บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติความเป็นมาของข้าวแดง

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์สารสี ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนข้าวนึ่ง ที่รู้จักกันมาช้านานแถบตะวันออกเช่นประเทศจีน ประเทศแถบเอเชียใต้ เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น (Johns and Stuart, 1991) โดยกำเนิดของข้าวแดงมาจากประเทศจีนเชื่อว่าในตำบลหนึ่งมีดินเป็นสีแดงและเมื่อใช้ดินนี้พอกข้าวนึ่งไว้ในระยะเวลาหนึ่งจะทำให้ข้าวนึ่งนั้นกลายเป็นสีแดงได้ (เชิดชัย เชียวธีรกุล และคณะ, 2519)

ในสมัยราชวงค์ถัง (800 AD) ได้ใช้ข้าวแดงมาเป็นสารเติมแต่งสีและรสชาติในปลาและเนื้อ (Stuart, 1979) สมัยราชวงค์หมิงค์ (1368-1644) ได้มีการนำข้าวแดงมาใช้เพื่อปรุงยาจีนโบราณ ซึ่งได้มีการบันทึกไว้ในตำรายาชื่อ Ben Cao Gang Mu-Dan Shi Bu Yi ข้าวแดงจะออกฤทธิ์ช่วยทำให้ระบบหมุนเวียนโลหิตในร่างกายดีขึ้น (Wu *et al.*, 1966)

ในปี 1920 Church (อ้างอิงโดยบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) รายงานว่าการผลิตข้าวแดงมีกันมานานแล้วในสาธารณรัฐประชาชนจีน และได้ทดลองแยกสายพันธุ์ที่ได้จากข้าวแดงของประเทศจีนจนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่ให้สีแดงคือ *Monascus purpureus* ต่อมา Palo *et al.* (1960) นักวิทยาศาสตร์ชาวฟิลิปปินส์ได้ทดลองใช้เชื้อราข้าวแดงนี้ทำข้าวแดง จนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพดีพอควร สามารถนำเอาข้าวแดงมาใช้เจือสีในอาหารได้โดยตรง (Su and Wong, 1983) ภายหลังได้มีความสนใจที่จะศึกษาสายพันธุ์ราโมแนสคัสที่เหมาะสมสำหรับใช้ในสภาพหมักเหลว (submerged cultivation) ริเริ่มโดย Lin (1973) ต่อมาก็มีผู้ประสบความสำเร็จในการศึกษาการผลิตสีในอาหารเหลว (Shepherd and Carels, 1938; Yoshimura *et al.*, 1975; Shin *et al.*, 1998; บุษบา ยงสมิทธ์ และวรรณภา ทาบโลกา, 2527; Lee *et al.*, 1992 อ้างอิงโดยบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

ประเทศจีนได้มีการศึกษาการบริโภคข้าวแดงในคนและสัตว์ พบว่าการบริโภคข้าวแดงในปริมาณ 14-55 กรัม/คน/วัน สามารถลดความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลได้ 11-32 % และลดความเข้มข้นของ Triacylglycerol ได้ 12-19 % (Heber *et al.*, 1999) ในปี 1979 Endo ได้แยกสารโมนาโคลิน เค (Monacolin K) ที่ผลิตได้จาก *Monascus* spp. สารดังกล่าวมีจุดหลอมเหลวที่ 157-159 °ซ มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{36}O_5$ (MW 404) มีค่า LD_{50} ในหนูเท่ากับ 1,000 mg/kg น้ำหนักตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฤทธิ์ของสารโมนาโคลิน เค จะเป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ HMG Co A reductase (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในตับ และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลในร่างกาย

2.2 ลักษณะรูปร่างของเชื้อรา *Monascus* spp. และ *Aspergillus* spp.

Monascus spp. เป็นเชื้อราที่ Alexopoulos and Mims (1979) จัดอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

Division Amastigomycota
Subdivision Ascomycotina
Class Ascomycetes
Subclass Plectomycetidae
Order Eurotiales
Family Monascaceae
Genus *Monascus*

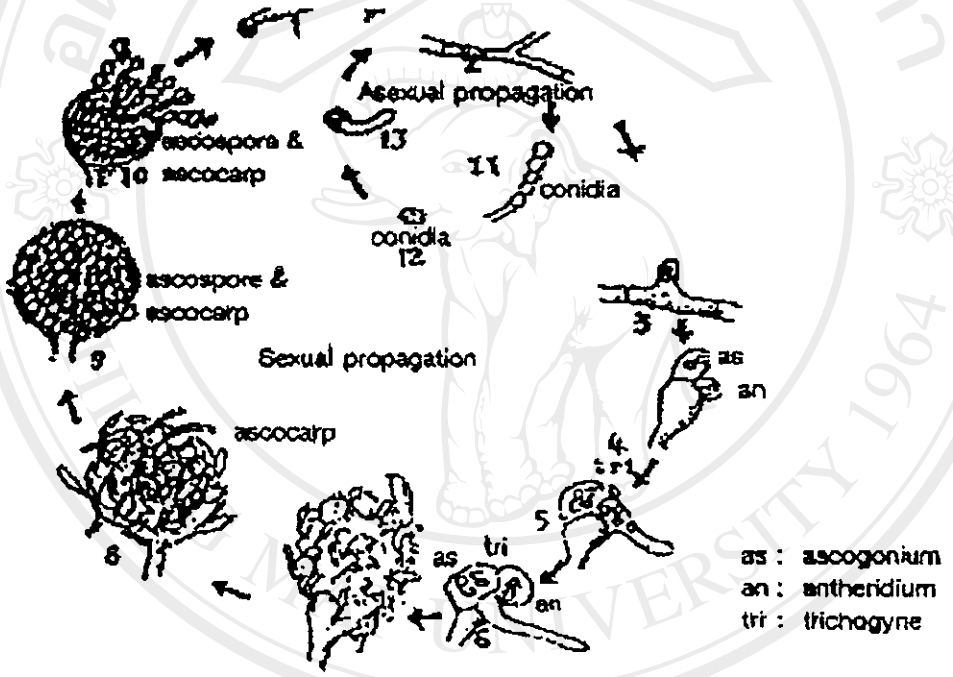
เส้นใยมีผนังกั้น (septate) มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศและไม่มีเพศเส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายและมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่อมีอายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือสีแดงม่วง

การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศมีการสร้างโคนิเดียเจริญมาจากโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) โคนิเดีย มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือเกิดติดต่อกันเป็นลูกโซ่ โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเกิดสีแดงได้บ้าง โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้นหรือเซพเตต การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร เช่น C medium ที่เหมาะสมสำหรับการเกิดโคนิเดียของ *Monascus* คือซูโครส 10 กรัม สารสกัดยีสต์ 0.3 กรัม กรดคาสอะมิโน 0.5 กรัม KH_2PO_4 0.1 กรัม $NaNO_3$ 0.2 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 กรัม $FeSO_4.7H_2O$ 0.001 กรัม KCl 0.05 กรัม วุ้น 2.0 กรัม และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีกหลายประการ เช่น อายุสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ความเป็นกรดด่าง แสงและอุณหภูมิ เช่นอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปโคนิเดียจะงอกภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมด้วยการสร้าง germ-tube ขึ้นมา 1 อัน หรือ 2 อัน หรือบางทีอาจมีได้ถึง 6 อัน ซึ่งการงอกของโคนิเดียกระตุ้นได้ด้วยคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด

ส่วนการสืบพันธุ์แบบมีเพศจะคล้ายกับเชื้อราอื่นใน Class Ascomycetes คือมีการสร้างเพอริทีเซียม (perithecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) ที่มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้าน (stalk) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(homothallic) โดยสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิดคือ แอนเทอริเดียม (antheridium) และแอสโคโกเนียม (ascogonium) ซึ่งจะเกิดการรวมตัว (fusion) ที่ปลายของแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วจึงวิวัฒนาการต่อไปคือ แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส และไมโตซิส มี daughter nuclei จากการแบ่งตัว มีการขยายผนังเซลล์รวมออกเรียกว่า การสร้างแอสโคคาร์ป ภายในเพอริทีเซียมมีแอสโคสปอร์ (ascospores) มากมาย โดยแอสโคสปอร์จำนวน 2-8 อันจะรวมตัวอยู่ในแอสคัส (ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์ออกมาเพื่อให้งอกเป็นเส้นใหม่ขึ้น (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) วัฏจักรชีวิตของเชื้อราชนิดนี้แสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อรา *Monascus*
ที่มา : บุษบา ยงสมิทธ์ (2542)

Samson *et al.* (2000) จัดเชื้อรา *Aspergillus terreus* อยู่ใน Class Deuteromycetes และ Genus *Aspergillus*

เชื้อรานี้จะมีเส้นใยที่มีผนังกั้นและสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศเท่านั้น โดยการสร้างโคนิเดีย ยังไม่พบวงชีวิตของการสืบพันธุ์แบบมีเพศ จึงมีชื่อสามัญว่า Imperfect fungi หรือชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Fungi imperfecti

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วงชีวิตแบบสร้างโคนิเดียของเชื้อราใน form-class Deuteromycetes นี้คล้ายกับวงชีวิตแบบไม่มีเพศของ Class Ascomycetes จนเป็นที่ยอมรับกันว่าเชื้อใน form-class นี้เป็นระยะการดำรงชีวิตแบบไม่มีเพศของพวก Ascomycetes นั่นเอง โดยการสืบพันธุ์แบบมีเพศเกิดขึ้นได้ยากในธรรมชาติจึงยังศึกษาไม่พบ หรือไม่ก็ได้สูญเสียการสืบพันธุ์แบบมีเพศไปแล้ว เนื่องจากการวิวัฒนาการของเชื้อ (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2525)

2.3 อนุพันธุ์ประเภทต่างๆ จากเชื้อราโมแนสคัส (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

การศึกษาต่อๆ มาได้พบสารเมแทบอไลต์หลายชนิดที่น่าสนใจ และมีค่าทางเศรษฐศาสตร์จากเชื้อราโมแนสคัสดังรวบรวมในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารเมแทบอไลต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัส

เอนไซม์	เมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolites)	เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites)
1. กลูโคอะมิเลส 2. โปรตีเอส 3. แอลฟา กาแลคโตซิเดส 4. แอลฟา-อะมิเลส 5. ไรโบนิวคลีเอส	1. เอทิลแอลกอฮอล์ 2. กรดอินทรีย์ 3. วิตามินบี 2 4. ไขมัน 5. กรดไขมัน	1. สารสี (แดง, เหลือง, ส้ม) 2. สารปฏิชีวนะ 3. สารลดโคเลสเตอรอล หรือ monacolins 4. สารตกตะกอน (flocculants) 5. ยาลดความดันโลหิต (antihypertensives) 6. ยาพื้นบ้านของจีนรักษาโรคอาหารไม่ย่อย, โรคบิด, กล้ามเนื้อฟกช้ำ 7. คูราริน (coumarin) รักษาโรคด่างขาว 8. สารถนอมอาหารประเภทเนื้อ 9. โคเอนไซม์ Q_{10} 10. สารให้กลิ่นหอม (methyl ketones) 11. สารยับยั้งการกลายพันธุ์

ที่มา : ดัดแปลงจาก บุษบา ยงสมิทธ์ (2542)

2.4 ประโยชน์ของข้าวแดงในการผลิตยาเพื่อใช้ลดโคเลสเตอรอล

อาหารเสริม (Dietary supplement) ที่มีชื่อ Cholestin ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเชื้อรา *Monascus purpureus* Went ลงบนข้าว โดยที่ Cholestin นั้นเป็นสินค้าเพื่อสุขภาพของประเทศจีน เป็นที่รู้จักและนิยมใช้กันมานานกว่า 2,000 ปี ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่า Cholestin มีคุณสมบัติช่วยรักษาระดับไขมันในเส้นเลือด และได้มีการศึกษาคุณสมบัติของ Cholestin ที่สามารถ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ช่วยรักษาระดับไขมันในเส้นเลือดมามากกว่า 20 ปี เมื่อเร็วๆนี้ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของ Cholestin ปรากฏลงในหนังสือ American Journal of Clinical Nutrition (AJCN) หน้า 231 ในเดือนกุมภาพันธ์ ปี ค.ศ. 1999 ว่า Cholestin สามารถไปช่วยยับยั้ง HMG-Co A reductase enzymes ที่ตับสร้างขึ้นเพื่อผลิตโคเลสเตอรอล (cholesterol) Cholestin ช่วยให้ระดับโคเลสเตอรอลทั้งหมดน้อยกว่า 230 mg/dL และระดับ triglyceride น้อยกว่า 200 mg/dL โคเลสเตอรอลประมาณ 80 % ถูกสร้างขึ้นจากตับ และถูกควบคุมโดย HMG-Co A reductase enzymes อาหารเสริม Cholestin ช่วยไปยับยั้ง HMG-Co A reductase enzymes ทำให้ร่างกายมีระดับโคเลสเตอรอลที่ปกติ (Anonymous, 2003)

2.5 ข้าว

ข้าวสามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน (Tropical) และเขตอบอุ่น (Temperate) ทั่วโลกมีพันธุ์ข้าวถึง 120,000 พันธุ์ ในขณะที่ประเทศไทยมีข้าวอยู่ประมาณ 3,500 พันธุ์ ปัจจุบันข้าวที่ปลูกเพื่อการบริโภคมีอยู่ 2 ชนิดคือ ข้าว *Oryza sativa* ปลูกในทวีปเอเชีย และข้าว *Oryza glaberrinma* ปลูกในทวีปแอฟริกา ข้าวที่ขายในท้องตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวที่ปลูกจากแถบเอเชีย ซึ่งข้าวชนิดดังกล่าวนั้นยังสามารถแบ่งตามแหล่งที่ปลูกได้อีกคือ

- ข้าวอินดิกา (Indica) มีลักษณะเมล็ดยาวรี ต้นสูง เป็นข้าวที่ปลูกในเอเชียเขตมรสุม ตั้งแต่จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา ข้าวพันธุ์นี้ค้นพบครั้งแรกในอินเดีย
- ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวที่ปลูกในเขตอบอุ่น เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี เมล็ดป้อมกลมรี ต้นเตี้ย
- ข้าวจาวานิกา (Javanica) ปลูกในอินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ เมล็ดป้อมใหญ่ ไม่ได้รับความนิยมเพราะให้ผลผลิตต่ำ (อุตสาหกรรมสาร, 2544)

ข้าวเปลือกเมื่อผ่านกรรมวิธีการสีข้าว เปลือกของเมล็ดข้าวที่เรียกว่า แกลบ จะถูกกะเทาะออกเหลือเป็นเนื้อข้าวที่เรียกว่า ข้าวกล้อง เมื่อนำข้าวกล้องมาสีและขัดก็จะได้เป็นข้าวขาว ซึ่งนำมาขายให้กับผู้บริโภค ส่วนรำข้าว ซึ่งประกอบด้วยเยื่อหุ้มเมล็ดและจมูกข้าวเป็นส่วนที่ทางโรงสีจะนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ ดังนั้นสิ่งที่สูญหายไประหว่างการขัดสีข้าวกล้องเป็นข้าวขาวก็คือเยื่อหุ้มเมล็ด ซึ่งมีเส้นใยอาหารสูงและมีวิตามินเกลือแร่อยู่บ้าง จมูกข้าว ซึ่งอุดมสมบูรณ์ไปด้วยโปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ด้วยเหตุนี้ ข้าวขาวที่กินกันทั่วๆไปจึงเหลือแค่เนื้อเมล็ดหรือสารอาหารคาร์โบไฮเดรตเสียส่วนใหญ่ แต่ขาดสารอาหารอื่นๆที่อยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ด และจมูกข้าวคุณค่าทางอาหารในข้าวขาวจึงน้อยกว่าข้าวกล้อง (งามชื่น คงเสรี, 2543) ดังตารางที่ 2.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบองค์ประกอบของข้าวกล้อง และข้าวขาว

องค์ประกอบ	ข้าวกล้อง	ข้าวขาว
แคลอรี่ (100 แคลอรี่ต่อกรัม)	28.0	29.0
โปรตีน (ร้อยละ)	8.9	7.6
ไขมัน (ร้อยละ)	2.0	0.3
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	77.2	79.4
เถ้า (ร้อยละ)	1.90	0.4
เส้นใย (ร้อยละ)	1.0	0.2
วิตามิน (ppm)		
กรดแอสคอร์บิก	3-5	0.6-1.0
ไทอะมีน	0.8-1.0	0.23
ไรโบฟลาวิน	55	15.20
กรดนิโคตินิก	17	6.4
กรดแพนโทธินิก	10.3	4.5
เอ (IU ต่อกรัม)	0.5-1.0	0
แร่ธาตุ (ร้อยละ)	0.084	0.009
แคลเซียม	0.119	0.028
แมกนีเซียม	0.342	0.079
โพแทสเซียม	0.078	0.028
โซเดียม	0.290	0.096
ฟอสฟอรัส	0.023	0.006
กำมะถัน	0.002	0.0009
เหล็ก (มิลลิกรัม)	1.6	0.8
ทองแดง (ppm)	3.5	1.9

