

อภิธาน์นทาการ



สำนักหอสมุด



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการผลิต Lovastatin จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542  
 โดยใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริม  
 (Improvement of Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* ATCC 20542  
 Using Vegetable Oils as Sole and Supplement Carbon Sources)

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ และคณะ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร  
 วันลงทะเบียน..... 4 ก.ค. 2555  
 เลขทะเบียน..... 1.5896538  
 เลขเรียกหนังสือ..... จ อป

CS  
พ5325  
2555

พฤษภาคม 2555

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการผลิต Lovastatin จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542

โดยใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริม

(Improvement of Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* ATCC 20542

Using Vegetable Oils as Sole and Supplement Carbon Sources)

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ

สังกัด ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

รองศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา

สังกัด ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาการผลิต lovastatin จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริม (Improvement of lovastatin production by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 using vegetable oils as sole and supplement carbon sources)” นี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2554 สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือ วิทยาศาสตร์และสถานที่ในการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย และขอขอบคุณนางสาวจรรยา รื่นเกษร ผู้ช่วยวิจัยประจำโครงการวิจัยฯ ที่ช่วยให้โครงการนี้สำเร็จลงด้วยดี

รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ



## บทคัดย่อ

โครงการวิจัย	การพัฒนาการผลิต lovastatin จากเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริม
ผู้วิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ รองศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา
หน่วยงานที่สังกัด	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
หมายเลขโทรศัพท์	055-961861
ได้รับทุนอุดหนุน	การวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช
งบประมาณแผ่นดิน	ประจำปี 2554
จำนวนเงิน	200,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี (1 ธันวาคม พ.ศ. 2553 ถึง 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2554)

การศึกษาผลของน้ำมันพืชเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมในการผลิต lovastatin โดย *Aspergillus terreus* ATCC 20542 ในอาหารเหลว น้ำมันพืช 11 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันคาโนลา น้ำมันมะพร้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอเลอิน น้ำมันรำข้าว น้ำมันเมล็ดดอกคำฝอย น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน โดยทำการตรวจวัดความเข้มข้นของ lovastatin และน้ำหนักรเชื้อราแห้ง จากการศึกษาพบว่า การทดลองที่มีการเติมน้ำมันพืชทุกชนิดลงในอาหารเหลวจะมีปริมาณ lovastatin สูงกว่าการทดลองควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองจะให้ปริมาณ lovastatin สูง 8.2 และ 5.9 เท่า การทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืช ตามลำดับ น้ำหนักรเชื้อราแห้งจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของน้ำมันมะพร้าว แต่การเติมน้ำมันปริมาณสูงเกินไปจะทำให้ผลิตภัณฑ์ลดลง ทั้งการเลี้ยงเชื้อราที่มีน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนหลักจะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ต่ำกว่า การทดลองควบคุมที่ใช้ไขมันพืชทั้งสองดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมที่ดีที่สุดสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต lovastatin

## ABSTRACT

Title Improvement of lovastatin production by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 using vegetable oils as sole and supplement carbon sources

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

Affiliation Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

Telephone 055-961861

Financial support National Research Council of Thailand

Budget 200,000 Baht

Duration 1 Year (1 December 2010 - 30 November 2011)

The effect of vegetable oils as sole and supplementary carbon sources during the production of lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in submerged culture has been study. The eleven vegetable oils tested were camellia tea oil, canola oil, coconut oil, corn oil, olive oil, palm olein oil, rice bran oil, safflower oil, sesame oil, soya bean oil and sunflower oil. Lovastatin concentration and biomass were measured. Lovastatin productions with vegetable oil containing media were higher yield than the control medium. In particular, coconut oil and soya bean oil significantly improved lovastatin production with 8.2- and 5.9-fold higher, respectively, compared with the media without vegetable oil supplementation. Biomass was proportional to coconut oil concentration, but an excessive concentration of oil resulted in a lower yield. Both cultivations with coconut oil and soya bean oil used as a sole carbon source gave lower production than the control medium with vegetable oil supplementation. Thus, it can be concluded that vegetable oils appear to be excellent supplementary carbon sources for improving lovastatin production efficiency.

## สรุปรายงานวิจัย (Executive Summary)

สัญญาเลขที่	R2554B058
โครงการวิจัย	การพัฒนาการผลิต lovastatin จากเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริม
หัวหน้าโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ
หน่วยงานที่สังกัด	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
จำนวนเงิน	200,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี (1 ธันวาคม พ.ศ. 2553 ถึง 30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2554)

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันพบผู้ป่วยโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้การใช้ยารักษาโรคดังกล่าวมีความจำเป็นเพิ่มขึ้น lovastatin เป็นยาในกลุ่มลดคอเลสเตอรอล (cholesterol-lowering drug) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด lovastatin ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *Aspergillus terreus* ขาดกล่าวว่ามีราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากผลิตแต่ละครั้งได้ปริมาณน้อย การพัฒนาเทคโนโลยีการหมักให้มีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญต่อผลผลิตเพื่อให้ได้ยาปริมาณสูงขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้วชนิดของสารอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น น้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นสารอาหารชนิดหนึ่งซึ่งมีประโยชน์ต่อกระบวนการหมักของยาหลายชนิด เช่น erythromycin tetracycline cephamycin C clavulanic acid และ gentamicin เป็นต้น การประยุกต์ใช้น้ำมันพืชต่อการพัฒนาการผลิต lovastatin จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

### วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมต่อการผลิต lovastatin

### ผลการวิจัย

การศึกษาผลของน้ำมันพืชเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมในการผลิต lovastatin โดย *Aspergillus terreus* ATCC 20542 ในอาหารเหลว น้ำมันพืช 11 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ น้ำมันเมล็ดชา (camellia tea oil) น้ำมันคาโนลา (canola oil) น้ำมันมะพร้าว (coconut oil) น้ำมัน

ข้าวโพด (corn oil) น้ำมันมะกอก (olive oil) น้ำมันปาล์มโอเลอิน (palm olein oil) น้ำมันรำข้าว (rice bran oil) น้ำมันเมล็ดดอกคำฝอย (safflower oil) น้ำมันงา (sesame oil) น้ำมันถั่วเหลือง (soya bean oil) และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน (sunflower oil) โดยทำการตรวจวัดความเข้มข้นของ lovastatin และน้ำหนักระเหยแห้ง จากการศึกษพบว่า การทดลองที่มีการเติมน้ำมันพืชทุกชนิดลงในอาหารเหลวจะมีปริมาณ lovastatin สูงกว่าการทดลองควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันถั่วเหลืองจะให้ปริมาณ lovastatin สูง 8 และ 5 เท่ากว่าการทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืช ตามลำดับ น้ำหนักระเหยแห้งจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของน้ำมันมะพร้าว แต่การเติมน้ำมันปริมาณสูงเกินไปจะทำให้ผลิตภัณฑ์ลดลง ทั้งการเลี้ยงเชื้อราที่มีน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนหลักจะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าการทดลองควบคุมที่ใช้ไขมันพืชทั้งสองดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมที่ดีสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต lovastatin

#### Output ของงานวิจัย

นำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการที่มีการตีพิมพ์เฉพาะ Abstract จำนวน 1 เรื่อง ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37 (วทท 37)

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
สรุปรายงานวิจัย (Executive Summary)	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ฎ
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	5
2. วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย	6
2.1 วิธีดำเนินการวิจัย	6
2.1.1 เชื้อรามาตรฐาน	6
2.1.2 สารเคมี	6
2.1.3 การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์	9
2.1.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา	10
2.1.5 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin	10
2.1.6 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin	10
2.1.7 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักต่อการผลิต lovastatin	11



	หน้า
2.1.8 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมต่อการผลิต lovastatin	11
2.2 ผลการวิจัย	11
2.2.1 การวิเคราะห์กราฟมาตรฐานของ lovastatin	11
2.2.2 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin	15
2.2.3 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin	19
2.2.4 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักต่อการผลิต lovastatin	23
2.2.5 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมต่อการผลิต lovastatin	27
3. อภิปรายผลการวิจัย	30
3.1 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin	30
3.2 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin	33
3.3 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักต่อการผลิต lovastatin	35
3.4 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมต่อการผลิต lovastatin	37
4. สรุปและเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	39
ภาคผนวก ก ตัวชี้วัดเพื่อประเมินผลสำเร็จของโครงการ	41

## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1	7
2	12
3	16
4	16
5	17
6	17
7	18
8	18
9	20
10	21

ตาราง	หน้า
11	22
<p>ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม</p>	
12	23
<p>การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม</p>	
13	24
<p>ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก</p>	
14	25
<p>การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก</p>	
15	26
<p>ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก</p>	
16	27
<p>การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก</p>	
17	28
<p>ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริม</p>	
18	29
<p>การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริม</p>	

## สารบัญรูป

รูป	หน้า	
1	โครงสร้างของ lovastatin	1
2	กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน lovastatin กับพื้นที่ใต้ peak	13
3	โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของการวิเคราะห์ lovastatin ที่ได้จากเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542	13
4	การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin และน้ำหนักรเชื้อราแห้งที่ผลิตจากเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมจากน้ำมันเมล็ดชา น้ำมันคาโนลา และน้ำมันมะพร้าว ความเข้มข้น 1 %w/v	31
5	การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin และน้ำหนักรเชื้อราแห้งที่ผลิตจากเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมจากน้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม โอเลอิน และน้ำมันรำข้าว ความเข้มข้น 1 %w/v	32
6	การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin และน้ำหนักรเชื้อราแห้งที่ผลิตจากเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมจากน้ำมันเมล็ดดอกคำฝอย น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ความเข้มข้น 1 %w/v	32
7	การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin และน้ำหนักรเชื้อราแห้งที่ผลิตจากเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมจากน้ำมันมะพร้าว ความเข้มข้น 1-5 %w/v	34
8	การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin และน้ำหนักรเชื้อราแห้งที่ผลิตจากเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมจากน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1-5 %w/v	34
9	การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin และน้ำหนักรเชื้อราแห้งที่ผลิตจากเชื้อรา <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนหลักจากน้ำมันมะพร้าว ความเข้มข้น 1-5 %w/v	36

## รูป

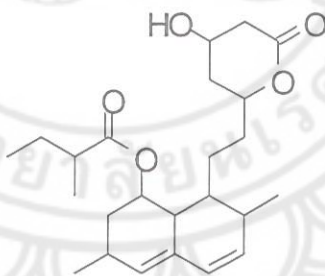
- 10 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin และน้ำหนักระเบิดราแห้งที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนหลักจากน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1-5 %w/v 36
- 11 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin (กราฟแท่งสีขาว) และน้ำหนักระเบิดราแห้ง (กราฟแท่งสีเทา) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนหลัก (Sole) และแหล่งคาร์บอนเสริม (Sup.) จากน้ำมันมะพร้าว และน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1 %w/v 37



## 1. บทนำ

### 1.1 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

Lovastatin (mevinolin, monacolin K หรือ Mevacor™) มีสูตรโมเลกุลคือ  $C_{24}H_{36}O_5$  และน้ำหนักโมเลกุล (M.W.) 404.55 จัดอยู่ในกลุ่มยาลดคอเลสเตอรอล (cholesterol-lowering drug) ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน lovastatin เป็นยาตัวแรกของกลุ่ม statins สำหรับใช้ลดระดับคอเลสเตอรอลที่ได้ผ่านคณะกรรมการอาหารและยา (FDA) ของประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1987 [1] โดยยาดังกล่าวออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ hydroxymethylglutary coenzyme A (HMG-CoA) reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้น HMG-CoA ไปเป็นผลิตภัณฑ์ mevalonate ของกระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย [2,3] lovastatin สามารถผลิตขึ้นได้จากเชื้อราหลายชนิด เช่น *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber* และ *Penicillium species* เป็นต้น [4] จากรายงานการวิจัยพบว่า *Aspergillus terreus* ถูกใช้ในการศึกษาวิจัยเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณสูง [1-5] กระบวนการชีวสังเคราะห์ของ lovastatin ซึ่งเป็นสาร secondary metabolite เกิดขึ้นผ่าน polyketide pathway [4] นอกจากนี้แล้ว lovastatin ยังมีประโยชน์สำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ยา simvastatin (Zocor™) ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม statins อีกชนิดหนึ่งซึ่งใช้สำหรับลดระดับคอเลสเตอรอลเช่นกัน [6]



รูป 1 โครงสร้างของ lovastatin (lactone form)

*Aspergillus terreus* สามารถผลิตยาดังกล่าวได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส และที่ pH 5.8-6.3 โดยมีระดับการละลายของออกซิเจนที่เหมาะสม ( $\geq 40$  เปอร์เซ็นต์) กระบวนการหมักจนได้ผลิตภัณฑ์ใช้เวลาน้อยกว่า 10 วัน [7] ได้มีคณะนักวิจัยต่างๆ ได้ศึกษาชนิดและอัตราส่วนของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และเกลือแร่ชนิดต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการผลิตยา lovastatin [8-13] การใช้สารอาหารที่ไม่เหมาะสมจะทำให้ไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ ส่งผลกระทบต่อการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ลดลง [7] โดยทั่วไปแล้ว จุลชีพต้องการอาหารจากแหล่งคาร์บอน แหล่ง

ในโตรเจน และเกลือแร่ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตและเมตาบอลิซึม น้ำมันพืชเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในสารอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิต secondary metabolite เนื่องจากน้ำมันพืชมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดฟอง เป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริม ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะ และใช้สำหรับการเจริญเติบโตและรักษาสภาพของเชื้อ [14-15] มีตัวอย่างของรายงานวิจัยต่างๆ ที่ประสบความสำเร็จในการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อราของการผลิตยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เช่น การใช้น้ำมัน black cherry kernel ในการผลิต erythromycin [14] การใช้น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันในการผลิต tetracyclin [15] การใช้น้ำมันถั่วเหลืองในการผลิต cephamycin C [16] clavulanic acid [17] และ gentamicin [18] การใช้น้ำมันรำข้าวในการผลิต cephalosporin C [19] เป็นต้น

จากข้อมูลในอดีตของการศึกษาผลของสารอาหารชนิดต่างๆ ต่อการผลิต lovastatin ยังไม่มีนักวิจัยกลุ่มใดรายงานถึงการประยุกต์ใช้น้ำมันพืชในกระบวนการผลิต lovastatin งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเติมน้ำมันพืชชนิดและปริมาณต่างๆ โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมในสารอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต lovastatin ของ *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น ซึ่งมีแนวโน้มในการเพิ่มปริมาณการผลิต หรือน้ำมันพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถหามาทดสอบได้ง่าย

## 1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันพบผู้ป่วยโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้การใช้ยารักษาโรคดังกล่าวมีความจำเป็นเพิ่มขึ้น lovastatin เป็นยาในกลุ่มลดคอเลสเตอรอล (cholesterol-lowering drug) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด lovastatin ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *Aspergillus terreus* ยาคงกล่าวว่ามีราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากผลิตแต่ละครั้งได้ปริมาณน้อย การพัฒนาเทคโนโลยีการหมักให้มีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญต่อผลผลิตเพื่อให้ได้ยาปริมาณสูงขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้วชนิดของสารอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อรา มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น น้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นสารอาหารชนิดหนึ่งซึ่งมีประโยชน์ต่อกระบวนการหมักของยาหลายชนิด เช่น erythromycin tetracycline cephamycin C clavulanic acid และ gentamicin เป็นต้น การประยุกต์ใช้น้ำมันพืชต่อการพัฒนาการผลิต lovastatin จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 จึงมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

## 1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 เพื่อพัฒนาวิธีการผลิตยา lovastatin

1.3.2 เพื่อศึกษาผลของน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมต่อการผลิต lovastatin

#### 1.4 ขอบเขตการวิจัย

- 1.4.1 กระบวนการหมักใช้เชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542
- 1.4.2 น้ำมันพืชที่ใช้ในการศึกษาคือ ได้แก่ น้ำมันเมล็ดชา (camellia tea oil) น้ำมันคาโนลา (canola oil) น้ำมันมะพร้าว (coconut oil) น้ำมันข้าวโพด (corn oil) น้ำมันมะกอก (olive oil) น้ำมันปาล์มโอเลอิน (palm olein oil) น้ำมันรำข้าว (rice bran oil) น้ำมันเมล็ดดอกคำฝอย (safflower oil) น้ำมันงา (sesame oil) น้ำมันถั่วเหลือง (soya bean oil) และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน (sunflower oil)
- 1.4.3 การตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ โดยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC)

#### 1.5 วิธีการดำเนินการวิจัย

- 1.5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา
- (1) subculture เชื้อรามาตรฐาน *Aspergillus terreus* ATCC 20542 ในอาหารแข็ง malt extract agar
  - (2) เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้ incubator เป็นเวลา 5 วัน
- 1.5.2 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin
- (1) เตรียม stock เชื้อราในรูปของแขวนตะกอนโดยการ subculture เชื้อราจากอาหารแข็งลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวมาตรฐาน 100 มิลลิลิตร
  - (2) เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน
  - (3) แบ่ง stock เชื้อราที่ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวมาตรฐาน 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ปริมาณ 1 %w/v เป็นส่วนประกอบ (เปรียบเทียบกับ control)
  - (4) เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน
  - (5) เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ lovastatin ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน
- 1.5.3 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin
- (1) เตรียม stock เชื้อราในรูปของแขวนตะกอนโดยการ subculture เชื้อราจากอาหารแข็งลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวมาตรฐาน 100 มิลลิลิตร
  - (2) เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน



- (3) แบ่ง stock เชื้อราที่ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวมาตรฐาน 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันพืชปริมาณต่างๆ (1-5 %w/v) เป็นส่วนประกอบ (เปรียบเทียบกับ control)
- (4) เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน
- (5) เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ lovastatin ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

#### 1.5.4 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักต่อการผลิต lovastatin

- (1) เตรียม stock เชื้อราในรูปของแขวนตะกอน โดยการ subculture เชื้อราจากอาหารแข็งลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวมาตรฐาน 100 มิลลิลิตร
- (2) เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน
- (3) แบ่ง stock เชื้อราที่ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวมาตรฐาน 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันพืช (1-5 %w/v) เป็นส่วนประกอบ โดยไม่มีแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ (เปรียบเทียบกับ control)
- (4) เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน
- (5) เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ lovastatin ที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

#### 1.5.5 การสกัดแยกและการวิเคราะห์

- (1) สกัดแยก lovastatin จาก fermentation medium ด้วย ethyl acetate ใน separatory funnel
- (2) เขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารแยกชั้น
- (3) นำส่วนที่เป็น ethyl acetate มาระเหยแห้งบน water bath
- (4) ละลายส่วนที่เหลือด้วย solvent ที่เหมาะสม
- (5) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

### 1.6 ทฤษฎีและแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

Lovastatin เป็น secondary metabolite ที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ชนิดของสารอาหารที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา มีผลต่อปริมาณของผลิตภัณฑ์ยาที่ผลิตขึ้น การเลือกใช้ชนิดของสารอาหารที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อราจะทำให้ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ยามากขึ้น น้ำมันพืชเป็นสารอาหารชนิดหนึ่งซึ่งมีประโยชน์ต่อการเกิด secondary metabolite ในกระบวนการหมัก การนำ

ความรู้ใหม่ที่นำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมการผลิตยา lovastatin ส่งผลให้ได้ยาปริมาณที่สูงขึ้น และทำให้ยามีราคาถูกลง

### 1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.7.1 เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการระดับชาติ ระดับนานาชาติ หรือการจดสิทธิบัตร
- 1.7.2 เผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ
- 1.7.3 เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตและนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์
- 1.7.4 เป็นองค์ความรู้ในการทำวิจัยต่อไป



## 2. วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

### 2.1 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1.1 เชื้อรามาตรฐาน

เชื้อรามาตรฐาน *Aspergillus terreus* ATCC 20542 ซึ่งจาก American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) เชื้อรามาตรฐานในรูปแบบ revival freeze-dried culture ทั้งหมดจะถูกกระตุ้นให้เจริญโดยเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) เป็นระยะเวลา 2 วัน และอาหารแข็ง malt extract agar (MEA) (Merck KGaA) เป็นระยะเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อราถูก subculture ใหม่ทุกๆ ครั้งที่เริ่มการทดลองใหม่ เทคนิคการเลี้ยงเซลล์และการเก็บตัวอย่างทั้งหมดทำในตู้ laminar air flow cabinet (Forma Scientific Inc., Marietta, OH)

#### 2.1.2 สารเคมี

สารมาตรฐาน lovastatin ( $\beta$ -hydroxyacid form) (ความบริสุทธิ์  $\geq 98$  เปอร์เซ็นต์) จาก Sigma Chemical, Co. (St. Louis, MO) อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อราประกอบด้วย yeast extract (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland), lactose (Ajax Finechem, NSW, Australia),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fisher Scientific, Leicestershire, UK)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck KGaA),  $\text{NaCl}$  (Merck KGaA),  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck KGaA),  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Merck KGaA) และ biotin (Merck KGaA) สารละลาย trace elements ประกอบด้วย  $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (Ajax Finechem),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Ajax Finechem),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Ajax Finechem) และ  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Ajax Finechem) รายละเอียดของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตาราง 1 ตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการสกัดเป็น AR grade คือ ethyl acetate (Lab-scan, Bangkok, Thailand) ตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการวิเคราะห์ HPLC ได้แก่ acetonitrile (Lab-scan) และ methanol (BDH, Poole, England) เป็น AR grade ส่วน phosphate buffer saline (PBS) เตรียมจาก  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fisher Scientific) 0.26 กรัม,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck KGaA) 2.17 กรัม และ  $\text{NaCl}$  (Merck KGaA) 8.71 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.0 ด้วย  $\text{HCl}$  (Lab-scan)

ตาราง 1 รายละเอียดต่างๆ ของน้ำมันพืชที่ใช้ในการศึกษา

		ปริมาณไขมัน (g)					
น้ำมันพืช (Vegetable oil)	ชนิด	ปริมาณน้ำมัน	ไขมันทั้งหมด (Total fat)	ไขมันอิ่มตัว (Saturated fat)	ไขมันไม่อิ่มตัวตำแหน่งเดียว (Monounsaturated fat)	ไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (Polyunsaturated fat)	
Camellia Tea oil (น้ำมันเมล็ดชา)	Refined	15 mL / 14 g	14	1.5	n/a	n/a	Lam Soon (Thailand) Pcl., Samutprakarn, Thailand
Canola oil (น้ำมันคาโนลา)	Pure	14 g	14	1	8.3	4.1	Sime Darby Edible Products Ltd., Singapore
Coconut oil (น้ำมันมะพร้าว)	n/a	-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Com 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

บริษัทผู้ผลิต

ตาราง 1 รายละเอียดต่างๆ ของน้ำมันพืชที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

น้ำมันพืช (Vegetable oil)	ชนิด	ปริมาณ	ปริมาณไขมันชนิดต่างๆ				บริษัทผู้ผลิต
			ไขมันทั้งหมด (Total fat)	ไขมันอิ่มตัว (Saturated fat)	ไขมันไม่อิ่มตัวตำแหน่งเดียว (Monounsaturated fat)	ไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (Polyunsaturated 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	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
Soya bean oil (น้ำมันถั่วเหลือง)	Refined	15 mL	15	2.5	3.5	9	Morakot Industries Pl., Samutprakarn, Thailand
Sunflower oil (น้ำมันดอกทานตะวัน)	Refined	15 mL	15	2	5	8	Thanakorn Vegetable Oil Products Co., Ltd. Samutprakarn, Thailand
n/a = Not available							

### 2.1.3 การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์

#### (1) การเตรียมตัวอย่าง

แยกเชื้อราออกจากอาหารเหลวโดยกรองผ่านสำลี ตวงอาหารเหลวดังกล่าว 50 มิลลิลิตร แล้วนำมาปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 3.0 โดยใช้กรด HCl เข้มข้น สกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ lovastatin จากอาหารเหลวด้วย ethyl acetate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (อัตราส่วนการสกัด 1:1 โดยปริมาตร) ใน separatory funnel เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำชั้นของ ethyl acetate 25 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งบน water bath แล้วละลายสารสกัดที่เหลือจากการระเหย (residue) ด้วย mobile phase 2.0 มิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ lovastatin โดยเครื่อง HPLC ส่วนเชื้อราที่เหลือนำมาอบแห้งแล้วชั่งน้ำหนักห้าน้ำหนักแห้ง

