สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การหมักเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร่วมกับแบคทีเรียเซลลูโลส และการคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้

T058539

นางสาวกรุณา โชติฤทธิไกร
นางสาวจิราพร จันทรา
นางสาวสินิทธ์ วุฒิกรสมบัติกุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 58539
วัน เดือน ปี 25 ส.ค. 2549
b.....
i.....
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช

Fermentation of *Monascus purpureus* TISTR 3090 on Bacterial Cellulose-nata and the Color Stability of *Monascus* – nata Complex

Miss Karuna Chotirittikrai
Miss Jiraporn Chantra
Miss Sinith Wutigornsombatkul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang

Academic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การหมักเลี้ยงเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร่วมกับแบคทีเรียเซลลูโลสและการคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้
นักศึกษา	นางสาวกรุณา โชติฤทธิไกร
	นางสาวจิราพร จันทรา
	นางสาวสินิทธ์ วุฒิกรสมบัติกุล
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ	ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ	อ. ลินจง สุขลำภู	

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การหมักเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร่วมกับแบคทีเรียเซลลูโลสและการคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้

นักศึกษา นางสาวกรุณา โชติฤทธิไกร
นางสาวจิราพร จันทรา
นางสาวสินิทธ์ วุฒิกรสมบัติกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

ปีการศึกษา 2546

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล

บทคัดย่อ

วุ้นน้ำมะพร้าวผลิตได้จาก *Acetobacter xylinum* TISTR 967 นำมาหมักร่วมกับเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในอาหารเหลวที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5.5 และอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 30 องศาเซลเซียส จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีแดงและวัดค่าสีได้สูงสุด และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้างต้นมาทดสอบการคงตัวของสี พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้ค่อนข้างทนต่อการทดสอบโดยกรรมวิธีต่าง ๆ เช่น การล้างด้วยน้ำก๊อก การให้ความร้อน การแช่แข็ง การแช่ในสารละลายกรดและวางใต้รังสีอัลตราไวโอเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Fermentation of *Monascus purpureus* TISTR 3090 on Bacterial Cellulose-nata and the Color Stability of *Monascus* – nata Complex
Name	Miss Karuna Chotirittikrai
	Miss Jiraporn Chantra
	Miss Sinith Wutigornsombatkul
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2004
Special Project Advisor	Asst.Prof.Duangjai Ochaikul

ABSTRACT

Bacterial cellulose was produced by *Acetobacter xylinum* TISTR 967 . It was fermented with *Monascus purpureus* TISTR 3090 in culture medium on rotary shaker at 150 rpm at 30 °c for 12 days. Sucrose concentration of 5 % (50 g/l), ammonium nitrate concentration of 1.5 %, initial pH at 5.5 and temperature 30 °c gave the most appealing and bright red color. The color stability was carried out using a medium compose of 5 % sucrose, 1.5 % ammonium nitrate and initial pH at 5.5 for fermentation at 30 °c for 12 days. Products showed good resistance to washing, heat, freezing, acidification and irradiation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนและการช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการโครงงานพิเศษที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัยตลอดจนการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนองและ อ. ลินจง สุขลำภู ที่เป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้การเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทดลอง และช่วยอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ ทำให้โครงงานพิเศษสามารถสำเร็จได้

สุดท้ายนี้ต้องขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และรุ่นพี่ เพื่อนๆ ทุกท่าน และผู้มีส่วนร่วมในโครงงานพิเศษทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนและเป็นส่วนหนึ่งในความสำเร็จนี้

นางสาวกรุณา โชติฤทธิไกร
นางสาวจิราพร จันทรา
นางสาวสินิทธ์ วุฒิกรสมบัติกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
2.1 การจัดจำแนกและประวัติของเชื้อรา *M. purpureus*	3
2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Monascus* sp.	4
2.3 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp.	5
2.4 สารสีจากเชื้อรา *Monascus* sp.	11
2.5 คุณสมบัติของสารสีจากเชื้อรา *Monascus* sp.	22
2.6 การใช้ประโยชน์	23
2.7 ความปลอดภัยของสารสีจากเชื้อรา *Monascus* sp.	26
2.8 อันตรายของไนเตรทและไนไตรท์	26
2.9 การผลิตและแปรรูปวุ้นน้ำมะพร้าว	27
2.10 ส่วนประกอบและคุณค่าทางอาหารของวุ้นน้ำมะพร้าว	28
2.11 แบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส	39
2.12 กระบวนการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum*	30
2.13 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เซลลูโลสโดยแบคทีเรีย	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุอุปกรณ์	39
3.2 วิธีการทดลอง	40
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย	
4.1 ผลการศึกษาการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090	44
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์	47
4.3 ผลการศึกษาการคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้	55
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	58
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก ก	65
ภาคผนวก ข	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณแร่ธาตุและวิตามินในข้าวสายพันธุ์ขาวมะลิและข้าวแดงที่ผลิตได้	23
2. ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของวุ้นน้ำมะพร้าว	28
3. ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum*	34
4. ผลจากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	47
5. ผลจากการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	49
6. ผลจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	51
7. ผลจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน	53
8. ผลของสีที่เหลือในผลิตภัณฑ์โดยนำผลิตภัณฑ์ไปผ่านการทดสอบโดยกรรมวิธีต่าง ๆ	56
ข-1 แสดงค่า $c_{เฉลี่ย}$ ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ	66
ข–2 แสดงค่า $c_{เฉลี่ย}$ ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ	67
ข-3 แสดงค่า $c_{เฉลี่ย}$ ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ	68
ข-4 แสดงค่า $c_{เฉลี่ย}$ ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ	69
ข-5 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อนำไปล้างน้ำเป็นเวลา 8 ชั่วโมง	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข-6 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อนำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง	70
ข-7 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน	71
ข-8 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อแช่ในสารละลายกรดอะซิติกที่มีพีเอช 2.5 นาน 5 วัน	71
ข-9 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อแช่ในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีพีเอช 12.0 นาน 5 วัน	72
ข-10 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อวางใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. วัฏจักรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* spp.	5
2. การเกิดสาร 6-MSA และ orsellinic acid จาก acetyl และ malonyl unit	12
3. เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase กับ polyketide synthases	13
4. โครงสร้างเคมีของรงควัตถุที่แยกจาก *Monascus* spp.	15
5. โครงสร้างทางโมเลกุลของสารสีที่สกัดได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus* spp.	17
6. ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อรา *Monascus* spp.	18
7. การสังเคราะห์ Monascorbrin (I)	20
8. ลักษณะวุ้นน้ำมะพร้าวที่ผลิตได้จาก *A. xylinum* TISTR 967 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน	44
9. ลักษณะการเจริญของเชื้อ *M. purpureus* TISTR 3090 บนอาหาร MYS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน	45
10. ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้ภายหลังจากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในอาหารเหลว สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	46
11. ผลจากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	48
12. แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
13. ผลจากการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	50
14. แสดงการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	50
15. ผลจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	52
16 แสดงการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	52
17. ผลจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน	54
18. แสดงการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน	54
19. ผลของสีที่เหลือในผลิตภัณฑ์โดยนำผลิตภัณฑ์ไปผ่านการทดสอบโดยกรรมวิธีต่าง ๆ	57
20. แสดงสีที่เหลือในผลิตภัณฑ์โดยนำผลิตภัณฑ์ไปผ่านการทดสอบโดยกรรมวิธีต่าง ๆ	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

วุ้นน้ำมะพร้าวเป็นเซลลูโลสจากแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นสีขาวสร้างจากแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* spp. *xylinum* โดยหมักจากน้ำผลไม้ วุ้นน้ำมะพร้าวเป็นอาหารพื้นเมืองของชาวฟิลิปปินส์และเป็นที่นิยมกันแพร่หลายในประเทศแถบเอเชีย เช่น อินโดนีเซีย ญี่ปุ่นและไต้หวัน ซึ่งลักษณะของวุ้นน้ำมะพร้าวจะมีลักษณะนุ่มและมีสารเยื่อใยสูง การหมักวุ้นน้ำมะพร้าวได้มีการศึกษากันมาก อย่างไรก็ตามมีการศึกษากันเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับสีของวุ้นน้ำมะพร้าวซึ่งสีของวุ้นน้ำมะพร้าวสามารถปรับปรุงให้มีสีดีขึ้นได้และนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหาร

Monascus purpureus เป็นเชื้อราที่สร้างเส้นใยที่แท้จริงและสร้างสารสีแดงในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งบนข้าวนึ่ง ขนมปัง รำข้าวและธัญพืชต่าง ๆ โดยมีการใช้เป็นสารที่ให้สีและกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มกันมานานแล้ว (Johns and Stuart, 1991) สภาวะในการหมักที่มีผลต่อการผลิตสารสีจากเชื้อชนิดนี้ได้มีการศึกษากันมาก (Wong et al., 1981; Lin and Demain 1991) สารสีที่ได้จากเชื้อชนิดนี้จะมีความคงตัวและเหมาะสมที่จะนำมาเติมในผลิตภัณฑ์อาหาร (Fink-Gremmels et al., 1991; Fabre et al., 1993) เชื้อราชนิดนี้ยังประกอบด้วยสารที่ใช้เป็นยารักษาโรค เช่น monakolin K (mevinolin) ซึ่งสารนี้ใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพในประเทศแถบเอเชีย

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษเพื่อจะศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่จากการเลี้ยง *Monascus purpureus* ร่วมกับวุ้นน้ำมะพร้าวโดยใช้กระบวนการหมักร่วมกันและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักและการเกิดสีของ *Monascus purpureus* TISTR 3090 รวมทั้งความคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อกระบวนการหมักและการสร้างสารสีระหว่างวุ้นน้ำมะพร้าว กับ *Monascus purpureus* TISTR 3090

1.2.2 ศึกษาความคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้

1.2.3 นำผลการศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติชนิดใหม่ซึ่งเกิดจากการหมักวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* และเป็นการลดปัญหามลภาวะโดยนำน้ำมะพร้าวซึ่งเป็นของเหลือทิ้งนำมาใช้ประโยชน์ได้อีกทางหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 การจัดจำแนกและประวัติของเชื้อรา *Monascus* sp.

2.1.1 จัดจำแนกของเชื้อรา *Monascus* sp.

เชื้อราโมแนสคัสสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

Class	Ascomycetes
Subclass	Plectomycetidae
Order	Eurotiales
Genus	Monascus

2.1.2 ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส

M. purpureus เป็นเชื้อราที่ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1884 โดย Van Tieghem แบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยาและความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* และ *M. floridanas* และสามารถเจริญได้ดีในอาหารแข็งในรูปของข้าวแดง เพื่อใช้ปรุงแต่งสีในไวน์ เต้าหู้ยี้ ใช้ถนอมอาหารประเภทเนื้อ ใช้รักษาโรครวมทั้งใช้เป็นสีผสมในอาหาร ยาและเครื่องสำอาง ต่อมาได้ผลิตเป็นการค้าในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน และจีน ในปี 1973 ได้เริ่มมีการทดลองเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลว โดย Lin ได้แยกเชื้อราจากข้าวแดงจากประเทศต่างๆ ในแถบเอเชียใต้ และพบว่าเชื้อราเหล่านี้สร้างสารสีในอาหารเหลวได้ดีเช่นกัน

ต่อมาได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารสี โดยใช้วิธีการต่างๆ เช่น ใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) หรือใช้รังสีต่างๆ การใช้เทคนิคโปรโตรพลาสต์ฟิวชั่น การปรับปรุงกรรมวิธีในการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบครั้งคราว (batch culture) แบบป้อน (fed-batch culture) และการใช้วิธีการตรึงเซลล์

เชื้อราโมแนสคัสนอกจากจะสามารถสร้างสารสีได้แล้ว ยังสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด ในปี 1977 Wong และ Bau ได้รายงานเป็นครั้งแรกถึงการค้นพบสารต่อต้านแบคทีเรียจากเชื้อรา *M. purpureus* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร เช่น *Bacillus* sp. *Streptococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น สารนี้มีชื่อว่า monascidin A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังพบ การสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ เอทานอล สารโมนาโคลิน (monacolins) ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์ คอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และสารช่วยในการตกตะกอน (flocculant) อีกด้วย

2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อรา *M. purpureus* อยู่ใน Class Ascomycetes เส้นใยมีผนังกั้น (septate) และมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายและมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วง สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศคือสร้างสปอร์ และการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศโดยการสร้างโคนิเดีย (conidia) รูปร่างกลมหรือรูปไข่อาจมี 1 หรือ หลายโคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่อยู่ที่ปลายเส้นใย โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจมีสีแดงหรือน้ำตาลอ่อน

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Monascus* sp. มีการสร้างเพอริทีเซียม (perithecium) หรือ คลิสโททีเซียม (cleistothecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้านชู (stalk) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใย ซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (homothallic) เริ่มจากเส้นใยเจริญและพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (antheridium) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ascogonium) ซึ่งเจริญอยู่ใต้เส้นใยแอนเทอริเดียม เส้นใยบริเวณส่วนบนของแอสโคโกเนียม จะพัฒนาไปเป็นไตรโคจีน (trichogyne) เชื่อมต่อกับแอนเทอริเดียม เพื่อให้นิวเคลียสผ่านเข้าไปผสมกับนิวเคลียสของแอสโคโกเนียม หลังจากผสมแล้วแอสโคโกเนียมมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากมีการสร้างผนังขึ้นมาล้อมรอบ 1-2 ชั้น ก่อนจะพัฒนาไปเป็นเพอริทีเซียม ภายในเพอริทีเซียมมีแอสโคสปอร์ (ascospores) มากมาย โดยแอสโคสปอร์จำนวน 2–8 รวมอยู่ภายในแอสคัส (ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อย แอสโคสปอร์งอกเป็นเส้นใยใหม่ขึ้น ระยะเวลาในการเกิดแอสโคสปอร์ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อด้วย การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสังเกตจากโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนของเชื้อรา *M. purpureus* ทำให้ทราบขั้นตอนอย่างละเอียดและพบว่าแอสโค- สปอร์ของเชื้อรา *M. purpureus* มีลักษณะเรียบ รูปร่างกลม หรือรี และยังมีการศึกษาการพัฒนาการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) ของเชื้อรา *Monascus* spp. ในอาหารเหลว โดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการสร้างโคนิเดียเจริญมาจากโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) โคนิเดียมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือเกิดติดต่อกันเป็นลูกโซ่ (Hawksworth and Pitt, 1983) โคนิเดียมักจะไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเกิดสีแดงได้บ้าง โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้น 0-1 ด้าน ถ้ามีขนาดยาวจะมีผนังกั้น 2-6 ด้าน เป็นสายการงอกขดเป็นเกลียว และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออายุแก่ขึ้น การงอกของโคนิเดียจะมากน้อยขึ้นกับอายุของสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ความเป็นกรด ด่าง แสง อุณหภูมิและสารอาหารดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 วัฏจักรชีวิตของเชื้อรา *Monascus* spp.
ที่มา : Iizuka and Lin (1981)

2.3 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส

2.3.1 การเลี้ยงเชื้อราในสภาพหมักแห้ง (solid cultivation)

การเลี้ยงเชื้อราในสภาพหมักแห้งนั้นเชื้อราที่เจริญสามารถสร้างสารสีออกมานอกเซลล์ได้มาก ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี จึงสร้างสารสีออกมานอกเซลล์ได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

Chiu และ Chan (1992) ศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* บนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรคือ ชานอ้อย โดยเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อบนขวดหมุน (roller bottle) ความเร็ว 2 รอบต่อนาที กับตั้งทิ้งไว้เฉยๆ พบว่าการใช้ระบบขวดหมุน เชื้อราจะสร้างสารสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แดงและสารสีเหลืองได้ดีกว่าตั้งทิ้งไว้เฉยๆ ประมาณ 2-3 เท่า แต่ก็ยังให้สารสีน้อยกว่าในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยกลูโคส เปปโตน และยีสต์สกัด นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมน้ำมันข้าวโพด ปริมาตร ร้อยละ 6.0 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว ทำให้การสร้างสารสีออกนอกเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า แต่การเจริญลดลง

Johns และ Stuart (1991) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* จะสร้างสารสีได้น้อยเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 38.0-39.0 แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงขึ้นเป็นร้อยละ 56.0 และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 การสร้างสารสีจะเพิ่มขึ้น

ดังนั้นการผลิตข้าวแดงให้มีคุณภาพดีขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญหลายประการ ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์เชื้อรา และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ความชื้นเริ่มต้นของข้าวสำคัญมากต่อการเจริญ ชนิด และปริมาณของสารสีที่เชื้อสร้างขึ้น ความชื้นเริ่มต้นที่ต่ำเกินไปทำให้เชื้อราเจริญและสร้างสารสีลดลง แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงเกินไป ทำให้การเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเป็นไปได้ดี จึงมีการสะสมกลูโคสมากขึ้น และนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลแทนการผลิตสารสี นั่นคือปริมาณกลูโคสที่สูงเกินไปจะยับยั้งการสังเคราะห์สารสีนั่นเอง

2.3.1.1ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง

2.3.1.1.1 สายพันธุ์ของเชื้อรา

โดยทั่วไปแล้วเชื้อราโมแนสคัส เมื่อเจริญบนเมล็ดข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั้งผิวหน้าและแทรกทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าวนั้นจะมีการสร้างสารสีได้ภายหลังจากการบ่มไปได้นาน 3 วัน สารสีเหล่านี้เมื่อนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าสารสีแดงทั่วไปจะมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด 2 จุดคือที่ 420 และ 500 นาโนเมตร บางสายพันธุ์ที่ให้สีข้าวแดงเป็นสีแดงสวย หรือแดงชมพูแก่จะมีความโด่งที่จุด 500 นาโนเมตร เช่นที่พบในสายพันธุ์ของ *M. purpureus* หรือ *M. anka* แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงคล้ำ

2.3.1.1.2 พันธุ์ข้าว

Palo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ทีผลต่อการสร้างสารสีของ *M. purpureus* และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดง คือ ความชื้นไม่เกินร้อยละ 50 พีเอชระหว่าง 3.0–7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และข้าวที่ใช้ไม่ควรเป็นสายพันธุ์ที่มียางเหนียวโดยเฉพาะข้าวเหนียว หรือข้าวเมล็ดพันธุ์สั้นจาปอนนิก้าไม่เหมาะสมในการทำข้าวแดง

2.3.1.1.3 การให้อากาศ

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต Hesseltine (1965) พบว่าการเขย่าหรือให้อากาศช่วยให้การสร้างสารสีได้ดีและเร็วขึ้น Han และ Mudgett (1992) ได้ศึกษาเพิ่มทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทราบว่า ก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นสูงทำให้การสร้างสารสีและการเจริญลดลง และไม่สามารถสร้างสารสีและเจริญได้เมื่อมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตั้งแต่ 1.0 บรรยากาศ ก๊าซออกซิเจนตั้งแต่ 0.2 บรรยากาศ ทำให้การสร้างสารสีและการเจริญเพิ่มขึ้นและเพิ่มสูงสุดเมื่อมีก๊าซออกซิเจนมากกว่า 2.1 บรรยากาศ ความดันออกซิเจนต่อความดันคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.50 ต่อ 0.02 บรรยากาศ จะมีผลดีต่อการสร้างสารสีแดงมากที่สุด สภาพที่มีก๊าซออกซิเจนคงที่ที่ 0.50 บรรยากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำๆ เป็นสภาพที่ให้การผลิตสารสีสูงสุด

