สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตสีผสมอาหารโดยการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus purpureus* บนอาหารแข็งเมล็ดข้าวเสาไห้ในขวดหมุน

นางสาว อภิญญา ผลยังส่ง
นางสาว อัจฉราพรรณ สุธิราธิกุล

วพ.
ว253ก
2550

เทขหมู่.....
เลขทะเบียน 84002
วัน,เดือน,ปี 23 ก.ย. 2551

b 11937539 8
.....
.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The Pigment Production by *Monascus purpureus* on Solid State Cultivation with Sao Hai Rice Grain in Rotated Bottle

Miss Apinya Polyungsong

Miss Adcharapan Suthirathigul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science Biotechnology Program

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตสีผสมอาหารโดยการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus purpureus* บนอาหารแข็งเมล็ดข้าวเสาไห้ในขวดหมุน

นักศึกษา อภิญญา ผลยังส่ง รหัสนักศึกษา 47050171

อัจฉราพรรณ สุธิราธิกุล รหัสนักศึกษา 47050176

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตสีผสมอาหารโดยการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus purpureus* บนอาหารแข็งเมล็ดข้าวเสาไห้ในขวดหมุน

นักศึกษา อภิญญา ผลยังส่ง รหัสนักศึกษา 47050171

อัจฉราพรรณ สุธิราธิกุล รหัสนักศึกษา 47050176

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

การผลิตสีผสมอาหารจากเชื้อรา *Monascus purpureus* โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของการเจริญบนอาหารแข็ง MYS พบว่าสร้างเส้นใยสีขาวฟู เมื่ออายุมากขึ้นสีของเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีแดงทั่วทั้งโคโลนี การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อราโมแนสคัส และการสร้างสารสีในอาหารเหลว MYS ให้ค่าสูงสุด 8.12 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร และ 1,433.57 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในวันที่ 5 และ 7 ของการเจริญ ตามลำดับ การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสีบนอาหารแข็งโดยใช้เชื้อเริ่มต้นในรูปของเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนอาหารเหลว MYS อายุ 4 วัน ปริมาตร 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในขวดบรรจุเมล็ดข้าวเสาไห้ปลอดเชื้อจำนวน 50 กรัม พบว่าสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบหมุนขวดให้การผลิตสีสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบตั้งทิ้งไว้ โดยให้ค่าการสร้างสีสูงสุด 1,512.82 และ 1,298.75 หน่วยต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบวิธีการให้ความชื้นเริ่มต้นแก่เมล็ดข้าวแบบต่าง ๆ พบว่า การเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 8.5 มิลลิลิตร ให้การสร้างสารสีใกล้เคียงกับการนำเมล็ดข้าวแช่น้ำ 12 ชั่วโมง แล้วสะเด็ดน้ำ 30 นาที การเติมน้ำปริมาตรรวมทั้งหมด 15 มิลลิลิตร ระหว่างเลี้ยงเชื้อราเพื่อควบคุมความชื้น พบว่าการเติมน้ำครั้งแรก 8.5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำครั้งที่สอง 5 มิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้ผลการสร้างสีสูงสุด เมื่อทดสอบอายุของเชื้อเริ่มต้นที่เจริญเป็นเวลา 3 วัน และ 4 วัน ที่ปริมาตร 3.0 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการใช้เชื้ออายุ 3 วัน และ 4 วัน ที่ปริมาตร 3.0 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างสีสูงสุดใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Spacial Project Title The Pigment Production by *Monascus purpureus* on Solid State Cultivation with Rice Grain in Rotated Bottle

Student Apinya Polyungsong ID 47050171

Adcharapan Suthirathigul ID 47050176

Program Biotechnology

Department Applied Biology

Spacial Project Advisor Asst.Prof. Dr. Somchai KRAIRAK

ABTRACT

The *Monascus purpureus* morphology was investigated on MYS agar. The white turf mycelium was found at a couple days and the altered to orange or red after 7-10 days of cultivation period. The correlation between growth and pigment production of *Monascus purpureus* was also examined in MYS broth. It maximal cell concentration and pigment yield were found about 8.12 g-DCW/L and 1,433.57 U/g-DCW at 5 and 7 days of cultivation, respectively. The pigment production on solid state cultivation was proceeded by using 3.0% of pre-culture mycelium that cultivated on MYS broth for 4-day as the inoculum. The condition of solid state culture was carried on rotated bottle contained 50 g. of sterile Sao-Hai rice grain, produced higher pigment production than the static bottle one at 1,592.82 and 1,298.75 U/g-DCW, respectively. Thereafter, the initial moisture content of rice grain was tested by various method. The result showed that the addition of 8.5-ml sterile distilled water on the 50-g. sterile rice grain gave the same pigment yield as sterile rice which was steeped for 2 hr. and dried for 30 min. Then, the total amount of 15-ml. sterile distilled water was examined for added volume and times. It was found that the addition volume of 8.5-ml. at the beginning of cultivation and then 5-ml. at 1 week of cultivation gave the maximal pigment production. Finally, the inoculum age of 3-day and 4-day was investigated at 3.0 5.0 and 10.0 of inoculum size. It was concluded that the 3.0% of 3-day or 4-day of inoculum age gave the same pigment yield in solid state cultivation of *Monascus purpureus*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ที่ให้ความรู้ ข้อคิดเห็น และคำชี้แนะที่เป็นประโยชน์ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล และ ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการและกรรมการสอบหัวข้อโครงงานพิเศษที่ให้คำชี้แนะในการแก้ไขให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี ขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและประสานงาน

ขอบคุณเพื่อนๆในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ อีกทั้งให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์สำหรับการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

และที่สำคัญ ขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวผลยังส่ง และครอบครัวสุธิราธิกุล สำหรับกำลังใจและการสนับสนุนในด้านต่างๆ

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากรายงานฉบับนี้ ผู้จัดทำขอมอบให้กับคุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาวอภิญญา ผลยังส่ง
นางสาวอัจฉราพรรณ สุธิราธิกุล
25 มีนาคม 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส	5
2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาและการสืบพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส	6
2.3 สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส	7
2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเมตาบอลิซึมปฐมภูมิและเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ	8
2.5 การปล่อยสารสีออกจากเส้นใยของเชื้อราโมแนสคัส	9
2.6 ผลิตภัณฑ์อื่นที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส	9
2.7 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation)	10
2.8 การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง	10
2.9 ถังหมักที่ใช้ในกระบวนการเลี้ยงชื้อบนอาหารแข็ง	13
2.10 คุณลักษณะของจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งวิตามินหรือสารสี	14
2.11 คุณสมบัติและมาตรฐานสีผสมอาหาร	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	18
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	18
3.1.1 *Monascus purpureus*	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	18
3.2.1 MYS	18
3.2.2 ข้าวเสาไห้	18
3.3 อุปกรณ์	18
3.4 วิธีการทดลอง	18
3.4.1 เชื้อราโมแนสคัส	18
3.4.2 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส	19
3.4.3 ศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว MYS	19
3.4.4 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	25
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส	25
4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัสเมื่อเจริญบนอาหารวุ้น	25
4.1.2 ลักษณะของเชื้อราโมแนสคัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์	25
4.2 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลว	28
4.3 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงบนอาหารแข็งในขวด	30
4.3.1 ผลการศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีบ่มบนเครื่องหมุนขวดและการตั้งทิ้งไว้	30
4.3.2 ผลการศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง	31
4.3.3 ผลการศึกษาการเติมน้ำที่ระยะเวลาต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส	34
4.3.4 ผลการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นและอายุของเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส	37
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
ภาคผนวก		48
ภาคผนวก ก	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	48
ภาคผนวก ข	การวิเคราะห์	50
ภาคผนวก ค	รูปภาพแสดงการทดลอง	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	The amount of water addition at the beginning of solid state fermentation for pigment production by *M. purpureus* with 4-day inoculum age	21
3.2	The amount of water addition during solid state fermentation for pigment production by *M. purpureus* with 4-day inoculum age	22
3.3	The amount of water addition during solid state fermentation for pigment production by *M. purpureus* with various 3-day and 4-day inoculum size	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	The chemical structure of *Monascus* sp. pigments	8
3.1	The slide culture technique	19
3.2	The solid state fermentation of *Monascus* pigment production in rotated bottle at 30°C	20
4.1	The morphological property *M. purpureus* on MYS slant	26
4.2	The mycelial structure of *M. purpureus* under microscopic observation	27
4.3	The pellet and mycelium formation of *M. purpureus* cultivation in MYS broth, 200 rpm and 28-30°C	28
4.4	The growth and pigment production of *M. purpureus* cultivation in MYS broth, 200 rpm and 28-30°C	29
4.5	The effect of inoculum size and culturing condition on pigment production by solid stat fermentation	31
4.6	The effect of water addition on initial moisture content (A), pigment production (B) and pH changing (C) on solid state fermentation by *M. purpureus* with 3.0% inoculum size	33
4.7	The effect of water addition on initial moisture content (A), pigment production (B) and pH changing (C) during solid state fermentation of *M. purpureus*, with 3.0% inoculum size	36
4.8	The effect of water addition on initial moisture content (A), pigment production (B) and pH changing (C) during solid state fermentation of *M. purpureus* with various inoculum size of 3-day inoculum age	38
4.9	The effect of water addition on initial moisture content (A), pigment production (B) and pH changing (C) during solid state fermentation of *M. purpureus* with various inoculum size of 4-day inoculum age	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

สีผสมอาหารเป็นวัตถุเจือปนอาหารชนิดหนึ่ง ซึ่งผู้ประกอบอาหารใช้ผสมลงไปในอาหารเพื่อปรุงแต่งอาหารให้ดูสวยงามหรือกลบเกลื่อนลักษณะอาหารที่เปลี่ยนสภาพเมื่อผ่านกระบวนการผลิตให้คล้ายสีของอาหารตามธรรมชาติ รวมทั้งการแต่งสีเพื่อช่วยให้อาหารมีคุณภาพและมูลค่าสูงขึ้น ส่วนใหญ่สีผสมอาหารที่ใช้ในปัจจุบันได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากสามารถหาซื้อได้ง่ายและสะดวกต่อการใช้งาน แม้ใช้เพียงเล็กน้อยก็สามารถให้สีของอาหารตามต้องการได้ อย่างไรก็ตามอาจมีผู้ประกอบอาหารบางรายที่ขาดความรับผิดชอบต่อผู้บริโภคหันไปใช้สีย้อมผ้าแทนสีผสมอาหารเนื่องจากสีย้อมผ้ามีราคาถูกกว่าและทำให้อาหารมีสีสันน่าทานกว่าสีผสมอาหาร ซึ่งผู้บริโภคอาจได้รับอันตรายจากสารเคมีที่มีอยู่ในสีย้อมผ้าได้

จากเหตุผลดังกล่าวทำให้การศึกษาสีผสมอาหารจากธรรมชาตินับวันจะมีความสำคัญ และจำเป็นมากยิ่งขึ้น เพราะมีความปลอดภัยมากกว่าสีผสมอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากการใช้สีสังเคราะห์อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenicity) และเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenicity) (Sabater-Vilar และคณะ, 1999) แหล่งที่มาของสีธรรมชาติที่สำคัญได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ อาทิเช่น ใบเตย กระเจี๊ยบ ข้าวเหนียวดำ ครั่ง (เป็นแมลงตัวเล็ก ๆ ชอบอาศัยอยู่ตามต้นก้ามปู) และ *Monascus* sp. สีธรรมชาติจากพืชหรือสัตว์เป็นสีที่มนุษย์นำมาใช้ผสมสีของอาหารมาช้านานเนื่องจากสามารถหาได้ทั่วไปและการสกัดสีใช้เทคนิคไม่ซับซ้อน แต่มีข้อเสียเพราะปริมาณที่ได้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับฤดูกาล ภูมิประเทศ ภูมิอากาศ ซึ่งเป็นปัจจัยภายนอกที่ไม่สามารถควบคุมได้ ซึ่งสีธรรมชาติจากจุลินทรีย์น่าจะใช้ทดแทนสีสังเคราะห์ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสีธรรมชาติจากพืชและสัตว์ เนื่องจากสามารถเพิ่มกำลังการผลิตและพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ง่าย ใช้เวลาในการผลิตน้อย รวมทั้งสามารถควบคุมปัจจัยที่ใช้ในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย นำมาปรุงแต่งสีอาหารได้อย่างปลอดภัย เพิ่มคุณค่าของอาหารทางด้าน แร่ธาตุ และวิตามินอีกด้วย มีการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง และ ยารักษาโรคในประเทศแถบเอเชียมาเป็นเวลาหลายร้อยปี นอกจากสารสีแล้วเชื้อราโมแนสคัสยังผลิตสารอื่นๆที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด เช่น เอนไซม์ โคเอนไซม์ สารปฏิชีวนะ สารลดคอเลสเตอรอส สารลดความดันโลหิต และ methyl ketone เป็นต้น (บุษบา, 2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้เชื้อรา *Monascus* spp. ในอาหารและเครื่องยาพื้นบ้านในประเทศแถบตะวันออกมีมานานแล้วเป็นเวลาหลายร้อยปี (Wong, 1982) โดยลี้ยงเชื้อราบนข้าวนึ่งแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม เชื้อรานี้เจริญไปพร้อมๆ กับการย่อยข้าวจนข้าวนุ่มและในขณะเดียวกันก็สร้างสารสีแดงเข้มขึ้น (Su และ Wong, 1983) เชื้อราโมแนสคัสสามารถเจริญและสร้างสารสีได้ดีที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส และเจริญได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 2.5 - 8.0 แต่มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีระหว่าง 4.0 - 7.0 (Yongsmith และคณะ, 1993) ข้าวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโมแนสคัสมีชื่อเรียกต่าง ๆ มากมาย ได้แก่ ข้าวแดง (red rice) ข้าวแดงจากจีน (Chinese red rice) อังคัก (ankak) แองคา (anka) อังคเว (angquac) เบนนิ-โคจิ (beni-koji) และ อะกา-โคจิ (aka-koji) (Hesseltine, 1965)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส สภาวะที่บ่มบนเครื่องกลิ้ง และการบ่มแบบไม่กลิ้ง
2. ศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง (Solid State Cultivation)
3. ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นและอายุของเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส
4. ศึกษาการเติมน้ำที่ระยะเวลาต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาการเจริญและการสร้างสารสีบนอาหารแข็งในสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ความชื้นเริ่มต้น ปริมาณเชื้อเริ่มต้น อายุของเชื้อ และ การเติมน้ำที่ระยะเวลาต่างๆ ของเชื้อราโมแนสคัส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารแข็ง
2. การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปพัฒนาการผลิตข้าวแดงจากเชื้อราโมแนสคัสในขนาดกำลังการผลิตใหญ่ขึ้น
3. เพิ่มมูลค่าวัตถุดิบทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เชื้อราโมแนสคัส

นำเชื้อ *Monascus purpureus* มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง MYS ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการศึกษาต่อไป

2. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

การเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค slide culture แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยของ และสปอร์ของเชื้อรา

3. ศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว MYS นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ นำไปหาน้ำหนักแห้งเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา และ วัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา แล้วนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างสารสี

4. การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง

4.1. การเตรียมเชื้อเริ่มต้นสำหรับลงเชื้อบนอาหารแข็ง

เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลว MYS บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

4.2 ศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่บ่มบนเครื่องหมุนขวด และการตั้งทิ้งไว้

นำข้าว 50 กรัม แช่น้ำ 2 ชั่วโมง แล้วสะเด็ดน้ำ 30 นาทีก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นจึงลงเชื้อเริ่มต้น แล้วนำไปบ่มบนเครื่องหมุนขวด ส่วนอีกชุดหนึ่งตั้งทิ้งไว้วิเคราะห์ผลความชื้น พีเอช และสารสีที่เวลาต่างๆ

4.3 ศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง

นำข้าว และน้ำไปฆ่าเชื้อแยกกัน ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเทน้ำลงในข้าว นำไปหมุนบนเครื่องหมุนขวด 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงลงเชื้อเริ่มต้นและบ่มบนเครื่องหมุนขวด 1 คืน แล้วจึงเก็บตัวอย่างข้าวมาหาความชื้นเริ่มต้น พีเอช สารสีที่ได้ และ ความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ศึกษาการเติมน้ำที่ระยะเวลาต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส

วิธีการเตรียมข้าวและการลงเชื้อเหมือนข้อ 4.3 หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตรต่างๆ ใส่ลงในขวดข้าวแต่ละขวดตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ วิเคราะห์ผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3

4.5 ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นและอายุของเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส

วิธีการเตรียมข้าวเหมือนข้อ 4.3 โดยเมื่อนำข้าวไปหมุนบนเครื่องหมุนขวดครบ 12 ชั่วโมงแล้วจึงลงเชื้อเริ่มต้นปริมาตรต่างๆ โดยใช้เชื้อในอาหารเหลวที่มีอายุ 3 และ 4 วัน ลงในขวดข้าว แล้วนำไปบ่มบนเครื่องหมุนขวด การวิเคราะห์ผลทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3

5. การวิเคราะห์

ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ประมาณ 4 สัปดาห์ นำไปวิเคราะห์สารสีด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง พีเอช ความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัสจัดอยู่ใน Class Ascomycetes Subclass Plectomycetidae Order Eurtials (Alexopoulos และ Mims, 1979) แบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยา และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ *Monascus pilosus* *Monascus purpureus* *Monascus rubber* (Hawksworth และ Pitt, 1983) และ *Monascus floridanus* (Bridge และ Hawksworth, 1985 ; Barnard และ Cannon, 1987) เจริญได้ดีบนอาหารแข็งในรูปข้าวแดง (อั่งคัก) เพื่อใช้ปรุงแต่งสีในไวน์ เต้าหู้ยี้ ใช้ถนอมอาหารประเภทเนื้อ ใช้รักษาโรครวมทั้งใช้เป็นสีผสมในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ต่อมาผลิตเป็นการค้าในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน จีน (Hendry และ Houghton, 1992) และเยอรมัน

Church (1920) รายงานถึงการทดลองแยกสายพันธุ์ที่ได้จากข้าวแดงของประเทศจีน จนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่ให้สีแดงคือ *Monascus purpureus* ต่อมา Palo และคณะ (1960) นักวิทยาศาสตร์ชาวฟิลิปปินส์ได้ทดลองใช้เชื้อราโมแนสคัสนี้ทำข้าวแดงจนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอสมควร สามารถนำเอาข้าวแดงมาใช้เจือสีอาหารได้โดยตรง ภายหลังได้มีความสนใจที่จะศึกษาสายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัสที่เหมาะสมสำหรับใช้ในสภาพหมักเปียก (submerged cultivation) ริเริ่มโดย Lin (1973) ต่อมาก็มีผู้ประสบความสำเร็จในการศึกษาการผลิตสีในอาหารเหลว (Shephed และ Carels, 1983 ; Yoshimaru และคณะ, 1975 ; Shin และคณะ ,1998 ; บุษบาและวรรณภา, 2527 ; Lee และคณะ, 1992)

เชื้อราโมแนสคัสนอกจากสร้างสารสีแล้ว ยังสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิด Wong และ Bau (1977) รายงานเป็นครั้งแรกถึงการค้นพบสารต่อต้านแบคทีเรียจากเชื้อรา *M. purpureus* ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร เช่น *Bacillus* sp. *Streptococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น สารนี้มีชื่อว่า monascidin A นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ เอทธานอล สารโมนาโคลิน (monacolins) ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และสารช่วยในการตกตะกอน (flocculants) อีกด้วย (Fink-Gremmels และ Leistner, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ลักษณะสันฐานวิทยาและการสืบพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส (บุษบา , 2542)

เชื้อราโมแนสคัส *(Monascus* spp.) เคยจัดอยู่ใน Family Aspergillaceae Order Plectascales แต่ปัจจุบันอยู่ใน Family Monascaceae Class Ascomycetes Subclass Plectomycetidae Order Eurotiales เส้นใยมีผนังกั้น มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายและมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือม่วง

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการสร้างโคนิเดีย (conidia) เจริญมาจากโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) โดยจะสร้างโคนิเดีย รูปร่างกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือหลายโคนิเดียต่อกัน เป็นลูกโซ่อยู่ที่ปลายเส้นใย โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจจะมีสีแดงหรือสีน้ำตาลอ่อน (Ainswarth และคณะ, 1973 ; Hawksworth และ Pitt, 1983) โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้นหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ ถ้ามีขนาดยาวจะมีผนังกั้น 2 - 6 อัน เป็นสายตรงหรือขดเป็นเกลียวและเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออายุมากขึ้น การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร เช่น C medium เหมาะสมสำหรับการเกิดโคนิเดียของโมแนสคัส นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีกหลายๆ ประการ เช่น อายุสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ค่าพีเอช แสงและอุณหภูมิ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปโคนิเดียจะงอกภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสม ด้วยการสร้าง germ-tube ขึ้นมา 1 เส้น หรือ 2 เส้น หรือบางครั้งอาจมีได้ถึง 6 เส้น ซึ่งการงอกของโคนิเดียกระตุ้นได้ด้วยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราโมแนสคัสคล้าย ๆ กับเชื้อราอื่นใน Class Ascomycetes มีการสร้างเพอริทีเซียม (perithecium) หรือคลิสโททีเซียม(cleistothecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้าน (stalk) (Von Arx, 1974) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (homothallic) โดยการสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิด คือ แอนเทอริเดียม (antheridium) แอสโคโกเนียม (ascogonium) เกิดการฟิวชั่น (fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วจึงจะมีการขยายผนังเซลล์รวมออกและสร้างแอสโคคาร์ปขึ้นในที่สุด ภายในแอสโคคาร์ปมีแอสโคสปอร์ (ascospores) มากมาย โดยแอสโคสปอร์จำนวน 2 – 8 แอสโคสปอร์ จะรวมอยู่ภายในแอสคัส (ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์งอกเป็นเส้นใหม่ขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส (บุษบา , 2542 ; นิสา , 2537)

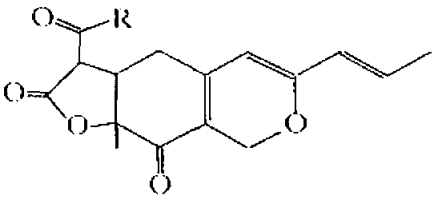
สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสเป็นสารประเภท polyketide ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เชื้อราสร้างขึ้นพร้อม ๆ กับการเจริญ (growth associated) หรือสร้างหลังจากการเจริญหยุดลงแล้ว (non-growth associated) มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม azaphilones เช่น sclerotiorin และ rotiorin

Haws และคณะ (1959) พบโครงสร้างของรูโบรพังตาติน (rubropunctatin , $C_{21}H_{22}O_5$) ซึ่งเป็นสารสีส้ม และสารสีเหลืองโมนาสซิน (monascin, $C_{21}H_{26}O_5$) ที่แยกได้จากเชื้อรา *Monascus rubropunctatus* Sâto สารสีส้มรูโบรพังตาตินละลายในสารละลายอินทรีย์เกือบทุกชนิด แต่ไม่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ที่อุณหภูมิต่ำ และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายแอมโมเนียจะได้สารสีม่วงของรูโบรพังเตตามีน (rubropunctatamine, $C_{21}H_{23}O_4N$)

Fielding และคณะ (1960, 1961) ศึกษาการสร้างสารสีที่ Nishikawa แยกได้จาก *M. purpureus* Went. คือ โมนาสโครูบริน (monascorubrin, $C_{23}H_{23}O_5$) และโมนาสโคฟลาวิน (monascoflavin) หรือ โมนาสซิน Nakanishi (1959) แสดงให้เห็นว่าโมนาสโครูบรามีน (monascorubramine) และรูโบรพังเตตามีนเปลี่ยนมาจากโมนาสโครูบริน และรูโบรพังตาติน (สีส้ม) ตามลำดับ Hiroi และคณะ (1975) ศึกษาโครงสร้างของสารสี 2 ชนิด คือ โมนาสโครู-บริน (สีส้ม) และ รูโบพังเตตามีน (สีม่วง)

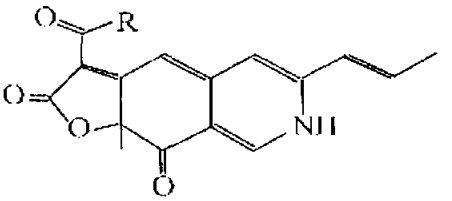
Manchand และคณะ (1973) พบว่าเชื้อราโมแนสคัสแต่ละสายพันธุ์ให้สารสีแตกต่างกันออกไปและพบการสร้างสารสีเหลืองตัวใหม่จากเชื้อรา *M. anka* มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับโมนาสซิน (monascin) มีชื่อว่าอังคาฟลาวิน (ankaflavin , $C_{23}H_{30}O_5$) ต่อมา Sweeny และคณะ (1981) สามารถสกัดสารสีจากโคจิของ *M. anka* พบสารสี 3 กลุ่ม คือ สารสีแดงประกอบด้วย รูโบรพังตามีน และโมนาสโครูบรามีน สารสีส้มประกอบด้วย รูโบรพังตาติน และ โมนาสโครูบริน และสารสีเหลืองประกอบด้วย โมนาสซิน และ อังคาฟลาวิน โครงสร้างโมเลกุลของสารสี (Fig. 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



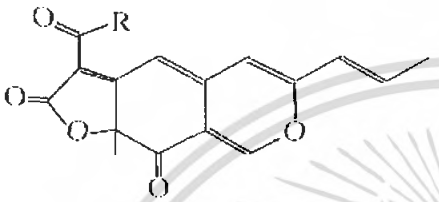
$R = C_5H_{11}$ Monasin
$R = C_7H_{15}$ Ankaflavin

Yellow pigments (A)



$R = C_5H_{11}$ Rubropunctamine
$R = C_7H_{15}$ Monascorubramine

Red pigments (B)



$R = C_5H_{11}$ Rubropunctatin
$R = C_7H_{15}$ Monascorubrin

Orange pigments (C)

Figure 2.1 The chemical structure of *Monascus* sp. pigments (A) Yellow pigments (B) Red pigments and (C) Orange pigments

ที่มา : Nakanishi และคณะ (1959); Sweeny และคณะ (1981)

Carels และ Shepherd (1977) เสนอว่าสารสีส้มถูกสังเคราะห์เป็นสีแรก และสารสีเหลืองหรือสารสีแดงมาจากปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นกับสีส้มนั้นๆ

Yongsmith และคณะ (1993) รายงานสารสีเหลืองที่มีโครงสร้างเคมีใหม่ต่างจากโมนาสซินและ อังคาฟลาวิน ที่มีผู้รายงานก่อนหน้านี้ โดยให้ชื่อว่า yellow pigment II ซึ่งมีโครงสร้างเคมีที่มีอนุมูลไฮดรอกซิล (OH) แทนที่หมู่พันธะคู่ออกซิเจน (=O) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 10

2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเมตาบอลิซึมปฐมภูมิ และเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ (สมชาย, 2536)

สีธรรมชาติจากเชื้อราโมแนสคัสจัดเป็นสารเมตาบอไลท์ประเภททุติยภูมิซึ่งไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับหน้าที่เมตาบอลิซึมที่สำคัญๆ ของสิ่งมีชีวิตที่สร้างขึ้นมา ลักษณะประการหนึ่งของสารประกอบชนิดนี้คือการสร้างสารหลังจากช่วงการเจริญผ่านไปแล้ว การแยกจากกันระหว่างการเจริญของเซลล์กับการสร้างสารทุติยภูมิ ในบางครั้งก็ใช้เป็นคำจำกัดความของสารทุติยภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่กลไกการสร้างดังกล่าวไม่สามารถยึดเป็นหลักในการจัดจำแนกได้ เพราะว่าในบางกรณีสารทุติยภูมิสามารถสังเคราะห์ในระหว่างการเจริญ Bu'Lock (1974) และ Bajpai และ Rueb (1981) จัดสารประกอบที่เรียกว่าสารทุติยภูมิอยู่ในผลิตภัณฑ์หลักประเภท 3 ตามการแบ่งประเภทของผลิตภัณฑ์หลักจากกระบวนการหมัก ดังนี้คือ

1. ผลิตภัณฑ์หลักจากเมตาบอลิซึมแบบปฐมภูมิโดยตรง
2. ผลิตภัณฑ์หลักจากเมตาบอลิซึมแบบปฐมภูมิโดยอ้อม
3. ผลิตภัณฑ์หลักที่ไม่เกี่ยวกับการเมตาบอลิซึม

2.5 การปล่อยสารสีออกจากเส้นใยของเชื้อราโมแนสคัส

Su และ Huang (1980) กล่าวว่าสารสีที่เชื้อราโมแนสคัสสร้างขึ้นจะมีลักษณะเป็น granular fluid ซึ่งจะถูกขับออกมาตามช่องหรือรอยแตกของผนังเส้นใย ในบางครั้งเมื่อขับออกมาแล้วสารสียังคงติดอยู่กับปลายเส้นใย และสะสมจนมีจำนวนมากก่อนหลุดจากเส้นใย สารสีบางส่วนจะสะสมอยู่ภายในเส้นใยด้วย

Lin และ Iizuka (1982) ทดลองเลี้ยงเชื้อรา *M. Kaoliang* R-10847 บนอาหารแข็ง mantou - meal เพื่อศึกษาการสร้างสารสีนอกเซลล์ พบว่าเชื้อราจะเริ่มต้นสร้างสารสี และปล่อยออกมาในวันที่ 2 ของการเจริญ พร้อมกับสารที่มีลักษณะหนืดชนิดหนึ่ง (viscous substance) ทำให้สารสีเกาะติดอยู่กับเส้นใย และสะสมเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งเส้นใยแตกจึงหลุดออกมา ไม่พบการสะสมสารสีภายในเส้นใย

Lin และ Iizuka (1982) พบว่าการชักนำให้เชื้อราเกิดการผ่าเหล่าเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีรอยรั่ว (leakage) ของผนังเส้นใยมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อราสร้างสารสีได้ดีขึ้น เนื่องจากมีความสมดุลย์ระหว่างการสังเคราะห์สารสี และการปล่อยออกจากเส้นใย การเติม Tween 80 ปริมาณที่เหมาะสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (วรรณภา, 2529 ; สมชาย, 2536 ; Chiu และ Poon, 1993) หรือปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (วรรณภา, 2529) ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยให้การปล่อยสารสีออกจากเส้นใยเพิ่มขึ้น

2.6 ผลิตภัณฑ์อื่นที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

Kranz และคณะ (1992) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* สร้าง methyl ketone ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสใน blue cheese ได้ดีใกล้เคียงกับ *Penicillium roquefortii* เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็นกรดไขมันสายสั้น ๆ ข้าวหมักสีแดง (red fermented rice: RFR) เป็นที่รู้จักในด้านยาสำหรับการรักษาการย่อยอาหาร และการหมุนเวียนโลหิตในประเทศจีน และมีการบริโภคเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างมาก (Sung, 1966; Chen, 1982; Hu, 1997; Wang และคณะ, 1999) ซึ่งมีโครงสร้างสำคัญเป็นองค์ประกอบ เช่น โมนาโคลิน เค (Monacolin K) มีชื่อทางการค้าว่า เมวาคอร (Mevacor) คอเลสติน (Cholestin) หรือ โลวาสเตทิน (Lovastatin) และอื่น ๆ ซึ่งจะช่วยรักษาระดับไขมันในเลือดโดยการลดการผลิตคอเลสเตอรอลในร่างกาย (Endo, 1979; Bach, 1986; Endo และ Hasumi, 1997; Wang และคณะ, 1997, Li และคณะ, 1998; Kennedy และคณะ, 1999; Heber และคณะ, 2001)

2.7 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation) (ดุษณี, 2546)

การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งส่วนใหญ่จะใช้กับเชื้อราที่สร้างใยรา ยีสต์บางชนิด แบคทีเรียบางชนิด เช่น พวก Actinomycetes และ พวก Bacillus บางสายพันธุ์ เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในอาหารเหลวหรืออย่างน้อยอาหารนั้นจะต้องมีน้ำอยู่ในรูปอิสระ ด้วยเหตุนี้กระบวนการหมักของเชื้อแบคทีเรียทั่วๆไปจึงใช้อาหารเหลวหรืออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งต่างจากเชื้อราที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารแข็งที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น ท่อนไม้ ราก ลำต้น ใบและเมล็ดของพืช และบริเวณที่แห้งของสัตว์ เช่นหนัง กระดูก และมูลสัตว์ที่มีความชื้นต่ำ ตัวอย่างเช่น *Eurotium halophilicum* จะเจริญได้บนข้าวสาลีที่มีความชื่นเพียงร้อยละ 13-14 ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารแข็งแต่มีจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่นำมาใช้ในการผลิตเพื่อเป็นการค้าตัวอย่างเช่น อาหารหมักพื้นเมืองในแถบตะวันออกไกล จะใช้เชื้อราพวก *Mucor*, *Rhizopus*, *Amylomyces*, *Aspergillus*, *Monascus* และ *Neurospora* การผลิตเนยแข็งจะใช้เชื้อต่างๆ เป็นตัวให้กลิ่นรสในระหว่างการบ่มเนยแข็งการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณมากโดยการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของเชื้อ *Phanerochaete*, *Trichoderma* และ *Chaetomium* และการผลิตเห็ดโดยเชื้อ *Agaricus*, *Lentinus* และ *Volvariella*

2.8 การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง (บุษบา, 2542)

เชื้อราที่เจริญบนข้าวสามารถปล่อยสารสีออกมานอกเซลล์ได้มาก ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี จึงสร้างสารสีได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่นิยมใช้หมักข้าวแดง ได้แก่ *M. purpureus* และ *M. anka* ซึ่งการผลิตข้าวแดงให้ได้คุณภาพดีขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญหลายประการที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์เชื้อรา สภาวะเลี้ยงเชื้อ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ค่าพีเอช เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.1 สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส

โดยทั่วไปเชื้อราโมแนสคัส เมื่อเจริญบนเม็ดข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั่วทั้งผิวหน้า และทะลุเข้าไปภายในเมล็ดข้าวนั้นก็จะมีการสร้างสารสีได้ภายหลังจากการบ่มได้นาน 3 วัน สารสีเหล่านี้เมื่อมีการนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าสารสีแดงทั่วไปจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 2 ความยาวคลื่น ได้แก่ 420 และ 500 นาโนเมตร บางสายพันธุ์ที่ให้สีข้าวแดงหรือ อังคัก เป็นสีแดงสด หรือแดงเข้ม จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สูงกว่าที่ 420 นาโนเมตร เช่น ที่พบในสายพันธุ์ของ *M. purpureus* หรือ *M. anka* แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงเข้มคล้ำ โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร หรือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร เป็นต้น เช่น สายพันธุ์ *M. barkeri* หรือ *M. kaoliamg*

2.8.2 สับสเตรท

สับสเตรทที่ใช้ในการหมักสีโมแนสคัสแบบแห้งนั้นปกติจะเป็นข้าว หรือเมล็ดธัญพืชอื่นๆ ได้แก่

2.8.2.1 ข้าว Polo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสร้างสารสีของ *M. purpureus* และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอังคัก มีดังต่อไปนี้ ความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชระหว่าง 3.0-7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่สายพันธุ์ข้าวเหนียวให้ผลไม่ดีนัก บุษบา (2518) ได้ทดลองการสร้างสารสีของ *M. purpureus* โดยใช้สภาวะการผลิตข้าวแดงของ Palo และคณะ (1960) มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ต่างๆของไทย พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวพันธุ์หอมมะลิให้สีเข้มใกล้เคียงกัน แต่ข้าวเหนียวกลับให้กลิ่นหอมมากกว่าข้าวหอมมะลิ กลิ่นหอมดังกล่าวคือกลิ่นเอสเทอร์และแอลกอฮอล์ปนกัน ทั้งนี้ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูและข้าวพันธุ์หอมมะลิให้ผลความเข้มข้นของสีใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ญี่ปุ่น ในขณะที่ข้าวพันธุ์อื่นๆของไทยนั้นล้วนแต่ให้สีและความหอมน้อยกว่ามาก

2.8.2.2 เมล็ดธัญพืชและอื่นๆ พลายแก้วและบุษบา (2534) ได้ศึกษาแหล่งสับสเตรทชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตสีโมแนสคัสเปรียบเทียบกับการผลิตสีบนเมล็ดข้าวโดยใช้ข้าวโพด มันเทศ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง ขนมปังแทนเมล็ดข้าวต่อการเจริญการสร้างสี และการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliamg* พบว่าขนมปังให้ค่าสีแดงมากที่สุด ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Lin และ Iizuka (1982) รองลงมาได้แก่ มันฝรั่ง และปลายข้าวหอมมะลิ นอกนั้นสีไม่ดีนัก ส่วนการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliamg* พบว่าถั่วเหลืองให้ปริมาณสปอร์สูงสุด รองลงมาได้แก่ ถั่วเขียว ขนมปัง และปลายข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ ส่วนธัญพืชอื่นๆ ให้ผลการสร้างสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ดีนัก Rashbaum และ Yueh (1983) ทดลองใช้ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และข้าวบาร์เล่ย์เป็นสับสเตรทแทนข้าวพบว่าได้ผลดีเช่นกัน

2.8.3 พีเอช

Palo (1960) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสีแดงได้ดีที่พีเอชระหว่าง 3.0-7.5 พลายแก้วและบุษบา (2534) พบว่าสภาวะเป็นกรดไม่มีผลต่อการสร้างสีเหลืองของ *M. barkeri*

2.8.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีอยู่ที่ระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส โดยบุษบา (2518) พบว่าอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แต่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส

2.8.5 อัตราส่วนของก๊าซ

Han และ Mudgett (1992) รายงานเป็นครั้งแรกของสัดส่วนระหว่างก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลต่อการผลิตข้าวแดงด้วย โดยพบว่าความดันก๊าซออกซิเจนต่อความดันคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.50 ต่อ 0.02 บรรยากาศ (atm) จะมีผลดีต่อการสร้างสีแดงของอังคักมากที่สุด

2.8.6 ความชื้น

Palo และคณะ (1960) รายงานเป็นครั้งแรกว่าความชื้นต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการสร้างสีของ *M. purpureus* เชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงของ *M. purpureus* K001 บนเมล็ดข้าว คือ 60.0 เปอร์เซ็นต์ การเขย่าหรือให้อากาศช่วยให้เชื้อราสร้างสารสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวมีเพียงพอต่อการสร้างสารสีอยู่แล้ว รัตนา (2528) พบว่าการหมักข้าวแดงในสภาพที่มีความชื้นสูงมากไปนั้น เชื้อราโมแนสคัสจะสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสูง เกิดการสะสมกลูโคสยับยั้งการสร้างสารสีได้

Johns และ Stuart (1991) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* จะสร้างสารสีได้น้อยเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 38.0-39.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงขึ้นเป็น 56.0 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 การสร้างสารสีจะเป็นไปได้ดี

Han (1990) คัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. จำนวน 13 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 125 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาการสร้างสารสีบนข้าว พบว่า *M. purpureus* ATCC 16365 สร้างสารสีดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5.0-6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Chiu และ Chan (1992) ศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* บนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือชานอ้อย โดยเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อบนขวดหมุน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(roller bottle) ความเร็ว 2 รอบต่อนาที กับตั้งทิ้งไว้เฉย ๆ พบว่าการใช้ระบบขวดหมุน เชื้อราจะสร้างสารสีแดงและสารสีเหลืองได้ดีกว่าตั้งทิ้งไว้เฉย ๆ ประมาณ 2-3 เท่า แต่ก็ยังให้สารสีน้อยกว่าในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยกลูโคส เปปโตน และยีสต์เอกซ์แทรค

2.9 ถังหมักที่ใช้ในกระบวนการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (ดุษณี , 2546)

การหมักในอาหารแข็งโดยทั่วไปจะใช้ถังหมักที่มีโครงสร้างและการควบคุมที่ง่าย ซึ่งต่างจากระบบการควบคุมที่ใช้สำหรับการหมักในอาหารเหลว การหมักในอาหารแข็งแบ่งออกเป็น การหมักที่ไม่มีการกวนอาหาร การหมักที่มีการกวนอาหารเป็นครั้งคราว และการหมักที่มีการกวนอาหารตลอดเวลา ซึ่งการหมักในอาหารแข็งแบบที่อาศัยการกวนเพิ่มอากาศให้กับเชื้อจุลินทรีย์จะมีความสำคัญต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งการหมักในอาหารแข็งแบบมีการกวนแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. การหมักที่มีการกวนหรือการหมุนถังหมักเป็นครั้งคราว โดยไม่มีการให้อากาศ
2. การหมักที่มีการกวนอย่างต่อเนื่อง โดยไม่มีการให้อากาศ
3. การหมักที่มีการกวนเป็นครั้งคราว และมีการให้อากาศ

ถังหมักที่ใช้สำหรับการหมักในอาหารแข็งจะออกแบบให้การเจริญของเชื้อใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ และใช้ระบบการหมักแบบครั้งคราวมากกว่าระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องหรือต่อเนื่อง ถังหมักชนิดต่างๆที่ใช้ในกระบวนการหมักในอาหารแข็ง ได้แก่

2.9.1 ถังหมักทรงกระบอกหมุนได้ (rotating drum bioreactor) ประกอบด้วยภาชนะบรรจุรูปทรงกระบอกติดอยู่บนลูกกลิ้งที่ทำหน้าที่เป็นตัวยึดถังหมักและเป็นเครื่องมือใช้ในการหมุนถังหมัก ข้อเสียเปรียบของถังหมักชนิดนี้คือ บริเวณที่ใช้ในการหมักมีเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมดของถังหมัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักโดยใช้ถังหมักชนิดนี้ ได้แก่ เอนไซม์ เซลล์จุลินทรีย์ และอาหารสัตว์

2.9.2 ถังหมักแบบถาด (tray fermentation) เป็นถังหมักที่ใช้ได้ง่ายและให้ผลผลิตที่สม่ำเสมอ ถังหมักชนิดนี้ช่วยให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์สูงขึ้นในระหว่างการหมัก แต่ข้อเสียคือต้องใช้พื้นที่การหมักเป็นบริเวณมาก ถังหมักชนิดนี้ใช้กันมากในการผลิตอาหารหมัก เอนไซม์เห็ด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบตะวันออกไกลในการผลิตโคจิ ถังหมักชนิดนี้ทำงานโดยอาศัยการเป่าลมผ่านบริเวณด้านล่างของอาหารแข็ง มีการควบคุมความร้อนและความชื้นภายในถังหมักระหว่างกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.3 ถังหมักแบบคอลัมน์ (column bioreactor) ประกอบด้วยคอลัมน์พลาสติกหรือแก้วที่เปิดได้ทั้งหัวและท้าย อุณหภูมิของถังหมักจะถูกควบคุมโดยนำถังหมักมาไว้ในสภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมอุณหภูมิ หรือโดยการผ่านน้ำไปยังกระบอกเสื้อสูบที่อยู่รอบๆคอลัมน์ ถังหมักชนิดนี้ใช้ในการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ และเซลล์จุลินทรีย์

2.9.4 ถังหมักชนิด fluidized bed ถังหมักชนิดนี้ใช้ในการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งในระหว่างการหมักจะมีการกระเพื่อม เพื่อป้องกันการเกาะของของแข็งที่ผนังของถังหมัก

2.10 คุณลักษณะของจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งวิตามินหรือสารสี (บุษบา , 2542)

จุลินทรีย์เป็นกุญแจแห่งความสำเร็จ หรือความล้มเหลวของกระบวนการ ฉะนั้นหลักการทั่วไปในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในการผลิตสีและวิตามิน ควรมีข้อพิจารณาดังนี้

1. สามารถเจริญได้เร็ว ขยายพันธุ์ได้ดี
2. มีความสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ เช่น วิตามินหรือสารสีได้สูง ได้ผลสม่ำเสมอ และไม่ควรให้ผลพลอยได้ที่ไม่จำเป็นหรือไม่ต้องการ
3. ควรเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้วัตถุดิบที่หาง่าย ราคาถูก ที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่นได้ดี (ข้อนี้สำคัญมากในทางปฏิบัติ)
4. มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี มีช่วงพีเอช และช่วงอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตกว้าง
5. เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะทางด้านพันธุกรรมที่คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงง่าย
6. เป็นจุลินทรีย์ที่เลี้ยงง่าย ตายยาก เก็บได้นาน
7. ควรเป็นจุลินทรีย์บริสุทธิ์ปราศจากแบคทีริโอฟาจ (bacteriophage) หรือทนต่อการทำลายของแบคทีริโอฟาจหรือของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคทีเรียควรเป็นสายพันธุ์ต้านทานแบคทีริโอฟาจ สาหร่ายก็ควรทนต่อการเข้าทำลายของแบคทีเรีย หรือรา เป็นต้น
8. ต้องไม่เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคต่อคน และไม่สร้างสารพิษให้กับผลผลิตนั้น ๆ

ข้อปลีกย่อยจุลินทรีย์ที่ต้องการควรมีความสามารถป้องกันตนเองจากการปนเปื้อนของเชื้ออื่น (contamination) เช่น สามารถเจริญที่พีเอชต่ำ หรือที่อุณหภูมิสูงได้ และควรเป็นจุลินทรีย์ที่นำมาปรับปรุงพันธุ์ได้ง่าย เช่น การกลายพันธุ์ (mutation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 คุณสมบัติและมาตรฐานสีผสมอาหาร

สีผสมอาหารมีวัตถุประสงค์ในการใช้เพื่อเพิ่มความดึงดูดใจ แต่งแต้มสีสัน ทำให้อาหารน่ารับประทานมากยิ่งขึ้น การใช้สีผสมอาหารช่วยให้การผลิตอาหารหรือผลิตภัณฑ์อาหารเป็นที่พอใจ ของผู้บริโภค เกี่ยวกับคุณค่าของอาหาร และเป็นการหาจุดเด่นของผลิตภัณฑ์อาหารในทุกๆ สถานการณ์ NAS ได้สรุปความสำคัญของการใช้สีผสมอาหาร ดังนี้

1. ช่วยในการแก้ไขปัญหาอันเกิดจากการแปรเปลี่ยนสีตามธรรมชาติ หรือการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารในขณะแปรรูปและเก็บรักษา

2. เป็นการเน้นหรือรักษาเอกลักษณ์ของกลิ่นรส ซึ่งโดยปกติเกี่ยวข้องกับสีของอาหารหรือสีผสมอาหาร

3. เป็นการแก้ไขปัญหาอันเกิดจากผลกระทบของการแปรรูปอาหาร การบรรจุหีบห่อ การจัดจำหน่าย เพื่อประกันคุณภาพอาหาร

4. ช่วยในการถนอมเอกลักษณ์หรือรูปลักษณ์ที่ทำให้เป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันสหรัฐอเมริกา ได้แบ่งสีผสมอาหารอกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

ก.) สีผสมอาหารยกเว้นการควบคุมหรือไม่ประกาศควบคุม ได้แก่ สีที่ได้จากพืชผัก ผลไม้ สัตว์ สีเหล่านี้จึงถูกเรียกว่า "สีผสมอาหารตามธรรมชาติ" ตัวอย่างสีผสมอาหารตามธรรมชาติ เช่น คลอโรฟิล ไรโบฟลาวิน เป็นต้น

ข.) สีผสมอาหารที่ถูกบังคับให้ประกาศควบคุม ได้แก่ สีสังเคราะห์ทางเคมีที่เลียนแบบโครงสร้างสีจากธรรมชาติ เช่น เบต้า-แคโรทีน ถูกใช้ทำสีของเนยเทียม, เนยเหลว, เนยแข็ง, ไอศกรีม น้ำผลไม้คั้น และเครื่องดื่ม

2.11.1 ประเภทของสีผสมอาหาร

สีผสมอาหารเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 21 (พ.ศ.2522) ซึ่งได้แบ่งสีผสมอาหารที่กระทรวงสาธารณสุขอนุญาตให้ใช้ผสมอาหารได้ 3 ประเภทดังนี้

1. สีอินทรีย์ที่ได้จากการสังเคราะห์ ได้แก่

1.1 จำพวกสีแดง ได้แก่ ปองโซ 4 อาร์ (Ponceau-4 R) เออริโธรซีน (Erythrosine) คาร์โมอีซีนหรือเอโซรูบีน(Carmoisine or Azorubine)