#### (2) การวิเคราะห์ HPLC

ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่ผ่านการกรอง membrane แล้ว เข้าเครื่อง HPLC ซึ่งประกอบด้วย solvent delivery system (Varian 9012, Varian, Inc., Palo Alto, CA) และ variable wavelength UV-Vis detector (Varian 9050, Varian Inc.) ซึ่งต่อกับ Rheodyne (7725) sample injector (Rohnert Park, CA) และ 100- $\mu$ L sample loop โดยใช้ ODS Hypersil<sup>®</sup> C18 column (250 $\times$ 4.6 mm i.d.; 5  $\mu$ m particle diameter, 250 Å average pore size) (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) และ mobile phase ประกอบด้วย acetonitrile, methanol และ phosphate buffer saline pH 4.0 อัตราส่วน 55:12:33 โดยปริมาตร ซึ่งได้จากการกรองผ่าน 0.45  $\mu$ m nylon filter membrane (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL) ก่อนการใช้ทุกครั้ง mobile phase ไหลด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ UV-Vis detector เป็นเครื่องตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 238 โนนาเมตร เปรียบเทียบ retention time ของ peak ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากเชื้อรากับของสารมาตรฐาน lovastatin รวมทั้งคำนวณปริมาณ lovastatin ที่เกิดขึ้นจากเชื้อราโดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นใน โครมาโตแกรมกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน lovastatin

#### (3) การวิเคราะห์กราฟมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน lovastatin 25 มิลลิกรัม ด้วย methanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น standard stock solution (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เตรียมสารละลาย lovastatin 6 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จาก standard stock solution ด้วยการเจือจางด้วย mobile phase แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC นำพื้นที่ใต้ peak และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน lovastatin มาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression)

#### 2.1.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

sterilization อาหารเหลวมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย (ต่อลิตร) lactose 10 กรัม, yeast extract 8 กรัม,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.51 กรัม,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.52 กรัม, NaCl 0.40 กรัม,  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2 มิลลิกรัม,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  2 มิลลิกรัม และ biotin 0.04 มิลลิกรัม และสารละลาย trace elements ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย (ต่อลิตร)  $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  100 มิลลิกรัม,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  50 มิลลิกรัม,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50 มิลลิกรัม, และ  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  250 มิลลิกรัม ปรับค่า pH ของอาหารเหลวเป็น 6.5 ด้วยสารละลาย NaOH 0.1 นอร์มอล

subculture เชื้อรา *Aspergillus terreus* ในอาหารแข็ง malt extract agar ก่อนเริ่มการศึกษา 5 วัน เชื้อรามาตรฐานถูก subculture ในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงแบ่งเชื้อราแขวนตะกอนไปใช้ในการศึกษาต่อไป

#### 2.1.5 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin

แบ่งเชื้อรา *Aspergillus terreus* ในรูปแขวนตะกอนในข้อ 2.1.4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมลงในอาหารเหลวมาตรฐานปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ซึ่งมี lactose เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก) ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบได้แก่ น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันคาโนลา น้ำมันมะพร้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอเลอิน น้ำมันรำข้าว น้ำมันเมล็ดดอกคำฝอย น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง หรือน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ความเข้มข้น 1 %w/v (เปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืช) เลี้ยงเชื้อราดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน (แต่ละการทดลองทำการศึกษาซ้ำ 5 ครั้ง) เก็บตัวอย่างและสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ lovastatin ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน lovastatin กรองเก็บเชื้อราทั้งในรูปแบบสปอร์และเส้นใยที่ได้จากการทดลองทั้งหมด นำมาอบแห้ง และชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณ

#### 2.1.6 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin

แบ่งเชื้อรา *Aspergillus terreus* ในรูปแขวนตะกอนในข้อ 2.1.4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมลงในอาหารเหลวมาตรฐานปริมาตร 100 มิลลิลิตร (โดยมี lactose เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก) ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบได้แก่ น้ำมันมะพร้าว หรือ น้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 %w/v (เปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืช) เลี้ยงเชื้อราดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน (แต่ละการทดลองทำการศึกษาซ้ำ 5 ครั้ง) เก็บตัวอย่างและสกัดเพื่อวิเคราะห์หา

ปริมาณ lovastatin ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน lovastatin กรองเก็บเชื้อราทั้งใน รูปแบบสปอร์และเส้นใยที่ได้จากการทดลองทั้งหมด นำมาอบแห้ง และชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณ

#### 2.1.7 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักต่อการผลิต lovastatin

แบ่งเชื้อรา *Aspergillus terreus* ในรูปแขวนตะกอนในข้อ 2.1.4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมลงในอาหารเหลวมาตรฐานปริมาณ 100 มิลลิลิตร (ซึ่งไม่มี lactose เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก) ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบได้แก่ น้ำมันมะพร้าว หรือน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 %w/v (เปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืช) เลี้ยงเชื้อราดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน (แต่ละการทดลองทำการศึกษาซ้ำ 5 ครั้ง) เก็บตัวอย่างและสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ lovastatin ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน lovastatin กรองเก็บเชื้อราทั้งใน รูปแบบสปอร์และเส้นใยที่ได้จากการทดลองทั้งหมด นำมาอบแห้ง และชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณ

#### 2.1.8 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมต่อการผลิต lovastatin

แบ่งเชื้อรา *Aspergillus terreus* ในรูปแขวนตะกอนในข้อ 2.1.4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมลงในอาหารเหลวมาตรฐานปริมาณ 100 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบ ได้แก่ น้ำมันมะพร้าว หรือน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1 %w/v โดยที่อาหารเหลวมาตรฐานดังกล่าวมีและไม่มี lactose เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (เปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืช) เลี้ยงเชื้อราดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน (แต่ละการทดลองทำการศึกษาซ้ำ 5 ครั้ง) เก็บตัวอย่างและสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ lovastatin ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน lovastatin กรองเก็บเชื้อราทั้งในรูปแบบสปอร์และเส้นใยที่ได้จากการทดลองทั้งหมด นำมาอบแห้ง และชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณ

## 2.2 ผลการวิจัย

### 2.2.1 การวิเคราะห์กราฟมาตรฐานของ lovastatin

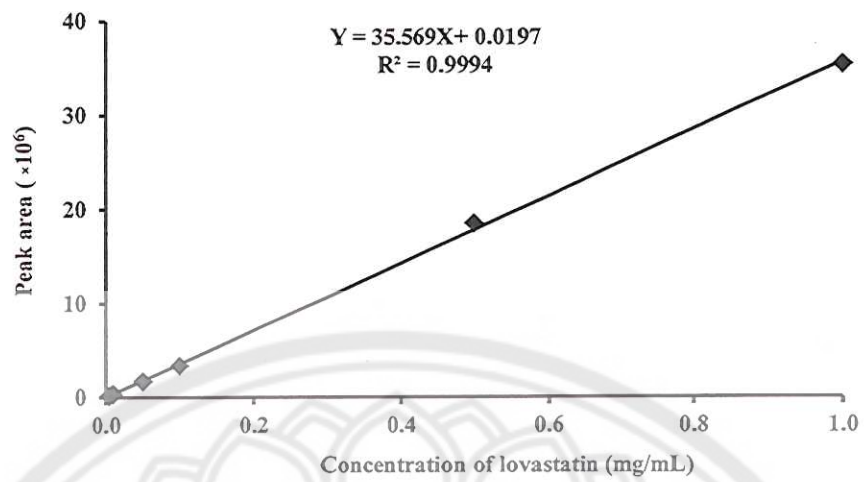
การวิเคราะห์ lovastatin ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า peak ของสารสำคัญปรากฏในโครมาโตแกรมที่เวลา 15-16 นาที โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละครั้งประมาณ 20 นาที ผลการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน lovastatin กับพื้นที่ใต้ peak ดังตาราง 2 สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ lovastatin กับพื้นที่ใต้ peak คือ  $Y = 35.569X + 0.0197$  ( $R^2 = 0.9994$ ) กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน lovastatin กับพื้นที่ใต้ peak ของช่วงความเข้มข้น 0.005-1.0 มิลลิกรัมต่อ



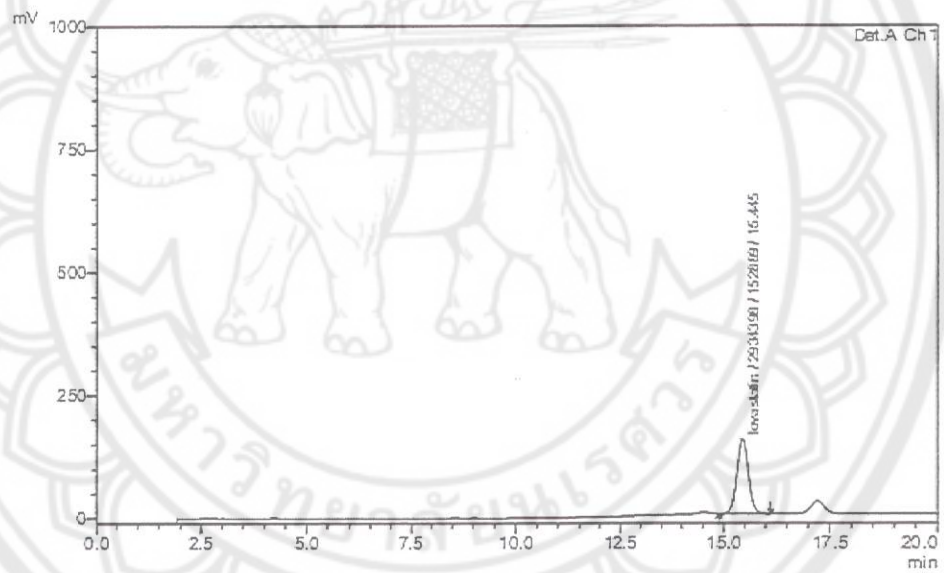
มิลลิลิตร แสดงในรูป 2 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ lovastatin ด้วยเครื่อง HPLC แสดงในรูป 3

ตาราง 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน lovastatin กับพื้นที่ใต้ peak

ความเข้มข้น Lovastatin (mg/mL)	ครั้งที่	พื้นที่ใต้ Peak	พื้นที่ใต้ Peak เฉลี่ย
0.005	1	176,638	177,221
	2	164,183	
	3	179,391	
	4	188,897	
	5	176,996	
0.01	1	352,974	354,681
	2	362,764	
	3	349,757	
	4	357,986	
	5	349,922	
0.05	1	1,658,505	1,690,589
	2	1,697,336	
	3	1,731,217	
	4	1,684,318	
	5	1,681,570	
0.1	1	3,397,046	3,365,222
	2	3,300,228	
	3	3,517,785	
	4	3,229,880	
	5	3,381,170	
0.5	1	16,898,958	18,470,262
	2	19,085,456	
	3	18,695,959	
	4	18,725,087	
	5	18,945,851	
1.0	1	36,933,631	35,282,218
	2	32,911,953	
	3	36,250,163	
	4	35,395,105	
	5	34,920,239	

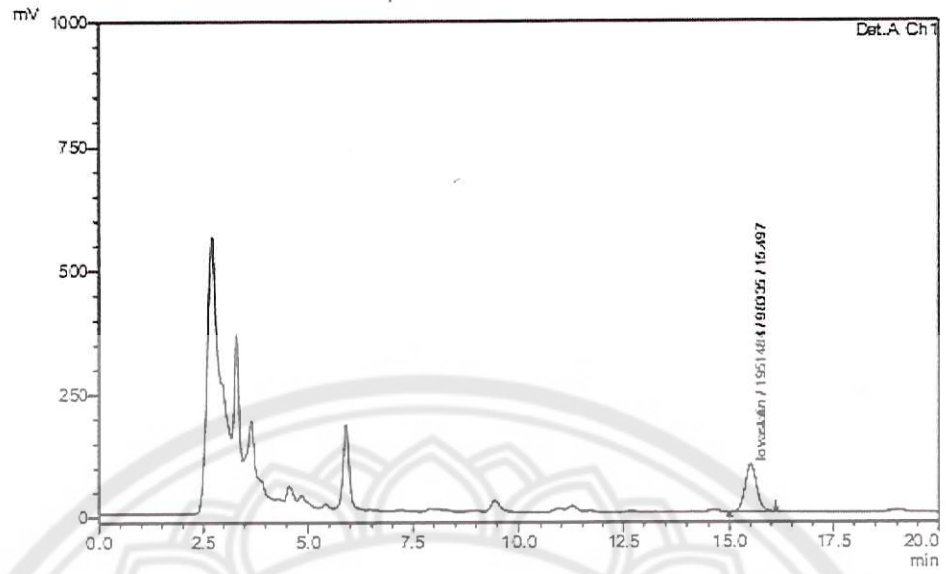


รูป 2 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน lovastatin กับพื้นที่ใต้ peak

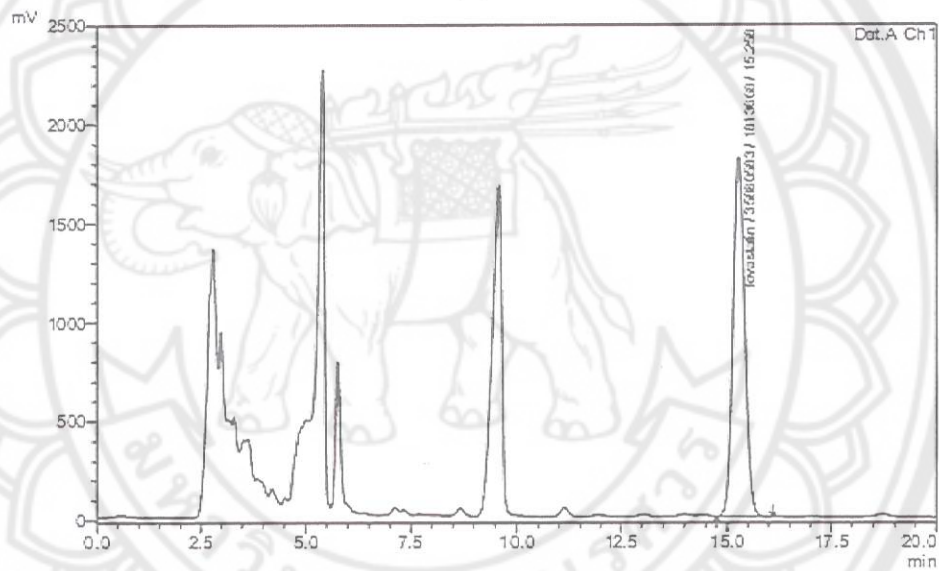


(A)

รูป 3 โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของการวิเคราะห์ lovastatin ที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 (A) lovastatin standard solution (B) control ที่ไม่เติมน้ำมันพืช (C) เติมน้ำมันพืช โดยที่ retention time ของ lovastatin ประมาณ 15-16 นาที



(B)



(C)

รูป 3

โครมาโตแกรมจากเครื่อง HPLC ของการวิเคราะห์ lovastatin ที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 (A) lovastatin standard solution (B) control ที่ไม่เติมน้ำมันพืช (C) เติมน้ำมันพืช โดยที่ retention time ของ lovastatin ประมาณ 15-16 นาที (ต่อ)

2.2.2 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin การทดสอบเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 ที่สามารถผลิต lovastatin โดยใช้ ชนิดแหล่งคาร์บอนหลักเป็น lactose และแหล่งคาร์บอนเสริมเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ปริมาณความเข้มข้น 1 %w/v ได้ผลโครมาโตแกรมและผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin ที่เกิดขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 กับการใช้น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันคาโนลา และน้ำมันมะพร้าว แสดงดังตาราง 3 และ 4 ตามลำดับ น้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอเลอิน และน้ำมันรำข้าวแสดงดังตาราง 5 และ 6 ตามลำดับ และ น้ำมันเมล็ดดอกคำฝอย น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน แสดงดังตาราง 7 และ 8 ตามลำดับ



ตาราง 3 ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันคาโนลา และน้ำมันมะพร้าว เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำมันพืช (1% w/v)	ครั้งที่	พื้นที่ใต้ Peak	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/flask)
Control (ไม่เติมน้ำมันพืช)	1	1,951,484	1.46
	2	3,681,375	1.44
	3	2,862,578	1.36
	4	12,630,376	1.35
	5	2,490,651	1.49
Camellia tea oil	1	14,633,987	2.25
	2	11,735,761	2.22
	3	12,510,745	2.24
	4	1,052,698	2.21
	5	8,951,392	2.28
Canola oil	1	10,480,378	2.13
	2	8,827,695	2.17
	3	9,992,917	2.12
	4	14,628,850	2.19
	5	9,252,810	2.16
Coconut oil	1	35,880,583	2.28
	2	33,854,520	2.31
	3	44,150,231	2.18
	4	37,317,608	2.30
	5	42,703,582	2.26

ตาราง 4 การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันเมล็ดชา น้ำมันคาโนลา และน้ำมันมะพร้าว เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำมันพืช (1% w/v)	ความเข้มข้น Lovastatin (mg/L)	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/L)
Control (ไม่เติมน้ำมันพืช)	10.58±10.04	14.20±0.62
Camellia tea oil	21.95±11.89	22.40±0.27
Canola oil	23.88± 5.22	21.54±0.29
Coconut oil	87.18±10.00	22.66±0.52

ตาราง 5 ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันข้าวโพด ไขมันมะกอก ไขมันปาล์ม โอเลอิน และ ไขมันรำข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำมันพืช (1% w/v)	ครั้งที่	พื้นที่ใต้ Peak	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/flask)
Control (ไม่เติมน้ำมันพืช)	1	4,155,158	1.45
	2	5,231,236	1.37
	3	2,761,263	1.29
	4	3,675,100	1.37
	5	3,085,063	1.41
Corn oil	1	17,950,024	2.13
	2	2,722,416	2.21
	3	10,733,885	2.11
	4	13,317,864	2.11
	5	17,475,859	2.15
Olive oil	1	14,703,275	2.49
	2	24,411,764	2.33
	3	14,572,421	2.36
	4	18,297,739	2.38
	5	16,240,857	2.32
Palm olein oil	1	19,781,284	2.35
	2	24,131,473	2.39
	3	20,132,795	2.34
	4	19,713,654	2.34
	5	13,395,826	2.36
Rice bean oil	1	20,619,804	2.33
	2	17,472,302	2.18
	3	20,320,616	2.29
	4	8,246,769	2.20
	5	20,507,368	2.30

ตาราง 6 การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันข้าวโพด ไขมันมะกอก ไขมันปาล์ม โอเลอิน และไขมันรำข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำมันพืช (1% w/v)	ความเข้มข้น Lovastatin (mg/L)	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/L)
Control (ไม่เติมน้ำมันพืช)	8.46± 2.19	13.78±0.59
Corn oil	27.94±13.95	21.42±0.41
Olive oil	39.64± 9.16	23.76±0.68
Palm olein oil	43.66± 8.65	23.56±0.21
Rice bean oil	39.17±11.92	22.60±0.66

ตาราง 7 ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันเมล็ดดอกคำฝอย น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และ น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำมันพืช (1% w/v)	ครั้งที่	พื้นที่ใต้ Peak	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/flask)
Control (ไม่เติมน้ำมันพืช)	1	3,988,913	1.22
	2	3,831,545	1.18
	3	3,764,884	1.28
	4	3,854,306	1.30
	5	4,983,174	1.23
Safflower oil	1	29,089,541	2.13
	2	23,231,270	2.20
	3	20,458,823	2.12
	4	14,662,842	2.17
	5	24,086,056	2.23
Sesame oil	1	3,249,296	2.06
	2	7,804,951	2.12
	3	9,085,315	2.14
	4	7,980,240	2.07
	5	9,158,022	2.10
Soya bean oil	1	34,068,134	2.09
	2	29,375,636	2.08
	3	15,199,941	2.06
	4	28,541,882	2.17
	5	12,672,345	2.13
Sunflower oil	1	24,411,794	2.24
	2	10,953,545	2.21
	3	13,627,257	2.14
	4	30,412,911	2.15
	5	29,973,370	2.15

ตาราง 8 การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันเมล็ดดอกคำฝอย น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำมันพืช (1% w/v)	ความเข้มข้น Lovastatin (mg/L)	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/L)
Control (ไม่เติมน้ำมันพืช)	9.14± 1.14	12.42±0.48
Safflower oil	50.12±11.89	21.70±0.46
Sesame oil	16.72± 5.47	20.98±0.33
Soya bean oil	53.87±21.24	21.06±0.44
Sunflower oil	49.16±20.50	21.78±0.44

2.2.3 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin การทดสอบเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 ที่สามารถผลิต lovastatin โดยใช้ ชนิดแหล่งคาร์บอนหลักเป็น lactose และแหล่งคาร์บอนเสริมเป็นน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาณต่างๆ ดังนี้ 1 2 3 4 และ 5 %w/v ได้ผลโครมาโตแกรมและผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin ที่เกิดขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 กับการใช้น้ำมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ แสดงดังตาราง 9 และ 10 ตามลำดับ และน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ แสดงดังตาราง 11 และ 12 ตามลำดับ



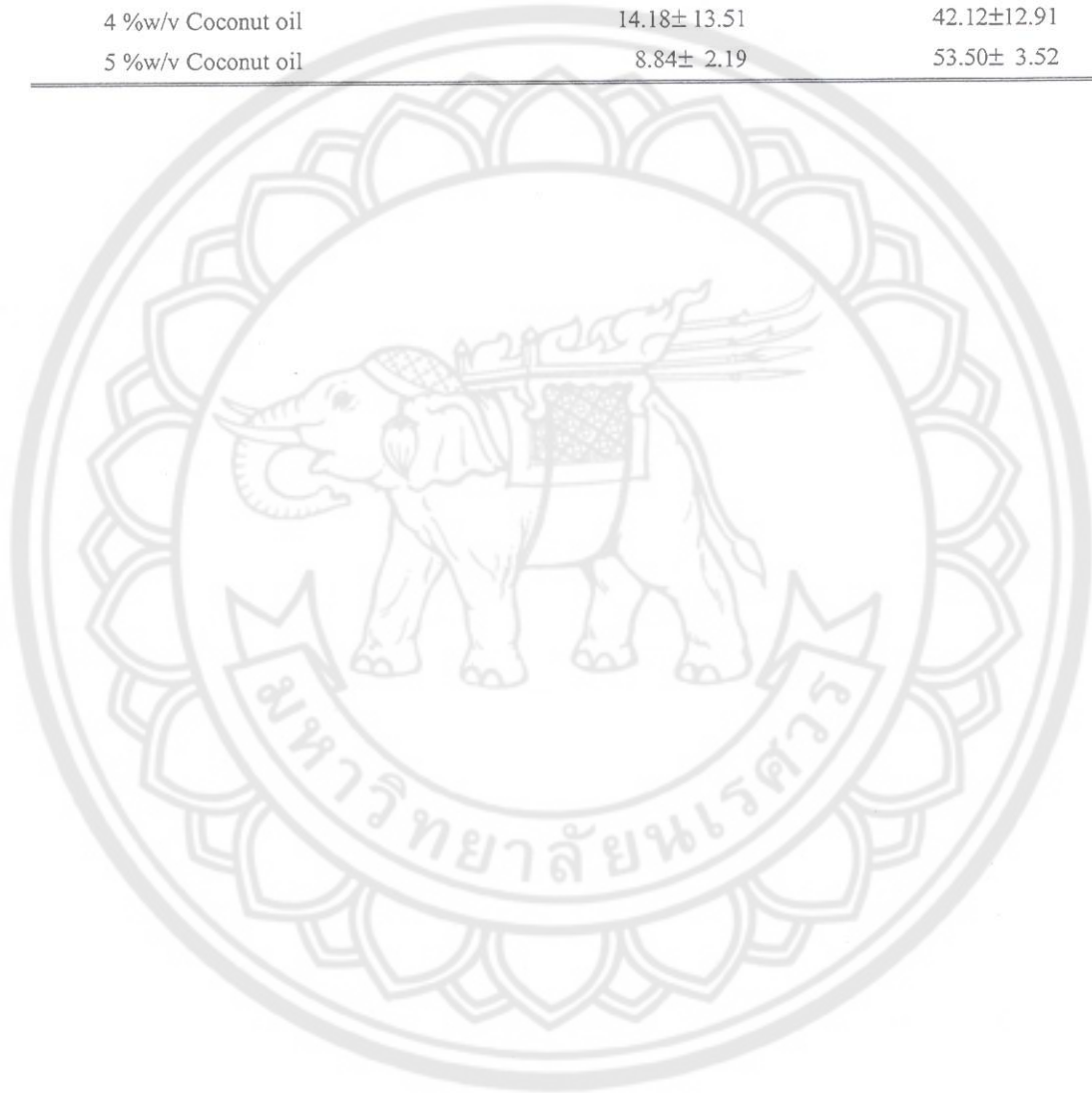


ตาราง 9 ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำมันพืช	ครั้งที่	พื้นที่ใต้ Peak	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/flask)
Control (ไม่เติมน้ำมันพืช)	1	8,686,062	1.44
	2	5,521,663	1.48
	3	7,152,313	1.14
	4	10,976,000	1.38
	5	2,991,699	1.45
1 %w/v Coconut oil	1	42,892,243	2.28
	2	56,236,358	2.17
	3	56,058,554	2.23
	4	54,829,396	2.27
	5	52,738,806	2.29
2 %w/v Coconut oil	1	36,879,521	3.09
	2	31,707,893	3.19
	3	54,812,594	3.19
	4	43,554,936	3.13
	5	45,968,976	3.18
3 %w/v Coconut oil	1	21,136,522	4.17
	2	22,484,451	4.06
	3	7,637,586	4.04
	4	11,738,983	4.20
	5	1,162,167	1.54
4 %w/v Coconut oil	1	16,725,562	4.90
	2	3,678,759	4.88
	3	4,860,787	4.84
	4	5,063,377	4.52
	5	1,287,666	1.92
5 %w/v Coconut oil	1	2,541,962	5.11
	2	4,057,010	5.17
	3	3,832,052	5.81
	4	4,041,795	5.64
	5	5,282,838	5.02

