

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

1. เศษข้าวอบกรอบจากการผลิตข้าวอบกรอบตราวิสดี

บริษัทเป๊ปซี่-โคล่า (ไทย) เทรคคิง จำกัด (ภาพ 1) เริ่มดำเนินธุรกิจในประเทศไทยเมื่อ พ.ศ. 2525 โดยจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่จ้างบริษัทอื่นผลิตให้ ในปี พ.ศ. 2538 ได้ตั้งโรงงานฟรีโตะ-เลย์ (ประเทศไทย) จังหวัดลำพูน ซึ่งตั้งอยู่ระหว่างจังหวัดที่เป็นแหล่งวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์และประกอบกับเป็นเขตพื้นที่อุตสาหกรรมด้วย ในโรงงานผลิตข้าวอบกรอบตราวิสดี ซึ่งมีวัตถุดิบหลักเป็นข้าวเจ้าของบริษัทเป๊ปซี่-โคล่า (ไทย) เทรคคิง จำกัด จังหวัดลำพูน มีการประกันคุณภาพของผลิตภัณฑ์หลัก ซึ่งต้องมีการคัดเกรดขนาดข้าวอบกรอบตราวิสดีให้ได้มาตรฐาน ทำให้ในแต่ละวันของกระบวนการผลิต มีผลผลิตข้างเคียงเป็นชิ้นส่วนข้าวอบกรอบที่แตกหักหลังจากการขึ้นรูปประมาณ 2,000 กิโลกรัมต่อวัน (ภาพ 2) ปกติทางบริษัทจะคัดขายออกให้โรงงานอาหารสัตว์ ราคา กิโลกรัมละ 1-2 บาท ซึ่งต่างจากข้าวเจ้าทั่วไปซึ่งมีราคา กิโลกรัมละ 29 บาท (สมาคมโรงสีข้าวไทย, 2554) จากการวิเคราะห์ห้อยค์ประกอบแป้งของเศษข้าวอบกรอบจากโรงงาน พบว่าในเศษข้าวอบกรอบมีเนื้อแป้ง $85.80 \pm 0.30\%$



ภาพ 1 บริษัทเป๊ปซี่-โคล่า (ไทย) เทรคคิง จำกัด จังหวัด ลำพูน



ภาพ 2 เศษข้าวอบกรอบที่แตกหักไม่ได้มาตรฐาน

2. เชื้อราโมนาสคัส (*Monascus* spp.)

Monascus เป็นเชื้อราเส้นสายที่สามารถสร้างสารสีได้หลายชนิดตั้งแต่สีเหลือง จนถึงสีแดง และจัดเป็นเชื้อราเส้นสายใน Class *Ascomycetes* ที่สามารถดำรงชีวิตโดยการสืบพันธุ์แบบครบวงจรได้ด้วยตัวเอง (homothallic fungus) (ภาพ 3) ชาวจีนรู้จักเชื้อรานี้มาช้านานมากกว่าพันปีว่าสามารถใช้เป็นยารักษาโรค (Lizuka and Lin, 1981) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมัก เช่น ไวน์แดง บรันดี เกาเหลียง (Hesseltine, 1965) และอาหารหมักพื้นบ้านจำพวก เต้าหู้ยี้ ปลาแปงแดง มิโซะ และสีผสมอาหารตามธรรมชาติ (Su *et al.*, 1973)

Alexopoulos *et al.* (1996) และ Hawksworth *et al.* (1995) ได้จัดอนุกรมวิธานของ *Monascus* spp. ไว้ดังนี้

Kingdom : Fungi

Division : *Ascomycota*

Class : *Ascomycetes*

Order : *Eurotiales*

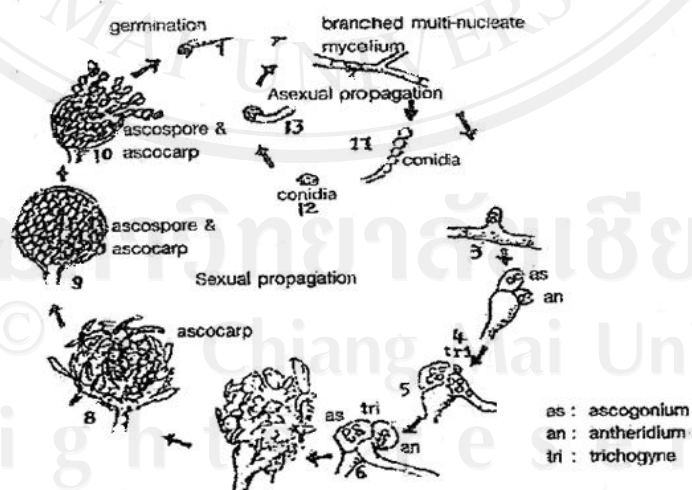
Family : *Monascaceae*

Genus : *Monascus*

Monascus spp. เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกันและมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย เส้นใยเมื่ออายุน้อยมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วงและมักเจริญแบบซิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง การสืบพันธุ์มีทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ

การสืบพันธุ์แบบมีเพศจะคล้ายกับเชื้อราใน Class *Ascomycetes* คือ มีการสร้างเพอริทีเซียม (perithecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลม โดยจะเกิดบนก้อนที่มีหรือไม่มีผนังกันก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (homothallic) โดยสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิดคือ แอนเทอริเดียม (antheridium) และแอสโคโกเนียม (ascogonium) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวที่ปลายของแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วจึงมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส และไมโทซิส ภายในเพอริทีเซียมมีแอสโคสปอร์ (ascospores) มากมาย โดยแอสโคสปอร์จำนวน 2-8 อันจะรวมตัวอยู่ในแอสคัส (ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้ม หรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์ออกมาเพื่อให้งอกใหม่ได้

การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศมีการสร้างโคนิเดียเจริญมาจากโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) โคนิเดีย มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือเกิดติดต่อกันเป็นลูกโซ่ โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเกิดสีแดงได้บ้าง โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกัน การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร และปัจจัยอื่นๆอีกหลายประการ เช่น อายุสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ความเป็นกรดด่าง แสงและอุณหภูมิ เช่นอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35°C โดยทั่วไปโคนิเดียจะงอกภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสม



ภาพ 3 วงจรชีวิตของ *Monascus* (บุษบา, 2540)

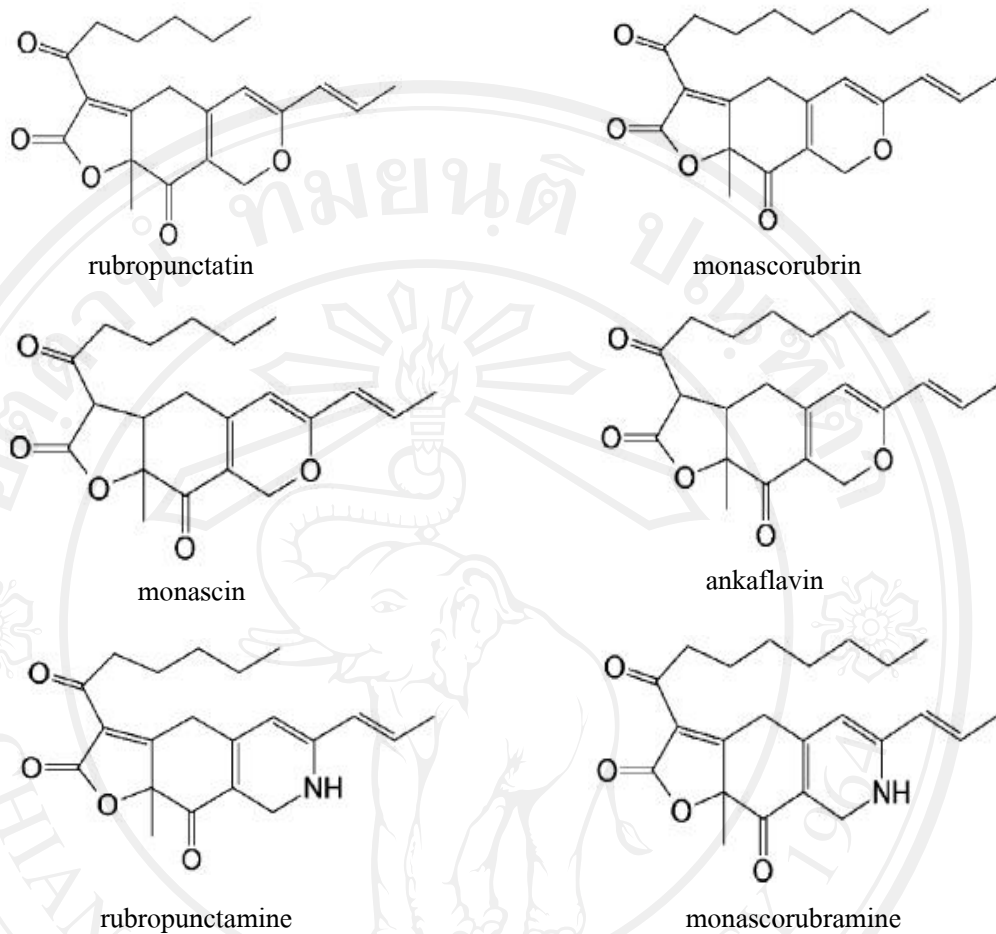
สายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส

ราข้าวแดงที่แยกได้ครั้งแรกจาก Chinese Anka (Ang-quac) เป็น *Monascus purpureus* (Went, 1895) ซึ่งต่อมาได้จัดจำแนกราข้าวแดงที่ได้จากหลายประเทศแถบเอเชียตามระบบใหม่ ออกได้เป็น 12 สปีชีส์ และ 2 วาไรตี้ (Lizuka and Lin, 1981) โดยเน้นที่ลักษณะภายนอกหรือสัณฐานวิทยาเป็นสำคัญ ซึ่งมักมีการเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อมที่มันเจริญอยู่ เช่น อุณหภูมิ ชนิดของอาหาร แสง ความชื้น และอื่นๆ ส่วนลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมีของ *Monascus* นั้นจะมีความคงตัวมากกว่า ดังนั้นในการจัดจำแนก *Monascus* จึงมักใช้ลักษณะทั้งสองควบคู่กันไป ต่อมา Hawksworth and Pitt (1983) ได้จัดจำแนกรา *Monascus* ในระดับสปีชีส์ โดยอาศัยชนิดของอาหาร เลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังพบว่า *Monascus* มีความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นเสมอภายในเซลล์และสปอร์ และมีการเกิด recombination ของดีเอ็นเอในกระบวนการสืบพันธุ์ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศด้วยเช่นกัน

จากการแยก *M. purpureus* จากข้าวแดงหรืออังกักทำให้รู้จักประโยชน์ของเชื้อรานี้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น และปัจจุบันได้รวบรวมเชื้อราโมแนสคัส 25 สายพันธุ์ ได้ดังนี้ คือ *M. albidus*, *M. albus*, *M. anka*, *M. araneosus*, *M. barkeri*, *M. bisporus*, *M. floridanus*, *M. fuliginosus*, *M. kaoliang*, *M. major*, *M. mucoroides*, *M. olei*, *M. paxii*, *M. pallens*, *M. pilosus*, *M. pubigerus*, *M. purpureus*, *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. rubiginosus*, *M. rubropunctatus*, *M. sanguineus*, *M. serorubercens*, *M. vini* และ *M. vitreus* (Lizuka and Lin, 1981; Hawksworth and Pitt, 1983; Nishikawa *et al.*, 1988; Nishikawa and Lizuka, 1993)

สารสีจากโมแนสคัส

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *M. purpureus* บนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C จะพบว่าการสร้างสีภายในเส้นใย หลังจากนั้นอาหารเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีส้มและสีแดง เนื่องจากการขับสารสีในรูปของเหลวออกมาภายนอกทางรูเปิดของปลายเส้นใย เชื้อราโมแนสคัสสามารถสร้างสารสีประกอบด้วยสีส้ม 2 ชนิด คือ rubropunctatin และ monascorubrin สีเหลือง 2 ชนิด คือ monascin และ ankaflavin และสีแดง 2 ชนิด คือ monascorubramine และ rubropunctamine โครงสร้างของสารสีเหล่านี้แสดงในภาพ 4 โดย monascorubramine และ rubropunctamine ที่เป็นสารสีแดงจะเปลี่ยนมาจาก monascorubrin และ rubropunctatin ตามลำดับ



ภาพ 4 โครงสร้างของสารสีจาก *Monascus* (Lin *et al.*, 2008)

สารสีที่สกัดได้จากเชื้อราโมแนสคัส เช่น สารสี rubropunctatin จาก *M. rubropunctatatus* สารสี monascorubrin จาก *M. purpureus* และสารสี monascin จาก *Monascus* sp. เป็นสารประเภท โพลีคีไทด์ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ โดยสารประเภทโพลีคีไทด์จะมีกระบวนการสังเคราะห์ คล้ายกรดไขมันแต่มีสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน Martinkova *et al.* (1995) รายงานระดับความเป็นพิษ ของสารสีที่แยกได้จากเส้นใย *M. purpureus* พบว่าระดับความเป็นพิษต่อตัวอ่อนไก่จากมากไปน้อย คือ monascorubrin, rubropunctatin, monascin และ ankaflavin ตามลำดับ โดยสารสี monascorubrin และ rubropunctatin สามารถสร้างยาปฏิชีวนะต่อ *Bacillus subtilis* และ *Candida pseudotropicalis* และเมื่อทำการเติมไกลซีนในการบ่มเพื่อเลี้ยงเชื้อราพบว่า monascorubrin และ rubropunctatin จะ เปลี่ยนเป็น rubropunctamine และ monascorubramine ซึ่งให้สีม่วงแดง เนื่องจากเกิดการแทนที่

อะตอมออกซิเจนด้วยหมู่อะมิโน นอกจากนี้สารสีที่ได้ทั้ง 6 ชนิด ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของตับเมื่อทดสอบในหนูทดลอง ต่อมาในปี ค.ศ.1999 Martinkova และคณะ ได้ทำการแยกสารสีเหลืองชนิดใหม่ที่เรียกว่า xanthomonasin A จาก *M. anka* สายพันธุ์กลายและได้มีการค้นพบสารประกอบใหม่สองชนิด คือ monascopyridines A และ B ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบสีแดง แต่มีการเติมหมู่ไฮโดรเจน (Wild *et al.*, 2003) นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติด้านอื่นๆพบว่าสารสีเหลือง monascin และ ankaflavin มีคุณสมบัติเป็นสารกดภูมิคุ้มกันต่อเซลล์มะเร็งในหนู Yasukawa *et al.* (1996) รายงานว่าสารสีโมแนสคัสที่สกัดจาก *M. anka* สามารถยับยั้งสาร 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) ซึ่งเป็นสารชักนำการเกิดมะเร็งในหนูและยังพบว่าสารสี monascorubrin มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity)

Carvalho *et al.* (2006) รายงานเกี่ยวกับสารสีที่ผลิตจากเชื้อราโมแนสคัส โดยชี้ให้เห็นว่าสารสีดังกล่าวมีความปลอดภัย เมื่อทำการทดสอบในเชิงปริมาณ โดยสารสีเหล่านี้มีความเป็นพิษต่ำหรือมีความเป็นพิษที่ไม่ชัดเจน ความเป็นพิษดังกล่าวยังเป็นคุณสมบัติด้านการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย ซึ่งพบมากในสารสีส้ม แต่พบน้อยในสารสีแดง เมื่อศึกษาเชื้อราโมแนสคัสอย่างเป็นระบบมากขึ้น จึงพบว่าสารสีเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะด้วย ต่อมาพบว่าผลในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์นี้เป็นผลมาจากสารอื่นที่มีชื่อว่า monascidin A หรือ ซิตรีนินนั่นเอง แต่ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสที่ผลิตซิตรีนิน

