

ผลของรูปแบบการเติมอากาศต่อการเจริญและอัตราการผลิตสีแดงของเชื้อ
Monascus purpureus บนข้าวด้วยถังหมักแบบแพคเบด

Effect of Aeration Forms on Growth and Red Pigment Production of
Monascus purpureus on Rice using Packed Bed Bioreactor

นางสาวชลลดา	จิระสมบูรณ์ยิ่ง
นางสาวพิชญ์พิมล	จันทร์กระจ่าง
นางสาวเมธพร	รักษาสีมันต์
นางสาวศิริวรรณ	กรทองนิมิต

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2557

ผลของรูปแบบการเติมอากาศต่อการเจริญและอัตราการผลิตสีแดงของเชื้อ
Monascus purpureus บนข้าวด้วยถังหมักแบบแพคเบด

Effect of Aeration Forms on Growth and Red Pigment Production of
Monascus purpureus on Rice using Packed Bed Bioreactor

นางสาวชลลดา	จีระสมบุญยิ่ง
นางสาวพิชญ์พิมล	จันทร์กระจ่าง
นางสาวเมธาพร	รักษาสีมันต์
นางสาวศิริวรรณ	กรทองนิมิต

ปฏิญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2557

EFFECT OF AERATION FORMS ON GROWTH AND RED PIGMENT
PRODUCTION OF *MONASCUS PURPUREUS* ON RICE USING
PACKED BED BIOREACTOR

MISS CHOLLADA	JEERASOMBOONYING
MISS PITPIMOL	JANKRAJANG
MISS MAYTAPORN	RUKSASEEMUNT
MISS SIRIWAN	KORNTHONGNIMIT

THIS THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF FOOD ENGINEERING
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
FACULTY OF ENGINEERING
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2014

ปริญญาานิพนธ์ปีการศึกษา 2557

สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร

คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เรื่อง ผลของรูปแบบการเติมอากาศต่อการเจริญและอัตราการผลิตสีแดงของเชื้อ *Monascus purpureus* บนข้าวด้วยถังหมักแบบแพคเบด

Effect of aeration forms on growth and red pigment production of *Monascus purpureus* on rice using packed bed bioreactor

ผู้จัดทำ

- | | | |
|--------------------|-----------------|----------|
| 1. นางสาวชลลดา | จิระสมบูรณ์ยิ่ง | 54010287 |
| 2. นางสาวพิชญ์พิมล | จันทร์กระจ่าง | 54010911 |
| 3. นางสาวเมธาพร | รักษาสีมันต์ | 54011037 |
| 4. นางสาวศิริวรรณ | กรทองนิมิต | 54011272 |

(ดร. อธิพันธ์ ฉายศิริโชติ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ปริญญาานิพนธ์เรื่อง	ผลของรูปแบบการเติมอากาศต่อการเจริญและอัตราการผลิตสีแดงของเชื้อ <i>Monascus purpureus</i> บนข้าวด้วยถังหมักแบบแพคเบด		
โดย	นางสาวชลลดา	จีระสมบูรณ์ย้ง	54010287
	นางสาวพิชญ์พิมล	จันทร์กระจ่าง	54010911
	นางสาวเมธาพร	รักษาสีมันต์	54011037
	นางสาวศิริวรรณ	กรทองนิมิต	54011272
ปริญญาานิพนธ์	วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิศวกรรมอาหาร ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		
ปีการศึกษา	2557		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. ชีรินทร์ ฉายศิริโชติ		

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเติมอากาศต่อการเจริญและการผลิตสารสีแดงของเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3615 บนข้าวเสาไห้หุงสุกโดยการหมักในถังหมักแบบแพคเบด ซึ่งทำการศึกษาที่ลักษณะการเติมอากาศ 2 รูปแบบ คือ แบบคงที่ (0.25 0.35 และ 0.45 ลิตรต่อนาที่) และแบบไม่คงที่ (เริ่มการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที่ และปรับเป็น 1) 0.25 ลิตรต่อนาที่ และ 2) 0.45 ลิตรต่อนาที่ เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary) จากผลการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อราซึ่งวัดด้วยวิธีการวัดปริมาณกลูโคซามีในผงข้าวแดง พบว่า การเจริญของเชื้อราเข้าสู่ช่วงระยะ stationary ในวันที่ 2 – 3 ของการหมัก จากค่าอัตราการเจริญจำเพาะในระยะ exponential พบว่า ที่อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที่มีค่าสูงกว่าที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 และ 0.25 ลิตรต่อนาที่ ตามลำดับ จากผลการทดลอง เชื้อราเริ่มการผลิตสารสีแดง เมื่อเชื้อราเข้าสู่ระยะ stationary และความเข้มของสารสีแดงจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยอัตราการเติมอากาศที่ 0.35 ลิตรต่อนาที่มีความเข้มของสีแดงมากที่สุด รองลงมาคือ 0.45 และ 0.25 ลิตรต่อนาที่ ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างของการผลิตสีแดงระหว่างการหมักด้วยอัตราการเติมอากาศแบบคงที่และแบบไม่คงที่

คำสำคัญ ; การหมักบนอาหารแข็ง, การเติมอากาศ, ถังหมักแบบแพคเบด, *Monascus purpureus*

Thesis Title	Effect of aeration forms on growth and red pigment production of <i>Monascus purpureus</i> on rice using packed bed bioreactor		
By	Miss Chollada	Jeerasomboonying	54010287
	Miss Pitpimol	Jankrajang	54010911
	Miss Maytaporn	Ruksaseemunt	54011037
	Miss Siriwan	Kornthongnimit	54011272
Thesis for	Bachelor's Degree of Food Engineering Department of Food Engineering Faculty of Engineering King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang		
Year	2014		
Advisor	Dr. Teerin Chysirichote		

Abstract

The objective of this research is to study the effect of aeration on the growth and the red pigment production of *Monascus purpureus* TISTR 3615 on rice in packed bed bioreactor. The work were divided into 2 parts; 1) constant aeration rate (0.25, 0.35 and 0.45 liters per minute (LPM)) and 2) inconstant aeration rates (0.35 LPM at the initial time and then change to a) 0.25 LPM and b) 0.45 LPM when the growth become stationary phase). The results of growth, which was analyzed by glucosamine measurement indicated that the exponential phase change to the stationary phase at the second or third day of fermentation. The highest value of specific growth rate was found in the run with 0.45 LPM aeration followed by the run with 0.35 and 0.25 LPM ones, respectively. The red pigment production occurred in a stationary phase and its concentration increased with the fermentation time. The maximum red pigment production was obtained when the rice was fermented with the 0.35 LPM aeration, higher than the 0.45 and the 0.25 LPM aeration, respectively. Moreover, there was no difference in the red pigment production between using constant and inconstant aerations.

Keywords ; Solid state fermentation, Aeration, Packed bed bioreactor,
Monascus purpureus

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีโดยได้รับความกรุณาและความอนุเคราะห์จาก ดร. อธิรินทร์ ฉายศิริโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำปรึกษาแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย ช่วยแนะแนวทางในการปรับปรุงข้อบกพร่องต่างๆ อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงาน รวมไปถึงให้ความรู้และประสบการณ์ในการทำงานที่ดี ให้นักศึกษาได้รู้จักกระบวนการคิดวิเคราะห์ผลและประสบการณ์ในการทำวิจัยอีกมากมาย

ขอขอบคุณ อ.สมัคร รักแม่ สำหรับแง่คิดข้อแนะนำและคำปรึกษาในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.สาธิป รัตนภาสกร ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงษ์ ดร.เอกพงษ์ ชีวิตโสภณ ดร.เจษฎา ชัยโฉม อ.สมัคร รักแม่ และ ดร.เอกภพ ไพรรัมย์ กรรมการสอบปริญญานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำและแนวคิดต่างๆ เพื่อนำไปแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนเล่มปริญญานิพนธ์

ขอขอบคุณ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณ คุณอำนาจ คูตะคุ (พี่แมน) คุณวราภรณ์ มาไพศาลทรัพย์ (พี่นุ้ย) คุณบุญนำ ผลโพธิ์ (พี่บุญนำ) และคุณสุธัญญา ถาดนาค (พี่โอ) เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการและธุรการ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านการดำเนินงานวิจัยและข้อมูลในด้านเอกสารในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ บิดา มารดา ครอบครัวและเพื่อนๆนักศึกษา ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำต่างๆ และให้กำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากปริญญานิพนธ์เล่มนี้ คณะผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

คณะผู้วิจัย

นางสาวชลลดา	จิระสมบุญยิ่ง
นางสาวพิชญ์พิมล	จันทร์กระจ่าง
นางสาวเมธาพร	รักษาสีมันต์
นางสาวศิริวรรณ	กรทองนิมิต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	1
1.2 จุดประสงค์ของโครงการ	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตงานวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เชื้อรา	3
2.1.1 เชื้อรา	3
2.1.2 การวัดการเจริญของเชื้อรา	6
2.1.3 ลักษณะของเชื้อรา <i>Monascus</i> spp.	8
2.1.4 สีจากเชื้อรา	10
2.2 ข้าวและการย่อยสลายโดยเชื้อรา	11
2.2.1 ข้าว	11
2.2.2 เอนไซม์อะไมเลส	13
2.3 การหมัก	15
2.3.1 การหมัก	15
2.3.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมักบนอาหารแข็ง	15
2.3.3 การเติมอากาศ	18
2.4 ถังหมักในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง	19
2.4.1 ไม่มีทั้งการผสมซัสเตรทและการเติมอากาศ	20
2.4.2 ไม่มีการผสมซัสเตรท แต่มีการเติมอากาศ	20
2.4.3 มีการผสมซัสเตรท แต่ไม่มีการเติมอากาศ	21
2.4.4 มีการผสมซัสเตรทและมีการเติมอากาศ	21
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุอุปกรณ์	25
3.1.1 วัสดุ	25
3.1.2 อุปกรณ์	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 วิธีการดำเนินงาน	28
3.2.1 การเตรียมเชื้อ	28
3.2.2 การเตรียมซัพสเตรท	28
3.2.3 การหมัก	28
3.2.4 การวิเคราะห์	29
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน	31
4.1.1 การเจริญของเชื้อรา	31
4.1.2 การวิเคราะห์อัตราการผลิตสารสีแดง	32
4.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นสารสีแดง	38
4.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตสารสีแดง	44
4.4 การวิเคราะห์ทนเกลือของสารสีแดง	44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	51
5.2 ข้อเสนอแนะ	51
บรรณานุกรม	52
ภาคผนวก	55
ภาคผนวก ก วิธีการทดลอง	
ก.1 วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน	56
ก.2 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer	57
ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบ	
ข.1 ความชื้น	58
ข.2 การทำกราฟสารมาตรฐาน	63
ข.3 การวัดปริมาณกลูโคซามีน และสารสีแดง	64
ภาคผนวก ค รูปภาพอุปกรณ์	
ค.1 ถังหมัก	70

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 น้ำหนักของเชื้อราที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณ Ergosterol ในแต่ละช่วงเวลาของการหมักเชื้อรา <i>Monascus</i> sp. LPB 31 บนข้าวในคอลัมน์แก้ว	7
ตารางที่ 2.2 ปริมาณโปรตีนในแต่ละช่วงเวลา	8
ตารางที่ 2.3 ปริมาณกลูโคซามีนในแต่ละช่วงเวลาจากการหมักเชื้อรา <i>Monascus purpureus</i> บนข้าวเป็นเวลา 240 ชั่วโมง	8
ตารางที่ 2.4 สารเมทาบอลไลต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อรา <i>Monascus</i> spp.	10
ตารางที่ 2.5 เชื้อราผลิตสี	10
ตารางที่ 2.6 ฟังไจที่ให้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม	11
ตารางที่ 2.7 ปริมาณสารอาหารในข้าว	13
ตารางที่ 2.8 ผลของสายพันธุ์ข้าวต่อการสร้างสี โดย <i>Monascus purpureus</i> CMU-KU	23
ตารางที่ 2.9 ผลของความชื้นเริ่มต้นของซบสเตอร์ต่อการผลิตสีโดย <i>Monascus purpureus</i> CMU-KU บนข้าวเจ้า	23
ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญจำเพาะ	32

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1	ลักษณะของรา	4
รูปที่ 2.2	ระยะการเจริญของเชื้อ	5
รูปที่ 2.3	เมทาบอลิซึมปฐมภูมิและเมทาบอลิซึมทุติยภูมิ	5
รูปที่ 2.4	น้ำหนักของเชื้อในแต่ละช่วงเวลาของการหมักเชื้อรา <i>Aspergillus</i> strain S14 บนรำข้าวสาลีในขวดรูปชมพู่	6
รูปที่ 2.5	องค์ประกอบภายในผนังเซลล์ซึ่งประกอบด้วย เออโกสเตอรอล ไคติน และ โปรตีน โดยการวัดการเจริญของเชื้อราทางอ้อมจะอาศัย การวัดองค์ประกอบภายในผนังเซลล์	7
รูปที่ 2.6	เชื้อราโมแนสคัส	9
รูปที่ 2.7	กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงและซีทรินินโดยเชื้อรา <i>M. ruber</i>	12
รูปที่ 2.8	(1) โครงสร้างอะไมโลส และ (2) โครงสร้างอะไมโลเพกติน	14
รูปที่ 2.9	การถ่ายเทออกซิเจนระหว่างการหมักในอาหารเหลว	19
รูปที่ 2.10	รูปแบบการเติมอากาศในการหมักในอาหารเหลวโดย (1) การกวนและ (2) เติมอากาศ	19
รูปที่ 2.11	(1) รูปแบบการเติมอากาศในการหมักบนอาหารแข็ง และ (2) การถ่ายเท ออกซิเจน ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งที่มีการเติมอากาศแต่ไม่มีการผสม	20
รูปที่ 2.12	ถังหมักแบบถาด	20
รูปที่ 2.13	(1) และ (2) ถังหมักแบบแพคเบต	21
รูปที่ 2.14	(1) ถังหมักแบบไบกวน (2) ถังหมักแบบหมุน	21
รูปที่ 2.15	(1) ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบต (2) ถังหมักแบบมีไบกวนแนวตั้ง	22
รูปที่ 2.16	การผลิตสีและการเจริญของ <i>Monascus purpureus</i> KACC 424300 จากการหมักบนซังข้าวโพด (1) อุณหภูมิการหมักที่ต่างกัน (2) ค่า pH เริ่มต้นของซัสเตรทต่างกัน	24
รูปที่ 2.17	การผลิตสารสี และการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของอาหารเหลว	24
รูปที่ 3.1	ถังหมักแบบแพคเบตที่ออกแบบสำหรับการทดลอง	27
รูปที่ 3.2	ระบบการหมักแบบเติมอากาศ	28
รูปที่ 3.3	ตำแหน่งการเก็บตัวอย่าง (1) ภาพมุมบน (2) ภาพตัดขวาง	29
รูปที่ 4.1	ปริมาณกลูโคซามีนที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	33
รูปที่ 4.2	ปริมาณกลูโคซามีนที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	34
รูปที่ 4.3	ปริมาณกลูโคซามีนที่อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	35

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 4.4 ปริมาณกลูโคซามีนในการหมักแบบเริ่มต้นการหมัก ด้วยอัตราการเติม 0.35 ลิตรต่อนาที่ จากนั้นลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	36
รูปที่ 4.5 ปริมาณกลูโคซามีนในการหมักแบบเริ่มต้นการหมัก ด้วยอัตราการเติม 0.35 ลิตรต่อนาที่ จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	37
รูปที่ 4.6 ปริมาณสารสีแดงที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	39
รูปที่ 4.7 ปริมาณสารสีแดงที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	40
รูปที่ 4.8 ปริมาณสารสีแดงที่อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	41
รูปที่ 4.9 ปริมาณสารสีแดงในการหมักแบบเริ่มต้นการหมัก ด้วยอัตราการเติม 0.35 ลิตรต่อนาที่ จากนั้นลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	42
รูปที่ 4.10 ปริมาณสารสีแดงในการหมักแบบเริ่มต้นการหมัก ด้วยอัตราการเติม 0.35 ลิตรต่อนาที่ จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	43
รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตสีที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	45
รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตสีที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	46
รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตสีที่อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2	47
รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตสีในการหมักแบบเริ่มต้น การหมักด้วยอัตราการเติม 0.35 ลิตรต่อนาที่ จากนั้นลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที่ (1) ถังที่ 1 และ (2) ถังที่ 2	48
รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตสีในการหมักแบบเริ่มต้น การหมักด้วยอัตราการเติม 0.35 ลิตรต่อนาที่ จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที่ (1) ถังที่ 1 และ (2) ถังที่ 2	49
รูปที่ 4.16 ความเข้มของสารสีแดงเมื่อแช่สารละลายเกลือ	50

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

Monascus purpureus เป็นเชื้อราที่สามารถสร้างรงควัตถุสีแดง เหลือง และส้ม โดยสามารถเจริญได้ดีบนผิวของอาหารแข็ง ซึ่งการหมักเชื้อราบนอาหารแข็งนี้เรียกว่า solid state fermentation, SSF (มีชัย, 2552) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเชื้อราชนิดนี้บนข้าวหุงสุก คือ ข้าวแดง (Red mold rice) หรือที่รู้จักในชื่อว่า อังกัก (Angkak, Angkhak) หรือ อังกา (Anka) ในภาษาจีน สีแดงจากเชื้อ *Monascus purpureus* มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสีผสมอาหาร (Food colorant) ในผลิตภัณฑ์ เช่น สาเก ไวน์แดง เต้าหู้ยี้ มิโอะโซ โยเกิร์ต และผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื่องจากสีแดงจากเชื้อ *Monascus purpureus* ใช้เป็นสีที่ได้จากธรรมชาติและมีความปลอดภัยกว่าสีสังเคราะห์ที่ผลิตโดยวิธีทางเคมี อีกทั้งยังมีคุณสมบัติทนต่อความร้อนและความเป็นกรดต่างจึงเป็นที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม (กมลวรรณ และดวงใจ, 2555) ซึ่งโดยทั่วไปในระดับอุตสาหกรรมได้จากการหมักในอาหารเหลว โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นซับสเตรท แต่เนื่องจากต้องมีการควบคุมสถานะและค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงจึงมีการพัฒนาวิธีการหมักโดยใช้อาหารแข็ง ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้หมักข้าวแดงในระดับครัวเรือน ซับสเตรทที่นำมาใช้หมักเพื่อผลิตสีแดงมีหลายชนิด เช่น มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง กากผลไม้ และข้าว ซึ่งข้าวนั้นก็เป็นหนึ่งในซับสเตรทของแข็งที่นิยมใช้ในการหมัก โดยข้าวเสาไห้ (เจ๊กเซย) ถือเป็นซับสเตรทที่ดีเนื่องจาก องค์ประกอบของข้าวเสาไห้ มีอะไมโลส ร้อยละ 27-28 ด้วยองค์ประกอบของอะไมโลส จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูง เมื่อหุงสุกข้าวจะร่วนเป็นเม็ด ไม่เกาะกันเป็นก้อน (กรมทรัพย์สินทางปัญญา, 2552) เหมาะกับการเจริญของเชื้อที่จะเจริญบนซับสเตรทที่เป็นของแข็ง (มีชัย, 2552) และในท้องตลาดข้าวเสาไห้มีราคาถูกเมื่อเทียบกับข้าวขาวชนิดอื่น การนำข้าวเสาไห้มาใช้เป็นซับสเตรทในการหมักสารสีแดง จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้สินค้า

โดยทั่วไปกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมนั้นจะเริ่มจากการเตรียมกล้าเชื้อ จากนั้นจะนำกล้าเชื้อไปผสมกับข้าวหุงสุกในบ่อหมัก มีการเติมน้ำเพื่อรักษาระดับความชื้น 2-3 ครั้งต่อระยะเวลาการหมัก 1 ครั้ง และกวนเป็นครั้งคราวเพื่อลดอุณหภูมิในการหมัก หลังจากนั้นจะทำการสกัดเพื่อแยกสีและนำไปทำแห้งในขั้นตอนสุดท้าย (มีชัย, 2552) โดยถังหมักที่ใช้ในกระบวนการหมักก็มีหลายประเภท เช่น ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด ถังหมักแบบหมุน ถังหมักแบบถาดและ ถังหมักแบบแพคเบด ซึ่งถังหมักแบบแพคเบดนั้นเป็นถังหมักที่พัฒนามาจากถังหมักแบบถาด เพื่อให้สามารถควบคุมความร้อนภายในถังหมักให้อยู่ในสถานะที่ต้องการควบคุมได้ด้วยการเติมอากาศ นอกจากนี้ถังหมักแบบแพคเบดยังมีข้อดี คือ ไม่ทำให้เส้นใยของเชื้อราเกิดความเสียหาย เนื่องจากไม่มีการกวนภายในถังหมัก (วสันต์ และคณะ, 2545) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาการเติมอากาศที่มีผลต่อการเจริญและอัตราการผลิตสีของเชื้อราที่ยังมีการศึกษาไม่แพร่หลาย โดยศึกษาการหมักเชื้อ *Monascus purpureus* บนข้าวหุงสุกด้วยถังหมักแบบแพคเบดขนาดห้องปฏิบัติการ

1.2 จุดประสงค์ของโครงการงาน

ศึกษาผลของการเติมอากาศต่อการเจริญ และการผลิตสารสีแดงของเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3615 บนข้าวเสาไห้หุงสุกโดยการหมักในถังหมักแบบแพคเบต

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ถังหมักแบบแพคเบตในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง
- 1.3.2 รูปแบบการเติมอากาศที่เหมาะสมกับการผลิตสีแดงของเชื้อ *Monascus purpureus* TISTR 3615 ด้วยถังหมักแบบแพคเบตขนาดห้องปฏิบัติการ

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

- 1.4.1 ออกแบบถังหมักแบบแพคเบตให้มีขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 16 ซม. สูง 17 ซม. เพื่อบรรจุข้าวหุงสุกสูง 13 ซม. (ปริมาตรของข้าวในการหมักแต่ละครั้ง = 2.61 ลิตร)
- 1.4.2 ซับสเตอร์ทที่ใช้ในการหมัก คือ ข้าวเสาไห้ (ขนาด 8-16 mesh) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 12 มาตรฐานเปียก หุงสุกที่อุณหภูมิ 121 ซ เป็นเวลา 20 นาที (ความชื้นร้อยละ 55 มาตรฐานเปียก)
- 1.4.3 ตัวแปรต้น คือ สภาวะการเติมอากาศ 2 แบบ ได้แก่
 - 1.4.3.1 แบบคงที่ตลอดการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 0.35 และ 0.45 ลิตรต่อ นาที
 - 1.4.3.2 แบบอัตราการเติมอากาศไม่คงที่ คือ
 - 0.35 ลิตรต่อ นาที ตั้งแต่เริ่มต้น จนกระทั่งเข้าระยะ stationary จากนั้นลด อัตราการเติมอากาศเป็น 0.25 ลิตรต่อ นาที
 - 0.35 ลิตรต่อ นาที ตั้งแต่เริ่มต้น จนกระทั่งเข้าระยะ stationary จากนั้นเพิ่ม อัตราการเติมอากาศเป็น 0.45 ลิตรต่อ นาที
 ตัวแปรตาม คือ การเจริญของเชื้อราโดยการวัดปริมาณกลูโคซามีน และการผลิต สีแดงของเชื้อราจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร
- 1.4.4 ปัจจัยที่ควบคุม ได้แก่
 - 1.4.4.1 อุณหภูมิการหมักที่ 30^oซ
 - 1.4.4.2 ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ ที่อุณหภูมิ 30^oซ
 - 1.4.4.3 ข้าวเสาไห้ ขนาด 8-16 mesh หุงสุกด้วยความชื้นร้อยละ 55 มาตรฐานเปียก
 - 1.4.4.4 เชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3615

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อรา

2.1.1 เชื้อรา

เชื้อรา คือ จุลินทรีย์ในกลุ่มฟังไจ (Fungi) เป็นสิ่งมีชีวิตพหุยูคาริโอต (Eukaryote) เชื้อราเจริญได้ดีในภาวะที่มีอากาศ (Obligate aerobes) จึงพบการเจริญของเชื้อราบริเวณผิวหน้าของอาหาร เชื้อราจัดเป็นพหุยูคาริโอตที่ไม่มีคลอโรฟิลล์ สร้างอาหารเองไม่ได้ ต้องได้รับพลังงานและสารอาหารจากแหล่งอาหารอื่นด้วยการออกซิโดซซารอินทรีย์ ดูดซับสารจากสิ่งแวดล้อม หรือ เป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ หรือเป็นปรสิต (Symbionts)

เชื้อรามีหลายเซลล์เรียงเป็นเส้นใย เส้นใยทั่วไปมีความกว้าง 5-10 ไมโครเมตร และมีความยาวมาก เส้นใยประกอบด้วยผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์และช่องว่างภายในที่บรรจุโปรโทพลาซิมเยื่อหุ้มเซลล์เป็นเยื่อ 2 ชั้นล้อมรอบโปรโทพลาซิม ซึ่งเส้นใยของเชื้อราจะยึดติดกับอาหาร และสืบพันธุ์ รวมทั้งสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ คือสปอร์ (Spore) ส่วนผนังเซลล์ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส หรือ ไคติน ในราชั้นต่ำผนังเซลล์ประกอบด้วยเซลลูโลส (นงลักษณ์, 2544)

โครงสร้างเซลล์ของเชื้อรามีลักษณะทั่วไป เหมือนโครงสร้างเซลล์พืชซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างที่สำคัญดังนี้

1. ผนังเซลล์ (Cell wall) ผนังเซลล์ของฟังไจทำหน้าที่เช่นเดียวกับผนังเซลล์ของพืชชั้นสูง โดยจะทำให้เซลล์คงรูปร่างอยู่ได้ ในฟังไจส่วนมากจะมีผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกไคติน (Chitin; N-acetyl glucosamine) หรือเซลลูโลสกับไคติน นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ แตกต่างกันไปในแต่ละชนิด

2. อาหารสะสม ซึ่งมี 2 ชนิด คือ ไกลโคเจนและลิพิด ไกลโคเจนจะพบมากที่สุดที่เซลล์ทั่วไป และเซลล์ของโครงสร้างที่ใช้สืบพันธุ์ ส่วนลิพิดจะพบมากในสปอร์และเป็นอาหารที่นำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ดี โดยทั่วไปแล้วไกลโคเจนและลิพิดจะพบมากในเซลล์ที่เจริญเต็มที่มากกว่าเซลล์ที่มีอายุน้อย (ณัฐพงษ์, 2006)

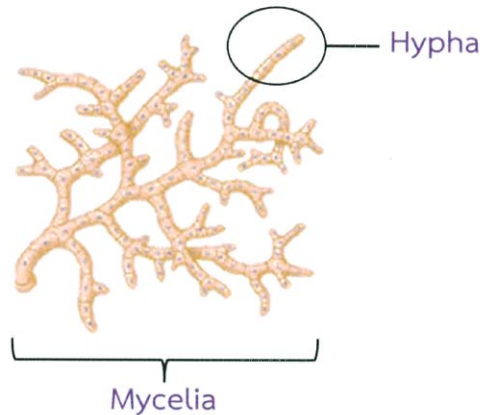
เส้นใยของเชื้อราแบ่งเป็น 3 แบบ คือ

- เส้นใยไม่มีผนังกัน เส้นใยจะเป็นท่อทะลุถึงกัน มีไซโทพลาซิมและนิวเคลียสต่อเนื่องกัน
- เส้นใยที่มีผนังกัน และมีนิวเคลียสอันเดียวในแต่ละเซลล์
- เส้นใยที่มีผนังกัน และมีนิวเคลียสหลายอันในแต่ละเซลล์ (นงลักษณ์, 2544)

เส้นใยของฟังไจมีการเจริญได้ 2 ทิศทาง ในตามขวางจะเจริญไปอย่างเต็มที่แล้วจึงหยุดเจริญ ส่วนการเจริญตามยาวของเส้นใยจะขยายยาวออกไปและแตกแขนงอย่างไม่จำกัดร่าบเท่าที่สภาวะแวดล้อมยังเหมาะสม เชื้อราบางชนิดจะมีการเจริญเติบโตของเส้นใยที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 15 มิลลิเมตร เส้นใยที่มารวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า ไมซีเลียม ซึ่งจะประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นไมซีเลียมที่ยึดเกาะกับอาหารเรียกว่า vegetative mycelium ทำหน้าที่ดูดสารอาหารไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ส่วนที่สองเป็นไมซีเลียมที่ยื่นไปในอากาศ เรียกว่า aerial mycelium หรือ reproductive mycelium ทำหน้าที่สร้างสปอร์เพื่อการสืบพันธุ์ (ณัฐพงษ์, 2006)

การเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อราส่วนใหญ่จะใช้สปอร์ ซึ่งอาจเกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศหรือไม่อาศัยเพศก็ได้ การสืบพันธุ์อาศัยเพศเกิดจากนิวเคลียสของเซลล์ 2 เซลล์รวมกันและสร้าง

เป็นสปอร์ขึ้นมา สปอร์แบบอาศัยเพศ ได้แก่ โอโอสปอร์ (Oospore) ไชโกสปอร์ (Zygospore) แอสโคสปอร์ (Ascospore) และเบสิดิโอสปอร์ (Basidiospore) ส่วนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะเป็นการสร้างสปอร์ขึ้นภายใน aerial hypha ซึ่งสปอร์ที่สร้างขึ้นจะสามารถกระจายออกสู่อากาศได้ง่าย เมื่อแรกสร้างสปอร์ สปอร์จะไม่มีสี แต่เมื่อสปอร์มีอายุมากขึ้นจะมีสีซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อราประเภทนั้นๆ (อินอะอะ, 2546)



รูปที่ 2.1 ลักษณะของรา
ที่มา : ดัดแปลงจาก

http://www.anselm.edu/homepage/jpitolcch/genbi101/diversity3_Fungi.html

จากรูปที่ 2.2 แสดงถึงการเจริญของเชื้อรา โดยในระยะ lag เป็นระยะที่เชื้อจะสร้างเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อย่อยสลายสารเพื่อให้เชื้อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้และพร้อมที่จะแบ่งตัว เชื้อจะเริ่มแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในระยะ exponential เริ่มคงที่ในระยะ stationary และตายในที่สุด (Death phase) (Johnson, 2003) จากรายงานของ Said และ Brooks (2010) พบว่าการหมัก *Monascus ruber* ICMP 15220 บนข้าวขาว เชื้อรามีการผลิตสีประมาณวันที่ 6 ของการหมักหรือในระยะ stationary ของการเจริญของเชื้อรา โดยในช่วงระยะ exponential นั้นสามารถหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) โดยหาจาก

$$dx / dt = \mu x \quad (2.1)$$

เมื่อ x = จำนวนของเซลล์หรือมวลของเซลล์

t = เวลา (วัน)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน⁻¹)

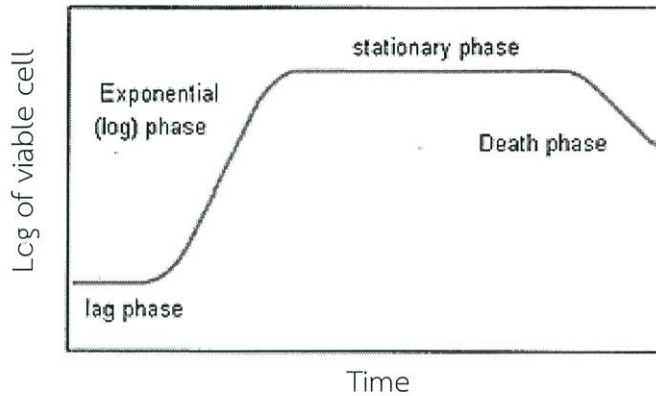
เมื่ออินทิเกรต สมการที่ 1 จะได้

$$X_1 = X_0 e^{\mu t} \quad (2.2)$$

เมื่อ X_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น

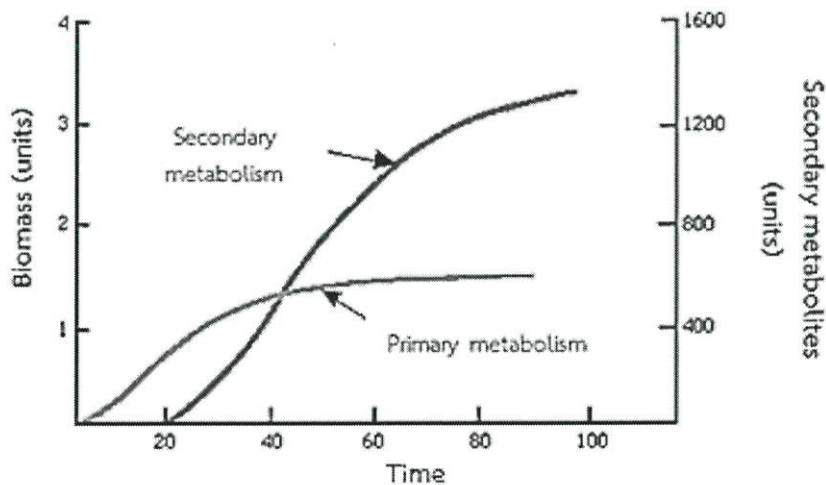
X_1 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t วัน

สารเมทาบอลไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolites) คือผลผลิตแรกจากการหมักในช่วงเริ่มต้น มีความจำเป็นต่อการเจริญและดำรงชีวิตของเชื้อรา เช่น เอทานอล กรดแลคติก และกรดอะซิติก ในขณะที่สารเมทาบอลไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) มีความจำเป็นต่อเชื้อราในด้านการดำรงชีวิตเท่านั้น โดยจะเกิดหลังจากการเจริญของเชื้อราสิ้นสุดลง หรือเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary ดังรูปที่ 2.3 มีความสำคัญคือ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Bennett และ Ciegler, 1983)



รูปที่ 2.2 ระยะการเจริญของเชื้อรา

ที่มา : ดัดแปลงจาก : <http://www.microbiologybytes.com/introduction/Biotechnology.html>



รูปที่ 2.3 เมทาบอลิซึมปฐมภูมิ และทุติยภูมิ

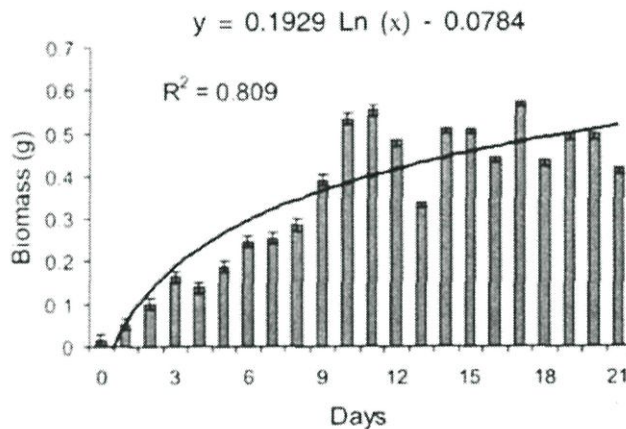
ที่มา : ดัดแปลงจาก : <http://www.microbiologybytes.com/introduction/Biotechnology.html>

2.1.2 การวัดการเจริญของเชื้อรา

2.1.2.1 การวัดทางตรง

1) การวัดน้ำหนักแห้งของเชื้อรา

การวัดน้ำหนักแห้งของเชื้อราเป็นการวัดน้ำหนักของเชื้อราโดยตรง โดยการนำตัวอย่างที่ได้จากการหมักมาเหวี่ยงแยกเชื้อราออกจากซบสเตรท จากนั้นเชื้อราจะถูกกรองโดยใช้กระดาษแล้วจึงนำไปอบแห้งเพื่อให้น้ำหนักคงที่ โดย Augustine และคณะ (2006) ได้ใช้วิธีนี้ในการวัดการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* strain S14 บนรำข้าวสาลี ระหว่างการหมักในขวดรูปชมพู่เป็นเวลา 21 วัน ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 น้ำหนักของเชื้อในแต่ละช่วงเวลาของการหมักเชื้อรา *Aspergillus* strain S14 บนรำข้าวสาลีในขวดรูปชมพู่
ที่มา : Augustine และคณะ (2006)

2.1.2.2 การวัดทางอ้อม

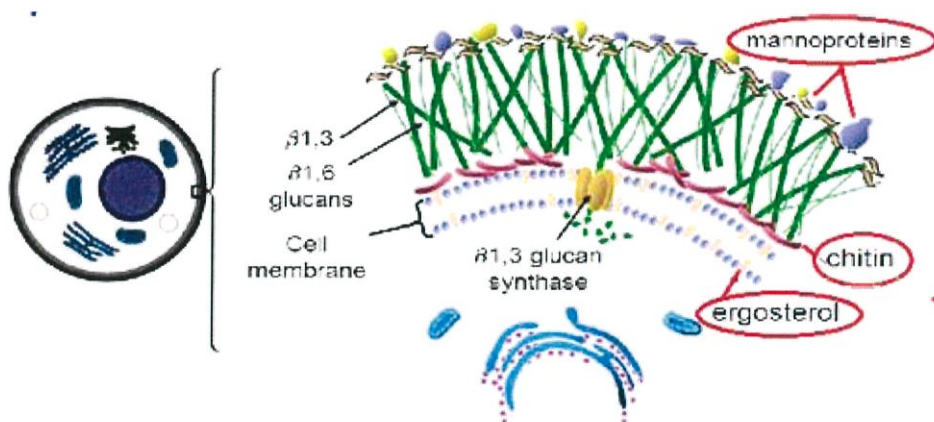
1) การวัดเออโกสเตอร์อล (Ergosterol)

เออโกสเตอร์อล เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ในกลุ่มราเส้นใย สปอร์ และเซลล์พืช ดังรูปที่ 2.5 มีการใช้เออโกสเตอร์อลอย่างกว้างขวางในการวัดการเจริญของเชื้อราในสภาวะแวดล้อมต่างๆ เพราะ ปริมาณเออโกสเตอร์อลมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักแห้งของเชื้อรา อย่างไรก็ตามปริมาณของเออโกสเตอร์อลในเชื้อรานั้นไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์เชื้อรา ช่วงเวลาการเพาะ ช่วงของการเจริญ และ สภาวะการเจริญ ถึงแม้ว่าปริมาณเออโกสเตอร์อลจะไม่คงที่แต่สามารถตรวจวิเคราะห์ค่าที่แน่นอนได้ เออโกสเตอร์อลเหมาะสำหรับการหาปริมาณการเจริญของเชื้อราในซบสเตรทแข็ง เพราะสัมพันธ์กับความยาวของเส้นใย (Pasanen และคณะ, 1999) โดยได้มีการศึกษาการวัดการเจริญของเชื้อราด้วยการวัดปริมาณเออโกสเตอร์อล โดยการหมักเชื้อรา *Monascus* sp. LPB 31 บนข้าวในคอลัมน์แก้วเป็นเวลา 300 ชั่วโมง เมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากการหมักมาวัดการเจริญของเชื้อรา โดยแสดงในรูปของปริมาณเออโกสเตอร์อล (Carvalho และคณะ, 2006) ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 น้ำหนักของเชื้อราที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณเออโกสเตอรอล ในแต่ละช่วงเวลาของการหมักเชื้อรา *Monascus* sp. LPB 31 บนข้าวในคอลัมน์แก้ว

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	น้ำหนักของเชื้อรา (มิลลิกรัมต่อคอลัมน์)
0	10
59	278
107	480
131	681
152	3,030
180	3,625
297	4,816

ที่มา : Carvalho และคณะ, 2006



รูปที่ 2.5 องค์ประกอบภายในผนังเซลล์ซึ่งประกอบด้วยเออโกสเตอรอล ไคติน และ โปรตีน โดยการวัดการเจริญของเชื้อราทางอ้อมจะอาศัยการวัดองค์ประกอบภายในผนังเซลล์

ที่มา : ดัดแปลงจาก <http://slideplayer.com/slide/774256/>

2) การวัดปริมาณโปรตีน

โปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์ดังรูปที่ 2.5 การวัดการเจริญของเชื้อราด้วยการวัดปริมาณโปรตีน ทำได้โดยวิธีการ Kjeldahl ซึ่งสารที่ทำปฏิกิริยาจะถูกแบ่งระดับวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีนของเชื้อราจะแสดงออกมาในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมของเชื้อรา โดย Chen และคณะ (2010) ได้ศึกษาการหมักเชื้อรา *Aspergillus oryzae* SICC 3.302 ในอาหารเหลว (น้ำตาลซูโครสและโซเดียมไนเตรท) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยปริมาณโปรตีนที่วัดได้แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณโปรตีนในแต่ละช่วงเวลา

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อกรัมของเชื้อรา)
24	396.18 ± 17.85
48	391.43 ± 8.34
72	398.22 ± 6.49
96	400.92 ± 3.97
120	398.33 ± 9.61

ที่มา : Chen และคณะ, 2010

3) การวัดปริมาณกลูโคซามีน

กลูโคซามีนเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในไคติน กลูโคซามีนจะถูกปล่อยออกมาเมื่อมีการไฮโดรไลซิสของไคตินด้วยกรด ซึ่งไคตินนั้นเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์เชื้อราดังรูปที่ 2.5 จึงสามารถวัดการเจริญของเชื้อราด้วยการวัดปริมาณกลูโคซามีนได้ (Said และ Brooks, 2010) โดย Rosenblitt และคณะ (2000) ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อราโดยการหมักเชื้อรา *Monascus purpureus* บนข้าว และได้ใช้วิธีกลูโคซามีนในการวัดการเจริญผลปรากฏว่าปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5.42 จนถึงร้อยละ 7.12 โดยแสดงในตารางที่ 2.3 แสดงช่วงของการเจริญของเชื้อราและแสดงปริมาณกลูโคซามีนที่เกิดขึ้นในการหมักเป็นเวลา 240 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.3 ปริมาณกลูโคซามีนในแต่ละช่วงเวลาจากการหมักเชื้อรา *Monascus purpureus* บนข้าวเป็นเวลา 240 ชั่วโมง

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณกลูโคซามีน (ร้อยละโดยมวล)
60	5.42 ± 0.422
120	5.77 ± 0.099
180	6.22 ± 0.218
240	7.12 ± 0.991

ที่มา : Rosenblitt และคณะ, 2000

2.1.3 ลักษณะของเชื้อรา *Monascus* spp.

Monascus spp. จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Monascaceae กลุ่ม (Class) Ascomycetes กลุ่มย่อย (Subclass) Plectomycetidae อันดับ (Order) Eurotiales เส้นใยมีผนังกัน (Septate) มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศและไม่มีเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขาและมักจะเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุน้อยมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วง (จักรพงษ์, 2014) ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 เชื้อราโมนาสคัส
ที่มา : จักรพงษ์ นิมานะ, 2014

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Monascus* spp. จะมีการสร้างเพอริทีเซียม (Perithecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (Ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้าน (Stalk) ที่มีหรือไม่มีผนังก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมเทลลิก (Homothallic) โดยมีการสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิดคือ แอนเทอริเดียม (Antheridium) และแอสโคโกเนียม (Ascogonium) เกิดการฟิวชัน (Fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียมแล้วจึงจะมีการวิวัฒนาการต่อไปอีกคือ แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสตามมาด้วยไมโทซิสมี Daughter nuclei จากการแบ่งตัวมีการขยายผนังเซลล์รวมออกเรียกว่า การสร้างแอสโคคาร์ปชั้นในที่สุด ภายในเพอริทีเซียมมีแอสโคสปอร์ (Ascospores) มากมาย โดยแอสโคสปอร์จำนวน 2-8 รวมอยู่ภายในแอสคัส (Ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์ออกเป็นเส้นใหม่ขึ้น (มีชัย, 2552)

เชื้อรา *Monascus* spp. สามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การปรุงแต่งสีในไวน์ และการถนอมอาหารประเภทเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง นอกจากนี้จะทำการสร้างสารสีแล้วยังสร้างสารอื่นที่เป็นประโยชน์อีกหลายชนิดเช่น Monacolin k, เอนไซม์โปรติเอส เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.4 (กมลวรรณ และดวงใจ, 2555)

เม็ดสีที่เชื้อราผลิตได้ประกอบด้วยรงควัตถุสีแดง ได้แก่ monascorubramine และ rubropunctamine เม็ดสีเหลือง ได้แก่ monascine ankaflavine และ monascoavin และเม็ดสีส้ม ได้แก่ rubropunctatine และ monascorubrin เชื้อราส่วนใหญ่จะสร้างเม็ดสีขึ้นภายในเซลล์ (Gupta และคณะ, 2011)

ตารางที่ 2.4 สารเมทาบอลไลต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อรา *Monascus* spp.

เมทาบอลไลต์	ชนิด
1. เอนไซม์	- กลูโคอะไมเลส - โปรติเอส - แอลฟา-อะไมเลส - ไรโบนิวคลีเอส
2. เมทาบอลไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolites)	- เอทิลแอลกอฮอล์ - กรดอินทรีย์ - ไขมัน - กรดไขมัน
3. เมทาบอลไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites)	- รงควัตถุ (แดง, เหลือง, ส้ม) - สารลดคลอเลสเตอรอล (Monacolin k) - ยาลดความดันโลหิต - โคเอนไซม์ Q ₁₀

ที่มา : ดัดแปลงจาก บุชบา, 2540

2.1.4 สีจากเชื้อรา

สีจากจุลินทรีย์จัดเป็นสีที่ได้จากธรรมชาติชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กัน โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิตสารสีเป็นเชื้อรา ซึ่งมีหลายสายพันธุ์ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 เชื้อราผลิตสี

สายพันธุ์	รงควัตถุ
<i>Monascus</i> spp.	สีแดง สีเหลือง และสีส้ม
<i>Blakeslea trispora</i>	สีครีม
<i>Candida</i> sp.	สีเหลือง หรือสีเหลืองส้ม
<i>Ashbya gossypi</i>	สีเหลือง หรือสีเหลืองส้ม
<i>Aspergillus</i> spp.	สีแดงเข้ม
<i>Helminthosporium</i> sp.	สีแดง
<i>Penicillium</i> spp.	สีแดง
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	สีแดง
<i>Haematococcus Pluvialis</i>	สีแดง
<i>Cordyceps unilateralis</i>	สีแดงเข้ม
<i>Neurospora crassa</i>	สีเหลืองส้ม
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	สีเหลืองส้ม
<i>Paecilomyces farinosus</i>	สีแดง

ที่มา : ดัดแปลงจาก Malik และคณะ, 2012

มีการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตยา เครื่องสำอาง และ อุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งใช้เป็นตัวเพิ่มกลิ่นรสและสีผสมอาหาร ได้ เช่น เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ไวน์แดง อาหารหมัก เช่น เต้าหู้ยี้ ผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็ง และใช้เป็นสีผสมในเนื้อสัตว์ ดังตารางที่ 2.6 (ณัฐพงษ์, 2006)

ตารางที่ 2.6 ฟังไจที่ให้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

ชนิดเชื้อรา	การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม
<i>Penicillium roqueforti</i> และ <i>Penicillium camemberti</i>	ใช้ปนกับเนย ทำให้รสชาติและคุณภาพดี
<i>Aspergillus wentii</i>	ใช้ในการทำเต้าเจี้ยว
<i>Aspergillus niger</i>	ใช้ผลิตกรดซิตริก
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	ใช้ทำอุตสาหกรรมเหล้า เบียร์
<i>Saccharomyces rouxii</i>	ใช้ผลิตซีอิ๊ว
<i>Candida milleri</i>	ใช้ทำขนมปัง
<i>Rhizopus nigricans</i>	ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดฟูมาริก
<i>Rhizopus oryzae</i>	ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์
<i>Rhizopus nodusus</i>	ใช้ผลิตกรดแลคติก
<i>Gibberilla fujikuroi</i>	Gibberillin สำหรับเร่งการเจริญของพืช

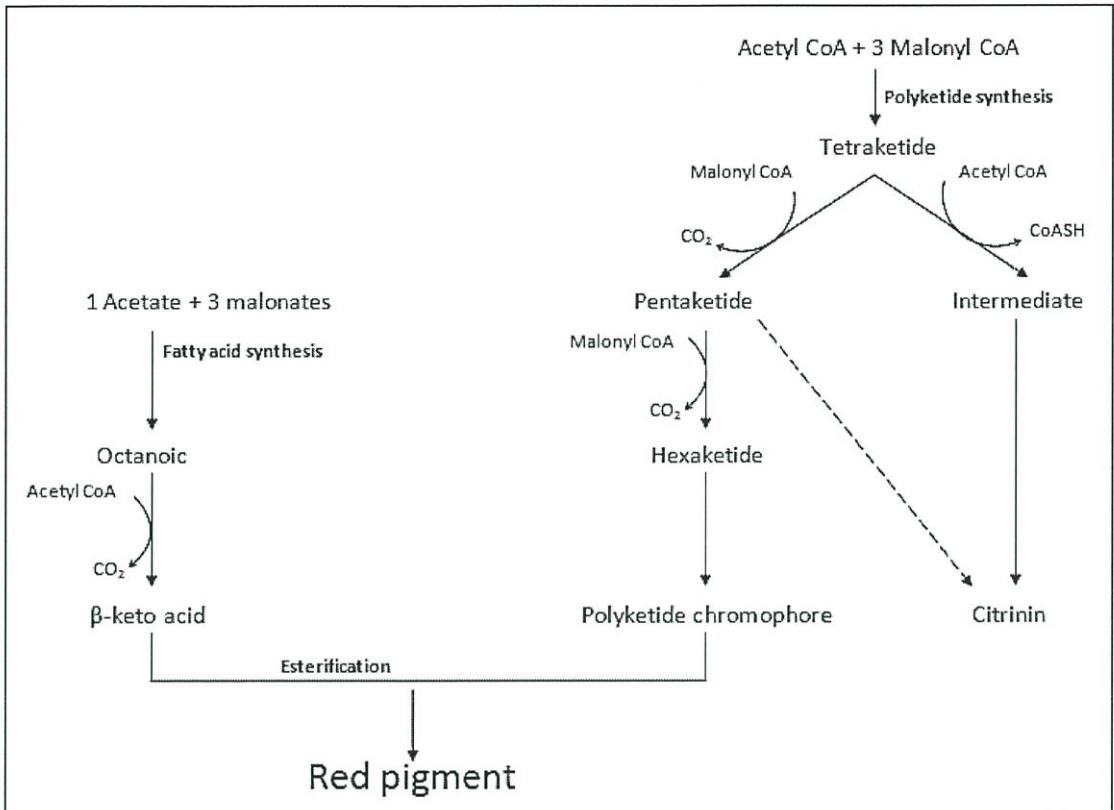
ที่มา : ดัดแปลงจาก ณัฐพงษ์, 2006

การผลิตรงควัตถุสีต่างๆ จากเชื้อรา *Monascus* เกิดจากการรวมตัวของอะซิเตต (acetate) 1 โมล กับ มาโลเนต (Malonate) 5 โมล เป็นสารประกอบ hexaketide chromophore ผ่าน polyketides pathway เมื่อกรดไขมันสายขนาดกลาง (Medium - chain fatty acids, C₆ - C₁₈) สังเคราะห์จากวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน เช่น กรดออกตาโนอิก (Octanoic acid) ทำปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอร์ฟิเคชัน (Trans-esterification) กับ โครโมฟอร์ (Chromophore) ได้เป็นรงควัตถุสีส้ม โมนาสโครูบริน (Monascorubrin) และเมื่อสีสัมฤทธิ์ตัว จะได้สีเหลือง ในขณะที่สีแดง เกิดจากปฏิกิริยา amination กับ NH₃ ดังรูปที่ 2.7 (Hajjaj และคณะ, 1999)

2.2 ข้าวและการย่อยสลายโดยเชื้อรา

2.2.1 ข้าว

ข้าวเป็นธัญพืช ธัญชาติ หมายถึง พืชวงศ์หญ้า (Gramineae) แต่ข้าวจัดอยู่ในวงศ์ Poaceae ข้าวเป็นธัญญาหารชนิดหนึ่ง ธัญพืชในขณะที่ยังเจริญเติบโต เมล็ดจะมีการสะสมสารประกอบทางเคมีภายในเมล็ด ซึ่งมีความสำคัญต่อมนุษย์ทั่วโลก ธัญพืชมีหลายพันธุ์ ปลูกง่าย เมล็ดเก็บรักษาได้นาน มนุษย์จึงใช้ธัญพืชชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นอาหารหลักตามลักษณะสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศที่ ธัญพืชชนิดนั้นเจริญเติบโตได้ดี ธัญพืชจะมีคุณค่าทางอาหารที่จำเป็นคือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ฟอสฟอรัส เหล็ก ไทอะมีน ไรโบฟลาวิน และไนอะซิน ธัญพืชจึงเป็นอาหารที่มีความสำคัญในด้านคุณค่าทางอาหารแก่มนุษย์มาก และประโยชน์ของธัญพืชมีดังต่อไปนี้



รูปที่ 2.7 กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงและซิตรีนินโดยเชื้อรา *Monascus ruber*
ที่มา : ดัดแปลงจาก Hajjaj และคณะ, 1999

1. เป็นแหล่งพลังงานที่ได้จากการโบไฮเดรต มีอยู่ในแป้ง เซลลูโลส เดกซ์ทริน และน้ำตาล กัม เพกติน และอื่นๆ

2. มีโปรตีนที่มีคุณภาพดีกว่าเนื้อสัตว์ เนื่องจากมีกรดอะมิโนที่จำเป็นน้อยกว่าเนื้อสัตว์ เช่น ไลซีน ทรีโอนีน เมธิโอนีน และทริปโทเฟน ถ้าหากรับประทานธัญพืชร่วมกับเนื้อสัตว์เพียงเล็กน้อยทำให้ได้รับสารอาหารโปรตีนเพียงพอต่อความต้องการของร่างกายได้

3. มีไขมันของธัญพืชมีอยู่ทั่วไปในเมล็ด จะมีมาก ในคัพภะ และเปลือกซึ่งมักจะถูกขัดสีหรือแยกออกไป ไขมันจะมีส่วนทำให้เกิดการเหม็นหืนในแป้งหรือเมล็ดที่ขัดสีแล้วเร็วขึ้น ไขมันที่แยกออกไปนำไปผลิตเป็น น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด ใช้ประกอบอาหารต่อไป

4. แร่ธาตุในธัญพืชมีมากในเปลือกและคัพภะมากกว่าในเนื้อของเมล็ด แต่ธาตุเกือบร้อยละ 95 คือโพแทสเซียมฟอสเฟต และโพแทสเซียมซิลิเฟต แมกนีเซียมฟอสเฟต แมกนีเซียมซิลิเฟต แคลเซียมฟอสเฟต และแคลเซียมซิลิเฟต นอกจากนั้นฟอสฟอรัสในรูปกรดไฟติก (ศศิธร, 2551)

โดยกลุ่มข้าวสามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1) กลุ่มข้าวเจ้านุ่ม

แป้งของข้าวขาวมีปริมาณอะไมโลสต่ำ (ตั้งแต่ร้อยละ 13 - 20 โดยน้ำหนัก ที่ระดับความชื้นร้อยละ 14) และข้าวมีค่าการสลายเมล็ดในต่าง ระดับ 6 - 7 เมื่อสุกเป็นข้าวสวยแล้วเมล็ดจะอ่อนนุ่มค่อนข้างเหนียว

2) กลุ่มข้าวเจ้ารวน

แป้งของข้าวขามีปริมาณอะไมโลสปานกลาง (มากกว่าร้อยละ 20 - 25 โดยน้ำหนักที่ระดับความชื้นร้อยละ 14) เมื่อสุกเป็นข้าวสวยแล้วเมล็ดข้าวจะร่วนค่อนข้างนุ่ม

3) กลุ่มข้าวเจ้าแข็ง

แป้งของข้าวขามีปริมาณอะไมโลสสูง (มากกว่าร้อยละ 25 ขึ้นไปโดยน้ำหนัก ที่ระดับความชื้นร้อยละ 14) เมื่อสุกเป็นข้าวสวยแล้วเมล็ดข้าวจะร่วนและแข็ง

4) กลุ่มข้าวเหนียว

ข้าวมีการสลายเมล็ดในต่างระดับ 6 - 7 เมื่อสุกเมล็ดข้าวจะเหนียวและจับติดกัน (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555)

ข้าวเสาไห้ (เจ๊กเซย) หมายถึง ข้าวที่ได้จากการแปรรูปข้าวเปลือก พันธุ์เจ๊กเซย ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองและเป็นข้าวเจ้าไวต่อช่วงแสงปลูกในช่วงฤดูนาปี ในพื้นที่อำเภอเสาไห้ อำเภอเมือง อำเภอหนองแสง อำเภอวิหารแดง อำเภอหนองแค อำเภอหนองโดน และกิ่งอำเภอดอนพุด จังหวัดสระบุรี เป็นข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูง (ร้อยละ 27 - 28) เป็นข้าวพื้นแข็ง เมื่อหุงสุกข้าวจะร่วนเป็นตัว ไม่เกาะกันเป็นก้อน ข้าวหุงขึ้นหม้อ ข้าวสุกจะนุ่ม ไม่แฉะ ไม่แข็งกระด้าง ไม่เหนียวและ ไม่ยุบตัวเมื่อเป็นข้าวราดแกง ไม่บูดง่ายเมื่อทิ้งไว้เย็นข้ามวัน คุณภาพไม่เปลี่ยนแปลงข้าวเก่าเมื่อนำมาหุงไม่มีกลิ่นสาบ (กรมทรัพย์สินทางปัญญา, 2552)

ตารางที่ 2.7 ปริมาณสารอาหารในข้าว

ชนิดของข้าว	โปรตีน	ไขมัน	เส้นใย	แร่ธาตุ	คาร์โบไฮเดรต
ข้าวเปลือก	9.1	2.2	10.2	7.2	71.2
ข้าวกล้อง	11.0	2.7	1.2	1.8	83.2
ข้าวสาร	9.8	0.5	0.3	0.6	88.9

ที่มา : ศศิธร, 2551

2.2.2 เอนไซม์อะไมเลส (Amylase enzyme)

เอนไซม์อะไมเลส เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolases และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ในการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลโดยไฮโดรไลซ์พันธะ 1,4-glycosidase bond ในโมเลกุลของสตาร์ช (Starch) ให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็นเดกซ์ทริน (Dextrin) น้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ เช่น มอลโทส (Maltose) และมอลโทแซ็กคาไรด์ เช่น กลูโคส (Glucose) อะไมเลสส่วนใหญ่พบในน้ำลาย ตับอ่อน อะไมเลสที่พบในน้ำลายจะเรียกว่า ไทยาลิน (Ptyalin) ซึ่งสามารถพบได้ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (วิราสิณี และนพพล, 2556)

ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส สามารถแบ่งได้ 3 ชนิดคือ

2.2.2.1 แอลฟา-อะไมเลส (Alpha-amylase)

รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.1 เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลสตาร์ช (Starch) และไกลโคเจน (Glycogen) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 แบบสุ่ม ทำให้โมเลกุลของสตาร์ช และไกลโคเจนถูกไฮโดรไลซ์ได้ น้ำตาล เช่น น้ำตาลมอลโทส และกลูโคส อย่างรวดเร็ว เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส พบทั่วไปในระบบการย่อยอาหาร (Digestive system) ของมนุษย์ และสัตว์เช่น ในน้ำลาย และน้ำย่อยจากตับอ่อน ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เอนไซม์นี้ในการไฮโดรไลซ์

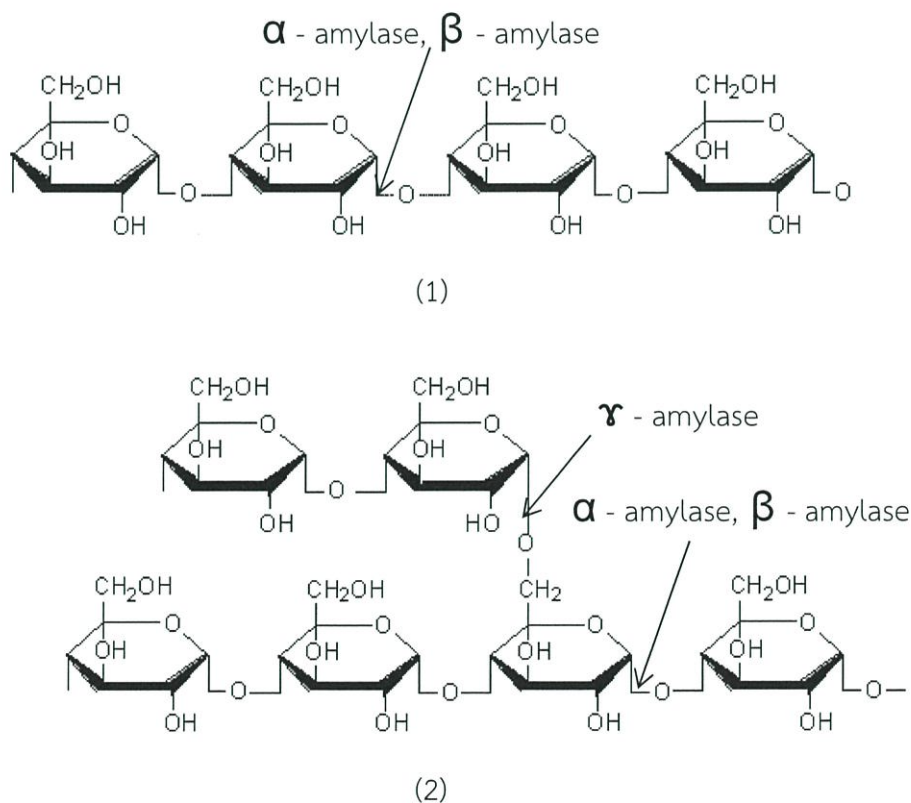
สตาร์ช (Starch hydrolysis) ในขั้นตอนการทำ liquefaction เพื่อลดความหนืดของสารละลาย สตาร์ช ภายหลังจากการเกิดเจลาติไนซ์ (Gelatinization) เพื่อผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส

2.2.2.2 เบต้า-อะไมเลส (Beta-amylase)

รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.2 เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สตาร์ช (Starch) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 ของพันธะไกลโคไซด์ที่เฉพาะส่วนปลายสายด้านที่เป็นนอนรีดิวส์ (Non-reducing end) เข้ามาทีละ 2 หน่วย ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทส เอนไซม์นี้ไม่พบในน้ำย่อยของมนุษย์ แต่พบในเชื้อรา (Mold) แบคทีเรีย (Bacteria) และพบในผลไม้ระหว่างการสุก (Ripe) (วิราสิณี และนพพล, 2556)

2.2.2.3 แกมมา-อะไมเลส หรือกลูโคอะไมเลส (Glucoamylase)

ตามระบบคือ γ - 1,4-glucan glucohydrolase รหัสเอนไซม์คือ 3.2.1.3 เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์สายพอลิเมอร์ของสตาร์ช (Starch) ได้ทั้งที่พันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 และแอลฟา 1-6 จึงสามารถไฮโดรไลซ์โมเลกุลของอะไมโลเพกทิน (Amylopectin) ซึ่งโมเลกุลมีสายแขนง โดยจะไฮโดรไลซ์จากส่วนปลายด้านนอนรีดิวส์ (Non reducing end) เข้ามาทีละ 1 หน่วยได้น้ำตาลกลูโคส ผลิตได้โดยรา และแบคทีเรีย (ศศิธร, 2551 และ วิราสิณี และนพพล, 2556)



รูปที่ 2.8 (1) โครงสร้างอะไมโลส และ (2) โครงสร้างอะไมโลเพกทิน

ที่มา : <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/carbohydrates.htm>

2.3 การหมัก (Fermentation)

2.3.1 การหมัก

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักอาหาร อาจเป็นจุลินทรีย์ที่มาจากธรรมชาติในรูปของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ หรือจุลินทรีย์ผสมที่อยู่ในรูปของเหลวหรือเป็นผงแห้ง กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมัก ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยทั่วไปอาจแบ่งการหมักได้หลายประเภท ขึ้นอยู่กับเกณฑ์พิจารณาที่นำมาใช้แบ่ง ในที่นี้จะขอกกล่าวถึงการแบ่งประเภทการหมักตามลักษณะหรือ ปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ การหมักในอาหารเหลว และการหมักบนอาหารแข็ง (นันทนา, 2555)

2.3.1.1 การหมักในอาหารเหลว (Submerged state fermentation, Smf)

กระบวนการหมักในอาหารเหลวเป็นการหมักที่ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลว เช่น กากน้ำตาล และอาหารสังเคราะห์ที่มีสารอาหารที่จำเป็นต่อจุลินทรีย์ (นันทนา, 2555) ในระหว่างกระบวนการหมัก สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) จะถูกผลิตออกมาผสมกับอาหารเหลว ชีวสเตรทจะถูกย่อยอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการหมักแบบนี้จึงต้องการการเติมชีวสเตรทอย่างต่อเนื่องและคงที่เพื่อให้มีสารอาหารตลอดระยะเวลาการหมัก การหมักแบบนี้เหมาะสมกับจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียซึ่งต้องการความชื้นสูง (Subramaniyam และ Vimala, 2012)

2.3.1.2 กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง (Solid state fermentation ,SSF)

กระบวนการหมักบนอาหารแข็ง คือการบ่มเพาะ หรือการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ภายใต้การควบคุมสภาวะในการบ่ม โดยมีแนวคิดการใช้ชีวสเตรทเป็นของแข็งในกระบวนการหมักซึ่งเหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ตัวอย่างชีวสเตรทที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น มันสำปะหลัง เมล็ดข้าว เศษไม้ และชิ้นส่วนที่แห้งแล้วของสัตว์ เช่น หนิง และกระดุก ความชื้นมีความจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งความชื้นจะถูกดูดซับหรือเป็นส่วนประกอบของชีวสเตรท ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารและจะมีปริมาณน้ำอิสระอยู่น้อยมากหรือมีเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้น ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ เอนไซม์อุตสาหกรรม เชื้อเพลิง และใช้เติมสารอาหารในอาหารสัตว์ (Bhargav และคณะ, 2008; Bashir และคณะ, 2011)

ข้อดีของกระบวนการหมักบนอาหารแข็งเมื่อเทียบกับการหมักในอาหารเหลว

- มีสภาวะในการหมักเหมือนกับสิ่งแวดล้อมซึ่งเหมาะกับพฤติกรรมของเชื้อรา ซึ่งเป็นจุลินทรีย์หลักที่ใช้ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง
- ชีวสเตรทที่ใช้ในการหมักมีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อรา
- กระบวนการหมักบนอาหารแข็งโดยส่วนมากใช้พลังงานน้อย เช่น การเติมอากาศ การกวนเชิงกล เป็นต้น ในการหมักบางกรณีนั้นไม่ต้องการ จึงสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ (Bashir และคณะ, 2011)

2.3.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการหมักบนอาหารแข็ง

การเลือกตัวแปรที่เหมาะสมถือเป็นกุญแจสำคัญในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ประกอบไปด้วยกายภาพ เคมี และชีวเคมี เช่น ขนาดอนุภาค ความชื้นเริ่มต้นของชีวสเตรท ค่า pH เริ่มต้น

อุณหภูมิการบ่ม ระยะเวลาการหมัก การเติมอากาศ และแหล่งอาหาร เป็นต้น (Manpreet และคณะ, 2005)

2.3.2.1 ค่า pH

แม้ว่าค่า pH จะเป็นตัวแปรที่สำคัญตัวแปรหนึ่ง แต่การวัดและควบคุมค่า pH ในระหว่างกระบวนการหมักแบบแห้งนั้นไม่นิยมกระทำ ความสามารถทำให้เป็นกลางและซบสเตรทบางตัวจะช่วยให้ไม่ต้องมีการควบคุมค่า pH ระหว่างการหมัก จุดเด่นของวิธีนี้ได้แก่ ใช้การปรับค่า pH เริ่มต้นของซบสเตรทที่ช่วง 4.5 – 5.0 ในระหว่างทำให้ขึ้นด้วยน้ำให้ได้ระดับค่า pH ที่ต้องการ วิธีการอื่นนอกเหนือจากวิธีนี้ ในการต้านทานความเป็นกรดในซบสเตรทที่หมักเมื่อใช้เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน คือ การใช้ยูเรียเพื่อให้ได้ปริมาณไนโตรเจนอย่างน้อยร้อยละ 40 ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และวิธีนี้จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อรา อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนค่า pH ที่บริเวณใด ๆ ที่จับตัวเป็นก้อน ทำให้จุลินทรีย์สร้างฟิล์มบนซบสเตรท และไม่สามารถตรวจสอบได้ ทำให้ได้ผลผลิตจากการหมักต่ำในถังหมักที่ไม่มีการกวนที่ผลิตขึ้นมีผลทำให้ ค่า pH ต่ำลงไปอีก และมีผลกระทบต่ออาการเจริญของจุลินทรีย์อื่นในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ (จุฬารัตน์, 2547)

2.3.2.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็งมีการสร้างความร้อนประมาณ 100-300 กิโลจูลต่อกิโลกรัมของน้ำหนักเซลล์ ดังนั้นจึงต้องออกแบบการหมักเพื่อแก้ปัญหาความร้อนสะสม ซึ่งทำให้กิจกรรมของจุลินทรีย์มีความล่าช้า

ส่วนประกอบที่แตกต่างกันทำให้การถ่ายเทความร้อนยาก เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทและการนำความร้อนต่ำ อุณหภูมิสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเพราะมีน้ำในการถ่ายเทความร้อนน้อย หรือในทางตรงกันข้ามค่าความจุความร้อนจำเพาะของมวลที่ใช้ในการหมักมีค่าต่ำกว่าน้ำ ดังนั้นการผลิตความร้อนต้องทำให้กระจายอย่างรวดเร็ว เพราะส่วนมากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักบนอาหารแข็งเป็นจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเจริญอยู่ระหว่าง 20-40 °ซ และการเจริญสูงที่สุดต้องไม่เกิน 50 °ซ (Manpreet และคณะ, 2005)

2.3.2.3 อากาศ (ออกซิเจน)

การเจริญของจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนในการเจริญมากน้อยต่างกัน ขึ้นอยู่กับกระบวนการออกซิเดชัน และรีดักชัน จุลินทรีย์บางชนิดต้องการออกซิเจนในการสร้างพลังงานระดับเซลล์ในรูปของ ATP ในขณะที่บางชนิดสามารถสร้างพลังงานระดับเซลล์โดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน เชื้อราส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการหายใจ แต่อาจแบ่งเชื้อราเป็นกลุ่มต่างๆ ตามความต้องการออกซิเจนในการเจริญ ดังนี้

1) Obligate aerobic fungi

เชื้อราในกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งการเจริญหรือตาย ถ้ามีออกซิเจนไม่เพียงพอ

2) Obligate fermentative fungi

สามารถเจริญได้ดีทั้งในที่ที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่จะได้พลังงานส่วนใหญ่จากกระบวนการหมัก

3) Obligate anaerobic fungi

ต้องการสภาพแวดล้อมที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมาก เชื้อราในกลุ่มนี้ไม่สามารถดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนได้ (มยุรา และคณะ, 2554)

2.3.2.4 ปริมาณน้ำอิสระ (Water activity : a_w)

น้ำบริสุทธิ์มีค่า $a_w = 1.00$ และจะลดลงเมื่อมีการเติมตัวถูกละลาย แบคทีเรียจะเจริญที่ค่า a_w สูง ในขณะที่เชื้อรา และยีสต์บางชนิดสามารถโตได้ที่ปริมาณ a_w ต่ำกว่า 0.6 - 0.7 จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญและมีกระบวนการเมทาบอลิซึมที่สภาวะ a_w ต่ำได้ จึงเหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง

อย่างไรก็ตามปริมาณความชื้นของซบสเตรทที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อราอยู่ระหว่างร้อยละ 40 - 80 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ซบสเตรทที่แตกต่างกันความชื้นที่เหมาะสมก็จะเปลี่ยนแปลงไป

ค่า a_w ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น เกลือ น้ำตาล เป็นต้น ค่า a_w ที่เหมาะสมในกระบวนการหมักนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยในการหมักด้วย เช่น อัตราการกวน อุณหภูมิระหว่างการหมัก เป็นต้น (Manpreet และคณะ, 2005)

2.3.2.5 สารอาหาร

จุลินทรีย์แต่ละชนิดได้พลังงานในการดำรงชีวิตแตกต่างกันไป จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้จะได้อพลังงานจากแสงอาทิตย์ ในขณะที่จุลินทรีย์พวกเคมีโมอแกโนโทรป (Chemoorganotroph) จะได้อพลังงานจากการออกซิไดซ์สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นพวกเคมีโมอแกโนโทรป ซึ่งโดยทั่วไปได้พลังงานจากสารประกอบคาร์บอน เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน และจุลินทรีย์บางชนิดใช้มีเทน หรือเมทานอลเป็นแหล่งพลังงานได้

1) แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 55 ในการสังเคราะห์เซลล์

กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน คาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณมากและนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ แป้งข้าวโพด แป้งจากธัญพืชชนิดต่าง ๆ แป้งมันฝรั่ง และแป้งมันสำปะหลัง นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมหมัก ได้แก่ เมล็ดข้าวบาร์เลย์ กากน้ำตาล หางนม กากถั่วเหลือง น้ำมันพืช สารอื่น ๆ ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และอัลเคน ก็สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมหมักได้ด้วย แม้ว่าสารเหล่านี้จะมีราคาแพงกว่าคาร์โบไฮเดรต แต่สามารถผลิตได้ในรูปที่บริสุทธิ์ และเมื่อใช้เป็นซบสเตรทในกระบวนการหมักจะทำให้กระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตและการทำให้บริสุทธิ์ง่ายขึ้น

2) แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์แต่บางชนิดจะต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมัก ได้แก่ ก๊าซแอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท เป็นต้น สำหรับแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน และจุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะพวกเชื้อที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดอะมิโน จะเจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีกรดอะมิโนชนิดที่จำเป็นเท่านั้น แต่เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคา

แพง ดังนั้นโดยทั่วไปจึงนิยมใช้กรดอะมิโนจากสารประกอบเชิงซ้อน เช่น การผลิตไลซีนจะใช้โปรตีน ถั่วเหลืองไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งเมไทโอนีน และทรีโอนีน เป็นต้น วัตถุดิบอื่น ๆ ที่นิยมใช้เป็นแหล่ง ไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง เคซีนไฮโดรไลเซต กากปลา และยีสต์สกัด เป็นต้น

3) แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญซึ่งตามปกติจะต้องเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แคลเซียมและคลอรีน นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุที่มีความจำเป็นแต่ต้องการใน ปริมาณน้อย (Trace elements) ได้แก่ โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส โมลิบดีนัม และสังกะสี ซึ่งความเข้มข้นของแร่ธาตุเหล่านี้จะมีผลโดยตรงต่อการผลิตสารบางชนิดของจุลินทรีย์ เช่น สารเมทาบอลิท์ทุติยภูมิ เป็นต้น แต่โดยทั่วไปจะพบแร่ธาตุในส่วนหลังนี้ในปริมาณเพียงพออยู่แล้วใน วัตถุดิบที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แป้งข้าวโพด กากน้ำตาล ฯลฯ ยกเว้นการเตรียมอาหาร สังเคราะห์ จึงจำเป็นต้องเติมแร่ธาตุเหล่านี้ลงในอาหารโดยตรง

4) แหล่งวิตามิน

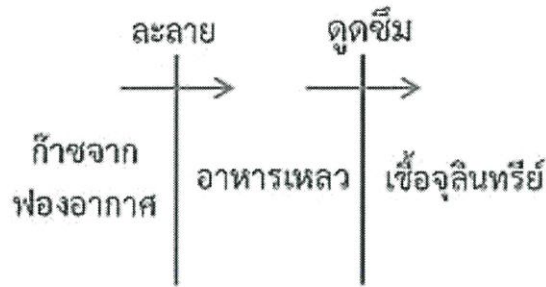
วิตามินเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิต วิตามินเป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (Growth factor) และทำหน้าที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ (Coenzyme) ทำให้สิ่งมีชีวิต เจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ จุลินทรีย์บางชนิดจะสังเคราะห์วิตามินที่ต้องการได้เอง แต่จุลินทรีย์บาง ชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเติมวิตามินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาทิ ไทอะมีน ไบโอฟลาวิน ไบโอดีน กรดนิโคตินิก เป็นต้น แหล่งวิตามินที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ ได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จากธรรมชาติ ในกรณี ที่แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนที่เลือกใช้นั้นขาดวิตามินบางชนิดที่จุลินทรีย์ต้องการ อาจ แก้ปัญหาได้โดยการใช้แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนหลายชนิดผสมกัน เพื่อให้ได้วิตามิน ครบถ้วน (จุฬารัตน์, 2547)

2.3.3 การเติมอากาศ (Aeration)

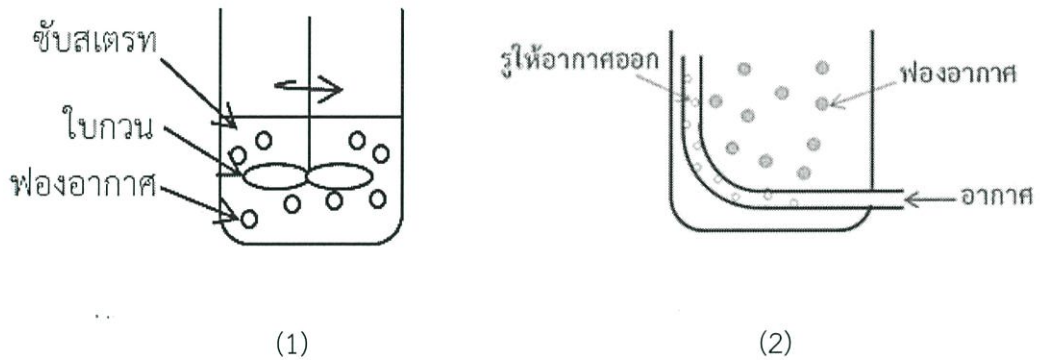
ออกซิเจนมีความสำคัญสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ที่ต้องการออกซิเจน ปริมาณ ออกซิเจนจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญ และการผลิตสารเมทาบอลิต์ อัตราการเติมอากาศที่ เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนที่ต้องการ เพื่อการเจริญและสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ (จุฬารัตน์, 2547)

2.3.3.1 การเติมอากาศในการหมักแบบอาหารเหลว

การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการหมักในอาหารเหลวต้องการออกซิเจนในรูปที่ สามารถละลายในของเหลว (Dissolved oxygen) แต่ออกซิเจนสามารถละลายในสารละลายได้เพียง บางส่วน จึงต้องการการเติมอากาศอย่างต่อเนื่อง การถ่ายเทก๊าซออกซิเจนไปยังเชื้อจุลินทรีย์เริ่มจาก ก๊าซออกซิเจนจากฟองอากาศละลายในของเหลว จากนั้นจะถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ (Scragg, 1991) ดังรูปที่ 2.9 โดยการเติมอากาศผ่านแผ่น หรือท่อที่มีรูพรุน ควรเติมอากาศจากทางด้านล่างของถัง หมัก เนื่องจากออกซิเจนจะละลายในชั้นสเตรทอย่างช้าๆ (Chisti, 1999)



รูปที่ 2.9 การถ่ายเทออกซิเจนระหว่างการหมักในอาหารเหลว
โดย P_{O_2} คือความดันไอของออกซิเจน
 C_{O_2} คือความเข้มข้นของออกซิเจนในของเหลว



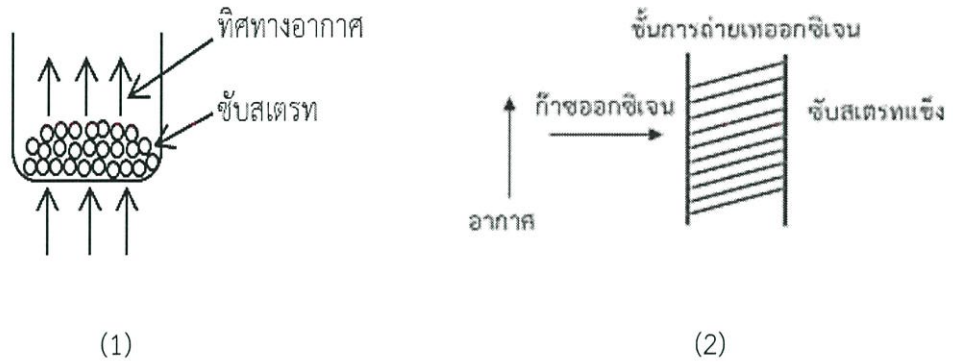
รูปที่ 2.10 รูปแบบการเติมอากาศในการหมักในอาหารเหลวโดย (1) การกวนและ (2) เติมอากาศ

2.3.3.2 การเติมอากาศในการหมักบนอาหารแข็ง

การเติมอากาศมีความสำคัญในการถ่ายเทความร้อนและความชื้น รวมถึงการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเกิดจากการหายใจของเชื้อจุลินทรีย์ออกจากซับสเตรท การเพิ่มความดันไอของก๊าซออกซิเจนอาจทำให้การผลิตผลิตภัณฑ์บางชนิดเพิ่มขึ้น การเติมอากาศจำเป็นมากในการหมักบนอาหารแข็งที่มีความหนาแน่นของซับสเตรทมาก เนื่องจากมีการสะสมของความร้อนมาก และการเคลื่อนที่ของก๊าซและความชื้นต่ำ อัตราการเติมอากาศที่แตกต่างกันที่ใช้เป็นแบบอย่างในการหมักอยู่ในช่วง 0.05 – 0.2 ลิตรต่อกิโลกรัมต่อนาที นอกจากนี้การกวนเป็นครั้งคราวจะทำให้การถ่ายเทก๊าซออกซิเจนดีขึ้น และทำให้อนุภาคของซับสเตรทกระจายตัวไม่อัดแน่น (Chisti, 1999)

2.4 ถังหมักในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง (Bioreactor)

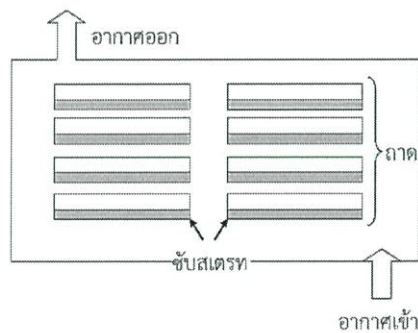
ในกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง ระบบในถังหมักจะถูกออกแบบให้ใกล้เคียงกับสถานะตามธรรมชาติของการเจริญของเชื้อรา (Bhargav และคณะ, 2008) มีถังหมักหลายชนิดที่นำมาใช้ในกระบวนการหมัก ทั้งนี้สามารถแบ่งเป็นประเภทต่างๆตามลักษณะการผสมซับสเตรทและการเติมอากาศ ดังนี้



รูปที่ 2.11 (1) รูปแบบการเติมอากาศในการหมักบนอาหารแข็ง และ (2) การถ่ายเทออกซิเจน ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งที่มีการเติมอากาศแต่ไม่มีการผสม
ที่มา : ดัดแปลงจาก Mitchell และคณะ, 2003

2.4.1 ไม่มีทั้งการผสมซับสเตรทและการเติมอากาศ

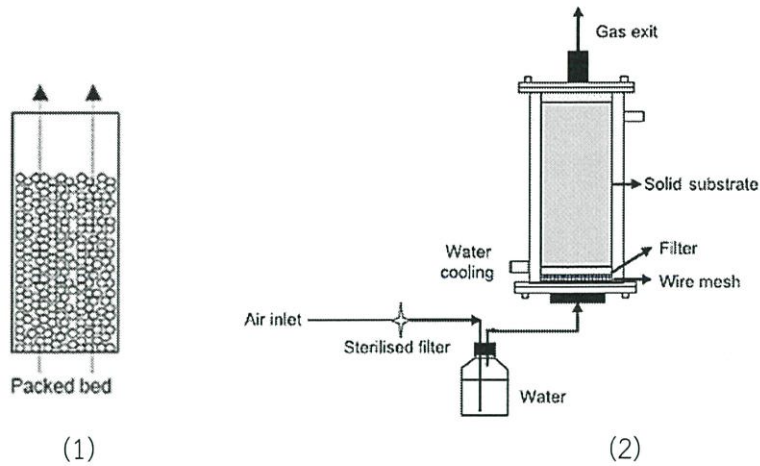
ถังหมักที่มีซับสเตรทอยู่กับที่หรือมีการผสมเป็นครั้งคราว (1 – 2 ครั้งต่อวัน) และมีการถ่ายเทมวลบริเวณผิวหน้าของซับสเตรทเท่านั้น ถังหมักประเภทนี้ได้แก่ ถังหมักแบบถาด แสดงดังรูปที่ 2.12 ซับสเตรทจะถูกบรรจุไว้บนถาด โดยถาดจะซ้อนกันอยู่เป็นชั้นๆและมีช่องว่างระหว่างชั้นวางอยู่ในตู้ และมีการปล่อยอากาศให้ผ่านเข้าไปในตู้ของถังหมัก โดยวัสดุที่นำมาทำถาดสามารถใช้ได้ทั้ง ไม้ ไม้ไผ่ โลหะ หรือพลาสติก (Mitchell และคณะ, 2006) ข้อเสียของถังหมักแบบถาด คือ การควบคุมในระดับอุตสาหกรรมทำได้ค่อนข้างยาก จึงต้องการแรงงานที่มีความละเอียดรอบคอบสูง นอกจากนี้ยังพบปัญหาในการทำความสะอาดและต้องการพื้นที่ติดตั้งในการผลิตมาก (จุฬารัตน์, 2547)



รูปที่ 2.12 ถังหมักแบบถาด
ที่มา : Couto และ Sanroman, 2006

2.4.2 ไม่มีการผสมซับสเตรท แต่มีการเติมอากาศ

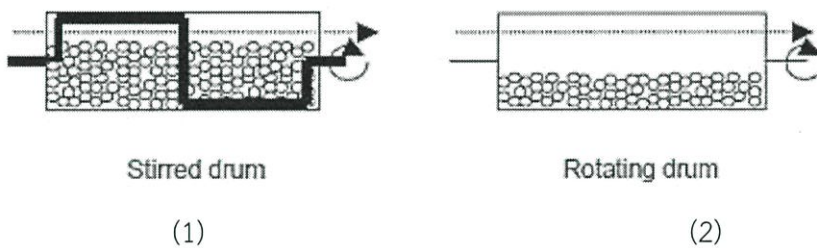
ถังหมักที่มีซับสเตรทอยู่กับที่หรือมีการผสมเป็นครั้งคราว (1 - 2 ครั้งต่อวัน) และมีการเติมอากาศผ่านซับสเตรท ถังหมักประเภทนี้ได้แก่ ถังหมักแบบแพคเบต ถังหมักแบบนี้จะมีคอลัมน์ของซับสเตรทวางตัวในแนวตั้งอยู่บนฐานรองที่มีรูพรุนเพื่อให้อากาศสามารถไหลผ่านเข้าสู่ซับสเตรทได้ ดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 (1) และ (2) ถังหมักแบบแพคเบด
ที่มา : Mitchell และคณะ, 2006; Couto และ Sanroma, 2006

2.4.3 มีการผสมซับสเตรท แต่ไม่มีการเติมอากาศ

ถังหมักที่ซับสเตรทถูกผสมอย่างต่อเนื่องหรือผสมเป็นครั้งคราว แบ่งช่วงการผสมตั้งแต่นาทีจนถึงชั่วโมง ถังหมักประเภทนี้ได้แก่ ถังหมักแบบมีใบกวน ตัวถังจะหยุดนิ่งและมีใบกวนบริเวณแนวแกนกลางของถังทำหน้าที่กวนตลอดเวลา และถังหมักแบบหมุน ตัวถังหมักทั้งหมดจะหมุนตามแนวแกนกลางของถัง เพื่อให้ซับสเตรทถูกผสม โดยถังหมักทั้งสองแบบจะมีซับสเตรทวางตัวอยู่ในแนวนอน ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 (1) ถังหมักแบบใบกวน (2) ถังหมักแบบหมุน
ที่มา : Mitchell และคณะ, 2006

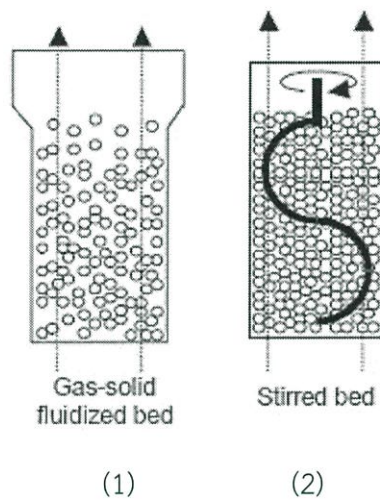
2.4.4 มีการผสมซับสเตรทและมีการเติมอากาศ

ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบด (Air-solid fluidized beds) อากาศจะถูกเติมผ่านตะแกรงรองซับสเตรทด้วยความเร็วเพียงพอที่จะทำให้ซับสเตรทลอยได้ ดังรูปที่ 2.15 (1)

ถังหมักแบบมีใบกวนแนวตั้ง ถังหมักประเภทนี้ซับสเตรทถูกกวนอย่างต่อเนื่องหรือกวนเป็นช่วงๆ และมีการเติมอากาศผ่านซับสเตรท ถังหมักประเภทนี้สามารถทำงานทั้งในระบบต่อเนื่องและไม่ต่อเนื่องได้ มีลักษณะการวางตัวของซับสเตรทคล้ายกับแบบแพคเบด ตัวถังจะหยุดนิ่งแต่จะมีการกวนจากใบกวนและมีการเติมอากาศที่ด้านล่าง (Mitchell และคณะ, 2006) ดังรูปที่ 2.15 (2)

เชื้อราที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบหมุนเจริญอย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอกว่าการหมักแบบถาด แต่การเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้งในถังหมักแบบหมุนและแบบถาด จะทำให้เส้นใยถูกทำลายเนื่องจากแรงเฉือนที่เพิ่มขึ้นจากการหมุนหรือกวน ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้ การจับตัวเป็นก้อนของซัสเตรทและการเจริญที่ช้าลง เนื่องจากการเสียดสีของอนุภาค ซึ่งถือเป็นปัญหาสำคัญที่พบในการเพาะเลี้ยงเชื้อราในถังหมักแบบหมุน (จุฬารัตน์, 2547)

เมื่อเปรียบเทียบถังหมักทั้ง 4 ประเภท ถังหมักแบบแพคเบตมีข้อดีกว่าถังหมักชนิดอื่น คือ ใช้พื้นที่และอุปกรณ์น้อย สามารถควบคุมสภาวะการหมักได้ดีกว่าแบบถาด ประหยัดพลังงานเนื่องจากไม่มีการกวนและไม่ทำให้เส้นใยเชื้อราขาด และสามารถบรรจุซัสเตรทได้มากกว่าถังหมักแบบตัวถังหมุนที่มีปริมาตรถังหมักเท่ากัน (วสันต์ และคณะ, 2545)



รูปที่ 2.15 (1) ถังหมักแบบฟลูอิดไดซ์เบต (2) ถังหมักแบบมีใบกวนแนวตั้ง
ที่มา : Mitchell และคณะ, 2006

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อรัญ และคณะ (2530) ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยง *Monascus purpureus* CMU-KU ในข้าวเจ้า 5 พันธุ์ คือ กข 7, กข 23, กข 25, ขาวดอกมะลิ 104 และเหลือง 148 และพบว่า เชื้อรานี้สร้างสีแดงได้ปริมาณมากที่สุดในข้าวพันธุ์เหลือง 148 และรองลงมาคือพันธุ์ กข 23 และ กข 25 และสร้างสีแดงปริมาณที่ต่ำที่สุด คือ สายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เนื่องจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณอะไมโลสต่ำ ขณะที่ข้าวพันธุ์เหลือง 148 มีปริมาณอะไมโลสสูง จากตารางที่ 2.7 จะเห็นได้ว่า ชนิดข้าวที่เหมาะสมแก่การหมักเพื่อผลิตสีแดงโดยเชื้อรา *Monascus* ควรจะมีปริมาณของอะไมโลสสูง

โดยพบว่าที่ความชื้นเริ่มต้นที่ร้อยละ 50 และ 57 เหมาะสมต่อการผลิตสีแดง ดังแสดงในตารางที่ 2.8 และยังพบว่าถ้าปริมาณความชื้นเริ่มต้นของซัสเตรทสูงจะทำให้การเจริญของเชื้อรา และการผลิตสีต่ำ

ตารางที่ 2.8 ผลของสายพันธุ์ข้าวต่อการสร้างสีแดง โดย *Monascus purpureus* CMU-KU

สายพันธุ์ข้าว	ปริมาณอะไมโลส*	ความเข้มข้นของสีแดง(วัดที่ OD ₅₀₀) ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
กข 7	ปานกลาง	3.40
กข 23	สูง	4.00
กข 25	สูง	3.90
ขาวดอกมะลิ 105	ต่ำ	1.27
เหลือง 148	สูง	4.60

*ต่ำ น้อยกว่าร้อยละ 20, ปานกลาง ร้อยละ 24, สูง มากกว่า ร้อยละ 24

ที่มา : ดัดแปลงจาก อรัญ และคณะ, 2530

ตารางที่ 2.9 ผลของความชื้นเริ่มต้นของซบสเตรทต่อการผลิตสีแดง โดย *Monascus purpureus* CMU-KU บนข้าวเจ้า

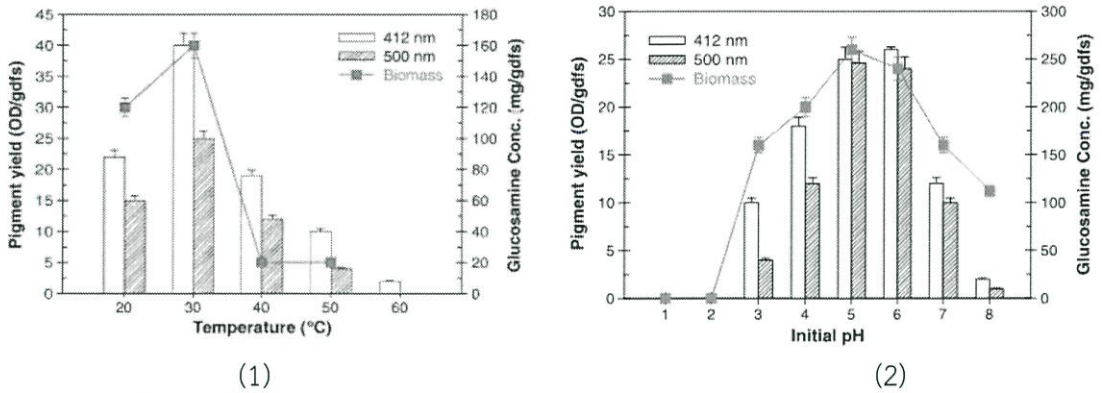
ปริมาณความชื้นเริ่มต้นของข้าว (ร้อยละ)	การผลิตสีแดง (วัดที่ OD ₅₀₀) ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
33	0.20
40	0.63
50	3.3
57	3.25
62	2.03
66	2.15
70	1.68
72	1.73

ที่มา : ดัดแปลงจาก อรัญ และคณะ, 2530

สุนีย์ และคณะ (2557) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารสีแดง และ Monacolin K ที่ได้จากการหมักเมล็ดขนุนผง ด้วยเชื้อรา *Monascus* ต่างสายพันธุ์ ได้แก่ *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus* และ *Monascus ruber* พบว่า การหมัก *Monascus purpureus* บนเมล็ดขนุนผง ที่ความชื้นร้อยละ 50 สามารถผลิตสารสีแดงได้มากที่สุด

งานวิจัยของ Velmurugan และคณะ (2011) ได้ทำการหมักเชื้อ *Monascus purpureus* KACC 42430 บนซังข้าวโพดบดโดยได้ทำการหมักในอุณหภูมิตั้งแต่ 20 ถึง 60 °ซ พบว่าสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 30 °ซ เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารสีแดง ดังแสดงในรูปที่ 2.16 (1) และยังพบว่าสามารถผลิตสารสีแดงปริมาณมากเมื่อค่า pH เริ่มต้นของสารที่ละลายได้จากซบสเตรท เท่ากับ 5 ดังแสดงในรูปที่ 2.16 (2) และยิ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ กมลวรรณ และดวงใจ (2555) ซึ่งพบว่าในสภาวะที่เหมาะสมของ pH ที่พบ คือ อยู่ในช่วง pH (จากส่วนที่สามารถละลายได้) ในการผลิตสารสีแดงของ *Monascus purpureus* TISTR 3090 เท่ากับ 5.95-6.25 นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า pH ที่เหมาะสมในการผลิตตรงควัตถุสีแดงจากการหมัก *Monascus purpureus* ในอาหารเหลว

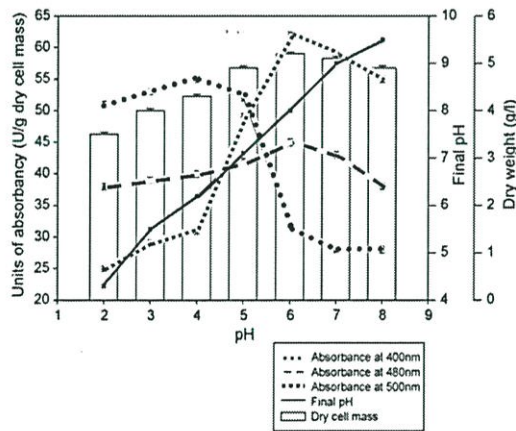
(Mukherjee, 2011) ยังมีค่าใกล้เคียงกับการหมักบนอาหารแข็ง คือที่ pH เท่ากับ 6 ดังแสดงในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.16 การผลิตสีและการเจริญของ *Monascus purpureus* KACC 424300 จากการหมักบนซังข้าวโพด (1) อุณหภูมิการหมักที่ต่างกัน (2) ค่า pH เริ่มต้นของซังสเตรทต่างกัน
ที่มา : Velmurugan, 2011

* OD_{412 nm} และ OD_{500 nm} แสดงถึง ความเข้มข้นของสีเหลืองและแดงของสารละลายที่สกัดได้ตามลำดับ

* ปริมาณกลูโคซามีน แสดงถึงการเจริญของเชื้อรา



รูปที่ 2.17 การผลิตสารสี และการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของอาหารเหลว
ที่มา : ดัดแปลงจาก Mukherjee, 2011

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุ

- 3.1.1.1 เชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3615
- 3.1.1.2 ซับเซตรที่ใช้ในการทดลอง คือ ข้าวเสาไห้ (ขนาด 8 – 16 mesh) ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 12 มาตรฐานเปียก
- 3.1.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Potato dextrose agar, PDA)
- 3.1.1.4 น้ำกลั่น
- 3.1.1.5 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
- 3.1.1.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.1.1.7 โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$)
- 3.1.1.8 โพแทสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต ($KHSO_4$)
- 3.1.1.9 แอมโมเนียมซัลฟาเมต ($H_6N_2SO_3$)
- 3.1.1.10 MBTH (methyl -2- benzothia zolinone hydrazone hydrochloride)
- 3.1.1.11 เฟอร์ริกคลอไรด์ 6-ไฮเดรต ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)
- 3.1.1.12 กลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ (D-(+)-Glucosamine hydrochloride)
- 3.1.1.13 เอทานอล (C_2H_5OH)
- 3.1.1.14 อลูมิเนียมฟอยล์
- 3.1.1.15 สำลี
- 3.1.1.16 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.1.2 อุปกรณ์

- 3.1.1.1 อุปกรณ์สำหรับเพาะเชื้อ
 - 1) จานเพาะเชื้อ
 - 2) แท่งแก้วสามเหลี่ยม
 - 3) ไมโครปิเปต
 - 4) หลอดเก็บเชื้อ
 - 5) เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม
 - 6) กล้องจุลทรรศน์
 - 7) ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 8) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
 - 9) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.1.1.2 อุปกรณ์สำหรับเตรียมซัสเตรท

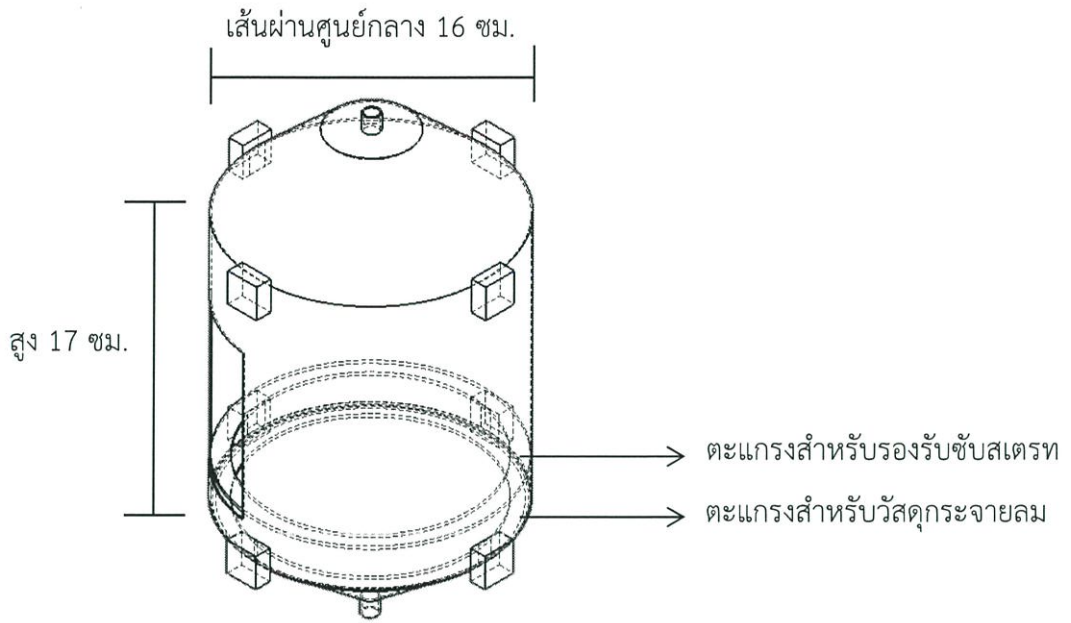
- 1) ปีกเกอร์
- 2) แท่งแก้ว
- 3) เครื่องชั่งน้ำหนัก
- 4) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.1.1.3 อุปกรณ์สำหรับกระบวนการหมัก

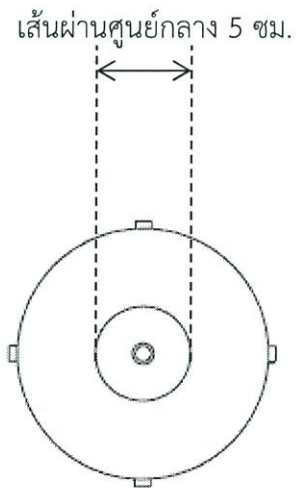
- 1) ถังหมักแบบแพคเบดทำด้วยสแตนเลส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 ซม. สูง 17 ซม. บรรจุตะแกรงสองชั้น ที่บริเวณฐานสำหรับบรรจุวัสดุเพื่อกระจายลมให้ทั่วถึง และที่บริเวณตัวถังเพื่อรองรับซัสเตรท ดังรูปที่ 3.1
- 2) ตัวกรองอากาศขนาด 0.22 ไมโครเมตร ทำจากวัสดุ PTFE
- 3) อุปกรณ์ปรับอัตราการไหลอากาศ
- 4) ชุดปรับความชื้นอากาศ
- 5) ปีมลม
- 6) ตู้อุ่น
- 7) หลอดเก็บตัวอย่าง
- 8) ตู้อบลมร้อน
- 9) ครกบดตัวอย่าง
- 10) แท่งแก้ว
- 11) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.1.1.4 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ผล

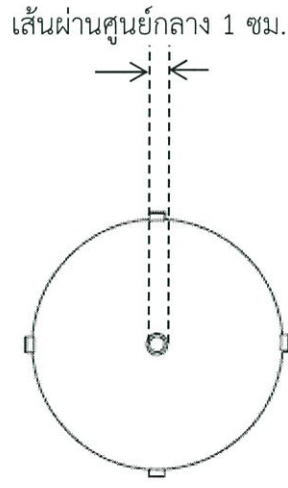
- 1) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น Libra S12 Student Spectrophotometer)
- 2) คิวเวทท์ (Cuvette)
- 3) หลอดทดลอง
- 4) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ (Autoclave)
- 5) ไมโครปิเปต
- 6) เครื่องวัดค่า pH
- 7) เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)
- 8) เครื่องชั่งน้ำหนัก
- 9) กระบอกตวง
- 10) ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
- 11) เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)



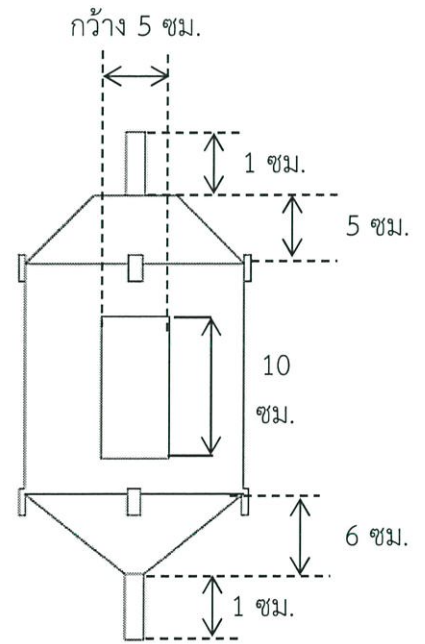
(1)



(2)



(3)



(4)

รูปที่ 3.1 ถังหมักแบบแพคเบดที่ออกแบบสำหรับการทดลอง

(1) ภาพรวม (2) รูปด้านบน ส่วนฝาปิดถังหมัก (3) รูปด้านล่าง ส่วนท้ายของถังหมัก (4) รูปด้านหน้า

3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.2.1 การเตรียมเชื้อ

ใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3615 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย นำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 7 วัน (Said และ Brooks, 2010) จากนั้นเก็บสปอร์ของเชื้อราออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นและปรับให้มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2 การเตรียมซบัสเตรท

ล้างข้าวเสาไห้ และฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 °ซ ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ เป็นเวลา 20 นาที โดยเติมน้ำเพื่อให้ได้ความชื้นสุดท้ายร้อยละ 55 มาตรฐานเปียก ทิ้งข้าวหุงสุกในสภาวะปลอดเชื้อ จนกระทั่งข้าวเริ่มเย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง

3.2.3 การหมัก

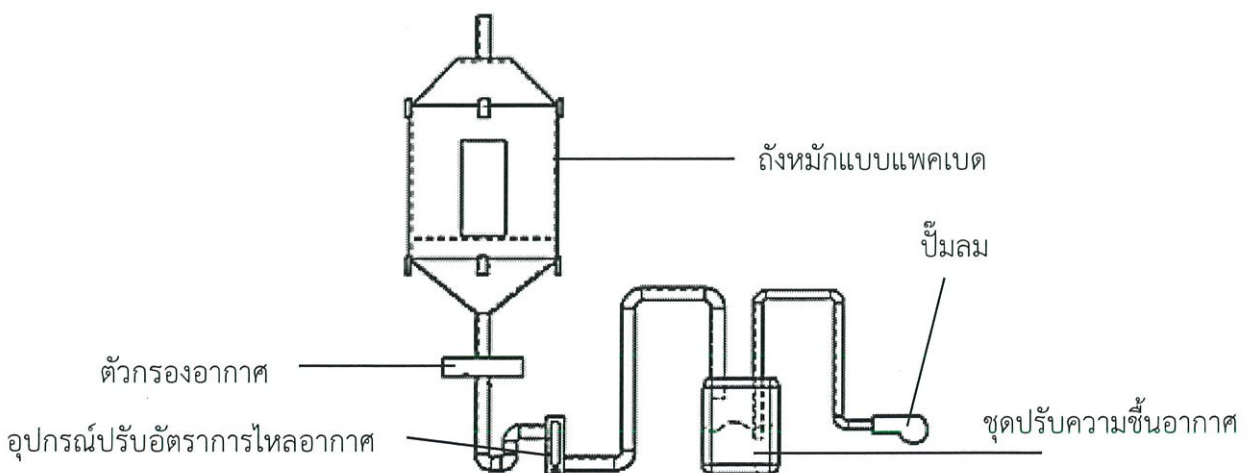
ประกอบอุปกรณ์ต่างๆ ในระบบเข้าด้วยกัน ดังรูปที่ 3.2

นำสปอร์ของเชื้อราผสมกับข้าว (10^6 สปอร์ต่อกรัมของข้าวหุงสุก) และบรรจุในถังหมักแบบแพคเบตดังรูปที่ 19 บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 8 วัน โดยเติมอากาศขึ้น สภาวะดังนี้คือ

3.2.3.1 การเติมอากาศแบบคงที่ตลอดช่วงเวลาในการหมัก โดยกำหนดอัตราการเติมอากาศ 3 ค่า คือ 0.25 0.35 และ 0.45 ลิตรต่อนาที

3.2.3.2 การเติมอากาศแบบไม่คงที่ อัตราการเติมอากาศจะถูกปรับค่าในระหว่างการหมัก โดยกำหนดอัตราการเติมอากาศ คือ

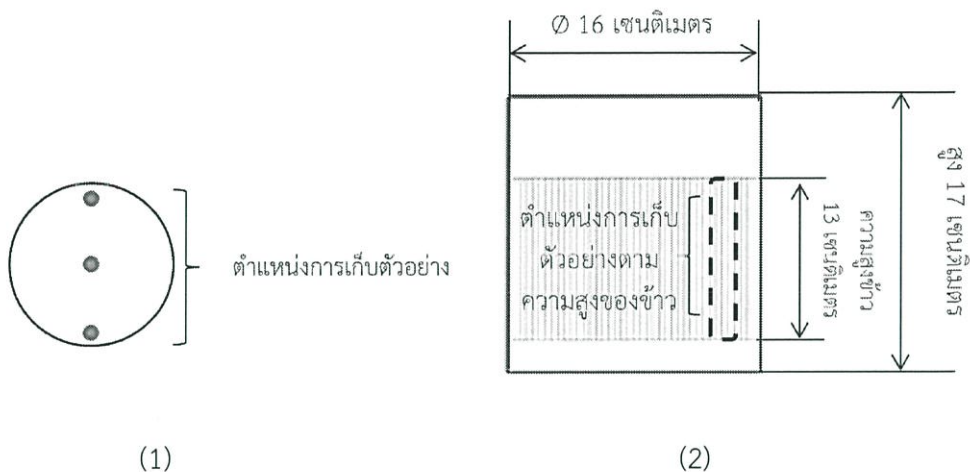
- 1) 0.35 ลิตรต่อนาที ตั้งแต่เริ่มต้นจนเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary จากนั้นลดอัตราการเติมอากาศเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที



รูปที่ 3.2 ระบบการหมักแบบเติมอากาศ

2) 0.35 ลิตรต่อนาที ตั้งแต่เริ่มต้นจนเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary จากนั้นเพิ่มอัตราการเติมอากาศเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที

ทำการเก็บตัวอย่างในระหว่างการหมักเพื่อนำไปวิเคราะห์ โดยสุ่ม 3 ตำแหน่งตามความสูงของข้าว ดังในรูปที่ 3.3 และจะเก็บตัวอย่างข้าวที่หมักในวันที่ 0 1 2 3 4 7 และ 8 ในสภาวะปลอดเชื้อ โดยตัวอย่างข้าวแดงที่เก็บได้ในแต่ละวันจะนำไปอบแห้งที่ 105°C จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ และบดให้ละเอียด เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน และความเข้มข้นของสารสีแดง



รูปที่ 3.3 ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างในถังหมัก (1) ภาพมุมบน (2) ภาพตัดขวาง

3.2.4 การวิเคราะห์

3.2.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

นำตัวอย่างผงข้าวแดง 10 มิลลิกรัมผสมกับกรดซัลฟิวริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60 โดยปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อมาลดความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกด้วยการเติมน้ำให้ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริกลดลงเหลือ 0.5 โมลต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมาทำให้เป็นกลางโดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ นำสารละลายที่ได้ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร นำสารละลายสีปริมาณ 0.6 มิลลิลิตร ผสมกับแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 12.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 3 นาที ต่อมาจึงเติม MBTH ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำของผสมไปต้มเป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงเติม $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อเวลาผ่านไปจึงนำของผสมทั้งหมดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (Chysirichote และคณะ, 2013) จากนั้นนำไปคำนวณปริมาณกลูโคซามีนจากสมการที่ 3.1 ซึ่งได้จาก

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากการทำปฏิกิริยาของสารมาตรฐาน ดังแสดงในภาคผนวก ข 1

$$\text{สมการมาตรฐาน} \quad y = 0.0203x - 0.0012 \quad (3.1)$$

แกน y คือ ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 650 nm

แกน x คือ ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมกลูโคซามีน)

3.2.4.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสีแดง

นำตัวอย่างข้าวที่บดแล้วมาสกัดสีโดยแช่ในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนน้ำหนักผงข้าวต่อน้ำหนักเอทานอลเป็น 1 ต่อ 20 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำวิเคราะห์ปริมาณสีแดงด้วยการวัดการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร รายงานผลเป็นค่าการดูดกลืนแสงต่อกรัมผงข้าว

3.2.4.3 การวิเคราะห์ความคงตัวต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ของสารที่สกัดได้

นำตัวอย่างข้าวที่บดแล้วมาสกัดสีโดยแช่ในสารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนน้ำหนักผงข้าวต่อน้ำหนักเอทานอลเป็น 1 ต่อ 20 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำสารละลายสีแดงที่สกัดได้มาผสมกับสารละลายเกลือ (โซเดียมคลอไรด์) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 10 20 และ 25 เป็นเวลา 1 2 3 4 และ 5 วัน จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

4.1.1 การเจริญของเชื้อรา

จากการหมักเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3615 บนข้าวเสาไห้หุงสุกที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที่แบบคงที่ตลอดการหมัก เมื่อวัดการเจริญของเชื้อราด้วยการหาปริมาณกลูโคซามีน ในตัวอย่างข้าวแดงบดแห้ง พบว่ามีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นประมาณ 40 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง เมื่อเข้าสู่วันที่ 1 - 2 ของการหมัก หรือเข้าสู่ระยะ exponential เชื้อราจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วทำให้เมื่อวัดการเจริญของเชื้อรา มีปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 53 - 57 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง และเมื่อเข้าสู่วันที่ 2 - 3 ของการหมัก พบว่าการเจริญของเชื้อราเข้าสู่ระยะ stationary และมีปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในช่วง 48 - 103 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง ดังรูปที่ 4.1

ในขณะที่การหมักแบบอัตราการเติมอากาศคงที่ที่ 0.35 ลิตรต่อนาที่ตลอดการหมัก เมื่อวัดการเจริญของเชื้อรา พบว่ามีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นอยู่ในช่วง 24 - 31 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะ exponential อยู่ในช่วง 40 - 55 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง และหลังจากวันแรกของการหมักการเจริญของเชื้อราเข้าสู่ระยะ stationary ซึ่งเข้าสู่ระยะเร็วกว่าที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที่ และมีปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในช่วง 45 - 128 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง ดังรูปที่ 4.2

การหมักแบบอัตราการเติมอากาศคงที่ที่ 0.45 ลิตรต่อนาที่ เมื่อวัดการเจริญของเชื้อราด้วยการหาปริมาณกลูโคซามีน พบว่ามีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นอยู่ในช่วง 14 - 20 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง เมื่อเข้าสู่ระยะ exponential หรือในวันแรกของการหมัก มีปริมาณเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 40 - 41 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง และหลังจากวันแรกของการหมัก การเจริญของเชื้อราเข้าสู่ระยะ stationary มีปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในช่วง 39 - 50 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง ดังรูปที่ 4.3

การหมักแบบอัตราการเติมอากาศไม่คงที่ โดยเริ่มการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที่ เมื่อวัดการเจริญของเชื้อราด้วยการหาปริมาณกลูโคซามีน พบว่ามีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นอยู่ในช่วง 16 - 29 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง เมื่อเข้าสู่วันแรกของการหมัก หรือระยะ exponential มีปริมาณเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 29 - 31 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดงเนื่องจากเป็นช่วงที่เชื้อรามีการเจริญอย่างรวดเร็ว และในช่วงวันที่ 2 ของการหมัก หรือการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary มีการลดอัตราการเติมอากาศเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที่ มีปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในช่วง 29 - 75 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง ดังรูปที่ 4.4

ในทำนองเดียวกันการหมักแบบอัตราการเติมอากาศไม่คงที่ โดยอัตราการเติมอากาศเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที่ เมื่อการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary พบว่า มีปริมาณกลูโคซามีนเริ่มต้นอยู่ในช่วง 17 - 57 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง เมื่อเข้าสู่ระยะ exponential หรือในวันแรกของการหมัก มีปริมาณเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 25 - 66 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง และเมื่อเพิ่มอัตราการเติมอากาศเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที่ มีปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในช่วง 25 - 81 มิลลิกรัมต่อกรัมผงข้าวแดง ดังรูปที่ 4.5

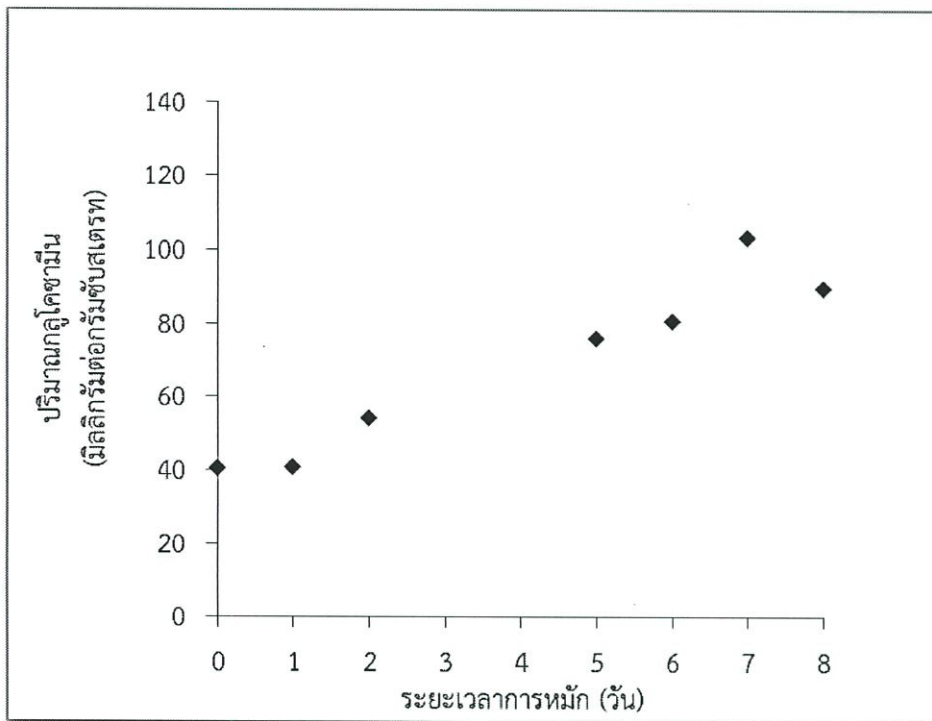
ในระยะ stationary เชื้อราจะมีการผลิตเส้นใยบริเวณด้านบนบนผิวหน้าของซบสเตอร์ท เส้นใยจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก การผลิตสารสีเดงนั้นสามารถสังเกตเห็นจุดสีเดงกระจายทั่วถึงหมัก และเข้มข้นตามระยะเวลาการหมักเช่นกัน ในระหว่างการผลิตสีเดงเชื้อราจะมีการผลิตเอทานอลขึ้นโดยส่งกลิ่นทั่วบริเวณตู้ป่ม

4.1.2 การวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate)

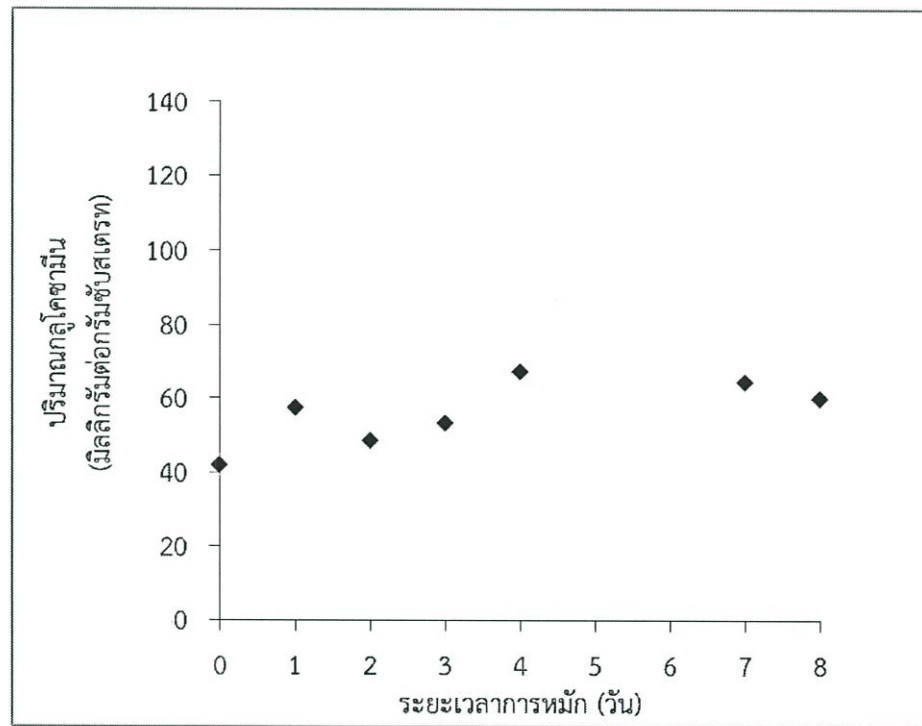
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ซึ่งคำนวณจากปริมาณกลูโคซามีน ด้วยสมการที่ 1 โดยใช้ปริมาณกลูโคซามีนในระยะ exponential ในการคำนวณ เนื่องจากเชื้อราจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะนี้ จากนั้นจะเจริญอย่างคงที่ในระยะ stationary จากผลการคำนวณพบว่า ที่การหมักแบบอัตราการเติมอากาศคงที่ที่ 0.45 ลิตรต่อนาที เชื้อราจะมีเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ exponential แต่อัตราการเจริญน้อยที่สุดเมื่อเติมอากาศที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที แสดงให้เห็นว่าอัตราการเติมอากาศคงที่ที่ 0.45 ลิตรต่อนาที เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรา

ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญจำเพาะ

อัตราการเติมอากาศ (ลิตรต่อนาที)	อัตราการเจริญจำเพาะ (วัน ⁻¹)	
	ถังที่ 1	ถังที่ 2
0.25	0.28	0.31
0.35	0.55	0.51
0.45	0.76	1.10
0.35 ลดลงเป็น 0.25	0.49	0.64
0.35 เพิ่มขึ้นเป็น 0.45	0.15	0.38

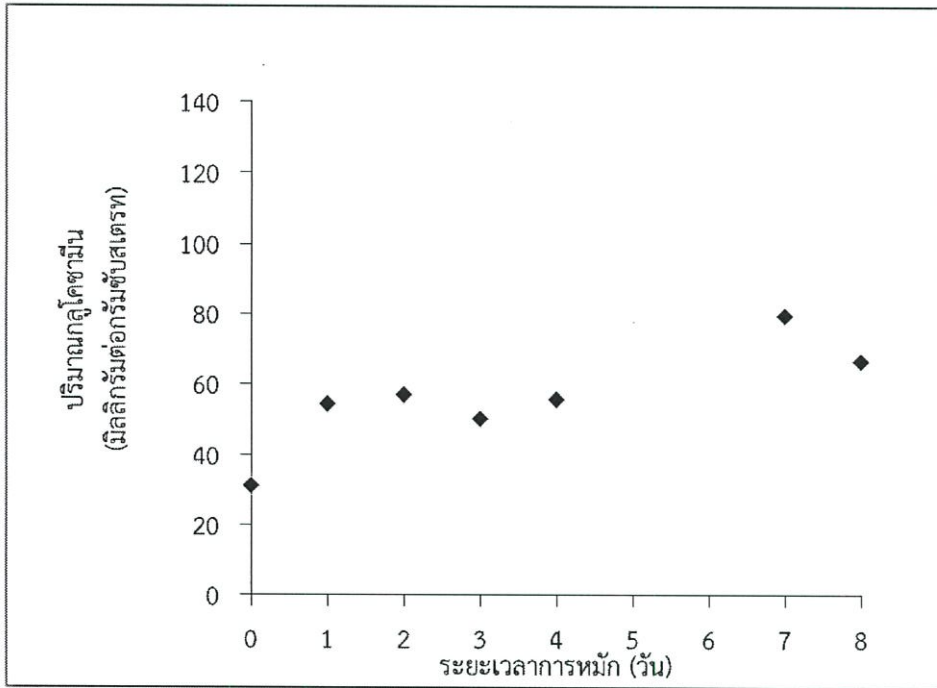


(1)

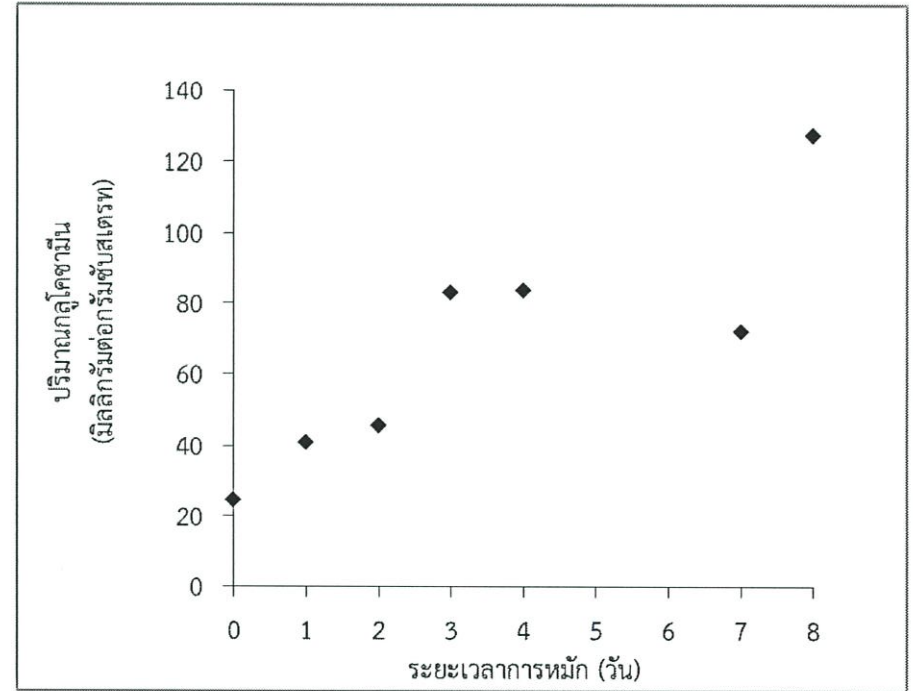


(2)

รูปที่ 4.1 ปริมาณคลอโรฟิลล์เคอซามีนจากการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

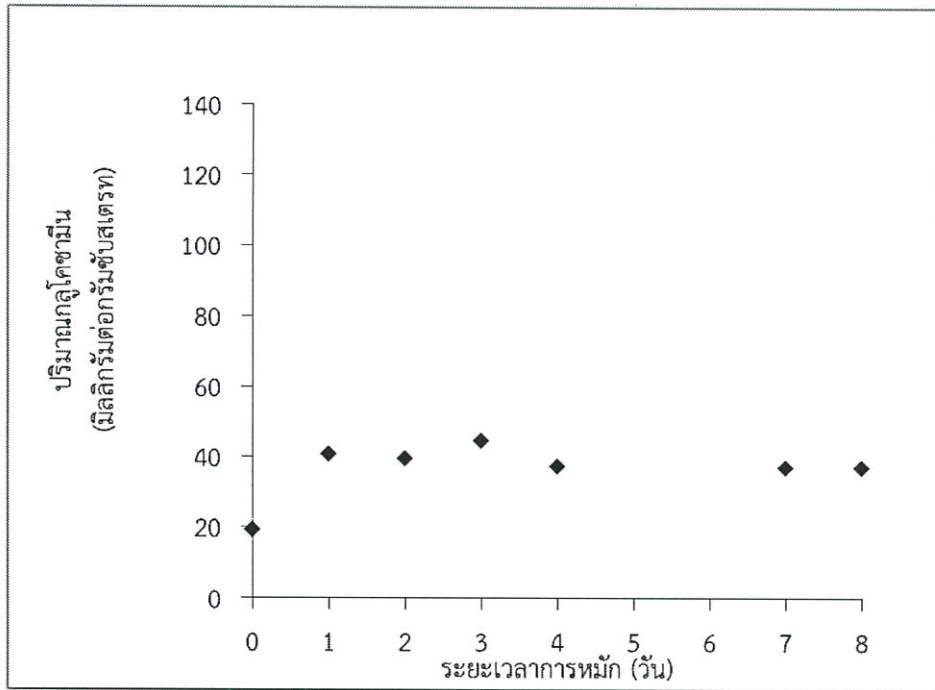


(1)

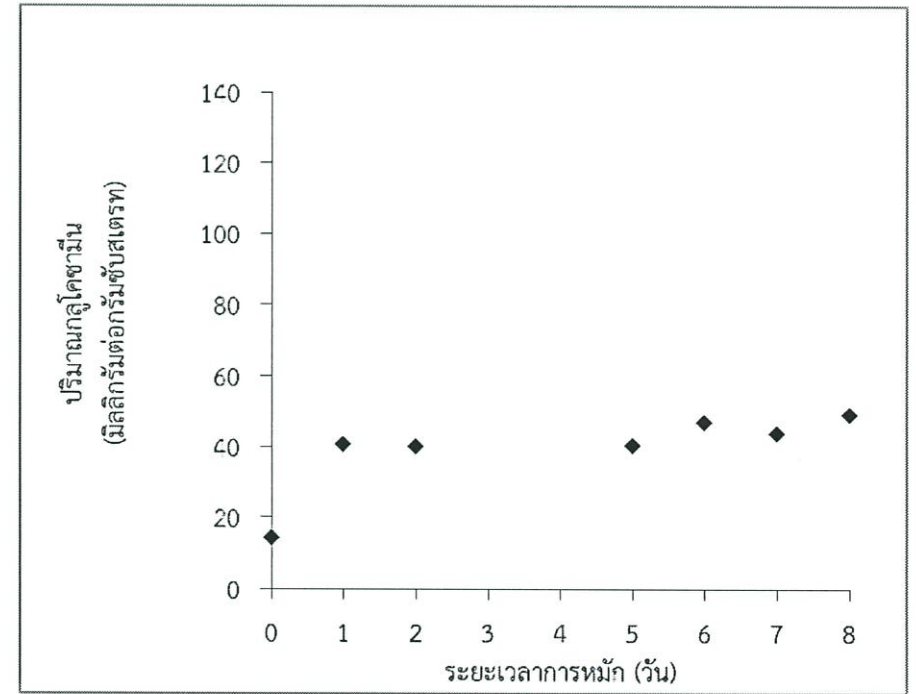


(2)

รูปที่ 4.2 ปริมาณกลูโคสจากหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

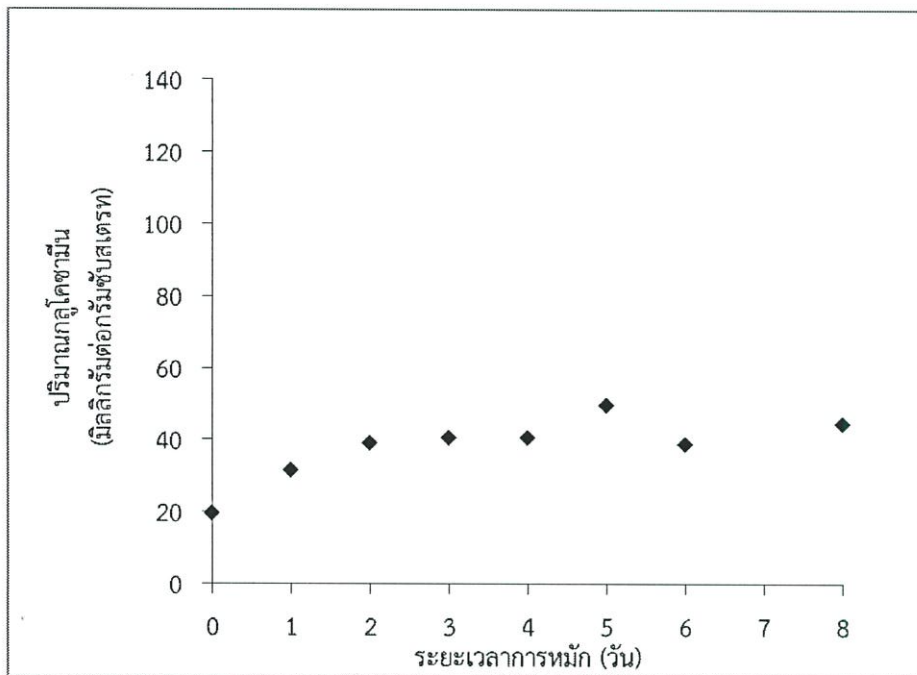


(1)

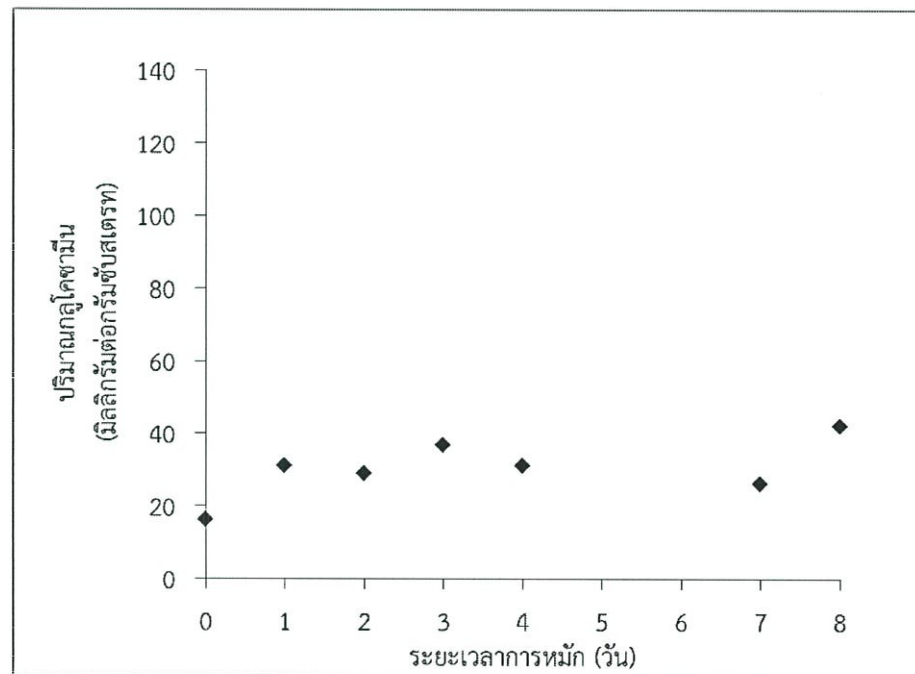


(2)

รูปที่ 4.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์โคซามีนจากการหมักที่อัตราอากาศเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

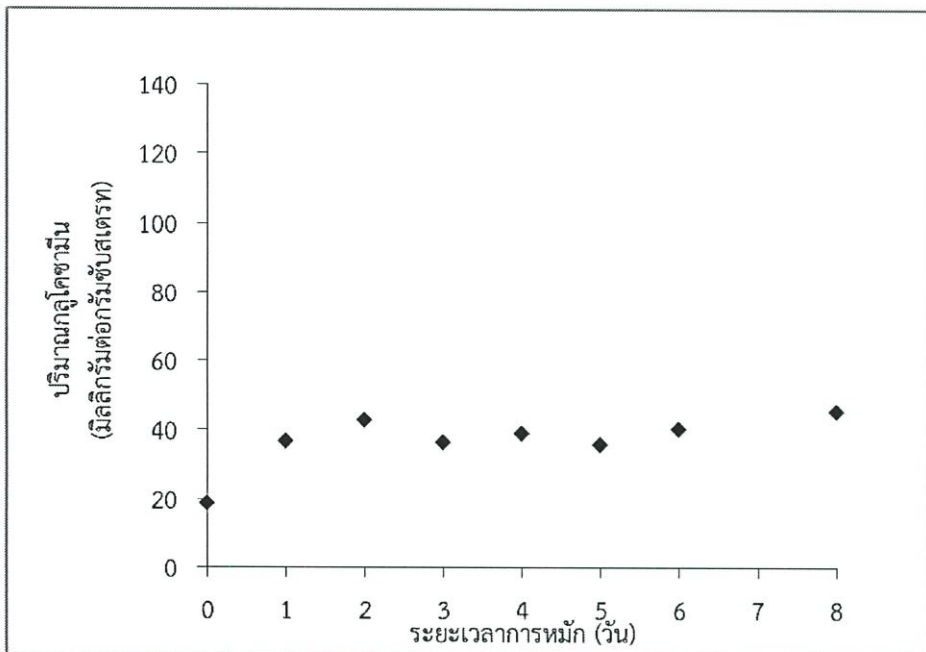


(1)

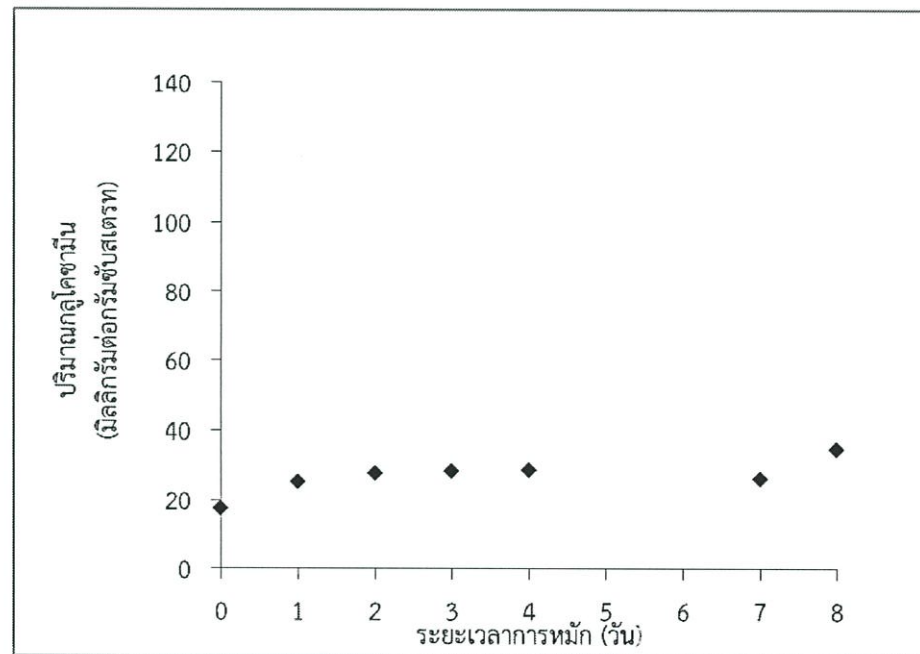


(2)

รูปที่ 4.4 ปริมาณกลูโคซามีนในการหมักแบบเริ่มต้นการหมักด้วยอัตราการเติม 0.35 ลิตรต่อนาที่ จากนั้นลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที่
(1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2



(1)



(2)

รูปที่ 4.5 ปริมาณกลูโคสในในการหมักแบบเริ่มต้นการหมักด้วยอัตราการเติม 0.35 ลิตรต่อนาฬิกา จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาฬิกา
(1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

4.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารสีแดง

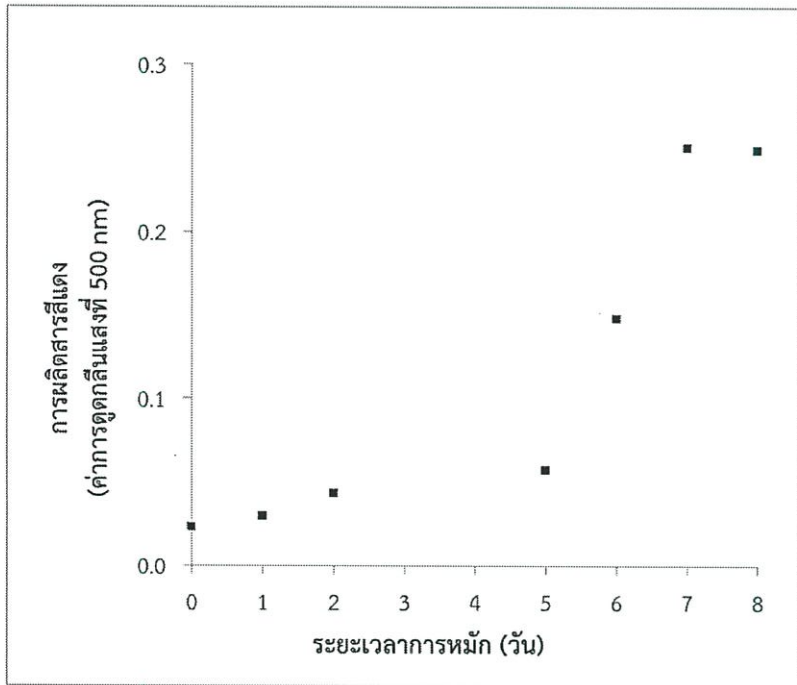
ในการหมักข้าวเสาไห้หุงสุกด้วยเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3615 แบบการเติมอากาศคงที่ตลอดการหมัก เมื่อนำตัวอย่างมาสกัดสารสีแดงด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดสีแดงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร พบว่า เริ่มต้นการหมัก ซับสเตอร์ทในทุกอัตราการเติมอากาศมีค่าการดูดกลืนสารสีแดงต่ำ เนื่องจากซับสเตอร์ทยังมีสีขาวตามปกติ เพราะการผลิตสารสีแดงของเชื้อราจะเกิดเมื่อวันที่ 2 ของการหมักในทุกอัตราการเติมอากาศ หรือเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary โดยสังเกตเห็นเป็นจุดสีแดงทั่วทั้งถังหมัก อีกทั้งเชื้อรามีการสร้างเส้นใยบริเวณผิวหน้าด้านบนของซับสเตอร์ท จากผลการทดลองที่อัตราการเติมอากาศที่ 0.25 ลิตรต่อนาที พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงจะสูงขึ้นจนกระทั่งวันที่ 7 ของการหมักและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง 0.039 – 0.255 จากนั้นการดูดกลืนแสงมีค่าลดลง อยู่ในช่วง 0.074 – 0.250 โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของสีแดงมีลักษณะเป็นเส้นตรงตามระยะเวลาการหมัก ดังรูปที่ 4.6

ผลของการวัดความเข้มข้นของสีแดงของสารสกัดที่ได้จากการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาทีคงที่ตลอดการหมัก พบว่า ความเข้มข้นของสารสีแดงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลังวันที่ 2 ของการหมัก โดยค่าที่สูงขึ้นอยู่ในช่วง 0.050 – 0.135 โดยมีการผลิตสีเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงในช่วงวันที่ 1 – 4 ของการหมัก ดังรูปที่ 4.7

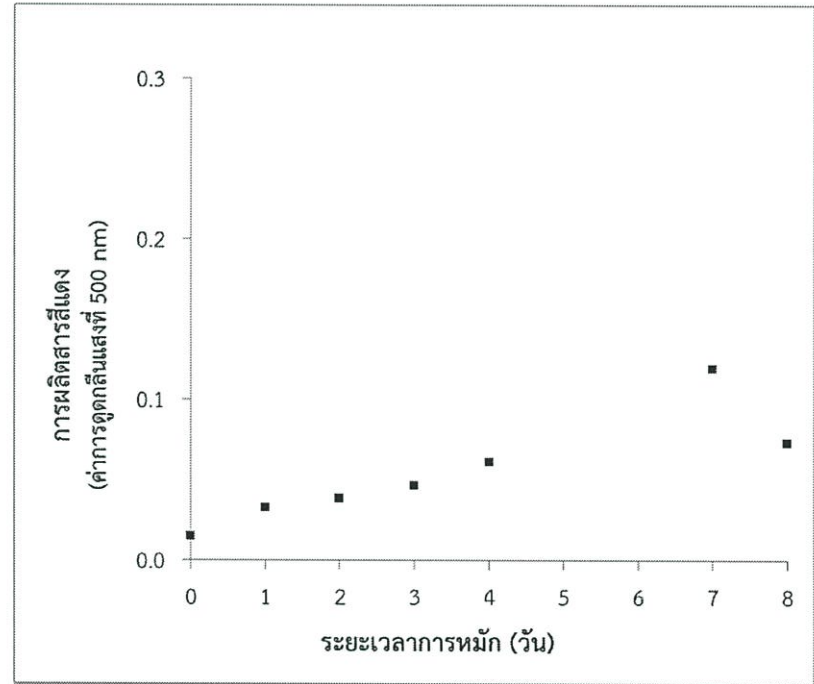
ในขณะที่การหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาทีคงที่ตลอดการหมัก การผลิตสีแดงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเริ่มที่วันที่ 2 ของการหมัก โดยค่าที่สูงขึ้นอยู่ในช่วง 0.025 – 0.155 โดยมีการผลิตสีเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรง ความเข้มข้นของสารสีแดงที่อัตราการเติมอากาศนี้มีค่าน้อยกว่าความเข้มข้นของสารสีแดงที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที ดังรูปที่ 4.8

ในการหมักแบบอัตราการเติมอากาศไม่คงที่ เริ่มต้นการหมักที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที จากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary ของการเจริญของเชื้อรา อัตราการเติมอากาศจะถูกจะปรับให้ลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที และอีกแบบหนึ่งจะถูกปรับให้เพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที โดยพบว่า ในการหมักทั้ง 2 แบบ เมื่อเข้าสู่วันที่ 2 ของการหมักเชื้อราจะผลิตสารสีแดงขึ้น และค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างเป็นเส้นตรงตามระยะเวลาการหมัก โดยวันที่ 0 - 4 ของการหมักแบบลดอัตราการเติมอากาศ มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.117 – 0.135 และในช่วงวันที่ 1 - 4 ของการหมักแบบเพิ่มอัตราการเติมอากาศ มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.040 – 0.145 ดังรูปที่ 4.9 และ 4.10

เมื่อสังเกตสีของตัวอย่างที่เก็บตามความสูงของข้าว และตามเส้นผ่านศูนย์กลางของถังหมักด้วยตา ในวันที่ 2 ของการหมัก หรือเชื้อราเข้าสู่ระยะ stationary พบว่า ซับสเตอร์ทจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีแดงในบางจุดกระจายอยู่ทั่วถังหมัก เมื่อระยะเวลาผ่านไปสีของซับสเตอร์ทในบริเวณที่เป็นสีแดงในช่วงแรกจะเข้มข้น ในขณะที่บางจุดที่เคยเป็นสีขาวในช่วงแรกจะค่อยๆเข้มข้นตามระยะเวลาการหมัก นอกจากสีแล้ว เชื้อรายังผลิตเอทานอลโดยส่งกลิ่นทั่วบริเวณตู้หมัก อีกทั้งซับสเตอร์ทมีความชื้นสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมัก เนื่องมาจากการเติมอากาศชื้นให้กับระบบ

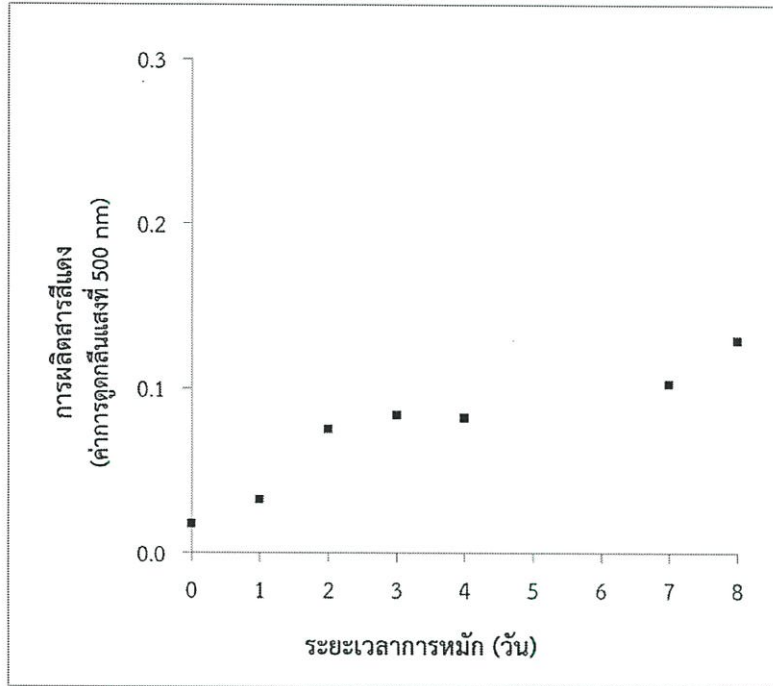


(1)

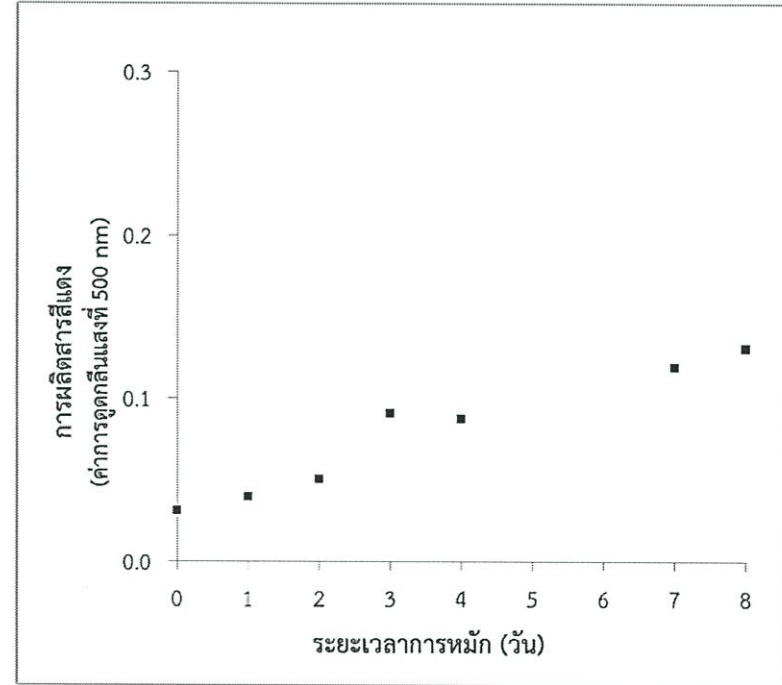


(2)

รูปที่ 4.6 การผลิตสีม่วงจากการหมักข้าวด้วย *Monascus purpureus* TISTR 3615 ที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

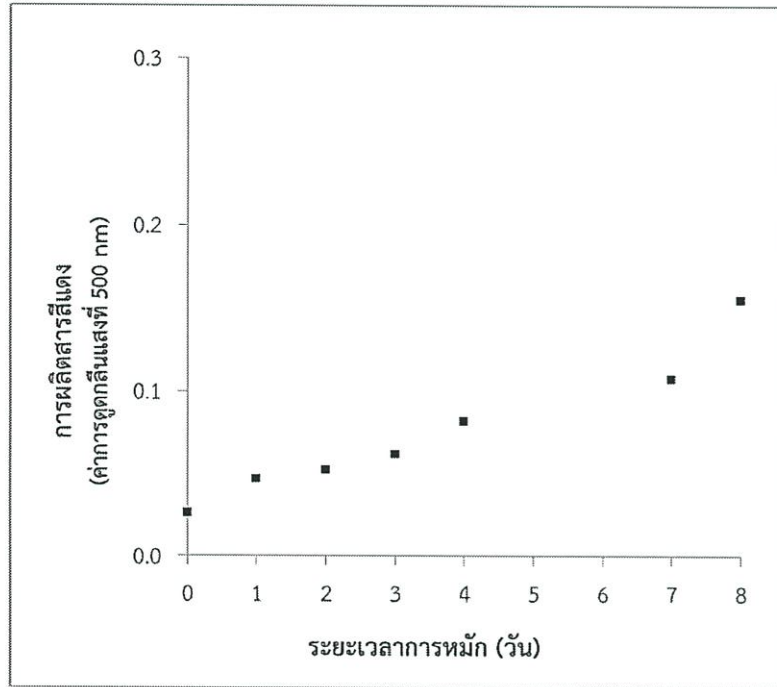


(1)

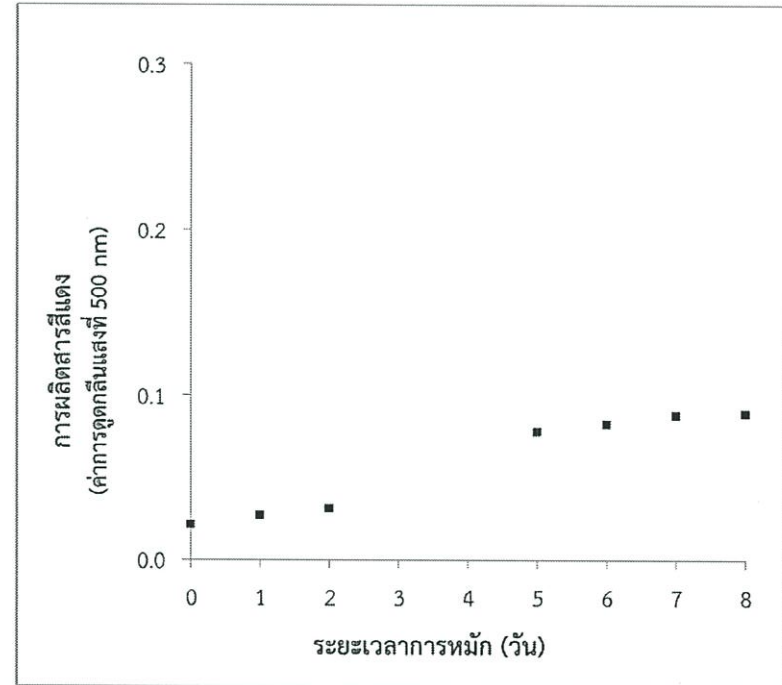


(2)

รูปที่ 4.7 การผลิตสีม่วงจากการหมักข้าวด้วย *Monascus purpureus* TISTR 3615 ที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

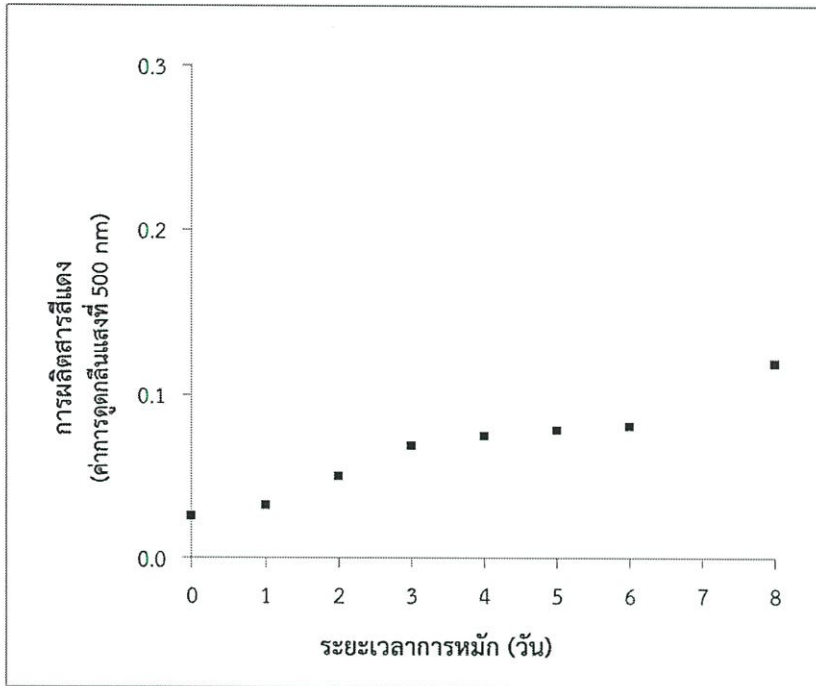


(1)

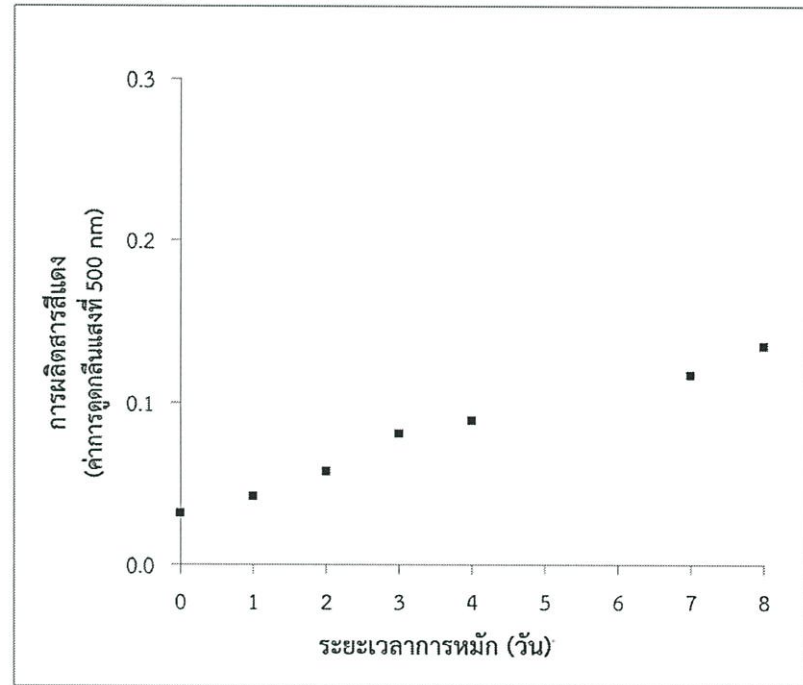


(2)

รูปที่ 4.8 การผลิตสีม่วงจากการหมักข้าวด้วย *Monascus purpureus* TISTR 3615 ที่อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

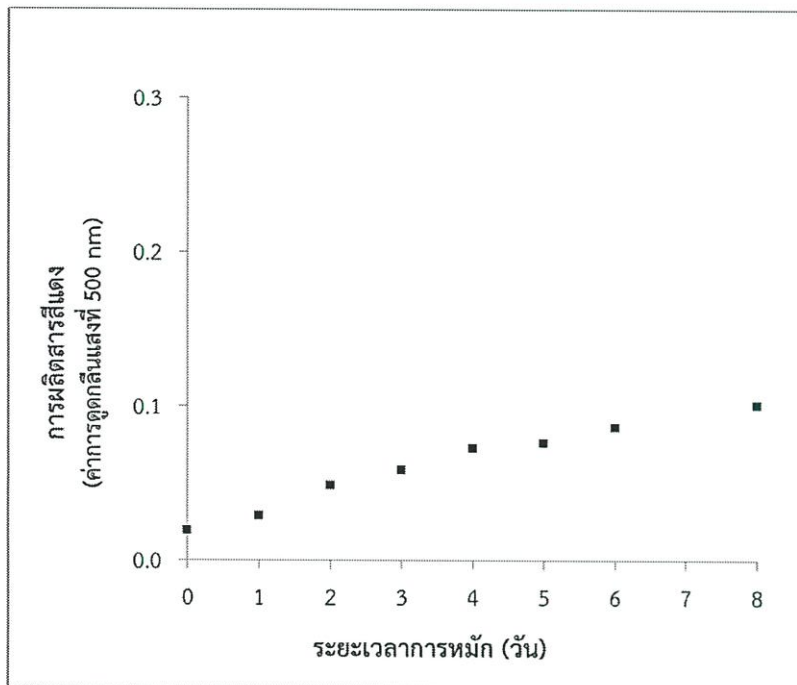


(1)

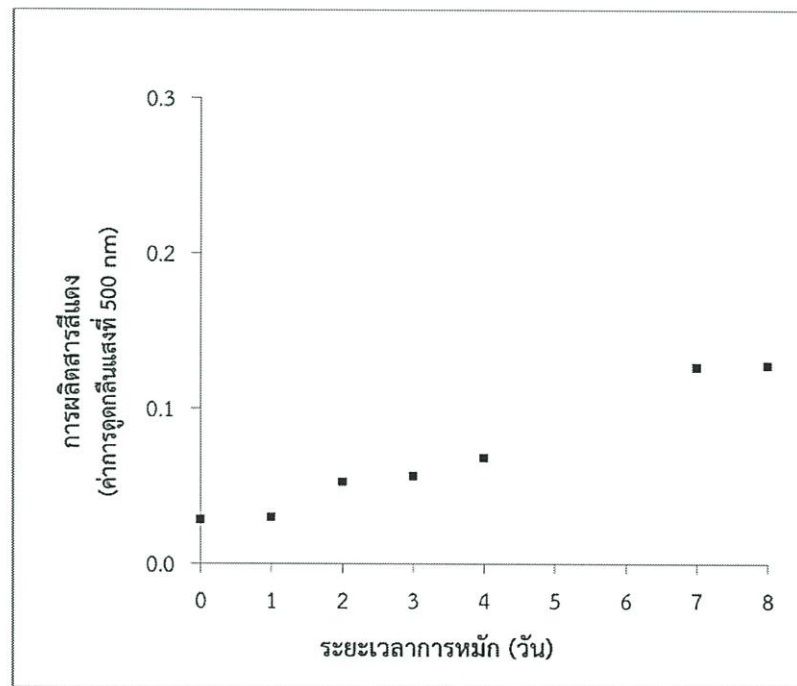


(2)

รูปที่ 4.9 การผลิตสีม่วงจากการหมักข้าวด้วย *Monascus purpureus* TISTR 3615 ที่อัตราการเติมอากาศเริ่มต้น 0.35 ลิตรต่อนาที่ จากนั้นลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2



(1)



(2)

รูปที่ 4.10 การผลิตสีม่วงจากการหมักข้าวด้วย *Monascus purpureus* TISTR 3615 ที่อัตราการเติมอากาศเริ่มต้น 0.35 ลิตรต่อนาที จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที
(1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

4.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการผลิตสารสีแดง

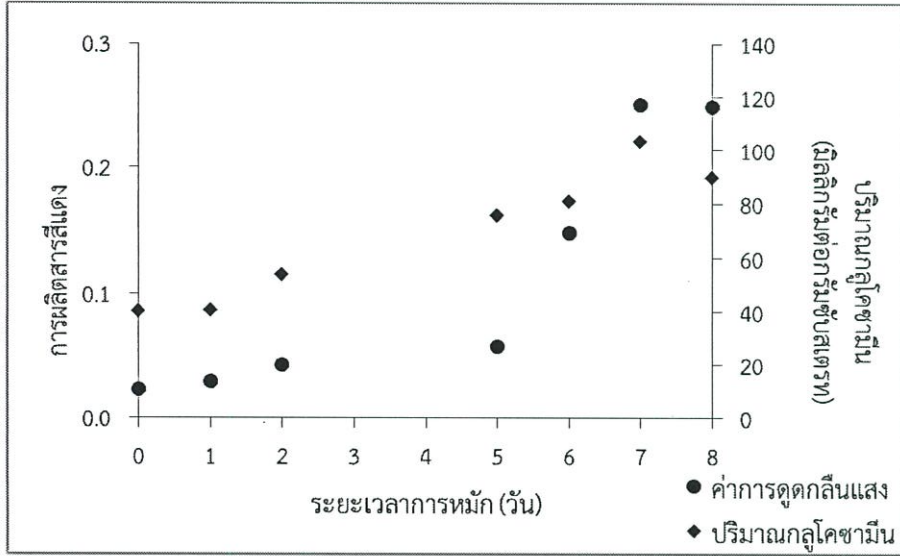
จากการหมักแบบอัตรการเติมอากาศคงที่ที่ 0.25 ลิตรต่อนาที่ พบว่า เมื่อสังเกตสีของ ซับสเตอร์ที่ใช้ในการหมัก ในระยะ exponential ซับสเตอร์จะมีสีขาวตามปกติ โดยค่าการดูดกลืนแสงจะต่ำ ในขณะที่ปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเชื้อราจะผลิตสารสีแดงในช่วงวันที่ 2 - 8 ของการหมัก หรือเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary โดยการผลิตสารสีแดงจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก จะเห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณกลูโคซามีนเริ่มมีค่าคงที่ ซึ่งหมายความว่า การเจริญของเชื้อมีค่าคงที่ในขณะที่มีการผลิตสีของเชื้อรา ดังรูปที่ 4.11

การหมักแบบอัตรการเติมอากาศคงที่ที่ 0.35 และ 0.45 ลิตรต่อนาที่ พบว่า เชื้อรามีการผลิตสีเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 2 ของการหมัก หรือเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary ซึ่งการเจริญของเชื้อรามีค่าคงที่ และจะสังเกตเห็นเป็นจุดสีแดงทั่วถังหมัก และเข้มข้นตามระยะเวลาการหมัก ดังรูปที่ 4.12 และ 4.13

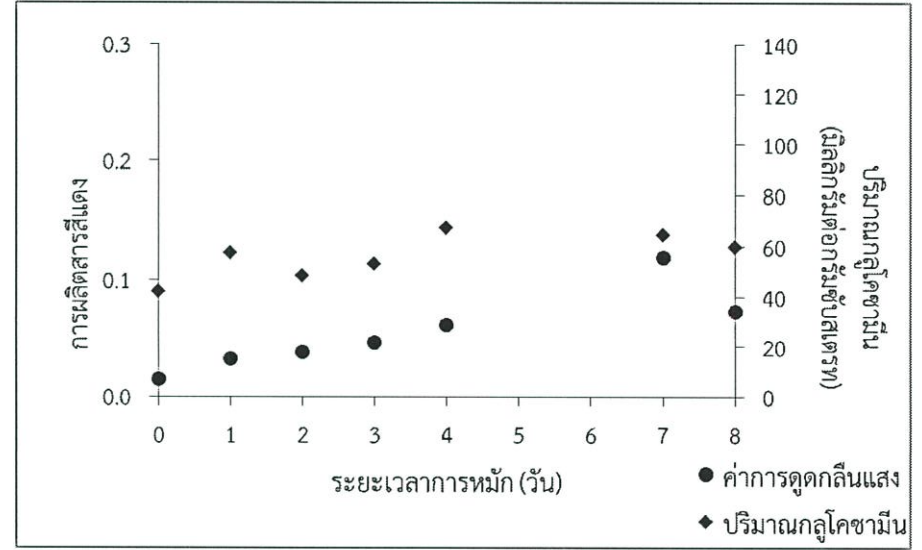
ในการลดหรือเพิ่มอัตรการเติมอากาศ เชื้อรายังคงเข้าสู่ระยะ stationary และผลิตสีในวันที่ 2 ของการหมักเช่นเดียวกับการเติมอากาศแบบคงที่ แต่เมื่อวิเคราะห์การเจริญด้วยปริมาณกลูโคซามีน พบว่า เมื่อปรับอัตรการเติมอากาศ ส่งผลให้การเจริญของเชื้อราลดลง ในขณะที่ความเข้มข้นของสารสีแดงไม่มีความแตกต่างจากการหมักแบบอัตรการเติมอากาศคงที่

4.4 การวิเคราะห์ความคงตัวของเกลียวโซเดียมคลอไรด์ของสารที่สกัดสีแดง

จากการนำตัวอย่างที่ได้ไปทำการสกัดและแช่สารละลายเกลียวเพื่อทดสอบ พบว่า เมื่อทำการแช่สารละลายเกลียวทิ้งไว้ 1 คืน พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดงมีค่าใกล้เคียงกับค่าเริ่มต้นในสารละลายเกลียวทุกความเข้มข้น ซึ่งหมายความว่า การแช่เกลียว 1 คืนยังไม่ส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นของสารสีแดง ในขณะที่เมื่อแช่สารละลายเกลียวต่อไป 2 3 4 และ 5 คืน ส่งผลต่อความเข้มข้นของสารสีแดง โดยเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจะมีค่าลดลงตามระยะเวลาการแช่สารละลายเกลียว ดังรูปที่ 4.16

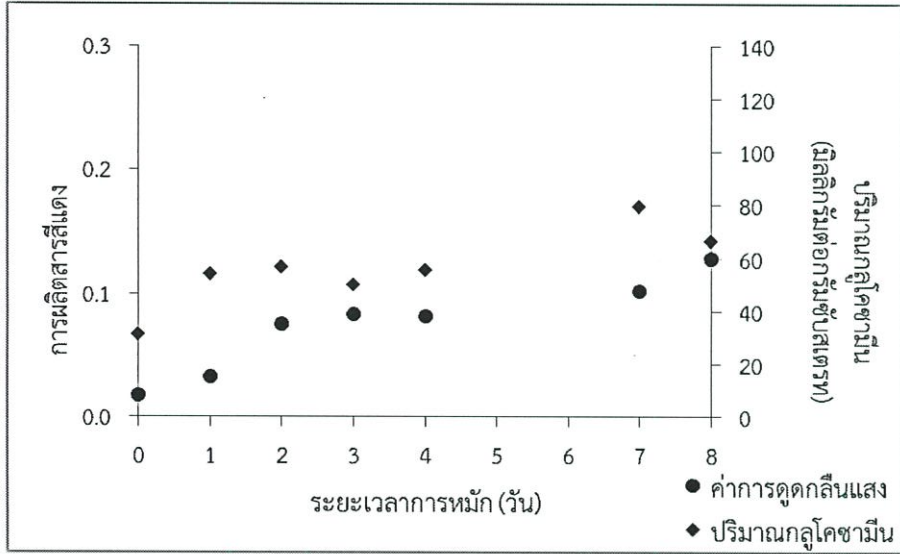


(1)

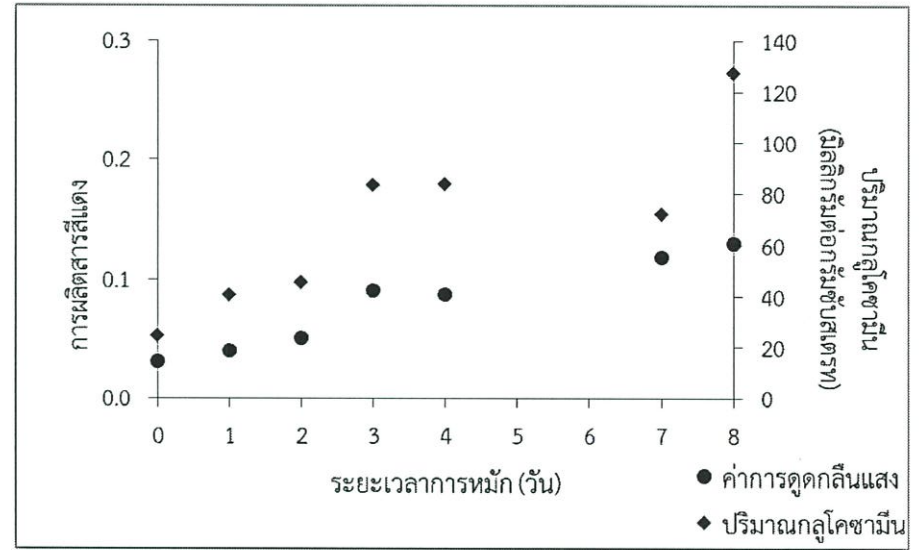


(2)

รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตสีแดงที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

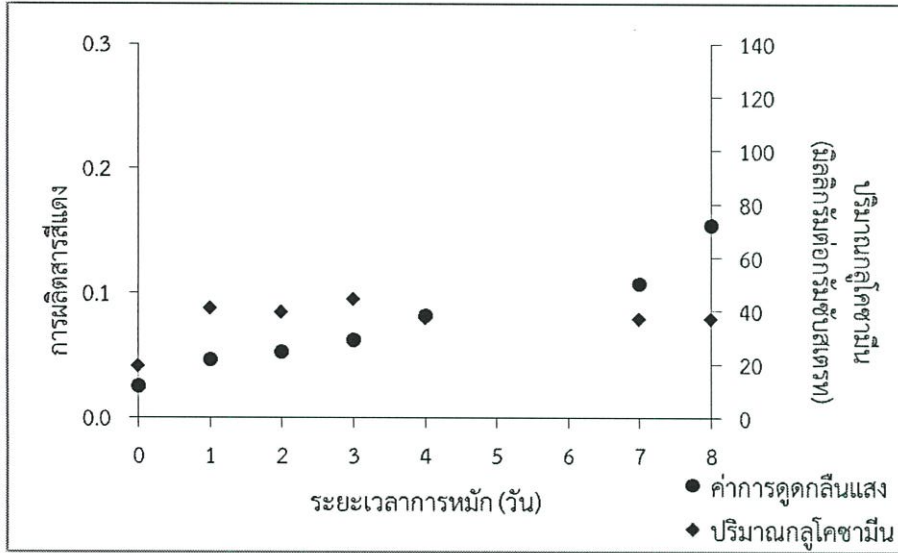


(1)

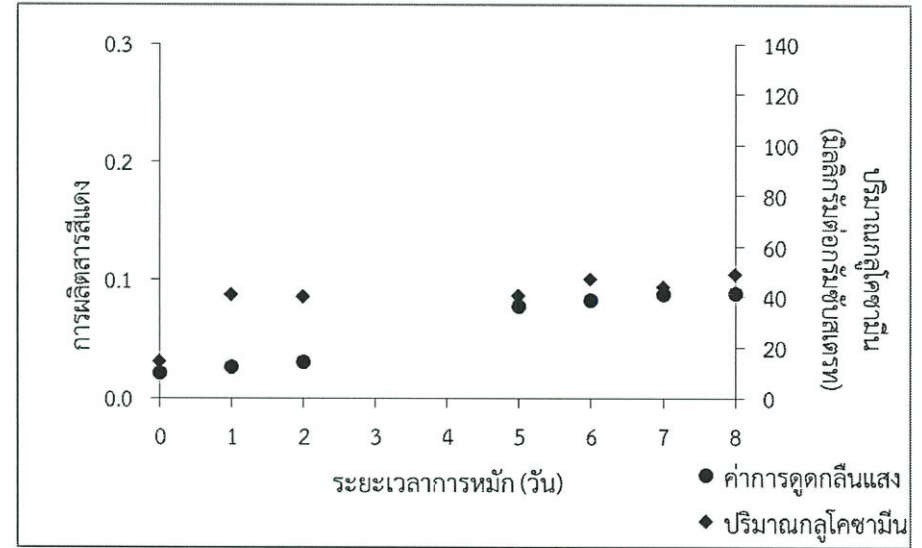


(2)

รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตสีแดงที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

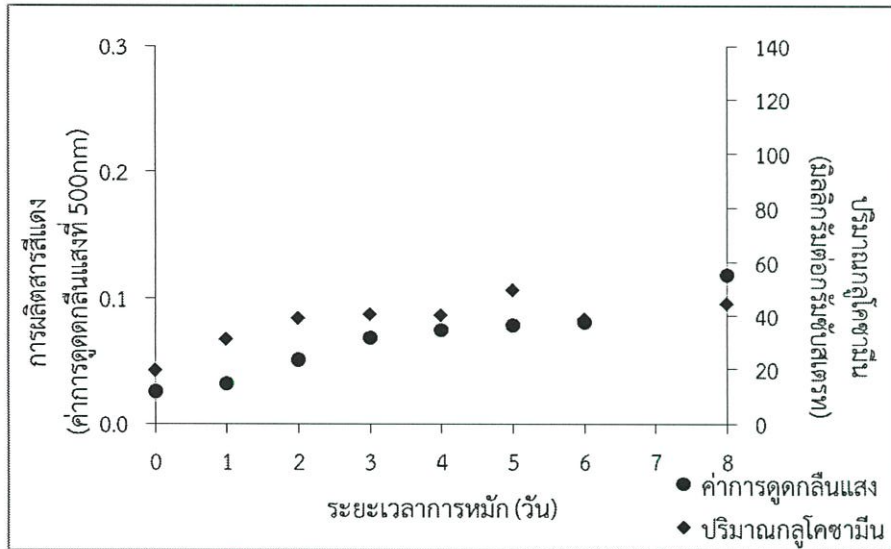


(1)

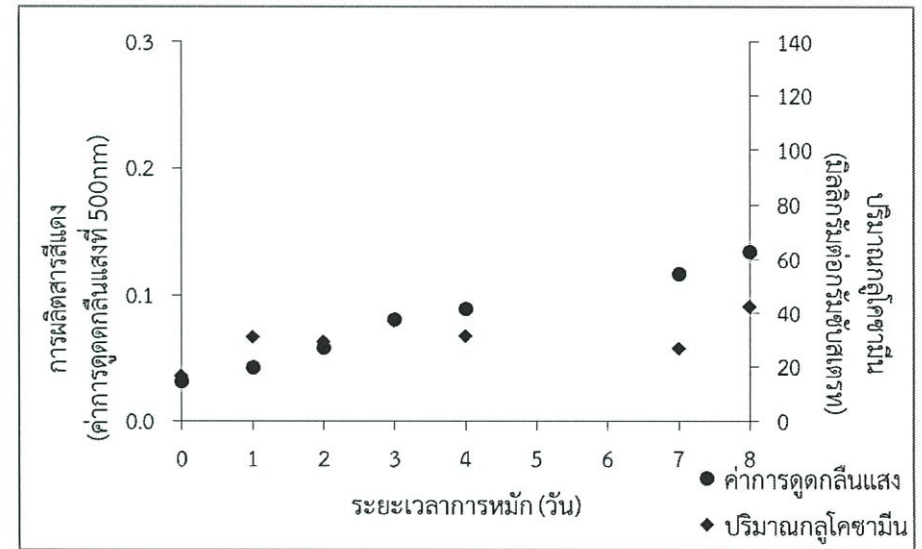


(2)

รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตสีแดงที่อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

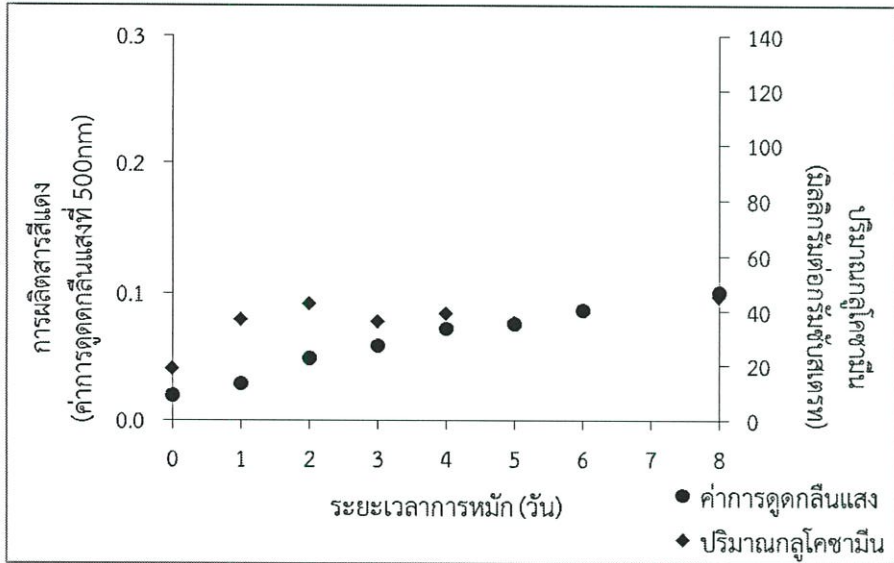


(1)

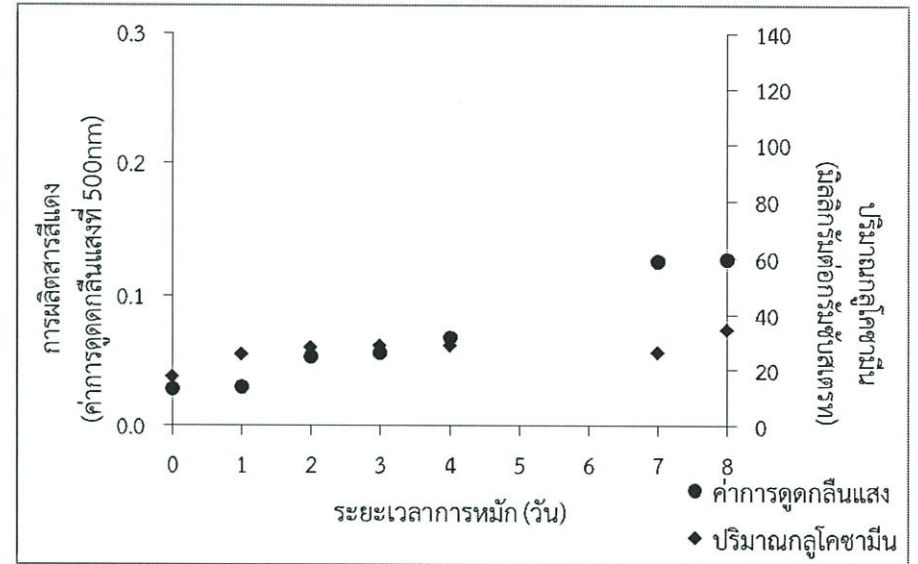


(2)

รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตสีแดงในการหมักแบบเริ่มต้นการหมักด้วยอัตราการเติม 0.35 ลิตรต่อนาที่ จากนั้นลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2

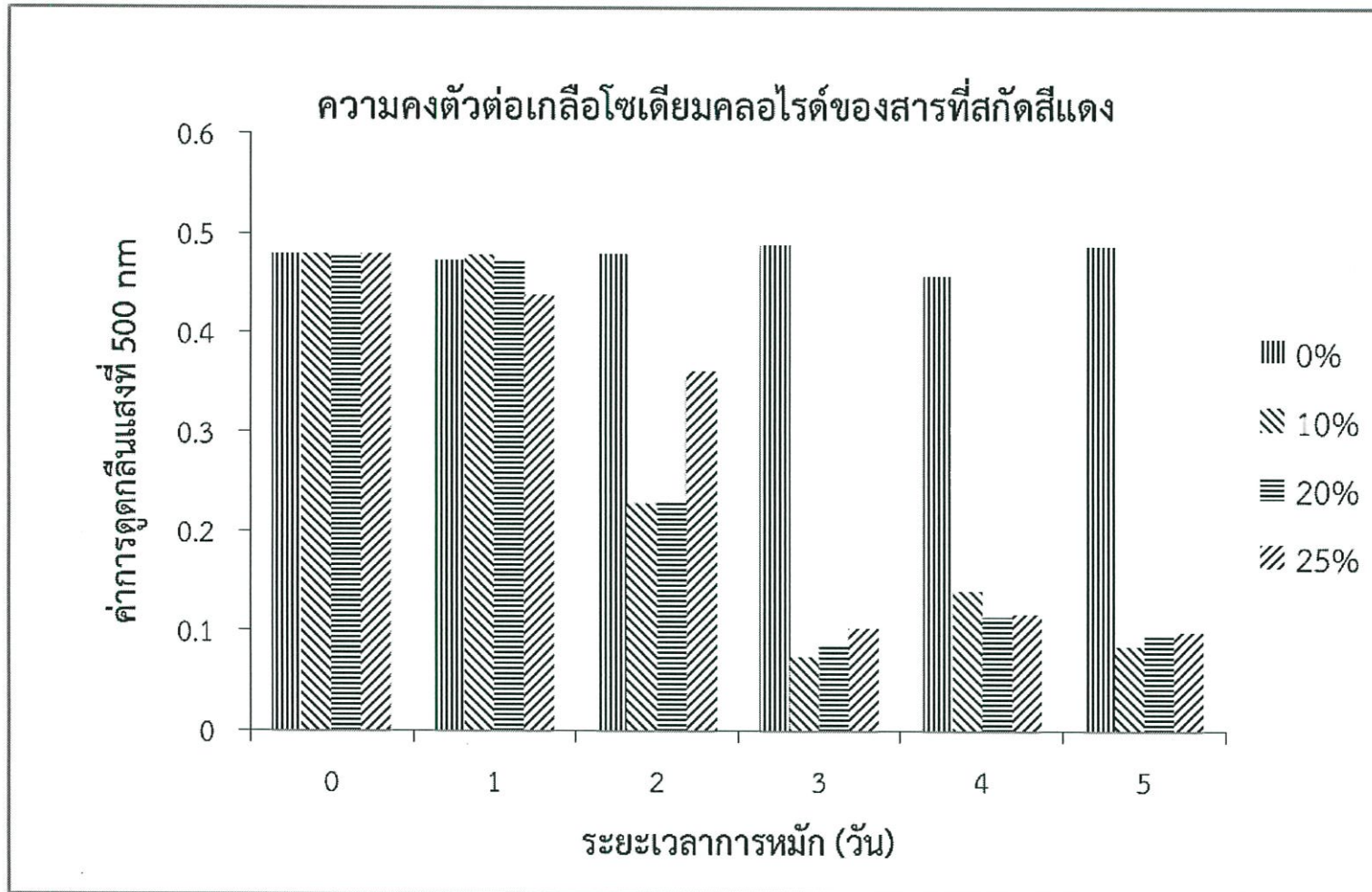


(1)



(2)

รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตสีแดงในการหมักแบบเริ่มต้นการหมักด้วยอัตราการเติม 0.35 ลิตรต่อนาที่ จากนั้นเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที่ (1) การทดลองครั้งที่ 1 และ (2) การทดลองครั้งที่ 2



รูปที่ 4.16 ความเข้มของสารสกัดสีแดงเมื่อแช่สารละลายเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การเติมอากาศในระหว่างการหมักมีผลต่อการเจริญและการผลิตสีของเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3615 แต่รูปแบบการเติมอากาศที่แตกต่างกันนั้นไม่มีผลต่อระยะเวลาการเปลี่ยนระยะจากระยะ exponential สู่ระยะ stationary ของเชื้อรา แม้ว่าการผลิตสารสีแดงของเชื้อราจะเกิดขึ้นในระยะ stationary แต่การปรับอัตราการเติมอากาศในระยะ stationary ของการหมักแบบการเติมอากาศไม่คงที่นั้นไม่มีผลต่อการผลิตสีของเชื้อรา และอัตราการเติมอากาศแบบคงที่ที่ 0.45 ลิตรต่อนาที เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3615 ในขณะที่อัตราการเติมอากาศแบบคงที่ที่ 0.35 ลิตรต่อนาที เหมาะสมต่อการผลิตสีของเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3615

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. เพิ่มความพรุนให้กับเบดของซบสเตอร์เพื่อให้อากาศสามารถผ่านซบสเตอร์ได้อย่างทั่วถึง
2. เพิ่มระบบระบายอากาศให้กับถังหมักแบบแพคเบดเพื่อไม่ให้เกิดการกลั่นตัวของไอน้ำที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเชื้อราขึ้นทำให้ซบสเตอร์มีความชื้น
3. ในกระบวนการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อราควรมีการบันทึกค่าอุณหภูมิ ออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างกระบวนการหมัก

บรรณานุกรม

- กมลวรรณ ตันโสภณ และดวงใจ โอชัยกุล. (2555). การผลิตสารสีของเชื้อรา *Monascus Purpureus* TISTR 3090 บนลูกเต๋อยในสภาวะอาหารแข็ง. กรุงเทพมหานคร: สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กรมทรัพย์สินทางปัญญา. (2552). ประกาศกรมทรัพย์สินทางปัญญาเรื่องการขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ ข้าวเจ้ากเขยเส้าให้ ทะเบียนเลขที่ สข52100024. กรุงเทพมหานคร: กรมข้าว.
- จักรพงษ์ นิมานะ. (2014). การผลิตสารสีจากจุลินทรีย์.
- จุฬารัตน์ ครองแถว. (2547). การผลิตต้นเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* โดยวิธีการหมักแบบแห้งในถังแพคเบต. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ณัฐพงษ์ บุญปอง. (2006). ใบความรู้ที่ 1 เรื่อง อาณาจักรฟังไจ (Kingdom Fungi).
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. (2544). จุลินทรีย์น่ารู้. กรุงเทพมหานคร: องค์การค้าของคุรุสภา.
- นันทนา สีสุข. (2555). วิทยาศาสตร์สำหรับเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุษบา ยงสมิทธิ์. (2540). จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- มยุรา ศรีกัลยานุกุล, ฐปน ชื่นบาล, ศิราภรณ์ ชื่นบาล และไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน. (2555). การผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อราจากน้ำทิ้งโรงงานมันฝรั่งทอดกรอบ. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- มิชัย ลัดดี. (2552). บทปฏิบัติการที่ 8 การผลิตสารสีจากจุลินทรีย์. กรุงเทพมหานคร: คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- วสันต์ สิริยาภวัฒน์, เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และสุภาภรณ์ พิศพันธ์. (2545). การจำลองแบบการถ่ายโอนความร้อนและมวลแบบสองมิติในสภาวะไม่คงตัวภายในถังหมักแบบแพคเบต. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- วิราลีณี จันทร์เป็ง และนพพล เล็กสวัสดิ์. (2556). อะไมเลส (Amylase). เชียงใหม่: สาขาวิศวกรรมกระบวนการอาหาร สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศศิธร แทนทอง. (2551). ข้าวข้าวอก. เพชรบูรณ์: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
- สุนีย์ เอียดมุสิก, วิจิตรา สานพภา และณัฐชยาน์ ชูสุข. (2557). การผลิตสารสีและโมนาโคลิน เค ที่ได้จากการหมักเมล็ดขนุนผงด้วยเชื้อราโมแนสคัสต่างสายพันธุ์. กรุงเทพมหานคร: คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2555). ข้าว. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- อรัญ หันพงศ์กิตติคุณ, เมธินี เหวซึ่งเจริญ, และเรณู ปิ่นทอง. (2530). การผลิตสารสีแดงจาก *Monascus Purpureus* จากข้าวในระดับกึ่งอุตสาหกรรม I. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตข้าวแดง. เชียงใหม่: ภาควิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- อินะฮุอะ ฟุจิโอะ (2546). จุลินทรีย์กับการควบคุมสุขลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม. สุวิมล กীরติพิบูล. กรุงเทพมหานคร: สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี(ไทย-ญี่ปุ่น)
- Anna-Liisa Pasanen, Kati Yli-Pietila, Pertti Pasanen, Pentti Kalliokoski and Juhani Tarhanen. (1999). Ergosterol Content in Various Fungal Species and Biocontaminated Building Materials. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65, No. 1, p. 138-142.
- Asha-Augustine, Imelda-Joseph and R. Paul Raj. (2006). Biomass estimation of *Aspergillus niger* S₁₄ a mangrove fungal isolate and *A. oryzae* NCIM 1212 in solid-state fermentation. Journal of the Marine Biological Association of India. Vol. 48, No. 2, p. 139-146.
- Ariel Rosenblitt, Eduardo Agosin, Javier Delgado and Ricardo Perez-Correa. (2000). Solid Substrate Fermentation of *Monascus purpureus*: Growth, Carbon Balance and Consistency Analysis. Department of Chemical and Bioprocess Engineering. Vol. 16, No. 2, p. 152-162.
- Bashir Sajo Mienda, Ahmad Idi and Abdulhamid Umar. (2011). Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. Research in Biotechnology. Vol. 2, No. 6, p. 21-26.
- Bennett, J. W. and Ciegler, A. (1983). Secondary metabolism. Secondary metabolism and differentiation in fungi. Mycology series Vol. 5.
- Bhargav, S., Panda, B. P.,a, Ali, M. and Javed, S. (2008). Solid-state fermentation: An overview. Journal of Chemical and Biochemical Engineering. Vol. 22, No. 1, p. 49–70.
- Biotechnology. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.microbiologybytes.com/introduction/Biotechnology.html> (17 พฤศจิกายน 2557)
- Carbohydrates. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/carbohydrates.htm> (18 พฤษภาคม 2558)
- Charu Gupta, Amar P. Garg, Dhan Prakash, Sudha Goyal and Sneh Gupta. (2011). Microbes as potential source of biocolours. Pharmacologyonline. Vol 2, p. 1309-1318.
- Chisti, Y. (1999). Fermentation (Industrial). Academic Press.
- Couto, S. R. and Sanroman, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry: A review. Journal of Food Engineering. Vol. 76, p. 291–302.
- David A. Mitchell, Nadia Krieger and Marin Berovic. (2006). Solid-state fermentation bioreactors. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 447 pages.
- David A. Mitchell, Oscar F. von Meien and Nadia Krieger. (2003). Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. Journal of Biochemical Engineering. Vol. 13, p. 137–147.

- Hajjaj H, Klæbe A, Loret MO, Goma G, Blanc PJ and Francois J. (1999). **Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance.** Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65, No. 1, p. 311-314
- Johnson. (2003). **Biology 1009-Summer.**
- Julio Cesar de Carvalho, Ashok Pandey, Bruno Oliva Oishi, Debora Brand, Jose Angel Rodriguez-Leon and Carlos Ricardo Soccol. (2006). **Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation.** Journal of Biochemical Engineering. Vol. 29, p. 262-269.
- Kamla Malik, Jayanti Tokkas and Sneha Goyal. (2012). **Microbial Pigments: A review.** International Journal of Microbial Resource Technology. Vol. 1, No. 4,
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S. and Banerjee, U.C. (2005). **Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation.** Journal of Microbiology. Vol. 1, No. 2, p. 1-9.
- Mukherjee, G., and Singh, S. K. 2011. **Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation.** Journal of process biochemistry. Vol.46, p. 188 - 192.
- Said, F. M. and Brooks, J. (2010). **The effects forced aeration and initial moisture level on red pigment and biomass production by *Monascus ruber* in packed bed solid state fermentation.** International Journal of Environmental Science and Development. Vol.1, No.1, p. 1-4.
- Scragg, A. H. (1991). **Bioreactors in biotechnology.** Ellis Horwood: Great Britain. 330 pages
- Subramaniam, R. and Vimala, R. (2012). **Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substance : A comparative study.** International journal of science and nature. Vol. 3, p. 480-486.
- Survey of Biodiversity – Fungi.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.anselm.edu/homepage/jpitocch/genbi1_0_1/diversity3_Fungi.html (5 พฤษภาคม 2558)
- The fungal cell wall.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://slideplayer.com/slide/774256/> (5 พฤษภาคม 2558)
- Velmurugan, P., Hur, H., Balachandar, V., Kamala-Kannan, S., Lee, K., Lee, S., Chae, J., Shea, P. and Oh, B. (2011). ***Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate.** Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 112, No. 6, p. 590–594.

Zhongping Chen, Zhisheng Wang and Anguo Zhou. (2010). Fungal protein estimation of *Aspergillus oryzae* growing in solid state cultivation conditions. SENRA Academic Publishers. Vol. 4, No. 2, p. 1127-1131.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก วิธีการทดลอง

- ก.1 วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน
- ก.2 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบ

- ข.1 ความชื้น
- ข.2 กราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณปริมาณกลูโคซามีน
- ข.3 ผลการวัดปริมาณกลูโคซามีน และสารสีแดง

ภาคผนวก ค ถังหมัก

- ค.1 ส่วนประกอบของถังหมัก

ภาคผนวก ก
วิธีการทดลอง

ภาคผนวก ก.1

วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน

ขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. นำผงกลูโคซามีนบริสุทธิมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 0 30 40 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. นำสารละลายมาผสมกับสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายใส่ปริมาณ 0.6 มิลลิลิตร ผสมกับแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 12.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 3 นาที
4. เติม MBTH ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร
5. นำของผสมไปต้มเป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาลดอุณหภูมิให้มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว
6. เติม $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร
8. ทำตามข้อ 2 – 7 เพื่อทำแบลนด์สำหรับปรับเครื่องให้อยู่ในตำแหน่ง “ศูนย์” (Set zero)

ภาคผนวก ก.2

วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Biochrom, Single Beam Spectrophotometer Libra S12 200 – 999 nm, USA)

1. เปิดเครื่องสำรองไฟ และเปิดเครื่อง Spectrophotometer
2. กดปุ่ม F2 เพื่อทำการปรับค่ามาตรฐานเครื่อง (Calibration)
3. นำกดปุ่ม λ เพื่อป้อนความยาวคลื่นที่ต้องการวัด
4. เติมนสารละลายให้ได้ประมาณร้อยละ 80 ของคิวเวท จากนั้นคิวเวทด้านที่มีสัญลักษณ์ Q เข้าหาด้านลำแสง กดปุ่ม II เพื่อปรับเครื่องให้อยู่ในตำแหน่งศูนย์
5. นำสารละลายที่เตรียมไว้มาวัด โดยเริ่มจากที่ความเข้มข้นต่ำ

ภาคผนวก ข
ข้อมูลดิบ

ภาคผนวก ข.1

ความชื้น

ตารางที่ ข.1.1 ความชื้นของชั้นสเตรทระหว่างการหมักแบบอัดราการเติมอากาศคงที่ ที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที การทดลองที่ 1

วันที่หมัก	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
0	5.4991	2.7710	2.2576	49.6099
1	5.8668	2.5996	2.0675	55.6896
2	9.6037	3.8992	3.0403	59.3990
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	9.8842	3.6710	3.0291	62.8599
6	10.4456	3.4509	2.8244	66.9631
7	9.7615	3.6853	2.9384	62.2466
8	9.6233	3.4957	2.6700	63.6746

ตารางที่ ข.1.2 ความชื้นของชั้นสเตรทระหว่างการหมักแบบอัดราการเติมอากาศคงที่ ที่อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที การทดลองที่ 2

วันที่หมัก	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
0	9.9295	4.7158	4.0810	55.9748
1	9.1680	4.3472	3.6106	57.8127
2	10.6255	4.705	3.8005	55.7197
3	10.9648	4.7644	3.9346	56.5482
4	16.1031	5.7113	4.8905	64.5329
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	16.3350	5.4030	4.5292	66.9238
8	16.2668	5.7423	4.8059	64.6993

ตารางที่ ข.1.3 ความชื้นของชั้นสเตรทระหว่างการหมักแบบอัดราการเติมอากาศคงที่ ที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที การทดลองที่ 1

วันที่หมัก	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
0	11.5008	5.4052	4.6255	53.0015
1	11.4889	5.5760	4.5374	51.4662
2	14.1310	6.1990	5.1425	56.1319
3	17.1025	7.0128	5.9034	58.9955
4	16.0100	5.7719	4.7134	63.9482
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	17.7618	6.2791	5.1088	64.6483
8	17.6867	5.5318	4.6250	68.7234

ตารางที่ ข.1.4 ความชื้นของชั้นสเตรทระหว่างการหมักแบบอัดราการเติมอากาศคงที่ ที่อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที การทดลองที่ 2

วันที่หมัก	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
0	10.7497	5.0675	4.0892	52.8591
1	10.1824	5.4741	4.4439	46.2396
2	12.2276	5.8562	4.4359	52.1067
3	12.2456	5.0375	3.8590	58.8628
4	13.9693	5.1060	3.8353	63.4484
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	12.4387	4.1479	2.9894	66.6533
8	19.2874	5.8715	4.8119	69.5578

ตารางที่ ข.1.5 ความชื้นของชั้นสเตรทระหว่างการหมักแบบอัดราการเติมอากาศคงที่ ที่อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที การทดลองที่ 1

วันที่หมัก	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
0	9.6189	4.6484	3.6050	51.6743
1	11.0791	5.4979	4.8270	50.3759
2	11.7253	5.3679	4.3017	54.2195
3	11.7694	4.8826	3.8648	58.5145
4	13.8971	5.0714	3.9375	63.5075
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	12.8950	4.6954	3.5672	63.5874
8	19.5654	6.1442	5.0148	68.5966

ตารางที่ ข.1.6 ความชื้นของชั้นสเตรทระหว่างการหมักแบบอัดราการเติมอากาศคงที่ ที่อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที การทดลองที่ 2

วันที่หมัก	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	%Mc (wb)
0	10.7377	5.0159	4.0034	53.2870
1	10.3078	4.9802	3.9530	51.6851
2	10.3764	4.5202	3.7399	56.4377
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	11.5540	3.7081	2.6365	67.9064
6	14.1186	4.6191	3.6651	67.2836
7	12.4186	3.8446	2.8906	69.0416
8	15.1685	4.6108	3.2877	69.6028

ตารางที่ ข.1.7 ความชื้นของชั้นสเตรทระหว่างการหมักแบบอัดอากาศเติมอากาศแบบไม่คงที่ ที่อัดอากาศเติมอากาศเริ่มต้น 0.35 ลิตรต่อนาที่ และลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 1

วันที่หมัก	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
0	11.9583	5.5136	4.8585	53.8931
1	11.7112	5.7544	4.7960	50.8641
2	12.8515	5.7443	4.9963	55.3025
3	12.9634	5.6521	4.8278	56.3996
4	12.7760	5.5168	4.6988	56.8190
5	13.1723	5.2824	4.4802	59.8977
6	12.5246	4.9136	3.8384	60.7684
7	-	-	-	-
8	11.7042	4.9482	4.2694	57.7229

ตารางที่ ข.1.8 ความชื้นของชั้นสเตรทระหว่างการหมักแบบอัดอากาศเติมอากาศแบบไม่คงที่ ที่อัดอากาศเติมอากาศเริ่มต้น 0.35 ลิตรต่อนาที่ และลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 2

วันที่หมัก	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
0	11.4721	5.2352	4.3798	54.3658
1	11.4896	5.5092	4.5136	52.0506
2	10.4102	5.0611	3.9885	51.3833
3	9.9378	4.1058	3.4282	58.6850
4	13.3568	4.8722	3.9469	63.5227
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	10.1291	4.1300	3.1839	59.2264
8	15.2190	5.5560	4.3551	63.4930

ตารางที่ ข.1.9 ความชื้นของชั้นสเตรทระหว่างการหมักแบบอัดอากาศเติมอากาศแบบไม่คงที่ ที่อัดอากาศเติมอากาศเริ่มต้น 0.35 ลิตรต่อนาที่ และเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 1

วันที่หมัก	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
0	13.6283	6.3626	5.7019	53.3133
1	11.4623	5.6977	4.8666	50.2918
2	11.3851	5.1286	4.3733	54.9534
3	10.8538	4.9039	4.1335	54.8186
4	13.6020	5.6171	4.7974	58.7039
5	12.9438	4.6718	3.9851	63.9070
6	13.0076	4.8805	3.7592	62.4796
7	-	-	-	-
8	13.3906	4.5468	3.9019	66.0448

ตารางที่ ข.1.10 ความชื้นของชั้นสเตรทระหว่างการหมักแบบอัดอากาศเติมอากาศแบบไม่คงที่ ที่อัดอากาศเติมอากาศเริ่มต้น 0.35 ลิตรต่อนาที่ และเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 2

วันที่หมัก	น้ำหนักก่อนอบ (กรัม)	น้ำหนักหลังอบ (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ร้อยละความชื้น (ฐานเปียก)
0	11.0566	5.0692	4.2175	54.1523
1	12.2189	5.7136	4.7430	53.2397
2	12.4088	5.6525	4.5660	54.4477
3	11.9156	5.1391	4.1299	56.8708
4	13.2451	4.6795	4.0530	64.6700
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	12.6303	4.7178	3.4574	62.6470
8	13.7570	5.4320	4.3605	60.5146

ภาคผนวก ข.2

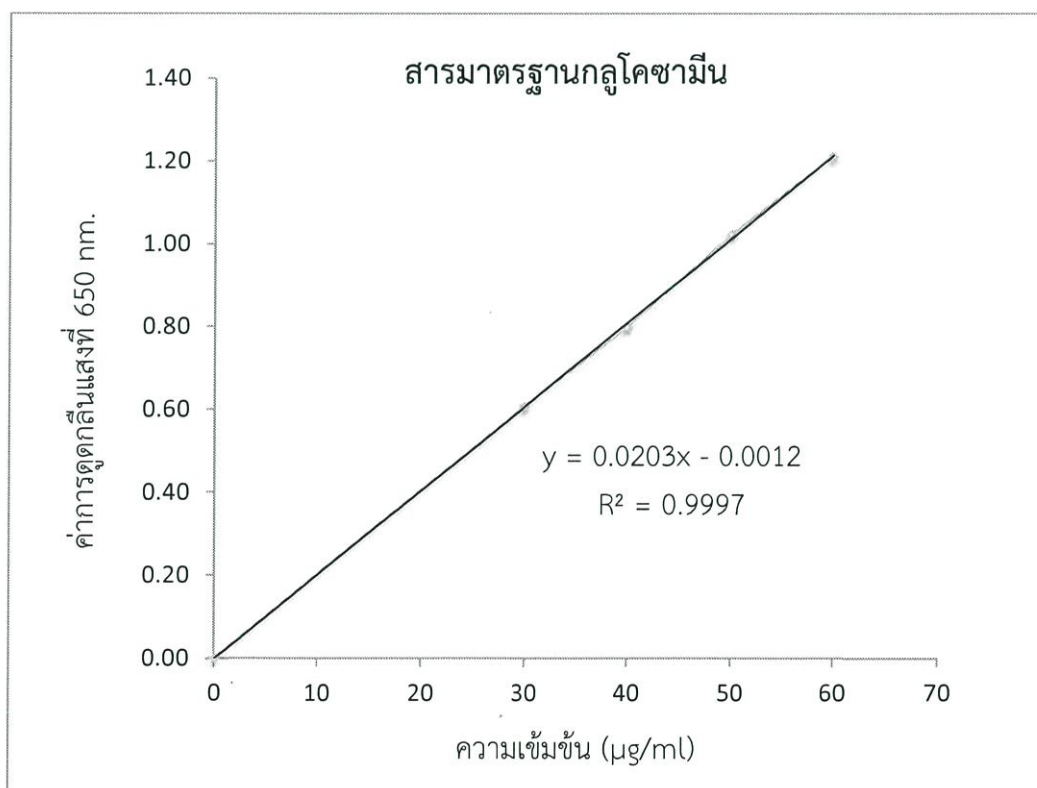
การทำกราฟสารมาตรฐาน

ตารางที่ ข.2.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคซามีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลาย กลูโคซามีน ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าการดูดกลืนแสง	ค่าเฉลี่ยค่าการ ดูดกลืนแสง
0	0.000	0.000	0.000
30	0.621	0.594	0.608
40	0.933	0.663	0.798
50	0.855	1.189	1.022
60	1.037	1.386	1.212

นำค่าเฉลี่ยในตารางที่ 13 มาพลอตกราฟ จะได้สมการของสารมาตรฐานดังสมการที่ 1 แสดง
ในรูปที่ 1 ข

$$y = 0.0203x - 0.0012 \quad (\text{ข.2.1})$$



รูปที่ ข.2.1 สารมาตรฐานกลูโคซามีน

ภาคผนวก ข.3
การวัดปริมาณกลูโคซามีน และสารสีแดง

ตารางที่ ข.3.1 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคซามีน และสารสีแดงในตัวอย่างจากการหมักแบบคงที่ ที่ อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 1

วันที่หมัก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสง ของการหาปริมาณกลูโคซามีน (650 นาโนเมตร)			ค่าการดูดกลืนแสง ของสารสีแดง (500 นาโนเมตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.0106	0.084	0.087	0.0855	0.029	0.017	0.023
1	0.0109	0.085	0.092	0.0885	0.018	0.041	0.030
2	0.0104	0.099	0.126	0.1125	0.063	0.023	0.043
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	0.0105	0.161	0.159	0.1600	0.053	0.062	0.058
6	0.0112	0.176	0.188	0.1820	0.136	0.160	0.148
7	0.0105	0.217	0.220	0.2185	0.284	0.217	0.251
8	0.0110	0.212	0.185	0.1985	0.230	0.268	0.249

ตารางที่ ข.3.2 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคซามีน และสารสีแดงในตัวอย่างจากการหมักแบบคงที่ ที่ อัตราการเติมอากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 2

วันที่หมัก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสง ของการหาปริมาณกลูโคซามีน (650 นาโนเมตร)			ค่าการดูดกลืนแสง ของสารสีแดง (500 นาโนเมตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.0112	0.095	0.093	0.0940	0.014	0.016	0.015
1	0.0111	0.127	0.128	0.1275	0.024	0.041	0.033
2	0.0116	0.113	0.112	0.1125	0.041	0.036	0.039
3	0.0108	0.114	0.116	0.1150	0.042	0.051	0.047
4	0.0103	0.147	0.131	0.1390	0.049	0.074	0.062
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	0.0102	0.140	0.123	0.1315	0.115	0.124	0.120
8	0.0113	0.136	0.135	0.1355	0.078	0.069	0.074

ตารางที่ ข.3.3 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคซามีน และสารสีแดงในตัวอย่างจากการหมักแบบคงที่ ที่ อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 1

วันที่หมัก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงของการหาปริมาณกลูโคซามีน (650 นาโนเมตร)			ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดง (500 นาโนเมตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.0106	0.062	0.070	0.0660	0.017	0.018	0.018
1	0.0109	0.105	0.132	0.1185	0.052	0.013	0.033
2	0.0108	0.125	0.121	0.1230	0.065	0.085	0.075
3	0.0106	0.107	0.106	0.1065	0.085	0.082	0.084
4	0.0105	0.148	0.086	0.1170	0.079	0.085	0.082
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	0.0105	0.171	0.165	0.1680	0.104	0.101	0.103
8	0.0110	0.152	0.141	0.1465	0.136	0.121	0.129

ตารางที่ ข.3.4 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคซามีน และสารสีแดงในตัวอย่างจากการหมักแบบคงที่ ที่ อัตราการเติมอากาศ 0.35 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 2

วันที่หมัก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงของการหาปริมาณกลูโคซามีน (650 นาโนเมตร)			ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดง (500 นาโนเมตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.0109	0.050	0.056	0.053	0.018	0.044	0.031
1	0.0102	0.084	0.082	0.083	0.044	0.035	0.040
2	0.0109	0.106	0.093	0.100	0.055	0.046	0.051
3	0.0102	0.181	0.160	0.171	0.066	0.115	0.091
4	0.0106	0.178	0.179	0.179	0.086	0.089	0.088
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	0.0104	0.166	0.135	0.151	0.138	0.100	0.119
8	0.0101	0.281	0.238	0.260	0.124	0.137	0.131

ตารางที่ ข.3.5 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคซามีน และสารสีแดงในตัวอย่างจากการหมักแบบคงที่ ที่ อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 1

วันที่หมัก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงของการหาปริมาณกลูโคซามีน (650 นาโนเมตร)			ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดง (500 นาโนเมตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.0106	0.049	0.031	0.0400	0.032	0.019	0.026
1	0.0100	0.086	0.077	0.0815	0.049	0.044	0.047
2	0.0105	0.087	0.078	0.0825	0.030	0.075	0.053
3	0.0103	0.096	0.087	0.0915	0.052	0.072	0.062
4	0.0106	0.081	0.077	0.0790	0.093	0.071	0.082
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	0.0103	0.069	0.082	0.0755	0.098	0.117	0.108
8	0.0098	0.079	0.065	0.0720	0.148	0.161	0.155

ตารางที่ ข.3.6 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคซามีน และสารสีแดงในตัวอย่างจากการหมักแบบคงที่ ที่ อัตราการเติมอากาศ 0.45 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 2

วันที่หมัก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงของการหาปริมาณกลูโคซามีน (650 นาโนเมตร)			ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดง (500 นาโนเมตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.0108	0.032	0.027	0.030	0.016	0.026	0.021
1	0.0106	0.087	0.085	0.086	0.033	0.020	0.027
2	0.0103	0.087	0.077	0.082	0.018	0.043	0.031
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	0.0103	0.078	0.088	0.083	0.084	0.072	0.078
6	0.0104	0.096	0.099	0.098	0.075	0.091	0.083
7	0.0106	0.097	0.088	0.093	0.091	0.085	0.088
8	0.0102	0.101	0.099	0.100	0.083	0.095	0.089

ตารางที่ ข.3.7 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคซามีน และสารสีแดงในตัวอย่างจากการหมักแบบไม่คงที่ ที่อัตราการเติมอากาศเริ่มต้น 0.35 ลิตรต่อนาที และลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที การทดลองที่ 1

วันที่หมัก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงของการหาปริมาณกลูโคซามีน (650 นาโนเมตร)			ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดง (500 นาโนเมตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.0108	0.046	0.037	0.0415	0.019	0.031	0.025
1	0.0102	0.073	0.054	0.0635	0.031	0.032	0.032
2	0.0102	0.064	0.095	0.0795	0.055	0.045	0.050
3	0.0104	0.091	0.077	0.0840	0.039	0.098	0.069
4	0.0106	0.096	0.075	0.0855	0.100	0.049	0.075
5	0.0093	0.084	0.101	0.0925	0.101	0.055	0.078
6	0.0099	0.088	0.065	0.0765	0.081	0.080	0.081
7	-	-	-	-	-	-	-
8	0.0103	0.095	0.088	0.0915	0.124	0.114	0.119

ตารางที่ ข.3.8 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคซามีน และสารสีแดงในตัวอย่างจากการหมักแบบไม่คงที่ ที่อัตราการเติมอากาศเริ่มต้น 0.35 ลิตรต่อนาที และลดลงเป็น 0.25 ลิตรต่อนาที การทดลองที่ 2

วันที่หมัก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงของการหาปริมาณกลูโคซามีน (650 นาโนเมตร)			ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดง (500 นาโนเมตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.0100	0.028	0.036	0.0320	0.026	0.036	0.031
1	0.0104	0.055	0.073	0.0640	0.033	0.050	0.042
2	0.0103	0.074	0.045	0.0595	0.065	0.049	0.057
3	0.0105	0.065	0.089	0.0770	0.084	0.077	0.081
4	0.0102	0.052	0.074	0.0630	0.095	0.083	0.089
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	0.0109	0.058	0.056	0.0570	0.086	0.148	0.117
8	0.0100	0.083	0.086	0.0845	0.100	0.170	0.135

ตารางที่ ข.3.9 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคซามีน และสารสีแดงในตัวอย่างจากการหมักแบบไม่คงที่ ที่อัตราการเติมอากาศเริ่มต้น 0.35 ลิตรต่อนาที่ และเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 1

วันที่หมัก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงของการหาปริมาณกลูโคซามีน (650 นาโนเมตร)			ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดง (500 นาโนเมตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.0108	0.037	0.045	0.0410	0.018	0.020	0.019
1	0.0102	0.075	0.072	0.0735	0.031	0.026	0.029
2	0.0102	0.109	0.067	0.0880	0.046	0.051	0.049
3	0.0104	0.076	0.076	0.0760	0.055	0.061	0.058
4	0.0106	0.058	0.098	0.0780	0.065	0.08	0.073
5	0.0093	0.052	0.098	0.0750	0.057	0.095	0.076
6	0.0099	0.081	0.092	0.0865	0.085	0.088	0.087
7	-	-	-	-	-	-	-
8	0.0103	0.095	0.079	0.0870	0.106	0.095	0.101

ตารางที่ ข.3.10 ค่าการดูดกลืนแสงของกลูโคซามีน และสารสีแดงในตัวอย่างจากการหมักแบบไม่คงที่ ที่อัตราการเติมอากาศเริ่มต้น 0.35 ลิตรต่อนาที่ และเพิ่มขึ้นเป็น 0.45 ลิตรต่อนาที่ การทดลองที่ 2

วันที่หมัก	น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)	ค่าการดูดกลืนแสงของการหาปริมาณกลูโคซามีน (650 นาโนเมตร)			ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีแดง (500 นาโนเมตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.0099	0.030	0.037	0.0335	0.013	0.043	0.028
1	0.0105	0.067	0.038	0.0525	0.031	0.028	0.030
2	0.0099	0.065	0.044	0.0545	0.047	0.058	0.053
3	0.0108	0.073	0.049	0.0610	0.046	0.066	0.056
4	0.0102	0.053	0.063	0.0580	0.052	0.083	0.068
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	0.0104	0.058	0.050	0.0540	0.111	0.142	0.127
8	0.0100	0.048	0.090	0.0690	0.155	0.101	0.128

ตารางที่ ข.3.11 ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อแชนสารละลายโซเดียมคลอไรด์

วันที่แช่	ความเข้มข้นของ NaCl			
	0%	10%	20%	25%
1	0.432	0.514	0.452	0.412
	0.542	0.506	0.499	0.477
	0.448	0.414	0.475	0.428
	ค่าเฉลี่ย	0.474	0.478	0.475
2	0.514	0.236	0.238	0.231
	0.493	0.233	0.178	0.419
	0.433	0.22	0.277	0.432
	ค่าเฉลี่ย	0.480	0.230	0.231
3	0.473	0.09	0.069	0.085
	0.504	0.065	0.129	0.113
	0.489	0.074	0.07	0.115
	ค่าเฉลี่ย	0.489	0.076	0.089
4	0.453	0.137	0.168	0.101
	0.433	0.141	0.096	0.133
	0.487	0.147	0.085	0.121
	ค่าเฉลี่ย	0.458	0.142	0.116
5	0.465	0.103	0.115	0.111
	0.514	0.077	0.091	0.103
	0.483	0.077	0.092	0.087
	ค่าเฉลี่ย	0.487	0.086	0.099

ภาคผนวก ค
ถึงหมัก

ภาคผนวก ค.1
ส่วนประกอบของถังหมัก



รูปที่ ค.1.1 ฐานรองถังหมัก



รูปที่ ค.1.2 ตะแกรงรองขับสเตรท และวัสดุกระจายลม



(1)

(2)

รูปที่ ค.1.3 (1) ส่วนฝาปิดท้ายถังหมัก (2) ส่วนฝาปิดด้านบนถังหมัก



(1)

(2)

รูปที่ ค.1.4 (1) ส่วนด้านหน้าตัวถังหมัก (2) ส่วนด้านข้างของถังหมัก



รูปที่ ค.1.5 ถังหมักแบบแพคเบต