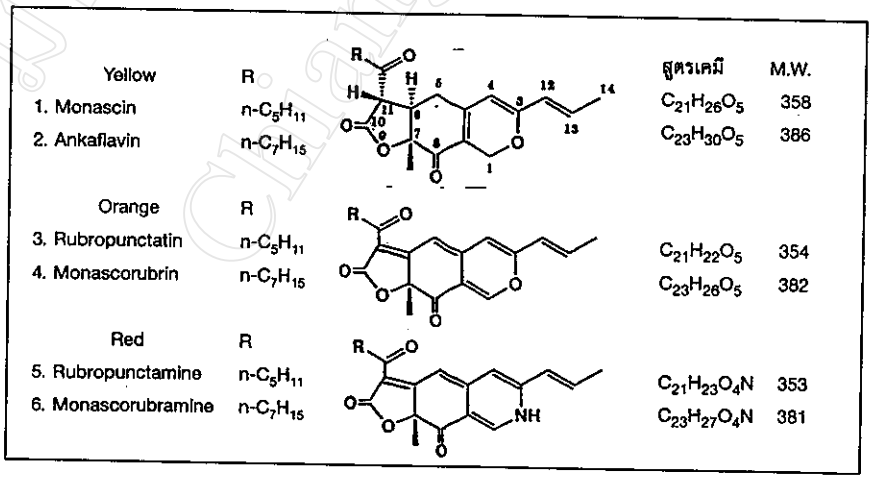
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารสีแดง

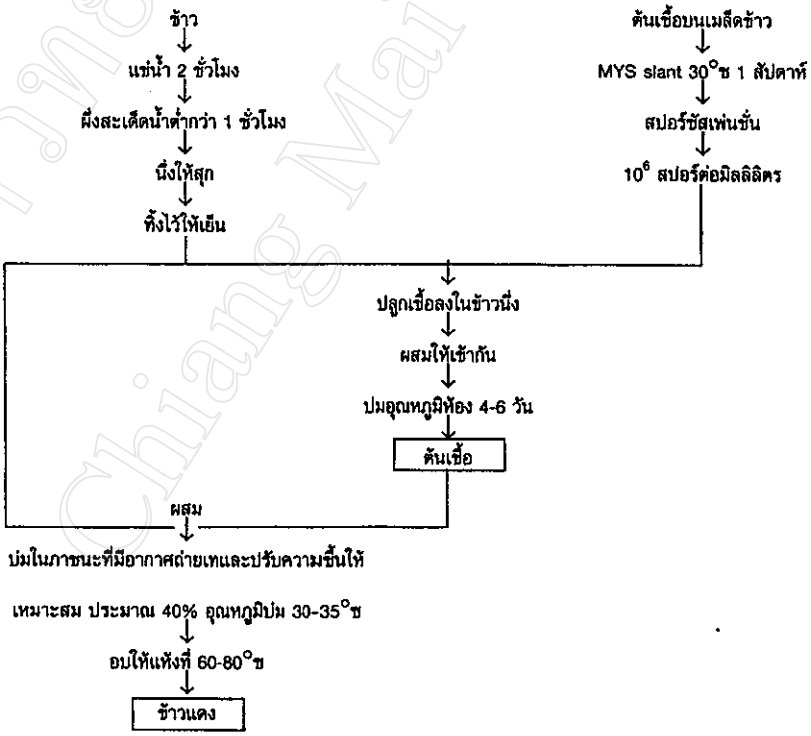
สารสีแดง (red pigment) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักทั้งแบบอาหารแข็ง เช่น ข้าว ขนมปัง เมล็ดธัญพืช และแบบอาหารเหลวสังเคราะห์ ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Monascus* sp. สารสีแดงนี้มีองค์ประกอบของสีอยู่ 3 สีหลัก คือ เหลือง ส้ม และแดง โดยแบ่งเป็น 6 อนุพันธุ์ย่อย คือ สีเหลือง(monascin และ ankaflavin) สีส้ม(rubropunctatin และ monascorubrin) และสีแดง (rubropunctamine และ monascorubramine) (รูปที่ 2.1) โดยเชื้อราสายพันธุ์ *Monascus* sp. ที่นิยมนำมาผลิตสารสีแดงมี 4 สายพันธุ์สำคัญ คือ *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. pilosus* และ *M. froridanus* ซึ่งทั้งหมดได้จากการแยกเชื้อจากอาหารพื้นเมืองของชาวตะวันออก (Blanc และคณะ, 1995(a); Juzlova และคณะ, 1994) ถึงแม้ว่าในประเทศแถบตะวันออกจะมีการยอมรับ และใช้สารสีแดงในทางอาหารและทางยามาเป็นระยะเวลานานแล้ว แต่ก็มีเพียงประเทศญี่ปุ่นเท่านั้นที่มีกฎหมายควบคุมการใช้อย่างเป็นทางการ ในขณะที่กลุ่มประเทศยุโรปและสหรัฐอเมริกายังไม่มีการยอมรับให้มีการใช้อย่างถูกต้องตามกฎหมาย (Hendry และ Houghton, 1996)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างเคมีของรงควัตถุ (pigment) ที่แยกได้จาก *Monascus* sp.
ที่มา บุษบา (2542)

2.2 ข้าวแดง

ข้าวแดง (red rice) มีชื่อเรียกต่างๆ มากมาย เช่น อังคัก (ang-kak) แอนแคก (ankak) แองคา (anka) อังคเวค (angquac) เบนนิโคจิ (beni-koji) และ อะกาโคจิ (aka-koji) เป็นผลิตภัณฑ์สารสีที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนข้าวนึ่ง ซึ่งรู้จักกันมานานในประเทศแถบเอเชีย เช่น จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน ฮ่องกง มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย เป็นต้น เชื้อราที่เจริญบนข้าวจะสร้างสีออกมานอกเซลล์ได้ในปริมาณมาก จึงไม่เกิดการสะสมของสี และทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี (Johns และ Stuart, 1991) เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่นิยมใช้หมักข้าวแดง คือ *M. purpureus* และ *M. anka* โดยปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของข้าวแดงมีผู้ศึกษาวิจัยไว้มากมายส่วนใหญ่จะเป็นปัจจัยที่เกี่ยวกับสายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์เชื้อรา สภาวะการเลี้ยงเชื้อ เช่น ความชื้น อุณหภูมิบ่ม และความเป็นกรดเป็นด่าง เป็นต้น (บุษบา, 2542) โดยทั่วไปกรรมวิธีการหมักข้าวแดงแสดงดังรูปที่ 2.2



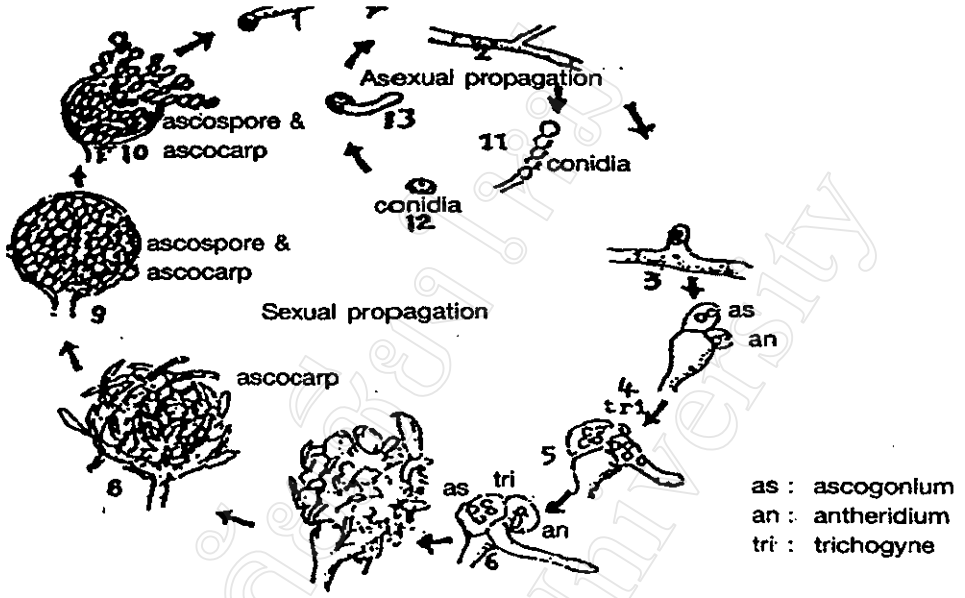
รูปที่ 2.2 แผนผังการทำข้าวแดง
ที่มา บุษบา, 2542

