

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การสร้างสารพิษและรงควัตถุของราโมแนสคัสที่ ตัดแยกจากอังคัก

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC, MYCOTOXIN AND PIGMENT PRODUCTIONS OF *MONASCUS* SP. ISOLATED FROM ANGKAK (RED YEAST RICE)

เกตุการ ดาจันทา* หทัยทิพย์ ร้องคำ
Katekan Dajanta, Hathaitip Rongkom*

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก
*Division of Food Science and Technology, Faculty of Food and Agricultural Technology,
Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok.*

*Corresponding author, E-mail: dkatekan@hotmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างสารพิษและรงควัตถุของราโมแนสคัสที่ตัดแยกได้จากข้าวแดง (อังคัก) ทางการค้า ผลการศึกษาพบราโมแนสคัส 13 ไอโซเลตที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีหลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน อยู่ระหว่าง 1.63-2.72 เซนติเมตร โคโลนีเป็นสีขาวครีมจนถึงสีส้ม โดยทั่วไปราที่ตัดแยกได้สร้างโคโคนีเดี่ยวรูปร่างกลมและมีสีใสหรือสีกากีหรือสีส้ม และมีการสร้างรงควัตถุสีแดงหรือสีส้มภายในโครงสร้าง เส้นใยแตกแขนงมีสีใสหรือสีน้ำตาล การศึกษาความสามารถการสร้างสารพิษของราโมแนสคัสใช้การทดสอบการต้านการเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี agar disc diffusion ผลการศึกษาพบราโมแนสคัส 4 ไอโซเลตที่ไม่แสดงการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* คือ PSRU03 PSRU05 PSRU08 และ PSRU10 โดย PSRU03 สามารถสร้างรงควัตถุได้มากกว่าราไอโซเลตอื่นและจากการศึกษาเปรียบเทียบตัวทำละลายในการสกัดรงควัตถุพบว่าสารสกัดเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 มีปริมาณของรงควัตถุสูงกว่าสารสกัดน้ำ 2-8 เท่า

คำสำคัญ: โมแนสคัส รงควัตถุ สารพิษจากเชื้อรา ซิตรีนิน ข้าวแดง

Abstract

This research aimed to study the capability of producing mycotoxin and pigments of *Monascus* strains isolated from commercial red yeast rice products (angkak). It was found that 13 different morphological characters of *Monascus* were isolated from the red yeast rice products. Colonies of isolated strains were 1.63-2.72 cm in diameters with white or orange front colors after cultured in potato dextrose agar at 30°C for 3 days. They commonly produced globular and hyaline conidia, hyaline or orange ascospores, and red or orange pig-

ments. Mycelia were branched and in hyaline to brown color. Capability of producing mycotoxin of isolated **Monascus** was designed based on the fact that mycotoxin possesses antibacterial activity for **B.subtilis**. As a result, 4 isolated **Monascus** strains PSRU03, PSRU05, PSRU08, and PSRU10 did not show any inhibition activity. In addition, *Monascus* sp. PSRU03 produced more pigments than the other isolated strains. In comparative study of solvent for pigments extraction, it was found that 80% ethanolic extracts exhibited 2–8 times higher pigment contents than those contained in the water extracts.

Keywords: Monascus, Pigments, Mycotoxin, Citrinin, Red Yeast Rice

บทนำ

โมแนสคัส (*Monascus*) เป็นราที่ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยผลิตภัณฑ์อาหารจากราโมแนสคัสที่รู้จักอย่างแพร่หลายคือข้าวแดง (Red Yeast Rice) หรืออังกัก (Angkak) ในระหว่างการเจริญของราโมแนสคัสบนวัสดุหมักได้มีการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิดเช่นสารสื่อประสาทกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก (g-aminobutyric Acid) [1–2] สารลดคอเลสเตอรอลโมนาโคลิน (Monacolin) [3–5] สารต้านออกซิเดชันคือกรดไดเมอร์มิก (Dimeric Acid) [6] และสารสีหรือรงควัตถุ (Pigments) สีแดง เหลือง และส้ม [7] รงควัตถุของข้าวแดงถูกใช้เป็นสีผสมอาหารธรรมชาติที่ปลอดภัยและมีสรรพคุณการต้านการอักเสบ [8] ยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ [7] และช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง [9–10] ดังนั้นข้าวแดงนอกจากจะถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้วยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาด้วยโดยมีรายงานการใช้ข้าวแดงในการลดระดับไขมันในเลือดทั้งในสัตว์ทดลอง [11] และผู้ป่วยโรคคอเลสเตอรอล [12] อย่างไรก็ตามการบริโภคข้าวแดงหรืออาหารหมักโมแนสคัสมีข้อจำกัดด้านความปลอดภัย เนื่องจากมีการตรวจพบสารพิษซิทรินิน (Citrinin) ที่ออกฤทธิ์ทำลายตับและไตในระหว่างการเจริญของราโมแนสคัสด้วย [13–14]

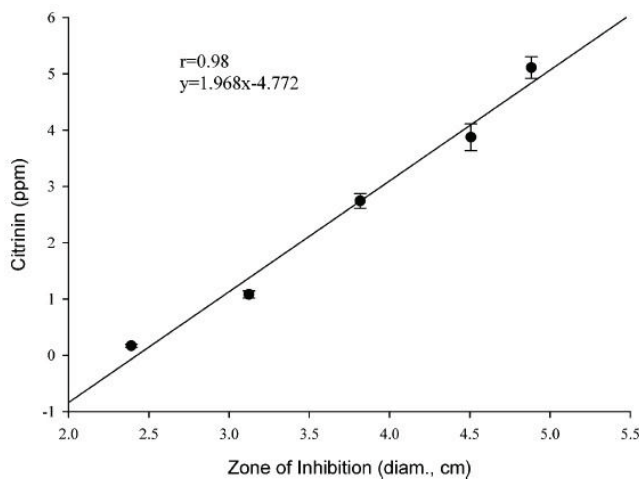
สายพันธุ์ของราโมแนสคัสเป็นปัจจัยที่สำคัญในการบ่งชี้ถึงความปลอดภัยของข้าวแดงจากราพิษซิทรินินดังนั้นจึงมีการศึกษาคัดกรองราโมแนสคัสที่สร้างสารพิษต่ำอย่างแพร่หลาย ดังเช่นรายงานของ Pisareva และคณะ [15] ที่ประสบความสำเร็จในการคัดแยกราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษซิทรินินและสร้างสารรงควัตถุสูงจากอาหารหมักโมแนสคัสนอกจากนี้รายงานของ Pisareva และ Kujumdzieva [16] ยังได้ศึกษาจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษด้วยสำหรับประเทศไทยมีการศึกษาการคัดแยกราโมแนสคัสจากข้าวแดงตั้งแต่ปี 2528 [17] และได้มีการศึกษามาอย่างต่อเนื่องดังรายงานของ Pinthong และคณะ [18] ที่ได้คัดแยก *M. purpureus* จากข้าวแดงที่จำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่และนำไปใช้เป็นกลิ่นเชื้อในการหมักข้าวแดง ซึ่งพบว่าราที่คัดแยกได้มีการสร้างรงควัตถุสีแดงที่ดีที่สุดมีการสร้างสารพิษซิทรินินที่สูงกว่าสายพันธุ์มาตรฐานและรายงานของ Chairote และคณะ [19] ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถในการสร้างรงควัตถุของราโมแนสคัสที่คัดแยกได้จากข้าวแดงการค้า

โมแนสคัสเป็นราใน Class Ascomycetes ลักษณะเฉพาะของราในจีนัสนี้คือมีเส้นใยสีใสถึงสีแดงสร้างแอสโคสปอร์รูปไข่สีใสอยู่ในโครงสร้าง stalked ascomata รูปทรงกลม (Globose) หรือ

เกือบกลม (Subglobose) และสร้างโคนินเดีย สีใสรูปปร่างกลมหรือเกือบกลม [20-21] รายงานของ Stchigel และคณะ [22] ได้ระบุแนวทางในการบ่งชี้ชนิดของราโมแนสคัสที่คัดแยกได้ โดยเริ่มจากการสังเกตลักษณะผิวหน้าโคโลนีบนอาหาร Potato Dextrose Agar ซึ่งช่วงแรกของการเจริญสีของเส้นใยเป็นสีขาวและเมื่อเชื้อรามีอายุมากขึ้นเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีส้มและสีแดงตามลำดับ และการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งพบโครงสร้างของถุงแอสคัสรูปปร่างกลมรีสีที่สร้างบนก้านภายในถุงมีแอสโคสปอร์จำนวนไม่น้อยกว่า 8 อัน

การศึกษาความสามารถการสร้างสารพิษซิตรีนินของราโมแนสคัสนอกจากใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง เช่น high performance liquid chromatography, thin layer chromatography และ gas chromatography-mass spectroscopy แล้วยังสามารถใช้วิธีทางชีวภาพ

ในการทดสอบการสร้างสารพิษซิตรีนินได้อีกด้วย โดยรายงานของ Wang และคณะ [23] พบว่าสารที่พบบริเวณสีใส (Clear Zone) ในการทดสอบการต้านการเจริญแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ด้วยวิธี agar disc diffusion คือสารซิตรีนินและความกว้างของบริเวณสีใสที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารซิตรีนินเป็นแบบเส้นตรง โดยมีค่าสหสัมพันธ์ (R^2) สูงถึง 0.98 (ภาพที่ 1) ในปัจจุบันการผลิตอาหารหมักให้ได้เพียงสารลดคอเลสเตอรอลโมนาโคลิน โดยไม่มีการปนเปื้อนสารซิตรีนินทำได้ยาก จึงทำให้การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งหรือลดการสร้างสารพิษในอาหารของราโมแนสคัสมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกราโมแนสคัสจากข้าวแดงทางการค้าและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงความสามารถในการสร้างสารพิษและรงควัตถุของราโมแนสคัสที่คัดแยกได้



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารซิตรีนิน

กับความกว้างของบริเวณยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis* จากการทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion

ที่มา: Wang, J.J., Lee, C.L.; & Pan, T.M. (2004). Modified mutation method for screening low citrinin-producing strains of *Monascus purpureus* on rice culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 6977-6982.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดแยกราโมแนสคัสจากข้าวแดงทางการค้า และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตลอดจนจัดกรองราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษต่ำจากปฏิกิริยาการต้านการเจริญแบคทีเรีย **B. subtilis** และศึกษาความสามารถในการสร้างรงควัตถุของราโมแนสคัสที่คัดแยกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกราโมแนสคัสจากข้าวแดงทางการค้า

ทำการคัดแยกราโมแนสคัสจากข้าวแดงที่ซื้อจากตลาดเยาวราชกรุงเทพมหานครและตลาดย่านท่าหลวง จังหวัดจันทบุรี แหล่งละ 20 เมล็ด ทำการฆ่าเชื้อข้าวแดงด้วยวิธี Surface Sterilization Method [19] โดยการแช่เมล็ดข้าวแดงในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95 นาน 30 วินาที จากนั้นล้างเมล็ดข้าวแดงด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และนำเมล็ดข้าวแดงวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar (Merck, Germany) บ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ตรวจสอบความบริสุทธิ์และการเจริญของราโมแนสคัสและถ่ายเชื้อที่เจริญลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck, Germany) บ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน สังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาและสีของโคโลนี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ [20-21] เก็บราโมแนสคัสบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในตู้เย็น

เพื่อรอการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. ศึกษาความสามารถการสร้างสารพิษของโมแนสคัสที่คัดแยกได้

2.1 การเตรียมแบคทีเรียสำหรับทดสอบ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย **B. subtilis** TISTR008 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (Merck, Germany) บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียม Stock Suspension ของ **B. subtilis** ในสารละลายเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปรับความขุ่นของสารละลายเชื้อเป็น 0.5 MacFarland Standard ซึ่งมีเชื้อประมาณ 106 เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นใช้สาลีพ่นปลายไม้ปลอดเชื้อชุบสารละลายแบคทีเรีย **B. subtilis** เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่แห้งให้ทั่วปล่อยให้ผิวหน้าของอาหารวุ้นแห้งประมาณ 3-5 นาที ก่อนนำไปทดสอบความสามารถการสร้างสารพิษของราโมแนสคัสในขั้นตอนต่อไป

