

การศึกษาประสิทธิภาพของรา (*Monascus* sp. LC1) ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (*Aeromonas hydrophila* TISTR 1321)

A Study on the Efficiency of Red Rice Mold (*Monascus* sp. LC1) on the Inhibition of Growth (*Aeromonas hydrophila* TISTR 1321)

เสวานิต ขอบบุญ^{1*} นฤมล อัศวากेमณี² พัชรี หลุ่งหม่าน³

Saowanit Chobbun^{1*} Naruemon Usawakesmanee² Patcharee Lungmann³

¹*อาจารย์คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

¹A Lecturer, Faculty of Science and Technology, Songkhla Rajabhat University, Mueang, Songkhla 90000

²รองศาสตราจารย์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

²Associate Professor, Faculty of Agricultural Technology, Songkhla Rajabhat University, Mueang, Songkhla 90000

³อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

³A Lecturer, Faculty of Science and Technology, Suratthani Rajabhat University, Mueang, Suratthani 84100

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน : นายเลขไทรศักดิ์ 08-6957-0362 และ E-mail : chsaowanit@yahoo.com

บทคัดย่อ

ราข้าวแดง (*Monascus* sp. LC1) คัดแยกจากราข้าวแดงที่มีจำหน่ายในร้านยาสมุนไพรจีน อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) โดยวิธี streak plate technique และนำเชื้อที่บริสุทธิ์มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 ชั่วโมง พบร้าราข้าวแดง (*Monascus* sp. LC1) สร้างสารต้านจุลชีพ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 ได้ มีวงไสروبโคโลนีร้าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 19.36 ± 0.52 mm.

คำสำคัญ : ราข้าวแดง (*Monascus* sp. LC1) สารต้านจุลชีพ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321

Abstract

Red rice mold (*Monascus* sp. LC1) isolated from red rice available in Chinese medical herbs drugstore, Hat Yai, Songkhla Province. Pure culture was performed by streak plate technique on Potato Dextrose Agar (PDA). The efficiency of pure red rice mold on growth inhibition of *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 was determined. The result showed that *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 was inhibited by antimicrobial substances produced by *Monascus* sp. LC1. The inhibition zone formed surrounding the colony of *Monascus* sp. LC1 was 19.36 ± 0.52 mm. in diameter.

Keywords : red rice mold (*Monascus* sp. LC1), antimicrobial activity, *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321

บทนำ

ราข้าวแดง (*Monascus* spp.) เป็นราจัดอยู่ในคลาสแอลกอโนไซด์ ค้นพบโดย Van Tieghem (1884) (อ้างถึงใน Abdulaziz et al., 2006, pp.167-174) ในประเทศไทยมีการใช้ราข้าวแดงสำหรับผลิตข้าวแดง (ang-kak) มากกว่าพันปีเพื่อใช้เป็นสีผสมอาหาร และมีการใช้ราข้าวแดงผลิตอาหารหมักเครื่องดื่มมีแอลกอฮอล์ (Martinkova, & Patakova, 1999, pp.1481-1487, อ้างถึงใน Abdulaziz et al., 2006, pp.167-174) รวมทั้งใช้ในการแพทย์ ในรูปข้าวแดงเป็นเมล็ดข้าว ข้าวแดงผง แคปซูล และสารสกัดข้าวแดง ซึ่งมีจำหน่ายไปทั่วโลก (Focus Technology Co. Ltd., 2011, URL) ชนิดนี้ผลิตสารเมแทบอลิตทุติยภูมิหลายชนิด ได้แก่ รงค์วัตถุ ประกอบด้วย สารสีเหลือง (ankafavin และ monascin) สารสีเขียว (monascorubrin และ rubropunctatin) สารสีแดง (monascorubramine และ rubropuctamine) (Blanc et al., 1994, pp.862-865 ; Wong & Kochler, 1981, pp.589-592) เอนไซม์หลายชนิด เช่น กรูโคอะไมเลส (Lotong, & Suwanrit, 1990, pp.565-570 ; Yasuda et al., 1989, pp.247-249) และโปรตีอส (Tsai et al., 1978, pp.293-302) เป็นต้น สารลดコレสเตอรอล (antihypercholesterolemic agents) เช่น monacolin K (Wang et al., 2006, pp.812-818) และ mevinolin (Heber et al., 1999, pp.231-236) สารทำให้ความดันโลหิตต่ำ (hypotensive agent) เช่น γ -aminobutyric acid; GABA (Su et al., 2003, pp.394-399) สารแอนติออกซิเดนซ์ เช่น dimerumic acid และ 3-hydroxy-4-methoxy-benzoic acid และสารต้านจุลชีพชนิด monascidin A ซึ่งได้มีการรายงานครั้งแรกโดย Wong และ Bau ในปี ค.ศ.1977 เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer พบร่วมกับ monascidin A มีโครงสร้างเหมือนกับซิตรินิน (citrinin) สามารถยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus magaterium*, *Streptococcus lactis*, *Pseudomonas fluorescens* (Blanc et al., 1995, pp.291-294) และ *Staphylococcus aureus* (Fink-Gremmels et al., 1991, pp.329-331 อ้างโดย Erdogan & Azirak, 2005, pp.10-15) นอกจากนี้ *Monascus purpureus* ยังสร้าง

สาร cytotoxic azaphilones สามารถยับยั้ง human cancer cell line A549 ได้ (Li et al., 2010, pp.1958-1966)

Aeromonas hydrophila เป็นแบคทีเรียจัดอยู่ในวงศ์ Aeromonadaceae พบรด้วยไปในน้ำจืด น้ำเค็ม น้ำกร่อย และน้ำที่มีคลอรีนและไม่มีคลอรีน เชื้อนี้เป็นสาเหตุของการโรคในปลาและสัตว์ครึ่งบก ครึ่งน้ำ ซึ่งพบมากใน平原น้ำจืดและปลาสวยงาม นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรคท้องร่วง (gastroenteritis) กับมนุษย์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทดสอบประสิทธิภาพของรา *Monascus* sp. LC1 ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321

วิธีการวิจัย

1. การแยกและเตรียมราข้าวแดง (*Monascus* sp. LC1)

นำข้าวแดงที่จำหน่ายในร้านยาสมุนไพรจีน สำเภาหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 1 กรัม วางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ด้วยวิธี aseptic technique บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 4 วัน นำเชื้อที่ได้ไปแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate technique บนอาหาร PDA ทำการแยกชนิด โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีของ Cannon et al. (1995, pp.659-662.) นำเชื้อบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 4 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณและนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 ตามวิธีของ Wang (2004, pp.812-818.)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ *Monascus* sp. LC1 ต่อการยับยั้ง *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321

2.1 การเตรียมความชุ่มมาตรฐาน

เตรียมสารละลายที่มีความชุ่มมาตรฐาน McFarland standard No.05 โดยใช้ 1.175 เบอร์เซ็นต์ $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 0.5 ml. ผสมกับ H_2SO_4 1 เบอร์เซ็นต์ ปริมาตร 99.5 ml. (โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ, 2551, URL) นำไปวัดความชุ่มด้วย Spectrophotometer ให้ค่า OD₆₂₅ ระหว่าง 0.08-0.10 หรือมีจำนวนเชื้อประมาณ 1×10^8 - 2×10^8 cfu/ml เทียบ McFarland standard No.05 ไว้ในหลอดทดลองจุกเกลียวที่อุณหภูมิห้องในที่มืด (อายุไม่เกิน 6 เดือน) ก่อนใช้เทียบความชุ่ม ต้องเขย่าให้เข้ากันทุกครั้ง

2.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321

นำเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 ที่เจริญบนอาหาร Nutrient agar อายุ 24 ชั่วโมง มาเตรียมสารละลายด้วยวิธี Direct colony suspension method (DCS) ในสารละลาย normal saline solution (NSS) ที่ปราศจากเชื้อ ปรับความชุ่มให้เท่ากับมาตรฐาน McFarland standard No.0.5

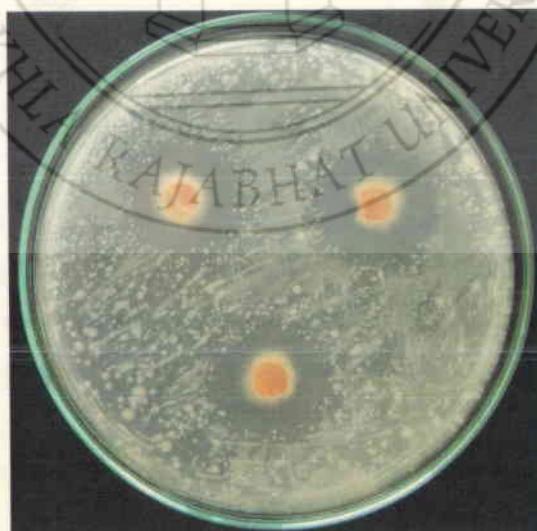
2.3 การทดสอบความสามารถของราข้าวแดงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 โดยวิธีของ Wang (2004, pp.812-818.)

นำสารแ xenobiotics ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยวิธี swab plate technique ด้วย cotton swab ที่ปราศจากเชื้อ ทิ้งไว้นาน 10

นาที จันกระทิ้งผิวน้ำอาหารแห้ง จากนั้นใช้ cork borer ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm. เจาะบนโคลนีของเชื้อร้า *Monascus* sp. LC1 ที่มีอายุ 4 วัน (ข้อ 1) ใช้ปากคีบปราศจากเชื้อ คีบชิ้น วุ้นวางบนอาหาร PDA ที่มีเชื้อ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 โดยวางชิ้นวุ้นให้เชื้อร้าคร่าลัง สัมผัสบนผิวน้ำอาหาร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างวงไสรอบโคลนีรา (clear zone) และบันทึกผล

ผลการวิจัยและวิจารณ์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของราข้าวแดง (*Monascus* sp. LC1) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 พบว่ามีวงไสรอบโคลนีรา *Monascus* sp. LC1 เส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาด 19.36 ± 0.52 mm. (รูปที่ 1) แสดงว่า รา *Monascus* sp. LC1 ผลิตสารต้านจุลชีพบนอาหาร PDA ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 ได้จากการวิจัยของ Wang และคณะ (2004, pp.6977-6982) ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงไสและปริมาณซิตรินินในอาหาร PDA ที่สร้างโดยรา *Monascus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Monascus* sp. KT, *M. ruber* BCRC 31538, *M. alka* M-13 และ *M. purpureus* BCRC 31615 เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* พบว่า *M. ruber* BCRC 31538 ผลิตซิตรินินปริมาณสูงที่สุด คือ 4.36 ± 0.14 ppm. บนอาหาร PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงไสรอบโคลนี *Bacillus subtilis* กว้าง 5.0 ± 0.1 เซนติเมตร และสายพันธุ์ผลิตซิตรินินรองลงมาคือ *M. alka* M-13, *M. purpureus* BCRC 31615 และ *Monascus* sp. KT ผลิตซิตรินินเท่ากับ 2.74 ± 0.13 , 1.08 ± 0.05 , 0.17 ± 0.02 ppm. ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงไสรอบโคลนี เท่ากับ 3.8 ± 0.2 , 2.9 ± 0.1 และ 2.4 ± 0.3 cm. ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้เป็นแนวทางที่จะนำสารต้านจุลชีพที่สร้างโดย *Monascus* sp. LC1 ไปใช้เป็นทดสอบสารเคมีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ในการควบคุมเชื้อ *Aeromonas hydrophila* สาเหตุการก่อโรคในปลาได้



รูปที่ 1 วงไสรอบโคลนีรา *Monascus* sp. LC1 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321

สรุป

รา *Monascus* sp. LC1 ผลิตสารต้านจุลชีพสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงไส้รอบโคลอโนีรา เฉลี่ยเท่ากับ 19.36 ± 0.52 mm. ซึ่งจากการศึกษาข้างต้น จึงมีแนวโน้มที่จะนำสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Monascus* sp. LC1 ไปใช้ยับยั้ง *Aeromonas hydrophila* เพื่อทดสอบการใช้สารเคมีได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2552 ที่ได้สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย และขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร

เอกสารอ้างอิง

- โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ.(2551). การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ. หน้า 2-4 สืบค้นวันที่ 29 เมษายน 2554, จาก <http://www.hospital.tu.ac.th/LABWEBSITE/Work%20Instruction/WI%20-%20202410%20-%20009.pdf>
- Abdulaziz, Q. M., Al-sarrani, & Moustafa, Y.M.El-Naggar. (2006). Application of Plackett-Burman factorial design to improve citrinin production in *Monascus ruber* batch cultures. *Botanical Studies*, 47, 167-174.
- Blanc,P. J. , Loret, M. O., & Goma G. (1995). Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotech. Letters*, 17(3), 291-294.
- Blanc, P. J., Loret, M.O., Santerre, A. T., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J. C., Laussac, J. P., & Goma, G. (1994). **Pigment of Monascus**. *J. Food Sci*, 59, 862-865.
- Cannon, P. F., Abdullah, S. K., & Abbas, B.A. (1995). Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to know species of the genus. *Mycological Research*, 99, 659-662.
- Fink-Gremmels, J., Dresel, J., & Leistner, L. (1991). Use of *Monascus* extracts as an alternative to nitrite in meat products. *Fleischwirtschaft*, 71, 329-331
- Focus Technology Co. Ltd. (2011). **Red yeast rice**. Retrieved April 29, 2011, from: http://www.made-in-china.com/products-search/hot-china-products/Red_Yeast_Rice.html.
- Heber, D., Yip, I., Ashley, J. M., Elashoff, R.W., & Go, V.L.W. (1999). Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am. J. Clin Nutr*, 69, 231-236.

- Li, J. J., Shang, X. Y., Li, L. L., Liu, M. T., Zheng, J. Q., & Jin, Z. L. (2010). New cytotoxic azaphilones from *Monascus purpureus*-fermented Rice (red yeast rice). **Molecules**, 15, 1958-1966.
- Lotong, N. & Suwanarit, P. (1990). Fermentation of ang-kak in plastic bags and regulation of pigmentation by initial moisture content. **J. Appl. Bacteriol.**, 68, 565-570.
- Martinkova, L. & Patakova, P. (1999). *Monascus*. In R.K.Robinson, C.A. Batt, & P.D. Patel (eds.), **Encyclopedia of food Microbiology** (pp.1481-1487). London : Academic Press.
- Su, Y. C., Wang, J.J., Lin, T. T., & Pan, T. M. (2003). Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus sp.* **Acta Microbiol. Sin.**, 40, 394-399.
- Tsai, M. S., Hseu, T. H., & Shen, Y. S. (1978). Purification and characterization of an acid protease from *Monascus kaoliang*. **Int. J. Pept. Protein Res.**, 12, 293-302.
- Van Tieghem, P. (1884). *Monascus*, genre nouveau de l'ordre des Ascomycetes. **Bull. Soc. Bot.**, 31, 226-231.
- Wang, J.J., Lee, C.L., & Pan, T.M. (2004). Modified mutation method for screening low citrinin-producing strains of *Monascus purpureus* on rice culture. **J. Agric. Food Chem.**, 52, 6977-6982.
- Wang, J. J., Pan, T. M., Shieh, M.J. & Hsu, C.C. (2006). Effect of red mold rice supplement on serum and meat cholesterol levels of broilers chicken. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 71, 812-818.
- Wong, H. C. & Bau, Y. Y. (1977). Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron and X-Ray-induced strains of *Monascus purpureus* Went. **Plant Physiology**, 60, 578-581.
- Wong, H. C. & Koehler, P. E. (1981). Production and isolation of and antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. **J. Food Sci.**, 46, 589-592.
- Yasuda, M., Kuwae, M.,& Matsushita, H. (1989). Purification and properties of two forms glucoamylase from *Monascus sp.* No. 3. **Agric. Biol. Chem.**, 53, 247-249.