



อิทธิพลของสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีต่อการผลิตสารสีโดย *Monascus* sp. LC1

Effect of Culture Conditions on Pigment Production by *Monascus* sp. LC1

นฤมล อัสวเกษมณี*

พัชรี หลุ่งหม่าน* *

เสาวนิตย์ ชอบบุญ***

Naruemon Usawakesmanee

Patcharee Lungmann

Saowanit Chobbun

บทคัดย่อ

เชื้อราสกุล *Monascus* สามารถผลิตสารสีจากธรรมชาติตั้งแต่สีเหลืองถึงสีแดง เพื่อใช้เป็นสารให้สีสำหรับอาหารประเภทต่าง ๆ การศึกษาครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของกล้าเชื้อ อุณหภูมิการบ่มเชื้อ เวลาในการแช่ข้าว อุณหภูมิสำหรับการฆ่าเชื้อข้าว และเวลาสำหรับการฆ่าเชื้อข้าวต่อการผลิตสารสีแดงบนข้าว โดย *Monascus* sp. LC1 ในถุงพลาสติก โดยนำปัจจัยต่าง ๆ มาศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมด้วยการออกแบบสูตรวิธี Two-level factorial design พบว่า สูตรปัจจัยที่ 22 ประกอบด้วยกล้าเชื้อ 3 กรัม อุณหภูมิการบ่มเชื้อ 25 °C เวลาในการแช่ข้าว 120 นาที อุณหภูมิสำหรับการฆ่าเชื้อข้าว 80 °C และเวลาสำหรับการฆ่าเชื้อข้าว 15 นาที เป็นสูตรที่ *Monascus* sp. LC1 ผลิตสารสีแดงสูงสุด คือ 194 ± 9.89 ยูนิตต่อกรัม และให้สารสีแดงสูงกว่าสูตรดั้งเดิม 40.84 เท่า ส่วนค่าพีเอช มีแนวโน้มลดลงในข้าวทุกสูตร ซึ่งอยู่ในช่วง พีเอช 4.60 ถึง 5.94 ที่เวลาการบ่ม 14 วัน วิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และไนโตรเจนทั้งหมดของข้าวแดงสูตรที่ 22 คิดเป็น $11.26 \pm 5.7\%$, $6.0 \pm 0.7\%$, $81.08 \pm 7.6\%$, $1.8 \pm 0.8\%$ ตามลำดับ โปรตีนละลายน้ำ $81.12 \pm 4.7 \mu\text{g/ml}$ ปริมาณอะมิโลส 36 % ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มข้าวแดงที่มีอะมิโลสสูง ความชื้นในข้าวแดงโดยน้ำหนักเปียกและแห้ง คิดเป็น $41.5 \pm 0.5\%$ และ $0.33 \pm 0.2\%$ และ *Monascus* sp. LC1 ที่เจริญบนข้าวสามารถผลิตซีทรินิน 52.82 mg/Kg

คำสำคัญ: โมแนสคัส, สารสี, สภาวะการเพาะเลี้ยง, ข้าวแดง, ซีทรินิน

* รองศาสตราจารย์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

** อาจารย์ประจำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

*** อาจารย์ประจำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา



Abstract

Monascus spp. is a fungus that capable of producing natural yellow to red pigments for use as food colorants. The purpose of this study is to investigate the effects of starter, incubation temperature, rice-soaking time, rice-sterilization temperature and rice-sterilization time on red pigment production by *Monascus* sp. LC1 in plastic bags. The results shown that the recipe no. 22 with optimal factors of 3 g/L starter, incubated at 25°C, rice-soaking time for 120 min., rice-sterilization temperature at 80°C and rice-sterilization time for 15 minutes resulted in the highest red pigment yield of 194 ± 9.89 unit/g, which was 40.84 times higher than the original formula. The pH of all formulas showed decreasing trend with values in the range of 4.60 to 5.94 after 14 days incubation. The red rice produced from recipe no. 22 contained 11.26 ± 5.7 % protein, 6.0 ± 0.7 % lipids, 81.08 ± 7.6 % carbohydrate, 1.8 ± 0.8 % total nitrogen and 36% amylase, respectively. The insoluble protein was 81.12 ± 4.7 μ g/ml. Moisture of wet weight and ash of red rice were 41.5 ± 0.5 % and 0.33 ± 0.2 %, respectively. In addition, *Monascus* sp. LC1 produced 52.82 mg/Kg citrinin when grown on rice.

Keywords : *Monascus*, Pigment, Culture condition, Red rice, Citrinin

บทนำ

ข้าวแดงหรืออังคัก (Ang-kak) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการผลิตและใช้ประโยชน์มานานในประเทศจีนเพื่อใช้เป็นสีผสมอาหารและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Martinkova & Patakova, 1999, 1481-1487, อ้างโดย Abdulaziz et al., 2006, 167-174) นอกจากนี้ยังมีการใช้ข้าวแดงในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ซีสถั่วเหลืองแดง และเต้าหู้ยี้ เป็นต้น ในการผลิตข้าวแดงจะใช้รา *Monascus* spp. หรือเรียกว่าราข้าวแดง ซึ่งเป็นฟังไจจัดอยู่ในคลาสแอสโคไมซีต ค้นพบโดย Van Tieghem (1884) (อ้างโดย Abdulaziz et al., 2006, 167-174) ในระหว่างการผลิตข้าวแดงเส้นใยของรา *Monascus* spp. จะเจริญปกคลุมและซ่อนเข้าไปภายในเมล็ดธัญพืช ราชนิดนี้ผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิหลายชนิด

ได้แก่ รงควัตถุ คือ สารสีเหลือง (ankaflavin) และ monascin สารสีส้ม (monascorubrin และ rubropunctatin) สารสีแดง (monascorubramine และ rubropuctamine) (Wong & Koehler, 1981, 589-592, Blanc et al., 1994, 862-865) เอนไซม์หลายชนิด เช่น glucoamylase และ α -amylase เป็นต้น (Yoshizaki et al, 2010, 670-674) สารลดโคเลสเตอรอล (antihypercholesterolemic agents) (Wang et al., 2006, 812-818) สารทำให้ความดันโลหิตต่ำ (hypotensive agent) (Su et al., 2003, 394-399) สารแอนติออกซิแดนซ์ (Aniya et al, 999-1004) และสารต้านจุลชีพชนิดซิทรินิน (citrinin) (Pattanagul et al, 2008, 20-23) เป็นต้น และสำหรับในด้านเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสารสีแดงจะช่วยในการปรับปรุง



สีผิว เกิด การผลิตสารสีโดย *Monascus* spp. มีข้อได้เปรียบมากกว่ากลุ่มสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในแง่การเพาะเลี้ยงในรูปของ submerge state culture หรือ solid state culture ซึ่งควบคุมสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการผลิตได้ นอกจากนี้ยังสามารถเลือกแหล่งซัพพลายที่มีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น ข้าว มันสำปะหลัง ขนบึง เมล็ดข้าวโพด งานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงศึกษาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสี โดยออกแบบสูตรปัจจัยการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนข้าวหอมมะลิ ด้วยวิธี Two-level factorial design ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณซิทริ닌ในข้าวแดงสูตรที่เชื้อรา *Monascus* sp. ผลิตสารสีได้ปริมาณสูงที่สุด

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปัจจัยทางชีวภาพและทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีแดง ผลิตโดย *Monascus* sp. LC1 บนข้าวหอมมะลิ
2. ศึกษาค่าสารสีแดง ปริมาณอะมิโลสและซิทริ닌ของข้าวแดง

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การแยกและเตรียม *Monascus* sp. LC1
นำข้าวแดงที่จำหน่ายในร้านยาสมุนไพรมงจิ้น อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 1 กรัม วางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ด้วยวิธี aseptic technique บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 4 วัน นำเชื้อที่ได้ไปแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate technique บนอาหารเดิม และจำแนกชนิดโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีของ Cannon et al.

(1995) และเพาะเลี้ยงรา *Monascus* sp. LC1 บนอาหารแข็ง CM ที่อุณหภูมิ 30 °C บ่มเป็นเวลา 7 วัน นำมาเตรียมกล้าเชื้อราโดยทำ spore suspension ด้วยสารละลาย 0.1 % tween 80 ให้มีจำนวนสปอร์เท่ากับ $(1.0-2.0) \times 10^6$ cells/ml แล้วนำกล้าเชื้อราปริมาณ 2 มิลลิลิตร เติมน้ำในข้าวหอมมะลิ 100 กรัม บรรจุในพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งแช่น้ำ 90 นาที และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 14 วัน

2. การเตรียมข้าวสำหรับผลิตข้าวแดง

นำข้าวหอมมะลิ 100 กรัม (ตราฉัตรอุบล, CP Intertrade Co., Ltd) บรรจุในถุงโพลีเอทิลีน เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปิดปากถุงด้วยสำลี ตั้งทิ้งไว้ 90 นาที จากนั้นเทน้ำทิ้ง นำถุงข้าวไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 10 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำเชื้อรา 2 กรัม ลงในถุงข้าวที่เตรียมไว้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นานเป็นเวลา 14 วัน คลุกเคล้าข้าวทุกวัน

3. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดง โดยเชื้อรา *Monascus* sp. LC1 ด้วยวิธี Two-level factorial design

นำสภาวะการเพาะเลี้ยงราบนข้าว มาออกแบบสูตรปัจจัยด้วยวิธี two-level factorial design ที่ระดับของปัจจัย 2 ระดับ จากระดับสภาวะเดิม คือ ระดับสภาวะต่ำสุด (lower level) โดยกำหนดสัญลักษณ์ -1 และระดับสภาวะสูงสุด (upper level) โดยกำหนดสัญลักษณ์ +1 (ตารางที่ 1) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากตาราง เข้าโปรแกรม Design Expert DX 7 จะได้สูตรปัจจัยทั้งหมด 32 สูตร



ตารางที่ 1 การออกแบบสูตรปัจจัยการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนข้าว โดยวิธี Two-level factorial design

ตัวแปร (variables)	ลักษณะของปัจจัย (codes level, factors)			ปัจจัยในรูปแบบ ξ_i
	ξ_i	-1	+1	
A= น้ำหนักกล้าเชื้อรา	ξ_1	1	3	$A = (\xi_1 - 2)/1$
B= อุณหภูมิที่บ่ม	ξ_2	25	35	$B = (\xi_2 - 30)/5$
C= เวลาแช่ข้าว	ξ_3	60	120	$C = (\xi_3 - 90)/30$
D= อุณหภูมิฆ่าเชื้อข้าว	ξ_4	80	120	$D = (\xi_4 - 100)/20$
E= ระยะเวลาการฆ่าเชื้อข้าว	ξ_5	5	15	$E = (\xi_5 - 10)/5$

3. การศึกษาคุณสมบัติของข้าวแดงผลิต

โดย *Monascus sp.* LC1

3.1 คำสารสีแดงและฟิเอช ตามวิธีของ John & Stuart (1991)

3.2 ปริมาณอะมิโลส ตามวิธีของ Juliano (1984)

3.3 การวิเคราะห์สารซิทรีนิน ตามวิธีของ Ganrong et al. (2009)

3.4 การวิเคราะห์โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และไนโตรเจนทั้งหมด ความชื้น และเถ้าตามวิธีของ AOAC (1995)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการเตรียมหัวเชื้อ *Monascus spp.*

LC1 ในข้าวหอมมะลิ

เมื่อเพาะเลี้ยง *Monascus Sp.* LC1 บนอาหาร CM ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 วัน พบว่าเชื้อรา มีการเจริญอย่างช้า ๆ เส้นใยมีสีชมพูแดงและฟูเล็กน้อย และมีการปลดปล่อยรงควัตถุสีส้มแดงซึ่ง

เป็นรงควัตถุละลายน้ำได้ (water-soluble pigment) (Lin et al, 1992, 173-179) ออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 1 ก-ข) และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าภายในเส้นใยและแอสโคคาร์ปบางส่วนมีการสะสมของรงควัตถุสีส้มแดง(ภาพที่ 1ค-ง) เมื่อเติมสปอร์แขวนลอยของ *Monascus sp.* LC1 ลงในข้าวหอมมะลินึ่งฆ่าเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นานเป็นเวลา 14 วัน พบว่าในระยะเวลา 3 วันแรกของการบ่ม เมล็ดข้าวหอมมะลียังคงมีสีขาวขุ่นดั้งเดิม และมีเส้นใยเชื้อราสีขาวคลุมบริเวณทั่วทั้งผิวหน้า (ภาพที่ 1จ) หลังจากนั้นจะสังเกตเห็นว่าเมล็ดข้าวเริ่มมีสีชมพูแดง และสีจะเข้มขึ้นเรื่อย ๆ การคลุกเคล้าเมล็ดข้าวทุกวันจะช่วยให้ราเจริญเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วขึ้นและทำให้เส้นใยราขนานไปทั่วเมล็ดข้าว นอกจากนี้ยังทำให้เมล็ดข้าวไม่จับกันเป็นก้อน และเมื่อบ่มเป็นเวลานาน 7 วัน สังเกตพบว่าเมล็ดข้าวมีสีชมพูแดงทั่วทั้งถุง (ภาพที่ 1ค) เมื่อบ่มครบเวลา 14 วัน เมล็ดข้าวทั้งหมดในภาชนะมีสีแดงเข้ม (ภาพที่ 1ข) มีกลิ่นหอมของสารระเหยและแอลกอฮอล์ ซึ่งจาก



การศึกษาของ Patakova- -Jozlov et al. (1998) ด้วย GC-MS พบว่าเมื่อหมัก *Monascus purpureus* บนเมล็ดข้าว เราสามารถสร้างสารเมแทบอไลต์หอมระเหย (volatile metabolites compound) จำนวน 80 ชนิด ประกอบด้วยแอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ คีโตน เอสเทอร์ และเทอร์ปีนอยด์



จ



ก



ข



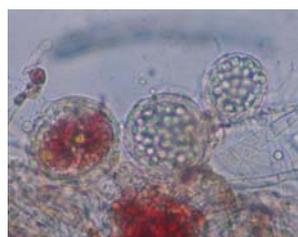
ข



ช



ค



ง

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของกล้าเชื้อรา

Monascus sp. LC1

ก.-ข. กล้าเชื้อ *Monascus* sp. LC1 บน

อาหาร CM

ค.-ง. ลักษณะของเส้นใยและแอสโคคาร์ปของกล้าเชื้อ

จ. ระยะเวลาการบ่มเชื้อบนข้าว 3 วัน

ฉ. ระยะเวลาการบ่มเชื้อบนข้าว 7 วัน

ช. ระยะเวลาการบ่มเชื้อบนข้าว 14 วัน



2. ผลการศึกษาสูตรปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสี โดยเชื้อรา *Monascus sp. LC1*

จากการศึกษาสูตรปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีแดงโดย *Monascus sp. LC1* บนข้าวหอมมะลิ จำนวน 32 สูตร (ตารางที่ 1) พบว่า *Monascus sp. LC1* สร้างสารสีแดงอยู่ในช่วง 0.328-194 ยูนิตต่อกรัม โดยสูตรปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารสีแดงประกอบด้วยกล้าเชื้อ 3 กรัม อุณหภูมิการบ่มเชื้อ 25 °C เวลาในการแช่ข้าว 120 นาที อุณหภูมิการฆ่าเชื้อข้าว 80 °C และเวลาการฆ่าเชื้อข้าว 15 นาที (สูตรที่ 22) ซึ่งหลังจากการบ่มเป็นเวลา 14 วัน ทำให้เมล็ดข้าวมีสีแดงเข้ม และเมื่อนำไปศึกษาชนิดของสารสี ที่ค่าดูดกลืนแสง 500 และ 400 นาโนเมตร พบว่ามีสารสีแดงสูงสุดเท่ากับ 194 ± 9.89 ยูนิตต่อกรัม โดยให้สารสีแดงสูงกว่าสูตรดั้งเดิม 40.84 เท่า (ภาพที่ 2ก) และสารสีเหลืองมีปริมาณ 183.5 ± 4.940 ยูนิตต่อกรัม จะเห็นได้ว่าหัวเชื้อปริมาณ 3 กรัม มีความเหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุในข้าวหอมมะลิ 100 กรัม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lee et al. (2002) พบว่าปริมาณของหัวเชื้อหรือกล้าเชื้อ (inoculums size) จะมีอิทธิพลต่อการสร้างสารสีแดง โดยหากหัวเชื้อมีปริมาณน้อยเกินไปจะทำให้เชื้อเจริญเติบโตช้า และทำให้มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ และหากหัวเชื้อมีปริมาณสูงเกินไปจะทำให้มีไบโอแมสมากเกินไป และส่งผลทำให้สารอาหารลดลง จึงทำให้สร้างรงควัตถุได้น้อยลง



ก



ข

ภาพที่ 2 สูตรปัจจัยการผลิตสารสี โดยเชื้อรา *Monascus sp. LC1*

ก. ข้าวแดง สูตรที่ 22 ประกอบด้วยกล้าเชื้อ 3 กรัม อุณหภูมิการบ่มเชื้อ 25 °C เวลาในการแช่ข้าว 120 นาที อุณหภูมิการฆ่าเชื้อข้าว 80 °C และเวลาการฆ่าเชื้อข้าว 15 นาที

ข. ข้าวแดงสูตรดั้งเดิมประกอบด้วยกล้าเชื้อ 2 กรัม อุณหภูมิการบ่มเชื้อ 30 °C เวลาในการแช่ข้าว 90 นาที อุณหภูมิการฆ่าเชื้อข้าว 100 °C และเวลาการฆ่าเชื้อข้าว 10 นาที



ตารางที่ 2 สูตรปัจจัยของการเพาะเลี้ยง *Monascus* sp. LC1 เพื่อผลิตสารสีและค่าฟิเอช

สูตรปัจจัย	ตัวแปร										ค่าสารสี (ยูนิตต่อกรัม) สีส้ม (OD ₅₀₀) ± SD	ฟิเอช ± SD
	A ^a	B ^a	C ^a	D ^a	E ^a	A ^b	B ^b	C ^b	D ^b	E ^b		
1	-	-	-	-	-	1	25	60	80	5	56.80 ± 4.38	4.83 ± 0.47
2	+	-	-	-	-	3	25	60	80	5	75.80 ± 5.93	4.87 ± 0.12
3	-	+	-	-	-	1	35	60	80	5	13.65 ± 0.07	5.03 ± 0.29
4	+	+	-	-	-	3	35	60	80	5	17.80 ± 0.56	5.28 ± 0.10
5	-	-	+	-	-	1	25	120	80	5	13.80 ± 1.97	5.49 ± 0.37
6	+	-	+	-	-	3	25	120	80	5	48.35 ± 0.35	5.20 ± 0.05
7	-	+	+	-	-	1	35	120	80	5	27.20 ± 0.14	4.90 ± 0.05
8	+	+	+	-	-	3	35	120	80	5	27.40 ± 4.24	5.15 ± 0.22
9	-	-	-	+	-	1	25	60	120	5	0.754 ± 0.002	5.75 ± 0.09
10	+	-	-	+	-	3	25	60	120	5	2.285 ± 0.007	5.54 ± 0.18
11	-	+	-	+	-	1	35	60	120	5	21.9 ± 0.424	5.11 ± 0.06
12	+	+	-	+	-	3	35	60	120	5	2.85 ± 0.622	5.15 ± 0.07
13	-	-	+	+	-	1	25	120	120	5	5.12 ± 1.1	5.85 ± 0.11
14	+	-	+	+	-	3	25	120	120	5	26.00 ± 0.56	5.53 ± 0.05
15	-	+	+	+	-	1	35	120	120	5	19.60 ± 0.98	4.92 ± 0.07
16	+	+	+	+	-	3	35	120	120	5	34.45 ± 3.18	4.93 ± 0.01
17	-	-	-	-	+	1	25	60	80	15	60.60 ± 4.24	4.94 ± 0.03
18	+	-	-	-	+	3	25	60	80	15	188.00 ± 15.55	4.60 ± 0.05



สูตร ปัจจัย	ตัวแปร										ค่าสารสี (ยูนิตต่อกรัม) สีส้ม (OD ₅₀₀) ± SD	พีเอช ± SD
	A ^a	B ^a	C ^a	D ^a	E ^a	A ^b	B ^b	C ^b	D ^b	E ^b		
19	-	+	-	-	+	1	35	60	80	15	14.75 ± 1.34	5.06 ± 0.04
20	+	+	-	-	+	3	35	60	80	15	24.60 ± 0.14	5.31 ± 0.005
21	-	-	+	-	+	1	25	120	80	15	119.00 ± 1.41	4.80 ± 0.08
22	+	-	+	-	+	3	25	120	80	15	194.00 ± 9.89	4.65 ± 0.005
23	-	+	+	-	+	1	35	120	80	15	14.65 ± 0.49	5.04 ± 0.02
24	+	+	+	-	+	3	35	120	80	15	28.60 ± 0.28	5.05 ± 0.04
25	-	-	-	+	+	1	25	60	120	15	0.328 ± 0.12	5.76 ± 0.14
26	+	-	-	+	+	3	25	60	120	15	2.85 ± 0.62	5.77 ± 0.08
27	-	+	-	+	+	1	35	60	120	15	28.75 ± 1.48	5.12 ± 0.04
28	+	+	-	+	+	3	35	60	120	15	27.25 ± 8.414	5.16 ± 0.07
29	-	-	+	+	+	1	25	120	120	15	3.615 ± 1.06	5.94 ± 0.06
30	+	-	+	+	+	3	25	120	120	15	14.85 ± 0.35	5.58 ± 0.02
31	-	+	+	+	+	1	35	120	120	15	16.25 ± 3.88	5.03 ± 0.06
32	+	+	+	+	+	3	35	120	120	15	32.15 ± 2.47	5.03 ± 0.005
สูตร ดั้งเดิม	0	0	0	0	0	2	30	90	100	10	46.80 ± 6.22	4.74 ± 0.16

หมายเหตุ : -1 แทน ความเข้มข้นของปัจจัยระดับต่ำสุด ; +1 แทน ความเข้มข้นของปัจจัยระดับสูงสุด ; 0 แทน ความเข้มข้นของปัจจัยในสูตรดั้งเดิม

a คือ Pseudo coded ; b คือ Real coded ; ตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ; ทำการทดลอง 2 ซ้ำ



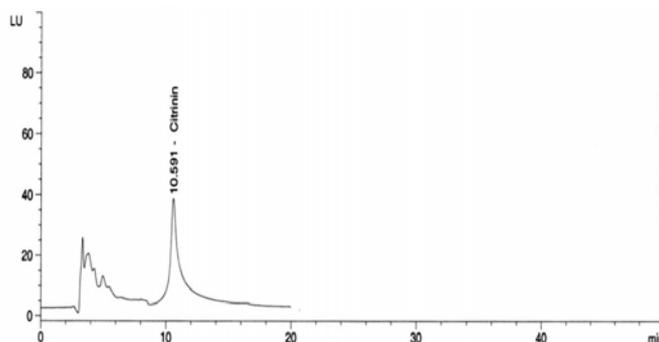
เมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตสารสีแดงบนข้าว พบว่าอุณหภูมิการบ่มเชื้อและอุณหภูมิสำหรับฆ่าเชื้อข้าว ที่อุณหภูมิต่ำสุด (lower level) 25 และ 80°C ทำให้ *Monascus* sp. LC1 ผลิตสารสีแดงเพิ่มจากสูตรเดิม (ตารางที่ 1 สูตรปัจจัยที่ 1 2 17 18 21 และ 22 ค่าสารสีแดง 56.80 ± 4.38, 75.80 ± 5.93, 60.60 ± 4.24, 188.00 ± 15.55, 119.00 ± 1.41 และ 194.00 ± 9.89 ยูนิต์ต่อกรัมตามลำดับ) ในทางกลับกันถ้าอุณหภูมิการบ่มเชื้อและอุณหภูมิสำหรับฆ่าเชื้อข้าว ระดับสูงสุด (upper level) 35 และ 120°C ทำให้การผลิตสารสีของเชื้อราลดลงจากสูตรเดิม (ตารางที่ 1 สูตรปัจจัยที่ 11 12 15 16 27 28 31 และ 32 ค่าสารสีแดง 21.9 ± 0.424, 2.85 ± 0.622, 19.60 ± 0.98, 34.45 ± 3.18, 28.75 ± 1.48, 27.25 ± 8.414, 16.25 ± 3.88 และ 32.15 ± 2.47 ตามลำดับ) ส่วนเวลาในการแช่ข้าวก่อนนำมาหมักกับเชื้อราเพื่อผลิตสารสีแดง ไม่มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

อุณหภูมิสำหรับการฆ่าเชื้อข้าวถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการผลิตสารสี โดยเชื้อรา *Monascus* sp. LC1 รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิการบ่มเชื้อ เวลาสำหรับการฆ่าเชื้อข้าว ปริมาณหัวเชื้อ และ

เวลาในการแช่ข้าว ตามลำดับ เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย (two-variables interaction) ระหว่างอุณหภูมิการบ่มเชื้อกับอุณหภูมิสำหรับการฆ่าเชื้อข้าว อุณหภูมิการบ่มเชื้อกับเวลาสำหรับการฆ่าเชื้อข้าว และอุณหภูมิสำหรับการฆ่าเชื้อข้าวกับเวลาสำหรับการฆ่าเชื้อข้าว มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัยอื่น ๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1. ผลการศึกษาคุณสมบัติของข้าวแดง

พีเอชของข้าวแดงทั้ง 32 สูตรอยู่ในช่วง 4.6-5.94 เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลในอาหารลดลง เฟอร์เร็นต์อะมิโลสอยู่ในช่วง 6.6-38.6 องค์ประกอบของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และไนโตรเจนทั้งหมด ในสูตรที่ผลิตสารสีสูงสุด (สูตรที่ 22) คิดเป็น 11.26 ± 5.7 %, 6.0 ± 0.7 %, 81.08 ± 7.6 %, 1.8 ± 0.8 % ตามลำดับ โปรตีนละลายน้ำ 81.12 ± 4.7 µg/ml ความชื้นโดยน้ำหนักเปียกและเถ้าคิดเป็น 41.5 ± 0.5 % และ 0.33 ± 0.2 % ปริมาณซิทรีนิน 52.82 mg/Kg (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 กราฟการวิเคราะห์ซิทรีนินโดย HPLC ของข้าวแดง ผลิตโดยเชื้อรา *Monascus* sp. LC1



สรุปผลการวิจัย

เชื้อราสกุล *Monascus* สามารถผลิตสารสีจากธรรมชาติตั้งแต่สีเหลืองถึงสีแดง เพื่อใช้เป็นสารให้สีสำหรับอาหารประเภทต่าง ๆ โดยสูตรปัจจัยที่ 22 ประกอบด้วยกล้าเชื้อ 3 กรัม อุณหภูมิการบ่มเชื้อ 25 °C เวลาในการแช่ข้าว 120 นาที อุณหภูมิสำหรับการฆ่าเชื้อข้าว 80 °C และเวลาสำหรับการฆ่าเชื้อข้าว 15 นาที เป็นสูตรที่ *Monascus* sp. LC1 ผลิตสารสีแดงสูงสุด คือ 194 ± 9.89 ยูนิต์ต่อกรัม และให้สารสีแดงสูงกว่าสูตรดั้งเดิม 40.84 เท่า ส่วนค่าพีเอชมีแนวโน้มลดลงในข้าวทุกสูตร ซึ่งอยู่ในช่วง พีเอช 4.60 ถึง 5.94 ที่เวลาการบ่ม 14 วัน วิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ในโตรเจนทั้งหมดของข้าวแดงสูตรที่ 22 คิดเป็น $11.26 \pm 5.7 \%$, $6.0 \pm 0.7 \%$, $81.08 \pm 7.6 \%$, $1.8 \pm 0.8 \%$ ตามลำดับ โปรตีนละลายน้ำ 81.12 ± 4.7 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาณอะมิโลส 36 % ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มข้าวแดงที่มีอะมิโลสสูง ความชื้นในข้าวแดงโดยน้ำหนักเปียกและแห้ง คิดเป็น $41.5 \pm 0.5 \%$ และ $0.33 \pm 0.2 \%$ และ *Monascus* sp. LC1 ที่เจริญบนข้าวสามารถผลิตซิทรินิน 52.82 mg/Kg

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี พ.ศ. 2552

เอกสารอ้างอิง

Abdulaziz, Q.M., Al-sarrani, & Moustafa, Y.M.El-Naggar. (2006). Application of Plackett-Burman factorial design to improve citrinin production in

Monascus ruber batch cultures. **Botanical Studies.** 47, 167-174.

Aniya, Y, Ohtani I. I., Higa, T., Miyagi, C., Gibo, H., Shimabukuro, M., Nakanishi, H., & Taira, J. (2000). Dimerumic acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. **Free Radical Biology & Medicine.** 28(6), 999–1004.

AOAC. (1995). **Association of official analytical chemists** (16thed). Virginia, USA: AOAC. Inc.

Blanc, P.J., Loret, M.O., Santerre, A.T., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J.C., Laussac, J. P., & Goma, G. (1994). Pigment of *Monascus*. **J. Food Sci.** 59, 862-865.

Cannon, P.F., Abdullah, S.K., & Abbas, B.A. (1995). Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to know species of the genus. **Mycological Research.** 99, 659-662.

Ganrong X. , Yue C. Yun C., Xiaorong L. & Xing L. (2009). **Production of Monacolin K in solid-state Fermentation of *Monascus* sp. 9901 that does not produce citrinin.** Retrieved 2009, November 4, from http://platpro.doae.go.th/worldfermentedfood/P16_xu.pdf.

Johns, M.R. & Stuart, D.M. (1991). Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. **Journal of Industrial Microbiology.** 8, 23-28.



- Juliano. (1984). **Rich starch : Production, properties and used. In.R.L. Whistler, J.N. Bemiller and E.F. Paschall (2 nd ed.). Starch chemistry and technology.** Orlands, FL: Academic press, 507-529.
- Lee,B.K., Piao, H. Y., & Chung, W.J. (2002). Production of red pigments by *Monascus purpureus* in solid-stateculture. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** (7), 21-25.
- Lin, T. F., Yakushijin, K. , Büchi, G. H. & Demain, A. L. (1992). Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic processes. **J. Ind. Microbial Biotechnol.** 9, 173-179 .
- Martinkova, L. & Patakova, P. (1999). *Monascus*. In R.K.Robinson, C.A. Batt, & P.D. Patel (Eds.), **Encyclopedia of food Microbiology** (pp.1481-1487). London : Academic Press.
- Patakova-Jozlov, P., Ezanka, T. & Vden, I. (1998). Identification of Volatile Metabolites from Rice Fermented by the Fungus *Monascus purpureus* (Ang-kak). **Folia Microbiol.** 43 (4), 407-410.
- Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A. & Tharatha , S. (2008) Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. **Inter. J. Food Microbiol.** 126, 20–23.
- Su, Y.C., Wang, J.J., Lin, T.T., & Pan, T.M. (2003). Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus* sp. **Acta Microbiol. Sin.** 40, 394-399.
- Van Tieghem, P. (1884). *Monascus*, genre nouveau de l'ordre des Ascomycetes. **Bull. Soc. Bot.** 31, 226-231.
- Wang, J.J., Pan, T.M., Shieh, M.J. & Hsu, C.C. (2006). Effect of red mold rice supplement on serum and meat cholesterol levels of broilers chicken. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 71, 812-818.
- Wong, H.C. & Koehler, P.E. (1981). Production and isolation of and antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. **J. Food Sci.** 46, 589-592.
- Yoshizaki, Y., Susuki, T., Takamine, K.i , Tamaki, H. , Ito, K. & Sameshima, Y. (2010). Characterization of glucoamylase and α -amylase from *Monascus anka*: Enhanced production of α -amylase in red koji. **J Biosci Bioeng.** 110(6), 670-674 .