2.2 การทดสอบความสามารถการสร้างสารพิษของราโมแนสคัส

เพาะเลี้ยงราโมแนสคัสที่คัดแยกได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเพาะที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของราโมแนสคัสและวางชิ้นวุ้นบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ย **B. subtilis** จากข้อ 2.1 นำจานทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นสังเกตวงแหวนใส (Clear Zone หรือ Inhibition Zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆ ชิ้นวุ้นของรา [23] วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและวงแหวนใสรวมทั้งโคโลนีของรา คำนวณหาค่า Relative Magnitude of Inhibition (RMI) จากสูตร

$$\text{Relative Magnitude of Inhibition} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรวมทั้งโคโลนีของรา}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา}}$$

3. ศึกษาการผลิตรังควัตถุจากราโมเนสคัสไอโซเลตที่สร้างสารพิษต่ำ

หมักข้าวแดงด้วยราโมเนสคัสไอโซเลตที่สร้างสารพิษต่ำ ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 2 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Chairote และคณะ [19] ดังนี้

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมสปอร์ของราโมเนสคัสที่สร้างสารพิษต่ำที่คัดแยกได้และราโมเนสคัสสายพันธุ์มาตรฐานคือ **M. ruber**TISTR3006 และ **M. purpureus**ATCC16365 โดยเพาะราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วันใช้ cork borer ขนาด 3 มิลลิเมตร เจาะตัดเส้นใยบริเวณขอบของโคโลนีเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าเอียงของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในหลอดแก้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วันเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 10 มิลลิตร ลงในหลอดเพาะเชื้อและใช้ห่วงถ่ายเชื้อเกลี่ยให้สปอร์ของราหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย (ความเข้มข้นประมาณ 106 สปอร์/มิลลิตร)

3.2 การเตรียมข้าวแดง

แช่ข้าวเจ้าสายพันธุ์ พิษณุโลก 2 ในน้ำสะอาดนาน 8 ชั่วโมง หลังการสะเด็ดน้ำ ชั่งข้าว จำนวน 50 กรัม ใส่ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิตร ปิดปากพลาสติกด้วยสำลีและหุ้มด้วยกระดาษฆ่าเชื้อในหม้อหนึ่ง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปล่อยให้เย็น เติมสารละลายสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 ในอัตราร้อยละ 5 (v/w) เขย่าให้เข้ากันดีบ่มเพาะในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เขย่าพลาสติกทุก 3 วัน

3.3 การตรวจวิเคราะห์รังควัตถุ

อบข้าวแดงให้แห้งในตู้อบแห้งแบบลมร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 ชั่วโมง (ค่า Water Activity ต่ำกว่า 0.5) บดข้าวแดงให้ละเอียดด้วย Hammer Mill ร่อนผ่านตะแกรง

ขนาด 80-100 mesh สกัดรังควัตถุจากผงข้าวแดงด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และน้ำโดยชั่งผงข้าวแดง 1 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิตร เติมตัวทำละลาย 20 มิลลิตร สกัดสารสีในเครื่อง Ultrasonic bath นาน 30 นาที บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 20 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของรังควัตถุสีแดงที่ช่วงคลื่น 500 นาโนเมตร รังควัตถุสีเหลืองที่ช่วงคลื่น 400 นาโนเมตร และรังควัตถุสีส้มที่ช่วงคลื่น 470 นาโนเมตร คำนวณปริมาณรังควัตถุโดยรังควัตถุ 1 หน่วย (Unit) คือสารเมตาบอไลต์จากราโมเนสคัสที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 470 และ 500 นาโนเมตรเท่ากับ 1 [24-25]

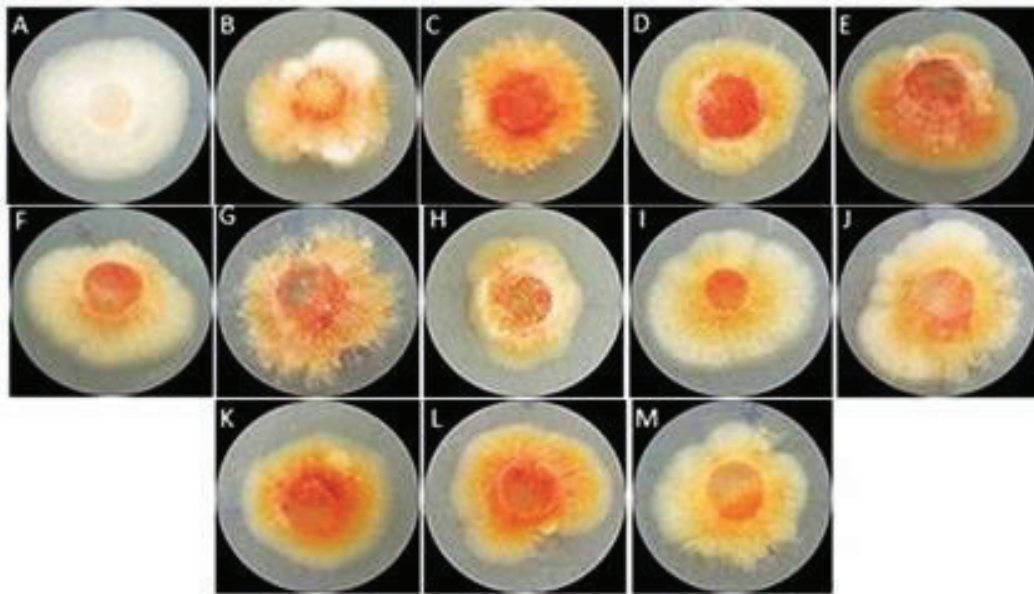
4. การวิเคราะห์ห้ำข้อมูล

แสดงข้อมูลด้วยค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ผลการวิจัย

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโมเนสคัสที่คัดแยกจากข้าวแดงการค้า

การคัดแยกราโมเนสคัสจากข้าวแดงทางการค้า พบราทั้งหมด 13 ไอโซเลต ที่มีลักษณะโคโลนีและการเจริญแตกต่างกัน และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นาน 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าราที่คัดแยกได้มีโคโลนีสีขาวครีมจนถึงสีส้ม การเจริญของเส้นใยในช่วงแรกเป็นสีข้าวและเมื่อมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีส้มและสีแดง ลักษณะเส้นใยมีทั้งที่ไม่ฟูจนถึงฟูปกคลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีอยู่ระหว่าง 1.63-2.72 เซนติเมตร (ภาพที่ 2 และตารางที่ 1)



ภาพที่ 2 โคลนของ *Monascus* sp. คัดแยกจากข้าวแดงทางการค้า: PSRU01 (A) PSRU02 (B) PSRU03 (C) PSRU04 (D) PSRU05 (E) PSRU06 (F) PSRU07 (G) PSRU08 (H) PSRU09 (I) PSRU10 (J) PSRU11 (K) PSRU12 (L) และ PSRU13 (M)

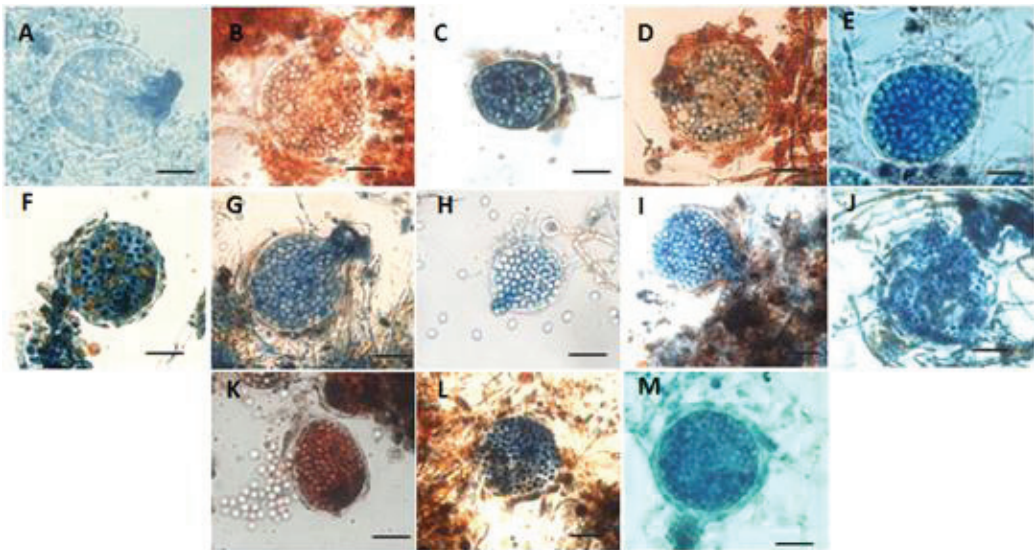
ตารางที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Monascus* sp. คัดแยกจากข้าวแดงทางการค้าเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

ไอโซเลต	ขนาดโคโลนี ¹ (เซนติเมตร)	สีของโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	ขนาดแอสโคสปอร์ ² (ไมโครเมตร)	รูปร่างถุง ² แอสคัส	ขนาดโคนเดี่ยว ² (ไมโครเมตร)	สารสี ²
PSRU01	2.72 ± 0.17a ³	ส้มอ่อน	ฟูเล็กน้อย	2.01 ± 0.15b	ค่อนข้างกลม	2.32 ± 0.23cd	ไม่พบ
PSRU02	2.09 ± 0.12ab	ส้มเข้ม	ฟูเล็กน้อย	1.82 ± 0.08bc	ค่อนข้างกลม	2.52 ± 0.16cd	ส้มแดง
PSRU03	1.63 ± 0.11b	ส้มแดง	ไม่ฟู	1.93 ± 0.17bc	ค่อนข้างกลม	2.34 ± 0.23cd	ส้มแดง
PSRU04	1.96 ± 0.03ab	ส้มแดง	ไม่ฟู	1.72 ± 0.08c	กลม	4.67 ± 0.49a	ไม่พบ
PSRU05	1.80 ± 0.51ab	ส้มอ่อน	ไม่ฟู	1.85 ± 0.14bc	ค่อนข้างกลม	4.23 ± 0.09a	ไม่พบ
PSRU06	2.24 ± 0.12ab	ส้มอ่อน	ไม่ฟู	1.84 ± 0.10bc	ค่อนข้างกลม	2.52 ± 0.13cd	เหลืองส้ม
PSRU07	2.00 ± 0.22ab	ส้มอ่อน	ไม่ฟู	1.92 ± 0.16bc	กลม	2.43 ± 0.15cd	ไม่พบ
PSRU08	1.75 ± 0.44ab	ส้มอ่อน	ไม่ฟู	1.77 ± 0.09bc	กลม	2.62 ± 0.08c	ไม่พบ
PSRU09	2.70 ± 0.64a	ส้มเข้ม	ฟู	1.94 ± 0.07b	กลม	2.55 ± 0.13cd	เหลืองส้ม
PSRU10	2.17 ± 0.10ab	ส้มเข้ม	ไม่ฟู	2.11 ± 0.05a	กลม	2.03 ± 0.33d	ไม่พบ
PSRU11	1.90 ± 0.28ab	ส้มเข้ม	ไม่ฟู	2.13 ± 0.09a	ค่อนข้างกลม	3.20 ± 0.07b	เหลืองส้ม
PSRU12	1.90 ± 0.37ab	ส้มเข้ม	ฟูเล็กน้อย	1.93 ± 0.16bc	กลม	4.50 ± 0.45a	ส้ม
PSRU13	2.27 ± 0.13b	ส้มอ่อน	ฟูเล็กน้อย	1.92 ± 0.24bc	กลม	2.31 ± 0.21d	เหลืองส้ม

¹ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3); ²ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังการเพาะเลี้ยงรบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน และข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 10); ³ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P ≤ 0.05)

เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบโครงสร้างของเชื้อราที่มีลักษณะเฉพาะของราโมแนสคัส [20-21] โดยเส้นใยของราเป็นแบบมีผนังกันแตกแขนงสีใสและพบแอสโคสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของราโมแนสคัสราที่คัดแยกได้ทั้งหมดสร้างแอสโคสปอร์จำนวนมากว่า 8 อันภายในถุงแอสคัส ส่วนใหญ่มีสีใส รูปร่างกลมรี และมีขนาดแตกต่างกันโดยมีค่าอยู่ในช่วง 1.72 - 2.13 ไมโครเมตร (ตารางที่ 1)

ถุงแอสคัสของราที่คัดแยกได้ทั้งหมดเป็นแบบ stalk ascomata รูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม สีใส ขนาดของถุงแอสคัสมีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 3) โคนิเดียของราที่คัดแยกได้ทั้งหมดมีรูปร่างกลมสีใส ขนาดแตกต่างกันโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 2.03 - 4.50 ไมโครเมตร บางไอโซเลตพบรงควัตถุสีเหลืองหรือสีส้มแดงอยู่ในโครงสร้างเส้นใย ถุงแอสคัสและโคนิเดีย บางไอโซเลตมีการขับสารสีออกมานอกเซลล์ (ตารางที่ 1)

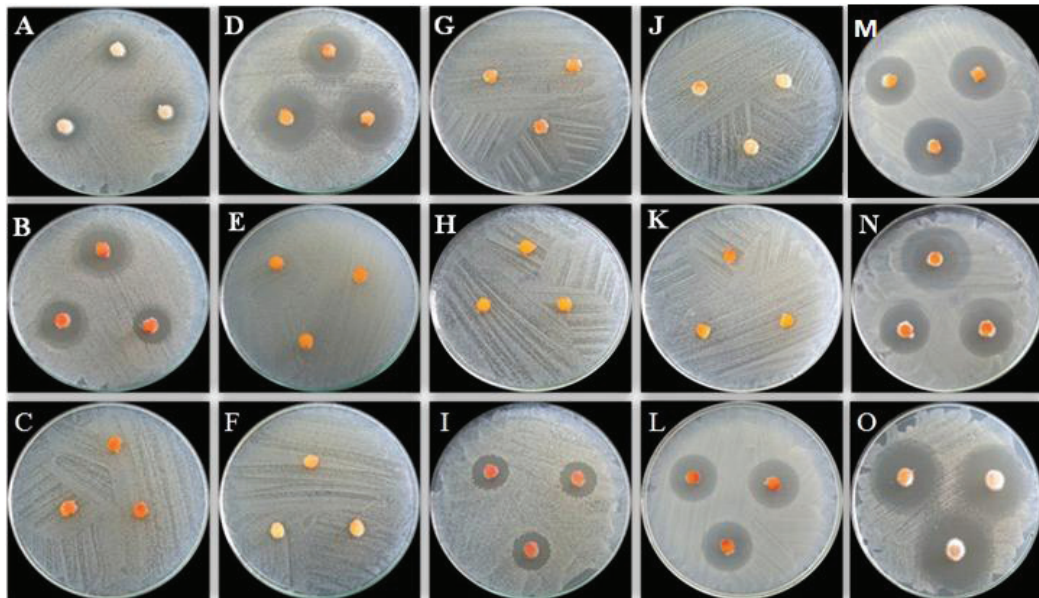


ภาพที่ 3 ถุงแอสคัสของ *Monascus* sp. คัดแยกจากข้าวแดงทางการค้า: PSRU01 (A) PSRU02 (B) PSRU03 (C) PSRU04 (D) PSRU05 (E) PSRU06 (F) PSRU07 (G) PSRU08 (H) PSRU09 (I) PSRU10 (J) PSRU11 (K) PSRU12 (L) และ PSRU13

2. ความสามารถในการสร้างสารพิษของโมแนสคัสที่คัดแยกจากข้าวแดงทางการค้า

ราโมแนสคัสที่คัดแยกจากข้าวแดงแสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *B. subtilis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นบริเวณใสล้อมรอบโคโลนีของรากับขนาดความกว้างที่แตกต่างกัน โดยมีค่า RMI อยู่ระหว่าง 1.00 - 5.04 (ภาพที่ 4 และตารางที่ 2) และพบราโมแนสคัส 4 ไอโซเลตที่ไม่แสดงวงแหวนใสยับยั้งการเจริญ

ของแบคทีเรีย คือ PSRU03 PSRU05 PSRU08 และ PSRU10 บ่งชี้ว่าราเหล่านี้ไม่สามารถสร้างสารพิษซิทรินินหรือสร้างได้น้อยมากจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังพบรา 3 ไอโซเลตที่มีการสร้างสารพิษต่ำกว่าราสายพันธุ์มาตรฐาน *M. purpureus* ATCC16365 และ *M. ruber* TISTR3006 คือ PSRU06 PSRU07 และ PSRU11 โดยมีค่า RMI ต่ำกว่าราสายพันธุ์มาตรฐาน 3-4 เท่า ตามลำดับ



ภาพที่ 4 บริเวณยับยั้งการเจริญ *B. subtilis* ของ *Monascus* sp. ที่คัดแยกจากข้าวแดงทางการค้า :PSRU01 (A) PSRU02 (B) PSRU03 (C) PSRU04 (D) PSRU05 (E) PSRU06 (F) PSRU07 (G) PSRU08 (H) PSRU09 (I) PSRU10 (J) PSRU11 (K) PSRU12 (L) PSRU13 (M) *M. purpureus* ATCC16365 (N) และ *M. ruber* TISTR3006 (O)

ตารางที่ 2 การสร้างสารพิษของ *Monascus* sp. ที่คัดแยกจากข้าวแดงทางการค้า

ไอโซเลต	Relative Magnitude of Inhibition
PSRU01	1.71 ± 0.08c
PSRU02	3.57 ± 0.80b
PSRU03	1.00 ± 0.00c
PSRU04	4.81 ± 0.46a
PSRU05	1.00 ± 0.00c
PSRU06	1.53 ± 0.34c
PSRU07	1.34 ± 0.10c
PSRU08	1.00 ± 0.00c
PSRU09	3.03 ± 0.04b
PSRU10	1.00 ± 0.00c
PSRU11	1.53 ± 0.19c
PSRU12	5.04 ± 0.22a
PSRU13	4.68 ± 0.61a
<i>M. purpureus</i> ATCC16365	4.56 ± 0.81a
<i>M. ruber</i> TISTR3006	5.14 ± 0.61a

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3. ความสามารถการสร้างรงควัตถุของ โมแนสคัสไฮโซเลตที่สร้างสารพิษต่ำ

งานวิจัยนี้ได้้นำราโมแนสคัสที่ไม่แสดง การยับยั้งการเจริญแบบคที่เรีย **B. subtilis** ทั้ง 4 ไฮโซเลตคือ PSRU03 PSRU05 PSRU08 และ PSRU10 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักข้าวแดง หรืออังกักเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้าง รงควัตถุเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์มาตรฐาน **M. purpureus** ATCC16365 และ **M. purpureus** BCC6131 และทำการสกัดรงควัตถุจากข้าวแดง ด้วยน้ำและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80

โดยอ้างอิงชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด รงควัตถุข้าวแดงจากงานวิจัยของ Vidyalakshmi และคณะ [26] และงานวิจัยของ Carvalho และคณะ [27] ระบุว่าเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 80 มีประสิทธิภาพในการสกัดรงควัตถุ สีแดงของราโมแนสคัสได้ดีกว่าเอทานอลความ เข้มข้นร้อยละ 90 และ 95 แสดงปริมาณรงควัตถุ ที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 80 ในตารางที่ 3 และปริมาณรงควัตถุ ที่สกัดด้วยน้ำในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 รงควัตถุในข้าวแดงสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80

สายพันธุ์	รงควัตถุ (หน่วย/กรัม)			รวม	อัตราส่วน สีแดง:สีส้ม:สีเหลือง
	สีแดง	สีส้ม	สีเหลือง		
PSRU03	303 ± 8a	250 ± 39a	631 ± 29a	1,183 ± 69a	26:21:53
PSRU05	46 ± 5e	34 ± 6d	47 ± 11d	127 ± 19d	36:26:37
PSRU08	180 ± 10b	72 ± 11bc	202 ± 24b	454 ± 44b	40:16:44
PSRU10	27 ± 4f	22 ± 4d	38 ± 5d	87 ± 13d	31:25:43
M. purpureus ATCC16365	66 ± 7d	50 ± 13cd	99 ± 4c	214 ± 24c	31:23:46
M. purpureus BCC6131	156 ± 2c	91 ± 18b	172 ± 36b	419 ± 52b	37:22:41

ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน ในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P ≤ 0.05)

ตารางที่ 4 รงควัตถุในข้าวแดงสกัดด้วยน้ำ

สายพันธุ์	รงควัตถุ (หน่วย/กรัม)			รวม	อัตราส่วน สีแดง:สีส้ม:สีเหลือง
	สีแดง	สีส้ม	สีเหลือง		
PSRU03	36 ± 4a	39 ± 4a	68 ± 5a	143 ± 9a	25:27:48
PSRU05	12 ± 2cd	14 ± 2cd	22 ± 3cd	48 ± 6cd	26:30:45
PSRU08	16 ± 1c	17 ± 2c	28 ± 3c	61 ± 6c	26:28:47
PSRU10	10 ± 2d	12 ± 2d	20 ± 2d	43 ± 6d	23:29:48
M. purpureus ATCC16365	13 ± 1cd	16 ± 2cd	28 ± 2cd	57 ± 5c	23:28:48
M. purpureus BCC6131	24 ± 2b	26 ± 2b	40 ± 6b	90 ± 10b	27:29:45

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำหนดค่าของข้อมูล ในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P ≤ 0.05)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณรงควัตถุทั้งหมดที่สกัดได้จากตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ พบว่ารงควัตถุของราโมแนสคัสละลายในตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ได้ดีกว่าน้ำ โดยมีปริมาณของรงควัตถุทั้งหมดสูงกว่ารงควัตถุที่สกัดด้วยน้ำ (87-1,183 และ 43-143 หน่วย/กรัม ตามลำดับ) คิดเป็น 2 - 8 เท่า รงควัตถุในข้าวแดงที่สกัดด้วยเอทานอลส่วนใหญ่เป็นรงควัตถุสีเหลือง โดยมีสัดส่วนอยู่ในช่วงร้อยละ 37 - 53 รองลงมาคือรงควัตถุสีแดงและสีส้ม โดยมีสัดส่วนอยู่ในช่วงร้อยละ 26 - 40 และ 16 - 26 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Broder และ Koehler [28] ที่พบว่ารงควัตถุส่วนใหญ่ที่พบในอังกักคือรงควัตถุสีเหลืองและสีแดง สำหรับรงควัตถุที่สกัดด้วยน้ำส่วนใหญ่เป็นรงควัตถุสีเหลืองเช่นกัน โดยมีสัดส่วนอยู่ในช่วงร้อยละ 45 - 48 รองลงมาคือรงควัตถุสีส้มและสีแดง ซึ่งมีสัดส่วนของสารสีอยู่ในช่วงร้อยละ 28 - 30 และ 23 - 27 ตามลำดับ จะเห็นว่ารงควัตถุสีแดงละลายในตัวทำละลายเอทานอลได้ดีกว่าน้ำมากกว่ารงควัตถุสีอื่น ทำให้มีสัดส่วนของรงควัตถุสีแดงเมื่อสกัดด้วยน้ำลดลงอย่างชัดเจน รายงานของ Sweeny และคณะ [29] และ Galaup และคณะ [30] ได้แนะนำให้เพิ่มแหล่งของไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และเปปไทด์ในอาหารหมักจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของรงควัตถุได้ดียิ่งขึ้น

สรุปและอภิปรายผล

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถตัดแยกราโมแนสคัสจากข้าวแดงทางการค้าได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลตโดยมีราโมแนสคัสอย่างน้อย 4 ไอโซเลตที่สร้างสารพิษชิตรินินต่ำโดยไม่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย **B. subtilis** ราโมแนสคัสสังเคราะห์สารพิษชิตรินินผ่านทางกระบวนการ polyketide pathway เช่นเดียวกับกระบวนการสร้างรงควัตถุและมีการตรวจ

พบชิตรินินเป็นครั้งแรกในปี 1931 ในเชื้อสาร monascidin A [13]

