บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

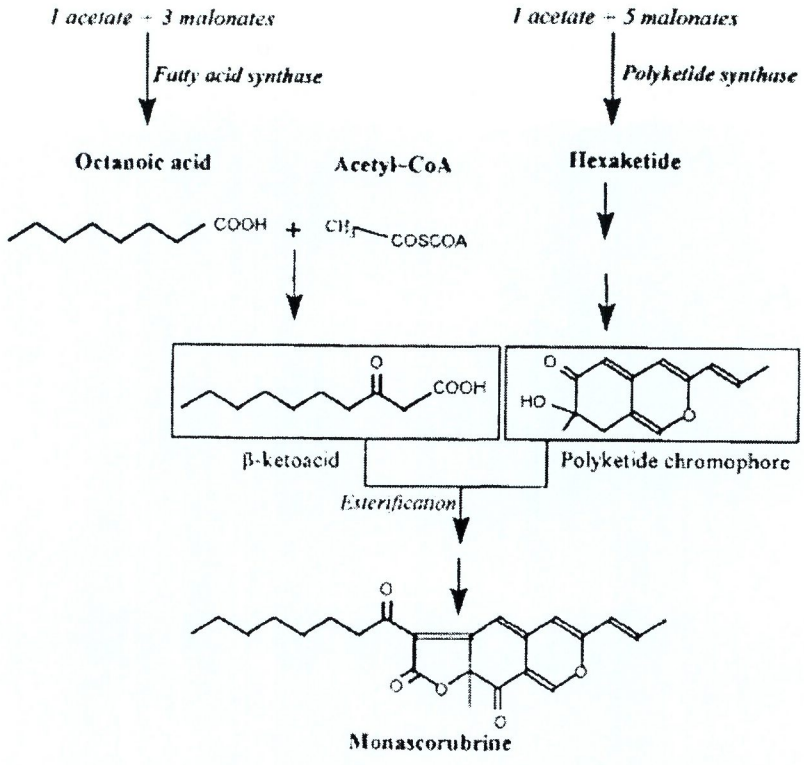
2.1 รงควัตถุของ *Monascus*

รงควัตถุหรือเม็ดสีจากรา *Monascus* เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) โครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่ม Azaphilones หรือ Aminophilones (Erdogral และ Azirak, 2004) กลไกการผลิตเป็นแบบพร้อมการเจริญและไม่พร้อมการเจริญ (Mix type: Growth-assosiated and non growth-associated) ทั้งนี้รา *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุหรือเม็ดสีอิสระ (Free form) ได้ 6 ชนิด แบ่งตามลักษณะปรากฏของสีได้เป็น 3 ประเภทคือ สีเหลือง ส้ม และแดง โดยสีเหลืองประกอบด้วย Monascin ($C_{21}H_{26}O_5$) และ Ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$) สีส้มประกอบด้วย Rubrapunctatin ($C_{21}H_{22}O_5$) และ Monascorubrine ($C_{23}H_{26}O_5$) และสีแดงประกอบด้วย Rubropunctamine ($C_{21}H_{23}NO_4$) และ Monascorubramine ($C_{23}H_{27}NO_4$) (Lin , 1973)

<u>กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus*</u>

1) รงควัตถุสีส้ม

รงควัตถุสีส้มมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน (Intracellular lipophilic pigments) หรือละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย ซึ่งกลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีส้มนั้นจะต้องใช้ทั้งวิถีการสังเคราะห์ Polyketide และกรดไขมันร่วมกัน โดย Hexaketide คือสารตั้งต้นของโครงสร้างหลักที่มีคุณสมบัติการให้สี (Chromophore structure) ซึ่งสังเคราะห์ผ่าน Polyketide pathway โดย Hexaketide เกิดจากปฏิกิริยา Condensation ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 5 โมเลกุล จากนั้น Hexaketide เกิดปฏิกิริยา Methylation และ Hydroxylation จนกลายเป็น Polyketide chromophore ตามลำดับ ส่วนวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันจะผลิตกรดไขมันขนาดกลางที่มีจำนวนคาร์บอน 6 หน่วย (Hexanoic acid) หรือ 8 หน่วย (Octanoic acid) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา Condensation ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 3 โมเลกุล ผ่าน Fatty acid pathway จากนั้นทั้งสองส่วนมาเชื่อมต่อกันด้วยปฏิกิริยาทราน- เอสเทอร์ริฟิเคชั่น (*tran*-esterification) ได้รงควัตถุสีส้มคือ Rubrapunctatin และ Monascorubrine ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 (Hajjaj และคณะ, 2000)



รูปที่1 กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีส้ม

ที่มา: Hajjaj และคณะ (2000)

2) รงควัตถุสีแดง

การสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างรงควัตถุสีส้มและหมู่เอมีน โดยไนโตรเจนจากกรดอะมิโน โปรตีน เปปไทด์ หรือกรดนิวคลีอิกจะเข้าแทนที่ Pyronoid oxygen atom ของเม็ดสีส้มด้วยปฏิกิริยา Schiff base formation และ Dehydration เปลี่ยนแปลงโครงสร้างเม็ดสีจาก Rubropunctatin หรือ Monascorubrin เป็น Rubropunctamine หรือ Monascorubramine ตามลำดับ อีกทั้งการมีองค์ประกอบของอะมิโนในโครงสร้างสีแดง ทำให้สีแดงมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ (Extracellular hydrophilic pigments) (Hajjaj และคณะ, 1997; Hajjaj และคณะ, 2000; Carvalho และคณะ, 2003)

3) รงควัตถุสีเหลือง

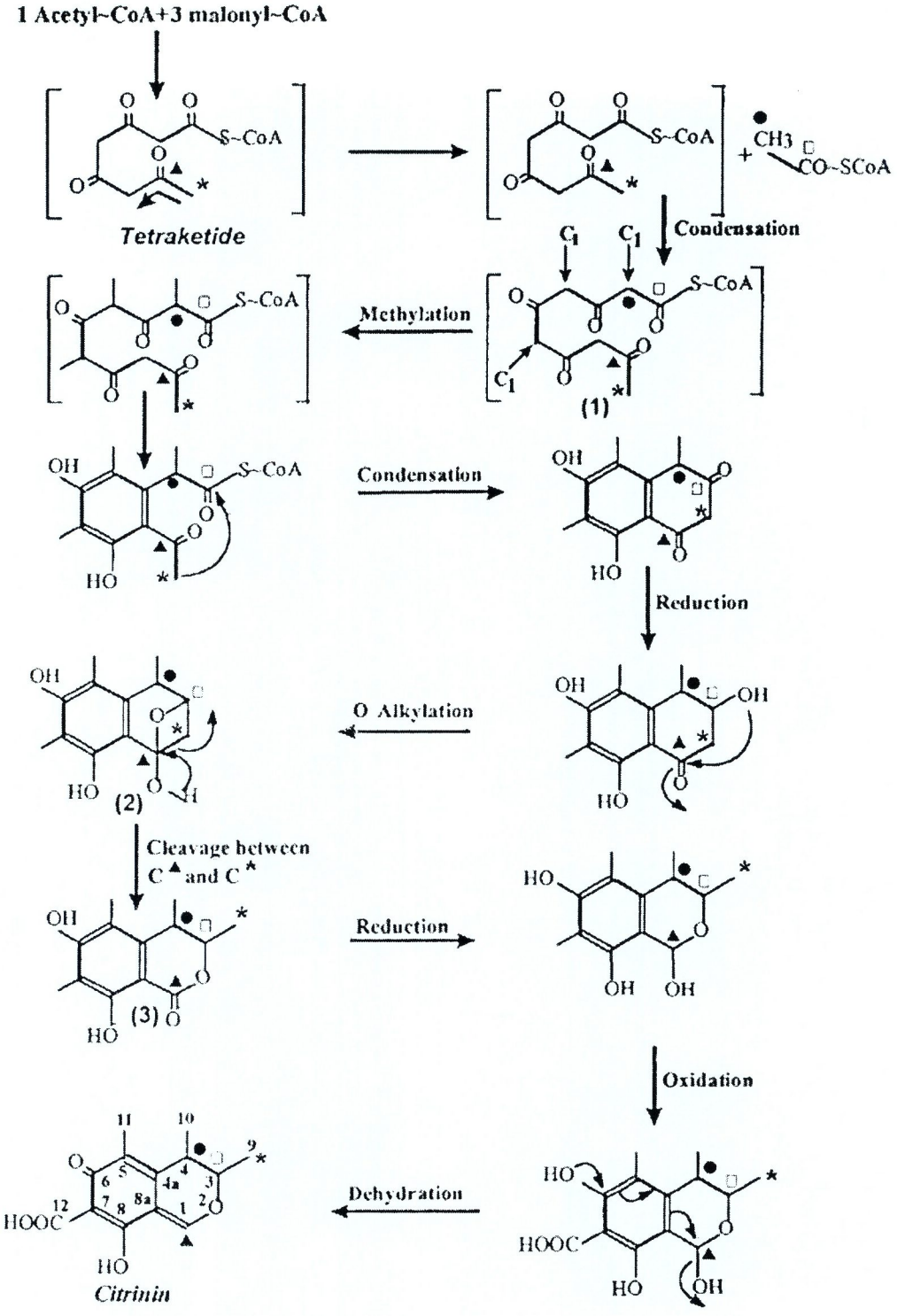
กลไกการสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลืองยังไม่มีใครอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่มีทฤษฎีที่มีความเป็นไปได้อยู่ 2 ทฤษฎี คือ ทฤษฎีที่ 1 ระบุว่ารงควัตถุสีส้มคือ Rubropunctatin หรือ Monascorubrin เกิดปฏิกิริยา Reduction กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้รงควัตถุสีเหลืองคือ Monascin และ Ankaflavin ตามลำดับ (Hajjaj และคณะ, 1997) ส่วนอีกทฤษฎีหนึ่งระบุว่า การสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลืองนั้นเกิดจากกระบวนการทางชีวภาพของรา *Monascus* เอง (Yongsmith และคณะ, 1993)

2.2 ซิตรินิน (Citrinin)

ซิตรินิน (Citrinin) หรือโมนาสซิดิน เอ (Monascidin A) มีสูตรโครงสร้างคือ $C_{13}H_{14}O_5$ เป็น Mycotoxin ที่ถูกผลิตโดยรา *Monascus*, *Penicillium citrinum* และ *Aspergillus* sp. สารนี้มีพิษต่อระบบประสาท ไต และตัวอ่อนในครรภ์ของหนู (Hajjaj และคณะ, 1999) และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้แก่ *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Streptococcus lactis* และ *Pseudomonas fluorescens* (Blanc และคณะ, 1995) ทั้งนี้ซิตรินินพบมากในธัญญาพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ มอลต์ แอปเบิ้ล ชีส และข้าวแดง ซึ่งในสหรัฐอเมริกามีรายงานการปนเปื้อนซิตรินินที่พบในข้าวแดงประมาณ 0.47-11.82 µg/capsule ในประเทศจีนประมาณ 0.2-140 mg/kg และในไต้หวันและจีนประมาณ 4.2-25.1 mg/kg (Xu และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตามข้อกำหนดของการปนเปื้อนของซิตรินินในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมไม่ควรเกิน 0.2 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในประเทศญี่ปุ่นและประเทศไต้หวัน ตามลำดับ ทั้งนี้มีหลายวิจัยซึ่งศึกษาถึงการควบคุมปริมาณความเข้มข้นของซิตรินินในข้าวแดง ดังแสดงในหัวข้อ 2.4

กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน

กลไกการสังเคราะห์ซิตรินินต้องใช้วิถีการสังเคราะห์ Polyketide โดยมีสารตั้งต้นคือ Tetraketide เกิดจากการปฏิกิริยา Condensation ระหว่าง Acetyl-CoA 1 โมเลกุล และ Malonyl-CoA 3 โมเลกุล ผ่าน Polyketide pathway จากนั้นเกิดปฏิกิริยา Methylation, Condensation, Reduction, O-alklyation, Cleavage ระหว่าง C-1 และ C-9, Oxidation และ Dehydration ตามลำดับ จนได้เป็นซิตรินิน (Hajjaj และคณะ, 1999) ดังรูปที่ 2



รูปที่2 กลไกการสังเคราะห์ซิตรินิน เมื่อ C-1 (Δ), C-3 (□), C-9 (*) และ C-4 (●)

ที่มา: Hajjaj และคณะ (1999)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุและโมนาโคลิน เค ของรา *Monascus* ในข้าวแดง

กระบวนการผลิตข้าวแดงแบบดั้งเดิมใช้วิธีการการหมักแบบอาหารแข็ง โดยการหมักแบบอาหารแข็งนั้น หมายถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งในสภาวะที่ไม่มีน้ำอิสระ (Mitchell and Lonane, 1992) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุและโมนาโคลิน เค ของรา *Monascus* ในข้าวแดง ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์ของ *M. purpureus* และสภาวะการเตรียมข้าว เช่น อุณหภูมิ และเวลาในการนึ่งข้าว เป็นต้น นอกจากนี้ยังเป็นผลจากสภาวะในการผลิตข้าวแดงได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นของข้าว ความเป็นกรด-ด่างของข้าว ปริมาณก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุเสริม เป็นต้น ทั้งนี้จากปัจจัยที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น มีผู้ศึกษาความเหมาะสมและอิทธิผลของปัจจัยดังกล่าวแล้วในหลายกรณีด้วยกันซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

1) อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราตระกูล *Monascus* มีค่าประมาณ 28-32 °C โดยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุดที่ 15-18 °C และมีอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญที่ 45 °C ตัวอย่างเช่น *M. purpureus* CBS 109.7 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ต่ำที่สุด และอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ 34, 18 and 46 °C ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุมีค่าอยู่ระหว่าง 25-28 °C (Carvalho et al., 2003)

Lin (1973) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Monascus* sp. F-2 ต่อการสร้างรงควัตถุในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว โดยทดลองหมักรา *Monascus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของแป้งข้าว ที่อุณหภูมิ 27, 32, 37 และ 40 °C นาน 3 วัน พบว่า *Monascus* สามารถการผลิตสีสูงสุดที่อุณหภูมิ 32 °C และหากอุณหภูมิของสภาวะการหมักสูงกว่า 32 °C จะทำให้ *Monascus* สามารถสร้างสารสีลดลง อีกทั้งยังเสนอว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของรา โดยรา *Monascus* สามารถเจริญที่อุณหภูมิระหว่าง 25-37 °C และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30 °C

นอกจากนั้นหลายๆ งานวิจัยได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตโมนาโคลิน เค จาก *Monascus* sp. ตัวอย่างเช่น Su และคณะ (2003) ทำการทดลองหมัก *M. purpureus* CCRC 31615 ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 °C พบว่า รา *Monascus* สามารถผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 °C ขณะที่การผลิตโมนาโคลิน เค ลดลงอย่างมาก เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ 25 และ 37 °C

2) ความชื้น

ความชื้นเริ่มต้นของสารอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตสารทุติยภูมิ เช่น การผลิตรงควัตถุของราในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ Johns และ Stuart (1991) ได้ศึกษาการสร้างสีของ *M. purpureus* FRR 2190 ในอาหารแข็ง (glucose-peptone media) โดยทดลองหมักข้าวด้วย *M. purpureus* ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 16 วัน และเตรียมข้าวที่มีความชื้นเริ่มต้นระหว่าง 15-56 %(wb) พบว่าความชื้นเริ่มต้นของข้าวที่เหมาะสมต่อการสร้างสีของ *Monascus* ควรมีค่าประมาณ 56 % และ มีค่า pH เริ่มต้น

6.0 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเหมาะสมต่อการเจริญของราเข้าไปถึงกลางเมล็ดข้าว และราสามารถสร้างสีส้ม-แดงได้ในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังพบว่า ถ้าความชื้นเริ่มต้นของข้าวต่ำกว่า 38 % จะไม่พบเส้นใยของราภายหลังการบ่มนานถึง 2 สัปดาห์ และที่ความชื้นเริ่มต้นของข้าว 38-39.5 % พบว่าการเจริญของราจำกัดเฉพาะแต่เพียงภายนอกเมล็ดข้าวเท่านั้น และผู้วิจัยเสนอว่าการผลิตรงควัตถุของ *Monascus* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งควรใช้ความชื้นเริ่มต้นสูง (~ 56 %wb) อีกทั้งสามารถเติมน้ำในระหว่างหมักข้าว เพื่อให้รามีน้ำเพียงพอสำหรับการเจริญ

แต่อย่างไรก็ตาม Teng และ Feldheim (2000) ได้ศึกษาการหมักข้าวเพื่อผลิตสีจากข้าวแดงพบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการหมักข้าวแดง เพื่อให้ *Monascus* ผลิตสีได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 24 % และการสร้างรงควัตถุของราจะลดลงหากเติมน้ำในระหว่างการหมัก

ทั้งนี้ Yongsmith และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของความชื้นเริ่มต้นต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus* sp. KB9 ด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง โดยทดลองหมักข้าวด้วย *Monascus* sp. KB9 ที่ความชื้นเริ่มต้น 32, 35, 38 และ 43 % ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C นาน 18 วัน พบว่าความชื้นเริ่มต้นมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและการสังเคราะห์รงควัตถุ ซึ่งความชื้นเริ่มต้นของข้าวที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus* sp. KB9 มีค่าระหว่าง 32-43 % โดยที่ความชื้นเริ่มต้นของข้าว 38 % จะให้ค่าความเข้มสีสูงสุด อย่างไรก็ตาม Yongsmith และคณะ เสนอว่าจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะหรือชอบที่จะเจริญที่ความชื้นเริ่มต้นต่างกัน ปริมาณน้ำที่มากเกินไปอาจลดความพรุนของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเมล็ดข้าว เป็นสาเหตุให้สารตั้งต้นเกาะกันแน่น ซึ่งเหนี่ยวนำให้การถ่ายเทออกซิเจนลดลง

3) ความเป็นกรด-ด่าง

ราตระกูล *Monascus* สามารถเจริญได้ในช่วง pH กว้างตั้งแต่ 2.5-8.0 แต่ pH ที่เหมาะสมควรมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0-7.0 อย่างไรก็ตาม pH เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญควรมีค่าประมาณ 6.5 นอกจากนี้ pH ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุนั้นมีความแตกต่างกันไป โดยที่ pH ต่ำ (pH 4.0) เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สีเหลือง และ pH ที่สูงกว่า (pH 5.5-7.0) เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดง (Chen และ Johns, 1993; Teng และ Feldheim, 2001; Carvalho และคณะ, 2003) ขณะที่ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค ของรา *Monascus* มีค่าอยู่ระหว่าง 5.5-7.0 (Lian และคณะ, 2007; Ng และ Shyu, 2004; Panda และคณะ, 2010)

Johns และ Stuart (1991) ศึกษาความเป็นกรด-ด่างของข้าวเริ่มต้นที่ระดับ pH 3.4 , 6.0 และ 7.0 ต่อการสร้างสีของ *M. purpureus* FRR 2190 โดยหมักข้าวด้วย *Monascus* ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C นาน 16 วัน pH ถูกปรับด้วย HCl เข้มข้น 1M หรือ NaOH เข้มข้น 1 M จากผลการทดลองพบว่า ที่ pH เริ่มต้น 3.4, 6.0 และ 7.0 เหมาะสมต่อการสร้างสีเหลือง ส้ม แดง ตามลำดับ และที่ pH เริ่มต้น 6.0 *M. purpureus* FRR 2190 สามารถผลิตสีทั้งสามสีได้สูงสุด

นอกจากนั้น Ng และ Shyu (2004) ศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตโมนาโคลิน เค จาก Monascus-nata complex ซึ่ง *M. ruber* CCRC 31532 หรือ/และ *M. pilosus* NCHU M-35 จะถูกเพาะเลี้ยงในชิ้นวุ้นมะพร้าวในอาหารเหลว pH ถูกปรับด้วย HCl เข้มข้น 1M หรือ NaOH เข้มข้น 1 M ผลการทดลองพบว่า pH 6.0-7.0 เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโมนาโคลิน เค

4) ปริมาณก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ราตระกูล *Monascus* เป็น Aerobic fungi แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนอย่างจำกัด ซึ่งภายใต้สภาวะดังกล่าว *Monascus* จะผลิตเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูง แต่สังเคราะห์รงควัตถุได้ในปริมาณต่ำ อย่างไรก็ตาม *Monascus* จะผลิตเอทานอลลดลงและให้รงควัตถุเพิ่มขึ้น เมื่อเจริญภายใต้สภาวะอากาศที่มีองค์ประกอบตามธรรมชาติ (O_2~0.21-0.5 atm, CO_2~0.02 atm) (Han และ Mudgett, 1992) หรือมีการถ่ายเทของอากาศสูงไม่มากเกินไป (aeration rate ~1 NmL/g.min) (Carvalho และคณะ, 2006) ทั้งนี้การผลิตสารสีของ *Monascus* จะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสูงมากเกินไป (O_2~1.2-2.0 atm) (Han และ Mudgett, 1992) หรือมีการถ่ายเทของอากาศสูง (aeration rate > 1 NmL/g.min) (Carvalho และคณะ, 2006) หรือมีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบสูง (CO_2 > 0.02 atm) (Han และ Mudgett, 1992)

Han และ Mudgett (1992) ศึกษาประสิทธิภาพของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุของ *M. purpureus* ATCC 16365 ในอาหารหมักแบบแข็ง โดยทดลองหมักข้าวด้วย *M. purpureus* ATCC 16365 ใน Closed pressure vessels และเปลี่ยนแปลงระดับของก๊าซออกซิเจนระหว่าง 0.1-2.1 atm ที่คาร์บอนไดออกไซด์คงที่ 0.02 atm พบว่า *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุได้สูง เมื่อให้ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ 0.5 atm และการสังเคราะห์รงควัตถุจะลดลงเมื่อปริมาณก๊าซออกซิเจนสูงถึง 1.2 atm และการสังเคราะห์รงควัตถุจะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์เมื่อปริมาณก๊าซออกซิเจนเพิ่มขึ้นถึง 2.0 atm นอกจากนี้จากการทดลองหมักข้าวที่สภาวะออกซิเจนคงที่ที่ 0.21 atm และเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่าง 0.02-1.0 atm พบว่า *Monascus* สามารถสังเคราะห์รงควัตถุได้สูงสุดที่ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำที่สุด คือที่สภาวะ 0.02 atm และหากเพิ่มก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงถึง 1.0 atm การสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus* จะถูกยับยั้งโดยสมบรูณ์ อย่างไรก็ตาม Han และ Mudgett (1992) ยังได้เสนอว่า ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกสะสมหรือก๊าซออกซิเจนที่ถูกจำกัดในระหว่างการหมัก จะมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus* ในอาหารแข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระหว่างการหมักควรกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์และเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในระบบ เพื่อให้ *Monascus* สามารถสังเคราะห์รงควัตถุได้สูงสุด

นอกจากนี้ Carvalho และคณะ (2006) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ อัตราการหายใจ และการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง โดยทดลองหมัก *Monascus* sp. LPB 31 ในข้าวที่อุณหภูมิ 32 °C นาน 8 วัน ภายในคอลัมน์ และให้อากาศที่อัตรา 0.00-2.00 NmL/g.min (มิลลิลิตรของอากาศต่อกรัมของข้าวน้ำหนักเปียกต่อนาที) พบว่า *Monascus* สามารถผลิตสารสีได้สูงสุด ที่

สภาวะ 1 NmL/g.min และจะผลิตสารสีลดลงเมื่ออัตราการให้อากาศต่ำ (< 1 NmL/g.min) หรือสูงมากเกินไป (> 1 NmL/g.min) เนื่องจากภายใต้สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศต่ำ ทำให้อากาศไม่เพียงพอต่อการถ่ายเทของออกซิเจน และการนำออกซิเจนไปใช้สำหรับกระบวนการ Metabolism ของเซลล์ อีกทั้งภายใต้สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศสูง จะเกิดการ Shift ของ Metabolism ของราไปใช้ยังกระบวนการอื่น เช่น การผลิตเอทานอลหรือซิตรินิน

ทั้งนี้อากาศเป็นจุดวิกฤตอย่างหนึ่งสำหรับการผลิตสารสีของ *Monascus* เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความชื้นสัมพัทธ์หรือการถ่ายเทออกซิเจนเป็นผลต่อการเปลี่ยนแปลง Metabolism ของเซลล์ ความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารสีมีค่าอยู่ที่องค์ประกอบของอากาศตามธรรมชาติ คือ ออกซิเจน 0.21 atm และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.02 atm

5) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุ โมนาโคลิน เค และการเจริญเติบโตของรา *Monascus* ทั้งนี้ชนิดของรงควัตถุและการหลั่งรงควัตถุออกนอกเซลล์มีความสัมพันธ์กับแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของรา *Monascus* ได้แก่ สารอินทรีย์ เช่น เปป โตน และสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียและไนเตรต (Carvalho และคณะ, 2003) โดยเฉพาะโมโนโซเดียมกลูตาเมต (MSG) ซึ่งมีผลช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์สารสีแดงให้สามารถละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น (Lin, 1973; Johns และ Stuart, 1991; Chens และ Johns, 1993) นอกจากนี้หลายๆ งานวิจัยได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารโมนาโคลิน เค พบว่า แหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียคลอไรด์ Histidine โซเดียมกลูตาเมต และเปปโทน เหมาะสมต่อการผลิตโมนาโคลิน เค จาก *Monascus* sp. ขณะที่แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมอะซิเตรต เมไทโอนีน และยูเรีย ไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารโมนาโคลิน เค (Lian และคณะ, 2007; Ng และ Shyn, 2004; Wang และคณะ, 2003)

Lin (1973) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์รงควัตถุของ *M. purpureus* F-2 ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว โดยบ่มราที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 วัน ใน Erlenmeyer flask ที่ความเร็วรอบ 160 rpm แหล่งไนโตรเจนจะเติมที่อัตราส่วน 13.0 mg ต่อกลูโคสเข้มข้น 3% ในน้ำ 50 ml พบว่า โมโนโซเดียมกลูตาเมต โซเดียมไนเตรต และโพแทสเซียมไนเตรต เหมาะสมสำหรับการผลิตรงควัตถุสีแดง ในทางตรงกันข้ามสารอินทรีย์ เช่น เปปโตน และ Yeast extract ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตรงควัตถุสีแดง

ทั้งนี้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการผลิตรงควัตถุสีแดงมากที่สุด ที่ความเข้มข้น 1.26% (Lin และ Demain, 1991) นอกจากนี้กรดอะมิโน เช่น Histidine และ Serine ยังช่วยปรับปรุงการผลิตรงควัตถุสีแดง แต่กรดอะมิโน เช่น Leucine, Valine, Lysine และ Methionine มีผลทำให้การผลิตรงควัตถุสีแดงลดลง (Lin และ Demain, 1994)

อย่างไรก็ตาม Chen และ John (1993) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์รงควัตถุของ *M. purpureus* UQM 192F (FRR 2190) ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว โดยหมักรา *Monascus* ในแหล่งคาร์บอนกลูโคส และเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนระหว่าง เปปโทน แอมโมเนีย และไนเตรต ควบคุม pH 6.5

ตลอดการทดลอง พบว่าเปปโตนสามารถช่วยกระตุ้นให้ราสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงได้สูงสุด รองมาคือแอมโมเนียและไนเตรต ตามลำดับ

นอกจากนี้ Wang และคณะ (2004) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์โมนาโคลิน เค และซิตรินินด้วย *M. purpureus* NTU 601 โดยเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% และ 0.1%, เมไทโอนีน 0.5% และ 1.0%, ยูเรีย 0.5%, โมโนเดียมกลูตาเมต 1.0% ลงในข้าว จากนั้นทำการหมักข้าวด้วย *Monascus* ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 9 วัน ผลการทดลองพบว่า เพียงการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% สามารถปรับปรุงการผลิตโมนาโคลิน เค ได้ ขณะที่การผลิตซิตรินินเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

6) แร่ธาตุและอาหารเสริม

Lin (1973) ศึกษาประสิทธิภาพของวิตามินบีที่มีผลต่อการสังเคราะห์รงควัตถุของ *M. purpureus* F-2 พบว่ากรดโฟลิกสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุได้ แต่วิตามินบีชนิดอื่น อันได้แก่ PABA, thaiamine, biotin, Ca-pantothenate, riboflavin, niacin และ pyridoxine ไม่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุของ *Monascus* ได้

นอกจากนี้ Carvalho และคณะ (2003) เสนอว่า ฟอสเฟตเข้มข้นสูงและแมกนีเซียมซัลเฟตมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุของ *M. purpureus* แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันข้าวโพด และโมโนโซเดียมกลูตาเมตจะช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุ ขณะที่การเติม Tween 80 เข้มข้น 0.4% สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุ โดยไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของ *Monascus*

2.4 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตซิตรินินของรา *Monascus*

การลดปริมาณการผลิตซิตรินินจากเชื้อราสามารถปฏิบัติได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธีการกลายพันธุ์ การควบคุมองค์ประกอบของอาหาร การควบคุมสภาวะการเลี้ยง หรือวิธีการสกัด ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตซิตรินิน ของรา *Monascus* อันได้แก่ ปัจจัยด้านสารอาหาร เช่น แหล่งไนโตรเจน กรดไขมันและ Methylketone และปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณก๊าซออกซิเจน ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งและเหลว สามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
29 พ.ย. 2555

1) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการช่วยลดการผลิตซิตรินิน ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการลดซิตรินินของ *Monascus* ได้แก่ เมไทโอนีน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต

Blanc และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจน (ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต และเมไทโอนีน) ต่อการผลิตซิตรินินของ *M. ruber* ATCC 96218 โดยหมักราที่อุณหภูมิ 27 °C ในอาหารเหลวด้วยแหล่งคาร์บอนเป็นเอทานอล ปรับ pH เริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 6.5 ผลการทดลองพบว่า ราสามารถผลิตซิตรินินได้ 100-120 mg/L เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตและโมโนโซเดียมกลูตา

เมตเป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามเมื่อใช้เมไทโอนีนเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของซิตรินินลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ทั้งนี้การใช้เมไทโอนีนและยูเรียจะมีผลต่อการลดลงทั้งการสังเคราะห์รงควัตถุและซิตรินินของ *Monascus*

Wang และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตซิตรินิน Monacolin K และ γ-aminobutyric acid (GABA) ของ *M. purpureus* NTU 601 ด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ โมโนโซเดียมกลูตาเมต เมไทโอนีนและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า เมไทโอนีนและยูเรียสามารถยับยั้งการผลิตซิตรินิน และ Monacolin K โดยซิตรินินจะลดลงจาก 813 ppb เป็น 55-81 ppb เมื่อใช้เมไทโอนีนที่ความเข้มข้น 0.5-1.0% และยูเรียเข้มข้น 0.5% อย่างไรก็ตามโมโนโซเดียมกลูตาเมตและแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 1.0% สามารถลดการผลิตซิตรินินจาก 813 ppb เป็น 90-98 ซึ่งแหล่งไนโตรเจนได้แก่ เมไทโอนีน ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และโมโนโซเดียมกลูตาเมต สามารถยับยั้งการผลิตซิตรินินได้ตามลำดับ

2) กรดไขมันและ Methylketone

กรดไขมันเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการยับยั้งการผลิตซิตรินิน ทั้งนี้กรดไขมันที่สามารถลดซิตรินินเป็นกรดไขมันที่มีขนาดสายกลาง (Medium-chain fatty acids) อันได้แก่ Octanoic acid (C_8), Decanoic acid (C_{10}) และ Dodecanoic acid (C_{12}) อีกทั้งกรดไขมัน Octanoic acid (C_8) สามารถเพิ่มการผลิตรงควัตถุสีแดงของ *Monascus* ได้ ซึ่งสามารถแสดงรายละเอียดได้ดังนี้

Hajjaj และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของกรดไขมันต่อการผลิตซิตรินินของรา *M. ruber* ATCC 96218 โดยเติมกรดไขมัน ได้แก่ Hexanoic acid (C_6), Octanoic acid (C_8), Decanoic acid (C_{10}), Dodecanoic acid (C_{12}), Myristic acid (C_{14}), Stearic acid (C_{16}) และ Oleic acid (C_{18}) เข้มข้น 1 mM ในอาหารเหลว พบว่า Octanoic acid เป็นกรดไขมันเพียงตัวเดียวที่สามารถเน้นการผลิตรงควัตถุสีแดงได้ เนื่องจาก Octanoic acid เป็นกรดไขมันตั้งต้นของการสังเคราะห์รงควัตถุ นอกจากนี้ Medium-chain fatty acids ได้แก่ Octanoic acid, Decanoic acid และ Dodecanoic acid สามารถยับยั้งการผลิตซิตรินิน โดยเฉพาะ Dodecanoic acid ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสุด ส่วน Hexanoic acid, Myristic acid, Stearic acid และ Oleic acid ไม่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการผลิตซิตรินิน เนื่องจาก Medium-chain fatty acids (C_8-C_{12}) จะถูกดูดซึมโดยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Peroxisomal เปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA หรือ Medium-chain fatty acids ได้แก่ Octanoic acid, Decanoic acid และ Dodecanoic acid ถูกเมทาบอลิไลซ์ด้วยกระบวนการ β-decarboxylation เปลี่ยนเป็น Methylketones ได้แก่ Heptanone, 2-nonanone และ 2-undecanone ตามลำดับ จากนั้น Methylketones จะเปลี่ยนเป็น Acetyl-CoA ด้วยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Peroxisomal

ทั้งนี้ Medium-chain fatty acids หรือ Methylketones เป็นสาเหตุของการยับยั้งการผลิต ซิตรินิน เนื่องจากซิตรินินหรือสารตัวกลางในการสร้างซิตรินินจะถูกทำลายด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ Peroxisome หรือ Peroxisomal enzyme (peroxidase) จากการเหนี่ยวนำของกรดไขมันและ Methylketones อย่างไรก็ตามกรดไขมัน Long-chain fatty acids (C_{14}-C_{18}) หรือ Short-chain fatty acids (C_6) จะ

ไม่เปลี่ยนเป็น Methylketones เนื่องจากกรดไขมันดังกล่าวจะถูกดูดซึมโดยกระบวนการ β-oxidation ภายใน Mitochondrial จึงเป็นผลให้กรดไขมันทั้ง Long-chain fatty acids (C_{14}-C_{18}) และ Short-chain fatty acids (C_6) ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการผลิตซิตรินินของ *Monascus*

3) อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์สารทุติยภูมิของ *Monascus* เช่น ซิตรินิน Monacolin K และ γ-aminobutyric acid (GABA) โดยรา *Monascus* จะผลิตซิตรินินลดลง เมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 30-34 °C และสามารถผลิตซิตรินินได้สูงขึ้น เมื่อเจริญที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 26 °C (Wang และคณะ, 2003)

4) Water activity

Water activity และความชื้นมีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตซิตรินินของรา ซึ่งจากงานวิจัยของ Comerio และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของ Water activity (0.800, 0.810, 0.825 และ 0.885) ต่อการเจริญและการผลิตซิตรินินของ *Penicillium citrinum* ในข้าวสาลี พบว่าซิตรินินเพิ่มขึ้นเมื่อ Water activity สูงขึ้น โดยที่ Water activity เท่ากับ 0.885 รา *P. citrinum* จะผลิตซิตรินินได้สูงถึง 20,000 μg/kg แต่ที่สภาวะ Water activity น้อยกว่า 0.810 ราสามารถเจริญโดยไม่ผลิตซิตรินิน

อย่างไรก็ตาม Water activity และความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการลดการผลิตซิตรินินของ *Monascus* ยังไม่มีการแนะนำในเบื้องต้น

5) ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการสังเคราะห์รงควัตถุและซิตรินิน โดยออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายของปฏิกิริยา Oxidative phosphorylation และเป็นสารตั้งต้นของ Monooxygenases ซึ่งเกี่ยงข้องกับการเมทาบอไลซ์ของเชื้อรา โดยเฉพาะสารทุติยภูมิ อย่างไรก็ตามบทบาทของ Monooxygenases ต่อการสังเคราะห์รงควัตถุยังไม่มีการอธิบาย (Hajjaj และคณะ, 1999)

Hajjaj และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของ Oxygen supply ต่อการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงและซิตรินินของ *M. ruber* ATCC 96218 ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว โดยแปรผัน Relative oxygen transfer coefficients (rOTC) ที่ 0.33, 1.00, 1.48, 2.22, 3.16 และ 7.07 ผลการทดลองพบว่า การผลิตซิตรินินแปรผันตรงกับการถ่ายเทออกซิเจน โดยที่สภาวะ High relative oxygen transfer coefficients รา *Monascus* จะผลิตสารสีแดงและซิตรินินปริมาณสูง โดยอัตราการผลิตซิตรินินจะสูงกว่าอัตราการผลิตรงควัตถุสีแดง แต่ที่สภาวะ Low relative oxygen transfer coefficients รา *Monascus* จะผลิตสารสีแดงและซิตรินินปริมาณต่ำ แต่อัตราการผลิตซิตรินินจะต่ำกว่าอัตราการผลิตรงควัตถุสีแดง