

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ข้าวแดง หรือ red yeast rice คือ ผลผลิตจากการใช้รา *Monascus* spp. มาหมักแบบแห้งบนเมล็ดข้าวเจ้าขาว (*Monascus*-fermented) จากนั้นเชื้อราดังกล่าวจะสร้างสารสีแดงขึ้นมาในปริมาณมากทำให้ข้าวกลายเป็นสีแดงทั้งเมล็ด ซึ่งข้าวแดงที่ได้จากกระบวนการหมักได้ถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ยา และในอุตสาหกรรมต่างๆในประเทศแถบเอเชียมาเป็นเวลานานแล้ว (Shi & Pan, 2011) โดยนำไปผลิตอาหารจะนำไปใช้เพื่อแต่งสี กลิ่นและรส เช่น เต้าหู้ยี้ สีส้มอาหาร เช่น หมูแดง เป็ดปักกิ่ง และขนมต่างๆ ของจีน เหล้าจีน สาเกญี่ปุ่น สารสีที่พบในข้าวแดงประกอบด้วยสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารสี polyketide monacolin dimerumic acid และ γ -aminobutyric acid เป็นต้น (Shi & Pan, 2011) ดังนั้นคุณสมบัติของสารต่างๆในข้าวแดงนั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราที่ใช้ในการผลิตข้าวแดง ปัจจุบันผลิตภัณฑ์จากข้าวแดงได้รับความนิยมมากขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มผู้บริโภคที่นิยมบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ มีการรายงานจากนักวิทยาศาสตร์ว่า ข้าวแดง มีคุณสมบัติในการลด cholesterol ในเลือด จึงช่วยลดอัตราเสี่ยงในการก่อโรคเรื้อรังชนิดไม่ติดต่อ เช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของระบบประสาท ป้องกันโรค Alzheimer ช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบทางเดิน และยังป้องกันการเกิดมะเร็งได้ด้วย (Shi & Pan, 2011)

สาร Monacolin สามารถเรียกได้หลายชื่อ เช่น Lovastatin, Mevinolin และ Mevacor เป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีคุณสมบัติสำคัญที่สุดในการช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอชเอ็มจี-โคเอรีดักเทส (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMG-CoA) ไม่ให้ออกฤทธิ์ ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์สารคอเลสเตอรอลในตับได้อย่างมีประสิทธิภาพและนอกจากนี้ยังมีสารสำคัญในกลุ่มเดียวกันและการทำงานคล้ายคลึงกันอีก เช่น mevinolin, dihydromonacolin และ monacolin อื่นๆ (monacolin I to VI) โดยพบว่า Monacolin K เป็นสารในกลุ่ม Monacolin ที่น่าสนใจมากที่สุด ทั้งนี้เพราะสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ cholesterol และลดปริมาณระดับ cholesterol ในเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ สาร Monacolins มีอยู่ด้วยกันหลายชนิดเช่น Monacolin K, M, J และ L ฯลฯ โดยสารในกลุ่มดังกล่าวนี้ที่สำคัญคือ Monacolin K ซึ่งสามารถพบได้ในเชื้อราในกลุ่ม *Monascus* และ *Aspergillus* (Patakova, 2013)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดข้าวแดง *Monascus* spp. พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เช่น *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus, *Streptococcus* sp., *Yersinia enterocolitica* และ *Listeria monocytogenes* ได้ (Dikshit & Tallapragada, 2010) Ferders (2009) พบว่า สารสกัดข้าวแดงที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้ง *Streptomyces albus*, *B. subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้เท่ากับ 8, 9 และ 9 mm ตามลำดับ แต่เมื่อทำการสกัดด้วย n-hexane พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้เท่ากัน คือ 10 mm เมื่อเร็ว ๆ นี้ กรกต สุนทรกุล และคณะ (2012) ได้ทำปรับปรุงการผลิตสาโทแดงจากข้าวเหนียวดำโดยใช้ *Monascus purpureus* TISTR 3002 เพื่อย่อยข้าวและใช้ยีสต์ *Saccharomyces bayanus* EC1118 ในการผลิตเอทานอล จากวัสดุหมักผสมระหว่างข้าวเหนียวดำและข้าวขาว พบว่า สาโทแดงที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำ 70 % ของข้าวเหนียวขาวร่วมกับราแดงมีฤทธิ์ในการแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงได้ดีโดยให้บริเวณใสต่อเชื้อ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* TISTR 029, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27533, *Escherichia coli* TISTR 073, *Enterobacter aerogenes* TISTR 1540 และ *Salmonella Typhimurium* TISTR 292 ตามลำดับ รวมทั้ง *Aeromonas hydrophila* ที่พบว่ารา *Monascus* sp. LC1 สามารถยับยั้งได้ดี (เสาวนิตย์ ชอบบุญ, 2554)

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจอันดับหนึ่งของประเทศไทย ในการกะเทาะเปลือกและสีข้าวจะทำโดยเครื่องจักรและได้ส่วนที่เป็นปลายข้าว 10 – 20 % :ซึ่งผลพลอยได้จากการสีข้าว คือ ปลายข้าว ที่มีราคาถูก เมื่อเร็ว ๆ ประเทศไทยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยและมีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของข้าวจะมีความแตกต่างกัน ในเรื่องของปริมาณและชนิดของสารที่พบในข้าว ตัวอย่างเช่น ข้าวสาลีจะมีโปรตีน gluten ที่มีประโยชน์ในการลดการเกิดการบาดเจ็บของกล้ามเนื้อได้ (หน่วยบริการฐานข้อมูลสมุนไพร, 2009) แต่ โปรตีน gluten จะไม่พบในข้าวอื่นๆ สำหรับข้าวสีในประเทศไทยที่นิยมปลูก ได้แก่ ข้าวสีนิล และข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นต้น ซึ่งข้าวสีจะมีปริมาณของสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการมากกว่าข้าวขาว ได้แก่ โปรตีน ไขมัน วิตามินบี 2 และแร่ธาตุอื่นๆ ในการการผลิตสารสีจาก *Monascus* โดยทั่วไปจะใช้ข้าวขาวในการหมักข้าวแดง แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามเลือกใช้วัสดุหมักที่มีราคาถูก เพื่อลดต้นทุนในการผลิต ซึ่งวัสดุหมักที่นำมาใช้ได้แก่ เปลือกขุ่น (Subhasree et al., 2011) แป้งข้าวโพด (Velmurugan et al. 2011) ชั่งข้าวโพดและกากหีบอ้อย (Rajeswari et al. 2014) เป็นต้น

เนื่องจากข้าวแดงหมักได้รับความนิยมมากในผลิตภัณฑ์อาหารมากมายจึงต้องมีความปลอดภัยสูง ดังนั้นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตจะต้องมีการผลิตสารพิษ citrinin ที่เชื่อมีการสร้างขึ้นเองตามปกติอยู่แล้ว ในปริมาณต่ำกว่ามาตรฐาน เมื่อเร็ว ๆ นี้เราได้ทำการเพาะเลี้ยง *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลาย พบว่า สายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติ เนื่องจากสามารถผลิตสาร monacolin K ได้ในปริมาณสูง แต่ผลิตสารพิษ citrinin ในปริมาณต่ำมาก และพบสารบางชนิดซึ่งอาจเป็นสารชนิดใหม่ นอกจากนี้ยังได้มีการพยายามพัฒนาขยายขนาดการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณสารโดย

วิธีที่ง่าย สะดวก ราคาถูก โดยใช้กล่องพลาสติก ซึ่งจะสามารถขยายขนาดการผลิตสารได้ขึ้นกับขนาด และปริมาณกล่องที่ใช้ แต่ยังคงต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทางกายภาพ ได้แก่ ความหนาของวัสดุ หมักที่เหมาะสม ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ความชื้น อุณหภูมิ และสภาพความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น

จะเห็นได้ว่าทั้งปลายข้าว และ *Monascus* spp. จะให้สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ ที่มีประโยชน์ทางการแพทย์และมีประโยชน์ต่อสุขภาพ และปลายข้าวยังเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาถูก ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อคุณภาพของการผลิตข้าวแดง คือ วัสดุที่ใช้ในการหมักเพื่อผลิตข้าวแดง ซึ่งโดยทั่วไป *Monascus purpureus* สามารถเจริญได้ดีบนข้าวเหนียวขาวมากกว่าข้าวเหนียวดำ จึงนิยมใช้ข้าวขาวในการผลิต นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงในกระบวนการหมักจะมีผลต่อปริมาณสารสำคัญเหล่านี้ด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งพัฒนากระบวนการผลิต สารสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระและแบคทีเรียบางชนิดที่ทำให้เกิดท้องร่วง และก่อโรคผิวหนัง รวมทั้งสาร Monacolin K โดยใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลาย โดยศึกษาผลขององค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันของปลายข้าวสาลี ข้าวสาลีและปลายข้าวขาว และการใช้วัสดุหมักในสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการผลิต ตลอดจนพัฒนาการขยายขนาดการผลิตแบบง่ายโดยใช้กล่องพลาสติกในการหมัก รวมทั้งศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมทางกายภาพของกระบวนการหมัก เพื่อให้ได้ปริมาณสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิเพิ่มมากขึ้น พร้อมทั้งทำการทดสอบคุณสมบัติของสารสำคัญที่ได้ก่อนการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ เนื่องจากสารสำคัญดังกล่าวนี้สามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ และผลิตภัณฑ์เวชสำอาง เป็นต้น นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังช่วยเพิ่มมูลค่าของข้าว ทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น และช่วยส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวพื้นเมืองของประเทศไทยได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังสามารถนำกระบวนการผลิตที่พัฒนาแล้วไปส่งเสริมและถ่ายทอดให้ผู้สนใจต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบชนิดและสัดส่วนของปลายข้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีข้าวแดงโดย *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลาย เพื่อผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ ด้วยการวางแผนการทดลองแบบผสมแบบ simplex-centroid mixture design ในระดับห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อพัฒนาการขยายขนาดและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตข้าวแดงต่อผลิต สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ
3. เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิก่อนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ (pre-formulation)

ขอบเขตการวิจัย

1. พัฒนาระบบการผลิตข้าวแดง โดยหาอัตราส่วนของวัสดุหมักที่เหมาะสม จากวัสดุหมัก 3 ชนิด คือ ปลายข้าวสาลี (มีโปรตีน คือ gluten) ข้าวหอมนิล (แอนโทไซยานิน) และ ปลายข้าวเจ้า (เป็นวัสดุหมักเดิม) โดยใช้แผนการทดลองแบบผสมแบบ simplex-centroid mixture design
2. พัฒนาการขยายขนาดการหมักข้าวแดงแบบง่ายโดยการเพาะเลี้ยงในภาชนะที่มีน้ำหนักของวัสดุหมักขนาด 300 g
3. วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและแบคทีเรีย หาปริมาณสาร Monacolin K
4. ทดสอบคุณสมบัติของสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิก่อนการพัฒนาผลิตภัณฑ์

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยที่เชื้ออาจจะยังไม่ตายทั้งหมด โดยเพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานนาน 18-24 ชั่วโมง (Peterson & Shanholtzer, 1992) ซึ่งเป็นการทดสอบในอาหารเหลวที่ผสมยาหรือสารต้านเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นของยาต่างกันตามลำดับ (serial dilution) โดยให้ถือว่าความเข้มข้นของยาในหลอดทดลองที่มีระดับของสารต่ำที่สุดและไม่พบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวเป็นค่า MIC แต่เมื่อนำสารจากหลอดทดลองที่ไม่พบการเจริญของเชื้อมาทำการเพาะเชื้อในอาหารแข็งที่ไม่มียาด้านเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นอาจพบการเจริญของเชื้อได้

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) และ minimum lethal concentration หมายถึง ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารฆ่าแบคทีเรียที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 99.9% ($3 \log_{10}$ reduction) ของเชื้อทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ (เทียบเทียบจากเชื้อเริ่มต้น) โดยเพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานนาน 18-24 ชั่วโมง สำหรับคำว่า minimum lethal concentration จะใช้เมื่อทดสอบอ้างอิงโดยตรงกับจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ใช่แบคทีเรีย ได้แก่ รา และ ไวรัส เป็นต้น (Peterson & Shanholtzer, 1992)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ด้านวิชาการ
 - ได้ปริมาณสารสำคัญที่สร้างขึ้นระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อรา *Monascus* spp. เพิ่มขึ้น ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านแบคทีเรีย และ monacolin K
 - ได้กระบวนการผลิตและสารสำคัญที่มีราคาถูกลง ที่จะนำไปพัฒนาจนถึงการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้
 - ทราบผลขององค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าวต่อการผลิตสารสำคัญ
 - ได้สัดส่วนวัสดุหมักข้าวแดงที่เหมาะสมในกระเพื่อให้ได้สารสำคัญในปริมาณมาก
 - ได้กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยใช้กล่องพลาสติก
 - ได้คุณสมบัติของสาร
2. ด้านนโยบาย
 - เพื่อเพิ่มมูลค่าปลายข้าวไทย และอนุรักษ์พันธุ์ข้าวสีดั้งเดิมของไทย
3. ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์
 - ได้กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่มีขนาดใหญ่ขึ้น สะดวกและราคาถูกลง
 - สามารถใช้คุณสมบัติของสารที่ได้นำไปต่อยอดพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป
4. ด้านสังคมและชุมชน
 - สามารถนำกระบวนการและองค์ความรู้ที่ได้ไปส่งเสริมให้ชุมชนมีการพัฒนาศักยภาพผลิตภัณฑ์และเพิ่มรายได้ให้ชุมชน
 - เผยแพร่ผลการศึกษาผ่านสื่อหนังสือพิมพ์ วิทยุ โทรทัศน์ หรือ web site ที่เกี่ยวข้อง เพื่อเป็นการ
5. รวมถึงการเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ
 - เผยแพร่ผลงานโดยการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการในประเทศหรือต่างประเทศ
 - เผยแพร่ผลการวิจัยโดยการนำไปเสนอในการประชุมวิชาการหรือตีพิมพ์ในวารสาร
6. หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - ภาครัฐบาล เช่น หน่วยวิจัย และมหาวิทยาลัยต่างๆ และภาคเอกชนและกลุ่มเป้าหมายที่สนใจ เช่น SME
7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย
 - ประชาสัมพันธ์ผลงานสู่ภาคเอกชนและกลุ่มเป้าหมายที่สนใจ
 - จัดอบรมถ่ายทอดผลการศึกษาสู่เอกชนและกลุ่มเป้าหมายที่สนใจเพื่อเป็นการต่อยอดผลงานวิจัยที่ได้สู่ภาคเอกชน ในเชิงพาณิชย์

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารอนุมูลอิสระและกระบวนการทำงานของสารที่มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ

กลุ่มอนุมูลอิสระเป็นกลุ่มสารที่รายงานว่ามีผลก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพและชีวิต มีคุณสมบัติที่ก่อให้เกิดโรคเรื้อรังชนิดไม่ติดต่อ เช่น กระตุ้นให้ก่อเซลล์มะเร็ง ทำให้การทำงานของหลอดเลือดหัวใจผิดปกติ โรคเบาหวาน เป็นต้น (Shi & Pan, 2011) นอกจากนี้ยังมีผลต่ออัตราการเสื่อมของเซลล์ร่างกายต่างๆ ทำให้อัตราการเสื่อมดังกล่าวเร็วขึ้น ดังนั้นการบริโภคอาหารที่มีฤทธิ์หรือคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อขจัดสารอนุมูลอิสระและทำให้เกิดความสมดุลของสารเหล่านี้ มีผลช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆ เหล่านี้ได้

สารที่มีฤทธิ์หรือคุณสมบัติในต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดการก่อตัวของสารกลุ่มอนุมูลอิสระ โดยจะทำการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และหยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระ ช่วยซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากตัวอนุมูลอิสระที่ไปทำลายเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย รวมทั้งช่วยกำจัดสารอนุมูลอิสระเหล่านั้นด้วย ซึ่งเป็นกระบวนการแตกตัวของกรดไขมันอิสระ ที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น ความร้อน การทำงานของเอนไซม์ จะมีผลทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระขึ้น หลังจากทีกระบวนการต่างๆดำเนินไปโดยไม่มีกรยับยั้ง จะทำให้เกิดสารให้ต่างๆที่มีผลต่อกลิ่น รส ของอาหารเช่น กลิ่นหืน เป็นต้น

2.2 สารสำคัญในธัญพืช

ธัญพืชมีสีนั้นมีสารฟีนอลิกที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายในเชิงเสริมสุขภาพ สามารถป้องกันการทำลายของระบบประสาทและลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรังชนิดไม่ติดต่อได้ (Nam et al., 2006; Zhao et al., 2004; Hyum & Chung 2004) สารฟีนอลิกในธัญชาติมีหลายกลุ่ม ประกอบไปด้วย กรดฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกมักอยู่บริเวณเปลือกของธัญชาติ โดยอยู่ในรูปของอนุภาคอิสระ ไม่ละลายน้ำและละลายน้ำ โดยส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะพบมากบริเวณผนังเซลล์ ซึ่งสารฟีนอลิกจะจับกับแป้งด้วยพันธะเอสเทอร์ และสามารถแยกสกัดออกจากแป้งด้วยสารละลายต่าง รูปแบบของสารฟีนอลิกในธัญพืชแต่ละชนิดนั้นจะอยู่ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เช่นในการศึกษาของเมล์ดซ์ข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี และข้าวโอ๊ต พบว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จะอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ละลายน้ำ และอนุภาคอิสระในอัตราส่วน 100:1:0.1 โดยประมาณ (Adom & Lui, 2002)

Zhou et al. (2004) ได้ทำการศึกษา สารฟีนอลิกในข้าวกล้อง (สารพันธุ์ Koshihikara) เปรียบเทียบกับข้าวที่ขัดสีแล้ว โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสาร phenolic หลักในข้าวคือ สาร ferulic acid ซึ่งมีอยู่ในข้าวกล้อง 330 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ข้าวขัดสีมีเพียง 76 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเท่านั้น และในข้าวกล้องยังมีสาร p-coumaric acid, gallic acid, vanillic acid, caffeic acid และ syringic acid ในปริมาณ 117, 22, 4.3, 5.1 และ 3.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Abdel-Aal et al.. (2006) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณของสาร anthocyanin ในธัญพืชมีสีหลายชนิดคือ ข้าวสาลีสีน้ำเงิน สีแดง และสีขาว ข้าวบาร์เลย์สีน้ำเงิน ข้าวโพดสีน้ำเงิน ม่วง ชมพู และแดง และข้าวสีดำ และสีแดง โดยนำตัวอย่างไปสกัดด้วยกรด 1N hydrochloric acid (85:15, v/v) นาน 30 นาที และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี colorimetric เพื่อหาปริมาณสารแอนโทไซยานิน พบว่าข้าวสีมีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูงสุดตามด้วย ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีสาร cyanidin-3- glucoside เป็นสารแอนโทไซยานินหลักในตัวอย่างธัญพืชทุกชนิด ยกเว้นในข้าวสาลีสีน้ำเงินนั้นมี delphinidin-3-glucoside เป็นสารหลัก นอกจากนี้ยังพบ peonidin-3-glucoside, pelargonidin and cyanidin-malonyl glucoside ในธัญพืชเหล่านี้ด้วย

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวดำ และข้าวแดง โดยศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาวิจัยพบว่า ข้าวแดงซึ่งมีความเข้มข้นของสีน้อยที่สุด มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด และปริมาณสารแคโรทีนอยด์ทั้งหมดน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับตัวอย่างธัญพืชชนิดอื่น แต่ข้าวแดงกลับมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงมากที่สุด จึงคาดว่าสารสำคัญหลักที่มีคุณสมบัติดังกล่าวในข้าวมีสีเหล่านี้ อาจเป็นสารที่ไม่มีสีจึงไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิกที่ให้สีอย่างสารแอนโทไซยานินในตัวอย่างเหล่านี้ (Htwe et al., 2009) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า คุณสมบัติหรือฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนั้นประกอบด้วยปัจจัยในหลายๆด้าน อาจเป็นสารสำคัญแต่ละชนิด โครงสร้างของสารสำคัญเหล่านี้ที่อาจเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการต่างๆ นอกจากนี้วิธีการสกัดก็อาจมีผลด้วยเช่นกัน ถึงอย่างไรก็ตามกลุ่มธัญพืชที่มีสีก็ยังเป็นกลุ่มที่มีคุณสมบัติหรือฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มธัญพืชชนิดเดียวกันที่ไม่มีสี ทั้งนี้คุณสมบัติดังกล่าวอาจเพิ่มขึ้นหรือลดลงขึ้นอยู่กับการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

2.3 จุลินทรีย์มีความสำคัญสามารถผลิตสารสีและสีธรรมชาติ

จุลินทรีย์มีความสำคัญสามารถผลิตสารสีและสีธรรมชาติได้เพื่อนำมาใช้ในชีวิตประจำวันได้ ตารางที่ 2.1 แสดงชนิดของสารสีที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

ตารางที่ 2.1 สารสีบางชนิดธรรมชาติที่ผลิตจากจุลินทรีย์

สารสีธรรมชาติ	จุลินทรีย์ที่ผลิตสารสีธรรมชาติ
β -carotene	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Dunadiella salina</i> , <i>Serratia marcescens</i> , and <i>Sporobolomyces ruberrimus</i>
Actinorhodin	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Astaxanthin	<i>Chrorella pyrenoidosa</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i> , and <i>Phaffia rhodozyma</i>
Canthaxanthin	<i>Brevibacterium sp.</i> and <i>Cantharellus cinnabarinus</i>
Lutein	<i>Chrorella pyrenoidosa</i> and <i>Spongiococcum excentricum</i>
Monascus	<i>Monascus pilosus</i> , <i>Monascus purpureus</i> , and <i>Monascus ruber</i>
Phycocyanin	<i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Spirulina platensis</i> , <i>Synechocystis sp.</i>
Prodigiosin	<i>Serratia marcescens</i>
Violacein	<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> , and <i>Janthinobacterium lividum</i>
Zeaxanthin	<i>Flavobacterium sp.</i> and <i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>

ที่มา: Vendruscolo (2016)

2.4 สารสำคัญในข้าวแดง

2.4.1 สารสีและสารต้านอนุมูลอิสระ

ในเอเชียมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการใช้ประโยชน์ของเชื้อราในกลุ่ม *Monascus* spp. ทั้งในรูปอาหารและยาหลากหลายชนิด ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการเรียกแตกต่างกัน เช่น Anka, Red Koji, Red Chinese Rice, Red Mold Rice แต่ที่นิยมเรียกกันมาก คือ Red Yeast Rice หรือ ข้าวแดงในไทย โดยราดังกล่าวจะสร้างสารสีม่วงแดงทำให้เมล็ดข้าวที่เป็นวัตถุดิบมีสีแดงเข้ม รา *Monascus* spp. สามารถสร้างสารสำคัญระหว่างกระบวนการหมักได้หลายชนิด โดยเฉพาะสารให้สี สีต่างๆทั้ง สีแดง สีส้ม สีเหลือง ซึ่งสารเหล่านี้ เกิดจากสารประกอบที่แตกต่างกัน สารสีแดงเป็นกลุ่มสาร

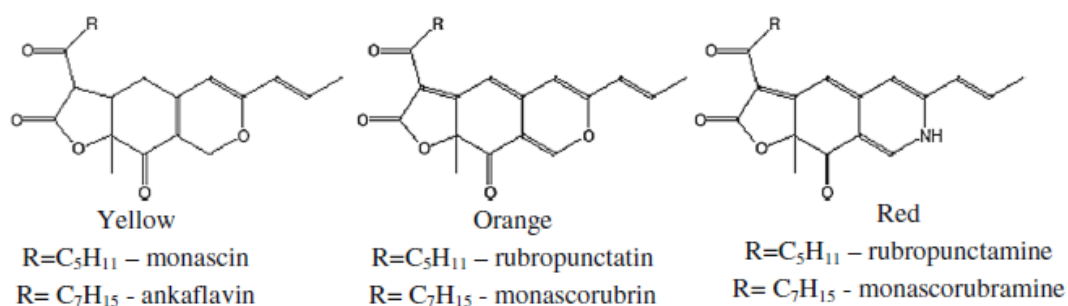
Monascorubramine และ Rubropunctanin สารสีส้มเป็นสารกลุ่ม Monascorubrin และ Rubropunctanin สารกลุ่มสีเหลือง เป็นสารกลุ่ม Ankaflavin และ Monascin (Patakova, 2013) นอกจากนี้ยังมีสารสำคัญชนิดอื่นๆ เช่น Isoflavone, Polyketide, Monacolins, Dimerumic acid และ Gamma-aminobutyric acid (GABA) (Wang et al., 2003) ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเชิงสุขภาพ และมีงานวิจัยรายงานว่า ผลิตภัณฑ์จาก *Monascus* spp. มีผลทำให้ปริมาณ cholesterol ในกระแสเลือดลดลง ซึ่งส่งผลให้ระดับความดันโลหิตลดลงในผู้ป่วยความดันโลหิตสูง มีคุณสมบัติ anti-fatigue นอกจากนี้ยังมีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานได้ดีขึ้น มีผลช่วยให้การทำงานของระบบทางเดินอาหารดีขึ้น ช่วยเพื่อประสิทธิภาพในการทำงานของกระเพาะอาหาร

Wang et al. (2004) ได้รายงานว่า ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Monascus anka* มีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ จึงนำไปทดลองการยับยั้งการเสียหายของเซลล์ตับ ซึ่งมีผลป้องกันการทำงานของเซลล์ตับ จากการศึกษาพบว่า สารอนุมูลอิสระมีผลทำให้เซลล์ตับของหนูถูกทำลายและเป็นพิษ แต่เมื่อมีการเติมสารสกัดจาก *M. anka* พบว่าสามารถป้องกันเซลล์ตับจากการถูกทำลายได้ ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากคุณสมบัติที่สามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระได้ เมื่อเร็วๆนี้ Lee & Pan (2013) ได้ทำการศึกษา สารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อ *Monascus anka* และ *Monascus pilosus* พบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น silymarin, resveratrol และ curcumin เป็นต้น ในสารทั้งหมดนั้น พบว่า มีสาร dimerumic acid เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ และมีคุณสมบัติในการยับยั้งสภาวะเครียดของเซลล์ซึ่งช่วยลดอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งหลากหลายชนิด สามารถยับยั้งการทำงานที่ผิดปกติของเซลล์ตับซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งตับได้ ลดการกระจายหรือการแพร่ของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการลดการอักเสบติดเชื้อด้วย

สีของข้าวแดงเกิดจากสารสี 2 ชนิด ที่เชื้อรา *Monascus* สร้างขึ้นได้แก่ Monascorubin และ Rubropunctatin แต่สารสีทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงได้เนื่องจากปฏิกิริยาทางเคมี (oxidation) ได้เป็นสารสีอื่นๆ เช่น Ankaflavin และ Monascin ให้เป็นสีเหลือง เป็นต้น โครงสร้างของสารสี Rubropunctin ($C_{21}H_{22}O_5$) ซึ่งทำการคัดแยกได้จากสายพันธุ์ของ *M. rubropunctatus* Sato สารสีดังกล่าวนี้ เมื่ออยู่ในสารละลายแอมโมเนียจะได้ Rubropunctamine ($C_{21}H_{23}O_4N$) ซึ่งเป็นสีม่วง โครงสร้างสารสีที่ Nishikawa แยกได้จาก *M. purpureus* Went คือ Monascorubin ($C_{23}H_{26}O_5$) และ Monascoflavin หรือ Monascin ($C_{21}H_{26}O_5$) ภาพที่ 2.1 (Patakova, 2013) สารที่ *Monascus* สร้างขึ้นมีหลากหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารหลายๆชนิดมักเกิดขึ้นในระดับเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ซึ่งนอกเหนือจากสารสี (สีแดง

สีส้ม สีเหลือง) ที่เชื้อรา *Monascus* สร้างได้แล้ว ยังมีสารที่สำคัญมากมายหลากหลายชนิดและมีประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Monacolins

สารสีธรรมชาติที่หมักจาก *Monascus* นั้นถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลกและมีค่าทางเศรษฐกิจ ซึ่งสารที่สร้างจาก *Monascus* มีประโยชน์ คือ การผลิตราคาถุก วัสดุหมักไม่แพง ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย มีความปลอดภัยสูง



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของสารสี *Monascus*

ที่มา: Vendruscolo et al. (2016)

Monascus spp. เป็นราเส้นใยที่แยกจากข้าวราแดง (red mold rice, RMR) ที่ได้มีการจัดจำแนกและการตั้งชื่อโดย Tieghem (1884) จัดอยู่ในจันีส Ascomycetes สร้างสปอร์ cleistothecia และ aluriconidia สีน้ำตาล สปีส์ *Monascus* มีอยู่มากกว่า 20 ชนิด แต่มีเพียง 9 ชนิดที่นำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ *M. argentinensis*, *M. eremophilus*, *M. floridanus*, *M. lunisporas*, *M. pallens*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. reber*, และ *M. sanguineus* สปีชีส์ของจันีส *Monascus* ดังตารางที่ 2.2 เป็นสารสีที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น โยเกิร์ต ไส้กรอก ไวน์แดง โดฟุ แฮมร์ เนื้อ เป็นต้น

Dominguez-Espinosa & Webb (2003) ได้ทำการผลิตตรงควัตถุสีส้มจาก *Monascus purpureus* Went (IMI 210765) ด้วยการหมักแบบแห้ง พบว่า การเติม NH₄Cl จะช่วยเพิ่มปริมาณ biomass และรงควัตถุสีส้มได้ ข้าวสาลีที่ใช้เป็นสับสเตรทในการหมักจะใช้แบ่งข้าวสาลีที่ปราศจาก gluten ที่ความเข้มข้น 3-5 % จะเหมาะสมต่อการผลิตตรงควัตถุสีส้ม

Park & Kim (2011) ได้ศึกษา red yeast rice-garlic (RYRG) ที่สกัดด้วยเอทานอลที่ผลิตจาก *Monascus pilosus* ในอาหารที่มีกระเทียมนาน 0, 2, 4, 6, และ 8 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากสารสกัด RYRG เพิ่มขึ้นตามเวลาการเพาะเลี้ยง

Velmurugan et al. (2011) ได้ศึกษาการหมัก *Monascus purpureus* KACC 42430 แบบแห้งด้วยแบ่งข้าวโพด พบว่า ให้สารปริมาณสารสีสูงถึง 25.42 OD Units/gram of dry

fermented substrate ที่ความชื้นเริ่มต้น 60% (w/w) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 4 mL of spores/gram of dry substrate เพาะเลี้ยงนาน 7 วัน

ตารางที่ 2.2 สปีชีส์ของ *Monascus* ที่สร้างสารสี

Process	สปีชีส์ของ <i>Monascus</i>
Solid state fermentation (SSF)	<i>Monascus ruber</i> ATCC 96218
	<i>Monascus</i> sp. KCCM 10093
	<i>Monascus ruber</i> LEB A 1-3
	<i>Monascus purpureus</i>
	<i>Monascus</i> sp. TTWMB 6093
	<i>Monascus</i> sp. ATCC 16436
	<i>Monascus</i> sp. J101
	<i>Monascus kaoliang</i> ATCC 26264
	<i>Monascus</i> sp. KB20M10.2
SmF (Submerged fermentation)	<i>Monascus purpureus</i> IMI 210765
	<i>Monascus ruber</i> CCT 3802
	<i>Monascus purpureus</i> NRRL 1992
	<i>Monascus ruber</i> 102w
	<i>Monascus</i> sp. B683
	<i>Monascus ruber</i>
	<i>Monascus purpureus</i> CCM8152
	<i>Monascus ruber</i> ATCC 96218
<i>Monascus pallens</i> , <i>Monascus ruber</i>	

ที่มา: Vendruscolo et al. (2016)

การผลิตสารสีจาก *Monascus purpureus* เปลือกขนุน โดยการหมักแบบแห้ง พบว่าให้สารสีมากที่สุดเมื่อเติมน้ำตาล fructose เป็นแหล่งคาร์บอน และ yeast extract เป็นแหล่งของไนโตรเจน (Subhasree et al., 2011) นอกจากนี้ Velmurugan et al. (2011) ได้ใช้แป้งข้าวโพดเพื่อผลิตสารสีจาก *Monascus purpureus* KACC 42430 ด้วยกระบวนการหมักแบบแห้ง พบว่าสามารถให้สารสีได้ 25.42 Units/g of dry fermented substrate เมื่อเลี้ยงที่ความชื้น 60% อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเร็วๆนี้ Rajeswari et al. (2014) ได้ทำการผลิตสารสีจาก *Monascus* จากวัสดุหมักธัญพืช ซึ่งพบว่า ชั่งข้าวโพดและกากหีบอ้อยสามารถให้ผลผลิตสารสีได้ดี โดยให้ค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมของการเลี้ยงเท่ากับ 3.6 และ 5.6 ตามลำดับ

Pourshirazi et al. (2014) ได้ศึกษาสารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Monascus purpureus* พบสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้ค่า 50% DPPH radicals เท่ากับ 142.45 $\mu\text{g/ml}$ และ 2112.33 $\mu\text{g eq.Fe}^{2+}/\text{mg extract}$ โดยวิธี FRAP assay

Jamaluddin et al. (2015) การหมักรา *Monascus purpureus* แบบแห้งโดยใช้เยื่อหุ้มเมล็ดมะพร้าว รำข้าว และผลสมระหว่างเยื่อหุ้มเมล็ดมะพร้าวและรำข้าว พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสับสเตรทที่หมักด้วยรา *Monascus purpureus* กับสับสเตรทที่ไม่ได้หมักด้วยราจะทำให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า สารต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี FRAP จะเพิ่มขึ้นในช่วง 23.70 to 63.15 mg AAE/g sample

Singha et al. (2015) ศึกษาการผลิตสารสีด้วยการหมักในอาหารเหลวโดยรา *Monascus purpureus* MTCC 369 ในการหมักเพื่อผลิตสารสีนี้จะทำการศึกษา 3 ปัจจัย คือ เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนาน 6-18 วัน ค่าพีเอชของน้ำข้าวที่ใช้เป็นสับสเตรท (3.0-5.0) และความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน(0.0-2.0%) จากการศึกษาพบว่าสามารถผลิตสารสีได้ 20.44 U abs 500 nm/mg dry fungal biomass ที่ค่าพีเอช 4.0 ไม่มีแอมโมเนียม เพาะเลี้ยงนาน 12 วัน

Haque et al. (2016) รายงานว่า การใช้ bakery waste เป็นสับสเตรทเพื่อผลิตสารสีจากรา *Monascus purpureus* โดย bakery waste จะถูก hydrolyzate ด้วย *Aspergillus awamori* และ *Aspergillus oryzae* ก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงรา *Monascus purpureus* พบว่าสามารถผลิตสารสีได้สูงสุด (24 AU/g glucose) เมื่อใช้ bakery waste hydrolyzate ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 5 g/L ผลิตเอนไซม์ glucoamylase และ protease ได้ 8 U/g และ 117 U/g ตามลำดับ ที่ความชื้น 55% และ 65% ตามลำดับที่อุณหภูมิ 30 °C นี่คือการผลิตสารสีและเอนไซม์จาก น้ำตาลและกรดอะมิโนที่ได้จาก bakery waste

Srianta et al. (2016) ได้ทำการผลิตตรงควัตถุจาก *Monascus purpureus* โดยใช้เวลาในการหมัก 14 วัน ด้วยการหมักแบบแห้งโดยใช้สับสเตรท ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด เมล็ดธัญพืชข้าวฟ่าง (whole sorghum grain, WSG) ข้าวกล้องเมล็ดธัญพืชข้าวฟ่าง (dehulled sorghum grain, DSG) รำข้าวฟ่าง (sorghum bran, SB) พบว่าการเจริญของ *M. purpureus* สามารถเจริญได้เร็วมากในสับสเตรทที่เป็นข้าวมากกว่าสับสเตรทอื่น สับสเตรทที่ผลิตตรงควัตถุได้มากที่สุด คือ ข้าว ตามด้วยข้าวกล้องเมล็ดธัญพืชข้าวฟ่าง เมล็ดธัญพืชข้าวฟ่าง ข้าวโพด และรำข้าวฟ่าง ในทุกสับสเตรทที่ใช้เพาะเลี้ยงจะพบรงควัตถุสีแดง Rubropunctamine มากถึง 57–87% ยกเว้น รำข้าวฟ่างจะผลิตตรงควัตถุสีเหลือง 2 ในสับสเตรทข้าวกล้องเมล็ดธัญพืชข้าวฟ่างจะผลิตตรงควัตถุสีแดง Rubropunctatin ในปริมาณมาก ดังนั้นนอกจากสับสเตรทที่เป็นข้าวแล้วยังพบสับสเตรทข้าวกล้องเมล็ดธัญพืชข้าวฟ่างจะสามารถผลิตตรงควัตถุและ biomass ได้สูงสุด จึงเหมาะที่จะใช้เป็นสารสีใน

อาหาร (food colorant) อาหารเสริม (food supplement) อาหารสุขภาพ (functional food) หรือเป็นยาเนื่องจากสามารถต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง และต้านจุลินทรีย์

การผลิตสารสีจาก *Monascus* ดังตารางที่ 2.3

Cheng et al. (2016) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักรำข้าวด้วย *Monascus pilosus* KCCM60084 เพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารลดคลอเรสเตอรอล monacolin พบว่า ที่ความชื้น 45% ของวัสดุหมักโดยใช้หัวเชื้อ 5 % เพาะเลี้ยงนาน 10 วัน ผลิตสารที่มีฤทธิ์ reducing power, iron chelating activity และ ABTS+ radical scavenging activity เท่ากับ 60, 80, และ 38 %ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบสาร total flavonoid เพิ่มขึ้น 4.58 เท่า

ตารางที่ 2.3 การผลิตสารสีของ *Monascus*

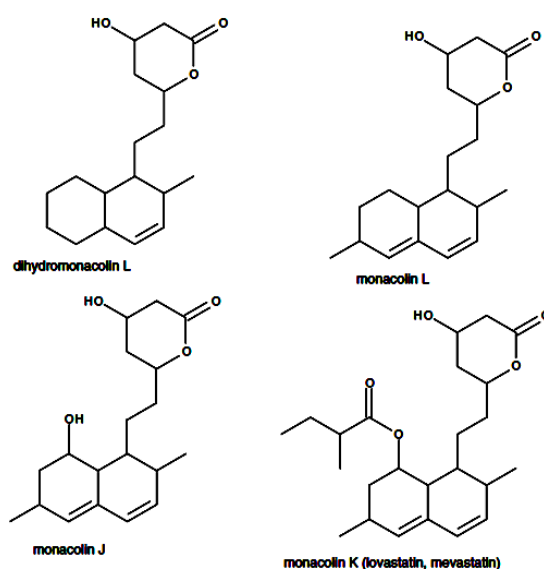
Product	Microorganism	Substrate/support	Productivity	Bioreactor	Reference
Pigments					
Pigments	<i>Monascus purpureus</i>	Rice, corn, whole sorghum grain, dehulled sorghum grain and sorghum bran	Highest peak is EMS ($\times 10^3$) 18895 for rubropunctamine, with rice as substrate	A jar with 20 g of substrate	Srianta et al. (2016)
Pigments (red)	<i>Monascus purpureus</i> KACC 42430	Corn cob powder	25.42 OD units/g, 168 h	Static flasks	Velmurugan et al. (2011)
Pigment, glucoamylase and protease	<i>Monascus purpureus</i>	Bakery waste	24 AU (absorbance units)/g; 8 U and 117 U respectively for pigments, glucoamylase and protease, 168 h	Static flasks	Haque et al. (2016)

Srianta et al. (2017) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารสีจาก *Monascus purpureus* ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการหมักแบบแห้งด้วยข้าว ข้าวโพด เมล็ดธัญพืชข้าวฟ่าง ข้าวกล้อง เมล็ดธัญพืชข้าวและรำข้าวฟ่าง พบว่าฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ DPPH-scavenging activities ในช่วง 588 และ 2,950 μmol Trolox Equivalent (TE)/100g การเพาะเลี้ยงด้วยข้าวจะให้สารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดตามด้วยข้าวกล้องเมล็ดธัญพืชข้าว เมล็ดธัญพืชข้าวฟ่างและรำข้าวฟ่าง สารสีที่พบมี 2 ชนิดคือ Monapilol B และ Rubropunctamine ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ 64 และ 33%

2.4.2 สาร Monacolin และคุณสมบัติเสริมสุขภาพ

สาร Monacolin สามารถเรียกได้หลายชื่อ เช่น Lovastatin, Mevinolin และ Mevacor เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่มีคุณสมบัติสำคัญที่สุดในการ

ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เอชเอ็มจี-โคเอรีดักเตส (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMG-CoA) ไม่ให้ออกฤทธิ์ ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์สารคอเลสเตอรอลในตับได้อย่างมีประสิทธิภาพ และนอกจากนี้ยังมีสารสำคัญในกลุ่มเดียวกันและการทำงานคล้ายคลึงกันอีก เช่น mevinoлин, dihydromonacolin และ monacolin อื่นๆ (monacolin I to VI) โดยพบว่า Monacolin K เป็นสารในกลุ่ม Monacolin ที่น่าสนใจมากที่สุด ทั้งนี้เพราะสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ Cholesterol และลดปริมาณระดับ Cholesterol ในเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ สาร Monacolins มีอยู่ด้วยกันหลายชนิดเช่น Monacolin K, M, J และ L ฯลฯ โดยสารในกลุ่มดังกล่าวนี้ที่สำคัญคือ Monacolin K ซึ่งสามารถพบได้ในเชื้อรากลุ่ม *Monascus* และ *Aspergillus* โดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมี คือ $C_{24}H_{36}O_5$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 404.59 Monacolin K ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักข้าวแดงจากเชื้อรา *Monascus* ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Endo เมื่อปี 1979 จากสายพันธุ์ *M. ruber* โดยพบว่าเชื้อรา *Monascus* เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสร้างสารในกลุ่มนี้ จากรายงานพบว่าปัจจุบันสายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* ที่สามารถผลิตสาร Monacolin K ได้ในปริมาณมากประกอบด้วย 7 สายพันธุ์ด้วยกันคือ *M. albidus* Sato, *M. pilosus* Sato, *M. pubigeras* Sato, *M. ruber* van Tieghem, *M. paxii* Lingelsheim, *M. fuliginosus* Sato และ *M. purpureus* Went ภาพที่ 2.2 (Patakova, 2013)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ Monacolin K ที่ผลิตโดย *Monascus*
ที่มา: Patakova (2013)

จากการศึกษาของ Wang et al. (2003) พบว่าเมื่อใช้สาร Monacolin K เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงหนูทดลองพบว่าสามารถลดปริมาณ Total Cholesterol ได้ถึง 18 % ลด low-density lipoprotein cholesterol ได้ 23% นอกจากนี้ยังสามารถลดปริมาณของ Triglycerides

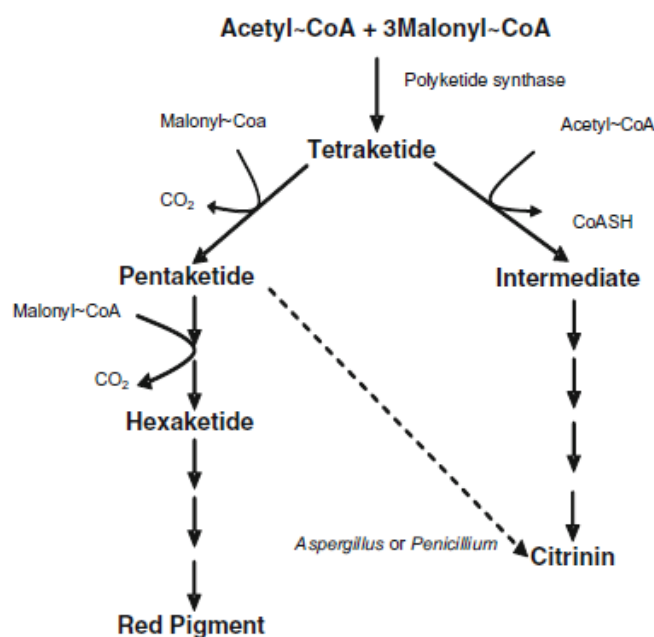
ได้ถึง 15% ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสาร Monacolin K นี้สามารถช่วยบรรเทาการเกิดการอุดตันของหลอดเลือดเนื่องจาก Cholesterol ได้ผลอย่างจริงจัง

สำหรับการศึกษาปริมาณ Monacolin K ที่ผลิตขึ้นจากเชื้อรา *Monascus* สามารถตรวจพบได้ทั้งโดยวิธีทางตรงและทางอ้อมในระหว่างขั้นตอนการหมักข้าวแดงโดยมีปัจจัยต่างๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องคือ ค่า pH อุณหภูมิ ปริมาณความชื้น และสายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* เอง เป็นสิ่งบ่งชี้ปริมาณของสารดังกล่าวนี้ นอกจากนี้ยังมีรายงานสนับสนุนว่าวิธีการหมักแบบแห้ง (solid fermentation) เป็นวิธีการที่ทำให้เชื้อรา *Monascus* สามารถสร้างสาร Monacolin K ได้ดีกว่าวิธีการหมักแบบเปียก (submerged fermentation) ทั้งนี้เพราะว่าสาร Monacolin K สามารถผลิตและมีความคงตัวได้ดีกว่าการละลายในสารละลายนั่นเอง ส่วนวิธีการหมักแบบเปียกนั้นสาร Monacolin K ที่เกิดขึ้นจะคงอยู่ในเส้นใยของเชื้อรา (mycelium) โดยไม่ได้ปลดปล่อยออกมาภายนอกเหมือนกับการหมักแบบแห้ง (Shi & Pan, 2011)

กลไกการสังเคราะห์สารสีและสาร citrinin จาก *Monascus ruber* และการสร้างสารพิษจาก *Aspergillus* และ *Penicillium* ดังภาพที่ 2.3

Kim et al. (2010) รายงานว่า การเพาะเลี้ยง *Monascus pilosus* แล้วนำมาสกัดเส้นใยด้วยเอทานอลและสารจากน้ำเลี้ยงพบว่า ปริมาณ monacolin K ทั้งหมดจากการสกัดเส้นใยราด้วยเมทานอล (24.91 mg %) จะสูงกว่าจากน้ำเลี้ยงรา (1.27 mg %) และจากการหมัก *Monascus pilosus* ด้วยข้าว (14.65 mg%) อย่างไรก็ตามปริมาณ active monacolin K จากการหมัก *Monascus pilosus* ด้วยข้าว (5.48 mg %) สูงกว่าจากการสกัดเส้นใย (3.35 mg %) และจากน้ำเลี้ยงรา (0.4 mg %) ไม่พบสาร Citrinin ในทุกตัวอย่าง สำหรับปริมาณสารฟิโนลิกทั้งหมดจะพบในสารสกัดเส้นใย (4.68%, w/w) ใกล้เคียงกับสารน้ำเลี้ยงรา (4.29%, w/w) แต่สูงกว่าจากการหมัก *Monascus pilosus* ด้วยข้าว (3.70 %, w/w)

Cheng et al. (2016) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักข้าวด้วย *Monascus pilosus* KCCM60084 เพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารลดคอเลสเตอรอล monacolin พบว่า ที่ความชื้น 45% ของวัสดุหมักโดยใช้หัวเชื้อ 5 % เพาะเลี้ยงนาน 10 วัน สามารถผลิตสาร monacolin ได้ 2.88 มิลลิกรัมต่อกรัม



ภาพที่ 2.3 การสังเคราะห์สารสีและสาร citrinin จาก *Monascus ruber* และการสร้างสารพิษจาก *Aspergillus* และ *Penicillium*
ที่มา: Vendruscolo et al. (2016)

Pengnoi et al. (2017) รายงานการศึกษาผลของความหลากหลายของข้าวสีม่วงต่อการผลิต monacolin K citrinin และ รงควัตถุสีแดงจาก *Monascus purpureus* CMU002 สายพันธุ์กลายพบว่าการผลิต citrinin น้อยที่สุด(132 ppm ของการหมักแบบแห้งด้วยข้าวนา ค่า citrinin ถือว่าผ่านมาตรฐานของประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน และสหภาพยุโรป ปริมาณ monacolin K และ รงควัตถุสีแดงจากการหมักด้วยข้าวตอยมูเซอเท่ากับ 13 482 ppm และรงควัตถุสีแดงเท่ากับ 388.25 units/g ให้ค่ารงควัตถุสีแดงเมื่อหมัก *Monascus purpureus* CMU002 สายพันธุ์กลายด้วยข้าวตอยมูเซอ

Bunnoy et al. (2017) รายงานว่า ข้าวแดงหมักจากข้าวเหนียวสามารถลดคลอเลสเทอรอลทั้งหมดในเลือดได้ และลด low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), atherosclerotic index, LDL-C/HDL-C ratio และ ระดับคลอเลสเทอรอลในตับ (hepatic cholesterol levels) ในทั้งกลุ่ม high fat and cholesterol diet (HFC-1 g) และ HFC-2 g ($p < 0.05$) ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับ HFC-control group และไม่มีความแตกต่างกับความเข้มข้นของ high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ทั้ง 6 กลุ่ม การลดลงของคลอเลสเทอรอลทั้งหมดและ LDL-C สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้จากการแสดงออกของ mRNA expressions ของยีนส์ที่

เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลและการรักษาสมดุล (homeostasis) ในตับ จากการให้สารสกัดข้าวแดงกับหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง (hypercholesterolemic rats) พบว่ามีการแสดงออกของ *LDLR* และ *HMGCR* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่การแสดงออกของ *CYP7A1* ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ hypercholesterolemic rats (HFC-control) ที่ไม่ได้ให้สารสกัดข้าวแดง ($p < 0.05$) การได้รับบาดเจ็บของตับของหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงเมื่อให้สารสกัดข้าวแดงบรรเทาลง ดังนั้นสารสกัดข้าวแดงหมักจากข้าวเหนียวมีความสำคัญทำให้คอเลสเตอรอลลดลง (Hypocholesterolemic activity) และป้องกันหลอดเลือดแข็งตัว (Anti-atherogenic activity) ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง โดยสารสกัดข้าวแดงจะไปช่วยเพิ่ม LDL-C endocytosis ในตับ และยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับ

2.4.3 สารต้านจุลินทรีย์

สารสกัดข้าวแดง *Monascus* spp. มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เช่น *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Yersinia enterocolitica* และ *Listeria monocytogenes* ได้

Heng et al. (2009) รายงานว่า สารสีข้าวแดงจาก *Monascus* sp. สายพันธุ์ Mg มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *E.coli* และ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้นของสารสีข้าวแดง เท่ากับ 0.9 U/ml และ จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเพิ่มมากขึ้นถ้าเพิ่มปริมาณสารสีข้าวแดงเพิ่มขึ้น (3.6 U/ml)

Dikshit & Tallapragada (2012) พบว่า สารสกัดข้าวแดงจาก *Monascus purpureus* MTCC 410 และ *M. sanguineus* ที่ทำการหมักแบบแห้งด้วยข้าว มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* โดยให้ค่าการยับยั้งบริเวณใสเท่ากับ 85.4 mm และ 112.05 mm ตามลำดับ

Ferders et al. (2009) พบว่าสารสกัดข้าวแดงที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้ง *Streptomyces albus*, *B. subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้เท่ากับ 8, 9 และ 9 mm ตามลำดับ แต่เมื่อทำการสกัดด้วย n-hexane พบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้เท่ากัน คือ 10 mm

Kim et al. (2010) รายงานว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus brevis* and *Escherichia coli* จากน้ำเลี้ยงราดีกว่าจากการสกัดจากเส้นใย ในขณะที่สารสกัดจากเส้นใยมีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, และ *Salmonella enteritidis* ดีกว่าสารสกัดจากน้ำเลี้ยงรา อย่างไรก็ตามฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์สารสกัดจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราน้อยกว่าจากการหมัก *Monascus pilosus* ด้วยข้าวและสารต้านการเกิดออกซิเดชัน Butylated hydroxytoluene

เสาวนิตย์ และคณะ (2552) ได้แยกเชื้อราข้าวแดง *Monascus* sp. LC1 จากร้านขายยาสมุนไพรจีน จ.สงขลา เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อกรวยยับยั้ง *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 พบว่า ไห้วงใสรอบโคโลนี เท่ากับ 19.36 mm

กรกต สุนทรกุล และคณะ (2012) ได้ทำการผลิตสาโทแดงจากข้าวเหนียวดำโดยใช้ *Monascus purpureus* TISTR 3002 เพื่อย่อยข้าวและใช้ยีสต์ *Saccharomyces bayanus* EC1118 ในการผลิตเอทานอล จากวัสดุหมักผสมระหว่างข้าวเหนียวดำและข้าวขาว พบว่า สาโทแดงที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำ 70 % ของข้าวเหนียวขาวร่วมกับราแดงมีฤทธิ์ในการแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุดโดยให้บริเวณใสต่อเชื้อ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* TISTR 029, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27533, *Escherichia coli* TISTR 073, *Enterobacter aerogenes* TISTR 1540 และ *Salmonella Typhimurium* TISTR 292

Dikshit & Tallapragada (2013) รายงานว่าทั้งรา 2 สายพันธุ์ คือ *Monascus purpureus* MTCC 410 และ *Monascus sanguineus* และ แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ให้ค่าโซนใสเท่ากับ 85.40 sq.mm และ 112.95sq.mm ตามลำดับ

Vendruscolo et al. (2014) ได้ศึกษาสารสีสกัดจากการเพาะเลี้ยง *Monascus ruber* CCT 3802 ในอาหารเหลวต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า สารสีส้มสามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และสารสีแดงสามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 ในขณะที่สารสีแดงและสีส้มไม่สามารถยับยั้ง *S. enteritidis* ATCC ได้

Martinková et al. (1995) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสีจาก *Monascus purpureus* พบว่า ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์มีผลมาจากการการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี กรดอะมิโน peptides หรือ proteins สำหรับในการหมักแบบแห้งจะเพาะเลี้ยงใน ข้าว ข้าวสาลีหรือข้าวบาร์เลย์

Kim et al. (2006) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยใช้กรดอะมิโนในการเพาะเลี้ยง *Monascus* sp. KCCM 10093 พบว่า L-tyrosine ที่ความเข้มข้น $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ และ L-phenylalanine ที่ความเข้มข้น $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ จะสามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ดีที่สุดในขณะที่ L-glutamine และ Lasparagine จะมีฤทธิ์ต่ำ

Kumar et al. (2015) รายงานว่า *Monascus purpureus* ผลิตสาร monascidin A ที่มีรงควัตถุสีแดงคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ สารสกัดรงควัตถุสีแดงด้วยเอทานอลที่ได้จากการหมัก *Monascus purpureus* ที่หมักด้วยขามอลต์ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C ใช้เวลานาน 10 วัน ที่ความเข้มข้น 80 % สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* (13mm), *B. subtilis* (12mm), *B. megaterium* (14mm) และ *Pseudomonas aeruginosa* (17.8mm)

2.4.4 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

Kumar et al. (2011) ได้ศึกษา red yeast rice-garlic (RYRG) ที่สกัดด้วยเอทานอลที่ผลิตจาก *Monascus pilosus* ในอาหารที่มีระยะเวลา 0, 2, 4, 6, และ 8 สัปดาห์ พบว่า ฤทธิ์

ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 มะเร็งลำไส้ HT-29 และมะเร็ง B16F10 murine melanoma cells

Pourshirazi et al. (2014) ได้ศึกษาสารสกัดด้วยเอทานอลจาก *Monascus purpureus* ต่อเซลล์มะเร็ง breast carcinoma MCF-7 และ cervical carcinoma HeLa cells พบว่ามีผลต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 7 µg/mL แต่ไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง HeLa

2.4.5 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase และ elastase

Jamaluddin et al. (2015) การหมักรา *Monascus purpureus* แบบแห้งโดยใช้เชื้อหุ้มเมล็ดมะพร้าว รำข้าว และผสมระหว่างเชื้อหุ้มเมล็ดมะพร้าวและรำข้าว พบว่า เมื่อหมัก สับสเตรทด้วยรา *Monascus purpureus* นอกจากนี้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase และ elastase ก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน

2.5 ความคงตัวของสารสี

Velmurugan et al. (2011) รายงานว่า สีของ *Monascus* จะคงอยู่ในช่วง pH 5, 6 และ 7 ที่ pH ความเป็นกรด (pH 1–4) สีจะหายไป สีจะเปลี่ยนไปเมื่อมีความเป็นเบส (pH 8–14) สารสีของ *Monascus* จะมีสีน้ำตาลที่ pH 8 สีส้มที่ pH 9 มีสีเหลืองที่ pH 10 และมีสีแดงที่ pH 14 สารสีจะคงที่เมื่อมี sodium chloride และ ammonium chloride ได้สูงถึง 0.5% (w/v) เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 12 h จะทำให้สีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ตารางที่ 2.4 สีของ *Monascus* จะคงอยู่ 92 ถึง 98 % หลังจากเก็บที่ 4 °C นาน 3 เดือน (Vendruscolo et al., 2016)

Subsaendee et al. (2014) การเก็บรักษาข้าวแดงหมักที่มีสารสีและ monacolin K พบว่า จะคงที่เมื่อให้อุณหภูมิที่ความร้อน 100 °C นาน 30 นาที อบที่ 50 °C นาน 1 คืน และเก็บในตู้เย็น (2-4 °C) นาน 1.5 เดือน

ความคงตัวของสารสี *Monascus* สรุปดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ความคงตัวของสารสี *Monascus* ในสภาวะต่างๆ

Parameter	Observed stability	Relative stability (%)
pH 2-14 (10 min)	pH 4, 5, 6, 7	99.0
Dry heat (60 °C for 12 h)	-	86.2
121°C (20 min)	-	95.9
UV light (12 h)	-	99.2
Sun light (2 h)	-	99.4
Sodium chloride (0.1-1 % w/v, pH 7.0, 1 h)	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 %	96.1
Aluminum chloride (0.1-1% w/v, pH 7.0, 1 h)	0.1, 0.2, 0.5%	90.2

–, Not applicable

ที่มา: Velmurugan et al. (2011)

2.6 ปลายข้าว (Brocken milled-rice)

ปลายข้าว (Rice broken) ประกอบด้วยเศษข้าวที่หักและส่วนของจมูกข้าว โดยทั่วไปปลายข้าวมีประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ มีไขมันและเยื่อใยต่ำ ปลายข้าวมี 3 ขนาด คือ ขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่หรือที่เรียกกันว่าข้าวท่อน ปลายข้าวขนาดเล็กจะเหมาะกับการนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ เนื่องจากมีส่วนของจมูกข้าวมากจึงมี โปรตีน ไขมัน ไบโตามิน และแร่ธาตุมากกว่าส่วนอื่นของเมล็ดข้าว ดังนั้นปลายข้าวขนาดเล็กจึงเป็นที่นิยมใช้เลี้ยงสัตว์มากกว่า และมักมี ราคาแพงและหาซื้อได้ยาก

2.6.1 ข้าวสาลี

ข้าวสาลีเป็นพืชอาหารที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่ง แต่โดยทั่วไปไม่ค่อยกินข้าวสาลีเป็นเมล็ด แต่จะนำไปแปรรูปเป็นแป้งสาลีเสียก่อน เนื่องจากแป้งสาลีมีโปรตีนกลูเตน (Gluten) สูงจึงเหมาะจะใช้หมักกับยีสต์ให้พองฟู ทำเป็นขนมปัง ขนมเค้ก เส้นพาสต้า คุกกี้ ในเมล็ดข้าวสาลีที่ยังไม่ขัดขาวหรือโฮลเกรนจะมีโปรตีนสูง มีคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานได้ดี มีวิตามินบีชนิด เช่น วิตามินบี 1 บี 2 ไนอะซิน บี 5 บี 6 มีเส้นใยอาหารสูง เส้นใยเป็นเส้นใยชนิดละลายน้ำช่วยลดคอเลสเตอรอลในเลือด และเส้นใยอาหารชนิดไม่ละลายน้ำที่ช่วยเพิ่มกากใยในระบบขับถ่าย (ประโยชน์ดอทคอม, 2014) เมล็ดข้าวสาลีปริมาณ 100 กรัม ประกอบด้วยพลังงาน 1,300-1,500 กิโลจูล น้ำ 11-14 กรัม โปรตีน 8-16 กรัม ไขมัน 1.7-4.0 กรัม คาร์โบไฮเดรต 69-72 กรัม เส้นใย 2-3 กรัม และเถ้า 1.5-1.8 กรัม และแป้งสาลีสีขาวปริมาณ 100 กรัม ประกอบด้วยน้ำ 12.0-12.4 กรัม โปรตีน 10-12 กรัม ไขมัน 1-1.2 กรัม คาร์โบไฮเดรต 74-76 กรัม เส้นใย 0.3-0.4 กรัม และเถ้า 0.3-0.5 กรัม เมล็ดจำนวน 1,000 เมล็ดหนัก 30-50 กรัม (van Ginkel & Villareal, 1996)

จากการศึกษาสารโปรตีนจากข้าวสาลี (wheat gluten hydrolysate : WGH) กับ นักกีฬาชายที่มีอายุอยู่ระหว่าง 18-22 ปี โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 คน กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่ม ควบคุม กลุ่มที่ 2 ให้รับประทานโปรตีนจากข้าวสาลีขนาด 10 กรัม กลุ่มที่ 3 ให้รับประทาน WGH ขนาด 20 กรัม พบว่าสารโปรตีนจากข้าวสาลี wheat gluten hydrolysate สามารถยืดระยะเวลา การเกิดบาดเจ็บของกล้ามเนื้อหลังการแข่งขันในนักกีฬาประเภทวิ่งได้ (หน่วยบริการฐานข้อมูล สมุนไพร, 2009)

Xiao-ling et al. (2008) รายงานว่าข้าวสาลีจะมีกรดอะมิโนหลายชนิดซึ่งจากปริมาณ โปรตีน 100 g จะพบ กรดอะมิโน lysine 2.74%, threonine 2.83%, phenylalanine 4.17%, isoleucine 3.42%, valine 3.90%, histidine 2.81%, glutamic acid 29.96%, proline 9.12%, glycine 3.59%, alanine 3.37%, and cysteine 1.57% เป็นต้น

2.5.2 ข้าวขาว

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารในเมล็ดข้าวคิดเป็นกรัมต่อ 100 กรัม ของ ข้าวสารขาวและข้าวสารกล้อง ซึ่งเป็นส่วนที่นำมารับประทาน พบว่าประกอบด้วย น้ำ 12 กรัม โปรตีน 6.7-7.5 กรัม ไขมัน 0.4-1.9 กรัม คาร์โบไฮเดรต 77.4-80.4 กรัม เส้นใย 0.3-0.9 กรัม แล็ก 0.5-12 กรัม โดยพบว่า ข้าวสารขาวมีปริมาณโปรตีน ไขมัน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ไทอามิน ไรโบฟ ลาวิน และไนอาซิน ต่ำกว่าข้าวกล้อง ในปลายข้าวพบประกอบด้วย น้ำ 11.8 กรัม โปรตีน 6.0 กรัม ไขมัน 1.4 กรัม คาร์โบไฮเดรต 80.1 กรัม เส้นใย 0.2 กรัม แล็ก 0.7 กรัม (กรมอนามัย, 2548)

2.5.3 ข้าวหอมนิล

ข้าวหอมนิล หรือ ข้าวสีนิล หรือ black rice เป็นข้าวที่มีมีแอนโทไซยานินมากกว่าที่ พบในบลูเบอร์รี่ มีน้ำตาลน้อยกว่า มีใยอาหารและวิตามินอีมากกว่า ซึ่งนักวิจัยยังพบว่าข้าวเจ้าสีนิล สามารถป้องกันมะเร็งได้ ข้าวชนิดนี้มีน้ำตาลน้อยแต่มีเส้นใยมาก และมีสารประกอบของพืชที่ช่วย ต้านทานโรคหัวใจและโรคมะเร็ง นักวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยลุยเซียนาในสหรัฐ พบสารต้าน อนุมูลอิสระแอนโทไซยานิน ที่ละลายน้ำได้ปริมาณมาก (ไทยโพสต์, 2553)

Kitisin et al. (2015) จากการศึกษาข้าวสีไทยได้แก่ ข้าวมันปู (ข้าวแดง) ข้าวสังข์หยด (ข้าวสีน้ำตาล) ข้าวเหนียวดำและข้าวหอมนิล พบว่า ข้าวมันปูจะแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และลด การอักเสบได้เนื่องจากสามารถลดการแสดงออกของสาร cytokines และ matrix metalloproteinase (MMP-2) expression ในเซลล์ HL-60 ที่ส่งเสริมให้เกิดการอักเสบด้วยสารพิษ LPS

องค์ประกอบทางเคมีของข้าวหอมนิลและแป้งสาลี ดังตารางที่ 2.5 และสารต้านอนุมูล อิสระที่พบในข้าวตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบทางเคมีของข้าวหอมนิลและแป้งสาลี

Chemical compositions	Hom Nil rice ^a	Wheat Flour ^{b, c}
Moisture content (g/100g)	8.43	11.96
Crude fat	10.8	1.15
Crude fiber	2.76	0.35
Protein	12.56 - 5.53	12.5 - 11.87
Carbohydrate (g/100g)	70.0	64
Ash	1.45	0.74
Fe	3.26	0.96 – 3.08
Zn	2.9	1.0 – 3.77
Ca	4.2	11.2 – 27.9
K	339.4	72 – 316
Cu	0.1	0.15 – 0.61

ที่มา: ^a, Sirichokeorrakit et al. (2016); ^b, Sirichokeorrakit et al. (2015); ^c, อรอนงค์ นัยวิกุล (2540)

ตารางที่ 2.6 สารต้านอนุมูลอิสระและสารฟีนอลิกทั้งหมด

Rice	DPPH assay		FRAP ^b	Total polyphenol content (GAE) ^c	% Yield ^d (dry weight)	Reference
	TEAC ^a	% Scavenging				
Hom Nin rice						Sadabpod et al. (2010)
Raw	1.189	95.03	5214.44	272.07	0.8	
Cooked	1.173	93.99	2744.36	235.42	0.6	
Fermented	0.117	24.26	360.87	38.56	27.3	
Hom Nin				0.234 – 1.319		Kitisin et al. (2015)

^aTEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) in mg/g dry weight of rice extract.

^bFRAP assay = The FRAP value of the extract was expressed as mg of ferrous iron (Fe (II))/g dry weight of rice extract.

^cGAE (The gallic acid equivalent) in mg/g dry weight of rice extract.

^d%Yield calculated from dry weight of raw material.

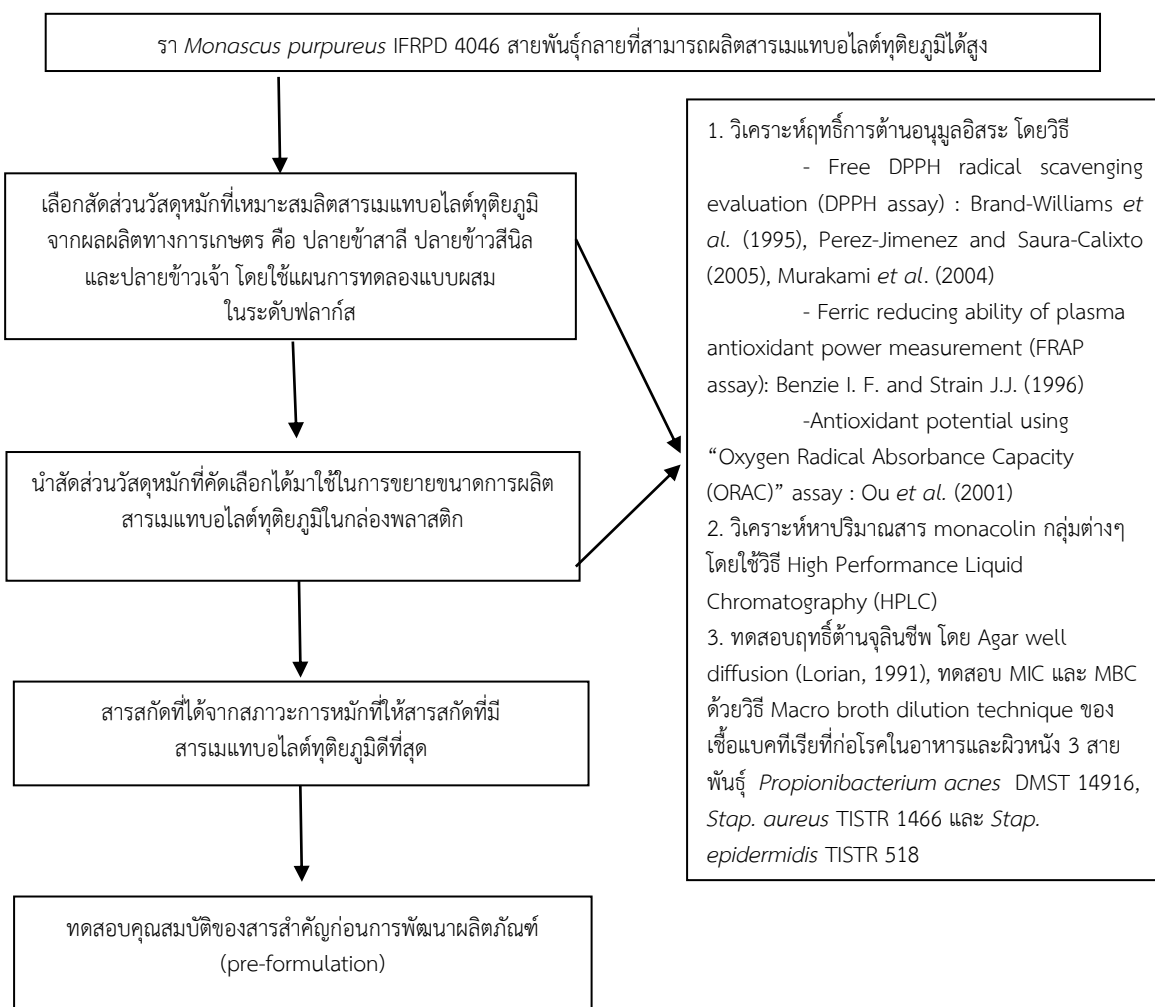
2.7 กรอบแนวคิดในการวิจัย

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักของเชื้อรากลุ่ม *Monascus* spp. โดยใช้ข้าวเป็นวัสดุหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่ได้มักนำไปใช้เป็นสารให้สีในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลากหลาย

ชนิด ข้าวแดงมีการผลิตและใช้อย่างแพร่หลายทั่วแถบเอเชีย นอกจากคุณสมบัติที่สามารถใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆแล้ว ยังมีการสกัดนำไปใช้เป็นยาและอาหารเสริมอีกหลายชนิด คุณสมบัติหรือฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของข้าวแดงที่มีผลเกี่ยวโยงไปถึงคุณสมบัติอื่นๆของข้าวแดง เช่น คุณสมบัติการยับยั้งความเป็นพิษของเซลล์ตับที่ก่อให้เกิดมะเร็งตับ เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตข้าวแดงให้ได้สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิเพิ่มขึ้น โดย *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลาย มาทำการหมักแบบแห้งโดยใช้วัสดุหมัก 3 ชนิด คือ ปลายข้าวสาลี (มีโปรตีน คือ gluten) ข้าวสาลี (แอนโธไซยานิน) และปลายข้าวเจ้า หมักปลายข้าว ซึ่งปลายข้าวทั้ง 3 ชนิดนี้จะมีคุณสมบัติต่างกันขององค์ประกอบทางเคมีทั้งชนิดและปริมาณ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าปลายข้าวสี จากที่ส่วนใหญ่จะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์

ดังนั้นผลผลิตจากโครงการนี้จะได้ทั้งผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงและสารต้านแบคทีเรีย รวมทั้ง Monacolin K แล้วยังเป็นการเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและใช้ประโยชน์จากปลายข้าวอีกทางหนึ่งด้วย กรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัยดังแสดงในแผนภูมิ



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดเลือกชนิดและอัตราส่วนของวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิโดยใช้การทดลองแบบผสม mixture design

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อและการหมักข้าวแดง

ถ่ายเชื้อจาก stock ในอาหารวุ้นเยือกลง Potato Dextrose Agar (PDA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเติมสารละลาย 0.05% ของ Tween 80 ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5 ml ลงในอาหารวุ้นเยือก ทำการเขย่าเบาๆ ให้สปอร์กระจายนำสารละลายสปอร์ที่ได้เทรวมกันในฟลasks แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้สปอร์ 10^7 สปอร์/ml จากนั้นใช้ปริมาตร 5 ml ใส่ลงในวัสดุหมักที่เป็นข้าวปริมาณ 50 g ใส่ในฟลask ขนาด 500 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 7 วัน เพื่อนำไปใช้เป็นหัวเชื้อ

ซึ่งวัสดุหมักผสม ปริมาณ 50 g ใส่ในฟลask ขนาด 500 ml และการปรับให้ได้ความชื้นเป็น 60% ด้วย 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) จากนั้นไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 45 min จากนั้นใส่กล้าเชื้อเริ่มต้นลงไป 5 g นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C และทำการเก็บตัวอย่าง ทุก 2 วัน นาน 10-15 วัน ใช้สำหรับการคัดเลือกวัสดุหมักแบบ statistical mixture design แต่สำหรับการทดลองอื่นๆจะเลือกใช้วันที่เหมาะสมในการผลิตสารสำคัญ นำตัวอย่างไปหาน้ำหนักแห้ง ความชื้นและและนำอีกส่วนไปอบที่ 45 °C นาน 1 คืน จากนั้นนำมาสกัดด้วยเอทานอลและนำไปวิเคราะห์หาสารสำคัญต่อไป

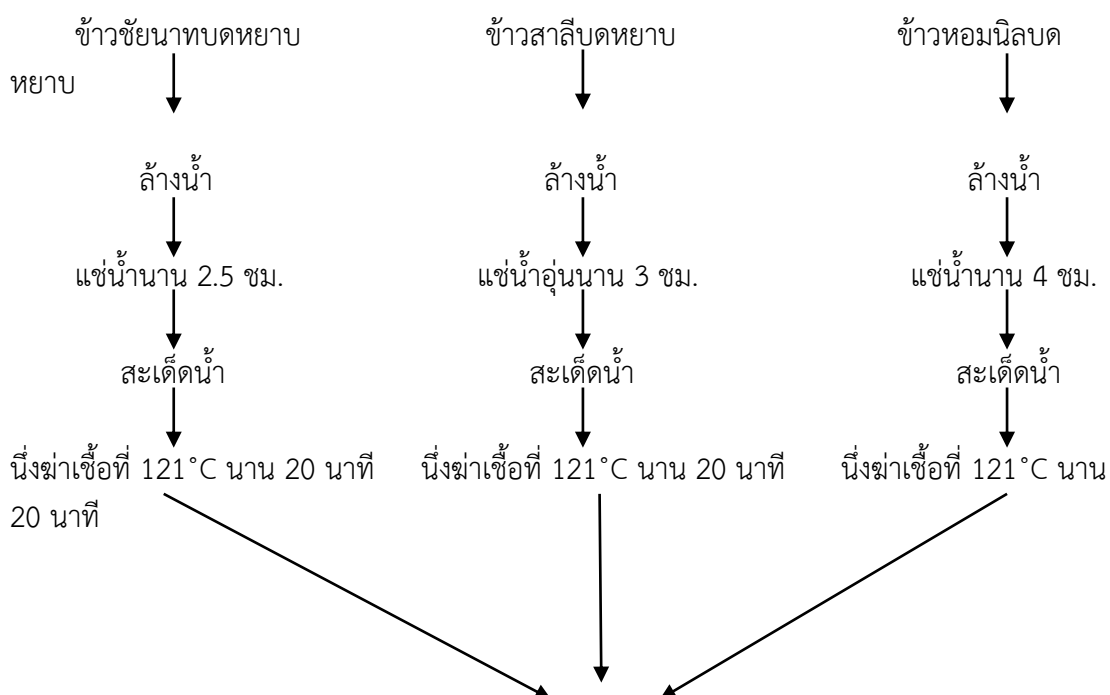
นำวัสดุหมัก 3 ชนิด มีปริมาณรวม 50 g คือ ปลายข้าวสาลี ปลายข้าวสีนิล และ ปลายข้าวเจ้ามาผสมโดยใช้แผนการทดลองแบบผสม (mixture design) ซึ่งจะได้ 7 การทดลอง ที่มีชนิดวัสดุหมักต่างๆกันตามตารางที่ 3.1 ทำการเพาะเลี้ยง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาสารสำคัญ แล้วทำการสร้างภาพคอนทัวร์ของ mixture design ต่อการผลิตสารสำคัญเพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักที่ทำให้มีการผลิตสารสำคัญสูง เพื่อนำสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักไปศึกษาในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.1 การทดลองหาสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักต่อการผลิตสารโดยใช้ mixture design

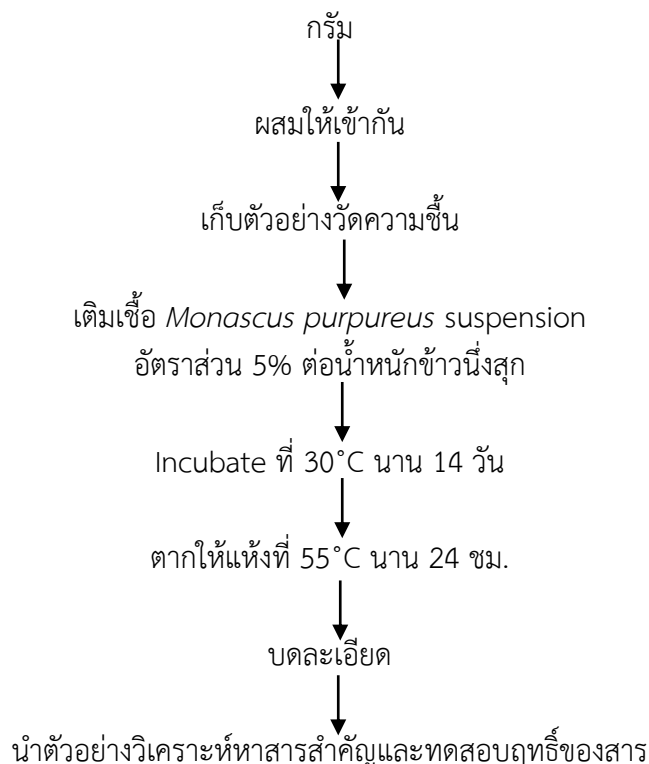
Run	Independent various		
	Chai Nart Broken Rice	Wheat Broken Rice	Homin Broken Rice
	(X1)	(X2)	(X3)
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	1/3	1/3	1/3

3.2 ศึกษาการขยายขนาดกระบวนการหมักข้าวแดง

นำสัดส่วนวัสดุหมักที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในระดับฟลักส์ (ตารางที่ 3.1) มาทำการขยายขนาดการหมักโดยใช้กล่องพลาสติกที่บรรจุวัสดุหมักขนาด 300 kg และใช้สภาวะที่เหมาะสมในการหมัก เก็บตัวอย่างหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาความชื้น พีเอช และสกัดด้วยเอทานอล เพื่อนำไปวิเคราะห์หาสารสำคัญต่อไป ในการศึกษาการขยายขนาดการผลิตข้างแสดงแสดงดัง Flow chart ด้านล่าง



ซึ่งใส่กล่องพลาสติก ขนาดความจุ 7 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อตามอัตราส่วนที่กำหนด กล่องละ 300



3.3 การวิเคราะห์

3.3.1 วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระการหมักข้าวแดง

1) หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดวัดโดยวิธี Folin-Cicalteu assay จะทำตามวิธีของ Tananuwong & Tewarut, (2010) .วิธีการทำโดยเติมตัวอย่าง 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่น 70 mL และเติมสารละลาย Folin-Cicalteu reagent ปริมาตร 5 mL ทำการผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 min จากนั้นเติมสารละลาย sodium carbonate 15 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 h และนำไปวัดด้วยด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 765 nm และนำไปคำนวณค่าจากกราฟมาตรฐาน gallic acid รายงานผลเป็น $\mu\text{g gallic acid/g flour}$

2) การวิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

วิธีนี้จะทำตามวิธีของ Tananuwong & Tewarut, (2010) ซึ่งทำโดยเติมตัวอย่าง 10 μL และ 990 μL ของสารละลาย FRAP (acetate buffer : ferric chloride solution : tripyridyltriazine solution ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 โดยปริมาตร) ลงไปใน cuvette ทำการผสมและทิ้งไว้ในเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 nm ทำการอ่านค่าเมื่อเวลาผ่านไป 4 min นำไปคำนวณค่าจากกราฟมาตรฐาน trolox รายงานผลเป็น $\mu\text{mol trolox / g flour}$

3) การวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity assay

วิธีวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity assay จะทำตามวิธีของ Tananuwong & Tewart, (2010) ทำโดยใช้ตัวอย่างเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 50 μL ผสมกับ 950 μL ของ 0.3 mmol/L DPPH solution ใน cuvette ทิ้งไว้ 3 min นำไปวัดด้วยด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 515 nm นำไปหาค่า EC50 (g flour / g DPPH) ที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมีผลทำให้ DPPH ที่ลดลงจากความเข้มข้นเริ่มต้นครึ่งหนึ่ง

3.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณสาร monacolin

ทำการวิเคราะห์หา monacolin K กลุ่มต่างๆ โดยใช้วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ดังนี้

นำตัวอย่างข้าวแดงที่อบแห้งและบดละเอียดมาชั่งปริมาตร 0.5 กรัม ใส่ในหลอด centrifuge เต็มแอลกอฮอล์ 75% ปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำไปแช่ในเครื่อง Ultrasonic bath นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนใส ใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เต็มแอลกอฮอล์ 75% ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงในหลอด centrifuge ที่มีตัวอย่างข้าวแดงอยู่ แล้วนำไปทำตามขั้นตอนเดิมซ้ำอีก 2 ครั้ง ปรับปริมาตรของสารละลายใน volumetric Flask ให้ได้ 25 มิลลิลิตรด้วยแอลกอฮอล์ 75% ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ดูดสารละลายกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm ใส่หลอดพร้อมนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC สภาพของเครื่อง HPLC ที่ใช้คือคอลัมน์ C 18 ที่มี mobile phase คือ acetonitrile กับ 0.1% trifluoro acetic acid (TFA) โดยมีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที วัดค่า Monacolin K chromatogram ที่ค่าความดูดกลืนแสง 237 nm โดยใช้ UV detector นำ peak area ที่ได้มาคำนวณเทียบกับ standard รายงานผลเป็นปริมาณ Monacolin K ต่อน้ำหนักแห้ง (ดัดแปลงจากวิธีการของ Li et al. (2005))

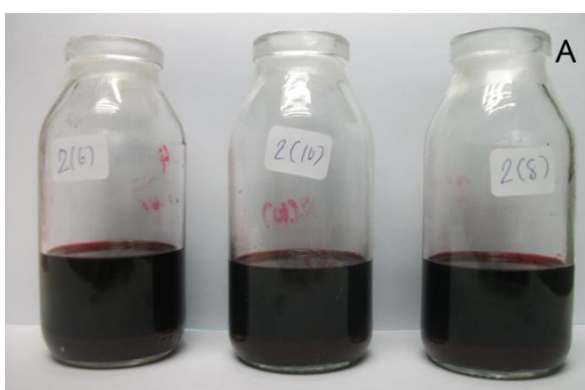
3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์

1) วิธีสกัดสารจากข้าวแดง (ดัดแปลง Kumar et al., 2013)

นำผงของข้าวแดงหลังจากการหมัก (ภาพที่ 3.1) มาสกัดด้วย 95% ethanol แช่ทิ้งไว้ 3 วัน (ภาพที่ 3.2, 3.3) จากนั้นนำมากรองด้วยการตาข่ายกรอง Whatmann's filter paper No 1 และทำการระเหยด้วยเครื่อง evaporator ให้แห้ง จากนั้นนำไปเตรียมสารสกัดไปเตรียมสารตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 59% ethanol



ภาพที่ 3.1 ลักษณะผงของข้าวแดงหลังจากการหมัก



ภาพที่ 3.2 การสกัดสารจากข้าวแดงด้วยด้วย 95% ethanol



ภาพที่ 3.3 การกรองสารจากข้าวแดง

2) การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อโคโลนิของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มา 1 ลูบใสในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร นำหลอดไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเจือจางให้ได้จำนวนแบคทีเรีย $10^5 - 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบความขุ่นให้ได้เทียบกับความขุ่นของ

McFarland Standard No.5 ในการเจือจางนี้ทำโดยการใส่ปิเปตที่ปราศจากเชื้อแล้ว หยดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ที่ละหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ จนได้ความขุ่นที่ต้องการ

3) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์ทดสอบ

ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งโดยวิธี Agar well diffusion โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด และต้องไม่ประกอบด้วยสารที่ขัดขวางประสิทธิภาพของสารที่ต้องการทดสอบ ดังนั้นจึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน (ดังตารางที่ 3.2) อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร ตลอดทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ (25 มิลลิตร)

ตารางที่ 3.2 เชื้อทดสอบและอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อทดสอบ

Microorganisms	Medium
Gram-positive bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 1466	Trypticase soy media
<i>Staphylococcus epidermidis</i> TISTR 518	Trypticase soy media
<i>Propionibacterium acnes</i> DMST 14916	Trypticase soy media

4) การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของด้วยวิธี Agar well diffusion

ทำการ swab เชื้อแบคทีเรียก่อโรคปรับความขุ่นของเชื้อแล้วลงบนอาหารแข็ง ให้ทั่วแบบ three-ways จากนั้นทำการเจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ด้วย Cork borer No.3 จากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม บ่มเลี้ยงเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางฤทธิ์ยับยั้ง (Inhibition zone) การทดลองแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง ผลการยับยั้งจุลินทรีย์วัดได้จากขนาดของโซนใสโดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration หรือ MIC)

5) การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารสกัด ด้วยวิธี Macro broth dilution technique

5.1) การเตรียมสารละลาย resazurin (preparation of resazurin solution)

เตรียมสารละลาย resazurin ให้ได้ความเข้มข้น 0.01% (w/v) ในน้ำกลั่น จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บได้นาน 1 สัปดาห์ (Sarker *et al.*, 2007) หรือละลาย resazurin 270 mg tablet ใน 40 mL

จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm (Nateche, *et al.*, 2006)

5.2) การเตรียมแบคทีเรีย

เตรียมความขุ่นของเชื้อ (turbidity) โดยเปรียบเทียบกับ Macfarland standards No. 0.5 ซึ่งจะได้ค่าปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 5×10^6 cfu/mL

5.3) การเตรียมจานเพาะเชื้อ

แถวที่ 1 เติมน้ำละลายตัวอย่างทดสอบที่ละลายด้วย 10% (v/v) DMSO ปริมาตร 100 μL แถวสารทดสอบ เติม 80 μL ของอาหารเหลว TSB หรือ normal saline solution (ถ้าเป็นสารละลายบริสุทธิ์จะเตรียม stock เท่ากับ 1mg/mL และถ้าเป็นสารสกัดจะเตรียม stock เท่ากับ 10mg/mL) จากนั้นทำการเจือจางสารทดสอบโดยเติมน้ำทดสอบ 80 μL ในหลุมที่ 1 และดูดแบบต่อเนื่องไปเรื่อยๆ และหลุมสุดท้ายจะดูดทิ้ง แต่ละช่องในทุกแถวจะเติม 10 μL ของสารละลาย resazurin เติม 10 μL ของสารละลายเชื้อที่เข้มข้น 5×10^6 cfu/mL จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5×10^5 cfu/mL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 18 หรือ 24 ชั่วโมง ขึ้นกับจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

5.4) การอ่านผล

1) การอ่านผล การหา Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

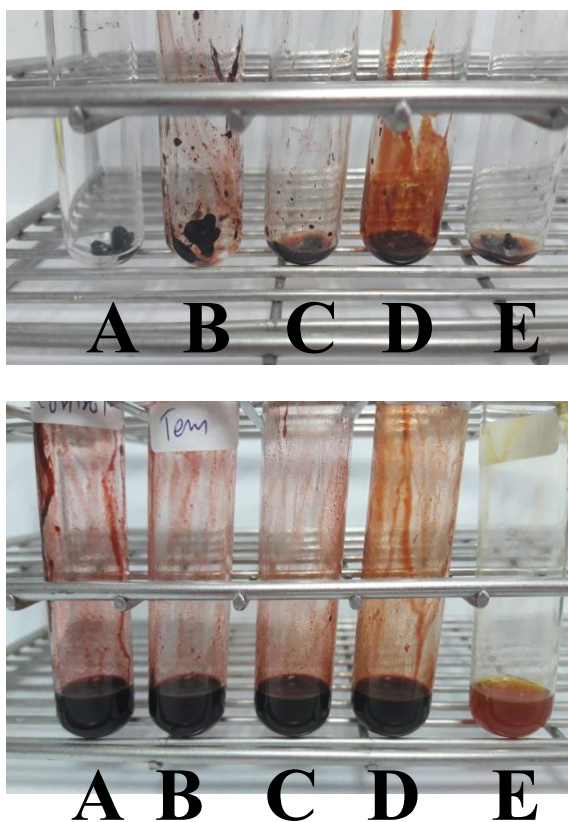
เมื่อบ่มเชื้อจนครบเวลาที่ต้องการแล้ว ให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่มีสีอมม่วง อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้เป็นค่า MIC ของ บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างสมบูรณ์

2) การหา Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

จากการทดสอบหาค่า MIC ในการทดลองข้างต้น สามารถนำมาหาค่า MBC โดยให้นำหลุมที่มีสีอมม่วงและสีชมพูและน้ำเงินจากหลุมสีอมม่วงอย่างละ 2 หลุม จุลินทรีย์ทดสอบที่ไม่ตายจะกลับเจริญได้ใหม่เมื่อปราศจากสารต้านจุลินทรีย์ อ่านค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่น้อยที่สุดที่ฆ่าเชื้อจะได้ 99.9 เปอร์เซ็นต์ (คือ มีจุลินทรีย์ขึ้นได้น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อ 0.1 มิลลิเมตร) การหา MBC ทำได้โดยสารละลาย 10 μL ที่เลือกไว้ drop ลงในอาหารแข็ง นำเข้า ที่ 35 - 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมานับจำนวนโคโลนี

3.4 ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดก่อนการพัฒนาผลิตภัณฑ์

การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดก่อนนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์หรือตั้งตำรับนั้นจะมีสถานะแตกต่างกันอย่างไรซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของ Thai FDA guideline โดยทำการทดสอบตามวิธีของ พรเทพ เต็มรังษี (2554) ภาพที่ 3.4 ดังนี้



ภาพที่ 3.4 ลักษณะสารสกัดข้าวแดงด้วย 95% ethanol ก่อนการทดสอบคุณสมบัติความคงตัวของสารสกัด (บน) และหลังการทดสอบคุณสมบัติความคงตัวของสารสกัด (ล่าง)
A = Control, B = Temperature degradation, C = Acid hydrolysis, D = Alkaline hydrolysis, E = Oxidation

3.5.1 Acid hydrolysis

ซังสารสกัดมา 100 mg ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม 3N HCl ลงไป 5 หยด นำไปวางในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 3 h แล้วนำไปปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วย NaOH เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนติออกซิเดนต์ monakolin K และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion

3.4.2 Alkaline hydrolysis

ซังสารสกัดมา 100 mg ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม 3N NaOH ลงไป 5 หยด นำไปต้มในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 3 h แล้วนำไปปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วย HCl เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนติออกซิเดนต์ monakolin K และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion

3.4.3 Temperature degradation

ซังสารสกัดมา 100 mg ใส่ในหลอดทดลอง นำไปวางในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 3 h ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนติออกซิเดนต์ monakolin K และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion

3.4.4 Oxidation

ซังสารสกัดมา 100 mg ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม 30% H₂O₂ ลงไป 5 หยด นำไปวางในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 3 h นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนติออกซิเดนต์ monakolin K และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion

3.5 การประเมินผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) แบบ Complete Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การคัดเลือกชนิดและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเมแทบอลิซึมโดยใช้การทดลองแบบผสม mixture design

ผลของการวัสดุหมัก 3 ชนิด ได้แก่ ปลายข้าวเจ้าชัณนาท ปลายข้าวสาลี และปลายข้าวสีนิล มาผสมโดยใช้แผนการทดลองแบบผสม (mixture design) ซึ่งจะได้ 7 การทดลอง เพื่อหาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สาร monacolin และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 11 ชนิด พบว่าเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ที่สุกที่สุดในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ให้ค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 650.78 ± 26.71 (mg trolox/ g DW) และให้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดลงไป 50% (EC_{50}) เท่ากับ 8.64 ± 0.11 g flour/g DPPH (ตารางที่ 4.1 และ 4.2) นอกจากนี้ยังให้ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงในการหมัก *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ที่สุกด้วยปลายข้าวชัณนาทและปลายข้าวสีนิล (Run5) ของการทดลองตั้งแต่วันที่ 10 และสูงสุดในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง (1737 ± 61.22 g /g dry weight) (ตารางที่ 4.3) ในขณะที่การผลิตสาร monacolin จะผลิตได้ดีในวันที่ 12 และดีที่สุดในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 4.4) และการผลิตสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดีที่สุดในวันที่ 12-15 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.1 การคัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่วัดโดยวิธี FRAP จากข้าวหมักแดงหมักด้วยรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลาย

Time (day)	Antioxidant activity equivalent Trolox (mg trolox / g DW)						
	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	Run 7
0	0.29±0.01	22.19±2.19	28.64±0.38	0.30±0.03	21.49±2.31	16.71±1.32	24.91±4.03
2	2.57±0.03	23.02±2.28	47.03±0.63	45.76±0.05	48.84±10.08	85.35±0.18	58.95±11.39
4	136.55±10.46	70.65±0.70	89.19±2.78	31.02±2.09	63.99±1.32	60.67±6.10	65.56±3.95
6	129.44±8.83	139.09±1.29	104.11±1.04	121.70±1.37	219.26±44.49	69.21±5.65	38.54±1.07
8	248.98±5.06	198.88±9.67	237.95±5.22	260.84±12.35	394.25±44.49	188.92±6.62	225.21±19.78
10	314.54±10.97	200.41±0.42	159.79±5.26	365.75±0.59	431.13±34.65	219.55±10.59	248.99±0.03
12	365.78±7.700	233.05±8.23	370.13±22.92	245.77±0.08	387.79±8.42	171.64±8.59	211.98±15.91
14	452.77±5.98	248.94±7.95	434.89±4.59	281.06±33.13	408.18±95.4	189.64±22.93	322.57±19.01
15	376.26±1.79	301.42±1.54	470.69±13.27	147.35±1.85	650.78±6.44	192.47±8.21	214.49±0.35

หมายเหตุ: Run1 = Chai Nart Broken Rice, Run2 = Wheat Broken Rice, Run3 = Homin Broken Rice, Run4 = Chai Nart Broken Rice and Wheat Broken Rice, Run5 = Chai Nart Broken Rice and Homin Broken Rice, Run6 = Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice, Run7 = Chai Nart Broken Rice, Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice

ตารางที่ 4.2 การคัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อค่า EC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระที่วัดโดยวิธี DPPH จากข้าวหมักแดงหมักด้วยรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลาย

Time (day)	EC_{50} (g flour/g DPPH)						
	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	Run 7
0	553.43±18.42	163.34±1.03	161.15±3.78	901.56±114.41	407.95±2.37	319.16±23.64	723.34±3.23
2	164.79±1.09	99.84±0.34	257.79±18.98	257.79±18.98	188.89±9.21	125.87±3.99	170.64±9.91
4	30.47±0.29	35.89±0.29	682.00±7.49	682.00±7.48	36.04±2.98	84.13±0.86	115.60±1.35
6	11.71±0.12	33.28±0.97	31.15±2.93	31.15±2.93	15.98±0.32	67.32±1.81	43.05±1.23
8	8.3±0.90	18.76±0.36	15.35±1.14	15.35±1.14	14.18±0.21	32.24±3.25	24.16±0.46
10	6.94±0.89	20.18±0.97	14.75±0.49	14.75±0.49	11.16±0.46	17.97±0.88	21.96±0.10
12	6.97±0.05	15.38±0.18	13.49±0.10	13.49±0.11	10.53±0.16	18.22±0.99	14.46±0.57
14	6.29±0.04	15.08±0.54	14.49±0.58	14.49±0.58	9.25±0.19	16.39±0.78	14.46±0.36
15	6.74±0.05	12.27±0.24	17.83±0.79	17.83±0.79	8.643±0.11	17.02±0.48	17.21±0.38

หมายเหตุ: Run1 = Chai Nart Broken Rice, Run2 = Wheat Broken Rice, Run3 = Homin Broken Rice, Run4 = Chai Nart Broken Rice and Wheat Broken Rice, Run5 = Chai Nart Broken Rice and Homin Broken Rice, Run6 = Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice, Run7 = Chai Nart Broken Rice, Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice

ตารางที่ 4.3 การคัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตปริมาณฟีนอลทั้งหมดจากข้าวหมักแดงหมักด้วยรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลาย

Time (day)	Total phenolic content equivalent gallic acid (g /g dry weight)						
	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	Run 7
0	3.00±0.22	51.10±0.08	44.21±0.18	16.15±0.14	28.36±1.52	34.22±0.15	18.98±0.28
2	55.26±0.16	90.54±0.04	104.79±13.60	78.18±0.77	71.81±1.07	117.85±0.62	78.27±2.00
4	329.68±0.73	269.16±1.47	154.89±1.25	167.94±1.67	467.64±2.71	148.59±4.29	152.12±0.13
6	547.24±0.36	538.79±1.05	165.99±0.91	525.21±16.02	903.17±2.09	185.40±0.78	506.57±60.76
8	795.30±0.90	584.09±0.43	399.17±3.71	884.76±5.29	1036.82±0.55	479.67±0.79	700.40±44.09
10	765.46±0.36	630.42±1.48	472.99±2.51	1040.49±98.43	1418.10±114.9	834.99±11.06	770.45±162.30
12	789.79±0.36	698.79±0.21	746.55±2.94	958.37±50.33	1445.85±9.11	927.33±7.23	928.89±87.65
14	860.53±2.01	724.72±0.63	794.67±3.35	1007.08±20.90	1513.28±1.99	888.06±75.25	951.61±30.92
15	817.00±0.36	807.26±0.19	990.11±12.50	909.01±0.33	1737±61.22	854.15±27.20	854.37±44.72

หมายเหตุ: Run1 = Chai Nart Broken Rice, Run2 = Wheat Broken Rice, Run3 = Homin Broken Rice, Run4 = Chai Nart Broken Rice and Wheat Broken Rice, Run5 = Chai Nart Broken Rice and Homin Broken Rice, Run6 = Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice, Run7 = Chai Nart Broken Rice, Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice

ตารางที่ 4.4 การคัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร monacolin จากข้าวหมักแดงที่หมักด้วยรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์

Time (day)	Monacolin (mg/kg)						
	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	Run 7
0	ND	18.54	22.77	ND	ND	ND	ND
2	ND	21.63	43.85	ND	ND	ND	ND
4	ND	39.96	51.46	ND	49.02	ND	ND
6	ND	60.72	48.35	ND	134.03	ND	ND
8	ND	148.16	51.55	51.69	138.27	ND	16.32
10	ND	203.87	50.39	145.16	135.02	227.16	139.18
12	166.9	313.65	91.72	301.43	130.18	275.28	140.91
14	194.35	375.89	226.08	293.15	130.52	309.83	241.53
15	155.47	421.24	292.45	424.42	133.26	293.83	280.04

หมายเหตุ: ND = not determined, Run1 = Chai Nart Broken Rice, Run2 = Wheat Broken Rice, Run3 = Homin Broken Rice, Run4 = Chai Nart Broken Rice and Wheat Broken Rice, Run5 = Chai Nart Broken Rice and Homin Broken Rice, Run6 = Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice, Run7 = Chai Nart Broken Rice, Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice

ตารางที่ 4.5 การคัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมในการผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม /มิลลิลิตรจากข้าวหมักแดงที่หมักด้วยรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์

Time (day)	Inhibition zone (mm)						
	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	Run 7
<i>P. acnes</i>							
DMST 14916							
6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	3.66±0.58	0.00±0.00	4.33±0.58
8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.33±0.58	0.00±0.00	4.33±0.58
10	4.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.33±0.58	0.00±0.00	4.00±0.00
12	3.67±0.58	4.33±0.58	1.33±0.58	4.66±0.58	4.00±1.00	4.33±0.58	4.33±0.58
14	4.67±0.58	4.67±0.58	1.33±0.58	5.00±0.00	4.33±0.58	5.33±0.58	4.33±0.58
15	6.00±0.00	6.00±0.00	2.00±0.00	7.00±0.00	3.00±0.00	5.00±0.00	6.00±0.00
<i>Stap. epidermidis</i>							
TISTR 518							
6	7.00±1.00	0.00±0.00	0.00±0.00	8.66±0.58	10.00±0.00	0.00±0.00	2.66±0.58
8	5.33±0.58	0.00±0.00	0.00±0.00	10.00±0.00	9.33±0.58	0.00±0.00	4.66±1.53
10	5.33±0.58	0.00±0.00	0.00±0.00	10.67±0.58	9.66±0.58	0.00±0.00	4.33±1.53
12	4.67±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.66±1.15	5.30±0.00	0.00±0.00	4.00±1.73
14	4.67±1.00	0.00±0.00	0.00±0.00	5.00±1.00	5.00±0.58	0.00±0.00	3.33±0.58
15	5.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	5.00±1.00	4.66±0.00	0.00±0.00	3.00±0.00
<i>Stap. aureus</i>							
TISTR 1466							
6	2.83±0.29	7.00±1.00	4.66±0.58	3.66±0.58	3.66±0.58	0.00±0.00	6.00±1.00
8	5.00±1.00	7.00±1.00	5.00±0.00	6.00±2.00	5.33±0.58	2.66±0.58	7.33±1.15
10	5.00±1.00	6.67±1.15	5.33±0.58	5.66±2.08	5.33±0.58	4.33±0.58	7.33±1.15
12	4.33±0.58	6.67±0.57	5.66±0.58	4.33±0.58	6.00±1.73	6.66±1.15	6.33±0.58
14	4.00±1.00	6.00±3.00	5.66±2.89	5.66±0.58	7.00±1.00	5.00±1.00	5.33±0.58
15	5.00±0.00	6.00±0.00	4.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	4.00±1.00	5.00±0.00

หมายเหตุ: Run1 = Chai Nart Broken Rice, Run2 = Wheat Broken Rice, Run3 = Homin Broken Rice, Run4 = Chai Nart Broken Rice and Wheat Broken Rice, Run5 = Chai Nart Broken Rice and Homin Broken Rice, Run6 = Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice, Run7 = Chai Nart Broken Rice, Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice

^a Diameter of Inhibition zone not including well diameter

จากผลการทดลองหาสัดส่วนวัสดุหมักที่เหมาะสมพบว่าสัดส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด (650.78 ± 26.71 mg trolox/ g DW) คือปลายข้าวเจ้าชยันตปลายข้าวสาลี และปลายข้าวสีนิลในสัดส่วนของวัสดุหมักเท่ากับ 0.5:0:0.5 และสัดส่วนวัสดุหมักปลายข้าวเจ้าชยันต และปลายข้าวสาลีจะให้สาร monacolin (424.42 mg/kg) (ตารางที่ 4.6) และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (7.55 mm) สูงสุดในสัดส่วนของวัสดุหมักเท่ากับ 0.5:0.5:0 (ตารางที่ 4.7)

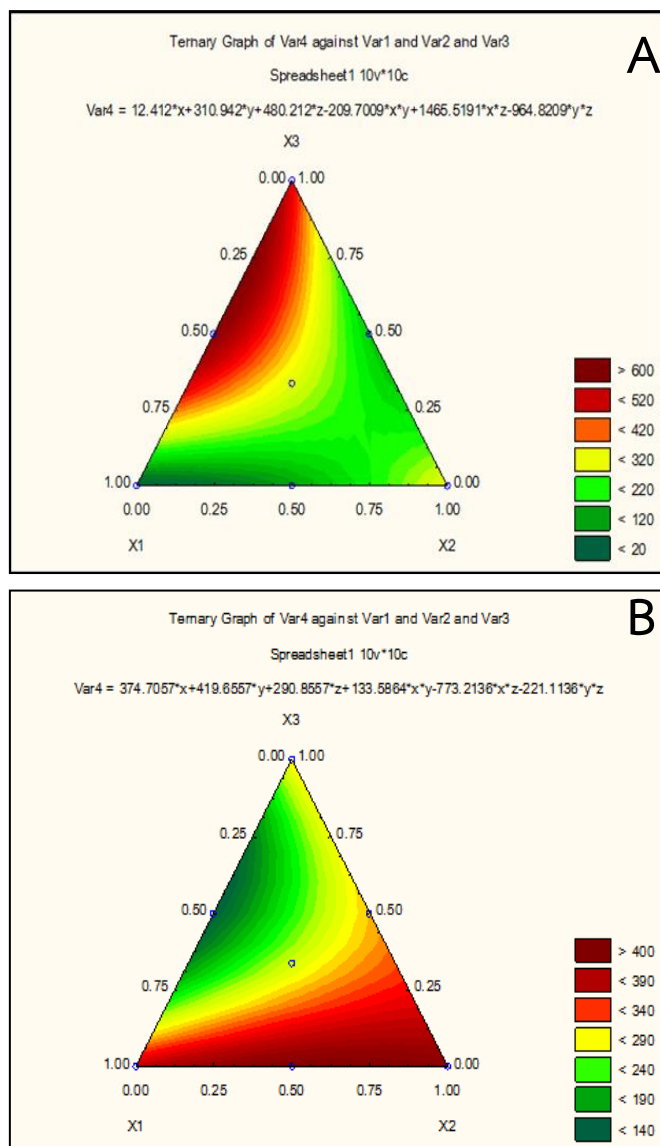
ตารางที่ 4.6 อัตราส่วนที่เหมาะสมของวัสดุหมักต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ สาร monacolin K และสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยใช้ mixture design เพาะเลี้ยงนาน 15 วัน

Run	Chai Nart Broken Rice (X1)	Wheat Broken Rice (X2)	Hom Nin Broken Rice (X3)	Antioxidant activity (mg trolox / g DW)	Monacolin (mg/kg)
1	1	0	0	376.25 ± 10.11	155.47
2	0	1	0	301.42 ± 6.54	421.24
3	0	0	1	470.69 ± 24.23	292.45
4	1/2	1/2	0	147.34 ± 33.91	424.42
5	1/2	0	1/2	650.78 ± 26.71	133.26
6	0	1/2	1/2	192.46 ± 19.06	293.83
7	1/3	1/3	1/3	214.49 ± 15.47	280.04

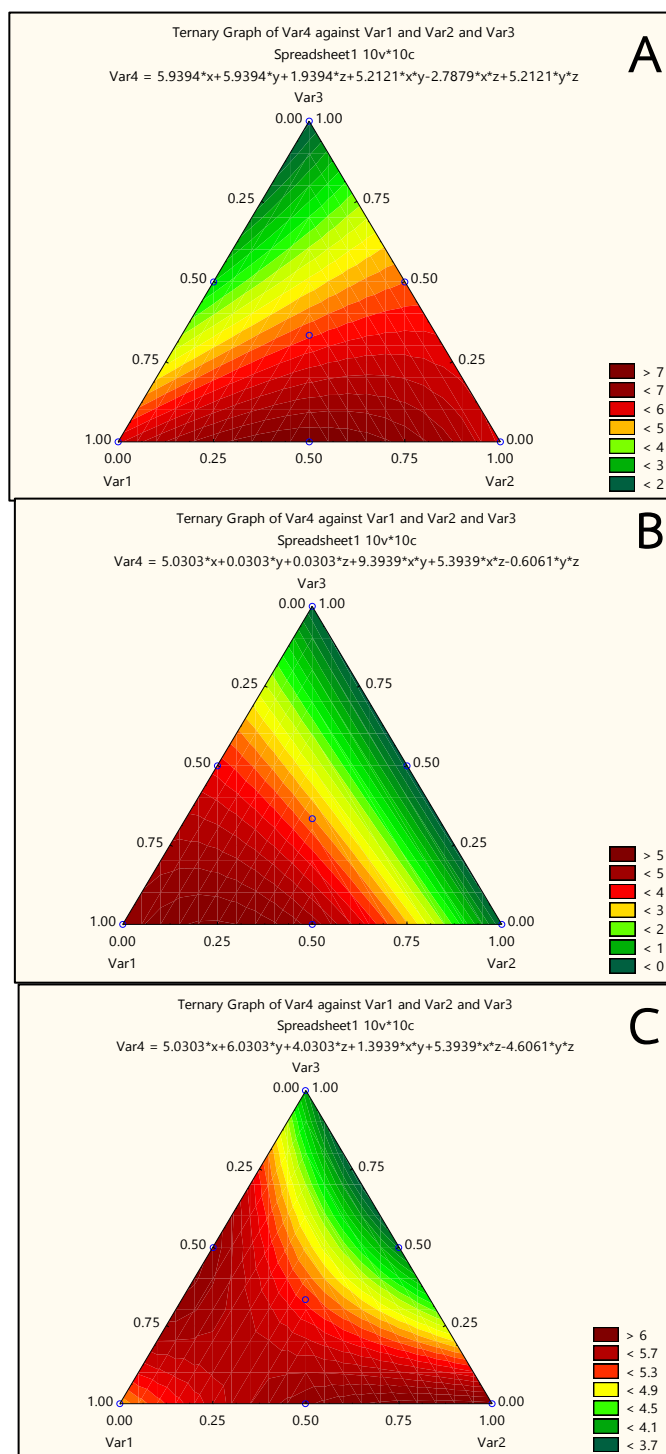
ตารางที่ 4.7 สัดส่วนของวัสดุหมักต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยใช้ mixture design ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม /มิลลิลิตรจากข้าวหมักแดงในวัสดุหมัก 3 ชนิดที่สัดส่วนแตกต่างกันด้วยรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงนาน 15 วัน

Run	Chai Nart	Wheat	Hom Nin	Antimicrobial activity ^a (mm)		
	Broken Rice (X1)	Broken Rice (X2)	Broken Rice (X3)	<i>P. acnes</i> DMST 14916	<i>Stap. aureus</i> TISTR 1466	<i>Stap. epidermidis</i> TISTR 518
1	1	0	0	6	5	5
2	0	1	0	6	6	0
3	0	0	1	2	4	0
4	1/2	1/2	0	7	6	5
5	1/2	0	1/2	3	6	4
6	0	1/2	1/2	5	4	0
7	1/3	1/3	1/3	6	5	3

นำสัดส่วนของวัสดุหมักที่ได้จากการทดลองต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ สาร monacolin K และสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยใช้ mixture design ดังตารางที่ จากนั้นนำมาสร้างภาพ contour plots ดังภาพที่ 4.1 และ 4.2



ภาพที่ 4.1 พื้นผิวตอบสนองของสัดส่วนผสมของวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (A) สาร monacolin (B) ที่ได้จาก quadratic model ของ mixture เพาะเลี้ยงนาน 15 วัน



ภาพที่ 4.2 พื้นผิวตอบสนองของสัดส่วนผสมของวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้าน *P. acnes* DMST 14916 (A) *Stap. epidermidis* TISTR 518 (B) *Stap. aureus* TISTR 1466 (C) ที่ได้จาก quadratic model ของ mixture เพาะเลี้ยงนาน 15 วัน

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวัสดุหมัก 3 ชนิด จากการวิเคราะห์การถดถอยโดยสร้างสมการการถดถอย (regression equation) และพิจารณาความเหมาะสมของสมการการถดถอยจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) นำสมการถดถอยแบบการพหุนาม (polynomial equation) มาทำนายสัดส่วนของวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สาร monacolin K และสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้สูงสุดตั้งสมการที่ 1, 2 และ 3

$$Y_1 = 12.412X_1 + 310.942X_2 + 480.212X_3 - 209.7009X_1X_2 + 1465.5191X_1X_3 - 964.8209X_2X_3 \quad \text{สมการที่ 1}$$

$$Y_2 = 374.7057X_1 + 419.6557X_2 + 290.8557X_3 + 133.5864 X_1X_2 - 773.2136X_1X_3 - 221.1136X_2X_3 \quad \text{สมการที่ 2}$$

เมื่อ Y_1 = ปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Y_2 = ปริมาณสาร monacolin K

Y_3 = ปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

X_1 = ปลายข้าวเจ้าชัณนาท

X_2 = ปลายข้าวสาลี

X_3 = ปลายข้าวสีนิล

สำหรับสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้สูงสุดตั้งสมการที่ 3, 4 และ 5

$$Y_a = 5.9394X_1 + 5.9394X_2 + 1.9394X_3 + 5.2121X_1X_2 - 2.7879X_1X_3 + 5.2121X_2X_3 \quad \text{สมการที่ 3}$$

$$Y_b = 5.0303X_1 + 0.0303X_2 + 0.0303X_3 + 9.3939X_1X_2 + 5.3939X_1X_3 - 0.6061X_2X_3 \quad \text{สมการที่ 4}$$

$$Y_c = 5.0303X_1 + 6.0303X_2 + 4.0303X_3 + 1.3939X_1X_2 + 5.3939X_1X_3 - 4.6061X_2X_3 \quad \text{สมการที่ 5}$$

เมื่อ Y_a = ปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้าน *P. acnes* DMST 14916

Y_b = ปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้าน *Stap. aureus* TISTR 1466

Y_c = ปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้าน *Stap. epidermidis* TISTR 518

X_1 = ปลายข้าวเจ้าชัณนาท

X_2 = ปลายข้าวสาลี

X_3 = ปลายข้าวสีนิล

จากภาพพื้นผิวตอบสนองและสมการการถดถอยในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสาร monacolin K และสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์พบว่า การผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะใช้ปลายข้าวเจ้าชัณนาทต่อปลายข้าวหอมนิลอัตราส่วนเท่ากับ 16.4 : 33.6 เท่ากับ 668.18 ± 16.35 ซึ่งมากกว่าค่าการทำนาย ในขณะที่การผลิตสาร monacolin จะใช้ปลายข้าวเจ้าชัณนาทต่อปลายข้าวสาลีอัตราส่วนเท่ากับ 16.4 : 33.6 ให้ค่าการผลิต monacolin เท่ากับ 445.52 mg/kg ซึ่งมากกว่าค่าการทำนาย ดังตารางที่ 4.8 และ 4.9

ตารางที่ 4.8 อัตราส่วนของปลายข้าว 3 ชนิดที่แตกต่างกันที่หมักด้วยรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ในพลาสติกปริมาณทั้งหมด 50 g เพาะเลี้ยงนาน 14 วันเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ และสาร monacolin K

Secondary compounds	Chai Nart Broken Rice (g)	Wheat Broken Rice (g)	Homin Broken Rice (g)	Total (g)
Monacolin K	16.4	33.6	0	50
Antioxidant activity	17	0	33	50

ตารางที่ 4.9 สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสาร monacolin ที่ผลิตจากการหมักรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลายด้วยวัสดุหมัก 3 ชนิดในอัตราส่วนที่แตกต่างกันในพลาสติกปริมาณทั้งหมด 50 g ใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

Secondary compounds	Chai Nart Broken Rice (X1)	Wheat Broken Rice (X2)	Homin Broken Rice (X3)	Predicted	Validated value
Antioxidant activity	0.34	0	0.66	650.02	668.18±16.35
FRAP (mg trolox / g DW)					
EC ₅₀ (g substrate / g DPPH)	0.34	0	0.66	ND	26.98±0.08
Total phenolic (mg galic acid / g DW)	0.34	0	0.66	ND	1469.27±23.65
Monacolin (mg/kg)	0.33	0.67	0	434.37	445.52

ND = Not determined

สำหรับการผลิตสารที่ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *P. acnes* DMST 14916, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *Stap. epidermidis* TISTR 518 จะใช้ปลายข้าวเจ้าชัณษาทต่อปลายข้าวสาลี อัตราส่วนเท่ากับ 0.50 : 0.50, 0.14 : 0.86 และ 0.77 : 0.23 ให้ค่าการยับยั้งจุลินทรีย์เท่ากับ 7.36, 7.50 และ 5.77 mm ใกล้เคียงกับค่าการทำนายดังตารางที่ 4.10 และ 4.11

ตารางที่ 4.10 อัตราส่วนของปลายข้าว 3 ชนิดที่แตกต่างกันที่หมักด้วยรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ในพลาสติกปริมาณทั้งหมด 50 g เพาะเลี้ยงนาน 14 วันเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

Secondary compounds	Chai Nart Broken Rice (g)	Wheat Broken Rice (g)	Homin Broken Rice (g)	Total (g)
Antimicrobial activity^a (mm)				
<i>P. acnes</i> DMST 14916	25	25	0	50
<i>Stap. aureus</i> TISTR 1466	7	43	0	50
<i>Stap. epidermidis</i> TISTR 518	38.5	11.5	0	50

ตารางที่ 4.11 สารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ผลิตจากการหมักรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลายด้วยวัสดุหมัก 3 ชนิดในอัตราส่วนที่แตกต่างกันในพลาสติกใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

Secondary compounds	Chai Nart Broken Rice (X1)	Wheat Broken Rice (X2)	Homin Broken Rice (X3)	Predicted	Validated value
Antimicrobial activity^a (mm)					
<i>P. acnes</i> DMST 14916	0.50	0.50	0.00	7.24	7.36
<i>Stap. aureus</i> TISTR 1466	0.14	0.86	0.00	6.06	6.50
<i>Stap. epidermidis</i> TISTR 518	0.77	0.23	0.00	5.54	5.77

หมายเหตุ: ^a, Diameter of Inhibition zone not including well diameter (6mm)

4.2 ผลการขยายขนาดกระบวนการหมักข้าวแดง

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยง *M. purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลายมาเพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวต่างๆ ได้แก่ ปลายข้าวชัยนาท ปลายข้าวสาลี และปลายข้าวหอมนิล โดยใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมจากพื้นผิวตอบสนอง ทำการขยายขนาดของกระบวนการหมักข้าวแดงโดยเพาะเลี้ยงใน

กล่องพลาสติกขนาดความจุ 7 ลิตร ที่มีอัตราส่วนของปลายข้าวที่เหมาะสมในปริมาณทั้งหมด 300 กรัม โดยการผลิตสาร monacolin K จะใช้ปลายข้าวพันธุ์ชัยนาทและปลายข้าวสาลิเท่ากับ 99 และ 201 กรัม ในขณะที่การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจะใช้ปลายข้าวชัยนาทและปลายข้าวหอมนิลเท่ากับ 102 และ 198 กรัม ดังตารางที่ 4.12 ที่ความชื้นเริ่มต้นในช่วง 30.83 - 41.99% ดังตารางที่ 4.13 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยไม่มีการเขย่า

ตารางที่ 4.12 อัตราส่วนของปลายข้าว 3 ชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกันที่หมักด้วยรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ในกล่องหมักเพาะเลี้ยงนาน 15 วัน เพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ และสาร monacolin K

Secondary compounds	Chai Nart Broken Rice (g)	Wheat Broken Rice (g)	Homin Broken Rice (g)	Total (g)
Monacolin K	99	201	0	300
Antioxidant activity	102	0	198	300

ตารางที่ 4.13 ปริมาณความชื้นและน้ำหนักแห้งในกระบวนการหมักสำหรับการขยาย scale การผลิต

Ratio of substrates	Initial moisture content (%)	Final moisture content (%)	Dry weight of after fermentation (%)
Chai Nart Broken Rice (102 g) + Hom Nin Broken Rice (198 g)	30.83	56.79	95
Chai Nart Broken Rice (99 g) + Wheat Broken Rice (201 g)	41.99	64.56	72
Chai Nart Broken Rice (150 g) + Wheat Broken Rice (150 g)	32.87	61.46	75

เมื่อนำวัสดุหมักที่หมักด้วย *M. purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลายมาหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สาร monacolin และสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่า สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ EC50 และปริมาณ total phenolic เท่ากับ 678.22±16.35 mg trolox / g DW 26.98±0.08 g substrate / g DPPH และ 1468.27±27 mg galic acid/g DW ตามลำดับ และ สาร monacolin เท่ากับ 719.87 mg/kg ดังตารางที่ 4.14 ในขณะการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์มีค่า

ไม่แตกต่างจากการหมักในระดับฟลักส์ ให้ค่าการยับยั้ง *P. acnes* DMST 14916, *Stap. aureus* TISTR 1466 และ *Stap. epidermidis* TISTR 518 เท่ากับ 16.00 ± 3.06 5.00 ± 0.58 และ 7.66 ± 4.07 mm ตามลำดับ ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อก่อสิว *P. acnes* DMST 14916 จะให้ค่าการยับยั้งดีที่สุด (16.00 ± 3.06) ซึ่งสูงกว่าที่ยังไม่มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม 2.3 เท่า (7.00 ± 0.00) ตารางที่ 4.15 และภาพที่ 4.3 ให้ผลผลิตของสารสกัดหยาบเท่ากับ 0.08 g/g DW ความชื้นของการเพาะเลี้ยงวันที่ 14 คือ 56.79 - 64.56% (ตารางที่ 4.13) และการเพาะเลี้ยงด้วยปลายข้าวชัณนาทและปลายข้าวหอมนิล จะให้ปริมาณน้ำหนักแห้ง (95 %) ดีกว่าเพาะเลี้ยงด้วยปลายข้าวชัณนาทและปลายข้าวสาลี (72 - 75 %) (ตารางที่ 4.13)

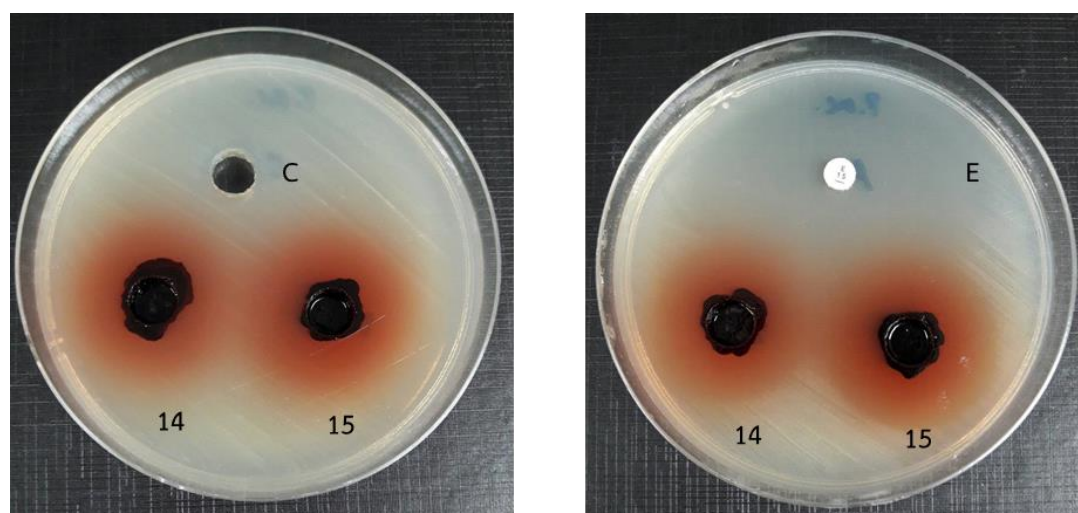
ตารางที่ 4.14 การผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสาร monacolin จากการหมักรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ที่กลายด้วยปลายข้าว 3 ชนิดในสัดส่วนที่เหมาะสมในกล่องหมักขนาด 7 ลิตร ใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

Secondary compounds	Chai Nart Broken Rice (g)	Wheat Broken Rice (g)	Hom Nin Broken Rice (g)	Value
Antioxidant activity FRAP (mg trolox / g DW)	102	0	198	705.07 ± 8.85
EC ₅₀ (g substrate / g DPPH)	102	0	198	28.75 ± 0.82
Total phenolic (mg galic acid/g DW)	102	0	198	1895.51 ± 35.65
Monacolin (mg/kg)	99	201	0	719.87

ตารางที่ 4.15 การผลิตสารที่มีสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากการหมักรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ที่กลายด้วยปลายข้าว 3 ชนิดในสัดส่วนที่เหมาะสมในกล่องหมัก ขนาด 7 ลิตร ใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

Tested microorganisms	Chai Nart Broken Rice (X1)	Wheat Broken Rice (X2)	Homin Broken Rice (X3)	Predicted	Validated value	Inhibition zone of antibiotic (mm)
Antimicrobial activity^a (mm)						
<i>P. acnes</i> DMST 14916	0.50	0.50	0.00	7.24	16.00±3.06	40-50 (E)
<i>Stap. aureus</i> TISTR 1466	0.14	0.86	0.00	6.06	5.00±0.58	26 (E)
<i>Stap. epidermidis</i> TISTR 518	0.77	0.23	0.00	5.54	7.66±4.07	26 (E)

หมายเหตุ: ^a, Diameter of Inhibition zone not including well diameter (6mm); E, Erythromycin



P. acnes DMST 14916

ภาพที่ 4.3 การยับยั้ง *P. acnes* DMST 14916 ของสารสกัดหมักจากวัสดุหมักปลายข้าวชัชนา และปลายข้าวสาลีใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 14 และ 15 วัน; C = 95% alcohol, E = Erythromycin

จากตารางที่ 4.16 ผลของสารสกัดจากการหมักปลายข้าวชั๊วชั๊วและปลายข้าวหอมนิล *M. purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลายมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.39 และ 0.78 mg/mL ต่อ *P. acnes* DMST 14916 ดีที่สุด รองลงมาคือ *Stap. epidermidis* TISTR 518 ให้ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.78 และ 1.56 mg/mL

ตารางที่ 4.16 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบจากข้าวแดงในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

Tested microorganisms	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>P. acnes</i> DMST 14916	0.39	0.78
<i>Stap. epidermidis</i> TISTR 518	0.78	1.56
<i>Stap. aureus</i> TISTR 1466	50	100

3.5 ผลคุณสมบัติของสารก่อนการพัฒนาผลิตภัณฑ์

การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดก่อนนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์หรือตั้งตำรับนั้นจะใช้สภาวะในการทดสอบ คือ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และการเกิด oxidation ของสาร พบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความคงตัวได้ 50 % ขึ้นไป ได้แก่สภาวะความเป็นกรด (58.78 %) และการเกิด oxidation (58.78 %) ในสภาวะของอุณหภูมิ 80 °C และความเป็นด่างสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะมีความคงตัวต่ำ ในขณะที่สาร monacolin มีความคงตัวในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง และการเกิด oxidation ได้ 100 % แต่มีความคงตัวในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 80 °C ได้ 90 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4.17)

ตารางที่ 4.17 คุณสมบัติความคงตัวของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความคงตัวของสาร monacolin K ต่อการทดสอบทางกายภาพ

Secondary compounds	Remaining value (%)				
	Before treated	Temperature degradation (80 °C, 3 h)	Acid hydrolysis	Alkaline hydrolysis	Oxidation
Antioxidant activity	100	32.45	58.78	32.05	50.05
Monacolin K	100	90	100	100	>100

การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากการหมักรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ที่กลายด้วยปลายข้าวชัณษาทและปลายข้าวสาลิในกล่องหมักขนาด 7 ลิตร ใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน ก่อนนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์หรือตั้งตำรับ พบว่า สารสกัดหยาบมีความคงตัวกับการเกิด oxidation 100 % ต่อการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิด รองลงมาคือมีความคงตัวต่อความเป็นกรดได้มากกว่า 90 % ต่อการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิด และมีความคงตัวต่ออุณหภูมิ 80 °C ได้ 100 % ยกเว้นต่อการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 (79.3 %) สารสกัดหยาบมีความคงตัวมากกว่า 80 % ยกเว้นความคงตัวของสารต่อ *Stap. aureus* TISTR 1466 สามารถคงตัวได้ 100 % (ตารางที่ 4.18)

ตารางที่ 4.18 คุณสมบัติความคงตัวของสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อการทดสอบทางกายภาพ

Parameter Tested microorganisms	Remaining value (%)				
	Before treated	Temperature degradation (80 °C, 3 h)	Acid hydrolysis	Alkaline hydrolysis	Oxidation
<i>P. acnes</i> DMST 14916	100	79.3	100	86.2	>100
<i>Stap. epidermidis</i> TISTR 518	100	100	100	88.6	>100
<i>Stap. aureus</i> TISTR 1466	100	100	96.2	100	>100

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกวัสดุหมักและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิโดยใช้การทดลองแบบผสม mixture design โดยใช้วัสดุหมัก 3 ชนิด ได้แก่ ปลายข้าวเจ้าชัณษาท ปลายข้าวสาลี และปลายข้าวหอมนิลด้วยพื้นผิวตอบสนองต่อการสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สาร monacolin และสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อสิว 3 ชนิด ได้แก่ *P. acnes* DMST 14916, *Stap. epidermidis* TISTR 518 และ *Stap. aureus* TISTR 1466 พบว่า ให้ค่าการทำนายอัตราส่วนของ สับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ ปลายข้าวเจ้าชัณษาทและ ปลายข้าวหอมนิลในอัตราส่วน 0.34 : 0.66 และให้ค่าการทำนายอัตราส่วนของสับสเตรทที่เหมาะสม ในการผลิตสาร monacolin คือปลายข้าวชัณษาทและปลายข้าวสาลีในอัตราส่วน 0.33:0.67 สารที่มี ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สูงสุดคือปลายข้าวชัณษาทและปลายข้าวสาลีให้ค่าอัตราส่วนต่อการยับยั้งเชื้อแต่ละ ชนิดแตกต่างกัน ได้แก่ได้แก่ *P. acnes* DMST 14916, *Stap. epidermidis* TISTR 518 และ *Stap. aureus* TISTR 1466 ในอัตราส่วน 0.5 : 0.5, 0.14 : 0.86 และ 0.77 : 0.23 ตามลำดับ และเมื่อนำ ค่าอัตราส่วนของสับสเตรทมาทำการทดลองเพื่อทวนสอบพบว่า ให้ค่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสาร monacolin เท่ากับ 420.27 ± 9.67 mg trolox / g DW และ 445.52 mg/kg ตามลำดับ ให้ค่ายับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่ *P. acnes* DMST 14916, *Stap. epidermidis* TISTR 518 และ *Stap. aureus* TISTR 1466 เท่ากับ 7.36 ± 3.06 , 6.50 ± 0.58 และ 5.77 ± 4.07 mm ตามลำดับ เมื่อทำการ ขยายขนาดของกระบวนการหมักข้าวแดงโดยเพาะเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาดความจุ 7 ลิตร ที่มี ปริมาณปลายข้าวในอัตราส่วนที่เหมาะสมในปริมาณทั้งหมด 300 กรัม พบว่า ให้ค่าสารที่มีฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ และสาร monacolin เท่ากับ 705.07 ± 8.85 mg trolox / g DW และ 719.87 mg/kg ตามลำดับ ให้ค่ายับยั้งแบคทีเรีย *P. acnes* DMST 14916, *Stap. epidermidis* TISTR 518 และ *Stap. aureus* TISTR 1466 เท่ากับ 16.00 ± 3.06 , 5.00 ± 0.58 และ 7.66 ± 4.07 mm ตามลำดับ ค่า ความคงตัวของสาร monacolin และสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ต่อสภาวะ อุณหภูมิ 80°C ความเป็นกรด-ด่าง และการเกิด oxidation มีความคงตัวสูงกว่า 80 % อย่างไรก็ตาม สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความคงตัวสูงกว่า 50 % ในสภาวะความเป็นกรด และการเกิด oxidation ยกเว้น ในสภาวะของอุณหภูมิ 80°C และความเป็นด่างจะมีความคงตัวต่ำ (ตารางที่ 5.1, 5.2 และ 5.3)

ตารางที่ 5.1 สรุปการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและ total phenolic จากการหมัก *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ที่กลายด้วยปลายข้าวในอัตราส่วนที่เหมาะสมในพลาสติกและกล่องหมักขนาด 7 ลิตร ใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

Experiment	Ratio of substrates		Antioxidant activity		Total phenolic (mg gallic acid / g DW)
	Chai Nart Broken Rice	Hom Nin Broken Rice	FRAP (mg trolox / g DW)	EC ₅₀ (g substrate / g DPPH)	
Flask	17	33	420.27±9.67	26.98±0.08	1469.27±23.65
Box	102	198	705.07±8.85	28.75±0.82	1895.51±35.65

ตารางที่ 5.2 สรุปการผลิตสารต้าน Monacolin K จากการหมัก *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ที่กลายด้วยปลายข้าวในอัตราส่วนที่เหมาะสมในพลาสติกและกล่องหมักขนาด 7 ลิตร ใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

Experiment	Ratio of substrates		Monacolin (mg/kg)
	Chai Nart Broken Rice	Wheat Broken Rice	
Flask	16.4	33.6	445.52
Box	99	201	719.87

ตารางที่ 5.3 สรุปการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากการหมัก *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ที่กลายด้วยปลายข้าวในอัตราส่วนที่เหมาะสมในพลาสติกและกล่องหมักขนาด 7 ลิตร ใช้เวลาเพาะเลี้ยงนาน 14 วัน

Experiment	Ratio of substrates		Antimicrobial activity ^a (mm)		
	Chai Nart Broken Rice	Wheat Broken Rice	<i>P. acnes</i> DMST 14916	<i>Stap. aureus</i> TISTR 1466	<i>Stap. epidermidis</i> TISTR 518
Flask	16.4	33.6	7.36	6.50	5.77
Box	99	201	16.00±3.06	5.00±0.58	7.66±4.07
			0.39 (MIC)	0.78 (MIC)	50 (MIC)
			0.78 (MBC)	1.56 (MBC)	100 (MBC)

5.2 อภิปรายผล

5.2.1 การคัดเลือกวัสดุหมักและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิโดยใช้การทดลองแบบผสม mixture design ในระดับฟลาสก์และในระดับกล่องขนาด 300 กรัม

จากการคัดเลือกวัสดุหมักและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิโดยใช้การทดลองแบบผสม mixture design โดยใช้วัสดุหมัก 3 ชนิด ได้แก่ ปลายข้าวชัณษาท ปลายข้าวสาลี และปลายข้าวสีนิล ด้วยพื้นผิวตอบสนองต่อการสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สาร monacolin และสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของสิว ได้แก่ *P. acnes* DMST 14916 *Stap. epidermidis* TISTR 518 และ *Stap. aureus* TISTR โดยทำการหมักในระดับฟลาสก์และในระดับกล่องขนาด 300 กรัม

5.2.2.1 ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ

จากการคัดเลือกวัสดุหมักและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิโดยใช้การทดลองแบบผสม mixture design โดยใช้วัสดุหมัก 3 ชนิด ได้แก่ ปลายข้าวชัณษาท ปลายข้าวสาลี และปลายข้าวสีนิล ด้วย *Monascus purpureus* IFRPD 4046 โดยใช้พื้นผิวตอบสนองต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ให้ค่าการทำนายอัตราส่วนของสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ ปลายข้าวเจ้าชัณษาทและปลายข้าวสีนิล ในอัตราส่วน 0.34:0.66 โดยไม่ใช้ปลายข้าวสาลี ให้ค่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 668.18 ± 16.35 mg trolox / g DW ในวันที่ 14 ของการทดลอง ซึ่งการที่รา *M. purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลายไม่ใช้ปลายข้าวสาลีในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากมีรายงานของ Domínguez-Espinosa & Webb (2003) พบว่า การผลิตสารสีจะสามารถผลิตได้ดีเมื่อใช้สับสเตรทในการหมักจะใช้แป้งข้าวสาลีที่ปราศจาก gluten ที่ความเข้มข้น 3-5 % ดังนั้นสาร gluten ที่พบในปลายข้าวสาลีจึงมีผลกับการผลิตสารสีและสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มมาจากปลายข้าวสีนิลด้วยเนื่องจากปลายข้าวสีนิลจะให้ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (28.64 ± 3.07 mg trolox / g DW) สูงกว่าปลายข้าวชัณษาท (0.29 ± 0.01 mg trolox / g DW) และปลายข้าวสาลี (22.20 ± 2.19 mg trolox / g DW) เมื่อทำการขยายขนาดของกระบวนการหมักข้าวแดงเป็นขนาด 300 g โดยเฉพาะเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาดความจุ 7 ลิตร ที่มีปริมาณปลายข้าวเจ้าชัณษาทและปลายข้าวสีนิลในอัตราส่วน 0.34:0.66 ระยะเวลาการหมักเป็น 14 วัน พบว่าให้ค่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและค่า EC₅₀ เท่ากับ 705.07 ± 8.85 mg trolox / g DW และ 28.75 ± 0.82 สูงกว่าการหมักในฟลาสก์ ให้ปริมาณ total phenolic เท่ากับ การที่ประสิทธิภาพของข้าวแดงเพิ่มขึ้นนี้อาจเกิดจากกระบวนการหมักของเชื้อ *M. purpureus* สามารถเติบโตได้ดีขึ้นมี enzymatic reaction เพิ่มขึ้น ทำให้สาร bioactive compound ที่อยู่ในวัตถุดิบตั้งต้นโดยเฉพาะข้าวหอมนิล มี

ประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับสาร second metabolite อย่าง Monacolin K มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง (Wang et al., 2003)

5.2.2.3 ผลิตสาร Monacolin K

จากการคัดเลือกวัสดุหมักและปริมาณวัสดุหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิโดยใช้การทดลองแบบผสม mixture design ด้วยพื้นผิวตอบสนอง พบว่าอัตราส่วนของสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตสาร monacolin K สูงสุด คือ ปลายข้าวชัยนาทและปลายข้าวสาลีในอัตราส่วน 0.33:0.67 ไม่ใช้ปลายข้าวหอมมะลิ ให้ค่าสาร monacolin K 445.52 mg/kg (0.445 mg/g หรือ 4.45 mg %) ในระดับการหมักในพลาสติก แต่เมื่อขยายขนาดจาก 50 g มาเป็น 300 g พบว่าให้สาร monacolin K เพิ่มขึ้น 60.58 % (719.87 mg / kg) โดยมีปริมาณความชื้นของข้าวเริ่มต้นที่ 41.99% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Busaba, et al (2000) ที่กล่าวว่า การหมักข้าวแดงที่มีความชื้นระหว่าง 38–43% เชื้อรา *Monascus* sp. จะสามารถสร้างเอนไซม์ glucoamylase ได้สูงทำให้มีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้น เชื้อราสามารถนำไปใช้ในการผลิตสารสีและสารเมตาโบไลต์ต่างๆได้ดี ถ้าความชื้นเริ่มต้นในการหมักต่ำเกินไปเชื้อราก็จะเจริญเติบโตไม่ได้

จากผลการผลิตสาร monacolin K ที่ได้ (719.87 mg / kg) จะมีปริมาณสูงกว่าจากรายงานของ Kim et al. (2010) ที่สามารถผลิตปริมาณ active monacolin K จากการหมัก *Monascus pilosus* ด้วยข้าวได้ 5.48 mg % แต่การผลิตสาร monacolin K จากการหมักรำข้าวด้วย *Monascus pilosus* KCCM60084 จะให้ปริมาณสาร monacolin K มากกว่า (2.88 mg/g) (Cheng et al., 2016) และ รายงานของ Pengnoi et al. (2017) ที่หมักด้วยข้าวดอยมูเซอโดยรา *Monascus purpureus* CMU002 สายพันธุ์กลายจะให้ monacolin K มากกว่าเช่นกัน (13 482 ppm)

สารสำคัญเพิ่มขึ้นเนื่องจากปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Monascus purpureus* ในการหมักก็คือเรื่องของอากาศ เมื่อขยายการผลิตมาใช้กล่องที่ใหญ่ขึ้นทำให้มีพื้นที่ในการแลกเปลี่ยนออกซิเจนได้มากกว่าการหมักในพลาสติก เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดีทำให้การผลิตสารเมตาโบไลต์ Monacolin K ได้สูงขึ้น

5.2.2.4 ผลิตสารต้านแบคทีเรีย

สารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สูงสุด คือ ปลายข้าวเจ้าชัยนาทและปลายข้าวสาลี ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของเชื้อ เนื่องจากในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากข้าวแดงจะต้องเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดอะมิโน peptides หรือ proteins สำหรับในการหมักแบบแห้งจะเพาะเลี้ยงใน ข้าว ข้าวสาลีหรือข้าวบาร์เลย์ (Martinková et al., 1995) นอกจากนี้กรดอะมิโน L-tyrosine ที่ความเข้มข้น 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ และ L-phenylalanine ที่ความเข้มข้น 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ใช้เพาะเลี้ยง *Monascus* sp. KCCM 1009 จะสามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ดีที่สุด (Kim

et al., 2006) ดังนั้นปลายข้าวสาสีจะให้สารโปรตีนกับรา *M. purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์ กลาย เนื่องจากปลายข้าวสาสีจะมีโปรตีนมากกว่าปลายข้าวขาวชัณนาท (Sirichokeorrakit et al., 2015) และมีกรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ lysine 2.74%, threonine 2.83%, phenylalanine 4.17%, isoleucine 3.42%, valine 3.90%, histidine 2.81%, glutamic acid 29.96%, proline 9.12%, glycine 3.59%, alanine 3.37%, and cysteine 1.57% (Xiao-ling et al., 2008) นอกจากนี้สารสกัดข้าวแดงจะมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดีที่สุด คือ แบคทีเรียแกรมบวก *P. acnes* DMST 14916 รองลงมาคือ *Stap. epidermidis* TISTR 518 และ *Stap. aureus* TISTR เมื่อขยาย ขนาดของกระบวนการหมักข้าวแดงโดยเพาะเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาดความจุ 7 ลิตร ที่มีปริมาณ ปลายข้าวในอัตราส่วนที่เหมาะสมในปริมาณทั้งหมด 300 กรัม พบว่าค่ายับยั้งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดจะ สูงกว่าการหมักในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร

ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Heng et al. (2009) ที่รายงานว่าสารสีข้าวแดงจาก *Monascus* sp. สายพันธุ์ Mg มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *E.coli* และ *S. aureus* ได้ และ รายงานของ Kumar et al. (2015) ที่พบว่า สารสกัดตรงควัตถุสีแดงด้วยเอทานอลที่ได้จากการหมัก *Monascus purpureus* ที่หมักด้วยข้าวมอลต์ จะผลิตสาร monascin A ที่ความเข้มข้น 80 % สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* (13mm), *B. subtilis* (12mm), *B. megaterium* (14mm) และ *Pseudomonas aeruginosa* (17.8mm) เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C ใช้เวลานาน 10 วัน ในขณะที่จากรายงานของ Dikshit & Tallapragada (2012) พบว่าสารสกัดข้าวแดงจาก *Monascus purpureus* MTCC 410 และ *M. sanguineus* มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้สูงให้ค่าการยับยั้งบริเวณ ใสเท่ากับ 85.4 mm และ 112.05 mm ตามลำดับ จากผลการทดลองจะพบว่าเวลาการหมักนานขึ้น ปริมาณสารสีจะเพิ่มขึ้น ซึ่งสารสีที่ผลิตเพิ่มมากขึ้นจะมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีขึ้นสอดคล้องกับรายงานของ Heng et al. (2009) พบว่า สารสีข้าวแดงจาก *Monascus* sp. สายพันธุ์ Mg มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *E.coli* และ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้นของสารสีข้าวแดงเท่ากับ 0.9 U/ml และจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเพิ่มมากขึ้นถ้าเพิ่มปริมาณสารสีข้าวแดงเพิ่มขึ้น (3.6 U/ml)

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าได้ว่าปลายข้าวชัณนาทเป็นสับสเตรทที่จำเป็นต้องใช้ใน ทั้ง 3 ชนิดของปลายข้าว การผลิตสารเนื่องจากข้าวเหมาะสมในการเจริญของ *M. purpureus* และ ผลิตตรงควัตถุได้มากกว่าสับสเตรทอื่น ได้แก่ ข้าวกล้องเมล็ดธัญพืชข้าวฟ่าง เมล็ดธัญพืชข้าวฟ่าง ข้าวโพด และรำข้าวฟ่าง เป็นต้น (Srianta et al., 2016) นอกจากนี้ปลายข้าวหอมนิลจะช่วยเพิ่มสาร ต้านอนุมูลอิสระและสาร total phenolic และ ปลายข้าวสาสีจะช่วยในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ และสาร monacolin เนื่องจากมีโปรตีนและกรดอะมิโนสูง

5.2.2 คุณสมบัติของสารสกัดก่อนการพัฒนาผลิตภัณฑ์

การทดสอบ คือ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และการเกิด oxidation ของสาร พบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความคงตัวได้ 50 % ขึ้นไป ได้แก่สภาวะความเป็นกรด (58.78 %) และ

การเกิด oxidation (58.78 %) ในสภาวะของอุณหภูมิ 80 °C และความเป็นด่างสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะมีความคงตัวต่ำ ในขณะที่สาร monacolin มีความคงตัวในสภาวะความเป็นกรด-ด่างและการเกิด oxidation ได้ 100 % แต่มีความคงตัวในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 80 °C ได้ 90 % ตามลำดับ สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิด ไม่เสื่อมสภาพเมื่อเกิดการ oxidation และที่อุณหภูมิ 80 °C สารสกัดหยาบไม่เสื่อมสภาพยกเว้นต่อการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 มีความคงตัวของสารในความเป็นกรดได้มากกว่า 90 % ต่อการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับ Velmurugan et al. (2011) ที่พบว่า สารสีของ *Monascus* จะคงอยู่ในช่วง pH 5, 6 และ 7 ที่ pH ความเป็นกรด (pH 1-4) สีจะหายไป สีจะเปลี่ยนไปเมื่อมีความเป็นเบส (pH 8-14) สารสีของ *Monascus* จะมีสีน้ำตาลที่ pH 8 สีส้มที่ pH 9 มีสีเหลืองที่ pH 10 และมีสีแดงที่ pH 14 สารสีจะคงที่เมื่อมี sodium chloride และ ammonium chloride ได้สูงถึง 0.5% (w/v) เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 12 h จะทำให้สีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล นอกจากนี้สารสีของ *Monascus* จะคงอยู่ 92 ถึง 98 % หลังจากเก็บที่ 4 °C นาน 3 เดือน และรายงานของ Subsaendee et al. (2014) ที่พบว่าข้าวแดงหมักที่มีสารสีและ monacolin K พบว่ามีความคงตัวเมื่อให้อุณหภูมิที่ความร้อน 100 °C นาน 30 นาที อบที่ 50 °C นาน 1 คืน และเก็บในตู้เย็น (2-4 °C) นาน 1.5 เดือน

5.3 ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

จากผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไปได้ และการสร้างสาร monacolin ได้ในปริมาณมากสามารถนำไปใช้ในการเติมในอาหารเพื่อเพิ่มคุณค่าทางยา เช่นเป็นสารลดคอเลสเตอรอล สารต้านการอักเสบ สารต้านมะเร็ง ได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ผสมในอาหารได้

5.4 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

พัฒนาผลิตภัณฑ์จากคุณสมบัติของสารที่พบในข้าวแดง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

กรมอนามัย (2548) ข้าว. Available from URL:

http://www.baanjomyut.com/library_2/extension-2/cereals/01_4.html, 15 August 2014

กรกต สุนทรกุล, สุกานดา วิจิตพันธ์ และ คณิต วิจิตพันธ์. 2012. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคสาโทแดงที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำ. Graduate Research Conference. p 410-418.

ประโยชน์ต่อทคอม. (2114). ข้าวสาลี. Available from URL:

<http://prayod.com/%E0%B8%82%E0%B9%89%E0%B8%B2%E0%B8%A7%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A5%E0%B8%B5-wheat/>, Aug 15, 2014.

ไทยโพสต์. 2553. ข้าวสีนิลช่วยป้องกันมะเร็ง: Online: อังคาร 14 กันยายน 2553.

เสาวนิตย์ ขอบบุญม นฤมล อิศวเกษตรนิ และ พัชรี หล่งหม่าน. การศึกษาประสิทธิภาพของรา *Monascus sp.* LC1. วารสารการมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. 4(1): 10-15.

หน่วยบริการฐานข้อมูลสมุนไพร. (2009). โปรตีนจากข้าวสาลี (wheat gluten hydrolysate) ลดการบาดเจ็บของกล้ามเนื้อ. Available from URL:

<http://soclaimon.wordpress.com/2012/03/10/โปรตีนจากข้าวสาลี-wheat-gluten-hydrolysate-ลด/>, August 15 2014.

อรอนงค์ นัยวิกุล. (2540). ข้าวสาลี. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

บรรณานุกรมภาษาอังกฤษ

Abdel-Aal, E.M., Young, J.C. & Rabalski, I. (2006) Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4696-4704.

Adom, K. K., & Liu, R. H. 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6182-6187.

Bunoy, A., Saenphet, K., Lumyong, S., Saenphet, S., & Chomdej, S. (2017). *Monascus purpureus*-fermented Thai glutinous rice reduces blood and hepatic cholesterol and hepatic steatosis concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 15(88), 1-11.

- Cheng, J., Choi, B.-K., Yang, S.H. & Suh, J.-W. (2016). Effect of fermentation on the antioxidant activity of rice bran by *Monascus pilosus* KCCM60084. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 59(1), 57-62.
- Dikshit, R. & P. Tallapragada. 2012. Comparative study of *Monascus sanguineus* and *Monascus purpureus* as potential sources for red pigment production. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 3(4): 885-895.
- Domínguez-Espinosa, R. M. & Webb, C. (2003). Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19(3), 329-336.
- Ferdes, M., Ungureanu, C., Radu, N., & Chirvase, A.A. (2009). Antimicrobial effect of *Monascus purpureus* red rice against some bacterial and fungal strains. Available from URL: https://www.researchgate.net/publication/237207951_Antimicrobial_effect_of_Monascus_purpureus_red_rice_against_some_bacterial_and_fungal_strains, 6 October 2017.
- Haque, M. A., Kachrimanidou, V., Koutinas, A., & Lin, C. S. K. (2016). Valorization of bakery waste for biocolorant and enzyme production by *Monascus purpureus*. *Journal of Biotechnology*. 231, 55-64.
- Heng, H. J., Y. Yan, X.X. Bo, L. Jie & J.D. Hua. (2009). *Journal of Shanghai Jiaotong University Agricultural Science*. 27(4): 363-367.
- Htwe, N., Srilaong, V., Tanprasert, K., Uthairatanakij, A. & Kanlayanarat, S. (2009) "Characterization of bioavailability compounds in black and red pigmented rice cultivars in Thailand." *Acta Hort*, 837.
- Hyum, J. W. & Chung, H. S. (2004). Cyanidin and malvidin from *Oryza sativa* cv. Heugjinjubyeo mediate cytotoxicity against human monocytic leukemia cells by arrest of G2/M phase and induction of apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 13: 590-594.
- Jamaluddin, A., Razak, D.L.A., Rashid, N.Y.A., Sharifudin, S.A., Kahar, A.B., Saad, A.Z.M. & Long, K. (2015). Effects of solid state fermentation by *Monascus purpureus* on phenolic content and biological activities of coconut testa and rice bran. *Journal Teknologi*. 78(11-2), 23-28.
- Kim, J.-W., Lee, S.- Il, Kim, S.-H., Lee, Y.-K. & Kim, S.-D. (2010). Antioxidative and antimicrobial activities of *Monascus pilosus* (Corn Silage Mold) mycelial extract and its culture filtrate. *The Korean Society of Food Preservative*. 17(5), 741-751.

- Kim, C., Jung, H., Kim, Y. O. & Shin, C. S. (2006). Antimicrobial activities of amino acid derivatives of *Monascus* pigments. *FEMS Microbiology Letters*. 246, 117-124.
- Kitisin, T., Saewan, N. & Luplertlop, N. (2015). Potential anti-inflammatory and anti-oxidative properties of Thai colored-rice extracts. *Plant Omics Journal*. 8(1), 69-77.
- Kumar, A., Verma, U. & Sharma, H. (2015). Antibacterial activity *Monascus purpureus* (red pigment) isolated from rice malt. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*. 1(3), 252-255.
- Martínková, L., Juzlová, P. & Vesely, D. (1995). Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *Journal of Applied Microbiology*. 79(6), 609-616.
- Nam, S.H., Choi, S.P., Kang, M.Y., Koh, H.J., Kozukue, N., & Friedman, M. (2006). Antioxidant activities of bran from twenty one pigmented rice cultivars. *Food Chemistry*. 94: 613-620.
- Park, H.-J. & Kim, I-S. (2011). Antioxidant activities and anticancer effects of red yeast rice grown in the medium containing garlic. *Food Science Biotechnology*. 20(2), 297-302.
- Patakova, P. (2013). *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 40: 169-181.
- Pengnoi, P., Mahawan, R., Khanongnuch, C., & Lumyong, S. (2017). Antioxidant properties and production of monacolin K, citrinin, and red pigments during solid state fermentation of purple rice (*Oryzae sativa*) varieties by *Monascus purpureus*. *Food Chemistry and Safety*. 35(1), 32-39.
- Peterson, L.R. & Shanholtzer, C. J. (1992). Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews*. 5(4), 420-432.
- Pourshirazi, M., Esmaelifar, M., Aliahmadi, A., Yazdian, F., Zarami, A.S.H., Ashrafi, S.J. (2014). Antioxidant and Anticancer Activities of Ethanolic Extract from *Monascus purpureus*. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 1(9), .
- Rajeswari, T.R., Ponnusami, V. & Sugumaran, K.R. (2014). Production of *Monascus* pigment in low cost fermentation. *International Journal of Chemistry Technology Research*. 6(5): 2929-2932.
- Sadabpod, K., Kangsadalampai, K. & Tongyonk, L. (2010). Antioxidant activity and antimutagenicity of Hom Nil rice and black glutinous rice. *Journal of Health Research*. 24(2), 49-54.

- Shi, Y.-C., & Pan, T.-M. (2011). Beneficial effects of *Monascus purpureus* NTU 568-fermented products: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 1207-1217.
- Singha, N., Goel, G., Singha, N., Pathak, B. K., & Kaushik, D. (2015). Modeling the red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 by Artificial Neural Network using rice water based medium. *Food Bioscience.* 17-22.
- Sirichowarrakit, S., Intasen, P. & Angkawat, C. (2016). Quality of donut supplemented with Hom Nin rice flour. *Food and Biotechnological Engineering.* 10(7), 443-446.
- Sirichowarrakit, S., Juthamat, P., & Anantachai, K. (2015). Effect of partial substitution of wheat flour with riceberry flour on quality of noodles. *Procedia-Social and Behavioral Science.* 197, 1006-1012.
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Yamada, M., & Harijono. (2016). Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 7, 181-186.
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Iuchi, Y., Harijono & Yamada, M. (2017). Antioxidant activity of pigments derived from *Monascus purpureus*-fermented rice, corn, and sorghum. *International Food Research Journal.* 24(3), 1186-1191.
- Subhasree, R.S., P.D. Babu, R. Vidyakshmi & C. Mohan. (2011). Effect of carbon and nitrogen sources on stimulation of pigment production by *Monascus purpureus* on jackfruit seeds. *International Journal of Microbiological Research.* 2(2): 184-187.
- Subsaendee, T., Kitpreechavanich, V. & Yongsmith, B. (2014). Growth, glucoamylase, pigments and monacolin K production on rice solid culture in flask and koji chamber using *Monascus* sp. KB9. *Chiang Mai Journal of Science.* 41(5.1), 1044-1057.
- Tananuwong, K., & Tewarut, W. (2010). Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice. *LWT - Food Science and Technology.* 43, 476-481.
- Velmurugan, P., H. Hur, V. Balachandar, S. Kamala-Kannan, K.-J. Lee, S.-M. Lee, J.-C. Chae, P. J. Shea, & B.-T. Oh. (2011). *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 112(6): 590-594.
- Wang, J., Lee, C. and Pan, T. 2003. Improvement of monacolin K, γ -aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601. *J. Ind. Microbial. Biotechnol.* 30: 669-676.

- Wang, J., Lee, C.L., & Pan, T.M. 2004. Modified mutation method for screening low citrinin producing strains of *Monascus purpureus* on rice culture. *J. Agric. Food. Chem.* 52: 6977-6982.
- Velmurugan, P., Hur, H., Balachandar, V., Kamala-Kannan, S., Lee, K.J., & Lee, S.M. (2011). *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 112, 590-594.
- Vendruscolo, F., Bühler, R.M.M., de Carvalho, C.J., de Oliveira, D., Moritz, D.E., Schmidell, W. & Ninow, J.L. 2016. *Monascus*: a reality on the production and application of microbial pigments. *Applied Biochemistry Biotechnology.* 178:211-223.
- Vendruscolo, F., Tosin, I., Giachini, A. J. & Ninow, J. L. (2014). Antimicrobial activity of *M onascus* pigments produced in submerged fermentation. *Journal of Processing and Preservative.* 38(4), 1860-1865.
- Zhao, C., M. Giusti, M.M., Malik, M., Moyer, M.P., & Magnuson, B.A. (2004). Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6122 – 6128.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ 1 การคัดเลือกวัสดุหมักที่เหมาะสมปริมาณสารฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของข้าวหมัก
แดงที่ หมักด้วยรา *Monascus purpureus* IFRPD 4046 สายพันธุ์กลาย

Time (day)	Antioxidant activity equivalent Trolox (mg trolox / g DW)						
	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Run 6	Run 7
0	0.29±	22.20±2.19	28.64±3.07	0.30±0.02	21.48±6.42	16.70±2.50	24.91±7.57
2	2.71±0.01	23.02±3.56	47.02±3.53	45.75±9.19	48.48±12.73	85.35±11.02	58.95±11.36
4	136.55±0.26	70.66±11.47	89.19±2.96	31.02±4.89	63.99±14.33	60.67±6.72	65.56±7.17
6	129.44±11.67	139.09±13.23	104.29±2.46	121.70±10.05	219.25±71.05	69.20±7.52	38.54±4.89
8	248.97±12.64	198.87±17.83	237.95±10.70	260.83±28.33	394.25±48.66	188.92±14.19	225.21±22.29
10	314.54±29.26	200.41±15.43	159.79±19.27	365.75±8.59	431.13±37.94	219.55±23.80	248.99±45.35
12	365.77±13.51	233.05±14.38	370.13±22.89	245.77±8.45	387.80±11.62	171.36±10.70	211.98±21.33
14	448.53±10.11	248.94±11.32	434.89±22.68	281.06±30.75	408.18±23.34	189.64±26.84	332.57±28.56
15	376.25±	301.42±6.54	470.69±24.23	147.34±33.91	650.78±26.71	192.46±19.06	214.49±15.47

หมายเหตุ: Run1 = Chai Nart Broken Rice, Run2 = Wheat Broken Rice, Run3 = Homin Broken Rice, Run4 = Chai Nart Broken Rice and Wheat Broken Rice, Run5 = Chai Nart Broken Rice and Homin Broken Rice, Run6 = Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice, Run7 = Chai Nart Broken Rice, Wheat Broken Rice and Homin Broken Rice

ตารางผนวกที่ 4.11 คุณสมบัติความคงตัวของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความคงตัวของสาร
monacolin K ต่อการทดสอบทางกายภาพ

Parameter	Before Treat	After Treat			
		Temperature	Acid	Alkaline	Oxidation
Antioxidant activity (mg trolox / g DW)	635.86 ± 16.01	429.49 ± 72.48	262.10 ± 25.07	432.07 ± 30.22	317.61 ± 29.77

ประวัติผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ: ดร. ศรีสุดา หาญภาคภูมิ
(Dr. Srisuda Hanpakphoom)
เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3341600396587
บทบาทของนักวิจัย: ดำเนินงาน และสรุปวิเคราะห์ผลการวิจัย
รวมทั้งเตรียมต้นฉบับการตีพิมพ์
สัดส่วนที่ทำการวิจัย: 60%
หน่วยงาน: หลักสูตรวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
โทรศัพท์: 092-2781455
e-mail: srisuda_han@hotmail.com

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัยที่ 1

ชื่อ: นางวนิดา ชิตีธรรมกุล (นักวิจัย)
เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3100500451234
บทบาทของนักวิจัย: สรุปวิเคราะห์ผลการวิจัย
รวมทั้งเตรียมต้นฉบับการตีพิมพ์
สัดส่วนที่ทำการวิจัย: 20%
หน่วยงาน: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ฝ่ายโภชนาการและสุขภาพ
โทรศัพท์: 02 942 8629 ต่อ 605
e-mail: ifrwnd@ku.ac.th

3. ผู้ร่วมโครงการวิจัยที่ 2

ชื่อ: นายประมวล ทรายทอง (นักวิจัย)
เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน :38105001255535
บทบาทของนักวิจัย: สรุปวิเคราะห์ผลการวิจัย
รวมทั้งเตรียมต้นฉบับการตีพิมพ์
สัดส่วนที่ทำการวิจัย: 15%
หน่วยงาน: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์

โทรศัพท์: 02 942 8629 ต่อ 411 / 416
 e-mail: ifrmlb@ku.ac.th

4. นักวิจัยรุ่นใหม่

ชื่อ: เรืออากาศเอกหญิงชุตินา ทองวชิระ
 (Flt.Lt. Chutima Thongwachira)
 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3539800028234
 บทบาทของนักวิจัย: สรุปรวิเคราะห์ รวมทั้งเตรียมต้นฉบับการตีพิมพ์
 สัดส่วนที่ทำการวิจัย: 5%
 หน่วยงาน: คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
 โทรศัพท์: 02-2439471
 e-mail: ctchutima@gmail.com

5. ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ชื่อ: นางมาลัย เมืองน้อย (Mrs. Malai Muangnoi)
 ตำแหน่ง: นักวิจัย เชี่ยวชาญ (ข้าราชการบำนาญ)
 ผู้ทรงคุณวุฒิพิเศษของสถาบันคั้นคว่ำและ
 พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
 ที่ปรึกษาศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร
 สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
 เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน ::38105001255535
 บทบาทของนักวิจัย: ตรวจสอบผลการวิจัย ตรวจสอบต้นฉบับการตีพิมพ์
 หน่วยงาน: สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 ฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์
 โทรศัพท์: 02 942 8629 ต่อ 411 / 416
 e-mail: ifrmlb@ku.ac.th