รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตรงควัตถุสีเหลืองและโมนาโคลิน เค โดย *Monascus purpureus* บนกาก เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารเส้น และการประยุกต์ใช้

The production of monacolin K and yellow pigment by *Monascus purpureus* on noodle industrial wastes and its application

ดร.ศนิ จิระสถิตย์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 387049
สัญญาเลขที่ 82/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตรงควัตถุสีเหลืองและโมนาโคลิน เค โดย *Monascus purpureus* บนกากเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารเส้น และการประยุกต์ใช้

The production of monacolin K and yellow pigment by *Monascus purpureus* on noodle industrial wastes and its application

ดร. ศนิ จิระสถิตย์
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 82/2560

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 82/2560)

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

รายละเอียดตามเอกสารแนบ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *Monascus purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629 ผลการทดลองพบว่า *M. purpureus* TISTR 3541 และ/หรือ TISTR 3629 สามารถเจริญเติบโตและผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมมะลิแดง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล และผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสม โดยผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้ามีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินทั้งจาก *M. purpureus* TISTR 3541 และ/หรือ TISTR 3629 ทั้งนี้ *M. purpureus* TISTR 3629 ที่เพาะเลี้ยงบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาวสามารถผลิตรงควัตถุสีเหลือง (880.35 OD units/g substrate dry weight (sdw)) สีส้ม (519.56 units/g sdw) และสีแดง (586.64 units/g sdw) ได้สูงสุด (p<0.05) และโมนาโคลิน เค สูงสุด (117.69 mg/kg sdw) (p<0.05) ตลอดจนให้ปริมาณซิตรินินต่ำ (4.11 mg/kg sdw) นอกจากนี้จากการศึกษาผลของการเสริมข้าวแดง (0, 0.1, 0.2 และ 0.3% (w/w)) ต่อคุณภาพของข้าวหมากพบว่า การเสริมข้าวแดงจาก 0 ถึง 0.3% ในข้าวหมากทำให้ผลิตภัณฑ์มีปริมาณรงควัตถุสูงขึ้น (p<0.05) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น (p<0.05) อีกทั้งการเสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้น 0.3% ได้รับคะแนนความชอบทางด้านประสาทสัมผัสสูงกว่าตัวอย่างอื่นยกเว้นข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดง (p<0.05) นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยต่อการบริโภค โดยมีจำนวน *Escherichai coli* น้อยกว่า 3 MPN/g ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ข้าวหมากที่เสริมด้วยข้าวแดงความเข้มข้น 0.3% เหมาะสมต่อการประยุกต์เป็นอาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of rice pasta by-products (RPBP) on growth and production of pigments, monacolin K and citrinin by either *M. purpureus* TISTR 3541 or *M. purpureus* TISTR 3629. It was found that both *Monascus* strains in this study grew and produced pigments and monacolin K, but mycotoxin citrinin was also produced on white RPBP, brown RPBP, red jasmine RPBP, black jasmine RPBP and mixed RPBP. The growth and production of pigments, monacolin K and citrinin from *M. purpureus* TISTR 3541 and/or *M. purpureus* TISTR 3629 were influenced by various RPBP. *M. purpureus* TISTR 3629, on white RPBP produce the most yields of pigments including yellow (880.35 OD units/g substrate dry weight (sdw)), orange (519.56 OD units/g sdw) and red (586.64 OD units/g sdw) (p<0.05) and monacolin K (117.69 mg/kg) (p<0.05) together with low yield of toxin citrinin (4.11 mg/kg). In addition, the supplementation of red yeast rice (0, 0.1, 0.2 and 0.3% (w/w)) on quality of Khoa-Mak showed that the supplementation of red yeast rice from 0 to 0.3% resulted in the increasing of *Monascus* pigments concentrations (p<0.05) and antioxidative activity in Khoa-Mak (p<0.05). Sensory scores of Khoa-Mak supplemented with 0.3% of red yeast rice were higher than those for other samples, except Khoa-Mak without red yeast rice (p<0.05). This product was safe for the consumption because the counts of *Escherichai coli* were less than 3 MPN/g. These results indicated that Khoa-Mak supplemented with 0.3% of red yeast rice could be a new functional food product.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศภาษาไทย	ก
กิตติกรรมประกาศภาษาอังกฤษ	ข
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญเรื่อง	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
เนื้อเรื่อง	
1. บทนำ	1
2. วัตถุดิบและวิธีการทดลอง	5
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	8
3.1 ผลของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629	8
3.2 ผลของการเสริมข้าวแดงต่อคุณภาพของข้าวหมาก	17
4. สรุปผลการทดลอง	20
ผลผลิต	21
บรรณานุกรม	22
ภาคผนวก	27
ประวัตินักวิจัยและคณะ	38

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
3-1	ปริมาณชีวมวล รงควัตถุ ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง โมนาโคลิน เค และซิตรินินในผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ที่หมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3541 นาน 14 วัน	15
3-2	ปริมาณชีวมวล รงควัตถุ ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง โมนาโคลิน เค และซิตรินินในผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ที่หมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3629 นาน 14 วัน	16
3-3	คุณภาพทางด้านเคมี-กายภาพของข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดงและข้าวหมากที่เสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ	17
3-4	ปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดงและข้าวหมากที่เสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ	18
3-5	คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดงและข้าวหมากที่เสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ	18
3-6	คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดงและข้าวหมากที่เสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ	19

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
3-1	การเปลี่ยนแปลงความชื้นของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3541 (a) และ TISTR 3629 (b) เมื่อ ♦:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมมะลิ; ■:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้องหอมมะลิ; ▲:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดง; x:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล และ ●:พาสต้าข้าวผสม	9
3-2	การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3541 (a) และ TISTR 3629 (b) เมื่อ ♦:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมมะลิ; ■:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้องหอมมะลิ; ▲:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดง; x:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล และ ●:พาสต้าข้าวผสม	11

บทที่1
บทนำ

การใช้ประโยชน์จากราแดงสายพันธุ์ *Monascus* มีมานานแล้ว โดยนำมาผลิตรงควัตถุ (pigment) และสารสำคัญที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น γ-aminobutyric acid (GABA), dimerumic acid และโมนาโคลิน เค (monacolin K) เพื่อใช้เป็นสีผสมอาหารและใช้ในการรักษาโรคต่างๆ (Erdogral & Azirak, 2004)

ทั้งนี้รงควัตถุที่ผลิตจากรา *Monascus* ประกอบด้วย 3 สีหลัก ได้แก่ รงควัตถุสีเหลือง (monascin และ ankaflavin) รงควัตถุสีส้ม (rubrapunctatin และ monascorubrine) และรงควัตถุสีแดง (rubropunctamine และ monascorubramine) ซึ่งรงควัตถุที่ผลิตจากรา *Monascus* นั้นถือว่ามีความปลอดภัยต่อการบริโภค (Generally recognized as safe: GRAS) ยิ่งไปกว่านั้นรงควัตถุสีเหลืองยังแสดงคุณสมบัติเป็น anti-inflammation, anticancer, antioxidation และ anti-atherosclerosis (ต้านทานการเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง) (Lee et al., 2006; Lee et al., 2013; Jirasatid et al., 2013) และยังมีคุณสมบัติเป็น antihyperlipidemic agent โดยสามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอล (total cholesterol), ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลชนิดเลว (low-density lipoprotein cholesterol) และสามารถเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลชนิดดี (high-density lipoprotein cholesterol) ในเซรั่มของหนูแฮมเตอร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม่มีผลข้างเคียงต่อการเกิด rhabdomyolysis (ภาวะกล้ามเนื้อสลายตัว) (Lee et al., 2010; Lee et al., 2013)

นอกจากรา *Monascus* จะผลิตรงควัตถุแล้ว ราชนิดนี้ยังผลิตโมนาโคลิน เค (monacolin K) หรือโลวาสตาติน (lovastatin) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น anti-hypercholesterolemic agent โดยโมนาโคลิน เค ได้ผ่านการรับรองจาก United States Food and Drug Administration (FDA) ถึงความมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการใช้เป็นยาเพื่อลดระดับคอเลสเตอรอลและลดการเกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในคน (Jirasatid et al., 2013; Manzoni & Rollini, 2002) อีกทั้งโมนาโคลิน เค ยังสามารถลดการเจริญของเนื้องอก โดยยับยั้งการสังเคราะห์สาร nonsterol isoprenoid เช่น dolichol, ubiquinone และ isopentenyl-tRNA (Juzlova et al., 1996; Lin et al., 2008)

อย่างไรก็ตาม *Monascus* ผลิตสารพิษซิตรินิน (citrinin) ซึ่งมีพิษต่อตับและไตของมนุษย์ จากงานวิจัยของ Liu et al. (2005) พบว่า ซิตรินินที่ความเข้มข้น 1.8-4.7 mg/ml สามารถทำลายเซลล์ตัวอ่อนของไตมนุษย์ (human embryonic kidney cell) ได้ถึง 50% ดังนั้นการนำผลผลิตจาก *Monascus* มาใช้ ควรมีการควบคุมปริมาณซิตรินินให้มีอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งข้อกำหนดของ European Union (EU) Commission ได้อนุญาตให้มีปริมาณซิตรินินในผลิตภัณฑ์อาหารที่เสริมข้าวแดงไม่เกิน 2 mg/kg (European Commission, 2014)

โดยทั่วไปการเลี้ยงรา *Monascus* จะทำการหมักโดยใช้ข้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าข้าวแดง หรือ red yeast rice ซึ่งมีต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากข้าวมีราคาแพง และมีผลพลอยได้ (กากข้าว) เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก ดังนั้นการพัฒนาวิธีการหรือกระบวนการผลิตเพื่อลดต้นทุนจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ทั้งนี้ประเทศไทยเป็นประเทศอุตสาหกรรมเกษตร และมีการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายชนิด ทำให้มีผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตรในปริมาณมาก เช่น ผลพลอยได้จำพวกแป้งจากอุตสาหกรรมอาหารเส้น เป็นต้น การประยุกต์ใช้ผลพลอยได้ในกระบวนการชีวภาพ โดยนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งนอกจากเป็นการลดต้นทุนการผลิตแล้ว ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้และสามารถเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้

หลายงายวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุได้เป็นอย่างดี เมื่อใช้ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร ได้แก่ กากมันสำปะหลัง (ศนิ จิระสถิตย์ และกุลยา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์, 2558; Jirasatid and Nopharatana, 2016) รำข้าว (ศนิ จิระสถิตย์ และกุลยา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์, 2558; Jirasatid and Nopharatana, 2017) กากกาแฟ (Jirasatid and Nopharatana, 2016) กากข้าวโพด (Nimnoi and Lumyong, 2009) ผงเมล็ดขนุน (Babitha et al., 2006) ซังข้าวโพด (Velmurugan et al., 2011) และผงเมล็ดทุเรียน (Srianta et al., 2012) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง นอกจากนี้ Japakaset et al. (2008) พบว่า *M. purpureus* IFRPD 4060 สามารถเจริญได้เป็นอย่างดีและผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงถึง 191.88 mg/kg เมื่อหมักบนกากถั่วเหลืองด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง และ Srianta et al. (2015) พบว่า *M. purpureus* สามารถเจริญและผลิตสารโมนาโคลิน เค บนรำข้าวฟ่าง (sorghum bran) โดยมีปริมาณโมนาโคลินเค แปรผันอยู่ระหว่าง 70-90 mg/kg ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจทดลองศึกษาการใช้ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตรชนิดอื่น เพื่อนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำและช่วยเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า ซึ่งอุดมไปด้วยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในการใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญและผลิตสารลดคอเลสเตอรอลทั้งโมนาโคลิน เค และรงควัตถุสีเหลืองจากรา *Monascus*

นอกจากการศึกษาเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตข้าวแดงให้มีต้นทุนต่ำแล้ว การประยุกต์ใช้ข้าวแดงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ (functional foods) ยังเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษา ทั้งนี้ข้าวหมากเป็นอาหารจากภูมิปัญญาของคนไทย ซึ่งเป็นที่นิยมบริโภคโดยเฉพาะผู้สูงอายุ ข้าวหมากเป็นแหล่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีประโยชน์ในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Mongkontanawat & Lertnimitmongkol, 2015; Prada et al., 2008) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการประยุกต์ใช้ข้าวแดงในข้าวหมากเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อาหารโพรไบโอติกที่มีฤทธิ์ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดและต้านอนุมูลอิสระ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า ได้แก่ ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ผลพลอยได้ข้าวหอมแดง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอม

นิล และผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสมต่อการผลิตโมนาโคลิน เค รงควัตถุ และซิตรินินจาก *M. purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629 จากนั้นนำข้าวแดงไปประยุกต์ใช้ในข้าวหมากเพื่อผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ (ข้าวหมากผสมข้าวแดง) โดยทำการศึกษาคุณภาพระหว่างข้าวหมากผสมข้าวแดงเปรียบเทียบกับข้าวหมาก ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากการทดลองสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Monascus* ในระดับอุตสาหกรรม และผลิตอาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่เพื่อเป็นทางเลือกให้กับผู้บริโภค

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตโมนาโคลิน เค รงควัตถุ และซิตรินินจาก *M. purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629
2. ศึกษาผลของการเสริมข้าวแดงต่อคุณภาพของข้าวหมาก

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า (ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล และผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสม) ต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* (TISTR 3541 และ TISTR 3629)
2. ศึกษาผลของการเสริมข้าวแดง (0, 0.1, 0.2 และ 0.3%) ต่อคุณภาพของข้าวหมาก

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การใช้ผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าในกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งนอกจากจะช่วยลดต้นทุนการผลิตแล้ว ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า โดยสามารถเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้ ทั้งนี้หลายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า *Monascus* สามารถผลิตรงควัตถุได้เป็นอย่างดี เมื่อใช้ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตร และ/หรือเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ กากข้าวโพด ผงเมล็ดขนุน ซังข้าวโพด ผงเมล็ดทุเรียน กากมันสำปะหลัง กากถั่วเหลือง กากมะเขือเทศ กากกาแฟ และรำข้าว เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (ศนิ จิระสถิตย์และกุลยา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์, ๒๕๕๘; Babitha et al., 2006; Babitha et al., 2007; Nimnoi & Lumyong, 2009; Velmurugan et al., 2011; Srianta et al., 2012) ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้ชนิดอื่น ในการใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำจึงเป็นที่น่าสนใจทดลองศึกษา อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาผลการผลิตโมนาโคลิน เค รงควัตถุ และซิตรินิน จาก *M. purpureus* ด้วยผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า (ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ผลพลอยได้ข้าวหอมแดง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล และผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสม) ต่อการผลิตโมนาโคลิน เค รงควัตถุ และซิตรินินจาก *M. purpureus* 2 สายพันธุ์ (*M. purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629) และประยุกต์ใช้ข้าวแดงที่ได้จากการทดลองในขั้นตอน

แรกกับผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเสริมข้าวแดงในข้าวหมากเพื่อผลิตอาหารโพรไบโอติกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและลดระดับคอเลสเตอรอล โดยงานวิจัยนี้คาดหวังว่าจะสามารถผลิตรงควัตถุ โดยเฉพาะรงควัตถุสีเหลืองและ/หรือโมนาโคลิน เค ได้ในปริมาณสูง ในราคาต้นทุนต่ำ และผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติทางยาในการป้องกันและรักษาโรคอย่างหลากหลาย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลิตภัณฑ์ข้าวแดงที่มีรงควัตถุ และ/หรือโมนาโคลิน เค ในปริมาณสูง และมีความปลอดภัยต่อการบริโภคโดยมีซิตรินินต่ำและมีราคาต้นทุนการผลิตต่ำ
2. เพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า
3. ผลิตภัณฑ์ข้าวหมากผสมข้าวแดงซึ่งเป็นอาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่

บทที่2
วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

1. *Monascus purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629 (ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) เก็บรักษากล้าเชื้อที่อุณหภูมิ 4°C บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)

2. ผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า (ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ผลพลอยได้ข้าวหอมแดง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท แฟมิลี่ ทรี ฟู้ด จำกัด ซึ่งเป็นพาสต้าข้าวเจ้าที่ขึ้นรูปไม่ได้ตามมาตรฐานภายหลังจากผ่านการขึ้นรูปด้วยเครื่องเอ็กซ์ทรูเดอร์

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารละลายสปอร์

ทำการเพาะ *M. purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลานาน 14-15 วัน จากนั้นเตรียมสารละลายสปอร์ด้วยการเทสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% (w/v) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 10 มล. ลงไปในจานเพาะเชื้อ ขูดสปอร์โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม นับความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ด้วย Haemacytometer โดยสารละลายสปอร์เข้มข้นเท่ากับ 1×10^{6} สปอร์/มล. จะถูกใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum)

2.2 ศึกษาผลของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าต่อการผลิตโมนาโคลิน เค รงควัตถุ และซิตรินินจาก *M. purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629

การทดลองนี้ออกแบบการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า ได้แก่ ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ผลพลอยได้ข้าวหอมแดง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล และผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสม (อัตราส่วนของผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ผลพลอยได้ข้าวหอมแดง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล เป็น 1:1:1:1) จะถูกปั่นให้มีขนาดเล็กด้วยเครื่องปั่น (blender) เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

ชั่งผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า ได้แก่ ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล และผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสม 10 กรัม ใส่ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 มล. เพื่อปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าประมาณ 45-50% คลุกให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C

นาน 30 นาที ทิ้งให้เย็น เติมสารละลายสปอร์ของ *M. purpureus* TISTR 3541 หรือ TISTR 3629 ปริมาณ 10% (v/w) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เกลี่ยสารละลายสปอร์ให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Johns & Stuart, 1991) และปริมาณความชื้น (AOAC 32.1.03, 1995) ทุกๆ 2 วัน ตลอดระยะเวลาการหมัก และตัวอย่างที่ผ่านการหมักแล้ว (วันที่ 14) จะนำมาอบแห้งที่ 50°C จนกระทั่งความชื้นน้อยกว่า 10% จากนั้นนำมาบดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh ทำการวิเคราะห์ปริมาณชีวมวล (Aidoo et al., 1981) โมนาโคลิน เค (Ma et al., 2000; Li et al., 2005) รงควัตถุ ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง (Johns & Stuart, 1991) และซิตรินิน (Wang et al., 2014)

2.3 ศึกษาผลของการเสริมข้าวแดงต่อคุณภาพของข้าวหมาก

การผลิตข้าวหมากเสริมข้าวแดงสามารถทำได้โดย หมักข้าวเหนียวด้วยลูกแป้ง 0.2% (w/w) ของน้ำหนักข้าว ตามวิธีของ Jirasatid and Nopharatana (2018) โดยหมักนาน 48 ชม. ในถ้วยพลาสติก ที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นเติมผงข้าวแดง 0, 0.1, 0.2 และ 0.3% (w/w) ลงในข้าวหมากภายหลังการหมัก คลุกเบาให้เข้ากัน ทั้งนี้ตัวอย่างข้าวหมากที่ปราศจากการเติมผงข้าวแดงถูกใช้เป็นตัวอย่างควบคุม ทำการวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ ได้แก่

1) ปริมาณเอทานอลโดยวิธี redox titration (Amerine & Ough, 1974)

2) ของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble soils; TSS) ด้วย handheld refractometer ที่ 25°C (Master, Atago, Japan)

3) ค่า pH ด้วย pH meter (Model Lab 850 set, Schott instruments)

4) ค่าสีระบบ CLE (L*, a*, b*) ด้วยเครื่อง Hunter colorimeter (Minican XP Plus, Hunter Associates Laboratory, USA)

5) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตามวิธีของ Mongkontanawat and Lertnimitmongkol, (2015)

6) ปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดง (Johns & Stuart, 1991)

7) จำนวนยีสต์และราทั้งหมด รายงานผลเป็น log cfu/g (Yousef & Carlstrom, 2003)

8) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลเป็น log cfu/g (Yousef & Carlstrom, 2003)

9) จำนวน *Escherichai coli* ด้วยวิธี Most Probable Number of coliform organisms (MPN) รายงานผลเป็น MPN/g (BAM, 2002)

10) คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสแบบ 9-point hedonic scale โดยประเมินความชอบด้านลักษณะปรากฏ สี รสชาติ กลิ่น กลิ่นรส และความชอบโดยรวม กำหนดระดับความชอบดังนี้ 9= ชอบมากที่สุด 5=เฉยๆ และ 1=ไม่ชอบมากที่สุด ใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 20 คน โดยต้องเป็นผู้ที่รับประทานข้าวหมากหรือเคยรับประทานข้าวหมาก

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้แผนการทดลองสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ส่วนการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสวางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design: RCBD) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s multiple range test

บทที่ 3
ผลการทดลองและวิจารณ์

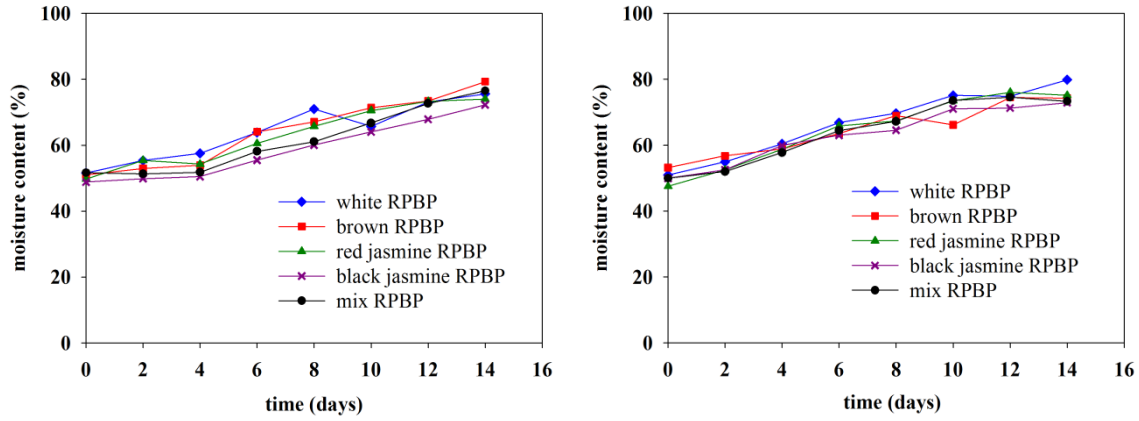
3.1 ผลของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629

3.1.1 ความชื้น

จากการทดลองหมักรา *M. purpureus* TISTR 3541 และ *M. purpureus* TISTR 3629 ด้วยผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า ซึ่งได้แก่ ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ผลพลอยได้ข้าวหอมแดง ผลพลอยได้ข้าวหอมนิล และผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสม ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 14 วัน สามารถแสดงปริมาณความชื้นที่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629 ดังภาพที่ 3-1 (a) และ (b) ตามลำดับ

1) การเปลี่ยนแปลงความชื้นของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าในระหว่างการหมักด้วยรา *M. purpureus* TISTR 3541

ตัวอย่างที่ใช้ผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3541 มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 49-52% และปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก โดยความชื้นสุดท้ายภายหลังการหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 72-79% ทั้งนี้ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาวมีปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 52-76% ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้องมีปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 51-79% ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดงมีปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 50-74% ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิลมีปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 49-72% และตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสมมีปริมาณความชื้นระหว่าง 52-76% ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้น เกิดจากจุลินทรีย์ย่อยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เพื่อสังเคราะห์สารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งกิจกรรมของวิถีต่างๆ เช่น วิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโน จะได้ CO_2 และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งน้ำที่จุลินทรีย์ผลิตผ่านกิจกรรมของเซลล์จะทำให้ปริมาณความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก



ภาพที่ 3-1 การเปลี่ยนแปลงความชื้นของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3541 (a) และ TISTR 3629 (b) เมื่อ ♦:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว; ■:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง; ▲:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดง; x:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิลและ ●:พาสต้าข้าวผสม

2) การเปลี่ยนแปลงความชื้นของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าในระหว่างการหมักด้วยรา *M. purpureus* TISTR 3629

ตัวอย่างที่ใช้ผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3629 มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 48-53% และความชื้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก โดยความชื้นสุดท้ายภายหลังการหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 73-80% ทั้งนี้ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว มีปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 51-80% ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้องมีปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 53-74% ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดงมีปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 48-76% ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิลมีปริมาณความชื้นอยู่ระหว่าง 50-73% และตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสมมีปริมาณความชื้นระหว่าง 50-75% ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นได้อธิบายไว้ข้างต้น

ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าความชื้นเริ่มต้นของผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมพาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตรงควัตถุของเชื้อรา *Monascus* sp. โดย Velmurugan et al. (2011) รายงานว่าเชื้อรา *Monascus* sp. สามารถเจริญและผลิตรงควัตถุได้เป็นอย่างดีที่ปริมาณความชื้นอยู่ในช่วง 50-60% และการผลิตรงควัตถุจะลดลงที่ปริมาณความชื้นต่ำกว่า 40% เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pattanagul et al. (2008) ได้ศึกษาปริมาณโมนาโคลิน เค ซิตรินิน และรงควัตถุ จากการหมักลูกเดือยด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. พบว่า ปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่รา *M. purpurues* สามารถผลิตรงควัตถุได้เป็นอย่างดีอยู่ในช่วง 50-65% นอกจากนี้ John and Stuart (1991) พบว่าถ้าปริมาณความชื้นเริ่มต้นของข้าวต่ำกว่า 38% จะไม่พบเส้นใยของเชื้อรา *Monascus* ภายหลังการหมักนาน 2

สัปดาห์ ซึ่งการผลิตรงควัตถุของเชื้อรา *Monascus* ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งควรใช้ความชื้นเริ่มต้นสูง (ประมาณ 56% wet basis) อีกทั้งสามารถเติมน้ำในระหว่างการหมักข้าวเพื่อให้รามีน้ำเพียงพอสำหรับการเจริญ แต่อย่างไรก็ตาม Teng and Feldheim (2000) ได้ศึกษาการหมักข้าวเพื่อผลิตสีจากรา *Monascus* พบว่า ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการหมักข้าวแดงเพื่อให้รา *Monascus* ผลิตสีได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 24% และการสร้างรงควัตถุของราจะลดลงหากเติมน้ำในระหว่างการหมัก

จากข้อมูลงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะหรือชอบที่จะเจริญที่ความชื้นเริ่มต้นแตกต่างกัน โดยการผลิตรงควัตถุจะลดลงเมื่อปริมาณความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากความสามารถในการนำสารอาหารมาใช้ประโยชน์ได้ในปริมาณน้อย เช่นเดียวกับการแลกเปลี่ยนความร้อนและการถ่ายเทออกซิเจนที่ลดน้อยลง เนื่องจากน้ำเป็นตัวกลางในการแลกเปลี่ยนความร้อนออกจากเซลล์และน้ำยังช่วยนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ (Velmurugan et al., 2011)

3.1.2 ค่า pH

1) การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ในระหว่างการหมักด้วยรา *M. purpureus* TISTR 3541

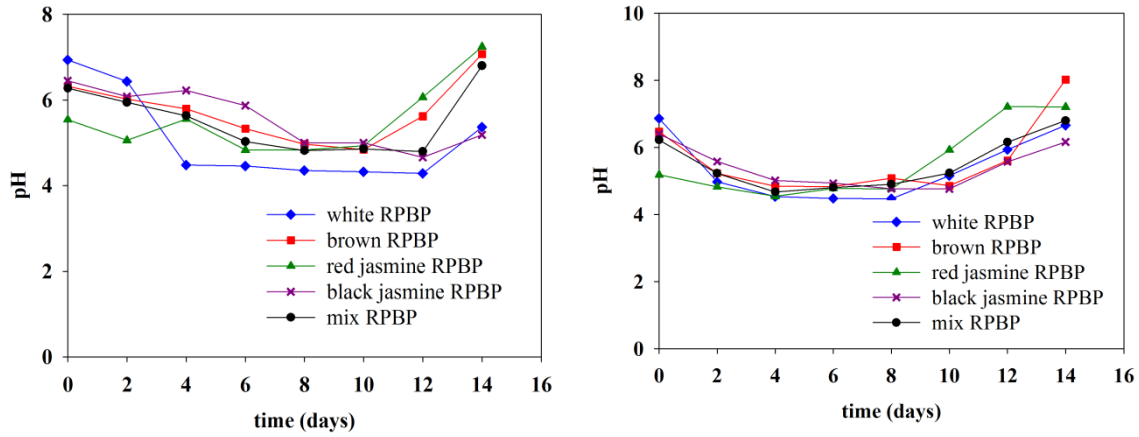
ค่า pH เริ่มต้นของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ที่หมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3541 แปรผันอยู่ในช่วง 5.54-6.94 (ภาพที่ 3-2a) โดยค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 10-12 และเพิ่มขึ้นในช่วงสุดท้ายของการหมัก ทั้งนี้ค่า pH ของตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาวแปรผันอยู่ระหว่าง 4.29-6.94 ค่า pH ของตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้องแปรผันอยู่ระหว่าง 4.66-6.45 ค่า pH ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดงแปรผันอยู่ระหว่าง 4.83-7.24 ค่า pH ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิลแปรผันอยู่ระหว่าง 4.66-6.45 และค่า pH ตัวอย่างผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสมแปรผันอยู่ระหว่าง 4.80-6.80 ในระหว่างการหมัก

2) การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของผลพลอยได้ผลิตพาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ในระหว่างการหมักด้วยรา *M. purpureus* TISTR 3629

ค่า pH เริ่มต้นของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าทุกชนิดที่หมักด้วยรา *M. purpureus* TISTR 3629 แปรผันอยู่ในช่วง 5.18-6.87 โดยค่า pH มีแนวโน้มลดลงในระหว่างการหมักจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 10 และเพิ่มขึ้นภายหลังจากวันที่ 10 ถึงวันที่ 14 ค่า pH สุดท้ายภายหลังการหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 6.16-8.02 ทั้งนี้ในระหว่างการหมัก ค่า pH ของผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดง ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล และผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสมแปรผันอยู่ระหว่าง 4.47-6.87, 4.83-8.02, 4.54-7.21, 4.76-6.40 และ 4.67-6.80 ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในระหว่างการหมัก อาจเป็นผลเนื่องมาจากในช่วงแรกของการหมัก (0-12 วัน) เชื้อราผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดมาลิกและกรดซักซินิก ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิที่

สังเคราะห์จากวิถี Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) ทำให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง และจากนั้นเชื้อราอาจมีกิจกรรมของกระบวนการ deamination ซึ่งเป็นปฏิกิริยาขจัดหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนต่างๆ ได้แอมโมเนียเป็นผลิตภัณฑ์ เป็นผลให้ค่า pH เพิ่มขึ้นในช่วงสุดท้ายของการหมัก (Ramawat & Merillon, 2007) รูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Teng and Feldheim (2000) ทั้งนี้เชื้อรา *Monascus* sp. สามารถเจริญได้ในช่วง pH กว้างตั้งแต่ 2.5-8.0 แต่ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญมีค่าอยู่ระหว่าง 4.0-7.0 อย่างไรก็ตามค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญควรมีค่าประมาณ 6.5 (Carvalho et al., 2003) และค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์รงควัตถุจากรา *Monascus* โดยใช้ข้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าประมาณ 6.0 (Johns & Stuart, 1991) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่า pH ของงานวิจัยนี้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตรงควัตถุของเชื้อรา *Monascus*



ภาพที่ 3-2 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ในระหว่างการหมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3541 (a) และ TISTR 3629 (b) เมื่อ ♦:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว; ■:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง; ▲:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดง; x:ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล และ ●:พาสต้าข้าวผสม

3.1.3 ปริมาณชีวมวล รงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินิน

1) ผลของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* TISTR 3541

ตารางที่ 3-1 แสดงปริมาณชีวมวล รงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* TISTR 3541 บนผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ภายหลังการหมักเป็นเวลานาน 14 วัน ผลการทดลองพบว่า *M. purpureus* TISTR 3541 สามารถเจริญเติบโตและผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินได้บนผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าทุกชนิด โดยมีปริมาณชีวมวลแปรผันอยู่ระหว่าง 449.40-724.11

mg/g substrate dry weight (sdw) มีปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดง แปรผันอยู่ระหว่าง 141.89-383.06, 67.14-160.02 และ 95.62-180.89 OD units/g sdw ตามลำดับ ปริมาณโมนาโคลิน เค และซิตรินิน แปรผันอยู่ระหว่าง 13.66-82.93 และ 17.02-33.57 mg/kg ตามลำดับ

ทั้งนี้ *M. purpureus* TISTR 3541 สามารถเจริญเติบโตได้สูงสุด (724.11 mg/g sdw) เมื่อหมักบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดง (p<0.05) ขณะที่เจริญเติบโตได้ต่ำสุด (449.40 mg/g sdw) เมื่อหมักบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว (p<0.05) นอกจากนี้ *M. purpureus* TISTR 3541 สามารถผลิตรงควัตถุ ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม และ สีแดงได้สูงสุด (383.06, 160.02 และ 180.89 OD units/g sdw ตามลำดับ) (p<0.05) และมีปริมาณโมนาโคลิน เค สูงสุด (82.93 mg/kg) (p<0.05) เมื่อหมักบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว อย่างไรก็ตาม *M. purpureus* TISTR 3541 สามารถผลิตซิตรินินได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาวเช่นกัน โดยมีซิตรินินเท่ากับ 33.57 mg/kg

2) ผลของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* TISTR 3629

ตารางที่ 3-2 แสดงปริมาณชีวมวล รงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* TISTR 3629 บนผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ภายหลังการหมักเป็นเวลานาน 14 วัน ผลการทดลองพบว่า *M. purpureus* TISTR 3629 สามารถเจริญเติบโตและผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินได้บนผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าทุกชนิด โดยมีปริมาณชีวมวลแปรผันอยู่ระหว่าง 1105.70-1667.40 mg/g sdw มีปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดง แปรผันอยู่ระหว่าง 314.76-880.35, 154.74-519.56 และ 184.04-586.64 OD units/g sdw ตามลำดับ ปริมาณโมนาโคลิน เค และซิตรินิน แปรผันอยู่ระหว่าง 16.61-117.69 และ 1.63-4.11 mg/kg ตามลำดับ

ทั้งนี้ *M. purpureus* TISTR 3629 สามารถเจริญเติบโตได้ค่อนข้างต่ำ (1112.20 mg/g sdw) เมื่อเพาะเลี้ยงบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว แต่สามารถผลิตรงควัตถุ ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง (880.35, 519.56 และ 586.64 units/g sdw ตามลำดับ) (p<0.05) โมนาโคลิน เค (117.69 mg/kg) (p<0.05) รวมทั้งสารพิษซิตรินินได้สูงสุด (4.11 mg/kg) (p<0.05) เมื่อหมักบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว

จากการทดลองหมักผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าด้วยรา *M. purpureus* ทั้งสองสายพันธุ์ (TISTR 3541 และ TISTR 3629) สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของซับสเตรต 2 กลุ่ม โดย *Monascus* จะมีปริมาณชีวมวลสูง แต่สามารถสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ได้แก่ รงควัตถุ (สีเหลือง สีส้ม และสีแดง) โมนาโคลิน เค และซิตรินิน ได้ในปริมาณต่ำ เมื่อเพาะเลี้ยงบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง ขณะที่ *Monascus* จะมีปริมาณชีวมวลต่ำ แต่สามารถสังเคราะห์รงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินิน ได้ในปริมาณสูง เมื่อเพาะเลี้ยงบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า รงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินิน เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของรา *Monascus* โดยหลายงานวิจัยรายงานว่า จุลินทรีย์จะระงับการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ภายใต้สภาวะที่มีอัตราการ

เจริญจำเพาะ (specific growth rate) สูง อย่างไรก็ตามเมื่อจุลินทรีย์เจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีอัตราการเจริญจำเพาะต่ำหรือไม่สูงมากเกินไป เช่น เจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารจำกัด จะทำให้การเจริญเติบโตค่อนข้างต่ำ แต่จะสามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิได้ในปริมาณสูง (Demain, 1986) นอกจากนี้ *Monascus* สังเคราะห์รงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินิน จากวิถีเดียวกัน คือ polyketide pathway เป็นผลให้การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิเหล่านี้มีความสัมพันธ์กัน (Lee et al., 2006)

ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้ามีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus* โดยการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (รงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินิน) จากรา *Monascus* ที่แตกต่างกัน อาจเป็นผลมาจากผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าแต่ละชนิดประกอบด้วยชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน รวมทั้งมีปริมาณแร่ธาตุที่แตกต่างกัน โดยหลายวิจัยรายงานว่า ข้าวแต่ละสายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวขาวที่ผ่านการขัดสี ข้าวกล้อง ข้าวหอมแดง และข้าวหอมนิล มีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน เส้นใยอาหาร วิตามิน เช่น วิตามินบี1 และ วิตามินบี2 ที่แตกต่างกัน (Ha et al., 1999; Fernanso, 2013) นอกจากนี้สภาวะแวดล้อม เช่น pH ยังมีผลกระทบต่อการเจริญและการสังเคราะห์สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจากรา *Monascus* ทั้งนี้ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pengnoi et al. (2017) ผู้ซึ่งรายงานว่า สายพันธุ์ของข้าวสีม่วงมีอิทธิพลต่อการผลิตรงควัตถุสีแดง โมนาโคลิน เค และซิตรินินจาก *M. purpureus*

เมื่อพิจารณาผลของสายพันธุ์รา *Monascus* พบว่า *M. purpureus* TISTR 3629 สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่า *M. purpureus* TISTR 3541 บนผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าทุกชนิด โดยมีปริมาณชีวมวลสูงกว่า 1.8-2.5 เท่า และสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลือง สีส้ม สีแดง และ โมนาโคลิน เค ได้สูงกว่า 1.0-2.3, 1.4-3.2, 1.5-3.2 และ 1.2-2.2 เท่า ตามลำดับ อีกทั้งผลิตซิตรินินต่ำกว่า 8.2-12.6 เท่า ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *M. purpureus* TISTR 3629 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตข้าวแดงโดยให้รงควัตถุและโมนาโคลิน เค สูง รวมทั้งซิตรินินต่ำ

จากการเพาะเลี้ยง *M. purpureus* TISTR 3629 ที่อุณหภูมิ 30°C บนผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาวที่ความชื้นเริ่มต้น 50% นาน 14 วัน พบว่า ข้าวแดงมีปริมาณรงควัตถุ ได้แก่ สีเหลือง (880.35 OD units/g sdw) สีส้ม (519.56 units/g sdw) และสีแดง (586.64 units/g sdw) และโมนาโคลิน เค (117.69 mg/kg sdw) ในปริมาณสูง อีกทั้งมีสารพิษซิตรินินต่ำ (4.11 mg/kg sdw) ดังนั้นข้าวแดงที่ได้การหมักผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาวด้วย *M. purpureus* TISTR 3629 จึงมีศักยภาพในการประยุกต์เป็นสารออกฤทธิ์เชิงหน้าที่ (functional ingredient) ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ โดยอาหารที่เสริมข้าวแดงนี้จะมีปริมาณซิตรินินต่ำหรือไม่เกินมาตรฐานตามข้อกำหนดของ European Union (EU) Commission (<2 mg/kg ของน้ำหนักอาหาร) (European Commission, 2014) เนื่องจากข้าวแดงถูกใช้เสริมในอาหารเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้ข้าวแดงที่ได้จากการหมักผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาวด้วย *M. purpureus* TISTR 3629 ในงานวิจัยนี้มีปริมาณรงควัตถุสูงกว่างานวิจัยของ Babitha et al. (2007)

และ Nimnoi and Lumyong (2009) และมีปริมาณโมนาโคลิน เค สูงกว่างานวิจัยของ Patcharee et al. (2008) และ Srianta et al. (2012) ซึ่งผลการทดลองที่แตกต่างกันอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของสารอาหารหรือซับสเตรต และสภาวะแวดล้อม เช่น ความชื้น ค่า pH และอุณหภูมิ รวมทั้งสายพันธุ์รา *Monascus*

ตารางที่ 3-1 ปริมาณชีวมวล รงควัตถุ ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง โมนาโคลิน เค และซิตรินินในผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ที่หมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3541 นาน 14 วัน

ผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า	ปริมาณชีวมวล (mg/g sdw)	รงควัตถุ (OD units/g sdw)			โมนาโคลิน เค (mg/kg)	ซิตรินิน (mg/kg)
		สีเหลือง	สีส้ม	สีแดง		
ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว	449.40±92.14^{c}	383.06±2.47^{a}	160.02±22.06^{a}	180.89±22.51^{a}	82.93±7.05^{a}	33.57±0.49^{a}
ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง	717.44±19.85^{a}	141.89±12.09^{d}	67.14±12.04^{b}	95.62±9.38^{b}	13.66±0.35^{cd}	17.47±2.78^{b}
ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดง	724.11±13.32^{a}	319.00±12.12^{b}	112.93±28.69^{ab}	122.49±34.91^{ab}	44.18±7.00^{b}	40.30±0.71^{a}
ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล	604.95±0.27^{abc}	157.97±16.99^{cd}	70.08±2.59^{b}	96.47±29.94^{b}	21.49±6.61^{c}	17.02±1.34^{b}
ผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสม	620.55±41.05^{ab}	184.61±2.41^{c}	85.44±1.12^{b}	99.04±2.17^{b}	21.72±2.76^{c}	18.10±4.31^{b}

a,b,c,...หมายถึง ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 3-2 ปริมาณชีวมวล รงควัตถุ ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง โมนาโคลิน เค และซิตรินินในผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าชนิดต่างๆ ที่หมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3629 นาน 14 วัน

ผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า	ปริมาณชีวมวล	รงควัตถุ (OD units/g sdw)			โมนาโคลิน เค	ซิตรินิน
	(mg/g sdw)	สีเหลือง	สีส้ม	สีแดง	(mg/kg)	(mg/kg)
ผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาว	1112.20±139.17^{b}	880.35±21.99^{a}	519.56±84.91^{a}	586.64±7.57^{a}	117.69±14.30^{a}	4.11±0.66^{a}
ผลพลอยได้พาสต้าข้าวกล้อง	1374.00±54.89^{ab}	314.76±58.25^{b}	186.59±15.97^{b}	235.64±19.19^{b}	16.61±0.53^{c}	1.66±0.47^{b}
ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมแดง	1667.40±76.99^{a}	332.24±3.65^{b}	154.74±3.02^{b}	184.04±6.85^{b}	57.76±2.66^{b}	3.20±0.86^{ab}
ผลพลอยได้พาสต้าข้าวหอมนิล	1141.80±56.80^{b}	371.40±80.36^{b}	208.59±76.13^{b}	258.93±88.41^{b}	34.31±5.76^{b}	1.63±0.06^{b}
ผลพลอยได้พาสต้าข้าวผสม	1105.70±102.20^{b}	414.62±56.59^{b}	248.36±42.43^{b}	303.81±66.16^{b}	47.56±7.26^{b}	2.06±0.89^{b}

a,b,c,...หมายถึง ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

3.2 ผลของการเสริมข้าวแดงต่อคุณภาพของข้าวหมาก

ตัวอย่างข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดง (0%) และข้าวหมากที่เสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.2 และ 0.3% (w/w) มีค่า pH, TSS และปริมาณเอทานอลค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยแปรผันอยู่ระหว่าง 3.68-3.91, 30.50-32.33 และ 0.094-0.111% ตามลำดับ (ตารางที่ 3-3) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าสี (L*, a* และ b*) ในข้าวหมากตัวอย่างต่างๆ พบว่า การเติมข้าวแดงกระทบต่อค่าค่าสี ได้แก่ L*, a* และ b* ของข้าวหมากอย่างมีนัยสำคัญ โดยข้าวหมากมีค่า L* หรือค่าความสว่างลดลงเมื่อปริมาณข้าวแดงเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ข้าวหมากมีค่า +a* หรือค่าความเป็นสีแดงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปริมาณข้าวแดงเพิ่มขึ้น อีกทั้งค่า +b* หรือค่าความเป็นสีเหลืองของตัวอย่างข้าวหมากมีแนวโน้มลดลงเมื่อเติมข้าวแดง (ตารางที่ 3-3) ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่าข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ให้สีแดงในผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นการเติมข้าวแดงในข้าวหมากจึงทำให้ข้าวหมากมีค่าความเป็นสีแดงเพิ่มขึ้น และค่าความสว่างลดลง

ตารางที่ 3-3 คุณภาพทางด้านเคมี-กายภาพของข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดงและข้าวหมากที่เสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ

คุณภาพทางเคมี-กายภาพ	ความเข้มข้นของข้าวแดง (%w/w)			
	0	0.1	0.2	0.3
ค่า pH	3.91±0.02	3.86±0.03	3.66±0.06	3.68±0.05
TSS	32.33±0.11	31.23±0.67	30.50±0.14	31.00±0.35
เอทานอล	0.094±0.006	0.111±0.007	0.104±0.004	0.106±0.004
L*	80.27±1.16	64.33±0.17	57.49±1.16	54.09±0.57
a*	-1.33±0.15	12.76±1.04	19.50±4.34	20.34±0.27
b*	12.70±0.14	9.19±0.44	8.83±0.27	9.88±0.52

ความเข้มข้นของรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดงจากรา *Monascus* ในข้าวหมากเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปริมาณข้าวแดงเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 0.3% (p<0.5) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อปริมาณข้าวแดงเพิ่มขึ้น (p<0.5) (ตารางที่ 3-4) โดยการเสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3% ช่วยปรับปรุงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้าวหมาก ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.1, 1.2 และ 1.3 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดง) ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่า รงควัตถุจากรา *Monascus* โดยเฉพาะรงควัตถุสีเหลือง (monascin และ ankaflavin) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Lee et al., 2006; Lee et al., 2013) ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้าวหมากเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อปริมาณข้าวแดงเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3-4 ปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดงและข้าวหมากที่เสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของข้าวแดง (%w/w)	รงควัตถุ (OD units/g sdw)			ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH
	สีเหลือง	สีส้ม	สีแดง	
0	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{c}	0.00±0.00^{d}	61.98±0.35^{d}
0.1	4.78±0.62^{c}	1.69±0.07^{c}	6.32±0.82^{c}	68.82±0.13^{c}
0.2	14.77±0.53^{b}	4.22±0.88^{b}	10.26±0.52^{b}	72.41±0.38^{b}
0.3	27.58±1.27^{a}	14.28±0.72^{a}	25.29±0.47^{a}	80.59±0.20^{a}

a,b,c,...หมายถึง ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

การเติมข้าวแดงในข้าวหมากไม่มีอิทธิพลต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์ของข้าวหมาก โดยตัวอย่างตัวอย่างข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดง (0%) และข้าวหมากที่เสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.2 และ 0.3% (w/w) มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดแปรผันอยู่ระหว่าง 4.3-4.5 log cfu/g ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p≥0.05) (ตารางที่ 3-5) นอกจากนี้ทุกตัวอย่างมีจำนวนยีสต์และราทั้งหมดแปรผันอยู่ระหว่าง 3.9-4.6 log cfu/g ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน (p≥0.05) (ตารางที่ 3-5) อีกทั้งมีจำนวน *Escherichai coli* <3 MPN/g (ตารางที่ 3-5) ซึ่งไปเป็นตามข้อกำหนดของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนข้าวหมาก (มผช. 162/2556) (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2556)

ตารางที่ 3-5 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดงและข้าวหมากที่เสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของข้าวแดง (%w/w)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g)^{ns}	จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (log cfu/g)^{ns}	*Escherichai coli* (MPN/g)
0	4.3±0.0	3.9±0.4	<3
0.1	4.3±0.1	4.6±0.5	<3
0.2	4.3±0.1	4.3±0.2	<3
0.3	4.5±0.0	4.5±0.0	<3

ns หมายถึง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในแถวแนวตั้งแถวเดียวกัน (p≥0.05)

การเติมข้าวแดงมีผลกระทบเชิงลบต่อคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของข้าวหมาก โดยคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏ สี รสชาติ กลิ่น กลิ่นรส และความชอบโดยรวมของตัวอย่างข้าวหมากที่เติมข้าวแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (p<0.05) (ตารางที่ 3-6) ซึ่งอาจเป็นผลกระทบจากรสชาติ กลิ่น และสีของข้าวแดงต่อคุณลักษณะของข้าวหมาก

อย่างไรก็ตามข้าวหมากที่เติมข้าวแดงความเข้มข้น 0.3% มีคะแนนความชอบโดยรวมสูงกว่าตัวอย่างที่เติมข้าวแดงที่ความเข้มข้นอื่น (0.1 และ 0.2%)

ตารางที่ 3-6 คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของข้าวหมากที่ปราศจากข้าวแดงและข้าวหมากที่เสริมข้าวแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของข้าวแดง (%w/w)	คุณภาพด้านประสาทสัมผัส (คะแนน)					
	ลักษณะปรากฏ	สี	รสชาติ	กลิ่น	กลิ่นรส	ความชอบโดยรวม
0	8.8[a]	8.7[a]	9.0[a]	8.5[a]	9.0[a]	9.0[a]
0.1	6.1[c]	6.6[b]	7.1[c]	7.0[c]	6.4[c]	6.4[c]
0.2	5.7[d]	6.0[c]	5.2[d]	5.5[d]	5.2[d]	5.6[d]
0.3	6.8[b]	6.7[b]	8.2[b]	7.6[b]	8.6[b]	7.9[b]

a,b,c,...หมายถึง ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวแนวตั้งแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ดังนั้นเมื่อพิจารณาคุณภาพของข้าวหมากด้านต่างๆ แล้ว จึงแนะนำได้ว่า ควรเติมข้าวแดงที่ความเข้มข้น 0.3% เนื่องจากผลิตภัณฑ์มีประโยชน์ต่อสุขภาพเพราะมีปริมาณรงควัตถุสูงสุดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคโดยมีคะแนนความชอบโดยรวมสูงกว่าตัวอย่างอื่นยกเว้นตัวอย่างควบคุม อีกทั้งมีความปลอดภัยต่อการบริโภค โดยมีจำนวน *Escherichai coli* ไปเป็นเกณฑ์ตามข้อกำหนดของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนข้าวหมาก (มผช. 162/2556) (<3 MPN/g)

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าสำหรับการเจริญและการผลิตรงควัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินจากรา *M. purpureus* โดยผลพลอยได้พาสต้าข้าวขาวที่หมักด้วย *M. purpureus* TISTR 3629 เป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับเน้นการผลิตรงควัตถุสีเหลือง (880.35 OD units/g sdw) สีส้ม (519.56 units/g sdw) และสีแดง (586.64 units/g sdw) และโมนาโคลิน เค (117.69 mg/kg sdw) จากรา *Monascus* ตลอดจนให้ปริมาณซิตรินินต่ำ (4.11 mg/kg sdw)

นอกจากนี้ข้าวแดงที่ประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์เชิงหน้าที่ยังเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในข้าวหมากเพื่อผลิตอาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่ โดยการเสริมข้าวแดงจาก 0 ถึง 0.3% (w/w) ในข้าวหมากทำให้ผลิตภัณฑ์มีปริมาณรงควัตถุสูงขึ้นและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ผลการทดลองแนะนำให้เติมข้าวแดงที่ความเข้มข้น 0.3% เนื่องจากผลิตภัณฑ์มีประโยชน์ต่อสุขภาพเพราะมีปริมาณรงควัตถุสูงสุดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคโดยมีคะแนนความชอบโดยรวมสูงกว่าตัวอย่างอื่นยกเว้นตัวอย่างควบคุม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาผลของสายพันธุ์รา *M. purpureus* อื่นๆ ต่อการเจริญและการผลิตรงวัตถุ โมนาโคลิน เค และซิตรินินบนผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้า
2. ควรนำข้าวแดงที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพชนิดใหม่

ผลผลิต (output)

ผลงานตีพิมพ์บทความฉบับสมบูรณ์ในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ (ศนิ จิระสถิตย์, เสาวลักษณ์ จันทโรจน์, นันทิยา เจริญผล, กุลยา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์ และชุลีพร พุฒนวล, ๒๕๖๑, การใช้ประโยชน์ของผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าสำหรับการผลิตรงควัตถุสีเหลืองและโมนาโคลินเค จาก *Monascus purpureus*, *วิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ ๑๐*, ๒๔-๒๕ พฤษภาคม, หน้า BI๒๘๙-BI๒๙๖)

อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์บทความวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ “International Food Research Journal” (Jirasatid, S., Limroongreungrat, K. and Nopharatana, M. Monacolin K, pigments and citrinin of rice pasta by-products fermented by *Monascus purpureus*)

บรรณานุกรม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ข้าวหมาก; มผช. 162. (2546). สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กระทรวงอุตสาหกรรม

ศนิ จิระสถิตย์ และกุลยา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์. (๒๕๕๘). การผลิตรงควัตถุสีเหลืองจาก *Monascus* บนเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง, การประชุมวิชาการพืชเขตร้อนและกึ่งร้อนครั้งที่ ๙, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย, ๑-๒ กันยายน ๒๕๕๘.

Aidoo, K.E., Handry, R. & Wood, B.J.B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European Journal of Applied Microbiology Biotechnology*, *12*, 6-9.

Amerine, M. A. & Ough, C. S. (1974). *Wine and must analysis*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

Association of Official Analytical Chemists. (1995). *Official Method of the Association of Official Analytical Chemists*. 15th ed. Virginia: The Association of Official Analytical Chemists.

Babitha, S., Soccol, C.R. & Pandey, A. (2006). Jackfruit seed-a novel substrate for the production of *Monascus* pigments through solid-state fermentation. *Food Technolology and Biotechnology*, *44*, 465–471.

Babitha, S., Soccol, C.R. & Pandey, A. (2007). Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*, *98*, 1554-1560.

Bacteriological Analytical Manual. (BAM) (2002). *Laboratory Method.* US Food and Drug Administration. Retrieved July 22, 2014, from http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm

Carvalho, J.C., Pandey, A., Babitha, S. & Soccol, C.R. (2003). Production of *Monascus* biopigments: an overview. *Agro-Food industry hi-technology*, 37-41.

Demain, A. L. (1986). Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure and Applied Chemistry, 58*, 219-226.

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

European Commission. (2014). Commission regulation (EU) No 212/2014 of 6 March 2014 amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of the contaminant citrinin in food supplements based on rice fermented with red yeast *Monascus purpureus*. Retrieved on March 23, 2018 from https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg212_2014.pdf.

Fernando, B. (2013). Rice as a source of fiber. *Journal of Rice Research*, *1*, 1-4.

Ha, T.Y., Park, S.H., Lee, C.H. & Lee, S.H. (1999). Chemical composition of pigmented rice varieties. *Korean Journal of Food Science and Technology*, *31*, 336-341.

Japakaset, J., Wongkhalaung, C. & Leelawatcharama, V. (2009). Utilization of soybean residue to produce monacolin K-cholesterol lowering agent. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 35-39.

Jirasatid, S. & Nopharatana, M. (2016). Utilization of cassava and coffee residues with carbon sources supplementation on production of monacolin K and yellow pigment by *Monascus purpureus*. In *Proceedings of Burapha University International Conference (BUU 2016)* (pp. 33-38). Chonburi: Thailand.

Jirasatid, S. & Nopharatana, M. (2017). Improvement of pigments production of rice bran fermented by *Monascus purpureus*. In *Proceedings of Burapha University International Conference (BUU 2017)* (pp. 509-515). Chonburi: Burapha University.

Jirasatid, S. & Nopharatana, M. (2018). Product development of sweet fermented rice (Khoa-Mak) supplemented with red yeast rice. *International Journal of Agricultural Technology, 14*, 521-534

Jirasatid, S., Nopharatana, M., Kitsubun, P., Vitchitsoonthonkul, T. & Tongta, A. (2013). Statistical optimization for monacolin K and yellow pigment production and citrinin reduction by *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*, 364-374.

Johns, M.R. & Stuart, D.M. (1991). Production of pigment by *Monascus purpureus* in solid culture. *Journal of Industrial Microbiology*, *8*, 23-28.

Juzlova, P., Martinkova, L. & Kren, V. (1996). Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *Journal of Industrial Microbiology*, *16*, 163-170.

Lee, C.L., Hung, Y.P., Hsu, Y.W. & Pan, T.M. (2013). Monascin and ankaflavin have more anti-atherosclerosis effect and less side effect involving increasing creatinine phosphokinase activity than monacolin K under the same dosages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 143-150.

Lee, C.L., Kung, Y.H., Wu, C.L., Hsu, Y.W. & Pan, T.M. (2010). Monascin and ankaflavin act as novel hypolipidemic and high-density lLipoprotein cholesterol-raising agents in red mold dioscorea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 9013-9019.

Lee, C.L., Wang, J.J., Kuo, S.L. & Pan, T.M. (2006). *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent-monacolin K and antiinflamation agent-monascin. *Applied Microbiology and Biotechnology, 72*, 1254-1262.

Li, Y.G., Liu, H. & Wang, Z. T. (2005). A validated stability-indicating HPLC with photodiode array detector (PDA) method for the stress tests of *Monacus purpureus* fermented rice, red yeast rice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 39*, 82-90.

Lin, W.Y., Chang, J.Y., Hish, C.H. & Pan, T.M. (2008). Profiling the *Monascus pilosus* proteome during nitrogen limitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 433-441.

Liu, B., Wu, T., Su, M., Chung, C. & Yu, F. (2005). Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in *Monascus* fermentation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 170-175.

Ma, J., Li, Y., Ye, Q., Li, J., Hua, Y., Ju, D., Zhang, D., Cooper, R. & Chang, M. (2000). Constituents of Red Yeast Rice, a Traditional Chinese Food and Medicine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5220-5225.

Manzoni, M. & Rollini, M. (2002). Biosynthesis and biotechnology production of statins by filamentous fungi and application these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *58*, 555-564.

Mongkontanawat, N. & Lertnimitmongkol, W. (2015). Product development of sweet fermented rice (Khao-Mak) from germinated native black glutinous rice. *International Journal of Agricultural Technology, 11*, 501-515.

Nimnoi, P. & Lumyoung, S. (2009). Improving solid-state fermentation of *Monascus purpureus* on agricultural products for pigment production. *Food and Bioprocess Technology*, *4*, 1384-1390.

Patcharee, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A. & Leksawadi, Noppol. (2007). Review of angkok production (*Monascus purpureus*). *Chiang Mai Journal of Science*, *34*, 319-328.

Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhol, A. & Tharatha, S. (2008). Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkok fermented by *Monascus* sp. *International Journal of Food Microbiology*, *126*, 20-23.

Pengnoi, P., Mahawan, R., Khanongnuch, C. & Lumyong, S. (2017). Antioxidant properties and production of monacolin K, citrinin, and red pigments during solid state fermentation of purple rice (*Oryzae sativa*) varieties by *Monascus purpureus*. *Czech Journal of Food Sciences, 35*, 32-39.

Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A. & Soccol, C.R. (2008). Trends in Non-dairy Probiotic Beverages. *Food Research International, 44,* 111-123.

Ramawat, K.G. and Merillon, J.M. (2007). *Biotechnology Secondary Metabolites Plants and Microbes* (2 nd ed.). New Hampshire: Science Publishers.

Srianta, I. & Harijono (2015). *Monascus*-fermented sorghum: pigments and monacolin K produced by *Monascus purpureus* on whole grain, dehulled grain and bran substrate. *International Food Research Journal*, 22, 377-382.

Srianta, I., Hendrawan, B., Kusumawati, N. & Blanc, P.J. (2012). Study on durian seed as a new substrate for angkok production. *International Food Research Journal, 19*, 941-945.

Teng, S.S. & Feldheim, W. (2000). The fermentation of rice for anka pigment production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *25*, 141-146.

Velmurugan, P., Hur H., Balachandar, V., Kamala-Kannan, S., Lee K.J., Lee, S.M., Chae, J.C., Shea, P.J. & Oh, B.T. (2010). *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 112*, 590-594.

Wang, W., Chen, Q., Zhang, X., Zhang, H., Huang, Q. & Li, D. (2014). Comparision of extraction methods for analysis of citrinin in red fermented rice. *Food Chemistry*, *157*, 408-412.

Yousef, A. E. & Carlstrom, C. (2003). *Food Microbiology: A Laboratory Manual*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ทางเคมี-กายภาพ

ก-1 วิเคราะห์ปริมาณความชื้น

นำถาดอลูมิเนียมมาอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง นำถาดอลูมิเนียมใส่ในเครื่องวัดความชื้น ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม อบที่อุณหภูมิ 105°C รอจนเครื่องแสดงผล บันทึกผล

ก-2 วิเคราะห์ค่า pH (Johns & Stuart, 1991)

ทำการสุ่มตัวอย่าง 3 กรัม เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 บดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย mortar ทำการวัดค่า pH โดยใช้ pH meter

ก-3 วิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ (Johns & Stuart, 1991)

1. นำตัวอย่างไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 50°C จนกระทั่งความชื้นต่ำกว่า 10% บดให้ละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรง ขนาด 80 mesh

2. นำตัวอย่าง 0.1 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 40 ml แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็งรอบ 100 rpm นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

3. จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วกลั้วด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 10 ml.

4. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400, 470 และ500 นาโนเมตร สำหรับรงควัตถุสีเหลือง ส้ม และแดง ตามลำดับ ใช้เอทานอลความเข้มข้น 70% สำหรับเป็น blank ความเข้มข้นของรงควัตถุ (OD units/g substrate dry weight) คำนวณดังสมการ

$$\text{pigment concentration} = \frac{\text{OD} \times \text{dilution factor} \times \text{v}}{\text{w}}$$

เมื่อ OD คือ ค่าการดูดกลืนแสง, V คือ ปริมาณเอทานอล (50 ml), w คือน้ำหนักตัวอย่างแห้ง (g), dilution factor คือ ค่าการเจือจางตัวอย่าง

ก-4 วิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (Aidoo et al., 1981)

1. วิธีการสกัดกลูโคซามีนสามารถทำได้โดยชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100°C นาน 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็น

2. ดูดตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml (ตัวอย่างควบคุมใช้น้ำกลั่น) ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วหยด 0.5% phenolphthalein 1 หยด ไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 N จนเป็นสีชมพู

3. ทำ back titrated ด้วย 1% potassium hydrogen phosphate จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นไม่มีสี ปรับปริมาตรให้ได้ 25 ml ด้วยน้ำกลั่น

4. นำสารละลายที่ได้มา 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 5% sodium nitrite 1 ml และ 5% potassium hydrogen sulfate 1 ml ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

5. เติม 12.5% ammonium sulphamate 1 ml เขย่า แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

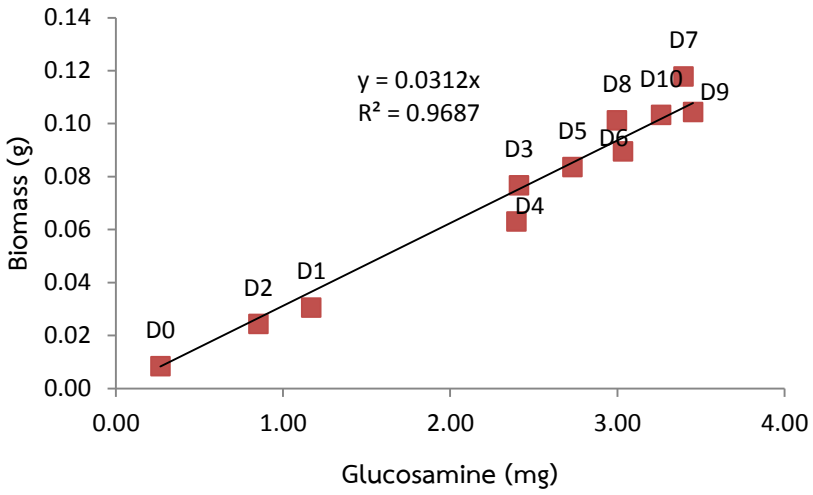
6. เติม 5% MBTH (3-methyl-2-benzothiozole hydrazine) 1 ml ให้ความร้อนโดย water bath 5 นาที ทำให้เย็นทันที ผสม 0.83% ferric chloride 1 ml ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

7. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

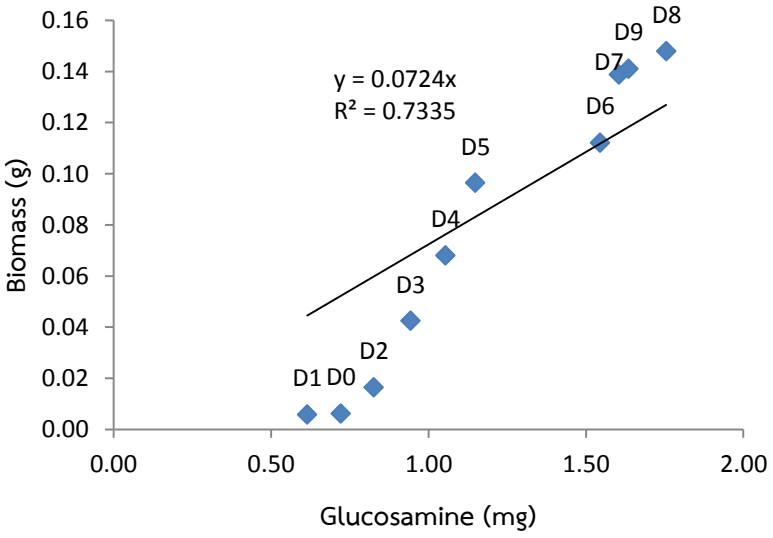
8. คำนวณปริมาณชีวมวล (biomass) โดยใช้กราฟมาตรฐาน standard growth curve

การทำกราฟมาตรฐาน standard growth curve

การวิเคราะห์กราฟมาตรฐาน standard growth curve ใช้เทคนิค membrane culture technique โดยตัดเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 mm ที่เจริญเติบโตสูงสุดแล้ว (เจริญนาน 14-15 วัน) ลงบนกระดาษกรอง Whatman No. 4 ที่ชั่งน้ำหนักและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซึ่งวางอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 30°C ดึงกระดาษกรองทุกๆ วันในระหว่างการเพาะเลี้ยงนาน 14-15 วัน นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ราเจริญไปอบที่อุณหภูมิ 80°C นาน 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักปริมาณชีวมวลของราในแต่ละวัน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนและพล็อตกราฟ standard growth curve ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคซามีน (mg) และปริมาณชีวมวล (g) ของ *Monascus purpureus* TISTR 3541 และ TISTR 3629 แสดงดังภาพที่ ก-1 และ ก-2 ตามลำดับ



ภาพที่ ข-1 กราฟการเจริญมาตรฐานของ *M. purpureus* TISTR 3541



ภาพที่ ข-2 กราฟการเจริญมาตรฐานของ *M. purpureus* TISTR 3629

ก-5 วิเคราะห์โมนาโคลิน เค (Wang et al., 2004)

ความเข้มข้นของโมนาโคลิน เค ทั้งหมดจะวิเคราะห์ในรูปของ lactone form ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC Model 600E, Waters, USA) โดยมีวิธีวิเคราะห์ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างผงข้าวแดง 0.5-1 กรัม สกัดด้วย ethyl acetate ปริมาณ 5 ml ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 1.5 ชม.

2. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1

3. เติม trifluoroacetic acid ความเข้มข้น 1% ปริมาณ 10 ml สำหรับ lactonization ของโมนาโคลิน เค

4. ระเหยสารสกัดด้วย vacuum rotary evaporation

5. เติม acetronitrile (HPLC grade) ปริมาณ 1 ml เพื่อชะสารละลายโมนาโคลิน เค

6. กรองด้วย filter ขนาดความพรุน 0.45 μm ใส่ vial สำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC

7. วิเคราะห์ความเข้มข้นของโมนาโคลิน เค โดยใช้ C_{18} column เฟจเคลื่อนที่ประกอบด้วย (mobile phase) acetonitrile:0.5% phosphoric acid (65:35 v/v) อัตราการไหลเท่ากับ 0.7 ml/min ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ 238 nm

ก-6 วิเคราะห์ซิตรินิน (Wang et al., 2014)

1. สกัดตัวอย่าง 1 g ด้วยสารละลาย EW solution (ethanol:water, 70:30, v/v) โดยเขย่าบน rotary shaker ที่ 200 rpm นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40°C จากนั้นนำไป ultrasonicate นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40°C และเขย่าบน rotary shaker ที่ 200 rpm นาน 1.5 ชม. ที่อุณหภูมิ 40°C

2. กรองสารละลายด้วย Whatman No. 1

3. กรอง supernatant ด้วย filter ขนาดความพรุน 0.45 μm ใส่ vial สำหรับวิเคราะห์ซิตรินินด้วยเครื่อง HPLC

4. ซิตรินินจะถูกแยกด้วย Atlantis C_{18} column ขนาดอนุภาค 5 μm, 100A และ 150×4.6 mm I.D. (Atlantis T3, Waters, USA) เฟจเคลื่อนที่ประกอบด้วย (mobile phase) Acetonitrile-water (50:50) (ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 2.5 ด้วย H_3PO_4) อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 ml/min ตรวจวัดด้วย fluorescence detector ด้วย excitation และ emission wavelength เท่ากับ 331 and 500 nm ตามลำดับ

ก–7 วิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดน้ำที่ละลายได้ (total soluble solid) (AOAC, 1995)

นำตัวอย่างนมข้าวหมากมาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ด้วยเครื่อง Hand Refractometer ที่มีช่วงการวัด 28–62 °Brix ที่อุณหภูมิห้อง ทำวิธีการวิเคราะห์ 3 ซ้ำโดยก่อนวัดทำการสอบเทียบเครื่อง Refractometer ด้วยน้ำกลั่นเพื่อปรับค่าที่อ่านได้เท่ากับ 0°Brix

ก–8 วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2–diphenyl–1–picrylhydrazyl scavenging capacity (DPPH) (Mongkontanawat & Lertnimitmongkol, 2015)

1. สกัดตัวอย่าง 1 g ในเอทานอล 10 ml จากนั้นแยกสารละลายส่วนใสโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 rpm

2. นำสารละลายส่วนใสมาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 µl/ml

3. ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 ml ใส่หลอดทดลองเติมสารละลาย แล้วเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM ในเอทานอล 1 ml ลงในสารละลายตัวอย่าง

4. ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที

5. วัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Inhibition (%)) จากสมการ

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0}\right) \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

ก-9 วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์

ปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต 25 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปรองรับสารละลายที่กลั่นได้จากปลายหลอดควบแน่น (condenser) โดยปล่อยให้ปลายหลอดควบแน่นจุ่มในสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตตลอดเวลา ปิเปตตัวอย่าง 1 ml ใส่ในหลอดกลั่น เติมน้ำกลั่นลงไป 39 ml แล้วกลั่นจนสารละลายในขวดรองรับทั้งหมดมีปริมาตร 40 ml (ปริมาตรรวมสารละลาย) จากนั้นใช้น้ำกลั่นล้างปลายหลอดควบแน่นลงขวดรองรับปิดพลาสก์ด้วยแผ่นฟลอยด์อลูมิเนียม แล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 นาที ถ่ายสารละลายทั้งหมดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml โดยใช้น้ำกลั่นฉีดล้างให้สะอาดประมาณ 2-3 ครั้ง หยดสารละลาย 1,10-ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต 7-10 หยด จากนั้นไทเทรตด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตจนมีสีเขียว แล้วหยดสารละลาย indicator 3 หยด ไทเทรตต่อจนถึงจุดยุติ โดยสังเกตสีจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลม่วง ส่วน blank ทำเช่นเดียวกันกับวิธีข้างต้น แต่จะใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง จากนั้นคำนวณตามสูตร

$$\text{ปริมาณแอลกอฮอล์} \left(\frac{\text{ml}}{100\ \text{ml}}\right) = 25 - (25 \times \frac{\text{A}}{\text{B}}) \times (\frac{0.7933}{10})$$

หรือ $$\text{ปริมาณแอลกอฮอล์} \left(\frac{g}{100\ \text{ml}}\right) = 25 - (25 \times \frac{\text{A}}{\text{B}})$$

เมื่อ A = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดี (ไทเทรต) กับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง (แอลกอฮอล์)

B = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตกับ blank

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์

ข–1 วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total viable count) โดยวิธีนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (Yousef & Carlstrom, 2003)

1. ชั่งอาหาร 25 g ลงในถุง stomacher ที่ปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 225 ml ลงในถุง (อัตราส่วน 1:9) นำไปผสมด้วยเครื่องตีผสมอาหารนานประมาณ 60 วินาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1}
2. ทำการเจือจางตัวอย่างลง 10 เท่า โดยใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างจากความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาณ 1 ml ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปปโตน 9 ml (อัตราส่วน 1:9 เท่ากับเจือจางลง 10 เท่า) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-2}
3. เตรียมตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} โดยทำตามข้อ 3 จากนั้นเลือกความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ เช่น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป TC ทำการทดลองความเจือจางละ 2
4. บ่มเชื้อที่ 37°C นาน 48 ชม. (วางจานคว่ำ)
5. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจุลินทรีย์ทั้งหมดในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี
6. คำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในหน่วย CFU/g sample ตามสมการ

$$\text{CFU/g} = \frac{\text{จำนวนโคโลนี}}{\text{dilution}}$$

ข–2 วิเคราะห์จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (total yeast and mold) โดยวิธีนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (Yousef & Carlstrom, 2003)

1. ชั่งอาหาร 25 g ลงในถุง stomacher ที่ปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 225 ml ลงในถุง (อัตราส่วน 1:9) นำไปผสมด้วยเครื่องตีผสมอาหารนานประมาณ 60 วินาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1}
2. ทำการเจือจางตัวอย่างลง 10 เท่า โดยใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างจากความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาณ 1 ml ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปปโตน 9 ml (อัตราส่วน 1:9 เท่ากับเจือจางลง 10 เท่า) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-2}

3. เตรียมตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-3}, 10^{-4} โดยทำตามข้อ 3 จากนั้นเลือกความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ เช่น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป YM ทำการทดลองความเจือจางละ 2 ซ้ำ

4. บ่มเชื้อที่ 30°C นาน 4-5 วัน (วางจานแบบหงาย)

5. ตรวจนับจำนวนยีสต์และราทั้งหมดในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี

6. คำนวณหาจำนวนยีสต์และราทั้งหมดในหน่วย CFU/g sample ตามสมการ

$$\text{CFU/g} = \frac{\text{จำนวนโคโลนี}}{\text{dilution}}$$

ข–3 วิเคราะห์จำนวน *E. coli* (BAM, 2002)

1. ชั่งตัวอย่าง 10 g ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ (stomacher bag) เทสารละลายเปปโตน (0.1%) ปริมาตร 90 ml

2. ตีผสมตัวอย่างกับสารละลายด้วยเครื่องตีผสมตัวอย่าง (stomacher) จะได้ตัวอย่างระดับความเจือจางที่ 10^{-1}

3. เจือจางตัวอย่างให้มีระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}

4. Presumptive test (การทดสอบขั้นต้น)

4.1 ปิเปตตัวอย่าง ที่ระดับเจือจางต่างกัน 3 ระดับ (10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}) จำนวน 1 ml ลงในอาหาร LST ที่มีหลอดดักก๊าซคว่ำอยู่ (ให้สังเกตด้วยว่าไม่มีฟองอากาศอยู่ในหลอดดักก๊าซ) ระดับความเจือจางละ 3 หลอด รวมทั้งหมด 9 หลอด

4.2 นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 และ 48 ชั่วโมง

4.3 ถ่ายเชื้อจากหลอดที่บรรจุอาหาร LST ที่ให้ผลบวก (เกิดที่ว่างในหลอดดักก๊าซมากกว่า 1/10 ของหลอด) ด้วยลูปเขี่ยเชื้อลงในอาหาร BGLB หลอดละ 1 ลูป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบหลอดทดสอบที่ให้ผลบวกนำไปอ่านค่าจากตาราง MPN

4.4 รายงานผลเป็นค่า “จำนวน Coliform ทั้งหมด.....MPN/g”

5. Confirm test (การทดสอบยืนยัน)

5.1 เขี่ยเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในอาหาร BGLB (เกิดที่ว่างในหลอดดักก๊าซมากกว่า 1/10 ของหลอด) ขีดลงบนอาหาร EMB เพื่อแยกเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C นาน 18-24 ชั่วโมง

6. Completed test (การทดสอบขั้นสมบูรณ์)

6.1 ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่มีลักษณะที่คาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *E. coli* (โคโลนีมีจุดสีเข้มกลางโคโลนี ผิวโคโลนีมีสีเขียวเหลือบแสงหรือไม่มี ลักษณะนูนเล็กน้อย ขนาด 3–4 มิลลิเมตร ซึ่งลักษณะการเหลือบแสงของโคโลนีเช่นนี้ เรียกว่า เงาโลหะ (Methalic sheen) นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

6.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

a) การทดสอบการสร้าง Indole

ถ่ายเชื้อลงในหลอด Tryptone broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบการสร้าง Indole โดยหยดสาร Kovac's reagent 2–3 หยด หากเชื้อสามารถสร้าง Indole ได้ จะเกิดวงแหวนสีแดง อ่านผลเป็นบวก ส่วนผลลบจะไม่เกิดวงแหวนสีแดง

b) การทดสอบ Methyl red (MR)

ถ่ายเชื้อลงในหลอด MR – VP broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับ Methyl red โดยค่อยๆ หยดสารทดสอบ Methyl red ลงไป 5 หยด หากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง อ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลือง อ่านผลเป็นลบ

c) การทดสอบ Voges–Proskauer (VP)

ถ่ายเชื้อลงในหลอด MR – VP broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 48 ชั่วโมง หยดสาร α–napthol 5 หยด และ 40% KOH 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน อ่านผลภายใน 2 ชั่วโมง หากเกิดสีชมพูอ่านผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอ่านผลเป็นลบ

d) การทดสอบการใช้ Citrate

ถ่ายเชื้อลงในหลอด Simmon's citrate agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 24 ชั่วโมง

7. อ่านค่าจำนวน *E. coli* ที่พบในตัวอย่างนมเปรี้ยวจากจำนวนทดสอบที่ให้ผลบวกจากขั้นสมบูรณ์ ที่ให้ผลการทดสอบ IMViC เป็น ++-- หรือ -+-- ไปอ่านค่า "จำนวน *E. coli* ทั้งหมดต่อมิลลิลิตรนมเปรี้ยว" จากตาราง MPN

8. รายงานผลเป็นค่า "จำนวน *E. coli* ทั้งหมด.....MPN/g"

ภาคผนวก ค

แบบทดสอบความชอบด้วยวิธี 9–point Hedonic scale

ชื่อผู้ทดสอบ.....วันที่ทดสอบ.....

<u>คำแนะนำ</u> : กรุณาทดสอบตัวอย่างแล้วให้คะแนนความชอบที่ท่านมีต่อผลิตภัณฑ์ตามคุณลักษณะที่กำหนด ตามคำอธิบายคะแนนความชอบด้านล่างนี้ (กรุณาบ้วนปากระหว่างตัวอย่าง)

9=ชอบมากที่สุด	8=ชอบมาก	7=ชอบปานกลาง
6=ชอบเล็กน้อย	5=เฉยๆ	4=ไม่ชอบเล็กน้อย
3=ไม่ชอบปานกลาง	2=ไม่ชอบมาก	1=ไม่ชอบมากที่สุด

ลักษณะที่ทดสอบ	รหัสผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง				
	.....	.....	.....	.....	.....
ลักษณะที่ปรากฏ	.....	.....	.....	.....	.....
สี	.....	.....	.....	.....	.....
รสชาติ	.....	.....	.....	.....	.....
กลิ่น	.....	.....	.....	.....	.....
กลิ่นรส	.....	.....	.....	.....	.....
ความชอบโดยรวม	.....	.....	.....	.....	.....

<u>หมายเหตุ</u> หากให้คะแนนต่ำกว่า 5 คะแนน ให้ระบุเหตุผลลงในข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

.....