การใช้ประโยชน์สีโมแนสคัส

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า สีผสมอาหารที่ปลอดภัยควรได้มาจากธรรมชาติ เช่น จากพืช สัตว์ หรือ เชื้อราแดง ในอดีตมีการสำรวจชนิดและจำนวนแหล่งสีต่างๆของ Francis ในปี ค.ศ. 1987 พบว่า ทั่วโลกมีการจดลิขสิทธิ์เกี่ยวกับแหล่งที่ใช้ในการผลิตสี 127 ฉบับ ซึ่งเป็นแหล่งสีที่ได้มาจากธรรมชาติ 356 ฉบับ และได้มาจากการสังเคราะห์ 7 ฉบับ โดยมีแหล่งสีจากธรรมชาติที่มาจากเชื้อราโมแนสคัสถึง 38 ฉบับ (ศศิธร, 2546) เชื้อราโมแนสคัสหลายสายพันธุ์สามารถผลิตสีได้ แต่สายพันธุ์ที่สำคัญ คือ *M. purpurens* จึงมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในประเทศได้หวัน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และฝรั่งเศส แต่มีเพียงประเทศญี่ปุ่นที่อนุญาตให้ใช้สีจาก *M. purpurens* ได้ถูกต้องตามกฎหมาย แต่ยังมีหลายประเทศในแถบเอเชียใช้สีจากเชื้อรานี้เป็นสีผสมอาหาร ถึงแม้ว่ายังไม่มี การอนุญาตให้ใช้ได้ตามกฎหมายก็ตาม *Monascus* มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่ออุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารให้สี (colorant) ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น สาเก ไวน์แดง เต้าหู้ยี้ มิโชะ และผลิตภัณฑ์เนื้อ นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์ของ *Monascus* ในเครื่องสำอาง

แอลกอฮอล์ จำพวกน้ำหวาน นํ้านม นํ้านมเปรี้ยว และน้ำผลไม้ และอาหารประเภทโปรตีน จำพวก ปลาแป้งแดง ไส้กรอก แฮม เนื้อเทียม ซอสมะเขือเทศ ผลิตภัณฑ์ทะเล ขนมลูกชุบ ปูเทียม และอื่นๆ (บุญบา, 2540)

นอกจากการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารแล้วยังพบว่า *Monascus* สามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ได้หลายชนิดที่น่าสนใจและมีค่าทางเศรษฐกิจจำพวกสารกลุ่มเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ คือเอทิลแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ วิตามินบี 2 ไขมัน และกรดไขมัน สารกลุ่มเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ คือ สารปฏิชีวนะ โมนาโคลิน สารตกตะกอน ยาลดความดันโลหิต ยาพื้นบ้านของจีนรักษาโรคอาหารไม่ย่อย คูมาริน รักษาโรคต่างขาต โคเอนไซม์ Q₁₀ สารให้กลิ่นหอม สารแองคาแลคโตน และสารยับยั้งการกลายพันธุ์ อีกทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด คือ กลูโคอะมิเลส โปรติเอส แอลฟา-กาแลคโตซิเดส แอลฟา-อะมิเลส และโรโบนิวคลิเอส ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อราโมแนสค์ในอาหารมากขึ้น (บุญบา, 2540) ในปี ค.ศ.1992 มีรายงานการใช้สารสีโมแนสค์จำนวนมากกว่า 600 ตันในประเทศญี่ปุ่นซึ่งนับเป็นมูลค่าถึง 1,440 ล้านบาท [(Lee *et al.*, (1995); Carvalho *et al.*, (2006); Fabre *et al.*, (1993)] ได้รายงานว่าการใช้สารสีจาก *M. ruber* สำหรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอก Strasbourg sausages ทำให้ลักษณะสีแดง ความเป็นเนื้อเดียวกันและกลิ่นเครื่องเทศในไส้กรอกดีขึ้นด้วย Shehata *et al.* (1998) ศึกษาการเติมสารสีจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแบบ Egyptian fresh beef sausages พบว่า การใช้ข้าวแดงผสมกับไนไตรท์รวมกันให้รสชาติที่ดีและสีที่ได้มีความเสถียรมากกว่าใช้ในไนไตรท์เพียงอย่างเดียวในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก Andrea *et al.* (2001) ทดลองใช้สีจาก *M. purpureus* ทดแทนการใช้เกลือไนไตรท์กับผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก พบว่าการเติมเกลือไนไตรท์ 10 กรัม/กิโลกรัม ผสมกับสีจากโมแนสค์ 0.5 กรัม/กิโลกรัมในแฮมไก่ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจทั้งในด้านสี รสชาติ และลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ Pattanagul (2002) ศึกษาผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่ทำจากน้ำมันพืชโดยใช้สีจาก *Monascus* ช่วยเพิ่มสีแดง พบว่าไส้กรอกที่พัฒนาได้มีปริมาณคอเลสเตอรอลต่ำกว่าไส้กรอกที่ขายตามท้องตลาด ในปี ค.ศ. 2003 งานวิจัยของ Koehler ได้ทดลองใช้สีจาก *M. purpureus* ผสมในโยเกิร์ตสผลไม้และเปรียบเทียบกับสีผสมอาหารที่ใช้อย่างแพร่หลายในทางการค้า โดยวัดค่าสีจาก *M. purpureus* ในโยเกิร์ตระหว่างการบ่มจนเป็นโยเกิร์ต พบว่าให้ค่าใกล้เคียงกับสีของโยเกิร์ตสดรอเบอร์รี่ในทางการค้า และไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการเก็บ 21 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณ *Lactobacillus* และ *Streptococcus* เท่ากับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสี ดังนั้นจึงสามารถใช้สารสีจาก *M. purpureus* เป็นสีผสมในโยเกิร์ตสดรอเบอร์รี่ได้

Lee and Chen (1998) ศึกษาการใช้สีโมแนคัสในอาหารหลายประเภทดังนี้ 1) Chinese sausage และ dumpling พบว่าให้สีกับส่วนที่เป็นเนื้อได้ดีกว่าส่วนผสมที่เป็นไขมัน ซึ่งมีเพียงเล็กน้อยในผลิตภัณฑ์ 2) ผลิตภัณฑ์เส้นก๋วยเตี๋ยวในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้สีจากโมแนคัสเป็นสีผสมอาหารและไม่มีผลกระทบต่อรสชาติของก๋วยเตี๋ยว 3) นมและโยเกิร์ต พบว่าสีโมแนคัสให้สีใกล้เคียงกับนมกลั่นสเตอริไรซ์ และผลิตภัณฑ์มีความคงตัวมากกว่า 1 เดือน 4) ลูกกวาด ยังสรุปไม่ได้ เนื่องจากสีโมแนคัสไม่ทนต่อกระบวนการผลิตที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงมากกว่า 150°C

นอกจากการใช้สีแดงจากเชื้อราโมแนคัสเป็นสีผสมอาหารแล้ว ยังพบว่าสีเหลืองที่มาจากเชื้อราโมแนคัสนั้นจะมีราคาแพงกว่าสีแดงถึง 5 เท่า ที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน แต่ยังมีความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยมากกว่าสีแดง สีโมแนคัสสามารถใช้สารเคมี เช่น นอร์เมลเอ็คเซน หรือคลอโรฟอร์มสกัดสีเหลืองออกจากสารสีหมักได้แต่อันตราย ถ้ามีสารเคมีที่ใช้สกัดตกค้างดังนั้นก็จะมีนักวิจัยได้ศึกษาสายพันธุ์โมแนคัสสีเหลืองที่สามารถใช้สับสเตรทราคาถูกที่หาได้ในท้องถิ่น เช่น แป้งมันสำปะหลัง เศษมันฝรั่งที่เหลือจากการแปรรูป แป้งถั่วเหลือง หรือข้าว นำมาใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาพหมักแห้ง หรือในอาหารเหลว ทำให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาวิชาการและได้ความรู้การหมักผลิตภัณฑ์จากเชื้อราเพื่ออุตสาหกรรมหมักในประเทศ

