บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 การใช้สีธรรมชาติเพื่อเติมแต่งในอาหาร

สีที่ใช้ผสมอาหารมีทั้งสีสังเคราะห์และสีธรรมชาติ แต่สีที่นิยมใช้กันคือสีธรรมชาติ เพราะให้ความปลอดภัยต่อผู้บริโภคดีกว่า จากการสำรวจของ Francis (1987) พบว่า ตั้งแต่ปี 1969–1984 ทั่วโลกมีการจดลิขสิทธิ์เกี่ยวกับแหล่งสี (Colorant Sources) 127 ฉบับ โดยเป็นแหล่งสีธรรมชาติถึง 356 ฉบับ ขณะที่เป็นแหล่งสีสังเคราะห์เพียง 7 ฉบับ และในแหล่งสีธรรมชาติมีการจดลิขสิทธิ์ของแหล่งสีจากโมแนสคัสมากที่สุด (อ้างจาก อรัญและคณะ, 2530)

ตารางที่ 2.1 ชนิดและจำนวนของแหล่งสีที่มีการขอจดทะเบียนลิขสิทธิ์

แหล่งสี	จำนวนสิทธิบัตร
Carotenoids	
Paprika	24
Citrus, tomatoes and carrots	17
Synthetic	17
Miscellaneous	20
Anthocyanins	
Grapes	12
Miscellaneous	37
Monascus	38
Synthetic colorants	30
Annatto and gardenis	23
Linked polymers	21
Chlorophyll	18
Heme	15
Caramel	14
Anthraquinones and naphthoquinones	12
(cochineal, carmine, lac, Kermes, alkannet)	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 ชนิดและจำนวนของแหล่งสีที่มีการขอจดทะเบียนลิขสิทธิ์ (ต่อ)

แหล่งสี	จำนวนสิทธิบัตร
Turmaric	12
Phycocyanins	10
Cartbamin (safflower)	10
Flavonoids	10
Cacao	9
Iron	6
Miscellaneus	30

ที่มา : อรัญและคณะ (2530)

2.2 ประวัติความเป็นมาของข้าวแดง (อ้างจาก อรัญและคณะ, 2530)

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักข้าวกับเชื้อราที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Monascus purpureus* โดยเชื้อรานี้จะเจริญและย่อยข้าว ขณะเดียวกันก็สร้างรงควัตถุสีแดง ทำให้ข้าวมีลักษณะสีแดงเข้มและมีกลิ่นเฉพาะ เมื่อนำไปอบแห้งก็จะได้เป็นข้าวแดง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีชื่อเรียกต่างกันตามท้องถิ่น เช่น ชาวจีนเรียกว่า อังคัก (Angkak, Angkhak) หรือ อังคา (Anka) ชาวญี่ปุ่นเรียก เบนิ-โคจิ (Beni-koji) หรือ อังคา-โคจิ (Anka-koji)

การผลิตข้าวแดงทำได้โดยการนำข้าวมานึ่งให้สุกปล่อยให้เย็นแล้วเติมเชื้อรา *Monascus purpureus* ลงไป ปล่อยให้เชื้อราเจริญที่อุณหภูมิ 25-30^{O}ซ ประมาณ 3 สัปดาห์ ก็จะได้ข้าวแดง ควรใช้ข้าวเจ้าไม่ควรใช้ข้าวเหนียวในการผลิตเพราะข้าวเหนียวจะเกาะแน่นติดกัน หรืออาจใช้วิธีแช่ข้าวไว้ 24 ชั่วโมง ปล่อยให้สะเด็ดน้ำแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อเย็นได้ที่ให้เติมเชื้อเริ่มต้นที่ประกอบด้วย 5 มิลลิลิตรของแอสโคสปอร์ (ascospores) ของเชื้อรา *M. purpureus* ซึ่งเจริญอาหาร SA 25 วัน ผสมเชื้อเริ่มต้นกับข้าวให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 25-32^{O}ซ โดยระวังอย่าให้ข้าวเปียกหรือเละ ข้าวจะเริ่มแดงภายใน 3 วัน และมีความร้อนเกิดขึ้น ให้เขย่าข้าวเพื่อให้เกิดการกระจายความชื้นและความร้อนอย่างสม่ำเสมอ ภายใน 3 สัปดาห์ ข้าวที่ได้ควรมีสีแดงเข้ม เมล็ดข้าวไม่เกาะกันและมีสีแดงตลอดทั้งเมล็ด นำข้าวนี้ไปอบที่ 40^{O}ซ ก็จะได้ข้าวแดงตามต้องการ

การผลิตอังคักในไต้หวันซึ่งมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมนั้นทำโดยนำข้าวมา 1,450 กิโลกรัม ล้างแล้วนึ่งนาน 60 นาที แล้วฉีดด้วยน้ำ 180 ลิตร นำไปนึ่งอีกครั้งนาน 30 นาที เมื่อเย็นได้ที่ให้ผสมกับเชื้อเริ่มต้น 32 ลิตร ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในข้าวที่ผ่าน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การนึ่ง 60 นาที มีพีเอช 3.3 เป็นเวลา 4 วัน โดยมีการคนอย่างสม่ำเสมอ นำข้าวทั้งหมดไปกองไว้ในกระบะไม้ไผ่ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 42^{O}ซ จึงนำไปเกลี่ยใส่ในถาดแล้ววางตามชั้นในห้องบ่ม ระหว่างการหมักมีการเติมน้ำ 3 ครั้ง เพื่อรักษาความชื้น ระวังอย่าเติมน้ำมากเกินไป ควรรักษาความชื้นอยู่ประมาณ 85±5% หมักเป็นเวลา 8 วัน แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45^{O}ซ ก็จะได้ข้าวแดงหมัก 700 กิโลกรัม

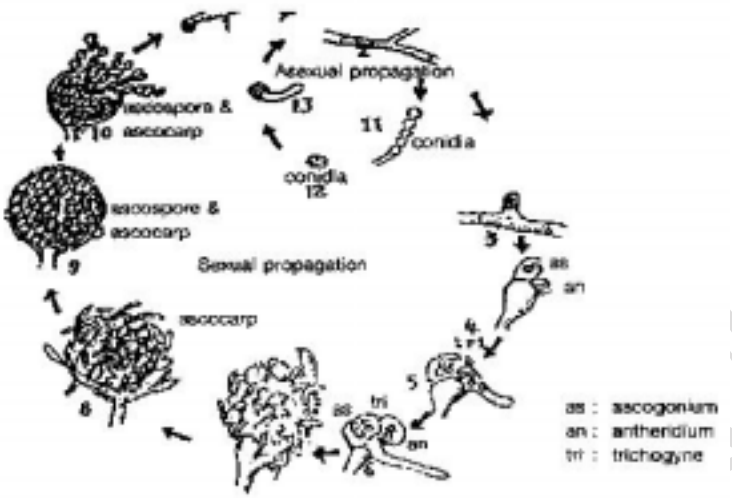
2.3 ลักษณะรูปร่างของเชื้อราโมแนสคัส (อ้างจาก พัชรีย์, 2545)

เชื้อรา *Monascus purpureus* เป็นเชื้อราใน กลุ่ม (Class) Ascomycetes กลุ่มย่อย (Subclass) Plectomycetidae อันดับ (Order) Erotiales วงศ์ (Family) Monascaceae จีนัส (Genus) Monascus เป็นจีนัสเดียวที่อยู่ในวงศ์นี้ เส้นใยมีผนังกั้นมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 ไมโครเมตร เมื่อเจริญบนอาหารแข็งเส้นใยจะแนบชิดกับผิวอาหาร มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ

การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ มีการสร้างโคนิเดีย (conidia) เจริญมาจากโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) อาจเป็นสปอร์เดี่ยวหรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ มี 2-6 สปอร์ โคนิเดียรูปไข่ ขณะอ่อนอยู่ไม่มีสี เมื่ออายุมากขึ้นอาจมีสีแดงได้บ้าง ขนาด 9.0-10.5 x 7.0–9.0 ไมโครเมตร การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร เช่น C medium ที่เหมาะสมสำหรับการเกิดโคนิเดียของโมแนสคัส นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ความเป็นกรดด่าง แสงและอุณหภูมิ

การสืบพันธุ์แบบมีเพศจะคล้ายกับเชื้อราอื่นในกลุ่ม Ascomycetes คือมีการสร้างเพอริทีเซียม (perithecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้าน (stalk) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (homothallic) โดยสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิด คือ แอนเทอริเดียม (antheridium) และแอสโคโกเนียม (ascogonium) ซึ่งจะเกิดการรวมตัว (fusion) ที่ปลายของแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วจึงมีการวิวัฒนาการต่อไปคือ แบ่งเซลล์แบบไมโอซีส และไมโตซีส จากการแบ่งตัว มีการขยายผนังเซลล์รวมออกเรียกว่า การสร้างแอสโคคาร์ป ภายในเพอริทีเซียมมีแอสโคสปอร์มากมาย โดยแอสโคสปอร์จำนวน 2-8 จะรวมตัวอยู่ในแอสคัส (ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ ขนาด 5.5-6.0 x 3.5-4.0 ไมโครเมตร อาจมีสีน้ำตาล แดง ส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์ออกมาเพื่อให้งอกเป็นเส้นใหม่ขึ้น วัฏจักรชีวิตของเชื้อราชนิดนี้แสดงดังในรูปที่ 2.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัส
ที่มา : บุษบา (2542)

2.4 สายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อราโมแนสคัส (อ้างจาก บุษบา, 2542)

ปี ค.ศ. 1884 Van Tieghem ได้แยกและให้ชื่อเชื้อราโมแนสคัสและแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ *M. mucoroides* และ *M. ruber* ต่อมาปี ค.ศ. 1895 Went ได้แยกสายพันธุ์สำคัญคือ *M. purpureus* จากข้าวแดงหรืออังคัก ปัจจุบันมีการรวบรวมเชื้อราโมแนสคัสนี้กว่า 20 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 จัดแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสตามสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

ตารางที่ 2.2 สายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อราโมแนสคัส

M. albidus	*M. albus*	*M. anka*	*M. araneosus*	*M. barkeri*
M. bisporus	*M. floridanus*	*M. fuliginosus*	*M. kaoliang*	*M. major*
M. mucoroides	*M. olei*	*M. paxii*	*M. pallens*	*M. pilosus*
M. pubigerus	*M. purpureus*	*M. purpurescens*	*M. ruber*	*M. rubiginosus*
M. rubropunctatus	*M. sanguineus*	*M. serorubercens*	*M. vini*	*M. vitreus*

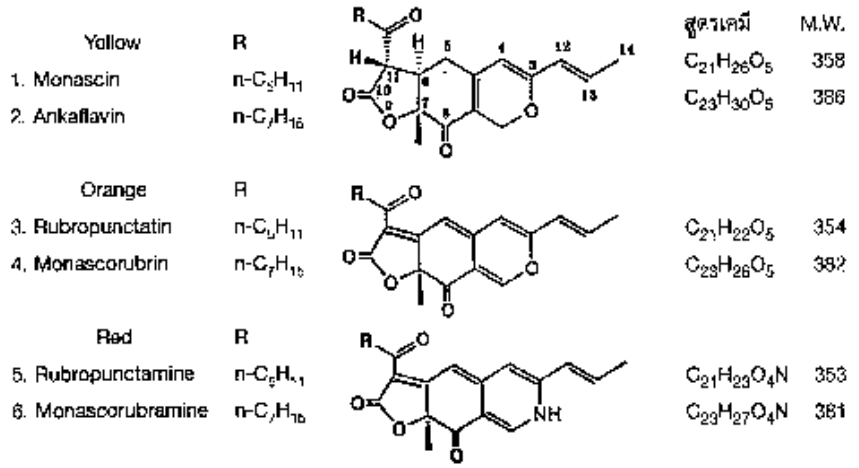
ที่มา : บุษบา (2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 คุณสมบัติและโครงสร้างของรงควัตถุจากเชื้อราโมแนสคัส (อ้างจาก อรัญและคณะ, 2530)

การสร้างรงควัตถุโดยเชื้อรา *M. purpureus* พบว่าการสร้างสีเกิดภายในเส้นใย เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเช่น Potato Dextrose Agar (PDA) หรือ Sabouraud Agar (SA) จะสังเกตเห็นหลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 40 - 48 ชั่วโมง และถูกขับออกมาภายนอกในรูปรงควัตถุที่เป็นของเหลวทางรูเปิดของปลายเส้นใย ทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีแดง

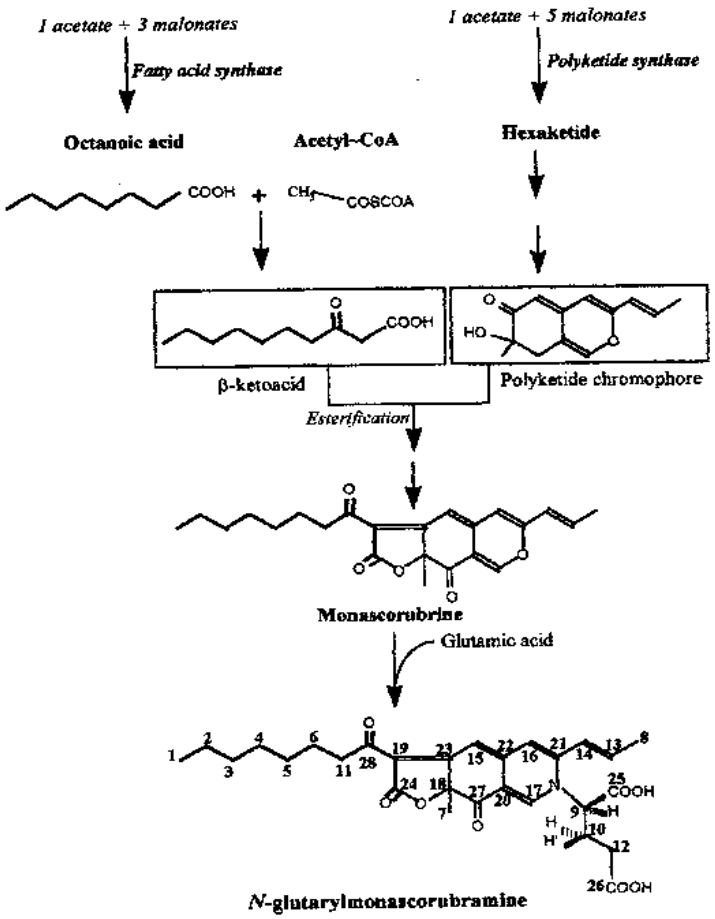
เชื้อราโมแนสคัสสามารถสร้างรงควัตถุ ประกอบด้วยสีส้ม 2 ชนิด คือ โมนาสโครูบริน (monascorubrin) และรูโบรพังตาติน (rubropunctatin) สีเหลือง 2 ชนิด คือ โมนาสซิน (monascin) และอังคาฟลาวิน (ankaflavin) และสีแดงอีก 2 ชนิด คือโมนาสโครูบรามีน (monascorubramine) และรูโบรพังตามีน (rubropunctamine) โครงสร้างของรงควัตถุเหล่านี้ดังแสดงในรูปที่ 2.2 โดยเชื่อว่าโมนาสโครูบรามีนและรูโบรพังตามีน เป็นสารอนุพันธุ์ของโมนาสโครูบรินและรูโบรบังตาติน ตามลำดับ ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีเอมีน (amine) สีส้มที่ผลิตโดยเชื้อราโมแนสคัสละลายน้ำได้ยาก แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีกลุ่มอะมิโน ผ่านทาง ring-opening และ Schiff rearrangement จะได้เป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีขึ้น นอกจากสามารถละลายในน้ำ ยังละลายในน้ำมัน ทนต่อการทำลายด้วยความร้อนและมีความคงตัวในช่วงค่าพีเอช 2-10



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของรงควัตถุที่ผลิตโดยเชื้อราโมแนสคัส
ที่มา : บุษบา (2542)

กลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพของรงควัตถุสีต่างๆ จากเชื้อราโมแนสคัส เกิดจากการรวมตัวของอะซิเตต (acetate) 1 โมล กับ มาโลเนต (malonate) 5 โมล เป็นสารประกอบ hexaketide chromophore ผ่านวิถีโพลีคีไทด์ เมื่อกรดไขมันสายขนาดกลาง (medium-chain fatty acids, C_6–C_{18}) ที่สังเคราะห์จากวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน เช่น กรดออกตาโนอิก (octanoic acid) ทำปฏิกิริยาทรานส์-เอสเทอริฟิเคชัน *(trans*-esterification) กับ โครโมฟอร์ (chromophore) ได้เป็นรงควัตถุสีส้ม โมนาสโครูบริน (หรือ รูโบรพังตาติน เกิดจากปฏิกิริยากับ กรดเฮกซาโนอิก) เมื่อสีส้มถูกรีดิวซ์ จะได้สีเหลือง ในขณะที่สีแดงเกิดจากปฏิกิริยา amination ของสีส้มกับ NH_3 รงควัตถุยังคงอยู่ภายในเซลล์เชื้อราเพราะมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (hydrophobicity) และถูกขับออกมานอกเซลเมื่อเกิดปฏิกิริยากับหมู่ NH_2 ของกรดอะมิโน ทำให้ละลายน้ำได้ เช่น โมนาสโครูบรินทำปฏิกิริยากับกรดกลูตามิก เกิดเป็นสารประกอบ *N*-glutarylmonascorubramine แสดงดังรูปที่ 2.3 (อ้างจาก Hajjaj และคณะ, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2.3 กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงที่ละลายน้ำได้ โดยเชื้อรา *Monascus ruber*
ที่มา : Hajjaj และคณะ (2000)

อรัญและคณะ (2530) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตข้าวแดง โดยใช้เชื้อรา *M. purpureus* พบว่า เชื้อรา *M. purpureus* CMU-KU เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสีได้ดีที่สุด โดยใช้ข้าวต่อน้ำในอัตราส่วน 1:1 หรือ 3:4 จะช่วยให้เชื้อราสร้างสีได้ดีที่สุด ข้าวพันธุ์เหลือง 148 เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงมากที่สุด การสีข้าวก็มีผลต่อการผลิตข้าวแดง โดยข้าวที่สีแล้วขัด 3 นาที จะให้สีดีที่สุด ปริมาณธาตุอาหารต่างๆ ที่มีในข้าวมีเพียงพอต่อการเจริญและการสร้างสีโดยเชื้อรา *M. purpureus* ควรใช้อุณหภูมิระหว่าง 30-35^{O}ซ ควรใช้ข้าวโดยไม่ปรับค่าพีเอช และ ควรให้มีความชื้นของบรรยากาศสูงกว่า 74%

บุษบาและคณะ (1994) ศึกษาการผลิตรงควัตถุสีเหลืองในอาหารเหลว โดยเชื้อรา *Monascus* sp. ที่กลายพันธุ์ โดยวัดปริมาณสีเหลืองด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร แทน 420 และ 500 นาโนเมตร ซึ่งใช้สำหรับการวัดปริมาณสีแดงที่ได้จากสายพันธุ์พ่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แม่ ส่วนสภาวะในการผลิตสีเหลืองสูงสุดเป็นสภาวะเดียวกับสายพันธุ์พ่อแม่ ผลคือปริมาณสีเหลืองและเอนไซม์อะมิโลไลติค (amilolytic enzyme) เพิ่มขึ้นถึง 10 เท่า

Joy Dussa และคณะ (1998) ศึกษาการสร้างรงควัตถุจากเชื้อรา *M. purpureus* DSM 1379 จากการวัดปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) โดยหาความสัมพันธ์ของรงควัตถุที่เชื้อผลิตได้ คือ โมนาสโครูบรามิน (monascorubramin) และรูโบรพังตาติน (rubropunctatin) กับปริมาณกรดอะมิโนอิสระในข้าว วัดปริมาณสีแดงที่ค่าการดูดกลืนแสง 500 นาโนเมตร เทียบกับระยะเวลาการหมัก 11 วัน ใน 5 วันแรกสีแดงเกิดน้อย และค่อยๆ เพิ่มจนสูงสุดวันที่ 9 ของการทดลอง จากนั้นค่อยๆ ลดลง การวัดปริมาณกรดอะมิโน 6 ชนิดเทียบกับเวลา ได้แก่ วาลีน (valine) เมไทโอนีน (methionine) ไอโซลูซีน (isoleusine) ไกลซีน (glycine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) และ อะลานีน (alanine) พบว่าปริมาณกรดอะมิโนเริ่มเพิ่มขึ้นจนสูงสุดในวันที่ 5 และมีแนวโน้มลดลงแบบเอกโพเนนเชียลจนต่ำสุดในวันที่ 9 และค่อยๆ สูงขึ้นจนถึงวันที่ 11 สรุปได้ว่ากรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับสร้างรงควัตถุสีแดง ในกระบวนการเมตาโบลิซึมครั้งที่สองของเชื้อ *M. purpureus* ในปฏิกิริยา shiff base formation เพราะปริมาณรงควัตถุสีแดงเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระในข้าวลดลง

S-S Teng และ W Feldheim (2001) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของข้าวระหว่างกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *Monascus purpureus* เพื่อผลิตอังคักและรงควัตถุ การวัดการเจริญของเชื้อราไม่สามารถทำได้โดยตรง จึงต้องใช้วิธีทางอ้อม โดยวัดปริมาณสตาร์ทที่เหลือ ปริมาณโปรตีนทั้งหมด และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช จากการทดลองพบว่า ช่วง 5 วันแรกปริมาณสตาร์ท โปรตีนทั้งหมด และค่าพีเอชลดลง เพราะมีการเมตาโบไลท์และเชื้อเจริญอย่างรวดเร็ว ช่วงนี้ปริมาณสีมีน้อยมาก จากนั้นระหว่างวันที่ 5-15 ของการหมัก ปริมาณสตาร์ทยังคงลดลงเรื่อยๆ ค่าพีเอชลดลงต่ำสุด เพราะสตาร์ทเป็นองค์ประกอบหลักในข้าวและค่าพีเอชลดลงยืนยันกระบวนการเมตาโบไลท์ของเชื้อรา ส่วนปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มาจากโปรตีนที่มีอยู่ในข้าวและโปรตีนที่มาจากเซลล์เชื้อรา) เพิ่มขึ้นเพราะโปรตีนในข้าวลดลงและจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น ช่วงนี้มีการผลิตรงควัตถุเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักมากกว่า 15 วัน ธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อเริ่มหมด เชื้อหยุดการเจริญและหยุดการสร้างสี ปริมาณรงควัตถุสีเหลืองคงที่ ในขณะที่ปริมาณรงควัตถุสีส้มลดลงในอัตรา 3.6 มิลลิกรัม/กรัม/วัน

Hee Young Jung และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของการผลิตรงควัตถุ โดยเชื้อโมแนสคัสในอาหารเหลวที่เติมกรดอะมิโน 20 ชนิด เปรียบเทียบกับ NH_4NO_3 วัดค่าสี L a b chroma และ hue พบว่าการเติมกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดอนุพันธ์ของรงควัตถุสีแดงทำให้สีแดงจากโมแนสคัสมีเฉดสีแตกต่างกัน สีแดงที่ได้จะมีเฉดสีส้มแดงไปจนถึงม่วงแดง ซึ่งแตก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ต่างกันตามชนิดของกรดอะมิโน ส่วนค่าสีเหลืองและสีส้มไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเติมกรดอะมิโนแตกต่างกัน

เรณูและคณะ (2543) ได้ทดลองเติมอังคักเพื่อเพิ่มสีในไส้กรอกหมู พบว่าปริมาณอังคักที่เหมาะสมในสูตรไส้กรอกเท่ากับ 1.5% และการเติมโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองอาจช่วยเพิ่มคุณลักษณะด้านความเป็นเนื้อเดียวกันและความฉ่ำน้ำในไส้กรอกให้สูงขึ้น

พัชรีย์ (2545) ได้ศึกษาการผลิตอังคักจากข้าวสายพันธุ์ต่างกัน 4 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวซ้อมมือ ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท ข้าวหอมมะลิแม่จัน และข้าวหอมมะลิสุรินทร์ พบว่าพันธุ์ข้าวมีผลต่อค่าสี b (yellowness) และค่า h (hue) value การพิจารณาเลือกพันธุ์ข้าวเพื่อใช้ในการผลิตอังคักจะใช้ค่า h value เป็นเกณฑ์ ค่า h value ที่ต่ำสุดจะให้ค่าสีแดงสูงที่สุด จากการทดลองข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาทจะให้ค่า h value ต่ำสุดหรือให้สีแดงสูงสุด

เชื้อราโมแนสคัสหลายสายพันธุ์สามารถผลิตสีได้ แต่สายพันธุ์ที่สำคัญคือ *M. purpureus* จึงมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในประเทศไต้หวัน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และฝรั่งเศส เพื่อแยกสีให้ได้ปริมาณมากและมีคุณภาพ ประเทศญี่ปุ่นเป็นเพียงประเทศเดียวที่อนุญาตให้ใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* ได้ถูกต้องตามกฎหมาย แต่ยังมีหลายประเทศในแถบเอเชียใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* เป็นสีผสมอาหาร ถึงแม้ว่ายังไม่มีการอนุญาตให้ใช้ได้ตามกฎหมายก็ตาม M. Sabater-Vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาการใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* เพื่อเพิ่มสีให้กับผลิตภัณฑ์เนื้อแทนการใช้วัตถุเจือปนที่มีใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ E-249 (เกลือไนไตรท์) E-252 (โปแตสเซียมไนเตรท) และ E-120 (โคชินีล) นอกจากนั้นยังได้มีการใช้สีจากโมแนสคัสเพื่อเพิ่มสีให้กับเครื่องดื่มและลูกกวาด

Andrea B. และคณะ (2001) ศึกษาการใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* ทดแทนการใช้เกลือไนไตรท์กับผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก โดยทดลองเติมสีจากเชื้อรา *M. purpureus* 0.5 กรัม/กิโลกรัม และ 0.75 กรัม/กิโลกรัม เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (เกลือไนไตรท์ 20 กรัม/กิโลกรัม) ผลการทดลองพบว่า การเติมเกลือไนไตรท์ 10 กรัม/กิโลกรัม ผสมกับสีจากโมแนสคัส 0.5 กรัม/กิโลกรัม ในแฮมไก่ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจทั้งในด้านสี รสชาติ และลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์

Fabre C.E. และคณะ (2002) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตรงควัตถุสีแดงจากเชื้อรา *M. ruber* ในอาหารเหลวและนำไปเป็นวัตถุเจือปนในอาหาร โดยใช้แอลกอฮอล์ 20 กรัม/ลิตร และกลูตาเมท 5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ ภายหลังจากการสกัดและทำให้บริสุทธิ์จึงนำสีไปละลายในน้ำ ยังได้ศึกษาถึงความคงตัวของสีในสารละลายและใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อ (ไส้กรอกและ pate) โดยจะเก็บที่ 40^{O}ซ นาน 3 เดือน พบว่ามีความเสถียร 92-98% และยังได้มีการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส เพื่อจะใช้สีจากโมแนสคัสทดแทนสีที่เกิดจากการใช้เกลือไนไตรท์ หรือโคชินีล (cochineal)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Yuan-Kun Lee และ Duang-Cheng Chen (2002a) ศึกษาเกี่ยวกับการใช้สีจากโมแนสคัสเติมลงในอาหารหลายประเภทคือ 1) Chinese sausage และ dumpling (Bao) การทดลองใช้สีในไส้กรอกและ Bao สีจากโมแนสคัสใช้ได้ดี โดยเฉพาะให้สีกับส่วนที่เป็นเนื้อได้ดีกว่าส่วนผสมที่เป็นไขมัน ซึ่งมีเพียงเล็กน้อยในผลิตภัณฑ์ 2) การผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยวในระดับอุตสาหกรรมได้พัฒนาโดยใช้สีจากโมแนสคัสเป็นสีผสมอาหาร และไม่มีผลกระทบต่อรสชาติของก๋วยเตี๋ยว 3) นมและโยเกิร์ตที่มีการใช้สีจากโมแนสคัสให้สีที่ใกล้เคียงกับนมกลิ่นสตรอเบอร์รี่ และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความคงตัวมากกว่า 1 เดือน และ 4) ลูกกวาด ยังสรุปไม่ได้ เพราะว่าสีโมแนสคัสไม่ทนต่อกระบวนการผลิตที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง มากกว่า 150^{O}ซ

P.E. Koehler (2003) ศึกษาการใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* ผสมในโยเกิร์ตรสผลไม้ โดยเปรียบเทียบกับสีผสมอาหารที่ใช้อย่างแพร่หลายในทางการค้าได้แก่ FD&C Red#40 ผงบีทรูท คาร์ไมน์ (carmine) สีผสมระหว่าง คาร์ไมน์กับแอนแนตโต กับสีจาก *M. purpureus* ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการวัดค่า L a b ด้วยเครื่อง minolta CR-300 Colorimeter การเปลี่ยนแปลง (ค่าสี L ค่า hue angle และค่า Chroma) ของสีจากเชื้อรา *M. purpureus* ในโยเกิร์ตระหว่างการบ่มนมจน เป็นโยเกิร์ต เปรียบเทียบกับสีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน การเพิ่มสีของเชื้อรา *M. purpureus* จาก 0.125% เป็น 0.375% ทำให้ค่า L ลดลงจาก 69 เป็น 61 ค่า Chroma เพิ่มจาก 10 เป็น 16 เปลี่ยนค่า hue angle จาก 33 องศา เป็น 21 องศา ซึ่งให้ค่าใกล้เคียงกับสีของโยเกิร์ตรสสตรอเบอร์รี่ในทางการค้า พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเก็บ 21 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณของเชื้อ *Lactobacillus* และ *Streptococcus* เท่ากับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสี การวัดแรงจากเครื่อง Instron เท่ากับ 0.230 นิวตัน ซึ่งใกล้เคียงกับชุดควบคุม สรุปได้ว่าสามารถใช้สีจากเชื้อรา *M. purpureus* เป็นสีผสมในโยเกิร์ตรสสตรอเบอร์รี่เพราะการเปลี่ยนแปลงสีใกล้เคียงกับสี FD&C Red#40 และเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับใช้สีคาร์ไมน์ หรือผงบีทรูท

2.6 ประโยชน์ของสารที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส (อ้างจาก บุษบา, 2542)

มีการศึกษาต่อๆ มาพบสารเมตาโบไลท์หลายๆ ชนิดที่น่าสนใจและมีค่าทางเศรษฐศาสตร์จากเชื้อราโมแนสคัสดังแสดงรวบรวมในตารางที่ 2.3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.3 สารเมตาโบไลท์ที่มีประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัส

เมตาโบไลท์	ชนิด
1.เอนไซม์	- กลูโคอะมิเลส
	- โปรติเอส
	- แอลฟา กาแลคโตซิเดส
	- แอลฟา-อะมิเลส
	- ไรโบนิวคลีเอส
2. เมตาโบไลท์ปฐมภูมิ (primary metabolites)	- เอทิลแอลกอฮอล์
	- กรดอินทรีย์
	- วิตามินบี 2
	- ไขมัน
	- กรดไขมัน
3. เมตาโบไลท์ทุติยภูมิ	- รงควัตถุ (แดง, เหลือง, ส้ม)
(secondary metabolites)	- สารปฏิชีวนะ
	- สารลดคอเลสเตอรอลหรือโมนาโคลิน
	- สารตกตะกอน
	- ยาลดความดันโลหิต
	- สารยาพื้นบ้านของจีนรักษาโรคอาหารไม่ย่อย, โรคบิด, กล้ามเนื้อฟกช้ำ
	- คูมาริน (coumarin) รักษาโรคด่างขาว
	- โคเอนไซม์ Q_{10}
	- สารให้กลิ่นหอม (methyl ketones)
	- สารแองคาแลคโตน (ankalactone)
	- สารยับยั้งการกลายพันธุ์

ที่มา : ดัดแปลงจาก บุษบา (2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โมนาโคลิน เค (Monacolin K)

โมนาโคลิน เค (Monacolin K) เป็นสารกลุ่มสตาติน (statin) ได้จากเชื้อราที่มีฟิลาเมนต์ (filament) เกิดโดยกระบวนการเมตาโบไลท์ครั้งที่สอง ได้สารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนผ่านวิถีโพลีคีไทด์ (polyketide pathway) เชื้อรา *M. ruber, P. brevicompactum* และ *A. terreus* สามารถผลิตโลวาสตาติน (Lovastatin), โมนาโคลิน เจ (Monacolin J), โมนาโคลิน แอล (Monacolin L) และ เมวาสตาติน (Mevastatin) พบว่า สารกลุ่มนี้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริล

โคเอนไซม์ เอ (hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase : mevalonate:NADP+ oxidoreductase [EC 1.1.1.34]) ซึ่งเป็นเอนไซม์กระตุ้นการเปลี่ยน HMG-CoA ให้เป็นเมวาโลเนต (mevalonate) เพื่อใช้ในการสร้างโคเลสเตอรอล (อ้างจาก Hajjaj และคณะ, 2001)

ประโยชน์ของอังคัก (ข้าวแดง) ในการผลิตยาเพื่อใช้ลดโคเลสเตอรอล ในสมัยราชวงค์มิงค์ (1368-1644) ได้มีการนำอังคักมาใช้เพื่อปรุงยาจีนโบราณ ซึ่งได้มีบันทึกในตำรายาชื่อ Ben Cao Gang Mu-Dan Shi Bu Yi ประสิทธิภาพของอังคักจะออกฤทธิ์อ่อนๆ ช่วยให้ระบบการไหลเวียนโลหิตในร่างกายดีขึ้น นักวิจัยในประเทศจีนได้ศึกษาการบริโภคอังคักในมนุษย์ พบว่า การบริโภคอังคักประมาณ 14-55 กรัม/คน/วัน สามารถลดความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลได้ 11-32% และลดความเข้มข้นของไตรกลีเซอรอล (Triacylglycerol) ได้ 12-19% ต่อมาในปี 1979 Endo ได้แยกสารโมนาโคลิน เค (Monacolin K) ที่ผลิตโดยโมแนสคัส สารดังกล่าวมีจุดหลอมเหลวที่ 157-159^{O}ซ มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{36}O_5$ (MW 404) มีค่า LD_{50} ในหนูเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (อ้างจาก พัชรีย์, 2545)

ในปี 1998 บริษัท Phamanex ได้ผลิตอาหารเสริม (Dietary supplement) ที่ชื่อคอเลสติน (Cholestin) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเชื้อราโมแนสคัสลงบนข้าว โดยการผลิตอังคักจะผลิตเพื่อให้ได้สารลดโคเลสเตอรอลในปริมาณสูง ฉลากบนภาชนะบรรจุของคอเลสติน ระบุให้ผู้ใช้บริโภคได้ไม่เกิน 2 แคปซูลในแต่ละครั้ง และบริโภควันละ 2 ครั้ง ผู้บริโภคจะได้คอเลสติน ในปริมาณ 4 แคปซูลต่อวัน แต่ละแคปซูลบรรจุ 0.6 กรัม ดังนั้นผู้บริโภคจะได้รับคอเลสติน ในปริมาณ 2.4 กรัมต่อวัน นอกจากนี้ฉลากยังระบุคำเตือนของอาหารเสริมชนิดนี้ ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อตับและกล้ามเนื้อ ดังนั้นในฉลากจึงระบุเจาะจงกลุ่มผู้ใช้ที่ต้องการลดระดับโคเลสเตอรอลเท่านั้น (อ้างจาก พัชรีย์, 2545)

Hajjaj H. และคณะ (2001) ได้ศึกษาการสังเคราะห์โลวาสตาตินจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* Thom ATCC 74135 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ เพื่อศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการสร้างโลวาสตาติน โดยทดลองดังนี้ 1) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างโลวาสตาตินในอาหารเหลวสังเคราะห์ ได้เติมแหล่งไนโตรเจนทั้งสารอินทรีย์ (กลูตาเมท, ฮีสติดีน, ไกลซีน, อาจินีน และไอโซลูซีน) และอนินทรีย์ (แอมโมเนียมดาร์เตรท, แอมโมเนียมไนเตรท, แอมโมเนียมอะซิเตท, โซเดียมไนเตรท หรือยูเรีย) และใช้กลูโคส 45 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ช่วยเพิ่มมวลชีวภาพเท่านั้น แต่สร้างโลวาสตาตินน้อย ส่วนแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ พบว่าโซเดียมกลูตาเมท (sodium glutamate) และฮีสทิดีน (histidine) ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 12.5 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณโลวาสตาติน เท่ากับ 47 และ 46 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และกลูโคสถูกใช้จนหมดภายหลัง 140 ชั่วโมง เนื่องจากกรดอะมิโนสามารถให้ทั้งแหล่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คาร์บอนและไนโตรเจนแก่เชื้อรา สำหรับโซเดียมกลูตาเมทนิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพราะทำให้มวลชีวภาพของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว 2) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการสร้างโลวาสตาติน ในอาหารเหลวสังเคราะห์ ได้เติมแหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ แลคโตส กลีเซอรอล เอทานอล และกลูโคส และใช้โซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ภายหลังการทดลอง 160 ชั่วโมง พบว่าอาหารที่เติมกลูโคส 20 และ 45 กรัม/ลิตร มีปริมาณโลวาสตาติน เท่ากับ 37 และ 35 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ อาหารที่เติมแลคโตส 45 กรัม/ลิตร มีโลวาสตาติน เท่ากับ 25 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารที่เติมกลูโคส 20 กรัม/ลิตร ร่วมกับแลคโตส 20 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณโลวาสตาตินสูงสุดถึง 54 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าการเพิ่มปริมาณกลูโคส ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณโลวาสตาติน ส่วนการใช้แลคโตสเชื้อราสามารถสร้างโลวาสตาตินทั้งที่ยังมีปริมาณแลคโคสเหลืออยู่ในอาหาร สำหรับการใช้ทั้งกลูโคสและแลคโคส ทำให้ได้โลวาสตาตินสูงสุด ส่วนการใช้เอทานอลและกลีเซอรอล มีปริมาณโลวาสตาตินน้อยมาก เพราะสารเหล่านี้จะไปลดการสร้าง NADH ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์โลวาสตาตินผ่านวิถีโพลีคีไทด์ สรุปว่าอาหารที่มีกลูโคสและกลูตาเมท จะเริ่มผลิตโลวาสตาตินเมื่อปริมาณกลูโคสในอาหารหมด กล่าวคือกลูโคสมีคุณสมบัติกดการสังเคราะห์โลวาสตาติน แต่เมื่อใช้แลคโคสการผลิตโลวาสตาตินเริ่มได้ทั้งที่ในอาหารยังมีแลคโคสเหลืออยู่

Zhao Hai (2002) ได้ศึกษาการผลิตโมนาโคลิน (Monacolin) โดยเชื้อรา *M. purpureus* โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง (ข้าว) และอาหารแบบเหลว (rice powder) พบว่าสามารถผลิตโมนาโคลินในข้าว เท่ากับ 0.28-0.35 มิลลิกรัม/กรัม ได้มากกว่าในอาหารแบบเหลว ซึ่งผลิตโมนาโคลินเพียง 0.108 มิลลิกรัม/กรัม (rice powder)

Shindia A. A. (2001) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์เมวิโนลิน (mevinolin) โดยเชื้อรา *A. terreus* พบว่าอาหารที่มีกลูโคส 6% เป็นแหล่งคาร์บอน และส่วนผสมของสารสกัดจากยีสต์และโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์เมวิโนลิน และยังได้ศึกษาการผลิตเมวิโนลินจากเชื้อราหลายชนิด โดยเชื้อราที่แยกจากดินของประเทศอียิปต์จำนวน 25 สายพันธุ์ เลี้ยงเชื้อราที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (selected substrate) นำอาหารภายหลังการเลี้ยงเชื้อได้กรอง โดยแยกเอาของเหลวที่กรองได้วิเคราะห์การสร้างเมวิโนลิน โดย TLC จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วย HPLC พบว่าเชื้อราจำนวน 1 ใน 3 ของทั้งหมด มีการผลิตเมวิโนลิน โดยเชื้อรา *A. terreus* สามารถผลิตเมวิโนลินได้มากที่สุด

C.Z. LEE และคณะ (2002) ได้ศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส ที่ผลิตรงควัตถุสีแดงและโมนาโคลิน เค ในปริมาณสูง โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและอาหารเหลว เริ่มจากเลี้ยงเชื้อโมแนสคัส ใน modified rice broth เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30^{O}ซ จากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เลี้ยงเชื้อดังต่อไปนี้ 1) อาหารแข็ง (ข้าวเจ้า) และบ่มในถาดที่อุณหภูมิ 30^{O}ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 7 วัน และ 2) อาหารเหลว โดยบ่มในถัง 5 ลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30^{O}ซ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร เพื่อวัดปริมาณสีแดง และวิเคราะห์ปริมาณโมนาโคลิน เค โดยใช้ HPLC จากการศึกษาเชื้อราโมแนสคัสทั้งหมด 72 สายพันธุ์ พบว่า *M. purpureus* M15 ผลิตรงควัตถุสีแดงปริมาณมาก (ค่าสี 12) และโมนาโคลิน เค (4 มิลลิกรัม/กรัม) ในอาหารแข็ง โดยสภาวะในการเลี้ยงต้องมีความชื้นและปริมาณอากาศที่เหมาะสม ส่วนในอาหารเหลวตรวจพบปริมาณโมนาโคลิน เค น้อยกว่า 5 ไมโครกรัม/กรัม และไม่มีความเสถียร

Yaw-Nan Chang และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตโลวาสตาติน (lovastatin) จากเชื้อรา *Monascus ruber* CCRC 31535 (ATCC 18199) บนอาหารเหลว โดยวางแผนการทดลองแบบ Response Surface Methodology (RSM) พบว่าปริมาณของโลวาสตาตินสูงสุดที่เชื้อผลิตได้ เท่ากับ 131 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของแป้ง เปปโตน กลีเซอรีน และกลูโคส ดังนี้คือ 34.4 กรัม/ลิตร, 10.8 กรัม/ลิตร, 26.4 มิลลิกรัม/ลิตร และ 129.2 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

Yuan-Chi Su และคณะ (2003) ศึกษาปริมาณของ γ–aminobutyric acid (GABA) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ความดันโลหิตต่ำ (hypotensive) และ โมนาโคลิน เค (monacolin K: ใช้เป็นยาลดโคเลสเตอรอล) ที่สร้างจากเชื้อรา *M. purpureus* CCRC31615 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตโมนาโคลิน เค สูงสุด จากการคัดเลือกทั้งหมด 16 สายพันธุ์ การเพิ่มโซเดียมไนเตรตในข้าว ทำให้เชื้อรา *M. purpureus* CCRC 31615 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

2.7 ซิตรินิน (Citrinin) (อ้างจาก European Mycotoxin Network, 2002)

ซิตรินิน เป็นสารพิษจากเชื้อรา ส่วนใหญ่จะพบจากเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่ปนเปื้อนในอาหาร ประเภทธัญพืช ผลไม้ และถั่ว คนจะได้รับซิตรินินจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเข้าไป

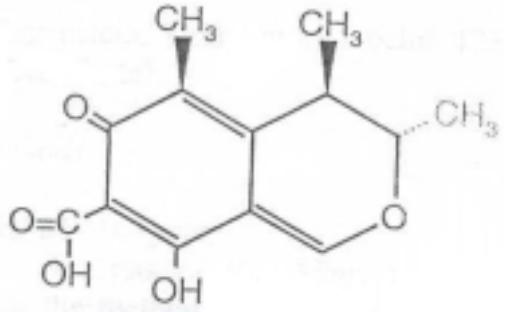
ซิตรินินพบครั้งแรกโดยการแยกจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* ในปี 1931 ต่อมาในปี 1951 พบปัญหาข้าวเหลือง “yellow rice problem” ในข้าวที่ประเทศไทยส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น เพราะมีการปนเปื้อนจากเชื้อรา *P. citrinum* และตรวจพบซิตรินิน จากนั้นพบว่าเชื้อรา *Penicillium* สายพันธุ์อื่น เช่น *P. verrucosum* สามารถสร้างซิตรินิน เนื่องจากเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารพิษ ชื่อ โอคราท็อกซิน เอ (Ochratoxin A, OTA) พบทั่วไปในธัญพืช เช่น ข้าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สาลี และข้าวบาร์เลย์ จึงไม่ใช่เรื่องแปลกที่จะพบทั้ง โอคราท๊อกซิน เอ และซิตรินินพร้อมกัน แต่มีการศึกษาเกี่ยวกับซิตรินินน้อยกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะไม่บ่อยครั้งที่สามารถตรวจพบซิตรินิน เนื่องจากอาจสลายไปในระหว่างขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสกุลอื่นที่สร้างซิตรินิน เช่น *A. terreus, A. carnues* และ *A. niveus* ช่วงแรกของการศึกษาพบว่าซิตรินินมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (antibacteria) แต่ยังมีผลกระทบต่อไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงไม่ได้มีการนำสารนี้มาใช้ประโยชน์

1. คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

ซิตรินิน มีชื่อเรียกตามระบบ IUPAC คือ (3R,4S)-4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl - 6- 3*H*-2-benzopyran-7-carboxylic acid) มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.4



รูป 2.4 โครงสร้างของซิตรินิน
ที่มา : M. Sabater-Vilar และคณะ (1999)

ซิตรินิน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 250 กรัม มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{13}H_{14}O_5$ มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองเลมอน มีจุดหลอมเหลว 172^{O}ซ ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมอะซิเตต เมทานอล อะซิโตไนไตรท์ เอทานอล และสารละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว สลายตัวได้ด้วยแสง (photodecomposition) สารละลายกรดหรือด่างหรือจากความร้อน สามารถเกิดสีน้ำตาลเมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอริคคลอไรด์ สีเขียวกับไททาเนียมคลอไรด์ สีแดงคล้ำกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และด่าง ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สามารถทำให้เกิดคีเลต (chelate) กับ โมโนอะซิเตต (mono-acetate), ไดเอทิล (diethyl), เมทิลเอสเทอร์ (methyl ester) และ อนุพันธ์ไดไฮโดร (dihydro derivatives)

2. การศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษ

ซิตรินินเมื่อทดสอบกับสัตว์ทดลอง ได้ค่า LD_{50} 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (สำหรับหนูทดลอง) และ 19 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (สำหรับกระต่าย) ซิตรินินทำให้ไตถูกทำลายและมีฤทธิ์อย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อ่อนกับตับ เพราะความสามารถกรองไขมัน (fatty filtration) ลดลง ผลกระทบอื่นคือทำให้เกิดการขยายตัวของเส้นเลือดก่อให้เกิดการไหลเวียนโลหิตผิดปกติ และทำให้หลอดลมหดตัว

ซิตรินินจะเสริมฤทธิ์กับโอคราท๊อกซิน เอ และเป็นพิษกับระบบประสาทของหมู เกิดในประเทศเดนมาร์ก สวีเดน นอร์เวย์ และไอร์แลนด์ ซิตรินินเป็นสารพิษต่อตับและไต (hepato-nephrotoxin) พบในเชื้อราสายพันธุ์ทั่วไป และยังเกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิด endemica Balkan nephropathy ในคน เหมือนกับโอคราท๊อกซิน เอ และสารพิษอื่นๆ ที่มีลักษณะคล้ายกัน แต่อย่างไรก็ตามซิตรินินไม่อันตรายรุนแรงต่อคน เพราะความไม่เสถียรในระหว่างกระบวนการแปรรูป แต่จะมีผลโดยตรงต่อสัตว์ที่บริโภคธัญพืชที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปใดเลย

มีรายงานการปนเปื้อนลงในอาหารประเภทต่างๆ โดยเฉพาะอาหารประเภทเมล็ดธัญพืช และอาหารสัตว์ M. Sabater-Vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าซิตรินินมีผลต่อการทำงานของไตและ ultra-structure ซิตรินินจะไปสะสมในไมโตคอนเดรียและรบกวนระบบการแลกเปลี่ยนอิเล็คตรอนในเซลล์ โดยขึ้นกับค่าพีเอช แต่ไม่มีผลกระทบต่อผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA การเรียงลำดับของโปรตีนและ RNA เมื่อการทำงานของไมโตคอนเดรียผิดปกติไป ทำให้ระดับของไกลโคเจนในตับลดลง และยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลและไตรกลีเซอรอลในตับ

3. ความเสถียร (stability)

ซิตรินินสลายตัวได้ที่อุณหภูมิ 175^{O}ซ ในสภาวะปราศจากน้ำ (anhydrous) แต่จะสลายที่อุณหภูมิ 140^{O}ซ ในสภาวะชื้นปานกลาง (semi-moist) ดังนั้นความเป็นพิษจะลดลงเมื่อได้รับความร้อนร่วมกับความชื้น จากการศึกษายังพบอีกว่า ซิตรินินสลายได้ในขั้นตอนการทำเบียร์ ถึง 90% โดยผ่านกระบวนการการงอก (germination) การผสม (mash) และการทำน้ำเบียร์ (wort) และยังมีการใช้กรดโพรพิโอนิค (propionic acid) กับข้าวบาร์เลย์เพื่อทำลายซิตรินินในระหว่างการเก็บรักษา

4. ซิตรินินจากเชื้อราโมแนสคัส

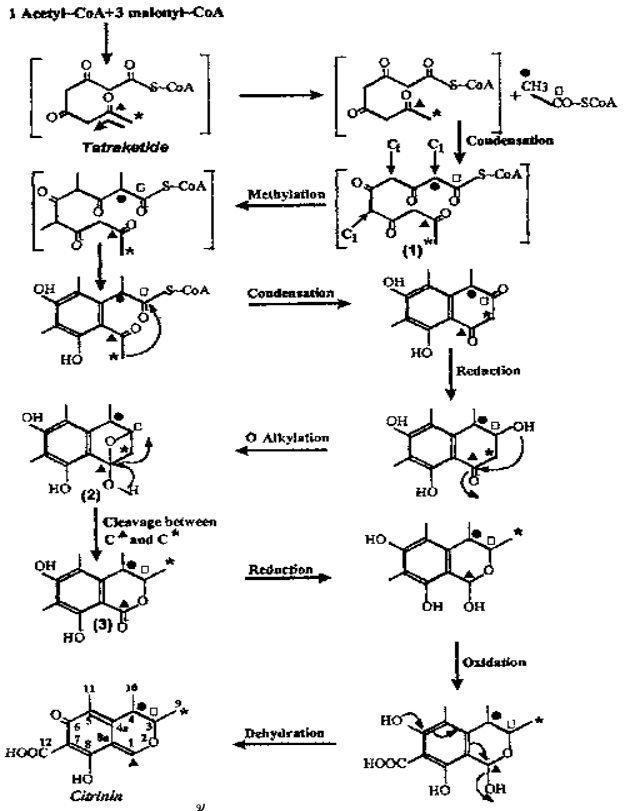
นอกจากคุณสมบัติในการรักษาโรคของข้าวแดงจากโมนาโคลิน เค (monacolin K) ได้มีผลงานวิจัยหลายฉบับ ได้ศึกษาเกี่ยวกับซิตรินิน (citrinin) ที่สร้างจากเชื้อราสกุลโมแนสคัส พร้อมกับสร้างรงควัตถุ Wong และ Bau (1977) Wong และ Koehler (1981) Fink-Gremmels และคณะ (1991) แสดงให้เห็นว่า มีการสร้างสารที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ในสีที่สกัดได้จากโมแนสคัส ซึ่งสนับสนุนงานวิจัยของ Ober และ Kunz (1989) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ จากนั้นได้มีการแยกเอาโมนาสซิดิน เอ (monascidin A) จากโมแนสคัสหลายสายพันธุ์ และบ่งชี้ได้ว่าเป็นสารตัวเดียวกับซิตรินิน (Blanc และคณะ, 1995 in

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

press) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดอาการไตอักเสบและผลิตจากเชื้อราหลายๆ ชนิด (Wu และคณะ, 1974, อ้างอิงจาก M. Sabater-Vilar และคณะ, 1999)

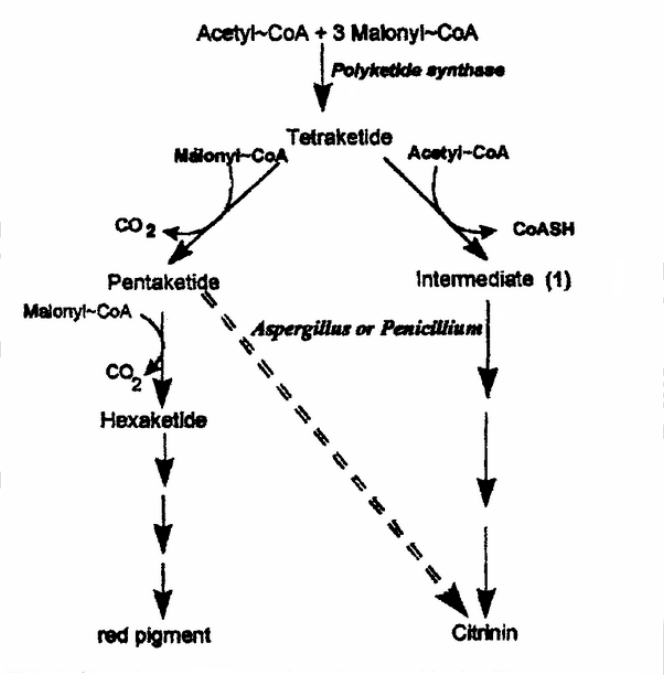
คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ในรงควัตถุจากเชื้อราโมแนสคัส ได้ถูกศึกษาจากนักวิจัยหลายคน เช่น Wong และ Koehler (1981) ได้แยกสารประกอบ 2 ตัว จากเชื้อรา *M. purpureus* ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้แก่ สารสีเหลืองซีด คือ โมนาสซิดิน เอ (monascidin A) และ สารสีเหลืองเรืองแสงที่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของสารประกอบดังกล่าว ต่อมา Blanc P.J. และคณะ (1995b) ได้แยกสารโมนาสซิดิน เอ ออกจากเชื้อราโมแนสคัสหลายสายพันธุ์ และพิสูจน์ได้ว่าโมนาสซิดิน เอ คือซิตรินิน โดยใช้วิธี Mass Spectroscopy เพื่อยืนยันและอธิบายโครงสร้างของสารดังกล่าว

Hajjai และคณะ (1999) ได้ศึกษากลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพของซิตรินิน จาก *Monascus ruber* ATCC 96218 โดยวัดจาก ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance ทดลองโดยวัด [^{13}C] citrinin หลังจากเติม [^{13}C]acetate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการสังเคราะห์ซิตรินินเกิดจาก tetraketide แทนที่จะสังเคราะห์จาก pentaketide เหมือนกับเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่สามารถสร้างซิตรินินเช่นเดียวกัน กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินจากโมแนสคัส แสดงในรูปที่ 2.5 และ 2.6



รูปที่ 2.5 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินโดยเชื้อรา *Monascus ruber*
ที่มา : Hajjaj และคณะ (1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2.6 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินและรงควัตถุสีแดง โดยเชื้อรา *Monascus ruber*
(เส้นประ แสดงกลไกการสังเคราะห์ซิตรินินโดยเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium*)
ที่มา : Hajjaj และคณะ (1999)

การใช้สีที่ผลิตจากโมแนสคัสเป็นวัตถุเจือปนในอาหาร พบว่าอาจมีการปนเปื้อนของซิตรินินอยู่ด้วย M. Sabaler-Vilar และคณะ (1999) ได้ศึกษาดังนี้ 1) ตรวจพบซิตรินินในผลิตภัณฑ์จากโมแนสคัสในทางการค้าหรือไม่ 2) ซิตรินิน และ/หรือ สารสกัดจากโมแนสคัส มีคุณสมบัติทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenic) และปลอดภัยสำหรับใช้ในอาหารหรือไม่ และได้ศึกษาสารสกัดจากโมแนสคัส โดย HPLC การทดสอบ mutagenicity assay ของซิตรินินบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับสารสกัดจากโมแนสคัส รวมทั้งศึกษาเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างซิตรินิน สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทำให้เชื้อราโมแนสคัสสร้างซิตรินิน หรือกำจัดซิตรินินออกจากสีของโมแนสคัส

Blanc P.J. และคณะ (1995a) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสร้างซิตรินินจากเชื้อราโมแนสคัสหลายสายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเลี้ยงต่างกัน ทดลองดังนี้ 1) ศึกษาสายพันธุ์เชื้อราที่ไม่สร้างซิตรินิน พบว่า ซิตรินินที่ได้จากเชื้อรา *M. purpureus* CBS 109.07 (wild) ผลิตซิตรินิน เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในข้าว ส่วนเชื้อรา *M. ruber* ATCC 96218 ผลิตซิตรินิน มากถึง 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม 2) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตซิตรินิน โดยเติม ยูเรีย, แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3), แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), โมโนโซเดียมกลูตาเมท และเมไทโอนีน โดยใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน หมักโดย *M. ruber* พบว่าอาหารที่เติมโมโน-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โซเดียมกลูตาเมท ตรวจพบปริมาณซิตรินินสูงสุด เท่ากับ 120 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนการเติมยูเรียและเมไทโอนีน พบซิตรินินน้อย เท่ากับ 17 และ 0 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ แต่ปริมาณสีแดงที่ได้ก็น้อยเช่นกัน การศึกษานี้ยังไม่ได้ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุและไม่ผลิตซิตรินิน 3) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยเปรียบเทียบระหว่างเอทานอลและกลูโคส พบว่าอาหารที่เติมกลูโคส 45 กรัม/ลิตร และเติมเอทานอล 28 กรัม/ลิตร มีการผลิตซิตรินิน เท่ากับ 226 และ 136 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และยังพบว่าถ้าในอาหารมีเอทานอลมากกว่า 45 กรัม/ลิตร จะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. ruber* 4) ศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อ *M. ruber* โดยมีเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน เปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงในฟลาสก์ที่เขย่า และในถังหมัก พบว่า ในถังหมัก (fermentor) พบปริมาณซิตรินิน เท่ากับ 380 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่ในฟลาสก์ ผลิตซิตรินิน 136 มิลลิกรัม/ลิตร 5) การเติมสารยับยั้งการสร้างซิตรินิน ได้แก่ cerolenin และ ethionin พบว่ามีผลยับยั้งทั้งการผลิตซิตรินินและรงควัตถุสีแดง

Blanc P.J. และคณะ (1998) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์หรือปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างซิตรินินจากโมแนสคัส โดยทดลองดังนี้ 1) โดยการเติมกรดไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ caproic, hexanoic และ octanoic เป็นต้น พบว่ากรดไขมันทำให้ได้ปริมาณรงควัตถุเพิ่มมากขึ้น แต่ยังคงมีการผลิตซิตรินินพร้อมๆ กัน 2) โดยการควบคุมการเติมอากาศและการกวน พบว่าซิตรินินเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะการเติมอากาศมากๆ และมีอัตราเพิ่มมากกว่าการเพิ่มรงควัตถุ 3) โดยการเติมกรดมาลิก (malic acid) ที่ความเข้มข้นต่างกัน และยืนยันว่ากรดมาลิกมีผลทำให้การสังเคราะห์รงควัตถุจากโมแนสคัสลดลง แต่ไม่มีผลต่อการลดของซิตรินิน เนื่องมาจากกรดมาลิกเกิดขึ้นเพราะการลดลงของกลูตาเมท จึงทำการทดลองโดยเติมกรดอะมิโนอื่นๆ แทนกลูตาเมทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมฮีสติดีน (histidine) ให้ปริมาณสีแดงเพิ่มขึ้น ประมาณ 6 เท่า ในขณะเดียวกันไม่พบการสร้างซิตรินิน และพบว่าในระหว่างการนำฮีสติดีนไปใช้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้น และทำลายโครงสร้างของซิตรินินได้ ดังนั้นนอกจากการควบคุมสภาวะการเลี้ยงแล้ว ในกรณีที่เกิดซิตรินินขึ้นจึงใช้วิธีกำจัดซิตรินินโดยการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมี ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

Hajjaj H. และคณะ (2000a) ได้ศึกษาผลของกรดไขมันที่มีคาร์บอน 6-18 อะตอม ที่มีต่อการสร้างซิตรินินโดยเชื้อรา *Monascus ruber* การทดลองทำในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 5 หรือ 20 กรัม/ลิตร และกลูตาเมท 5 กรัม/ลิตร และได้เติมกรดออกตาโนอิก (octanoic acid) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงผ่านวิถีโพลีคีไทด์ พบว่ากรดไขมันทำให้ปริมาณสีแดงเพิ่มขึ้น 30-40% และยังพบว่าปริมาณซิตรินินลดลง เพราะว่ากรดไขมันมีคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซ์รุนแรง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

และทำลายโครงสร้างของซิตรินิน รวมทั้งการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีผลทำลายโครงสร้างซิตรินินเช่นเดียวกัน

Hajjaj H. และคณะ (2000b) ศึกษาการผลิตรงควัตถุสีแดงและปริมาณซิตรินินโดยเชื้อรา *Monascus ruber* ATCC96218 ในอาหารเหลวซึ่งเติมน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม/ลิตร และกลูตาเมท 5 กรัม/ลิตร ในสภาวะที่จำกัดปริมาณออกซิเจน รงควัตถุสีแดงและสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) คือ ซิตรินิน จะเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ขั้นปฐมภูมิ ส่วนในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนมากเกินพอจะเกิดกระบวนการสังเคราะห์แบบทุติยภูมิ เกิดการสร้างซิตรินิน ในช่วง stationary phase ของการเจริญของเชื้อ แต่การผลิตรงควัตถุสีแดงจะลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงว่าสภาวะดังกล่าวเป็นการยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดง จากการศึกษายังพบว่าในสภาวะการเติมอากาศ เกิดกรดอินทรีย์ขึ้นในอาหารเหลว เช่น แอลมาเลท (L-malate), ซัคซิเนท (succinate), ฟูมาเรท (fumarate) และตาร์เตรท (tartrate) ที่มีผลยับยั้งการสร้างรงควัตถุสีแดงเพียงเล็กน้อย แต่ไม่มีผลต่อการสร้างซิตรินิน

Ting-Kuo Huang และคณะ (2002) ศึกษาสภาวะการกวน การเติมอากาศ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus purpureus* CCRC31499 เพื่อให้สร้าง γ–aminobutyric acid (GABA) และยับยั้งการสร้างซิตรินิน โดยใช้ RSM ในการออกแบบการทดลอง การทดลองนี้เป็นแบบ 2^3 full-factorial composite design สภาวะที่เหมาะสมคือ การกวนที่ 206 รอบต่อนาที การเติมอากาศ 2.65 SLPM และอุณหภูมิ 34.7^{O}ซ โดยสามารถผลิต γ–aminobutyric acid (GABA) และซิตรินิน เท่ากับ 115.84 และ 0.124 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

2.8 การหมักเชื้อราโมแนสคัสบนข้าว

ข้าวแดง หรือ อังคัก เป็นผลิตภัณฑ์รงควัตถุ (สารสี) ที่ได้จากการเลี้ยงโมแนสคัสบนข้าว นึ่งรู้จักกันมาช้านาน แถบตะวันออก เช่น ประเทศจีน ประเทศแถบเอเชียใต้ เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น เชื้อราที่เจริญบนข้าวสามารถสร้างรงควัตถุออกมานอกเซลล์ได้มากทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุ เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่นิยมใช้หมักข้าวแดง คือ *M. purpureus* และ *M. anka* กรรมวิธีการหมักแสดงในรูปที่ 2.7 (อ้างจาก บุษบา, 2542)

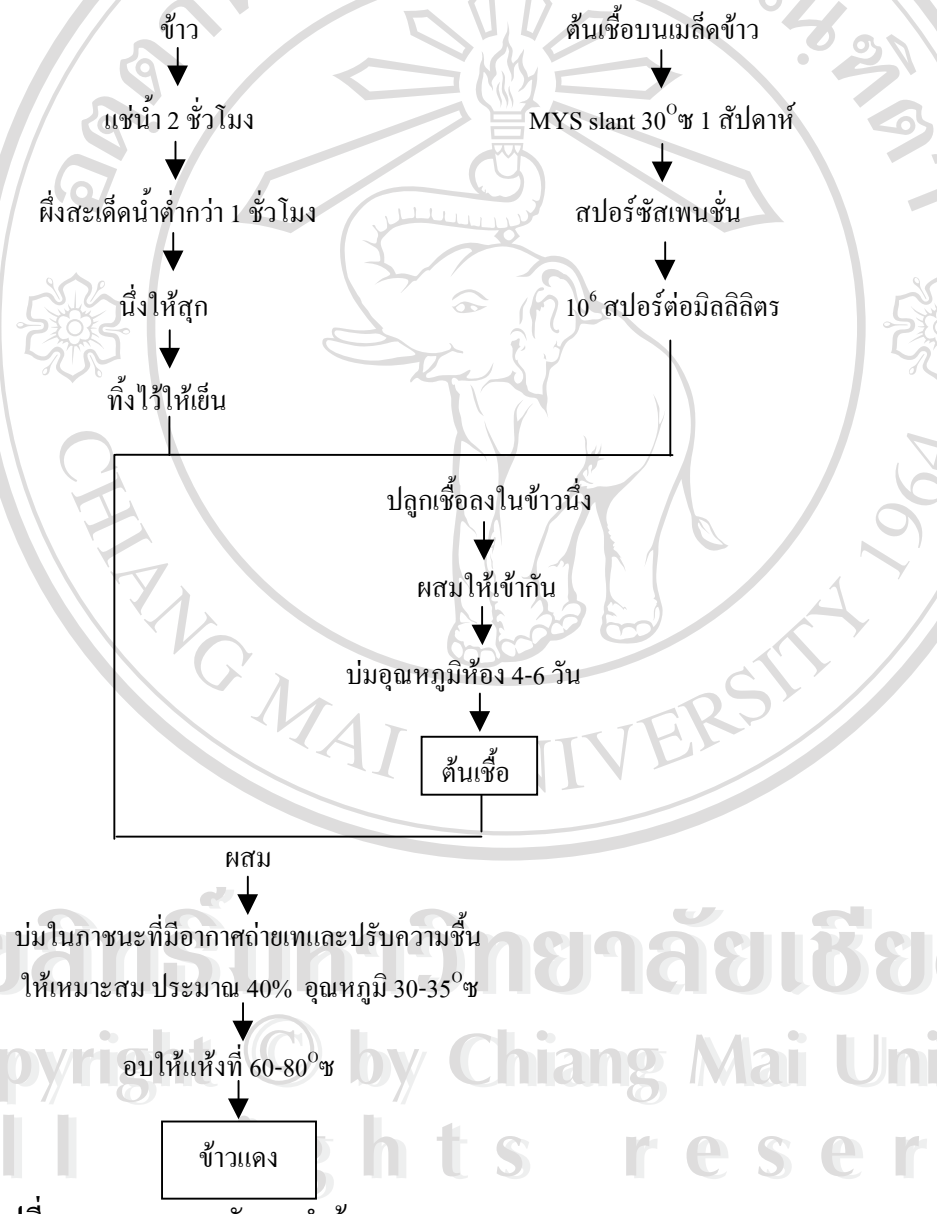
ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักสีโมแนสคัสบนอาหารแข็ง

(ก) สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส

โดยทั่วไปเชื้อราโมแนสคัส เมื่อเจริญบนเมล็ดข้าวโดยการงอกของเส้นใยทั้งผิวหน้า และแทรกทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าวนั้น ก็จะมีการสร้างรงควัตถุได้ภายหลังจากการบ่มไปได้นาน 3 วัน รงควัตถุเหล่านี้เมื่อมีการนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล พบว่ารงควัตถุสีแดงทั่วไปจะมีค่าดูด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กลืนแสงสูงสุด 2 จุด ที่ 420 และ 500 นาโนเมตร บางสายพันธุ์ที่ให้สีข้าวแดง หรือ อังคัก เป็นสีแดงสวย หรือแดงชมพูแก่ จะมีความโด่ง (peakedness) ที่จุด 500 นาโนเมตร สูงกว่าที่ 420 นาโนเมตร เช่นที่พบในสายพันธุ์ของ *M. purpureus* หรือ *M. anka* แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงเข้มคล้ำ โดยมีค่าความโด่งที่ 420 สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร หรือค่าความโด่งที่ 370 สูงกว่า 500 นาโนเมตร เป็นต้น เช่น สายพันธุ์ *M. bakeri* หรือ *M. kaoliang* (อ้างจาก บุษบา, 2542)



รูปที่ 2.7 แสดงแผนผังการทำข้าวแดง

ที่มา : บุษบา (2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Shepherd (1977) ศึกษาการสร้างรงควัตถุโดยเชื้อราโมแนสคัส กว่า 40 สายพันธุ์ที่มีใน American Type Culture Collection พบว่า *M. purpureus* ATCC 16427 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างรงควัตถุได้ดีที่สุด เชิดชัยและคณะ (2519) ศึกษาสภาวะการสร้างรงควัตถุของ 4 สายพันธุ์ ในอาหารวุ้น 6 ชนิด พบว่า M. *purpureus* K001 สร้างสีได้ดีที่สุด และอาหารที่เหมาะสมคือ Yeast Malt Agar (YMA) และ Glucose Starch Agar (GSA) รัตนาภรณ์ (2531) ศึกษาการสร้างรงควัตถุของเชื้อราโมแนสคัส 6 สายพันธุ์จากศูนย์เก็บรวบรวมพันธุ์จุลินทรีย์ Bangkok MIRCENS ในข้าว พบว่า TISTR 3090 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสีได้ดีที่สุด ในข้าวทุกพันธุ์ที่ทดสอบ (อ้างจาก อรัญและคณะ, 2530)

(ข) สับสเตรต

สับสเตรตที่ใช้ในการหมักสีโมแนสคัสแบบแห้งนั้น ปกติจะเป็นข้าว หรือเมล็ดธัญพืชอื่นๆ

1. ข้าว Palo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างรงควัตถุของ *Monascus purpureus* และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอังคัก มีดังนี้ ความชื้นไม่เกิน 50% ค่าพีเอชระหว่าง 3.0-7.5 อุณหภูมิ 27^{O}ซ แต่สายพันธุ์ข้าวเหนียวให้ผลไม่ดีนัก บุษบา (2518) ได้ทดลองการสร้างรงควัตถุของ *M purpureus* โดยใช้สภาวะต่อการผลิตข้าวแดงของ Palo และคณะ (1960) มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ต่างๆ ของไทย พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวพันธุ์หอมมะลิให้สีเข้มใกล้เคียงกัน แต่ข้าวเหนียวกลับให้กลิ่นหอมมากกว่าข้าวหอมมะลิ กลิ่นหอมดังกล่าวคือ เอสเทอร์ และแอลกอฮอล์ปนกัน ทั้งนี้ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และข้าวเจ้าพันธุ์หอมมะลิให้ผลความเข้มของสีใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ญี่ปุ่น ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์อื่นๆ ของไทย คือ พันธุ์เสาไห้ พันธุ์ธรรมดา ฯลฯ นั้นล้วนแต่ให้สีและความหอมน้อยกว่ามาก ส่วนอรัญและคณะ (2531) รายงานว่าปริมาณอะมิโลสข้าวที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตข้าวแดงแตกต่างกันไปด้วย โดยพบว่าพันธุ์ข้าวที่มีอะมิโลสสูงมากกว่า 24% เช่น พันธุ์เหลือง 148, กข 23 และ กข 25 เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงมากกว่าพันธุ์ กข 7 และขาวดอกมะลิ 105 เชิดชัยและคณะ (2519) พบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวมีเพียงพอต่อการสร้างรงควัตถุ จึงไม่จำเป็นต้องเติมเปปโตน Schumacher และคณะ (1996) พบเช่นกันว่าข้าวจากแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศเกาหลีมีผลต่อการสร้างของข้าวแดง และพบว่าข้าวจากแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศเกาหลีมีผลต่อการสร้างสีของข้าวแดง และพบว่าข้าวจากแหล่งปลูก Punpo ให้ผลดีที่สุด

กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (2524) ทดสอบหาสายพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงจากข้าวจำนวน 22 สายพันธุ์ พบว่าข้าวเจ้าที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงคือพันธุ์พวงไร่ ขาวมะลิ ดับเบิลยูพี 153 ตะเภาแก้ว และเล็บมือนาง ข้าวสารเหนียวไม่เหมาะต่อการผลิตข้าวแดง รัตนาภรณ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(2531) ศึกษาการสร้างรงควัตถุโดย *M. purpureus* ในข้าวเจ้า 5 สายพันธุ์ คือ กข 7, กข 21, กข 23 , กข 25 และขาวดอกมะลิ 105 เมื่อเพาะเลี้ยงโดย *M. purpureus* TISTR 3090 พบว่าการสร้างรงควัตถุในข้าวพันธุ์ กข 21, กข 23 และกข 25 ให้ผลดีใกล้เคียงกัน โดยสร้างรงควัตถุดีที่สุด ในข้าวพันธุ์ กข 23 ขณะที่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ และกข 7 จะได้ผลต่ำกว่า (อ้างจาก อรัญและคณะ, 2530)

2. เมล็ดธัญพืช และอื่นๆ พรายแก้วและบุษบา (2534 ก) ได้ศึกษาแหล่งสับสเตรตชนิดต่างๆ ต่อการผลิตสีโมแนสคัสเปรียบเทียบกับการผลิตบนข้าวโดยใช้เมล็ดข้าวโพด มันเทศ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง ขนมปังแทนข้าวต่อการเจริญ การสร้างสี และการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* พบว่าขนมปังให้ค่าสีแดงมากที่สุด คือ 862 UA_{500}/กรัมแห้ง ซึ่งตรงกับผลของ Lin และ lizuka (1982) รองลงมาคือมันฝรั่ง และปลายข้าวหอมมะลิ นอกนั้นให้สีไม่ดีนัก ส่วนการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* พบว่าถั่วเหลืองให้ปริมาณสปอร์สูงสุด รองลงมาคือ ถั่วเขียว ขนมปัง และปลายข้าวหอมมะลิ ตามลำดับ ส่วน Rashbaum และ Yueh (1983) ทดลองใช้ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และข้าวบาร์เล่ย์ เป็นสับสเตรตแทนข้าวพบว่าได้ผลดีเช่นกัน (อ้างจาก บุษบา, 2542)

Xu Ganrony และคณะ (1998) ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงเชื้อ *M. anka* เพื่อผลิตรงควัตถุสีแดง พบว่าเส้นใยของเชื้อราไม่สามารถแทรกเข้าไปภายในเมล็ดข้าวโพดได้ง่ายเพราะยังมีเปลือกหุ้มอยู่และลักษณะโครงสร้างของแป้งข้าวโพด จึงปรับปรุงโดยการแยกเอาเปลือกหุ้มเมล็ดข้าวโพดออกและบดให้มีขนาดเล็กลงประมาณ 16-20 mesh เพื่อเพิ่มความสามารถดูดซับน้ำและการเกิดเจลของแป้ง การแช่ข้าวโพดในน้ำนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้มีความชื้น 70% ส่วนขั้นตอนการเพาะเลี้ยงทำเช่นเดียวกับในข้าว พบว่าการผลิตรงควัตถุและความสามารถในการย่อยแป้ง (glucoamylase activity) ใกล้เคียงกับในข้าว

Choi Jeong-Sil (2003) ศึกษาการสร้างรงควัตถุจากเชื้อรา *M. purpureus* โดยที่เลี้ยงบนอาหารแข็งให้ผลดีที่สุด (ค่าการดูดกลืนแสง 13.92) จากนั้นมีการเลี้ยงบนขนมปังและสกัดสีโดยใช้แอลกอฮอล์ สำหรับอาหารเหลวที่มีสารอาหารจำเป็นผสมอยู่ ปริมาณสีที่ได้จะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบที่มีในอาหารและค่าความเป็นกรดด่าง การทดลองมีการเขย่าเพื่อเพิ่มการละลายของออกซิเจน โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 ให้สีมากกว่าที่ค่าพีเอช 4.0 หรือ 9.0 ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ดี ได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมท (monosodium glutamate) ให้ค่าสี เท่ากับ 3.01 และ 3.525 หน่วย (400 และ 500 นาโนเมตร) ตามลำดับ ไคโตซาน (chitosan) โดยการเติม 65% degree deacetylation chitosan ในอาหาร ให้ค่าสีเท่ากับ 3.205 และ 2.785 หน่วย (400 และ 500 นาโนเมตร) และ ไคติน (chitin) ให้สีแดงเท่ากับ 3.305 และ 4.76 หน่วย (400 และ 500 นาโนเมตร) ซึ่งเติมภายหลังการเลี้ยง 48 ชั่วโมง ภายหลังการหมักได้ 4 วัน เทียบกับ 10 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(ค) พีเอช

Palo (1960) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างรงควัตถุสีแดงได้ในพีเอชระหว่าง 3.0-7.5 พลายแก้วและบุษบา (2534 ข) พบว่าสภาวะเป็นกรดไม่มีผลต่อการสร้างรงควัตถุสีเหลืองของ *M. barkari* (อ้างจาก บุษบา, 2542)

(ง) อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะต่อการสร้างรงควัตถุจะอยู่ระหว่าง 27-30^{O}ซ โดยบุษบา (2529) พบว่าอุณหภูมิ 35-37^{O}ซ เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคสอะมิเลส แต่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุของเชื้อราโมแนสคัส (อ้างจาก บุษบา, 2542)

(จ) อัตราส่วนของแก๊ส

Han และ Mudgett (1992) เป็นรายแรกที่รายงานว่าสัดส่วนของก๊าซออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ มีส่วนต่อการผลิตข้าวแดงด้วย โดยพบว่าความดันก๊าซออกซิเจนต่อความดันคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.50 ต่อ 0.02 บรรยากาศ (atm) จะมีผลต่อการสร้างสีแดงของอังคักมากที่สุด (อ้างจาก บุษบา, 2542)

(ฉ) ความชื้น

Palo และคณะ (1960) เป็นคนแรกที่รายงานว่าความชื้นต่ำกว่า 50% ให้ผลดีต่อการสร้างสีอังคักของ *M. purpureus* เชิดชัยและคณะ (2519) พบว่าความชื้น 60% ให้ผลดีเมื่อมีการเขย่า หรือการใช้อากาศช่วยให้เชื้อราสร้างรงควัตถุสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น รัตนา (2528) พบว่าการหมักข้าวแดงในสภาพที่มีความชื้นสูงมากไปนั้น เชื้อราโมแนสคัสจะสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูง แต่สีกลับน้อยลง Lotong และ Suwanarit (1990) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงในถุงพลาสติกของเชื้อรา *Monascus sp.* NP 1 คือ 32.6% แต่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 39.6% อัตราการสร้างรงควัตถุจะลดลง ความชื้นต่ำเกินไปทำให้เชื้อราเจริญได้ไม่ดี ส่งผลให้การสร้างสีไม่ดีด้วย ความชื้นสูงเกินไปเกิดการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคสอะมิเลสมาก เกิดการสะสมกลูโคสยับยั้งการสร้างสีได้ จึงได้พัฒนาสายพันธุ์กลายที่ทนกลูโคสได้สูง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตข้าวแดง (กังสดาลย์, 2538; กังสดาลย์และคณะ, 2539) ในขณะที่ Han (1990) และ Johns และ Stuart (1991) พบว่าถ้าความชื้นเริ่มต้นต่ำกว่า 40% จะได้สีน้อย แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นที่ 50-56% จะทำให้สีสูงสุดภายใน 8 วัน พลายแก้วและบุษบา (2534 ข) ศึกษาสภาพวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสีของ *M. kaoliang* ที่ให้สีแดง โดยศึกษาเวลาในการแช่ข้าว และเวลาสะเด็ดน้ำ และของ *M. barkari* ที่ให้สีเหลือง ในสภาพที่เป็นกรด พบว่าเวลาแช่ข้าวนาน 8 ชั่วโมง และสะเด็ดน้ำ 5-10 นาที ที่ทำให้ข้าวมีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 41% เหมาะต่อการสร้างสีแดงของ *M. kaoliang* และสีเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ *M. barkari* นอกจากนั้นยังพบเพิ่มเติมว่าการแช่ข้าวในน้ำนานเกินไปทำให้เมล็ดข้าวเกาะกัน การผึ่งสะเด็ดน้ำชั่วครู่ก็เพียงพอ

2.9 การหมักเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลว (อ้างจาก บุษบา, 2542)

การหมักในอาหารเหลวนั้น อาจใช้กระบวนการหมักเบ็ดเสร็จ แบบป้อนอาหารเป็นระยะ (fed-batch) ใช้เซลล์อิสระหรือเซลล์ที่ถูกตรึง (immobilized cells) ในถังหมักลักษณะปกติที่มีใบกวน หรือแบบ air lift fermentor

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสีโมแนสคัสในอาหารเหลว

(ก) แหล่งคาร์บอน

Lin (1973) รายงานการหมักเปียกของ *Monascus* sp. F-2 ในอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าแป้งละลายน้ำ (soluble starch) กาแลคโทส และมอลโทส เหมาะสมกับการผลิตสี ตามลำดับ การเติมสังกะสีประมาณ 800 ไมโครกรัม/ลิตร มีส่วนเพิ่มการเจริญของเส้นใย และเพิ่มความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ ดังต่อไปนี้ เช่น อะราบิโนส ไซโลส กลูโคส ฟรุคโทส แมนโนส ซูโครส มอลโทส แป้ง ซอร์บิทอล เอทานอล (Johnson and McHan, 1975) บุษบาและวรรณภา (2527) ได้รายงานเป็นครั้งแรกเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์มันสำปะหลังในการผลิตสีโมแนสคัส โดยการคัดเลือกเชื้อราโมแนสคัสที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกและต่อมาได้รวบรวมเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (บุษบาและคณะ, 2531) ส่วน Lee และคณะ (1995) ได้ใช้ชิ้นมันสำปะหลังในอาหารเหลวและเรียกกระบวนการนี้ว่า solid-liquid state culture method ซึ่งช่วยลดปัญหาความหนืดของอาหารหมักได้ แป้งข้าวเจ้า (Su และ Huang, 1980 ;Yongsmith และคณะ, 1994a,b) สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ผลิตสีโมแนสคัสได้ดีเช่นกัน ส่วน Lin และ Demain (1991) พบว่าเมื่อใช้ defined medium นั้น แหล่งคาร์บอนที่พบว่าเหมาะสมต่อการสร้างสีของ *Monascus* sp. TTWMB 6042 จะเป็น มอลโทส กลูโคส และฟรุคโทส ตามลำดับ ในขณะที่การเจริญของเชื้อรานี้จะดีใน แป้ง กลูโคส และมอลโทส ตามลำดับ แต่ไม่พบการเจริญในกาแลคโทส แลคโทส และซูโครส Chen และ John (1994) พบว่าถ้าเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเข้มข้นสูง 50 กรัมต่อลิตร ในสภาพอับอากาศ จะพบว่ามีการสร้างเอทานอลเกิดขึ้น ส่วน *M. ruber* สร้างสีจากเอทานอลดีกว่ากลูโคส (Pastrana และ Goma, 1994) (อ้างจาก บุษบา, 2542)

Petra J. และคณะ (1994) ศึกษาการใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตรงควัตถุจากเชื้อ *M. purpureus* CCM 8152 พบว่าการใช้เอทานอลเข้มข้น 2% (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่ามอลโตส (maltose) 3% (w/w) อาหารเลี้ยงเชื้อเติมแหล่งไนโตรเจน ที่มีไนโตรเจน 0.025%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(w/w) ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์จะช่วยให้เกิดการสังเคราะห์สีส้ม กรดอะมิโนจะมีผลต่อการสังเคราะห์ทั้งสีเหลืองและสีแดง โพลีเปปโตนจะให้สีเหลืองมาก และพบการเลี้ยงเชื้อแบบ two-stage สำหรับขั้นที่ 1 (first stage) ใช้มอลโตสแหล่งคาร์บอน และขั้นที่ 2 (second stage) ใช้เอทานอล ช่วยเพิ่มความสามารถในการใช้เอทานอลต่อการผลิตรงควัตถุ

Rosa M. และคณะ (2002) ได้ศึกษาการผลิตรงควัตุสีแดงจากเชื้อรา *M. purpureus* Went ('MI 210765) โดยใช้แป้งข้าวสาลีเป็นแหล่งอาหาร และเลี้ยงในฟลาสก์ที่มีการเขย่า ปริมาณสีที่เชื้อผลิตได้มีความแตกต่างกันเมื่อใช้อาหารที่มีรำข้าว และ/หรือ กลูเตน (gluten) ยังพบว่าความหนืดของอาหารมีผลต่อการผลิตรงควัตถุสีแดง แป้งที่มีกลูเตน 3-5% เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อ การเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 2 กรัม/ลิตร ทำให้เกิดมวลชีวภาพ (biomass) มากกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมถึง 40% แต่จะไปยับยั้งการผลิตสีแดง ในทางตรงกันข้ามการเติมซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_20$) 0.1 กรัม/ลิตร (w/v) ทำให้เกิดรงควัตถุสีแดงปริมาณมาก

(ข) แหล่งไนโตรเจน (อ้างจาก บุษบา, 2542)

Lin (1973) พบว่า *Monascus* sp. F-2 สามารถผลิตสีได้ดีในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารไนเตรต และกลูตาเมท ส่วนแหล่งสารอินทรีย์ที่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตสี เช่น เปปโตน และสารสกัดยีสต์ แต่จากรายงานของ Carels และ Shepherd (1977), Shepherd (1977) พบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดยีสต์จะผลิตสีแดงอย่างเดียว เนื่องจากอาหารนี้มีกรดอะมิโนมากพอเมื่อเชื้อเจริญขึ้นจะทำให้พีเอชสูงขึ้น รงควัตถุสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระและกรดอะมิโน หรือ NH-group ภายในเส้นใยเปลี่ยนเป็นกลุ่มสารอนุพันธุ์เอมีนได้และไม่พบสีส้มหรือสีเหลือง ส่วนอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรตจะได้รงควัตถุสีแดงและสีส้ม อาหารนี้ไม่มีกรดอะมิโนอิสระ ถึงแม้พีเอชจะสูงขึ้น รงควัตถุจะสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนหรือ NH-group ภายในเส้นใยได้เท่านั้น จึงทำให้รงควัตถุสีส้มยังเหลืออยู่ ขณะที่อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไนเตรตจะทำให้ค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้รงควัตถุที่ผลิตได้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ NH-group ภายในเส้นใยได้ ผลที่เกิดขึ้นคือจะมีการสะสมของโมนาสโครูบรินและรูโบรพังตาติน ได้เป็นสีส้ม การเจริญของราแดงบางสายพันธุ์ในอาหารนี้ได้รงควัตถุสีเหลือง สามารถเกิดขึ้นโดยการเกิดออกซิเดชัน ของ โมนาสโครูบริน หรือ รูโบรพังตาติน กับ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้เป็น โมนาสซิน หรือ แองคาฟลาวิน Carels และ Shepherd (1977) พบว่ารงควัตถุสีส้ม โมนาสโครูบริน และรูโบรพังตาติน สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางชีวภาพ ส่วนสีอื่นๆ เช่น สีแดง สีเหลือง เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยขึ้นกับสภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเติมกรดอะมิโนในรูปของสารสกัดยีสต์ ในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรตและแอมโมเนียมคลอไรด์ จะมีผลทำให้เพิ่มการสร้างเส้นใยหรือมวลชีวภาพ อาจเนื่องมาจากในสารสกัดยีสต์มีวิตามินอยู่ด้วย ส่วนการเติมกรดอะมิโนทั้งหมดที่พบในสารสกัดยีสต์ลงในอาหารที่มีไนเตรตหรือแอมโมเนียม จะเป็นการลดการสร้างรงควัตถุ แต่จะกระตุ้นการสร้างโคนิเดีย (Shepherd, 1977 ; Carels และ Shepherd, 1978; Shepherd และ Carels, 1983)

Wong และคณะ (1981) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนสำคัญต่อการสร้างสี โดยกลูโคสความเข้มข้นระหว่าง 40-200 กรัม/ลิตร และแอมโมเนียมไนเตรตที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 กรัม/ลิตร ทำให้ *M. purpureus* ผลิตสีแดงได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตสูงมากกว่า 50 กรัม/ลิตร จะยับยั้งการเจริญการผลิตสี

วรรณภา (2529) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุสีแดงของเชื้อราโมแนสคัสกลุ่มที่ใช้มันสำปะหลังได้ดี เช่น สายพันธุ์ *Monascus* sp. KB21035, KB11304 และ KB20322 พบว่า เปปโตนให้รงควัตถุสีแดงสูงสุด โพแทสเซียมไนเตรตให้รงควัตถุสีแดงพอสมควร ส่วนโซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียให้รงควัตถุสีแดงน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบการสร้างรงควัตถุสีแดงในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเปปโตน และแป้งถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสายพันธุ์ KB11304 และ KB20322 ใช้แป้งถั่วเหลืองในการสร้างรงควัตถุสีแดงได้น้อยกว่าเปปโตน ขณะที่สายพันธุ์ KB11304 สร้างรงควัตถุสีแดงได้ดีในอาหารที่มีแป้งถั่วเหลืองมากกว่าเปปโตนและเป็นรายงานแรกที่มีการใช้ถั่วเหลืองไขมันเต็ม (full fat soy flour) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลดีต่อการสร้างสีโมแนสคัส

Lin และ Demain (1991) พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และโมโนโซเดียมกลูตาเมท เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB 6042 ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุ คือ โมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 1.26% เมื่อใช้ร่วมกับมอลโทสเข้มข้น 10.0% Pastrana และคณะ (1994) Santerre และคณะ (1995) พบกันว่าสารไนโตรเจนชนิดที่ร่วมกับกลูโคสดีสำหรับการสร้างสีของ *M. ruber* แต่แอมโมเนียมไนเตรตให้ไนโตรเจนต่ำในปฏิกิริยา Schiff-base reaction จึงเกิดการสร้างสีแดงน้อย (Lin และ Demain, 1995)

Yongsmith และคณะ (1993) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิดคือสารสกัดยีสต์ เปปโตน และสารสกัดมอลต์ ต่อการเจริญและการสร้างรงควัตถุสีเหลืองของเชื้อราสายพันธุ์ป่า *Monascus* sp. KB10 พบว่าเปปโตนมีผลโดยตรงกระตุ้นการสร้างรงควัตถุ สอดคล้องกับรายงานของ Chen และ Johns (1993) แต่สารสกัดยีสต์ส่งเสริมการเจริญมากกว่าการสร้างรงควัตถุ ส่วนสารสกัดมอลต์มีผลต่อการเจริญและการสร้างรงควัตถุน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ซึ่งสอดคล้องกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองของวรรณภา (2529) สมชาย (2536) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้เปปโตนและเข้มข้น 0.4% ร่วมกับกรดกลูตามิกและเข้มข้น 0.1% จะให้สีเหลืองสูงสุดเมื่อพีเอชเป็นกรด

สมชาย (2536) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุสีเหลืองของเชื้อราสายพันธุ์กลาย *Monascus* sp. KB 20M10.2 พบว่าแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอนินทรีย์ที่ให้รงควัตถุสีเหลืองได้ดีที่สุดคือโพแทสเซียมไนเตรต โดยจะให้รงควัตถุสีเหลือง 216 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ แคลเซียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ที่ให้รงควัตถุสีเหลืองสูงที่สุดคือแป้งถั่วเหลืองเท่ากับ 674.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นเปปโตน สารสกัดเนื้อ สารสกัดยีสต์ และสารสกัดมอลต์ได้ปริมาณรงควัตถุสีเหลือง 434.7, 392.5, 211.7 และ 20.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อศึกษาความเข้มข้นของแป้งถั่วเหลืองที่เหมาะสมพบว่า ที่ความเข้มข้น 5.0% ให้รงควัตถุสีเหลืองสูงสุดที่สุดรองลงมาคือ 4.0 และ 2.0% ตามลำดับ

การใช้แป้งถั่วเหลืองเข้มข้น 5.0% ร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 3.0% เหมาะสมต่อการผลิตสีเหลืองของ *Monascus* sp. KB 20M10.2 (Yongsmith และคณะ, 1998)

(ค) อุณหภูมิ (อ้างจาก บุษบา, 2542)

Manandhar และ Apinis (1971) ศึกษาอัตราการเจริญของ *Monascus* sp. 37 สายพันธุ์บนอาหาร malt extract agar พบว่า *Monascus* sp. ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 40^{O}ซ อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 30 หรือ 37^{O}ซ และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ คือ 45^{O}ซ การเจริญของ *Monascus* sp. ส่วนใหญ่ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 ^{O}ซ ไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญโดยทั่วไปที่ 25 และ 40^{O}ซ จะช้า ส่วนที่อุณหภูมิ 45 และ 18^{O}ซ การเจริญจะช้ามาก การสร้างสีจะสร้างได้ดีที่อุณหภูมิ 25-28^{O}ซ

Lin (1973) เพาะเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ลงในอาหารเหลวนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27, 32, 37 และ 40^{O}ซ บ่มนาน 3 วัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการสร้างสีได้ดีที่สุด คือ 32^{O}ซ รองลงมาคือ 27^{O}ซ และถ้าอุณหภูมิมากกว่า 32^{O}ซ จะทำให้การผลิตสีลดลงอย่างรวดเร็ว

(ง) ระยะเวลากับการผลิตสีและการเจริญของเซลล์ (อ้างจาก บุษบา, 2542)

ปกติการสร้างสีโมแนสคัสในอาหารเหลวสูงสุดไม่เกิน 7 วัน ตัวอย่างเช่น Lin (1973) ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ในอาหารเหลวที่มีผงข้าว 5%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.1%, KH_2PO_4 0.2% บรรจุอาหาร 75 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 ^{O}ซ เป็นเวลา 5 วัน พบว่าการผลิตสีมีความสัมพันธ์กับการเจริญ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(จ) พีเอชอาหาร (อ้างจาก บุษบา, 2542)

Lin (1973) ทดลองปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารตั้งแต่ 2 ถึง 10 เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน *Monascus* sp. F-2 จะให้การผลิตสีสูงสุดในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 และ พีเอชสุดท้ายของอาหารภายหลังการบ่มลดลงเป็น 5.8 ส่วนการทดลองของ Wong และคณะ (1981) ศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมเป็น 5.5 ส่วนใหญ่จะผลิตสีแดงได้มากกว่าที่มีพีเอชต่ำกว่า 6.0 เมื่อบ่มเป็นเวลานาน 17 วัน โดยเชื้อรา *M. purpureus*

สายพันธุ์ป่า *M. barkari* KB10 สามารถสร้างสีเหลืองได้ดีในอาหารที่มีพีเอชต่ำ 2.5-4.0 (Yongsmith และคณะ, 1993) ในขณะที่สายพันธุ์กลาย KB20M10.2 ของ *M. kaoliang* สามารถสร้างสีเหลืองได้ทั้งในสภาพเป็นกรดและเป็นกลาง

(ฉ) สารอื่นๆ (อ้างจาก บุษบา, 2542)

Hong และคณะ (1995) ได้รายงานการใช้กรดโครโทนิก และกรดซอร์บิกที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเร่งการสร้างสีได้โดยไม่มีผลต่อการเพิ่มเส้นใย ส่วนการเติมสาร cerulenin ethionine เมไทโอนีน หรือยูเรีย มีผลต่อการยับยั้งการสร้างสี (Blanc และคณะ, 1995) ในขณะที่ Kang และ Jung (1995) พบว่า $MgSO_4$ เข้มข้น 0.1% มีผลต่อการผลิตสีในอาหารที่ประกอบด้วยผงข้าว 2% และเปปโตน 0.05%

2.10 งานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง

Chul Soo Shin และคณะ (1998) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่กระตุ้นการสร้างรงควัตถุจากโมแนสคัสและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม โดยทดลองเลี้ยง *Monascus sp.* J101 ร่วมกับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar plate) พบว่าปริมาณเชื้อโมแนสคัสมากขึ้น (ความหนาของเชื้อบนอาหารเพิ่มขึ้น) และมีปริมาณสีแดงและเหลืองเพิ่มขึ้น 30-40 เท่า พบว่าเอนไซม์ที่สกัดจาก *S. cerevisiae* คือ chitinase ต่อมา Jung-Hae Suh และ Chul Soo Shin (2000) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ *Monascus sp.* J101 ที่เลี้ยงร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าการเจริญของเซลล์ *Monascus sp.* J101 เร็วขึ้นและสืบพันธุ์เร็วขึ้น ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ โครงสร้างภายในเซลล์มีการเพิ่มทั้งจำนวนและขนาดของ vacuoles ซึ่งเป็นที่กักเก็บรงควัตถุที่เชื้อโมแนสคัสสังเคราะห์ขึ้น รวมทั้งรงควัตถุที่ได้มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (hydrophobic) มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยง *Monascus sp.* J101 เพียงชนิดเดียว

Hamdi M. และคณะ (1998) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* โดยใช้น้ำคั้นจากลูกแพร์ เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ สำหรับการสร้างรงควัตถุสีแดง พบว่าเมื่อเจือจางน้ำคั้นจากลูกแพร์ 4 เท่า ให้สีแดงสูงสุด และเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมท 10 กรัม/ลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้น 5.2 จะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้สีแดงเท่ากับ 22.8 ยูนิต ที่ค่าการดูดกลืนแสง 480 นาโนเมตร ส่วนการเลี้ยงในถังหมัก พบว่ามวลชีวภาพ (biomass) เพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับการใช้น้ำตาลและการสร้างเอทานอล ต่อมาเอทานอลจะถูกใช้ไปพร้อมกับการสร้างรงควัตถุสีแดง ยังพบอีกว่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเกิดเอทานอล

Slugen D. และคณะ (1998) ศึกษาเกี่ยวกับการสร้างรงควัตถุโดยเชื้อรา *M. purpureus* CCM 8112 (=ATCC 16427 =ARRL 2897) บนอาหารแข็งโดยใช้ธัญพืชเป็นวัตถุดิบ โดยการสร้างรงควัตถุไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณความชื้นเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นกับระดับความเป็นกรด ชนิดของกรดที่ใช้เติมลงในอาหารและการฆ่าเชื้อ สำหรับการเลือกใช้วัตถุดิบ พบว่าข้าวให้ปริมาณสีมากที่สุด แต่ให้ผลตรงข้ามกับวัตถุดิบที่มีปริมาณโปรตีนสูง เช่น การใช้ถั่วเหลืองจะให้สีปริมาณน้อยกว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงบนอาหารแข็งคือ อุณหภูมิ 28^{O}ซ การเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.1 M และควบคุมความชื้นในอาหารให้ได้ 37.5% จะให้ปริมาณสีสูงสุดคือ 1,931 ยูนิตต่อกรัม (ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร) และ 1,057 ยูนิต/กรัม (ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร) ภายหลังการเพาะเลี้ยง 400 ชั่วโมง สำหรับอาหารเหลว พบว่า ค่าสีสูงสุดมากกว่า 100 ยูนิต/มิลลิลิตร โดย a_w ของอาหารใกล้ 1.0 และยังนำฟองของเชื้อที่ติดด้านข้างถังหมักไปวัดสีได้ 2,660 ยูนิต/กรัม น้ำหนักแห้ง (ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร) และ 1,830 ยูนิต/กรัม น้ำหนักแห้ง (ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร)

Massimiliano F. และคณะ (2000) ศึกษาการสร้างรงควัตถุสีแดงโดยเชื้อรา *M. purpureus* C322 ที่เซลล์ถูกตรึง โดย แคลเซียมอัลจิเนต (Ca-alginate) โพลียูรีเทน (polyurethane sponge) แอคทีฟคาร์บอน (active carbon) และเพียไลท์ (pearlite) พบว่าการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตให้ปริมาณสีสูงสุด เท่ากับ 30.5 ยูนิต (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร) ในขณะที่การสูญเสียปริมาณเซลล์เท่ากับ 0.4 กรัม/ลิตร ยังมีการเพิ่มการเลี้ยงเป็น 9 batch ใช้ระยะเวลา 55 วัน สามารถผลิตรงควัตถุสีแดงได้ในอัตรา 3.84 ยูนิตต่อวัน

Somchai K. และคณะ (2000) ศึกษาแนวโน้มการสร้างรงควัตถุสีเหลืองจาก *Monascus* sp. แบบป้อนอาหารเป็นระยะ (fed-batch) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density) เพื่อวัดความเข้มข้นของจำนวนเซลล์ โดยใช้หัววัด (probe) ต่อเข้ากับคอมพิวเตอร์ เพื่อควบคุมอัตราการไหล และอัตราการเจริญ (μ) ให้คงที่เทียบกับความเข้มข้นของเซลล์ใน simple feed forward ที่วัดความเข้มข้นของจำนวนเซลล์ ณ เวลาเริ่มต้นการทดลองเท่านั้น อัตราการสร้างสีสูงสุดเมื่อ μ = 0.02 h^{-1} และยังศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสที่ทำให้ได้ปริมาณสีสูงสุดคือ กลูโคส 10 กรัม/ลิตร และให้ค่า μ=0.01 h^{-1}

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Y. L. Chen และคณะ (2001) ศึกษาการสร้างรงควัตถุสีเหลืองจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ YLC1 ซึ่งได้จากการปรับปรุงพันธุ์กรรม เพื่อให้สร้างรงควัตถุสีเหลืองและลดการสร้างซิตรินิน โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30^{O}ซ เป็นเวลา 5 วัน และใช้ RSM เพื่อสร้างสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือต่างๆ สภาวะการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร วัดปริมาณสีจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ 500 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณซิตรินินโดย HPLC ผลที่ได้พบว่าสภาวะการเลี้ยงเชื้อ ค่าพีเอช และ pO_2 มีผลต่อการสร้างรงควัตถุสีเหลืองและซิตรินิน และพบว่าผงข้าว (rice powder) และกลูตาเมทเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ดีที่สุด ตามลำดับ สำหรับปริมาณสีเหลืองที่ผลิตได้เท่ากับ 40 ยูนิต และคุณภาพสีคือ 6-10:1 (สีเหลือง วัดที่ 400 นาโนเมตร:สีแดง วัดที่ 500 นาโนเมตร) และพบซิตรินินไม่เกิน 5 มิลลิกรัม/ลิตร

Hyun Jung Kim และคณะ (2002) ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมลักษณะสัณฐานวิทยาและการสร้างรงควัตถุสีแดงของเซลล์โมแนสคัส โดยเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากนั้นขยายขนาดเป็น 300 ลิตร ในสภาวะการเขย่าที่ความเร็ว 350 รอบต่อนาที หรือน้อยกว่า พบว่าเกิดการรวมกันของเส้นใยไมซีเลียมให้ปริมาณสีแดง เท่ากับ 37.5 ยูนิต (OD Units) เส้นใยที่มีลักษณะยาวทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น ให้ผลเช่นเดียวกับการเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจาก 350 เป็น 700 รอบต่อนาที ค่า k_La (volume O_2 transfer) เพิ่มขึ้นจาก 0.003 เป็น 0.029 ต่อวินาที วัดปริมาณสีแดงสูงสุด เท่ากับ 220 ยูนิต ซึ่งเมื่อเซลล์มีไมซีเลียมเป็นสายสั้นๆ ที่การเขย่าความเร็ว 500 รอบต่อนาที เส้นใยไมซีเลียมีสายสั้นลงเนื่องจากเกิดความเสียหายจากแรงเฉือน เนื่องจากความเร็วรอบในการเขย่าสูงๆ เมื่อทำการเลี้ยงโมแนสคัสในถังภายใต้แรงเฉือนสูง ทำให้ปริมาณรงควัตถุสีแดงและ DOT (Dissolve Oxygen Tension) สูงตามไปด้วย

Kris T. (2002) ได้ศึกษาการผลิตรงควัตถุสีแดง โดยเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเทมเป้ พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* สามารถเจริญและผลิตรงควัตถุสีแดง น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเทมเป้จึงเหมาะสำหรับเป็นวัตถุดิบที่ราคาถูกและสามารถผลิตสีได้ครั้งละมากๆ และยังสามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลการเติมแป้งมันสำปะหลัง เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อการผลิตรงควัตถุสีแดง พบว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เติมมีผลต่อมวลชีวภาพ แต่ไม่มีผลต่อปริมาณสีแดงที่เชื้อราผลิตได้

Yuan-Kun Lee และ Duan-Cheng Chen (2002b) ได้ศึกษาเรื่องการสร้างรงควัตถุสีแดงของเชื้อโมแนสคัสในอาหารแบบเหลว พบว่าการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารปริมาณ 75 ลิตร ให้ปริมาณสีแดง เท่ากับ 365 ยูนิต/ลิตร การเลี้ยงมีการกวนและเติมอากาศเพื่อให้ได้ปริมาณสีแดงสูง ส่วนแหล่งของคาร์บอน ความเข้มข้นของเซลล์และลักษณะของเส้นใยไมซีเลียม ทำให้ความหนืด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

และอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเปลี่ยนแปลง ตัวแปรทั้งหมดมีผลต่อการผลิตรงควัตถุสีแดง จากการทดลอง พบว่าปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการผลิตรงควัตถุและรักษาความเสถียรของสีด้วย แต่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนรงควัตถุที่เกิดขึ้นจะสลายอย่างรวดเร็ว ส่วนในสภาวะที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำและความเข้มข้นของคาร์บอนสูงทำให้มีการผลิตรงควัตถุในปริมาณสูง

San-Lang Wang และคณะ (2002) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Fusarium oxysporum* ที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. purpureus* CCRC 31499, *M. purpureus* CCRC32966, *M. purpureus* CCRC31530, *M. ruber* CCRC31535 และ *M. pilosus* CCRC31527 โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรามีส่วนประกอบของเปลือกกุ้งและปู (SCSP, Shrimp and Crab Shell Powder) ผลการทดลองพบว่า *M. purpureus* CCRC31499 ผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporum* มากที่สุด โดยยับยั้งการสร้างและการงอกของสปอร์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี SCSP เข้มข้น 1% สารนี้มีความเสถียรในช่วงพีเอช 6-8 แต่คุณสมบัติลดลงเมื่อได้รับความร้อน 100^{O}ซ นาน 5 นาที นอกจากสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ยังมีคุณสมบัติการย่อยไคติน (chitinolytic) และการย่อยโปรตีน (proteolytic) อีกด้วย

Chalam R.V. และ Stahr H.M. (1979) ได้ศึกษาวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินจากอาหารสัตว์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatographic (TLC) โดยการสกัดอาหารสัตว์ด้วยเมทานอลและน้ำ ที่ปรับสภาวะให้เป็นด่างด้วย 10% โซเดียมคาร์บอเนต จากนั้นกรองและสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเพื่อกำจัดสารอื่นที่อาจรบกวน ปรับค่าค่าพีเอชของชั้นน้ำด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 N และทำการสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นทำให้เข้มข้นโดยการระเหยและจุดลงบนแผ่น TLC และแยกในสารละลายที่ประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม:อะซิโตน:เอทานอล:น้ำ (60:40:40:1) สามารถมองเห็นซิตรินินภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต วิธีการนี้สามารถหาวิเคราะห์ปริมาณซิตรินิน ได้ที่ 0.5 ไมโครกรัม/กรัม (ตัวอย่างอาหาร)

H. A. H. Hasan (1993) ศึกษาผลกระทบของแคมฟอร์ (camphore) และน้ำคั้นจากใบ blue-gum (*Eucalyptus globulus L.*) ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. terreus* var *aureus* และการเกิดซิตรินิน ผลการทดลองพบว่าการใช้แคมฟอร์ 0.05% และน้ำคั้นใบ blue-gum 0.5% มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ซิตรินินตลอดระยะเวลาการบ่ม ส่วนการใช้แคมฟอร์ 0.5% ยับยั้งการเจริญของไมซีเลียและการสังเคราะห์ซิตรินินภายหลังการบ่ม 5 วัน แต่ภายหลัง 15 วัน มีการผลิตซิตรินินเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามก็ยังน้อยกว่าชุดควบคุม พบว่า การเติมแคมฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มการสะสมของซิตรินินเนื่องจากเพิ่มการหายใจของเชื้อรา

Ricardo Comerio และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ในข้าวสาลี ที่มีผลต่อการเจริญของ *Penicillium citrinum* และการสร้างซิตรินิน ซึ่งตรวจปริมาณซิตรินินโดยใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

TLC ทดลองโดยนำข้าวสาลีที่มีค่า a_w ต่างกัน บ่มด้วยเชื้อ *Penicillium citrinum* ที่ 30^{O}ซ นาน 2 เดือน วัดการเจริญของเชื้อราพบว่าเชื้อเจริญได้น้อยที่ค่า a_w =0.775 ส่วนซิตรินินตรวจไม่พบในตัวอย่างที่มีค่า a_w ต่ำกว่า 0.800 โดยที่ค่า a_w ที่ตรวจพบซิตรินินในปริมาณมาก ได้แก่ a_w = 0.810 พบซิตรินิน 65 ไมโครกรัม/กิโลกรัม, a_w = 0.825 พบซิตรินิน 460 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และ a_w = 0.885 พบซิตรินิน 22 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และพบว่าซิตรินินจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุด

D. Abramson และคณะ (1999) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทาง biotic และ abiotic รวมทั้งสารพิษจากเชื้อรา โดยวัดอุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณ ergosterol การงอกของเมล็ด ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ และสารพิษจากเชื้อรา ในการทดลองนำข้าวบาร์เลย์ที่มีความชื้นเท่ากับ 15 และ 19% เก็บเป็นเวลา 20 สัปดาห์ พบว่า ข้าวบาร์เลย์ที่มีความชื้น 19% สร้างโอคราท๊อกซิน เอ (Ochratoxin A) ซิตรินิน และสเตอริกมาโตไซสติน (sterigmatocystin) โดยเฉลี่ยคือ 24, 38 และ 441 ppb ส่วนที่ความชื้น 15% ไม่พบสารพิษใดๆ

Centeno. S และ Calvo M.A. (2002) ศึกษาการสร้างสารพิษจากเชื้อราที่แยกจากจุกคอร์กปิดไวน์ เมื่อเปรียบเทียบสารสกัด 4 ส่วนที่ได้จากเชื้อรา *Alternaria alternata* ด้วย TLC กับสารมาตรฐานของ tenuazonic acid, alter toxin 1, alternuene, alternariol, alternariol monomethyl และสารพิษ 10 ชนิด พบว่า *A. alternata* สร้างสารพิษ alter toxin 1, alternuene และ alternariol monomethyl เชื้อรา *Penicillium citrinum* สร้างซิตรินิน เชื้อรา *Fusarium monilliforme* สร้าง fumonisin B1 ส่วนเชื้อรา *Fusarium solani* ไม่พบการสร้าง fumosin B1

จุลยุทธ (2546) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ต่อการสร้างซิตรินินในข้าวแดง ได้แก่ เชื้อรา *Monascus purpureus* 4 สายพันธุ์ ชนิดข้าว 3 ชนิด ผลของการเติมโซเดียมอะซิเตตและเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวแบบให้อากาศ และไม่ให้อากาศต่อการสร้างซิตรินิน และรงควัตถุสีแดง พบว่าสายพันธุ์เชื้อรา *Monascus purpureus* และชนิดของข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่างกัน มีผลต่อรงควัตถุสีแดงและซิตรินิน ในข้าวแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งจากข้าวแดงที่หมักโดยเชื้อรา *Monascus purpureus* ATCC 16365 ในข้าวหอมมะลิให้ค่าสีแดงสูงสุดที่ 632 ยูนิต/กรัม ขณะที่ข้าวแดงที่หมักโดยเชื้อรา *Monascus purpureus* FTCMU ในข้าวซ้อมมือให้ปริมาณซิตรินินสูงสุดเท่ากับ 4,400 ppm รองลงมาคือข้าวเจ้าพิจิตร 2,200 ppm และ ข้าวหอมมะลิ 950 ppm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved