การผลิตดักแด้ปนจากการเลี้ยงหนอน *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: *Calliphoridae*) ในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่หมักด้วย *Monascus* sp.

Production of Magmeal by Cultivation of *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: *Calliphoridae*) in Palm Kernel Meal Fermented with *Monascus* sp.

สุไหวบ๊ะ เร๊ะดุมหลี

Suwaibah Rehdumlee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตดักแด้ปนจากการเลี้ยงหนอน *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: *Calliphoridae*) ในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่หมักด้วย *Monascus* sp.

ผู้เขียน นางสาวสุไหวบ๊ะ เร๊ะดุมหลี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..…….…..

(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……..……

(รองศาสตราจารย์ ดร. จิราพร เพชรรัตน์)

คณะกรรมการสอบ

……..…....…....……ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

……..กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

…..……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เลอลักษณ์ จิตรดอน)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

……

(รองศาสตราจารย์ ดร. เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตดักแด้ปนจากการเลี้ยงหนอน *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: *Calliphoridae*) ในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่หมักด้วย *Monascus* sp.
ผู้เขียน	นางสาวสุไหวบ๊ะ เร๊ะดุมหลี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

กากเนื้อเมล็ดในปาล์มเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันเมล็ดในปาล์ม ประกอบด้วยเยื่อใย ไขมัน และโปรตีน (ร้อยละ 14-18 ของน้ำหนักแห้ง) ซึ่งเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารสัตว์ การวิจัยนี้มี 2 ประเด็น คือ การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของกากเนื้อเมล็ดในปาล์มด้วยการเพิ่มสารสีแดงและโปรตีนของเชื้อราโมแนสคัส และการทดลองนำกากเมล็ดในปาล์มที่มีสารสีแดงนี้ไปเลี้ยงหนอน (*Diptera: Calliphoridae*) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นโดยการวิเคราะห์องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ดักแด้ป่น ในการทดลองแรกเป็นการหมักแบบอาหารแข็งบนกากเนื้อเมล็ดในปาล์มโดยเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Monascus purpureus* TISTR 3002, *M. purpureus* TISTR 3090 และ *M. ruber* TISTR 3006 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2 มิลลิลิตร ($1x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร) พบว่า *M. ruber* TISTR 3006 ผลิตสารสีแดงได้สูงสุด หลังการหมักเป็นเวลา 6 วัน และสภาวะที่เหมาะสม คือ ความชื้นร้อยละ 60 พีเอชเริ่มต้น 7.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ เชื้อสามารถผลิตสารสีแดงได้เพิ่มขึ้น 2 เท่า (จาก 11.0 เป็น 20.16 OD units/g substrate) เมื่อทดสอบความคงทนต่ออุณหภูมิ พบว่า สารสีแดงที่ผลิตได้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีภายหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และที่อุณหภูมิ 30, 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสีที่ผลิตได้ พบวงใส (inhibition zone) รอบแผ่น disc (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) มีขนาด 7.5, 7.12 และ 6.17 มิลลิเมตร สำหรับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ตามลำดับ

เมื่อนำกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่มีสารสีแดงของ *M. ruber* TISTR 3006 ไปใช้ทดลองเลี้ยงหนอนนั้น จากขั้นตอนการเตรียมหนอน พบว่า แมลงวันหัวเขียว (*Chysomya megacephala*) สามารถไข่ได้เฉลี่ยคราวละ 138 ฟอง และมีอัตราการรอดชีวิตของไข่หนอนมากกว่า

ร้อยละ 57 เมื่อนำไข่หนอนแมลงวันไปเลี้ยงในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่มีสารสีแดงโมแนสคัส พบว่าการพัฒนาจากไข่เป็นดักแด้ใช้ระยะเวลา 4 วัน ภายใต้สภาวะที่มีความชื้นที่เหมาะสม คือ ร้อยละ 65 และสามารถผลิตดักแด้ป่นได้ร้อยละ 53 (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง) เมื่อทำการวิเคราะห์ดักแด้ป่นเทียบกับคุณภาพของปลาป่น พบว่าดักแด้ป่นที่ได้มีสีน้ำตาล มีกลิ่นหอม และมีความชื้นเป็นองค์ประกอบไม่เกินร้อยละ 10 มีโปรตีน เยื่อใย ไขมัน และเถ้า ในช่วงร้อยละ 40.06 - 51.97, 8.84 – 12.51, 8.75 – 24.58 และ 4.67 – 3.28 (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ โปรตีนที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น (โดยมีปริมาณของอาร์จีนีน ไลซีน ลิวซีน และฟีนิลแอลลานีนสูงมาก) ผลที่ได้นี้แสดงว่าอาหารที่มีสารสีแดงไม่มีผลต่อองค์ประกอบของดักแด้ป่นที่ผลิตได้ เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานอื่นที่มีรายงานมาก่อน พบว่าผลที่ได้มีปริมาณใกล้เคียงหรือสูงกว่า

คำสำคัญ: กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม, สารสีโมแนสคัส, ดักแด้ป่น, ปลาป่น

Thesis Title	Production of Magmeal by Cultivation of *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: *Calliphoridae*) in Palm Kernel Meal Fermented with *Monascus* sp.
Author	Miss Suwaibah Rehdumlee
Major Project	Biotechnology
Academic Year	2009

ABSTRACT

Palm kernel meal, a by-product from palm kernel oil milling process, is composed of fiber, fat and protein (14-18 % dry weight). It can be used as an animal feed ingredient. This project had two aims; to increase the nutritive value of palm kernel meal in the presence of pigment and protein from *Monascus*. This substance was used for cultivation of maggot (*Diptera: Calliphoridae*) for feasibility studies on using it as an alternative protein source to substitute fish meal by composition analysis of their composition. In the first experiment, solid-state fermentation on palm kernel meal was carried out using three strains of *Monascus; M. purpureus* TISTR 3002, *M. purpureus* TISTR 3090 and *M. ruber* TISTR 3006, with 2 ml inoculum ($1x10^4$ spores/ml) cultivated at 60% moisture content, initial pH 7.5 at 30 °C. It was found that *M. ruber* TISTR 3006 produced the highest pigment. The optimum initial moisture content was 60 % after 6 days cultivation at 30 °C and initial pH 7.5. Under this optimum condition, *M. ruber* TISTR 3006 could increase the red pigment nearly 2 folds (from 11.0 to 20.16 OD units/g substrate)**.**Thermal stability tasting revealed that the red color of *Monascus* pigment was very stable after autoclaving (121 °C) for 15 min., and keeping at 30 °C, 4°C and -20 °C for 28 days. Biological activity of *Monascus* pigment was tested and found to possess the antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* with the inhibition zone of 7.5, 7.12 and 6.17 millimeter, respectively.

The palm kernel meal with the red pigment of *M. ruber* TISTR 3006 was used for cultivation of maggot. The blow fly (*Chysomya megacephala*) generated 138 eggs each time with the survival rate of > 57%. After applied the palm kernel meal with red *Monascus* pigment

1as a feed for culture the blow fly (*Diptera: Calliphoridae*), growth development from egg to maggot took 4 days under the optimum initial moisture content of 65 % and produced the blow fly maggot meal (magmeal) at 53% (% dry weight). Proximate composition of the maggot meal (magmeal) was determined compared to the fish meal. The magmeal was brown with <10% moisture content, protein, crude fiber and ash content were 40.06 - 51.97, 8.84 – 12.51, 8.75 – 24.58 and 4.67 – 3.28 (% dry weight), respectively. The protein was rich in the essential amino acids (with arginine, lysine, leucine and phenylalanine being very high). Results obtained indicated that pigmented palm kernel meal has no effect on the proximate composition of maggot which was similar or higher than those previously reported.

Keywords: Palm kernel meal, *Monascus* pigment, Magmeal, Fishmeal, Blow fly

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ..... (3)

Abstract..... (5)

กิตติกรรมประกาศ..... (7)

สารบัญ..... (8)

LIST OF TABLES..... (9)

LIST OF FIGURES..... (11)

บทที่

1 บทนำ..... 1

บทนำต้นเรื่อง..... 1

การตรวจเอกสาร..... 2

วัตถุประสงค์..... 20

2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ..... 21

วัสดุอุปกรณ์..... 21

วิธีการ..... 23

3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 31

4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ..... 58

เอกสารอ้างอิง..... 61

ภาคผนวก..... 70

ประวัติผู้เขียน..... 78

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Percentage of essential amino acids (EAA)1 in fishmeal (FM), rendered meat meal (MM), poultry by-product meal (PBM), blood meal (BM), soybean meal (SBM). Percentage of crude protein in the meal (in parenthesis).....	5
2.	Nutrient Composition of solvent extracted and expeller pressed palm kernel meal.....	7
3.	Proximate composition of magmeals compare with fish meal.....	14
4.	Proximate composition of palm kernel meal.....	31
5.	Selection of *Monascus* spp. use palm kernel meal as a substrate for 7 days……....	32
6.	Thermal stability of red pigment production by *Monascus ruber* TISTR 3006 on Palm Kernel Meal at 30°C for 28 days……	40
7.	Egg batches and percentage of survival of *Chrysomya megacephala* eggs for experimental test; Control (palm kernel meal; PKM) and the fresh fish offal……	43
8.	The percentage of survival of *Chrysomya megacephala* pupae on several of initial of moisture content for experimental test; Control (palm kernel meal), fresh fish offal, fermented palm kernel meal and palm kernel meal with the rinse of fresh fish offal…….	45
9.	The weight of *Chrysomya megacephala* pupa on several of initial of moisture content for experimental test; Control (palm kernel meal), fresh fish offal, fermented palm kernel meal and palm kernel meal with the rinse of fresh fish offal……..	46
10.	The percentage of survival and weigh of pupae of *Chrysomya megacephala* reared on palm kernel meal, fresh fish offal and palm kernel meal mixed with fresh fish offal……..	49
11.	The developmental time (days) and percentage of survival of *Chrysomya megacephala* for experimental test; control (PKM), fermented palm kernel meal and palm kernel meal with the rinse of fresh fish offal……....	50

LIST OF TABLES (CONTINUED)

Table		Page
12.	Weight and percentage of moisture of magmeals production produced from different maggot rearing sources…….	51
13.	Proximate composition of magmeal production produced from fly pupae of difference rearing media…….	54
14.	Amino acid profile (mg/100mg) of magmeals produced from different medium experimental test; control (fishmeal) fresh fish offal, fermented palm kernel meal and palm kernel meal with the rinse of fresh fish offal……...	55
15.	Antimicrobial action of the antimicrobial compounds from *Monascus ruber* TISTR 3006…….	57

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Process flow diagram of fish meal and fish oil production.....	3
2.	Extraction of palm kernel oil.....	6
3.	Adult male and female *Chrysomya megacephala* (F.)…….....	11
4.	Life cycle of blow fly.....	12
5.	Biosynthesis of citrinin and red pigment in *Monascus ruber*.....	17
6.	Probable mechanisms of the biosynthesis of rubropunctatin ($C_{12}H_{22}O_5$)	17
7.	Pigment production at different incubation period by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 7.5, initial moisture content 60%, inoculums size 10^6 spore/ 5 gram dry substrate and 30°C for 7 days……...	33
8.	Pigment production at different incubation period by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 7.5, initial moisture content 60%, inoculums size 10^6 spore/ 5 gram dry substrate and 30°C for 7 days……...	35
9.	Enzyme activities at different incubation period by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 7.5, initial moisture content 60%, inoculums size 10^6 spore/ 5 gram dry substrate and 30°C for 6 days……...	36
10.	Effect of initial moisture content on pigment production by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 7.5, inoculums size 10^6 spore/ 5 gram dry substrate and 30°C for 6 days……	37
11.	Effect of inoculum size on pigment production by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 7.5, initial moisture content 60%, and 30°C for 6 days…….	38
12.	Effect of initial pH of substrate on growth and pigment yield by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 5.5-8, inoculums size 2×10^6 spore/ 5 gram dry substrate, initial moisture content 60%, and 30°C for 6 days…	39

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

Figure		Page
13.	Red pigment production by *Monascus ruber* TISTR 3006 on Palm Kernel Meal at 30°C for 6 days (a) Fermented Palm Kernel Meal at 30°C for 6 days (b) Red pigment after extracted by 40% Ethanol; (before diluted) (c) Dilution 1:1, 1: 5 and 1:10 of red pigment (from left to right) (d) Dilution 1:1 and 1: 5 of initial pigment of Palm Kernel Meal (from left to right……	41
14.	Cultured of *Chrysomya megacephala* (a) inside an insect cage (b) cluster of eggs inside egg-laying cup (1.5x)……	42
15.	Color appearances of magmeal production produced from (a) control (fresh fish offal) (b) palm kernel meal (c) fermented palm kernel meal……..	53
16.	Inhibition zones for bacterial strains grown on medium supplemented with disc of *Monascus* red pigment (a) the inhibition zones of *Bacillus subtilis* and (b) the inhibition zones of *Escherichia coli*……	57
17	Standard curve for reducing sugar analyze…….	76
18	Standard curve for xylanase activity analyze……..	76
19	Standard curve for glucosamine analyze…….	77

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันการผลิตทางด้านปศุสัตว์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ปริมาณความต้องการอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบประเภทโปรตีน ซึ่งแต่ละสูตรมักจะมีส่วนผสมโปรตีนอยู่ประมาณร้อยละ 15-25 แหล่งของโปรตีนมีทั้งจากพืชและสัตว์ เช่น ถั่วลิสง ถั่วเหลือง เมล็ดฝ้าย ปลา และเนื้อสัตว์อื่นๆ เป็นต้น (Gilbert, 2002) แหล่งโปรตีนสำคัญมักเป็นปลาป่น เนื่องจากให้โปรตีนสูงและมีคุณภาพดี ปลาป่นแท้จะมีโปรตีนระหว่างร้อยละ 50-65 และมีกรดอะมิโนไลซีน ประมาณร้อยละ 6 รวมทั้งแร่ธาตุในปริมาณสูงถึงร้อยละ 20-24 ในจำนวนนี้จะเป็นธาตุแคลเซียมและธาตุฟอสฟอรัส ปริมาณร้อยละ 5-8 และร้อยละ 3-3.8 ตามลำดับ (สุกัญญา จัตตุพรพงษ์, 2539)

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตปลาป่นเพื่อการส่งออกเป็นอันดับที่ 4 ของโลก โดยสามารถผลิตได้ปีละประมาณ 400,000 – 500,000 ตัน แต่เนื่องจากปลาเป็ดหรือปลาขนาดเล็กที่ไม่นิยมบริโภคซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญที่ใช้ในการผลิตมีราคาสูงขึ้นและมีปริมาณน้อยลง ปลาป่นคุณภาพดีมีโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 60 มีปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการใช้ จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ (เกวลิน หนูฤทธิ์, 2551) ซึ่งแหล่งนำเข้าสำคัญ คือประเทศเกาหลี (นิรนาม, 2550)

ปัจจุบันมีการนำเอาหนอนแมลงวันชนิดต่างๆ ทั้งที่แยกได้จากมูลสุกรและมูลสัตว์ปีก อาทิ ไก่ มาอบแห้งและป่นเพื่อนำไปใช้เป็นองค์ประกอบสำหรับอาหารสัตว์ นอกจากจะลดต้นทุนในการจัดซื้อวัตถุดิบอาหารสัตว์โดยเฉพาะปลาป่นแล้ว ยังเป็นอีกหนทางหนึ่งในการกำจัดมูลสุกรและสัตว์อื่นๆเพื่อลดมลภาวะ (วิโรจน์ วนาสิทธชัยวัฒน์, 2551) หนอนแมลงวันบ้านอบแห้งโดยทั่วไปประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 37.5-45.13 ไขมันร้อยละ 19.8-25.3 เยื่อใยร้อบละ 5.90-7.5 และเถ้าร้อยละ 6.25-16.09 (วิโรจน์ วนาสิทธชัยวัฒน์, 2551; Ogunji *et al,* 2007; Aniebo *et al,* 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าหนอนแมลง Black Soldier fly มีองค์ประกอบของโปรตีนร้อยละ 38-40 ไขมันร้อยละ 18-28 และเยื่อใยร้อยละ 5-7 (Bondari and Sheppard, 1987)

จากการที่วัตถุดิบสำคัญในการผลิตปลาป่นมีปริมาณลดลง การหาแหล่งวัตถุดิบทดแทนปลาป่นจึงมีความสำคัญ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการหาแหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นโดยการเลี้ยงหนอนแมลงวันหัวเขียว (*Chrysomya megacephala*) ในอาหารปกติและในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านและไม่ผ่านการหมักด้วย *Monascus* sp. เพื่อเพิ่มคุณค่าจากสารสีของเชื้อราในผลิตภัณฑ์

การตรวจเอกสาร

1. ปลาป่น

ปลาป่น (Fishmeal) เป็นส่วนของแข็งที่ได้จากการกำจัดน้ำแ ละไขมันออกจากเศษปลา โดยวิธีการบีบอัดหรือปั่นเหวี่ยงส่วนน้ำและไขมันออกไป องค์ประกอบของปลาป่นประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 50-60 ความชื้นร้อยละ 5-15 เถ้าร้อยละ 8-33 เส้นใยน้อยกว่าร้อยละ 1 และมีกรดอะมิโนจำเป็นและวิตามินบางชนิด ได้แก่ บี 12 โคลีน ไนอะซิน กรดแพนโททินิก อุตสาหกรรมปลาป่นเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือที่นิยมกันมากที่สุด เนื่องจากตลาดมีความต้องการสูง การผลิตมีการใช้ต้นทุนสูงและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูง ราคาการรับซื้อวัตถุดิบและขายผลิตภัณฑ์ขึ้นกับปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2542) วัตถุดิบที่นำมาผลิตปลาป่นได้จากปลาเป็ดหรือปลาขนาดเล็กที่ไม่นิยมบริโภคและเศษปลาจากโรงงานแปรรูป โดยปลาเป็ดจัดเป็นวัตถุดิบที่สำคัญที่สุดในการผลิตปลาป่น ปกติการผลิตปลาป่น 1 กิโลกรัม จะต้องใช้ปลาเป็ด 3.4-4.5 กิโลกรัม สำหรับอาหารสัตว์โดยทั่วไปจะมีปลาป่นเป็นสัดส่วนอยู่ร้อยละ 7-10 แต่ในอาหารสัตว์บางชนิดจำเป็นต้องใช้ปลาป่นเป็นส่วนผสมถึงร้อยละ 35 เพื่อเร่งการเจริญเติบโต เช่น อาหารกุ้งกุลาดำ (เกวลิน หนูฤทธิ์, 2551)

1.1 การผลิต

การผลิตปลาป่นโดยรวม ผลผลิตปลาป่นของโลกมีประมาณปีละ 6-8 ล้านตัน/ปี แหล่งผลิตใหญ่ที่สุดอยู่ในทวีปอเมริกาใต้ ได้แก่ เปรู (ร้อยละ 31) และชิลี (ร้อยละ 15) ซึ่งสามารถผลิตปลาป่นได้มากเป็นอันดับ 1 และอันดับ 2 ของโลกตามลำดับ สำหรับประเทศไทยเป็นอันดับที่ 4 ของโลก ปลาที่เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตปลาป่น ได้แก่ ปลาแองโชวี่ ซาร์ดีน และปลาชนิดอื่นๆ (Miles and Chapman, 2006) ปัจจุบันไทยมีโรงงานปลาป่นประมาณ 133 โรงงาน ทั่วประเทศภาคใต้ มีประมาณ 91 โรงงาน จังหวัดที่มีผลผลิตมากได้แก่ สงขลา ระนอง สมุทรสาคร ปัตตานี นครศรีธรรมราช โดยภาพรวมประเทศไทยสามารถผลิตปลาป่นได้ปีละประมาณ 400,000 – 500,000 ตัน (นิรนาม, 2550)

ผลิตภัณฑ์ปลาป่นที่ได้มีการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์หลากชนิด จากรายงานของ Miles และ Chapman (2006) พบว่าในปี 2002 มีการใช้ปลาป่นในการผลิตอาหารสัตว์น้ำสูงสุดถึงร้อยละ 46 และคาดการณ์ว่าในปี 2010 จะมีการใช้ปลาป่นในการผลิตอาหารสัตว์น้ำเพิ่มขึ้นอีกถึงร้อยละ 56 ส่วนสัตว์เศรษฐกิจอื่นๆ มีรายงานการใช้ปลาป่นเป็นอันดับรองลงมา ได้แก่ สุกร (ร้อยละ 20) สัตว์ปีก (ร้อยละ 12) สัตว์เคี้ยวเอื้อง (น้อยกว่าร้อยละ 1) และอื่นๆ (ร้อยละ 12) สำหรับกรรมวิธีการผลิตปลาป่น แสดงใน Figure 1

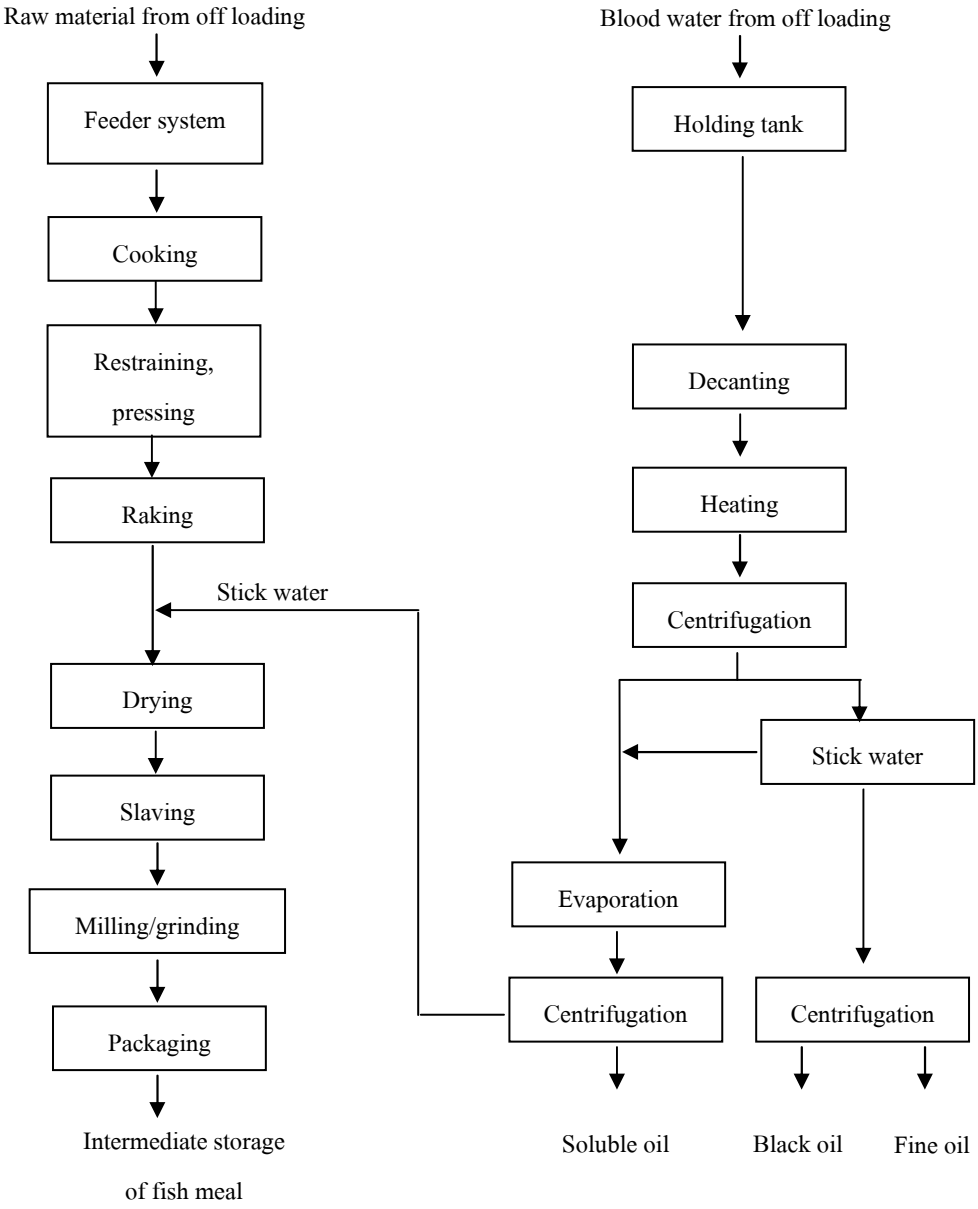


Figure 1. Process flow diagram of fish meal and fish oil production

ที่มา: Anonymous (2010)

1.2 คุณภาพของปลาป่น

โดยปกติปลาป่นคุณภาพสูงจะมีโปรตีนร้อยละ 60 และร้อยละ 72 ขึ้นไป ซึ่งจะเป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และวัตถุดิบที่ต่างชนิดกันย่อมจะให้ปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงปลาชนิดต่างๆ ต้องการปริมาณโปรตีนในสูตรอาหารร้อยละ 32 – 45 และอาจสูงถึง ร้อยละ 55 สำหรับการเพาะเลี้ยงปลาเทราส์ ปลาเซลมอนและปลาที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ นอกจากโปรตีนแล้วปลาป่นคุณภาพดียังยังมีปริมาณของไขมันร้อยละ 4 – 20 ทั้งนี้ไขมันที่ได้จากปลามีปริมาณของกรดไขมันจำเป็นทั้ง PUFA (Essential polyunsaturated fatty acids) DHA (Docosahexaenoic acid) และ EPA (Eicosapentaenoic acid) (Miles and Chapman, 2006) จากรายงานของ Hardy (1996) พบว่า ปลา Herring ผลิตปลาป่นที่ให้โปรตีนสูงถึงร้อยละ 70-72 อันดับรองลงมาเป็นปลา Anchovy ที่ให้ปลาป่นคุณภาพโปรตีนร้อยละ 65 สำหรับองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นในปลาป่น ได้แก่ อาร์จินีน ฮิสทีดีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และชนิดอื่นๆ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปกับโปรตีนที่ได้จากแหล่งอื่นๆ เช่น เนื้อป่น ผลพลอยได้จากสัตว์ปีกป่น เลือดป่น ถั่วเหลืองป่น เป็นต้น (Table 1) ทั้งนี้ควรคำนึงด้วยว่าสัตว์แต่ละชนิดจะมีข้อจำกัดในการใช้สารประกอบไนโตรเจนจากกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน (Miles and Chapman, 2006)

โดยทั่วไปการเลือกใช้ปลาป่นในการผลิตอาหารสัตว์รวมถึงอาหารสัตว์น้ำ มักใช้ระดับของโปรตีนในปลาป่นเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพ ในประเทศไทยมีการจัดลำดับคุณภาพปลาป่น ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (เรื่องกำหนดชื่อ ประเภท ชนิด หรืออายุของสัตว์ คุณภาพหรือมาตรฐานของภาชนะและการใช้ภาชนะบรรจุ (ฉบับที่ 8) พ.ศ. 2538) ตามอัตราส่วนของโปรตีนเป็น 3 เกรด คือ (ชุติมา และคณะ, 2548)

(1) โปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 60

(2) โปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 55

(3) โปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 50

นอกจากนี้สมาคมผู้ผลิตปลาป่นไทย (2550) ได้กำหนดคุณภาพปลาป่นแยกตามระดับโปรตีนต่างๆ เป็น 5 ระดับ ดังต่อไปนี้

(1) โปรตีนร้อยละ 63 ขึ้นไป

(2) โปรตีนร้อยละ 58-62.9

(3) โปรตีนร้อยละ 55.57.9

(4) โปรตีนร้อยละ 52 - 54.9

(5) โปรตีนต่ำกว่าร้อยละ 52

Table 1. Percentage of essential amino acids (EAA)1 in fishmeal (FM), rendered meat meal (MM), poultry by-product meal (PBM), blood meal (BM), soybean meal (SBM). Percentage of crude protein in the meal (in parenthesis)

Essential Amino Acid	FM (64.5%)[2]	MM (55.6%)[2]	PBM (59.7%)[2]	BM (89.2%)[2]	SBM (50.0%)[2]
Arginine	3.82	3.60	4.06	3.75	3.67
Histidine	1.45	0.89	1.09	5.14	1.22
Isoleucine	2.66	1.64	2.30	0.97	2.14
Leucine	4.48	2.85	4.11	10.82	3.63
Lysine	4.72	2.93	3.06	7.45	3.08
Methionine + Cystine[3]	2.31	1.25	1.94	2.32	1.43
Phenylalanine + Tryosine[4]	4.35	2.99	3.97	8.47	4.20
Threonine	2.31	1.64	0.94	3.76	1.89
Tryptophan	0.57	0.34	0.46	1.04	0.69
Valine	2.77	2.52	2.86	7.48	2.55

[1]The percentage values for the EAA composition of each feedstuff were taken from the 1993 NRC (National Research Council, Nutrient Requirements of Fish, National Academy of Sciences, Washington, DC).

[2]Percentage of total crude protein in feedstuff.

[3]Cystine can be synthesized from methionine.

[4]Tyrosine can be synthesized from phenylalanine.

ที่มา: Miles and Chapman (2006)

2. กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม

2.1 ความหมาย

กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม (Palm kernel cake หรือ Palm kernel meal; PKC หรือ PKM) เป็นกากปาล์มที่ได้จากการเอาเฉพาะเนื้อในของเมล็ดมาผ่านกระบวนการสกัดน้ำมัน จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มแบบมาตรฐานและมีกระบวนการผลิตแบบแยกส่วน ประกอบด้วยส่วนของเนื้อเมล็ดในที่ผ่านการแยกเอาน้ำมันจากเนื้อเมล็ดในออกไปแล้วเป็นส่วนใหญ่ อาจมีชิ้นส่วนของกะลาปาล์มปะปนบ้างเล็กน้อย ดังแผนภูมิแสดงผลผลิตและผลพลอยได้จากการสกัดปาล์มน้ำมันจากเนื้อเมล็ดในปาล์มด้วยวิธีการใช้เครื่องกลและวิธีการใช้สารเคมีดัง Figure 2 (Aspar, 2009)

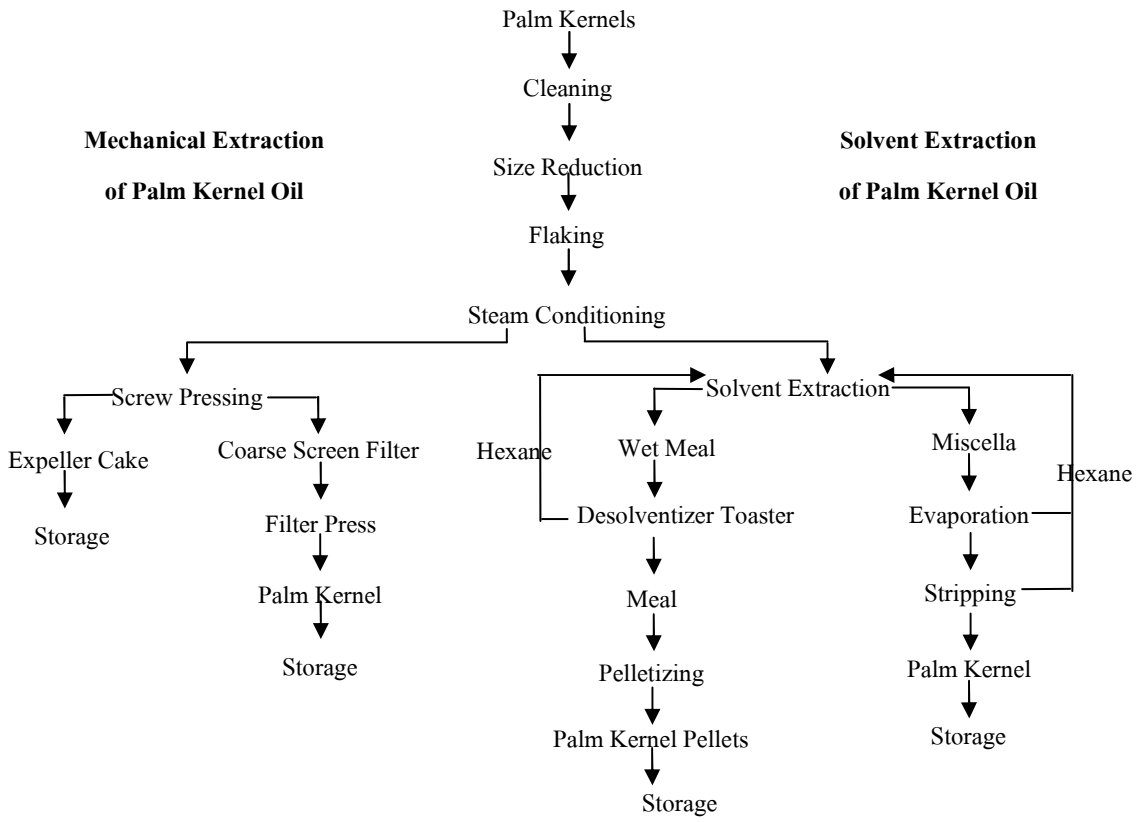


Figure 2. Extraction of palm kernel oil

ที่มา: Aspar (2009)

2.2 คุณค่าทางอาหารของกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม

กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันมีโปรตีนประมาณร้อยละ 14.5 – 19.24 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ปาล์มและกระบวนการสกัดน้ำมัน (Table 2) และมีปริมาณเยื่อใยสูงถึงร้อยละ 17.96 จึงเหมาะที่จะใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Ezieshi and Olomu, 2007) นอกจากนี้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มยังมี กรดอะมิโนที่จำเป็นบางชนิด เช่น อาร์จินีน (0.89 g/100 g PKC) และไอโซลิวซีน (0.93 g/100 g PKC) และชนิดอื่นๆ แต่มีในปริมาณที่ยังน้อย ซึ่งหากต้องการใช้เป็นอาหารสัตว์โดยตรงและทดแทนปลาป่น จำเป็นต้องเสริมกรดอะมิโนที่จำเป็นเพิ่มเติม (Iluyemi *et al.,* 2006) ปริมาณกรดอะมิโนในกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม มีกรดอะมิโนทริฟโทเฟนน้อยสุด คือ ร้อยละ 0.17 และมีกรดกลูตามิคมากที่สุด คือ ร้อยละ 3.15 ส่วนกรดอะมิโนชนิดเมทไธโอนีน ไลซีน และซิสทีน ซึ่งมีความสำคัญและเป็นที่ต้องการสำหรับสัตว์เศรษฐกิจ เช่น ไก่ สุกร เป็นต้น ยังมีในปริมาณน้อย (Yeong *et al.,* 1983)

Table 2. Nutrient Composition of solvent extracted and expeller pressed palm kernel meal

Components	Solvent extracted			Expeller pressed		
	1	2	3	1	2	3
Dry matter (%)	89.0	91.0	91.0	92.7	93.0	89.1
Crude protein (%)	15.3	15.2	15.0	14.6	14.8	16.0
Crude fibre (%)	14.3	16.0	15.6	12.1	15.7	16.8
Crude fat (%)	2.9	1.8	0.9	9.1	9.8	10.6
Ash (%)	4.1	3.8	3.5	4.3	4.2	4.1
Calcium (%)	0.20	0.25	-	0.21	0.20	-
Phosphorus (%)	0.54	0.52	-	0.52	0.32	-

ที่มา: Chin (2009)

2.3 การใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มในการผลิตอาหารสัตว์

จากการศึกษาการใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มเป็นแหล่งทดแทนพลังงานในอาหารข้นที่ใช้เสริมให้แก่โครุ่นสาว พบว่าสามารถใช้ได้ถึงร้อยละ 50 ในอาหารผสมโดยไม่กระทบต่อการเจริญเติบโต และสามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้อีกแนวทางหนึ่ง (สมพงษ์ เทศประสิทธ์, 2526) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มในอาหารไก่กระทงร้อยละ 20-30 และในอาหารสุกรขุนร้อยละ 0-50 พบว่าสัตว์ที่ได้รับอาหารที่ผสมกากเนื้อเมล็ดในปาล์มระดับต่างๆ ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และประสิทธิภาพในการใช้อาหาร ทั้งช่วยในการลดต้นทุนค่าอาหารได้อีกด้วย (วินัย ประลมพ์กาญจน์ และคณะ, 2526; วินัย ประลมพ์กาญจน์ และคณะ, 2528)

3. แหล่งโปรตีนจากหนอนแมลงวัน

แมลงวันจัดอยู่ในอันดับ Diptera ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใหญ่อันดับ 4 ของแมลง เป็นแมลงขนาดเล็ก แตกต่างจากแมลงอื่นๆ คือ มีปีกเพียง 1 คู่ มีลำตัวอ่อนนุ่ม หลายชนิดสามารถดูดเลือดสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และหลายชนิดสามารถกัดกินหรือทำลายพืชที่ปลูกทำให้ผลผลิตเสียหาย หลายชนิดสวยงาม บางชนิดมีลวดลายแปลกตา บางชนิดเป็นตัวห้ำ หรือผสมเกสร (ภรณี บุญสิงห์, 2551; Borror *et al.,* 1976; CSIRO, 1991)

3.1 วงจรชีวิตของแมลงวัน

แมลงวันมีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) ประกอบด้วย 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ ระยะตัวอ่อน (หนอน หรือ maggot) ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย (ภรณี บุญสิงห์, 2551)

3.1.1 ระยะไข่ แมลงวันสามารถผสมพันธุ์ได้หลังจากเป็นตัวเต็มวัยได้เพียง 18-30 ชั่วโมงเท่านั้น และผสมพันธุ์เพียงครั้งเดียว หลังจากนั้นก็จะหาแหล่งที่เหมาะสมในการวางไข่ ค้นหาแหล่งวางไข่โดยอาศัยกลิ่นเป็นตัวนำทาง แล้ววางไข่ในที่ลับตาแสงแดดส่องไม่ถึงและมีความชื้นสูง โดยวางเป็นกลุ่มๆ ละประมาณ 120 ฟอง แมลงวันตัวเมีย 1 ตัว สามารถขยายพันธุ์ได้ 200-1,000 ฟอง ไข่แมลงวันมีระยะฟักภายใน 6-12 ชั่วโมง

3.1.2 ระยะตัวอ่อน เป็นระยะตัวอ่อนหรือตัวหนอน มีรูปร่างเรียวยาว ปลายด้านท้องใหญ่ หัวหรือปากเรียวแหลมและแข็ง ตัวอ่อนจะกินของกำลังเน่าเหม็นและมักชอบกลิ่นแอมโมเนียหรือกลิ่นของยีสต์เป็นพิเศษ ตัวอ่อนจะกินอาหารมากจนเข้าใกล้ระยะดักแด้จึงหยุดกินอาหาร ระยะนี้ใช้เวลา 6-7 วัน

3.1.3 ระยะดักแด้ เป็นระยะที่ตัวหนอนหยุดกินและเริ่มคลานไปสู่ที่แห้งๆ เพื่อเริ่มปรับเปลี่ยนร่างกาย โดยหดตัวเองให้สั้นลง จนมีลักษณะอ้วนสั้น ผนังลำตัวจะแข็งขึ้นเพื่อห่อหุ้มตัวหนอน ระยะนี้ใช้เวลา 3-4 วัน ก็จะเข้าสู่ระยะตัวโตเต็มวัย

3.1.4 ระยะตัวโตเต็มวัย เป็นระยะที่ดักแด้พัฒนาร่างกายจนมีรูปร่างครบสมบูรณ์ และเริ่มออกจากดักแด้ ซึ่งขณะที่ออกจากดักแด้ใหม่ๆ ยังบินไม่ได้ในทันที จะต้องใช้วิธีเดิน กระโดด เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 15 นาที ลำตัวและปีกเริ่มแข็งแรงขึ้นสามารถบินได้

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแมลงวัน

3.2.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแมลงวันอยู่ระหว่าง 21-37.8 องศาเซลเซียส (Anderson, 2000; Grassberger and Reiter, 2002; Lefebvre and Pasquerault, 2004; Berkebile *et al.,* 2006) นอกจากนี้ Adams และ Reinecke (1979) ยังรายงานเพิ่มเติมว่าที่อุณหภูมิ 32.2 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญและช่วยให้ไข่ของแมลงวัน (*Cochliomyia hominivorax*) เจริญและพัฒนาเข้าสู่ระยะตัวหนอนได้เร็วที่สุดภายในเวลา 8 ชั่วโมง

3.2.2 ความชื้น

ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเป็นตัวหนอนของแมลงวัน มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 60-95 (Abou Zied *et al.,* 2003; Lefebvre and Pasquerault, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงที่ความชื้นร้อยละ 60 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไข่จะพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้รวดเร็วที่สุดภายในระยะเวลา 9.19 ± 0.3 วัน (Grassberger and Reiter, 2002)

3.2.3 อาหารสำหรับแมลงวัน

Abou Zied และคณะ (2003) ทดลองใช้ชิ้นเนื้อวัวสดเพื่อให้แมลงวันหัวเขียว (*Lucilia cuprina*) ใช้ในการวางไข่และเจริญเติบโต ทั้งนี้เพื่อศึกษาจำนวนประชากรและสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตภายในห้องปฏิบัติการ โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 29-32 องศาเซลเซียส พบว่าไข่หนอนแมลงวันเจริญและพัฒนาเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยภายในเวลา 20 วัน นอกจากนี้ยังพบรายงานการใช้ตับวัว ซากสัตว์ และตับแกะทั้งที่ยังสด แช่เย็นและแช่เยือกแข็ง (Grassberger and Reiter, 2002; Day and Wallman, 2006) และการเจริญของหนอนแมลงวัน *Calliphora augur* ในอาหารที่เป็นตับแกะทั้งที่ยังสด แช่เย็นและแช่เยือกแข็งไม่ได้มีความแตกต่างกัน (Day and Wallman, 2006)

3.3 แมลงวันหัวเขียว (Blow fly)

3.3.1 ลักษณะทั่วไปของแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* (F.)

แมลงวันหัวเขียว *C. megaphala* (Figure 3) เป็นแมลงที่มีปีกคู่เดียว (Dipteran) ในวงศ์ Calliphoridae วงศ์นี้ประกอบด้วยแมลงวันหัวเขียว แมลงวันที่ช่วยผสมเกสร แมลงวันที่กินซากสัตว์ (carrion flies) และตัวอ่อนของแมลงวันที่เป็นปรสิตชนิดอื่นๆ

ตัวเต็มวัยของแมลงวันหัวเขียว *C. megacephala* โดยทั่วไปมีสีเขียวหรือน้ำเงินประกายแวววาว ใบหน้าของแมลงวันจะมีสีเหลือง และมีขนอ่อนขนาดเล็กสีเหลือง ความยาวของตัวเต็มวัยอยู่ในช่วง 7 - 12 มิลลิเมตร แผ่นแข็งที่พบด้านหลังของปล้องท้อง (abdominal tergites) มีแถบแคบๆ สีเข้ม และขามีสีดำหรือน้ำตาลเข้ม ที่ฐานของปีกเท่านั้นที่มีสีน้ำตาลขุ่น ส่วนบริเวณปีกจะมีลักษณะใสเหมือนกระจก ช่องหายใจด้านหน้า (anterior spiracles) มีสีจากน้ำตาลเข้มถึงส้ม ตัวผู้มีกระจกตา (eye facet) มีขอบเขตกั้นระหว่างส่วนบนและล่าง ตาประกอบส่วนบนมีขนาดใหญ่กว่าตาประกอบส่วนล่าง หน้าผากของแมลงวัน มี frons ในบริเวณตรงกลางแคบอย่างเห็นได้ชัดเจน มักอาศัยในบริเวณบ้านและตอมสิ่งปฏิกูลเป็นอาหาร (นิรนาม, 2552; Jame, 1976; Lane and Croskey, 1993)

3.3.2 การกระจายทางภูมิศาสตร์

แมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในพื้นที่เขตศูนย์สูตรหรือเขตร้อนของซีกโลกตะวันออกและประเทศเขตอบอุ่น (นิรนาม, 2552) และยังเป็นสายพันธุ์เด่นที่สุดในประเทศไทย (เผด็จ สิริยะเสถียร และ นันทนา ศิริทรัพย์, 2005)

3.3.3 วงจรชีวิตของแมลงวันหัวเขียว (*Chrysomya megacephala*)

แมลงวันหัวเขียวมีการเจริญเติบโตแบบ Complete Metamorphosis โดยมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะๆ จนครบสมบูรณ์ 4 ระยะ ประกอบด้วย ระยะไข่ ระยะตัวอ่อน (หนอน) ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัย (Figure 4) วงจรชีวิตของแมลงวันตั้งแต่ไข่จนเป็นตัวเต็มวัยกินเวลาประมาณ 8-10 วัน และตัวเต็มวัยมีอายุขัยประมาณ 14-70 วัน (เผด็จ สิริยะเสถียร และ นันทนา ศิริทรัพย์, 2005)

แมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัยตัวเมียวางไข่เป็นกลุ่มประมาณ 50-100 ฟอง ประมาณ 12 ชั่วโมง ไข่จึงฟักออกเป็นหนอนวัยที่ 1 (1st stage larva หรือ 1st instar larva) หนอนแมลงวันมักจะใช้คำเรียกเฉพาะว่า maggot ลักษณะของหนอนแมลงวันคือ ส่วนหัวมีขนาดเล็กมีอวัยวะที่ใช้กินอาหารเรียกว่า hook อยู่ 1 คู่ ส่วนท้ายของหนอนมีลักษณะป้านโดยมีท่อหายใจอยู่ 1 คู่เรียกว่า posterior spiracle รูปร่างลักษณะของ posterior spiracle นี้ใช้ช่วยในการจำแนกชนิดของหนอนแมลงวันได้ (Figure 4) หนอนจะลอกคราบ 2 ครั้งเป็นหนอนวัยที่ 2 และ 3 ตามลำดับ หนอนวัยที่ 1

ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมงเพื่อเจริญเป็นหนอนวัยที่ 2 และหนอนวัยที่ 2 ใช้เวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมง เพื่อเจริญเป็นหนอนวัยที่ 3 เมื่อหนอนวัยที่ 3 โตเต็มที่ (peak feeding) มันจะหยุดกินอาหาร และหาที่มืดและแห้งเพื่อเข้าสู่ระยะดักแด้ต่อไป หนอนวัยที่ 3 ใช้เวลาจนกระทั่งเป็นดักแด้ (pupa) ประมาณ 4-5 วัน ภายในดักแด้ตัวหนอนจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อเป็นแมลงวันตัวเต็มวัยโดยใช้เวลาในดักแด้ประมาณ 5-7 วัน ทั้งนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตของหนอนแต่ละระยะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณอาหาร ความหนาแน่นของหนอนแมลงวัน แต่ปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดคืออุณหภูมิ (เผด็จ สิริยะเสถียร และ นันทนา ศิริทรัพย์, 2005)

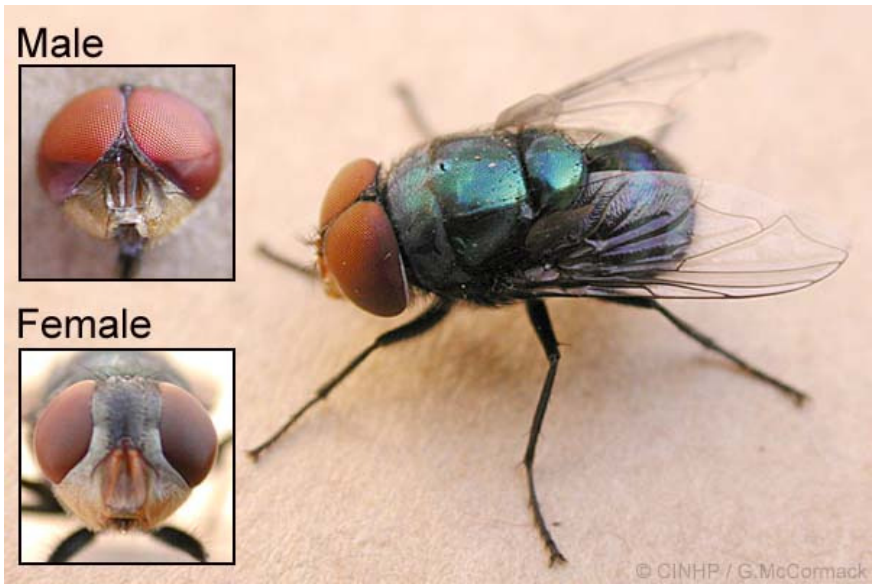


Figure 3. Adult male and female *Chrysomya megacephala* (F.)

ที่มา: Anonymous (2010)

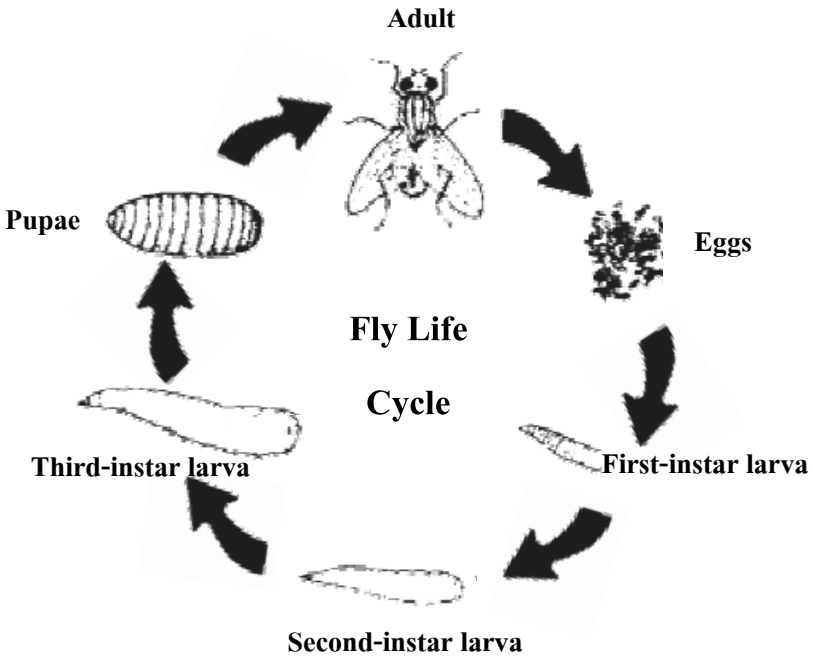


Figure 4. Life cycle of blow fly

ที่มา: เผด็จ สิริยะเสถียร และ นันทนา ศิริทรัพย์ (2005)

3.4 การใช้หนอนแมลงเป็นอาหารสัตว์

มีการศึกษาการนำตัวอ่อนของแมลง (หนอน) มาใช้เป็นอาหารสัตว์ เช่น

3.4.1 Soldier fly หรือ Black Soldier fly **(*Hermetia illucens*)** จัดอยู่ในวงศ์ *Stratiomyidae* เป็นแมลงที่มีขนาดลำตัวยาว 15-20 มิลลิเมตร มีสีดำมันวาว หรืออาจมีสีเขียว ม่วง โดยมีสีดำเป็นสีหลัก โดยปกติตัวเมียวางไข่คราวละประมาณ 500 ฟอง มีการแพร่กระจายทั่วไปในแถบซีกโลกเขตร้อน และออสเตรเลีย (นิรนาม, 2552) ซึ่งมีรายงานการนำหนอนแมลงชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ในการจัดการกับขยะและมูลสัตว์ปีก อาทิ ไก่ไข่ พบว่าสามารถลดการสะสมของมูลไก่ได้อย่างน้อยที่สุดร้อยละ 50 (Sheppard *et al.*, 1994) Pavia (2007 อ้างโดย Wikipedia 2010) กล่าวว่า หนอนแมลงวัน *H. illucens* มีแคลเซียมสูงและเป็นประโยชน์ต่อสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ บางครั้งจึงมีการนำไปเป็นอาหารของสัตว์เลี้ยงจำพวก กบ ปลา เป็นต้น

Bondari และ Sheppard (1987) รายงานการใช้หนอนป่นจากแมลงชนิดนี้เป็นแหล่งโปรตีนเพื่อทดแทนปลาป่น โดยในการทดลองหนอนแมลงที่ใช้มีองค์ประกอบของโปรตีนร้อยละ 38-40 ไขมันร้อยละ 18-28 และเยื่อใยร้อยละ 5-7 ใช้ทดแทนปลาป่นในสูตรอาหารสำหรับปลาดุก (*Ictalurus punctatus*) และปลานิล (*Oreochromis aureus*) และพบว่าสามารถใช้ทดแทน

และส่งผลดีต่อการเจริญของปลาทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้หนอนป่นชนิดนี้ทดแทนกากถั่วเหลืองในอาหารสำหรับสุกร พบว่าสามารถทดแทนได้ถึงร้อยละ 20 โดยไม่เกิดการต่อต้านและผลเสียต่อสุกร (Newton *et al.*, 1977)

3.4.2 Housefly *Musca domestica* หรือแมลงวันบ้าน จัดอยู่ในวงศ์ *Muscidae* เป็นแมลงวันที่มีขนาดลำตัวยาว 7-9 มิลลิเมตร มีสีเทาดำ ไม่สะท้อนแสง โดยปกติตัวเมียวางไข่เป็นกลุ่มประมาณ 120 ฟอง ในสภาพธรรมชาติสามารถวางไข่ได้ 1-2 ครั้ง มีอายุขัยประมาณ 14-70 วัน นอกจากช่วยผสมเกสรดอกไม้ แพทย์บางแห่งยังใช้หนอนแมลงวันช่วยในการรักษาแผลเน่าเปื่อยในคน ทำให้แผลหายเร็วขึ้น นอกจากนี้สามารถช่วยในการชันสูตรศพ ประมาณระยะเวลาตาย หรือการหาสาเหตุของการตายในบางกรณีได้ (กาบแก้ว สุคนธสรรพ์, 2552) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้หนอนแมลงวันเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนราคาถูก โดยการนำเอาหนอนแมลงวันบ้านที่แยกได้จากมูลสุกรมาอบแห้งและป่นเพื่อนำไปใช้เป็นองค์ประกอบสำหรับอาหารสัตว์ นอกจากจะลดต้นทุนในการจัดซื้อวัตถุดิบอาหารสัตว์แล้ว ยังเป็นหนทางหนึ่งในการกำจัดมูลสุกรเพื่อลดมลภาวะ (วิโรจน์ วนาสิทธชัยวัฒน์, 2551) หนอนแมลงวันบ้านอบแห้งโดยทั่วไปประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 37.5-45.13 ไขมันร้อยละ 19.8-25.3 เยื่อใยร้อยละ 5.90-7.5 และเถ้าร้อยละ 6.25-16.09 (วิโรจน์ วนาสิทธชัยวัฒน์, 2551; Ogunji *et al.,* 2007; Aniebo *et al.,* 2008)

Ogunji และคณะ (2007) ศึกษาผลของการใช้หนอนแมลงวันบ้าน *M. domestica* ที่แยกได้จากมูลสัตว์ปีกในประเทศไนจีเรีย นำมาใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารสำหรับลูกปลาแซลมอน (*Oreochromis niloticus*) โดยในการทดลองหนอนแมลงวันที่ใช้มีองค์ประกอบของโปรตีนร้อยละ 37.5 ไขมันร้อยละ 19.8 และพลังงานทั้งหมดร้อยละ 20.3 นำมาทดแทนปลาป่นซึ่งมีองค์ประกอบของโปรตีนร้อยละ 70.7 พบว่าลูกปลาแซลมอนมีอัตราการเจริญที่เป็นปกติ ไม่พบการตาย แต่อัตราการอยู่รอดเริ่มลดลงเมื่อแทนที่ด้วยหนอนแมลงวันในปริมาณที่มากขึ้น (ร้อยละ 66.2) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีการใช้ปลาป่นร้อยละ 100 ซึ่งมีอัตราการรอดร้อยละ 95.6

นอกจากนี้ Zuidhof และคณะ (2003) ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนในหนอนแมลงวันที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของไก่งวง พบว่าหนอนแมลงวันบ้าน *Musca domestica* มีปริมาณกรดอะมิโนชนิดเมทไธโอนีน และ ซิสทีน ในปริมาณน้อย (4.6 กรัมต่อกิโลกรัม) เมื่อเทียบกับความต้องการ เมทไธโอนีน และ ซิสทีน ของไก่งวง (10.5 กรัมต่อกิโลกรัม) อาจต้องเสริมกรดอะมิโนชนิดนี้เพิ่มเติมอีกเล็กน้อย

3.4.3 Emperor moth *Cirina forda* (Westwood) จัดอยู่ในวงศ์ *Saturniidae* เป็นแมลงจำพวกผีเสื้อ พบได้ทั่วไปทางตอนใต้ของไนจีเรีย มีขนาดลำตัวยาว 7-9 มิลลิเมตร มีสีเทาดำ ไม่สะท้อนแสง มีองค์ประกอบของโปรตีนร้อยละ 33.12-48.70 ไขมันร้อยละ 19.8-22.21 และเยื่อใย

ร้อยละ 2.68-9.40 (Akinnawo and Ketiku, 2000; Ogunleye and Omotoso, 2005; Oluremi *et al.,* 2006; Omotoso, 2006) จัดเป็นหนึ่งในชนิดของแมลงที่นิยมนำตัวอ่อน (larva) มาบริโภคเป็นอาหารว่างทางตอนใต้ของประเทศไนจีเรีย (Omotoso, 2006) นอกจากเป็นที่นิยมในการบริโภคโดยทั่วไปแล้ว ยังมีรายงานการนำมาใช้ผลิตเป็นโปรตีนสำหรับทดแทนปลาป่นสำหรับไก่กระทง โดยพบว่าสูตรอาหารที่ทดแทนปลาป่นร้อยละ 50 และร้อยละ 100 ไก่กระทงสามารถใช้และเจริญได้ดีทั้งสองสูตรไม่แตกต่างกันและเทียบเท่ากับสูตรที่ใช้ปลาป่นเป็นแหล่งโปรตีน (Oyegoke *et al.,* 2006)

Oluremi และคณะ (2006) รายงานการใช้หนอน *Cirina forda meal* อบแห้งป่นในอาหารสำหรับกระต่าย โดยสามารถใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารได้ในระดับร้อยละ 7.5 และเมื่อใช้ในปริมาณที่สูงขึ้นจะส่งผลให้พฤติกรรมการกินอาหารของกระต่ายลดลง นอกจากนี้ยังพบรายงานการทดลองใช้ในหนู ซึ่งสามารถใช้ได้ดีไม่แตกต่างจากอาหารสูตรควบคุม (Ogunleye and Omotoso, 2005)

การใช้หนอนแมลงชนิดต่างๆ สำหรับทดแทนปลาป่นในอาหารสัตว์ นอกจากนำมาแปรรูปเป็นหนอนแมลงป่นแล้ว ยังมีรายงานการนำหนอนแมลงมาใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำโดยตรง โดยเลือกใช้ในระยะก่อนเข้าดักแด้ เป็นอาหารให้ปลาจำพวกปลาดุกและปลานิล และพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญได้ดี (Hem *et al.,* 2008) ทั้งนี้เนื่องจากมีหลายรายงานพบว่าองค์ประกอบของหนอนแมลงชนิดต่างๆ มีคุณค่าทางโภชการที่เหมาะแก่การนำมาใช้เป็นวัตถุดิบราคาถูกสำหรับทดแทนปลาป่นในอาหารสัตว์ได้ดี (Table 3)

Table 3. Proximate composition of magmeals compare with fish meal

Type of Meal	Proximate composition							Reference
	Dry matter (%)	Protein (%)	Fat (%)	Fiber (%)	Ash (%)	NFE (%)*	GE (kJ g^{-1}) #	
Fish meal	91.0	70.7	7.8	-	18.3	3.2	20.6	Ogunji *et al.*, 2007
Soldier fly larvae meal	-	42.1	34.8	7.0	14.6	1.4	-	Newton *et al*, 1977
House fly larvae meal	96.4	37.5	19.8	6.25	23.1	19.6	20.3	Ogunji *et al.*, 2007
C. forda larvae meal	93.5	48.70	22.21	2.68	6.45	0.46	-	Ogunleye and Omotoso, 2005

*Nitrogen-free extract + fibre, (NFE) =100-(% protein + % fat + % ash)

#Gross Energy (GE); Calculated by: CP = 23.9 kJg^{-1}; CF = 39.8 kJg^{-1}; NFE = 17.6 kJg^{-1}

4. สารสีและสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส

4.1 สารสีโมแนสคัสและการใช้ประโยชน์

ข้าวแดง หรืออังคัก เป็นผลิตภัณฑ์สารสีที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนข้าวนึ่งซึ่งรู้จักกันมาช้านานในประเทศแถบตะวันออก เช่น ประเทศจีน ประเทศแถบเอเชียใต้ เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น เชื้อรามีการเจริญบนข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั่วผิวหน้า และแทรกทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าว จากนั้นจะมีการสร้างสารสีภายหลังการบ่มเป็นเวลา 3 วัน (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

เชื้อราในสกุล *Monascus* จัดอยู่ในชั้น *Ascomycetes* และ วงศ์ *Monascaceae* ลักษณะเส้นใยมีผนังกั้น มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศและไม่มีเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายและมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วง เชื้อราชนิดนี้เป็นแหล่งของสารเมทาบอไลต์ปฐมภูมิที่สำคัญซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประเภทโพลีคีไทด์ (polyketides) (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

Monascus spp. สามารถผลิตสารสีแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ 6 ชนิด ได้แก่ สารสีแดง (monascorubranmin และ rubropunctamine) สารสีส้ม (monascorubin และ rubropunctatin) และสารสีเหลือง (ankaflavin และ monascin) (Jůzlová *et al.*, 1996) นอกจากนี้ได้มีการค้นพบสารสีเหลืองเพิ่มเติมอีก 2 ชนิด ได้แก่ yellow II และ xanthomonascin (Sato *et al.*, 1992; Jůzlová *et al.*, 1996)

การใช้ประโยชน์ของสีธรรมชาติชนิดนี้มีมานานกว่าพันปีในประเทศจีน และมีรายงานการนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร เช่น ไส้กรอก แยมถั่วเหลือง (Bean jam) เต้าหู้ยี้ (Chinese cheese หรือ sufu) เนื้อเทียม (artificial meat products) ปลาแป้งแดง ไอศกรีม นม นมเปรี้ยว แฮม และอื่นๆ อีกหลากหลายชนิด (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542) นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำเอาการหมักเชื้อราโมแนสคัสมาใช้ร่วมกับการหมักเพื่อผลิตวุ้นสวรรค์ หรือ Bacterial Cellulose-nata พบว่าชิ้นวุ้นสวรรค์ที่หมักด้วยเชื้อรา *M. purpureus* สามารถผลิตสารสีแดงและสารสีมีความคงตัวเมื่อทดสอบที่อุณหภูมิสูง (121 องศาเซลเซียส) และยังมีความคงตัวเมื่อทดสอบการแช่เยือกแข็ง (Sheu and Shyu, 2000)

เชื้อราโมแนสคัส นอกจากจะผลิตสารสีที่สามารถนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารประเภทต่างๆได้แล้ว ยังมีรายงานว่าสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติช่วยในการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งเป็นสารโมนาโคลิน เค (monakolin K) อีกทั้งยังมีรายงานการผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีชื่อ

ว่า ซิตรินิน (citrinin) (Hajjaj *et al.,* 1999; Wang *et al.,* 2002) เช่น *Bacillus, Pseudomonas, Streptococcus* และเชื้อรา *Fusarium oxysporum* เป็นต้น (Jůzlová *et al.*, 1996; Wang *et al.,* 2002)

4.2 สายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อราโมแนสคัส

ปัจจุบันมีการรวบรวมเชื้อราโมแนสคัสไว้เกือบ 20 สายพันธุ์ มีวิธีการจัดแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสโดยหลักการที่แตกต่างกัน เช่น อาศัยสมบัติสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา สมบัติวิทยาเอนไซม์ เชื้อราโมแนสคัสทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *Monascus pilosus, M. purpureus*, *M. ruber* และ *M. floridanus* นอกจากจะแตกต่างกันด้านลักษณะทางสรีรวิทยาแล้วทางด้านวิทยาเอนไซม์ยังต่างกันอีกด้วย โดยเชื้อราในกลุ่ม *M. pilosus* พบกิจกรรมเอนไซม์ β-galactosidase และ α-glucosidase ส่วน *M. purpureus* พบเอนไซม์ polypectase และ cystine arylamidase และพบเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสใน *M. ruber* ส่วน *M. floridanus* เป็นสายพันธุ์เดียวที่พบกิจกรรมเอนไซม์ trypsinase แต่ไม่พบเอนไซม์ valine arylamidase เหมือนสายพันธุ์อื่น (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

4.3 สารสีและเมทาบอไลต์ประเภทต่างๆ จากเชื้อราโมแนสคัส

Haws และคณะ (1959) พบโครงสร้างของรูโบรพังตาติน (rubropunctatin, $C_{12}H_{22}O_5$) แยกได้จาก *M. rubropunctatus* Sato ซึ่งสารนี้เมื่ออยู่ในสารละลายแอมโมเนียจะได้รูโบรพังตามีน (rubropunctamine, $C_{21}H_{23}O_4N$) ซึ่งเป็นสีม่วง นอกจากนี้ได้มีการศึกษาโครงสร้างสารสีจาก *M. purpureus* คือ โมนาสโครูบริน (monascorubrin, $C_{23}H_{26}O_5$) และโมนาสโคฟลาวิน (monascoflavin) สารสีจาก *Monascus* spp. เช่น รูโบรพังตาติน จาก *M. rubropunctatus* โมนาสโครูบริน จาก *M. purpureus* และโมนาสซินหรือโมนาสโคฟลาวิน จาก *Monascus* spp. เป็นสารประเภทโพลีคีไทด์ (polyketides) สารสีที่ได้ผลิตขึ้นมาคล้ายกับเส้นทางสังเคราะห์กรดไขมัน (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ความเป็นไปได้ของกระบวนการสังเคราะห์รูโบรพังตาตินได้อธิบายไว้ดัง Figure 5 และ 6

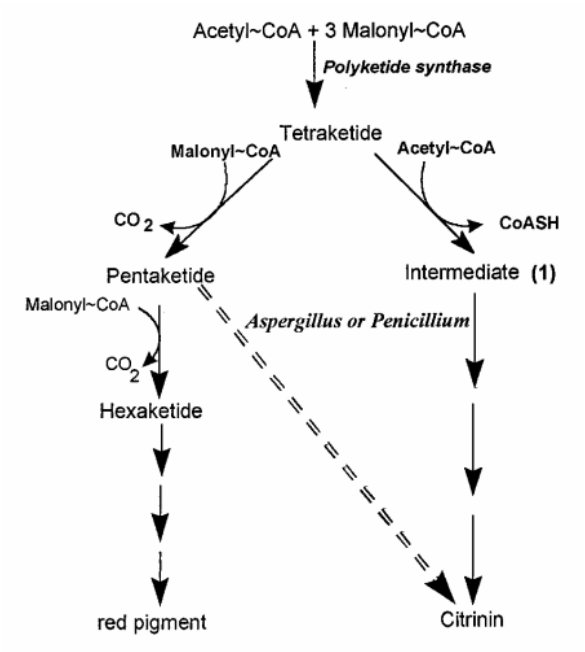


Figure 5. Biosynthesis of citrinin and red pigment in *Monascus ruber*

ที่มา: Hajjaj *et al*., 1999

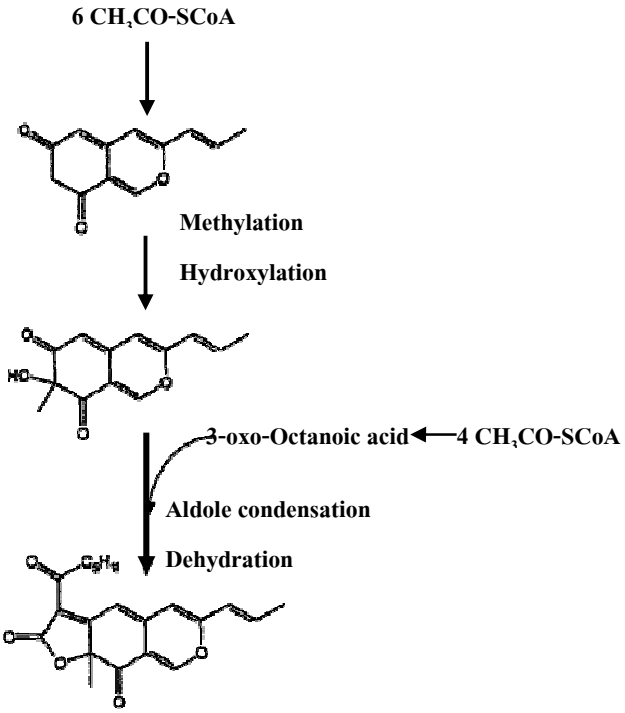


Figure 6. Probable mechanisms of the biosynthesis of rubropunctatin ($C_{12}H_{22}O_5$)

ที่มา : Juzlova *et al*., 1996

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักสารสีโมแนสคัสบนอาหารแข็ง

5.1 สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส

โดยทั่วไปเชื้อราโมแนสคัส เมื่อเจริญบนเมล็ดข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั้งผิวหน้า และแทรกทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าวนั้นก็จะมีการสร้างสารสีได้ภายหลังจากการบ่มไปได้นาน 3 วัน สารสีเหล่านี้ เมื่อนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าให้ข้าวสีแดง หรือ อังคัก เป็นสีแดงหรือชมพูแก่ เช่น *M. purpureus* หรือ *M. anka* แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงเข้มคล้ำ เช่น *M. barkeri* หรือ *M. kaoliang* (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

5.2 สับสเตรต

สับสเตรตที่ใช้ในการหมักสารสีโมแนสคัสแบบแห้งนั้น ปกติจะเป็นข้าว หรือเมล็ดธัญพืชอื่นๆ มีรายงานว่าปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารสีโมแนสคัสเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตบนข้าว โดยการใช้เมล็ดข้าวโพด มันเทศ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง ขนมปังแทนข้าวต่อการเจริญ การสร้างสารสี และการสร้างสปอร์ ของ *M. kaoliang* พบว่าขนมปังให้ค่าสีแดงมากที่สุด รองลงมาคือมันฝรั่ง และปลายข้าวหอมมะลิ นอกนั้นให้สีไม่ดีนัก ส่วนการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* พบว่ากากถั่วเหลืองให้ปริมาณสปอร์สูงสุด รองลงมาคือ ถั่วเขียว ขนมปัง และปลายข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการทดลองการใช้ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และข้าวบาร์เล่ย์ เป็นสับสเตรตแทนข้าว พบว่าให้ผลดีเช่นกัน (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542) นอกจากนี้มีการผลิตสารสีโมแนสคัสโดยใช้กากเมล็ดในขนุน พบว่าการผลิตสารสีแดงของ *M. purpureus* LPB97 ให้ผลผลิตสูงสุด 25 OD Units/g dry fermented substrate (Babitha *et al.,* 2007)

5.3 พีเอชเริ่มต้น

Babitha และคณะ (2007) รายงานว่าการเลี้ยง *M. purpureus* LPB97 ที่พีเอช ระหว่าง 3.0-7.5 เชื้อสามารถสร้างสารสีแดงรวมถึงสารสีชนิดอื่นๆได้อีกหลากหลาย และยังพบว่าพีเอช ระหว่าง 4.0-7.5 ให้ yield ของการผลิตสารสีที่ดี แต่เชื้อราชนิดนี้ไม่สามารถเจริญในพีเอชต่ำกว่า 2

5.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีอยู่ระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส แต่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

5.5 ความชื้น

การหมักข้าวแดงในสภาพที่มีความชื้นสูงมากไปนั้น เชื้อราโมแนสคัสสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูง แต่สีกลับน้อยลง ความชื้นที่สูงเกินไปจะเกิดการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส มากและเกิดการสะสมกลูโคสยับยั้งการสร้างสารสีได้ ทำให้มีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ทนกลูโคสได้สูง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตข้าวแดง หากมีปริมาณความชื้นที่ต่ำเกินไปทำให้เชื้อราเจริญได้ไม่ดี ส่งผลให้การสร้างสารสีไม่ดีด้วย มีรายงานว่าความชื้นเริ่มต้นที่ต่ำกว่าร้อยละ 40 จะได้สีน้อย แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นที่ร้อยละ 50-56 จะทำให้ได้การผลิตสีสูงสุดภายใน 8 วัน (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ส่วน Babitha และคณะ (2007) รายงานว่า *M. purpureus* LPB 97 สามารถเจริญและผลิตสารสีได้ดีที่ความชื้นเริ่มต้นที่ร้อยละ 50-60

นอกจากการหมักบนอาหารแข็งแล้ว การผลิตสารสีโดยเชื้อราโมแนสคัสยังสามารถผลิตได้ในสภาวะแบบกึ่งเหลว โดยการใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อรา *Monascus* sp. B683 สามารถผลิตสารสีแดงได้หลังจากเลี้ยงไป 60 ชั่วโมง (ใช้อาหารที่มีแป้งสาคู 200 กรัมต่อลิตร) ให้ความเข้มข้นของสารสีแดง 60 OD Units/g fermented substrate (Lee *et al.,* 1995) และยังมีรายงานการผลิตในสภาวะเหลวโดยใช้น้ำกระบองเพชร (Prickly pear juice) และน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน (Hamdi *et al.,* 1996; Hamano and Kilikian, 2006)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อผลิตสารทดแทนโปรตีนของปลาป่นโดยการผลิตหนอนป่น และเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการและปริมาณสารสีระหว่างหนอนป่นที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารปกติ และในกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่ผ่านและไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. กับปลาป่น

ศึกษาผลของความชื้นที่มีต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวัน รวมทั้งศึกษาของอุณหภูมิในการอบแห้งต่อคุณภาพทางโภชนาการ และปริมาณสารสีของหนอนป่นที่เลี้ยงในกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่ผ่านและไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา *Monascus* sp.

ขอบเขตและระเบียบวิธีวิจัย

วิเคราะห์องค์ประกอบของกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสีจากเชื้อรา *Monascus sp.* ในกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านและไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา *Monascus sp.* และศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้น และชนิดของอาหารต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันกระทั่งการเข้าสู่ระยะดักแด้ รวมทั้งการผลิตดักแด้ป่น และวิเคราะห์คุณภาพของหนอนป่นที่ผลิตได้เทียบกับปลาป่นเกรดคุณภาพ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. จุลินทรีย์

ในการทดลองใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3002, *Monascus purpureus* TISTR 3090 และ *Monascus ruber* TISTR 3006 จากห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) และเชื้อราทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสีสกัดจากเชื้อรา *Monascus* sp. ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3002, *M. purpureus* TISTR 3090 และ *M. ruber* TISTR 3006 เก็บรักษาในหลอดอาหารวุ้นเอียง PDA (Potato Dextrose Agar) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 10-14 วัน ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 3 สัปดาห์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อต้องการใช้ควรถ่ายเชื้อล่วงหน้า 1 สัปดาห์

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสีแดงที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส และวิเคราะห์มวลเซลล์ (Biomass) น้ำตาลรีดิวซ์ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส และวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสีแดงที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

4. กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม

กากเนื้อเมล็ดในปาล์ม ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ศรีเจริญ ปาล์ม ออยล์ จำกัด จังหวัดกระบี่ บรรจุในถุงพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการใช้ นำมาบดให้ละเอียดและร่อนผ่านตระแกรงร่อนที่มีรูเปิดขนาด 40 - 60 mesh (40 mesh เท่ากับ 400 ไมครอน) เก็บบรรจุในภาชนะปิดสนิท จะได้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มสำหรับใช้ในการทดลอง

5. เครื่องในปลาสด

เครื่องในปลาสด ได้รับความอนุเคราะห์จากร้านค้าปลาสดในตลาดสด คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ เป็นเครื่องในปลาสดชนิดรวมระหว่างปลาทูและปลาจารเม็ด เมื่อต้องการเตรียมน้ำล้างเครื่องในปลาสด ชั่งเครื่องในปลาสด 100 กรัม เติมน้ำสะอาด 100 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองเพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนน้ำล้างเครื่องในปลา ผ่านผ้าขาวบาง จะได้น้ำล้างเครื่องในปลาเพื่อใช้ในการทดลอง สำหรับเศษเครื่องในปลาที่เหลือสามารถนำไปใช้เป็นตัวล่อสำหรับแมลงวันวางไข่ต่อไปได้

อุปกรณ์

1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น G25 ยี่ห้อ New Brunswick Scientific
2 เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น 32 R ยี่ห้อ Universal
3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น 200 rt ยี่ห้อ Zenyth
4 ตู้ถ่ายเชื้อ รุ่น V8 ยี่ห้อ Clean
5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น HV-85 ยี่ห้อ Hirayama
6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 29 ยี่ห้อ Memmert
7 ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น VD ยี่ห้อ WTB binder
8 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชั่น รุ่น JEM-100CX II ยี่ห้อ JEOL
9 กรงเลี้ยงแมลง ขนาด 12×12×12 นิ้ว
10 กล่องพลาสติกทรงกลมขนาด 7.5×4 เซนติเมตร (กว้าง×สูง) เจาะรูโดยรอบสำหรับใช้ล่อแมลงวางไข่
11 กล่องพลาสติกทรงกลมขนาด 7.5×4 เซนติเมตร (กว้าง×สูง) สำหรับทดสอบ
12 กล่องพลาสติกขนาด 12×20 เซนติเมตร (กว้าง×ยาว)
13 พู่กันเบอร์ 0 สำหรับเขี่ยไข่แมลงวัน
14 ผ้าขาวบาง
15 กระดาษกรองเบอร์ 1 และเบอร์ 4
16 เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด (Analytical balance)
17 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง รุ่น 320 ยี่ห้อ Mettler Toledo
18 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

วิธีการ

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์สารสี

นำกากเนื้อในเมล็ดปาล์มที่หมักได้มาสกัดสารสีด้วยเอทานอลร้อยละ 40 โดยใช้ 5 มิลลิลิตร เอทานอลร้อยละ 40% ต่อ 1 กรัมของสับสเตรต ในการสกัดสารสี ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 7000 *g* เป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 400 และ 500 นาโนเมตร เพื่อวัดสารสีเหลือง และแดง ตามลำดับ (Lee *et al*., 1995)

2. การวิเคราะห์ชีวมวล (Biomass)

วัดการเจริญของเชื้อในรูปชีวมวล โดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน เตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณกลูโคซามีน โดยนำกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่หมักเพิ่มสารสีด้วยเชื้อราโมแนสคัส ไปอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ชั่งตัวอย่างอบแห้งที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 0.25 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 30 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Acetyl acetone reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที เติมเอธานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Ehrlich reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณกลูโคซามีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีน ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 25-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Van de loo, 1976)

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

นำกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านการหมักมาเติมร้อยละ 0.1 Tween 80 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมสับสเตรต นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร แล้วนำ

หลอดทอลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็นทันที เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ในการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกัน เปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบของหนอนป่นและปลาป่น

วิเคราะห์หา proximate composition ของหนอนป่นและปลาป่น โดยวิเคราะห์หาความชื้น dry matter, โปรตีน, ไขมัน และเถ้า (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1999) รวมทั้งหาค่า nitrogen-free extract (NEF) และ Gross energy (Ogunji *et al.*, 2007) รวมทั้งการวิเคราะห์หาปริมาณสารเยื่อใย (ดัดแปลงจาก Egan *et al.,* 1981)

5. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

5.1 เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการหมักสารสีด้วยเชื้อราโมแนสคัสมาสกัดด้วยร้อยละ 0.1 Tween 80 โดยเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 7000 *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เติมร้อยละ 1 Soluble starch ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร 0.1 acetate buffer (pH 5.0) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ต่อด้วยวิธี DNS method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร ใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน และใช้ 0.1 acetate buffer (pH 5.0) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ร้อยละ 1 Soluble starch 1.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อเป็น Blank (Ramachandran *et al.,* 2004) (เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่ทำงานภายในโมเลกุลของแป้ง จะตัดพันธะ α-1,4 กลูโคซิดิก ระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ผลผลิตที่ได้จะเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ และ α-limit-dextrins เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 1 หน่วย หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 μmol ในเวลา 1 นาที)

5.2 เอนไซม์เซลลูเลส (Ghose, 1987)

โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการหมักสารสีด้วยเชื้อราโมแนสคัสมาสกัดด้วย 0.1% Tween 80 โดยเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 7000 *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ไว้ นำกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 1x6 เซนติเมตร จำนวน 50 มิลลิกรัม ลงในหลอดขนาดกลาง จากนั้นเติมสารละลาย 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แยกตะกอนออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 8000 *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ต่อด้วยวิธี DNS method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่า OD ที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์ในสารละลายตัวอย่าง (เอนไซม์เซลลูเลส 1 หน่วย หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 μmol ในเวลา 1 นาที)

5.3 เอนไซม์ไซลาเนส (Xylanase activity)

โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการหมักสารสีด้วยเชื้อราโมแนสคัสมาสกัดด้วย 0.1% Tween 80 โดยเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 7000 *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ตามวิธีของ Tan และคณะ (1987 อ้างโดย หัสลินดา บินมะแอ, 2547) โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายไซแลน เข้มข้นร้อยละ 1.0 ในซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ต่อด้วยวิธี DNS method วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่า OD ที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์ในสารละลายตัวอย่าง (เอนไซม์ไซลาเนส 1 หน่วย หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นน้ำตาลไซโลส 1 μmol ในเวลา 1 นาที)

วิธีการทดลอง

1. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีจากเชื้อรา *Monascus sp.* ในกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม

1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบ (proximate composition) ของกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม

กากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ศรีเจริญ ปาล์ม ออยล์ จำกัด จังหวัดกระบี่ นำมาบดละเอียด และร่อนผ่านตระแกรงที่มีรูเปิดขนาด 40 - 60 mesh (40 mesh เท่ากับ 400 ไมครอน) จากนั้นนำส่งวิเคราะห์องค์ประกอบของกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และเถ้า (ภาคผนวก ก) ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Monascus sp.* ที่สามารถเจริญและสร้างสารสีบนกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม

เตรียมกากเนื้อในเมล็ดปาล์ม 5 กรัม เติมลงใน 250 ml Erlenmeyer flasks และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับให้ความชื้น ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.5 ด้วย 1 N NaOH (โดยวิธีการหาค่าพีเอชในภาคผนวก) และปรับให้ได้ความชื้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 60 (โดยวิธีการคำนวณการหาค่าความชื้นในภาคผนวก) ภายหลังการเติมน้ำกลั่นและปรับค่าพีเอชเป็นที่เรียบร้อยแล้ว นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติมสปอร์ของเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3002, *M. purpureus* TISTR 3090 และ *M. ruber* TISTR 3006 ที่เตรียมด้วยสารละลายร้อยละ 0.1 Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (จำนวน $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) หรือ $1x10^6$ สปอร์ต่อกรัมสับสเตรท เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °C) เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างนำมาสกัดสารสีด้วยเอธานอลร้อยละ 40 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 400 และ 500 นาโนเมตร เพื่อวัดสารสีเหลือง และแดง ตามลำดับ และวัดค่าการเจริญของเชื้อด้วยการวิเคราะห์ชีวมวล เลือกสายพันธุ์ที่ให้การผลิตสารสีสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 ผลของระยะเวลาในการหมัก

เลี้ยงเชื้อ ***Monascus sp*** ที่สร้างสารสีได้สูงสุด (จากข้อ 1.2) ในกากเนื้อในเมล็ดปาล์มภายใต้สภาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 8 วัน เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1.2 และเพิ่มการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ รวมทั้งวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส กลูโคอะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส รวมทั้งเลือกระยะเวลาที่ให้การผลิตสารสีสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.4 ผลของความชื้นเริ่มต้น

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น ทำการหมักเชื้อราในกากเนื้อในเมล็ดปาล์มโดยปรับความชื้นด้วยน้ำกลั่นและปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.5 ด้วย 1 N NaOH ให้ได้ความชื้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 40, 50, 60 และ 70 เลี้ยงเชื้อในระยะเวลาที่เชื้อผลิตสารสีได้สูงสุด (ผลจากข้อ 1.3) เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1.2 เลือกชุดการทดลองที่ให้การผลิตสารสีแดงสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.5 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น

เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีแดงจากข้อ 1.4 มาใช้ศึกษาผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยใช้หัวเชื้อในปริมาณ 0.5, 1, 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร (จำนวนสปอร์เริ่มต้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) และปรับให้ได้ความชื้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 60 เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1.4 เลือกชุดการทดลองที่ให้การผลิตสารสีแดงสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.6 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีจากข้อ 1.5 มาใช้ ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นโดยปรับพีเอชเป็น 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH (โดยหาค่าพีเอชพร้อมด้วยการปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 60 ในทุกๆ ค่าพีเอช ทำการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1.5 เลือกชุดการทดลองที่ให้การผลิตสารสีแดงสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาต่อความคงตัวของสารสี

นำกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านการหมัก และให้การผลิตสารสีสูงสุดจากการทดลองในข้อ 1 มาสกัดสารสีและวัดค่าสารสีเริ่มต้น เปรียบเทียบกับอีกชุดการทดลองที่ยังไม่สกัดสารสีและนำไปเก็บที่ อุณหภูมิห้อง (30), 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน เก็บตัวอย่างสารสีและสกัดสารสีมาตรวจสอบด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และศึกษาการทนอุณหภูมิสูงโดยการนำสารสีที่สกัดได้และกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักที่ยังไม่สกัดสารสี มาทดสอบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบมาสกัดสารสี (กากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักที่มีสารสี) และสารสีมาตรวจสอบด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เพื่อวัดสารสีแดงในทุกๆ รอบของการทดสอบ

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของหนอนแมลงวันและการเจริญเข้าสู่ระยะดักแด้ในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านและไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา *Monascus* sp.

3.1 การเตรียมไข่หนอนแมลงวัน

เตรียมไข่ของหนอนแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* โดยนำเครื่องในปลาใส่ในกล่องพลาสติกและทาให้ทั่วภายในกล่องสำหรับล่อให้แมลงวันวางไข่ โดยเป็นกล่องมีฝาปิด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร เจาะรูโดยรอบ (เนื่องจากแมลงวันจะชอบแทงส่วนก้นวางไข่ไว้ตามช่องเล็กๆ) ภายในบรรจุเครื่องในปลาเพื่อใช้กลิ่นปลาเป็นตัวล่อในการวางไข่ จากนั้นนำไปวางไว้กรงที่มีแมลงวันทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์มาแล้ว (อายุของตัวเต็มวัยประมาณ 10 วัน) วางทิ้งไว้ 1-3 วัน และตรวจนับจำนวนไข่ทุกๆ 24 ชั่วโมง จะพบไข่ของหนอนแมลงวัน ซึ่งมีสีขาว รูปร่างรียาว ขนาดประมาณ 1.5 มิลลิเมตร แยกไข่หนอนแมลงวันออกจากเศษเครื่องในปลา นำไข่ที่ได้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 ผลของความชื้นของกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม

เตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงหนอนแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* เป็น 18 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 6.66) ชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ปรับค่าความชื้นเริ่มต้น (8 ชุดการทดลอง) ตั้งแต่ร้อยละ 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 และ 90 ชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัส (จากการทดลองที่ 1) ชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสที่ปรับค่าความชื้นเริ่มต้นตั้งแต่ (7 ชุดการทดลอง) ร้อยละ 55, 60, 65, 70, 75, 80 และ 90 และชุดเครื่องในปลาสด บรรจุชุดการทดลองละ 10 กรัม ใส่ในกล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร จากนั้นศึกษาผลของความชื้นของแต่ละชุดอาหารทดลองที่มีต่อการเจริญของหนอนแมลงวัน โดยนำไข่ของหนอนแมลงวันที่เตรียมจากข้อ 3.1 จำนวน 10 ฟองต่อชุดการทดลอง ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) เลือกชุดการทดลองที่ไข่หนอนแมลงวันพัฒนาเป็นตัวดักแด้ที่มีอัตรารอดและน้ำหนักสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3 ผลของชนิดอาหารต่อการเจริญเติบโต

เลือกชุดอาหารการทดลองที่ได้สภาวะความชื้นที่เหมาะสมโดยสามารถพัฒนาเป็นตัวดักแด้ มีอัตรารอดและน้ำหนักสูงสุด (ผลจากการทดลองที่ 3.2) มาศึกษาผลของชนิดอาหารที่มีต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* ศึกษาเทียบกับชุดทดลองกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่มีส่วนผสมของเครื่องในปลาสดในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 และ 5:1 ชุดการทดลองละ 10 กรัม ใส่ในกล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร นำไข่ของหนอนแมลงวันที่เตรียมจากข้อ 3.1 จำนวน 10 ฟองต่อชุดการทดลอง ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ

เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) เลือกชุดการทดลองที่ไข่หนอนแมลงวันพัฒนาเป็นตัวดักแด้ที่มีอัตรารอดและน้ำหนักสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4. การผลิตและองค์ประกอบของดักแด้ป่น

4.1 การผลิตดักแด้ป่น

เลือกชุดอาหารทดลองที่มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของหนอนแมลงวัน และไข่หนอนแมลงวันพัฒนาเป็นตัวดักแด้ที่มีอัตรารอดและน้ำหนักสูงสุด (จากการทดลองข้อ 3) มาใช้ในการศึกษาการผลิตหนอนดักแด้ป่น โดยเพิ่มปริมาณอาหารทดลองเป็น 200 กรัมต่อกล่อง (น้ำหนักภายหลังการปรับค่าความชื้นที่เหมาะสม) ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 12×21×8 เซนติเมตร นำไข่ของหนอนแมลงวันที่เตรียมจากข้อ 3.1 จำนวน 100 ฟองต่อชุดการทดลอง เพิ่มชุดการทดลองเพื่อเลี้ยงให้ได้ปริมาณดักแด้มากที่สุด เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) เก็บดักแด้ที่ผลิตได้ มาล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ชั่งน้ำหนักดักแด้ 100 กรัม ใส่ในกล่องพลาสติกเพื่อนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคั่วดักแด้ที่อบไว้แล้วเป็นเวลา 10 นาที จะได้ดักแด้แมลงวันอบแห้ง บันทึกน้ำหนักที่ได้ภายหลังการทำแห้ง เตรียมนำไปป่นให้ละเอียดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของดักแด้ป่น และการวิเคราะห์สารสีในดักแด้ป่น

เลือกดักแด้หนอนแมลงวันอบแห้งที่ผลิตได้จากข้อ 4.1 มา 3 ชุดอาหารทดลอง โดยมีชุดทดลองหลักเป็นชุดเครื่องในปลาสด มาป่นละเอียด นำส่งวิเคราะห์องค์ประกอบของกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม ได้แก่ น้ำหนักแห้ง ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และค่า NFE ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และวิเคราะห์สารสีที่มีในดักแด้ป่นโดยการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 40 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 400 และ 500 นาโนเมตร เพื่อวัดสารสีเหลือง และแดง ตามลำดับ (Lee *et al*., 1995)

4.3 การวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโนในหนอนป่นและปลาป่น

นำดักแด้หนอนแมลงวันอบแห้งที่ได้และเป็นชุดเดียวกันกับข้อ 4.3 มาป่นละเอียด วิเคราะห์หาชนิดกรดอะมิโนด้วย HPLC โดยใช้ ACCQ. TAG Column ใช้ Fluorescence เป็นตัว Detector และใช้ Acetonitrile และน้ำเป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (A.O.A.C., 1995) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และนำมาเปรียบเทียบกับคุณภาพปลาป่นจากโรงงาน ที่มีโปรตีนเกรด 3 คือ มีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 (ชุติมา และคณะ, 2548)

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสีสกัดจากเชื้อรา *Monascus* sp. โดยวิธี disc diffusion (ดัดแปลงจาก NCCLS, 1993)

เนื่องจากมีรายงานว่าเชื้อรา *Monascus* sp บางสายพันธุ์ผลิตสารสีที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Ferdes *et al*, 2009) ดังนั้น จึงทำการทดสอบคุณสมบัตินี้ในสารสีแดงที่ผ่านการเลี้ยงในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่มี *Monascus* sp. โดยนำสารสีที่สกัดได้ไประเหยให้แห้งภายใต้เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน ชั่งน้ำหนักและเก็บสารที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion (ดัดแปลงจาก NCCLS, 1993) โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aure*us มาเพาะเลี้ยงบน NA ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เลือกเขี่ยเชื้อมา 4 ถึง 5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน MHB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 5 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อในระยะ Log phase จากนั้นนำมาปรับปริมาณเชื้อด้วย 0.85% NaCl ปราศจากเชื้อ ให้ได้เชื้อเท่ากับ 1.5 X 10^8 CFU/ml โดยเทียบความขุ่นกับ McFarland standard No. 0.5 จากนั้นเตรียมละลายสารสกัดที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้น 100 mg/ml โดยละลายด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองไร้เชื้อขนาดรู 0.45 μm จากนั้นดูดสารสกัดมา 10 μl หยดลงบนแผ่น disc ไร้เชื้อ ที่วางบนแผ่นตะแกรงแล้วนำไปทดสอบบนอาหาร MHA ที่เตรียมโดยการใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อทดสอบข้างต้นมาพอหมาดๆ แล้ว streak ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA โดย streak ในแนว 3 ระนาบ โดยหมุนจานเพาะเชื้อในแนวทำมุม 60 องศา เพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอกัน วางทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง หลังจากนั้นใช้ forceps ลนไฟปล่อยให้เย็น คีบแผ่น disc ที่ชุบสารสกัดและแผ่น disc ที่เป็นชุดควบคุม วางบนผิวหน้าอาหาร โดยแต่ละแผ่นวางห่างกันประมาณ 15-20 มิลลิเมตร และห่างจากขอบจานอาหารเพาะเชื้อประมาณ 15 มิลลิเมตร นำจานเพาะเชื้อที่วางแผ่น disc แล้วไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประมาณ 16-18 ชั่วโมง โดยทดสอบ 3 ซ้ำ และอ่านผลโดยสังเกตวงใสรอบแผ่น disc (inhibition zone) และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสด้วย Vernier caliper

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสีจากเชื้อรา *Monascus sp.* ในกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม

1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบ (proximate composition) ของกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม โดยวิธี Proximate analysis โดยการนำตัวอย่างบดและร่อนละเอียด ส่งวิเคราะห์ยังศูนย์ปฏิบัติการวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พบว่ากากเนื้อเมล็ดในปาล์มประกอบด้วยโปรตีน ร้อยละ 16.56 เยื่อใยร้อยละ 22.44 ความชื้นร้อยละ 6.66 NFE ร้อยละ 56.08 และไขมันร้อยละ 18.70 (Table 4) ซึ่งไขมันที่วิเคราะห์ได้สูงกว่าที่เคยมีรายงานในองค์ประกอบของกากเนื้อเมล็ดในปาล์มในประเทศมาเลเซีย (ร้อยละ 1.30-9.48) ทั้งนี้อาจขึ้นกับวิธีการในการสกัดน้ำมันปาล์มออกจากเมล็ดในและชนิดของพันธุ์ปาล์มที่อาจแตกต่างกัน (Ezieshi and Olomu, 2007)

Table 4. Proximate composition of palm kernel meal

Comosition	% dry weight
Crude protein	16.56
Crude fat	18.70
Crude fiber	22.44
Moisture content	6.66
Ash	4.92
NFE*	56.08
Total N	2.65

* Nitrogen-free extract + fibre, (NFE) =100-(% protein + % fat + % ash)

1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Monascus sp.* ที่สามารถเจริญและสร้างสารสีบนกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม

จากการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสที่สามารถใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มเพื่อเป็นแหล่งอาหารและผลิตสารสีแดงได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นเริ่มต้นอยู่ในช่วงร้อยละ 50-60 พีเอชเริ่มต้น 7.5 และเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า *Monascus ruber* TISTR 3006 เจริญและผลิตสารสีรวมทั้งมีมวลเซลล์สูงสุด 11.03 OD Units/gds และ 46.271 µg/gds ตามลำดับ โดยสามารถผลิตสารสีแดงได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ อีก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Monascus purpureus* TISTR 3090, *Monascus purpureus* TISTR 3002 และชุดการทดลองที่มีการผสมเชื้อราทั้งสามสายพันธุ์ อีกทั้งยังพบว่าเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3002 ไม่สามารถเจริญและผลิตสารสีได้ที่สภาวะเดียวกันข้างต้น จึงสรุปได้ว่าเมื่อใช้เชื้อผสมระหว่าง *M. ruber* TISTR 3006 กับเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์อื่นๆ การเจริญและการผลิตสารสี น่าจะเกิดจากการเจริญและการผลิตสารสีจาก *M. ruber* TISTR 3006 ซึ่งให้มวลเซลล์และสารสีสูงสุด (Table 5)

Table 5. Selection of *Monascus* spp. use palm kernel meal as a substrate for 7 days

Stains of *Monascus*	Biomass (µg/gds*)	Red Pigment Yield (ODunit/gds*)
M. ruber TISTR 3006	46.271	11.03
M. purpureus TISTR 3090	38.476	3.4
M. purpureus TISTR 3002	-**	-**
M. ruber TISTR 3006+ *M. purpureus* TISTR 3090	44.447	11.00
M. ruber TISTR 3006+ *M. purpureus* TISTR 3002	45.976	11.01
M. ruber TISTR 3006+ *M. purpureus* TISTR 3090 + *M. purpureus* TISTR 3002	46.112	11.04

* gds; gram dry fermented substrate

** Not growth and no produced red pigment

1.3 ผลของระยะเวลาในการหมัก

จากการศึกษาการผลิตสารสีจากเชื้อรา *Monascus ruber* TISR 3006 ที่ระยะเวลาต่างๆ ใน 250 ml Erlenmeyer flasks โดยเลี้ยงในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มในสภาวะแห้ง โดยปรับค่าความชื้นให้อยู่ในช่วงร้อยละ 50-60 ปรับพีเอชให้อยู่ที่ 7.5 จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 สามารถเจริญและมีการสร้างสารสีได้ 3 ชนิด คือสารสีเหลือง สารสีส้มและสารสีแดง (Figure 7) แสดงให้เห็นว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไปปริมาณสารสีจะถูกสร้างได้เพิ่มมากขึ้นทั้งสารสีเหลือง สารสีส้มและสารสีแดง โดยสารสีทั้งสามชนิดจะถูกผลิตได้สูงขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป และผลิตได้สูงสุดในวันที่ 6 คือ 11.03 OD Units/gds (สารสีเหลืองเป็นสารสีที่มีเริ่มต้นในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มก่อนการหมัก 6.8 OD Units/gds) หลังจากวันที่ 6 การผลิตสารสีเหลือง และสารสีส้มเริ่มลดลง และการผลิตสารสีแดงจะคงที่ แต่ยังเป็นปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับการผลิตสารสีจากกากเนื้อเมล็ดในขนุน (Babitha *et al*, 2007) ที่สามารถผลิตได้สูงสุดถึง 25 OD Units/gds ที่สภาวะเดียวกัน

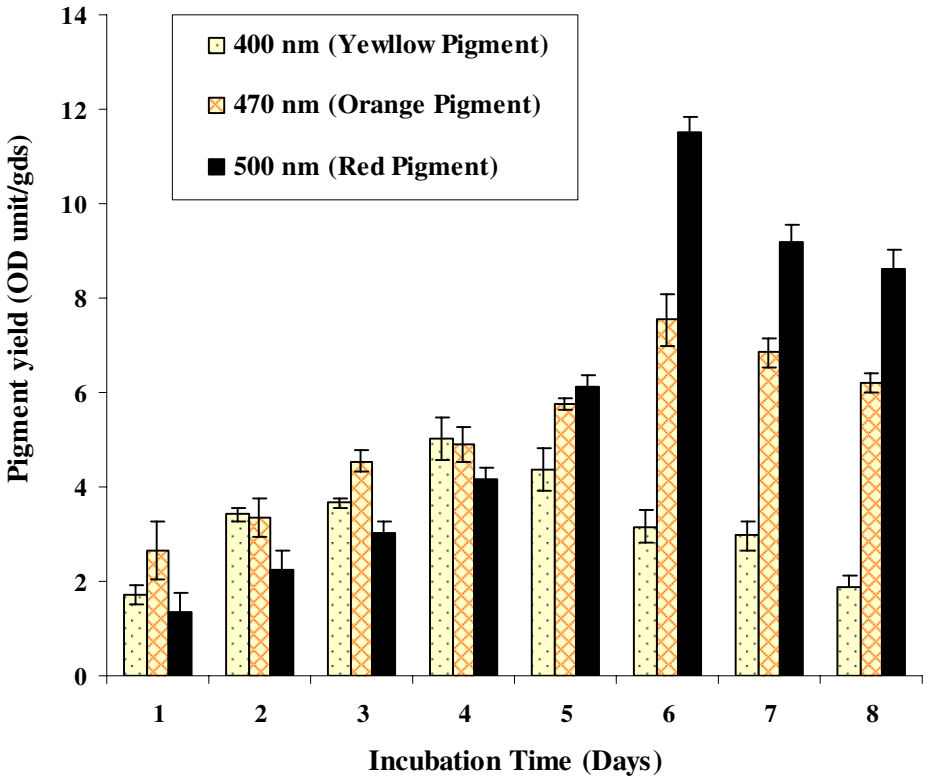


Figure 7. Pigment production at different incubation period by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 7.5, initial moisture content 60%, inoculums size 10^6 spore/ 5 gram dry substrate and 30°C for 7 days

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และมวลเซลล์ (Biomass) ในระหว่างการผลิตสารสีจากเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 ที่ระยะเวลาต่างๆ และศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงการเจริญโดยการวิเคราะห์ Biomass ที่ระยะเวลาต่างๆ (Figure 8) พบว่าระยะเวลาของช่วง Lag phase อยู่ในช่วงวันที่ 0-1 เมื่อผ่านวันที่ 1 ไปมวลเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีมวลเซลล์สูงสุดในวันที่ 6 (0.1475 μg/gds) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดในวันที่ 4 จากนั้นค่าจะลดลงเรื่อยๆ ดังความสัมพันธ์สรุปรวมใน Figure 6 นอกจากนี้ในวันที่ 4 ยังพบปริมาณของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนสเป็น 227.2367, 14.69742 และ 27.42721 Units/gds ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ดังกล่าวหมายถึงผลจากการใช้แป้งเป็นสับสเตรตในการสร้างน้ำตาลให้เชื้อราเจริญและส่งผลต่อปริมาณการสร้างสารสีแดง (Figure 9) พบว่าภายหลังวันที่ 4 ปริมาณน้ำตาลทั้ง 4 ชนิด มีค่าลดลง ซึ่งสัมพันธ์กับรูปที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดในวันที่ 4 จากนั้นค่าจะลดลง เนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่สูงจนเกินไปจะส่งผลให้เกิดปริมาณความชื้นที่สูงส่งผลให้มีการเจริญและเกิดการสะสมกลูโคสยับยั้งการสร้างสารสีได้ หากมีปริมาณความชื้นที่ต่ำเกินไปทำให้เชื้อราเจริญได้ไม่ดี ส่งผลให้การสร้างสารสีไม่ดีด้วย (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542) Babitha และคณะ (2007) รายงานว่า *M. purpureus* LPB 97 สามารถเจริญและมีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้สูงสุด 5 วัน หลังจากนั้นค่าที่ได้เริ่มลดลง

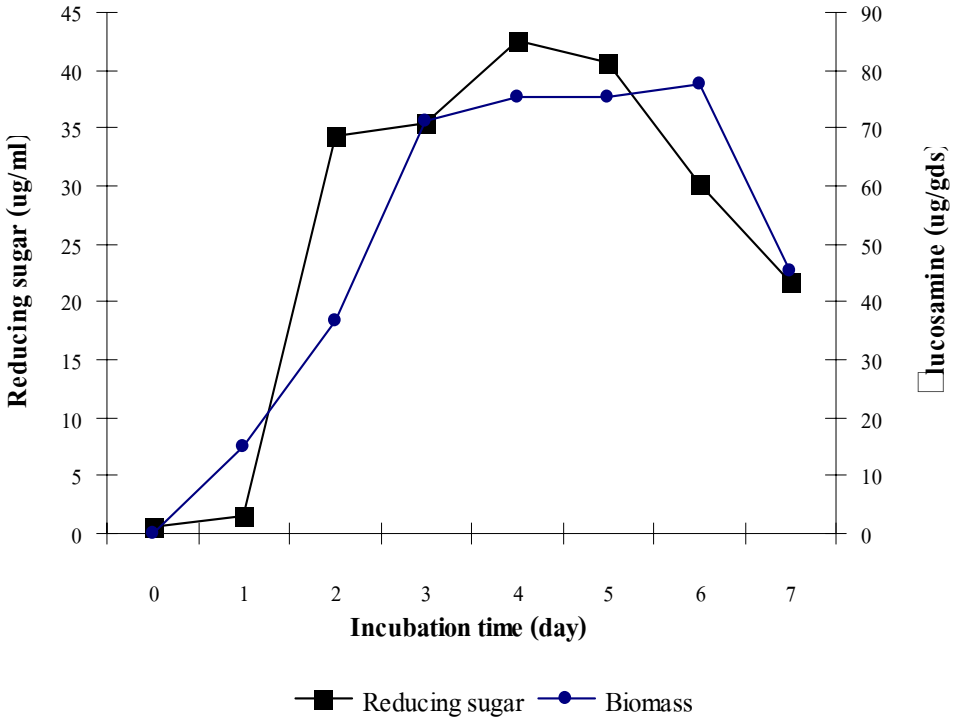


Figure 8. Pigment production at different incubation period by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 7.5, initial moisture content 60%, inoculums size 10^6 spore/ 5 gram dry substrate and 30°C for 7 days

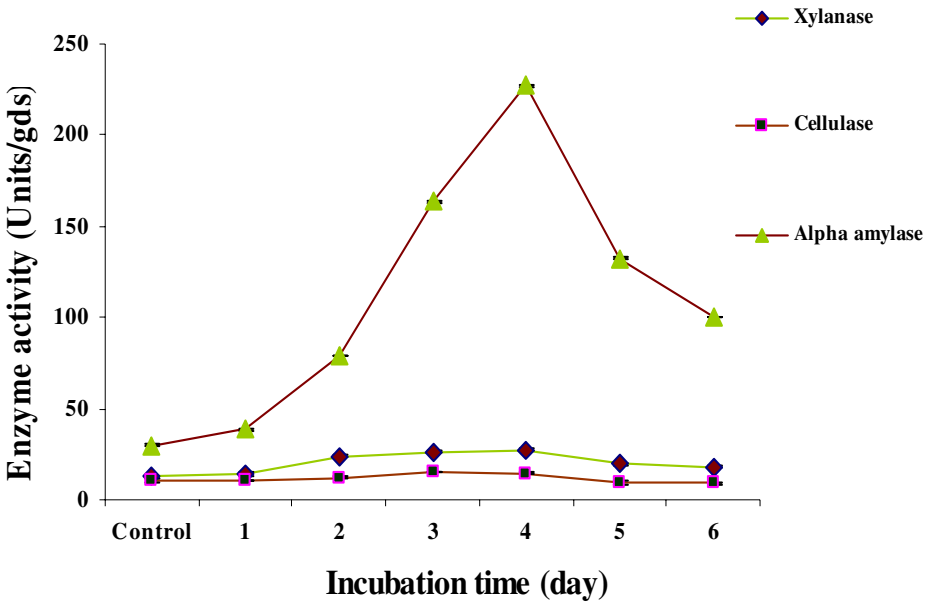


Figure 9. Enzyme activities at different incubation period by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 7.5, initial moisture content 60%, inoculums size 10^6 spore/ 5 gram dry substrate and 30°C for 6 days

1.4 ผลของความชื้นเริ่มต้น

จากการศึกษาการผลิตสารสีจากเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1.2 ในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่สภาวะความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 45-70 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 6.6) ใน 250 ml Erlenmeyer flasks โดยปรับพีเอชให้อยู่ที่ 7.5 และใช้ระยะเวลา 6 วัน ในการผลิตสารสีดังที่คัดเลือกได้การทดลองที่ 1.3 จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 สามารถเจริญและมีการสร้างสารสีได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อความชื้นมากกว่าร้อยละ 45 โดยสารสีที่ผลิตได้ที่สภาวะความชื้นร้อยละ 45, 50, 55, 60, 65, 70 และชุดควบคุมเป็น 3.9, 7.6, 10.03, 19.77, 8.2, 4.67 และ 2.2 OD Units/gds ซึ่งสารสีผลิตได้สูงสุดในสภาวะที่มีความชื้นร้อยละ 60 (19.77 OD Units/gds) ดัง Figure 10 จากนั้นเมื่อความชื้นสูงกว่าร้อยละ 60 การสร้างสารสีจะเริ่มลดลงเรื่อยๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Babitha และคณะ (2007) ที่รายงานว่าการผลิตสารสีแดงจะเริ่มลดลงเมื่อความชื้นเพิ่มขึ้นตั้งแต่ร้อยละ 60 ขึ้นไปสำหรับการหมักกากเนื้อเมล็ดในขนุนด้วยเชื้อรา *M. purpureus* LPB97 อย่างไรก็ตามสำหรับกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่หมักด้วยเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 ผลิตสารสีแดงลดลงเมื่อความชื้นเพิ่มขึ้นตั้งแต่ร้อยละ 65 ขึ้นไป

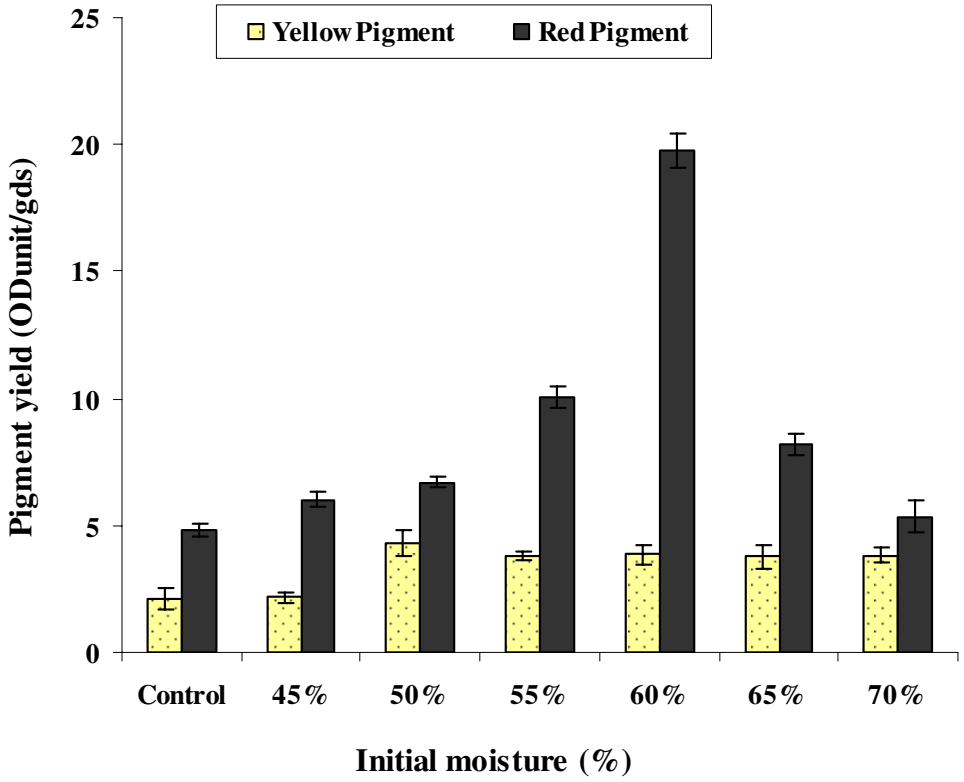


Figure 10. Effect of initial moisture content on pigment production by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 7.5, inoculums size 10^6 spore/ 5 gram dry substrate and 30°C for 6 days

1.5 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น

เชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 ที่คัดเลือกได้ เมื่อเลี้ยงในกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 (จากการทดลองที่ 1.4) พีเอช 7.5 เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าสามารถเจริญและสร้างสารสีได้สูงสุด 20.06 OD Units/gds (Figure 11) เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2 มิลลิลิตร ($1x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร) และเริ่มค่อยๆ ลดน้อยลงเรื่อยๆ เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่สูงขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Babitha และคณะ (2007) ที่รายงานว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่น้อยเกินไปและสูงเกินไปจะส่งผลให้การผลิตสารสีแดงลดน้อยลงไปด้วย

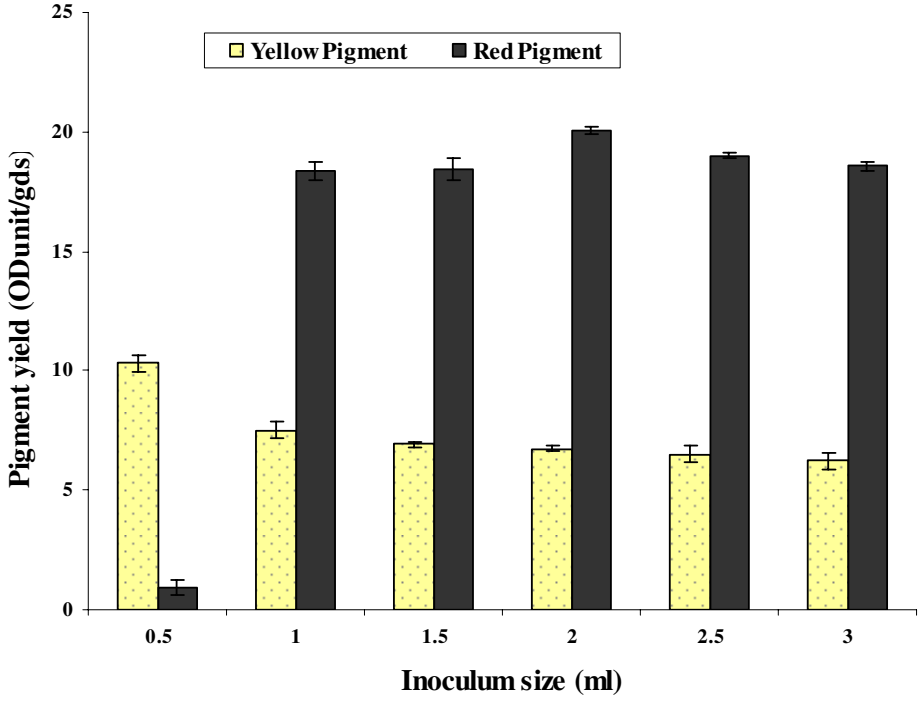


Figure 11. Effect of inoculum size on pigment production by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 7.5, initial moisture content 60%, and 30°C for 6 days

1.6. ผลของพีเอช

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 ในกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม ที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 และใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2 มิลลิลิตร ($1x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร) (จากการทดลองที่ 1.5) โดยปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 5.5 – 8.0 (pH 5.5 เป็นพีเอชเริ่มต้นของในกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม) เป็นระยะเวลา 6 วัน จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 สามารถเจริญและมีการสร้างสารสีได้สูงสุด 20.16 OD unit/gds OD Units/gds (Figure 12) ที่ค่าพีเอช 7.5 และลดน้อยลงเมื่อพีเอชสูงขึ้น อรัญและคณะ (2530) ได้ทดสอบความสามารถในการสร้างสารสีแดงจากเชื้อรา *M. purpureus* CMU-KU ในข้าวพันธุ์เหลือง 148 รายงานว่า ที่ค่าพีเอช 5.0 และ 6.0 เชื้อราเจริญเป็นสีชมพูอ่อนและใช้ระยะเวลากว่า 14 วัน จึงมีสีแดงเข้ม แต่ที่ค่าพีเอช 7 ข้าวมีสีแดงทั่วในระยะเวลา 7 วัน และที่พีเอช 8.0 เชื้อเจริญช้ากว่า 14 วัน นอกจากนี้การทดลองของ Babitha และคณะ (2007) รายงานว่า ที่ค่าพีเอชตั้งแต่ 2.5 – 6.0 เชื้อราเจริญและสร้างสารสีแดงได้น้อย และเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นมากกว่า 6.5 เชื้อราสามารถเจริญและสร้างสารสีแดงได้เพิ่มขึ้น

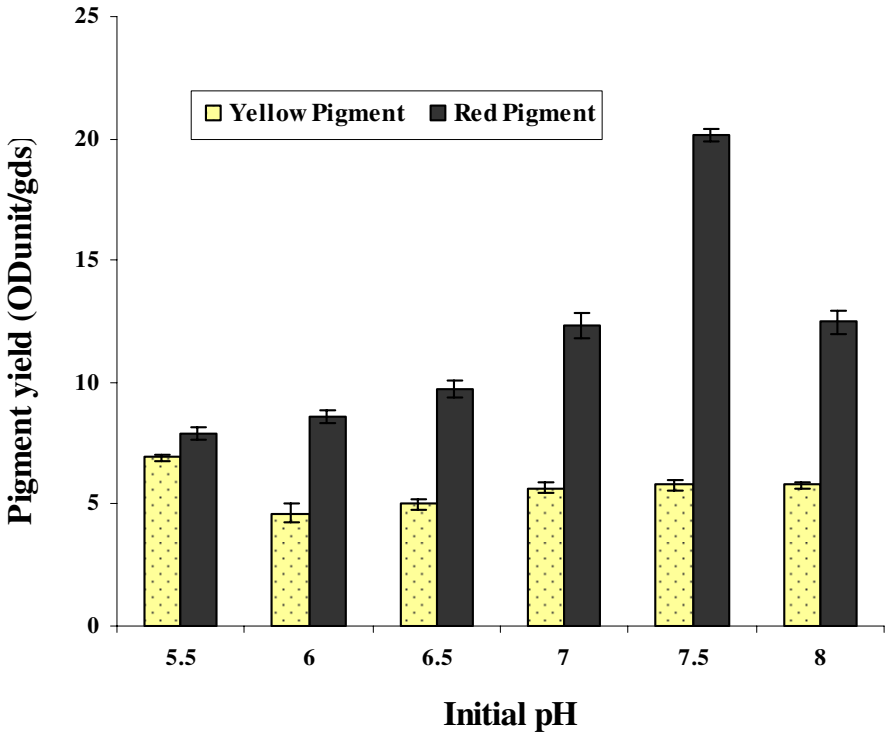


Figure 12. Effect of initial pH of substrate on growth and pigment yield by *Monascus ruber* TISTR 3006 on palm kernel meal at pH 5.5-8, inoculums size 2×10^6 spore/ 5 gram dry substrate, initial moisture content 60%, and 30°C for 6 days

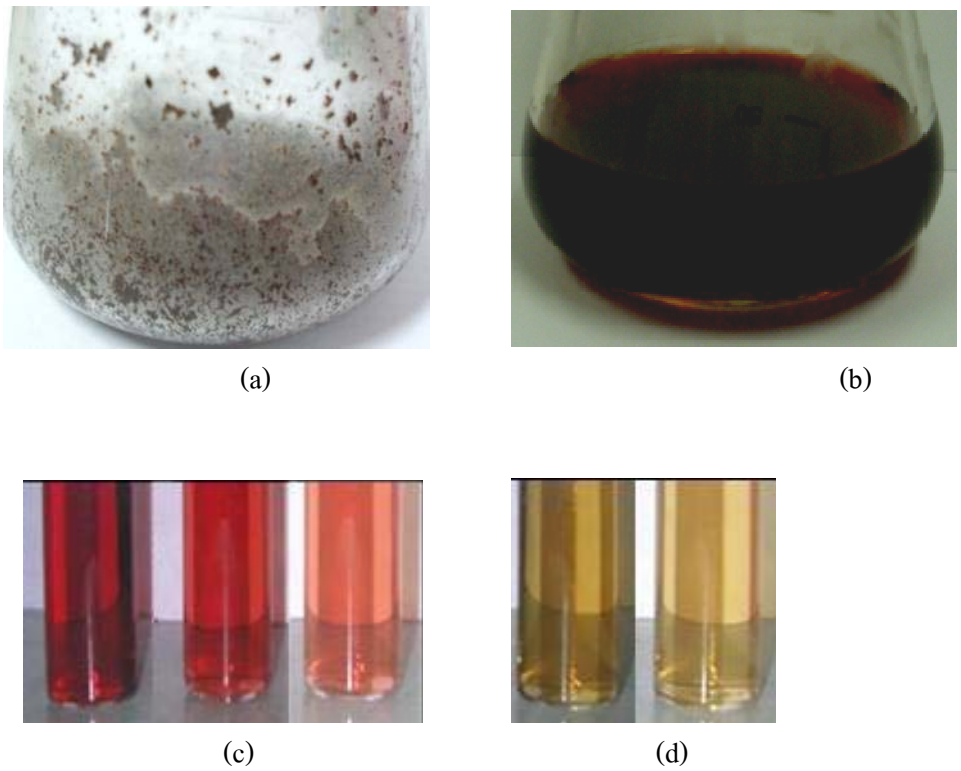
2. ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาต่อความคงตัวของสารสี

สารสีแดงจากเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 ที่เลี้ยงในกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม (PKM) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60 พีเอชเริ่มต้น 7.5 ที่ 30°C เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าสารสีไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการผ่านอุณหภูมิ 121 °C เป็นระยะเวลา 15 นาที และที่อุณหภูมิ 30 °C, 4° C และ -20 °C เป็นระยะเวลา 28 วัน ไม่พบการเลี่ยนแปลงของสารสีแดงที่ผลิตได้เช่นกัน (Table 6) สารสีภายหลังการสกัดจะมีสีแดงเข้มจนเกือบเป็นสีดำ จากนั้น เมื่อนำมาเจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ จะเห็นสีแดงชัดเจนยิ่งขึ้น (Figure 13) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Sheu และคณะ (2000) รายงานว่าสารสีแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสารสีเมื่อผ่านอุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (121 °C เป็นระยะเวลา 15 นาที) และ -20 °C อีกทั้งไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารสีทั้งที่สภาวะกรดและด่าง (pH 2.5 และ pH 12)

Table 6. Thermal stability of red pigment production by *Monascus ruber* TISTR 3006 on Palm Kernel Meal at 30°C for 28 days

Day	Before (Autoclaving)	Thermal stability						
		121°C *		30°C		4°C	-20°C	
		Red pigment in PKM	red pigment	Red pigment in PKM	red pigment	Red pigment in PKM	red pigment	Red pigment in PKM
0	19.85±0.171	20.88±0.13	19.28±0.11	17.62±0.55	19.45±0.11	19.31±0.08	19.45±0.12	19.18±0.12
7	19.85±0.171	20.68±0.13	19.15±0.10	14.04±0.18	19.19±0.12	18.92±0.14	19.00±0.23	18.82±0.41
21	19.85±0.171	20.88±0.11	18.99±0.02	9.65±0.17	19.04±0.16	19.01±0.10	19.20±0.45	19.13±0.23
28	19.85±0.171	19.75±0.13	18.88±0.10	6.26±0.19	18.74±0.31	18.80±0.17	18.83±0.24	18.78±0.29

* Autoclaving temperature on the coloration of *Monascus ruber* TISTR 3006



(a) (b)

(c) (d)

Figure 13. Red pigment production by *Monascus ruber* TISTR 3006 on Palm Kernel Meal at 30°C for 6 days (a) Fermented Palm Kernel Meal at 30°C for 6 days (b) Red pigment after extracted by 40% Ethanol; (before diluted) (c) Dilution 1:1, 1: 5 and 1:10 of red pigment (from left to right) (d) Dilution 1:1 and 1: 5 of initial pigment of Palm Kernel Meal (from left to right)

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของหนอนแมลงวัน และการเจริญเข้าสู่ระยะดักแด้ในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านและไม่ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา *Monascus* sp.

3.1 การเตรียมไข่แมลงวัน

เตรียมไข่ของแมลงวันหัวเขียว *Chysomya megacephala* โดยการบรรจุเศษปลาและเครื่องในปลาสด ในกล่องพลาสติกกลม เจาะรูโดยรอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร (Figure 14a) เพื่อใช้กลิ่นปลาเป็นตัวล่อในการวางไข่ โดยวางล่อไว้ในกรงที่มีแมลงวันทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์มาแล้ว (อายุของตัวเต็มวัยประมาณ 10 วัน) จากนั้น ตรวจนับจำนวนไข่ทุกๆ 24 ชั่วโมง จะพบไข่แมลงวัน ซึ่งมีสีขาว รูปร่างรียาว ขนาดยาวประมาณ 1.53 มิลลิเมตร เป็นไข่ฟองเดี่ยวๆ หรืออยู่เป็นกลุ่มก้อน (Figure 14b) โดยสามารถเก็บไข่แมลงวันได้เฉลี่ยคราวละ 138 ฟอง จากจำนวนแมลงวัน 20-30 คู่ เมื่อนำไข่แมลงวันที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมงที่ได้ไปเลี้ยง ไม่พบอัตราการรอดชีวิตของไข่แมลงวันในอาหารชุดควบคุม (กากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 6.66) และสำหรับอาหารชุดเครื่องในปลาสดพบอัตราการรอดชีวิตจากไข่เป็นตัวเต็มวัย คิดเป็นร้อยละ 95.34 ทั้งยังพบว่าสามารถเก็บไข่หนอนแมลงวันได้มากกว่า 10 วัน แต่จำนวนไข่ที่เก็บได้จะมีจำนวนลดลง และเริ่มมีอัตราการรอดที่น้อยลงเช่นเดียวกัน (Table 7)

(a) (b)

Figure 14. Cultured of *Chrysomya megacephala* (a) inside an insect cage (b) cluster of eggs inside egg-laying cup (1.5x)

Table 7. Egg batches and percentage of survival of *Chrysomya megacephala* eggs for experimental test; Control (palm kernel meal; PKM) and the fresh fish offal

Days	Number of eggs	Survival (%)	
		PKM (Control) (initial moisture 6.6%)	Fresh fish offal
1	80	-*	96.70[a]±0.50
2	120	-	100[a]±0.50
3	180	-	90.00[a]±0.50
4	224	-	96.70[a]±0.50
5	185	-	100.00[a]±0.00
6	180	-	100.00[a]±0.00
7	125	-	96.70[a]±0.50
8	100	-	93.33[a]±0.50
9	102	-	90.00[a]±0.50
10	84	-	90.00[a]±0.50
Mean	138	-	95.343[a]±0.50
F-test	**	**	**

* No growth

** Significantly different ($P < 0.05$)

3.2 ผลของความชื้นต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวัน

จากการศึกษาผลของความชื้นที่มีต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* ในอาหารชุดควบคุม (กากเนื้อเมล็ดในปาล์มสดที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 6.66) ชุดเครื่องในปลาสด (ที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65) ชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ปรับค่าความชื้นเริ่มต้นด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสดตั้งแต่ร้อยละ 50 - 90 และชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัส (จากการทดลองที่ 1) ที่ปรับค่าความชื้นเริ่มต้นด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสดตั้งแต่ร้อยละ 55 - 90 (ความชื้นสุดท้ายภายหลังกระบวนการหมักเป็นร้อยละ 55) พบว่าเมื่อเลี้ยงหนอนแมลงวันในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มสดที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 6.66 ไม่พบอัตราการรอดของไข่หนอนแมลงวัน เนื่องจากสภาวะที่แห้งจนเกินไป ทั้งนี้เมื่อปรับความชื้นด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสดในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มสดและกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสที่ความชื้นตั้งแต่ร้อยละ 50 พบว่าไข่หนอนสามารถเจริญเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ดี มีอัตราการรอดที่สูงขึ้นเมื่อความชื้นเพิ่มขึ้น และอัตราการรอดจะลดลงเมื่อความชื้นสูงกว่าร้อยละ 80 โดยมีอัตราการรอดของอาหารชุดควบคุม ชุดเครื่องในปลาสด ชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ปรับค่าความชื้นเริ่มต้นด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสด และชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัส อยู่ในช่วงค่าเฉลี่ยร้อยละ 0, 78.00, 54.57 และ 66.67 ตามลำดับ สำหรับชุดอาหารเครื่องในปลาสดพบอัตราการรอดตั้งแต่ค่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65 จนถึงร้อยละ 80 และอาหารชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัส พบอัตราการรอดตั้งแต่ค่าความชื้นร้อยละร้อยละ 55 จนถึงร้อยละ 80 และยังพบว่าที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65 มีอัตราการรอดสูงสุดสำหรับทุกชุดการทดลอง (Table 8) ซึ่งเมื่อสังเกตจาก Table 8 พบว่าที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60-70 อัตราการรอดชีวิตของการเข้าสู่ระยะดักแด้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่พบว่าชุดการทดลองในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัสน้ำหนักของดักแด้ที่ได้น้อยที่สุด (0.028 กรัมต่อตัวดักแด้) เมื่อเทียบกับชุดทดลองอื่นๆ ชุดการทดลองในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัส (Table 9) พบไข่แมลงวันเริ่มต้นสามารถเจริญเป็นตัวหนอน และเจริญเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ดีในสภาวะที่มีความชื้นเริ่มต้น ตั้งแต่ร้อยละ 60 - 70 โดยที่ความชื้นร้อยละ 60 และ 65 มีอัตราการรอดชีวิตและเข้าสู่ระยะดักแด้ที่เท่ากัน ความชื้นที่เพิ่มขึ้นอัตราการรอดชีวิตจะลดลงอย่างต่อเนื่อง รวมถึงชุดที่ใช้เครื่องในปลาสด ซึ่งมีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65 พบอัตราการรอดชีวิตลดลงเช่นเดียวกันหากมีความชื้นเริ่มต้นที่สูงมากกว่าร้อยละ 80 ขึ้นไป (Table 8)

สามารถสรุปได้ว่าที่ค่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65 สำหรับทุกชุดอาหารทดลองไข่หนอนแมลงวันสามารถเจริญเข้าสู่ระยะดักแด้และมีอัตราการรอดที่ดีที่สุด และสำหรับที่ความชื้นสูงถึงร้อยละ 90 ไม่พบการเจริญและอัตราการรอดในทุกๆ อาหารทดลอง ทั้งนี้พบว่าปริมาณ

ความชื้นในอาหารที่น้อยจนเกินไป (ต่ำกว่าร้อยละ 50) และสูงจนเกินไป (มากกว่าร้อยละ 80) อัตราการรอดชีวิตของหนอนแมลงวันหัวเขียว *C. megacephala* เริ่มลดลงตามไปด้วย (Table 9) สอดคล้องกับรายงานค่าความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเป็นตัวหนอนของแมลงวัน ควรมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 60-95 ทั้งนี้ ค่าความชื้นเริ่มต้นที่สูงมากกว่าร้อยละ 80 นั้นจำเพาะกับสายพันธุ์บางชนิดของหนอนแมลงวันเท่านั้น (Abou Zied *et al.,* 2003; Lefebvre and Pasquerault, 2004)

Table 8. The percentage of survival of *Chrysomya megacephala* pupae on several of initial of moisture content for experimental test; Control (palm kernel meal), fresh fish offal, fermented palm kernel meal and palm kernel meal with the rinse of fresh fish offal

Moisture (%)	Percentage of survival of pupae (%)			
	PKM (Control) (initial moisture 6.6%)	fresh fish offal	Fermented Palm Kernel Meal	PKM with the rinse of fresh fish offal
6.6	0*	-#	-	-
50	0	-	-	66.67^{b}±0.58
55	0	-	40.33^{c}±0.58	73.67^{b}±0.58
60	0	-	90.00^{a}±0.58	90.33^{a}±0.58
65	0	100^{a}±0.00	90.00^{a}±0.58	90.67^{a}±0.58
70	0	100^{a}±0.00	60.33^{b}±0.58	90.33^{a}±0.58
75	0	100^{a}±0.00	40.33^{c}±0.58	80.33^{ab}±0.58
80	0	90.00^{a}±0.58	20.67^{d}±0.58	50.33^{c}±0.58
90	0	0^{b}	0^{e}	0^{e}
Mean	0	78.00	54.57	66.67
F-test	**	**	**	**

* No growth

** Significantly different ($P < 0.05$)

\# No investigation; start with the initial moisture of each substrate.

Table 9. The weight of *Chrysomya megacephala* pupa on several of initial of moisture content for experimental test; Control (palm kernel meal), fresh fish offal, fermented palm kernel meal and palm kernel meal with the rinse of fresh fish offal

Moisture (%)	Weight of pupa (gram)			
	PKM (Control) (initial moisture 6.6%)	Fresh fish offal	Fermented palm kernel meal	PKM with the rinse of fresh fish offal
6.6	0*	-#	-	-
50	0	-	-	0.040^{c}±0.001
55	0	-	0.028^{a}±0.003	0.045^{ab}±0.001
60	0	-	0.028^{a}±0.001	0.045^{ab}±0.003
65	0	0.042^{a}±0.003	0.029^{a}±0.003	0.047^{a}±0.001
70	0	0.042^{a}±0.004	0.028^{a}±0.003	0.045^{ab}±0.004
75	0	0.038^{b}±0.001	0.028^{a}±0.003	0.045^{ab}±0.001
80	0	0.036^{b}±0.004	0.028^{a}±0.004	0.040^{bc}±0.004
90	0	0^{c}	0^{b}	0^{d}
F-test	**	**	**	**

* No growth

** Significantly different ($P < 0.05$)

\# No investigation; start with the initial moisture of each substrate.

3.3 ผลของชนิดอาหารต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวัน

เมื่อศึกษาผลของชนิดอาหารต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* ในอาหารชุดควบคุม (กากเนื้อเมล็ดในปาล์มสดที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 6.66) ชุดเครื่องในปลาสด (ที่มีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65) และอาหารชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่มีส่วนผสมของกากเนื้อเมล็ดในปาล์มต่อเครื่องในปลาสดในอัตราส่วนต่างๆ (ปรับค่าความชื้นเริ่มต้นด้วยน้ำสะอาด) พบว่าเมื่อเลี้ยงหนอนแมลงวันในอาหารชุดควบคุม ไม่พบอัตราการรอดของไข่หนอนแมลงวัน เนื่องจากสภาวะที่แห้งจนเกินไป ชุดอาหารเครื่องในปลาสดพบอัตราการรอดที่สูงถึงร้อยละ 100 และมีน้ำหนักของดักแด้ 0.043 กรัมต่อตัวดักแด้ (ไข่หนอนเจริญเข้าสู่ระยะดักแด้ในวันที่ 4) สำหรับอาหารชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่มีส่วนผสมของเครื่องในปลาสดในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 และ 5:1 พบว่าการเจริญจากไข่แมลงวันเข้าสู่วัยดักแด้ในวันที่ 4 มีอัตราการรอดอยู่ที่ร้อยละ 30, 90, 90, 80, 70 และ 30 ตามลำดับและมีน้ำหนักของดักแด้เป็น 0.044, 0.046, 0.040, 0.045, 0.042 และ 0.040 กรัมต่อตัวดักแด้ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าในอัตราส่วนกากเนื้อเมล็ดในปาล์มต่อเครื่องในปลาสดที่อัตรา 1:0, 4:1 และ 5:1 พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Rhizopus* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราที่เส้นใยไม่มีผนังกั้นตามขวาง มีสโตลอน และไรซอยด์ มีสปอร์แรงจิโอฟอร์ชูตรง โคโลนีมีลักษณะฟูและเติบโตแผ่ลามอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้มีการยับยั้งการเจริญ แต่ยังมีหนอนบางส่วนที่สามารถเจริญและเข้าสู่ระยะดักแด้จนเป็นตัวเต็มวัยได้ ทั้งนี้การปนเปื้อนดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของกล่องเลี้ยงแมลง น้ำสะอาดที่ใช้ปรับค่าความชื้นเริ่มต้น ซึ่งไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ รวมถึงอาจปนเปื้อนในระหว่างการเก็บไข่หนอนแมลงวัน (Table 10)

จากผลการทดลองข้างต้น เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดของดักแด้ที่ได้กับการทดลองที่ 3.2 ซึ่งเป็นชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่มีส่วนผสมของเครื่องในปลาสดในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าชุดอาหารที่ปรับค่าความชื้นด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสดให้อัตราการรอดที่ดีกว่าและยังลดการใช้ปริมาณเครื่องในปลาสด อีกทั้งเครื่องในปลาสดที่เหลือจากการเตรียมน้ำล้างเครื่องในปลาสดเพื่อนำมาปรับค่าความชื้นในอาหารสำหรับแมลงวัน สามารถนำมาใช้เป็นตัวล่อให้แมลงวันวางไข่ได้อีกด้วย ดังนั้นจึงเลือกชุดอาหารทดลองที่ปรับค่าความชื้นร้อยละ 65 ด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสดทดสอบเทียบกับชุดควบคุม ชุดเครื่องในปลาสด ชุดอาหารกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัสที่ใช้สภาวะความชื้นสุดท้ายภายหลังกระบวนการหมักเป็นร้อยละ 55 และชุดอาหารกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัสที่ปรับค่าความชื้นด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสด พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของดักแด้เป็นร้อยละ 0, 100, 40 และ 80 ตามลำดับ ดัง Table 11 โดยพบว่าชุดอาหารกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัสที่ปรับค่าความชื้นด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสดมีอัตราการรอดที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มสดที่ปรับ

ความชื้นด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสด (Table 11) แต่พบว่าน้ำหนักของดักแด้ที่ได้จากชุดอาหารกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัสทั้งสองชุดเป็น 0.028 กรัมต่อตัวดักแด้ และมีค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับชุดทดลองอื่นๆ ทั้งนี้สภาวะที่ได้จากกระบวนการหมักสารสีแดงโมแนสคัสอาจมีปัจจัยบางประการที่ไปยับยั้งการเจริญ อาทิ สารอาหารสำคัญบางอย่างสำหรับหนอนแมลงวันอาจถูกใช้ไปในกระบวนการหมักจนหมดหรือมีเหลือในปริมาณที่น้อยและไม่เพียงพอต่อการส่งเสริมการเจริญของหนอนแมลงวัน และอาจมีสารบางชนิดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักสารสีโมแนสคัสมีผลไปยับยั้งการเจริญ หรือทำให้มีการสะสมสารอาหารบางประการได้น้อยลง เป็นผลให้น้ำหนักดักแด้ที่ได้ลดลงตามไปด้วย (Table 11) นอกจากนี้พบว่าอาหารชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มสดผสมน้ำล้างเครื่องในปลาสดจะส่งผลให้เกิดการผสมกันได้อย่างทั่วถึงมากกว่าการผสมด้วยเครื่องในปลาสดโดยตรง เป็นผลให้หนอนแมลงวันสามารถใช้อาหารได้ง่ายขึ้น ทั้งยังมีกลิ่นของเครื่องในปลาที่จะช่วยส่งเสริมและดึงดูดการใช้อาหารของหนอนแมลงวันมากยิ่งขึ้นตามไปด้วย อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้ไส้ปลาสดในการทดลองได้อีกด้วย

Table 10. The percentage of survival and pupae weigh of *Chrysomya megacephala* reared on palm kernel meal, fresh fish offal and palm kernel meal mixed with fresh fish offal

Pupae	Control (PKM) (Start with initial moisture 6.6%)	Fresh fish offal	Percentage of survival and weight of pupae					
			Palm kernel meal : Fresh fish offal					
			1:0*	1:1	2:1	3:1	4:1*	5:1*
Survival (%)	0^{e}	$100^{a}\pm0.00$	$30^{d}\pm0.50$	$90^{ab}\pm0.50$	$90^{ab}\pm0.10$	$80^{b}\pm0.50$	$70^{c}\pm0.50$	$30^{d}\pm0.50$
Weight (gram)	-	$0.043^{a}\pm0.003$	$0.044^{a}\pm0.003$	$0.046^{a}\pm0.003$	$0.040^{a}\pm0.002$	$0.045^{a}\pm0.001$	$0.042^{a}\pm0.002$	$0.040^{a}\pm0.004$
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**

* Contaminated with fungal

** Significantly different ($P < 0.05$)

Table 11. Percentage of survival and pupae weight of *Chrysomya megacephala* reared on palm kernel meal; PKM (control), fresh fish offal, fermented palm kernel meal (FPKM) and palm kernel meal with the rinse of fresh fish offal

Pupae	Percentage of survival and weight of pupae				
	Control (PKM)* (start with initial moisture 6.6%)	Fresh fish offal (start with initial moisture 65%)	Fermented PKM (FPKM)		PKM with the rinse of fresh fish offal (initial moisture 65%)
			FPKM (start with initial moisture 55%)	FPKM with the rinse of fresh fish offal (initial moisture 65%)	
Survival (%)	0^{d}	$100^{a}\pm0.00$	$40^{c}\pm0.00$	$80^{b}\pm1.50$	$90^{b}\pm0.00$
Weight (gram)	-	$0.043^{a}\pm0.002$	$0.028^{b}\pm0.003$	$0.028^{b}\pm0.001$	$0.045^{a}\pm0.003$
F-test	**	**	**	**	**

* No growth

** Significantly different ($P < 0.05$)

4. การผลิตและองค์ประกอบของดักแด้ป่น

4.1 การผลิตดักแด้ป่น

จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของหนอนแมลงวัน และมีอัตราการเจริญเข้าสู่ระยะดักแด้เร็วที่สุด (การทดลองที่ 3) พบว่าสามารถเลือกใช้ชุดทดลองกากเนื้อเมล็ดในปาล์มผสมน้ำล้างเครื่องในปลาสด และชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัสที่ปรับค่าความชื้นด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสดมาใช้ในการศึกษาการผลิตหนอนป่น เทียบกับชุดอาหารเครื่องในปลาสด โดยนำหนอนแมลงวันในระยะดักแด้ที่ได้มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ 3 ครั้ง จนกระทั่งไม่มีเศษของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มหลงเหลืออยู่ ชั่งน้ำหนักดักแด้ 100 กรัม ก่อนนำไปคั่ว 5-10 นาที เพื่อให้มีความชื้นลดลง จะได้ดักแด้คั่วที่มีกลิ่นหอมคล้ายเนื้อปลาคั่ว จากนั้นนำไปอบอีกครั้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักภายหลังการอบอีกครั้ง พบว่าจากตัวอย่างดักแด้ 100 กรัม จะได้ดักแด้แมลงวันอบแห้งเป็น 53.33, 53.2 และ 52.98 กรัม จากชุดควบคุม ชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มผสมน้ำล้างเครื่องในปลาสด และชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัส ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ความชื้นสำหรับหนอนดักแด้แห้งที่ผลิตได้ทั้ง 3 ชุดทดลอง พบว่ามีความชื้นที่ไม่เกินร้อยละ 10 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (Table 12) นำไปป่นให้ละเอียดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

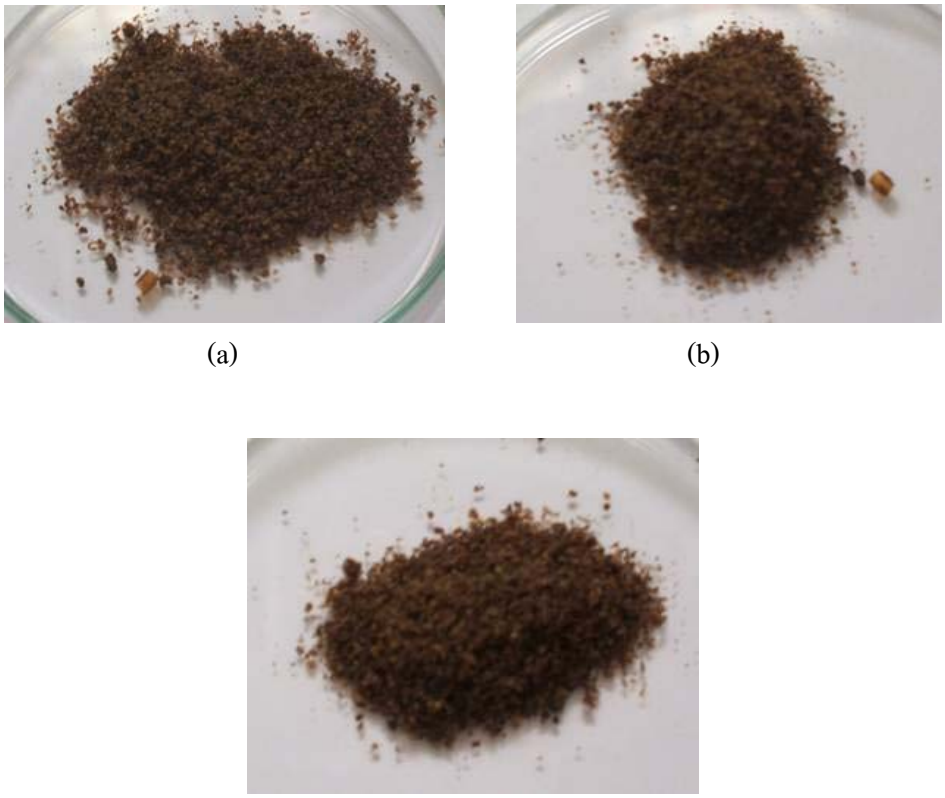
Table 12. Weight and percentage of moisture of magmeals production produced from different maggot rearing sources