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารโมนาโคลิน เค (Monacolin K)

นอกจากสารสีธรรมชาติที่ผลิตมาจาก *Monascus* แล้วยังพบสารสำคัญที่มีคุณสมบัติในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด เรียกว่า โมนาโคลิน เค โดยเกิดจากกระบวนการผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิได้สารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนผ่านวิถีโพลีคีไทด์ (polyketide pathway) ในสมัยราชวงศ์หมิง (1368-1644) ได้มีการนำข้าวแดงมาใช้เพื่อปรุงยาจีนโบราณ ซึ่งมีการบันทึกในตำรายาชื่อ Ben Cao Gang Mu-Dan Shi Bu Yi ว่ามีคุณสมบัติช่วยให้ระบบการไหลเวียนโลหิตในร่างกายดีขึ้น นักวิจัยในประเทศจีนได้มีการศึกษาการบริโภคข้าวแดงในคน พบว่า การบริโภคข้าวแดงปริมาณ 14-55 กรัม/คน/วัน สามารถลดความเข้มข้นของคอเลสเตอรอลได้ 11-32% และลดความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ได้ 12-19% ต่อมาในปี ค.ศ. 1970 Endo ได้แยกสารโมนาโคลินที่ผลิตจาก *Monascus* spp. สารดังกล่าวมีจุดหลอมเหลวที่ $157-159^{\circ}\text{C}$ มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_5$ (MW 404) มีค่า LD_{50} ในหนูเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ฤทธิ์ของสารโมนาโคลิน เค จะเป็นตัวยับยั้งการสร้างเอนไซม์ HMG Co A reductase (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในตับ และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย

(Manzoni and Rollini, 2002) ในปี ค.ศ. 1998 บริษัท Pharmanex ได้นำข้าวแดงที่ได้จากการหมัก *Monascus* ลงบนข้าวมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในร่างกายที่เรียกว่า cholestin สำหรับในประเทศไทย รศ.ดร.สุพล นธการกิจกุล (2551) หัวหน้าคณะวิจัย เรื่อง การผลิตสารลดไขมันในเลือดโดยวิธีชีวสังเคราะห์จาก *M. purpureus* ในข้าวไทย พบสารโมนาโคลิน เค ซึ่งมีฤทธิ์ลดคอเลสเตอรอลในเลือด เทียบเท่ากับลดไขมันในเลือดที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเสริมหรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ ซึ่งช่วยให้ผู้ที่มีปัญหาด้านคอเลสเตอรอลสูงมีทางเลือกในการรักษาเพิ่มขึ้น

Zhao (2002) ศึกษาการผลิตสารโมนาโคลิน เค (monacolin K) ของ *M. purpureus* บนอาหารแข็งโดยใช้ข้าว และอาหารแบบเหลวโดยใช้ผงแป้งจากข้าว พบว่าปริมาณโมนาโคลิน เค ในอาหารแข็ง (0.28-0.35 มิลลิกรัม/กรัม) สูงกว่าในอาหารแบบเหลว (0.108 มิลลิกรัม/กรัม)

Xu *et al.* (2002) ศึกษาเชื้อราสายพันธุ์ *Monascus* sp. XFP-1 เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดงและสารโมนาโคลิน เคได้มากขึ้น โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 7 วัน พบว่าค่าสีในการหมักข้าวแดงประมาณ 1,500 U (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร) และใกล้ 2,000 U (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร) จากการวิเคราะห์สารโมนาโคลิน เค โดยวิธี HPLC พบว่าปริมาณโมนาโคลิน เค เท่ากับ 0.71 มิลลิกรัม/กรัม และ 1.27 มิลลิกรัม/กรัม เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน xuezhikang และ lovastatin ตามลำดับ

Lee *et al.* (2002) ศึกษาสายพันธุ์ของ *Monascus* ที่ผลิตสารสีแดงและสารโมนาโคลิน เค ในปริมาณมากขึ้น โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและอาหารเหลว จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรสำหรับวัดปริมาณสีแดงและวัดปริมาณโมนาโคลิน เค โดยใช้วิธี HPLC จากการศึกษาเชื้อราโมแนสค์สทั้งหมด 72 สายพันธุ์ พบว่า *M. purpureus* M15 สร้างสารสีแดงปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 12 ยูนิต และปริมาณโมนาโคลิน เค เท่ากับ 4 มิลลิกรัม/กรัม ในอาหารแข็ง โดยสภาวะในการเพาะเลี้ยงต้องมีความชื้นและปริมาณอากาศที่เหมาะสม ส่วนในอาหารเหลวตรวจพบปริมาณสารโมนาโคลิน เค น้อยกว่า 5 ไมโครกรัม/กรัม และไม่มีความเสถียร

Chang *et al.* (2002) ได้วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ response surface methodology เพื่อหาสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารโลวาสตาติน โดย *M. ruber* CCRC 31535 ซึ่งพบว่าปริมาณของสารโลวาสตาตินจะเพิ่มสูงสุดเท่ากับ 131 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อใช้อาหารที่มีสูตรดังนี้ แป้งข้าวเจ้า 34.4 กรัม/ลิตร เปปโตน 10.8 กรัม/ลิตร ไกลซีน 26.4 มิลลิกรัม/ลิตร และกลูโคส 129.2 กรัม/ลิตร

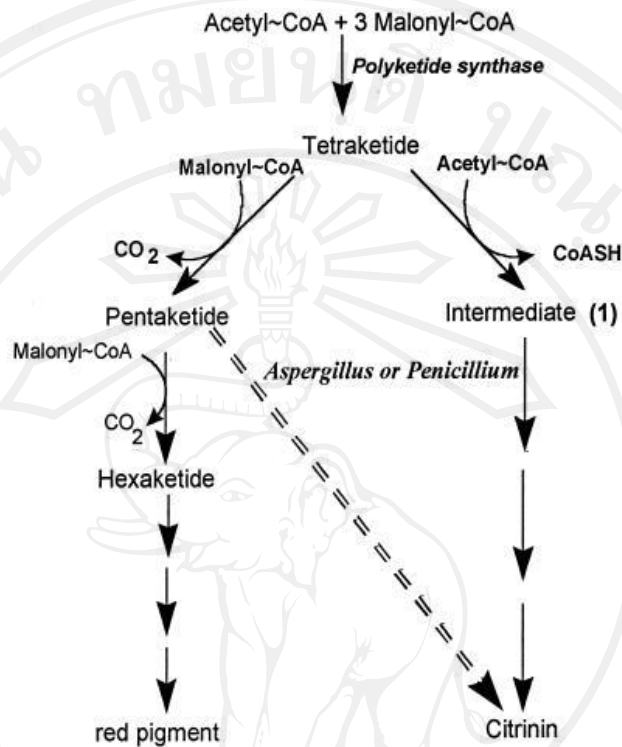
Chen and Hu (2005) ศึกษาปริมาณโมนาโคลิน เค และซีตรินินในข้าวแดงที่หมักจาก *Monascus* sp. M12-69 พบว่า การเพาะเลี้ยงที่ความชื้นเริ่มต้นระหว่าง 55% ถึง 75% เป็นสภาวะที่ดีที่สุดต่ออัตราส่วนของโมนาโคลินเค (2.52 mg/g) และซีตรินิน (0.13 ng/g) ดังนั้น *Monascus* sp. M12-69 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการใช้ผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่ให้ปริมาณสารโมนาโคลินสูง

