

<b>Thesis Title</b>	Preparation and Study on Red Yeast Rice Prepared from Glutinous Rice Using <i>Monascus purpureus</i> Isolated from Chinese Traditional Red Yeast Rice	
<b>Author</b>	Mrs. Em-on Chairote	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Biotechnology)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Griangsak Chairote	Member
	Assoc. Prof. Dr. Suganya Wongpornchai	Member

### ABSTRACT

A strain of *Monascus purpureus* CMU001 was isolated from locally available commercial Chinese red yeast rice (Ankak or Ang Khak) by surface sterile technique. The identity of the strain was then confirmed based on morphological and biochemical characteristics. Preparation of red yeast rice using isolated strain was carried out on various kinds of rice, especially, the most well known varieties of Thai glutinous rice such as Kor Kho 6, white glutinous rice (RD6), Purple glutinous rice (Kam) and Sanpatong 1, white glutinous rice (SPT1). The red rice products obtained were studied for the intensity of red pigment by measuring the absorbance of the red extracts at 500 nm. The results indicated that the most intense red pigment was present in RD6 at 3 weeks of cultivation. In order to study the effect of nutrient variation, soybean milk was added during cultivation as amino acid source. The highest intensity was achieved when RD6 used was only at 2 weeks of cultivation.

The supplement of 1 ml concentrated soybean milk gave the product with more intense red color.

The analysis for the presence and the content of monacolins, the cholesterol lowering compounds, were carried out using high performance liquid chromatography (HPLC). The presence of the monacolins was confirmed by the retention time of the reference compounds and LC-MS. The results were compared to those obtained from the Chinese red yeast rice and Thai non-glutinous rice (*Oryza sativa* L. cv. Mali105). The chromatograms show the presence 5 monacolins (monacolin K acid form (MKA), monacolin M acid form (MMA), monacolin K (MK), monacolin M (MM), dehydromonacolin K (DMK) and compactin (P1). A large peak of a compound with the molecular weight of 358 was also detected but could not be identified. The amounts of two important monacolins, compactin and monacolin K, were determined. It was found that the highest amounts of compactin and monacolin K were 21.98 and 33.79 mg/g respectively for fermented Thai rice variety *Oryza sativa* L. cv. RD6 without adding soybean milk.

The analysis for the presence of antioxidant activity in red yeast rice was carried out by studying antioxidant capacity and  $\beta$ -carotene bleaching method (BCB).

For the study on antioxidant activities of each kind of red yeast rice prepared, the ethanol extract from ground red yeast rice was used. The highest antioxidant activity was obtained in red yeast rice of 3 weeks old from SPT1 and RD6 with the addition of soybean milk. The antioxidant capacity and the  $IC_{50}$  of BCB methods were found to be 0.53 mg gallic acid equivalent (GAE) / ml and 0.09 mg/ml for RD6 and SPT1, respectively. This result is concurrent to the production of darker red pigments.

Study on the aroma compounds present in red yeast rice was carried out in order to understand the contribution of volatile aroma compounds to red yeast rice aroma. The odor description was provided. The solid phase micro-extraction method and the GC-MS analysis were the techniques employed for this study. The identification of volatile compounds was done by means of searching and matching the mass spectra of the compounds with the known reference compounds in the database library of volatile compounds. Chromatograms of volatile compounds in red yeast rice fermented without an addition of soybean milk were obtained. The composition of volatile aroma compounds of red yeast rice using *Oryza sativa* L. cv. Mali105 which is a non-glutinous rice was significantly different from that of glutinous rice. The chromatogram of *Oryza sativa* L. cv. Mali105 shows 20 peaks. Most identified compounds of *Oryza sativa* L. cv. Mali105 were alcohols. Glutinous rice; *Oryza sativa* L. cv. Kam, *Oryza sativa* L. cv. RD6 and *Oryza sativa* L. cv. SPT1 contain various groups of volatile compounds such as alcohols, aldehydes and methyl ketones.

An extraction of the sample was carried out using 2.5 g of ground red rice for the study of citrinin. The extracts were analyzed for citrinin using HPLC. The chemical profiling procedure conducted on the HPLC (Agilent HP 1100) with a photodiode array detector was optimized by testing various system conditions. The symmetry and resolution were increased by lowering the pH of mobile phase. The results suggested higher citrinin content when use glutinous rice with the highest amount in SPT1 red yeast rice fermented for 3 weeks.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเตรียมและการศึกษาข้าวแดงที่เตรียมจาก ข้าวเหนียว โดยเชื้อ <i>Monascus purpureus</i> ที่แยกจากข้าวแดง พื้นบ้านของจีน	
ผู้เขียน	นางเอมอร ไชยโรจน์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร.สายสมร ลำยอง	ประธานกรรมการ
	รศ.ดร.เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์	กรรมการ
	รศ.ดร.สุกัญญา วงศ์พรชัย	กรรมการ

