การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสีแดงของ *Monascus* spp.ที่คัดแยก จากข้าวแดง

Studies on Optimization of Red Pigment Production by *Monascus* spp. isolated from Ankak

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์[1] และ ธีระดา ตั้งประเสริฐพงศ์

Ampun Chaikulsareewath[1] and Teerada Tangprasertpong

บทคัดย่อ

คัดแยก *Monascus* spp. จากข้าวแดง (อังคัก) จาก 4 แหล่ง ได้ 7 ไอโซเลต คือ SU1, SU2, SU3, SU4, SU5, SU6 และ SU7 จากนั้นนำมาศึกษาการผลิตสารสีแดง โดยเลี้ยงในข้าวเสาไห้นึ่งฆ่าเชื้อ พบว่า SU3 และ SU6 มีความสามารถในการผลิตสารสีแดงได้สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ โดยวัดค่า OD_{500} ได้เท่ากับ 15.50±0.71 และ 15.00±0.00 ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน จากนั้นศึกษาผลของปริมาณความชื้นเริ่มต้น (60 และ 80 เปอร์เซนต์) และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (3, 6 และ 9) ที่มีผลต่อการผลิตสารสีแดงของ SU3 และ SU6 พบว่า SU3 ผลิตสารสีแดงได้สูงสุด มีค่า OD_{500} เท่ากับ 76.67±5.77 เมื่อเลี้ยงในข้าวเสาไห้นึ่งฆ่าเชื้อ ที่มีความชื้น 80 เปอร์เซนต์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน ส่วน SU6 ผลิตสารสีแดงได้สูงสุด มีค่า OD_{500} เท่ากับ 29.67±6.51 เมื่อเลี้ยงในข้าวเสาไห้นึ่งฆ่าเชื้อ ที่มีความชื้น 80 เปอร์เซนต์ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน

คำสำคัญ : *Monascus* spp., อังคัก, การผลิตสารสีแดง

Abstract

Seven isolates of *Monascus* spp. SU1, SU2, SU3, SU4, SU5, SU6 and SU7 were isolated from four Chinese red rice (Ankak) sources. Red pigment production of isolates were studied by culturing on sterile Sao Hai rice. SU3 and SU6 produced highest red pigment of 15.50±0.71 and 15.00±0.00 OD_{500} after 18 days of incubation. Effect of initial moisture content (60 and 80%) and initial pH (3, 6 and 9) on red pigment production of SU3 and SU6 were investigated. SU3 produced highest red pigment of 76.67±5.77 OD_{500} when cultivated on 80% initial moisture content of sterile Sao Hai rice and initial pH of 6 at 30°C after 18 days of incubation. While, SU6 produced highest red pigment of 29.67±6.51 OD_{500} after incubation on 80% initial moisture content of sterile Sao Hai rice with initial pH of 9 at 30°C for 18 days.

Key words: *Monascus* spp., Ankak, Red pigment production

Chai_ampun@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

บทนำ

สีผสมอาหารอาจได้มาจากธรรมชาติหรือถูกสังเคราะห์ขึ้น สีผสมอาหารที่ปลอดภัยควรได้มาจากธรรมชาติ เช่น จากพืช สัตว์ หรือราแดง เป็นต้น สีมีความสำคัญสำหรับกระบวนการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากสีผสมอาหารที่ปรากฏบนเนื้ออาหาร ทำให้อาหารมีลักษณะเฉพาะและมีส่วนดึงดูดความสนใจให้แก่ผู้บริโภค มีความอยากรับประทานอาหาร และเป็นการเพิ่มมูลค่าทางการตลาด การใช้สีสังเคราะห์อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และเกิดมะเร็ง จึงได้มีการพัฒนาสีผสมอาหารจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น ข้าวแดงหรืออังคัก (Ankak) เป็นผลิตภัณฑ์สารสีที่ได้จากการเลี้ยงรา *Monascus* spp. บนข้าวนึ่ง รู้จักกันมาช้านานแถบตะวันออก เช่น ประเทศจีน ประเทศแถบเอเชียใต้ เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น ราที่เจริญบนข้าวสามารถสร้างสารสีออกมานอกเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก [1] รา *Monascus* spp. มีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ได้หลายชนิดที่มีโครงสร้างของ polyketide เช่น สารประเภท antihypercholesterolemic agents ได้แก่ statin สารประเภท hypotensive agent ได้แก่ γ-aminobutyric acid (GABA) และสารประเภท anti-bacterial compound ได้แก่ pigments และ citrinin [2] ในแถบเอเชียได้มีการใช้ข้าวแดงมาเป็นสารให้สีในผลิตภัณฑ์ปลา เนยแข็ง ไวน์แดง เต้าหู้ยี้ และผลิตภัณฑ์ไส้กรอก เป็นต้น และถูกนำมาใช้ผลิตยาลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด เนื่องจากสารในข้าวแดงที่เรียกว่า mevinolin ($C_{24}H_{36}O_5$, Lovastatin, Monacolin and Mevacor) ที่สามารถยับยั้งการผลิตคอเลสเตอรอล [3], [4] ในการเลี้ยงรา *Monascus* spp. ปัจจัยที่ทำให้สามารถผลิตสารสีได้ในปริมาณสูง เช่น สายพันธุ์ จุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น อากาศ และอุณหภูมิ เป็นต้น มีงานวิจัยเกี่ยวกับการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของรา เช่น งานวิจัยของศิววรรณ และคณะ (2550) พบรา *Monascus* สายพันธุ์ KT055 สามารถผลิตสารสีได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงบนตะกอนแป้งแห้งที่ความชื้น 80 เปอร์เซนต์ และมีการเจริญสูงสุดที่ความชื้น 60 เปอร์เซนต์ [5] และงานวิจัยของ Kaur และคณะ (2009) ที่ได้เลี้ยง *Monascus purpureus* MTCC410 ในอาหาร Malt extract agar โดยราสามารถผลิตสารสีแดงได้ดีในอาหารที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 [6] เป็นต้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้สนใจศึกษาการคัดแยกรา *Monascus* spp. จากข้าวแดง ตามแหล่งต่างๆ และหาภาวะความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตสารสีจากรา *Monascus* spp. ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. ศึกษาการคัดแยกรา *Monascus* spp. จากข้าวแดง

คัดแยกราจากข้าวแดงที่มาจากร้านขายยา จำนวน 4 แห่ง ได้แก่ 1) ร้านสุริยาโอสถ วงเวียนใหญ่ กรุงเทพฯ 2) ร้านย่งซิวตึ้ง คลองถม กรุงเทพฯ 3) ร้านไชน่ามาร์ท เยาวราช กรุงเทพฯ และ 4) ร้านเจริญโอสถ บางยี่เรือ กรุงเทพฯ โดยดัดแปลงมาจาก กนกกรและกาญจนา (2543) [7] ดังนี้

นำข้าวแดงมาแยกรา โดยนำลูปเขี่ยบริเวณผิวของข้าวแดง แล้วนำมา cross streak บนอาหาร YM agar (Yeast malt extract agar) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี แยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์และเป็นโคโลนีเดี่ยว เก็บรักษา *Monascus* spp. ทั้งหมดไว้ในอาหาร YM slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

2. ศึกษาการผลิตสีแดงจากรา *Monascus* spp.

เตรียมข้าวแดงโดยดัดแปลงจากรายงานของกนกกรและกาญจนา (2543) [7] และ Babitha และคณะ

Chai_ampun@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

(2007) [8] โดยเติมสปอร์ของ *Monascus* sp. ปริมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีข้าวเสาไห้ 50 กรัม ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ และปรับความชื้นเป็น 60 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน สังเกตผลที่เวลา 0, 3, 5, 7, 9 ,12,15 และ 18 วัน วิเคราะห์ปริมาณสารสีตามวิธีของ Johns และ Stuart (1991) [1] และวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine) ตามวิธีของ Van de Loo (1976) [9] และ Cochran และ Vercellotti (1978) [10]

3. ศึกษาปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตสารสีแดงของรา *Monascus* spp.

เติมสปอร์ของ *Monascus* spp. ปริมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีข้าวเสาไห้ 50 กรัม ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ และปรับความชื้นเท่ากับ 60, 80 เปอร์เซนต์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3, 6 และ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน วิเคราะห์ปริมาณสารสีตามวิธีของ Johns และ Stuart (1991) [1] และวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine) ตามวิธีของ Van de Loo (1976) [9] และ Cochran และ Vercellotti (1978) [10]

4. ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารสีแดง

วิเคราะห์ปริมาณสารสีแดงโดยการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Johns และ Stuart (1991) [1] โดยนำตัวอย่างมาอบให้แห้ง แล้วนำมาบดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่าง 7 กรัม แล้วนำมาเติมเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าใน water bath shaker ที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง เท่ากับ 500 nm โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คูณด้วยค่า dilution factor ซึ่งจะได้เป็นค่าปริมาณสารสีแดง

5. ศึกษาการวัดปริมาณกลูโคซามีน

วัดปริมาณกลูโคซามีนจากเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Van de Loo (1976) [9] และ Cochran และ Vercellotti (1978) [10] โดยชั่งตัวอย่างอบแห้งที่บดละเอียด 0.25 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ดูดส่วนใส 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Acetyl acetone 1 มิลลิลิตร ต้มน้ำเดือดนาน 20 นาที เติมเอทานอล ความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Ehrilich reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร หาปริมาณกลูโคซามีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามีนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

6. สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป R Project for Statistical Computing (R Version 2.10.1, USA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

Chai_ampun@hotmail.com

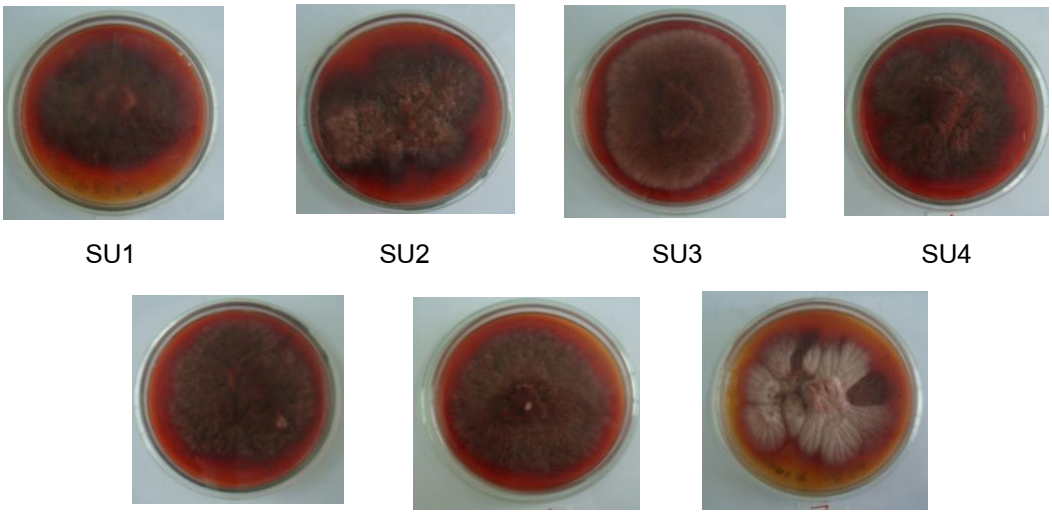
[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดแยกรา *Monascus* spp. จากข้าวแดง

คัดแยกรา *Monascus* spp. จากข้าวแดงทั้ง 4 แหล่ง ได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต ได้แก่ SU1 และ SU3 จากร้านสุริยาโอสถ SU2 และ SU5 จากร้านย่งซิวตึ๊ง SU4 จากร้านไชน่ามาร์ท และ SU6 และ SU7 จากร้านเจริญโอสถ ทั้ง 7 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีสีแดงเข้ม นูนเล็กน้อยเป็นรอยหยักย่นเต็มโคโลนี มีสปอร์สีแดงขึ้นรอบๆ โคโลนี แต่มีบางชนิดมีเส้นใยสีขาวแต่ยังผลิตสารสีแดงออกมาที่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 1) เส้นใยของราโมแนสคัสมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายและมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วง ซึ่งจำแนกได้ว่าเป็นรา *Monascus* spp. โดยการสังเกตจากลักษณะโคโลนีและเส้นใย ลักษณะดังกล่าวสนับสนุนโดยรายงานของบุษบา ยงสมิทธ์ (2542) [11]



รูปที่ 1 รา *Monascus* spp. ทั้งหมด 7 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหาร MY agar เป็นเวลา 10 วัน

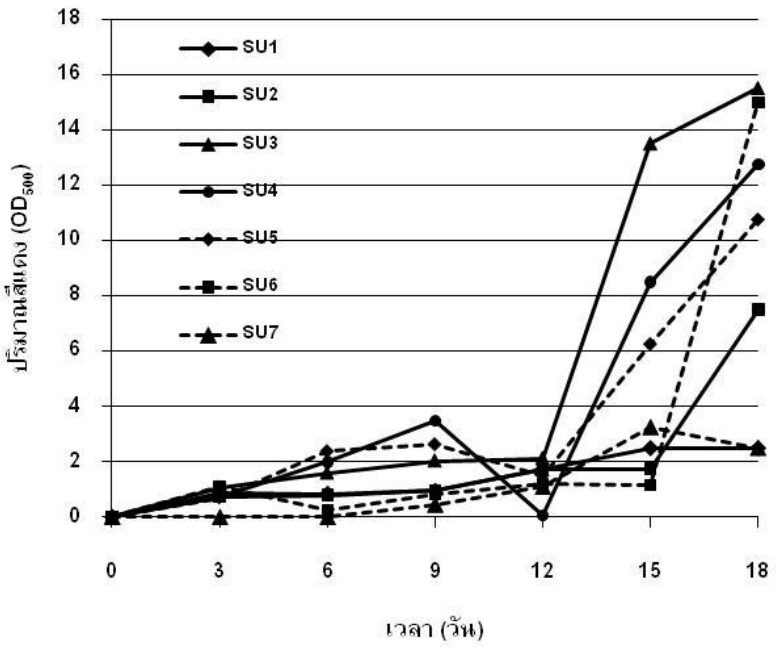
2. การผลิตสีแดงจากรา *Monascus* spp.

นำรา *Monascus* spp. 7 ไอโซเลต มาเลี้ยงในข้าวเสาไห้ 50 กรัม ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และปรับความชื้นเป็น 60 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน แล้วนำไปวัดปริมาณสารสีแดง และปริมาณกลูโคซามีน ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 และนำผลของสารสีแดงและปริมาณกลูโคซามีนในวันที่ 18 มาเปรียบเทียบกันได้ดังตารางที่ 1

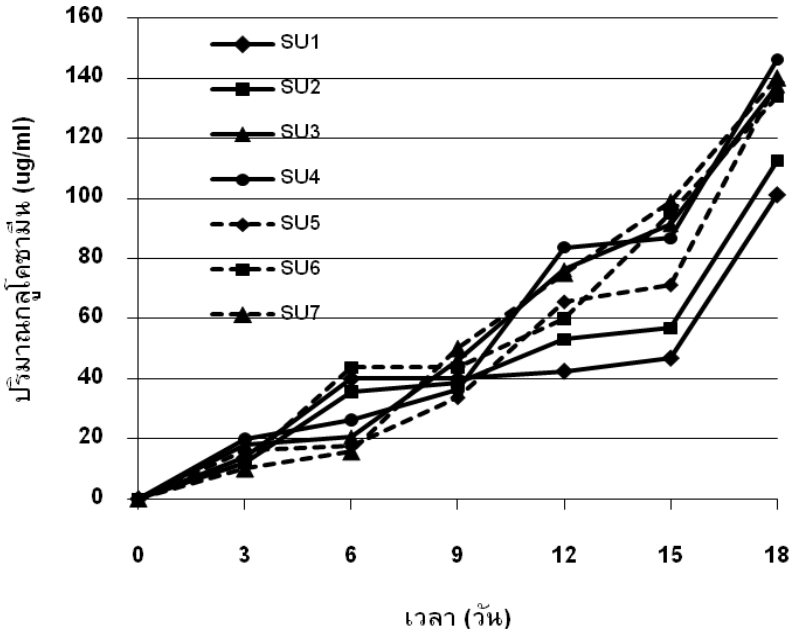
Chai_ampun@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University



รูปที่ 2 ปริมาณสารสีแดงที่ SU1, SU2, SU3, SU4, SU5, SU6 และ SU7 ผลิตได้ตลอดช่วงระยะเวลา 18 วัน



รูปที่ 3 ปริมาณกลูโคซามีนที่ SU1, SU2, SU3, SU4, SU5, SU6 และ SU7 ผลิตได้ตลอดช่วงระยะเวลา 18 วัน

Chai_ampun@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสีแดง และปริมาณกลูโคซามีนของราทั้ง 7 ไอโซเลต เมื่อบ่มเป็นเวลา 18 วัน

ไอโซเลต	ปริมาณสารสีแดง (OD_{500})	ปริมาณกลูโคซามีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
SU1	2.48 ± 0.00^{d}	101.25 ± 5.30^{b}
SU2	7.50 ± 3.54^{c}	112.50 ± 7.07^{b}
SU3	15.50 ± 0.71^{a}	137.50 ± 17.68^{a}
SU4	12.75 ± 1.06^{b}	146.25 ± 12.37^{a}
SU5	10.75 ± 0.35^{bc}	138.75 ± 15.91^{a}
SU6	15.00 ± 0.00^{a}	133.75 ± 12.37^{a}
SU7	2.50 ± 0.00^{d}	140.00 ± 7.07^{a}

หมายเหตุค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a-e}$ ข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p \leq 0.05$)

จากรูปที่ 2 และตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า SU3, SU4 และ SU5 จะมีการผลิตสารสีแดงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในช่วงวันที่ 0-12 แต่หลังจากนั้นจะมีการผลิตสารสีแดงเพิ่มขึ้นมาก โดยสามารถผลิตสารสีแดงซึ่งวัดค่า OD_{500} ได้เท่ากับ 15.50 ± 0.71, 12.75 ± 1.06 และ 10.75 ± 0.35 ตามลำดับ ในวันที่ 18 ของการบ่ม ไอโซเลต SU2 และ SU6 จะมีการผลิตสารสีแดงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงวันที่ 0-15 และจะผลิตสารสีแดงเพิ่มขึ้นหลังจากนั้น โดยผลิตสารสีแดงซึ่งวัดค่า OD_{500} ได้เท่ากับ 7.50 ± 3.54 และ 15.00 ± 0.00 ตามลำดับ ในวันที่ 18 ของการบ่ม ส่วน SU1 และ SU7 จะผลิตสารสีแดงมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ตลอดช่วงการเลี้ยงรา โดยพบว่าสามารถผลิตสารสีแดง ซึ่งวัดค่า OD_{500} ได้ เท่ากับ 2.48 ± 0.00 และ 2.50 ± 0.00 ตามลำดับ ในวันที่ 18 ของการบ่ม และจากรูปที่ 3 และตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าทุกไอโซเลตจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงระยะเวลา 18 วัน (ปริมาณกลูโคซามีนจะสัมพันธ์กับการเจริญ เนื่องจากกลูโคซามีนเป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ของรา ดังนั้นหากปริมาณกลูโคซามีนมากขึ้นก็แสดงว่ามีการเจริญของราเพิ่มขึ้นตามไปด้วย) โดยพบว่าในวันที่ 18 ของการบ่ม ราไอโซเลต SU3, SU4, SU5, SU6 และ SU7 จะมีปริมาณกลูโคซามีนไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ แต่แตกต่างกับ SU1 และ SU2 (SU1 และ SU2 มีปริมาณกลูโคซามีนไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์) และพบว่ามี 2 ไอโซเลต คือ SU3 และ SU6 สามารถเจริญและสร้างสารสีแดงได้สูงสุด ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวัดค่า OD_{500} ได้เท่ากับ 15.50 ± 0.71 และ 15.00 ± 0.00 ตามลำดับ แต่มีบางไอโซเลต คือ SU4, SU5 และ SU7 ถึงแม้จะมีการเจริญสูง แต่ก็ผลิตสารสีแดงได้น้อย โดยมีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ราทั้งหมดจะผลิตสารสีแดงได้สูงหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12-15 วัน ซึ่งเป็นไปตามปรากฏการณ์ที่มีผู้ศึกษามาก่อนว่า *Monascus* spp. สามารถผลิตสีได้หลังจากที่ราเจริญไปช่วงระยะเวลาหนึ่ง โดยจะผลิตได้ในช่วงของ stationary

Chai_ampun@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

phase [8] สีที่ผลิตขึ้นจากราโมแนสคัส สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม กล่าวคือ (1) สารสีเหลือง ได้แก่ monasin ($C_{21}H_{26}O_5$) ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$) (2) สารสีส้ม ได้แก่ monascorubin ($C_{23}H_{26}O_5$) และ rubropunctatin ($C_{21}H_{22}O_5$) และ (3) สารสีแดง ได้แก่ monascorubramine ($C_{23}H_{27}NO_4$) และ rubropunctamine ($C_{21}H_{23}NO_4$) โดยสารสีแดงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร [12]

ในการทดลองขั้นต่อไปได้เลือกใช้ราไอโซเลต SU3 และ SU6 ที่สามารถผลิตสารสีแดงได้สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ มาใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ศึกษาปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตสารสีแดงของรา *Monascus* spp.

จากการนำ *Monascus* spp. มาเลี้ยงในอาหารที่มีการปรับปริมาณความชื้นเท่ากับ 60 และ 80 เปอร์เซนต์ ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Monascus* spp. [5] และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3, 6 และ 9 เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตสารสีแดงของราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน เป็นเวลา 18 วัน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2-3 และ รูปที่ 4-5

ตารางที่ 2 ปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อการผลิตสารสีแดงของ SU3 และ SU6 เมื่อบ่มเป็นเวลา 18 วัน

ไอโซเลต	ปริมาณสารสีแดง (OD_{500})					
	ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ความชื้น 60 เปอร์เซนต์			ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ความชื้น 80 เปอร์เซนต์		
	3	6	9	3	6	9
SU3	1.63±0.06^{d}	10.33±0.58^{cd}	15.00±2.00^{c}	5.33±1.53^{d}	76.67±5.77^{a}	60.00±10.00^{b}
SU6	1.00±0.00^{d}	7.17±0.29^{c}	6.67±0.76^{c}	1.33±0.29^{d}	22.17±2.75^{b}	29.67±6.51^{a}

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a-d}$ ข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 2 และรูปที่ 4 พบว่าราไอโซเลต SU3 จะผลิตสารสีแดงได้ค่าสูงกว่าไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีค่า OD_{500} เท่ากับ 76.67±5.77 ในภาวะที่มีความชื้น 80 เปอร์เซนต์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 ส่วน SU6 จะผลิตสารสีแดงได้ค่าสูงกว่าไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ในภาวะที่มีความชื้น 80 เปอร์เซนต์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 9 โดยผลิตสารสีแดงได้ค่า OD_{500} เท่ากับ 29.67±6.51 โดยจะเห็นว่าราทั้งสองไอโซเลตจะผลิตสารสีแดงได้สูงสุดที่ความชื้น 80 เปอร์เซนต์ เนื่องจากความชื้นดังกล่าวเหมาะสมต่อการผลิตสีของรา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของศิววรรณ และคณะ (2550) ที่พบว่าราโมแนสคัส สายพันธุ์ KT055 สามารถผลิตสร้างสารสีแดงได้สูงสุด เท่ากับ 778.54 ยูนิตต่อกรัม ที่ความชื้น 80 เปอร์เซนต์ [5] SU3 ผลิตสารสีได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaur และคณะ (2009) ที่ได้เลี้ยง *Monascus purpureus* MTCC410 ในอาหาร Malt extract agar โดยราสามารถผลิตสารสีแดงได้ดีในอาหารที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 [6] และได้ผลการทดลองใกล้เคียงกับการทดลองของ

Chai_ampun@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

Pattanagul และคณะ (2008) ที่พบว่าความชื้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีของ *M. purpureus* ATCC16365, BCC6131, DMKU และ FTCMU และ *M. ruber* TISTR3006 มีค่ามากกว่า 70 เปอร์เซนต์ และ *M. purpureus* ATCC16365 และ DMKU สามารถผลิตสีได้มากที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.28-6.54 [13]

ตารางที่ 3 ปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อปริมาณกลูโคซามีนของ SU3 และ SU6 เมื่อบ่มเป็นเวลา 18 วัน

ไอโซเลต	ปริมาณกลูโคซามีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ความชื้น 60 เปอร์เซนต์			ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ความชื้น 80 เปอร์เซนต์		
	3	6	9	3	6	9
SU3	66.67±1.44 [d]	95.00±2.50 [c]	90.83±0.72 [c]	33.33±3.82 [e]	135.42±0.72 [a]	120.00±6.61 [b]
SU6	29.58±6.88 [e]	110.83±8.78 [a]	92.92±1.91 [bc]	45.00±3.31 [d]	98.33±1.91 [b]	84.17±4.73 [c]

หมายเหตุ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a-e] ข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

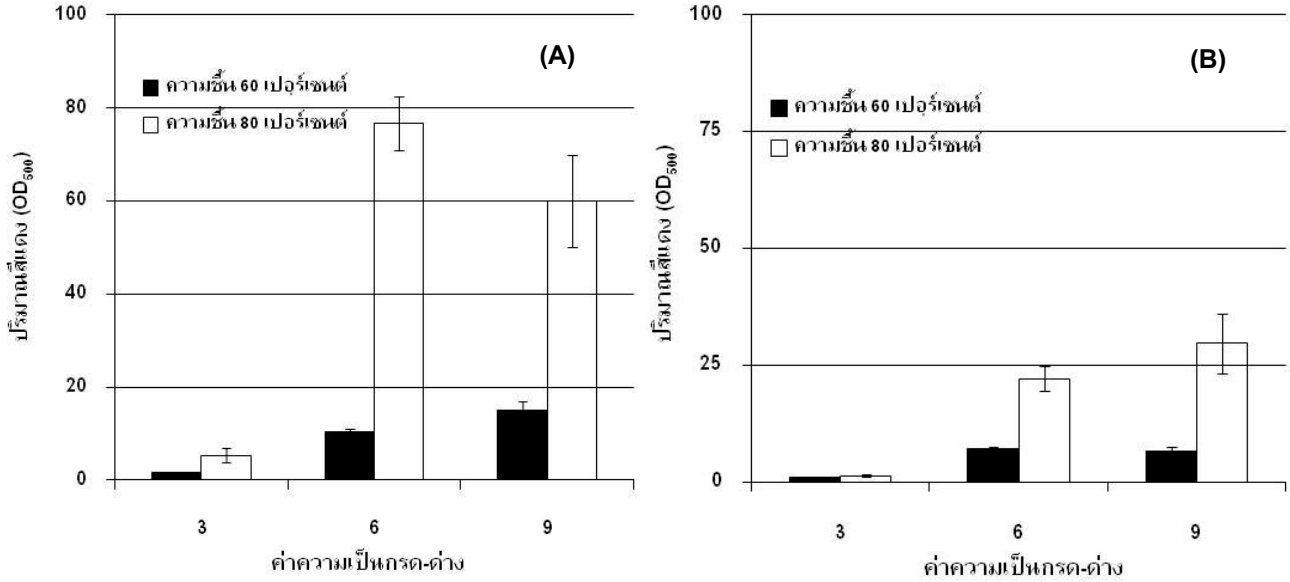
ตารางที่ 3 และรูปที่ 5 SU3 จะมีการเจริญสูงสุดในอาหารที่มีความชื้น 80 เปอร์เซนต์ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 โดยมีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 135.42±0.72 ยูนิตต่อกรัม ส่วนเชื้อ SU6 จะมีการเจริญสูงสุดในอาหารที่มีความชื้น 60 เปอร์เซนต์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 โดยมีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 110.83±8.78 ยูนิตต่อกรัม เนื่องจากความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่างระดับนี้เหมาะต่อการเจริญของรา โดยราทั้งสองไอโซเลตเจริญได้ดีในที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเดียวกัน แต่ความชื้นแตกต่างกัน

Monascus spp. แต่ละไอโซเลตจะมีค่าปริมาณความชื้นเบื้องต้นและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีได้แตกต่างกัน โดย Yongsmith และคณะ (2000) ได้รายงานว่าความชื้นเริ่มต้นของสารตั้งต้นที่เป็นอาหารแข็งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของกลูโคอะไมเลส และสารสีที่ราผลิตขึ้น [14] โดยหากความชื้นต่ำจะทำให้ราไม่เจริญ แต่หากความชื้นสูงเกินไปจะทำให้สารตั้งต้นเกิดการรวมกลุ่มกัน ทำให้ออกซิเจนที่แทรกอยู่ในอาหารมีปริมาณต่ำ ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสีของรา [15] ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของสารตั้งต้นมีผลต่อสีที่ผลิตขึ้นแตกต่างกันโดยค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3-4 เหมาะสมต่อการผลิตสารสีเหลืองอมส้ม ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 เหมาะสมต่อการผลิตสารสีส้ม ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 เหมาะสมต่อการผลิตสารสีแดง และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7-10 เหมาะสมต่อการผลิตสารสีแดงอมม่วง [16], [17]

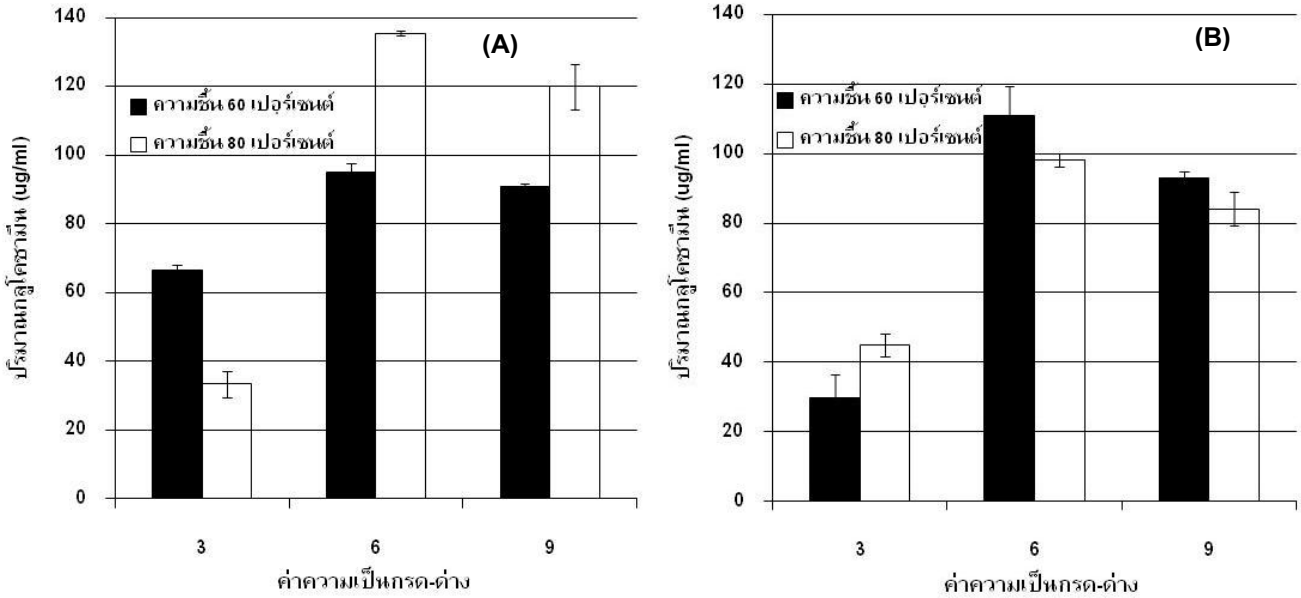
Chai_ampun@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University



รูปที่ 4 ปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อการผลิตสารสีแดงของ SU3 (A) และ SU6 (B) เมื่อบ่มเป็นเวลา 18 วัน



รูปที่ 5 ปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีต่อปริมาณกลูโคซามีนของ SU3 (A) และ SU6 (B) เมื่อบ่มเป็นเวลา 18 วัน

Chai_ampun@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

สรุป

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกรา *Monascus* spp. จากข้าวแดง ได้ 7 ไอโซเลต โดยมีเพียงสองไอโซเลตที่สามารถผลิตสารสีแดงได้สูงสุด คือ SU3 และ SU6 ซึ่งผลิตสารสีแดงได้ค่ามากกว่าราไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อนำไปหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสี โดยศึกษาที่ปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน พบว่าทั้งสองไอโซเลตผลิตสารสีแดงได้สูงสุดที่ปริมาณความชื้น 80 เปอร์เซนต์ แต่ค่าความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน คือ SU3 ผลิตสารสีแดงได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 ส่วน SU6 ผลิตสารสีแดงได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 9

เอกสารอ้างอิง

[1] Johns, M.R. and Stuart, D.M. 1991. Production of Pigments by *Monascus purpureus* in Solid Culture. J. Ind. Microbiol. 8: 23-28.

[2] Wang, J.J., Lee, C.L. and Pan, T.M. 2003. Improvement of Monacolin K, C-Aminaobutyric Acid and Citrinin Production Ratio as a Function of Environmental Conditions of *Monascus purpureus* NTU601. J. of Ind. Microbiol. and Biotechnol. 30: 669-676.

[3] Erdogrul, O. and Azirak, S. 2004. Review of the Studies on the Red Yeast Rice (*Monascus purpureus*). Turkish Elec. J. of Biot. 2: 37–49.

[4] Chen, F. and Hu, X. 2005. Study on Red Fermented Rice with High Concentration of Monacolin K and Low Concentration of Citrinin. Int. Food Microbiol. 103: 331–337.

[5] ศิววรรณ พูลพันธุ์, เกษณี ชุมพล, ศิราภรณ์ แก้วปรารถนา และอาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2550. การสร้างสารสีของราโมแนสคัสบนตะกอนแป้ง. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 33. 18-20 ตุลาคม 2550 มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จ.นครศรีธรรมราช. หน้า 91.

[6] Kaur, B., Chakraborty, D. and Kaur, H. 2009. Production and Evaluation of Physico-chemical Properties of Red Pigment from *Monascus purpureus* MTCC 410. Int. J. Microbiol. 7(1). [Online: http://www.ispub.com/ journal/the internet journal of microbiology/archive/last.html]

[7] กนกกร สินมา และ กาญจนา แสนทำพล. 2543. การเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนกากสับปะรดเพื่อผลิตเม็ดสี, ภาคนิพนธ์ปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

[8] Babitha, S., Soccol, C.R. and Pandey, A. 2007. Solid-State Fermentation for the Production of *Monascus* Pigments from Jackfruit Seed. Biores. Technol. 98: 1554–1560.

[9] Van de Loo, H.M. 1976. An Improved Method for the Quantitative Determination of Hexosamine According to Elson and Morgan. Anal. Biochem. 76: 556-560.

[10] Cochran, T.W. and Vercellotti, J.K. 1978. Hexosamine Biosynthesis and Accumulation by Fungi in Liquid and Solid Media. Carbohydrate Res. 61:529-543.

[11] บุษบา ยงสมิทธ์. 2542. จุลชีววิทยาการหมัก วิตามินและสารสี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 197-247.

[12] Sweeny, J.G., Estrada-Valdes, M.C., Lacobucci, G.A., Sato, H. and Sakamura,

Chai_ampun@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

S. 1981. Photoprotection of the Red Pigments of *Monascus anka* in Aqueous Media by 1, 4, 6-Trihydroxynaphthalene. J. Agric. Food Chem., 29 (6): 1189–1193.

[13] Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A. and Tharatha, S. 2008. Mevinolin, Citrinin and Pigments of Adlay Angkak Fermented by *Monascus* sp. Int. J. Food Microbiol. 126: 20–23.

[14] Yongsmith, B., Kitprechavanich, V., Chitradon, L., Chaisrisook, C. and Budda, N. 2000. Color Mutants of *Monascus* sp. KB9 and their Comparative Glucoamylases on Rice Solid Culture. J. Mol. Catal. B: Enzymatic 10: 263–272.

[15] Gautam, P., Sabu, A., Pandey, A., Szackacs, G. and Soccol, C.R. 2002. Microbial Production of Extra-Cellular Phytase Using Polystyrene as Inert Support. Biores. Technol. 83, 229–233.

[16] Kao, C. 2004. Study on the Flavor of Red Rice Chiew Effected by the Addition of *Monascus*, Yeast Strains, and Culture Temperature. Thesis for Master of Science, Department of Bioengineering, Tatung University, Taipei, Taiwan.

[17] Carvalho, J., Oishi, B., Pandey, A. and Soccol, C. 2005. Strain Selection, Citrinin Productionand Color Stability. Braz. Arch. Biol. Technol. 48(6): 885–894.

Chai_ampun@hotmail.com

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University