2.3.1.1.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อการเจริญเติบโต อุณหภูมิสูงเกินไปทำให้เชื้อเจริญได้ช้า สร้างสารสีในข้าวแดงได้ไม่ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีจะอยู่ระหว่าง 27–30 องศาเซลเซียส

2.3.1.1.5 ความชื้น

การผลิตข้าวแดงสามารถผลิตได้ที่ความชื้นเริ่มต้นต่ำ ต้องมีการพ่นน้ำเป็นครั้งคราวไปบนเมล็ดข้าวเพื่อควบคุมความชื้นซึ่งจะช่วยให้เชื้อสร้างสารสีได้ดีขึ้น การผลิตในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องมีการเติมน้ำระหว่างการบ่ม แต่ความชื้นที่เหมาะสมในการสร้างสารสีขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของข้าวด้วยเช่นกัน

2.3.1.1.6 พีเอช

Carels และ Shepherd (1975) พบว่าพีเอชต่ำมีการสะสมสีส้มเนื่องจากสีส้มโมนาสโครูรินและรูโบพังทาทินที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้นไม่สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนได้แต่พีเอชสูงๆ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้จึงให้สีแดงออกมา จากรายงานของ John และ Stuart (1991) ได้ศึกษาปรับ พีเอชของน้ำให้ได้ 3.0 4.0 6.0 และ 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมล ก่อนนำไปแช่ข้าวเป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าพีเอช 6 เป็นพีเอชที่เหมาะสมในการสร้างสารสีของ เชื้อรา *M. purpureus* FRR 2190

วรรณภา ทาบโลกา (2529) ได้ทำการศึกษาพบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* spp. KB 11304 KB 21035 และ KB 20322 ที่พีเอชเริ่มต้น 7.0 มีการสร้างสารสีสูงสุด และถ้าพีเอชสุดท้ายค่อนไปทางด่างจะให้สีแดง แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อ KB 21035 ในสภาพที่เป็นกรดพบการสร้างสีเหลืองดีที่สุด ดังนั้นจึงพบว่าพีเอชที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อราในสภาพหมักเปียก (submerged cultivation)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสารสี ในการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส

2.3.2.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.2.1.1 แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน

Lilly และ Bernett (1962) รายงานว่า ฟรุคโตส กลูโคส และน้ำตาลอินเวอร์ท จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดี สำหรับการเจริญเติบโตของ *M. purpureus* และเป็นการเพิ่มอัตราการเจริญถ้าหากว่ามีซูโครสกับฟรุคโตสหรือกลูโคสในอาหาร จะทำให้อัตราการเจริญสูงขึ้นถ้าใช้น้ำตาลสองชนิด และดีกว่าน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ เพียงชนิดเดียว

Mchanและ Johnson (1970) ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลวที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานพบว่ากลูโคสเข้มข้นร้อยละ 5 ให้การเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้น 6.25 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Lin (1973) คัดเลือกเชื้อราที่เจริญได้ดีในอาหารเหลวจากโคจิที่ใช้ทำเหล้าเกาเหลียง พบว่า *Monascus* F-2 สามารถใช้คาร์บอนเป็นแหล่งอาหารได้หลายชนิด และอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสี คือ แป้ง น้ำตาลกาแลคโตส และมอลโตสตามลำดับ

Broder และ Koehler (1980) พบว่าทั้งเชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 สร้างสารสีแดงได้ดีที่สุด ในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลมอลโตสเข้มข้นร้อยละ 10.0 โดยสร้างสารสีแดงดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 634 นาโนเมตร รองลงมาเป็นน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้นร้อยละ 15.0 และ 8.0 เชื้อราสร้างสารสีแดงดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 627 และ 625 นาโนเมตร ตามลำดับ

Wong และ Koehler (1981) ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคส และแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมไนเตรทต่อการเจริญ และการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* N11S พบว่าเมื่อใช้กลูโคส 40.0 กรัมต่อลิตร จะใช้แอมโมเนียมไนเตรทเพียง 0.5 กรัมต่อลิตร สำหรับการเจริญและการสร้างสารสี เมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงขึ้น ความต้องการแหล่งไนโตรเจนก็จะมากขึ้นด้วย ในปีเดียวกันเขาพบว่าถ้ามีปริมาณคาร์บอนในอาหารเพิ่มขึ้น ความต้องการไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้นโดยเชื้อ *M. purpureus* ที่ใช้ทดลองมีอัตราการเจริญ เติบโตสูงสุดเมื่อใช้กลูโคส 200 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรท 5–10 กรัมต่อลิตร และพบว่าถ้าขาดคาร์บอนในอาหารจะไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ nitrate reductase และ glutamate dehydrogenase ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมไนโตรเจนและวิถีเมแทบอลิซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lin และ Demin (1991) พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB6042 ในอาหารเหลวชนิด defined medium ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นเด็กซ์ตริน จะให้การเจริญดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ แป้ง กลูโคส มอลโตส และฟรุคโตส แต่ไม่พบการเจริญในกาแลคโตส แลคโตส และซูโครส

2.3.2.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญ การสร้างสารสี และชนิดของสารสีที่เชื้อราสร้างขึ้น Lin (1973) พบว่า *Monascus* sp. F-2 ใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิดในการสร้างสารสีแดง ได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนเปปโตนและยีสต์สกัดไม่เหมาะที่จะเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับสร้างสารสีแดง เช่นเดียวกับการทดลองของ Su และ Huang (1980) ที่พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงของเชื้อรา *M. anka* V – 204 คือ โมโนโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ส่วน Broder และ Koechler (1980) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* NRRL2897 สร้างสารสีแดงดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 611 นาโนเมตร ได้ดีที่สุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 1.6 เป็นแหล่งไนโตรเจน

Carels และ Shepherd (1977) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารสี และสปอร์ของเชื้อรา *Monascus* sp. พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยีสต์สกัดหรือไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อราจะผลิตสีแดงที่พีเอช 6.5 เนื่องจากอาหารนี้มีกรดอะมิโนมากพอภายหลังจากที่เชื้อเจริญทำให้พีเอชสูงขึ้น สารสีสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระ และกรดอะมิโนหรือ NH-group ภายในเส้นใยเปลี่ยนเป็นพวกอนุพันธุ์เอมีนได้ และไม่พบสีส้มหรือสีเหลือง ส่วนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรท จะได้สารสีสีแดงและส้มเนื่องจากอาหารนี้ไม่มีกรดอะมิโนอิสระถึงแม้พีเอชจะสูงขึ้น สารสีจะสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนภายในเส้นใยได้เท่านั้น จึงทำให้สารสีสีส้มยังเหลืออยู่ ขณะที่อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไนเตรท จะทำให้พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 2.5 เป็นผลทำให้สารสีที่ผลิตได้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ NH-group ภายในเส้นใยได้ ผลคือ จะมีการสะสมของ monascorubrin และ rubropunctatin ได้เป็นสีส้ม การเจริญของบางสายพันธุ์ในอาหารนี้ได้สารสีสีเหลืองเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ monascorubrin หรือ rubropunctatin กับ hydrogen peroxide ได้เป็น monascin หรือ ankaflavin ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 5.0 – 10.0 กรัมต่อลิตรของแอมโมเนียมไนเตรท จะให้อัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อเซลล์และการสร้างสารสี เนื่องจากแอมโมเนียมในอาหารจะไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รีดิวซ์การทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเตรส (nitrate reductase) ดังนั้นจะเป็นการลดความสามารถในการดูดซึมไนเตรท แต่พบว่าแอมโมเนียมไอออนสามารถแพร่กระจายได้เร็วมากกว่าภายในเซลล์และสังเคราะห์ได้เร็ว ดังนั้นแสดงว่าจะไม่มีผลยับยั้งการเจริญ ถ้าใช้ในปริมาณที่มีความเข้มข้นต่ำๆ

Wong และคณะ (1981) พบว่าไนเตรทกระตุ้นการสร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ขณะที่แอมโมเนียมจะยับยั้งการสร้างสปอร์ ในปีเดียวกัน Wong ได้ทดลองและพบว่ากลูโคสที่ความเข้มข้นระหว่าง 40–200 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมไนเตรท ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตรจะทำให้ *M. purpureus* ผลิตสีแดงได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทสูงมากกว่า 50 กรัมต่อลิตรจะยับยั้งการเจริญและการผลิตสารสี

Lin และ Demain (1991) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB6042 เจริญได้ดีในแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรทและโมโนโซเดียมกลูตาเมท ขณะที่สร้างสารสีได้ดีในโมโนโซเดียม-กลูตาเมทความเข้มข้นร้อยละ 1.26 เมื่อใช้ร่วมกับน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นร้อยละ 10.0

Yongsmith และคณะ (1993) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ยีสต์สกัด เปปโตนและมอลท์เอกซ์แทรค ต่อการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 พบว่าเปปโตนกระตุ้นการสร้างสารสีโดยตรง แต่ยีสต์สกัดส่งเสริมการเจริญมากกว่าการสร้างสารสี ส่วนมอลท์เอกซ์แทรคมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารสีน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้ เปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ร่วมกับกรดกลูตามิค ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สร้างสารสีเหลืองได้สูงถึง 86.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร

2.3.2.1.3 สารจำเป็นต่อการเจริญ (growth factor)

Johnson และ Mchan (1975) พบว่าการเติมวิตามิน 5 ชนิดคือ ไพริดิกซีน ไบโอติน ไธอะมีน ไนอะมีน และไรโบฟลาวิน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่มีผลต่อการเจริญ ส่วนกรดอะมิโนและเกลือแร่ช่วยให้การเจริญเพิ่มขึ้น แต่ยังน้อยกว่าในกรณีที่เติมเปปโตน หรือยีสต์สกัด ในจำนวนเกลือแร่ 5 ชนิด คือ แคลเซียม โมลิบดินัม ทองแดง แมงกานีส และสังกะสี พบว่าสังกะสี 800 ไมโครกรัมต่อลิตร ให้การเจริญดีที่สุดและการเจริญดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับกรดอะมิโนทริฟโตเฟน ลิวซีน กรดแอสปาติก ไทโรซีน ไกลซีน และฮีสติดีน เนื่องจากสังกะสีช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนโดยไปลดค่า economic coefficient (น้ำตาลที่ถูกใช้ไปต่อน้ำหนักแห้ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.1.4 อุณหภูมิและพีเอช

Lin (1973) ศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารที่อุณหภูมิ 27-40 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นตั้งแต่ 2-10 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีคือ 32 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงมากกว่า 37 องศาเซลเซียส การสร้างสารสีจะลดลงส่วนพีเอชที่เหมาะสมคือ 6.0 รองลงมาคือ 5.0 และ 7.0 ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงพีเอชในขณะเลี้ยงเชื้อรา ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งไนโตรเจน ถ้าพีเอชเป็นกลางจะสร้างสารสีแดง แต่ถ้าพีเอชเป็นกรดจะเปลี่ยนเป็นสร้างสารสีส้ม นอกจากนี้ที่พีเอชเป็นกรดยังทำให้การสร้างโคนิเดียลดลง แต่การสร้างสารสีจะสูงขึ้นเนื่องจากที่พีเอชต่ำ กลูโคสและฟอสเฟตถูกใช้ไปในการสร้างเซลล์เป็นจำนวนมาก จึงเหลือเพียงเล็กน้อยสำหรับสร้างโคนิเดีย

Su และ Huang (1980) พบว่าเชื้อรา *M. anka* V- 204 สร้างสารสีดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิและพีเอชมีผลน้อยมากต่อการเจริญของคลิสโททีเซียมและโคนิเดีย คือ 28–30 และ 35–40 องศาเซลเซียสตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะยับยั้งการสร้างสปอร์อย่างสมบูรณ์

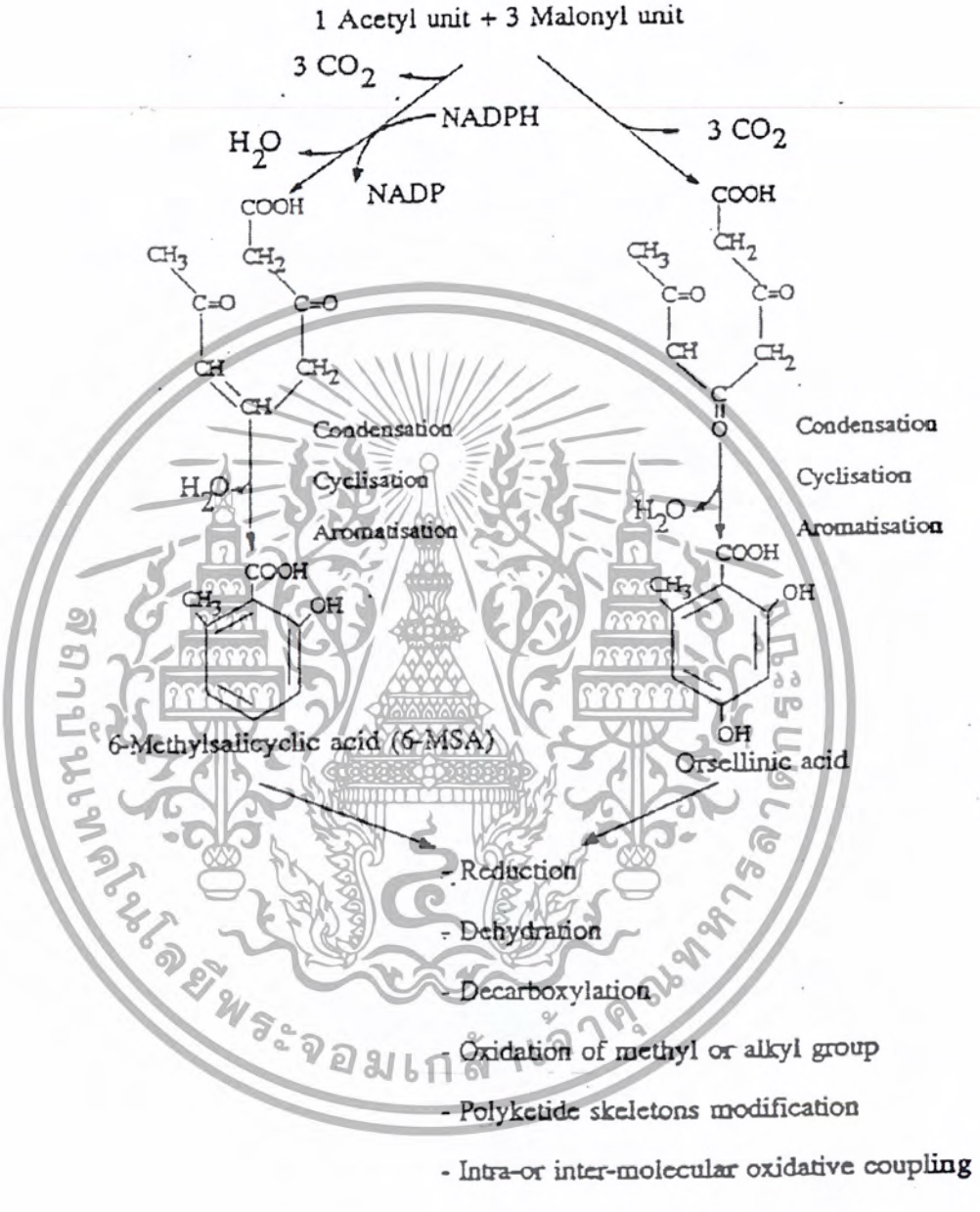
Yongsmith และคณะ (1993) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 สร้างสารสีเหลืองดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร ได้ดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส รองลงมาคืออุณหภูมิ 31 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับโดยอาหารมีพีเอชเริ่มต้นเป็น 2.5 ส่วนอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 40 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.0 ตามลำดับ

2.4 สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส

2.4.1 สารสีจากเชื้อโมแนสคัส

เป็นสารประเภท โพลีคีไทด์ (polyketide) ที่เกิดจากการรวมตัวของ acetyl unit 1 หน่วย กับ malonyl unit 3 หน่วยขึ้นไปได้เป็นไพร์เมอร์ (primer) และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา วิถีการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์เหมือนกับกรดไขมันแต่จะไม่พบสารตัวกลางที่เกิดจากปฏิกิริยาการรีดักชัน ในการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์นั้นสายของโพลีคีไทด์จะยาวขึ้นตามจำนวนของคาร์บอน 2 หน่วยที่มาจาก malonyl unit ที่ถูกเติมเข้าไปในสายไพร์เมอร์เกิดเป็น triketide tetraketide pentaketide และ polyketides ตามลำดับ ต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยา cyclisation และ aromatisation ได้เป็นสาร 6–methylsalicylic acid หรือ orsellinic acid ซึ่งเป็นสาร tatraketide เริ่มต้นที่จะนำไปสู่การสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์อื่นๆ ต่อไปดังรูปที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 การเกิดสาร 6 – MSA และ orsellinic acid จาก acetyl และ malonyl unit

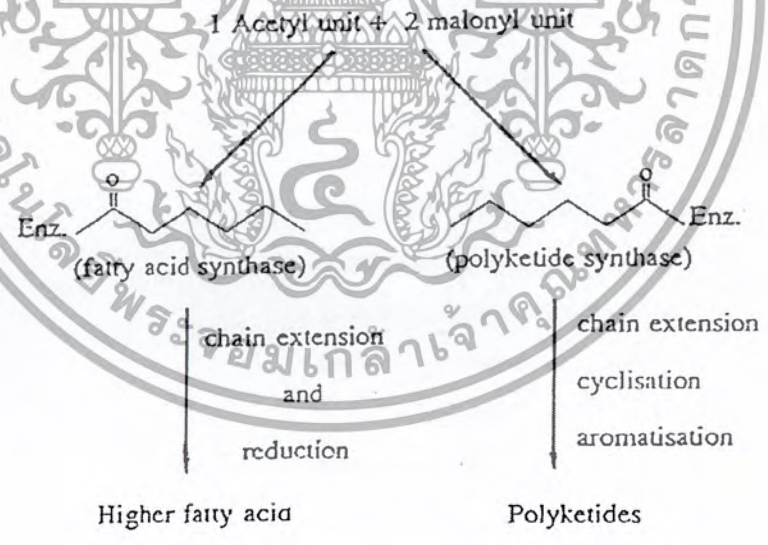
ที่มา : นิสา (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อได้สารเริ่มต้นแล้วปฏิกิริยาที่จะเกิดขึ้นต่อไปขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์นั้นๆ เช่น อาจมีการเติม หรือดึงออกซิเจนออกจากโครงสร้างของสาร เกิดปฏิกิริยา decarboxylation มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรูปหรือยักย้ายหมู่ต่างๆ ภายในโมเลกุลของสารเกิด intra- หรือ inter-molecular oxidative coupling หรือให้เกิดพันธะระหว่าง C-C หรือ C=O เป็นต้น

สารสีที่สกัดได้จาก *Monascus* sp. เช่น rubropunctation จาก *M. rubropunctatus* monascorbrin จาก *M. purpureus* และ monascin (monascoflavin) จาก *Monascus* sp. เป็นสารประเภทโพลีคีไทด์ซึ่งเป็นแมทาบอไลท์ทุติยภูมิ โดยผลิตขึ้นมาคล้ายกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน

เชื่อว่าเอนไซม์โพลีคีไทด์ เป็นเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์สารโพลีคีไทด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ fatty acid synthase อย่างใกล้ชิด จากการจำลองตัวเองที่ผิดพลาดของยีนทำให้สูญเสียขั้นตอนรีดักชันไป ทำให้เอนไซม์ polyketide synthase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โพลีคีไทด์แทนที่จะเป็น fatty acid synthase ซึ่งมีหน้าที่สังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองแสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase กับ polyketide synthases
ที่มา : นิสา (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์โพลีคีไทด์ถูกยับยั้งด้วยแสงสีน้ำเงิน โดยพบว่าแสงสีน้ำเงินจะกระตุ้นให้เชื้อราสร้างโคนิเดีย เบต้าแคโรทีนและกรดไขมัน แทนสารโพลีคีไทด์ โดยไปมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์หรือควบคุมวิถีการสร้างโพลีคีไทด์ การได้รับแสงสีน้ำเงินเวลาเพียง 2 นาที ก็สามารถยับยั้งการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์ได้แล้ว

2.4.2 สารสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อรา *Monascus* spp. ผลิตสารสีชนิดต่างๆ ดังนี้

1. โมนาสโคฟลาวิน (monascoflavin) แยกได้เป็นครั้งแรกพร้อมกับสารสีโมนาสโครูบรินจากเชื้อรา *M. purpureus* Wentii เป็นสารสีในกลุ่มสีเหลือง สูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{26}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 358 ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปคโตรสโคปีดังนี้ λ^{MeOH}_{max} 225 228 385 mμ มีจุดหลอมเหลว 143-155 องศาเซลเซียส สารสีโมนาสโคฟลาวินเป็นตัวเดียวกันกับสารสีโมนาสซิน (monascin) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *M. rubiginousus* Sato อยู่ในกลุ่มสีเหลือง

2. อังคักฟลาวิน (ankaflavin) เป็นสารสีในกลุ่มสีเหลือง สูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{30}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 386 มีจุดหลอมเหลว 120-121 องศาเซลเซียส ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปคโตรสโคปีดังนี้ λ^{dioxan}_{max} 212 228 382 mμ สารสีอังคักฟลาวินมีสูตรโครงสร้างสัมพันธ์กับสารสีโมนาสซินเช่นเดียวกับสารสีรูโบรพังทาทินที่มีสูตรสัมพันธ์กับสารสีโมนาสโครูบริน

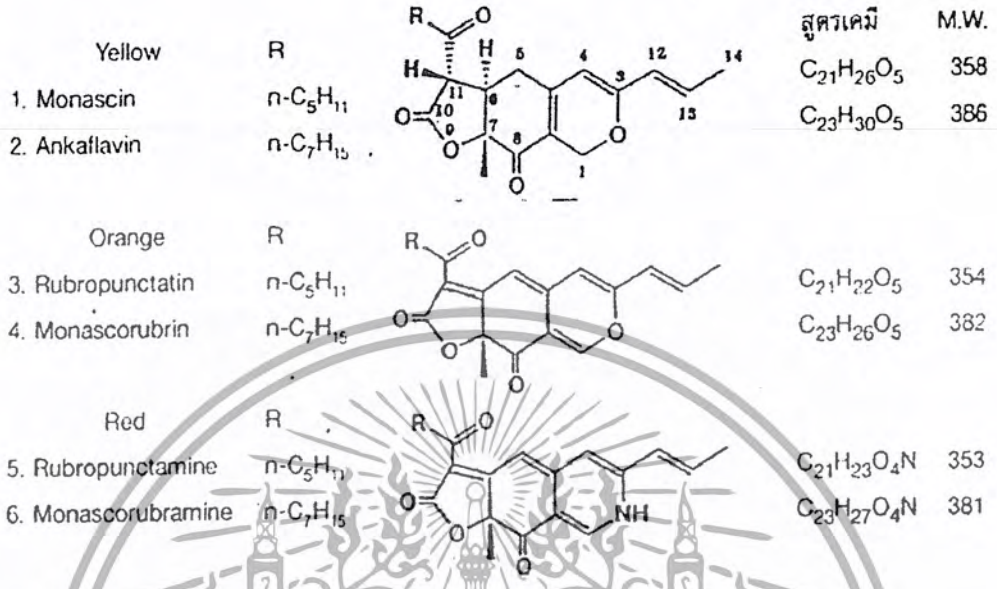
3. รูโบรพังทาทิน (robropunctatin) เป็นสารสีในกลุ่มสีส้ม สูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{22}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 354 สารสีรูโบรพังทาทินสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้สารรูโบรพังทามีนซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาต่อได้อีกกับสังกะสีและกรดแอซิติกได้สารอะโปรู-โบรพังทามีน (aporubropunctamine) สารนี้มีผลึกรูปเข็มสีแดง มีจุดหลอมเหลว 156-157 องศาเซลเซียส

4. โมนาสโครูบิน (monascorubrin) เป็นสารสีในกลุ่มสีส้ม สูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{26}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 382 ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปคโตรสโคปีดังนี้ λ^{BtOH}_{max} 253 302 352 mμ มีจุดหลอมเหลว 134-136 องศาเซลเซียส

5. รูโบรพังทามีน (robropunctamine) เป็นสารสีในกลุ่มสีแดง สูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{23}O_4N$ และน้ำหนักโมเลกุล 353 สารรูโบรพังทามีนเกิดจากสารรูโบรพังทาทินทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียม

6. โมนาสโครูบรามีน (monascorubramine) เป็นสารสีในกลุ่มสีแดง สูตรโมเลกุล คือ $C_{23}H_{27}O_4N$ และน้ำหนักโมเลกุล 381 มีจุดหลอมเหลว 207-208 องศาเซลเซียส สารโมนาสโครูบรามีนเกิดจากสารโมนาสโครูบรินทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียม ดังรูปที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 โครงสร้างเคมีของรงควัตถุที่แยกจาก *Monascus* spp.
ที่มา : บุษบา ยงสมิทธิ์ (2542)

โดยสารสีเหล่านี้เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เชื้อราสร้างขึ้นพร้อมๆกับการเจริญหรือสร้างหลังจากการเจริญหยุดลงแล้ว มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม Azaphiloner เช่น sclerotiorin และ rotiorin

Haws และคณะ (1959) พบว่าเมื่อนำเส้นใยที่ได้จากการเจริญของเชื้อรา *M. purpureus Sato* ในอาหารเหลว czapek dox อายุ 14-20 วัน มาสกัดด้วย light petroleum และอีเทอร์จะได้สารสีส้มของ rubropunctatin ($C_{21}H_{22}O_5$) และสารสีเหลืองของ monascin ($C_{21}H_{26}O_5$) สารสีส้ม rubropunctatin ละลายในสารละลายอินทรีย์เกือบทุกชนิด แต่ไม่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ที่อุณหภูมิต่ำและเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายแอมโมเนียจะได้สารสีม่วงของ rubropunctatamine ที่ละลายในแอลกอฮอล์ได้ดีที่สภาวะเป็นด่างแต่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ที่สภาวะเป็นกรดและไม่ละลายในน้ำ เมื่อนำมาทำให้เกิดการรีดักชันด้วยผงสังกะสีจะได้สารไม่มีสี

สารสี rubropunctatin พบครั้งแรกใน *M. rubropunctatus* โดย Sato ซึ่งแยกมาจาก *M. purpureus* Carels (1977) พบว่าถ้ามีแอมโมเนียมไนเตรทในปริมาณ 5-10 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อสร้างสารสีค่อนข้างแดง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนมากขึ้นสารสีแดงจะเพิ่มขึ้น ยกเว้นการเพิ่มในปริมาณมากๆ ที่จะไปยับยั้งการเจริญและการสร้างสารสี เนื่องจากสีแดงส่วนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มาจากอาหารที่มีกลูโคสอยู่น้อย เนื่องจากการเจริญของเส้นใยที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูง อาหารจะมีความเป็นกรดมากซึ่งจะไม่ผลิตสารสีแดงออกมา ดังนั้นที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูงๆ เส้นใยอาจจะต้องการสารประกอบไนโตรเจนเพื่อเป็นองค์ประกอบโครงสร้างของเส้นใยในการเจริญเติบโต

Carels และ Shepherd (1977) พบว่าการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งไนโตรเจน และพีเอชเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อ เมื่อแหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์เอกซ์แทรคหรือไนเตรทที่พีเอช 6.5 จะสร้างสารสีแดง และจะสร้างสารสีส้มในอาหารที่มีแอมโมเนียมหรือแอมโมเนียมไนเตรทที่พีเอช 2.5 โดยปรับให้มีพีเอชในอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 แต่พีเอชสุดท้ายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารนั้นๆ พบว่าเชื้อราจะสร้างสารสีแดง ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีน (NH–group) ของกรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในเซลล์กับสารสีส้ม monascorubrin หรือrubropunctatin ที่เชื้อราสังเคราะห์ขึ้น ปฏิกิริยานี้ไม่เกิดขึ้นที่พีเอชของการเลี้ยงเชื้อเป็นกรด จึงพบเฉพาะสารสีส้มที่เชื้อราสังเคราะห์ขึ้นเท่านั้น แต่ถ้าพีเอชสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 6 สารสีส้มจะเปลี่ยนเป็นอนุพันธุ์เอมีนของสารสีแดง โดยทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียในน้ำพบว่าถ้ามีความเข้มข้นแอมโมเนียมไนเตรท 5–10 กรัมต่อลิตร อาจจะมีแอมโมเนียมอิออนอิสระมากกว่าหรือมีอะมิโนกลุ่มอิสระภายในหรือภายนอกเซลล์มากกว่า ซึ่งสามารถที่จะไปทำปฏิกิริยากับสารสีส้มทำให้เปลี่ยนเป็นอนุพันธุ์เอมีนของสารสีแดง ส่วนสารสีเหลือง monascin และ ankaflavia นั้นสันนิษฐานว่าได้มาจากการถูกออกซิไดส์ของสารสีส้ม Fielding และคณะ (1961) รายงานว่าเชื้อราโมแนสคัสสังเคราะห์ได้ทั้งสารสีส้มและสีเหลือง เฉพาะสารสีแดงเท่านั้นที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี

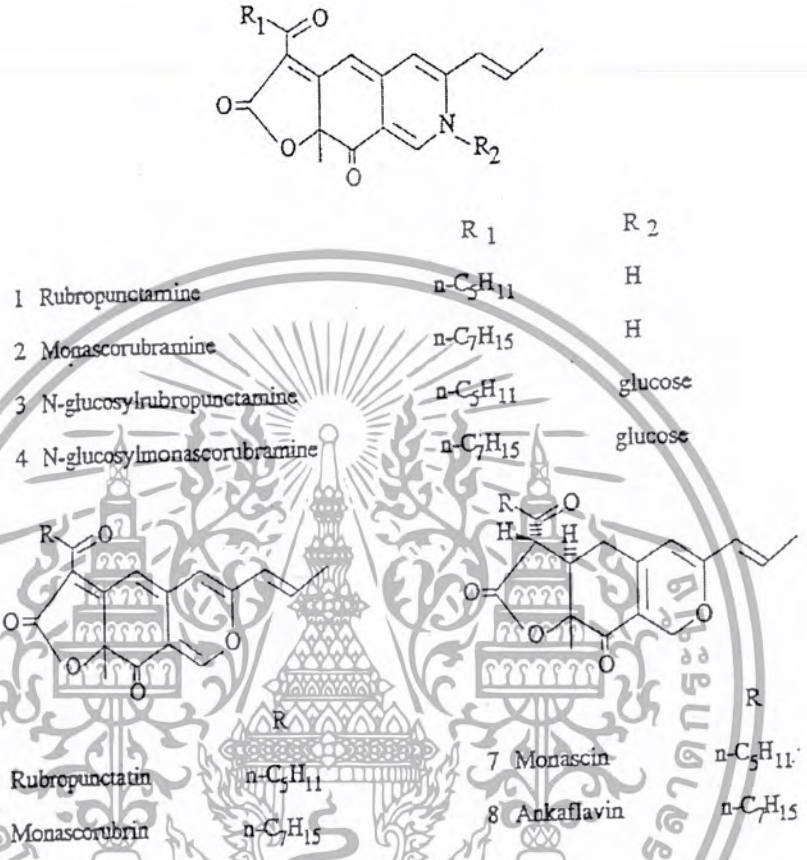
ข้อสันนิษฐาน ดังกล่าวต่างจากการทดลองของ Yongsmith และคณะ (1990) และสมชาย (2536) ที่พบว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายพันธุ์ KB20M10.2 สร้างสารสีเหลืองได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเป็นกลาง และมีหมู่เอมีนจากกรดอะมิโนเหลือเพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา ดังนั้นการสร้างสารสีเหลืองจึงน่าจะมีปัจจัยอื่นๆ เกี่ยวข้องนอกเหนือจากไนโตรเจนและพีเอชเริ่มต้น

Manchand และคณะ (1973) พบว่าเชื้อโมแนสคัสแต่ละสายพันธุ์ให้สารสีแตกต่างกันออกไป *M. rubropunctatus* Sato สร้างสาร rubropunctatin และ monascin *M. purpureus* สร้างสาร monascorubrin และ monascin ส่วน *M .rubriginosus* สร้างเฉพาะสาร monascin เท่านั้น และพบการสร้างสารสีเหลืองตัวใหม่จากเชื้อรา *M. anka* มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ monascin มีชื่อว่า ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$) ต่อมาในปี 1981 Sweeny และคณะได้ใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ สกัดสารสีออกจากข้าวแดงซึ่งเกิดจากการเจริญของเชื้อรา *M. anka* พบสารสี 3 กลุ่ม คือ สารสีแดงประกอบด้วย rubropunctamine และ monascorubramine สารสีส้มประกอบด้วย rubropunctatin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

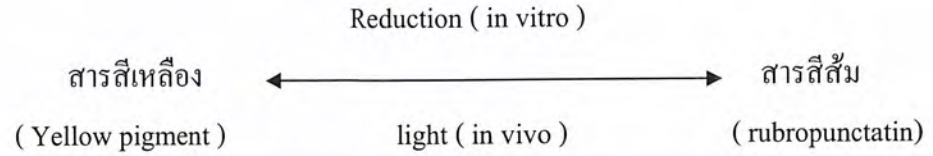
และ monascorubrin และสารสีเหลืองประกอบด้วย monascin และ ankaflavin โครงสร้างโมเลกุลของสารสีทั้ง 3 กลุ่ม แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 โครงสร้างทางโมเลกุลของสารสีที่สกัดได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp
ที่มา : Sweeny และคณะ (1981)

Wong และ Bau (1978) ศึกษาผลของแสงต่อการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัสพบว่าแสงอุลตราไวโอเลต และสารบางอย่างที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. กระตุ้นให้เชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้น้อย หรือไม่สร้างสารสีเลย (albino mutant) สร้างสารสีได้ดีขึ้น ในขณะเดียวกันก็ยับยั้งการสร้างสีในสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้สูง แสงสีขาว แสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงกระตุ้นการสร้างสารสีเหลืองแต่ไม่มีผลต่อสารสีแดง ทั้งนี้เนื่องจากสารสีเหลืองทำหน้าที่เป็นตัวรับแสง (photoreceptor) ซึ่งอาจเป็นสารเริ่มต้นหรือสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์สารสีก็เป็นได้ สารสีเหลืองนี้สามารถถูกออกซิไดซ์ไปเป็นสารสีส้มคือ rubropunctatin ได้ในหลอดทดลอง และปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดย้อนกลับได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง ดังแสดงดังรูปที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
58539



รูปที่ 6 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อรา *Monascus* sp.
ที่มา : Wong และ Bau (1978)

2.4.3 การปล่อยสารสีออกจากเส้นใยของเชื้อราโมแนสคัส

Su และ Huang (1980) กล่าวว่าสารสีที่เชื้อราโมแนสคัสสร้างขึ้นจะมีลักษณะเป็น granular fluid ซึ่งจะถูกขับออกมาตามช่องหรือรอยแตกของผนังเส้นใยในบางครั้งเมื่อขับออกมาแล้วสารสียังคงติดอยู่กับปลายเส้นใย และสะสมจนมีจำนวนมากก่อนหลุดจากเส้นใย สารสีบางส่วนสะสมอยู่ภายในเส้นใยด้วย

Lin และLizuka (1982) ทดลองเลี้ยงเชื้อรา *M. kaoliang* R-10847 บนอาหารแข็ง Mantou meal เพื่อศึกษาการสร้างสารสีนอกเซลล์ พบว่าเชื้อราจะเริ่มต้นสร้างสารสีและปล่อยออกมาในวันที่ 2 ของการเจริญพร้อมกับสารสีที่มีลักษณะหนืดชนิดหนึ่ง (viscous substance) ทำให้สารสีเกาะติดอยู่กับเส้นใย และสะสมเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งเส้นใยแตกจึงหลุดออกมา ไม่พบการสะสมสารสีภายในเส้นใย

Lin และ Lizuka (1982) พบว่าการชักนำให้เชื้อราเกิดการผ่าเหล่าเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีรอยรั่ว (leakage) ของผนังเส้นใยมากขึ้นส่งผลให้เชื้อราสร้างสารสีได้ดีขึ้นเนื่องจากมีความสมดุลย์ระหว่างการสังเคราะห์สารสี และการปล่อยออกจากเส้นใย การเติมทวิน (Tween) 80 ปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็เป็นอีกวิธีที่ช่วยให้การปล่อยสารสีออกจากเส้นใยเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 การสังเคราะห์สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส

สารสีที่สร้างโดยเชื้อรา *Monascus* spp. เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิประเภทโพลีคีไทด์ (polyketide) ในพวกเฮกซาคีไทด์ (hexaketide) เนื่องจากโครงสร้างของสายหลักของสารสีประกอบด้วยกลุ่มคาร์บอน 2 อะตอม (C_2-units) จำนวน 6 ยูนิต

กระบวนการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิประเภทโพลีคีไทด์โดยใช้เทคนิคการติดฉลากสารด้วยสารไอโซโทป (isotopically labeled compounds) อธิบายว่าโพลีคีไทด์เกิดจากสารแอซิติกผนวกเข้ากับสารมาโลเนต (เกิดจากสารแอซิเตตหนึ่งยูนิตผนวกเข้ากับสารคาร์บอนไดออกไซด์ 1 หน่วย) แล้วเกิดกระบวนการดึงสารคาร์บอนไดออกไซด์ เพิ่มสายโพลีคีไทด์โดยผนวกมาโลเนตทีละยูนิตแล้วดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออกเช่นนี้ซ้ำแล้วซ้ำเล่า ซึ่งคล้ายกับการสังเคราะห์กรดไขมัน แต่การเกิดสารโพลีคีไทด์ไม่มีกระบวนการรีดักชันของเบตา-ไดคาร์บอนิล (β-dicarbonyl) ในขณะที่การสังเคราะห์กรดไขมันจะมีรีดักชันหลังกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) เสมอและระบบของเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์นั้นแตกต่างกันโดยสิ้นเชิง

สารโพลีคีไทด์แต่ละชนิดแตกต่างกันเนื่องจากต้องปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้สารตัวกลางเสถียรมากขึ้น กลไกที่เกิดกระบวนการสังเคราะห์ ได้แก่ การประกอบเข้ากับสายที่สร้างอีกส่วนหนึ่งกับสายหลัก การเติมกลุ่มเมทธิล การดึงออกซิเจนออกจากโมเลกุล การนำไปสู่การมีพันธะคู่และการเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในโมเลกุล

สารสีโมนาสโครูบินและสารสีโมนาสโคฟลาวิน เกิดจากการผนวกเข้าด้วยกันแบบเส้นตรง (linear condensation) ของสารแอซิติก (สารแอซิติลโคเอ) จากนั้นจึงเกิดกระบวนการเมทธิลเลชัน เกิดการปิดวง (cyclization)และการต่อสายซึ่งเกิดโครงสร้างขึ้นอีกส่วนหนึ่ง ดังรูปที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

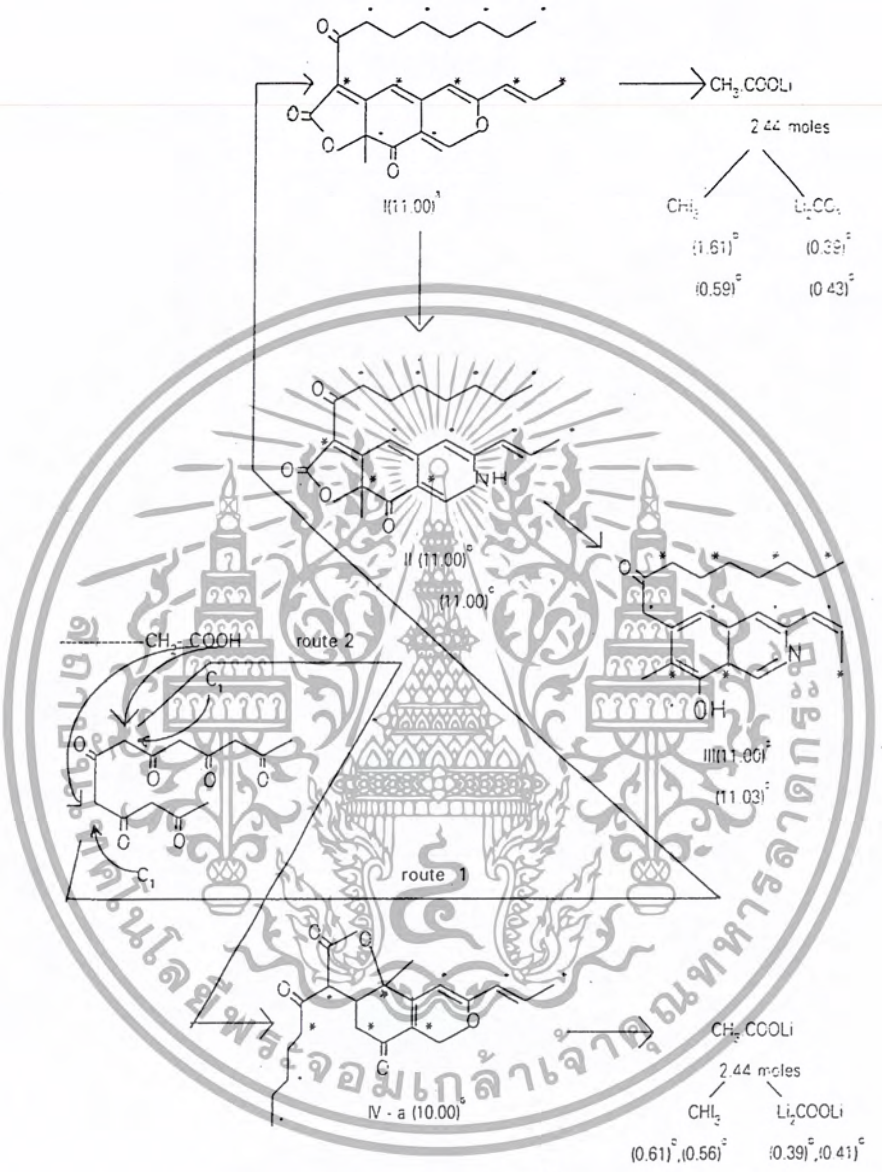


chart 1 Biogenetic Route of Monascorubrin and Monascoflavin,and Relative ^{14}C - Values

* : carbon originating from methyl group ; a : standard ; b: calculated ; c : found

รูปที่ 7 การสังเคราะห์ Monascorubrin (I) : route 1 และ monascoflavin (IV) : route 2

ที่มา : Turner (1971)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายหลักของโพลีเบตาคีไตด์ (β-ketide chain) เกิดจากการต่อกันของยูนิตโครงสร้างกับปลายด้านหนึ่งของสารแอซิติลโคเอซึ่งถือว่าเป็นยูนิตตั้งต้น และพบว่าไม่ได้เกิดจากการผนวกสารแอซิติลโคเอเข้ากับแอซิติลโคเอเอง แต่จะเกิดจากสารแอซิติลโคเอรวมกับสารมาโลนิลโคเอแล้วเกิดการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ก่อนที่จะผนวกเป็นสายหลักของโพลีเบตาคีไตด์ ซึ่งใช้วิธีการพิสูจน์โดยการติดฉลากที่คาร์บอนอะตอมด้วยสารไอโซโทป

สายหลักโพลีคีไตด์เกิดจากวิถี แอซิเตต-มาโลเนต (acetate-malonate pathway) และส่วนของ เบตาออกโซลแลคโตน (β-oxo-lactone) ของสารสีรูโบรพังทาทินและสารสีโมนาสโครูบริน เกิดจากการผนวกเข้าด้วยกันระหว่างเฮกซาโนเอต (C_6-units) กับแอซิเตต (C_2-units) และออกตาโนเอต (C_8-units) กับแอซิเตต (C_2-units) ตามลำดับ จึงหมดข้อสงสัยว่าส่วนของคาร์บอน 2 อะตอมที่มาต่อกับเฮกซาโนเอตและออกตาโนเอตเป็นแอซิเตตไม่ได้เกิดจากการผนวกเข้ากับมาโลเนตแล้วเกิดกระบวน การคาร์บอกซิเลชัน

การสังเคราะห์สารสีในเส้นใยเชื้อรา เกิดจากการรวมตัวของอะซิเตต 1 โมลกับมาโลเนต 3 โมล ทำให้เกิดกรดไขมันที่มีสายยาวปานกลาง เช่น ออกทาโนอิกแอซิด (octanoic acid) จากการสังเคราะห์วิถีกรดไขมัน (fatty acid pathway) ซึ่งจะรวมตัวกับอะซิติลโคเอ เป็นสารคีโตแอซิดและเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันกับโครงสร้างโครโมฟอร์ เกิดเป็นสารสีส้มโมนาสโครูบรินหรือเป็นสารรูโบรพังทาทิน และเมื่อเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นกับเฮกซาโนอิก (hexanoic acid) สารสีส้มจะลดลงเปลี่ยนเป็นสารสีเหลือง เกิดเป็นสารอังคักฟลาวินจากโมนาสโครูบริน ส่วนสารสีแดงโมนาสโครูบรามีนและรูโบพังทามีนจะเกิดปฏิกิริยาอะมีเนชัน (amination) ของสารสีส้มกับแอมโมเนีย

2.4.5 การแยกสารสีโมแนสคัส

วิธีสกัดสีออกจากเส้นใยจะแตกต่างกันไป ทั้งทางด้านการใช้ตัวทำละลายเป็นตัวสกัด และปริมาณความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยได้มีการทดลองใช้เมทานอล คลอโรฟอร์ม เอทานอลและอะซีโตน ในการสกัดสีออกจากเส้นใย พบว่าสารสีที่สกัดได้ดีที่สุด คือ เมทานอล ซึ่งสีที่สกัดได้จะมีค่าดูดกลืนแสงเด่นอยู่ที่ 2 สี ที่ความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร (สีเหลือง) และ 500 นาโนเมตร (สีแดง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการใช้เอทานอลร้อยละ 50 ในการสกัดสีออกจากเส้นใย นำเอาส่วนใสที่กรองได้ไปวัดค่าสีด้วยสเปกโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังสามารถวัดค่าสีที่ละลายน้ำได้และสีที่ละลายได้ทั้งในน้ำและละลายในเอทานอลร้อยละ 95 ได้ด้วย นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และ 500 นาโนเมตร

2.5 คุณสมบัติของสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส

Su และ Huang (1980) ศึกษาคุณสมบัติของสารสีจากเชื้อรา *M.anka* V-204 พบว่าละลายได้ดีในเอทานอลแต่ละลายได้เล็กน้อยในน้ำ สารสีในตัวทำละลายพีเอชต่างกันจะได้เฉดสีแตกต่างกัน ดังนี้ ที่พีเอช 3.0–4.0 จะเป็นสีส้ม พีเอช 5.0–6.0 เป็นสีแดง และที่พีเอช 7.0–9.0 จะเป็นสีม่วงแดง เมื่อแยกสารสีจากเส้นใยมาทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ได้จากแป้งถั่วเหลืองจะได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดงเข้มละลายในน้ำได้ดี สารสีจะไวต่อแสงเมื่อละลายในน้ำแต่จะทนต่อแสงมากขึ้นเมื่อละลายใน เอทานอล และทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้ดีเมื่ออยู่ในตัวทำละลายพีเอชเป็นกลางหรือเบส

Sweeny และคณะ (1981) ทดสอบคุณสมบัติของสารสีโดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นคือ N-glucosylrubropunctamine และ N-glucosylmonascorunramine พบว่าสารทั้งสองคงสภาพต่อแสงแดดได้ดีขึ้นเมื่อเติมสาร quercetin–5–sulfonic acid สำหรับพีเอช 2.8 6-hydroxy-1,4-naphthoquinone สำหรับพีเอช 6.0 และ 1,4,6 – trihydroxynaphthalene ใช้ได้ดีทั้งพีเอช 2.8 และ 6.0 เป็นสารป้องกันการสลายตัวของสารสีจากแดด

Wong และ Koehler (1983) นำสารสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัสมาทำปฏิกิริยากับสารที่ไม่เป็นอันตรายและมีราคาถูกเพื่อให้ละลายน้ำได้ดี พบว่าสาร aminoacetic acid และ aminobenzoic acid ใช้กับสารสีแดงได้ดี สารเชิงซ้อนที่ได้คงตัวที่พีเอช 9.2 และพีเอช 7.0 มากกว่าที่พีเอช 3.0 เมื่ออยู่ในตัวทำละลายพีเอชเป็นกลางหรือด่างจะทนความร้อนและแสงอัลตราไวโอเลตได้ดี โดยเหลือสารสีมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อได้รับแสงอัลตราไวโอเลตนาน 30 ชั่วโมง ส่วนวรรณภา (2528) พบว่าน้ำสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัสโดยผ่านกระบวนการใด ๆ คงตัวได้ดีที่พีเอชเป็นกลางถึงด่างเช่นกัน ทนต่ออุณหภูมิน้ำเดือดนาน 15 นาที และคงตัวได้ดีในสารละลายโซเดียมเบนโซเอท กลีเซอรอล น้ำและกรดอะซิติค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การใช้ประโยชน์

ในแถบเอเชียได้มีการใช้เชื้อรา *Monascus* spp. ผลิตอาหารหมัก เช่น ข้าวแดง ไวน์ขาว (rice wine) สุราเกาเหลียง (kaoliang brandy) และเต้าหู้ยี้ (tofuyo) ซึ่งก่อให้เกิดสีสันและกลิ่นเฉพาะ นอกจากนี้ยังใช้ข้าวแดงผสมในตำรับยาจีนเพื่อรักษาโรค

ข้าวแดงจะมีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามินบีอยู่สูง จากผลการวิเคราะห์ของกรมวิทยาศาสตร์บริการ (2518) พบว่าในข้าวแดงมีปริมาณแร่ธาตุ และวิตามินสูงกว่าในข้าวสารมาก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันแล้วเห็นได้ว่าข้าวแดงมีปริมาณวิตามินบีสองสูงกว่าข้าวสารถึง 185 เท่า (ตาราง 1)

ตารางที่ 1. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณแร่ธาตุและวิตามินในข้าวสารพันธุ์ขาวมะลิ และข้าวแดงที่ผลิตได้

รายการ	ข้าวพันธุ์ขาวมะลิ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)	ข้าวแดงที่ผลิตได้ (มิลลิกรัมต่อ 10 กรัม)
แคลเซียม	4.30	18.70
ฟอสฟอรัส	86.70	326.00
วิตามินบี 1	0.12	0.54
วิตามินบี 2	0.04	9.28

ที่มา : กรมวิทยาศาสตร์บริการ (2518)

เชื้อรา *Monascus* spp. บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. *Bacillus* spp. และ *Pseudomonas* spp. ซึ่งทั้ง 3 สกุลพบว่าเป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษและก่อให้เกิดอาหารเน่าเสีย ซึ่งอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อนี้คือ ยีสต์เอกซ์แทรกอาการ์ (Yeast extract Agar, YEA) (Wong and Koehler,1981) ซึ่งได้แยกสารปฏิชีวนะจากเชื้อรา *M. purpureus* N11S แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธีเปเปอร์แอสเซย์ดิสก์ (paper assay disc) พบว่าต้องใช้ปริมาณอย่างน้อยที่สุด 1.5 ไมโครกรัมต่อ 6 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวแดงได้ถูกใช้เป็นสารเจือสีในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเป็นสารสีจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัย ราคาถูก โดยใช้ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ น้ำหวาน น้ำนม นมเปรี้ยว น้ำผลไม้ แยม ขนม ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์ซูริมิ เป็นต้น

นอกจากนั้นข้าวแดงยังใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องยาจีน เนื่องจากมีสาร โมนาโคลินเค (monacolin K) โดยสารนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutareyl coenzyme A (HMG-CoA) reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลทำให้มีคุณสมบัติในการลดปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือดได้ ใช้ในผู้ป่วยที่มีปริมาณไขมันในเลือดสูงและยังพบว่า สารสีโมนาสโครูบิน (monascorubin) จากเชื้อรา *M. anka* สามารถยับยั้งการส่งเสริมเนื้องอกในหนู เนื่องจากสารสีสามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบ อันเกิดจากสารทีพีเอ (TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-aeetate) ซึ่งเป็นสารที่ส่งเสริมการเกิดเนื้องอก

สาร โมนาโคลิน เค (monacolin *K*) มีผลต่อปริมาณคลอเลสเตอรอล (total cholesterol) ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein cholesterol ; LDL-C) และไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein cholesterol ; HDL-C) LDL-C เป็นคลอเลสเตอรอลที่ไม่ดี (bad cholesterol) ทำให้เลือดตกตะกอนเป็นลิ่มแล้วเกาะติดที่ผนังเส้นเลือดเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้ผนังของเส้นเลือดภายในหนาขึ้น การไหลเวียนของเลือดไม่สะดวก ก่อให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือด ส่วน HDL-C เป็นโคเลสเตอรอลที่ดี (good cholesterol) เนื่องจากนำคลอเลสเตอรอลที่ไม่จำเป็นต่อร่างกายกลับไปสู่ตับแล้วขับถ่ายออกเรียกกระบวนการนี้ว่า "Reverse Transportation of cholesterol" ถ้าในร่างกายมีระดับ HDL-C ต่ำกว่า 35 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรจะมีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคเส้นเลือดในสมองและหัวใจอุดตัน

ได้มีการทดลองให้หนูได้รับข้าวแดงเป็นระยะ 6 เดือนหลังจากนั้นจะวัดปริมาณไขมันในเลือดและตับพบว่าความเข้มข้นของซีรัมไตรกลีเซอไรด์ โคเลสเตอรอล VLDL-C (very low density lipoprotein cholesterol) และ LDL-C จะลดลง ส่วน HDL-C จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากข้าวแดงจะมีสารในกลุ่มโมนาโคลินซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล

นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้สารสีจาก *M. rubiginosus* เจือสีในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว โดยเติมสารสีในปริมาณต่าง ๆ กัน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0.2 0.5 และ 1 และได้นำมาเปรียบเทียบกับนมเปรี้ยวรสธรรมชาติ นมเปรี้ยวที่เติมสารสีร้อยละ 0.2 จะมีแดงอ่อนและนมเปรี้ยวที่เติมสารสีร้อยละ 1 จะมีสีแดงเข้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสกัดสารสีโมนัสคัสจาก *M. pururеus* DSM 1379 ด้วยเมทานอลแล้วเติมลงในไส้กรอกแฟรงเฟอเตอร์เพื่อลดปริมาณไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งพบว่าสารสีสกัดจะทำให้เกิดสีน้ำตาลแดง ซึ่งเป็นสีที่ผู้บริโภคต้องการในผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีไนไตรท์และเมื่อนำไปให้แสงเป็นเวลา 30 นาที และ 2.5 ชั่วโมง สีของไส้กรอกที่เติมสารสีโมแนสคัสจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

มีการศึกษาคุณสมบัติของสารสีจาก *M. ruber* ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เอทานอลและกลูตาเมตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน หลังจากการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ก็ได้ตรวจสอบคุณสมบัติของสารสีที่อยู่ในสารละลาย โดยทดสอบความคงตัวของสารสีทั้งในสารละลายและเมื่อเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ พบว่าสารสีที่เติมลงในผลิตภัณฑ์จะยังคงอยู่ได้เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานถึง 3 เดือน จะคงตัวอยู่ระหว่างร้อยละ 92-98 จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสปรากฏว่าผลิตภัณฑ์ที่เติมสารสีจาก *M. ruber* จะช่วยเพิ่มกลิ่นรส เนื่องจากสารสีรวมตัวกับกลูตาเมต

ได้มีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากสารสีเพื่อผลิตเหล้าสาเกโดยทำโปรโตพลาสฟิวชันระหว่างเชื้อรา *M. anka* กับเชื้อรา *Aspergillus oryzae* การเลี้ยงโดยใช้เทคนิคถึงการหมักแห้งและหมักเปียก (solid-liquid state culture method)

นอกจากนี้ยังมีศึกษาการใช้ข้าวแดงเพื่อปรับปรุงสีในไส้กรอกอิมัลชั่นโดยเปรียบเทียบด้วยการประเมินผลทางประสาทสัมผัสกับไส้กรอกที่ใช้ผงเพรคร้อยละ 0.3 พบว่าข้าวแดงบดละเอียดในระดับร้อยละ 0.6 ของน้ำหนักเนื้อ ผู้ชิมให้การยอมรับมากที่สุดส่วนการใช้สีที่สกัดจากข้าวแดงบดละเอียด พบว่าไส้กรอกจากการสีที่สกัดจากข้าวแดงบดละเอียดในระดับร้อยละ 0.3 0.6 และ 0.9 ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องนี้ และการยอมรับโดยรวมและเมื่อเก็บไส้กรอกที่ปรับปรุงสีโดยใช้ข้าวแดงบดละเอียดพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าสี

การผลิตสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัส โดยวิธีการหมักแห้งนอกจากจะผลิตจากข้าวแล้วยังสามารถผลิตได้จากข้าวโพด ข้าวฟ่าง ขนมปัง ถั่วเหลือง ชานอ้อย ถั่วเขียว มันสำปะหลัง มันเทศ และมันฝรั่ง เป็นต้น และยังสามารถพัฒนาเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวได้ออกมาในรูปสีผสมอาหารที่สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ความปลอดภัยของสารสีโมแนสคัส

บุษบา และวรรณภา (2528) ได้ศึกษาความปลอดภัยของสารสีจากเชื้อราโมแนสคัสโดยวิเคราะห์หาโลหะหนัก เช่น โครเมียม ตะกั่ว สารหนู ในน้ำสี พบว่าไม่มีโลหะหนักทั้ง 3 ชนิดปะปนอยู่ในน้ำสีเลย

บุษบา และคณะ (2531) พบว่าน้ำสีจากเชื้อราโมแนสคัสไม่เป็นอันตรายใดๆ ต่อไข่ไก่ฟัก ไม่ทำให้โครโมโซมเม็ดเลือดขาวของคนเปลี่ยนแปลง และไม่เป็นพิษต่อหนูทดลองที่ได้รับสารสีในอัตรา 0.02 0.10 และ 2.00 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ธวัช และคณะ (2530) เปรียบเทียบผลของสีปองโซ 4 อาร์ ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์และสารสีจากเชื้อราโมแนสคัสต่อความผิดปกติของโครโมโซมของคน พบว่าสีปองโซ 4 อาร์ ทำให้โครโมโซมผิดปกติสูงถึงร้อยละ 28.64 ขณะที่สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสไม่ทำให้โครโมโซมผิดปกติแต่อย่างใด

2.8 อันตรายของไนเตรตและไนไตรท์

ทั้งไนเตรตและไนไตรท์เป็นพิษแก่ร่างกายเมื่อบริโภคในปริมาณมากเกินไป โดยเฉพาะไนไตรท์มีพิษแรงกว่าไนเตรต เพราะเมื่อซึมผ่านลำไส้เข้าสู่กระแสโลหิตแล้วจะไปออกซิไดส์ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงกลายเป็นเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) ซึ่งจะทำให้เม็ดเลือดนั้นหมดสภาพไม่สามารถลำเลียงออกซิเจนได้อีก ความเป็นพิษไนเตรตได้มีรายงานไว้ว่า เด็กดื่มน้ำที่มีไนเตรตเพียง 30 พีพีเอ็มแล้วเสียชีวิต แสดงว่าไนเตรตมีพิษต่อเด็กมาก โดยเฉพาะทารกที่อายุต่ำกว่า 6 สัปดาห์เพราะในกระเพาะของเด็กมีแบคทีเรียที่รีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรท์ได้ ประกอบกับเด็กยังไม่สร้างกรดเกลือในกระเพาะที่จะช่วยกำจัดแบคทีเรียดังกล่าวได้ แม้ในผู้ใหญ่ที่ได้รับไนเตรตในปริมาณมากเกินไป และมีเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกระเพาะจะได้รับพิษดังกล่าวได้เช่นกัน จึงเป็นข้อพึงระวังการบริโภคผลิตภัณฑ์พวกเนื้อสัตว์ในเด็กอ่อน ปัจจุบันในประเทศอังกฤษได้กำหนดให้ไนเตรตและไนไตรท์เป็นสารเคมีถนอมอาหารชนิดสังเคราะห์ (synthetic chemical perservative) มีกฎหมายควบคุม

นอกจากพิษอันเนื่องจากไนเตรตและไนไตรท์โดยตรงดังกล่าวแล้ว ยังพบว่าสารประกอบดังกล่าวจะช่วยให้เกิดสารประกอบที่เรียกว่าไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่าสารนี้คือ สารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง (carcinogen) เช่น ไดเอทิลไนโตรซามีน (diethylnitrosamine) เป็นสาเหตุโรคมะเร็งในตับของสัตว์ทดลอง (สุภาวดี อินทร์เขียว, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 การผลิตและแปรรูปวุ้นน้ำมะพร้าว

วุ้นมะพร้าว หรือวุ้นน้ำมะพร้าว หรือวุ้นสวรรค์ หรือลูกพร้าว หรือวุ้นส้ม หรือเห็ดชาแดง หรือเห็ดรัสเซีย หรือเห็ดกัมพูชา เป็นผลิตภัณฑ์อุสาหกรรมเกษตรที่น่าสนใจ เนื่องจากผลิตได้ง่ายในครัวเรือนและระดับอุตสาหกรรม ต้นทุนในการผลิตต่ำ เพราะใช้น้ำมะพร้าวแก่ที่เหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์ วุ้นที่ได้สามารถนำมาแปรรูปเป็นอาหารคาวหวานได้มากมายหลายชนิด อาหารคาวจะปรุงโดยใช้วุ้นสวรรค์แทนเนื้อปลาหมึกหรือแมงกะพรุน ทำยำต่างๆ แกงเผ็ด แกงจืด ผัดเผ็ด ผัดกระเพราเป็นต้น อาหารหวาน ได้แก่ วุ้นในน้ำเชื่อม วุ้นกรอบ เยลลี่ รวมมิตร แยมวุ้นสวรรค์ อีกทั้งหลังการหมักจะได้น้ำส้มสายชูเป็นผลพลอยได้ด้วย

วุ้นมะพร้าว จัดเป็นแผ่นวุ้นชนิดเซลลูโลสเจล (gelatinous bacterial cellulose) ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* subspecies *xylinum* หรือ *Acetobacter xylinum* นอกจากแบคทีเรียสกุล *Acetobacter* แล้วยังมีแบคทีเรียนสกุลอื่นๆ ที่สร้างวุ้นชนิดนี้ ได้แก่ *Rhizobium Alcaligenes, Agrobacterium* และ *Pseudomonas* เป็นต้น

แบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* เป็นแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้ผลิตวุ้นมะพร้าว จัดอยู่ในสกุล *Acetobacter* spp. เรียกกันทั่วไปว่า Acetic acid bacteria หรือแบคทีเรียน้ำส้มสายชูเป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต โคโลนีที่ขึ้นอยู่บนอาหารวุ้นมีลักษณะกลมนูน ทึบแสงสีน้ำตาลอ่อน ผิวเรียบมัน มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร สามารถผลิตวุ้นเซลลูโลสได้ที่ผิวหน้าของอาหารเหลว

เนื่องจากวุ้นมะพร้าวมีปริมาณเส้นใยอาหารอยู่มาก เป็น Micro-Fibrill Cellulose ที่มีความละเอียดอ่อนและนุ่มกว่า Dietary Fiber ที่พบในผัก ผลไม้ เมื่อรับประทานแล้วจะไปช่วยในระบบการย่อยและขับถ่ายของร่างกาย สามารถช่วยระบายพิษและลดปัญหาที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่ายได้เป็นอย่างดี คุณประโยชน์ของการบริโภคอาหารที่มีเส้นใยสูง จะช่วยในการควบคุมน้ำหนัก ช่วยป้องกันโรคท้องผูก โรคมะเร็งในลำไส้ใหญ่ โรคริดสีดวงทวาร ลดการเกิดคลอเลสเตอรอลในเส้นเลือด และยังช่วยลดการดูดซึมสารพิษต่างๆ ในระบบการย่อยของร่างกายด้วย การบริโภคอาหารที่มีเส้นใยเป็นประจำมีผลดีต่อสุขภาพ โดยเฉพาะผู้ที่ไม่ชอบทานผักและผลไม้ หรือผู้ที่กลัวสารพิษตกค้าง ยาฆ่าแมลงในผักผลไม้ อาจหันมาบริโภควุ้นมะพร้าวแทนได้ วุ้นมะพร้าวนอกจากจะมีปริมาณเส้นใยสูงและแคลอรี่ต่ำแล้ว ยังมีแร่ธาตุอื่นๆ อยู่ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 ส่วนประกอบและคุณค่าทางอาหารของวุ้นน้ำมะพร้าว

วุ้นน้ำมะพร้าวนอกจากผลิตง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำ ยังมีคุณค่าทางอาหารคือ มีแร่ธาตุและวิตามินต่างๆ ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของวุ้นน้ำมะพร้าว

		ผลการวิเคราะห์โดย	
		กรมวิทยาศาสตร์บริการ	กองเกษตรเคมี
น้ำ	ร้อยละ	94.4	94.6
ไขมัน	ร้อยละ	0.05	0.06
ไฟเบอร์	ร้อยละ	1.10	1.15
โปรตีน	ร้อยละ	0.68	0.84
เถ้า	ร้อยละ	0.77	0.10
คาร์โบไฮเดรท	ร้อยละ	3.00	3.20
แคลเซียม	(มิลลิกรัม/100กรัม)	34.5	5.20
เหล็ก	(มิลลิกรัม/100กรัม)	0.20	-
ฟอสฟอรัส	(มิลลิกรัม/100กรัม)	22.00	5.70
วิตามินบี 1	(มิลลิกรัม/100กรัม)	0.01	-
วิตามินบี 2	(มิลลิกรัม/100กรัม)	0.02	-
ไนอาซีน	(มิลลิกรัม/100กรัม)	0.22	0.22

ที่มา : สมคิด ธรรมรัตน์ (2531)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 แบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส

Kang และ Corrtel (1979) พบว่าโพลีแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยแบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ โฮโมโพลีแซคคาไรด์และเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ สายพันธุ์แบคทีเรียชนิดต่างๆที่สามารถผลิตสารโพลีแซคคาไรด์ อาทิเช่น *Corynebacterium* sp., *Arthobacter vicosus* NRRL B-1797 , *Alcaligenes faecalis var. myxogenes* 10C3 , *Pseudomonas solanacearum* , *Erwinia stewatii coli* , *Erwinia amylovora* , *Acinetobacter vinelandii strain* D-0.5 , *Acinetobacter* sp. *Strain* 12 , *Leuconostoc mesenterroides* , *L. dextranicum* , *Xanthomons campestris* และสายพันธุ์ *Acetobacter* sp.

เชื้อแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่เชื้อ *Acetobacter* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ หรือ Gram variable จัดอยู่ในแฟมิลี่ Acetobacteraceae สายพันธุ์ที่สำคัญและใช้ในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสกันอย่างกว้างขวางคือ *A. xylinum* , *A. pasteurianus* , *A. hansenii* , *A. sucrofermantans* และ *A. acetigenumx* สำหรับ *Acetobacter aceti subsp. xylinum* เซลล์มีลักษณะรูปร่างรีจนถึงเป็นท่อน อาจเป็นท่อนตรงหรือโค้ง เซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย ขนาดเซลล์กว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-4.0 ไมครอน และอาจพบในลักษณะกลม ยืดยาว (elongation) บวม (swollen) รูปกระบอง (clop shape) หรือเป็นเส้นสาย (filamentous) เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลารอบเซลล์หรือแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ หรือไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) โคโลนีของเชื้อ *Acetobacter* sp. มีสีชมพูเนื่องจากมีการสังเคราะห์สารพอร์ไฟริน (porpyrin) ต้องการอากาศ (aerobic) มีเมแทบอลิซึมจากการหายใจด้วยออกซิเจน โดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron accepter) ในกระบวนการเปลี่ยนสารอาหารให้เป็นพลังงาน (Gossele และ Swings, 1985) เป็นพวกเคโมออร์กาโนโทรพิค (chemoorganotrophic) สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase positive) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือที่พีเอช 5.4 - 3.3 และอุณหภูมิประมาณ 25 – 30 องศาเซลเซียส (Kring และ Holt, 1984) ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติก และออกซิไดซ์ กรดอินทรีย์ประเภทอะซิเตทและแลคเตทเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นสารประเภทเอทานอล กลีเซอรอล แลคเตท กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส แลคโตส และอะราบิโนส (Holt และคณะ, 1994) สามารถสร้างกรดจากเอทานอล และยังสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเอทานอลและโพรพานอล อุณหภูมิที่สามารถยับยั้งเชื้อได้คือ 65 – 70 องศาเซลเซียส

2.12 กระบวนการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum*

ลักษณะการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* เป็นแบบ Growth associated (Ishikawa และคณะ, 1995) มีลักษณะสำคัญคือการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสเกิดพร้อมกัน โดยในระหว่างช่วงการเจริญเติบโต (trophophase) แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสจะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นจำนวนมากและมีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสออกมาน้อย แต่ในช่วงผลิตผลิตภัณฑ์คือแบคทีเรียลเซลลูโลส (idiophase) จะมีการเจริญของเซลล์เพียงเล็กน้อยแต่มีการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสสูงสุด สำหรับกระบวนการผลิตต่างๆในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสแบ่งออกได้ดังนี้

1. กระบวนการหมักบนอาหารเหลว

การหมักวิธีนี้โดยทั่วไปใช้น้ำมะพร้าว ซึ่งเป็นวัตถุเหลือใช้จากโรงงานอาหารและภาชนะที่ใช้มักเป็นถาดอลูมิเนียมหรือพลาสติกผิวเรียบ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5 –10 และ pH เริ่มต้นปรับด้วยกรดอะซิติกเข้มข้นให้อยู่ในช่วงพีเอช 4.0 – 5.0 ธาตุอื่นๆที่เติม อาทิเช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) (วราวุฒิและคณะ, 2535) หรือไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) (Lapus และคณะ, 1967) สำหรับเป็นแหล่งไนโตรเจน (N-source) การฆ่าเชื้อใช้วิธีการต้มให้เดือด เมื่ออาหารเย็นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในถาดอลูมิเนียมหรือพลาสติกผิวเรียบ ให้มีระดับความลึก 10 – 15 เซนติเมตร คลุมภาชนะด้วยผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้ว ห้องบ่มรมควันฆ่าเชื้อด้วยไซยาไนด์ก่อนการหมัก 2 – 3 วัน ห้องมีการระบายอากาศ จากนั้นใส่กล้าเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ประมาณร้อยละ 10 – 40 (วราวุฒิ และคณะ, 2536) หลังจากการหมักเป็นเวลา 7 – 14 วัน แบคทีเรียจะผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะสีขาวครีม มีเนื้อสัมผัสที่เหนียวและแน่น และที่สำคัญ คือมีปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลสสูง มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น วุ้นสวรรค์ วุ้นมะพร้าว และเห็ดรัสเซีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักวิธีนี้อัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสในช่วง 10 วันแรกของการหมักจะมีอัตราการผลิตสูง ดังนั้นในการควบคุมการหมักจำเป็นต้องคำนึงถึงแหล่งอาหารให้มีทั้งชนิด และปริมาณที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ที่ได้ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว หลังจาก 10 วันแรกของการหมัก พบว่าอัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสต่ำลง เนื่องจากธาตุอาหารเหลือน้อย

นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนามากขึ้น ทำให้อากาศซึมผ่านลงไปได้ยากขึ้น จึงมีผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ในระหว่างการหมักควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 28 – 35 องศาเซลเซียส และปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 3.5 – 4.0 โดยการเติมกรดอะซิติก

นอกจากน้ำมะพร้าวและน้ำสับปะรด สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้จากหางนมหรือเวย์ (whey) (วราวุฒิ และคณะ, 2536) ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้ส่วนใหญ่จากการผลิตเนยแข็ง หรือการแยก เคซีน (casein) ซึ่งหางนมมีส่วนประกอบโดยประมาณดังนี้ น้ำตาลแลกโทสร้อยละ 4.8 โปรตีน 0.85 ไขมัน 0.35 แร่ธาตุ 0.60 และน้ำ 93.40 (Delhi, 1980) หางนมสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต แบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* แบบอยู่กับที่ในถาด อัตราการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสมีความสัมพันธ์กับการใช้สารอาหาร การผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสจะมีอัตราลดลงเมื่อสารอาหารมีความเข้มข้นสูง เนื่องจากมีการผลิต กรดกลูโคนิกจากน้ำตาลกลูโคสบางส่วน และเกิด cataboiite repression มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในน้ำหมักมีผลทำให้ปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลสลดลง (Tahara และคณะ, 1997)

2. กระบวนการหมักในอาหารเหลว (submerged culture)

Toyosaki และคณะ (1995) ได้รายงานผลการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส โดยใช้เชื้อ *A. xylinum* BPR 2001ในถังหมัก และใช้อาหารเหลว CSL – fructose medium พบว่าการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสมีประสิทธิภาพสูง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยน้ำแช่ข้าวโพด (CSL) และน้ำตาลฟรุคโตส อาหารเลี้ยงเชื้อฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นลงจะใส่กล้าเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ประมาณร้อยละ 5 – 10 ให้เชื้อเจริญในสภาพที่มีอัตราการกวน และให้อากาศ ควบคุมค่าพีเอชในระหว่างหมักให้คงที่ประมาณ 5.0 ด้วยกรดซัลฟิวริก และก๊าซแอมโมเนีย ควบคุมอุณหภูมิของหมักที่ 28 – 32 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ระยะเวลาในการหมัก 3 – 5 วัน ซึ่งแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการหมักจะมีลักษณะเป็นเม็ด การหมักในอาหารเหลวมีหลายรูปแบบ อาทิ เช่น การหมักแบบกะ (batch culture)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Toyosaki และคณะ, 1995) ทั้งการหมักในถังหมักเดี่ยวและหลายถังหมัก (single และ multi – stage) แบบกึ่งกะ (fed batch culture) (Hwang และคณะ, 1999 ; Yang และคณะ, 1998) และแบบต่อเนื่อง (continuous culture) โดยทั่วไปการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสก็ยังใช้กรรมวิธีการหมักแบบกะ เนื่องจากประสิทธิภาพสูง

การหมักแบบกะในอาหารเหลวมีข้อดีคือ ใช้วัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบได้ทุกชนิด ผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสสูงกว่าการหมักแบบบนอาหารเหลวร้อยละ 40 ปรับปรุงวิธี และควบคุมกระบวนการหมักได้ง่าย ใช้พื้นที่และแรงงานคนน้อย และสามารถควบคุมสภาพปลอดเชื้อได้ง่าย

2.13 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เซลลูโลสโดยแบคทีเรีย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ตลอดจนการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* มีดังต่อไปนี้

1. แหล่งคาร์บอน (C-source)

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50-55 ในการสังเคราะห์เซลล์ (Stabury และ Whitaker, 1984) ในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส โดยเชื้อแบคทีเรียนี้ต้องการแหล่งคาร์บอนที่จำเพาะเจาะจงและแน่นอนสำหรับใช้ในการสร้างแบคทีเรียลเซลลูโลส ในกรณีนี้ซึ่งพบว่าแบคทีเรียลเซลลูโลสซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโฮโมโพลีแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์โดยเอนไซม์ชนิดเดียว แต่เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการแหล่งคาร์บอนที่ไม่จำเพาะเจาะจง จะสามารถสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสได้จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด (Crueger และคณะ ,1982)

Hestrin และคณะ (1947) รายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* เช่น น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส เช่น แอมโมเนียมฟอสเฟตและแอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alaban (1962) ได้ศึกษาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ซูโครส กาแลคโตส แมนนิทอล มอลโทส แลคโตส และอะราบิโนส พบว่าการหมักเซลลูโลสในซับสเตรทที่มีน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ สามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ ผลผลิตของแบคทีเรียลเซลลูโลสต่อน้ำตาลชนิดต่างๆ สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3

Lapus และคณะ (1967) พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสจะอยู่ในช่วงร้อยละ 5-7 Francis และคณะ (1954) ได้นำเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้หลายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 4.0-6.0 ที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส แหล่งไนโตรเจนเหมาะสม ประกอบด้วยเปปโตนและสารสกัดจากยีสต์ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เช่น น้ำตาลซูโครส กลูโคส และแลคโตส ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum*

จำพวกของสารอาหารคาร์บอน	ชนิด	ผลผลิตของเซลลูโลส (ร้อยละ)
Monosaccharide	D-fructose	92
	D-galactose	15
	D-glucose	100
	D-mannose	6
	D-xylose	11
	L-arabinose	14
	L-sorbose	11
Disaccharide	Lactose	16
	Maltose	7
	Sucrose	33
	Starch	18
	Ethanol	4
	Ethylene glycol	1
	Diethylene glycol	1
	Propylene glycol	8
	Glycerol	93
	Myo-inositol	17
Organic acids	Citric acid	20
	L-malic acid	15
	Succinic acid	12
Other	D-glucono lactone	62
	No carbon source	2

ที่มา : Satoshi และคณะ (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mosaoka และคณะ (1993) พบว่าผลผลิตของแบคทีเรียลเซลลูโลสจะมีความสัมพันธ์กับการใช้สารอาหารน้ำตาลกลูโคส ผลผลิตของแบคทีเรียลเซลลูโลสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูโคนิก และกรดคีโตกลูโคนิก

แหล่งคาร์บอนจะมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. โดยเป็นแหล่งพลังงานแก่เซลล์และเป็นองค์ประกอบหลักของแบคทีเรียลเซลลูโลส เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ ซึ่งรวมทั้งน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส กาแลคโตส ซูโครส มอลโทส และแมนโนส เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตเซลลูโลสบางสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้สารในกลุ่มแอลกอออล์ อาทิเช่น กลีเซอรอล ไกลคอล เอทานอล และโพรพานอล เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเป็นแหล่งให้พลังงาน (Yoshinaga และคณะ,1997) แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันจะมีผลต่อกิจกรรมของ phosphocose isomerase และในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลฟรุกโตส พบว่ากิจกรรมของอนไซม์ UDPG pyrophosphorylase สูงขึ้น ซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส

2. แหล่งไนโตรเจนและสารอาหารอื่นๆ

เซลล์แบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันไป แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) แต่บางสายพันธุ์ต้องการสารไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen) แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่สำคัญเป็นสารประเภทก๊าซแอมโมเนียม เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟต ปกติเมื่อแอมโมเนียม (NH_4^+) ถูกใช้ไปจะทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นกรด เพราะจะเกิดการสะสมอนุมูลซัลเฟต (SO_4^+) ขึ้น ส่วนก๊าซแอมโมเนียมและไนเตรท เมื่อถูกเมตาโบไลท์และทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Stabury และ Whitaker, 1984) สารไนโตรเจนอินทรีย์ที่สำคัญประกอบด้วย เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ และเคซีน

Stabury และ Whitaker (1984) รายงานว่าธาตุอาหารอื่นๆ มีความจำเป็นเกี่ยวกับอัตราการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสภายนอกเซลล์ เช่น แหล่งไนโตรเจน แคลเซียม และฟอสเฟต เป็นต้น อย่างไรก็ตามชนิดและปริมาณของธาตุอาหารที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส รวมถึงสภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส อาทิเช่น พีเอช อุณหภูมิ และการให้อากาศ แหล่งไนโตรเจน เป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ถ้ามีปริมาณสูงจะลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์โบไฮเดรตเป็นแบคทีเรียลเซลลูโลส สำหรับโปตัสเซียมและโซเดียมไนเตรท แบคทีเรียไม่สามารถใช้ได้ และยังเป็นพิษต่อเชื้ออีกด้วย (Lapuz และคณะ, 1967)

3. อุณหภูมิ

Alaban (1962) และ Lapuz และคณะ (1967) ได้รายงานสอดคล้องกันว่าในการหมักเชื้อ *Acetobacter* sp. ในน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิในช่วง 10-45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้แต่จะไม่ผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส การสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสจะเริ่มมีการผลิตตั้งแต่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสจนถึงช่วงอุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตเซลลูโลสในปริมาณสูง เมื่ออุณหภูมิสูงจะเกิดผลเสียต่อคุณสมบัติของเอนไซม์หรือการเสียสภาพโปรตีน โครงสร้างของแฟลกเจลลา ไรโบโซม โปรโตพลาส และไมโตคอนเดรีย

Krusong และ Yoshida (1995) พบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ในการผลิตสารโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Escherichia coli* โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 20 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณสารโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นจะต่ำกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

4. อัตราการให้อากาศ

Krusong และ Yoshida (1995) พบว่าปริมาณการให้อากาศและปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* โดยมีผลกับปริมาณพลังงานที่สร้างขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ในกรณีของแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* และ *Acetobacter aerogenes* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ พบว่ามีการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสในปริมาณที่ต่ำกว่าในสภาพที่มีอากาศ โดยการสังเคราะห์จะต่ำกว่าร้อยละ 25-40 กรณีของเชื้อ *A. xylinum* พบว่าในสภาพที่ไม่มีอากาศ จะไม่สามารถสังเคราะห์แบคทีรียลเซลลูโลสได้เลย การสังเคราะห์จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อปริมาณก๊าซออกซิเจนมีเพียงพอต่อความต้องการของเซลล์เท่านั้น

Guzman และคณะ (1982) รายงานว่าปริมาณอากาศมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสโดยได้ศึกษาการผลิตของเชื้อ *A. xylinum* ในการศึกษาใช้กระบวนการหมัก 2 แบบ คือ แบบอยู่กับที่ให้เกิดแบคทีเรียลเซลลูโลสขึ้นเองที่ผิวหน้าของอาหารเหลวเปรียบเทียบการหมักที่มีการให้อากาศและมีการกวนตลอดเวลา (submerged culture) ในถังหมักขนาด 1 ลิตร อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.25 ปริมาตรต่อปริมาตรนาที ปริมาณแบคทีเรียลเซลลูโลสที่ผลิตได้ร้อยละ 22.47 และ 71.52 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ebner (1982) พบว่าเชื้อ *Acetobacter* sp. จะมีเอนไซม์อไฟเรส (aprayrase) ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพลังงาน ATP (ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานและมีการสะสมในระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก) ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เหลือพลังงาน ATP สำหรับกิจกรรมของ เมแทบอลิซึมอื่นๆ ของเซลล์ในระดับต่ำ ดังนั้นเมื่องดให้อากาศทำให้พลังงาน ATP ในแหล่งเก็บพลังงานหรือ ATP pool สูญเสียไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

Alaban (1962) ได้ศึกษาการหมักเชื้อ *A. xylinum* บนเครื่องเขย่าโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณต่างกัน คือ 25 50 75 100 และ 125 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 75 มิลลิลิตร ให้ผลผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสปริมาณสูงสุด

ปริมาณอากาศมีส่วนสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลส และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสเพิ่มขึ้น จะทำให้การแผ่กระจายของอากาศลดลง เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แบคทีเรียลเซลลูโลสลดลง เนื่องจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น Kouda และคณะ (1997) ได้ศึกษาการส่งผ่านออกซิเจน (oxygen transfer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เชื้อ *A. xylinum* BPR2001 เพื่อผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความหนืดสูงจะทำให้อัตราการส่งผ่านก๊าซออกซิเจนลดลง เป็นผลให้ก๊าซออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น เป็นตัวจำกัดปริมาณก๊าซออกซิเจนที่มีอยู่ด้วย ชนิดของใบกวนในถังหมักแบบ Maxblen และ Gate with turbine จะช่วยเพิ่มการส่งผ่านก๊าซออกซิเจนได้สูงขึ้น ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านของมวล (volumetric mass transfer coefficient, K_La) มีค่าสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากใบกวนจะช่วยเพิ่มฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อและช่วยเพิ่มผิวสัมผัสระหว่างฟองอากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ค่า K_La สูงขึ้น และนอกจากนี้ Kouda และคณะ (1997) ยังพบว่าการเพิ่ม partial pressure ของก๊าซออกซิเจนในถังหมักแบคทีเรียสามารถผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลสได้สูงขึ้น และลดพลังงานในการกวน

5. ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Ohara และคณะ (1992) รายงานว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมัก แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงค่าพีเอช 4.0-5.0 และค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารอาหาร รวมถึงการยอมให้สารอาหารผ่านผนังเซลล์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alaban (1962) ได้ศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* พบว่าค่าพีเอช 4.0-5.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ที่มีค่าพีเอช 3.0 การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลงและที่ค่าพีเอชมากกว่า 8.0 เชื้อไม่สามารถเจริญ เติบโตได้ การเติมกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อร้อยละ 1-10 ลงในน้ำมะพร้าว นอกจากเป็นการปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ได้เมื่อเติมกรดอะซิติกร้อยละ 1 และเมื่อเพิ่มปริมาณกรดเป็นร้อยละ 2 จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อ *Pennicillium* sp. และ *Bacillus* sp. ได้ และมีรายงานว่ากรดอะซิติกที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีค่าพีเอชประมาณ 4.0-5.0 เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. xylinum* มีผลโดยตรงต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โปรโตพลาสซึม และการแบ่งเซลล์ของเชื้อ *A. xylinum* และเชื้อจุลินทรีย์ยังสามารถนำกรดอะซิติกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้อีกด้วย (Naritomi และคณะ, 1998)

Mosaoka และคณะ (1993) รายงานว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องมีการควบคุมก่อนการหมักเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. และยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ไม่สามารถทนต่อการเป็นกรดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* TISTR 967 เป็นเชื้อที่ใช้ผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว

3.1.1.2 เชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3090 เป็นเชื้อที่ใช้ผลิตสารสี

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.2.1 อาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก.) ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อและผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว

3.1.2.2 อาหารวุ้นเอียง MYS (ภาคผนวก ข.) ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3090

3.1.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับสร้างสารสี โดยใช้อาหารสูตรของ Lin และ Demain(1991) (ภาคผนวก ค.)

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.3.1 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

3.1.3.2 เครื่องวัดสี

3.1.3.3 เครื่องวัดพีเอช

3.1.3.4 ถาดพลาสติกขนาด 28.5×42.5×9 เซนติเมตร

3.1.3.5 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.1.3.6 ปิเปต

3.1.3.7 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

3.1.3.8 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว

เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 967 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ซึ่งประกอบด้วยน้ำมะพร้าวแก่ น้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และกรดอะซิติกร้อยละ 1 (เป็นตัวปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีพีเอช 4.5) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 – 4 วัน

3.2.2 การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว

เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 967 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ซึ่งมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนสูตรที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ โดยเตรียมอาหารใส่ถาดพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการลวกน้ำร้อน เติมหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 1 ลงไปในถาดพลาสติกโดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ปิดถาดด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 – 9 วัน จะได้แผ่นวุ้นน้ำมะพร้าว นำแผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวมาตัดให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมที่มีขนาด 2 x 2 x 1.5 เซนติเมตร นำไปล้างน้ำโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อของ *Monascus purpureus* TISTR 3090

นำเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3090 เลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง MYS นาน 6 –7 วัน จากนั้นนำมาทำสารละลายสปอร์ โดยใช้น้ำกลั่นผสม Tween 80 ร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปนับสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 1.0×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษาต่อไป

3.2.4 ศึกษาการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ตามสูตรของ Lin และ Demain (1991) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร ใส่ชิ้นวุ้นน้ำมะพร้าวลงไป 5 ชิ้นต่อ 1 ฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นเติมหัวเชื้อของ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ที่ได้จากข้อ 3.2.3 ร้อยละ 10 (15 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์) นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงนาน 12 วัน วัดพีเอชของน้ำหมัก และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปวัดสีด้วยเครื่องวัดสี นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณตามสูตร

$$c = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

ค่า c คือ เป็นสีที่วัดได้

ค่า a คือ เป็นค่าแสดงปริมาณของสีแดง +a และสีเขียว –a

ค่า b คือ เป็นค่าแสดงปริมาณของสีเหลือง +b และสีฟ้า –b

3.2.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090

3.2.5.1 แหล่งคาร์บอน

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร่วมกับวุ้นน้ำมะพร้าวเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4 โดยใช้อาหารสูตรของ Lin และ Demain (1991) และเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหารเป็นดังนี้ แป้งข้าวเจ้า (rice powder) น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลมอลโตส ซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาหารสูตรนี้อยู่แล้วเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยใช้ในความเข้มข้นร้อยละ 5 (50 กรัมต่อลิตร) สภาวะในการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4 เลี้ยงนาน 12 วัน วัดพีเอชของน้ำหมัก และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด นำไปวัดสีด้วยเครื่องวัดสี เปรียบเทียบสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยดูจากค่า c จากนั้นคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในอาหารสูตรของ Lin และ Demain(1991) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.5.1 และแบ่งแหล่งไนโตรเจนเป็นดังนี้ โมโนโซเดียมกลูตาเมท (MSG) เปปโตน แอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยใช้ในความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (15 กรัมต่อลิตร) สภาวะในการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4 เลี้ยงนาน 12 วัน วัดพีเอชของน้ำหมักและนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด นำไปวัดสีด้วยเครื่องวัดสี เปรียบเทียบสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยดูจากค่า c จากนั้นคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.3 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในอาหารสูตรของ Lin และ Demain(1991) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.5.1 และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.5.2 จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปรับพีเอชเริ่มต้นดังนี้ 3.5 4.5 5.5 6.5 และ 7.5 สภาวะในการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4 เลี้ยงนาน 12 วัน วัดพีเอชของน้ำหมักและนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด นำไปวัดสีด้วยเครื่องวัดสีเปรียบเทียบสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยดูจากค่า c จากนั้นคัดเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2.5.4 อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในอาหารสูตรของ Lin และ Demain (1991) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.5.1 และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.5.2 จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.5.3 นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อดังนี้ 15 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เลี้ยงนาน 12 วัน วัดพีเอชของน้ำหมักและนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด นำไปวัดสีด้วยเครื่องวัดสีเปรียบเทียบสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยดูจาก ค่า c

การทดลองในหัวข้อ 3.2.5.1 ถึง 3.2.5.4 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ทรีทเมนต์ละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของคันคัน (Duncan's New Multiple Range Test)

3.2.6 ศึกษาความคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์

เลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในอาหารสูตรของ Lin และ Demain(1991) โดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.5.1 และ 3.2.5.2 ตามลำดับ จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปรับพีเอชเริ่มต้นที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.5.3 นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.2.5.4 เลี้ยงนาน 12 วัน วัดพีเอชของน้ำหมักและนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด นำไปวัดสีด้วยเครื่องวัดสี จากนั้นแบ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกเป็น 6 ชุด โดยนำแต่ละชุดไปทดลองดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุดที่ 1 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง

ชุดที่ 2 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

ชุดที่ 3 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้วางใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ชุดที่ 4 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ล้างด้วยน้ำก๊อก โดยเปิดน้ำก๊อกไหลผ่านตลอดเวลาที่อัตรา 5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

ชุดที่ 5 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้แช่ในสารละลายกรด โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกที่มีพีเอช 2.5 นาน 5 วัน

ชุดที่ 6 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้แช่ในสารละลายด่าง โดยใช้สารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีพีเอช 12 นาน 5 วัน

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทดลองทั้ง 6 ชุด มาวัดสีในผลิตภัณฑ์อีกครั้งโดยใช้เครื่องวัดสี นำค่าที่ได้มาคำนวณหาสีที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ดังสูตร

$$\text{สีที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ (ร้อยละ)} = \frac{\text{ค่า } c \text{ หลังการทดสอบ}}{\text{ค่า } c \text{ ก่อนผ่านการทดสอบ}} \times 100$$

ค่า c คือ สีที่วัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปราย

4.1 ผลการศึกษาการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090

4.1.1 การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว

จากการเลี้ยง *Acetobacter xylinum* TISTR 967 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวในถาดพลาสติกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จะได้แผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวที่มีลักษณะเป็นเยื่อเหนียว มีสีขาวหรือครีม ผิวเนียนนุ่ม แสดงดังรูปที่ 8

รูปที่ 8 ลักษณะวุ้นน้ำมะพร้าวที่ผลิตได้จาก *A. xylinum* TISTR 967 โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.12 การเลี้ยง *Monascus purpureus* TISTR 3090 บนอาหาร MYS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

ลักษณะการเจริญของเชื้อแสดงดังรูปที่ 9 เส้นใยจะค่อยๆ เปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีส้มและสีแดงในที่สุด

รูปที่ 9 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *M. purpureus* TISTR 3090 บนอาหาร MYS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการศึกษาเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090

จากการศึกษาการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในอาหารเหลว วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวัดสี โดยใช้เครื่องวัดสี นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า c ซึ่งเป็นสีที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ พร้อมทั้งวัดพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีแดงเข้มมีค่า c เท่ากับ 23.25 แสดงดังรูปที่ 10 และพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังการหมักมีค่า 6.70

รูปที่ 10 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้ภายหลังจากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในอาหารเหลว สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์

4.2.1 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่มีต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์

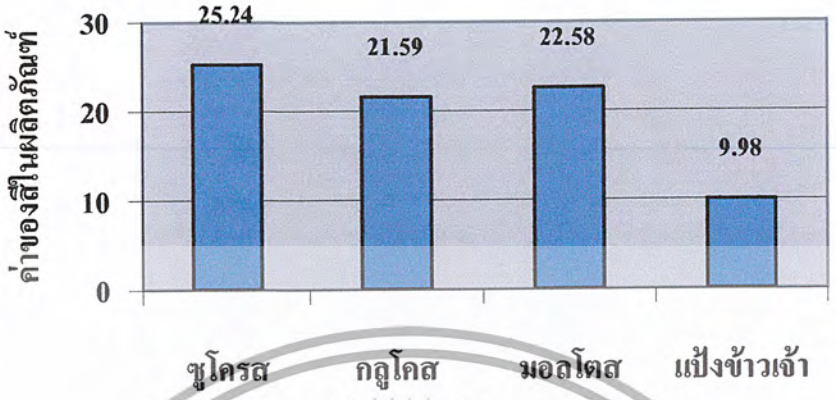
จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 โดยศึกษาแหล่งคาร์บอนดังนี้ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส แป้งข้าวเจ้าและน้ำตาลมอลโตสซึ่งเป็นส่วนประกอบในสูตรอาหารเหลวเป็นตัวเปรียบเทียบ (ชุดควบคุม) ใช้ในความเข้มข้นร้อยละ 5 นำมาวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน นำชิ้นวุ้นที่ได้มาวัดสีและวัดพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า การใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าของสี (ค่า c) 25.24 ซึ่งสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนตัวอื่น แสดงดังตารางที่ 4 และรูปที่ 11 รองลงมาเป็นน้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกลูโคส และแป้งข้าวเจ้า โดยมีค่าของสีที่วัดได้ 22.58 21.59 และ 9.98 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่าของสีในผลิตภัณฑ์สูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้น้ำตาลกลูโคสและแป้งข้าวเจ้า แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้น้ำตาลมอลโตส ในการทดลองขั้นต่อไป เลือกใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลมอลโตส เนื่องจากทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าของสีสูงกว่า และราคาถูกกว่า

ตารางที่ 4 ผลจากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

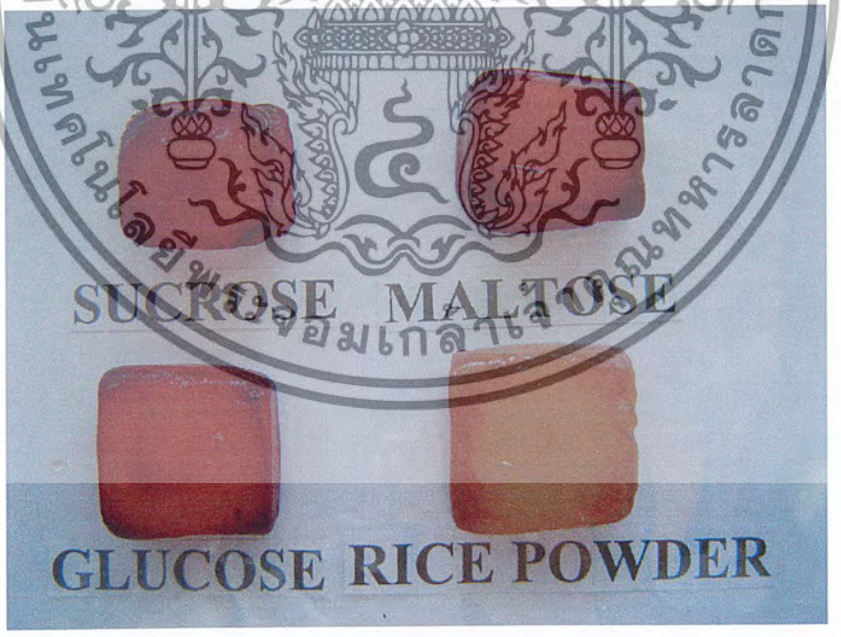
แหล่งคาร์บอน	ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้ $c = (a^2 + b^2)^{1/2}$	พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมัก
น้ำตาลซูโครส	25.24 [a]	6.80
น้ำตาลมอลโตส	22.58 [ab]	6.72
น้ำตาลกลูโคส	21.59 [b]	6.50
แป้งข้าวเจ้า	9.98 [c]	3.40

หมายเหตุ ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่า ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 ผลจากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน



รูปที่ 12 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่มีต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์

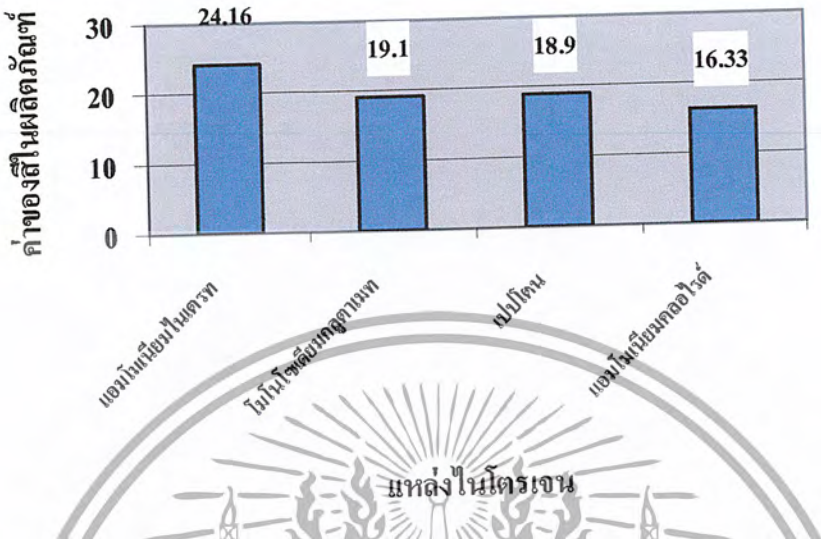
จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3090 โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันแหล่งไนโตรเจนดังนี้ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ เปปโตนและโมโนโซเดียมกลูตาเมทซึ่งเป็นส่วนประกอบของอาหารเหลวเป็นตัวเปรียบเทียบ (ชุดควบคุม) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวัดสี จากการทดลองพบว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรทจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าสี (ค่า c) สูงสุดคือ 24.16 รองลงมาคือการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมท เปปโตน และแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยจะมีค่าสี 19.10 18.90 และ 16.33 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 5 และรูปที่ 13 เมื่อนำข้อมูลเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าสีสูงสุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมท แอมโมเนียมคลอไรด์ และเปปโตน ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ 5 ผลจากการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

แหล่งไนโตรเจน	ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้ $c = (a^2 + b^2)^{1/2}$	พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมัก
แอมโมเนียมไนเตรท	24.16 [a]	6.03
โมโนโซเดียมกลูตาเมท	19.10 [b]	5.89
เปปโตน	18.90 [bc]	5.84
แอมโมเนียมคลอไรด์	16.33 [c]	2.44

หมายเหตุ ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่า ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 ผลจากการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

รูปที่ 14 แสดงการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์

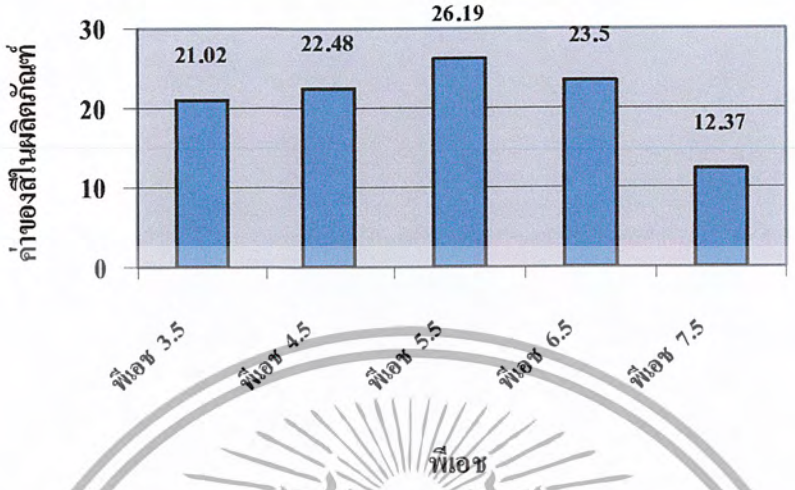
จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับเชื้อรา *M. purpureus* TISTR 3090 โดยใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนและปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3.5 4.5 5.5 6.5 และ 7.5 ตามลำดับ วางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวัดสี จากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าสีสูงสุดคือ 26.99 รองลงมาเป็นพีเอชเริ่มต้นที่ 6.5 4.5 3.5 และ 7.5 โดยจะมีค่าสีที่วัดได้ 23.50 22.48 21.01 และ 12.37 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 6 และรูปที่ 15 เมื่อนำข้อมูลเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าสีสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5 3.5 และ 7.5 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.5 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 ซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออีก

ตารางที่ 6 ผลจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้ $c = (a^2 + b^2)^{1/2}$	พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมัก
3.5	21.01 [b]	5.16
4.5	22.48 [b]	6.47
5.5	26.99 [a]	6.78
6.5	23.50 [ab]	6.99
7.5	12.37 [c]	7.43

หมายเหตุ ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่า ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 15 ผลจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

รูปที่ 16 แสดงการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่มีต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์

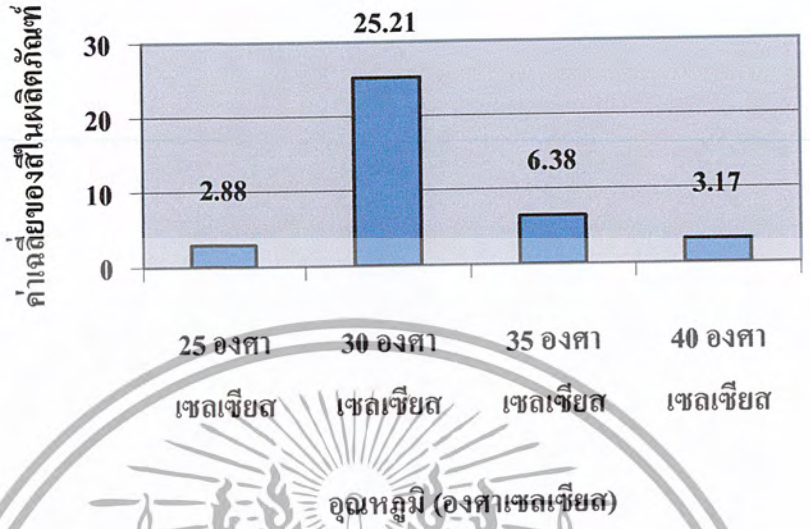
จากการเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน และ ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5 วางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวัดสี จากการทดลองพบว่า จากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าสีสูงสุด 25.21 รองลงมาเป็นการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 40 และ 25 องศาเซลเซียส โดยจะมีค่าที่วัดได้ 6.38 3.17 และ 2.88 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 7 และรูปที่ 17 เมื่อนำข้อมูลเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ค่าของสีในผลิตภัณฑ์สูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิอื่น ในการทดลองขั้นต่อไป จะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเนื่องจากทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าของสีสูงสุด

ตารางที่ 7 ผลจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ (องศาเซลเซียส)	ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้ $c = (a^2+b^2)^{1/2}$	พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการหมัก
25	2.88 [b]	5.38
30	25.21 [a]	6.14
35	6.38 [b]	5.74
40	3.17 [b]	5.29

หมายเหตุ ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติในกรณีที่มีอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันแสดงว่า ค่าสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 ผลจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

รูปที่ 18 แสดงการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้

จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5 วางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวัดสี จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้แบ่งเป็น 6 ชุดการทดลองนำมาทดสอบโดยกรรมวิธีต่าง ๆ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากชุดการทดลองเหล่านี้มาวัดสีที่เหลืออีกครั้ง นำค่าสีที่วัดได้มาคำนวณร้อยละของสีที่เหลือในผลิตภัณฑ์ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่นำไปทดสอบโดยการล้างน้ำ (ชุดที่ 4) มีสีที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สูงสุดคือร้อยละ 90.92 รองลงมาเป็นการทดสอบโดยการแช่สารละลายกรด (ชุดที่ 5) ซึ่งมีสีที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ร้อยละ 82.60 สำหรับผลิตภัณฑ์ที่นำไปทดสอบโดยการแช่สารละลายด่างที่พีเอช 12.0 นาน 5 วัน เมื่อนำไปวัดสีที่เหลือในผลิตภัณฑ์พบว่าค่า b ที่วัดได้มีค่ามาก ซึ่งค่า b เป็นค่าที่บ่งบอกถึงสีเหลืองที่เกิดในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์จะไปจับกับผลิตภัณฑ์ที่ได้ ดังนั้นเมื่อนำมาคำนวณค่าร้อยละของสีที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ทำให้มีค่าติดลบ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *M. purpureus* TISTR 3090 เมื่อนำมาทดสอบการคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีต่างๆ พบว่าการทดสอบโดยวิธีการต่างๆ สีที่มีในผลิตภัณฑ์ลดลงไม่มากนัก โดยเฉพาะการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปล้างด้วยน้ำก๊อก โดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ความคงตัวของสียังมีค่าสูง ซึ่งผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับ Sheu และคณะ (2000) ซึ่งรายงานว่า ภายหลังนำผลิตภัณฑ์มาผ่านน้ำก๊อกที่ไหลด้วยอัตราเร็ว 10 ลิตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวัดสีที่เหลือมีค่าร้อยละ 93.30 ซึ่งค่อนข้างสูง และผลจากการนำผลิตภัณฑ์มาทดสอบโดยการใช้ความร้อน การแช่แข็ง ใช้รังสีอัลตร้าไวโอเลต พบว่าผลิตภัณฑ์ยังคงมีสีเหลืออยู่ค่อนข้างสูงเช่นกัน ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Sheu และคณะ (2000) เช่นกัน อย่างไรก็ตามการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแช่ในสารละลายด่างที่พีเอช 12.0 เมื่อนำมาวัดสีพบว่าค่าสีแดงในผลิตภัณฑ์มีน้อยมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ผลของสีที่เหลือในผลิตภัณฑ์โดยนำผลิตภัณฑ์ไปผ่านการทดสอบโดยกรรมวิธีต่าง ๆ

ชุดการทดลอง	ค่าของสีในผลิตภัณฑ์ (ค่า c)		ร้อยละของสีที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์
	ก่อนการทดสอบ	หลังการทดสอบ	
ชุดที่ 1	22.80	16.75	73.40
ชุดที่ 2	19.42	15.88	81.79
ชุดที่ 3	22.02	17.39	78.97
ชุดที่ 4	22.36	20.33	90.92
ชุดที่ 5	21.58	17.71	82.06
ชุดที่ 6	18.06	22.88	-126.69

หมายเหตุ การทดลองชุดที่ 5 มีค่าของสีที่เหลือในผลิตภัณฑ์ติดลบ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีเหลือง

ชุดที่ 1 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง

ชุดที่ 2 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

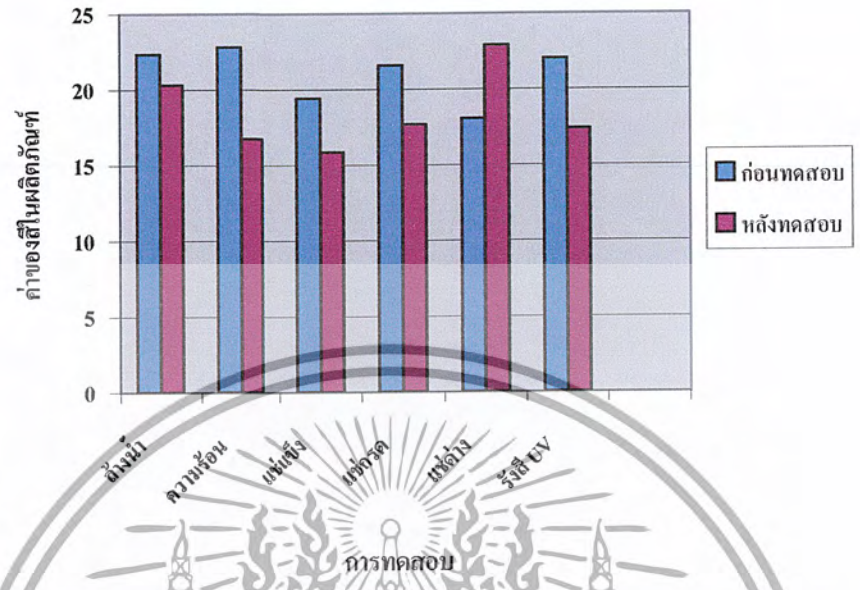
ชุดที่ 3 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้วางใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ชุดที่ 4 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ล้างด้วยน้ำก๊อก โดยเปิดน้ำก๊อกไหลผ่านตลอดเวลาที่อัตรา 5 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

ชุดที่ 5 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้แช่ในสารละลายกรด โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกที่มีพีเอช 2.5 นาน 5 วัน

ชุดที่ 6 หมายถึง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้แช่ในสารละลายด่าง โดยใช้สารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีพีเอช 12 นาน 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 19 ผลของสีที่เหลือในผลิตภัณฑ์โดยนำผลิตภัณฑ์ไปผ่านการทดสอบโดยกรรมวิธีต่าง ๆ

รูปที่ 20 แสดงสีที่เหลือในผลิตภัณฑ์โดยนำผลิตภัณฑ์ไปผ่านการทดสอบโดยกรรมวิธีต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเลี้ยง *Acetobacter xylinum* TISTR 967 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวที่ได้จะมีลักษณะเป็นเยื่อเหนียว สีขาวหรือครีม ผิวเนียนนุ่ม เมื่อนำวุ้นน้ำมะพร้าวมาเลี้ยงร่วมกับรา *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในอาหารเหลวสูตร Lin และ Demain (1991) วางบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีสีแดงเข้ม วัดค่าสีในผลิตภัณฑ์ได้ 23.25 และจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์ พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีแดง เมื่อนำผลิตภัณฑ์ไปวัดสีจะวัดได้ 25.24 ซึ่งสูงกว่าการใช้น้ำตาล มอลโตส น้ำตาลกลูโคส และแป้งข้าวเจ้า โดยจะให้สีในผลิตภัณฑ์ซึ่งวัดได้ดังนี้ 22.58 21.59 และ9.98 ตามลำดับ เมื่อนำค่าเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ค่าของสีในผลิตภัณฑ์สูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น จึงเลือกใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาต่อไป จากการทดลองพบว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าสีสูงสุด คือ 24.16 รองลงมาเป็นการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมท เปปโตน และแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยจะมีค่าสี คือ 19.10 18.90 และ 16.33 ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้แอมโมเนียมไนเตรทจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน และพบว่าการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5 จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าสูงสุด คือ 26.99 รองลงมาเป็นพีเอชเริ่มต้นที่ 6.5 4.5 3.5 และ 7.5 โดยจะมีค่าสีที่วัดได้คือ 23.50 22.48 21.01 และ12.37 ตามลำดับ และที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5 จะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าสีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5 3.5 และ7.5 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้น 6.5 จึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 ในการศึกษาต่อไป จากการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์ พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าสีสูงสุด คือ 25.21 รองลงมาเป็นการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 40 และ 25 องศาเซลเซียส โดยค่าสีที่วัดได้ 6.38 3.17 และ 2.88 ตามลำดับ และพบว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ค่าของสีในผลิตภัณฑ์สูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิอื่น ในการทดลองขั้นต่อไปจะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการศึกษาการคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่นำไปทดสอบโดยการล้างน้ำมีสีเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สูงสุด คือ ร้อยละ 90.92 รองลงมาเป็นการทดสอบโดยแช่สารละลายกรดที่มีพีเอช 2.5 ซึ่งมีสีเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ร้อยละ 82.60 สำหรับการทดสอบโดยวิธีต่าง ๆ เช่น นำผลิตภัณฑ์ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง การแช่แข็งที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำมาวางใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าสีที่มีในผลิตภัณฑ์ลดลงไม่มากนัก ขณะที่การนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแช่ในสารละลายด่างที่มีพีเอช 12.0 นาน 5 วัน สีที่เหลือในผลิตภัณฑ์มีค่าน้อยมาก

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสามารถเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 เพื่อผลิตเป็นอาหารชนิดใหม่ที่มีสีแดงเข้ม ซึ่งการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะมีผลต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้และผลิตภัณฑ์ที่ได้ค่อนข้างทนต่อการทดสอบโดยกรรมวิธีต่าง ๆ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาความหนาของชิ้นวุ้นน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมในการนำมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Monascus purpureus*
2. ในการวัดสีของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* ควรที่จะผ่าชิ้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้และทำการวัดสีบริเวณตรงกลางของผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบกับสีที่วัดได้จากผิวนอก
3. ในการทดสอบการคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยนำผลิตภัณฑ์แช่ในสารละลายด่างที่มีพีเอช 12 น่าจะศึกษาชนิดของด่างที่ใช้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2518. การศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงระดับห้องปฏิบัติการ. รายงานกิจกรรมกรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม.

ธวัช ขนบดี , ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ , นิตยา เลาหจินดา และอารีย์ เสือก้อน. 2530. เปรียบเทียบการทดสอบผลของสีผสมอาหารในกลุ่มอะโซบางชนิด และสีที่ได้จากการหมักเชื้อราโมนาสคัสในโครโมโซมของคน. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 25 สาขาสิ่งแวดล้อม. น. 1-45.

บุษบา ยงสมิทธ์ และวรรณภา ทาบโลกา. 2528. สีผสมอาหารจากมันสำปะหลังโดยเชื้อราโมนาสคัส. วิทยาสารเกษตรศาสตร์(วิทย์.). 19 (1): 45-50

บุษบา ยงสมิทธ์ , วิเชียร ยงมานิตชัย , สนทนา แสงจันทร์ และชุลี ชัยศรีสุข. 2531. การผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลังเพื่ออุตสาหกรรมหมัก. รายการวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการแห่งชาติ กรุงเทพฯ. น. 225

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมนาสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราวุฒิ ครูส่ง, นฤมล ชูวัฒนะเดช, เชิดชัย ตั้งอมรสุขสันต์ และอินทรา ปรุงเลิศบัวทอง. 2533. การผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าว. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 10(4) : 46 – 60.

วราวุฒิ ครูส่ง, กรวิภา สุขศรีวงศ์ และปนัดดา พวงเกษม. 2536. การผลิตเซลลูโลสจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ในน้ำหางนม. วารสารพระจอมเกล้าฉลาดกระบัง. 1(1) : 47 – 50.

สมคิด ธรรมรัตน์. 2530. วุ้นจากน้ำมะพร้าว. กสิกร 5 : 433 – 435.

Alban, C.A. 1962. Studies on the optimum conditions for Nata de coco bacterium or Nata formation in coconut water. The Philippine Agricutruist. 45 : 490-415.

Broder, C.U. and P.E. Cannon. 1987. A new species of *Monascus* from pine tissues in Florida. Mycologia , 79 (3) : 479-484.

Carels, M. and D. Shepherd. 1975. Sexual reproduction cycle of *Monascus* sp. in submerged shaker culture J. Bact. 122 (1) : 288-294.

Carels, M. and D. Shepherd. 1977. The Effect of different nitrogen source on pigment production and sporulation on *Monascus* sp. in submerged shaker culture. Can. J. Microbiol. 23 : 1360-1372.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chiu,S.W. and S.M. Chan. 1992. Production of pigment by *Monascus purpureus* using sugar – cane bagasse in roller bottle cultures. 8 : 68 – 70.

Crueger, W. and A. Crueger. 1982. Biotechnology : A textbook of industrial Microbiology. Sinauer Associates, Sunderland. P. 380.

Delhi, S. D. 1980. "Dairy by-product". Oxford University Press. Bombay, Calcutta. P. 545.

Ebner. H. 1982 Vinegar. *In* G. Reed (ed.). Proscott and Dunn's Industrial Microbiology. 4th . Reed. A VI Publishing com., Inc Wesport, Connecticut.

Fabre, C.E., Santerre, A.L., Loret, M.O., Baberian, R., Pareilleux, A., Goma, G., and Blanc, P.J. 1993. Production and food application of the red pigments of *Monascus ruber* J. Food Sci. 58 : 1099-1110.

Fielding, B.C.,J.S.E. Holker, D.F. Jone, A.D.G. Powell, K.W. Richman, A Robertson and W.B. Whalley. 1961. The Chemistry of Fungi, Part XXXIX. The structure of Monascin. J.Chem.Soc. 1961 : 4579-4589.

Fink –Gremmels, J., Dresel, J. and Leistner, L.1991. Use of *Monascus* extracts as an alternative to nitrite in meat products. Fleischwirtsch. 71 : 1187-1186

Guzman, M.P., E.F. Alabastro and C.B. Tinsay. 1982. A submerged process for the production of Nata. NRCP Research Bull. 37(1) : 1 – 50.

Han, O. and Mudgett, R.E. 1992. Effects of oxygen and carbondioxide partial pressure on *Monascus* growth and pigment production in solid – state fermentation. Biotechnol. Prog. 8 : 5 – 10.

Hawksworth. D.L. and J.I.Pitt. 1983. A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. Aust. J. Bot. 31 : 51 – 61.

Haws, EJ. J.S.E. Holker. A. Kelly , A.D.G. Powell and A. Robertson. 1959. The Chemistry of Fungi. Part XXXVII. The Structure of Rubropunctatin. J. Chem. Soc. 1959 : 3598 – 3610.

Hesseltine, C.W. 1965. A millienium of fungi, food and fermentation. Mycologia. 57 : 179 – 181.

Hestrin, S., M. Ascher and J. Mager. 1947. Synthesis of cellulose by resulting cells of *Acetobacter xylinum*. Nature(London). 159 : 64 – 65.

Iizuka, H. and Lin, C.F. 1981. Advances in Biotechnology Vol. 2. Toronto : Pergamon Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ishikawa, A., M. Matsuoka, T. Tsuchuida and F. Yoshinaga. 1995. Increase in cellulose production by sulfaquanidine-resistant mutant derived from *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans.* Bioscience Biotechnology Biochemistry 59(2) : 2,259-2,260.

Johns, M.R. and D.M. Stuart. 1991. Production of pigment by *Monascus purpureus* in solid culture. J. of Industrail Microbiology. 8 : 23 – 28.

Johnson, G.T. and F. McHan. 1975. Some effect of Zinc on the utilization of carbon source by *Monascus purpureus*. Mycologia. 67 : 806 – 816.

Kang, K.S. and I.W. Corrtell. 1979. Polysaccharide *In* H.J., Peppler and D. Perlman (eds.). Microbial Technology. Academic Press, New York. pp. 418 – 481.

Kouda, T., Y. Hisato, Y. Fumihiro and Y. Hisato. 1997. Effect of agitator configulation on bacterail cellulose productivity in aerated and agitated culture. J. Fermentation and Bioengineering, 83(4) : 371 – 374.

Kring, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1 William and Wilkins, Baltimore. P. 964.

Krusong, W. and T. Yoshida. 1995. Counteraction of negative effect on cellulose formation in agitaed culture of *Acetobacter xylinum* by addition of alginate gel beads as microaerophillic carrier. Annual Report International Conference Biotechnology, Japan. pp. 155 – 200.

Lapuz, M.M., E.G. Gallardo and M.A. Palo. 1967. The Nata organism-culture requirements characteristics and identity. The Philippine J. Science. 96 : 91-109.

Lin, T.F. and A.L. Demain. 1991. Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 70-75.

Lin, C.F. 1973 Isolation and culture condition of *Monascus* sp. for the production of pigment in submerged culture. J. Ferment. Technol. 51 (6) : 407-414.

Lin, C.F. and H. lizuka. 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 43 (3) : 671-676.

Masaoka, S. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum.* J. Ferment. Bioeng. 75 : 18-22.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Matsuoka, M., T. Tsuchida, K. Matcushita, O. Adachi and Y. Yoshinaga. 1996. Asynthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*. Bioscience Biotechnology Biochemisty. 60 : 575 – 579.

Mchand, P.S., W.B. Whalley and F.C. Chen. 1973. Isolation and structure of ankaflavin : a new pigment from *Monascus anka.* Phytochemistry 12 : 2531-2532.

Mchan, F. and G.T. Johnson. 1970. Zinc and amino acid : important components of a medium promoting growth of *Monascus purpureus*. Mycologia 62 : 1019-1031.

Naritomi, T., T. Kouda, H. Yano and F. Yoshinaga. 1998a. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. J. Fermentation and Bioengineering. 85910 : 89-95.

Ohara, H., K. Hiyama and T. Yoshida. 1992. Kinetic study on pH dependence of growth and death of *Streptococcus faecalis*. Applied Microbiology Biotechnology. 38 : 403 – 407.

Palo, M.A., L. Vidal-Adeva and L. Maceda. 1960. Study on ang-kak and its production. Philipp. J. Sci. Soc. 89 : 1-22.

Satoshi, M., T. Ohe and N. Sakota. 1993. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. J. of fermention and Bioengineering. 75 : 18 – 22.

Stanbury, P. F. and Whitaker. 1984. Principle of fermentation Technology. Oxford, Pergamon Press. p. 459.

Sweeny, J.G., M.C. Estrada-Valdes, G.A. Iacobucci, H. Sato and S. Sakamura. 1981. Photoprotection of the red pigments of *Monascus anka* in aqueous media by 1,4,6-trihydroxynaphthalene, J. Agric. Food Chem. 29 (6) : 1189-1193.

Su, Y-C. and J.H. Huang. 1980. Fermentative production of anka-pigments (*Monascus* pigments.) Proc. Nati. Sci. Counc. ROC. 4 (2) : 201-215.

Tahara. N., M. Tabuchi. K. Watanabe. H. Yano. Y. Morinaga and F. Yoshinaga. 1997a. Degree of polymerization of cellulose from *Acetobacter xylinum* BPR2001 decrease by the strain. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 61(11) : 1,862 – 1,865.

Toyosaki, H., T. Naritomi, A. Seto, M. Matsuoka, M. Tsuchida and F. Yoshonaga. 1995. Screening of bacterial cellulose –producing *Acetobacter* strain suitable for agitated culture. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 59 : 1,498 – 1,502.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Van Tieghem, P. 1884, *Monascus,* genre nouvau de I' order des Ascomycetes. Bull. Soc. Bot. France, 31 : 226-231.

Wong, H.C. and P.E. Koehler. 1981. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus*. And its relationship to pigment production. J. Fd. Sci. 46 : 589-592.

Wong, H.C. and Y.S. Bau. 1977. Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron and X-rays induced strains of *Monascus purpureus*. Went. Plant Physiol. 60 : 578-581.

Wong, H.C. and Y.S. Bau. 1978. A comparision of conidial and ascospore germination of *Monascus purpureus*. Trans. Br. Mycol Soc. 70 (2) : 277-282.

Yang, Y. K., S. H. Park, J. W. Hwang, Y. R. Pyurr and Y. S. Kim. 1998. Cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 under agitated condition. J. Fermentation and Bioengineering. 85(3) : 312-317.

Yongsmith, B., W. Tabloka, S. Krairak and R. Bavavoda. 1990. Cassava fermentation of yellow pigments and amylolytic enzymes by a mutant of *Monascus* spp. in submerged cultivation. Microbial Utilization of Renewable Resources 7 : 354-363.

Yongsmith, B. 1993. Potentials of *Monascus* molds on production of yellow pigments. Invited paper in International Symposium of the 20th Anniversary of Inten. Post-Graduate Univ. course in Microbiology. September 20-22, 1993. Osaka, Japan. pp. 155-163.

Yoshinaga, F., T. Naoto and W. Kunihiko. 1997. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a industrial material. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 61 : 219-224.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารน้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวแก่	
น้ำตาลซูโครสร้อยละ	5
แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ	0.1
กรดอะซิติกร้อยละ	1

2. สูตรอาหาร MYS

เปปโตน	5	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	3	กรัมต่อลิตร
มอลท์สกัด	3	กรัมต่อลิตร
แป้งมันสำปะหลัง	20	กรัมต่อลิตร
วุ้นผง	15	กรัมต่อลิตร

3. สูตรอาหารของ Lin & Demain (1991)

maltose	50	กรัมต่อลิตร
anhydrous MSG	12.6	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	2.4	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	2.4	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	8	กรัมต่อลิตร
KCl	0.5	กรัมต่อลิตร
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$ZnSO_4.7H_2O$	0.01	กรัมต่อลิตร
$MnSO_4.H_2O$	0.003	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

1. ศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์

ตาราง ข –1 แสดงค่า $c_{เฉลี่ย}$ ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

แหล่งคาร์บอน	ค่าที่ได้จากเครื่องวัดสีและนำมาคำนวณ			
	a^2	b^2	$c = (a^2+b^2)^{1/2}$	$c_{เฉลี่ย}$
น้ำตาลซูโครส1	501.67	156.30	25.65	25.24
น้ำตาลซูโครส2	475.68	193.93	25.88	
น้ำตาลซูโครส3	394.42	190.60	24.19	
น้ำตาลกลูโคส1	416.00	163.94	24.08	21.59
น้ำตาลกลูโคส2	278.49	103.84	19.55	
น้ำตาลกลูโคส3	296.80	149.82	21.13	
น้ำตาลมอลโตส1	326.45	177.42	22.45	22.58
น้ำตาลมอลโตส2	336.58	256.96	24.36	
น้ำตาลมอลโตส3	280.90	157.65	20.94	
แป้งข้าวเจ้า1	9.41	101.16	10.52	9.98
แป้งข้าวเจ้า2	15.68	113.30	11.36	
แป้งข้าวเจ้า3	8.00	57.00	8.06	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์

ตารางที่ ข – 2 แสดงค่า $c_{เฉลี่ย}$ ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

แหล่งไนโตรเจน	ค่าที่ได้จากเครื่องวัดสีและนำมาคำนวณ			
	a^2	b^2	$c = (a^2 + b^2)^{1/2}$	$c_{เฉลี่ย}$
แอมโมเนียมไนเตรท1	552.53	107.16	25.68	24.16
แอมโมเนียมไนเตรท2	425.10	71.84	22.29	
แอมโมเนียมไนเตรท3	511.85	88.21	24.50	
แอมโมเนียมคลอไรด์1	151.93	117.42	18.15	16.39
แอมโมเนียมคลอไรด์2	112.02	120.70	15.25	
แอมโมเนียมคลอไรด์3	148.55	99.72	15.76	
โมโนโซเดียมกลูตาเมท1	453.69	177.42	25.12	22.20
โมโนโซเดียมกลูตาเมท2	313.86	120.69	20.85	
โมโนโซเดียมกลูตาเมท3	327.39	98.64	20.64	
เปปโตน1	194.71	102.82	17.25	18.90
เปปโตน2	317.91	83.21	20.03	
เปปโตน3	278.69	98.21	19.41	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ศึกษาหาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์

ตารางที่ ข – 3 แสดงค่า $c_{เฉลี่ย}$ ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ

พีเอช	ค่าที่ได้จากเครื่องวัดสีและนำมาคำนวณ			
	a^2	b^2	$c = (a^2 + b^2)^{1/2}$	$c_{เฉลี่ย}$
3.5(1)	352.39	42.46	19.87	21.01
3.5(2)	397.12	29.14	20.65	
3.5(3)	454.80	52.42	22.52	
4.5(1)	420.90	69.79	22.15	22.48
4.5(2)	458.30	79.21	23.18	
4.5(3)	413.96	74.72	22.11	
5.5(1)	624.00	172.87	28.23	26.19
5.5(2	539.17	126.43	25.80	
5.5(3)	486.56	115.69	24.54	
6.5(1)	459.50	90.25	23.45	23.50
6.5(2)	516.65	74.48	24.31	
6.5(3)	476.20	41.14	22.75	
7.5(1)	18.97	73.24	9.60	12.37
7.5(2)	10.46	183.44	13.92	
7.5(3)	13.68	171.03	13.59	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเกิดสารสีในผลิตภัณฑ์

ตารางที่ ข – 4 แสดงค่า $c_{เฉลี่ย}$ ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน

อุณหภูมิ	ค่าที่ได้จากเครื่องวัดสีและนำมาคำนวณ			
	a^2	b^2	$c = (a^2 + b^2)^{1/2}$	$c_{เฉลี่ย}$
25(1)	3.50	1.61	2.26	2.88
25(2)	7.34	2.86	3.19	
25(3)	6.55	3.61	3.19	
30(1)	591.46	104.82	26.39	25.21
30(2)	568.06	21.59	24.28	
30(3)	605.26	17.39	24.95	
35(1)	81.00	18.37	9.97	6.38
35(2)	27.10	7.99	5.92	
35(3)	0.37	10.20	3.25	
40(1)	2.86	11.36	14.22	1.39
40(2)	3.42	4.93	8.35	
40(3)	2.72	5.52	8.24	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ศึกษาความคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์

ตารางที่ ข – 5 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อนำไปล้างน้ำเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

ชิ้นวุ้น	ก่อนการทดลอง				หลังการทดลอง				ร้อยละของสีที่คงเหลือ
	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	
1	427.25	112.15	23.22		381.42	14.90	19.91		
2	445.21	117.07	23.71		293.44	13.18	17.51		
3	604.67	57.46	25.73	22.36	476.98	30.69	22.53	20.33	90.92
4	403.81	42.25	21.12		418.61	29.59	21.17		
5	303.80	21.53	18.04		398.80	21.81	20.51		

ตารางที่ ข - 6 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อนำไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 1 ชั่วโมง

ชิ้นวุ้น	ก่อนการทดลอง				หลังการทดลอง				ร้อยละของสีที่คงเหลือ
	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	
1	490.62	108.37	24.47		337.09	159.01	22.27		
2	526.70	103.84	25.11		177.96	98.80	16.64		
3	446.05	66.10	22.63	22.80	66.10	77.79	12.00	16.75	73.40
4	384.16	74.13	21.41		143.52	96.43	15.49		
5	381.42	33.06	20.36		228.31	72.42	17.34		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข – 7 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแช่แข็ง ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสนาน 5 วัน

ชิ้นวุ้น	ก่อนการทดลอง				หลังการทดลอง				ร้อยละของสีที่คงอยู่
	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	
1	279.22	13.62	17.11		26.94	104.04	11.44		
2	171.87	13.32	13.61		169.65	177.42	18.62		
3	483.56	5.24	22.11	19.42	226.50	174.77	15.05	15.88	81.79
4	261.79	14.14	16.61		195.02	159.52	18.83		
5	314.71	12.96	18.10		239.48	122.43	15.48		

ตารางที่ ข - 8 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อแช่ในสารละลายกรดอะซิติกที่มีพีเอช 2.5 นาน 5 วัน

ชิ้นวุ้น	ก่อนการทดลอง				หลังการทดลอง				ร้อยละของสีคงอยู่
	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	
1	512.34	3.57	22.17		447.32	4.93	21.26		
2	546.16	7.08	23.52		363.66	0.21	19.08		
3	500.86	6.63	22.53	21.58	420.25	0.56	20.51	17.71	82.06
4	497.29	2.19	22.35		422.51	2.81	20.62		
5	292.41	9.39	17.37		44.16	6.00	7.08		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข – 9 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อแช่ในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีพีเอช 12.0 นาน 5 วัน

ชิ้นวุ้น	ก่อนการทดลอง				หลังการทดลอง				ร้อยละของสีที่คงอยู่
	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	
1	233.17	13.32	15.70		85.47	713.16	28.26		
2	454.54	4.00	21.41		37.64	428.90	21.60		
3	419.84	8.12	20.69	18.06	43.56	494.62	23.20	22.88	-126.69
4	297.56	19.09	17.79		9.99	485.54	22.26		
5	201.07	14.90	14.70		3.33	360.24	19.07		

ตารางที่ ข – 10 แสดงค่าร้อยละของสีที่คงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์เมื่อวางใต้รังสีอัลต้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ชิ้นวุ้น	ก่อนการทดลอง				หลังการทดลอง				ร้อยละของสีที่คงอยู่
	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	a^2	b^2	c	$c_{เฉลี่ย}$	
1	279.56	26.52	17.50		457.53	9.68	23.55		
2	597.31	15.60	24.76		148.35	13.82	18.42		
3	514.38	8.70	22.87	22.02	164.35	2.43	12.9	17.39	78.97
4	459.67	26.42	22.05		190.03	14.23	14.29		
5	515.29	10.82	22.94		179.96	1.69	17.79		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้