Source	Magmeal	
	Dry weight (%) (w/w)	Moisture (%)
Fresh fish offal (Control)	53.33[a]±0.17	6.55[a]±0.79
Palm kernel meal	53.20[a]±0.17	5.92[a]±0.79
Fermented palm kernel meal	52.98[a]±0.17	7.49[a]±0.79
F-test	*	*

* Significantly different ($P < 0.05$)

4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของดักแด้ป่น และการวิเคราะห์สารสีในดักแด้ป่น

นำดักแด้หนอนแมลงวันอบแห้งทั้ง 3 ชุดทดลองที่ได้จากข้อ 4.1 มาป่นละเอียด วิเคราะห์หาองค์ประกอบต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 1.1 โดยวิเคราะห์เทียบคุณภาพที่ได้กับปลาป่น พบว่าดักแด้ป่นที่ได้มีสีน้ำตาล (Figure 15) มีกลิ่นหอมคล้ายกลิ่นปลาเผาเหมือนกันทั้ง 3 ชุดตัวอย่าง และมีความชื้นที่ไม่เกินร้อยละ 10 ดักแด้ป่นที่ผลิตได้มีโปรตีนอยู่ระหว่างร้อยละ 40.06 - 51.97 (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง) ซึ่งเมื่อเทียบกับปลาป่นแล้วพบว่าปริมาณโปรตีนที่ได้ยังน้อยกว่าอยู่มาก เนื่องจากปลาป่นคุณภาพจะมีโปรตีนอยู่ระหว่างร้อยละ 50 - 60 ขึ้นไป แต่ทั้งนี้ตัวอย่างดักแด้ป่นที่ผลิตได้จากกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผสมน้ำล้างเครื่องในปลาสดมีโปรตีนถึงร้อยละ 51.97 (Table 13) ซึ่งนับว่าใกล้เคียงกับปลาป่นคุณภาพเกรด 3 ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ คือ มีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 50 จากผลการวิเคราะห์คุณภาพดักแด้ป่นที่ได้พบว่ามีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกับรายงานการใช้หนอนป่นชนิดต่าง ซึ่งมีโปรตีนอยู่ระหว่างร้อยละ 33.12 – 48.70 (Ogunji *et al.*, 2007; Newton *et al*, 1977; Ogunleye and Omotoso, 2005) นอกจากนี้ปลาป่นคุณภาพยังมีไขมันไม่เกินร้อยละ 12 เมื่อเทียบกับดักแด้ป่นที่ผลิตได้แล้วนับว่าดักแด้ป่นมีปริมาณไขมันที่สูงกว่าปลาป่นมากถึงร้อยละ 24.58 ยกเว้นดักแด้ป่นที่ได้จากชุดอาหารที่เลี้ยงด้วยกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีโมแนสคัสมีไขมันร้อยละ 8.75 ซึ่งนับว่าเป็นค่าไขมันที่อยู่ในช่วงของปลาป่นคุณภาพ ทั้งนี้อาหารที่ใช้เลี้ยงหนอนแมลงวัน เป็นอาหารที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราโมแนสคัส ซึ่งภายหลังกระบวนการหมักอาจมีสารบางอย่างที่มีคุณสมบัติในการลดการสะสมไขมัน เนื่องจากเคยมีรายงานความสามารถของสารสีที่ได้จากเชื้อราชนิดนี้ในการลดระดับไขมันและโคเลสเตอรอล ซึ่งเป็นสารโมนาโคลิน เค (monakolin K) (Jůzlová *et al.*, 1996; Wang *et al.,* 2002) สำหรับชุดทดลองอื่นถึงแม้จะมีปริมาณไขมันที่สูงแต่ใกล้เคียงกับร้อยละของไขมันในหนอนป่นที่มีรายงานอยู่ในช่วงระหว่าง 19.8 – 34.8 และไม่ได้เกิดผลเสียเมื่อใช้ในอาหารสัตว์แต่อย่างใด (Ogunji *et al.*, 2007; Newton *et al*, 1977; Ogunleye and Omotoso, 2005) ดัง Table 13



(a) (b)

(c)

Figure 15. Color appearances of magmeal production produced from (a) control (fresh fish offal) (b) palm kernel meal (c) fermented palm kernel meal

Table 13. Proximate composition of magmeal production produced from fly pupae of different rearing media

Components (% dry weight)	Fishmeal (% dry weight)	Magmeal (Control) (% dry weight)	Magmeal (PKM) (% dry weight)	Magmeal (FPKM) (% dry weight)
Dry Matter	91.0	93.45	94.08	92.50
Moisture	< 10.00	6.55	5.92	7.49
Crude Protein	50.00-60.00	46.84	51.97	40.06
Crude Fat	7.80-12.00	20.45	24.58	8.75
Crude Fiber	< 2.00	8.95	12.51	8.84
Ash	< 30.00	3.28	4.67	4.72
NFE*	3.21	13.93	0.35	30.14
Calcium	5.00-7.70	0.25	0.43	0.40
Phosphorus	3.00-3.80	0.62	1.08	1.20

* Nitrogen-free extract + fibre, (NFE) =100-(% protein + % fat + % ash)

4.3 การวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโนในหนอนป่นและปลาป่น

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบโดยทั่วไปของดักแด้ป่นที่ผลิตได้ พบว่ามีปริมาณโปรตีนในระดับที่น่าพึงพอใจเมื่อเทียบกับรายงานการผลิตหนอนป่น (Ogunji *et al.*, 2007; Newton *et al*, 1977; Ogunleye and Omotoso, 2005) และเมื่อนำดักแด้หนอนแมลงวันอบแห้งที่ได้วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดอะมิโนด้วย HPLC พบว่ากรดอะมิโนบางตัวมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับปลาป่นคุณภาพอีกทั้งยังมีในปริมาณที่สูงกว่าหนอนป่นที่เคยมีรายงานอีกด้วยโดยเฉพาะชุดควบคุม และชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มผสมน้ำล้างไส้ปลา (Miles and Chapman, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณกรดอะมิโนในชุดอาหารชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มผสมน้ำล้างเครื่องในปลาสดให้ปริมาณสูงสุด รองลงมาเป็นชุดควบคุม และชุดทดลองด้วยกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัส ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากชุดทดลองด้วยกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัส เป็นชุดที่หนอนแมลงวันเติบโตได้น้อยที่สุด มีขนาดตัวหนอนและน้ำหนักน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการทดลองชุดอื่นๆ อาจเป็นผลจากการที่สารอาหารจำเป็นบางอย่างถูกใช้ไปในระหว่างกระบวนการหมักสารสีแดง ส่งผลให้ได้ดักแด้ที่คุณภาพด้อยกว่าชุดการทดลองอื่นๆ แต่ยังคง

สารอาหารและปริมาณกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงหรือเทียบเท่าได้กับหนอนป่น (magmeal) ที่เคยมีรายงาน (Ogunji *et al.*, 2007; Newton *et al*, 1977; Ogunleye and Omotoso, 2005) ดัง Table 14

Table 14. Amino acid profile (mg/100mg) of magmeals produced from different medium experimental test; control (fishmeal) fresh fish offal, fermented palm kernel meal and palm kernel meal with the rinse of fresh fish offal

Type of Amino Acids	Fishmeal** (Control)	Magmeal (fresh fish offal)	Magmeal (PKM)	Magmeal (PKMF)
Aspartic acid	4.32	4.28	4.67	2.63
Glutamic acid	6.03	5.44	6.05	3.22
Serine	2.13	1.70	1.96	1.18
Histidine*	1.45	1.27	1.40	0.72
Glycine	3.05	1.76	1.96	1.35
Threonine*	2.31	1.91	2.12	1.25
Arginine*	3.82	3.24	3.57	2.00
Alanine	3.20	2.51	2.85	1.63
Tyrosine	0.9	2.07	2.26	1.56
Valine*	2.77	2.24	2.47	1.41
Phenylalanine*	3.1	2.02	2.33	1.51
Isoleucine*	2.66	1.62	1.78	1.07
Leucine*	4.48	2.87	3.14	1.86
Lysine*	4.72	2.96	3.35	2.21

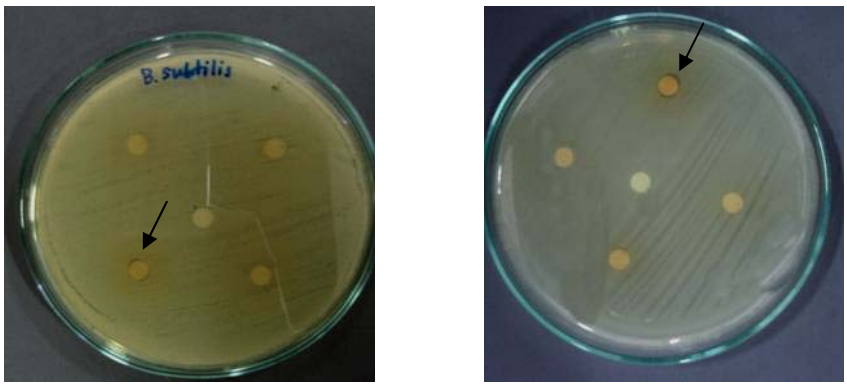
* Essentials Amino Acid (EAA)

** Miles and Chapman, 2006; Folador *et al.,* 2006

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสีสกัดจากเชื้อรา *Monascus* sp. โดยวิธี disc diffusion (ดัดแปลงจาก NCCLS, 1993)

เมื่อนำสารสีจากเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 (จากการทดลองที่ 1) ที่สกัดได้ไประเหยให้แห้งภายใต้เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion ด้วยเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* พบวงใส (inhibition zone) รอบแผ่น disc (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) มีขนาด 7.5, 7.12 และ 6.17 มิลลิเมตร ตามลำดับ (figure 16 และ Table 15) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ (*E.a coli* และ *S. aureus*) เป็นตัวแทนของเชื้อก่อโรคที่อาจเป็นอันตรายต่อสัตว์ สำหรับ *B. subtilis* จัดเป็นโพรไบโอติก ซึ่งในปัจจุบันมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์อย่างกว้างขวาง (Fritis *et al.,* 2000) ดังนั้นหากสารสีที่ผลิตได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* คงไม่เป็นผลดีเท่าที่ควร ทั้งนี้ควรศึกษาเพิ่มเติมกรณีหากมีการเติมสารสีชนิดนี้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารสำหรับสัตว์

Ferdes และคณะ (2009) รายงานการฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสีแดงที่ผลิตได้จาก *Monascus purpureus* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* B1, *Bacillus subtilis* B2, *Pseudomonas aeruginosa* P1, *Pseudomonas aeruginosa* P2 และ *Escherichia coli* โดยมีวงใสการยับยั้งเป็น 8, 9, 8, 8 และ 8 ตามลำดับ (แผ่น disc มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) นอกจากแบคทีเรียข้างต้น ยังมีรายงานความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* CCRC15323, *Micrococcus luteus* CCRC10452 และแบคทีเรียชนิดอื่นๆอีกหลายสายพันธุ์ รวมถึงเชื้อรา *Aspergillus niger* CCRC30201 (Wang *et al*, 2002)



(a) (b)

Figure 16. Inhibition zones for bacterial strains grown on medium supplemented with disc of *Monascus* red pigment (a) the inhibition zones of *Bacillus subtilis* and (b) the inhibition zones of *Escherichia coli*

Table 15. Antimicrobial action of the antimicrobial compounds from *Monascus ruber* TISTR 3006

Bacterial strain	**Inhibition zone diameter, mm**			
	1	**2**	**3**	$\overline{\mathbf{X}}$
Bacillus subtilis	7.5	7.0	7.0	7.12
Escherichia coli	7.0	8.0	7.5	7.5
*Staphyloco*ccus *aureus*	6.0	6.5	6.0	6.17

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. กากเนื้อเมล็ดในปาล์มประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 16.56 เยื่อใยร้อยละ 22.44 ความชื้นร้อยละ 6.66 และไขมันร้อยละ 18.70

2. *Monascus ruber* TISTR 3006 เจริญและมีการผลิตสารสี 11.03 OD Units/gds โดยสามารถผลิตสารสีแดงได้สูงกว่าอีก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. purpureus* TISTR 3090, *M. purpureus* TISTR 3002

3. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูงสุดในวันที่ 4 จากนั้นค่าจะลดลง มีการเจริญและสร้างสารสีได้ได้สูงสุดในสภาวะที่มีความชื้นร้อยละ 60 (19.77 OD Units/gds) เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2 มิลลิลิตร ($1x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร) และที่ค่าพีเอช 7.5 สร้างสารสีได้สูงสุด 20.16 OD unit/gds OD Units/gds และการสร้างสารสีลดน้อยลงเมื่อพีเอชสูงขึ้น

4. สารสีแดงที่ผลิตได้จากเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีภายหลังการผ่านอุณหภูมิ 121 °C เป็นระยะเวลา 15 นาที และที่อุณหภูมิ 30 °C, 4°C และ -20 ° C เป็นระยะเวลา 28 วัน ไม่พบการเลี่ยนแปลงของสารสีแดงที่ผลิตได้เช่นกัน

5. ไข่ของหนอนแมลงวันหัวเขียว *Chysomya Megacephala* มีสีขาว รูปร่างรียาว ขนาดยาวประมาณ 1.53 มิลลิเมตร สามารถเก็บไข่หนอนแมลงวันได้เฉลี่ยคราวละ 138 ฟอง จากจำนวนแมลงวัน 20-30 คู่ และพบอัตราการรอดชีวิตของไข่ในอาหารชุดควบคุม (ไส้ปลาสด) ชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์ม (ปรับความชื้นด้วยน้ำล้างไส้ปลาสด) และชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีโมแนสคัสเป็นร้อยละ 95.34, 69.67 และ 57 ตามลำดับ

6. อาหารชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัส มีอัตราการรอดชีวิตจากไข่แมลงวันเริ่มต้นเป็นตัวหนอนและเจริญเข้าสู่ตัวเต็มวัยเป็น 4 ตัว และมีน้ำหนักของตัวหนอนสูงสุดก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ในวันที่ 3 เป็น 0.039 กรัม และดักแด้เป็น 0.028 กรัม เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีน้ำหนักของตัวหนอนสูงสุดก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ในวันที่ 3 เป็น 0.055 กรัม และดักแด้เป็น 0.045 กรัม และยังมีปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากการผสมด้วยน้ำล้างเครื่องในปลาสดจะส่งผลให้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มและน้ำล้างเครื่องในปลาสดผสมกันได้อย่างทั่วถึงมากกว่าการผสมด้วยไส้ปลาโดยตรง ทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้ไส้ปลาสดในการทดลองได้ด้วย

7. ไข่แมลงวันเริ่มต้นสามารถเจริญเป็นตัวหนอน และเจริญเข้าสู่ระยะดักแด้ได้ดีในสภาวะที่มีความชื้นเริ่มต้น ตั้งแต่ร้อยละ 55-80 และที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65 มีอัตราการรอดสูงสุด และที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 60-70 อัตราการรอดชีวิตและเข้าสู่ระยะดักแด้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ชุดการทดลองกากเนื้อเมล็ดในปาล์มสดไม่พบการเปลี่ยนแปลงจากไข่แมลงวันเป็นตัวหนอน เนื่องจากสภาวะที่แห้งจนเกินไป ชุดแต่ที่สภาวะความชื้นเริ่มต้น ตั้งแต่ร้อยละ 55-70 โดยที่ความชื้นร้อยละ 60 และ 65 มีอัตราการรอดชีวิตและเข้าสู่ระยะดักแด้ที่เท่ากัน เมื่อความชื้นเพิ่มมากขึ้นอัตราการรอดชีวิตจึงค่อยๆลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เครื่องในปลาสด ซึ่งมีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 65 พบอัตราการรอดชีวิตเริ่มลดลงเช่นเดียวกันหากมีความชื้นเริ่มต้นที่สูงมากกว่าร้อยละ 80 ขึ้นไป

8. เมื่อเลือกใช้ชุดทดลองกากเนื้อเมล็ดในปาล์มผสมน้ำล้างเครื่องในปลาสด และชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัสมาใช้ในการศึกษาการผลิตดักแด้ปน พบว่าจากตัวอย่างดักแด้ 100 กรัม จะได้ดักแด้แมลงวันอบแห้งเป็น 53.33, 53.2 และ 52.98 กรัม ของชุดควบคุม ชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มผสมน้ำล้างไส้ปลา และชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัส ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ความชื้นสำหรับหนอนดักแด้ปนที่ผลิตได้ทั้ง 3 ชุดทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

9. เมื่อทำการวิเคราะห์ดักแด้ปนเทียบคุณภาพที่ได้กับปลาป่น พบว่าดักแด้ปนที่ได้มีสีน้ำตาล มีกลิ่นหอมคล้ายกลิ่นปลาเผาเหมือนกันทั้ง 3 ชุดตัวอย่าง และมีความชื้นที่ไม่เกินร้อยละ 10 ดักแด้ปนที่ผลิตได้มีโปรตีนอยู่ระหว่างร้อยละ 40.06 - 51.97 (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ดักแด้ปนมีปริมาณไขมันที่สูงกว่าปลาป่นมากถึงร้อยละ 24.58 ยกเว้น ดักแด้ปนที่ได้จากชุดอาหารที่เลี้ยงด้วยกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีโมแนสคัส

10. ผลการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณกรดอะมิโน พบว่ากรดอะมิโนที่ได้มีปริมาณที่ใกล้เคียงกับปลาป่นคุณภาพอีกทั้งยังมีในปริมาณที่สูงกว่าหนอนป่นที่เคยมีรายงานอีกด้วย โดยเฉพาะชุดควบคุม และชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มผสมน้ำล้างไส้ปลา นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณกรดอะมิโนในชุดอาหารชุดกากเนื้อเมล็ดในปาล์มผสมน้ำล้างไส้ปลาให้ปริมาณสูงสุด รองลงมาเป็นชุดควบคุม และชุดทดลองด้วยกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัส ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากชุดทดลองด้วยกากเนื้อเมล็ดในปาล์มหมักสารสีแดงโมแนสคัส เป็นชุดที่หนอนแมลงวันเติบโตได้น้อยที่สุด มีขนาดตัวหนอนและน้ำหนักน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการทดลองชุดอื่นๆ อาจเป็นผลจากการที่สารอาหารจำเป็นบางอย่างถูกใช้ไปในระหว่างกระบวนการหมักสารสี

แดง ส่งผลให้ได้ดักแด้ที่คุณภาพด้อยกว่าชุดการทดลองอื่นๆ แต่ยังคงสารอาหารและปริมาณกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงหรือเทียบเท่าได้กับหนอนปั่นที่เคยมีรายงาน

11. สารสีจากเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 ที่สกัดได้ พบวงใส (clear zone) รอบแผ่น disc (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) มีขนาด 7.5, 7.12 และ 6.17 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กาบแก้ว สุคนธสรรพ์. 2552. แมลงวัน (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www.med.cmu.ac.th/dept/parasite/public/Fly.htm (3 สิงหาคม 2552)

เกวลิน หนูฤทธิ์. 2551. สถานการณ์การผลิตและการค้าปลาป่น (ออนไลน์).สืบค้นจาก: http://fishco.fisheries.go.th/fishery3/magazine/Y2007Jan_mar/2.htm (1 มีนาคม 2551)

ชุติมา ตันติกิตติ, เสาวนิต คูประเสริฐ, ระพีพรรณ เลาหบรรจง, มณี ศรีชะนันท์, อนุชิต อาจหาญ และ กิจการ ศุภมาตย์. 2548. คุณภาพปลาป่นจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีและกล้องจุลทรรศน์. ว. สงขลานครินทร์ 27 (1) : 25-34.

นิรนาม. 2550. ปาล์มน้ำมัน. กรมส่งเสริมการเกษตร (ออนไลน์) สืบค้นจาก: http://www.doae.go.th/plant/palm htm (21 กรกฎาคม 2550)

นิรนาม. 2550. สถานการณ์ปลาป่น สำนักบริหารการนำเข้าส่งออกสินค้าทั่วไป กลุ่มวิเคราะห์สินค้า 2 (ออนไลน์). สืบค้นจาก: www.dft.moc.go.th/the_files/$$16/level4/ปลาป่นไตรมาส%203 (ก.ค.-ก.ย.50).doc (9 มีนาคม 2550)

นิรนาม. 2552. *Chrysomya_megacephala* (ออนไลน์) สืบค้นจาก: http://en.wikipedia.org/wiki/Chrysomya_megacephala (21 ธันวาคม 2552)

บุษบา ยงสมิทธ์. 2542. จุลชีววิทยาและการหมักวิตามินและสารสี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เผด็จ สิริยะเสถียร และ นันทนา ศิริทรัพย์. 2005. บทความพิเศษ “การประมาณเวลาการตายโดยอาศัยข้อมูลวงจรชีวิตของแมลงวันบนศพ”. Chula Med J. 49 (4) :195-202.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์. 2542. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ภรณี บุญสิงห์. 2551. แมลงวัน. บทความวิชาการ (ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://gotoknow.org/blog/biocontrol/3398 (6 มีนาคม 2551)

วินัย ประลมพ์กาญจน์, วรวิทย์ วณิชาภิชาติ, อุตสาห์ จันทร์อำไพ และบุญธรรม พฤกษวานิช. 2526. การศึกษาระดับที่เหมาะสมของกากปาล์มน้ำมันในสูตรอาหารไก่กระทง. ว. สงขลานครินทร์ 5 (4) : 331-336.

วินัย ประลมพ์กาญจน์, เสาวนิต คูประเสริฐ, สุรพล ชลดำรงค์กุล และสมเกียรติ ทองรักษ์. 2528. ผลของการใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันระดับต่างๆ ในอาหารสุกรขุน. ว. สงขลานครินทร์ 7 (2) : 137-144.

วิโรจน์ วนาสิทธชัยวัฒน์. 2551. “หนอนแมลงวัน” แหล่งโปรตีนราคาถูกสำหรับเลี้ยงสุกร. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์. 113-116 หน้า.

สมพงษ์ เทศประสิทธ์. 2526. การใช้กากปาล์มน้ำมันเป็นอาหารโค. ว. สงขลานครินทร์ 5 (3) : 137-144.

สุกัญญา จัตตุพรพงษ์. 2539. การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบอาหารสัตว์. ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม: 194 หน้า.

A.O.A.C. 1995. Official of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 3th ed. The Association of Official Analytical Chemists. Virginia.

A.O.A.C. 1999. Official of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists. Washington, D. C.

Abou Zeid, E. M., Gabe, R. M. and Shi, H. 2003. Life table of the Australian sheep blow fly *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). Egypt. J. Zool. 41: 29-45.

Adams, T.S. and Reinecke, J.P. 1979. The reproductive physiology of the screwworm, Cochliomyia hominivorax (Diptera: Calliphoridae). I. Oogenesis. J. Med. Entom. 15: 472-483.

Akinnawo, O. and Ketiku, A. O. 2000. Chemical composition and fatty acid profile of edible larva of *Cirina forda* (Westwood). Afr. J. Biomed. Res. 3: 93-96.

Anderson, G.S. 2000. Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). Forensic Sci. Int. 45: 824-832.

