บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ข้าวแดง (Red yeast rice) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักข้าวด้วยรา *Monascus* sp. (Rosenblitt และคณะ, 2000) รู้จักในชื่อของ Red koji หรือ Ang-kok หรือ Anka เป็นต้น โดยมีการบริโภคมานับพันปีในเขตทวีปเอเชีย เช่น ประเทศจีน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย และ ฟิลลิปินส์ เป็นต้น ประโยชน์ของข้าวแดงนั้นมีหลายประการด้วยกัน ซึ่งในอดีตนิยมใช้ข้าวแดงเป็นวัตถุปรุงแต่งสีและกลิ่นรสในอาหาร เช่น เนื้อ ปลา ไวน์ข้าวแดง เต้าหู้จีน และใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาของอาหาร เป็นต้น(Erdogral และ Azirak, 2004) นอกจากนี้ข้าวแดงยังสามารถใช้ประโยชน์เพื่อเป็นยาพื้นบ้าน เช่น บำรุงไหลเวียนโลหิต ช่วยลดอาการอาหารไม่ย่อย ท้องอืดหรือมีลมในกระเพาะ และกล้ามเนื้อฟกช้ำ เป็นต้น (Wild และคณะ, 2002) ปัจจุบันมีการผลิตข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรม เพื่อเป็นสีผสมอาหารจากธรรมชาติ ซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้สีแดงจากสีสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมอาหารและใช้สำหรับอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง นอกจากนี้ในหลายๆ ประเทศ ได้แปรรูปข้าวแดงเป็นอาหารเสริม โดยมีคุณสมบัติเพื่อช่วยลดคลอเลสเตอรอล และช่วยป้องกันโรคหัวใจ เป็นต้น เนื่องจากข้าวแดงประกอบไปด้วยสารโมนาโคลิน เค ทั้งนี้ประเทศที่เป็นผู้ผลิตข้าวแดงรายใหญ่คือ จีนและญี่ปุ่น ตัวอย่างเช่นบริษัท Nanjing Tianshu Food Ingredients Supermarket Co., Ltd ของประเทศจีนนั้นสามารถผลิตข้าวแดงได้สูงถึงปีละ 50,000 ก.ก. อีกทั้งการบริโภคสีจาก *Monascus* ในประเทศญี่ปุ่นพบว่า ปี ค.ศ. 1981 มีการบริโภคสารสีของ *Monascus* เป็นจำนวน 100 ตัน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยปี ค.ศ. 1992 มีการบริโภคเพิ่มขึ้นถึง 600 ตัน คิดเป็นเงินมูลค่าประมาณ 12 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Carvalho และคณะ, 2003)

ข้าวแดงที่ใช้บริโภคในประเทศไทย ส่วนมากได้มาจากการนำเข้าจากประเทศจีนและญี่ปุ่น โดยมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 300 – 400 บาท ขึ้นอยู่กับคุณภาพ มีเพียงบางส่วนที่ผลิตได้เองในประเทศ โดยสาเหตุที่กระบวนการหมักข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก เนื่องจากยังขาดความรู้ความเข้าใจพื้นฐานของกระบวนการหมักข้าวแดง อีกทั้งยังขาดความเข้าใจถึงกลไกการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุของรา *Monascus* ทำให้ข้าวแดงที่ผลิตได้นั้นที่มีปริมาณโมนาโคลิน เค ต่ำ ความเข้มของสีแดงต่ำ และมีข้าวแดงเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตสูงถึงประมาณร้อยละ 50 จากวัตถุดิบเริ่มต้น และใช้ระยะเวลาในการหมักนานถึง 2 สัปดาห์ อีกทั้งไม่สามารถขยายกำลังการผลิตให้เพียงพอแก่ความต้องการของผู้บริโภคได้ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว หน่วยปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงานต้นแบบ BIOTEC และกลุ่มวิจัยกระบวนการหมักอาหารแข็งของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี จึงร่วมมือศึกษาและพัฒนากระบวนการผลิตข้าวแดงโดยใช้ถังหมักแบบหมุน (Rotary drum bioreactor) ในระดับโรงงานต้นแบบ เนื่องจากถังหมักแบบหมุนมีข้อได้เปรียบคือ สามารถควบคุมสภาวะการผลิต ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และการถ่ายเทอากาศ เป็นต้น และมีระบบควบคุมแบบ Semi-automatic ซึ่งเหมาะสำหรับการขยายกำลังการผลิตในอนาคต ซึ่งโครงการดังกล่าวได้รับการสนับสนุนผ่านโครงการ iTAP ของ สวทช.

ทั้งนี้งานวิจัยได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตข้าวแดงในถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร โดยศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นของข้าว การให้อากาศ (ความเร็วลม) การพ่นน้ำเพื่อรักษาความชื้น และรอบการ

หมุนถังต่อการเจริญและการสร้างสารสีของ *M. purpureus* และศึกษาความเป็นไปได้และต้นทุนการผลิตข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้ถังหมักแบบหมุน

แม้ว่าข้าวแดงที่ผลิตด้วยถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร มีความเข้มสีเพิ่มขึ้นจาก 1000 units/g substrate dry weight เป็น 2000 units/g substrate dry weight และใช้ระยะเวลาในหมักลดลงจาก 15 วัน เป็น 12 วัน แต่ปัญหาที่พบคือ กระบวนการหมักบางสภาวะทำให้ได้ข้าวแดงที่สารเฉดสีแดงน้อย หรือได้สารสีที่ละลายน้ำได้น้อย ดังนั้นในการพัฒนากระบวนการหมักข้าวแดงในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้ถังหมักแบบหมุนนั้นจำเป็นต้องมีการวิจัยเชิงลึกถึงผลปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อการผลิตสารสีของ *M. purpureus*

จากการสำรวจเอกสารพบว่า รา *Monascus* สามารถผลิตสีทั้งหมด 3 เฉดสี ได้แก่ สีแดง ส้มและเหลือง ซึ่งเฉดสีแรกที่ราผลิตคือสีส้ม จากนั้นเมื่อสีส้มทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน เปปไทด์ โปรตีน หรือกรดนิวคลีอิก โครงสร้างสีส้มจะเปลี่ยนเป็นสีแดง และเมื่อสีส้มเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นจะเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสีเหลือง ทั้งนี้คุณสมบัติของสีแดงสามารถละลายน้ำได้ (hydrophilic pigments) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ Glutamic acid จะทำให้โครงสร้างสีแดงเปลี่ยนจาก Free form เป็น Complex form ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของสีส้มและเหลือง ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่จะละลายได้ดีในไขมัน (Lipophilic pigments) (Hajjaj และคณะ, 1997; Hajjaj และคณะ,2000; Carvalho และคณะ, 2003) ทั้งนี้จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า ตัวอย่างข้าวแดงที่ไม่ละลายน้ำนั้น มีองค์ประกอบของสีส้มสูงกว่าสีแดงมาก หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ โครงสร้างสีส้มมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีแดงน้อยมาก เป็นผลให้ข้าวแดงไม่สามารถละลายน้ำได้

นอกจากปัญหาดังกล่าวแล้ว *Monascus* ยังเป็นราที่สามารถผลิต Mycotoxin เรียกว่า ซิตรินิน ซึ่งมีผลต่อระบบประสาท เป็นผลให้ข้าวแดงที่ผลิตได้ ต้องควบคุมให้มีองค์ประกอบของซิตรินินไม่เกินร้อยละ 0.2 หรือ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามข้อกำหนดของประเทศญี่ปุ่นและไต้หวันตามลำดับ ทำให้งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเพื่อหาความเหมาะสมของปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีต่อการสังเคราะห์สารโมนาโคลิน เค และรงควัตถุที่ความเข้มข้นสูง และการผลิตซิตรินินที่ความเข้มข้นต่ำ จาก *M. purpureus* ด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง และพัฒนาเทคโนโลยีการหมักข้าวแดงในระดับโรงงานต้นแบบ โดยใช้ถังหมักแบบหมุน (Rotary drum bioreactor) ทั้งนี้การทดลองจะวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล ปริมาณโมนาโคลิน เค ความเข้มสี ปริมาณซิตรินิน ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความชื้นที่เป็นองค์ประกอบในข้าวแดง ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้พัฒนาและควบคุมการผลิตข้าวแดง เพื่อขยายสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. คัดเลือกปัจจัยสำคัญจากปัจจัยทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค รงควัตถุและซิตรินินของ *M. purpureus* ด้วยวิธี Fractional-factorial design

2. หาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยสำคัญต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค รงควัตถุที่ความเข้มข้นสูงและซิตรินินต่ำ ด้วยวิธี Response surfaces method

3. พัฒนากระบวนการผลิตข้าวแดงในระดับโรงงานต้นแบบ ด้วยถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. คัดเลือกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค รงควัตถุและซิตรินินของ *M. purpureus* ด้วยวิธี Fractional factorial design โดยคัดเลือกปัจจัยทั้งจากสภาวะแวดล้อมและแหล่งอาหาร ซึ่งปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และระยะเวลาการหมัก ปัจจัยทางแหล่งอาหารประกอบด้วย แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน และกรดไขมันได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต แอมโมเนียมคลอไรด์ เปปโทน เมทไทโอนีน โซเดียมไนเตรต กลูโคส เอทานอล กลีเซอรอล กรดออกทาโนอิก และกรดโดเดกคาโนอิก

2. หาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยสำคัญต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค รงควัตถุที่ความเข้มข้นสูงและซิตรินินที่ความเข้มข้นต่ำของ *M. purpureus* โดยวางแผนการทดลองด้วย Response surface method

3. นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาขั้นต้น มาพัฒนาการผลิตข้าวแดงในระดับโรงงานต้นแบบโดยใช้ถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในระหว่างการเจริญ ราตระกูล *Monascus* ผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล กรดอินทรีย์ เช่น อะซิติก และเอนไซม์ เช่น โปรติเอสและอะไมเลส (Tseng และคณะ, 2000) นอกจากนี้ *Monascus* ยังผลิตสารทุติยภูมิหลายชนิด ได้แก่ รงควัตถุ (pigments), โมนาโคลิน (Lovastin, Mevinolin, Mevacor), ซิตรินิน (Citrinin; Monascidin A), γ-aminobutyric acid (GABA) และ Dimerumic acid เป็นต้น ซึ่ง *Monascus* จะผลิตรงควัตถุ โมนาโคลินและซิตรินิน ผ่าน Polyketide pathway (Muthuwong, 2003; Wang และคณะ, 2004)

รงควัตถุหรือเม็ดสีจากรา *Monascus* เป็นสาร Secondary metabolite โครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่ม Azaphilones หรือ Aminophilones (Erdogral และ Azirak, 2004) ทั้งนี้ *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุหรือเม็ดสีอิสระ (Free form) แบ่งตามลักษณะปรากฏของสีได้เป็น 3 ประเภทคือ สีเหลือง ส้ม และแดง

รงควัตถุสีส้มมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน (Intracellular lipophilic pigments) หรือละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งกลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีส้มนั้นจะต้องใช้ทั้งวิถีการสังเคราะห์ Polyketide และกรดไขมันร่วมกัน ส่วนการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างรงควัตถุสีส้มและหมู่เอมีน สำหรับกลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลืองยังไม่มีสามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุของรา *Monascus*ในข้าวแดงได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์ของ *M. purpureus* และสภาวะการเตรียมข้าว เช่น อุณหภูมิ และเวลาในการนึ่งข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นผลจากสภาวะในการผลิตข้าวแดงได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นของข้าว ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของข้าว ปริมาณก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุเสริม อีกด้วย

โมนาโคลิน เค หรือรู้จักกันอีกชื่อหนึ่งว่า Lovastatin เป็นสารลดการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอลในตับ โดยโมนาโคลิน เค จะจับกับเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase ในวิถี Mevalonate pathway เป็นผลให้ LDL-cholesterol และ VLDL-cholesterol ลดลง อีกทั้งทำให้ปริมาณ HDL-cholesterol เพิ่มขึ้น (Manzoni และ Rollini, 2002)

ซิตรินินเป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ซึ่งกลไกการสังเคราะห์ซิตรินินต้องใช้วิถีการสังเคราะห์ Polyketide เช่นกัน ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus* อันได้แก่ ปัจจัยด้านสารอาหาร เช่น แหล่งไนโตรเจน กรดไขมันและ Methylketone และปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณก๊าซออกซิเจน

ถึงแม้ว่ามีงานวิจัยอยู่มากที่ศึกษาถึงการผลิตโมนาโคลิน เค รงควัตถุและซิตรินินของรา *Monascus* แต่งานส่วนมากจะแยกศึกษาระหว่างการเพิ่มปริมาณโมนาโคลิน เค รงควัตถุ และการลดปริมาณซิตรินิน ของรา *Monascus* งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะหาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยสำคัญทั้งจากสภาวะแวดล้อมและแหล่งอาหาร เพื่อผลิตข้าวแดงที่มีปริมาณโมนาโคลิน เค และรงควัตถุที่ความเข้มข้นสูง และมีปริมาณซิตรินินต่ำ