

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อราจากข้าวแดงและการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนเศษข้าวอบกรอบ โดยวิธี solid-state cultivation

จากการคัดแยก *Monascus* จากตัวอย่างข้าวแดงแหล่งต่างๆในประเทศไทย โดยวิธี direct isolation บนอาหาร potato dextrose agar สามารถแยกเชื้อราได้ 15 ไอโซเลท และจากการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเทียบกับคำบรรยายลักษณะเชื้อราจากหนังสือ Fungi and Food Spoilage (Pitt and Hocking, 1997) พบว่า เชื้อราทั้งหมด 15 ไอโซเลท จัดเป็น *Monascus* spp.

จากการทดลองเพาะเลี้ยง *Monascus* 15 ไอโซเลท ลงบนเศษข้าวอบกรอบในสภาพการหมักแบบแห้ง พบว่า *Monascus* 15 ไอโซเลท สามารถเจริญและสร้างเส้นใยบนอาหารได้ดี เนื่องจากเศษข้าวอบกรอบที่ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา มีปริมาณเนื้อแป้ง $85.80 \pm 0.30\%$ และสารอินทรีย์อื่นๆ ที่มีส่วนทำให้เชื้อรานี้ นำมาใช้ในการเจริญ ผลิตสี และสร้างสปอร์อย่างเต็มที่ รวมทั้งขนาดของเศษข้าวอบกรอบมีขนาดเล็กประมาณ 1×1 เซนติเมตร ทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับเชื้อราได้มากและทำให้ออกซิเจนถ่ายเทได้อย่างทั่วถึง สอดคล้องกับงานวิจัยของพลายแก้ว และบุญบา (2534ก) ได้ศึกษาเบื้องต้นโคจิเชื้อราแดงของ *Monascus kaoliang* ที่หมักจากวัตถุดิบจำพวกคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เช่น ปลายข้าว เมล็ดข้าวโพด ข้าวฟ่าง ขนมันปิ้ง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว มันเทศ มันสำปะหลัง และมันฝรั่ง พบว่า เชื้อราสามารถใช้ขนมันปิ้งเป็นสับสเตรทได้ดีและให้ค่าสีมากที่สุด คือ 862 หน่วยต่อน้ำหนักตัวอย่าง (กรัม) และยังให้จำนวนสปอร์มากถึง 2.2×10^7 สปอร์ต่อกรัม

2. การบ่งบอชนิดของไอโซเลท NK1

จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเปรียบเทียบลักษณะโคโลนี เพอร์ทิเซียม และโคนิเดีย กับสายพันธุ์อ้างอิง *Monascus purpureus* TISTR 3385 และเปรียบเทียบลักษณะเชื้อราจากหนังสือ Fungi and Food Spoilage (Pitt and Hocking, 1997) ควบคู่กัน พบว่า เชื้อราไอโซเลท NK1 เป็น *M. purpureus* NK1 จึงได้นำมาศึกษาในขั้นต่อไป

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของ *Monascus* ที่ได้ทำการคัดเลือกไว้โดยวิธี solid-state cultivation

เนื่องจากการใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension เหมาะสำหรับการหมักในระบบขนาดเล็กเพราะมีความสะดวกมากกว่าและสามารถเตรียมเชื้อตั้งต้นได้ในรูปของอาหารร่วนเยือก เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension ยังเหมาะสำหรับการหมักซึ่งใช้เวลานานจึงได้เลือกใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Monascus purpureus* NK1 ในเศษข้าวอบกรอบเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้น ดังนี้ 10%, 20%, 30%, 40% และ 50% ผลการทดลองพบว่า สามารถผลิตสารสีเพิ่มขึ้นแปรผันตามปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นที่ปริมาณเชื้อตั้งต้น 50% พบว่ามีปริมาณสารสีลดลงเล็กน้อย การทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้ปริมาณ spore suspension 30% สำหรับเพาะเลี้ยง *M. purpureus* NK1 เพื่อผลิตสารสีแดง ส้ม และเหลือง สอดคล้องกันกับงานวิจัยของ Pandey *et al.* (2000) ที่รายงานว่าปริมาณของเชื้อตั้งต้นที่สูงและต่ำเกินไปมีผลต่อการสร้างสารสี โดยปริมาณที่สูงเกินไปทำให้มีปริมาณชีวมวลมากและเชื้อราใช้สารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการสร้างสารสีหมดไปอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นต่ำเกินไปมีผลต่อปริมาณชีวมวลส่งผลให้การสร้างสารสีไม่ดี