ตาราง 10 การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำมันพืช	ความเข้มข้น Lovastatin (mg/L)	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/L)
Control (ไม่เติมน้ำมันพืช)	15.85± 6.83	13.78± 1.38
1 %w/v Coconut oil	118.15±12.54	22.48± 0.49
2 %w/v Coconut oil	95.74±19.89	31.56± 0.44
3 %w/v Coconut oil	28.82±20.32	36.02±11.55
4 %w/v Coconut oil	14.18± 13.51	42.12±12.91
5 %w/v Coconut oil	8.84± 2.19	53.50± 3.52



ตาราง 11 ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำมันพืช	ครั้งที่	พื้นที่ใต้ Peak	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/flask)
Control (ไม่เติมน้ำมันพืช)	1	1,937,778	1.38
	2	8,407,754	1.33
	3	3,192,119	1.36
	4	2,263,629	1.44
	5	1,971,756	1.28
1 %w/v Soya bean oil	1	17,135,481	2.32
	2	22,043,182	2.29
	3	24,385,939	2.28
	4	21,567,094	2.30
	5	37,224,835	2.30
2 %w/v Soya bean oil	1	25,172,520	3.20
	2	28,697,616	3.18
	3	22,695,443	3.31
	4	24,620,822	3.28
	5	20,511,328	3.26
3 %w/v Soya bean oil	1	19,128,520	4.18
	2	18,956,502	4.20
	3	18,518,513	4.18
	4	26,408,884	4.13
	5	31,289,916	4.17
4 %w/v Soya bean oil	1	28,130,808	4.97
	2	7,234,298	4.22
	3	9,322,020	4.85
	4	19,798,623	4.83
	5	16,861,927	5.20
5 %w/v Soya bean oil	1	26,043,889	5.64
	2	28,693,368	5.80
	3	10,848,584	5.95
	4	25,898,659	5.77
	5	29,343,767	5.61

ตาราง 12 การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม

น้ำมันพืช	ความเข้มข้น Lovastatin (mg/L)	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/L)
Control (ไม่เติมน้ำมันพืช)	7.95± 6.21	13.58±0.59
1 %w/v Soya bean oil	55.00±17.08	22.98±0.15
2 %w/v Soya bean oil	54.70± 6.85	32.46±0.55
3 %w/v Soya bean oil	51.37±12.90	41.72±0.26
4 %w/v Soya bean oil	36.55±18.92	48.14±3.63
5 %w/v Soya bean oil	54.31±17.10	57.54±1.36

#### 2.2.4 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักต่อการผลิต lovastatin

การทดสอบเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 ที่สามารถผลิต lovastatin โดยใช้ชนิดแหล่งคาร์บอนหลักเป็นน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ ดังนี้ 1 2 3 4 และ 5 %w/v โดยไม่มีการเติม lactose ได้ผลโครมาโตแกรมและผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin ที่เกิดขึ้นจากเชื้อ *Aspergillus terreus* ATCC 20542 กับการใช้น้ำมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ แสดงดังตาราง 13 และ 14 ตามลำดับ และน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ แสดงดังตาราง 15 และ 16 ตามลำดับ

ตาราง 13 ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

น้ำมันพืช	ครั้งที่	พื้นที่ใต้ Peak	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/flask)
Control 1 (ไม่เติมน้ำมันพืช)	1	2,348,325	1.49
	2	5,209,217	1.47
	3	6,462,192	1.50
	4	2,241,183	1.29
	5	1,232,021	1.35
Control 2 (ไม่เติมน้ำมันพืช และ Lactose)	1	180,594	1.04
	2	135,266	1.04
	3	207,349	1.08
	4	176,498	1.06
	5	247,780	1.04
1 %w/v Coconut oil	1	416,472	1.98
	2	452,596	2.03
	3	219,982	1.93
	4	352,963	1.86
	5	873,122	1.86
2 %w/v Coconut oil	1	138,344	2.87
	2	175,789	2.88
	3	162,399	2.68
	4	324,353	2.83
	5	461,425	2.90
3 %w/v Coconut oil	1	267,087	3.77
	2	286,255	3.68
	3	495,215	3.70
	4	388,787	3.95
	5	91,431	3.83
4 %w/v Coconut oil	1	89,284	4.67
	2	202,219	4.65
	3	95,458	4.68
	4	60,405	4.78
	5	72,556	4.81
5 %w/v Coconut oil	1	124,821	5.21
	2	216,866	5.38
	3	77,522	5.70
	4	185,797	5.09
	5	61,102	4.06

๖ ๑๑  
๗๒  
-๐๕  
๗๕๓๒๕  
๒๕๕๕

25

1.5896538



ตาราง 14 การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักร้างของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

สำนักหอสมุด

น้ำมันพืช	ความเข้มข้น Lovastatin (mg/L)	น้ำหนักร้างเชื้อราแห้ง (g/L)
Control 1 (ไม่เติมน้ำมันพืช)	7.82±5.00	14.20±0.94
Control 2 (ไม่เติมน้ำมันพืชและ Lactose)	<0.04	10.52±0.18
1 %w/v Coconut oil	1.00±0.55	19.32±0.75
2 %w/v Coconut oil	0.52±0.31	28.32±0.89
3 %w/v Coconut oil	0.64±0.34	37.86±1.09
4 %w/v Coconut oil	<0.04	47.18±0.72
5 %w/v Coconut oil	<0.04	50.88±6.19

- 4 ก.ค. 2555



ตาราง 15 ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

น้ำมันพืช	ครั้งที่	พื้นที่ใต้ Peak	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/flask)
Control 1 (ไม่เติมน้ำมันพืช)	1	1,282,921	1.32
	2	1,100,894	1.35
	3	904,861	1.34
	4	1,016,243	1.34
	5	1,120,031	1.38
Control 2 (ไม่เติมน้ำมันพืช และ Lactose)	1	46,975	1.01
	2	6,504	0.94
	3	2,777	0.94
	4	2,423	0.98
	5	1,846	0.89
1 %w/v Soya bean oil	1	827,809	1.72
	2	332,425	1.78
	3	502,327	1.82
	4	1,465,083	1.81
	5	1,212,990	1.87
2 %w/v Soya bean oil	1	2,004,282	2.71
	2	976,116	2.80
	3	1,032,859	2.70
	4	1,056,699	2.80
	5	687,264	2.80
3 %w/v Soya bean oil	1	1,180,528	3.59
	2	1,114,405	3.60
	3	909,308	3.70
	4	961,805	3.74
	5	1,442,594	3.74
4 %w/v Soya bean oil	1	861,163	4.53
	2	262,615	4.50
	3	716,599	5.28
	4	1,192,280	4.47
	5	1,351,124	4.50
5 %w/v Soya bean oil	1	1,049,657	5.54
	2	179,891	4.24
	3	1,161,841	5.38
	4	1,091,265	5.41
	5	518,261	5.38

ตาราง 16 การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

น้ำมันพืช (1% w/v)	ความเข้มข้น Lovastatin (mg/L)	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/L)
Control 1 (ไม่เติมน้ำมันพืช)	2.40±0.31	13.46±0.22
Control 2 (ไม่เติมน้ำมันพืชและ Lactose)	<0.04	9.52±0.45
1 %w/v Soya bean oil	1.91±1.07	18.00±0.55
2 %w/v Soya bean oil	2.55±1.12	27.62±0.52
3 %w/v Soya bean oil	2.48±0.47	36.74±0.74
4 %w/v Soya bean oil	1.93±0.96	46.56±3.49
5 %w/v Soya bean oil	1.76±0.97	51.90±5.35

2.2.5 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมต่อการผลิต lovastatin การทดสอบเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 ที่สามารถผลิต lovastatin โดยใช้ชนิดแหล่งคาร์บอนหลักและแหล่งคาร์บอนเสริมเป็นน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณ 1 %w/v ได้ผลโครมาโตแกรมและผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin ที่เกิดขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 แสดงดังตาราง 17 และ 18 ตามลำดับ

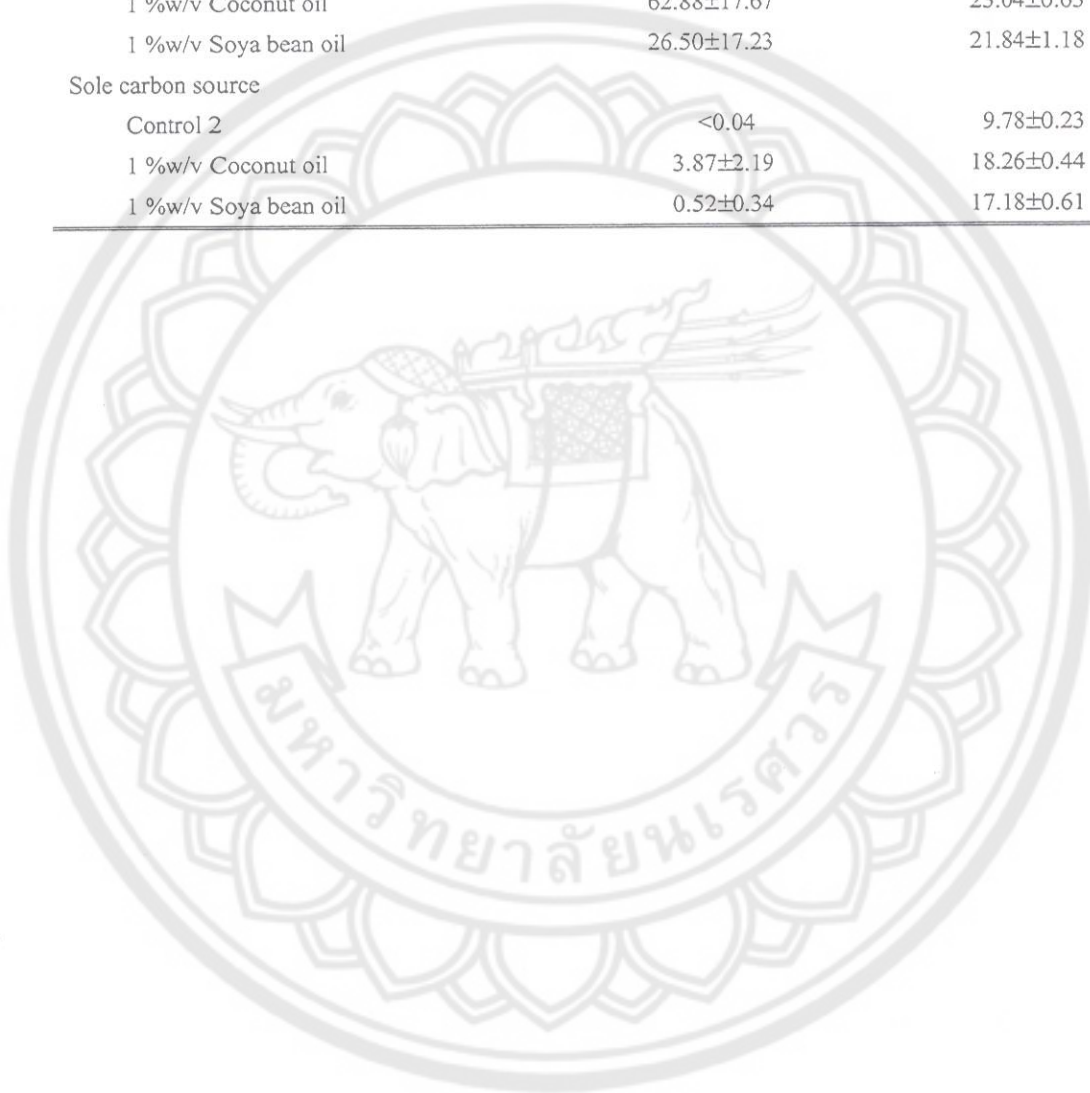


ตาราง 17 ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้ไขมันมะพร้าวและไขมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และเสริม

น้ำมันพืช	ครั้งที่	พื้นที่ใต้ Peak	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/flask)
Control 1 (ไม่เติมน้ำมันพืช)	1	1,865,848	1.39
	2	2,576,174	1.33
	3	1,355,565	1.32
	4	1,491,870	1.37
	5	1,983,713	1.24
1 %w/v Coconut oil (Supplement carbon source) + Lactose	1	16,971,411	2.22
	2	34,665,506	2.38
	3	23,973,005	2.30
	4	28,237,676	2.35
	5	36,037,935	2.27
1 %w/v Soya bean oil (Supplement carbon source) + Lactose	1	19,474,663	2.32
	2	19,059,434	2.17
	3	12,481,465	2.12
	4	4,689,930	2.03
	5	3,309,849	2.28
Control 2 (ไม่เติมน้ำมันพืช และ Lactose)	1	44,172	0.95
	2	57,142	1.00
	3	68,405	0.96
	4	95,532	0.98
	5	68,782	1.00
1 %w/v Coconut oil (Sole carbon source)	1	1,959,967	1.80
	2	553,728	1.88
	3	1,205,554	1.82
	4	3,166,244	1.77
	5	1,823,967	1.86
1 %w/v Soya bean oil (Sole carbon source)	1	26,738	1.69
	2	305,886	1.77
	3	316,036	1.76
	4	420,396	1.64
	5	181,543	1.78

ตาราง 18 การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริม

น้ำมันพืช	ความเข้มข้น Lovastatin (mg/L)	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (g/L)
Supplement carbon source		
Control 1	4.13±1.08	13.30±0.58
1 %w/v Coconut oil	62.88±17.67	23.04±0.63
1 %w/v Soya bean oil	26.50±17.23	21.84±1.18
Sole carbon source		
Control 2	<0.04	9.78±0.23
1 %w/v Coconut oil	3.87±2.19	18.26±0.44
1 %w/v Soya bean oil	0.52±0.34	17.18±0.61



### 3. อภิปรายผลการวิจัย

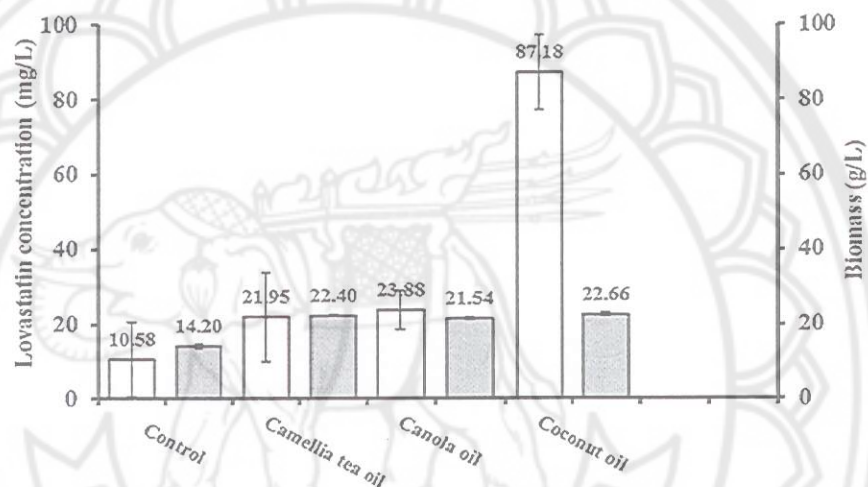
#### 3.1 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin

แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเหลว เป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสาร secondary metabolite ของเชื้อรา ดังนั้นการเลือกชนิดและสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเหลวมีส่วนสำคัญต่อกระบวนการผลิต lovastatin ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็นตัวควบคุมการผลิตสาร secondary metabolite ของเชื้อรา [8] ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน lactose เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (sole carbon source) และน้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม (supplementary carbon source) โดยการทดลองควบคุม (control) ใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน และ lactose เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก ผลการศึกษาเปรียบเทียบการใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 %w/v กับปริมาณ lovastatin ที่เกิดขึ้นและปริมาณ biomass มีดังนี้ การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ชุด โดยน้ำมันเมล็ดชา น้ำมันคาโนลา และน้ำมันมะพร้าว แสดงในรูป 4 น้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอเลอิน และน้ำมันรำข้าว แสดงในรูป 5 และน้ำมันเมล็ดดอกคำฝอย น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน แสดงในรูป 6

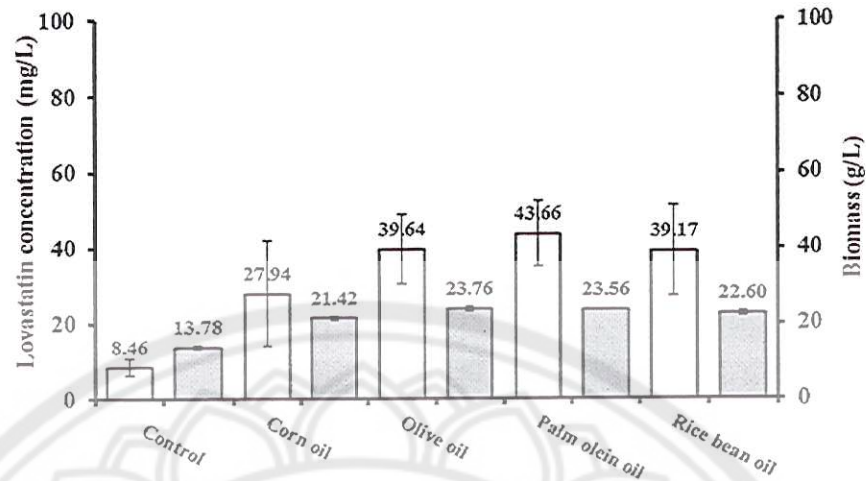
จากการศึกษาผลของน้ำมันพืชทั้ง 11 ชนิด พบว่าน้ำมันมะพร้าวให้ปริมาณ lovastatin สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองที่ใช้ไขมันชนิดอื่นๆ และการทดลองควบคุม โดยมี lovastatin เกิดขึ้น 87.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนน้ำมันถั่วเหลืองให้ปริมาณ lovastatin เท่ากับ 53.87 มิลลิกรัมต่อลิตร ในส่วนน้ำมันงาให้ปริมาณ lovastatin ต่ำสุด (16.72 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกันกับการศึกษาของ Sripalakit และคณะ [20] ในส่วนของการทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืชจะให้ค่าเฉลี่ยของการผลิต lovastatin เท่ากับ 9.39 มิลลิกรัมต่อลิตร (อยู่ในช่วง 8.46-10.58 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยรวมแล้วน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองให้ผลผลิตสูงกว่าการทดลองควบคุมถึง 8.2 และ 5.9 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นน้ำมันพืช 2 ชนิดดังกล่าวจึงถูกเลือกในสำหรับการศึกษาต่อไป ในส่วนปริมาณ biomass ที่เกิดขึ้น พบว่าการทดลองที่เติมน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ลงในอาหารเหลวจะให้ปริมาณ biomass ใกล้เคียงกันซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 20.40-23.76 กรัมต่อลิตร (ค่าเฉลี่ย 21.95 กรัมต่อลิตร) ซึ่งมีน้ำหนักมากกว่าการทดลองควบคุมซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 12.42-14.20 กรัมต่อลิตร (ค่าเฉลี่ย 13.47 กรัมต่อลิตร)

ผลการทดลองดังกล่าวจึงมีความสอดคล้องกับการศึกษาเกี่ยวกับการเติมน้ำมันพืชลงในอาหารเหลวในการเพิ่มผลผลิตของยาหลายชนิด เช่น erythromycin [14], tetracycline [15], cephamycin C [16], clavulanic acid [17], gentamicin [18] และ cephalosporin C [19] เป็นต้น เมื่อ

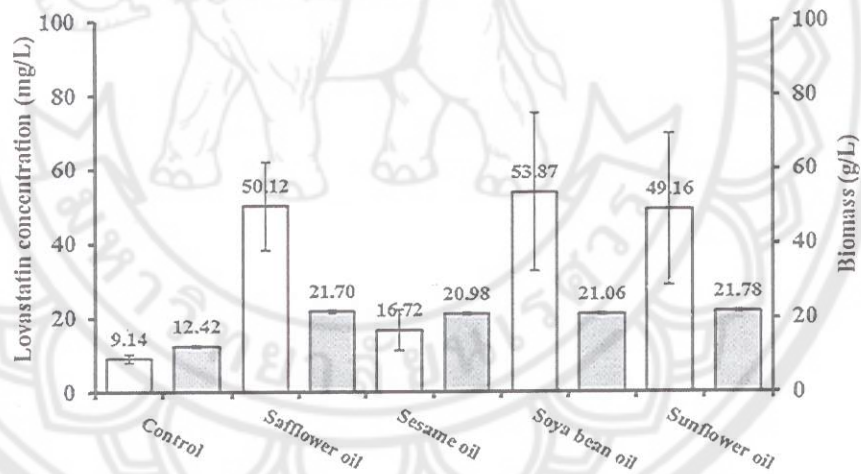
เปรียบเทียบชนิดของน้ำมันพืชที่ใช้ในการศึกษา พบว่าน้ำมันถั่วเหลืองเป็นน้ำมันพืชที่เหมาะสมสำหรับเติมลงในอาหารเหลว เนื่องจากสามารถทำให้มีปริมาณ secondary metabolite หลายชนิดในระดับสูง [12-18] อย่างไรก็ตามยังไม่มียางานที่กล่าวว่าสารประกอบชนิดใดในน้ำมันพืชที่มีผลต่อการผลิตเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิต lovastatin การศึกษาต่อไปควรจะศึกษาผลของชนิดของกรดไขมัน (fatty acid) และสารประกอบอื่นๆ ที่มีในน้ำมันพืช การศึกษาในปี 2010 โดย Sorrentino และคณะ [21] พบว่าการเสริมกรดไขมัน linoleic acid ลงในอาหารเหลวช่วยให้ปริมาณ lovastatin สูงขึ้น ซึ่งกลไกเกี่ยวข้องกับยีนของการผลิต lovastatin



รูป 4 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin (กราฟแท่งสีขาว) และน้ำหนักเชื้อราแห้ง (กราฟแท่งสีเทา) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมจากน้ำมันเมล็ดชา น้ำมันคาโนลา และน้ำมันมะพร้าว ความเข้มข้น 1 %w/v (Control = ไม่เติมน้ำมันพืช)



รูป 5 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin (กราฟแท่งสีขาว) และน้ำหนักเชื้อราแห้ง (กราฟแท่งสีเทา) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมจากน้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม โอเลอิน และน้ำมันรำข้าว ความเข้มข้น 1 %w/v (Control = ไม่เติมน้ำมันพืช)

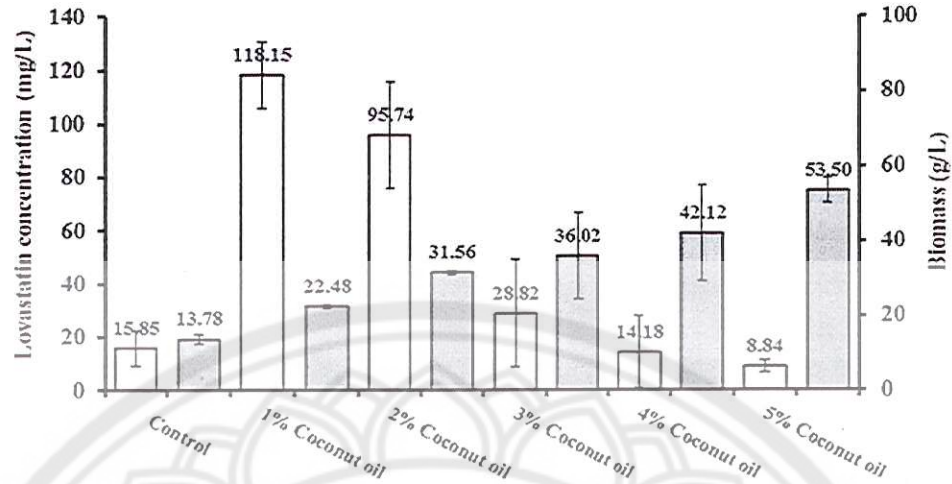


รูป 6 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin (กราฟแท่งสีขาว) และน้ำหนักเชื้อราแห้ง (กราฟแท่งสีเทา) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมจากน้ำมันเมล็ดดอกคำฝอย น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ความเข้มข้น 1 %w/v (Control = ไม่เติมน้ำมันพืช)