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับซีตรินินในเชื้อราโมแนสคัส

ซีตรินินจัดเป็นสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) ส่วนใหญ่จะพบจาก *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในธัญพืช ผลไม้ และถั่ว คนจะได้รับซีตรินินจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน พบครั้งแรกในปี ค.ศ.1931 จากการแยกสารจาก *Penicillium citrinum* ต่อมาในปี ค.ศ. 1951 พบปัญหาข้าวเหลือง “yellow rice problem” ในข้าวที่ประเทศไทยส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น เพราะมีการปนเปื้อนจาก *P. citrinum* และตรวจพบซีตรินิน นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสกุลอื่นที่สามารถสร้างซีตรินินได้ เช่น *A. terreus*, *A. carneus* และ *A. niveus* เป็นต้น จากรายงานการปนเปื้อนซีตรินินในอาหารประเภทต่างๆ โดยเฉพาะอาหารประเภทเมล็ดธัญพืชและอาหารสัตว์ (European mycotoxin network, 2002) Sabater-Villar *et al.* (1999) ได้ศึกษาในห้องปฏิบัติการ พบว่าซีตรินินมีผลต่อการทำงานของไตและโครงสร้างระดับจุลภาค ซีตรินินจะไปสะสมในไมโทคอนเดรียและรบกวนระบบการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนในเซลล์แต่ไม่มีผลต่อผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การเรียงลำดับของโปรตีนและอาร์เอ็นเอเมื่อการทำงานของไมโทคอนเดรียผิดปกติไป ทำให้ระดับของไกลโคเจนในตับลดลง และยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอรอลในตับ จากการศึกษาคุณสมบัติของซีตรินินพบว่า ซีตรินินสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่มีผลกระทบต่อไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจึงไม่มีการนำสารนี้มาใช้ประโยชน์

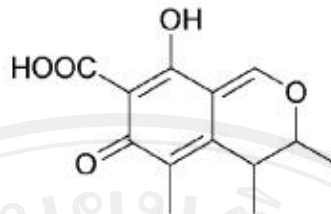
นอกจากคุณสมบัติการรักษาโรคของข้าวแดงจากโมนาโคลิน เค ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับซีตรินินที่สร้างมาจาก *Monascus* พร้อมกับการสร้างสารสี Wong and Koehler (1981) แสดงให้เห็นว่าสารสีที่ได้สกัดมาจากเชื้อราโมแนสคัสมีการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ ต่อมาได้แยกสารประกอบ 2 ตัวจาก *M. purpureus* ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* คือ สารสีเหลือง (monascidin A) และสารสีเหลืองเรืองแสง (ยังไม่มีการศึกษาโครงสร้างของสาร) Blanc *et al.* (1995) ได้แยกสารโมนาสซิดิน เอ จาก *Monascus* หลายสายพันธุ์และพิสูจน์ได้ว่าเป็นสารชนิดเดียวกับซีตรินิน โดยใช้วิธี Mass Spectroscopy เพื่อยืนยันโครงสร้างสารดังกล่าว ต่อมา Hajjaj *et al.* (1999) ศึกษากลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพของซีตรินิน จาก *M. ruber* ATCC 96218 โดยวัดจาก ^{13}C nuclear magnetic Resonance พบว่า การสังเคราะห์ซีตรินินเกิดจาก tetraketide แทนที่จะสังเคราะห์จาก

pentaketide เหมือนกับเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่สามารถสร้างซิตรีนินเช่นเดียวกัน กลไกการสังเคราะห์ซิตรีนินจากโมแนสคัส แสดงดังภาพ 5



ภาพ 5 กลไกการสังเคราะห์ซิตรีนินและสารสีแดงของ *M. ruber* (เส้นประ แสดงกลไกการสังเคราะห์ซิตรีนินโดย *Aspergillus* และ *Penicillium*) (Hajjaj *et al.*, 1999)

ซิตรีนิน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 250.25 กรัมต่อโมล มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{13}H_{14}O_5$ และมีโครงสร้างดังภาพ 6 มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองเลมอน มีจุดหลอมเหลว $175^{\circ}C$ ละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ในโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมอะซิเตต เมทานอล อะซิโตน ไตรโทล เอทานอล และสารละลายอินทรีย์ที่มีขี้ สลายตัวได้ด้วยแสง (photodecomposition) สารละลายกรดหรือด่างหรือจากความร้อน มีปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอริกคลอไรด์ โททาเนียมคลอไรด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สีเขียว และสีแดงเข้ม ตามลำดับ



ภาพ 6 โครงสร้างของซิตรีนิน (Lin *et al.*, 2008)

มีการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของซิตรีนิน เมื่อทดสอบกับสัตว์ทดลองได้ค่า LD₅₀ เท่ากับ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (สำหรับหนูทดลอง) และ 19 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (สำหรับกระต่าย) ซิตรีนินทำให้ไตถูกทำลายและมีฤทธิ์อย่างอ่อนกับตับ เพราะความสามารถรองไขมันลดลง ผลกระทบอื่นคือทำให้เกิดการขยายตัวของเส้นเลือดก่อให้เกิดการไหลเวียนโลหิตผิดปกติ และทำให้หลอดลมหดตัว

Blanc *et al.* (1995) พบว่าสายพันธุ์ของ *Monascus* มีผลต่อการผลิตซิตรีนิน โดย *M. ruber* (wild) จะสามารถผลิตซิตรีนินได้มากกว่า *M. purpureus* (wild) เมื่อใช้ข้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศศิธร (2546) ศึกษาผลของ monosodium glutamate และ L-histidine ต่อการผลิตสารสีแดงและซิตรีนินในข้าวแดงจากการเพาะเลี้ยง *M. purpureus* FTCMU โดยมีการทดลองผลิตข้าวแดง 3 วิธี ดังนี้ วิธีที่ 1 เติม monosodium glutamate 12.5 กรัมต่อกิโลกรัม วิธีที่ 2 เติม L-histidine 12.5 กรัมต่อกิโลกรัม และวิธีที่ 3 ไม่มีการเติมกรดอะมิโนใดๆ พบว่า ข้าวแดงที่มีการเติม monosodium glutamate ให้ปริมาณสีแดง 126 ยูนิตต่อกรัม และซิตรีนิน 900 ppm ส่วนข้าวแดงที่มีการเติม L-histidine ให้ปริมาณสีแดง 150.45 ยูนิตต่อกรัม และซิตรีนิน 450 ppm และข้าวแดงที่ไม่ได้มีการเติมกรดอะมิโนให้ปริมาณสีแดง 207.85 ยูนิตต่อกรัม และซิตรีนิน 1,119 ppm ดังนั้นการเติม monosodium glutamate และ L-histidine ลงในข้าวแดง มีผลต่อการลดทั้งปริมาณซิตรีนินและสารสีแดงที่สร้างโดย *M. purpureus* FTCMU

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในสภาพของแข็ง (Solid-state cultivation)

การเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาพของแข็งในอุตสาหกรรมเกิดขึ้นมานานแล้ว เช่น การเลี้ยงเห็ดอาหารหมัก การผลิตเอนไซม์ การผลิตโคจิ และการผลิตข้าวแดง หรืออังกักซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สารสีที่ได้จากการเลี้ยง *Monascus* บนข้าวนึ่งและรู้จักกันมานานในประเทศแถบตะวันออก เช่น ประเทศจีน ประเทศแถบเอเชีย เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย ฮองกง ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย

โดย *Monascus* สายพันธุ์ที่นิยมใช้หมักบนข้าว คือ *M. purpureus* และ *M. anka* ปัจจัยต่างๆของสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผู้ศึกษาไว้มากมาย ส่วนใหญ่จะเป็นปัจจัยเกี่ยวกับสายพันธุ์เชื้อรา และสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ความดัน

