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)

เสาวนิตย์ ชอบบุญ[1*] นฤมล อัศวเกศมณี[2] พัชรี หลุ่งหม่าน[3]

Saowanit Chobbun[1*] Naruemon Usawakesmanee[2] Patcharee Lungmann[3]

[1*]อาจารย์คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

[1*]A Lecturer, Faculty of Science and Technology, Songkhla Rajabaht University, Mueang, Songkhla 90000

[2]รองศาสตราจารย์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

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

[3]อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

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

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

บทคัดย่อ

ราข้าวแดง (*Monascus* sp. LC1) คัดแยกจากข้าวแดงที่มีจำหน่ายในร้านยาสมุนไพรจีน 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 พบว่าราข้าวแดง (*Monascus* sp. LC1) สร้างสารต้านจุลชีพ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 ได้ มีวงใสรอบโคโลนีราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 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 $\pm$ 0.52 mm. in diameter.

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

บทนำ

ราข้าวแดง (*Monascus* spp.) เป็นราจัดอยู่ในคลาสแอสโคไมซีส ค้นพบโดย Van Tieghem (1884) (อ้างถึงใน Abdulaziz et al., 2006, pp.167-174) ในประเทศจีนมีการใช้ราข้าวแดงสำหรับผลิตข้าวแดง (ang-kak) มานานกว่าพันปีเพื่อใช้เป็นสีผสมอาหาร และมีการใช้ราข้าวแดงผลิตอาหารหมัก เครื่องดื่มมีแอลกอฮอล์ (Martinkova, & Patakova, 1999, pp.1481-1487, อ้างถึงใน Abdulaziz et al., 2006, pp.167-174) รวมทั้งใช้ในทางการแพทย์ ในรูปข้าวแดงเป็นเมล็ดข้าว ข้าวแดงผง แคปซูล และสารสกัดข้าวแดง ซึ่งมีจำหน่ายไปทั่วโลก (Focus Technology Co. Ltd., 2011, URL) ราชนิดนี้ผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิหลายชนิด ได้แก่ รงควัตถุ ประกอบด้วย สารสีเหลือง (ankaflavin และ monascin) สารสีส้ม (monascorubrin และ rubropunctatin) สารสีแดง (monascorubramine และ rubropuctamine) (Blanc et al., 1994, pp.862-865 ; Wong & Kochler, 1981, pp.589-592) เอนไซม์หลายชนิด เช่น กลูโคอะไมเลส (Lotong, & Suwanrit, 1990, pp.565-570 ; Yasuda et al., 1989, pp.247-249) และโปรติเอส (Tsai et al., 1978, pp.293-302) เป็นต้น สารลดโคเลสเตอรอล (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) สารแอนติออกซิแดนซ์ เช่น dimerumic acid และ 3-hydoxy-4-methoxy-benzoic acid และสารต้านจุลชีพชนิด monascidin A ซึ่งได้มีการรายงานครั้งแรกโดย Wong และ Bau ในปี ค.ศ.1977 เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer พบว่า monascidin A มีโครงสร้างเหมือนกับซิตรินิน (citrinin) สามารถยับยั้งการเจริญของ *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 Erdogrul & 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 พบได้ทั่วไปในน้ำจืด น้ำเค็ม น้ำกร่อย และน้ำที่มีคลอรีนและไม่มีคลอรีน เชื้อนี้เป็นสาเหตุของการโรคในปลาและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ซึ่งพบมากในปลาน้ำจืดและปลาสวยงาม นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรคท้องร่วง (gastroenteritis) กับมนุษย์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทดสอบประสิทธิภาพของรา *Monascus* sp. LC1 ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321

วิธีการวิจัย

1. การแยกและเตรียมราข้าวแดง (*Monascus* sp. LC1)

นำข้าวแดงที่จำหน่ายในร้านยาสมุนไพรจีน อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 1 กรัม วางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ด้วยวิธี aseptic technique บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 4 วัน นำเชื้อที่ได้ไปแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate technique บนอาหาร PDA ทำการแยกชนิดโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีของ 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 การเตรียมความขุ่นมาตรฐาน

เตรียมสารละลายที่มีความขุ่นมาตรฐาน McFarland standard No.05 โดยใช้ 1.175 เปอร์เซ็นต์ $BaCl_2.2H_2O$ ปริมาตร 0.5 ml. ผสมกับ H_2SO_4 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 99.5 ml. (โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ, 2551, URL) นำไปวัดความขุ่นด้วย Spectrophotometer ให้ค่า OD_{625} ระหว่าง 0.08-0.10 หรือมีจำนวนเชื้อประมาณ $1x10^8$ -2 x 10^8 cfu/ml เก็บ McFarland standard No.05 ไว้ในหลอดทดลองจุกเกลียวที่อุณหภูมิห้องในที่มืด (อายุไม่เกิน 6 เดือน) ก่อนใช้เทียบความขุ่น 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 ปรับความขุ่นให้เท่ากับมาตรฐาน McFarland standard No.0.5

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

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

นาที จนกระทั่งผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้ cork borer ปราศจากเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm. เจาะบนโคโลนีของเชื้อรา *Monascus* sp. LC1 ที่มีอายุ 4 วัน (ข้อ 1) ใช้ปากคีบปราศจากเชื้อ คีบชิ้นวุ้นวางบนอาหาร PDA ที่มีเชื้อ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 โดยวางชิ้นวุ้นให้เชื้อราคว่ำลงสัมผัสบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างวงใสรอบโคโลนีรา (clear zone) และบันทึกผล

ผลการวิจัยและวิจารณ์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของราข้าวแดง (*Monascus* sp. LC1) ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 พบว่ามีวงใสรอบโคโลนีรา *Monascus* sp. LC1 เส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาด 19.36±0.52 mm. (รูปที่ 1) แสดงว่า รา *Monascus* sp. LC1 ผลิตสารต้านจุลชีพบนอาหาร PDA ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* TISTR 1321 ได้จากงานวิจัยของ Wang และคณะ (2004, pp.6977-6982) ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและปริมาณซิตรินินในอาหาร PDA ที่สร้างโดยรา *Monascus* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Monascus* sp. KT, *M. ruber* BCRC 31538, *M. anka* M-13 และ *M. purpureus* BCRC 31615 เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* พบว่า *M. ruber* BCRC 31538 ผลิตซิตรินินปริมาณสูงที่สุด คือ 4.36±0.14 ppm. บนอาหาร PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี *Bacillus subtilis* กว้าง 5.0±0.1 เซนติเมตร และสายพันธุ์ผลิตซิตรินินรองลงมาคือ *M. anka* 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 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี เท่ากับ 3.8±0.2, 2.9±0.1 และ 2.4±0.3 cm. ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้เป็นแนวทางที่จะนำสารต้านจุลชีพที่สร้างโดย *Monacus* sp. LC1 ไปใช้เป็นทดแทนสารเคมีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ในการควบคุมเชื้อ *Aeromonas hydrophila* สาเหตุการก่อโรคในปลาได้

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

สรุป

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

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2552 ที่ได้สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย และขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

เอกสารอ้างอิง

โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ.(2551). **การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ**. หน้า 2-4 สืบค้นวันที่ 29 เมษายน 2554, จาก http://www.hospital.tu.ac.th/LABWEBSITE/Work%20Instruction/WI%20-%202410%20-%20009.pdf

Abdulaziz, Q. M., Al-sarrani, & Moustafa, Y.M.El-Naggar. (2006). Application of Plackett-Burman facterial 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. Myycological 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 ϒ-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.