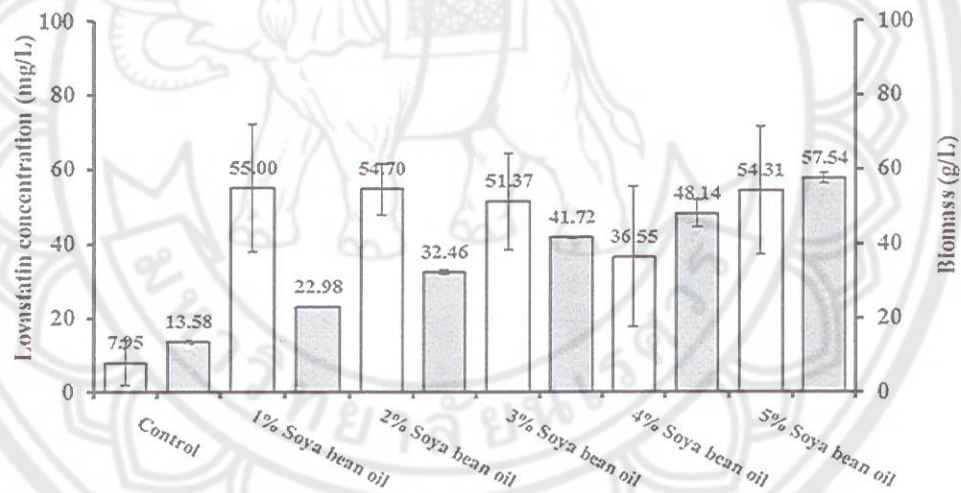
### 3.2 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมต่อการผลิต lovastatin

จากผลการศึกษาในการเลือกชนิดของน้ำมันพืชซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมที่ทำให้ผลผลิต lovastatin สูงคือน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง ผู้วิจัยได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองที่เติมลงในอาหารเหลว โดยศึกษาที่ความเข้มข้นดังนี้ คือ 1 2 3 4 และ 5 %w/v และเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม ดังแสดงในรูป 7 และ 8 สำหรับน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของน้ำมันมะพร้าวพบว่าปริมาณ lovastatin ที่เกิดขึ้นจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของน้ำมัน คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันมะพร้าวจะทำให้ปริมาณ lovastatin ลดลงตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้น 1 %w/v จะให้ปริมาณ lovastatin สูงสุด (118.15 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมพบว่า การเติมน้ำมันมะพร้าวทุกความเข้มข้นให้ปริมาณ lovastatin สูงกว่า สำหรับน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าที่ความเข้มข้น 1-5 %w/v จะให้ปริมาณ lovastatin ที่แตกต่างกันคืออยู่ในช่วง 36.55-55.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ความเข้มข้น 1 %w/v จะให้ปริมาณ lovastatin สูงสุด (55.00 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งผลการทดลองของน้ำมันถั่วเหลืองมีลักษณะเดียวกันกับการวิจัยที่คณะวิจัยได้เคยรายงานไว้ [20] แต่อย่างไรก็ตามการเติมน้ำมันจะให้ปริมาณมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม ส่วนปริมาณ biomass ของทั้งการศึกษาในน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองจะแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำมันพืช



รูป 7 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin (กราฟแท่งสีขาว) และน้ำหนักเชื้อราแห้ง (กราฟแท่งสีเทา) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมจากน้ำมันมะพร้าว ความเข้มข้น 1-5 %w/v (Control = ไม่เติมน้ำมันพืช)



รูป 8 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin (กราฟแท่งสีขาว) และน้ำหนักเชื้อราแห้ง (กราฟแท่งสีเทา) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเสริมจากน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1-5 %w/v (Control = ไม่เติมน้ำมันพืช)

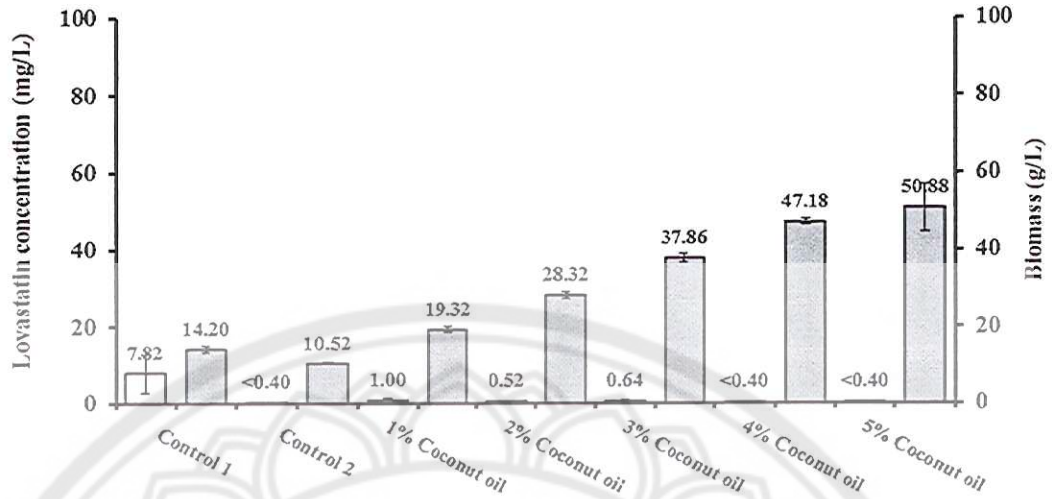
### 3.3 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักต่อการผลิต lovastatin

จากผลการศึกษาการใช้น้ำมันพืช 2 ชนิด คือน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม โดยมีแหล่งคาร์บอนหลักเป็น lactose สำหรับศึกษานี้ ผู้วิจัยได้เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนหลักโดยให้น้ำมันพืช 2 ชนิดดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก โดยไม่เติม lactose ลงให้อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ การเติมน้ำมันในครั้งนี้จะใช้ความเข้มข้น 1-5 %w/v ผลการทดลองแสดงในรูป 9 และ 10 สำหรับน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง ตามลำดับ

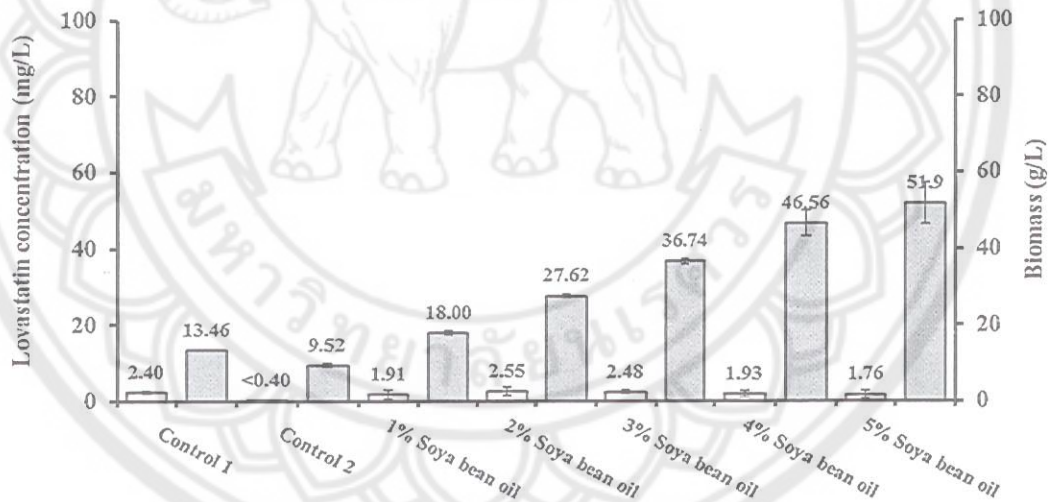
จากผลการศึกษาพบว่า การเติมน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (ความเข้มข้น 1-5 %w/v) มีผลทำให้การผลิต lovastatin มีปริมาณลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมที่เติม lactose แต่ไม่เติมน้ำมันพืช (control 1) และการทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืชและ lactose (control 2) โดยมีปริมาณ lovastatin มีค่าน้อยกว่า 1.00 และ 2.55 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณ biomass ของการศึกษาทั้งในน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลืองจะแปรผันตามความเข้มข้นของน้ำมันพืชที่เติมลงไปให้อาหารเหลว

เพราะฉะนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่าน้ำมันพืชเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมมากกว่าแหล่งคาร์บอนหลักในการเพิ่มผลผลิตของ lovastatin ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมในการผลิต tetracycline [15], cephamycin C [16] และ clavulanic acid [17] แต่อย่างไรก็ตามน้ำมันพืชสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักได้ในการผลิต erythromycin [14], gentamicin [18] และ cephalosporin C [19]





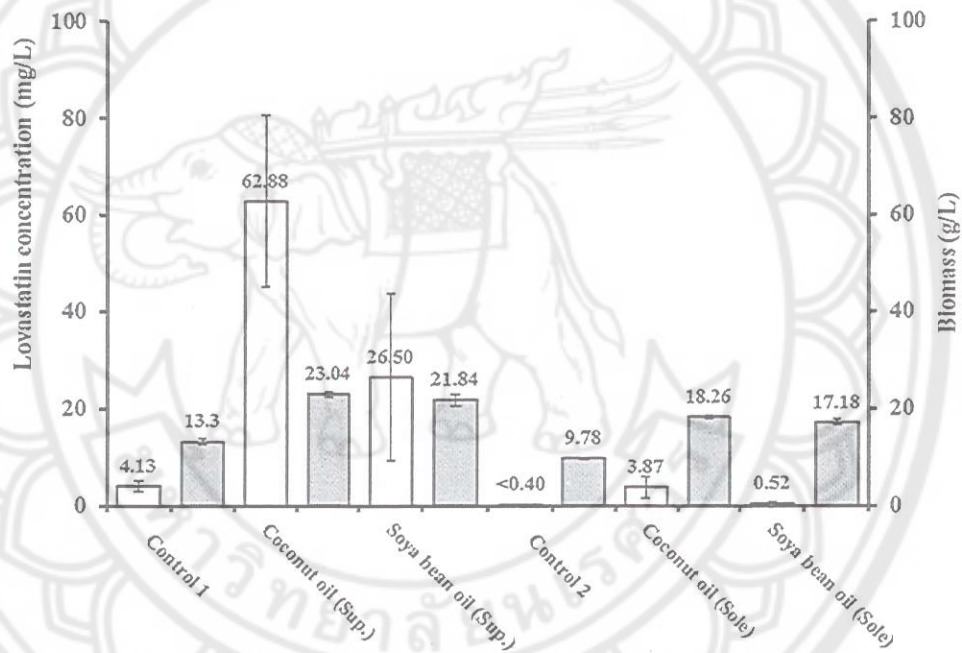
รูป 9 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin (กราฟแท่งสีขาว) และน้ำหนักเชื้อราแห้ง (กราฟแท่งสีเทา) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนหลักจากน้ำมันมะพร้าว ความเข้มข้น 1-5 %w/v (Control 1 = ไม่เติมน้ำมันพืช, Control 2 = ไม่เติมน้ำมันพืชและ lactose)



รูป 10 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin (กราฟแท่งสีขาว) และน้ำหนักเชื้อราแห้ง (กราฟแท่งสีเทา) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนหลักจากน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1-5 %w/v (Control 1 = ไม่เติมน้ำมันพืช, Control 2 = ไม่เติมน้ำมันพืชและ lactose)

### 3.4 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมต่อการผลิต lovastatin

ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบผลของการใช้น้ำมันพืชในการเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และแหล่งคาร์บอนเสริมภายใต้การทดลองครั้งเดียวกัน โดยเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืช (control 1) และการทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืชและ lactose (control 2) ดังรูป 11 จากการศึกษาพบว่ากลุ่มการทดลองที่มีการเติม lactose และน้ำมันพืชจะได้ปริมาณ lovastatin สูงกว่ากลุ่มการทดลองที่เติมเพียงน้ำมันพืชอย่างเดียว รวมทั้งการเติมน้ำมันมะพร้าวจะได้ปริมาณ lovastatin สูงกว่าน้ำมันถั่วเหลือง ผลการทดลองดังกล่าวเป็นการยืนยันว่าการเติมน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมจะช่วยเพิ่มผลผลิต lovastatin ได้เป็นอย่างดี



รูป 11 การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin (กราฟแท่งสีเทา) และน้ำหนักเชื้อราแห้ง (กราฟแท่งสีขาว) ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้แหล่งคาร์บอนหลัก (Sole) และแหล่งคาร์บอนเสริม (Sup.) จากน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1 %w/v (Control 1 = ไม่เติมน้ำมันพืช, Control 2 = ไม่เติมน้ำมันพืชและ lactose)

#### 4. สรุปและเสนอแนะ

Lovastatin สามารถผลิตได้โดยเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 เพื่อให้เชื้อราสามารถผลิต lovastatin ได้ในปริมาณที่เหมาะสม สารอาหารที่เติมลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิต secondary metabolite ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่เกิดขึ้น ชนิดของน้ำมันพืชที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อปริมาณ lovastatin ที่เกิดขึ้น ซึ่งเกิดขึ้นจากน้ำมันพืชแต่ละชนิดมีปริมาณและชนิดของกรดไขมันรวมถึงสารอื่นๆ ในสัดส่วนที่แตกต่างกันไป ปริมาณน้ำมันพืชที่มากเกินไปจะทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ลดลง การเติมน้ำมันพืชซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้ lovastatin มีปริมาณสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามควรเติมควบคู่กับแหล่งคาร์บอนหลักเช่น lactose เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันพืชสามารถเปลี่ยนเป็นแหล่งคาร์บอนและสารอาหารที่ให้พลังงานได้ และอาจจะช่วยเปลี่ยนแปลงกลไกการผลิต lovastatin ในระดับยีน

## บรรณานุกรม

- [1] Tobert JA. (1987). New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. *Circulation*, 76, 534-538.
- [2] Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, *et al.* (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3957-3961.
- [3] Alberts AW. (1990). Lovastatin and simvastatin-inhibitors of HMG CoA reductase and cholesterol-biosynthesis. *Cardiology*, 77, 14-21.
- [4] Manzoni M, Rollini M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 58, 555-564.
- [5] Greenspan MD, Yudkovitz JB. (1985). Mevinolinic acid biosynthesis by *Aspergillus terreus* a relation to fatty acid biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 2, 704-707.
- [6] Daborah RA, Lein J, Conder MJ, Tewalt GL. (1992). Enzymatic deacylation of simvastatin. *British Patent*, GB2255974.
- [7] Kumar MS, Jana SK, Senthil V, Shashanka V, Kumar SV, Sadhakan AK. (2000). Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. *Process Biochemistry*, 36, 363-368.
- [8] Lopez JLC, Perez JAS, Sevilla JMF, Fernandez FGA, Grima EM, Chisti Y. (2003). Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 270-277.
- [9] Hajjaj H, Niedererger P, Duboc P. (2001). Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemical defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2596-2602.
- [10] Lai LT, Pan CC, Tzeng BK. (2003). The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Process Biochem.*, 38, 1317-1326.
- [11] Bizukojc M, Pawlowska B, Ledakowicz S. (2007). Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *J. Biotechnol.*, 127, 258-268.

- [12] Lopez JLC, Perez JAS, Sevilla JMF, Fernandez FGA, Grima EM, Chisti Y. (2004). Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 79, 1119-1126.
- [13] Jia Z, Zhang X, Cao X. (2009). Effects of carbon sources on fungal morphology and lovastatin biosynthesis by submerged cultivation of *Aspergillus terreus*., *Asia-Pacific J. Chem Eng.*, 4, 672-677.
- [14] Hamed J, Malekzadeh F, Saghafi-nia AE. (2004). Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythaea* with common and uncommon oils. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 447-456.
- [15] Jones AM, Porter MA. (1998). Vegetable oils in fermentation: beneficial effects of low-level supplementation. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.*, 21, 203-207.
- [16] Park YS, Momose I, Tsunoda K, Okabe M. (1994). Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 773-779.
- [17] Maranesi GL, Baptista-Neto A, Hokka CO, Badino AC. (2005). Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerous* ATCC 27064. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 509-514.
- [18] Choi DB, Park SS, Ahn BK, Lim DH, Lee YW, Moon JH, Sin DY. (2008). Studies on production of gentamicin from *Micromonosporas purpurea* using crude vegetable oils. *Process Biochem.*, 43, 835-841.
- [19] Kim JH, Lim JS, Kim SW. (2004). The improvement of cephalosporin C production by fed-batch culture of *Cephalosporium acremonium* M25 using rice oil. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 9, 459-464.
- [20] Sripalakit S, Riunkesorn J, Saraphanchotiwitthaya A. (2011). Improvement of lovastatin production by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 using vegetable oils. *Maejo. Inter. J. Sci. Technol.*, 5, 231-240.
- [21] Sorrentino F, Roy I, Keshavarz T. (2010). Impact of linoleic acid supplementation on lovastatin production in *Aspergillus terreus* cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 65-73.

## ภาคผนวก ก

## ตัวชี้วัดเพื่อการประเมินผลสำเร็จของโครงการ

- นำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการที่มีการตีพิมพ์เฉพาะ Abstract จำนวน 1 เรื่อง
 

งานประชุมวิชาการ :	การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37 (วทท 37) The 37 <sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT 37)
วันที่ :	10-12 ตุลาคม 2554
สถานที่ :	โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ และ บางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ กรุงเทพฯ
หัวข้อเรื่อง :	Improvement of lovastatin production by <i>Aspergillus terreus</i> using vegetable oils as sole and supplementary carbon sources
รูปแบบการนำเสนอ :	โปสเตอร์และตีพิมพ์ Abstract ในเอกสารประกอบการประชุม “The 37 <sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand: Creative Sciences for Creating the Future”



STT37-0357



Science Society of Thailand Under the Royal Patronage of His Majesty the King, Faculty of Science,  
Chulalongkorn University, Phaya Thai Rd., Bangkok 10330  
Tel: 085-018-3131, 02-2527987, 02-2185245 Fax. 02-2527987  
E-mail: s\_srisung@hotmail.com, kkung.scisoc@gmail.com, jaksriri14@hotmail.com

## Acknowledgement

Dear Pattana Sripalakit

The secretariat committee of STT37 would like to inform you that we have received your STT37 registration information for ID: **0357** and e-mail address: **pattanas@nu.ac.th**  
The secretariat committee of STT37 have received

Ordinary participant  Participant with paper submission

We recieved the payment as  cash  bank transfered  cheque bank  
with amount **1,800.00** baht ( หนึ่งพันแปดร้อยบาทถ้วน )

Your submitted paper entitled **Improvement of lovastatin production by Aspergillus terreus ATCC 20542 using vegetable oils as sole and supplementary carbon sources**  
was reviewed from academic subcommittee of STT with the result:

- Poster  
 Oral presentation (the presentation schedule can be checked at the uploaded files)  
 Not accepted

Sincerely yours,

Associate Professor Dr. Thararat Supasiri



# Improvement of Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 Using Vegetable Oils as Sole and Supplementary Carbon Sources

Pattana Sripalakit, Janya Rlunkesorn, Aurasorn Saraphanchotiwitthaya

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, THAILAND

pattanas@nu.ac.th (P. Sripalakit)

## Abstract

This study investigated the effect of vegetable oils as sole and supplementary carbon sources during the production of lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in submerged culture. The eleven vegetable oils tested were camellia tea oil, canola oil, coconut oil, corn oil, olive oil, palm olein oil, rice bran oil, safflower oil, sesame oil, soya bean oil and sunflower oil. Lovastatin concentration and biomass were measured. Lovastatin production was higher in oil-containing media compared with the control medium. In particular, coconut oil and soya bean oil significantly improved lovastatin production. Yields with coconut oil and soya bean oil were 8- and 5-fold higher, respectively, compared with control media without oil supplementation. Biomass was proportional to coconut oil concentration, but an excessive concentration of oil resulted in a lower yield. The cultivations with coconut oil and soya bean oil used as a sole carbon source gave lower production than the control medium. Thus, it can be concluded that vegetable oils appear to be excellent supplementary carbon sources for improving lovastatin production efficiency.

## Introduction

Hypercholesterolemia is considered as an important risk factor in coronary artery diseases of human being. Lovastatin, a widely used anti-hypercholesterolemic drug, is a secondary metabolite produced by the fermentation of *A. terreus*. As with any fermentation product, the culture medium has a significant influence on the yield of product. The selection and composition optimization of a suitable medium is important for establishing a process for producing lovastatin. Numerous examples of the successful use of vegetable oils as carbon sources are cited in the literature. Many studies proved that the vegetable oils can improve fermentation efficiency.

The present work reports on the effect of adding vegetable oils as a sole and supplementary carbon sources to enhance fermentation productivity of lovastatin by *A. terreus*.

## Methodology

The standard fungal of *A. terreus* was reactivated by culturing on PDA (potato dextrose agar) slants at room temperature. The culture media contained (per L): 10 g lactose (C source), 8 g yeast extract (N source), 1.51 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.52 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 g NaCl, 1 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , 0.04 mg biotin and some trace elements. All fermentations were carried out at room temperature in 250-mL shake flasks held on a orbital shaker (150 rpm). Lovastatin was extracted by ethyl acetate from the media and was determined as its  $\beta$ -hydroxyacid form by high performance liquid chromatography (HPLC).

## Results and Discussion

The maximum production levels of lovastatin were found in coconut oil and soya bean oil, whereas sesame oil gave lowest production (Fig. 1). As supplementary oil concentration of 1 %v/v resulted in the highest lovastatin production; higher concentrations tended to give lower yields (Fig. 2). The biomass increased with increasing oil concentration, which suggests that cell growth is related to oil concentration. Fig. 3 shows the effects of vegetable oils in different concentration as a sole carbon source. The experiment with only oil as carbon source shows negative effect on lovastatin production. Vegetable oil used as supplementary carbon source gave higher yield than their sole carbon source (Fig. 4).

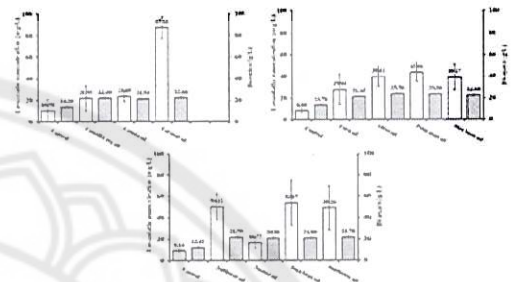


Fig. 1 Effect of vegetable oils on lovastatin production (light bar) and biomass (dark bar)

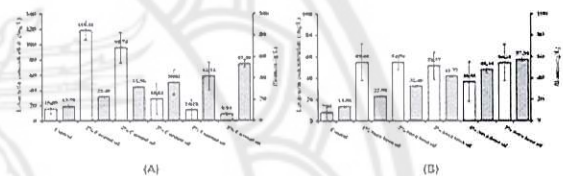


Fig. 2 Effect of concentration of coconut oil (A) and soya bean oil (B) as supplementary carbon sources on lovastatin production (light bar) and biomass (dark bar) (Control = C+N)

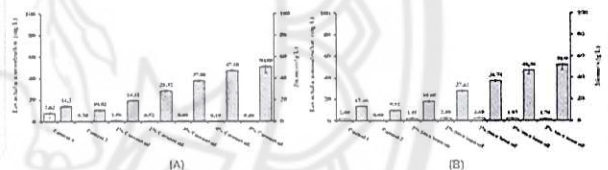


Fig. 3 Effect of concentration of coconut oil (A) and soya bean oil (B) as sole carbon sources on lovastatin production (light bar) and biomass (dark bar) (Control 1 = C+N; Control 2 = N)

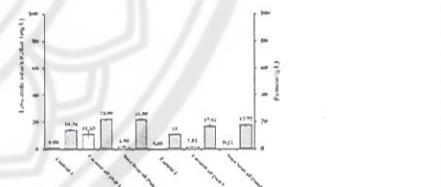


Fig. 4 Influence of supplementary and sole carbon sources on lovastatin production (light bar) and biomass (dark bar) (Control 1 = C+N; Control 2 = N)

## Conclusion

The lovastatin production performance of *A. terreus* depends on the composition of medium. Clearly, the vegetable oil supplement as a carbon source seemed to improve fermentation yield.

## Acknowledgements

This work was supported by a research grant from Naresuan University, Thailand.