2.3 เชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัส *(Monascus* sp.) อยู่ในวงศ์ Monascaceae กลุ่ม (Class) Ascomycetes กลุ่มย่อย (Subclass) Plectomycetidae อันดับ (Order) Eurotiales (Hawksworth และคณะ, 1995) เส้นใยมีผนังกั้น (septate) มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศและไม่มีเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายและมักเจริญแบบชิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุอ่อนมีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีส้มแดง สีแดง หรือม่วงแดง ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อรา

การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ มีการสร้างโคนีเดียเจริญมาจากโคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) โคนีเดียมีลักษณะกลมหรือรูปไข่ อาจมีอันเดียวหรือเกิดติดต่อกันเป็นลูกโซ่ (Hawksworth และ Pitt, 1983) โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะเกิดสีแดงได้บ้าง โคนิดิโอฟอร์มีขนาดสั้นอาจมีผนังกั้นหรือเซพเตต 0-1 ช่อง ถ้าขนาดยาวจะมีผนังกั้น 2-6 ช่อง เป็นสายตรงหรือสายคดงอ และการงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน (Hiroi และคณะ, 1979) เหมาะสมสำหรับการเกิดโคนีเดียของโมแนสคัส นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีกหลายๆ ประการ เช่น อายุสปอร์ ความหนาแน่นของสปอร์ ความเป็นกรดเป็นด่าง แสงและอุณหภูมิ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปโคนิเดียจะงอกภายใน 4 ชั่วโมง เมื่อมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมด้วยการสร้าง germ-tube ขึ้นมา 1 อัน หรือ 2 อัน หรือบางทีอาจมีได้ถึง 6 อัน สามารถกระตุ้นการงอกของโคนีเดียได้ โดยใช้คาร์โบไฮเดรตหลายชนิด (Wong และ Bau, 1978)

ส่วนการสืบพันธุ์แบบมีเพศของเชื้อราโมแนสคัส คล้ายกับเชื้อราอื่นๆ ใน Class Ascomycetes มีการสร้างเพอริทีเซียม (perithecium) (บางรายงานใช้คลิสโททีเซียม, cleistothecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยเกิดบนก้าน (stalk) ที่มีหรือไม่มีผนังกั้นก็ได้ (Kolotila และคณะ 1978) แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยแบบโฮโมแทลลิก (homothallic) โดยการสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิด คือ แอนเทอริเดียม (antheridium) และแอสโคโกเนียม (ascogonium) เกิดการฟิวชั่น (fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม แล้วมีวิวัฒนาการต่อไปโดยแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส ตามด้วยไมโตซีส ได้ daughter nuclei จากการแบ่งตัว มีการขยายผนังเซลล์รวมออกเรียกว่า การสร้างแอสโคคาร์ปขึ้นในที่สุด (Carels และ Shepherd, 1975) ภายในเพอริทีเซียมมีแอสโคสปอร์ (ascospores) มากมาย โดยแอสโคสปอร์จำนวน 2-8 อันรวมอยู่ในแอสคัส (ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง สีส้มหรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์งอกเป็นเส้นใหม่ขึ้น วัฏจักรชีวิตของเชื้อรานี้แสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 วงจรชีวิตของเชื้อราโมแนสคัส
ที่มา บุษบา, 2542

ปัจจุบันมีการรวบรวมเชื้อราโมแนสคัสนี้กว่า 20 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2.1) มีวิธีการจัดแบ่งสายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัสโดยคณะนักวิจัยหลายวิธีการ เช่น แบ่งตามสมบัติสัณฐานวิทยา แบ่งตามสมบัติสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา หรือแบ่งตามการใช้สมบัติเอนไซม์ชนิดต่างๆ (ตารางที่ 2.2) นอกจากจะแตกต่างกันด้านลักษณะทางสรีรวิทยาแล้ว ทางด้านวิทยาเอนไซม์ยังต่างกันอีกด้วย โดยพบเอนไซม์ β-galactosidase และ α-galactosidase ในเชื้อรากลุ่ม *M. pilosus* ในขณะที่พบเอนไซม์ polypectase และ cystine arylamidase ใน *M. purpureus* และพบเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสใน *M. ruber* สำหรับ *M. floridanus* เป็นสายพันธุ์เดียวที่พบเอนไซม์ trypsinase แต่ไม่พบเอนไซม์ valine arylamidase เหมือนสายพันธุ์อื่น (Bridge และ Hawksworth, 1985)

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อราโมแนสคัส

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

ที่มา : รวบรวมจาก Hawksworth และ Pitt, 1983; Nishikawa และ Iizuka, 1993; Schindler และคณะ, 1992; Cannon และคณะ, 1995 โดย บุษบา, 2542

ตารางที่ 2.2 กิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกันในเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ

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

ที่มา Bridge และ Hawksworth, 1985

2.4 สารเมทาโบไลต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัส

Haws และคณะ (1959) พบโครงสร้างของรูโบรพังตาติน (rubropunctatin, $C_{21}H_{22}O_5$) ดังภาพที่ 2.1(3) แยกได้จาก *M. rubropunctatus* Sato ซึ่งสารนี้เมื่ออยู่ในสารละลายแอมโมเนียจะได้รูโบรพังตามีน (rubropunctamine, $C_{21}H_{23}O_4N$) ซึ่งเป็นสีม่วง ดังรูปที่ 2.1(5) Fielding และคณะ (1961) ศึกษาโครงสร้างสารสีโมนาสโครูบริน (monascorubrin, $C_{23}H_{26}O_5$) ดังรูปที่ 2.1(4) และโมแนสซิน (monascin, $C_{21}H_{26}O_5$) ดังรูปที่ 2.1(1) โดยแสดงให้เห็นว่าโมนาสโครูบรามีน (monascorubramine) และรูโบรพังตามีน (rubropunctamine) เป็นสารสีแดงที่เปลี่ยนมาจากโมนาสโครูบริน และรูโบรพังตาติน (สีส้ม) ตามลำดับ

สารสีที่สกัดได้จาก *Monascus* sp. เช่น รูโบรพังตาติน จาก *M. rubropunctatus* โมนาสโครูบรินจาก *M. purpureus* และโมนาสซิน จาก *Monascus* sp. เป็นสารประเภทโพลิคีไทด์ (polyketides) ซึ่งเป็นสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิ (Turner, 1971) โดยสารประเภทโพลิคีไทด์จะมีกระบวนการสังเคราะห์คล้ายกับการสังเคราะห์กรดไขมัน แต่มีสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน Carels และ Shepherd (1977) เสนอว่าสารสีส้มถูกสังเคราะห์เป็นสีแรก และสารสีเหลืองหรือสารสีแดงมาจากปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นกับสีส้มนั้นๆ นอกจากสารสีแล้วเชื้อราโมแนสคัสยังให้สารเมทาโบไลต์ที่มีประโยชน์อื่นๆ อีกดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารเมทาโบไลต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัส

เอนไซม์	เมทาโบไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites)	เมทาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites)
1. กลูโคอะไมเลส	1. เอทิลแอลกอฮอล์	1. สารปฏิชีวนะ
2. โปรตีเอส	2. กรดอินทรีย์	2. สารลดคอเลสเตอรอล (mevinolin)
3. แอลฟา กาแลคโตซิเดส	3. วิตามินบี2	3. ยาลดความดันโลหิต
4. แอลฟา-อะไมเลส	4. ไขมัน	4. สารตกตะกอน (flocculants)
5. ไรโบนิวคลีเอส	5. กรดไขมัน	5. คูมาริน (coumarin) รักษาโรคด่างขาว
		6. สารถนอมอาหารประเภทเนื้อ
		7. โคเอนไซม์ Q_{10}
		8. สารให้กลิ่นหอม (methyl ketones)
		9. สารแองคาแลคโตน (ankalactone)
		10. สารยับยั้งการกลายพันธุ์

ที่มา : ดัดแปลงจาก บุษบา, 2542

2.5 ข้าว (อุตสาหกรรมสาร, 2544)

ทั่วโลกมีพันธุ์ข้าวถึง 120,000 พันธุ์ ในขณะที่ประเทศไทยมีข้าวอยู่ประมาณ 3,500 พันธุ์ มีตั้งแต่ ข้าวพันธุ์ป่า ข้าวพันธุ์พื้นเมือง และข้าวที่ผสมพันธุ์ขึ้นมาใหม่ ข้าวที่นำมาปลูกเป็นอาหารนั้นแบ่งได้ 2 ชนิด คือ ข้าว *Oryza sativa* ปลูกในทวีปเอเชีย และ *Oryza glaberrinma* ปลูกในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ค้าขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวที่ปลูกจากแถบเอเชีย ซึ่งข้าวชนิดดังกล่าวนั้นยังสามารถแบ่งตามแหล่งที่ปลูกได้อีกคือ

- ข้าวอินดิกา (Indica) มีลักษณะเมล็ดยาวรี ต้นสูง เป็นข้าวที่ปลูกในเอเชียเขตมรสุม ตั้งแต่จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา ข้าวพันธุ์นี้ค้นพบครั้งแรกในอินเดีย
- ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวที่ปลูกในเขตอบอุ่น เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี เมล็ดป้อมกลมรี ต้นเตี้ย
- ข้าวจาวานิกา (Javanica) ปลูกในอินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ เมล็ดป้อมใหญ่ ไม่ได้รับความนิยม เพราะให้ผลผลิตต่ำ

สำหรับข้าวเจ้าและข้าวเหนียวก็อยู่ในสายพันธุ์ข้าวเอเชียเหมือนกัน แต่ความแตกต่างของข้าวเจ้าและข้าวเหนียวอยู่ที่ส่วนประกอบของแป้งในเมล็ดข้าว โดยทั่วไปข้าวมีแป้งสองชนิด คืออมิโลเพคติน (amylopectin) และอมิโลส (amylose) แป้งอมิโลเพคตินเป็นส่วนที่ทำให้ข้าวสุกเหนียวและนุ่ม ในขณะที่แป้งอมิโลสช่วยลดความเหนียวและความนุ่มของข้าว ทำให้ข้าวสุกร่วนและแข็งกระด้างมากขึ้น การจัดแบ่งชนิดข้าวตามปริมาณอมิโลส สามารถแบ่งเป็น 4 ประเภท (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 การแบ่งประเภทข้าวตามปริมาณอมิโลส

ประเภทข้าว	ปริมาณอมิโลส (%)	ลักษณะข้าวสุก	ชนิดข้าวที่รู้จักกันทั่วไป
ข้าวเหนียว	0-2	เหนียวมาก	ข้าวเหนียว
ข้าวอมิโลสต่ำ	10-20	เหนียวนุ่ม	ข้าวหอมมะลิ
ข้าวอมิโลสปานกลาง	20-25	ค่อนข้างร่วนไม่แข็ง	ข้าวขาวตาแห้ง
ข้าวอมิโลสสูง	25-34	ร่วนแข็ง	ข้าวเสาไห้

ที่มา : งามชื่น, 2543

เนื่องจากข้าวที่มีอมิโลสสูงเมื่อหุงสุกข้าวสวยจะแข็ง ในการหุงต้มจึงมักใส่น้ำมากเพื่อปรับปรุงให้ความแข็งของข้าวลดลง จากการศึกษาพันธุ์ข้าวต่างๆ ของรัฐบาล พบว่า ปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการหุงต้มข้าวมีความสัมพันธ์กับปริมาณอมิโลสในข้าวสาร (งามชื่น, 2543) พันธุ์ข้าวของไทยไม่ว่าจะเป็นพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ใหม่ที่ปรับปรุงให้ผลผลิตสูง ต่างเป็นข้าวที่มีเมล็ดเรียวยาว เพื่อให้ผลิตเป็นข้าวเกรด 100% ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 การจัดแบ่งข้าวพันธุ์ดีบางพันธุ์ตามคุณภาพการหุงต้ม และปริมาณอมิโลส

พันธุ์ข้าว	เมล็ดยาว (มม.)	อมิโลส (%)
ข้าวนุ่ม และเหนียว		
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
ข้าวสวย แข็ง หุงขึ้นหม้อ (ข้าวเสาไห้)		
เหลืองประทิว 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 : * มีกลิ่นหอม

ที่มา : ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร(อ้างในงามชื่น, 2543)

นอกจากนี้ยังมีการแบ่งข้าวตามกระบวนการผลิตด้วย (งามชื่น, 2543) โดยแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ ข้าวขาว และข้าวกล้องหรือข้าวซ้อมมือ เมื่อนำข้าวเปลือกมาผ่านกรรมวิธีการสีข้าว กระบวนการนี้เป็นการแยกเปลือกของเมล็ดข้าวออกจากเนื้อข้าวโดยการกะเทาะเปลือกเรียกว่า แกลบออก เนื้อข้าวที่เหลือเป็นข้าวกล้อง เมื่อนำข้าวกล้องมาขัดสีก็จะได้ข้าวขาว เนื้อเมล็ดส่วนที่ถูกขัดออกจะเป็นรำข้าวและจมูกข้าว โดยข้าวกล้องเป็นข้าวที่มีสีน้ำตาลอ่อน เนื่องจากผ่านการกะเทาะเพื่อเอาเปลือกออกเพียงครั้งเดียว จึงยังคงมีจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวที่อุดมด้วยวิตามินแร่ธาตุและเส้นใยอาหารติดอยู่ จึงให้คุณค่าทางอาหารและเป็นประโยชน์ต่อร่างกายมากดังแสดงในตารางที่ 2.6

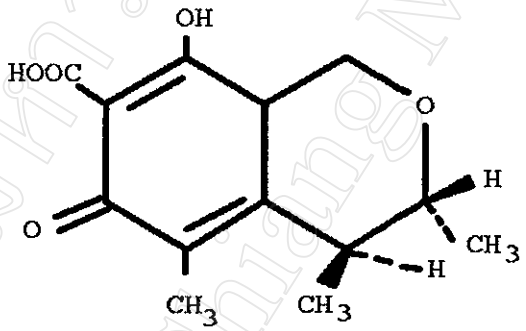
ตารางที่ 2.6 ปริมาณสารอาหารต่อข้าว 100 กรัมระหว่างข้าวกล้องหอมมะลิ กับ ข้าวขาวหอมมะลิ