1.2 จำพวกสีเหลือง ได้แก่ ตาร์ตราซีน(Tartrazine) ซันเซต เยลโลว์ เอฟซีเอฟ(Sunset yellow FCF) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)

1.3 จำพวกสีเขียว ได้แก่ ฟาสต์กรีน เอฟซีเอฟ (Fast green FCF)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 จำพวกสีน้ำเงิน ไดแก่ อินดิโกคาร์มีน หรืออินดิโกทีน (Indigocarmine or indigotine) บริลเลียนต์บลู เอฟซีเอฟ (Brilliant blue FCF)

2. สีอนินทรีย์ ได้แก่

2.1 ผงถ่านที่ได้จากเผาพืช (Vegetable charcoal)

2.2 ไตเตเนียมไดออกไซด์ (Titanium dioxide)

3. สีที่ได้จากธรรมชาติ โดยการสกัดพืช ผัก ผลไม้ และสัตว์ที่ใช้บริโภคได้โดยไม่เกิดอันตราย และสีชนิดเดียวกันที่ได้จากการสังเคราะห์

3.1 สีธรรมชาติ ที่สกัดจากพืช ผัก ผลไม้ และสัตว์ ได้แก่

- **สีเหลือง** จากขมิ้นชัน , ขมิ้นอ้อย , ดอกโสน , ฟักทอง , ดอกคำฝอย ดอกกรรณิการ์ และลูกพุด
- **สีแดง** จากครั่ง เป็นแมลงตัวเล็ก ๆ ชอบอาศัยอยู่ตามต้นก้ามปู ต้นโพธิ์ ต้นทองกวาว , ข้าวแดง , มะเขือเทศสุก , กระเจี๊ยบ ,มะละกอ ,ถั่วแดง และพริกแดง
- **สีม่วง** จากดอกอัญชันสีน้ำเงินผสมมะนาว , ข้าวเหนียวดำ และถั่วดำ
- **สีเขียว** จากใบเตย , ใบย่านาง ,พริกเขียว และใบคะน้า
- **สีน้ำตาล** จากน้ำตาลไหม้
- **สีน้ำเงิน** จากดอกอัญชัน
- **สีดำ** จากใบยอ ถ่าน กาบหรือกะลามะพร้าวเผาไฟ หรือใบจาก หรือรวงตาลเผาไฟ ถั่วดำ ดอกดิน
- **สีแสด** จากเมล็ดของผลคำแสด

3.2 สีชนิดเดียวกันที่ได้จากการสังเคราะห์

- โคชินิล (Cochineal)
- สีจากคาโรทีนอยด์ (Carotenoide) ได้แก่
  - แคนธาแซนธีน (Canthaxanthine)
  - คาโรทีน (Carotenes , natural)
  - เบตา - คาโรทิน (Beta-carotene)
  - เบตา-อะโป-8-คาโรทีนาล (Beta-apo-8,-carotenal)
  - เบตา-อะโป-8-คาโรทีโนอิค แอซิด (Beta-apo-8,-carotenoic acid)
  - เอทิลเอสเตอร์ของท เบตา-อะโป-8-คาโรทีโนอิค แอซิด (Ethyl ester of Beta-apo-8,-carotenoic acid)
  - เมทิลเอสเตอร์ของท เบตา-อะโป-8-คาโรทีโนอิค แอซิด (Methyl ester of beta-apo-8-carotenoic acid)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll)
- คลอโรฟิลล์คอปเปอร์คอมเพลกซ์ (Chlorophyll copper complex)

2.11.2 พิษจากการใช้สีผสมอาหาร

สีผสมอาหารที่สังเคราะห์จากกระบวนการทางเคมี เมื่อนำมาผสมอาหารและรับประทานเข้าไปในร่างกาย อาจทำให้เกิดอันตรายได้จากเหตุ 2 ประการได้แก่

1. อันตรายจากสีสังเคราะห์ ถึงแม้จะเป็นสีสังเคราะห์ที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารได้ หากบริโภค ในปริมาณที่มากหรือบ่อยครั้ง จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค คือ สีจะไปเคลือบเยื่อบุกระเพาะอาหาร และลำไส้ทำให้น้ำย่อยอาหารออกมาไม่สะดวก อาหารย่อยยาก เกิดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และขัดขวาง การดูดซึมอาหาร ทำให้ท้องเดิน น้ำหนักลด อ่อนเพลีย อาจมีอาการ ของตับและไตอักเสบ ซึ่งจะเป็นสาเหตุ ของโรคมะเร็ง

2. อันตรายจากสารอื่นที่ปะปนมา เนื่องจากแยกสารออกไม่หมด ยังคงมีตกค้างในปริมาณที่มากเกินไป ได้แก่ โลหะหนักต่าง ๆ เช่น แคดเมียม ตะกั่ว สารหนู ปรอท พลวง โครเมียม เป็นต้น ซึ่งเป็น ส่วนประกอบของสีทาบ้าน และสีย้อมผ้า แม้ได้รับในปริมาณเล็กน้อย ก็สามารถสะสมอยู่ในร่างกาย และทำให้เกิดอันตรายขึ้นได้ เช่น พิษจากสารหนูนั้นเมื่อเข้าไปในร่างกาย จะสะสมอยู่ตามกล้ามเนื้อ กระดูก ผิวหนัง ตับและไต จะเกิดอาการอ่อนเพลีย กล้ามเนื้ออ่อนแรง เกิดความผิดปกติของระบบ ทางเดินอาหาร โลหิตจาง และหากได้รับสารหนูปริมาณมากในครั้งเดียวจะเกิดพิษต่อร่างกายทันที โดยปาก และโพรงจมูกไหม้เกรียมแห้ง ทางเดินอาหารผิดปกติ กล้ามเนื้อเกร็งเพ้อคลั่ง และยังอาจมีอาการหน้าบวม หนังตาบวมด้วย ส่วนตะกั่วนั้นจะมีพิษต่อระบบประสาททั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังอาจทำให้ถึงกับชีวิตใน 1 - 2 วัน ส่วนอาการมีพิษเรื้อรังนั้นจะพบเส้นตะกั่วสีม่วงคล้ำที่เหงือก มือตก เท้าตก เป็นอัมพาต เกิดอาการผิดปกติของทางเดินอาหาร คลื่นไส้ อาเจียน และอาจพบอาการทางระบบประสาทได้

84002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Monascus purpureus*

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 MYS

3.2.2 ข้าวเสาไห้ (บริษัท ธัญญทรัพย์ไรซ์อินเตอร์เทรด จำกัด จังหวัด สระบุรี)

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.3.2 ขวดเตรียมอาหาร

3.3.3 หม้อนึ่งความดัน

3.3.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

3.3.5 เครื่องหมุนขวด

3.3.6 เครื่องชั่งสารพิกัด 4 ตำแหน่ง

3.3.7 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

3.3.8 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 เชื้อราโมแนสคัส

เชื้อ *Monascus purpureus* จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยี-พระจอมเกล้าจ้าคุณทหารลาดกระบัง เลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง MYS ที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 10 วัน จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร MYS ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

ทำ slide culture โดยนำแท่งแก้วงอวางลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปเล็กน้อย ตัดชิ้นวุ้น MYS agar ขนาด 1 ตารางเซนติเมตรวางลงบนแผ่นสไลด์ปลอดเชื้อทั้ง 2 ด้าน แล้วเขี่ยเส้นใยของเชื้อรามาวางลงที่ตรงกลางขอบทั้ง 4 ด้าน ปิดด้วยกระจกปิดแผ่นสไลด์ที่ปลอดเชื้อ เพื่อให้เกิดความชื้น บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน (Fig. 3.1) เมื่อเส้นใยเจริญเต็มด้านข้างของแผ่นวุ้นให้นำแผ่นวุ้นออกโดยระวังอย่าให้เส้นใยขาด ทำการย้อมแผ่นสไลด์ที่นำชิ้นวุ้นออกด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue และปิดด้วยกระจกปิดเล็กโดยระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ส่วนกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยติดอยู่ก็ย้อมด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue จากนั้นจึงปิดลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาดอีก 1 แผ่น นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

A. B.

Figure 3.1 The slide culture technique

3.4.3 ศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว MYS

นำชิ้นเชื้อที่เจริญบนอาหาร MYS agar อายุ 10 - 14 วัน จำนวน 4 ชิ้นใส่ลงในอาหารเหลว MYS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 15 ฟลาสก์ บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อรา และ ปริมาณสารสีที่เวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

3.4.4.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นสำหรับลงเชื้อบนอาหารแข็ง

นำชิ้นเชื้อที่เจริญบนอาหาร MYS agar อายุ 10 - 14 วัน จำนวน 4 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลว MYS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

3.4.4.2 ศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีบ่มบนเครื่องหมุนขวด และการตั้งทิ้งไว้

นำข้าว 50 กรัม แช่น้ำ 2 ชั่วโมงแล้วสะเด็ดน้ำ 30 นาที (นิสา, 2537) ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 4 ขวด ทิ้งไว้ให้เย็นจึงลงเชื้อ ขวดที่ 1 และ 2 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว ส่วนขวดที่ 3 และ 4 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว นำขวดที่ 1 และ 3 ไปบ่มบนเครื่องหมุนขวด (Fig. 3.2) ขวดที่ 2 และ 4 ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์เพื่อนำไปวิเคราะห์ความชื้น พีเอช และสารสีที่เวลาต่างๆ

Figure 3.2 The solid state fermentation of *Monascus* pigment production in rotated bottle at 30°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.3 ศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง

นำข้าว 50 กรัม และน้ำปริมาตร 3.5 8.5 และ 13.5 มิลลิลิตร อย่างละ 2 หลอด ไปนึ่งฆ่าเชื้อแยกที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเทน้ำลงในข้าว ทั้ง 6 ขวด โดยแบ่งขวดเป็น 3 ชุด ชุดละ 2 ขวด ชุดที่ 1 2 และ 3 เติมน้ำกลั่น 3.5 8.5 และ 13.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนบนเครื่องหมุนขวด 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมลงไปในเมล็ดข้าว หลังจากนั้นจึงลงเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว (Table3.1) บ่มบนเครื่องหมุนขวดที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส แล้วจึงเก็บตัวอย่างข้าวสัปดาห์ละ 1 ครั้งมาหาความชื้นเริ่มต้น พีเอช สารสี และความชื้นที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ

Table 3.1 The amount of water addition at the beginning of solid state fermentation for pigment production by *M. purpureus* with 4-day inoculum age

No.	Initial water mount (ml.)	Amount of inoculum (ml.)	Water addition (ml./week)					Total water amount (ml.)
			0	1	2	3	4	
1	3.5	1.5 (3 %)	5	-	-	-	-	5
2	3.5	1.5 (3 %)	5	-	-	-	-	5
3	8.5	1.5 (3 %)	10	-	-	-	-	10
4	8.5	1.5 (3 %)	10	-	-	-	-	10
5	13.5	1.5 (3 %)	15	-	-	-	-	15
6	13.5	1.5 (3 %)	15	-	-	-	-	15

3.4.4.4 ศึกษาการเติมน้ำที่ระยะเวลาต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส

นำข้าว 50 กรัม และน้ำปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร 4 หลอด ปริมาตร 8.5 และ 13.5 มิลลิลิตร อย่างละ 2 หลอด ไปนึ่งฆ่าเชื้อแยกกันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงในข้าวทั้ง 8 ขวด โดยแบ่งขวดเป็น 4 ชุด ชุดละ 2 ขวด ชุดที่ 1 และ 2 เติมน้ำกลั่น 3.5 มิลลิลิตร ชุดที่ 3 เติมน้ำกลั่น 8.5 มิลลิลิตร และชุดที่ 4 เติมน้ำกลั่น 13.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนบนเครื่องหมุนขวด 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมลงไปในเมล็ดข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นจึงลงเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวบ่มบนเครื่องหมุนขวด ที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อมีอายุครบ 1 สัปดาห์ นำข้าวชุดที่ 1 2 และ 3 เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพิ่ม 5 10 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ และชุดที่ 4 ไม่เติม สัปดาห์ที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพิ่ม 5 มิลลิลิตร ในข้าวชุดที่ 1 ให้ได้ปริมาตรน้ำสุดท้ายรวม 15 มิลลิลิตร (Table 3.2) วิเคราะห์ผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5.4.3

Table 3.2 The amount of water addition during solid state fermentation for pigment production by *M. purpureus* with 4-day inoculum age

No.	Initial water amount (ml.)	Amount of inoculum (ml.)	Water addition (ml./wiik)					Total water amount (ml.)
			0	1	2	3	4	
1	3.5	1.5(3 %)	5	5	5	-	-	15
2	3.5	1.5 (3 %)	5	5	5	-	-	15
3	3.5	1.5 (3 %)	5	10	-	-	-	15
4	3.5	1.5 (3 %)	5	10	-	-	-	15
5	8.5	1.5 (3 %)	10	5	-	-	-	15
6	8.5	1.5 (3 %)	10	5	-	-	-	15
7	13.5	1.5 (3 %)	15	-	-	-	-	15
8	13.5	1.5 (3 %)	15	-	-	-	-	15

3.4.4.5 ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นและอายุของเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส

นำข้าว 50 กรัม จำนวน 6 ขวด และน้ำปริมาตร 5 7.5 และ 8.5 มิลลิลิตรอย่างละ 2 หลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเทน้ำทั้ง 6 หลอดลงในข้าว โดยแบ่งข้าวเป็น 3 ชุด ชุดละ 2 ขวด ชุดที่ 1 เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร ชุดที่ 2 เติมน้ำ 7.5 มิลลิลิตร และชุดที่ 3 เติมน้ำ 8.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุน 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมลงไปในเมล็ดข้าว ทำ 2 ซ้ำ โดยใช้เชื้อเริ่มต้นอายุ 3 และ 4 วัน ข้าวชุดที่ 1 2 และ 3 ใช้เชื้อเริ่มต้น 3 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว (Table 3.3) แล้วนำไปบ่มบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องหมุนขวดที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อมีอายุ 1 สัปดาห์ เติมน้ำเพิ่มขวดละ 5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5.4.3

Table 3.3 The amount of water addition during solid state fermentation for pigment production by *M. purpureus* with various 3-day and 4-day inoculum size

No.	Initial water amount(ml.)	Amount of inoculum (ml.)	Inoculum age (day)	Water addition (ml./week)					Total water amount (ml.)
				0	1	2	3	4	
1	8.5	1.5 (3 %)	3	10	5	-	-	-	15
2	8.5	1.5 (3 %)	3	10	5	-	-	-	15
3	7.5	2.5 (5 %)	3	10	5	-	-	-	15
4	7.5	2.5 (5 %)	3	10	5	-	-	-	15
5	5	5 (10 %)	3	10	5	-	-	-	15
6	5	5 (10 %)	3	10	5	-	-	-	15
7	8.5	1.5 (3 %)	4	10	5	-	-	-	15
8	8.5	1.5 (3 %)	4	10	5	-	-	-	15
9	7.5	2.5 (5 %)	4	10	5	-	-	-	15
10	7.5	2.5 (5 %)	4	10	5	-	-	-	15
11	5	5 (10 %)	4	10	5	-	-	-	15
12	5	5 (10 %)	4	10	5	-	-	-	15

3.5.6 การวิเคราะห์ผล

3.5.6.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลว MYS มากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ที่ทำการอบให้แห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนกว่าเซลล์จะแห้งสนิท จากนั้นจึงนำออกมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6.2 การวิเคราะห์สารสีจากน้ำหมัก

นำน้ำหมักที่ผ่านการกรองเซลล์ออกแล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตร-โฟโตมิเตอร์ โดยทำการเจือจางสารสีด้วยเอทานอลเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และใช้เอทานอลเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบลงค์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร วิธีวิเคราะห์ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.5.6.3 การหาน้ำหนักแห้งของข้าวแดง

เก็บตัวอย่างข้าวแดงประมาณ 2 กรัม ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้อบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำออกมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ และ ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของข้าว วิธีวิเคราะห์ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.5.6.4 การสกัดสารสี

สกัดสารสีที่ได้จากการหมักของเชื้อราโมแนสคัสด้วยเอทานอลเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปิดปากฟลาสก์ให้สนิทแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารสีที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟ-โตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร วิธีวิเคราะห์ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.5.6.5 การหาพีเอชของข้าว

นำตัวอย่างของข้าวประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติมน้ำกลั่นพีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1 : 10 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ ทิ้งไว้ 1 - 2 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดพีเอช ด้วยเครื่องวัดพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัสเมื่อเจริญบนอาหารวุ้น

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์พ่อแม่ เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYS agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้เส้นใยฟูพบรอยพับตามแนวรัศมีรอบ ๆ โคโลนี เมื่ออายุน้อยๆ สีของเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีจะเป็นสีขาว แต่ถัดเข้าไปซึ่งเป็นเส้นใยที่แก่กว่าจะมีสีส้มแดง เมื่ออายุการเลี้ยงเชื้อมากขึ้นสีของเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีแดงตลอดทั้งโคโลนี (Fig. 4.1)

4.1.2 ลักษณะของเชื้อราโมแนสคัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เชื้อราโมแนสคัสจัดอยู่ใน Class Ascomycetes สืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้าง cleistothecium รูปร่างกลม จำนวน 1 อันบนก้านชู (stalk) ภายในมี ascus ซึ่งบรรจุ ascospore จำนวนมากอยู่ภายใน ascus นั้น (Smith, 1969 ; Kolotila และคณะ, 1978) บางรายงานพบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง perithecium (Lin และ Iizuka, 1982) ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะสร้างโคนิเดียรูปร่างกลม หรือรูปไข่ มีรอยตัดที่ฐาน (truncate) อาจมี 1 หรือหลายโคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่อยู่ที่ปลายเส้นใย โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจมีสีแดง ซึ่งการศึกษาลักษณะการเจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อราโมแนสคัส โดยการทำ slide culture นำแท่งแก้วงอวางลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปเล็กน้อย ตัดชิ้นวุ้น MYS agar ขนาด 1 ตารางเซนติเมตรวางลงบนแผ่นสไลด์ปลอดเชื้อแล้วทั้ง 2 ด้านในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการเขี่ยเส้นใยของเชื้อรามาวางลงที่ตรงกลางขอบทั้ง 4 ด้าน ปิดด้วยกระจกปิดแผ่นสไลด์ที่ปลอดเชื้อ เพื่อให้เกิดความชื้น บ่มที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 10 วัน เมื่อเส้นใยเจริญเต็มด้านข้างของชิ้นวุ้นให้นำชิ้นวุ้นออก ทำการย้อมแผ่นสไลด์ด้วย lactophenol cotton blue แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Fig. 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Figure 4.1 The morphological property *M. purpureus* on MYS slant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

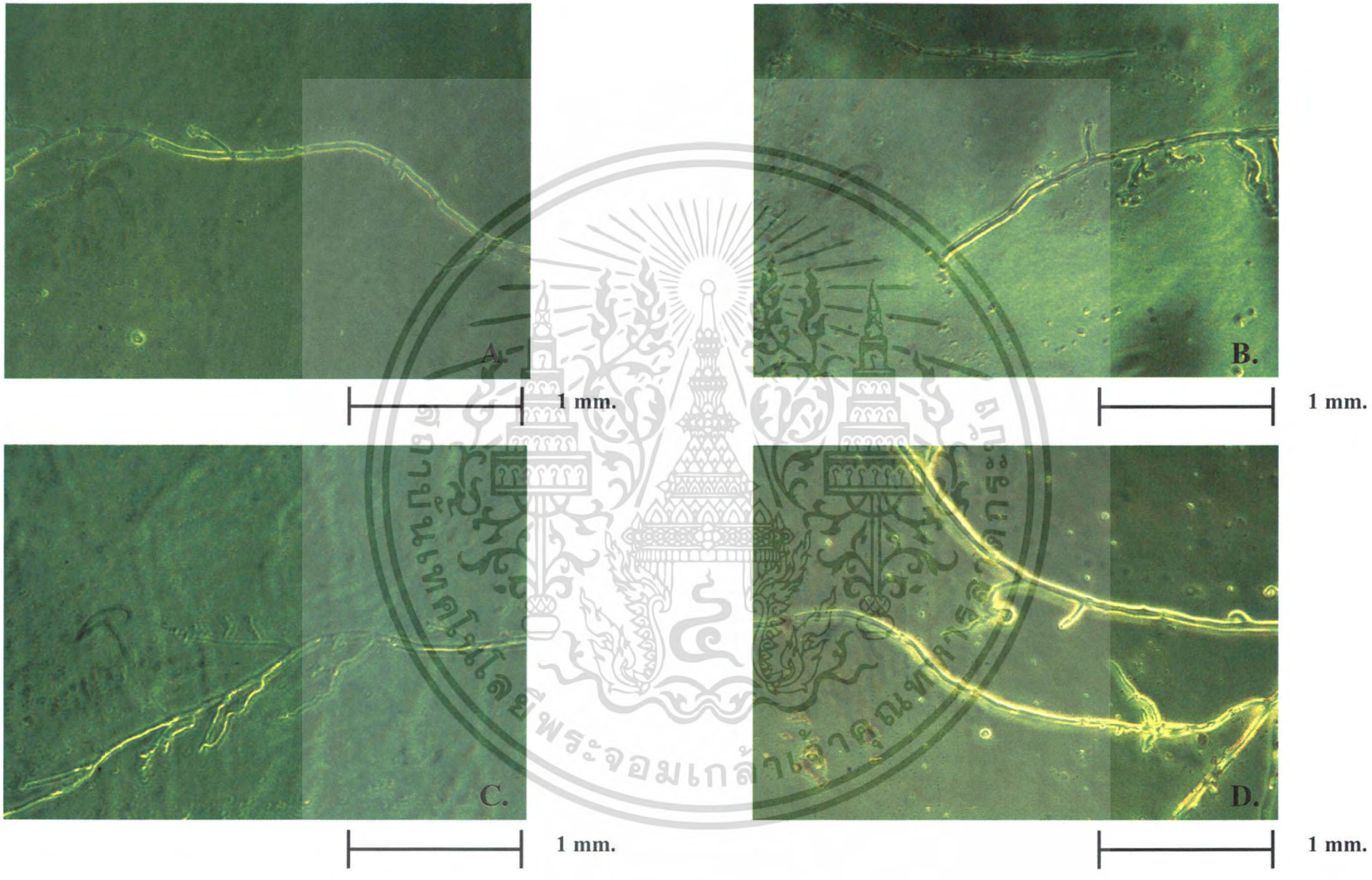


Figure 4.2 The mycelial structure of *M. purpureus* under microscopic observation

4.2 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลว

4.2.1 การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลว MYS medium

เชื้อราโมแนสคัสสามารถเจริญ และสร้างสารสีได้ทั้งบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว ซึ่งการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวจะให้อัตราการเจริญและการสร้างสารสีเร็วกว่าบนอาหารแข็ง สามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น พีเอช อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ง่าย ซึ่งการทดลองนี้เลี้ยงในอาหาร MYS medium เป็นสูตรอาหารที่ให้ปริมาณสารสีได้ดีพอสมควร ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง เปปโตน มอลท์เอกซ์แทรค และยีสต์เอกซ์แทรค โดยใช้ cock borror ตัดชิ้นเชื้อที่เจริญบนอาหาร MYS agar จำนวน 4 ชิ้น เป็นเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (Fig. 4.3)

Figure 4.3 The pellet and mycelium formation of *M. purpureus* cultivation in MYS broth, 200 rpm and 28-30°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราโมแนสคัสสามารถสร้างสารสีได้ดีในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน สารสีที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร อัตราการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสเมื่อครบ 7 วัน สามารถวัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 5.85 กรัมต่อลิตร แต่มีการเจริญได้สูงสุดในวันที่ 5 วัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้เท่ากับ 8.12 กรัมต่อลิตร สำหรับการสร้างสารสี เชื้อรานั้นเริ่มสร้างสารสีตั้งแต่วันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ จนถึงวันที่ 7 ของการเจริญมีการสร้างสารสีสูงสุดวัดได้ 1,433.57 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักเซลล์ (Fig. 4.4)

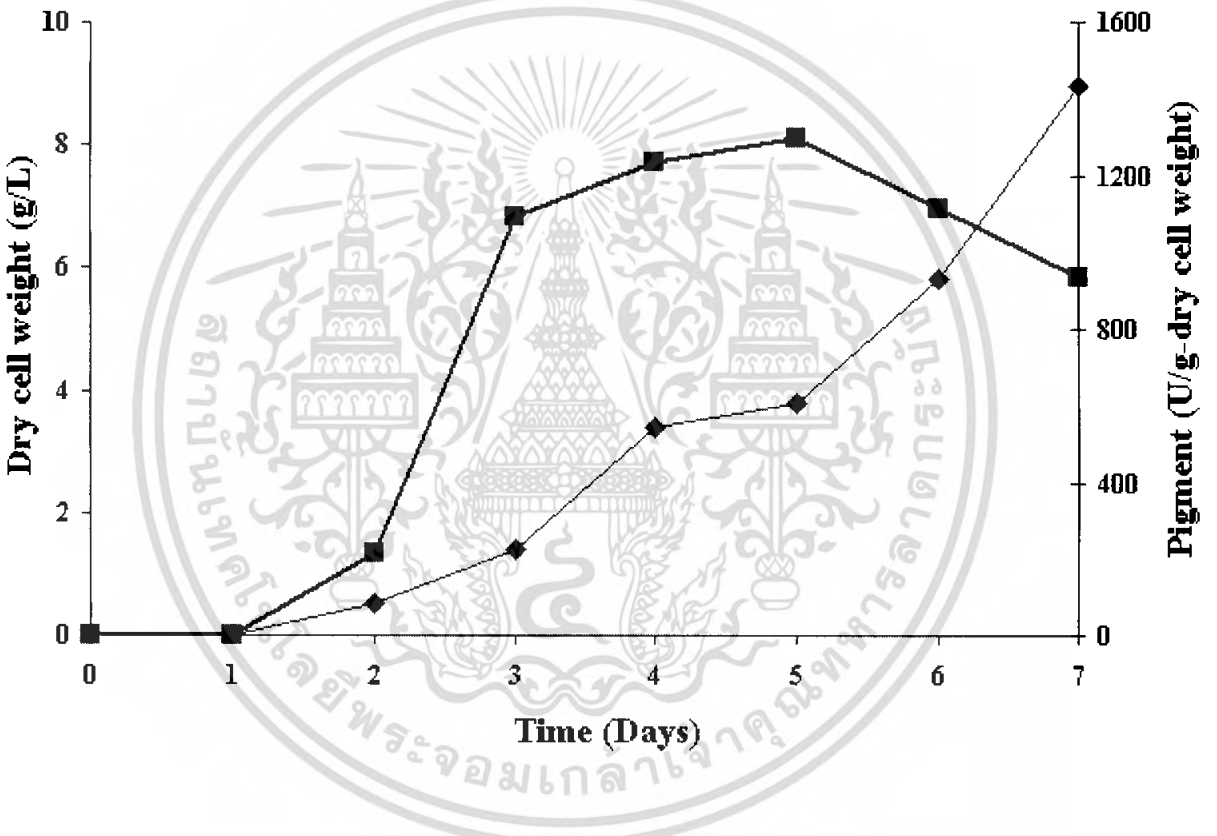


Figure 4.4 The growth and pigment production of *M. purpureus* cultivation in MYS broth, 200 rpm and 28-30°C

Dry cell weight Pigment

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงในขวดบนเครื่องหมุนขวด

4.3.1 ผลการศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีบ่มบนเครื่องหมุนขวดและการตั้งทิ้งไว้

จากการทดลองแช่ข้าว 50 กรัมในน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วสะเด็ดน้ำ 30 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 4 ขวด ขวดที่ 1 และขวดที่ 2 จะใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ นำขวดที่ 1 ไปบ่มบนเครื่องหมุนขวด ขวดที่ 2 ตั้งทิ้งไว้บ่มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าขวดที่ 1 และขวดที่ 2 จะมีการสร้างสารสีแดง 1,152.24 และ 1,040.92 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สำหรับ ขวดที่ 3 และ 4 ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยนำข้าวขวดที่ 3 ไปบ่มบนเครื่องหมุนขวด ขวดที่ 4 ตั้งทิ้งไว้ เมื่อครบ 4 สัปดาห์ พบว่ามีการสร้างสารสีแดง 1,592.82 และ 1,298.75 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Fig. 4.5)

จากการทดลองพบว่าเชื้อราสามารถสร้างสารสีได้ดีในสภาวะการบ่มบนเครื่องหมุนขวดโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว ถึงแม้ว่าการใช้ข้าวสะเด็ดน้ำแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจะทำให้เมล็ดข้าวบางส่วนถูกเยลาติไนซ์ซึ่งทำให้เชื้อราสามารถเจริญได้ดี (นิสา,2537) แต่เมล็ดข้าวจะเกาะตัวกันเป็นก้อนทำให้เส้นใยไม่สามารถชอนไชเข้าไปในเมล็ดข้าวได้ดีเนื่องจากตรงกลางของเมล็ดข้าวอากาศ ดังนั้นเมื่อทำการนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จแล้วจะต้องเขย่าให้เมล็ดข้าวกระจายตัวกันก่อนที่เมล็ดข้าวเย็นลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

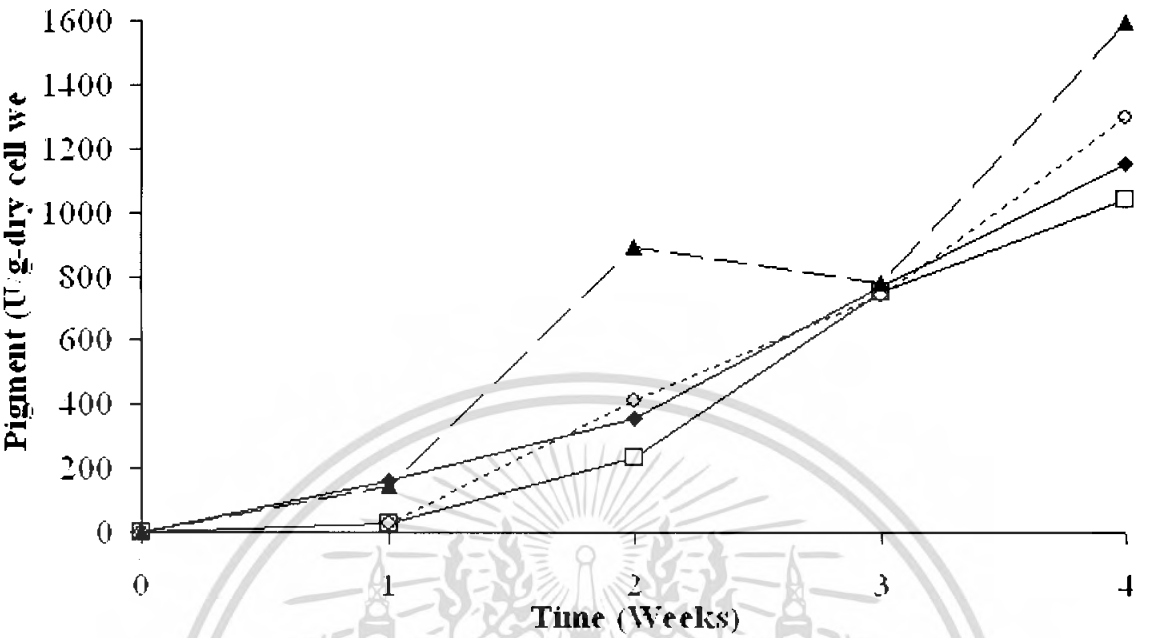


Figure 4.5 The effect of inoculum size and culturing condition on pigment production by solid stat fermentation

Treatment 1; rotated condition with 1.0% inoculum size

Treatment 2; static condition with 1.0% inoculum size

Treatment 3; rotated condition with 3.0% inoculum size

Treatment 4; static condition with 3.0% inoculum size

4.3.2 ผลการศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง

จากการทดลองการศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีบ่มบนเครื่องหมุนขวดและการตั้งทิ้งไว้ พบว่าการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีบ่มบนเครื่องหมุนขวดโดยใช้เชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว เชื้อราสามารถสร้างสารสีได้ดี แต่มีปัญหาเรื่องเมล็ดข้าวเกาะตัวกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงให้ความชื้นแก่เมล็ดข้าวโดยการเติมน้ำลงในข้าวหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อไม่ให้เมล็ดข้าวเกาะตัวกัน

การศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมทำได้โดยนำข้าว 50 กรัม จำนวน 6 ขวด และน้ำกลั่นปริมาตร 3.5 8.5 และ 13.5 มิลลิลิตร อย่างละ 2 หลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำข้าวทั้ง 6 ขวด เติมน้ำกลั่นโดยแบ่งขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น 3 ชุด ชุดละ 2 ขวด ชุดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 3.5 มิลลิลิตร ชุดที่ 2 เติมน้ำกลั่น 8.5 มิลลิลิตร และชุดที่ 3 เติมน้ำกลั่น 13.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปกลิ้ง 12 ชั่วโมง ลงเชื้อเริ่มต้นอายุ 4 วันปริมาตร 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว บ่มบนเครื่องหมุนขวดที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส

จากการทดลองพบว่า เมื่อนำขวดข้าวที่เติมน้ำ 3.5 8.5 และ 13.5 มิลลิลิตร ที่ลงเชื้อเริ่มต้นแล้ว บ่มบนเครื่องหมุนขวดเป็นเวลา 1 คืน จะได้ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นประมาณ 16.46 23.91 และ 27.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการสร้างสารสี สำหรับการสร้างสารสีบนข้าวของเชื้อราโมแนสคัส พบว่าข้าวที่เติมน้ำเริ่มต้น 3.5 มิลลิลิตร มีความชื้นเริ่มต้น 16.46 เปอร์เซ็นต์ให้ปริมาณสารสีน้อยมากเนื่องจากมีความชื้นเริ่มต้นต่ำ ทำให้เชื้อราเจริญได้น้อย ส่วนข้าวที่เติมน้ำเริ่มต้น 8.5 มิลลิลิตร มีความชื้นเริ่มต้น 23.91 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณสารสีสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 1,231.41 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร และข้าวที่เติมน้ำเริ่มต้น 13.5 มิลลิลิตรมีความชื้นเริ่มต้น 27.71 เปอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณสารสีสูงสุดในอาทิตย์ที่ 3 431.69 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งเท่านั้น และเมื่ออายุการเลี้ยงเชื้อมากขึ้นการสร้างสารสีจะลดลง (Fig. 4.6)

จากการทดลองของพลายแก้ว และ บุษบา (2534) พบว่าพันธุ์ข้าวที่เหมะสมต่อการผลิตข้าวแดง คือ พันธุ์หอมมะลิ นอกจากนี้ยังมีอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการหมักข้าวแดง คือ ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม ในกรณีที่มีความชื้นเริ่มต้นต่ำเกินไป จะทำให้เชื้อรามีการเจริญน้อย เป็นเหตุให้การสร้างสารสีน้อยไปด้วย แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงเกินไปจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูโคอมิเลส ทำให้มีปริมาณกลูโคสสูงเกินไป จนเกิดการยับยั้งการสร้างสารสีของเชื้อรา แต่ส่งเสริมการสร้างเอทานอลแทน (Lotong และ Suwanarit 1990) ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องปรับให้เมล็ดข้าวมีความชื้นที่เหมาะสมต่อการหมักข้าวแดง

พีเอชของข้าวที่มีปริมาตรน้ำเริ่มต้น 3.5 มิลลิลิตร มีค่าประมาณ 6 ตลอดช่วงการทดลองเนื่องจากความชื้นเริ่มต้นของข้าวต่ำมากจึงมีผลให้เชื้อเจริญได้น้อย ส่วนข้าวที่มีปริมาณน้ำเริ่มต้น 8.5 และ 13.5 มิลลิลิตร พบว่าพีเอชลดลงเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 อยู่ในช่วง 4.22 - 4.42 และ 5.10 - 5.28 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อกำลังเจริญ และจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 3 เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

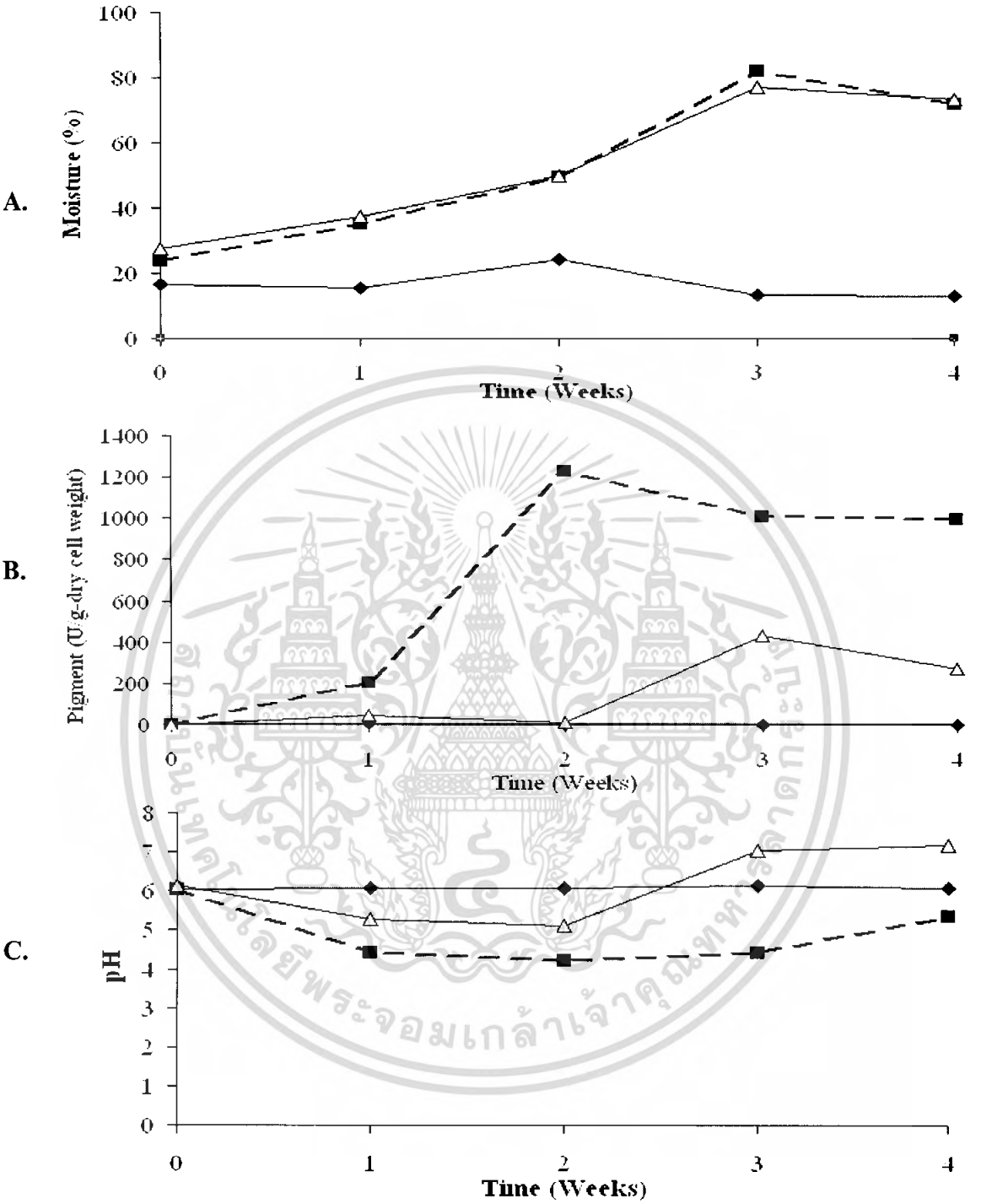


Figure 4.6 Effect of water addition on initial moisture content (A), pigment production (B) and pH changing on solid state fermentation by *M. purpureus* with 3.0% inoculum size

—◆— 3.5 ml of water addition

– ■ - 8.5 ml of water addition

—△— 13.5 ml of water addition

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่าการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสขึ้นอยู่กับความชื้นเริ่มต้นของเมล็ดข้าว น้ำเริ่มต้น 8.5 มิลลิลิตร และเชื้อเริ่มต้น 3 เปอรเซ็นต์ของน้ำหนักข้าว ทำให้เมล็ดข้าวมีความชื้นเริ่มต้น 23.91 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส ส่วนเมล็ดข้าวที่มีความชื้นเริ่มต้นสูง จะทำให้เมล็ดข้าวเกาะกันเป็นก้อนกลมแน่น หรือ ติดอยู่รอบ ๆ ขวด ทำให้เชื้อราเจริญได้เฉพาะที่ผิวหน้า ไม่สามารถชอนไชเข้าไปในเมล็ดข้าวได้ และอากาศก็สามารถซึมผ่านเข้าสู่ส่วนในของข้าวที่เกาะกันเป็นก้อนได้น้อยทำให้การสร้างสารสีลดลง รวมทั้งเมื่อมีการหมุนขวดก็อาจทำให้เมล็ดข้าวแตกหักง่าย

4.3.3 ผลการศึกษาการเติมน้ำที่ระยะเวลาต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมพบว่า การเติมน้ำเริ่มต้น 8.5 มิลลิลิตร และ เชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว เป็นความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อรา ส่วนการเติมน้ำเริ่มต้น 13.5 มิลลิลิตร และใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณเท่ากัน โดยมีปริมาตรน้ำรวมทั้งหมด 15 มิลลิลิตรก็สามารถสร้างสารสีได้ดีพอสมควร เนื่องจากการบ่มข้าวแดงบนขวดหมุนจะทำให้เชื้อราได้รับอากาศอย่างทั่วถึง แต่ก็จะเกิดการระเหยของน้ำทำให้ข้าวมีความชื้นลดลงดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาการเติมน้ำที่เวลาต่าง ๆ เพื่อเป็นการควบคุมความชื้นของเมล็ดข้าว ที่มีผลต่อการสร้างสารสีของเชื้อรา

การศึกษาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของการเติมน้ำที่เวลาแตกต่างกัน โดยนำข้าว 50 กรัม และน้ำปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร 4 หลอด ปริมาตร 8.5 และ 13.5 มิลลิลิตร อย่างละ 2 หลอด ไปนึ่งฆ่าเชื้อแยกกันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงในข้าวทั้ง 8 ขวด โดยแบ่งขวดเป็น 4 ชุด ชุดละ 2 ขวด ชุดที่ 1 และ 2 เติมน้ำกลั่น 3.5 มิลลิลิตร ชุดที่ 3 เติมน้ำกลั่น 8.5 มิลลิลิตร และชุดที่ 4 เติมน้ำกลั่น 13.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนบนเครื่องหมุนขวด 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมลงไปในเมล็ดข้าว หลังจากนั้นจึงลงเชื้อเริ่มต้น 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวบ่มบนเครื่องหมุนขวด ที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อมีอายุครบ 1 สัปดาห์ ข้าวชุดที่ 1 2 และ 3 เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพิ่ม 5 10 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ และชุดที่ 4 ไม่เติม ในสัปดาห์ที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ ชุดที่ 1 เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพิ่ม 5 มิลลิลิตร 2 ขวดให้ได้ปริมาตรน้ำสุดท้ายรวม 15 มิลลิลิตร

จากการทดลองพบว่า ชุดที่ 1 น้ำกลั่นเริ่มต้น 3.5 มิลลิลิดร เมื่อเชื้อมีอายุ 1 และ 2 สัปดาห์ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อสัปดาห์ละ 5 มิลลิลิตร มีความชื้นสูงสุด 76.0 เปอร์เซ็นต์ในสัปดาห์ที่ 4 ชุดที่ 2 น้ำกลั่นเริ่มต้น 3.5 มิลลิลิตร เมื่อเชื้อมีอายุ 1 สัปดาห์ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 มิลลิลิตร มีความชื้นสูงสุด 47.43 เปอร์เซ็นต์ในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากนั้นความชื้นค่อย ๆ ลดลง ชุดที่ 3 มีน้ำกลั่นเริ่มต้น 8.5 มิลลิลิตร เมื่อเชื้อมีอายุ 1 สัปดาห์ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพิ่ม 5 มิลลิลิตร พบว่ามีความชื้นสุดท้ายสูงสุด 77.18 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ชุดที่ 4 น้ำกลั่นเริ่มต้น 13.5 มิลลิลิตร มีความชื้นสุดท้าย 73.87 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสที่มีระยะเวลาการเติมน้ำที่แตกต่างกัน ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร พบว่าความชื้นเริ่มต้นมีผลต่อการสร้างสารสีอย่างมากโดย ชุดที่ 1 และ 2 พบการสร้างสารสีในช่วงสัปดาห์แรกน้อยมากเนื่องจากมีความชื้นต่ำ เชื้อจึงเจริญได้น้อย และเมื่อมีการเติมน้ำเพิ่มขึ้น จะทำให้เมล็ดข้าวมีความชื้นสูงขั้นขึ้น เชื้อราสามารถเจริญได้ดีขึ้น จึงมีการลิตสารสีได้เพิ่มขึ้น ซึ่งชุดที่ 1 และ 2 สามารถสร้างสารสีได้สูงสุด 550.52 และ 100.78 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ชุดที่ 3 ปริมาณสารสีสูงสุดที่ได้ 874.15 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และชุดที่ 4 ได้ปริมาณสารสีสูงสุด 207.31 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำเริ่มต้นมากเกินไปจะทำให้เล็ดข้าวมีความชื้นเริ่มต้นมีสูงและมีผลกระทบต่อการสร้างสารสีเช่นเดียวกัน อาจเนื่องมาจากเชื้อเจริญได้ดี สามารถย่อยข้าวได้เร็ว เกิดการสะสมกลูโคสทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสารสีได้ สำหรับการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ข้าวที่มีความชื้นเริ่มต้น 21.65 และ 27.69 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความชื้นเริ่มต้นที่เชื้อสามารถเจริญได้ดี พบว่าค่าพีเอชจะลดลงเล็กน้อยในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น (Fig. 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

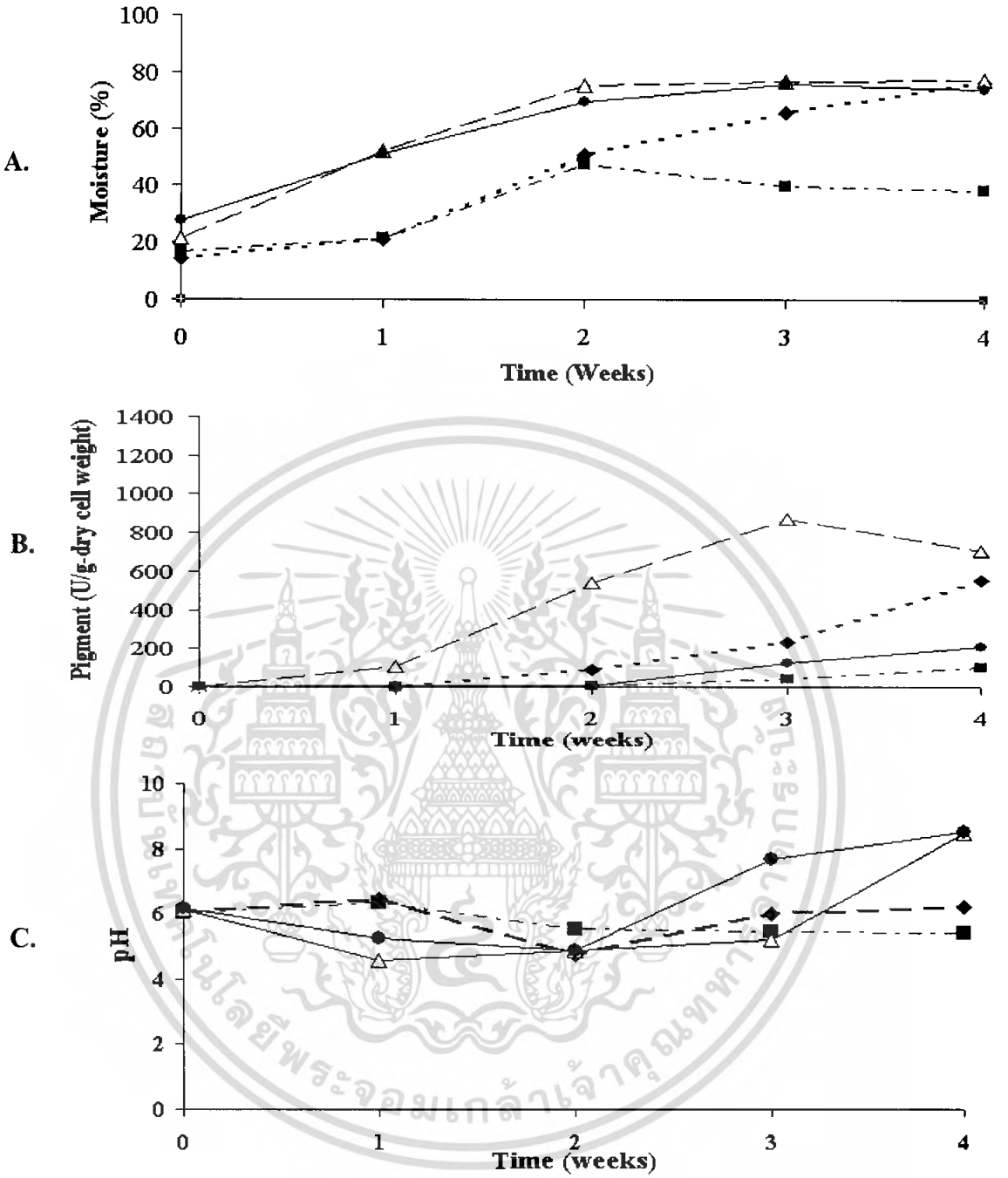


Figure 4.7 The effect of water addition on initial moisture content (A), pigment production (B) and pH changing (C) during solid state fermentation of *M. purpureus*, with 3.0% inoculum size

- -◆- 3.5 ml of initial added water and 5 ml. addition on 1-week and 2-week cultivation, respectively
- —■— 3.5 ml of initial added water and 10 ml. addition on 1-week cultivation
- —△— 8.5 ml of initial added water and 5 ml. addition on 1-week cultivation
- —●— 13.5 ml of initial added water

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 ผลการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นและอายุของเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส

จากรายงานของ Calam (1976) พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีความสำคัญต่อการผลิต secondary metabolites Shepherd และ Carels (1983) กล่าวว่า ถึงแม้ว่าจะไม่มีการศึกษาถึงระดับเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการผลิตสี (pigment synthesizing enzyme) ในโมแนสคัส แต่จากการศึกษาพบว่า เพื่อที่จะให้ช่วงการเจริญที่ดีในอาหารที่ใช้ผลิตสี ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อช่วงแรกของการเพาะเชื้อคือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ดังนั้นจึงทดลองหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงนอกเซลล์จากการทดลองใช้เชื้อเริ่มต้นที่มาจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MYS 2 ชุด คือ ชุดแรกมีอายุเชื้อ 3 วัน ชุดที่สอง มีอายุเชื้อ 4 วัน ศึกษาโดยใช้ปริมาณเชื้อต่าง ๆ กัน คือ 3 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปริมาตรน้ำเริ่มต้นรวมทั้งหมดคือ 10 มิลลิลิตร และเมื่อเชื้อมีอายุ 1 สัปดาห์ จะเติมน้ำเพิ่ม 5 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่สามารถสร้างสารสีได้สูงที่สุดในการทดลอง 4.3.3

สำหรับเชื้อรา *Monascus purpureus* เมื่อเลี้ยงบนข้าวเพื่อผลิตสารสีแดงนั้น ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อราที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยการ นำข้าว 50 กรัม จำนวน 6 ขวด และน้ำกลั่นปริมาตร 5 7.5 และ 8.5 มิลลิลิตร อย่างละ 2 หลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนำข้าวทั้ง 6 ขวด เติมน้ำกลั่นโดยแบ่งขวดเป็น 3 ชุด ชุดละ 2 ขวด โดยชุดที่ 1 2 และ 3 เติมน้ำ 5 7.5 และ 8.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปกลิ้ง 12 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมลงไปในเมล็ดข้าว ใช้เชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน และ 4 วัน โดยข้าวชุดที่ 1 2 และ 3 ใช้เชื้อเริ่มต้น 3 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มบนเครื่องกลิ้งที่อุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อมีอายุ 1 สัปดาห์ เติมน้ำเพิ่มขวดละ 5 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างแต่ละสัปดาห์เพื่อนำไปสกัดและหาปริมาณสารสีที่ได้ และเมื่อนำมาหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้นพบว่าเชื้ออายุ 3 และ 4 วัน โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 21.0 - 23.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความชื้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และจะลดลงเล็กน้อยเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น ส่วนการผลิตสารสีพบว่าการผลิตสีแดงจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยในสัปดาห์ที่ 4 ปริมาณสารสีที่ได้ในเชื้ออายุ 3 วัน ที่ 3 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1,154.66 700.99 และ 1,142.65 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Fig. 4.8) และที่อายุเชื้อ 4 วัน ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเหมือนกันมีการผลิตสารสีสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ได้ 1,264.41 1,180.85 และ 973.60 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Fig. 4.9)

ค่าพีเอชของการใช้เชื้อเริ่มต้นอายุ 3 และ 4 วัน สัปดาห์แรกพีเอชมีค่าลดลงใกล้เคียงกันในช่วง 4.19 – 4.7 และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีอายุการเลี้ยงเชื้อมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

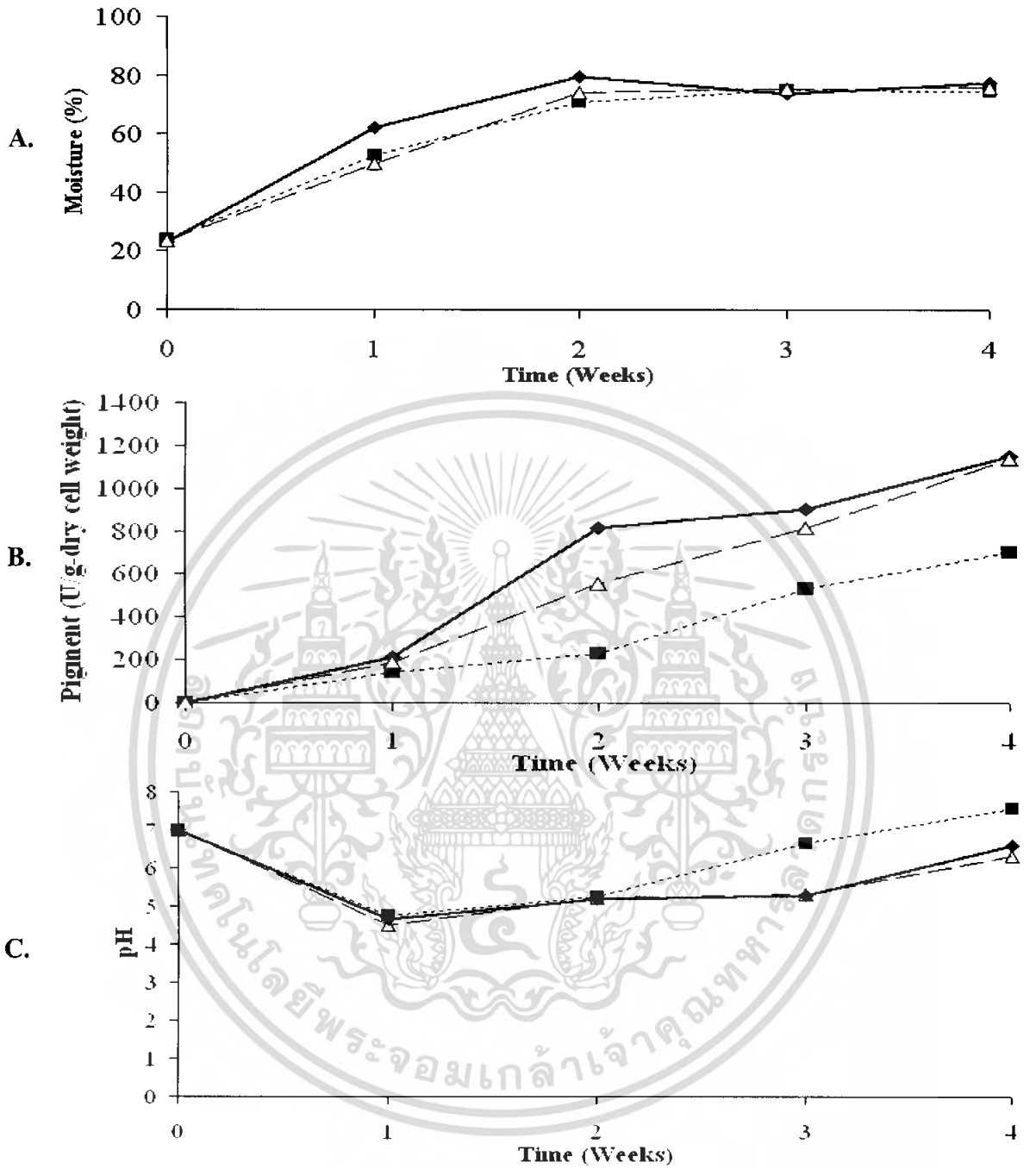


Figure 4.8 The effect of water addition on initial moisture content (A), pigment production (B) and pH changing (C) during solid state fermentation of *M. purpureus* with various inoculum size of 3-day inoculum age

8.5 ml added water and 3.0% inoculum size

7.5 ml added water and 5.0% inoculum size

5 ml added water and 10.0% inoculum size

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

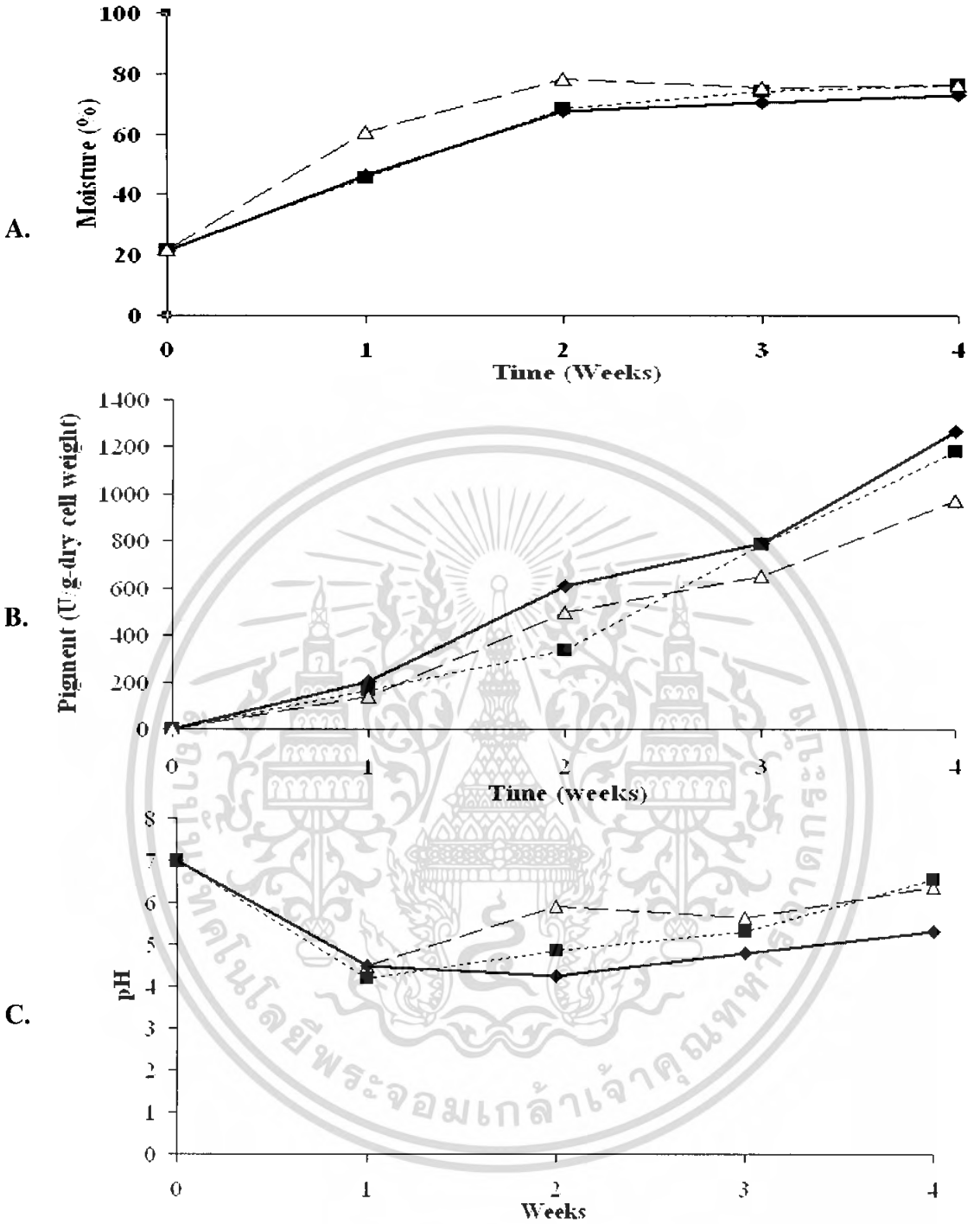


Figure 4.9 The effect of water addition on initial moisture content (A), pigment production (B) and pH changing (C) during solid state fermentation of *M. purpureus* with various inoculum size of 4-day inoculum age

—◆— 8.5 ml added water and 3.0% inoculum size

—△— 7.5 ml added water and 5.0% inoculum size

---■-- 5 ml added water and 10.0% inoculum size

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่าการหมักข้าวแดงโดยใช้ เชื้ออายุ 3 และ 4 วัน ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างสารสีใกล้เคียงกันดังนั้นในการขยายกำลังการผลิตจึงสามารถใช้เชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อสะดวกต่อการเตรียมเชื้อเริ่มต้น เนื่องจากสามารถเตรียมเชื้อเริ่มต้นใช้ในการหมักข้าวแดงโดยใช้เวลาและปริมาณน้อยลง แต่ในการนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในปริมาณมากนั้นควรจะนำไปทำการ homogenize ก่อนเพื่อให้เส้นใยของเชื้อรามีขนาดเล็กลงและสามารถกระจายตัวได้ดีบนเมล็ดข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การผลิตสีผสมอาหารจากเชื้อรา *Monascus purpureus* โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของการเจริญบนอาหารแข็ง MYS พบว่าสร้างเส้นใยสีขาวฟู เมื่ออายุมากขึ้นสีของเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีส้มหรือสีแดงทั่วทั้งโคโลนี จากนั้นจึงนำเชื้อราที่เจริญบนอาหารแข็ง MYS อายุ 10 – 14 วัน มาลงเชื้อในอาหารเหลว MYS ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัสพบว่า ให้ค่าสูงสุด 8.12 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร และ 1,433.57 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในวันที่ 5 และ 7 ของการเจริญ ตามลำดับ แต่จากการสังเกตพบว่าเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเหลว MYS อายุ 4 วัน เส้นใยมีการกระจายตัวดีและมีปริมาณมากกว่าเชื้ออายุ 3 วัน จึงเลือกเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเหลว MYS อายุ 4 วัน มาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง

การเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตสีบนอาหารแข็งโดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เจริญบนอาหารเหลว MYS อายุ 4 วัน ปริมาตรเชื้อเริ่มต้น 1.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวโดยใช้ข้าวสะเด็ดน้ำบ่มบนเครื่องหมุนขวดและการตั้งทิ้งไว้ พบว่าสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบหมุนขวดโดยใช้ปริมาตรเชื้อเริ่มต้น 1.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวให้การผลิตสีสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อแบบตั้งทิ้งไว้ โดยให้ค่าการสร้างสีสูงสุด 1,317.51 และ 1,512.82 หน่วยต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อแบบหมุนที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ให้การสร้างสารสีสูงสุด จึงใช้สภาวะการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนำมาทดสอบวิธีการให้ความชื้นเริ่มต้นแก่เมล็ดข้าวแบบต่าง ๆ พบว่า การเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 8.5 มิลลิลิตร และ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว คิดเป็นความชื้นเริ่มต้น 23.91 เปอร์เซ็นต์ ให้การสร้างสารสีสูงสุด 1,231.41 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้งในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการนำเมล็ดข้าวแช่น้ำ 2 ชั่วโมง แล้วสะเด็ดน้ำ 30 นาที แต่จะเห็นได้ว่าที่ปริมาณน้ำเริ่มต้น 13.5 มิลลิลิตร เชื้อราสามารถสร้างสารสีน้อยในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 2 แต่สามารถสร้างสารสีได้สูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 ดังนั้นจึงเลือกการเติมน้ำเริ่มต้น 13.5 มิลลิลิตร และ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว ซึ่งมีปริมาณน้ำสุทธิ 15 มิลลิลิตร มาทำการทดลองต่อไป

การศึกษาเติมน้ำระหว่างเลี้ยงเชื้อราเพื่อควบคุมความชื้นโดยให้มีปริมาณน้ำสุทธิ 15 มิลลิลิตร และใช้เชื้อเริ่มต้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว พบว่าการเติมน้ำครั้งแรก 8.5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำ 5 มิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ให้ผลการสร้างสีสูงสุด 874.15 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากการทดลองพบว่าสภาวะดังกล่าวเชื้อราสามารถสร้างสารสีได้สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สุด ดังนั้นในการทดลองศึกษาการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น และ อายุของเชื้อเพื่อใช้ในการขยายกำลังการผลิตจึงใช้การเติมน้ำครั้งแรก 8.5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำ 5 มิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ซึ่งเป็นสภาวะที่สามารถควบคุมความชื้นที่ดีที่สุด ในการศึกษาปริมาณและอายุของเชื้อเริ่มต้นโดยใช้เชื้อที่เจริญในอาหารเหลว MYS เป็นเวลา 3 และ 4 วัน ที่ปริมาตร 3.0 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว พบว่าการใช้เชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วัน และ 4 วัน ที่ปริมาตร 3.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าว ให้การสร้างสีสูงสุด 1,154.66 และ 1,264.41 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการผลิตสีผสมอาหารของเชื้อรา *Monascus* บนอาหารแข็ง จึงสามารถใช้เชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว MYS อายุ 3 วัน ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักข้าวได้ ซึ่งจะทำให้สามารถลดเวลาการเตรียมเชื้อเริ่มต้นรวมทั้งลดปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ได้ แต่ในการลงเชื้อปริมาณมากบนอาหารแข็งนั้นจะต้องนำเส้นใยของเชื้อราไป homogenize ก่อนเพื่อให้เส้นใยของเชื้อสามารถกระจายตัวได้อย่างทั่วถึงบนอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. 2537 . ภัยมืดจากสารพิษ. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ เชษฐ สตูดิโอ แอน กราฟิคดีไซน์ จำกัด

เชิดชัย เชี่ยวธีรกุล, ประสิทธิ์ แซ่ลี้ และปนัดดา แซ่อึ้ง. 2519. สีแดงจากข้าว (อั้งคัก). วารสารอาหาร 8(1) : 51-55.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์ . 2546 . จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม . ครั้งที่ 3 .กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นิสา บุตรดา . 2537 . การกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส กบ. 11304 ให้เป็นสายพันธุ์ไม่สร้างสี และเปรียบเทียบสมบัติบางประการกับสายพันธุ์พ่อแม่ สายพันธุ์กลายพันธุ์สีแดง และสีเหลือง . วิยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุษบา ยงสมิทธ์ . 2534 . การปรับปรุงด้านปริมาณและคุณภาพของการผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลัง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุษบา ยงสมิทธ์ . 2542 . จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี . ครั้งที่ 2 . กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

วรรณภา ทาบโลกา, บุษบา ยงสมิทธ์ . 2527 . การศึกษาการใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตสีผสมอาหารและเอนไซม์ย่อยแป้งโดยราโมแนสคัสในสภาพ submerged culture. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

สุทธิ ภมรสุมิตร. 2544 . เอกสารประกอบการเรียนวิชา Food Additives . ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

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

Ainswarth, G.C., F.K. Sparrow and A.S. Sussman. 1973. The Fungi. Vol. IV A. Academic Press, Inc., New York. 621 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bach TJ. 1986. IIydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis? Lipids 21 : 82-88.

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

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

Carels, M. and D. Shepherd. 1977. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged, skaken culture. Can. J. Microbiol. 23 : 1360-1372.

Chiu, S.W. and S.M. Chan. 1992. Production of pigments by *Monascus purpureus* using sugar-cane bagasse in roller bottle cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. 8 : 68-70.

Chiu, S.W. and Y.K. Poon. 1993. Submerged production of *Monascus* pigments. Mycologia 85(2) : 214-218.

Endo A. 1979 . Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot (Tokyo).* Aug; **32**(8):852–854.

Endo, A. & Hasumi, K. (1997). Mevinic acids. In *Fungal Biotechnology*, pp. 162-172. Edited by T. Anke. Weinheim: Chapman & Hall.

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

Fink-Gremmels, J. and L. Leistner. 1989. *Monascus* product, pp. 260-263. *In* G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (eds.). Natural Food Colorants. Blackie and Son., New York. 280 p.

Fink-Gremmels J, Leirtner L. 1989 .Biologische wirkung von *Monascus purpureus*. Fleischwirtschraft; 69 (1): 115-22.c

Fischbach, R., Laufenberg, G., Kunz, B. 2000 . Generation of Natural Flavours by Solid-State Fermentation of Food Industry By-Products. Biotechnology 2000, Berlin, Germany. Frankfurt/M: Dechema e.V. 2000, Vol.4, pp. 266-268

Han, O. H. 1990a. Optimization of *Monascus* pigment production in solid-state fermentation, pp. 260-263. *In* G.A.F. Hendry and J.D. Houghton (eds.). Natural Food Colorants. Blackie and Son., New York. 280 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Haws, E.J., J.S.E. Holker., A. Kelly, A.D.G. Powell and A. Robertson. 1959. The chemistry of fungi part XXXVII. The structure of rubropunctatin. J. Chem. Soc. 1959 : 3598-3610.

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

Hesseltine, C.W. 1965. A millenium of fungi, food and fermentation. *Mycologia*, 57, 149-179.

Hiroi T., T. Shima, T. Suzuki, M. Tsukioka, and O. Naghir. 1975 . Hyperpigment-productive mutant of *Monascus anka* for solid culture Agr. Biol. Chem. 43 , 1975-1976

Hwan, C.H. and C.C. Chou. 1999. Volatile components of the Chinese fermented soya bean curd as affected by the addition of ethanol in ageing solution. J. Sci. Food. Agric. 79 : 243-248.

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

Ju°zlová P, Martínková L and Kr˘en V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. J Ind Microbiol 1996; 16 : 163-170.

Kranz, C., C. Panitz and B. Kunz. 1992. Biotransformation of free fatty acid in mixtures to methyl ketones by *Monascus purpureus*. Appl. Micro. Biotechnol. 36 : 436-439.

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. Iizuka. 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 43(3) : 671-676.nts of tofunyu. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 62 : 1201-1205.

Lin, C.W. and W.L. Chou. 1998. Strain screening of *Monascus* sp. on oriental type cheese manufacturing and its mycological profile. *Journal of Chinese Animal Science* 27, 143-162.

Lotong, N. and P. Suwannarit. 1990. Production of Chainese red rice in plastic bag. NRCT,NUS,DOST-JSPS Joint Seminar on Biotechnology December 22-24,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Nakanishi, K., M. Ohashi., S. Kumasaki and S. Yamamura. 1959. Monascorubrin structure of monascorubrin and monascamine. J. Am. Chem. Soc. 81 : 6339-6340.

Palo, M.A.L., Vidal-Adeva and M.M. Leticia. 1960. A study on angkak and its production. Philippenes J. Sci. 89 : 1-19

Rashbaum SA and EMY Barrington. 1983. Natural red coloring prepared from an oat substrate. US Patent 4418081.102

Sabater-Vilar M., Roel F.M. and Fink-Gremmels J. 1999. Mutagenicity of commercial fermentation products and the role of citrinin contamination. Mutation Research 444 ; 7-16.

Shephered, D. and M. Carels. 1983. Product formation and differentiation in fungi, pp. 315-535. *In* J.E. Smith (ed.). Fungal Differentation. Marcel Dekker, Inc., New York.

Shin, C.-S., H.-J. Kim, M.-J. Kim, and J.-Y. Ju. 1998. Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when coclutured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. Biotechnol. Bioeng. 59, 576 - 581

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

Su, Y.C. and Wong W.H. 1983. Chinese red rice : anka, pp.547-553. *In* Steinkraus, K.H., Cullen, R.E., Pederson, C.S., Nellis, L.F. and Gavitt, B.K. (eds.). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Marcel Dekker, New York.

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

Von Arx, J.A. 1974. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. J. Crammer, Verlag. 315 p.

Wang, X. S., Diener, K., Manthey, C. L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C. N., Chan-Hui, P. Y., Mantlo, N., *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23668-23674.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wong, H.C. 1982. Antibiotic and pigment production by *Monascus purpureus*. Cited by T.F. Lin and A.L. Demain. Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigment. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 70-75.

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

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

Yoshimura, M., S. Yamanaka, K. Mitsugi and Y. Hirose. 1975. Production of *Monascus* pigment in submerged culture. Agr. Biol. Chem. 39 : 1789-1795.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การทำข้าวแดง (นิสา , 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อาหาร MYS (Malt yeast extract starch agar)

เปปโตน	5.0	กรัม
ยีสต์สกัด	3.0	กรัม
มอลต์สกัด	3.0	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	20.0	กรัม
วุ้น	12-15	กรัม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวมเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
การวิเคราะห์

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น

โดยใช้สูตร เปอร์เซ็นต์ความชื้น = $\frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$

ตัวอย่างคำนวณหาสารสี

เก็บตัวอย่างข้าว 1 กรัม สกัดสารสีเอททานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ที่ค่าการเจือจาง 20 เท่า วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.693 ABS ส่วนข้าวที่สกัดสีแล้วนำไปอบแห้งและชั่งน้ำหนักแห้งได้ 0.4749 กรัม สามารถนำมาคำนวณปริมาณสารสีได้ดังนี้

ปริมาณสี	20 X 0.693	=	13.86 unit/ml.
ปริมาณสารสีทั้งหมด	40 X 13.86 unit.ml./ml.	=	554.4 unit
น้ำหนักแห้ง 0.4749 กรัม		ได้สารสี	554.4 unit
ในข้าว 1 กรัมมีสารสีทั้งหมด		=	1167.4037 U/g-dry weight

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

รูปภาพแสดงการทดลอง

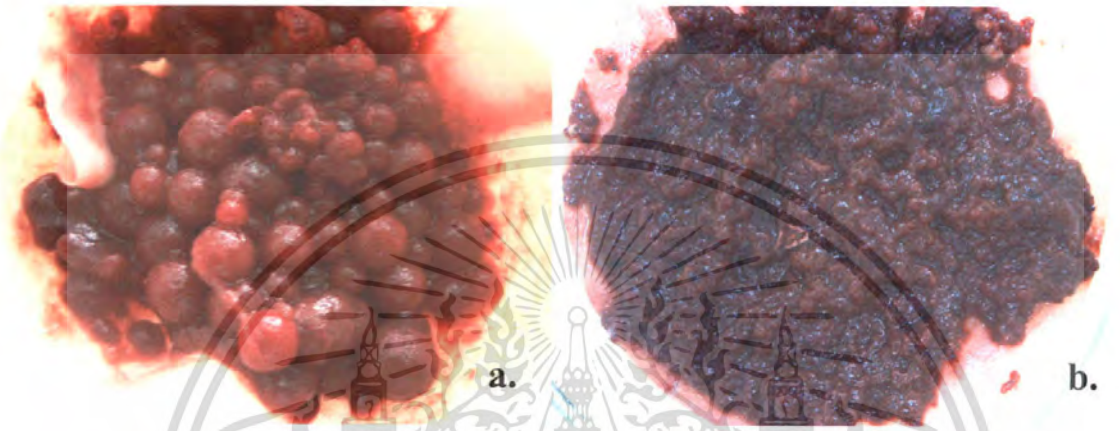


Figure The pellet of *M. purpureus* by cultivation in MYS broth (A) 4-day age (B) 7-day age

Figure The red rice product after 4-week cultivation by *M. purpureus* in solid state fermentation with rotated incubation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Figure The pigment extraction from red rice by 50% ethanol on shaker 200 rpm for 2 hr.

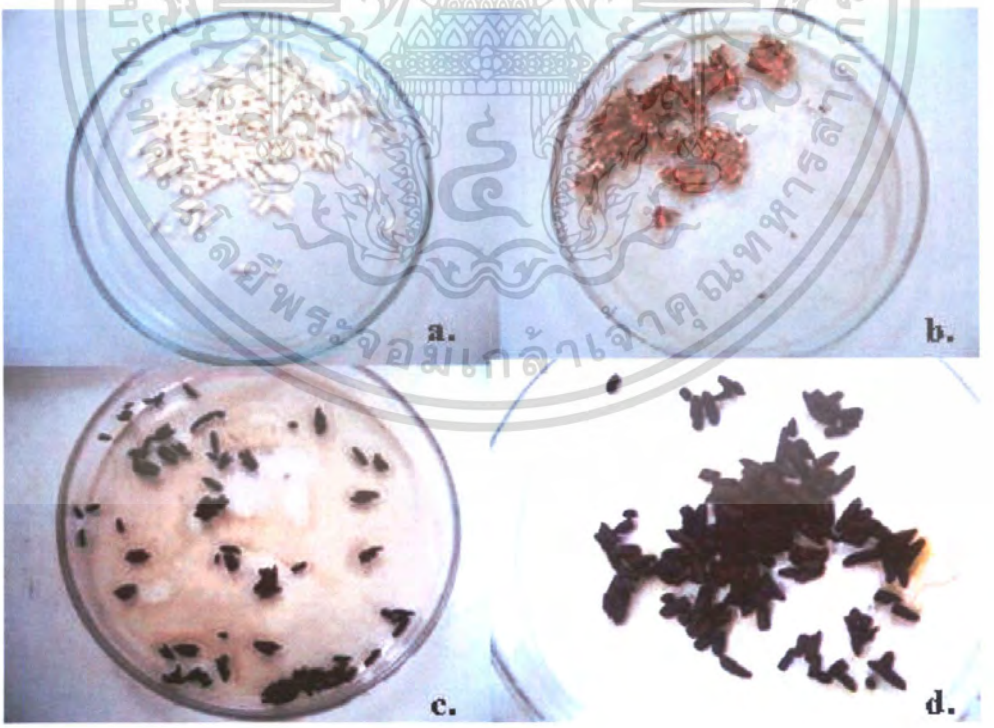


Figure The red rice production by solid state fermentation of *M. purpureus* at (A) 0-week, (B) 1- week, (C) 2- week and (D) 4-week of cultivation in rotated bottle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

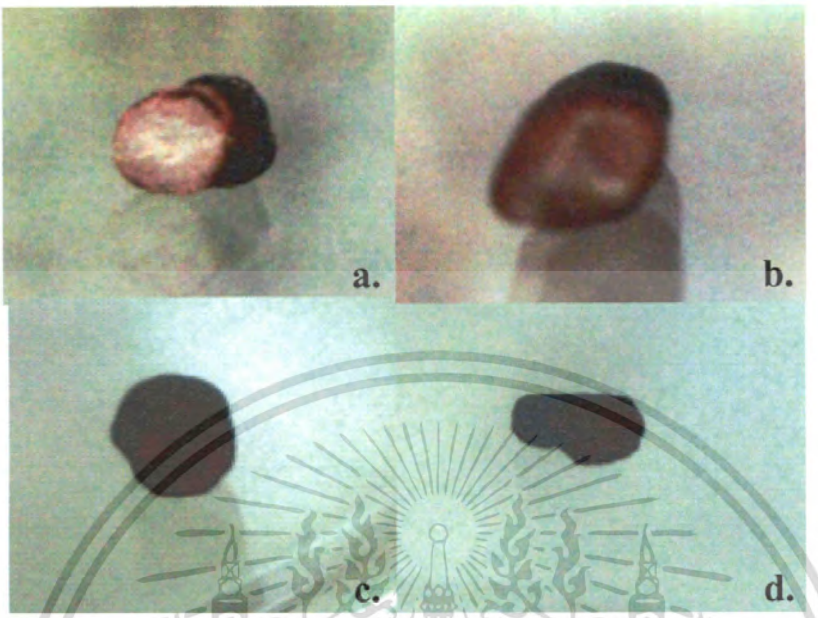


Figure The growth of *M. purpureus* on the surface of rice grain at (A) 1-week, (B) 2-week, (C) 3-week and (B) 4-week of solid state cultivation in rotated bottle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้