Kasetsart J. (Nat. Sci.) 31 : 317 - 326 (1997) ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) ปีที่ 31 : 317 - 326 (2540)

# การคัดเลือก Glucose Derepression Mutants เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวแดง และกลไกควบคุมการสร้างสีของเชื้อกลายพันธุ์

# Selection of Glucose Derepression Mutants for the Improvement of Ang-Kak Production and Regulation of Pigmentation

กังสดาลย์ บุญปราบ[1] พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ [2] และ นภา โล่ห์ทอง[2]

**Kangsadan Boonprab, Poonpilai Suwanarit, and Napha Lotong**

## ABSTRACT

For the improvement of fungal strain used in Chinese red rice (ang-kak) fermentation, glucose derepression mutants, R8 and R53 was selected after UV exposure of the wild type *Monascus* sp. NP1. The mutants produced higher pigment with a faster rate compared to the parent strain. Although 37.2% served as optimal initial moisture for both the wild type and its mutants, success of ang-kak production could be made at higher initial moisture contents. Red pigment with $\lambda_{max}$ at 500 nm which was corresponded to their parent strain was produced at 2.54 by R8 and 2.47 times by R53 higher than that by the wild type. Mutant R8 and R53 gave yellow pigment with $\lambda_{max}$ 410 and 396 respectively compared to 384 of that obtained from *Monascus* sp. NP1. Ratios of yellow to red compounds produced, using strain R8 and R53 were 1.278 and 1.612 respectively, whereas that of the wild type was 1.693. By studying time course of glucoamylase production and effects of added glucose on fermentation, it implied that the mutants pigmentation efficiency in solid state fermentation resulted from two mechanisms. Firstly : toleration to glucose repression and secondly through their ability to regulate glucose concentration liberated to a level under which the mold could tolerate by a sharp drop in glucoamylase production after the maximal activity was achieved in day 5.

**Key words** : *Monascus* sp., glucose repression, ang-kak, Chinese red rice, *Monascus* pigment, glucoamylase

[1] ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Kasetsart University,Bangkok 10900, Thailand.

[2] ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

## บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์เชื้อรา *Monascus* sp. NP1 ให้มีคุณสมบัติทนต่อการกดการสร้างสีโดยกลูโคส(glucose derepression) ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต และคัดเลือกด้วยอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ได้เชื้อกลายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดง 2 สายพันธุ์ได้แก่ เชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 ซึ่งมีคุณสมบัติการสร้างสีได้สูงและเร็วกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์ ถึงแม้ว่าจะมีระดับความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับเชื้อพ่อแม่พันธุ์ (37.2 เปอร์เซนต์) แต่เชื้อกลายพันธุ์สามารถหมักให้ผลิตภัณฑ์เป็นข้าวแดงได้ที่ระดับความชื้นเริ่มต้นที่สูงกว่า สารสีแดงที่เชื้อกลายพันธุ์สร้างมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นคือ 500 nm เช่นเดียวกับเชื้อพ่อแม่พันธุ์ โดยมีความเข้มสีสูงกว่า 2.54 และ 2.47 เท่า เมื่อผลิตด้วยเชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 ตามลำดับ และในขณะที่เชื้อพ่อแม่พันธุ์ผลิตสารสีเหลืองซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 384 nm สารสีที่ผลิตโดยเชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 และ 396 nm ตามลำดับ ส่วนอัตราส่วนของความเข้มสีเหลืองต่อความเข้มสีแดงของเชื้อ R8 และ R53 มีค่าเท่ากับ 1.278 และ 1.612 ในขณะที่เชื้อพ่อแม่พันธุ์มีอัตราส่วน 1.693 นอกจากนี้การศึกษานี้ได้พบว่า เชื้อกลายพันธุ์สามารถสร้างสีได้สูงกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์เนื่องจากสามารถทนต่อการกดการสร้างสีโดยน้ำตาลได้ดี และมีกลไกการควบคุมระดับน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายแป้งได้ไม่เกินระดับที่เชื้อจะทนได้โดยการลดการสร้างเอนไซม์กลูโคอไมเลสอย่างมากและฉับพลันในวันที่ 5 ของการหมักหลังจากเมื่อมีกิจกรรมสูงสุด


## คำนำ

ข้าวแดงเป็นสีผสมอาหารที่ได้จากธรรมชาติโดยเกิดจากการหมักแห้ง (solid state fermentation) ด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. ซึ่งใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบ เชื้อจะสร้างเส้นใยชอนไชและปกคลุมเมล็ดข้าวและสร้างสีขึ้นภายในเส้นใย หรือบางส่วนจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเส้นใย ทำให้เมล็ดข้าวมีสีแดงเข้มทั้งเมล็ด สีในข้าวแดงประกอบด้วยสารสีที่เป็นสารทุติยภูมิจำพวกโพลีคีไทด์ 4 ชนิดได้แก่ อังคาฟลาวิน (ankaflavin) โมนาสซิน (monascin) รูโบรพังทาทิน (rubropunctatin) และโมนาสโครูบริน (monascorubrin) (นภา, 2527) ซึ่งสามารถบริโภคได้ไม่เป็นพิษ (วรรณภา, 2529) ข้าวแดงจัดเป็นวัสดุเจือปนอาหารที่ก่อให้เกิดสีสันซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชียโดยใส่ในอาหารหมักเช่น เต้าหูยี้ ปลาแป้งแดง เหล้าเกาเหลียง และผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น กุนเชียงและไส้กรอก ฯลฯ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของกลิ่น (Hesseltine, 1965; Kranz *et al.*, 1992) และแหล่งเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์กลูโคอไมเลส (Yasuda *et al.*, 1989; Lotong and Suwanarit, 1990) เอนไซม์โปรติเอส (Tsai *et al.*, 1978) เป็นต้น ยิ่งไปกว่านั้นการใส่ข้าวแดงในอาหารยังเป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2524) อีกทั้งเชื้อราในข้าวแดงยังสร้างสารที่ยับยั้งการสร้างสารโคเลสเตอร์รอลในมนุษย์ (Endo and Hasumi, 1985) ในด้านเภสัชวิทยาข้าวแดงเป็นสูตรหนึ่งในส่วนผสมของตำรับยาจีนรักษาโรค (Lee, 1979) และมีรายงานว่าสารสีโมนาสซินในข้าวแดงสามารถยับยั้งการส่งเสริมเนื้องอกในหนูได้ (Yasukawa *et al.*, 1994)

การผลิตข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เปลี่ยนเป็นข้าวแดงได้ที่ความชื้นเริ่มต้นต่ำ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมความชื้นโดยการพ่นน้ำระหว่างการหมัก (นภา, 2527; Hesseltine, 1965; Su, 1980) ผลิตภัณฑ์ที่ระดับความชื้นสูงจะมีลักษณะแฉะและ มีปริมาณเอทธานอลสูง และมีความเข้มสีต่ำมาก กังสดาลย์, 2538; Lotong and Suwanarit, 1990)

สาเหตุดังกล่าวเนื่องจากเชื้อรา *Monascus* sp. สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอไมเลสได้สูง ทำให้แป้งเปลี่ยนเป็นกลูโคสมาก เป็นผลให้น้ำตาลไปกดการสร้างสี และเกิดเอทธานอลขึ้นแทน (Lotong and Suwanarit, 1990) การศึกษานี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาการผลิตข้าวแดงโดยการปรับปรุงพันธุ์เชื้อราโมแนสคัสด้วยวิธีทำให้กลายพันธุ์ ให้มีคุณสมบัติเป็นเชื้อกลายพันธุ์ที่ทนต่อการกดการสร้างสีด้วยน้ำตาลกลูโคส (glucose derepression mutant) สามารถผลิตสีได้มากในสภาวะที่ระดับความชื้นเริ่มต้นสูง และสร้างสีได้เร็วกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์ รวมทั้งศึกษากลไกที่ควบคุมให้เชื้อกลายพันธุ์สามารถสร้างสีได้มากกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์

## อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อที่ใช้ก่อให้กลายพันธุ์ได้แก่เชื้อรา *Monascus* sp. NP1 (Lotong and Suwanarit, 1990) เชื้อที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบ ได้แก่ เชื้อรา *Monascus* sp. 3179 ได้รับจากศูนย์รวบรวมพันธุ์จุลินทรีย์ Bangkok MIRCENS และ เชื้อกลายพันธุ์ *Monascus* sp. M1 และ M5 ได้จากงานทดลองของ สุรัตน์ และ ปกรณ์ (2535) ซึ่งเป็นเชื้อราที่กลายพันธุ์จากเชื้อรา *Monascus* sp. 3179

เก็บรักษาเชื้อในขวดแก้วขนาดเล็กขนาด 10 x 24 มิลลิเมตร และในถุงพลาสติก (polypropylene)ขนาด 7x13 เซนติเมตรเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นตลอดการทดลอง ทำตามวิธีในงานทดลองของกังสดาลย์ (2538)

**การผลิตข้าวแดง** โดยการเตรียมกล้าเชื้อและเตรียมข้าวแดงในถุงพลาสติกตามวิธีของ นภา (2529) และ Lotong and Suwanarit (1988; 1990) โดยใช้ความชื้นเริ่มต้นต่างๆ กันตามที่จะศึกษา สำหรับการศึกษาผลของการกดการสร้างสีของกลูโคสใช้สารละลายกลูโคสตามความเข้มข้นที่ต้องการแทนน้ำ

**วิเคราะห์ปริมาณความเข้มสีในข้าวแดง** ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Lin and Iizuka (1982) โดย Lotong and Suwanarit (1990) วัดความเข้มสีด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu UV- VIS Recording Spectrophotometer UV-240) ใช้ความยาวคลื่น 300-700 นาโนเมตร โดยให้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) อยู่ระหว่าง 0-0.4 สำหรับน้ำสีที่สกัดด้วยเอทธานอล ก่อนการวัดความเข้มสี เจือจางด้วยเอทธานอล 76 เปอร์เซนต์ และใช้เอทธานอลเป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) แล้วคูณด้วยระดับความเจือจาง (dilution factor) ที่รายงานความเข้มสีต่อ 100 กรัมโคจิข้าวแดง

**การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอไมเลส** สกัดเอนไซม์กลูโคอไมเลส โดยชั่งข้าวแดงปริมาณ 20.0 กรัม เติมแอซิเตต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M พีเอช 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 12 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใส่ในภาชนะที่วางในถาดน้ำแข็งที่เย็นจัด นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอไมเลส ด้วยการวัดปริมาณกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยจากน้ำแป้ง(soluble starch)ด้วยวิธีกลูโคสออกซิเดส โดยหนึ่งยูนิต (unit) ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ซึ่งย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาทีต่อ 100 กรัมโคจิข้าวแดง วิธีวิเคราะห์ทำตามวิธีทดลองของ Lotong and Suwanarit (1990)

**การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส** ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์และใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจาก ชุด (kit) ของ PGO ENZYMES Sigma (กังสดาลย์, 2538)

**การวิเคราะห์เปอร์เซนต์เอทธานอล** เตรียมตัวอย่างน้ำสีเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณเอทธานอล โดยชั่งข้าวแดง 20 กรัมบรรจุในถุงพลาสติกที่ยังไม่ผ่านการใช้ขนาด 8x12 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วยเครื่องสโตมักเชอร์ (Stomacher) เป็นเวลา 15 วินาที นำมากรองด้วยผ้าขาวบางที่ซ้อนกัน 2

ชั้น แยกเฉพาะส่วนใสไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์เอทธานอลด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟี (Shimadzu GC-9A) พร้อมเครื่องบันทึก (CR-3A) โดยใช้ n-propanol เป็น internal standard สภาพการวิเคราะห์ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3.20 มิลลิเมตร ยาว 2.1 เมตร บรรจุด้วย 10 เปอร์เซนต์ polyethylene glycol 20 M ขนาด 60-80 mesh เคลือบบน shimalite ตั้งอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส อุณหภูมิขณะ injection 200 องศาเซลเซียส ใช้กาซไนโตรเจนเป็นตัวพา (carrier gas) ด้วยอัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ดีเทกเตอร์แบบ FID (flame ionized detector)

**การชักนำให้กลายพันธุ์** เตรียมกล้าเชื้อโดยใช้น้ำปริมาตร 24 มิลลิลิตรต่อวัตถุดิบปลายข้าวหอมมะลิ 40 กรัม เมื่อบ่มครบ 5 วัน ตักผงสปอร์ 1 กรัมลงในถุงพลาสติกทนร้อนที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.2 M พีเอช 7.0 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร และ Tween 80 0.1 เปอร์เซนต์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใช้มือขยี้ถุงเพื่อให้สปอร์แตกกระจายประมาณ 200 ครั้ง จากนั้นใช้ปิเปตดูดซัสเปนชันปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่มีแท่งแม่เหล็ก นำไปวางบนที่เขย่าด้วยความเร็วต่ำในตู้ปลอดเชื้อซึ่งมีหลอดแสงอุลตราไวโอเลต 15 วัตต์ โดยวางผิวหน้าซัสเปนชันให้ห่างจากหลอดแสง 40 เซนติเมตร ใช้ระยะเวลาการฉายแสงที่ให้อัตราการรอดตายอยู่ในช่วง 1.0-0.01 เปอร์เซนต์ ซึ่งในการศึกษานี้ใช้เวลา 60 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาใช้ปิเปตดูดซัสเปนชันใส่ขวดแล้วหุ้มด้วยอลูมินัมฟอยด์เพื่อป้องกันการกลายพันธุ์กลับ เนื่องจากแสง ดำเนินการทุกขั้นตอนด้วยวิธีปลอดเชื้อ

**การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์** คัดเลือกโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose medium agar (GA) (กังสดาลย์, 2538) ที่เติมกลูโคส 20 เปอร์เซนต์ โดยเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีแดงเข้มกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์ ถ่ายเชื้อบนอาหาร GA ที่มีน้ำตาลกลูโคส 8 เปอร์เซนต์ ด้วยวิธี point inoculation บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บเฉพาะโคโลนีที่ไม่มีการแบ่งเซคเตอร์

## ผลและวิจารณ์

### การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์

จากการทำให้เชื้อรา *Monascus* sp. NP1 กลายพันธุ์โดยฉายรังสีอุลตราไวโอเลตประมาณ 60 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อมีอัตราการรอดตาย 0.79 เปอร์เซนต์ คัดเลือกโคโลนีที่มีสีแดงเข้มขนาดเล็กบนอาหาร GA ที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ ได้เชื้อกลายพันธุ์ทั้งหมด 61 สายพันธุ์ เมื่อทำการถ่ายเชื้อต่อพบว่ามีเพียงสองสายพันธุ์ได้แก่ เชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 ที่มีความคงตัวทางพันธุกรรม จึงได้นำมาใช้ศึกษา