Aniebo, A. O., Erondu, E. S. and Owen, O. J. 2008. Proximate composition of housefly larvae (*Musca domestica*) meal generated from mixture of cattle blood and wheat bran. Livestock Research for Rural Development (online) Available http://www.lrrd.org/lrrd20/12/anie20205.htm (18 August 2008)

Anonymous. 2010. Cook Islands Biodiversity and Natural Heritage (online). Available http://cookislands.bishopmuseum.org/MM/MX5/5AUw090_Chry-mega_RR2_GM1_MXa.jpg (20 May 2010)

Anonymous. 2010. Cook Islands Biodiversity and Natural Heritage. Chapter 2 Overview of Fish Processing. Page 12. http://www.p2pays.org/ref/24/23296/f_chp2.pdf (19 August 2009)

Aspar,H. M. 2009. Malaysian Palm Kernel Cake as Animal Feed. Malaysian Palm Oil Board, Kuala Lumpur, 122 pp. (online) Available http://palmoilis.mpob.gov.my/publications/pod34-hisham.pdf (18 June 2008)

Babitha, S., Carlos, Soccol R. and Pandey A. 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. Biores. Technol. 98: 1554–1560.

Berkebile, D. R., Sagel, A., Skoda, S. R. And Foster, J. E. 2006. Laboratory environment effects on the reproduction and mortality of adult screwworm (Diptera: Calliphoridae). Neotrop. Entomol. 35: 1-9.

Bondari, K. and Sheppard, D. C. 1987. Soldier fly, *Hermetia illucens* L., larvae as feed for channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), and blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner). Aquaculture and Fisheries Mgment. 18: 209-220.

Cahu, C.L., Infante, J. L. Z., Quazuguel, P. and Gall, M. M. L. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture. 171: 109–119**.**

Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. 1986. Carbohydrate Analysis: A Practical Approach. Washington DC: IRL Press.

Chin, F. Y. 2009. Palm Kernel Cake (PKC) as a Supplement for Fattening and Dairy Cattle in Malaysia (online) Available http://www.fao.org/ag/AGP/agpc/doc/Proceedings/manado/chap25. htm. (7 February 2009)

Day, D. M. and Wallman, J.F. 2006. Acomparison of frozen/thawed and fresh food substrates in development of *Calliphora augur* (Diptera:Calliphoridae) larvae. Int. J. Legal Med. 120: 391–394.

Egan, H., Kirk, R. S. and Sawyer, R. 1981. Pearson's Chemical Analysis of Food. 18th ed. Churchill Livingstone. Edinburgh. London. Melbourne and New York.

Ezieshi, E. V. and Olomu, J. M. 2007. Nutritional evaluation of palm kernel meal types: 1. Proximate composition and metabolizable energy values. African J. Biotechnol. 6: 2484-2486.

Ferdes, M., C. Ungureanu, C., Radu, N. and Chirvase, A. A. 2009. Antimicrobial effect of *Monascus purpureus* red rice against some bacterial and fungal strains. New Biotechnol. Abstracts of the 14th European Congress on BiotechnologyBarcelona, Spain 13–16 September, 2009: 25: S194 pp.

Folador, J. F., Karr-Lilienthal, L. K., Parson, C. M., Bauer, L. L., Utterback, P. L., Schasteen, C. S., Bechtel, P.J. and Fahey Jr., G. C. 2006. Fish meals, fish components and fish protein hydrolysates as potential ingredients in pet foods. J. Anim. Sci. 84: 2752-2765.

Fritil's, C. A., Kersn, J. H., Motl, M. A., Kroger, E. C., Yan, E., Si, J., Jiang, Q., Campos, M. M., Waldroup, A. L., and Waldroup, P. W. 2000. *Bacillus subtilis* C-3102 (calsporin)

improves live performance and microbiological status of broiler chickens. J. Appl. Poultry Res. 9: 149-155.

Ghose, T. K. 1987. Measurements of cellulose activities. Pure Appl. Chem. 59: 257-268.

Gilbert, R. 2002. Overview of World Protein Needs and Supply. Proceedings of a workshop on Protein Sources for the Animal Feed Industry. Bangkok, 29 April-3 May 2002, FAO. 9 pp.

Grassberger, M. and Reiter, C. 2002. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). Forensic Sci. Int. 128: 177-182.

Hajjaj, H., Klaebe, A., Loret, M. O., Goma, G., Blanc, P. J. and Francois, J.1999. Biosynthetic Pathway of Citrinin in the Filamentous Fungus *Monascus ruber* as Revealed by C 13 Nuclear Magnetic Resonance. Appl. Environ. Microbiol. 65: 311-314.

Hamano, P. S. and Kilikian, B. V. 2006. Production of Red Pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. Brazilian J. Chem.Eng. 23: 443-449.

Hamdi, M., Blanc, P.J. and Goma, G. 1996. Effect of Aeration Conditions on the Production of Red Pigments by *Monascus purpureus* Growth on Prickly Pear Juice. Process Biochem. 31: 543-547.

Hardy, R.W. 1996. Alternate protein sources for salmon and trout diets. Anim. Feed Sci. Technol. 59: 7 1 - 80.

Harris, Jr. B. and Staples, C. R. 2003. Vegetable Protein Meal By-product Feedstuffs for Dairy Cattle. The Animal Science Department. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida (online) Available http://edis.ifas.ufl.edu (5 February2008)

Hem, S., Toure, S., Sagbla, C. and Legendre, M. 2008. Bioconversion of palm kernel meal for aquaculture: Experiences from the forest region (Republic of Guinea). African J. Biotechnol. 7: 1192–1198.

Iluyemi, F.B., Hanafi, M.M., Radziah, O., Kamarudin, M.S. 2006. Fungal solid state culture of palm kernel cake. Biores. Technol. 97: 477–482.

Jůzlová, P., Martínková, L., and Křen, V. 1996. Secondary metabolites of the fungus Monascus: a review. J. Indust. Microbiol. 16: 163-170.

Lee, Y. K., Chen, D. C., Chauvatcharin, S., Seki, T. And Yosilida. 1995. Production of Monascus Pigments by a Solid-Liquid State Culture Method. J. Ferment. Bioeng. 79: 516-518.

Lefebvre, F. and Pasquerault, T. 2004. Temperature-dependent development of *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) and *Ophyra capensis* (Wiedemann, 1818) (Diptera,Muscidae). Forensic Sci. Int. 139: 75-79.

Lim, H., Yoo, S. Shin, C. and Hyun, Y. 2000. Monascus red pigment overproduction by coculture with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting glucoamylase. J. Microbiol. 38: 48-51.

Lorian, V. 1996. Antibiotics in Laboratory Medicine. 3th ed. Baltimmore: Williams & Wilkins.

Miles, R.D. and Chapman, F.A. 2006. The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets (online) Available http://www.thefishsite.com/articles/200/the-benefits-of-fish-meal-in-aquacultu re-diets (9/5/2008)

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.

Mustaffa, A. B., Chin, F.Y. and Yusoff, M.S. 1987. The use of palm kernel cake as animal feed. Dept Vet. Services Mimeograph. Bangkok, Thailand as contribution from Mustaffa, A. B. อ้างโดย Chin, F. Y. 2009. Palm Kernel Cake (PKC) as a Supplement for Fattening

and Dairy Cattle in Malaysia (online) Available http://www.fao.org/ag/AGP/agpc/doc/Proceedings/manado /chap25. htm (7 February 2009)

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Vilanova, Pa

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Vilanova, Pa

Newton, G. L., Booram, C. V., Barker, R. W. and Hale, O. M. 1977. Dried *Hermetia Illucens* Larvae Meal as a Supplement for Swine. J. Anim. Sci. 1977. 44: 395-400.

Ogunji, J.O., Nimptsch, J., Wiegand, C., and Schulz, C. 2007. Evaluation of the influence of housefly maggot meal (magmeal) diets on catalase, glutathione S-transferase and glycogen concentration in the liver of Oreochromis niloticus fingerling. Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol. 147: 942-947.

Ogunji1, J., Toor, R. S., Schulz, C. and Kloas, W. 2008. Growth Performance, Nutrient Utilization of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* Fed Housefly Maggot Meal (Magmeal) Diets. Turkish J. Fisheries and Aquatic Sci. 8: 141-147.

Ogunleye, R. F. and Omotoso, O. T. 2005. Edible Orthopteran and Lepidopteran as protein substitutes in the feeding of experimental albino rat. Afr. J. Appl. Zool. and Environ. Biol. 7: 48-51.

Oluremi, O. I. A., Bogbenda, M. and Mkah, T. P. 2006. The effect of C*irina forda* larva meal in rabbit diets on performance, carcass quality and nutrient digestibility. Livestock Research for Rural Development. 18 (online) Available http://ftp.sunet.se/wmirror/www.cipav.org. co/lrrd/lrrd18/7/olur18092.htm (21 March 2009)

Omotoso, O. T. 2006. Nutritional quality, functional properties and anti-nutrient compositions of the larva of *Cirina forda* (Westwood) (Lepidoptera: Saturniidae). J. Zhejiang Univ. SCIENCE B. 7: 51-55.

Oyegoke, O. O., Akintola, A. J. and Fasoranti, J. O. 2006. Dietary potentials of the edible larvae of Cirina forda (westwood) as a poultry feed. Afr. J. Biotechnol. 5: 1799-1802.

Pereira, J. O. and Gomes, E. F. 1995. Growth of rainbow trout fed a diet supplemented with earthworms, after chemical treatment. Aquaculture International 3: 36-42.

Ramachandran, S., Patel, A. K., Nampoothiri, K. M., Francis, F., Nagy, V., Szakacs, G. and Pandey, A. 2004. Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α-amylase. Biores. Technol. 93: 169-174.

Sato, K., S. Iwakami, Y. Goda, E. Okuyama, K. Yoshinira, T. Ichi, Y. Odake, H. Noguchi, and Sankawa U. 1992. Novel natural colorants from U-1. Heterocycles. 34: 2057-2060.

Sheppard, D. C., Newton, G. L., Thompson, S. A. and Savage, S. 1994. A Value added manure management system using The Black Soldier Fly. Biores. Technol. 50: 275-279.

Sheu, F., Wang, C. L. and Shyu, Y. T. 2000. Fermentation of *Monascus purpureus* on Bacterial Cellulose-nata and the Color Stability of *Monascus*-nata Complex. J. Food Sci. 65: 342-345.

Sogbesan, A. O. and Ugwumba, A. A. A. 2008. Nutritional Values of Some Non-Conventional Animal Protein Feedstuffs Used as Fishmeal Supplement in Aquaculture Practices in Nigeria. Turkish J. Fisheries and Aquatic Sci. 8: 159-164.

St-Hilaire, S., Sheppard, C., Tomberlin, J. K., Irving, S., Newton, L., Mcguire, M. A., Mosley, E. E., Ronald W. Hardy, R. W. and Sealey, W. 2007. Fly Prepupae as a Feedstuff for Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. The Wolrd Aquaculture Society. 38: 59-67.

Sukontason, K., Chiwong, T., Tayutivutikul, J., Somboom, P., Choochote, W., Piangjai, S. and Sukontason, K. L. 2005. Susceptibility of *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala* to Permethrin and Deltamethrin in Thailand. J. Med. Entomol. 42: 812-814.

Tuan, N. N. and Focken, U. 2009. Earthworm Powder as Potential Protein Source in Diets for Common Carp (Cyprinus carpio L.). Present at the Conference on Biophysical and Socio-economic Frame Conditions for the Sustainable Management of Natural Resources. Tropentag, Hamburg, 6-8 October 6-8 2009.

Van de loo, H.-M. 1976. An improved method for the quantitative determination of hexosamines according to Elson and Morgan. Anal. Biochem. 76: 556-560.

Wang, S., Yen, Y., Tsiao, W., Chang, W. and Wang, C. 2002. Production of antimicrobial compounds by *Mona scus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. Enzyme Microb. Technol. 31: 337–344.

Yeong, S. W., Mukherjee, T. K. and Hutagulung, R. I. 1983. The nutritive value of palm kernel cake as a feedstuff for poultry. *Proc. of the National Workshop on Oil Palm By-products Utilization*. 100-107.

Yongsmith, B., Kitprechavanich, V., Chitradon, L., Chaisrisook, C. and Budda, N. 2000. Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic. 10: 263–272.

Zuidhof, M.J., Molnar, C.L., Morley, F.M., Wray, T.L., Robinson, F.E., Khan, Al-Ani, B.A.L. and Goonewardene, L.A. Nutritive value of housefly (*Musca domestica*) Larvae as a feed supplement for turkey pout. Anim. Feed Sci. Technol. 105: 225–230.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1999)

อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก (ทำซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม) ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียด ประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 4-5 ชั่วโมง ออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก อบซ้ำอีก ครั้งละประมาณ 30 นาที (ทำซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม) คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = 100 \times \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

2. การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1999)

เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง เปิดสวิทซ์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใสในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก เผาซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาที (ทำซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม) ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผา ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาใสในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก (ทำซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม) คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้าคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = 100 \times \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

3. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 1999)

อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก (ประมาณ 1-2 กรัม) แล้วใสลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยใยแก้วหรือสำลี เพื่อให้สารตัวทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซอคเลต เตรียมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดหาไขมันประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา ประกอบชุดสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทซ์ ใช้เวลาในการสกัดไขมันนาน 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที จากนั้นนำหลอดตัวอย่างออกจากซอคเลต ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจากซอคเลตลงในขวดกลมจนหมด ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ แล้วนำขวดไขมันอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมันคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{100 \times \text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารเยื่อใย (ดัดแปลงจาก Egan *et al.,* 1981)

นำกระดาษกรองวางบนกระจกนาฬิกา อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก เก็บไว้ใช้กรอง ชั่งตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดไขมันออกแล้วลงบีกเกอร์ทรงสูงสำหรับวิเคราะห์สารเยื่อใยขนาด 600 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 1.25 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร วางบีกเกอร์บนอุปกรณ์ให้ความร้อนซึ่งต่อเข้ากับอุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น พร้อมเปิดสวิทซ์ไฟ ต้มตัวอย่างให้เดือดนาน 30 นาที นำมากรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นกรด ถ่ายกากที่ได้ลงในบีกเกอร์ใบเดิม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร วางบีกเกอร์บนอุปกรณ์ให้ความร้อนซึ่งต่อเข้ากับอุปกรณ์ควบแน่น และ ต้มต่ออีก 30 นาที กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองแผ่นเดิม ล้างด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างหมดความเป็นด่าง ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (ร้อยละ 95) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองพร้อมกากใส่ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ อบแห้งในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำอีกครั้งละ 30

นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม นำถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมกากที่อบแห้งแล้วไปเผาเช่นเดียวกับวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า คำนวณหาปริมาณสารเยื่อใยจากสูตร

$$\text{ปริมาณสารเยื่อใยคิดเป็น} = \frac{100 \times \text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างหลังอบและหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

5. การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลส และลิกนิน (ดัดแปลงจาก Van Soest and Wine, 1967)

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิลิตร มาประมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ทรงสูงขนาด 600 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Acid detergent ปริมาณ 100 มิลลิลิตร และ decahydronapthalene ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นลดความร้อนลงให้เดือดเบาๆ เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านครูซิเบิลที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว (W_1) โดยใช้แรงดูดสุญญากาศเบาๆ ล้างตัวอย่างที่ติดอยู่ในบีกเกอร์ลงครูซิเบิลด้วยน้ำร้อน 3-5 ครั้ง ขณะล้างให้เขี่ยก้อนเยื่อใยที่อยู่ในครูซิเบิลให้กระจายออกโดยใช้แท่งแก้ว จากนั้นจึงดูดด้วยเครื่องดูดสุญญากาศและล้างต่อด้วยอะซิโตน ปริมาณเล็กน้อยประมาณ 2-3 ครั้ง แล้วใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูดให้แห้ง นำครูซิเบิลไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หรืออบจนกระทั่งชั่งน้ำหนักได้คงที่ (W_2) นำครูซิเบิลวางในถาดก้นตื้น เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 72 (ก่อนใช้ให้แช่เย็นที่อุณหภูมิ ประมาณ 15 องศาเซลเซียส) ลงในครูซิเบิลประมาณครึ่งหนึ่ง แล้วคนด้วยแท่งแก้วคนเพื่อให้เยื่อใยเปียกอย่างทั่วถึง เติมกรดเพิ่มลงไปทุกๆ 1 ชั่วโมง พร้อมคนอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำครูซิเบิลไปกรองเอากรดออก โดยใช้เครื่องดูดสุญญากาศ แล้วล้างออกด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด นำครูซิเบิลไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ตลอดคืน ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก (W_3) นำครูซิเบิลไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าไม่มีคาร์บอน ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก (W_4) คำนวณหาปริมาณเซลลูโลส และลิกนินจากสูตร

$$\text{ADF} = \frac{(W_2 - W_1) \times 100}{S}$$

$$\text{L} = \frac{(W_3 - W_4) \times 100}{S}$$

$$\text{C} = \text{ADF} - \text{L}$$

โดยที่ ADF = Acid detergent fiber (ร้อยละ)

L = ปริมาณลิกนิน (ร้อยละ)

C = น้ำหนักเซลลูโลส (ร้อยละ)

W_1 = น้ำหนักครูซิเบิลเปล่า (กรัม)

W_2 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังผ่านสารละลาย Acid detergent (กรัม)

W_3 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังผ่านกรดซัลฟุริก (กรัม)

W_4 = น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

S = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

6. การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Kjeldahl method)

นำตัวอย่าง1 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อย (Kjeldahl tube) ใส่ลูกแก้ว (glass bead) ลงในหลอด 5-6 เม็ด ใส่ catalyst (K_2SO_4) ลงในหลอดๆ ละ 1 เม็ด เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร แล้ววางลงในเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส ย่อยเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนสารละลายในหลอดใสและไม่มีควัน นำหลอดออกจากจานเครื่องย่อยวางในที่วางหลอด และทิ้งไว้ให้สารละลายอุ่นเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 75 มิลลิลิตร จัดอุปกรณ์กลั่น เปิดสวิตซ์ไฟและเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น เติม 4% boric acid ลงในขวดรูปชมพู่ ประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นวางลงในเครื่องกลั่นซึ่งพร้อมที่จะกลั่นโดยให้ส่วนปลายของเครื่องกลั่น เติม 40% NaOH ประมาณ 20 มิลลิลิตร ทำการกลั่นจนสารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว ได้สารละลายที่กลั่นปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ที่ได้มาไตเตรตกับกรด 0.1 N HCl จนได้จุดยุดติเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ ทำ blank ด้วยวิธีเดียวกันแต่ไม่ใส่สารละลายตัวอย่าง นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณไนโตรเจน (A.O.A.C., 1999)

7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

นำกากเนื้อเมล็ดในปาล์มที่ผ่านการหมักมาเติม 0.1% Tween 80 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมสับสเตรต นำไปเขย่าที่ 180 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็บรอบ 7000 g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายดีเอ็นเอสปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดทอลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็นทันที เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520

นาโนเมตร ในการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์เช่นเดียวกัน เปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง

8. การวิเคราะห์ Biomass

โดยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน เตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณกลูโคซามีน โดยนำเส้นใยไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ชั่งตัวอย่างอบแห้งที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 0.25 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร วางที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 30% และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Acetyl acetone reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที เติม 95% Ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Ehrlich reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณกลูโคซามีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีน ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 25-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Van de loo, 1976)

ภาคผนวก ข

เส้นกราฟมาตรฐานต่างๆ

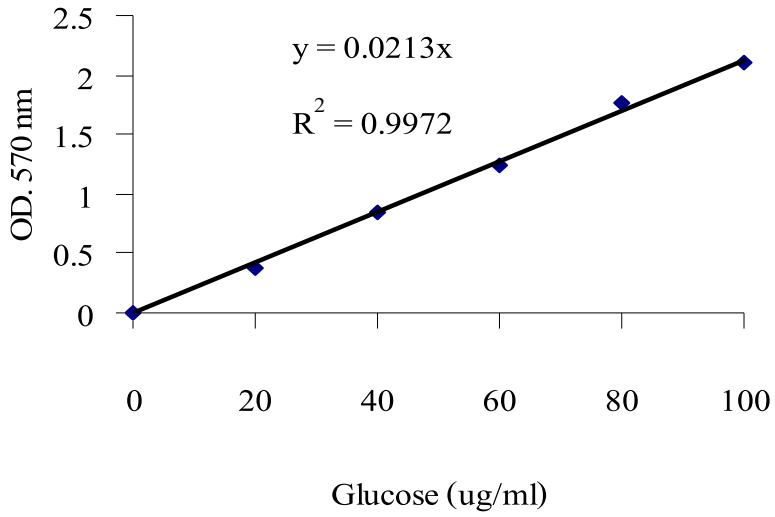


Figure 17 Standard curve for reducing sugar analyze

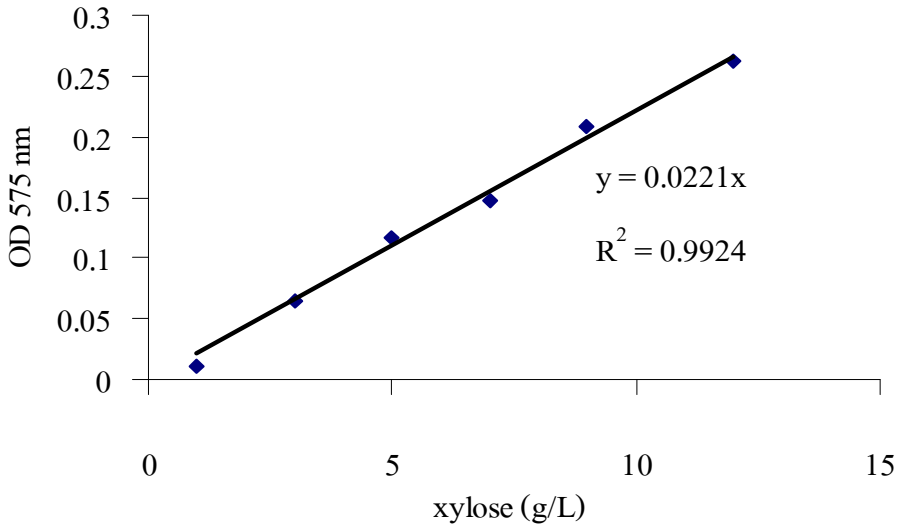


Figure 18 Standard curve for xylanase activity analyze

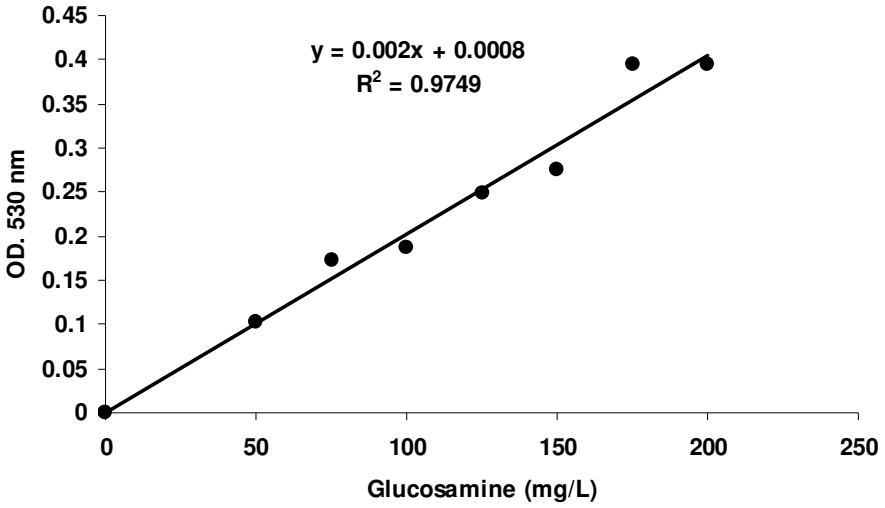


Figure 19 Standard curve for glucosamine analyze

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสุไหวบ๊ะ เร๊ะดุมหลี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5011020059

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการสร้างกำลังคนเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมระดับปริญญาโท (สกว.- สสว.)

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Rehdumlee, S. and Prasertsan, P. 2008. Screening and production of monascus pigment on palm kernel meal. Oral Presentation at The Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology TSB 2008: Biotechnology for Global Care". 14th - 17th October 2008. Taksila Hotel, Mahasarakhum, Thailand.