รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตถั่วเหลืองหมักที่ปลอดภัยและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ด้วยราโมแนสคัสเพื่อเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรและ สร้างขีดความสามารถในการแข่งขัน

ดร.เกตุการ ดาจันทา

ดร.อุทัยวรรณ ฉัตรธง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่สนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้และขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหารที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย

เกศุการ ดาจันทา

อุทัยวรรณ ฉัตรธง

มีนาคม 2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกราโมแนสคัสที่เหมาะสมในการหมักถั่วเหลืองให้มี monacolin K สูงและสาร citrinin ต่ำ หลังจากนั้นได้ศึกษากระบวนการหมักถั่วเหลืองที่เหมาะสมโดยบ่มถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 25 30 และการเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30 เป็น 25 องศาเซลเซียส ระหว่างการหมัก นาน 20 วัน ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในถั่วเหลืองหมักได้แก่ รงควัตถุ, monacolin K, citrinin, phenolic compounds และ isoflavones นอกจากนี้ยังได้ตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical-scavenging effect และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) ในถั่วเหลืองหมักอีกด้วย ผลการศึกษาพบว่าถั่วเหลืองที่หมักด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 มีปริมาณของสาร monacolin K สูงที่สุด (29.98 mg/kg DM) เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PSRU05, PSRU08 และ PSRU10 (6.83 – 17.76 mg/kg DM) และพบ citrinin ในปริมาณต่ำ

สำหรับการศึกษากระบวนการหมักพบว่าถั่วเหลืองที่หมักด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน มีปริมาณของรงควัตถุและ phenolic compounds สูงที่สุด และถั่วเหลืองที่หมักนาน 15 วันมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน DPPH radical-scavenging effect และ FRAP เพิ่มขึ้นสูงกว่าการบ่มถั่วเหลืองที่อุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ตรวจพบปริมาณรงควัตถุและสมบัติการต้านออกซิเดชันสูงกว่าถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ปริมาณของสาร isoflavones รวม (daidzin+glycitin+genistin+daidzein+glycitein+genistein) ในถั่วเหลืองหมักอบแห้งทั้ง 3 อุณหภูมิมีค่าไม่แตกต่างกัน สาร isoflavones ที่พบในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสเกือบทั้งหมดเป็นชนิด aglucosides โดยพบ daidzein มากที่สุด (ร้อยละ 53-54 ของ isoflavones รวม) รองลงมาคือ genistein (ร้อยละ 36-38 ของ isoflavones รวม) และ glycitein (ร้อยละ 10 ของ isoflavones รวม)

ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่ผลิตด้วยสภาวะที่เหมาะสมและผ่านการอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส มีปริมาณของสาร monacolin K และ citrinin 38.87 และ 1.60 mg/kg DM ตามลำดับ งานวิจัยนี้พบว่ารา *Monascus* sp. PSRU03 มีศักยภาพในการนำมาผลิตถั่วเหลืองหมักที่อุดมด้วยสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด อย่างไรก็ตามการนำถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสไปใช้ประโยชน์นั้นควรมีการตรวจสอบด้านความปลอดภัยจากสารพิษ citrinin ร่วมด้วย

คำสำคัญ: โมแนสคัส, ถั่วเหลือง, ถั่วเหลืองหมัก, สารสี, แอนตีออกซิแดนต์, โมนาโคลิน, ซิตรินิน

Abstract

This study aims to screen the suitable *Monascus* fungus that can ferment soybeans with high monacolin K content and low citrinin production. The optimal fermenting process for *Monascus*-fermented soybeans using the incubation temperatures at 25, 30°C or two-step temperature-shift cultivation for 20 days were also studied. The quantities of bioactive components (pigments, monacolin K, citrinin, phenolic compounds and isoflavones) and antioxidant activities as evaluated by DPPH radical-scavenging effect and ferric reducing antioxidant power (FRAP) were also determined. The results found that the soybeans fermented by *Monascus* sp. PSRU03 showed the highest monacolin K content (29.98 mg/kg DM) when compared to those fermented by PSRU05, PSRU08, and PSRU10 (6.83 – 17.76 mg/kg DM). In addition, a small amount of citrinin production was found in the samples fermented with PSRU03.

For the fermentation process, soybean fermented by *Monascus* sp. PSRU03 at 30°C for 20 days showed the highest content of pigments and total phenolic compounds. While antioxidant powers as determined by DPPH radical-scavenging activity and FRAP reached the significant level after 15 days of fermentation. Drying *Monascus*-fermented soybeans at 70°C provided better pigments and antioxidant properties than those dried at 50 and 60°C. Though, total isoflavones (daidzin + glycitin + genistin + daidzein + glycitein + genistein) were not significantly different in all drying temperatures. Most of isoflavones found in *Monascus*-fermented soybeans were aglucoside type with daidzein as the most abundant (53-54% proportion), followed by genistein (36-38% proportion) and glycitein (10% proportion).

At the optimum fermentation and drying conditions, the concentrations of monacolin K and citrinin in soy fermented products were 38.87 and 1.60 mg/kg DM, respectively. These results reveal that *Monascus* sp. PSRU03 is a potential strain, which can be used to produce fermented soybeans with high contents of health benefit components. However, safety concerns from citrinin content should be taken into account before utilization.

Keywords: *Monascus*, soybean, fermented soybean, pigments, antioxidant, monacolin, citrinin

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 แนวคิดทฤษฎีงานวิจัย	4
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	28
3.1 วัตถุดิบ	28
3.2 เชื้อจุลินทรีย์	28
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์	28
3.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	29
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล	29
3.6 ระเบียบวิธีวิจัย	29
ตอนที่ 1 การคัดเลือกสายพันธุ์ราโมแนสคัสที่สร้างสารพิษ citrinin ต่ำและสร้างสาร monacolin K สูง	29
ตอนที่ 2 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการหมักถั่วเหลืองด้วยราโมแนสคัส	31
ตอนที่ 3 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักราโมแนสคัสชนิดผง	33

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ตอนที่ 4 ฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการแปรรูปผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักราโมแนสคัสชนิดผง	34
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย	35
4.1 ผลการศึกษาสายพันธุ์ราโมแนสคัสที่สร้าง citrinin ต่ำและสร้าง monacolin K สูง	35
4.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการหมักถั่วเหลืองด้วยราโมแนสคัส	36
4.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิอบแห้งถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่เหมาะสมในการรักษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผง	43
4.4 การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส	50
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	52
5.1 สรุปผลการทดลอง	52
5.2 ข้อเสนอแนะ	55
บรรณานุกรม	56
ภาคผนวก	67
ประวัตินักวิจัย	97
การนำเสนอผลงานวิจัยทางวิชาการ	105

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณสารพิษ citrinin ที่สร้างจากราโมแนสคัสหลายสายพันธุ์	11
2.2	ผลของโซเดียมอะซิเตตที่มีต่อพีเอช การเจริญ การผลิตสี และค่าการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียต่อการหมักเชื้อ *M. purpureus*	11
2.3	สารเมตาบอไลต์ของราโมแนสคัส	13
2.4	ปริมาณของ citrinin, monacolin K และสารสีของเชื้อ *Monascus* ต่างสายพันธุ์	14
2.5	ผลของอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการหมักต่อการผลิตสีของ *M. kaoliang* เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน	15
2.6	ผลการแช่ข้าวในเวลาต่างๆ ต่อการผลิตสีของเชื้อ *M. kaoliang* ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	17
4.1	ปริมาณสาร citrinin และ monacolin ในถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อรา *Monascus* sp.	35
4.2	ค่า total phenolic compounds ในถั่วเหลืองระหว่างการหมักด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	39
4.3	ค่า DPPH radical-scavenging activity ในถั่วเหลืองระหว่างการหมักด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	41
4.4	ค่า Ferric reducing antioxidant power ในถั่วเหลืองระหว่างการหมักด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	42
4.5	ปริมาณรงควัตถุในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	43
4.6	สมบัติการต้านออกซิเดชันของถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	48

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของราโมแนสคัส: ถุงแอสคัส (a), แอสโคสปอร์ (b) และโคนิเดีย (c)	5
2.2	ลักษณะรงควัตถุภายในเส้นใย (a) และลักษณะโคโลนี (b) ของเชื้อ *Monascus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง	5
2.3	โครงสร้างทางเคมีของสาร monacolin K (a) monacolin J (b) monacolin M (c) monacolin X (d) และ monacolin L (e)	6
2.4	โครงสร้างทางเคมีของรงควัตถุจากโมแนสคัส: รงควัตถุสีแดง rubropunctatin (a) และ monascorubrin (b) รงควัตถุสีเหลือง monascin (c) และ ankaflavin (d) รงควัตถุสีส้ม rubropunctamine (e) และ monascorubramine (f)	8
2.5	โครงสร้างทางเคมีของสาร γ-aminobutyric acid	8
2.6	โครงสร้างทางเคมีของสาร dihydromonacolins L (a) และสาร dihydromonacolins MV (b)	9
2.7	โครงสร้างทางเคมีของ dimerumic acid	9
2.8	โครงสร้างทางเคมีของสาร citrinin	10
2.9	โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ propyl gallate (a), 3- butylated hydroxyanisole (b), 2-butylated hydroxyanisole (c), butylated hydroxytoluene (d), tertiary butyl hydroquinone (e)	21
2.10	การทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน	23
2.11	สูตรโครงสร้างของ isoflavones ที่พบในถั่วเหลือง	25
4.1	ลักษณะปรากฏของถั่วเหลืองหมัก *Monascus* sp. PSRU03 ที่อุณหภูมิ 25 (a) 30/25 (b) และ 30 องศาเซลเซียส (c) นาน 20 วัน	36
4.2	การเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุสีแดง (a) สีส้ม (b) และสีเหลือง (c) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองด้วย *Monascus* sp. PSRU03 ในสภาวะที่แตกต่างกัน	37
4.3	ชนิดและปริมาณสาร isoflavone glucosides และ aglucosides ในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่อบแห้งในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน	44

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.4	กระบวนการ deglycosylation เปลี่ยนรูปสาร isoflavone β-glucosides เป็น aglucosides โดยเอนไซม์ β-glucosidase	46
4.5	ปริมาณสาร isoflavone รวมในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่ผ่านการอบแห้งในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน	47
4.6	กระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่ปลอดภัยและมีคุณค่าทางโภชนาการจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย	49
4.7	ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่ผลิตจากกระบวนการที่คัดเลือกจากงานวิจัย	50
4.8	การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร	51
ก-1	กราฟมาตรฐานของ gallic acid	69
ก-2	กราฟมาตรฐานของ trolox	69
ก-3	HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน isoflavone daizin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein และ genistein	70
ก-4	HPLC chromatogram ของ isoflavone ในสารสกัดถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส	70
ก-5	HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน monacolin K และ citrinin	71
ก-6	HPLC chromatogram ของ monacolin K และ citrinin ในสารสกัดถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส	71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Monascus เป็นราที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหมักและมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากในระหว่างการเจริญของราได้มีการสร้างสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) หลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร monacolin K ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-Co A) ในขั้นตอนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย (Alberts *et al.*, 1980; Endo, 1980) ดังนั้นจึงมีการใช้อาหารหมักจาก *Monascus* ในการรักษาโรคคอเลสเตอรอลสูง (Wei *et al.*, 2003; Guardamagna *et al.*, 2009; Venero *et al.*, 2010) รวมถึงช่วยลดอาการของโรคความดันโลหิตสูง (Rhyu *et al.*, 2002) และโรคหลอดเลือดหัวใจ (Wei *et al.*, 2003) นอกจากนี้ในระหว่างการเจริญของราโมแนสคัสยังสร้างรงควัตถุสีแดง (pigment) เป็นสารให้สีธรรมชาติในอาหารและมีสรรพคุณทางยาในการลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง (Yasukawa *et al.*, 1996; Akihisa *et al.*, 2005) ต้านการอักเสบ (Yasukawa *et al.*, 1994) และมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (Martinkova *et al.*, 1995) รา *Monascus* สามารถสร้าง γ-aminobutyric acid (GABA) ซึ่งมีสรรพคุณช่วยลดความดันโลหิต รักษาและป้องกันโรคมะเร็ง โรคกระดูกพรุน โรคหัวใจ โรคอัลไซเมอร์ และโรคความจำเสื่อม รวมถึงการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระคือ dimerumic acid และ dihydromonacolins (Endo *et al.*, 1985; Taira *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามในระหว่างการเจริญของรา *Monascus* พบการสร้างสาร citrinin หรือที่มีชื่อเรียกอื่นคือ monascidin A ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อตับและไตของมนุษย์ โดยสาร citrinin ถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการ polyketide pathway ของราซึ่งเป็นกระบวนการเดียวกันกับการสร้างสาร monacolin K และรงควัตถุสีแดง ดังนั้นในอาหารหมักจากรา *Monascus* ถึงแม้จะมีสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอยู่มากแต่มักมีการปนเปื้อนของสาร citrinin ร่วมอยู่ด้วยเสมอ ในปัจจุบันยังไม่มีการผลิตอาหารหมักจากรา *Monascus* สที่ปราศจากสารพิษ citrinin ส่วนใหญ่เป็นการควบคุมกระบวนการผลิตให้มีการปนเปื้อนของ citrinin น้อยที่สุดหรืออยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายซึ่งสามารถทำได้โดยคัดเลือกสายพันธุ์รา *Monascus* ที่มีการสร้าง citrinin ต่ำร่วมกับการปรับสภาวะการหมักให้เหมาะสมกับการสร้าง monacolin และควบคุมการสร้างสารพิษ citrinin ให้อยู่ในระดับที่ต่ำ

งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะใช้ถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชเกษตรที่มีการปลูกอย่างแพร่หลายในพื้นที่จังหวัดภาคเหนือ และเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่อุดมไปด้วยสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิดทั้งสารไอโซฟลาโวน (isoflavone) และสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ที่มีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคมะเร็ง (Gotoh *et al.*, 1998) โรคหลอดเลือดหัวใจ (Potter *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2003) โรคเบาหวาน (Liu *et al.*, 2006) โรคกระดูกพรุน (Potter *et al.*, 1998; Ishimi *et al.*, 2002) และใช้เป็น phytoestogen ในหญิงวัยหมดประจำเดือนได้ (Morabito *et al.*, 2002) มาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมัก โดยให้ความสำคัญกับความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์จากสารพิษ citrinin ด้วยการศึกษาคัดเลือกรา *Monascus* สายพันธุ์ที่มีการสร้างสารพิษ citrinin ต่ำแต่สามารถสร้างสาร monacolin K ได้สูงร่วมกับการศึกษาสภาวะการหมักให้เหมาะสมกับการสร้างสารชีวโมกุลที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และได้ต่อยอดงานวิจัยพื้นฐานสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและมีความปลอดภัยด้วยเทคโนโลยีการอบแห้งซึ่งเทคโนโลยีต้นทุนต่ำ เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตในเชิงพาณิชย์ในรูปของอาหารเสริมสุขภาพโดยตรงหรือใช้เป็นสารเจือปนเสริมคุณค่าทางโภชนาการในอาหารเพื่อสุขภาพชนิดอื่นออกจำหน่ายภายในประเทศหรือส่งออกต่างประเทศส่งผลให้สามารถแข่งขันในตลาดโลกได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกรา *Monascus* sp. สายพันธุ์ที่สร้าง citrinin ต่ำ

1.2.2 เพื่อศึกษาหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการบ่มถั่วเหลืองหมักด้วยรา *Monascus*

1.2.3 เพื่อศึกษาคุณค่าทางโภชนาการจากสารชีวโมเลกุลในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส คือสารสี, monacolin, isoflavone และ phenolic compound รวมทั้งฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน DPPH radical-scavenging activity และ Ferric reducing antioxidant power

1.2.4 เพื่อศึกษากระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและปลอดภัย

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการคัดเลือก *Monascus* sp. สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษต่ำแต่สามารถสร้างสาร monacolin K ได้สูงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เป็นกล้าเชื้อในการผลิตถั่วเหลืองหมัก และคัดเลือกอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการหมักถั่วเหลืองด้วยรา *Monascus* sp. เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่อุดมด้วยสารต้านออกซิเดชัน รวมทั้งการศึกษาอุณหภูมิอบแห้งถั่วเหลืองหมักที่เหมาะสมในการรักษาสารต้านออกซิเดชันก่อนนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก *Monascus* ชนิดผง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.4.1 ได้รา *Monascus* sp. สายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยจาก citrinin และมีศักยภาพสูงในการผลิตอาหารหมักที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสูง

1.4.2 ได้กระบวนการหมักถั่วเหลืองด้วยรา *Monascus* ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสูง

1.4.3 ได้ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก *Monascus* ชนิดใหม่ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมหรือใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพได้หลากหลายเพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

1.4.4 นำไปสู่การจดอนุสิทธิบัตรกระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักจากรา *Monascus* ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและปลอดภัยจาก citrinin

1.4.5 ได้ผลงานการวิจัยที่สามารถเผยแพร่ในงานประชุมสัมมนาวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ อย่างน้อย 1 เรื่อง

บทที่ 2

แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดทฤษฎีงานวิจัย

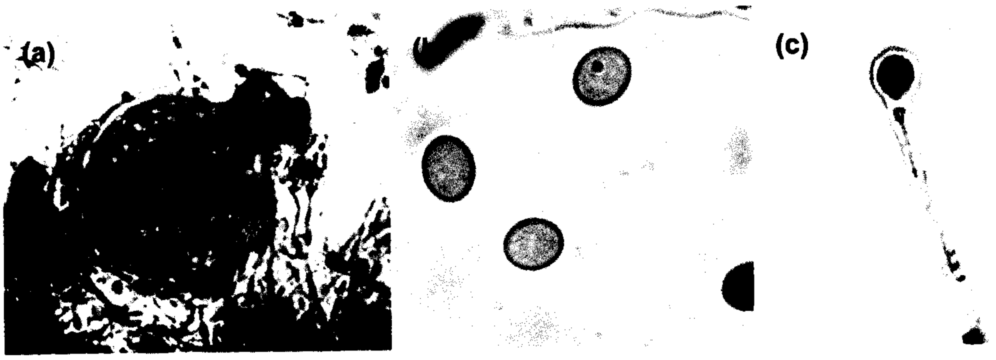
Monascus sp. เป็นราที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักและเภสัชวิทยาเนื่องจากสามารถสร้างสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น pigments สารลดคอเลสเตอรอล monacolin สารสื่อประสาท γ-aminobutyric acid และสารต้านอนุมูลอิสระ dimerumic acid และ dihydromonacolins แต่อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์จากราชนิดนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากมีการสร้างสารพิษ citrinin ขึ้นพร้อมกับการสร้างสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิชนิดที่มีประโยชน์ สารพิษ citrinin มีความเป็นพิษต่อระบบตับและไตของมนุษย์ รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น งานวิจัยนี้ได้นำราโมแนสคัสที่ผ่านการคัดเลือกความสามารถในการสร้างสาร citrinin ต่ำ (เกตุการ, 2554) มาต่อยอดงานวิจัยใช้เป็นกล้าเชื้อหมัก ถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชเกษตรที่อุดมด้วยพฤกษเคมีที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด เช่น โปรตีน, isoflavone และ phenolic compounds ดังนั้นถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสจึงเป็นการรวมคุณประโยชน์ทั้งจากราโมแนสคัสและถั่วเหลืองและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพได้ต่อไป

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ราโมแนสคัส

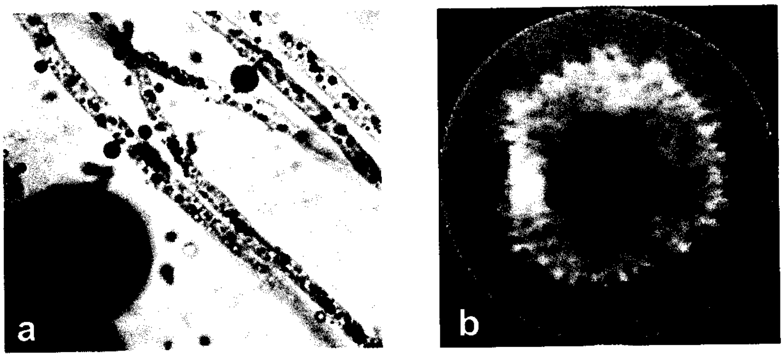
ราโมแนสคัสจัดอยู่ในวงศ์ Monascaceae กลุ่ม Ascomycetes กลุ่มย่อย Plectomycetidae อันดับ Eurotiales จีนัส Monascus เป็นราที่มีเส้นใยแบบมีผนังกัน แตกแขนงมากมาย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 ไมโครเมตร เมื่อเจริญบนอาหารแข็งจะแนบชิดกับผิวอาหาร เส้นใยอายุน้อยมีสีขาวและเมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีแดง ราโมแนสคัสสามารถสร้างสปอร์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราโมแนสคัสเป็นการสร้างแอสโคสปอร์รูปไข่ อาจมีสีน้ำตาลหรือสีแดงหรือสีส้มหรือไม่มีสีในโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุงที่เรียกว่าแอสโคคาร์ป (ascocarp) หรือแอสคัส (ascus) ที่มีรูปร่างกลมที่เกิดบนก้าน (stalk) ที่ไม่มีหรือมีผนังกั้นมีขนาดแตกต่างกันขึ้นกับอายุการเจริญ สำหรับการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศราโมแนสคัสจะสร้างโคนิเดีย (conidia) บนก้านโคนิดิโอฟอร์ (conidiophores) โคนิเดียมีลักษณะรูปไข่อาจมีอัน

เดียวหรือต่อกันเป็นลูกโซ่ ตั้งแต่ 2-6 โคนิเดีย โดยมากมักไม่มีสีแต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีน้ำตาลอ่อนได้ (กัญญุมา, 2546) (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของราโมแนสคัส: ถุงแอสคัส (a), แอสโคสปอร์ (b) และโคนิเดีย (c)
ที่มา: เกตุการ (2554)

ราโมแนสคัสสามารถสร้างรงควัตถุหรือสารสีภายในเส้นใยและถูกขับออกมาภายนอกในรูปรงควัตถุที่เป็นของเหลวทางรูเปิดของปลายเส้นใยทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีแดง (รูปที่ 2.2) เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร เช่น potato dextrose agar หรือ sabouraud agar จะสังเกตเห็นการหลั่งสารสีแดงออกมายังอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการเพาะเลี้ยงนาน 40-48 ชั่วโมง ในปัจจุบันมีการพบราโมแนสคัสทั้งหมด 58 สายพันธุ์ที่เก็บไว้ที่ American Type Culture Collection อย่างไรก็ตามราโมแนสคัสที่นิยมนำมาผลิตอาหารหมักมี 4 สายพันธุ์ที่สำคัญคือ *Monascus purpureus* *M. ruber* *M. pilosus* และ *M. froridanus* โดย *M. purpureus* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการผลิตอาหารหมักมากที่สุด (Blanc *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2008)

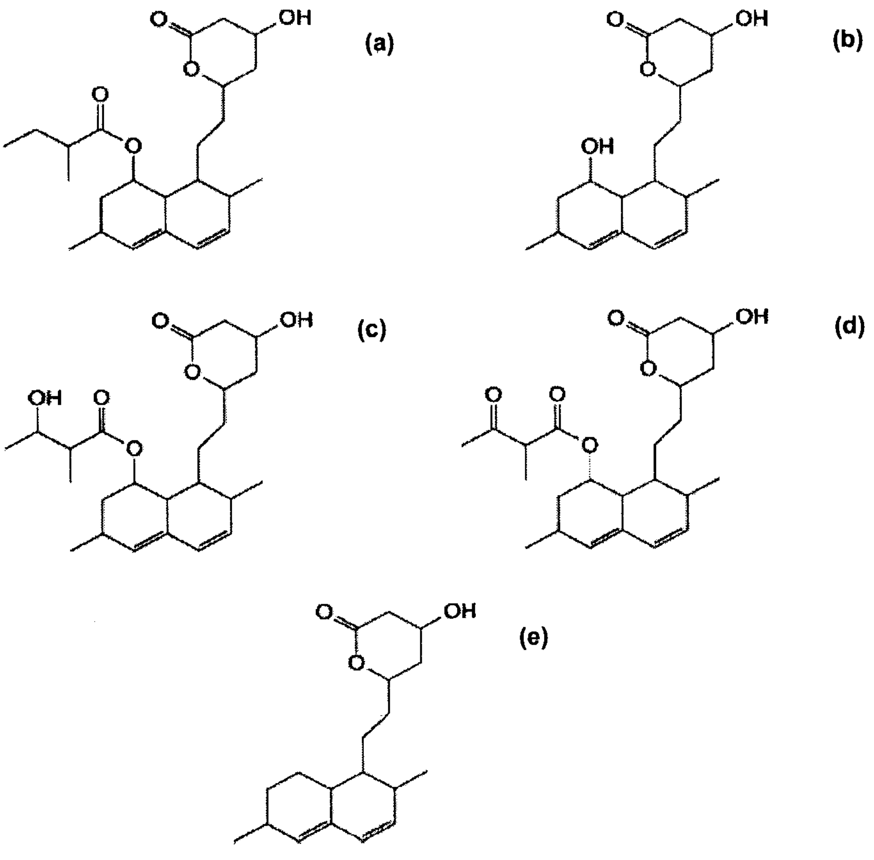


รูปที่ 2.2 ลักษณะรงควัตถุภายในเส้นใย (a) และลักษณะโคโลนี (b) ของเชื้อ *Monascus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง
ที่มา: เกตุการ (2554)

สารเมตาโบไลต์ของราโมแนสคัส

1. สารโมนาโคลิน (monacolin)

สาร monacolin เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ราโมแนสคัสสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญ และเป็นสารที่มีความสำคัญในด้านเภสัชวิทยาด้วยการออกฤทธิ์ควบคุมภาวะไขมันในเลือดสูง (Endo, 1979; 1980) ราโมแนสคัสสร้างสาร monacolin 14 อนุพันธ์ เช่น monacolin K, monacolin J, monacolin L, monacolin M, monacolin X และสารในรูปของ hydroxyl acid form เช่น dehydromonacolin K, dihydromonacolin L, compactin, 3-α-hydroxy-3,5-dihydromonacolin L (Li *et al.*, 2004) แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารอนุพันธ์ monacolin ในรูปที่ 2.3



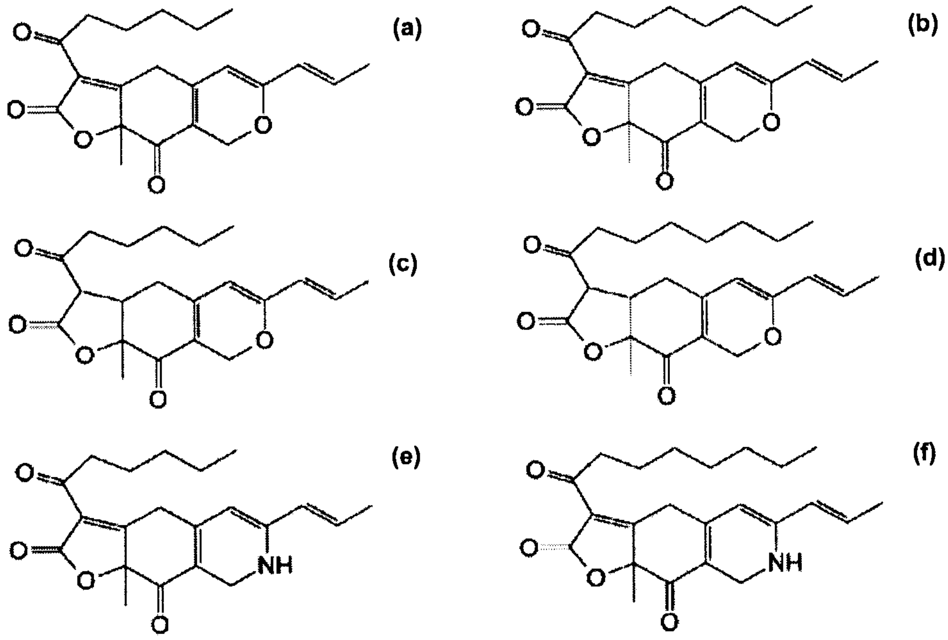
รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสาร monacolin K (a) monacolin J (b) monacolin M (c) monacolin X (d) และ monacolin L (e)

ที่มา: Lin *et al.* (2008)

สาร monacolin K เป็นอนุพันธ์ที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการลดคอเลสเตอรอลในเลือด โดยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA reductase inhibitors) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ทำให้มีคุณสมบัติในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดได้ สาร monacolin K มีผลต่อการลดลงของคอเลสเตอรอลทั้งหมด ไตรกลีเซอไรด์ ไลโพโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein cholesterol; LDL-C) และไลโพโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein cholesterol; HDL-C) โดย LDL-C เป็นคอเลสเตอรอลที่ทำให้เลือดตกตะกอนเป็นลิ่มและเกาะติดที่ผนังเส้นเลือดเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้ผนังของเส้นเลือดภายในหนาขึ้นทำให้การไหลเวียนของเลือดไม่สะดวกก่อให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือด ส่วน HDL-C เป็นคอเลสเตอรอลที่ดีเนื่องจากทำหน้าที่นำคอเลสเตอรอลที่ไม่จำเป็นต่อร่างกายกลับไปสู่ตับแล้วขับถ่ายออกจากร่างกายเรียกกระบวนการนี้ว่า reverse transportation of cholesterol ถ้าในร่างกายมีระดับ HDL-C ต่ำกว่า 35 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเส้นเลือดในสมองและหัวใจอุดตัน (สุภาวดี, 2545; Erdogral and Azirak, 2004) สาร monacolin K มีชื่อเรียกอื่นอีกหลายชื่อ เช่น โลวาสเตติน (lovastatin) เมวิโนลิน (mevinolin) โคเลสติน (cholestin) และเมวาคอร์ (mevacor) (Akihisa *et al.*, 2005)

2. รงควัตถุหรือสารสี (pigments)

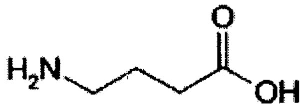
ราโมแนสคัสสามารถสร้างรงควัตถุหรือสารสีผ่านทาง polyketide pathway 3 กลุ่ม ได้แก่ รงควัตถุสีแดง คือ สารสี rubropunctamine และ monascorubramine รงควัตถุสีเหลือง คือ monascin และ ankaflavin และรงควัตถุสีส้ม คือ rubropunctatin และ monascorubrin (โครงสร้างทางเคมีแสดงในรูปที่ 2.4) (Lin *et al.*, 2008) รงควัตถุจากราโมแนสคัสใช้เป็นสีผสมอาหารธรรมชาติแทนสีสังเคราะห์ได้เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงและไม่เป็นสารก่อมะเร็ง ซึ่ง Chinese Ministry of Health ได้อนุญาตให้ใช้อังคักหรือข้าวแดงเป็นวัตถุเจือปน (food additive) ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อสัตว์ ปลาและถั่วเหลือง (Ma *et al.*, 2000) รวมถึงเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เครื่องดื่มและอาหาร เช่น สาเก ไวน์ น้ำหวาน นม น้ำผลไม้ แยมถั่ว กุนเชียง นอกจากนี้ยังมีการใช้ข้าวแดงเป็นส่วนประกอบในยาจีน เครื่องสำอางและสีย้อมด้วย (ศนิ, 2548) สารสีจากโมแนสคัสนอกจากใช้เป็นสารให้สีธรรมชาติแล้วยังมีสรรพคุณทางยาในการยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งในหนู (Yasukawa *et al.*, 1996; Akihisa *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005) ช่วยบรรเทาอาการอักเสบ (Yasukawa *et al.*, 1994) และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และราได้ (Matinkova *et al.*, 1995)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของรงควัตถุจากโมแนสคัส: รงควัตถุสีแดง rubropunctatin (a) และ monascorubrin (b) รงควัตถุสีเหลือง monascin (c) และ ankaflavin (d) รงควัตถุสีส้ม rubropunctamine (e) และ monascorubramine (f)
ที่มา: Lin *et al.* (2008)

3. กรดแกมมาอะมิโนบิทิริคหรือสารกาบา (γ-aminobutyric acid; GABA)

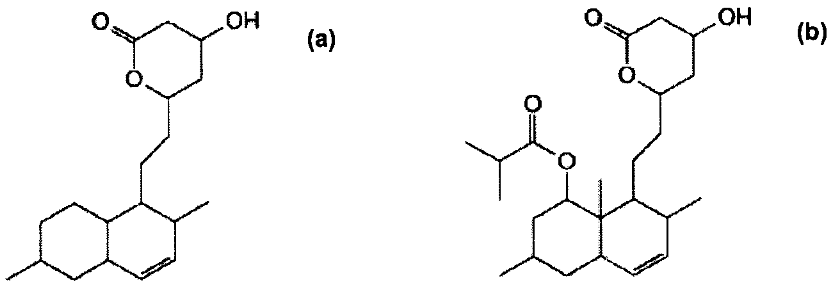
γ-aminobutyric acid เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ในกระบวนการ decarboxylation ของกรดกลูตามิคด้วยเอนไซม์ catalyzing glutamate decarboxylase (แสดงโครงสร้างทางเคมีในรูปที่ 2.5) สารกาบาเป็นสารออกฤทธิ์ช่วยลดความดันโลหิต ลดอาการอัลไซเมอร์ ลดอาการเกี่ยวกับระบบประสาทส่วนกลางและทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท มีรายงานการตรวจพบสารกาบาในอาหารหมักจากราโมแนสคัสในปริมาณที่สูง (Kohama *et al.*, 1987; Kono and Himeno, 2000)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของสาร γ-aminobutyric acid
ที่มา: Lin *et al.* (2008)

4. ไดไฮโดรโมนาโคลินส์ (dihydromonacolins)

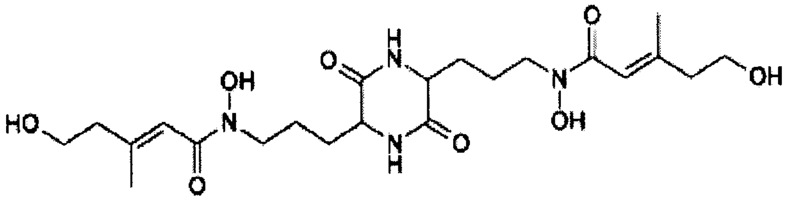
สาร dihydromonacolins ถูกแยกได้จากอาหารหมักโมแนสคัส เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับสาร monacolin (รูปที่ 2.6) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Dhale *et al.*, 2007) และยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล (Endo *et al.*, 1985)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของสาร dihydromonacolins L (a) และสาร dihydromonacolins MV (b)
ที่มา: Lin *et al.* (2008)

5. กรดไดเมอรูมิค (dimerumic acid)

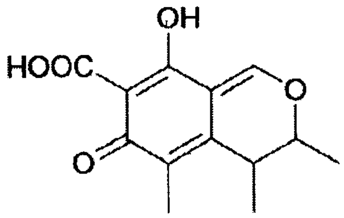
มีรายงานการพบ dimerumic acid ในอาหารหมักโมแนสคัส (สูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.7) dimerumic acid เป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ปกป้องตับจากสารพิษ (hepatoprotective) และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation (Taira *et al.*, 2002)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ dimerumic acid
ที่มา: Lin *et al.* (2008)

6. **ซิตรินิน (citrinin)**

สาร citrinin (รูปที่ 2.8) เป็นสารพิษที่เกิดจากราโมแนสคัส ซึ่งตรวจพบครั้งแรกในปี 1931 ในชื่อสาร monascidin A ถูกสร้างขึ้นจากรา *Penicillium* นอกจากนี้ยังมีรายงานการสร้างสาร citrinin จากราชนิดอื่น เช่น *Aspergillus* และ *Monascus* มักพบการปนเปื้อนของสาร citrinin ในอาหารประเภทธัญพืช ถั่วและผลไม้ สาร citrinin เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 250 มีลักษณะผลึกรูปเข็มสีเหลืองเลมอน ละลายในน้ำได้น้อยและละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง เอทานอลและอะซิโตไนไตรล์ สามารถเปลี่ยนสีได้เมื่อทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริกคลอไรด์ ไททาเนียมคลอไรด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สีเขียว และสีแดงเข้ม ตามลำดับ



รูปที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของสาร citrinin
ที่มา: Lin *et al.* (2008)

citrinin เป็นสารที่เป็นพิษต่อตับและไต โดยทำให้เกิดการขยายตัวของเส้นเลือดก่อให้เกิดการไหลเวียนโลหิตผิดปกติและทำให้หลอดลมหดตัว ลดปริมาณไกลโคเจนในตับและเพิ่มปริมาณกลูโคสในเลือด (Krejci *et al.*, 1996) สาร citrinin สามารถซึมผ่านเข้าไปยังไมโตคอนเดรียและทำให้เกิดความไม่สมดุลของ Ca^{2+} (Chagas *et al.*, 1995) และรบกวนระบบการลำเลียงอิเล็กตรอน (Ribeiro *et al.*, 1997) citrinin มีค่า LD_{50} (ปริมาณสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 ของจำนวนทั้งหมด) เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในหนูทดลอง และ 19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในกระต่าย นอกจากนี้ citrinin ยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและแบคทีริโอฟาจ ราโมแนสคัสสังเคราะห์สาร citrinin ผ่านทางกระบวนการ polyketide pathway เช่นเดียวกับสารสี ในปัจจุบันการผลิตอาหารหมักจากราโมแนสคัสให้ได้เพียงสารลดคอเลสเตอรอล monacolin โดยไม่มีการปนเปื้อนสาร citrinin ทำได้ยาก สาร citrinin สามารถสลายตัวได้ด้วยความร้อนและด่าง โดยสลายตัวที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ปราศจากน้ำ และที่อุณหภูมิ 160 - 175 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีความชื้นร่วมด้วย (Kitabatake *et al.*, 1991)

การปนเปื้อนสาร citrinin ในข้าวแดงและผลิตภัณฑ์อื่น

มีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนสาร citrinin ในข้าวแดงและผลิตภัณฑ์อื่นในหลายประเทศ จากการวิจัยของ Heber *et al.* (2001) พบว่าข้าวแดงบรรจุแคปซูลที่จำหน่ายในสหรัฐอเมริกามีการปนเปื้อนสาร citrinin อยู่ในช่วง 0.47 - 11.82 µg/capsule การวิจัยของ Xu *et al.* (1999) ได้สำรวจการปนเปื้อนของสาร citrinin ในข้าวแดงทางการค้าจำนวน 35 ตัวอย่าง พบว่า มีข้าวแดงจำนวนมากถึง 32 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของสาร citrinin โดยมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.2 - 140 mg/kg และ Shu and Lin (2002) ทำการวิจัยที่ประเทศไต้หวันและประเทศจีนพบว่าข้าวแดงมีปริมาณการปนเปื้อน citrinin อยู่ในช่วง 4.2 - 25.1 mg/kg ญี่ปุ่นเป็นเพียงประเทศเดียวที่ออกกฎหมายอาหารกำหนดปริมาณ citrinin ในสารสีโมแนสคัส โดยยอมให้มีสาร citrinin ไม่เกิน 0.2 µg/g หรือ 200 ppb (Lin *et al.*, 2008) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานสำรวจการปนเปื้อนของสาร citrinin อย่างเป็นทางการ การปนเปื้อนสาร citrinin ในข้าวแดงและผลิตภัณฑ์อาหารขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ของราโมแนสคัส แสดงความสามารถในการสร้างสารพิษ citrinin ที่แตกต่างกันของรา *Monascus* ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารพิษ citrinin ที่สร้างจากราโมแนสคัสหลายสายพันธุ์

สายพันธุ์ของราโมแนสคัส	การสร้าง citrinin (mg/L)
M. purpureus	73-386
M. rubber	65-160
M. floridanus	215
M. lunisporas	68
M. pallens	480
M. pilosus	127-169
M. sanguineus	78
M. aurantiacus	239

ที่มา: Wang *et al.* (2005)

จากการรายงานการวิจัยที่กล่าวอ้างในข้างต้นจะเห็นว่าผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อ citrinin เป็นอย่างมากทำให้การศึกษาวิจัยที่สามารถลดการปนเปื้อนของสารพิษดังกล่าวจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง วิธีดั้งเดิมที่นักวิทยาศาสตร์เลือกใช้ในการลดปริมาณของสาร citrinin ในอาหารหมักคือการคัดเลือกราโมแนสคัสสายพันธุ์ป่า (wild type) ที่คัดแยกจากอาหารหมักพื้นเมือง รวมถึงการ

ใช้ราโมแนสคัสสายพันธุ์ผ่าเหล่าที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยแสงยูวีหรือสารเคมี ซึ่งจากรายงานของ Jia *et al.* (2010) พบว่าการเหนี่ยวนำให้ราโมแนสคัสเกิดการผ่าเหล่าทำให้ความสามารถในการสร้างสารพิษ citrinin ของราลดลงโดยที่ยังสามารถสร้างรงควัตถุสีแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง citrinin ของราโมแนสคัส

รายงานของจุลยุทธ (2546) ระบุว่าโซเดียมอะซิเตตสามารถยับยั้งการสร้างสาร monascidin A ของรา *M. purpureus* ได้ (ตารางที่ 2.2) โดยสาร monascidin A จะถูกสร้างขึ้นในส่วนของเส้นใยและละลายออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ขณะที่รงควัตถุสีแดงจะถูกสร้างและสะสมอยู่ในส่วนของเส้นใย และจากการศึกษาของ Blanc *et al.* (1995) ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่าสาร monascidin A ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่พบในเชื้อราโมแนสคัส คือ สาร citrinin ซึ่งเป็นสารพิษจากเชื้อรามีฤทธิ์ทำลายระบบไตโดยตรวจวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยวิธี HPLC และเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว yeast extract sucrose medium พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* และ *M. ruber* สร้างสาร citrinin ในปริมาณ 270 และ 340 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในข้าวจะให้ปริมาณ citrinin เท่ากับ 100 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ หลังการค้นพบนี้ทำให้หลายฝ่ายให้ความสนใจถึงความปลอดภัยในการใช้สารสีจากเชื้อราโมแนสคัสในอาหารมากขึ้น

ตารางที่ 2.2 ผลของโซเดียมอะซิเตตที่มีต่อพีเอช การเจริญ การผลิตสี และค่าการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียต่อการหมักเชื้อ *M. purpureus*

โซเดียมอะซิเตต (mol/L)	**พีเอช**	**ค่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (mm)**	**น้ำหนักแห้งเชื้อรา (mg)**	**ปริมาณสี (mg)**
0.005	5.5	25	960	94
0.01	6.5	22	1000	98
0.02	7.3	20	980	107
0.03	7.3	10	980	92
0.04	7.4	0	980	81

ที่มา: จุลยุทธ (2546)

นอกจากสารสี monacolin และ citrinin แล้วราโมแนสคัสยังสร้างสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิอื่นอีกดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารเมตาบอไลต์ของราโมแนสคัส

สารเมตาบอไลต์	การนำมาใช้ประโยชน์	เอกสารอ้างอิง
1. Dimerumic acid	สารป้องกันการออกซิไดซ์	Aniya *et al.* (2000);
2. γ-aminobutyric acid	สารลดความดันในเส้นเลือด	Kono and Himeno (2000)
3. Chitinase	สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์	Wang *et al.* (2000)

ที่มา: กัญญุมา (2546)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารเมตาโบไลต์ของราโมแนสคัส

1. สายพันธุ์ของราโมแนสคัส

เมื่อราโมแนสคัสเจริญบนเมล็ดข้าวจะสร้างเส้นใยบนผิวหน้าแล้วแทรกทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าว มีการสร้างสีแดงภายหลังจากการบ่มได้นาน 3 วัน สารสีเหล่านี้เมื่อมีการนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลพบว่ารงควัตถุสีแดงที่ได้จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง 2 ช่วงคลื่น คือที่ความยาวคลื่น 420 และ 500 นาโนเมตร ราโมแนสคัสบางสายพันธุ์ เช่น *M. purpureus* และ *M. anka* สร้างรงควัตถุสีแดงอมชมพูแก่จะสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรสูงกว่าที่ 420 นาโนเมตร และบางสายพันธุ์อาจสร้างรงควัตถุสีแดงคล้ำซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 สูงกว่าที่ 500 นาโนเมตร หรือให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 สูงกว่า 500 นาโนเมตร เช่น *M. barkeri* หรือ *M. kaoliang* ราโมแนสคัสแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างสารลดคอเลสเตอรอล monacolin K สารสีและสารพิษ citrinin ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาของ Tsukahara *et al.* (2009) พบว่าราโมแนสคัส 16 สายพันธุ์จาก 29 สายพันธุ์ที่ทำการศึกษาสามารถสร้างสาร citrinin ได้ต่ำกว่า 1000 µg/g koji และมีเพียง 4 สายพันธุ์เท่านั้นที่มีการสร้าง monacolin K สูงกว่า 100 µg/g โดยเชื้อ *M. pilosus* เป็นสายพันธุ์ที่สร้าง monacolin และสารสีได้ในปริมาณสูงที่สุด ขณะที่สร้างสาร citrinin ได้ต่ำ (ตารางที่ 2.4) และจากรายงานของ Pattanagul *et al.* (2008) พบว่าราโมแนสคัสสามารถสร้างสาร monacolin K, citrinin และสารสีในปริมาณที่แตกต่างกันในลูกเดือย โดย *M. purpureus* DMKU สามารถสร้างสาร citrinin ได้น้อยที่สุดขณะที่สร้างสาร monacolin K ได้ในปริมาณที่มากที่สุด

ตารางที่ 2.4 ปริมาณของ citrinin, monacolin K และสารสีของเชื้อ *Monascus* ต่างสายพันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ		citrinin (µg/g koji)	monacolin K (µg/g koji)	รงควัตถุ
M. purpureus	NBRC 4485	346	20.8	0.73
M. pilosus	NBRC 4521	82	8.3	1.20
M. pilosus	NBRC 8201	101	75.0	1.30
M. ruber	NBRC 4483	108	15.0	1.40
M. ruber	NBRC 4532	75	50.0	1.46
M. pilosus	NBRC 4480	104	314.8	1.48
M. purpureus	NBRC 4484	398	0	1.52
M. pilosus	NBRC 4487	100	0	1.57
M. purpureus	NBRC 4489	161	0	1.59
M. pilosus	NBRC 4520	165	565.3	2.17
M. purpureus	NBRC 6085	721	nt	2.39
M. ruber	NBRC 9203	59	202.5	2.56
M. ruber	NBRC 32318	36	405.5	3.31
M. ruber	ATCC 20657	50	57.0	5.03
Monascus	ATCC 16434	65	0	7.77

ที่มา: Tsukahara *et al.* (2009)

2. ชนิดของสับสเตรต

การหมักเชื้อราโมแนสคัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็งนั้นปกติจะใช้ข้าว และมีการใช้เมล็ดธัญพืชอื่นน้อยมากเมื่อเทียบกับข้าว Palo *et al.* (1960) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างสารสีของ *M. purpureus* พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอังคักคือค่าความชื้นของข้าวไม่เกินร้อยละ 50 พีเอชอยู่ระหว่าง 3.0-7.5 อุณหภูมิในการหมัก 27 องศาเซลเซียส และข้าวเหนียวไม่เหมาะกับการนำมาเป็นวัสดุหมักอังคัก ขณะที่รายงานของบุษบา (2518) ที่ได้ทดลองการสร้างสารสีของ *M. purpureus* ในข้าวต่างสายพันธุ์พบว่าข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูพันธุ์หอมมะลิและข้าวญี่ปุ่นให้อังคักสีแดงเข้มใกล้เคียงกัน และอังคักจากข้าวเหนียวพันธุ์เขี้ยวงูจะให้กลิ่นหอมของเอสเทอร์และแอลกอฮอล์มากกว่าอังคักจากข้าวพันธุ์หอมมะลิ ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์เสาไห้ให้อังคักที่มีสีแดงและความหอมน้อยกว่า ส่วนอรัญและคณะ (2531) รายงานว่าปริมาณอะมิโลสในเม็ดข้าวที่

แตกต่างกันมีผลต่อการผลิตข้าวแดงแตกต่างกันไปด้วย โดยพบว่าพันธุ์ข้าวที่มีอะมิโลสสูงมากกว่าร้อยละ 24 เช่น พันธุ์เหลือง 148 กข25 เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงมากกว่าพันธุ์ กข7 และขาวดอกมะลิ 105 และจากรายงานของเชิดชัยและคณะ (2519) พบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวมีเพียงพอต่อการสร้างสารสีจึงไม่จำเป็นต้องเติมเปปโตนเพื่อเป็นแหล่งของไนโตรเจนให้กับราโมแนสคัส

นอกจากข้าวแล้วยังมีการใช้พืชเกษตรชนิดอื่นเป็นวัตถุดิบในการหมักโมแนสคัสด้วย โดยพลายแก้วและบุษบา (2534ก) ได้ศึกษาการสร้างสารสีแดงโดยการหมักโมแนสคัสในเมล็ดข้าวโพด มันเทศ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง และขนมปัง เปรียบเทียบกับการผลิตบนข้าว โดยสังเกตการเจริญของรา การสร้างสารสีและการสร้างสปอร์ของ *M. kaoling* พบว่าขนมปังให้ค่าสีแดงมากที่สุด รองมาคือมันฝรั่งและปลายข้าวหอมมะลิ (ตารางที่ 2.5) จากการศึกษาของเกศแก้วและณยุรี (2542) รายงานว่าสามารถนำกากมันสำปะหลัง กากสับปะรดและกากถั่วเหลืองมาใช้เป็นวัสดุหมักในการผลิตรงควัตถุสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัสได้ 24.7 13.2 และ 1.8 หน่วย ตามลำดับ และรายงานของจิราภรณ์และชุติมา (2543) พบว่ากากมันสำปะหลังสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุหมักโมแนสคัสในการผลิตรงควัตถุได้เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 2.5 ผลของอาหารแข็งชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการหมักต่อการผลิตสีของ *M. kaoliang* เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

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

หมายเหตุ: * คำนวณจาก ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm x ค่าความเจือจาง

ที่มา: พลายแก้วและบุษบา (2534ก)

3. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีจะอยู่ระหว่าง 27 - 30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะอยู่ที่ 35 - 34 องศาเซลเซียส จากการศึกษาของ Tsukahara *et al.* (2009) พบว่า อุณหภูมิและเวลาในการบ่มมีผลต่อการสร้างสาร monacolin K, citrinin และสารสี รา *M. pilosus* จะสร้างสาร monacolin K และสารสีได้ดีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างการหมัก โดยเริ่มจากการบ่มข้าวแดงที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรามากที่สุดเป็นระยะเวลา 4 วัน เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราเจริญได้ดี หลังจากนั้นลดอุณหภูมิในการบ่มเป็น 23 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสาร monacolin K และรงควัตถุขณะที่สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษ citrinin ไว้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสร้างสาร monacolin K และสารสีหรือรงควัตถุได้ดีในช่วงการหมักที่ 23 องศาเซลเซียส โดยมีการเพิ่มขึ้นของสารตั้งแต่วันที่ 4 - 12 ของการหมัก และในวันที่ 14 ของการหมักพบสาร monacolin K เพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 225 μg/g dry koji โดยที่ไม่มีการสร้าง citrinin เกิดขึ้นเลย สอดคล้องกับรายงานของ Chen and Hu (2005) ที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้าง monacolin K คือ อุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา ซึ่งงานทดลองของ Chen and Hu (2005) ได้ผันแปรอุณหภูมิการหมักข้าวแดง ที่ 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าการบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 16 วัน จะทำให้ได้ข้าวแดงที่มีสาร monacolin K มากที่สุด และในขณะเดียวกันก็สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษ citrinin ไว้ได้อีกด้วย

4. ความชื้น

พลายแก้วและบุษบา (2534ข) ได้ศึกษาความชื้นเริ่มต้นในการหมักข้าวแดงของรา *M. kaoliang* (ตารางที่ 2.6) พบว่าเวลาแช่ข้าวนาน 8 ชั่วโมงและสะเด็ดน้ำ 5 - 10 นาทีจะทำให้ข้าวมีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 41 เหมาะต่อการสร้างสีแดง นอกจากนี้ยังพบว่าการแช่ข้าวนานเกินไปจะทำให้เมล็ดข้าวเกาะกัน และการผึ่งลมนานเกินไปจะทำให้ผิวหน้าข้าวแห้งไม่เป็นผลดีต่อการสร้างสี จากรายงานของ Johns and Stuart (1991) พบว่าเมื่อหมัก *M. purpureus* FRR 2190 ในข้าวที่มีความชื้นเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 56 ที่พีเอช 6 จะให้สีดีที่สุดและพบว่าเมื่อเติมเปปโตนลงในข้าวจะช่วยเพิ่มการสร้างสีแดงได้ แตกต่างกับรายงานของ Chen and Hu (2005) ที่พบว่าการปรับความชื้นของข้าวให้อยู่ที่ร้อยละ 65 ก่อนการหมักทำให้เชื้อสร้างสาร monacolin K ได้สูงกว่าข้าวที่มีที่ความชื้นในระดับร้อยละ 45 55 75 และ 85 ขณะเดียวกันก็ควบคุมการสร้าง citrinin ได้ต่ำกว่าด้วย

ตารางที่ 2.6 ผลการแช่ข้าวในเวลาต่างๆ ต่อการผลิตสีของเชื้อ *M. kaoliang* ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

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

หมายเหตุ: * คำนวณจาก ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm x ค่าความเจือจาง

ที่มา: พลายแก้วและบุษบา (2534ข)

5. การเพาะเลี้ยงในสภาวะให้อากาศ

เมื่อบ่มเชื้อ *M. purpureus* ใน Humidity chamber พบว่าออกซิเจนถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจทำให้ออกซิเจนใน Chamber ต่ำลง (Johns and Stuart, 1991) ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างรงควัตถุ ซึ่ง Han and Mudgett (1992) พบว่าการควบคุมออกซิเจนที่ระดับ 0.05-0.5 atm และคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.02 atm ทำให้การสร้างรงควัตถุสูงขึ้น และเมื่อควบคุมระดับของออกซิเจนที่ระดับ 0.21 atm และคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 0.02 atm จะเหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุ การสร้างรงควัตถุของเชื้อ *M. purpureus* จะลดลงเมื่อเริ่มมีออกซิเจนสูงขึ้นเป็น 1.2 atm และจะยับยั้งการสร้างรงควัตถุเมื่อมีออกซิเจนสูงถึงระดับ 2.0 atm และจากรายงานการวิจัยของ Tsukahara *et al.* (2009) พบว่าการเพาะเลี้ยงราโมแนสคัสในสภาวะที่มีอากาศทำให้เชื้อสามารถสร้างสาร monacolin K ได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ

6. แหล่งคาร์บอน

Lin and Demain (1991) เลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. TTWMB 6042 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลมอลโตส กลูโคส และฟรุคโตส พบว่าเชื้อราสามารถสร้างรงควัตถุได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่

ผสมน้ำตาลมอลโตสเข้มข้นร้อยละ 10 อย่างไรก็ตามเชื้อราสามารถนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้สำหรับการเจริญได้ดีกว่าน้ำตาลมอลโตส (Wong *et al.*, 1981) น้ำตาลกลูโคสถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากเชื้อราสามารถย่อยสับสเตรตที่มีน้ำตาลมอลโตสเป็นองค์ประกอบได้ต่ำกว่าสับสเตรตที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ (Chen and Johns, 1994)

7. แหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาของ Carels and Shepherd (1977) ที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน พบว่าแหล่งอาหารที่มีองค์ประกอบของแอมโมเนียม (NH_4^+) และไนเตรต (NO_3^-) และแอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) มีผลต่อการผลิตรงควัตถุของเชื้อรา โดยแหล่งไนโตรเจนจากไนเตรตส่งผลต่อการสร้างรงควัตถุสีแดง ในขณะที่แอมโมเนียมหรือแอมโมเนียมไนเตรตจะมีผลต่อการสร้างรงควัตถุสีส้ม สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น ยีสต์เอกซ์แทรคเหมาะสมต่อการสร้างรงควัตถุสีแดง (Broder and Koehler, 1980) สำหรับแหล่งไนโตรเจนจากเปปโตนจะเหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุสีแดง monascorubramine (Johns and Stuart, 1991) ชนิดของสารที่เป็นแหล่งของไนโตรเจนนอกจากจะมีผลต่อการสร้างสารสีแล้วยังมีผลต่อการสร้างสาร citrinin ด้วย จากรายงานของ Blanc *et al.* (1995) พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิต citrinin ของเชื้อรา *M. ruber* โดยเมื่อแทนที่โมโนโซเดียมกลูตาเมตด้วยแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ คือ แอมโมเนียไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ ยูเรีย และเมทไธโอนิน พบว่าปริมาณ citrinin ลดลงจาก 120 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 100 42 17 และ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากรายงานของ Vidyalakshmi *et al.* (2009) พบว่าการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเติมในข้าวเพื่อเป็นแหล่งของไนโตรเจนในการเจริญของเชื้อราทำให้ได้ผลผลิตข้าวแดงและรงควัตถุสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมเปปโตน ยีสต์เอกซ์แทรคและแอมโมเนียมไนเตรต

8. พีเอช

ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิของเชื้อรา จากรายงานของ Palo (1960) พบว่า *M. purpureus* สร้างสีแดงได้ในพีเอชระหว่าง 3.0-7.5 ขณะที่ John and Stuart (1991) รายงานว่า *M. purpureus* สร้างสีได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 6.0 เมื่อเทียบกับที่พีเอช 3.4 และ 7.0 ขณะที่รายงานของพลายแก้วและบุษบา (2534ข) ระบุว่าสภาวะเป็นกรดไม่มีผลต่อการสร้างสีเหลืองของ *M. barkari*

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation)

การเกิดออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างออกซิเจนกับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวอิสระหรือที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในไลพิดหรืออาหารที่มีไลพิด ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพ (deterioration) ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเป็นไปอย่างต่อเนื่องเมื่อไลพิดหรืออาหารสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ อัตราเร็วของปฏิกิริยาออกซิเดชันจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระ (free-radical chain reaction) ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ

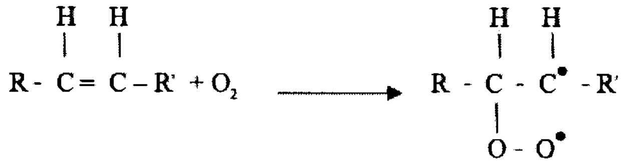
1. initiation เป็นขั้นตอนการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical)
2. propagation เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระ
3. termination เป็นปฏิกิริยาสุดท้ายที่ทำให้โปรดักต์ที่เกิดขึ้นไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระ (non-radical products)

ปฏิกิริยาเริ่มต้นของออกซิเจนกับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวจะทำให้เกิดไฮโดรเพอร์ออกไซด์ (hydroperoxide, ROOH) โดยไฮโดรคาร์บอนตรงตำแหน่งพันธะคู่สูญเสียไฮโดรเจนอะตอมทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระ

$$RH \longrightarrow R^{\bullet} + H^{\bullet}$$

กรดไขมัน อนุมูลอิสระ

และออกซิเจนจะเข้าไปทำปฏิกิริยาที่พันธะคู่เกิดเป็น diradical ดังนี้



หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระกับออกซิเจนต่อเนื่องไปเรื่อยๆ

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet}$$

ได้เป็นอนุมูลเพอร์ออกซี ($ROO^{\bullet}$) ไฮโดรเพอร์ออกไซด์ (ROOH) และอนุมูลไฮโดรคาร์บอน ($R^{\bullet}$) อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่นี้จะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องกับออกซิเจนต่อไป และ

เมื่อใดที่อนุมูลอิสระมาทำปฏิกิริยากันเองจะเกิดเป็นสารประกอบใหม่ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาจะหยุดลง เช่น

$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow R-R$$

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOR + O_2$$

$$RO^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow ROR$$

$$ROO^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow ROOR$$

$$2RO^{\bullet} + 2ROO^{\bullet} \longrightarrow 2ROOR + O_2$$

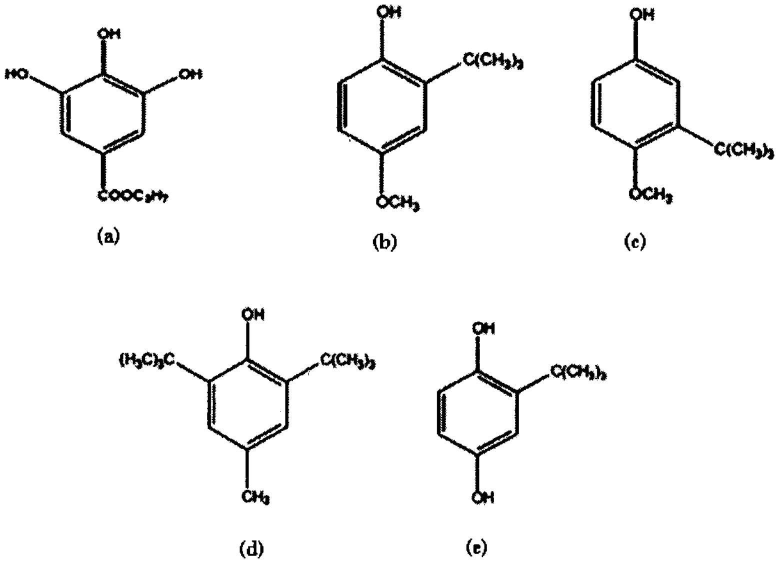
เมื่อไม่มีอนุมูลอิสระเหลือสำหรับทำปฏิกิริยาต่อเนื่องกับออกซิเจนแล้ว หากยังมีออกซิเจนมากพออยู่ก็จะเริ่มเกิดปฏิกิริยาขั้นที่ 1 คือ initiation reaction ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้ใหม่ ปฏิกิริยาเริ่มต้นนี้เกิดขึ้นได้ง่ายเนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่ใช้พลังงานในการทำลายพันธะระหว่างคาร์บอนและไฮโดรเจน ประมาณ 35 กิโลแคลอรี หรือ 146 กิโลจูล/โมล และยังต้องใช้พลังงานอีกจำนวนหนึ่ง ซึ่งน้อยกว่าพลังงานที่ใช้ในการเติมออกซิเจนเข้าไปที่พันธะคู่ เพื่อให้เกิดเป็น diradical อย่างไรก็ตามพลังงานที่ใช้จะลดน้อยลงในภาวะที่มีโลหะ เอนไซม์ หรือแสงช่วยเร่งให้เกิดโฟโตออกซิเดชัน (photo-oxidation) (นิธิยา, 2549)

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาเนื่องจากต้องการจับคู่กับอิเล็กตรอนอื่นเพื่อเข้าสู่สถานะเสถียร ร่างกายของมนุษย์มีระบบป้องกันการสะสมของสารอนุมูลอิสระด้วยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อควบคุมปริมาณให้อยู่ในระดับสมดุล อย่างไรก็ตามเมื่อร่างกายได้รับสิ่งกระตุ้นจากการได้รับมลพิษจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น การสัมผัสแสงแดด การสูบบุหรี่ การกินอาหารไขมันสูง อาหารปิ้ง ย่าง จะส่งผลต่อการเสียสมดุลในการควบคุมสารอนุมูลอิสระและเกิดการสะสมในร่างกายจนอยู่ระดับที่เรียกว่า "oxidative stress" ซึ่งเป็นสภาวะที่เป็นอันตรายต่อร่างกายเนื่องจากการทำปฏิกิริยาของสารอนุมูลอิสระกับเยื่อหุ้มเซลล์ต่างๆ จะทำให้เซลล์เกิดการเสื่อมสภาพและนำไปสู่ความผิดปกติของเซลล์และร่างกายได้ในที่สุด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องได้รับสารต้านออกซิเดชันเพิ่มเติมจากอาหาร เช่น วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี และสารประกอบฟีนอล เป็นต้น

สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant)

สารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง สารปริมาณน้อยที่สามารถยับยั้งหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) แหล่งที่มาของสารต้านออกซิเดชันแบ่งได้ 2 ประเภท ได้แก่

1. สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ เป็นสารประกอบฟีนอลสังเคราะห์ 5 ชนิดได้แก่ propyl gallate, 3-butylated hydroxyanisole (BHA), 2-butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene (BHT) และ tertiary butylhydroquinone (สูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.9) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันซึ่งเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokorny *et al.*, 2001)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ propyl gallate (a), 3-butylated hydroxyanisole (b), 2-butylated hydroxyanisole (c), butylated hydroxytoluene (d), tertiary butyl hydroquinone (e)

ที่มา: Pokorny *et al.* (2001)

2. สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ เป็นสารต้านออกซิเดชันที่พบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ มีทั้งที่อยู่ในรูปของวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบตาแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (non-nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอล โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น isoflavones และ flavonoids ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชั่น (functional group) เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยการให้อนุมูล $H^{\bullet}$ แก่อนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\bullet}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำได้โดยการเข้าจับกับโลหะดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) (Sanchez-Moreno *et al.*, 2000) สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบันเนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity)

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ตามลักษณะการต้านออกซิเดชัน (Sherwin, 1990; Yanishlieva, 2001) ได้แก่

1. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันปฐมภูมิ (primary antioxidant activity)

เป็นการหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการให้อนุมูลไฮโดรเจน ($H^{\bullet}$) หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระโดยตรง (radical scavenging effect) จึงทำให้อนุมูลเกิดความเสถียรขึ้น ดังสมการ

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet}$$

$$R^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow RA$$

$$RO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow ROA$$

สารต้านออกซิเดชันที่ออกฤทธิ์ดักจับอนุมูลอิสระส่วนใหญ่คือสารประกอบฟีนอลซึ่งออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำแต่เมื่อความเข้มข้นสูงอาจออกฤทธิ์เป็นสารเสริมฤทธิ์ออกซิเดชันได้ (Rajalakshni and Narasimhan, 1996)

2. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทุติยภูมิ (secondary antioxidant activity)

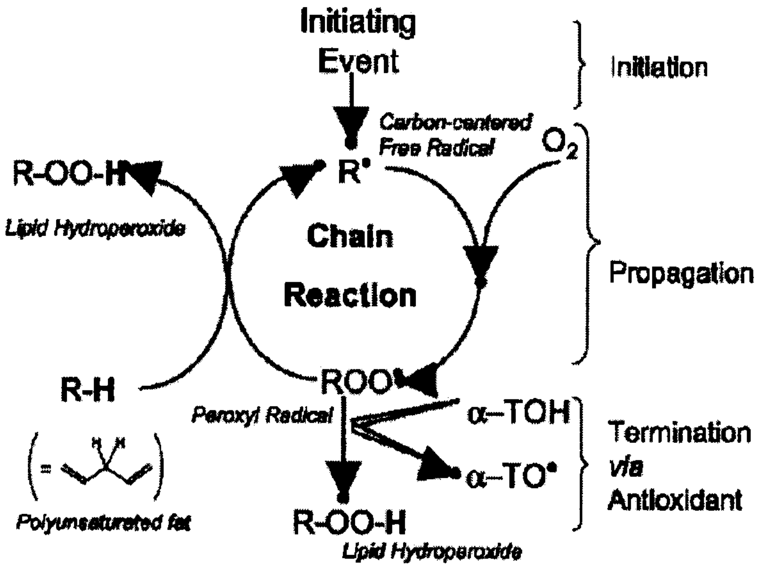
สารต้านออกซิเดชันประเภทนี้ไม่ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงแต่จะช่วยสารต้านต้านออกซิเดชันปฐมภูมิทำงานในลักษณะต่างๆ (Gordon, 2001) ได้แก่

1) ยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen (singlet oxygen quenching)

ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยเปลี่ยน singlet oxygen ($^1O_2$*) ให้อยู่ในรูป triplet oxygen ($^3O_2$) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน เช่นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies *et al.*, 1992)

2) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking)

หยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็คตรอนจากอนุมูลเพอร์ออกซี ($ROO^{\bullet}$) เช่น วิตามินอี (α-tocopherol; toc-OH) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันด้วยการเป็นตัวรับอิเล็คตรอนจากอนุมูลเพอร์ออกซี ดังรูปที่ 2.10 (Burton and Traber, 1990)

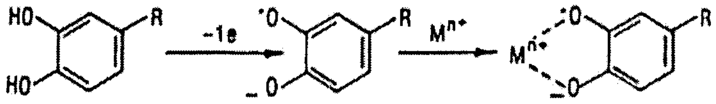


รูปที่ 2.10 การทำงานของวิตามินอีในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

ที่มา: Burton and Traber (1990)

3) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation)

หยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการจับโลหะคือ Fe^{2+} และ Cu^{2+} ที่ทำหน้าที่เป็นสารเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นช้าลง เช่น flavonoids, phosphoric acid และ citric acid กลไกแสดงในสมการ (Sanchez-Moreno *et al.*, 2000)



4) เสริมฤทธิ์ (synergism)

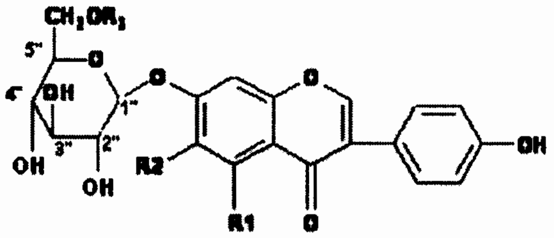
เป็นการออกฤทธิ์ของสารต้านออกซิเดชันด้วยการช่วยสนับสนุนให้สารต้านออกซิเดชันทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมระหว่าง α-tocopherol กับ ascorbic acid โดยที่ ascorbic acid ไม่สามารถทำงานในระบบ hydrophobic ได้เหมือนกับ α-tocopherol แต่จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล α-tocopherol peroxyl ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง α-tocopherol กับอนุมูล peroxyl ($ROO^{\bullet}$) เปลี่ยนรูปกลับไปเป็น α-tocopherol ที่สามารถทำงานได้ (Frankel, 1998)

5) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition)

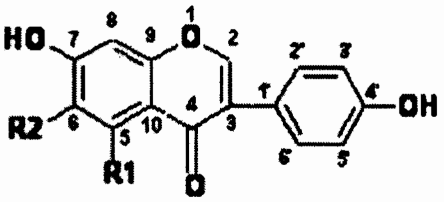
สารต้านออกซิเดชันบางกลุ่ม เช่น สารประกอบฟีนอล สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลิโพออกซีจีเนส (lipoxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (co-factor) ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (Puerta, 1999)

สาร isoflavone ในถั่วเหลือง

isoflavone เป็นสารประกอบฟีนอลที่พบในถั่วเหลือง เกิดจากการรวมตัวกันของ phenylpropane กับ malonyl coenzyme 3 โมเลกุล สาร isoflavone ที่พบในถั่วเหลืองมี 12 ชนิด แบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 3 ชนิด คือ กลุ่ม β-glucosides ประกอบด้วย daidzin, genistin และ glycitin กลุ่ม malonylglucosides ประกอบด้วย malonyldaidzin, malonylgenistin และ malonylglycitin กลุ่ม acetylglucosides ประกอบด้วย acetyldaidzin, acetylgenistin และ acetylglycitin และกลุ่ม aglucosides (หรือ aglucones หรือ aglycones) ประกอบด้วย daidzein, genistein และ glycitein (สูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.11)



Glucosides



Aglucosides

Compounds	R1	R1	R3	isoflavones
β-glucosides	H	H	H	daidzin
	OH	H	H	genistin
	H	OCH_3	H	glycitin
malonylglucosides	H	H	$COCH_2COOH$	malonyldaidzin
	OH	H	$COCH_2COOH$	malonylgenistin
	H	OCH_3	$COCH_2COOH$	malonylglycitin
acetylglucosides	H	H	$COCH_3$	acetyldaidzin
	OH	H	$COCH_3$	acetylgenistin
	H	OCH_3	$COCH_3$	acetylglycitin
aglucosides	H	H	-	daidzein
	OH	H	-	genistein
	H	OCH_3	-	glycitein

รูปที่ 2.11 สูตรโครงสร้างของ isoflavones ที่พบในถั่วเหลือง
ที่มา: Sakthivelu *et al.* (2008)

สาร isoflavone โดยเฉพาะอย่างยิ่ง aglucosides มีสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจึงส่งผลต่อความสามารถในการป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ เช่น โรคมะเร็ง (Gotoh *et al.*, 1998) โรคหลอดเลือดหัวใจ (Potter *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2003) โรคเบาหวาน (Liu *et al.*, 2006) โรคกระดูกพรุน (Potter *et al.*, 1998; Ishimi *et al.*, 2002) และใช้เป็น phytoestogen ในหญิงวัยหมดประจำเดือนได้ (Morabito *et al.*, 2002) สาร isoflavone ในเมล็ดถั่วเหลืองส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม malonylglucosides โดยเฉพาะ

อย่างยิ่ง malonylgenistin (Lee et al. 2004; Kim and Chung, 2007) รองลงมาคือ β-glucosides aglucosides และ acetylglucosides (Lee *et al.*, 2004; Kim and Chung, 2007) ชนิดและปริมาณของสาร isoflavone ในเมล็ดถั่วเหลืองมีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับระยะการเจริญ สายพันธุ์ ฤดูการเพาะปลูก สถานที่เพาะปลูก และสภาวะและอายุการเก็บรักษา (Wang and Murphy, 1994; Hoeck *et al.,* 2000; Lee *et al.*, 2003; Kim and Chung, 2007) เมื่อมีการบริโภคถั่วเหลืองร่างกายจะสามารถเปลี่ยนสาร isoflavone glucosides ไปเป็น aglucosides โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในส่วนของลำไส้ก่อนจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย (Day *et al.*, 1998) จากรายงานของ Izumi *et al.* (2000) ระบุว่าร่างกายของมนุษย์สามารถดูดซึมสาร isoflavone aglucosides ได้ในปริมาณที่มากและรวดเร็วกว่ากลุ่ม glucosides ดังนั้นการบริโภคอาหารที่มีสาร isoflavone aglucosides สูงจึงส่งผลดีต่อร่างกายได้มากกว่า

ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

ถั่วเหลืองหมักและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองหมักจัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเนื่องจากเป็นแหล่งของโปรตีนและไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการหมักย่อยของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักทำให้ร่างกายดูดซึมได้ง่าย นอกจากนี้ถั่วเหลืองหมักยังเป็นแหล่งสำคัญของสาร isoflavone ในรูปของ aglucosides และ phenolic compounds รวมทั้งสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักอีกด้วย (Lee *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามสารชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเหล่านี้พบในถั่วเหลืองหมักในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของถั่วเหลือง สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก และกระบวนการผลิต ถั่วเหลืองหมักราโมแนสคัสเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่อุดมด้วยสารชีวโมเลกุลที่มีประโยชน์ต่อร่างกายทั้งจากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักและการสร้างขึ้นของราโมแนสคัสในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น สารประกอบฟีนอล สาร isoflavone aglucosides สารลดคอเลสเตอรอล monacolin สารสีหรือรงควัตถุและสารต้านออกซิเดชัน (Rhyu *et al.*, 2002, Kuba *et al.*, 2005; Pyo and Lee, 2007; Lee *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2010) นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส เช่น น้ำนมถั่วเหลืองยังพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้มากกว่าผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักแบบดั้งเดิมอีกด้วย (Lim *et al.*, 2010)

อาหารหมักจากโมแนสคัสที่มีสาร monacolin สามารถใช้เป็นยารักษาโรคไขมันในเลือดสูง ลดคอเลสเตอรอลชนิด LDL และลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจในคนและสัตว์ทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการทดลองให้กระต่ายกินอาหารที่มีส่วนผสมของข้าวแดง

ทำให้ระดับคอเลสเตอรอลทั้งหมดในเลือดของกระต่ายลดลงร้อยละ 25-40 ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนผสมของข้าวแดงและยังสามารถลดปริมาณของ LDL-cholesterol และค่าดัชนีความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจลงได้ (Wei *et al.*, 2003) และจากการทดลองของ Wang *et al.* (2000) ที่ทดลองให้หนูกินข้าวแดงเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสามารถลดความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ในซีรัม คอเลสเตอรอลชนิด VLDL (very low density lipoprotein cholesterol) และ LDL ขณะที่พบปริมาณคอเลสเตอรอลชนิด HDL เพิ่มขึ้นเล็กน้อย การศึกษาของ Qin *et al.* (1998) ได้ให้ผู้บริโภค 187 คนกินข้าวแดงหรืออังคักติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าข้าวแดงช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดลงร้อยละ 20 ลดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ลงร้อยละ 24 และมีคอเลสเตอรอลชนิด HDL เพิ่มขึ้นร้อยละ 14 นอกจากนี้ยังมีการทดลองให้ผู้ป่วยโรคคอเลสเตอรอลสูงกินข้าวแดงทดแทนการกินยารักษาโรคคือยาสเตติน (Statin) แล้วมีอาการข้างเคียงของยา พบว่า ข้าวแดงช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลทั้งหมดของผู้ป่วยลงได้ร้อยละ 15 ลดปริมาณคอเลสเตอรอลชนิด LDL ลงได้ร้อยละ 21 และยังช่วยลดอาการข้างเคียงที่เกิดจากยาสเตตินได้อีกด้วย (Venero *et al.*, 2010) และจากการทดลองใช้ข้าวแดงในการรักษาโรคคอเลสเตอรอลสูงในเด็กพบว่า ข้าวแดงสามารถลดปริมาณของคอเลสเตอรอลทั้งหมด คอเลสเตอรอลชนิด LDL และอะโปไลโพโปรตีน (apolipoprotein) ลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Guardamagna *et al.*, 2011) นอกจากผลในการลดคอเลสเตอรอลในเลือดแล้วรายงานของ Hong *et al.* (2008) ยังระบุว่าข้าวแดงสามารถยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้อีกด้วย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

- ถั่วเหลือง สายพันธุ์เชียงใหม่ 60 จากสถาบันวิจัยพืชไร่ จังหวัดเชียงใหม่

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

- *Monascus* sp. ไอโซเลตที่สร้างสารพิษ citrinin ต่ำจากการทดสอบด้วยวิธี Bioassay screening จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ PSRU03 PSRU05 PSRU08 และ PSRU10 (เกตุการ, 2554)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, Germany)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Eppendorf Centrifuge 5403)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- เครื่องชั่งทศนิยม (Wettler Toledo, Switzerland)
- ตู้อบลมร้อน (Memmert, Germany)
- เครื่องเขย่า (Vortex Genie 2, USA)
- เครื่องอัลตราโซนิก (Thailand)
- เครื่อง Spectrophotometer (Spectrophotometerevolution 201, China)
- เครื่อง Spectrophotometer Microplate Reader (KGW-961, Manufacture)
- อ่างน้ำอุ่น (Stuart shaker bath , English)
- หม้อนึ่งความดันไอ (TKA TEKNOLABO, MILANO, Italy)
- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (Agilent technologies 1100 Series, Germany)
- HPLC Column (Zorbax SB C18 150 x 4.6 mm, 5 micron, Agilent technologies USA)
- Mass detector system (Agilent technologies LC/MSD SL, USA)

3.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) (Himedia, India)
- Butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma – Aldrich, Germany)
- Methanol (Labscan, Ireland)
- Gallic acid (Fluka , USA)
- Folin- Ciocalteu (Merck, Germany)
- Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Merck , Germany)
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazy (DPPH) (Fluka, Germany)
- Linoleic acid (Fluka, India)
- Tween 20 (Fluka, Spain)
- Ammonium thiocyanate (Rankem, India)
- Iron (II) chloride tetrahydrate (Grade AR, Malaysia)
- Ethanol (Lab-Scan, Ireland)
- Hydrochloric acid (Lab-Scan, Ireland)
- Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($NaH_2PO_4.H_2O$) (Merck, Germany)
- Di-sodium hydrogen phosphate dihydrate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Merck, Germany)

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.0 (SPSS Inc., USA)

3.6 ระเบียบวิธีวิจัย

แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ตอน คือ

ตอนที่ 1 การคัดเลือกสายพันธุ์ราโมแนสคัสที่สร้างสารพิษ citrinin ต่ำและสร้างสาร monacolin K สูง

การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยง *Monascus* sp. สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ citrinin ต่ำซึ่งคัดแยกได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (เกตุการ, 2554) จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ PSRU03 PSRU05 PSRU08 และ PSRU10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสนาน 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรเจาะโคโลนีของเชื้อราและนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) (10 ชิ้นวุ้นต่อ 100 มิลลิลิตร) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสนาน 7 วัน

หลังครบเวลาบ่มนำอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เข้าเครื่อง stomacher นาน 30 วินาที กรองเอาเฉพาะสารละลายสปอร์เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักถั่วเหลือง

การเตรียมถั่วเหลือง

นำเมล็ดถั่วเหลืองมาคัดสิ่งแปลกปลอมและเมล็ดลีบ แช่เมล็ดถั่วเหลืองในน้ำในอัตรา 1:4 นานประมาณ 16 ชั่วโมง หลังสะเด็ดน้ำบรรจุเมล็ดถั่วเหลืองใส่ในฟลาสค์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 50 กรัม ปรับค่า pH ของถั่วเหลืองให้เป็นกรด (ประมาณ 3.5 - 4) ด้วยการเติม vinegar ในปริมาณร้อยละ 10 ปิดปากฟลาสค์ด้วยสำลีและกระดาษ นึ่งถั่วเหลืองให้สุกในหม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที รอให้เย็นลงก่อนการเติมสารละลายสปอร์ของรา *Monascus* sp.

ศึกษาความสามารถในการสร้างสาร citrinin และ monacolin K ของราโมแนสคัสในถั่วเหลือง

เติมสารละลายสปอร์ของรา *Monascus* sp. ลงในถั่วเหลืองนึ่งสุกในปริมาณร้อยละ 5 บ่มถั่วเหลืองในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน (Pyo and Lee, 2007) จะได้ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่นำไปศึกษาปริมาณของสาร citrinin และ monacolin K

การเตรียมตัวอย่าง

อบแห้งถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสในตู้อบแห้งแบบลมร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนค่า water activity (a_w) ของเมล็ดถั่วเหลืองต่ำกว่า 0.6 บดถั่วเหลืองให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น เก็บผงถั่วเหลืองหมักในถุงอลูมิเนียมฟอยล์และเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

การสกัดสาร

สกัดผงถั่วเหลืองหมัก 1 กรัม ด้วย acidified acetonitrile 10 มิลลิลิตร ในเครื่อง homoginizer นาน 1 ชั่วโมงและสกัดในเครื่องอัลตราโซนิคต่ออีก 10 นาที นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 5,000 rpm นาน 10 นาที เก็บสารละลายเฉพาะส่วนใสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สาร citrinin และ monacolin K ต่อไป

การตรวจวิเคราะห์สาร citrinin และ monacolin K

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร citrinin และ monacolin K ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS) โดยใช้ HPLC Agilent technologies 1100 series

Germany คอลัมน์ Zorbax SB C18 ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมครอน (Agilent technology, USA) ในการตรวจวิเคราะห์ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 30 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ A คือ trifluoroacetic acid เข้มข้นร้อยละ 0.1 และเฟสเคลื่อนที่ B คือ acetonitrile ใช้ระบบการวิเคราะห์แบบ isocratic A:B อัตรา 40:50 ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที detector เป็น photodiode array ตรวจวัดที่ 238 และ 330 นาโนเมตร และ Mass Spectroscopy (Agilent technology, USA) สแกนที่ 100 – 500 m/z

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตอนที่ 2 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการหมักถั่วเหลืองด้วยราโมแนสคัส

เตรียมถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสเช่นเดียวกับการทดลองตอนที่ 1 โดยใช้ *Monascus* sp. สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ citrinin ต่ำแต่สร้างสารลดคอเลสเตอรอล monacolin K สูงจากการทดลองที่ 1 มาใช้เป็นกล้าเชื้อ ผันแปรอุณหภูมิการบ่มถั่วเหลืองดังนี้

สภาวะที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน (Chen and Hu, 2005)

สภาวะที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน (Chen and Hu, 2005)

สภาวะที่ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (30/25) จนครบ 20 วัน (Tsukahara *et al.*, 2009)

สุ่มตัวอย่างทุก 5 วัน คือ วันที่ 0 5 10 15 และ 20 ของการบ่ม เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุและสมบัติการต้านออกซิเดชัน

การเตรียมสารสกัด

สกัดผงถั่วเหลือง 1.5 กรัม ด้วยเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 จำนวน 15 มิลลิลิตร ในเครื่องอัลตราโซนิค นาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 3,000 rpm นาน 30 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนใสเพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุและสมบัติการต้านออกซิเดชันต่อไป

การตรวจวิเคราะห์รงควัตถุสีแดง สีเหลืองและสีส้ม

ตรวจวิเคราะห์รงควัตถุสีแดง สีเหลืองและสีส้มในสารสกัดโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุสีแดงที่ช่วงคลื่น 500 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุสีเหลืองที่ช่วงคลื่น

400 นาโนเมตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงของรงควัตถุสีส้มที่ช่วงคลื่น 470 นาโนเมตร (Johns and Stuart, 1991) คำนวณหาปริมาณของรงควัตถุแต่ละชนิดโดยค่ารงควัตถุ 1 หน่วย (unit) คือสารเมตาบอไลต์จากราโมแนสคัสที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 470 และ 500 นาโนเมตร เท่ากับ 1 ดังนั้น

รงควัตถุสีเหลือง (units)	=	A_{400} x dilution factor
รงควัตถุสีส้ม (units)	=	A_{470} x dilution factor
รงควัตถุสีแดง(units)	=	A_{500} x dilution factor

เมื่อ

A_{400}	คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร
A_{470}	คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร
A_{500}	คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

การตรวจวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compounds)

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัดตามวิธีของ Luque-Rodriguez *et al.* (2007) โดยผสมสารสกัด 400 ไมโครลิตรกับสารละลาย Folin–Ciocalteu reagent (เข้มข้น 0.25 นอร์มัล) 2 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (เข้มข้นร้อยละ 7.5) 1.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีด้วย vortex บ่มหลอดทดลองในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นบ่มต่อในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวเคลื่อน 760 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลรวมในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกับกรดแกลลิคต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (mg gallic acid equivalent (GAE)/g dw.) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิคซึ่งทำที่ความเข้มข้น 10 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า R^2 เป็น 0.9986

การตรวจวิเคราะห์ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ตรวจวิเคราะห์ค่า FRAP ในสารสกัดโดยอ้างอิงวิธีของ Maier *et al.* (2009) ดังนี้ ผสมสารสกัดตัวอย่าง 400 ไมโครลิตรกับสารละลาย FRAP 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีด้วย vortex บ่มในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวเคลื่อน 593 นาโนเมตร คำนวณหาค่า FRAP ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกับโทรลอกซ์ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง (mg trolox equivalent (TE)/g dw.) โดยเปรียบเทียบกับ

กราฟมาตรฐานของสารโทรลอกซ์ซึ่งทำที่ช่วงความเข้มข้น 1 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า R^2 เป็น 0.9984

การตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical-scavenging effect)

ตรวจวิเคราะห์ DPPH radical-scavenging effect ในสารสกัดโดยอ้างอิงวิธีของ Maier *et al.* (2009) โดยมีการปรับเปลี่ยนเล็กน้อยดังนี้ ผสมสารสกัด 1.5 มิลลิลิตรกับสารละลาย DPPH (เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์) 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex บ่มในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร สำหรับชุดควบคุมใช้เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 ทำปฏิกิริยาแทนสารสกัด คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็นร้อยละได้ดังนี้

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ร้อยละ) = [1 – (Abs สารตัวอย่าง/Abs ชุดควบคุม) x 100]

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ตอนที่ 3 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักราโมแนสคัสชนิดผง

ศึกษาหาอุณหภูมิในการอบแห้งถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่เหมาะสมต่อการรักษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพก่อนนำไปผลิตเป็นผง โดยการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสด้วยกระบวนการหมักที่เหมาะสมคัดเลือกจากการทดลองตอนที่ 1 – 2 อบให้แห้งในตู้อบแบบลมร้อนโดยผันแปรอุณหภูมิในการอบแห้ง 3 ระดับ คือ 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส บดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น ตรวจวัดคุณภาพผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักราโมแนสคัสชนิดผง ดังนี้

ตรวจวิเคราะห์ค่าความชื้นและพีเอช

วัดค่าความชื้นของถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสก่อนและหลังการอบแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ อ้างอิงตามวิธีของ AOAC (2000) และวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter

การตรวจวิเคราะห์รงควัตถุสีแดง สีเหลืองและสีส้ม

ใช้วิธีตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกับตอนที่ 2

ตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ isoflavone

ทำการสกัดผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส จำนวน 10 กรัม ด้วยตัวทำละลายเมทานอลเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 100 มิลลิลิตร ในเครื่องอัลตราโซนิกอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำกากที่เหลือไปสกัดซ้ำด้วยวิธีการสกัดเดิม นำสารสกัดที่กรองได้ทั้ง 2 ครั้งมารวมกันและนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 3,000 rpm นาน 15 นาที แยกเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสไปทำให้แห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศด้วยเครื่อง evaporator อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เก็บผงแห้งของสารสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ isoflavone

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ isoflavone ในกลุ่ม β-glucosides 3 ชนิด คือ daidzin, genistin และ glycitin และกลุ่ม aglucosides 3 ชนิด คือ daidzein, genistein และ glycitein ใช้เครื่อง HPLC คอลัมน์ Inertsil ODS3 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร, 5 ไมครอน เฟสเคลื่อนที่ A คือ acetic acid เข้มข้นร้อยละ 0.1 และเฟสเคลื่อนที่ B คือ เมทานอล ใช้ระบบการวิเคราะห์แบบ gradient อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที detector เป็น photodiode array ตรวจวัดที่ 255 นาโนเมตร ในระหว่างตรวจวิเคราะห์ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส

ตรวจวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน

ตรวจวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลรวม ฤทธิ์ FRAP และ DPPH radical-scavenging effect ด้วยวิธีการเดียวกับตอนที่ 2

ตรวจวิเคราะห์สาร citrinin และ monacolin K

คัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลการต้านออกซิเดชันสูงที่สุดไปตรวจวิเคราะห์ citrinin และ monacolin K ด้วยวิธีการเดียวกับตอนที่ 1

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ตอนที่ 4 ฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการการแปรรูปผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักราโมแนสคัสชนิดผง

จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองหมักชนิดผงและการประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในคุ้กกี้ให้กับนักวิจัยและผู้สนใจทั่วไป โดยใช้เวลาในการฝึกอบรม 1 วัน ณ อาคารแปรรูป คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปราย

4.1 ผลการศึกษาสายพันธุ์ราโมแนสคัสที่สร้าง citrinin ต่ำและสร้าง monacolin K สูง

งานวิจัยนี้ได้นำเชื้อรา *Monascus* sp. จำนวน 4 ไอโซเลต คือ PSRU03 PSRU05 PSRU08 และ PSRU10 ซึ่งผู้วิจัยได้คัดแยกจากข้าวแดงทางการค้าและผ่านการคัดเลือกการสร้างสารพิษ citrinin ต่ำด้วยวิธี Bioassay screening โดยเทคนิค agar disc diffusion method (เกตุการ, 2554) มาต่อยอดงานวิจัยโดยการนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักถั่วเหลืองเพื่อเสริมคุณค่าด้วยสารลดคอเลสเตอรอล monacolin K และสารต้านออกซิเดชันกลุ่ม phenolic compounds

รา *Monascus* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลตสามารถสร้างสาร citrinin และ monacolin K ในถั่วเหลืองได้ในปริมาณแตกต่างกันเมื่อบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสนาน 20 วัน (ตารางที่ 4.1) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างไอโซเลตของรา *Monascus* sp. ที่ศึกษาพบว่าไอโซเลต PSRU10 สามารถสร้างสารพิษ citrinin ได้น้อยกว่าไอโซเลตอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยมีค่า 2.26 mg/kg DM ขณะที่ไอโซเลต PSRU03 สร้างสารพิษ citrinin ได้มากที่สุด คือ 4.04 mg/kg DM

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสาร citrinin และ monacolin K ในถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อรา *Monascus* sp.

Isolate Number	Citrinin (mg/kg DM)	Monacolin K (mg/kg DM)
PSRU03	4.04 ± 0.07a	29.98 ± 0.13a
PSRU05	3.13 ± 0.11b	10.87 ± 0.10c
PSRU08	3.91 ± 0.14a	17.76 ± 0.08b
PSRU10	2.26 ± 0.07c	6.83 ± 0.14d

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละแถวที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการตรวจพบ citrinin ในข้าวแดงหรืออังคักที่มีจำหน่ายในประเทศจีนและไต้หวันซึ่งมีการปนเปื้อนของสาร citrinin อยู่ในช่วง 0.2 -140 mg/kg และ 4.2 - 25.1 mg/kg ตามลำดับ (Xu *et al.*, 1999; Shu and Lin, 2002) พบว่า สารพิษ citrinin ที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้มีปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ และเมื่อเทียบกับรายงานของ Tsukahara *et al.* (2009) ที่ได้จัดกลุ่มของเชื้อรา *Monascus* sp. ที่สร้างสาร citrinin ต่ำคือกลุ่มที่สร้างสาร citrinin ได้น้อยกว่า 1,000 μg/g

(หรือ 1,000 mg/kg) ดังนั้นรา *Monascus* sp. ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ทั้ง 4 ไอโซเลตจึงจัดเป็นกลุ่มที่สร้างสาร citrinin ต่ำ

เมื่อพิจารณาปริมาณของ monacolin K ในตารางที่ 4.1 พบผลที่ตรงข้ามกับการตรวจพบสาร citrinin นั่นคือไอโซเลต PSRU03 สามารถสร้างสารลดคอเลสเตอรอล monacolin K ได้มากที่สุด คือ 29.98 mg/kg DM และไอโซเลต PSRU10 สร้างสาร monacolin K ได้น้อยที่สุด โดยไอโซเลต PSRU03 สามารถสร้างสาร monacolin K ได้มากกว่าไอโซเลตอื่นคิดเป็นร้อยละ 69 – 339 ปริมาณของ citrinin และ monacolin K ที่พบในถั่วเหลืองในการศึกษาครั้งนี้ใกล้เคียงกับที่พบในลูกเดือยที่หมักด้วยรา *Monascus* ต่างสายพันธุ์ คือ *M. purpureus* ATCC16365, *M. purpureus* BCC6131, *M. purpureus* DMKU, *M. purpureus* FTCMU และ *M. ruber* TISTR3006 ซึ่งในรายงานของ Pattanagul *et al.* (2008) ระบุว่าพบสาร citrinin อยู่ในช่วง 0.26 – 14.64 mg/kg และสาร monacolin K อยู่ในช่วง 14.97–25.03 mg/kg ในการศึกษาคัดเลือกไอโซเลตของเชื้อ *Monascus* sp. เพื่อใช้ในการผลิตถั่วเหลืองหมักที่มีความปลอดภัยและมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ประโยชน์ต่อร่างกาย งานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกไอโซเลต PSRU03 เป็นกล้าเชื้อในการทดลองตอนต่อไป เนื่องจากสามารถสร้างสารลดคอเลสเตอรอล monacolin K ได้มากกว่าไอโซเลตอื่นและสร้างสาร citrinin ได้ในปริมาณต่ำ

4.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการหมักถั่วเหลืองด้วยราโมแนสคัส

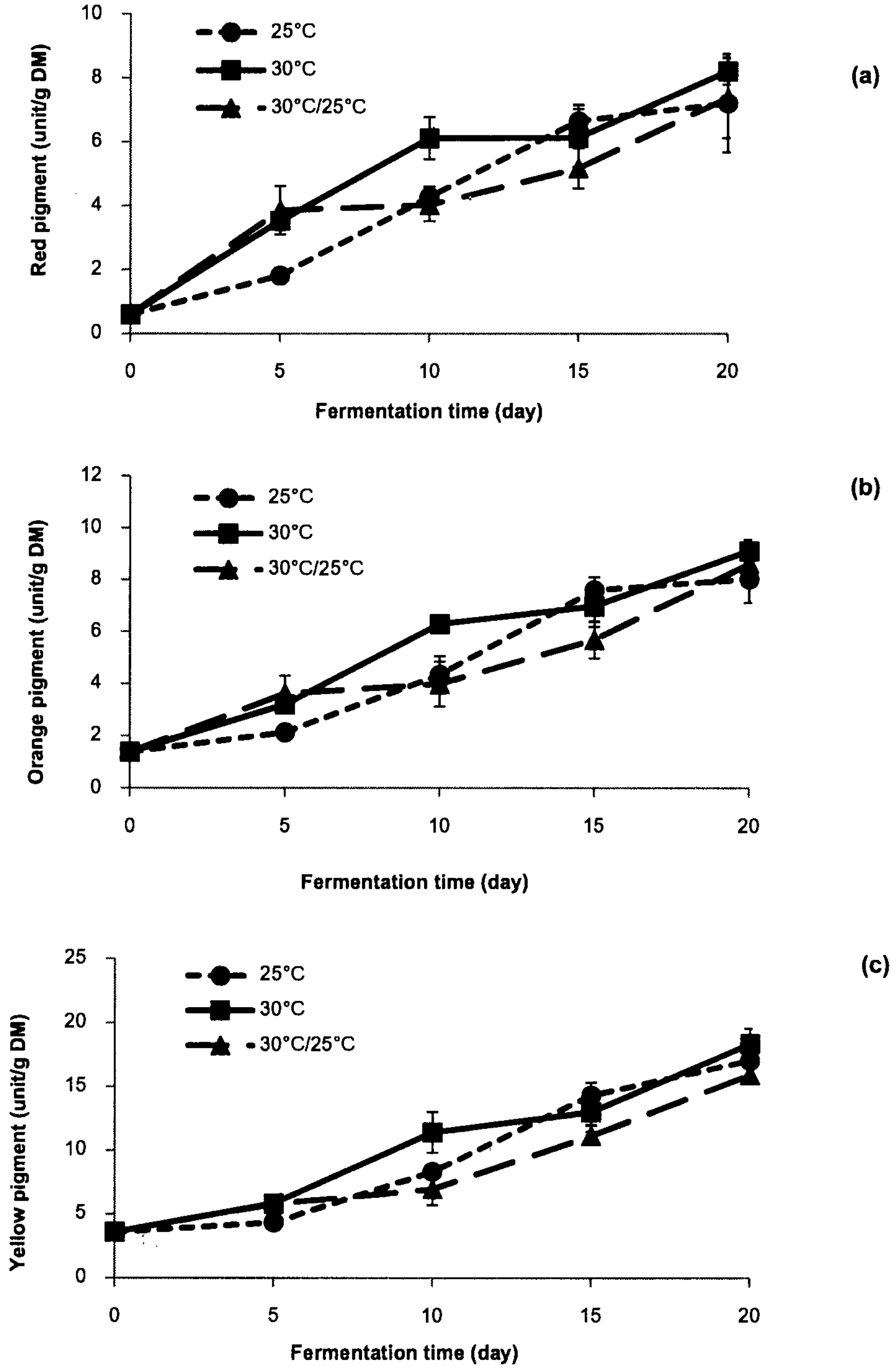
หลังการบ่มถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 25 30/25 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน รา *Monascus* sp. PSRU03 สามารถเจริญและเปลี่ยนสีของเมล็ดถั่วเหลืองให้เป็นสีแดงได้ไม่แตกต่างกันเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ลักษณะถั่วเหลืองโมแนสคัสแสดงในรูปที่ 4.1

(a) (b) (c)

รูปที่ 4.1 ลักษณะปรากฏของถั่วเหลืองหมัก *Monascus* sp. PSRU03 ที่อุณหภูมิ 25 (a) 30/25 (b) และ 30 องศาเซลเซียส (c) นาน 20 วัน

4.2.1 ผลการศึกษาปริมาณรงควัตถุระหว่างการหมักถั่วเหลือง

ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่าเชื้อราสามารถสร้างรงควัตถุสีแดง สีเหลือง และสีส้มในปริมาณที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุสีแดง (a) สีส้ม (b) และสีเหลือง (c) ในระหว่างการหมักถั่วเหลืองด้วย *Monascus* sp. PSRU03 ในสภาวะที่แตกต่างกัน

เชื้อราสร้างรงควัตถุทั้ง 3 สีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาการหมักถั่วเหลืองเพิ่มมากขึ้นในช่วง 10 วันแรกของการหมักพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณรงควัตถุในอัตราที่แตกต่างกันโดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเชื้อราเจริญและมีการสร้างรงควัตถุทั้ง 3 สีได้อย่างรวดเร็วทำให้มีปริมาณของรงควัตถุสูงกว่าถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ขณะที่การหมักถั่วเหลืองที่ 25 องศาเซลเซียสมีการเพิ่มขึ้นของรงควัตถุทั้ง 3 สีอย่างช้าๆ ในช่วง 5 วันแรกของการหมักหลังจากนั้นมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและในสภาวะที่เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิการบ่มจาก 30 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียส หลังการบ่ม 4 วัน พบว่า ปริมาณของรงควัตถุทั้ง 3 สีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการหมักหลังจากนั้นจะค่อนข้างคงที่ก่อนที่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 15 - 20 วันของการหมัก

รงควัตถุในถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 และ 30/25 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 20 ของการหมัก โดยพบปริมาณของรงควัตถุทั้งหมด 32.27 35.67 และ 31.90 หน่วย/กรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ รงควัตถุส่วนใหญ่ที่รา *Monascus* sp. PSRU03 สร้างขึ้นในถั่วเหลืองระหว่างการหมักคือรงควัตถุสีเหลือง โดยหลังจากการหมักครบ 20 วัน พบรงควัตถุสีเหลืองในสัดส่วนที่มากที่สุดคือร้อยละ 50 - 53 (ปริมาณ 6.94 – 14.31 หน่วย/กรัมตัวอย่างแห้ง) รองลงมาเป็นรงควัตถุสีส้มร้อยละ 25 -27 (ปริมาณ 8.02 – 9.11 หน่วย/กรัมตัวอย่างแห้ง) และสีแดงร้อยละ 22 - 23 (ปริมาณ 7.21 – 8.21 หน่วย/กรัมตัวอย่างแห้ง) ตามลำดับ ผลการศึกษาของงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Broder and Koehler (1980) ที่พบรงควัตถุสีเหลืองในข้าวหมักโมแนสคัสมากกว่ารงควัตถุสีส้มและสีแดง รายงานของ Martinkova *et al.* (1999) ระบุว่ารงควัตถุสีเหลืองประกอบด้วยสารสี monascin และ ankflavin รงควัตถุสีส้มประกอบด้วยสารสี monascorubrin และ rubropunctatin และรงควัตถุสีแดงประกอบด้วยสารสี rubropunctamine และ monascorubramine สารสีเหล่านี้มีความคงตัวที่พีเอช 4 - 11 สามารถทนต่อการต้มในน้ำเดือดนานถึง 120 นาที และในสภาวะใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นอกจากนี้ยังคงตัวได้ดีในสภาวะที่มีแสงและอุณหภูมิห้องโดยปริมาณของสารสีไม่ลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 วัน สารสีโมแนสคัสนอกจากจะเป็นสารให้สีจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์อาหารแล้วยังมีรายงานการวิจัยที่บ่งชี้ว่าสารสกัดสารสีจากอังคักสามารถยับยั้งการก่อมะเร็งในหนูได้ (Yasukawa *et al.*, 1996) สารสี monascin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งผิวหนังที่มีสาเหตุจากรังสีอัลตราไวโอเลตจากการทดลองในหนู (Akihisa *et al.*, 2005) และสารสี ankflavin มีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง (Su *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ารงควัตถุสีส้ม rubropunctatin และ monascorubrin มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และรา (Martinkova *et al.*, 1995) และยับยั้งการอักเสบ (Yasukawa *et al.*, 1994) อีกด้วย

4.2.2 ผลการศึกษาปริมาณสารต้านออกซิเดชัน total phenolic compounds

อุณหภูมิและเวลาในการบ่มถั่วเหลืองมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ phenolic compounds ในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส (ตารางที่ 4.2) ปริมาณของ phenolic compounds ในถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่าเมื่อบ่มนาน 10 วัน ขณะที่การบ่มที่อุณหภูมิอื่นต้องใช้เวลาในการบ่มอย่างน้อย 15 วันจึงจะมีการเพิ่มขึ้นของ phenolic compounds อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และการบ่มถั่วเหลืองทั้ง 3 สภาวะมีปริมาณของ phenolic compounds เพิ่มขึ้นสูงที่สุดหลังการบ่มนาน 20 วัน

ตารางที่ 4.2 ค่า total phenolic compounds ในถั่วเหลืองระหว่างการหมักด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน[1,2]

เวลาในการหมัก (วัน)	Total phenolic compounds (mg GAE/g dbs.)		
	25°C	30°C	30/25°C
0	2.48 ± 0.29cA	2.48 ± 0.29dA	2.48 ± 0.29cA
5	2.51 ± 0.26cA	2.59 ± 0.33dA	2.58 ± 0.27cA
10	2.56 ± 0.31cB	4.49 ± 0.39cA	2.61 ± 0.21cB
15	4.23 ± 0.05bB	5.25 ± 0.06bA	3.48 ± 0.07bC
20	5.33 ± 0.25aB	6.10 ± 0.36aA	5.13 ± 0.07aB

[1]ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

[2]ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละแถวที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ถั่วเหลืองหมักที่บ่มในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน ตรวจพบปริมาณ total phenolic compounds มากกว่าถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30/25 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยมีปริมาณ phenolic compounds ทั้งหมด 6.10 5.33 และ 5.13 mg GAE/g dbs. ตามลำดับ ปริมาณ phenolic compounds ที่พบในถั่วเหลืองหมักจากรา *Monascus* sp. PSRU03 ในงานวิจัยนี้มีปริมาณใกล้เคียงกับถั่วเหลืองหมักจากรา *M. pilosus* BCRC31527 แต่มีปริมาณต่ำกว่าถั่วเหลืองหมักจากรา *M. purpureus* BCRC31499 ในรายงานของ Lee *et al.* (2008) ซึ่งระบุว่าพบ phenolic compounds ในถั่วเหลืองหมัก (หมักที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน) ที่สกัดด้วยน้ำร้อนอยู่ที่ 6.05 และ 8.50 mg GAE/g ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแตกต่างของ

สายพันธุ์ของถั่วเหลืองและเชื้อราที่ใช้ในการหมักรวมทั้งระยะเวลาการหมัก ชนิดของตัวทำละลาย และวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (ชุด 0 วัน) และถั่วเหลืองหมักรา *Monascus* sp. PSRU03 นาน 20 วัน พบว่า ถั่วเหลืองหมักที่บ่มในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณ phenolic compounds เพิ่มมากขึ้นในระหว่างการหมักร้อยละ 146 ขณะที่ถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30/25 องศาเซลเซียสมีปริมาณ phenolic compounds เพิ่มมากขึ้นในระหว่างการหมักร้อยละ 115 และ 107 ตามลำดับ จากผลในข้างต้นแสดงให้เห็นว่ารา *Monascus* sp. PSRU03 สามารถหมักย่อยถั่วเหลืองและปลดปล่อย phenolic compounds อิสระที่มีความสามารถในการละลายออกมาได้มากขึ้น (McCue and Shetty, 2003)

4.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

งานวิจัยนี้ตรวจวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดถั่วเหลืองหมักจากรา *Monascus* sp. PSRU03 ด้วยการวัดค่า DPPH radical-scavenging activity และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) โดยค่า DPPH radical-scavenging activity เป็นค่า primary antioxidant activity ของสารต้านออกซิเดชันที่แสดงถึงความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ขณะที่ค่า FRAP เป็นการวัดค่า total antioxidant activity ด้วยกลไกการลดลงของ ferric-tripyridyl-triazine complex ไปเป็นสารประกอบ ferrous และเกิดสารสีขึ้น ดังนั้นจึงเป็นการวัดค่า total reducing power ของสารต้านออกซิเดชัน

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดถั่วเหลืองหมักจากรา *Monascus* sp. PSRU03 แสดงในตารางที่ 4.3 ค่า DPPH radical-scavenging activity ของถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสสูงกว่าถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30/25 องศาเซลเซียส ในช่วงการหมักนาน 10 - 15 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่หลังจากหมักครบ 20 วันพบว่าค่า DPPH radical-scavenging activity ของถั่วเหลืองหมักไม่แตกต่างกันโดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 49.28 – 50.76 เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (ชุด 0 วัน) พบว่าถั่วเหลืองหมักมีค่า DPPH radical-scavenging activity เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักอยู่ในช่วงร้อยละ 15 – 37 ค่า DPPH radical-scavenging activity ของถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่ 25 และ 30/25 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นสูงสุดหลังการบ่มครบ 20 วัน โดยมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50.59 และ 49.28 ขณะที่ถั่วเหลืองหมักที่บ่ม 30 องศาเซลเซียส มีค่า DPPH radical-scavenging activity เพิ่มขึ้นสูงสุด (ร้อยละ 58.78) หลังการบ่มนาน 15 วัน

ตารางที่ 4.3 ค่า DPPH radical-scavenging activity ในถั่วเหลืองระหว่างการหมักด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน[1,2]

เวลาในการหมัก (วัน)	DPPH radical-scavenging activity (%)		
	25°C	30°C	30/25°C
0	42.81 ± 1.39bcA	42.81 ± 1.39dA	42.81 ± 1.39cA
5	41.39 ± 3.61cA	44.01 ± 4.13cdA	43.31 ± 3.02bcA
10	45.14 ± 2.88bcB	57.08 ± 3.75abA	46.32 ± 0.20abcB
15	47.80 ± 2.77bB	58.78 ± 1.77aA	47.63 ± 2.00abB
20	50.59 ± 0.23aA	50.76 ± 5.63bcA	49.28 ± 3.14aA

[1]ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

[2]ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละแถวที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ค่า FRAP ของถั่วเหลืองหมักด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 แสดงในตารางที่ 4.4 ค่า FRAP ของถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 - 15 วัน มีค่าสูงกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30/25 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (ชุด 0 วัน) พบว่าค่า FRAP เพิ่มขึ้นร้อยละ 68 ค่า FRAP ของถั่วเหลืองที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นสูงสุดหลังการบ่มครบ 15 วัน หลังจากนั้นค่า FRAP จะลดลง ขณะที่การบ่มถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 25 และ 30/25 องศาเซลเซียส ค่า FRAP เพิ่มขึ้นสูงสุดหลังการบ่มครบ 20 วัน โดยมีค่า FRAP 3.22 และ 3.21 mg trolox/g dbs. ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักพบว่าค่า FRAP เพิ่มขึ้นร้อยละ 37 - 38

ตารางที่ 4.4 ค่า Ferric reducing antioxidant power ในถั่วเหลืองระหว่างการหมักด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน[1,2]

เวลาในการหมัก	Ferric reducing antioxidant power (mg trolox/g dbs.)		
(วัน)	25°C	30°C	30/25°C
0	2.34 ± 0.37cA	2.34 ± 0.37cA	2.34 ± 0.37bA
5	2.29 ± 0.28cA	2.23 ± 0.14cA	2.50 ± 0.32bA
10	2.45 ± 0.19bcB	3.70 ± 0.24abA	2.49 ± 0.43bB
15	2.86 ± 0.33abB	3.91 ± 0.29aA	2.58 ± 0.05bB
20	3.22 ± 0.10aA	3.36 ± 0.16bA	3.21 ± 0.15aA

[1]ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

[2]ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละแถวที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

สมบัติการต้านออกซิเดชันในสารสกัดถั่วเหลืองหมักที่ได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Pyo and Lee (2007) ซึ่งพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังการหมักถั่วเหลืองที่ 30 องศาเซลเซียสนาน 15 วัน นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Kwak *et al.* (2007) และ Dajanta *et al.* (2011) ที่รายงานการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในถั่วเหลืองหมักจุงคุคแจง (chungkukjang) และถั่วเน่าเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองก่อนหมัก การเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน DPPH radical-scavenging activity และ FRAP ในถั่วเหลืองหมัก (ตารางที่ 4.3-4.4) เป็นผลมาจากการออกฤทธิ์ของ phenolic compounds ที่มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเวลาเดียวกัน (ตารางที่ 4.2) นอกจากนี้ในรายงานของ Kwak *et al.* (2007) ได้ระบุว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการเพิ่มขึ้นของสาร isoflavone aglucosides ในถั่วเหลืองหมักด้วย

งานวิจัยนี้ใช้สมบัติการต้านออกซิเดชันเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาในการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการหมักถั่วเหลืองด้วยราโมแนสคัส ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบสมบัติการต้านออกซิเดชันของถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 และ 30/25 องศาเซลเซียส พบว่าการบ่มถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสเพื่อให้ได้ปริมาณของรงควัตถุและสารต้านออกซิเดชันกลุ่ม phenolic compounds มากกว่าการบ่มถั่วเหลืองที่อุณหภูมิอื่น

4.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิอบแห้งถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่เหมาะสมในการรักษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผง

4.3.1 ค่าความชื้นและค่าพีเอชของถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสอบแห้ง

ถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งให้สุกด้วยหม้อนึ่งความดันก่อนการหมักด้วยราโมแนสคัสมีค่าความชื้นร้อยละ 58.95 ± 0.37 และค่าพีเอช 3.8 ± 0.01 เมื่อหมักถั่วเหลืองด้วยกล้าเชื้อ *Monascus* sp. PSRU3 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสนาน นาน 20 วัน พบว่าถั่วเหลืองหมักมีค่าความชื้นและค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนหมัก โดยค่าความชื้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 66.62 ± 0.62 และค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 7.28 ± 0.08 และถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 – 70 องศาเซลเซียสมีความชื้นอยู่ระหว่างร้อยละ 4.13 – 6.94 อุณหภูมิในการอบแห้งไม่มีผลต่อค่าพีเอชของถั่วเหลืองโดยถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสอบแห้งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.13 – 7.27

4.3.2 ปริมาณรงควัตถุในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผง

ระดับความร้อนในการอบแห้งมีผลต่อปริมาณของรงควัตถุที่ถูกสกัดออกมาจากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส โดยเมื่อใช้ความร้อนในการอบแห้งสูงมากขึ้นส่งผลให้รงควัตถุในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น จากตาราง 4.5 พบว่าถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส ตรวจพบปริมาณของรงควัตถุทั้งสีแดง สีส้มและสีเหลืองสูงกว่า ถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการอบแห้งที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

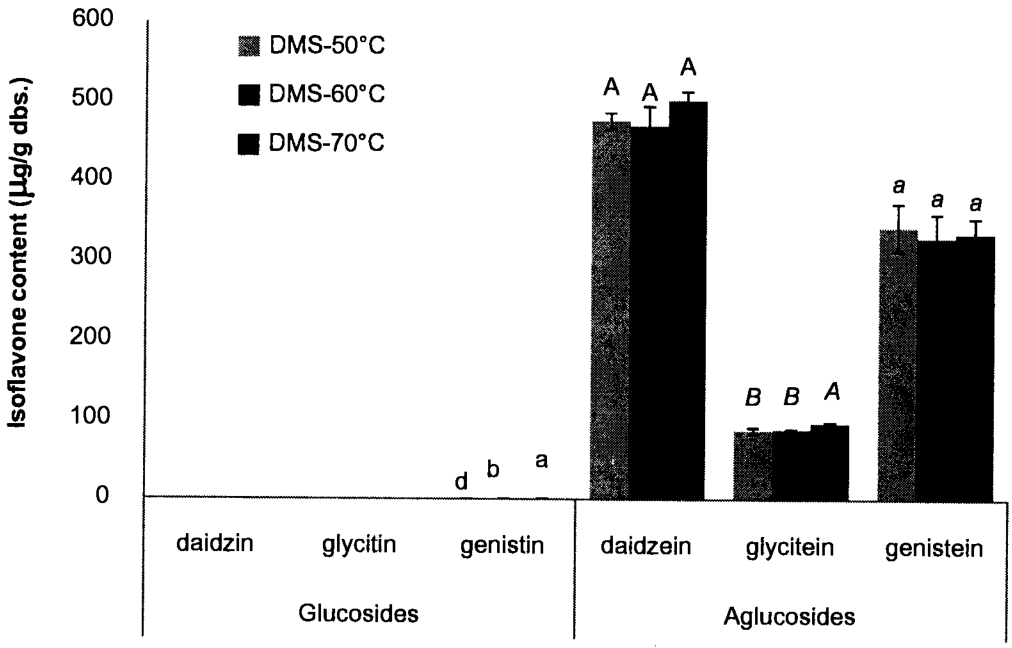
ตารางที่ 4.5 ปริมาณรงควัตถุในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ถั่วเหลืองหมัก	ปริมาณรงควัตถุ (unit/g dbs.)			
	สีแดง	สีส้ม	สีเหลือง	รวม
อบแห้งที่ 50°C	5.91 ± 0.22c	7.41 ± 0.27c	18.10 ± 1.23c	31.43 ± 1.60c
อบแห้งที่ 60°C	6.70 ± 0.29b	8.84 ± 0.30b	21.66 ± 0.34b	37.20 ± 0.94b
อบแห้งที่ 70°C	8.35 ± 0.43a	12.12 ± 0.53a	31.70 ± 1.00a	52.17 ± 1.93a

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

4.3.3 สาร isoflavone ในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสอบแห้ง

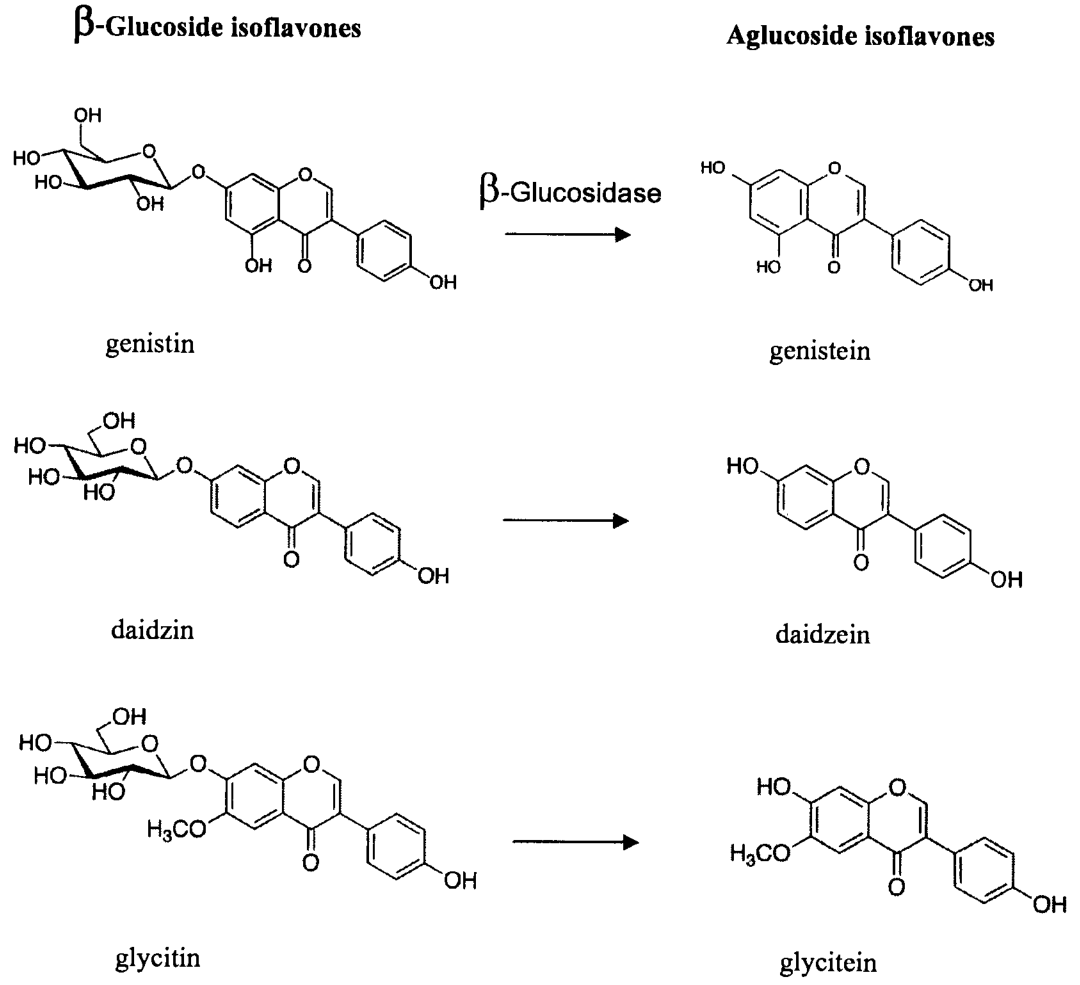
สาร isoflavone ที่พบในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสเกือบทั้งหมด (ร้อยละ 99.88 – 99.91) เป็นสารในกลุ่ม aglucosides (daidzein+genistein+glycitein) เช่นเดียวกับที่พบในรายงานของ Lee *et al.* (2010) และพบสาร daidzein ในปริมาณที่สูงกว่า genistein และ glycitein คิดเป็นสัดส่วน (%proportion) ร้อยละ 53-54 36-38 และ 10 ตามลำดับ สำหรับ isoflavone ในกลุ่ม β-glucosides (daidzin+genistin+glycitin) ตรวจพบ genistin เพียงชนิดเดียวและพบในปริมาณที่น้อยมากคือร้อยละ 0.09 – 0.12 ของสาร isoflavone รวมเท่านั้น (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ชนิดและปริมาณสาร isoflavone glucosides และ aglucosides ในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่อบแห้งในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

สาร isoflavone ในถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ glucoside คือ malonylglucosides, β-glucosides และ acetylglucosides (Lee *et al.*, 2004; Kim and Chung, 2007) ในรายงานของ Dajanta *et al.* (2009) และ Wei *et al.* (2008) ระบุว่าถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งสุกด้วยหม้อนึ่งความดันมีปริมาณของสาร isoflavone ในรูป β-glucosides มากถึงร้อยละ 84 - 88 ของสาร isoflavone ทั้งหมด และพบ genistin มากที่สุด ในกระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสมีหลายขั้นตอนที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูป (conversion) ของสาร isoflavone จาก glucoside form ไปสู่ aglucoside form เช่น ขั้นตอนการแช่เมล็ดถั่วเหลืองแห้งในน้ำ (soaking) และการนึ่งสุกถั่วเหลืองด้วยไอน้ำ จากรายงานของ Kao *et al.* (2004) พบว่าหลังการแช่เมล็ดถั่วเหลืองในน้ำนาน 12 ชั่วโมงจะมีการเพิ่มขึ้นของสาร isoflavone aglucosides สวนทางกับการลดลงของสาร isoflavone glucosides โดยเริ่มจากการเปลี่ยนรูปของสาร malonylglucosides ไปเป็น acetylglucosides และเปลี่ยนรูปต่อไปเป็น β-glucosides หรือ aglucosides ในที่สุด และจากรายงานของ Chein *et al.* (2005) ระบุว่าในระหว่างการนึ่งสุกถั่วเหลืองด้วยไอน้ำร้อนจะเกิดการเปลี่ยนรูปของสาร isoflavone จาก malonylgenistin ไปเป็น genistin ได้ในอัตราที่เร็วที่สุด รองลงมาเป็นการเปลี่ยนรูปของสาร malonylgenistin ไปเป็น acetylgenistin และ acetylgenistin ไปเป็น genistin ตามลำดับ ดังนั้นในถั่วเหลืองนึ่งสุกก่อนการหมักจึงพบสาร isoflavone glucosides ในรูปของสาร genistin มากที่สุด

การตรวจพบสาร isoflavone กลุ่ม aglucosids มากกว่า glucosides ในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสในครั้งนี้คล้ายคลึงกับที่พบในถั่วเหลืองหมักมิโซะ (Yamabe *et al.*, 2007) เต้าหู้ยี้ (Yin *et al.*, 2004; 2005) โดชิ (douche) (Wang *et al.*, 2007) จุงคุกแจง (chungkukjang) (Kwak *et al.*, 2007) และถั่วเน่าพื้นเมือง (Dajanta *et al.*, 2009) ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์กล้าเชื้อหมักจะสร้างเอนไซม์ β-glucosidase ออกมาย่อยสลายสาร isoflavone glucosides ให้เปลี่ยนรูปไปเป็น aglucosides ผ่านทางกระบวนการ deglycosylation (Chien *et al.*, 2006; Kuo *et al.*, 2006; Chun *et al.*, 2007; 2008) ดังแสดงในรูปที่ 4.4

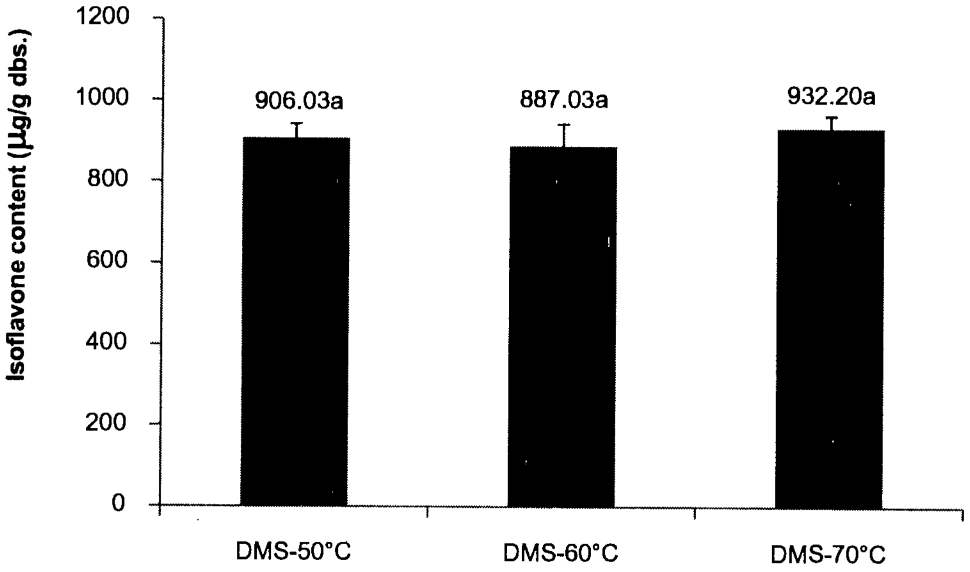


รูปที่ 4.4 กระบวนการ deglycosylation เปลี่ยนรูปสาร isoflavone β-glucosides เป็น aglucosides โดยเอนไซม์ β-glucosidase

การทดลองนี้ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสพบสาร daidzein มากที่สุด ซึ่งคล้ายคลึงกับที่มีรายงานในถั่วเหลืองหมักถั่วเน่าและนัตโตะ (Dajanta *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2008) ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยา deglycosylation ของ daidzin เปลี่ยนเป็น daidzein เกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าปฏิกิริยา deglycosylation ของ genistin และ glycitin (Kuo *et al.*, 2006)

อุณหภูมิในการอบแห้งไม่มีผลต่อปริมาณของสารisoflavoneรวมในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส สาร isoflavone รวม (β-glucosides+aglucosides) ในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 60 และ 70 องศาเซลเซียสมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (รูปที่ 4.5) โดยมีปริมาณ 887.03 – 932.20 μg/g dbs. เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่

หมักด้วย *Bacillus* (สาร isoflavone รวม 320 – 888 μg dbs.) ในรายงานของ Dajanta *et al.* (2009) พบว่าถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสมีปริมาณของสาร isoflavone รวมสูงกว่าเล็กน้อย



รูปที่ 4.5 ปริมาณสาร isoflavone รวมในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่ผ่านการอบแห้งในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

4.3.4 สมบัติการต้านออกซิเดชันของถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ระดับความร้อนในการอบแห้งมีผลต่อ phenolic compounds ที่ถูกสกัดออกมาจากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส โดยเมื่อใช้ความร้อนในการอบแห้งสูงมากขึ้นทำให้สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลจากผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสได้มากขึ้นตามลำดับ สารสกัดของผงถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส ตรวจพบปริมาณของ phenolic compounds สูงกว่าสารสกัดของผงถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.6) ถั่วเหลืองหมักจาก *Monascus* sp. PSRU03 ตรวจพบ phenolic compounds ในปริมาณ 7.96 – 9.66 mg GAE/g dbs. ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณที่พบในถั่วเหลืองหมักจาก *M. purpureus* Went (BCRC31499) และ *M. pilosus* BCRC31527 ในรายงานของ Lee *et al.* (2008) โดยสารสกัดจากน้ำเย็นพบ phenolic compounds ในช่วง 10.10 – 10.80 mg GAE/g และสารสกัดจากน้ำร้อนพบ phenolic compounds ในช่วง 6.05 – 8.50 mg GAE/g

ตารางที่ 4.6 สมบัติการต้านออกซิเดชันของถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ถั่วเหลืองหมัก	Total phenolics (mg GAE/g dbs.)	DPPH radical-scavenging effect (%)	FRAP (mg trolox/g dbs.)
อบแห้งที่ 50°C	7.96 ± 0.38b	43.58 ± 1.77b	3.40 ± 0.14b
อบแห้งที่ 60°C	8.01 ± 1.06b	47.79 ± 5.46b	3.83 ± 0.48b
อบแห้งที่ 70°C	9.66 ± 0.44a	62.22 ± 3.48a	5.12 ± 0.23a

ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำหนดค่าของข้อมูลในแต่ละคอลัมน์ที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

อุณหภูมิในการอบแห้งมีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH radical-scavenging effect และ FRAP เช่นเดียวกับ phenolic compounds โดยตรวจพบค่า DPPH radical-scavenging effect และ FRAP เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในอบแห้งถั่วเหลืองหมักจาก 50 เป็น 70 องศาเซลเซียส และมีความสอดคล้องกับปริมาณของ phenolic compounds ที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในสารสกัดถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสเป็นผลมาจากการออกฤทธิ์ของ phenolic compounds และในรายงานของ Pyo and Lee (2007) พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสเกิดจากการเพิ่มขึ้นของสาร monacolin K และสาร isoflavone aglucosides โดยมีค่าสหสัมพันธ์ (linear correlation) เป็น 0.85 และ 0.98 ตามลำดับ

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบแห้งถั่วเหลืองโมแนสคัสพบว่าที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบแห้งถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสก่อนนำไปผลิตเป็นผงเนื่องจากตรวจพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพคือรงควัตถุ สาร isoflavone phenolic compoundsและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิอื่น

4.3.5 ปริมาณสาร citrinin และ monacolin K ในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสอบแห้ง

ได้ศึกษาปริมาณสาร citrinin และสาร monacolin K ในผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่ผ่านการอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส พบว่า ปริมาณของ citrinin ยังอยู่ในระดับต่ำคือ 1.60 mg/kg DM และยังคงมีสาร monacolin K ในปริมาณที่สูงคือ 38.87 mg/kg DM

ผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่ได้จากการทดลองนี้มีการปนเปื้อนของสาร citrinin สูงเกินเกณฑ์มาตรฐานของญี่ปุ่น ซึ่งกำหนดให้สารสีโมแนสคัสมีการปนเปื้อนสาร citrinin ได้ไม่เกิน

0.2 μg/g หรือ 0.2 mg/kg (Lin *et al.*, 2008) และมีปริมาณต่ำกว่าข้าวแดงที่มีจำหน่ายในจีนและไต้หวัน ซึ่งพบการปนเปื้อนสาร citrinin ในช่วง 0.2-140 mg/kg (Xu *et al.*, 1999; Shu and Lin, 2002) ดังนั้นผงถั่วเหลืองหมักที่ผลิตได้จากการทดลองนี้จึงจัดอยู่เกณฑ์ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด สำหรับสาร monacolin K เป็นสารที่สามารถเกิดการเสื่อมสลายได้ที่อุณหภูมิสูงในสภาวะที่เป็นด่าง เช่น ที่ 121 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีค่าพีเอช 9 อย่างไรก็ตามสาร monacolin K ยังคงเหลืออยู่มากกว่าร้อยละ 95 หลังการให้ความร้อนที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ที่ค่าพีเอช 7 (Ou *et al.*, 2009)

จากการศึกษากระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่ปลอดภัยจากสารพิษ citrinin และอุดมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกายคือสารต้านออกซิเดชันกลุ่ม phenolic compounds, isoflavones และ monacolin K สามารถสรุปเป็นกระบวนการผลิตดังแสดงใน รูปที่ 4.6 และแสดงลักษณะของถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงในรูปที่ 4.7

ถั่วเหลือง

↓

แช่น้ำนานข้ามคืนหรือประมาณ 12 ชั่วโมง

↓

หลังสะเด็ดน้ำ ปรับค่าพีเอชของถั่วเหลืองให้เป็นกรด (ประมาณ 3.5 - 4)
โดยการเติม vinegar ในอัตราร้อยละ 10

↓

นึ่งให้สุกในหม้อนึ่งความดันไอ 121 องศาเซลเซียสนาน 40 นาที

↓

รอให้ถั่วเหลืองเย็นลง เติมสารละลายสปอร์ของรา *Monascus* sp. PSRU03
ในปริมาณร้อยละ 5 บ่มถั่วเหลืองในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน

↓

อบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส บดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น

↓

ผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

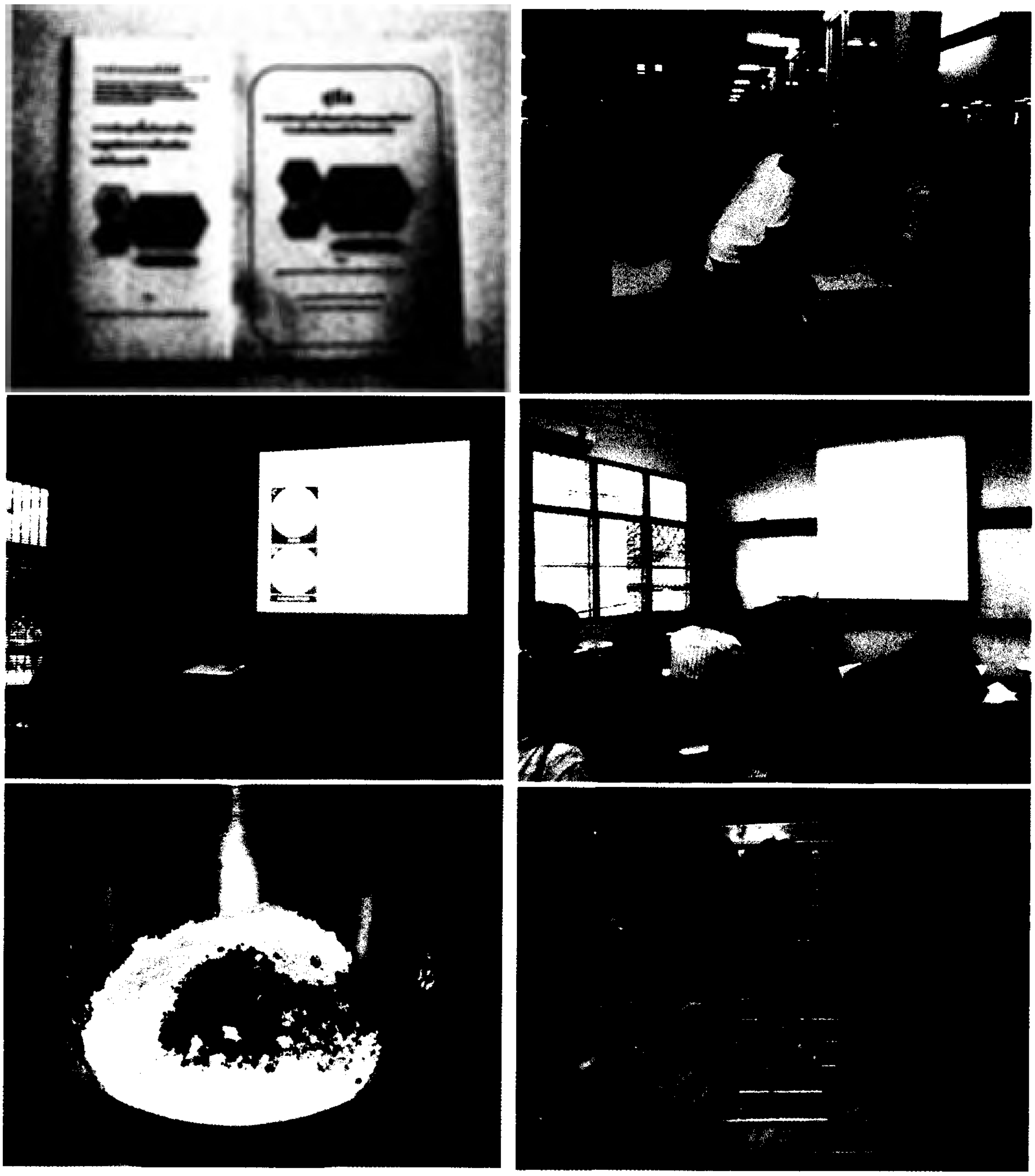
รูปที่ 4.6 กระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่ปลอดภัยและมีคุณค่าทางโภชนาการจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย

รูปที่ 4.7 ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่ผลิตจากกระบวนการที่คัดเลือกจากงานวิจัย

4.4 การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

ได้จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสและการประยุกต์ใช้ผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสในผลิตภัณฑ์อาหารให้กับนักวิจัยและผู้สนใจทั่วไป ในวันที่ 10 ตุลาคม 2555 ณ อาคารแปรรูปและพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม มีผู้เข้าร่วมฝึกอบรมทั้งหมดจำนวน 30 คน (ลายมือชื่อผู้เข้าร่วมฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการแสดงในภาคผนวก ข) ในการอบรมในครั้งนี้ได้เผยแพร่องค์ความรู้จากงานวิจัยโดยได้จัดทำแผ่นพับและคู่มือการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์คุกกี้ (ภาคผนวก ค) รวมทั้งการบรรยาย การสาธิต และให้ผู้เข้าร่วมฝึกอบรมได้ร่วมปฏิบัติการ แสดงภาพการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการในรูปที่ 4.8

งานวิจัยนี้ได้แสดงถึงศักยภาพในการนำองค์ความรู้งานวิจัยไปพัฒนาต่อยอดพืชเกษตรสู่การเพิ่มมูลค่าพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและมีความปลอดภัยด้วยเทคโนโลยีการอบแห้งซึ่งเป็นเทคโนโลยีต้นทุนต่ำ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตในเชิงพาณิชย์ในรูปของอาหารเสริมสุขภาพโดยตรงหรือใช้เป็นสารเจือปนเสริมคุณค่าทางโภชนาการในอาหารเพื่อสุขภาพชนิดอื่นได้ ผลการดำเนินงานของงานวิจัยนี้ได้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยอย่างครบถ้วน โดยได้ราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ citrinin ต่ำ คือ *Monascus* sp. PSRU03 มาใช้เป็นกล้าเชื้อหมักถั่วเหลือง ได้กระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่เหมาะสมในการรักษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ และได้แนวทางในการประยุกต์ใช้ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต



รูปที่ 4.8 การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษากระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผงที่ปลอดภัยและมีคุณค่าทางโภชนาการจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การศึกษาสายพันธุ์ราโมแนสคัสที่สร้าง citrinin ต่ำและสร้าง monacolin K สูง

จากการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสร้างสารพิษ citrinin และสารลดคอเลสเตอรอล monacolin K ของรา *Monascus* sp. PSRU03 PSRU05 PSRU08 และ PSRU10 ในการหมักถั่วเหลือง พบว่ารา *Monascus* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลตสามารถสร้างสาร citrinin และ monacolin K ในถั่วเหลืองหมักได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยตรวจพบสาร citrinin ในปริมาณ 3.91 – 4.04 mg/kg DM และสร้างสาร monacolin K ได้ในช่วง 6.83 – 29.98 mg/kg DM โดยไอโซเลต PSRU03 และ PSRU10 สามารถสร้างสารลดคอเลสเตอรอล monacolin K ได้มากที่สุดและน้อยที่สุดตามลำดับ

2. การศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการหมักถั่วเหลือง

จากการผันแปรอุณหภูมิและเวลาในการหมักถั่วเหลืองด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 พบว่า เชื้อราสร้างรงควัตถุทั้ง 3 สีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาการหมักถั่วเหลืองเพิ่มมากขึ้นโดยในช่วง 10 วันแรกของการหมักพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณรงควัตถุในอัตราที่แตกต่างกัน การบ่มถั่วเหลืองที่ 30 องศาเซลเซียสพบการสร้างรงควัตถุทั้ง 3 สีได้อย่างรวดเร็วและมีปริมาณของรงควัตถุสูงกว่าถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) การหมักถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีการเพิ่มขึ้นของสารรงควัตถุทั้ง 3 สีอย่างช้าๆ ในช่วง 5 วันแรกของการหมักหลังจากนั้นรงควัตถุทั้ง 3 สีมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและในสภาวะที่เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิการบ่มจาก 30 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียส หลังการบ่ม 4 วัน พบว่า ปริมาณของสารรงควัตถุทั้ง 3 สีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการหมัก หลังจากนั้นการเพิ่มขึ้นของสารรงควัตถุจะค่อนข้างคงที่ก่อนที่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้งในช่วง 15 - 20 วัน เมื่อหมักถั่วเหลืองครบเวลา 20 วันปริมาณของสารรงควัตถุในถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 และ 30/25 องศาเซลเซียสมีปริมาณไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยพบในช่วง 31.9 - 35.67 หน่วย/กรัมตัวอย่างแห้ง

รงควัตถุส่วนใหญ่ที่เชื้อรา *Monascus* sp. PSRU03 สร้างขึ้นในถั่วเหลืองระหว่างการหมัก คือรงควัตถุสีเหลือง โดยหลังจากการหมักครบ 20 วัน พบรงควัตถุสีเหลืองในสัดส่วนที่มากที่สุดคือ ร้อยละ 50-53 (ปริมาณ 6.94 – 14.31 หน่วย/กรัมตัวอย่างแห้ง) รองลงมาเป็นรงควัตถุสีส้มร้อยละ 25 -27 (ปริมาณ 8.02 – 9.11 หน่วย/กรัมตัวอย่างแห้ง) และสีแดงร้อยละ 22 - 23 (ปริมาณ 7.21 – 8.21 หน่วย/กรัมตัวอย่างแห้ง) ตามลำดับ

ปริมาณของ phenolic compounds ในถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่าเมื่อบ่มนาน 10 วัน ขณะที่การบ่มที่อุณหภูมิอื่นต้องใช้เวลาในการบ่มอย่างน้อย 15 วันจึงจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และการบ่มถั่วเหลืองทั้ง 3 สภาวะมีปริมาณของ phenolic compounds เพิ่มขึ้นสูงที่สุดหลังการบ่มนาน 20 วัน โดยมีปริมาณในช่วง 5.13 – 6.10 mg GAE/g dbs. ถั่วเหลืองหมักที่บ่มในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณ phenolic compounds เพิ่มมากขึ้นในระหว่างการหมักร้อยละ 146 ขณะที่ถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30/25 องศาเซลเซียสมีปริมาณ phenolic compounds เพิ่มมากขึ้นในระหว่างการหมักร้อยละ 115 และ 107 ตามลำดับ

ค่า DPPH radical-scavenging activity ของถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส สูงกว่าถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30/25 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) หลังการหมักนาน 10 - 15 วัน และหลังครบเวลาการบ่ม 20 วัน ค่า DPPH radical-scavenging activity ที่พบในถั่วเหลืองไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 49.28 – 50.76 ถั่วเหลืองหมักมีค่า DPPH radical-scavenging activity เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักอยู่ในช่วงร้อยละ 15 – 37

ค่า FRAP ของถั่วเหลืองหมักที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 และ 30/25 องศาเซลเซียส นาน 10 - 15 วัน มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยการบ่มถั่วเหลืองที่ 30 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ถั่วเหลืองหมักที่มีค่า FRAP มากที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (ชุด 0 วัน) พบว่าค่า FRAP เพิ่มขึ้นร้อยละ 68 ค่า FRAP ของถั่วเหลืองที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นสูงสุดหลังการบ่มครบ 15 วัน หลังจากนั้นค่า FRAP จะลดลง ขณะที่การบ่มถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 25 และ 30/25 องศาเซลเซียส ค่า FRAP เพิ่มขึ้นสูงสุดหลังการบ่มครบ 20 วัน โดยมีค่า FRAP 3.22 และ 3.21 mg trolox/g dbs. ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักพบว่าค่า FRAP เพิ่มขึ้นร้อยละ 37 - 38

3. การศึกษาอุณหภูมิอบแห้งถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่เหมาะสมในการรักษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสชนิดผง

ถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งให้สุกด้วยหม้อนึ่งความดันก่อนการหมักด้วยราโมแนสคัสมีค่าความชื้นร้อยละ 58.95 ± 0.37 และค่าพีเอช 6.39 ± 0.01 เมื่อหมักถั่วเหลืองด้วยกล้าเชื้อ *Monascus* sp. PSRU3 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสนาน นาน 20 วัน พบว่าถั่วเหลืองหมักมีค่าความชื้นและค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับก่อนหมัก โดยค่าความความชื้นเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 66.62 ± 0.62 และค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 7.28 ± 0.08

ระดับความร้อนในการอบแห้งมีผลต่อปริมาณของรงควัตถุที่ถูกสกัดออกมาจากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส โดยเมื่อใช้ความร้อนในการอบแห้งสูงมากขึ้นส่งผลให้รงควัตถุในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น ถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส ตรวจพบปริมาณของรงควัตถุทั้งสีแดง สีส้มและสีเหลืองสูงกว่าถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการอบแห้งที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

สาร isoflavone ที่พบในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสเกือบทั้งหมด (ร้อยละ 99.88 – 99.91) เป็นสารในกลุ่ม aglucosids โดยพบ daidzein ในปริมาณที่สูงกว่า genistein และ glycitein คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 53-54 36-38 และ 10 ตามลำดับ สำหรับ isoflavone ในกลุ่ม β-glucosides ตรวจพบ genistin เพียงชนิดเดียวและพบในปริมาณที่น้อยมากคือร้อยละ 0.09 – 0.12 ของสาร isoflavone ทั้งหมด อุณหภูมิในการอบแห้งไม่มีผลต่อปริมาณของสาร isoflavone รวมในถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสโดยพบสาร isoflavone รวมในปริมาณ 887.03 – 932.20 μg/g dbs.

ระดับความร้อนในการอบแห้งมีผลต่อสารประกอบฟีนอลที่ถูกสกัดออกมาจากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส โดยเมื่อใช้ความร้อนในการอบแห้งสูงมากขึ้นทำให้สามารถสกัดสารในกลุ่ม phenolic compounds จากผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสได้มากขึ้นตามลำดับ สารสกัดของผงถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียส ตรวจพบปริมาณของ phenolic compounds สูงกว่าสารสกัดของผงถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส โดยตรวจพบสารประกอบฟีนอลในปริมาณ 7.96 – 9.66 mg GAE/g dbs.

อุณหภูมิในการอบแห้งมีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH radical-scavenging effect และ FRAP โดยตรวจพบค่า DPPH radical-scavenging effect และ FRAP เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในอบแห้งถั่วเหลืองหมักจาก 50 เป็น 70 องศาเซลเซียส และมีความสอดคล้องกับปริมาณของ phenolic compounds ที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย ผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสที่ผ่านการอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียสมีสาร citrinin ในปริมาณต่ำ 1.60 mg/kg DM และยังคงมีสาร monacolin K ในปริมาณที่สูงคือ 38.87 mg/kg DM

4. การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

ได้จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารให้กับนักวิจัยและผู้สนใจทั่วไป ในวันที่ 10 ตุลาคม 2555 ณ อาคารแปรรูปและพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม มีผู้เข้าร่วมฝึกอบรมทั้งหมดจำนวน 30 คน ในการอบรมในครั้งนี้ได้เผยแพร่องค์ความรู้จากงานวิจัยโดยได้จัดทำแผ่นพับและคู่มือการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์คุกกี้ รวมทั้งการบรรยาย การสาธิต และให้ผู้เข้าร่วมฝึกอบรมได้ร่วมปฏิบัติการ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร citrinin และ monacolin K ในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิแตกต่างกันเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารลดคอเลสเตอรอลมากที่สุด

5.2.2 ควรศึกษาปัจจัยหรือสภาวะการหมักราโมแนสคัสที่เหมาะสมในการสร้างสารลดคอเลสเตอรอลสูงและควบคุมการสร้าง citrinin ให้อยู่ในระดับที่ไม่อันตรายต่อร่างกาย

5.2.3 ควรศึกษาต่อยอดงานวิจัยนำผงถั่วเหลืองโมแนสคัสไปประยุกต์เพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น หรือพัฒนาให้อยู่ในรูปของผงปรุงรสชนิดผงหรือชนิดก้อนสำเร็จรูป

5.2.4 ควรศึกษาต่อยอดถึงศักยภาพของผงถั่วเหลืองโมแนสคัสในการป้องกันโรคต่างๆในเชิงลึก

บรรณานุกรม

กัญญุมา มุทุวงศ์. 2546. **การผลิตรงควัตถุของเชื้อราโมแนสคัสโดยการหมักสภาพแห้ง.** ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เกตุการ ดาจันทา. 2554. **การคัดเลือกราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษต่ำเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตสารสีที่ปลอดภัยจากข้าวแดง.** รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

เกศแก้ว อภิณหพัฒน์ และณยุรี เชนทร. 2542. **การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อผลิตเม็ดสีสีแดงจากเชื้อราโมแนสคัสในสภาวะการหมักแห้ง.** ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

จิราภรณ์ อนันต์ชัยพัทธนา และชุติมา กิตติภัญโญวัฒน์. 2543. **การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสบนกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเม็ดสี.** ปริญญาวิทยาศาสตรบัญฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

จุลยุทธ บุญสร้างสม. 2546. **การลดซิตรินินในข้าวแดง.** ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัญฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัย เชียงใหม่.

เชิดชัย เชียวธีรกุล ประสิทธิ์ แซ่ลี้ และปนัดดา แซ่อึ้ง. 2519. **สีแดงจากข้าวแดง (อังคัก).** วารสารอาหาร. 8: 51-55.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549. **เคมีอาหาร.** โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพฯ. 487 หน้า.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2518. **การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตข้าวแดงโดยรา *M. purpureus*.** เอกสารประการปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.

พลายแก้ว ไชยเบญจวงศ์ และบุษบา ยงสมิทธ์. 2534ก. **การศึกษาเบื้องต้นโคจิเชื้อราแดงโมแนสคัสเตรียมจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ.** การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29 4-7 กุมภาพันธ์ 2534. กรุงเทพฯ. หน้า 277-282.

พลายแก้ว ไชยเบญจวงศ์ และบุษบา ยงสมิทธ์. 2534ข. **การศึกษาการปรับสภาพของวัตถุดิบต่อคุณภาพการหมักข้าวแดง.** การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29 4-7 กุมภาพันธ์ 2534. กรุงเทพฯ. หน้า 283-291.

ศนิ จิระสถิตย์. 2548. **ผลของระดับการเกิดเจลาติไนซ์ของข้าวต่อจลนพลศาสตร์การเจริญและการสร้างสารสีของ** ***Monascus purpureus.*** ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สุภาวดี อินทร์เขียว. 2545. **การใช้สารสีโมแนสคัส (อังคัก) ทดแทนไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกรมควันและกุนเชียง.** ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัญฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อรัญ หันพงศ์เจริญ เมธินี เห่วซึ่งเจริญ และเรณู ปิ่นทอง. 2531. **ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตข้าวแดงโดย** ***Monascus purpureus.*** วารสารเกษตร. 4: 125-128.

Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Kiyota, A., Yasukawa, K., Sakamoto, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Takayasu, J., and Nishino, H. 2005. Anti-tumorinitiating effects of monascin, an azaphilonoid pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice). **Chemistry and Biodiversity**. 2: 1305–1309.

Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., and Springer, J. 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 77: 3957–3961.

Aniya, Y., Ohtani, I.I., Higa, T., Miyagi, C., Gibo, H., Shimabukuro, M., Nakanishi, H., and Taira, J. 2000. Dimerumic acid as an antioxidant of the mold, *Monascus* anka. **Free Radical Biology and Medicine**. 28(6): 999-1004.

AOAC. 2002. **Official methods of analysis of AOAC International**, 17th edition. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Blanc, P.J., Laussac, J.P., Bars, J.L., Bars, P.L., Loret, M.O., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, Santerre, A.L., and Goma, G. 1995. Characterization of Monascidin A from *Monascus* as Citrinin. **International Journal of Food Microbiology**. 27: 201-213.

Broder, C.U., and Koehler, P.E. 1980. Pigments produced by *Monascus purpureus* with regard to quality and quantity. **Journal of Food Science**. 45: 567-569.

Burton, G.W., and Traber, M.G. 1990. Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. **Annual Review of Nutrition**. 10: 357.

Carels, M., and Shepherd, D. 1977. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* speices in submerged, shaken culture. **Canadian Journal of Microbiology**. 23: 1360-1370.

Chagas, G.M., Campello, A.P., Kluppel, M.I., and Olivira, M.B. 1995. Citrinin affects the oxidative metabolism of BHK-21 cells. **Cell Biochemistry and Function**. 13: 267-271.

Chein, J.T., Hsieh, H.C., Kao, T.H., and Chen, B.-H. 2005. Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. **Food Chemistry**. 91: 425-434.

Chen, F., and Hu, X. 2005. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. **International Journal of Food Microbiology**. 103: 331-336.

Chen, M-H., and Johns, M.R. 1994. Effect of carbon source on ethanol and pigment production by *Monascus purpureus*. **Enzyme and Microbial Technology**. 16: 584-590.

Chien, H.-L, Huang, H-Y, and Chou, C.-C. 2006. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**. 23: 772–778.

Chun, J., Kim, G.M., Lee, K.W., Choi, I.D., Kwon, G.-H., Park, J.-Y., Jeong, S.-J., Kim, J.-S., and Kim, J.H. 2007. Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**. 72: 39-44.

Chun, J., Kim, J. S., and Kim, J.H. 2008. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. 4. **Food Chemistry**. 109: 278–284.

Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A., and Chukeatirote, E. 2011. Antioxidant properties and total phenolics of *Thua Nao* (a Thai fermented soybean) as affected by *Bacillus*-fermentation. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**. 3(4): O56-O59.

Dajanta, K., Chukeatirote, E., Apichartsrangkoon, A., and Frazier, R.A. 2009. Enhanced aglycone production of fermented soybean products by *Bacillus* species. **Acta Biologica Szegediensis**. 52(2): 93-98.

Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J.C., Morgan, M.R.A., and Williamson, G. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β-glucosidase activity. **FEBS Letters**. 436: 71-75.

Dhale, M.A., Divakar, S., Kumar, S.U., and Vijayalakshmi, G. 2007. Isolation and characterization of dihydromonacolin-MV from *Monascus purpureus* for antioxidant properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 73: 1197–1202.

Endo, A. 1979. Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. **The Journal of Antibiotics**. 32: 852–854.

Endo, A. 1980. Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase. **The Journal of Antibiotics**. 33: 334–336.

Endo, A., Hasumi, K., Nakamura, T., Kunishima, M., and Masuda, M. 1985. Dihydromonacolin-L and monacolin-x, new metabolites those inhibit cholesterol-biosynthesis. **The Journal of Antibiotics**. 38: 321–327.

Erdogral, O., and Azirak, S. 2004. Review of the red yeast rice (*Monascus purpureus*). **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**. 2: 37-49.

Frankel, E.N. 1998. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 46: 834-838.

Gordon, R.A. 2001. Eating disorders East and West: A culture-bound syndrome Unbound. In: **Eating Disorders and Cultures in Transition**. Nasser, M., Katzman, M. and Gordon, R. (Eds.). Taylor & Francis, New York. p. 1 – 16.

Gotoh, T., Yamada, K., Yin, H., Ito, A., Kataoka, T., and Dohi, K. 1998. Chemoprevention of *N*-Nitroso-*N*-methylurea-induced rat mammary carcinogenesis by soy foods or biochanin A. **Japanese Journal Cancer Research**. 89: 137–142.

Guardamagna, O., Abello, F., Baracco, V., Stasiowska, B., and Martino, F. 2011. The treatment of hypercholesterolemic children: efficacy and safety of a combination of red yeast rice extract and policosanols. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. 21(6): 424-429.

Halliwell, B. 2009. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology and Medicine**. 46: 531-542.

Han, O., and Mudgett, E.R. 1992. Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid-state fermentation. **Biotechnology Progress**. 8: 5-10.

Heber, D., Lembertas, A., Lu, Q.Y., Bowerman, S., and Go, V.L.W. 2001. An analysis of nine proprietary Chinese red yeast rice dietary supplements: implications of variability in chemical profile and contents. **Journal of Alternative and Complementary Medicine.** 7: 133-139.

Hoeck, J.A., Fehr, W.R., Murphy, P.A., and Welke, G.A. 2000. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Science.** 40: 48-51.

Hong, M.Y., Seeram, N.P., Zhang, Y., and Heber, D. 2008. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry.** 19: 448-458.

Ishimi, Y., Yoshida, M., Wakimoto, S., Wu, J., Chiba, H., Wang, X., Takeda, K., and Miyaura, C. 2002. Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. **Bone.** 31: 180-185.

Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., and Kikuchi, M. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **Journal of Nutrition.** 130: 1695-1699.

Jia, X.Q., Xu, Z.N., Zhou, L.P., and Sung, C.K. 2010. Elimination of the mycotoxin citrine production in the industrial important strain *Monascus purpureus* SM001. **Metabolic Engineering.** 12: 1-7.

Johns , M.R., and Stuart, D.M. 1991. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. **Journal of Industrial Microbiology.** 8: 23-28.

Kao, T.K. Lu, Y.F., Hsieh, H.C., and Chen, B.H. 2004. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. **Food Research International.** 37: 891-900.

Kim, J.-A., and Chung, I.-M. 2007. Change in isoflavone concentration of soybean (*Glycine max* L.) seeds at different growth stages. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 87: 496-503.

Kitabatake, N., Doi, E., and Trivedi, A.B. 1991. Toxicity lunation evaluation of the mycotoxins, citrinin and ochratoxin A, using several animal cell lines. **Comparative Biochemistry and Physiology.** 105: 428-433.

Kohama, Y., Matsumoto, S., Mimura, T., Tanabe, N., Inada, A., and Nakanishi, T. 1987. Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 35: 2484–2489.

Kono, I., and Himeno, K. 2000. Changes in gamma-aminobutyric acid content during *beni-koji* making. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 64: 617-619.

Krejci, M.E., Bretz, N.S., and Koechel, D.A. 1996. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium] plasma. **Toxicology**. 106: 167–177.

Kuba, M., Tana, C., Tawata, S., and Yasuda, M. 2005. Production of angiotesin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. **Process Biochemistry**. 40: 2191-2196.

Kuo, L.C., Cheng, W.Y., Wu, R.Y., Huang, C.J., and Lee, K.T. 2006. Hydrolysis of black soybean isoflavone glycosides by *Bacillus subtilis* natto. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 73: 314-320.

Kwak, C.S., Lee, M.S., and Park, S.C. 2007. Higher antioxidant properties of Chungkukjang, a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation. **Nutrition Research**. 27: 719-727.

Lee, J.H., Renita, M., Fioritto, R., Martin, S.K.S., Schwartz, S.J., and Vodovotz, Y. 2004. Isoflavone characterization and antioxidant activity of Ohio soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52: 2647-2651.

Lee, S.J., Chung, I.M., Ahn, J.K., Kim, J.T., Kim, S.H., and Hahn, S.J. 2003. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 3383–3389.

Lee, Y.L., Yang, J.H., and Mau, J.L. 2008. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybean. **Food Chemistry**. 106: 1128-1137.

Li, Y.G., Zhang, F., Wang, Z.T., and Hu, Z.B. 2004. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 35: 1101–1112.

Lim, J.-Y., Kim, J.J., Lee, D.S., Kim, G.H., Shim, J.-Y., Lee, I., and Imm, J.-Y. 2010. Physiochemical characteristics and production of whole soymilk from *Monascus* fermented soybeans. **Food Chemistry**. 120: 255-260.

Lin, T.F., and Demain, A.L. 1991. Effect of nutrition of *Monascus* sp. of fermentation of red pigments. **Applied and Microbiology Biotechnology**. 36(1): 70-75.

Lin, Y.-L., Wang, T.-H., Lee, M.-H., and Su, N.-W. 2008. Biologically active compounds and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 77: 965-973.

Liu, D., Zhen, W., Yang, Z., Carter, J.D., Si, H., and Reynolds, K.A. 2006. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. **Diabetes**. 55: 1043–1050.

Luque-Rodnguez, J.M., Luque de Castro, M.D., and Perez-Juan, P. 2007. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. **Bioresource Technology**. 98: 2705–2713.

Ma, J., Li, Y., Ye, Q., Li, J., Hua, Y., Ju, D., Zhang, D., Cooper, R., and Chang, M. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48: 5220-5225.

Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D.R., and Carle, R. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**. 112: 551-559.

Martinkova, L., Juzlova, P., and Vesely, D. 1995. Biological-activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. **Journal of Applied Bacteriology**. 79: 609–616.

Martinkova, L., Patakova-Juzlova, P., Kren, V., Kucerova, Z., Havlicek, V., Olsovsky, P., Hovorka, O., Rihova, B., Vesely, D., Vesela, D., Ulrichova, J., and Prikrylova, V. 1999. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. **Food Additives and Contaminants**. 16: 15–24.

McCue, P., and Shetty, K. 2003. Role of carbohydrate-cleaving enzymes in phenolic antioxidant mobilization from whole soybean fermented with *Rhizopus oligosporus*. **Food Biotechnology**. 17: 27-37.

Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M. A., Cincotta, M., Altavilla, D., Lentile R., and Squadrito, F. 2002. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. **Journal of Bone and Mineral Research.** 17: 1904-1912.

Ou, H.P., Wang, C.-C.R., and Lai, L.-S. 2009. Thermal degradation kinetics analysis of monacolin K in *Monascus* fermented products. **LWT Food Science and Technology**. 42: 292-296.

Palo, M.A., Vidal-Adeva, L., and Maceda, L. 1960. Study on ang-kak and its production. **Philippine Journal of Science Society**. 89: 1-22.

Park, K.-Y., Jung, K.-O., Rhee, S.-H., and Choi, Y.H. 2003. Antimutagenic effects of *doenjang* (Korean fermented soy paste) and its active compounds. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. 523–524: 43–53.

Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A., and Tharatha, S. 2008. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. **International Journal of Food Microbiology**. 126: 20–23.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M. 2001. In: **Antioxidants in Food: Practical Applications**. CRC Press, New York. p. 380.

Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., Shay, N.F., and Erdman, J.W.Jr. 1998. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 68: 1375S-1379S.

Puerta, T. 1999. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 57: 445 – 449.

Pyo, Y.H., and Lee, T.C. 2007. The potential antioxidant capacity and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Monascus*-fermented soybean extracts: Evaluation of *Monascus*-fermented soybean extracts as multifunctional food additives. **Journal of Food Science: Sensory and Nutritive Qualities of Food**. 72(3): S218-223.

Qin, S., Zhang, W., Qi, P., Zhao, M., Dang, Z., Li, Y., Zu, X., Fang, Z., Fu, L., Rasheva, T., Hallet, N. J., and Kujumdzieva, A. 1998. Taxonomic investigation of *Monascus purpureus* 94-25 strain. **Journal of Culture Collection**. 2: 155-157.

Rajalakshmi, D., and Narasimhan, S. 1996. Food antioxidants: Source and methods of evaluations. In: **Food Antioxidants**. Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunlhe, D.K. (Eds.). Marcel Decker, New York, p. 65 – 158.

Rhyu, M.-R., Kim, E.-Y., and Han, J.-S. 2002. Antihypertensive effect of the soybean paste fermented with the fungus *Monascus*. **International Journal of Food Science and Technology**. 37: 585-588.

Ribciro, S.M.R., Chagas, G.M., Campello, A.P., and Kluppcl, M.L.W. 1997. Mechanism of citrinin-induccd dysfunction of mitochondria: Effcct on thc homeostasis of the rcactive oxygcn specics. **Cell Biochemistry and Function**. 15: 203–209.

Sakthivelu, G., Akitha Devi, M.K., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G.A., Nikolova, M.T., Angelov, G.B., Todorova, R.M., and Kosturkova, G.P. 2008. Isoflavone composition, phenol content, and antioxidant activity of soybean seed from India and Bulgaria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 2090-2095.

Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escria, A., and Saura-Calixto. J. 2000. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutrition Research**. 20: 941-953.

Sherwin, E.R. 1990. Antioxidants. In: **Food Additives**. Branen, R. (Ed.). Marcel Dekker, New York. p. 135-193.

Shu, P.Y., and Lin, C.H. 2002. Simple and sensitive determination of citrinin in *Monascus* by GC-selected ion monitoring mass spectrometry. **Analytical Sciences**. 18: 283-287.

Sies, H., Stahl, W., and Sundquist, A. 1992. Antioxidant functions of vitamins: Vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. **Annals of the New York Academy of Science**. 368: 7-19.

Su, N.W., Lin, Y.L., Lee, M.H., and Ho, C.Y. 2005. Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 1949–1954.

Taira, J., Miyagi, C., and Aniya, Y. 2002. Dimerumic acid as an antioxidant from the mold, *Monascus anka*: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and hemeprotein-mediated oxidation. **Biochemical Pharmacology**. 63: 1019–1026

Tsukahara, M., Shinzato, N., Tamaki, Y., Namihira, T., and Matsui, T. 2009. Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color; Lavastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. **Applied Biochemistry Biotechnology**. 158: 476-482.

Venero, C.V., Venero, J.V., Wortham, D.C., and Thompson, P.D. 2010. Lipid-lowering efficacy of red yeast rice in a population intolerant to statins. **The American Journal of Cardiology**. 105: 664-666.

Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., Murugesh, S., and Singaravadivel, K. 2009. Stimulation of *Monascus* pigments by invention of different nitrogen sources. **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry**. 4: 25-28.

Wang, H., and Murphy, P.A. 1994. Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 42: 1674-1677.

Wang, I.K., Lin-Shiau, S.Y., Chen, P.C., and Lin, J.K. 2000. Hypertriglyceridemic effect of anka (a fermented rice product of *Monascus* sp.) in rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48: 3183-3189.

Wang, L.J., Yin, L.-J., Li, D., Zou, L., Saito, M., Tatsumi, E., and Li, L.T. 2007. Influences of processing and NaCl supplementation on isoflavone contents and composition during douchi manufacturing. **Food Chemistry**. 10: 1247-1253.

Wang, Y.-Z., Ju, X.-L., and Zhou, Y.-G. 2005. The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. **Food Microbiology**. 22: 145-148.

Wei, Q.-K., Chen, T.-R., and Chen, J.-T. 2008. Use of *Bacillus subtilis* to enrich isoflavone aglycones in fermented natto. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 88: 1007-1011.

Wei, W., Li, C., Wang, Y., Huaide, S., Zhu, J., and Kritchevsky, D. 2003. Hypolipidemic and anti-atherogenic effects of long-term cholestin (*Monascus purpureus*-fermented rice, red yeast rice) in cholesterol fed rabbits. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 14: 314-318.

Wong, H.C., Lin, Y.C., and Koehler, P.E. 1981. Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentration. **Mycologia**. 73: 649-654.

Xu, G.R., Lu, C., Mu, X.Q., Chen, Y., Gu, Y.M., Wu, Y.P., Sheng, F., and Wu, M.Y. 1999. A study on the production of citrinin by *Monascus* spp. **Archv fur Lebensmittelhygiene**. 50: 88-91.

Yamabe, S., Kobyashi-Hattori, K., Kaneko K., Endo H., and Takita T. 2007. Effect of soybean varieties on the content and composition of isoflavone in rice-koji miso. **Food Chemistry**. 100: 369-374.

Yanishlieva, N.V., and Marinova, E.M. 2001. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**. 103: 752–767.

Yasukawa, K., Akihisa, T., Oinuma, H., Kaminaga, T., Kanno, H., Kasahara, Y., Tamura, T., Kumaki, K., Yamanouchi, S., and Takido, M. 1996. Inhibitory effect of taraxastane-type triterpenes on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Oncology**. 53: 341–344.

Yasukawa, K., Takahashi, M., Natori, S., Kawai, K., Yamazaki, M., Takeuchi, M., and Takido, M. 1994. Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in 2-stage carcinogenesis in mice. **Oncology**. 51: 108–112.

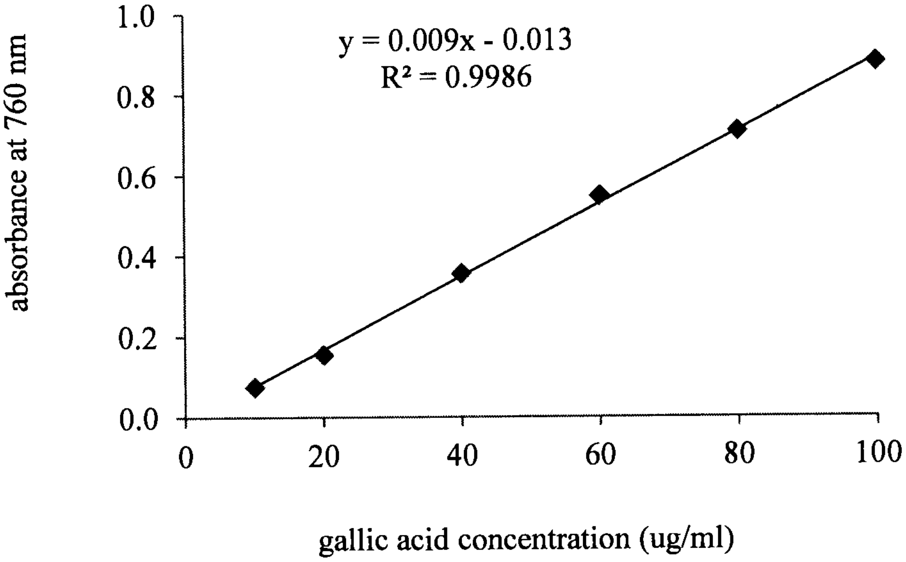
Yin, L.-J., Li, L.-T., Li, Z.-G., Saito, M., and Tatsumi, E. 2004. Change in isoflavone contents and composition of sufu (fermented tofu) during manufacturing. **Food Chemistry**. 87: 587-592.

Yin, L.-J., Li, L.-T., Liu, H., Saito, M., and Tatsumi, E. 2005. Effects of fermentation temperature on the content and composition of isoflavones and β-glucosidase activity in sufu. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 69: 267-272.

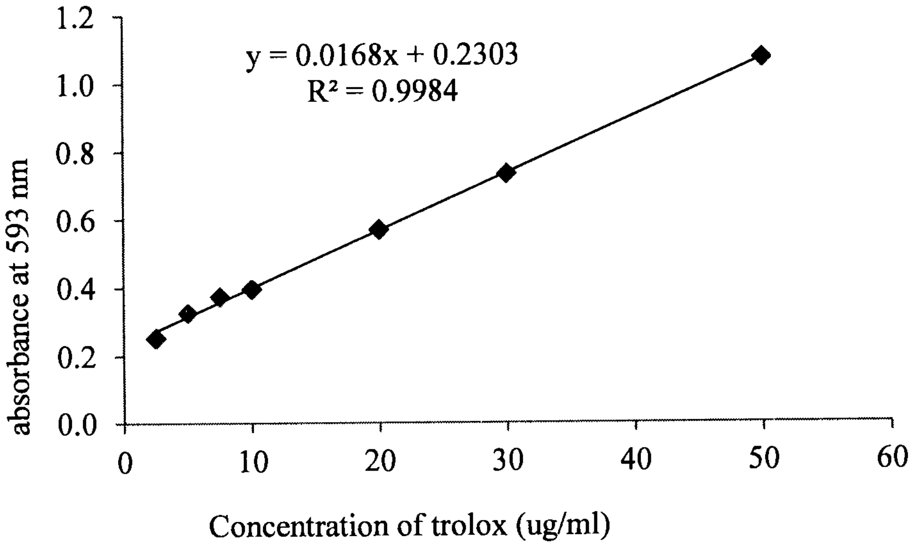
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

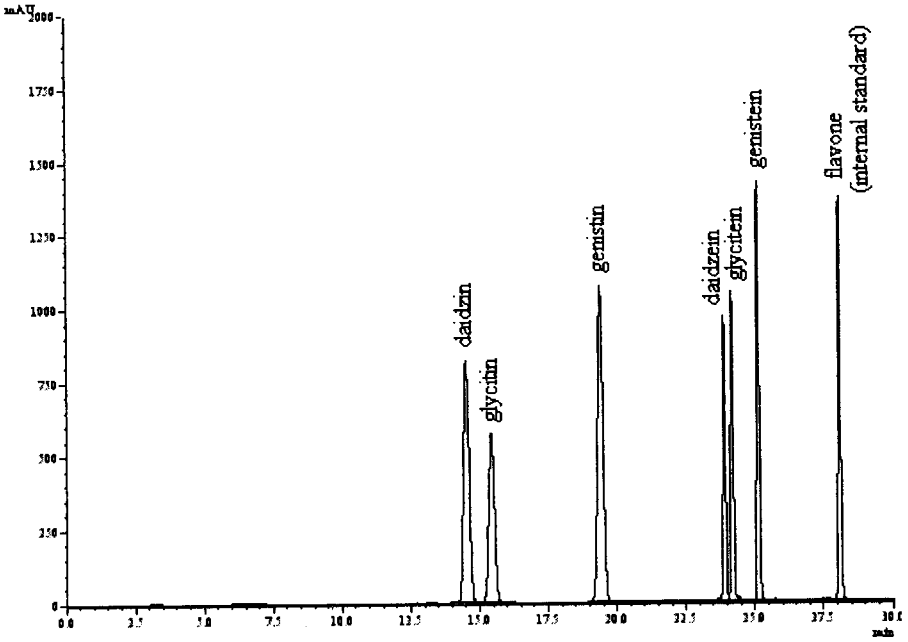
กราฟมาตรฐานและโครมาโตแกรม



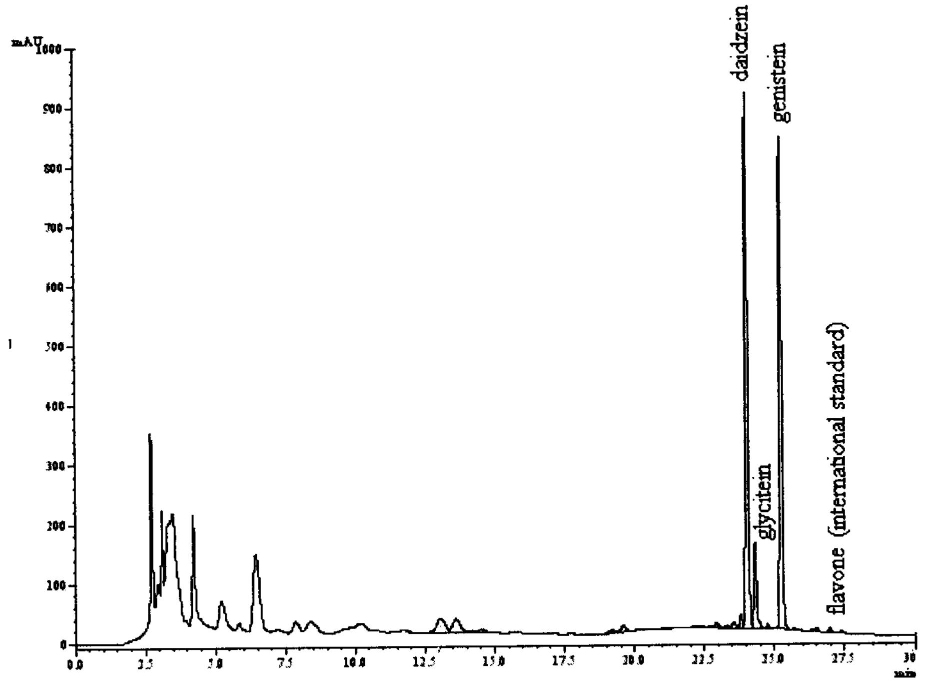
รูปที่ ก-1 กราฟมาตรฐานของ gallic acid



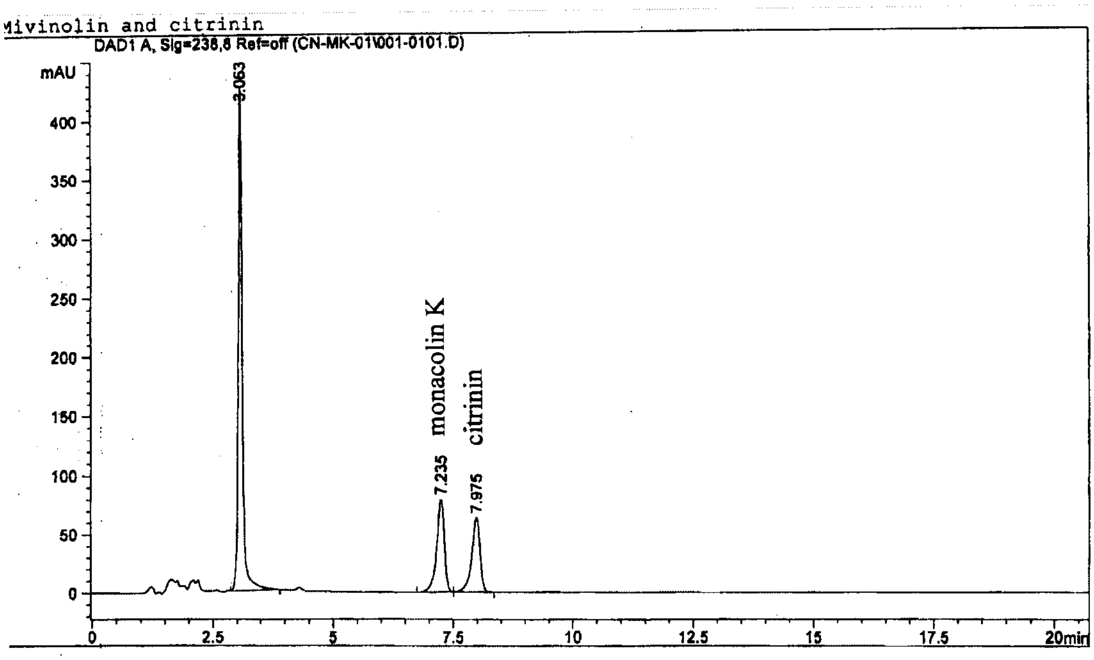
รูปที่ ก-2 กราฟมาตรฐานของ trolox



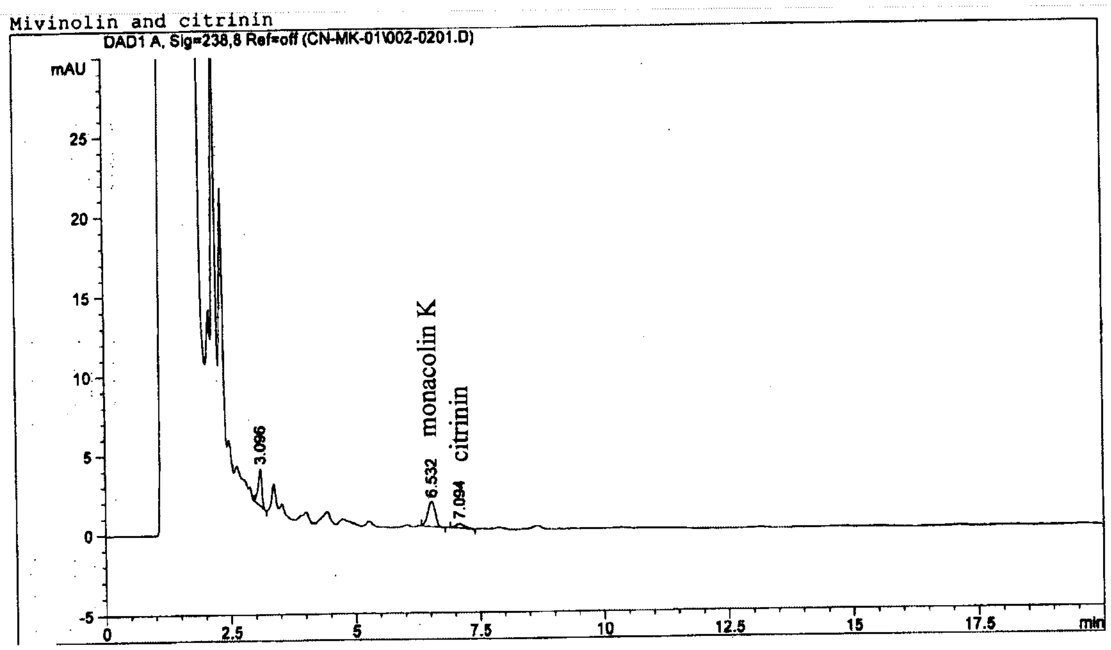
รูปที่ ก-3 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน isoflavones: daizin, glycitin, genistin, daidzein, glycitein และ genistein



รูปที่ ก-4 HPLC chromatogram ของ isoflavone ในสารสกัดถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส



รูปที่ ก-5 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน monacolin K และ citrinin



รูปที่ ก-6 HPLC chromatogram ของ monacolin K และ citrinin ในสารสกัดถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

ภาคผนวก ข

ลายมือชื่อผู้เข้าร่วมฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ

ลงทะเบียนผู้เข้าร่วมการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ

เรื่อง การผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

วันที่ 10 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00 น. – 16.30 น.

ณ อาคารแปรรูปและพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ลำดับที่	ชื่อ–นามสกุล	หน่วยงาน	ลายเซ็น
1	นางสาวนลิสา ทองอรุณ	มรภ. กำแพงเพชร	นลิสา
2	นางสาวเบญจมาศ การช่าง	เบญจมาศ การช่าง	เบญจมาศ
3	นางสาวสิริธนา นุสนธิ์	สิริธนา นุสนธิ์	สิริธนา
4	นางสาวรดารัตน์ ธงทอง	รดารัตน์ ธงทอง	รดารัตน์
5	นางสาวนงนุช โปติะ	นงนุช โปติ๊ะ	นงนุช
6	นางสาวสุรีรัตน์ พิลา	มรภ. กำแพงเพชร	สุรีรัตน์
7	นางสาวศิริลักษณ์ ดวงใจ	มรภ. กำแพงเพชร	ศิริลักษณ์
8	นางสาวจรัสพร ปานคำ	จรัสพร ปานคำ	จรัสพร
9	นางสาวธันย์ชนก สุริยะลังกา	มรภ. กำแพงเพชร	ธันย์ชนก
10	นางสาวจุฑามาศ บุญรอด	มรพส	จุฑามาศ บุญรอด
11	นางสาวภัณฑิรา ศรีคำ	มรพส.	ภัณฑิรา ศรีคำ
12	นางสาวศิริพร คำชุ่ม	มรพส.	ศิริพร คำชุ่ม
13	นางสาวฤทัยรัตน์ แดงอ่อน	มรพส.	ฤทัยรัตน์ แดงอ่อน
14	นางสาวรำไพ ทองแท้	มรพส	รำไพ ทองแท้
15	นายอนุชา ศรีสว่าง	มรพส.	อนุชา ศรีสว่าง

ลงทะเบียนผู้เข้าร่วมการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ

เรื่อง การผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

วันที่ 10 ตุลาคม 2555 เวลา 09.00 น. – 16.30 น.

ณ อาคารแปรรูปและพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ลำดับที่	ชื่อ-นามสกุล	หน่วยงาน	ลายเซ็น
1	นายแดนชัย เครื่องเงิน	[illegible]	[signature]
2	นางสุจิตรา ~~ปอสันเทียะ~~ เพียงสันเทียะ	"	[signature]
3	นางสาวสุภาวดี แหยมคง	[illegible]	สุภาวดี แหยมคง
4	นางสาวพรดรัล จุลกัลป์	มพร.	พรดรัล จุลกัลป์
5	นางพัชรียา พิทักษ์สุธีพงศ์	/ มรภส.	[signature]
6	นางชุติมา เลิศลักษมี	~~ชุติมา เลิศลักษมี~~ มร.ภส	ชุติมา เลิศลักษมี
7	นางสาวกนกวรรณ พรมจีน	~~กนกวรรณ พรมจีน~~ มร.ภส	กนกวรรณ พรมจีน
8	นางสาวอารีรัตน์ ยิ้มศิลป์	[illegible]	[signature]
9	นางสาวเปรมนภา สีโสภา	มรภส.	เปรมน ภ.
10	นางรัชนี รังสิยีรานนท์	[illegible]	[illegible]
11	นางสาวจีราพร น่วมนุช	คทก. มรภส.	[signature]
12	นางสาวกรววรรณ ทองสอน	คทก.	[signature]
13	[illegible]	คทก.	[signature]
14	[illegible]	พทก.	[signature]
15	[illegible]	–״–	เขมจิรา

ภาคผนวก ค

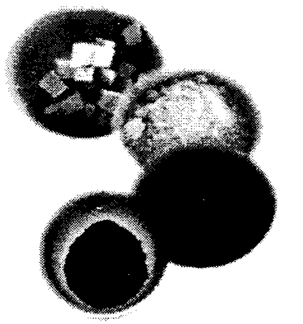
เอกสารเผยแพร่การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองหมัก

แผ่นพับการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตคุกกี้เสริมสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

คุกกี้เสริมสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

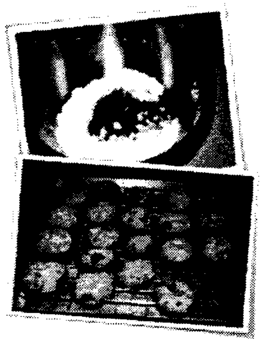
ส่วนผสม

แป้งสาลีอเนกประสงค์	500	กรัม
เนยสดชนิดจืด	320	กรัม
เกลือป่น	1	ช้อนชา
น้ำตาลทราย	200	กรัม
ผงฟู	10	กรัม
ผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส	20 - 30	กรัม
กากถั่วเหลืองอบ	100	กรัม
ลูกเกด	100	กรัม
เมล็ดมะม่วงหิมพานต์อบบดหยาบ	100	กรัม
ไข่ไก่	2	ฟอง
วานิลลา	3	ช้อนชา
กลิ่นเนยสด	1	ช้อนชา



วิธีทำ

1. ผสมแป้ง ผงฟู ผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส รวมกันพักไว้
2. ตีเนยสด น้ำตาลทราย เกลือป่น จนกระทั่งขึ้นฟู ใส่ไข่ทีละฟอง ผสมให้เข้ากันดี เติมวานิลลาและกลิ่นเนยสด
3. แบ่งแป้งเป็น 2 ส่วน ใส่แป้งทีละส่วน ผสมพอเข้ากัน เติมกากถั่วเหลืองอบ เมล็ดมะม่วงหิมพานต์อบบดหยาบ และลูกเกด เคล้าให้เข้ากันด้วยไม้พาย
4. ใช้ช้อนตักเป็นก้อนกลม วางบนถาดที่ทาด้วยเนยขาว นำเข้าเตาอบอุณหภูมิ 160 - 170 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15 - 20 นาที หรือจนกระทั่งคุกกี้สุก แซะออกจากถาดวางบนตะแกรง ตั้งไว้ให้เย็น



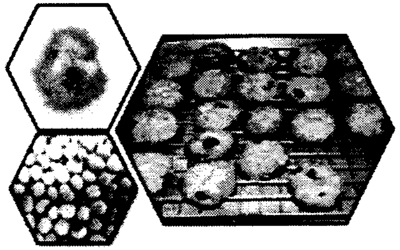
การถ่ายทอดเทคโนโลยีงานวิจัย

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
เลขที่ 156 หมู่ 5 ตำบลพลายชุมพล อำเภอเมือง
จังหวัดพิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 0-5526-7060 โทรสาร 0-5526-7061
http://[illegible].psru.ac.th

การถ่ายทอดเทคโนโลยี

โครงการวิจัยเรื่อง "การผลิตถั่วเหลืองหมักที่ปลอดภัยและมีคุณค่าทางโภชนาการสูงด้วยราโมแนสคัสเพื่อเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรและสร้างขีดความสามารถในการแข่งขัน"

การผลิตคุกกี้เสริมสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

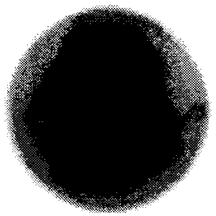


โดย

ดร.เกตุการ ดาจันทา และ ดร.อุทัยวรรณ ฉัตรธง

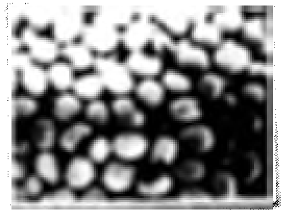
ราโมแนสคัส

ราโมแนสคัส (*Monascus* sp.) เป็นราที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหมักและมีการนำไปใช้ในยาและอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย เนื่องจากในระหว่างการเจริญของราได้มีการสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิดทั้งสารต้านอนุมูลอิสระและสารลดคอเลสเตอรอลที่มีชื่อว่า "โมนาโคลินเค" อาหารหมักจากราโมแนสคัสถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคคอเลสเตอรอล รวมถึงช่วยลดอาการของโรคความดันโลหิตสูงและโรคหลอดเลือดหัวใจ นอกจากนี้ในระหว่างการเจริญของราโมแนสคัสยังสร้างรงควัตถุสีแดง ซึ่งเป็นสารให้สีธรรมชาติในอาหารและมีสรรพคุณทางยาในการลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง ต้านการอักเสบและมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ราโมแนสคัสสามารถสร้างกรดแกมมาอะมิโนบิวทิริคหรือสารกาบาซึ่งมีสรรพคุณช่วยลดความดันโลหิต รักษาและป้องกันโรคมะเร็ง โรคกระดูกพรุน โรคหัวใจ โรคอัลไซเมอร์และโรคความจำเสื่อม อย่างไรก็ตามในระหว่างการเจริญของราโมแนสคัสพบการสร้างสารซิตรินินซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อตับและไตของมนุษย์รวมอยู่ด้วยเสมอ



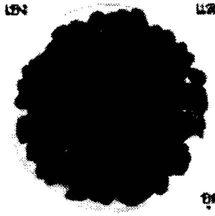
ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการคัดเลือกราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารลดคอเลสเตอรอลสูงแต่สร้างสารซิตรินินต่ำ คือ *Monascus* sp. PSRU03 จึงได้นำมาใช้ในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชเกษตรที่มีการปลูกอย่างแพร่หลายในพื้นที่จังหวัดภาคเหนือ



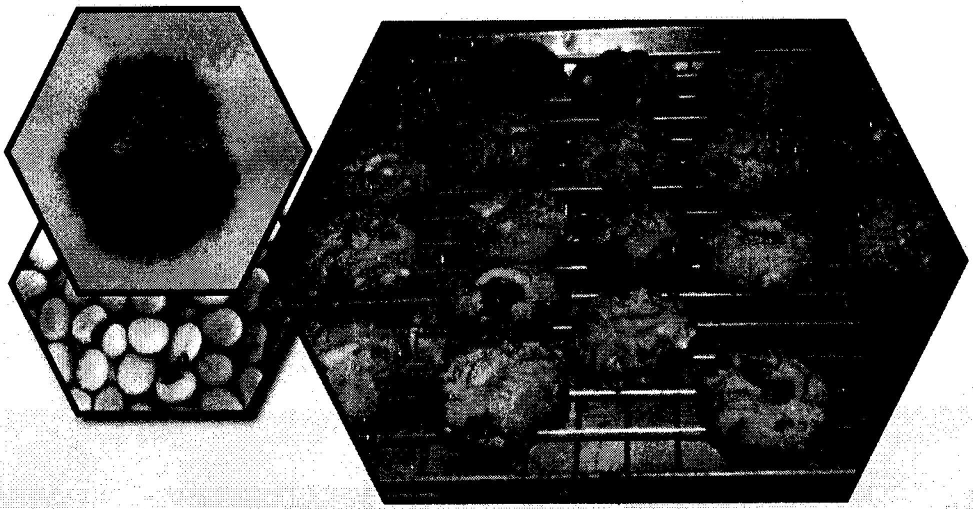
"ถั่วเหลือง" เป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่อุดมไปด้วยสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิดทั้งสารไอโซฟลาโวนและสารประกอบฟีนอลที่มีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเบาหวาน โรคกระดูกพรุน และมีสารที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนเพศหญิงจึงใช้ทดแทนฮอร์โมนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้

"ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส" จัดเป็นการผลิตอาหารสุขภาพที่อุดมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อร่างกายทั้งจากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอง และการสร้างขึ้นของราโมแนสคัสในระหว่างกระบวนการหมัก



ถั่วเหลืองที่หมักด้วยรา *Monascus* sp. PSRU03 อุดมด้วยสารลดคอเลสเตอรอลโมนาโคลินเค สารต้านออกซิเดชันกลุ่มสารประกอบฟีนอล สารไอโซฟลาโวนชนิดอะไกลโคนรงควัตถุสีแดง รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) มากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการหมักเกิดการหมักย่อยของโปรตีนในถั่วเหลืองทำให้ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสมีรสชาติอร่อยคล้ายผงชูรส จึงสามารถนำไปใช้เป็นสารเพิ่มรสชาติในเมนูอาหารได้ นอกจากนี้การนำถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสไปประยุกต์เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารจึงเป็นการเพิ่มสรรพคุณในการต้านอนุมูลอิสระและเสริมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์ได้

คู่มือ
การผลิตคุกกี้เสริมสารต้านอนุมูลอิสระ จากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส



โดย
ดร.เกตุการ ดาจันทา และ ดร.อุทัยวรรณ ฉัตรธง

คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

คำนำ

เอกสารคู่มือการผลิตคุกกี้เสริมสารต้านอนุมูลอิสระจากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีที่ได้จากโครงการวิจัยเรื่อง "การผลิตถั่วเหลืองหมักที่ปลอดภัยและมีคุณค่าทางโภชนาการสูงด้วยราโมแนสคัสเพื่อเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรและสร้างขีดความสามารถในการแข่งขัน" ซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ 2554

ผู้จัดทำได้เรียบเรียงเนื้อหาให้เข้าใจง่ายและมีภาพประกอบทุกขั้นตอน หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารฉบับนี้จะมีส่วนช่วยให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส ซึ่งนอกจากความอร่อยแล้วยังได้สารอาหารที่ประโยชน์ต่อร่างกายและสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

เกตุการ ดาจันทา และ อุทัยวรรณ ฉัตรธง

ตุลาคม 2555

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
อุปกรณ์และเครื่องมือ	3
ขั้นตอนการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส	4
1. การเตรียมถั่วเหลือง	4
2. การเตรียมราโมแนสคัส	7
3. การเตรียมถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส	8
4. การผลิตคุกกี้เสริมถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส	11
คุณภาพของถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส	13
เอกสารอ้างอิง	14

บทนำ

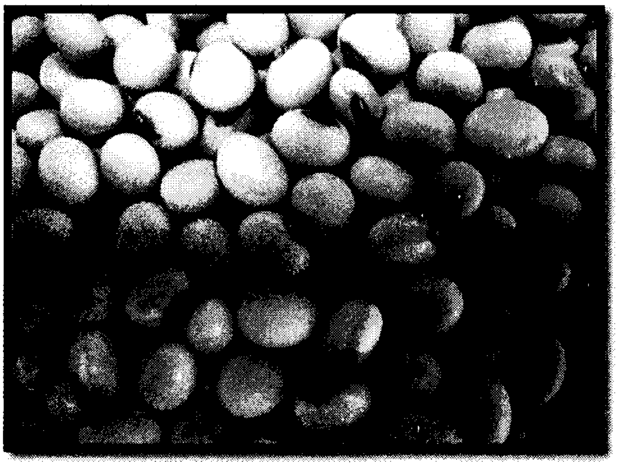
ราโมแนสคัส (*Monascus*) เป็นราที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหมักและมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาอย่างแพร่หลายเนื่องจากในระหว่างการเจริญของราได้มีการสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิดทั้งสารต้านอนุมูลอิสระและสารลดคอเลสเตอรอลที่มีชื่อว่าโมนาโคลินเค ดังนั้นจึงมีการใช้อาหารหมักจากราโมแนสคัสในการรักษาโรคคอเลสเตอรอล รวมถึงช่วยลดอาการของโรคความดันโลหิตสูงและโรคหลอดเลือดหัวใจ นอกจากนี้ในระหว่างการเจริญของราโมแนสคัสยังสร้างรงควัตถุสีแดง ซึ่งเป็นสารให้สีธรรมชาติในอาหารและมีสรรพคุณทางยาในการลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง ต้านการอักเสบ และมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ราโมแนสคัสสามารถสร้างกรดแกมมาอะมิโนบิทิริคหรือสารกาบาซึ่งมีสรรพคุณช่วยลดความดันโลหิต รักษาและป้องกันโรคมะเร็ง โรคกระดูกพรุน โรคหัวใจ โรคอัลไซเมอร์และโรคความจำเสื่อม อย่างไรก็ตามในระหว่างการเจริญของราโมแนสคัสพบการสร้างสารพิษซิตรินินซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อตับและไตของมนุษย์ร่วมอยู่ด้วยเสมอ

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาทีมผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการคัดเลือกราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่มีการสร้างสารพิษซิตรินินต่ำและมีการสร้างสารลดคอเลสเตอรอลสูง จึงได้นำมาใช้ในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชเกษตรที่มีการปลูกอย่างแพร่หลายในพื้นที่จังหวัดภาคเหนือและเป็นอาหารเพื่อ

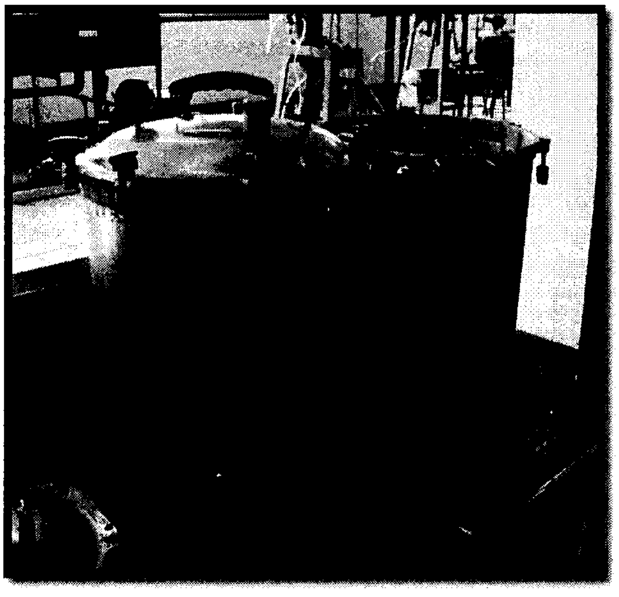
สุขภาพที่อุดมไปด้วยสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิดทั้งสาร isoflavoneและสารประกอบฟีนอลที่มีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเบาหวาน โรคกระดูกพรุน และมีสารที่ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนเพศหญิงจึงใช้ทดแทนฮอร์โมนในหญิงวัยหมดประจำเดือนได้ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ต่อยอดงานวิจัยพื้นฐานสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพโดยการนำถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสมาเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับคุกกี้ซึ่งเป็นขนมที่บริโภคกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นคู่มือฉบับนี้จึงเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพจากองค์ความรู้ที่ได้ผลงานวิจัยซึ่งจะทำให้เกิดความเชื่อมั่นในคุณภาพของสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอย่างแท้จริง

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ราโมแนสคัส PSRU03



2. ถั่วเหลือง



3. หม้อนึ่งความดันไอ

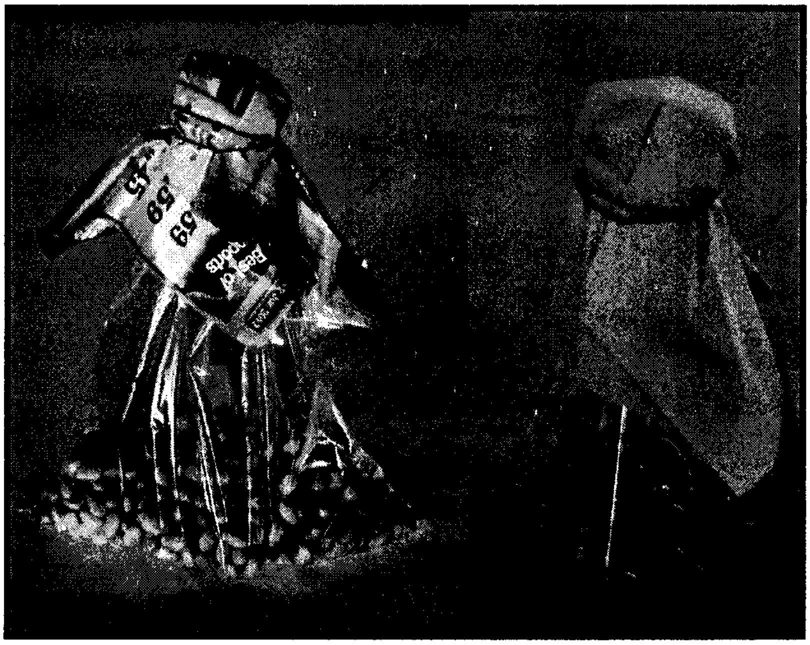
ขั้นตอนการผลิตถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

1. การเตรียมถั่วเหลือง

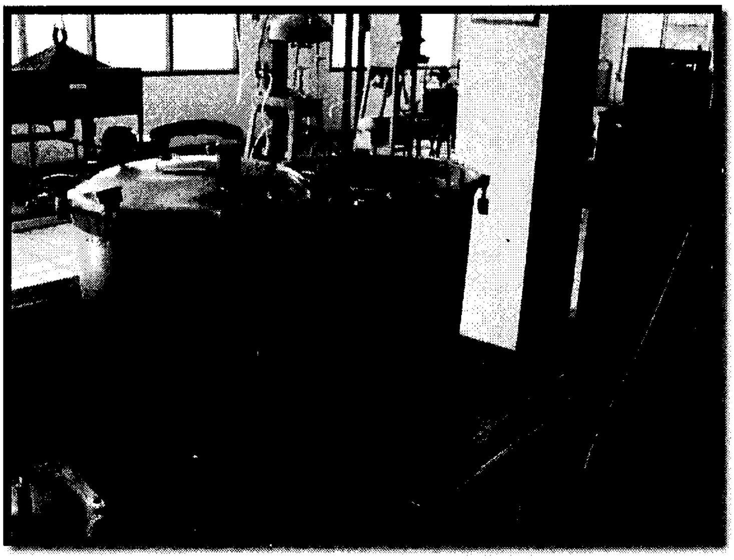
คัดเลือกเมล็ดถั่วเหลืองให้สะอาด

แช่เมล็ดถั่วเหลืองในน้ำสะอาดนานข้ามคืน

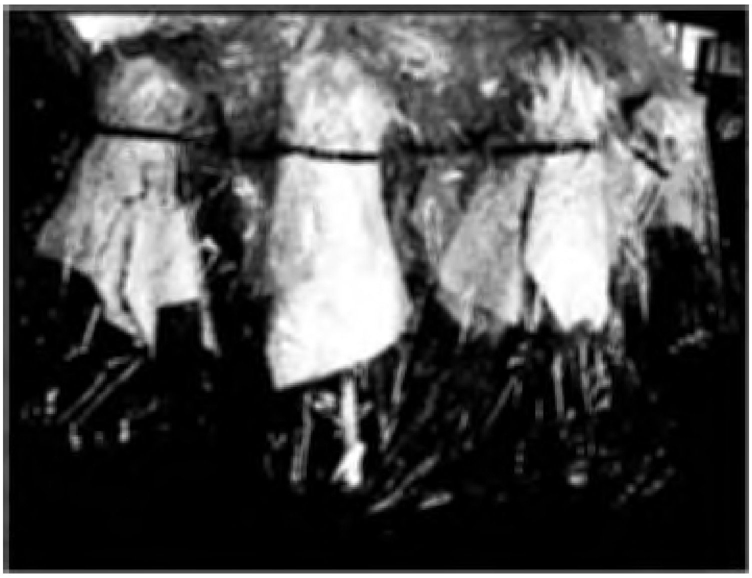
สะเด็ดน้ำจากเมล็ดถั่วเหลือง



บรรจุเมล็ดถั่วเหลืองใส่ในถุงพลาสติกหรือฟลาสค์

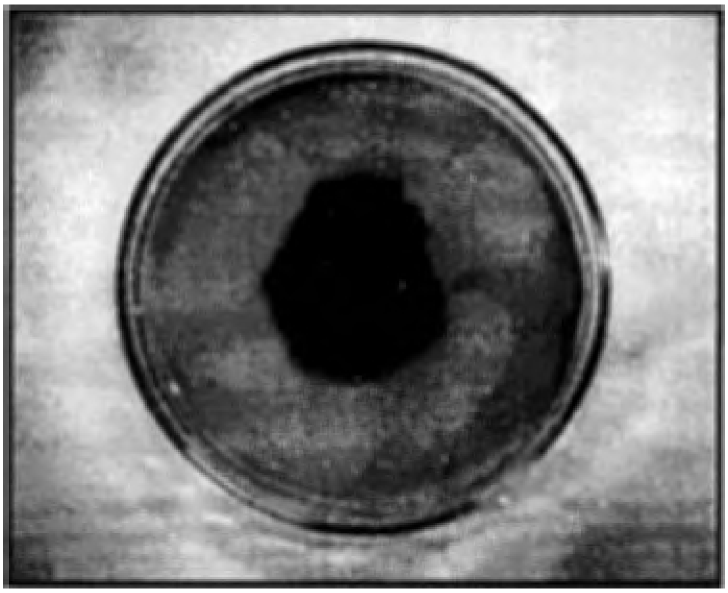


นึ่งถั่วเหลืองในหม้อนึ่งความดันไอที่ 15 ปอนด์ นาน 40 นาที
หรือต้มถั่วเหลืองในน้ำเดือดจนนิ่ม

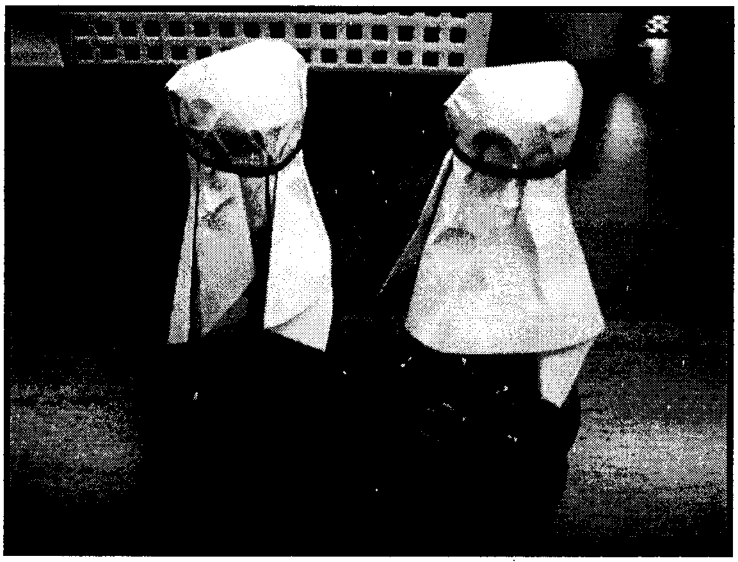


ปล่อยให้ถั่วเหลืองเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมราโมแนสคัส

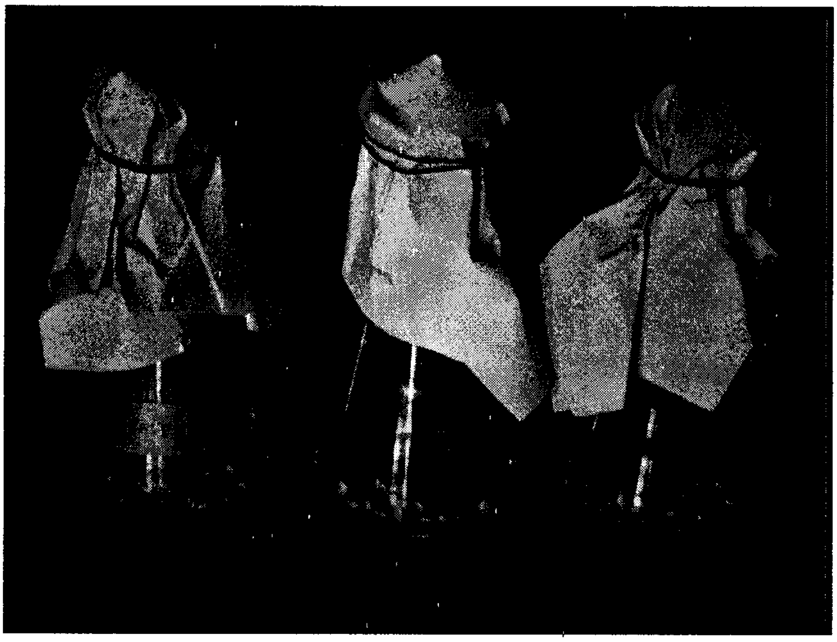


เพาะเลี้ยงราโมแนสคัส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน



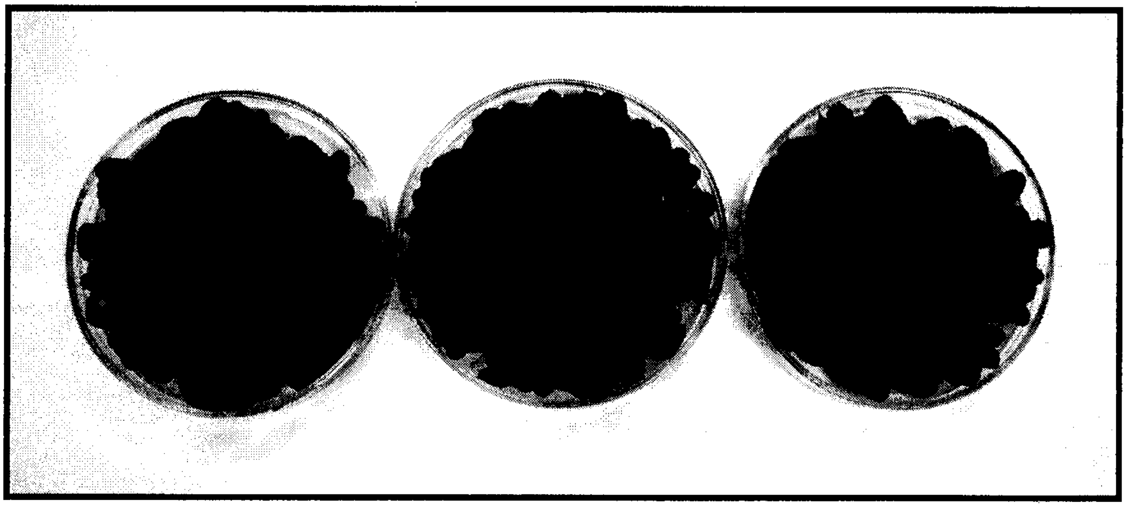
ย้ายราโมแนสคัส ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

3. การเตรียมถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

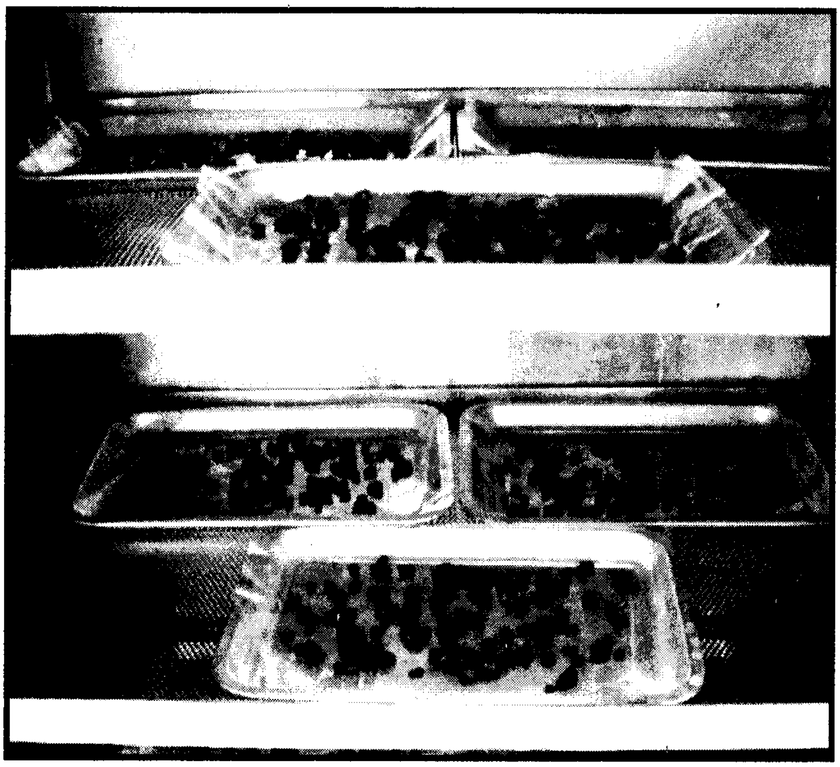


เติมราโมแนสคัสจากอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth ลงในถั่วเหลืองที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 1

บ่มในตู้บ่ม อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 15 - 20 วัน จะได้ถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส



ถั่วเหลืองหมักพบราโมแนสคัสเจริญปกคลุมเมล็ดถั่วเหลือง
อย่างทั่วถึงเห็นเป็นสีแดงทั้งเมล็ด

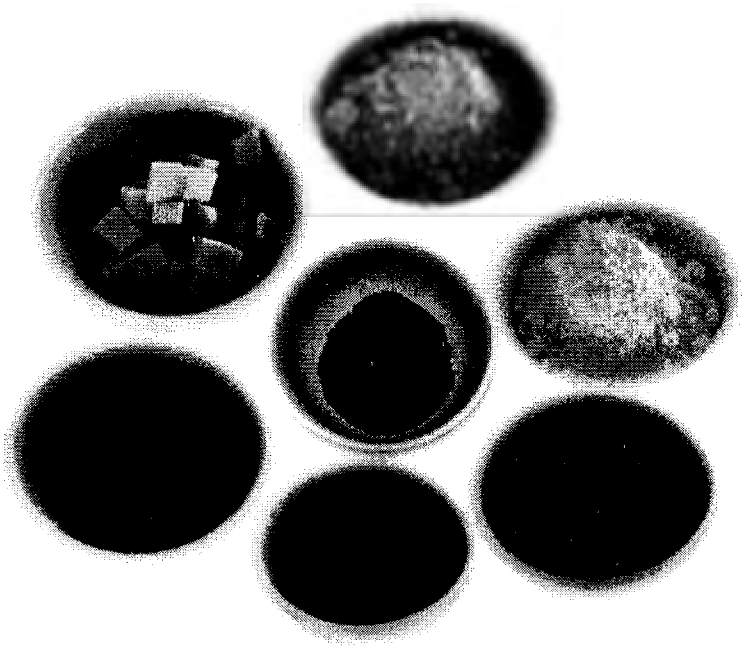


บแห้งถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสในตู้อบแห้งแบบลมร้อน

บดถั่วเหลืองหมักโมแนสคัสอบแห้งให้เป็นผงละเอียด
นำไปใช้ในการแปรรูปเป็นคุกกี้เสริมสารต้านอนุมูลอิสระ

4. การผลิตคุกกี้เสริมถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

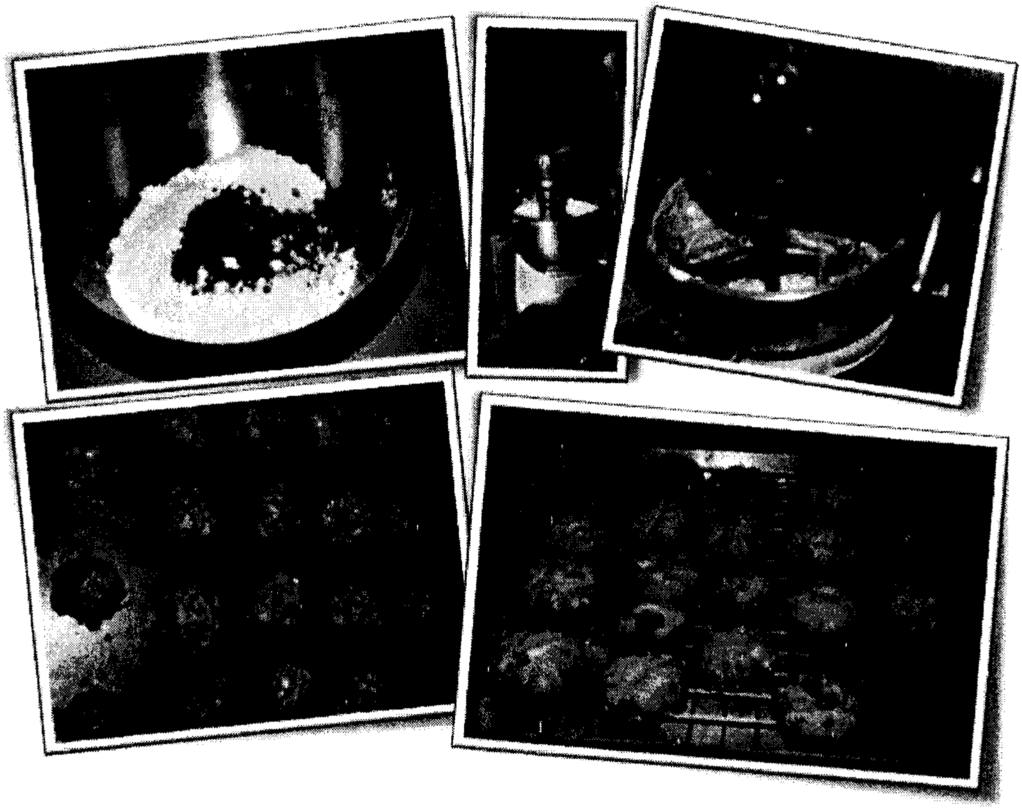
ส่วนผสม



1. แป้งสาลีเอนกประสงค์	500	กรัม
2. เนยสดชนิดจืด	320	กรัม
3. เกลือป่น	1	ช้อนชา
4. น้ำตาลทราย	200	กรัม
5. ผงฟู	10	กรัม
6. ผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส	20 – 30	กรัม
7. กากถั่วเหลืองอบ	100	กรัม
8. ลูกเกด	100	กรัม
9. เมล็ดมะม่วงหิมพานต์อบบดหยาบ	100	กรัม
10. ไข่ไก่	2	ฟอง
11. วานิลลา	3	ช้อนชา
12. กลิ่นเนยสด	1	ช้อนชา

วิธีทำ

1. ผสมแป้ง ผงฟู ผงถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส รวมกันพักไว้
2. ตีเนยสด น้ำตาลทราย เกลือป่น จนกระทั่งขึ้นฟู ใส่ไข่ทีละฟอง ผสมให้เข้ากันดี เติมวานิลลาและกลิ่นเนยสด
3. แบ่งแป้งเป็น 2 ส่วน ใส่แป้งทีละส่วน ผสมพอเข้ากัน เติมกากถั่วเหลืองอบ เมล็ดมะม่วงหิมพานต์อบบดหยาบ และลูกเกด เคล้าให้เข้ากันด้วยไม้พาย
4. ใช้ช้อนตักเป็นก้อนกลม วางบนถาดที่ทาด้วยเนยขาว นำเข้าเตาอบอุณหภูมิ 160 - 170 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15 - 20 นาที หรือจนกระทั่งคุกกี้สุก แซะออกจากพิมพ์วางบนตะแกรง ทิ้งไว้ให้เย็น



คุณภาพของถั่วเหลืองหมักโมแนสคัส

- มีสารลดคอเลสเตอรอลโมนาโคลินเค 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
- มีสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มประกอบฟีนอล 9 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิก/กรัม
- มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH
- มีฤทธิ์ ferric reducing antioxidant power (FRAP)
- สารรงควัตถุ 50 ยูนิต/กรัม

เอกสารอ้างอิง

เกตุการ ดาจันทา. 2554. การคัดเลือกราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษต่ำเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตสารสีที่ปลอดภัยจากข้าวแดง. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม. 81 หน้า

Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Kiyota, A., Yasukawa, K., Sakamoto, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Takayasu, J., and Nishino, H. 2005. Anti-tumorinitiating effects of monascin, an azaphilonoid pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice). *Chemistry and Biodiversity, 2,* 1305–1309.

Gotoh, T., Yamada, K., Yin, H., Ito, A., Kataoka, T., and Dohi, K. 1998. Chemoprevention of *N*-Nitroso-*N*-methylurea-induced rat mammary carcinogenesis by soy foods or biochanin A. *Japanese Journal Cancer Research, 89,* 137–142.

Ishimi, Y., Yoshida, M., Wakimoto, S., Wu, J., Chiba, H., Wang, X., Takeda, K., and Miyaura, C. 2002. Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. *Bone, 31,* 180-185.

Liu, D., Zhen, W., Yang, Z., Carter, J.D., Si, H., and Reynolds, K.A. 2006. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes, 55,* 1043–1050.

Martinkova, L., Juzlova, P., and Vesely, D. 1995. Biological-activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus. Journal of Applied Bacteriology, 79,* 609–616.

Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M. A., Cincotta, M., Altavilla, D., Lentile R., and Squadrito, F. 2002. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Journal of Bone and Mineral Research, 17,* 1904-1912.

Park, K.-Y., Jung, K.-O., Rhee, S.-H., and Choi, Y. H. 2003. Antimutagenic effects of *doenjang* (Korean fermented soypaste) and its active compounds. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 523–524,* 43–53.

Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., Shay, N.F., and Erdman, J.W.Jr. 1998. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition, 68,* 1375S-1379S.

Rhyu, M.-R., Kim, E.-Y., and Han, J.-S. 2002. Antihypertensive effect of the soybean paste fermented with the fungus *Monascus. International Journal of Food Science and Technology, 37,* 585-588.

Venero, C.V., Venero, J.V., Wortham, D.C., and Thompson, P.D. 2010. Lipid-lowering efficacy of red yeast rice in a population intolerant to statins. *The American Journal of Cardiology, 105,* 664-666.

Wei, W., Li, C., Wang, Y., Huaide, S., Zhu, J., and Kritchevsky, D. 2003. Hypolipidemic and anti-atherogenic effects of long-term cholestin (*Monascus purpureus*-fermented rice, red yeast rice) in cholesterol fed rabbits. *The Journal of Nutritional Biochemistry, 14,* 314-318.

Yasukawa, K., Akihisa, T., Oinuma, H., Kaminaga, T., Kanno, H., Kasahara, Y., Tamura, T., Kumaki, K., Yamanouchi, S., and Takido, M. 1996. Inhibitory effect of taraxastane-type triterpenes on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology, 53,* 341–344.

Yasukawa, K., Takahashi, M., Natori, S., Kawai, K., Yamazaki, M., Takeuchi, M., and Takido, M. 1994. Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in 2-stage carcinogenesis in Mice. *Oncology, 51,* 108–112.

ทีมผู้วิจัย

ดร.เกตุการ ดาจันทา	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
ดร.อุทัยวรรณ ฉัตรธง	มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวเกตุการ ดาจันทา

(ภาษาอังกฤษ) Miss Katekan Dajanta

2. เลขหมายประจำตัวบัตรประชาชน 3 6704 00504 71 4

รหัสประจำตัวนักวิจัยของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 00075950

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 7

4. ที่อยู่ที่ทำงาน

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม เลขที่ 156 หมู่ 5 ต.พลายชุมพล อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000 โทรศัพท์ 055-267080 โทรสาร 055-267081 มือถือ 086-1797207

E-mail: dkatekan@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ (ระบุสาขาวิชาเอก)	**ปี พ.ศ.**	**ชื่อสถานศึกษา**	**ประเทศ**
วท.ด. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)	2553	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
วท.ม. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)	2546	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
วท.บ. (เกษตรศาสตร์)	2537	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย

6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

- Food Science and Technology
- Food Microbiology
- Food Fermentation Technology
- Food Quality Assurance

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ในสถานะหัวหน้าโครงการวิจัย

(1) การสังเคราะห์บริบทองค์รวมการใช้ประโยชน์ของเหลือจากการแปรรูปองุ่นทางเครื่องสำอางและการพัฒนาเครื่องสำอางต้นแบบจากน้ำมันและสารสกัดจากจากเมล็ดองุ่น แหล่งทุนจาก สกว. งบประมาณปี 2554

(2) การผลิตผงกล้าเชื้อและผงปรุงรสจากถั่วเหลืองหมักเพื่อการยกระดับอาหารพื้นบ้านสู่การแข่งขันในตลาดธุรกิจ
แหล่งทุนจากสำนักงานคุณกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ในโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา ประจำปี 2554

(3) การสังเคราะห์บริบทงานวิจัยโดยรวมของมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงครามเพื่อสร้างแต้มต่อและเสริมศักยภาพทางอุตสาหกรรมอาหารในเขตจังหวัดพิษณุโลก
แหล่งทุนจาก สกว. งบประมาณปี 2554

(4) การคัดเลือกราโมแนสคัสสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษต่ำเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตสารสีที่ปลอดภัยจากข้าวแดง
แหล่งทุนจากงบกองทุนสนับสนุนงานวิจัยของมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ปี 2554

(5) การเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มที่ผลิตจากน้ำนมวัวแท้และนมผง ในชุดโครงการแก้ไขปัญหาน้ำนมดิบของภาคเหนือตอนบน
แหล่งทุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(6) ความสัมพันธ์ระหว่างระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสกับคุณภาพการเก็บรักษาน้ำนมดิบที่ผลิตได้ในฤดูร้อน
แหล่งทุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ในสถานะผู้ร่วมโครงการวิจัย

(1) การผลิตถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า) ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยเชื้อบาซิลลัส ซับทิลิส (งบประมาณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) รุ่นที่ 8 ปี 2549)

(2) การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาราเร่เสริมนัตโตะในเชิงพาณิชย์ (งบประมาณของ สกว. ปี 2550)

(3) น้ำพริกหนุ่มที่ผลิตจากพันธุ์พริกปรับปรุง แปรรูปโดยการแช่เยือกแข็งด้วยอัตราเร็วสูงต้นทุนต่ำ เพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยี ในชุดชุดโครงการน้ำพริกหนุ่มที่ผลิตจากพันธุ์พริกปรับปรุงแปรรูปโดยแช่เยือกแข็งด้วยอัตราเร็วสูง ต้นทุนต่ำ เพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยี (งบประมาณของ วช. ปี 2551)

(4) ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพจากใบบัวบกที่ได้รับการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยี (งบประมาณของ วช. ปี 2551)

(5) โครงการน้ำผักและน้ำผลไม้ผงเพื่อสุขภาพโดยใช้ต้นทุนต่ำสำหรับผู้ประกอบการ SMEs (งบประมาณของ วช. ปี 2550)

(6) การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำมันงาเพื่อให้ได้มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.) (งบพัฒนาอุตสาหกรรมจังหวัดแม่ฮ่องสอน ปี 2550)

(7) การผลิตเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่ทนต่อแบคทีริโอฟาจ (งบประมาณของ วช. ปี 2550)

(8) การปรับปรุงพันธุ์พริกเพื่อผลิตน้ำพริกหนุ่มที่มีความเผ็ดคงที่และปราศจากรสขม ปี 1 (งบประมาณของ สกว. ปี 2549)

(9) ผลของการให้ความร้อนต่ออายุการวางจำหน่ายน้ำพริกตาแดง (งบประมาณของ วช. ปี 2547)

(10) ความสัมพันธ์ระหว่างระบบเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสกับการเก็บรักษาคุณภาพน้ำนมดิบ (งบประมาณของ วช. ปี 2546)

(11) การผลิตสารลดคลอเรสเตอรอลจากข้าวแดง (งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2546)

(12) คุณภาพทางจุลชีววิทยาของลำไยอบแห้งทั้งเปลือก (บริษัทเอกชน ปี 2546)

(13) การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลคติกในโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง (งบประมาณของ วช. ปี 2545)

(14) คุณค่าทางอาหารและการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์เนยแข็งจากถั่วเหลือง (งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2543)

(15) กระบวนการแปรรูปน้ำพริกหนุ่มบรรจุกระป๋อง (งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2542)

7.3 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

(1) การผลิตอังคักที่ปลอดภัยจากเศษก๋วยเตี๋ยว แหล่งทุนคือมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ 2554 ในสถานะผู้ร่วมวิจัย ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณ 90%

งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

(1) **Dajanta, K.**, Chukeatirote, E., and Apichartsrangkoon, A. 2012. Nutritional and physicochemical qualities of Thua Nao (Thai traditional fermented soybean). Chiang Mai Journal of Science, 39(4): 562-574.

(2) Chukeatirote, E., **Dajanta, K.**, and Apichartsrangkoon, A. 2012. Thua Nao: A traditional Thai Fermented Soy product. In: Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology, Hui, Y.H., and Evranuz, O. (Eds.). CRC Press: 131-138.

(3) **Dajanta, K.**, Apichartsrangkoon, A., and Somsang, S. 2012. Comparison of physical and chemical properties of high pressure- and heat- treated Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) in syrup. High Pressure Research: An International Journal, 32(1): 114-118.

(4) **Dajanta, K.**, Chukeatirote, E., and Apichartsrangkoon, A. 2011. Improvement of thua nao production using protein-rich soybean and *Bacillus subtilis* TN51 starter culture. Annals of Microbiology, 62(2): 785-795.

(5) **Dajanta, K.**, Apichartsrangkoon, A., and Chukeatirote, E. 2011. Antioxidant properties and total phenolics of Thua Nao (a Thai Fermented Soybean) as affected by *Bacillus*-fermentation. Microbial and Biochemical Technology, 3: 56-59.

(6) Chukeatirote, E., In-khian, S., **Dajanta, K.**, and Apichartsrangkoon, A. 2011. Thua Nao - An Indigenous Fermented Soybean of Thailand. Srinakharinwirot Science Journal, 27: 197-213. (in Thai).

(7) **Dajanta, K.**, Apichartsrangkoon, A. and Chukeatirote, E. 2011. Volatile profiles of *thua nao*, a Thai fermented soy products. *Food Chemistry, 125*, 464-470.

(8) **Dajanta, K.**, Apichartsrangkoon, A. Chukeatirote, E., and Frazier, R. A. 2011. Free amino acid profiles of *Thua Nao*, a Thai fermented soybean. Food Chemistry, 125, 342-347.

(9) **Dajanta, K.**, Chukeatirote, E., and Apichartsrangkoon, A. 2011. Analysis and characterisation of amino acid contents of thua nao, a traditionally fermented soybean food of Northern Thailand. International Food Research Journal, 18, 588-592.

(10) Chukeatirote, E., **Dajanta, K.**, and Apichartsrangkoon, A. 2010. Thua nao, indigenous Thai fermented soybean: a review. Journal of Biological, 10, 581-583.

(11) Sungkam, J., Apichartsrangkoon, A., and **Dajanta, K.** 2010. Processing of dried jelly from pennwort juice by vacuum infrared. Rajabhat Chiangmai Research Journal, 2, 97-104. (in Thai).

(12) **Dajanta, K.**, Chukeatirote, E., Apichartsrangkoon, A. and Frazier, R. A. 2009. Enhanced aglycone production of fermented soybean products by *Bacillus* species. Acta Biologica Szegediensis, 52(2), 93-98.

(13) **Dajanta K.**, Wongkham, S, Thirach, P., Baophoeng, P., Apichartsrangkoon, A., Santithum, P., and Chukeatirote, E. 2009. Comparative study of proteolytic activity of protease-producing bacteria isolated from *thua nao*. Maejo International Journal of Science and Technology, 3, 269-276.

(14) **Dajanta, K.**, Chukeatirite, E., and Apichartsrangkoon, A. 2008. Effect of lactoperoxidase system on keeping quality of raw cow's milk in Thailand. International Journal of Dairy Science, 3, 112-116.

ผลงานวิจัยในรูปบทคัดย่อ/Proceeding ในการประชุมวิชาการ

(1) **Dajanta, K.**, Janpum, P., and Leksing, W. 2012. Phenolics, flavonoids and antioxidant capacity in thua nao produced from yellow and black soybeans fermented with powder of Bacillus subtilis TN51. The 14th Food Innovation Asia Conference 2012, BITEC, Bangkok, Thailand, June 14-15, 2012.

(2) **Dajanta, K.**, Apichartsrangkoon, A., Somsang, S. and Worametrachanon, S. 2011. Comparison of physical and chemical properties of high pressure and thermal treated Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) in syrup. 49th EHPRG International Conference, Budapest (Hungary), 28 August-2 September 2011.

(3) **Dajanta, K.**, Trephara, N., and Katedit, W. 2011. Characteristics of low citrinin-producing strains of *Monascus* sp. isolated from Chinese red mould rice. The 12th ASEAN Food Conference 2011, Food innovation: Key to creative economy, BITEC, Bangkok, Thailand, June 16-18, 2011.

(4) **Dajanta, K.**, Chukeatirote, E., and Apichartsrangkoon, A. 2010. Nutritional and physiochemical qualities of *Thua Nao* (Thai traditional fermented soybean). Food Innovation Asia Conference 2010: Indigenous Food Research and Development to Global Market, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand, June 17-18, 2010.

(5) **Dajanta, K.**, Apichartsrangkoon, A., and Chukeatirote, E. 2009. Composition and quantities of free amino acids in *thua nao* (a Thai fermented soybean). Food Innovation Asia Conference 2009, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand, June 18-19, 2009.

(6) **Dajanta, K.**, Apichartsrangkoon, A., Chukeatirite, E., and Frazier, R.A. 2009. Comparison of isoflavone contents in *Bacillus*-fermented soybeans. A poster presentation at RGJ-Ph.D. Congress IX at Jomthien Palm Beach and Resort, Pattaya, Thailand, April 4-6, 2009.

(7) **Dajanta, K.**, Baophoeng, P., Thirach, P., Santithum, P., Chukeatirote, E., and Apichartsarangoon, A. 2007. Comparative analysis of protease activity of *Bacillus* species isolated from *thua nao*. 33rd congress on science and technology of Thailand (STT.33) at Walailak University Nakhon Si Thammarat, Thailand, October 18-20, 2007.

(8) **Dajanta, K.** and Pinthong, R. 2004. Preservation of raw milk by Lactoperoxidase System combination with refrigerated temperature. The 6th Agro-Industrial Conference, THAIFEX & HALFEX 2004, Impact, Bangkok, Thailand, May 28 – 29, 2004.

(9) Pinthong, R. and **Dajanta, K.** 2003. Effect of Lactoperoxidase System in raw milk. The 5th Agro-Industrial Conference, THAIFEX & HALFEX 2003, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand, June 31– July 1, 2003.

เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ

เกตุการ ดาจันทา. (2548). คู่มือกระบวนการและการจัดการคุณภาพและมาตรฐานของสหกรณ์โคนม. คลินิกเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวอุทัยวรรณ ฉัตรธง

(ภาษาอังกฤษ) Miss Utaiwan Chattong

2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 7

3. สถานที่ทำงาน สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม เลขที่ 156 หมู่ 5 ต.พลายชุมพล

อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-267080 โทรสาร 055-267081 มือถือ 081-632-0217

E-mail : nuwongs@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ (ระบุสาขาวิชาเอก)	ปี พ.ศ.	ชื่อสถานศึกษา	ประเทศ
วท.ด. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)	2550	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
วท.ม. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)	2546	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
วท.บ. (วัสดุศาสตร์)		มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย

5. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ High pressure processing, Rheology, Microstructure by Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM) and Scanning Electron Microscopy (SEM)

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

6.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ในสถานะหัวหน้าโครงการวิจัย

(1) การพัฒนาไอศกรีมกะทิลดไขมันเพื่อสุขภาพ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (MAG Window II) Co-funding ปี 2552

(2) การผลิตเนื้อนกกระจอกเทศขอเสริมไฮโดรคอลลอยด์ที่ผ่านการแปรรูปด้วยความดันสูง ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) รุ่นที่ 6 ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(3) การพัฒนาปลาทูเค็มเพื่อสุขภาพ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ประจำปีงบประมาณ 2550 (หัวหน้าโครงการ)

(4) การพัฒนามอลทิทอลไซรัปทดแทนน้ำตาลทรายในฝอยทอง (ขนมไทย) ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ประจำปีงบประมาณ 2551 (หัวหน้าโครงการ)

(5) การศึกษากระบวนการผลิตและอายุการเก็บน้ำพริกตาแดงผง ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการ IRPUS สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปี 2551 (หัวหน้าโครงการ)

(6) นวัตกรรมของการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากข้าวงอก ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551 (ผู้วิจัยร่วม)

6.2 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

(1) การผลิตอังคักที่ปลอดภัยจากเศษก๋วยเตี๋ยว แผนงานวิจัยการใช้ประโยชน์จากของเหลือในอุตสาหกรรมก๋วยเตี๋ยว ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ 2554 (หัวหน้าโครงการ)

7. งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

(1) **Chattong U**., and Apichartsrangkoon A. 2009. Dynamic viscoelastic characterisation of ostrich-meat yor (Thai sausage) following pressure, temperature and holding time regimes. Meat Science, 81(3), 426-432.

(2) **Chattong, U**., Apichartsrangkoon, A., and Bell, A. E. 2007. Effects of hydrocolloid addition and high pressure processing on the rheological properties and microstructure of a commercial ostrich meat product "Yor" (Thai sausage). Meat Science, 76(3), 548-554.

(3) **อุทัยวรรณ ฉัตรธง** และอรุณี อภิชาติสรางกูร. 2546. การจำลองแบบทางวิสโคอิลาสติกของมะม่วงกวน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 34(4-6;พิเศษ), 29-32.

(4) อรุณี อภิชาติสรางกูร และ**อุทัยวรรณ ฉัตรธง**. 2546. การจำลองแบบทางวิสโคอิลาสติกของมะม่วงแก้วกวน. วารสารอาหาร, 33(4), 292-298.

การนำเสนอผลงานวิจัยทางวิชาการ

นำเสนอผลงานรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง

1. Dajanta, D. and Chattong, U. 2013. Monacolin K, citrinin and antioxidant properties of *Monascus*-fermented soybeans. Poster presentation at The 15th Food Innovation Asia Conference 2013, 13th-14th June 2013, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.

2. Dajanta, D. and Chattong, U. 2013. Fermentation temperature affects the phenolics and antioxidant activity of *Monascus*-fermented soybeans. Poster presentation at The 15th Food Innovation Asia Conference 2013, 13th-14th June 2013, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.

PB-25

Monacolin K, citrinin and antioxidant properties of *Monascus*-fermented soybeans

Katekan Dajanta[1] and Utaiwan Chattong [1]*
[1] Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand
* Corresponding author: dkatekan@hotmail.com

Abstract

Both the filamentous fungus *Monascus* sp. and soybeans have been widely used as traditional fermented foods in Asia. Functional components of each have also been utilized. The bioactive compounds produced from *Monascus* species during fermentation are red pigments, lipid-lowering monacolin K and antioxidants. In addition, a hepato-nephrotoxin citrinin is also formed in the fermented products. The objective of this study was to evaluate monacolin K, citrinin and antioxidative activities of *Monascus*-fermented soybeans. Four strains of *Monascus* sp. including PSRU03, PSRU05, PSRU08 and PSRU10 were applied to ferment soybeans at 30° C for 20 days. Monacolin K and citrinin contents of the *Monascus*-fermented soybean extracts were determined by Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (LC-MS) technique. Antioxidative activity of the products were assayed using DPPH radical-scavenging activity, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and total phenolics. The results found that PSRU03 produced the highest monacolin K content of 29.98 ppm. It also provided the best antioxidant properties with high phenolic content (21.43 mg GAE/g extract), FRAP (5.38 mg trolox/g extract) and DPPH radical-scavenging effect (7.10 IC_{50}, mg/ml) with citrinin content of 4.04 ppm. This study suggested that *Monascus* sp. PSRU03 has a potential for the production of *Monascus*-fermented soybeans, however safety measures should be taken when the products from *Monascus* are utilized.

Keywords: Monascus, Soybean, Fermented soybean, Monacolin, Antioxidant

The 15th FOOD INNOVATION ASIA CONFERENCE 2013
13th -14th June 2013
BITEC Bangna, Bangkok, Thailand

PB-26

Fermentation temperature affects the phenolics and antioxidant activity of *Monascus*-fermented soybeans

*Katekan Dajanta[1] * and Utaiwan Chattong[1]*
[1] Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand
* Corresponding author: dkatekan@hotmail.com

Abstract

The functional foods produced from soybeans and filamentous fungus *Monascus* sp. are known for their antioxidant effects. However, effect of fermentation temperature on antioxidant activity has not been investigated. The objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of soybeans fermented by *Monascus* sp. PSRU03 at different temperatures. Inoculums of *Monascus* sp. PSRU03 were prepared by growing in potato dextrose broth at 30°C for 7 days. After filtration through sterile cotton wood, 5% inoculums were inoculated into acidified autoclaved (121°C for 40 min) soybeans. Inoculated soybeans were incubated at 25°C and 30°C for 20 days and sampling at 5 days intervals for evaluating of antioxidant quality. In addition, two-step temperature-shift cultivation was proceeded with incubation at 30°C for 4 days, followed by further incubation at 25°C for additional 16 days. To examine the antioxidant quality, the methanol extracts of *Monascus*-fermented soybean were first prepared by mixing the ground powder of the samples with methanol (1:10, w/v) and sonicating at room temperature for 60 min. The extracts were then obtained by filtering through Whatman No. 1 filter paper, and subsequently centrifuged. The results found that fermentation temperature and the duration of incubation period affected the content of phenolics, DPPH radical-scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP) of the *Monascus*-fermented soybean extracts. The *Monascus*-fermented product incubated at 30°C for 15 or 20 days showed the most profound enhancement in the total phenolic content, DPPH radical-scavenging effect and FRAP, which was 146%, 37% and 68%, respectively, when compared with non-fermented soybeans. After fermentation for 20 days, the highest content of total phenolic compounds was found in soybean incubated at 30°C. Furthermore, at 15 days of fermentation, higher significant antioxidant power of DPPH radical-scavenging activity and FRAP also found in soybeans incubated at 30°C. This study revealed that antioxidant quality of *Monascus*-fermented soybean could be enhanced by incubating at 30°C for at least 15 days.

Keywords: Monascus, Soybean, Fermented soybean, Phenolic, Antioxidant