### การเปรียบเทียบการดูดกลืนแสงของสีที่สกัดจากข้าวแดง

เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสีและอัตราส่วนความเข้มสีเหลืองต่อความเข้มสีแดง จึงได้ทำการผลิตข้าวแดงด้วยเชื้อพ่อแม่พันธุ์และเชื้อกลายพันธุ์ *Monascus* sp. R8 และ R53 ที่ความชื้นเริ่มต้น 33.7 เปอร์เซนต์ แล้วสกัดสีด้วยเอทธานอล นำน้ำสีไปหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดพบว่า เชื้อกลายพันธุ์มีคุณสมบัติสร้างสารสีเหลืองที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแตกต่างจากเชื้อพ่อแม่พันธุ์ได้แก่ 410 และ 396 นาโนเมตร โดยเชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อพ่อแม่พันธุ์มีค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 382 นาโนเมตร ส่วนสารสีที่ดูดกลืนแสงในช่วงสีแดงให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเดียวกับเชื้อพ่อแม่พันธุ์คือ 500 นาโนเมตร(Figure 1) นอกจากนี้เชื้อกลายพันธุ์ R8 ยังผลิต

สีที่มีอัตราส่วนของความเข้มสีเหลืองต่อความเข้มสีแดงต่ำกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์คือ 1.278 โดยที่เชื้อกลายพันธุ์ R53 ผลิตสารสีในอัตราส่วน 1.612 ซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อพ่อแม่พันธุ์ซึ่งมีอัตราส่วน 1.693 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ทำให้เชื้อกลายพันธุ์ R8 สร้างสารสีที่ให้สีแดง (รูโบรพังทาทิน โมนาสโคฟลาวิน อังคาฟลาวินหรือโมนาสซินที่ถูกรีดิวซ์) มากกว่าสารสีเหลือง (อังคาฟลาวิน โมนาสซิน) ในขณะที่เชื้อกลายพันธุ์ R53 ยังคงผลิตสารสีที่ให้สีแดงและสารสีเหลืองในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกับเชื้อพ่อแม่พันธุ์

**การศึกษาอิทธิพลของความชื้นในการผลิตข้าวแดง**

ในการศึกษาคุณสมบัติการสร้างสีของเชื้อพ่อแม่พันธุ์และเชื้อกลายพันธุ์ในการผลิตข้าวแดงที่ระดับความชื้นเริ่มต้น 30.2, 33.7, 37.2, 40.7 และ 44.2 เปอร์เซนต์ โดยนำข้าวแดงมาสกัดสี เมื่อครบ 5 วัน พบว่า เชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 สร้างสีได้สูงกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์ทุกระดับความชื้นที่ทดลอง (Figure 2 ) และเชื้อกลายพันธุ์ R8 ทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นข้าวแดงได้ที่ทุกระดับความชื้นที่ทดลองเมื่อหมักครบ 5 วัน ในขณะที่เชื้อกลายพันธุ์ R53 สามารถหมักให้ผลิตภัณฑ์เป็นข้าวแดงในวันเดียวกับเชื้อกลายพันธุ์ R8 ได้ที่ 3 ระดับความชื้น ได้แก่ 37.2, 40.7, และ 44.2 เปอร์เซนต์ ส่วนเชื้อพ่อแม่พันธุ์ไม่สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์เปลี่ยนเป็นข้าวแดงที่ระดับความชื้นเริ่มต้น 40.7 และ 44.2 เปอร์เซนต์ โดยที่ผลิตภัณฑ์มีลักษณะแฉะเละ มีการสร้างสีต่ำและมีกลิ่นเอทธานอลแรง อย่างไรก็ตามระดับความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตข้าวแดงด้วยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ที่ระดับเดียวกัน คือ 37.2 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ยังไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นระหว่างการหมักซึ่งต่างกับการผลิตด้วยวิธีการเติมน้ำระหว่างการหมัก (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2531)

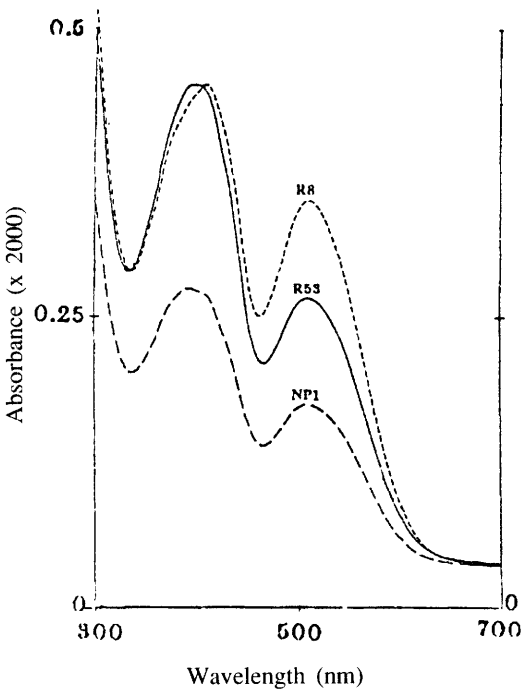



**Figure 1** Absorption spectra of the pigments of wild type NP1 compared to its mutants.

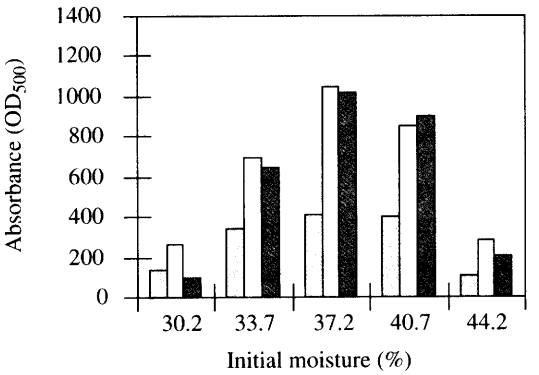



**Figure 2** Effect of rice moisture content on pigmentation after 5 days.
□: NP1, □: R8, ■: R53

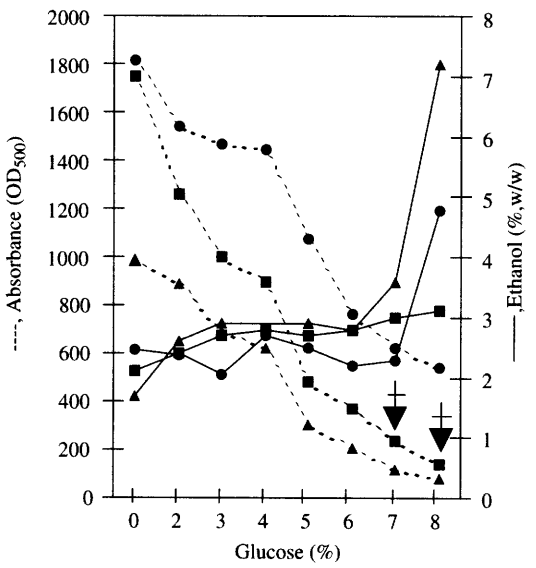



**Figure 3** Effect of glucose added before the fermentation of rice containing 33.7% moisture after 7 days on pigmentation and ethanol production.
▲ : NP1, ■ : R53, ● : R8 ;
ǂ : fermentation was not successful.

**การศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลที่เติมในข้าว**

จากการศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลที่เติมในข้าวที่มีต่อการสร้างสีเพื่อให้ผลิตภัณฑ์เป็นข้าวแดง และการสร้างเอทธานอลของเชื้อพ่อแม่พันธุ์ เชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 โดยผลิตข้าวแดงที่ความชื้นเริ่มต้น 33.7 เปอร์เซนต์ด้วยการเติมน้ำตาลลงในข้าว 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก เมื่อครบ 7 วัน พบว่า ทุกเชื้อสร้างสีลดลงตามความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น โดยมีระดับการลดลงต่างกันซึ่งเชื้อ R8 ทนต่อการกดการสร้างสีโดยน้ำตาลได้ดีกว่าเชื้ออื่น จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ยังมีลักษณะเป็นข้าวแดงได้ที่ทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติม ในขณะที่เชื้ออื่นๆ ไม่สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นข้าวแดงได้เมื่อเติมน้ำตาล 7 และ 8 เปอร์เซนต์ (Figure 3) จากภาพนี้ยังแสดงให้เห็นว่า การทนการกดการสร้างสีโดยน้ำตาลไม่ได้เกิดจากความสามารถเดิมของเชื้อ โดยที่ในการหมักที่ไม่เติมน้ำตาลเชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 สร้างสีได้ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเติมน้ำตาลปรากฏว่า เชื้อ R53 ผลิตสีต่ำลงอย่างรวดเร็วจนมากกว่าในทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติม

ในสภาวะที่หมักในถุงพลาสติกที่ทำการทดลองในการศึกษานี้พบว่า ทั้งเชื้อพ่อแม่พันธุ์และเชื้อกลายพันธุ์สามารถผลิตเอทธานอลได้ประมาณ 1.7-3 %สำหรับการหมักที่ไม่ได้เติมน้ำตาลและเติมน้ำตาลตั้งแต่ 2-6 เปอร์เซนต์ ซึ่งการที่ *Monascus* sp. ผลิตเอทธานอลได้นั้นเป็นคุณสมบัติที่ได้เคยมีรายงานไว้เป็นจำนวนมาก (กังสดาลย์, 2538; Lin and Iizuka, 1982; Lotong and Suwanarit, 1990; Pastrana *et al.*, 1995) ส่วนการเติมน้ำตาลในปริมาณที่สูงขึ้นจนถึง 8% จะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณเอทธานอลแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์โดยที่ระดับของเอทธานอลจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อหมักด้วยเชื้อ R53 ส่วนเชื้อ R8 ปริมาณเอทธานอลจะยังคงที่เมื่อเติมน้ำตาล 7% (2.3%) และจะเพิ่มขึ้นอย่างมาก (4.8%) เมื่อเติมน้ำตาล 8% ส่วนเชื้อพ่อแม่พันธุ์ NP1 นั้นที่ระดับน้ำตาล 7% ผลิตเอทธานอลได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (3.5%) และปริมาณเอทธานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างมากเช่นกันในสภาวะที่เติมน้ำตาล 8% (7.2%) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lotong and Suwanarit (1990) ดังนั้นการที่ข้าวที่หมักด้วยเชื้อ NP1 และ เชื้อ R53 ไม่มีลักษณะเป็นข้าวแดงเมื่อเติมน้ำตาล 7% ขึ้นไป ในขณะที่การเติมน้ำตาลถึง 8% เชื้อ R8 ยังหมักให้เกิดข้าวแดงได้จึงเป็นการยืนยันการค้นพบของ Lotong and Suwanarit (1990) เมื่อศึกษากับเชื้อพ่อแม่พันธุ์ว่าการกดการสร้างสีนั้นเกิดจากน้ำตาลไม่ใช่เอทธานอล ซึ่งปรากฏการณ์ catabolic repression นี้มักจะพบอยู่เสมอในการผลิตสารทุติยภูมิชนิดอื่น เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะ (Vining, 1986)

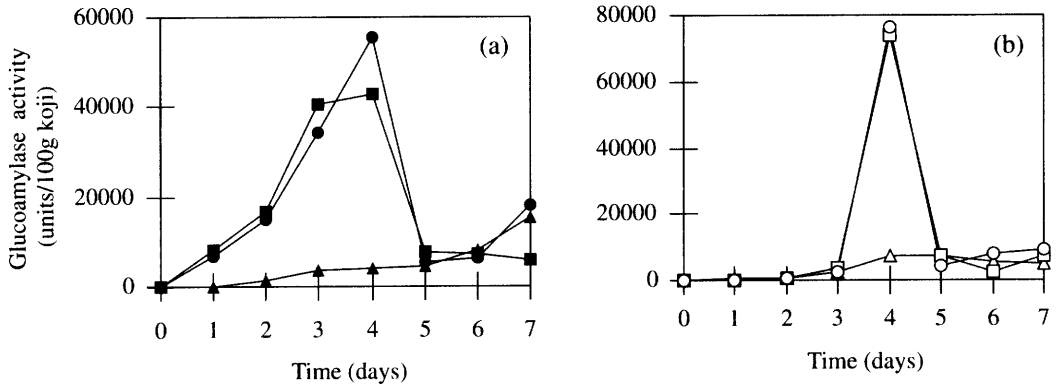



**Figure 4** Patterns of glucoamylase production of wild type compared to their mutants at 37.2% initial moisture content. Wild type NP1 and its mutants; (a) ▲ : NP1, ■ : R53, ● : R8 ; Wild type 3179 and its mutants, (b) △ : 3179, □ : M1, ○ : M5.

**การสร้างเอนไซม์กลูโคอไมเลสในขณะหมักข้าวแดงและศักยภาพในการผลิตสี**

เมื่อผลิตข้าวแดงด้วยเชื้อพ่อแม่พันธุ์ NP1 และเชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 ที่ได้จากการศึกษานี้และเชื้อเปรียบเทียบ *Monascus* sp. 3179 (พ่อแม่พันธุ์) และเชื้อกลายพันธุ์ M1 และ M5 ที่ความชื้นเริ่มต้น 37.2 เปอร์เซนต์ ตลอดระยะเวลาการหมักข้าวแดง 7 วันทำการศึกษา กิจกรรมเอนไซม์กลูโคอไมเลสและศึกษาศักยภาพของเชื้อพ่อแม่พันธุ์เปรียบเทียบกับเชื้อกลายพันธุ์ในการผลิตข้าวแดงโดยวิเคราะห์ความเข้มสีแดงต่อ 100 กรัมโคจิข้าวแดง($OD_{500}$) ตลอดระยะเวลาการหมัก 7 วันเช่นกัน ผลปรากฏว่า เชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีการควบคุมการสร้างเอนไซม์แตกต่างจากเชื้อพ่อแม่พันธุ์ (Figure 4a and 4b) กล่าวคือ เชื้อพ่อแม่พันธุ์จะมีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าและมีการสร้างเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ตลอดระยะเวลาการหมัก ในขณะที่เชื้อกลายพันธุ์จะผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามลำดับจนได้กิจกรรมสูงสุดเมื่อหมักครบ 4 วัน หลังจากนั้นการสร้างเอนไซม์จะลดลงอย่างมากและรวดเร็วจนถึงระดับเดียวกับเชื้อพ่อแม่พันธุ์ในวันที่ 5 ของการหมัก ซึ่งตามการศึกษาของ Lotong and Suwanarit (1990) โดยใช้เชื้อพ่อแม่พันธุ์ NP1 ได้รายงานไว้ว่า ในสภาวะที่เชื้อสร้างเอนไซม์ได้ดีจะทำให้การผลิตสีลดลงจนถึงระดับที่ไม่เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ข้าวแดง เนื่องจากมีกลูโคสเกิดขึ้นจากการย่อยสลายแป้งในปริมาณที่สูงเกินกว่าที่เชื้อจะทนได้ ดังนั้นถึงแม้ว่าเชื้อกลายพันธุ์จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกลูโคอไมเลสได้สูงกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์เป็นอย่าง

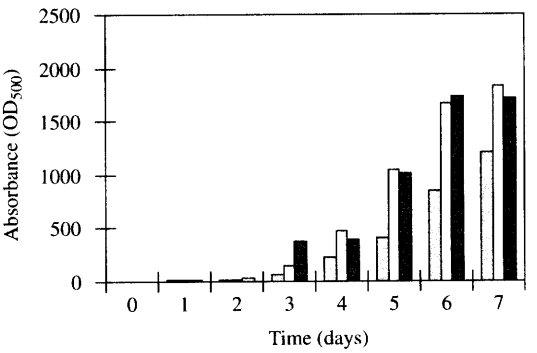



**Figure 5** Time course of pigmentation at 37.2% initial moisture content, □ : NP1, □ : R8, ■ : R53.

มากในระยะแรกของการหมัก แต่เชื้อจะยังคงรักษาปริมาณน้ำตาลไม่ให้สูงเกินระดับที่เชื้อจะทนได้โดยการควบคุมการสร้างเอนไซม์ให้น้อยลงในระยะท้ายของการหมัก เชื้อกลายพันธุ์จึงสามารถหมักให้เกิดข้าวแดงได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่า ในวันที่ 5 ของการหมักจะมีน้ำตาลเหลืออยู่ในวัสดุหมัก 3-5 เปอร์เซนต์ ซึ่งการที่เชื้อทนการกดการสร้างสีได้ดีกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์ และการควบคุมการสร้างเอนไซม์ให้ลดลงจะเป็นเหตุผลที่ใช้อธิบายถึงการที่สามารถหมักด้วยเชื้อกลายพันธุ์ที่ระดับความชื้นที่สูงดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น

ในการศึกษาศักยภาพในการผลิตสีโดยการผลิตข้าวแดงด้วยเชื้อพ่อแม่พันธุ์ NP1 และเชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 ที่ระดับความชื้นเริ่มต้น 37.2 % วิเคราะห์ความเข้มสีทุกวันตลอดระยะเวลาการหมัก 7 วันดังแสดงใน Figure 5 พบว่า เชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 สามารถสร้างสีได้สูงและเร็วกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์

**การศึกษาคุณสมบัติการคงตัวทางพันธุกรรมของเชื้อกลายพันธุ์**

จากการนำเชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 มาศึกษาประสิทธิภาพการสร้างสีเปรียบเทียบกับเชื้อตั้งต้นโดยทำการถ่ายเชื้อต่อเนื่องอย่างน้อย 7 ครั้ง (passage) พบว่า เชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 มีความคงตัวทางพันธุกรรมอย่างน้อยทั้ง 7 ครั้งของการถ่ายเชื้อ

## สรุป

การศึกษานี้สามารถคัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงได้ 2 สายพันธุ์ได้แก่ เชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 ซึ่งเชื้อสามารถสร้างสีได้เร็วกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์และมีความเข้มสีเมื่อสกัดจากข้าวแดงสูงกว่า 2.54 และ 2.47 เท่าตามลำดับโดยที่สีแดงที่ผลิตได้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นเดียวกับเชื้อพ่อแม่พันธุ์ ส่วนสารสีเหลืองให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดสูงกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์เล็กน้อย ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ประสิทธิภาพการผลิตสีได้สูงเป็นผลจากความสามารถจากการที่เชื้อทนต่อการกดการสร้างสีด้วยน้ำตาลได้ดี และมีกลไกการควบคุมระดับน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายแป้งให้ไม่เกินระดับที่เชื้อจะทนได้โดยลดการสร้างเอนไซม์กลูโคอไมเลสอย่างมากและฉับพลันในวันที่ 5 ของการหมักหลังจากเมื่อมีกิจกรรมสูงสุด ซึ่งความสามารถทั้ง 2 ประการนี้ส่งผลให้เชื้อกลายพันธุ์สามารถผลิตข้าวแดงได้ที่ความชื้นสูงกว่าเชื้อพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งความชื้นเริ่มต้นสูงนี้เป็นสภาวะที่ เชื้อ *Monascus* sp. ผลิตเอนไซม์ได้ดี

ผลจากการปรับปรุงพันธุ์เชื้อราโมแนสคัสครั้งนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตข้าวแดงกล่าวคือทำให้ผลิตข้าวแดงที่มีคุณภาพด้านความเข้มของสีดีขึ้น นอกจากนั้นจะทำให้สามารถทำการหมักโดยใช้ความชื้นเริ่มต้นสูงได้โดยไม่มีปัญหาของน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ จึงไม่จำเป็นต้องพ่นน้ำเพิ่มเติมระหว่างการหมัก ซึ่งเป็นปัญหาของกระบวนการผลิตที่ปฏิบัติกันอยู่ในปัจจุบัน นอกจากนั้นการที่เชื้อสามารถผลิตสีได้ในสภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง อาจเหมาะต่อการนำไปผลิตสีในอาหารเหลว ซึ่งน่าจะทำให้สามารถเริ่มต้นการหมักโดยใช้ปริมาณแป้งได้มากขึ้นกว่าในรายงาน (วรรณภา, 2529; สมชาย, 2536; Su, 1980) แต่ทั้งนี้จำเป็นจะต้องมีการศึกษาให้แน่ใจว่า เชื้อกลายพันธุ์เหล่านี้จะไม่สร้างสารพิษหรือสารปฏิชีวนะ เชื้อกลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ยังมีประโยชน์ต่อการนำไปศึกษากระบวนการสังเคราะห์สี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของการกดการผลิตสี (catabolic repression) นอกจากนี้ยังใช้เป็น clone ของเชื้อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

## เอกสารอ้างอิง


กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2524. ข้าวแดง-สีธรรมชาติสำหรับใช้ผสมอาหาร. ข่าวกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 95 : 2-4.

กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2531. การผลิตสีของเชื้อรา *Monascus purpureus* โดยวิธี solid state culture, น. 145-151. *ใน* รายงานกิจกรรมกรมวิทยาศาสตร์บริการฉบับที่ 46. กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและพลังงาน, กรุงเทพฯ.

กังสดาลย์ ศรแก้ว. 2538. การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นภา โล่ห์ทอง. 2527. ข้าวแดง. วารสารวิทยาศาสตร์ 38-9 : 414-418.

_____. 2529. การประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตรที่ พณ.0507.05/638. กองสิทธิบัตรและเครื่องหมายการค้า กรมทะเบียนการค้า กระทรวงพาณิชย์, กรุงเทพฯ.

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมแนสคัส ที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมชาย ไกรรักษ์. 2536. ศักยภาพของเชื้อราโมแนสคัสกลายพันธุ์ชนิดใหม่ในการผลิตสีเหลืองธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรัตน์ สุรรัตน์รังษี และ ปกรณ์ โพธิ์บริสุทธิ์. 2535. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราแดงเพื่อเพิ่มความสามารถการผลิตสีโดยวิธีการกลายพันธุ์. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Endo, A. and K. Hasumi. 1985. Dihydromonacolin L and Monacolin X, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis. J. Antibiot. 38 : 321-327.

Hesseltine, C. W. 1965. A millennium of fungi, food and fermentation. Mycologia 57 : 180-181.

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

Lee, S. T. 1979. The Anka, pp. 1518-1593. *In* Pen cha kan mu (Chinese herbal medicine). Yeh Book Co., Taipei.

Lin, C. F. and H. Iizuka. 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 43: 671-676.

Lotong, N. and P. Suwanarit. 1988. Production of Chinese red rice in plastic bag. NRCT, NUS, DOST-JSPS Joint Seminar on Biotechnology December 22-24, 1988. Chaing Mai, Thailand.

_____. 1990. Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content. J. Appl. Bacteriol. 68 : 565-570.

Pastrana, L. , P. J. Blanc, A. L. Santerre, M. O. Loret and G. Goma. 1995. Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a stricly controlled nitrogen source. Process Biochem. 30 : 333-341.

Su, Y. C. 1980. Traditionnal fermented foods in Taiwan. Proceedings of the Oriental Fermented Foods, 10-4 December 1979. Taipei, Republic of China.

Tsai, M. S. , T. H. Hseu and Y. S. Shen. 1978.

Purification and characterization of an acid protease from *Monascus kaoliang*. Int. J. Pept. Protein Res. 12 : 293-302.

Vining, L.C. 1986. Secondary Metabolism, pp. 19-38. *In* H. J. Rhem and G. Reed (eds). Biotechnology Vol. 4 Microbial Products II. VCH Verlagsgsellschaft.

Yasuda, M. , M. Kuwae, and H. Matsushita. 1989. Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Monascus* sp. No 3403. Agric. Biol. Chem. 53 : 247-249.

Yasukawa, K., M. Takahash, S. Natori, K. Kawai, M. Yamazaki, M. Takeuchi, and M. Takido. 1994. Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-state carcinogenesis in mice. Oncology 51 : 108-112.