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักสารสีโมแนสคัสในสภาพของแข็ง

1. สับสเตรท ปัจจุบันมีนักวิจัยทำการศึกษาศึกษาการเจริญของเชื้อราดังกล่าวบนธัญพืช เช่น ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด และลูกเดือย เป็นต้น

พลายแก้ว และบุษบา (2534) ได้ศึกษาแหล่งอาหารแข็งที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Monascus kaoliang* โดยมี ข้าวหักปลาย ข้าวโพด มันเทศ มันฝรั่ง มันสำปะหลัง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง และขนมปัง พบว่าขนมปังเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่าสีแดงมากที่สุด รองลงมาคือ มันฝรั่ง และปลายข้าวหอมมะลิ นอกนั้นให้สีไม่คือนัก ส่วนการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* พบว่าถั่วเหลืองให้ปริมาณสปอร์สูงสุด รองลงมาคือ ถั่วเขียว ขนมปัง และปลายข้าวหอมมะลิตามลำดับ ส่วน Rashbaum and Yueh (1983) ทดลองใช้ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ เป็นสับสเตรทแทนข้าวพบว่าได้ผลดีเช่นกัน

Ganrong *et al.* (1998) (อ้างจาก เรณู, 2548) ศึกษาเกี่ยวกับการใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยง *M. anka* เพื่อผลิตสารสีแดง พบว่าเส้นใยของเชื้อราไม่สามารถแทรกเข้าไปภายในเมล็ดข้าวโพดได้ง่าย เพราะยังมีเปลือกหุ้มอยู่และลักษณะโครงสร้างของแป้งข้าวโพด จึงปรับปรุงโดยแยกเอาเปลือกหุ้มเมล็ดข้าวโพดออกและบดให้มีขนาดเล็กลงประมาณ 16-20 mesh การแช่ข้าวโพดในน้ำนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้มีความชื้น 70 % โดยมีค่าความชื้นสัมพัทธ์ของน้ำที่ใช้ในการแช่เมล็ดข้าวโพดจะอยู่ในช่วง 4.0-5.5 จากการเพาะเลี้ยง *M. anka* พบว่าการผลิตสารสีและความสามารถในการย่อยแป้งใกล้เคียงกับในข้าว อย่างไรก็ตามข้าวโพดก็จัดเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกที่ *Monascus* เจริญได้ยาก เนื่องจากมีปริมาณไขมันสูงซึ่งมีส่วนในการป้องกันน้ำซึมเข้าสู่เมล็ดข้าวโพด ทำให้การเจริญของเชื้อเป็นไปได้ช้า ดังนั้นจึงควรใช้ endosperm ของข้าวโพดเป็นวัตถุดิบทดแทนการใช้ทั้งเมล็ด เนื่องจากใน endosperm จะมีส่วนของแป้งมากและมีไขมันน้อยกว่าส่วนอื่นๆ

Babitha *et al.* (2007) ศึกษาการใช้เมล็ดขนุนบดละเอียดเป็นสับสเตรทสำหรับการเลี้ยง *M. purpureus* เพื่อผลิตสารสีโมแนสคัส พบว่า *M. purpureus* สามารถผลิตสารสีปริมาณ 25 หน่วยต่อกรัม โดยใช้เมล็ดขนุนบดละเอียดเป็นสับสเตรท และสารสีที่ได้มีความคงทนต่อความเป็นกรดและด่างในช่วงกว้างซึ่งมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร Pattanagul *et al.* (2008) ศึกษาการใช้

ลูกเห็บเป็นสับสเตรทสำหรับการหมักเชื้อราโมแนสคัส เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สารสีและผลิตภัณฑ์อาหารเสริม จากการทดลองพบว่า *M. purpureus* DMKU สามารถใช้ลูกเห็บเป็นสับสเตรทในการผลิตเป็นอังกักทดแทนข้าวแดงได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังพบสารสำคัญที่ช่วยลดระดับคลอเลสเทอรอลในร่างกาย คือ โมนาโคลิน เค ในผลิตภัณฑ์อังกักลูกเห็บอีกด้วย Nimnoi and Lumyong (2010) ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงชนิดต่างๆต่อการสร้างสีของ *M. purpureus* CMU 001 โดยใช้เศษวัสดุจากการเกษตรที่มีราคาถูกเป็นสับสเตรท ดังนี้ แปะข้าวโพด กากมะพร้าว แปะถั่ว และแปะถั่วเหลือง เพื่อพัฒนาเป็นวัสดุที่มีคุณค่าเพิ่มขึ้น จากการทดลองพบว่า แปะข้าวโพดเป็นอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการสร้างสีแดง โดยให้ผลผลิตสีสูงที่สุดเท่ากับ 129.63 ยูนิตต่อกรัม และให้ผลผลิตสีรองลงมา คือ กากมะพร้าว 63.50 ยูนิตต่อกรัม แปะถั่ว 52.50 ยูนิตต่อกรัม และแปะถั่วเหลือง 22.50 ยูนิตต่อกรัม คารารัตน์ (2553) ศึกษาเกี่ยวกับการใช้เศษมันฝรั่งจากโรงงานผลิตมันฝรั่งทอดในการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส พบว่า *Monascus* sp. DK1 สามารถเจริญและสร้างสารสีแดง สีส้ม และสีเหลืองได้ดีในเศษมันฝรั่ง

นอกจากนี้วัตถุดิบเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์หรือเหมาะสมต่อการผลิตสารเมแทบอไลต์ที่ต้องการหลักสำคัญก็คือ ต้องให้ราคาวัตถุดิบต่ำที่สุด ในขณะที่เดียวกันก็ต้องให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุด วัตถุดิบที่กล่าวถึงนี้หมายถึง แหล่งอาหารคาร์บอน แหล่งอาหารไนโตรเจน อากาศ แร่ธาตุ น้ำ สารอาหารพิเศษ เช่น สารเริ่มต้น สารชักนำ สารเร่งการเจริญ ฯลฯ เป็นต้น การใช้วัตถุดิบในห้องปฏิบัติการ ใช้เพียงเล็กน้อย จึงอาจใช้ของราคาถูกได้ แต่ถ้าจะนำมาใช้หมักขนาดใหญ่ขึ้นแล้ว ราคาวัตถุดิบ เป็นเรื่องสำคัญมากต้องลงทุนร่วม 50 % ของต้นทุนทั้งหมด โดยจะต้องมีการเปรียบเทียบราคาวัตถุดิบกับประสิทธิภาพการผลิตระดับใหญ่ รวมทั้งคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้มา

2. สายพันธุ์ *Monascus* ได้มีการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อราในการผลิตอังกัก พบว่าสายพันธุ์ *M. purpureus* และ *M. anka* ทำให้สีข้าวแดง หรือ อังกัก เป็นสีสวย หรือแดงชมพูแก่ จากการวัดค่าสีโดยการดูดกลืนแสงที่จุด 500 นาโนเมตร (สีแดง) สูงกว่าที่ 420 นาโนเมตร (สีส้ม) แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงเข้มและคล้ำ เช่น สายพันธุ์ *M. barkari* หรือ *M. kaoliang* โดยมีค่าสีที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร หรือที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 (สีเหลือง) สูงกว่า 500 นาโนเมตร อย่างไรก็ตาม *Monascus* หลายสายพันธุ์สามารถผลิตสีได้ แต่สายพันธุ์ที่สำคัญคือ *M. purpureus* ทำให้มีการศึกษาการนำมาใช้สำหรับการแยกสารสีให้ได้ปริมาณมากและมีคุณภาพ

ในประเทศไต้หวัน ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และฝรั่งเศส โดยมีประเทศญี่ปุ่นเพียงหนึ่งประเทศที่อนุญาตให้ใช้สารสีจาก *M. purpureus* ได้ถูกต้องตามกฎหมาย

