโอนีน 0.14% (w/w) กลีเซอรอล 2% (v/w) ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 16 วัน) ด้วยถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร โดยการทดลองเบื้องต้นในการเลี้ยงเชื้อตามวิธี Optimization ในถังหมักแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 25 °C พบว่าเชื้อรา *เจริญเติบโต* เป็นผลให้ง่ายต่อการปนเปื้อน ดังนั้นจึงทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *M. purpureus* โดย Temperature profile และความเร็วอากาศเข้าระหว่างการเลี้ยงเชื้อราในถังหมักแบบหมุนแสดงดังรูปที่ 6 นอกจากนี้ผลของความชื้นและความเป็นกรด-ด่างของข้าวแดงในระหว่างการหมักแสดงดังรูปที่ 7 ซึ่งข้าวมีความชื้นเริ่มต้นและค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ $42.44 \pm 1.63\%$ และ 6.29 ± 0.05 ตามลำดับ และในระหว่างหมักข้าวแดงมีความชื้นและความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 32.59-43.76% และ 5.08-6.24 ตามลำดับ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 อุณหภูมิและความเร็วอากาศเข้าระหว่างการหมักข้าวแดงถึงหมักแบบหมุน

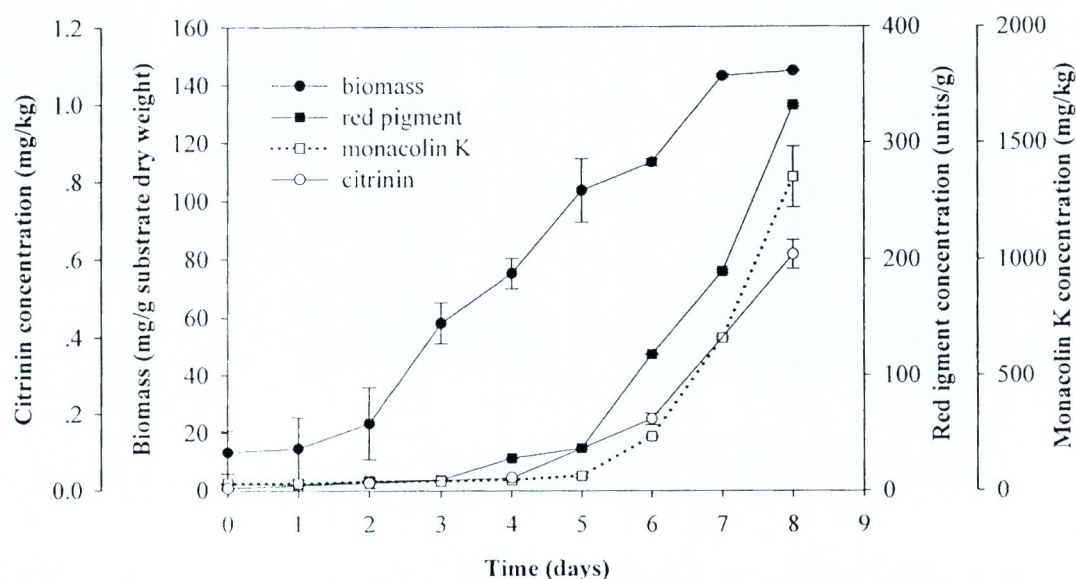


รูปที่ 7 ความชื้นและความเป็นกรด-ด่าง ของข้าวแดงในระหว่างการหมัก ด้วยถังหมักแบบหมุน

จากการควบคุมความเร็วลมเข้าที่ 0.5-1.9 m/s ในช่วง 1-4 วันแรกของการหมัก พบว่าความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจาก $43.75 \pm 6.23\%$ (วันที่ 1) เป็น $32.59 \pm 5.63\%$ (วันที่ 4) (รูปที่ 7) เป็นผลให้เชื้อราเกิดการเจริญเติบโตลดลงโดยพิจารณาได้จากค่าความเป็นกรด-ด่างที่เพิ่มขึ้นประมาณ 5.51-5.63 ในวันที่ 3-4 ของการหมัก (รูปที่ 7) ซึ่งอธิบายได้ว่า หากเชื้อราเกิดการเจริญเติบโตได้ดีในช่วง exponential phase ค่าความเป็นกรด-ด่างของข้าวแดงควรมีค่าต่ำอยู่ประมาณ 4-5 เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของกรด เช่น succinic, malic citric, pyruvic และ fumaric ในระบบ ซึ่งเป็นผลจากการผลิตของเชื้อราผ่านกระบวนการ TCA cycle ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญต่อการผลิต ATP สำหรับการใช้ในกิจกรรมของเซลล์และการเจริญเติบโต (Griffin, 1994) อีกทั้งเชื้อรายังมีช่วง lag phase นานประมาณ 2 วัน (รูปที่ 6) ดังนั้นจึงทำการลดความเร็วลมเข้าเป็น 0.1 m/s ในวันที่ 5 ของการหมักและพ่นน้ำลงข้าว เพื่อเพิ่มปริมาณความชื้นของข้าวแดง โดยปรับความชื้นเพิ่มขึ้นประมาณ 40% (รูปที่ 5) ซึ่งเป็นช่วงความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของรา *Monascus* อีกทั้งการเพิ่มปริมาณความชื้นที่มากเกินไป จะทำให้ยากต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ภายหลังจากการเพิ่มความชื้นและลดความเร็วลม พบว่าเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยสังเกตได้จากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงในวันที่ 5-7 อย่างไรก็ตามเชื้อราเข้าสู่ช่วง Stationary phase ภายหลังจากการหมักนาน 7 วัน เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณความชื้นไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในช่วงแรกของการหมัก

นอกจากนั้นเชื้อราามีช่วง Idiophase หรือ Production phase ในการผลิตสารทุติยภูมิ ได้แก่โมนาโคลิน เค รงควัตถุ และซิทรินิน ภายหลังจากวันที่ 4-5 ของการหมัก (รูปที่ 8) โดยวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 8) เชื้อรา มีปริมาณความเข้มข้นของโมนาโคลิน เค รงควัตถุสีแดง สีส้มและสีเหลือง และปริมาณซิทรินิน เท่ากับ 1350 mg/kg, 330 OD units/g, 280 OD units/g, 460 OD units/g และ 0.60 mg/kg ตามลำดับ (รูปที่ 8) ซึ่งปริมาณโมนาโคลิน เค และรงควัตถุที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่การผลิตซิทรินินมีค่าลดลง ด้วยการหมักในถังหมักแบบหมุน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหมักแบบดั้งเดิม (Basal medium) ที่เวลาการหมักเท่ากัน



รูปที่ 8 ปริมาณชีวมวล และปริมาณโมนาโคลิน เค รงควัตถุ และซิทรินิน

จากรา *Monascus* ในระหว่างการหมักด้วยถังหมักแบบหมุน