



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์



การผลิต Androstenones จากสเตอรอลที่มีในน้ำมันพืช
โดยเซลล์ตรึง *Mycobacterium sp.*
(Production of Androstenones from Sterol-Containing Vegetable Oils
by Immobilized *Mycobacterium sp.*)

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ และคณะ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วันลงทะเบียน..... ๒๖ มี.ค. ๒๕๕๘
เลขทะเบียน..... 1-1696521
เลขเรียกหนังสือ..... 0 RS

๒๐๗
๐E7
พธ๒25
๒๕๕7

กุมภาพันธ์ 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิต Androstenones จากสเตอรอลที่มีในน้ำมันพืช
โดยเซลล์ตรึง *Mycobacterium sp.*
(Production of Androstenones from Sterol-Containing Vegetable Oils
by Immobilized *Mycobacterium sp.*)

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ

สังกัด ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

รองศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา

สังกัด ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิต Androstenones จากสเตอรอลที่มีในน้ำมันพืชโดยเซลล์ตรึง *Mycobacterium sp.* (Production of androstenones from sterol-containing vegetable oils by immobilized *Mycobacterium sp.*)” นี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร (แบบปกติ) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือ วิทยาศาสตร์และสถานที่ตลอดระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัย ขอขอบคุณ นางสาวจรรยา รื่นเกษร ผู้ช่วยวิจัยประจำโครงการวิจัยฯ ที่ช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ



บทคัดย่อ

โครงการวิจัย	การผลิต Androstenones จากสเตอรอลที่มีในน้ำมันพืช โดยเซลล์ตรึง <i>Mycobacterium sp.</i>
ผู้วิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ รองศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา
หน่วยงานที่สังกัด	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
หมายเลขโทรศัพท์	055-961861
ได้รับทุนอุดหนุน	การวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช
งบประมาณแผ่นดิน	ประจำปี 2555
จำนวนเงิน	273,320 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี (1 มีนาคม พ.ศ. 2555 ถึง 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556)

ปฏิกิริยาการตัดสายโซ่ที่ C-17 ของ phytosterol ให้กลายเป็น androst-4-ene-3,17-dione (AD) และ androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) มีประโยชน์มากในเภสัชอุตสาหกรรม ทั้ง AD และ ADD สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำคัญสำหรับการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศและอนุบอริก จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชที่มี phytosterol การศึกษาทดสอบน้ำมันพืชสำหรับรับประทานจำนวนมาก เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียครบ 7 วัน AD และ ADD จะถูกสกัดจากอาหารเหลวและวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC จากการเปรียบเทียบ น้ำมันพืชทั้งหมดที่ใช้ทดสอบของแบคทีเรียทั้งสองพบว่าน้ำมันคาโนลาให้ปริมาณสารกลุ่ม androstene สูงสุด ในขณะที่น้ำมันมะพร้าวให้ผลผลิตต่ำสุด การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันพืชในอาหารเหลวทำให้ผลผลิตลดลงสำหรับ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และให้ผลผลิตมากขึ้น สำหรับ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 เซลล์ตรึงทั้งใน calcium alginate และ Celite ไม่สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตได้ เพราะฉะนั้นชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันพืชมีอิทธิพลต่อการผลิต AD และ ADD การผลิตสารกลุ่ม androstenone โดยใช้ น้ำมันพืชเป็นกระบวนการที่เป็นไปได้ในเชิงเศรษฐศาสตร์ การผลิตดังกล่าวทำให้น้ำมันพืชเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มสูง

ABSTRACT

Title Production of androstenones from sterol-containing vegetable oils by immobilized *Mycobacterium sp.*

By Assoc. Prof. Dr. Pattana Sripalakit
Assoc. Prof. Dr. Aurasorn Saraphanchotiwitthaya

Affiliation Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

Telephone 055-961861

Financial support Naresuan University

Budget 273,320 Baht

Duration 1 Year (1 March 2012 - 28 February 2013)

Cleavage of the phytosterol C-17 side chain into androst-4-ene-3,17-dione (AD) and androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) has much usefulness in the pharmaceutical industry. Both AD and ADD can be already used as the main precursors for all kinds of sex and anabolic hormones. The objective of this study was to optimize the production of AD and ADD by *Mycobacterium sp.* DSM 2966 and *Mycobacterium sp.* DSM 2967 using vegetable oils containing phytosterols as a substrate. The numerous different edible vegetable oils have been tested. After 7-day cultivation, AD and ADD were extracted from the media and were determined by HPLC. Compared to all tested vegetable oils in both strains, canola oil significantly showed higher androstenones production, whereas lowest yields obtained from coconut oil. The increase of relative vegetable oil concentrations in the media resulted in the reduction of yields for *Mycobacterium sp.* DSM 2966 and the escalation of yield for *Mycobacterium sp.* DSM 2967. Neither immobilized cell in calcium alginate nor Celite could improve the production yield. Therefore, type and concentration of vegetable oils on the production of AD and ADD should be determined. The production of androstenone using vegetable oils was economically feasible processes. These could lead vegetable oils as high value-added products.

สรุปรายงานวิจัย (Executive Summary)

สัญญาเลขที่	R2555B074
โครงการวิจัย	การผลิต Androstenones จากสเตอรอลที่มีในน้ำมันพืช โดยเซลล์ตรึง <i>Mycobacterium sp.</i>
หัวหน้าโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ
หน่วยงานที่สังกัด	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
จำนวนเงิน	273,320 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี (1 มีนาคม พ.ศ. 2555 ถึง 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สารกลุ่ม androstenone ได้แก่ androst-4-ene-3,17-dione (AD) และ androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) เป็นสารที่ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการผลิตยา เนื่องจากสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กลุ่มยาสเตียรอยด์ต่างๆ เช่น ฮอโมนเพศ ยาคุมกำเนิด กลูโคคอร์ติคอยด์ ยาขับปัสสาวะ และยาต้านมะเร็ง เป็นต้น สารกลุ่มดังกล่าวได้มาจากกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันของ phytosterol โดยมี *Mycobacterium sp.* เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ phytosterol สามารถพบได้ในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ดังนั้นน้ำมันพืชจึงเป็นทางเลือกอย่างหนึ่งสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารกลุ่ม androstenone

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการผลิต androst-4-ene-3,17-dione (AD) และ androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) จากน้ำมันพืช โดยใช้กระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันของเซลล์ตรึง *Mycobacterium sp.*

ผลการวิจัย

ปฏิกิริยาการตัดสายโซ่ที่ C-17 ของ phytosterol ให้กลายเป็น androst-4-ene-3,17-dione (AD) และ androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) มีประโยชน์มากในเภสัชอุตสาหกรรม ทั้ง AD และ ADD สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำคัญสำหรับการสังเคราะห์ฮอโมนเพศและอนุบาลิกจุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต AD และ ADD ของ *Mycobac-*

terium sp. DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชที่มี phytosterol การศึกษาทดสอบน้ำมันพืชสำหรับรับประทานจำนวนมาก เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียครบ 7 วัน AD และ ADD จะถูกสกัดจากอาหารเหลวและวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC จากการเปรียบเทียบน้ำมันพืชทั้งหมดที่ใช้ทดสอบของแบคทีเรียทั้งสองพบว่าน้ำมันคาโนลาให้ปริมาณสารกลุ่ม androstenone สูงสุด ในขณะที่น้ำมันมะพร้าวให้ผลผลิตต่ำสุด การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันพืชในอาหารเหลวทำให้ผลผลิตลดลงสำหรับ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และให้ผลผลิตมากขึ้นสำหรับ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 เซลล์ตรึงทั้งใน calcium alginate และ Celite ไม่สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตได้ เพราะฉะนั้นชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันพืชมีอิทธิพลต่อการผลิต AD และ ADD การผลิตสารกลุ่ม androstenone โดยใช้ น้ำมันพืชเป็นกระบวนการที่เป็นไปได้ในเชิงเศรษฐศาสตร์ การผลิตดังกล่าวทำให้น้ำมันพืชเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มสูง

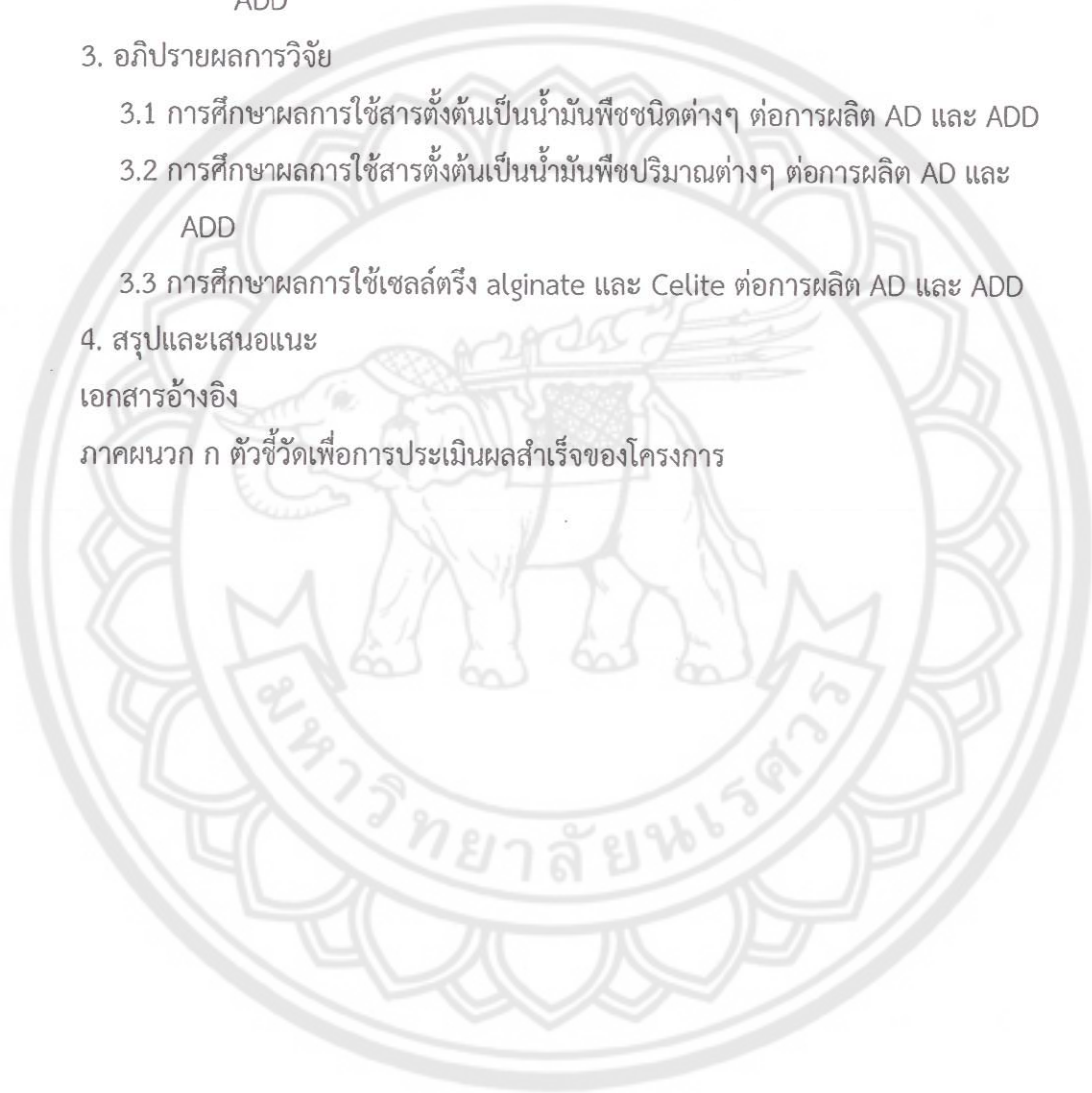
Output ของงานวิจัย

นำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการที่มีการตีพิมพ์เฉพาะ Abstract จำนวน 1 เรื่อง ในการประชุมวิชาการเรื่อง The 1st ASEAN Microbial Biotechnology Conference (AMBC2014) ระหว่างวันที่ 19-21 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค กรุงเทพฯ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	๗
บทคัดย่อ	๘
Abstract	๙
สรุปรายงานวิจัย (Executive Summary)	๑๐
สารบัญตาราง	๑๑
สารบัญรูป	๑๒
1. บทนำ	1
1.1 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	2
1.3 วัตถุประสงค์	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย	3
1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย	3
1.6 ทฤษฎีและแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	4
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	5
2.1 วิธีดำเนินการวิจัย	5
2.1.1 สารเคมี	5
2.1.2 แบคทีเรีย	8
2.1.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย	8
2.1.4 การศึกษาและพัฒนาการผลิต AD และ ADD จากน้ำมันพืช	8
2.1.5 การวิเคราะห์หาปริมาณของ AD และ ADD	10
2.2 ผลการวิจัย	12
2.2.1 การวิเคราะห์กราฟมาตรฐานของ AD และ ADD	12
2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ AD และ ADD ในส่วนต่างๆ ของตัวอย่าง	15

	หน้า
2.2.3 การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD	16
2.2.4 การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD	20
2.2.5 การศึกษาผลการใช้เซลล์ตรึง alginate และ Celite ต่อการผลิต AD และ ADD	26
3. อภิปรายผลการวิจัย	31
3.1 การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD	31
3.2 การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD	34
3.3 การศึกษาผลการใช้เซลล์ตรึง alginate และ Celite ต่อการผลิต AD และ ADD	39
4. สรุปและเสนอแนะ	41
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก ก ตัวชี้วัดเพื่อการประเมินผลสำเร็จของโครงการ	44



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 รายละเอียดต่างๆ ของน้ำมันพืชที่ใช้ในการศึกษา 1	6
2 รายละเอียดต่างๆ ของน้ำมันพืชที่ใช้ในการศึกษา 2	7
3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน AD และ ADD กับ peak area จากเครื่อง HPLC	12
4 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ชั้นน้ำมัน ชั้นน้ำ และ Amberlite ของตัวอย่าง (ใช้ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 และสารตั้งต้นเป็น soya bean oil)	15
5 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ในชั้นน้ำมัน ชั้นน้ำ และ Amberlite ของตัวอย่าง (ใช้ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 และสารตั้งต้นเป็น soya bean oil)	16
6 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็น น้ำมันพืชชนิดต่างๆ	17
7 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็น น้ำมันพืชชนิดต่างๆ	18
8 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ	19
9 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ	19
10 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณต่างๆ	21
11 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น rice bean oil ที่ปริมาณต่างๆ	21

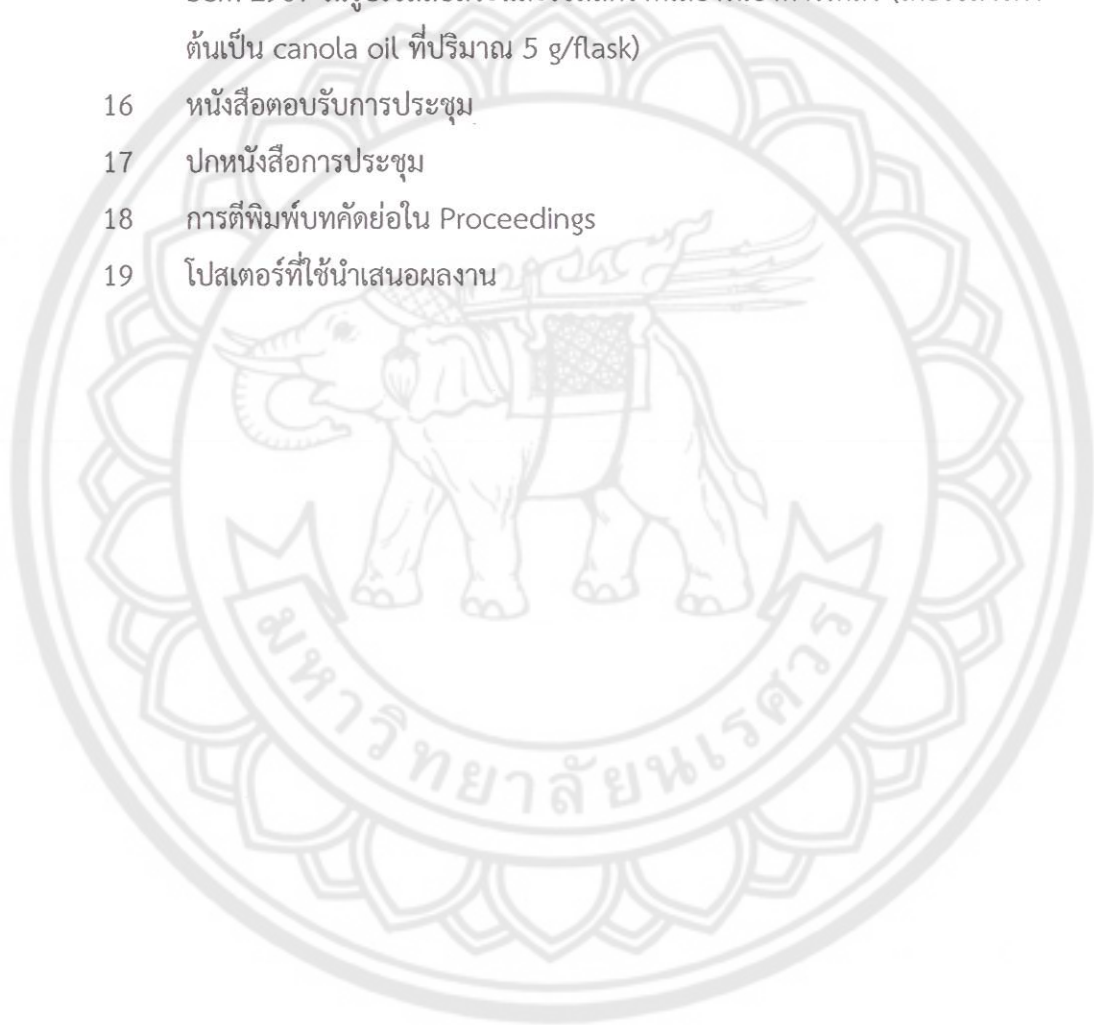
ตาราง	หน้า	
12	ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น soya bean oil ที่ปริมาณต่างๆ	22
13	ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น sunflower oil ที่ปริมาณต่างๆ	22
14	ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณต่างๆ	23
15	ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น rice bean oil ที่ปริมาณต่างๆ	23
16	ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น sunflower oil ที่ปริมาณต่างๆ	24
17	ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น soya bean oil ที่ปริมาณต่างๆ	24
18	การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันที่ปริมาณต่างๆ	25
19	การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจากน้ำมันที่ปริมาณต่างๆ	25
20	ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 ในรูปเซลล์อิสระและ เซลล์ตรึงที่เลี้ยงในสารละลายบัฟเฟอร์ (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ ปริมาณ 5 g/flask)	26
21	ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 ในรูปเซลล์อิสระและ เซลล์ตรึงที่เลี้ยงในสารละลายบัฟเฟอร์ (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ ปริมาณ 5 g/flask)	27

ตาราง		หน้า
22	ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 ในรูปเซลล์อิสระและ เซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)	28
23	ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก โครมาโตแกรมของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 ในรูปเซลล์อิสระและ เซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)	29
24	การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในสารละลายบัฟเฟอร์ (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)	30
25	การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในสารละลายบัฟเฟอร์ (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)	30
26	การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)	30
27	การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)	30

สารบัญรูป

รูป	หน้า
1 โครงสร้าง 4-androstene-3,17-dione (AD) และ 1,4-androsta-diene-3,17-dione (ADD)	1
2 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน AD และ ADD ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL (A) การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 (B)	13
3 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับ peak area ของ AD (A) และ ADD (B) จากเครื่อง HPLC	14
4 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นจากน้ำมันพืชชนิดต่างๆ	32
5 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจากน้ำมันพืชชนิดต่างๆ	33
6 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นจาก canola oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ	35
7 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นจาก rice bean oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ	35
8 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นจาก soya bean oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ	36
9 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นจาก sunflower oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ	36
10 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของเชื้อ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจาก canola oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ	37
11 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจาก rice bean oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ	37
12 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจาก soya bean oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ	38

รูป	หน้า
13 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจาก sunflower oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ	38
14 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2966 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)	40
15 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ <i>Mycobacterium sp.</i> DSM 2967 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)	40
16 หนังสือตอบรับการประชุม	45
17 ปกหนังสือการประชุม	46
18 การตีพิมพ์บทความย่อใน Proceedings	47
19 โปสเตอร์ที่ใช้นำเสนอผลงาน	48

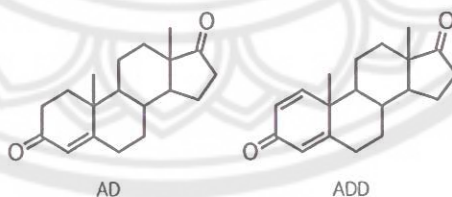


1. บทนำ

1.1 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

กลุ่มยาสเตียรอยด์มีโครงสร้างเคมีที่ซับซ้อน จึงทำให้การสังเคราะห์เป็นไปอย่างยุ่งยากและต้องใช้ปฏิกิริยาเคมีหลายขั้นตอน จากข้อมูลในอดีตเกี่ยวกับการสังเคราะห์กลุ่มยาสเตียรอยด์พบว่า การประยุกต์ใช้สารตั้งต้นจากพืชร่วมกับการใช้เทคโนโลยีจุลชีพ (microbial technology) ทำให้วิธีการผลิตยาดังกล่าวง่ายและสะดวกขึ้น รวมทั้งทำให้ขั้นตอนของการสังเคราะห์ลดลง ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตของยาลดลง สารตั้งต้นโดยทั่วไปที่นิยมใช้ในการผลิตกลุ่มยาสเตียรอยด์ส่วนใหญ่ได้มาจากพืช โดยมีโครงสร้างเป็นสเตียรอยด์ เช่น กลุ่ม sapogenin (เช่น diosgenin hecogenin solasodine เป็นต้น) และกลุ่ม phytosterol (เช่น stigmasterol β -sitosterol campesterol cholesterol เป็นต้น) [1-4]

ยาสเตียรอยด์ในปัจจุบัน เช่น ฮอร์โมนเพศ ยาคุมกำเนิด กลูโคคอร์ติคอยด์ ยาขับปัสสาวะ และยาต้านมะเร็ง เป็นต้น ได้มาด้วยวิธีการกึ่งสังเคราะห์ที่ใช้สารกลุ่ม androstenone เป็นสารตัวกลาง อุตสาหกรรมการผลิตยาสเตียรอยด์ทั่วโลกต้องใช้สารตัวกลางดังกล่าวในปริมาณอย่างน้อย 1,000 ตันต่อปี โดยที่ปริมาณที่ใช้อุตสาหกรรม 60 เปอร์เซ็นต์ ได้มาจากกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตสารกลุ่ม androstenone ได้แก่ androst-4-ene-3,17-dione (AD) และ androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) (รูป 1) อาศัย phytosterol เป็นสารตั้งต้นและใช้แบคทีเรียเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา [5,6]



รูป 1 โครงสร้าง 4-androstene-3,17-dione (AD) และ 1,4-androsta-diene-3,17-dione (ADD)

รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต AD และ ADD ได้กล่าวถึงการใช้กระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มชันมากมาย โดยใช้เชื้อราและแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น *Mycobacterium* *Lactobacillus* *Brevibacterium* *Rhodococcus* *Moraxella* เป็นต้น [1-4] โดยใช้สารตั้งต้นบริสุทธิ์ในกลุ่มของ phytosterol เช่น β -sitosterol cholesterol stigmasterol campesterol และ ergosterol [1-4,7] หรือวัตถุดิบที่มี phytosterol เช่น tall oil และ pulping soup จากอุตสาหกรรม

กระดาศ [2] cocoa bean จากอุตสาหกรรมช็อคโกแล็ต [8] sugarcane mud จากอุตสาหกรรมน้ำตาล [9] แป้งข้าวโพดและแป้งถั่วเหลือง [10] เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงเซลล์โดยใช้พาหะชนิดต่างๆ ทั้งนี้การตรึงเซลล์สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตดังกล่าวได้ [1]

จากการศึกษาพบว่าสารกลุ่ม phytosterol เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการสังเคราะห์กลุ่มยาสเตียรอยด์ เนื่องจากราคาไม่แพงและง่ายต่อการเปลี่ยนไปเป็นสารตัวกลาง AD และ ADD จากการศึกษาพบว่าการใช้ phytosterol บริสุทธิ์ที่ผ่านการสกัด จะได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ phytosterol [7] อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือ phytosterol บริสุทธิ์มีราคาแพง จึงไม่คุ้มค่าต่อการผลิต AD และ ADD ซึ่งมีราคาที่ถูกลงกว่า จากรายงานพบว่าสารกลุ่ม phytosterol สามารถพบได้ในพืช และส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสารผสมระหว่าง β -sitosterol stigmasterol และ campesterol [2] นอกจากนี้ยังพบว่าสารกลุ่ม phytosterol เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ [11-12] ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาการผลิต AD และ ADD จากสารตั้งต้น phytosterol ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่ในน้ำมันพืช โดยใช้เซลล์ตรึง *Mycobacterium sp.* ทั้งนี้เพื่อลดต้นทุนของการผลิตลง และใช้วัตถุดิบที่มีอยู่ในน้ำมันพืชโดยตรงโดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สารกลุ่ม androstenone ได้แก่ androst-4-ene-3,17-dione (AD) และ androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) เป็นสารที่ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการผลิตยา เนื่องจากสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กลุ่มยาสเตียรอยด์ต่างๆ เช่น ฮอโมนเพศ ยาคุมกำเนิด กลูโคคอร์ติคอยด์ ยาขับปัสสาวะ และยาต้านมะเร็ง เป็นต้น สารกลุ่มดังกล่าวได้มาจากกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันของ phytosterol โดยมี *Mycobacterium sp.* เป็นตัวตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ phytosterol สามารถพบได้ในน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ดังนั้นน้ำมันพืชจึงเป็นทางเลือกอย่างหนึ่งสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารกลุ่ม androstenone

1.3 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการผลิต androst-4-ene-3,17-dione (AD) และ androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) จากน้ำมันพืช โดยใช้กระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันของเซลล์ตรึง *Mycobacterium sp.*

1.4 ขอบเขตการวิจัย

- 1.4.1 แบคทีเรียมาตรฐาน: *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967
- 1.4.2 สารตั้งต้น: น้ำมันพืชที่มี phytosterol ชนิดต่างๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันรำข้าว เป็นต้น
- 1.4.3 ผลิตภัณฑ์: androst-4-ene-3,17-dione (AD) และ androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD)
- 1.4.4 พาหะตรึงเซลล์: celite calcium alginate หรือสารตรึงชนิดอื่นๆ ที่เหมาะสม
- 1.4.5 ตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ: high performance liquid chromatography (HPLC)

1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย

1.5.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

- (1) เลี้ยงแบคทีเรียมาตรฐานในอาหารที่เหมาะสมบน slant
- (1) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ก่อนใช้งาน

1.5.2 การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD

- (1) เตรียม stock แบคทีเรียในรูปของสารแขวนตะกอน
- (2) เติมน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ลงใน media เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำมัน)
- (4) เลี้ยงแบคทีเรีย 7 วัน เก็บตัวอย่าง สกัดและวิเคราะห์ด้วย HPLC
- (5) คำนวณหาปริมาณของ AD และ ADD ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟมาตรฐาน

1.5.3 การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD

- (1) เตรียม stock แบคทีเรียในรูปของสารแขวนตะกอน
- (2) เติมน้ำมันพืชชนิดปริมาณต่างๆ ลงใน media เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำมัน)
- (4) เลี้ยงแบคทีเรีย 7 วัน เก็บตัวอย่าง สกัดและวิเคราะห์ด้วย HPLC
- (5) คำนวณหาปริมาณของ AD และ ADD ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟมาตรฐาน

1.5.4 การศึกษาผลการตรึงเซลล์ด้วย celite ต่อการผลิต AD และ ADD

- (1) เตรียม stock แบคทีเรียในรูปของสารแขวนตะกอน
- (2) ตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วย celite
- (3) เติมน้ำมันพืชลงใน media
- (4) เติมน้ำมันพืชลงใน media
- (5) เลี้ยงแบคทีเรีย 7 วัน เก็บตัวอย่าง สกัดและวิเคราะห์ด้วย HPLC
- (6) คำนวณหาปริมาณของ AD และ ADD ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟมาตรฐาน

1.5.5 การศึกษาผลการตรึงเซลล์ด้วย calcium alginate ต่อการผลิต AD และ ADD

- (1) เตรียม stock แบคทีเรียในรูปของสารแขวนตะกอน
- (2) ตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วย calcium alginate
- (3) เติมน้ำที่เตรียมในรูปแบบบิสและแบบตรึงลงใน media
- (4) เติมน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ลงใน media
- (5) เลี้ยงแบคทีเรีย 14 วัน เก็บตัวอย่าง สกัดและวิเคราะห์ด้วย HPLC
- (6) คำนวณหาปริมาณของ AD และ ADD ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟมาตรฐาน

1.6 ทฤษฎีและแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

การพัฒนาวิธีการผลิต androst-4-ene-3,17-dione (AD) และ androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) จากสารตั้งต้น phytosterol ที่มีในน้ำมันพืช โดยใช้กระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์มเมชันของเซลล์แบคทีเรีย *Mycobacterium sp.* ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ปริมาณสูงขึ้น การนำความรู้ใหม่ที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมการผลิตยาสเตียรอยด์ส่งผลให้ได้ยามีราคาถูกลง

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.7.1 เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ
- 1.7.2 เผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ
- 1.7.3 เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตและนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์
- 1.7.4 เป็นองค์ความรู้ในการทำวิจัยต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

2.1 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1.1 สารเคมี

สารมาตรฐานอ้างอิง androst-4-ene-3,17-dione (AD) และ androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD) ซื้อจาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย yeast extract และ Tris HCl (tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride) จาก Fluka Chemie GmbH (Buchs, Switzerland) $MgCl_2$ ซื้อจาก BDH Chemical Ltd. (Poole, England) และ ammonium sulfate ซื้อจาก Lab-scan (Bangkok, Thailand) สารละลายอินทรีย์ที่ใช้สำหรับการสกัด ethyl acetate และ dichloromethane ซื้อจาก Lab-scan

สารช่วยละลายที่ใช้คือ Amberlite XAD7HP ซื้อจาก Dow Chemical Company (Erstein Gare, France) รายละเอียดของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตาราง 1 และ 2 HPLC solvents เป็น analytical grade ซึ่งได้จากการกรองผ่าน 0.45 μm nylon filter membrane (Alltech Associates, Inc., Deerfield IL) ก่อนการใช้ ตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการวิเคราะห์ HPLC ได้แก่ acetonitrile และ methanol เป็น AR grade จาก Lab-scan สารชนิดอื่นๆ และตัวทำละลายชนิดอื่นๆ เป็น reagent grade สารที่ใช้ตรึงเซลล์คือ Celite-545 และ sodium alginate ได้มาจาก Sigma Chemical Co. และ Fluka Chemie GmbH ตามลำดับ

ตาราง 1 รายละเอียดต่างๆ ของน้ำมันพืชที่ใช้ในการศึกษา 1

น้ำมันพืช (Vegetable oil)	ชนิด	ปริมาณ	ปริมาณไขมัน (g)					บริษัทผู้ผลิต
			ไขมันทั้งหมด (Total fat)	ไขมันอิ่มตัว (Saturated fat)	ไขมันไม่อิ่มตัว (Monounsat. fat)	ไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (Polyunsat. fat)	ไขมันไม่อิ่มตัวตำแหน่งเดียว	
Camellia Tea oil (น้ำมันเมล็ดชา)	Refined	15 mL / 14 g	14	1.5	n/a	n/a	n/a	Lam Soon (Thailand) Pcl., Samutprakarn, Thailand
Canola oil (น้ำมันคาโนลา)	Pure	14 g	14	1	8.3	4.1	n/a	Sime Darby Edible Products Ltd., Singapore
Coconut oil (น้ำมันมะพร้าว)	n/a	-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
Corn oil (น้ำมันข้าวโพด)	Refined	14 g	14	2	4	8		Lam Soon (Thailand) Pcl., Samutprakarn, Thailand
Olive oil (น้ำมันมะกอก)	Extra virgin	-	n/a	n/a	n/a	n/a		Rafael Salgado SA, Madrid, Spain
Palm olein oil (น้ำมันปาล์มโอเลอิน)	Refined	15 mL	14	6	n/a	n/a		P. S. Pacific Co., Ltd., Petchburi, Thailand

ตาราง 2 รายละเอียดต่างๆ ของน้ำมันพืชที่ใช้ในการศึกษา 2

น้ำมันพืช (Vegetable oil)	ชนิด	ปริมาณ	ปริมาณไขมันชนิดต่างๆ					บริษัทผู้ผลิต
			(Total fat)	ไขมันอิ่มตัว (Saturated fat)	ไขมันไม่อิ่มตัว (Monounsat. fat)	ไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (Polyunsat. fat)		
Rice bran oil (น้ำมันรำข้าว)	Extra-cold filtered	14 g	14	3.1	5.7	4.8	Coagro Co., Ltd, Bangkok, Thailand	
Safflower oil (น้ำมันดอกคำฝอย)	Refined	-	n/a	n/a	n/a	n/a	Quiheng Health Consumer Co., Ltd., Bangkok, Thailand	
Sesame oil (น้ำมันงา)	n/a	15 mL	13	2.5	n/a	n/a	Chaiseri Co.,Ltd., Chiang Mai, Thailand	
Soybean oil (น้ำมันถั่วเหลือง)	Refined	15 mL	15	2.5	3.5	9	Morakot Industries Pcl., Samutprakarn, Thailand	
Sunflower oil (น้ำมันดอกทานตะวัน)	Refined	15 mL	15	2	5	8	Thanakorn Vegetable Oil Products Co., Ltd. Samutprakarn, Thailand	

n/a = Not available

2.1.2 แบคทีเรีย

แบคทีเรีย *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 ได้จาก German National Resource Centre for Biological Material (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany) แบคทีเรียอยู่ในรูปของ revival freeze-dried culture จะถูกกระตุ้นในเจริญโดยเลี้ยงในอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ที่อุณหภูมิ 30°C แบคทีเรียถูก subculture ใหม่ทุกครั้งของการทดลองโดยเลี้ยงบน PDA slant agar นาน 5 วัน

2.1.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

แบคทีเรียในอาหารแข็งถูก subculture ลงในอาหารเหลว (50 mL) ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 5 g/L, ammonium sulfate 3 g/L และ magnesium chloride 0.1 g/L ใน 50 mM Tris HCl buffer pH 7.8 ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250-mL โดยใช้สภาวะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm บนเครื่อง orbital shaker (Revco Scientific Inc., Asheville, NC) เป็นระยะเวลา 3-4 วัน เทคนิคการเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดทำในตู้ laminar air flow cabinet ชนิด biosafety class II (Forma Scientific Inc., Marietta, OH)

2.1.4 การศึกษาและพัฒนาการผลิต AD และ ADD จากน้ำมันพืช

(1) การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD

ปิเปตสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 1.0 mL ใส่ลงในอาหารเหลว (50 mL) ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 5 g/L ammonium sulfate 3 g/L และ magnesium chloride 0.1 g/L ใน 50 mM Tris HCl buffer pH 7.8 ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250-mL โดยใช้สภาวะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นระยะเวลา 2 วัน

หลังจากนั้นเติมน้ำมันพืชแต่ละชนิด ได้แก่ camellia tea oil canola oil coconut oil corn oil olive oil palm olein oil rice bran oil safflower oil sesame oil soya bean oil หรือ sunflower oil ปริมาณ 5 g/flask และ Amberlite ปริมาณ 100 mg/flask ลงในอาหารเหลว โดยใช้สภาวะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลาระยะ 7 วัน เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเพื่อวิเคราะห์ HPLC

(2) การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD

ปิเปตสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 1.0 mL ใส่ลงในอาหารเหลว (50 mL) ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 5 g/L ammonium sulfate 3 g/L และ magnesium chloride 0.1 g/L ใน 50 mM Tris HCl buffer pH 7.8 ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250-mL โดยใช้สภาวะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นระยะเวลา 2 วัน

หลังจากนั้นเติมน้ำมันพืชแต่ละชนิด ได้แก่ canola oil rice bran oil soya bean oil หรือ sunflower oil ปริมาณ 5 10 และ 20 g/flask และ Amberlite ปริมาณ 100 mg/flask ลงในอาหารเหลว โดยใช้สภาวะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลา ระยะ 7 วัน เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเพื่อวิเคราะห์ HPLC

(3) การศึกษาผลการตรึงเซลล์ด้วย Celite ต่อการผลิต AD และ ADD

ปีเปตสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 4.0 mL ใส่ลงในอาหารเหลว (50 mL) ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 5 g/L ammonium sulfate 3 g/L และ magnesium chloride 0.1 g/L ใน 50 mM Tris HCl buffer pH 7.8 ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250-mL โดยใช้สภาวะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นระยะเวลา 4 วัน

เติม celite ที่ autoclave แล้ว ปริมาณ 5 กรัม / flask ลงใน flask เขย่าตามปกติ เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับเป็นระยะเวลา celite 1 วัน จากนั้นทิ้งให้เซลล์ตรึงตกตะกอนเองแล้วล้างด้วย Tris HCl buffer นำเซลล์ตรึงบน celite ทั้งหมดเติมลงในอาหารเหลว (50 mL) ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 5 g/L, ammonium sulfate 3 g/L และ magnesium chloride 0.1 g/L ใน 50 mM Tris HCl buffer pH 7.8 ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250-mL (ทำการทดลองเปรียบเทียบกับเซลล์จากการปั่นแยกที่ไม่ถูกตรึง)

หลังจากนั้นเติมน้ำมันพืชแต่ละชนิด ได้แก่ canola oil หรือ soya bean oil ปริมาณ 5 g/flask และ Amberlite ปริมาณ 100 mg/flask ลงในสารละลายบัฟเฟอร์หรืออาหารเหลว โดยใช้สภาวะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลา ระยะ 7 วัน เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเพื่อวิเคราะห์ HPLC

(4) การศึกษาผลการตรึงเซลล์ด้วย alginate ต่อการผลิต AD และ ADD

ปีเปตสารละลายเซลล์แบคทีเรีย *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 4.0 mL ใส่ลงในอาหารเหลว (50 mL) ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 5 g/L ammonium sulfate 3 g/L และ magnesium chloride 0.1 g/L ใน 50 mM Tris HCl buffer pH 7.8 ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250-mL โดยใช้สภาวะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นระยะเวลา 4 วัน

ปั่นแยกเซลล์จากอาหารเหลวที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm แล้วเติม 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.8 ปริมาตร 5.0 mL และ sodium alginate ปริมาณ 0.2 g (4 %w/v) แล้วผสมกันด้วยเครื่อง vortex mixer จนเป็นสารละลายเซลล์เนื้อเดียวกัน บีบสารละลายเซลล์ดังกล่าวผ่านเข็มฉีดยา No. 21 ลงใน 0.2 M CaCl₂ ใน 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.8 (100 mL) ที่เม็ดลูกปัด (bead) ไม้ 1 ชั่วโมง นำเซลล์ตรึงบน calcium alginate ทั้งหมดเติมลงในอาหารเหลว (50 mL) ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 5 g/L ammonium sulfate 3 g/L และ magnesium chloride 0.1 g/L ใน 50 mM Tris

HCl buffer pH 7.8 ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250-mL (ทำการทดลองเปรียบเทียบกับเซลล์จากการปั่นแยกที่ไม่ถูกต้อง)

หลังจากนั้นเติมน้ำมันพืชแต่ละชนิด ได้แก่ canola oil หรือ soya bean oil ปริมาณ 5 g/flask และ Amberlite ปริมาณ 100 mg/flask ลงในสารละลายบัฟเฟอร์หรืออาหารเหลว โดยใช้สภาวะสำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิห้องและเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลาระยะเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเพื่อวิเคราะห์ HPLC

2.1.5 การวิเคราะห์หาปริมาณของ AD และ ADD

(1) การวิเคราะห์กราฟมาตรฐานของ AD และ ADD

เตรียมสารละลายมาตรฐาน AD และ ADD ใน mobile phase จำนวน 6 ความเข้มข้น แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC นำข้อมูลพื้นที่ใต้ peak และความเข้มข้นของสาร มาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง กราฟมาตรฐานดังกล่าวจะใช้ในเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของ AD และ ADD ในสารตัวอย่างต่อไป

(2) การเตรียมตัวอย่าง

นำอาหารเหลวทั้งหมดมาปั่นแยกชั้นน้ำและชั้นน้ำมันที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm แล้วนำชั้นน้ำมันปริมาตร 500 μ L ใส่ลงใน Eppendorf ขนาด 2-mL เติม methanol ปริมาตร 1,500 μ L เขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นระยะเวลา 5 นาที ทิ้งจนสารสกัดแยกชั้น นำชั้น methanol ปริมาตร 1,000 μ L เก็บในขวดปิดสนิทเพื่อวิเคราะห์ HPLC

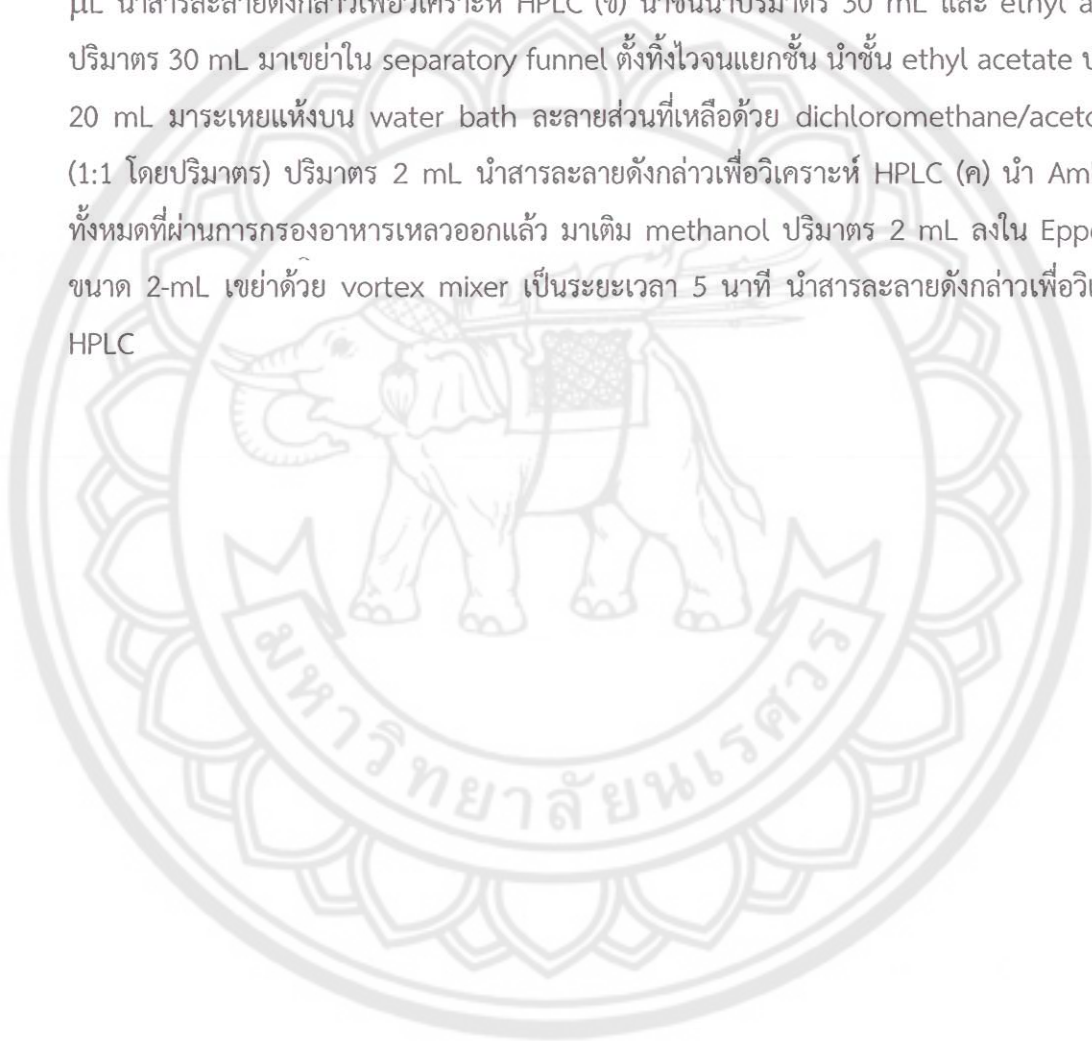
(3) การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย HPLC

ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 μ L เข้าเครื่อง Shimadzu HPLC ซึ่งประกอบด้วย dual plunger pump (LC-10ATVP; Shimadzu, Kyoto, Japan), system controller (SCL-10AVP, Shimadzu) และ UV-Vis detector (SPD-10AVP, Shimadzu) ซึ่งต่อกับ Rheodyne (7725) sample injector (Rohnert Park, CA) และ 20- μ L sample loop โดยใช้ Synergi fusion-RP column (250 \times 4.6 mm i.d.; 4 μ m particle diameter, 80 Å average pore size) (Phenomenex, Torrance, CA) และ mobile phase เป็น water/acetonitrile/methanol (45:40:15 โดยปริมาตร) ด้วยอัตราเร็ว 1.0 mL/min โดยใช้ UV-Visible detector เป็นเครื่องตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 238 nm นำ retention time ของ peak ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน AD และ ADD รวมทั้งนำพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (AD และ ADD) ในโครมาโตแกรมมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน

(4) การวิเคราะห์หาปริมาณ AD และ ADD ในส่วนต่างๆ ของตัวอย่าง

ทำการทดลองเหมือนกับข้อ (1) การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD โดยใช้น้ำมันพืชเป็น soya bean oil และใช้เซลล์แบคทีเรีย *Mycobacterium sp.* DSM 2966 แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ AD และ ADD ในส่วนต่างๆ ของตัวอย่าง ได้แก่ ชั้นน้ำ ชั้นน้ำมัน และ Amberlite

ปั่นแยกตัวอย่างด้วยความเร็วรอบ 3,500 rpm เพื่อแยกชั้นน้ำมันและชั้นน้ำ (ก) นำชั้นน้ำมัน ปริมาตร 100 μ L ละลายด้วย dichloromethane/acetonitrile (1:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 900 μ L นำสารละลายดังกล่าวเพื่อวิเคราะห์ HPLC (ข) นำชั้นน้ำปริมาตร 30 mL และ ethyl acetate ปริมาตร 30 mL มาเขย่าใน separatory funnel ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้น นำชั้น ethyl acetate ปริมาตร 20 mL มาระเหยแห้งบน water bath ละลายส่วนที่เหลือด้วย dichloromethane/acetonitrile (1:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 2 mL นำสารละลายดังกล่าวเพื่อวิเคราะห์ HPLC (ค) นำ Amberlite ทั้งหมดที่ผ่านการกรองอาหารเหลวออกแล้ว มาเติม methanol ปริมาตร 2 mL ลงใน Eppendorf ขนาด 2-mL เขย่าด้วย vortex mixer เป็นระยะเวลา 5 นาที นำสารละลายดังกล่าวเพื่อวิเคราะห์ HPLC



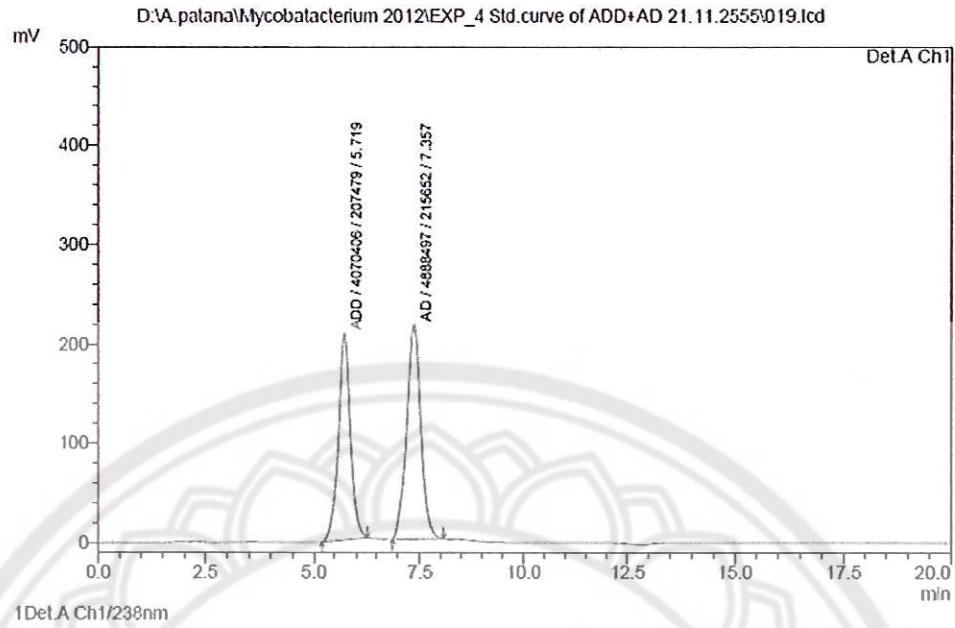
2.2 ผลการวิจัย

2.2.1 การวิเคราะห์กราฟมาตรฐานของ AD และ ADD

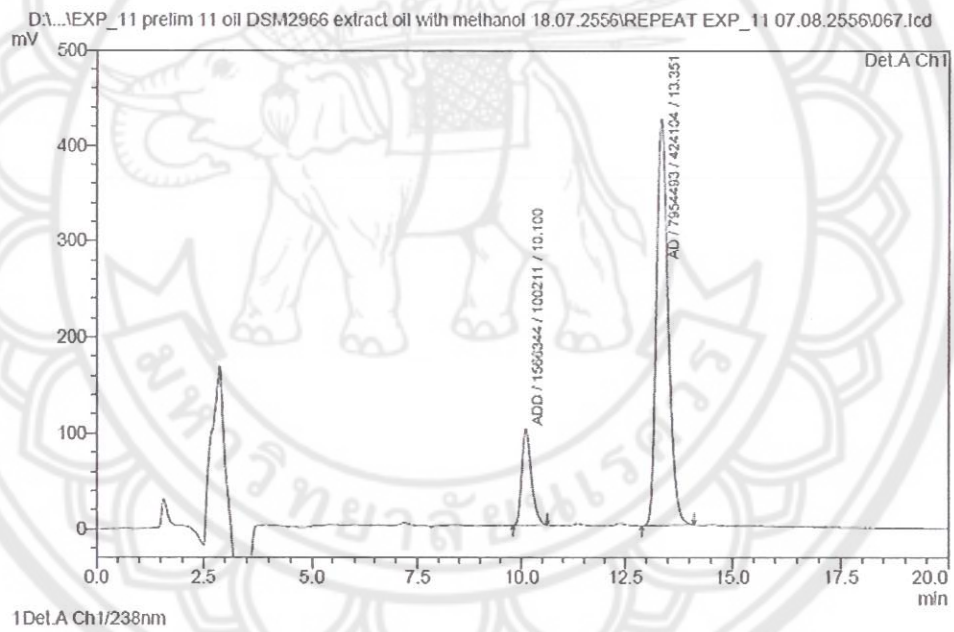
โครมาโตแกรมปรากฏ peak ของ ADD และ AD ที่เวลาประมาณ 5.7 และ 7.3 นาที ตามลำดับ โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละครั้งประมาณ 30 นาที ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน AD และ ADD และการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก *Mycobacterium sp.* DSM 2966 ดังรูป 2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน AD และ ADD กับพื้นที่ใต้ peak แสดงดังตาราง 3 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน AD และ ADD กับพื้นที่ใต้ peak ของช่วงความเข้มข้น 0.0001-0.1 mg/mL (0.0001 0.0005 0.001 0.005 0.01 0.05 และ 0.1 mg/mL) แสดงในรูป 3 สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ AD และ ADD กับพื้นที่ใต้ peak คือ $y=488.41x+0.0286$ ($R^2=0.9999$) และ $y=405.74x+0.0953$ ($R^2=0.9999$) ตามลำดับ

ตาราง 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน AD และ ADD กับ peak area จากเครื่อง HPLC

Concentration (mg/mL)	AD			ADD		
	No.	Peak area	Average ($\times 10^5$)	No.	Peak area	Average ($\times 10^5$)
0.0001	1	5,813	0.05	1	9,938	0.11
	2	4,815		2	12,108	
	3	4,522		3	10,354	
0.0005	1	29,529	0.28	1	31,605	0.30
	2	26,999		2	29,752	
	3	26,775		3	28,635	
0.001	1	52,231	0.51	1	49,037	0.49
	2	51,130		2	48,167	
	3	49,399		3	49,659	
0.005	1	251,800	2.51	1	215,436	2.16
	2	251,023		2	217,556	
	3	250,926		3	215,683	
0.01	1	487,907	4.87	1	415,699	4.12
	2	486,295		2	414,686	
	3	487,024		3	405,212	
0.05	1	2,443,794	24.51	1	2,040,254	20.45
	2	2,453,218		2	2,047,174	
	3	2,454,573		3	2,046,263	
0.1	1	4,888,497	48.84	1	4,070,406	40.64
	2	4,884,700		2	4,063,860	
	3	4,879,992		3	4,057,369	

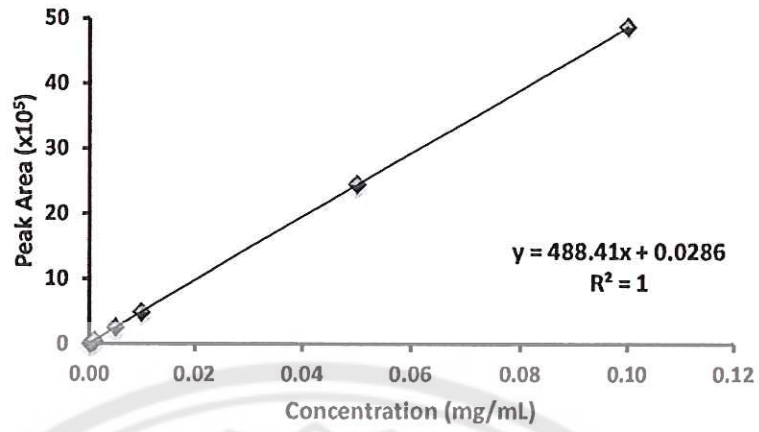


(A)

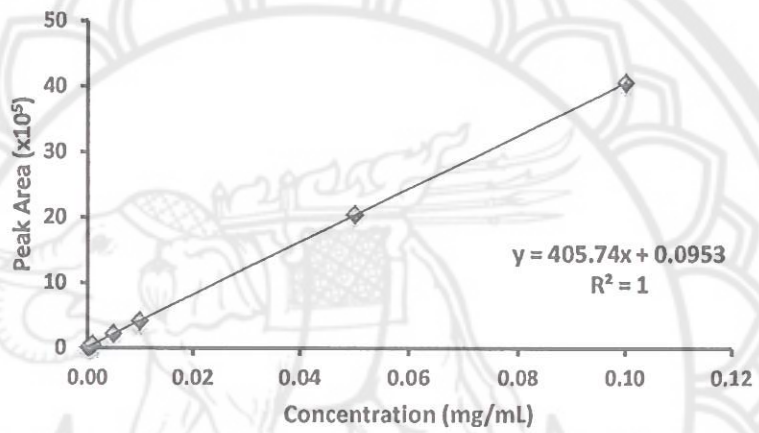


(B)

รูป 2 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน AD และ ADD ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL (A) การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จาก *Mycobacterium sp.* DSM 2966 (B)



(A)



(B)

รูป 3 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับ peak area ของ AD (A) และ ADD (B) จากเครื่อง HPLC

2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ AD และ ADD ในส่วนต่างๆ ของตัวอย่าง

ผลของโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์หาปริมาณ AD และ ADD ในส่วนต่างๆ ของตัวอย่าง ได้แก่ ชั้นน้ำ ชั้นน้ำมัน และ Amberlite แสดงในตาราง 4 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ในชั้นน้ำมัน ชั้นน้ำ และ Amberlite ของตัวอย่าง แสดงในตาราง 5 จากการวิเคราะห์ปริมาณ AD และ ADD ที่เกิดขึ้นพบว่าผลิตภัณฑ์ส่วนมากพบในชั้นน้ำมัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกวิเคราะห์ตัวอย่าง เฉพาะชั้นน้ำมัน เพื่อใช้สำหรับการเปรียบเทียบของการศึกษาต่างๆ

ตาราง 4 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ชั้นน้ำมัน ชั้นน้ำ และ Amberlite ของตัวอย่าง (ใช้ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ สารตั้งต้นเป็น soya bean oil)

Part of sample	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
Oil layer	1	7.600	634,879	5.887	563,621
	2	7.580	866,394	5.875	744,052
	3	7.559	836,594	5.866	746,650
	4	7.506	887,483	5.843	763,270
Water layer	1	7.741	1,015,801	5.991	1,125,986
	2	7.698	1,086,677	5.961	1,221,292
	3	7.670	1,144,998	5.944	1,472,761
	4	7.603	1,243,481	5.911	1,604,170
Amberlite	1	7.578	7,540,140	5.834	7,471,059
	2	7.566	3,446,581	5.825	3,221,255
	3	7.560	2,991,815	5.822	2,466,722
	4	7.558	3,019,753	5.821	2,703,130

ตาราง 5 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ในชั้นน้ำมัน ชั้นน้ำ และ Amberlite ของตัวอย่าง (ใช้ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และสารตั้งต้นเป็น soya bean oil)

Product	No.	Amount (mg/flask)			
		Oil layer	Water layer	Amberlite	Total
AD	1	0.65	0.10	0.31	1.06
	2	0.88	0.11	0.14	1.14
	3	0.85	0.12	0.12	1.09
	4	0.91	0.13	0.12	1.16
	Average	0.82	0.11	0.17	1.13
ADD	1	0.68	0.14	0.37	1.19
	2	0.91	0.15	0.16	1.21
	3	0.91	0.18	0.12	1.21
	4	0.93	0.20	0.13	1.26
	Average	0.86	0.17	0.20	1.22

2.2.3 การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD

ผลโครมาโตแกรมของการศึกษาการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 แสดงในตาราง 6 และ 7 ตามลำดับ

การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ที่เกิดขึ้นจาก *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจากน้ำมันชนิดต่างๆ แสดงในตาราง 8 และ 9 ตามลำดับ

ตาราง 6 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

Substrate	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
Camellia tea oil	1	13.491	1,265,063	10.319	41,620
	2	13.505	782,584	10.284	ND
	3	13.497	829,883	10.337	74,207
Canola oil	1	13.470	21,481,957	10.191	394,981
	2	13.487	18,733,906	10.195	2,416,445
	3	13.477	17,194,876	10.192	617,029
Coconut oil	1	-	ND	-	ND
	2	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	ND
Corn oil	1	13.438	121,284	10.149	20,743
	2	13.427	948,632	10.149	87,874
	3	13.430	286,659	10.149	40,853
Olve oil	1	13.334	365,715	10.232	134,616
	2	13.288	3,459,985	10.067	673,045
	3	13.264	4,314,748	10.153	150,587
Palm olein oil	1	13.252	1,197,511	10.046	14,025
	2	13.245	526,331	-	ND
	3	13.237	33,231	-	ND
Rice bran oil	1	13.230	16,408,629	10.148	320,457
	2	13.228	14,744,265	10.039	259,672
	3	13.277	11,972,877	10.101	220,330
Safflower oil	1	-	ND	-	ND
	2	13.223	6,870,989	10.027	147,477
	3	13.212	7,060,738	10.104	90,400
Sesame oil	1	13.205	2,485,224	10.010	236,141
	2	13.199	4,590,831	10.008	278,117
	3	13.169	205,864	10.036	29,783
Soybean oil	1	13.176	2,357,707	9.992	146,108
	2	13.262	9,114,863	10.046	293,491
	3	13.299	9,599,434	10.067	311,790
Sunflower oil	1	13.332	1,257,811	10.085	137,112
	2	13.352	330,617	10.096	52,006
	3	13.351	7,954,493	10.100	1,566,344

ND= Not Detectable

ตาราง 7 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium* sp. DSM 2967 โดยการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

Substrate	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
Camellia tea oil	1	-	ND	-	ND
	2	13.641	755,121	10.295	455,705
	3	13.642	25,371	10.300	16,252
Canola oil	1	13.622	20,172,554	10.290	6,168,179
	2	13.631	3,283,493	10.287	4,401,945
	3	13.618	15,541,838	10.286	6,197,112
Coconut oil	1	13.630	116,518	10.290	47,071
	2	136.14	14,032	-	ND
	3	-	ND	-	ND
Corn oil	1	13.606	81,289	10.269	59,846
	2	-	ND	-	ND
	3	13.597	84,010	10.269	59,062
Oilve oil	1	13.582	72,483	10.260	55,097
	2	13.583	305,367	10.258	179,179
	3	13.574	17,366	10.256	16,143
Palm olein oil	1	-	ND	-	ND
	2	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	ND
Rice bran oil	1	13.407	10,810	10.232	9,405
	2	13.506	8,253,784	10.242	7,436,822
	3	13.564	218,014	10.245	200,460
Safflower oil	1	13.562	54,226	10.244	105,941
	2	13.558	2,406,378	10.238	5,550,494
	3	13.558	1,938,094	10.240	3,071,862
Sesame oil	1	13.562	108,324	10.243	90,782
	2	-	ND	-	ND
	3	13.558	42,223	10.240	38,468
Soybean oil	1	13.548	8,746,639	10.238	1,173,412
	2	13.549	914,383	10.236	365,677
	3	13.548	2,775,414	10.234	4,175,882
Sunflower oil	1	13.551	5,211,481	10.235	5,901,502
	2	13.544	233,804	10.149	1,139,886
	3	13.535	4,518,478	10.230	7,763,009

ND= Not Detectable

ตาราง 8 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยการ
ใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

Substrate	Concentration (mg%)		
	AD	ADD	Total
Camellia tea oil	0.59	0.04	0.61
Canola oil	11.75	0.84	12.59
Coconut oil	0.00	0.00	0.00
Corn oil	0.28	0.03	0.31
Olve oil	1.66	0.23	1.89
Palm olein oil	0.36	0.00	0.36
Rice bran oil	8.83	0.19	9.02
Safflower oil	4.28	0.08	4.36
Sesame oil	1.49	0.13	1.62
Soybean oil	4.31	0.18	4.49
Sunflower oil	1.95	0.43	2.38

ตาราง 9 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยการ
ใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

Substrate	Concentration (mg%)		
	AD	ADD	Total
Camellia tea oil	0.24	0.17	0.41
Canola oil	7.98	4.13	12.11
Coconut oil	0.04	0.03	0.04
Corn oil	0.03	0.04	0.09
Olve oil	0.08	0.05	0.13
Palm olein oil	0.00	0.00	0.00
Rice bran oil	1.74	1.88	3.61
Safflower oil	0.90	2.14	3.04
Sesame oil	0.04	0.04	0.09
Soybean oil	2.54	1.40	3.95
Sunflower oil	2.04	3.64	5.68

2.2.4 การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD

ผลโครมาโตแกรมของการศึกษาการใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil rice bean oil soya bean oil และ sulflower oil ที่ปริมาณ 5 10 และ 20 g/flask ต่อการผลิต AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 แสดงในตาราง 10 11 12 และ 13 ตามลำดับ และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 แสดงในตาราง 14 15 16 และ 17 ตามลำดับ

การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจากน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ แสดงในตาราง 18 และ 19 ตามลำดับ



ตาราง 10 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณต่างๆ

Weight of added vegetable oil (g/flask)	No.	AD		ADD	
		Retention time (min)	Peak area	Retention time (min)	Peak area
5	1	13.193	125,547	10.023	40,027
	2	13.173	20,115,959	10.005	1,423,826
	3	13.175	20,994,456	10.007	948,511
10	1	13.198	1,722,814	10.011	3,340,406
	2	13.192	2,218,728	10.014	765,329
	3	13.195	2,558,721	10.016	951,160
20	1	13.166	4,103,398	9.999	1,329,303
	2	13.147	193,509	10.005	113,175
	3	13.138	91,286	10.006	123,207

ตาราง 11 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น rice bean oil ที่ปริมาณต่างๆ

Weight of added vegetable oil (g/flask)	No.	AD		ADD	
		Retention time (min)	Peak area	Retention time (min)	Peak area
5	1	13.130	6,139,580	9.997	213,524
	2	13.120	10,402,405	9.825	505,778
	3	13.121	7,414,678	9.969	197,529
10	1	13.126	236,497	-	ND
	2	13.118	12,054,761	9.913	129,427
	3	13.125	316,339	-	ND
20	1	13.128	639,006	9.844	81,681
	2	13.129	80,792	-	ND
	3	13.120	33,295	-	ND

ตาราง 12 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น soya bean oil ที่ปริมาณต่างๆ

Weight of added vegetable oil (g/flask)	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
5	1	13.118	9,648,988	9.971	318,897
	2	13.123	1,830,412	9.971	167,169
	3	13.125	2,550,005	9.973	354,556
10	1	13.113	11,505,616	9.951	466,982
	2	13.109	10,805,730	9.965	644,322
	3	13.105	14,087,047	9.964	364,290
20	1	13.113	162,587	-	ND
	2	13.127	15,761	-	ND
	3	-	ND	-	ND

ตาราง 13 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น sunflower oil ที่ปริมาณต่างๆ

Weight of added vegetable oil (g/flask)	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
5	1	13.117	1,878,833	9.967	698,952
	2	13.112	9,946,934	9.967	450,068
	3	13.115	2,292,684	9.961	7,752,940
10	1	13.118	194,190	9.964	297,163
	2	13.134	87,224	9.966	76,121
	3	13.113	12,293,618	9.962	423,329
20	1	13.121	450,021	9.967	31,937
	2	13.116	95,991	-	ND
	3	13.113	67,452	-	ND

ตาราง 14 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณต่างๆ

Weight of added vegetable oil (g/flask)	No.	AD		ADD	
		Retention time (min)	Peak area	Retention time (min)	Peak area
5	1	13.135	15,473,681	9.992	9,005,238
	2	13.143	1,666,229	9.996	274,089
	3	13.153	18,042,936	10.010	1,850,151
10	1	13.122	16,264,382	9.990	6,013,248
	2	13.136	3,878,679	9.990	2,596,672
	3	13.154	9,371,601	10.012	11,054,424
20	1	13.121	3,429,285	9.979	6,786,061
	2	13.101	12,431,423	9.972	6,484,211
	3	13.114	12,570,708	9.986	6,989,996

ตาราง 15 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น rice bean oil ที่ปริมาณต่างๆ

Weight of added vegetable oil (g/flask)	No.	AD		ADD	
		Retention time (min)	Peak area	Retention time (min)	Peak area
5	1	13.102	12,614,352	9.976	4,100,151
	2	13.078	7,052,199	9.955	539,177
	3	13.126	9,596,122	9.982	1,535,623
10	1	13.141	7,019,948	9.993	2,522,448
	2	13.085	13,086,952	9.958	2,545,375
	3	13.072	7,187,853	9.947	4,779,834
20	1	13.086	5,518,817	9.957	1,741,505
	2	13.105	4,337,357	9.971	2,292,457
	3	13.097	1,005,339	9.963	287,154

ตาราง 16 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น soya bean oil ที่ปริมาณต่างๆ

Weight of added vegetable oil (g/flask)	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
5	1	13.101	6,051,302	9.964	523,274
	2	13.070	8,726,531	9.950	871,562
	3	13.081	9,473,541	9.947	660,638
10	1	13.092	9,957,463	9.962	2,237,692
	2	13.078	6,054,052	9.956	1,913,482
	3	13.051	9,492,138	9.934	2,650,320
20	1	13.057	2,230,559	9.933	863,527
	2	13.057	4,685,012	9.937	1,993,024
	3	13.083	4,078,262	9.959	3,127,659

ตาราง 17 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นเป็น sunflower oil ที่ปริมาณต่างๆ

Weight of added vegetable oil (g/flask)	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
5	1	13.051	2,314,514	9.930	3,776,965
	2	13.055	8,875,410	9.937	3,349,840
	3	13.045	7,050,085	9.927	2,006,955
10	1	13.045	3,821,834	9.926	3,218,867
	2	13.055	5,058,068	9.927	1,449,495
	3	13.043	6,345,057	9.925	2,261,269
20	1	13.039	8,427,702	9.924	3,916,915
	2	13.050	123,347	9.926	58,719
	3	13.043	2,090,905	9.924	1,031,068



ตาราง 18 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ

สำนักหอสมุด

ไอ. ๖๙๖๕ 21

๒๖ มี.ค. ๒๕๕๘

Substrate	Weight of vegetable oil (g/flask)	Concentration (mg%)		
		AD	ADD	Total
Canola oil	5	8.44	0.59	9.03
	10	2.66	2.48	5.14
	20	3.59	1.52	5.10
Rice bean oil	5	4.90	0.22	5.12
	10	5.16	0.18	5.22
	20	0.61	0.21	0.68
Soya bean oil	5	2.87	0.20	3.07
	10	14.90	0.71	15.61
	20	0.21	0.00	0.21
Sunflower oil	5	2.89	2.19	5.08
	10	5.15	0.38	5.52
	20	0.50	0.07	0.52

ตาราง 19 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจากน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ

Substrate	Weight of vegetable oil (g/flask)	Concentration (mg%)		
		AD	ADD	Total
Canola oil	5	7.20	2.74	9.94
	10	12.08	9.68	21.76
	20	23.28	19.95	43.22
Rice bean oil	5	5.99	1.51	7.50
	10	11.17	4.84	16.01
	20	8.89	4.23	13.12
Soya bean oil	5	4.96	0.50	5.46
	10	10.44	3.34	13.78
	20	9.00	5.87	14.87
Sunflower oil	5	3.73	2.24	5.98
	10	6.23	3.40	9.63
	20	8.71	4.91	13.62

2.2.5 การศึกษาผลการใช้เซลล์ตรึง alginate และ Celite ต่อการผลิต AD และ ADD

ผลโครมาโตแกรมของการศึกษาการใช้เซลล์ตรึง alginate และ Celite ต่อการผลิต AD และ ADD โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 ที่เลี้ยงในสารละลายบัฟเฟอร์ แสดงในตาราง 20 และ 21 ตามลำดับ และที่เลี้ยงในอาหารเหลว แสดงในตาราง 22 และ 23 ตามลำดับ

การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในสารละลายบัฟเฟอร์ แสดงในตาราง 24 และ 25 ตามลำดับ และที่เลี้ยงในอาหารเหลว แสดงในตาราง 26 และ 27 ตามลำดับ

ตาราง 20 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในสารละลายบัฟเฟอร์ (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)

Type of cell	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
Free cell centrifuged	1	-	ND	-	ND
	2	13.354	11,049	-	ND
	3	13.334	11,506	-	ND
	4	-	ND	-	ND
	5	13.352	11,103	-	ND
Immobilized cell in alginate	1	-	ND	-	ND
	2	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	ND
	4	-	ND	-	ND
	5	-	ND	-	ND
Immobilized cell in Celite	1	-	ND	-	ND
	2	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	ND
	4	-	ND	-	ND
	5	-	ND	-	ND

ตาราง 21 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในสารละลายบัพเฟอร์ (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)

Type of cell	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
Free cell centrifuged	1	-	ND	-	ND
	2	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	ND
	4	-	ND	-	ND
	5	-	ND	-	ND
Immobilized cell in alginate	1	-	ND	-	ND
	2	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	ND
	4	-	ND	-	ND
	5	-	ND	-	ND
Immobilized cell in Celite	1	-	ND	-	ND
	2	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	ND
	4	-	ND	-	ND
	5	-	ND	-	ND

ตาราง 22 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)

Type of cell	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
Free cell centrifuged	1	12.913	26,371	9.845	43,185
	2	12.888	5,220,474	9.835	11,019,110
	3	12.891	65,603	9.832	226,126
	4	12.874	2,931,441	9.829	3,325,817
	5	12.872	9,367,046	9.824	13,973,656
Immobilized cell in alginate	1	12.857	8,039,205	9.818	2,986,834
	2	12.836	243,741	9.810	235,897
	3	12.880	106,406	9.837	101,982
	4	12.850	52,451	9.817	38,769
	5	12.861	35,586	9.743	132,208
Immobilized cell in Celite	1	12.846	2,724,701	9.813	3,118,254
	2	12.852	115,862	9.872	218,183
	3	12.862	21,468	9.788	92,486
	4	12.887	6,762,352	9.796	15,680,743
	5	12.824	6,116,943	9.795	12,026,174

ตาราง 23 ค่า retention time และ peak area ของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่ได้จากโครมาโตแกรมของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)

Type of cell	No.	AD		ADD	
		Retetion time (min)	Peak area	Retetion time (min)	Peak area
Free cell centrifuged	1	13.757	17,419	9.726	131,200
	2	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	ND
	4	-	ND	9.684	51,694
	5	13.626	697,027	9.683	57,214
Immobilized cell in alginate	1	13.695	476,425	9.790	148,606
	2	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	ND
	4	13.574	256,459	-	ND
	5	-	ND	-	ND
Immobilized cell in Celite	1	13.618	123,132	-	ND
	2	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	ND
	4	-	ND	-	ND
	5	-	ND	-	ND

ตาราง 24 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 ในรูป เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในสารละลายบัพเฟอร์ (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)

Type of cell	Concentration (mg%)		
	AD	ADD	Total
Free cell centrifuged	0.00	0.00	0.00
Immobilized cell in alginate	0.00	0.00	0.00
Immobilized cell in Celite	0.00	0.00	0.00

ตาราง 25 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 ในรูป เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในสารละลายบัพเฟอร์ (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)

Type of cell	Concentration (mg%)		
	AD	ADD	Total
Free cell centrifuged	0.01	0.00	0.01
Immobilized cell in alginate	0.00	0.00	0.00
Immobilized cell in Celite	0.00	0.00	0.00

ตาราง 26 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 ในรูป เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)

Type of cell	Concentration (mg%)		
	AD	ADD	Total
Free cell centrifuged	2.16	4.22	6.38
Immobilized cell in alginate	1.04	0.51	1.55
Immobilized cell in Celite	1.93	4.60	6.53

ตาราง 27 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์เฉลี่ย AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 ในรูป เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)

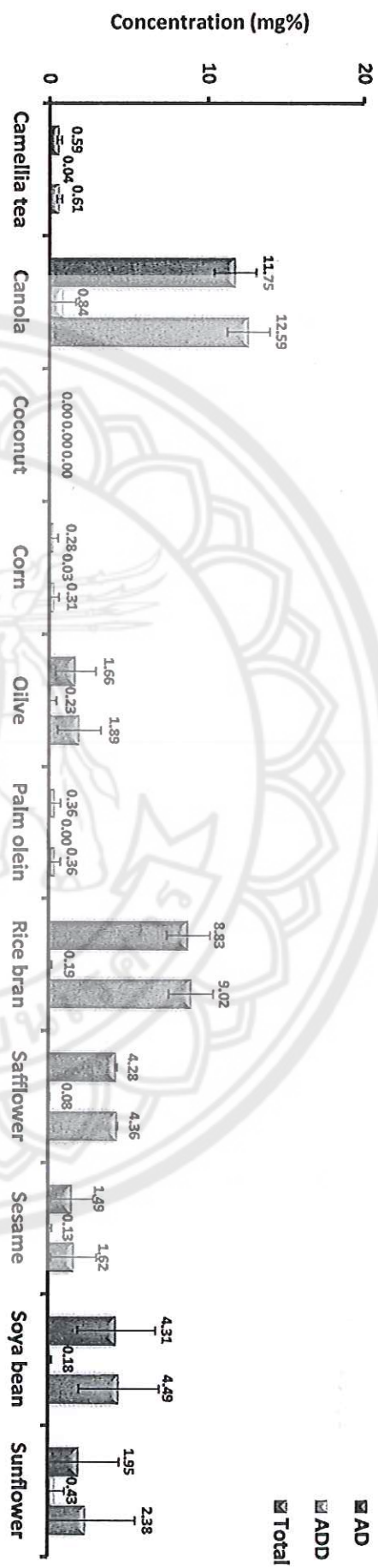
Type of cell	Concentration (mg%)		
	AD	ADD	Total
Free cell centrifuged	0.22	0.05	0.20
Immobilized cell in alginate	0.22	0.10	0.27
Immobilized cell in Celite	0.07	0.00	0.07

3. อภิปรายผลการวิจัย

3.1 การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD

การศึกษามผลของการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยการเติมน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ camellia tea oil canola oil coconut oil corn oil olive oil palm olein oil rice bran oil safflower oil sesame oil soya bean oil และ sunflower oil ลงในอาหารเหลว เมื่อเปรียบเทียบน้ำมันทุกชนิดพบว่า canola oil rice bran oil และ soya bean oil ให้ผลิตภัณฑ์รวม androstenone สูงสุด 3 อันดับแรกจากมากไปน้อยตามลำดับ สำหรับ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ canola oil sunflower oil และ rice bran oil ให้ผลิตภัณฑ์รวม androstenone สูงสุด 3 อันดับแรกจากมากไปน้อยตามลำดับ สำหรับ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 ดังรูป 4 และ 5 ส่วนกรณีของ coconut oil palm olein oil และ corn oil พบผลิตภัณฑ์รวมของ androstenone น้อยที่สุดหรือไม่เกิดขึ้น ทั้งเชื้อ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 น้ำมันแต่ละชนิดให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ไม่เท่ากัน เนื่องจากในน้ำมันพืชแต่ละชนิดมีปริมาณและชนิดของ phytosterol ที่แตกต่างกัน [13] การใช้ไขมันพืชแทน phytosterol บริสุทธิ์ช่วยลดต้นทุนการผลิต AD และ ADD ลง เนื่องจากกระบวนการแยกไฟโตสเตอรอลให้เป็นสารบริสุทธิ์ค่อนข้างยุ่งยาก [14]

จากรายงานในอดีตพบอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ AD และ ADD แตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียทั้งสองชนิด โดย *Mycobacterium sp.* DSM 2966 มักให้ AD เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ส่วน *Mycobacterium sp.* DSM 2967 ให้ ADD เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ทั้งนี้เกิดขึ้นจาก *Mycobacterium sp.* DSM 2967 มีการทำงานของเอนไซม์ Δ^1 -dehydrogenase ที่เด่นกว่า *Mycobacterium sp.* DSM 2966 จึงสามารถเปลี่ยน AD ไปเป็น ADD ได้มาก [7] แต่จากการศึกษาพบว่า *Mycobacterium sp.* DSM 2967 มีประสิทธิภาพการผลิต AD มากกว่า ADD ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียหรือแบคทีเรียมีการกลายพันธุ์ เพราะแบคทีเรียดังกล่าวถูกใช้ต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลาานาน



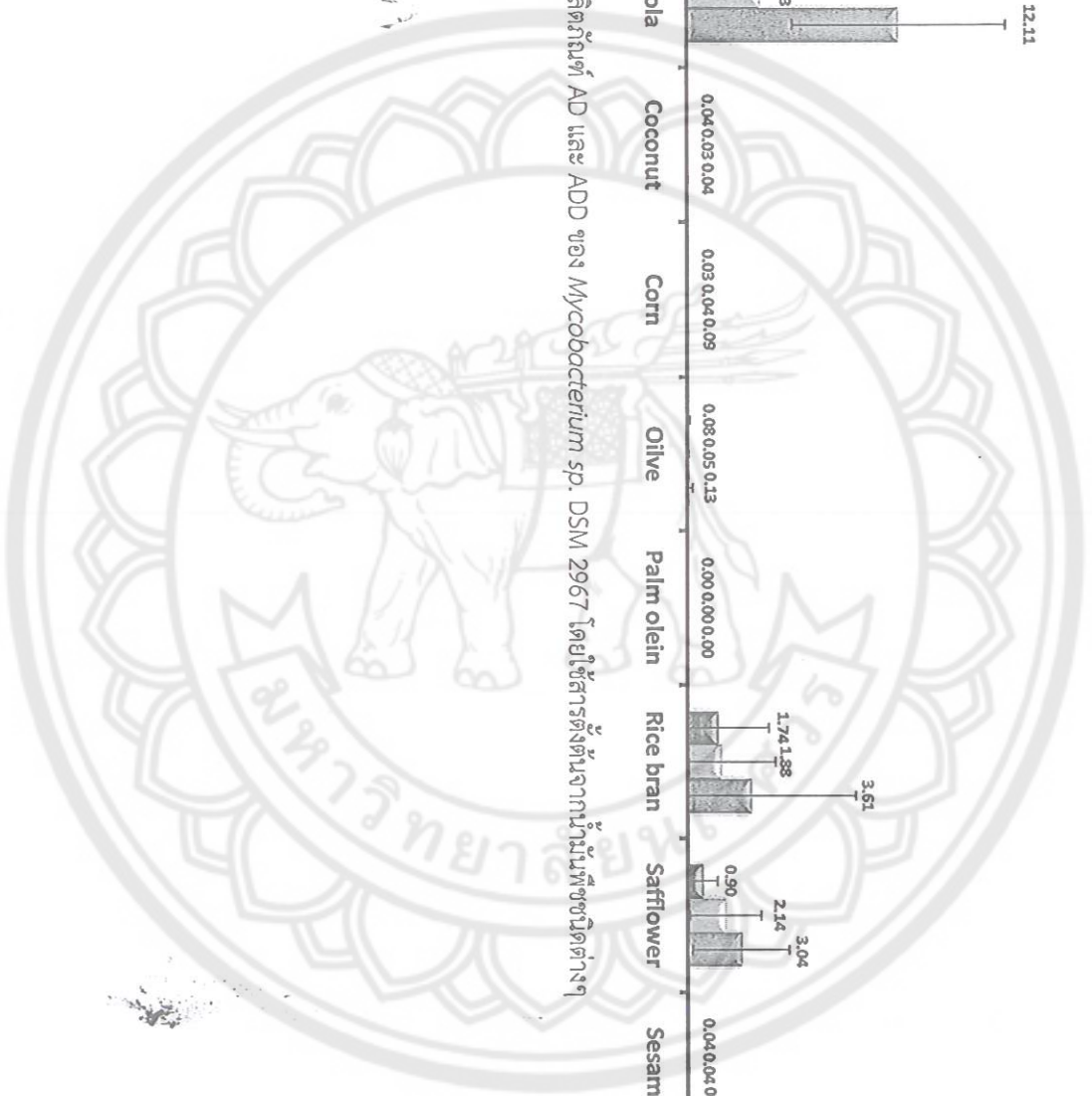
รูป 4

การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium* sp. DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นจากน้ำมันพืชชนิดต่างๆ



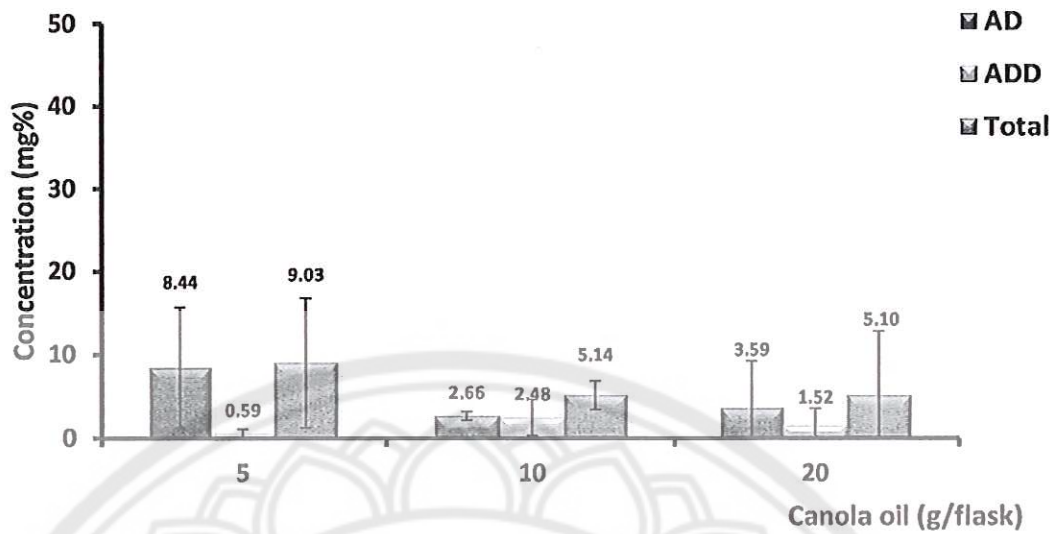
รูป 5

การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium* sp. DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจากน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

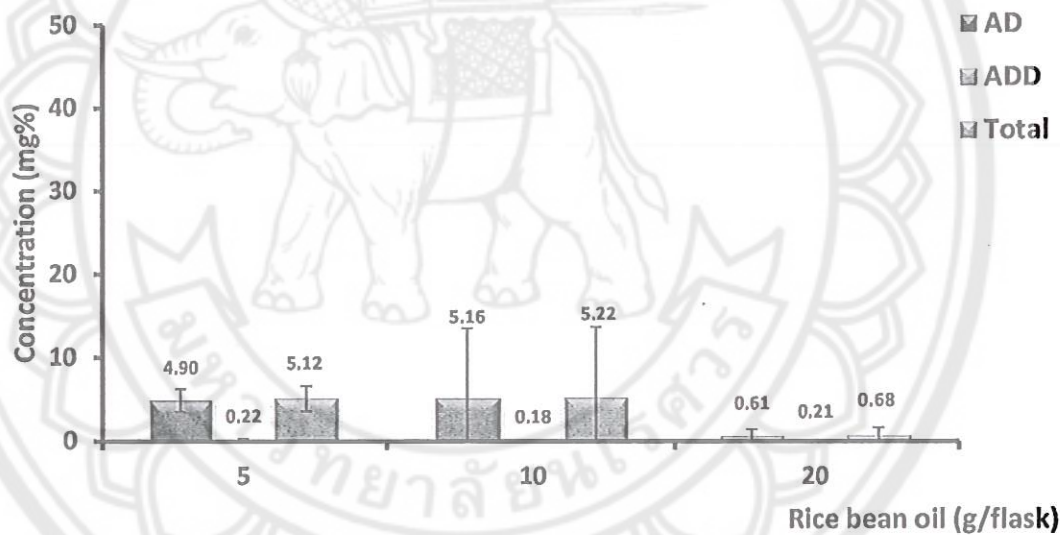


3.2 การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD

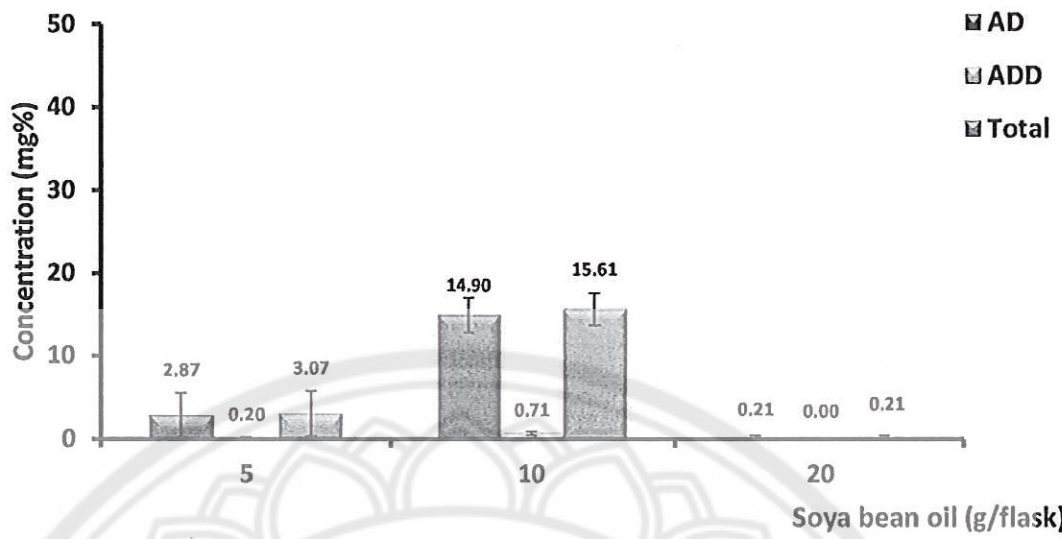
การศึกษาผลการใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ ต่อการผลิต AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยการเติมน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ 5 10 และ 20 g/flask ลงในอาหารเหลว น้ำมันพืชที่เลือกใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ canola oil rice bran oil soya bean oil และ sunflower oil ดังรูป 6 7 8 และ 9 ตามลำดับ สำหรับ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 และรูป 10 11 12 และ 13 ตามลำดับ สำหรับ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 พบว่าแนวโน้มการผลิต AD และ ADD ของแบคทีเรียทั้งสองโดยรวมของน้ำมันทุกชนิดที่ศึกษามีความแตกต่างกัน โดยที่ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 จะให้ปริมาณ AD และ ADD ลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันพืชในอาหารเหลว ในขณะที่ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 จะให้ปริมาณ AD และ ADD เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันพืชในอาหารเหลว ทำให้ไม่เป็นไปตามสมมุติฐานที่คาดไว้ว่า ปริมาณน้ำมันพืชที่เติมลงไปในการเพาะเลี้ยงโดยตรงกับปริมาณของผลิตภัณฑ์ androstenone ที่เกิดขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการละลายของน้ำมันพืชในอาหารเหลวมีขีดจำกัด ดังนั้น phytosterol ที่ไม่สามารถละลายในอาหารเหลวได้ก็จะไม่สามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้



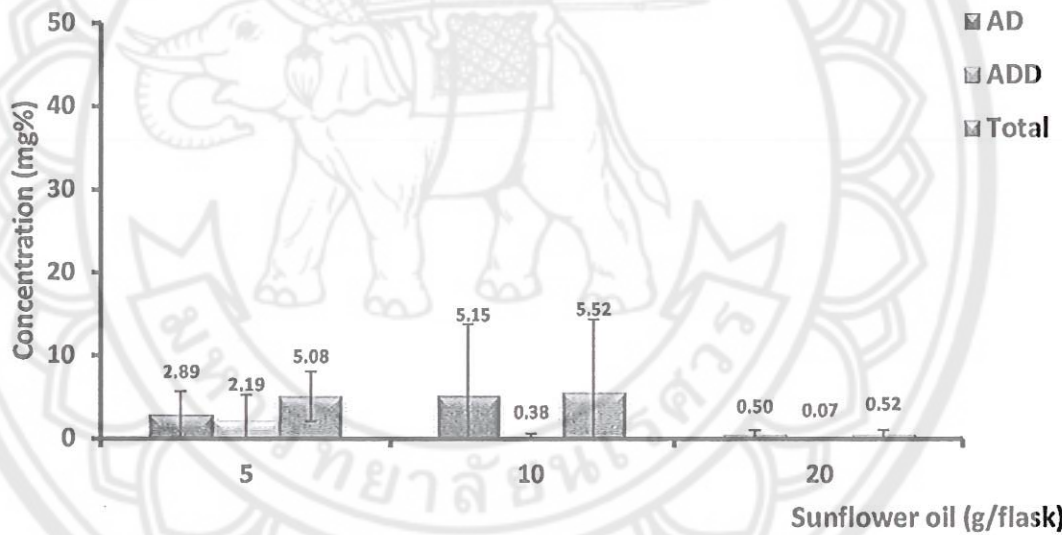
รูป 6 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นจาก canola oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ



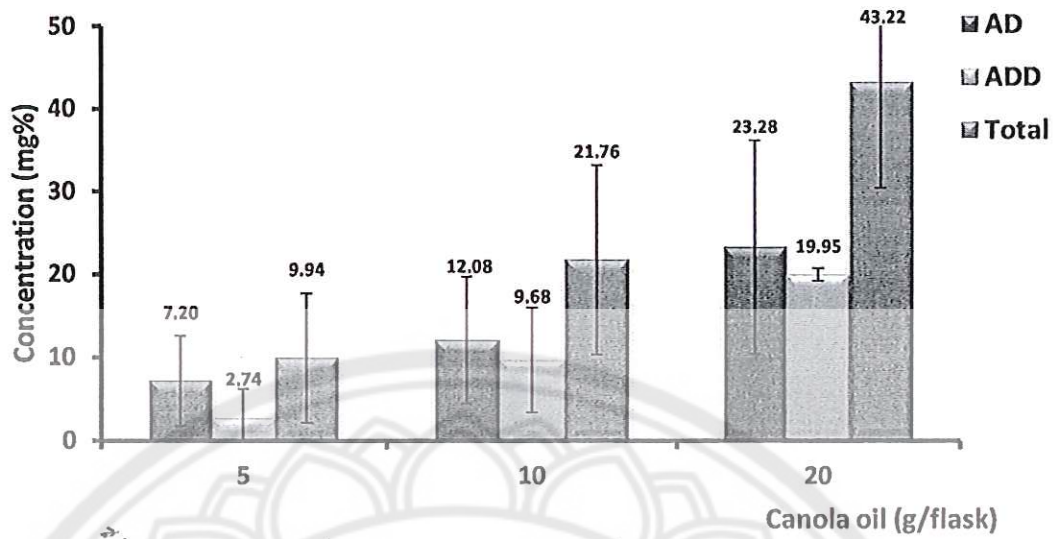
รูป 7 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นจาก rice bean oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ



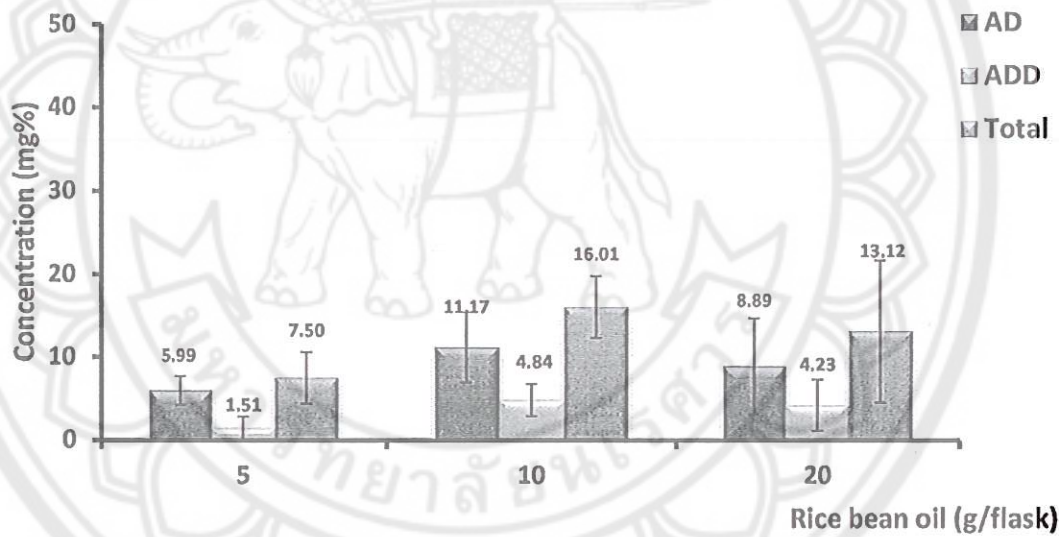
รูป 8 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นจาก soya bean oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ



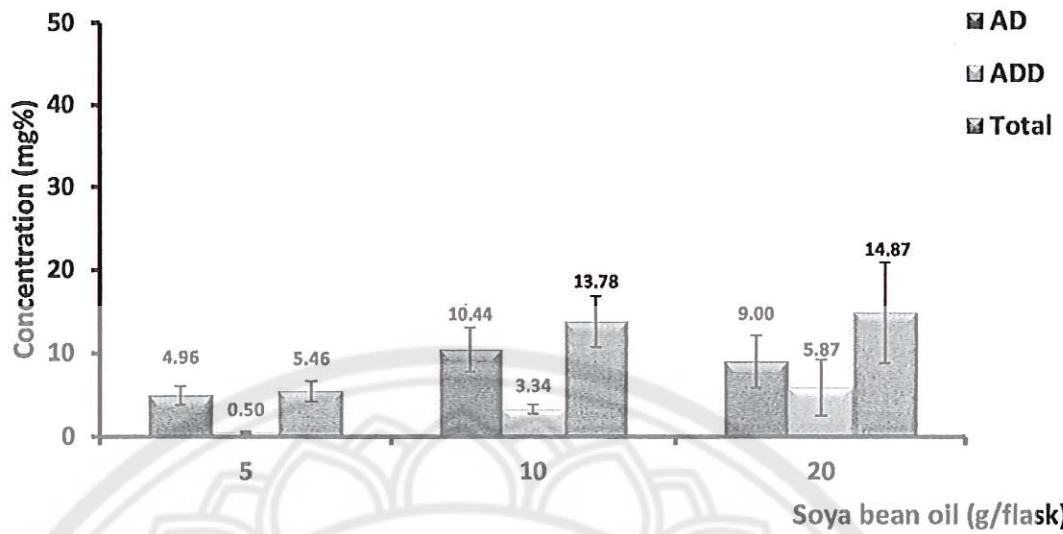
รูป 9 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 โดยใช้สารตั้งต้นจาก sunflower oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ



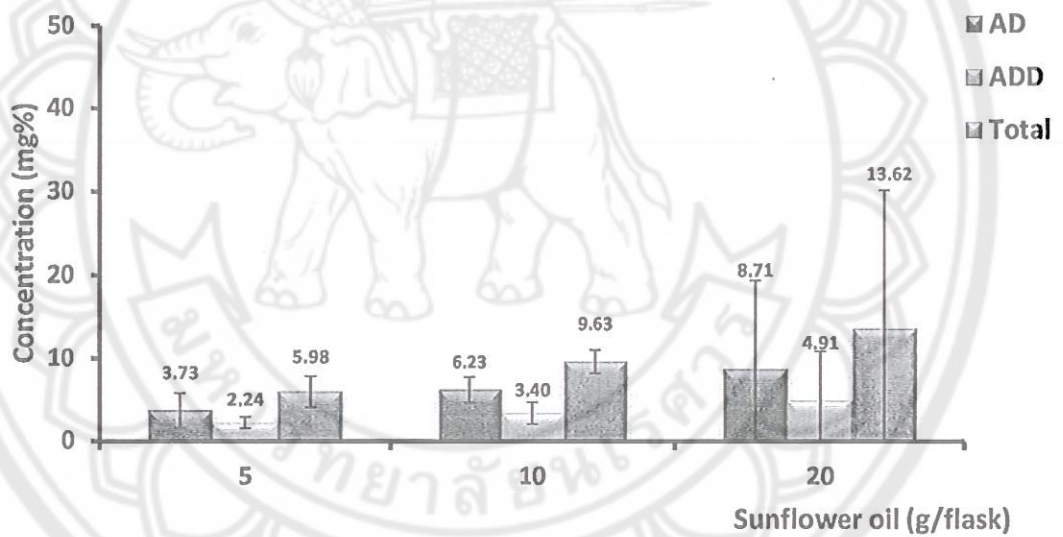
รูป 10 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของเชื้อ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจาก canola oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูป 11 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจาก rice bean oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูป 12 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจาก soya bean oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ

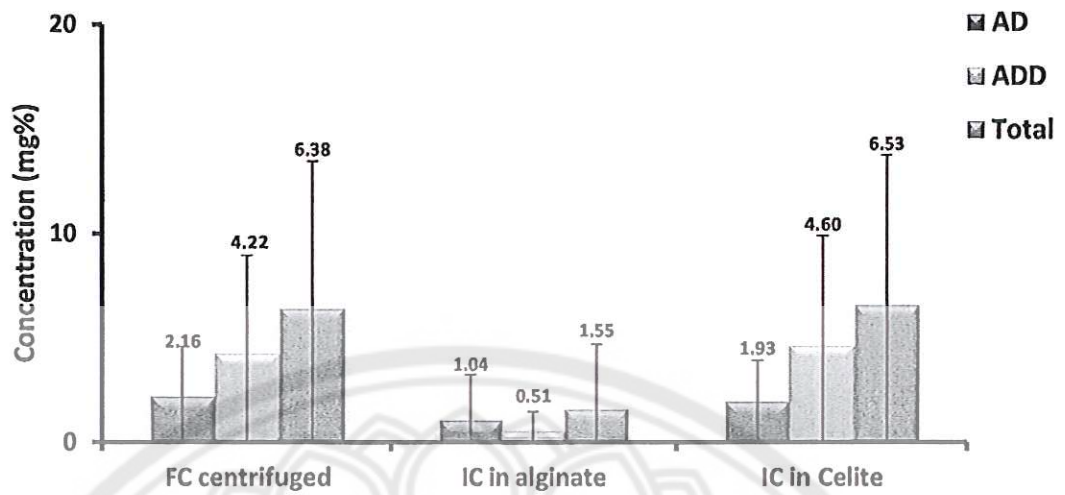


รูป 13 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 โดยใช้สารตั้งต้นจาก sunflower oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ

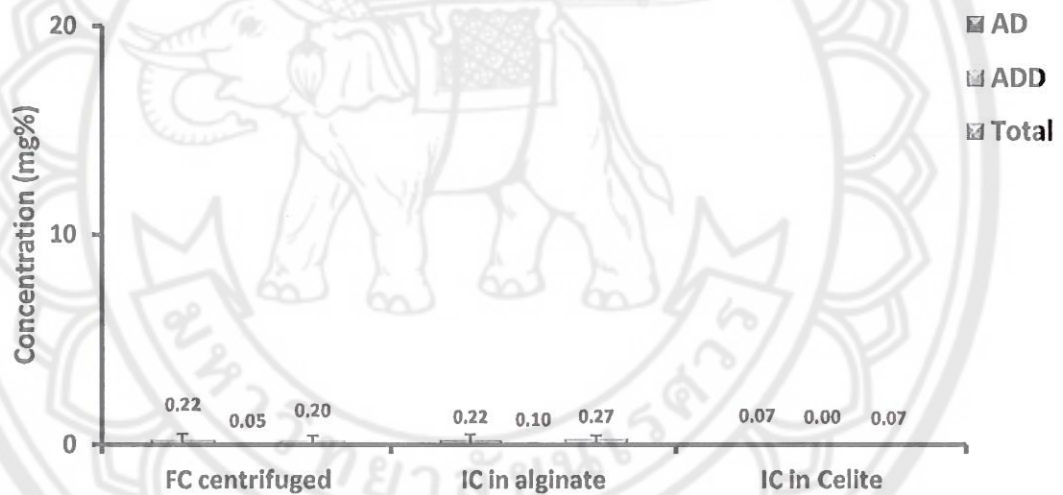
3.3 การศึกษาผลการใช้เซลล์ตรึง alginate และ Celite ต่อการผลิต AD และ ADD

การตรึงเซลล์มีประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น เซลล์ตรึงสามารถแยกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย เซลล์ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ เซลล์ตรึงสามารถใช้งานได้อย่างต่อเนื่อง เซลล์ตรึงสามารถเพิ่มการเก็บกักแบคทีเรียได้มากขึ้น เซลล์ตรึงสามารถป้องกันการถูกทำลายของเซลล์จากสภาวะแวดล้อม เป็นต้น การศึกษาผลการใช้เซลล์ตรึง alginate และ Celite เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระต่อการผลิต AD และ ADD การศึกษาใน *Mycobacterium sp.* DSM 2966 ที่มีการเติม canola oil ในอาหารเหลว พบว่าเซลล์ตรึง Celite ให้ผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ใกล้เคียงกับเซลล์อิสระที่ได้จากการปั่น และให้ผลิตภัณฑ์มากกว่าเซลล์ตรึง alginate ดังรูป 14 ส่วนการศึกษาใน *Mycobacterium sp.* DSM 2967 ที่มีการเติม canola oil ในอาหารเหลว พบว่าทั้งเซลล์ตรึง alginate และ Celite และเซลล์อิสระที่ได้จากการปั่นให้ผลิตภัณฑ์ AD และ ADD น้อยมาก ดังรูป 15 ทั้งนี้อาจเกิดจากเซลล์ที่ใช้ตรึงมีปริมาณน้อยเกินไป เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระที่มีการเจริญซึ่งมีจำนวนเซลล์ที่มากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้เซลล์ตรึงอาจส่งผลให้การสัมผัสระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์เป็นไปได้ยากขึ้น ดังนั้นจึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์น้อย [14,15] เมื่อเปลี่ยนชนิดของน้ำมันพืชในอาหารเหลวเป็น soya bean oil พบว่าผลการทดลองมีลักษณะคล้ายกับการใช้ canola oil (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

การใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนอาหารเหลว พบว่าทั้งเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระที่ได้จากการปั่นไม่สามารถผลิต AD และ ADD ได้ เนื่องจากแบคทีเรียมีความจำเป็นต้องใช้สารอาหารในระหว่างขั้นตอนการผลิต AD และ ADD หรือเซลล์ที่ใช้เตรียมในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงยังอยู่ในสภาพไม่เหมาะสมสำหรับการใช้งาน



รูป 14 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2966 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)



รูป 15 การเปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ของ *Mycobacterium sp.* DSM 2967 ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงที่เลี้ยงในอาหารเหลว (โดยใช้สารตั้งต้นเป็น canola oil ที่ปริมาณ 5 g/flask)

4. สรุปและเสนอแนะ

Mycobacterium sp. DSM 2966 และ *Mycobacterium* sp. DSM 2967 สามารถผลิต AD และ ADD ได้โดยใช้น้ำมันพืชเป็นสารตั้งต้น ผลการศึกษามีความแปรปรวนสูงทั้งในการทดลองเดียวกัน และระหว่างการทดลองแต่ละครั้ง อาจเกิดจากปริมาณเซลล์ในแต่ละครั้งของการทดลองไม่เท่ากันหรือสถานะของการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไม่เหมาะสม การแก้ไขจึงควรใช้วิธีตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้น รวมทั้งการปรับแก้ไขวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ให้เหมาะสม เนื่องจากในระบบที่มีน้ำมันมักมีผลรบกวนต่อการวิเคราะห์ HPLC ผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่เกิดขึ้นมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย การเลือกใช้ชนิดของน้ำมันพืชเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากในน้ำมันพืชแต่ละชนิดมีปริมาณและชนิดของ phytosterol ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ AD และ ADD ที่แตกต่างกัน ปริมาณน้ำมันพืชที่ใช้เป็นสารตั้งต้นมีผลต่อปริมาณการผลิต AD และ ADD การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง alginate และเซลล์ตรึง Celite ไม่ช่วยทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ AD และ ADD เพิ่มขึ้น ผลการศึกษาของเซลล์ตรึงไม่แตกต่างจากการศึกษาที่ได้จากเซลล์อิสระที่ได้จากการปั่น ปัจจัยหลักที่ทำให้เซลล์ตรึงไม่มีประสิทธิภาพอาจเนื่องมาจากการใช้เซลล์ที่มีปริมาณน้อยเกิน

เอกสารอ้างอิง

- [1] Malaviya A, Gomes J. (2008). Androstenedione production biotransformation of phytosterols. *Bioresource Technol.* 99: 6725-6737.
- [2] Fernandes P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro HM, Cabral JMS. (2003). Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 688-705.
- [3] Mahato SB, Mukherjee A. (1984). Steroid transformations by microorganisms. *Phytochemistry* 23: 2131-2154.
- [4] Mahato SB, Majumdar I. (1993). Current trends in microbial steroid biotransformation. *Phytochemistry* 34: 883-898.
- [5] Donova MV, Dovbnaya DV, Sukhodolskaya GV, Khomutov SM, Nikolayeva VM, Kwon I, Han K. (2005). Microbial conversion of sterol-containing soybean oil production waste. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 55-60.
- [6] Huang CL, Chen YR, Liu WH. (2006). Production of androstenones from phytosterol by mutants of *Mycobacterium* sp. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 296-300.
- [7] Sripalakit P, Wichai U, Saraphanchotiwitthaya A. (2006). Biotransformation of various natural sterols to androstenones by *Mycobacterium* sp. and some steroid-converting microbial strains. *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 41, 49-54.
- [8] Romanczyk Jr. LJ, McClelland C. (2001). Extraction of sterols from cocoa hulls. WO 0179400.
- [9] Perez C, Falero A, Llanes N, Hung BR, Harve ME, Pamero A, Marti E. (2003). Resistance to androstanes as an approach for androstenedione yield enhancement in industrial mycobacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 623-626.
- [10] Lin Y, Song X, Fu J, Lin J, Qu Y. (2009). Microbial transformation of phytosterol in corn flour and soybean flour to 4-androstene-3,17-dione by *Fusarium moniliforme* Sheld. *Bioresource Technol.* 100: 1864-1867.

- [11] Yamaya A, Endo Y, Fujimoto K, Kitamura K. (2007). Effects of genetic variability and planting location on the phytosterol content and composition in soybean seeds. *Food Chem.* 102: 1071–1075
- [12] Vlahakis C, Hazebroek J. (2000). Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 49-53
- [13] Abidi SL. (2001). Chromatographic analysis of plants sterols in foods and vegetable oils. *J. Chrom. A* 935: 173-201.
- [14] Fernandes P, Cabral JMS. (2007). Phytosterols: applications and recovery methods. *Biores. Technol.* 98: 2335–2350.
- [15] El-Hadi AA. (2003). Factor affecting the production of prednisolone by immobilization of *Bacillus pumillus* E601 cells in poly(vinyl alcohol) cryogels produced by radiation polymerization. *Process Biochem.* 38: 1659-1664.
- [16] Kloosterman J, Lilly MD. (1984). Effect of supersaturated aqueous hydrocortisone concentrations on the Δ^1 -dehydrogenase activity of free and immobilized *Arthroacter simplex*. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 113-116.

ภาคผนวก ก
การรายงานตัวชี้วัด

1. กรณีที่นำเสนอในการประชุมหรือสัมมนาในระดับชาติและนานาชาติ

ชื่อผู้วิจัย: พัฒนา ศรีพากิจ จรรยา รุ่งเกสร อรสร สารพันโชติวิทยา
วัน เดือน ปี ที่นำเสนอ: 19-21 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2557
ชื่อผลงานที่นำเสนอ: Optimization of 4-androstene-3,17-dione and 1,4-androstadiene-3,17-dione productions from vegetable oils by *Mycobacterium sp.*
รูปแบบการนำเสนอ: โปสเตอร์ (หมายเลข PP-S2-15) ที่มีการตีพิมพ์เป็น Proceedings (หน้า 171)
ชื่อการประชุมวิชาการ: The 1st ASEAN Microbial Biotechnology Conference (AMBC2014)
เมือง/สถานที่ที่นำเสนอ: ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค กรุงเทพฯ
ประเทศที่นำเสนอ: ประเทศไทย



The 1st ASEAN Microbial Biotechnology Conference
AMBC2014

19 – 21 February 2014

Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Bangkok, Thailand

20 December 2013

Assoc.Prof.Dr. Pattana Sripalakit
Naresuan University,
Thailand
Email: pattanas@nu.ac.th

Notification of Paper Acceptance and Letter of Invitation

Dear Assoc.Prof.Dr. Pattana Sripalakit,

It is our pleasure to inform you that your abstract titled "Optimization of 4-androstene-3,17-dione and 1,4-androstadiene-3,17-dione productions from vegetable oils by *Mycobacterium* sp." has been accepted for an oral presentation for the session on - Industrial biotechnology at The 1st ASEAN Microbial Biotechnology Conference (AMBC2014) at the Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Bangkok, Thailand during 19 – 21 February 2014. Also, we would like to take this opportunity to invite you to join the conference as an oral presenter.

As the abstract will be published in the book of abstract and distributed at the conference, we request you to kindly send us your well proofed abstract in a page of A4 ONLY in "WORD" format before 15 January 2014, in case, if any corrections be needed, please have it done within the time stated.

Payment received by 15 January 2014: Your abstract will be entitled to publish in AMBC2014 book of abstract and you are welcome to present your paper at the oral session.

Payment received 16 January 2014 onwards: Your paper will not be accepted for the conference. Nevertheless, you are welcome to join the conference as a regular participant.

Finally, we look forward to seeing you at AMBC2014, Bangkok, Thailand.

Yours sincerely,

Chutima Chaochaiya

Miss Chutima Chaochaiya
AMBC2014 Secretariat

Conference Secretariat
Tel: (66-2) 564 6700 Ext. 3379 – 3382
Fax: (66-2) 564 6704
e-mail: ambc2014@biotec.or.th

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง
จังหวัดปทุมธานี 12120 โทรศัพท์ 0 2564 6700 โทรสาร 0 2564 6701-5

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
National Science and Technology Development Agency
113 Thailand Science Park, Phahonyothin Road, Klung 1, Klung Luang, Pathumthani 12120, Thailand.
Tel. +66 2564 6700 Fax. +66 2564 6701-5 <http://www.biotec.or.th>



The 1st ASEAN Microbial Biotechnology Conference

Book of Abstracts

AMBC 2014

19 - 21 February 2014

Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC)

Bangkok, Thailand

Host Organizations



NSTDA

BIOTEC
a member of NSTDA

Supported by



รูป 17 ปกหนังสือการประชุม

PP-S2-15

Optimization of 4-androstene-3,17-dione and 1,4-androstadiene-3,17-dione productions from vegetable oils by *Mycobacterium* sp.

Pattana Sripalakit, Janya Ruankesorn and
Aurasorn Saraphanchotwittaya

Pharmaceutical Biotechnology Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Mahasarakham University, Muangsongkhro 65000, Thailand

Abstract:

Cleavage of the phytosterol C-17 side chain into 4-androstene-3,17-dione (AD) and 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) has much usefulness in the pharmaceutical industry. Both AD and ADD can be already used as the main precursors for all kinds of sex and anabolic hormones. The objective of this study was to optimize the production of AD and ADD by *Mycobacterium* sp. DSM 2966 and *Mycobacterium* sp. DSM 2967 using vegetable oils containing phytosterols as a substrate. The numerous different edible vegetable oils have been tested. After 7-day cultivation, AD and ADD concentrations were extracted from the media and were determined by HPLC. Compared to all tested vegetable oils in both strains, canola oil, rice bean oil, soya bean oil and sunflower oil significantly showed higher androstenones production, whereas fewer yields obtained from coconut oil and sesame oil. The increase of relative oil concentration in the media resulted in the reduction of yields. These studies were also performed to compare the free cell suspension and immobilized whole cells using calcium alginate and Celiteas supporting materials. In conclusion, the development of androstenone production using low-cost abundantly available vegetable oils was economically feasible processes. These could lead vegetable oils as high value-added products.

Keywords: 4-Androstene-3,17-dione, 1,4-Androstadiene-3,17-dione, *Mycobacterium* sp. DSM 2966, *Mycobacterium* DSM 2967, Vegetable oils

The 1st ASEAN Microbial Biotechnology Conference



PP-S2-15 Optimization of 4-androstene-3,17-dione and 1,4-androstadiene-3,17-dione productions from vegetable oils by *Mycobacterium* sp.



Pattana Sripalakit, Janya Riunkesorn, Aurasorn Saraphanchotiwitthaya

Pharmaceutical Biotechnology Research Unit,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, THAILAND
pattanas@nu.ac.th (P. Sripalakit)

Introduction

The biotransformation of steroids is of considerable commercial interest. Microbial degradation of the side chain of natural sterols into 4-androstene-3,17-dione (AD) and 1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD) has received much attention in the pharmaceutical industry. These intermediates from mentioned reaction can be used for the synthesis of high-value steroidal drugs. The biotransformation step is the degradation of the C-17 side chain of phytosterols without concomitant degradation of the steroid nucleus. The vegetable oils containing phytosterols were selected as a substrate based on their low cost with abundantly available and the ease of their transformation into steroid intermediates.

The objective of this study was to optimize the production of androstenones including AD and ADD by *Mycobacterium* sp. DSM 2966 and *Mycobacterium* sp. DSM 2967 using vegetable oil containing phytosterols as a substrate and the production by immobilized cell was also studied.

Materials and Methods

Stock cultures of *Mycobacterium* sp. kept on agar were subcultured in the culture medium. After two days of incubation, various vegetable oils were added to the biotransformation medium. The reaction flasks were shaken for 7 days and the extracted media were analyzed by HPLC.

Vegetable Oils Containing Plant Sterols

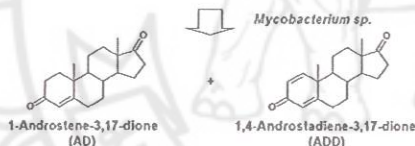


Fig.1 Sterol side-chain cleavage reaction

Results

(1) Effect of types of vegetable oils

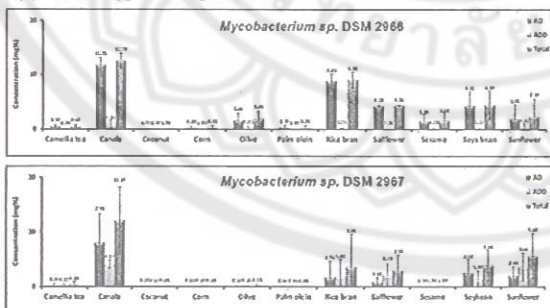


Fig. 2 Effect of types of vegetable oils on the production of androstenones by *Mycobacterium* sp. DSM 2966 and DSM 2967

(2) Effect of concentrations of vegetable oils

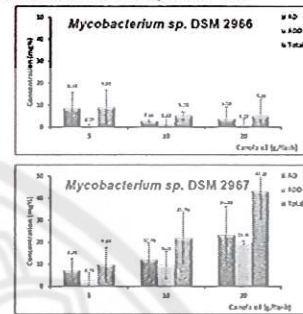


Fig. 3 Effect of concentrations of canola oil on the production of androstenones by *Mycobacterium* sp. DSM 2966 and DSM 2967

(3) Effect of cell immobilizations

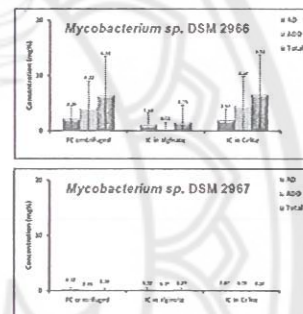


Fig. 4 Effect of cell immobilizations on the production of androstenones by *Mycobacterium* sp. DSM 2966 and DSM 2967 using canola oil (5 g/flask) as a substrate (FC: free cells, IC: immobilized cells)

Conclusion

Phytosterols containing in vegetable oils could be directly transformed to AD and ADD by both *Mycobacterium* sp. Compared to all vegetable oils in both strains, canola oil significantly showed highest androstenone production whereas lowest yields obtained from coconut oil. The increase of relative vegetable oil concentrations in the media resulted in the reduction of yields for *Mycobacterium* sp. DSM 2966 and the escalation of yield for DSM 2967. Neither immobilized cell in calcium alginate nor Celite could improve the production yield. Therefore, type and concentration of vegetable oils on the production of AD and ADD should be determined. The production of androstenone using vegetable oils was economically feasible processes. These could lead vegetable oils as high value-added products.

Acknowledgements

This work was supported by a research grant from Naresuan University, Thailand (Grant No. R2555B074).