เรณู และจุลยุทธ (2546) ศึกษาผลของสายพันธุ์ *M. purpureus* และชนิดของข้าวต่อค่าสีแดงและปริมาณชิตรีนิน พบว่าสายพันธุ์ของ *M. purpureus* และชนิดของข้าวมีผลต่อค่าสีแดงและปริมาณชิตรีนินในข้าวแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยลำดับการสร้างสีแดงของสายพันธุ์เชื้อราจากสูงไปต่ำ คือ *M. purpureus* ATCC 16365, *M. purpureus* DMKU, *M. purpureus* FTCMU และ *M. purpureus* BCC 6131 ตามลำดับ ในขณะที่ลำดับการสร้างชิตรีนินของสายพันธุ์เชื้อราจากสูงไปต่ำคือ *M. purpureus* FTCMU, *M. purpureus* ATCC 16365, *M. purpureus* DMKU และ *M. purpureus* BCC 6131 โดยข้าวพิจิตรเป็นชนิดข้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดง เนื่องจากให้สีแดงของข้าวที่สูงกว่า 100 ยูนิต/กรัม จากการหมักเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์

อภิรักษ์ และคณะ (2550) ศึกษาผลของสายพันธุ์ *M. purpureus* 5 สายพันธุ์ คือ *M. purpureus* ATCC 16365, *M. purpureus* BCC6131, *M. purpureus* DMKU, *M. purpureus* CMU 3385 และ *M. ruber* TIRSTR 3006 ต่อคุณภาพของอังกัก โดยทำการเพาะเลี้ยงบนลูกเดี๋ย พบว่า *M. purpureus* ATCC 16365 ให้สีเหลืองสูงสุดโดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 13.4477 ส่วน *M. ruber* TISTR 3006 ให้ค่าสีส้มและสีแดงสูงที่สุดโดยมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 10.8182 และ 9.5575 ตามลำดับ นอกจากนั้นทำการตรวจหาสารเมแทบอลิต์อื่นๆ พบว่า *M. purpureus* DMKU ให้ปริมาณชิตรีนินต่ำสุดเท่ากับ 0.0056 ppm และให้ปริมาณเมวินอลินสูงสุดเท่ากับ 0.2747 ppm ขณะที่ *M. ruber* TISTR 3006 ให้ปริมาณชิตรีนินสูงสุดเท่ากับ 0.2747 ppm

3. ความชื้น ได้มีงานวิจัยหลายชิ้นศึกษาผลของความชื้นต่อการสร้างสารสีโมแนสคัส ดังนี้ Palo *et al.* (1960) เป็นคนแรกที่รายงานว่าความชื้นต่ำกว่า 50 % ให้ผลดีต่อการสร้างสีของ *M. purpureus* เชิดชัยและคณะ (2519) พบว่าความชื้น 60 % ให้ผลดีเมื่อมีการเขย่าหรือให้อากาศก็สามารถช่วยให้เชื้อราสร้างสารสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น รัตน (2524) พบว่าการหมักข้าวแดงในสภาพที่มีความชื้นสูงมากไปนั้น เชื้อราโมแนสคัสจะสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูง แต่สีกลับน้อยลง Lotong and Suwanarit (1990) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงในถุงพลาสติกของ *Monascus* sp. NP1 คือ 32.6 % ส่วนที่ความชื้นเท่ากับ 39.6 % นั้น อัตราการสร้างสารสีจะลดลง นอกจากนี้พบว่าที่ความชื้นต่ำเกินไปจะทำให้เชื้อราเจริญได้ไม่ดี ส่งผลให้การสร้างสีไม่ดีด้วย และที่ความชื้นสูงเกินไปจะเกิดการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูง ทำให้เกิดการสะสมของกลูโคส

ส่งผลไปยับยั้งการสร้างสี ในขณะที่ Han (1990) พบว่าถ้าความชื้นเริ่มต้นกว่า 40 % จะได้สีน้อย แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นอยู่ที่ 50-60 % จะทำให้ได้สีสูงสุดภายใน 8 วัน

4. ในปี ค.ศ. 1960 Palo รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสีแดงได้ใน pH ระหว่าง 3.0-7.5 Johns and Stuart (1991) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสีได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 6.0 เมื่อเทียบกับที่พีเอช 3.4 และ 7.0 พลายนแก้ว และบุษบา (2534ข) พบว่าสภาวะเป็นกรดไม่มีผลต่อการสร้างสีเหลืองของ *M. barkari* กรรณิการ์ (2553) พบว่า *Monascus* sp. DK1 สามารถสร้างสารสีแดง สีส้ม และสีเหลืองได้ดีที่สุดที่พีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 6.0

5. อุณหภูมิ ช่วงที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีจะอยู่ระหว่าง 27-30 °C โดยบุษบา (2540) พบว่า อุณหภูมิ 35-37 °C เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคสอะมิเลส แต่ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส คารารัน (2553) พบว่า *Monascus* sp. NK1 สามารถสร้างสารสีได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28 °C

6. อัตราส่วนของแก๊ส ใน ค.ศ. 1992 Han และ Mudgett เป็นรายแรกที่รายงานว่าสัดส่วนของ ก๊าซออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.50 ต่อ 0.02 บรรยากาศ (atm) จะมีผลต่อการสร้างสีแดงของอังกักมากที่สุด

ข้อดีและข้อจำกัดของการหมักในสภาพของแข็ง

กระบวนการหมักในสภาพของแข็งมีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว อาทิ เช่น โอกาสเกิดการปนเปื้อนในกระบวนการหมักน้อยเนื่องจากปริมาณความชื้นในระบบต่ำ มีต้นทุนต่ำเนื่องจากสับสเตรทที่ใช้ได้จากวัสดุเหลือใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ใช้อุปกรณ์น้อยและใช้เทคโนโลยีอย่างง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเส้นสาย เช่น เชื้อราชนิดต่างๆ เนื่องจากมีสภาพใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติที่จุลินทรีย์ดังกล่าวอาศัยอยู่ และไม่จำเป็นต้องใช้เชื้อตั้งต้นในรูปกล้าเชื้อในปริมาณมาก สามารถใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension ได้ นอกจากนี้ ผลผลิตที่ได้จากการหมักอาจมีปริมาณสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและอาจมีการผลิตสารเมแทบอไลต์บางอย่างที่แตกต่างไปจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ดังนั้นกระบวนการหมักในสภาพของแข็งจึงมีศักยภาพสูงในการนำมาประยุกต์ใช้ในประเทศไทย เช่น ในกระบวนการผลิตโคจิ ในอุตสาหกรรมการผลิตซีอิ๊ว (นพกาญจน์, 2543) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการใช้ถังหมักขนาดใหญ่ในกระบวนการหมักในสภาพของแข็งมากนัก เนื่องจากการหมักในสภาพของแข็งมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการกวนเพื่อผสมอาหารแข็งให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน และการควบคุมอุณหภูมิเมื่อเชื้อรา

เจริญเติบโตได้ดีและผลิตความร้อนออกมาเป็นจำนวนมาก ซึ่งการดำเนินการจัดความร้อนจากการหมักและการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่สม่ำเสมอจะทำให้ยากกว่าการหมักในอาหารเหลวที่ใช้ถังหมักแบบกวนทั่วไป รวมทั้งด้านความรู้และความเข้าใจในการออกแบบและขยายขนาดถังหมัก นอกจากนี้เมื่อมีการกวนเพื่อเพิ่มอากาศให้กับระบบ แรงจากการกวนอาจทำให้เส้นใยเสียหาย สับสเตรทหลายชนิดต้องผ่านการบดหรือทำให้มีขนาดเล็กลงก่อนนำมาใช้ในการหมัก ไม่สามารถบ่งบอกองค์ประกอบที่แน่นอนของสารอาหารภายในสับสเตรทได้ และไม่เหมาะสมในการใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียหลายชนิด (สาโรจน์, 2547)

การแยกสารสี

วิธีการสกัดสีออกจากเส้นใยจะแตกต่างกันไปทั้งทางด้านการใช้สารตัวทำละลาย (solvent) เป็นตัวสกัดและปริมาณความเข้มข้นของสารตัวทำละลายที่ใช้สกัด Broder and Koehler (1980) ทดลองใช้เมทานอล (methanol) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เอทานอล (ethanol) และอะซิโตน (acetone) ในการสกัดสีออกจากเส้นใย พบว่าสารที่สกัดได้ดีที่สุดคือ เมทานอล ซึ่งสีที่สกัดได้มีค่าดูดกลืนแสงเด่นอยู่ 2 สีที่ความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร (สีเหลือง) และ 500 นาโนเมตร (สีแดง) Lin (1973) ใช้เอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดสีออกจากเส้นใย นำเอาส่วนสีที่กรองได้ไปวัดค่าสีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร Lin and Lizuka (1982) มีการวัดค่าสีที่ละลายน้ำได้ (water soluble) และสีที่ละลายน้ำรวมทั้งละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ได้ด้วย นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และ 500 นาโนเมตร ส่วน Sweeny *et al.* (1981) ประสบความสำเร็จจากการแยกสีบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ จากข้าวแดงตั้งขั้นตอนต่างๆ แสดงในภาพ 7

(rubropunctation !! $\mathbb{Z}$ monascorubrin)

ภาพ 7 การแยกสารสีบริสุทธิ์จากผงข้าวแดง (Sweeny *et al.* 1981)

4.งานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

Kaio *et al.* (1978) ศึกษาทางด้านความเป็นพิษของสีที่ได้จาก *Monascus* โดยทดลองกับหนูพบว่าไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลองนั้นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า LD₅₀ มีค่า 33.3 หรือ 8.7 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเมื่อกินสีเข้าไป หรือเมื่อนิดเข้าช่องท้อง ตามลำดับ นุษบา และวรรณภา (2528) ศึกษาความปลอดภัยของสารสีจากเชื้อราโมแนสคัส โดยนำสีไปฉีดทดสอบความเป็นพิษในไข่ไก่ฟักเปรียบเทียบกับกรินดด้วยน้ำกลั่นตามวิธี AOAC พบว่าไข่ไก่ฟักที่ผ่านการฉีดด้วยน้ำสีแดงหรือสีเหลืองมีอัตราการรอดเท่ากับไข่ไก่ฟักควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำกลั่น นุษบา และคณะ (2531) พบว่าสารสีจาก *M. kaoliang* และ *M. barkari* ที่คัดมาจากการใช้มันสำปะหลังได้ดี ไม่เป็นพิษต่อหนูทดลอง 144 ตัว ที่ได้รับสารสีในอัตรา 0.02, 0.1 และ 2.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 12 สัปดาห์

Shin *et al.* (1998) ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่กระตุ้นการสร้างรงควัตถุจากโมแนสคัสและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม โดยทดลองเลี้ยง *Monascus* sp. J101 ร่วมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* บนจานอาหารวุ้น พบว่าปริมาณของ *Monascus* เพิ่มขึ้น และมีปริมาณสีแดงและสีเหลืองเพิ่มขึ้น 30-40 เท่า พบว่าเอนไซม์ที่สกัดมาจาก *S. cerevisiae* คือ chitinase ต่อมา Suh and Shin (2000) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของ *Monascus* sp. J101 ที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* พบว่า *Monascus* sp. J101 มีการเจริญเร็วขึ้นและสืบพันธุ์เร็วขึ้น ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ โครงสร้างภายในเซลล์มีการเพิ่มทั้งจำนวนและขนาดของ vacuoles ซึ่งเป็นที่กักเก็บสารสีที่โมแนสคัสสังเคราะห์ขึ้น รวมทั้งรงควัตถุที่ได้มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยง *Monascus* sp. J101 เพียงชนิดเดียว

Hamdi *et al.* (1996) ศึกษาการเลี้ยง *M. purpureus* ในน้ำคั้นจากลูกแพร์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างรงควัตถุสีแดง พบว่าเมื่อเจือจางน้ำคั้นจากลูกแพร์ 4 เท่า ให้ค่าสีแดงสูงสุด (ค่าการดูดกลืนที่ 500 นาโนเมตร) และเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมต 10 กรัม/ลิตร ปรับ pH เริ่มต้น 5.2 จะให้สีแดงเท่ากับ 22.8 ยูนิต ที่ค่าการดูดกลืนแสง 480 นาโนเมตร ส่วนการเลี้ยงในถังหมักพบว่ามวลชีวภาพ (biomass) เพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับการใช้น้ำตาลและการสร้างเอทานอล ต่อมาเอทานอลจะถูกใช้ไปพร้อมกับการสร้างรงควัตถุสีแดง ยังพบอีกว่าปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเกิดเอทานอล

Kris (1998) ศึกษาการสารสีแดงของเชื้อราโมแนสคัสในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเทมเป้ พบว่า *M. purpureus* สามารถเจริญและผลิตสารสีแดง น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเทมเป้จึงเหมาะสำหรับ

เป็นวัตถุดิบที่ราคาถูกและสามารถผลิตได้ครั้งละมากๆและยังสามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี นอกจากนี้ยังศึกษาการเติมแป้งมันสำปะหลังเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารสีแดง พบว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เดิมมีผลต่อมวลชีวภาพ แต่ไม่มีผลต่อปริมาณสีแดงที่เชื้อราผลิตได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 Kris ศึกษาการใช้แป้งมันสำปะหลังและน้ำแช่หัวเห็ดหลินหลือซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสีโมแนสคัส พบว่า *M. purpureus* UKSW 40 สามารถเจริญและผลิตสารสีแดงได้ดี โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง 2% ในน้ำแช่หัวเห็ดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลูโคสหรือมอลโตสในน้ำแช่หัวเห็ด

Wang *et al.* (2002) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Fusarium oxysporum* ที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. purpureus* CCRC 31499, *M. purpureus* CCRC 32966, *M. purpureus* CCRC 31530, *M. ruber* CCRC 31535 และ *M. pilosus* CCRC 31527 ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราที่มีส่วนประกอบของเปลือกกุ้งและปู (SCSP, shrimp and crab shell powder) จากการทดลองพบว่า *M. purpureus* CCRC 31499 สามารถสร้างสารยับยั้ง *F. oxysporum* มากที่สุด โดยยับยั้งการสร้างและการงอกของสปอร์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี SCSP เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สารนี้มีความเสถียรในช่วงพีเอช 6-8 แต่คุณสมบัติลดลงเมื่อได้รับความร้อน 100 °C นาน 5 นาที นอกจากสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ยังมีคุณสมบัติการย่อยไคติน (chitinolytic) และการย่อยโปรตีน (proteolytic) อีกด้วย

Su *et al.* (2003) ศึกษาปริมาณของ aminobutyric acid (GABA) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ความดันโลหิตต่ำ (hypotensive) และโมนาโคลิน เค (monacolin K) ที่สร้างจาก *M. purpureus* CCRC 31615 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตโมนาโคลิน เค สูงสุด จากการคัดเลือกทั้งหมด 16 สายพันธุ์ การเพิ่มโซเดียมไนเตรตในข้าว ทำให้ *M. purpureus* CCRC 31615 ผลิตโมนาโคลิน เค และ GABA เท่ากับ 378 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 1,367.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และเมื่อเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรฟอสเฟต (dipotassium hydrophosphate) ทำให้ปริมาณ GABA เพิ่มขึ้นเป็น 1,493.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม