สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

พัฒนาการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ทดแทนไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

นางสาวณัฐวดี กิจแสงทอง
นายวีระศักดิ์ บุญช่วย
นางสาวอภิญญา สุวรรณ์ทวีกุล

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67302
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549

.b 11663200
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Development on Products from *Monascus purpureus* TISTR 3090 – Nata Complex as an Alternative to Nitrite in Chinese Sausage

Miss Natthawadee Kijsangtong

Mr. Weerasak Boonchuay

Miss Apinya Suwanthaweekul

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 Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	พัฒนาการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ทดแทนไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์กุนเชียง
นักศึกษา	นางสาวณัฐวดี กิจแสงทอง
	นายวีระศักดิ์ บุญช่วย
	นางสาวอภิญญา สุวรรณ์ทวีกุล
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ลินจง สุขลำภู
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์	คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง พัฒนาการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ทดแทนไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

นักศึกษา นางสาวณัฐวดี กิจแสงทอง
นายวีระศักดิ์ บุญช่วย
นางสาวอภิญญา สุวรรณ์ทวีกุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดวงใจ โอชัยกุล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ลินจง สุขลำภู

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีจุดประสงค์เพื่อลดปริมาณการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ซึ่งใช้แทนไนไตรท์ในการทำกุนเชียง โดยมีการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ระดับร้อยละ 0.10 0.20 0.30 0.40 และ 0.50 ของน้ำหนักเนื้อ ทดสอบการประเมินผลทางด้านประสาทสัมผัส พบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 0.10 ของน้ำหนักเนื้อในผลิตภัณฑ์กุนเชียงได้รับคะแนนในทุกด้านสูง และแตกต่างจากสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และเมื่อนำไปวัดค่าสี พบว่ากุนเชียงสูตรควบคุมจะมีค่าความสว่าง (L*) มากที่สุด และค่าสีเหลือง (b*) มีค่าน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 การใช้ผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นจะทำให้มีสีแดงเพิ่มขึ้นจนถึงแดงคล้ำ มีผลทำให้มีค่าความสว่าง (L*) ลดลง และมีค่าสีแดงเพิ่มขึ้น จากการศึกษาอายุการเก็บรักษาของกุนเชียง พบว่าค่า water activity (a_w) ความชื้นและค่าความหืนของกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 มีค่าน้อยกว่ากุนเชียงสูตรควบคุม สำหรับความคงตัวของสารสี พบว่ากุนเชียงสูตรควบคุมและสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 จะมีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงค่าสีไปในแนวทางเดียวกัน โดยมีค่า L* และ a* ลดลง ค่า b* เพิ่มขึ้น เมื่อเก็บในถุงโพลีโพรไพลีน ปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Development on Products from *Monascus purpureus* TISTR 3090 – Nata Complex as an Alternative to Nitrite in Chinese Sausage
Name	Miss Natthawadee Kijsangtong
	Mr. Weerasak Boonchuay
	Miss Apinya Suwanthaweekul
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Assoc. Prof.Duangjai Ochaikul
Special Project co-advisor	Assist. Prof.Linchong Suklumpoo

ABSTRACT

Aim of this project was reduced amount of products from *Monascus purpureus* TISTR 3090 – nata complex as an alternative to nitrite in Chinese sausage. Amount of products 0.10%, 0.20%, 0.30%, 0.40%, 0.50% of meat weight were assessed by sensory panels and compared with nitrite used control products. The results found Chinese sausage with 0.10% product from *Monascus purpureus* TISTR 3090 – nata complex obtained the high acceptability score in all characteristics, no significant difference from control sample ($P \leq 0.05$). For color measuring, it was revealed that control sample had the highest L* value whereas the higher content of products from *Monascus purpureus* TISTR 3090 – nata complex resulted in decreasing L* value and increasing a* value. For study on products shelflife, it was found that Chinese sausage with 0.10% product from *Monascus purpureus* TISTR 3090 – nata complex was lower water activity (a_w), moisture content and racidity than control, color stability during storage had similar stability trend. It found that L* and a* value reduced, b* increased when stored in vacuum polypropyrene bags and kept at room temperature for 6 weeks.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนและการช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษา และกรรมการโครงงานพิเศษที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัยตลอดจนการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง และผศ.ลินจง สุขลำภู ที่เป็นประธานกรรมการและกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษ ที่ช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้การเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดลอง และช่วยอำนวยความสะดวกด้านต่าง ๆ ทำให้โครงงานพิเศษสามารถสำเร็จได้

สุดท้ายนี้ต้องขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และรุ่นพี่ เพื่อน ๆ ทุกท่าน และผู้มีส่วนร่วมในโครงงานพิเศษทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนและเป็นส่วนหนึ่งในความสำเร็จนี้

นางสาวณัฐวดี กิจแสงทอง
นายวีระศักดิ์ บุญช่วย
นางสาวอภิญญา สุวรรณ์ทวีกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส	3
2.2 การจัดจำแนกเชื้อรา *Monascus* sp.	4
2.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส	4
2.4 สายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อราโมแนสคัส	6
2.5 สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส	7
2.6 คุณสมบัติของสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส	16
2.7 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส	16
2.8 การใช้ประโยชน์	24
2.9 ความปลอดภัยของสารสีโมแนสคัส	28
2.10 การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสีโมแนสคัส	28
2.11 บทบาทของสารเคมีที่ใช้ในการหมักเชื้อต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์สัตว์	29
2.12 สารป้องกันการเสื่อมเสียจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมี	41
2.13 การผลิตและแปรรูปวุ้นมะพร้าว	43
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	54
3.1 เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 วัตถุดิบ และสารเคมี	54
3.3 อุปกรณ์	55
3.4 วิธีการทดลอง	55
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	59
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	78
เอกสารอ้างอิง	80
ภาคผนวก	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณแร่ธาตุและวิตามิน ในข้าวสารพันธุ์ข้าวมะลิและข้าวแดงที่ผลิตได้ 25

ตารางที่ 2.2 ปริมาณไนเตรทในน้ำที่ประเทศไทยกำหนด 35

ตารางที่ 2.3 ปริมาณไนเตรท ไนไตรท์สูงสุดเท่าที่ยอมให้มีในอาหารที่สหภาพโซเวียตแนะนำ 36

ตารางที่ 2.4 ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของวุ้นมะพร้าว 46

ตารางที่ 2.5 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในการสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* 49

ตารางที่ 3.1 แสดงสูตรควบคุมของกุนเชียง 57

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า L* a* และ b* ของสีภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมกับกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในระดับต่าง ๆ กัน 62

ตารางที่ 4.2 แสดงคะแนนเฉลี่ยการทดสอบในด้านคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกุนเชียง 65

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า water activity (a_w) ของผลิตภัณฑ์กุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ 67

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์กุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ 68

ตารางที่ 4.5แสดงค่าความหืนของกุนเชียงสูตรควบคุม และกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10(มิลลิลิตร malonaldity ต่อกิโลกรัม) 70

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณแอนแอโรบิกแบคทีเรีย และ *Clostridium perfringens* ของผลิตภัณฑ์กุนเชียงที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิห้อง (CFU/ml) 72

ตารางที่ 4.7 แสดงค่า L* ภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงค่า a* ภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 75

ตารางที่ 4.9 แสดงค่า b* ภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัส 5

ภาพที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดสำคัญในการแบ่งสายพันธุ์ของสกุลโมแนสคัส 7

ภาพที่ 2.3 การเกิดสาร 6 – MSA และ orsellinic acid จาก acetyl และ malonyl unit 9

ภาพที่ 2.4 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase กับ polyketide synthases 10

ภาพที่ 2.5 โครงสร้างเคมีของรงควัตถุที่แยกจาก *Monascus* spp. 11

ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางโมเลกุลของสารสีที่สกัดได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. 14

ภาพที่ 2.7 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อรา *Monascus* sp. 14

ภาพที่ 2.8 สีของข้าวแดงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. 24

ภาพที่ 2.9 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* sp. 26

ภาพที่ 2.10 สูตรโครงสร้างไอโซเมอร์ของไนเตรท 29

ภาพที่ 2.11 สูตรโครงสร้างไอโซเมอร์ของไนไตรท์ 30

ภาพที่ 2.12 pathwayการสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย 47

ภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการผลิตกุนเชียง 58

ภาพที่ 4.1 แสดงผลิตภัณฑ์กุนเชียงสูตรควบคุมและสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในระดับต่าง ๆ 61

ภาพที่ 4.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า water activity (a_w) ของผลิตภัณฑ์กุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ 67

ภาพที่ 4.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงความชื้นของผลิตภัณฑ์กุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ 68

ภาพที่ 4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความหืนของกุนเชียงที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 70

ภาพที่ 4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า L* ภายในของกุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์ 73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า a* ภายในของกุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 75

ภาพที่ 4.7 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า b* ภายในของกุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ 77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

วุ้นมะพร้าวทำมาจากการหมักอาหารเหลว ไม่ว่าจะเป็นน้ำผัก น้ำผลไม้อื่น ๆ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โดยใช้เชื้อแบคทีเรียชื่อ *Acetobacter xylinum* หากหมักด้วยน้ำมะพร้าวทางฟิลิปินส์จะเรียกว่า Nata de Coco หากหมักด้วยน้ำสับปะรดจะเรียกว่า Nata de Pina วุ้นมะพร้าวหรือวุ้นสวรรค์มีชื่อเป็นภาษาอังกฤษว่า Bacterial cellulose วุ้นมะพร้าวส่วนที่เรานำมารับประทานนั้นคือ เส้นใยเซลลูโลสที่ลอยอยู่บนน้ำหมัก (อาหารเหลว น้ำผัก น้ำผลไม้ อาหารเลี้ยงเชื้อ) และแบคทีเรียนั่นเอง โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิต แผ่นวุ้นที่ลอยอยู่มีสีขาว มีรูปร่างลักษณะคล้ายดอกเห็ดที่ขยายตัวหนาขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาหมัก จึงเรียกกันว่า เห็ดวุ้นมะพร้าว ต่อมาจึงเรียกว่า วุ้นมะพร้าว เฉย ๆ เพื่อจะได้ไม่เข้าใจผิดว่าเป็นเห็ด วุ้นมะพร้าวที่ได้จากแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* จะมีลักษณะเฉพาะคือ เส้นใยสีใสมีขนาดเล็กมากจึงทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่าง ๆ ได้ดี เส้นใยไม่มีเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพกตินเจือปน ทั้งยังมีความเป็น Hydrophilic สูง อุ้มน้ำได้ 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง ทนต่อแรงดึงได้สูงกว่าไฟเบอร์สังเคราะห์ต่าง ๆ สามารถใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก หาง่าย ควบคุมคุณสมบัติทางกายภาพได้ตามที่ต้องการ อย่างไรก็ตามมีการศึกษากันเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับสีของวุ้นมะพร้าว ซึ่งสีของวุ้นมะพร้าวสามารถปรับปรุงให้มีสีที่ดีขึ้นได้ และนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหาร

Monascus purpureus เป็นเชื้อราที่สร้างเส้นใยที่แท้จริงและสร้างสารมีสีแดงในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งบนข้าวนึ่ง ขนมปัง รำข้าว และธัญพืชต่าง ๆ โดยมีการใช้เป็นสารที่ให้สีและกลิ่นรสตามธรรมชาติมาเป็นเวลานานแล้ว (Lin และ Demain, 1991) ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงการควบคุมโครงสร้างของเชื้อรา *Monascus purpureus* เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตสารสีแดงจากการหมัก เพื่อนำมาใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้น สารสีที่ได้ถูกนำมาใช้เป็นสีผสมอาหารแทนสีสังเคราะห์ เพราะมีราคาถูก มีความปลอดภัยสูง คงตัวต่อ pH และความร้อน อีกทั้งยังไม่พบว่าเป็นสารก่อมะเร็งเหมือนสีผสมอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์อีกด้วย จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus purpureus* พบว่าไม่มีพิษต่อการฟักตัวของไข่ไก่ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมของเม็ดเลือดขาว ไม่พบความผิดปกติในหนูทดลอง และยังประกอบด้วยสารที่ใช้เป็นยารักษาโรค เช่น Monakolin k (mevinolin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รุ้นมะพร้าวที่มีสีแดงที่เกิดจากการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Monascus purpureus* จะนำมาใช้ในการปรุงแต่งสีของอาหาร ก่อให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น กุนเชียง ได้มีการใช้สารไนไตรท์เป็นสารเจือปน เพื่อให้กุนเชียงมีสีแดง และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่ปริมาณสารไนไตรท์ที่ตกค้างจะเป็นสารตั้งต้นของการเกิดสารไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งในปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสำคัญกับความปลอดภัยมากขึ้น ดังนั้นการใช้สารสีจากธรรมชาติจากรุ้นมะพร้าวสีแดงที่เกิดจากการเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับเชื้อรา *Monascus purpureus* โดยผ่านกระบวนการต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์กุนเชียงที่ก่อให้เกิดมะเร็งดังกล่าว ซึ่งเป็นการลดปริมาณการใช้สารไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์ และเพิ่มความปลอดภัยและมีประโยชน์แก่ผู้บริโภคอีกด้วย เนื่องจากรุ้นมะพร้าวมีแคลอรี่ต่ำ มีไฟเบอร์สูงช่วยในการขับถ่ายป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ ไฟเบอร์ของรุ้นมะพร้าวเป็น gel form ร่างกายสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ง่ายกว่าไฟเบอร์จากพืช

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ทดแทนไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์กุนเชียง
2. ศึกษาอายุการเก็บรักษาและความคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์กุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ทดแทนไนไตรท์

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ทดแทนไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์กุนเชียง รวมทั้งอายุการเก็บรักษาและความคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นการใช้สารสีจากธรรมชาติในการปรุงแต่งสีในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และทดแทนไนไตรท์ทำให้ผู้บริโภคมีความปลอดภัยมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส

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

ต่อมาได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารสี โดยใช้วิธีต่างๆ เช่น ใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) การใช้รังสีต่างๆ การใช้เทคนิคโปรโตร พลาสต์ฟิวชั่น การปรับปรุงกรรมวิธีในการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบครั้งคราว (batch culture) แบบป้อน (fed – batch culture) และการใช้วิธีการตรึงเซลล์

เชื้อราโมแนสคัสนอกจากจะสามารถสร้างสารสีได้แล้ว ยังสามารถสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด ในปี 1977 Wong และ Bau รายงานถึงการค้นพบสารต่อต้านแบคทีเรียจากเชื้อรา *M. purpureus* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Bacillus* sp. *Streptococcus* sp. และ*Pseudomonas sp.* เป็นต้น สารนี้มีชื่อว่า monascidin A

นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ เอทานอล สารโมนาโคลิน (monacolins) ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และสารช่วยในการตกตะกอน (flocculant) อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การจัดจำแนกเชื้อรา *Monascus* sp.

เชื้อราโมแนสคัสสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

Class	Ascomycetes
Subclass	Plectomycetidae
Order	Eurotiales
Genus	Monascus

2.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

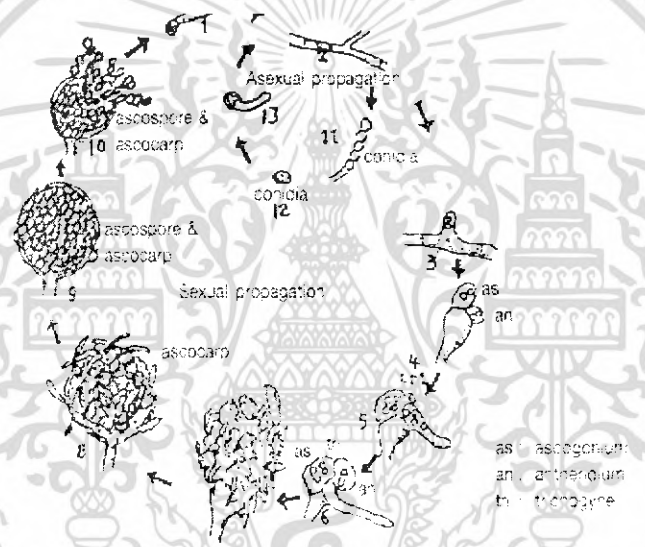
เชื้อราโมแนสคัส (*Monascus* spp.) เคยจัดอยู่ในวงศ์ Aspergillaceae อันดับ Plectascales แต่ปัจจุบันจัดอยู่ในวงศ์ Monascusceae กลุ่ม Ascomycetes กลุ่มย่อย Plectomycetidae อันดับ Eurotiales (Alexopoulos and Mims, 1979; Hawksworth *et al.*, 1995) เส้นใยมีผนังกั้น มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายและมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยอายุอ่อนมีสีขาวแต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงม่วง

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการสร้างโคนิเดียเจริญมาจากโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) โคนิเดียมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือเกิดติดต่อกันเป็นลูกโซ่ (Hawksworth and Pitt 1983) โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเกิดสีแดงได้บ้าง โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้น 0-1 ด้าน ถ้ามีขนาดยาวจะมีผนังกั้น 2-6 ด้าน เป็นสายตรงหรือขดเป็นเกลียว และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออายุแก่ขึ้น การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร เช่น C Medium (Hiroi *et al.*, 1979) เหมาะสมสำหรับการเกิดโคนิเดียของโมแนสคัส นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีกหลายประการ เช่น อายุสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง แสงและอุณหภูมิ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปโคนิเดียจะงอกภายใน 4 ชั่งโมง เมื่อมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมด้วยการสร้าง germ-tube ขึ้นมา 1 อัน หรือ 2 อัน ซึ่งการงอกของโคนิเดียกระตุ้นได้ด้วยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด (Wong and Bau, 1978)

ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราโมแนสคัส คล้ายๆกับเชื้อราอื่นใน Class Ascomycetes มีการสร้างเพอริทีเซียม (perithecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้าน (Kolotila, 1978, 1980; Smith, 1969; Von Arx, 1974) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก โดยสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิด คือแอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทอริเดียม (antheridium) แอสโคโกเนียม (ascogonium) เกิดการฟิวชัน (fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วจึงจะมีการวิวัฒนาการต่อไป คือแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส ตามมาด้วยไมโตซีส มี daughter nuclei จากการแบ่งตัว มีการขยายผนังเซลล์รวมออกเรียกว่า การสร้างแอสโคคาร์ปขึ้นในที่สุด ภายในเพอริทีเซียมมีแอสโคสปอร์มากมาย โดย แอสโคสปอร์จำนวน 2-8 รวมอยู่ภายในแอสคัส แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์งอกเป็นเส้นใยใหม่ขึ้น วัฏจักรชีวิตของเชื้อรานี้แสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัส

ที่มา : Lin และ Demain (1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

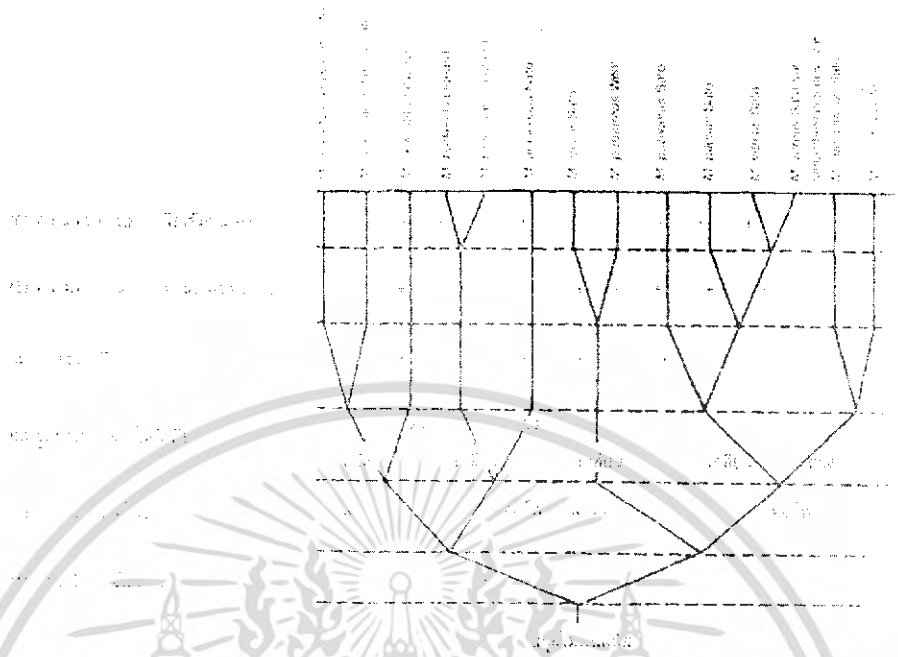
2.4 สายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อราโมแนสคัส

ปี ค.ศ. 1884 Van Tieghem ได้แยกและให้ชื่อเชื้อราโมแนสคัส และแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ *M. mucoroides* และ *M. ruber* ต่อมาปี ค.ศ. 1895 Went ได้แยกสายพันธุ์สำคัญ คือ *M. purpureus* จากข้าวแดง หรืออังคัก ปัจจุบันมีการรวบรวมเชื้อราโมแนสคัสโดยคณะนักวิจัยหลายกลุ่ม แต่ละกลุ่มก็ใช้หลักการแตกต่างกันในการแบ่งสายพันธุ์ เช่น โดยอาศัยสมบัติสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา (Lizuka and Lin, 1981) แสดงไว้ในภาพที่ 2.2 ใช้เฉพาะสัณฐานวิทยา (Hawksworth and Pitt, 1983)

เชื้อราโมแนสคัสทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *M. pilosus, M. purpureus, M. ruber* และ *M. floridanus* นอกจากจะแตกต่างกันด้านลักษณะทางสรีรวิทยาแล้ว ทางด้านเอนไซม์วิทยายังต่างกันอีกด้วย โดยเชื้อราในกลุ่ม *M.pilosus* พบกิจกรรมเอนไซม์ β-galactosidase และ α-glucosidase *M. purpureus* พบเอนไซม์ polypectase และ cystine arylamidase และพบเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสใน *M. ruber* (Bridge and Hawksworth 1985) ส่วน *M. floridanus* เป็นสายพันธุ์เดียวที่พบกิจกรรมเอนไซม์ trypsinase แต่ไม่พบเอนไซม์ valine arylamidase เหมือนสายพันธุ์อื่น (Bridge and Hawksworth, 1985; Bernard and Cannon, 1987) ส่วน Nishikawa *et al.* (1988) ได้พบว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่าง ๆ ส่วนใหญ่จะมีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสมากกว่าแอซิดโปรตีเอส และมีน้อยชนิดที่มีเอนไซม์โปรตีเอสทั้ง 2 แบบ

ต่อมา Nishikawa and lizaka (1993) ได้เสนอความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อราโมแนสคัสโดยใช้หลักการวิเคราะห์ acrylamide gel electrophoresis สามารถแบ่งเชื้อรานี้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่ I และกลุ่มที่ II โดยอาศัยความเหมือนกันของวิทยาเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น เอนไซม์เอสเทอเรส แลคเตตดีไฮโดรจีเนส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และกลูโคส-6-ฟอตเฟสดีไฮโดรจีเนส ส่วนในประเทศอิรักมีรายงานพบสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อราโมแนสคัส คือ *M. pallens* และ *M. sangulneus* (Cannon *et al.*, 1995) ล่าสุด Udagawa and Baba (1998) ได้รายงานว่าพบสายพันธุ์ใหม่คือ *M. lunisporus* เทคนิคทางพันธุกรรมได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราข้าวแดง ริเริ่มโดยคณะวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ชุลี, 2536, 2542; กมลนันท์ และคณะ 2540; เสาวนิตย์ และคณะ, 2540; กมลนันท์และคณะ, 2541; เสาวนิตย์และคณะ, 2542; Chaisrisook , 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดสำคัญในการแบ่งสายพันธุ์ของสกุลโมแนสคัส

+ เกิด , สร้าง ; - ไม่เกิด , ไม่สร้าง

ลาวา (lava) โคโลนีลักษณะผิวหน้าภูเขาไฟ

เทอร์ฟ (turf) โคโลนีลักษณะเรียบแบบสนามหญ้า

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Lizuka and Lin (1991)

2.5 สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส

2.5.1 สารสีจากเชื้อโมแนสคัส

เป็นสารประเภทโพลีคีไทด์ (polyketide) ที่เกิดจากการรวมตัวของ acetyl unit 1 หน่วยกับ malonyl unit 3 หน่วยขึ้นไปได้เป็นไพรเมอร์ (primer) และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา วิถีการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์เหมือนกับกรดไขมันแต่ไม่พบสารตัวกลางที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชัน ในการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์นั้นสายของโพลีคีไทด์จะยาวขึ้นตามจำนวนของคาร์บอน 2 หน่วยที่มาจาก malonyl unit ที่ถูกเติมเข้าไปในสายไพร์เมอร์เกิดเป็น triketide tetraketide pentaketide และ polyketides ตามลำดับ ต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยา cyclisation และ aromatization ได้เป็นสาร 6-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

methylsalicylic acid หรือ orsellinic acid ซึ่งเป็นสาร tetraketide เริ่มต้นที่จะนำไปสู่การสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์อื่นๆ ต่อไปดังภาพที่ 2.3

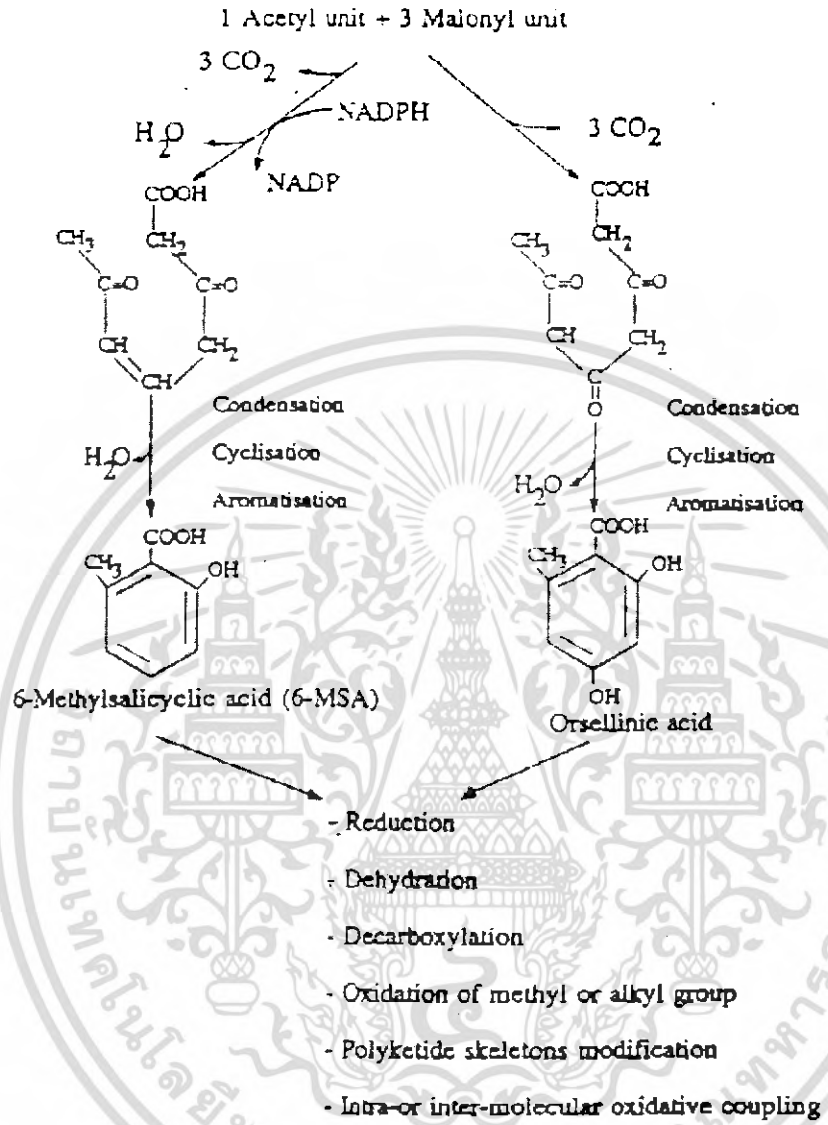
เมื่อได้สารเริ่มต้นแล้วปฏิกิริยาที่จะเกิดขึ้นต่อไปขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ เช่น อาจมีการเติม หรือดึงออกซิเจนออกจากโครงสร้างของสารเกิดปฏิกิริยา decarboxylation มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรูปหรือยักย้ายหมู่ต่าง ๆ ภายในโมเลกุลของสารเกิด intra- หรือ inter- molecular oxidative coupling หรือให้เกิดพันธะระหว่าง C-C หรือ C=O เป็นต้น

สารสีที่สกัดได้จาก *Monascus* sp. เช่น rubropunctatin จาก *M. rubropuntatus* monascorbrin จาก *M. purpureus* และ monascin (monascoflavin) จาก *Monascus* sp. เป็นสารประเภทโพลีคีไทด์ซึ่งเป็นเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ โดยผลิตขึ้นมาคล้ายกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน

เชื่อว่าเอนไซม์โพลีคีไทด์ เป็นเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์สารโพลีคีไทด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ fatty acid synthase อย่างใกล้ชิด จากการจำลองตัวเองที่ผิดพลาดของยีนทำให้สูญเสียขั้นตอนรีดักชันไป ทำให้เอนไซม์ polyketide synthase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โพลีคีไทด์แทนที่จะเป็น fatty acid synthase ซึ่งมีหน้าที่สังเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองแสดงดังภาพที่ 2.4

การสังเคราะห์โพลีคีไทด์ถูกยับยั้งด้วยแสงสีน้ำเงิน โดยพบว่าแสงสีน้ำเงินจะกระตุ้นให้เชื้อราสร้างโคนิเดีย เบต้าแคโรทีนและกรดไขมัน แทนสารโพลีคีไทด์ โดยไปมีผลต่อเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์หรือควบคุมวิถีการสร้างโพลีคีไทด์ การได้รับแสงสีน้ำเงินเวลาเพียง 2 นาทีก็สามารถยับยั้งการสังเคราะห์สารโพลีคีไทด์ได้แล้ว

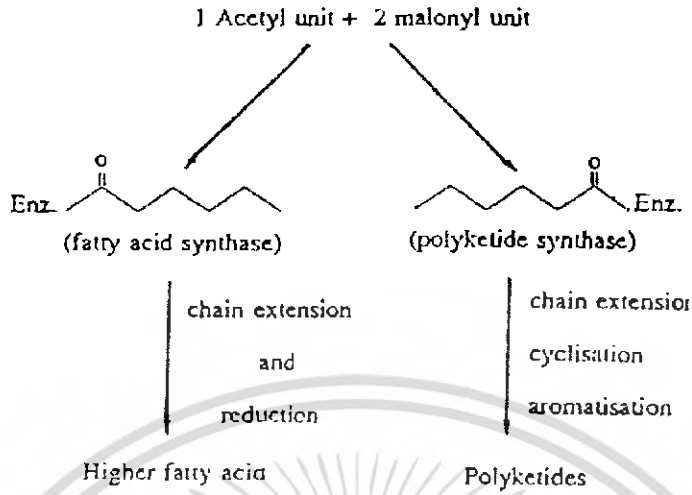
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 การเกิดสาร 6 – MSA และ orsellinic acid จาก acetyl และ malonyl unit

ที่มา : นิสา (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 เปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ fatty acid synthase กับ polyketide synthases
ที่มา : นิสา (2537)

2.5.2 สารสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อรา *Monascus* spp. ผลิตสารสีชนิดต่าง ๆ ดังนี้

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

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

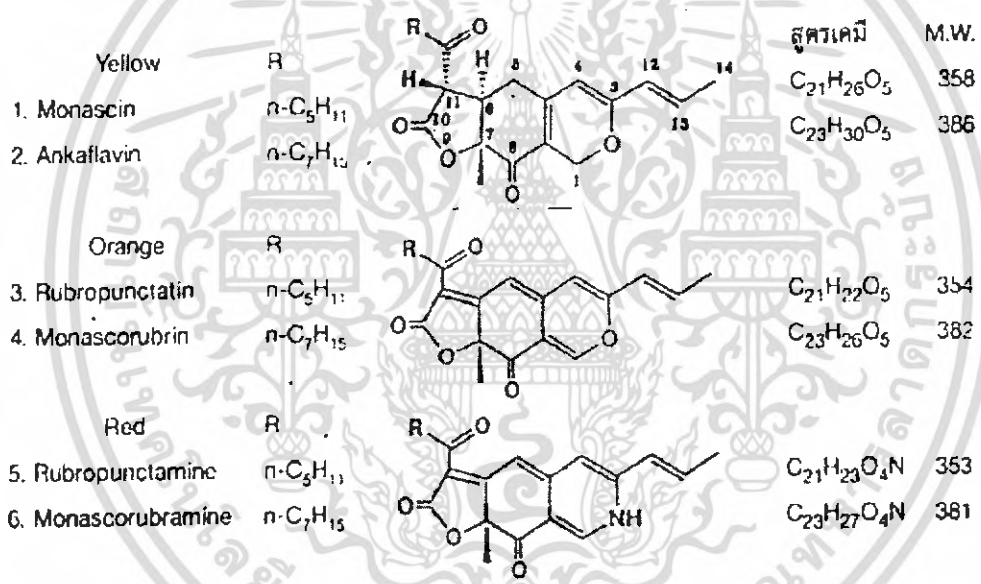
3. รูโบรพังทาทิน (robropunctatin) เป็นสารสีในกลุ่มสีส้ม สูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{22}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 354 สารสีรูโบรพังทาทินสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้สารรูโบรพังทาทินซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาต่อได้กับสังกะสีและกรดแอซิติกได้อะโปรูโบรพังทามีน (aporubropunctamine) สารนี้มีผลึกรูปเข็มสีแดง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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. โมนาสโครูบิน (monascorubin) 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$C_{21}H_{23}O_4N$ น้ำหนักโมเลกุล 353 สารรูโบรพังทามีนเกิดจากสารรูโบรพังทาทินทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียม

6. โมนาสโครูบรามีน (monascorubramine) เป็นสารสีในกลุ่มสีแดง สูตรโมเลกุลคือ $C_{23}H_{27}O_4N$ และน้ำหนักโมเลกุล 381 มีจุดหลอมเหลว 207-208 องศาเซลเซียส สารโมนาสโครูบรามีนเกิดจากสารโมนาสโครูบรินทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียม ดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างเคมีของรงควัตถุที่แยกจาก *Monascus* spp.

ที่มา : บุษบา (2542)

โดยสารสีเหล่านี้เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เชื้อราสร้างขึ้นพร้อม ๆกับการเจริญหรือสร้างหลังจากการเจริญหยุดลงแล้ว มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม Azaphiloner เช่น sclerotiorin และ rotiorin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Haws และคณะ (1959) พบว่าเมื่อนำเส้นใยที่ได้จากการเจริญของเชื้อรา *M.purpureus* ในอาหารเหลว czapek dox อายุ 14-20 วัน มาสกัดด้วย light petroleum และอีเทอร์จะได้สารสีส้มของ rubropunctatin ($C_{21}H_{22}O_5$) และสาสีเหลือง monascin ($C_{21}H_{26}O_5$) สารสีส้ม rubropuntatin ละลายในสารละลายอินทรีย์เกือบทุกชนิด แต่ไม่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 2 นอร์มอลที่อุณหภูมิต่ำ และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายแอมโมเนียจะได้สารสีม่วงของ rubropunctamine ที่ละลายในแอลกอฮอล์ได้ดีที่สภาวะเป็นด่าง แต่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ที่สภาวะเป็นกรดและไม่ละลายในน้ำ เมื่อนำมาทำให้เกิดการรีดักชันด้วยผงสังกะสีจะได้สารไม่มีสี

สารสี rubropunctatin พบครั้งแรกใน *M. rubrapunctatus* โดย Sato ซึ่งแยกมาจาก *M.purpureus* Carels และ Shepherd (1977) พบว่าถ้ามีแอมโมเนียมไนเตรทในปริมาณ 5-10 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อสร้างสารสีค่อนข้างแดง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนมากขึ้นสารสีแดงจะเพิ่มขึ้น ยกเว้นการเพิ่มในปริมาณมากๆ ที่จะไปยับยั้งการเจริญและการสร้างสารสี เนื่องจากสีแดงส่วนมากได้มาจากอาหารที่มีกลูโคสอยู่น้อย เนื่องจากการเจริญของเส้นใยที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูงอาหารจะมีความเป็นกรดมากซึ่งจะไม่ผลิตสารสีแดงออกมา ดังนั้นที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูงๆ เส้นใยอาจจะต้องการสารประกอบไนโตรเจนเพื่อเป็นองค์ประกอบโครงสร้างของเส้นใยในการเจริญเติบโต

Carels และ Shepherd (1977) พบว่าการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งไนโตรเจน และพีเอชเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อ เมื่อแหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์เอกซ์แทรคหรือ ไนเตรตที่พีเอช 6.5 จะสร้างสารสีแดง และจะสร้างสารสีส้มในอาหารที่มีแอมโมเนียมหรือแอมโมเนียมไนเตรตที่พีเอช 2.5 โดยปรับให้มีพีเอชในอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 แต่พีเอชสุดท้ายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารนั้น ๆ พบว่าเชื้อราจะสร้างสารสีแดง ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่เอมีน (NH-group) ของกรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในเซลล์กับสารสีส้ม monascorbrin หรือ rubropunctatin ที่เชื้อราสังเคราะห์ขึ้น ปฏิกิริยานี้ไม่เกิดขึ้นที่พีเอชของการเลี้ยงเชื้อเป็นกรด จึงพบเฉพาะสารสีส้มที่เชื้อราสังเคราะห์ขึ้นเท่านั้น แต่ถ้าพีเอชสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 6 สารสีส้มจะเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์เอมีนของสารสีแดงโดยทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียในน้ำ พบว่าถ้ามีความเข้มข้นแอมโมเนียมไนเตรต 5-10 กรัมต่อลิตร อาจจะมีแอมโมเนียมอิออนอิสระมากกว่าหรือมี อะมิโนกลุ่มอิสระภายในหรือภายนอกเซลล์มากกว่า ซึ่งสามารถที่จะไปทำปฏิกิริยากับสารสีส้มทำให้เปลี่ยนเป็นอนุพันธ์เอมีนของสารสีแดง ส่วนสารสีเหลือง monascin และ ankaflavin นั้นสันนิษฐานว่าได้มาจากการถูกออกซิไดส์ของสารสีส้ม มีรายงานว่าเชื้อราโมแนสคัสสังเคราะห์ได้ทั้งสาร สีส้มและสีเหลือง เฉพาะสารสีแดงเท่านั้นที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี ข้อสันนิษฐานดังกล่าวต่างจากการทดลองของ สมชาย (2536) ที่พบว่าเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายพันธุ์ KB20M10.2 สร้างสารสีเหลืองได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเป็น

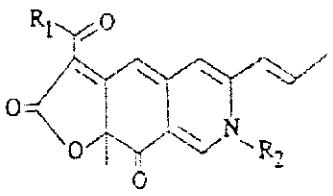
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลาง และมีหมู่เอมีนจากกรดอะมิโนเหลือเพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา ดังนั้นการสร้างสารสีเหลืองจึงน่าจะมีปัจจัยอื่นๆ เกี่ยวข้องนอกเหนือจากไนโตรเจนและพีเอชเริ่มต้น

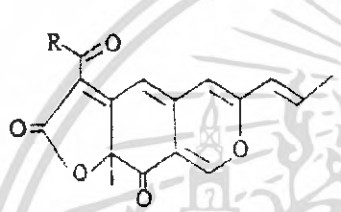
Manchand และคณะ (1973) พบว่าเชื้อโมแนสคัสแต่ละสายพันธุ์ให้สารสีแตกต่างกันออกไป *M. rubropunctatus* สร้างสาร rubropunctatin และ monascin *M. purpureus* สร้างสาร monascorubrin และ monascin ส่วน *M. rubriginosus* สร้างเฉพาะสาร monascin เท่านั้น และพบการสร้างสารสีเหลืองตัวใหม่จากเชื้อรา *M. anka* มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ monascin มีชื่อว่า ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$) ต่อมา ได้ใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆสกัดสารสีออกจากข้าวแดงซึ่งเกิดจากการเจริญของเชื้อรา *M.anka* พบสารสี 3 กลุ่ม คือ สารสีแดงประกอบด้วย rubropunctamine และ monascorubramineสารสีส้มประกอบด้วย rubropunctatin และ monascorubrin และสารสีเหลืองประกอบด้วย monascin และ ankaflavin โครงสร้างโมเลกุลของสารสีทั้ง 3 กลุ่ม แสดงดังภาพที่ 2.6

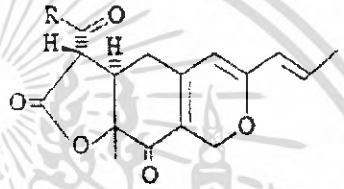
Wong และ Bau (1978) ศึกษาผลของแสงต่อการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส พบว่าแสงอุลตราไวโอเลต และสารบางอย่างที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. กระตุ้นให้เชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้น้อย หรือไม่สร้างสารสีเลย (albino mutant) สร้างสารสีได้ดีขึ้น ในขณะเดียวกันก็ยับยั้งการสร้างสีในสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้สูง แสงสีขาว แสงสีน้ำเงินและแสงสีแดงกระตุ้นการสร้างสารสีเหลืองแต่ไม่มีผลต่อสารสีแดง ทั้งนี้เนื่องจากสารสีเหลืองทำหน้าที่เป็นตัวรับแสง (photoreceptor) ซึ่งอาจเป็นสารเริ่มต้นหรือสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์สารสีก็เป็นได้ สารสีเหลืองนี้สามารถถูกออกซิไดส์ไปเป็นสารสีส้มคือ rubropunctatin ได้ในหลอดทดลอง และปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดย้อนกลับได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง ดังแสดงดังภาพที่ 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



	R_1	R_2
1 Rubropunctamine	n-C_5H_{11}	H
2 Monascorubramine	n-C_7H_{15}	H
3 N-glucosylrubropunctamine	n-C_5H_{11}	glucose
4 N-glucosylmonascorubramine	n-C_7H_{15}	glucose

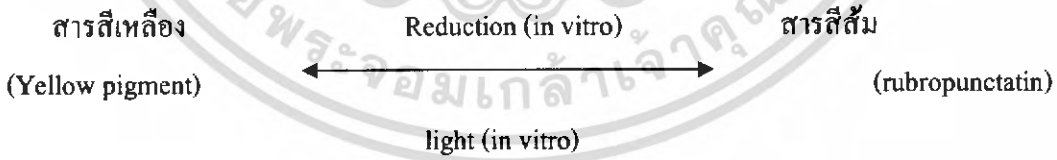




	R		R
5 Rubropunctatin	n-C_5H_{11}	7 Monascin	n-C_5H_{11}
6 Monascorubrin	n-C_7H_{15}	8 Ankaflavin	n-C_7H_{15}

ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางโมเลกุลของสารสีที่สกัดได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp.

ที่มา : Sweeny *et al.* (1981)



ภาพที่ 2.7 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อรา *Monascus* sp.

ที่มา : Wong and Bau (1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 การปล่อยสารสีออกจากเส้นใยของเชื้อราโมแนสคัส

Su และ Huang (1980) กล่าวว่าสารสีที่เชื้อราโมแนสคัสสร้างขึ้นมีลักษณะเป็น granular fluid ซึ่งจะถูกขับออกมาตามช่องหรือรอยแตกของผนังเส้นใ ยในบางครั้งเมื่อขับออกมาสารสียังคงติดอยู่กับปลายเส้นใย และสะสมจนมีจำนวนมากก่อนหลุดจากเส้นใย สารสีบางส่วนสะสมอยู่ภายในเส้นใยด้วย

Lin และ Lizuka (1982) การทดลองเลี้ยงเชื้อรา *M. kaoliang* R-10847 บนอาหารแข็ง Mantou meal เพื่อศึกษาการสร้างสารสีนอกเซลล์ พบว่าเชื้อราจะเริ่มต้นสร้างสารสีและปล่อยออกมาในวันที่ 1 ของการเจริญพร้อมกับสารสีที่มีลักษณะหนืดชนิดหนึ่ง (viscousus subtance) ทำให้สารสีเกาะติดอยู่กับเส้นใย และสะสมเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งเส้นใยแตกจึงหลุดออกมา ไม่พบการสะสมสารสีภายในเส้นใย

Lin และ Lizuka (1982) พบว่าการชักนำให้เชื้อราเกิดการผ่าเหล่าเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีรอยรั่ว (leakage) ของผนังเส้นใยมากขึ้นส่งผลให้เชื้อราสร้างสารสีได้ดีขึ้นเนื่องจากมีความสมดุลย์ระหว่างการสังเคราะห์สารสี และการปล่อยออกจากเส้นใย การเติมทวิน (Tween) 80 ปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอีกวิธีที่ช่วยให้การปล่อยสารสีออกจากเส้นใยเพิ่มขึ้น

2.5.4 การแยกสีโมแนสคัส

วิธีสกัดสีออกจากเส้นใยจะแตกต่างกันไป ทั้งทางด้านการใช้ตัวทำละลายเป็นตัวสกัดและปริมาณความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยได้มีการทดลองใช้เมทานอล คลอโรฟอร์ม เอทานอลและ อะซีโตน ในการสกัดสีออกจากเส้นใย พบว่าสารที่สกัดได้ดีที่สุด คือเมทานอล ซึ่งสีที่สกัดได้จะมีค่าดูดกลืนแสงเด่นอยู่ที่ 2 สี ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร (สีเหลือง) และ 500 นาโนเมตร (สีแดง)

การใช้เอทานอลร้อยละ 50 ในการสกัดสีออกจากเส้นใย นำเอาส่วนใสที่กรองได้ไปวัดค่าสีด้วยสเปกโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร นอกจากนี้ยังสามารถวัดค่าสีที่ละลายน้ำได้และสีที่ละลายได้ทั้งในน้ำและละลายในเอทานอลร้อยละ 95 ได้ด้วย นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตรและ 500 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 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 เมื่อแยกสารสีจากเส้นใยมาทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ได้จากแป้งถั่วเหลือง จะได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดงเข้ม ละลายในน้ำได้ดี สารสีจะไวต่อแสงเมื่อละลายในน้ำแต่จะทนต่อแสงมากขึ้นเมื่อละลายในเอทานอล และทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้ดีเมื่ออยู่ในตัวทำละลายพีเอชเป็นกลางหรือเบส

Sweeny และคณะ (1981) การทดสอบคุณสมบัติของสารสีโดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ดีขึ้นคือN-glucosylribropunctamine และ N-glucosylmonascorunramine พบว่าสารทั้งสองคงสภาพต่อแสงแดดได้ดีขึ้นเมื่อเติมสาร quercetin-5-sulfonic acid สำหรับพีเอช 2.8 สาร 6-hydroxy-1,4-naphthoquinone สำหรับพีเอช 6.0 และ สาร 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 เมื่ออยู่ในตัวทำละลายพีเอชเป็นกลางหรือด่างจะทนความร้อนและแสงอัตราไวโอเลตได้ดี โดยเหลือสารสีมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อได้รับแสงอุลตราไวโอเลตนาน 30 ชั่วโมง ส่วนวรรณกา (2528) พบว่าน้ำสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัสโดยผ่านกระบวนการใดๆคงตัวได้ดีที่พีเอชเป็นกลางถึงด่างเช่นกัน ทนต่ออุณหภูมิน้ำเดือดนาน 15 นาที และคงตัวได้ดีในสารละลายโซเดียมเบนโซเอท กลีเซอรอล น้ำและกรดอะซิติก

2.7 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส

2.7.1 การเลี้ยงเชื้อราในสภาพหมักแห้ง (Solid cultivation)

ข้าวแดงหรืออังคักเป็นผลิตภัณฑ์สารสีที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนข้าวนึ่งรู้จักกันมาช้านานแถบตะวันออก เช่น ประเทศจีน ประเทศแถบเอเชียใต้ เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่น ฟิลลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น เชื้อราที่เจริญบนข้าวสามารถสร้างสารสีออกมานอกเซลล์ได้มาก ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี (Johns และ Stuart, 1991) เชื้อราโมแนสคัส สายพันธุ์ที่นิยมใช้หมักข้าวแดงคือ *M. purpureus* และ *M. anka* ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของข้าวแดงมี ผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ศึกษาไว้มากมาย ส่วนใหญ่จะเป็นปัจจัยเกี่ยวกับสายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์เชื้อรา สภาวะการเลี้ยง เช่น ความชื้น อุณหภูมิบ่ม ความเป็นกรดด่าง เป็นต้น

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักของโมแนสคัสบนอาหารแข็งเพื่อผลิตสารสี

2.7.1.1. สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส

โดยทั่วไป เชื้อราโมแนสคัส เมื่อเจริญบนเมล็ดข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั้งผิวหน้า และแทรกทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าวนั้นก็จะมีการสร้างสารสีได้ภายหลังจากการบ่มไปได้นาน 3 วัน สารสีเหล่านี้เมื่อมีการนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าสารสีแดงทั่วไปจะมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด 2 จุด ที่ 420 และ 500 นาโนเมตร บางสายพันธุ์ให้สีข้าวแดง หรือ อังคัก เป็นสีแดงสวย หรือแดงชมพูแก่ จะมีความโค่ง (peakedness) ที่จุด 500 นาโนเมตร สูงกว่าที่ 420 นาโนเมตร เช่นที่พบในสายพันธุ์ของ *M. purpureus* หรือ *M. anka* แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงเข้มคล้ำ โดยมีค่าความโค่งที่ 420 นาโนเมตร สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร หรือค่าความโค่งที่ 370 สูงกว่า 500 นาโนเมตร เป็นต้น เช่น สายพันธุ์ *M. barkeri* (พลายแก้ว และบุษบา, 2534) หรือ *M. kaoliang* (บุษบา และวรรณภา, 2528)

2.7.1.2. สับสเตรต

สับสเตรตที่ใช้ในการหมักสีโมแนสคัสแบบแห้งนั้น ปกติจะเป็นข้าว (Palo *et al*., 1960) หรือเมล็ดธัญพืชอื่น ๆ (พลายแก้ว และบุษบา, 2534; Han, 1990; Lin and Lizuka, 1983)

1. ข้าว

Palo และคณะ (1960) ได้ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างสีของ *M. purpureus* และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอังคัก มีดังต่อไปนี้ ความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ pH ระหว่าง 3.0 – 7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่สายพันธุ์ข้าวเหนียวให้ผลไม่ดีนัก บุษบา (2518) การสร้างสีของ *M. purpureus* โดยใช้สภาวะต่อการผลิตข้าวแดงของ Palo และคณะ (1960) มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ต่างๆ ของไทย พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวพันธุ์หอมมะลิให้สีเข้มใกล้เคียงกัน แต่ข้าวเหนียวกลับให้กลิ่นหอมมากกว่าข้าวหอมมะลิ กลิ่นหอมดังกล่าว คือ กลิ่นเอสเทอร์ และแอลกอฮอล์ปนกัน ทั้งนี้ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวเจ้าพันธุ์หอมมะลิให้ผลความเข้มของสีใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ญี่ปุ่น ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์อื่นๆ ของไทย คือ พันธุ์เส้าไห้ พันธุ์ธรรมดา ฯลฯ นั้นล้วนแต่ให้สีและความหอมน้อยกว่ามาก ส่วนพันธุ์เหลือง 148 กข 23 กข 25 เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงมากกว่าพันธุ์ กข 7 และข้าวดอกมะลิ 105 เชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวมีเพียงพอต่อการสร้างสารสี จึงไม่จำเป็นต้องเติมเปปโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67302

Schumacher และคณะ (1996) พบว่าข้าวจากแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศเกาหลี มีผลต่อการสร้างสีของข้าวแดง และพบว่าข้าวจากแหล่งปลูก Punpo ให้ผลดีที่สุด

2. เมล็ดธัญพืชและอื่นๆ

พลายแก้ว และบุษบา (2534) ได้ศึกษาแหล่งสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสี โมแนสคัส เปรียบเทียบกับการผลิตบนข้าวโดยใช้เมล็ดข้าวโพด มันเทศ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง ขนมปัง แทนข้าวต่อการเจริญ การสร้างสี และการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* พบว่าขนมปังให้ค่าสีแดงมากที่สุด ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Lin และ Lizuka (1982) รองลงมาคือมันฝรั่ง และปลายข้าวหอมมะลิ นอกนั้นให้สีไม่ดีนัก ส่วนการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* พบว่า ถั่วเหลืองให้ปริมาณสปอร์สูงสุด รองลงมาคือ ถั่วเขียว ขนมปัง และปลายข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ Rashbaum and Yueh (1983) และการทดลองใช้ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และข้าวบาร์เล่ย์ เป็นสับสเตรตแทนข้าว พบว่าให้ผลดีเช่นกัน

2.7.1.3. ความชื้น

Palo และคณะ (1960) รายงานว่าความชื้นต่ำกว่า 50 เปอร์เซนต์ ให้ผลดีต่อการสร้างสีอังคักของ *M. purpureus* เชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าความชื้น 60 เปอร์เซนต์ ให้ผลดีเมื่อมีการเขย่า หรือการให้อากาศช่วยให้เชื้อราสร้างสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น และการหมักข้าวแดงในสภาพที่มีความชื้นสูงมากไปนั้น เชื้อราโมแนสคัสจะย่อยแป้งได้สูง แต่สีกลับน้อยลง Lotong และ Suwanarit (1990)ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงในถุงพลาสติกของเชื้อรา *Monascus* sp. NP 1 คือ 32.6 เปอร์เซ็นต์ แต่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 39.6 เปอร์เซนต์ นั้น อัตราการสร้างสีจะลดลง ความชื้นต่ำเกินไป ทำให้เชื้อราเจริญได้ไม่ดี ส่งผลให้การสร้างสีไม่ดีด้วย ความชื้นสูงเกินไปเกิดการเจริญและการสร้างเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสมาก เกิดการสะสมกลูโคสยับยั้งการสร้างสีได้ จึงพัฒนาสายพันธุ์กลายที่ทนกลูโคสได้สูงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตข้าวแดง (กังสดาลย์, 2538; กังสดาลย์ และคณะ, 2539) ในขณะที่ Han (1990); และ Stuart (1991) พบว่าถ้าความชื้นเริ่มต้นที่ 50-56 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้สีสูงสุดภายใน 8 วัน พลายแก้ว และบุษบา (2534) การศึกษาสภาพวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสีของ *M. kaoliang* ที่ให้สีแดง โดยศึกษาเวลาในการแช่ข้าว และเวลาสะเด็ดน้ำ และ *M.barkari* ที่ให้สีเหลือง ในสภาพที่เป็นกรด พบว่าเวลาแช่ข้าวนาน 8 ชั่วโมง และสะเด็ดน้ำ 5-10 นาที ที่ทำให้ข้าวมีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์ เหมาะต่อการสร้างสีแดงของ *M. kaoliang* และสีเหลืองของ *M.barkari* นอกจากนั้นยังพบเพิ่มเติมว่าการแช่ข้าวในน้ำนานเกินไปทำให้เมล็ดข้าวเกาะกัน การผึ่งสะเด็ดน้ำชั่วครู่ก็เพียงพอ มิฉะนั้นอาจทำให้ข้าวผึ่งลมมากเกินไป ทำให้ผิวหน้าแห้งเกินไป ไม่เป็นผลดีต่อการสร้างสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1.4. พีเอช

Palo (1960) รายงานว่า *M. purpureus* สามารถสร้างสารสีแดงได้ในพีเอชระหว่าง 3.0-7.5 (พลายแก้วและบุษบา, 2534) พบว่าเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจะไม่มีผลต่อการสร้างสีเหลืองของ *M. barkari*

Carels และ Shepherd (1975) พบว่าพีเอชต่ำมีการสะสมสีส้มเนื่องจากสีส้มโมนาสโครูบรินและรูโบพังทาทินที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้นไม่สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนได้แต่พีเอชสูง ๆ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้จึงให้สีแดงออกมา จากรายงานของ John and Stuart (1991) การศึกษาการปรับพีเอชของน้ำให้ได้ 3.0 4.0 6.0 และ 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลก่อนนำไปแช่ข้าวเป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าพีเอช 6 เป็นพีเอชที่เหมาะสมในการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* FRR 2190

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

2.7.1.5. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึม เพื่อการเจริญเติบโต อุณหภูมิสูงเกินไปทำให้เชื้อเจริญได้ช้า สร้างสารสีในข้าวแดงได้ไม่ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีจะอยู่ระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส

บุษบา (2542) พบว่าอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส แต่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส

2.7.1.6 การให้อากาศ

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต Hesseltine (1965) การเขย่าหรือให้อากาศช่วยให้การสร้างสารสีได้ดีและเร็วขึ้น Han และ Mudgett (1992) ได้ศึกษาพบว่า ก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นสูงทำให้การสร้างสารสีและการเจริญลดลง และไม่สามารถสร้างสารสีและเจริญได้เมื่อมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตั้งแต่ 1.0 บรรยากาศ ก๊าซออกซิเจนตั้งแต่ 0.2 บรรยากาศ ทำให้การสร้างสารสีและการเจริญเพิ่มขึ้นและเพิ่มสูงสุดเมื่อมี ก๊าซออกซิเจนมากกว่า 2.1 บรรยากาศ ความดันออกซิเจนต่อความดันคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.50 ต่อ 0.02 บรรยากาศ จะมีผลต่อการสร้างสารสีแดงมากที่สุด สภาพที่มีก๊าซออกซิเจนคงที่ที่ 0.50 บรรยากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำๆ เป็นสภาพที่ให้การผลิตสารสีสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 การหมักเชื้อราโมแนสคัสในสภาพหมักเปียก (Submerged cultivation)

การหมักในอาหารเหลวนั้น อาจใช้กระบวนการหมักแบบเบ็ดเสร็จ แบบป้อนอาหารเป็นระยะ (fed-batch) ใช้เซลล์อิสระหรือเซลล์ที่ถูกตรึง (immobilized cells) ในถังหมักลักษณะปกติที่มีใบกวน หรือแบบ air lift fermentor (บุษบา และคณะ, 2531; Evans and Wang, 1984) แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสีโมแนสคัสในสภาพการหมักเปียกนั้นมีมากมาย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสารสีในการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในสภาพหมักเปียก

2.7.2.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แหล่งคาร์บอน

Lin (1973) รายงานการหมักเปียกของ *Monascus* sp. F-2 ในอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่า แป้งละลายน้ำ (soluble starch) กาแลคโทส และมอลโทส เหมาะสมกับการผลิตสี ตามลำดับ การเติมสังกะสีประมาณ 800 ไมโครกรัมต่อลิตร มีส่วนเพิ่มการเจริญของเส้นใย และเพิ่มความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ เช่น อะราบิโนส ไซโลส กลูโคส ฟรุคโทส แมนโนส ซูโครส มอลโทส แป้ง ซอร์บิทอล เอทานอล (Johnson and McHan, 1975)

บุษบา และวรรณภา (2527) ได้รายงานเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์มันสำปะหลังในการผลิตสีโมแนสคัส โดยทำการคัดเลือกเชื้อราโมแนสคัสที่สามารถใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี และต่อมาได้รวบรวมเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (บุษบา และคณะ, 2531)

ส่วน Lee *et al.* (1995) ได้ชิ้นมันสำปะหลังในอาหารเหลวและเรียกกระบวนการนี้ว่า solid-liquid state culture method ซึ่งช่วยลดปัญหาความหนืดของอาหารหมักได้

แป้งข้าวเจ้า(Su and Huang, 1980; Yongsmith *et al.*, 1994) สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตสารสีโมแนสคัสได้ดีเช่นกัน ส่วน Lin และ Demain (1991) พบว่าเมื่อใช้ defined medium เป็นแหล่งคาร์บอนที่พบว่าเหมาะสมต่อการสร้างสีของ *Monascus* sp. TTWMB 6042 จะเป็นมอลโทส กลูโคส และฟรุคโทส ตามลำดับ แต่ไม่พบกาแลคโทส และซูโครส ถ้าเลี้ยง *M. purpureus* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเข้มข้นสูง 50 กรัมต่อลิตร ในสภาพอับอากาศ จะพบว่ามีการสร้างเอทานอลเกิดขึ้น และพบว่า *M. purpureus* CCM 8152สามารถสร้างสีจากเอทานอลได้ดีกว่ามอลโทส *M. ruber* สร้างสีจากเอทานอลได้ดีกว่ากลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แหล่งไนโตรเจน

Lin (1973) พบว่า*Monascus* sp. F-2 สามารถผลิตสีได้ดีในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารไนเตรต และกลูตาเมต ส่วนแหล่งสารอินทรีย์ที่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตสี เช่น เปปโตน และสารสกัดยีสต์ แต่จากรายงานของ Carels และ Shepherd (1977) พบว่าเมื่อแหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดยีสต์จะผลิตสีแดงอย่างเดียว เนื่องจากอาหารนี้มีกรดอะมิโนมากพอ เมื่อเชื้อเจริญขึ้นจะทำให้พีเอชสูงขึ้น สารสีสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระ หรือ NH-group ภายในเส้นใยเปลี่ยนเป็นกลุ่มสารอนุพันธุ์เอมีนได้ และไม่พบสีส้มหรือสีเหลือง ส่วนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรตจะได้สารสีแดงและสีส้ม อาหารนี้ไม่มีกรดอะมิโนอิสระ ถึงแม้พีเอชจะสูงขึ้น สารสีจะสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนหรือ NH-group ภายในเส้นใยได้เท่านั้น จึงทำให้สารสีส้มยังเหลืออยู่ ขณะที่อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมมิโนคลอไรด์และแอมมิโนไนเตรตจะทำให้พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วเป็นผลให้สารสีที่ผลิตได้ ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ NH-group ภายในเส้นใยได้ ผลที่เกิดขึ้นคือ จะมีการสะสมของโมนาสโครูบรินและรูโบรพังตาติน ได้เป็นสีส้ม การเจริญของราแดงบางสายพันธุ์ในอาหารนี้ได้สารสีเหลือง สามารถเกิดขึ้นโดยการเกิดออกซิเดชันของโมนาสโครูบรินหรือรูโบรพังทาทินกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้เป็น โมนาสซิน หรือ แองคาฟลาวิน Carels และ Shepherd (1977) พบว่าสารสีส้ม โมนาสโครูบริน และ รูโบรพังตาติน สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีการทางชีวภาพ ส่วนสีอื่นๆ เช่น สีแดง สีเหลือง เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยขึ้นกับสภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อ

การเติมกรดอะมิโนในรูปของสารสกัดยีสต์ ในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรตและแอมโมเนียม คลอไรด์จะมีผลทำให้เพิ่มการสร้างเส้นใยหรือมวลชีวภาพ อาจเนื่องมาจากในสารสกัดยีสต์มีวิตามินอยู่ด้วย ส่วนการเติมกรดอะมิโนทั้งหมดที่พบในสารสกัดยีสต์ลงในอาหารที่มีไนเตรตหรือแอมโมเนียม จะเป็นการลดการสร้างสารสี แต่จะกระตุ้นการสร้างโคนิเดีย

Wong และคณะ (1981) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนสำคัญต่อการสร้างสีโดยกลูโคสความเข้มข้นระหว่าง 40 –200 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรตที่มีความเข้มข้น 5 และ10 กรัมต่อลิตร ทำให้ *M. purpureus* ผลิตสีแดงได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตสูงมากกว่า 50 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญและการผลิตสี

วรรณภา (2529)แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะต่อการสร้างสารสีแดงของเชื้อโมแนสคัส กลุ่มที่ใช้มันสำปะหลังได้ดี เช่นสายพันธุ์ *Monascus* sp. KB21035 KB11304 และ KB20322 พบว่า เปปโตนให้สารสีแดงสูงสุด โพแทสเซียมไนเตรตให้สารสีแดงพอสมควร ส่วนโซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียให้สารสีแดงน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบการสร้างสารสีแดงในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเปปโตน และแป้งถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสายพันธุ์ KB21035 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KB20322 ใช้แป้งถั่วเหลืองในการสร้างสารสีแดงได้น้อยกว่าเปปโตน ขณะที่สายพันธุ์ KB11304 สร้างสารสีแดงได้ดีในอาหารที่มีแป้งถั่วเหลืองมากกว่าเปปโตน และเป็นรายงานแรกที่มีการใช้ถั่วเหลืองไขมันเต็ม (full fat soy flour) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลดีต่อการสร้างสีโมแนสคัส

Lin และ Demain (1991) พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และโมโนโซเดียมกลูตาเมต เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB 6042 ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารคือ โมโนโซเดียมกลูตาเมตที่มีความเข้มข้น 1.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ร่วมกับมอลโทสเข้มข้น 10.0 เปอร์เซนต์ พบกันว่าสารไนโตรเจนชนิดนี้ร่วมกับกลูโคสดีสำหรับการสร้างสีของ *Monascus ruber* แต่แอมโมเนียมไนเตรตให้ไนโตรเจนต่ำในปฏิกิริยา Schiff-base reaction จึงเกิดการสร้างสีแดงน้อย

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิดคือสารสกัดยีสต์ เปปโตน และสารสกัดมอลต์ต่อการเจริญ และการสร้างสารสีเหลืองของเชื้อราสายพันธุ์ป่า *M. purpureus* KB10 พบว่าเปปโตนมีผลโดยตรงต่อการกระตุ้นการสร้างสารสี แต่สารสกัดยีสต์ส่งเสริมการเจริญมากกว่าการสร้างสารสี ส่วนสารสกัดมอลต์มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารสีน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้เปปโตนและความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซนต์ ร่วมกับกรดกลูตามิกเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ จะให้สีเหลืองสูงสุดเมื่อพีเอชเป็นกรด

สมชาย (2536) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลืองของเชื้อราสายพันธุ์กลาย *Monascus* sp. KB 20M10.2 พบว่าแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอนินทรีย์ที่ให้สารสีเหลืองที่ดีที่สุดคือโพแทสเซียมไนเตรต โดยจะให้สารสีเหลือง 216 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือแคลเซียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ที่ให้สารสีเหลืองสูงที่สุด คือ แป้งถั่วเหลืองเท่ากับ 674.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นเปปโตน สารสกัดเนื้อ สารสกัดยีสต์ และสารสกัดมอลต์ได้ปริมาณสารสีเหลือง 434.7 392.5 211.7 และ 20.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อศึกษาความเข้มข้นของแป้งถั่วเหลืองที่เหมาะสมพบว่า ที่ความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ ให้สารสีเหลืองสูงที่สุด รองลงมาคือ 4.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การใช้แป้งถั่วเหลืองเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 3.0 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการผลิต สีเหลืองของ *Monascus* sp. KB 20M10.2

3. อุณหภูมิ

Manandhar and Apinis (1971) ศึกษาอัตราการเจริญของ *Monascus* sp. 37 สายพันธุ์บนอาหาร malt extract agar พบว่า *Monascus* sp. ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส การเจริญของ *Monascus* sp. ส่วนใหญ่ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญทั่วไปที่ 25 และ 40 องศาเซลเซียสจะช้า ส่วนที่อุณหภูมิ 45 และ 18 องศาเซลเซียสการเจริญจะช้ามาก การสร้างสีจะสร้างได้ดีที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส

Lin (1973) การเพาะเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ลงในอาหารเหลวนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 32 37 และ 40 องศาเซลเซียส บ่มนาน 3 วัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการสร้างสีได้ดีที่สุดคือ 32 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 27 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิมากกว่า 32 องศาเซลเซียส จะทำให้การผลิตสีลดลงอย่างรวดเร็ว

4. ระยะเวลากับการผลิตสีและการเจริญของเซลล์

ปกติการสร้างสีโมแนสคัสในอาหารเหลวสูงสุดไม่เกิน 7 วัน ตัวอย่างเช่น Lin (1973) ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารเหลวที่มีผงข้าว 5 เปอร์เซ็นต์ $MgSo_4.7H_2O$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.2 เปอร์เซ็นต์ บรรจุอาหาร 75 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าการผลิตสีมีความสัมพันธ์กับการเจริญ

5. พีเอชอาหาร

Lin (1973) การปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารตั้งแต่ 2 ถึง 10 เมื่อบ่มเวลา 3 วัน *Monascus* sp. F-2 จะให้การผลิตสีสูงสุดในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 และพีเอชสุดท้ายของอาหารภายหลังการบ่มลดลงเป็น 5.8 ส่วนการ ศึกษาของ Wong *et al.* (1981) พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมเป็น 5.5 ส่วนใหญ่จะผลิตสีแดงได้มากกว่าที่มีพีเอชต่ำกว่า 6.0 เมื่อบ่มเป็นเวลานาน 17 วัน โดยเชื้อรา *M. purpureus*

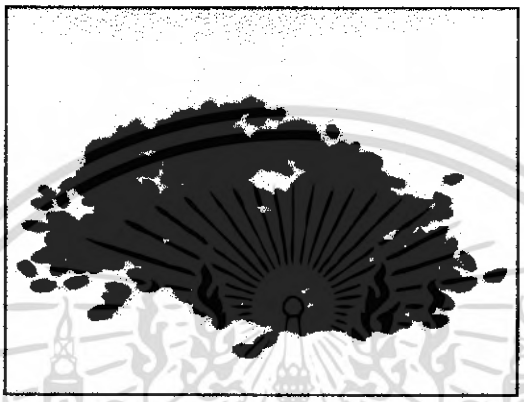
6. สารอื่นๆ

การใช้กรดโครโทนิก และกรดซอร์บิกที่ความเข้มข้นต่ำ สามารถเร่งการสร้างสีได้โดยไม่มีผลต่อการเพิ่มเส้นใย ส่วนการเติมสาร cerulenin ethionine เมทิโอนีน หรือยูเรียมีผลต่อการยับยั้งการสร้างสี และ พบว่า $MgSO_4$ เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการผลิตสีในอาหารที่ประกอบด้วยผงข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ และเปปโตน 0.05 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 การใช้ประโยชน์

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



ภาพที่ 2.8 สีของข้าวแดงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp.
ที่มา : www.poli.usp.br/Pigmento/imagens/pigmentomonascus.jpg

ข้าวแดงจะมีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามินบีอยู่สูง จากผลการวิเคราะห์ของกรมวิทยาศาสตร์บริการ (2518) พบว่าในข้าวแดงมีปริมาณแร่ธาตุ และวิตามินสูงกว่าในข้าวสารมาก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันแล้วเห็นได้ว่าข้าวแดงมีปริมาณวิตามินบีสองสูงกว่าข้าวสารถึง 185 เท่า (ตารางที่ 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณแร่ธาตุและวิตามินในข้าวสารพันธุ์ข้าวมะลิและข้าวแดงที่ผลิตได้

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	9.20

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, 1983) ซึ่งได้แยกสารปฏิชีวนะจากเชื้อรา *M. purpureus* N11S แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธีเปเปอร์แอสเซย์ดิสก์ (paper assay disc) พบว่าต้องใช้ปริมาณอย่างน้อยที่สุด 1.5 ไมโครกรัมต่อ 6 ไมโครลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.9 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* sp.