นำ *M. purpureus* NK1 มาเพาะเลี้ยงในเศษข้าวอบกรอบ โดยใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension 40% เป็นเวลา 14 วันเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสี ผลการทดลองพบว่า มีการสร้างสีแดง ส้ม และเหลืองในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงและปริมาณสารสีแดงจะเพิ่มขึ้นตลอดช่วงการเพาะเลี้ยงนาน 10 วัน โดยมีปริมาณสีแดงเท่ากับ 63 หน่วยต่อกรัม หลังจากนั้นปริมาณสีแดงลดลงเล็กน้อย ผลดังภาพ 12 ปริมาณสีส้มและสีเหลืองเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 ซึ่งอาจเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตและสกัดแยกเอาสารสีส้มและสีเหลืองออกมา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee *et al.* (2002) รายงานว่าเชื้อราโมแนสคัสมีการสร้างสารสีหลังจากการเพาะเลี้ยง 3 วัน และจะสร้างสีแดงได้สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน เมื่อการเจริญเติบโตถึงระยะ stationary phase แล้ว กระบวนการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจะหยุดทำงานมีผลต่ออัตราการผลิตสารสีลดลง

การผลิตสารสีแดง ส้ม และเหลืองในระหว่างการเพาะเลี้ยง *M. purpureus* NK1 ที่อุณหภูมิ 25°C, 28°C, 30°C, 37°C และ 45°C มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การผลิตสีต่างๆที่ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C จะได้ปริมาณสารสีสูงที่สุด รองลงมา คือ ที่อุณหภูมิ 28°C และ 25°C ตามลำดับ ผลดังภาพ 14 ในขณะที่อุณหภูมิ 37°C และ 45°C ได้ปริมาณสารสีแดง

สีส้ม และเหลืองเพียงเล็กน้อย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Babitha *et al.* (2006) รายงานว่า *M. purpureus* LPB 97 สามารถสร้างสารสีดีที่อุณหภูมิ 30 °C โดยให้ผลผลิตของสารสีเท่ากับ 25 ยูนิต์ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

สำหรับการเพาะเลี้ยง *M. purpureus* NK1 บนเศษข้าวอบกรอบ โดยการแปรผันความชื้น ดังนี้ 28.5%, 33%, 50% และ 60% ผลการทดลองพบว่า ปริมาณสารสีแดง สีส้ม และสีเหลืองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีการผลิตสารสีแดง สีส้มและสีเหลืองสูงที่สุดเมื่อปรับความชื้นเริ่มต้น 33% รองลงมา คือ ความชื้นเริ่มต้นที่ 50% ผลดังภาพ 15 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่ปรับความชื้น 60% และ 28.5% มีการผลิตสารสีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Johns and Stuart (1991) รายงานว่า ความชื้นเป็นส่วนสำคัญในการหมักเชื้อราและเป็นตัวกำหนดการเจริญของเส้นใยของเชื้อราที่สำคัญ ถ้าความชื้นมีน้อยเกินไป เส้นใยของเชื้อราจะเจริญช้า ถ้าความชื้นมากเกินไปการระบายอากาศภายในอาหารไม่ดี ทำให้เส้นใยขาดออกซิเจนและไม่เจริญซึ่งจะส่งผลให้การสร้างสีลดลงด้วย รวมทั้งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lotong and Suwanarit (1990) รายงานว่า ในอาหารที่มีความชื้นเริ่มต้นสูง *Monascus* sp. NP1 สามารถปลดปล่อยกลูโคสออกมาจำนวนมาก มีผลทำให้กลูโคสยับยั้งการสร้างสารสีโมแนสคัส

เมื่อเพาะเลี้ยง *M. purpureus* NK1 บนเศษข้าวอบกรอบที่มีการปรับ pH เริ่มต้นให้เป็นค่าต่างๆ ตั้งแต่ 2-7 ผลการทดลองพบว่า *M. purpureus* NK1 สามารถผลิตสารสีแดง สีส้ม และสีเหลืองได้ ให้ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการเพาะเลี้ยงที่ปรับค่า pH เริ่มต้น เท่ากับ 6 ให้ปริมาณสารสีแดง สีส้มและสีเหลืองสูงที่สุด รองลงมา คือ pH 7 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่ปรับค่า pH เท่ากับ 2 ให้ค่าสารสีแดงต่ำที่สุด ผลดังภาพ 15 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Palo *et al.* (1960) รายงานว่า ค่า pH ระหว่าง 3.0-7.5 เหมาะสมต่อเจริญและสร้างสีแดงของ *M. purpureus*

นอกจากสารสีที่เชื้อราชนิดนี้ผลิตแล้ว ยังพบการผลิตสารโมนาโคลิน เค ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในร่างกาย ปัจจุบันได้มีการหมักเชื้อราโมแนสคัสลงบนข้าว เพื่อผลิตสารโมนาโคลิน เค ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในร่างกาย โดยผลิตในรูปแบบผลิตภัณฑ์อาหารเสริมของบริษัท Phramanex ที่ชื่อว่า Cholestin ในการทดลองครั้งนี้จึงศึกษาปริมาณโมนาโคลิน เค ในข้าวกรอบราแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* NK1 โดยวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิควิธีโครมาโทกราฟี พบว่าในข้าวกรอบราแดงมีปริมาณโมนาโคลิน เค ถึง 0.095 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Chen and Hu (2005) รายงานว่าในข้าวแดงที่หมักจาก *Monascus* sp. M12-69 มีปริมาณโมนาโคลิน เค เท่ากับ 2.52 มิลลิกรัมต่อกรัม พบว่า

ปริมาณโมนาโคลิน เค ที่ได้จากข้าวแดงมีปริมาณสูงกว่าปริมาณโมนาโคลิน เค ที่ได้จากเศษข้าวอบกรอบราแดง รวมทั้งในการทดลองของ Zhao (2002) ได้ทำการศึกษาการผลิตโมนาโคลิน เค โดย *M. purpureus* โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งในข้าว และอาหารเหลว พบว่ามีปริมาณโมนาโคลิน เค ในข้าวเท่ากับ 0.28-0.35 มิลลิกรัมต่อกรัม ได้มากกว่าการหมักในอาหารเหลวซึ่งมีปริมาณ โมนาโคลิน เค เพียง 0.108 มิลลิกรัมต่อกรัม (rice powder) จึงอาจเป็นแนวทางในการผลิตสารโมนาโคลิน เค จาก *Monascus* โดยใช้การหมักแบบ solid-state cultivation ต่อไป และเป็นแนวทางหนึ่งสำหรับนำวัสดุเหลือใช้ในโรงงานมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตสารโมนาโคลิน เค ทดแทนการใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบ สำหรับการผลิตผงเศษข้าวอบกรอบในปริมาณมากขึ้น อาจจะต้องปรับเปลี่ยนภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา เช่น อาจจะไปเปลี่ยนจากฟาสก์เป็นกระบะหรือถาดขนาดใหญ่ ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาปริมาณซีทรินินในข้าวกรอบราแดงเปรียบเทียบกับข้าวแดงทั่วไป พบว่าในข้าวกรอบราแดงมีปริมาณซีทรินินต่ำกว่าข้าวแดง โดยข้าวกรอบราแดงมีปริมาณซีทรินินเท่ากับ 0.87 มิลลิกรัม/กรัม และข้าวแดงทั่วไปมีปริมาณซีทรินินเท่ากับ 8.79 มิลลิกรัม/กรัม เนื่องจากสภาวะแวดล้อมและวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ทำให้มีผลต่อการสร้างซีทรินิน ดังเช่นงานวิจัยของเรณูและจุลยุทธ (2546) พบว่าสายพันธุ์ของ *M. purpureus* และชนิดของข้าว มีผลต่อการสร้างซีทรินินและสีแดง โดยข้าวแดงที่หมักโดย *M. purpureus* BCC 6131 ในข้าวหอมมะลิให้ปริมาณซีทรินินต่ำสุด เท่ากับ 105 ppm และการหมักโดย *M. purpureus* FTCMU ในข้าวซ้อมมือให้ปริมาณซีทรินินสูงสุดถึง 4,400 ppm ดังนั้นการนำสารสีหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆจากเชื้อราโมแนสคัสควรมีการตรวจสอบความปลอดภัยก่อนนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ จากการศึกษาปริมาณสปอร์ของผงข้าวอบกรอบราแดงจาก *M. purpureus* NK1 พบว่า จำนวนของสปอร์หลังจากการเก็บรักษาในรูปกล้าเชื้อบนเศษข้าวอบกรอบที่อุณหภูมิห้อง (3.4×10^6 สปอร์ต่อกรัม) และที่อุณหภูมิ 4°C (3.32×10^6 สปอร์ต่อกรัม) เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าจำนวนของสปอร์ไม่มีความแตกต่างกันมาก สปอร์ส่วนใหญ่จะเป็นแอสโคสปอร์

นอกจากนี้ หากต้องการสืบฤทธิ์จาก *M. purpureus* NK1 ที่เป็นสีเหลือง สีส้ม หรือสีแดง ก็สามารถสกัดออกมาจากสีได้โดยง่าย เนื่องจากสีจากเชื้อราสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด เช่น acetone, ether, ethanol และ methanol เป็นต้น สีจากเชื้อรานี้ยังสามารถทนทานต่อความร้อนได้ดี สามารถทนต่อความร้อน 100°C เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยคุณภาพสีไม่เปลี่ยนแปลงไป สารสีแดงนี้ยังทนต่อความเป็นกรดและด่าง ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางที่จะนำสารสี

แตงนี้ผสมในอาหารที่มีฟิเชต่ำ เช่น น้ำผลไม้ หรือ โยเกิร์ต หรืออาหารที่มีฟิเชเป็นกลาง เช่น เนื้อสัตว์



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved