รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตโมนาโคลิน เค รงควัตถุสีเหลืองและซิตรินิน โดย *Monascus purpureus* จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

The production of monacolin K, yellow pigment and citrinin by *Monascus purpureus* on agro-industrial byproducts in solid-state fermentation

ดร.ศนิ จิระสถิตย์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 177242
สัญญาเลขที่ 78/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตโมนาโคลิน เค รงควัตถุสีเหลืองและซิตรินิน โดย *Monascus purpureus* จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

The production of monacolin K, yellow pigment and citrinin by *Monascus purpureus* on agro-industrial byproducts in solid-state fermentation

ดร. ศนิ จิระสถิตย์
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา

5/2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 78/2558

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 78/2558)

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

รายละเอียดตามเอกสารแนบ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินของ *Monascus purpureus* TISTR 3541 ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ผลการทดลองพบว่า รา *Monascus* สามารถเจริญเติบโตได้บนกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก โดยการเติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคสและกลีเซอรอลความเข้มข้น 4% และ 8%) มีผลกระทบต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* เช่นเดียวกับการเติมแหล่งไนโตรเจน (เปปโตนและแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1% และ 5%) ทั้งนี้ข้าวหักเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* รองลงมาได้แก่ รำข้าวและกากมันสำปะหลัง ตามลำดับ โดยการหมักรา *M. purpureus* บนข้าวหักร่วมกับการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 1% และกลูโคส 4% สามารถปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *M. purpureus* ได้สูงสุด (526.77 OD units/g sdw) ซึ่งเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ขณะที่ตัวอย่างยังคงมีปริมาณซิตรินินต่ำ (0.20 mg/kg) นอกจากนี้ข้าวหักยังเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค รองลงมาได้แก่ กากมันสำปะหลังและรำข้าว ตามลำดับ โดยรา *Monascus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุด เท่ากับ 40.33 mg/kg และมีปริมาณซิตรินินต่ำ (0.61 mg/kg) เมื่อหมักบนข้าวหักร่วมกับการเติมเปปโตน 1% และกลูโคส 4% ซึ่งปริมาณโมนาโคลิน เค เพิ่มขึ้น 4.4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

Abstract

The effects of agricultural by-products supplemented with carbon source and nitrogen source on growth and the production of yellow pigment, monacolin K and citrinin by *Monascus purpureus* TISTR 3541 were studied by solid-state fermentation. The genus of *Monascus* was capable to growth on cassava residue, rice bran and broken rice. The supplementation of either carbon source (4% and 8% of glucose and glycerol) impacted on growth and the production of yellow pigment, monacolin K and citrinin by *Monascus* as well as the supplementation of either nitrogen source (1% and 5% of peptone and ammonium chloride). The broken rice was the best substrate for yellow pigment production from *Monascus*, followed by rice bran and cassava residues, respectively. The broken rice supplemented with 1% of ammonium chloride and 4% of glucose achieved the highest yellow pigment concentration (526.77 OD units/g sdw) up to 2.5 times as compared with the broken rice without supplemented carbon source and nitrogen source, while the low yield of citrinin was obtained (0.20 mg/kg). In addition, the broken rice was also the best substrate for monacolin K production, followed by cassava residue and rice bran, respectively. The maximum amount of monacolin K was 40.33 mg/kg and low yield of citrinin was observed (0.61 mg/kg) when *Monascus* was cultivated on the broken rice supplemented with 1% of peptone and 4% of glucose. The monacolin K increased approximately 4.4 times as compared to the broken rice without supplemented carbon source and nitrogen source.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศภาษาไทย	ก
กิตติกรรมประกาศภาษาอังกฤษ	ข
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญเรื่อง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
เนื้อเรื่อง	
1. บทนำ	1
2. วิธีดำเนินการวิจัย	5
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	7
3.1 ผลของกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจากรา *M. purpureus*	7
3.2 ผลของกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักร่วมกับการเติมแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจากรา *M. purpureus*	16
4. สรุปผลการทดลอง	24
ผลผลิต	25
บรรณานุกรม	26
ภาคผนวก	30
ภาคผนวก ก ผลการทดลองเบื้องต้น	31
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	43
ประวัตินักวิจัยและคณะ	47

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของกากมันสำปะหลัง (a) รำข้าว (b) และข้าวหัก (c) ที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	8
2	การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของกากมันสำปะหลัง (a) รำข้าว (b) และข้าวหัก (c) ที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	9
3	ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนกากมันสำปะหลังที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	11
4	ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนรำข้าวที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	11
5	ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนข้าวหักที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	12
6	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของกากมันสำปะหลัง (a) รำข้าว (b) และข้าวหัก (c) ที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	17
7	การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของกากมันสำปะหลัง (a) รำข้าว (b) และข้าวหัก (c) ที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	18
8	ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนกากมันสำปะหลังที่เติมเปป โตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับการเติมกลูโคส 8%) ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	19
9	ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนรำข้าวที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับการเติมกลูโคส 8%) ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	20
10	ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนข้าวหักที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับการเติมกลูโคส 8%) ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	20

ภาพ		หน้า
ก-1	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของกากกาแฟที่เติมกลูโคส กลีเซอรอล และซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	33
ก-2	การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของกากกาแฟที่เติมกลูโคส กลีเซอรอล และซูโครส ความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	33
ก-3	ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง และโมนาโคลิน เค บนกากกาแฟที่เติม กลูโคส กลีเซอรอลและซูโครส ที่ความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	34
ก-4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของกากกาแฟที่เติมเปปโตน, NH_4Cl และ $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% และตัวอย่างที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	36
ก-5	การเปลี่ยนแปลง pH ของกากกาแฟที่เติมเปปโตน, NH_4Cl และ $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% และตัวอย่างที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*	36
ข-1	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคซามีนกับปริมาณชีวมวลของ *M. purpureus* TISTR 3541	45

บทที่1
บทนำ

การใช้ประโยชน์จากราแดงสายพันธุ์ *Monascus* มีมานานแล้ว โดยนำมาผลิตรงควัตถุ (pigment) และสารสำคัญที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น γ-aminobutyric acid (GABA), dimerumic acid และโมนาโคลิน เค (monacolin K) เพื่อใช้เป็นสีผสมอาหารและใช้ในการรักษาโรคต่างๆ (Erdogral & Azirak, 2004)

ทั้งนี้รงควัตถุที่ผลิตจากรา *Monascus* ประกอบด้วย 3 สีหลัก ได้แก่ รงควัตถุสีเหลือง (monascin และ ankaflavin) รงควัตถุสีส้ม (rubrapunctatin และ monascorubrine) และรงควัตถุสีแดง (rubropunctamine และ monascorubramine) ซึ่งรงควัตถุที่ผลิตจากรา *Monascus* นั้นถือว่ามีความปลอดภัยต่อการบริโภค (Generally recognized as safe: GRAS) ยิ่งไปกว่านั้นรงควัตถุสีเหลืองยังแสดงคุณสมบัติเป็น anti-inflammation, anticancer, antioxidation และ anti-atherosclerosis (ต้านทานการเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง) (Lee et al., 2006; Lee et al., 2013) และยังมีคุณสมบัติเป็น antihyperlipidemic agent โดยสามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอล (total cholesterol) ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลชนิดเลว (low-density lipoprotein cholesterol) และสามารถเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลชนิดดี (high-density lipoprotein cholesterol) ในเซรั่มของหนูแฮมเตอร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม่มีผลข้างเคียงต่อการเกิด rhabdomyolysis (ภาวะกล้ามเนื้อสลายตัว) (Lee et al., 2010; Lee et al., 2013)

นอกจากรา *Monascus* จะผลิตรงควัตถุแล้ว ราชนิดนี้ยังผลิตโมนาโคลิน เค (monacolin K) หรือโลวาสตาติน (lovastatin) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น anti-hypercholesterolemic agent โดยผ่านการรับรองจาก United States Food and Drug Administration (FDA) ถึงความมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการใช้เป็นยาเพื่อลดระดับคอเลสเตอรอลและลดการเกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในคน (Manzoni & Rollini, 2002) อีกทั้งโมนาโคลิน เค ยังสามารถลดการเจริญของเนื้องอก โดยยับยั้งการสังเคราะห์สาร nonsterol isoprenoid เช่น dolichol, ubiquinone และ isopentenyl-tRNA (Juzlova et al., 1996; Lin et al., 2008)

อย่างไรก็ตาม *Monascus* ผลิตสารพิษซิตรินิน (citrinin) ซึ่งมีพิษต่อตับและไตของมนุษย์ จากงานวิจัยของ Liu et al.(2005) พบว่าซิตรินินที่ความเข้มข้น 1.8-4.7 mg/ml สามารถทำลายเซลล์ตัวอ่อนของไตมนุษย์ (human embryonic kidney cell) ได้ถึง 50% ดังนั้นการนำผลผลิตจาก *Monascus* มาใช้ ควรมีการควบคุมปริมาณซิตรินินให้มีอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งข้อกำหนดของประเทศญี่ปุ่นและไต้หวัน ได้อนุญาตให้มีปริมาณซิตรินินในผลิตภัณฑ์อาหารไม่เกิน 0.2 mg/kg และ 2 mg/kg ตามลำดับ (Jirasatid et al., 2013)

โดยทั่วไปการเลี้ยงรา *Monascus* จะทำการหมักโดยใช้ข้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าข้าวแดง หรือ red yeast rice ซึ่งมีต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากข้าวมีราคาแพง ดังนั้นการพัฒนาวิธีการหรือกระบวนการผลิตเพื่อลดต้นทุนจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ทั้งนี้ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (agricultural by-product) ในปริมาณมาก เช่น กากมันสำปะหลัง รำข้าว และกากมะเขือเทศ เป็นต้น การประยุกต์ใช้เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ในกระบวนการทางชีวภาพโดยนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งนอกจากเป็นการลดต้นทุนการผลิตแล้ว ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากเศษวัสดุเหลือทิ้ง โดยสามารถเพิ่มมูลค่าของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้

จากงานวิจัยของ Babitha et al. (2006), Babitha et al. (2007), Nimnoi and Lumyong (2009), Velmurugan et al. (2011) พบว่า *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุได้เป็นอย่างดี เมื่อใช้เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ กากข้าวโพด กากถั่วลิสง กากมะพร้าว กากถั่วเหลือง ผงเมล็ดขนุน และซังข้าวโพดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง นอกจากนี้ Lian et al. (2007) พบว่า *Aspergillus terreus* สามารถผลิตสารโมนาโคลิน เค สูงถึง 1000-2000 mg/kg จากการหมักด้วยกากเหลือทิ้ง ได้แก่ รำข้าวสาลี corn particle และ soybean cake particle

นอกจากนี้ปัจจัยด้านสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และกรดไขมันมีอิทธิพลต่อการเจริญและการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ต่างๆ ของรา (Carvalho et al., 2003; Jirasatid et al., 2013; Jirasatid & Nopharatana, 2016) แหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส กาแล็กโทส กากน้ำตาลและกลีเซอรอลมีผลกระทบเชิงบวกต่อการผลิตรงควัตถุของ *Monascus* บนเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและข้าว (Jirasatid et al., 2013; Jirasatid & Nopharatana, 2016; Nimnoi et al., 2015; Nimnoi & Lumyong et al., 2009) แหล่งไนโตรเจนหลายชนิด เช่น เปปโตน โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) มีผลต่อการปรับปรุงการผลิตรงควัตถุจากรา *Monascus* (Chen & Johns, 1993; Johns & Stuart, 1991; Lin, 1973) อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ของราที่แตกต่างกันจะเป็นผลให้การผลิตสารเมแทบอไลต์ต่างๆ แตกต่างกัน

ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจทดลองศึกษาการใช้เศษเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่น เพื่อนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ และยังช่วยเพิ่มมูลค่าของเศษวัสดุเหลือทิ้ง ทั้งนี้ยังไม่มีการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก ในการเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตสารลดคอเลสเตอรอล ได้แก่ โมนาโคลิน เค และรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม่มีการรายงานการปนเปื้อนของสารพิษซิตรินินในผลิตภัณฑ์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก ด้วยการเติมและไม่เติมแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* TISTR 3541 จากนั้นคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีเหลือง และ/หรือ โมนาโคลิน เค และมีปริมาณซิ

ตรินินต่ำไปใช้สำหรับการศึกษาผลของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก) ด้วยการเติมและไม่เติมแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินของ *M. purpureus* TISTR 3541 ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะนำไปประยุกต์เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Monascus* ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก) ร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus*
2. ศึกษาผลของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก) ร่วมกับการเติมแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus*

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก) ร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคสและกลีเซอรอลความเข้มข้น 4% และ 8%) ต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. pururеus* TISTR 3541
2. ศึกษาผลของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก) ร่วมกับการเติมแหล่งไนโตรเจน (เปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% w/w) ต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. pururеus* TISTR 3541

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การใช้เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรใน bioprocess โดยใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งนอกจากจะช่วยลดต้นทุนการผลิตแล้ว ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยสามารถเพิ่มมูลค่าของเศษวัสดุเหลือทิ้ง ทั้งนี้หลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุได้เป็นอย่างดี เมื่อใช้เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ กากข้าวโพด กากถั่วลิสง กากมะพร้าว กากถั่วเหลือง ผงเมล็ดขนุน และซังข้าวโพดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (Babitha et al., 2006; Babitha et al., 2007; Nimnoi &Lumyong, 2009; Velmurugan et al., 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเศษวัสดุเหลือทิ้งที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส และแหล่งไนโตรเจน จะทำให้ปริมาณรงควัตถุเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Babitha et al., 2006; Nimnoi & Lumyong, 2009) นอกจากนี้ *Aspergillus terreus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงจากการหมักด้วยกากเหลือทิ้ง ได้แก่ รำข้าวสาลี corn particle และ soybean cake particle (Lian et al., 2007)

ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเศษวัสดุเหลือทิ้งชนิดอื่นสำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำจึงเป็นที่น่าสนใจทดลองศึกษา อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาผลการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* ด้วยเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก ด้วยการเติมและไม่เติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ และการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* โดยงานวิจัยนี้คาดหวังว่าจะสามารถผลิตรงควัตถุสีเหลือง และ/หรือโมนาโคลิน เค ได้ในปริมาณสูงในราคาต้นทุนต่ำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรา *Monascus* ที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ และเป็นทางเลือกหนึ่งในสำหรับการใช้ประโยชน์จากเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตในอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่2
วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. *Monascus purpureus* TISTR 3541 (ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

2. กากมันสำปะหลัง (ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัท ชลเจริญ จำกัด เป็นกากมันสำปะหลังที่ได้จากการสกัดแป้งมันสำปะหลังด้วยการปั่นเหวี่ยงจากไซโลขั้นที่ 1)

3. รำข้าวหอมมะลิ 105 (ได้รับจาก ต.ปราสาททอง อ.เขวาสินรินทร์ จ.สุรินทร์)

4. ข้าวหักหอมมะลิ (ตรา ดอกบัว)

วิธีการทดลอง

2.1. การเตรียมสารละลายสปอร์

ทำการเพาะ *M. purpureus* TISTR 3541 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลานาน 14-15 วัน จากนั้นเตรียมสารละลายสปอร์ด้วยการเทน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 10 ml ลงไปในจานเพาะเชื้อ ขูดสปอร์โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม วัดความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ด้วย Haemacytometer โดยใช้สารละลายสปอร์ความเข้มข้น 10^6 spore/ml เป็นหัวเชื้อ (inoculum)

2.2 ศึกษาผลของกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจากรา *M. purpureus*

เศษวัสดุเหลือทิ้งที่หาได้ง่ายในประเทศไทย ได้แก่ กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักถูกนำมาใช้ทดลองสำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส และกลีเซอรอล โดยใช้ความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ 4% และ 8% (โดยน้ำหนัก) และตัวอย่างที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนคือตัวอย่างควบคุม

ขั้นตอนการเตรียมเศษวัสดุเหลือทิ้งสามารถทำได้โดยนำกากมันสำปะหลังที่มีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 75% มาอบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50°C นาน 12 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งความชื้นน้อยกว่า 10%

ขั้นตอนการหมักแบบอาหารแข็ง (solid-state fermentation) สามารถทำได้โดย ชั่งเศษวัสดุเหลือทิ้ง ได้แก่ กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก (ผ่านการแช่น้ำที่มากเกินพอนาน 1.5 ชม.) ปริมาณ 5 หรือ 10 g ใส่ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในรูปของ nutrient broth โดยกากมันสำปะหลังจะทำการเติม nutrient broth 7 ml ต่อตัวอย่างกาก 10 g เพื่อปรับให้ได้

ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50% รำข้าวเติม nutrient broth 5 ml ต่อรำข้าว 5 g เพื่อปรับให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50% และข้าวหักเติม nutrient broth 4 ml ต่อข้าวหัก 10 g เพื่อให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 40% ทำการคลุกให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ 5% (v/w) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ระหว่างการหมักจะต้องทำการเขย่าจานเพาะเชื้อทุกวัน วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC,1995) ทุกๆ 2 วันตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Adioo, 1981) รงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) โมนาโคลิน เค (Wang et al., 2004) และซิตรินิน (Wang et al., 2014) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14) ทั้งนี้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีเหลือง และ/หรือ โมนาโคลิน เค รวมทั้งให้ปริมาณซิตรินินต่ำ จะถูกนำไปใช้สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.3 ศึกษาผลของกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักร่วมกับการเติมแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจากรา *M. purpureus*

การทดลองทำการหมักรา *M. purpureus* บนกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตนและแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ที่ความเข้มข้น 1% และ 5% (โดยน้ำหนัก) และมีตัวอย่างควบคุมคือตัวอย่างที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน (แต่เติมแหล่งคาร์บอน) ทั้งนี้ทุกตัวอย่างจะมีการเติมแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจากการทดลองในขั้นต้น

ขั้นตอนการหมักสามารถทำได้โดย ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หรือ 10 กรัม ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเติมแหล่งแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตนหรือแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1% หรือ 5% (w/w) ในรูป nutrient broth เช่นเดียวกับการทดลองขั้นต้น (โดยกากมันสำปะหลังจะทำการเติม nutrient broth 7 ml ต่อตัวอย่างกาก 10 g เพื่อปรับให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50% รำข้าวเติม nutrient broth 5 ml ต่อรำข้าว 5 g เพื่อปรับให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50% และข้าวหักเติม nutrient broth 4 ml ต่อข้าวหัก 10 g เพื่อให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 40%) ทำการคลุกให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วเติมสารละลายสปอร์ 5% (v/w) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ระหว่างการหมักจะต้องทำการเขย่าจานเพาะเชื้อทุกวัน วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC,1995) ทุกๆ 2 วันตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Adioo, 1981) รงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) โมนาโคลิน เค (Wang et al., 2004) และซิตรินิน (Wang et al., 2014) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14)

บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลของกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจากรา *M. purpureus*

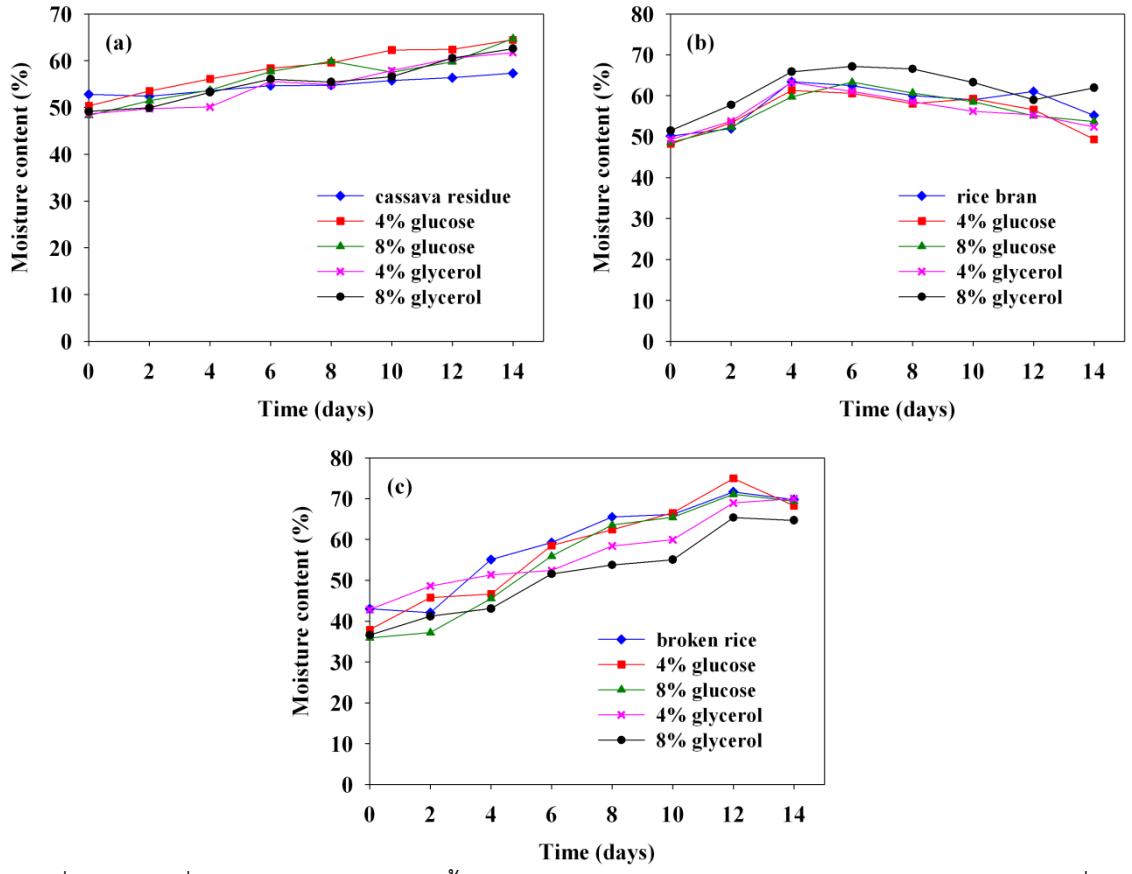
3.1.1 ปริมาณความชื้น

ปริมาณความชื้นเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญและผลิตสารเมแทบอไลต์จากจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (Babitha et al., 2007) ความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่างกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักทั้งเติมแหล่งคาร์บอนและปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน แปรผันอยู่ระหว่าง 48-53%, 48-52% และ 37-43% ตามลำดับ (ภาพที่ 1a-c) ทั้งนี้ในระหว่างการเจริญเติบโตการเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยปริมาณความชื้นของกากมันสำปะหลัง และข้าวหัก (ทั้งเติมแหล่งคาร์บอนและปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน) ค่อยๆ เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักนาน 14 วัน ขณะที่ปริมาณความชื้นของรำข้าว (ทั้งเติมแหล่งคาร์บอนและปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน) เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 4 และมีแนวโน้มค่อยๆ ลดลงจากวันที่ 4 ถึงวันที่ 14 ดังนั้นความชื้นสุดท้ายของตัวอย่างกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักแปรผันอยู่ระหว่าง 57-65%, 49-62% และ 65-70% ตามลำดับ (ภาพที่ 1a-c) ปริมาณความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักเป็นผลมาจากเชื้อราผลิตน้ำเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์ในระหว่างการเจริญเติบโต (Rosenblitt et al., 2000)

ผลการทดลองจะเห็นได้ว่าความชื้นเริ่มต้นของกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักทุกตัวอย่างอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและสร้างรงควัตถุของเชื้อรา *Monascus* โดย Yongsmith et al. (2000) เสนอว่า รา *Monascus* สามารถเจริญและผลิตรงควัตถุได้เป็นอย่างดีบนข้าวโดยปริมาณความชื้นเริ่มต้นของข้าวด้วยการหมักแบบอาหารแข็งควรอยู่ระหว่าง 32-43% ขณะที่ Babitha et al. (2007) พบว่า รา *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุสีแดงและสีเหลืองได้สูงสุดบนผงเมล็ดขนุนด้วยความชื้นเริ่มต้น 50% ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Velmurugan et al. (2011) ผู้ซึ่งรายงานว่า *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุสีเหลืองและสีแดงได้สูงบนซังข้าวโพดที่มีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50-60% นอกจากนี้ John and Stuart (1991) รายงานว่าการผลิตรงควัตถุของรา *Monascus* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ข้าวเป็นซับสเตรตควรมีความชื้นเริ่มต้นสูง (ประมาณ 56% wet basis) อีกทั้งสามารถเติมน้ำในระหว่างการหมักข้าวเพื่อให้รามีน้ำเพียงพอสำหรับการเจริญ ถ้าปริมาณความชื้นเริ่มต้นของข้าวต่ำกว่า 38% จะไม่พบเส้นใยของรา *Monascus* ภายหลังการบ่มนาน 2 สัปดาห์

แต่อย่างไรก็ตาม Teng and Feldheim (2000) ได้ศึกษาการหมักข้าวเพื่อผลิตสีจากรา *Monascus* พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการหมักข้าวแดง เพื่อให้รา *Monascus* ผลิตสีได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 24% และการสร้างรงควัตถุของราจะลดลงหากเติมน้ำในระหว่างการหมัก

จากข้อมูลงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะหรือชอบที่จะเจริญที่ความชื้นเริ่มต้นแตกต่างกันโดยปริมาณน้ำที่มากเกินไปอาจลดความพรุนของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสาเหตุให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกาะกันแน่น ซึ่งเหนี่ยวนำให้ลดการถ่ายเทออกซิเจนและความร้อนในระบบ (Yongsmith et al., 2000)



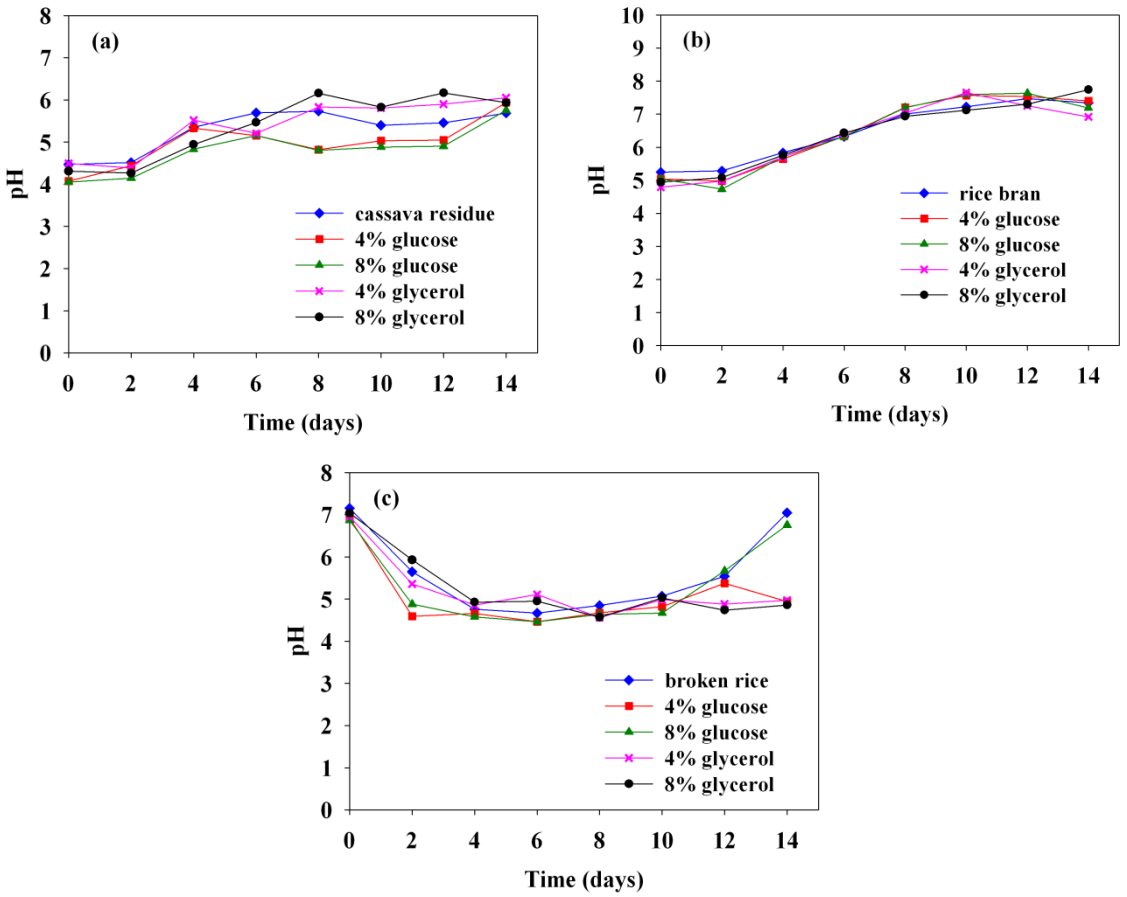
ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของกากมันสำปะหลัง (a) รำข้าว (b) และข้าวหัก (c) ที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*

3.1.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ค่า pH ของกากมันสำปะหลังและรำข้าวทุกตัวอย่างทั้งเติมแหล่งคาร์บอนและปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยค่า pH เริ่มต้นของกากมันสำปะหลังและรำข้าวอยู่ในระดับเป็นกรด ซึ่งแปรผันอยู่ระหว่าง 4.06-4.49 และ 4.79-5.24 ขณะที่ค่า pH สุดท้ายมีค่าอยู่ระหว่าง 5.93-5.64 และ 6.92-7.75 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่า pH ของข้าวหักทั้งเติมแหล่งคาร์บอนและปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอนมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยค่า pH

เริ่มต้นของตัวอย่างข้าวหักมีค่าเป็นกลาง ซึ่งแปรผันเท่ากับ 6.87-7.16 และค่า pH สุดท้ายมีค่าอยู่ระหว่าง 4.86-7.05 (ภาพที่2a-c)

ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ต่างๆ จากรา *Monascus* ทั้งนี้ราตระกูล *Monascus* สามารถเจริญได้ในช่วง pH กว้างตั้งแต่ 2.5-8.0 แต่ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0-7.0 อย่างไรก็ตาม pH เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญควรมีค่าประมาณ 6.5 (ซึ่งพบในตัวอย่างข้าวหัก) นอกจากนี้ pH ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุนั้นมีความแตกต่างกันไปโดยที่ค่า pH เริ่มต้นต่ำประมาณ 4.0 เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลือง ขณะที่ pH เริ่มต้นประมาณ 5.5-7.0 เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดง (Carvalho et al. 2003; Chen & Johns, 1993; Johns & Stuart, 1991) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักทุกตัวอย่างมีค่า pH อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของรา *Monascus* (Carvalho et al., 2003)



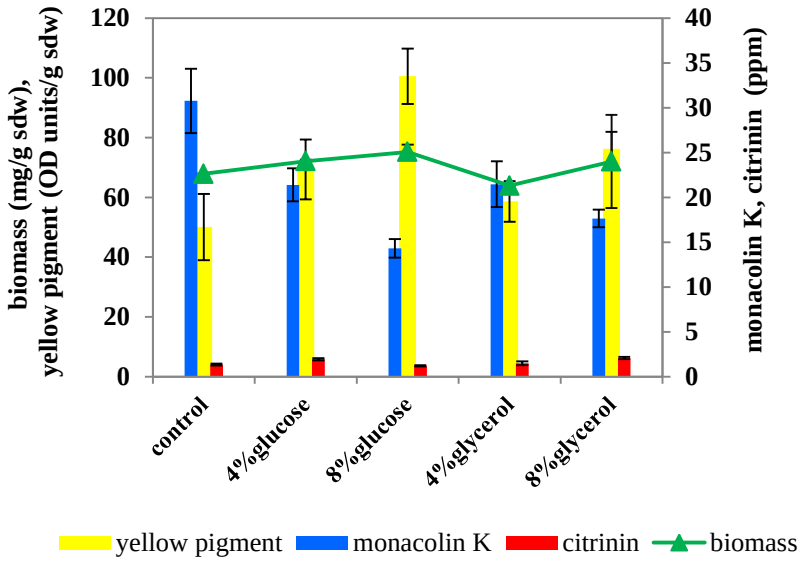
ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของกากมันสำปะหลัง (a) รำข้าว (b) และข้าวหัก (c) ที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*

3.1.3 ปริมาณชีวมวลของ *M. purpureus*

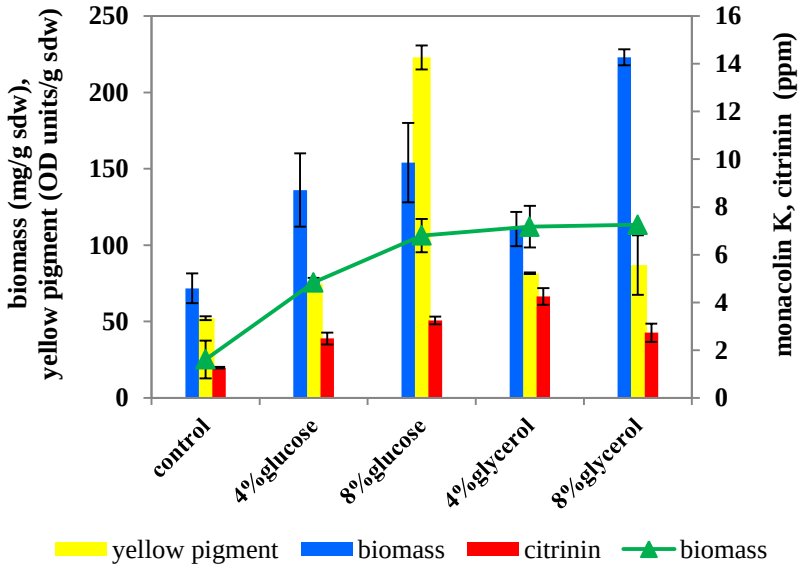
ภาพที่ 3-5 แสดงปริมาณชีวมวล ปริมาณรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* บนกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก ที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลความเข้มข้น 4% และ 8% ผลการทดลองพบว่า รา *Monascus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก โดยตัวอย่างกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักที่หมักด้วยรา *Monascus* ทั้งเติมแหล่งคาร์บอนและปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอนมีปริมาณชีวมวลแปรผันอยู่ระหว่าง 63.93-75.24, 25.16-113.35 และ 117.03-230.63 mg/g substrate dry weight (sdw) ตามลำดับ ผลการทดลองสังเกตได้ว่า *Monascus* สามารถเจริญได้ดีบนข้าวหัก เนื่องจากข้าวประกอบด้วยสารอาหาร เช่น ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Monascus* (Johns & Stuart, 1991)

การเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ (กลูโคสและกลีเซอรอลความเข้มข้น 4% และ 8%) ลงในกากมันสำปะหลังและรำข้าวมีผลต่อการปรับปรุงการเจริญเติบโตของรา *Monascus* (ยกเว้นตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่เติมกลีเซอรอล 4%) โดยปริมาณชีวมวลของรา *Monascus* ในกากมันสำปะหลังและรำข้าวที่เติมแหล่งคาร์บอนมีค่าเพิ่มขึ้น 1.06-1.11 และ 3.00-4.50 เท่า ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (กากมันสำปะหลังหรือรำข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน) อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ขัดแย้งกันถูกพบในข้าวหัก โดยการเจริญของ *Monascus* ลดลงเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ลงในข้าวหัก ยกเว้นข้าวหักร่วมกับการเติมกลูโคส 4%

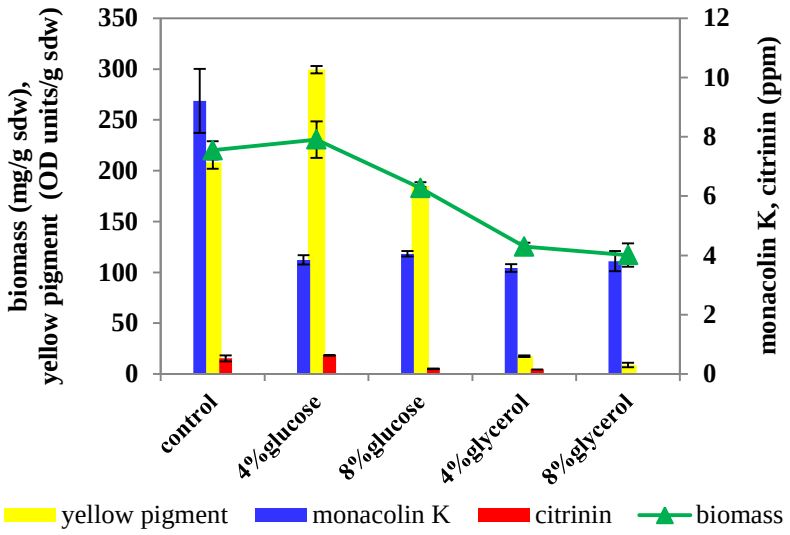
เมื่อพิจารณาปริมาณชีวมวลของรา Monascus บนเศษวัสดุเหลือทิ้งแต่ละชนิด พบว่า *M. purpureus* มีปริมาณชีวมวลสูงสุดบนกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมกลูโคส 8%, รำข้าวร่วมกับการเติมกลีเซอรอล 8% และข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 75.25±2.41, 113.35±3.33 และ 230.63±18.02 mg/g sdw ตามลำดับ



ภาพที่ 3 ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนกากมันสำปะหลังที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*



ภาพที่ 4 ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนรำข้าวที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*



ภาพที่ 5 ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนข้าวหักที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*

3.1.4 การผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus*

นอกจากรา *Monascus* จะสามารถเจริญได้ดีบนกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักแล้ว ราชนิดนี้ยังผลิตรงควัตถุสีเหลืองได้ในปริมาณสูง โดยตัวอย่างกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักที่หมักด้วยรา *Monascus* ทั้งเติมแหล่งคาร์บอนและไม่เติมแหล่งคาร์บอน มีปริมาณรงควัตถุสีเหลืองแปรผันอยู่ระหว่าง 50.10-100.56, 52.14-222.90 และ 8.86-299.43 OD units/g sdw ตามลำดับ (ภาพที่ 3-5)

ตัวอย่างกากมันสำปะหลังและรำข้าวที่เติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8%) มีปริมาณรงควัตถุสีเหลืองภายหลังการหมัก (วันที่ 14) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (กากมันสำปะหลังหรือรำข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน) โดยปริมาณรงควัตถุสีเหลืองเพิ่มขึ้น 1.17-2.01 และ 1.43-4.27 เท่า ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงเห็นได้ว่า กลูโคสหรือกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีอิทธิพลเชิงบวกต่อการเจริญเติบโตและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* บนกากมันสำปะหลังและรำข้าว อย่างไรก็ตามการเติมแหล่งคาร์บอนบนข้าวหักมีผลเชิงลบต่อปริมาณรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* ยกเว้นตัวอย่างข้าวหักร่วมกับการเติมกลูโคส 4% ที่สามารถปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โดยมีปริมาณรงควัตถุสีเหลืองเท่ากับ 299.43±3.75 OD units/g sdw หรือเพิ่มขึ้น 1.44 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน)

ทั้งนี้กากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมกลูโคส 8% สามารถกระตุ้นให้รา *Monascus* ผลิตรงควัตถุสีเหลืองสูงที่สุด (100.56±9.25 OD units/g sdw) รองลงมา ได้แก่ กากมันสำปะหลังเติมกลีเซอรอล 8% (76.27±5.72 OD units/g sdw) กากมันสำปะหลังเติมกลูโคส 4% (69.35±10.02 OD

units/g sdw) และกากมันสำปะหลังเติมกลีเซอรอล 4% (58.64±6.85 OD units/g sdw) ตามลำดับ นอกจากนี้รำข้าวร่วมกับการเติมกลูโคส 8% สนับสนุนให้รา *Monascus* ผลิตรงควัตถุสีเหลืองสูงสุด (222.90±7.87 OD units/g sdw) รองลงมา ได้แก่ รำข้าวเติมกลีเซอรอล 8% (86.98±19.46 OD units/g sdw) รำข้าวเติมกลีเซอรอล 4% (81.60±0.44 OD units/g sdw) และรำข้าวเติมกลูโคส 4% (74.85±0.76 OD units/g sdw) ตามลำดับ

ผลการทดลองสังเกตได้ว่า ตัวอย่างกากมันสำปะหลังหรือรำข้าวที่เติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคสหรือกลีเซอรอล) ที่ความเข้มข้นสูง (8%) มีปริมาณชีวมวลและรงควัตถุสีเหลืองสูงกว่าตัวอย่างกากมันสำปะหลังหรือรำข้าวที่เติมแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่ำ (4%) แสดงเห็นได้ว่าการเติมแหล่งคาร์บอนที่ความเข้นข้นสูง (8%) ทั้งในกากมันสำปะหลังและรำข้าว จะทำให้เชื้อรามีแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในเมแทบอลิซึมของเซลล์เพิ่มขึ้น และส่งผลต่อการสนับสนุนการเจริญและผลิตรงควัตถุจาก *M. purpureus* ได้ดีกว่าเติมแหล่งคาร์บอนที่ความเข้นข้นต่ำ (4%) นอกจากนี้กลูโคสที่ความเข้มข้น 8% เป็นแหล่งคาร์บอนที่กระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* ได้ดีกว่ากลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 8% ทั้งบนกากมันสำปะหลังและรำข้าว ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า *Monascus* สามารถใช้โมโนแซคคาไรด์ เช่น กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนได้ง่ายกว่า sugar alcohol เช่น กลีเซอรอล (Nimnoi & Lumyong, 2009) เมื่อจุลินทรีย์มีปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ง่ายเพิ่มขึ้นก็อาจกระตุ้นการผลิตรงควัตถุได้สูงขึ้น

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nimnoi and Lumyong (2009) ผู้ซึ่งรายงานว่า โมโนแซคคาไรด์ เช่น กลูโคส และกาแลคโตส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่า sugar alcohol เช่น แมนนิทอล ไซโคส (psicose) และไซลิทอล สำหรับการผลิตรงควัตถุสีแดงจาก *Monascus* บนเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (กากข้าวโพด กากถั่วลิสง กากมะพร้าว และกากถั่วเหลือง) และการเติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคส กาแลคโตส แมนนิทอล ไซโคส และไซลิทอล) ที่ความเข้มข้นสูง (8%) สามารถปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีแดงจาก *Monascus* ได้ดีกว่าการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันที่ความเข้มข้นต่ำ (4%) นอกจากนี้ Nimnoi et al. (2015) รายงานว่า การผลิตรงควัตถุสีแดงจากรา *Monascus* ถูกปรับปรุงเมื่อเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคสหรือกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 4%, 6% และ 8% (โดยน้ำหนัก) ในเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ชานอ้อย กากมะพร้าว กากถั่วเหลือง และกากข้าวโพด โดยปริมาณรงควัตถุสีแดงเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม Babitha et al. (2006) พบว่า การเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ เด็กโตส (dextrose) แมนนิทอล แลคโตส ไซโลส (xylose) ข้าว ซอสบิทอล ซูโครส และแป้งมันสำปะหลัง (4% และ 8% โดยน้ำหนัก) ในผงเมล็ดขนุนด้วยการหมักแบบอาหารแข็งไม่สามารถปรับปรุงการผลิตรงควัตถุจากรา *Monascus* ยกเว้นการเติมไซโลสและข้าวที่ความเข้มข้น 8% โดยน้ำหนัก ซึ่งสามารถปรับปรุงการผลิตรงควัตถุจากรา *Monascus* ได้

3.1.5 การผลิตโมนาโคลิน เค จาก *M. purpureus*

แม้ว่าการเจริญเติบโตและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *Monascus* เพิ่มขึ้นบนกากมันสำปะหลังที่เติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคสหรือกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% หรือ 8%) อย่างไรก็ตาม

ปริมาณโมนาโคลิน เค ลดลง เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูง (8%) (ภาพที่ 3) รา *Monascus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุดบนตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน โดยมีค่าเท่ากับ 30.77±3.58 mg/kg (ppm) ซึ่งสูงกว่าผลิตภัณฑ์ลูกเดือยหมักด้วยรา *Monascus* (14.97-25.03 mg/kg) (Pattanagul et al., 2008) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโมนาโคลิน เค ในตัวอย่างข้าวหัก โดยปริมาณโมนาโคลิน เค ลดลง เมื่อเติมแหล่งกลูโคสหรือกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% หรือ 8% ในข้าวหัก ซึ่งรา *Monascus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุดบนข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน โดยมีค่าเท่ากับ 9.21±1.08 mg/kg (ppm) (ภาพที่ 5)

อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ขัดแย้งกันถูกพบในตัวอย่างรำข้าว ซึ่งมีปริมาณโมนาโคลิน เค เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูง (8%) โดยการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 8% สามารถสนับสนุนการผลิตโมนาโคลิน เค ได้ดีกว่ากลูโคสที่ความเข้มข้น 8% (ภาพที่ 4) ทั้งนี้รา *Monascus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุดบนรำข้าวร่วมกับการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 8% ซึ่งมีปริมาณโมนาโคลิน เค เท่ากับ 14.27±0.33 mg/kg หรือเพิ่มขึ้น 3.11 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับรำข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน

Xu et al. (2005) รายงานว่า การเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 3% (โดยน้ำหนัก) ในข้าวด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง สามารถกระตุ้นการผลิตโมนาโคลิน เค จาก *M. ruber* ได้อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่การเติมกลูโคสและแลคโตสที่ความเข้มข้นเดียวกัน (3%) ไม่สามารถปรับปรุงการผลิตโมนาโคลิน เค ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน และ *M. ruber* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุดเมื่อเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 3% บนข้าว เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 1%, 5% และ 10% ตามลำดับ โดยการเติมกลีเซอรอลที่เข้มข้นสูง (5% และ 10%) จะมีผลต่อการกระตุ้นการผลิตโมนาโคลิน เค เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ Wong et al. (2003) พบว่า โมนาโคลิน เค จาก *M. purpureus* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (4 ppm) เมื่อเติมกลูโคสความเข้มข้น 2% (w/w) ลงบนข้าว เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน (136 ppm) อย่างไรก็ตามปริมาณโมนาลิน เค เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเติมกลูโคสความเข้มข้นเพียง 1% (w/w) ลงบนข้าว (178 ppm)

3.1.6 การผลิตซิตรินิน จาก *M. purpureus*

การเติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8%) บนกากมันสำปะหลังหรือรำข้าวเป็นผลให้ปริมาณซิตรินินเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (กากมันสำปะหลังหรือรำข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน) (ภาพที่ 3-4) ยกเว้นกากมันสำปะหลังที่เติมกลูโคส 8% ซึ่งมีปริมาณซิตรินิน (1.21 mg/kg) ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม (1.34 mg/kg) อย่างไม่มีนัยสำคัญ ทั้งนี้กากมันสำปะหลังและรำข้าวทุกตัวอย่าง (ทั้งเติมแหล่งคาร์บอนและปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน) มีปริมาณซิตรินินแปรผันอยู่ระหว่าง 1.21-2.08 และ 1.26-4.25 mg/kg ตามลำดับ

นอกจากนี้การเติมแหล่งคาร์บอนในข้าวหักเป็นผลให้ปริมาณซิตรินินลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน) (ภาพที่ 5) ยกเว้นข้าวหักที่เติมกลูโคส 4% ซึ่งมีปริมาณซิตรินิน (0.63 mg/kg) สูงกว่าตัวอย่างควบคุม (0.53 mg/kg) อย่างไม่มีนัยสำคัญ นอกจากนี้การเติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 8% ในข้าวหักเป็นผลให้ไม่สามารถตรวจพบซิตรินินในตัวอย่างได้ ทั้งนี้ตัวอย่างข้าวหักทั้งเติมแหล่งคาร์บอนและปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอนมีปริมาณซิตรินินแปรผันอยู่ 0.00-0.63 mg/kg ตามลำดับ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. (2003) ผู้ซึ่งรายงานว่าการเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ เอทานอลความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0%, กลูโคสความเข้มข้น 2% และ acetic acid ความเข้มข้น 1.0% ในข้าวด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง เป็นผลให้ปริมาณซิตรินินนของ *M. purpureus* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อความความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงขึ้นจะเป็นผลให้ปริมาณซิตรินินลดลงตามลำดับ

ผลการทดลองแนะนำได้ว่า การเติมกลูโคสความเข้มข้น 8% ในกากมันสำหลังสามารถกระตุ้นให้ *Monascus* เจริญเติบโตสูงสุด (75.24 mg/g sdw) และปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีเหลืองได้สูงสุด (100.56 OD units/g sdw) อีกทั้งให้ปริมาณซิตรินินต่ำสุด (1.21 mg/kg) และมีปริมาณโมนาลิน เค เท่ากับ 14.32 mg/kg ดังนั้นจึงคัดเลือกการเติมกลูโคสความเข้มข้น 8% ในกากมันสำปะหลังเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

นอกจากนี้รำข้าวที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 8% สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต *Monascus* (106.28 mg/g sdw) ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (25.16 mg/g sdw) และให้ปริมาณรงควัตถุสีเหลืองสูงสุด (222.90 OD units/g sdw) และมีปริมาณโมนาโคลิน เค และซิตรินิน เท่ากับ 9.85 และ 3.24 mg/kg ตามลำดับ อย่างไรก็ตามรำข้าวร่วมกับการเติมกลีเซอรอล 8% สามารถปรับปรุงการผลิตโมนาลิน เค ได้สูงสุด (14.27 mg/kg) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า รำข้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* แต่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค เนื่องจากโมนาโคลิน เค ที่ได้จากการหมักรา *Monascus* บนรำข้าวทุกตัวอย่าง มีปริมาณต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น (Japakaset et al., 2009; Jirasatid et al., 2013; Srianta et al., 2015; Xu et al., 2005) อย่างไรก็ตามรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* บนรำข้าวร่วมกับการเติมกลูโคสความเข้มข้น 8% มีปริมาณสูงกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น (Biabitha et al., 2007; Srianta et al., 2012; Srianta et al., 2015; Velmurugan et al., 2011) ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกการเติมกลูโคสความเข้มข้น 8% ในรำข้าวเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

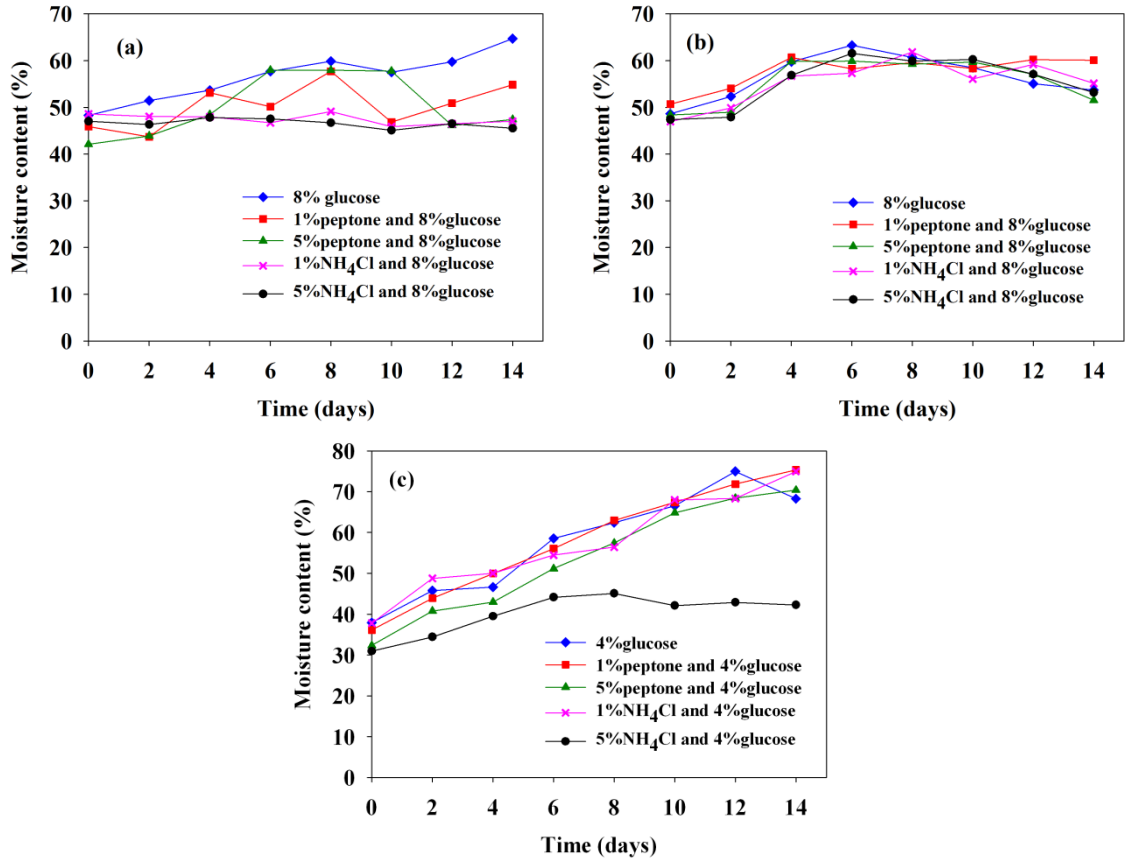
ข้าวหักที่เติมกลูโคสความเข้มข้น 4% สามารถปรับปรุงการเจริญของ *Monascus* (230.63 mg/g sdw) และผลิตรงควัตถุสีเหลืองได้สูงสุด (299.45 OD units/g sdw) และมีปริมาณโมนาโคลิน เค และซิตรินิน เท่ากับ 3.85 และ 0.63 mg/kg ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ข้าวหักเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตวัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* แต่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค เนื่องจากโมนาโคลิน เค ที่ได้จากการหมักรา *Monascus* บนข้าวหักทุกตัวอย่างมี

ปริมาณต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น (Japakaset et al., 2009; Jirasatid et al., 2013; Srianta et al., 2015) ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกการเติมกลูโคสความเข้มข้น 4% ในข้าวหักเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2 ผลของกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักร่วมกับการเติมแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจากรา *M. purpureus*

3.2.1 ปริมาณความชื้น

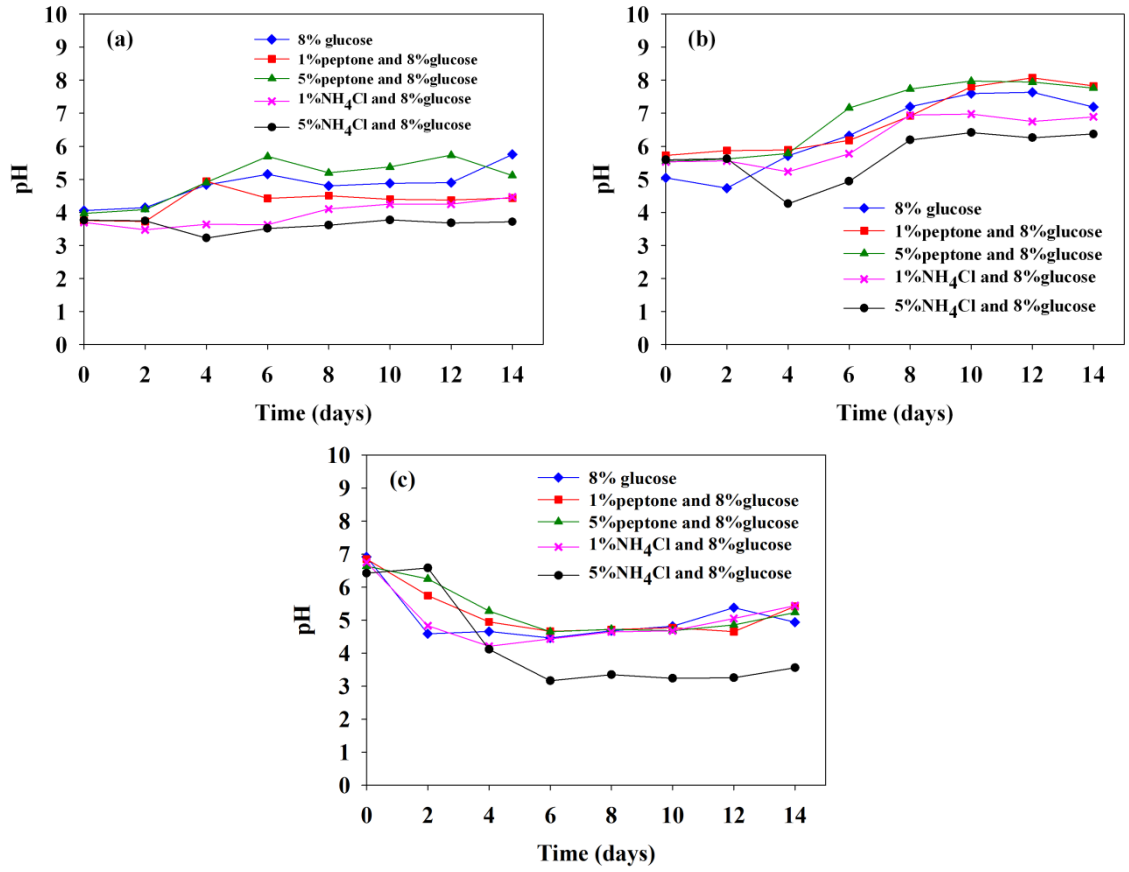
ความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่างกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักทั้งเติมแหล่งไนโตรเจนและปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนแปรผันอยู่ระหว่าง 42-53%, 46-51% และ 31-38% ตามลำดับ (ภาพที่ 6a-c) ซึ่งความชื้นเริ่มต้นของกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักทุกตัวอย่างอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและสร้างรงควัตถุของเชื้อรา *Monascus* (Babitha et al., 2007; Velmurugan et al., 2011; Yongsmith et al., 2000) ทั้งนี้ปริมาณความชื้นของกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักทั้งเติมแหล่งไนโตรเจนและปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนค่อยๆ เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักนาน 14 วัน โดยความชื้นสุดท้ายของตัวอย่างกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักแปรผันอยู่ระหว่าง 47-57%, 45-60% และ 42-75% ตามลำดับ (ภาพที่ 6a-c)



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของกากมันสำปะหลัง (a) รำข้าว (b) และข้าวหัก (c) ที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*

3.2.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ภาพที่ 7 แสดงค่า pH ของกากมันสำปะหลัง (a) รำข้าว (b) และข้าวหัก (c) ที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus* ผลการทดลองพบว่า ค่า pH ของกากมันสำปะหลังและรำข้าวทุกตัวอย่างทั้งเติมแหล่งไนโตรเจนและปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยค่า pH เริ่มต้นของกากมันสำปะหลังและรำข้าวอยู่ในระดับเป็นกรด ซึ่งแปรผันอยู่ระหว่าง 3.70-4.47 และ 5.05-5.73 ขณะที่ค่า pH สุดท้ายมีค่าอยู่ระหว่าง 3.72-5.69 และ 6.37-7.82 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่า pH ของข้าวหักทั้งเติมแหล่งไนโตรเจนและปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยค่า pH เริ่มต้นของตัวอย่างข้าวหักมีค่าเป็นกลางซึ่งแปรผันเท่ากับ 6.42-6.85 และค่า pH สุดท้ายมีค่าอยู่ระหว่าง 3.56-5.44 (ภาพที่ 7a-c) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กากมันสำปะหลัง รำข้าวและข้าวหักทุกตัวอย่างมีค่า pH อยู่ในช่วงที่รา *Monascus* สามารถเจริญได้ (Carvalho et al., 2003) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองตอนต้น



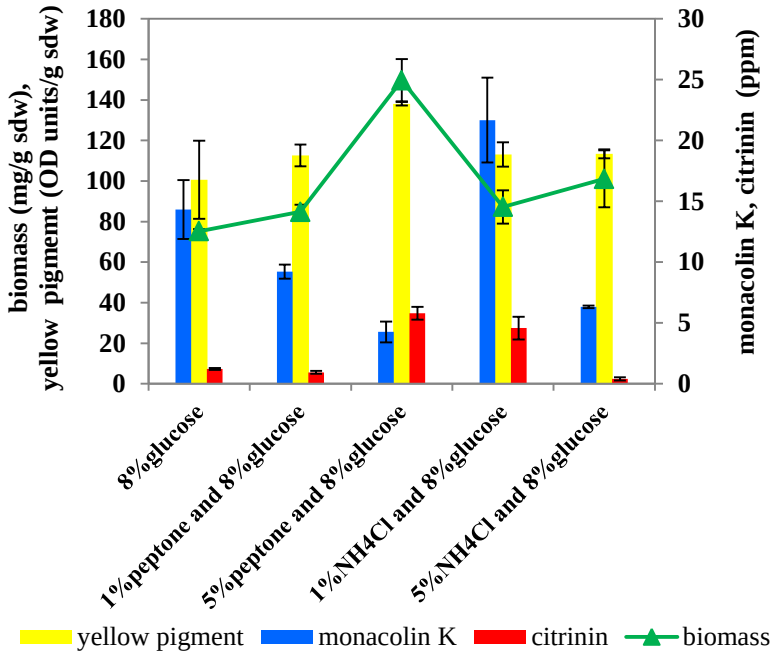
ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของกากมันสำปะหลัง (a) รำข้าว (b) และข้าวหัก (c) ที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*

3.2.3 ปริมาณชีวมวลของ *M. purpureus*

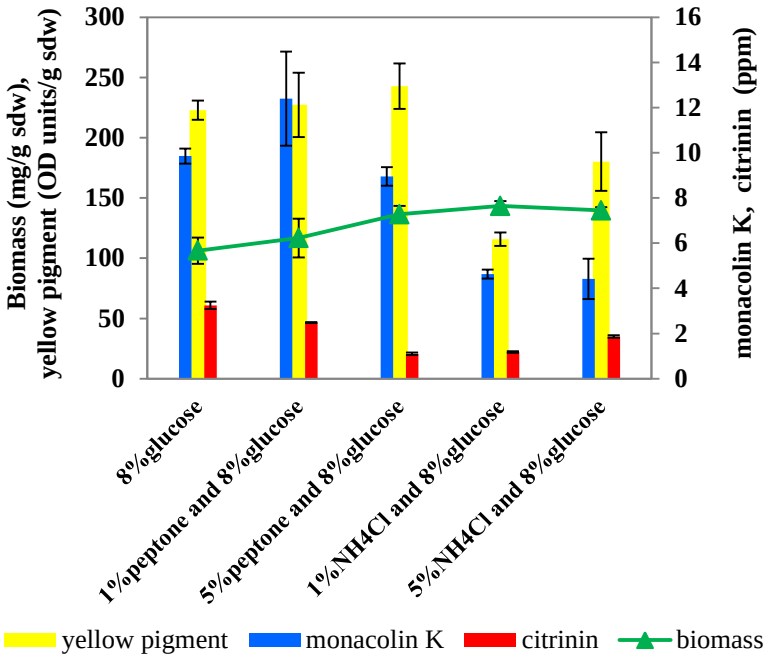
ภาพที่ 8-10 แสดงปริมาณชีวมวล ปริมาณรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* บนกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก ที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% ผลการทดลองพบว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ลงในกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก มีผลต่อการปรับปรุงการเจริญเติบโตของรา *Monascus* ยกเว้นตัวอย่างข้าวหักที่เติม NH_4Cl 5% โดยตัวอย่างกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักที่หมักด้วยรา *Monascus* ทั้งเติมแหล่งไนโตรเจนและปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน (ร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอน) มีปริมาณชีวมวลแปรผันอยู่ระหว่าง 75.25-149.71, 106.28-143.30 และ 96.48-354.08 mg/g sdw ตามลำดับ ซึ่งปริมาณชีวมวลของรา *Monascus* ในกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหักที่เติมแหล่งไนโตรเจนมีค่าเพิ่มขึ้น 1.13-1.34, 1.10-1.35 และ 1.10-1.61 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (กากมันสำปะหลัง รำข้าว หรือข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน แต่เติมแหล่งคาร์บอน)

เมื่อพิจารณาผลของเศษวัสดุเหลือแต่ละชนิดต่อการเจริญของ *Monascus* พบว่า *Monascus* สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมเปปโตน 1% และกลูโคส 8%, รำข้าวร่วมกับ

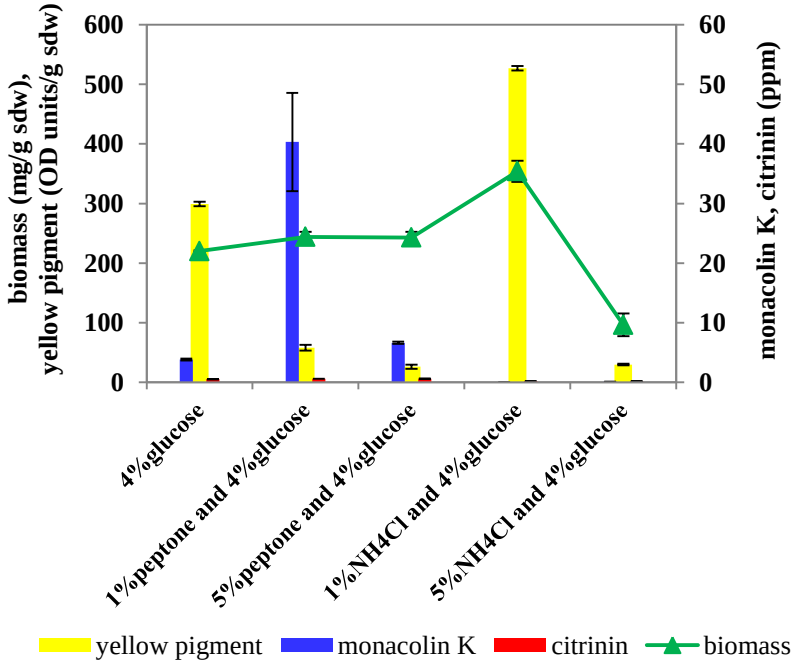
การเติม NH_4Cl 1% และกลูโคส 8% และข้าวหักร่วมกับการเติม NH_4Cl 1% และกลูโคส 4% โดยมีปริมาณชีวมวลเท่ากับ 149.71±10.43, 143.30±4.14 และ 354.08±17.62 mg/g sdw ตามลำดับ ซึ่งปริมาณชีวมวลของ *Monascus* เพิ่มขึ้น 1.99, 1.35 และ 1.61 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน แต่เติมแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 8 ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนกากมันสำปะหลังที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับการเติมกลูโคส 8%) ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*



ภาพที่ 9 ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนรำข้าวที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับการเติมกลูโคส 8%) ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*



ภาพที่ 10 ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนข้าวหักที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับการเติมกลูโคส 8%) ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*

3.2.4 การผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus*

ตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับการเติมกลูโคส 8%) รำข้าวที่เติมเปปโตนความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับการเติมกลูโคส 8%) และเพียงข้าวหักที่เติม NH_4Cl ความเข้มข้น 1% (ร่วมกับการเติมกลูโคส 4%) มีปริมาณรงควัตถุสีเหลืองสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (เศษวัสดุเหลือทิ้งที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนแต่เติมแหล่งคาร์บอน) (ภาพที่ 8-10)

กากมันสำปะหลังหรือรำข้าวร่วมกับการเติมเปปโตน 5% (และกลูโคส 8%) สามารถกระตุ้นการผลิตรงควัตถุสีเหลืองได้สูงสุด (ภาพที่ 8-9) ซึ่งมีปริมาณรงควัตถุสีเหลืองเท่ากับ 138.09±0.84 และ 242.88±18.90 OD units/g sdw หรือเพิ่มขึ้น 1.37 และ1.10 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ขณะที่ข้าวหักที่เติม NH_4Cl ความเข้มข้น 1% (ร่วมกับการเติมกลูโคส 4%) มีปริมาณรงควัตถุสีเหลืองสูงสุด (ภาพที่ 10) โดยมีปริมาณรงควัตถุสีเหลืองเท่ากับ 526.77±3.75 OD units/g sdw หรือเพิ่มขึ้น 1.76 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนแต่เติมแหล่งคาร์บอน

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าข้าวหักร่วมกับการเติม NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และกลูโคส 4% (โดยน้ำหนัก) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus* TISTR 3541 ซึ่งปริมาณรงควัตถุสีเหลืองที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้สูงกว่างานวิจัยของ Babitha et al. (2007); Srianta et al. (2012); Srianta et al. (2015); Velmurugan et al. (2011)

3.2.5 การผลิตโมนาโคลิน เค จาก *M. purpureus*

แม้ว่าการเติมแหล่งไนโตรเจน (เปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5%) บนกากมันสำปะหลังเป็นผลให้การเจริญเติบโตและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *Monascus* เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณโมนาโคลิน เค ลดลง ยกเว้นตัวอย่างกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติม NH_4Cl 1% และกลูโคส 8% ซึ่งมีโมนาโคลิน เค เพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณโมนาโคลิน เค เท่ากับ 21.78±3.49 mg/kg หรือเพิ่มขึ้น 1.51 เท่า เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (กากมันสำปะหลังที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนแต่เติมกลูโคส 8%) (14.32±2.41 mg/kg) (ภาพที่ 8)

นอกจากนี้พบว่า เพียงการเติมเปปโตน 1% ร่วมกับกลูโคส 8% สามารถปรับปรุงการผลิตโมนาโคลิน เค จากรา *Monascus* บนรำข้าวได้ เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (รำข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน แต่เติมกลูโคส 8%) (ภาพที่ 9) โดยมีปริมาณโมนาโคลิน เค เท่ากับ 12.40±2.08 mg/kg หรือเพิ่มขึ้น 1.23 เท่า ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในตัวอย่างข้าวหัก โดยการเติมเปปโตน 1% ร่วมกับกลูโคส 4% สามารถปรับปรุงการผลิตโมนาโคลิน เค จากรา *Monascus* บนข้าวหักได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน แต่เติมกลูโคส 4%) โดยมีปริมาณโมนาโคลิน เค เท่ากับ 40.33±8.24 mg/kg หรือเพิ่มขึ้น 10.49 เท่า

(ภาพที่ 10) อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบโมนาโคลิน เค ในข้าวหักที่เติม NH_4Cl ความเข้มข้น 1% ร่วมกับกลูโคส 4%

ทั้งนี้ Lian et al. (2007) รายงานว่าการเติมเปปโตน 0.5% และกลูโคส 5% ในข้าวสามารถปรับปรุงการผลิตโมนาโคลิน เค (2,900 mg/kg sdw) จากรา *Apergillus terreus* ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (2,200 mg/kg sdw) (ข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน)

3.2.6 การผลิตซิตรินินจาก *M. purpureus*

ปริมาณซิตรินินจากรา *Monascus* บนกากมันสำปะหลังที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับกลูโคส 8%) แปรผันอยู่ระหว่าง 0.40-5.80 mg/kg โดยการเติมเปปโตน 5% หรือ NH_4Cl 1% (ร่วมกับกลูโคส 8%) ลงในกากมันสำปะหลังเป็นผลให้ปริมาณซิตรินินเพิ่มขึ้น ขณะที่การเติมเปปโตน 1% หรือ NH_4Cl 5% (ร่วมกับกลูโคส 8%) ลงในกากมันสำปะหลังเป็นผลให้ปริมาณซิตรินินลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (กากมันสำปะหลังที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนแต่เติมกลูโคส 8%) (ภาพที่ 8) โดยสามารถอธิบายได้ว่า การเติมเปปโตน 5% หรือ NH_4Cl 1% (ร่วมกับกลูโคส 8%) ลงในกากมันสำปะหลังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งนอกจากจะปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีเหลืองแล้ว ยังเป็นผลให้กระตุ้นการผลิตซิตรินินจากรา *Monascus*

นอกจากนี้ปริมาณซิตรินินจากรา *Monascus* บนรำข้าวที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับกลูโคส 8%) แปรผันอยู่ระหว่าง 1.09-3.24 mg/kg โดยการเติมแหล่งไนโตรเจนทุกชนิดในรำข้าวเป็นผลให้ปริมาณซิตรินินลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (รำข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนแต่เติมกลูโคส 8%) (ภาพที่ 9)

ปริมาณซิตรินินจากรา *Monascus* บนข้าวหักที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับกลูโคส 4%) มีปริมาณค่อนข้างต่ำ โดยแปรผันอยู่ระหว่าง 0.15-0.61 mg/kg โดยข้าวหักที่เติมเปปโตนทั้งความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับกลูโคส 4%) มีปริมาณซิตรินินเท่ากับ 0.61 และ 0.60 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณซิตรินินเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (0.53 mg/kg) (ข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนแต่เติมกลูโคส 4%) ขณะที่ข้าวหักที่เติม NH_4Cl ทั้งความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับกลูโคส 4%) มีปริมาณซิตรินินเท่ากับ 0.20 และ 0.15 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณซิตรินินลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ภาพที่ 10)

จากงานวิจัยของ Wang et al. (2003) รายงานว่า การเติม NH_4Cl ความเข้มข้น 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจนในข้าว เป็นผลให้ปริมาณซิตรินิน จากรา *M. purpureus* เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (863 mg/kg) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (813 mg/kg) (ข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน) ขณะที่การเติม NH_4Cl ความเข้มข้น 1.0% ในข้าวเป็นผลให้ซิตรินินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (90 mg/kg)

ผลการทดลองสรุปได้ว่าการเติมเปปโตน 1% ร่วมกับกลูโคส 8% บนกากมันสำปะหลังสามารถกระตุ้นการเจริญของ *Monascus* ได้สูงสุด (149.70±10.43 mg/g sdw) และผลิตรงควัตถุสีเหลืองได้

สูงสุด (138.10±0.84 OD units/g sdw) ขณะที่มีปริมาณซิตรินินสูงสุด (5.80±0.52 mg/kg) อย่างไรก็ตาม *Monascus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุดบนกากมันสำปะหลังที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนโดยมีปริมาณโมนาโคลิน เค เท่ากับ 30.77±3.58 mg/kg แสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8%) และแหล่งไนโตรเจน (เปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5%) บนกากมันสำปะหลังไม่สามารถปรับปรุงการผลิตโมนาโคลิน เค จากรา *Monascus* ได้

การเติมกลูโคส 8% บนรำข้าวเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *Monascus* โดยเชื้อราสามารถผลิตรงควัตถุสีเหลืองได้เท่ากับ 222.90±7.87 OD units/g sdw ขณะที่มีปริมาณซิตรินินเท่ากับ 3.24±0.16 mg/kg อย่างไรก็ตามการเติมเปปโตน 1% ร่วมกับกลูโคส 8% บนรำข้าวสามารถปรับปรุงผลิตรงควัตถุสีเหลืองได้สูงสุด (242.89±18.90 OD units/g sdw) และมีปริมาณซิตรินินต่ำ (1.10±0.06 mg/kg) อย่างไรก็ตามรา *Monascus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุด เท่ากับ 14.27±0.33 mg/kg เมื่อหมักบนรำข้าวร่วมกับการเติมกลีเซอรอล 8%

การเติม NH_4Cl ความเข้มข้น 1% ร่วมกับกลูโคส 4% บนข้าวหักสามารถกระตุ้นการเจริญของ *Monascus* ได้สูงสุด (354.07±17.62 mg/g sdw) และผลิตรงควัตถุสีเหลืองได้สูงสุด (526.77±3.75 OD units/g sdw) อีกทั้งยังคงมีปริมาณซิตรินินต่ำ (0.20±0.002 mg/kg) แต่ไม่พบการผลิตโมนาโคลิน เค อย่างไรก็ตามรา *Monascus* สามารถผลิต โมนาโคลิน เค ได้สูงสุด เท่ากับ 40.33±8.24 mg/kg เมื่อหมักบนข้าวหักร่วมกับการเติมเปปโตน 1% และกลูโคส 4%

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า รา *Monascus* สามารถเจริญเติบโตได้บนกากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก โดยการเติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคสและกลีเซอรอลความเข้มข้น 4% และ 8%) และแหล่งไนโตรเจน (เปปโตนและ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% และ 5%) บนเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีผลกระทบต่อการเจริญ และการผลิตรงควัตถุสีเหลือง โมนาโคลิน เค และซิตรินินของ *M. purpureus* TISTR 3541 ทั้งนี้ข้าวหักเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* รองลงมาได้แก่ รำข้าว และกากมันสำปะหลัง ตามลำดับ โดยการหมักรา *M. purpureus* บนข้าวหักร่วมกับการเติมกลูโคส 4% และ NH_4Cl ความเข้มข้น 1% สามารถปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *M. purpureus* ได้สูงสุด (526.77±3.75 OD units/g sdw) ขณะที่ตัวอย่างยังคงมีซิตรินินต่ำ (0.20±0.002 mg/kg) นอกจากนี้ข้าวหักยังเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค รองลงมาได้แก่ กากมันสำปะหลัง และรำข้าว ตามลำดับ โดยรา *Monascus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุด เท่ากับ 40.33±8.24 mg/kg และมีปริมาณซิตรินิน เท่ากับ 0.61±0.02 mg/kg เมื่อหมักบนข้าวหักร่วมกับการเติมกลูโคส 4% และเปปโตน 1%

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาผลของเศษวัสดุเหลือทิ้งชนิดอื่น เช่น เศษวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมพาสต้าข้าวเจ้าต่อการเจริญและการผลิตรงวัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจากรา *Monascus*
2. ควรนำข้าวแดงที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

ผลผลิต (output)

ผลงานตีพิมพ์บทความฉบับสมบูรณ์ในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Jirasatid, S. & Nopharatana, M., 2016, Utilization of cassava and coffee residues with carbon sources supplementation on production of monacolin K and yellow pigment by *Monascus purpureus*, *The 5th Burapha University International Conferencen*, 28-29 July, pp.33-38)

ผลงานตีพิมพ์บทความฉบับสมบูรณ์ในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Jirasatid, S. & Nopharatana, M., 2017, Improvement of pigments production of rice bran fermented by *Monascus purpureus*, *The 6th Burapha University International Conferencen*, 3-4 August, pp.509-515)

บรรณานุกรม

Aidoo, K.E., Handry, R. & Wood, B.J.B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European Journal of Applied Microbiology Biotechnology*, 12, 6-9.

Association of Official Analytical Chemists. (1995). *Official Method of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Virginia: The Association of Official Analytical Chemists.

Babitha, S., Soccol, C.R. & Pandey, A. (2006). Jackfruit seed-a novel substrate for the production of *Monascus* pigments through solid-state fermentation. *Food Technolology and Biotechnology*, *44*, 465–471.

Babitha, S., Soccol, C.R. & Pandey, A. (2007). Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*, 98, 1554-1560.

Carvalho, J.C., Pandey, A., Babitha, S. & Soccol, C.R. (2003). Production of *Monascus* biopigments: an overview. *Agro-Food industry hi-technology*, 37-41.

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.

Demain, A. L. (1986). Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure and Applied Chemistry, 58*, 219-226.

Erdogral, O. & Azirak, S. (2004). Review of the red yeast rice (*Monascus purpureus*). *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, *2*, 37-49.

Japakaset, J., Wongkhalaung, C. & Leelawatcharamas, V. (2009). Utilization of soybean residue to produce monacolin K-cholesterol lowering agent. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *31*, 35-39.

Jirasatid, S., Nopharatana, M., Kitsubun, P. & Tongta, A. (2013). Degradation kinetics of monacolin K in red yeast rice powder using mutiresponse modeling approach. *Journal of Food Engineering*, 116, 436-443

Jirasatid, S., Nopharatana, M., Kitsubun, P., Vitchitsoonthonkul, T. & Tongta, A. (2013). Statistical optimization for monacolin K and yellow pigment production and citrinin reduction by *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*, 364-374.

Johns, M.R. & Stuart, D.M. (1991). Production of pigment by *Monascus purpureus* in solid culture. *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 23-28.

Juzlova, P., Martinkova, L. & Kren, V. (1996). Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16, 163-170.

Lee, C.L., Hung, Y.P., Hsu, Y.W. & Pan, T.M. (2013). Monascin and ankaflavin have more anti-atherosclerosis effect and less side effect involving increasing creatinine phosphokinase activity than monacolin K under the same dosages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 143–150.

Lee, C.L., Kung, Y.H., Wu, C.L., Hsu, Y.W. & Pan, T.M. (2010). Monascin and ankaflavin act as novel hypolipidemic and high-density lLipoprotein cholesterol-raising agents in red mold dioscorea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 9013-9019.

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 Antiinflamation Agent-Monascin. *Applied Microbiology and Biotechnology, 72*, 1254-1262.

Lian, W.P., Nan, X.Z. & Lin, C.P. (2007). Monacolin K production by *Aspergillus terrus* in solid-state fermentation. *Journal of Zhejiang University Science A*, 8, 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*, 407-414.

Lin, W.Y., Chang, J.Y., Hish, C.H. & Pan, T.M. (2008). Profiling the *Monascus pilosus"* proteome during nitrogen limitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 433-441.

Liu, B., Wu, T., Su, M., Chung, C. & Yu, F. (2005). Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in *Monascus* fermentation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 170–175.

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, 555-564.

Nimnoi, P. & Lumyoung, S. (2009). Improving Solid-State Fermentation of *Monascus purpureus* on Agricultural Products for Pigment Production. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1384-1390.

Nimnoi, P., Pongsilp, N. & Lumyong, S. (2015). Utilization of agro-industrial products for increasing red pigment production of *Monascus purpureus* AHK12. *Chiang Mai Journal of Science, 42*, 331-338.

Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A. & Tharatha, S. (2008). Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkok fermented by *Monascus* sp. *International Journal of Food Microbiology*, *126*, 20-23.

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.

Jirasatid, S. & Nopharatana, M. (2016). Utilization of cassava and coffee residues with carbon sources supplementation on production of monacolin K and yellow pigment by *Monascus purpureus*. In *Burapha University International Conference (BUU 2016), July 28-29, 2016* (pp. 33-38). Thailand.

Srianta, I. & Harijono (2015). *Monascus*-fermented sorghum: pigments and monacolin K produced by *Monascus purpureus* on whole grain, dehulled grain and bran substrate. *International Food Research Journal*, 22, 377-382.

Srianta, I., Hendrawan, B., Kusumawati, N. & Blanc, P.J. (2012). Study on durian seed as a new substrate for angkok production. *International Food Research Journal, 19*, 941-945.

Teng, S.S. & Feldheim, W. (2000). The fermentation of rice for anka pigment production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 3, 141-146.

Velmurugan, P., Hur H., Balachandar, V., Kamala-Kannan, S., Lee K.J., Lee, S.M., Chae, J.C., Shea, P.J. & Oh, B.T. (2010). *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 112, 590-594.

Wang, J.J., Lee, C.L. & Pan, T.M. (2003). Improvement of Monacolin K, γ-amino butyric Acid and Citrinin Production Ratio as a Function 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 strain of *Monascus pupureus* on rice culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*, 6977-6982.

Wang, W., Chen, Q., Zhang, X., Zhang, H., Huang, Q. & Li, D. (2014). Comparision of extraction methods for analysis of citrinin in red fermented rice. *Food Chemistry*, *157*, 408-412.

Xu, B.J., Wang, Q.W., Jia, X.Q. & Sung, C.K. (2005). Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of *Monascus ruber*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *10*, 78-84.

Yongsmith, B., Kitprechavanich, V., Chitradon, L., Chaisrisook, C. & Budda, N. (2000). Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylase on rice solid culture. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *10*, 263-272.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ผลการทดลองเบื้องต้น

ก-1 ผลของกากมะเขือเทศต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองและโมนาโคลิน เค จาก *M. purpureus*

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนการหมักสามารถทำได้โดย ชั่งกากมะเขือเทศ 5 g ใส่จานเพาะเชื้อ จากนั้นเติมน้ำ 5 ml เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50% นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วเติมสารละลายสปอร์ *M. purpureus* ความเข้มข้นสปอร์ 1×10^{6} spore/ml ปริมาณ 5% (v/w) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC 32.1.03, 1995) ทุกๆ 2 วัน ตลอดระยะเวลาการหมัก และตัวอย่างที่ผ่านการหมักแล้วจะนำเป็นอบแห้งที่ 50°C จนกระทั่งความชื้นน้อยกว่า 10% ทำการบดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh วิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Aidoo, 1981) รงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) และโมนาโคลิน เค (Wang et al., 2004) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองหมักรา *M. purpureus* ด้วยกากมะเขือเทศ พบว่าตัวอย่างมีปริมาณความชื้นเริ่มต้น เท่ากับ 52% และมีปริมาณความชื้นค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยมีความชื้นสุดท้าย เท่ากับ 49% ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความชื้นเริ่มต้นของกากมะเขือเทศอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและสร้างรงควัตถุของเชื้อรา *Monascus* (Babitha et al., 2007)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) พบว่า ตัวอย่างกากมะเขือเทศมีค่า pH เริ่มต้น เท่ากับ 6.30 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยมีค่า pH สุดท้าย เท่ากับ 7.50 ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของกากมะเขือเทศในระหว่างการหมักอยู่ในช่วงที่รา *Monascus* sp. สามารถเจริญได้ โดย Carvalho et al. (2003) รายงานว่า *Monascus* sp. สามารถเจริญได้ในช่วง pH กว้าง ตั้งแต่ 2.5-8.0 แต่ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0-7.0

M. purpureus TISTR 3541 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในกากมะเขือเทศ โดยมีปริมาณชีวมวลภายหลังการหมักนาน 14 วัน เท่ากับ 135.65±12.34 mg/g sdw อย่างไรก็ตามรา *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุสีเหลืองและโมนาโคลิน เค ได้เพียงเล็กน้อยบนกากมะเขือเทศ โดยมีค่าเท่ากับ 27.30±0.93 OD units/g sdw และ 13.00±1.24 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งอธิบายได้ว่ากากมะเขือเทศอาจประกอบด้วยสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน และ/หรือ แหล่งไนโตรเจนที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุสีเหลืองและโมนาโคลิน เค จากรา *M. purpureus*

ก-2 ผลของกากกาแฟต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus*

ก-2.1ผลของกากกาแฟร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอน (กลูโคส กลีเซอรอล หรือซูโครส ความเข้มข้น 4% และ 8%) ต่อการเจริญ และการผลิตรงควัตถุสีเหลืองและโมนาโคลิน เค จาก *M. purpureus*

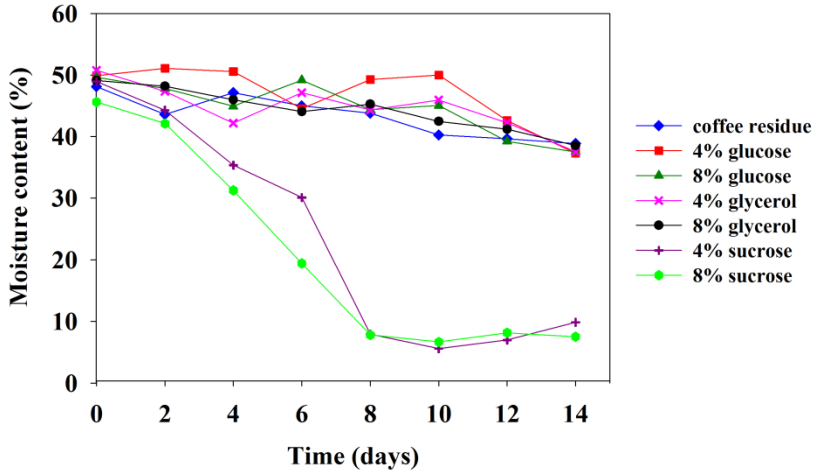
วิธีการทดลอง

กากกาแฟได้รับความอนุเคราะห์จากร้านพูนคอฟฟี่ อ.เมือง จ.ชลบุรี นำกากกาแฟมาอบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50°C จนกระทั่งความชื้นน้อยกว่า 10% จากนั้นขั้นตอนการหมักแบบอาหารแข็งสามารถทำได้โดย ชั่งกากกาแฟ 5 g ใส่ในจานเพาะเชื้อ แล้วเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส กลีเซอรอล หรือซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% (w/w) ในรูปของ nutrient broth จำนวน 9 ml เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นให้มีค่าประมาณ 50% คลุกให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วเติมสารละลายสปอร์ของ *M. purpureus* ความเข้มข้นสปอร์ 1×10^{6} spore/ml ปริมาณ 5% (v/w) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ระหว่างการหมักจะต้องทำการเขย่าจานเพาะเชื้อทุกวัน วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC,1995) ทุกๆ 2 วันตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Adioo, 1981) รงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) และโมนาโคลิน เค (Wang et al., 2004) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14) ทั้งนี้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีเหลือง และ/หรือ โมนาโคลิน เค จะถูกนำไปใช้สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

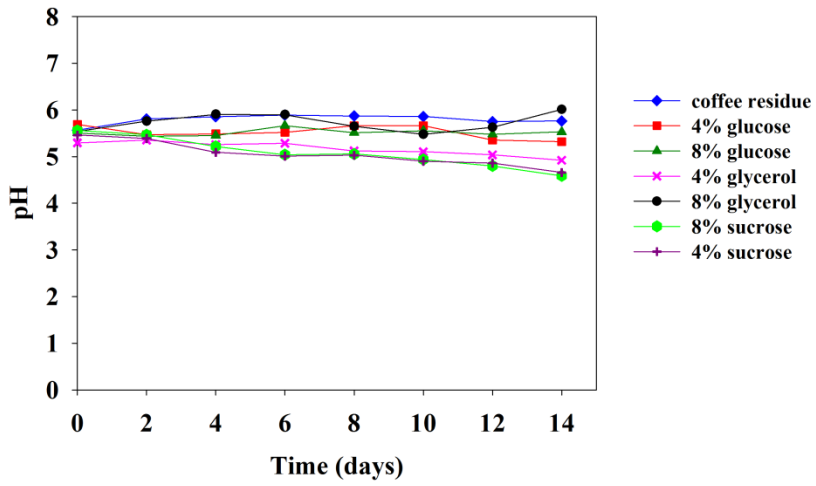
ผลการทดลองและวิจารณ์

ปริมาณความชื้นเริ่มต้นของกากกาแฟที่เติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส กลีเซอรอล และซูโครส ความเข้มข้น 4% และ 8% และปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน แปรผันอยู่ระหว่าง 46-51% ซึ่งเป็นความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและสร้างรงควัตถุจากเชื้อรา *Monascus* (Babitha et al., 2007; Velmurugan et al., 2011; Yongsmith et al., 2000) อย่างไรก็ตามความชื้นของตัวอย่างค่อยๆ ลดลงในระหว่างการหมัก โดยมีความชื้นสุดท้ายของกากกาแฟทุกตัวอย่างแปรผันอยู่ระหว่าง 8-39% (ภาพที่ ก-1)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของตัวอย่างในระหว่างการหมักพบว่า ค่า pH ของกากกาแฟที่เติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส กลีเซอรอล หรือซูโครส ความเข้มข้น 4% และ 8% และปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน มีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก โดยมีค่า pH เริ่มต้นของกากกาแฟทุกตัวอย่างแปรผันอยู่ระหว่าง 5.30-5.69 และค่า pH สุดท้ายของกากกาแฟทุกตัวอย่างแปรผันอยู่ระหว่าง 4.59-6.01 (ภาพที่ ก-2)



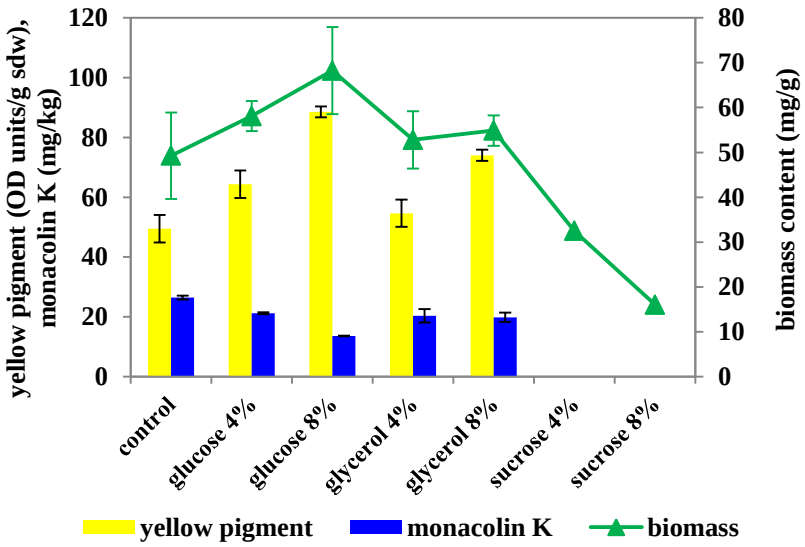
ภาพที่ ก-1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของกากกาแฟที่เติมกลูโคส กลีเซอรอล และซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*



ภาพที่ ก-2 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของกากกาแฟที่เติมกลูโคส กลีเซอรอล และซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*

จากภาพที่ ก-3 แสดงให้เห็นว่าการเติมกลูโคสหรือกลีเซอรอลความเข้มข้น 4% และ 8% มีผลต่อการปรับปรุงการเจริญเติบโตและปริมาณรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* แต่เป็นผลให้ปริมาณโมนาโคลิน เค ลดลง โดยเชื้อรามีปริมาณชีวมวลสูงสุด (68.23±9.70 mg/g sdw) และรงควัตถุสีเหลืองสูงสุด (88.56±1.83 OD unit/g sdw) เมื่อเติมกลูโคส 8% บนกากกาแฟ ซึ่งเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.38 และ 1.30 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างกากกาแฟที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน (ตัวอย่างควบคุม) ขณะที่รา *Monascus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุด เท่ากับ 26.42±0.66 mg/kg ในตัวอย่างควบคุม

นอกจากนี้การเติมซูโครสที่ความเข้มข้น 4% และ 8% มีผลเชิงลบต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุและโมนาโคลิน เค จากรา *Monascus* โดย *Monascus* มีปริมาณชีวมวลลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม และไม่สามารถตรวจพบปริมาณรงควัตถุสีเหลืองและโมนาโคลิน เค ภายหลังการหมัก



ภาพที่ ก-3 ปริมาณชีวมวล รงควัตถุสีเหลือง และโมนาโคลิน เค บนกากกาแฟที่เติมกลูโคส กลีเซอรอล และซูโครส ที่ความเข้มข้น 4% และ 8% ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*

ผลการทดลองแนะนำได้ว่า รา *Monascus* ไม่สามารถเจริญได้ดีบนกากกาแฟ ซึ่งสังเกตได้จากค่าปริมาณชีวมวลที่ค่อนข้างต่ำภายหลังการหมักและปริมาณความชื้นที่ลดลงในระหว่างการหมัก เป็นผลให้เชื้อราผลิตรงควัตถุสีเหลืองและโมนาโคลิน เค ในปริมาณต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่น เช่น กากมันสำปะหลัง รำข้าว และข้าวหัก อย่างไรก็ตามตัวอย่างกากกาแฟที่เติมกลูโคส 8% สามารถกระตุ้นการเจริญ (68.23±9.70 mg/g sdw) และการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *Monascus* ได้สูงสุด (88.56±1.83 OD unit/g sdw) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ขณะที่พบการผลิตปริมาณโมนาลิน เค เพียง 13.57±0.09 mg/kg ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงคัดเลือกการเติมกลูโคสความเข้มข้น 8% ในกากกาแฟเพื่อใช้สำหรับการศึกษาขั้นต่อไป

ก-2.2 ผลของกากกาแฟร่วมกับการเติมแหล่งไนโตรเจน (เปปโตน แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ที่ความเข้มข้น 1% และ 5%) ต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus*

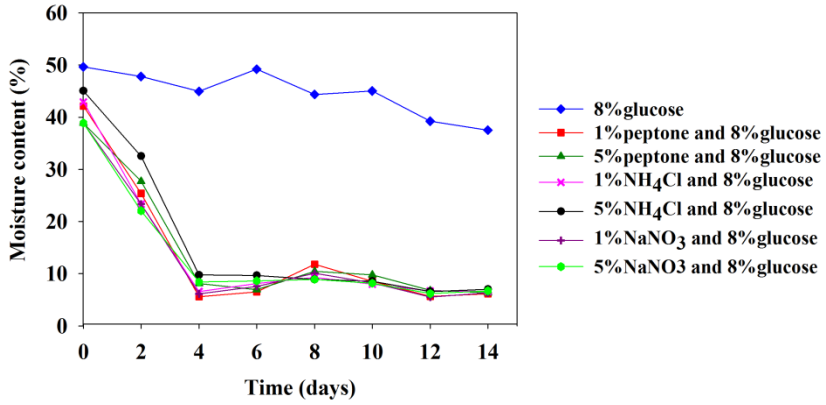
วิธีการทดลอง

การทดลองทำการหมักรา *M. purpureus* บนกากกาแฟที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตน แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ที่ความเข้มข้น 1% และ 5% (w/w) และมีตัวอย่างควบคุมคือ ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน (แต่เติมกลูโคส 8%) ทั้งนี้ทุกตัวอย่างจะมีการเติมแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจากการทดลองในขั้นต้น (กลูโคส 8%)

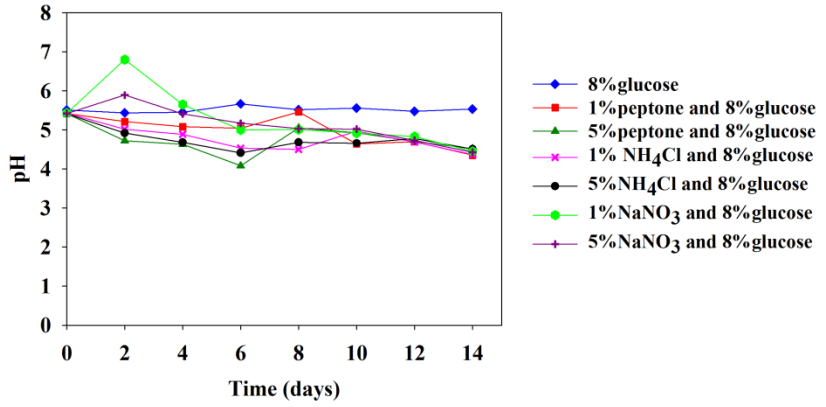
ขั้นตอนการหมักสามารถทำได้โดย ชั่งกากกาแฟ 5 g ใส่ในจานเพาะเชื้อ แล้วเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตน NH_4Cl หรือ $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% หรือ 5% (w/w) และกลูโคส 8% (w/w) ในรูป nutrient broth เช่นเดียวกับการทดลองขั้นต้น จำนวน 9 ml เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นให้มีค่าประมาณ 50% จากนั้นคลุกให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที เติมสารละลายสปอร์ของ *M. purpureus* ความเข้มข้นสปอร์ 1×10^6 spore/ml ปริมาณ 5% (v/w) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ระหว่างการหมักจะต้องทำการเขย่าจานเพาะเชื้อทุกวัน วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC,1995) ทุกๆ 2 วันตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Adioo, 1981) และรงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ปริมาณความชื้นเริ่มต้นของกากกาแฟที่เติมเปปโตน, NH_4Cl และ $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับกลูโคส 8%) และตัวอย่างที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน (แต่เติมกลูโคส 8%) แปรผันอยู่ระหว่าง 39-45% อย่างไรก็ตามความชื้นของตัวอย่างค่อยๆ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างการหมัก โดยมีความชื้นสุดท้ายของกากกาแฟทุกตัวอย่างแปรผันอยู่ระหว่าง 6-7% (ภาพที่ ก-4) นอกจากนี้ค่า pH ของกากกาแฟที่เติมเปปโตน, NH_4Cl และ $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับกลูโคส 8%) และตัวอย่างที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน (แต่เติมกลูโคส 8%) มีแนวโน้มลดลงในระหว่างการหมัก โดยมีค่า pH เริ่มต้น และค่า pH สุดท้ายของกากกาแฟทุกตัวอย่างแปรผันอยู่ระหว่าง 5.41-5.43 และ 4.35-4.52 ตามลำดับ (ภาพที่ ก-5)



ภาพที่ ก-4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของกากกาแฟที่เติมเปปโตน, NH_4Cl และ $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% และตัวอย่างที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*



ภาพที่ ก-5 การเปลี่ยนแปลง pH ของกากกาแฟที่เติมเปปโตน, NH_4Cl และ $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% และตัวอย่างที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus*

การเติมเปปโตน, NH_4Cl และ $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% ร่วมกับกลูโคส 8% ในกากกาแฟมีผลเชิงลบอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus* โดยเชื้อรามีปริมาณชีวมวลเพียง 12.30-23.58 mg/g sdw บนกากกาแฟที่เติมเปปโตน, NH_4Cl และ $NaNo_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% ร่วมกับกลูโคส 8% อีกทั้งไม่สามารถตรวจพบปริมาณรงควัตถุสีเหลืองในทุกตัวอย่าง ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กากกาแฟร่วมกับการเติมแหล่งไนโตรเจน (และกลูโคส 8%) เป็นซับสเตรตที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus*

ก-3 การเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus* บนกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8%

วิธีการทดลอง

ชั่งกากมันสำปะหลัง 10 g ใส่ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% (w/w) ในรูปของ nutrient broth จำนวน 7 ml เพื่อปรับให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50% คลุกให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ 5% (v/w) ความเข้มข้นสปอร์ 1×10^6 spore/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ระหว่างการหมักจะต้องทำการเขย่าจานเพาะเชื้อทุกวัน วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC,1995) ทุกๆ 2 วันตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Adioo, 1981) และรงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรา *Monascus* บนกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณความชื้นค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยตัวอย่างกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นและความชื้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 50-52% และ 48-52% ตามลำดับ

นอกจากนี้กากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% มีค่า pH ค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยมีค่า pH เริ่มต้นและค่า pH สุดท้ายแปรผันอยู่ระหว่าง 3.73-3.75 และ 4.04-4.07 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า ตัวอย่างควบคุมมีค่า pH เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก โดยมีค่า pH เริ่มต้นและค่า pH สุดท้ายเท่ากับ 4.47 และ 5.69 ตามลำดับ

รา *Monascus* สามารถเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดีบนกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% โดยมีค่าปริมาณชีวมวลเท่ากับ 152.03±19.51 และ 157.36±6.38 mg/g sdw ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุม (67.90±0.14 mg/g sdw) และตัวอย่างที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ได้แก่ กลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8% (63.93-75.25 mg/g sdw) อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% มีปริมาณรงควัตถุสีเหลืองเพียง 31.29±1.46 และ 29.45±2.46 OD units/g sdw ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม 50.11±11.08 (OD units/g sdw) และตัวอย่างที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8% (58.64-100.57 OD units/g sdw) ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่า รงควัตถุเป็นสารเมแทบอไบต์ทุติภูมิซึ่งจะถูกสังเคราะห์ในปริมาณต่ำเมื่อจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูง (high growth rate) เนื่องจากยีนที่นำรหัสการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทุติภูมิจะถูกยับยั้งในระหว่างการเจริญเติบโต (Demain, 1986) ผลการทดลองสรุปได้ว่า กากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4%

และ 8% เป็นซับสเตรตที่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *M. purpureus*

ก-4 การเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus* บนกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 8%)

วิธีการทดลอง

ชั่งกากมันสำปะหลัง 10 g ใส่ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเติม NaNO3 ความเข้มข้น 1% และ 5% และกลูโคสความเข้มข้น 8% (w/w) ในรูปของ nutrient broth จำนวน 7 ml เพื่อปรับให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50% นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ 5% (v/w) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ระหว่างการหมักจะต้องทำการเขย่าจานเพาะเชื้อทุกวัน วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC,1995) ทุกๆ 2 วันตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Adioo, 1981) และรงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14)

ผลการทดลองและวิจารณ์

อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณความชื้นค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยตัวอย่างกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นและความชื้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 49% และ 52-54% ตามลำดับ

นอกจากนี้กากมันสำปะหลังร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% มีค่า pH เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยมีค่า pH เริ่มต้นและค่า pH สุดท้ายแปรผันอยู่ระหว่าง 3.66-3.73 และ 5.85-8.74 ตามลำดับ

รา *Monascus* สามารถเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดีบนกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 8%) โดยมีค่าปริมาณชีวมวลเท่ากับ 205.46±11.06 และ 169.16±33.84 mg/g sdw ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมกลูโคสความเข้มข้น 8% (ตัวอย่างควบคุม) (75.25±1.03 mg/g sdw) และตัวอย่างที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ได้แก่ เปปโตนและ NH_4Cl ที่ความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 8%) (84.77-149.71 mg/g sdw) นอกจากนี้กากมันสำปะหลังร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 8%) มีปริมาณรงควัตถุสีเหลือง 56.32±3.70 และ 96.68±12.79 OD units/g sdw ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม 100.57 (OD units/g sdw) และตัวอย่างที่เติมเปปโตนและ NH_4Cl ที่ความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 8%) (112.65-138.10 OD units/g sdw) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การหมักรา *Monascus* บนกากมัน

สำปะหลังร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 8%) เป็นซับสเตรตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus*

ก-5 การเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus* บนรำข้าวร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8%

วิธีการทดลอง

ชั่งรำข้าว 5 g ใส่จานเพาะเลี้ยง เติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% (w/w) ในรูปของ nutrient broth ปริมาตร 5 ml เพื่อปรับให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50% นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ 5% (v/w) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ระหว่างการหมักจะต้องทำการเขย่าจานเพาะเชื้อทุกวัน วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC,1995) ทุกๆ 2 วันตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Adioo, 1981) และรงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรา *Monascus* บนรำข้าวร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณความชื้นลดลงในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยตัวอย่างรำข้าวร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นและความชื้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 50% และ 16-17% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า รำข้าวที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน (ตัวอย่างควบคุม) มีปริมาณความชื้นค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก โดยมีปริมาณความชื้นเริ่มต้นและความชื้นสุดท้ายเท่ากับ 50% และ 55% ตามลำดับ

นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อรำข้าวร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% มีค่า pH ค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยมีค่า pH เริ่มต้นและค่า pH สุดท้ายแปรผันอยู่ระหว่าง 5.95 และ 6.30-6.31 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า ตัวอย่างควบคุมมีค่า pH เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก โดยมีค่า pH เริ่มต้นและค่า pH สุดท้ายเท่ากับ 5.25 และ 7.35 ตามลำดับ

แม้ว่ารำข้าวร่วมกับการเติมซูโครสจะมีปริมาณความชื้นค่อนข้างต่ำในระหว่างการหมัก ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Monascus* อย่างไรก็ตามพบว่า รา *Monascus* สามารถเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดีบนรำข้าวร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% โดยมีค่าปริมาณชีวมวลเท่ากับ 234.51±21.33 และ 188.15±3.40 mg/g sdw ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุม (25.16±12.32 mg/g sdw) และตัวอย่างที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ได้แก่ กลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8% (75.56-113.35 mg/g sdw) อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามรำข้าวร่วมกับการเติมซูโครสความ

เข้มข้น 4% และ 8% มีปริมาณรงควัตถุสีเหลืองเพียง 44.73 และ 43.23 OD units/g sdw ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม (52.41±1.20 OD units/g sdw) และตัวอย่างที่เติมกลูโคสและกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 4% และ 8% (74.85-222.90 OD units/g sdw) ผลการทดลองสรุปได้ว่า รำข้าวร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% เป็นซับสเตรตที่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *M. purpureus* ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับตัวอย่างกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% ซึ่งสามารถแนะนำได้ว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สนับสนุนการเจริญของรา *Monascus* ได้เป็นอย่างดี แต่ไม่สนับสนุนการสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลือง เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เช่น กลูโคส หรือกลีเซอรอล (ความเข้มข้น 4% และ 8%)

ก-6 การเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus* บนรำข้าวร่วมกับการเติมโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 8%)

วิธีการทดลอง

ชั่งรำข้าว 5 g ใส่จานเพาะเลี้ยง เติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (w/w) และกลูโคส 8% (w/w) ในรูปของ nutrient broth ปริมาตร 5 ml เพื่อปรับให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 50% นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ 5% (v/w) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ระหว่างการหมักจะต้องทำการเขย่าจานเพาะเชื้อทุกวัน วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC,1995) ทุกๆ 2 วันตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Adioo, 1981) และรงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรา *Monascus* บนรำข้าวร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคส 8%) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณความชื้นลดลงในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยตัวอย่างรำข้าวร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นและความชื้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 49-51% และ 15-26% ตามลำดับ นอกจากนี้ตัวอย่างมีค่า pH ค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยมีค่า pH เริ่มต้นและค่า pH สุดท้ายแปรผันอยู่ระหว่าง 6.32-6.96 และ 6.32-7.22 ตามลำดับ

รา *Monascus* สามารถเจริญเติบโตได้บนรำข้าวร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคส 8%) โดยมีค่าปริมาณชีวมวลเท่ากับ 171.16±13.41 และ 104.38±13.50 mg/g sdw ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า รา *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุสีเหลืองเพียง 57.89±0.53 และ 49.65±2.73 OD units/g sdw ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าตัวอย่างที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจน (แต่เติมกลูโคส 8%) (222.90±7.87 OD units/g sdw) อย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า

การเจริญของ *Monascus* อาจไม่สัมพันธ์กับการผลิตรงควัตถุสีเหลืองซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติภูมิ และรำข้าวร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% เป็นซับสเตรตที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *M. purpureus* เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างรำข้าวตัวอย่างอื่น

ก-7 การเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus* บนข้าวหักร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8%

วิธีการทดลอง

แช่ข้าวหักในน้ำกลั่นที่มากเกินพอนาน 1.5 ชม. เทน้ำทิ้ง ชั่งข้าวหัก 10 g ใส่ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% (w/w) ในรูปของ nutrient broth ปริมาตร 4 ml เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นให้มีค่าประมาณ 40% นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที เติมสารละลายสปอร์ 5% (v/w) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ระหว่างการหมักจะต้องทำการเขย่าจานเพาะเชื้อทุกวัน วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC,1995) ทุกๆ 2 วันตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Adioo, 1981) และรงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรา *Monascus* บนข้าวหักร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณความชื้นค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยตัวอย่างข้าวหักเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นและความชื้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 40-49% และ 51% ตามลำดับ นอกจากนี้ตัวอย่างมีค่า pH ลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 0 ถึง 6 วันแรกของการหมัก และภายหลังจากนั้น ค่า pH ค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยมีค่า pH เริ่มต้นและค่า pH สุดท้ายแปรผันอยู่ระหว่าง 6.64-6.85 และ 5.23-5.42 ตามลำดับ

รา *Monascus* สามารถเจริญเติบโตได้บนข้าวหักร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% โดยมีค่าปริมาณชีวมวลเท่ากับ 158.68±46.17 และ 158.75±33.02 mg/g sdw ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณชีวมวลในตัวอย่างข้าวหักที่เติมซูโครสมีค่าต่ำกว่าข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งคาร์บอน (ตัวอย่างควบคุม) (220.13±8.98 mg/g sdw) อีกทั้งรา *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุสีเหลืองได้เท่ากับ 20.78±0.93 และ 13.54±0.23 OD units/g sdw ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม (208.24±6.42 OD units/g sdw) อย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แม้ว่าข้าวหักร่วมกับการเติมซูโครสความเข้มข้น 4% และ 8% เป็นซับสเตรตที่มีประโยชน์ต่อการเจริญของรา *Monascus* เมื่อเปรียบเทียบกับเศษวัสดุเหลือทิ้งชนิดอื่น เช่น กากมันสำปะหลัง รำข้าว และกากกาแฟ แต่ข้าวหักร่วมกับการเติมซูโครส (ความเข้มข้น 4% และ 8%) เป็นซับสเตรตที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus*

ก-8 การเจริญและการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *M. purpureus* บนข้าวหักร่วมกับการเติมโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 4%)

วิธีการทดลอง

แช่ข้าวหักในน้ำกลั่นที่มากเกินพอนาน 1.5 ชม. เทน้ำทิ้ง ชั่งข้าวหัก 10 g ใส่ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% และกลูโคสความเข้มข้น 4% ในรูปของ nutrient broth ปริมาตร 4 ml เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นให้มีค่าประมาณ 40% นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 30 นาที เติมสารละลายสปอร์ 5% (v/w) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ระหว่างการหมักจะต้องทำการเขย่าจานเพาะเชื้อทุกวัน วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC,1995) ทุกๆ 2 วันตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Adioo, 1981) และรงควัตถุสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 14)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงรา *Monascus* บนข้าวหักร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 4%) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยตัวอย่างข้าวหักเติมเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (ร่วมกับกลูโคสความเข้มข้น 4%) มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นและความชื้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 42-44% และ 48-49% ตามลำดับ นอกจากนี้ตัวอย่างมีค่า pH ลดลงในระหว่างการหมัก (ไม่แสดงข้อมูล) โดยมีค่า pH เริ่มต้นและค่า pH สุดท้ายแปรผันอยู่ระหว่าง 7.06-7.14 และ 5.74-5.97 ตามลำดับ

รา *Monascus* สามารถเจริญเติบโตได้บนข้าวหักร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 4%) โดยมีค่าปริมาณชีวมวลเท่ากับ 111.26±26.75 และ 107.86±24.32 mg/g sdw ตามลำดับ อย่างไรก็ตามปริมาณชีวมวลในตัวอย่างข้าวหักที่เติม $NaNO_3$ (ร่วมกับกลูโคสความเข้มข้น 4%) มีค่าต่ำกว่าข้าวหักที่ปราศจากการเติมแหล่งไนโตรเจนแต่เติมกลูโคส 4% (ตัวอย่างควบคุม) (230.63±18.02 mg/g sdw) อีกทั้งรา *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุสีเหลืองได้เท่ากับ 1.04±0.90 และ 1.19±0.30 OD units/g sdw ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม (299.43±3.75 OD units/g sdw) อย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ข้าวหักร่วมกับการเติม $NaNO_3$ ความเข้มข้น 1% และ 5% (และกลูโคสความเข้มข้น 4%) เป็นซับสเตรตที่มีประโยชน์ต่อการเจริญของรา *Monascus* แต่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *Monascus*

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

ข-1 วิเคราะห์ปริมาณความชื้น

นำถาดอลูมิเนียมมาอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง นำถาดอลูมิเนียมใส่ในเครื่องวัดความชื้น ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม อบที่อุณหภูมิ 105°C รอจนเครื่องแสดงผล บันทึกผล

ข-2 วิเคราะห์ค่า pH (Johns & Stuart, 1991)

ทำการสุ่มตัวอย่าง 3 กรัม เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 บดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย mortar ทำการวัดค่า pH โดยใช้ pH meter

ข-3 วิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ (Johns & Stuart, 1991)

1. นำตัวอย่างไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 50°C จนกระทั่งความชื้นต่ำกว่า 10% บดให้ละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรง ขนาด 80 mesh

2. นำตัวอย่าง 0.1 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 40 ml แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็งรอบ 100 rpm นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

3. จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วกลั้วด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 10 ml.

4. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400, 470 และ500 นาโนเมตร สำหรับรงควัตถุสีเหลือง ส้ม และแดง ตามลำดับ ใช้เอทานอลความเข้มข้น 70% สำหรับเป็น blank ความเข้มข้นของรงควัตถุ (OD units/g substrate dry weight) คำนวณดังสมการ

$$\text{pigment concentration} = \frac{\text{OD} \times \text{dilution factor} \times \text{v}}{\text{w}}$$

เมื่อ OD คือ ค่าการดูดกลืนแสง, V คือ ปริมาณเอทานอล (50 ml), w คือน้ำหนักตัวอย่างแห้ง (g), dilution factor คือ ค่าการเจือจางตัวอย่าง

ข-4 วิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (Aidoo et al., 1981)

1. วิธีการสกัดกลูโคซามีนสามารถทำได้โดยชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100°C นาน 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็น

2. ดูดตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml (ตัวอย่างควบคุมใช้น้ำกลั่น) ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วหยด 0.5% phenolphthalein 1 หยด ไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 N จนเป็นสีชมพู

3. ทำ back titrated ด้วย 1% potassium hydrogen phosphate จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นไม่มีสี ปรับปริมาตรให้ได้ 25 ml ด้วยน้ำกลั่น

4. นำสารละลายที่ได้มา 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 5% sodium nitrite 1 ml และ 5% potassium hydrogen sulfate 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

5. เติม 12.5% ammonium sulphamate 1 ml เขย่า แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

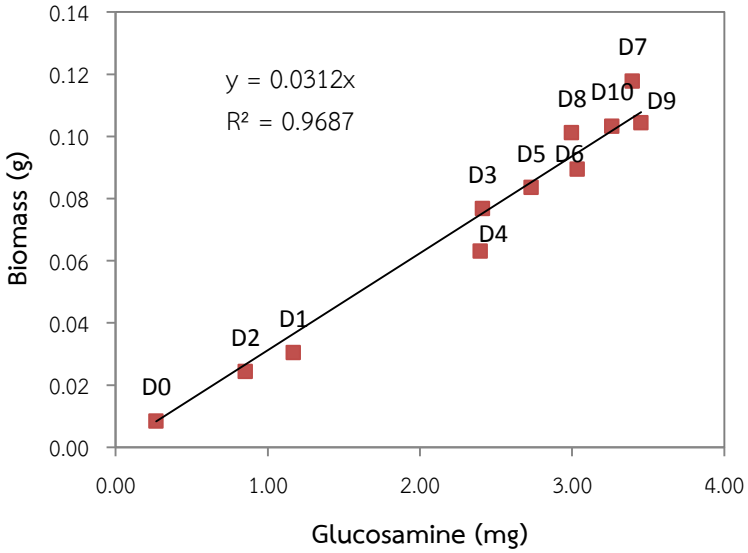
6. เติม 5% MBTH (3-methyl-2-benzothiozole hydrazine) 1 ml ให้ความร้อนโดย water bath 5 นาที ทำให้เย็นทันที ผสม 0.83% ferric chloride 1 ml ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

7. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

8. คำนวณปริมาณชีวมวล (biomass) โดยใช้กราฟมาตรฐาน standard growth curve

การทำกราฟมาตรฐาน standard growth curve

การวิเคราะห์กราฟมาตรฐาน standard growth curve ใช้เทคนิค membrane culture technique โดยตัดเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm ที่เจริญเติบโตสูงสุดแล้ว (เจริญนาน 14-15 วัน) ลงบนกระดาษกรอง Whatman No. 4 ที่ชั่งน้ำหนักและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซึ่งวางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 30°C ดึงกระดาษกรองทุกๆวันในระหว่างหารเพาะเลี้ยงนาน 14-15 วัน นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ราเจริญไปอบที่อุณหภูมิ 80°C นาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักปริมาณชีวมวลของราในแต่ละวัน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนและสร้าง standard growth curve ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคซามีน (mg) และปริมาณชีวมวล (g) ของ *Monascus purpureus* TISTR 3541 (ภาพที่ ข-1)



ภาพที่ ข-1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคซามีนกับปริมาณชีวมวลของ *M. purpureus* TISTR 3541

ข-5 วิเคราะห์โมนาโคลิน เค (Wang et al., 2004)

ความเข้มข้นของโมนาโคลิน เค ทั้งหมดจะวิเคราะห์ในรูปของ lactone form ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC Model 600E, Waters, USA) โดยมีวิธีวิเคราะห์ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างผงข้าวแดง 0.5-1 กรัม สกัดด้วย ethyl acetate ปริมาณ 5 ml ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 1.5 ชม.
2. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1
3. เติม trifluoroacetic acid ความเข้มข้น 1% ปริมาณ 10 ml สำหรับ lactonization ของโมนาโคลิน เค
4. ระเหยสารกัดด้วย vacuum rotary evaporation
5. เติม acetronitrile (HPLC grade) ปริมาณ 1 ml เพื่อชะสารละลายโมนาโคลิน เค
6. กรองด้วย filter ขนาดความพรุน 0.45 μm ใส่ vial สำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC
7. วิเคราะห์ความเข้มข้นของโมนาโคลิน เค โดยใช้ C_{18} column เฟจเคลื่อนที่ประกอบด้วย (mobile phase) acetonitrile:0.5% phosphoric acid (65:35 v/v) อัตราการไหลเท่ากับ 0.7 ml/min ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ 238 nm

ข-6 วิเคราะห์ซิตรินิน (Wang et al., 2014)

1. สกัดตัวอย่าง 1 g ด้วยสารละลาย EW solution (ethanol:water, 70:30, v/v) โดยเขย่าบน rotary shaker ที่ 200 rpm นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40°C จากนั้นนำไป ultrasonicate นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40°C และเขย่าบน rotary shaker ที่ 200 rpm นาน 1.5 ชม. ที่อุณหภูมิ 40°C
2. กรองสารละลายด้วย Whatman No. 1
3. กรอง supernatant ด้วย filter ขนาดความพรุน 0.45 μm ใส่ vial สำหรับวิเคราะห์ซิตรินินด้วยเครื่อง HPLC
4. ซิตรินินจะถูกแยกด้วย Atlantis C_{18} column ขนาดอนุภาค 5 μm, 100A และ 150×4.6 mm I.D. (Atlantis T3, Waters, USA) เฟจเคลื่อนที่ประกอบด้วย (mobile phase) Acetonitrile-water (50:50) (ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 2.5 ด้วย H_3PO_4) อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 ml/min ตรวจวัดด้วย fluorescence detector ด้วย excitation และ emission wavelength เท่ากับ 331 and 500 nm ตามลำดับ