บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว

ข้าวเป็นธัญชาติชนิดหนึ่ง ซึ่งได้มาจากเมล็ดของธัญพืชพวกหญ้าที่อยู่ในวงศ์ Gramineae ซึ่งมีลำต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุเพียงหนึ่งปี (annual grass) มีใบชนิดใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledon) มีรากเป็นระบบรากฝอย (Fibrous root system) สามารถเจริญเติบโตได้ในลักษณะภูมิประเทศและภูมิอากาศที่แตกต่างกัน ทั้งในเขตร้อน (Tropical zone) และเขตอบอุ่น (Temperate zone) ตั้งแต่พื้นที่น้ำท่วมสูงไปจนถึงพื้นที่สูงตามไหล่เขา ทำให้เกิดความหลากหลายของข้าวชนิดต่าง ๆ ที่แพร่กระจายไปทั่วโลกอย่างน้อย 23 ชนิด (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547) โดยทั่วโลกมีพันธุ์ข้าวถึง 120,000 พันธุ์ ขณะที่ประเทศไทยมีข้าวอยู่ประมาณ 3,500 พันธุ์ ในปัจจุบันข้าวที่ปลูกเพื่อการบริโภคมีอยู่ 2 ชนิดคือ ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa Linn*) และข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima Steud*) ข้าวที่ขายในท้องตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวที่ปลูกมาจากแถบเอเชีย ซึ่งข้าวชนิดดังกล่าวนั้น ยังสามารถแบ่งตามแหล่งที่ปลูกได้อีก 3 กลุ่ม คือ

1. ข้าวจาปอนิกา (Japonica) มีลักษณะเมล็ดสั้น ทนต่ออากาศหนาวเย็น และมีปริมาณอะไมโลสต่ำ มีการปลูกในแถบเกาหลี ญี่ปุ่น

2. ข้าวอินดิกา (Indica) มีลักษณะเมล็ดยาวรีขึ้นได้ดีในเขตร้อน เป็นข้าวที่ปลูกในเอเชียเขตมรสุม ตั้งแต่จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา

3. ข้าวจาวานิกา (Javanica) มีลักษณะเมล็ดใหญ่-ป้อม เป็นข้าวที่ปลูกในอินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์

ข้าวเปลือกเมื่อผ่านกรรมวิธีการสีข้าว เปลือกของเมล็ดข้าวที่เรียกว่าแกลบจะถูกกระเทาะออก เหลือเป็นเนื้อข้าวที่เรียกว่าข้าวกล้อง เมื่อนำข้าวกล้องมาสีและขัดก็จะได้เป็นข้าวขาวซึ่งนำมาขายให้กับผู้บริโภค ส่วนรำข้าวซึ่งประกอบด้วยเยื่อหุ้มเมล็ดและจมูกข้าว เป็นส่วนที่ทางโรงสีจะนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ ดังนั้นสิ่งที่สูญหายไประหว่างการขัดสีข้าวกล้องเป็นข้าวขาวก็คือเยื่อหุ้มเมล็ด ซึ่งมีเส้นใยอาหารสูง และจมูกข้าวซึ่งอุดมไปด้วยโปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ ด้วยเหตุนี้ข้าวขาวที่บริโภคกันทั่วไป จึงเหลือเพียงเนื้อเมล็ดหรือสารอาหารคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนใหญ่ แต่ขาดสารอาหารอื่น ๆ ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ด และจมูกข้าว คุณค่าทางอาหารในข้าวขาวจึงน้อยกว่าข้าวกล้อง (งามชื่น, 2543 อ้างในนันทญาภรณ์ ชัยมงคล, 2546) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบองค์ประกอบของข้าวกล้องและข้าวขาว

องค์ประกอบ	ข้าวกล้อง	ข้าวขาว
พลังงาน (กิโลแคลอรี)	363-385	349-373
เส้นใยอาหาร (กรัม)	2.9-3.9	0.7-2.3
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	73-87	77-89
เถ้า (กรัม)	1.0-1.5	0.3-0.8
เส้นใย (กรัม)	0.6-1.0	0.2-0.5
ไขมัน (กรัม)	1.6-2.8	0.3-0.5
โปรตีน (กรัม)	7.1-8.3	6.3-7.1
วิตามิน (มิลลิกรัม)		
ไทอะมิน	0.29-0.61	0.02-0.11
ไรโบเฟลวิน	0.04-0.14	0.02-0.06
ไนอะซิน	3.5-5.3	1.3-2.4
แอลฟา-ทอโคเฟอรอล	0.90-2.50	0.075-0.30
แร่ธาตุ		
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	10-50	10-30
ฟอสฟอรัส (กรัม)	0.17-0.43	0.08-0.15
ไฟทินฟอสเฟต (กรัม)	0.13-0.27	0.02-0.07
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.2-5.2	0.2-2.8
สังกะสี (มิลลิกรัม)	0.6-2.8	0.6-2.3

ที่มา : Juliano (1993 อ้างในอรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

นักวิจัยนิยมแบ่งประเภทข้าวหรือธัญพืช โดยใช้ความผันแปรของสัดส่วนระหว่างอะไมโลสกับอะไมโลเพคตินในเม็ดแป้ง (starch granules) เป็นหลัก โดยทั่วๆ ไปธัญพืชมักมีอะไมโลส 25-27% ในแป้ง ในขณะที่พวกข้าวและข้าวโพดแป้งส่วนมากจะเป็นอะไมโลเพคติน (Mckevith, 2004) อะไมโลเพคตินเป็นส่วนที่ทำให้ข้าวสุกเหนียวและนุ่ม ในขณะที่อะไมโลสช่วยลดความเหนียวและความนุ่มของข้าว ทำให้ข้าวสุกร่วนและแข็งกระด้างมากขึ้น ข้าวที่มีอะไมโลสสูงในระหว่างการหุงต้มจะดูดน้ำได้มากกว่าข้าวที่มีอะไมโลสต่ำ (จุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) และเนื่องจากอะไมโลสเมื่อต้มสุกแล้ว มีคุณสมบัติคืนตัว (retrogradation) เปลี่ยนแปลงจากสภาพละลายน้ำได้เป็นของแข็ง ด้วยเหตุนี้ข้าวที่มีอะไมโลสสูงเมื่อหุงต้มสุก จึงร่วนและแข็งกว่าข้าวที่มีอะไมโลสต่ำ จึงต้องใส่น้ำมากเพื่อปรับปรุงให้ความแข็งของข้าวลดลง และการที่ข้าวไม่เหนียวเกาะติดกัน จึงทำให้ข้าวฟูมีช่องอากาศ จึงเห็นเป็นว่าการขยายปริมาตรของข้าวสุก (ขึ้นหม้อ) ดีกว่า จากการศึกษาพันธุ์ข้าวต่าง ๆ ของรัฐบาลพบว่า ปริมาณน้ำที่เหาะสมในการหุงต้มข้าว มีความสัมพันธ์กับปริมาณอะไมโลสในข้าวสาร (นันทญาภรณ์ ชัยมงคล, 2546) พันธุ์ข้าวของไทยไม่ว่าจะเป็นพันธุ์พื้นเมือง หรือพันธุ์ใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ปรับปรุงให้มีผลผลิตสูง ต่างเป็นข้าวที่มีเมล็ดยาวเรียว เพื่อให้ผลิตเป็นข้าวเกรด 100% ดังตารางที่ 2.2 และ 2.3

ตารางที่ 2.2 การแบ่งประเภทข้าวตามปริมาณอะไมโลส

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

ที่มา : งามชื่น, 2543 (อ้างในจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546)

ตารางที่ 2.3 การจัดแบ่งข้าวพันธุ์ดีบางพันธุ์ตามคุณภาพการหุงต้ม และปริมาณอะไมโลส

พันธุ์ข้าว	ความยาวเมล็ด (มิลลิเมตร)	อะไมโลส (%)
	ข้าวสวยนุ่มและเหนียว	
ขาวดอกมะลิ 105*	7.4	1-17
กข 15*	7.5	14-17
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
สุพรรณบุรี 60	7.5	19-26
	ข้าวสวยแข็ง หุงขึ้นหม้อ (ข้าวเสาไห้)	
เหลืองปะทิว 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 (อ้างในงามชื่น, 2543 อ้างในจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 ประวัติความเป็นมา และความสำคัญของข้าวแดง

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักข้าวกับเชื้อราที่อยู่ในสกุล (Genus) *Monascus* จัดเป็นสีผสมอาหารที่ได้จากธรรมชาติซึ่งได้จากการหมักแห้ง (solid state fermentation) โดยเชื้อราจะสร้างเส้นใยชอนไชและปกคลุมเมล็ดข้าว และสร้างสีขึ้นภายในเส้นใย โดยมีสีบางส่วนถูกปล่อยออกมาภายนอกเส้นใย ทำให้เมล็ดข้าวมีสีแดงเข้ม (กังสดาลย์ บุญปราบ และคณะ, 2539) และมีกลิ่นเฉพาะ เมื่อนำไปอบแห้งก็จะได้เป็นข้าวแดง ข้าวแดงเป็นที่รู้จักกันมาเป็นระยะเวลานานแล้วในแถบตะวันออก คือ ประเทศจีน ไต้หวัน และญี่ปุ่น และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น มาเลเซีย ไทย กัมพูชา ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น (Johns and Stuart, 1991) โดยกำเนิดของข้าวแดงมาจากประเทศจีน เชื่อกันว่าในตำบลหนึ่งมีดินเป็นสีแดง และเมื่อใช้ดินนี้พอกข้าวนึ่งไว้ในระยะเวลาหนึ่ง จะทำให้ข้าวนึ่งนั้นกลายเป็นสีแดงได้ (ชิดชัยและคณะ, 2519 อ้างในนันทญาภรณ์ ชัยมงคล, 2546) ข้าวแดงมีประวัติความเป็นมายาวนานหลายพันปี สามารถย้อนหลังไปได้ถึงสมัยราชวงศ์โจว (770-221 B.C.) โดยมีบันทึกเก่าแก่เกี่ยวกับการใช้ข้าวแดงในการปรุงแต่งอาหาร และใช้เป็นยาพื้นบ้าน (Chen and Hu, 2005) ในประเทศจีนสมัยราชวงศ์ถัง (618-907) ได้ใช้ข้าวแดงมาเป็นสารเติมแต่งสีและรสชาติในปลาและเนื้อ (Stuart, 1979) มีบันทึกเป็นทางการในตำรายาแผนโบราณชื่อ Ben Cao Gang Mu Dan Shu Bin Yi ซึ่งทำการบันทึกโดยเภสัชกรในสมัยราชวงศ์หมิง (1368-1644) โดยรวบรวมวิธีการเตรียม ขั้นตอนการผลิต และการนำไปใช้ทางอาหารและยา (Stuart, 1990 อ้างในเรณู ปิ่นทอง และคณะ, 2546)

Church (1920 อ้างในบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) รายงานว่า การผลิตข้าวแดงมีมานานแล้วในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน และได้ทดลองแยกเชื้อในข้าวแดงที่ได้จากประเทศจีน จนในที่สุดก็ทราบว่าเชื้อราที่ให้สีแดงคือ *Monascus purpureus* ต่อมา Palo et al. (1960) ได้ทดลองใช้เชื้อราข้าวแดงนี้ผลิตข้าวแดง จนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพพอสมควร สามารถนำข้าวแดงมาใช้เจือสีอาหารได้โดยตรง (Su and Wong, 1983) ภายหลังได้มีความสนใจที่จะศึกษาสายพันธุ์เชื้อราที่เหมาะสมสำหรับใช้ในสภาพการหมักเปียก (submerged culture) ซึ่งริเริ่มโดย Lin (1973) ต่อมาก็มีผู้ประสบความสำเร็จในการศึกษาการผลิตสีในอาหารเหลว (Shepherd and Carels, 1983; Yoshimaru et al., 1975; บุษบา และวรรณภา, 2527; Lee et al., 1992) การใช้สารสีจากธรรมชาติโดยเฉพาะสารสีที่ได้จากเชื้อจุลชีพ เป็นทางเลือกหนึ่งของการใช้สารสีจากธรรมชาติ ในการแต่งเติมสีให้กับอาหารแทนการใช้สารสีสังเคราะห์ซึ่งมีความเสี่ยงในการก่ออันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคสูง เนื่องจากอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenicity) และการเกิดมะเร็ง (carcinogenicity) มีกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน มีต้นทุนในการผลิตและการนำเข้าสูงกว่าสารสีจากธรรมชาติ และนอกจากนี้สารสีจากเชื้อจุลชีพ ยังสามารถควบคุมการผลิตให้มีปริมาณสูงได้ (Carvalho et al., 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้าวแดงจัดเป็นวัสดุเจือปนอาหารที่ก่อให้เกิดสีสัน (อ้างในกังสดาลย์ บุญปราบ และคณะ, 2539) ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศในแถบเอเชีย โดยใส่ในอาหารหมัก เช่น เต้าหู้ยี้ ปลาแป้งแดง เหล้าเกาเหลียง และผลิตภัณฑ์เนื้อเช่น กุนเชียง และไส้กรอก นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของกลิ่น (Hesseltine, 1965; Kranz et al., 1992) และแหล่งของเอนไซม์หลายชนิดเช่น เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และเอนไซม์โปรตีเอส เป็นต้น ยิ่งไปกว่านั้นการใส่ข้าวแดงในอาหารยังเป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2524) อีกทั้งเชื้อราในข้าวแดงยังสร้างสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลในมนุษย์ ในด้านเภสัชวิทยาข้าวแดงเป็นส่วนหนึ่งในส่วนผสมของตำรับยาจีนรักษาโรค (Lee, 1979) โดยข้าวแดงมีคุณสมบัติรักษาอาการต่าง ๆ เช่น ช่วยในระบบย่อยอาหาร รักษาท้องร่วง อาการเมา ช่วยในการทำงานของระบบไหลเวียนโลหิต และช่วยในการทำงานของม้ามและกระเพาะอาหาร โดยใช้ข้าวแดงเป็นส่วนประกอบร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ (Johns et al., 1990 อ้างในเรณู ปิ่นทอง และคณะ, 2546) ปัจจุบันข้าวแดงจัดเป็นยาพื้นบ้านของประเทศจีน (Traditional Chinese Medicine (TCM)) ในประเทศจีนได้มีการศึกษาการบริโภคข้าวแดงในคนและสัตว์ (อ้างในนันทญาภรณ์ ชัยมงคล, 2546) พบว่าการบริโภคข้าวแดงในปริมาณ 14-55 กรัม/คน/วัน สามารถลดความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลได้ 11-32% และลดความเข้มข้นของ Triacylglycerol ได้ 12-19% (Heber et al., 1999) นอกจากนี้ Wang et al. (2000 อ้างในอรอนงค์ นัยวิกุล, 2547) ยังทดลองเลี้ยงหนูที่เป็นโรคความดันโลหิตสูง ด้วยอาหารผสมน้ำตาลฟรุคโตส 30% มีและไม่มีข้าวแดง 2% เปรียบเทียบกัน พบว่าข้าวแดงช่วยลดปริมาณไขมันในเลือด และโคเลสเตอรอลทั้งหมดในหนูที่รับประทานอาหารที่มีข้าวแดง

มีการใช้ข้าวแดงในรูปผงเป็นสารให้สีอาหารในประเทศแถบเอเชีย ในอเมริกาเหนือใช้ในการเพิ่มสีสำหรับผลิตภัณฑ์ปลา เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และเนยแข็ง (cheese) ใช้แทนที่สารไนเตรทและไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อ และมีการศึกษาประสิทธิภาพของการแทนที่สีสังเคราะห์ด้วยสีจากข้าวแดง ซึ่งปัจจุบันในยุโรปมีการนำข้าวแดงมาใช้ในการเพิ่มสีผลิตภัณฑ์ไส้กรอก และซาลามิ (salami) ในอุตสาหกรรมเนื้อกันอย่างแพร่หลาย (อ้างในเรณู ปิ่นทอง และคณะ, 2546) เนื่องจากศักยภาพของข้าวแดงในการใช้เป็นสารแต่งเติมสีในอาหาร จึงได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับข้าวแดงมากขึ้นในทศวรรษหลังสุดนี้ ในปัจจุบันมีหลายบริษัทได้ขายผลิตภัณฑ์ข้าวแดงอบแห้งเป็นสารเติมแต่งสีให้กับอาหาร ซึ่งมีความสามารถในการลดระดับโคเลสเตอรอล และมีการขายสารสกัดบริสุทธิ์จากข้าวแดงสำหรับใช้เป็นสีในอาหารอีกด้วย (Carvalho et al., 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การผลิตข้าวแดง

การผลิตข้าวแดง (อ้างในอรัญ หันพงศ์กิตติกูล และคณะ, 2531) ทำได้โดยการนำข้าวมานึ่งให้สุก ปล่อยให้เย็นแล้วเติมเชื้อ *Monascus purpureus* ลงไป ปล่อยให้เชื้อราเจริญเจริญในข้าวที่อุณหภูมิ 25-30°C นานประมาณ 3 สัปดาห์ ก็จะได้ข้าวแดง ในการผลิตข้าวแดงควรใช้ข้าวเจ้า ไม่ควรใช้ข้าวเหนียวเพราะข้าวเหนียวจะเกาะแน่นติดกัน (Beuchat, 1978) Hesseltine (1965) ได้ศึกษาการผลิตข้าวแดงในระดับห้องทดลอง โดยใช้ข้าวสารที่ขัดสีแล้วจำนวน 50 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์หรือภาชนะแก้ว แล้วปิดฝาเพื่อป้องกันการปนเปื้อน แต่ยังคงให้มีอากาศผ่านเข้าออกได้ เติมน้ำลงไปจำนวน 30 มิลลิลิตรต่อภาชนะ หรืออาจใช้วิธีแช่ข้าวไว้นาน 24 ชั่วโมง ปล่อยให้สะเด็ดน้ำแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อเย็นได้ที่ให้เติมเชื้อเริ่มต้นที่ประกอบด้วย 5 มิลลิลิตรของแอสโคสปอร์ของ *M. purpureus* ซึ่งเจริญบนอาหาร SA (Sabouraud Dextrose agar) มาเป็นเวลา 25 วัน ผสมเชื้อเริ่มต้นกับข้าวให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-32°C โดยระวังอย่าให้ข้าวเปียกหรือเละ ข้าวจะเริ่มมีสีแดงภายในเวลา 3 วันและมีความร้อนเกิดขึ้น ให้เขย่าข้าวเพื่อให้เกิดการกระจายความชื้นและความร้อนอย่างสม่ำเสมอ ภายในเวลา 3 สัปดาห์ ข้าวที่ได้ควรมีสีแดงเข้ม เมล็ดข้าวไม่เกาะติดกัน และมีสีแดงตลอดทั้งเมล็ด จากนั้นนำข้าวแดงนี้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40°C ก็จะได้ข้าวแดงตามต้องการ

Palo et al. (1960 อ้างในวินิต ดีประชากร, 2520) ทดลองทำข้าวแดงโดยใช้ข้าวจำนวน 50 กรัม เติมน้ำ 30 มิลลิลิตร นำไปอบด้วยเครื่องอบอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้ข้าวสุกและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับข้าว จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง เมื่อข้าวเย็นแล้ว เอาน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่เลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* อายุ 25 วันซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SA เขี่ยสปอร์ของเชื้อราให้แขวนลอยในน้ำกลั่น แล้วเทลงไปในข้าว ทิ้งไว้ 20 วันที่อุณหภูมิห้อง (28-32°C) เขี่ยข้าวให้เข้ากันทุกวัน เพื่อให้เชื้อรามีการเจริญทั่วทั้งเมล็ดข้าวทั้งยังเป็นการเพิ่มอากาศให้กับเชื้อราด้วย จากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40°C วินิต ดีประชากร (2520) ได้ศึกษาการผลิตข้าวแดงโดยใช้เชื้อรา *M. purpureus* นำข้าวจำนวน 30 กรัมใส่ในขวดแก้ว ทำการล้างน้ำ 2 ครั้งจากนั้นเติมน้ำกลั่น ให้น้ำหนักข้าวกับน้ำหนักน้ำทั้งหมดรวมกันเป็น 50 กรัม ปิดขวดด้วยจุกสำลี เอาไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาทีแล้วทิ้งไว้ให้เย็น เอาน้ำกลั่นที่ต้มฆ่าเชื้อโรคแล้ว 5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดแก้วที่เลี้ยงเชื้อราไว้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ SA เขี่ยสปอร์ของเชื้อราให้ลอยอยู่ในน้ำ แล้วเทลงในข้าวที่นึ่งแล้ว เกลี่ยข้าวให้เข้ากัน เพาะไว้ที่อุณหภูมิห้อง (24-28°C) ทำการเกลี่ยข้าวทุกวัน เพื่อให้เกิดสีแดงสม่ำเสมอทั่วทั้งเมล็ดข้าว เมื่อเกิดสีแดงเข้มทั้งถึงกันแล้ว นำมาอบแห้งโดยใช้ตู้อบที่อุณหภูมิ 40°C จนแห้งสนิท

การผลิตข้าวแดงแบบจีนไต้หวัน (Chu Chong) (อ้างในอรอนงค์ นัยวิกุล, 2547) วิธีการนี้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดคือ *M. anka* และยีสต์ (*Saccharomyces formosensis*) ซึ่งเจริญเติบโตด้วยข้าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหนียวนึ่งสุกผสมกับไวน์ข้าว หมักไว้ที่อุณหภูมิ 33°C เป็นเวลา 12-15 วัน หลังจากนั้นจึงบดผสมรวมกัน แล้วนำไปผสมกับข้าวเหนียวนึ่งสุกที่เย็น หมักไว้ที่อุณหภูมิ 35°C ความชื้นสัมพัทธ์ 90% เป็นเวลา 1 วัน เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 42°C จึงทำการเกลี่ยข้าวบนถาดทิ้งไว้ 6-7 วัน แล้วจึงทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 1 วัน จะได้เป็นข้าวแดง (Su and Wang, 1997; Steinkraus, 1983) นำมาบดใช้เป็นผงสีแดงผสมอาหารได้ การผลิตข้าวแดงแบบจีน (Anka) วิธีการนี้ใช้เชื้อจุลินทรีย์คือ *Monascus purpureus* เตรียมโดยผสมกับน้ำที่อุณหภูมิ 33°C เป็นเวลา 10 วัน จึงนำหัวเชื้อนี้มาผสมกับข้าวเจ้านึ่งสุกที่ทิ้งให้เย็นแล้ว หมักไว้ที่อุณหภูมิ 77°C pH 5-6 ขณะหมักควรพรมน้ำเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอ แต่ต้องไม่ให้ข้าวแฉะ จนได้เป็นข้าวแดง แล้วนำไปบดเป็นผงสีแดงใช้ในการปรุงแต่งอาหารต่อไป (Su and Wang, 1997; งามชื่น, 2541)

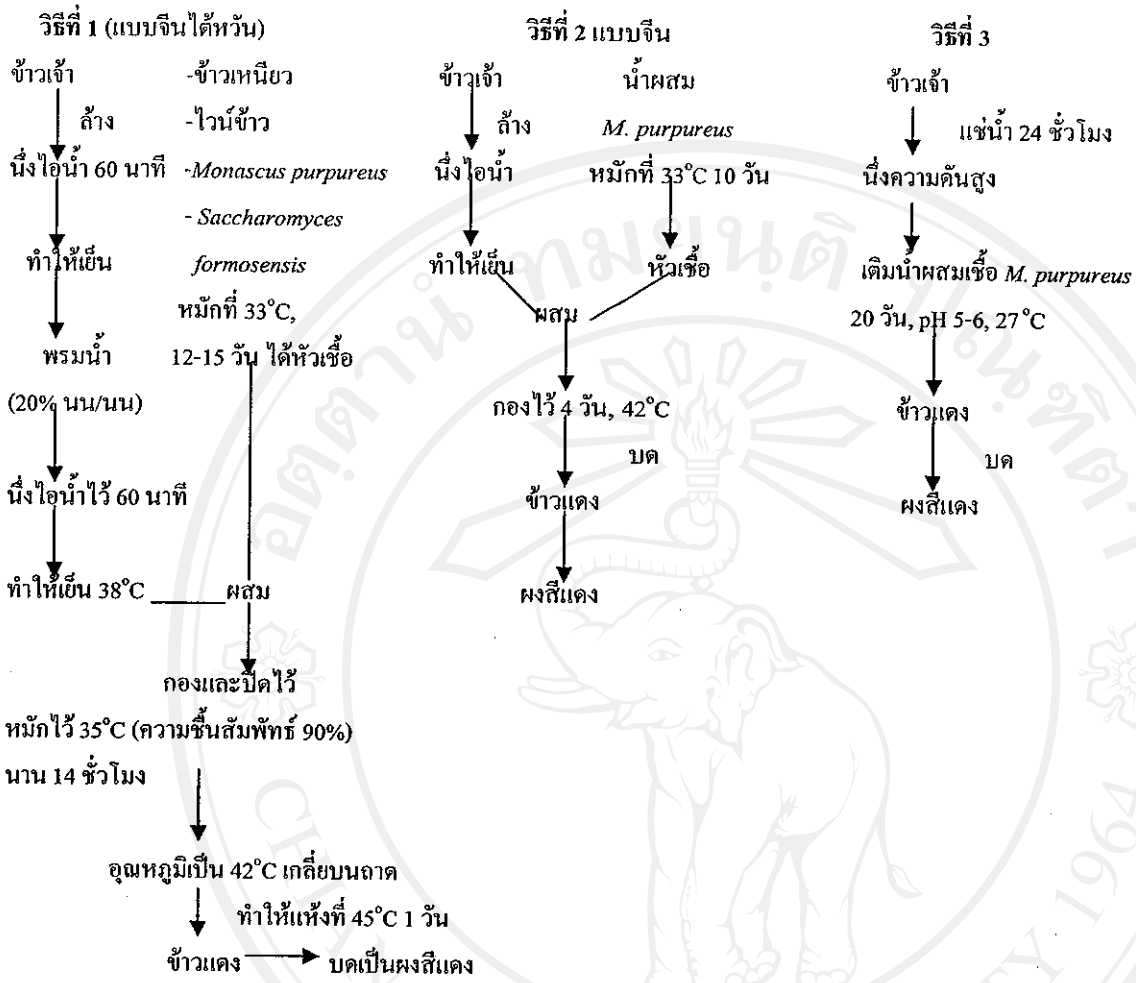
การผลิตข้าวแดงอีกวิธีการหนึ่งในประเทศจีนและไต้หวัน (อ้างในนันทญาภรณ์ ชัยมงคล, 2546) ทำโดยแช่ข้าวในน้ำเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนึ่งให้สุก หลังจากข้าวเย็นแล้วจึงนำไปใส่บ่อหมัก แล้วเพาะเชื้อโดยใช้กล้าเชื้อซึ่งมีการเจริญบนเมล็ดข้าวประมาณครึ่งหนึ่งของเมล็ดข้าวที่นึ่งไว้ เติมน้ำลงในบ่อหมักประมาณหนึ่งเท่าโดยน้ำหนักของวัตถุดิบและเชื้อ ระหว่างการหมักจะทำการกวนเป็นครั้งคราวเพื่อลดอุณหภูมิ การหมักในขั้นนี้ใช้เวลาเพียง 4 วันข้าวจะมีสีแดง ในขั้นตอนต่อไปสามารถใช้ผลิตข้าวแดงได้ปริมาณถึง 30 เท่าของกล้าเชื้อ ขั้นตอนการหมักในระยะหลังนี้ เริ่มด้วยการนึ่งข้าวโดยใช้ความดันไอ 0.2 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วลดอุณหภูมิให้ต่ำลงถึงระดับ 40°C พ่นน้ำประมาณ 20% ลงบนข้าวแล้วนึ่งต่อไปอีก 30 นาที ปล่อยให้อุณหภูมิลดลงถึง 36°C จึงทำการเพาะกล้าเชื้อ ในระยะแรกของการหมักอุณหภูมิจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นถึง 42°C เมื่ออุณหภูมิเพิ่มถึงระดับนี้ จะต้องแบ่งข้าวซึ่งเดิมรวมกันอยู่ในบ่อ โดยแบ่งใส่กระด้งหรือบุ้งกี๋แล้วบ่มต่อไปอีก 8 วัน ในระหว่างการบ่มจะนำกระด้งเชื้อมาจุ่มน้ำแล้วยกขึ้นจนสะเด็ดน้ำ ซึ่งตลอดระยะการบ่มจะทำเช่นนี้ประมาณ 3 ครั้งด้วยกัน เพื่อให้เมล็ดข้าวชุ่มชื้นเหมาะสมต่อการเจริญและชอนไชของเส้นใยเชื้อรา และป้องกันการเกาะติดกันระหว่างเมล็ดข้าว หลังจากการบ่มข้าวจะเปลี่ยนเป็นสีแดงทั่วทั้งเมล็ด และเมื่อบี้เมล็ดข้าวให้แตกออก จะเห็นว่าภายในก็จะเป็นสีแดงเข้มเช่นกัน จึงนำข้าวแดงนี้ไปตากหรืออบ จนมีความชื้นเหลือเพียง 7-10% (นภา, 2527)

การผลิตข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์จะเปลี่ยนเป็นข้าวแดงได้ที่ความชื้นเริ่มต้นต่ำ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมความชื้นโดยการพ่นน้ำระหว่างการหมัก (นภา, 2527; Hesseltine, 1965; Su, 1980 อ้างในกังสดาลย์ บุญปราบ และคณะ, 2539) ผลิตภัณฑ์ที่ระดับความชื้นสูงจะมีลักษณะแฉะ มีปริมาณเอทานอลสูงและมีความเข้มสีต่ำมาก สาเหตุดังกล่าวเนื่องมาจากเชื้อรา *Monascus sp.* สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้สูง ทำให้แป้งเปลี่ยนเป็นกลูโคสมาก เป็นผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำให้น้ำตาลไปกดการสร้างสี และเกิดเอทานอลขึ้นแทน (Lotong and Suwanarit, 1990) การผลิตข้าวแดงอีกวิธีการหนึ่ง (พัชรีย์, 2545 อ้างในนันทญาภรณ์ ชัยมงคล, 2546) เริ่มจากการผสมข้าวกับน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 นำไปนึ่งในรังถึงที่อุณหภูมิ 100°C นาน 20 นาที แบ่งข้าวนึ่งใส่ถุงทนร้อน (polypropylene) ขนาด 8 x 12 นิ้ว ถุงละ 100 กรัม ใส่คอขวดอุดด้วยสำลี แล้วหุ้มด้วยฟอยล์ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาทีด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) หลังจากฆ่าเชื้อแล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นก่อนทำการเพาะเชื้อ แล้วจึงถ่ายเชื้อจากกล้าเชื้อลงบนข้าวนึ่งนี้ กล้าเชื้อเตรียมโดยการเพาะเชื้อ *Monascus purpureus* ลงบนอาหาร PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7 วัน ถ่ายเชื้อโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีของเชื้อแล้ววางลงบนผิวหน้าของข้าวนึ่ง นำข้าวที่ถ่ายเชื้อแล้วนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 28-30°C นาน 20 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำมาอบที่อุณหภูมิ 80°C นาน 6 ชั่วโมง นำไปบดให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 mesh

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.1 เปรียบเทียบกรรมวิธีการแปรรูปข้าวแดง 3 วิธี

ที่มา : งามชื่น (2541); Su and Wang (1977 อ้างในอรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

2.4 เชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัส (*Momascus spp.*) เป็นเชื้อราที่ Alexopoulos and Mims (1979) จัดอนุกรมวิธานดังนี้ (อ้างในนันทญาภรณ์ ชัยมงคล, 2546)

Division Amastigomycota

Subdivision Ascomycotina

Class Ascomycetes

Subclass Plectomycetidae

Order Eurotiales

Family Monascaceae

Genus *Monascus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

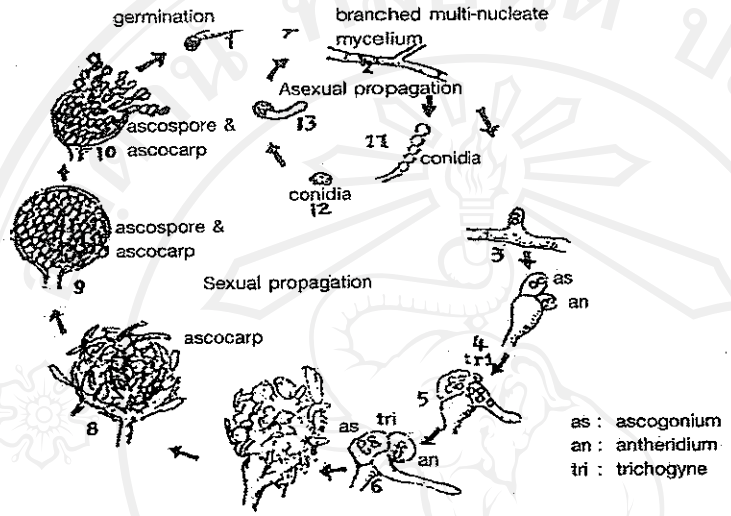
เส้นใยของเชื้อรามีผนังกั้น (septate) มีการสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบมีเพศ (sexual) และแบบไม่มีเพศ (asexual) เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย และมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วง (อ้างในบุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศของเชื้อราโมแนสคัส มีการสร้างโคนิเดีย (conidia) ซึ่งเจริญมาจากโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) โคนิเดียมีลักษณะรูปร่างกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือเกิดติดต่อกันเป็นลูกโซ่ (Hawksworth and Pitt, 1983) โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเกิดสีแดงได้บ้าง โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้นหรือ septate 0-1 ถ้ามีขนาดยาวขึ้นจะมีผนังกั้น 2-6 เป็นสายตรงหรือขดเป็นเกลียว และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่ออายุมากขึ้น การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น C medium ที่เหมาะสมสำหรับการเกิดโคนิเดียของเชื้อราโมแนสคัสคือ ซูโครส 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 นอกจากนี้ยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายประการ เช่น อายุสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ สภาวะความเป็นกรด-ด่าง แสงและอุณหภูมิ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35°C โดยทั่วไปโคนิเดียจะงอกภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสม ด้วยการสร้าง germ tube ขึ้นมา 1-2 อัน หรือบางทีอาจมีได้ถึง 6 อัน ซึ่งสามารถกระตุ้นการงอกของโคนิเดียได้โดยใช้คาร์โบไฮเดรตหลายชนิด (Wong and Bau, 1978)

ส่วนการสืบพันธุ์แบบมีเพศของเชื้อราโมแนสคัส คล้ายกับเชื้อราอื่น ๆ ใน Class Ascomycetes คือมีการสร้างเพอริทีเซียม (perithecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยเกิดขึ้นบนก้าน (stalk) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ (Smith, 1969; Von Arx, 1974) แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนสายใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (homotallic) โดยการสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิดคือ แอนเทอริเดียม (antheridium) และแอสโคโกเนียม (ascogonium) เกิดการฟิวชั่น (fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วมีการพัฒนาต่อไป โดยมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสและแบบไมโตซีสตามมา ได้ daughter nuclei จากการแบ่งตัว มีการขยายผนังเซลล์รวมออกเรียกว่าการสร้างแอสโคคาร์ปขึ้นในที่สุด (Carels and Shepherd, 1975; Koltila et al., 1978) ภายในเพอริทีเซียมมีแอสโคสปอร์ (ascospores) มากมาย โดยแอสโคสปอร์จำนวน 2-8 อันรวมอยู่ในแอสคัส (ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออก ก็จะปล่อยแอสโคสปอร์งอกเป็นเส้นใหม่ขึ้น วัฏจักรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัสแสดงในภาพที่ 2.2 สำหรับเชื้อรา *Monascus purpureus* เมื่อโคโลนีมีอายุมากขึ้นสายใยของเชื้อราจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลแดง หรือสีม่วง และกลายเป็นสีเทาเมื่อมีการพัฒนาสร้างโคนิเดียและเพอริทีเซียม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วจะกลับเปลี่ยนเป็นสีแดงอมม่วงอีกครั้ง เพอริทีเซียมหลายอันถูกสร้างบนก้านเดียวกัน มีโคนิเดียรูปกลมรี จัดเรียงกันเป็นสายสั้น ๆ หลายสาย แอสโคสปอร์มีรูปร่างกลมรีขอบเรียบและไม่มีสี มีขนาด 5.5-6 x 3.5-4 ไมครอน โคนิเดียมีสีน้ำตาลมีรูปร่างกลมรีหรือเป็นรูปถัง มีขนาด 9-10.5 x 7-9 ไมครอน (Smith, 1969)



ภาพที่ 2.2 วงจรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัส
(ที่มา : บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

ปัจจุบันมีการรวบรวมเชื้อราโมแนสคัสนี้กว่า 20 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 2.4 มีการจัดแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส โดยคณะนักวิจัยหลายกลุ่ม แต่ละกลุ่มใช้หลักการแตกต่างกันในการแบ่งสายพันธุ์เช่น อาศัยสมบัติสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ใช้สมบัติสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว การใช้สมบัติเอนไซม์วิทยาเข้าช่วย เช่น การใช้สมบัติเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 สายพันธุ์ต่าง ๆ 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. pilosus*	*M. pubigerus*	*M. purpureus*	*M. ruber*
M. rubiginosus	*M. rubropunctatus*	*M. serorubercens*	*M. vini*	*M. vitreus*

ที่มา : รวบรวมจาก lizuka and Lin, 1981; Hawksworth and Pitt, 1983; Nishikawa et al., 1988; Nishikawa and lizuka, 1993 โดยบุษบา ยงสมิทธ์, 2542

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.5 กิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกันในเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่าง ๆ

Enzyme Activity	*M. floridanus*	*M. pilosus*	*M. purpureus*	*M. ruber*
Valine arylamidase	-	+	+	+
Cystine arylamidase	-	-	+	-
Trypsinase	+	-	-	-
α-galactosidase	-	+	-	+
β-galactosidase	-	+	-	-
α-glucosidase	-	+	-	-
Polypectase pH 6.0	-	-	+	-
Cellulose hydrolysis	-	-	-	+

ที่มา : Bridge and Hawksworth, 1985 โดยบุษบา ยงสมิทธ์, 2542

2.5 สารเมทาบอไลต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราที่มีการสร้างเส้นใย (filamentous fungi) ในสกุล (Genus) *Monascus* เป็นที่รู้จักกันดีว่าสามารถสังเคราะห์สารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิหลายชนิด เช่น สารสี โมนาโคลิน และ ankalactone (Juzlova et al., 1996) โดยสารสีจากเชื้อราโมแนสคัสเป็นสารสีธรรมชาติ ที่ถูกใช้เป็นสารเพิ่มสีในอาหาร มีการค้นพบว่าสารสกัดจากเส้นใยของเชื้อราโมแนสคัส มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Wong and Bau, 1977; Wong and Koehler, 1981; Nozaki et al., 1991; Martinkova et al., 1995) ทำให้เกิดพิษต่อตัวอ่อน (embryotoxicity) และทำให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อนก่อนถือกำเนิดออกมา (teratogenic effect) (Martinkova et al., 1995 อ้างใน Martinkova L., et al., 1999)

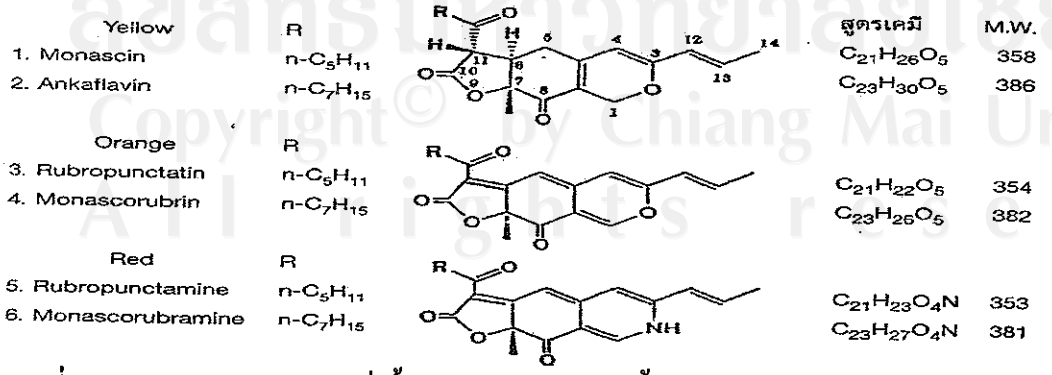
สำหรับสารสีที่เชื้อราในสกุล *Monascus* สังเคราะห์ขึ้นเป็นส่วนผสมของสารประกอบสีแดง สีเหลือง และสีส้ม สารสีดังกล่าวนี้ตามปกติจะใช้โดยไม่มีการแยกสีต่าง ๆ ออกจากกัน ถึงแม้ว่าสีหลักที่สนใจในทางการค้า จะเป็นสารประกอบสีแดงก็ตาม เป็นเวลานานมาแล้วเป็นที่ทราบกันดีว่า มีสารสี 6 ชนิดถูกสร้างโดยเชื้อราโมแนสคัส คือ สีเหลือง (monascin และ ankaflavin) สีส้ม (rubropunctatin และ monascorubrin) และสีแดง (rubropunctamine และ monascorubramine)

Haws et al. (1959 อ้างในจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) พบโครงสร้างของ rubropunctatin ($C_{21}H_{22}O_5$) ซึ่งแยกได้จาก *M. rubropunctatus* Sato เมื่อสารนี้อยู่ในสารละลายแอมโมเนียจะได้ rubropunctamine ($C_{21}H_{22}O_4N$) ซึ่งเป็นสีม่วง Fielding et al. (1961) ศึกษาโครงสร้างสารสี monascorubrin และ monascin โดยแสดงให้เห็นว่า monascorubramine และ rubropunctamine เป็นสารสีแดงที่เปลี่ยนมาจาก monascorubrin และ rubropunctatin (สารสีส้ม) ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 2.3 สารสีที่สกัดได้จากเชื้อราโมแนสคัส เช่น rubropunctatin จาก *M. rubropunctatus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

monascorubrin จาก *M. purpureus* และ monascin จาก *Monascus sp.* เป็นสารประเภทโพลิคีไทด์ (polyketides) ซึ่งเป็นสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิ (Turner, 1971) โดยสารประเภทโพลิคีไทด์จะมีกระบวนการสังเคราะห์คล้ายกับกรดไขมัน แต่มีสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน Carels and Shepherd (1977) เสนอว่าสารสีส้มถูกสังเคราะห์เป็นสีแรก และสารสีเหลืองหรือสารสีแดงมาจากปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นกับสีส้มนั้น ๆ

กลไกการสังเคราะห์สารสีต่าง ๆ ของเชื้อราโมแนสคัส เกิดจากการรวมตัวของ acetate 1 โมล และ malonate 5 โมล เหนี่ยวนำให้เกิดเป็นสารประกอบ hexaketide chromophore โดยใช้เอนไซม์ polyketide synthase จากนั้นกรดไขมันสายขนาดกลาง (medium-chain fatty acids; C6-C18) เช่น octanoic acid ซึ่งมาจากกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน จะเข้ารวมตัวกับโครงสร้าง chromophore โดยปฏิกิริยา trans-esterification ได้สารสีสีส้ม (monascorubrin หรือ rubropunctatin ถ้าเกิดปฏิกริยา trans-esterification กับ hexanoic acid) การลดลงของสารสีส้มทำให้มีการเพิ่มขึ้นของสารสีเหลือง (ankaflavin) ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก monascorubrin (หรือ monascin ที่เปลี่ยนแปลงมาจาก rubropunctatin) ในขณะที่สารสีแดง (monascorubramine และ rubropunctamine) ถูกสังเคราะห์จากปฏิกิริยา amination ของสารสีส้มกับแอมโมเนีย สารสีเหล่านี้ยังคงอยู่ภายในเซลล์เชื้อรา เนื่องจากมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (hydrophobicity) สูง แล้วจะถูกขับออกมานอกเซลล์เชื้อรา หลังจากทำปฏิกิริยากับหมู่ NH_2 ของกรดอะมิโน ทำให้ละลายน้ำได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้ กลูตาเมทจึงเป็นกรดอะมิโนที่ใช้กันมากที่สุด เนื่องจากเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (Hajjaj et al., 1999) สำหรับสารสีส้มคือ rubropunctatin และ monascorubrin ถูกสังเคราะห์ขึ้นในไซโตซอลจาก acetyl coenzyme A ผ่านขบวนการใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่ม polyketide synthase ซึ่งสารสีดังกล่าวนี้ไม่ละลายน้ำ และไม่คงตัวเมื่ออยู่ในสภาวะที่ pH สูงมาก ๆ (Hajjaj, 2000 อ้างใน Carvalho J.C., et al., 2003) แต่โครงสร้างของสารสีดังกล่าวมีความสามารถในการจับกับหมู่อะมิโนปฐมภูมิ ในการสร้างเป็นสารประกอบ aminophiles ได้

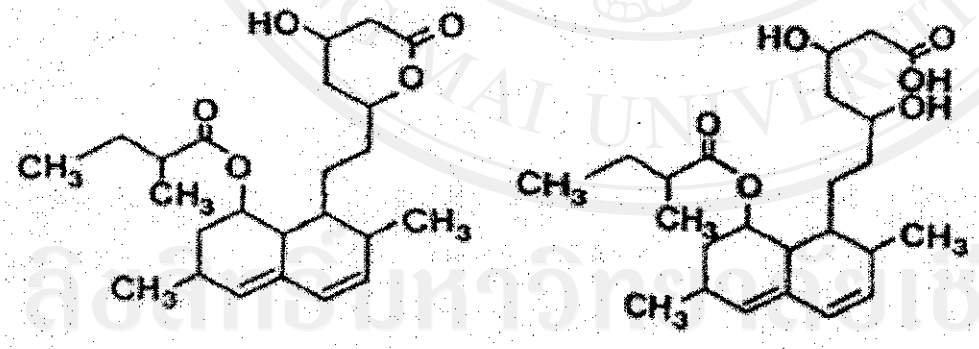


ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของสารสีที่เชื้อราโมแนสคัสสร้างขึ้น
(ที่มา : บุษบา ยงสมิทธ์, 2542)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในทศวรรษล่าสุดนี้มีการค้นพบสารเมทาบอไลต์ให้สีชนิดใหม่ จากสารสีที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus sp.* คือ xanthomonascin และ yellow II ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสารสีทั้งสองชนิดนี้ มีการเปลี่ยนแปลงมาจาก rubropunctatin (Sato et al., 1992; Juzlova, 1996; Watanabe, 1997) และเมื่อเร็ว ๆ นี้มีการค้นพบสารประกอบใหม่สองชนิด คือ monascopyridines A และ B ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบสีแดง แต่มีการเติมหมู่ไฮโดรเจน (Wild et al., 2003) สารประกอบเหล่านี้มีการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตสูงสุดที่ 360 นาโนเมตร

Endo (1979 อ้างใน Kao C-L., 2004) ค้นพบว่าสารประกอบของ compactin ที่มีการเติมหมู่เมธิล ซึ่งรู้จักกันในชื่อ โมนาโคลินเค (Monacolin K) ถูกสร้างขึ้นในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Monascus ruber* โมนาโคลินเค (มีชื่อเรียกอย่างอื่น เช่น lovastatin, mevinolin, และ mevacor) เป็นตัวยับยั้งการทำงาน (competitive inhibitor) ของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์จำกัดอัตราของกระบวนการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลที่ตับ โมนาโคลินเคมีจุดหลอมเหลวที่ 157-159°C มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{36}O_5$(MW 404) มีค่าขนาดที่ทำให้เกิดการตาย 50% (Lethal dose 50 : LD_{50})ในหนูเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สารนี้นอกจากสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลแล้ว ยังช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของทั้งมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจึงสามารถใช้สารดังกล่าวเป็นยาลดระดับโคเลสเตอรอล และป้องกันหลอดเลือดของหัวใจไม่ให้มีการอุดตันได้ (นันทญาภรณ์ ชัยมงคล, 2546) โครงสร้างของโมนาโคลินเคแสดงดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของเมวิโนลินในรูปอนุพันธ์แลคโตน (ซ้าย) และอนุพันธ์กรด (ขวา)
ที่มา : เรณู ปิ่นทอง และคณะ, 2546

Gamma-amino butyric acid (GABA) เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในกระบวนการ decarboxylation ของกรดกลูตามิก โดยใช้เอนไซม์ catalyzing glutamate decarboxylase เชื้อราที่ใช้ผลิตข้าวแดงจะให้ GABA ในปริมาณสูง GABA มีบทบาททางสรีรวิทยาหลายอย่างเช่น เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) เป็นสารช่วยในการขับปัสสาวะ (diuretic) และมีผลในการลดความดัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โลหิต (hypotensive) มีการใช้ GABA ในการช่วยลดความดันโลหิตในมนุษย์ เมื่อ GABA มีการจับกับตัวรับ (receptors) ที่สมองคือ $GABA_A$ และ $GABA_B$ จะมีฤทธิ์ในการกดการหลั่งสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง (Wang et al., 2003)

นอกจากสารสี สารลดโคเลสเตอรอล และ GABA แล้วเชื้อราโมแนสคัสยังให้สารเมทาบอไลต์ที่มีประโยชน์อื่น ๆ อีกดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 สารเมทาบอไลต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัส

เอนไซม์	เมทาบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites)	เมทาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites)
1. กลูโคอะไมเลส 2. โปรตีเอส 3. แอลฟากาแลคโตซิเดส 4. แอลฟาอะไมเลส 5. ไรโบนิวคลีเอส	1. เอทิลแอลกอฮอล์ 2. กรดอินทรีย์ 3. เอสเทอร์ 4. สารให้กลิ่นหอม (methyl ketones)	1. สารสี (แดง เหลือง ส้ม) 2. สารปฏิชีวนะ 3. สารลดโคเลสเตอรอล (mevinolin) 4. สารตกตะกอน (flocculants) 5. ยาลดความดันโลหิต (antihypertensives) 6. วิตามินบี 2 7. สารยาพื้นบ้านของจีนรักษาโรคอาหารไม่ย่อย, โรคบิด, กล้ามเนื้ออักเสบ 8. คูมาริน (coumarin) รักษาโรคด่างขาว 9. สารถนอมอาหารประเภทเนื้อ 10. โคเอนไซม์ Q_{10} 11. สารยับยั้งการกลายพันธุ์

ที่มา : ดัดแปลงจาก บุษบา ยงสมิทธ์, 2542

2.6 การทดสอบความเป็นพิษของสารสีโมแนสคัส

Kaio et al. (1978) ศึกษาทางด้านความเป็นพิษของสารสีที่ได้จากเชื้อรา *Monascus sp.* โดยทดลองกับหนู พบว่าไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลองนั้น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าปริมาณของสารสีที่ทำให้เกิดการตายของหนูไป 50% (Lethal dose 50 : LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 33.3 และ 8.7 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เมื่อกินสารสีเข้าไป และเมื่อฉีดเข้าช่องท้องตามลำดับ

บุษบา และวรรณภา (2528 อ้างในบุษบา ยงสมิทธ์, 2542) ศึกษาความปลอดภัยของสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส โดยนำน้ำสีไปฉีดทดสอบความเป็นพิษในไข่ไก่ฟัก เปรียบเทียบกับการฉีดด้วยน้ำกลั่นตามวิธีการของ AOAC พบว่าไข่ไก่ฟักที่ผ่านการฉีดด้วยน้ำสีแดงหรือน้ำสีเหลือง มีอัตราการรอดเท่ากับไข่ไก่ฟักควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำกลั่น บุษบา และคณะ (2531) พบว่าสารสีจากเชื้อรา *M. kaoliang* และ *M. barkari* ที่คัดมาจากความสามารถในการใช้มันสำปะหลังได้ดี ไม่เป็นพิษต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หนูทดลอง 144 ตัวที่ได้รับสารสีในอัตรา 0.02, 0.1 และ 2.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ธวัช และคณะ (2530); บุษบา และคณะ (2531) เปรียบเทียบผลของสีปองโซ 4 อาร์ซึ่งเป็นสีสังเคราะห์ และสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส ต่อความผิดปกติของโครโมโซมของคน พบว่าสีปองโซ 4 อาร์ ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมถึงร้อยละ 28.64 ขณะที่ความผิดปกติของโครโมโซมที่เป็นผลมาจากสารสีของเชื้อราโมแนสคัส ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสี

Fink et al. (1991a อ้างในจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) พบว่าสารสกัดจากเชื้อรา *Monascus purpureus* มีความเป็นพิษต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบไนไตรท์ที่ใช้เติมในผลิตภัณฑ์เนื้อ จึงสามารถใช้สารสกัดจากเชื้อรา *M. purpureus* เพื่อให้สีในผลิตภัณฑ์เนื้อ เพื่อลดความเสี่ยงอันตรายจากสารประกอบไนโตรเจน Fink et al. (1991b) ได้ทำการศึกษาถึงการเติมสารสกัดจากเชื้อรา *M. purpureus* DSM 1379 ในปริมาณ 1,000-4,000 ppm ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก เพื่อเปรียบเทียบกับไส้กรอกที่เติมไนไตรท์ในปริมาณ 0.72 ppm พบว่าไส้กรอกที่เติมสารสกัดจากเชื้อราโมแนสคัสให้สีน้ำตาลแดงที่สวยงาม แต่สีแดงที่ได้จะไม่เหมือนกับสีของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกทั่วไปที่เติมไนไตรท์ และสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัสจะมีความคงทนกว่าสีจากไนไตรท์ ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลิ่นและรสชาติของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกทั้งสอง แต่ยังต้องมีการศึกษาถึงความปลอดภัยของสารสกัดเชื้อราโมแนสคัสก่อนนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

Martinkova et al. (1995 อ้างในจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) รายงานถึงความเป็นพิษของสารสกัดจากเชื้อรา *M. purpureus* จะขึ้นอยู่กับปริมาณสารสีส้ม (rubropunctatin และ monascorubrin) ซึ่งการสังเคราะห์สารสีส้มจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติมสารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ลงในอาหาร จะทำให้สารซึ่งมีสมบัติเป็นสารที่ส่งผลกระทบทางชีวภาพ (bioactive compound) เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ สังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของสารสีส้มเป็นสารสีม่วงแดง ซึ่งเกิดจากการแทนที่อะตอมของออกซิเจนด้วยหมู่อะมิโน ทำให้ความเป็นพิษของสารสีส้มลดน้อยลงหรือหมดไป

Martinkova et al. (1999) ศึกษาผลทางชีวภาพของสารเมทาบอไลต์ต่าง ๆ ที่สังเคราะห์จากเชื้อรา *M. purpureus* CCM 8152 โดยพบว่า rubropunctatin, monascorubrin, monascin, และ ankaflavin มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนของไก่ เรียงตามลำดับความรุนแรงดังนี้ monascorubrin > rubropunctatin > monascin > ankaflavin ส่วนสารอนุพันธ์ของ rubropunctatin และ monascin แสดงผลทำให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อนไก่ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า rubropunctatin และ monascorubrin มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะต้านการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Candida pseudotropicalis* อย่างมีนัยสำคัญ ส่วน monascin และ ankaflavin แสดงผลในการกดการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ T-splenocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่ม้ามในหนูเม้าส์อย่างเห็นได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชัด สารประกอบทั้ง 4 ชนิดข้างต้นนี้ไม่มีสารประกอบใดเลย แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ตับของหนูแร็ต ซึ่งนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะภายนอกร่างกาย (in vitro) อย่างมีนัยสำคัญ การบ่มเซลล์ของเชื้อ *M. purpureus* กับไกลซีน ทำให้ได้สารประกอบสีแดงเข้ม 2 ชนิดซึ่งมีหมู่ pyran เหมือนกับ rubropunctatin และ manascorubrin แต่ถูกเปลี่ยนเป็นหมู่ N-substituted dihydropyridine โดยการแทนอะตอมของออกซิเจนภายในหมู่ pyran ด้วยหมู่อะมิโนของไกลซีน พบว่าสารประกอบทั้งสองชนิดนี้ ทำให้เกิดผลทางชีวภาพน้อยกว่า rubropunctatin, monascorubrin, monascin, และ ankaflavin

Carvalho et al. (2005) รายงานถึงการศึกษาหลายงานเกี่ยวกับพิษของสารสีที่ผลิตจากเชื้อราโมแนสคัส โดยชี้ให้เห็นว่าสารสีดังกล่าวนี้มีความปลอดภัย เมื่อทำการทดสอบในเชิงปริมาณ โดยสารสีเหล่านี้มีความเป็นพิษต่ำหรือมีความเป็นพิษที่ไม่ชัดเจน ความเป็นพิษดังกล่าวยังเป็นคุณสมบัติต้านการเจริญของเชื้อจุลชีพด้วย ซึ่งพบมากในสารสีส้ม แต่พบน้อยในสารสีแดง (Martinkova, 1995) และเมื่อมีการศึกษาเชื้อราโมแนสคัสอย่างเป็นระบบมากขึ้น จึงมีความเชื่อว่าสารสีเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะด้วย ซึ่งต่อมาพบว่าผลในการต้านการเจริญของเชื้อจุลชีพนี้เป็นผลมาจากสารอื่นที่มีชื่อว่า monascidin A (Wong, 1981) หรือซิตรินินนั่นเอง แต่ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสที่ผลิตซิตรินิน

2.7 ซิตรินิน (Citrinin) (อ้างใน European Mycotoxin Awareness Network, 2002)

ซิตรินินเป็นสารพิษจากเชื้อราซึ่งส่วนใหญ่จะพบจากเชื้อราสกุล Penicillium และ Aspergillus ที่ปนเปื้อนในอาหารประเภทธัญพืช ผลไม้ และถั่ว คนจะได้รับซิตรินินจากอาหารที่มีการปนเปื้อนเข้าไป ซิตรินินเป็นสารเมทาบอไลต์จากเชื้อรา ซึ่งพบครั้งแรกในปี 1931 โดยแยกได้ในรูปสารประกอบบริสุทธิ์จากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Penicillium citrinum* โดย Raistrick และ Hetherington และภายหลังพบในพืชจากออสเตรเลียที่มีชื่อว่า *Crotolaria crispata* นอกจาก *P. citrinum* แล้วยังมีเชื้อราอื่นที่สามารถผลิตซิตรินินได้คือ *P. viridicadum, P. implicatum, P. fellutanum, P. citreo-viridae, P. velutinum, P. canescens, P. jenseni, P. steckii, P. notatum, P. palitans, P. expansum, P. claviforme, Aspergillus niveus, A. terreus, A. flavipes,* และ *A. carneus* (Uraguchi and Yamazaki, 1978) และ *Alternaria kikchiana* (Champ et al., 1991) นอกจากนี้ยังพบในเชื้อราโมแนสคัสอีกด้วย (Blanc, Loret, Goma, 1995a, 1995b; Li et al., 2003 อ้างใน Xu B-J., et al., 2006)

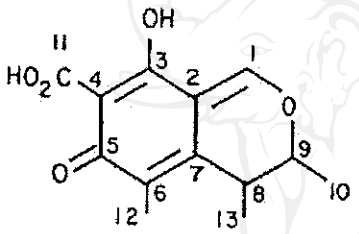
ในปี 1951 พบปัญหาข้าวเหลือง "yellow rice problem" ในข้าวที่ประเทศไทยส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อรา *P. citrinum* และตรวจพบซิตรินิน (อ้างในศศิธร ใบผ่อง, 2546) เป็นที่น่าสนใจว่าในบางสายพันธุ์ของเชื้อราในสกุล Peniciilium เช่น *P. viridicatum,*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

P.palitans, และ*P. verrucosum* สามารถสร้างซิตรินินและสารพิษจากเชื้อราอีกชนิดหนึ่งคือ โอคราท็อก-ซินเอ (ochratoxin A) ได้ มักพบสารพิษจากเชื้อราทั้งสองชนิดนี้ได้ในธัญพืชเช่น ข้าวสาลี ข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์ จึงไม่ใช่เรื่องแปลกที่จะพบทั้งโอคราท็อกซินเอ และซิตรินินได้พร้อมกัน แต่มีการศึกษาเกี่ยวกับซิตรินินน้อยกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะไม่บ่อยครั้งที่สามารถตรวจพบซิตรินิน เนื่องจากอาจมีการสลายตัวไปในระหว่างขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ ในระยะแรกที่มีการศึกษาเกี่ยวกับซิตรินินพบว่า ซิตรินินมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้ด้วย แต่ก็พบว่ามีความเป็นพิษต่อไตเมื่อนำไปใช้ในการรักษา (Champ et al., 1991) จึงไม่ได้มีการนำสารนี้ไปใช้ประโยชน์

1. คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของซิตรินิน

ซิตรินินมีชื่อเรียกตามระบบ IUPAC คือ (3R, 4S)-4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid มีโครงสร้างดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของซิตรินิน

ที่มา : Miller J.D. and Trenholm H.L., 1997

ซิตรินินมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 250 มีสูตรโครงสร้างคือ $C_{13}H_{14}O_5$ มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองเลมอน มีจุดหลอมเหลว 172°C มีการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตสูงสุดที่ความยาวคลื่น 250 และ 333 นาโนเมตร (เมื่อละลายในเมทานอล) ละลายน้ำได้น้อย แต่สามารถละลายได้ในสารละลายหรือตัวทำละลายบางชนิด เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง โซเดียมคาร์บอเนต เมทานอล อะซิโตไนไตรล์ เอทานอลและสารละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว สลายตัวได้ด้วยแสง (photodecomposition) เมื่อได้รับแสงฟลูโอเรสเซ็นต์ทั้งในสภาวะที่อยู่ในสารละลาย และในสภาวะที่เป็นของแข็ง สารละลายกรดหรือด่าง หรือจากความร้อน สามารถเกิดสีน้ำตาลเมื่อทำปฏิกริยากับเฟอริคคลอไรด์ เกิดสีเขียวกับไททาเนียมคลอไรด์ เกิดสีแดงคล้ำกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และด่าง ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์สามารถเกิดคีเลต (chelate) กับโมโน-อะซิเตต (mono-acetate), ไดเอธิล (diethyl), เมธิลเอสเทอร์ (methyl ester), และอนุพันธ์ไดไฮโดร (dihydro derivatives) และสารประกอบคีเลตนี้มักไม่คงตัว ดังนั้นควรวางแผนวิธีการสกัดซิตรินินอย่างระมัดระวัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการใช้รังสีเอ็กซ์ (X-ray) วิเคราะห์โครงสร้างผลึกของซิตรินินแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของซิตรินินเป็นวง p-quinone methide ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ซึ่งมีพันธะไฮโดรเจนสองพันธะภายในโมเลกุล (Rodig et al., 1971 อ้างใน Miller J.D. and Trenholm H.L., 1997) ต่อมาก็พบว่าผลึกซิตรินินก็สามารถมีโครงสร้างเป็นวง o-quinone methide ได้ (Sankawa et al., 1983; Destro and Marsh, 1984) ซึ่งโครงสร้างทั้งสองแบบนี้มีการเปลี่ยนแปลงจากอีกแบบหนึ่งไปสู่อีกแบบหนึ่ง เมื่ออยู่ในสภานะของแข็ง การเปลี่ยนแปลงนี้อยู่ในสภาพสมดุลตลอดเวลา ในสารละลายบัฟเฟอร์ (D_2O, pH 7.4) ซิตรินินจะมี diasterioisomer ซึ่งเชื่อมต่อกับโมเลกุลของน้ำ (diasterioisomeric hydrates) ซึ่งไอโซเมอร์ดังกล่าวสามารถแสดงให้เห็นได้ด้วยวิธีการ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy ซึ่งใช้ ^{1}H และ ^{13}C (Barber et al., 1987b) โดยโมเลกุลของน้ำถูกเติมเข้าไปในโครงสร้างของซิตรินิน แล้วเกิดเป็นโครงสร้าง dihydric phenolic เมื่ออยู่ในเมทานอลหรือสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับเมธิลีนคลอไรด์ ซิตรินินจะเกิดปฏิกิริยาที่สามารถเติมหมู่ nucleophilic ชนิด Michael-type ได้ โดยปฏิกิริยานี้สามารถผันกลับได้ และสมดุลของปฏิกิริยาจะโน้มไปทางด้านที่เกิดเป็นโครงสร้างของซิตรินินตามปกติ ถ้าอุณหภูมิของเมธิลีนคลอไรด์เพิ่มขึ้น (Poupko, Luz, and Destro, 1997 อ้างใน Xu B-J., et al., 2004)

ซิตรินินสามารถทำการสังเคราะห์ขึ้นได้หลายวิธีเช่น การสังเคราะห์ enantiomer ของซิตรินินที่ไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (Regan and Staunton, 1987) อนุพันธ์ของซิตรินินสามารถมีได้หลายรูปแบบอาทิเช่น อนุพันธ์โมโนอะซิเตต ไดเอธิลเมธิลอสเทอร์ และอนุพันธ์ไดไฮโดร ซึ่งอนุพันธ์เหล่านี้สามารถทำให้เกิดสีเอโซ (azo dyes) โดยทำปฏิกิริยาจับกับสารประกอบ diazotized aromatic amines (Scott, 1977) ซิตรินินยังสามารถเกิดสารประกอบกับโลหะได้เช่น เมื่อทำปฏิกิริยากับทองแดงในอัตราส่วน 1 : 1 หรือ 1 : 2 จะได้เป็นสารประกอบคีเลตของ copper (II)-citrinin ซิตรินินสามารถจับกับโปรตีนในซีรั่มของมนุษย์ได้ โดยยังไม่มีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่า ซิตรินินสามารถจับรวมตัวกับ DNA ได้ การรวมตัวของซิตรินินกับโปรตีนในซีรั่มถูกยับยั้งได้ด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine)

2. ความคงตัวของซิตรินิน (stability)

ซิตรินินสามารถสลายตัวได้ด้วยความร้อนและด่าง กล่าวคือ ซิตรินินสลายตัวได้ที่อุณหภูมิ 175°C โดยไม่มีความเป็นพิษเหลืออยู่ที่อุณหภูมินี้ในสภาวะปราศจากน้ำ (anhydrous) ส่วนในสภาวะที่มีความชื้นปานกลาง (semi-moist) ซิตรินินจะสลายตัวได้ที่อุณหภูมิประมาณ 140°C ดังนั้นความเป็นพิษของซิตรินินจะลดลงเมื่อได้รับความร้อนร่วมกับความชื้น โดยเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นพิษลดลง ทั้งนี้พบสารประกอบที่มีชื่อว่า citrinin H1 ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของซิตรินิน 2 โมเลกุล เมื่อซิตรินินอยู่ในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% หรือ n-hexane สามารถทนต่อความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ร้อนได้ระดับหนึ่ง แต่ถ้าอยู่ในสารละลายที่เป็นกรดหรือด่างจะไม่ทนต่อความร้อน การสูญเสียซิตรินินพบได้ในธัญพืชที่ได้รับความร้อนสูง (Scott, 1991 อ้างใน Miller J.D. and Trenholm H.L., 1997) ซิตรินินสามารถถูกทำลายได้ในระหว่างการผลิตเบียร์ โดยพบว่าซิตรินินมากกว่า 90% ถูกทำลายโดยผ่านกระบวนการงอก (germination) ของข้าวบาร์เลย์ โดยไม่มีซิตรินินเหลือไปถึงกระบวนการผสม (mashing) เพื่อผลิตน้ำเบียร์ (wort) จากมอลต์ การเติมกรดโพรพิโอนิกเพื่อใช้เป็นวัตถุกันเสียในการเก็บรักษาข้าวบาร์เลย์ ช่วยทำลายซิตรินินได้ และยังมีจุดมุ่งหมายในการใช้กรดโพรพิโอนิกในการช่วยเก็บรักษาอาหารสัตว์ ให้ปลอดภัยจากเชื้อราอีกด้วย

Speijers and Spijers (2004) เสนอผลการทำให้เกิดพิษร่วมกันของสารพิษจากเชื้อราอาหารหลายชนิดที่ผลิตมาจากพืช สามารถมีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราชนิดต่าง ๆ ได้ ถ้าสารพิษจากเชื้อรามีอยู่ร่วมกันในผลิตภัณฑ์อาหาร การบริโภคอาหารดังกล่าวจะโน้มนำให้มีการรับสารพิษร่วมกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราการดูดซึมของสารพิษจากเชื้อราที่ต่างชนิดกัน ดังนั้นการได้รับสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดร่วมกัน จะโน้มนำสู่ความเสี่ยงที่สูงมากขึ้นต่อผลเสียกับสุขภาพมากกว่าการได้รับสารพิษจากเชื้อราเพียงชนิดเดียวจากที่อยู่รวมกัน เช่น ในกรณีของโอคราท็อกซินเอและซิตรินิน เมื่อสารพิษจากเชื้อราต่างชนิดกัน มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน สร้างมาจากเชื้อราชนิดเดียวกันหรือเชื้อราในวงศ์เดียวกัน จึงอาจคาดการณ์ได้ว่าวิธีการออกฤทธิ์ของสารพิษจากเชื้อราดังกล่าว และหรือคุณสมบัติความเป็นพิษของมันก็จะคล้ายคลึงกันด้วย สิ่งนี้บ่งชี้ว่าสารพิษจากเชื้อราที่มีความสัมพันธ์กัน อาจส่งเสริมการออกฤทธิ์ซึ่งกันและกัน

มีรายงานถึงการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของซิตรินินโดยตรงในประเทศกลุ่มยุโรปอยู่น้อย เนื่องจากมักพบซิตรินินปนเปื้อนอยู่ร่วมกับโอคราท็อกซินเอในตัวอย่างอาหาร เช่น ธัญพืชต่าง ๆ เสมอ และเนื่องจากโอคราท็อกซินเอมีอันตรายสูงกว่าซิตรินินมาก การควบคุมปริมาณโอคราท็อกซินเอเพียงอย่างเดียว จึงจัดเป็นการควบคุมปริมาณซิตรินินทางอ้อม โดยปริมาณโอคราท็อกซินเอต้องมีไม่เกิน 5 ไมโครกรัม/กิโลกรัมในธัญพืช และ 10 ไมโครกรัม/กิโลกรัมในผลไม้ (อ้างในจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546)

3. กระบวนการสังเคราะห์ซิตรินิน

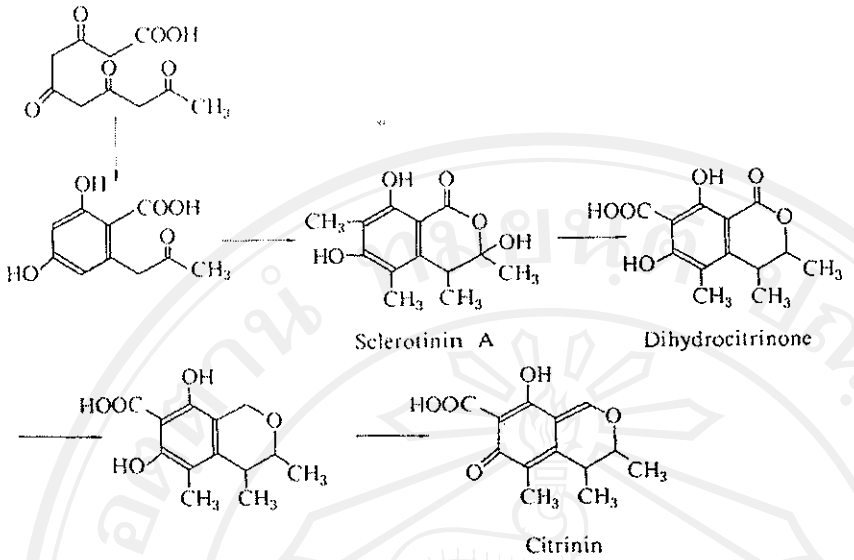
การสังเคราะห์ซิตรินินมีจุดเริ่มต้นจากสารประกอบเพนตะคีไทด์ (pentaketides) ซึ่งเป็นสารประกอบพวกโพลิคีไทด์ (polyketides) โดยการสังเคราะห์สารประกอบโพลิคีไทด์ในระยะแรก เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เชื้อรา อาจจำเป็นต้องมีเอนไซม์ในกลุ่ม polyketide synthetase เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย สำหรับสารพิษจากเชื้อราซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารประกอบโพลิคีไทด์ จะเกิดขึ้นในขั้นตอนการจัดเรียงตัวใหม่ ภายในโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการอัดแน่นของสายโพลิคีไทด์ (Smith and Moss, 1985)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในกรณีของการสังเคราะห์ซิตรินิน มีจุดเริ่มต้นจากสารประกอบเพนตะคีไทด์ซึ่งประกอบด้วยหมู่อะเซธิล 5 หมู่มารวมกัน สายเดียวกันกับที่เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์โอคราท๊อกซิน และอัสไดออล (ausdiol) โดยมีจำนวนหมู่ของอะตอมคาร์บอน ที่ถูกเติมเข้าไปในสารประกอบเพนตะคีไทด์เริ่มต้นต่างกัน (การเกิดอัสไดออล โอคราท๊อกซิน และซิตรินิน มีการเติมหมู่ของอะตอมคาร์บอนเข้าไปจำนวน 1, 2, และ 3 หมู่ตามลำดับ) การสังเคราะห์ซิตรินินจากสารประกอบเพนตะคีไทด์จะผ่านทางวิถีอะซิเตต-มาโลเนต (acetate-malonate pathway) โดยมีการเติมหมู่ของอะตอมคาร์บอนจากภายนอกเข้าไปจำนวน 3 หมู่ โดยเป็นหมู่เมธิล 2 หมู่และหมู่คาร์-บอกซิล 1 หมู่ มีการแสดงให้เห็นว่าหมู่ของอะตอมคาร์บอนที่มาจากภายนอกเหล่านี้ แต่ละหมู่มาจากอะตอมคาร์บอน 1 หน่วย จากการทดลองโดยใช้เมไธโอนีนที่มีหมู่ $^{14}CH_3$ และฟอร์เมทที่มี ^{14}C

จุดเริ่มต้นของกระบวนการสังเคราะห์ซตรินินทางชีวภาพถูกค้นพบโดยBirch et al. (1958a) โดยทำการเติม [^{14}C] sodium acetate ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus candidus* ทำให้ได้ [^{14}C] citrinin เมื่อทำการย่อยสลายซิตรินินดังกล่าวด้วยกรด (acid hydrolysis) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ 3 ชนิดคือ คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปที่ไม่ทำงาน (inactive form) มาจากอะตอมของคาร์บอนในตำแหน่งที่ 11 ของโครงสร้างซิตรินิน กรดฟอร์มิกซึ่งมาจากอะตอมของคาร์บอนในตำแหน่งที่ 1 ในโครงสร้างของซิตรินิน และเป็นตัวแทนประมาณ 20% ของ ^{14}C ทั้งหมด และฟีนอลซึ่งมี ^{14}C ถึง 78% การให้หมู่ฟอร์เมทและเมไธโอนีนซึ่งมีหมู่เมธิลคาร์บอนอะตอม กับสารประกอบเพนตะคีไทด์ แสดงให้เห็นการเกิดขึ้นของอะตอมคาร์บอนในตำแหน่งที่ 11, 12, และ 13 ในโครงสร้างส่วนนอกของซิตรินิน โดยที่อะตอมคาร์บอนในตำแหน่งที่ 12 และ 13 ของโครงสร้างซิตรินินไม่มี ^{14}C จาก [^{14}C] sodium formate ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Schwenk et al. (1958) ซึ่งเติมเมไธโอนีนซึ่งมีหมู่ ^{14}C-methyl ในการเลี้ยงเชื้อ *P. citrinum* โดยที่อะตอมคาร์บอนในตำแหน่งที่ 11, 12, และ 13 ของโครงสร้างซิตรินิน ก็ไม่มี ^{14}C เช่นกัน ปัญหาดังกล่าวได้ถูกตรวจสอบซ้ำโดยRodig et al. (1966) โดยใช้กลูโคสที่มี 1-^{14}C และ 6-^{14}C ผลดังกล่าวได้ยืนยันว่าอะซิเตตเป็นสารตั้งต้นของซิตรินิน และการทำงานของอะตอมคาร์บอนที่สัมพันธ์กันชี้ให้เห็นว่า มีการเกิดขึ้นมาเป็นลำดับของอะตอมคาร์บอนในตำแหน่งที่ 11, 12, และ 13 โดยที่ยังไม่มีความแน่ชัดในเรื่องการใช้เวลาในการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชั่นของอะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 11 หรือการเกิดเป็นวงของสารประกอบซิตรินิน (Steyn, 1980) สารประกอบบางอย่างที่มีความสัมพันธ์กับซิตรินิน ซึ่งแยกได้จาก *P. citrinum* ที่มีการกลายพันธุ์แล้วได้แก่ sclerotinin A และ B, dihydrocitrinone, decarboxycitrinin, decarboxydihydrocitrinone, และสารประกอบพวกฟีนอล (Uraguchi and Yamazaki, 1978) กระบวนการสังเคราะห์ซิตรินินและสารประกอบที่มีความสัมพันธ์กันนี้แสดงดังภาพที่ 2.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.6 กระบวนการสังเคราะห์ซิตรินินและสารประกอบที่มีความสัมพันธ์กัน
ที่มา : Uraguchi K. and Yamazaki M., 1978

2.8 การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับซิตรินินในเชื้อราโมแนสคัส

Wong and Bau (1977), Wong and Koehler (1981), และ Fink-Gremmels et al. (1991 อ้างใน Sabater-Vilar M., et al., 1999) ชี้ให้เห็นว่ามีการสร้างสารที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ในสีที่สกัดได้จากเชื้อราโมแนสคัส ซึ่งสนับสนุนงานวิจัยของ Ober และ Kunz (1989) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราบางสายพันธุ์ ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ จากนั้นได้มีการแยกเอาโมนาสซิดินเอ (monascidin A) จากเชื้อราโมแนสคัสหลายสายพันธุ์ และบ่งชี้ว่าเป็นสารตัวเดียวกับซิตรินิน คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส ได้ถูกศึกษาโดยนักวิจัยหลายคน เช่น Wong และ Koehler (1981 อ้างในศศิธร ใบผ่อง, 2546) ได้แยกสารประกอบ 2 ชนิดที่สร้างจากเชื้อรา *Monascus purpureus* ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้แก่สารสีเหลืองซีด คือโมนาสซิดินเอ (monascidin A) และสารสีเหลืองเรืองแสง ที่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของสารประกอบดังกล่าว

Wong and Koehler (1983 อ้างในจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) ศึกษาการผลิตสารโมนาสซิดินเอ ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (antibiotic) จากเชื้อรา *M. purpureus* พบว่าโมนาสซิดินเอมีปริมาณสูงสุด เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวแบบตั้งทิ้งไว้ โดยสูตรของอาหารเหลวคือ สารสกัดยีสต์และกลูโคสในปริมาณ 0.8 และ 10% ตามลำดับ และพบว่าสารสีจะถูกสร้างและสะสมในเส้นใยเชื้อรา ส่วนโมนาสซิดินเอจะถูกสร้างและละลายออกมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมโซเดียมอะซิเตตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณโมนาสซิดินเอจะลดลง โดยสังเกตจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone) มีค่าลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และพบว่าสารสีส้มและสารสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสารสีแดงมากขึ้น ปริมาณสารสีเหลืองเรืองแสงและโมนาสซิดินเอที่พบหลังจากการหมักจะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

Blanc et al. (1995a) รายงานเป็นครั้งแรกว่า สารโมนาสซิดินเอซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่พบในเชื้อราโมแนสคัสคือ ซิตรินิน จากการศึกษาด้วยวิธีการเชิงคุณภาพคือ Nuclear Magnetic Resomance (NMR) และ mass spectroscopy ซิตรินินเป็นสารที่มีพิษต่อไตซึ่งผลิตได้จากเชื้อรา *M. purpureus* และ *M. ruber* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YES โดยให้ความเข้มข้นของซิตรินินเท่ากับ 270 และ 340 มิลลิกรัม/ลิตรตามลำดับ และจากการเลี้ยงเชื้อราทั้งสองชนิดนี้ลงในอาหารแข็ง (ข้าว) จะให้ความเข้มข้นของซิตรินินเท่ากับ 100 และ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักแห้งตามลำดับ เนื่องจากซิตรินินเป็นสารที่มีความเป็นพิษ จึงมีความจำเป็นที่ในการผลิตสารสีแดงจากการหมักเชื้อราโมแนสคัส เพื่อใช้เป็นสารเติมแต่งสีให้กับอาหาร ควรหลีกเลี่ยงไม่ให้มีซิตรินินเกิดขึ้น หลังการค้นพบนี้ทำให้หลายฝ่ายให้ความสนใจถึง การใช้สารสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัสในอาหารมากขึ้น

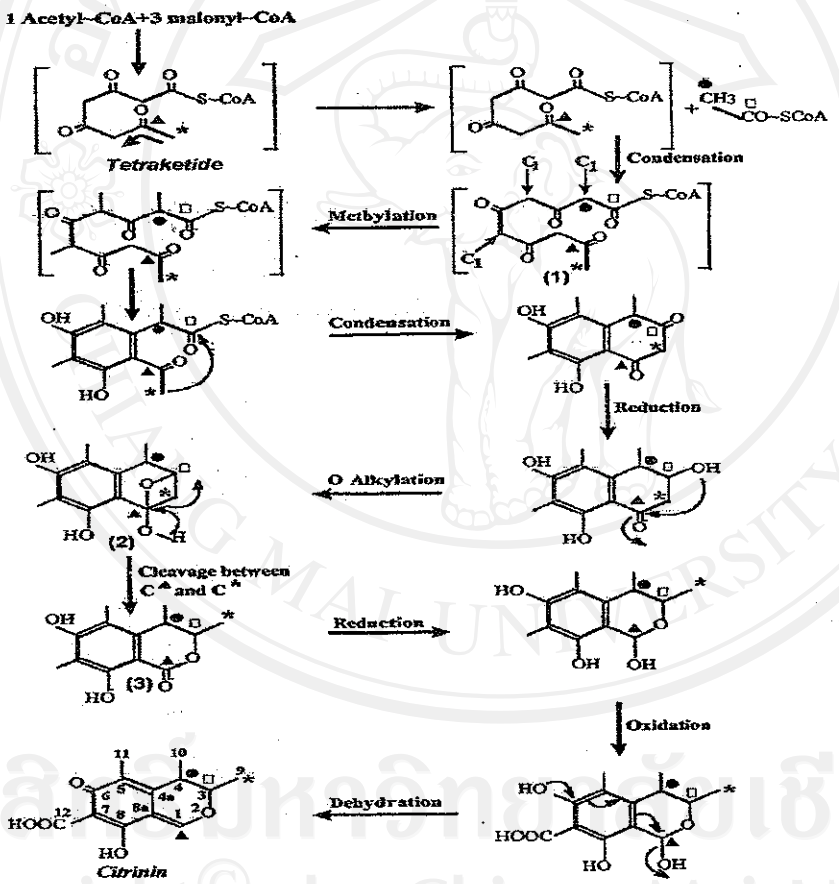
Blanc et al. (1995b อ้างในจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) พบว่าแหล่งไนโตรเจนในอาหารมีผลต่อการสร้างซิตรินินของเชื้อรา *Monascus ruber* โดยเมื่อแทนที่โมโนโซเดียมกลูตาเมท ซึ่งให้ปริมาณซิตรินินเท่ากับ 120 มิลลิกรัม/ลิตรนั้น ด้วยแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ คือ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ ยูเรีย และเมไธโอนีน พบว่าปริมาณซิตรินินลดลงเท่ากับ 100, 42, 17, และ 0 มิลลิกรัม/ลิตรตามลำดับ แต่ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปริมาณและวิธีการใช้แหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ ในการเติมในขั้นตอนการหมักอาหารเหลวเพื่อลดปริมาณซิตรินินต่อไป

Blanc et al. (1998 อ้างในศศิธร ใบผ่อง, 2546) ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ หรือการปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงเชื้อ ต่อการสร้างซิตรินินของเชื้อราโมแนสคัส โดยทดลองดังนี้ 1). โดยการเติมกรดไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ กรดคาโพรอิก กรดเฮกซาโนอิก และกรดออกทาโนอิก เป็นต้น พบว่ากรดไขมันทำให้ได้ปริมาณสารสีเพิ่มมากขึ้น แต่ยังคงมีการผลิตซิตรินินพร้อม ๆ กัน 2). โดยการควบคุมการเติมอากาศและการกวน พบว่าซิตรินินเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะการเติมอากาศมาก ๆ และมีอัตราเพิ่มมากกว่าการเพิ่มขึ้นของสารสี 3). โดยการเติมกรดมาลิกที่มีความเข้มข้นต่างกัน และยืนยันว่ากรดมาลิกมีผลทำให้การสังเคราะห์สารสีของเชื้อราโมแนสคัสลดลง แต่ไม่มีผลต่อการลดลงของซิตรินิน เนื่องมาจากกรดมาลิกเกิดขึ้นเพราะมีการลดลงของกลูตาเมท จึงทำการทดลองโดยเติมกรดอะมิโนอื่น ๆ แทนกลูตาเมทในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมฮีสติดีน ให้ปริมาณสีแดงเพิ่มขึ้นประมาณ 6 เท่า ในขณะเดียวกันไม่พบการสร้างซิตรินิน และพบว่าในระหว่างการนำฮีสติดีนไปใช้ เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้น และทำลายโครงสร้างของซิตรินินได้ ดังนั้นนอกจากการควบคุมสภาวะการเลี้ยงแล้ว ในกรณีที่เกิดซิตรินินขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จึงใช้วิธีการกำจัดซิตรินินโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

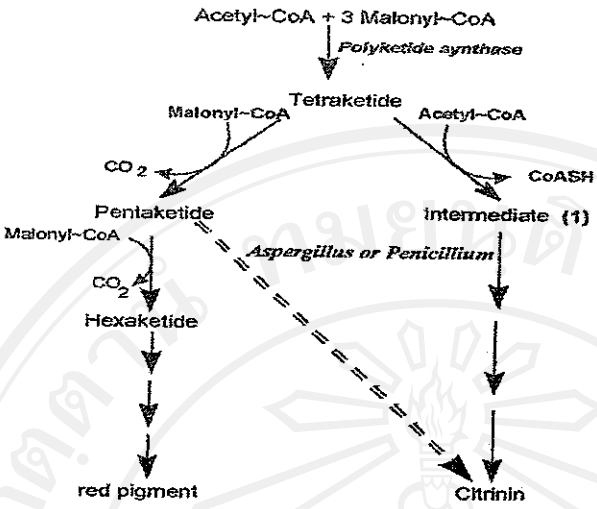
Hajjaj et al. (1999) ได้ศึกษากลไกการสังเคราะห์ซิตรินินทางชีวภาพ ในเชื้อรา *Monascus ruber* ATCC 96218 โดยวิเคราะห์จาก ^{13}C Nuclear Magnetic Resornance ทำการวัด [^{13}C] citrinin หลังจากเติม [^{13}C] acetate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการสังเคราะห์ซิตรินินของ *M. ruber* มีจุดเริ่มต้นจากเตตระคีไทด์ แทนที่จะมีจุดเริ่มต้นจากเพนตะคีไทด์ เหมือนกับการสังเคราะห์ซิตรินินในเชื้อราสกุล Penicillium และ Aspergillus กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินจากเชื้อราโมแนสคัสแสดงในภาพที่ 2.7 และ 2.8



ภาพที่ 2.7 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินของ *M. ruber*

ที่มา : Hajjaj H., et al. (1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2.8 การสังเคราะห์ซิตรินินและสารสีแดงของ *M. ruber*

(เส้นประ แสดงกลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน โดยเชื้อราในสกุล Aspergillus และ Penicillium)

ที่มา : Hajjaj H., et al. (1999)

Sabater-Villar et al. (1999) ศึกษาปริมาณซิตรินิน ในตัวอย่างข้าวแดงที่มีขายกันทั่วไป ซึ่งผลิตโดยบริษัทต่าง ๆ ในยุโรป จำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการ HPLCแบบใช้การเรืองแสงอัลตร้าไวโอเลต จากผลการตรวจพบว่า ข้าวแดงทุกตัวอย่างให้ความเข้มข้นของซิตรินินอยู่ในช่วง 0.2-17.1 ไมโครกรัม/กรัม นอกจากนี้ยังได้มีการทดสอบผลของ ตัวอย่างสารสกัดข้าวแดงเหล่านี้ ต่อการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการ Salmonella-microsome assay และ Salmonella-hepatocyte assay เปรียบเทียบกับซิตรินิน พบว่าซิตรินินและสารสกัดข้าวแดง 2 ตัวอย่าง เหนี่ยวนำให้เกิดผลบวกต่อการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการ Salmonella-hepatocyte assay จากการใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA-98 อย่างไรก็ดีไม่พบการกลายพันธุ์เกิดขึ้น จากการตรวจด้วยวิธีการ Salmonella-microsome assay จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ซิตรินินจำเป็นต้องมีกลไกการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพที่ซับซ้อน ในระดับเซลล์ในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์

Xu et al. (1999 อ้างในจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) ศึกษาถึงปริมาณซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดงด้วยวิธีการ HPLC พบว่าข้าวจำนวน 32 ตัวอย่างจากทั้งหมด 35 ตัวอย่าง มีปริมาณซิตรินินอยู่ในช่วง 0.2-140 ppm และพบว่าเชื้อรา *M. anka* และ *M. ruber* เป็นสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณซิตรินินสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YES นอกจากนี้พบว่าเมื่อเติมโมโนโซเดียมกลูตามเมท หรือฮีสติดีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณซิตรินินในน้ำหมักของการหมักเชื้อรา*M. nber* JH-2 ในอาหารเหลว และพบว่าปริมาณซิตรินินจากการหมักเชื้อราในอาหารแข็ง (ข้าว) จะสูงกว่าการหมักในอาหารเหลวมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Hajjaj et al. (2000a) ศึกษาอิทธิพลของกรดไขมันที่มีสายขนาดกลาง (medium-chain fatty acids) ต่อการผลิตซิตรินินของเชื้อรา *Monascus ruber* ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 5 หรือ 20 กรัม/ลิตร และกลูตาเมท 5 กรัม/ลิตร เชื้อรา *M. ruber* มีการสร้างสารสีแดงที่ละลายน้ำได้ร่วมกับซิตรินิน ในการศึกษานี้ได้ตัดกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีสายขนาดกลางออก โดยการเติมกรดไขมันดังกล่าวลงในอาหารที่เลี้ยงเชื้อเลย พบว่ากรดไขมันที่มีสายคาร์บอนซึ่งประกอบด้วยคาร์บอน 6-18 อะตอม โดยเฉพาะกรดออกทาโนอิก แสดงถึงการกระตุ้นให้มีการผลิตสารสีแดงอยู่ในช่วง 30-50% โดยไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกริยา trans-esterification ของกรดไขมันนี้กับโครงสร้าง chromophore 30-40% ของปริมาณเริ่มต้นของกรดไขมันดังกล่าว ถูกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อในรูปเมธิลคีโตนที่มีคาร์บอนอะตอมต่อหน่วยสั้นลง เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งเมื่อพบว่ากรดไขมันเหล่านี้ หรือเมธิลคีโตนที่เกิดจากมันเป็นสาเหตุทำให้เกิดการรีดิวซ์อย่างรุนแรง หรือเกิดการยับยั้งการสร้างซิตรินินของ *M. ruber* อย่างสมบูรณ์เมื่อเติมสารดังกล่าวนี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการสลายตัวของซิตรินินซึ่งเพิ่งสังเคราะห์ขึ้น (หรือมีการสลายตัวของสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์ซิตรินิน) ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของ peroxisome ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยกรดไขมันที่มีสายขนาดกลางหรือเมธิลคีโตน

Hajjaj et al. (2000b) ศึกษาการผลิตสารสีแดงและซิตรินินในการเลี้ยงเชื้อ *M. ruber* ในอาหารเหลวสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสและกลูตาเมท พบว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด การผลิตทั้งสารสีแดงและซิตรินิน จะมีขึ้นในช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโต เหมือนกับการผลิตสารเมทาบอไลต์ปฐมภูมิ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจนเกินพอ การผลิตซิรินินจะเป็นรูปแบบของการผลิตสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิ เนื่องจากมีการผลิตซิตรินินส่วนใหญ่ในช่วงที่เชื้อมีการเจริญคงที่ แต่ในทางตรงกันข้ามการผลิตสารสีมีการลดลงอย่างรวดเร็วตลอดช่วงการเพาะเลี้ยงเชื้อ กรดอินทรีย์ที่มีการผลิตขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อคือ L-malate และ succinate มีผลยับยั้งอย่างอ่อนต่อการผลิตสารสี โดยที่ไม่มีผลต่อการผลิตซิตรินิน

Wild (2000 อ้างในจุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546) พบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* DSM 1379 ในข้าว จะมีปริมาณซิตรินินจากการตรวจด้วยวิธีการ HPLC อยู่ในช่วง 600-800 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในขณะที่เมื่อตรวจวัดปริมาณซิตรินินจากตัวอย่างข้าวแดงตามท้องตลาด พบว่ามีปริมาณซิตรินินน้อยกว่า 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เนื่องจากมีการใช้สารสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัส ในการให้สีแดงกับผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไส้กรอก ดังนั้นจึงควรมีการให้ความสนใจถึงความปลอดภัย ในการใช้สารสีแดงมากขึ้นโดยเฉพาะประเทศเยอรมัน

Schneweis et al. (2001) ทำการศึกษาธัญพืชหมัก (หญ้าหมักและต้นข้าวโพดหมัก) ทั้งหมด 233 ตัวอย่าง พบเชื้อรา *Monascus ruber* จำนวน 43 ตัวอย่าง ซึ่งมีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง $1x10^3$ ถึง $9x10^6$ cfu/

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรัม (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $2x10^5$ cfu/กรัม) ตรวจพบ monacolin K_L และ hydroxy acid monacolin K_A ด้วยวิธีการ liquid chromatography และ mass spectrometry ในธัญพืชหมักจำนวน 45 และ 50 ตัวอย่าง โดยสารทั้งสองชนิดมีปริมาณอยู่ในช่วง 25-15,600 และ 28-65,400 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ มีการตรวจหาซิตรินินในตัวอย่างธัญพืชหมักจำนวน 14 ตัวอย่างด้วยวิธีการ HPLC ให้ความเข้มข้นของซิตรินินอยู่ในช่วง 2.4-4.2 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ความเข้มข้นของซิตรินินที่ได้ค่อนข้างต่ำ และมีความเป็นพิษที่ยังไม่สามารถคาดเดาได้

Chen et al. (2001 อ้างในศศิธร ใบผ่อง, 2546) ศึกษาการสร้างสารสีเหลืองจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ YLC1 ซึ่งได้จากการปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อให้สร้างสารสีเหลืองและลดการสร้างซิตรินิน โดยเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน และใช้ RSM ในการสร้างสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และเกลือต่าง ๆ สภาวะการเลี้ยงภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร วัดปริมาณสีจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับที่ 500 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC ผลที่ได้พบว่าสภาวะการเลี้ยงเชื้อ, ค่า pH, และ PO_2 มีผลต่อการสร้างสารสีเหลือง และซิตรินิน และพบว่าผงข้าว (rice powder) และกลูตาเมท เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ดีที่สุดตามลำดับ สำหรับปริมาณสีเหลืองที่ผลิตได้เท่ากับ 40 ยูนิต และคุณภาพสีคือ 6-10 : 1 (สีเหลืองวัดที่ 400 นาโนเมตร : สีแดงวัดที่ 500นาโนเมตร) และตรวจพบซิตรินินไม่เกิน 5 มิลลิกรัม/ลิตร

Wild et al. (2002) ค้นพบสารเมทาบอไลต์ชนิดใหม่ในข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* DSM 1379 ด้วยวิธีการ HPLC แบบใช้การดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต จากผลการตรวจพบสารสี 6 ชนิด คือ สารสีแดง (rubropunctamine และ monascorubramine), สารสีส้ม (rubropunctatin และ monascorubrin), และสารสีเหลือง (monascin และ ankaflavin) พบพีคของซิตรินินที่ค่า retention time 11.8 นาที โดยคำนวณปริมาณซิตรินินได้เท่ากับ 0.19 มิลลิกรัม/กรัม จากการให้ความร้อนแก่ข้าวแดงในน้ำ (ในอัตราส่วน 1 : 2) เป็นเวลา30นาทีที่อุณหภูมิ 90°Cพบว่าระดับความสูงพีคของซิตรินิน, monascorubrin, และ rubropunctatin ลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ปริมาณซิตรินินเหลือเพียง 0.3 มิลลิกรัม/กรัม) แต่พีคของสารชนิดใหม่กลับมีความสูงเพิ่มมากขึ้นโดยมีปริมาณเท่ากับ 5 มิลลิกรัม/กรัม จากการนำสารสกัดข้าวแดงที่ผ่านการให้ความร้อนสูง มาตรวจสอบด้วยวิธีการ mass spectrometry ที่ให้ความคมชัดสูง และ NMR พบว่าสารชนิดใหม่ดังกล่าวคือ โมแนสโคดิโลน ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง $C_{15}H_{12}O_4$ ประกอบด้วย pyrone ring ที่มีหมู่ propenyl aromatic ring และหมู่ γ–lactone

Wang et al. (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ต่างกันและกรดไขมันหรือน้ำมัน ต่อการผลิตโมนาโคลินเค ซิตรินิน และ GABA ของเชื้อรา *Monascus purpureus* NTU 601 จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเติมเอทานอลเข้มข้น 0.5% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ การผลิตซิตรินินลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จาก 813 ppb เป็น 561 ppb ในขณะที่การผลิตโมนาโคลินเคเพิ่มขึ้นจาก 1,060 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็น 7,453 มิลลิกรัม/กิโลกรัม นอกจากนี้มีการ ใช้ RSM ในการหาสภาวะการณ์เลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ต่อการผลิตโมนาโคลินเค ซิตรินิน และ GABA โดยใช้แผนการทดลองแบบ central composite design 3 ระดับ เมื่อข้าวจำนวน 500 กรัมถูกใช้เป็นอาหารแข็ง โดยมีน้ำ 120 มิลลิลิตร และเอทานอลเข้มข้น 0.3% การผลิตโมนาโคลินเคที่อุณหภูมิ 30°C เพิ่มขึ้นจาก 136 มิลลิกรัม/กิโลกรัมเป็น 530 มิลลิกรัม/กิโลกรัม การผลิต GABA เพิ่มขึ้นจาก 1,060 มิลลิกรัม/กิโลกรัมเป็น 5,004 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และการผลิตซิตรินินลดลงจาก 813 ppb เป็น 460 ppb

Pereira et al. (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิ และจลนศาสตร์ในการเจริญของเชื้อ *Monascus purpureus* CCT 3802 ในอาหารเหลว จากผลการศึกษาพบว่า อัตราจำเพาะในการใช้ออกซิเจน และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชุดมีความสัมพันธ์กันโดยตรง ค่าต่ำสุดของอัตราจำเพาะในการใช้ออกซิเจนสูงสุด (q_{O2max} อยู่ที่ประมาณ 2.45 มิลลิโมลของออกซิเจน/กรัมของเซลล์/ชั่วโมง) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ (เท่ากับ 10%) มีความสัมพันธ์กับค่าต่ำสุดของการผลิตสารสีแดง และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ (เท่ากับ 0.11 ต่อชั่วโมง) ภายใต้สภาวะที่มีค่าอัตราจำเพาะในการใช้ออกซิเจนสูงสุดมาก ๆ อัตราการผลิตสารสีแดงจะเพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่าการผลิตซิตรินิน และสารสีเหลืองมีการเพิ่มขึ้นในสัดส่วนที่สูงกว่า

Li F., et al. (2003) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตซิตรินินในเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราที่ผลิตซิตรินินได้น้อยหรือไม่ผลิตเลย โดยเลือกเชื้อราโมแนสคัสจำนวน 25 สายพันธุ์ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ในการศึกษาสภาวะการเลี้ยง และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตซิตรินิน ผลที่ได้จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเชื้อราโมแนสคัสทุกสายพันธุ์มีการผลิตซิตรินินบนข้าว โดยมีระดับอยู่ในช่วง 0.28-2,458.80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในขณะที่มีเชื้อราโมแนสคัสเพียง 30 สายพันธุ์ (คิดเป็น 85.71% ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่นำมาใช้) ให้ซิตรินินจากการเลี้ยงในอาหารเหลว โดยมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.09-55.65 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งต่ำกว่าในข้าว นอกจากนี้การผลิตสารสีแดงในข้าวคิดเป็น 93 เท่าของการผลิตสารสีแดงในอาหารเหลว และได้เชื้อราโมแนสคัสเพียงสายพันธุ์เดียวที่ให้ค่าสีสูงสุด (เท่ากับ 1,134 ยูนิต/กรัม) แต่ผลิตซิตรินินในระดับต่ำมากจากการหมักบนข้าว

Miyashira et al. (2003) ศึกษาจลนศาสตร์ของการผลิตสารเมทาบอไลต์ทุติยภูมิของ *Monascus ruber* บนข้าว ภายใต้ความผันแปรของความเข้มข้นของเซลล์ *M. ruber* เริ่มต้น จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อความชื้นของข้าวซึ่งหมักด้วยเชื้อรา *M. ruber* ทุกการทดลองเพิ่มขึ้นถึง 65% และข้าวซึ่งหมักด้วยเซลล์ของ *M. ruber* เริ่มต้นจำนวน 0.325 มิลลิกรัม มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 2.6 ยูนิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และข้าวซึ่งหมักด้วยเซลล์ของ *M. ruber* เริ่มต้นอีก 3 การทดลองที่เหลือ มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นถึง 1.8 ± 0.17 ยูนิต ผลการวิเคราะห์ปริมาณซิตรินิน และเมวิโนลินในข้าว ไม่ได้แสดงถึงความแตกต่างระหว่างสภาวะการถ่ายเชื้อลงในข้าว (ปริมาณซิตรินินและเมวิโนลินเท่ากับ 0.02 และ 0.08 กรัม/กรัมของผลิตภัณฑ์แห้งตามลำดับ ณ จุดสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ) โดยปริมาณสูงสุดของซิตรินิน (ในวันที่ 21 ของการเลี้ยงเชื้อ) มีความสัมพันธ์กับการผลิตสารสีแดงที่สูงขึ้น (ปริมาณซิตรินินและสารสีแดงเท่ากับ 0.66 และ 0.47 มิลลิกรัม/กรัมของผลิตภัณฑ์แห้ง) โดยสารสีแดงนี้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.55 ยูนิต จากนั้นความเข้มข้นของสารสีแดงจะคงที่หลังวันที่ 21 ของการเลี้ยงเชื้อบนข้าว ส่วนซิตรินินมีการลดลง

Wang et al. (2005) ศึกษาความผันแปรของการผลิตซิตรินินจากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยได้มีการตรวจหาซิตรินินในสายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อราโมแนสคัสหลายชนิดด้วยวิธีการ HPLC จากการศึกษาเชื้อราโมแนสคัส 8 ชนิด จำนวน 23 สายพันธุ์พบว่า สายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสเหล่านี้มีการผลิตซิตรินิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YES ในปริมาณ 65-480 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณซิตรินินสูงสุด (480 มิลลิกรัม/ลิตร) มาจากเชื้อ *Monascus pallens* IMI 356820 ส่วนปริมาณซิตรินินต่ำสุด (65 มิลลิกรัม/ลิตร) มาจากเชื้อ *M. ruber* IFO 8201 ผลการศึกษาดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่า การผลิตซิตรินินเป็นอิสระจากการผลิตสารสีในเชื้อราโมแนสคัสชนิดต่าง ๆ และควรได้มีการตรวจวัดระดับความปลอดภัย เมื่อมีการนำสารสีหรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ จากเชื้อราโมแนสคัสมาใช้ประโยชน์

Chen and Hu (2005) ได้คัดเลือกใช้เชื้อรา *Monascus spp.* M12 (เป็นสายพันธุ์หนึ่งของ *Monascus pilosus* Sato) ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างข้าวแดงของจีน มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยนำสปอร์ของเชื้อดังกล่าวมาผ่านการฉายรังสีอัลตร้าไวโอเลต การฉายรังสี $^{60}Co\gamma$ และการใช้ไดเมธิลซัลเฟตตามลำดับ ได้เชื้อราสายพันธุ์กลายคือ *Monascus spp.* M12-69 จากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักข้าวแดงด้วย *Monascus spp.* M12-69 ณ สภาวะที่เหมาะสม ความเข้มข้นของโมนาโคลินแคและซิตรินินในข้าวแดงที่ผ่านการอบแห้ง ณ อุณหภูมิ 50°C จนมีน้ำหนักแห้งคงที่เท่ากับ 2.52 มิลลิกรัม/กรัม และ 0.13 นาโนกรัม/กรัมตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่า *Monascus spp.* M12-69 เป็นสายพันธุ์ที่น่าจะนำไปใช้ผลิตข้าวแดง ที่ให้ปริมาณโมนาโคลินแคสูงและให้ปริมาณซิตรินินต่ำๆ

เรณู ปิ่นทอง และจุลยุทธ บุญสร้างสม (2546) ศึกษาถึงผลกระทบของสายพันธุ์เชื้อรา *M.purpureus* และชนิดของข้าว ต่อค่าสีแดงและปริมาณซิตรินิน พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. purpureus* และชนิดของข้าว มีผลต่อค่าสีแดงและปริมาณซิตรินินในข้าวแดง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยลำดับการสร้างสีแดงของสายพันธุ์เชื้อราจากสูงไปต่ำคือ *M. purpureus* ATCC 16365, *M. purpureus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

DMKU, *M. purpureus* FTCMU, และ *M purpureus* BCC 6131 ตามลำดับ ในขณะที่ลำดับการสร้างซิตรินินของสายพันธุ์เชื้อราจากสูงไปต่ำคือ *M. purpureus* FTCMU, *M. purpureus* ATCC 16365, *M. purpureus* DMKU, และ *M. purpureus* BCC 6131 ตามลำดับ ซึ่งข้าวแดงที่หมักโดยเชื้อรา *M. purpureus* ATCC 16365 ในข้าวหอมมะลิให้ค่าสีแดงสูงสุดเท่ากับ632ยูนิต/กรัม ในขณะที่ข้าวแดงที่หมักโดยเชื้อรา *M. purpureus* FTCMU ในข้าวซ้อมมือและ *M. purpureus* BCC 6131ในข้าวหอมมะลิ ให้ปริมาณซิตรินินสูงสุดและต่ำสุดเท่ากับ 4,400 และ 105 ppm ตามลำดับ โดยข้าวเจ้าพิจิตรเป็นชนิดข้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดง เนื่องจากให้สีแดงของข้าวที่สูงกว่า 100 ยูนิต/กรัม จากการหมักโดยเชื้อราทั้งสี่สายพันธุ์นี้

เรณู ปิ่นทอง และศศิธร ใบผ่อง (2546) ศึกษาถึงผลของโมโนโซเดียมกลูตาเมทและL-histidine ต่อการผลิตสารสีแดงและซิตรินินในข้าวแดงโดยเชื้อรา *M. purpureus* FTCMU การทดลองผลิตข้าวแดงรวม 3 กรรมวิธี โดยกรรมวิธีที่ 1 เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมท 12.5 กรัม/กิโลกรัม กรรมวิธีที่ 2 เติม L-histidine 12.5 กรัม/กิโลกรัม และกรรมวิธีที่ 3 ไม่มีการเติมกรดอะมิโนใด ๆ พบว่าค่า pH และปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีแนวโน้มลดลงในข้าวแดงที่ผลิตจากทุกกรรมวิธี ส่วนปริมาณไนโตรเจนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และสัมพันธ์กับปริมาณสารสีแดงที่เพิ่มสูงขึ้น ข้าวแดงที่มีการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมทให้ปริมาณสีแดง 126.00 ยูนิต/กรัม และซิตรินิน 900 ppm ข้าวแดงที่มีการเติม L-histidine ให้ปริมาณสีแดง 150.45 ยูนิต/กรัม และซิตรินิน 450 ppm และข้าวแดงที่ไม่ได้มีการเติมกรดอะมิโนให้ปริมาณสีแดง 207.85 ยูนิต/กรัม และซิตรินิน 1,190 ppm ดังนั้นการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมทหรือL-histidine ลงในข้าวแดง มีผลต่อการลดทั้งปริมาณซิตรินินและสารสีแดงที่สร้างโดยเชื้อรา *M. purpureus* FTCMU

อภิรักษ์ เพียรมงคล และคณะ (2549) ศึกษาผลของสายพันธุ์เชื้อรา *Monascus purpureus* จำนวน 5 สายพันธุ์คือ *M. purpureus* ATCC 16365, BCC 6131, DMKU, CMU 3385, และ *M. ruber* TISTR 3006 ต่อคุณภาพของอังคัก โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนลูกเดือย พบว่าเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 มีการเจริญสูงสุดโดยให้ปริมาณกลูโคซามีน 2.399 ppm ส่วน *M. purpureus* ATCC 16365 มีการเจริญต่ำที่สุดโดยให้ปริมาณกลูโคซามีน 0.3612 ppm สำหรับการตรวจหาซิตรินินพบว่าเชื้อรา *M. purpureus* DMKU ให้ปริมาณซิตรินินต่ำสุดเท่ากับ 0.0056 ppm ส่วน *M. ruber* TISTR 3006 ให้ปริมาณซิตรินินสูงสุดเท่ากับ 0.2747 ppm ผลการตรวจหาเมวิโนลินพบว่าเชื้อรา *M. purpureus* DMKU ให้ปริมาณเมวิโนลินสูงสุดเท่ากับ 24.6546 ppm และ *M. purpureus* ATCC 16365 ให้ปริมาณเมวิโนลินต่ำสุดเท่ากับ 14.3869 ppm จากการตรวจปริมาณสีเหลืองพบว่าเชื้อรา*M. purpureus* ATCC 16365 ให้สีเหลืองสูงสุดโดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 13.4477 ส่วน *M. ruber* TISTR 3006 ให้สีส้มและสีแดงสูงที่สุดโดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 10.8182 และ 9.5575 ตามลำดับ จากการตรวจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณความชื้นในอังคักพบว่า อังคักที่ผลิตจากเชื้อรา *M. ruber* TISTR 3006 มีปริมาณความชื้นต่ำสุดเท่ากับ 78.1670% ในขณะที่อังคักที่ผลิตจาก *M. purpureus* ATCC 16365 และ BCC 6131 ให้ปริมาณความชื้นสูงที่สุด (เท่ากับ 84.3808 และ 84.0933% ตามลำดับ)

2.9 การศึกษาความเป็นพิษของสารทดสอบโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (อ้างในกัลยาณี จิรศรี-พงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนกิจ, 2547)

การประเมินความปลอดภัยของสารที่ใช้เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ในยา เครื่องสำอาง สารปรุงแต่งอาหาร ยาฆ่าแมลง และสารเคมีทางอุตสาหกรรม ก็มักทำโดยการตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารเหล่านี้กับสิ่งมีชีวิต ในปัจจุบันมีการนำเซลล์สัตว์มาใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้น ซึ่งมีผลทำให้เซลล์สัตว์เป็นระบบการตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ยอมรับกันมากขึ้น โดยเฉพาะในงานทดสอบการรักษาโรคมะเร็งทางเคมีหรือมะเร็งเคมีบำบัด (cancer chemotherapy) และใช้ในงานวิเคราะห์ความปลอดภัยของสารเคมีต่าง ๆ ต่อเซลล์ รวมทั้งใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารเคมีในด้านการเกิดการกลายพันธุ์ (mutagenicity) การเกิดมะเร็ง (carcinogenicity) การเกิดความเป็นพิษแบบเรื้อรัง (chronic toxicity) และการเกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) เป็นต้น

2.9.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) เป็นเหตุการณ์ที่ซับซ้อนโดยมีหลายปัจจัยเกี่ยวข้อง เช่น การเป็นสารพิษของสารที่ทดสอบ ชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยง (เซลล์ไลน์) ที่นำมาทดสอบ การตอบสนองของเซลล์ไลน์ในวิธีการที่ใช้วิเคราะห์ความเป็นพิษ และรูปแบบหรือกลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษ ดังนั้นความเป็นพิษต่อเซลล์จึงขึ้นอยู่กับลักษณะที่ศึกษาคือ เซลล์ต่างชนิดกันอาจตอบสนองแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ไม่เหมือนกัน อีกทั้งระดับความเป็นพิษอาจแตกต่างกัน เช่น เซลล์อาจถูกทำให้ตายหรือถูกทำให้มีกระบวนการเมทาบอลิซึมเปลี่ยนแปลงไป วิธีการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงต้องเป็นวิธีที่สะท้อนให้ผลที่ต้องการได้ถูกต้อง สารก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxins) อาจให้ผลแบบผันกลับ (reversible) หรือไม่ผันกลับ (irreversible effect) และการออกฤทธิ์ให้ได้ผลดังกล่าวอาจเกิดขึ้นทันที หรือใช้ระยะเวลานานเป็นสัปดาห์ ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์จึงแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบใหญ่ ๆ คือ

1. ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดจากการทำลายทางกายภาพเคมี (physical-chemical damage) ที่มีผลให้เซลล์ตายทันที

2. ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ออกฤทธิ์ต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ และมักออกฤทธิ์ในเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือเป็นวัน และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการแบ่งตัวเช่น การเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งไม่ปรากฏให้เห็นการลดลงของความมีชีวิตของเซลล์ได้อย่างชัดเจน

ดังนั้นในการวิเคราะห์ความเป็นพิษด้วยเซลล์สัตว์จึงต้องทราบข้อมูลพื้นฐานเช่น คุณสมบัติของสารขณะสัมผัสกับเซลล์ทดสอบ กลไกการเปลี่ยนแปลงของสารในร่างกาย ชนิด และปริมาณของเซลล์ที่เป็นเซลล์เป้าหมาย ความเข้มข้นของสารและระยะเวลาในการสัมผัสจริงในธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อให้การวิเคราะห์ใกล้เคียงกับสภาวะความเป็นจริงในสิ่งมีชีวิต และได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ และเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ได้ โดยวิธีการวิเคราะห์ควรมีลักษณะดังนี้

1. ระบบวิธีวิเคราะห์ต้องให้กราฟความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อปริมาณสารทดสอบ (dose response curve) ที่เป็นผลซ้ำของการวิเคราะห์ (reproducible) โดยข้อมูลจากผลซ้ำควรมีความแตกต่างกันน้อยมากในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา

2. ช่วงวิกฤตที่เลือกต่อการตอบสนอง (selected response criterion) ต้องมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณเซลล์

3. ข้อมูลที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อปริมาณสารทดสอบต้องมีความสอดคล้อง และสามารถทำนายผลของสารทดสอบชนิดเดียวกันในสัตว์ทดลองได้

2.9.2 ประโยชน์และข้อจำกัดของการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง มีประโยชน์คือ ทำให้สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมที่ทำการวิเคราะห์ได้เช่น ความเข้มข้นของสารพิษ และระยะเวลาที่สัมผัสกับสารพิษ ซึ่งในเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถควบคุมได้แม่นยำมากกว่าในสัตว์ทดลอง (แม้ว่าสารทดสอบบางชนิดอาจจะไม่มีความเสถียร) เนื่องจากในสัตว์ทดลองมีระบบหมุนเวียนโลหิตและระบบขับถ่ายกำจัดสารพิษหรือสารทดสอบ จึงทำให้ควบคุมปัจจัยที่ศึกษาได้ยาก การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมีความประหยัดมากกว่าการใช้สัตว์ทดลอง และการเกิดแรงกดดันทางศีลธรรมที่ต้องการให้มีการใช้สัตว์ทดลองลดลง การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงยังเอื้อประโยชน์ต่อการเก็บตัวอย่างได้สม่ำเสมอ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานทดสอบสารปริมาณมาก ๆ หรือสารหลาย ๆ ชนิดได้ (large scale screening)

อย่างไรก็ดีเซลล์เพาะเลี้ยงไม่ได้อยู่ในสภาวะแวดล้อมจริงตามธรรมชาติ แต่เป็นสภาวะการทดลองที่มีเซลล์ชนิดเดียว ทำให้ไม่สามารถศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงของยา (pharmacokinetics) ตั้งแต่การรับยา ระยะเวลาและความเข้มข้นของยาที่ออกฤทธิ์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของยา กระบวนการเมทาบอลิซึม การแทรกซึมของยาเข้าสู่เนื้อเยื่อ การกำจัดยาออกจากเนื้อเยื่อ และการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กำจัดยาออกจากร่างกาย สารที่ไม่เป็นพิษส่วนมากจะมีความเป็นพิษหลังจากถูกเมทาบอไลซ์ที่ตับแล้ว ในขณะเดียวกันสารที่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงส่วนมาก จะถูกทำให้หมดความเป็นพิษไปได้โดยเอนไซม์จากตับ ดังนั้นในการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ต้องมีการแสดงให้เห็นว่าสารพิษหรือสารทดสอบดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ในสภาพเพาะเลี้ยง (in vitro) ในรูปแบบเดียวกับการเข้าสู่เซลล์เมื่ออยู่ภายในร่างกาย (in vivo) และอาจมีความจำเป็นในการกำจัดเอนไซม์จากตับให้หมดไปก่อน ในการทดสอบสารเป้าหมายกับเซลล์เพาะเลี้ยง หรืออาจแก้ไขโดยการใช้เซลล์ทดสอบที่มีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ในร่างกาย การเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ activated hepatocytes หรือใช้เซลล์ปฐมภูมิ เป็นต้น การตอบสนองต่อสารพิษของเซลล์เพาะเลี้ยงอาจวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต หรือการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ ในขณะที่ปัญหาหลักของเซลล์ที่อยู่ภายในร่างกาย ในการตอบสนองต่อสารพิษคือปฏิกริยาการอักเสบเฉพาะบริเวณ หรือการตอบสนองของร่างกาย (เช่น การมีไข้, เส้นเลือดขยายตัว) จึงอาจแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่พัฒนามาจากเซลล์ของอวัยวะที่ต้องการศึกษา และมีการให้ฮอร์โมนที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์นั้น ๆ เพื่อลดปัญหาการขาดปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ชนิดอื่นที่มีในระบบอวัยวะหรือในร่างกายสัตว์ (Freshney, 2000)

2.9.3 วิธีการวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์ความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. Short-Term Assay เป็นวิธีการให้ผลกับสารทดสอบอย่างฉับพลัน หรือมีการตอบสนองต่อสารทดสอบภายในระยะเวลาสั้น ๆ เช่น มีการตอบสนองภายในระยะเวลา 4-24 ชั่วโมง (immediate or short term response) นิยมใช้วัดสัดส่วนความมีชีวิตของเซลล์ หลังจากผ่านกระบวนการซึ่งอาจก่อการบาดเจ็บของเซลล์ เช่น การบดแยกเซลล์ในการทำเซลล์ปฐมภูมิ และการละลายเซลล์จากสภาพแช่แข็ง วิธีการนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับเซลล์ได้ทุกชนิด ในการวิเคราะห์หาตัวยาที่ออกฤทธิ์ เนื่องจากการทดสอบโดยวิธีการนี้ไม่ต้องการการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีการเจริญ ดังนั้นความสามารถของเซลล์จึงไม่ใช่ข้อจำกัด และปัญหาการคัดเลือกโคลน (clone) ก็ลดลง วิธีการทดสอบแบบนี้จึงสะดวกทำได้ง่าย และให้ผลรวดเร็ว โดยการตรวจดูผลของสารทดสอบที่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งใช้ในการบ่งบอกความเป็นพิษต่อเซลล์ แล้วใช้สีทดสอบเช่น trypan blue หรือ diacetyl fluorescein เพื่อดูการย้อมติดสีของเซลล์ ในการจำแนกเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และเซลล์ที่ตายแล้วออกจากกัน

2. Long-Term Assay สารพิษหรือสารทดสอบบางชนิดไม่ได้มีฤทธิ์ทำให้เซลล์ตาย แต่อาจเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเซลล์ หรือรบกวนวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle) ซึ่งไปมีผลทำให้รูปแบบการเจริญของเซลล์ผิดไป ผลที่เกิดขึ้นนี้สามารถบ่งบอกได้ โดยดูการเปลี่ยนแปลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกี่ยวกับกระบวนการหายใจ การเกิดไกลโคไลซิส การออกฤทธิ์ของเอนไซม์ (enzyme activity) วงจรชีวิตของเซลล์ ความสามารถสร้างโคโลนี และผลของ DNA หรือพันธุกรรม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสิ่งเหล่านี้ในเซลล์ สามารถใช้บ่งบอกการตอบสนองของเซลล์ต่อสารพิษได้ การตรวจความอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) มักทำได้ค่อนข้างยาก แต่ถ้าหากเปรียบเทียบความอยู่รอดของเซลล์เป็นความสามารถสร้างโคโลนีของเซลล์ ก็อาจใช้วิธีการ colony forming efficiency เป็นวิธีวิเคราะห์ได้ โดยเฉพาะเมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นสามารถแบ่งตัวต่อไปได้อีกอย่างน้อย 2-3 ครั้ง หลังจากที่นำสารทดสอบออกไป ดังนั้น long-term assay จึงเป็นวิธีการที่วัดผลของสารพิษในระยะยาวเช่น ระยะเวลานาน 4-7 วัน ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถวิเคราะห์การออกฤทธิ์ของสารแบบผันกลับ และใช้บ่งบอกถึงความสามารถฟื้นกลับคืนได้ของเซลล์ โดยการวัดความสามารถในการเจริญและการเกิดเมทาบอลิซึมของประชากรเซลล์ทั้งหมด

ข้อควรพิจารณาเกี่ยวกับวิธีการวิเคราะห์

(1). การดูดซับที่ไม่ต้องการ สารประกอบบางชนิดอาจจับบนตัวกรองที่ผ่านการทำไร้เชื้อทั่ว ๆ ไปของเซลลูโลสอะซิเตตหรือ เซลลูโลสไนเตรท ดังนั้นการทำไร้เชื้อด้วยตัวกรอง จะต้องทำภายใต้สภาวะควบคุม และตรวจสอบการสูญเสียสารทดสอบจากการกรองด้วยการใช้ตัวกรองที่มีความสามารถจับโปรตีนได้น้อยจึงมักเป็นที่ต้องการ ในกรณีสารประกอบบางชนิดอาจจับกับโปรตีนในซีรั่ม ควรพิจารณาใช้อาหารที่ปราศจากซีรั่มในการทดสอบ

(2). การตกตะกอน การตกตะกอนของสารทดสอบทำให้การเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) ไม่ได้ค่าที่ถูกต้องและมีค่าลดลง ซึ่งอาจมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ ดังนั้นจึงควรเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเช่น DMSO เอทานอล และโพรพิลีน-ไกลคอล และควรใช้ที่ความเข้มข้นซึ่งไม่ก่อความเป็นพิษต่อเซลล์

(3). การกระตุ้นฤทธิ์สารเคมี สารหลายชนิดไม่ได้เป็นพิษโดยตัวมันเอง แต่อาจก่อความเป็นพิษเมื่อได้รับการกระตุ้นเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

(4). ความเข้มข้นของสารละลาย ในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารทดสอบครั้งแรก ควรใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบเป็นช่วงกว้าง และมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ เช่น 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, และ 10^{-3}โมลาร์ แล้วค่อยใช้ความเข้มข้นในช่วงแคบ ๆ จากผลการทดสอบครั้งแรกมาทำการทดสอบครั้งต่อไป

(5). ช่วงระยะเวลาการได้รับสารทดสอบ โดยปกติแล้วการบ่มเซลล์กับสารทดสอบ จะต้องทำทันทีหลังการใช้เอนไซม์แยกเซลล์จากชิ้นเนื้อเยื่อ หรือหลังจากการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เกาะกับพื้นผิวโดยการทำ trypsinization แต่เซลล์บางชนิดอาจมีความไวต่อสารทดสอบเปลี่ยนไปได้เช่น หลังผ่านการใช้เอนไซม์ (enzymatic treatment) และไม่อาจกลับคืนสู่สภาพเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหมือนก่อนการทำ trypsinization จนกระทั่งเวลาผ่านไป หลังการสัมผัสกับเอนไซม์เป็นเวลานาน ประมาณ 12 ชั่วโมง หากเป็นเช่นนี้การทดสอบต้องรวมเวลาดังกล่าวอยู่ในระยะเวลาบ่มด้วย นอกจากนี้ค่า pH ในช่วงเวลาการบ่มก็มีความสำคัญเช่นกัน เพราะค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป สามารถทำให้การเจริญของเซลล์เปลี่ยนไปได้ โดยเฉพาะค่า pH ที่เป็นด่างสามารถลดความมีชีวิตของเซลล์ลงอย่างชัดเจน ช่วงระยะเวลาการบ่มยังขึ้นอยู่กับ คุณสมบัติการละลายของสารทดสอบที่ให้สารละลายที่เป็นพิษ หากสารสามารถละลายและออกฤทธิ์เร็ว การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสามารถให้ผลได้ภายในเวลาการบ่มนาน 1 ชั่วโมง ส่วนสารทดสอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเมทาบอลิซึม อาจต้องการระยะเวลาหลายวันในการให้ผลของฤทธิ์ยา นอกจากนี้อัตราการแทรกซึมของสารพิษเข้าไปภายในเซลล์อาจเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) หากใช้ช่วงระยะเวลาบ่มสั้น ๆ

เซลล์แขวนลอยมีอัตราการตายของเซลล์ได้สูง เมื่อใช้ระยะเวลาบ่มกับ alkylating agent นาน 1 ชั่วโมง ส่วนเซลล์เกาะพื้นผิวต้องการเวลาการบ่มที่นานกว่าในการให้ยาออกฤทธิ์และให้ผลเหมือนกัน นอกจากนี้สารหลาย ๆ ชนิดสามารถจับกับองค์ประกอบภายในเซลล์แบบไม่ปล่อยกลับคืน ดังนั้นเวลาการสัมผัสจริงอาจนานเกินกว่า 1 ชั่วโมง เนื่องจากสารถูกเก็บกักไว้ในเซลล์ ส่วนสารบางชนิดอาจให้สารกลับคืนถ้าเซลล์ไม่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมเช่น สารบางชนิดที่อาจก่อฤทธิ์เฉพาะบางช่วงในวงจรชีวิตเซลล์ (phase specific toxins) และระยะเวลาที่บ่มนาน 1-2 ช่วงเวลาวงจรชีวิตเซลล์อาจนานเพียงพอให้เกิดผลได้

อย่างไรก็ตามการใช้ระยะเวลาบ่มนาน อาจต้องคำนึงว่าสารอาจหมดฤทธิ์ความเป็นพิษที่อุณหภูมิ 37°C และฤทธิ์ของยาที่ลดลงอาจเป็นผลจากความไม่เสถียรของสารทดสอบ ดังนั้นระยะเวลาในการสัมผัสสาร (T) และความเข้มข้นของสาร (C) จึงมีความสัมพันธ์กัน แม้ว่าผลคูณของ C และ T (C x T) จะไม่ได้ค่าที่คงที่เสมอไป การยืดเวลาให้ระยะเวลาสัมผัสนานขึ้น สามารถเพิ่มความไวต่อการทดสอบภายใต้ค่าที่ทำนายจาก C x T ซึ่งเป็นผลจากวงจรชีวิตเซลล์และการทำลายสะสมได้ (Freshney, 2000)

(6). ความหนาแน่นของเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์ในช่วงระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสกับสารทดสอบ อาจมีผลในการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองต่อสารทดสอบได้ เช่น เซลล์ Hela มีความไวต่อ alkylating agent ลดลง เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นสูง เพื่อหาผลของความหนาแน่นเซลล์ ควรทำการผันแปรช่วงก่อนทำการบ่ม (preincubation phase) ในขณะที่เซลล์มีการสัมผัสกับสารทดสอบ จำนวนโคโลนีของเซลล์อาจมีการลดลง เมื่อได้รับสารพิษที่มีความเข้มข้นสูง ๆ แต่ก็อาจชดเชยผลดังกล่าว โดยการเพิ่มปริมาณเซลล์ที่ถ่ายลงเพาะเลี้ยงให้มากขึ้น ซึ่งจะทำให้จำนวนโคโลนีของเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นของสารทดสอบมีเท่า ๆ กัน วิธีนี้ยังช่วยกำจัดความเสี่ยงจากการที่มีความหนาแน่นของเซลล์ต่ำ แล้วส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ และช่วยทำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติดีขึ้น ควรถ่ายเซลล์ที่จะทำการทดสอบลงในชั้น preformed feeder ก่อน เพื่อหาความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสมในการถ่ายลงถาดทดสอบว่าจะมากเกินพอในการทำให้เกิดโคโลนีได้

(7). ตัวทำละลาย สารทดสอบบางชนิดสามารถละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้น้อยมาก และจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์แทนเช่น เอทานอล โพรพิลีน-ไกลคอล และ DMSO แต่ตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวอาจก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงควรใช้ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของตัวทำละลายในการเตรียมสารละลาย นั่นคือเตรียมสารละลายที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นสูง ๆ แล้วค่อยเจือจางด้วย Balanced Salt Solution (BSS) และเจือจางครั้งสุดท้ายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อต้องการทำการทดสอบ โดยความเข้มข้นสุดท้ายของตัวทำละลายต้องน้อยกว่า 0.5% และควรมีชุดควบคุม (control) ที่มีตัวทำละลายอย่างเดียวกันเป็นตัวเปรียบเทียบด้วย (control ต้องมีตัวทำละลาย ณ ความเข้มข้นสุดท้ายเหมือนกับสารละลายทดสอบ แต่ไม่มีสารทดสอบอยู่ด้วย) การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์กับอุปกรณ์ประเภทพลาสติกและยาง สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ ควรใช้แก้วกับตัวทำละลายเจือจาง และใช้พลาสติกเมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายมีน้อยกว่า 10%

(8). ช่วงระยะเวลาเก็บผล การคำนึงถึงช่วงระยะเวลาเก็บผลหลังการบ่มกับสารพิษ มีความสำคัญเนื่องจากเหตุการณ์ 3 ประการคือ 1). เมื่อใช้การยับยั้งเมทาบอลิซึมเป็นดัชนีบอกความเป็นพิษของสาร การเก็บผลที่เกิดจากการรบกวนเมทาบอลิซึม ต้องไม่มีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ 2). ควรทราบว่าการทำลายเซลล์ในระดับที่ทำให้เกือบตาย (sublethal) อาจได้รับการแก้ไขกลับคืน 3). ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ออกฤทธิ์ช้า อาจเกิดจากสารประกอบบางชนิด ซึ่งอาจไม่ให้ผลในช่วงระยะเวลา 1-2 ช่วงวงจรชีวิตเซลล์ ดังนั้นการไม่มีช่วงระยะเวลาเก็บผล อาจประเมินระดับการตายของเซลล์สูงหรือต่ำเกินไปได้ อย่างไรก็ตามช่วงระยะเวลาเก็บผลไม่ควรนานเกินไป เพราะการตายของเซลล์อาจถูกปิดบังได้ด้วยเซลล์ที่มีความต้านทาน ซึ่งให้ผลการเจริญของเซลล์มากไป การวิเคราะห์เซลล์ที่เกาะพื้นผิวโดยวิธีการนับเซลล์หรือการตรวจดูการนำสารเข้าสู่เซลล์ เซลล์เหล่านั้นต้องมีการเจริญอยู่ในช่วง log phase ตลอดระยะเวลาการสัมผัสกับยาและการเก็บผล

2.1 Plating efficiency เป็นวิธีการที่ดีที่สุดในการบอกความสามารถในการอยู่รอด และการเจริญของเซลล์ หากเซลล์มีประสิทธิภาพในการเกาะเจริญได้เป็นโคโลนี (plating efficiency) อย่างไรก็ตามเซลล์ส่วนใหญ่มี plating efficiency ต่ำ โดยเฉพาะเซลล์ปกติ (normal cells) นอกจากนี้เซลล์มักให้จำนวนโคโลนีลดลง เมื่อมีความเข้มข้นของสารพิษมากขึ้น จึงต้องชดเชยโดยใส่เซลล์เริ่มต้นให้มากขึ้น เพื่อให้จำนวนโคโลนีที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมีจำนวนใกล้เคียงกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 Microtitration Assay การใช้ถาดทดสอบที่ประกอบด้วยหลุมหลายๆหลุม (multiwell plates) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำให้ได้ตัวอย่างซ้ำ ๆ (replicate sample) ในเซลล์เพาะเลี้ยง วิธีการนี้เป็นวิธีที่ประหยัดทำให้ใช้เครื่องมืออัตโนมัติ และให้ผลที่เชื่อถือได้ สามารถตรวจสอบคุณภาพผลการทดลองที่ได้ด้วยสายตา การใช้ถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96 well plates) เป็นวิธีที่นิยมที่สุด เนื่องจากมีพื้นที่การเจริญของเซลล์ในแต่ละหลุมเป็น 28-32 ตารางมิลลิเมตร มีความจุปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมเท่ากับ 0.1-0.2 มิลลิลิตร และสามารถใช้เซลล์ได้ถึง 10^5เซลล์/หลุม วิธีการ Microtitration นี้สามารถใช้หาจำนวนโคโลนี ปริมาณแอนติบอดี ปริมาณไวรัสและยา รวมทั้งสามารถประยุกต์ใช้วิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารพิษได้ ซึ่งสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน ในแต่ละตัวอย่างจะใช้ปริมาณเซลล์น้อยลง ตามวิธีการดังกล่าวประชากรเซลล์ทั้งหมดภายในหลุมของถาดทดสอบ ซึ่งมีการเจริญในช่วง log phase จะได้รับสารทดสอบที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วจึงตรวจหาการรอดชีวิตของเซลล์ (cell viability) ณ จุดสุดท้ายของวิธีการ Microtitration จะมีการประเมินปริมาณเซลล์ ซึ่งสามารถทำได้โดยตรงด้วยการนับปริมาณเซลล์ หรือตรวจผลด้วยวิธีการทางอ้อม เช่น การลดลงของสี MTT (MTT reduction) ซึ่งวิธีการตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์โดยใช้ MTT (MTT bioassay) เป็นที่นิยมใช้แพร่หลายในปัจจุบัน ในการศึกษาความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์

หลักการของวิธีการตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการใช้ MTT (MTT-Based Cytotoxicity Assay) วิธีการ MTT reduction (MTT bioassay) เป็นวิธีการตรวจโดยใช้การเปลี่ยนแปลงของสี ซึ่งบอกผลได้ในเชิงปริมาณ มีความไวและผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือ วิธีนี้สามารถตรวจวัดการรอดชีวิต การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการกระตุ้นเซลล์ได้ โดยอาศัยการมีเอนไซม์ในกลุ่มดีไฮโดรจีเนสซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial dehydrogenases) ของเซลล์ที่มีชีวิต โดยเอนไซม์ดังกล่าวสามารถเปลี่ยนสาร สีเหลืองที่ละลายน้ำได้ [MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] ให้เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อว่า formazan ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้มและไม่ละลายน้ำ ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะไม่สามารถย่อยสลายสี MTT ได้ ปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

วิธีการ MTT bioassay มีประโยชน์มากในการตรวจจับเซลล์ที่ไม่มีการแบ่งตัว แต่ยังคงมีชีวิตอยู่และทำงานได้ จึงสามารถใช้วิธีการนี้ในการแบ่งแยกระหว่างการแบ่งตัวและการกระตุ้นเซลล์ได้ (Doyle and Griffiths, 1998) เซลล์ที่มีการเจริญในช่วงการแบ่งตัวแบบทวีคูณ มีความเหมาะสมในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วงระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสสารพิษ คือเวลาที่ทำให้เกิดการทำลายสูงสุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความเสถียรของสาร หลังจากนำสารทดสอบออกไป จะปล่อยให้เซลล์มีการเจริญประมาณ 2-3 ครั้ง โดยเติมอาหารเลี้ยง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์ที่มี MTT ในแต่ละหลุมของถาดทดสอบแล้วบ่มในที่มืด เพื่อให้เกิดความแตกต่างแยกออกจากกันได้ ระหว่างเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตและมีความสามารถในการเจริญ กับเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตหรือตายแล้วและไม่สามารถเจริญได้ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสามารถบอกได้โดยวิธีอ้อมจากการลดลงของ MTT ซึ่งก็คือปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้น สุดท้ายจึงละลาย formazan ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วสามารถวัดปริมาณสีที่ได้ด้วยวิธีการ spectrophotometry สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของซิตรินินและสารสกัดข้าวแดงในงานวิจัยนี้ จะใช้วิธีการตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการใช้ MTT

2.3 Metabolic Test เป็นวิธีการตรงที่วัดผลของสารทดสอบต่อวิถีเมทาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งควรวัดทันทีหรือภายใน 24 ชั่วโมงแรกที่ทำการทดสอบกับสาร และผลที่ได้จะเป็นเมทาบอลิซึมของเซลล์ต่อสารทดสอบ วิธีการวิเคราะห์เมทาบอลิซึมมีหลายวิธี ตั้งแต่วิธีง่าย ๆ โดยสังเกตการยับยั้งการลดลงของค่า pH จนถึงวิธีที่ต้องใช้สารติดตาม หรือการตรวจหาฤทธิ์เอนไซม์ ซึ่งอาจใช้เวลาทดสอบสั้น ๆ (ประมาณ 30 นาทีหรือมากกว่า) หรือระยะเวลาทดสอบเป็นเวลาหลายวัน (กัลยาณี จิรศรีพงษ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนกิจ, 2547)

2.10 เซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่มีต้นกำเนิดมาจากไตของตัวอ่อนของมนุษย์ (Human Embryonic Kidney cells : HEK293T)

เซลล์ไลน์ HEK293T เป็นเซลล์มะเร็งที่มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลง มาจากเซลล์เยื่อบุไตของตัวอ่อนมนุษย์ โดยในขั้นแรกทำการแยกเซลล์เยื่อบุไตของตัวอ่อนมนุษย์ออกมาก่อน แล้วทำการถ่ายทอด (transfection) ยีนส์ Ad_5 ของ Adenovirus ลงใน DNA ของเซลล์เยื่อบุไตของตัวอ่อนมนุษย์ ทำการเพาะเลี้ยงต่อมาจนได้เซลล์ไลน์ HEK293 ก่อน ต่อจากนั้นทำการตัดต่อเพิ่มยีนส์ SV_{40} ของ Simian virus เพื่อให้มีการแสดงลักษณะของ T antigen (แอนติเจนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocytes) ขนาดใหญ่บนผิวเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงต่อมาอีกหลายครั้ง (passages) จนได้เซลล์ไลน์ HEK293T เซลล์ไลน์ชนิดนี้ยังมียีนส์ซึ่งทำหน้าที่รายงานการมีเอนไซม์ beta-lactamase นอกจากนี้ยังแสดงการมีโปรตีนแบบรวมตัวกัน ซึ่งประกอบด้วยกลุ่ม (domain) ยีนส์ GAL4 จับกับ DNA และกลุ่มตัวรับ (receptor ligand) กับวิตามินดี ดังนั้นเซลล์ไลน์ชนิดนี้จึงแสดงการตอบสนองต่อการกระตุ้นจาก 1α,25-dihydroxyvitamin D_3 ที่ไปจับกับตัวรับวิตามินดี

เซลล์ HEK293T มีลักษณะรูปร่างเป็นเซลล์เยื่อบุ (epithelium) เหมือนกับเซลล์ HEK293 ที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิด เป็นเซลล์ไลน์ที่มีความสามารถในการเจริญได้อย่างต่อเนื่อง เจริญโดยการเกาะยึดกับพื้นผิว (adherent cells) สามารถหลุดออกจากพื้นผิวที่เจริญเกาะอยู่ได้ง่าย (Gene BLAzer®VDR-UAS-bla HEK293T, 2004) สามารถใช้เซลล์ไลน์ HEK293T ในการศึกษาการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พัฒนาเปลี่ยนแปลง (transformation) เมื่อมีการถ่ายทอดยีนส์หรือสารเคมีบางชนิดให้กับเซลล์ชนิดนี้ เนื่องจากเซลล์ HEK293T มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงดีกว่าเซลล์ HEK293 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ไลน์ HEK293T ตามปกติใช้ Dulbaco Modified Eagle Medium (DMEM) ร่วมกับ fetal bovine serum ในอัตราส่วน 90 : 10 โดยปริมาตร ทั้งนี้ให้ใช้ยาปฏิชีวนะเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมขึ้น เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพ โดยเลือกใช้ Penicillin ในขนาด 100 ยูนิต/มิลลิลิตร ร่วมกับ Streptomycin ในขนาด 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือใช้ Hygromycin และ Zeocin™ ในขนาด 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์หรือสารละลายใดก็ตาม ที่ใช้ในการตรวจสอบกับเซลล์นี้ ต้องมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องเป็นอย่างน้อย (อุณหภูมิ 37°C มีความเหมาะสมที่สุด) ก่อนใช้กับเซลล์

2.11 งานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาความเป็นพิษของซิตรินินในเซลล์เพาะเลี้ยง

Yoneyama et al. (1986) ศึกษาความเป็นพิษของซิตรินินในระบบเซลล์เยื่อบุไตเพาะเลี้ยง โดยใช้เซลล์ไลน์ Madin-Darby bovine kidney (MDBK) และเซลล์ไลน์ primary fetal bovine kidney (PFBK) ในการศึกษา จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของซิตรินินในการเกิดพิษต่อเซลล์พบว่า ณ ความเข้มข้นของตรินินเป็นมิลลิโมลาร์ เซลล์ MDBK มีความไวในการเกิดพิษมากกว่าเซลล์ PFBK ผลอย่างแรกของซิตรินินเกิดขึ้นกับการเกาะยึดของเซลล์ MDBK กับพื้นผิวของฉาดทดสอบ จากการประเมินการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชี้ให้เห็นว่า เซลล์มีรูปร่างยาวออกแล้วแบนลง จากนั้นมีการบวมและมีรูปร่างกลม แต่ยังต้องมีการพิจารณาการประเมินหาความเป็นพิษของซิตรินิน ด้วยวิธีการที่เหมาะสมในระบบเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะภายนอกร่างกายต่อไป

Stetina and Votava (1986) ศึกษาการเหนี่ยวนำให้ DNA สายเดี่ยว (single strand DNA) เกิดการแตกโดยพาทูลิน โอคราท็อกซินเอ ซิตรินิน และ aflatoxin B1 ในเซลล์ไลน์ Chinese Hamster ovary (CHO) และ AWRF พบว่าความเข้มข้นของพาทูลิน โอคราท็อกซินเอ ซิตรินิน และ aflatoxin B1 ซึ่งทำให้มีการยับยั้งการเกิดโคโลนีของเซลล์ไลน์ CHO ถึง 50% เท่ากับ 0.07, 33, 31, และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ และความเข้มข้นเดียวกันนี้ในเซลล์ไลน์ AWRF เท่ากับ 0.011, 6.4, 6.7, และ 0.15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ พาทูลินมีผลยับยั้งการสร้าง DNA อย่างรุนแรงในเซลล์ไลน์ CHO และ AWRF ณ ความเข้มข้นมากกว่า 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนโอคราท็อกซินเอและซิตรินินมีผลยับยั้งการสร้าง DNA ในเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดนี้เพียงบางส่วน (ไม่เกิน 20%) ณ ความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร aflatoxin B1 ณ ความเข้มข้นมากกว่า 5 ไมโครกรัม/

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มิลลิลิตร ยับยั้งการสร้าง DNA ในเซลล์ AWRF อย่างรุนแรง แต่มีผลกระตุ้นการสร้าง DNA ในเซลล์ CHO

Wasternack and Weisser (1992) ศึกษาการยับยั้งการสร้าง RNA และ DNA โดยซิตรินิน และผลของซิตรินินต่อการเมทาบอลิซึมของสารตั้งต้นในการสร้าง DNA ในเซลล์ไลน์ V79-E จากผลการศึกษาพบว่า ซิตรินินสามารถยับยั้งการสร้าง RNA ของเซลล์ไลน์ V79-E โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาและความเข้มข้นของซิตรินิน การสังเคราะห์ rRNA ถูกยับยั้งโดยซิตรินินเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ DNA ถูกยับยั้งโดยซิตรินินที่ระยะเวลา 30 นาทีเป็นอย่างน้อย และ มีการหยุดชะงักการเมทาบอลิซึมของสารตั้นต้นในระหว่างที่มีการให้ซิตรินิน

Kitabatake et al. (1993) ศึกษาความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราสองชนิดคือ ซิตรินิน และโอคราท๊อกซินเอ โดยใช้เซลล์ไลน์หลายชนิดคือ Hela, C3H/10T1/2, NIH/3T3, MDCK, และ Hela P3 ด้วยวิธีการ MTT bioassay จากผลการศึกษาพบว่าซิตรินินมีความเป็นพิษน้อยกว่าโอคราท๊อกซินเอ เมื่อทดสอบกับเซลล์ไลน์แต่ละชนิด เซลล์ไลน์ MDCK มีความไวต่อซิตรินิน และโอคราท๊อกซินเอมากกว่าเซลล์ไลน์ชนิดอื่น จากการศึกษาผลตามขนาดของสารทดสอบที่ให้ โดยวัดผลจากการทำงานของเอนไซม์ leucine aminopeptidase และ alkaline phosphatase ในเซลล์ MDCK พบว่ามีความไวต่ำกว่าการวัดผลโดยวิธีการ MTT bioassay เป็นการบ่งชี้ว่าเอนไซม์เหล่านี้ไม่ถูกยับยั้งแบบจำเพาะในเซลล์ MDCK

Chagus et al. (1994) ศึกษาถึงความเป็นพิษของซิตรินินในเซลล์ไลน์ที่มาจากเซลล์ไตของลูกหนูแฮมสเตอร์ (baby hamster kidney cells : BHK) ผลอันแรกของซิตรินินเกิดขึ้นกับการเกาะยึดของเซลล์กับพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นว่า เมื่อให้ซิตรินินที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, และ 1.0 มิลลิโมลาร์ให้กับเซลล์ไลน์นี้ แล้วบ่มเป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์อย่างเห็นได้ชัด โดยเซลล์มีการบวมและตายลง ซิตรินินมีผลยับยั้งการทำงานของระบบรีด๊อกซ์ (ปฏิกิริยารีดักชั่น-ออกซิเดชั่น) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ถึง 81% ผลที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของซิตรินินเพียงอย่างเดียว แต่ยังรวมไปถึงระยะเวลาที่ซิตรินินสัมผัสกับเซลล์อีกด้วย

Chagus et al. (1995) ศึกษาอิทธิพลของซิตรินินต่อวิถี oxidative metabolism ของเซลล์ไลน์ BHK-21 จากผลการศึกษาพบว่า ซิตรินินยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ถึง 45% อัตราการหายใจของเซลล์ที่ทำการให้ digitonin ซึ่งมีการใช้ succinate เป็นแหล่งพลังงานในสภาวะที่มี ADP ลดลงประมาณ 39% ซิตรินินยับยั้งการใช้กลูโคสของเซลล์ไลน์ BHK-21 ได้ประมาณ 86% เซลล์ที่ถูกทดสอบกับซิตรินินมีการผลิตไพรูเวตในปริมาณน้อย แต่ไม่สามารถผลิตแลคเตทได้เลย จึงอาจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปได้ว่าเซลล์ไลน์ BHK-21 ไม่สามารถสร้างแลคเตท เมื่อกระบวนการ oxidative metabolism ถูกยับยั้งโดยซิตรินิน การเสื่อมสภาพของเซลล์ BHK-21 ที่มีสาเหตุจากซิตรินิน เกิดขึ้นจากการเสียหน้าที่การทำงานของไมโทคอนเดรีย และการเปลี่ยนแปลงของวิถีไกลโคไลซิสในภาวะที่ขาดออกซิเจน (glycolytic anaerobic pathway)

Bondy and Armstrong (1998) ศึกษาผลของ โอคราท๊อกซินเอ โอคราท๊อกซินบี และซิตรินินในการทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ไลน์ LLC-PK1 และ OK ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เยื่อบุไตของสุกรและโอพอสซัมตามลำดับ โดยทำการวัดผล 4 วิธีการด้วยกันคือ MTT bioassay, Lactate dehydrogenase assay, Neutral red assay, และ DNA assay ใช้ gentamycin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีพิษต่อไตเป็น possitive control ทำการบ่มสารทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวเป็นเวลา 24, 48, และ 72 ชั่วโมง จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์ไลน์ LLC-PK1 มีความไวต่อสารพิษจากเชื้อราทั้งสามชนิดข้างต้นมากกว่าเซลล์ไลน์ OK เมื่อทำการทดสอบโดยวิธีการ MTT bioassay จากการเปลี่ยนแปลงขนาดสารทดสอบที่ให้ โดยไม่ทำการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์เพาะเลี้ยง มีอิทธิพลต่อการเกิดพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงดังนี้ ซิตรินินมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้งสองนี้มาก เมื่อให้ซิตรินินลงในขั้นตอนการนำเซลล์ลงเพาะเลี้ยง ในขณะที่โอคราท๊อกซินเอมีความเป็นพิษมากที่สุด เมื่อให้กับเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดหลังการเพาะเลี้ยงได้นาน 24 ชั่วโมง เมื่อเรียงลำดับความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราทั้ง 3 ชนิดจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ โอคราท๊อกซินเอ > โอคราท๊อกซินบี > ซิตรินิน

Pfeiffer et al. (1998) ศึกษาศักยภาพของสารพิษจากเชื้อราคือ ซิตรินิน และพาทูลิน ในการทำให้เกิดความผันแปรจากการทวีเพิ่มขึ้นของโครโมโซมครึ่งคู่ (haploid chromosome) (aneuploidogenicity) และความเสียหายของโครโมโซม (clastogenicity) โดยศึกษาจากการตรวจหาการยับยั้งการทำงานของ microtubule ภายใต้สภาวะที่ปลอดจากเซลล์ และวัดการเหนี่ยวนำให้เกิดความล้มเหลวในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส และการเกิด micronuclei ในเซลล์ไลน์ V79 ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ พบว่าทั้งซิตรินินและพาทูลินยับยั้งกระบวนการเกิดโพลิเมอร์ (polymerization) ของ microtubule ในสภาวะที่ปลอดจากเซลล์ โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารทดสอบที่ให้ เวลาที่ใช้เหนี่ยวนำการเกิด micronucleus และการติดสี CREST ชี้ให้เห็นศักยภาพของพาทูลินและซิตรินินในการทำให้เกิดความผันแปรจากการทวีเพิ่มขึ้นของโครโมโซมครึ่งคู่ โดยพาทูลินมีศักยภาพในการทำให้เกิดความเสียหายแก่โครโมโซม ส่วนศักยภาพในการทำให้เกิดความผันแปรในการทวีขึ้นของโครโมโซมครึ่งคู่ของซิตรินิน อาจโน้มนำไปสู่การศึกษาความสามารถในการก่อมะเร็งของสารพิษจากเชื้อราในระยะยาวในสัตว์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Wijnands and Leusden (2000) รายงานว่าซิตรินินทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ SK โดยเริ่มต้นที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากการวัดความเป็นพิษโดยวิธีการ MTT bioassay

Heussner et al. (2002) ศึกษาถึงผลการทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ของสารพิษจากเชื้อราทั้ง 4 ชนิดคือ ซิตรินิน พาทูลิน โอคราท็อกซินเอ และโอคราท็อกซินบี และส่วนผสมของสารพิษจากเชื้อราทั้ง 4 ชนิดนี้ โดยใช้เซลล์ไลน์ LLC-PK1 และเซลล์ไลน์ที่มาจากเซลล์ไตมนุษย์ (IHKE) เป็นแบบจำลองในการศึกษา ตรวจวัดการเกิดพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีการ MTT bioassay หลังจากให้สารพิษกับเซลล์ไปแล้วนาน 48 ชั่วโมง พบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ LLC-PK1 ของซิตรินินและพาทูลินจะเพิ่มขึ้น เมื่อนำมาผสมรวมกับโอคราท็อกซินเอ หรือโอคราท็อกซินบี ส่วนเซลล์ไลน์ IHKE จะแสดงการเกิดพิษมากขึ้น เฉพาะกับซิตรินินที่ผสมกับโอคราท็อกซินเอ

Wichmann et al. (2002) ศึกษาอิทธิพลของสารพิษจากเชื้อราคือ ซิตรินิน กลิโอท็อกซิน (gliotoxin) และพาทูลิน ต่อการสร้าง interferon-γ(IFN-γ) ซึ่งมากกว่า interleukin-4 (IL-4) ในเซลล์เม็ดเลือดของมนุษย์ โดยนำเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียวในกระแสเลือดส่วนรอบนอกของร่างกาย (peripheral blood mononuclear cells : PBMC) ที่ถูกกระตุ้นโดย CD3/CD28 ซึ่งได้รับบริจาคโดยผู้ที่มีสุขภาพดี มาบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงกับสารพิษจากเชื้อราทั้ง 3 ชนิดนี้ การใช้ซิตรินินเข้มข้น 8.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กลิโอท็อกซินเข้มข้น 34.2 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และพาทูลินเข้มข้น 64.8 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เกิดการยับยั้งการหลั่ง IFN-γ ถึง 50% (50% inhibitory dose : ID_{50}) สำหรับความเข้มข้นของสารพิษจากเชื้อราที่ทำให้เกิดการยับยั้งการหลั่ง IL-4 ถึง 50% คือ เมื่อใช้ซิตรินินเข้มข้น 21.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กลิโอท็อกซินเข้มข้น 82.8 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และพาทูลินเข้มข้น 243.2 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จึงอาจเป็นการบ่งชี้ได้ว่าสารพิษจากเชื้อรา เป็นสาเหตุอันดับต้น ๆ ในการยับยั้งเซลล์ Th1 ที่ผลิต IFN-γ อย่างรุนแรง ซึ่งอาจโน้มนำให้เซลล์ T-lymphocyte มีการเปลี่ยนลักษณะการทำงานเป็นเซลล์ Th2 มากขึ้น และอาจเพิ่มความเสี่ยงในการพัฒนาการเกิดโรคภูมิแพ้ขึ้นได้

Hirota et al. (2002) ศึกษาผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายซิตรินิน ด้วยความร้อนร่วมกับความชื้น โดยทำการตรวจผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของซิตรินิน ซึ่งผ่านการให้ความร้อนในน้ำที่อุณหภูมิ 140°C โดยได้ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญคือ Citrinin H2 [3-(3,5-dihydroxy-2-methylphenyl)-2-formyloxybutane] Citrinin H2 ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ไลน์ Hela อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นสูงสุด 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดพิษต่อเซลล์เท่ากับ 39%) เมื่อทำการบ่มเป็นระยะเวลา 63 ชั่วโมง แต่ซิตรินินแสดงความเป็นพิษอย่างรุนแรงต่อเซลล์ไลน์ Hela ที่ความเข้มข้นต่ำเพียง 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดพิษต่อเซลล์เท่ากับ 73%) ส่วนสารประกอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไดอะซิเตตของ citrinin H2, citrinin H2 ที่ถูกไฮโดรไลซิส, และสารประกอบไดเมธิลอีเทอร์ของ citrinin H2 ที่ถูกไฮโดรไลซิส ที่ความเข้มข้นสูงสุด 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดพิษต่อเซลล์ Hela เท่ากับ 46, 42, และ 35% ตามลำดับ

Liu et al. (2003) ค้นคว้าความเสี่ยงในการเกิดพิษต่อยีนส์ และความเสียหายต่อ DNA จากวิถีออกซิเดชั่นในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อได้รับสารพิษจากเชื้อรา (พาทูลิน และซิตรินิน) สำหรับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ใช้คือ เซลล์ไลน์จากเซลล์รังไข่ของหนูแฮมเตอร์จีน (Chinese hamster ovary cells : CHO-K1), เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocytes จากกระแสเลือดบริเวณรอบนอกของร่างกายมนุษย์ (peripheral blood lymphocytes), และเซลล์ไตจากตัวอ่อนของมนุษย์ (human embryonic kidney cells : HEK293) จากผลการค้นคว้าพบว่า เฉพาะพาทูลินทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ sister chromatid ซึ่งขึ้นกับขนาดของพาทูลินที่ให้อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบการเปลี่ยนแปลงนี้ได้บ่อยในเซลล์ไลน์ CHO-K1 และเซลล์ lymphocytes ของมนุษย์ การให้พาทูลินกับเซลล์ไลน์ CHO-K1 เพิ่มระดับการเกิดช่องว่างในโครงสร้าง DNA และทำให้โครงสร้าง DNA แตก อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า tail moment และความแตกหักในโครงสร้างของ DNA อย่างมีนัยสำคัญ ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งหมดที่มีการทดสอบกับซิตรินิน เป็นการบ่งชี้ว่าซิตรินินไม่ทำให้เกิดพิษต่อยีนส์ในเซลล์ไลน์ HEK293 จากการบ่มเซลล์ HEK293 ที่ให้ซิตรินิน มีการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ใน heat shock protein 70 (HSP70) แต่ไม่มีเอนไซม์ human 8-hydroxyguanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) การทดสอบเซลล์ดังกล่าวกับพาทูลิน ไม่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงของ mRNA ใน HSP70 หรือ hOGG1

Herzog-Soares and Freire (2004) ศึกษาผลของซิตรินิน และผลของซิตรินินร่วมกับ aflatoxin B1 ต่อความสามารถในการทำให้ติดเชื้อ (infectivity) และการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ *Toxoplasma gondii* ในสภาวะการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย โดยใช้เซลล์ macrophages (เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง ทำหน้าที่จับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมเช่น เชื้อโรคในร่างกาย)ของหนูแม้าส์ที่เพาะเลี้ยงไว้ พบว่าในช่วง 2 ชั่วโมงแรกเซลล์ macrophages ที่ใช้เป็นชุดควบคุมมีการติดเชื้อ *Toxoplasma gondii* ในระยะ tachyzoites 59% หลังจากที่เซลล์ macrophages ได้รับซิตรินินหรือสารละลายผสมระหว่างซิตรินินกับ aflatoxin B1 ในขนาด 0.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและ 0.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้ว เซลล์ macrophages มีการติดเชื้อ 77.5 และ 75% ตามลำดับ

Heussner et al. (2005) ศึกษาผลการทำให้เกิดพิษของโอคราท็อกซินเอและสารพิษจากเชื้อราชนิดอื่นคือ โอคราท็อกซินบี ซิตรินิน และพาทูลิน ทั้งแบบทำให้เกิดพิษโดยสารพิษเพียงชนิดเดียว และแบบทำให้เกิดพิษร่วมกันระหว่างสารพิษหลายชนิด ต่อเซลล์ไตที่เพาะเลี้ยงในสภาวะภายนอกร่างกายคือ เซลล์ไลน์ LLC-PK1 และใช้วิธีการ MTT reduction (MTT bioassay) ในการตรวจวัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเป็นพิษ ณ จุดยุติ โดยประยุกต์ใช้วิธี step-wise ในการทดสอบความเป็นพิษแบบร่วมกันต่อเซลล์ ใช้ full factorial เป็นแบบ central composite ในการออกแบบการทดลองผลการออกฤทธิ์ร่วมกัน (หรือเสริมกัน) ของสารพิษจากเชื้อราทั้งสี่ชนิดนี้ จากผลการศึกษานี้ยืนยันว่า มีผลการเสริมฤทธิ์กันระหว่างซิตรินินและโอคราท็อกซินเอ และอาจมีความเป็นไปได้สำหรับสารพิษจากเชื้อราชนิดอื่น ที่จะออกฤทธิ์ร่วมกันในเซลล์ไต

Yu et al. (2005) ศึกษาผลของซิตรินินในการเหนี่ยวนำให้เกิด การฝ่อลีบและตายลง (apoptosis) ของเซลล์ไลน์ HL-60 (เซลล์ไลน์ที่เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด promyelocytic ในมนุษย์ : human promyelocytic leukemia cells) โดยกระตุ้นผ่านวิถีการทำงานของไมโทคอนเดรีย ลักษณะทางกายรูปวิทยาของเซลล์ที่เกิดขึ้นในการฝ่อลีบและตายลง รวมไปถึงการแตกเป็นชิ้นส่วนของนิวเคลียส กับการเกิดเป็นรอยลุ่ยของสาย DNA ถูกตรวจพบที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากให้ซิตรินินกับเซลล์ HL-60 การวิเคราะห์ด้วยวิธีการ flow cytometry สะท้อนให้เห็นว่า การฝ่อลีบและตายลงของเซลล์ HL-60 ที่เพาะเลี้ยงไว้ มีการเพิ่มขึ้นเมื่อให้สารละลายซิตรินินเข้มข้นสูงกว่า50 ไมโครโมลาร์ การค้นพบนี้บ่งชี้ว่า ซิตรินินเหนี่ยวนำให้เกิดการฝ่อลีบและตายลงของเซลล์ HL-60 โดยกระตุ้นการหลั่ง cytochrome C ตามด้วยการกระตุ้นโปรตีน caspase หลายชนิด

Liu et al. (2005) ศึกษาการพบซิตรินิน และผลการทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ของผลิตภัณฑ์การหมักจากเชื้อราโมแนสคัส (ข้าวแดง) โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินในสารสกัดที่ละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้ว และสารสกัดที่ละลายน้ำได้ของข้าวแดงที่มีขายกันทั่วไป ด้วยวิธีการ HPLC ตรวจพบซิตรินินในสารสกัดที่ละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้ว จากข้าวแดงทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจ ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.28-6.29 ไมโครกรัม/กรัม แต่ไม่ตรวจพบซิตรินินในสารสกัดที่ละลายน้ำได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ HEK293 และให้สารสกัดข้าวแดง แล้วทำการบ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารสกัดที่ละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้วทุกตัวอย่าง ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293 มีการตายไป 50% อยู่ในช่วง 1.8-4.7 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดที่ละลายน้ำได้แสดงระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำมาก นอกจากนี้การให้สารละลายซิตรินินบริสุทธิ์ร่วมกับสารสกัดที่ละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้วจากตัวอย่างข้าวแดง เพิ่มการเกิดพิษต่อเซลล์ HEK293 ของซิตรินินอย่างมีนัยสำคัญ จากการตรวจด้วยวิธีการ MTT bioassay

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved