การชักนำให้เกิดมิวเตชันในรา MONASCUS PURPUREUS ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

579.565
ว285ก

การชักนำให้เกิดมิวเตชันในรา *Monascus purpureus* ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

Mutation Induction in *Monascus purpureus* by ultraviolet radiation

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

25 ต.ค. 2543

I19025919

การชักนำให้เกิดมิวเตชันในรา *Monascus purpureus* ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

Mutation Induction in *Monascus purpureus* by ultraviolet radiation

รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Monascus purpureus* สามสายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสองสูตร คือ yeast extract malt (YM) และ yeast extract malt + cassava srarch (YMC) พบว่าเชื้อราทั้งสามสายพันธุ์นี้มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และจากการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารสีแดงของเชื้อราทั้งสามสายพันธุ์พบว่า สายพันธุ์ที่ 1 สามารถสร้างสารสีแดงได้มากกว่าสายพันธุ์ที่ 3 ส่วนสายพันธุ์ที่ 2 ไม่สามารถสร้างสารสีแดงได้เลยในสภาวะแวดล้อมที่เลี้ยง ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกันในอาหารเหลวทั้งสองสูตร และสายพันธุ์ที่ 1 ซึ่งสร้างสารสีแดงมากที่สุดในอาหารเหลวสูตร YMC มากกว่าในอาหารสูตร YM และพบว่าเชื้อราที่สร้างสารสีแดงทั้ง 2 สายพันธุ์สร้างสารสีแดงในอาหารเหลวสูตร YMC ได้สูงกว่าในสูตร YM

การชักนำให้เกิดมิวเตชันในเชื้อรา *Monascus purpureus* สายพันธุ์ 1 โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ช่วงเวลาต่าง ๆ คือ 0 นาที, 2 นาที, 3 นาที, 5 นาที, 10 นาที, 15 นาที, 20 นาที, 30 นาที และ 60 นาที สามารถแยกเชื้อรา Mutant ได้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ คือ CU21 และ CU22 แยกได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ช่วงเวลา 2 นาที CU31 แยกได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ช่วงเวลา 3 นาที CU51 แยกได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ช่วงเวลา 5 นาที และ CU101 แยกได้จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ช่วงเวลา 10 นาที ซึ่ง Mutant ทั้งหมดที่ได้ มีการสร้างคลิสโททีเซียหนาแน่นขึ้น สีเข้มขึ้น แต่มีการสร้างโคนิเดียน้อยลง เส้นใยมีลักษณะยาวเล็ก นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อรา Mutant CU21, CU22, CU31, CU51 และ CU101 มีการเจริญเพิ่มขึ้น มีการผลิตสารสีแดงและสารสีเหลืองเพิ่มขึ้นโดยการวัดค่า optical density ของสารสีแดงและสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 500 และ 400 นาโนเมตร ตามลำดับ ยกเว้นเชื้อรา Mutant CU21 ที่มีการผลิตสารสีแดงและสารสีเหลืองลดลง

บทนำ

การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติและเกิดจากการชักนำให้เกิดขึ้นโดยการใช้รังสีหรือสารเคมี มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจีโนไทป์ (Genotype) และอาจได้สิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะดีขึ้นหรือเลวลง ในปัจจุบันกระบวนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ดังนั้นจึงได้มีการนำกระบวนการกลายพันธุ์มาใช้ปรับ

ปรุงพันธุ์จุลินทรีย์ เพื่อวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน เช่น การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *Aspergillus niger* เพื่อให้มีการสร้างเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสเพิ่มมากขึ้น (Navalainen, 1981)

ในอุตสาหกรรมอาหารได้มีการใช้สีผสมอาหารกันอย่างแพร่หลาย เพื่อตกแต่งสีสันของอาหารให้ชวนรับประทาน เช่น อุตสาหกรรมขนมหวานต่าง ๆ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ฯลฯ ในปัจจุบันผู้บริโภคได้หันมานิยมสีที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น เพราะมีความปลอดภัยสูงกว่าสารสีที่ได้จากสารเคมี สารสีที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ สารสีที่ได้จากพืชหรือจุลินทรีย์ สารสีที่ได้จากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าสีที่ได้จากพืชในแง่ของปริมาณการผลิต ซึ่งสามารถที่จะปรับปรุงการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสีได้มากกว่า โดยไม่ต้องใช้เนื้อที่ในการเพาะเลี้ยงมาก เนื่องจากเจริญได้รวดเร็ว และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโดยชักนำให้เพิ่มการสร้างสารสีด้วยวิธีทางพันธุกรรมได้ง่าย (กังสดาร ศรแก้ว, 2538) เช่น การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนโดยวิธีการกลายพันธุ์ เพื่อให้มีการผลิตสีเพิ่มขึ้น (สุภาพร, 2531) หรือการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี (NTG) ได้ Mutant ของเชื้อรา *Monascus sp.* F-2 ในสภาพ Solid Culture พบว่า Mutant ที่ได้มีความสามารถในการสร้าง Pigment สีแดงและสีเหลืองเพิ่มขึ้น (Lin and Iizuka, 1982)

Monascus sp. เป็นเชื้อราที่มีการศึกษากันมาก มีความสามารถผลิตสารสีที่นำมาใช้เป็นสีผสมอาหารได้ และมีความปลอดภัย นอกจากนี้แล้วสารสีที่ผลิตขึ้นบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญ หรือเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย (บุษบา ยงสมิทธ์, 2540)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา *Monascus purpureus* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารสี โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

วัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างสารสีแดงจากเชื้อรา *Monascus purpureus* 3 สายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุด
2. ชักนำให้เกิดมิวเตชันในสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สายพันธุ์กลายที่อาจจะมีคุณสมบัติใหม่ๆในการผลิตสารสีอื่นๆ
2. ได้สายพันธุ์กลายที่อาจจะมีคุณสมบัติในการผลิตสารสีแดงสูงกว่าเดิม

วิธีการวิจัย

1. ทดสอบความสามารถในการผลิตสารสีแดงของเชื้อ *Monascus purpureus* 3 สายพันธุ์
2. คัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดเพื่อชักนำให้เกิดมิวเตชัน
3. ชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยกระบวนการใช้รังสี
4. ทดสอบคุณสมบัติของสายพันธุ์ที่เกิดมิวเตชัน

ตรวจเอกสาร

การจัดจำแนกของเชื้อรา *Monascus* sp.

เชื้อรา *Monascus* sp. สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (Alexpoulos and Mins, 1979)

Class	Ascomycetese
Subclass	Plectomycetidae
Oder	Eurotiales
Genus	Monascus

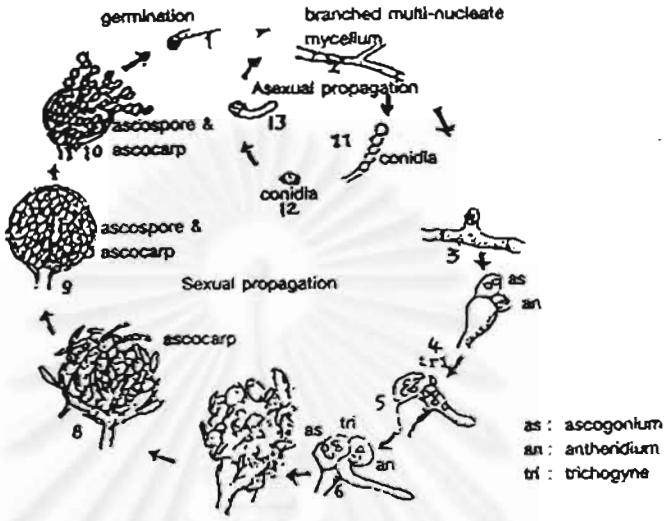
ลักษณะและรูปร่างของเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อรา *Monascus* spp. มีเส้นใยที่มีผนังกั้น (Septate) และแตกกิ่งก้านสาขามากมาย มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (Sexual) และไม่มีเพศ (Asexual) มักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วง

การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ (Asexual Reproduction) มีการสร้างโคนิเดีย (Conidia) เจริญมาจากโคนิดิโอฟอร์ (Conidiophore) โคนิเดียมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ อาจมียันเดียวหรือติดต่อกันเป็นลูกโซ่ โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นจะเกิดสีแดงได้บ้าง โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้น 0-1 ถ้ามีขนาดยาวจะมีผนังกั้น 2-6 เป็นสายตรงหรือขดเป็นเกลียว และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออายุมากขึ้น การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร เช่น C medium เหมาะสมสำหรับการเกิดโคนิเดียของโมแนสคัส (Hiroi et al., 1979) นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับอิทธิพลหลาย ๆ ประการ เช่น อายุสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง แสงและอุณหภูมิ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปโคนิเดียมักจะงอกภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมด้วยการสร้าง Germ-tube ขึ้นมา 1 อัน หรือ 2 อัน หรือบางทีอาจมีได้มากกว่า 6 อัน

ส่วนการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (Sexual Reproduction) ของเชื้อราโมแนสคัส คล้ายกับเชื้อราอื่นใน Class Ascomycetes มีการสร้างเพอริทีเซียม (Perithecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (Ascocarp) มีรูปร่างกลมและจะเกิดบนก้าน (Stalk) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (Homothallic) โดยการสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิดคือ แอนเทอริเดียม (Antheridium) และแอสโคโกเนียม (Ascogonium) เกิดการฟิวชั่น (Fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วจึงแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Meiosis) และไมโตซิส (Mitosis) มี Daughter Nuclei จากการแบ่งตัวมีการขยายผนังเซลล์รวมออก สร้างเป็นแอสโคคาร์ปที่เรียกว่า เพอริทีเซียม ซึ่งภายในมีแอสโคสปอร์ (Ascospores) มากมาย โดยแอสโคสปอร์จำนวน 2-8 รวมอยู่ภายในแอสคัส (Ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง

สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์งอกเป็นเส้นใหม่ขึ้น วงจรชีวิตของเชื้อรานี้แสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัส

ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส

Monascus purpureus เป็นเชื้อราที่พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1884 Van Tieghem (Carels and Shepherd (1975) อ้างโดย กมลวรรณ (2539)) แบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยา และความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ *Monascus pilosus., Monascus purpureus., Monascus ruber* (Hawksworth and Pitt, 1983) และ *Monascus floridanas* (Barmard and Cannon, 1987) และสามารถเจริญได้ดีในอาหารแข็งข้าวแดงเพื่อใช้ปรุงแต่งสีไวน์ เต้าหู้ยี้ ใช้ถนอมอาหารประเภทเนื้อ ใช้รักษาโรค รวมทั้งเป็นสีผสมในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ต่อมาได้ผลิตเป็นการค้าในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน และจีน

Monascus barkari ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ที่รู้จักกันดีในประเทศจีนว่า Samau ต่อมาเริ่มมีการทดลองเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส ในอาหารเหลวในปี 1973 โดย Lin ได้แยกเชื้อราจากข้าวแดงจากประเทศต่างๆ ในแถบเอเชียใต้ และพบว่าเชื้อราเหล่านี้สร้างสีในอาหารเหลวได้เช่นกัน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต่อมาได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อให้ประสิทธิภาพในการสร้างสารสีเพิ่มขึ้น โดยใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (Mutagen) หรือใช้รังสีต่างๆ (Hiroi et al., 1979; Su and Huang, 1980; Yongsmith et al., 1990)

ประวัติการใช้เชื้อรา *Monascus sp.*

การใช้เชื้อรา *Monascus sp* ในอาหารและเครื่องยาพื้นบ้านในประเทศตะวันออกมีมานานแล้วเป็นเวลาหลายร้อยปี มีการใช้ชื่อสกุลโมแนสคัส (Monascus) มานานกว่าร้อยปีแล้วในยุโรปและในอินโดนีเซีย แต่สำหรับชาวตะวันตกเองสปีชีต่าง ๆ ในเชื่อราโมแนสคัสกลับเป็นที่รู้จักกันในฐานะเชื้อราปะปนในธัญพืช, แป้ง, ไซเลจ และสารอื่น ๆ เชื้อรานี้สามารถเจริญบนข้าวนึ่งเมื่อม่มที่อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมโดยย่อยข้าวจนข้าวนุ่ม และขณะเดียวกันก็สร้างสีแดงเพิ่มขึ้น ข้าวแดงมีชื่อเรียกต่างๆ กันมากมาย คือ ข้าวแดง (Red Rice) ข้าวแดงจากจีน (Chinese Red Rice) อังคัก (Ang-kak) แอนแคก (Ankak) แองคา (Anka) อังคเวค (Aangquac) เบนนิ-โคจิ (Beni-koji) และ อกา-โคจิ (Aka-koji)

การผลิตข้าวแดงมีกันมานานแล้วในประเทศจีน และได้ลองแยกเชื้อที่ได้จากประเทศจีนจนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่ให้สีแดงคือ *Monascus purpureus* ต่อมาได้มีการทดลองใช้เชื้อข้าวแดงทำการปรับปรุงจนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพพอควร โดยใช้เชื้อราแดง และสับสเตรท (Substrate) ที่เหมาะสม ภายหลังได้มีการสนใจที่จะศึกษาสายพันธุ์ราที่เหมาะสมสำหรับใช้ในสภาพหมักเปียก (Submerged C ulture) ต่อมามีผู้ประสบผลสำเร็จในการผลิตสีในอาหารเหลว

เมแทบอไลต์ประเภทต่าง ๆ จากเชื้อราโมแนสคัส

การศึกษาต่อๆ มาได้พบสารเมแทบอไลต์ (Metabolite) หลายๆ ชนิดที่น่าสนใจ และมีค่าทางเศรษฐศาสตร์จากเชื้อราโมแนสคัส (บุษบา,2540) ดังต่อไปนี้

ก. เอนไซม์ (Enzyme)
- กลูโคอะมิเลส (Glucoamylase)
- โปรตีเอส (protease)
- แอลฟา-กาแลกโตซิเดส
- แอลฟา- อะมิเลส

ข. เมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolites)
- เอทิลออลกอฮอล์
- กรดอินทรีย์
- เอสเทอร์
- สารให้กลิ่นหอม (methyl ketones)

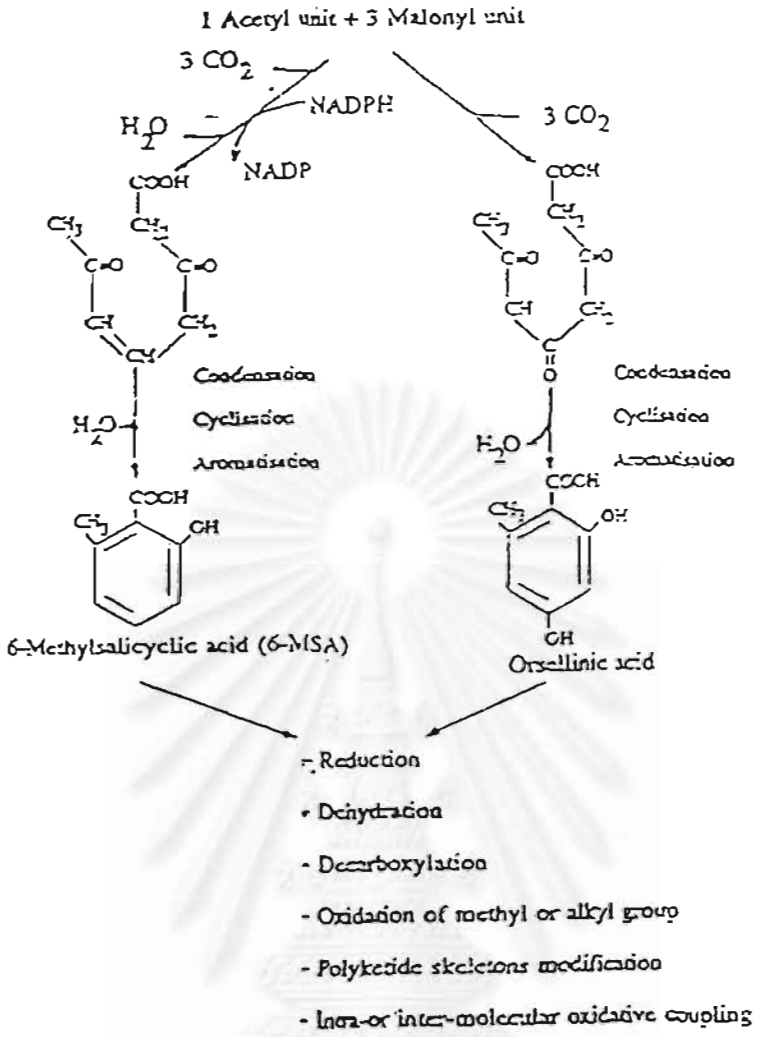
ค. เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites)

- สารสี (แดง, เหลือง, ส้ม)
- สารปฏิชีวนะ
- สารลดคอเลสเทอรอล
- สารตกตะกอน (flocculants)
- ยาลดความดันโลหิต (antihypertensives)
- วิตามินบี 2
- สารยาพื้นบ้านของจีนรักษาโรคอาหารไม่ย่อย, โรคบิด, กล้ามเนื้อฟกช้ำ
- คูมาริน (coumarin) รักษาโรคด่างขาว
- สารถนอมอาหารประเภทเนื้อ
- โคเอนไซม์ Q_{10}

สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส

สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสเป็นสารประเภท Polyketide ที่เกิดจากการรวมตัว (Condensation) ของ Acetyl unit 1 หน่วย กับ Malonyl unit 3 หน่วยขึ้นไป ได้เป็น Primer หรือ Starter และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา การสังเคราะห์สาร Polyketide นั้นสายของ Polyketide จะยาวขึ้นตามจำนวนของคาร์บอน 2 หน่วยที่มาจาก Malonyl unit ที่ถูกเติมเข้าไปในสาย Primer เกิดเป็น Triketide Pentaketide และ Polyketide ตามลำดับ ต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยา Cyclisation และ Aromatisation ได้เป็นสาร 6-Methylsalicylic acid หรือ Orsellinic acid ซึ่งเป็นสาร Tetraketide เริ่มต้นที่จะนำไปสู่การสังเคราะห์สาร Polyketide อื่น ๆ ต่อไป เมื่อได้สารเริ่มต้นแล้วปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อไปขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ เช่น อาจมีการเติมหรือดึงออกซิเจนออกจากโครงสร้างของสาร เกิดปฏิกิริยา Decarboxylation หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงร่างหรือโยกย้ายหมู่ต่าง ๆ ภายในโมเลกุลของสารเกิด Intra- หรือ Inter-molecular oxidative Coupling ทำให้เกิดพันธะระหว่าง C-C หรือ C=O เป็นต้น (บุษกร, 2538 อ้างโดย กมลวรรณ, 2539) ดังแสดงใน รูปที่ 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 การเกิด 6-MSA และ orsellinic จาก Acetyl และ Aalonyl unit

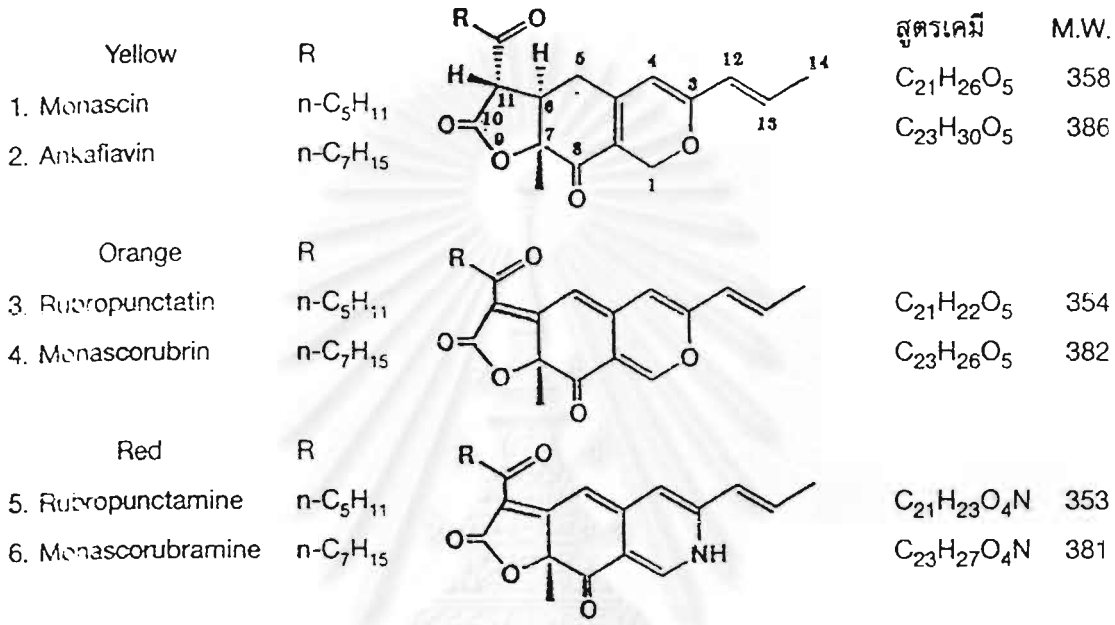
สารสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

สารมีสีของเชื้อราโมแนสคัส ประกอบด้วย องค์ประกอบสารอย่างน้อย 6 ชนิดด้วยกัน เช่น *Monascorubrin* และ *Rubopunctatin* ถือว่าเป็นตัวเริ่มต้นของชีวสังเคราะห์ ขณะที่สารสีเหลืองหรือ Monascin และ Ankaflavin และสารสีแดงของ Rubropunctamine จะได้มาจากสีส้มอีกที

โดยสารเหล่านี้เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ที่เชื้อราสร้างขึ้นพร้อม ๆ กับการเจริญ หรือ สร้างหลังจากการเจริญหยุดลงแล้ว มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม Azaphilones เช่น Sclerotiorin และ Rotiorin

เมื่อนำเส้นใยที่ได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus rubropunctarus* ในอาหารเหลว Czapek dox อายุ 14-20 วัน มาสกัดด้วย Light petroleum และ Ether จะได้สารสีส้มของ Rubropunctatin ($C_{21}H_{22}O_5$) และสารสีเหลืองของ Monascin ($C_{21}H_{26}O_6$) สารสีส้ม Mubropunctatin ละลายในสารอินทรีย์เกือบทุกชนิดแต่ไม่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 N ที่

อุณหภูมิต่ำ และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายแอมโมเนียจะได้สารสีม่วงของ Rubropuentamine ($C_{21}H_{23}O_4N$) ที่ละลายในแอลกอฮอล์ได้ดีในสภาวะเป็นด่าง แต่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ในสภาวะเป็นกรด และไม่ละลายในน้ำ เมื่อนำมาทำให้เกิดการรีดักชั่นด้วยผงสังกะสีจะได้สารไม่มีสีของ Aporubropunctamine (อ้างตามบุษกร, 2538)



<u>รูปที่ 3</u> แสดงโครงสร้างของรงควัตถุหรือ pigment ที่แยกได้จาก *Monascus* spp.

สารสี Rubropunctatin พบครั้งแรกใน *Monascus rubropuentatus* โดย Sato ซึ่งแยกมาจาก *Monascus purpureus* (Carels, 1977) พบว่าถ้ามีแอมโมเนียมไนเตรท ในปริมาณ 5-10 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อสร้างสารสีค่อนข้างแดง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนเตรทมากขึ้นสารสีแดงจะเพิ่มขึ้น ยกเว้นการเพิ่มในปริมาณมาก ๆ ที่จะไปยับยั้งการสร้างสีแดง

มิวเตชัน (Mutation)

มิวเตชั่น (Mutation) หมายถึงการเปลี่ยนแปลงอย่างกระทันหันของสารพันธุกรรม ซึ่งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของหน่วยควบคุมลักษณะ (Gene) จากอัลลีลหนึ่งไปเป็นอีกอัลลีลหนึ่ง หรือการขาดหาย (Deletion) หรือการเพิ่มขึ้นมา (Duplication) ของส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซม และสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นมีจีโนไทป์ (Genotype) เปลี่ยนแปลงไป สามารถทดสอบได้ในระดับโมเลกุล

ผลของสารมิวทาเจน *เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสาร Mutagen เข้าไป อาจก่อให้เกิดลักษณะ* 3 ชนิด คือ

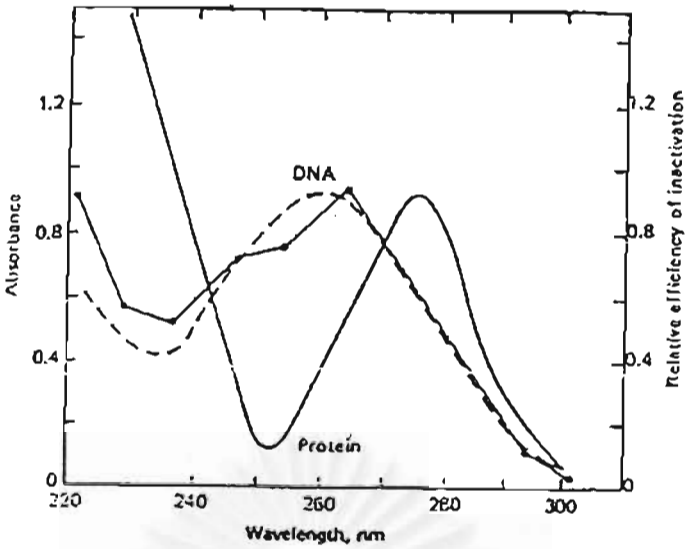
- *Physiological damage (Primary injury)*
- Factor mutation (point mutation หรือ Gene mutation)
- *Chromosome mutation (Chromosome aberration)*

Factor mutation และ Chromosome mutation สามารถถ่ายทอดลักษณะจากพ่อแม่ไปยังลูกหลานชั่วต่างๆ ได้ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ ส่วน Physiological damage จะเกิดขึ้นและแสดงในรุ่นพ่อแม่เท่านั้น ในแบบของ Factor mutation ถ้าไม่สามารถเห็นได้ในรุ่นพ่อแม่ แต่ถ้ามี tester หรือ haploid gamete ซึ่งกลายพันธุ์ไปแล้วก็สามารถทดสอบได้

ผลของมิวเตชั่นทั้ง 3 ชนิดขึ้นกับอัตราของสาร Mutagen ทำการทดลองใช้ physiological และ Chemical mutation พบว่ารังสีแกมม่าจะมีผลในเชิงการลดการอยู่รอด และการเจริญมากกว่า mutagen อื่น ๆ เมื่ออัตราการใช้ Mutagen สูง และการใช้ปริมาณรังสีสูง จะทำอันตรายให้กับโครโมโซม ส่วนรังสีอัลตราไวโอเลต มีผลทำให้เกิด Chromosome mutation น้อย และทำให้เกิด Genetic variation การมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตนั้นจะมีผลทำให้ได้ลักษณะใหม่ที่ดีขึ้นหรือเลวลงก็ได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการค้นคว้า และศึกษาการกลายพันธุ์ด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว และวงชีวิตสั้น ทำให้ระยะเวลาสั้นมากขึ้น

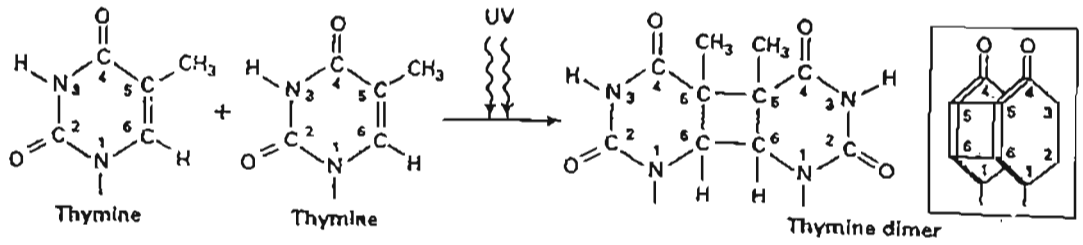
รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และมิวเตชัน

รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นรังสีที่มีพลังงานไม่เพียงพอที่จะชักนำให้เกิดกระบวนการ Ionization ได้แต่พบว่าเบส Purine และ Pyrimidine สามารถดูดกลืนรังสีชนิดนี้ได้ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การดูดกลืนรังสี UV ของดีเอนเอ

เนื่องจากรังสีนี้มีพลังงานต่ำจึงสามารถทะลุผ่านเนื้อเยื่อบาง ๆ ได้ โดยปกติสามารผ่านได้เพียงผิวเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง อย่างไรก็ตามรังสีอัลตราไวโอเลต ก็นับเป็น Mutagen สำหรับสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเซลล์เดียว ดีเอนเอมีการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลต สูงสุดที่ความยาวคลื่น 254 nm. พบว่าการเกิดมิวเตชันจากรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นปฏิภาคโดยตรงกับการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตของเบส Purine และเบส Pyrimidine ผลที่เกิดขึ้นจากรังสีอัลตราไวโอเลต มี 2 ประการคือ ทำให้เกิด Pyrimidine hydrate และ Pyrimidine dimer แต่ต่อมามีการชี้ให้เห็นว่าการเกิด Thymine dimer เป็นผลหลักของการเกิดมิวเตชันจากรังสีอัลตราไวโอเลต



รูปที่ 5 การเกิด thymine dimer ชักนำโดยรังสี UV เกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างเบส thymine 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันทำให้ดีเอนเอมีรูปร่างผิดปกติแบบ distortion ขึ้น

ผลของรังสีต่อดีเอนเอ คือทำให้เกิดพันธะเคมีที่ผิดปกติระหว่างเบส Purine ที่อยู่ข้างเดียวกันในสายดีเอนเอ หรือระหว่างเบส Purine ตรงข้ามกันของสายดีเอนเอ ผลส่วนมากเกิดขึ้นกับ Thymine บนสายเดียวกันหรือตรงกันข้ามกันของดีเอนเอ อาจเกิดเป็น Thymine dimer เป็นต้น การเกิดพันธะที่ผิดปกติเช่นนี้มีผลกระทบต่อการจับคู่ปกติของ Thymine กับเบส Adenineในสายดีเอนเอตรงข้ามกัน สายดีเอนเออาจเกิดเป็น Loop และทำให้พันธะคู่เบส T=A ในสายตรงข้ามอ่อนตัวลง

การเกิด Thymine dimer เป็นสาเหตุให้เกิดมิวเตชันเนื่องจาก

1. การเกิด Dimer เป็นเหตุให้เกิดการชะงักของกระบวนการจำลองตัวเอง
2. มีโอกาสเกิดความผิดพลาดขึ้นขณะที่มีการ Repair ของดีเอนเอ

ความสัมพันธ์ของอัตราการเกิดมิวเตชันและปริมาณของรังสีอัลตราไวโอเลต ขึ้นอยู่กับชนิดของมิวเตชัน สิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม พบว่าจำนวน Mutant ของแบคทีเรีย *E. coli* ที่เกิดจากการชักนำโดยรังสีอัลตราไวโอเลตสามารถลดลงโดยการให้แสง Visible light ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการ Repair แบบ Photoreaction

รังสีอัลตราไวโอเลตเป็นรังสีที่มีความสำคัญต่อการชักนำให้เกิดมิวเตชัน แต่มีความรุนแรงน้อยกว่ารังสีเอกซ์ เนื่องจากรังสีนี้มีความยาวคลื่นยาวจึงมีพลังงานน้อย รังสีอัลตราไวโอเลต ไม่สามารถทะลุทะลวงเนื้อเยื่อได้ดีเช่นเดียวกับรังสีเอกซ์ แต่มีความสำคัญคือเบส Purine และ Pyrimidine สามารถดูดกลืนรังสีนี้ได้ดี เบส Thymine และ Cytosine เมื่อได้รับรังสีนี้แล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเกิดมิวเตชันขึ้นในที่สุด เช่นเกิด Thymine dimer ทำให้สายดีเอนเอมีรูปร่างที่ผิดปกติและไปกีดขวางการจำลองตัวเอง ความสัมพันธุ์ระหว่างปริมาณของรังสีอัลตราไวโอเลต และการเกิดมิวเตชันไม่ได้เป็นลักษณะเส้นตรง ดังที่เกิดขึ้นกับรังสีเอกซ์ หลักฐานการศึกษาหลาย ๆ ตัวอย่าง ชี้ให้เห็นว่าผลของรังสีอัลตราไวโอเลตต่อการเกิดมิวเตชัน ไม่ได้เกิดขึ้นโดยตรงแต่เป็นผลขั้นแรก และอาจมีผลต่อเอนไซม์ในเซลล์จนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอนเอ

รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอนเอในขณะที่เกิดการจำลองตัวเอง กล่าวคืออาจเกิดความผิดพลาดขึ้นระหว่างที่มีการนำเบสเข้าสู่ดีเอนเอ เนื่องจากการเกิด Dimer ของเบสไปกีดขวางการจำลองตัวเอง ในการศึกษามิวเตชันที่เกิดขึ้นจากรังสีอัลตราไวโอเลตในไวรัส Bacteriophage พบว่าการเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่เกิดมิวเตชันจากเบส Cytosine ไปเป็น Thymine เมื่อนำเอา mutant นี้ไปรับรังสีอัลตราไวโอเลต ปรากฏว่าสามารถกลับกลายเป็น Wild type ได้

ถึงแม้ว่ารังสีเอกซ์เป็น Mutagen ชนิดแรกที่ค้นพบ ตั้งแต่ปี 1920 แต่ข้อมูลของผลกระทบจากรังสีเอกซ์ มีน้อยกว่ารังสีรังสีอัลตราไวโอเลต เนื่องจากรังสีอัลตราไวโอเลต ศึกษาได้ง่ายกว่า จากการศึกษาร่วมกันระหว่างวิธีการทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ ทำให้เข้า

ใจถึงผลของรังสี อัลตราไวโอเลต ต่อกระบวนการทางเอนไซม์ตลอดจนกระบวนการ repair ได้เป็นอย่างดี พบว่ารังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 nm. สามารถใช้ฆ่าเชื้อได้ คุณสมบัติของรังสีอัลตราไวโอเลต คือเป็นรังสีที่มีความยาวคลื่นสูงและมีพลังงานต่ำทำให้สามารถผ่านของแข็งได้ไม่ดีเท่ากับพวกที่มีพลังงานสูง หรือความยาวคลื่นสั้น เช่น รังสีเอกซ์ และรังสี Ionizing ดังนั้นรังสีอัลตราไวโอเลต จึงมีประสิทธิภาพสำหรับผิวเซลล์บาง ๆ หรือเซ m(1Uล์ที่อยู่กระจาย รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถชักนำให้เกิดความเสียหายของเซลล์ได้มากมาย แต่ที่รู้จักกันดีคือ " Pyrimidine dimer" ของดีเอนเอ กล่าวคือมี Pyrimidine base ในสายดีเอนเอเดียวกัน และอยู่ใกล้ชิดกันแล้วสร้างพันธะระหว่างคาร์บอน-คาร์บอน ของเบสที่ติดกัน การเกิด Thymine-thymine dimer สามารถเขียนเป็น T-T เกิดขึ้นได้ง่ายกว่า Cytosine-ctosine หรือ Thymine-cytosine dimer การเกิด Dimerization ทำให้พันธะไฮโดรเจนอ่อนตัวลงและอาจทำให้เกิดการขาดออกจากกันจนเป็น Cross-linkage ระหว่างเบสที่ติดกันบนสายดีเอนเอเดียวกัน สาเหตุใหญ่ของการเกิด lethal effect เนื่องจากการได้รับรังสี UV เกิดจากการที่ดีเอนเอไม่สามารถจำลองตัวเอง ภายหลังจากการเกิด Dimerization ระหว่างเบสบนสายดีเอนเอเดียวกันนั่นเอง (วรวุฒิ, 2541)

Hiroi และคณะ (1979) ได้ทดลองใช้แสงอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา *Monascus anka* โดยคัดเลือก mutant ที่สามารถสร้าง Pigment เพิ่มขึ้นในสภาพ Submerged culture พบว่า Mutant ที่ได้สามารถสร้าง Pigment เพิ่มขึ้น 4-7 เท่า

Sekine และคณะ (1969) ได้ทดลองการใช้รังสีเอกซ์ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Aspergillus sojae* . K.S. เพื่อคัดเลือก mutant ที่ให้โปรตีเอสเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นมากกว่า 2 เท่า ของสายพันธุ์พ่อแม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการศึกษา

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อจุลินทรีย์

   เชื้อรา *Monascus purpureus* 3 สายพันธุ์

2. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

   2.1 ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

   2.2 เครื่องเขย่า (Shaker)

   2.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

   2.4 ตู้อบฆ่าเชื้อ

   2.5 เครื่องชั่งแบบหยาบ

   2.6 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง

   2.7 ตู้ปลอดเชื้อ

   2.8 ไมโครเวฟ (Microwave)

   2.9 Hot plate-stirrer

   2.10 เครื่องแก้ว

   2.11 กระดาษกรอง

3. สารเคมี

   3.1 Sucrose

   3.2 KH_2PO_4

   3.3 $MgSO_4 . 7H_2O$

   3.4 $NaNO_3$

   3.5 KCl

   3.6 $FeSO_4 . 7H_2O$

   3.7 Yeast extract

   3.8 Casien hydrolysate

   3.9 Agar

   3.10 Glucose

   3.11 Peptone

   3.12 Malt extract

   3.13 Ethanol

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาหารเลี้ยงเชื้อ

C medium, Yaest Malt extract Agar (YMA) และ Yeast Malt extract Borth (YMB) รายละเอียดดูที่ภาคผนวก

วิธีการศึกษา

เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างสารสีแดงจากเชื้อรา *Monascus purpureus* 3 สายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุด

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เก็บรักษาเชื้อ ใช้อาหารวุ้นเอียงสูตรอาหาร YM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพิ่มจำนวนของเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ ใช้อาหารแข็ง YM ซึ่งมีการใส่แป้งมันสำปะหลังผสมลงไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน
3. อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ YMC ใช้เลี้ยงเชื้อราเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน
4. อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ YM ใช้เลี้ยงเชื้อราเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน
5. อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YMCใช้เลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์
6. อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YM ใช้เลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์

การศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเตชันในสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยการใช้รังสี โดยรังสีอัลตราไวโอเลต

1. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อรา *Monascus purpureus* 1

1.1 เลี้ยงเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 ในอาหารสูตร YMB เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ

1.2 เลี้ยงเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 ในหลอดอาหารที่มีอาหารแข็งสูตร YM เก็บเป็น stock

2. ขั้นตอนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

2.1 นำ *Monascus purpureus* 1 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร C medium ในหลอดเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน เติมน้ำ 10 ml. ขูดเชื้อตรงผิวหน้าอาหารเพื่อให้สปอร์หลุด

2.2 นำน้ำที่มีสปอร์อยู่ที่ได้จากข้อ 2.1 มากรองผ่านสำลีที่สะอาด (Cotton filter) พวกเส้นใยจะติดอยู่บนสำลี ส่วนสารละลายที่กรองได้จะมีสปอร์ ได้เป็น Spore suspension

2.3 นำสปอร์ที่ได้จากข้อ 2.2 แบ่งใส่หลอดทดลอง 2 หลอด หลอดละ 5 ml. เติมน้ำกลั่นใส่แต่ละหลอดให้ครบ 10 ml. นำไปใส่จานเลี้ยงเชื้อโดยไม่ปิดฝา นำไปฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยให้ห่างจากแหล่งกำเนิดแสงเป็นระยะทาง 40 เซนติเมตร เป็นเวลา 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ

2.4 นำ 100 µl. ของ spore suspension ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้จากข้อ 2.3 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YMA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.5 เลือกโคโลนีที่มีสีแดงเข้ม มีเส้นผ่าศูนย์กลางกว้าง เพื่อนำไปทำการศึกษาต่อไป

3. ขั้นตอนการวิเคราะห์การสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1. และ Mutant ที่ได้

3.1 ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YMA เป็นเวลา 7 วัน โดยตัดบริเวณรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เซนติเมตร ย้ายไปเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวสูตร YMB ปริมาณ 50 ml. เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยเลี้ยงบน Shaker ทำเช่นเดียวกันนี้กับ Mutant ที่ได้

3.2 นำเชื้อที่ได้เติม 95 % Ethanol ปริมาณ 200 ml. แล้วนำไปหมุนบน Shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อสกัด Pigment

3.3 นำสารที่ได้กรองผ่านกระดาษกรอง นำสารละลายที่กรองได้ไปวัดค่า Optical density ของสารสีแดงและสีเหลือง ที่ความยาวคลื่น 500 และ 400 นาโนเมตร ตามลำดับ ส่วนเส้นใยที่ติดอยู่บนกระดาษกรองนำไปชั่งน้ำหนักแห้งเพื่อวัดการเจริญต่อไป

4.ขั้นตอนการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ mutant

4.1 1 ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YMA เป็นเวลา 7 วัน โดยตัดบริเวณรอบนอกของโคโลนีที่มีการเจริญดีด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เซนติเมตร ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YMA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำเช่นเดียวกันนี้กับ Mutant ที่ได้

4.2 ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีในหน่วยเซนติเมตรทุกวัน บันทึกผลที่ได้

5. ขั้นตอนการศึกษาการสร้างสปอร์ และเส้นใยของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ Mutant

5.1 เขี่ยเส้นใยของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ mutant ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YMA เป็นเวลา 7 วัน วางบนสไลด์แล้วปิดทับด้วย Cover glass

5.2 ศึกษาลักษณะของ สปอร์ และลักษณะของ เส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X บันทึกลักษณะผลการศึกษา

ผลการทดลอง

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Monascus sp.* 3 สายพันธุ์

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Monascus sp.* 1 บนอาหารแข็ง YM และ YMC

	0	2	4	6	8	10	12
YM	0.40	2.10	3.45	4.81	6.13	6.64	7.00
YMC	0.40	1.91	3.15	4.34	5.51	6.40	7.00

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Monascus sp.* 2 บนอาหารแข็ง YM และ YMC

	0	2	4	6	8	10	12
YM	0.40	1.94	3.00	4.25	5.34	6.54	7.25
YMC	0.40	2.10	3.16	4.33	5.38	6.56	7.55

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Monascus sp.* 3 บนอาหารแข็ง YM และ YMC

	0	2	4	6	8	10	12
YM	0.40	2.31	3.65	4.95	6.25	7.20	7.46
YMC	0.40	2.19	3.33	4.56	5.98	7.25	7.78

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Monascus sp.* 3 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง YM

	0	2	4	6	8	10	12
Monascus sp. 1	0.40	2.10	3.45	4.81	6.13	6.64	7.00
Monascus sp. 2	0.40	1.94	3.00	4.25	5.34	6.54	7.25
Monascus sp. 3	0.40	2.31	3.65	4.95	6.25	7.20	7.46

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Monascus sp.* 3 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง YMC

	0	2	4	6	8	10	12
Monascus sp. 1	0.40	1.91	3.15	4.34	5.51	6.40	7.00
Monascus sp. 2	0.40	2.10	3.16	4.33	5.38	6.56	7.55
Monascus sp. 3	0.40	2.19	3.33	4.56	5.98	7.25	7.78

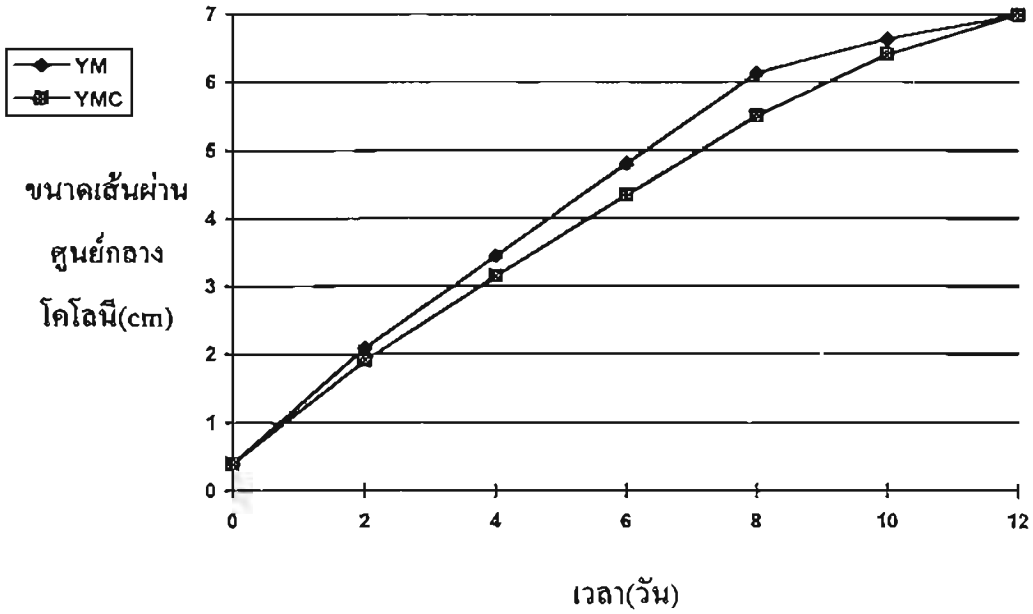
หมายเหตุ : everage from 3 replications

YM : อาหารสูตร YM

YMC : อาหารสูตร YM ผสม cassava strach

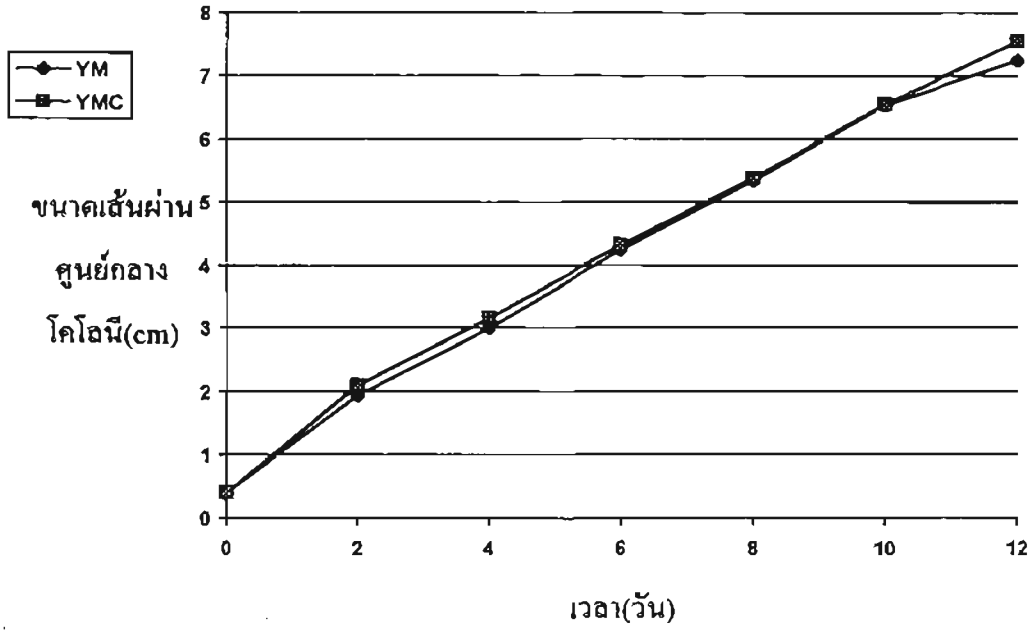
กราฟที่ 1 แสดงการเจริญเติบโตของ *Monascus sp* . 1

บนอาหารแข็ง YM และ YMC ในเวลา 12 วัน

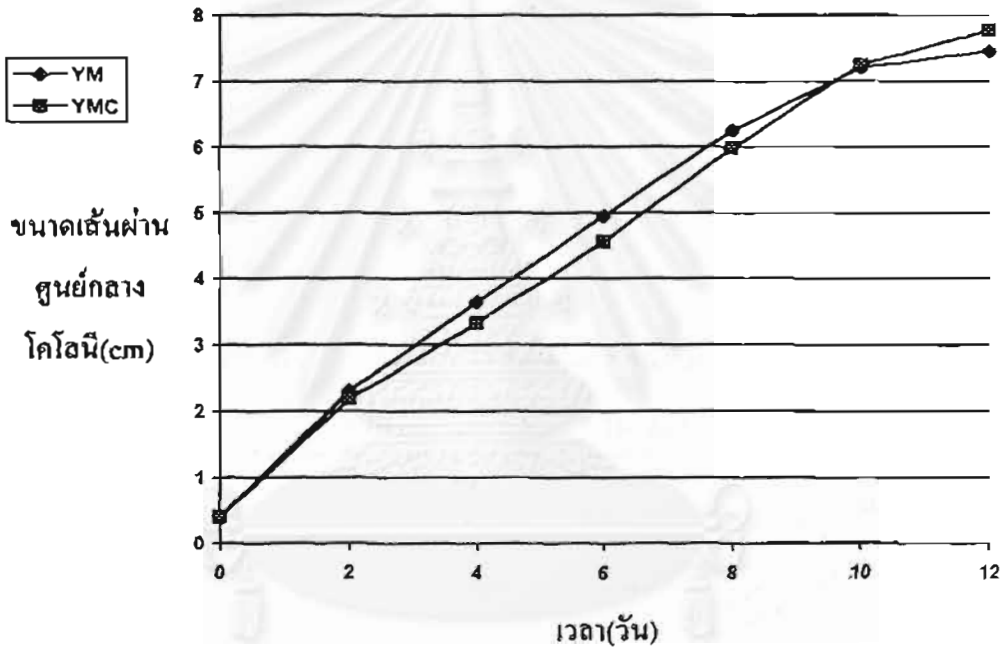


กราฟที่ 2 แสดงการเจริญเติบโตของ *Monascus sp* . 2

บนอาหารแข็ง YM และ YMC ในเวลา 12 วัน

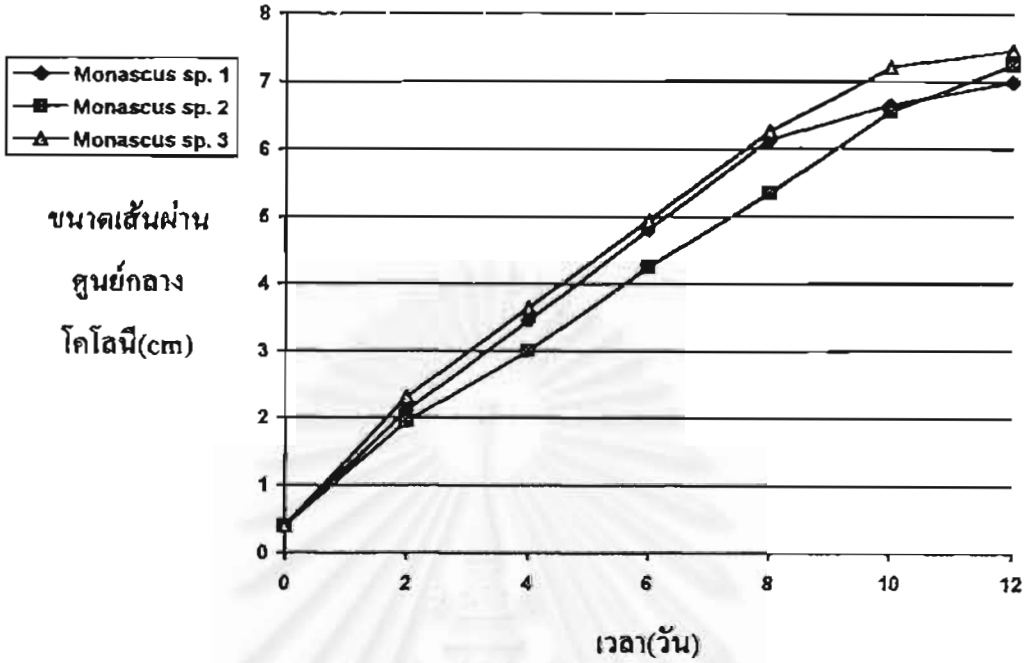


กราฟที่ 3 แสดงการเจริญเติบโตของ *Monascus sp* . 3 บนอาหารแข็ง YM และ YMC ในเวลา 12 วัน



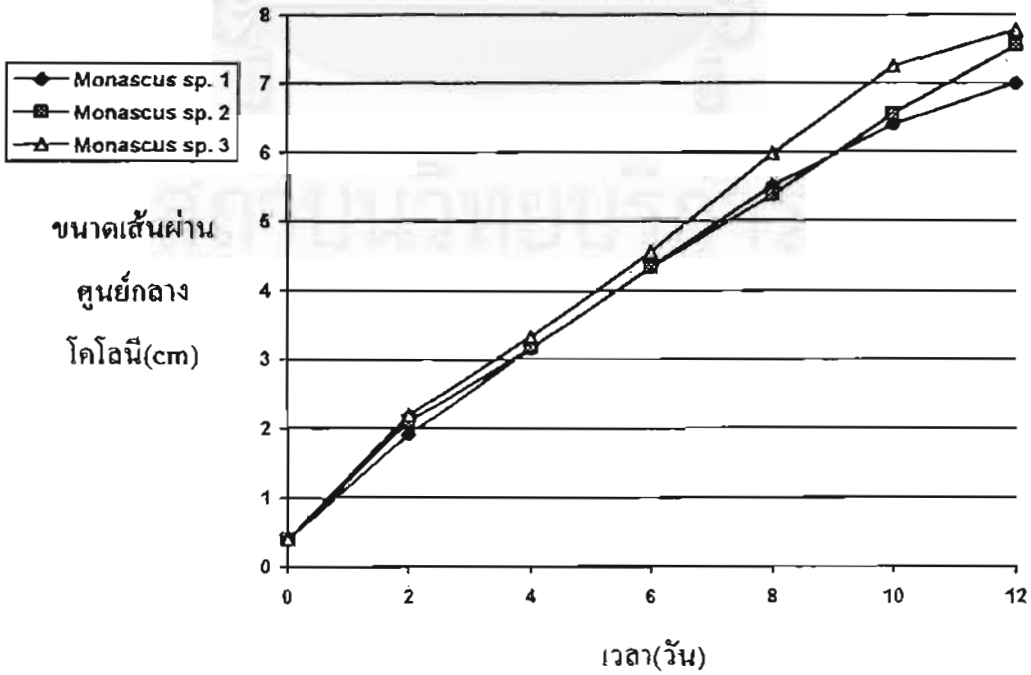
กราฟที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของ *Monascus sp* . 3 สายพันธุ์

บนอาหารแข็ง YM ในเวลา 12 วัน



กราฟที่ 5 แสดงการเจริญเติบโตของ *Monascus sp.* 3 สายพันธุ์

บนอาหารแข็ง YMC ในเวลา 12 วัน



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่า Optical density ของสารสีแดงและสารสีเหลือง ที่ความยาวคลื่น 500 และ 400 และน้ำหนักแห้งระหว่างเชื้อรา *Monascus purpureus* 3 สายพันธุ์

strain	Optical density		น้ำหนักแห้ง (g/50ml.)
	สารสีแดง (OD 500)	สารสีเหลือง (OD 400)	
M. purpureus 1	YM 0.552	1.466	0.0704
	YMC 0.213	4.169	
M. purpureus 2	YM 0.020	0.073	0.0495
	YMC 0.064	0.096	
M. purpureus 3	YM 0.511	0.471	0.1300
	YMC 0.095	2.997	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง

<u>สรุปผลการทดลอง ส่วนที่ 1</u>

ความสามารถในการสร้างสารสีแดงจากเชื้อรา *Monascus purpureus* 3 สายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุด

การเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบขนาดโคโลนีของ *Monascus purpureus* 3 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง YM และ YMC พบว่ามีความแตกต่างกันน้อยมาก ดังนั้นแป้งมันสำปะหลังที่เติมลงไปไม่น่าจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและจากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Monascus purpureus* 3 สายพันธุ์บนอาหารแข็งสูตรอาหารเดียวกัน พบว่า *Monascus purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความสามารถในการเจริญเติบโตเท่าๆกัน หลังจากเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการสร้างสารสีแดงนั้นเป็นแบบ extracellular คือ สร้างขึ้นแล้วปล่อยออกนอกเซลล์ เมื่อทำการวัดค่า OD ที่ 400 และ 500 นาโนเมตร พบว่า *Monascus purpureus* สายพันธุ์ที่ 2 ไม่สร้างสารให้สี ส่วน *Monascus purpureus* สายพันธุ์ที่ 1 และ 3 ในอาหารเหลวสูตร YM มีการสร้างสารสีแดงน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวสูตร YMC แสดงว่า แป้งมันสำปะหลังที่เติมลงไป น่าจะเป็นสารที่ช่วยสนับสนุนให้มีการสร้างสารสีแดงมากขึ้น

สมมุติฐานว่าแป้งจะถูกย่อยให้เป็นกลูโคส เข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซีส (glycolysis) และ Kreb's cycle ทำให้มีปริมาณของ acetly unit และ malonyl unit สูงขึ้น ซึ่งทั้งสองเป็นสารตั้งต้นของการเกิดสารให้สีแดง ซึ่งเป็น polyketide ชนิดหนึ่ง

ดังนั้นการเติม cassava starch ลงไปในอาหารเหลวก็จะเป็นการเพิ่ม carbon sousce ให้กับการสร้างสารให้สี โดยพบว่า *Monascus purpureus* สายพันธุ์ที่ 1 มีความสามารถในการสร้างสารให้สีแดงมากกว่า *Monascus purpureus* สายพันธุ์ที่ 3

ผลการทดลองส่วนที่ 2

การชักนำให้เกิดมิวเตชัน (Mutation) ของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนโคโลนีที่ได้จาก Spore suspension ที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตบนอาหารแข็งสูตร YMA ที่เวลา 2 นาที, 3 นาที, 5 นาที, 10 นาที, 15 นาที, 20 นาที, 30 นาที และ 60 นาที

เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีต่อ petridish				
	1	2	3	4	เฉลี่ย
0	27	29	30	34	30
2	1	2	-	-	0.75
3	2	-	-	-	0.5
5	1	2	-	-	0.75
10	1	-	-	-	0.25-
15	-	-	-	-	0
20	-	-	-	-	0
23	-	-	-	-	0
60	-	-	-	-	0

หมายเหตุ เชื้อรา *Monascus purpureus* 1 แทนด้วย CU1

จากตารางจะเห็นว่าจากการชักนำให้เกิดมิวเตชันของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 สามารถแยกเชื้อรา mutant ได้ดังนี้

เวลา 2 นาที ได้เชื้อรา Mutant ที่แตกต่างกัน 2 สายพันธุ์ คือ

CU21 โคโลนีมีสีแดงม่วง

CU22 โคโลนีมีสีแดงเลือดหมูเข้ม

เวลา 3 นาที ได้เชื้อรา Mutant 1 สายพันธุ์

CU31 โคโลนีมีสีแดงเข้ม

เวลา 5 นาที ได้เชื้อรา Mutant 1 สายพันธุ์

CU51 โคโลนีสีแดงเข้ม

เวลา 10 นาที ได้เชื้อรา Mutant 1 สายพันธุ์

CU101 โคโลนีสีแดง

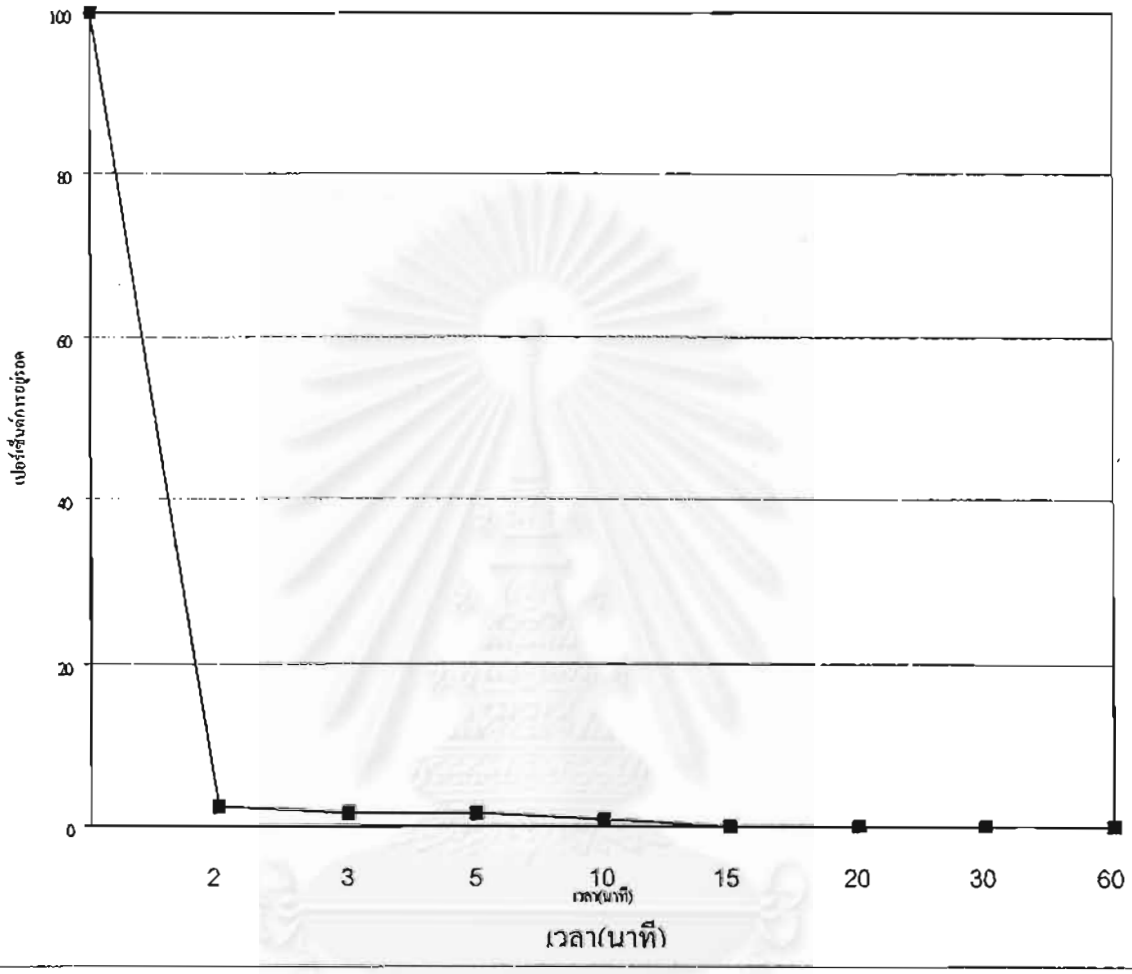
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนที่เวลา 15 นาที, 30 นาที และ 5-60 นาที ไม่พบการเจริญของเชื้อรา

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (Survival) ระหว่างเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ Mutant

เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีที่เจริญ	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด
0	30	100
2	0.75	2.5
3	0.5	1.7
5	0.5	1.7
10	0.25	0.8
15	0	0
20	0	0
30	0	0
60	0	0

กราฟที่ 6 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 ที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ



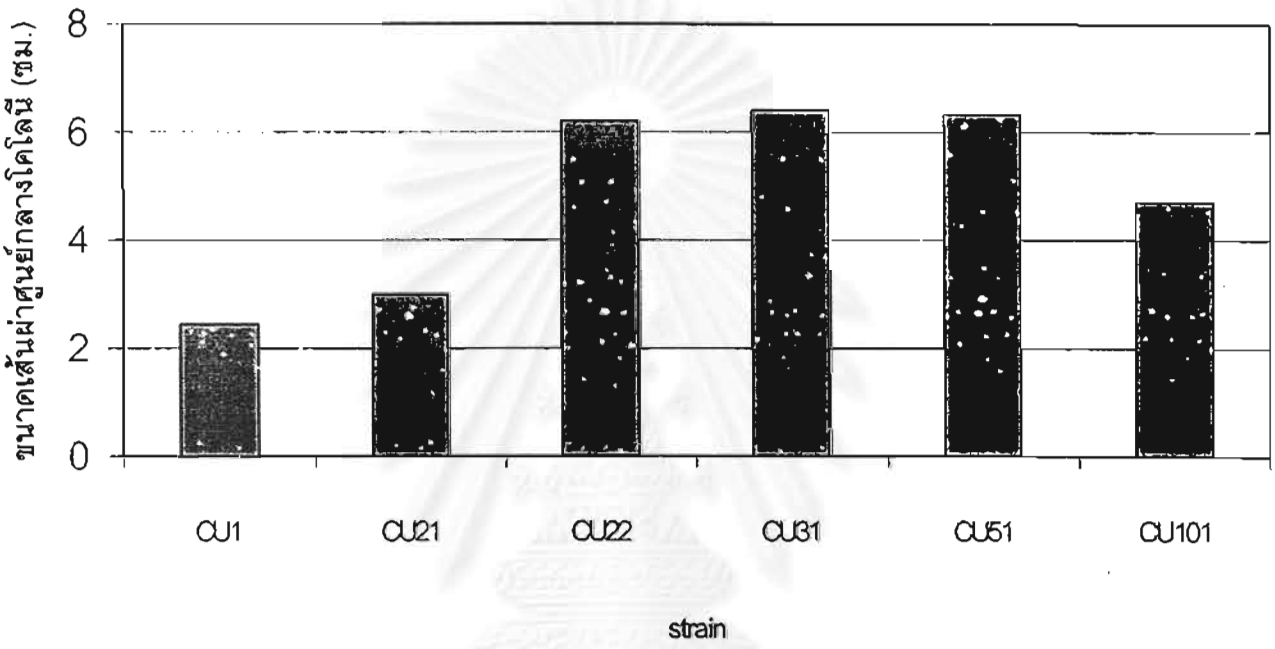
การศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ Mutant ที่ได้ บนอาหารแข็งสูตร YMA ที่เวลา 12 วัน

<u>ตารางที่ 9</u> เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ mutant ที่ได้ บนอาหารแข็งสูตร YMA ที่เวลา 12 วัน โดยวัดความกว้างของโคโลนีในหน่วยของเซนติเมตร

strain	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่เวลา 12 วัน			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
CU1	2.5	2.5	2.3	2.43
CU21	3.0	3.2	2.8	3.00
CU22	6.0	6.1	6.5	6.20
CU31	6.5	6.1	6.6	6.40
CU51	6.1	6.3	6.6	6.33
CU101	4.9	4.8	4.4	4.70

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3090 และ Mutant โดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) ที่เวลา 12 วัน



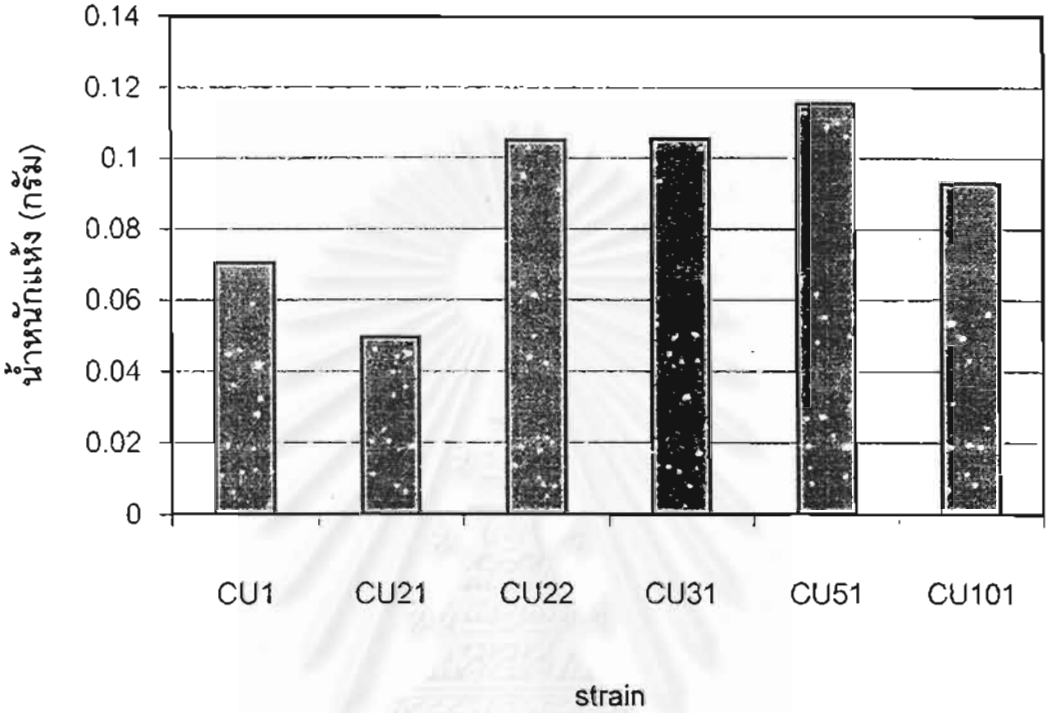
การเจริญของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ Mutant ที่ได้ โดยการวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YMB เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ Mutant ที่ได้ โดยการวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใย ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YMB เป็นเวลา 7 วัน

Strain	น้ำหนักแห้ง			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
CU1	0.0700	0.0710	0.0702	0.0704
CU21	0.0488	0.0506	0.0491	0.0495
CU22	0.1049	0.1059	0.1040	0.1049
CU31	0.1062	0.1053	0.1046	0.1054
CU51	0.1161	0.1152	0.1148	0.1154
CU101	0.0918	0.0938	0.0927	0.0928

จากตารางจะเห็นว่าเชื้อรา CU51 มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุด และเชื้อรา CU21 มีน้ำหนักแห้งต่ำสุด

กราฟที่ 8 เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งระหว่างเชื้อรา *Monascus purpureus* และ Mutant



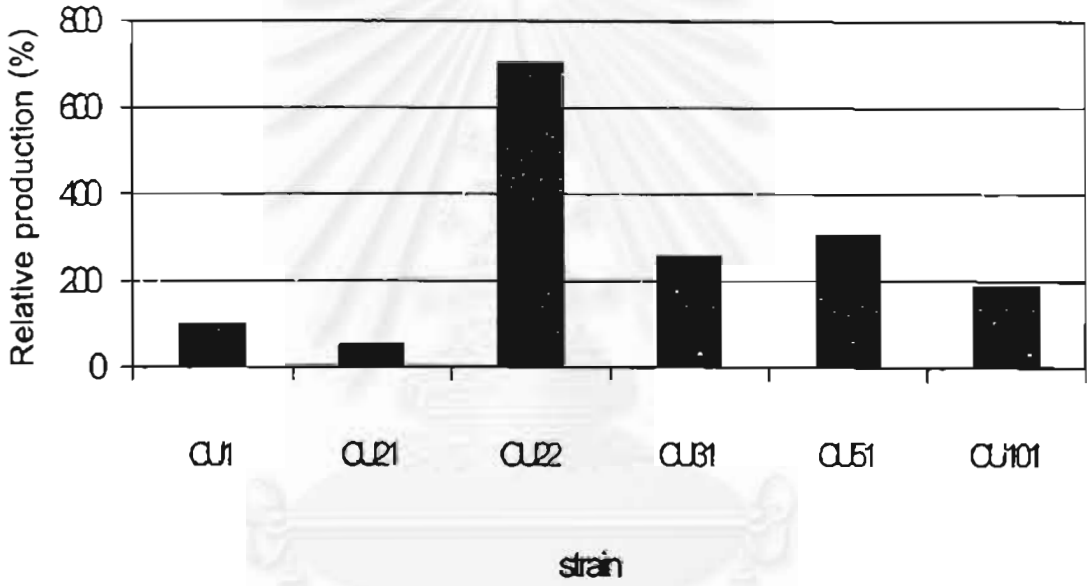
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสร้าง pigment ของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ Mutant โดยการวัด Optical density ของสารสีแดงและสารสีเหลือง ที่ความยาวคลื่น 500 และ 400 นาโนเมตร ตามลำดับ

<u>ตารางที่ 11</u> เปรียบเทียบ การผลิตสารสีแดง (OD 500) และสารสีเหลือง (OD 400) และเปอร์เซ็นต์ Relative production ของสารสีแดง และสารสีเหลืองระหว่างเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ Mutant

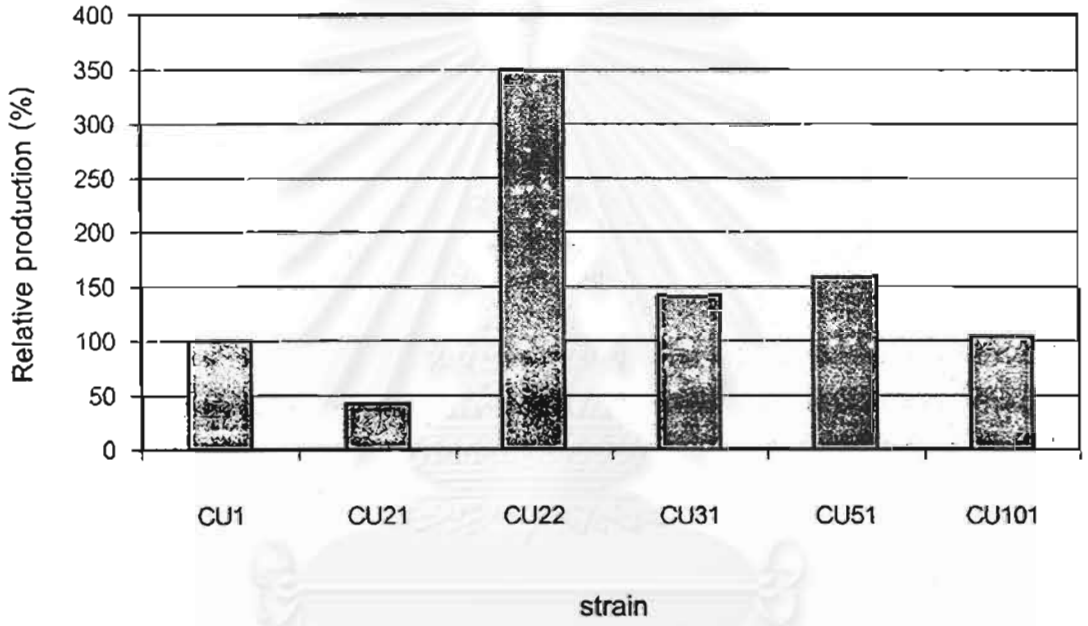
strain	สารสีแดง		สารสีเหลือง	
	Productivity (OD 500)	Relative production (%)	Productivity (OD 400)	Relative production
CU1	0.522	100	1.466	100
CU21	0.288	52.2	0.614	41.9
CU22	3.886	704.0	5.124	349.5
CU31	1.418	256.9	2.070	141.2
CU51	1.702	308.3	2.330	158.9
CU101	1.038	188.0	1.520	103.7

กราฟที่ 9 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ Relative production ของค่า Optical density ของสารสีแดงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ระหว่างเชื้อรา *Monascus purpureus* และ Mutant



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟที่ 10 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ Relative production ของค่า Optical density ของสารสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ระหว่างเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3090 และ Mutant



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่า Optical density ของสารสีแดงและสารสีเหลือง ที่ความยาวคลื่น 500 และ 400 และน้ำหนักแห้งระหว่างเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 กับ Mutant

strain	Optical density		น้ำหนักแห้ง (g/50ml.)
	สารสีแดง (OD 500)	สารสีเหลือง (OD 400)	
CU1	0.552	1.466	0.0704
CU21	0.288	0.614	0.0495
CU22	3.886	5.124	0.1049
CU31	1.418	2.070	0.1054
CU51	1.702	2.330	0.1154
CU101	1.038	1.520	0.0928

การศึกษาลักษณะของสปอร์ และเส้นใยของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1 และ Mutant ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40.X สรุปผลตามตาราง

<u>ตารางที่ 13</u> ลักษณะของสปอร์ และเส้นใยของเชื้อรา *Monascus purpureus* 1และ Mutant

strain	ลักษณะของเส้นใย	ลักษณะของโคนิเดีย	ลักษณะของคลิสโททีเซีย
CU1	- เส้นใยยาว - มีผนังกั้น	- กลม - เรียงต่อกันคล้ายลูกโซ่ และอยู่แบบเดี่ยว ๆ	- สีแดง - มีสีแดง - กระจายอยู่ทั่วไป
CU21	- สั้นกว่า CU1 - มีผนังกั้น	- กลม - แบบเดี่ยว ๆ - มีการสร้างโคนิเดียน้อยกว่า CU1	- กลม - มีสีแดงเข้ม - กระจายตัวอยู่อย่างหนาแน่นมากกว่า CU1
CU22	- ยาว, เล็ก - มีผนังกั้นแต่มีระยะห่างระหว่างผนังกั้นมากกว่า CU1	- กลม - แบบเดี่ยว ๆ - มีการสร้างน้อยกว่า CU1	- กลม - มีสีแดงเข้ม - มีการกระจายตัวมากกว่า CU1
CU31	- ยาว, เล็ก - มีผนังกั้นแต่ห่างกันมากกว่า CU1	- กลม - แบบเดี่ยว ๆ - มีการสร้างน้อยกว่า CU1	- กลม - สีแดงเข้ม - กระจายตัวอย่างหนาแน่นมากกว่า CU1
CU51	- ยาว - มีผนังกั้นแต่ระยะห่างมากกว่า CU1	- กลม - แบบเดี่ยว ๆ - มีการสร้างน้อยกว่า CU1	- กลม - สีแดงเข้ม - กระจายตัวอย่างหนาแน่นมากกว่า CU
CU101	- ยาว - มีผนังกั้นแต่มีระยะห่างระหว่างกันมากกว่า CU1	- กลม - ตัวแบบเดี่ยว ๆ - มีการสร้างน้อยกว่า CU1	- กลม - สีแดง - กระจายตัวหนาแน่นมากกว่า CU1

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

1. จากการศึกษาการมิวเตชันของเชื้อรา *Monascus purpureus* สายพันธุ์ 1 โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต สามารถแยกเชื้อรามิวเตชันที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ดังนี้คือ

   เวลา 2 นาที ได้เชื้อรา Mutant ที่แตกต่างกัน 2 สายพันธุ์ คือ CU21 ลักษณะโคโลนีมีสีแดงม่วง และ CU22 ลักษณะโคโลนีมีสีแดงเลือดหมูเข้ม

   เวลา 3 นาที ได้เชื้อรา Mutant 1 สายพันธุ์ คือ CU31 ลักษณะโคโลนีมีสีแดงเข้ม

   เวลา 5 นาที ได้เชื้อรา Mutant 1 สายพันธุ์ คือ CU51 ลักษณะโคโลนีสีแดงเข้ม

   เวลา 10 นาที ได้เชื้อรา Mutant 1 สายพันธุ์ คือ CU101ลักษณะโคโลนีสีแดง

   หมายเหตุ เชื้อรา *Monascus purpureus* สายพันธุ์ 1 แทนด้วย CU1

   ส่วนที่เวลา 15 นาที, 20 นาที, 30นาที และ 1 ชั่วโมง นั้นไม่พบการเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็งสูตร YMA เลย

2. จากการศึกษาการเจริญของเชื้อรา CU1 และ Mutant ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร YMA เป็นเวลา 12 วัน โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ปรากฏว่า เชื้อรา Mutant ทั้งหมดที่ได้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีมากกว่า CU1 โดย CU21 มีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีมากกว่า CU1 ($P < 0.05$) ส่วน CU22, CU31, CU51 และ CU101 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีมากกว่า CU1 ($P < 0.01$) ซึ่งพบว่าเชื้อรา Mutant CU31 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีมากที่สุดเมื่อวัดจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่เวลา 12 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.40 ซม ในขณะที่ CU1 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 2.43
3. จากการศึกษาการเจริญของเชื้อรา CU1 และ Mutant โดยการชั่งน้ำหนักแห้งของเส้นใย ปรากฏว่าเชื้อรา Mutant CU22, CU31, CU51 และ CU101 มีน้ำหนักแห้งมากกว่า CU1 ($P < 0.01$) โดยเชื้อรา Mutant CU51 มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 0.1154 ในขณะที่เชื้อรา Mutant CU21 มีค่าน้ำหนักแห้งต่ำสุดเท่ากับ 0.0495 และต่ำกว่า CU1
4. จากการศึกษาการผลิตสารสีของเชื้อรา CU1 และ Mutant ในอาหารเหลวสูตร YMB เป็นเวลา 7 วัน ปรากฏว่าการผลิตสารสีนั้นเป็นแบบ extracellular คือ มีการสร้างสารสีแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ เมื่อทำการวัดค่า Optical density ของสารสีแดงและสารสีเหลือง ที่ความยาวคลื่น 500 และ 400 นาโนเมตร ตามลำดับ พบว่าเชื้อรา Mutant CU22, CU31, CU51 และ CU101 มีการผลิตสารสีแดงและสารสีเหลืองมากกว่า CU1 ($P < 0.01$) โดย CU22 มีค่า 0ptical density ของสารสีแดงและสีเหลืองสูงที่สุดคือ 3.886 และ 349.5 ตามลำดับ ส่วนเชื้อรา Mutant CU21 มีการผลิตสารสีแดงและสารสีเหลืองต่ำสุดและต่ำกว่า CU1 โดยมีค่า Optical density เท่ากับ 0.288 และ 0.614 ตามลำดับ

   หมายเหตุ ใช้ค่าสถิติ ANOVA ในการแปลผล (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและหกรณ์, 2532; จรัญ, 2543)

5. จากการศึกษาลักษณะของสปอร์ (Spore) และเส้นใย (Mycelium) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อรา Mutant ที่ได้ทั้งหมดมีการสร้างคลิสโททีเซียหนาแน่นขึ้น และสีเข้มขึ้น แต่มีการสร้างโคนิเดียลดลง ส่วนการสร้างเส้นใยของ Mutant ที่ได้ส่วนใหญ่จะยาวและเล็กกว่า CU1 ยกเว้นเส้นใยของเชื้อรา Mutant CU21 ที่มีขนาดของเส้นใยสั้นกว่า wild type

จากการศึกษาการมิวเตชันของเชื้อรา *Monascus purpureus* สายพันธุ์ 1 โดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตในครั้งนี้ส่วนใหญ่แล้ว Mutant ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงจาก wild type ในลักษณะที่ดีขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากช่วงเวลาที่ฉายรังสี เพื่อชักนำให้เกิดมิวเตชัน คือ ที่เวลา 2 นาที, 3 นาที, 5 นาทีและ 10 นาที เป็นช่วงเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตในอัตราที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดมิวเตชันขึ้น และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ซึ่งไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอก (phenotype) ที่แตกต่างไปจากพ่อแม่ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นนั้นอาจไปมีผลเกี่ยวข้องกับบางขั้นตอนของการเจริญ และกระบวนการสร้างสารสีของเชื้อราเอง ทำให้เชื้อรา Mutant ที่ได้มีการสร้างสารสีและการเจริญเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลง ไปในทางที่ดี ส่วนช่วงเวลาที่ 10 นาที, 20 นาที, 30 นาที และ 1 ชั่วโมง นั้นไม่พบการเจริญของเชื้อรา ทั้งนี้อาจเป็นเพราะช่วงเวลาดังกล่าวนี้ เป็นช่วงเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตในอัตราที่สูงเกินไป ทำให้เกิดมิวเตชันซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมของเชื้อราที่ทำให้เชื้อราไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ เพราะการชักนำให้เกิดมิวเตชันนั้นอาจจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ดีขึ้นหรือเลวลงก็ได้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2532. เอกสารประกอบคำบรรยายการฝึกอบรมสถิติหลักสูตร การใช้สถิติกับงานวิจัย. 39-47 น.

กังสดาร ศรแก้ว. 2538. การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวแดง. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จรัญ จันทลักขณา. 2532. สถิติวิเคราะห์และการวางแผนงานวิจัย. ครั้งที่ 6. 441 น.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2540. สีโมแนสคัส. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสีธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. รังสี UV และมิวเตชัน. เอกสารประกอบคำสอนเรื่องมิวเตชัน. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาพร จันทร์ศิริโพธา. 2531. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราแดง เพื่อเพิ่มความสามารถการผลิตสีโดยวิธีการกลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

Alexopolos, C.J. and Mims, C.W. 1979. Introductory mycology. John Wiley and Son. Inc, New York. p 632.

Bardmard, E.L. and P.E. Cannon. 1987.A new species of *Monascus* from Pine tissue in Florida. Myokogia, 76(3):476-480.

Carel, M. and Shepherd, D. 1977. The effect of difference nitrogen souces on pigment production and sporulation of *Monascus sp.* in submerged shaken culture. Can. J of Microbial, 23:1360-1372. กมลวรรณ ถิรังกูร. 2539. การเปรียบเทียบปริมาณการสร้างสารสีของเชื้อรา *Moascus* สามสายพันธุ์. วิทยาปฏิบัติ ปริญญาตรี ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Hawks worth, D.L. and Pitt, J.I. 1983. A new taxonomy for *Monascus sp.* base on cultural and microscopical characters. Austl.J. of Bot. 31:51-61.

Hiroi, T., Shima, T. and Ogasanara,N. 1979. Hyperpigment productive mutant of *Monascus anka* for solid culture. Agr. Biol. Chen. 43(9): 1975-1976.

Lin, T.F. and Izuka. 1982. Production of extracellular pigment of *Monascus kaoliang sp.* nov.Appl. Envirin. Microbiol. 43(3): 671-676.

Navalainen, K.M.H. 1981. Induction, isolation and chalacterization of *Aspergillus niger* mutant strain producing elevated levels of B-galactocidase. Appl. Environ. Microbiol. 41: 593-596.

Sekine, H., Nasuno, S. and Iguchi, N. 1969. Isolating of highly protiolytic mutants from *Aspergillus sojae* Arg. Biol. Chen. 33:1477-1482.

Su, Y.C. and Huang, J.H. 1980. Fermentative production of anka-pigment (*Monascus* pigment). Proc. Nat. Sci. Counc. ROC. 4(2):201-215.

Yongsmith, B., Chitradon, L., Krairak, S., Tabloka, W. and Bavavoda. 1990. Cassava fermentation of yellow pigments and enzymes of a mutant of Monascus spp. in submerg cultivation. Microbial Utilization of Resources. 7:354-363.

ภาคผนวก

สูตรอาหาร

C medium

Sucrose	10	g
KH_2PO_4	0.1	g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.05	g
$NaNO_3$	0.2	g
KCl	0.05	g
$FeSO_4 . 7H_2O$	0.001	g
Yeast extract	0.3	g
Casien hydrolysate	0.5	g
Agar	2	g
น้ำ	1000	ml

YMA (Yeast Malt extract Agar)

Peptone	5	g
Yeast extract	3	g
Malt extract	3	g
Glucose	10	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml

YMB (Yeast Malt extrat Broth)

Peptone	5	g
Yeast extract	3	g
Malt extract	3	g
Glucose	10	g
น้ำกลั่น	1000	ml

การใช้ค่าสถิติในการแปลผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีระหว่าง CU1 และ Mutant ที่เวลา 12 วัน

ตาราง ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA)

Source of Variation (SVO)	Dree of Freedom (DF)	Sum of Square (SS)	Mean Square (MS)	F-Value (Table)		
				Cal.	5 %	1 %
Total	17	47.78	-	-	-	-
Treatment	5	47.13	9.43	174.63	3.11	5.06
Error	12	0.65	0.054	-	-	-

ตารางการคำนวณค่าสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์

Treatment		CU1	CU21	CU22	CU31	CU51	CU101
	ค่าเฉลี่ย	2.43	3.00	6.20	6.40	6.33	4.70
CU1	2.4	-					
CU21	3.00	0.57*	-				
CU22	6.20	3.77**	3.20**	-			
CU31	6.40	3.97**	3.40**	0.20^{ns}	-		
CU51	6.33	3.90**	3.3**3	0.13^{ns}	0.07^{ns}	-	
CU101	4.70	2.27**	1.70**	1.50**	1.70**	1.63**	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การใช้ค่าสถิติในการแปลผลน้ำหนักแห้งระหว่าง CU1 และ Mutant ที่เวลา 12 วัน

ตาราง ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA)

Source of Variation (SVO)	Dree of Freedom (DF)	Sum of Square (SS)	Mean Square (MS)	F-Value (Table)		
				Cal.	5 %	1 %
Total	17	0.00941	-	-	-	-
Treatment	5	0.00940	0.00188	2256.903	3.11	5.06
Error	12	0.00001	0.0000008	-	-	-

ตารางการคำนวณค่าสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์

Treatment		CU1	CU21	CU22	CU31	CU51	CU101
	ค่าเฉลี่ย	0.0704	0.0495	0.1049	0.1054	0.1154	0.0928
CU1	0.0704	-					
CU21	0.0495	0.0209**	-				
CU22	0.1049	0.0345**	0.0554**	-			
CU31	0.1054	0.035**	0.0559**	0.0005^{ns}	-		
CU51	0.1154	0.045**	0.0659**	0.0105**	0.01**	-	
CU101	0.0928	0.0224**	0.0433**	0.0121**	0.0126**	0.0226**	-

การใช้ค่าสถิติในการแปลผลค่า Optical density ของสารสีแดงที่ความยาวคลื่น 500 nm.ระหว่าง CU1 และ Mutant ที่เวลา 12 วัน

ตาราง ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA)

Source of Variation (SVO)	Dree of Freedom (DF)	Sum of Square (SS)	Mean Square (MS)	F-Value (Table)		
				Cal.	5 %	1 %
Total	17	8.4082	-	-	-	-
Treatment	5	8.4076	1.6815	33630	3.11	5.06
Error	12	0.0006	0.00005	-	-	-

ตารางการคำนวณค่าสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์

Treatment		CU1	CU21	CU22	CU31	CU51	CU101
	ค่าเฉลี่ย						
CU1	0.276	-					
CU21	0.144	0.132**	-				
CU22	1.943	1.667**	1.799**	-			
CU31	0.709	0.433**	0.565**	1.234**	-		
CU51	0.851	0.576**	0.707**	1.092**	0.1420**	-	
CU101	0.519	0.243**	0.375**	1.424**	0.1900**	0.332**	-

การใช้ค่าสถิติในการแปลผลค่า Optical density ของสารสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 400 nm. ระหว่าง CU1 และ Mutant ที่เวลา 12 วัน

ตาราง ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA)

Source of Variation (SVO)	Dree of Freedom (DF)	Sum of Square (SS)	Mean Square (MS)	F-Value (Table)		
				Cal.	5 %	1 %
Total	17	9.778	-	-		
Treatment	5	9.0768	1.81514	21872.29	3.11	5.06
Error	12	0.001	0.000083	-	-	-

ตารางการคำนวณค่าสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์

Treatment		CU1	CU21	CU22	CU31	CU51	CU101
	ค่าเฉลี่ย	0.733	0.307	2.562	1.035	1.165	0.760
CU1	0.733	-					
CU21	0.307	0.426**	-				
CU22	2.562	1.829**	2.255**	-			
CU31	1.035	0.302**	0.728**	1.527**	-		
CU51	1.165	0.432**	0.858**	1.397**	0.130**	-	
CU101	0.760	0.027**	0.453**	1.802**	0.275**	0.405**	-