ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การสร้างสารพิษและรงควัตถุของราโมแนสคัสที่คัดแยกจากอังคัก

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

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

คำสำคัญ: โมแนสคัส รงควัตถุ สารพิษจากเชื้อรา ซิตรินิน 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 that13 different morphological characters of **Monascus** were isolated from the red yeast riceproducts. 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 ascomata, 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 **Monascuss** trains PSRU03, PSRU05, PSRU08, and PSRU10did not show any inhibition activity. In addition, Monascussp. 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

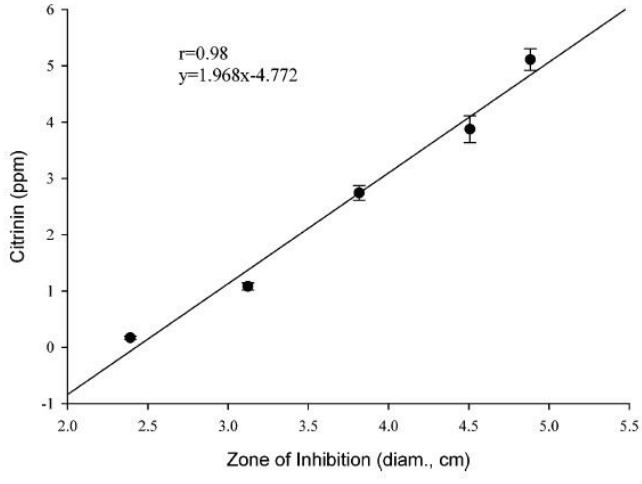
โมแนสคัส (Monascus) เป็นราที่ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยผลิตภัณฑ์อาหารจากราโมแนสคัสที่รู้จักอย่างแพร่หลายคือข้าวแดง (Red Yeast Rice) หรืออังคัก (Angkak) ในระหว่างการเจริญของราโมแนสคัสบนวัสดุหมักได้มีการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิดเช่นสารสื่อประสาทกรดแกมมาอะมิโนบิวทิริก (g-aminobutyric Acid) [1-2] สารลดคอเลสเตอรอลโมนาโคลิน (Monacolin) [3-5] สารต้านออกซิเดชันคือกรดไดเมอรูมิค (Dimerumic Acid) [6] และสารสีหรือรงควัตถุ (Pigments) สีแดง เหลือง และส้ม [7] รงควัตถุของข้าวแดงถูกใช้เป็นสีผสมอาหารธรรมชาติที่ปลอดภัยและมีสรรพคุณการต้านการอักเสบ [8] ยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ [7] และช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง [9-10] ดังนั้นข้าวแดงนอกจากจะถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้วยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาด้วยโดยมีรายงานการใช้ข้าวแดงในการลดระดับไขมันในเลือดทั้งในสัตว์ทดลอง [11] และผู้ป่วยโรคคอเลสเตอรอล [12] อย่างไรก็ตามการบริโภคข้าวแดงหรืออาหารหมักโมแนสคัสมีข้อจำกัดด้านความปลอดภัย เนื่องจากมีการตรวจพบสารพิษซิตรินิน (Citrinin) ที่ออกฤทธิ์ทำลายตับและไตในระหว่างการเจริญของราโมแนสคัสด้วย [13-14]

สายพันธุ์ของราโมแนสคัสเป็นปัจจัยที่สำคัญในการบ่งชี้ถึงความปลอดภัยของข้าวแดงจากสารพิษซิตรินินดังนั้นจึงมีการศึกษาคัดกรองราโมแนสคัสที่สร้างสารพิษต่ำอย่างแพร่หลาย ดังเช่นรายงานของ Pisareva และคณะ [15] ที่ประสบความสำเร็จในการคัดแยกราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษซิตรินินและสร้างสารรงควัตถุสูงจากอาหารหมักโมแนสคัสนอกจากนี้รายงานของ Pisareva และ Kujumdzieva [16] ยังได้ศึกษาจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษด้วยสำหรับประเทศไทยมีการศึกษาการคัดแยกราโมแนสคัสจากข้าวแดงตั้งแต่ปี 2528 [17] และได้มีการศึกษามาอย่างต่อเนื่องดังรายงานของ Pinthong และคณะ [18] ที่ได้คัดแยกรา **M. purpureus** จากข้าวแดงที่จำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่และนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักข้าวแดง ซึ่งพบว่าราที่คัดแยกได้มีการสร้างรงควัตถุสีแดงที่ดีแต่มีการสร้างสารพิษซิตรินินที่สูงกว่าราสายพันธุ์มาตรฐานและรายงานของ Chairote และคณะ [19] ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสามารถการสร้างรงควัตถุของราโมแนสคัสที่คัดแยกได้จากข้าวแดงการค้า

โมแนสคัสเป็นราใน Class Ascomycetes ลักษณะเฉพาะของราในจีนัสนี้คือมีเส้นใยสีใสถึงสีแดงสร้างแอสโคสปอร์รูปไข่สีใสอยู่ในโครงสร้าง stalked ascomata รูปร่างกลม (Globose) หรือ

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

การศึกษาความสามารถการสร้างสารพิษซิตรินินของราโมแนสคัสนอกจากใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ชั้นสูง เช่น high performance liquid chromatography, thin layer chromatography และ gas chromatography-mass spectroscopy แล้วยังสามารถใช้วิธีทางชีวภาพในการทดสอบการสร้างสารพิษซิตรินินได้อีกด้วย โดยรายงานของ Wang และคณะ [23] พบว่าสารที่พบบริเวณสีใส (Clear Zone) ในการทดสอบการต้านการเจริญแบคทีเรีย **Bacillus subtilis** ด้วยวิธี agar disc diffusion คือสารซิตรินิน และความกว้างของบริเวณสีใสที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารซิตรินินเป็นแบบเส้นตรง โดยมีค่าสหสัมพันธ์ (R2) สูงถึง 0.98 (ภาพที่ 1) ในปัจจุบันการผลิตอาหารหมักให้ได้เพียงสารลดคอเลสเตอรอลโมนาโคลินโดยไม่มีการปนเปื้อนสารซิตรินินทำได้ยาก จึงทำให้การศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งหรือลดการสร้างสารพิษในอาหารของราโมแนสคัสมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกราโมแนสคัสจากข้าวแดงทางการค้าและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงความสามารถในการสร้างสารพิษและรงควัตถุของราโมแนสคัสที่คัดแยกได้



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารซิตรินิน 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 **Monascuspurpureus** on rice culture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 52: 6977-6982.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดแยกราโมแนสคัสจากข้าวแดงทางการค้าและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตลอดจนคัดกรองราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษต่ำจากปฏิกิริยาการต้านการเจริญแบคทีเรีย **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] เก็บราโมแนสคัสบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในตู้เย็นเพื่อรอการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

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 จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ปลอดเชื้อชุบสารละลายแบคทีเรีย **B. subtilis** เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่แห้งให้ทั่ว ปล่อยให้ผิวหน้าของอาหารวุ้นแห้งประมาณ 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. ศึกษาการผลิตรงควัตถุจากราโมแนสคัสไอโซเลตที่สร้างสารพิษต่ำ

หมักข้าวแดงด้วยราโมแนสคัสไอโซเลตที่สร้างสารพิษต่ำ ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 2 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Chairote และคณะ [19] ดังนี้

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เตรียมสปอร์ของราโมแนสคัสที่สร้างสารพิษต่ำที่คัดแยกได้และราโมแนสคัสสายพันธุ์มาตรฐานคือ **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 มิลลิลิตร ลงในหลอดเพาะเชื้อและใช้ห่วงถ่ายเชื้อเกลี่ยให้สปอร์ของราหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย (ความเข้มข้นประมาณ 106 สปอร์/มิลลิลิตร)

3.2 การเตรียมข้าวแดง

แช่ข้าวเจ้าสายพันธุ์พิษณุโลก2 ในน้ำสะอาดนาน 8 ชั่วโมง หลังการสะเด็ดน้ำชั่งข้าว จำนวน 50 กรัม ใส่ในฟลาสค์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสค์ด้วยสำลีและหุ้มด้วยกระดาษฆ่าเชื้อในหม้อนึ่ง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปล่อยให้เย็น เติมสารละลายสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 ในอัตราร้อยละ 5 (v/w) เขย่าให้เข้ากันดีบ่มเพาะในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เขย่าฟลาสค์ทุก 3 วัน

3.3 การตรวจวิเคราะห์รงควัตถุ

อบข้าวแดงให้แห้งในตู้อบแห้งแบบลมร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 10 ชั่วโมง (ค่า Water Activity ต่ำกว่า 0.5) บดข้าวแดงให้ละเอียดด้วย Hammer Mill ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80-100 mesh สกัดรงควัตถุจากผงข้าวแดงด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และน้ำโดยชั่งผงข้าวแดง 1 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร สกัดสารสีในเครื่อง Ultrasonic bath นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm นาน 20 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุสีแดงที่ช่วงคลื่น 500 นาโนเมตร รงควัตถุสีเหลืองที่ช่วงคลื่น 400 นาโนเมตร และรงควัตถุสีส้มที่ช่วงคลื่น 470 นาโนเมตร คำนวณปริมาณรงควัตถุโดยรงควัตถุ 1 หน่วย (Unit) คือสารเมตาบอไลต์จากราโมแนสคัสที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 470 และ 500 นาโนเมตรเท่ากับ 1 [24-25]

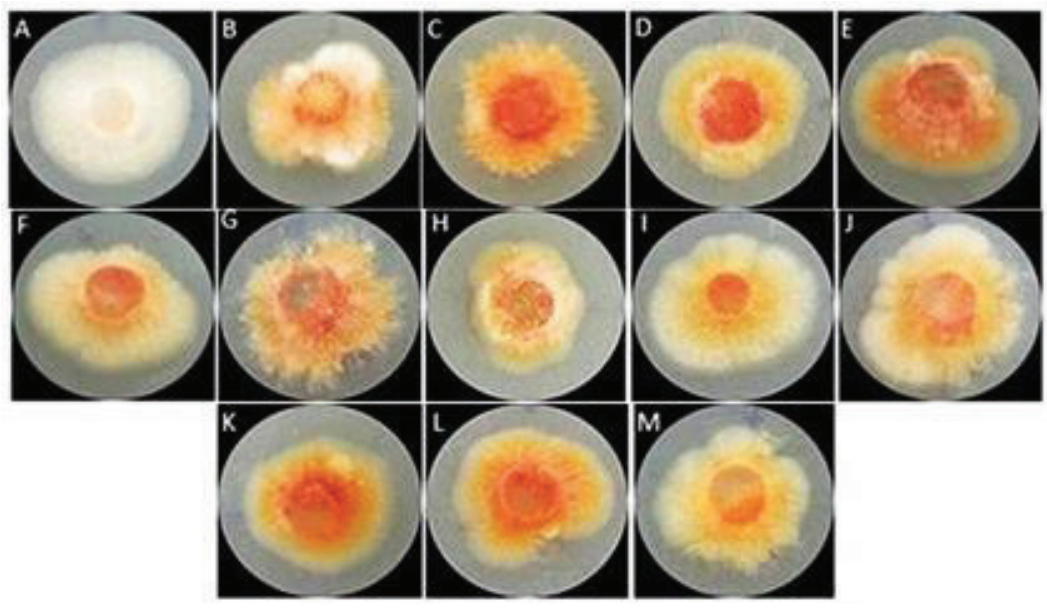
4. การวิเคราะห์ข้อมูล

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

ผลการวิจัย

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโมแนสคัสที่คัดแยกจากข้าวแดงการค้า

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



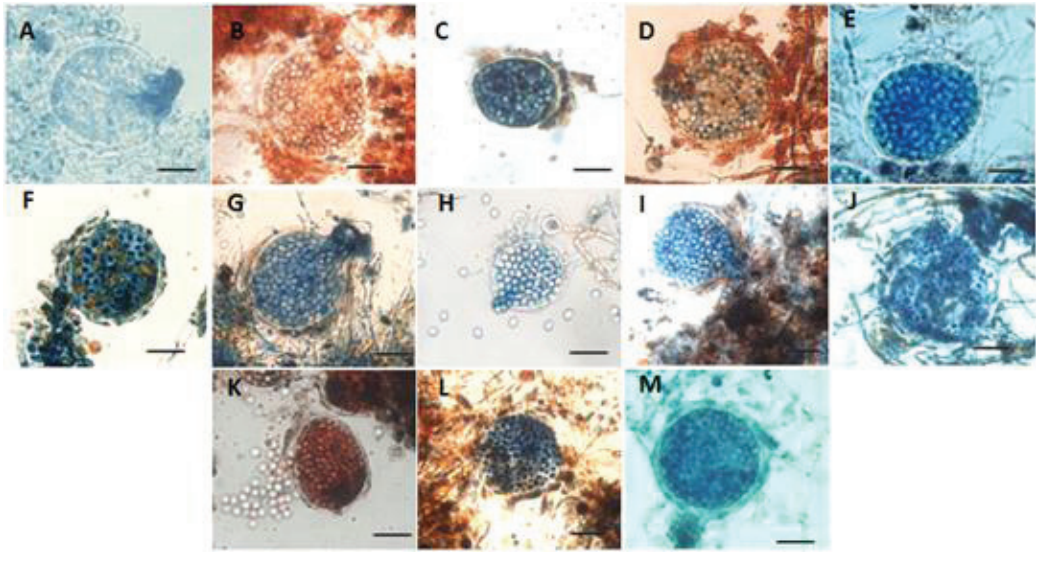
ภาพที่ 2 โคโลนีของ **Monascus**sp. คัดแยกจากข้าวแดงทางการค้า: PSRU01 (A) PSRU02 (B)PSRU03 (C) PSRU04 (D) PSRU05 (E) PSRU06 (F) PSRU07 (G) PSRU08 (H) PSRU09 (I) PSRU10 (J) PSRU11 (K) PSRU12 (L) และ PSRU13 (M)

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

ไอโซเลต	ขนาดโคโลนี[1] (เซนติเมตร)	สีของโคโลนี	ลักษณะเส้นใย	ขนาดแอสโคสปอร์[2] (ไมโครเมตร)	รูปร่างถุง[2] แอสคัส	ขนาดโคนิเดีย[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

[1]ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3); [2]ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังการเพาะเลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน และข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 10); [3]ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

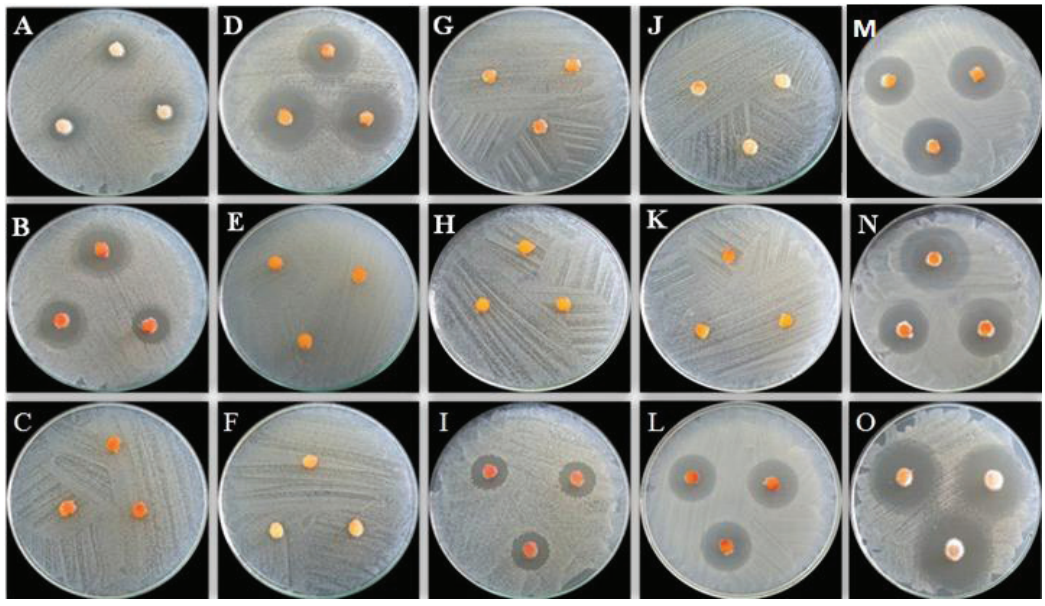
เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบโครงสร้างของเชื้อราที่มีลักษณะเฉพาะของราโมแนสคัส [20-21] โดยเส้นใยของราเป็นแบบมีผนังกั้น แตกแขนงสีใสและพบแอสโคสปอร์ซึ่งเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของราโมแนสคัส ราที่คัดแยกได้ทั้งหมดสร้างแอสโคสปอร์จำนวนมากกว่า 8 อันภายในถุงแอสคัส 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 บางไอโซเลตพบรงควัตถุสีเหลืองหรือสีส้มแดงอยู่ภายในโครงสร้างเส้นใย 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. ความสามารถการสร้างสารพิษของโมแนสคัสที่คัดแยกจากข้าวแดงทางการค้า

ราโมแนสคัสที่คัดแยกจากข้าวแดงแสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย **B. subtilis** บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นบริเวณใสล้อมรอบโคโลนีของราด้วยขนาดความกว้างที่แตกต่างกันโดยมีค่า RMI อยู่ระหว่าง 1.00 – 5.04 (ภาพที่ 4 และตารางที่ 2) และพบราโมแนสคัส 4 ไอโซเลตที่ไม่แสดงวงแหวนใสยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย คือ PSRU03 PSRU05 PSRU08 และ PSRU10 บ่งชี้ว่าราเหล่านี้ไม่สามารถสร้างสารพิษซิตรินินหรือสร้างได้น้อยมากจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 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 **Monascussp.** 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
M. purpureusATCC16365	4.56 ± 0.81a
M. ruberTISTR3006	5.14 ± 0.61a

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

3. ความสามารถการสร้างรงควัตถุของโมแนสคัสไอโซเลตที่สร้างสารพิษต่ำ

งานวิจัยนี้ได้นำราโมแนสคัสที่ไม่แสดงการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย **B. subtilis** ทั้ง 4 ไอโซเลตคือ PSRU03 PSRU05 PSRU08 และ PSRU10 มาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักข้าวแดงหรืออังคักเพื่อศึกษาความสามารถในการสร้างรงควัตถุเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์มาตรฐาน **M. purpureus** ATCC16365 และ **M. purpureus** BCC6131 และทำการสกัดรงควัตถุจากข้าวแดงด้วยน้ำและเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยอ้างอิงชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดรงควัตถุข้าวแดงจากงานวิจัยของ Vidyalakshmi และคณะ [26] และงานวิจัยของ Carvalho และคณะ [27] ระบุว่าเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 มีประสิทธิภาพในการสกัดรงควัตถุสีแดงของราโมแนสคัสได้ดีกว่าเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 และ 95 แสดงปริมาณรงควัตถุที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ในตารางที่ 3 และปริมาณรงควัตถุที่สกัดด้วยน้ำในตารางที่ 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) และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

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) และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

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] ที่พบว่ารงควัตถุส่วนใหญ่ที่พบในอังคักคือรงควัตถุสีเหลืองและสีแดง 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

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถคัดแยกราโมแนสคัสจากข้าวแดงทางการค้าได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลตโดยมีราโมแนสคัสอย่างน้อย 4 ไอโซเลตที่สร้างสารพิษซิตรินินต่ำโดยไม่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย **B. subtilis** ราโมแนสคัสสังเคราะห์สารพิษซิตรินินผ่านทางกระบวนการ polyketide pathway เช่นเดียวกับกระบวนการสร้างรงควัตถุและมีการตรวจพบซิตรินินเป็นครั้งแรกในปี 1931 ในชื่อสาร monascidin A [13]

รงควัตถุของราโมแนสคัสเป็นสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิประเภทโพลิคีไทด์ที่ราโมแนสคัสสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญเช่นเดียวกับสารซิตรินินเกิดจากการรวมตัวของ acetyl unit 1 หน่วย กับ malonyl unit 3 หน่วยขึ้นไป [31] กระบวนการสังเคราะห์รงควัตถุคล้ายกับการสังเคราะห์กรดไขมันแต่มีสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน รายงานของ Marínková และคณะ [32] พบว่าราโมแนสคัสสามารถสร้างรงควัตถุได้ 3 กลุ่มคือรงควัตถุสีเหลืองรงควัตถุสีส้มและรงควัตถุสีแดงแต่ละกลุ่มมีสารสีที่แตกต่างกันโดยรงควัตถุสีเหลืองประกอบด้วยสารสี monascin และ ankaflavin รงควัตถุสีส้มประกอบด้วยสารสี monascorubrin และ rubropunctatin และรงควัตถุสีแดงประกอบด้วยสารสี monascorubramine และ rubropunctamine รงควัตถุของราโมแนสคัสมีความคงตัวต่อความเป็นกรด-ด่างที่ 4 - 11 สามารถทนต่อการต้มในน้ำเดือดนานถึง 120 นาที และในสภาวะใต้ความดันที่อุณหภูมิ 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 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก สภาวะการหมัก และวิธีการสกัดรงควัตถุ [33-36] ชนิดของตัวทำละลายเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณของรงควัตถุที่สกัดได้ ซึ่งรายงานของ Broder และ Koehler [28] พบว่า เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดรงควัตถุจากอังคักได้ดีกว่าคลอโรฟอร์ม เอทานอลและอะซิโตน อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เลือกใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และน้ำในการสกัดรงควัตถุจากข้าวแดงเนื่องจากเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นมีการนำรงควัตถุจากราโมแนสคัสไปประยุกต์ใช้เป็นสารให้สีเหลืองหรือสีส้มแดงในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อ น้ำมัน บิสกิต ขนมปัง เค้ก และเครื่องดื่ม [37] นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เครื่องสำอาง และยาอีกด้วย [29, 38-39]

ผลงานวิจัยนี้ได้คัดแยกราโมแนสคัสที่สร้างสารซิตรินินต่ำจากข้าวแดงการค้า และรา Monascussp. PSRU03 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและสร้างรงควัตถุได้ในปริมาณสูงจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาในเชิงลึกด้านการจำแนกชนิดและการประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักข้าวแดงเพื่อใช้เป็นสารสีผสมอาหารธรรมชาติที่ปลอดภัยจากสารพิษซิตรินินในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบสนับสนุนงานวิจัยของมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

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.

[7] Martinková, L., Juzlova, P.; & Vesely, D. (1995, December). Biological-activity of polyketide 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-tetradecanoylphorbol-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 ยงสมิทธ์. (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 Monascuspur-pureusCMU001 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 Monascusspecies 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: CentraalbeauvoorSchimmelculture.

[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., Murugesh, S.; & Singaravadivel, 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 Monascusbiopigments by solid-statefermentation 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., Havlícek, 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., Murugesh, S.; & Singaravadivel, K. (2009). Stimulation of *Monascus* pigments by invention of different nitrogen sources. *Global Journal of Biotechnologyand 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 Monascusfermentation products: mini-review. *International Food Research Journal.* 21(1): 1-12.

[38] Jůzlová, P., Martnková, 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.