รงควัตถุของราโมแนสคัสเป็นสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิประเภทโพลีคีไทด์ที่ราโมแนสคัสสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญเช่นเดียวกับสารชิตรินินเกิดจากการรวมตัวของ acetyl unit 1 หน่วย กับ malonyl unit 3 หน่วยขึ้นไป [31] กระบวนการสังเคราะห์รงควัตถุคล้ายกับการสังเคราะห์กรดไขมันแต่มีสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน รายงานของ Marínková และคณะ [32] พบว่าราโมแนสคัสสามารถสร้างรงควัตถุได้ 3 กลุ่มคือรงควัตถุสีเหลืองรงควัตถุสีส้มและรงควัตถุสีแดงแต่ละกลุ่มมีสารสีที่แตกต่างกันโดยรงควัตถุสีเหลืองประกอบด้วยสารสี monascin และ ankaflovin รงควัตถุสีส้มประกอบด้วยสารสี monascorubrin และ rubropunctatin และรงควัตถุสีแดงประกอบด้วยสารสี monascorubramine และ rubropunctamine รงควัตถุของราโมแนสคัสมีความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่างที่ 4 - 11 สามารถทนต่อการต้มในน้ำเดือดนานถึง 120 นาที และในสภาวะได้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที คงตัวได้ดีในสภาวะที่มีแสงและอุณหภูมิห้องโดยปริมาณของรงควัตถุไม่ลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 วัน

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างรงควัตถุของราโมแนสคัสทั้ง 4 ไอโซเลตที่สร้างสารพิษต่ำคือ PSRU03 PSRU05 PSRU08 และ PSRU10 พบว่า PSRU03 สามารถสร้างรงควัตถุได้มากกว่าไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยในสารสกัดเอทานอล (ตารางที่ 3) ข้าวแดงที่หมักด้วย PSRU03 มีปริมาณของรงควัตถุทั้งหมดสูงกว่าสายพันธุ์อื่น 3-14 เท่า ขณะที่ในสารสกัดด้วยน้ำ (ตารางที่ 4) ข้าวแดงที่หมักด้วย PSRU03 มีปริมาณของรงควัตถุทั้งหมดสูงกว่าสายพันธุ์อื่นประมาณ 2-3 เท่า การสร้างรงควัตถุของราโมแนสคัสมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

ของรา วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการหมัก สภาวะการหมัก และวิธีการสกัดรงควัตถุ [33-36] ชนิดของตัวทำละลายเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณของรงควัตถุที่สกัดได้ ซึ่งรายงานของ Broder และ Koehler [28] พบว่า เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดรงควัตถุจากอังกักได้ดีกว่าคลอโรฟอร์ม เอทานอลและอะซิโตน อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เลือกใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และน้ำในการสกัดรงควัตถุจากข้าวแดงเนื่องจากเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นมีการนำรงควัตถุจากราโมแนสคัสไปประยุกต์ใช้เป็นสารให้สีเหลืองหรือสีส้มแดงในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อ น้ำมัน บิสกิต ขนมปังเค้ก และเครื่องดื่ม [37] นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องสำอาง และยาอีกด้วย [29, 38-39]

เอกสารอ้างอิง

- [1] YaKohama, Y., Matsumoto, S., Mimura, T., Tanabe, N., Inada, A.; & Nakanishi, T. (1987, June). Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 35(6): 2484-2489.
- [2] Su, Y.C., Wang, J.J., Lin, T.T.; & Pan, T.M. (2003, January). Production of the secondary metabolites g-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30(1): 40-46.
- [3] Endo, A. (1980, March). Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. *The Journal of Antibiotics*. 33: 334-336.
- [4] Wei, W., Li, C., Wang, Y., Huaide, S., Zhu, J.; & Kritchevsky, D. (2003, June). Hypolipidemic and anti-atherogenic effects of long-term cholestin (Monascuspurpureus-fermented rice, red yeast rice) in cholesterol fed rabbits. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 14(6): 314-318.
- [5] Venero, C.V., Venero, J.V., Wortham, D.C.; & Thompson, P.D. (2010, March). Lipid-lowering efficacy of red yeast rice in a population intolerant to statins. *American Journal of Cardiology*. 105(5): 664-666.
- [6] Aniya, Y., Ohtani, I.I., Higa, T., Miyagi, C., Gibo, H., Shimabukuro, M., Nakanishi, H.; & Taira, J. (2000, March). Dimerumic acid as antioxidant of the mold, *Monascusanka*. *Free Radical Biology and Medicine*. 28(6): 999-1004.

ผลงานวิจัยนี้ได้คัดแยกราโมแนสคัสที่สร้างสารซีทรินินต่ำจากข้าวแดงการค้า และรา *Monascus* sp. PSRU03 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและสร้างรงควัตถุได้ในปริมาณสูงจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาในเชิงลึกด้านการจำแนกชนิดและการประยุกต์ใช้เป็นกลิ่นหรือบิสซูทรีในการหมักข้าวแดงเพื่อใช้เป็นสารสีผสมอาหารธรรมชาติที่ปลอดภัยจากสารพิษซีทรินินในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณของมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์

- [7] Martinková, L., Juzlova, P.; & Vesely, D. (1995, December). Biological-activity of pol-yketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 79(6): 609-616.
- [8] Yasukawa, K., Takahashi, M., Natori, S., Kawai, K., Yamazaki, M., Takeuchi, M.; & Takido, M. (1994, January-February). Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mice. *Oncology*. 51(1): 108-112.
- [9] Yasukawa, K., Akihisa, T., Oinuma, H., Kaminaga, T., Kanno, H., Kasahara, Y. Tamura, T., Kumaki, K. Yamanouchi, S.; & Takido, M. (1996, July-August). Inhibitory effect of taraxastane-type triterpenes on tumor promotion by 12-O-etradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology*. 53(4): 341-344.
- [10] Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Kiyota, A., Yasukawa, K., Sakamoto, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Takayasu, J.; & Nishino, H. (2005, October). Anti-tumor-initiating effects of monascin, an azaphilonoid pigment from the extract of *Monascuspilosus* fermented rice (red-mold rice). *Chemistry and Biodiversity*. 2(10): 1305-1309.
- [11] Wang, I.K., Lin-Shiau, S.Y., Chen, P.C.; & Lin, J.K. (2000, August). Hypertriglyceridemic effect of anka (a fermented rice product of *Monascus* sp.) in rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(8): 3183-3189.
- [12] Guardamagna, O., Abello, F., Baracco, V., Stasiowska, B.; & Martino, F. (2011, June). The treatment of hypercholesterolemic children: efficacy and safety of a combination of red yeast rice extract and policosanols. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 21(6): 424-429.
- [13] Blanc, P.J., Laussac, J.P., Lebars, J., Lebars, P., Loret, M.O., Pareilleux A, Prome, D., Prome, J.C., Santerre, A.L.; & Goma, G. (1995, October). Characterization of monascidin-A from *Monascus* as citrinin. *International Journal of Food Microbiology*. 27(2-3): 201-213.
- [14] Krejci, M.E., Bretz, N.S.; & Koechel, D.A. (1996, January). Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultra-structure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium] (plasma). *Toxicology*. 106(1-3): 167-177.
- [15] Pisareva, E., Savov, V.; & Kujumdzieva, A. (2005, January-February). Pigment and citrinin biosynthesis by fungi belonging to genus *Monascus*. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*. 60(1-2): 116-120.
- [16] Pisareva, E.; & Kujumdzieva, A. (2006). Taxonomic investigation and growth characteristics of citrinin free *Monascuspilosus* C1 strain. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 20(1): 88-96.
- [17] บุษบา ยงสมิทธิ์. (2542). *จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- [18] Pinthong, R., Boonsangsom, J., Baipong, S.; & Raviyan, P. (2547). *Production of safety red yeast rice for using in food industry*. Final Report. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University. (in Thai).
- [19] Chairote, E., Chairote, G., Wongpornchai, S.; & Lumyong, S. (2007, November). Preparation of red yeast rice using various Thai glutinous rice and *Monascuspurpureus*CMU001 isolated from commercial Chinese red yeast rice sample. *KMITL Science and Technology Journal*. 7: 28-37.
- [20] Hawksworth, D.L.; & Pitt, J.I. (1983). A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. *Australian Journal of Botany*. 31(1): 51-61.
- [21] Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C.; & Filtenborg, O. (2002). *Introduction to Food and Airborne Fungi*. Netherlands: CentraalbeuvoorSchimmelculture.
- [22] Stchigel, A.M., Cano, J.F., Abdullah, S.K.; & Guarro, J. (2004, January). New and interesting species of *Monascus* from soil, with a key to the known species. *Studies in Mycology*. 50(2): 299-306.
- [23] Wang, J.J., Lee, C.L.; & Pan, T.M. (2004, November). Modified mutation method for screening low citrinin-producing strains of *Monascuspurpureus* on rice culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(23): 6977-6982.
- [24] Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A.; & Tharatha, S. (2008, August). Mevinolin, citrinin and pigments of adlayangkak fermented by *Monascus* sp. *International Journal of Food Microbiology*. 126(1-2): 20-23.
- [25] Ungureanu, C., Ferdes, M., Chirvase, A.A.; & Radu, N. (2009). Study of relationship concerning the pigment production and growth rate for five mutants strains of *Monascuspurpureus*. *Chemical Engineering Transactions*. 17: 1149-1154.
- [26] Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., Muruges, S.; & Singaravavel, K. (2009, January). Microbial bioconversion of rice broken to food grade pigments. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 4(2): 84-87.
- [27] Carvalho, J.C., Oishi, B.O., Woiciechowski, A.L., Pandey, A., Babitha, S.; & Soccol, C.R. (2007, April). Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents. *Indian Journal of Biotechnology*. 6: 194-199.
- [28] Broder, C.U.; & Koehler, P.E. (1980, May). Pigments produced by *Monascuspurpureus* with regard to quality. *Journal of Food Science*. 45(3): 567-569.
- [29] Sweeny, J.G., Estrada-Valdes, M.C., Iacobucci, G.A., Sato, H.; & Sakamura, H.S. (1981, November). Photoprotection of the red pigments of *Monascusanka* in aqueous media by 1,4,6-trihydroxynaphthalene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 29(6): 1189-1193.

- [30] Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C.; & Ravishankar, G.A. (2005, September). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or and industrial reality?. *Trends in Food Science and Technology*. 16(9): 389-406.
- [31] Turner, W.B. (1971). *Fungal Metabolites*. London: Academic Press.
- [32] Marínková, L., Patáková-Juůzlová, P., Krent, V., Kucerová, Z., Havlíček, V., Olsovský, P., Hovorka, O., Ríhová, B., Veselý, D., Veselá, D., Ulrichová, J.; & Prikrylová V. (1999, January). Biological activities of oligoketide pigments of *Monascuspurpureus*. *Food Additives and Contaminants*. 16(1): 15-24.
- [33] Tsukahara, M., Shinzato, N., Tamaki, Y., Namihira, T.; & Matsui, T. (2009, August). Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 158(2): 476-482.
- [34] Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., Muruges, S.; & Singaravadivel, K. (2009). Stimulation of *Monascus* pigments by invention of different nitrogen sources. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 4(1): 25-28.
- [35] Chen, F.; & Hu, X. (2005, September). Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. *International Journal of Food Microbiology*. 103(3): 331-336.
- [36] Chairote, E.O., Chairote, G.; & Lumyong, S. (2009, January). Red yeast rice prepared from Thai glutinous rice and the antioxidant activities. *Chiang Mai Journal of Science*. 36(1): 42-49.
- [37] Srianta, I., Ristiarini, S., Nugerahani, I., Sen, S.K., Zhang, B.B., Xu, G.R.; & Blanc, P.J. (2014). Recent research and development of *Monascus* fermentation products: mini-review. *International Food Research Journal*. 21(1): 1-12.
- [38] Juůzlová, P., Marínková, L.; & Kren, V. (1996, March). Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: review. *Journal of Industrial Microbiology*. 16(3): 163-170.
- [39] Hong, M.Y., Seeram, N.P., Zhang, Y., Chin, Y.; & Heber, D. (2008, July). Anti-cancer effects of Chinese red yeast rice beyond monacolin K alone in colon cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 19(7): 448-458.