

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ข้าวแดง (Red yeast rice) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักข้าวด้วยรา *Monascus* sp. (Rosenblitt และคณะ, 2000) รู้จักในชื่อของ Red koji หรือ Ang-kok หรือ Anka เป็นต้น โดยมีการบริโภคมานานนับพันปีในเขตทวีปเอเชีย เช่น ประเทศจีน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ เป็นต้น ประโยชน์ของข้าวแดงนั้นมีหลายประการด้วยกัน ซึ่งในอดีตนิยมใช้ข้าวแดงเป็นวัตถุปรุงแต่งสีและกลิ่นรสในอาหาร เช่น เนื้อ ปลา ไวน์ข้าวแดง เต้าหู้จีน และใช้ในการยืดยาการเก็บรักษาของอาหาร เป็นต้น (Erdogral และ Azirak, 2004) นอกจากนี้ข้าวแดงยังสามารถใช้ประโยชน์เพื่อเป็นยาพื้นบ้าน เช่น บำรุงไหลเวียนโลหิต ช่วยลดอาการอาหารไม่ย่อย ท้องอืดหรือมีลมในกระเพาะ และกล้ามเนื้อฟกช้ำ เป็นต้น (Wild และคณะ, 2002) ปัจจุบันมีการผลิตข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรม เพื่อเป็นสีผสมอาหารจากธรรมชาติ ซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้สีแดงจากสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมอาหารและใช้สำหรับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง นอกจากนี้ในหลายๆ ประเทศได้แปรรูปข้าวแดงเป็นอาหารเสริม โดยมีคุณสมบัติเพื่อช่วยลดคอเลสเตอรอล และช่วยป้องกันโรคหัวใจ เป็นต้น เนื่องจากข้าวแดงประกอบไปด้วยสารโมนาโคลิน เค ทั้งนี้ประเทศที่เป็นผู้ผลิตข้าวแดงรายใหญ่คือ จีนและญี่ปุ่น ตัวอย่างเช่นบริษัท Nanjing Tianshu Food Ingredients Supermarket Co., Ltd ของประเทศจีนนั้นสามารถผลิตข้าวแดงได้สูงถึงปีละ 50,000 ตัน. อีกทั้งการบริโภคสีจาก *Monascus* ในประเทศญี่ปุ่นพบว่าปี ค.ศ. 1981 มีการบริโภคสารสีของ *Monascus* เป็นจำนวน 100 ตัน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยปี ค.ศ. 1992 มีการบริโภคเพิ่มขึ้นถึง 600 ตัน คิดเป็นเงินมูลค่าประมาณ 12 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Carvalho และคณะ, 2003)

ข้าวแดงที่ใช้บริโภคในประเทศไทย ส่วนมากได้มาจากการนำเข้าจากประเทศจีนและญี่ปุ่น โดยมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 300 – 400 บาท ขึ้นอยู่กับคุณภาพ มีเพียงบางส่วนที่ผลิตได้เองในประเทศ โดยสาเหตุที่กระบวนการหมักข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก เนื่องจากยังขาดความรู้ความเข้าใจพื้นฐานของกระบวนการหมักข้าวแดง อีกทั้งยังขาดความเข้าใจถึงกลไกการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุของรา *Monascus* ทำให้ข้าวแดงที่ผลิตได้นั้นที่มีปริมาณโมนาโคลิน เค ต่ำ ความเข้มของสีแดงต่ำ และมีข้าวแดงเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตสูงถึงประมาณร้อยละ 50 จากวัตถุดิบเริ่มต้น และใช้ระยะเวลาในการหมักนานถึง 2 สัปดาห์ อีกทั้งไม่สามารถขยายกำลังการผลิตให้เพียงพอแก่ความต้องการของผู้บริโภคได้ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว หน่วยปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ BIOTEC และกลุ่มวิจัยกระบวนการหมักอาหารแข็งของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี จึงร่วมมือศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตข้าวแดงโดยใช้ถังหมักแบบหมุน (Rotary drum bioreactor) ในระดับโรงงานต้นแบบ เนื่องจากถังหมักแบบหมุนมีข้อได้เปรียบคือ สามารถควบคุมสภาวะการผลิต ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และการถ่ายเทอากาศ เป็นต้น และมีระบบควบคุมแบบ Semi-automatic ซึ่งเหมาะสำหรับการขยายกำลังการผลิตในอนาคต ซึ่งโครงการดังกล่าวได้รับการสนับสนุนผ่านโครงการ iTAP ของ สวทช.

ทั้งนี้งานวิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตข้าวแดงในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร โดยศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นของข้าว การให้อากาศ (ความเร็วลม) การพ่นน้ำเพื่อรักษาความชื้น และรอบการ

หมุนต่อการเจริญและการสร้างสารสีของ *M. purpureus* และศึกษาความเป็นไปได้และต้นทุนการผลิตข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้ถังหมักแบบหมุน

แม้ว่าข้าวแดงที่ผลิตด้วยถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 1000 units/g substrate dry weight เป็น 2000 units/g substrate dry weight และใช้ระยะเวลาในหมักลดลงจาก 15 วัน เป็น 12 วัน แต่ปัญหาที่พบคือ กระบวนการหมักบางสภาวะทำให้ได้ข้าวแดงที่สารเจดสีแดงน้อย หรือได้สารสีที่ละลายน้ำได้น้อย ดังนั้นในการพัฒนากระบวนการหมักข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้ถังหมักแบบหมุนนั้นจำเป็นต้องมีการวิจัยเชิงลึกถึงผลปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อการผลิตสารสีของ *M. purpureus*

จากการสำรวจเอกสารพบว่า รา *Monascus* สามารถผลิตสีทั้งหมด 3 เจดสี ได้แก่ สีแดง ส้มและเหลือง ซึ่งเจดสีแรกที่ราผลิตคือสีส้ม จากนั้นเมื่อสีส้มทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน เปปไทด์ โปรตีน หรือกรดนิวคลีอิก โครงสร้างสีส้มจะเปลี่ยนเป็นสีแดง และเมื่อสีส้มเกิดปฏิกิริยารีดักชันจะเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสีเหลือง ทั้งนี้คุณสมบัติของสีแดงสามารถละลายน้ำได้ (hydrophilic pigments) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ Glutamic acid จะทำให้โครงสร้างสีแดงเปลี่ยนจาก Free form เป็น Complex form ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของสีส้มและเหลือง ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่จะละลายได้ดีในไขมัน (Lipophilic pigments) (Hajjaj และคณะ, 1997; Hajjaj และคณะ, 2000; Carvalho และคณะ, 2003) ทั้งนี้จากการทดลองเบื้องต้นพบว่า ตัวอย่างข้าวแดงที่ไม่ละลายน้ำนั้น มีองค์ประกอบของสีส้มสูงกว่าสีแดงมาก หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ โครงสร้างสีส้มมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีแดงน้อยมาก เป็นผลให้ข้าวแดงไม่สามารถละลายน้ำได้

นอกจากปัญหาดังกล่าวแล้ว *Monascus* ยังเป็นราที่สามารถผลิต Mycotoxin เรียกว่า ซิตรีนิน ซึ่งมีผลต่อระบบประสาท เป็นผลให้ข้าวแดงที่ผลิตได้ ต้องควบคุมให้มีองค์ประกอบของซิตรีนินไม่เกินร้อยละ 0.2 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามข้อกำหนดของประเทศญี่ปุ่นและไต้หวันตามลำดับ ทำให้งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเพื่อหาความเหมาะสมของปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีต่อการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน เค และรงควัตถุที่ความเข้มข้นสูง และการผลิตซิตรีนินที่ความเข้มข้นต่ำ จาก *M. purpureus* ด้วยการหมักแบบอาหารแข็งและพัฒนาเทคโนโลยีการหมักข้าวแดงในระดับโรงงานต้นแบบ โดยใช้ถังหมักแบบหมุน (Rotary drum bioreactor) ทั้งนี้การทดลองจะวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล ปริมาณโมนาโคลิน เค ความเข้มข้น ปริมาณซิตรีนิน ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความชื้นที่เป็นองค์ประกอบในข้าวแดง ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้พัฒนาและควบคุมการผลิตข้าวแดงเพื่อขยายสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. คัดเลือกปัจจัยสำคัญจากปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค รงควัตถุและซิตรีนินของ *M. purpureus* ด้วยวิธี Fractional-factorial design
2. หาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยสำคัญต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค รงควัตถุที่ความเข้มข้นสูงและซิตรีนินต่ำ ด้วยวิธี Response surfaces method
3. พัฒนาระบวนการผลิตข้าวแดงในระดับโรงงานต้นแบบ ด้วยถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. คัดเลือกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค รังควัตถุและซิตรีนินของ *M. purpureus* ด้วยวิธี Fractional factorial design โดยคัดเลือกปัจจัยทั้งจากสภาวะแวดล้อมและแหล่งอาหาร ซึ่งปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และระยะเวลาการหมัก ปัจจัยทางแหล่งอาหารประกอบด้วย แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน และกรดไขมันได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต แอมโมเนียมคลอไรด์ เปปไทด์ เมทไทโอนีน โซเดียมไนเตรต กลูโคส เอทานอล กลีเซอรอล กรดออกทาลิก และกรดโคเดคาโนอิก
2. หาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยสำคัญต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค รังควัตถุที่ความเข้มข้นสูง และซิตรีนินที่ความเข้มข้นต่ำของ *M. purpureus* โดยวางแผนการทดลองด้วย Response surface method
3. นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาขั้นต้น มาพัฒนาการผลิตข้าวแดงในระดับโรงงานต้นแบบ โดยใช้ถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในระหว่างการศึกษา ราชตระกูล *Monascus* ผลิตรังควัตถุไดออกไซด์ เอทานอล กรดอินทรีย์ เช่น อะซิติก และเอนไซม์ เช่น โปรติเอสและอะไมเลส (Tseng และคณะ, 2000) นอกจากนี้ *Monascus* ยังผลิตสารทุติยภูมิหลายชนิด ได้แก่ รังควัตถุ (pigments), โมนาโคลิน (Lovastatin, Mevinolin, Mevacor), ซิตรีนิน (Citrinin; Monascidin A), γ -aminobutyric acid (GABA) และ Dimerumic acid เป็นต้น ซึ่ง *Monascus* จะผลิตรงควัตถุ โมนาโคลินและซิตรีนิน ผ่าน Polyketide pathway (Muthuwong, 2003; Wang และคณะ, 2004)

รงควัตถุหรือเม็ดสีจากรา *Monascus* เป็นสาร Secondary metabolite โครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่ม Azaphilones หรือ Aminophilones (Erdogral และ Azirak, 2004) ทั้งนี้ *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุหรือเม็ดสีอิสระ (Free form) แบ่งตามลักษณะปรากฏของสีได้เป็น 3 ประเภทคือ สีเหลือง ส้ม และแดง

รงควัตถุสีส้มมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน (Intracellular lipophilic pigments) หรือละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งกลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีส้มนั้นจะต้องใช้ทั้งวิถีการสังเคราะห์ Polyketide และกรดไขมันร่วมกัน ส่วนการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างรงควัตถุสีส้มและหมู่เอมีน สำหรับกลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลืองยังไม่มีสามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการสังเคราะห์รงควัตถุของรา *Monascus* ในข้าวแดงได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์ของ *M. purpureus* และสภาวะการเตรียมข้าว เช่น อุณหภูมิ และเวลาในการนึ่งข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นผลจากสภาวะในการผลิตข้าวแดงได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นของข้าว ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของข้าว ปริมาณก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุเสริม อีกด้วย

โมนาโคลิน เค หรือรู้จักกันอีกชื่อหนึ่งว่า Lovastatin เป็นสารลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับ โดยโมนาโคลิน เค จะจับกับเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase ในวิถี Mevalonate pathway เป็นผลให้ LDL-cholesterol และ VLDL-cholesterol ลดลง อีกทั้งทำให้ปริมาณ HDL-cholesterol เพิ่มขึ้น (Manzoni และ Rollini, 2002)

ซิทรีนินเป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งกลไกการสังเคราะห์ซิทรีนินต้องใช้วิธีการสังเคราะห์ Polyketide เช่นกัน ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตซิทรีนินของรา *Monascus* อันได้แก่ ปัจจัยด้านสารอาหาร เช่น แหล่งไนโตรเจน กรดไขมันและ Methylketone และปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณก๊าซออกซิเจน

ถึงแม้ว่ามีงานวิจัยอยู่มากที่ศึกษาถึงการผลิตโมนาโคลิน เค รงควัตถุและซิทรีนินของรา *Monascus* แต่งานส่วนมากจะแยกศึกษาระหว่างการเพิ่มปริมาณโมนาโคลิน เค รงควัตถุ และการลดปริมาณซิทรีนิน ของรา *Monascus* งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะหาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยสำคัญทั้งจากสภาวะแวดล้อมและแหล่งอาหาร เพื่อผลิตข้าวแดงที่มีปริมาณโมนาโคลิน เค และรงควัตถุที่ความเข้มข้นสูง และมีปริมาณซิทรีนินต่ำ

บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

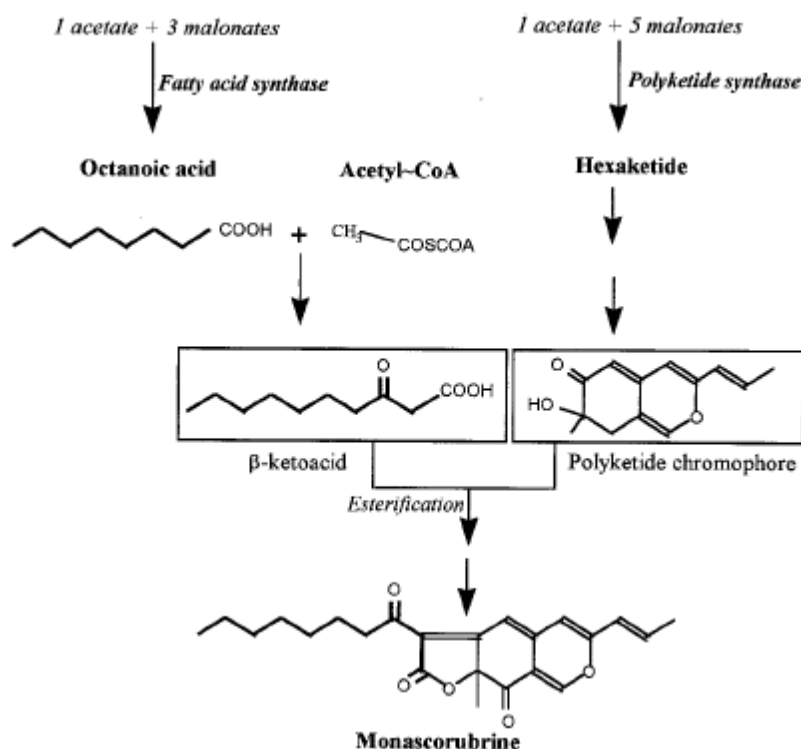
2.1 รงควัตถุของ *Monascus*

รงควัตถุหรือเม็ดสีจากรา *Monascus* เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) โครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่ม Azaphilones หรือ Aminophilones (Erdogral และ Azirak, 2004) กลไกการผลิตเป็นแบบพร้อมการเจริญและไม่พร้อมการเจริญ (Mix type: Growth-associated and non growth-associated) ทั้งนี้รา *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุหรือเม็ดสีอิสระ (Free form) ได้ 6 ชนิด แบ่งตามลักษณะปรากฏของสีได้เป็น 3 ประเภทคือ สีเหลือง ส้ม และแดง โดยสีเหลืองประกอบด้วย Monascin ($C_{21}H_{26}O_5$) และ Ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$) สีส้มประกอบด้วย Rubrapunctatin ($C_{21}H_{22}O_5$) และ Monascorubrine ($C_{23}H_{26}O_5$) และสีแดงประกอบด้วย Rubropunctamine ($C_{21}H_{23}NO_4$) และ Monascorubramine ($C_{23}H_{27}NO_4$) (Lin, 1973)

กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus*

1) รงควัตถุสีส้ม

รงควัตถุสีส้มมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน (Intracellular lipophilic pigments) หรือละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งกลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีส้มนั้นจะต้องใช้ทั้งวิถีการสังเคราะห์ Polyketide และกรดไขมันร่วมกัน โดย Hexaketide คือสารตั้งต้นของโครงสร้างหลักที่มีคุณสมบัติการให้สี (Chromophore structure) ซึ่งสังเคราะห์ผ่าน Polyketide pathway โดย Hexaketide เกิดจากปฏิกิริยา Condensation ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 5 โมเลกุล จากนั้น Hexaketide เกิดปฏิกิริยา Methylation และ Hydroxylation จนกลายเป็น Polyketide chromophore ตามลำดับ ส่วนวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันจะผลิตกรดไขมันขนาดกลางที่มีจำนวนคาร์บอน 6 หน่วย (Hexanoic acid) หรือ 8 หน่วย (Octanoic acid) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา Condensation ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 3 โมเลกุล ผ่าน Fatty acid pathway จากนั้นทั้งสองส่วนมาเชื่อมต่อกันด้วยปฏิกิริยาทราน-เอสเทอร์ริฟิเคชัน (*tran-esterification*) ได้รงควัตถุสีส้มคือ Rubrapunctatin และ Monascorubrine ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 (Hajjaj และคณะ, 2000)



รูปที่1 กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีส้ม

ที่มา: Hajjaj และคณะ (2000)

2) รงควัตถุสีแดง

การสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างรงควัตถุสีส้มและหมู่เอมีน โดยไนโตรเจนจากกรดอะมิโน โปรตีน เปปไทด์ หรือกรดนิวคลีอิกจะเข้าแทนที่ Pyronoid oxygen atom ของเม็ดสีส้มด้วยปฏิกิริยา Schiff base formation และ Dehydration เปลี่ยนแปลงโครงสร้างเม็ดสีจาก Rubropunctatin หรือ Monascorubrin เป็น Rubropunctamine หรือ Monascorubramine ตามลำดับ อีกทั้งการมีองค์ประกอบของอะมิโนในโครงสร้างสีแดง ทำให้สีแดงมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ (Extracellular hydrophilic pigments) (Hajjaj และคณะ, 1997; Hajjaj และคณะ, 2000; Carvalho และคณะ, 2003)

3) รงควัตถุสีเหลือง

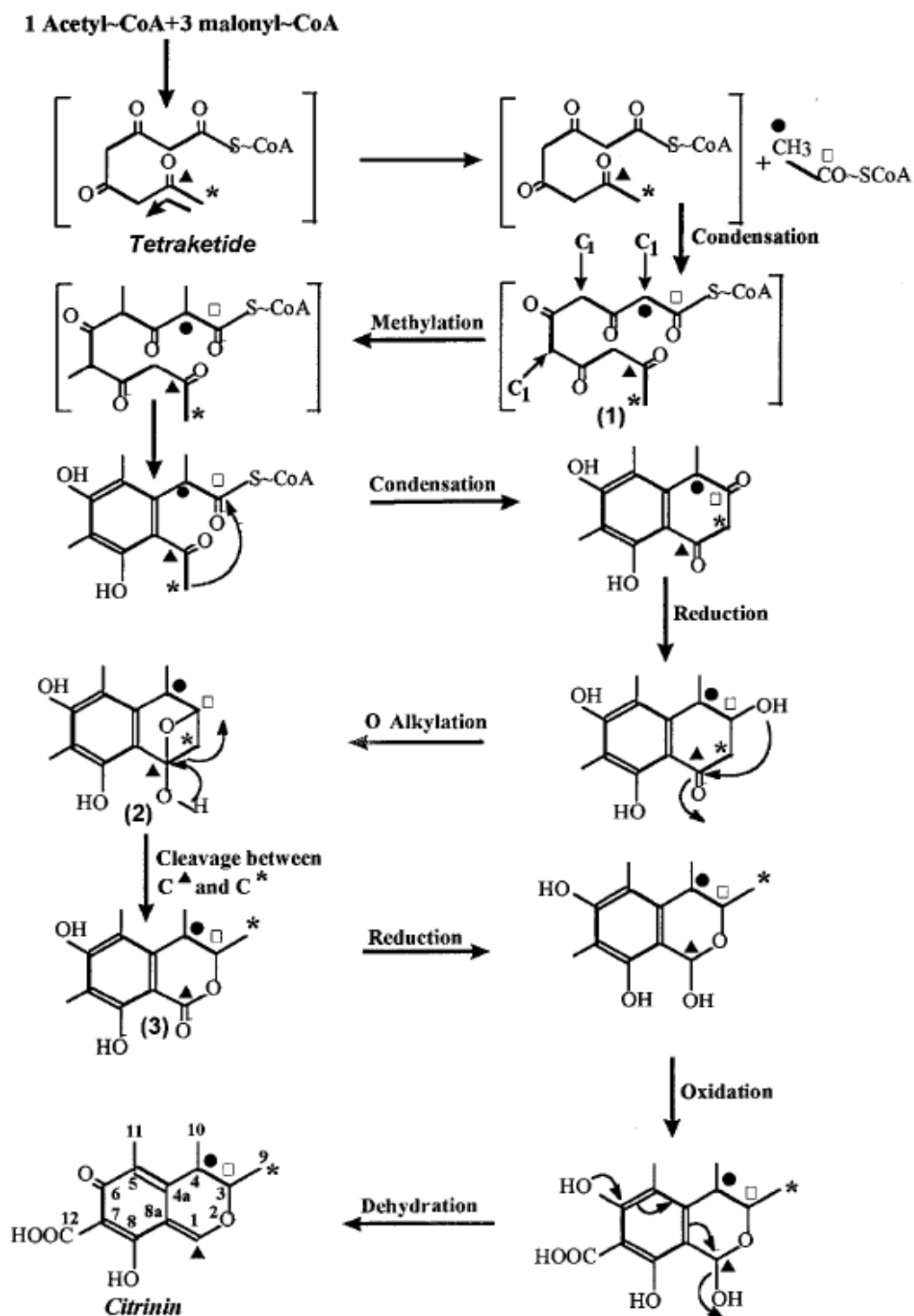
กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลืองยังไม่มีโครอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่มีทฤษฎีที่มีความเป็นไปได้ อยู่ 2 ทฤษฎี คือ ทฤษฎีที่ 1 ระบุว่ารงควัตถุสีส้มคือ Rubropunctatin หรือ Monascorubrin เกิดปฏิกิริยา Reduction กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้รงควัตถุสีเหลืองคือ Monascin และ Ankaflavin ตามลำดับ (Hajjaj และคณะ, 1997) ส่วนอีกทฤษฎีหนึ่งระบุว่า การสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลืองนั้นเกิดจากกระบวนการทางชีวภาพของรา *Monascus* เอง (Yongsmith และคณะ, 1993)

2.2 ซิตรีนิน (Citrinin)

ซิตรีนิน (Citrinin) หรือโมนาสซิดิน เอ (Monascidin A) มีสูตรโครงสร้างคือ $C_{13}H_{14}O_5$ เป็น Mycotoxin ที่ถูกผลิตโดยรา *Monascus*, *Penicillium citrinum* และ *Aspergillus* sp. สารนี้มีพิษต่อระบบประสาท ไต และตัวอ่อนในครรภ์ของหนู (Hajjaj และคณะ, 1999) และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Streptococcus lactis* และ *Pseudomonas fluorescens* (Blanc และคณะ, 1995) ทั้งนี้ซิตรีนินพบมากในธัญญาพืชม เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ มอลต์ แอปเปิ้ล ชีส และข้าวแดง ซึ่งในสหรัฐอเมริกา มีรายงานการปนเปื้อนซิตรีนินที่พบในข้าวแดงประมาณ 0.47-11.82 $\mu\text{g}/\text{capsule}$ ในประเทศจีนประมาณ 0.2-140 mg/kg และในไต้หวันและจีนประมาณ 4.2-25.1 mg/kg (Xu และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตามข้อกำหนดของการปนเปื้อนของซิตรีนินในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมไม่ควรเกิน 0.2 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในประเทศญี่ปุ่นและประเทศไต้หวัน ตามลำดับ ทั้งนี้มีหลายวิจัยซึ่งศึกษาถึงการควบคุมปริมาณความเข้มข้นของซิตรีนินในข้าวแดง ดังแสดงในหัวข้อ 2.4

กลไกการสังเคราะห์ซิตรีนิน

กลไกการสังเคราะห์ซิตรีนินต้องใช้วิธีการสังเคราะห์ Polyketide โดยมีสารตั้งต้นคือ Tetraketide เกิดจากการปฏิกิริยา Condensation ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 3 โมเลกุล ผ่าน Polyketide pathway จากนั้นเกิดปฏิกิริยา Methylation, Condensation, Reduction, O-alkylation, Cleavage ระหว่าง C-1 และ C-9, Oxidation และ Dehydration ตามลำดับ จนได้เป็นซิตรีนิน (Hajjaj และคณะ, 1999) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน เมื่อ C-1 (Δ), C-3 ($\square$), C-9 (*) และ C-4 ($\bullet$)

ที่มา: Hajjaj และคณะ (1999)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุและโมนาโคลิน เค ของรา *Monascus* ในข้าวแดง

กระบวนการผลิตข้าวแดงแบบดั้งเดิมใช้วิธีการการหมักแบบอาหารแข็ง โดยการหมักแบบอาหารแข็ง นั้น หมายถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งในสถานะที่ไม่มีน้ำอิสระ (Mitchell and Lonane, 1992) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุและโมนาโคลิน เค ของรา *Monascus* ในข้าวแดง ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์ของ *M. purpureus* และสภาวะการเตรียมข้าว เช่น อุณหภูมิ และเวลาในการนึ่งข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นผลจากสภาวะในการผลิตข้าวแดง ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นของข้าว ความเป็นกรด-ด่างของข้าว ปริมาณก๊าซออกซิเจนและการรับอนไดออกไซด์ แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุเสริม เป็นต้น ทั้งนี้จากปัจจัยที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น มีผู้ศึกษาความเหมาะสมและอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าวแล้วในหลายกรณีด้วยกันซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

1) อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราตระกูล *Monascus* มีค่าประมาณ 28-32 °C โดยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุดที่ 15-18 °C และมีอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญที่ 45 °C ตัวอย่างเช่น *M. purpureus* CBS 109.7 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ต่ำที่สุด และอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 34, 18 and 46 °C ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุมีค่าอยู่ระหว่าง 25-28 °C (Carvalho et al., 2003)

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

นอกจากนี้หลายๆ งานวิจัยได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตโมนาโคลิน เค จาก *Monascus* sp. ตัวอย่างเช่น Su และคณะ (2003) ทำการทดลองหมัก *M. purpureus* CCRC 31615 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 °C พบว่า รา *Monascus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 °C ขณะที่การผลิตโมนาโคลิน เค ลดลงอย่างมาก เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 25 และ 37 °C

2) ความชื้น

ความชื้นเริ่มต้นของสารอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิ เช่น การผลิตรงควัตถุของราในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ Johns และ Stuart (1991) ได้ศึกษาการสร้างสีของ *M. purpureus* FRR 2190 ในอาหารแข็ง (glucose-peptone media) โดยทดลองหมักข้าวด้วย *M. purpureus* ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 16 วัน และเตรียมข้าวที่มีความชื้นเริ่มต้นระหว่าง 15-56 % (wb) พบว่าความชื้นเริ่มต้นของข้าวที่เหมาะสมต่อการสร้างสีของ *Monascus* ควรีค่าประมาณ 56 % และ มีค่า pH เริ่มต้น

6.0 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเหมาะสมต่อการเจริญของราเข้าไปถึงกลางเมล็ดข้าว และราสามารถสร้างสีส้ม-แดงได้ในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าความชื้นเริ่มต้นของข้าวต่ำกว่า 38 % จะไม่พบเส้นใยของราภายหลังการบ่มนานถึง 2 สัปดาห์ และที่ความชื้นเริ่มต้นของข้าว 38-39.5 % พบว่าการเจริญของราจำกัดเฉพาะแต่เพียงภายนอกเมล็ดข้าวเท่านั้น และผู้วิจัยเสนอว่าการผลิตรงควัตถุของ *Monascus* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งควรใช้ความชื้นเริ่มต้นสูง (~ 56 %wb) อีกทั้งสามารถเติมน้ำในระหว่างหมักข้าว เพื่อให้รามีน้ำเพียงพอสำหรับการเจริญ

แต่อย่างไรก็ตาม [Teng และ Feldheim \(2000\)](#) ได้ศึกษาการหมักข้าวเพื่อผลิตสีจากข้าวแดงพบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการหมักข้าวแดง เพื่อให้ *Monascus* ผลิตสีได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 24 % และการสร้างรงควัตถุของราจะลดลงหากเติมน้ำในระหว่างการหมัก

ทั้งนี้ [Yongsmith และคณะ \(2000\)](#) ได้ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus* sp. KB9 ด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง โดยทดลองหมักข้าวด้วย *Monascus* sp. KB9 ที่ความชื้นเริ่มต้น 32, 35, 38 และ 43 % ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 18 วัน พบว่าความชื้นเริ่มต้นมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและการสังเคราะห์รงควัตถุ ซึ่งความชื้นเริ่มต้นของข้าวที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus* sp. KB9 มีค่าระหว่าง 32-43 % โดยที่ความชื้นเริ่มต้นของข้าว 38 % จะให้ค่าความเข้มสีสูงสุด อย่างไรก็ตาม [Yongsmith และคณะ](#) เสนอว่าจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะหรือชอบที่จะเจริญที่ความชื้นเริ่มต้นต่างกัน ปริมาณน้ำที่มากเกินไปอาจลดความพรุนของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเมล็ดข้าว เป็นสาเหตุให้สารตั้งต้นเกาะกันแน่น ซึ่งเหนียวนำไปให้การถ่ายเทออกซิเจนลดลง

3) ความเป็นกรด-ด่าง

ราตระกูล *Monascus* สามารถเจริญได้ในช่วง pH กว้างตั้งแต่ 2.5-8.0 แต่ pH ที่เหมาะสมควรมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0-7.0 อย่างไรก็ตาม pH เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญควรมีค่าประมาณ 6.5 นอกจากนี้ pH ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุนั้นมีความแตกต่างกันไป โดยที่ pH ต่ำ (pH 4.0) เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สีเหลือง และ pH ที่สูงกว่า (pH 5.5-7.0) เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดง ([Chen และ Johns, 1993](#); [Teng และ Feldheim, 2001](#); [Carvalho และคณะ, 2003](#)) ขณะที่ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค ของรา *Monascus* มีค่าอยู่ระหว่าง 5.5-7.0 ([Lian และคณะ, 2007](#); [Ng และ Shyu, 2004](#); [Panda และคณะ, 2010](#))

[Johns และ Stuart \(1991\)](#) ศึกษาความเป็นกรด-ด่างของข้าวเริ่มต้นที่ระดับ pH 3.4 , 6.0 และ 7.0 ต่อการสร้างสีของ *M. purpureus* FRR 2190 โดยหมักข้าวด้วย *Monascus* ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 16 วัน pH ถูกปรับด้วย HCl เข้มข้น 1M หรือ NaOH เข้มข้น 1 M จากผลการทดลองพบว่า ที่ pH เริ่มต้น 3.4, 6.0 และ 7.0 เหมาะสมต่อการสร้างสีเหลือง ส้ม แดง ตามลำดับ และที่ pH เริ่มต้น 6.0 *M. purpureus* FRR 2190 สามารถผลิตสีทั้งสามสีได้สูงสุด

นอกจากนั้น Ng และ Shyu (2004) ศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตโมนาโคลิน เค จาก *Monascus-nata* complex ซึ่ง *M. ruber* CCRC 31532 หรือ/และ *M. pilosus* NCHU M-35 จะถูกเพาะเลี้ยงในชั้นวุ้นมะพร้าวในอาหารเหลว pH ถูกปรับด้วย HCl เข้มข้น 1M หรือ NaOH เข้มข้น 1 M ผลการทดลองพบว่า pH 6.0-7.0 เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค

4) ปริมาณก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ราตระกูล *Monascus* เป็น Aerobic fungi แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนอย่างจำกัด ซึ่งภายใต้สภาวะดังกล่าว *Monascus* จะผลิตเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูง แต่สังเคราะห์กรดไขมันได้ในปริมาณต่ำ อย่างไรก็ตาม *Monascus* จะผลิตเอทานอลลดลงและให้แรงกดดันเพิ่มขึ้น เมื่อเจริญภายใต้สภาวะอากาศที่มีองค์ประกอบตามธรรมชาติ ($O_2 \sim 0.21-0.5$ atm, $CO_2 \sim 0.02$ atm) (Han และ Mudgett, 1992) หรือมีการถ่ายเทของอากาศสูงไม่มากเกินไป (aeration rate ~ 1 NmL/g.min) (Carvalho และคณะ, 2006) ทั้งนี้การผลิตสารสีของ *Monascus* จะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสูงมากเกินไป ($O_2 \sim 1.2-2.0$ atm) (Han และ Mudgett, 1992) หรือมีการถ่ายเทของอากาศสูง (aeration rate > 1 NmL/g.min) (Carvalho และคณะ, 2006) หรือมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบสูง ($CO_2 > 0.02$ atm) (Han และ Mudgett, 1992)

Han และ Mudgett (1992) ศึกษาประสิทธิภาพของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์กรดไขมันของ *M. purpureus* ATCC 16365 ในอาหารหมักแบบแข็ง โดยทดลองหมักข้าวด้วย *M. purpureus* ATCC 16365 ใน Closed pressure vessels และเปลี่ยนแปลงระดับของก๊าซออกซิเจนระหว่าง 0.1-2.1 atm ที่คาร์บอนไดออกไซด์คงที่ 0.02 atm พบว่า *Monascus* สามารถผลิตกรดไขมันได้สูง เมื่อให้ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ 0.5 atm และการสังเคราะห์กรดไขมันจะลดลงเมื่อปริมาณก๊าซออกซิเจนสูงถึง 1.2 atm และการสังเคราะห์กรดไขมันจะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์เมื่อปริมาณก๊าซออกซิเจนเพิ่มขึ้นถึง 2.0 atm นอกจากนี้จากการทดลองหมักข้าวที่สภาวะออกซิเจนคงที่ที่ 0.21 atm และเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 0.02-1.0 atm พบว่า *Monascus* สามารถสังเคราะห์กรดไขมันได้สูงสุดที่ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำที่สุด คือที่สภาวะ 0.02 atm และหากเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงถึง 1.0 atm การสังเคราะห์กรดไขมันของ *Monascus* จะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม Han และ Mudgett (1992) ยังได้เสนอว่า ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกสะสมหรือก๊าซออกซิเจนที่ถูกจำกัดในระหว่างการหมัก จะมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันของ *Monascus* ในอาหารแข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระหว่างการหมักควรกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์และเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในระบบ เพื่อให้ *Monascus* สามารถสังเคราะห์กรดไขมันได้สูงสุด

นอกจากนี้ Carvalho และคณะ (2006) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ อัตราการหายใจ และการสังเคราะห์กรดไขมันของ *Monascus* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง โดยทดลองหมัก *Monascus* sp. LPB 31 ในข้าวที่อุณหภูมิ 32 °C นาน 8 วัน ภายในคอลัมน์ และให้อากาศที่อัตรา 0.00-2.00 NmL/g.min (มิลลิลิตรของอากาศต่อกรัมของข้าวน้ำหนักเปียกต่อนาที) พบว่า *Monascus* สามารถผลิตสารสีได้สูงสุด ที่

สภาวะ 1 NmL/g.min และจะผลิตสารสีลดลงเมื่ออัตราการให้อากาศต่ำ (< 1 NmL/g.min) หรือสูงมากเกินไป (> 1 NmL/g.min) เนื่องจากภายใต้สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศต่ำ ทำให้อากาศไม่เพียงพอต่อการถ่ายเทของออกซิเจน และการนำออกซิเจนไปใช้สำหรับกระบวนการ Metabolism ของเซลล์ อีกทั้งภายใต้สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศสูง จะเกิดการ Shift ของ Metabolism ของราไปใช้ยังกระบวนการอื่น เช่น การผลิตเอทานอลหรือซิทรีนิน

ทั้งนี้อากาศเป็นจุดวิกฤตอย่างหนึ่งสำหรับการผลิตสารสีของ *Monascus* เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความชื้นสัมพัทธ์หรือการถ่ายเทออกซิเจนเป็นผลต่อการเปลี่ยนแปลง Metabolism ของเซลล์ ความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารสีมีค่าอยู่ที่องค์ประกอบของอากาศตามธรรมชาติ คือ ออกซิเจน 0.21 atm และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.02 atm

5) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุ โมนาโคลิน เค และการเจริญเติบโตของรา *Monascus* ทั้งนี้ชนิดของรงควัตถุและการหลั่งรงควัตถุออกนอกเซลล์มีความสัมพันธ์กับแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของรา *Monascus* ได้แก่ สารอินทรีย์ เช่น เปปโติน และสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียและไนเตรต (Carvalho และคณะ, 2003) โดยเฉพาะโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) ซึ่งมีผลช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์สารสีแดงให้สามารถละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น (Lin, 1973; Johns และ Stuart, 1991; Chens และ Johns, 1993) นอกจากนี้หลายๆ งานวิจัยได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารโมนาโคลิน เค พบว่า แหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ Histidine โซเดียมกลูตาเมต และเปปโติน เหมาะสมต่อการผลิตโมนาโคลิน เค จาก *Monascus* sp. ขณะที่แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมอะซิเตรต เมไทโอนีน และยูเรีย ไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารโมนาโคลิน เค (Lian และคณะ, 2007; Ng และ Shyn, 2004; Wang และคณะ, 2003)

Lin (1973) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์รงควัตถุของ *M. purpureus* F-2 ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว โดยบ่มราที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 วัน ใน Erlenmeyer flask ที่ความเร็วรอบ 160 rpm แหล่งไนโตรเจนจะเติมที่อัตราส่วน 13.0 mg ต่อกลูโคสเข้มข้น 3% ในน้ำ 50 ml พบว่า โมโนโซเดียมกลูตาเมต โซเดียมไนเตรต และโพแทสเซียมไนเตรต เหมาะสมสำหรับการผลิตรงควัตถุสีแดง ในทางตรงกันข้ามสารอินทรีย์ เช่น เปปโติน และ Yeast extract ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตรงควัตถุสีแดง

ทั้งนี้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการผลิตรงควัตถุสีแดงมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 1.26% (Lin และ Demain, 1991) นอกจากนี้กรดอะมิโน เช่น Histidine และ Serine ยังช่วยปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีแดง แต่กรดอะมิโน เช่น Leucine, Valine, Lysine และ Methionine มีผลทำให้การผลิตรงควัตถุสีแดงลดลง (Lin และ Demain, 1994)

อย่างไรก็ตาม Chen และ John (1993) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์รงควัตถุของ *M. purpureus* UQM 192F (FRR 2190) ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว โดยหมักรา *Monascus* ในแหล่งคาร์บอนกลูโคส และเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่าง เปปโติน แอมโมเนีย และไนเตรต ควบคุม pH 6.5

ตลอดการทดลอง พบว่าเปปไทด์สามารถช่วยกระตุ้นให้ราสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงได้สูงสุด รองมาคือ แอมโมเนียและไนเตรต ตามลำดับ

นอกจากนี้ Wang และคณะ (2004) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค และซีทรินินด้วย *M. purpureus* NTU 601 โดยเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% และ 0.1%, เมไทโอนีน 0.5% และ 1.0%, ยูเรีย 0.5%, โมโนเดียมกลูตาเมต 1.0% ลงในข้าว จากนั้นทำการหมักข้าวด้วย *Monascus* ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 9 วัน ผลการทดลองพบว่า เพียงการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% สามารถปรับปรุงการผลิตโมนาโคลิน เค ได้ ขณะที่การผลิตซีทรินินเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

6) แร่ธาตุและอาหารเสริม

Lin (1973) ศึกษาประสิทธิภาพของวิตามินบีที่มีผลต่อการสังเคราะห์รงควัตถุของ *M. purpureus* F-2 พบว่ากรดโฟลิกสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุได้ แต่วิตามินบีชนิดอื่น อันได้แก่ PABA, thiamine, biotin, Ca-pantothenate, riboflavin, niacin และ pyridoxine ไม่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus* ได้

นอกจากนี้ Carvalho และคณะ (2003) เสนอว่า ฟอสเฟตเข้มข้นสูงและแมกนีเซียมซัลเฟตมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุของ *M. purpureus* แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันข้าวโพด และโมโนโซเดียมกลูตาเมตจะช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุ ขณะที่การเติม Tween 80 เข้มข้น 0.4% สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุ โดยไม่มีผลกระทบต่ออายุของ *Monascus*

2.4 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตซีทรินินของรา *Monascus*

การลดปริมาณการผลิตซีทรินินจากเชื้อราสามารถปฏิบัติได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธีการกลายพันธุ์ การควบคุมองค์ประกอบของอาหาร การควบคุมสภาวะการเลี้ยง หรือวิธีการสกัด ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตซีทรินิน ของรา *Monascus* อันได้แก่ ปัจจัยด้านสารอาหาร เช่น แหล่งไนโตรเจน กรดไขมันและ Methylketone และปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณก๊าซออกซิเจน ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งและเหลว สามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

1) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการช่วยลดการผลิตซีทรินิน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการลดซีทรินินของ *Monascus* ได้แก่ เมไทโอนีน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต

Blanc และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจน (ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และเมไทโอนีน) ต่อการผลิตซีทรินินของ *M. ruber* ATCC 96218 โดยหมักราที่อุณหภูมิ 27 °C ในอาหารเหลวด้วยแหล่งคาร์บอนเป็นเอทานอล ปรับ pH เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 6.5 ผลการทดลองพบว่า ราสามารถผลิตซีทรินินได้ 100-120 mg/L เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตและโมโนโซเดียมกลูตา

เมตเป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามเมื่อใช้เมไทโอนีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของซิทรีนินลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ทั้งนี้การใช้เมไทโอนีนและยูเรียจะมีผลต่อการลดลงทั้งการสังเคราะห์กรดไขมันและซิทรีนินของ *Monascus*

Wang และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตซิทรีนิน Monacolin K และ γ -aminobutyric acid (GABA) ของ *M. purpureus* NTU 601 ด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต เมไทโอนีนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า เมไทโอนีนและยูเรียสามารถยับยั้งการผลิตซิทรีนิน และ Monacolin K โดยซิทรีนินจะลดลงจาก 813 ppb เป็น 55-81 ppb เมื่อใช้เมไทโอนีนที่ความเข้มข้น 0.5-1.0% และยูเรียเข้มข้น 0.5% อย่างไรก็ตามโมโนโซเดียมกลูตาเมตและแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 1.0% สามารถลดการผลิตซิทรีนินจาก 813 ppb เป็น 90-98 ซึ่งแหล่งไนโตรเจนได้แก่ เมไทโอนีน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต สามารถยับยั้งการผลิตซิทรีนินได้ตามลำดับ

2) กรดไขมันและ Methylketone

กรดไขมันเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการยับยั้งการผลิตซิทรีนิน ทั้งนี้กรดไขมันที่สามารถลดซิทรีนินเป็นกรดไขมันที่มีขนาดสายกลาง (Medium-chain fatty acids) อันได้แก่ Octanoic acid (C_8), Decanoic acid (C_{10}) และ Dodecanoic acid (C_{12}) อีกทั้งกรดไขมัน Octanoic acid (C_8) สามารถเพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้นของ *Monascus* ได้ ซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

Hajjaj และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของกรดไขมันต่อการผลิตซิทรีนินของรา *M. ruber* ATCC 96218 โดยเติมกรดไขมัน ได้แก่ Hexanoic acid (C_6), Octanoic acid (C_8), Decanoic acid (C_{10}), Dodecanoic acid (C_{12}), Myristic acid (C_{14}), Stearic acid (C_{16}) และ Oleic acid (C_{18}) เข้มข้น 1 mM ในอาหารเหลว พบว่า Octanoic acid เป็นกรดไขมันเพียงตัวเดียวที่สามารถเน้นการผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ เนื่องจาก Octanoic acid เป็นกรดไขมันตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดไขมัน นอกจากนี้ Medium-chain fatty acids ได้แก่ Octanoic acid, Decanoic acid และ Dodecanoic acid สามารถยับยั้งการผลิตซิทรีนิน โดยเฉพาะ Dodecanoic acid ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุด ส่วน Hexanoic acid, Myristic acid, Stearic acid และ Oleic acid ไม่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการผลิตซิทรีนิน เนื่องจาก Medium-chain fatty acids (C_8 - C_{12}) จะถูกดูดซึมโดยกระบวนการ β -oxidation ภายใน Peroxisomal เปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA หรือ Medium-chain fatty acids ได้แก่ Octanoic acid, Decanoic acid และ Dodecanoic acid ถูกเมทาบอลิซึมด้วยกระบวนการ β -decarboxylation เปลี่ยนเป็น Methylketones ได้แก่ Heptanone, 2-nonanone และ 2-undecanone ตามลำดับ จากนั้น Methylketones จะเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA ด้วยกระบวนการ β -oxidation ภายใน Peroxisomal

ทั้งนี้ Medium-chain fatty acids หรือ Methylketones เป็นสาเหตุของการยับยั้งการผลิตซิทรีนิน เนื่องจากซิทรีนินหรือสารตัวกลางในการสร้างซิทรีนินจะถูกทำลายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ Peroxisome หรือ Peroxisomal enzyme (peroxidase) จากการเหนี่ยวนำของกรดไขมันและ Methylketones อย่างไรก็ตามกรดไขมัน Long-chain fatty acids (C_{14} - C_{18}) หรือ Short-chain fatty acids (C_6) จะ

ไม่เปลี่ยนเป็น Methylketones เนื่องจากกรดไขมันดังกล่าวจะถูกดูดซึมโดยกระบวนการ β -oxidation ภายใน Mitochondrial จึงเป็นผลให้กรดไขมันทั้ง Long-chain fatty acids (C_{14} - C_{18}) และ Short-chain fatty acids (C_6) ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการผลิตซีตรินินของ *Monascus*

3) อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของ *Monascus* เช่น ซีตรินิน Monacolin K และ γ -aminobutyric acid (GABA) โดยรา *Monascus* จะผลิตซีตรินินลดลง เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30-34 °C และสามารถผลิตซีตรินินได้สูงขึ้น เมื่อเจริญที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 26 °C (Wang และคณะ, 2003)

4) Water activity

Water activity และความชื้นมีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตซีตรินินของรา ซึ่งจากงานวิจัยของ Comerio และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของ Water activity (0.800, 0.810, 0.825 และ 0.885) ต่อการเจริญและการผลิตซีตรินินของ *Penicillium citrinum* ในข้าวสาลี พบว่าซีตรินินเพิ่มขึ้นเมื่อ Water activity สูงขึ้น โดยที่ Water activity เท่ากับ 0.885 รา *P. citrinum* จะผลิตซีตรินินได้สูงถึง 20,000 $\mu\text{g/kg}$ แต่ที่สภาวะ Water activity น้อยกว่า 0.810 ราสามารถเจริญโดยไม่ผลิตซีตรินิน

อย่างไรก็ตาม Water activity และความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการลดการผลิตซีตรินินของ *Monascus* ยังไม่มีการแนะนำในเบื้องต้น

5) ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการสังเคราะห์รงควัตถุและซีตรินิน โดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายของปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation และเป็นสารตั้งต้นของ Monooxygenases ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมของเชื้อรา โดยเฉพาะสารทุติยภูมิ อย่างไรก็ตามบทบาทของ Monooxygenases ต่อการสังเคราะห์รงควัตถุยังไม่มีการอธิบาย (Hajjaj และคณะ, 1999)

Hajjaj และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของ Oxygen supply ต่อการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงและซีตรินินของ *M. ruber* ATCC 96218 ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว โดยแปรผัน Relative oxygen transfer coefficients (rOTC) ที่ 0.33, 1.00, 1.48, 2.22, 3.16 และ 7.07 ผลการทดลองพบว่า การผลิตซีตรินินแปรผันตรงกับการถ่ายเทออกซิเจน โดยที่สภาวะ High relative oxygen transfer coefficients รา *Monascus* จะผลิตสารสีแดงและซีตรินินปริมาณสูง โดยอัตราการผลิตซีตรินินจะสูงกว่าอัตราการผลิตรงควัตถุสีแดง แต่ที่สภาวะ Low relative oxygen transfer coefficients รา *Monascus* จะผลิตสารสีแดงและซีตรินินปริมาณต่ำ แต่อัตราการผลิตซีตรินินจะต่ำกว่าอัตราการผลิตรงควัตถุสีแดง

บทที่ 3 วัตถุดิบและวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อราและการเก็บรักษา

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

3.2 การผลิตข้าวแดง

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

- 1) แช่ข้าวในน้ำกลั่นปริมาณมากเกินพอ นาน 1 ชม.
- 2) เทน้ำออก แล้วล้างข้าวใส่ภาชนะ
- 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 ชม.
- 8) ร่อนผ่านตะแกรง 80 mesh

หมายเหตุ วิธีการเตรียมหัวเชื้อข้าวแดง (Seed culture)

หัวเชื้อข้าวแดงเตรียมโดยเติมสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 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 การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตตรงควัตถุและสารโมนาโคลิโน เค และลดปริมาณชิตรินินจาก *M. purpureus* ด้วยวิธี Fraction factorial design (FFD)

ขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตตรงควัตถุและสารโมนาโคลิโน เค และลดปริมาณชิตรินิน ของ *M. purpureus* ด้วยวิธี Fractional factorial design โดยคัดเลือกปัจจัยทั้งจากสภาวะแวดล้อมและแหล่งอาหาร ซึ่งปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมที่คาดว่าเป็นปัจจัยที่ส่งผลการผลิตตรงควัตถุและสารโมนาโคลิโน เค และลดปริมาณชิตรินิน ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และระยะเวลาการหมัก ปัจจัยทางแหล่งอาหารประกอบด้วย แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน และกรดไขมัน ได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) เปปโตน โซเดียมไนเตรต (NaNO_3) เมไทโอนีน กลูโคส เอทานอล กลีเซอรอล กรดออกทานอิก และกรดโดเดคาโนอิก ดังนั้นตัวแปรอิสระทั้งหมดมี 13 ตัวแปร โดยตัวแปรอิสระจะถูกเข้ารหัสให้อยู่ในช่วงระดับสูง (1) และระดับต่ำ (-1) ดังนั้นตัวแปรที่ถูกเข้ารหัสจะมีค่าดังตารางที่ 1

ใช้แผนการทดลองแบบเศษส่วนเชิงแฟคทอเรียลแบบสองระดับ (Fractional Factorial 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 และ คณะ, 1981) การสังเคราะห์หรั่งควัตถุ (Johns และ Stuart, 1991) ปริมาณโมนาโคลิน เค (Lee และคณะ, 2006) และชิตรินิน (Lee และคณะ, 2006) ทั้งนี้จะคัดเลือกปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตหรั่งควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณชิตรินินที่มีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าหรือเท่ากับ 95% มาทำการวิเคราะห์หาสถานะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวผลตอบ (Response Surface Methodology, RSM) แบบ Central composite design (CCD)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของแต่ละตัวแปรที่ระดับต่างๆ ใน Fractional factorial design สำหรับการผลิตหรั่งควัตถุ สารโมนาโคลิน เค และการลดปริมาณชิตรินินด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง

Variable	Variable code	Level		
		-1	0	+1
Monosodium glutamate (MSG) (%w/w)	X ₁	0.1	0.4	0.7
Ammonium chloride (NH ₄ Cl) (%)	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

ตารางที่ 2 Fractional factorial design matrix สำหรับการประเมินปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตรงควัตถุ สารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรีนินของ *M. purpureus*

Run	Components												
	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 X₁,...,X₁₃ คือ independent variable

3.4 การศึกษาเพื่อหาเหมาะสมในการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรีนิน ด้วยวิธี Response surfaces method (RSM)

นำปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรีนิน 5 ปัจจัย คือ NaNO₃ เมไทโอนีน กลีเซอรอล อุณหภูมิและระยะเวลาการหมัก มาศึกษาหาเหมาะสมในการผลิตรงควัตถุและสารโมนาโคลิน เค และลดปริมาณซิตรีนิน ด้วยวิธี Response surfaces method แบบ Central composite design (CCD) แต่ละตัวแปรถูกศึกษาที่ 5 ระดับ (ตารางที่ 3) โดยมีจำนวนชุดการทดลอง 32 การทดลอง (ตารางที่ 4)

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

ตารางที่3 ความเข้มข้นตัวแปรตามแผนการทดลอง Central composite design สำหรับการผลิตผงวัตถุ สารโมนาโคลีน เค และการลดปริมาณซิทรีนิน

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 (°C)	X ₁₁	22	25	28	31	34
Cultivation time (days)	X ₁₃	10	13	16	19	22

ตารางที่ 4 Central composite design matrix สำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตรงควัดู สารโมโนโค
ลิ น เค และลดปริมาณซิติรีนินของ *M. purpureus*

No.	ระยะเวลาการหมัก (days)	กลีเซอรอล (%)	อุณหภูมิ (°C)	เมไทโอนีน (%)	NaNO ₃ (%)
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 ชม. โดยทำการทดลองดังนี้

- 1) แช่ข้าว 5 kg ในน้ำให้มากเกินพอ นานประมาณ 1 ชม.
- 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 เทข้าวแดงที่เตรียมไว้ลงถัง โดยเลี้ยงที่ 25-30 °C หมุนถังด้วยความเร็วรอบ 0.2 รอบต่อนาที (rpm) และให้ความเร็วอากาศเข้าประมาณ 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) และซีทรินิน (Lee และคณะ, 2006)

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

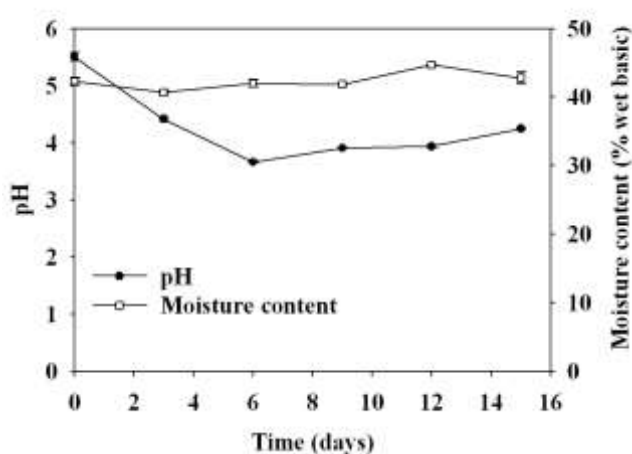
ใช้แผนการทดลองแบบเศษส่วนเชิงแฟคทอเรียลแบบสองระดับ และแผนการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Minitab version 16

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิจากรา *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)

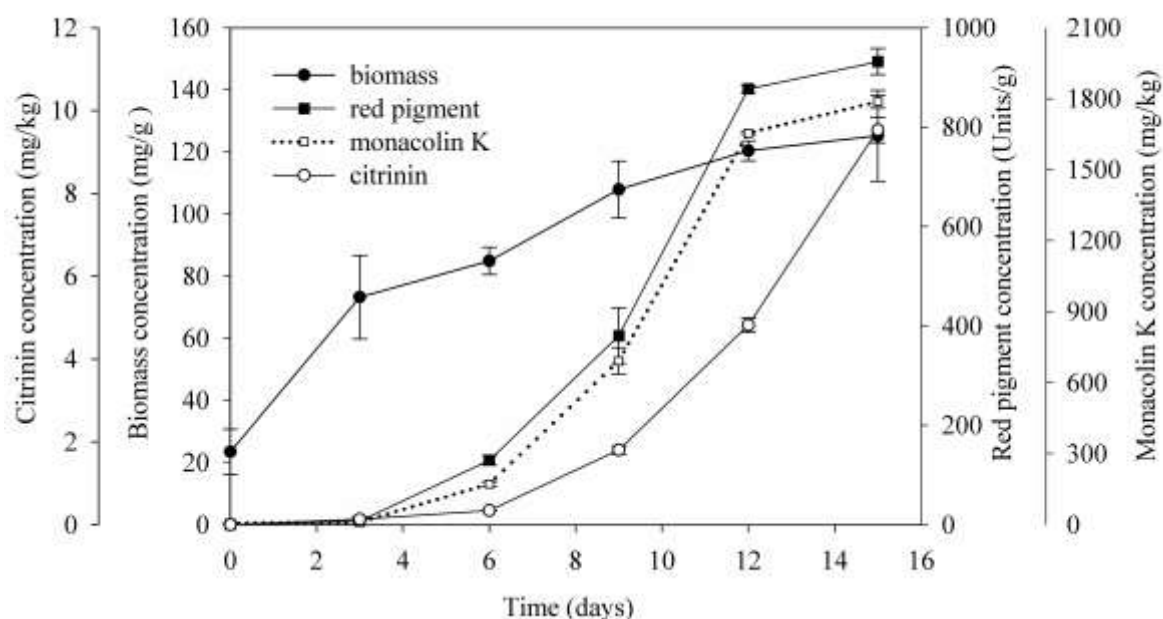
เมื่อพิจารณาผลของความเป็นกรด-ด่าง พบว่าข้าวแดงมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงในระหว่างการหมักตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 6 และเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนมีค่าสุดท้ายเท่ากับ 4.25 (รูปที่ 3) ทั้งนี้การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงแรกของการหมัก เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของกรดออร์แกนิก 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 โดยขั้นตอนแรกของการวิจัยคือ การหาปัจจัยสำคัญจากปัจจัยทาง

กายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค รงควัตถุและซิตรีนินของ *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 สารโมนาโคลิน 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 รงควัตถุ 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	<i>t</i> values	<i>p</i> -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 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการผลิตโมโนโคลิน เก 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 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการผลิตชิตรีนินตาม FFD

Variable	Variable code	Effect (Ex_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 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการผลิตตรงควัตถุสีแดงตาม 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

ตารางที่11 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการผลิตตรงควัตถุสีส้มตาม 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

ตารางที่12 การประเมินผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อการผลิตตรงควัตถุสีเหลืองตาม FFD

Variable	Variable code	Effect (Ex _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* โดยวิธีพินผิวตอบสนองแบบ 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 ปริมาณโมนาโคลิน เเค (mg/kg substrate dry weight), Y_2 , Y_3 และ Y_4 ปริมาณความเข้มข้นสีแดง สีส้ม และสีเหลือง (OD units/g substrate dry weight), Y_5 คือปริมาณซิทรีนิน (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} ของแบบจำลองการถดถอยสำหรับผลิตโมนาโคลิน เเค รงควัตถุสีแดง สีส้ม สีเหลือง สารซิทรีนินและปริมาณชีวมวลมีค่าเท่ากับ 0.039, 0.026, 0.013, 0.039, 0.033, 0.022 ซึ่งหมายความว่าสมการอันดับที่สองมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หรือสมการอันดับที่สองมีความเพียงพอสำหรับการทำนายบนพื้นผิวตอบสนอง นอกจากนี้แบบจำลองของการผลิตโมนาโคลิน เเค รงควัตถุสีแดง สีส้ม สีเหลือง สารซิทรีนินและปริมาณชีวมวล มีค่า $R^2 = 0.838, 0.845, 0.874, 0.838, 0.853$ and 0.859 ตามลำดับ แสดงว่าแบบจำลองการผลิตโมนาโคลิน เเค รงควัตถุสีแดง สีส้ม สีเหลือง สารซิทรีนิน และปริมาณชีวมวลสามารถอธิบายความผันแปรของข้อมูลได้ 83.8%, 84.5%, 87.4%, 83.8%, 85.3% และ 85.9% ตามลำดับ ค่าที่ทำนายได้จากสมการถูกนำไปสร้างกราฟ Response surface plot (รูปที่ 5) ซึ่งผลจากการคำนวณด้วย Polynomial models พบว่าค่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโมนาโคลิน เเค รงควัตถุ และลดปริมาณซิทรีนิน คือ NaNO_3 0.01% (w/w) เมไทโอนีน 0.14% (w/w) กลีเซอรอล 2% (v/w) ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 16 วัน ซึ่งสามารถปรับปรุงการผลิตโมนาโคลิน 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 ขณะที่ความเข้มข้นของซิทรีนินลดลงจาก 9.53 mg/kg เป็น 0.14 mg/kg ซึ่งลดลง 68 เท่า

เมื่อทดสอบหมักซ้ำแดงตามวิธี Optimization ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถผลิตโมนาโคลิน เเค รงควัตถุสีแดง สีส้ม สีเหลือง และซิทรีนินได้ 5900 mg/kg, 1200 units/g, 900 units/g, 1700 units/g, 0.26 mg/kg ตามลำดับ โดยโมนาโคลิน เเค และรงควัตถุเพิ่มขึ้น 3.28 และ 1.28-1.54 เท่า ตามลำดับ ขณะที่ซิทรีนินลดลง 36.65 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหมักแบบดั้งเดิม

ตารางที่13 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

ตารางที่13 (ต่อ) ผลของการการเจริญและการผลิตสารโมนาโคลิน เค และซิตรีนิน จาก *Monascus* ตามการทดลอง CCD

Trial	Response ($\pm$ Standard deviation)								
No.	Biomass			Monacolin K			Citrinin		
	(mg/g substrate dry weight)			(mg/kg substrate dry weight)			(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

ตารางที่14 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

ตารางที่14 (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	<i>t</i> level	<i>p</i> -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 สำหรับการผลิตโมโนโคลีน เค

Parameter	Coefficients	Standard error	<i>t</i> -level	<i>p</i> -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 สำหรับการผลิตซีตรินิน

Parameter	Coefficients	Standard error	<i>t</i> -level	<i>p</i> -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	<i>t</i> -level	<i>p</i> -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 สำหรับการผลิตตรงควัตถุสีส้ม

Parameter	Coefficients	Standard error	<i>t</i> level	<i>p</i> -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

ตารางที่20 ผลการวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) ของ CCD สำหรับการผลิตรงควัตถุสีเหลือง

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*temerature	-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

ตารางที่21 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 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตสาร โมโนโคลีน 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 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตซิทรีนิน

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 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตรงควัตถุสีแดง

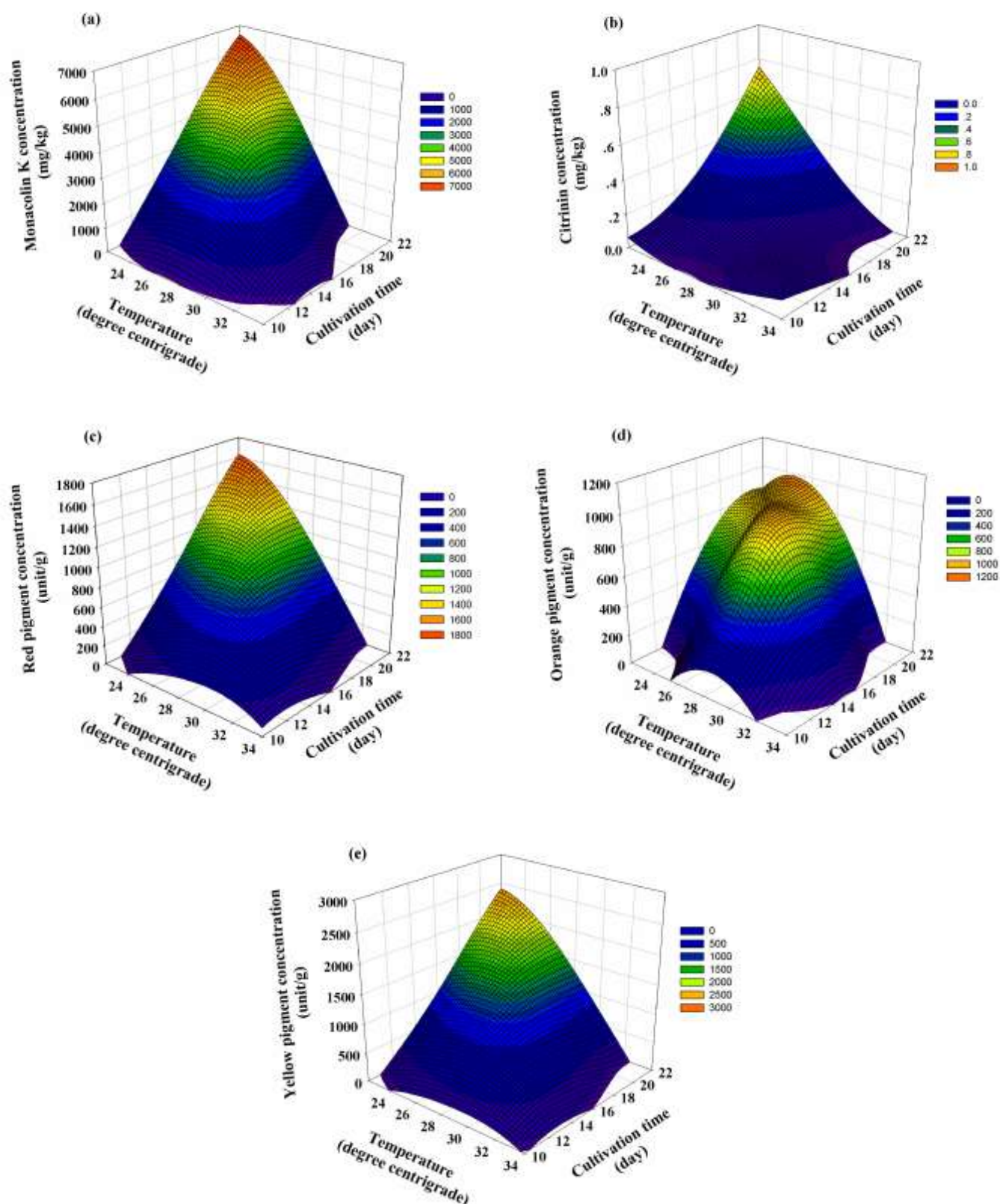
Mode	Sum of squares	d.f.	Mean of squares	<i>F</i>	<i>P</i>	R^2
Regression	4383359	20	219168	3.20	0.026	0.853
Residual error	753294	11	68481			
Lack of fit	712685	6	118781	14.63	0.005	
Pure error	40609	5	8122			
Total	5136653	31				

ตารางที่25 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตรงควัตถุสีส้ม

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				

ตารางที่26 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตตรงควัตถุสีเหลือง

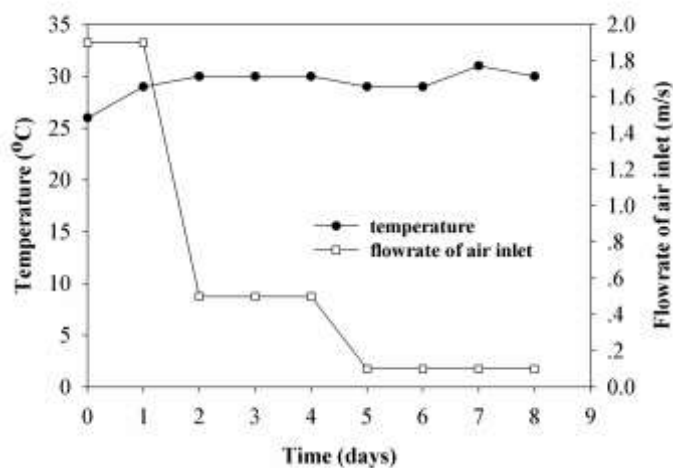
Mode	Sum of squares	d.f.	Mean of squares	<i>F</i>	<i>P</i>	R^2
Regression	10175630	20	508782	2.85	0.039	0.838
Residual error	1960943	11	178268			
Lack of fit	1874405	6	312401	18.05	0.003	
Pure error	86537	5	17307			
Total	12136573	31				



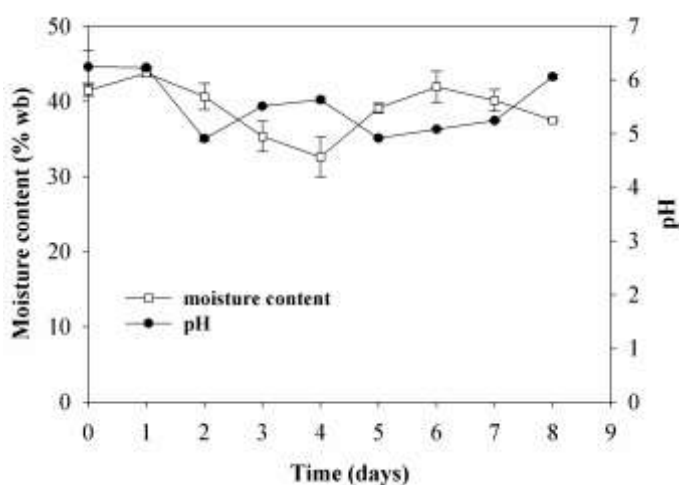
รูปที่ 5 กราฟแสดงพื้นที่การตอบสนองของปริมาณนาโคลิน เค (a), ซิตรีนิน (b), รงควัตถุสีแดง (c), สีส้ม (d) และสีเหลือง (e) ที่ความแตกต่างของอุณหภูมิและระยะเวลาการหมัก

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 *เจริญเติบโตช้า* เป็นผลให้ง่ายต่อการปนเปื้อน ดังนั้นจึงทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *M. purpureus* โดย Temperature profile และความเร็วอากาศขาเข้าระหว่างการเลี้ยงเชื้อราในถังหมักแบบหมุนแสดงดังรูปที่ 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 อุณหภูมิและความเร็วอากาศขาเข้าระหว่างการหมักข้าวแดงถึงหมักแบบหมุน

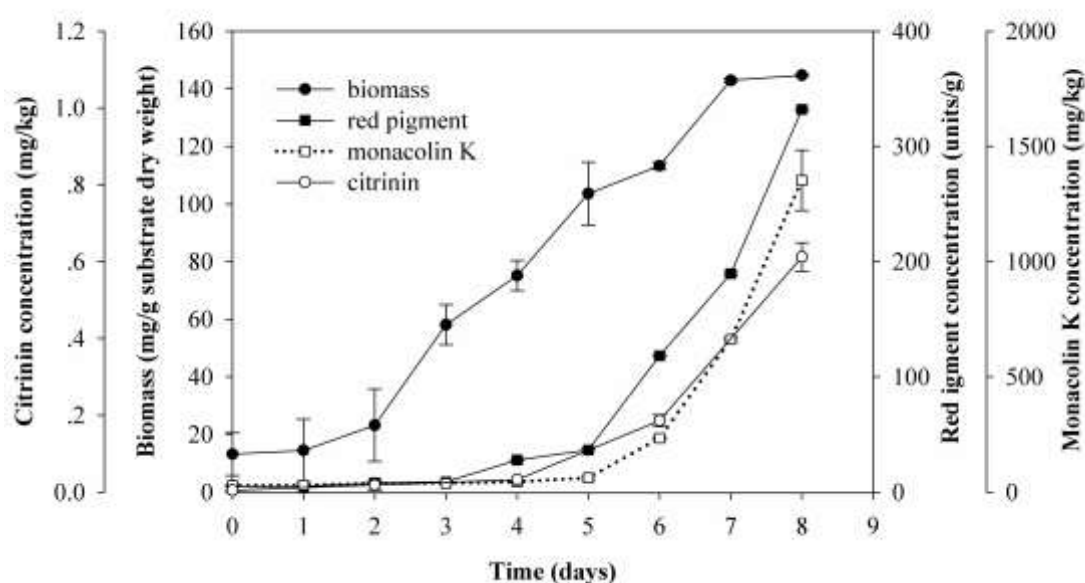


รูปที่ 7 ความชื้นและความเป็นกรด-ด่าง ของข้าวแดงในระหว่างการหมัก ด้วยถังหมักแบบหมุน

จากการควบคุมความเร็วลมขาเข้าที่ 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) ดังนั้นจึงทำการลดความเร็วลมขาเข้าเป็น 0.1 m/s ในวันที่ 5 ของการหมักและพ่นน้ำลงข้าว เพื่อเพิ่มปริมาณความชื้นของข้าวแดง โดยปรับความชื้นเพิ่มขึ้นประมาณ 40% (รูปที่ 5) ซึ่งเป็นช่วงความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของรา *Monascus* อีกทั้งการเพิ่มปริมาณความชื้นที่มากเกินไป จะทำให้ง่ายต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น

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

นอกจากนั้นเชื้อราามีช่วง Idiophase หรือ Production phase ในการผลิตสารทุติยภูมิ ได้แก่ โมนาโคลิน เค ริงควัตถุ และซิตรีนิน ภายหลังจากวันที่ 4-5 ของการหมัก (รูปที่ 8) โดยวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 8) เชื้อรา มีปริมาณความเข้มข้นของโมนาโคลิน เค ริงควัตถุสีแดง สีส้มและสีเหลือง และปริมาณซิตรีนิน 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 และริงควัตถุที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่การผลิตซิตรีนินมีค่าลดลง ด้วยการหมักในถังหมักแบบหมุน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหมักแบบดั้งเดิม (Basal medium) ที่เวลาการหมักเท่ากัน



รูปที่ 8 ปริมาณชีวมวล และปริมาณโมนาโคลิน เค ริงควัตถุ และซิตรีนิน

จากรา *Monascus* ในระหว่างการหมักด้วยถังหมักแบบหมุน

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทางสถิติแบบสองขั้นตอนต่อการผลิตสารโมนาโคลิน เค และรงควัตถุ และลดการผลิตชิตรินินจากเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3541 ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้แผนการทดลองแบบ Fractional factorial design พบว่า กลีเซอรอล เมไทโอนีน โซเดียมไนเตรท อุณหภูมิ และระยะเวลาการหมัก เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตโมนาโคลิน เค และรงควัตถุ และลดการผลิตชิตรินินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเมื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมโดยใช้แผนการทดลองแบบ Central composite design พบว่า ปริมาณที่เหมาะสม คือ กลีเซอรอล 2% (v/w) เมไทโอนีน 0.14% (w/w) โซเดียมไนเตรท 0.01% (w/w) ที่อุณหภูมิ 25 °C ด้วยระยะเวลาการหมักนาน 16 วัน ซึ่งสามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุด 5900 mg/kg และรงควัตถุสีแดง สีส้ม และสีเหลืองเท่ากับ 1200, 900 และ 1700 OD units/g ตามลำดับ อีกทั้งยังสามารถผลิตชิตรินินได้ต่ำสุดเท่ากับ 0.26 mg/kg โดยโมนาโคลิน เค และรงควัตถุที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้น 3.28 และ 1.28-1.54 เท่า ตามลำดับ ขณะที่ชิตรินินลดลง 36.65 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหมักแบบดั้งเดิม นอกจากนี้การผลิตข้าวแดงตาม Optimization method โดยใช้ถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร สามารถผลิตโมนาโคลิน เค และรงควัตถุเพิ่มขึ้น ขณะที่การผลิตชิตรินินลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหมักแบบดั้งเดิมที่เวลาการหมักเท่ากัน

เอกสารอ้างอิง

- Aidoo, K.E., Handry, R. & Wood, B.J.B. (1981). Estimation of Fungal Growth in a Solid State Fermentation System. *European Journal Applied Microbiology Biotechnology*. **12**, 6-9.
- The Association of Official Analytical Chemists. (1995). *Official Method of the Association of Official Analytical Chemists*. **15th ed.** The Association of Official Analytical Chemists. Virginia.
- Blanc, P.J., Laussac, J.P., Bars, J.L., Loret, M.O., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J.P., Santerre, A.L. & Goma, G. (1995). Characterization of Monascidin A from *Monascus* as Citrinin. *International Journal of Food Microbiology*. **27**, 201-213.
- Blanc, P.J., Loret, M.O. & Goma, G. (1995). Production of Citrinin by Various Species of *Monascus*. *Biotechnology letters*. **17**, 3, 291-294.
- Carvalho, J. C., Pandey, A., Babitha, S. & Soccol, C. R. (2003). Production of *Monascus* Biopigments. *Biotechnology. Agro-Food industry hi-technology*. 37-41.
- Carvalho, J.C., Pandey, A., Oishi, B.O., Brand, D., Rodriguez-Leon, J.A. & Soccol, C.R. (2006). Relation between Growth, Respirometric Analysis and Biopigments Production from *Monascus* by Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. **29**, 262-269.
- Chen, M. H. & Johns, M. R. (1993). Effect of pH and Nitrogen Source on Pigment Production by *Monascus purpureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **40**, 132-138.
- Comerio, R., Fernandez, V.E. & Vaamonde, G. (1998). Influence of Water Activity on *Penicillium citrinum* growth and Kinetics of Citrinin Accumulation in Wheat. *International Journal of Food Microbiology*. **42**, 219-223.
- Deacan, J. (2006). *Fungal Biology*, Blackwell publishing, Cornwall, UK.
- Erdogral, O. & Azirak, S. (2004). Review of the Red Yeast Rice (*Monascus purpureus*). *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*. **2**, 37-49.
- Griffin, D.H. (1994). *Fungal Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Publication. Singapore, pp. 132.
- Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Goma, G., Uribelarrea, J.L. & Loubiere, P. (1999). Improvement of Red Pigment/Citrinin Production Ratio as a Function of Environmental Conditions by *Monascus ruber*. *Biotechnology and Biochemical Engineering*. **64**, 4, 487-501.
- Hajjaj, H., Blanc, P., Groussac, E., Uribelarrea, J.L., Goma, G. & Loubiere, P. (2000). Kinetic Analysis of Red Pigment and Citrinin Production by *Monascus ruber* as a Function of Organic Acid Accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*. **27**, 619-625.

- Hajjaj, H., Klaebe, A., Goma, G., Blanc, P.J., Barbier, E. & Francois, J. (2000). Medium-Chain Fatty Acids Affect Citrinin Production in the Filamentous Fungus *Monascus ruber*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1120-1125.
- Hajjaj, H., Klaebe, A., Loret, M.O., Goma, G., Blanc, P.J. & Francois, J. (1999). Biosynthetic Pathway of Citrinin in the Filamentous Fungus *Monascus ruber* as Revealed by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance. *Applied and Environmental Microbiology*, 311-314.
- Hajjaj, H., Klaebe, A., Loret, M.O., Tzedakis, T., Goma, G. & Blanc, P.J. (1997). Production and Identification of N-Glucosylrubropunctamine and N-Glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and Occurrence of Electron Donor-Acceptor Complexes in These Red Pigments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2671-2678.
- Han, O. & Mudgett, R. E. (1992). Effects of Oxygen and Carbon Dioxide Partial Pressured on *Monascus* Growth and Pigment Production in Solid-state Fermentations. *Biotechnology Progress*. **8**, 5-10.
- Johns, M. R. & Stuart, D. M. (1991). Production of Pigment by *Monascus purpureus* in Solid Culture. *Journal of Industrial Microbiology*. **8**, 23-28.
- Lee, C. L., Wang, J.J., Kuo, S.L. & Pan, T.M. (2006). *Monascus* Fermentation of Dioscorea for Increasing the Production of Cholesterol-lowering agent-Monacolin K and Antiinflammation Agent-Monascin. *Applied Microbiology Biotechnology*. **72**, pp. 1254-1262.
- Lian, W. P., Nan, X. Z. & Lin, C. P., 2007, "Monacolin K Production by *Aspergillus terreus* in Solid-State Fermentation", *Journal of Zhejiang University Science A*, **8**, pp. 1521-1526.
- Lin, C. F. (1973). Isolation and Culture Conditions of *Monascus* sp. for the Production of Pigment in a Submerged Culture. *Journal of Fermentation Technology*. **51**, 6, 407-414.
- Manzoni, M. & Rollini, M. (2002). Biosynthesis and Biotechnology Production of Statins by Filamentous Fungi and Application These Cholesterol-Lowering Drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **58**, pp. 555-564.
- Mitchell, D.A. & Lonane, B.K. (1992). Definition, Characteristics and Potential, *In Solid State Cultivation*, Elsevier Applied Science, Barking, Essex, pp. 1-13.
- Muthuwong, K. (2003). *Production of Monascus Fungal Pigments by Solid Substrate Fermentation*. Master of Science. Applied Microbiology. Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi.
- Ng, C.C. & shyu, Y.T. (2004). Development and Production of Cholesterol-lowering *Monascus-nata* complex. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **20**, pp. 875-879.
- Panda, B. P., Javed, S. & Ali, M. (2010). Optimization of Fermentation Parameters for Higher monacolin K Production in Red Mold Rice through Co-Culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. *Food and Bioprocess Technology*. **3**, pp. 373-378.

- Rosenblitt, A., Agosin, E., Delgado, J. & Correa, R. P. (2000). Solid Substrate Fermentation of *Monascus purpureus*: Growth, Carbon Balance, and Consistency Analysis. *Biotechnology progress*. **16**, 152-162.
- Su, Y.C., Wang, J.J., Lin, T.T. & Pan, T.M. (2003). Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **30**, pp. 41-46.
- Teng, S. S. & Feldheim, W. (2000). The Fermentation of Rice for Anka Pigment Production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **25**, 3, 141-146.
- Teng, S. S. & Feldheim, W. (2001). Anka and Anka Pigment production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **26**, 5, 280-282.
- Wang, J.J., Lee, C.L. & Pan, T.M. (2003). Improvement of Monacolin K, γ -amino butyric Acid and Citrinin Production Ration as a Funtion of Environmental Conditions of *Monascus purpureus* NTU 601. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **33**, 669-676.
- Wang, J.J., Lee, C.L. & Pan, T.M. (2004). Modified Mutation Method for Screening Low Citrinin-Producing Stratin of *Monascus pupureus* on Rice Culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**, 6977-6982.
- Wild, D., Toth, G., & Humpf, H. U. (2002). New *Monascus* Metabolite Isolated from Red Yeast Rice (Angkok, Red Koji). *Journal of Agriculture of Food Chemistry*. **50**, 3999-4002.
- Xu, B.J., Jia, X.Q., Gu, L.J. & Sung, C.K. (2006). Review on the Qualitative and Quantitative analysis of the Mycotoxin Citrinin. *Food Control*. **17**, 271-285.
- Yongsmith, B., Kitprechavanich, V., Chitradon, L., Chaisrisook, C. and Budda, N. (2000). Color Mutants of *Monascus* sp. KB9 and Their Comparative Glucoamylase on Rice Solid Culture. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **10**, pp. 263-272.
- Yongsmith, B., Tabloka, W., Yongmanitchai, W. & Bavavoda, R. (1993). Culture Conditions for Yellow Pigment Formation by *Monascus* sp. KB. 10 grown on cassava medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **9**, 1, 85-90.