ผลการทดลอง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
12 ก.ย. 2554
242303

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสี และ คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR ๓๐๘๐ บนปลายข้าว

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสี และ คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของเชื้อรา *M. purpureus* TISTR ๓๐๘๐ บนปลายข้าว โดยบ่มที่อุณหภูมิ ๓๕ °C เป็นเวลา ๒๘ วัน นำไปตรวจสอบคุณภาพทางเคมี ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

๑. ปริมาณความชื้น

ตาราง ๑ แสดงถึงความชื้นเริ่มต้นก่อนการปลูกเชื้อรา *M. purpureus* พบว่า ของสภาวะที่ ๑ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาที มีความชื้นเริ่มต้น ๓๐.๑๕ ± ๑.๐๕ % และ สภาวะที่ ๒ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที มีความชื้นเริ่มต้น ๓๑.๒๖ ± ๑.๐๘ % โดยทั้งสภาวะ ๑ และ ๒ มีความชื้นเริ่มต้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>๐.๐๕) (ตาราง ๑) และมีความชื้นเริ่มต้นน้อยกว่าสภาวะอื่น ๆ ($P\leq$ ๐.๐๕) และเมื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเป็น ๑๕ ml จะทำให้ความความชื้นเริ่มต้นสูงขึ้น คือ สภาวะที่ ๓ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาทีและเติมน้ำ ๑๕ ml มีความชื้นเริ่มต้น ๓๙.๒๐ ± ๓.๗๖ % และ สภาวะที่ ๔ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที และเติมน้ำ ๑๕ ml มีความชื้นเริ่มต้น ๔๐.๔๕± ๓.๔๒ % และเมื่อเพิ่มปริมาตรเป็น ๓๐ ml จะทำให้ความชื้นสูงสุด คือ สภาวะที่ ๕ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาที และเติมน้ำ ๓๐ ml มีความชื้นเริ่มต้น ๔๖.๖๔ ± ๐.๔๑ % และสภาวะที่ ๖ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที และเติมน้ำ ๓๐ ml มีความชื้นเริ่มต้น ๔๘.๙๗ ± ๑.๒๒ %

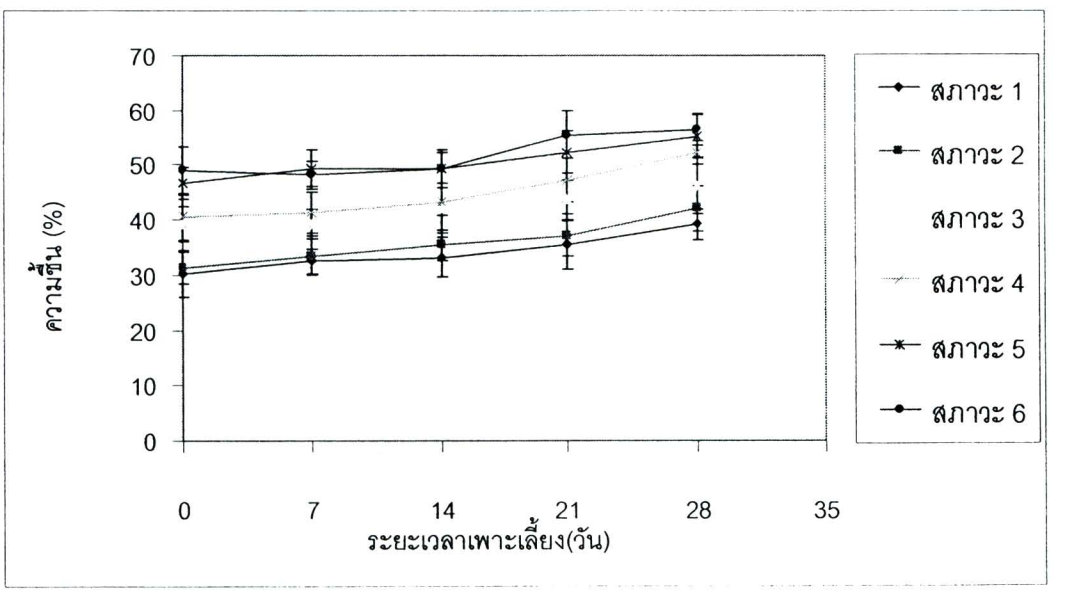
เพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนปลายข้าวเพิ่มขึ้นความชื้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและในวันสุดท้าย หรือ วันที่ ๒๘ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนปลายข้าว พบว่า สภาวะที่ ๑ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาที ความชื้นเท่ากับ ๓๙.๑๑ ± ๐.๔๙ % ซึ่งเป็นความชื้นที่น้อยที่สุด ($P\leq$ ๐.๐๕) ในขณะที่ สภาวะที่ ๖ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที และเติมน้ำ ๓๐ ml ความชื้นเท่ากับ ๕๖.๓๕ ± ๑.๑๐ % ซึ่งเป็นความชื้นมากที่สุด ($P\leq$ ๐.๐๕) (ภาพ ๔) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าความชื้นของทุกสภาวะจะสูงขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากการเกิดรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) หรือ การคืนตัว (setback) ของแป้ง (Smith, ๑๙๗๙) ทั้งนี้เมื่อแป้งได้รับความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่เกิดเจลาทิไนเซชันแล้วให้ความร้อนต่อไปจนถึงจุดที่พองตัวและแตกออก โมเลกุลของอะมิโลสจะเกิดการเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล เกิดเป็นร่างแหสามมิติ โครงสร้างใหม่นี้ไม่มีการดูดน้ำเข้ามาอีกและเมื่อลดอุณหภูมิลงลักษณะการเรียงตัวของโครงสร้างจะแน่นมากขึ้น โมเลกุลอิสระของน้ำที่อยู่ภายในจะถูกบีบออกมานอกเจล (กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, ๒๕๔๖) ดังนั้น น้ำที่ถูกบีบออกมาไม่กลับกลับเข้าไปในโครงสร้างของตัวแป้ง และเมื่อเชื้อรา *Monascus* เจริญตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อราจะย่อยปลายข้าวให้เป็น primary metabolize จึงทำให้โครงสร้างของปลายข้าวนิ่มขึ้นน้ำที่ถูกบีบออกมาตั้งแต่แรกนั้นจะค่อย ๆ ซึมเข้าไปทำให้ไปเพิ่มความชื้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (กังสดาลย์ บุญปราบ, ๒๕๓๘)

ตาราง ๑ ปริมาณความชื้นเริ่มต้น (%) ของปลายข้าวก่อนการปลูกเชื้อรา *Monascus Purpureus*

สภาวะ	แช่ปลายข้าว (นาที)	เติมน้ำ (ml)	ความชื้นเริ่มต้น (%)[๑]
๑	๐	๐	๓๐.๑๕ [a] ±๑.๐๕ %
๒	๒๐	๐	๓๑.๒๖ [a] ± ๑.๐๘ %
๓	๐	๑๕	๓๙.๒๐ [b] ± ๓.๗๖ %
๔	๒๐	๑๕	๔๐.๔๕ [b] ± ๓.๔๒ %
๕	๐	๓๐	๔๖.๖๔ [c] ± ๐.๔๑ %
๖	๒๐	๓๐	๔๘.๙๗ [c] ± ๑.๒๒ %

[๑] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

หมายเหตุ: สภาวะ: ๑ = แช่ปลายข้าว ๐ นาที
๒ = แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที
๓ = แช่ปลายข้าว ๐ นาที และเติมน้ำ ๑๕ ml
๔ = แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที และเติมน้ำ ๑๕ ml
๕ = แช่ปลายข้าว ๐ นาที และเติมน้ำ ๓๐ ml
๖ = แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที และเติมน้ำ ๓๐ ml



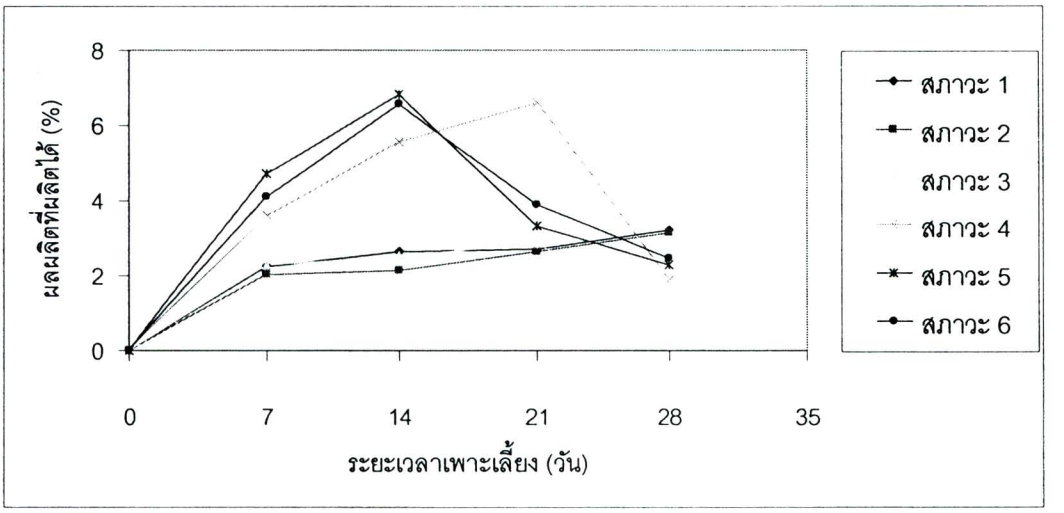
ภาพ ๔ ปริมาณความชื้น (%) ของปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* เจริญในสภาวะแตกต่างกัน เป็นเวลา ๒๘ วัน

๒. ผลผลิตสารสีที่ผลิตได้

ผลผลิตสารสี คือ น้ำหนักของสารสีที่คำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ ผลผลิตสารสีที่ผลิตได้ในสภาวะที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๒๘ วัน พบว่า ในสภาวะที่ ๑ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาที และ สภาวะที่ ๒ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที มีผลผลิตที่ผลิตได้สูงสุดที่ ๒๘ วัน โดยวันที่ ๒๘ สภาวะที่ ๑ ผลผลิตที่ผลิตได้เท่ากับ ๓.๒๓ % และรองลงมาคือ สภาวะที่ ๒ เท่ากับ ๓.๑๖ %

ในสภาวะที่ ๓ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาทีและเติมน้ำ ๑๕ ml และ สภาวะที่ ๔ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที และเติมน้ำ ๑๕ ml มีผลผลิตที่ผลิตได้สูงสุดที่ ๒๑ วัน หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลง โดยวันที่ ๒๑ สภาวะที่ ๔ มีผลผลิตที่ผลิตได้เท่ากับ ๖.๖๐ % และรองลงมาคือ สภาวะที่ ๓ เท่ากับ ๒.๘๖ %

ในสภาวะที่ ๕ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาที และเติมน้ำ ๓๐ ml และสภาวะที่ ๖ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที และเติมน้ำ ๓๐ ml มีผลผลิตที่ผลิตได้สูงสุดที่ ๑๔ วันหลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลง โดยวันที่ ๑๔ สภาวะที่ ๕ มีผลผลิตที่ผลิตได้เท่ากับ ๖.๘๓ % ซึ่งผลผลิตที่ผลิตได้สูงกว่าในสภาวะอื่น ๆ ทั้งหมดตลอดระยะเวลาการบ่ม ๒๘ วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ภาพ ๕) และรองลงมา คือ สภาวะที่ ๖ เท่ากับ ๖.๕๖ % เนื่องจากสภาวะที่ ๔, ๕ และ ๖ มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่สูงกว่าสภาวะอื่น ๆ และสูงขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง อาจจะมีผลให้ เชื้อรา *M. purpureus* สร้างเอนไซม์กลูโคสอะมิเลสมาก จึงเกิดการสะสมกลูโคสในระหว่างขบวนการหมัก จึงมีผลให้ตอนนำไปอบแห้งจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสีน้ำตาลไหม้จากขบวนการ caramellization ที่ผ่านความร้อนทำให้ผลิตภัณฑ์สีน้ำตาลไหม้นี้ไปเพิ่มผลผลิตที่ผลิตได้ (กังสดาลย์ บุญปราบ, ๒๕๓๘) สอดคล้องกับการทดลองของ Teng and Feldheim (๒๐๐๐) ซึ่งศึกษาเวลาในการแช่ข้าว, การเติมน้ำลงในข้าวก่อนฆ่าเชื้อ และ การเขย่าในระหว่างการหมัก ต่อการผลิตสารสีเหลืองและ สีส้ม (anka pigments) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๓๐°C เป็นเวลา ๑๔ วัน พบว่า เวลาในการแช่ข้าวที่ ๑๐ นาที ทำให้ความชื้นเริ่มต้นก่อนการปลูกเชื้อราเท่ากับ ๒๔.๓ % และมีผลผลิตสารสีสูงกว่าการแช่ข้าวเป็นเวลา ๕ และ ๒๐ นาที และการเขย่าอย่างรุนแรงในระหว่างการบ่มจะทำให้ผลผลิตสารสีสูงกว่าการเขย่าเบา ๆ และการไม่เขย่าเลย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการแช่ปลายข้าวจะมีผลต่อผลผลิตที่ผลิตได้ และ Tseng, et al. (๒๐๐๖) ซึ่งศึกษาผลผลิตสารสีที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* โดยการนำเชื้อราดังกล่าวเพาะเลี้ยงและไม่เพาะเลี้ยงเชื้อราบนลูกเดือยขาว และ ลูกเดือยกล้อง บ่มที่ ๒๕ °C เป็นเวลา ๗ วัน พบว่า ผลผลิตที่ผลิตได้ของลูกเดือยที่ปลูกเชื้อราจะอยู่ในช่วง ๒๓.๓๗ – ๒๙.๖๘ % ในขณะที่ผลผลิตที่ผลิตได้ของลูกเดือยที่ไม่ปลูกเชื้อราจะอยู่ในช่วง ๔.๐๘ – ๖.๐๙ % เนื่องจากว่า ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่ใส่ลงไปมีปริมาณมากกว่าสปอร์จากธรรมชาติจึงทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อรามีมากกว่าทำให้ได้ผลผลิตที่ผลิตได้ คือ ผลผลิตสารสีในปริมาณที่มากกว่า และ Yang, et al. (๒๐๐๖) ซึ่งศึกษาผลผลิตสารสีที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* โดยการนำเชื้อราดังกล่าวเพาะเลี้ยงและไม่เพาะเลี้ยงเชื้อราบนข้าวขาว และ ข้าวกล้อง โดยบ่มที่ ๒๕ °C เป็นเวลา ๗ วัน พบว่า ผลผลิตที่ผลิตได้ของลูกเดือยที่ปลูกเชื้อราจะอยู่ในช่วง ๓.๐๓ – ๓๐.๖๖ % ในขณะที่ ผลผลิตที่ผลิตได้ของลูกเดือยที่ไม่ปลูกเชื้อราจะอยู่ในช่วง ๑.๒๙ – ๖.๒๗ %



ภาพ ๕ ผลผลิตสารสีที่ผลิตได้ (%) ของปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* เจริญในสภาวะแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา ๒๘ วัน

๓. ปริมาณสารสีที่ผลิตได้

ปริมาณสารสี คือ ความเข้มของสีที่ได้จากการวัดโดยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น ๕๐๐ นาโนเมตร และคำนวณออกมาเป็น unit/g substrate ปริมาณสารสีที่ผลิตได้ในสภาวะที่แตกต่างกันที่ระหว่างการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๒๘ วัน พบว่า ในสภาวะที่ ๑ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาที และ ๒ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที มีปริมาณสารสีที่ผลิตได้สูงสุดที่ ๒๘ วัน โดยวันที่ ๒๘ สภาวะที่ ๑ มีปริมาณสารสีที่ผลิตได้ เท่ากับ ๒๐.๙ unit/g substrate ซึ่งสูงกว่าในสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ภาพ ๖) และ รองลงมาคือ สภาวะที่ ๒ เท่ากับ ๙.๔๕ unit/g substrate สอดคล้องกับผลผลิตที่ผลิตได้ในสภาวะที่ ๑และ ๒ ที่สูงสุดในวันที่ ๒๘ เช่นเดียวกัน และเมื่อพิจารณาความชื้นของสภาวะที่ ๑ เมื่อสิ้นสุดการทดลองคือในวันที่ ๒๘ พบว่าความชื้นเท่ากับ ๓๙.๑๑± ๒.๒๔ % จะสอดคล้องกับการทดลองของ พลายแก้ว ไชยเบญจรงค์ และ บุษบา ยงสมิทธ์ (๒๕๓๔) พบว่า ปลูกเชื้อรา *M. kaoliang* บนปลายข้าวหอมมะลิที่มีความชื้นเริ่มต้น ๓๒.๖๒ % และความชื้นเมื่อสิ้นสุดการหมัก ๓๗.๗๘ % บ่มเป็นเวลา ๑๒ วัน ที่อุณหภูมิ ๒๘ °C ให้ค่าสีที่ความยาวคลื่น ๕๐๐ นาโนเมตร/กรัมแห้ง เท่ากับ ๓๑๗ unit/g แสดงให้เห็นว่าความชื้นเริ่มต้นต่ำจะมีผลให้การผลิตปริมาณสารสีมีปริมาณที่สูง

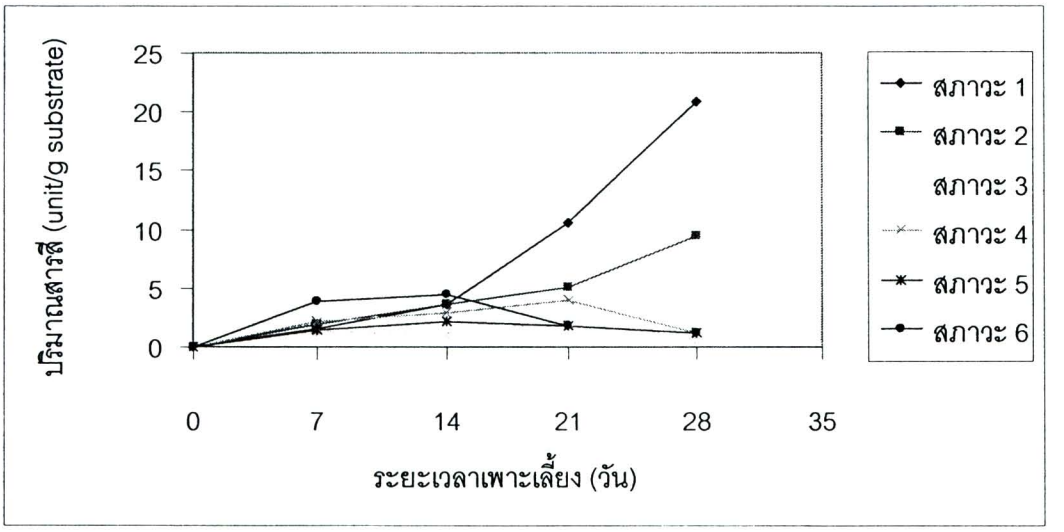
ในสภาวะที่ ๓ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาที และเติมน้ำ ๑๕ ml และ ๔ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที และเติมน้ำ ๑๕ ml มีปริมาณสารสีที่ผลิตได้สูงสุดที่ ๒๑ วัน หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลง โดยวันที่ ๒๑ สภาวะที่ ๓ และ ๔ ปริมาณสารสีที่ผลิตได้สูงสุดคือ ๒.๑๖ และ ๔.๐๐ unit/g substrate ตามลำดับ สอดคล้องกับผลผลิตที่ผลิตได้ของสภาวะที่ ๓ และ ๔ สูงสุดในวันที่ ๒๑ ในขณะที่ความชื้นเริ่มต้นสูงกว่าใน สภาวะที่ ๑ทำให้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงความชื้นมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระยะเวลาเพาะเลี้ยง ซึ่งมากกว่าความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสี

ในสภาวะที่ ๕ คือแช่ปลายข้าว ๐ นาที และเติมน้ำ ๓๐ ml และสภาวะที่ ๖ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที และเติมน้ำ ๓๐ ml มีปริมาณสารสีที่ผลิตได้สูงสุดที่ ๑๔ วัน หลังจากนั้นมี

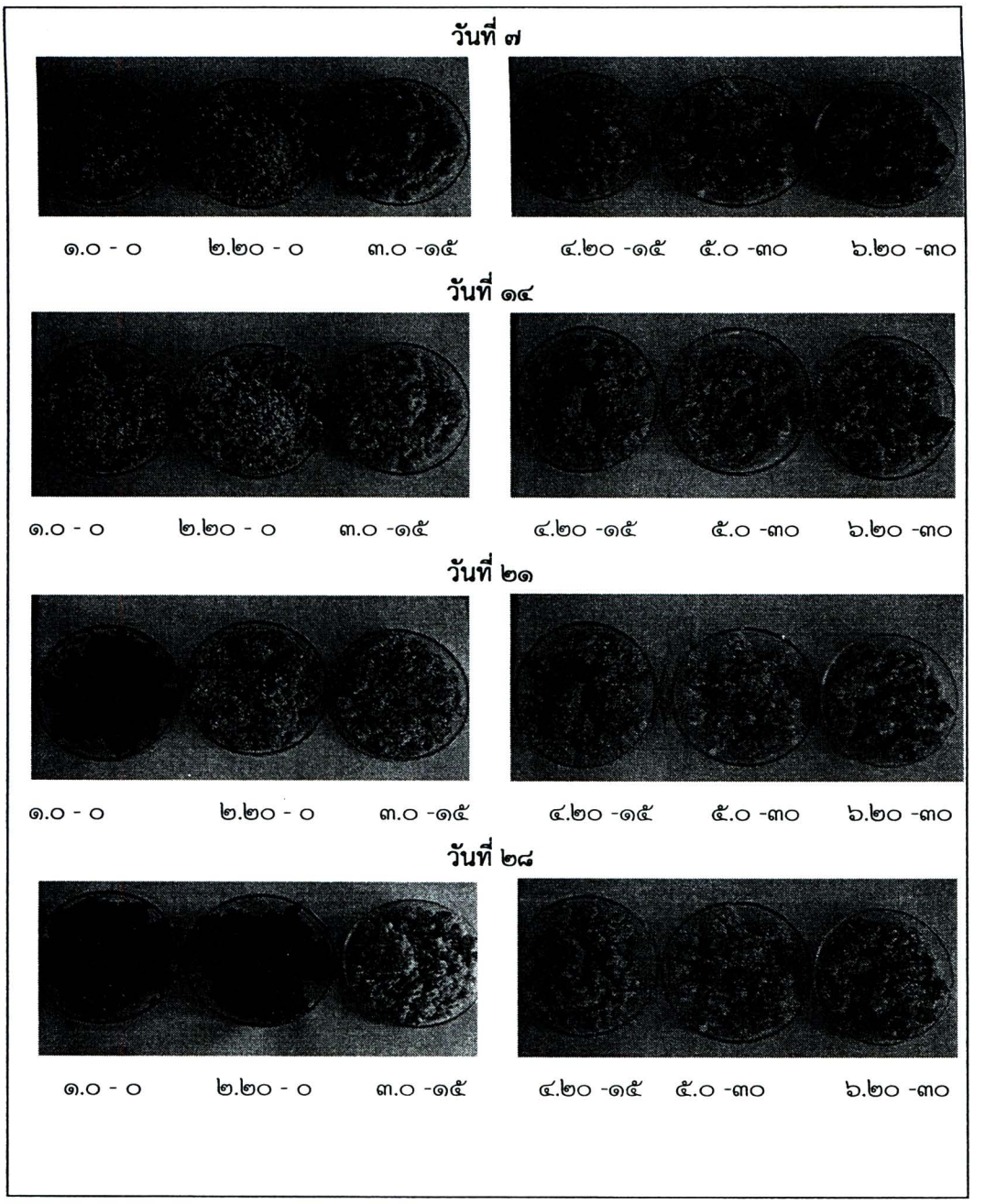
แนวโน้มลดลง โดยวันที่ ๑๔ สภาวะที่ ๕ และ ๖ ปริมาณสารสีที่ผลิตได้สูงสุด เท่ากับ ๒.๑๖ และ ๔.๔๖ unit/g substrate ตามลำดับ สอดคล้องกับปริมาณผลผลิตที่ผลิตได้สูงสุดในวันที่ ๑๔ เช่นเดียวกัน ในขณะที่ความชื้นเริ่มต้นสูงกว่าใน สภาวะที่ ๑ จึงทำให้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงความชื้นมีแนวโน้มสูงขึ้นมากกว่าความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสี

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารสีมีหลายปัจจัยคือ ๑. สายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* โดยสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับการผลิตสารสี คือ *M. purpureus* ๒. substrate หรืออาหารของเชื้อรา โดย substrate ที่นิยมมี ๒ ชนิด คือ ข้าวและ เมล็ดธัญพืช ๓. pH โดยควรจะอยู่ในช่วง ๓.๐-๗.๕ ๔. อุณหภูมิ พบว่าอุณหภูมิต่อการผลิตสารสีจะอยู่ระหว่าง ๒๗-๓๐°C ในขณะที่ อุณหภูมิ ๓๕ – ๓๗°C เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ๕. อัตราส่วนของก๊าซ ๖. ความชื้น (บุษบา ยงสมิทธ์, ๒๕๔๐) โดยในการทดลองนี้ศึกษาผลของความชื้นเป็นหลักทำให้ทราบว่า ความชื้นที่เหมาะสมกับการผลิตสารสี คือ สภาวะที่ ๑ ในขณะที่สภาวะอื่นความชื้นเริ่มต้นก่อนการปลูกเชื้อรามีปริมาณสูงทำให้การเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมากขึ้น จะมีผลให้ความชื้นสูงขึ้น และไม่เหมาะสมกับการผลิตสารสีไปด้วย เนื่องจากระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมากขึ้นจะทำให้ความชื้นสูงขึ้น (ภาพ ๔) และ อีกประการหนึ่งคือ Galaup, et al. (๒๐๐๕) รายงานว่าการผลิตสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* ในถุงพลาสติกนั้น การผลิตสารสีจะเกิดขึ้นที่ความชื้นต่ำ ๆ เท่านั้นคือ ความชื้นของข้าวก่อนการปลูกเชื้อราอยู่ในช่วง ๒๖ – ๓๒ % โดยที่ความชื้นต่ำจะทำให้เกิดการกระตุ้นการผลิตสารสีอีกทั้งเอนไซม์กลูโคอะไมเลสก็เพิ่มสูงด้วยเช่นเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามเมื่อเพิ่มความชื้นเริ่มต้นให้สูงก่อนการปลูกเชื้อราจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงไปด้วย จะทำให้กลูโคสผลิตออกมาเร็วกว่าที่ความชื้นต่ำ และผลิตอย่างรวดเร็วจึงไปยับยั้งการผลิตสารสี

ในงานวิจัยนี้ได้ขัดแย้งกับการทดลองของ กัญญุมา มุทุวงศ์, ศิววรรณ พูลพันธุ์ และ อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์ (๒๕๔๕) ซึ่งศึกษากากมันสำปะหลังที่ความชื้นเริ่มต้น ๖๐ %และนำไปปลูกเชื้อรา *M. purpureus* KT๓๐๕ KT๐๕๕ และ KT๐๖๕ บ่มที่อุณหภูมิ ๓๐°C เป็นเวลา ๑๔ วัน พบว่าให้สารสีแดงสูงสุดเท่ากับ ๑๒.๖๐ unit/g ทั้งนี้ปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่มากเกินไปจะทำให้แหล่งอาหารติดกันทำให้การหมุนเวียนอากาศไม่ดีดังนั้นความชื้นจึงมีความสำคัญกับเชื้อรา Babitha, Soccol, and Pandey (๒๐๐๗) ได้ทดลองนำเชื้อรา *M. purpureus* LPB๙๗ นำไปปลูกบนแป้งขนุน ที่มีความชื้นเริ่มต้นก่อนการปลูกเชื้อราเท่ากับ ๓๕, ๔๐, ๔๕, ๕๐ และ ๖๐ % บ่มที่ ๓๐°C เป็นเวลา ๑๔๔ ชั่วโมง พบว่าแป้งขนุนที่มีความชื้นเริ่มต้นก่อนการปลูกเชื้อรา เท่ากับ ๕๐% มีการผลิตสารสีสูงสุดคือ ๑๕.๑๒ OD unit/g substrate



ภาพ ๖ ปริมาณสารสีของปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* เจริญในสภาวะแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา ๒๘ วัน



ภาพ ๗ ปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* เจริญอยู่ในสภาวะแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา ๒๘ วัน (ระยะเวลาในการแช่ปลายข้าว(นาที)) – (ปริมาตรน้ำที่ใช้ในการเติม (ml))

๓. ปริมาณชีวมวลของราในรูปของกลูโคซามีน

การวัดปริมาณชีวมวลเป็นการวัดการเจริญของเชื้อรา *Monascus* เป็นวิธีที่ง่ายที่สุด โดยใช้การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (Pinthong, et al., ๒๐๐๗) การผลิตปริมาณชีวมวลของราตลอดระยะเวลาในการบ่มเป็นเวลา ๒๘ วัน ได้ผลการทดลองดังนี้

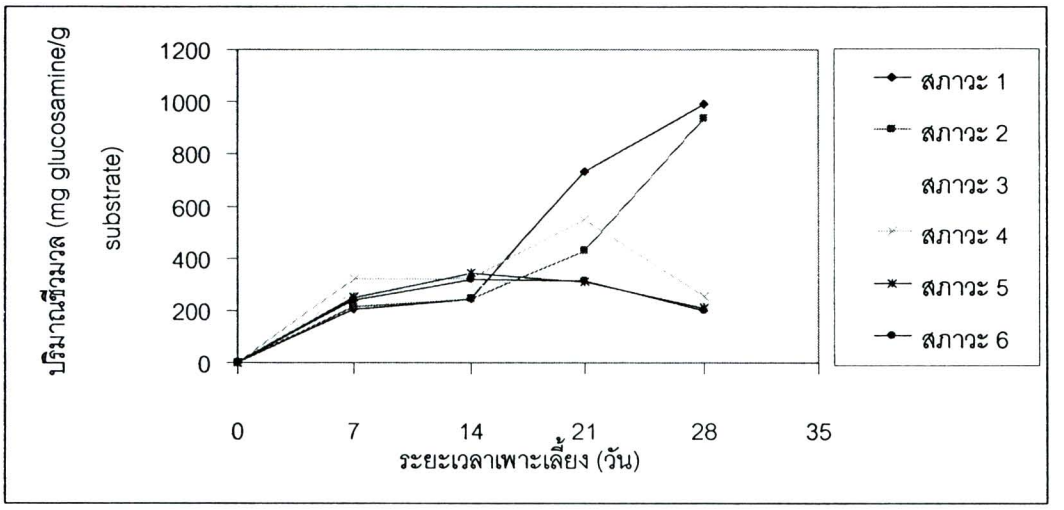
ในสภาวะที่ ๑ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาที และสภาวะที่ ๒ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที มีการผลิตชีวมวลสูงสุดที่ ๒๘ วัน โดยสภาวะที่ ๑ มีการผลิตปริมาณชีวมวลเท่ากับ ๙๙๐.๓๑ mg glucosamine/g substrate ซึ่งสูงกว่าสภาวะอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq ๐.๐๕$) (ภาพ ๘) และ รองลงมาคือ สภาวะที่ ๒ คือ ๙๓๖.๒๕ mg glucosamine/g substrate ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตสารสีในสภาวะที่ ๑ และ ๒ โดยสูงสุดที่ ๒๘ วัน เช่นเดียวกัน

ในสภาวะที่ ๓ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาที และเติมน้ำ ๑๕ ml และสภาวะที่ ๔ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาทีและเติมน้ำ ๑๕ ml มีการผลิตปริมาณชีวมวลสูงสุดที่ ๒๑ วัน หลังจากนั้นมีแนวโน้มลดลง โดยการผลิตปริมาณชีวมวลในสภาวะที่ ๓ และ ๔ คือ ๓๕๑.๖๕ และ ๕๔๘.๑๓ mg glucosamine/g substrate ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตสารสีในสภาวะที่ ๓ และ ๔ โดยสูงสุดที่ ๒๑ วัน เช่นเดียวกัน

ในสภาวะที่ ๕ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาทีและเติมน้ำ ๓๐ ml และสภาวะที่ ๖ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาทีและเติมน้ำ ๓๐ ml มีการผลิตปริมาณชีวมวลสูงสุดในวันที่ ๑๔ หลังจากนั้น มีแนวโน้มลดลง โดยการผลิตปริมาณชีวมวลในสภาวะที่ ๕ และ ๖ เท่ากับ ๓๔๑.๒๕ และ ๓๑๗.๔๑ mg glucosamine/g substrate ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตสารสีสูงสุดที่ ๑๔ วัน เช่นเดียวกัน (ภาพ ๘)

การผลิตสารสีจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณชีวมวลในระหว่างการเจริญของเชื้อรา *Monascus* spp. เนื่องจากเชื้อราจะทำการย่อยสลายอาหารจำพวกแป้งให้เป็นสารเมตาบอไลท์ต่าง ๆ โดยสารสีก็เป็นสารเมตาบอไลท์หนึ่งที่เป็นเมตาบอไลท์ประเภททุติยภูมิ การผลิตสารสีขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร และปัจจัยอื่น ๆ เช่น pH อุณหภูมิ ความชื้น (Pinthong, et al., ๒๐๐๗)

จากสภาวะที่เพิ่มความชื้นให้สูงขึ้นทำให้ความชื้นของอาหารแข็งสูงมากเกินไปมีผลให้การเจริญของเชื้อราไม่เหมาะสม เนื่องจากว่าจะทำให้อาหารติดกันมากเกินไป และเมื่อความชื้นน้อยมากเกินไป ทำให้การแลกเปลี่ยนความร้อน และการขนส่งออกซิเจน อีกทั้งยังทำให้ได้รับอาหารได้น้อยลง (Carrizales and Rodriguez, ๑๙๘๑) ทุกสภาวะมีการผลิตสารสีสูงสุดที่ระยะเวลาการผลิตชีวมวลได้ปริมาณสูงสุดเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับ Babitha, Soccol, and Pandey (๒๐๐๗) ได้ศึกษาการบ่มเชื้อรา *M. purpureus* บนแป้งขนุนที่ระยะเวลาในการบ่ม ๑๔๔ ชั่วโมง ให้สารสีแดงสูงที่สุด (๑๐.๒ OD unit /gds) ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับการผลิตกลูโคซามีนสูงที่สุดเช่นเดียวกัน Pattanagul, et al. (๒๐๐๘) ศึกษาการผลิตสารต้านออกซิเดชันจากข้าวแดงที่ผลิตจากลูกเดือย ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๒๘ วัน พบว่าปริมาณ glucosamine สูงทำให้ความเข้มข้นของสารสีจะสูงตามไปด้วย



ภาพ ๘ ปริมาณชีวมวลของราในรูปของกลูโคซามีนของปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* เจริญในสภาวะแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา ๒๘ วัน

๔. การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน

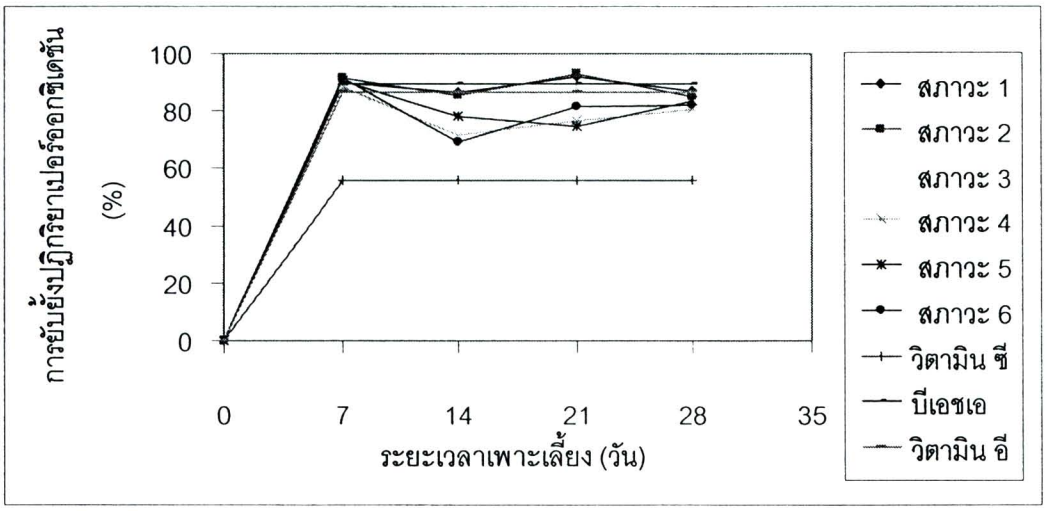
ในการทดลองนี้เป็นการศึกษาการยับยั้งการเกิดสารประกอบเปอร์ออกไซด์จากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยใช้วิธีทดสอบ คือ ferric thiocyanate method (FTC) โดยวิธีนี้จะศึกษาประสิทธิภาพสารสี *Monascus* ในการยับยั้งเปอร์ออกไซด์จากกรดลิโนเลอิกซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่งไม่ให้สารประกอบเปอร์ออกไซด์ ไปออกซิไดซ์ Fe^{2+} ไปเป็น Fe^{3+} แต่ถ้าไม่สามารถยับยั้งการเกิด Fe^{3+} ได้ ทำให้ Fe^{3+} จะไปรวมตัวกับ SCN^- เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีแดง โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ ๕๐๐ นาโนเมตร (Takao, et al., ๑๙๙๔) แต่ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีแสดงว่ามีระดับการยับยั้งคือ ๑๐๐ % ซึ่งเป็นระดับที่ยับยั้งสูงสุด

การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml ของปลายข้าวที่มีเชื้อรา *M. purupureus* เจริญอยู่ในสภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา ๒๘ วัน พบว่า ในสภาวะที่ ๑ แช่ปลายข้าว ๐ นาที และ ๒ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที ในวันที่ ๒๑ ของสภาวะที่ ๒ การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน คือ ๙๓.๑๖ % ซึ่งสูงกว่าในสภาวะอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ภาพ ๙) และ รองลงมา คือ สภาวะที่ ๑ คือ ๙๑.๙๖ % หลังจาก ๒๑ วันมีการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันมีแนวโน้มลดลง แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่ ๒ การผลิตสารสี ปริมาณชีวมวล ได้ปริมาณมากรองลงมาจากสภาวะที่ ๑ แสดงให้เห็นว่า การผลิตสารสี ปริมาณชีวมวล ได้ปริมาณมากไม่เป็นทิศทางเดียวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน เนื่องจากสภาวะที่ ๒ เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันทำให้เชื้อรา *M. purpureus* อาจจะผลิต Monacolin K และ γ-aminobutyric acid (GABA) ออกมาได้ปริมาณที่มาก จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากกว่าสภาวะอื่น ๆ (Galaup, et al., ๒๐๐๕) สอดคล้องกับการทดลองของ Yang, et al. (๒๐๐๔) พบว่าการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* บนลูกเดือยที่ระยะเวลา ๐ – ๓ เดือน จะทำให้ Acid value และ Peroxide value มีค่าใกล้เคียงกัน และ Coixenolide,

Monacolin K และ GABA content อยู่ในปริมาณไม่แตกต่างกัน โดยขณะที่เดือนที่ ๖ ทำให้ Peroxide value และ Acid value สูงขึ้น และ Coixenolide, Monacolin K and GABA content ปริมาณลดลง เมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้นจะทำให้สารต้านออกซิเดชัน และประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันลดลงได้เช่นกัน

ในสภาวะที่ ๓ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาทีและเติมน้ำ ๑๕ ml, สภาวะที่ ๔ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาทีและเติมน้ำ ๑๕ ml, สภาวะที่ ๕ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาทีและเติมน้ำ ๓๐ ml และ สภาวะที่ ๖ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาทีและเติมน้ำ ๓๐ ml สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันได้สูงสุดในวันที่ ๗ คือ ๘๘.๕๒ ๘๘.๖๑ ๙๐.๓๑และ ๙๑.๔๓ % ตามลำดับ หลังจากวันที่ ๗ มีแนวโน้มลดลง (ภาพ ๙) เนื่องจาก สภาวะที่ ๓, ๔, ๕ และ ๖ เป็นสภาวะที่มีความชื้นเริ่มต้นมากเกินไป จะทำให้เชื้อรามีการเจริญสูง และมีการผลิตสารได้ปริมาณที่มาก หลังจากนั้นเมื่อความชื้นจึงเพิ่มมากขึ้นทำให้ เกิดออกซิเดชันภายในตัวผลิตภัณฑ์เองทำให้ สารดังต้านออกซิเดชันเช่น Monacolin K และ GABA ถูกนำไปใช้ จึงทำให้สารดังกล่าวลดลงตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง มีผลให้ประสิทธิภาพน้อยลงตามระยะเวลาด้วยเช่นเดียวกัน (Yang, et al., ๒๐๐๔) และเมื่อนำสารสกัดในสภาวะที่ ๒ (๙๓.๑๖ %) มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันกับ วิตามินซี (๕๕.๕๘ %) บีเอชเอ (๘๙.๖๖ %) และ วิตามินอี (๘๖.๖๐ %) (ภาพ ๙) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดในสภาวะที่ ๒ มีประสิทธิภาพที่สูงกว่าสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ Tseng, et al. (๒๐๐๖) ได้ทดลองใช้สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ บีเอชเอ และวิตามิน อี ที่ความเข้มข้น ๐.๐๑ mg/ml พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันเท่ากับ ๙๖.๗ และ ๙๑.๒ % ตามลำดับ วิตามิน ซี ที่ความเข้มข้น ๑๐ mg/ml จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันเท่ากับ ๘๔.๒ % Yang, et al. (๒๐๐๖) ทดลองใช้สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ บีเอชเอ และวิตามินอี ที่ความเข้มข้น ๐.๐๑ mg/ml และ วิตามินซี ที่ความเข้มข้น๑๐ mg/ml พบว่าจะได้ผลการทดลองเหมือนกับการทดลองของ Tseng, et al. (๒๐๐๖) เช่นเดียวกัน

Tseng, et al. (๒๐๐๖) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* บนลูกเดือยขาว และลูกเดือยกล้อง บ่มเป็นเวลา ๗ วัน ที่ ๒๕°C พบว่า การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันที่ความเข้มข้น ๑ mg/ml ลูกเดือยขาวที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา *Monascus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์-ออกซิเดชันเท่ากับ ๑๕.๘ % ในขณะที่ ลูกเดือยกล้อง ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา และลูกเดือยขาวและกล้องที่ปลูกเชื้อรา จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันอยู่ในช่วง ๕๙.๖ – ๗๖.๕ % และ Yang, et al. (๒๐๐๖) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* บนข้าวขาว และข้าวกล้อง บ่มเป็นเวลา ๗ วัน ที่ ๒๕°C พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันที่ความเข้มข้น ๑ mg/ml ข้าวกล้องและขาวที่ไม่ได้ปลูกเชื้อราจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันอยู่ในช่วง ๙๗.๑ – ๙๘ % ในขณะที่ข้าวขาวและกล้องที่ปลูกเชื้อราจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันอยู่ในช่วง ๘๑.๑ – ๙๐.๐ % Yang, et al. (๒๐๐๐) ได้ศึกษาประสิทธิภาพยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน จากกากถั่วเหลืองโดยหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ดังนี้ *Acetobacter* sp., *Lactobacillus* sp., *Saccharomyces* sp. and *Streptomyces* sp. พบว่า การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันตัวอย่างที่ทำการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ และไม่ได้หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ที่ไม่ได้ทำการเจือจาง (๑๐๐%) จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันเท่ากับ ๘๐ – ๘๕ % ตามลำดับ ในขณะถ้าทำการเจือจางตัวอย่าง ๑๐ – ๑๐๐ % จะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันเท่ากับ ๕๑ – ๘๕ %



ภาพ ๙ การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* เจริญในสภาวะแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา ๒๘ วัน

๕. กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH

กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถคัดเลือกสารต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์ได้ (Robards, et al., ๑๙๙๙) ในการทดลองนี้จะประเมินประสิทธิภาพของสารสี *Monascus* ในการให้ไฮโดรเจนกับอนุมูล DPPH (Brand-Williams, Cuvelier and Berset, ๑๙๙๕; Wettasinghe and Shahidi, ๒๐๐๐)

กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml ของปลายข้าวที่เชื้อรา *Monascus* เจริญในสภาวะต่าง ๆ เป็นเวลา ๒๘ วัน พบว่า ในสภาวะที่ ๒ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที โดยกิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงสุดที่ระยะเวลาในการบ่ม ๒๑ วัน คือ ๙๑.๐๕ % สูงกว่าในสภาวะอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ภาพ ๑๐) และสภาวะที่มีประสิทธิภาพกิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH รองลงมา คือ สภาวะที่ ๓ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาทีและเติมน้ำ ๑๕ ml ทำให้กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH คือ ๘๒.๕๐ % หลังจาก ๒๑ วัน มีแนวโน้มกิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ของสภาวะที่ ๒ ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสภาวะอื่น ๆ เนื่องมาจากเป็นสภาวะที่เหมาะของเชื้อรา *M. purpureus* ในการผลิตสารที่มีประสิทธิภาพในกำจัดอนุมูล DPPH เช่น Monacolin K และ GABA ในปริมาณสูง ทำให้ในสภาวะที่ ๒ นี้จึงมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่สูง โดยในสภาวะที่ ๒ การผลิตสารสี ปริมาณชีวมวล ได้ปริมาณมากรองลงมาจากสภาวะที่ ๑ แสดงให้เห็นว่า การผลิตสารสี ปริมาณชีวมวล ได้ปริมาณมากไม่เป็นทิศทางเดียวกับ ความสามารถของการกำจัดอนุมูล DPPH ในสภาวะที่ ๒ มีประสิทธิลดลงหลังจากวันที่ ๒๑ เนื่องจาก Yang, et al. (๒๐๐๔) ซึ่งศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* บนลูกเดือยบ่มที่ระยะเวลาที่มากขึ้นจะทำให้สารต้านออกซิเดชัน และประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันลดลงได้เช่นกัน และ ความชื้นที่สูงขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจะทำให้เกิด Hydrolytic rancidity ที่เร็วกว่าโดยทำให้จุลินทรีย์หลั่งเอนไซม์ไลเพสออกมา

ทำให้ไตรเอซิลกลีเซอรอลเกิดการสลายตัวได้เป็นไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอล กลีเซอรอล และกรดไขมันอิสระ จึงทำให้การหืนสูงขึ้น (นิธิยา รัตนาปนนท์, ๒๕๔๘)

ในสภาวะ ๑ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาที, สภาวะที่ ๔ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาทีและเติมน้ำ ๑๕ ml, ๕ คือ แช่ปลายข้าว ๐ นาทีและเติมน้ำ ๓๐ ml และ สภาวะที่ ๖ คือแช่ปลายข้าว ๒๐ นาที และเติมน้ำ ๓๐ ml กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH มีแนวโน้มสูงขึ้นตลอด ๒๘ วัน และในวันที่ ๒๘ สภาวะที่ ๑ ๔ ๕ และ ๖ กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH เท่ากับ ๗๓.๖๔, ๖๑.๓๖, ๖๒.๗๗ และ ๖๔.๑๘ % ตามลำดับ (ภาพ ๑๐) จากสภาวะที่มีความชื้นเริ่มต้นมากเกินไป เมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมากขึ้น ความชื้นจึงเพิ่มมากขึ้น ทำให้เป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสม รา จึงทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH ต่ำ ในขณะที่เมื่อความชื้นน้อยมากเกินไปเช่น ในสภาวะที่ ๑ ทำให้การแลกเปลี่ยนความร้อน และการขนส่งออกซิเจน อีกทั้งยังทำให้ได้รับอาหารได้น้อยลง (Carrizales and Rodriguez, ๑๙๘๑) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ เช่น Monacolin K และ ϒ-aminobutyric acid content ปริมาณลดลง จึงทำให้ความสามารถของการกำจัดอนุมูลอิสระลดลงตามระยะเวลาเพาะเลี้ยง

และเมื่อนำสารสกัดในสภาวะที่ ๒ (๙๑.๐๕ %) มาเปรียบเทียบกับ วิตามินซี (๙๕.๑๙ %) บีเอชเอ (๙๕.๗๔%) และ วิตามินอี (๙๔.๙๒ %) จะเห็นได้ว่าสารสกัดในสภาวะที่ ๒ มีประสิทธิภาพที่น้อยกว่าสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ Tseng, et al. (๒๐๐๖) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ บีเอชเอ วิตามินซี และ อี พบว่า การกำจัดอนุมูล DPPH ที่ความเข้มข้น ๐.๑ mg/ml จะอยู่ในช่วง ๙๐ – ๙๖.๔ % และ Yang, et al. (๒๐๐๖) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ บีเอชเอ วิตามินซี และ อี พบว่า การกำจัดอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น ๐.๑ mg/ml จะมีประสิทธิภาพเท่ากับการทดลองของ Tseng, et al. (๒๐๐๖) เช่นเดียวกัน

โดยมีการทดลองอื่น ๆ ของ Tseng, et al. (๒๐๐๖) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *M. purpureus* บนลูกเดือยกล้อง และขาว บ่มเป็นระยะเวลา ๗ วัน ที่อุณหภูมิ ๒๕°C พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่ความเข้มข้น ๑ mg/ml ลูกเดือยขาวและกล้องที่ไม่ได้ปลูกเชื้อราจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง ๖.๒ – ๑๖.๐ % ในขณะที่ลูกเดือยกล้องและขาวที่ปลูกเชื้อราจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง ๒๐.๙ – ๔๑.๗ % Tseng, et al. (๒๐๐๓) พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากันคือ ๑ mg/ml ข้าวขาวที่ปลูกเชื้อราจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH เท่ากับ ๘๘.๖ % ในขณะที่ ข้าวขาว ข้าวกล้อง ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา และ ข้าวกล้องที่ปลูกเชื้อรา จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH เท่ากับ ๑๐.๕, ๙.๒๐ และ ๒๔.๓ % ตามลำดับ ยังมีการรายงานอีกว่าเชื้อรา *Monascus* นอกจากจะผลิตสารสี และสารต้านออกซิเดชันแล้วยังสามารถผลิตสารอื่น ๆ อีก คือ Tseng, et al. (๒๐๐๔) ได้นำลูกเดือยที่ปลูกเชื้อรา *M. purpureus* ที่บ่มเป็นระยะเวลา ๗ วัน ที่อุณหภูมิ ๒๕°C โดยมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล กรดอะมิโน ปริมาณ Nucleotides พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กรดอะมิโนทั้งหมด ปริมาณ Nucleotidesทั้งหมด ของลูกเดือยกล้องและขาวที่ปลูกเชื้อราจะมีปริมาณที่มากกว่า ลูกเดือยที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา และมีการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารพิษที่เชื้อราดังกล่าวผลิตได้ของ Pattanagul, et al. (๒๐๐๘) ซึ่งศึกษาการผลิตสารต้านออกซิเดชันจากข้าวแดงที่ผลิตจากลูกเดือย ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๒๘ วัน พบว่าปริมาณ glucosamine ที่สูงทำให้การผลิต citrinin สูงไปด้วย ในขณะที่ความเข้มข้นของสีจะสูงตามไปด้วย และสารต้านออกซิเดชันคือ

mevinolin ($C_{24}H_{36}O_5$, Lovastatin, Monacolin and Mevavor) จะอยู่ในปริมาณต่ำจะเห็นได้ว่าการผลิตสารต้านออกซิเดชันจะสวนทางกับการผลิตสารพิษของเชื้อรา คือ citrinin ในส่วนการใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นก็จะสามารถผลิตสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิในการให้ไฮโดเจนกับอนุมูล DPPH ได้เช่นเดียวกัน คือ Yang, et al. (๒๐๐๔) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH จากกากถั่วเหลือง ซึ่งหมักด้วยจุลินทรีย์ดังนี้ *Acetobacter* sp., *Lactobacillus* sp., *Saccharomyces* sp. and *Streptomyces* sp. พบว่า การกำจัดอนุมูล DPPHของตัวอย่างทำการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวที่ระดับการเจือจาง ๒๐ – ๑๐๐ % มีประสิทธิภาพในการกำจัดได้ ๑๐๐ % และตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่ไม่ได้หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ที่ไม่ได้ทำการเจือจาง (๑๐๐%) มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระเท่ากับ ๑๐๐ %

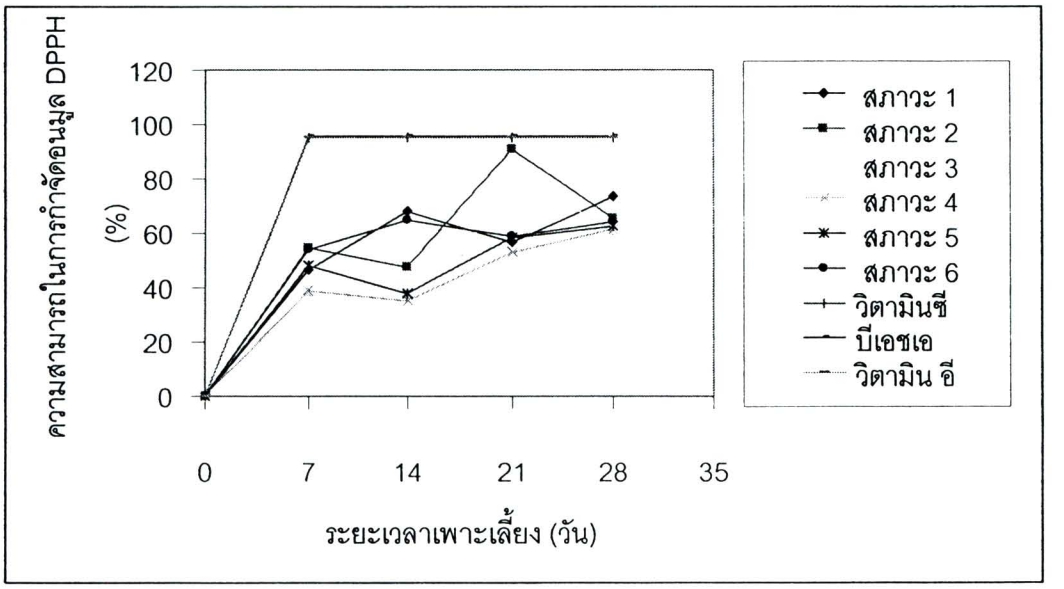
๖. สเปกตรัมของสารสี

นำสารสีในสภาวะที่ ๒ คือ แช่ปลายข้าวเป็นเวลา ๒๐ นาที เพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๒๑ วัน มาศึกษาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดจากเส้นสเปกตรัม พบว่าในภาพ ๑๑ แสดงให้มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุด ๒ จุด คือ ที่ ๕๐๐ และ ๔๐๕ นาโนเมตร จะเห็นได้ว่าค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดที่ได้สอดคล้องกับการรายงานของ บุษบา ยงสมิทธ์ และคณะ (๒๕๓๑) ซึ่งศึกษาการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* บนมันสำปะหลังสามารถผลิตสารสีที่มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดที่ ๕๐๐ และ ๔๒๐ นาโนเมตร และสารสีที่มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงดังกล่าวนั้นมีโครงสร้างทางเคมีของสารสีที่ชื่อว่า คือ Rubropunctamine ($C_{21}H_{23}O_4N$) และ Monascorubramine ($C_{23}H_{27}O_4N$) (Sweeny, et al., ๑๙๘๑) ดังนั้นสารสีที่ผลิตได้ในสภาวะที่ ๒ มีโครงสร้างทางเคมีของสารสีที่เหมือนกับ Sweeny, et al. (๑๙๘๑) อีกทั้งยังมีการรายงานของ Broder and Koehler (๑๙๘๐) ศึกษาการสกัดสารสีจากเส้นใยเชื้อราโดยใช้เมทานอล พบว่า สารสีที่สกัดได้มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุด ๒ จุด คือ ๕๐๐ และ ๓๙๐ นาโนเมตร อีกทั้งยังมีการรายงานของ Lin and Iizuka (๑๙๘๒) ทำการวัดค่าสีจากเชื้อรา *Monascus* ในเอทานอล ๙๕ % พบว่าสารสีที่ละลายในเอทานอล ๙๕ % ดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุด ๒ จุด คือ ๔๐๐ และ ๕๐๐ นาโนเมตร จะเห็นได้ว่าในการทดลองนี้สารสีที่ผลิตได้ในสภาวะที่ ๒ มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดเช่นเดียวกับการทดลองอื่นข้างต้น

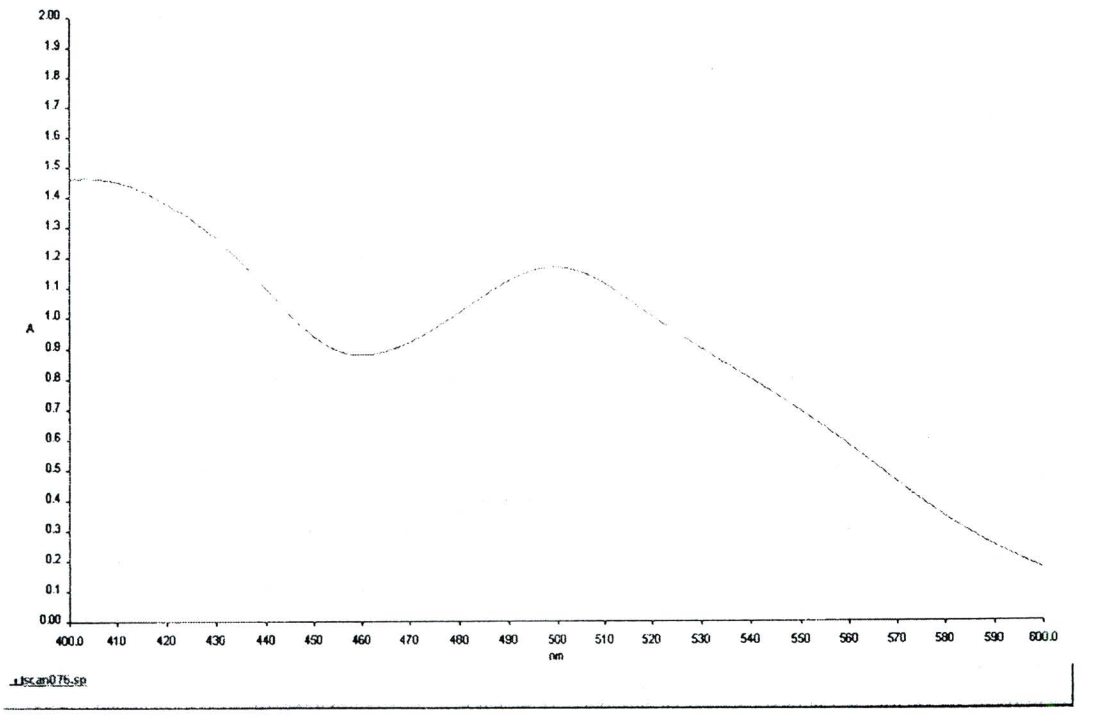
สรุปได้ว่าสารสีที่ผลิตได้ในสภาวะที่ ๒ มีโครงสร้างทางเคมีที่ชื่อว่า Rubropunctamine ($C_{21}H_{23}O_4N$) และ Monascorubramine ($C_{23}H_{27}O_4N$)

๗. สรุป

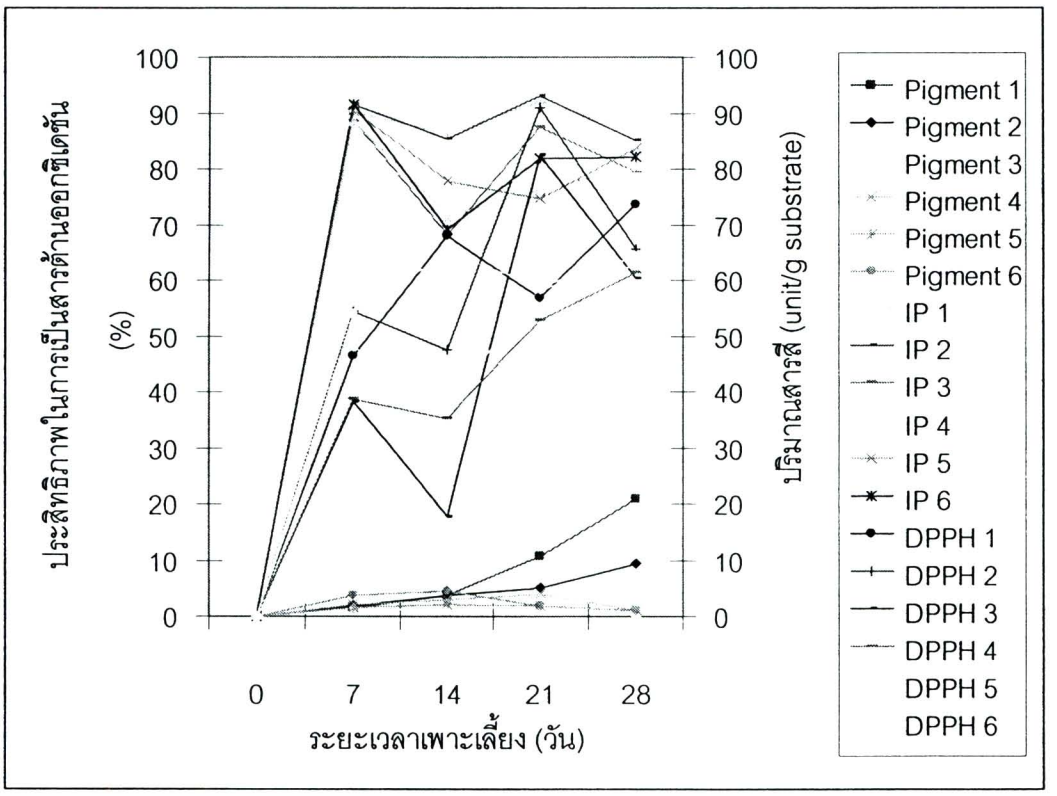
ในงานวิจัยนี้ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันเป็นหลัก จึงพิจารณาคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสีและคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน คือ สภาวะที่ ๒ โดยการแช่ปลายข้าวเป็นเวลา ๒๐ นาที โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๒๑ วัน เนื่องจาก ในภาพ ๑๙ เป็นการเปรียบเทียบปริมาณสารสี และ ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันทั้ง ๒ วิธี แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการเป็นการกำจัดอนุมูล DPPH และ มีการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสูงสุด ($P \leq 0.05$) ถึงแม้ว่ามีการผลิตสารสี และปริมาณชีวมวลของรา จะรองลงมาจาก สภาวะที่ ๑ (โดยไม่แช่ปลายข้าว และไม่เติมน้ำ) แต่เมื่อพิจารณาจากภาพ ๑๔ เห็นได้ว่าความเข้มของสีในสภาวะที่ ๒ ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา ๒๑ วัน มีความเข้มเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสีและคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในตอนที่ ๒ ต่อไป



ภาพ ๑๐ ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* เจริญในสภาวะแตกต่างกันเป็นระยะเวลา ๒๘ วัน



ภาพ ๑๑ สเปกตรัมดูดกลืนแสงของสีจากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* ในสภาวะที่ ๒ คือ แช่ปลายข้าวเป็นเวลา ๒๐ นาที ที่ระยะเวลาการบ่ม ๒๑ วัน



ภาพ ๑๒ ปริมาณสารสี ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH และการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* เจริญในสภาวะแตกต่างกันเป็นระยะเวลา ๒๘ วัน

หมายเหตุ: Pigment ตัวเลข คือ ปริมาณสารสี สภาวะ ๑ - ๖

IP ตัวเลข คือ การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน สภาวะ๑ - ๖

DPPH ตัวเลข คือ ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH สภาวะ๑ - ๖

ศึกษาสภาวะการสกัดสารสี และ คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ผลิตจาก *Monascus purpureus* TISTR ๓๐๘๐ บนปลายข้าว

นำปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR ๓๐๘๐ ของสภาวะที่ ๒ คือ แช่ปลายข้าว ๒๐ นาที (ความชื้นเริ่มต้น ๓๑.๒๖ ± ๑.๐๘ %) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ๒๑ วัน นำมาศึกษาสภาวะการสกัดสารสี และคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน นำไปตรวจคุณสมบัติทางเคมี ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

๑. ปริมาณความชื้นหลังอบปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR ๓๐๘

การวัดความชื้นของปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus* ที่อบแห้งด้วยอุณหภูมิ ระยะเวลาที่แตกต่างกันก่อนจะนำไปสกัดในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (ตาราง ๒) เพื่อได้ทราบความชื้นของปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus* เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับความชื้นของข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus* ที่มีจำหน่ายทางการค้า จากการทดลอง พบว่า ความชื้นของปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus* ในอุณหภูมิระยะเวลาในการอบที่แตกต่างกันมีความชื้นอยู่ในช่วง ๕.๕๗ – ๕.๗๕ % ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>๐.๐๕) (ตาราง ๒) จะเห็นได้ว่าจากการวัดความชื้นในทุกอุณหภูมิและระยะเวลาในการอบแห้งมีความชื้นต่ำกว่าผงข้าวแดงที่มีจำหน่ายทางการค้าที่ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ ๘ % ซึ่งปริมาณความชื้นที่น้อยกว่าหรือเท่ากับความชื้นดังกล่าวจะเพียงพอสำหรับหยุดการเจริญของเชื้อราและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีทางสารสีได้ (Hangzhou Twin-Horse Bioengineering Co.,Ltd., ๑๙๙๙) ดังนั้นการอบแห้งที่อุณหภูมิระยะเวลาที่ปรากฏในการทดลองนี้จะสามารถเก็บผงข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus* ไว้ได้นาน ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีเช่นเดียวกับการผลิตทางการค้า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ กนกกาญจน์ สามารถ และ อนุเทพ ภาสุระ (๒๕๓๙) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp. บนขนมปัง ร่วมกับ Na_2SO_4 ๐.๕ กรัม/ลิตร ที่ความชื้นเริ่มต้นก่อนการปลูกเชื้อรา ๓๐ % บ่มที่อุณหภูมิ ๓๐°C เป็นเวลา ๑๐ วัน หลังจากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ ๔๕, ๕๐ และ ๕๕°C ระยะเวลา ๓, ๖, ๙ และ ๑๒ ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ ๕๕°C เป็นเวลา ๙ ชั่วโมงขึ้นไปไม่พบเชื้อราที่มีชีวิตอยู่เลย เนื่องจากความร้อนและระยะเวลาในการอบที่นานจะไปจะมีผลในการทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ (inactivation) (Manandhar and Apinis, ๑๙๗๑) ดังนั้นการอบแห้งด้วยอุณหภูมิต่ำทำให้รักษาสารเคมีของเชื้อราผลิตขึ้นได้ไม่ให้เสื่อมสลายเนื่องจากความร้อน

ตาราง ๒ ปริมาณความชื้น (%) หลังอบปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่อุณหภูมิ ระยะเวลาแตกต่างกัน

อุณหภูมิและระยะเวลาในการอบ	ความชื้น (%)[ns]
๕๐ °C เวลา ๓๐ ชั่วโมง	๕.๕๗ ± ๐.๗๗
๖๐ °C เวลา ๒๔ ชั่วโมง	๕.๕๖ ± ๐.๘๖
๗๐ °C เวลา ๒๐ ชั่วโมง	๕.๗๕ ± ๐.๘๕

[ns]ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>๐.๐๕)

๒.ผลผลิตของสารสีที่สกัดได้

ประสิทธิภาพของการสกัดเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเปรียบเทียบผลผลิตสารสีที่สกัดได้ และ ประสิทธิภาพสารต้านอนุมูลออกซิเดชัน อย่างไรก็ตามการสกัดนั้นทำได้ไม่ง่ายนักเนื่องจากสารประกอบต่าง ๆ จะละลายในตัวทำสกัดที่แตกต่างกัน (Miller, et al., ๒๐๐๐) จากการทดลองการอบปลายข้าวที่มีเชื้อ *Monascus* ที่อุณหภูมิ ระยะเวลาในการ และ ตัวสกัดในการสกัดผลผลิตสารสีที่แตกต่างกัน ให้ผลผลิตสารสีที่แตกต่างกันดังนี้

เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิในการอบปลายข้าวที่แตกต่างกันของตัวสกัดชนิดเดียวกัน การอบแห้งปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus* ที่อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง ทำให้ได้ผลผลิตสารสีสูงสุด เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้อบเป็นอุณหภูมิที่ต่ำ ดังนั้น จะสามารถรักษาผลผลิตสารสีไม่ให้สูญเสียเนื่องจากความร้อนได้ ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้อุณหภูมิในการอบแห้ง ที่ ๗๐°C เวลา ๒๐ ชั่วโมงมีปริมาณผลผลิตที่สกัดมากกว่าอุณหภูมิในการอบแห้ง ๖๐°C เวลา ๒๔ ชั่วโมง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่น้อยกว่า เนื่องจากในระหว่างการหมักเชื้อราดังกล่าวจะมีเอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งคือ Glucoamylase และ alpha amylase ที่ใช้ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล reducing จึงทำให้เกิดการสะสมน้ำตาลในระหว่างการหมัก เมื่อนำปลายข้าวที่มีเชื้อราดังกล่าวมาอบด้วยความร้อนจะทำให้น้ำตาลที่ผ่านความร้อนได้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาลไม้จากปฏิกิริยา caramellization ขึ้นมาในระหว่างการอบจึงมีผลให้ผลิตภัณฑ์สีน้ำตาลไหม้ดังกล่าวจะเป็นเพิ่มผลผลิตที่สกัดได้ (Ho, et al., ๒๐๐๗) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Teng and Feldheim (๒๐๐๐) ซึ่งศึกษาการอบข้าวที่มี
เชื้อรา *M. purpureus* ต่อการผลิตสารสี เหลืองและสีส้ม (anka pigments) จากการหมักข้าวที่อุณหภูมิ ๓๐°C เป็นเวลา ๑๔ วัน พบว่า การทำแห้งแบบFreeze drying (-๖๐°C เวลา ๒๔ ชั่วโมง) ทำให้ผลผลิตสารสีสูงกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๒๔ ชั่วโมง และ ๑๐๕°C เวลา ๕ ชั่วโมง เนื่องจากความร้อนที่สูงกว่าการทำแห้งแบบ Freeze drying ความร้อนจะไปทำลายให้สารสีไม่คงตัวและเสื่อมสลายได้จึงทำให้ผลผลิตที่ได้น้อยกว่า

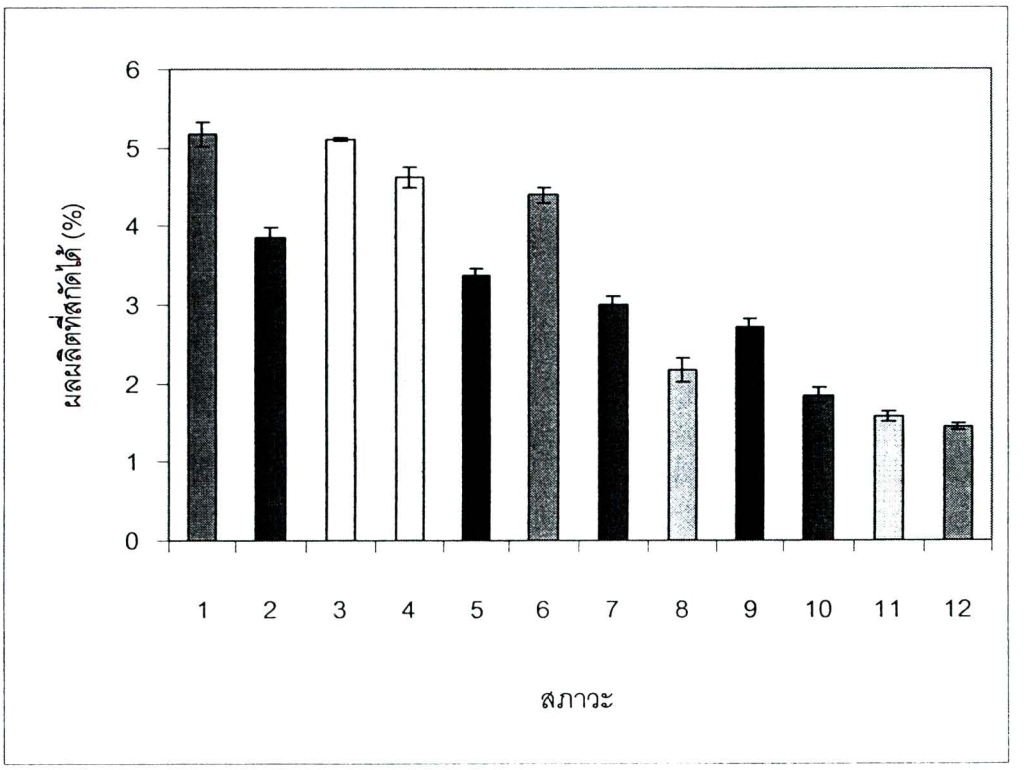
เมื่อเปรียบเทียบการใช้สารสกัดคนละชนิดกันที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่า ที่อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๑ คือ ใช้เอทานอล ๙๕ % : น้ำ (๒:๑) เป็นตัวสกัด สามารถสกัดให้ได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ ๕.๑๗ % ซึ่งสูงกว่าในสภาวะอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq$๐.๐๕) (ภาพ ๑๓) ในขณะที่ตัวสกัดที่สามารถสกัดผลผลิตสกัดออกมาได้รองลงมาจากสภาวะที่ ๑ คือ สภาวะที่ ๔, ๗ และ ๑๐ คือใช้เอทานอล ๙๕ % : น้ำ (๑ : ๑), น้ำ และ เอทานอล ๙๕ % เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๔.๖๒, ๓.๐๐ และ ๑.๘๕ % ตามลำดับ

ที่อุณหภูมิ ๗๐°C เวลา ๒๐ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๓ คือ ใช้ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒:๑) เป็นตัวสกัด พบว่าสามารถสกัดผลผลิตที่สกัดได้สูงสุดเท่ากับ ๕.๑๑ % ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P >$๐.๐๕) (ภาพ ๑๓) กับผลผลิตที่สกัดได้ ในสภาวะที่ ๑ (อุณหภูมิในการอบปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus* ที่ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง และเอทานอล ๙๕ % : น้ำ (๒:๑) เป็นตัวสกัด) และ ตัวสกัดที่สามารถสกัดผลผลิตได้รองลงมาจากสภาวะที่ ๓ คือ ๖, ๙ และ ๑๒ คือ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑), น้ำ และ เอทานอล ๙๕ % เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๔.๔๐, ๒.๗๒ และ ๑.๔๕ % ตามลำดับ (ภาพ ๑๓)

ที่อุณหภูมิ ๖๐°C เวลา ๒๔ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๒ คือ ใช้ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒:๑) เป็นตัวสกัด พบว่าสามารถสกัดผลผลิตที่ได้สูงสุด เท่ากับ ๓.๘๖ % ซึ่งผลผลิตที่สกัดออกมาได้มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ตัวทำละลายที่สามารถสกัดผลผลิตได้รองลงมาจากสภาวะที่ ๒ คือ ๕,

๘ และ ๑๑ คือใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑), น้ำ และ เอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๓.๓๘, ๒.๑๗ และ ๑.๕๐ % ตามลำดับ (ภาพ ๑๓)

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลผลิตสารสี คือ สภาวะที่ ๑ คือ การใช้อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมงสำหรับอบปลายข้าวที่มีเชื้อรา *M. purpureus* และ ใช้ เอทานอล ๙๕ % : น้ำ (๒:๑) เป็นตัวสกัด เนื่องจากผลผลิตสารสีที่ได้มีปริมาณสูงสุด การใช้ที่อุณหภูมิดังกล่าวในการอบปลายข้าวที่มีเชื้อราดังกล่าวทำให้คงสารสีไม่ให้เกิดการสูญเสียเนื่องจากความร้อน เพราะเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิอื่น อีกทั้งตัวสกัดที่นำมาใช้มีสภาพความเป็นขั้วที่เหมาะสมกับสารสีเนื่องจาก โครงสร้างทางเคมีและองค์ประกอบทางเคมีของสารสีของเชื้อรา *Monascus* เป็นองค์ประกอบแบบ azaphilones ซึ่งประกอบด้วยวงแหวน ๓ วง โดยวงแหวนที่อยู่ตรงกลาง cycloalkenes ซึ่งเป็นสารประกอบ hydrocarbon ที่ไม่มีขั้วและวงแหวนที่อยู่ด้านข้างอีก ๒ วงซึ่งมีขั้วเล็กน้อยดังจะเห็นได้จากการที่มีอะตอมของ N และ O ในโครงสร้างด้วย (Galaup, et al., ๒๐๐๕) ดังนั้นในโครงสร้างของสารสี *Monascus* จึงมีสภาพความเป็นขั้วเล็กน้อย โดยสอดคล้องกับผลผลิตที่สกัดได้มากที่สุดจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วอยู่เล็กน้อย คือเอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้ตัวสกัดที่มีความเป็นขั้วเพิ่มมากขึ้นคือ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) ก็จะทำให้ผลผลิตที่สกัดได้ลดลง เนื่องจากตัวสกัดมีความเป็นขั้วมากกว่าความเป็นขั้วที่เหมาะสมสำหรับการสกัด ดังนั้นความแตกต่างของความเป็นขั้วของตัวทำละลายเป็นผลให้ผลผลิตที่สกัดได้มีปริมาณที่แตกต่างกัน (Krygier, Sosulski, and Hogge, ๑๙๘๒) สอดคล้องกับการทดลองของ Broder and Koehler (๑๙๘๐) พบว่า การสกัดสีโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วเล็กน้อยก็จะทำให้ละลายสารสีจากเส้นใยได้ดีขึ้น เช่น สีจะละลายในเมทานอลที่มีความเป็นขั้วมากกว่าในแอลกอฮอล์ที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่า อีกทั้งยังมีการทดลองที่ใช้น้ำเป็นตัวสกัดสารสีของ Lee, Yang and Mau (๒๐๐๘) พบว่าผลผลิตของสารสีข้าวแดงที่ผลิตจากถั่วเหลืองโดยเชื้อรา ๒ สายพันธุ์ คือ *M. purpureus* MFS-๓๑๔๙๙ และ MFS-๓๑๕๒๗ และใช้น้ำร้อน และน้ำเย็นเป็นตัวสกัด โดยน้ำร้อนสกัดผลผลิตได้ (๓๐.๒-๓๙.๐ g/๑๐๐g) มากกว่าน้ำเย็น (๒๕.๗-๓๙.๖ g/๑๐๐g) อีกทั้งมีการทดลองของ Farhoosh , Golmovahhed and Khodaparast (๒๐๐๗) ศึกษาการสกัดผลผลิต จากใบชาเขียว ใบชาแก่ และ ของเสียจากชาดำ โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดแตกต่างกันคือ ethyl acetate, hot water และ methanol พบว่า การใช้ hot water เป็นตัวทำละลายที่สามารสกัดผลผลิตได้สูงสุดและใบชาเขียวสามารถสกัดผลผลิตออกมาได้สูงสุด เนื่องจากความแตกต่างกันของ affinities ของตัวทำละลาย เช่น ความเป็นขั้วของตัวทำละลาย และอุณหภูมิที่ใช้สกัด methanol และ ethyl acetate ที่มีความเป็นขั้วต่ำทำให้ไม่สามารถสกัด catechins ที่มีสภาพความเป็นขั้วที่สูงออกมาได้ และ catechins ยังเป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีอยู่ในใบชา และปริมาณ catechins จะลดลงเมื่ออายุมากขึ้นซึ่งจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของใบในระหว่างการเจริญเติบโตของพืช (Taiz and Zeiger, ๒๐๐๑)



ภาพ ๑๓ ผลผลิตของสารสีที่สกัดได้ของปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่อุณหภูมิ ระยะเวลาในการอบและตัวสกัดที่แตกต่างกัน

หมายเหตุ: ๑ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๒ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๓ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๔ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และ เอทานอล๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๕ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๖ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๗ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๘ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๙ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๑๐ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และเอทานอล๙๕ %เป็นตัวสกัด
๑๑ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และเอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด
๑๒ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และเอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด

๓. ปริมาณสารสีที่สกัดได้

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสีที่สกัดได้ โดยอบปลายข้าวที่มีเชื้อรา *M. purpureus* ที่อุณหภูมิ ระยะเวลาในการอบแห้ง และ ตัวสกัดที่แตกต่างกัน ได้ผลการทดลองดังนี้

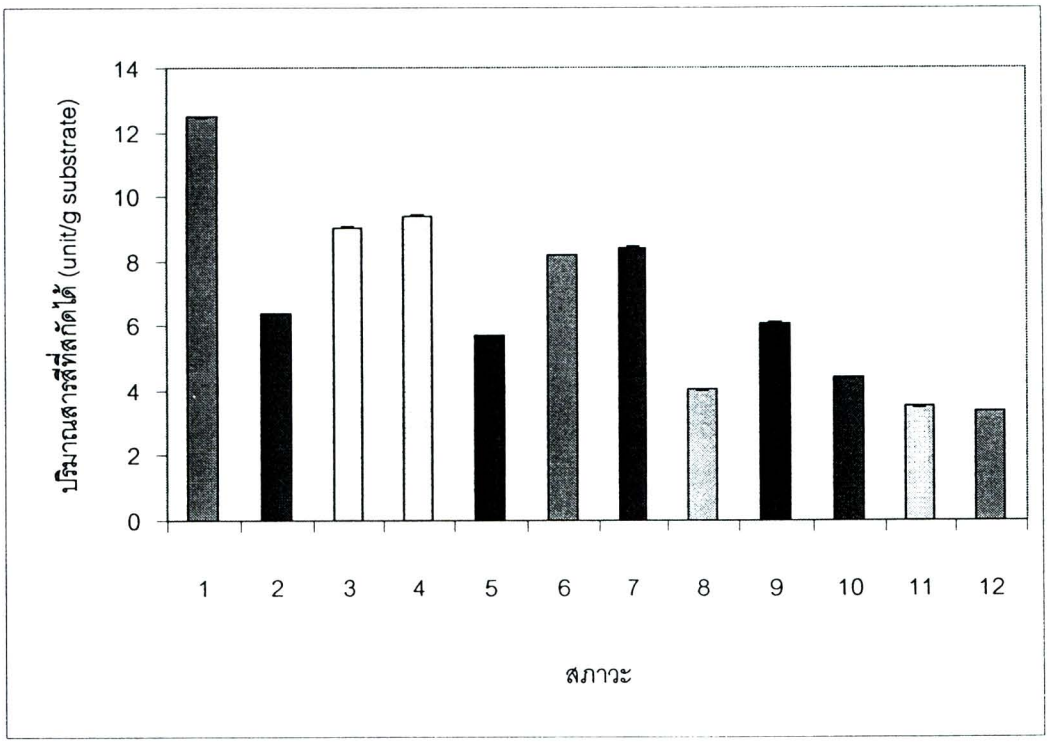
เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิ ระยะเวลาที่แตกต่างกันที่ใช้ในการอบปลายข้าวของตัวสกัดชนิดเดียวกัน พบว่าที่อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง ในการอบปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus* ทำให้ปริมาณสารสีที่สกัดได้สูงกว่าเมื่ออบแห้งที่อุณหภูมิ ๗๐°C เวลา ๒๐ ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ ๖๐°C เวลา ๒๔ ชั่วโมง สามารถสกัดสารสีได้ปริมาณน้อยที่สุด เนื่องจาก อุณหภูมิสูงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การคงตัวของสีลดลง (Fabre, et al., ๑๙๙๓) ซึ่งสอดคล้องกลับผลผลิตที่สกัดได้โดยเมื่อการอบปลายข้าว

เมื่อเปรียบเทียบตัวสกัดที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่าที่อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๑ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒:๑) เป็นตัวสกัดสามารถสกัดสารสีได้ปริมาณสารสีสูงสุด เท่ากับ ๑๒.๔๘ unit/g substrate ซึ่งสูงกว่าในสภาวะอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในขณะที่ตัวสกัดที่ใช้ในการสกัดสารสีได้รองลงมาจากสภาวะที่ ๑ คือ สภาวะที่ ๔ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด, สภาวะที่ ๗ ใช้น้ำ เป็นตัวสกัด และ สภาวะที่๑๐ ใช้เอทานอล ๙๕ % เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๙.๔๑, ๘.๔๒ และ ๔.๓๙ unit/g substrate ตามลำดับ

ที่อุณหภูมิ ๗๐°C เวลา ๒๐ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๓ คือ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒:๑) เป็นตัวสกัด พบว่าปริมาณสารสีที่สกัดออกได้มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ คือ ๙.๐๔ unit/g substrate ในขณะที่ตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารสีได้รองลงมาจากสภาวะที่ ๓ คือ สภาวะที่ ๖ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด, สภาวะที่ ๙ ใช้น้ำเป็นตัวสกัด และ สภาวะที่ ๑๒ ใช้ เอทานอล ๙๕ % เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๙.๐๔, ๘.๒๐, ๖.๐๙ และ ๓.๓๗ unit/g substrate ตามลำดับ

ที่อุณหภูมิ ๖๐°C เวลา ๒๔ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๒ คือ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒:๑) เป็นตัวสกัด พบว่าปริมาณสารสีที่สกัดออกมาได้มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ เท่ากับ ๖.๓๗ unit/g substrate ในขณะที่ตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารสีได้รองลงมาจากสภาวะที่ ๒ คือ สภาวะที่ ๕ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด, สภาวะที่ ๘ ใช้น้ำ เป็นตัวสกัด และสภาวะที่ ๑๑ ใช้เอทานอล ๙๕ % เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๕.๗๑, ๔.๐๒ และ ๓.๕๐ unit/g substrate ตามลำดับ (ภาพ ๑๔)

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารสีให้ได้ปริมาณสารสีสูงสุด คือ สภาวะที่ ๑ คือ การใช้อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมงสำหรับอบปลายข้าวที่มีเชื้อรา *M. purpureus* และ ใช้ เอทานอล ๙๕ % : น้ำ (๒:๑) เป็นตัวสกัด เนื่องจาก อุณหภูมิที่ใช้เป็นอุณหภูมิต่ำ และตัวสกัดที่ใช้มีความเป็นขั้วที่เหมาะสมจึงทำให้สามารถสกัดสารสีให้ได้ปริมาณสารสีสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ผลผลิตสารสีที่สกัดได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Carvalho, et al. (๒๐๐๕) ซึ่งศึกษาความคงตัวของสารสี โดยการสกัดสารสีโดยใช้ เอทานอล ๙๕ % โดยนำสารสีที่สกัดได้ไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ ๐, ๓๒, ๔๐, ๖๐ และ ๑๐๐°C เป็นเวลา ๒๕ ชั่วโมง พบว่า การบ่มสารสีที่ อุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ความคงตัวของสีลดลง และ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มที่ ๖๐°C จะทำให้สารสีเริ่มลดลงอย่างชัดเจน



ภาพ ๑๔ ปริมาณสารสีที่สกัดได้ของปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่อุณหภูมิ ระยะเวลาในการอบและตัวสกัดที่แตกต่างกัน

หมายเหตุ: ๑ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๒ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๓ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๔ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และ เอทานอล๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๕ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๖ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๗ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๘ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๙ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๑๐ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และเอทานอล๙๕ %เป็นตัวสกัด
๑๑ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และเอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด
๑๒ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และเอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด

๔.การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน

จากการทดลอง อุณหภูมิ ระยะเวลาในการอบแห้ง และ ตัวสกัดที่แตกต่างกันมีผลทำให้สารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml ประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกริยาเปอร์ออกซิเดชันแตกต่างกัน ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิ ระยะเวลาที่แตกต่างกันของตัวสกัดชนิดเดียวกัน พบว่า ที่อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสูงสุด และรองลงมา คือ ๖๐°C เวลา ๒๔ ชั่วโมง และต่ำที่สุด คือ ๗๐°C เวลา ๒๐ ชั่วโมง เนื่องจาก การอบแห้งปลายข้าวที่อุณหภูมิต่ำจะสามารถคงประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชัน เช่น Monacolin K และ GABA ไว้ได้ และ เมื่ออบปลายข้าวที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้สารดังกล่าวเกิดการสูญเสียเนื่องจากความร้อน จึงทำให้ประสิทธิภาพลดลง

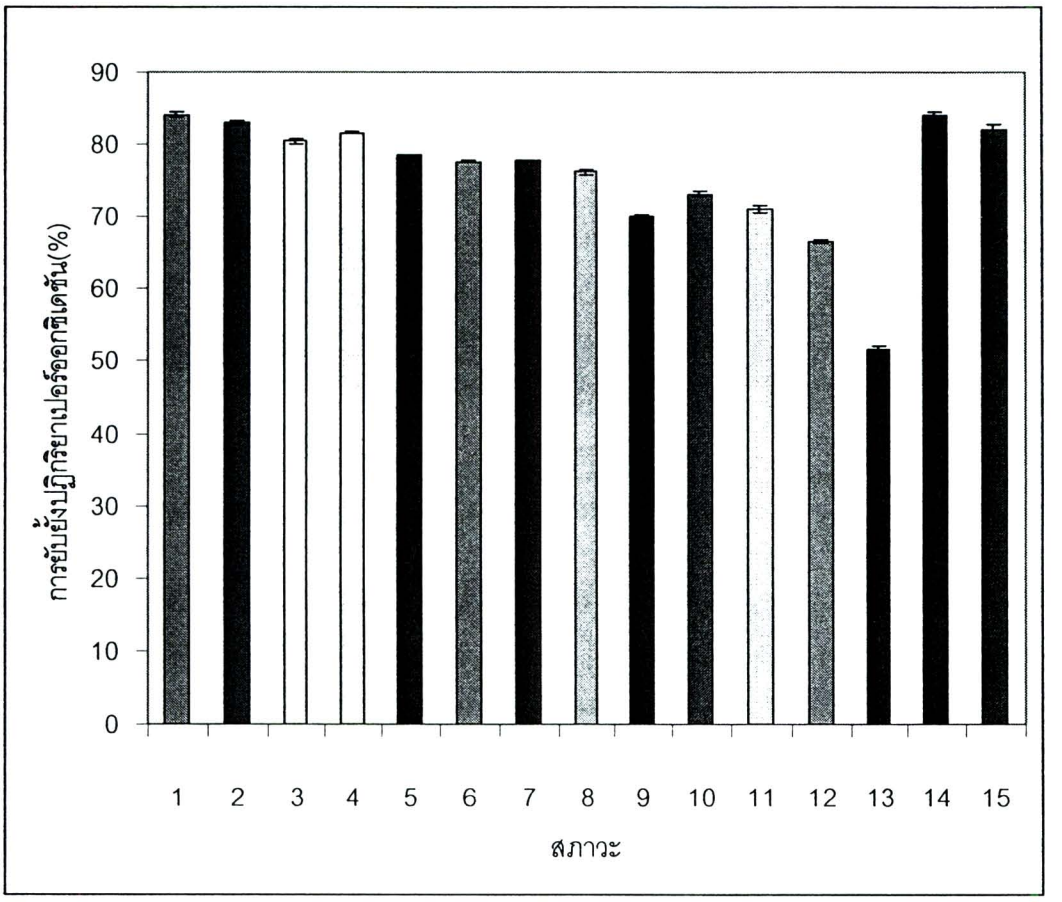
เมื่อเปรียบเทียบตัวสกัดที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่า ที่อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๑ คือ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสูงสุด เท่ากับ ๘๔.๑๔ % ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสภาวะอื่น ($P \leq$๐.๐๕) (ภาพ ๑๕) การยับยั้งเปอร์ออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพรองลงมาจากสภาวะที่ ๑ คือ สภาวะที่ ๔ ใช้ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑), สภาวะที่ ๗ ใช้ น้ำ เป็นตัวสกัด และ สภาวะที่ ๑๐ ใช้ เอทานอล ๙๕ % เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๘๑.๕๔, ๗๗.๖๖ และ ๗๓.๑๕ % ตามลำดับ

ที่อุณหภูมิ ๖๐°C เวลา ๒๔ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๒ คือ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน เท่ากับ ๘๓.๑๑ % การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันรองลงมาจากสภาวะที่ ๒ คือ สภาวะที่ ๕ ใช้เอทานอล ๙๕ %น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด, สภาวะที่ ๘ ใช้ น้ำ เป็นตัวสกัด และ สภาวะที่ ๑๑ ใช้ เอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๗๘.๔๓, ๗๖.๑๘ และ ๗๑.๐๙ % ตามลำดับ

ที่อุณหภูมิ ๗๐°C เวลา ๒๐ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๓ คือ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน เท่ากับ ๘๐.๔๒ % การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันรองลงมาจากสภาวะที่ ๓ คือ สภาวะที่ ๖ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด,สภาวะที่ ๙ ใช้น้ำ เป็นตัวสกัด และสภาวะที่ ๑๒ ใช้ เอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๗๗.๕๙, ๗๐.๑๑ และ ๖๖.๕๓ % ตามลำดับ ซึ่งจะสอดคล้องกับการวิเคราะห์ ผลผลิตที่สกัดได้ และปริมาณสารสีที่สกัด ในข้อ ๒ และ ๓ ตามลำดับ และ การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันในสภาวะที่ ๖ (ที่อุณหภูมิ ๗๐°C เวลา ๒๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด) และ ๗ (ที่อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง และใช้น้ำเป็นตัวสกัด) โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P >$๐.๐๕) (ภาพ ๑๕)

สภาวะที่เหมาะสมที่สามารถสกัดสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันคือ อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง และ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด โดยมีประสิทธิภาพสูงที่สุด เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการอบนั้นเป็นอุณหภูมิต่ำ อีกทั้งตัวสกัดนั้นมีสภาวะความเป็นขั้วเล็กน้อยเหมือนกับสภาพความเป็นขั้วของสารต้านออกซิเดชันที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Monascus* คือ Monacolin K และ GABA ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ซึ่งสามารถละลายในตัวทำละลายดังกล่าวได้ดีจึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันได้สูงกว่าที่อุณหภูมิอบแห้ง และ ตัวทำละลายชนิดอื่น (Galaup, et al., ๒๐๐๕) จึงทำให้สารสกัดมีประสิทธิภาพไปจับกับไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) ดังนั้นจึงสามารถไป

ลดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน อีกทั้งยังมีรายงานว่าสารดังกล่าวมีความสามารถไปจับกับโลหะ (Wang and Wixon, ๑๙๙๙) จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพที่สูง และเมื่อนำสารสกัดในสภาวะที่ ๑ (๘๔.๑๔ %) มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันกับ วิตามินซี (๕๑.๖๗ %), บีเอชเอ (๘๔.๐๐ %) และวิตามินอี (๘๒ %) จะเห็นได้ว่าสารสกัดในสภาวะที่ ๑ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสูงกว่าสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ดังกล่าว และ Lee, Yang, and Mau (๒๐๐๘) ได้ทดสอบประสิทธิการยับยั้งปฏิกริยาเปอร์ออกซิเดชัน ของสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ บีเอชเอ วิตามิน อี และวิตามิน ซี พบว่า บีเอชเอ วิตามินอี ที่ความเข้มข้น ๐.๐๑ mg/ml มีประสิทธิภาพการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน เท่ากับ ๘๘.๔ และ ๘๗.๔ % และ วิตามิน ซี ที่ความเข้มข้น ๒๐ mg/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันเท่ากับ ๖๔ % มีการทดลองของ Lee, Yang, and Mau (๒๐๐๘) ซึ่งศึกษาการสกัดสารต้านออกซิเดชัน จากถั่วเหลืองที่ไม่หมัก และ หมักด้วยเชื้อรา *M. purpureus* โดยใช้น้ำร้อนและน้ำเย็นเป็นตัวสกัด พบว่า สารสกัดที่ได้จากน้ำร้อนที่ความเข้มข้น ๕ mg/ml สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันอยู่ในช่วง ๕๔.๓๐ – ๗๐.๔% ในขณะที่สารสกัดที่ได้จากน้ำเย็นมีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง ๖๑.๔ – ๗๐.๕ % เนื่องจากว่าความร้อนจากน้ำร้อนจะทำลายสารต้านออกซิเดชัน จึงทำให้ไม่คงตัวและเสื่อมสลายไปได้มีผลให้ประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากน้ำร้อนต่ำกว่าน้ำเย็น ยังมีการรายงานของ Choi, Jeong, and Lee (๒๐๐๗) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของ เมล็ดพืชชนิดต่างๆ โดยใช้เมทานอลเป็นตัวสกัด พบว่า สารสกัดจากข้าวฟ่างสีแดง และ ข้าวดำ ที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสูงกว่า เมล็ดพืชที่มีสารสีน้อยกว่า และ Duan, et al. (๒๐๐๗) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของ anthocyanin จากเปลือกลิ้นจี่ พบว่า ตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติม anthocyanin มีค่าการดูดกลืนแสงของนั้น เท่ากับ ๓.๓๖ ในขณะที่ตัวอย่างที่มีการเติมสารสกัด Anthocyanin มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ ๐.๘๖๗ จะเห็นได้ว่าสารสีจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันได้ เนื่องจาก Anthocyanin สามารถจับกับไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) ในปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันในระบบของกรดลิโนเลอิกได้



ภาพ ๑๕ การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่อุณหภูมิ ระยะเวลาในการอบและตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

หมายเหตุ: ๑ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๒ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๓ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๔ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และ เอทานอล๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๕ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๖ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๗ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๘ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๙ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๑๐ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และเอทานอล๙๕ %เป็นตัวสกัด ๑๓ = วิตามิน ซี
๑๑ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และเอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด ๑๔ = บีเอชเอ
๑๒ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และเอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด ๑๕ = วิตามิน อี

๕.กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH

จากการทดลอง อุณหภูมิ ระยะเวลาในการอบแห้ง และ ตัวสกัดที่แตกต่างกันมีผลทำให้ประสิทธิภาพของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml มีกิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH มีความแตกต่างกัน ได้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิ ระยะเวลาในการอบแห้งของตัวสกัดชนิดเดียวกัน พบว่า ที่อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงสุด และ รองลงมา คือ ๖๐°C เวลา ๒๔ ชั่วโมง และต่ำที่สุด คือ ๗๐°C เวลา ๒๐ ชั่วโมง โดยให้ผลสอดคล้องกับการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันในข้อ ๔

เมื่อเปรียบเทียบตัวสกัดที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่า ที่อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๑ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด มีกิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงสุด เท่ากับ ๙๐.๓๘ % ซึ่งแตกต่างกับสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ภาพ ๑๖) และกิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่มีประสิทธิภาพรองลงมาจากสภาวะที่ ๑ คือ สภาวะที่ ๔ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด, สภาวะที่ ๗ ใช้น้ำ เป็นตัวสกัด และ สภาวะที่ ๑๐ ใช้เอทานอล ๙๕ % เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๘๐.๓๔, ๗๘.๕๒ และ ๗๔.๑๗ % ตามลำดับ

ที่อุณหภูมิ ๖๐°C เวลา ๒๔ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๒ คือ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด มีกิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH เท่ากับ ๘๕.๕๗ % และ กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH รองลงมาจากสภาวะที่ ๒ คือ สภาวะที่ ๕ ใช้เอทานอล ๙๕ % : น้ำ (๑:๑) เป็นตัวสกัด, สภาวะที่ ๕ ใช้น้ำเป็นตัวสกัด และสภาวะที่ ๑๑ ใช้เอทานอล ๙๕ % เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๗๓.๘๓, ๗๒.๗๓ และ ๗๑.๑๗ % ตามลำดับ

ที่อุณหภูมิ ๗๐°C เวลา ๒๐ ชั่วโมง ในสภาวะที่ ๓ คือ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด มีกิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH เท่ากับ ๗๗.๔๖ % และกิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH รองลงมาจากสภาวะที่ ๓ คือในสภาวะที่ ๖ ใช้เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด, สภาวะที่ ๙ ใช้น้ำเป็นตัวสกัด และสภาวะที่ ๑๒ ใช้เอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด เท่ากับ ๗๓.๔๘, ๗๒.๐๕ และ ๗๑.๓๖ % ตามลำดับ

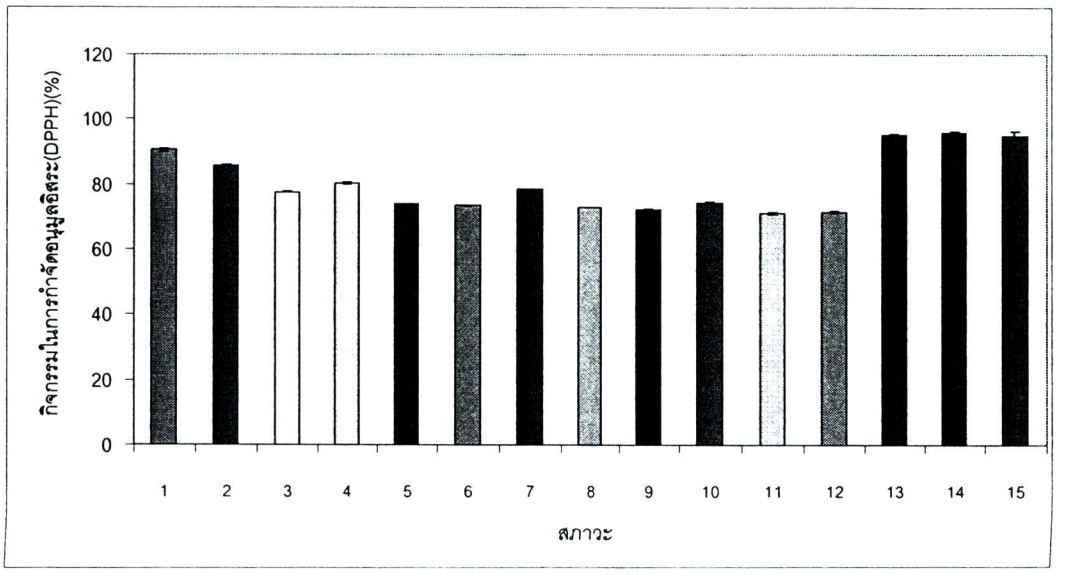
สภาวะที่เหมาะสมที่สามารถสกัดสารที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH คือ สภาวะที่ ๑ คือ อุณหภูมิ ๕๐°C เวลา ๓๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด ซึ่งจะสอดคล้องกับผลของผลผลิตที่สกัดได้ ปริมาณสารสีที่สกัดได้ และการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ในข้อ ๒, ๓ และ ๔ ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดในสภาวะที่ ๑ (๙๐.๓๘ %) มาเปรียบเทียบกับวิตามินซี (๙๕.๒๐%), บีเอชเอ (๙๕.๗๕ %) และวิตามินอี (๙๔.๙๒ %) จะเห็นได้ว่าสารสกัดในสภาวะที่ ๑ มีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูล DPPH° จะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน ๓ วง และหมู่ไนโตรในโครงสร้าง ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากำจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, ๒๕๕๐) ดังนั้นสารสกัดในสภาวะที่ ๑ อาจจะมีโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่กว่าสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ดังกล่าวทำให้มีประสิทธิภาพน้อยกว่า

ในงานวิจัยนี้อาจจะมีสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพในกำจัดอนุมูล DPPH ชนิดอื่นอีกนอกจาก Monacolin K และ GABA เนื่องจากมีการทดลองของ Tseng, et al. (๒๐๐๔) ซึ่งพบว่า

การนำเชื้อรา *M. purpureus* ไปปลูกลงบนลูกเดือย โดยบ่มเป็นระยะเวลา ๗ วัน ที่อุณหภูมิ ๒๕°C พบกรดอะมิโน L-tryptophan ปริมาณไม่มาก และในขณะที่ Herraiz, Galisteo, and Chamorro (๒๐๐๓) พบว่า L-tryptophan ที่มีอยู่ในปริมาณไม่มากสามารถทำปฏิกิริยากับ phenolic และ aldehydes ทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็น phenolic tetra hydro-□-carboline alkaloids ซึ่งจะมีประสิทธิภาพในการกำจัด ๒,๒-azinobis (๓-ethylbenzothiazoline)-๖-sulfonic acid (ABTS) ดังนั้น กรดอะมิโน L-tryptophan อาจจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH และ มีการรายงานว่า phenolic ที่เชื้อราชนิดนี้ผลิตขึ้นมาได้มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ McCue and Shetty (๒๐๐๕) รายงานว่าปริมาณ phenols ทั้งหมด ที่สูงทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นตัว reducing power และ สามารถกำจัด hydroxyl radicals อีกด้วย และ อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในการเป็นตัวจับกับโลหะ ferrous ions และคาดว่ามีประสิทธิภาพต่อต้านการกลายพันธ์ และ ต่อต้านมะเร็งด้วย (Lotito and Fraga, ๑๙๙๘; Ahmad and Mukhtar, ๑๙๙๙; Lee, Yang, and Mau, ๒๐๐๘) ซึ่งศึกษาการสกัดสารต้านออกซิเดชันจากถั่วเหลืองที่ไม่หมัก และ หมักด้วยเชื้อรา *M. purpureus* โดยใช้น้ำร้อนและน้ำเย็นเป็นตัวสกัด พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด ๕ mg/ml ของการสกัดด้วยน้ำร้อน ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง ๗๖.๘ – ๙๔.๗ % ในขณะที่ การสกัดด้วยน้ำเย็นซึ่งมี ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH อยู่ในช่วง ๓๖.๕ – ๘๙.๑ % โดยพบว่าการสกัดด้วยน้ำเย็นจะมีองค์ประกอบสารต้านออกซิเดชัน อยู่ในช่วง ๗.๙๓ – ๑๐.๘ mg/g ซึ่งมากกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนจะมีองค์ประกอบสารต้านออกซิเดชันอยู่ในช่วง ๕.๘๒ – ๘.๕๐ mg/g เนื่องจากความร้อนอาจจะทำลายองค์ประกอบให้ปริมาณสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำร้อนลดลงได้ แต่สารสกัดมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล DPPH เนื่องจากความร้อนอาจจะทำให้โครงสร้างใหญ่กลายเป็นกลายเป็นโครงสร้างเล็ก โดยโครงสร้างที่เล็กนี้อาจจะมีประสิทธิภาพในการให้ไฮโดรเจนกับอนุมูลง่ายกว่าจึง ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ดีกว่า

๖.สรุป

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสี และ คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ที่ผลิตจาก *Monascus* บนปลายข้าว คือ สภาวะที่ ๑ โดยใช้อุณหภูมิในการอบปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus* ๕๐°C เป็นเวลา ๓๐ ชั่วโมง และเอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด เนื่องจาก มีผลผลิตที่สกัด และ ปริมาณสารสี สูงที่สุด อีกทั้งมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ทดสอบทั้ง ๒ วิธีโดยมีประสิทธิภาพสูงที่สุด

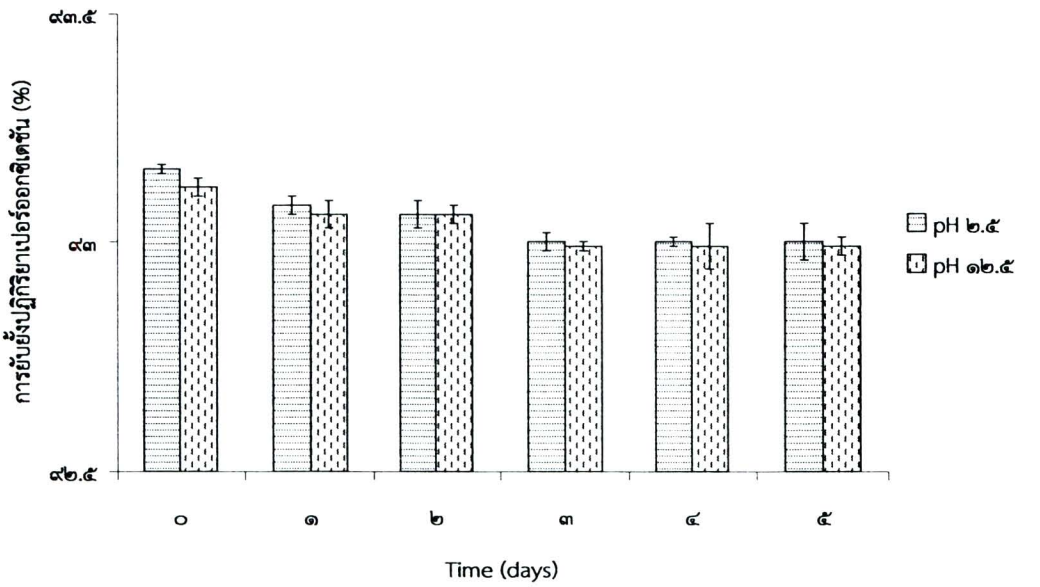


ภาพ ๑๖ กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีชื้อรา *M. purpureus* ที่อุณหภูมิ ระยะเวลาในการอบและตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

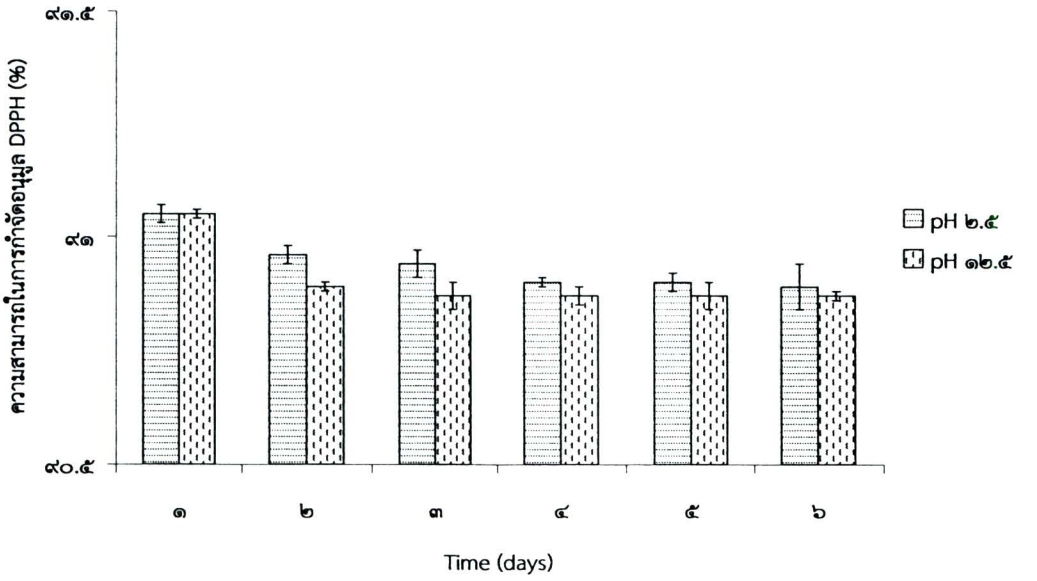
หมายเหตุ: ๑ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๒ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๓ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๒ : ๑) เป็นตัวสกัด
๔ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และ เอทานอล๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๕ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๖ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และ เอทานอล ๙๕ %: น้ำ (๑ : ๑) เป็นตัวสกัด
๗ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๘ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๙ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และน้ำเป็นตัวสกัด
๑๐ = ๕๐ °C ๓๐ ชั่วโมง และเอทานอล๙๕ %เป็นตัวสกัด ๑๓ = วิตามิน ซี
๑๑ = ๖๐ °C ๒๔ ชั่วโมง และเอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด ๑๔ = บีเอชเอ
๑๒ = ๗๐ °C ๒๐ ชั่วโมง และเอทานอล ๙๕ %เป็นตัวสกัด ๑๕ = วิตามิน อี

ศึกษาความคงตัวของสารสี และคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระ

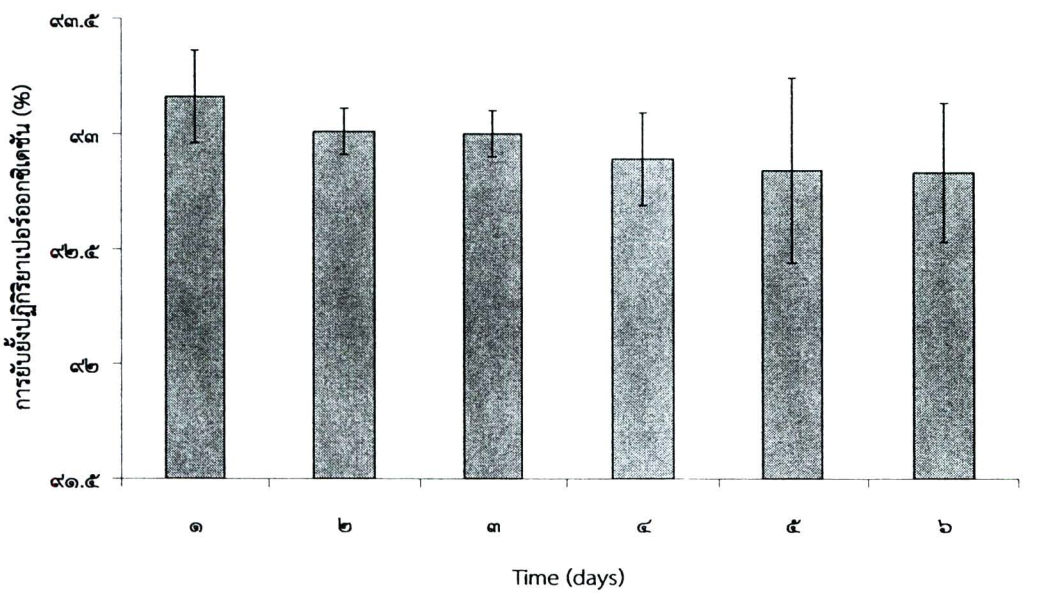
จากการศึกษาความคงตัวของสารสีที่ได้จากสภาวะการผลิตที่เหมาะสม พบว่า กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสีในสภาวะการศึกษาความเป็นกรด-ด่างต่างกัน และสภาวะการแช่แข็งนั้น กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยพบว่า เมื่อนำสารสีทดสอบความคงตัวที่ระดับ pH ๒.๕ นั้น คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระทั้งในเรื่องการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH จะลดลงเพียงเล็กน้อย (ภาพ ๑๗ และ ๑๘) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>๐.๐๕) เช่นเดียวกับการศึกษาความคงตัวของสารสีในสภาวะการแช่แข็ง (ภาพ ๑๙ และ ๒๐) ในขณะที่การศึกษาความคงตัวของสารสีในสภาวะที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียสและ การใช้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตรนั้น พบว่ามีผลต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เมื่อระยะเวลาในการให้ความร้อนและการฉายรังสีเพิ่มขึ้น คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระทั้งการยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระลงลดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤๐.๐๕) ภาพ ๒๑-๒๔



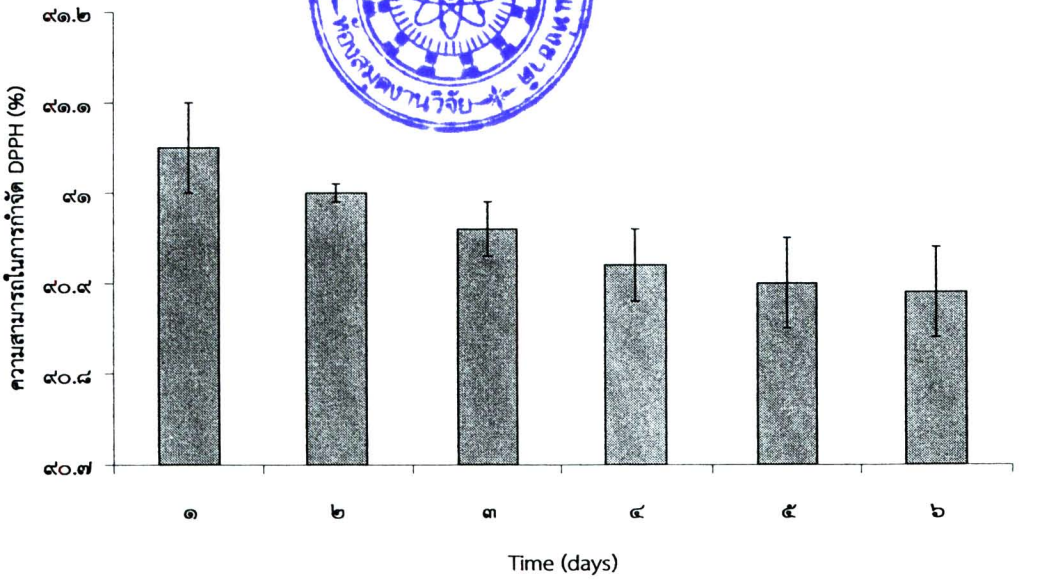
ภาพ ๑๗ การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่ pH แตกต่างกัน



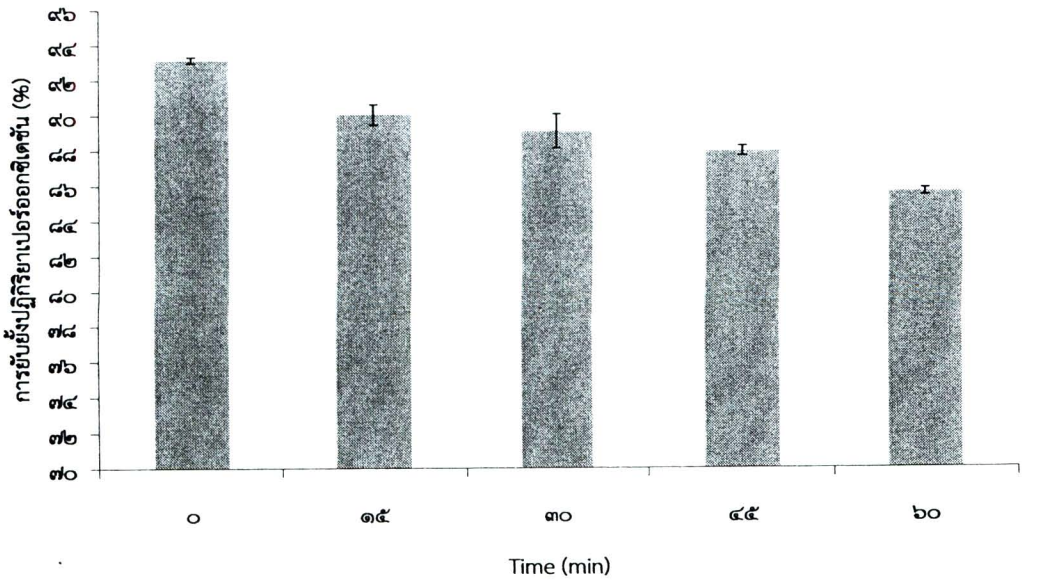
ภาพ ๑๘ กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *M. purpureus* ที่ pH แตกต่างกัน



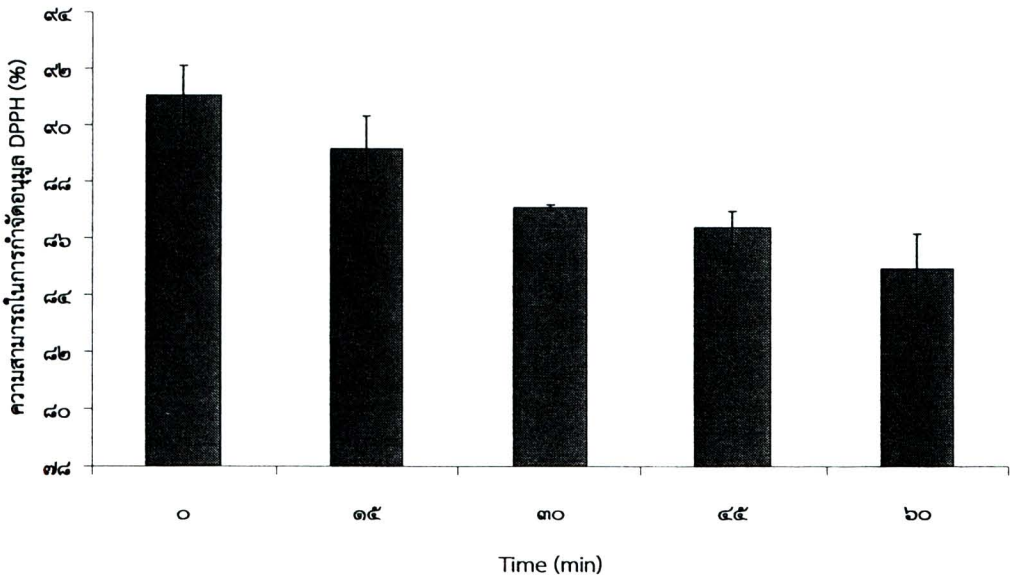
ภาพ ๑๙การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่อุณหภมิ -๑๘ องศาเซลเซียส



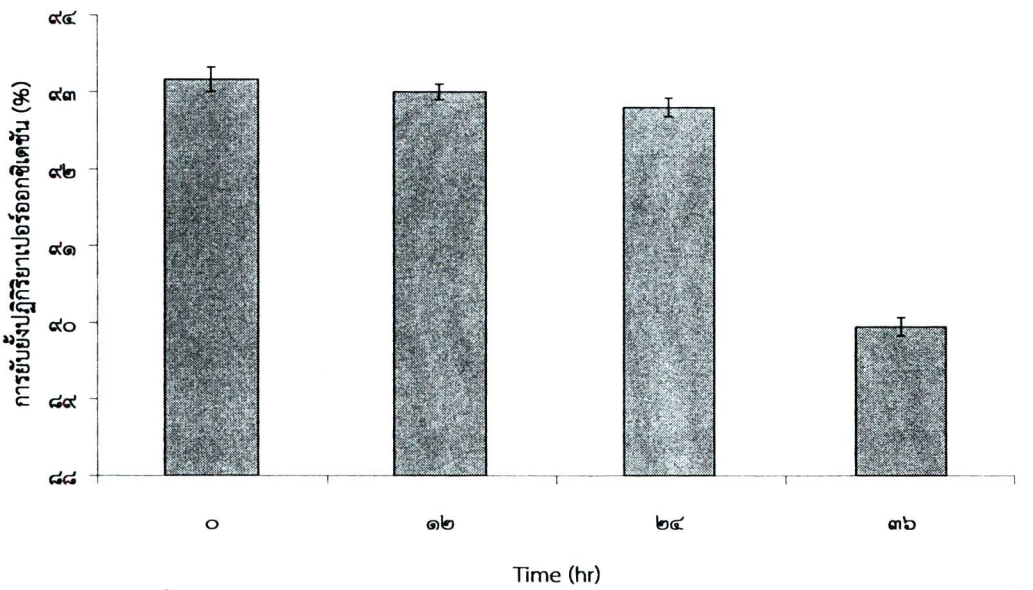
ภาพ ๒๐ กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *M. purpureus* ที่อุณหภูมิ -๑๘ องศาเซลเซียส



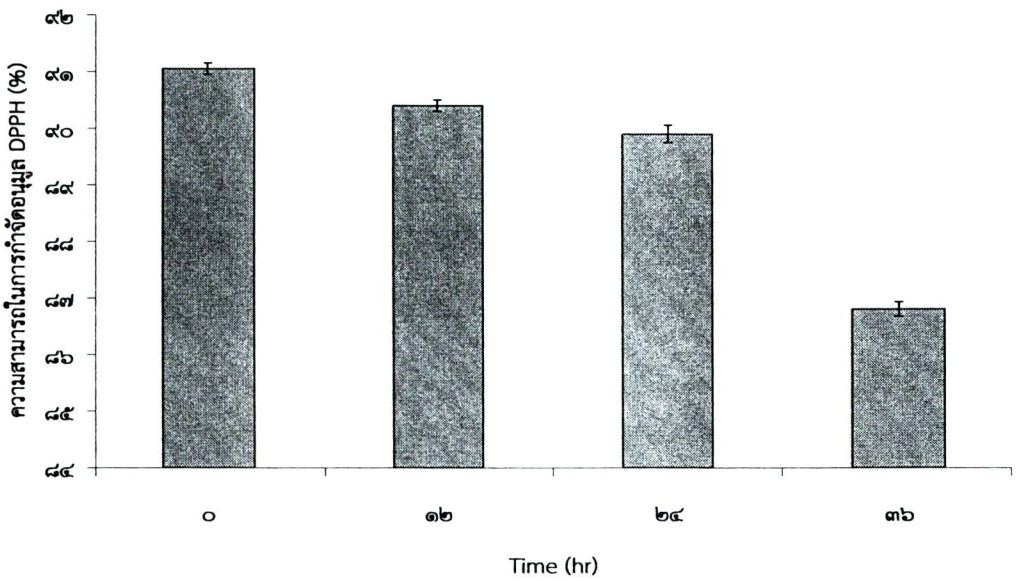
ภาพ ๒๑ การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส



ภาพ ๒๒ กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *M. purpureus* ที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส



ภาพ ๒๓ การยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *Monascus purpureus* ที่รังสี UV ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตร



ภาพ ๒๔ กิจกรรมในการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดที่ความเข้มข้น ๔ mg/ml จากปลายข้าวที่มีเชื้อรา *M. purpureus* ที่รังสี UV ความยาวคลื่น ๓๖๕ นาโนเมตร