ที่มา : www-efood-idv.tw/images/efood0407283/gif

www.ku.ac.th/e-magazine/september45/agri/rice.jpg

นอกจากนั้นข้าวแดงยังใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องยาจีน เนื่องจากมีสารโมนาโคลิน เค (monacolin K) โดยสารนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutareyl coenzyme A (HMG-CoA) reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลทำให้มีคุณสมบัติในการลดปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือดได้ ใช้ในผู้ป่วยที่มีปริมาณไขมันในเลือดสูงและเนื้องอกในหนู เนื่องจากสารสีสามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบ อันเกิดจากสารทีพีเอ (TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) ซึ่งเป็นสารที่ส่งเสริมการเกิดเนื้องอก

สารโมนาโคลิน เค (monacolin K) มีผลต่อปริมาณคอเลสเตอรอล (total cholesterol) ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein cholesterol ; LDL-C) และไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein cholesterol ; HDL-C) LDL-C เป็นคอเลสเตอรอลที่ไม่ดี (bad chlesterol) ทำให้เลือดตกตะกอนเป็นลิ่มแล้วเกาะติดที่ผนังเส้นเลือดเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้ผนังของเส้นเลือดภายในหนาขึ้น การไหลเวียนของเลือดไม่สะดวกก่อให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือด ส่วน HDL-C เป็นคอเลสเตอรอลที่ดี (good cholesterol) เนื่องจากนำคอเลสเตอรอลที่ไม่จำเป็นต่อร่างกายกลับไปสู่ตับแล้วขับถ่ายออก เรียกกระบวนการนี้ว่า " Reverse Transortation of cholesterol " ถ้าในร่างกายมีระดับ HDL-C ต่ำกว่า 35 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรจะมีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคเส้นเลือดในสมองและหัวใจอุดตัน

ได้มีการทดลองให้หนูได้รับข้าวแดงเป็นระยะ 6 เดือนหลังจากนั้นจะวัดปริมาณไขมันในเลือดและตับพบว่าความเข้มข้นของซีรัม ไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอล VLDL-C (very low density

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lipoprotein cholesterol) และ LDL-C จะลดลง ส่วน HDL-C จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากข้าวแดงจะมีสารในกลุ่มโมนาโคลินซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล

นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้สารสีจาก *M. rubiginosus* เจือสีในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว โดยเติมสารสีในปริมาณต่างๆ กัน 3 ระดับ คือ 0.2 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ และได้นำมาเปรียบเทียบกับนมเปรี้ยวรสธรรมชาติ นมเปรี้ยวที่เติมสารสี 0.2 เปอร์เซ็นต จะมีสีแดงอ่อนและนมเปรี้ยวที่เติมสารสี1 เปอร์เซ็นต์ จะมีสีแดงเข้ม

การสกัดสารสีโมแนสคัสจาก *M. purpureus* DSM 1379 ด้วยเมทานอลแล้วเติมในไส้กรอกแฟรงเฟอเตอร์เพื่อลดปริมาณไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งพบว่าสารสีสกัดจะทำให้เกิดสีน้ำตาลแดง ซึ่งเป็นสีที่ผู้บริโภคต้องการในผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีไนไตรท์และเมื่อนำไปให้แสงเป็นเวลา 30 นาทีและ 2.5 ชั่วโมง สีของไส้กรอกที่เติมสารสีโมแนสคัสจะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

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

ได้มีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากสารสีเพื่อผลิตเหล้าสาเกโดยทำโปรโตพลาสฟิวชันระหว่างเชื้อรา *M. anka* กับเชื้อรา *Aspergillus oryzae* การเลี้ยงโดยใช้เทคนิคกึ่งการหมักแห้งและหมักเปียก (solid – liquid state culture method)

นอกจากนี้ยังมีศึกษาการใช้ข้าวแดงเพื่อปรับปรุงสีในไส้กรอกอิมัลชันโดยเปรียบเทียบด้วยการประเมินผลทางประสาทสัมผัสกับไส้กรอกที่ใช้ผงเพรกร้อยละ 0.3 พบว่าข้าวแดงบดละเอียดในระดับ 0.6 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเนื้อ ผู้ชิมให้การยอมรับมากที่สุดส่วนการใช้สีที่สกัดจากข้าวแดงบดละเอียด พบว่าไส้กรอกจากการเติมสีที่สกัดจากข้าวแดงบดละเอียดในระดับ 0.3 0.6 และ 0.9 ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องนี้ รวมทั้งการยอมรับโดยรวมและเมื่อเก็บไส้กรอกที่ปรับปรุงสีโดยใช้ข้าวแดงบดละเอียดพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าสี

การผลิตสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัส โดยวิธีการหมักแห้งนอกจากจะผลิตจากข้าวแล้วยังสามารถผลิตได้จากข้าวโพด ข้าวฟ่าง ขนมปัง ถั่วเหลือง ชานอ้อย ถั่วเขียว มันสำปะหลัง มันเทศ และมันฝรั่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นต้น และยังสามารถพัฒนาเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวได้ออกมาในรูปสีผสมอาหารที่สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น

2.9 ความปลอดภัยของสารสีโมแนสคัส

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

บุษบา และคณะ (2531) น้ำสีจากเชื้อราโมแนสคัสไม่เป็นอันตรายใดๆ ต่อไข่ไก่ฟักไม่ทำให้โครโมโซมเม็ดเลือดขาวของคนเปลี่ยนแปลง และไม่เป็นพิษต่อหนูทดลองที่ได้รับสารสีในอัตรา 0.02 0.10 และ 2.00 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ธวัช และคณะ (2530) ผลการเปรียบเทียบผลของสีปองโซ 4 อาร์ ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์และสารสีจากเชื้อราโมแนสคัสต่อความผิดปกติของโครโมโซมของคน พบวาสีปองโซ 4 อาร์ ทำให้โครโมโซมผิดปกติสูงถึง 28.64 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสไม่ทำให้โครโมโซมผิดปกติแต่อย่างใด

2.10 การตรวจสอบความเป็นพิษของสารสีโมแนสคัส

ความเป็นพิษของสีที่ได้จาก *Monascus* sp. โดยทดลองกับหนู พบว่าไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลองนั้นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า LD_{50} มีค่า 33.3 หรือ 8.7 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเมื่อกินสีเข้าไป และเมื่อฉีดเข้าช่องท้อง ตามลำดับ

บุษบา และคณะ (2531) การศึกษาความปลอดภัยของสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส โดยนำน้ำสีไปฉีดทดสอบความเป็นพิษในไข่ไก่ฟัก เปรียบเทียบกับการฉีดด้วยน้ำกลั่นตามวิธีของ AOAC พบว่าไข่ไก่ฟักที่ผ่านการฉีดด้วยน้ำสีแดงหรือสีเหลืองมีอัตราการรอดเท่ากับไข่ไก่ฟักควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 บทบาทของสารเคมีที่ใช้ในการหมักเนื้อต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์สัตว์

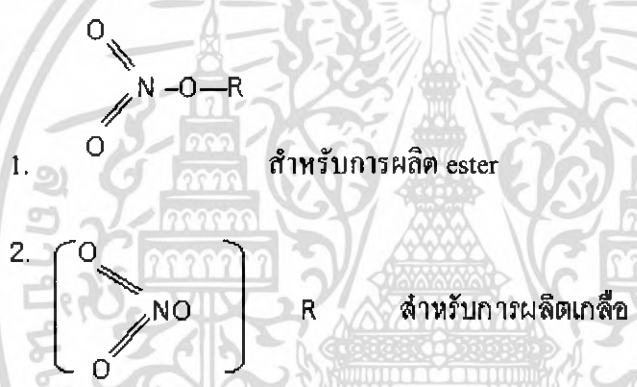
2.11.1 ไนไตรท์ (Nitrite) และ/หรือ ไนเตรท (Nitrate)

ส่วนใหญ่นิยมใช้ในรูปของเกลือโซเดียมไนไตรท์ หรือโปตัสเซียมไนไตรท์ และเกลือโซเดียมไนเตรท หรือโปตัสเซียมไนเตรท

2.11.1.1 การบ่งชี้

ไนเตรทเป็นเกลือของกรดไนตริกซึ่งเป็นกรดแก่ เกลือไนเตรทที่ใช้ในทางการเกษตร และอุตสาหกรรม ได้แก่ เกลือไนเตรทของโซเดียม โปแทสเซียม แคลเซียม แอมโมเนียม ทองแดง เหล็ก อะลูมิเนียม โครเมียม ปรอท เงิน บิสมัส แบเรียม สตรอนเตียม และตะกั่ว

สูตรโครงสร้างมี 2 ไอโซเมอร์ ดังนี้



ภาพที่ 2.10 สูตรโครงสร้างไอโซเมอร์ของไนเตรท

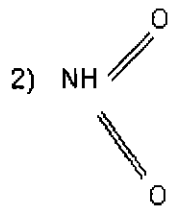
ที่มา : www.udru.ac.th/~pasak/nitrate.htm

ไนไตรท์ เป็นเกลือของกรดไนตรัสซึ่งเป็นกรดอ่อน สารไนไตรท์ถูกออกซิไดซ์เป็นสารไนเตรทได้ง่าย ดังนั้นในสิ่งแวดล้อมมักพบไนไตรท์ ในปริมาณต่ำ

สูตรโครงสร้างมี 2 ไอโซเมอร์ ดังนี้

1) H - O - N = O เกลือไนไตรท์ของ active metals

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เกลือไนไตรท์ของ quiescent metals

ภาพที่ 2.11 สูตรโครงสร้างไอโซเมอร์ของไนไตรท์

ที่มา : www.udru.ac.th/~pasak/nitrate.htm

2.11.1.2 แหล่งที่พบ

1. แหล่งธรรมชาติสังเคราะห์

ไนเตรทในดิน น้ำผิวดินและน้ำใต้ดินเกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ไนโตรเจน โดยจุลินทรีย์ แอมโมเนียมอิออนจะถูกออกซิไดซ์เป็นไนไตรท์และไนเตรท จึงเป็นผลเนื่องมาจากวัฏจักรของไนโตรเจน แต่ไนไตรท์โดยปกติจะพบในปริมาณต่ำมาก

2. แหล่งที่เกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมของมนุษย์

จากการใช้ปุ๋ยสังเคราะห์ ซึ่งเป็นแหล่งใหญ่ของไนเตรทในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ สารประกอบไนเตรทของแอมโมเนียม แคลเซียม โปแตสเซียมและโซเดียม ยูเรีย

1. ของเสียจากสัตว์

2. ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

3. การใช้สารไนโตรเจนและไนไตรท์เป็นสารปรุงแต่งอาหาร เช่น ใช้ดินประสิวในพวกเนื้อสด เนื้อเปื่อย เนื้อตุ๋น ทำให้เนื้อมีสีแดงสด และเปื่อยยุ่ย ใช้เป็นวัตถุกันเสียในเนื้อเค็ม ปลาช่อนแห้ง แหนม หมูยอ ไส้กรอก ซึ่งนอกจากจะช่วยกันเสียแล้วยังให้สีแดงสดสวยด้วย หากใช้ดินประสิวเจือปนในอาหารเกินกว่าที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้

2.11.1.3 วัตถุประสงค์ในการใช้

1. ช่วยป้องกันการเสื่อมเสียอันเนื่องจากสปอร์ของแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) เช่น Clostridium *botulinum* และ *Clostridium perfringens*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ช่วยให้เกิดสีและกลิ่นในผลิตภัณฑ์พวก cured meat ซึ่งเป็นที่ถูกใจผู้บริโภค และช่วยให้สีนั้นคงอยู่ได้นานในช่วงของการเก็บรักษาที่ถูกต้อง

หน้าที่ของเกลือไนไตรท์ และเกลือไนเตรท เมื่อใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ คือ

1.1 ทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อมีสีแดง และรักษาสีแดงของผลิตภัณฑ์เนื้อ ทำให้มีความน่ารับประทานเพิ่มขึ้น

1.2 ช่วยเพิ่มรสชาติ และกลิ่นรสแก่ผลิตภัณฑ์ ทำให้มีกลิ่นเฉพาะตัวเป็นที่ยอมรับสำหรับผู้บริโภคมากกว่าการใช้เกลือในการหมักเนื้อเพียงอย่างเดียว

1.3 ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และป้องกันการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ โดยเฉพาะพวก *Clostridium botulinum*

1.4 ช่วยยับยั้งการหืนของไขมันในผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยจะไปยับยั้งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนของไขมัน (oxidative rancidity)

2.11.1.4 บทบาทของเกลือไนไตรท์ และไนเตรท ต่อการเกิดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อ มีผลเนื่องจากการแตกตัวในสารไนตริกออกไซด์ เพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบินดังปฏิกิริยา ตามขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 NO_3^- (ไนเตรท) —แบคทีเรียที่รีดิวส์ไนเตรทได้ ดึงออกซิเจนออกไป→ NO_2^-

ขั้นตอนที่ 2 $NO_2^- + H^+$ (ไนเตรท) —แบคทีเรียพวกที่ผลิตกรดแลคติก อนุมูลไฮโดรเจน→ HNO_2 (กรดไนตรัส)

ขั้นตอนที่ 3 HNO_2 (กรดไนตรัส) —สลายตัว→ NO (ไนตริกออกไซด์) + H_2O (น้ำ)

ขั้นตอนที่ 4 Mb (ไมโอโกลบิน) —สภาพเหมาะสม→ MMb (เมทไมโอโกลบิน)

ขั้นตอนที่ 5 NO (ไนตริกออกไซด์) + MMb (เมทไมโอโกลบิน) —สภาพเหมาะสม→ NOMb (ไนโตรโซไมโกลบิน)

ขั้นตอนที่ 6 NOMb (ไนโตรโซไมโกลบิน) —ความร้อนในการอบและการรมควัน→ NO-Homochome (ไนโตรโซฮีโมโครม สารให้สีชมพูที่คงตัว)

ที่มา : ภัทธรินทร์ และคณะ (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้สารพวกไนไตรท์และไนเตรท แต่เดิมใช้เฉพาะดินประสิวซึ่งให้เกลือไนเตรท ต่อมาพบว่าการแตกตัวของไนเตรทให้ไนตริกออกไซด์ช้ามาก และต้องอาศัยจุลินทรีย์บางชนิดในเนื้อสัตว์ช่วยในกระบวนการผลิต ผลิตภัณฑ์เกิดสีแดงต้องใช้เวลานาน ถ้าการใช้ไนเตรทและไนไตรท์ร่วมกัน มีผลต่อการเร่งการแตกตัวของไนเตรท ทำให้เกิดการแตกตัวให้ไนตริกออกไซด์เร็วขึ้นและมากขึ้น จึงทำให้เกิดสีเร็วและมีไนเตรทเหลือตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์น้อยที่ลง

2.11.1.5 กลไกการทำงานของเกลือไนไตรท์และไนเตรทในผลิตภัณฑ์เนื้อ

1. ตามปกติพบว่าเกลือไนไตรท์ที่เติมลงในเนื้อจะหายไปครึ่งหนึ่งของปริมาณที่เติมลงไปทันที โดยเชื่อว่าไนไตรท์จะไปทำปฏิกิริยากับซิสทีอีน (cysteine) เกิดเป็น s-nitrosocysteine ทางหนึ่งส่วนอีกทางหนึ่งพบว่าเกลือไนไตรท์จะไปรวมตัวกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl group) ในโปรตีนของเนื้อเกิดเป็นไนโทรโซไทอัล (nitrosothiol) ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวนี้ เป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้เกลือไนไตรท์นี้ทำหน้าที่เป็น bacteriost

2. ส่วนหนึ่งของเกลือไนไตรท์จะสลายตัวให้ไนทริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) และ ไนทรัสออกไซด์ (nitrous oxide, N_2O) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้นับว่าเป็นกุญแจสำคัญของปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับสีของผลิตภัณฑ์เนื้อโดยตรงเพราะ NO เป็นจักรกลสำคัญโดยจะไปทำปฏิกิริยากับรงควัตถุฮีม (heme pigment) ในเนื้อคือ ไม่โอโกลบิน (myoglobin) เกิดเป็นไนโทรโซไมโอโกลบิน (nitrosomyoglobin) ให้สีแดงสดเมื่อนำผลิตภัณฑ์นั้นไปผ่านความร้อน จะได้สารไนโทรโซฮีโมโครม (nitrosohemochrome) ให้สีชมพูซึ่งเป็นสีเฉพาะที่เกิดขึ้นใน cured meat และสีนี้จะคงตัวได้ดี จากการศึกษาพบว่าไมโอโกลบินจะรับไนไตรท์ไว้ได้ 15 ส่วนต่อล้านส่วน

3. เกลือไนไตรท์บางส่วนถูกออกซิไดส์ได้เกลือไนเตรทดังที่ได้ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์เบคอนแล้วพบปริมาณของไนเตรทโดยมิได้เติมเกลือไนเตรทลงไปเลย สำหรับการเกิดการออกซิไดส์อาจเกิดไปพร้อม ๆ กับขณะที่ออกซีไมโอโกลบิน (oxymyoglobin) ที่มีเหล็กอยู่ในสภาพ Fe^{2+} ถูกออกซิไดส์ให้เป็น Fe^{3+} หรืออาจเกิดโดยวิธีออกซิไดส์เอง (autoxidation) ของเกลือไนไตรท์ก็ ได้

เกลือไนเตรททำหน้าที่ช่วยให้เกิดสีใน cured meat ทางอ้อมโดยทำหน้าที่เป็นแหล่งกักเก็บ (reservoir) ไนไตรท์ไว้เพื่อสลายตัวออกมาได้ในระยะยาวโดยมีแบคทีเรียที่รีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reducing bacteria) ทำหน้าที่นั้นซึ่งการทำงานของเกลือไนเตรทจะจำเป็นเมื่อทำการหมักเนื้อนั้นไว้ระยะนานตามวิธีดั้งเดิมนิยมปฏิบัติกันอยู่ จึงจำเป็นต้องใช้เกลือไนเตรทควบคู่กันไปด้วยซึ่งมักผลิตจำหน่ายในรูปของเกลือผสมอยู่แล้วซึ่งจะเรียกว่า ผงเพรก (Praque powder) ส่วนประสิทธิภาพในการป้องกันแบคทีเรียนั้นเกลือไนเตรทจะด้อยกว่าเกลือไนไตรท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.1.6 การเกิดสารไนโตรซามิน (nitrosamine)

นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าไนโตรซามินเป็นสารเคมี ที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ และพบว่าการเกิดสารไนโตรซามิน อาจเกิดได้จากกรดไนตรัสที่เกิดจากการแตกตัวของไนเตรต ดังนั้นการใช้ ไนเตรตเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ อาจก่อให้เกิดสารที่ทำให้เกิดมะเร็งขึ้นได้ในผู้บริโภคถ้าใช้ในปริมาณที่มากเกินไปและใช้ไม่ถูกต้อง

สารไนโตรซามิน อาจเกิดขึ้นได้ 2 กรณี คือ

1. กรดไนตรัสทำปฏิกิริยากับ secondary amine ที่อาจมีอยู่ในเนื้อสัตว์ทำให้เกิดสารไนโตรซามิน ดังแสดงในปฏิกิริยา

2. ปฏิกิริยาการเติมกลุ่มไนตริกอ็อกไซด์ (Nitrosation) กับโปรตีน โพรลีนอิสระ (free proline) ที่มีอยู่มากในหมูสามชั้น ทำให้เกิดเป็นสารไนโตรซามิน ดังแสดงในปฏิกิริยา

แต่อย่างไรก็ตามสถาบันเนื้อสัตว์ของอเมริกาโดย Nitrite Safety Council (1980) ได้ทำการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากเนื้อหมักตามโรงงานต่าง ๆ ในสหรัฐอเมริกาตรวจสอบพบว่าถ้ามีการใช้สารไนไตรท์และไนเตรต ในปริมาณที่ไม่มากกว่ามาตรฐานกำหนดแล้ว จะไม่พบสาร ไนโตรซามินในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แทบทุกชนิด ดังนั้นการที่มีผู้กล่าวถึงสารไนโตรซามินที่อาจเกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารไนไตรท์และไนเตรทเพื่อช่วยในการผลิต จึงเป็นการเตือนให้ทราบถึงผลเสียของการใช้สารเหล่านี้ในปริมาณที่มากเกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.1.7 ปริมาณไนไตรท์และไนเตรทที่เหมาะสมในการใช้

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 20 (2517) อนุญาตให้ใช้ไนเตรทได้ในปริมาณที่ไม่เกิน 500 ส่วนในล้านส่วน (โดยคิดคำนวณเป็นโซเดียมไนเตรท) และไนไตรท์ให้ใช้ได้ในปริมาณที่ไม่เกิน 200 ส่วนในล้านส่วน (โดยคิดคำนวณเป็นโซเดียมไนไตรท์)

สำหรับ Federal meat inspection regulation ของสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้ไนเตรทและไนไตรท์ ดังนี้

1. การใช้ไนเตรทในน้ำหมักให้ใช้ได้ 7 ปอนด์ต่อ100 แกลลอน สำหรับเนื้อสัตว์ที่หมักแบบแห้งใช้ไนเตรท 3 ออนซ์ต่อเนื้อบด 100 ปอนด์ และถ้าเป็นเนื้อบดที่มีการเติมไนเตรทควรใช้ 2 ¾ ออนซ์ ต่อเนื้อบด 100 ปอนด์

2. การใช้ไนไตรท์ ในน้ำหมักให้ใช้เพียง 2 ปอนด์ต่อน้ำหนัก 100 แกลลอน ที่ระดับที่มีการฉีดเข้าเนื้อประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ กรณีเนื้อหมักแบบแห้ง ใช้ไนไตรท์ 1 ออนซ์ต่อเนื้อ 100 ปอนด์ และถ้าเป็นเนื้อบดใช้ไนไตรท์ ¼ ออนซ์ต่อเนื้อบด 100 ปอนด์

3. ถ้าเป็นเนื้อ เกลือโพแทสเซียมไนไตรท์ (potassium nitrite, KNO_2) อนุญาตให้ใช้ได้ 0.02 เปอร์เซ็นต์ หรือ 200 ส่วนในล้านส่วนของปริมาณเนื้อ ถ้าเป็นโซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrate, $NaNO_2$) ให้ใช้ได้ 0.7 ส่วนในล้านส่วนในปลากระป๋อง แต่ถ้าเป็น cured fish ให้ใช้ได้ 200 ส่วนในล้านส่วนเช่นกัน ซึ่งถ้าใช้เกลือดังกล่าวในปริมาณที่ถูกต้องแล้ว ควรจะมีไนไตรท์เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ได้ประมาณ 10-50 ส่วนในล้านส่วนเท่านั้น

กรณีที่ใช้ไนเตรทและไนไตรท์รวมกัน ต้องมีไนเตรทเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายได้ไม่เกิน 200 ส่วนต่อล้านส่วน

เกลือไนเตรทและไนไตรท์ที่ใช้ทางการค้าจะผสมกันออกมา เพื่อสะดวกในการใช้ มีชื่อทางการค้าเป็นผงเพรค (praque powder) โดยมีปริมาณที่แนะนำใช้เป็น 0.25-0.38 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเนื้อ และ Tari colper 40s ปริมาณที่แนะนำใช้เป็น 2 กรัม ต่อเนื้อ 1 กิโลกรัม

ในปัจจุบันมีการผลิตสารหมักเนื้อผสมเสร็จ (meat curing premixes) ซึ่งประกอบด้วยสาร ไนไตรท์ สารไนเตรท และเครื่องปรุงรสต่างๆ ในลักษณะนี้ได้มีข้อกำหนดของการบรรจุไว้ว่าต้องทำการบรรจุสารไนไตรท์ และไนเตรท กับเครื่องปรุงรสแยกกัน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดมีการรวมตัวกันขึ้นเป็นสารไนโตรซามิน และบนภาชนะบรรจุต้องระบุว่าปราศจากสารไนโตรซามิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. มาตรการทางกฎหมายอื่น ๆ

1. ประเทศไทย

1.1 น้ำ

ประเทศไทยมีการกำหนดปริมาณไนเตรทในน้ำดังนี้

ตารางที่ 2.2 ปริมาณไนเตรทในน้ำที่ประเทศไทยกำหนด

ชนิด	มาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
น้ำดื่ม	ไนเตรท - ไนโตรเจน 4 มิลลิกรัมต่อลิตร
น้ำบาดาลเพื่อการบริโภค	ไนเตรท 45 มิลลิกรัมต่อลิตร
น้ำผิวดิน	ไนเตรท - ไนโตรเจน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ที่มา : www.udru.ac.th/~pasak/nitrate.htm

1.2 อาหาร

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข กำหนดให้มีไนเตรทในอาหารได้ไม่เกิน 500 (มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนไนไตรท์ ไม่เกิน 200 (มิลลิกรัมต่อลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ต่างประเทศ

2.1 อาหารสัตว์

สหภาพโซเวียตแนะนำปริมาณไนเตรท ไนไตรท์สูงสุดเท่าที่ยอมให้มีในอาหารดังนี้

ตารางที่ 2.3 ปริมาณไนเตรท ไนไตรท์สูงสุดเท่าที่ยอมให้มีในอาหารที่สหภาพโซเวียตแนะนำ

สัตว์	ปริมาณไนเตรท (มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)			
	ไนเตรทอิออน	โปแตสเซียมไนเตรท	ไนไตรท์อิออน	โปรแตสเซียมไนไตรท์
วัว ควาย	50	90	5.0	7.5
ลูกแกะ ลูกแพะ	4.0	6.0	-	-
หมู	10	16	1.0	1.5
แม่ไก่	100	16.0	10.0	15.0

ที่มา : www.udru.ac.th/~pasak/nitrate.htm

สหรัฐอเมริกาอนุญาติให้ใช้โซเดียมไนไตรท์เป็นวัตถุเจือปนในอาหารสัตว์และน้ำในระดับไม่เกิน 20 มิลลิกรัม/ลิตร

2.2 อาหารสำหรับมนุษย์

สหภาพโซเวียตแนะนำปริมาณไนเตรทสูงสุดที่ยอมให้มีในผักชนิดต่างๆ ดังนี้

จำกัดการใช้ในอาหารกระป๋องประเภทเนื้อสัตว์และปลา สำหรับสัตว์เลี้ยง กะหล่ำ 160 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แตงกวา 160 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม บีท 1,800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แครอท 415 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฯลฯ หากมีการต้มผักดังกล่าวปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้สามารถเพิ่มเป็น 2 เท่า เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนเตรทบางส่วนลงไปอยู่ในน้ำต้ม นอกจากนี้ปริมาณไนเตรท์ที่ยอมรับได้ใน 1 วัน (maximum allowable) สำหรับมนุษย์ไม่เกิน 200 มิลลิกรัม

สำหรับปริมาณไนไตรท์ตามข้อกำหนดของสหภาพโซเวียดกำหนดให้ใส้กรอกและหมูรมควันมีไนไตรท์ไม่เกิน 15-20 เปอร์เซนต์ และในอาหารสำเร็จรูปประเภทปลา เนยแข็ง ไม่เกิน 200 มิลลิกรัม

FAO/WHO แนะนำให้ปริมาณโซเดียมไนไตรท์และโปแตสเซียมไนไตรท์ที่ได้รับในแต่ละวัน (ADI) ไม่ควรเกิน 0-0.2 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

ปี ค.ศ.1981 สหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้โซเดียมไนไตรท์เป็นสารถนอมอาหาร สารคงสภาพสี (Colorfixation) และระงับการเจริญเติบโตและการเกิดสารพิษจาก *Clostridium botulinum* ชนิด E ของอาหารบางชนิดในระดับไม่เกิน 10-20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และในกรณีที่ใช้ระงับการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวต้องไม่ต่ำกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้สารที่เติมไนไตรท์ต้องระบุในฉลาก

2.3 น้ำ

ประเทศสหภาพโซเวียตกำหนดปริมาณไนเตรทในรูปของไนโตรเจนในแหล่งน้ำและการสันทนาการไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในแหล่งน้ำเพื่อการประมง 9.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ในรูปไนเตรท 40 มิลลิกรัมต่อลิตร) และกำหนดแอมโมเนียมไนเตรท์ในแหล่งน้ำเพื่อการประมงไม่เกิน 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ในรูปไนไตรท์ออออนหรือ 0.02 มิลลิกรัม/ลิตร ในรูปไนโตรเจนและในน้ำใช้ไม่เกิน 7 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับปริมาณไนเตรทและไนไตรท์ในน้ำเพื่อการอุตสาหกรรม ซึ่งแนะนำโดยสหภาพโซเวียตมีดังนี้

1. โรงงานสารเคมีไม่ควรมีไนเตรทเกิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และไนไตรท์เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. โรงงานผลิตยาไม่ควรมีไนไตรท์เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. โรงงานผลิตอาหารไม่ควรมีไนเตรทเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ข้อกำหนดอื่นๆ

ตลาดร่วมยุโรป (EEC) กำหนดให้สี น้ำมันชักเงา ที่มีโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้นเกินกว่า 5.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารพิษ และความเข้มข้น 1.0-5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารอันตรายซึ่งประเทศสมาชิกต้องไม่ให้มีสินค้าที่เป็นอันตรายดังกล่าวจำหน่ายในตลาดโดยไม่มีการบรรจุผูกมัด ติดฉลากอย่างถูกต้อง

2.11.1.8 การใช้ประโยชน์โดยทั่วไป

ไนเตรท ถูกนำมาใช้ในกิจการต่าง ๆ ทั้งทางด้านการเกษตรและอุตสาหกรรม ดังนี้

แอมโมเนียมไนเตรท ใช้เป็นปุ๋ย ใช้ผลิตวัตถุระเบิดและดินปืน ใช้ผลิตโซเดียมไนไตรท์ ฯลฯ

1. โปแตสเซียมไนเตรท ใช้เป็นปุ๋ย ใช้ถนอมอาหาร ใช้ในการผลิตโลหะ แก้ว เทียน ไม้ขีด

2. แคลเซียมไนเตรท ใช้เป็นปุ๋ย ใช้ผลิตไนเตรทของโปแทสเซียม ตะกั่ว และโครเมียมโดยวิธีการย่อยสลาย

3. ไนเตรทของเหล็ก ทองแดง อะลูมิเนียม โครเมียม ใช้ในอุตสาหกรรมทอผ้า โดยทำให้สีติดทนนาน

4. ไนเตรทของปรอท เงิน บิสมัส ใช้ในอุตสาหกรรมยารักษาโรค

ไนไตรท์ ที่ใช้อย่างแพร่หลายที่สุด ได้แก่ โซเดียมไนไตรท์ ซึ่งใช้ในกิจการต่าง ๆ ดังนี้

1. ใช้เป็นตัวเร่งให้คอนกรีตแข็งตัว
2. ใช้ถนอมอาหารสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อ
3. เป็นสารป้องกันการกัดกร่อนจากบรรยากาศ
4. ใช้ในด้านเภสัชกรรม
5. อุตสาหกรรมกระดาษ
6. อุตสาหกรรมยาง
7. อุตสาหกรรมทอผ้า
8. อุตสาหกรรมกำจัดวัชพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.1.9 อันตรายของไนเตรทและไนไตรท์

ทั้งไนเตรทและไนไตรท์เป็นพิษแก่ร่างกายเมื่อบริโภคในปริมาณมากเกินไป โดยเฉพาะไนไตรท์มีพิษแรงกว่าไนเตรท เพราะเมื่อซึมผ่านลำไส้เข้าสู่กระแสโลหิตแล้วจะไปออกซิไดส์ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงกลายเป็นเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) ซึ่งจะทำให้เม็ดเลือดนั้นหมดสภาพไม่สามารถลำเลียงออกซิเจนได้อีก ความเป็นพิษของไนเตรทได้มีรายงานไว้ว่า เด็กดื่มน้ำที่มีไนเตรทเพียง 30 พีพีเอ็มแล้วเสียชีวิต แสดงว่าไนเตรทมีพิษต่อเด็กมาก โดยเฉพาะทารกที่อายุต่ำกว่า 6 สัปดาห์เพราะในกระเพาะของเด็กมีแบคทีเรียที่รีดิวส์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ ประกอบกับเด็กยังไม่สร้างกรดเกลือในกระเพาะที่จะช่วยกำจัดแบคทีเรียดังกล่าวได้ แม้ในผู้ใหญ่ที่ได้รับไนเตรทในปริมาณมากเกินไป และมีเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกระเพาะจะได้รับพิษดังกล่าวได้ เช่นกัน จึงเป็นข้อควรระวัง การบริโภคผลิตภัณฑ์พวกเนื้อสัตว์ในเด็กอ่อน ปัจจุบันในประเทศอังกฤษได้กำหนดให้ไนเตรทและไนไตรท์เป็นสารเคมีถนอมอาหารชนิดสังเคราะห์ (synthetic chemical perservative) มีกฎหมายควบคุม

นอกจากพิษอันเนื่องจากไนเตรทและไนไตรท์โดยตรงดังกล่าวแล้ว ยังพบว่าสารประกอบดังกล่าวจะช่วยให้เกิดสารประกอบที่เรียกว่าไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่าสารนี้คือสารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง (carcinogen) เช่น ไดเอทิลไนโตรซามีน (diethylnitrosamine) เป็นสาเหตุโรคมะเร็งในตับของสัตว์ทดลอง ส่วนสารที่พบในเบคอนนั้นได้แก่เอ็น- ไนโทรโซไพโรลิดีน (N-nitrosopyrolidine) สารตั้งต้นที่จะเกิดสารนี้ ได้พิสูจน์แล้วว่าคือ โพรลีน (proline) ซึ่งมีอยู่ในอาหารหลายชนิด พบมากในส่วนเนื้อสามชั้นที่นำมาทำเบคอนคือ ประมาณ 11-16 มิลลิกรัม/กิโลกรัมจึงมีโอกาสเกิดไนโทรซามีนมากขึ้นพบว่าเบคอนดิบจะมีประมาณต่ำมากแต่เมื่อนำมาทอดหรือย่างจึงจะเกิดไนโทรซามีนขึ้น แต่ถ้านำไปย่างปริมาณจะต่ำกว่าและถ้าทอดนาน ๆ ปริมาณก็จะลดลง ที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งคือ ในน้ำมันที่เหลือจากทอดเบคอนจะมีไนโทรซามีนสูงกว่าในชิ้นเบคอนถึง 2 เท่า จึงควรหลีกเลี่ยงการใช้น้ำมันดังกล่าว จึงควรระมัดระวังอย่างยิ่งในการใช้ โดยเฉพาะปริมาณที่กำหนดไว้จะอยู่ในระดับที่ปลอดภัยพอสมควร นอกจากนี้ยังพบว่า เครื่องปรุงที่ใช้ในผลิตภัณฑ์มี N-nitrosopyrolidine ได้โดยเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไนไตรท์ กับพาพริกา (paprika) และพบ N-nitrosopyrolidine จากปฏิกิริยาระหว่างไนไตรท์กับพริกไทย ซึ่งการหลีกเลี่ยงการเกิดสารพิษดังกล่าวทาง FDA จึงออกกฎให้บรรจุสารไรไตรท์กับเครื่องปรุงรสแยกจากกันโดยเด็ดขาด

เมื่อพบว่าเกลือไนไตรท์และไนเตรทเป็นพิษดังกล่าว ทำให้มีผู้คิดค้นหาสารประกอบอื่นเพื่อจะมาใช้แทนและแก้ปัญหาดังกล่าวเช่น ในปี พ.ศ. 2516 Brown ได้เสนอว่าเมทิล และเฮกซิลนิโคติเนต (methyl และhexyl nicotinate) และเอ็น,เอ็น,ไดเอทิลนิโคตินามีด (N,N,diethylnicotinamide) อาจใช้แทนไนเตรทและไนไตรท์ได้ นอกจากนี้กลุ่มศึกษาจากประเทศสวีเดนได้รายงานว่า สารประกอบที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โอกาสใช้แทนได้คือ pentaerythritoltetranicotinate นอกจากนี้ยังได้เสนอแนะว่า ถ้าใช้โซเดียมแอสคอร์เบต (sodium ascorbate) หรือโซเดียมอิริทอร์เบต (sodium erythorbate) ร่วมกับเกลือไนไทรตจะช่วยลดการเกิดไนโทรซามีนได้ด้วย (สุภาวดี, 2545)

ลักษณะของความเป็นพิษ แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ

1. ความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute effects)

ไนเตรทและไนไตรท์ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) โดยทางกระเพาะอาหารในหนูขาว (albino rat) เท่ากับ 9,120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในหนู mice เท่ากับ 6,250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนปริมาณสูงสุดที่ทำให้ตาย (lethal doses) เท่ากับ 13,000 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

2. ความเป็นพิษเรื้อรัง

พิษที่เกิดจากไนเตรทและไนไตรท์ที่สำคัญคือ methaemoglobinnaemia ซึ่งพบในสัตว์ที่อายุน้อย พบว่าไนไตรท์เป็นสารก่อกลายพันธ์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด

2.11.1.10 การตกค้างและสะสมในสิ่งแวดล้อม

พืชหลายชนิดจะสะสมไนเตรทในลำต้น ซึ่งอาจจะมีปริมาณสูงมากพอที่จะทำให้เกิดพิษได้ จากการรวบรวมข้อมูลของ National Institute of Environmental Health Science พบว่า ปริมาณไนเตรทในผักแตกต่างกันมาก ในบีท มะเขือ ผักกะหล่ำ ผักขม มีปริมาณไนเตรทสูง ปริมาณของไนเตรทที่สะสมในต้นพืชจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น มีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนบริเวณดังกล่าว หรือระยะการเจริญเติบโตของต้นพืช การทำงานของเอนไซม์รีดักเทสผิดปกติ เนื่องจากได้รับแสงไม่เพียงพอ หรือกระบวนการสังเคราะห์แสงของต้นพืชลดน้อยลง หรือได้รับอาหารไม่เพียงพอ สาเหตุดังกล่าวจะทำให้เอ็นไซม์รีดักเทสไม่สามารถเปลี่ยนโปแตสเซียมที่รากและใบ ไปเป็นโปรตีนของพืช จึงทำให้เกิดการสะสมของไนเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12 สารป้องกันการเสื่อมเสียจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมี

การเสื่อมเสียของอาหารจากผลการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่พบเสมอคือ การเสียในรูปการเปลี่ยนสีและกลิ่นโดยเฉพาะในกรณีหลังมักเป็นปัญหาสำคัญในการเสื่อมเสียของอาหารประเภทไขมันรวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบเช่น อาหารที่ผ่านการทอดทั้งหลาย สารที่ใช้เพื่อลดปัญหาเรื่องการหืน (rancidity) คือสารกันหืน (antioxidants) การหืนในอาหารมักจะเกิดได้ 3 ทางคือ

2.12.1. Hydrolytic Rancidity

เกิดขึ้นจากการที่ไขมันแตกตัวออก (fat splitting) การเกิดปฏิกิริยานี้จะต้องมีน้ำเข้าไปเกี่ยวข้องด้วยและอาจมีเอนไซม์ย่อยไขมัน (lipolytic enzyme) เข้ามาเกี่ยวข้องด้วยซึ่งมักมีอยู่แล้วในอาหารนั้นตามธรรมชาติหรืออาจจะเกิดขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นมา การหืนแบบนี้มักพบเสมอในพวกน้ำมันมะพร้าวหรือ (lauric fat) รวมทั้งไขมันในผลิตภัณฑ์นมผลของการหืนแบบนี้จะทำให้เกิดกรดไขมันอิสระในปริมาณสูงขึ้นกว่าปกติ จึงทำให้มีกลิ่นคล้ายสบู่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ วิธีป้องกันกำจัดความหืนนี้คือการทำน้ำมันให้บริสุทธิ์ (refining) และการทำให้เอนไซม์นั้นเสีย

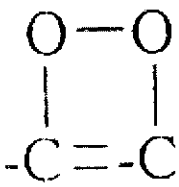
2.12.2 Ketonic Rancidity

เกิดขึ้นจากเชื้อจุลินทรีย์โดยตรง ทำให้เกิดปฏิกิริยา β-oxidation ขึ้นในไขมันและผลจากการหืนแบบนี้จะได้สารประกอบคีโตน การหืนแบบนี้มักเกิดในน้ำมันมะพร้าวที่ขึ้นรา มีความชื้นและสารอาหารพวกไนโตรเจนเข้ามาเกี่ยวข้องเพื่อการเจริญของราด้วย เมื่อเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวจะได้สารประกอบ methyl-amyl ketone นอกจากนี้ ยังพบว่าเกิดกับผลิตภัณฑ์นม การหืนนี้พบน้อยมากในอาหารที่ผ่านการแปรรูปและบรรจุในภาชนะบรรจุที่ดีถูกต้องและมีสุขลักษณะที่ดี การป้องกันการหืนแบบนี้จึงทำได้โดยการกำจัดความชื้นและสารประกอบไนโตรเจน

2.12.3 Oxidative Rancidity หรือ การออกซิไดซ์เอง (autoxidation)

เป็นการหืนที่เกิดจากไขมันสัมผัสกับออกซิเจนโดยตรงหรืออาจจะเกิดจากปฏิกิริยาโฟโตเคมี (photochemical reaction) หรือ โดยสารบางอย่างที่เติมลงไปในน้ำมัน ไขมันที่จะเกิดการหืนแบบนี้ได้อย่างรวดเร็วมักเป็นพวกที่มีพันธะคู่ในกรดไขมัน (unsaturated fatty acid) ซึ่งปฏิกิริยาในแบบนี้ปีนแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ซึ่งจะอธิบายได้เป็น 3 ขั้นคือ ขั้นเริ่มต้น ซึ่งจะได้ free radical (R °) เกิดขึ้นแล้วอนุมูลอิสระนี้จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเพอร์ออกซี (peroxy radical, ROO °) แล้วจะทำปฏิกิริยาต่อตรงพันธะคู่ของกรดไขมันอีกเกิดเป็นไฮโดรเพอร์ออกไซด์ (hydroperoxide, ROOH) คือเกิด peroxide bridge ตรงพันธะคู่ดังในรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาในขั้นที่ได้ ROO ° และ ROOH นี้จะเป็นขั้น propagation ตามปกติ ไฮโดรเพอร์ออกไซด์จะไม่มีกลิ่นรสเลยแต่จะไม่คงตัวมักสลายตัวให้สารประกอบแอลดีไฮด์ คีโตน พอลิมอร์ ลิพอเพอร์ออกไซด์ (lipoperoxide) และอนุมูลอิสระ สารเหล่านี้จะกลับเข้าไปก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องได้อีกและยังก่อให้เกิดกลิ่นหืนขึ้นในอาหารได้ด้วยซึ่งเป็นการเกิดปฏิกิริยาในขั้นสุดท้าย

2.12.3.1 สารกันหืน (Antioxidants)

สารกันหืนหมายถึง สารประกอบที่สามารถลดอัตราเร่งของปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารที่เกิดการอออกซิไดซ์ตัวเองโดยเฉพาะการยืดระยะเวลาในขั้นเริ่มก่อปฏิกิริยา (induction period) ในการเกิดการหืน

1 หน้าที่และปฏิกิริยาของสารกันหืน

จากปฏิกิริยาการหืนจะเห็นว่า ROO ° และ ROOH มีบทบาทสำคัญมากในการก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องกันไปเรื่อย ๆ ถ้าหาวิธีทำให้ R ° และ ROO ° นี้หมดความสามารถในการทำปฏิกิริยาแล้ว อัตราเกิดของปฏิกิริยาก็จะลดลงได้และ ROO ° จะง่ายต่อการที่จะยุติปฏิกิริยาของมันได้ สารกันหืนจะทำหน้าที่ได้ในแบบต่าง ๆ ดังนี้คือ

1.1 สารกันหืนทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ เกิดสารที่คงตัวไม่ทำปฏิกิริยาต่อไป ดังเช่นสมมติให้ AH เป็นสูตรของสารกันหืน จะเกิดปฏิกิริยา

แต่ปฏิกิริยานี้จะเกิดในระดับต่ำมากมีผลต่อการป้องกันการหืนไม่มากนัก

1.2 สารกันหืนทำหน้าที่รวมตัวกับอนุมูลเพอร์ออกไซด์ เกิดเป็นสารเชิงซ้อนแล้วสารนี้อาจทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร์ออกไซด์อื่น ๆ ได้อีกและเกิดเป็นสารประกอบสุดท้ายที่ไม่เปลี่ยนแปลงต่อไปดังสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$ROO^{\circ} + AH \longrightarrow (ROO.AH)$$

$$(ROO.AH) + ROO^{\circ} \longrightarrow \text{products of chain termination}$$

ปฏิกิริยาเช่นนี้มักจะเกิดขึ้นกับสารกันหืนที่เป็นฟีนอล (phenols)

2.13 การผลิตและแปรรูปวุ้นมะพร้าว

วุ้นมะพร้าวมีชื่อเป็นภาษาอังกฤษว่า Bacterial cellulose เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักอาหารเหลว ไม่ว่าจะเป็นน้ำผัก น้ำผลไม้ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โดยใช้เชื้อแบคทีเรียชื่อ *Acetobacter xylinum* หากหมักด้วยน้ำมะพร้าวทางฟิลิปินส์จะเรียกว่า Nata de Coco หากหมักด้วยน้ำสับปะรดจะเรียกว่า Nata de Pina มีชื่อเรียกหลายอย่าง เช่น วุ้นน้ำมะพร้าว วุ้นสวรรค์ ลูกมะพร้าว วุ้นเส้น เห็ดชาแดง เห็ดก้มพูชา เห็ดรัสเซีย วุ้นน้ำส้ม ทำจากน้ำมะพร้าว หรือน้ำผลไม้อื่น ๆ แผ่นวุ้นมีลักษณะเป็นเยื่อเหนียว มีสีขาว สีครีม ทึบแสง เป็นสารเซลลูโลส ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ลักษณะทางกายภาพคล้ายวุ้นทำขนม แต่เหนียวกว่า ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส ก็ไม่ละลายน้ำ วุ้นมะพร้าว เป็นผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่น่าสนใจ เนื่องจากผลิตได้ง่ายในครัวเรือนและระดับอุตสาหกรรม ต้นทุนในการผลิตต่ำ เพราะใช้น้ำมะพร้าวแก่ที่เหลือทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์ วุ้นที่ได้สามารถนำมาแปรรูปเป็นอาหารคาวหวานได้มากมายหลายชนิด อาหารคาวจะปรุงโดยใช้วุ้นสวรรค์แทนเนื้อปลาหมึกหรือแมงกะพรุน ทำยำต่างๆ แกงเผ็ด แกงจืด ผัดเผ็ด ผัดกระเพราเป็นต้น อาหารหวานได้แก่ วุ้นในน้ำเชื่อม วุ้นกรอบ เยลลี่ รวมมิตร แยมวุ้นสวรรค์ อีกทั้งหลังการหมักจะได้น้ำส้มสายชูเป็นผลพลอยได้ด้วย

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเฉพาะของวุ้นสวรรค์ที่ได้จาก *Acetobacter xylinum*

1. เส้นใยมีขนาดเล็กมาก คือ หนาประมาณ 3-4 นาโนเมตร กว้าง 60-80 นาโนเมตร และ ยาวประมาณ 180-960 นาโนเมตร

2. จากการที่เส้นใยมีขนาดเล็กมาก ดังนั้นจึงทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่าง ๆ ได้ดี

3. เส้นไม่มีเฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเพกตินเจือปน

4. เส้นใยมีความเป็น Hydrophilic สูง อุ้มน้ำได้ 60-700 เท่าของน้ำหนักแห้ง

5. เส้นใยมีลักษณะใส

6. เส้นใยทนต่อแรงดึงได้สูงกว่าไฟเบอร์สังเคราะห์ต่าง ๆ

7. สามารถใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก หาง่าย

8. สามารถควบคุมคุณสมบัติทางกายภาพได้ตามที่ต้องการโดยจัดองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยง และสภาวะการหมัก

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ของไฟเบอร์จากวุ้นมะพร้าวต่อสุขภาพ

1. มีแคลอรี่ต่ำ ช่วยควบคุมน้ำหนัก

2. ช่วยในการขับถ่าย

3. ช่วยป้องกันมะเร็งลำไส้

4. ไฟเบอร์ของวุ้นเป็น gel form ร่างกายนำมาใช้ประโยชน์ได้ง่ายกว่าไฟเบอร์จากพืช

วุ้นสวรรค์ในบ้านเราเริ่มเป็นที่นิยมตั้งแต่ปี 2528 เป็นเพราะเกิดการเน่าเสียของแม่น้ำแม่กลอง เนื่องมาจากสองฝั่งของแม่น้ำเป็นโรงกะเทาะมะพร้าว แล้วเทน้ำมะพร้าวทิ้งลงไปในแม่น้ำ มีนักวิจัยหลายทีมเข้าไปดำเนินการแก้ไข แต่ไม่สำเร็จเนื่องจากน้ำมะพร้าวที่ทิ้งในแต่ละปีมีปริมาณมากถึง 3 แสนตัน (3 พันล้านลิตร) ต่อมาทีมนักวิจัยจากมหาวิทยาเกษตรศาสตร์ คือ ทีมของท่านอาจารย์ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ ได้เข้าไปดำเนินการแก้ไขตั้งแต่ต้นเหตุ คือ การนำน้ำมะพร้าวเหล่านั้นมาผลิตเป็นวุ้นมะพร้าว แม่น้ำแม่กลองก็กลับมาสดใสอีกครั้ง และยังเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับชาวบ้านอีกด้วย

2.13.1 ส่วนประกอบและคุณค่าทางอาหารของวุ้นมะพร้าว

วุ้นมะพร้าวนอกจากผลิตง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำ ยังมีคุณค่าทางอาหารคือมีแร่ธาตุ และวิตามินต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของวุ้นมะพร้าว

		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
คาร์โบไฮเดรต	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 : ภัทธรินทร์ และคณะ (2547)

2.13.2 แบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส

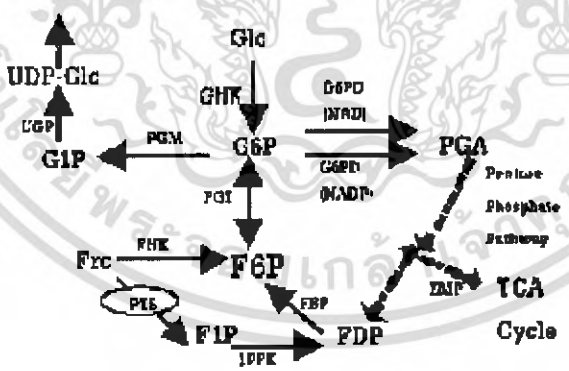
โพลีแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยแบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ โฮโมโพลีแซคคาไรด์ และเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ สายพันธุ์แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่สามารถผลิตสารโพลีแซคคาไรด์ อาทิ เช่น *Corynebacterium* sp., *Arthobacter vicosus* NRRL B-1797, *Alcaligenes faecalis var myxogenes* 10C3, *Pseudomonas solanacearum*, *Erwinia stewatii*, *Escherichia coli*, *Erwinia amylovora*, *Acinetobacter vinelandii* strain D-0.5, *Acinetobacter* sp. strain 12, *Leuconostoc mesenterroides*, *L. dextranicum*, *Xanthomonas campestris* และสายพันธุ์ *Acetobacter* sp.

เชื้อแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่เชื้อ *Acetobacter sp.* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ หรือ Gram variable จัดอยู่ในแฟมิลี่ Acetobacteraceae สายพันธุ์ที่สำคัญและใช้ในการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสกันอย่างกว้างขวาง คือ *A. xylinum*, *A. pasteurianus*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A.hansenii, A.sucrofermantans และ *A.acetigenumx* สำหรับ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* เซลล์มีลักษณะรูปร่างรีจนถึงเป็นท่อน อาจเป็นท่อนตรงหรือโค้งเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย ขนาดเซลล์กว้างประมาณ 0.6-0.8 ไมครอน ยาวประมาณ 1.0-4.0 ไมครอน และอาจพบในลักษณะกลม ยืดยาว (elongation) บวม (swollen) รูปกระบอง (clopshape) หรือเป็นเส้นสาย (filamentous) เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลารอบเซลล์หรือแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ หรือไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) โคโลนีของเชื้อ *Acetobacter* sp. มีสีชมพูเนื่องจากมีการสังเคราะห์สารพอร์ไฟริน (porpyrin) ต้องการอากาศ (aerobic) มีเมแทบอลิซึมจากการหายใจด้วยออกซิเจนโดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron accepter) ในกระบวนการเปลี่ยนสารอาหารให้เป็นพลังงาน เป็นพวกเคโมออร์กาโนโทรพิค (chemoorganotrophic) สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase positive) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือที่พีเอช 3.3-5.4 และอุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลซียส ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) สามารถออกซิไดส์เอทานอลเป็นกรดอะซิติก และออกซิไดส์ กรดอินทรีย์ประเภทอะซิเตท และแลคเตทเป็นน้ำ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นสารประเภทเอทานอล กลีเซอรอล แลคเตท กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส แลคโตส และอะราบิโนส สามารถสร้างกรดจากเอทานอล และยังสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเอทานอล และโพรพานอล อุณหภูมิที่สามารถยับยั้งเชื้อได้คือ 65-70 องศาเซลเซียส การสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรียมีวิถีทาง ดังนี้



ภาพที่ 2.12 Pathway การสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสจากแบคทีเรีย

ที่มา : www.gpo.or.th/rdi/htmls/cellu.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิตเซลลูโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการผลิตเซลลูโลสนั้นพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ การเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการให้อากาศและมีการเขย่าจะให้ผลดีที่สุด สำหรับการสร้างเซลลูโลส จะเกิดขึ้นในเซลล์ของแบคทีเรียและเส้นใยเหล่านี้จะถูกขับออกมาทางรูของ เซลล์เมมเบรน โดยในการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* นี้ใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร และจะให้เซลลูโลส สูงถึง 9 กรัมต่อลิตร ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* นั้นได้ทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในสภาพนิ่ง (static) และสภาพที่มีการเขย่า (agitation) พบว่าการเลี้ยงแบบสภาพนิ่งจะทำให้เส้นใยเจริญและจับตัวกันแน่น ทำให้สภาพอาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงกว่าการเลี้ยงแบบเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มกรดคาร์บอนิค จะช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตดีในช่วงของ lag phaseและยังช่วยเพิ่มการผลิตเซลลูโลสด้วย การเพิ่มกรดแลคติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้เชื้อสังเคราะห์ATP ได้ดีขึ้น โดยจะไปเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ lactate dehydrogenase และ TCA cycle นอกจากนี้ ปัจจัยอื่น ได้แก่ ชนิดของใบพัดในถังหมัก ความเร็วรอบในการกวน ปริมาณอากาศและ pH ก็มีผลต่อการเลี้ยงเซลลูโลสด้วย

2.13.4 ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *A.xylinum*

ลักษณะการผลิตเซลลูโลสโดยเชื้อ *A. xylinum* เป็นแบบ Growth associated มีลักษณะสำคัญคือการเจริญเติบโต (trophophase) แบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลสจะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นจำนวนมากและมีการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสออกมาน้อย แต่ในช่วงผลิตผลิตภัณฑ์คือเซลลูโลส (idiophase) จะมีการเจริญของเซลล์เพียงเล็กน้อยแต่มีการผลิตเซลลูโลสสูงสุด

2.13.4.1 แหล่งคาร์บอน

สำหรับผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในการสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* แบ่งออกได้ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ผลผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียจะมีความสัมพันธ์กับการใช้สารอาหารน้ำตาลกลูโคส ผลผลิตของแบคทีเรียลเซลลูโลสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดกลูโคนิก และกรดคีโตกลูโคนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในการสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum*

แหล่งคาร์บอน	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
Diasaccharide	Lactose	16
	Maltose	7
	Sucrose	33
	Starch	18
	Ethanol	4
	Ethylene glycol	1
	Diethylene glycol	1
	Propylene glycol	8
	Glycerol	93
	Myo-inositil	17
Organic acids	Citric acid	20
	L-malic acid	15
	Succinic acid	12
Organic acids	Citric acid	20
	L-malic acid	15
	Succinic acid	12
Other	D-glucono lactone	62
	No carbon source	2

ที่มา : Satoshi *et al.* (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งคาร์บอนจะมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. โดยเป็นแหล่งพลังงานแก่เซลล์และเป็นองค์ประกอบหลักของแบคทีเรียเซลลูโลส เช่น ซูโครส มอลโทส และแมนโนส เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียผลิตเซลลูโลสบางสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้สารในกลุ่มแอลกอฮอล์ อาทิเช่น กลีเซอรอล ไกลคอล เอทานอล และโพรพานอล เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเป็นแหล่งให้พลังงาน (Yoshinaga และคณะ 1997) แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันจะมีผลต่อกิจกรรมของ phosphocose isomerase และในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลฟรุกโตส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ UDPG pyrophosphorylase สูงขึ้น ซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส

2.13.4.2 แหล่งไนโตรเจนและสารอาหารอื่นๆ

เซลล์แบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 8-10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันไป แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีสารไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) แต่บางสายพันธุ์ต้องการสารไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen) แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่สำคัญเป็นสารประเภทก๊าซแอมโมเนียม เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟต ปกติเมื่อแอมโมเนียม (NH_4^+) ถูกใช้ไปจะทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นกรด เพราะจะเกิดการสะสมอนุมูลซัลเฟต (SO_4^+) ขึ้น ส่วนก๊าซแอมโมเนียมและไนเตรตเมื่อถูกเมตาโบไลท์จะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ สารไนโตรเจนอินทรีย์ที่สำคัญประกอบด้วย เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ และเคซีน

ธาตุอาหารอื่นๆมีความจำเป็นเกี่ยวกับอัตราการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลสภายนอกเซลล์ เช่น แหล่งไนโตรเจน แคลเซียม และฟอสเฟต เป็นต้น อย่างไรก็ตามชนิดและปริมาณของธาตุอาหารเหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส รวมถึงสภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส อาทิเช่น พีเอช อุณหภูมิ และการให้อากาศ แหล่งไนโตรเจน เป็นสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่ถ้ามีปริมาณสูงจะลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรตเป็นแบคทีเรียลเซลลูโลส สำหรับโปแตสเซียมและโซเดียมไนเตรท แบคทีเรียไม่สามารถใช้ได้ และยังเป็นพิษต่อเชื้ออีกด้วย (Lapuz และคณะ, 1967)

2.13.4.3 อุณหภูมิ

การหมักเชื้อ *Acetobacter* sp. ในน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิในช่วง 10-45 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้แต่จะไม่ผลิตเซลลูโลส การสังเคราะห์เซลลูโลสจะเริ่มมีการผลิตตั้งแต่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสจนถึงช่วงอุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตเซลลูโลสในปริมาณสูง เมื่ออุณหภูมิสูงจะเกิดผลเสียต่อคุณสมบัติของเอนไซม์หรือการเสียสภาพโปรตีน โครงสร้างของแฟลกเจลลา ไรโบโซม โปรโตพลาส และไมโตคอนเดรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส ในการผลิตสารโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *Escherichia coli* โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 20 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณสารโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นจะต่ำกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

2.13.4.4 อัตราการให้อากาศ

Krusong and Yoshida (1995) พบว่าปริมาณการให้อากาศและปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการสังเคราะห์เซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* โดยมีผลกับปริมาณพลังงานที่สร้างขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ในกรณีของแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* และ *Acetobacter aerogenes* ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ พบว่ามีการสังเคราะห์เซลลูโลสในปริมาณที่ต่ำกว่าในสภาพที่มีอากาศ โดยการสังเคราะห์จะต่ำกว่าร้อยละ 25-40 กรณีของเชื้อ *A. xylinum* พบว่าในสภาพที่ไม่มีอากาศจะไม่สามารถสังเคราะห์เซลลูโลสได้เลย การสังเคราะห์จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อปริมาณก๊าซออกซิเจนมีเพียงพอต่อความต้องการของเซลล์เท่านั้น

Guzman *et al.*, (1982) รายงานว่าปริมาณอากาศมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส โดยได้ศึกษาการผลิตของเชื้อ *A.xylinum* ในการศึกษาใช้กระบวนการหมัก 2 แบบ คือ แบบอยู่กับที่ให้เกิดเซลลูโลสขึ้นเองที่ผิวหน้าของอาหารเหลวเปรียบเทียบการหมักที่มีการให้อากาศและมีการกวนตลอดเวลา (submerged culture) ในถังหมักขนาด 1ลิตร อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.25 ปริมาตรต่อปริมาตรนาที ปริมาณแบคทีเรียเซลลูโลสที่ผลิตได้ 22.47 และ 71.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

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

การหมักเชื้อ *A. xylinum* บนเครื่องเขย่าโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณต่างกัน คือ 25 50 75 100 และ 125 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 75 มิลลิลิตร ให้ผลผลิตเซลลูโลสปริมาณสูงสุด (Alban, 1962)

ปริมาณอากาศมีส่วนสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แบคทีเรียเซลลูโลส และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เมื่อแบคทีเรียสังเคราะห์เซลลูโลสเพิ่มขึ้น จะทำให้การแผ่กระจายของอากาศลดลง เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เซลลูโลสลดลง เนื่องจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มขึ้น การส่งผ่านออกซิเจน (oxygen transfer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เชื้อ *A. xylinum* BPR2001 เพื่อผลิตแบคทีเรียเซลลูโลส พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น เป็นตัวจำกัดปริมาณก๊าซออกซิเจนที่มีอยู่ด้วยชนิดของใบกวนในถังหมักแบบ Maxblen และ Gate with turbine จะช่วยเพิ่มการส่งผ่านก๊าซออกซิเจนได้สูงขึ้น ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านของมวล (volumetric mass transfer coeffcient, K_La) มีค่าสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากใบกวนจะช่วยเพิ่มฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อและช่วยเพิ่มผิวสัมผัสระหว่างฟองอากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ค่า K_La สูงขึ้น และนอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่ม partial pressure ของก๊าซออกซิเจนในถังหมัก แบคทีเรียสามารถผลิตเซลลูโลสได้สูงขึ้น และลดพลังงานในการกวน

2.13.4.5 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Ohara และคณะ (1992) ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ในกระบวนการหมักแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูโลส ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงค่าพีเอช 4.0-5.0 และค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสารอาหาร รวมถึงการยอมให้สารอาหารผ่านผนังเซลล์ได้

การศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. xylinum* พบว่าค่าพีเอช 4.0-5.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตแบคทีเรียลเซลลูโลส ที่มีค่าพีเอช 3.0 การเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลงและที่ค่าพีเอชมากกว่า 8.0 เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ การเติมกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1-10 เปอร์เซ็นต์ 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

(Alban, 1962) ได้ศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องการควบคุมก่อนการหมักเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *Acetobacter* sp. และยังช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13.5 การนำเซลลูโลสจากแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์

จากคุณสมบัติที่โดดเด่นของเซลลูโลสจากแบคทีเรียคือ เส้นใยมีขนาดเล็กเชื่อมกันเป็นร่างแหทำให้มีความเหนียวสูง ดังนั้นจึงได้มีการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรีย มาดัดแปลงใช้เป็นส่วนประกอบของเมมเบรนต่าง ๆ เช่น เป็นส่วนประกอบของลำโพง และกระดาษที่ต้องการความเหนียวสูง ในทางการแพทย์ได้มีการนำเซลลูโลสจากแบคทีเรีย มาพัฒนาใช้เป็นผิวหนังเทียม (โดยตกแต่งแผล) เพราะว่ามีความเหนียวแม้ในสภาพเปียก และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง นอกจากนี้ยังได้มีการนำ เซลลูโลสจากแบคทีเรียมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารและเครื่องสำอางอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

- เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* TISTR 976 เป็นเชื้อที่ใช้ผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว
- เชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3090 เป็นเชื้อที่ใช้ผลิตสารสี

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารสูตรน้ำมะพร้าว (ภาคผนวก ก) ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อและผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว
- อาหารวุ้นเอียง PDA (ภาคผนวก ก.) ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3090
- อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับสร้างสารสี โดยใช้อาหารสูตรดัดแปลงของ Lin และ Demain (1991) (ภาคผนวก ก.)

3.2 วัตถุดิบ และสารเคมี

3.2.1 วัตถุดิบในการผลิตกุนเชียง

- หมูเนื้อแดง
- มันแข็ง
- ผงพะโล้
- เกลือ
- น้ำตาล
- แป้งข้าวโพด
- ไส้หมูเทียม

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ความหืน

- Thiobarbituric acid reagent
- HCL. 4 M

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

- Cooked meat medium
- Plate count agar
- Peptone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

- ถ้วยพลาสติก
- แก้วน้ำพลาสติก

3.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สี

- เครื่องวัดสี Minolta, CR-300

3.3.3 อุปกรณ์ที่ใช้วัดค่า water activity

- เครื่องวัดค่า water activity Novasina; Thermoconstanter, สวิตเซอร์แลนด์

3.3.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความชื้น

- กระป๋องหาความชื้น (moisture can)
- โถดูดความชื้น (dessicator)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) WTB binder; A10

3.3.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ความหืน

- อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- เครื่องกลั่นไนโตรเจน (distillation unit) Gerhardt; Vapodest 30
- เครื่องวัดพีเอช (pH meter) Eutech instruments; 510
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Shimadzu; uv 1201 v, Japan

3.3.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์

- อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) Tomy; SS-325, Japan
- ตู้บ่มเชื้อ Binder; BD240, Germany
- ตู้อบ กล้วยน้ำไทย เตาอบ
- เครื่องตีปั่นอาหาร (Stomacher) Iul instruments

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว

เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ซึ่งประกอบด้วย น้ำมะพร้าวแก่ น้ำตาลซูโครสร้อยละ 5 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 และกรดอะซิติกร้อยละ 1 (เป็นตัวปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีพีเอช 4-5) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การผลิตวุ้นน้ำมะพร้าว

เลี้ยงเชื้อ *Acetobacter xylinum* TISTR 976 ในอาหารสูตรน้ำมะพร้าว ซึ่งมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนสูตรที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ โดยเตรียมอาหารใส่ถาดพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการลวกน้ำร้อน เติมหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.4.1 ลงไปในถาดพลาสติกโดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ปิดถาดด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จะได้แผ่นวุ้นน้ำมะพร้าว นำแผ่นวุ้นน้ำมะพร้าวมาตัดให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมที่มีขนาด 2 x 2 x 0.5 เซนติเมตร นำไปล้างน้ำโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.3 การเตรียมหัวเชื้อของ *Monascus purpureus* TISTR 3090

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

3.4.4 การผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *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 3.4.3 ร้อยละ 10 (15 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์) นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงนาน 12 วัน และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาล้างน้ำให้สะอาด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ และนำมาปั่นให้ละเอียด อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งและนำมาปั่นอีกครั้งให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 100 เมช (Endecotts test sieves) เก็บใส่ถุงนำเข้าตู้เย็นเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4.5 การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ Monascus *purpureus* TISTR 3090 ในการตกแต่งแทนปริมาณไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

ศึกษาผลของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 5 ระดับ คือ ร้อยละ 0.10 ร้อยละ 0.20 ร้อยละ 0.30 ร้อยละ 0.40 และร้อยละ 0.50 ของน้ำหนักเนื้อ โดยใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นน้ำมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 แทนผงเพรกซึ่งมีไนไตรท์เป็นส่วนประกอบในสูตรควบคุม (ตารางที่ 3.1) และมีกระบวนการผลิตดังภาพที่ 3.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำกุนเชียงมาทำการตรวจสอบคุณภาพ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าสี โดยใช้เครื่อง Chroma meter (Minolta, CR-300)

โดยนำกุนเชียงมาปั่นให้ละเอียด และบรรจุลงในถ้วยวัดสีสำหรับของแข็งให้แน่นไม่ให้มีอากาศ ทำการวัดสีโดยวัดค่า

L* = lightness (0 = black, 100 = white)

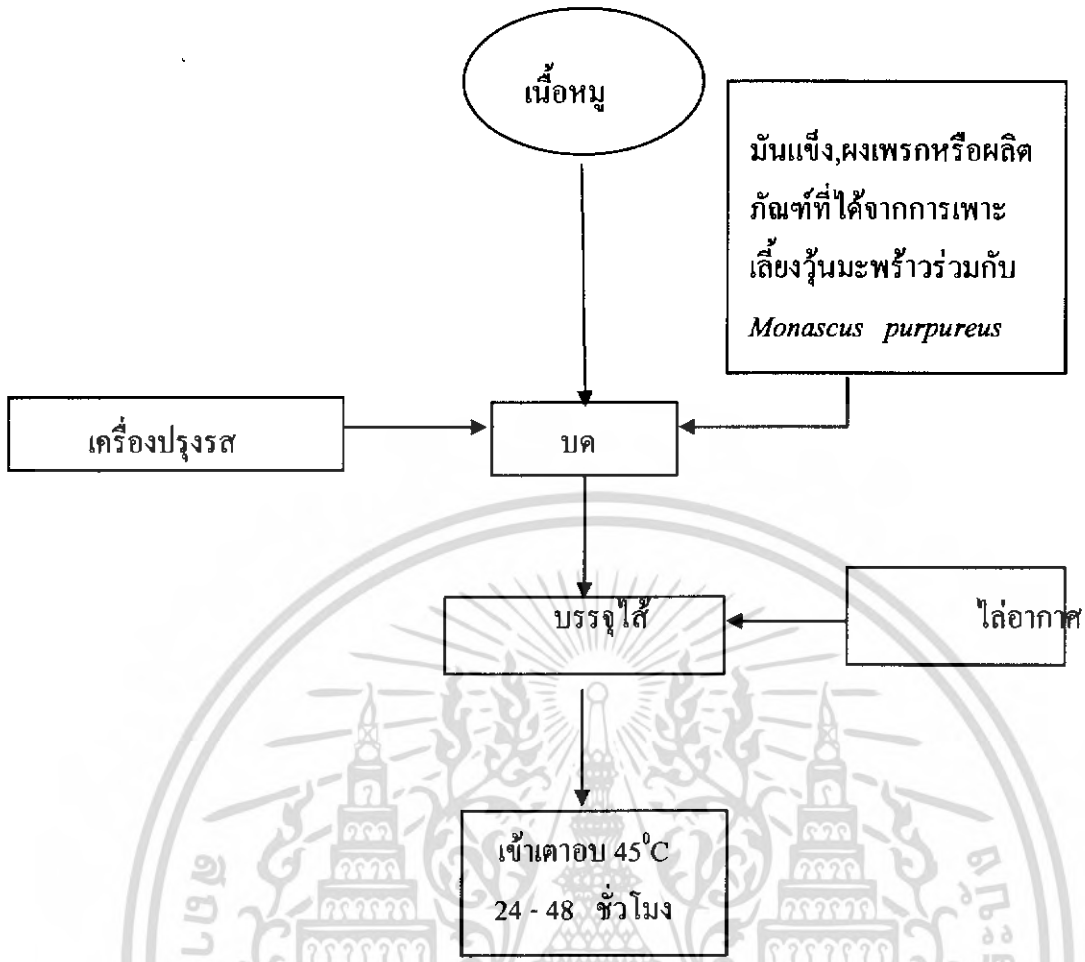
a* = redness / greenness (+ = red, - = green)

b* = yellowness / blueness (+ = yellow, - = blue)

ตารางที่ 3.1 แสดงสูตรควบคุมของกุนเชียง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
เนื้อหมู	10,500
มันแข็ง	4,500
ผงเพรก	15
ผงพะโล้	30
เกลือ	195
น้ำตาลทราย	2,800

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการผลิตกุนเชียง

คุณภาพทางประสาทสัมผัส

นำกุนเชียงไปทำการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมโดยใช้ผู้ทดสอบชิม 20 คน การให้คะแนนความชอบแบบ 9-point Hedonic Scale (1 = ไม่ชอบมากที่สุด และ 9 = ชอบมากที่สุด) ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ และการยอมรับโดยรวม วางแผนการทดลอง Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical Package for the Social Science (SPSS) เวอร์ชั่น 11.0 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เพื่อหาสูตรที่เหมาะสมและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเพื่อนำไปศึกษาอายุการเก็บรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.6 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์กุนเชียง

3.4.6.1 นำกุนเชียงที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.5 บรรจุลงในถุงพลาสติกโพลีโพรไพลีน หนาประมาณ 25-30 ไมครอน ปิดผนึกแบบสุญญากาศ โดยตั้งค่าต่าง ๆ ดังนี้

Vacuum time	85	sec
Heating time	2	sec
Inlate time	0	sec
Temperature	middle	

ทำการศึกษาสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ติดตามผลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทุก ๆ 7 วัน ทำการตรวจสอบคุณภาพ

คุณภาพทางกายภาพและเคมี

- ค่าสี โดยใช้เครื่อง Chroma meter (Minolta, CR-300) โดยวัดค่า L* a* และ b*
- Water Activity (a_w)
- ความชื้น
- ความหืน

คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ โดยตรวจเชื้อ

- แอนแอโรบิกแบคทีเรีย (AOAC,1995)
- *Clostridium perfringens* (AOAC,1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ทดแทนผงเพรกซึ่งมีไนไตรท์เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

จากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 5 ระดับ คือ ร้อยละ 0.10 0.20 0.30 0.40 และ 0.50 ของน้ำหนักเนื้อ เพื่อทดแทนผงเพรกซึ่งมีไนไตรท์เป็นส่วนประกอบ และเปรียบเทียบกับสูตรที่ใช้ผงเพรก (สูตรควบคุม) ทำการวัดสีของผลิตภัณฑ์กุนเชียง โดยนำกุนเชียงมาปั่นให้ละเอียด และบรรจุลงในถ้วยวัดสีสำหรับของแข็งให้แน่นไม่ให้มีอากาศ และทำการวัดสี (ตารางที่ 4.1) พบว่ากุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.2 มีค่า L* ซึ่งแสดงถึงความสว่าง สูงที่สุดคือ 36.6833 รองลงมาเป็นกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.1 และกุนเชียงสูตรควบคุมที่ใช้ผงเพรก คือ 36.3967 และ 35.6133 ตามลำดับ โดยกุนเชียงทั้ง 3 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และกุนเชียงสูตรควบคุมที่ใช้ผงเพรกไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.30 และ 0.40 ด้วย แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.50 ส่วนกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.30 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 กุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.2 ถึง 0.5 จะมีค่า L* ลดลงตามลำดับ

ส่วนค่า a* ซึ่งแสดงถึงความเข้มของสีแดงพบว่า กุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.50 มีค่า a* 8.5700 ซึ่งมีค่าสูงที่สุด และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.30 และ 0.40 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงสูตรควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 และ 0.20 แต่กุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.30 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.20 ด้วย ส่วนกุนเชียงสูตรควบคุม มีค่า a* 6.0667 ซึ่งมีค่าต่ำที่สุด และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 และ 0.20 โดยการเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 จากร้อยละ 0.10 ถึง 0.50 พบว่ามีผลทำให้ค่า a* เพิ่มขึ้น

ส่วนค่า b* ซึ่งแสดงถึงความเข้มของสีเหลืองพบว่า กุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 มีค่า b* 6.6300 ซึ่งมีค่าสูงที่สุด และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.30 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงสูตรควบคุม และกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 0.20 และ 0.50 แต่กุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.30 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงสูตรควบคุม และกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.50 ด้วย ส่วนกุนเชียงสูตรควบคุมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.20 และ 0.50 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 แต่กุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.20 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ด้วย ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ซึ่งแสดงผลิตภัณฑ์กุนเชียงสูตรควบคุมและสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในระดับต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.1 แสดงผลิตภัณฑ์กุนเชียงสูตรควบคุมและสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ เพาะเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในระดับต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า L* a* และ b* ของสีภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมกับกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในระดับต่าง ๆ กัน

ชนิดของกุนเชียง	L*	a*	b*
สูตรควบคุม	35.6133 [ab]	6.0667 [c]	5.5167 [bc]
ร้อยละ 0.10	36.3967 [a]	6.5133 [c]	4.1367 [d]
ร้อยละ 0.20	36.6833 [a]	6.7133 [bc]	4.9933 [ab]
ร้อยละ 0.30	33.9200 [b]	7.9100 [ab]	6.0600 [ab]
ร้อยละ 0.40	33.8200 [b]	8.2567 [a]	6.6300 [a]
ร้อยละ 0.50	27.7600 [c]	8.5700 [a]	5.4133 [bc]

หมายเหตุ

[1]ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสของกุนเชียง (ตารางที่ 4.2) เมื่อพิจารณาคุณลักษณะทางด้านลักษณะปรากฏ พบว่าสูตรควบคุมมีคะแนนสูงที่สุด และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.1 และ 0.30 แต่จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.20 0.40 และ 0.50 แต่กุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 และ 0.30 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.20 ด้วย และกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.20 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 และ 0.50 เช่นกัน ส่วนกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสี ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์กุนเชียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาคุณลักษณะทางด้านสี พบว่าสูตรควบคุมมีคะแนนสูงที่สุด และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง วุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 และ 0.30 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.20 0.40 และ 0.50 แต่กุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 และ 0.30 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.20 และกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.20 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 และ 0.50 เช่นกัน ส่วนกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสีของกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 และ 0.50 มีลักษณะแดงมาก ทำให้ผู้บริโภคเกิดความอคติต่อผลิตภัณฑ์กุนเชียงความเข้มข้นดังกล่าว

เมื่อพิจารณาคุณลักษณะทางด้านรสชาติ พบว่าสูตรควบคุมจะมีคะแนนสูงที่สุด ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง วุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 0.20 และ 0.30 แต่มีความต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 และ 0.50 แต่กุนเชียงใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง วุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 0.20 และ 0.30 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง วุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.50 ด้วย ส่วนกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.5

เมื่อพิจารณาคุณลักษณะทางด้านกลิ่น พบว่าสูตรควบคุมมีคะแนนสูงที่สุด ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 0.20 และ 0.30 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 และ 0.50 แต่สูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 0.20 และ 0.30 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.50 ส่วนกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.5 ซึ่งอาจเนื่องมาจากอิทธิพลของสีและลักษณะปรากฏ จึงทำให้ผู้บริโภคเกิดอคติต่อผลิตภัณฑ์กุนเชียงได้

ในด้านการยอมรับโดยรวม พบว่าสูตรควบคุมจะมีคะแนนสูงที่สุดซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus. purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 0.20 และ 0.30 แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 และ 0.50 แต่สูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.20 และ 0.30 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.50 ส่วนกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.40 ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.5 จากการศึกษาทางด้านสีและประสาทสัมผัส พบว่ากุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับกุนเชียงสูตรควบคุมเกือบทุกคุณลักษณะที่ทำการศึกษา ยกเว้นเพียงค่า b* ซึ่งแสดงถึงความเข้มของสีเหลืองเท่านั้น ดังนั้นจึงเลือกกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง วุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ0.10 มาใช้ในการศึกษาอายุการเก็บรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงคะแนนเฉลี่ยการทดสอบในด้านคุณภาพทางประสาทสัมผัสของกุนเชียง[2]

คุณลักษณะ	สูตรควบคุม	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090				
		0.10%	0.20%	0.30%	0.40%	0.50%
ลักษณะปรากฏ	6.9500 [a]	6.2000 [ab]	5.6500 [bc]	6.0500 [ab]	5.0500 [c]	4.7500 [c]
สี	6.7000 [a]	6.5500 [ab]	5.6000 [bc]	5.7500 [abc]	5.4500 [c]	5.3000 [c]
รสชาติ	6.7000 [a]	6.3000 [ab]	5.8500 [ab]	6.4500 [ab]	4.4500 [c]	5.2500 [bc]
กลิ่น	6.2500 [a]	6.0500 [ab]	6.0000 [ab]	5.6500 [abc]	4.8500 [c]	5.0500 [bc]
การยอมรับโดยรวม	6.7000 [a]	6.4500 [a]	5.9500 [ab]	6.1500 [ab]	4.9000 [c]	5.2000 [bc]

หมายเหตุ

[1]ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

[2]ผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสจากผู้ทดสอบชิม 20 คน

4.2 การศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์กุนเชียง

4.2.1 Water activity (a_w) และความชื้น

จากภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงค่า water activity (a_w) ของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ และในแต่ละสัปดาห์จะติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า water activity (a_w) พบว่าค่า a_w จะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ทั้งในสูตรควบคุมและสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 โดยค่า water activity (a_w) มีค่าการเปลี่ยนแปลงเท่ากับ 0.05 และ 0.06 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) และจากภาพที่ 4.3 ปริมาณความชื้นในสูตรควบคุมและสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 จะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเหมือนกับการเปลี่ยนแปลงของค่า water activity (a_w) (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

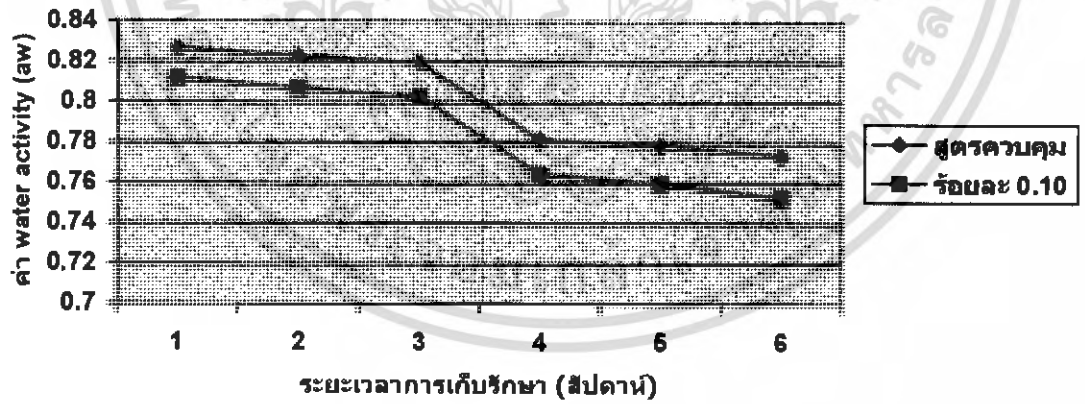
ความชื้นของกุนเชียงสูตรควบคุมในสัปดาห์ที่ 1 มีค่าร้อยละ 24.19 และสัปดาห์ที่ 6 มีค่าร้อยละ 20.00 นั่นคือมีค่าการเปลี่ยนแปลงร้อยละ 4.19 และกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในสัปดาห์ที่ 1 มีความชื้นร้อยละ 23.50 และในสัปดาห์ที่ 6 มีความชื้นร้อยละ 19.61 นั่นคือมีค่าการเปลี่ยนแปลงร้อยละ 3.89

จากผลการทดลองจะพบว่าค่า water activity (a_w) และความชื้นของกุนเชียงสูตรควบคุมจะมีค่าที่สูงกว่าสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ซึ่งเป็นไปตามแนวโน้มเดียวกับงานวิจัยของพอใจ (2002) และงานวิจัยของภัทธรินทร์และคณะ (2004) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 เป็นเซลลูโลสผงจึงอาจดูดซับน้ำที่มีอยู่ในกุนเชียงทำให้ค่า water activity (a_w) และความชื้นมีค่าต่ำกว่า และนอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของค่าความชื้นและค่า water activity (a_w) ในระหว่างการเก็บรักษานั้น อาจเนื่องมาจากชนิดของบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการบรรจุผลิตภัณฑ์กุนเชียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า water activity (a_w) ของผลิตภัณฑ์กุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

สัปดาห์	ค่า water activity	
	สูตรควบคุม	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10
1	0.826	0.811
2	0.822	0.806
3	0.819	0.802
4	0.781	0.764
5	0.778	0.759
6	0.773	0.752

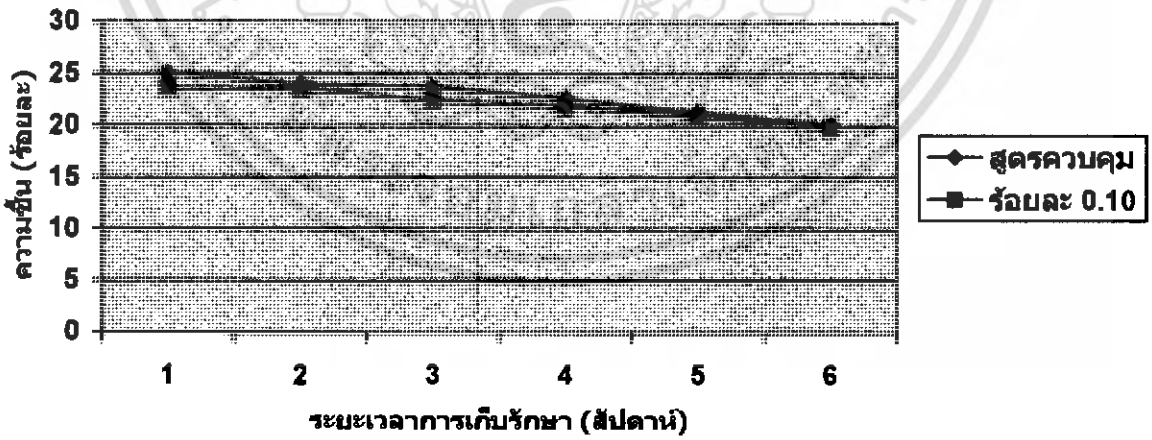


ภาพที่ 4.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า water activity (a_w) ของผลิตภัณฑ์กุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์กุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

สัปดาห์	ความชื้น (ร้อยละ)	
	สูตรควบคุม	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10
1	24.19	23.50
2	23.81	23.41
3	23.64	22.33
4	22.50	21.78
5	21.18	20.79
6	20.00	19.61



ภาพที่ 4.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงความชื้นของผลิตภัณฑ์กุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ค่าความหืน

จากการบรรจุกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง วุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ลงในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความหืนของผลิตภัณฑ์ทุก ๆ 1 สัปดาห์พบว่า

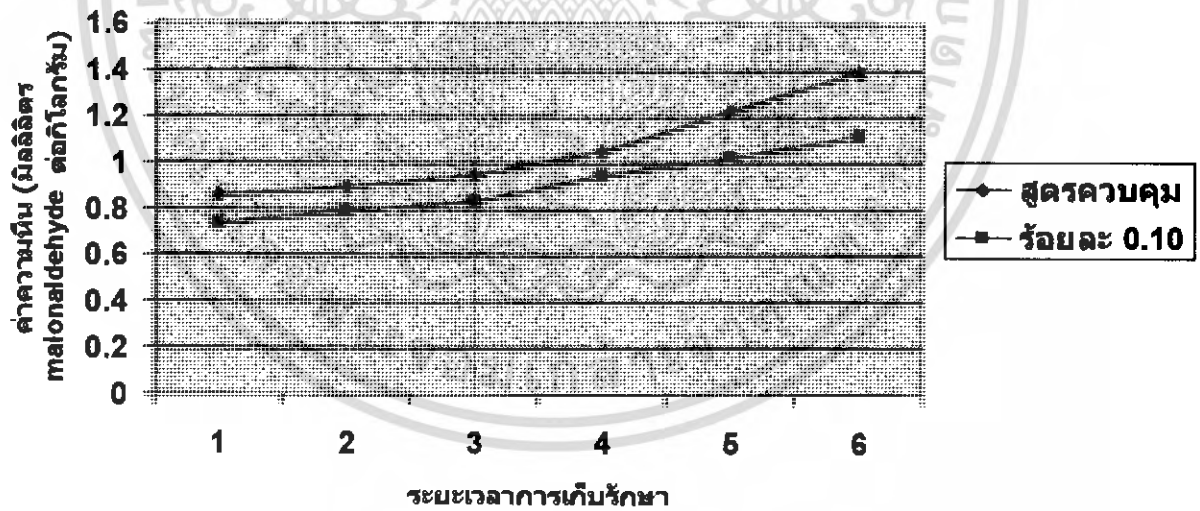
กุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง วุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 มีการเปลี่ยนแปลงของค่าความหืนพอสมควร โดยกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง วุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 มีค่าความหืนน้อยกว่ากุนเชียงสูตรควบคุม (ตารางที่ 4.5)

จากภาพที่ 4.4 กุนเชียงทั้ง 2 สูตรมีแนวโน้มของค่าความหืนเพิ่มขึ้น โดยกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง วุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 มีค่าความหืนเพิ่มขึ้นจาก 0.73 มิลลิลิตร malonaldehyde ต่อกิโลกรัม เป็น 1.11 มิลลิลิตร malonaldehyde ต่อกิโลกรัม นั่นคือมีการเปลี่ยนแปลง 0.38 มิลลิลิตร malonaldehyde ต่อกิโลกรัม ส่วนกุนเชียงสูตรควบคุมจะมีค่าความหืนเพิ่มขึ้นจาก 0.85 มิลลิลิตร malonaldehyde ต่อกิโลกรัม เป็น 1.39 มิลลิลิตร malonaldehyde ต่อกิโลกรัม นั่นคือมีการเปลี่ยนแปลง 0.54 มิลลิลิตร malonaldehyde ต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 4.5) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในผลิตภัณฑ์กุนเชียงมีไขมันเป็นส่วนประกอบมาก ซึ่งเป็นสาเหตุหลักให้เกิดความหืน ประกอบกับชนิดของบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการบรรจุผลิตภัณฑ์กุนเชียงซึ่งอากาศอาจสามารถผ่านเข้าไปภายในถุงได้เมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน จึงอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นระหว่างไขมันในผลิตภัณฑ์กุนเชียงกับออกซิเจนในอากาศ ทำให้ผลิตภัณฑ์กุนเชียงทั้ง 2 สูตรมีค่าความหืนเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าความหืนของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 (มิลลิลิตร malonaldehyde ต่อกิโลกรัม)

สัปดาห์	สูตรควบคุม	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10
1	0.85	0.73
2	0.89	0.78
3	0.94	0.83
4	1.04	0.94
5	1.22	1.02
6	1.39	1.11



ภาพที่ 4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าความหืนของกุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ปริมาณแอนแอโรบิกแบคทีเรีย (anaerobic bacteria) และ *Clostridium perfringens*

การบรรจุกุนเชียงในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ที่สภาวะสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (ตารางที่ 4.6) พบว่าในสัปดาห์แรกกุนเชียงสูตรควบคุมจะมีปริมาณแอนแอโรบิกแบคทีเรียในสัปดาห์แรก 2.54 x 10^6 CFU/ml และกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 จะมีปริมาณ แอนแอโรบิกแบคทีเรียในสัปดาห์แรก 2.48 x 10^6 CFU/ml ซึ่งในกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 จะมีปริมาณแอนแอโรบิกแบคทีเรียน้อยกว่ากุนเชียงสูตรควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่า a_w และความชื้นที่มีในผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ จึงทำให้ผลิตภัณฑ์สูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 มีปริมาณแอนแอโรบิกแบคทีเรียน้อยกว่ากุนเชียงสูตรควบคุม เมื่อเก็บรักษานานขึ้น กุนเชียงทั้งสูตรควบคุมและสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 จะมีการปนเปื้อนจากเชื้อราทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ต่อไปได้

สำหรับการวิเคราะห์หา *Clostridium perfringens* พบว่าในกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ในสัปดาห์แรกไม่พบการเจริญของ *Clostridium perfringens* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และโดยทั่วไปกุนเชียงเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่จะต้องให้ความร้อนอีกครั้งก่อนการบริโภค ดังนั้นโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจึงมีค่อนข้างน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณแอนแอโรบิกแบคทีเรีย และ *Clostridium perfringens* ของผลิตภัณฑ์กุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้อง (CFU/ml)

จุลินทรีย์ที่ตรวจสอบ	สูตรควบคุม	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10
แอนแอโรบิกแบคทีเรีย	2.54×10^6	2.48×10^6
Clostridium perfringens	0.00	0.00

4.2.4 การศึกษาความคงตัวของสารสีในผลิตภัณฑ์กุนเชียง

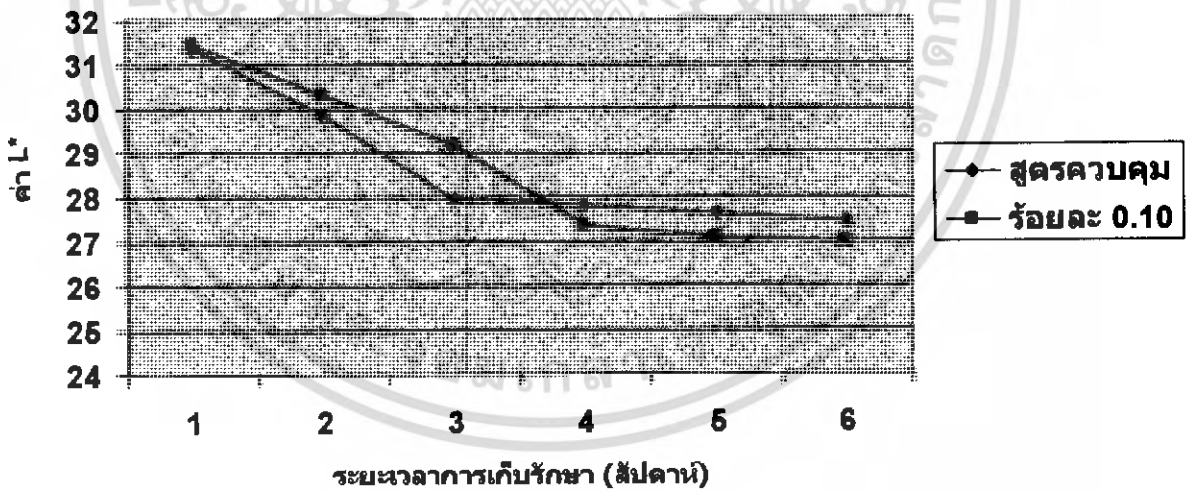
จากการบรรจุกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง วุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ลงในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์ทุก ๆ 1 สัปดาห์

จากภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงค่า L* ของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ซึ่งค่า L* เป็นค่าแสดงถึงความสว่าง พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่า L* ของสีภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งเป็นไปตามแนวโน้มเดียวกับงานวิจัยของพอใจ (2002) และงานวิจัยของภัทธรินทร์และคณะ (2004) การเปลี่ยนแปลงของค่า L* นี้อาจเนื่องมาจากการสูญเสียน้ำของผลิตภัณฑ์จึงทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีคล้ำขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ค่า L* ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงค่า L* ภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ Monascus *purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10

สัปดาห์	สูตรควบคุม	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10
1	31.31	31.39
2	29.83	30.27
3	27.90	29.13
4	27.78	27.33
5	27.60	27.03
6	27.40	26.94



ภาพที่ 4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า L* ภายในของกุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

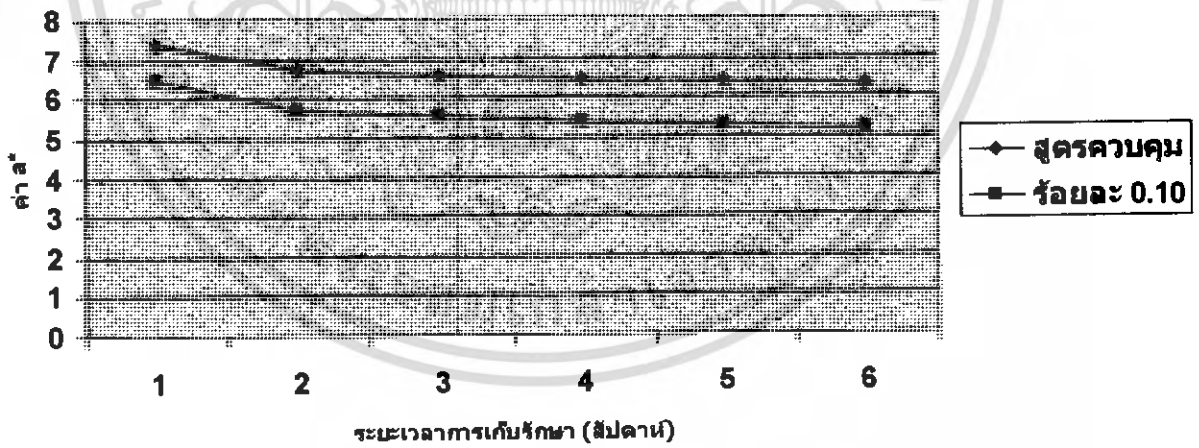
จากผลการวัดค่า a* ภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureu* TISTR 3090 ร้อยละ 0.01 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่า a* ซึ่งแสดงถึงความเข้มของสีแดงลดลง เพียงเล็กน้อยทั้งกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 โดยมีค่าลดลงจาก 7.33 เป็น 6.29 และจาก 6.44 เป็น 5.13 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) ซึ่งเป็นไปตามแนวโน้มเดียวกับงานวิจัยของพอใจ (2002) และงานวิจัยของภัทธรินทร์และคณะ (2004) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสีที่มีในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 มีความคงตัวค่อนข้างต่ำ ดังนั้นในการเก็บผลิตภัณฑ์จึงควรใช้ภาชนะบรรจุที่สามารถป้องกันการซึมผ่านของอากาศได้ค่อนข้างแน่นอน และอาจสามารถป้องกันแสงได้ด้วย

สุภาวดี (2545) พบว่าสภาพการบรรจุ และภาชนะบรรจุมีอิทธิพลต่อค่า a* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งในกุนเชียงสูตรควบคุมและสูตรที่ใช้ข้าวแดง ซึ่งบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์จะสามารถป้องกันการลดลงของสารสีแดง (ค่า a*) ได้ดีกว่าการบรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงค่า a* ภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10

สัปดาห์	สูตรควบคุม	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureu* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10
1	7.33	6.44
2	6.65	5.66
3	6.54	5.49
4	6.41	5.34
5	6.38	5.26
6	6.29	5.13



ภาพที่ 4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า a* ภายในของกุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์

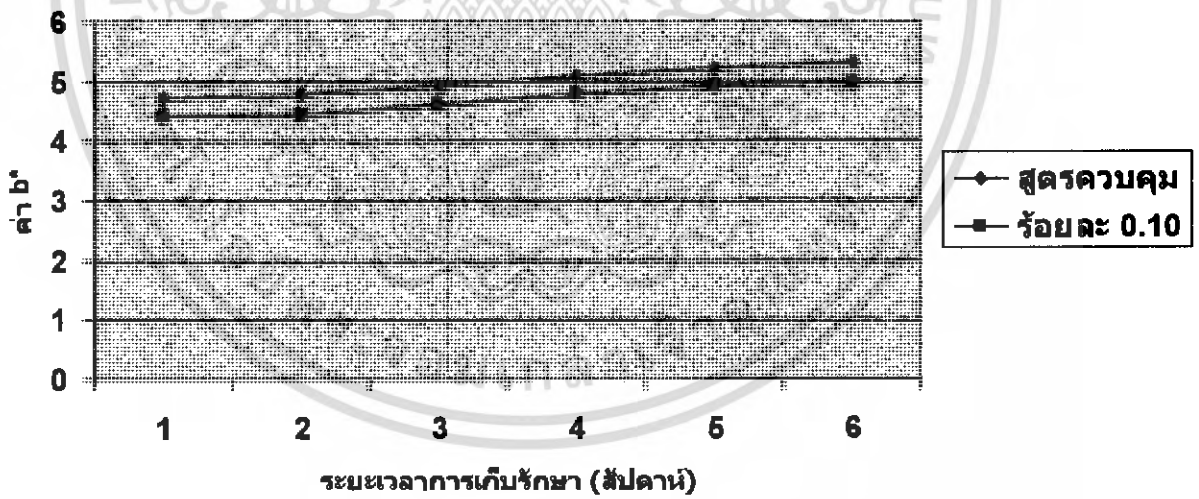
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการวัดค่า b* ภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ค่า b* มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยทั้งกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 4.70 เป็น 5.28 และจาก 4.39 เป็น 4.94 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) ซึ่งเป็นไปตามแนวโน้มเดียวกับงานวิจัยของพอใจ (2002) และงานวิจัยของภัทธรินทร์และคณะ (2004) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสีแดงลดลง ซึ่งส่งผลให้ค่า b* เพิ่มขึ้นและกลไกที่สีแดงในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 มีความคงตัวน้อยกว่าสีเหลือง สีแดงจึงสลายตัวไปทำให้สีเหลืองเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงค่า b* ภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมและกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10

สัปดาห์	สูตรควบคุม	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus*TISTR 3090 ร้อยละ0.10
1	4.70	4.39
2	4.75	4.43
3	4.88	4.58
4	5.07	4.74
5	5.20	4.88
6	5.28	4.94



ภาพที่ 4.7 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า b* ภายในของกุนเชียง ที่บรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ที่เหมาะสมในการทดแทนผงเพรก ซึ่งมีไนไตรท์เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์กุนเชียงคือ ร้อยละ 0.10 ของน้ำหนักเนื้อ และการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ไม่มีผลทำให้กลิ่นและรสชาติของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป

การศึกษาอายุการเก็บรักษาของกุนเชียง พบว่ากุนเชียงสูตรควบคุมและสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 มีการเปลี่ยนแปลงค่า water activity (a_w) และปริมาณความชื้นเพียงเล็กน้อยและมีการเปลี่ยนแปลงค่าความหืนพอสมควร โดยกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 มีค่า water activity (a_w) ปริมาณความชื้นและค่าความหืนน้อยกว่ากุนเชียงสูตรควบคุม เมื่อบรรจุในถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ความคงตัวของสารสีในกุนเชียงสูตรควบคุมและสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 เมื่อบรรจุในถุงโพลีโพรไพลีนปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่า L* a* และ b* เพียงเล็กน้อย โดยกุนเชียงสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 มีค่า L* มากกว่ากุนเชียงสูตรควบคุม และมีค่า a* และ b* น้อยกว่ากุนเชียงสูตรควบคุม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการบรรจุผลิตภัณฑ์กุนเชียงทั้งสูตรควบคุม และสูตรที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ร้อยละ 0.10 ลงในภาชนะบรรจุชนิดอื่นด้วย เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์กุนเชียงในระหว่างการเก็บรักษา

2. จากการตรวจเชื้อ *Clostridium perfringens* ไม่พบการเจริญของเชื้อชนิดนี้ ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Clostridium perfringens* ดังนั้นจึงควรทำการเติมเชื้อชนิดนี้ลงไปในผลิตภัณฑ์กุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ทดแทนผงเพรก ซึ่งมีไนไตรท์เป็นส่วนประกอบ แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจในระหว่างการเก็บรักษาว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Clostridium perfringens* หรือไม่

3. ในขั้นตอนการทดลองทุกขั้นตอน ควรทำให้สะอาดปลอดเชื้อมากที่สุด เพื่อไม่ให้ผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อน รวมถึงขั้นตอนการทำกุนเชียงก็ควรทำอย่างสะอาดมากที่สุด เช่น การฉีดตู้อบด้วยแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ ก่อนทำการอบกุนเชียง เป็นต้น

4. อาจทำการตรวจวิเคราะห์ aerobic bacteria ด้วย เนื่องจากไม่ทราบแน่ชัดว่าอากาศสามารถผ่านเข้าถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ที่ใช้บรรจุกุนเชียงได้หรือไม่ ซึ่งหากอากาศสามารถผ่านเข้าถุงโพลีโพรไพลีน (PP) ได้ อาจทำให้ aerobic bacteria ที่มีอยู่เพียงเล็กน้อยสามารถเจริญได้ถึงแม้จะปิดผนึกแบบสุญญากาศแล้วก็ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรุณา โชติฤทธิไกร จิราพร จันทรา และสินิทธ์ วุฒิกรสมบัติกุล. 2546. การหมักเชื้อ *Monascus purpureus TISTR 3090* ร่วมกับแบคทีเรียเซลลูโลสและการคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์ที่ได้. โครงงานพิเศษ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

คณาจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2546. *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เทพปัญญา เจริญรัตน์ และอรวรรณ เตมีเจตน์. 2541. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของเชื้อราโมแนสคัสจากกากมันสำปะหลัง. โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธวัช ขนบดี ประดิษฐ พงศ์ทองคำ นิตยา เสาหจินดา และอารี เสือก้อน. 2530. เปรียบเทียบการทดสอบผลของสีผสมอาหารในกลุ่มอะโซบางชนิด และสีที่ได้จากการหมักเชื้อรา *Monascus* sp. ในโครโมโซมของคน, น. 1 – 15. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 25 สาขาวิทยาศาสตร์ – เทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิสา บุตรภา. 2537. การกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส กบ. 11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสี และเปรียบเทียบสมบัติบางประการกับสายพันธุ์พ่อแม่ สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดงและสีเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บุษบา ยงสมิทธิ์ และวรรณภา ทาบโลกา. *2528*. สีผสมอาหารจากมันสำปะหลังโดยเชื้อราโมแนสคัส. *วารสารวิทยาศาสตร์*, มก. 19 : 45 – 50.

บุษบา ยงสมิทธิ์ วิเชียร ยงมานิตชัย สนทนา แสงจันทร์ และ ชุลี ชัยศรีสุข. 2531. การผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลังเพื่ออุตสาหกรรมการหมัก. รายงานการวิจัยเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 225 น.

บุษบา ยงสมิทธิ์. 2542. *จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี*. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พลายแก้ว ไวชเบญจวงศ์ และบุษบา ยงสมิทธ์. 2534. การศึกษาเบื้องต้นโคจิเชื้อราแดง โมแนสคัสเตรียมจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ หน้า 277 – 282. ในรายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 29 สาขาวิทยาศาสตร์ – เทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภัทธรินทร์ เจิมจำรูญ, รัตนาภรณ์ จำนงค์ศาสตร์ และวิจิตรา สานพภา. *2547*. ศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงวุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus TISTR 3090* ทดแทนไนไตรในผลิตภัณฑ์กุนเชียง. โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2536. *เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์*. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุภาวดี อินทรย์เขียว. 2545. การใช้สารสีโมแนสคัส (อังคัก) ทดแทนไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกรมควันและกุนเชียง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมชาย ไกรรักษ์. 2536. ศักยภาพของเชื้อราโมแนสคัสกลายพันธุ์ชนิดใหม่ ในการผลิตสีเหลืองธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯง

วราวุฒิ ครูส่ง. 2539. *บทปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหารชั้นสูง*. ปรับปรุงครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

Alban, C.A. 1962. Studies on the optimum conditions for Nata de coco bacterium or Nata formation in coconut water. *The Phillippine Agriculturist*. 45 : 409 – 415.

Alexopoulos, C.J and C.W.Mims. 1979. *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 632p.

AOAC. Official Method of Analysis. 1995. 16th ed. *The Association of Analysis Chemists. Arlington, Virginia.*

Aso, K., Y. Suzuki, F. Kato, J. Nishikawa and H. Lizuka. 1989. Comparative electrophoresis and some properties of alkaline proteinases produced by *Monacus* spp. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 35 : 281 – 288.

Bridge, P.D. and D.L. Hawksworth. 1985. Biochemical tests as an aid to the identification of *Monascus* sp. *Letters in Appl. Microbiol*. 1 : 25 – 29.

Carels, M. and Shepherd, D. 1997. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monacus* species in submerged, shaken culture. *J. Micro.* 24: 1346-1357.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Evan, P.J. and H.Y. Wang. 1984. Pigment production from immobilized *Monacus* sp. Utilizing polymeric resin adsorption. *App. Envion. Microbiol.* 47 (6) : 1323 – 1326.

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

Gusman, 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. *Biotecnol. Prog.* 8 : 5 -10.

Haus, E.J., J.S.E. Holkor., A. Kelly., A.D.G. Powell and A. Pobertson. 1959. The chemistry of fungi part xxxvii. The structure of rubropunctatin. *J. Chem. Soc.* 3598 – 3610.

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

Hendry, G.A.F. and J.D. Houghton. 1992. *Natural Food Colorants*. Blackie and Son., New York. 280 p.

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

Hiroi, T., T. Shima and N. Oagasanara. 1979. Hyperpigment. Productive mutant of *Monascus ank* for solid culture. *Agr. Biol. Chem.* 43(9) : 1975 – 1976

Hwang, J. and T.H. Hseu. 1980. Specificity of the acid protease from *Monascus kaoliang* towards the ß-chain of oxidized insulin. *Biochem. Biophy. Acta.* 614 : 607 – 612.

Iizuka, H. and S. Mineki. 1977. Studies on the genus *Monascus*, I. purification and properties of two forms of glucoamylase from *Monascus kaoliang* NOV. SP. F1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 23 : 217 – 230.

Iizuka, H. and S. Mineki. 1978. Studies on the genus *Monascus*, II. Substrate specificity of two glucoamylase obtained from *Monascus kaoliang* F-1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24 : 185 – 192.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krusong, W. and T. Yoshida. 1995. Countoraction of negative effect on cellulose formation in agitated culture of *Acetobacter xylinum* in addition of alginated gel beads as microaerophilic carrier. *Annual Report International Conference Biotechnology*, Japan. 155 – 200.

Lee, Y.K., Chen, D.C., Chauvatcharin, S., Seki, T. and Yoshida, T. 1995. Production of *Monascus* pigment by a solid – liquid state culture method. *J. Ferment. Bioeng.* 79 (5) : 516 – 518.

Lin, C.F. 1973. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. For the production of pigment in a 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

Lin. T.F. and Demain, A.L. 1991. Effect of nutrition of *Monascus* sp. On formation of red pigments. App. *Microbial Biotecnology.* 36 : 70-75.

Manandhar, K.L. and A.E. Apinis. 1971. Temperature relation in *Monascus. Trans. Br. Mycol. Soc.* 57 (3) : 465 – 472.

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

McLoughlin, A.J. and Champagne, G.P. 1994. Immobilized cells in meat fermentation. *Critical Review of Biotecnology.* 14 : 179-192.

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.

Wong, H.C., C.A. Hu, H.L. Yeh, W. Su, H.C. Lu and C.F. lin. 1986. Production, purification, and characterization of α- galactosidase from *Monascus pilosus.* Appl. *Environ. Microbiol.* 52 (5) : 1147 – 1152.

Wong, H.C. and Koehler, P.E. 1983. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigments production. *J.Food Sci.* 46 : 589-592.

Wong, H.C. and Koehler, P.E. 1983. Production of red water soluble *Monascus* pigments production. *J.Food Sci.* 48: 1200-1203.

Wong, H.C., Lin, Y.C. and and Koehler, P.E. 1981. Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentration. *Mycologia.* 73 : 649 – 654.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Wong-Leung, Y.L., W.F. Fong and W.L. Lam. 1993. Production of α- galactosidase by *Monascus* grown on soybean and sugarcane wastes. *World J. Microbiol. Bietechnol.* 9 : 529 – 533.

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

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

Sweeny, J.G., M.C. Estrada. Valdes, g.A. Iacobucci, H. Sato and S. Sakamura. 1981. Photopprotection of the red pigment of *Monascus anka* in aqueous media by 1,4,6 – trihydroxy – naphthalene. J. *Agric. Food. Chem.* 29 : 1189 – 1193.

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

Yongsmith, B., W. Tabloka, W. Yongmanitchai and R. Bavavoda. 1993. Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB 10 grown on cassava medium. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 9 : 85 – 90.

Yongsmith, B., S. Krairak and R. Bavavoda. 1994. Product of yellow pigment in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp. *J. Ferment. Bioeng.* 78 (3) : 223 – 228.

Yoshinaga F., Tonouchi N. and Watanabe K. Research Progress in Production of Bacterial Cellulose by Aeration and Agitation Culture and Its Application as a New Industrial Material. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1997 ; 61 (2) : 219-224.

www.agmassmedia.com

www-efood-idv.tw/images/efood0407283/gif

www.gpo.or.th/rdi/htmls/cellu.html

www.ku.ac.th/e-magazine/september45/agri/rice.jpg

www.poli.usp.br/Pigmento/imagens/pigmentomonascus.jpg

www.smejelly .com

www.udru.ac.th/~pasak/nitrate.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมี

ก1. สูตรอาหารน้ำมะพร้าว

น้ำมะพร้าวแก่	1,000	มิลลิลิตร
น้ำตาลซูโครส	50	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม
กรดอะซิติก	10	มิลลิลิตร

ก2. สูตรอาหาร PDA

Potato extract	4	กรัม
Sucrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ก3. สูตรอาหารดัดแปลงของ Lin & Demain (1991)

Sucrose	50	กรัม
Anhydrous MSG	15	กรัม
KH_2PO_4	2.4	กรัม
K_2HPO_4	2.4	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	8	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
$MnSO_4.7H_2O$	0.003	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ก4. สารละลายเปปโตน (Peptone solution)

Peptone	10	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก5. สูตรอาหาร Plate count agar (PCA)

Tryptone	5	กรัม
Yeast Extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

ก6. สูตรอาหาร Cooked meat medium (CM)

Beef heart	454	กรัม
NaCl	5	กรัม
Peptone	20	กรัม
Glucose	2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.2	

ก7. Thiobarbituric acid reagent (TBA)

Thiobarbituric acid	0.2883	กรัม
Acetic acid 90%	100	มิลลิลิตร

ก8. สารละลาย HCL 1 M

สารละลาย HCL	82.33	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

แบบทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส

ชื่อผู้ทดสอบ.....วันที่.....

กรุณาให้คะแนนคุณลักษณะต่าง ๆ ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์

<u>คำแนะนำ</u>

1. การชิมระหว่างตัวอย่างผู้ชิมต้องล้างตัวอย่างเดิมออกจากปากด้วยน้ำสะอาดที่เตรียมให้ก่อนการชิมตัวอย่างใหม่เสมอ

2. การให้คะแนนจะเป็นการให้คะแนนความชอบแบบ 9 – point Hedonic Scale โดย

1 = ไม่ชอบมากที่สุด	6 = ชอบเล็กน้อย
2 = ไม่ชอบมาก	7 = ชอบปานกลาง
3 = ไม่ชอบปานกลาง	8 = ชอบมาก
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย	9 = ชอบมากที่สุด
5 = เฉย ๆ	

	ตัวอย่าง				
	1	2	3	4	5
คุณลักษณะ					
ลักษณะปรากฏ	.....	.....	.....	.....	.....
สี	.....	.....	.....	.....	.....
กลิ่น	.....	.....	.....	.....	.....
รสชาติ	.....	.....	.....	.....	.....
การยอมรับโดยรวม	.....	.....	.....	.....	.....

ข้อเสนอแนะ.....

.....

.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

วิธีการวิเคราะห์

ค1. ความชื้น (AOAC, 1995)

ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัมในอะลูมิเนียมแคน (moisture can) ที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100-150 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้น

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้นร้อยละ} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

ค2. Water Activity (Thermoconstanter)

2.1 หมุนปุ่มสีเหลืองของเครื่อง thermoconstanter ในตำแหน่งที่ (1)

2.2 นำตลับพลาสติก (sample cup) มาใส่สารตัวอย่างให้ได้ปริมาตรประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์

2.3 นำตลับตัวอย่างมาใส่ไว้ใน Measuring Chamber

2.4 ปิดฝาให้เรียบร้อย

2.5 ตั้งอุณหภูมิให้ได้ตามที่ต้องการ เช่น ถ้าต้องการควบคุมตัวอย่างให้ได้ 25 องศาเซลเซียส ก็ให้ตั้งปุ่มสีดำตรงขวามือให้ได้หมายเลข 190 เป็นต้น

2.6 จากนั้นรอจนกระทั่งอ่านอุณหภูมิได้ตามที่ตั้งไว้ และ Relative Humidity ของอากาศที่วัดได้อยู่ในสภาวะที่สมดุล (Equilibrium) กับสารตัวอย่าง สภาวะนี้เราเรียกว่า Equilibrium Relative Humidity (ERH) เมื่อหารด้วย 100 ก็จะได้ค่า a_w (water activity) ตามที่ต้องการ

ค3. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศ (AOAC, 1995)

3.1 สุ่มตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ เทสารละลายเปปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (พีเอช 7.0 $\pm$ 0.1) 225 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1 : 10

3.2 นำไปตีป่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 1 นาที

3.3 ปิเปตตัวอย่างอาหารเจือจาง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ คือ 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 หลอมอาหารเลี้ยงเชื้อให้ละลายแล้วตั้งทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส

3.5 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารแต่ละความเจือจาง ใส่ในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จานละ 1 มิลลิลิตร แต่ละระดับความเจือจางทำ 3 ซ้ำ และใช้ระดับความเจือจาง 3 ระดับ โดยเรียงจานซ้อนกัน 4 ใบ ดูดตัวอย่างอาหารใส่จานใบล่างสุดก่อนแล้วไล่ขึ้นมาจนถึงใบบนสุด

3.6 เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 15-20 มิลลิลิตร โดยเริ่มจากจานใบล่างสุดก่อนเช่นเดียวกัน เขย่าจานที่ซ้อนกันอยู่ทั้ง 4 ใบพร้อม ๆ กัน โดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว

3.7 บ่มเชื้อในโถบ่มไร้อากาศ (anaerobic jar) ร่วมกับ Gas Par ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยกลับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.8 นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญบนผิวหน้าอาหารและที่เจริญฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี

3.9 รายงานผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมของตัวอย่างอาหาร โดยคูณจำนวนที่นับกับระดับความเจือจาง

ค4. การตรวจหาเชื้อ *Clostridium perfringens* (AOAC, 1995)

4.1 เตรียมตัวอย่างอาหารให้เจือจางตามที่ต้องการ 3 ระดับคือ 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3}

4.2 ใช้ปิเปดดูดตัวอย่างอาหารแต่ละความเจือจางใส่ลงในหลอด cooked meat (CM) โดยใส่ตัวอย่างอาหารหลอดละ 1 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางละ 3 หลอด

4.3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.4 ใช้ลูบจุ่มเชื้อจากหลอด CM medium โดยพยายามเขี่ยเชื้อจากก้นหลอดของ CM medium นำมาถ่ายเพาะเชื้อบน SPS agar

4.5 คว่ำจานเพาะเชื้อนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปใส่ไว้ใน anaerobic jar เพื่อขจัดออกซิเจน

4.6 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.7 ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีสีดำ นำมาทดสอบยืนยัน

4.8 ถ่ายเชื้อลง fluid thioglycollate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.8.1 stap ลง motility-nitrate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง *C. perfringens* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้นการเจริญจะเกิดเฉพาะตามรอยแทงของเข็มเขี่ยเชื้อเท่านั้น ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ ไนไตรท์จะทำปฏิกิริยากับน้ำยาทดสอบให้สีแดง ในกรณีที่การทดสอบครั้งแรกได้ผลลบ ให้บ่มหลอดเชื้ออีกหนึ่งหลอดต่อ 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8.2 stap ลง lactose gelatin medium บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง *C. perfringens* สามารถเฟอร์เมนท์แลคโตส เกิดฟองก๊าซ และมีกรดเกิดขึ้น ทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง และมีเอนไซม์ย่อยเจลาตินได้ โดยแช่หลอดในน้ำแข็งประมาณ 30 วินาที เจลาตินที่ถูกย่อยสลายแล้วจะไม่จับตัวเป็นก้อนแข็ง

ก5. การตรวจวิเคราะห์ความหืน (Thiobarbituric acid number)

5.1 ชั่งตัวอย่างมา 10 กรัม ปั่นกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร โดยใช้ blender เทใส่ flask ใช้น้ำกลั่นอีก 47.5 มิลลิลิตร ล้างตัวอย่างที่ติด blender ออกให้หมด แล้วเทใส่ใน flask

5.2 ใช้สารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 4 M ปรับพีเอชให้ได้ 1.5 เทตัวอย่างทั้งหมดลงในหลอดกลั่น

5.3 ใส่ glass bead 3-4 เม็ดต่อหลอดกลั่น

5.4 ต่อหลอดกลั่นเข้ากับเครื่องกลั่น ทำการกลั่นจนเก็บของเหลวที่กลั่นได้ 50 มิลลิลิตร

5.5 ปิเปตของเหลวที่กลั่นได้ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด

5.6 เติมสารละลาย TBA ลงไป 5 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่า

5.7 นำไปต้มในน้ำเดือด 35 นาที และทำให้เย็นภายใน 10 นาที (ทำ blank ไปพร้อมกัน โดยใช้น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และสารละลาย TBA 5 มิลลิลิตร)

5.8 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 538 nm เปรียบเทียบกับ blank คำนวณหาค่า TBA

TBA number = 7.8 x (O.D.ตัวอย่าง - O.D.blank)

= มิลลิลิตร malonaldehyde ต่อกิโลกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

ตารางวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ง1. การวิเคราะห์ค่า L* a* แล b* ของสีภายในของกุนเชียงสูตรควบคุมกับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในระดับต่าง ๆ โดยวิธีทางสถิติ

Oneway

ANOVA

ค่า L*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	**163.552**	**5**	**32.710**	**22.982**	**.000**
Within Groups	**17.080**	**12**	**1.423**		
Total	**180.632**	**17**			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

L

Duncan[a]

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
.50	3	27.7600		
.40	3		33.8200	
.30	3		33.9200	
.00	3		35.6133	35.6133
.10	3			36.3967
.20	3			36.6833
Sig.		1.000	.105	.317

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

ค่า a*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	**16.127**	**5**	**3.225**	**6.770**	**.003**
Within Groups	**5.717**	**12**	**.476**		
Total	**21.844**	**17**			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

A

Duncan[a]

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
.00	3	6.0667		
.10	3	6.5133		
.20	3	6.7133	6.7133	
.30	3		7.9100	7.9100
.40	3			8.2567
.50	3			8.5700
Sig.		.296	.055	.287

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

ค่า b*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	**11.110**	**5**	**2.222**	**8.216**	**.001**
Within Groups	**3.245**	**12**	**.270**		
Total	**14.355**	**17**			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

B

Duncan[a]

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
.10	3	4.1367			
.20	3	4.9933	4.9933		
.50	3		5.4133	5.4133	
.00	3		5.5167	5.5167	
.30	3			6.0600	6.0600
.40	3				6.6300
Sig.		.067	.264	.173	.204

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง2. การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสของกุนเชียงสูตรควบคุมกับกุนเชียงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรุ้นมะพร้าวร่วมกับ *Monascus purpureus* TISTR 3090 ในระดับต่าง ๆ โดยวิธีทางสถิติ

Oneway

ANOVA

ลักษณะ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	64.575	5	12.915	5.976	.000
Within Groups	246.350	114	2.161		
Total	310.925	119			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ลักษณะ

Duncan[a]

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
.50	20	4.7500		
.40	20	5.0500		
.20	20	5.6500	5.6500	
.30	20		6.0500	6.0500
.10	20		6.2000	6.2000
.00	20			6.9500
Sig.		.069	.269	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

ANOVA

สี

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34.742	5	6.948	2.968	.015
Within Groups	266.850	114	2.341		
Total	301.592	119			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

สี

Duncan[a]

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
.50	20	5.3000		
.40	20	5.4500		
.20	20	5.6000	5.6000	
.30	20	5.7500	5.7500	5.7500
.10	20		6.5500	6.5500
.00	20			6.7000
Sig.		.404	.065	.065

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

ANOVA

กลิ่น

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32.842	5	6.568	2.706	.024
Within Groups	276.750	114	2.428		
Total	309.592	119			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

กลิ่น

Duncan[a]

		Subset for alpha = .05		
ตัวอย่าง	N	1	2	3
.40	20	4.8500		
.50	20	5.0500	5.0500	
.30	20	5.6500	5.6500	5.6500
.20	20		6.0000	6.0000
.10	20		6.0500	6.0500
.00	20			6.2500
Sig.		.128	.065	.274

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

ANOVA

รสชาติ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	72.067	5	14.413	4.002	.002
Within Groups	410.600	114	3.602		
Total	482.667	119			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

รสชาติ

Duncan[a]

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
.40	20	4.4500		
.50	20	5.2500	5.2500	
.20	20		5.8500	5.8500
.10	20		6.3000	6.3000
.30	20		6.4500	6.4500
.00	20			6.7000
Sig.		.185	.069	.202

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oneway

ANOVA

ยอมรับ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	49.942	5	9.988	4.192	.002
Within Groups	271.650	114	2.383		
Total	321.592	119			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ยอมรับ

Duncan[a]

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
.40	20	4.9000		
.50	20	5.2000	5.2000	
.20	20		5.9500	5.9500
.30	20		6.1500	6.1500
.10	20			6.4500
.00	20			6.7000
Sig.		.540	.068	.166

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 20.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้