ที่มา: อรอนงค์ นัยวิกุล (2534)

นักวิจัยข้าวทั่วไปมักนิยมแบ่งประเภทข้าว โดยกล่าวถึงอะไมโลส (amylose) เป็นหลัก ทั้งนี้เมื่อเอ่ยถึงร้อยละอะไมโลส มักมีความหมายว่า ส่วนที่เหลือของแป้งเป็นอะไมโลเพคติน อัตราส่วนของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินเป็นปัจจัยสำคัญ ที่ทำให้ข้าวสุกมีคุณสมบัติแตกต่างกัน เช่น แป้งข้าวเหนียวมีอะไมโลเพคตินหรือมีอะไมโลสปนอยู่เพียงเล็กน้อย ในขณะที่แป้ง ข้าวเจ้ามีอะไมโลสปนอยู่มาก ข้าวที่มีอะไมโลสสูงในระหว่างการหุงต้มจะดูดน้ำได้มากกว่าข้าวที่มีอะไมโลสต่ำ และเนื่องจากอะไมโลสเมื่อต้มสุกแล้วมีคุณสมบัติคืนตัว (retrogradation)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปลี่ยนแปลงจากสภาพละลายน้ำได้เป็นของแข็ง ด้วยเหตุนี้ข้าวที่มีอะไมโลสสูง เมื่อหุงต้มสุกจึงร่วนกว่าและแข็งกว่าข้าวอะไมโลสต่ำ การที่ข้าวไม่เหนียวเกาะติดกัน จึงทำให้ข้าวฟูมีช่องอากาศมาก จึงเห็นเป็นว่าการขยายปริมาตรของข้าวสุก (ขึ้นหม้อ) ดีกว่า ได้มีการจัดแบ่งประเภทข้าวตามปริมาณอะไมโลส (งามชื่น คงเสรี, 2531) ดังตารางที่ 2.3 และ 2.4

ตารางที่ 2.3 การจัดแบ่งข้าวพันธุ์ดีบางพันธุ์ตามคุณภาพการหุงต้ม และปริมาณอะไมโลส

พันธุ์ข้าว	เมล็ดยาว (มม.)	อะไมโลส (ร้อยละ)
	ข้าวสวยนุ่ม และเหนียว	
ขาวดอกมะลิ 105*	7.4	1-17
กข 15*	7.5	14-17
	ข้าวสวยนุ่ม และเหนียว	
กข 21	7.3	17-20
ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1*	7.8	14-18
ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี *	7.7	18-19
ปทุมธานี 1*	7.6	15-16
	ข้าวสวยร่วน (ข้าวขาวตาแห้ง)	
ขาวปากหม้อ 148	7.7	24-26
ขาวตาแห้ง 17	7.5	26-28
กข 23	7.3	26-30
สุพรรรบุรี 60	7.5	19-26
	ข้าวสวยแข็งหุงขึ้นหม้อ (ข้าวเสาไห้)	
เหลืองประทิว 123	7.4	28-32
ปิ่นแก้ว 56	7.5	29-31
นางพญา 132	7.4	31-32
กข 11	7.6	29-32
กข 13	6.9	30-33
ปทุมธานี 60*	7.5	27-32
ชัยนาท 1	7.7	26-27

หมายเหตุ: 1) * หมายถึง มีกลิ่นหอม

ที่มา: ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร (อ้างอิงจากงามชื่น คงเสรี, 2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.4 การแบ่งประเภทข้าวตามปริมาณอะไมโลส

ประเภทข้าว	ปริมาณอะไมโลส (ร้อยละ)	ลักษณะข้าวสุก	ชนิดข้าวที่รู้จักกันทั่วไป
ข้าวเหนียว	0-2	เหนียวมาก	ข้าวเหนียว
ข้าวอะไมโลสต่ำ	10-20	เหนียวนุ่ม	ข้าวหอมมะลิ
ข้าวอะไมโลสปานกลาง	20-25	ค่อนข้างร่วนไม่แข็ง	ข้าวขาวตาแห้ง
ข้าวอะไมโลสสูง	25-34	ร่วนแข็ง	ข้าวเสาไห้

ที่มา : งามชื่น คงเสรี (2543)

2.6รงควัตถุจากเชื้อรา *Monascus purpureus*

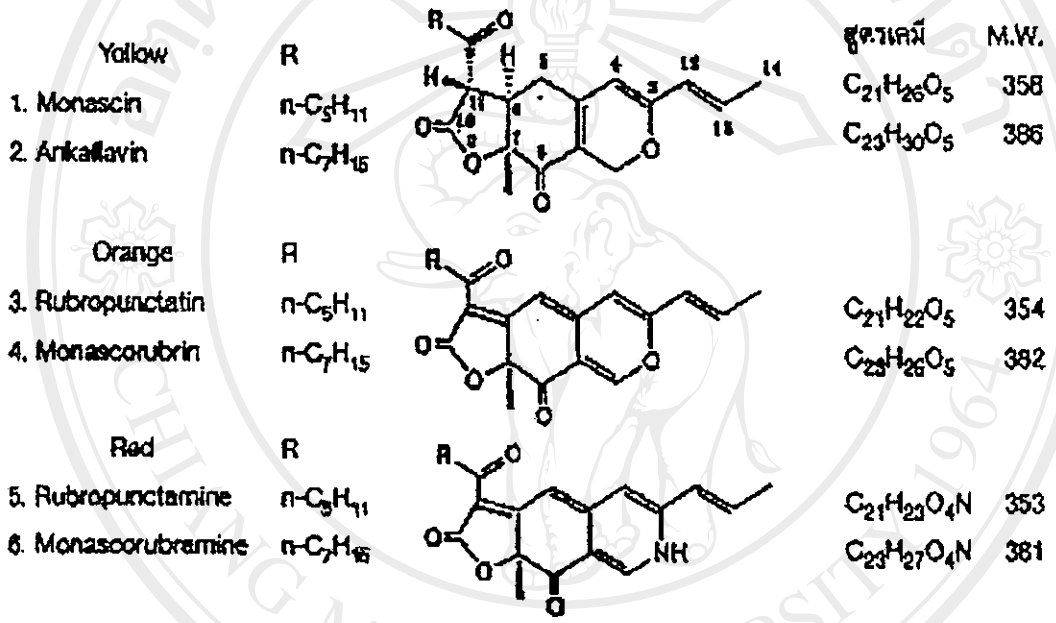
Nishikawa (1932, อ้างอิงจากวินิต ดีประชากร, 2520) แยกรงควัตถุจาก *Monascus purpureus* Went ได้ 2 ชนิดคือ

1. โมนาสโครูบริน (Monascorubrin) เป็นสารสีแดง มีสูตรโมเลกุล $C_{23}H_{26}O_5$ เป็นผลึกรูปเข็ม (needle) สีแดง (MW 382) มีจุดหลอมเหลว (melting point) 134 - 136 °ฟ สามารถละลายได้ในอีเทอร์ เอททิลแอลกฮอล์ เมทิลแอลกฮอล์ เบนซีน คลอโรฟอร์ม อะซิโตน และกรดอะซิติค ไม่สามารถละลายในปิโตรเลียม-อีเธอร์ (petroleum-ether) และน้ำ Hadfield *et al.* (1967) พบว่าเชื้อ *Monascus purpureus* ในขณะที่สร้างสารสีโมนาสโครูบรินนั้น เชื้อราชนิดนี้ก็สร้างสารสีรูโบรพังตาติน (rubropunctatin) ควบคู่กันด้วยการสร้างโมนาสโครูบริน และรูโบรพังตาติน เกิดจากเมตตะโบไลท์ของเชื้อรา โดยนำเอาอะซิเตต (ăcetate) รวมกับแฟตตี้ แอซิด (fatty acid) คือมาลโลเนต (malonate) เกิดเบต้า-ออกโซ-แลคโตน ริง (ß-oxo-lactone ring) โมนาสโครูบรินสามารถเปลี่ยนเป็นโมนาสโคเฟลวินได้โดยนำเอามาละลายในแอลกอฮอล์ (alcohol) แล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
2. โมนาสโคเฟลวิน (Monascoflavin) เป็นสารสีเหลือง มีสูตรโมเลกุล $C_{21}H_{26}O_5$ (MW 358) เป็นผลึกรูปปริซึม (prism) สีเหลือง มีจุดหลอมเหลว 142-145 °ฟ สามารถละลายในกรดซัลฟูริคเข้มข้น (H_2SO_4) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แอลกอฮอล์ อะซิโตน กรดอะซิติค (glacial acetic acid) เบนซีน (C_6H_6) และเอทธิลอะซิเตต ละลายได้เล็กน้อยในอีเธอร์ และปิโตรเลียม-อีเธอร์ ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ โมนาสโคเฟลวินอาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า โมนาสซิน (Monascin) Chen *et al.* (1971) กล่าวว่าโมนาสซินและรูโบรพังตาตินเกิดอยู่ร่วมกันจากเมตตะโบไลท์ของราหลายชนิดโมนาสซิน และรูโบรพังตาติน มีความสัมพันธ์ทาง Stereochemistry ที่ C-7 นอกจากนี้การเอาไฮโดรเจนออก (dehydrogenation) จากโมนาสซินอาจได้รูโบรพังตาติน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Nakanishi *et al.* (1959 อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ได้พบว่าโมนาสโครูบรามีน (monascorubramine) และรูโบรพังตามีน (rubropunctamine) ซึ่งมีสีแดงเปลี่ยนมาจากโมนาสโครูบริน และรูโบรพังตาติน (สีส้ม) ตามลำดับ

รงควัตถุที่เป็นองค์ประกอบของสีที่ผลิตโดยเชื้อรา *Monascus* spp. มีอยู่ 3 สีหลักคือ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง โดยแบ่งเป็น 6 อนุพันธุ์ย่อยคือ สีเหลือง (monascin และ ankaflavin) สีส้ม (rubropuntatin และ monascorubrin) และสีแดง (rubropunctamine และ monascorubramine) ดังภาพที่ 2.2

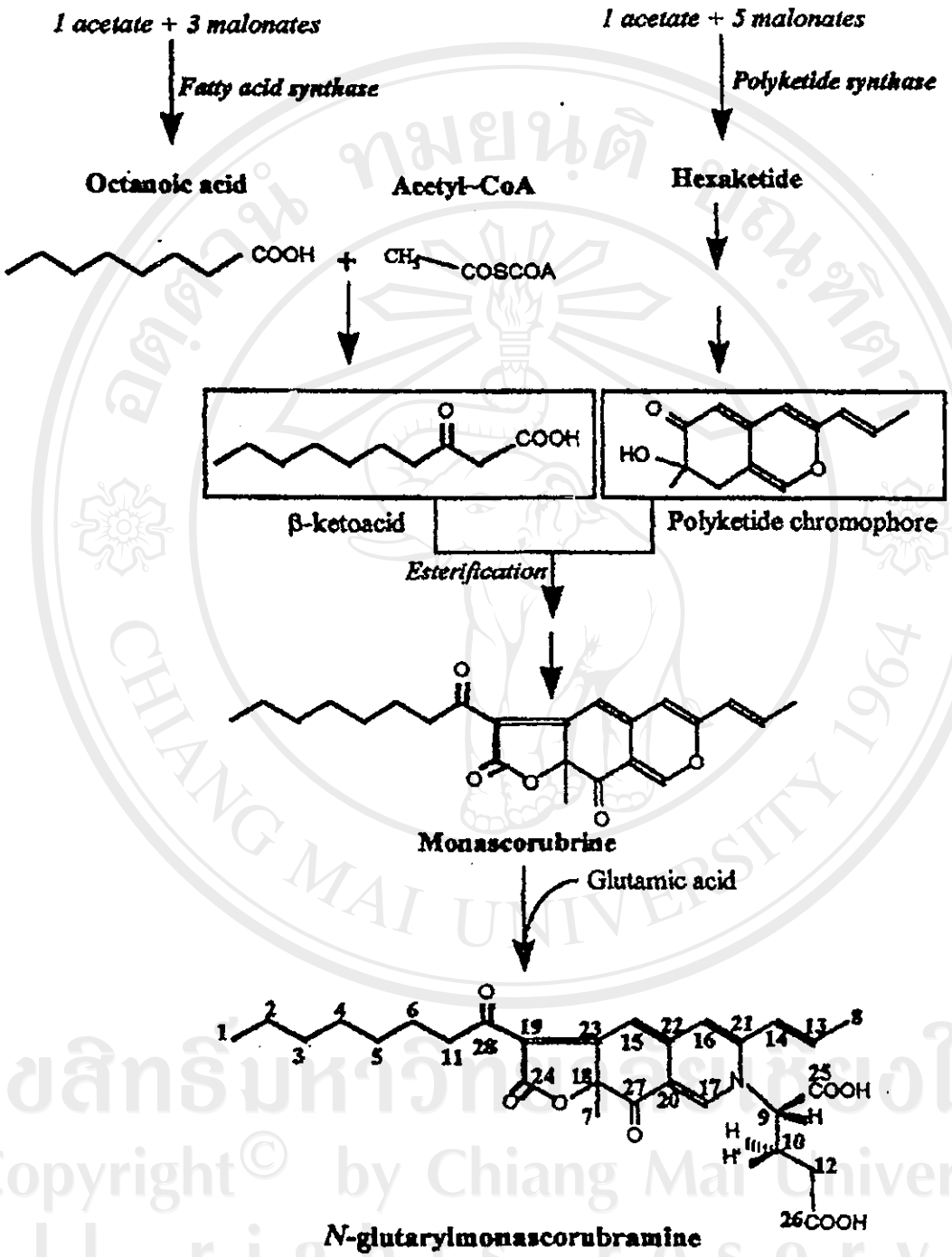


ภาพที่ 2.2 สูตรโครงสร้างรงควัตถุซึ่งเป็นองค์ประกอบของสีที่ผลิตโดยเชื้อ *Monascus* spp.
ที่มา : บุษบา ยงสมิทธ์ (2542)

กลไกสังเคราะห์ของรงควัตถุต่างๆจากเชื้อราโมแนสคัส เกิดจากการรวมตัวของอะซิเตต (acetate) 1 โมล และมาโลเนต (malonate) 5 โมล ซึ่งเป็นสารประกอบ hexaketide chromophore ผ่านวิถีโพลีคีไทด์ โดยที่กรดไขมันสายขนาดกลาง (medium-chain fatty acids, C_6-C_{18}) ที่สังเคราะห์กรดไขมัน เช่น กรดออกตาโนอิก (octanoic acid) ทำปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอริฟิเคชัน (trans-esterifcation) กับโครโมฟอร์ (chromophore) ได้เป็นรงควัตถุสีส้ม โมนาสโครูบริน (หรือรูโบรพังตาติน) เกิดจากปฏิกิริยา amination ของสีส้มกับ NH_3 รงควัตถุยังคงอยู่ภายในเซลล์เชื้อรา เพราะมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (hydrophobicity) และถูกขับออกมานอกเซลล์เมื่อทำปฏิกิริยากับหมู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NH_2 ของกรดอะมิโนทำให้ละลายน้ำได้ เช่น โมนาสโครูบรินทำปฏิกิริยากับกรดกลูตามิก เกิดเป็นสารประกอบ N-glutarylmonascorubramine ดังภาพที่ 2.3 (Hajjaj *et al.*, 2000a) .....



ภาพที่ 2.3 กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงที่ละลายน้ำได้ โดยเชื้อรา *Monascus rubber*
ที่มา : Hajjaj *et al.* (2000a)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7 การเก็บเกี่ยวสารหมัก (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

การสกัดสารหมักแล้วทำให้บริสุทธิ์เป็นเรื่องที่ลำบากและค่าใช้จ่ายสูงแพงมาก เริ่มจากการแยกสารให้มีคุณภาพสูงมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ แยกให้ได้เร็วที่สุด แยกอย่างมีประสิทธิภาพ โดยให้มีค่าใช้จ่ายต่ำที่สุด ค่าใช้จ่ายส่วนนี้จะตก 20-60 เปอร์เซ็นต์ ของค่าใช้จ่ายทั้งหมด วิธีปฏิบัติก็มีอยู่หลายแบบ จะเลือกใช้วิธีใดก็ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด และเครื่องมือของใช้ที่มีอยู่

สารหมักจะปะปนมากับอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อในปริมาณที่ต่ำมาก และยังมีจุลินทรีย์เศษเซลล์ สารอาหารที่ละลายและไม่ละลาย ผลิตภัณฑ์เมแทบอไลต์อื่นๆปะปนมาด้วย ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการอาจอยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ ถูกความร้อนอาจสลายตัวหรือถูกทำลายได้โดยง่ายโดยจุลินทรีย์ที่ปะปนมา สิ่งต่างๆเหล่านี้ล้วนแต่เป็นปัญหาในการแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกมา เพื่อได้ผลแน่นอนต้องเร่งการปฏิบัติงานให้เร็วที่สุด เพื่อกันการเสื่อมสภาพโดยธรรมชาติของสาร ดังนั้นเครื่องมือที่ใช้ต้องเหมาะสมทั้งชนิดและขนาด

โอกาสของกระบวนการแยกสารออกมาจึงขึ้นอยู่กับสิ่งต่อไปนี้

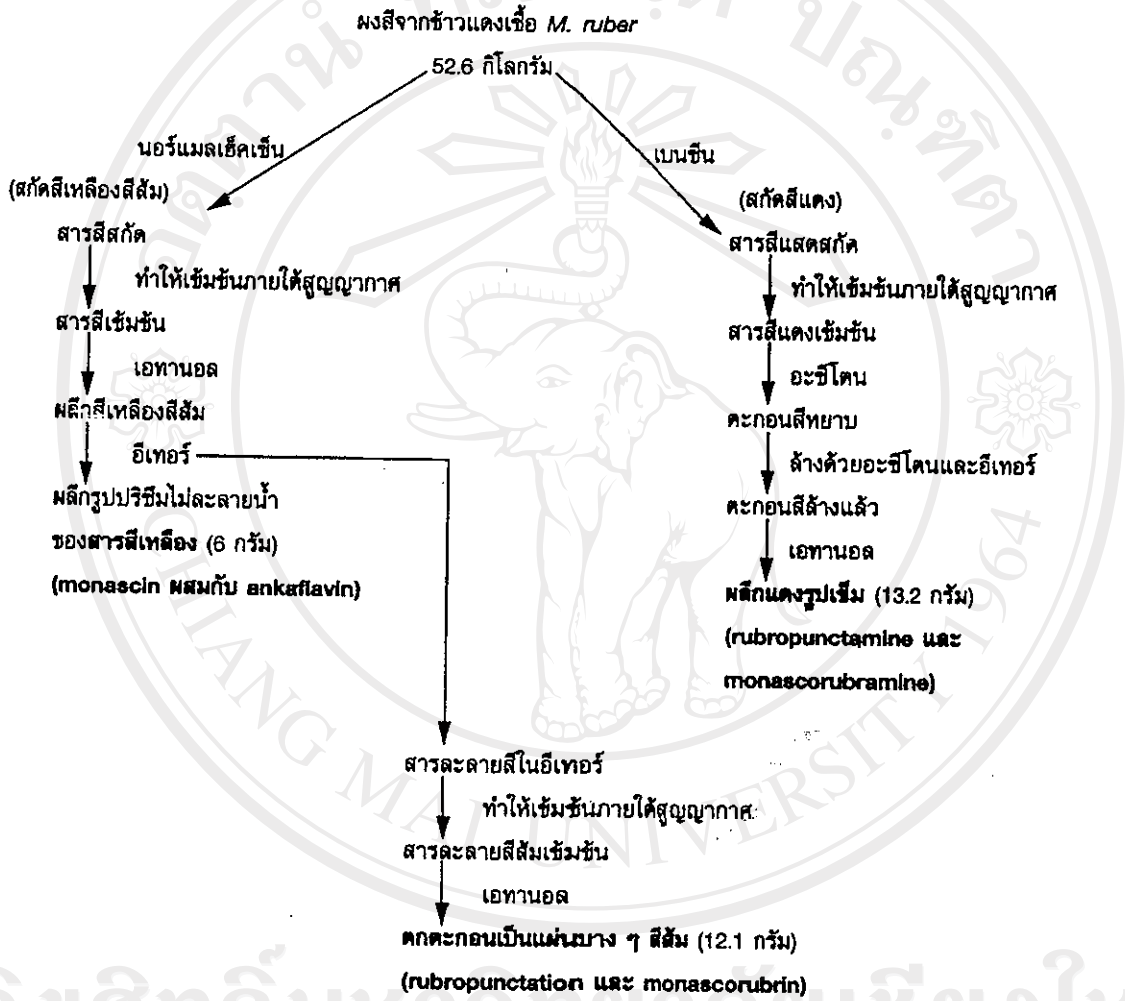
1. สารนั้นอยู่ภายในหรือถูกขับออกมานอกเซลล์
2. ความเข้มข้นของสารในอาหารเหลว
3. คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของสารที่ต้องการ
4. ความตั้งใจในการนำสารไปใช้
5. มาตรฐานการยอมรับขั้นต่ำสุดของความบริสุทธิ์ของสารนั้น
6. ความไม่บริสุทธิ์ของของเหลวหมัก
7. ราคาของผลิตภัณฑ์

2.8 การแยกสารสี (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

วิธีสกัดสีออกจากเส้นใยจะแตกต่างกันไปทั้งทางด้านการใช้สารตัวทำละลาย (solvent) เป็นตัวสกัดและปริมาณความเข้มข้นของสารตัวทำละลายที่ใช้สกัด Broder and Koehler (1980) ทดลองใช้เมทานอล (methanol) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เอทานอล (ethanol) และอะซิโตน (acetone) ในการสกัดสีออกจากเส้นใย พบว่าสารที่สกัดสีได้ดีที่สุดคือ เมทานอล ซึ่งสีที่สกัดได้จะมีค่าดูดกลืนแสงเด่นอยู่ 2 สีที่ความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร (สีเหลือง) และ 500 นาโนเมตร (สีแดง) Lin (1973) ใช้เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดสีออกจากเส้นใย นำเอาส่วนใสที่กรองได้ไปวัดค่าสีด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร Lin and Lizuka (1982) มีการวัดค่าสีที่ละลายน้ำได้ (water soluble) และสีที่ละลายน้ำรวมทั้งละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ได้ด้วย

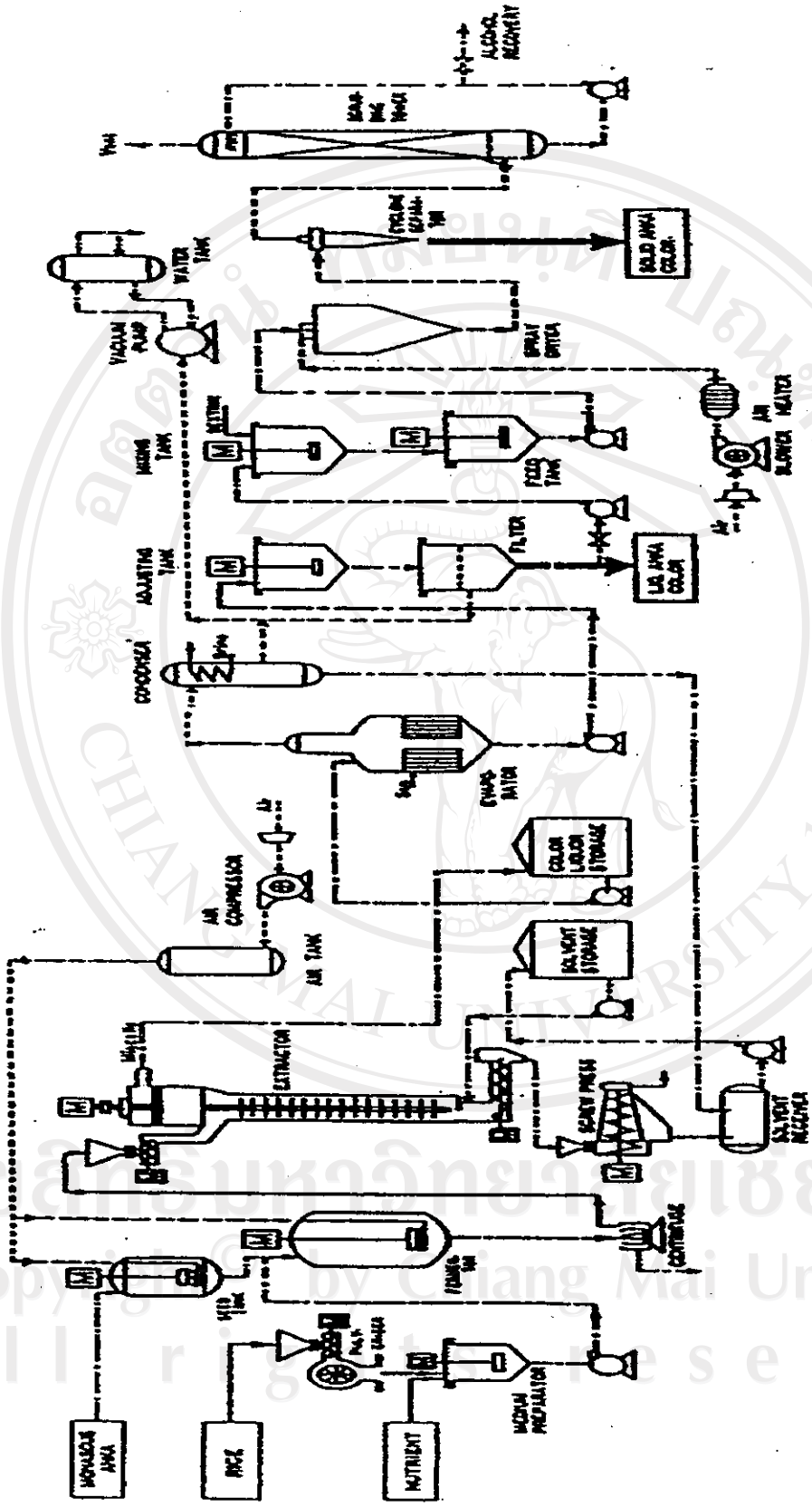
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นำมาวัดดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และ 500 นาโนเมตร ส่วน Sweeny *et al.* (1981) ประสบความสำเร็จจากการแยกสีบริสุทธิ์ชนิดต่างๆจากข้าวแดงดังขั้นตอนต่างๆ แสดงใน ภาพที่ 2.4 ส่วนภาพที่ 2.5 เป็นการแสดงกรรมวิธีการผลิตสีโมแนสคัส โดยวิธีการหมักเปียกและแบบวิธีการเก็บเกี่ยวสารสีในเชิงอุตสาหกรรม



ภาพที่ 2.4 การแยกสารสีบริสุทธิ์จากผงข้าวแดง
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Sweeny *et al.*, 1981 (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.5 แสดงกรรมวิธีการผลิตสีโมแนสคัส โดยวิธีการหมักเปียกและแบบวิธีการหมักเกลือแร่ของสารสีในชุดสาหกรรม

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Su and Huang, 1980 (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.9 การใช้ประโยชน์สีโมแนสคัส (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

การใช้ประโยชน์ของสีธรรมชาติชนิดนี้มีนานกว่าพันปีในประเทศจีน และมีรายงานกล่าวถึง ดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 2.5 สิทธิบัตรการใช้ประโยชน์สีโมแนสคัสมีมากกว่า 50 ฉบับ จดในประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส และเยอรมัน (Lin *et al.*, 1992) ในขณะที่ระหว่างปี ค.ศ. 1971 พบว่าเพียง 39 ฉบับ โดยจดในญี่ปุ่น 30 ฉบับ สหรัฐอเมริกา 4 ฉบับ และยุโรป 5 ฉบับ (Cook, 1994)

ตารางที่ 2.5 การใช้ประโยชน์จากสีโมแนสคัส

การใช้ประโยชน์	ชนิด
1. เครื่องดื่มแอลกอฮอล์	- สาเก (sake หรือ rice wine) - ไวน์แดง - เหล้าจีน
2. เครื่องดื่มไม่มีแอลกอฮอล์	- น้ำหวาน - น้ำนม น้ำนมเปรี้ยว - น้ำผลไม้
3. อาหาร	- แยมถั่วเหลือง (bean jam) - เต้าหู้ยี้ (Chinese cheese หรือ sufu) -เนื้อเทียม (artificial meat products) - กะทิ - ไอศกรีม - ไส้กรอก (sausages) - แฮม (hams) - ซอสมะเขือเทศ (ketchup) - ขนมลูกชุบทำจากถั่ว
4. อื่น ๆ	- โคจิ ซีอิ้ว - ยาเม็ดและยาน้ำ - เครื่องยาจีน - เครื่องสำอาง เช่น แป้งฝุ่นผัดหน้า - Aperitifs ขนมต่างๆ - ผ้าไหมและรังไหม -เจือสีกระดาษเซลโลเฟนห่อเนื้อ

ที่มา : ดัดแปลงจากบุษบา ยงสมิทธ์ (2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.10 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส ในอาหารเหลวและบนอาหารแข็ง

ก. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสีโมแนสคัสในอาหารเหลว

1. **แหล่งคาร์บอน**

Lin (1973) รายงานการหมักเหลวของ *Monascus* sp. F-2 ในอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าแป้งละลายน้ำ (soluble starch) กาแลคโทส และมอลโทส เหมาะสมกับการผลิตสีตามลำดับ การเติมสังกะสีประมาณ 800 ไมโครกรัมต่อลิตรมีส่วนเพิ่มการเจริญของเส้นใย และเพิ่มความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆดังต่อไปนี้ เช่น อะราบิโนส ไซโลส กลูโคส ฟรุคโทส แมนโนส ซูโครส มอลโทส แป้ง ซอร์บิทอล เอทานอล (Johnson and McHan 1975) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

บุษบา ยงสมิทธ์ และวรรณภา ทาบโลกา (2527) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ได้รายงานเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์มันสำปะหลังในการผลิตสีโมแนสคัส โดยได้ทำการคัดเลือกเชื้อราโมแนสคัสที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี

Lee *et al.* (1995) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ได้ใช้ชิ้นมันสำปะหลังในอาหารเหลว และเรียกกระบวนการนี้ว่า solid-liquid state culture method ซึ่งช่วยลดปัญหาความหนืดของอาหารหมักได้

แป้งข้าวเจ้า (Su and Huang, 1991) สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนผลิตสีโมแนสคัสได้ดีเช่นกัน ส่วน Lin and Demain (1991) พบว่าเมื่อใช้ defined medium นั้น แหล่งคาร์บอนที่พบว่าเหมาะสมต่อการสร้างสีของ *Monascus* sp. TTWMB 6042 จะเป็นมอลโทส กลูโคส และฟรุคโทส ตามลำดับ ในขณะที่การเจริญของเชื้อรานี้จะดีในแป้ง กลูโคส และมอลโทส ตามลำดับ แต่ไม่พบการเจริญในกาแลคโทส แลคโทส และซูโครส Chen and Johns (1994) พบว่าถ้าเลี้ยง *M. purpureus* ในอาหารที่มีคาร์บอนเข้มข้นสูง 50 กรัมต่อลิตร ในสภาพอับอากาศจะพบว่ามีการสร้างเอทานอลเกิดขึ้น Pastrana and Goma (1994) พบว่า *M. rubber* สร้างสีจากเอทานอลดีกว่ากลูโคส (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

Chiu and Chan (1992) (อ้างอิงจากจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) พบว่าเติม น้ำมันข้าวโพด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสังเคราะห์เพื่อเลี้ยง *M. purpureus* จะช่วยให้ค่าสีที่ได้เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า แต่การเจริญของเชื้อราจะลดลงครึ่งหนึ่ง

Petra *et al.* (1994) ศึกษาการใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตรงควัตถุจากเชื้อ *M. purpureus* CCM 8152 สามารถสร้างสีจากเอทานอลได้ดีกว่ามอลโทส

Rosa *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาเชื้อรา พันธุ์ *Monascus purpureus* Went (' MI 210765) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในการผลิตสีโดยใช้แป้งข้าวสาลีเป็นแหล่งอาหาร ทำการศึกษาใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฟลาสก์พร้อมทั้งเขย่า (shake flask) หาความหนืด (viscosty) ของอาหารว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและสารสี ปริมาณสีที่เชื้อผลิตมีความแตกต่างกันเมื่อใช้อาหารที่มีรำข้าวและ/หรือกลูเตน (gluten) และได้พบว่าแป้งที่มีกลูเตนในอาหารเหลวมีความเข้มข้น 3-5 เปอร์เซ็นต์เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อ และยังพบอีกว่าการเติม NH_4Cl ที่มีความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตรทำให้เกิดมวลเซลล์ (biomass) มากกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมถึง 40 เปอร์เซ็นต์ แต่จะไปยับยั้งการเกิดสีแดง ส่วนการเติม $ZnSO_4.7H_2O$ (w/v) ที่มีความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตรได้ผลิตภัณฑ์สีแดงมาก

2. **แหล่งไนโตรเจน**

Lin (1973) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) พบว่า *Monascus* sp. F-2 สามารถผลิตสีได้ดีในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารไนเตรต และกลูตาเมต ส่วนแหล่งสารอินทรีย์ที่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตสี เช่น เปปโตน และสารสกัดยีสต์ แต่จากรายงานของ Carels and Shepherd (1977), Shepherd (1977) พบว่าเมื่อแหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดยีสต์จะผลิตสีแดงอย่างเดียว เนื่องจากอาหารนี้มีกรดอะมิโนมากพอ เมื่อเชื้อเจริญขึ้นจะทำให้พีเอชสูงขึ้น สารสีสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระและกรดอะมิโน หรือ NH-group ภายในเส้นใยเปลี่ยนเป็นกลุ่มสารอนุพันธุ์เอมีนได้และไม่พบสีส้มหรือสีเหลือง ส่วนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรตจะได้สารสีแดงและสีส้ม อาหารนี้ไม่มีกรดอะมิโนอิสระ ถึงแม้พีเอชจะสูงขึ้น สารสีจะสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนหรือ NH-group ภายในเส้นใยได้เท่านั้น จึงทำให้สารสีส้มยังเหลืออยู่ ขณะที่อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไนเตรตจะทำให้พีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้สารสีที่ผลิตได้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ NH-group ภายในเส้นใยได้ ผลที่เกิดขึ้นคือ จะมีการสะสมของโมนาสโครูบริน (สีส้ม) และรูโบรพังตาติน (สีส้ม) ได้สารสีส้ม การเจริญของราแดงบางสายพันธุ์ในอาหารนี้ได้สารสีเหลืองสามารถเกิดขึ้น โดยการเกิดออกซิเดชันของโมนาสโครูบริน หรือรูโบรพังตาตินกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เป็นโมนาสซินหรือแองคาฟลาวิน Carels and Shepherd (1977) พบว่าสารสีส้มโมนาสโครูบริน และรูโบรพังตาตินสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางชีวภาพ ส่วนสีอื่นๆเช่น สีแดง สีเหลือง เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยขึ้นกับสภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อ

การเติมกรดอะมิโนในรูปของสารสกัดยีสต์ ในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรตและแอมโมเนียมคลอไรด์ จะมีผลทำให้เพิ่มการสร้างเส้นใยหรือมวลชีวภาพ อาจเนื่องมาจากในสารสกัดยีสต์มีวิตามินอยู่ด้วย ส่วนการเติมกรดอะมิโนทั้งหมดที่พบในสารสกัดยีสต์ลงในอาหารที่มีไนเตรตหรือแอมโมเนียมจะเป็นการลดการสร้างสารสีแต่จะกระตุ้นการสร้างโคนิเดีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Shepherd, 1977; Carels and Shepherd, 1978; Carels and Shepherd, 1983) (อ้างอิงจาก บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

Wong *et al.* (1981) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนสำคัญต่อการสร้างสีโดยกลูโคสความเข้มข้นระหว่าง 40-200 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรต ที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ทำให้ *M. purpureus* ผลิตสารสีแดงได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตสูงกว่า 50 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญการผลิตสี

วรรณภา ทาบโลกา (2529) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสีแดงของเชื้อโมแนสคัส กลุ่มที่ใช้มันสำปะหลังได้ดี เช่น สายพันธุ์ *M. purpureus* KB21035 KB11304 และ KB20322 พบว่าเปปโตนให้สารสีแดงสูงสุด โพแทสเซียมไนเตรตให้สารสีแดงพอสมควร ส่วนโซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียให้สารสีแดงน้อยมาก เมื่อเทียบการสร้างสารสีแดงในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเปปโตน และแป้งถั่วเหลืองที่มีความเข้มข้นต่างๆกันพบว่าสายพันธุ์ KB21035 และ KB20322 ใช้แป้งถั่วเหลืองสร้างสารสีแดงได้น้อยกว่าเปปโตน ขณะที่สายพันธุ์ KB11304 สร้างสารสีแดงได้ดีในอาหารที่มีแป้งถั่วเหลืองมากกว่าเปปโตน และเป็นรายงานแรกที่มีการใช้ถั่วเหลืองไขมันเต็ม (full fat soy flour) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลดีต่อการสร้างสีโมแนสคัส

Lin and Demain (1994) พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และโมโนโซเดียมกลูตาเมตเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB 6042 ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสีคือ โมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 1.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ร่วมกับมอลโทสเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ Pastrana *et al.* (1994) Santerre *et al.* (1995) พบกันว่าสารไนโตรเจนชนิดนี้ร่วมกับกลูโคสดีสำหรับการสร้างสีของ *M. rubber* แต่แอมโมเนียมไนเตรตให้ไนโตรเจนต่ำในปฏิกิริยา Schiff-base reaction จึงเกิดการสร้างสีแดงน้อย (Lin and Demain, 1995) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

Yongsmith *et al.* (1993) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิดคือสารสกัดยีสต์ เปปโตน และสารสกัดมอลต์ต่อการเจริญ และการสร้างสีเหลืองของเชื้อราสายพันธุ์ป่า *Monascus* sp. KB10 พบว่าเปปโตนมีผลโดยตรงต่อการกระตุ้นการสร้างสี สอดคล้องกับรายงานของ Chen and Johns (1993) แต่สารสกัดยีสต์ส่งเสริมการเจริญมากกว่าการสร้างสารสี ส่วนสารสกัดมอลต์มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารสีน้อยกว่าแหล่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไนโตรเจนอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้เปปโตนเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับกรดกลูตามิกเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์จะให้สีเหลืองสูงสุดเมื่อพีเอชเป็นกรด

สมชาย ไกรรักษ์ (2536) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลืองของเชื้อราสายพันธุ์กลาย *Monascus* sp. KB20M10.2 พบว่าแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอนินทรีย์ที่ให้สารสีเหลืองได้ดีที่สุดคือโพแทสเซียมไนเตรต โดยจะให้สารสีเหลือง 216 หน่วยต่อมิลลิมิตร รองลงมาคือแคลเซียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ที่ให้สารสีเหลืองสูงสุดคือแป้งถั่วเหลืองเท่ากับ 674.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเปปโตน สารสกัดเนื้อ สารสกัดยีสต์ และสารสกัดมอลต์ได้ปริมาณสารสีเหลือง 434.7, 392.5, 211.7 และ 20.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และศึกษาความเข้มข้นของแป้งถั่วเหลืองที่เหมาะสมพบว่าที่ความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ให้สารสีเหลืองสูงสุดรองลงมาคือ 4.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การใช้แป้งถั่วเหลืองเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 3.0 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมต่อการผลิตสารสีเหลืองของ *Monascus* sp. KB20M10.2 (Yongsmith *et al.*, 1998)

Juzlova *et al.* (1994) (อ้างอิงจากจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) รายงานถึงการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* CCM8152 ในอาหารเหลวสังเคราะห์พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการสังเคราะห์สารสีส้ม ในขณะที่สารประเภทกรดอะมิโนช่วยในการสังเคราะห์สารสีแดง และสีเหลือง นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อรา 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกใช้มอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนขั้นที่ 2 ใช้เอทานอลจะทำให้เชื้อราสามารถใช้ เอทานอลในการสังเคราะห์ในการสังเคราะห์สารสีได้ดีขึ้น

Ming and John (1993) (อ้างอิงจากจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) พบว่าการเติมแอมโมเนียและเปปโตนในอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* 192F จะช่วยในการเจริญและการสร้างสีของเชื้อรา ในขณะที่การเติมไนเตรตไม่ช่วยทั้งในการผลิตสีและการเจริญ โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงคือ การเลี้ยงเชื้อรานี้ในอาหารเหลวสังเคราะห์กลูโคส-เปปโตน ที่พีเอชเท่ากับ 4

Jung *et al.* (2003) ได้ศึกษาผลของการผลิตรงควัตถุ โดยเชื้อโมแนสคัสในอาหารเหลวที่เติมกรดอะมิโน 20 ชนิด เปรียบเทียบกับ NH_4NO_3 วัดค่าสี L a b chroma และ hue พบว่าการเติมกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดอนุพันธ์ของรงควัตถุสีแดง ทำให้สีแดงจากโมแนสคัสมีเฉดสีแตกต่างกัน สีแดงที่ได้จะมีเฉดสีส้มแดงไปจนถึงสีม่วงแดง ส่วนค่าสีเหลืองและสีส้มไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเติมกรดอะมิโนแตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. **อุณหภูมิ**

Manandhar and Apinis (1971) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ศึกษาอัตราส่วนการเจริญของ *Monascus* spp. 37 สายพันธุ์บนอาหาร malt extract agar พบว่า *Monascus* sp. ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส การเจริญของ *Monascus* sp. ส่วนใหญ่ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญโดยทั่วไปที่ 25 และ 40 องศาเซลเซียสจะช้า ส่วนที่อุณหภูมิ 45 และ 18 องศาเซลเซียส การเจริญจะช้ามาก การสร้างสีจะสร้างได้ดีที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส

Lin (1973) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) เพาะเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ลงในอาหารเหลวนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 27, 32, 37 และ 40 องศาเซลเซียส บ่มนาน 3 วัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการสร้างสีได้ดีที่สุดคือ 32 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 27 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิมากกว่า 32 องศาเซลเซียส จะทำให้การผลิตสีลดลงอย่างรวดเร็ว

Lee *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ที่สามารถสร้างสีแดงและสารโมนาโคลิน เค ได้ในปริมาณสูง โดยที่อาหารเหลวใส่เชื้อราลงในถัง 5 ลิตร บ่มที่ 30 ^{o}ซ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 500 rpm เป็นเวลา 10 วัน นำมาวัด OD 500 nm เพื่อหาปริมาณสีแดงและใช้ HPLC วิเคราะห์ปริมาณสารโมนาโคลิน เค (Monacolin K) พบว่าในอาหารเหลวมีสารโมนาโคลิน เค ต่ำ (5 ug/ml) และยังพบอีกว่าความชื้นและปริมาณอากาศมีผลต่อการผลิตสีและสารโมนาโคลิน เค

4. **ระยะเวลากับการผลิตสีและการเจริญของเซลล์**

ปกติการสร้างสีโมแนสคัสในอาหารเหลวสูงสุดไม่เกิน 7 วัน ตัวอย่างเช่น Lin (1973) ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารเหลวที่มีผงข้าว 5 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4 7H_2O$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.2 เปอร์เซ็นต์ บรรจุอาหาร 75 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าการผลิตสีมีความสัมพันธ์กับการเจริญ (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

Kim *et al.* (2002) ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมลักษณะสัณฐานวิทยาและการสร้างรงควัตถุสีแดงของเซลล์โมแนสคัส โดยเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากนั้นขยายขนาดเป็น 300 ลิตร เขย่าที่ความเร็ว 350 รอบต่อนาทีหรือน้อยกว่า พบว่าเกิดการรวมกันของเส้นใยไมซีเลียมให้ปริมาณสีแดงเท่ากับ 37.5 ยูนิต (OD Units) เส้นใยที่มีลักษณะยาวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น ให้ผลเช่นเดียวกับการเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจาก 350 เป็น 700 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัดปริมาณสีแดงสูงสุดเท่ากับ 220 ยูนิต เมื่อเซลล์มีเส้นใยไมซีเลียมเป็นสายสั้นลง เนื่องจากเกิดความเสียหายจากแรงเฉือนที่เขย่าความเร็ว 500 รอบต่อนาที

5. พีเอช (pH)

Lin (1973) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ทดลองปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารตั้งแต่ 2-10 เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน *Monascus* sp. F-2 จะให้การผลิตสีสูงสุดในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 และพีเอชสุดท้ายของอาหารภายหลังการบ่มลดลงเป็น 5.8 ส่วนใหญ่จะผลิตสีแดงได้มากกว่าที่มีพีเอชต่ำกว่า 6.0 เมื่อบ่มเป็นเวลานาน 17 วันโดยเชื้อรา *M. purpureus*

สายพันธุ์ *M. barkari* KB10 สามารถสร้างสีเหลืองได้ดีในอาหารที่มีพีเอชต่ำ 2.5-4.0 (Yongsmith *et al.*, 1993) ในขณะที่สายพันธุ์กลาย KB20M10.2 ของ *M. kaoliang* สามารถสร้างสีเหลืองได้ทั้งในสภาพเป็นกรดและเป็นกลาง (Yongsmith *et al.*, 1990) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

6. สารอื่นๆ

Hong *et al.* (1995) ได้รายงานการใช้กรดโครโทนิก และซอร์บิกที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเร่งการสร้างสีได้โดยไม่มีผลต่อการเพิ่มเส้นใย ส่วนการเติมสาร cerulenin ethionine เมทิโอนีนหรือยูเรียมีผลต่อการยับยั้งการสร้างสี (Blanc *et al.*, 1995) ในขณะที่ Kang and Jung (1995) พบว่า $MgSO_4$ เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการผลิตสีในอาหารที่ประกอบด้วยผงข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ และเปปโตน 0.05 เปอร์เซ็นต์ (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

ข. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสีโมแนสคัสบนอาหารแข็ง

1. สายพันธุ์เชื้อรา

เชิดชัย เชียวธีรกุล และคณะ (2519) ได้ศึกษาเชื้อราทั้งหมด 4 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *Monascus purpureus* K 001 ให้สีแดงเข้มกว่าตัวอื่นๆ

อรัญ หันพงศ์กิตติกุล และคณะ (2530) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสีของอังคักจากการทดสอบ *Monascus purpureus* 9 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่สร้างสีแดงได้สูงสุดได้แก่ *Monascus purpureus* CMU-KU รองลงมาคือ *Monascus purpureus* TISTR 3090 และ *Monascus purpureus* CMU-FST ตามลำดับ

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ (2531) ได้ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ *Monascus purpureus* ที่เหมาะสมในการผลิตสารสีจากการทดสอบ *Monascus purpureus* 6 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่สร้างสีแดงได้สูงสุดได้แก่ *Monascus purpureus* TISTR 3090

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. สับสเตรต

2.1 ข้าว

วินิต ดีประชากร (2520) ได้ศึกษาการผลิตข้าวแดงพบว่า ข้าวที่นำมาผลิตข้าวแดงใช้ข้าวเจ้าดีที่สุด เพราะสามารถให้สีแดงเข้มที่สุด เมื่อเทียบกับข้าวเหนียวและข้าวซ้อมมือ

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ (2531)ได้ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ *Monascus purpureus* ที่เหมาะสมในการผลิตสารสีจากการทดสอบข้าว 5 สายพันธุ์ พบว่าข้าว กข 23 ให้สารสีแดงได้ดีที่สุด

พัชรีย์ พัฒนากูล (2545) ได้นำอังคักมาเป็นส่วนผสมในการผลิตไส้กรอกเพื่อเพิ่มสีแดงให้สูงสุดตามที่ผู้บริโภคต้องการ โดยได้ศึกษาพันธุ์ข้าว 4 สายพันธุ์ได้แก่ ข้าวซ้อมมือ ข้าวเจ้าชัยนาท ข้าวหอมมะลิแม่จัน และข้าวหอมมะลิสุรินทร์ หลังจากการทดสอบพิจารณาเลือกข้าวเจ้าชัยนาทเป็นวัตถุดิบในการผลิตอังคักเพื่อเติมแต่งสีให้กับไส้กรอก

จุลยุทธ บุญสร้างสม (2546) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ต่อการสร้างซิตรินินในข้าวแดง ได้แก่ เชื้อรา *M. purpureus* 4 สายพันธุ์ ชนิดข้าว 3 ชนิด ผลของการเติมโซเดียมอะซิเตต และเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวแบบให้อากาศ และไม่ให้อากาศต่อการสร้างซิตรินินและรงควัตถุสีแดง พบว่าสายพันธุ์เชื้อรา *M. purpureus* และชนิดของข้าวที่มีอะมิโลสต่างกันมีผลต่อรงควัตถุสีแดงและซิตรินินในข้าวแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ซึ่งจากข้าวแดงที่หมักโดยเชื้อรา *M. purpureus* ATCC 16365 ในข้าวหอมมะลิให้ค่าสีแดงสูงสุดที่ 623 ยูนิต/กรัม ขณะที่ข้าวแดงที่หมักโดยเชื้อรา *M. purpureus* FTCMU ในข้าวซ้อมมือให้ปริมาณซิตรินินสูงสุดเท่ากับ 4,400 ppm รองลงมาคือข้าวเจ้าพิจิตร 2,200 ppm และข้าวหอมมะลิ 950 ppm

Palo *et al.* (1960) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสร้างสีของ *M. purpureus* และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอังคัก มีดังต่อไปนี้ ความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชระหว่าง 3.0-7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซียส แต่สายพันธุ์ ข้าวเหนียวให้ผลไม่ดีนัก บุษบา ยงสมิทธ์ (2518) ได้ทดลองการสร้างสีของ *M. purpureus* โดยใช้สภาวะต่อการผลิตข้าวแดงของ Palo *et al.* (1960) มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ต่างๆของไทย พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวหอมมะลิให้สีเข้มใกล้เคียงกัน แต่ข้าวเหนียวกลับให้กลิ่นหอมมากกว่าข้าวหอมมะลิ กลิ่นหอมดังกล่าวคือเอสเทอร์ และแอลกอฮอล์ปนกัน ทั้งนี้ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูและข้าวเจ้าพันธุ์หอมมะลิให้ผลความเข้มของสีใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ญี่ปุ่น ในขณะที่ข้าวสวยพันธุ์อื่นๆของไทยคือ พันธุ์เส้าไห้ พันธุ์ธรรมดา ฯลฯ นั้นส้วนแต่ให้สีและความหอมน้อยกว่ามาก ส่วนอรัญ หันพงศ์กิตติกุล และคณะ (2531) รายงานว่าปริมาณอะมิโลสในเมล็ดข้าวที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตข้าวแดงแตกต่างกันไปด้วยโดยพบว่าพันธุ์ข้าวที่มีอะมิโลสสูงกว่า 24 เปอร์เซ็นต์เช่น พันธุ์เหลือง 148 กข23 กข25 เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงมากกว่าพันธุ์ กข7 และขาวดอกมะลิ 105 เชิดชัย เชียวธีรกุล และคณะ (2519) พบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวมีเพียงพอต่อการสร้างสารสี จึงไม่จำเป็นต้องเติมเปปโตน

Schumacher *et al.* (1996) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) พบเช่นกันว่าข้าวจากแหล่งปลูกต่างๆในประเทศเกาหลีมีผลต่อการสร้างสีของข้าวแดง และพบว่าข้าวแดงจากแหล่งปลูก Punpo ให้ผลดีที่สุด

2.2 เมล็ดธัญพืช และอื่นๆ

พลายแก้ว ไชยเบญจรงค์ และบุษบา ยงสมิทธ์ (2534) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ได้ศึกษาแหล่งสับสเตรตชนิดต่างๆต่อการผลิตสีโมแนสคัส เปรียบเทียบกับการผลิตบนข้าวโดยใช้เมล็ดข้าวโพด มันเทศ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง ขนมปังแทนข้าวต่อการเจริญ การสร้างสี และการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* พบว่าขนมปังให้ค่าสีแดงมากที่สุด ซึ่งตรงกับการทดลองของ Lin and Lizuka (1982) รองลงมาคือมันฝรั่ง และปลายข้าวหอมมะลิ นอกจากนั้นให้สีไม่ดีนัก ส่วนการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* พบว่าถั่วเหลืองให้ปริมาณสปอร์สูงสุด รองลงมาคือ ถั่วเขียว ขนมปัง และปลายข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ ส่วน Rashbaum and Yueh (1983) ทดลองใช้ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ เป็น สับสเตรตแทนข้าวพบว่าได้ผลดีเช่นกัน

Xu *et al.* (1998) ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ *Monascus anka* เพื่อผลิตรงควัตถุสีแดง พบว่าเส้นใยของเชื้อราสามารถแทรกเข้าไปภายในเมล็ดข้าวโพดได้ยาก เพราะยังมีเปลือกหุ้มอยู่ จึงปรับปรุงโดยการแยกเอาเปลือกหุ้มเมล็ดข้าวโพดออกและบดให้มีขนาดเล็กลงประมาณ 16-20 mesh เพื่อเพิ่มความสามารถดูดซับน้ำและการเกิดเจล ของแป้ง ทำการแช่ข้าวโพดในน้ำนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง และมีความชื้น 70 % ส่วนขั้นตอนการเพาะเลี้ยงทำเหมือนข้าวพบว่าการผลิตรงควัตถุและความสามารถในการย่อยแป้ง (glucoamylase activity) ใกล้เคียงข้าว

Jeong-Sil (2003) ได้ศึกษาการสร้างรงควัตถุจากเชื้อรา *Monascus purpureus* โดยที่เลี้ยงบนอาหารแข็งให้ผลดีที่สุด จากนั้นมีการเลี้ยงบนขนมปัง และสกัดสีโดยใช้แอลกอฮอล์ สำหรับอาหารเหลวที่มีสารอาหารจำเป็นผสมอยู่ ปริมาณสีที่ได้จะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบที่มีในอาหาร และค่าพีเอช การทดลองมีการเขย่าเพื่อเพิ่มการละลายของออกซิเจน โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 ให้สีมากกว่าที่ค่าพีเอช 4.0 หรือ 9.0 ส่วนไนโตรเจนที่ดี ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โมโนโซเดียมกลูตาเมท (monosodium glutamate) ให้ค่าสีเท่ากับ 3.01 และ 3.52 หน่วย (400 และ 500 นาโนเมตร) ตามลำดับ

3 พีเอช (pH)

Palo (1960) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสีแดงได้ในพีเอชระหว่าง 3.0-7.5 พลายแก้ว ไชยเบญจรงค์ และบุษบา ยงสมิทธ์ (2534) พบว่าสภาวะเป็นกรดไม่มีผลต่อการสร้างสีเหลืองของ *M. barkari*

Johns and Stuart (1991) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสีได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 6.0 เมื่อเทียบกับพีเอช 3.4 และ7.0

Teng and Feldheim (2001) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของข้าวในระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* เพื่อผลิตอังคักและรงควัตถุ จากการทดลองพบว่า ช่วง 5 วันแรกมีค่าพีเอชลดลง และมีปริมาณสีน้อยมาก ช่วง 5-15 วันของการหมัก ปริมาณสตาร์ลดลงเรื่อยๆ ค่าพีเอชลดลงต่ำสุด

4 อัตราส่วนของก๊าซ

Han and Mudgett (1992) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) เป็นคนแรกที่รายงานว่าสัดส่วนของแก๊สออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ มีส่วนต่อการผลิตข้าวแดงด้วย โดยพบว่าความดันแก๊สออกซิเจนต่อความดันคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.50 ต่อ 0.02 บรรยากาศ (atm) จะมีผลดีต่อการสร้างสีแดงของอังคักมากที่สุด

5 อุณหภูมิ (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสีจะอยู่ระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส โดยบุษบา ยงสมิทธ์ (2529) พบว่าอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลส แต่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส

6 ความชื้น

Palo *et al.* (1960) เป็นคนแรกที่รายงานว่าความชื้นต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ให้ผลดีต่อการสร้างสีของอังคักของ *M. purpureus* เชิดชัย เชียวธีรกุล และคณะ (2519) พบว่าความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ให้ผลดี เมื่อมีการเขย่าหรือการให้อากาศช่วยให้เชื้อราสร้างสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น รัตนา สุขสรรค์ (2528) พบว่าการหมักข้าวแดงในสภาพที่มีความชื้นสูงมากไปนั้น เชื้อราโมแนสคัสจะสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูง แต่สีกลับน้อยลง Lotong and Suwanarit (1990) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงในถุงพลาสติกของเชื้อรา *Monascus* sp. NP 1 คือ 32.6 เปอร์เซ็นต์ แต่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 39.6 เปอร์เซ็นต์นั้น อัตราการสร้างสารสีจะลดลง ความชื้นต่ำเกินไปทำให้เชื้อราเจริญได้ไม่ดี ส่งผลให้การสร้างสีไม่ดีด้วย ความชื้นสูงเกินไปเกิดการเจริญและการสร้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอนไซม์กลูโคสอะมิเลสมาก เกิดการสะสมกลูโคสมากยับยั้งการสร้างสีได้จึงได้พัฒนาสายพันธุ์กลายที่ทนกลูโคสได้สูง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตข้าวแดง (กังสดาลย์ บุญปราบ, 2538; กังสดาลย์ บุญปราบ และคณะ, 2539) ในขณะที่ Han (1990) และ Johns and Stuart (1990) พบว่าถ้าความชื้นเริ่มต้นต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์จะให้สีน้อย แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นที่ 50-56 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้สูงสุดภายใน 8 วัน พลายแก้ว ไชยเบญจรงค์ และบุษบา ยงสมิทธ์ (2534) ศึกษาสภาพวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสีของ *M. kaoliang* ที่ให้สีแดงโดยศึกษาเวลาในการแช่ข้าว และเวลาสะเด็ดน้ำ และของ *M. barkari* ที่ให้สีเหลือง ในสภาพที่เป็นกรด พบว่าเวลาแช่ข้าวนาน 8 ชั่วโมง และสะเด็ดน้ำ 5-10 นาที ที่ทำให้ข้าวมีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมต่อการสร้างสีแดงของ *M. kaoliang* และสีเหลืองของ *M. barkari* นอกจากนั้นยังพบเพิ่มเติมว่าการแช่ข้าวในน้ำนานเกินไปทำให้เมล็ดข้าวเกาะกัน การผึ่งสะเด็ดน้ำชั่วครู่ก็เพียงพอ มิฉะนั้นอาจทำให้ข้าวผึ่งลมมากเกินไป ทำให้ผิวหน้าแห้งเกินไป ไม่เป็นผลดีต่อการสร้างสี (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

Lee *et al.* (2002)ได้ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ที่สามารถสร้างสีแดงและสารโมนาโคลิน เค ได้ในปริมาณสูง ได้นำเชื้อรามาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งคือ Tsai-Lai rice บ่มไว้ที่ 30 ^{o}ซ มีความชื้นสัมพัทธ์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าจากเชื้อรา *Monascus* 72 สายพันธุ์ สายพันธุ์ *Monascus purpureus* M15 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่ดีที่สุดในอาหารแข็งสามารถผลิตสีแดงได้ มีค่าสีแดง (color value 12) และสารโมนาโคลิน เค (4 mg/g)

2.11 ข้อดีข้อเสียของการหมักอาหารแข็ง (บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

ข้อดี 1. การหมักแข็งใช้สารอาหารธรรมชาติธรรมดาง่ายๆ ราคาถูกมากกว่าการใช้สารสังเคราะห์ราคาแพง

2. ปริมาณน้ำใช้ต่ำ ประหยัด น้ำเสียน้อย จุลินทรีย์อื่นปะปนน้อย

3. ง่ายต่อการนำผลผลิตภัณฑ์ไปใช้ประโยชน์

4. การให้อากาศแบบซึมผ่านหรือชั่วครั้งชั่วคราวมากกว่าให้แบบต่อเนื่อง

5. ผลผลิตสูง

6. การใช้พลังงานต่ำกว่าการใช้ถังหมักแบบกวน

ข้อเสีย 1. จำกัดการใช้กับเชื้อราซึ่งทนความชื้นต่ำได้

2. ความร้อนสะสมมากในการผลิตระดับใหญ่

3.การตรวจสอบกระบวนการหมักเช่น ระดับความชื้น มวลชีวภาพ ออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ทำได้ลำบาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การออกแบบถังหมักยังไม่พัฒนาพอ

5. ผลิตภัณฑ์จำกัด

6. จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญช้า

2.12 วิธีการผลิตข้าวแดง

วิธีที่ 1 ในประเทศจีนและไต้หวัน ทำโดยแช่ข้าวในน้ำเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง นึ่งให้สุก หลังจากข้าวเย็นแล้วจึงนำไปใส่บ่อหมัก แล้วเพาะเชื้อโดยใช้กล้าเชื้อซึ่งเจริญบนเมล็ดข้าวประมาณครึ่งหนึ่งของข้าวที่นึ่งไว้ เติมน้ำลงในบ่อหมักประมาณหนึ่งเท่าโดยน้ำหนักของวัตถุดิบและเชื้อ ระหว่างการหมักจะทำการกวนเป็นครั้งคราวเพื่อลดอุณหภูมิ การหมักในขั้นนี้ใช้เวลาเพียง 4 วัน ข้าวจะมีสีแดง ในขั้นต่อไปสามารถใช้ผลิตข้าวแดงได้ปริมาณถึง 30 เท่าของกล้าเชื้อ ขั้นตอนการหมักในระยะหลังนี้เริ่มด้วยการนึ่งข้าวโดยใช้ความดันไอ 0.2 กก./ซม.^{2} เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิให้ต่ำลงถึงระดับ 40 °ซ พ่นน้ำประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ลงบนข้าวแล้วนำไปนึ่งต่ออีก 30 นาที ปล่อยให้อุณหภูมิลดลงถึง 36 °ซ จึงเพาะกล้าเชื้อ ในระยะแรกของการหมักอุณหภูมิจะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึง 42 °ซ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มถึงระดับนี้จะต้องแบ่งข้าวซึ่งเดิมรวมกันอยู่ในบ่อ แบ่งใส่กระด้งหรือบุ้งกี๋ แล้วบ่มต่ออีก 8 วัน ในระหว่างการบ่มจะนำกระด้งเชื้อมาจุ่มน้ำแล้วยกขึ้นจนสะเด็ด ซึ่งตลอดระยะการบ่มจะทำเช่นนี้ประมาณสามครั้งด้วยกัน เพื่อให้เมล็ดข้าวชุ่มชื้นเหมาะสมต่อการเจริญและชอนไชของเส้นใย และป้องกันการเกาะติดระหว่างเมล็ดข้าว หลังจากการบ่มข้าวจะเปลี่ยนเป็นสีแดงทั่วทั้งเมล็ด และเมื่อบี้เมล็ดข้าวให้แตกออก จะเห็นว่าภายในก็จะเป็นสีแดงเข้มเช่นกัน จึงนำข้าวแดงนี้ไปตากหรืออบจนมีความชื้นเหลือเพียง 7-10 เปอร์เซ็นต์ (นภา โล่ห์ทอง, 2527)

วิธีที่ 2 ใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* ทำในขวดแก้ว ใช้ข้าว 50 กรัมใส่น้ำ 30 มิลิกรัม นำไปอบด้วยเครื่องอบอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 30 นาที เพื่อให้ข้าวสุกและทำลายจุลินทรีย์ที่ติดมากับข้าว จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง เอาน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่เลี้ยงเชื้อราอายุ 25 วัน ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar เขี่ยสปอร์ให้แขวนลอยในน้ำกลั่น เทลงไปในข้าว ทิ้งไว้ 20 วันที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °ซ) เขี่ยข้าวให้เข้ากันทุกวัน เพื่อให้เชื้อราเจริญทั่วเมล็ดข้าว ทั้งยังเป็นการเพิ่มอากาศแก่เชื้อราด้วย จากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 40 °ซ (วินิต ดีประชากร, 2520)

วิธีที่ 3 การผลิตข้าวแดงเริ่มจากผสมข้าวกับน้ำในอัตราส่วน 1:1 นำไปนึ่งในรังถึงที่อุณหภูมิ 100 °ซ นาน 20 นาที แบ่งข้าวนึ่งใส่ถุงทนร้อน (Polypropylene) ขนาด 8 x 12 นิ้ว ถุงละ 100 กรัม ใส่คอขวดอุดด้วยสำลีแล้วหุ้มด้วยฟอยล์ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อัดความดันไอ (Autoclave) หลังจากฆ่าเชื้อแล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นก่อนทำการเพาะเชื้อ แล้วจึงถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อลงบนข้าวนึ่ง กล้าเชื้อเตรียมได้โดยการเพาะเชื้อ *Monascus purpureus* ลงบนอาหาร PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ นาน 7 วัน ถ่ายเชื้อโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีของเชื้อ แล้ววางลงบนผิวหน้าของข้าวนึ่ง นำข้าวที่ถ่ายเชื้อแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °ซ นาน 20 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำมาอบที่อุณหภูมิ 80 °ซ นาน 6 ชั่วโมง นำไปบดให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 mesh (พัชรีย์ พัฒนากูล, 2545)

2.13 สูตรอาหารสำหรับเชื้อโมแนสคัสเพื่อนำไปผลิตรงควัตถุสีแดง

การทดลองในครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์แบบเหลว (Chemically defined medium) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Hajjaj *et al.* (2001) ได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีผลต่อการสร้างโมนาโคลิน เค ของเชื้อรา *Aspergillus terreus* Thom ATCC 74135 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ โดยสูตรอาหารเหลวพื้นฐานดังกล่าวประกอบด้วย

- K_2HPO_4	5 กรัม
- KH_2PO_4	5 กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$	0.1 กรัม
- $CaCl_2.2H_2O$	20 มิลลิกรัม
- $FeSO_4.7H_2O$	0.2 กรัม
- $ZnSO_4.7H_2O$	0.2 กรัม
- $MnSO_4.4H_2O$	20 มิลลิกรัม
- $CuCl_2.2H_2O$	5 มิลลิกรัม
- H_3BO_3	11 มิลลิกรัม
- $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	5 มิลลิกรัม

ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

การทดลองในครั้งนี้ใช้สูตรอาหารเหลวพื้นฐานดังได้กล่าวไว้ข้างบนนี้ ที่มีการเติมกลูโคสและ/หรือแลคโตส และเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมทหรือฮิสติดีน ในปริมาณที่แตกต่างกัน มีทั้งหมด 8 สูตร โดยอาหารเหลวสูตรที่ 1-6 ใช้เชื้อ *Monascus purpureus* FTCMU และอาหารเหลวสูตรที่ 7 และ 8 ใช้เชื้อ *Aspergillus terreus* TISTR 3109 การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์แบบเหลว (Chemically defined medium) นี้มาเลี้ยงเชื้อ เพราะต้องการให้เชื้อผลิตโมนาโคลิน เค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นหลัก ส่วนการผลิตรงควัตถุสีแดงนั้นเป็นเรื่องรอง แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 20 วัน แล้วพบว่าอาหารเหลวทั้งหมด 8 สูตรไม่เกิดสีแดง และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับอาหารสำหรับเชื้อโมแนสคัสเพื่อนำไปผลิตรงควัตถุสีแดงในสูตรที่ 1 นั้น พบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองในครั้งนี้มีสาร 3 ชนิดที่เพิ่มขึ้นมาคือ $CuCl_2.2H_2O$, H_3BO_3 และ $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ จึงสันนิษฐานว่าสารดังกล่าวอาจไปมีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างสีของเชื้อรา

สูตรอาหารสำหรับเชื้อโมแนสคัสเพื่อนำไปผลิตรงควัตถุสีแดงมีดังนี้

สูตรที่ 1 ประกอบด้วย (Blanc *et al.*, 1995)

Monosodium glutamate (MSG)	5 กรัม
K_2HPO_4	5 กรัม
KH_2PO_4	5 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 กรัม
$CaCl_2$	0.5 กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01 กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.01 กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.03 กรัม
Glucose	20 กรัม

ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

สูตรที่ 2 ประกอบด้วย (Yongsmith *et al.*, 1994) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

Polished rice powder	3%
$MgSO_4.7H_2O$	0.1%
KNO_3	0.15%
KH_2PO_4	0.25%

สูตรที่ 3 ประกอบด้วย (Yongsmith *et al.*, 1995) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

Polished rice powder	3%
monosodium glutamate	0.15%
$MgSO_4.7H_2O$	0.1%
KH_2PO_4	0.25%
$KH_2PO_4.7H_2O$	0.1%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

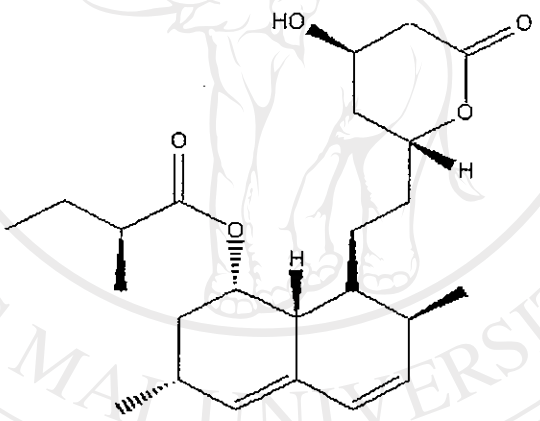
สูตรที่ 4 ประกอบด้วย (Yongsmith *et al.*, 1995) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

Cassava starch	3%
Malt extract	0.3%
Yeast extract	0.3%
peptone	0.5%

สูตรที่ 5 ประกอบด้วย (Yongsmith *et al.*, 1988) (อ้างอิงจากบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

แป้งมันสำปะหลัง	30 กรัม
แป้งถั่วเหลือง	30 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

2.14 โครงสร้างของโมนาโคลิน เค



ภาพที่ 2.6 สูตรโครงสร้างของสารโมนาโคลิน เค

ที่มา : Helen (2002)

ชื่อสามัญ : Monacolin K, Lovastatin, Mevinolin (Friedrich *et al.*, 1995)

ชื่อทางการค้า : Mevacor , Lipivas, Lovalip Mevinacor, Nergadan, Rovacor and Taucor (Helen, 2002)

สูตรโมเลกุล : $C_{24}H_{36}O_5$ (Endo, 1979)

น้ำหนักโมเลกุล : 404 (Endo, 1979)

จุดหลอมเหลว : 157 – 159 °C (Endo, 1979)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คุณสมบัติ : ไม่ละลายน้ำ และละลายได้เล็กน้อยในเมทานอล เอทานอล และอะซิโตไนไตรท์ (Helen, 2002)

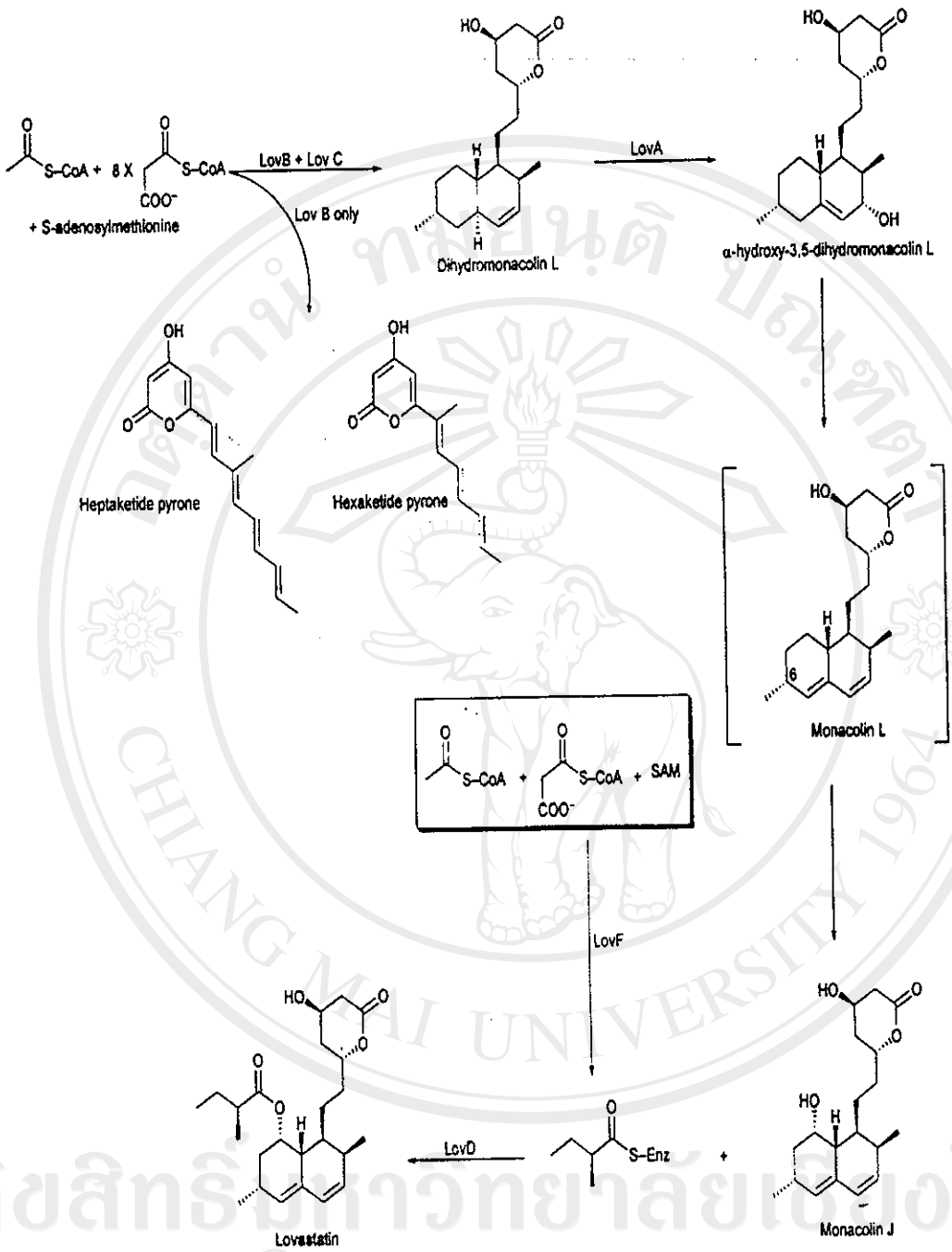
ชื่อ IUPAC :(1S-(1alpha(R), 3alpha, 7beta, 8beta(2S, 4S), 8abeta))-(1,2,3,7,8,8a-hexahydro-3, 7-dimethyl-8-(2-(tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2-yl) ethyl)-1-naphthyl) 2-methylbutanoate (Helen, 2002)

ประโยชน์ : สารโมนาโคลิน เค จะไปเป็นตัวยับยั้ง 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-Co A) ซึ่งเป็นสารหลัก (catalyses) ในการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล ผลของการยับยั้งเกิดจากสารโมนาโคลิน เค มีโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์ที่เป็น substrate ในธรรมชาติคือ HMG-Co A โดยที่สารโมนาโคลิน เค ไปมีส่วนทำให้การสังเคราะห์โคเลสเตอรอลลดลง โดยไปจำกัด VLDL (very low density lipoprotein) และ LDL (low density lipoprotein) ในหลอดเลือด (Sotiriadis, 2002)

2.15 กลไกการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน เค

เชื้อรา *Aspergillus terreus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้ด้วย polyketide pathway ดังภาพที่ 2.7 โดยเกิดได้จาก 2 ทางคือ ทางที่ 1 เป็น lovastatin nonaketide synthase (LNKS) เริ่มจาก acetate 1 โมเลกุล และ malonate 8 โมเลกุล เปลี่ยนเป็น dihydromonacolin L โดยมีรหัสพันธุกรรม (encoded) ได้แก่ lov B และ lov C แต่ถ้าไม่มี lov C มีแต่ lov B จะเกิดเป็น heptaketide pyrone และ hexaketide pyrone แทนที่จะเกิดเป็น dihydromonacolin L เมื่อเกิด dihydromonacolin L จะถูกเปลี่ยนเป็น ∞ hydroxyl-3,5-dihydromonacolin L โดย lov A และ ∞ hydroxyl-3,5-dihydromonacolin L ก็จะถูกเปลี่ยนเป็น Monacolin L และเปลี่ยนเป็น Monacolin J ตามลำดับ และในขณะที่ทางที่ 2 ก็เกิดไปพร้อมๆกับทางที่ 1 โดยทางที่ 2 เป็น lovastatin diketide synthase (LDKS) เริ่มจาก acetate 1 โมเลกุล malonate 1 โมเลกุล และ SAM (S-adenosylmethionine) โดยจะมี encoded คือ lov F แล้วเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างไป เมื่อทางที่ 2 มารวมตัวกับ Monacolin J ในทางที่ 1 แล้วมี lov D encodedจึงเกิดเป็น Lovastatin (โลวาสตาติน หรือโมนาโคลิน เค หรือเมวิโนลิน) Sorensen *et al.* (2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



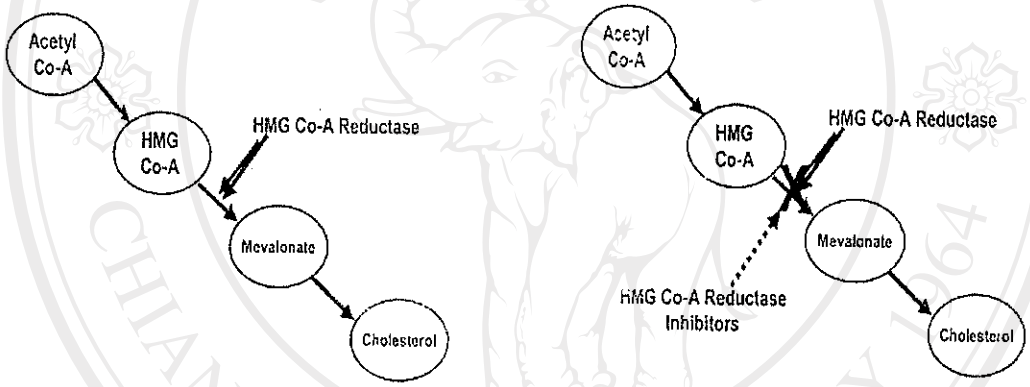
ภาพที่ 2.7 กลไกการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน เค

ที่มา : Sorensen *et al.* (2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.16 กลไกของโมนาโคลิน เค ในการยับยั้ง HMG-Co A reductase

โมนาโคลิน เค (Monacolin K) หรือโลวาสตาลิน (Lovastatin) หรือเมวิโนลิน (Mevinolin) เป็นสารที่ได้จากเชื้อราที่มีฟิลาเมนต์ (filament) เช่นเชื้อรา *Monascus rubber*, *Penicillium brevicompactum* และ *Aspergillus terreus* ซึ่งสารโมนาโคลิน เค นี้เกิดโดยกระบวนการเมตาโบไลท์ครั้งที่สอง ได้สารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนผ่านวิถีโพลีคีไทด์ (Polyketide pathway) พบว่าสารโมนาโคลิน เค นี้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์ เอ (Hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-Co A) reductase : Mevalonate : $NADP^+$ oxidoreductase [EC 1.1.1.34]) ซึ่งเป็นเอนไซม์กระตุ้นการเปลี่ยน HMG-Co A ให้เป็นเมวาโลเนต (Mevalonate) เพื่อใช้ในการสร้างโคเลสเตอรอล ดังภาพที่ 2.8 (Hajjaj *et al.*, 2001)



ภาพที่ 2.8 กลไกของสารโมนาโคลิน เค ในการยับยั้ง HMG-Co A reductase
ที่มา : Ender (2002)

2.17 ซิตรินิน (Citrinin) (European Mycotoxin Network, 2002 อ้างอิงโดยจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546)

นอกจากคุณสมบัติการรักษาโรคของข้าวแดงจากโมนาโคลิน เค (Monacolin K) ได้มีผลงานวิจัยหลายฉบับ ได้ศึกษาเกี่ยวกับซิตรินิน (Citrinin) ที่สร้างจากเชื้อราสกุลโมแนสคัสพร้อมกับสร้างรงควัตถุ ซิตรินินเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โดยมีสูตรโมเลกุลคือ $C_{13}H_{14}O_5$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 250 มีลักษณะผลึกรูปเข็มสีเหลืองเลมอน ละลายได้น้อยในน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เอทานอล และอะซิโตไนไตรล์ เป็นต้น มีปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอริกคลอไรด์ ไททาเนียมคลอไรด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สีเขียว และสีแดงเข้ม ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซิตรินินเป็นสารพิษจากเชื้อรา จัดอยู่ในกลุ่มสารไมโคทอกซิน (mycotoxin) ส่วนใหญ่จะพบจากเชื้อรา *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร--ประเภทธัญพืช ผลไม้ และถั่ว คนจะได้รับซิตรินินจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเข้าไป ซิตรินินถูกพบครั้งแรกในปี 1931 จากการแยกสารจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* หลังจากนั้นได้มีการพบการปนเปื้อนของซิตรินินในข้าวที่ประเทศญี่ปุ่นนำเข้าจากประเทศไทย ในปี ค.ศ. 1951 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเหตุการณ์ปัญหาข้าวเหลือง (yellow rice problem) จากนั้นมีรายงานมากมายถึงเชื้อราที่สามารถสร้างซิตรินินได้ เช่น *P. verrucosum* สร้างซิตรินิน ร่วมกับอ๊อกคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) ซึ่งจัดเป็นสารไมโคทอกซินเช่นกัน แต่มีฤทธิ์ทำลายระบบการทำงานของไต และตับที่รุนแรงกว่า บางครั้งจะพบสารไมโคทอกซิน ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันในตัวอย่างที่มี *P. verrucosum* ปนเปื้อน แต่ส่วนมากจะพบสารอ๊อกคราทอกซิน เอ เพียงอย่างเดียว

จากการศึกษาคุณสมบัติของซิตรินินพบว่า ซิตรินินสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (antibacterial) แต่ยังมีผลกระทบต่อไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงไม่ได้มีการนำสารนี้มาใช้ประโยชน์

2.18 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Lee and Chen (1998a) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้สารสีของ เชื้อรา *Monascus* ให้เกิดสีในอาหาร โดยใช้เชื้อรา *Monascus* พบว่าสามารถนำมาผสมในอาหารต่างๆทำให้เกิดสีได้ เช่น 1.ไส้กรอกจีน (Chinese sausages) และ dumpling (Bao) สีจาก *Monascus* สามารถใช้ได้ดี โดยเฉพาะสีของส่วนเนื้อ ซึ่งใช้ได้ดีกว่าส่วนของไขมันที่เป็นส่วนประกอบเพียงเล็กน้อย 2.เส้นก๋วยเตี๋ยว (Instant noodle) การใช้สีจาก *Monascus* เป็นสีผสมอาหารและไม่ทำให้รสชาติของก๋วยเตี๋ยวเปลี่ยนไป 3.ผลิตภัณฑ์นม (Milk products) นมและโยเกิร์ตจะใช้สีจาก *Monascus* ให้สีที่คล้ายคลึงกับนมกลิ่นสตอร์เบอรี่ และผลิตภัณฑ์มีความคงตัวได้นานมากกว่า 1 เดือน และ 4.ลูกกวาด (Candy) ผลการทดลองยังบอกไม่ได้ว่าสามารถใช้ผลิตลูกกวาดได้ เพราะว่าสีจะไม่ทนต่อการผลิตที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงมากกว่า 150 ^{o}C

Lee *et al.* (2002)ได้ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* ที่สามารถสร้างสีแดงและสารโมนาโคลิน เค ได้ในปริมาณสูง โดยทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและอาหารเหลว เริ่มจากเลี้ยงเชื้อ *Monascus* ใน modified rice broth เป็น เวลา 7 วันที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ จากนั้น 1.นำเชื้อรามาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งคือ Tsai-Lai rice บ่มไว้ที่ 30 ^{o}ซ มีความชื้นสัมพัทธ์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน 2.ในอาหารเหลวใส่เชื้อราลงในถัง 5 ลิตร บ่มที่ 30 ^{o}ซ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 500 rpm เป็นเวลา 10 วัน นำมาวัด OD 500 nm เพื่อหาปริมาณสีแดงและใช้ HPLC วิเคราะห์ปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารโมนาโคลิน เค (Monacolin K) พบว่าจากเชื้อรา *Monascus* 72 สายพันธุ์ สายพันธุ์ *Monascus purpureus* M15 เป็น เชื้อราสายพันธุ์ที่ดีที่สุดในอาหารแข็งสามารถผลิตสีแดงได้ มีค่าสีแดง (color value 12) และสารโมนาโคลิน เค (4 mg/g) ส่วนในอาหารเหลวมีสารโมนาโคลิน เค ต่ำ (5 ug/ml) และยังพบอีกว่าความชื้นและปริมาณอากาศมีผลต่อการผลิตสีและสารโมนาโคลิน เค

Xu *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ *Monascus* sp. XFP-1 เพื่อเลือกผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดงและสารโมนาโคลิน เค (Monacolin K) มาก จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าค่าสีในการหมักข้าวแดงประมาณ 1500 U ($0D_{505}$) และใกล้ 2000 U ($0D_{410}$) ส่วนสารโมนาโคลิน เค วิเคราะห์โดย HPLC ได้ 0.71 mg/g, 1.27 mg/g เมื่อเทียบกับ Xuezhikang และ Lovastatin ที่ใช้เป็นมาตรฐาน (standards) จากนั้นทำการวัดค่า spectrum ของสารประกอบได้ค่าความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร และภายหลัง 144 ชั่วโมง สารประกอบนี้จะเปลี่ยนเป็นสารประกอบอื่นๆ จึงสามารถสรุปได้ว่าการเกิดสารโมนาโคลิน เค เกิดขึ้นภายหลังสิ้นสุดกระบวนการหมักของเชื้อ

Hajjaj *et al.* (2001) ได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีต่อการสร้างโมนาโคลิน เค ของเชื้อรา *Aspergillus terreus* Thom ATCC 74135 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ 1. ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการสร้างโมนาโคลิน เค ในอาหารเหลวสังเคราะห์ ได้เติมแหล่งคาร์บอนต่างกันได้แก่ แลคโตส กลีเซอรอล เอทานอล และกลูโคสและใช้โซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน หลังการทดลอง 160 ชั่วโมง พบว่าอาหารที่เติมกลูโคส (Glucose) 20 และ 45 กรัมต่อลิตร มีปริมาณโมนาโคลิน เค เท่ากับ 37 และ 35 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ อาหารที่เติมแลคโตส (Lactose) 45 กรัมต่อลิตร มีโมนาโคลิน เค เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารที่เติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรร่วมกับแลคโตส 20 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณโมนาโคลิน เค สูงสุด 54 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเติมกลูโคสไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโมนาโคลิน เค ส่วนการใช้แลคโตสเชื้อราสามารถสร้างโมนาโคลิน เค ทั้งที่ยังมีปริมาณแลคโตสเหลืออยู่ในอาหาร สำหรับการใช้ทั้งกลูโคสและแลคโตส ทำให้ได้โมนาโคลิน เค สูงสุด ส่วนการใช้เอทานอลและกลีเซอรอลมีปริมาณโมนาโคลิน เค น้อยมาก 2.ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการสร้างโมนาโคลิน เค ในอาหารเหลวสังเคราะห์ ได้เติมแหล่งไนโตรเจนทั้งสารอินทรีย์ (กลูตาเมท, ฮิสติดีน, ไกลซีน, อาจินีน, และไอโซลูซีน) และสารอนินทรีย์ (แอมโมเนียมตาร์เตรท, แอมโมเนียมอะซิเตท, โซเดียมไนเตรท หรือยูเรีย) และใช้กลูโคส 45 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์จะช่วยเพิ่มมวลชีวภาพเท่านั้น แต่สร้างโมนาโคลิน เค น้อย ส่วนแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ พบว่าโซเดียมกลูตาเมท (Sodium glutamate) ที่มีความเข้มข้น 12.5 กรัมต่อลิตร และฮิทติดีน (Histidine) ที่มีความเข้มข้น 12.5 กรัมต่อลิตร ให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณโมนาโคลิน เค เท่ากับ 47 และ 46 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และกลูโคสถูกใช้หมดภายใน 140 ชั่วโมง เนื่องจากกรดอะมิโนสามารถให้ทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแก่เชื้อรา สำหรับโซเดียมกลูตาเมทนิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เพราะทำให้มวลชีวภาพของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

Hai (2002) ได้ศึกษาการผลิตโมนาโคลิน (Monacolin) โดยเชื้อรา *Monascus purpureus* เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุดในการผลิต red koji ซึ่งเป็นยาจีนรักษาโรค hypercholesterol ศึกษาทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลวเปรียบเทียบกัน ได้ผลว่าอาหารแข็งมีโมนาโคลิน (Monacolin) มากกว่าอาหารเหลว

Heber *et al.* (2001)ได้ศึกษาคุณสมบัติ 9 อย่างในข้าวแดงจีน โดยทำการศึกษาสายพันธุ์บางสายพันธุ์ของข้าวแดงจีนในอาหารแข็ง ตรวจหาส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อเรียกว่าโมนาโคลิน (Monacolin) ที่สามารถยับยั้ง cholesterol ได้ผลว่ามี โมนาโคลิน (Monacolin) ทั้งหมด 0 เปอร์เซ็นต์ถึง 0.58 เปอร์เซ็นต์ w/w มีเพียง 1 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่างเท่านั้นที่มีโมนาโคลิน (Monacolin) เป็นส่วนประกอบ

Li (2002) ได้ศึกษายาแคปซูลที่ช่วยต่อต้าน hyperlipidaemia โดยบริษัท WBL Peking University Biotechnology ในจีน ซึ่งผลิตจากข้าวแดงที่ใช้เชื้อราสายพันธุ์ *Monascus purpureus* Went M5801 ที่เลี้ยงในอาหารแข็งสกัดด้วยเอทานอล และได้รับสายพันธุ์จากพ่อแม่สายพันธุ์ *Monascus purpureus* 1003 เป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์โดยผ่านแสง UV, neutron และ X-rays irradiation โดยจะทำให้สามารถผลิตโมนาโคลิน เค (Monacolin K) ได้ 6 ถึง 10 mg/g ในข้าวแดงผง

Morovjan *et al.* (1997)ได้ศึกษาเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* 65 สายพันธุ์ และเชื้อรา *Aspergillus terreus* 70 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลวแล้ววิเคราะห์หา Mevinolin โดยการวิเคราะห์ใช้ HPLC พบว่า TUB F-514 ดีที่สุดสามารถผลิต Mevinolin ได้ 140 ug/ml ใน 7 วัน

Friedrich *et al.* (1995) ได้วิเคราะห์ Mevinolin โดย HPLC ในอาหารเหลวจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* หรือ *Monascus rubber* หลังจากเติมกรดและสกัดด้วย methanol ใช้ mobile phase ที่ pH3.0 ได้ผลปรากฏว่าพบ Mevinolin ใน 3 รูปแบบ คือ lactone, ß-hydroxy acid และ methyl ester

Kysilka and Kren (1993) ได้ใช้ HPLC ตรวจหา Lovastatin (Mevinolin) และ Mevinolinic acid ในอาหารเหลวที่ใช้เชื้อรา *Aspergillus terreus* โดยใช้ Separon SGX C_{18} column และ methanol-18 mM orthophoshoric acid ที่มีระดับความเข้มข้น 77.5 ต่อ 22.5 v/v

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

mobile phase ตรวจวัดที่ 238 nm ตรวจ Lovastatin (Mevinolin) และ Mevinolinic acid ได้จำกัดที่ 20-30 ng/ml

Su *et al.* (2003) ศึกษาปริมาณของ *y*-aminobutyric acid (GABA) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ความดันโลหิตต่ำ (hypotensive) และโมนาโคลิน เค (Monacolin K ใช้เป็นยาลดโคเลสเตอรอล) ที่สร้างจากเชื้อรา *Monascus purpureus* CCRC31615 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตโมนาโคลิน เค สูงสุด จากการคัดเลือกทั้งหมด 16 สายพันธุ์ การเติมโซเดียมไนเตรตในข้าว ทำให้เชื้อรา *M. purpureus* CCRC31615 ผลิตโมนาโคลิน เค และ GABA เท่ากับ 378 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ 1,367.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ และเมื่อเติมไดโพแตสเซียมไฮโดรฟอสเฟต (dipotassium hydrophosphate) ทำให้ปริมาณ GABA เพิ่มขึ้นเป็น 1,493.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

Teng and Feldheim (2001) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของข้าวในระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* เพื่อผลิตอังคักและรงควัตถุ การวัดการเจริญของเชื้อราต้องใช้วิธีทางอ้อมโดยวัดปริมาณสตาร์ทที่เหลือ ปริมาณโปรตีนทั้งหมด และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช จากการทดลองพบว่า ช่วง 5 วันแรกปริมาณสตาร์ท โปรตีนทั้งหมดและค่าพีเอชลดลง เพราะมีการเมตาโบไลท์และเชื้อราเจริญอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณสีน้อยมาก ช่วง 5-15 วันของการหมัก ปริมาณสตาร์ลดลงเรื่อยๆ ค่าพีเอชลดลงต่ำสุด ส่วนปริมาณโปรตีนทั้งหมดเพิ่มขึ้น (มาจากโปรตีนที่มีอยู่ในข้าวและโปรตีนที่มาจากเซลล์เชื้อรา) เพราะโปรตีนในข้าวลดลงและจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นพร้อมทั้งมีการผลิตรงควัตถุเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักมากกว่า 15 วัน สารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อเริ่มหมด เชื้อหยุดการเจริญและหยุดการสร้างสี ปริมาณรงควัตถุสีเหลืองคงที่ ในขณะที่ปริมาณรงควัตถุสีส้มลดลงในอัตรา 3.6 มิลลิกรัม/กรัม/วัน

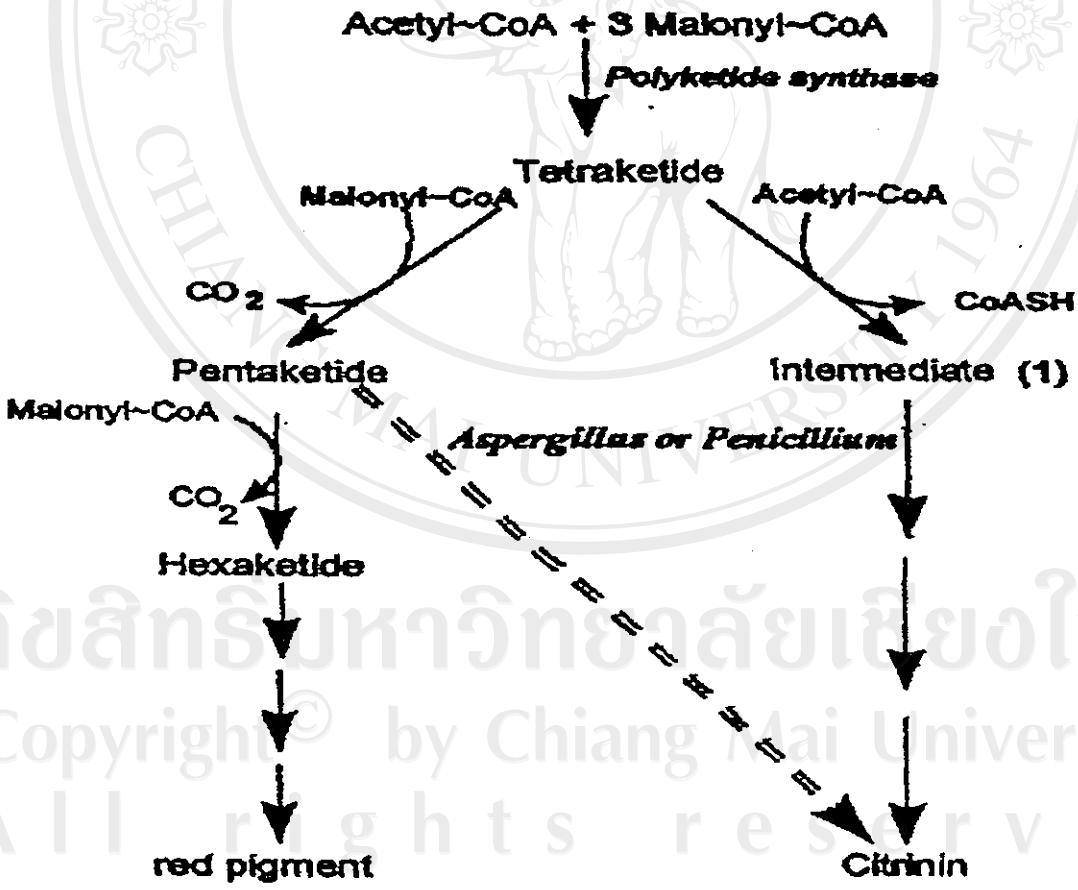
Dussa *et al.* (1998) ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ของรงควัตถุที่เชื้อ *Monascus purpureus* DSM 1379 ผลิตได้คือ โมนาสโครูบรามิน (monascorubamin) และรูโบรพังตาติน (rubropunctatin) กับปริมาณกรดอะมิโนอิสระในข้าว วัดปริมาณสีแดงที่ดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตร เทียบกับระยะเวลาที่ใช้หมัก 11 วัน 5 วันแรกสีแดงเกิดน้อยและค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นจนถึงวันที่ 9 มีค่าสีแดงสูงสุด จากนั้นค่อยๆลดลง วัดปริมาณกรดอะมิโน 6 ชนิดเทียบกับเวลา ได้แก่ วาลีน (valine) เมไทโอนีน (methionine) ไอโซลูซีน (isoleusine) ไกลซีน (glycine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) และอะลานีน (alanine) พบว่าปริมาณกรดอะมิโนเริ่มเพิ่มขึ้นจนสูงสุดถึงวันที่ 11 จึงสามารถสรุปได้ว่ากรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับสร้างรงควัตถุสีแดง ในกระบวนการเมตาโบลิซึมครั้งที่สองของเชื้อ *M. purpureus* เพราะปริมาณรงควัตถุสีแดงเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระในข้าวลดลง

Kim *et al.* (2002) ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมลักษณะสัณฐานวิทยาและการสร้างรงควัตถุสีแดงของเซลล์โมแนสคัส โดยเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากนั้นขยายขนาดเป็น 300 ลิตร เขย่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ความเร็ว 350 รอบต่อนาทีหรือน้อยกว่า พบว่าเกิดการรวมกันของเส้นใยไมซีเลียมให้ปริมาณสีแดงเท่ากับ 37.5 ยูนิต (OD Units) เส้นใยที่มีลักษณะยาวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น ให้ผลเช่นเดียวกับการเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจาก 350 เป็น 700 รอบต่อนาที วัดปริมาณสีแดงสูงสุดเท่ากับ 220 ยูนิต เมื่อเซลล์มีเส้นใยไมซีเลียมเป็นสายสั้นลง เนื่องจากเกิดความเสียหายจากแรงเฉือนที่เขย่าความเร็ว 500 รอบต่อนาที

Hajjaj *et al.* (1999) (อ้างอิงจากศศิธร ใบผ่อง, 2546) ได้ศึกษากลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพของซิตรินินจาก *Monascus rubber* ATCC96218 โดยวัด ^{13}C Nuclecr Magnetic Resonance ทดลองโดยวัด[^{13}C]citrinin หลังจากเติม[^{13}C]acetate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการสังเคราะห์ซิตรินินเกิดจาก tetraketide แทนที่จะสังเคราะห์จาก pentaketide เหมือนกับเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่สร้างซิตรินินเช่นเดียวกัน กลไกการสังเคราะห์ซินินจากโมแนสคัสแสดงในภาพที่ 2.9



หมายเหตุ : เส้นประ แสดงกลไกการสังเคราะห์ซิตรินินโดยเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus*

ภาพที่ 2.9 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินและรงควัตถุสีแดงโดยเชื้อรา *Monascus rubber*

ที่มา : Hajjaj *et al.* (1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Lee and Chen (1998b) ได้ศึกษาการสร้างรงควัตถุสีแดงของเชื้อราโมแนสคัส ในอาหารเหลว พบว่าการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารปริมาณ 75 ลิตรให้ปริมาณสีแดงเท่ากับ 365 ยูนิต/ลิตร ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิตรงควัตถุและรักษาความเสถียรของสีด้วย แต่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนรงควัตถุที่เกิดขึ้นจะสลายอย่างรวดเร็ว ส่วนในสภาวะที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำ และความเข้มข้นของคาร์บอนสูงทำให้มีการผลิตรงควัตถุในปริมาณสูง

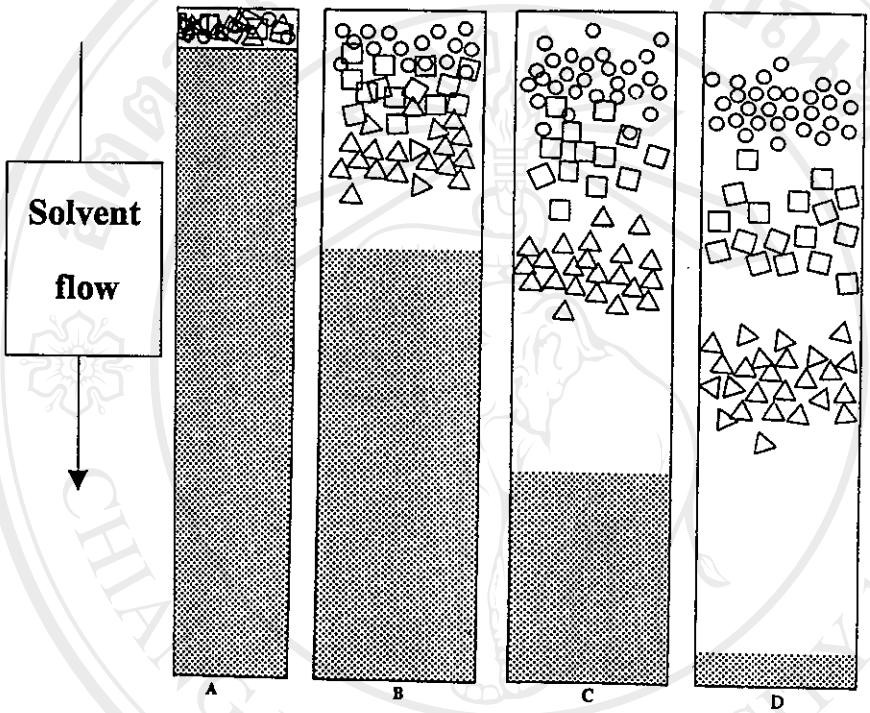
จุลยุทธ บุญสร้างสม (2546) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆคือ เชื้อรา *Monascus purpureus* 4 สายพันธุ์ ชนิดข้าว 3 ชนิด ผลของการเติมโซเดียมอะซิเตต และเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวแบบให้อากาศ และไม่ให้อากาศต่อการสร้างซิตรินินและสีแดง พบว่าสายพันธุ์เชื้อรา *M. purpureus* และชนิดของข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่างกันมีผลต่อค่าสีแดง และปริมาณซิตรินินในข้าวแดงอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งข้าวแดงที่หมักโดยเชื้อรา *M. purpureus* ATCC 16365 ในข้าวหอมมะลิให้ค่าสีแดงสูงสุดเท่ากับ 4,400 ppm ส่วนผลของการเติมโซเดียมอะซิเตตต่อคุณภาพของข้าวแดงพบว่า ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นและค่าสีแดงลดลง ขณะที่ปริมาณซิตรินินมีแนวโน้มสูงขึ้นตามความเข้มข้นโซเดียมอะซิเตต ส่วนจากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารเหลวสังเคราะห์พบว่าปริมาณซิตรินินของน้ำหมักลดลงเมื่อหมักแบบให้อากาศ

ศศิธร ใบผ่อง (2546) ได้ศึกษาผลของกลูโคส และแลคโตส โมโนโซเดียมกลูตาเมท (monosodium glutamate) และฮีสติดีน (L-histidine) ต่อการผลิตรงควัตถุและซิตรินิน โดยเชื้อรา *Monascus purpureus* FTCMU เปรียบเทียบกับ *Monascus rubber* TISTR 3006 ได้ทดลองทั้งในอาหารเหลวสังเคราะห์และในข้าว ในอาหารเหลวสังเคราะห์พบว่าทุกสูตรอาหารไม่มีการสร้างรงควัตถุสีแดงและพบซิตรินินน้อยกว่า 50 ส่วนในล้านส่วน โดยวิธี High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) และพบว่าอาหารสูตรที่เพิ่มอัตรามวลชีวภาพสูงสุด ได้แก่ สูตรที่เติมกลูโคส 20 กรัม/ลิตรผสมแลคโตส 20 กรัม/ลิตร และโมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร ให้มวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 1.84 กรัม/100 มิลลิลิตร รองลงมาคือสูตรที่เติมแลคโตส 45 กรัม/ลิตร ร่วมกับโมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร มีมวลชีวภาพเท่ากับ 1.46 กรัม/100 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมท จะให้มวลชีวภาพสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมฮิสติดีน สำหรับการทดลองในข้าว พบว่าจากกระบวนการหมักโดย *M. purpureus* FTCMUข้าวที่เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมทให้ค่าสีแดง 126.00 ยูนิต/กรัม และพบซิตรินิน 900 ppm ข้าวที่เติมฮิสติดีนให้ค่าสีแดง 150.45 ยูนิต/กรัม และพบซิตรินิน 450 ppm และข้าวสูตรที่ไม่ได้เติมกรดอะมิโนให้ค่าสีแดงสูงสุดเท่ากับ 207.85 ยูนิต/กรัม และพบซิตรินินปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1,190 ppm สำหรับข้าวที่เติมฮิสติดีนหมักโดย *M. rubber* TISTR 3006 ให้ค่าสีแดงมากที่สุดเท่ากับ 314.76 ยูนิต/กรัม และทุกตัวอย่างพบซิตรินินน้อยกว่า 50 ส่วนในล้านส่วน ดังนั้นการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมท หรือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฮิสติดีนลงในข้าวมีผลต่อการลดทั้งปริมาณซิตรินิน และรงควัตถุสีแดงที่สร้างโดย *M. purpureus* FTCMU แต่ไม่มีผลต่อ *M. rubber* TISTR 3006

2.19 หลักการขั้นพื้นฐานของโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Basic Principles of High Performance Liquid Chromatography)



ภาพที่ 2.10 แสดงการแยกของผสมของสาร 3 ชนิด โดยสมมุติให้สาร A เป็น △, สาร B เป็น □, สาร C เป็น ○ พื้นที่ที่เป็นจุดๆ แสดงถึงตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะล้าง
ที่มา : แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม (2543)

หลักการขั้นพื้นฐานของโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง หรือโครมาโทกราฟีของเหลวแบบความดันสูง (High Performance Liquid Chromatography หรือ High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) มีเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวหรือตัวทำละลายจะถูกปั๊มผ่านเฟสคงที่มีอนุภาคขนาดเล็กซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์เฟสเคลื่อนที่จะพาสารแต่ละชนิดออกจากคอลัมน์ผ่านเครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม แล้วแสดงผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม (chromatogram) ที่ประกอบด้วยพีก (peaks) ของสารต่างๆที่มีอยู่ในสารผสมนั้น (ดวงสมร ลิมปิติ, 2545) อาจทำให้เข้าใจได้ง่ายขึ้น โดยการพิจารณาถึงการแยกสารละลายผสมที่ประกอบด้วยสารสามชนิดด้วยกันใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คอลัมน์ปิด (closed column) ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็กๆ ที่มีรูพรุนเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 150 ไมครอน ในหลอดยาวเล็กๆ เรียกว่า คอลัมน์

จากภาพที่ 2.10 แสดงให้เห็นถึงกระบวนการทางโครมาโตกราฟี สารละลายตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในส่วนบนของคอลัมน์ดังภาพที่ 2.10A เฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่พาสารผ่านไปยังคอลัมน์ สารประกอบแต่ละตัวจะถูกดูดซับและถูกทำให้หลุดออกไปจากการดูดซับ (desorption) บนอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ผลที่ตามมาคือสารประกอบจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้าลง และอัตราเร็วของการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพ (affinity) ของสารกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารประกอบ X มีการกระจายอยู่ระหว่างเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เมื่อมันผ่านไปตามคอลัมน์ ดังสมการ

$$Xm \longleftrightarrow Xs \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1.1)$$

Xm ใน mobile phase Xs ใน stationary phase

ค่า distribution coefficient สำหรับสารประกอบที่สอดคล้องกับสารสมการข้างบน คือ

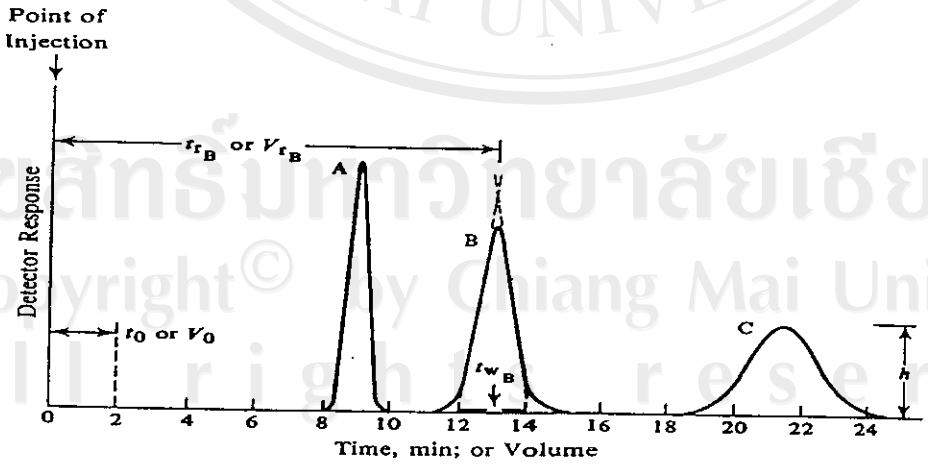
$$Kx = [X]s/[X]m = \text{คงที่} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1.2)$$

Kx = distribution coefficient ของสาร X

[X]s = ความเข้มข้นของสาร X ใน stationary phase

[X]m = ความเข้มข้นของสาร X ใน mobile phase

ถ้า Kx มีค่ามาก แสดงว่าสารประกอบชอบที่จะละลายในเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารประกอบดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้า ถ้า Kx มีค่าน้อย สารประกอบนี้ก็จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าเฟสอยู่กับที่และจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 2.11 แสดงโครมาโทแกรมของการแยก 3 ชนิด จากภาพที่ 2.10

ที่มา : แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม (2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจุบันนี้สามารถที่จะวัดส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง โดยใช้ดีเทคเตอร์ (detector) ซึ่งอาจเป็นการวัดสมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีของตัวถูกละลายหรือของเฟสเคลื่อนที่ ภาพที่ 2.11 แสดงลักษณะของโครมาโทแกรมของสารละลายซึ่งประกอบด้วยสารประกอบ 3 ชนิด (แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2543)

ประสิทธิภาพของ system ที่ใช้ในการแยกสามารถอธิบายและวัดได้ด้วยพารามิเตอร์ 4 อย่างคือ

1. **Capacity** การแยกที่มีประสิทธิภาพนั้นจะต้องใช้คอลัมน์ที่มีความสามารถที่จะจับสารไว้และแยกสารออกจากกันได้อย่างสมบรูณ์
2. **Selectivity** ของ system ในการแยกเป็นการวัดความแตกต่างของ retention time หรือ retention volume ระหว่างสาร 2 ชนิดหรือพีก 2 ซึ่งจะอธิบายว่า system ที่ใช้นั้นสามารถแยกสาร 2 ชนิดนั้นออกจากกันได้ดีเพียงใด ถ้า Selectivity ประมาณ 1 แสดงว่าไม่สามารถแยกสารทั้งสองออกจากกันได้ วิธีที่ได้ผลมากที่สุดในการเพิ่มค่า Selectivity ทำได้โดยการปรับปรุงส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ ถ้าเปลี่ยนความเข้มข้นของส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่แล้ว ยังให้ผลไม่เป็นที่พอใจก็อาจเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายตัวใดตัวหนึ่งที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งมักจะทำให้การแยกดีขึ้นได้
3. **Resolution (R)** เป็นเทอมที่ใช้อธิบายถึงสามารถในการแยกสารออกจากกัน โดยวัดความแตกต่างระหว่าง retention time และความกว้างของพีกของสาร 2 ชนิด R=1.0 หมายถึงสามารถแยกได้ 98% โดยมีพีกซ้อนทับกัน (overlap) เพียง 2% R=1.25 หมายถึงแยกได้เกือบสมบูรณ์ (99.4%)
4. **Efficiency** เมื่อฉีดสารละลายตัวอย่าง (sampleA+B+C) เข้าไปในคอลัมน์ตามภาพที่ 2.9 ตอนแรกความกว้างของ sample band จะเริ่มกว้างขึ้น ปรากฏการณ์เช่นนี้เกิดขึ้นเนื่องจากขณะที่สารเคลื่อนที่ลงไปตามคอลัมน์นั้น สารจะถูกจับอยู่ในคอลัมน์เป็นระยะๆ ทำให้ band กว้างขึ้นเรียกวาเกิด band broadening หรือ peak broadening ซึ่งอาจทำให้พีกของสารแต่ละชนิดซ้อนทับกันได้ การแยกที่ดีนั้นจะต้องมี band broadening น้อยที่สุด (ดวงสมร ลิมปิติ, 2545)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) (ดวงสมร ลิมปิติ, 2545)

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใหม่จะต้องมีการตรวจสอบความถูกต้อง ว่ามีคุณสมบัติเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งจะให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ ผลการวิเคราะห์จะถูกต้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หรือไม่เพียงใดขึ้นกับตัวแปรต่างๆ เริ่มตั้งแต่วิธีการสุ่มตัวอย่าง (sampling) ขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง (sample preparation) ชนิดของเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่หรือ system ที่ใช้ในการแยกจนถึงวิธีการตรวจวัด ตลอดจนวิธีการประเมินผลการวิเคราะห์

ลักษณะของงานวิเคราะห์มีอยู่ 4 อย่างคือ (ดวงสมร ลิมปิติ, 2545)

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification)
2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารปนเปื้อน (determination of impurities)
3. การตรวจสอบปริมาณสารปนเปื้อน (limit test of impurities)
4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ (assay)

สำหรับคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์ที่ต้องตรวจสอบมีดังนี้คือ (ดวงสมร ลิมปิติ, 2545)

1. **accuracy** ถ้าผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความใกล้เคียงหรือเท่ากับปริมาณสารที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นั้นให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง (accurate) ซึ่งการตรวจสอบความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ทำได้ 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่ตรวจสอบ กับผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีอื่นที่เชื่อถือได้เป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่ให้ผลถูกต้อง วิธีที่ 2 หา%Recovery ของวิธีนี้ทำได้โดยการเติมสารที่จะวิเคราะห์ที่รู้ปริมาณแน่นอนลงไปใน sample matrix หรือ placebo ซึ่งไม่มีสารนี้อยู่ โดยปริมาณสารที่เติมลงไปควรมีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 50, 75, 100, 125 และ 150% ของปริมาณสารที่ระบุไว้แล้ววิเคราะห์หาปริมาณที่เติมลงไปว่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้หรือไม่ ค่าที่ยอมรับได้จะแตกต่างกันไปแล้วแต่ละชนิดของสารและลักษณะของตัวอย่างที่วิเคราะห์
2. **Precision** เป็นการวัดความใกล้เคียงกันของผลการวิเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันซ้ำกันหลายๆครั้ง ซึ่งดูจากค่า RSD ของผลการวิเคราะห์
3. **Specificity** ความเฉพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์คือความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์สารได้โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง
4. **Limit of detection** เป็นปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยมี signal-to-noise ratio (S/N) ประมาณ 2-3 หมายถึง ปริมาณสารที่ให้สัญญาณการตรวจวัดสูงกว่าสัญญาณรบกวน 2-3 เท่า ค่านี้บ่งบอกถึงความไวในตรวจวัดของวิธีวิเคราะห์ว่าจะต้องมีสารปริมาณน้อยที่สุดเท่าไรจึงจะตรวจพบได้
5. **Limit of quantitation** เป็นปริมาณสารที่น้อยที่สุดสามารถวัดปริมาณได้ถูกต้องและเชื่อถือได้ โดยมี signal-to-noise ratio (S/N) ประมาณ 10 นั่นคือปริมาณสารที่ให้สัญญาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจวัดสูงกว่าสัญญาณรบกวน 10 เท่า หรืออาจหมายถึงปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่สามารถวัดปริมาณได้ถูกต้องโดยมีความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

6. **Linearity** ความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณของเครื่องตรวจวัดหรือ peak area กับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์จะต้องเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อจะได้ใช้เปรียบเทียบในการวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างได้ถูกต้อง
7. **Ruggedness** การเปลี่ยนแปลงสภาวะในการทดลองเพียงเล็กน้อย ไม่ควรมีผลต่อวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ เช่นในวิเคราะห์อาจมีการเปลี่ยนคอลัมน์อันใหม่แต่เป็นเฟสคงที่ชนิดเดิม หรืออาจเตรียมเฟสเคลื่อนที่จากตัวทำละลายหรือสารเคมีคนละขวด หรือมีส่วนผสมเปลี่ยนแปลงบ้างเล็กน้อย ผลการวิเคราะห์ก็ควรเหมือนเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved