# ความคงตัวของสีแดงที่สกัดได้จาก การเลี้ยงราที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว

# Stability of Red Pigments from Isolated *Monascus* spp. in Submerged Culture

**สิริพร อักษร, วงเดือน บุตรหนัน และปาริยา ณ นคร***

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

**Siriporn Aksorn, Wongdeaun Butnan and Pariya Na Nakorn***

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

## บทคัดย่อ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีราในกลุ่ม *Monascus* spp. สามารถผลิตสารสีแดงได้ ซึ่งราชนิดนี้นิยมนำไปใช้ในการผลิตข้าวแดง ดังนั้นในการศึกษานี้ ได้นำราที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ข้าวแดง 2 ตัวอย่าง (A และ B) จำนวน 6 ไอโซเลต คือ A7, A9, A22, B3, B5 และ B8 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงแบบเหลว พบว่า A22 ผลิตสารสีแดง (ในภาพรวม) ได้มากที่สุด และจากการศึกษาความคงตัวในภาวะต่าง ๆ ของสีที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับสีมาตรฐาน พบว่า A22 ให้ผลความคงตัวที่ดีที่สุดในทุกสภาวะและดีกว่าสารสีมาตรฐาน (Wisdom red และ Carophyll red) จากข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไปใช้เพื่อพัฒนาการผลิตสีแดงจากราในอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ : ความคงตัวของสารสีแดง; การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว; รา *Monascus* spp.

## Abstract

From previous study, *Monascus* spp. produced red pigments. Therefore it is favorable for Angkak production. This study investigated red pigment production in submerged culture by using 6 isolated fungi, A9, A22, B3, B5 and B8, those obtained from 2 Angkak samples (A and B). A22 showed the overview highest pigment production. Moreover, the stabilities of various conditions of red pigments were examined with the comparison of commercial red pigments. It was found that isolate A22 provided the best stabilities in all conditions and better than those obtained from

***Corresponding author:** *gipa77@hotmail.com*

*DOI: 10.14456/tjst.2013.14*

commercial red pigments (Wisdom red and Carophyll red). These results revealed the information for development of the industrial red pigments production.

**Keywords:** red pigment stabilities; submerged cultivation; *Monascus* spp.

## 1. คำนำ

สีเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยดึงดูดให้วัตถุต่าง ๆ น่าสนใจ ไม่ว่าจะเป็นสีที่ใช้ในชีวิตประจำวัน ได้แก่ สีของเครื่องนุ่งห่ม และสีที่ใช้ผสมอาหาร เป็นต้น ซึ่งพบว่าสีมีส่วนสำคัญที่ช่วยให้ผู้บริโภคตัดสินใจเลือกซื้อสินค้าต่าง ๆ ได้ แม้แต่สีของอาหารก็เป็นส่วนหนึ่งช่วยดึงดูดความสนใจและเพิ่มความน่ารับประทาน ดังนั้นสีผสมอาหารจึงมีความสำคัญที่ผู้ผลิตต้องใส่ใจ เพื่อให้ผู้บริโภคได้มีทางเลือกซื้ออาหารที่มีความปลอดภัย สีผสมอาหารที่มีขายอยู่ในปัจจุบันมีทั้งสีที่ได้จากธรรมชาติและสังเคราะห์ทางเคมี แต่สีที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีจะมีการนำมาใช้มากกว่าสารสีที่ได้จากธรรมชาติ เนื่องจากหาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาด และพบว่าในแต่ละปีประเทศไทยมีการนำเข้าสีจากต่างประเทศจำนวนมาก ดังนั้นการใช้สีจากธรรมชาติหรือที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ นอกจากจะเป็นการเพิ่มความมั่นใจกับผู้บริโภคแล้ว ยังเป็นอีกทางเลือกในการลดการนำเข้าสีจากต่างประเทศอีกด้วย

ราโมแนสคัส (*Monascus* sp.) หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่าราข้าวแดง เป็นราที่สามารถผลิตสารสีได้ สามารถคัดแยกได้จากข้าวแดง ซึ่งข้าวแดงคือการหมักข้าวนึ่งด้วยราโมแนสคัส โดยราจะย่อยข้าวและสร้างสารสีออกมานอกเซลล์ ทำให้ข้าวที่ได้มีสีแดงทั่วทั้งเมล็ดข้าว จึงเรียกว่าข้าวแดง นอกจากจะผลิตสีแดงแล้วยังสามารถผลิตสีเหลืองและสีส้มได้ สีที่ได้จากราโมแนสคัสจึงเป็นทางเลือกที่ดี เนื่องจากเป็นสารสีที่ได้จากธรรมชาติและนับว่ามีความปลอดภัยมากกว่าสีที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เพราะหากได้รับสีที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากจะทำให้เกิดโทษต่อร่างกาย รวมทั้งอาจเป็นสารก่อโรคมะเร็งได้อีกด้วย สีที่ได้จากธรรมชาติจึงมีข้อดีคือไม่ก่อให้เกิดโทษต่อร่างกายและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันจึงมีการนำสีที่ผลิตได้จากราโมแนสคัสมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะด้านอุตสาหกรรมอาหาร

การผลิตสารสีให้มีประสิทธิภาพนั้น นอกจากการหมักบนอาหารแข็งที่ใช้สารตั้งต้นในการหมักเป็นข้าวนึ่ง ซึ่งมีข้อจำกัดในการขยายขนาดสู่อุตสาหกรรมขนาดใหญ่แล้ว ยังมีปัญหาในเรื่องของการปนเปื้อนอีกด้วย ดังนั้นการเลี้ยงราโมแนสคัสในอาหารเหลวจึงเป็นอีกหนึ่งวิถีทางที่จะแก้ไขข้อจำกัดต่าง ๆ ของการเลี้ยงราโมแนสคัสในอาหารแข็ง (Velmurugan *et al*., 2011) Lee และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตสีของราโมแนสคัสในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นกลูโคสและโมโนโซเดียมกลูตาเมต (ผงชูรส) ที่ความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร และ 1.5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่สภาวะการเลี้ยง pH 6.5 และความเร็วในการเขย่า 700 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นสภาวะที่ให้ผลการผลิตมวล และให้การผลิตเม็ดสีแดงสูงที่สุด

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญของการศึกษาการผลิตสารสีแดงโดยราโมแนสคัสที่คัดแยกและคัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์ข้าวแดงสูงสุด 6 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว และนำสารสีที่ได้มาทดสอบความคงตัวที่สภาวะต่าง ๆ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ต่อไป

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

**2.1 สารเคมี**

ตัวอย่างข้าวแดงจาก บริษัท อุดมกิจไพศาล จำกัด (ตัวอย่าง A และ B) สารสีมาตรฐาน Wisdom red และ Carophally red

**2.2 การคัดแยกจุลินทรีย์จากข้าวแดง**

นำตัวอย่างข้าวแดง A และ B ที่ได้จาก บริษัท อุดมกิจไพศาล จำกัด โรยลงบนอาหารแข็ง NA (nutrient agar) และ PDA (potato dextrose agar) ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อด้วยวิธี aseptic technique แล้วปิดฝาจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญเติบโตจนเห็นความแตกต่างของโคโลนี จึงทำการแยกเชื้อลงบนอาหารเพาะเลี้ยงจนได้เชื้อบริสุทธิ์

**2.3 การระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้เบื้องต้นด้วยวิธี slide culture**

เนื่องจากจุลินทรีย์ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นรา จึงทำการระบุเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธี slide culture โดยวางแท่งแก้วรูปตัว V ในจานเพาะเชื้อ แล้วเทน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไปพอประมาณ ไม่ให้ท่วมแท่งแก้ว คีบแผ่นสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางบนแท่งแก้วรูปตัว V ใช้มีดตัดอาหาร PDA เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส วางลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้นเขี่ยเชื้อแต่ละโคโลนี นำไปแตะที่ด้านข้างของอาหาร PDA ทั้งสี่ด้าน ที่วางอยู่บนแผ่นสไลด์ แล้วนำ cover slip ที่ปลอดเชื้อวางทับบนชิ้นอาหารแล้วปิดฝาจานเพาะเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของเส้นใยรา จากนั้นทำการย้อมสไลด์ แล้วไปตรวจดูลักษณะของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อระบุสายพันธุ์ของราต่อไป

**2.4 การเลี้ยงราในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) และการสกัดสีที่ผลิตได้**

นำราที่คัดเลือกแล้ว (A7, A9, A22, B3, B5 และ B8) มาเลี้ยงในอาหารเหลวโดยวิธีใช้ cork borer จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำไปสกัดสีโดยใช้ 95 % เอทานอล และเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 วัน กรองสารสีที่สกัดได้เพื่อนำไปทดสอบความคงตัวต่อไป หาปริมาณสารสีที่สกัดได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 และ 507 นาโนเมตร

**2.5 การทดสอบความคงตัวของสารสีที่สกัดได้** (Wongjewboot and Kongruang, 2011)

นำสีที่สกัดได้ไปทดสอบความคงตัวที่สภาวะต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ สารละลายเกลือ ภายใต้สภาวะความรุนแรง คือ hot air oven หรือ UV หรือ autoclave หรือแสงแดด เปรียบเทียบกับสีมาตรฐานที่มีในท้องตลาด ได้แก่ Wisdom red และ Carophyll red

## 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

จากการนำข้าวแดง 2 ตัวอย่าง มาคัดแยกราที่สามารถผลิตสารสีแดง เหลือง หรือส้มได้ พบว่าได้จำนวนไอโซเลตทั้งสิ้น 32 ไอโซเลต จากทั้งสองตัวอย่างข้าวแดง จากนั้นได้ทำการระบุสายพันธุ์เบื้องต้นด้วยวิธี slide culture พบว่าราที่คัดแยกได้น่าจะเป็นราที่อยู่ในกลุ่ม Ascomycota เนื่องจากมีการสร้างแอสโคคาร์ปและเส้นใยมีผนังกั้น (บุษบา, 2542) ซึ่งราที่อยู่ในกลุ่มนี้ที่สามารถสร้างสารสี (โดยเฉพาะสีแดง) คือรา *Monascus* sp. จากนั้นได้คัดเลือกไอโซเลตที่ให้ผลการผลิตสารสีแดงได้มากที่สุด จำนวน 6 ไอโซเลต คือ A7, A9, A22, B3, B5 และ B8 จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (potato dextrose broth) และศึกษาความคงตัวของสารสีที่ผลิตได้ในสภาวะต่าง ๆ และผลการทดสอบเป็นดังนี้

**3.1 การเลี้ยงราที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว PDB แบบเขย่า**

การคัดแยกราจากข้าวแดงทั้ง 2 ตัวอย่าง ซึ่งจากตัวอย่างที่หนึ่ง (A) สามารถคัดแยกราได้ 22 ไอโซเลต และจากตัวอย่างที่สอง (B) สามารถคัดแยกราได้ 10 ไอโซเลต จากนั้นทำการคัดเลือกราที่มีการสร้างสารสีได้ดีบนอาหารแข็ง PDA มา 6 ไอโซเลต เพื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว PDB โดยเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 วัน พบว่า รามีการเจริญเติบโตโดยมีการสร้างเส้นใย ซึ่งพบว่าเส้นใยมีการเกาะกลุ่มเป็นก้อน และมีการสร้างสารสีเกิดขึ้น จากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเพื่อนำไปชั่งน้ำหนักเปียก โดยไอโซเลตที่มีน้ำหนักมากที่สุดคือ A9 มีน้ำหนักเส้นใย 10.89 กรัม รองลงมาคือ A22 และ B8 มีน้ำหนักเส้นใย 10.60 และ10.20 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ A7 มีน้ำหนักเส้นใยน้อยที่สุดที่ 10.89 กรัม (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** น้ำหนักของเส้นใยราที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว

| ไอโซเลต | น้ำหนักเส้นใย (กรัม) |
|---|---|
| A7 | 8.45 |
| A9 | 10.89 |
| A22 | 10.60 |
| B3 | 8.63 |
| B5 | 8.93 |
| B8 | 10.20 |

เมื่อนำเส้นใยที่ได้ไปสกัดสารสีด้วย 95 % เอทานอล แล้วจึงนำสีที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดูดกลืนแสงสูงสุด ($\lambda_{max}$) เท่ากับ 414 และ 507 นาโนเมตร ตามลำดับ พบว่าสารสีแดงที่สกัดได้จากตัวอย่างราที่แยกได้ 6 ไอโซเลตนั้น ไอโซเลต A22 ให้สีแดงที่เข้มที่สุดทั้งสองความยาวคลื่นซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะที่แสดงออกในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อ รองลงมาคือไอโซเลต A9 ที่ให้ความเข้มสีแดงมากที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร และ A7 ที่ให้ความเข้มสีแดงมากที่ความยาวคลื่น 507 นาโนเมตร จากนั้นนำสีที่สกัดได้ไปทำการทดสอบคุณภาพและความคงตัวที่สภาวะต่าง ๆ

**ตารางที่ 2** ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีที่สกัดจากเส้นใยราที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว

| ไอโซเลต | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น | |
|---|---|---|
| | 414 nm | 507 nm |
| A7 | 0.554 ± 0.713 | 1.074 ± 0.001 |
| A9 | 1.019 ± 0.003 | 0.627 ± 0.004 |
| A22 | 1.048 ± 0.007 | 1.051 ± 0.003 |
| B3 | 0.942 ± 0.016 | 0.515 ± 0.006 |
| B5 | 0.926 ± 0.006 | 0.500 ± 0.001 |
| B8 | 0.566 ± 0.001 | 1.022 ± 0.003 |

**3.2 การทดสอบความคงตัวของสารสีที่สกัดได้ต่ออุณหภูมิ**

การทดสอบความคงตัวของสารสีที่สกัดได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต่ออุณหภูมิ โดยการนำสารสีที่สกัดได้ไปแช่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 10 นาที โดยอุณหภูมิที่ใช้ทดสอบมีดังนี้ คือ 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ที่ความยาวคลื่น 414 และ 507 นาโนเมตร โดยค่าความคงตัวที่ได้แสดงดังตารางที่ 3

การทดสอบความคงตัวของสารสีที่สกัดได้ต่อสภาวะอุณหภูมิ (40-100 องศาเซลเซียส) พบว่าไอโซเลต A9, A22, B3 และ B5 มีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปได้มากที่สุด ในขณะที่สีมาตรฐาน Carophyll red มีความคงตัวน้อยที่สุด ซึ่งแสดงว่าสีแดงที่สกัดได้จากรามีประสิทธิภาพที่ดีและทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้

**ตารางที่ 3** การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของสีสกัดจากรา 6 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับสีมาตรฐาน

| อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | ความยาวคลื่น | การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง (%) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | A7 | A9 | A22 | B3 | B5 | B8 | Wisdom | Carophyll |
| 40 | 414 nm | 86.46 | -12.07 | 1.67 | -5.52 | -1.46 | 64.31 | 56.44 | -55.66 |
| | 507 nm | -1.58 | -4.94 | 2.28 | -2.14 | -2.40 | -48.43 | -11.31 | 261 |
| 50 | 414 nm | 68.86 | -10.55 | -11.98 | -3.88 | -5.51 | 58.48 | 52.88 | -56.38 |
| | 507 nm | -4.93 | -2.55 | -8.56 | -0.97 | -1.40 | -48.34 | -12.96 | 257 |
| 60 | 414 nm | 73.29 | -7.41 | -8.40 | -3.35 | -2.70 | 49.12 | 53.94 | -56.25 |
| | 507 nm | -12.76 | -3.03 | -9.23 | -2.14 | -1.20 | -48.53 | -12.47 | 257 |
| 70 | 414 nm | 66.43 | -10.21 | -1.96 | -0.27 | 4.75 | 72.97 | 53.48 | -55.52 |
| | 507 nm | -3.82 | -1.44 | -0.48 | 2.33 | 4.60 | -46.67 | -12.80 | 258 |
| 80 | 414 nm | 86.55 | 1.42 | -3.05 | 6.69 | 3.84 | 76.24 | 56.06 | -55.35 |
| | 507 nm | -3.54 | 24.08 | -1.14 | 31.46 | 10.40 | -40.70 | -11.31 | 253 |
| 90 | 414 nm | 85.74 | -1.67 | -2.34 | -0.32 | -0.11 | 72.79 | 41.82 | -57.12 |
| | 507 nm | -0.56 | -1.12 | 2.47 | 1.17 | 2.00 | -45.50 | -19.82 | 259 |
| 100 | 414 nm | 83.57 | -1.52 | -1.00 | -1.12 | 2.00 | 65.19 | 54.17 | -56.29 |
| | 507 nm | -1.30 | -0.96 | 1.90 | -0.78 | -1.20 | -54.60 | -13.71 | 258 |

### 3.3 การทดสอบความคงตัวของสารสีที่สกัดได้ต่อสารละลายเกลือ

ความคงตัวของสารสีที่สกัดได้ต่อสารละลายเกลือ NaCl + $NH_4Cl$ (% v/v) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 จากผลการทดสอบพบว่าสารสีสกัดจากราไอโซเลต A7 และ A22 ให้ผลความคงตัวต่อทุกความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ ได้ดีที่สุด ในขณะที่สารสีสกัดจากเชื้อราไอโซเลตอื่น ๆ (A9, B3, B5 และ B8) และสารสีมาตรฐานให้ผลที่ความคงตัวลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือมากตั้งแต่ 0.7 % (v/v) นอกจากนี้สีมาตรฐาน Carophyll red ให้ผลความคงตัวที่ต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wongjewboot และ Kongruang (2011)

### 3.4 การทดสอบความคงตัวของสารสีที่สกัดได้ภายใต้สภาวะรุนแรง

สารสีสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรา 6 ไอโซเลต ที่แยกได้จากข้าวแดง 2 ตัวอย่าง นำมาทดสอบความคงตัวของสารสีภายใต้สภาวะรุนแรงต่าง ๆ ได้แก่ ความร้อน (hot air oven) แสง UV ภายใต้สภาวะฆ่าเชื้อ (autoclave) และแสงแดด

ปกติ พบว่าสารสีสกัดที่ได้จากไอโซเลต A7 และ A22 มีความคงตัวในสภาวะรุนแรงทั้ง 4 สภาวะที่ดีมาก โดยเฉพาะสารสีสกัดจากไอโซเลต A22 ให้ผลค่าความคงตัวที่สูงที่สุด นอกจากนี้สารสีมาตรฐานทั้งสองให้ผลค่าความคงตัวที่ดีเช่นกัน ซึ่งดีกว่าสภาวะอื่น ๆ (อุณหภูมิและความเข้มข้นของเกลือ) ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสารสีสกัดและสารสีมาตรฐานในสภาวะรุนแรงต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 5

**ตารางที่ 4** การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงต่อความเข้มข้นของสารละลายเกลือ (NaCl + $NH_4Cl$ (% v/v) ต่าง ๆ ของสีสกัดจากรา 6 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับสีมาตรฐานมาตรฐาน

| ความเข้มข้น NaCl + $NH_4Cl$ (% v/v) | ความยาวคลื่น | การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงต่อความเข้มข้นของสารละลายเกลือ (%) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | A7 | A9 | A22 | B3 | B5 | B8 | Wisdom | Carophyll |
| 0.1 | 414 nm | -4.11 | -2.79 | -1.47 | -1.36 | 3.49 | -1.62 | -5.88 | 3.54 |
| | 507 nm | -2.98 | -8.89 | -3.18 | -5.65 | 3.94 | -6.02 | -0.09 | 3.64 |
| 0.2 | 414 nm | -3.92 | -2.31 | 0.05 | -2.47 | 2.62 | -2.45 | -7.56 | 3.75 |
| | 507 nm | -2.05 | -10.48 | -1.88 | -6.20 | 3.71 | -1.75 | -2.48 | 5.29 |
| 0.3 | 414 nm | -5.60 | -6.81 | -4.64 | -4.14 | 1.50 | -1.32 | -2.66 | 9.78 |
| | 507 nm | -5.30 | -17.25 | -3.91 | -6.30 | -0.67 | -2.52 | 3.42 | 12.02 |
| 0.4 | 414 nm | -3.41 | -6.43 | -3.27 | -7.98 | -1.99 | -0.24 | -2.94 | 8.53 |
| | 507 nm | -2.42 | -14.88 | -4.10 | -10.22 | -5.40 | -2.74 | 1.71 | 9.59 |
| 0.5 | 414 nm | -1.54 | 1.07 | -0.24 | 2.72 | 0.25 | -1.14 | 1.33 | 11.24 |
| | 507 nm | -0.51 | 7.13 | -0.05 | 1.09 | -3.26 | -3.06 | 6.32 | 11.03 |
| 0.6 | 414 nm | -6.02 | -7.45 | -4.73 | -3.83 | 3.18 | -1.80 | -4.20 | 16.55 |
| | 507 nm | -4.98 | -19.89 | -5.26 | -6.74 | -1.91 | -4.92 | 0.68 | 15.88 |
| 0.7 | 414 nm | -3.08 | 4.72 | -1.33 | 6.80 | 10.59 | 8.32 | -0.56 | 21.96 |
| | 507 nm | -2.42 | 24.65 | -1.06 | 22.72 | 27.45 | 27.68 | 7.34 | 23.70 |
| 0.8 | 414 nm | -3.87 | 3.06 | -0.62 | 3.40 | 9.22 | 6.94 | -1.40 | 21.64 |
| | 507 nm | -0.74 | 13.56 | 1.25 | 13.91 | 26.10 | 24.07 | 4.95 | 23.93 |
| 0.9 | 414 nm | -3.78 | 1.07 | -1.94 | 6.25 | 6.98 | 3.35 | -5.74 | 14.88 |
| | 507 nm | -2.56 | 13.12 | -1.40 | 21.52 | 21.26 | 18.38 | 1.96 | 15.10 |
| 1.0 | 414 nm | -1.68 | 5.58 | 0.00 | 5.81 | 8.85 | 8.86 | 4.13 | 19.46 |
| | 507 nm | -0.28 | 22.36 | 0.82 | 21.52 | 22.05 | 30.31 | 11.70 | 20.73 |

## 4. สรุป

การคัดแยกเชื้อจากข้าวแดงตัวอย่าง A และ B บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถแยกเชื้อได้ 32 ไอโซเลต จากตัวอย่าง A 22 ไอโซเลต และจากตัวอย่าง B 10 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการทำ slide culture พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้น่าจะเป็นราในกลุ่ม Ascomycota เนื่องจากรามีการสร้างแอสโคคาร์ปและเส้นใยมีผนังกั้น (บุษบา, 2542)

เมื่อนำราที่คัดแยกได้จากข้าวแดงมาเลี้ยงในอาหารเหลวแบบเขย่า พบว่าราสามารถเจริญเติบโตและสร้างสารสีออกมาได้ โดยสารสีที่ราสร้างขึ้นนั้นจะอยู่ภายในเส้นใย ซึ่งต้องทำการสกัดสารสีนั้นออกมาด้วยเอทานอล ที่ระยะเวลาในการเลี้ยง 5 วัน เขย่าบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้เส้นใยของราเจริญและเกาะกลุ่มเป็นก้อน ซึ่งการเกาะกลุ่มเป็นก้อนสามารถทำให้เส้นใยเข้าสู่ระยะ stationary phase ได้เร็วขึ้น จึงมีการสร้างสารสีซึ่งจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ได้เร็วขึ้นเช่นกัน ซึ่งนับว่าเป็นข้อดีของการเลี้ยงในอาหารเหลวแบบเขย่า ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ราสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเหลว PDB โดยราที่สามารถเจริญเติบได้ดีที่สุดคือ A9 มีน้ำหนักเส้นใย 10.89 กรัม และเมื่อนำเส้นใยไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 % พบว่า A22 สามารถสร้างสารสีได้ดีที่สุด

การทดสอบความคงตัวของสารสีที่สกัดได้ต่ออุณหภูมิ 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พบว่าไอโซเลต A22 ให้ผลค่าความคงตัวสูงที่สุดจากทุกไอโซเลต รวมทั้งสีมาตรฐาน Wisdom red และ Carophyll red ที่ไม่คงตัวในอุณหภูมิต่าง ๆ ดังกล่าว

นอกจากนี้สารสีสกัดจากไอโซเลต A7 และ A22 ให้ผลความคงตัวต่อความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ ของ $NH_4Cl$ และ NaCl (% v/v) และต่อสภาวะที่รุนแรงต่าง ๆ ในขณะที่สารสีสกัดจาก อีก 4 ไอโซเลต ให้ค่าความคงตัวที่ลดลงเมื่อสภาวะต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น และสารสีมาตรฐานทั้งสองให้ผลความคงตัวที่น้อยกว่าที่ได้จาก A7 และ A22

ผลการทดสอบสารสีสกัดที่สภาวะต่าง ๆ ทั้งหมดนี้ พบว่าสารสีสกัดที่ได้จากราที่แยกได้จากข้าวแดงนั้น ให้ผลความคงตัวที่ดีกว่าสารสีมาตรฐานที่มีขายในท้องตลาด แสดงให้เห็นว่าสารสีสกัดที่ได้จากการเลี้ยงรานี้มีประสิทธิภาพในการพัฒนาการผลิตสารสีแดงต่อไปในระดับอุตสาหกรรม

## 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปี 2555 ทุนเพิ่มพูนความรู้ในต่างประเทศและทุนสนับสนุนการวิจัยนักวิจัยรุ่นใหม่ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2554

## 6. เอกสารอ้างอิง

Velmurugan, P., Hur, H., Balachandar, V., Kamala-Kannan, S., Lee, K.J., Lee, S.M., Chae, J.C., Shea, P.J. and Oh, B.T., 2011, *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate, J. Biosci. Bioeng. 112: 590-594.

Lee, B.K., Park, N.H., Piao, H.Y. and Chung, W.J., 2001, Production of red pigments by *Monascus purpureus* in submerged culture, Biotechnol. Bioprocess Eng. 6: 341-346.

Wongjewboot, I. and Kongruang, S., 2011, pH stability of ultrasonic Thai isolated *Monascus purpureus* pigments, Int. J. Biosci. Biochem. Bioinf. 1: 79-83.

บุษบา ยงสมิทธ์, 2542, จุลชีววิทยาการหมัก วิตามินและสารสี, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.