#### บทคัดย่อ

สายพันธุ์ *Monascus purpureus* CMU001 ได้ถูกคัดแยกจากข้าวแดง (อังกัก) เมืองจีน ซึ่งได้จากแหล่งขายในท้องถิ่น แยกโดยใช้เทคนิคการปลอดเชื้อบนพื้นผิว คุณลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ดังกล่าวได้รับการตรวจยืนยันโดยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี การเตรียมข้าวแดงโดยใช้สายพันธุ์ดังกล่าวเตรียมโดยใช้ข้าวเหนียวพันธุ์ต่าง ๆ ของไทย คือ พันธุ์ กข6 (RD6) ข้าวท่า (Kam) ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 (SPT1) ผลผลิตข้าวแดงที่ได้ถูกนำมาศึกษาปริมาณสีแดงโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร ผลการศึกษาพบว่า ข้าวแดงจากข้าวเหนียว กข6 หมักเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ให้สีแดงเข้มที่สุด เพื่อเป็นการศึกษาผลของอาหารต่าง ๆ ได้ทำการเติมน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้นลงไป 1 มล เมื่อทำการหมักพบว่า ข้าวเหนียว กข6 หมักเป็นเวลา 2 สัปดาห์ให้สีแดงเข้มที่สุด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารโมนาโคลิน ซึ่งเป็นสารลดคอเรสเตอรอล ได้ทำโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (เอช พี แอล ซี) ยืนยันการมีโมนาโคลิน โดยเทียบเวลาริเทนชัน กับสารมาตรฐานอ้างอิง และการใช้ผลจากเทคนิค แอลซี-เอ็มเอส ผลที่ได้ถูกนำไปเทียบกับผลจากการวิเคราะห์ปริมาณในข้าวแดงจีน และข้าวแดงที่หมักจากข้าวเจ้า จากการศึกษาพบสารโมนาโคลิน ได้แก่ โมนาโคลิน เค ที่เป็นกรด (MKA) คอมแพคติน (P1) โมนาโคลินเอ็ม ที่เป็นกรด (MMA) โมนาโคลิน เค (MK) โมนาโคลินเอ็ม (MM) และดีไฮโดรโมนาโคลิน เค (DMK) พบสารโมนาโคลินขนาดใหญ่ ที่มีมวลโมเลกุล 358 แต่ไม่ทราบชนิด ได้ทำการหาปริมาณโมนาโค

ลิน เค และ คอมแพคติน พบว่า ปริมาณคอมแพคตินและโมนาโคลิน เค มีค่าสูงสุดเป็น 21.98 และ 33.79 มก/ก ตามลำดับ ในข้าวแดงที่ทำจากข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 (RD6) ที่ไม่เติมน้ำมันถั่วเหลือง

นอกจากนั้นได้ศึกษาปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ โดยศึกษาค่าแอนติออกซิแดนซ์ค่าปาลาซิติ และค่าการฟอกสี เบตา-แคโรทีน เตรียมสารแอนติออกซิแดนซ์สกัด โดยใช้เอทานอล พบค่าแอนติออกซิแดนซ์ค่าปาลาซิติสูงสุดในข้าวแดงที่ใช้ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 และ ข้าวเหนียว กข6 ที่หมัก 3 สัปดาห์ และเติมน้ำมันถั่วเหลือง แอนติออกซิแดนซ์ค่าปาลาซิติ มีค่า 0.53 มก/มล แกลลิกแอซิดอิลควิเวเลนส์ และค่าการยับยั้งที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) เป็น 0.09 มก/มล ในข้าวเหนียว กข6 และ ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1

การศึกษาสารให้กลิ่นหอมในข้าวแดง ได้ทำตารางบอกลักษณะของกลิ่นข้าวแดงแต่ละชนิด และ วิเคราะห์หาชนิดสาร และปริมาณสารโดยเทคนิค เอสพีเอ็มอี (SPME) ตามด้วย จีซี-เอ็มเอส (GC-MS) การหาชนิดสารใช้การเทียบแมสสเปกตรัมกับสารที่มีในฐานข้อมูล พบว่าสารให้กลิ่นของข้าวแดงจากข้าวเจ้าแตกต่างจากข้าวเหนียว โดยข้าวเจ้ามี 105 มีสารประมาณ 20 ตัว ส่วนใหญ่เป็นพวก แอลกอฮอล์ ในขณะที่สารในข้าวแดงที่ทำจากข้าวเหนียวข้าวเก่า ข้าว กข6 และ สันป่าตอง 1 มีสารให้กลิ่นหลายกลุ่มคือ แอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ และเมทิลคีโตน

สารสกัดที่ทำจากข้าวแดง 2.5 กรัม ได้นำมาหาปริมาณสารชิทรินิน โดยเทคนิคเอชพีแอลซี (HPLC) ตรวจวัดด้วยโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ดีเทกเตอร์ ที่ทำการหาภาวะที่เหมาะสมได้ความสมมาตรและรีโซลูชันสูงเมื่อค่าพีเอชของโมบายเฟสลดต่ำลง พบว่าข้าวเหนียวมีสารชิทรินินสูงกว่า โดยข้าวแดงสันป่าตอง 1 ที่หมักเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีค่าชิทรินินสูงสุด