

หัวข้อคุณิพนธ์	การพัฒนาเชื้อรา <i>Monascus purpureus</i> สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตโมนาโคลิน เค สูง และซิทรีนินต่ำเพื่อใช้ในการผลิตข้าวราแดง	
ผู้เขียน	นางสาวโปรคปราน เฟ็งน้อย	
ปริญญา	วิทยาศาสตรคุณิบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ ดร. สายสมร ถ้ายอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาดิชาย โจนงนุช Prof. Dr. Kozo Asano รองศาสตราจารย์ ดร. เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

ข้าวราแดงเป็นผลิตภัณฑ์จากข้าวที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อราในจินัสโมแนสคัส มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อถนอมอาหาร และแต่งสีอาหาร ข้าวราแดงประกอบด้วยสารที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางการแพทย์ เช่น สารลดคอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต สารยับยั้งการเกิดมะเร็ง และโดยเฉพาะโมนาโคลิน เค ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซิลเมธิลกลูตาไรล โคเอนไซม์ เอ รีดักเตส (HMG-CoA) ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล อย่างไรก็ตาม สารพิชิตรีนินอาจพบในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งสารนี้มีรายงานว่าเป็นพิษต่อตับและไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อีกทั้งยังมีผลในแง่ลบต่อการยอมรับของผลิตภัณฑ์หมักจากราโมแนสคัส

เชื้อรา *Monascus purpureus* สายพันธุ์ดั้งเดิม ถูกแยกจากข้าวราแดงด้วยเทคนิค Surface sterilization และทำการบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่อยืนยันระดับสปีชีส์ รังสีอัลตราไวโอเลต และสารเอ็นเมธิลเอ็นไนโตรเอ็นไนโตรโซควานิดีน ถูกใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม สายพันธุ์กลายทั้ง 5 ไอโซเลทที่ถูกคัดเลือก และ 3 สายพันธุ์ดั้งเดิมถูกนำมาใช้ในการหมักแบบแข็งเพื่อเปรียบเทียบการผลิตสารโมนาโคลิน เค ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน โดยใช้สับเสตราทั้ง 5 ชนิด ดังนี้ ข้าวเหนียวสันป่าตอง และ กข 6 (*Oryza sativa* L.) มันมือเสือ (*Dioscorea esculenta*) มันเทศ (*Ipomoea batatas*) และ เผือก (*Colocasia esculenta*) พบว่าเชื้อรา *M. purpureus* CMU002U และข้าวเหนียวสันป่าตองเป็นสายพันธุ์และ

สับเสตรงที่ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตโมนาโคลิน เค ได้สูงสุด 12,273 ppm และซีทรินิน 439 ppb ทำการคัดเลือก 5 ปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตโมนาโคลิน เค ด้วยวิธี Plackett-Burman design พบว่าระยะเวลาแช่ข้าว และระยะเวลาการหมัก มีผลอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 Central composite design ถูกนำมาใช้เพื่อทำนายปริมาณโมนาโคลิน เค โดยโปรแกรมทำนายไว้ สูงสุดที่ 35,985 ppm เมื่อเวลาแช่ข้าว คือ 3.46 ชั่วโมง และระยะเวลาการหมัก 35 วัน ผลการทดลอง พบโมนาโคลิน เค 34,759 ppm เพิ่มขึ้น 2.83 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตดั้งเดิม (ก่อนการหา สภาวะที่เหมาะสม) มีความแม่นยำร้อยละ 96.59

ศึกษานิดของข้าวเหนียวดำ (*Oryza sativa* L.) ข้าวดำคอดอยมุเซอ, คอยสะเก็ด, นา, น่าน, พะเยา, และ หอม มข ที่มีผลต่อการผลิตโมนาโคลิน เค ซีทรินิน รงควัตถุสีแดง และ คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าเมื่อหมักด้วยข้าวดำคอดอยมุเซอที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน สามารถผลิตรงควัตถุสีแดงมากที่สุด 388.25 หน่วยต่อกรัม และโมนาโคลิน เค 13,482 ppm อีกทั้งพบว่าเมื่อหมักด้วยข้าวดำก้านาให้ซีทรินินต่ำสุด 132 ppb ซึ่งผ่านมาตรฐานที่กำหนดของประเทศญี่ปุ่น ได้หวั่น และสหภาพยุโรป เมื่อทำการหมักด้วยวิธีสลับอุณหภูมิ (Temperature shifting) ระหว่างช่วง 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการหมักแบบแข็งที่ 30 องศาเซลเซียส 5 วัน และ 25 องศาเซลเซียส จนครบ 30 วัน ให้โมนาโคลิน เค สูงสุดที่ 35,292 ppm และซีทรินินเพิ่มเป็น 1,769 ppb

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าข้าวเหนียวดำให้ผลผลิตโมนาโคลิน เค ในปริมาณสูง ดังนั้นจึง ทำการศึกษาการหมักข้าวดำในรูปแบบของแป้งข้าว ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน พบว่าแป้งข้าวดำคอดอยมุเซอให้ปริมาณโมนาโคลิน เค 7,404 ppm และซีทรินิน 848 ppb ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าเมื่อเติม corn meal ลงไปในแป้งข้าว ปริมาณโมนาโคลิน เค เพิ่มขึ้นเป็น 10,082 ppm และซีทรินินลดลงเป็น 173 ppb ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโมนาโคลิน เค ด้วยวิธี Plackett-Burman design พบว่าร้อยละความชื้นเริ่มต้น ระยะเวลาการหมัก และ ปริมาณ corn meal มีผลต่อการผลิตโมนาโคลิน เค อย่างมี นัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แผนการทดลองแบบ Central Composite design ถูกนำมาใช้ในการทำนายปริมาณโมนาโคลิน เค สูงสุดที่ 23,560 ppm เมื่อใช้แป้งข้าวดำคอดอยมุเซอ 20 กรัม ปริมาณ corn meal ร้อยละ 2.68 เชื้อตั้งต้นร้อยละ 5 และ ความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 49.3 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 22.9 วัน จากนั้นทำการหมักแป้งข้าวดำตามสภาวะที่โปรแกรมทำนาย พบว่าโมนาโคลิน เค เพิ่มขึ้นจากเดิม 3.64 เท่า ได้โมนาโคลิน เค 23,172 ppm มีความแม่นยำถึงร้อยละ 98.34

ศึกษาศักยภาพของข้าวราแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* CMU002U ในการลดระดับคอเลสเตอรอลในซีรัมและไข่แดงของนกกระทาญี่ปุ่น (*Coturnix coturnix japonica*) ผลการทดลองพบว่า การเสริมข้าวราแดงในปริมาณต่างๆ (6, 12 และ 24 มิลลิกรัม/วัน/ตัว) ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของนกเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและโลวาสเตดิน อย่างไรก็ตามปริมาณอาหารที่กิน

และอัตราการเปลี่ยนอาหารมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ นกกระทาในกลุ่มข้าวราแดงให้ผลผลิตไข่เพิ่มขึ้นในขณะที่ข้าวราแดงไม่มีผลต่อน้ำหนักไข่ เปลือกไข่ ไข่ขาว และไข่แดง รวมทั้งไม่มีผลต่อสีของไข่แดง การเสริมข้าวราแดงทุกปริมาณมีผลต่อการลดระดับคอเลสเตอรอลไข่แดงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากการทดลอง 8 สัปดาห์ เลือดถูกเก็บและนำมาตรวจวัดระดับไขมันและค่าทางชีวเคมี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และ LDL ของนกในกลุ่มข้าวราแดงทั้งหมดและโลวาสเตดินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามระดับคอเลสเตอรอลของนกที่เสริมด้วยข้าวราแดง 12 และ 24 มิลลิกรัม/วัน/ตัว ต่ำกว่ากลุ่มของนกที่เสริมด้วยข้าวราแดง 6 มิลลิกรัม/วัน/ตัว อย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาพบว่าระดับไนโตรเจนครีอะตินีน อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส อัลบูมิน และโกลบูลิน ในเลือดนกที่เก็บในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นข้าวราแดงสามารถใช้เป็นสารชีวภาพในการส่งเสริมการผลิตไข่และสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในซีรัมและไข่แดงของนกกระทาญี่ปุ่น

คำสำคัญ: ซีทรินิน, นกกระทาญี่ปุ่น, โลวาสเตดิน, การกลายพันธุ์, การหาสภาวะที่เหมาะสม, ข้าวราแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

<b>Dissertation Title</b>	Development of High Monacolin K and Low Citrinin Generating Wild Type and Mutant Strains of <i>Monascus purpureus</i> for Red Mold Rice Production	
<b>Author</b>	Miss Prodpran Pengnoi	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)	
<b>Advisory Committee</b>	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Advisor
	Asst. Prof Dr. Chartchai Khanongnuch	Co-advisor
	Prof. Dr. Kozo Asano	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Griangsak Chairote	Co-advisor

### Abstract

Red mold rice (RMR) is a fermented rice product of the *Monascus* species, which has an important role in the food industry as food preservative and food coloring. RMR contains medicinal substances as anticholesterol, antitumor and especially monacolin K. Monacolin K is an inhibitor of the enzyme hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-COA), which can control the cholesterol biosynthesis. Unfortunately, citrinin (mycotoxin) occur naturally in fermentation process and it reported to be hepatotoxic and nephrotoxic in mammals that had a negative impact on the acceptability of *Monascus* fermented product.

Wild type strains of *Monascus purpureus* were isolated from RMR by surface sterilization technique. The isolates were identified by morphology observation and molecular technique. Strain improvement was carried out by random mutation under ultraviolet ray (UV) and N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (NTG) treatment. Five mutants were selected and compared with 3 wild type isolates using solid state fermentation for monacolin K production at 30°C 14 days on five substrates including Sanpatong and RD6 glutinous rice (*Oryza sativa* L.), dioscorea (*Dioscorea esculenta*), sweet potato (*Ipomoea batatas*) and taro (*Colocasia esculenta*). *M. purpureus* CMU002U was found to be a suitable strain and Sanpatong glutinous rice was a suitable

substrate for high monacolin K production (12,273 ppm) and production of mycotoxin citrinin was 439 ppb. Plackett-Burman design was used to screen 5 factors affecting the monacolin K production on Sanpatong glutinous rice using *M. purpureus* CMU002U. Soaking time and fermentation time were found to be the most significant factors at the level above 95%. Central Composite Design predicted that the maximum monacolin K was 35,985 ppm when soaked rice for 3.46 hour and fermented for 35 days and trial experiment validated the monacolin K total at 96.59%. The monacolin K yield was enhanced to 2.83 fold after optimization, increased to 34,759 ppm and citrinin was 427 ppb (decreased by 2.73%).

Alternative local rice was studied and aims to evaluate the effect of various purple rice (*Oryzae sativa* L.) varieties including Doi Muser, Doi Saked, Na, Nan Phayao and Hom CMU on the production of monacolin K, citrinin and red pigments by *Monascus purpureus* CMU002U (UV-mutant strain) and their antioxidant properties. The results showed that the high monacolin K (13482 ppm) and red pigment (388.25 units/g) levels were obtained from SSF of the Doi Muser variety at 30°C 14 days. The lowest value of citrinin concentration (132 ppb) was found in the SSF of the Na variety, which passed the standards of Japan, Taiwan and European Union. An investigation of temperature shifting of SSF for the Doi Muser variety indicated that the incubation at 30°C for 5 days, followed by 25°C until 30 days, yielded the highest value of monacolin K (35,292 ppm) production and citrinin increased to 1,769 ppb.

From the results as above, high yield of monacolin K could obtain from SSF of purple glutinous rice. SSF of purple glutinous rice powder was carried out at 30°C for 14 days. The results showed that Doi Muser powder gave high monacolin K yield at 7,404 ppm and citrinin was 848 ppb. Rice powder supplemented with corn meal could increase monacolin K to 10,082 ppm and citrinin decreased to 173 ppb. Plackett-Burman design was used to screen factors affecting the monacolin K production. Initial moisture, fermentation time and corn meal were found to be the most significant factors at the level above 95%. 20 g of Doi Muser purple glutinous rice powder with 2.68% corn meal, 5% v/w inoculum size with initial moisture of 49.3% and incubated at 30°C for 22.9 days can be designated as optimum conditions for maximum monacolin K yield. Central Composite design predicted that the maximum monacolin K was 23,560 ppm. The trial experiment validated the monacolin K total at 98.34%. The final

monacolin K yield was increased an additional 3.64 fold compared to the production after optimization. The final production reached approximately 23,172 ppm.

The potential for fermented RMR by *Monascus purpureus* CMU002U to reduce cholesterol levels in the serum and egg yolks of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) was investigated. The results showed that supplementation at various dosages of RMR (6, 12 and 24 mg/day/bird) did not affect the body weight of the birds when compared with both the control and the lovastatin drug treatments. However, the feed intake value and feed conversion ratio were significantly lowered. All dosages of RMR treatments could increase egg production, while they did not affect the weights of the eggs, eggshells, albumen and yolks, nor did they affect the color of the yolks. All supplemented RMR treatments showed significantly lower yolk cholesterol levels than those of the control treatment. After eight weeks of cultivation, the lipid profile and serum parameters of the birds were determined. The results indicated that the levels of total cholesterol, triglycerides and low-density lipoproteins (LDL) in birds at all dosages of RMR and lovastatin treatments were significantly lower than in the control treatment. However, the total cholesterol levels in 12 and 24 mg/day/bird RMR treatments were significantly lower than in the 6 mg RMR treatment. The results showed that the levels of blood urea nitrogen, creatinine, alanine aminotransferase, albumin, and globulin in the birds recorded in all treatments were not significantly different. Therefore, RMR could serve as a biological agent for the promotion of egg production and could facilitate a decrease in the cholesterol levels in the serum and egg yolks of Japanese quail.

Keywords: Citrinin, Japanese quail, Lovastatin, Mutation, Optimization, Red yeast rice