สารอาหาร	ข้าวกล้อง	ข้าวขาว
พลังงาน (kcal)	366	356
โปรตีน (g)	7	6.2
ไขมัน (g)	2.4	1.1
คาร์โบไฮเดรต (g)	79.1	80.4
ใยอาหาร (g)	2.5	0.6
บี 1 (mg)	0.55	0.11
บี 2 (mg)	0.06	0.04
ไนอะซิน (mg)	2.8	0.9
วิตามินอี (mg)	0.41	-
แคลเซียม (mg)	27	3
ฟอสฟอรัส (mg)	255	66
เหล็ก (mg)	3.7	เล็กน้อย

ที่มา : กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (อ้างจาก การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย, 2546)

2.6 ซิตรินิน (Citrinin) (European Mycotoxin Awareness Network, 2002)

ซิตรินิน $C_{13}H_{14}O_5$ (รูปที่ 2.4) จัดอยู่ในกลุ่มสารไมโคทอกซิน (mycotoxin) หรือสารพิษจากเชื้อรา ถูกพบครั้งแรกในปี 1931 จากการแยกสารจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* หลังจากนั้นได้มีการพบการปนเปื้อนของซิตรินินในข้าวที่ประเทศญี่ปุ่นนำเข้าจากประเทศไทย ในปี ค.ศ. 1951 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเหตุการณ์ "ปัญหาข้าวเหลือง" (yellow rice problem) จากนั้นมีรายงานมากมายถึงเชื้อราที่สามารถสร้างซิตรินินได้ เช่น *P. verrucosum* สร้างซิตรินิน ร่วมกับ อ๊อกคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) ซึ่งจัดเป็นสารไมโคทอกซินเช่นกัน แต่มีฤทธิ์ทำลายระบบการทำงานของไต และตับที่รุนแรงกว่า บางครั้งจะพบสารไมโคทอกซินทั้ง 2 ชนิดร่วมกันในตัวอย่างที่มี *P. verrucosum* ปนเปื้อน แต่ส่วนมากจะพบสารอ๊อกคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* sp. สามารถสร้างซิตรินินได้ เช่น *A. carneus*, *A. terreus* และ *A. niveus* เป็นต้น ในช่วงเวลาต่อมาพบว่าซิตรินินมีประสิทธิภาพเป็นสารต่อต้านการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial agent) แต่เนื่องจากซิตรินินมีฤทธิ์ในการทำลายไตสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจึงไม่สามารถนำมาใช้ในอาหารได้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของซิตรินิน

ซิตรินินเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 250 มีลักษณะผลึกรูปเข็มสีเหลืองเลมอน ละลายได้น้อยในน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เอทธานอล และอะซิโตไนไตรล์ เป็นต้น มีปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอริกคลอไรด์ ไททาเนียมคลอไรด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สีเขียว และสีแดงเข้ม ตามลำดับ

ซิตรินินมีค่า LD_{50} (ปริมาณสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนทั้งหมด) เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในหนูทดลอง และ 19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในกระต่าย โดยมีฤทธิ์ในการทำลายไตและมีฤทธิ์อย่างอ่อนในการทำลายตับ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการขยายตัวของเส้นเลือดก่อให้เกิดการไหลเวียนโลหิตผิดปกติและทำให้หลอดลมหดตัว แม้ซิตรินินจะเป็นสารพิษแต่เนื่องจากสามารถสลายตัวเมื่อผ่านกระบวนการผลิตอาหารประเภทธัญพืชซึ่งมีการใช้ความร้อน ดังนั้นจึงพบว่าจะเป็นอันตรายในสัตว์มากกว่าคน โดยเฉพาะหมูซึ่งกินธัญพืชเป็นอาหาร เนื่องจากอาหารสัตว์จะไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนใดๆ เลย

มีรายงานพบว่าซิตรินินสามารถสลายตัวได้ที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส ในรูปที่ไม่มีน้ำ (anhydrous) และจะใช้อุณหภูมิในการสลายตัวลดลงเป็น 140 องศาเซลเซียส เมื่ออยู่ในรูปของแข็งที่มีความชื้น (semi-moist) พบว่าซิตรินินสามารถถูกทำลายในกระบวนการผลิตเบียร์ ซึ่งปริมาณซิตรินินถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จะถูกทำลายในขั้นตอนเจอร์มิเนชั่น (germination) ของข้าวบาร์เล่ย์ และจะถูกทำลายทั้งหมดในขั้นตอนการทำแมช (mashing) และพบว่าการเติมกรดโพรพิโอนิกเพื่อช่วยในการเก็บรักษาข้าวบาร์เล่ย์จะช่วยทำลายซิตรินินได้ จึงมีการนำมาใช้ในการเก็บรักษาอาหารสัตว์อีกด้วย

มีรายงานถึงการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของซิตรินินโดยตรงในกลุ่มประเทศยุโรปอยู่น้อย เนื่องจากมักพบซิตรินินปนเปื้อนอยู่ร่วมกับออกคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) ในตัวอย่างอาหาร เช่น ธัญพืชต่างๆ เสมอ และเนื่องจากออกคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) มีอันตรายสูงกว่าซิตรินินมาก จึงจัดเป็นการควบคุมปริมาณซิตรินินทางอ้อมโดยการควบคุมปริมาณออกคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) เพียงอย่างเดียว โดยต้องไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในธัญพืช และ 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในผลไม้

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารแข็ง

1. สายพันธุ์เชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัส เมื่อเจริญบนเมล็ดข้าวจะงอกเส้นใยบนผิวหน้าและแทรกทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าว มีการสร้างสีแดงภายหลังจากการบ่มได้นาน 3 วัน สารสีเหล่านี้เมื่อมีการนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทธานอล พบว่าสารสีแดงที่ได้จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง 2 จุด คือที่ความยาวคลื่น 420 และ 500 นาโนเมตร บางสายพันธุ์ให้สีข้าวแดงเป็นสีแดงอมชมพูแก่ จะมีค่าความโด่ง (peakedness) ที่ค่าความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรสูงกว่าที่ 420 นาโนเมตร เช่นที่พบในสายพันธุ์ของ *M. purpureus* และ *M. anka* แต่บางสายพันธุ์อาจให้สีแดงคล้ำ ซึ่งให้ค่าความโด่งที่ 420 สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร หรือค่าความโด่งที่ 370 สูงกว่า 500 นาโนเมตร เช่น *M. barkeri* (พลายแก้ว และบุษบา, 2534ข) หรือ *M. kaoliang* (บุษบา และวรรณภา, 2528)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

การหมักเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็ง (solid state) นั้น ปกติจะใช้ข้าว และมีการใช้เมล็ดธัญพืชอื่นน้อยมากเมื่อเทียบกับข้าว Palo และคณะ (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างสีของ *M. purpureus* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอังคักมีดังต่อไปนี้ ความชื้นไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชระหว่าง 3.0-7.5 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่ให้ผลไม่ดีเมื่อใช้กับสายพันธุ์ข้าวเหนียว บุษบา (2518) ได้ทดลองสร้างสีของ *M. purpureus* โดยใช้สภาวะในการผลิตข้าวแดงของ Palo และคณะ (1960) มาทดสอบกับข้าวพันธุ์ต่างๆ ของไทย พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงู และพันธุ์หอมมะลิให้สีเข้มใกล้เคียงกัน แต่ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูจะให้กลิ่นหอมมากกว่าข้าวพันธุ์หอมมะลิ กลิ่นหอมดังกล่าวคือกลิ่นเอสเทอร์และแอลกอฮอล์ผสมกัน ทั้งนี้ข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูและข้าวพันธุ์หอมมะลิให้ผลความเข้มของสีใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ญี่ปุ่น ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์อื่นๆ ของไทย คือ พันธุ์เสาไห้ทั่วไป ฯลฯ นั้นล้วนแต่ให้สีและความหอมน้อยกว่ามาก ส่วนอรัญและคณะ (2531) รายงานว่าปริมาณอมิโลสในเมล็ดข้าวที่แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตข้าวแดงแตกต่างกันไปด้วย โดยพบว่าพันธุ์ข้าวที่มีอมิโลสสูงมากกว่า 24 เปอร์เซ็นต์ เช่นพันธุ์เหลือง 148 กข 23 และ กข 25 เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงมากกว่าพันธุ์ กข 7 และขาวดอกมะลิ 105 เชิดไชย และคณะ (2519) พบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวมีเพียงพอต่อการสร้างสารสี จึงไม่จำเป็นต้องเติมเปปโตน

Schumacher และคณะ (1996) พบว่าข้าวที่ปลูกจากแหล่งปลูกแตกต่างกันในประเทศเกาหลีมีผลต่อการสร้างสีของข้าวแดง และพบว่าข้าวจากแหล่งปลูก Punpo ให้คุณภาพข้าวแดงดีที่สุด พลายแก้ว และบุษบา (2534ก) ได้ศึกษาแหล่งอาหารแข็งชนิดต่างๆ คือ เมล็ดข้าวโพด มันเทศ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง และขนมปังต่อการผลิตสีโมแนสคัส เปรียบเทียบกับการผลิตบนข้าว โดยสังเกตการเจริญ การสร้างสี และการสร้างสปอร์ของ *M. kaoliang* (ตารางที่ 2.7) พบว่าขนมปังให้ค่าสีแดงมากที่สุด ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Lin และ Izuka (1982) รองลงมาคือมันฝรั่งและปลายข้าวหอมมะลิ นอกนั้นให้สีไม่ดีนัก

ตารางที่ 2.7 การศึกษาผลของอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการหมัก ต่อการผลิตสีของเชื้อ *M. kaoliang* เมื่อบ่มเป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

สับสเตรต	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)		พีเอช		ค่าสีที่ความยาวคลื่น 500 nm ต่อกรัมแห้ง
	เริ่มต้นหมัก	สิ้นสุดการหมัก	เริ่มต้นหมัก	สิ้นสุดการหมัก	
ปลายข้าวหอมมะลิ	32.62	37.78	6.20	4.33	317
เมล็ดข้าวโพด	46.15	49.16	5.90	6.20	107
ข้าวฟ่าง	34.64	37.01	6.25	5.40	105
ขนมปัง	46.23	78.94	5.35	6.80	862
ถั่วเหลือง	54.70	51.53	6.50	7.23	17.5
ถั่วเขียว	43.59	46.99	6.50	6.88	37
มันเทศ	68.95	82.21	5.50	5.18	213
มันสำปะหลัง	51.25	50.99	6.05	4.80	153
มันฝรั่ง	72.93	83.05	5.70	5.80	502

ที่มา : พลายแก้ว และบุษบา, 2534ก

3. พีเอช

Palo (1960) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสีแดงได้ในพีเอชระหว่าง 3.0-7.5 Johns และ Stuart (1991) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสีได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 6.0 เมื่อเทียบกับที่พีเอช 3.4 และ 7.0 พลายแก้ว และบุษบา (2534ข) พบว่าสภาวะเป็นกรดไม่มีผลต่อการสร้างสีเหลืองของ *M. barkari*

4. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสีจะอยู่ระหว่าง 27-30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะอยู่ที่ 35-37 องศาเซลเซียส (บุษบา, 2542)

5. อัตราส่วนของก๊าซ

Han และ Mudgett (1992) เป็นรายแรกที่รายงานถึงอิทธิพลของปริมาณก๊าซออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตสีของเชื้อรา *M. purpureus* ในอาหารแข็ง โดยพบว่าความดันแก๊สออกซิเจนต่อความดันคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.50-0.02 บรรยากาศ จะมีผลดีต่อการสร้างสีแดงของข้าวแดงมากที่สุด แต่ที่ความดันก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 1.0 บรรยากาศ จะเกิดการยับยั้งการผลิตสีอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสี และการเจริญของเชื้อรานั้นเป็นคนละสภาวะกัน

6. ความชื้น

พลายแก้ว และบุษบา (2534ข) ได้ศึกษาถึงความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการหมักข้าวแดงของเชื้อ *M. kaoliang* (ตารางที่ 2.8) พบว่าเวลาแช่ข้าวนาน 8 ชั่วโมง และสะเด็ดน้ำ 5-10 นาที จะทำให้ข้าวมีความชื้นเริ่มต้น 41 เปอร์เซ็นต์ เหมาะต่อการสร้างสีแดง นอกจากนี้ยังพบว่าการแช่ข้าวนานเกินไปจะทำให้เมล็ดข้าวเกาะกัน และการผึ่งลมนานเกินไปจะทำให้ผิวหน้าข้าวแห้งไม่เป็นผลดีต่อการสร้างสี Johns และ Stuart (1991) พบว่าเมื่อหมักเชื้อ *M. purpureus* FRR 2190 ในข้าวที่มีความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 56 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 6 จะให้สีดีที่สุด และพบว่าเมื่อเติมเปปโตนลงในข้าวจะช่วยเพิ่มการสร้างสีแดงได้ด้วย

Palo และคณะ (1960) รายงานว่าที่ความชื้นต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีต่อการสร้างสีอังคักของ *M. purpureus* เชิดไชย และคณะ (2519) พบว่าความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ และมีการเขย่าให้อากาศจะช่วยให้สร้างสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น Lotong และ Suwanarit (1990) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงในถุงพลาสติกของเชื้อรา *Monascus* sp. NP 1 คือ 32.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ความชื้นเท่ากับ 39.6 เปอร์เซ็นต์นั้น อัตราการสร้างสารสีจะลดลง นอกจากนี้พบว่าที่ความชื้นต่ำเกินไปจะทำให้เชื้อราเจริญได้ไม่ดี ส่งผลให้การสร้างสีไม่ดีด้วย และที่ความชื้นสูงเกินไปจะเกิดการสร้างเอนไซม์กลูโคอะมิเลสสูง ทำให้เกิดการสะสมของกลูโคส ส่งผลไปยับยั้งการสร้างสี ในขณะที่ Han (1990) พบว่าถ้าความชื้นเริ่มต้นต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ จะได้สีน้อย แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นอยู่ที่ 50-56 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ได้สีสูงสุดภายใน 8 วัน

ตารางที่ 2.8 การศึกษาผลของการแช่ข้าวในเวลาต่างๆ ต่อการผลิตสีของเชื้อ *M. kaoliang* ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เวลาแช่ข้าว (ชั่วโมง)	เปอร์เซ็นต์ความชื้นเริ่มต้น	ค่าสีที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรต่อกรัมแห้ง เวลาในการบ่มเชื้อ (วัน)	
		12	24
0	34.27	892	1588
1	33.51	756	1801
2	35.23	797	1618
3	36.54	755	1569
4	37.79	821	1585
5	37.6	750	1573
6	37.23	852	1119
8	35.69	896	1628
10	38.6	907	1772
12	36.59	749	14053

