abst.

ข้อมูลข่าวสาร วศ.

ข้อมูลข่าวสารของกรมวิทยาศาสตร์บริการ
ตาม พ.ร.บ. ข้อมูลข่าวสารของราชการ พ.ศ. 2540

วศ
กช
อว 40

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 8ว

เรื่องที่ 1

การศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง

โดย

นางสาวรัตนา สุขสรรค์

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ 7ว

กลุ่มงานจุลชีววิทยา

กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

ผู้ร่วมงานวิจัย

นายทรงศักดิ์ ลิ่มไพบูลย์

นางสาวอารี ชูวิสิฐกุล

นางสาวอรทัย ลีลาพจนาพร

นางสาวศิริบุญ พูลสวัสดิ์

นางสาวสุจิตรา วิมลจิตต์

นางสาวพูนทรัพย์ วิชัยพงษ์

นางสาวนงนุช เมธียนต์พิริยะ

นางสาวสุกัลยา พลเดช

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 4

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ตาม พ.ร.บ. ... พ.ศ. 2540

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 8ว

เรื่องที่ 1

การศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง

โดย

วศ
เลขหมู่ กช
ออ40
เลขทะเบียน 10505
วันที่ 5 ก.พ. 45

นางสาวรัตนา สุขสรรค์

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ 7ว

กลุ่มงานจุลชีววิทยา

กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

ผู้ร่วมงานวิจัย

นายทรงศักดิ์ ลิ่มไพบูลย์

นางสาวอารี ชูวิสิฐกุล

นางสาวอรทัย ลีลาพจนาพร

นางสาวศิริบุญ พูลสวัสดิ์

นางสาวสุจิตรา วิมลจิตต์

นางสาวพูนทรัพย์ วิชัยพงษ์

นางสาวนงนุช เมธียนต์พิริยะ

นางสาวสุกัลยา พลเดช

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 4

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

บทคัดย่อ

การผลิตข้าวแดงโดยใช้ข้าวพันธุ์เสาไห้ เชื้อราที่ใช้คือ โมนัสคัส เพอร์พิวเรียส (Monascus purpureus) รหัส RT จากการทดลองพบว่า หลังการนำเชื้อรา โมนัสคัส เพอร์พิวเรียส รหัส RT ไปปรับปรุงประสิทธิภาพด้วยแสงอัลตราไวโอเลท (UV) ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร ได้สายพันธุ์กลายใหม่ $RTUV_6$ ซึ่งให้ความเข้มของสีนอกเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์เดิม RT 3 เท่า และความเข้มของสีแดงภายในเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์เดิม RT 4 เท่า ระยะเวลาในการหมักข้าวแดงสั้นกว่าการใช้เชื้อราสายพันธุ์เดิม RT ความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทางคือ ที่ร้อยละ 80-90 และที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 จะดีที่สุด ตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตได้ทุกตัวอย่างวิเคราะห์แล้วไม่พบสารพิษของเชื้อราอะฟลาทอกซิน ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารพบว่าข้าวแดงที่ผลิตได้มีค่าความชื้นอยู่ระหว่างร้อยละ 6.57 ถึง 10.80 โปรตีน (NX6.25) ร้อยละ 16.20 ถึง 32.40 ไขมันร้อยละ 1.40 ถึง 6.28 กากร้อยละ 3.56 ถึง 9.29 เถ้าร้อยละ 0.70 ถึง 1.320 คาร์โบไฮเดรทร้อยละ 44.76 ถึง 71.57 ค่าพลังงานความร้อน 334.3 ถึง 365.10 กิโลแคลอรี่ ต่อ 100 กรัม แคลเซียม 12.50 ถึง 18.40 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ฟอสฟอรัส 160.50 ถึง 244.6 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ,เหล็ก 4.48 ถึง 8.35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไนอะซิน 4.92 ถึง 88.90 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม วิตะมินบี $_2$ 0.67 ถึง 4.52 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม วิตะมินบี$_6$ 1.34 ถึง 6.37 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม วิตะมินบี$_{12}$ 0.07 ถึง 0.16 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม

สารบาญ

	หน้า
สารบาญตาราง	ข
สารบาญภาพ	ค
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	7
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	8
ผลการศึกษาทดลอง	16
วิจารณ์ผลการศึกษาทดลอง	23
สรุปผลการศึกษาทดลอง	28
กิตติกรรมประกาศ	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	
1. วิธีการแยกเชื้อราข้าวแดงสายพันธุ์โมนัสคัส (Monascus spp.) ตัวอย่างที่ขายอยู่ตามท้องตลาด	58
2. การปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อรา	58
ภาคผนวก ข	
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม	61
ภาคผนวก ค	
วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง	63

หน้า

สารบาญตาราง

ตารางที่

1. ตารางแสดงถึงการเจริญเติบโตของเชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ ที่มีข้าวผสมอยู่ร้อยละ 3 ของเชื้อราสายพันธุ์เดิม RT และสายพันธุ์กลาย RTUV 32
2. ตารางแสดงความเข้มของสีของเชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลาย 33
3. ตารางแสดงผลการผลิตข้าวแดงเปรียบเทียบระหว่างเชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส สายพันธุ์เดิม RT และสายพันธุ์กลาย $RTUV_6$ 34
4. ตารางแสดงการดูดซึมน้ำของข้าวพันธุ์เสาไห้ ต่อการผลิตข้าวแดง 35
5. ตารางแสดงผลการดูดซึมน้ำของเมล็ดข้าวพันธุ์เสาไห้ 36
6. ตารางแสดงผลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการผลิตข้าวแดง 37
7. ตารางแสดงความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องอบเพาะเชื้อเมื่อรมด้วยไอน้ำเดือด 38
8. ตารางแสดงผลการผลิตข้าวแดงในห้องอบเพาะเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 39
9. ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบข้าวแดงที่ผลิตในห้องอบเพาะเชื้อและตู้อบเพาะเชื้อ 40
10. ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตได้ 41
11. ตารางแสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบตัวอย่างข้าวแดงจากตลาดและตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตขึ้นเองจากข้าวพันธุ์หอมมะลิและเสาไห้ 42

หน้า

สารบาญภาพ

ภาพที่

1. เชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส 43
2. สูตรโครงสร้างของสารสีที่ผลิตโดยเชื้อราสายพันธุ์โมนัสคัส 44
3. การแตกออกของสารสีจากลำต้นของเชื้อราสู่ภายนอก 45
4. ตัวอย่างข้าวแดง 46
5. ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ใช้ข้าวแดงเป็นส่วนประกอบ 47
6. เปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อราโมนัสคัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 48
7. เปรียบเทียบข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อราสายพันธุ์ที่แยกได้จากตลาด และสายพันธุ์ของ วศ. 49
8. เปรียบเทียบข้าวแดงที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ของเชื้อราต่าง ๆ 50
9. แสดงถึงเชื้อรากลายสายพันธุ์ $RTUV_6$ และสายพันธุ์เดิม RT 51
10. แสดงปริมาณสีที่ผลิตโดยเชื้อราสายพันธุ์กลาย RTUV และ สายพันธุ์เดิม RT 52
11. แสดงถึงปริมาณสีที่ผลิตจากข้าวแช่น้ำในระยะเวลาต่าง ๆ กัน 53
12. ข้าวแดงที่ผลิตจากข้าวแช่น้ำในระยะเวลาต่าง ๆ กัน 54
13. การหมักข้าวแดงในตู้อบเพาะเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิและความชื้น 55
14. การหมักข้าวแดงในห้องอบเพาะเชื้อขนาด 3 เมตร x 3 เมตร 56
15. ตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตได้ 57

คำนำ

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์หมักชนิดหนึ่ง ทำโดยการหมักข้าวกับเชื้อราสายพันธุ์โมนัสคัส *(Monascus spp.)* (ภาพที่ 1) เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตของเหลวในผนังเซลล์ ซึ่งประกอบด้วยสารสีเหลือง โมนัสซิน (monascin) $C_{21}H_{26}O_5$ หรือโมนัสโคฟลาวิน (syn. monascoflavin [Nga, B.H and Lee, Y.K 1990]) $C_{17}H_{22}O_4$ หรือ อังกาฟลาวิน (ankaflavin) $C_{23}H_{30}O_5$ สารสีแดง รูโบรพังต์ตาติน (rubropunctatin) $C_{21}H_{22}O_5$ หรือโมนัสโครูบริน (monascorubrin) $C_{23}H_{26}O_5$ และสารสีม่วง รูโบรพังค์ตามาย (rubropunctamine) $C_{21}H_{23}NO_4$ หรือ โมนัสโครูบรามาย (monascorubramine) $C_{23}H_{27}NO_4$ ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2 จะไหลมาตามท่อผนังเซลล์ออกสู่ปลายยอด (tips of the hyphae) ตามภาพที่ 3 เจาะลงสู่เมล็ดข้าว และขณะที่สปอร์แตกออกงอกเป็นต้นใหม่ราจะย่อยข้าวและปล่อยสารสีลงไปในเมล็ดข้าว สารสีจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มขึ้นเรื่อย ๆ ตามอายุของเชื้อรา และเมื่อราตายไปสารสีก็ยังคงอยู่ในเมล็ดข้าว ทำให้ข้าวมีสีแดงทั่วทั้งเมล็ด เรียกผลิตภัณฑ์นี้ว่าข้าวแดง (ภาพที่ 4) ใช้เป็นสีธรรมชาติผสมอาหาร เช่น เต้าหู้ยี้สีแดง หมูแดง ปลาแป้งแดง และเหล้าแดง เป็นต้น นอกจากนี้แล้วข้าวแดงยังมีสารบางชนิด เช่น วิตะมินและแร่ธาตุบางอย่างที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ จึงนิยมนำเอาข้าวแดงไปประกอบตำรับสมุนไพรยาจีนเพื่อใช้รักษาโรคบางชนิดอีกด้วย (ภาพที่ 5) (Su and Wang 1977)

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์ที่เก่าแก่ของจีนมีชื่อเรียกว่า อั้งคั่ก (ang-khak หรือ Anka) ใช้เป็นสีแดงธรรมชาติผสมอาหาร ใช้ทำเหล้าแดง และใช้เป็นยารักษาโรค ส่วนใหญ่จะมีโรงงานผลิตอยู่ในแถบตอนใต้ของประเทศจีน ปัจจุบันนี้กรรมวิธีการผลิตข้าวแดงไม่เป็นที่ปกปิดอีกต่อไป ดังนั้นนอกจากจีนแล้วยังมีโรงงานผลิตข้าวแดงในไต้หวัน ฟิลิปปินส์และอินโดนีเซีย ด้วย สำหรับไต้หวันจะผลิตข้าวแดงมากถึงปีละ 200 ตัน ค่าเฉลี่ยการบริโภคข้าวแดงของคนในไต้หวันประมาณ 12 กรัมต่อคนต่อปี (Su and Wang, 1977) ที่เหลือเป็นสินค้าส่งออกยังประเทศต่าง ๆ ซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย

กรมวิทยาศาสตร์ในขณะนั้นเห็นว่าประเทศไทย เป็นประเทศที่ปลูกข้าวมากน่าจะมีการผลิตข้าวแดงได้ จึงได้ทำการศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขนาดห้องปฏิบัติการจากข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกภายในประเทศ จำนวน 22 สายพันธุ์ และพบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้นที่เหมาะสมแก่การทำข้าวแดง คือ พวงไร่ ขาวมะลิ (หอมมะลิ) ดับเบิลยูพี 153 ตะเภาแก้วและเล็บมือนาง (กิจกรรมกรมวิทยาศาสตร์ 2519) ต่อมาได้มีการศึกษาทดลองเพิ่มเติม พบว่า สายพันธุ์นางมลเอส 4 และพันธุ์ข้าวเหนียวป้อม สามารถใช้ทำข้าวแดงได้ สำหรับข้าวพันธุ์เสาไห้ ก็สามารถใช้ทำข้าวแดงได้ แต่ข้าวแดงที่ได้จะมีลักษณะเนื้อแข็ง ในการศึกษาทดลองนี้กรมวิทยาศาสตร์ ใช้เชื้อราซึ่งได้มาจาก Tropical Products Institute ประเทศอังกฤษ มีชื่อเรียกว่า โมนัสคัส เพอร์พิวเรียส

โมนัสคัส เพอร์พิวเรียส เป็นเชื้อราจัดอยู่ในกลุ่มแอสโคมายเซตีส (Ascomycetes) ตระกูลโมนัสคาซีอี (Family Monascaceae) จีนัสโมนัสคัส (genus Monascus) สปิชี่ เพอร์พิวเรียส (species purpureus) เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อซาบอโรด์ เดกซโตรส อะการ์ (sabouraud dextrose agar) ต่อมามีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นและจากการศึกษาทดลองของ Sookson, R and Toshiomi, Y 1987 พบว่า เชื้อราสายพันธุ์นี้ให้ความเข้มของสีสูงสุด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้น ต่อมาจึงใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในการอบเพาะเชื้อ

จากการศึกษาทดลองของ Pichyangkura, 1977 พบว่า เชื้อรา Monascus มีเอนไซม์ แอมีเลส (amylase) โปรติเอส (protease) มอลเตส (maltase) อินเวอร์เทส (invertase) ไลเปส (Lipase) แอลฟา-กลูโคซิเดส (α - glucosidase) ออกซิเดส (oxidase) และไรโบนิวคลิเอส (ribonuclease) เชื้อรา โมนัสคัส สามารถสร้างแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

Su and Wang, 1977, C.F.Lin. 1977; Lee 1979 เชื่อว่าเชื้อราโมนัสคัส มีสารทางด้านเภสัชวิทยา Endo and Hasumi 1985 พบว่าเชื้อราในข้าวแดงมีสารที่ยับยั้งการสร้างสารโคเลสเตอร์รอล Dihydromonacolin L และ monacolin X

เชื้อราสายพันธ์โมนัสคัส ได้มีผู้สนใจและศึกษากันมากเพราะเป็นเชื้อราที่นอกจากจะให้สีตามธรรมชาติที่ไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภคแล้ว ยังให้ประโยชน์ต่อสุขภาพด้วย เพราะมีสรรพคุณในทางยา ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น มีหลายท่านแยกเชื้อราจากข้าวแดงที่ขายอยู่ตามท้องตลาด แล้วนำไปปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพในความหมายที่แตกต่างกันออกไป เช่น ปรับปรุงพันธุ์เพื่อใช้ผลิตสีโดยวิธีเลี้ยงในอาหารเหลว (Submerged culture) โดยใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ หรือการปรับปรุงพันธุ์เพื่อผลิตข้าวแดงในทางการค้า เป็นต้น ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ของเชื้อราเหล่านี้จะต้องมีเทคนิคโดยเฉพาะและต่างกันออกไปแล้วแต่วัตถุประสงค์ของผู้ใช้ ซึ่งผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ของผู้วิจัยอยู่ จึงได้ใช้สายพันธุ์เชื้อราเดิมจากห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ เพราะเป็นเชื้อราที่ทราบสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์เพอร์พิวเรียส (purpureus) ซึ่งให้สีแดงเข้มอมม่วง (purplish-red) ต่อข้าวแดงที่ผลิตได้

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการเพาะปลูกข้าวมาก แต่ยังไม่มีอุตสาหกรรมการผลิตข้าวแดงขึ้นภายในประเทศ กรมวิทยาศาสตร์บริการได้เคยทำการวิจัย เรื่องข้าวแดงไว้แล้วในขั้นห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาถึงอุณหภูมิ ความชื้น และสายพันธุ์ข้าวชนิดต่าง ๆ ที่ปลูกภายในประเทศเหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดง (กรมวิทยาศาสตร์ 2519) แต่การศึกษาทดลองนี้ยังไม่เคยทำในปริมาณมากถึงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง ทำให้ผู้สนใจที่นำไปผลิตขั้นอุตสาหกรรมประสบปัญหาและผลิตข้าวแดงออกมาได้คุณภาพไม่ดี ไม่เป็นที่ต้องการของอุตสาหกรรมบางชนิดที่จำเป็นต้องใช้ข้าวแดง ที่เป็น

เช่นนี้เพราะกระบวนการผลิตเพื่อจะให้ได้ข้าวแดงที่ดีนั้น**การคุมความชื้นในเมล็ดข้าวเป็นสิ่งสำคัญและค่อนข้างยาก ผู้ผลิตจำเป็นต้องอาศัยประสบการณ์** ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยของกรมวิทยาศาสตร์บริการเกี่ยวกับการควบคุมความชื้นในการผลิตข้าวแดงขั้นห้องปฏิบัติการ ซึ่งเมื่อใช้ข้าวประมาณ 50 ถึง 100 กรัม การคุมความชื้นจะทำโดยการเติมน้ำลงไปในข้าวหลังจากนำข้าวไปนึ่งฆ่าเชื้อและทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว (กรมวิทยาศาสตร์ 2519) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณข้าวเป็น 200 กรัม ถึง 1 กิโลกรัม การคุมความชื้นจะทำโดยการเติมน้ำลงไปในข้าวขณะร้อน เพื่อให้น้ำซึมลงไปในเนื้อข้าวให้หมด เพราะมิฉะนั้นแล้วน้ำที่เหลือจะไหลลงไปอยู่ที่ก้นภาชนะทำให้ข้าวแฉะและเสียไปในที่สุด

จากการศึกษาทดลองของ นภา 2527, Hesseltine, 1965 และ Su, 1980 พบว่า การผลิตข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรมความชื้นเริ่มต้นต้องต่ำ แล้วใช้วิธีการควบคุมความชื้นด้วยวิธีพ่นน้ำขณะหมัก Lotong และ Suwanarit 1990 พบว่าความชื้นสูงทำให้เกิดปริมาณเอทธานอลสูง ความเข้มของสีต่ำ เพราะการที่ความชื้นสูงทำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์กลูโคแอมีเลสได้มาก แป้งเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสมาก เป็นผลให้น้ำตาลไปกดการสร้างสีและเกิดเอทธานอลแทน กังสดาลย์ และคณะ 1997 ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อให้มีประสิทธิภาพทนต่อการกดการสร้างสีด้วยน้ำตาลกลูโคส (glucose derepression mutant) เชื้อราสายพันธุ์ที่กรมวิทยาศาสตร์บริการใช้อยู่ไม่มีผลต่อการกดการสร้างสีด้วยน้ำตาลแต่อย่างใด เพราะเคยเพาะเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์นี้ลงบนข้าวสุก เชื้อราสามารถสร้างสีแดงบนข้าวสุกได้ แต่ผลของความชื้นสูง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่ไม่ดี น้ำตาลสูงจะทำให้ข้าวแดงมีลักษณะเหนียวและลีบ ดังนั้นการคุมความชื้นในการผลิตข้าวแดงโดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ของกรมวิทยาศาสตร์บริการยังคงเป็นปัญหาสำคัญ และต้องควบคุมอยู่

ด้วยเหตุที่ลักษณะการควบคุมความชื้นของเมล็ดข้าวในการผลิตข้าวแดงขั้นห้องปฏิบัติการขึ้นอยู่กับปริมาณของข้าวที่ใช้ผลิต ดังนั้นถ้าการผลิตข้าวแดงในปริมาณมากขั้นอุตสาหกรรมนำทาง การควบคุมความชื้นอาจมีวิธีการที่ต่างออกไปจากการผลิตในห้องปฏิบัติการก็เป็นได้ และกรมวิทยาศาสตร์บริการยังไม่เคยทำการศึกษาวิจัยไว้ จึงเห็นว่าน่าจะมีการวิจัยในเรื่องนี้ขึ้น เพื่อจะได้นำไปใช้เป็นข้อมูลแนะแนวทางแก่ประชาชนที่สนใจนำไปผลิตขั้นอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

การผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนั้น จำเป็นต้องทราบถึงผลกระทบต่อการผลิตข้าวแดง และปัจจัยสำคัญที่เป็นผลกระทบต่อการผลิตข้าวแดง คือ

1. อุณหภูมิ
2. ความชื้น
3. แหล่งธาตุไนโตรเจน (nitrogen source)
4. ความชื้นในบรรยากาศหรือความชื้นสัมพัทธ์

1. อุณหภูมิ การที่มีอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไปเชื้อราจะผลิตสีได้น้อยทำให้ข้าวไม่เกิดสีแดง จากการศึกษาทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อราจะให้ความเข้มของสีสูงกว่าที่ 25, 35 และ 40 องศาเซลเซียส (Sookson, R and Yoshida, T, 1987)

2. ความชื้นในเมล็ดข้าวเป็นสิ่งสำคัญต่อการผลิตข้าวแดง เพราะข้าวแดงที่มีลักษณะดี เมื่อปั้นหรือบี้ด้วยนิ้วมือจะมีลักษณะปั้นเหมือนแป้งสีแดง การเพิ่มน้ำเพื่อเพิ่มความชื้นลงไปในเมล็ดข้าวแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อจะทำให้แป้งเกิดการ gelatinized เมื่อนำไปหมักกับเชื้อรา เอนไซม์ ในเชื้อราจะเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลหมด ทำให้ข้าวแดงที่ได้มีเมล็ดลีบ ทำอย่างไรจึงจะทำให้แป้งในเมล็ดข้าวไม่ถูก gelatinized ในการศึกษาทดลองในขั้นห้องปฏิบัติการคือเติมน้ำลงไปหลังจากนำข้าวไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และน้ำที่ใช้เติมเริ่มต้นจะต้องไม่เกิน 10 มิลลิลิตร ต่อข้าว 50 กรัม (กรมวิทยาศาสตร์ 2519) ซึ่งเป็นความชื้นเริ่มต้นที่ต่ำ เมื่อผลิตข้าวแดงออกมาแล้วจะได้ข้าวแดงที่มีลักษณะดี จากการศึกษาทดลองของ Palo และคณะ 1960 พบว่าความชื้นในการผลิตข้าวแดงต้องต่ำ แต่เพียงพอสำหรับการเจริญของเชื้อรา การที่จะให้เมล็ดข้าวมีความชื้นที่ต่ำและเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรานั้น ต้องมีการศึกษาทดลองและขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ข้าวด้วย และในการศึกษาทดลองขั้นอุตสาหกรรมนำทางจำเป็นต้องศึกษาหาความชื้นที่เหมาะสมในเมล็ดข้าวที่จะใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตข้าวแดงต่อไป

3. แหล่งธาตุไนโตรเจน (nitrogen source)

ข้าวแดงเป็นวิธีการหมักแห้ง (Solid-state-culture) และจากการศึกษาทดลองของ Sookson, R and Yoshida, T, 1987 พบว่า ความเข้มของสีที่ได้จากตัวอย่างที่เติมธาตุไนโตรเจนและไม่เติมใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมธาตุไนโตรเจนลงไปในการหมักข้าวแดง เพราะข้าวอาจเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนอยู่แล้ว ความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของการหมักข้าวแดง ที่ไม่ได้เติมสารอาหารไนโตรเจน คือ 6.8 และเมื่อเป็นข้าวแดงแล้ววัดความเป็นกรดด่างได้ 4.9

4. ความชื้นสัมพัทธ์

ในการหมักข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมความชื้นสัมพัทธ์ย่อมมีความสำคัญและเกี่ยวพันกันกับเมล็ดข้าวที่ใช้หมัก (กรมวิทยาศาสตร์บริการ 2531) ซึ่งต้องทดลองว่าความชื้นสัมพัทธ์เท่าใดจึงจะเหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดง และกรมวิทยาศาสตร์บริการยังไม่เคยทำการศึกษาไว้ จึงต้องศึกษาทดลองเพิ่มเติม เพื่อนำข้อมูลไปใช้สำหรับการศึกษาทดลองขั้นอุตสาหกรรมนำทางต่อไป

การผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนั้น สิ่งที่ต้องคำนึงถึงก็คือทำอย่างไรผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงจะมีราคาถูก ปัจจัยที่สำคัญคือวัตถุดิบและระยะเวลาในการผลิต จากการศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าข้าวพันธุ์เสาไห้อาจนำมาผลิตข้าวแดงได้ แต่ต้องคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราใหม่ให้

เหมาะสม และปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เพื่อสามารถย่อยข้าวพันธุ์เสาไห้ได้ทั่วทั้งเมล็ด และระยะเวลาในการผลิตสั้นลง

การกลายพันธุ์ (Mutation) หมายถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่สายพันธุกรรมหรือยีน (Genes) ทำให้สายพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้นมีลักษณะผิดปกติไปจากสายพันธุ์พ่อ-แม่ การกลายพันธุ์จะมีอยู่ 2 แบบ คือ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ (Spontaneous mutation) และการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยการเหนี่ยวนำ (Induced mutation) การกลายพันธุ์โดยการเหนี่ยวนำมนุษย์เป็นผู้กระทำเพื่อวัตถุประสงค์ใดประสงค์หนึ่ง การทำให้เกิดกลายพันธุ์จะใช้สารที่ก่อให้เกิดการกลาย เช่น แสงอัลตราไวโอเลต (UV) รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา สารเคมี และสารชีวภาพ โดยวิธีคอนจูเกชั่น (Conjugation) ทรานสฟอร์เมชั่น (Transformation) ทรานสดักชั่น (Transduction) ทรานสโพซอน (Transposon) และพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) เป็นต้น การใช้แสงอัลตราไวโอเลตไปก่อให้เกิดการกลายพันธุ์นั้น เนื่องจากว่าเบส (Base) ในดีเอ็นเอ (DNA ย่อมาจากคำว่า Deoxyribonucleic acid) สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 240-300 นาโนเมตร ทำให้ดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางเคมี เบสไพริมิดิน (Pyrimidine) จะไปจับกับไพริมิดินด้วยกันเป็นไดเมอร์ (Dimer) และเบสไพริมิดินยังเกิดการจับตัวกับโมเลกุลของน้ำที่แขนตำแหน่งที่ 4 และ 5 ซึ่งในการนี้จะเห็นว่าลำดับการเรียงตัวของเบสเปลี่ยนไปจากเดิม สายพันธุ์กลายใหม่จึงมีคุณลักษณะต่างไปจากสายพันธุ์พ่อ-แม่

เบส (Base) คืออะไร เบสคือ สารเคมีหน่วยเล็ก ๆ จำพวกกรดอะมิโน (amino acid) ที่อยู่ในโมเลกุลของนิวคลิอิค แอซิด (nucleic acid) เรียงตัวเหมือนบาร์โค๊ต (Bar code) เบสในดีเอ็นเอ คือ อะดีนีน (adenine เขียนย่อว่า A) ไทมีน (thymine เขียนย่อว่า T) ไซโตซีน (cytosine เขียนย่อว่า C) และ กัวนีน (guanine เขียนย่อว่า G) ในอาร์เอ็นเอ (RNA ย่อมาจากคำว่า Ribonucleic acid) จะพบยูราซิล (uracil เขียนย่อว่า U) แทนที่ ไทมีน

คู่เบส (Base pair) คือ 2 เบสที่อยู่ต่างสาย (strands) ในโมเลกุลของนิวคลิอิก แอซิด แต่เชื่อมต่อกันในสายดีเอ็นเอ เบสไซโตซีน จะจับคู่กับ เบสกัวนีน เรียกว่า CG คู่เบส และเบสอะดีนีน จะจับคู่กับเบสไทมีน เรียกว่า AT คู่เบส ในอาร์เอ็นเอ เบสอะดีนีน จะเชื่อมกับเบส ยูราซิล เรียกว่า AU คู่เบส

ในเชื้อราการทำให้กลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งเป็นสารก่อให้เกิดการกลายทางฟิสิกส์ (physical mutagen) แสงจะไปทำให้เกิดการเปลี่ยนที่ในคู่เบส (Base pair substitution) ลำดับการเรียงตัวของคู่เบสผิดไปจากปกติ ทำให้สายพันธุ์กลายใหม่ที่ได้มีสมบัติต่างไปจากสายพันธุ์เดิมอาจมีประสิทธิภาพด้อยกว่าสายพันธุ์เดิม หรือดีกว่าสายพันธุ์เดิมก็เป็นได้ ดังนั้นหลังจากทำให้กลายพันธุ์แล้วต้องทำการคัดเลือกเอาเฉพาะสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์เดิม นอกจากนี้แล้วแสง

อัลตราไวโอเลตอาจทำให้สายพันธุ์กลายสูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์ สารบางชนิดที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต เนื่องจากยีนซำรุดและสูญเสียเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์สารเหล่านั้น ดังนั้นจึงต้องมีการวิเคราะห์ว่าสายพันธุ์กลายใด ไม่สามารถสังเคราะห์สารตัวไหน จะได้เติมสารตัวนั้นลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายต่อไป

การศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง จึงใช้ข้าวพันธุ์เสาไห้เป็นวัตถุดิบเพราะมีขายทั่วไปตามท้องตลาด และราคาถูก การศึกษาทดลองแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอนคือ

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราที่เหมาะสม
2. การปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อรา
3. การศึกษาทดลองการดูดซึมน้ำของข้าวพันธุ์เสาไห้ต่อการผลิตข้าวแดง และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแช่ข้าว
4. การศึกษาทดลองหาความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง
5. การศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง (ขนาดการผลิตของข้าวต้องไม่ต่ำกว่า 40 กิโลกรัมต่อครั้ง)

ก่อนดำเนินการศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทางได้ดำเนินการศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นห้องปฏิบัติการอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ข้าวพันธุ์เสาไห้ ควบคู่กับข้าวหอมมะลิ เนื่องจากการศึกษาทดลองขั้นห้องปฏิบัติการพบว่า ข้าวหอมมะลิเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตข้าวแดงได้ดีที่สุด เพื่อหาข้อมูลของข้าวพันธุ์เสาไห้เพิ่มเติมก่อนนำไปทำขั้นอุตสาหกรรมนำทาง ข้าวแดงที่ทำจากข้าวหอมมะลินำไปวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารเพื่อใช้ผลเปรียบเทียบ ข้าวแดงจากตลาดและข้าวแดงที่ทำขึ้นใหม่จากข้าวพันธุ์เสาไห้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 11 ของการศึกษาทดลองเรื่องการผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของการศึกษาทดลองนี้เพื่อ

1. ศึกษาวิธีการผลิตข้าวแดงที่สามารถผลิตได้ในระดับอุตสาหกรรม
2. ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการและความปลอดภัยของข้าวแดง

ประโยชน์

1. เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการผลิตขั้นอุตสาหกรรม ซึ่งจะทำให้มีอุตสาหกรรมการผลิตข้าวแดงเกิดขึ้นภายในประเทศ
2. ช่วยลดการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นการช่วยเศรษฐกิจของชาติอีกทางหนึ่ง
3. การนำวัตถุดิบที่มีภายในประเทศมาใช้ อาจช่วยให้ต้นทุนการผลิตลดลง เป็นการช่วยอุตสาหกรรมที่จำเป็นต้องใช้ข้าวแดงเป็นส่วนประกอบ และช่วยเกษตรกรในทางอ้อม

ระยะเวลาในการศึกษาทดลอง 4 ปี (2536-2539)

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

เชื้อราและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาทดลองมี 3 สายพันธุ์ คือ
    1. โมนัสคัส เพอร์พิวเรียส *(Monascus purpureus)* เป็นเชื้อราจากห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ (วศ)
    2. โมนัสคัส สปีชี่ *(Monascus spp)* สายพันธุ์ TISTR # 3090 สายพันธุ์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท)
    3. โมนัสคัส สปีชี่ *(Monascus spp)* สายพันธุ์ที่แยกได้จากข้าวแดงที่ขายอยู่ตามท้องตลาดเมืองไทย (วิธีการแยกตามภาคผนวก ก(1))
- อาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้อาหารสูตรสำเร็จของบริษัท Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา
    1. ซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ (Sabouraud dextrose agar)
    2. โปเทโท เดกซ์โตรส อะการ์ (Potato dextrose agar)
    3. ซาเพ็ค ด๊อกซ์ บรอท (Czapek dox broth)
    4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์และข้าว ผสมอยู่ร้อยละ 3
    5. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซาแพ็ค ด๊อกซ์และข้าวผสมอยู่ร้อยละ 3

    (สูตรและวิธีการเตรียมตามภาคผนวก ข)

วัตถุดิบ

1. ข้าวเสาไห้ 100 % จากตลาดสด จำนวน 250 กิโลกรัม
2. ข้าวหอมมะลิ จากตลาดสด จำนวน 100 กิโลกรัม

อุปกรณ์

1. ถังพลาสติกสำหรับล้างและแช่ข้าว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เมตร
2. ไม้พายขนาดความยาว 1 เมตร สำหรับกวนข้าวที่แช่
3. ตะแกรงไม้ไผ่สำหรับทำให้ข้าวสะเด็ดน้ำ
4. ลังถึงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 75 ซม.
5. หม้อทรงสูงขนาดความจุ 10 ลิตร และถาดสำหรับหมักขนาด 78 ซม. x 97.5 ซม. x 6.5 ซม.
6. ห้องเพาะเชื้อราปรับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสขนาด 3 เมตร x 3 เมตร
7. ห้องอบแห้งอุณหภูมิ 40 - 45 องศาเซลเซียส หรือห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิ 10 - 15 องศาเซลเซียส

8. ตู้อบเพาะเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (Climatic cabinet) รุ่น KBP 6395 FL. เครื่องหมายการค้า Termaks ประเทศนอร์เวย์
9. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) เครื่องหมายการค้า Memmert รุ่น UBS 600 ของประเทศเยอรมนี
10. ตู้ปราศจากเชื้อ (Lamina air flow) เครื่องหมายการค้า Astec รุ่น SC 1200 ประเทศอังกฤษ
11. ตู้อบเพาะเชื้อ (Incubator) เครื่องหมายการค้า Hot pack รุ่น 352600 ประเทศสหรัฐอเมริกา และรุ่น 640 เครื่องหมายการค้า Hereus ประเทศเยอรมนี
12. เครื่องชั่งรุ่น LC 6200 เครื่องหมายการค้า Sartorius ประเทศเยอรมนี
13. เครื่องชั่งรุ่น AT 201 เครื่องหมายการค้า Mettler ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
14. เครื่องวัดความดูดกลืนแสง (UV/vis spectrophotometer) เครื่องหมายการค้า Perkin Elmer รุ่น Lambda 12 ประเทศเยอรมนี
15. เครื่องเขย่า (Incubator shaker) เครื่องหมายการค้า New Brunswick รุ่น 082540 G-2.5 ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. เครื่องเขย่าผสม (whirl mixer) เครื่องหมายการค้า Vortex Geniez รุ่น - 560 E ประเทศสหรัฐอเมริกา
17. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerated centrifuge) เครื่องหมายการค้า Sorvall รุ่น RC_{26} Plus ของบริษัท Du Pont ประเทศสหรัฐอเมริกา
18. เครื่องมือวัดความชื้น (Hygrometers) ใช้เครื่องวัดขนาดเล็กรุ่น Pocket Sized เครื่องหมายการค้า hygrocheck ของบริษัท HANNA ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. เครื่องนับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ของบริษัท AO Scientific Instruments ประเทศสหรัฐอเมริกา
20. กล้องจุลทรรศน์ เครื่องหมายการค้า Nikon รุ่น OPTIPHOT-2 ประเทศญี่ปุ่น
21. เข็มเขี่ยเชื้อ (loop)
22. จานเพาะเชื้อ (Petri Dish) ขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร เป็นชนิด Disposable polystyrene เครื่องหมายการค้า FALCON และ Ten twenty nine บริษัท BECTON DICKINSON ประเทศสหรัฐอเมริกา และชนิดแก้วของ KIMBLE ประเทศสหรัฐอเมริกา
23. ปิเปตแก้ว (Serological Pipets) ของ KIMBLE ประเทศสหรัฐอเมริกา
24. หลอดแก้วทดลอง (Test Tubes) ของ KIMBLE ประเทศสหรัฐอเมริกา
25. ขวดแก้วทดลองรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flasks) ของ KIMBLE ประเทศสหรัฐอเมริกา
26. บีกเกอร์ (Beakers) ของ KIMBLE ประเทศสหรัฐอเมริกา

27. กรวยสำหรับกรอง (Funnels)
28. กระดาษกรอง (Filter Paper) ใช้กระดาษกรองของ Whatman # 2
29. หม้อนึ่งอัด (Autoclave) รุ่น HA-300P ของบริษัท HIRAYAMA ประเทศญี่ปุ่น
30. แท่นแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) และแท่งกวนแม่เหล็ก (Magnetic bar)
31. แท่งแก้วงอรูป 3 เหลี่ยม ใช้สำหรับ spread plate
32. หลอดไฟอัลตราไวโอเลต (UV) รุ่น G3018 ของ SYLVANIA ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมี/และวิธีเตรียม

1. โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนท ($KMnO_4$)
2. ฟอร์มาลีน (Formalin)

สารเคมี ข้อ 1 และ ข้อ 2 ใช้ commercial grade ตวงสารละลายฟอร์มาลีน จำนวน 300 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์แก้วหรือพลาสติกขนาดความจุ 4 ลิตร นำไปตั้งไว้กลางห้องที่มีขนาด 3 เมตร x 3 เมตร ที่จะใช้สำหรับทำข้าวแดง ชั่งโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนท จำนวน 100 กรัม ใส่ลงในสารละลายฟอร์มาลีน แล้วปิดห้องให้สนิท ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนทและฟอร์มาลีนจะทำปฏิกิริยากันก๊าซที่เกิดขึ้นจะรมอยู่ภายในห้องนั้น ทำให้ห้องสะอาดปราศจากเชื้อ

3. แอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ร้อยละ 70 สำหรับสกัดสี

ตวงแอลกอฮอล์ 700 มิลลิลิตร ลงในกระบอกตวงที่มีความจุ 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปให้มีปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร เทลงในขวดแก้วที่สะอาด ปิดจุกเกลียว เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ใช้สำหรับสกัดสี

วิธีการ

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราที่เหมาะสม

นำเชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส และสายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวแดงที่ขายอยู่ตามท้องตลาด เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ สแล็นท์ (Sabouraud dextrose agar slant) ส่วนโมนัสคัส สายพันธุ์ TISTR # 3090 เพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โปเทโท เดกซ์โตรส อะการ์ สแล็นท์ (Potato dextrose agar slant) เนื่องจากระบุไว้ใน culture condition ของ

เชื้อราสายพันธุ์นี้ นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน นำเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่มีอายุนาน 7 วัน สายพันธุ์ละ 1 หลอด เพาะลงบนข้าวเสาไห้ที่มีความชื้นร้อยละ 30 ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 50 กรัม นำข้าวที่เพาะเชื้อราแล้วไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งข้าวมีสีแดงเข้มทั่วทั้งเมล็ด (แต่ละสายพันธุ์ของเชื้อราทำ 3 การทดลอง) ดูลักษณะข้าวแดงที่ผลิตได้ด้วยตาเปล่า แล้วนำไปวิเคราะห์หาความเข้มของสีด้วยเครื่อง UV/vis spectophotometer ของ Perkin Elmer รุ่น Lambda 12

2. <u>การปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อรา</u>

เชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจากข้อ 1 ว่าเหมาะสมต่อข้าวพันธุ์เสาไห้ นำไปปรับปรุงประสิทธิภาพให้สูงขึ้น โดยการทำให้กลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่มีความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร [รายละเอียดวิธีการปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อราให้สูงขึ้น ตามภาคผนวก ก (2)] เชื้อราที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์แล้ว นำไปเพาะลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ซาบอโรด์เดกซ์โตรส อะการ์และข้าวบดละเอียดผสมอยู่ร้อยละ 3 ด้วยวิธี point inoculation นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน คัดเอาเฉพาะสายพันธุ์ที่ให้สีแดงเข้มและโซนกว้าง จำนวน 6 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 1 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสี โดยการนำเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่คัดได้อายุนาน 7 วัน จำนวน 1 ลูฟ (loop) ไปเพาะลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซาเพ็ค ด็อกซ์ และข้าวผสมอยู่ร้อยละ 3 จำนวน 100 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องเขย่า (incubator shaker ของ New Brunswick Model 082540 G-2.5 USA) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน นำของเหลวสีแดงในขวดทดลองไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (refrigerated centrifuge เครื่องหมายการค้า Sorvall model RC_{26} Plus ของบริษัท Du Pont USA) ที่ความเร็วรอบ 20,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman #2 น้ำที่กรองได้นำไปวัดค่าความเข้มของสีนอกเซลล์ (extra cellular pigment) ด้วยเครื่องวัดความดูดกลืนแสง (UV/vis spectrophotometer เครื่องหมายการค้า Perkin Elmer รุ่น Lambda 12 ประเทศ เยอรมนี) ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สำหรับสารสีแดง และที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร สำหรับสารสีเหลือง ค่าความดูดกลืนแสงที่วัดได้คูณด้วยระดับความเจือจาง (dilution factor) จะได้ความเข้มของสีนอกเซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร ตะกอนที่กรองได้นำไปสกัด (extract) ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยปริมาตร ของตะกอนต่อแอลกอฮอล์ นำไปเข้าเครื่องเขย่า (incubator shaker ของ New Brunswick) ที่ความเร็วรอบเช่นเดิมนาน 1 ชั่วโมง เพื่อสกัดสีออกจากเซลล์

ให้หมด นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman # 2 ของเหลวสีแดงที่กรองได้นำไปทำให้เจือจางด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 เพื่อให้พอเหมาะแก่การที่จะนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สำหรับสารสีแดงและที่ความยาวคลื่นที่ 400 นาโนเมตร สำหรับสารสีเหลือง ค่าความดูดกลืนแสงที่วัดได้คูณด้วยระดับความเจือจาง (dilution factor) จะได้ความเข้มของสีในเซลล์ (intracellular pigment) ต่อ 1 มิลลิลิตร ผลการศึกษาทดลองดังตารางที่ 2 และภาพที่ 10

เชื้อราสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิตสีสูงสุด นำไปทดสอบ โดยการหมักกับข้าวพันธุ์เสาไห้เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม โดยวิธีการทดสอบในปริมาณน้อยขนาดห้องปฏิบัติการ ใช้ข้าวเสาไห้ตัวอย่างละ 50 กรัม เติมน้ำลงไปตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เย็น เมื่อเย็นแล้วเติมสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่จะใช้หมักลงไปตัวอย่างละ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส ขณะหมักต้องเติมน้ำบ้างเป็นครั้งคราว เมื่อเห็นว่าข้าวแห้ง จดบันทึกน้ำที่เติมระหว่างหมัก จนกระทั่งข้าวมีเมล็ดแดงทั่วทั้งเมล็ด ดูระยะเวลาที่ใช้ในการหมักเปรียบเทียบระหว่างเชื้อรา 2 สายพันธุ์ ผลการศึกษาทดลองดังตารางที่ 3

เชื้อราที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์เดิม นำไปเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ สแล็นท์ แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เก็บไว้ใช้สำหรับการศึกษาทดลองต่อไป ก่อนนำไปใช้ต้องทำการเพาะเชื้อใหม่ทุกครั้ง เพื่อให้เชื้อรามีประสิทธิภาพดี (active)

เชื้อราที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูง นำไปเตรียมหัวเชื้อราข้าวแดง เพื่อใช้สำหรับการผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทางต่อไป ซึ่งมีวิธีการเตรียม 2 วิธีคือ

a) การเตรียมหัวเชื้อราข้าวแดงชนิดแห้ง หรือที่เรียกว่ากล้าเชื้อหรือโคจิ (Koji)

นำเชื้อราที่มีอายุนาน 7 วัน จำนวน 1 หลอด มาเพาะลงบนข้าวพันธุ์เสาไห้ที่มีความชื้นร้อยละ 30 และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาดความจุ 500 มิลลิลิตร จำนวน 50 กรัม หรือบรรจุในถุงพลาสติก (12) ขนาด 8 x 12 นิ้ว ก็ได้ นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งข้าวมีสีแดงทั่วทั้งเมล็ด นำไปทำให้แห้งแล้วบดให้ละเอียด ใช้เป็นหัวเชื้อราข้าวแดงชนิดแห้งในอัตราส่วน 1 : 100 โดยน้ำหนักแห้ง

b) การเตรียมหัวเชื้อราข้าวแดงชนิดเหลว หรือ สำหมัก (starter)

นำเชื้อราที่มีอายุนาน 7 วัน จำนวน 1 หลอด ใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไป 5 มิลลิลิตร เขี่ยเอาสปอร์ออกมาให้หมดด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทใส่หลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ ล้างสปอร์ที่เหลือด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 5 มิลลิลิตร เทผสมเข้าด้วยกันแล้วนำไปเข้าเครื่องเขย่า (Whirl mixer) เพื่อให้สปอร์กระจายตัวอย่างอิสระและสม่ำเสมอ นับจำนวนสปอร์ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ปรับจำนวนสปอร์ให้มีจำนวนสปอร์ 10^7 ต่อมิลลิลิตร ใช้ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว ซาเพ็ค ด๊อกซ์บรอท ที่มีข้าวบดละเอียดผสมอยู่ร้อยละ 3 และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่า (incubator shaker ของ New Brunswick) ที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 วัน ใช้สำหรับเป็นหัวเชื้อราข้าวแดงชนิดเหลวในอัตราส่วน 1 : 20 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก

3. การศึกษาทดลองการดูดซึมน้ำของข้าวพันธุ์เสาไห้ต่อการผลิตข้าวแดง และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแช่ข้าว

นำข้าวเสาไห้ บรรจุลงในบีกเกอร์ (beaker) ขนาดความจุ 500 มิลลิลิตร บีกเกอร์ละ 100 กรัม จำนวน 8 บีกเกอร์ ล้างทำความสะอาด 2 ครั้ง แช่น้ำให้ท่วมโดยให้ระดับน้ำสูงจากข้าว 2 นิ้ว คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง บีกเกอร์ 1 แช่น้ำ 1 ชั่วโมง

บีกเกอร์ 2 แช่น้ำ 2 ชั่วโมง
บีกเกอร์ 3 แช่น้ำ 3 ชั่วโมง
บีกเกอร์ 4 แช่น้ำ 4 ชั่วโมง
บีกเกอร์ 5 แช่น้ำ 5 ชั่วโมง
บีกเกอร์ 6 แช่น้ำ 6 ชั่วโมง
บีกเกอร์ 7 แช่น้ำ 7 ชั่วโมง
บีกเกอร์ 8 แช่น้ำ 8 ชั่วโมง

ในบีกเกอร์ที่ 1 เมื่อแช่น้ำครบ 1 ชั่วโมง เทน้ำที่แช่ทิ้ง ล้างทำความสะอาดข้าวอีก 1 ครั้ง นำไปผึ่งบนตะแกรงไม้ไผ่ให้สะเด็ดน้ำใช้เวลา 1/2 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างข้าวไปวิเคราะห์หาความชื้น ส่วนข้าวที่เหลือนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็น ใส่เชื้อราที่มีอายุนาน 7 วัน ลงไป 1 หลอด เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งข้าวมีสีแดงทั่วทั้งเมล็ด ในบีกเกอร์ที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8

ทำเช่นเดียวกันกับบีกเกอร์ที่ 1 เมื่อแช่ข้าวครบ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการศึกษาทดลองดังตารางที่ 4 ข้าวแดงที่ผลิตได้นำไปวิเคราะห์หาความเข้มของสี ผลการศึกษาทดลองดังภาพที่ 11 ลักษณะข้าวแดงที่ผลิตได้ดังภาพที่ 12

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแช่ข้าว ทำโดยการนำข้าวเสาไห้จำนวน 5 กิโลกรัม ล้างทำความสะอาด 2 ครั้ง แล้วแช่น้ำให้ท่วม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง คนทุกครึ่งชั่วโมง เพื่อให้การซึมของน้ำเข้าไปในเมล็ดข้าวสม่ำเสมอ เก็บตัวอย่างข้าวที่แช่ไปวิเคราะห์หาความชื้น เมื่อแช่ครบ 1, 2, 3.... 8 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง (ค้างคืน) ตามลำดับ โดยทำให้ข้าวสะเด็ดน้ำบนตะแกรงไม้ไผ่ แล้วใช้ผ้าขาวบางซับเมล็ดข้าวให้แห้งอีกครั้งหนึ่ง เพื่อให้แน่ชัดว่าความชื้นที่วิเคราะห์ได้เป็นความชื้นจากเมล็ดข้าวโดยแท้จริง ผลการศึกษาทดลองดังตารางที่ 5

4. การศึกษาทดลองหาความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง

นำข้าวเสาไห้ตัวอย่างละ 5 กิโลกรัม ล้างทำความสะอาด 2 ครั้ง แล้วแช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าวได้เต็มที่ เอาน้ำที่แช่ออก ล้างทำความสะอาดอีก 1 ครั้ง แล้วผึ่งให้สะเด็ดน้ำ บรรจุลงภาชนะสำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำนาน 2 ชั่วโมง ผึ่งให้เย็นเมื่อข้าวเย็นขนาดมือจับได้ คลุกกับหัวเชื้อราข้าวแดงที่เตรียมไว้ ตามข้อ 2a) ในอัตราส่วน 1:100 โดยน้ำหนัก หัวเชื้อราก่อนนำไปคลุกผสมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 100 มิลลิลิตร เพื่อการกระจายตัวที่ดีของสปอร์ของเชื้อรา และปรับความชื้นภายในเมล็ดข้าวเป็นร้อยละ 30 บรรจุข้าวที่คลุกกับเชื้อราแล้วลงในหม้อที่ปราศจากเชื้อเกือบเต็ม ปิดฝา แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง เมื่อข้าวในหม้อมีอุณหภูมิขึ้นสูงประมาณ 40-42 องศาเซลเซียส นำไปใส่ลงในถาดขนาด 51.5 ซม. x 51.2 ซม. x 4.7 ซม. เกลี่ยให้สม่ำเสมอ โดยให้มีความหนา 2 ซม. นำไปหมักในตู้อบเพาะเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (climatic cabinet) โดยกำหนดให้อุณหภูมิในการหมักทุกการทดลองเป็น 30 องศาเซลเซียส (Sookson, R and Yoshida, T, 1987) แต่ความชื้นภายในตู้อบคือความชื้นสัมพัทธ์ ปรับเปลี่ยนไปแต่ละการทดลอง โดยเริ่มต้นจากร้อยละ 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 และ 90 ตามลำดับ ระยะเวลาในการหมักขึ้นอยู่กับข้าวแดงที่ผลิตได้ ผลการศึกษาทดลอง ดังตารางที่ 6

5. การศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง

วิธีการศึกษาทดลองทำเช่นเดียวกันกับข้อ 4 แต่ใช้ข้าวเสาไห้ 40 กิโลกรัม หัวเชื้อรา ข้าวแดงใช้หัวเชื้อราข้าวแดงชนิดเหลวตามข้อ 2b) เนื่องจากสามารถเตรียมได้เร็วกว่า อัตราส่วนตามที่กำหนดไว้ในหัวข้อที่เตรียม ข้าวที่คลุกเชื้อราแล้วแบ่งออกเป็น 4 ส่วนนำแต่ละส่วนบรรจุลงในหม้อที่ปราศจากเชื้อแล้วปิดฝา หรือนำไปทำเป็นกองรูปปิรามิดไว้บนถาดสำหรับหมักในห้องอบเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ 1 คืน (12 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อกระตุ้นประสิทธิภาพของเชื้อรา นำข้าวที่เกิดการหมักแล้วในหม้อหรือจากกอง เกลี่ยลงถาดให้สม่ำเสมอ ความหนาประมาณ 2 เซนติเมตร อบเพาะเชื้อต่อภายในห้องอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปรับความชื้นภายในห้องหมักให้มีความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 80-90 จนกระทั่งข้าวมีสีแดงทั่วทั้งเมล็ด ตรวจดูผลทุกวันระหว่างการหมัก อาจมีการเติมน้ำบ้างเมื่อข้าวมีลักษณะแห้ง ข้าวแดงที่ได้นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (24 ชั่วโมง) หรือปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งเอง ในห้องปรับอากาศที่อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 วัน ข้าวแดงที่ได้นำไปวิเคราะห์หาคุณค่าทางอาหาร วิตะมิน แร่ธาตุ สารพิษอะฟลาทอกซิน และความเข้มของสีทั้งหมด ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 10

ศูนย์วิทยาศาสตร์บริการ

ผลการศึกษาทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา

จากผลการศึกษาทดลองพบว่า เชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างข้าวแดงที่ขายอยู่ตามท้องตลาด และสายพันธุ์จากห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ (วศ.) เมื่อนำไปเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนาน 7 วัน จะให้สีแดงเข้ม ส่วนสายพันธุ์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สายพันธุ์ TISTR #3090 จะไม่ให้สีแดงเข้ม (ดังภาพที่ 6) ดูลักษณะคล้ายกับว่าสายพันธุ์ TISTR #3090 นี้ไม่สร้างสปอร์หรืออาจมีสปอร์น้อย ซึ่งไม่เหมาะแก่การนำมาใช้เป็นเชื้อราสำหรับหมักแห้ง (Solid state culture) อาจจะเหมาะสำหรับการหมักในอาหารเหลว แต่การผลิตข้าวแดงเป็นการหมักแห้ง ดังนั้นสายพันธุ์นี้จึงไม่เหมาะแก่การนำมาผลิตข้าวแดง

จากการศึกษาทดลองนำเอาเชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างข้าวแดงที่ขายอยู่ตามท้องตลาดและสายพันธุ์ของ วศ. ไปทดลองผลิตข้าวแดงจากข้าวพันธุ์เสาไห้โดยใช้ระยะเวลาในการหมักเท่ากัน พบว่าตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตได้มีลักษณะไม่แตกต่างกัน (ดังภาพที่ 7) แต่สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวแดงจากตลาด เมื่อมีการถ่ายเชื้อจะพบว่ามีการกลายพันธุ์บ่อย อาจเป็นเพราะว่าเชื้อราที่นำมาผลิตข้าวแดงขายมีการทำให้กลายพันธุ์แล้ว ซึ่งเชื้อที่กลายพันธุ์นี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงตัวของมันเองได้ตลอดเวลาขณะเจริญเติบโต และถ้านำมาใช้ศึกษาทดลองจะได้ผลที่ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นเชื้อราที่เหมาะสมคือสายพันธุ์จากห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ โมนัสคัส เพอร์พิวเรียส (Monascus purpureus) ซึ่งเป็นเชื้อราจาก Tropical Products Institute ประเทศอังกฤษ (ดังภาพที่ 1)

2. การปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อรา

จากการศึกษาทดลองพบว่า เวลาที่ใช้ในการทำให้เชื้อรากลายพันธุ์ภายใต้แสงอัตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 250 นาโมเมตร คือ 2.5 นาที จากเชื้อรากลาย จำนวน 300 สายพันธุ์ ที่เพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ ซึ่งมีข้าวบดละเอียดผสมอยู่ร้อยละ 3 มีเพียง 6 สายพันธุ์ เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ผลการศึกษาทดลองดังตารางที่ 1 และเมื่อนำสายพันธุ์กลายทั้ง 6 สายพันธุ์ไปทดสอบในการผลิตสี ผลปรากฏว่า สายพันธุ์ $RTUV_6$ ให้ความเข้มของสีสูงสุด ผลการศึกษาทดลองดังตารางที่ 2 และภาพที่ 10 ซึ่งจะได้ใช้เป็นเชื้อราสำหรับการผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทางต่อไป

จากผลการศึกษาทดลองดังตารางที่ 1 จะเห็นว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ $RTUV_1$ $RTUV_2$ $RTUV_3$ $RTUV_4$ $RTUV_5$ และ $RTUV_6$ มีโซนกว้าง 4.0, 3.5, 3.5, 3.5, 4.0 และ 5 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งกว้างกว่าโซนของสายพันธุ์เดิม RT ที่มีความกว้าง 3.0 เซนติเมตร สายพันธุ์กลาย $RTUV_4$ $RTUV_5$ และ $RTUV_6$ ให้สีแดงเข้มคล้ำ มีระดับสีที่ +++++ ซึ่งเป็นระดับสีที่เข้มที่สุด และจากผลการศึกษาทดลองดังตารางที่ 2 จะเห็นว่าเชื้อรากลายพันธุ์ $RTUV_6$ ให้ความเข้มของสีแดงนอกเซลล์ ที่ความดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร 1.7508 และความเข้มของสีภายในเซลล์ ที่ความดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่นเดียวกัน 3.3850 ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เดิม RT และสายพันธุ์กลายพันธุ์ $RTUV_1$ $RTUV_2$ $RTUV_3$ $RTUV_4$ และ $RTUV_5$ ที่ให้ความเข้มของสีนอกเซลล์ 0.5153, 1.0273, 0.9520, 0.9655 0.8855 และ 1.0655 ตามลำดับ และความเข้มของสีภายในเซลล์ 0.7655, 1.4005 1.1435, 1.2530, 1.4310 และ 1.4210 ตามลำดับ นอกจากความเข้มของสีแดงแล้ว เชื้อรากลายพันธุ์ $RTUV_6$ ยังให้ความเข้มของสีเหลืองหรือสีส้มนอกเซลล์ ที่ความดูดกลืนแสงช่วงความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร 1.6000 และความเข้มของสีภายในเซลล์ที่ความยาวคลื่นเดียวกัน 4.1240 สูงกว่าสายพันธุ์เดิม RT และสายพันธุ์กลายพันธุ์ $RTUV_1$ $RTUV_2$ $RTUV_3$ $RTUV_4$ และ $RTUV_5$ ที่มีความเข้มของสีนอกเซลล์ 0.4575, 0.9118, 0.8518,0.8655, 0.8058, 0.9063 และความเข้มของสีภายในเซลล์ 1.1115, 2.9415, 2.2185, 2.6575, 2.984 และ 2.9985 ตามลำดับ ภาพที่ 9 แสดงถึงโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ $RTUV_6$ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม RT บนอาหารเลี้ยงเชื้อซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ ที่มีข้าวบดละเอียดผสมอยู่ร้อยละ 3 จะเห็นว่าโคโลนีสายพันธุ์ $RTUV_6$ ให้สีแดงเข้มและโซนกว้างกว่าสายพันธุ์เดิม RT และจากภาพที่ 10 จะเห็นว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ $RTUV_6$ มีเส้นกราฟของค่าการดูดกลืนแสง สูงกว่าสายพันธุ์เดิม RT และสายพันธุ์กลายพันธุ์อื่นทั้ง ความเข้มของสีนอกเซลล์ และความเข้มของสีภายในเซลล์ ดังนั้นสายพันธุ์กลายพันธุ์ $RTUV_6$ จึงมีประสิทธิภาพในการผลิตสีสูงสุด และเพื่อเป็นการยืนยัน จึงได้นำเชื้อราสายพันธุ์กลายพันธุ์ $RTUV_6$ นี้ไปทดลองผลิตข้าวแดงจากข้าวพันธุ์เสาไห้เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม RT ดังตารางที่ 3 จะเห็นว่าเมื่อนำไปหมักกับข้าว 50 กรัม เชื้อรากลายพันธุ์สายพันธุ์ $RTUV_6$ จะใช้เวลาในการหมักนาน 9 วัน แต่สายพันธุ์เดิม RT ใช้เวลาในการหมัก 12 วัน ดังนั้นสายพันธุ์กลายพันธุ์ $RTUV_6$ จะใช้เป็นสายพันธุ์ของเชื้อราสำหรับการศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง เพราะนอกจากจะให้ความเข้มของสีสูงแล้วยังใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่าสายพันธุ์เดิมอีกด้วย

3. การศึกษาทดลองการดูดซึมน้ำของข้าวพันธุ์เสาไห้ต่อการผลิตข้าวแดง และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแช่ข้าว

จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าเมื่อแช่ข้าวในน้ำ 1 ชั่วโมง ความชื้นจะเพิ่มเป็นร้อยละ 29.3 จากเดิมซึ่งมีความชื้นเพียงร้อยละ 10.9 แต่เมื่อแช่ข้าวนาน 2 ชั่วโมง ความชื้นในเมล็ดข้าวเพิ่มเป็นร้อยละ 29.9 เพิ่มจากการแช่ 1 ชั่วโมงเพียงร้อยละ 0.6 เท่านั้น และเมื่อแช่ข้าวต่อไปถึง 5 ชั่วโมง ความชื้นในเมล็ดข้าวเพิ่มเป็นร้อยละ 30.1 เกือบเท่ากับความชื้นในเมล็ดข้าวเมื่อแช่ครบ 7 ชั่วโมงซึ่งมีความชื้นร้อยละ 30.0 ความชื้นในเมล็ดข้าว่เพิ่มเป็นร้อยละ 31.2 เมื่อแช่ข้าวครบ 8 ชั่วโมง แต่เมื่อนำไปผลิตข้าวแดงจะได้ผลิตภัณฑ์ข้าวแดงเมื่อนำไปป่นแล้วจะมีลักษณะเหนียว ไม่เปราะยุ่ยเป็นผงป่นง่าย ต้องใช้เวลานาน ถึงแม้ว่าข้าวแดงตัวอย่างนี้จะให้ความเข้มของสีสูงกว่าทุกตัวอย่างที่ทำจากข้าวที่แช่น้ำในระยะเวลา 1 - 7 ชั่วโมง (ดังภาพที่ 11) ก็ตามแต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ดี เพราะผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่ดีนั้นต้องคงรูปเมล็ดข้าวอยู่ และเปราะยุ่ยสามารถทำเป็นผงป่นโดยง่าย ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าข้าวเสาไห้แช่น้ำนาน 8 ชั่วโมง มีความชื้นในเมล็ดข้าวมากกว่าร้อยละ 30 ซึ่งเป็นความชื้นเริ่มต้นที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดง (กรมวิทยาศาสตร์บริการ 2531) สำหรับตัวอย่างอื่นใช้ได้

จากการศึกษาทดลองจะเห็นว่าการเพิ่มความชื้นให้เมล็ดข้าวพันธุ์เสาไห้ โดยวิธีการแช่ข้าวนั้นไม่มีผลต่อการผลิตข้าวแดง ถ้าความชื้นในเมล็ดข้าวไม่มากกว่าร้อยละ 30 และจากการทดลองของ Sookson, R และ Yoshida, T 1987 พบว่า การผลิตสีจากเชื้อราโมนัสคัส โดยวิธีหมักแห้งด้วยวิธีการแช่ข้าวนั้นจะให้ความเข้มของสีสูง แต่ความชื้นในเมล็ดข้าวจะต้องต่ำ ดังนั้นการทำข้าวแดงปริมาณมากขั้นอุตสาหกรรมนำทางจึงใช้วิธีการแช่ข้าว เพื่อเพิ่มความชื้นในเมล็ดข้าวให้พอเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อรา ระยะเวลาในการแช่ข้าวจำเป็นต้องมีการศึกษาทดลอง (ดังตารางที่ 5) เพื่อว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกมามีลักษณะดี

จากตารางที่ 5 จะเห็นว่าข้าวพันธุ์เสาไห้ดูดซึมน้ำได้เต็มที่ภายในเวลา 1 ชั่วโมง ได้ความชื้นประมาณร้อยละ 28 และเมื่อเพิ่มเวลาการแช่ออกไปอีกเป็น 2,3,4..... 24 ชั่วโมง (แช่ค้างคืน) พบว่าความชื้นในเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อยและสูงสุดเพียงร้อยละ 0.5 เท่านั้น ซึ่งไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรามากนัก และเพื่อประโยชน์ในทางเศรษฐกิจแล้วควรใช้ระยะเวลาสั้น ดังนั้นเวลา 1 ชั่วโมงในการแช่ข้าวจึงพอเหมาะสำหรับข้าวพันธุ์เสาไห้ และเพื่อให้ความชื้นในเมล็ดข้าวพอเหมาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราคือร้อยละ 30 (จากการศึกษาทดลองของกรมวิทยาศาสตร์บริการ ตามรายงานกิจกรรมกรมวิทยาศาสตรร์บริการ 2531) จึงเพิ่มน้ำลงไปในหัวเชื้อรา (Koji) ที่ใช้สำหรับผลิตข้าวแดง

4. <u>การศึกษาทดลองหาความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง</u>

จากตารางที่ 6 จะเห็นว่าที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80 ต้องใช้เวลาในการหมัก 39 วัน ซึ่งนานกว่าที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85 และ 90 คือใช้เวลาเพียง 32 และ 28 วัน ตามลำดับ และข้าวแดงที่หมักในตู้อบเพาะเชื้อที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 ใช้น้ำเติมระหว่างการหมัก 1200 มิลลิลิตร ต่อข้าว 5 กิโลกรัม ซึ่งน้อยกว่าข้าวแดงที่หมักในตู้อบเพาะเชื้อที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80 และ 85 คือ 1500 และ 1600 มิลลิลิตร ต่อข้าว 5 กิโลกรัม ตามลำดับ ลักษณะสีของข้าวแดงที่ได้ในแต่ละความชื้นสัมพัทธ์นั้นจะอยู่ในระดับเดียวกันคือ ++++ สำหรับที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 ถึง 75 ไม่เหมาะต่อการผลิตข้าวแดงในระบบเปิด เพราะทำให้เมล็ดข้าวแห้งและแข็ง ต้องเติมน้ำระหว่างการหมักบ่อยซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และทำให้ข้าวเสียไปในที่สุดดังนั้นความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมแก่การผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทางจะอยู่ในช่วงร้อยละ 80 ถึง 90 แต่ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 ดีที่สุด

5. <u>การศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง</u>

เนื่องจากห้องอบเพาะเชื้อของกรมวิทยาศาสตร์บริการใช้เครื่องปรับอากาศเป็นเครื่องปรับอุณหภูมิห้อง และไม่มีเครื่องมือปรับความชื้นสัมพัทธ์หรือเครื่องกำเนิดไอ ดังนั้นจึงใช้วิธีกรุห้องภายในอีกชั้นหนึ่งด้วยพลาสติก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเครื่องปรับอากาศสู่ข้าวที่ทำการหมักเพาะเชื้อและปรับความชื้นสัมพัทธ์ด้วยวิธีการต้มน้ำแล้วนำไปเปิดภายในห้องเพื่อให้ไอรม ผลการศึกษาทดลองดังตารางที่ 7, 8, และ 9 ตามลำดับ

จากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นถึงการปรับความชื้นสัมพัทธ์โดยวิธีการต้มน้ำแล้วน้าเอาไอไปรมเพื่อให้ภายในห้องมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้น จากการศึกษาทดลองพบว่า เมื่อต้มน้ำ 20 ลิตร ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดวัดได้ร้อยละ 82.1 และลดลงทันทีภายในเวลา 1 ชั่วโมง เหลือความชื้นสัมพัทธ์เพียงร้อยละ 45.5 และเมื่อเพิ่มน้ำต้มเป็น 40 ลิตร แล้วนำเอาไอไปรม ความชื้นสัมพัทธ์วัดได้สูงสุดร้อยละ 82.1 เช่นเดิมแล้วลดลงเหลือร้อยละ 45.6 ภายหลังจากนั้น 1 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มการต้มน้ำไปอีกเป็น 60 ลิตร ความชื้นสัมพัทธ์วัดได้สูงสุดร้อยละ 82.0 และลดลงเหลือ 45.0 เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 ชั่วโมง ดังนั้นเพื่อมิให้ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องต่ำจนเกินไป จึงต้องทำการต้มน้ำวันละ 2 ครั้ง พบการปนเปื้อนในข้าวที่ทำการหมักและเสียไปในที่สุด จึงหยุดการศึกษาทดลองโดยวิธีนี้

จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นถึงผลการผลิตข้าวแดง ในห้องอบเพาะเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ จะเห็นว่าวันแรกของการหมัก ภายในห้องอบเพาะเชื้อวัดความชื้นสัมพัทธ์ได้ร้อยละ 50 ข้าวในหม้อขณะหมักมีความชื้นร้อยละ 27 เมื่อมีการหมักเกิดขึ้นในวันที่ 2 ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องวัดได้ร้อยละ 85.0 และในวันที่ 3 และ 4 ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องวัดได้ร้อยละ 87.7 และ 88.0 ตามลำดับ และเมื่อปล่อยให้หมักต่อไปถึงวันที่ 6 ความชื้นสัมพัทธ์จะลดลงเหลือร้อยละ 50.0 ความชื้นในเมล็ดข้าวเหลือเพียงร้อยละ 16.5 จึงต้องเติมน้ำลงไปเพื่อเพิ่มความชื้นให้แก่เมล็ดข้าว จำนวน 3000 มิลลิลิตร นำเมล็ดข้าวไปวิเคราะห์หาความชื้นได้ความชื้นในเมล็ดข้าวร้อยละ 30.0 ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องจะวัดหลังจากเติมน้ำแล้ว 1 วัน วัดได้ร้อยละ 70.0 ปล่อยให้หมักต่อถึงวันที่ 9 ความชื้นสัมพัทธ์และความชื้นในเมล็ดข้าวเริ่มลดลงวัดได้ร้อยละ 59.7 และ 24.0 ตามลำดับ และในวันที่ 10 ความชื้นสัมพัทธ์ลดลงเหลือร้อยละ 53.0 ความชื้นในเมล็ดข้าวลดลงเหลือร้อยละ 19.8 จึงต้องเติมน้ำลงไปอีก 6600 มิลลิลิตร วัดความชื้นสัมพัทธ์ในวันที่ 11 ได้ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 70.0 ความชื้นในเมล็ดข้าววิเคราะห์ได้ร้อยละ 39.0 และในวันที่ 15 ของการหมัก ความชื้นในเมล็ดข้าวลดลงเหลือร้อยละ 21.0 ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องวัดได้ร้อยละ 36.2 จึงได้เติมน้ำลงไปอีก 2100 มิลลิตร วัดความชื้นสัมพัทธ์ในวันที่ 16 ของการหมักได้ร้อยละ 73.4 ความชื้นในเมล็ดข้าวเพิ่มเป็นร้อยละ 37.0 และเพียง 1 วันเท่านั้น ความชื้นสัมพัทธ์ลดลงเหลือร้อยละ 31.1 ความชื้นในเมล็ดข้าวลดลงเหลือร้อยละ 19.0 จึงได้เติมน้ำลงไปอีก 3300 มิลลิลิตร ในวันที่ 18 ของการหมัก วัดความชื้นสัมพัทธ์ได้ร้อยละ 84.2 และความชื้นในเมล็ดข้าวเพิ่มเป็นร้อยละ 56.0 และเมื่อหมักมาถึงวันที่ 24 ของการหมัก ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องวัดได้ร้อยละ 79.9 ความชื้นในเมล็ดข้าวเป็นร้อยละ 20.0 จึงเติมน้ำลงไปอีก 3600 มิลลิลิตร ความชื้นสัมพัทธ์ลดลงเหลือร้อยละ 37.0 แต่ความชื้นในเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 55.0 ในวันที่ 25 ของการหมัก ข้าวแดงมีลักษณะสีแดงเข้มจัด จึงหยุดการศึกษาทดลอง

จากตารางที่ 9 แสดงผลการเปรียบเทียบข้าวแดงที่ผลิตในห้องอบเพาะเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์และการหมักในตู้อบเพาะเชื้อที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 ซึ่งในการศึกษาทดลองนี้ได้ใช้ตู้อบเพาะเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (Climatic cabinet) ซึ่งสามารถทำการหมักข้าวแดงได้ครั้งละ 20 กิโลกรัม ดังนั้นการหมักในห้องอบเพาะเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์จึงต้องทำการหมักข้าวแดงเพียง 20 กิโลกรัมเท่านั้น และจากผลการศึกษาทดลองพบว่าข้าวแดงที่หมักในตู้อบเพาะเชื้อที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 เติมน้ำระหว่างการหมักเพียง 2 ครั้ง รวม 9.6 ลิตร เท่านั้น แต่ข้าวแดงที่หมักในห้องอบเพาะเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ ต้องเติมน้ำระหว่างการหมักหลายครั้ง รวมน้ำที่เติมได้ 21 ลิตร ระยะเวลาในการหมักนานถึง 35 วัน แต่ในตู้อบ

เพาะเชื้อที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 ใช้เวลาในการหมักเพียง 20 วันเท่านั้น ลักษณะของข้าวแดงที่ได้จากตู้อบเพาะเชื้อที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 เมล็ดข้าวยังคงรูปอยู่เช่นเดิม แต่ข้าวแดงที่หมักในห้องอบเพาะเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ เมล็ดข้าวแดงที่ได้จะหักมีลักษณะเหมือนปลายข้าว แต่ลักษณะอื่นไม่แตกต่างกัน

การศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทางนั้น พบว่าการทำข้าวแดงในปริมาณมากอาจทำให้การคลุกข้าวกับหัวเชื้อราไม่สม่ำเสมอดังนั้นจึงต้องมีการกระตุ้นประสิทธิภาพของเชื้อราโดยการนำข้าวที่คลุกเชื้อราแล้วมาทำเป็นกองรูปปิรามิดหรือนำไปใส่ภาชนะทรงสูง เช่นหม้อ จนเกือบเต็มแล้วปิดฝา ทิ้งไว้ 1 คืน (12 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิในกองข้าวหรือหม้อจะสูงขึ้น มีการหมักเกิดขึ้นเมล็ดข้าวจะเป็นสีขาวขุ่น เนื่องจากถูกย่อยโดยเอนไซม์ของเชื้อราเปลี่ยนองค์ประกอบของข้าว เพื่อให้เหมาะสมแก่การนำไปใช้เป็นอาหารเพื่อการดำรงชีพและเจริญเติบโต ระยะนี้เชื้อราจะใช้ความชื้นในเมล็ดข้าว ข้าวจะมีลักษณะแห้ง ห้ามเติมน้ำ เพราะหลังจากเชื้อราขยายพันธุ์งอกเป็นต้นก็จะคายเอาความชื้นออกมา ถ้าความชื้นเหมาะสมไม่มากไปเมล็ดข้าวจะมีสีม่วงอ่อน ซึ่งเป็นลักษณะเริ่มต้นที่ดีของการทำข้าวแดง และเมื่ออุณหภูมิภายในกองข้าวเพิ่มสูงขึ้นถึง 42 องศาเซลเซียส จำเป็นต้องลดอุณหภูมิลง โดยการนำไปเกลี่ยลงในถาดให้มีความหนา 2 เซนติเมตร เพราะมิฉะนั้นแล้วจะทำให้ข้าวในกองแฉะและเสียได้ เชื้อราจะค่อย ๆ เจริญเติบโตจากส่วนล่างของถาดมายังส่วนบนของผิวหน้า และสร้างสารสีแดงขึ้นบนเมล็ดข้าว เมล็ดข้าวจะมีสีแดงเข้มขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาของการหมัก ข้าวส่วนบนผิวหน้าของถาดจะแห้ง ต้องเติมน้ำลงไปบ้างหรือพ่นไอน้ำลงไป เพื่อให้เมล็ดข้าวมีความชื้นพอเหมาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา การหมักระยะนี้เชื้อราจะใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต ถ้าคนบ้างข้าวจะมีสีแดงเร็วขึ้น ข้าวแดงที่ทำการผลิตได้นำไปวิเคราะห์หาคุณค่าทางอาหาร สารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน วิตะมิน แร่ธาตุและความเข้มของสีทั้งหมด ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ข้าวแดงที่ผลิตได้ 5 ตัวอย่าง นำไปเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวแดงจากตลาด และข้าวแดงที่ผลิตด้วยข้าวพันธุ์หอมมะลิ ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบดังตารางที่ 11

และจากตารางที่ 10 จะเห็นว่าข้าวแดงที่ผลิตได้ สามารถนำไปใช้เป็นสีแดงผสมอาหารได้อย่างปลอดภัย เพราะตรวจไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซิน นอกจากนี้แล้วยังได้คุณค่าทางอาหารเพิ่มขึ้นอีกด้วย

และจากตารางที่ 11 จะเห็นว่าข้าวแดงที่ผลิตได้มีความเข้มของสีแดงทั้งหมด วัดที่ค่าความดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตร (A_{500}) 932.78 ต่อกรัม ซึ่งสูงกว่าข้าวแดงจากตลาดที่มีความเข้มของสี 325.4 ต่อ 1 กรัม และข้าวแดงที่ทำจากข้าวพันธุ์หอมมะลิที่มีความเข้มของสี 329.4 ต่อ 1 กรัม ข้าวแดงที่ผลิตจากข้าวพันธุ์เสาไห้มีค่าวิตะมินบี$_2$ บี$_6$ และไนอะซิน 2.2, 3.0 และ 39.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าข้าวแดงจากตลาดที่มีค่าวิตะมินบี$_2$ บี$_6$ และไนอะซิน 0.46 0.21 และ 2.82 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และข้าวแดงที่ทำจากข้าวพันธุ์หอมมะลิมีค่าวิตะมินบี$_2$ บี$_6$ และไนอะซิน 0.52, 1.38 และ 23.5 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ข้าวแดงที่ผลิตจากข้าวหอมมะลิมีปริมาณวิตะมินบี$_{12}$ สูงคือ 0.34 ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม แต่ข้าวแดงที่ผลิตจากข้าวพันธุ์เสาไห้มีปริมาณวิตะมินบี$_{12}$ 0.11 ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม ซึ่งต่ำกว่าวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตที่มีปริมาณวิตะมินบี$_{12}$ อยู่ 0.82 ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม สำหรับข้าวแดงจากตลาดมีปริมาณวิตะมินบี$_{12}$ อยู่ 0.20 ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม ซึ่งต่ำกว่าข้าวแดงที่ผลิตจากข้าวพันธุ์หอมมะลิ ข้าวแดงตัวอย่างจากตลาดและข้าวแดงที่ผลิตจากข้าวพันธุ์หอมมะลิมีปริมาณเหล็กใกล้เคียงกัน คือ 185.9 และ 184.8 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ แต่ข้าวแดงที่ผลิตจากข้าวพันธุ์เสาไห้ มีปริมาณเหล็กต่ำกว่า ซึ่งมีอยู่เพียง 0.63 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สำหรับแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสนั้น ข้าวแดงที่ทำจากข้าวพันธุ์เสาไห้มีปริมาณ 15.6 และ 205.12 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าตัวอย่างข้าวแดงจากตลาดที่มีปริมาณ 9.68 และ 64.3 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมตามลำดับ แต่ต่ำกว่าข้าวแดงที่ทำจากข้าวพันธุ์หอมมะลิที่มีอยู่ปริมาณ 18.7 และ 326.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์แอมีโลสของข้าวที่ ใช้ผลิตข้าวแดงพบว่า ข้าวพันธุ์หอมมะลิมีแอมีโลสอยู่ร้อยละ 19.45 แต่ข้าวพันธุ์เสาไห้มีแอมีโลสอยู่ร้อยละ 28.38 ซึ่งสูงกว่าข้าวพันธุ์หอมมะลิ

วิจารณ์ผลการศึกษาทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา

จากการศึกษาทดลองจะเห็นว่าเชื้อราที่นำมาใช้คัดเลือก มี 3 สายพันธุ์ เท่านั้น แต่เนื่องจากประเด็นหลักของการศึกษาทดลองในครั้งนี้จะมุ่งเน้น การผลิตข้าวแดงเพื่อการอุตสาหกรรม ดังนั้นวิธีการผลิตจึงสำคัญกว่าการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา และอีกประการหนึ่ง เชื้อราจากห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ (วศ) เป็นเชื้อราที่ทราบสายพันธุ์คือ โมนัสคัส เพอร์พิวเรียส และเคยใช้ผลิตข้าวแดงในห้องปฏิบัติการจากข้าวพันธุ์เสาไห้มาแล้ว แต่อย่างไรก็ดีถ้ามีสายพันธุ์อื่นที่สามารถผลิตข้าวแดงได้ดีกว่า คือ ให้สีเข้มกว่า ก็น่าจะใช้สายพันธุ์นั้น จึงได้ทำการคัดเลือก และสายพันธุ์ของเชื้อราที่แยกได้จากตลาดจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากเพราะวัตถุประสงค์ในการผลิตข้าวแดงเพื่อการอุตสาหกรรมนี้ต้องการให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่คล้ายคลึงกับตัวอย่างข้าวแดงที่ขายอยู่ตามท้องตลาด จึงได้นำสายพันธุ์ที่แยกได้จากตลาดเป็นสายพันธุ์ 1 ที่นำมาคัดเลือก อีก 1 สายพันธุ์ใช้โมนัสคัส สายพันธุ์ TISTR # 3090 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท) มาเปรียบเทียบ แต่ที่เลือกมาเพียงสายพันธุ์เดียวเพราะเห็นว่าเชื้อราโมนัสคัส ส่วนใหญ่ของ วท. เป็นเชื้อราที่แยกได้จากตลาด ซึ่งในการศึกษาทดลองคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดำเนินการอยู่ก็ใช้สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวแดงจากตลาดมาคัดเลือกอยู่แล้ว ดังนั้น จึงได้เลือกของ วท. เพียงสายพันธุ์เดียว คือ สายพันธุ์ TISTR#3090 และโดยบังเอิญที่พบว่าสายพันธุ์ TISTR#3090 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสปอร์หรือสร้างสปอร์น้อย เมื่อนำมาผลิตข้าวแดงจึงไม่ได้ผลเพราะไม่สามารถย่อยข้าวได้ถึงแกนใน (ดังภาพที่ 8) แต่มิได้หมายความว่าสายพันธุ์ TISTR#3090 จะไม่ผลิตสี เพราะจากการศึกษาทดลองของ SHEPHERD, D (1983) พบว่าเชื้อราโมนัสคัส บางสายพันธุ์ที่ไม่สร้างปอร์ แต่สามารถผลิตสีได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสม

2. การปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อรา

จากผลการศึกษาทดลองจะเห็นว่าเชื้อราสายพันธุ์กลาย $RTUV_6$ ที่ผ่านการปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตข้าวแดงจากข้าวพันธุ์เสาไห้ สามารถย่อยข้าวได้ถึงแกนในทำให้ข้าวแดงที่ผลิตได้มีเนื้อเบาและยุ่ย ประสิทธิภาพในการผลิตสูงกว่าสายพันธุ์เดิม RT ถึง 3 หรือ 4 เท่า แต่จากผลการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารตามตารางที่ 11 พบว่าข้าวแดงที่ทำจากข้าวพันธุ์เสาไห้ ที่ผลิตจากเชื้อราสายพันธุ์กลาย $RTUV_6$ ให้ค่าวิตะมินบี 12 0.11 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งมีค่าต่ำกว่าวิตะบินบี 12 ในวัตถุดิบที่ใช้ผลิตซึ่งวิเคราะห์ได้ 0.82 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม อาจเป็นเพราะว่าแสงอัลตราไวโอเลตที่ใช้ในการทำให้เชื้อรากลายพันธุ์ไปทำลายยีน (gene) ส่วนที่ใช้สังเคราะห์วิตะมินบี 12 ทำให้เชื้อรานั้น

ไม่สามารถสังเคราะห์วิตะมินบี 12 ได้ ต้องอาศัยวิตะมินบี 12 จากแหล่งอื่น เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโต ดังนั้นในการผลิตข้าวแดง เชื้อราสายพันธุ์กลาย $RTUV_6$ จะใช้วิตะมินบี 12 ที่มีอยู่ในวัตถุดิบ เพื่อการดำรงชีพ ทำให้วิตะมินบี 12 บางส่วนหมดไป ผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่ได้จึงมีค่าวิตะมินบี 12 ต่ำกว่าวัตถุดิบ

3. <u>การศึกษาทดลองการดูดซึมน้ำของข้าวพันธุ์เสาไห้ต่อการผลิตข้าวแดงและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแช่ข้าว</u>

จากผลการศึกษาทดลองพบว่าในชั่วโมงแรกของการแช่ข้าวน้ำจะซึมเข้าไปในเมล็ดข้าวเป็นจำนวนมาก แต่หลังจากนั้นการซึมของน้ำจะช้าลง เพราะน้ำในเมล็ดข้าวถึงจุดอิ่มตัวแล้ว แต่ยังคงสามารถดูดซึมเข้าไปได้อีกแต่เป็นจำนวนเล็กน้อยเท่านั้น และจากการแช่ข้าวเป็นระยะเวลานาน 8 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาความชื้นพบว่าในเมล็ดข้าวมีความชื้นอยู่ร้อยละ 31.2 ซึ่งมีความชื้นค่อนข้างสูง และเมื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน เกิดการ hydrolyzed ทำให้แอมีโลส (amylose) แยกตัวออกมาจากแอมีโลเพกติน (amylopectin) ง่ายต่อการย่อยของเชื้อรา ดังนั้น เอนไซม์ แอมีเลส (amylase enzyme) ของเชื้อรา จะเปลี่ยนแอมีโลสเป็นน้ำตาลมอลโทส (maltose) หมด ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีเนื้อเหนียว

จากผลการศึกษาทดลองในตารางที่ 4 จะเห็นว่าระยะเวลาในการแช่ข้าวและความชื้นที่วิเคราะห์ได้ไม่สัมพันธ์กัน อาจเป็นเพราะว่าการทำให้ข้าวสะเด็ดน้ำในตะแกรงไม้ไผ่ใช้ระยะเวลา 1/2 ชั่วโมง อาจไม่เพียงพอ น้ำสะเด็ดออกจากข้าวไม่หมด ดังนั้นจึงมีบางส่วนที่มีน้ำหลงเหลืออยู่มาก และเมื่อสุ่มตัวอย่างโดนส่วนนั้นมาวิเคราะห์ ความชื้นจึงออกมาสูง แต่ในตารางที่ 5 วิธีการเก็บตัวอย่างจะต่างออกไปจากตารางที่ 4 เพราะวัตถุประสงค์คือต้องการจะทราบว่าในการแช่ข้าว 5 กิโลกรัม ในระยะเวลาต่าง ๆ กันนั้น น้ำจะซึมเข้าไปในเนื้อข้าวชั่วโมงละเท่าใด ซึ่งเมื่อเก็บข้าวขึ้นมาทำให้สะเด็ดน้ำแล้วต้องใช้ผ้าขาวบางซับน้ำบริเวณที่อยู่ภายนอกเมล็ดข้าวออกให้หมด เพื่อต้องการหาค่าที่แท้จริงของน้ำที่ถูกเมล็ดข้าวดูดซึมเข้าไป ดังนั้นความชื้นที่วิเคราะห์ได้จึงเป็นความชื้นภายในเมล็ดข้าวอย่างแท้จริง ซึ่งจะเห็นว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างความชื้นและระยะเวลาในการแช่ข้าว

4. <u>การศึกษาทดลองหาความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง</u>

จากผลการศึกษาทดลองพบว่าที่ความชื้นสัมพัทธ์สูง ระยะเวลาในการหมักข้าวแดงจะสั้น และน้ำที่ใช้เติมระหว่างการหมักจะน้อย ที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะว่าเมื่อห้องหมักมีความชื้นสัมพัทธ์สูง บรรยากาศภายในห้องมีความชื้นมาก ดังนั้นความชื้นในเมล็ดข้าวจึงระเหยออกมาได้น้อย (อาศัยหลัก

การของวิธีการออสโมซิส) ทำให้เมล็ดข้าวมีความชื้นที่ค่อนข้างจะคงที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อราอยู่ตลอดเวลา เชื้อราทำงานอย่างต่อเนื่องทำให้ได้ผลผลิตเร็ว แต่ถ้าภายในห้องหมักมีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ บรรยากาศภายในห้องจะมีความชื้นน้อยลง ห้องมีลักษณะแห้ง ความชื้นในเมล็ดข้าวระเหยออกมามาก เมล็ดข้าวแห้งต้องเติมน้ำเพื่อให้ความชื้นภายในเมล็ดข้าวพอเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อรา การทำงานของเชื้อราไม่ต่อเนื่องมีระยะชะงักงันเมื่อข้าวแห้ง และรอปรับตัวเมื่อเมล็ดข้าวมีความชื้นที่เหมาะสม ทำให้ระยะเวลาในการผลิตข้าวแดงนานกว่าห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง และดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าห้องอบเพาะเชื้อที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำความชื้นในเมล็ดข้าวจะระเหยออกมามากกว่าความชื้นในเมล็ดข้าวที่อบเพาะเชื้อในห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง ดังนั้นปริมาณของน้ำที่ใช้เติมลงไปในเมล็ดข้าวเพื่อให้มีความชื้นพอเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อราจึงมากกว่าปริมาณของน้ำที่ใช้เติมลงไปในเมล็ดข้าวที่อบเพาะเชื้อในห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง เพราะฉะนั้นน้ำที่ใช้เติมระหว่างการหมักของข้าวแดงในห้องอบเพาะเชื้อที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ย่อมมากกว่าข้าวแดงที่หมักในห้องอบเพาะเชื้อที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูงด้วย

5. <u>การศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง</u>

จากผลการศึกษาทดลองในตารางที่ 7 การปรับความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องหมักขนาด 3 เมตร x 3 เมตร โดยวิธีการต้มน้ำ แล้วนำไปเปิดภายในห้องเพื่อให้ไอรมนั้นพบว่า การต้มน้ำในปริมาณ 20 ลิตร 40 ลิตร และ 60 ลิตร เมื่อนำไปเปิดภายในห้องปล่อยให้ไอรมวัดความชื้นสัมพัทธ์ได้สูงสุด ร้อยละ 82 ในแต่ละครั้งที่ดำเนินการศึกษาทดลอง ซึ่งความชื้นสัมพัทธ์นี้อยู่ในช่วงที่สามารถผลิตข้าวแดงได้ แต่เมื่อทำการวัดใหม่หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์ลดลงเหลือร้อยละ 45 อาจเป็นเพราะว่าการปรับอุณหภูมิภายในห้องหมักให้ได้ 30 องศาเซลเซียส นั้น ใช้วิธีการปรับโดยใช้เครื่องปรับอากาศ และเครื่องปรับอากาศนี้อาจทำให้น้ำที่ต้มเย็นเร็ว ไอน้ำหมดไป ทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ลดลงอย่างรวดเร็ว วิธีการนี้จึงใช้ไม่ได้ผล

จากผลการศึกษาทดลองในตารางที่ 8 จะเห็นว่าห้องอบเพาะเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ ที่มีขนาดของห้องประมาณ 3 เมตร x 3 เมตร ใช้ข้าวเสาไห้ 20 กิโลกรัม ในการหมักข้าวแดง วัดความชื้นสัมพัทธ์เริ่มต้นได้ร้อยละ 50 แต่เมื่อข้าวมีการหมักเกิดขึ้น ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องเพิ่มขึ้น วัดได้ร้อยละ 85.0 , 87.7 และ 88.0 ตามลำดับ ซึ่งความชื้นนี้ได้มาจากการคายความชื้นของเชื้อราขณะเจริญเติบโต (Linderferser, L.A., Ciegler, A 1975) และในขณะเดียวกันเชื้อราจะใช้ความชื้นในเมล็ดข้าว เพื่อการเจริญเติบโตเช่นกันดังนั้นเมื่อถึงระยะเวลาหนึ่ง ความชื้นในเมล็ดข้าวจะไม่เพียงพอแก่การเจริญ

เติบโตของเชื้อรา เชื้อราจะหยุดการเจริญทำให้ความชื้นภายในห้องลดลงเหลือร้อยละ 50 ความชื้นในเมล็ดข้าวเหลือร้อยละ 16.5 ระยะนี้จำเป็นต้องเติมน้ำ เพราะมิฉะนั้นแล้ว เมื่อปล่อยให้ข้าวแห้งกว่านี้ เชื้อราที่หยุดการเจริญเติบโต อาจตายได้ และเมื่อเพิ่มน้ำลงไปในเมล็ดข้าวเชื้อราจะเจริญเติบโตใหม่ ความชื้นภายในห้องเพิ่มขึ้นวัดความชื้นสัมพัทธ์ได้ร้อยละ 70 แต่ความชื้นสัมพันธ์ในช่วงนี้ไม่เหมือนในช่วงแรกของการหมัก ซึ่งในช่วงแรกนั้นความชื้นสัมพันธ์ภายในห้องมีแต่เพิ่มและเพิ่ม แต่ในช่วงหลังความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องเมื่อเพิ่มแล้วกลับค่อย ๆ ลดลงตามสภาพของห้องที่ใช้หมัก ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะว่าในช่วงแรก เชื้อราอยู่ในช่วงเจริญเติบโต (Log phase) ทำให้เชื้อราขณะหมักเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว ความชื้นที่เชื้อราคายออกมาจึงเพิ่มขึ้นด้วย แต่ในช่วงที่ 2 นี้ เชื้อราอาจอยู่ในช่วงคงที่ (Stationary phase หรือ Balanced phase) จำนวนของเชื้อราไม่เพิ่มขึ้นหรือเพิ่มน้อย ทำให้ความชื้นที่เชื้อราคายออกมาคงที่ และระเหยออกไปตามสภาพของห้องที่ใช้หมัก ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องจึงลดลง ความชื้นในเมล็ดข้าวลดลงด้วยเหลือความชื้นร้อยละ 19.8 จึงเติมน้ำเข้าไปในเมล็ดข้าว ความชื้นในเมล็ดข้าวเพิ่มเป็นร้อยละ 39.0 ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องวัดได้ร้อยละ 70 ซึ่งจากผลการศึกษาทดลองนี้จะเห็นว่าเชื้อรายังเจริญเติบโตได้อยู่ แต่หลังจากนั้น 4 วัน ความชื้นสัมพัทธ์ลดลงเหลือร้อยละ 36.2 แต่ความชื้นในเมล็ดข้าววิเคราะห์ได้ร้อยละ 21.0 แสดงว่ามีการใช้ความชื้นในเมล็ดข้าวน้อยลง อาจเป็นเพราะว่าช่วงนี้มีการตายของเชื้อราเกิดขึ้น ทำให้เหลือจำนวนของเชื้อราที่มีชีวิตอยู่น้อย เชื้อราอยู่ในช่วงของการลดจำนวน (Death หรือ Decline phase) และเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำเข้าไปอีกเพื่อให้ความชื้นภายในห้องมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นซึ่งวัดได้ร้อยละ 84.2 ความชื้นในเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 56.0 ซึ่งมากไปและไม่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อรา ระยะนี้จะเห็นว่าข้าวแดงมีสีแดงเข้ม แต่อาจยังไม่มากพอ จึงปล่อยทิ้งไว้ให้เกิดการหมักต่อไป ความชื้นในเมล็ดข้าวลดลงเหลือร้อยละ 20.0 ความชื้นสัมพัทธ์วัดได้ร้อยละ 79.9 ข้าวมีสีแดงเข้มขึ้นกว่าเดิม แต่เมล็ดข้าวมีลักษณะแห้งจึงเพิ่มน้ำลงไปอีก ความชื้นในเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 55 แต่ความชื้นสัมพัทธ์ซึ่งวัดในวันรุ่งขึ้นหลังจากเติมน้ำลงไปแล้ว วัดได้ร้อยละ 37.0 ซึ่งลดลง และความชื้นสัมพัทธ์ที่วัดได้เท่ากับความชื้นสัมพัทธ์ของห้องทั่วไปขณะที่ทำการวัด จึงหยุดการศึกษาทดลอง และผลจากการศึกษาทดลองนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการปรับความชื้นสัมพัทธ์ของห้องที่ใช้ทำการหมักได้อย่างเหมาะสม

จากตารางที่ 9 จะเห็นว่าการผลิตข้าวแดงในห้องที่ไม่ได้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ความชื้นในเมล็ดข้าวจะระเหยออกมาไม่สม่ำเสมอ มากบ้างน้อยบ้างตามสภาพของบรรยากาศภายในห้อง และเมื่อสภาพภายในห้องแห้งมาก ความชื้นในเมล็ดข้าวจึงระเหยออกมามาก แรงตึงผิวของเมล็ดข้าวปรับตัวไม่ทันเมื่อเติมน้ำลงไป บรรยากาศภายนอกผิวเกิดแรงดันมากกว่าและไม่สม่ำเสมอ

ตามสภาวะของหยดน้ำที่สัมผัสผิว ทำให้เมล็ดข้าวปริ และเมื่อคนเมล็ดข้าวจะหัก เมื่อทำบ่อยครั้งทำให้เมล็ดข้าวยิ่งหักมากขึ้น ผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่ได้จึงมีเมล็ดหักเหมือนปลายข้าว

และจากผลการวิเคราะห์ข้าวแดงในตารางที่ 11 จะเห็นว่า ข้าวแดงที่ทำจากวัตถุดิบที่มีค่าแอมีโลสสูงจะได้ค่าความเข้มของสีสูงกว่าข้าวแดงที่ทำจากวัตถุดิบที่มีค่าแอมีโลสต่ำ วัตถุดิบที่มีค่าแอมีโลสสูงอาจมีค่าแอมีโลเพกตินสูงด้วย การที่มีค่าแอมีโลเพกตินสูงนั้น เมื่อเกิดการย่อยด้วยเอนไซม์จากเชื้อราจะได้ค่าเดกซ์ตริน (Dextrin) สูง และค่าเดกซ์ตรินก็คือค่าความเข้มของสีนั่นเอง เพราะขณะที่เชื้อราเจริญเติบโตจะย่อยแป้งและปล่อยสารสีแดงเอาไว้ กระบวนการย่อยแป้งในเมล็ดข้าวของเชื้อราจะกำหนดให้หยุดแค่เดกซ์ตริน ด้วยวิธีการควบคุมความชื้นเริ่มต้น เพราะถ้าปล่อยให้ราย่อยแป้งเป็นน้ำตาลทั้งหมด ข้าวแดงจะมีเมล็ดลีบและเหนียวดังที่ได้เคยกล่าวไว้แล้วในรายงานกิจกรรมกรมฉบับที่ 46 ปีงบประมาณ 2531 หน้า 145 - 148

ขั้นตอนทั้งหมดนี้ยุ่งยากและสลับซับซ้อน ผู้วิจัยต้องมีประสบการณ์สูงเป็นพิเศษ เพื่อใช้วิจารณญาณพิเคราะห์ว่า ควรจะทำอย่างไร ข้าวแดงที่ได้จึงมีลักษณะดี **คือยังคงรูปเมล็ดข้าวอยู่ในลักษณะที่ดูเหมือนข้าวย้อมสี เมล็ดไม่ลีบ ไม่หัก เนื้อข้าวไม่เหนียว และที่สำคัญข้าวแดงที่ดีต้องมีน้ำหนักเบา** การควบคุมความชื้น ถ้ามากไปข้าวแดงที่ได้จะมีเมล็ดลีบ ถ้าน้อยไปข้าวแห้งอาจต้องเติมน้ำบ่อย ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ตัวอื่นได้ง่าย การคุมความชื้นในเมล็ดข้าวเพื่อให้เชื้อราเจริญเติบโตในการทำข้าวแดงนี้ยากมาก เพราะเชื้อราที่ใช้มีเอนไซม์ แอมีเลส พร้อมที่จะย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลอยู่ตลอดเวลา แต่กระบวนการย่อยต้องการให้หยุดแค่เดกซ์ตริน ดังนั้น ต้องหาวิธีการคุมความชื้นให้พอดีแก่ความต้องการ ซึ่งกว่าจะประสพผลสำเร็จต้องใช้เวลาในการศึกษาทดลองหลายครั้ง

นอกจากนี้แล้วการให้ความชื้นหลังจากเกิดการหมักก็มีผลต่อการผลิตสีด้วย ข้าวแดงที่ดีต้อง**มีสีแดงเข้มอมม่วง** ถ้าให้ความชื้นหลังจากเกิดการหมักเร็วไปจะทำให้ข้าวแดงที่ได้มีสีส้ม ถ้าให้ความชื้นหลังจากเกิดการหมักช้าไป เมล็ดข้าวจะแห้งมาก เชื้อราอาจตายได้ ทำให้ไม่ได้ผลิตภัณฑ์ข้าวแดงตามต้องการ ดังนั้น ระยะเวลาที่จะให้ความชื้นแก่เมล็ดข้าวหลังจากเกิดการหมักแล้วก็สำคัญต้องอาศัยประสบการณ์ เพาะมิฉะนั้นแล้วจะไม่ได้ผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่ดี

สรุปผลการศึกษาทดลอง

จากผลการศึกษาทดลองพอจะสรุปได้ดังนี้คือ

1. เชื้อราที่เหมาะสมแก่การนำมาผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทาง โดยใช้ข้าวพันธุ์เสาไห้เป็นวัตถุดิบ คือเชื้อราจากห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ โมนัสคัส เพอร์พิวเรียส
2. หลังการนำเอาเชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส โดยใช้ชื่อรหัสว่า RT ไปปรับปรุงประสิทธิภาพ โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ได้เชื้อรากลาย $RTUV_6$ ให้ประสิทธิภาพในการผลิตสีสูงกว่าสายพันธุ์เดิม RT ถึง 3 และ 4 เท่า สามารถย่อยข้าวเสาไห้ถึงแกนในทำให้ข้าวแดงที่ได้เบาและยุ่ย ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่าสายพันธุ์เดิม
3. การแช่ข้าวเสาไห้ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ไม่มีผลต่อการผลิตข้าวแดง และระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 1 ชั่วโมง
4. ความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทางอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 80-90 แต่ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 ดีที่สุด
5. ข้าวแดงที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้เป็นสีผสมอาหารได้อย่างปลอดภัย เพราะตรวจไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินในทุกตัวอย่าง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ คุณเสริมศรี คงศักดิ์ อดีตรองอธิบดี กรมวิทยาศาสตร์บริการ ผู้ริเริ่มให้มีการวิจัยเรื่องข้าวแดงขึ้น ทั้งได้ให้คำปรึกษาแนะนำ ช่วยเหลือทางด้านวิชาการเป็นอย่างดี

คุณมัณฑนา วงศ์มณี อดีตหัวหน้างานจุลชีววิทยา ได้ช่วยเหลือแนะนำให้คำปรึกษาในการเรียบเรียงเรื่องข้าวแดงเป็นภาษาอังกฤษ ในคราว Presented paper การประชุมทางวิชาการ GIAM V ในปี คศ. 1977

คุณนันทนา แก้วอุบล นักวิทยาศาสตร์ 9 ชช. ผู้ผลักดันให้มีการวิจัยเรื่องการศึกษาทดลองผลิตข้าวแดงขั้นอุตสาหกรรมนำทางขึ้น และขอขอบคุณหัวหน้ากลุ่มงานจุลชีววิทยา คุณวรรณี สมพร และผู้อำนวยการกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุกท่านที่ให้ใช้งบประมาณของกลุ่มและกองในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงไปไม่ได้ถ้าไม่ได้รับความช่วยเหลือเป็นอย่างดีทั้งการทำงานวิจัยและการจัดลำดับภาพ จาก นายบุญเติม ทองวัน ผู้วิจัยจึงใคร่ขอลงกิตติกรรมประกาศไว้ ณ ที่นี้ด้วย

นอกจากนี้ยังใคร่ขอขอบคุณ คุณสุคนธ์ เนคมานุรักษ์ หัวหน้ากลุ่มงานวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ คุณสุนทรี เปรื่องการ หัวหน้ากลุ่มงานชีวเคมี คุณวัฒนา เพชรเกษม อดีตนักวิจัยฝ่ายประยุกต์วิธีวิเคราะห์และวิจัยอาหารที่ให้การสนับสนุนการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ตามความจำเป็น และ คุณภามิณี ทองคำวงศ์ ที่ได้เรียบเรียงและจัดทำเป็นรูปเล่ม

ขอขอบคุณ คุณสุจินต์ ศรีคงศรี ผู้อำนวยการกอง กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ที่ได้ช่วยแนะนำแก้ไข ตรวจทานจนกระทั่งงานวิจัยออกมาเป็นรูปเล่มที่ดี

และขอขอบคุณบุคคลอื่นทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ แต่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม

เอกสารอ้างอิง

1. กรมวิทยาศาสตร์ 2519 : รายงานกิจกรรมกรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 34 หน้า 80-83
2. กรมวิทยาศาสตร์บริการ 2531 : รายงานกิจกรรมกรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและพลังงาน ฉบับที่ 46 หน้า 145-151
3. กังสดาลย์ บุญปราบ และคณะ 1997 : การคัดเลือก Glucose Derepression Mutants เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวแดง และกลไกควบคุมการสร้างสีของเชื้อกลายพันธุ์ เอกสารวิชาการ การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539 ISBN 974-553-261-4 หน้า 37-45
4. นภา โล่ห์ทอง 2527 ข้าวแดง วารสารวิทยาศาสตร์ 38-9 : 414-418
5. AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Official Method of Analysis (1995) Cereal Food chapter 32 Chapter 45 และ chapter 50
6. Endo, A and K. Hasumi 1985. Dihydromonacolin L and monacolin x, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis. J. Antibiotic XXXVIII 3 : 321-327
7. Hesseltine, c.w. 1965. A millennium of Fungi, food and Fermentation Mycologia 57 : 180-181
8. Hiroi, T, T. Shima, T. Suzuki, M. Tsukioka and Ogasawara 1979 Hyperpigment - productive mutant *Monascus anka* for solid culture. Agr. Biol. Chem. 43(9) ,1975-1976, 1979
9. Johns Mr, Stuart DM (1991) Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. J. Ind. Microbiol. 8; 23-28
10. Lee S.T 1979. The Anka, pp. 1518-1593. In Pen cha Kan mu (Chinese herbal medicine). Yeh Book Co., Taipai.
11. Lin, C.F 1977 : The anka mold - Monascus, a taxonomic study : papers submitted to the Symposium Workshop on Indigenous Fermented Foods, held in Bangkok, Thailand Nov. 21-27, 1977
12. Lin, C.F and Iizuka, H 1982 Production of Extracellular Pigment by a Mutant of *Monascus Kaoliang* sp. nov. Applied and Enviromental Microbiology Vol. 43 pp. 671-676
13. Linderferser, L.A., Ciegler, A : Appl. Microbiol., 29, 323 (1975)

14. Lotong et al 1983 Production of soy sauce koji mold spore inoculum in plastic bags. Applied and Enviromental Microbiology 46, 1224-1226

15. Lotong, N and Suwanarit, P 1990 : Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content : J. Appl. Bacteriology 68 : 565-570

16. Nga, B.H and Lee, Y.K 1990 Biotechnology of enzymes and pigments "studies on *Monascus*". Microbiology Application in Food Biotechnology : 81–84 Proceedings of the second Congress of the Singapore Society for Microbiology, Singapore 31 october - 3 Nov. 1989.

17. Palo, Macario, A. Luz Vidal - Adeva, and Leticia M. Maceda "A study on ang-khak and its production. The Philippines Journal of Science. Vol. 89 (1960) pp. 1-19.

18. Pichyangkura, S 1977 : Effect of nutrition on amylase production in Monascus purpureus : papers submitted to the Symposium Workshop on Indigenous Fermented Foods, held in Bangkok, Thailand Nov. 21-27, 1977

19. Shepherd, D. 1983 The relationships between pigment production and sporulation in *Monascus*. In Fungal Differentiation, J.E. Smith. Marcel Dekker, Inc. New York pp. 103-118

20. Sookson, R and Yoshida, T 1987 Solid - state Culture of *Monascus purpureus* for the pigment production. Annual Reports of IC Biotech Vol. 10 : 357-360

21. Su, Y. C and Wang, W. H 1977 : Chinese red rice - anka : papers submitted to the Symposium Workshop on Indigenous Fermented Foods, held in Bangkok, Thailand Nov. 21-27, 1977

22. Su, Y.C 1980 Fermentation Production of anka pigment (*Monascus* pigments) Proceeding of the Oriental Fermented Food. Taipei Taiwan : pp. 143-165

สารบาญตาราง

ตารางที่ 1. แสดงถึงการเจริญเติบโตของเชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาบอโรด์เดกซ์โตรส อะการ์ ที่มีข้าวผสมอยู่ร้อยละ 3 ของเชื้อราสายพันธุ์เดิม RT และสายพันธุ์กลาย RTUV

สายพันธุ์ของเชื้อรา โมนัสคัส เพอร์พิวเรียส	ความกว้างของโซน เซนติเมตร	ระดับสี (Shade)
RT	3.0	+++
$RTUV_1$	4.0	++++
$RTUV_2$	3.5	+++
$RTUV_3$	3.5	++++
$RTUV_4$	3.5	+++++
$RTUV_5$	4.0	+++++
$RTUV_6$	5.0	+++++

หมายเหตุ 1. ระดับสี + ชมพูอ่อน

+ + แดงอมส้มอ่อน

+ + + แดงออกส้ม

+ + + + แดงเข้ม

+ + + + + แดงเข้มอมม่วง

2. รหัสของสายพันธุ์เชื้อรา

RT เชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส สายพันธุ์เดิมที่ผ่านการทำให้กลายพันธุ์แล้วและสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิห้อง RT ย่อมาจากคำว่า Room Temperature แต่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะเจริญเติบโตดีที่สุด และผลิตสีได้สูงสุด

RTUV เชื้อราสายพันธุ์กลายทำโดยการนำเอาสายพันธุ์ RT มาทำให้กลายพันธุ์อีกครั้งหนึ่งด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ดังนั้น จึงได้คำย่อว่า RTUV เพื่อให้ทราบว่าสายพันธุ์กลายนี้ มาจากสายพันธุ์เดิม RT และผ่านการทำให้กลายพันธุ์ด้วย UV

$RTUV_1$, $RTUV_2$, $RTUV_3$, $RTUV_4$, $RTUV_5$, และ $RTUV_6$ คือ สายพันธุ์กลายที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าให้ประสิทธิภาพในการผลิตสีสูงกว่าสายพันธุ์เดิม RT สายพันธุ์ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มของสีของเชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส เปรียบเทียบระหว่าง สายพันธุ์เดิม และสายพันธุ์กลาย

เชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส		ความเข้มของสี[3] (ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร) ต่อ 1 มิลลิลิตร		ความเข้มของสี[3] (ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร) ต่อ 1 มิลลิลิตร	
		extracellular[1] pigment	intracellular[2] pigment	extracellular pigment	intracellula pigment
สายพันธุ์เดิม	RT	0.5153	0.7655	0.4575	1.1115
สายพันธุ์กลาย	$RTUV_1$	1.0273	1.4005	0.9118	2.9415
สายพันธุ์กลาย	$RTUV_2$	0.9520	1.1435	0.8518	2.2185
สายพันธุ์กลาย	$RTUV_3$	0.9655	1.2530	0.8655	2.6575
สายพันธุ์กลาย	$RTUV_4$	0.8855	1.4310	0.8058	2.9840
สายพันธุ์กลาย	$RTUV_5$	1.0655	1.4210	0.9063	2.9985
สายพันธุ์กลาย	$RTUV_6$	1.7508	3.3850	1.6000	4.1240

หมายเหตุ 1. extracellular pigment คือ สีนอกเซลล์ละลายได้ในน้ำและแอลกอฮอล์

2. intracellular pigment คือ สีส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ ไม่ละลายน้ำ ต้องสกัดด้วยแอลกอฮอล์

3. ความเข้มของสีได้จากการคำนวณค่าของ Abs คูณด้วยระดับความเจือจาง (dilution factor) จะได้เป็นความเข้มของสีต่อ 1 มิลลิลิตร (วิธีการตาม Yuan-Chi Su 1980)

ตารางที่ 3 แสดงผลการผลิตข้าวแดงเปรียบเทียบระหว่างเชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส สายพันธุ์เดิม RT และสายพันธุ์กลาย $RTUV_6$

รายการ		RT	$RTUV_6$
น้ำหนักข้าวดิบที่ใช้	กรัม	50*	50*
น้ำที่เติมก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ	มิลลิลิตร	10	10
จำนวนเชื้อราที่ใช้ในการหมัก	มิลลิลิตร	2	2
จำนวนน้ำที่ใช้ระหว่างการหมัก	มิลลิลิตร	10	14
ระยะเวลาในการหมัก	วัน	12	9
ลักษณะของสี		แดงเข้มอมม่วง	แดงเข้มอมม่วง
ระดับสี		+++++	+++++
ลักษณะของข้าวแดง		ค่อนข้างแข็งสามารถบี้ออกเป็นผงป่นได้ด้วยนิ้วมือ	เบาสามารถบี้ออกเป็นผงป่นได้ด้วยนิ้วมือ

หมายเหตุ * วิธีการตามการศึกษาทดลองการผลิตข้าวแดงในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 4 การดูดซึมน้ำของข้าวพันธุ์เสาไห้**ต่อการผลิตข้าวแดง

หมายเลขปฏิบัติการ	ระยะเวลาในการแช่ข้าว[a] ชั่วโมง	ความชื้น[b] ร้อยละ	ความเข้มของสีทั้งหมด (Total pigment)*** ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ต่อ 1 กรัม
QO.510	1	29.3	33.55
QO.511	2	29.9	176.49
QO.512	3	29.7	81.88
QO.513	4	29.3	181.16
QO.514	5	30.1	166.18
QO.515	6	29.8	233.47
QO.516	7	30.0	230.10
QO.517	8	31.2	358.70 *

หมายเหตุ

1. * ลักษณะข้าวแดงที่ได้จะมีเนื้อเหนียวเล็กน้อย

2. ** ข้าวเสาไห้ที่ใช้ในการศึกษาทดลองนี้มีความชื้นร้อยละ 10.9

   (จากการวิเคราะห์ของกลุ่มงานโภชนาการอาหารหมายเลขปฏิบัติการ QN.119)

3. *** ความเข้มของสีทั้งหมด (Total pigment) ได้จากการคำนวนค่าความดูดกลืนแสง Abs โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{ความเข้มของสีทั้งหมด (ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร) ต่อ 1 กรัม} = \frac{\text{ค่าความดูดกลืนแสง} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้เป็นกรัม}} \times \text{ปริมาตรของสารละลายที่ใช้สกัดสี}$$

4. a และ b ระยะเวลาในการแช่ข้าวและความชื้น วิจารณ์ไว้ในบทวิจารณ์ หน้า 21

ตารางที่ 5 แสดงผลการดูดซึมน้ำของเมล็ดข้าวพันธุ์เสาไห้

ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ข้าว ชั่วโมง	ความชื้นในเมล็ดข้าว ร้อยละ
0	12.4
1	28.0
2	28.0
3	28.2
4	28.2
5	28.4
6	28.5
7	28.2 *
8	28.1 *
24 (แช่ค้างคืน)	28.5

หมายเหตุ 1. น้ำหนักข้าวที่ใช้ 5 กิโลกรัม

2. อุณหภูมิห้องเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่ข้าว

3. * อาจมีข้อผิดพลาดระหว่างการทดสอบ

4. ความชื้นในเมล็ดข้าวคำนวณจากน้ำหนักของข้าวที่หายไปหลังการอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งและอบต่อจนน้ำหนักคงที่ [วิธีการทดสอบตามวิธีการของงานวิจัยเรื่องการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำในตัวอย่าง (water content) ซึ่งใช้เวลาอบ 24 ชั่วโมง]

ตารางที่ 6 แสดงผลของความชื้นสัมพัทธ์ต่อการผลิตข้าวแดง

ความชื้นสัมพัทธ์ในตู้อบเพาะเชื้อ	ระยะเวลาในการหมัก	น้ำที่ใช้เติมระหว่างการหมัก	ลักษณะสีของข้าวแดง
ร้อยละ	วัน	มิลลิลิตร	ระดับ*
80	39	1,500	+ + + +
85	32	1,600	+ + + +
90	28	1,200	+ + + +

หมายเหตุ 1. ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 ถึง 75 ผลปรากฏว่าข้าวแห้งมากต้องเติมน้ำทุกวันระหว่างการหมัก เพื่อให้ราสามารถย่อยข้าวได้ และเมื่อเปิดตู้เติมน้ำบ่อย จึงมีการปนเปื้อนของเชื้อราตัวอื่นเกิดขึ้น ทำให้ข้าวเสียไปในที่สุด

2. * ระดับสี

+	ชมพูอ่อน
+ +	แดงอมส้มอ่อน
+ + +	แดงออกส้ม
+ + + +	แดงเข้ม
+ + + + +	แดงอมม่วงเข้ม

ตารางที่ 7 ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องอบเพาะเชื้อเมื่อรมด้วยไอน้ำเดือด

ปริมาณของน้ำที่ใช้ต้ม	วันและเวลาที่ทำการวัดความชื้นสัมพัทธ์		ห้องอบเพาะเชื้อขนาด 3 เมตร x 3 เมตร	
			ความชื้นสัมพัทธ์ก่อนรมด้วยไอน้ำเดือด	ความชื้นสัมพัทธ์หลังรมด้วยไอน้ำเดือด
ลิตร	วัน	เวลา	ร้อยละ	ร้อยละ
20	13 กพ. 39	13.45	38.0	82.1
	13 กพ. 39	14.45	-	45.5
40	14 กพ. 39	13.50	54.0	82.1
	14 กพ. 39	14.50	-	45.6
60	15 กพ.39	13.40	47.4	82.0
	15 กพ.39	14.40	-	45.0

หมายเหตุ ห้องอบเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่องปรับอากาศ

ตารางที่ 8 แสดงผลการผลิตข้าวแดง[1] ในห้องอบเพาะเชื้อที่ไม่ได้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์

วันที่ทำการหมัก	ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องอบเพาะเชื้อ[3] ร้อยละ	ความชื้นในเมล็ดข้าว[2] ร้อยละ	ปริมาตรของน้ำที่เติมขณะทำการหมักข้าวแดง มิลลิลิตร	หมายเหตุ
วันแรกของการหมัก	50.0	27.0	-	ทำเป็นกองหรือบรรจุในหม้อทรงสูงปิดฝา
2	85.0	24.0	-	บรรจุลงถาดเกลี่ยให้
3	87.7	22.0	-	สม่ำเสมอปล่อยให้
4	88.0	20.0	-	หมักต่อ
6	50.0	16.5	3000	
7	70.0	30.0	-	
9	59.7	24.0	-	
10	53.0	19.8	6600	
11	70.0	39.0	-	
15	36.2	21.0	2100	
16	73.4	37.0	-	
18	31.1	19.0	3300	
19	84.2	56.0	-	ความชื้นไม่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อรา
24	79.9	20.0	3600	
25	37.0	55.0	-	ข้าวแดงมีสีแดงเข้มจัด หยุดการศึกษาทดลอง

หมายเหตุ 1 ข้าวที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ใช้ข้าวเสาไห้ 20 กิโลกรัม

2 ความชื้นในเมล็ดข้าวคำนวณจากน้ำหนักข้าวที่หายไป หลังการอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งและอบต่อจนน้ำหนักคงที่

3 ความชื้นสัมพัทธ์วัดด้วยเครื่องมือวัดความชื้น Hygrocheck ของบริษัท Hanna ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตารางที่ 9 แสดงผลการเปรียบเทียบข้าวแดง[1] ที่ผลิตในห้องอบเพาะเชื้อและตู้อบเพาะเชื้อ

รายการ	ข้าวแดงที่หมักในห้องอบเพาะเชื้อ	ข้าวแดงที่หมักในตู้อบเพาะเชื้อ
ความชื้นสัมพัทธ์[2] ร้อยละ	31-88[3]	90
ปริมาณน้ำที่เติมระหว่างการหมัก ลิตร	21	9.6
ระยะเวลาในการหมัก วัน	35	20
ลักษณะของข้าวแดงที่ได้	เมล็ดหักคล้ายปลายข้าว สีแดงเข้มเบา สามารถบี้ออกเป็นผงป่นสีแดงได้ด้วยนิ้วมือ	เมล็ดข้าวยังคงรูปเดิม สีแดงเข้มเบา สามารถบี้ออกเป็นผงป่นสีแดงได้ด้วยนิ้วมือ

หมายเหตุ 1 การศึกษาทดลองทำ lot เดียวกัน โดยใช้ข้าวสารทั้งสิ้น 40 กิโลกรัม เมื่อคลุกเชื้อแล้วแบ่งออกเป็น 2 ส่วนๆ ละ 20 กิโลกรัมของน้ำหนักแห้ง ส่วนหนึ่งนำไปอบเพาะเชื้อในห้องอบเพาะเชื้อที่ไม่มีเครื่องควบคุมความชื้นสัมพัทธ์และอีกส่วนหนึ่งนำไปอบในตู้อบเพาะเชื้อที่มีเครื่องควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ (ใช้ตู้ Termaks) โดยให้ภายในตู้มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90

2 วัดความชื้นสัมพัทธ์โดยเครื่อง Hygrocheck ของบริษัท Hanna ประเทศสหรัฐอเมริกา

3 ความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องวัดได้ต่ำสุดร้อยละ 31 และสูงสุดร้อยละ 88

ตารางที่ 10 ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตได้

หมายเลขปฏิบัติการ		SZ.418	SZ.419	SZ.420	SZ.421	SZ.422	SZ.423
ความชื้น	ร้อยละ	12.40	8.75	10.80	9.12	6.57	9.03
โปรตีน (N x 6.25)	ร้อยละ	7.39[3]	18.90	23.70	32.40	16.20	21.70
ไขมัน (acid hydolysis)	ร้อยละ	0.69	4.41	6.28	4.24	1.40	2.58
กาก	ร้อยละ	0.72	4.72	5.82	8.33	3.56	9.29
เถ้า	ร้อยละ	0.36	0.76	0.77	1.15	0.70	1.32
คาร์โบไฮเดรท(โดยการคำนวน)	ร้อยละ	78.44	62.46	52.63	44.76	71.57	56.08
ค่าพลังความร้อน	กิโลแคลอรี่/100กรัม	349.50	365.10	361.80	346.80	363.70	334.30
แคลเซียม	มิลลิกรัม/100 กรัม	7.80	12.50	15.20	18.40	17.50	14.20
ฟอสฟอรัส	มิลลิกรัม/ 100 กรัม	81.10	201.60	186.20	244.60	160.50	232.70
เหล็ก	มิลลิกรัม/กิโลกรัม	1.82	5.20	4.48	8.35	5.46	7.85
ไนอะซิน	มิลลิกรัม/100 กรัม	1.47	23.40	33.30	46.80	4.92	88.90
วิตะมิน บี$_2$	มิลลิกรัม/100 กรัม	0.24	1.82	1.24	4.52	0.67	2.76
วิตะมิน บี$_6$	มิลลิกรัม/100 กรัม	0.13	2.13	2.06	3.27	1.34	6.37
วิตะมิน บี$_{12}$	ไมโครกรัม/100 กรัม	0.82	0.07	0.11	0.09	0.16	0.10
อะฟลาทอกซิน (B_1 B_2 G_1 G_2)		ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ความเข้มของสีทั้งหมด (Total pigment)	ต่อ 1 กรัม	-	1237.58	1503.89	301.24	257.01	335.07

หมายเหตุ

1. วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ค.
2. SZ.418 : ตัวอย่างข้าวสารเสาไห้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตข้าวแดง
   SZ.419 : ข้าวแดงตัวอย่างที่ 1
   SZ.420 : ข้าวแดงตัวอย่างที่ 2
   SZ.421 : ข้าวแดงตัวอย่างที่ 3
   SZ.422 : ข้าวแดงตัวอย่างที่ 4
   SZ.423 : ข้าวแดงตัวอย่างที่ 5
3. SZ.418 : เป็นตัวอย่างข้าวสาร ดังนั้นโปรตีนคำนวนจากค่าของ NX 5.95

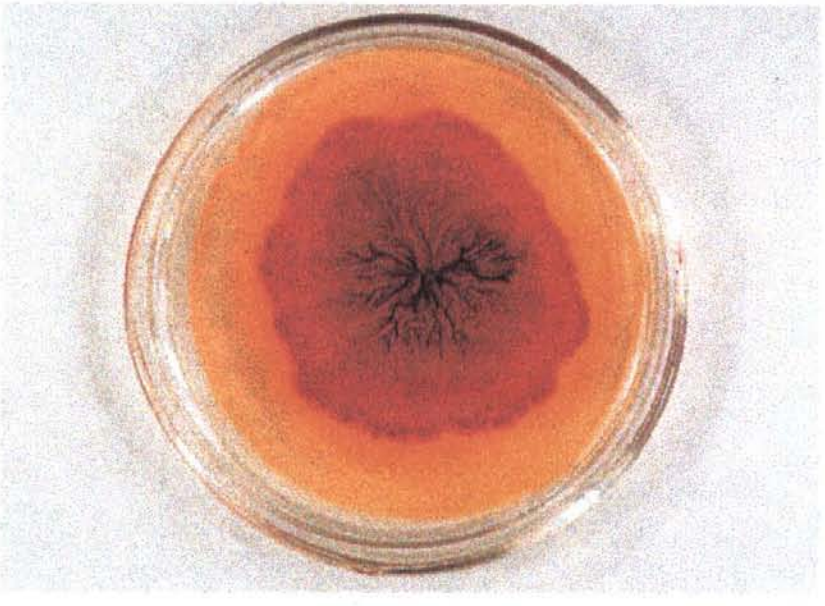
ตารางที่ 11 ตารางแสดงผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบตัวอย่างข้าวแดงจากตลาด และตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตขึ้นเองจากข้าวพันธุ์หอมมะลิและเสาไห้

รายงาน		ตัวอย่างข้าวแดงจากตลาด	ข้าวแดงที่ทำจากข้าวพันธุ์หอมมะลิ		ข้าวแดงทำจากข้าวพันธุ์เสาไห้	
			ข้าวสารหอมมะลิ	ข้าวแดง**	ข้าวสารเสาไห้	ข้าวแดง*
ความชื้น	ร้อยละ	7.40	12.10	7.90	12.40	8.90
วิตะมิน $บี_1$	มิลลิกรัม/ 100 กรัม	0.05	0.05	0.04	ไม่ได้วิเคราะห์	ไม่ได้วิเคราะห์
วิตะมิน $บี_2$	มิลลิกรัม/ 100 กรัม	0.46	0.05	0.52	0.24	2.20
วิตะมิน $บี_6$	มิลลิกรัม/ 100 กรัม	0.21	0.08	1.38	0.13	3.00
วิตะมิน $บี_{12}$	ไมโครกรัม/100 กรัม	0.20	0.11	0.34	0.82	0.11
ไนอะซิน	มิลลิกรัม/ 100 กรัม	2.82	1.22	23.50	1.47	39.50
แคลเซียม	มิลลิกรัม/ 100 กรัม	9.68	4.30	18.70	7.80	15.60
ฟอสฟอรัส	มิลลิกรัม/ 100 กรัม	64.30	86.70	326.00	81.10	205.12
เหล็ก	มิลลิกรัม/ 100 กรัม	185.90	0.17	184.80	1.820	0.63
แอมีโลส	ร้อยละ	-	19.45	-	28.38	-
ความเข้มของสีทั้งหมด (Total pigment)	ต่อ 1 กรัม	325.4	-	329.40	-	932.78

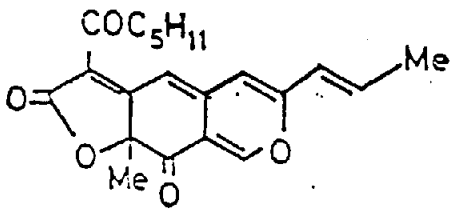
หมายเหตุ ✳ ข้าวแดงที่ทำจากข้าวพันธุ์เสาไห้เป็นค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 10

✳✳ ข้าวแดงจากหอมมะลิใช้วิธีการทำเช่นเดียวกับการศึกษาทดลองในห้องปฏิบัติการ

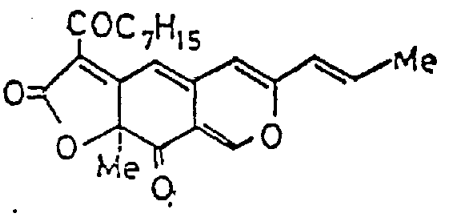
สารบาญภาพ



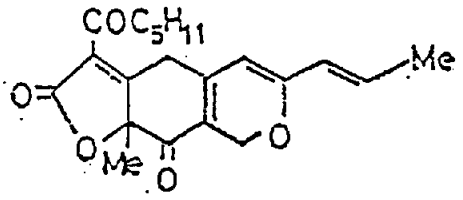
ภาพที่ 1 เชื้อราโมนัสคัส เพอร์พิวเรียส
สายพันธุ์ของกรมวิทยาศาสตร์บริการ (วศ.)



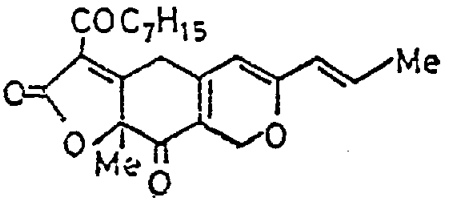
rubropunctatin
(red)



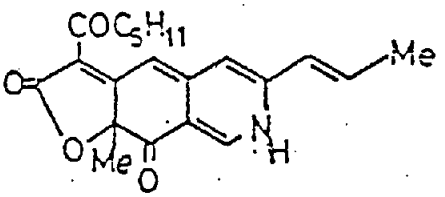
monascorubrin
(red)



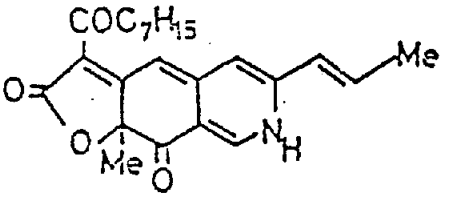
monascin
(yellow)



ankaflavin
(yellow)

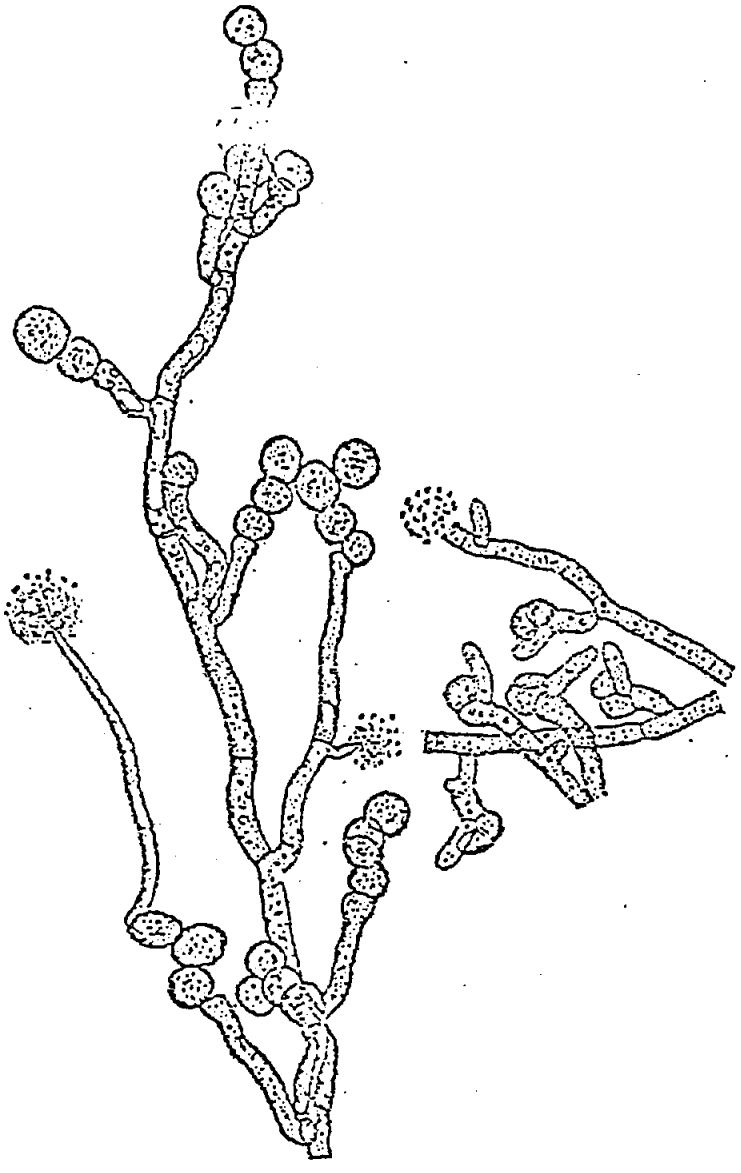


rubropunctamine
(purple)



monascorubramine
(purple)

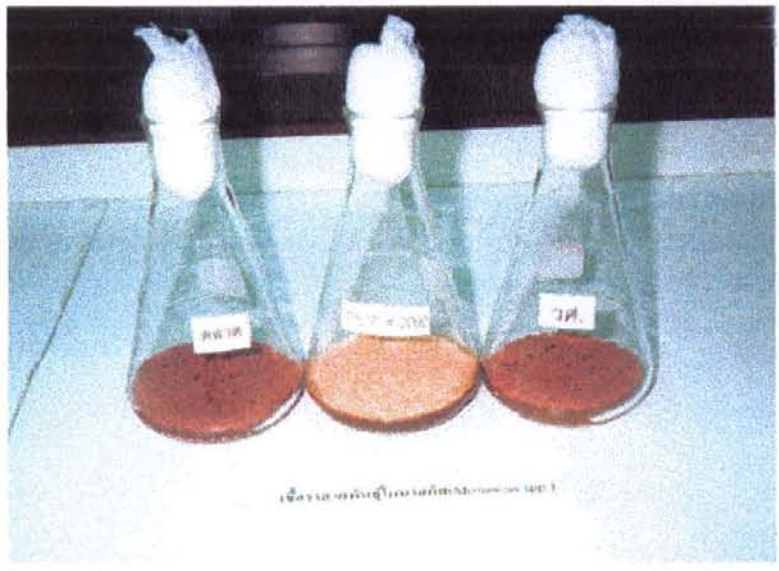
ภาพที่ 2. แสดงสูตรโครงสร้าง(structure formular)ของสารสีที่ผลิตโดยเชื้อราโมนัสคัส[Su, Y.C 1980]



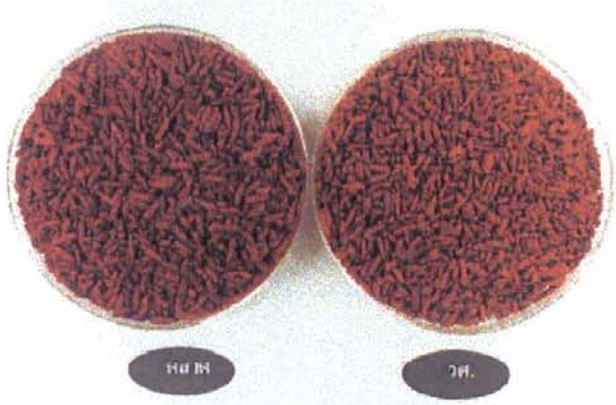
Extrusion of granular fluid (*Monascus*-Pigments)
from the tips of the hyphae

ภาพที่ 3. แสดงถึงการแตกออกของสารสีจากลำต้นของเชื้อราสู่ภายนอก[Su, Y.C 1980]

ภาพที่ 4 ข้าวแดง

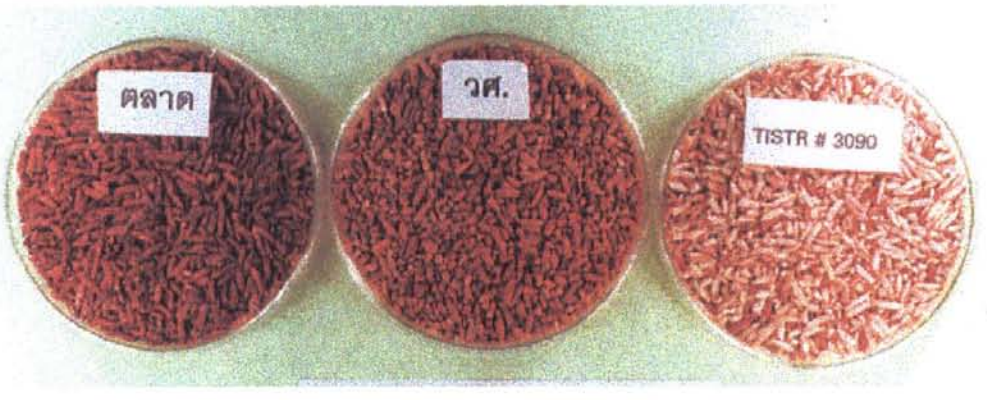


ภาพที่ 4 เปรียบเทียบเชื้อราสายพันธุ์ที่แยกได้จากตลาด วศ. และสายพันธุ์ TISTR#3090. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง



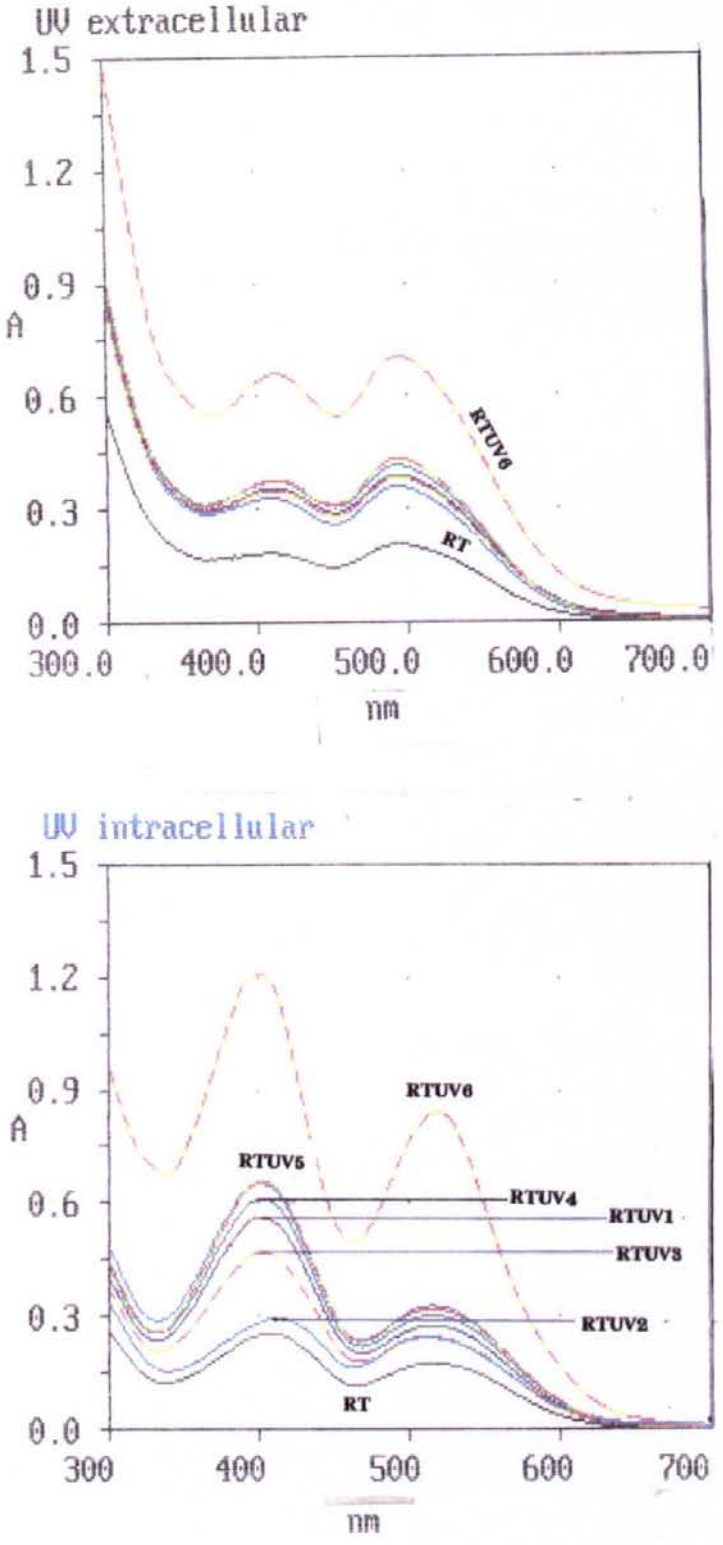
ข้าวแดงที่ผลิตโดยเชื้อราโมนัสคัสสายพันธุ์จากตลาด และ วศ.

ภาพที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบข้าวแดงที่ผลิตจากข้าวพันธุ์เสาไห้ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ที่แยกได้จากตลาด และสายพันธุ์ของ วศ.

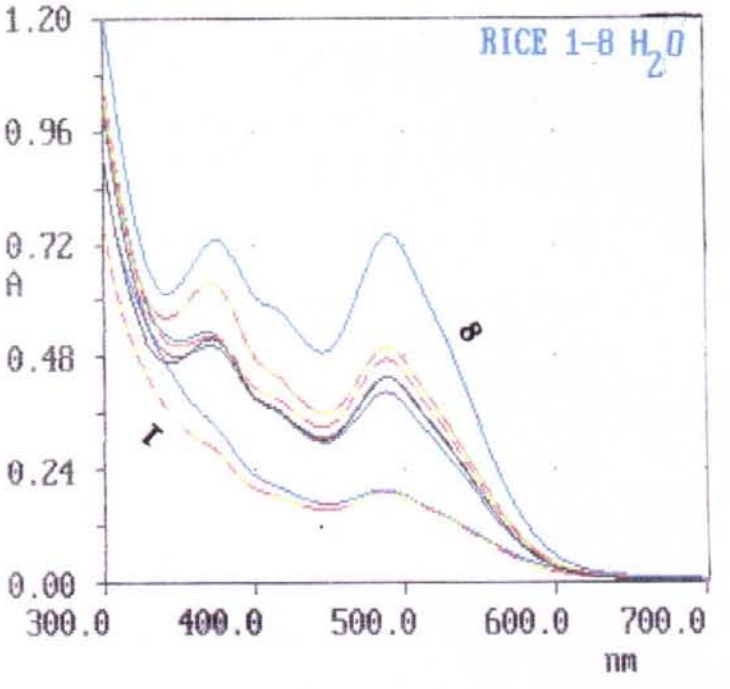


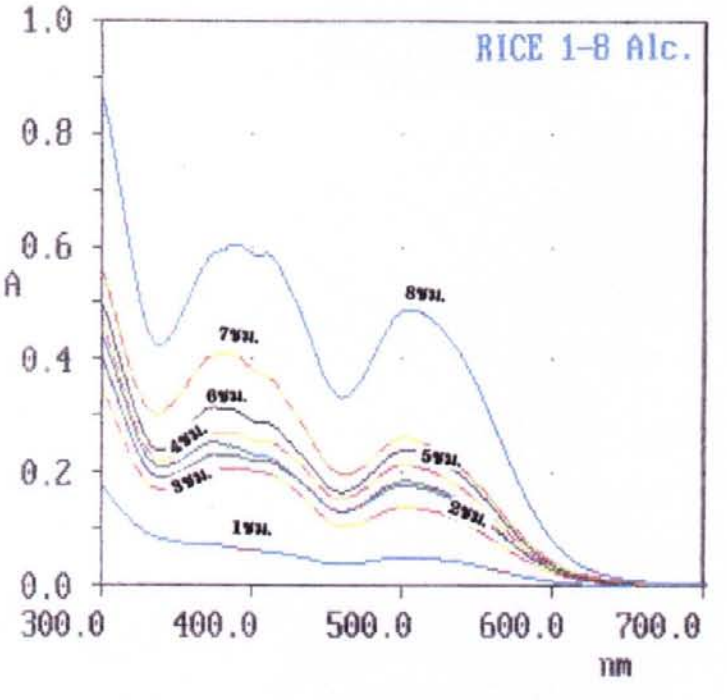
ภาพที่ 8 ข้าวแดงที่ผลิตโดยเชื้อราโมนัสคัสสายพันธุ์จากตลาด วศ. และTISTR#3090.

ภาพที่ 9. แสดงถึงเชื้อรากลายสายพันธุ์ RTUV6 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม RT.



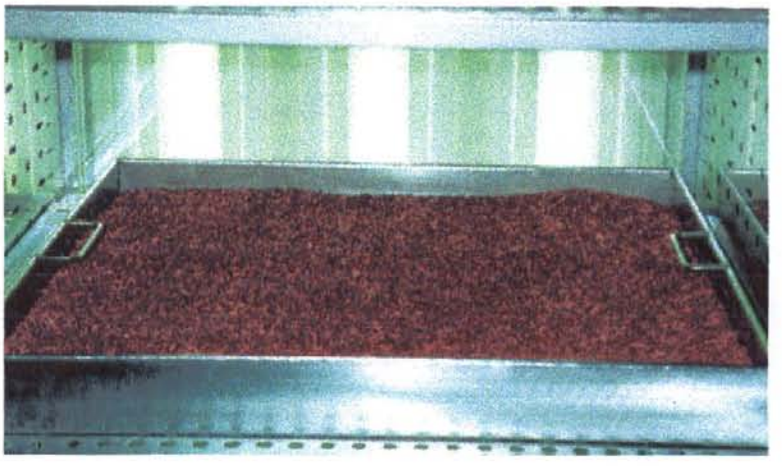
ภาพที่ 10. แสดงถึงปริมาณสีที่ผลิตโดยเชื้อรากลายพันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม





ภาพที่ 11 แสดงถึงปริมาณสีที่ผลิตจากข้าวแช่น้ำในระยะเวลาต่างๆกัน

ภาพที่ 12 ข้าวแดงที่ผลิตจากข้าวแช่น้ำในระยะเวลาต่าง ๆ กัน



ภาพที่ 13 การหมักข้าวแดงในตู้อบเพาะเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิและความชื้น
(climatic cabinet รุ่น KBP 6395 FL. เครื่องหมายการค้า Termaks นอร์เวย์)

ภาพที่ 14 การหมักข้าวแดงในห้องอบเพาะเชื้อขนาด 3 เมตร × 3เมตร

ภาพที่ 15. ตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตได้จากข้าวพันธุ์เสาไห้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. วิธีการแยกเชื้อราข้าวแดงสายพันธุ์โมนัสคัส (Monascus spp.)
   จากตัวอย่างข้าวแดงที่ขายอยู่ตามท้องตลาด

2. การปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อรา (ปรับปรุงจากวิธีของ Hiroi, T, T. Shima, T. Suzuki, M. Tsukioka and Ogasawara 1979 และ Su, Y.C 1980)

ภาคผนวก ก

1. วิธีการแยกเชื้อราข้าวแดงสายพันธุ์โมนัสคัส (Monascus spp.) จากตัวอย่างข้าวแดงที่ขายอยู่ตามท้องตลาด

1.1 นำตัวอย่างข้าวแดง 11 กรัม ใส่ในขวดทดลองซึ่งมีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบรรจุอยู่ 99 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นหรือ stomacher นาน 2 นาที ปล่อยให้ตกตะกอน น้ำใสจะมีความเข้มข้นของตัวอย่าง 1 ต่อ 10 หรือ 10^{-1} เจือจางให้มีความเข้มข้น 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} .....10^{-10} นำน้ำใสแต่ละความเข้มข้น จำนวนความเข้มข้นละ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ บรรจุอยู่จานละ 15-20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งไว้ให้อาหารแข็งตัว

1.2 นำจานเพาะเชื้อที่อาหารแข็งตัวแล้วไปอบเพาะเชื้อในตู้อบ (incubator รุ่น 640 เครื่องหมายการค้า Hereus ประเทศเยอรมนี) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน คัดเฉพาะโคโลนีที่ให้สปอร์สีแดงเข้ม นำไปใส่ในหลอดทดลองซึ่งมีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุอยู่ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สปอร์กระจายตัวอย่างอิสระ นำสารละลายสปอร์จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ไปกระจาย (spread) บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ ที่แข็งตัวแล้วในจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

1.3 คัดเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะว่าเป็นเชื้อราสายพันธุ์โมนัสคัส และมีสีแดงเข้ม โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเอาสปอร์ออกมาแล้วนำไปเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในจานอบเพาะเชื้อในลักษณะที่จะทำให้โคโลนีแยกออกจากกัน แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ทำเช่นเดียวกันนี้อีก 2-3 ครั้ง เพื่อคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ นำไปดูลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์โมนัสคัส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.4 นำเชื้อราสายพันธุ์โมนัสคัสที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวแดงไปเพาะลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ สแล็นท์ อบเพาะเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เก็บไว้ใช้สำหรับการศึกษาทดลองต่อไป

2. การปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อรา

2.1 นำเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าเหมาะสมต่อข้าวพันธุ์เสาไห้ไปเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ สแล็นท์ อบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

2.2 ล้างสปอร์ของเชื้อราที่มีอายุนาน 7 วัน ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวนหลอดละ 10 มิลลิลิตร เทใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ

2.3 นำหลอดทดลองที่บรรจุน้ำล้างสปอร์ไปเข้าเครื่องเขย่า (Whirl mixer) ประมาณ 1 นาที เพื่อให้สปอร์แตกตัวเป็นอิสระ แล้วนำไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อให้เหลือเฉพาะสปอร์

2.4 นำสารละลายสปอร์ (spores suspension) ไปนับสปอร์เริ่มต้นด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด Hemacytometer แล้วปรับให้มีสปอร์เริ่มต้น 10^7 ต่อมิลลิลิตร บรรจุลงในจานเพาะเชื้อซึ่งมีแท่งแม่เหล็กขนาดเล็กที่ปราศจากเชื้อบรรจุอยู่ด้วย แล้วปิดฝาจานเพาะเชื้อ

2.5 นำจานเพาะเชื้อจากข้อ 2.4 ไปวางไว้บนแท่นแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ใต้หลอดอัลตราไวโอเลต (UV) ที่มีความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร และอยู่ภายในตู้ปราศจากเชื้อ (Laminar air flow) ให้มีระยะห่างจากหลอด UV 30 เซนติเมตร (ก่อนที่จะนำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลต ให้เก็บตัวอย่างสารละลายสปอร์ไปเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ เพื่อทราบจำนวน โคโลนี เริ่มต้น)

2.6 เปิดแสงอัลตราไวโอเลต เปิดฝาจานเพาะเชื้อเพื่อให้แสงส่องผ่านสปอร์ของเชื้อรา เปิดเครื่องบนแท่นแม่เหล็ก จานเพาะเชื้อจะหมุนและแท่งแม่เหล็กในจานเพาะเชื้อทำหน้าที่กวนสารละลายสปอร์ เพื่อให้สปอร์ที่นำมาทำให้กลายพันธุ์ได้รับแสงอัลตราไวโอเลตสม่ำเสมอทั่วทุกสปอร์

2.7 เก็บตัวอย่างสารละลายสปอร์ หลังผ่านแสงอัลตราไวโอเลต เป็นระยะๆ เริ่มจากเวลา 1,1.5, 2, 2.5, 3, 5, 10, 15 ..... 60 นาที ตามลำดับ ไปเพาะลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง ซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์บรรจุอยู่ จำนวนจานละ 0.1 มิลลิลิตร โดยวิธีเกลี่ยลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread plate) แล้วนำไปอบเพาะเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ระยะเวลาการผ่านแสงอัลตราไวโอเลตที่มีสปอร์เหลือรอดอยู่ร้อยละ 1 คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้สปอร์นั้นกลายพันธุ์

2.8 ให้ทำสารละลายสปอร์ใหม่ โดยเริ่มทำเช่นเดิมจากข้อ 2.1 ถึง 2.4 โดยให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่าเดิม ตามข้อ 2.5 แล้วนำไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลต ตามข้อ 2.6 ใช้ระยะเวลาที่ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต ตามการศึกษาทดลองในข้อ 2.7 ณ ระยะเวลาที่สปอร์เหลือรอดอยู่ร้อยละ 1 ซึ่งเป็นสปอร์ที่กลายพันธุ์

2.9 สปอร์ที่กลายพันธุ์แล้วอาจมีประสิทธิภาพด้อย หรือดีกว่าสายพันธุ์เดิมก็ได้ ดังนั้น จึงนำสปอร์ที่เหลือรอดร้อยละ 1 ไปเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่บรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อโดยวิธี Point inoculation เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม คัดเอาเฉพาะสายพันธุ์ที่ให้ประสิทธิภาพดีกว่าสายพันธุ์เดิม เพื่อใช้ในการศึกษาทดลอง โดยดูจากโคโลนีที่ให้สีแดงเข้มและโซนที่กว้างกว่าสายพันธุ์เดิม

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

ภาคผนวก ข

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. ซาเพ็ค ด็อกซ์ บรอท (Czapek dox broth) ประกอบด้วย

แซคคาโรส (Sacharose)	30.0	กรัม
โซเดียมไนเทรต (Sodium nitrate)	3.0	กรัม
ไดโพแทสเซียม ฟอสเฟต (Dipotasium phosphate)	1.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulphate)	0.01	กรัม
แมกนีเซียม ซัลเฟต (Magnesium sulphate)	0.5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำดีไอโอไนซ์ (Distilled or deionized water)	1	ลิตร

ละลายซาแพ็ค ด็อกซ์ บรอท จำนวน 35 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร จำนวนขวดละ 100 มิลลิลิตร ปิดจุดขวดด้วยสำลีหรือฟองน้ำ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความเป็นกรด-ด่างสุดท้าย 7.3 $\pm$ 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปเก็บไว้ใช้เป็นอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ

2. โปเทโท เดกซ์โตรส อะการ์ (Potato dextrose agar) ประกอบด้วย

โปเทโท เอกซ์แทร็กซ์ (Potato extract)	4	กรัม
เดกซ์โตรส (Dextrose)	20	กรัม
แบคโต อะการ์ (Bacto agar)	15	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำดีไอโอไนซ์ (Distilled or deionized water)	1	ลิตร

ละลายโปเทโท เดกซ์โตรส อะการ์ จำนวน 39 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนและต้มจนละลายหมด เมื่อละลายแล้วบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส เติมกรดทาร์ทาริก (Tartaric acid) ร้อยละ 10 ลงไป 1.6 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร เพื่อให้มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) 3.5 เขย่าให้เข้ากันแล้วบรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 150x20 มม. ที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ปิดจุกเกลียวให้สนิท นำไปเอียงเป็นมุม 45 องศา จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เรียกอาหารในหลอดทดลองว่า โปเทโท เดกซ์โตรส อะการ์ สแล็นท์ เก็บไว้ใช้สำหรับเพาะเชื้อรา

3. ซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ (Sabouraud dextrose agar) ประกอบด้วย

นีโอเปปโตน (Neopeptone, Difco)	10 กรัม
แบคโต เดกซ์โตรส (Bacto dextrose)	40 กรัม
แบคโต อะการ์ (Bacto agar)	15 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำดีไอโอไนซ์ (Distilled or deionized water)	1 ลิตร

ละลายซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ จำนวน 65 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนและต้มจนละลายหมด แบ่งบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาดความจุ 500 มิลลิลิตร ขวดละ 300 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด ส่วนที่เหลือบรรจุลงในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองและขวดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ความเป็นกรด-ด่างสุดท้าย 5.6 $\pm$ 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส นำหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วไปเอียงทำมุม 45 องศา ทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เรียกว่า ซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์ สแล็นท์ ใช้สำหรับเพาะเชื้อราเพื่อเก็บไว้ใน stock อาหารเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ นำไปทำให้เย็นลงจนกระทั่งอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อแล้วจำนวนจานละ 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว เก็บไว้ใช้สำหรับเพาะเชื้อรา

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาบอโรด์ เดกซ์โตรส อะการ์และข้าว ผสมอยู่ร้อยละ 3

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 3 จำนวน 65 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนและต้มจนละลายหมด แบ่งบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร เติมข้าวเสาไห้ที่บดละเอียดแล้วลงไปในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ขวดละ 3 กรัม เขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนกระทั่งอุณหภูมิ 40 - 45 องศาเวลเซียส แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อแล้วจำนวนจานละ 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว ทำให้ผิวหน้าแห้งก่อนนำไปใช้สำหรับเพาะเชื้อราเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์

5. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ซาเพ็ค ด็อกซ์และข้าว ผสมอยู่ร้อยละ 3

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1 จำนวน 35 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ละลายจนหมด แบ่งบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร เติมข้าวเสาไห้ที่บดละเอียดแล้วลงไปขวดละ 3 กรัม เขย่าให้เข้ากัน ปิดจุกสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัด อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เอาไว้ใช้สำหรับเพาะเชื้อรา เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ และสำหรับทำหัวเชื้อชนิดเหลวในการทำข้าวแดง

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. คุณค่าทางอาหาร (Proximate analysis) (ข้อ 1-8) วิเคราะห์ตาม AOAC (1995)
2. เหล็ก, อะฟลาทอกซิน และ วิตะมิน (ข้อ 9-11) วิเคราะห์ตาม AOAC (1995)
3. ความเข้มของสี (ข้อ 12) วิเคราะห์และคำนวนความเข้มของสีที่ได้ตามวิธีของ
    - Hiroi, T, T. Shima, T. Suzuki, M. Tsukioka and Ogasawara 1979
    - Lin, C.F and Iizuka, H 1982
    - Sookson, R and Yoshida, T 1987
    - Su, Y.C 1980

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ปริมาณความชื้น วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) 925.10 ข้อ 32.1-0.3 โดยวิธีอบที่อุณหภูมิ 100 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3-5 ชั่วโมง ชั่งและอบต่อจนน้ำหนักคงที่ แล้วคำนวณน้ำหนักที่หายไปของตัวอย่างเป็นร้อยละ
2. ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) ข้อ 32.1.22 โดยวิธี เจลดาห์ล (kjeldahl method) ด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่าง แล้วเปลี่ยนค่าไนโตรเจนที่ได้เป็นค่าโปรตีน โดยคำนวณจากสูตร

   โปรตีนของตัวอย่างข้าวแดง = ไนโตรเจน x 6.25

   โปรตีนของตัวอย่างข้าวสาร = ไนโตรเจน x 5.95
3. ปริมาณไขมัน วิเคราะห์วิธี acid hydrolysis ตาม AOAC (1995) 922.06 - ข้อ 32.1.14
4. ปริมาณกาก (crude fiber) วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) 920.86 ข้อ 32.1.15
5. ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) 923.03 ข้อ 32.1.05 โดยเผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500-550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีน้ำหนักคงที่
6. ปริมาณคาร์โบไฮเดรท วิเคราะห์โดยวิธีคำนวณ จากการนำเอาค่าของความชื้น โปรตีน กาก ไขมันและเถ้า ไปหักออกจาก 100 ค่าที่เหลือคือปริมาณคาร์โบไฮเดรท
7. ปริมาณแคลเซียม วิเคราะห์โดยวิธีใช้เครื่อง atomic absorption spectrophotometer ทำโดยการละลายเถ้าจากข้อ 5 ด้วยกรดเกลือ (HCl) ความเข้มข้น 1: 3 แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer เทียบกับสารละลายมาตรฐาน ทำกราฟมาตรฐาน คำนวณค่าแคลเซียมจากกราฟมาตรฐานนั้น ต่อตัวอย่าง 100 กรัม
8. ปริมาณฟอสฟอรัส วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) 948.09 ข้อ 32.1.10 โดยวิธีใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เทียบกับสารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณฟอสฟอรัส ต่อตัวอย่าง 100 กรัม
9. ปริมาณเหล็ก วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) ข้อ 50.1.15

10. อะฟลาทอกซิน วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) 993.17 ข้อ 49.2.15 - 49.2.20 โดยวิธี Thin Layer Chromatographic Method โดยการสกัดสารพิษอะฟลาทอกซิน ออกจากตัวอย่างด้วย aqueous methanol กรอง น้ำที่กรองได้นำไปละลายด้วย 10% NaCl ในปริมาตรที่เท่ากัน เติมตัวละลาย hexane ลงไปเพื่อแยกชั้นส่วนที่ไม่ใช่อะฟลาทอกซินจะอยู่ในส่วนบน แยกเอาส่วนล่างที่เป็นสารละลายของอะฟลาทอกซินมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) อีกครั้งหนึ่งเพื่อให้บริสุทธิ์ แล้วนำไประเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมดด้วยไอน้ำ (water bath) ส่วนที่ตกค้างอยู่ในภาชนะคืออะฟลาทอกซิน ให้ละลายด้วย benzeneacetonitrile แล้วนำสารละลายอะฟลาทอกซินนี้ไป spot ลงบน Thin Layer Chromatography (TLC) plate โดยเทียบกับ spot ของสารละลายอะฟลาทอกซินมาตรฐาน บี$_1$ บี$_2$ จี$_1$ และจี$_2$ Developed แผ่น TLC ด้วยคลอโรฟอร์ม-อซิโตน (Chloroform - acetone : 9 : 1) ทำให้แห้งนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 365 นาโมเมตร ดูเรืองแสงสีม่วงที่เกิดขึ้นเทียบกับตัวอย่างมาตรฐาน

11. วิตะมิน

11.1 วิตะมินบี$_1$ หรือ Thiamin วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) ข้อ 50.1.08 โดยวิธี Thiochrome method ดูการเรืองแสงของการออกซิไดซ์ Thiamin เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

11.2 วิตะมินบี$_2$ หรือ Riboflavin วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) ข้อ 45.1.08 โดยวิธี Fluorometric method ดูการเรืองแสงเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

11.3 วิตะมินบี$_6$ หรือ Pyridoxine วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) 50.1.18 โดยวิธี Microbiological method ใช้ Saccharomyces uvarum (carlsbergensis) ATCC 9080 เป็นเชื้อทดลอง วัดค่าความขุ่น (Abs) ที่ความยาวคลื่น 630 นาโมเมตร ทำกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณปริมาณวิตะมินบี$_6$ ในสารละลายตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้

11.4 วิตะมินบี$_{12}$ หรือ Cobalamin วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) 50.1.20 โดยวิธี Microbiological method ใช้ Lactobacillus leichmannii ATCC 7830 เป็นเชื้อทดสอบ วัดค่าความขุ่น (Abs) ที่ความยาวคลื่น 630 นาโมเมตร ทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตะบินบี$_{12}$ แล้วคำนวณปริมาณวิตะมินของสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

11.5 ไนอะซิน วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) 50.1.19 โดยวิธี Microbiological method ใช้ Lactobacillus plantarum ATCC 8014 เป็นเชื้อทดสอบ วัดปริมาณของกรดที่เกิดขึ้นโดยวิธีไตเตรทด้วยด่าง (0.1 N NaOH โดยมี Bromthymol blue เป็น indicator) คำนวณปริมาณไนอะซินในสารละลายตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณของ NaOH และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไนอะซิน

12. การวิเคราะห์หาความเข้มของสีของข้าวแดง

1. นำตัวอย่างข้าวแดง 2-5 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา (Motar)
2.* ชั่งตัวอย่างข้าวแดงที่บดละเอียดแล้วลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 4 ขวด ๆ ละ 0.1 กรัม
3. แบ่ง 2 ขวด ใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปขวดละ 10 มิลลิลิตร อีก 2 ขวด ใส่แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ลงไป ขวดละ 10 มิลลิลิตร
4. นำทั้งหมดไปเข้าเครื่องเขย่า (New Brunswick Model 082540 G - 2.5 USA) นาน 1 ชั่วโมง
5. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman # 2 ล้างสีที่ค้างอยู่ตามภาชนะและกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 10 มิลลิลิตร อีกครั้งหนึ่ง น้ำสีที่กรองได้เขย่าให้เข้ากัน ส่วนสีที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ล้างสีที่ค้างอยู่ตามภาชนะและกระดาษกรองด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นเดียวกัน จำนวน 10 มิลลิลิตร อีกครั้งหนึ่ง เขย่าสารละลายสีที่กรองได้ให้เข้ากัน
6. นำสารละลายสีที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่างมาเจือจางให้พอเหมาะแก่การนำไปวัดหาค่าความดูดกลืนแสง แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สำหรับสารสีแดงและ 400 นาโนเมตร สำหรับสารสีเหลือง ด้วยเครื่องวัดความดูดกลืนแสง UV/vis spectrophotometer เครื่องหมายการค้า Perkin Elmer รุ่น Lambda 12 โดยวัดเทียบค่า (Blank) ที่ใช้เป็นตัวสกัดของสารที่นำมาทำละลายคือ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 70

7. ค่าความดูดกลืนแสงที่วัดได้ (O.D) คูณด้วยระดับความเจือจาง (Dilution factor) หารด้วยน้ำหนักตัวอย่าง แล้วคูณด้วยจำนวนสารละลายที่ใช้ในการสกัดจะได้ความเข้มของสีที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (A_{500}) ต่อ 1 กรัม ซึ่งเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้ :-

$$\text{ความเข้มของสี ต่อ 1 กรัม} = \frac{\text{ค่าความดูดกลืนแสง} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม}} \times \text{ปริมาตรของสารละลายที่ใช้สกัดสี}$$

8. ค่าของความเข้มของสีที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เป็นค่าของสีนอกเซลล์ (extracellular pigment) ส่วนความเข้มของสีที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นค่าของความเข้มของสีทั้งหมด (Total pigment)

หมายเหตุ * เนื่องจากข้าวแดงที่ผลิตเสร็จแล้ว มีน้ำหนักเบาจึงใช้ตัวอย่างน้อยในการสกัดสี เพื่อการประหยัดสารละลายที่ใช้สกัด