ที่มา : พลายแก้ว และบุษบา, 2534ก

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสีโมแนสคัสในอาหารเหลว

1. แหล่งคาร์บอน

การหมักเปียกของ *Monascus* sp. F-2 ในอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆที่เหมาะสมกับการผลิตสีจากมากไปน้อยคือ แป้งละลายน้ำ(soluble starch) กาแลคโตส และมอลโตส ตามลำดับ (Lin, 1973) การเติมสังกะสีประมาณ 800 ไมโครกรัมต่อลิตร มีส่วนเพิ่มการเจริญของเส้นใย และเพิ่มความสามารถในการนำแหล่งคาร์บอนต่างๆ มาใช้ เช่น อะราบิโนส ไซโลส กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส ซูโคส มอลโตส แป้ง ซอร์บิตอล และ เอทานอล (Johnson และ McHan, 1975) การใส่ชิ้นมันฝรั่งในอาหารเหลวสามารถช่วยลดปัญหาความหนืดของอาหารหมักในกระบวนการหมักแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (solid-liquid culture method) ได้ (Lee และคณะ, 1995) ลำดับแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างสีของ *Monascus* sp. TTWMB 6042 คือ มอลโตส กลูโคส และฟรุคโตส ตามลำดับ และลำดับแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรานี้คือ แป้ง กลูโคส และมอลโตส ตามลำดับ แต่เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ใน กาแลคโตส แลคโตส และซูโครส (Lin และ Demain, 1991)

ถ้าเลี้ยง *M. purpureus* ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูง 50 กรัมต่อลิตร ในสภาพอับอากาศ จะพบว่ามีการสร้างเอทานอลเกิดขึ้น (Chen และ Johns, 1994) เชื้อ *M. purpureus* CCM 8152 สามารถสร้างสีจากเอทานอลได้ดีกว่ามอลโตส (Juzlova และคณะ, 1994) การเติมน้ำมันข้าวโพด 0.6 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสังเคราะห์เพื่อเลี้ยงเชื้อ *M. purpureus* จะช่วยให้ค่าสีที่ได้เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า แต่การเจริญของเชื้อราจะลดลงครึ่งหนึ่ง (Chiu และ Chan, 1992)

2. แหล่งไนโตรเจน

Juzlova และคณะ (1994) รายงานถึงการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* CCM8152 ในอาหารเหลวสังเคราะห์พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการสังเคราะห์สารสีส้ม ในขณะที่สารประเภทกรดอะมิโนช่วยในการสังเคราะห์สารสีแดงและสีเหลือง นอกจากนี้การเลี้ยงเชื้อรา 2 ขั้นตอนโดยขั้นตอนแรกใช้มอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนขั้นตอนที่ 2 ใช้เอทานอล จะทำให้เชื้อราสามารถใช้เอทานอลในการสังเคราะห์สารสีได้ดีขึ้น

Lin (1973) พบว่า *Monascus* sp. F-2 สามารถผลิตสีได้ดีในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารไนเตรตและกลูตาเมต และพบว่าเปปโตน และสารสกัดยีสต์ ไม่เหมาะจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสี

Wong และคณะ (1981) พบว่าอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนสำคัญต่อการสร้างสี โดยกลูโคสความเข้มข้นระหว่าง 40-200 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรตที่มีความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ทำให้ *M. purpureus* ผลิตสีแดงได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตสูงมากกว่า 50 กรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญและการผลิตสี Lin และ Demain (1991) พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และโมโนโซเดียมกลูตาเมต เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB 6042 ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสีคือ โมโนโซเดียมกลูตาเมต ที่ความเข้มข้น 1.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ร่วมกับมอลโตสเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ Ming และ John (1993) พบว่าการเติมแอมโมเนียและเปปโตนในอาหารเหลวที่เลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* 192F จะช่วยในการเจริญและการสร้างสีของเชื้อรา ในขณะที่การเติมไนเตรตไม่ช่วยทั้งในการผลิตสีและการเจริญ โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแดงคือ การเลี้ยงเชื้อรานี้ในอาหารเหลวสังเคราะห์กลูโคส-เปปโตน ที่พีเอชเท่ากับ 4

3. อุณหภูมิ

Manandhar และ Apinis (1971) ศึกษาอัตราการเจริญของ *Monascus* sp. 37 บนอาหาร malt extract agar พบว่า *Monascus* sp. ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 และ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 45 องศาเซลเซียส การเจริญของ *Monascus* sp. ส่วนใหญ่ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญโดยทั่วไปที่ 25 และ 40 องศาเซลเซียส จะช้า ส่วนที่อุณหภูมิ 45 และ 18 องศาเซลเซียส การเจริญจะช้ามาก การสร้างสีจะสร้างได้ดีที่อุณหภูมิ 25 ถึง 28 องศาเซลเซียส ส่วน Lin และ Sue (1973) ได้เพาะเชื้อรา *Monascus* sp. F-2 ลงในอาหารเหลว นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27, 32, 37 และ 40 องศาเซลเซียส บ่มนาน 3 วัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการสร้างสีได้ดีที่สุดคือ 32 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 27 องศาเซลเซียส และถ้าอุณหภูมิมากกว่า 32 องศาเซลเซียส จะทำให้การผลิตสีลดลงอย่างรวดเร็ว

4. พีเอชอาหาร

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

5. อัตราการกวนให้อากาศ

Kim และคณะ (2002) ได้ศึกษาถึงลักษณะของเส้นใยต่อการหมักสีในถังหมัก โดยเมื่อทำการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าที่ความเร็วรอบใบพัดกวนให้อากาศ 350 รอบต่อนาที และที่ต่ำกว่า จะทำให้เส้นใยเชื้อรารวมเป็นกลุ่มและสร้างสีแดงได้ต่ำประมาณ 37.5 ยูนิต และพบว่าที่ความเร็วตั้งแต่ 350 ถึง 700 รอบต่อนาที เส้นใยของเชื้อราจะเจริญและยาวขึ้น และผลิตสีแดงได้ดีขึ้น โดยให้ค่าสีแดงสูงสุด 220 ยูนิต เมื่อให้ความเร็วเป็น 500 รอบต่อนาที แต่ที่ความเร็วรอบสูงกว่า 500 รอบต่อนาที เส้นใยจะถูกทำลายจนสั้นลง เนื่องจากแรงเฉือนของความเร็วใบพัดที่สูงขึ้น และเมื่อขยายขนาดถังหมักเป็น 300 ลิตร พบว่าระดับความเร็วใบพัดของถังหมักเท่ากับ 12,500 เซนติเมตรต่อนาที ให้การผลิตสีและลักษณะเส้นใยเชื้อราที่ดีที่สุด

Chiu และ Chan (1992) ได้ทำการศึกษาการผลิตสีของ *M. purpureus* ด้วยอาหารเหลวกึ่งสังเคราะห์พบว่า การเลี้ยงเชื้อราแบบมีการเขย่าให้อากาศจะให้ค่าสีสูงกว่าแบบตั้งทิ้งไว้กับที่ โดยค่าสีเหลืองและสีแดงที่ได้เท่ากับ 1,285 และ 1,728 ยูนิตต่อขวด ตามลำดับ

6. สารอื่นๆ

Hong และคณะ (1995) รายงานการใช้กรดโครโทนิก (chrotonic acid) และกรดซอร์บิกที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเร่งการสร้างสีได้โดยไม่มีผลต่อการเพิ่มเส้นใย และพบว่าการเติมเซอรูลินิน(cerulenin) เอทิโอนิน(ethionine) เมทิโอนีน หรือยูเรีย มีผลยับยั้งการสร้างสี (Blanc และคณะ, 1995(b))

2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างซิตรินิน

Wong และ Koehler (1983) ศึกษาถึงการผลิตสาร Monascidin A ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (antibiotic) จากเชื้อรา *M. purpureus* พบว่า Monascidin A มีปริมาณสูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งทิ้งไว้ โดยสูตรอาหารคือ สารสกัดยีสต์ และกลูโคสปริมาณ 0.8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าสารสีจะถูกสร้างและสะสมในเส้นใยเชื้อรา ส่วนMonascidin A จะถูกสร้างและละลายออกมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเติมโซเดียมอะซิเตตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ Monascidin A จะลดลง (ตารางที่ 2.9) โดยสังเกตจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone) มีค่าลดลง และพบว่าสารสีส้มและสีเหลืองจะเปลี่ยนไปเป็นสีแดงมากขึ้น ปริมาณสารสีเหลืองเรืองแสง และปริมาณ Monascidin A ที่พบหลังจากหมักจะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน หลังจากนั้น Blanc และคณะ (1995(a)) ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่าสาร Monascidin A ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่พบในเชื้อราโมแนสคัส คือซิตรินินซึ่งเป็นสารพิษจากเชื้อรามีฤทธิ์ทำลายระบบไต โดยตรวจวัดปริมาณซิตรินินด้วยวิธี HPLC เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว YES (Yeast Extract Sucrose Medium) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* และ *M. ruber* ให้ปริมาณซิตรินินเท่ากับ 270 และ 340 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในข้าวจะให้ปริมาณซิตรินินเท่ากับ 100 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ หลังการค้นพบนี้ทำให้หลายฝ่ายให้ความสนใจถึงการใช้สีจากเชื้อราโมแนสคัสในอาหารมากขึ้น

ตารางที่ 2.9 ผลกระทบของโซเดียมอะซิเตตที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อพีเอช การเจริญ การผลิตสี และค่าการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย ต่อการหมักเชื้อ *M. purpureus*

โซเดียมอะซิเตต (โมลต่อลิตร)	พีเอช	ค่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (มิลลิเมตร)	น้ำหนักแห้งเชื้อรา (มิลลิกรัม)	ปริมาณสี (มิลลิกรัม)
0.005	5.5	25	960	94
0.01	6.5	22	1000	98
0.02	7.3	20	980	107
0.03	7.3	10	980	92
0.04	7.4	0	980	81

ที่มา : Wong และ Koehler, 1983

Blanc และคณะ (1995(b)) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตซิตรินินของเชื้อรา *M. ruber* โดยเมื่อแทนที่โมโนโซเดียมกลูตาเมตซึ่งให้ปริมาณซิตรินินเท่ากับ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ คือ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ ยูเรีย และเมทไธโอนีน พบว่าปริมาณซิตรินินลดลงเท่ากับ 100, 42, 17 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปริมาณและวิธีการใช้แหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ในการเติมเพื่อลดปริมาณซิตรินินในการหมักอาหารเหลวต่อไป

Hajjaj และคณะ (2000 (a)) พบว่าระหว่างการเลี้ยงเชื้อรา *M. ruber* ด้วยอาหารเหลวซึ่งใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อราจะมีการสร้างสารสีแดงที่ละลายน้ำได้ร่วมกับซิตรินิน และจากการใช้เทคนิค NMR (Nuclear Magnetic Resonance) ตรวจสอบสารทั้งสองชนิดพบว่าสารสีแดงถูกสร้างจากกระบวนการสังเคราะห์โพลีคีไทด์และกระบวนการสังเคราะกรดไขมันร่วมกัน โดยกระบวนการสังเคราะห์โพลีคีไทด์ทำหน้าที่สังเคราะห์โครงสร้างโครโมฟอร์ (chromophore) คือ ส่วนโมเลกุลหรือโครงสร้างที่ให้สี ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของรงควัตถุ จากนั้นกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน จะทำการสังเคราะห์โมเลกุลกรดไขมันเพื่อมาต่อกับโครงสร้างโครโมฟอร์ให้ได้สารสีที่สมบูรณ์ จากการทดลองพบว่าเมื่อเติมกรดไขมันที่มีอะตอมของคาร์บอนในช่วง 8-12 อะตอม จะทำให้ปริมาณซิตรินินลดลง หรือไม่มีการสังเคราะห์ซิตรินินเลย ซึ่งคาดว่าเกิดจากไฮไดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ได้จากกรดไขมันไปยับยั้งการสังเคราะห์ซิตรินิน หรือสารมัชยันต์ (intermediate) ในการสังเคราะห์ซิตรินิน

Hajjaj และคณะ (2000(b)) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อรา *M. ruber* ในอาหารเหลวโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสารสีแดงและซิตรินิน พบว่าในสภาวะที่มีการให้ออกซิเจนที่จำกัด ทั้งสารสีแดงและซิตรินินจะถูกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อรา และเมื่อให้ปริมาณออกซิเจนในระบบเกินพอ พบว่าซิตรินินจะถูกสร้างในขณะที่เชื้อราเริ่มมีอัตราการเจริญคงที่ หรือเป็นสารทุติยภูมิ แต่สารสีแดงจะลดลงอย่างมากระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งแสดงว่าปริมาณออกซิเจนเกินพอมีผลยับยั้งการสร้างสีแดงของเชื้อรา นอกจากนี้ยังพบว่าระหว่างการหมักเชื้อราจะสร้างกรดมาลิกและกรดซัคซินิก ซึ่งพบว่ามีผลเล็กน้อยต่อการยับยั้งการสร้างสีแดง แต่ไม่มีผลต่อปริมาณซิตรินิน

2.10 งานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

Fink และคณะ (1991(a)) พบว่าสารสกัดจากเชื้อรา *M. purpureus* มีความเป็นพิษต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบไนไตรท์ที่ใช้เติมในผลิตภัณฑ์เนื้อ จึงสามารถใช้สารสกัดจากเชื้อรา *M. purpureus* เพื่อให้สีในผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อลดอันตรายจากสารประกอบไนโตรเจน

Leistner และ Dresel (1991) พบว่าสารสกัดจาก *M. purpureus* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* spp., salmonellae, lactobacilli และ *Listeria monocytogenes* ซึ่งสามารถนำไปใช้ร่วมกับสารประกอบไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อได้

Fink และคณะ (1991(b)) ได้ทำการศึกษาถึงการเติมสารสกัดจาก *M. purpureus* DSM 1379 ในปริมาณ 1,000-4,000 ppm ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก เพื่อเปรียบเทียบกับไส้กรอกที่เติมไนไตรท์ปริมาณ 0.72 ppm พบว่าไส้กรอกที่เติมสารสกัดจากเชื้อราโมแนสคัสให้สีแดงน้ำตาลที่สวยงาม แต่สีแดงที่ได้จะไม่เหมือนกับสีของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกทั่วไปที่เติมไนไตรท์ และสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัสจะมีความคงทนกว่าสีจากไนไตรท์ ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลิ่นและรสชาติของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกทั้งสอง แต่ยังต้องมีการศึกษาถึงความปลอดภัยของสารสกัดเชื้อราโมแนสคัสเพิ่มเติมก่อนนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

Jahn (1991) ทำการทดลองถึงผลของสารสกัดจากเชื้อรา *M. purpureus* ต่อการเกิดความผิดปกติของยีนส์ (genotoxicity) พบว่าไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของยีนส์อย่างมีนัยสำคัญ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้สารสกัดจาก *M. purpureus* ในผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อทดแทนไนไตรท์

Kranz และคณะ (1992) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* DSM 1379 สามารถเปลี่ยนกรดไขมันสายสั้นให้เป็นเมทธิลคีโตน (methyl ketones) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นที่สำคัญสำหรับบลูชีส (blue cheese) ซึ่งมีกระบวนการควบคุมการสร้างเมทิลคีโตนคล้ายที่พบใน *Penicillium roquefortii* โดยชนิดของเมทธิลคีโตนที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น

Martinkova และคณะ (1995) รายงานถึงความเป็นพิษของสารสกัดจากเชื้อรา *M. purpureus* จะขึ้นอยู่กับปริมาณสารสีส้ม (monascorubrin และ rubropunctatin) ซึ่งการสังเคราะห์สารสีส้มขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติมสารอินทรีย์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ลงในอาหาร จะทำให้สารที่มีสมบัติเป็นสารที่ส่งผลกระทบทางชีวภาพ (bioactive compound) เปลี่ยนไปอยู่รูปที่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้ สังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของสารสีส้มเป็นสารสีม่วงแดง ซึ่งเกิดจากการแทนที่อะตอมออกซิเจนด้วยหมู่อะมิโน ทำให้ความเป็นพิษของสารสีส้มลดน้อยลงหรือหมดไป

Trivedi และคณะ (1993) ศึกษาถึงผลของเวลา และอุณหภูมิต่อการสลายตัวของซิตรินินที่ได้จากการแยกอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Penicillium citrinum* พบว่าซิตรินินจะสลายตัวได้บางส่วนเมื่อให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 10 นาที ขึ้นไป ในสภาวะที่มีน้ำร่วมด้วย (aqueous conditions) แต่พบว่าซิตรินินจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารกลุ่มใหม่ (กลุ่มที่1) ซึ่งมีสมบัติเป็นพิษ และเมื่อให้ความร้อนถึงอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ซิตรินินจะถูกทำลายหมด และสารกลุ่มที่ 1 จะเปลี่ยนไปเป็นสารกลุ่มที่ 2 ซึ่งไม่มีพิษ ดังนั้นจึงสามารถอธิบายได้ว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการประกอบอาหารทั่วไปจะทำให้ซิตรินินเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารกลุ่มใหม่ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกาย

Martinkova และคณะ (1999) รายงานถึงระดับความเป็นพิษของสารสีที่แยกได้จากเส้นใย *M. purpureus* พบว่าระดับความเป็นพิษต่อตัวอ่อนไก่ จากมากไปน้อย คือ Monascorubin, Rubropunctatin, Monascin และ Ankaflavin ตามลำดับ ทั้ง Monascorubin และ Rubropunctatin มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (antibiotic) ต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *Candida pseudotropicalis* และเมื่อทำการเติมไกลซีนในการบ่มเพื่อเลี้ยงเชื้อราพบว่า Monascorubrin และ Rubropunctatin จะเปลี่ยนเป็น Rubropunctamine และ Monascorubramine ซึ่งให้สีม่วงแดง เนื่องจากเกิดการแทนที่อะตอมออกซิเจนด้วยหมู่อะมิโน โดยพบว่าสารสีที่ได้ทั้ง 2 มีผลกระทบทางชีวภาพ (biological active) ต่ำกว่าสารสีหลักทั้ง 4 ชนิด นอกจากนี้สารสีทั้ง 6 ชนิด ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของตับ เมื่อทดสอบในหนูทดลอง

Calvo และ Salvador (2002) ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้สีจากเชื้อราย้อมสีเจล โดยเปรียบเทียบกับสีแดงจากโคชินิล (cochineal) ซึ่งเป็นรงควัตถุสีแดงที่ได้จากแมลง โดยเจลที่ใช้ในการทดสอบคือ คาราจีแนน เจลแลน เจลลาติน และแซนแทน พบว่าเจลที่ได้จากการย้อมสีโมแนสคัสจะให้สีส้มแดง ในขณะที่เจลได้จากการย้อมสีโคชินิลจะให้สีม่วงแดง และนอกจากนี้พบว่าเจลแซนแทนจะให้ค่าสี L (ความสว่าง) สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเจลชนิดอื่นๆ

Suh และ Shin (2000) พบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. J101 ร่วมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อราแบบปกติ การเลี้ยงเชื้อราร่วมกับยีสต์จะทำให้มีการสร้างสปอร์แบบมีเพศสูงกว่า และมีปริมาณ และขนาดของแวคคิวโอ (vacuoles) เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งแวคิวโอมีหน้าที่ในการเก็บรงควัตถุสีแดงที่เชื้อราสร้างขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ารงควัตถุที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อร่วมกันจะมีคุณสมบัติเป็นแบบไฮโดรโฟบิกสูงกว่ารงควัตถุจากการเลี้ยงเชื้อราแบบปกติ คือจะไม่ชอบน้ำ หรือละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์

Chang และคณะ (2002) ได้ใช้วิธี Response Surface Methodology (RSM) เพื่อหาสัดส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *M. ruber* (สายพันธุ์คัดเลือก) ให้เพิ่มการผลิตโลวาสตาติน (lovastatin) ซึ่งเป็นสารลดคอเลสเตอรอล พบว่าสัดส่วนที่เหมาะสมของแป้งข้าวเจ้า เปปโตน กลีเซอร์รีน และกลูโคส ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 34.4, 10.8, 26.4 และ129.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ปริมาณโลวาสตาติน 131 มิลลิกรัมต่อลิตร

Sabater และคณะ (1999) ได้ทำการตรวจวัดปริมาณซิตรินินด้วยวิธี HPLC ในตัวอย่างข้าวแดงที่มีจำหน่ายในยุโรป จำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณซิตรินินอยู่ระหว่าง 0.2-17.1 ppm

XU และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาถึงปริมาณซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดงโดยวิธี HPLC พบว่าจากตัวอย่างข้าวแดง 32 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 35 ตัวอย่าง มีปริมาณซิตรินินระหว่าง 0.2-140 ppm และพบว่าเชื้อรา *M. anka* และ *M. ruber* เป็นสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณซิตรินินสูง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YES (Yeast Extract Sucrose Medium) นอกจากนี้พบว่าเมื่อเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมตหรือยีสทีดีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณซิตรินินในน้ำหมักของการหมักเชื้อรา *M. ruber* JH-2 ในอาหารเหลว และพบว่าปริมาณซิตรินินในการหมักเชื้อราในอาหารแข็ง(ข้าว) จะสูงกว่าการหมักในอาหารเหลวมาก

Zhelifonova และคณะ (2000) พบว่าการเติมไอออนของแมงกานีสและสังกะสี จะทำให้เชื้อรา *Penicillium citrinum* Thom VKM F-1079 สร้างซิตรินินเพิ่มมากขึ้น

Wild (2000) พบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* DSM 1379 ในข้าว จะมีปริมาณซิตรินินเมื่อตรวจวัดด้วยวิธี HPLC อยู่ในช่วง 600-800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่เมื่อตรวจวัดปริมาณซิตรินินจากตัวอย่างข้าวแดงตามท้องตลาด พบว่ามีปริมาณซิตรินินน้อยกว่า 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเนื่องจากมีการใช้สารสีแดงจากเชื้อโมแนสคัสในการให้สีแดงในผลิตภัณฑ์เนื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งไส้กรอก ดังนั้นจึงมีการให้ความสนใจถึงความปลอดภัยของการใช้สารสีแดงมากขึ้นโดยเฉพาะในประเทศเยอรมัน