

โพลีคีไทด์ (polyketide) เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายประเภทเช่น พืช แบคทีเรีย และ เชื้อรา สารกลุ่มนี้จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เกิดจากการเชื่อมกันของโมเลกุลคาร์บอนของเอซิลโคเอนไซม์เอ (acyl CoA) เช่น อะซีติลโคเอนไซม์เอ (acetyl CoA) หรือมาโลนิลโคเอนไซม์เอ (malonyl CoA) ด้วยกระบวนการดีคาร์บอกซิเลทีฟคอนเดนเซชัน (decarboxylative condensation) ที่ถูกควบคุมโดยยีนโพลีคีไทด์ซินเทส (polyketide synthase gene) ทำให้ได้เป็นสายยาวของหมู่คีโตน (ketone) (Staunton และ Weissman, 2006) เนื่องจากสารในกลุ่มโพลีคีไทด์นี้มีความหลากหลายทางโครงสร้าง สารกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่แตกต่างกันเช่น เป็นสารปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย (antibacterial) เช่น อีริโทรมัยซิน (erythromycin) และเตตราซัยคลิน (tetracycline), สารต้านเชื้อรา (antifungal) สารต้านมะเร็ง (antitumor), สารต้านปรสิต (antiparasitic), สารกดการแสดงออกของระบบภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressant) และสารลดโคเลสเตอรอล (anticholesterolemic) ทำให้โพลีคีไทด์นี้มีความสำคัญอย่างยิ่งทางการแพทย์ สาธารณสุข เกษษกรรม และอุตสาหกรรม และมีมูลค่าการซื้อขายทั่วโลกถึง 16,000 ล้านบาทต่อปี (Demain, 2000)

ในปัจจุบันได้มีการค้นพบสารโพลีคีไทด์ต่าง ๆ มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากเชื้อราที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่าง ๆ เช่น cytochalasin Q ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อมาลาเรียจาก *Xylaria* sp., depsides (สารต้านการอักเสบ) จากไลเคน *Pertusariales* (lichenized Ascomycota) ซึ่งเป็นแหล่งของโพลีคีไทด์หลายร้อยชนิด (Carlile et al., 2001; Schmitt et al., 2005; Opanowicz et al., 2006), lovastatin (สารลดโคเลสเตอรอล) จาก *Aspergillus terreus* เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังมิได้มีการนำสารโพลีคีไทด์เหล่านี้มาใช้ผลได้อย่างจริงจัง เนื่องจากราที่เป็นแหล่งของโพลีคีไทด์เหล่านี้เจริญเติบโตช้า และบางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ เช่น *Cordyceps* sp. ตลอดจนขาดความรู้ความเข้าใจและข้อมูลด้านจีโนมิกส์ (genomics) เกี่ยวกับราชนิดนั้น

วิธีหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าวคือ การผลิตโพลีคีไทด์โดยใช้จุลินทรีย์ต่างชนิดเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (heterologous production of polyketide) โดยนำยีนโพลีคีไทด์ซินเทสจากจุลินทรีย์ผู้ผลิต (natural host) มาใส่ในจุลินทรีย์ชนิดอื่นหรือที่เรียกว่าเซลล์เจ้าบ้าน (host) แล้วให้จุลินทรีย์ชนิดนั้นเป็นผู้ผลิตสารโพลีคีไทด์แทน จุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านนั้น ควรจะเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตง่าย ไม่มีปัญหาในการเพาะเลี้ยงทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม มีข้อมูลด้านจีโนมิกส์และมีเทคนิคด้านชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology technique) ที่สามารถใช้สำหรับการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตสารโพลีคีไทด์ เซลล์เจ้าบ้านเหล่านี้ได้แก่ *Escherichia coli* (Kealey et al., 1998),

Saccharomyces cerevisiae (Wattanachaisaereekul et al., 2007) หรือ *Aspergillus* sp. (Fujii et al., 1996) เป็นต้น

Aspergillus oryzae เป็นราที่มีการศึกษาและใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรม เช่น ใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส หรือเอนไซม์อื่น ๆ เป็นราที่มีความปลอดภัยเนื่องจากใช้ในการผลิตโคจิหรือเต้าเจี้ยวสำหรับการบริโภค รวมถึงมีคุณสมบัติอื่น ๆ ที่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการศึกษาและปรับปรุงสายพันธุ์ ทั้งนี้หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพด้านรา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ได้ทำการวิจัยศึกษาถึงการแสดงออกของยีนโพลีคีไทด์ซินเทสที่มีโดเมนเมทิลทรานสเฟอเรส (*pksmt*) จาก *Xylaria* sp. BCC1067 ซึ่งถูกค้นพบที่อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จ. เพชรบูรณ์ โดยใช้ *A. oryzae* U1638 เป็นเซลล์เจ้าบ้าน *A. oryzae* U1638 ที่มียีน *pksmt* จาก *Xylaria* sp. BCC1067 (หรือที่เรียกว่า *A. oryzae* MTG4) จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Malt Extract Broth (MEB) ซึ่งยังไม่ได้ผ่านการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยง (unoptimized medium) ในขวดเขย่า (shake flask) เป็นเวลา 21 วัน จึงเก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์โดย HPLC พบว่า *A. oryzae* MTG4 จะผลิต anhydromevalonolactone (AMVL) pyrone อีก 2 ชนิด ซึ่งเป็นสารโพลีคีไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งในช่องปาก โดย AMVL จะผลิตมากในช่วงเวลา 16-21 วัน อย่างไรก็ตามจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า AMVL จะผลิตได้ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำในอาหาร MEB ที่มีราคาแพง ทำให้มีต้นทุนการผลิตสูง และการผลิตในปริมาณดังกล่าวทำให้ไม่เพียงพอต่อการนำไปศึกษาต่อและใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาชนิดของสูตรอาหารแบบ defined medium และปริมาณของสารอาหารแต่ละชนิดที่เหมาะสมและมีราคาถูกที่ทำให้ผลิต AMVL ได้ในปริมาณมาก งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิต AMVL จาก *A. oryzae* MTG4 รวมถึงศึกษาการเจริญเติบโต และการผลิต AMVL ในสูตรอาหารชนิดใหม่ เพื่อจะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* MTG4 และการเพิ่มผลผลิตของสารโพลีคีไทด์ที่มีคุณค่าในรา *A. oryzae* MTG4 อย่างเป็นระบบ

2.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของตัวแปรที่สำคัญและมีความเหมาะสมของสูตรอาหารแบบ defined medium ที่ใช้สำหรับการผลิต anhydromevalonolactone (AMVL) จาก *A. oryzae* MTG4
2. เพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการทำนายการผลิต AMVL จาก *A. oryzae* MTG4
3. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* MTG4 ในสูตรอาหารที่เหมาะสม ปริมาณการผลิต AMVL ในแต่ละช่วงเวลา

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตในการทำงานวิจัยนี้ประกอบไปด้วย

1. นำ *A. oryzae* MTG4 มาเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า โดยศึกษาชนิดและตัวแปรอิสระที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตสาร anhydromevalonolactone (AMVL) ตัวแปรดังกล่าวได้จากการทดลองแบบ Factorial Design และ Plackett-Burman Design และหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวแปรแต่ละตัวจาก Response Surface Methodology ที่ทำการทดลองแบบ Central Composite Design
2. สร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการทำนายการผลิต AMVL เมื่อใช้ความเข้มข้นของตัวแปรในระดับที่แตกต่างกัน
3. ศึกษาการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* MTG4 และการผลิต AMVL ใน optimized medium

การออกแบบการวิจัย

ออกแบบการทดลองเป็น 3 ส่วนดังนี้

1. Factorial Design การทดลองนี้ใช้เพื่อหาปัจจัยที่ดีที่สุดในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ช่วยในการเพิ่มปริมาณการผลิต anhydromevalonolactone (AMVL) โดยแบ่งปัจจัยเป็น 2 กลุ่ม คือ carbon source ได้แก่ glucose และ sucrose และกลุ่ม nitrogen source ได้แก่ NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , KNO_3 และ urea
2. Plackett-Burman Design การออกแบบการทดลองนี้ใช้เพื่อหาตัวแปรอิสระที่มีนัยสำคัญต่อการผลิต AMVL ตัวแปรดังกล่าวส่วนหนึ่งเป็นตัวแปรที่หาได้ในขั้นตอนของ Factorial Design และอีกส่วนหนึ่งเป็นตัวแปรที่คาดว่าจะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิต AMVL ซึ่งมักจะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงรา ได้แก่ K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, biotin และ trace element
3. Central Composite Design ในขั้นตอนนี้จะใช้เพื่อหาระดับที่เหมาะสมที่สุดของตัวแปรอิสระที่ช่วยในการเพิ่มปริมาณการผลิต AMVL ซึ่งผลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์โดยใช้หลักการของ Response Surface Methodology เพื่อใช้หาค่าตอบของการทดลองที่ประกอบไปด้วยปัจจัยร่วมการทดลองหลายปัจจัย และหาความสอดคล้องกับพื้นที่ตอบสนองอันจะนำไปสู่การค้นพบคำตอบที่เหมาะสมที่สุด นอกจากนี้ ทฤษฎีที่นำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการผลิต AMVL คือ ทฤษฎีสมการถดถอย (regression model) และสหสัมพันธ์ (correlation) (Cohen et al., 2003) เพื่อใช้พิสูจน์ว่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ปริมาณของสารอาหารในสูตร) กับตัวแปรตาม (ปริมาณ AMVL ที่วัดได้) มีจริงหรือไม่

การออกแบบเพื่อหาความสอดคล้องกับพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Design) และการประเมินความเหมาะสมของสถานะที่ใช้ในการทดลองนั้น ได้ถูกนำมาใช้เพื่อค้นหาค่าตอบของการทดลองที่ประกอบด้วยจำนวนปัจจัยร่วมการทดลองหลายปัจจัย ซึ่งจะช่วยให้สามารถค้นพบการตอบสนองที่เหมาะสมในที่สุด การตอบสนองที่เหมาะสมพิจารณาได้ใน 2 ลักษณะขึ้นอยู่กับธรรมชาติและวัตถุประสงค์ของการทดลอง คือ การตอบสนองที่สูงที่สุด และการตอบสนองต่ำสุด วิธีการนี้ได้ถูกอธิบายขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Box และ Wilson (1951) และได้ถูกพัฒนาเรื่อยมาพร้อมกับการกำหนดวิธีการของพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Methodology) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือทางคณิตศาสตร์และสถิติ

วิธีการของพื้นที่การตอบสนองประกอบด้วยกลุ่มของเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาจากค่าสังเกต เพื่อกำหนดความสัมพันธ์ระหว่างค่าการตอบสนองที่วัดได้ 1 หรือ 2 ค่า กับตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวนี้สามารถใช้เพื่อให้คำตอบต่าง ๆ เช่น

1. ค่าตอบสนองได้รับผลกระทบจากชุดสิ่งทดลองบนพื้นที่เฉพาะที่น่าสนใจบางอย่างได้อย่างไร
2. ชุดของสิ่งทดลองใด ที่จะให้ผลิตภัณฑ์หนึ่งเป็นที่พอใจตรงตามข้อกำหนดจำเพาะพร้อม ๆ กัน
3. ค่าใดของสิ่งทดลองที่จะทำให้ได้ผลผลิตในจุดที่สูงสุดของพื้นที่เฉพาะหนึ่ง ๆ และพื้นที่การตอบสนองใดที่ใกล้กับค่าสูงสุดนี้

เนื่องจากในการทดลองแบบ one-variable-at-a-time นั้นจะมีจุดด้อยอยู่บางประการ อาทิ ไม่สามารถอธิบายผลอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างตัวแปรได้ เช่น ถ้าระหว่างสองตัวแปรอิสระมีการเปลี่ยนแปลงไปพร้อม ๆ กัน การสรุปผลการทดลองอาจเกิดความผิดพลาดและคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นความเข้าใจในธรรมชาติที่เป็นไปได้ของผลร่วมระหว่างตัวแปรอิสระ จึงเป็นสิ่งที่ต้องพิจารณาในทอมนของการทำหน้าที่ร่วมกันที่ไม่เป็นอิสระของตัวแปรดังกล่าวนี้ ดังเช่นในเรื่องของสูตรอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ หรือตัวแปรอิสระหลายชนิด และสารอาหารเหล่านี้ก็จะส่งผลร่วมกันต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการใช้หลักการของ Response Surface Methodology เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารที่ต้องการ ดังเช่นในการผลิต cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) จาก *Bacillus* G1 นั้น Ibrahim et al., (2005) ได้ใช้ 2^5 Central Composite Design (CCD; half fraction) สำหรับการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่มี 5 ตัวแปร ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง peptone, yeast extract magnesium sulphate และ potassium phosphate พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสูตรอาหารประกอบด้วย 4% แป้งมันสำปะหลัง 2% peptone 0.04% magnesium sulphate และ 1% potassium phosphate

การศึกษาผลของส่วนประกอบในอาหารที่ประกอบไปด้วย soybean meal, peptone, soybean oil และ cornstarch เพื่อใช้ในการผลิต actinomycin X2 จาก *Streptomyces* spp JAU4234 นั้น Xiong et al., (2008) ได้ใช้ response surface methodology และ 2^4 full factorial designs สำหรับประเมิน พบว่า cornstarch และ soybean oil ส่งผลต่อการผลิต actinomycin X2 ดังแสดงได้จากค่าสัมประสิทธิ์ first-order regression จากโปรแกรม MINITAB นอกจากนี้ ในการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้ central composite design พบว่า soybean meal และ peptone จะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหาร และจากการประมาณค่าโดยใช้แบบจำลองพบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต actinomycin X2 จะประกอบไปด้วย soybean meal 21.65 g/L และ peptone 9.41 g/L โดยให้ค่าสูงสุดของ actinomycin X2 เท่ากับ 617.4 mg/L ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองจริงคือ 612 mg/L และผลได้ของ actinomycin X2 จะเพิ่มขึ้น 36.9% เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารก่อนที่ยังมิได้ทำการ optimized

ในการศึกษาการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต phenazine-1-carboxylic acid จากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. M-18Q นั้น Yuan et al., (2008) ได้ใช้ Plackett–Burman Design ในการประเมินผลขององค์ประกอบ 8 ชนิดที่มีในอาหารต่อการผลิต PCA พบว่า กลูโคส และ soytone เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอาหาร ส่วนสูตรที่ดีที่สุดที่ทำให้ PCA มีค่าสูงสุด หาโดยใช้วิธี central composite design ตามหลักการของ response surface methodology (RSM) พบว่า ผลได้สูงสุดของ PCA เท่ากับ 1240 mg/L ที่ปริมาณกลูโคส 17.81 g/L และ soytone 11.47 g/L โดยมีผลผลิตเพิ่มขึ้น 65.3% เมื่อเทียบกับการใช้อาหารสูตรเดิมที่มีค่าสูงสุดของ PCA เพียง 750 mg/L

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัยนี้คือได้ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตสารโพลีดีไฮด์ anhydromevalonolactone (AMVL) ในรา *A. oryzae* MTG4 ทราบสมการทางคณิตศาสตร์ที่สามารถใช้ในการทำนายการผลิตเมื่อใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน รวมถึงทราบลักษณะการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* MTG4 ในขวดเขย่า ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางและองค์ความรู้ของ Bioprocess Engineering การขยายขนาดการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับอุตสาหกรรม และเพิ่มปริมาณการผลิตสาร AMVL อย่างเป็นระบบ

วิธีดำเนินการวิจัย

6.1 จลินทรีย์ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

6.1.1 จลินทรีย์

Aspergillus oryzae MTG4 เป็นราที่มียีน *pkmt* จาก *Xylaria* sp. BCC1067 สร้างโดยการถ่ายฝากยีน *pkmt* ลงใน *A. oryzae* U1638

6.1.2 อุปกรณ์

6.1.2.1 เครื่องเขย่า (shaker) สามารถปรับความเร็วรอบและอุณหภูมิได้

6.1.2.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สำหรับวัดปริมาณโพลีดีไฮด์ anhydromevalonolactone (AMVL)

6.2 แผนการวิจัยและขั้นตอนในการทดลอง

6.2.1 General Factorial Design

6.2.1.1 กำหนดตัวแปรอิสระที่สำคัญ หรือชนิดของสารอาหารที่จะนำมาใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Aspergillus* sp. โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ตัวแปรที่เป็นแหล่งของคาร์บอน ได้แก่ glucose และ sucrose และกลุ่มของตัวแปรที่เป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , KNO_3 และ urea

6.2.1.2 เตรียมอาหารชนิดละ 50 mL ลงใน shake flask โดยใช้ 40 g/L carbon source, 5 g/L nitrogen source ส่วนองค์ประกอบอื่น ๆ มีค่าคงที่ดังนี้ 5 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L KCl และ 0.5 mL/flask Trace element (0.3575 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0625 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.345 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g/L citric acid) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที

6.2.1.3 ทำการถ่ายสปอร์เชื้อ *A. oryzae* MTG4 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ขนาด 1×10^7 สปอร์ต่ออาหาร 50 mL ทำการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 25 °C ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 21 วัน เก็บ ตัวอย่างน้ำหนักเพื่อสกัดด้วย

ethyl acetate ระเหย และละลายใน acetonitrile จากนั้นวัดปริมาณ AMVL ด้วย HPLC ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

6.2.1.4 ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองเพื่อหาชนิดของ carbon และ nitrogen source ที่เหมาะสมกับการผลิต AMVL

6.2.2 Plackett-Burman Design

6.2.2.1 กำหนดตัวแปรที่ได้จากในข้อ 6.2.1 ที่เป็น carbon และ nitrogen source ร่วมกับตัวแปรอื่น ๆ ได้แก่ K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, biotin และ trace element โดยกำหนดค่า กลาง ค่าสูงสุด ต่ำสุดของแต่ละตัวแปรดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าในระดับต่าง ๆ ของตัวแปรที่ใช้ในการทดลองแบบ Plackett-Burman Design

Factor	Low level (-1)	Center point (0)	High level (+1)
A: Carbon source (g/L)	40	70	100
B: Nitrogen source (g/L)	3	5	7
C: K_2HPO_4 (g/L)	3	5	7
D: KH_2PO_4 (g/L)	0	1	2
E: KCl (g/L)	0.25	0.50	0.75
F: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	0.25	0.50	0.75
G: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (g/L)	0	0.10	0.20
H: $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (g/L)	0	1	2
I: Biotin (mL)	0	0.10	0.20
J: Trace element (mL/flask)	0.25	0.50	0.75

6.2.2.2 เตรียมอาหารชนิดละ 50 mL ลงใน shake flask ตามที่ได้กำหนดไว้ นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ 15 นาที ถ่ายสปอร์เชื้อ *A. oryzae* MTG4 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ขนาด 1×10^7 สปอร์ต่ออาหาร 50 mL เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 21 วัน เก็บ ตัวอย่างน้ำหมักเพื่อสกัดด้วย ethyl acetate ทำการระเหย และละลายใน acetonitrile จากนั้นวัดปริมาณ AMVL ด้วย HPLC ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง

6.2.2.3 ทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง เพื่อหาชนิดของตัวแปรที่มีนัยสำคัญต่อการเพิ่มปริมาณการผลิต AMVL

6.2.3 Central Composite Design

- 6.2.3.1 นำกลุ่มตัวแปรที่มีนัยสำคัญของการเพิ่มปริมาณการผลิต AMVL ซึ่งหาได้ในข้อ 6.2.2 มาที่กำหนดระดับความเข้มข้นเป็น 5 ระดับ (coded value: -2, -1, 0, 1, 2) ตัวแปรมีผลในการเพิ่มการผลิต AMVL อย่างไม่มีนัยสำคัญให้กำหนดเป็นค่าคงที่ในทุก run ของการทดลอง
- 6.2.3.2 เตรียมอาหารชนิดละ 50 mL ลงใน shake flask ตามที่ได้กำหนดไว้ นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที ถ่ายสปอร์เชื้อ *A. oryzae* MTG4 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ขนาด 1×10^7 สปอร์ต่ออาหาร 50 mL เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 21 วัน เก็บ ตัวอย่างน้ำหมักเพื่อสกัดด้วย ethyl acetate ทำการระเหย และละลายใน acetonitrile จากนั้นวัดปริมาณ AMVL ด้วย HPLC ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง
- 6.2.3.3 ทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของตัวแปรแต่ละชนิดต่อการผลิต AMVL

6.2.4 การวัดการเจริญเติบโตของรา *A. oryzae* MTG4 ใน optimized medium

การวัดการเจริญเติบโตของรา *A. oryzae* MTG4 นั้นสามารถทำได้โดยการถ่ายสปอร์รา *A. oryzae* MTG4 ขนาด 1×10^7 สปอร์ต่อ optimized medium 50 mL เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างเพื่อหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เวลาต่างๆ โดยการกรอง mycelia ด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 ล้างน้ำกลั่นสองครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °C จนมีน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นจึงนำเซลล์ไปชั่งหาปริมาณน้ำหนักแห้งด้วยเครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง นำค่าที่ได้ไปหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดต่อไป

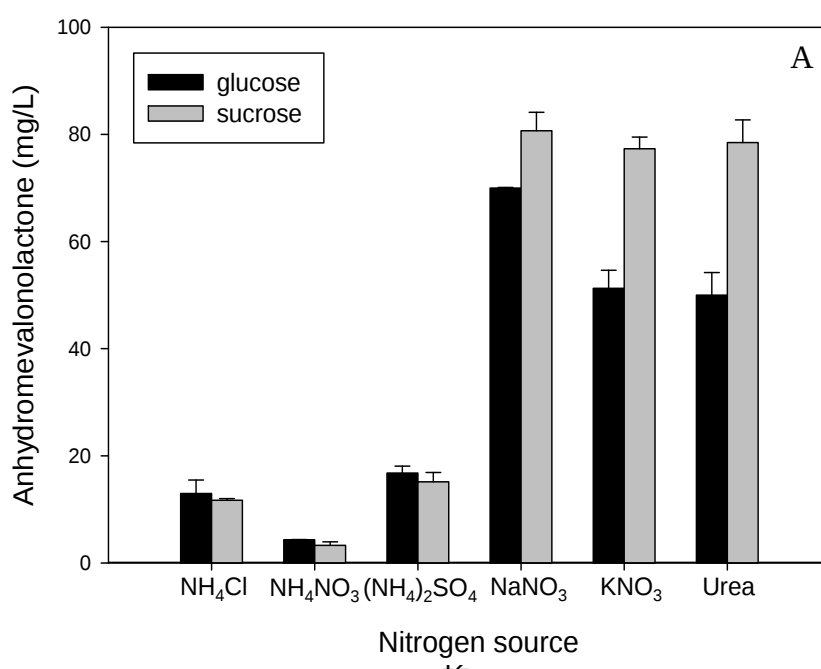
ผลการวิจัยและวิจารณ์

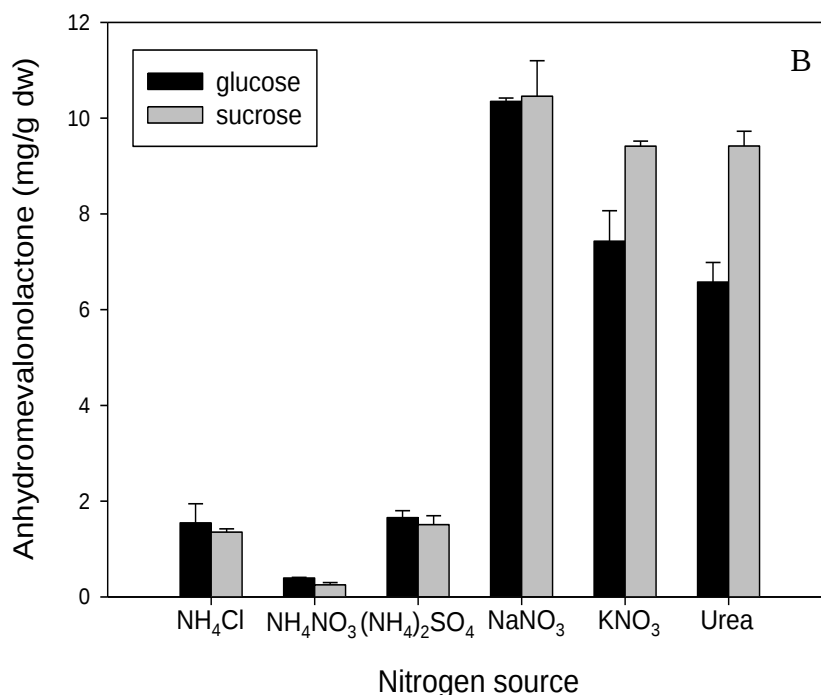
7.1 General Factorial Design

เป็นการทดลองเพื่อหาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต AMVL ใน *A. oryzae* MTG4 ซึ่งผลการทดลองและการวิเคราะห์ความแปรปรวนสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2 และ ภาพที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยปริมาณ anhydromevalonolactone (mg/L) ผลได้ (yield, mg/g dw) และ biomass (g/L) ที่ได้จากการทดลองแบบ Factorial Design เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

องค์ประกอบ	Glucose			Sucrose		
	AMVL (mg/L)	Yield (mg/g dw)	Biomass (g/L)	AMVL (mg/L)	Yield (mg/g dw)	Biomass (g/L)
NH_4Cl	12.97±2.52	1.55±0.40	8.55±0.59	11.70±0.32	1.35±0.07	8.65±0.18
NH_4NO_3	4.32±0.05	0.40±0.01	10.92±0.19	3.29±0.64	0.25±0.05	12.98±0.20
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16.77±1.32	1.66±0.14	10.13±0.08	15.15±1.75	1.51±0.18	10.04±0.07
NaNO_3	69.97±0.12	10.35±0.07	6.76±0.06	80.69±3.43	10.46±0.74	7.73±0.22
KNO_3	51.28±3.35	7.43±0.64	6.91±0.14	77.32±2.17	9.41±0.10	8.21±0.14
Urea	50.00±4.22	6.57±0.41	7.59±0.17	78.48±4.23	9.42±0.31	8.33±0.19





ภาพที่ 1 ปริมาณการผลิต anhydromevalonolactone ที่เวลา 21 วัน (A: mg/L; B: mg/g dw) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* MTG4 โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

จากภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่า NaNO₃ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมกับการผลิต AMVL มากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนจาก NH₄Cl, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, KNO₃ และ urea ส่วน sucrose เป็นแหล่งของคาร์บอนที่ช่วยเพิ่มปริมาณ AMVL ได้มากกว่าการใช้ glucose เมื่อใช้น้ำตาล sucrose และ NaNO₃ ร่วมกันแล้วจะทำให้สามารถผลิต AMVL ได้ประมาณ 80 mg/L หรือ 10 mg/g dw การใช้น้ำตาล sucrose และ NaNO₃ เป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับนั้น สอดคล้องกับผลการทดลองของ Raper และ Thom (1949), Pitt (1979), Samson และ Frisvad (2004) และ Frisvad (1981) ซึ่งได้นำ sucrose และ NaNO₃ มาใช้สำหรับอาหารสูตร Czapek-Dox (Cz), Czapek Yeast Autolysate (CYA), Czapek yeast autolysate with 5% NaCl (CYAS) และ Yeast extract sucrose (YES) ตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงราหลายชนิด

7.2 Plackett-Burman Design

หลังจากที่ได้แหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมแล้ว จึงนำมากำหนดค่าสูงสุด และต่ำสุด ร่วมกับตัวแปรชนิดอื่น ๆ ซึ่งแสดงได้ดังตารางที่ 1 จากนั้นจึงออกแบบการทดลองสำหรับ 10 ตัวแปร (3 center points, augment with fold over) ได้จำนวนทั้งหมด 30 runs จากนั้นทำการถ่ายสปอร์เชื้อ *A. oryzae* MTG4 ลงในอาหารที่เตรียมไว้ขนาด 1×10⁷ สปอร์ต่ออาหาร 50 mL ทำการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 25 °C ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 21 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมัก และทำการสกัดด้วย ethyl acetate ระเหยให้แห้ง ละลายใน acetonitrile และวัดปริมาณ AMVL ด้วย HPLC ทำการ

เพาะเลี้ยงซ้ำเป็นจำนวน 2 ครั้ง ค่าเฉลี่ยของปริมาณ AMVL ที่วัดได้ และการวิเคราะห์ความแปรปรวนแสดง
ได้ดังตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 การทดลองแบบ Plackett-Burman Design แสดงปริมาณ AMVL ที่ผลิตได้

Run	Coded values										AMVL (mg/L)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	44.54
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	57.94
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	32.58
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	54.65
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	17.74
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	11.72
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	24.24
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	89.89
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	38.36
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	23.84
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	19.50
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	56.18
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45.42
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41.81
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39.89
16	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	41.49
17	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	20.14
18	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	56.42
19	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	21.75
20	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	58.35
21	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	71.35
22	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	71.83
23	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	1	8.75
24	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	45.26
25	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	41.97
26	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	52.09
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	47.51
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46.95
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41.57
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40.45

Note: A, sucrose; B, NaNO₃; C, K₂HPO₄; D, KH₂PO₄; E, KCl; F, MgSO₄·7H₂O; G, CaCl₂·2H₂O; H, Na₃C₆H₅O₇·2H₂O; I, Biotin; J, Trace element.

ตารางที่ 4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองแบบ Plackett-Burman Design

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Block	152.21	1	152.21		
Model	9141.57	10	914.16	20.94	< 0.0001 significant
A-Sucrose	6.28	1	6.28	0.14	0.7089
B-NaNO ₃	4412.87	1	4412.87	101.09	< 0.0001
C-K ₂ HPO ₄	440.39	1	440.39	10.09	0.0052
D-KH ₂ PO ₄	712.17	1	712.17	16.31	0.0008
E-KCl	33.44	1	33.44	0.77	0.3930
F-MgSO ₄ ·7H ₂ O	157.88	1	157.88	3.62	0.0733
G-CaCl ₂ ·2H ₂ O	197.11	1	197.11	4.52	0.0477
H-Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	46.67	1	46.67	1.07	0.3149
I-Biotin	8.60	1	8.60	0.20	0.6625
J-Trace element	3126.17	1	3126.17	71.61	< 0.0001
Residual	785.78	18	43.65		
Lack of Fit	745.83	14	53.27	5.33	0.0590 not significant
Pure Error	39.95	4	9.99		
Cor Total	10079.56	29			

จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าตัวแปรที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ AMVL อย่างมีนัยสำคัญคือ NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 และ Trace element เนื่องจากค่าตัวแปรดังกล่าวเป็นแหล่งของ nitrogen และ phosphorus ที่มีคุณสมบัติเป็น buffer ที่ช่วยรักษาสมดุลของ pH ในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยค่า p-value ของ NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 และ Trace element มีค่า 0.0001, 0.0052, 0.0008 และ 0.0001 ตามลำดับ ซึ่งค่าเหล่านี้มีค่าน้อยกว่า 0.01 ซึ่งหมายถึงตัวแปรเหล่านี้มีผลต่อการผลิต AMVL ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดย standardized effect ของ NaNO_3 มีค่า +13.56 ซึ่งหมายถึงการเพิ่มปริมาณของ NaNO_3 มีผลทำให้ปริมาณของ AMVL เพิ่มขึ้น ในทางกลับกัน standardized effect ของ K_2HPO_4 , KH_2PO_4 และ Trace element มีค่าเท่ากับ -4.28, -5.45 และ -11.41 ตามลำดับ หมายถึงการเพิ่มปริมาณของสารเหล่านี้ในอาหารจะทำให้ปริมาณการผลิต AMVL ลดลง ส่วนปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ sucrose, KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และ biotin นั้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ AMVL เนื่องจากมีค่า absolute value ของ standardized effect เพียงเล็กน้อย และมีค่า p-value > 0.01 ซึ่งหมายความว่าปัจจัยดังกล่าวมีผลในการเพิ่มปริมาณการผลิต AMVL อย่างไม่มีนัยสำคัญ

7.3 Central Composite Design

ใช้เพื่อหาจุด optimal point ของตัวแปรที่ได้จากการผลการทดลองในข้อ 2 ค่าสูงสุด ต่ำสุด และค่า α ของตัวแปรที่ใช้แสดงได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ระดับของตัวแปรที่ใช้สำหรับ Central Composite Design ของอาหารที่ใช้ในการผลิต anhydromevalonolactone จาก *A. oryzae* MTG4

variables	Coded value				
	$-\alpha$ (-2)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+2)
NaNO_3 (g/L)	3	5	7	9	11
K_2HPO_4 (g/L)	3	5	7	9	11
KH_2PO_4 (g/L)	3	5	7	9	11
Trace element (mL/flask)	0	0.15	0.30	0.45	0.60

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* MTG4 นอกเหนือจากปัจจัยที่แสดงตามตารางที่ 5 แล้ว ยังประกอบไปด้วย 70 g/L sucrose, 0.25 g/L KCl และ 0.75 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ 2 g/L $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ซึ่งกำหนดให้มีค่าคงที่ในทุก run ของการทดลอง รูปแบบของการทดลองแบบของ Central Composite Design ทั้งหมด 30 runs และปริมาณของ AMVL ที่ผลิตได้แสดงได้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การทดลองแบบ Central Composite Design แสดงปริมาณของ AMVL ในแต่ละการทดลอง ซึ่งมีองค์ประกอบของสารอาหารที่แตกต่างกัน

Std run	Coded value				AMVL (mg/L)	
	NaNO ₃	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	Trace element	actual	predicted
1	-1	-1	-1	-1	157.58	142.99
2	1	-1	-1	-1	141.89	130.31
3	-1	1	-1	-1	70.95	68.23
4	1	1	-1	-1	42.98	55.55
5	-1	-1	1	-1	117.33	113.85
6	1	-1	1	-1	49.12	46.09
7	-1	1	1	-1	81.18	80.89
8	1	1	1	-1	21.83	13.13
9	-1	-1	-1	1	68.22	74.85
10	1	-1	-1	1	177.36	173.89
11	-1	1	-1	1	38.20	37.45
12	1	1	-1	1	135.07	136.49
13	-1	-1	1	1	85.27	84.43
14	1	-1	1	1	143.26	128.39
15	-1	1	1	1	94.82	88.83
16	1	1	1	1	106.42	132.79
17	-2	0	0	0	80.50	86.09
18	2	0	0	0	122.11	117.37
19	0	-2	0	0	85.95	103.15
20	0	2	0	0	49.12	32.79
21	0	0	-2	0	171.91	167.75
22	0	0	2	0	139.85	134.91
23	0	0	0	-2	19.78	30.25
24	0	0	0	2	91.41	81.77
25	0	0	0	0	141.89	151.33
26	0	0	0	0	135.75	151.33
27	0	0	0	0	154.17	151.33
28	0	0	0	0	168.50	151.33
29	0	0	0	0	149.40	151.33
30	0	0	0	0	158.26	151.33

ในการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design นั้นสามารถจำลองแบบการทดลองได้ 4 รูปแบบคือ Linear model, Linear interaction model, Quadratic model และ Cubic model ซึ่งสามารถนำแบบจำลองทั้ง 4 รูปแบบมาอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ AMVL (mg/L) กับตัวแปรอิสระต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ NaNO₃, K₂HPO₄, KH₂PO₄ และ Trace element แบบจำลองทั้ง 4 นั้นต้องพิจารณาค่า p-value ของแต่ละแบบจำลองเปรียบเทียบกับกัน เพื่อเลือกแบบจำลองที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้อธิบายผลการทดลองได้ดีที่สุด จากการวิเคราะห์ผลโดยใช้สถิติ F นั้น จะสามารถวิเคราะห์ความเหมาะสมของการใช้แบบจำลองในการอธิบายผลการทดลอง และผลการทดสอบ Lack of fit ของแต่ละแบบจำลองได้ดังตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ความเหมาะสมของการใช้แบบจำลองในการอธิบายผลการทดลอง

source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R-square	Predicted R-square
Linear	0.1603	0.0023	0.0995	-0.1169
2FI	0.0935	0.0036	0.2954	0.1746

Quadratic	< 0.0001	0.3207	0.9149	0.7922	<u>Suggested</u>
Cubic	0.1946	0.5382	0.9438	0.5559	Aliased

ตารางที่ 8 การทดสอบ Lack of fit ของแต่ละแบบจำลอง

source	Sum of Squares	df	Mean Squares	F value	P-value P>F	
Linear	49622.97	20	2481.15	18.08	0.0023	
2FI	29230.05	14	2087.86	15.21	0.0036	
Quadratic	2166.36	10	216.64	1.58	0.3207	<u>Suggested</u>
Cubic	193.01	2	96.50	0.7	0.5382	Aliased
Pure Error	686.33	5	137.27			

จากตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่าแบบจำลอง Quadratic นั้นมีค่า p-value ที่น้อยที่สุด คือ <0.0001 ดังนั้น และมีค่า predicted-R² และ adjusted-R² ที่มีค่าสูงสุดและต่างกันไม่เกิน 0.2 ซึ่งแสดงว่าแบบจำลอง Quadratic มีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาเป็นแบบจำลองอธิบายผลการทดลอง ส่วนการทดสอบ lack of fit ของแต่ละแบบจำลอง (ตารางที่ 8) พบว่า แบบจำลอง Quadratic นั้นมีค่า P-value มากกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าแบบจำลอง Quadratic นี้สามารถ fit ได้ดีกับผลการทดลอง ดังนั้นการอธิบายผลการทดลองครั้งนี้จึงเลือกแบบจำลองแบบ Quadratic มาใช้เพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ต่อไป

7.3.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลอง (ANOVA)

ผลการทดลองผลิต AMVL จาก *A. oryzae* MTG4 นั้นสามารถนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนได้ผลลัพธ์ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับ Response Surface Quadratic Model

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	P-value Prob>F	
Model	61950.92	14	4425.07	23.27	< 0.0001	significant
A-NaNO ₃	1466.37	1	1466.37	7.71	0.0141	
B-K ₂ HPO ₄	7429.48	1	7429.48	39.07	< 0.0001	
C-KH ₂ PO ₄	1619.47	1	1619.47	8.52	0.0106	
D-Trace element	3979	1	3979	20.92	0.0004	
AB	240.85	1	240.85	1.27	0.2781	
AC	3034.41	1	3034.41	15.96	0.0012	
AD	12478.18	1	12478.18	65.61	< 0.0001	
BC	1745.83	1	1745.83	9.18	0.0084	
BD	1394.94	1	1394.94	7.33	0.0162	
CD	1498.72	1	1498.72	7.88	0.0133	
A ²	4217.35	1	4217.35	22.18	0.0003	
B ²	11914.43	1	11914.43	62.65	< 0.0001	
C ²	42.42	1	42.42	0.22	0.6435	
D ²	15571	1	15571	81.88	< 0.0001	
Residual	2852.69	15	190.18			
Lack of fit	2166.36	10	216.64	1.58	0.3207	not significant
Pure Error	686.33	5	137.27			
Cor Total	64803.62	29				

Note: R²=0.9560, Adj-R²=0.9149, Pred-R² = 0.7922, C.V.%=12.93

ในการพิจารณานัยสำคัญของแบบจำลองตามตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่าค่า p-value ของ model มีค่าประมาณ 0.0001 (หรือน้อยกว่า 0.05) ซึ่งหมายความว่า จะมีโอกาส 0.01% ที่ model นี้เกิดความ

ผิดพลาดจากการถูกรบกวนโดยปัจจัยอื่นๆ (noise) model นี้จึงมีความ significant ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.99%

ในส่วนของการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง (model accuracy checking) นั้นได้นำเทคนิคการวิเคราะห์ความไม่สมรูปของตัวแบบ (testing for lack of fit) มาใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากในการทดลองได้มีการกำหนดให้ทำการทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง วิธีการนี้จะพิจารณาผลรวมกำลังสองของค่าความคลาดเคลื่อนจากส่วนตกค้าง (Residual SS_E) โดยมีองค์ประกอบสองส่วนคือ ผลบวกกำลังสองของค่าความผิดพลาดจากความคลาดเคลื่อน (sum of squares due to pure error: SS_{PE}) และผลบวกกำลังสองของค่าความผิดพลาดจากความไม่สมรูปของตัวแบบ (sum of squares due to lack of fit: SS_{LOF})

$$SS_E = SS_{PE} + SS_{LOF} \quad \dots\dots\dots(1)$$

จากตารางที่ 9 จะพบว่าค่า F และ p-value ของ lack of fit มีค่า 1.58 และ 0.3207 ตามลำดับ ซึ่งค่า p-value นี้มีค่ามากกว่า 0.05 ดังนั้น lack of fit นี้จึงไม่ significant หรือ สามารถสรุปได้ว่าสมการที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ AMVL กับตัวแปรอิสระต่าง ๆ นั้นมีความสัมพันธ์แบบ quadratic และมีความถูกต้องที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

7.3.3 การวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย

แบบจำลอง Quadratic สามารถหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยได้ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรเมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้ coded value

Factor	Coefficient Estimate	df	Standard Error	95% CI Low	95% CI High	VIF
Intercept	151.33	1	5.63	139.33	163.33	
A- NaNO_3	7.82	1	2.81	1.82	13.82	1.00
B- K_2HPO_4	-17.59	1	2.81	-23.59	-11.59	1.00
C- KH_2PO_4	-8.21	1	2.81	-14.21	-2.21	1.00
D-Trace element	12.88	1	2.81	6.88	18.88	1.00
AB	-3.88	1	3.45	-11.23	3.47	1.00
AC	-13.77	1	3.45	-21.12	-6.42	1.00
AD	27.93	1	3.45	20.58	35.27	1.00
BC	10.45	1	3.45	3.1	17.79	1.00
BD	9.34	1	3.45	1.99	16.69	1.00
CD	9.68	1	3.45	2.33	17.03	1.00
A ²	-12.4	1	2.63	-18.01	-6.79	1.05
B ²	-20.84	1	2.63	-26.45	-15.23	1.05
C ²	1.24	1	2.63	-4.37	6.86	1.05
D ²	-23.83	1	2.63	-29.44	-18.21	1.05

จากตารางที่ 10 สามารถหาค่าสัมประสิทธิ์ของแต่ละตัวแปรอิสระมาเขียนเป็นสมการเพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ AMVL กับตัวแปรต่าง ๆ ได้ดังนี้

$$\begin{aligned}\text{Anhydromevalonolactone (mg/L)} = & 151.33+7.82A-17.59B-8.21C+12.88D-3.88AB-13.77AC \\ & +27.93AD+10.45BC+9.34BD+9.68CD-12.4A^2-20.84B^2 \\ & +1.24C^2-23.83D^2 \quad \dots\dots\dots(2)\end{aligned}$$

เมื่อ

A = ความเข้มข้นของ NaNO_3 (coded value)

B = ความเข้มข้นของ K_2HPO_4 (coded value)

C = ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 (coded value)

D = ความเข้มข้นของ Trace element (coded value)

7.3.4 การวิเคราะห์นัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i) ของแต่ละตัวแปรอิสระ

ในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระต่าง ๆ ที่ได้จากตารางที่ 10 เพื่อเป็นการทดสอบว่าตัวแปรอิสระแต่ละตัวในสมการที่ (2) นั้นมีผลต่อปริมาณ AMVL หรือไม่อย่างไร ทำการทดสอบสมมติฐานโดย

$H_0 : \beta_1, \beta_2, \beta_3 \dots \beta_{14} = 0$ ตัวแปรอิสระทุกตัวไม่มีผลต่อตัวแปรตาม

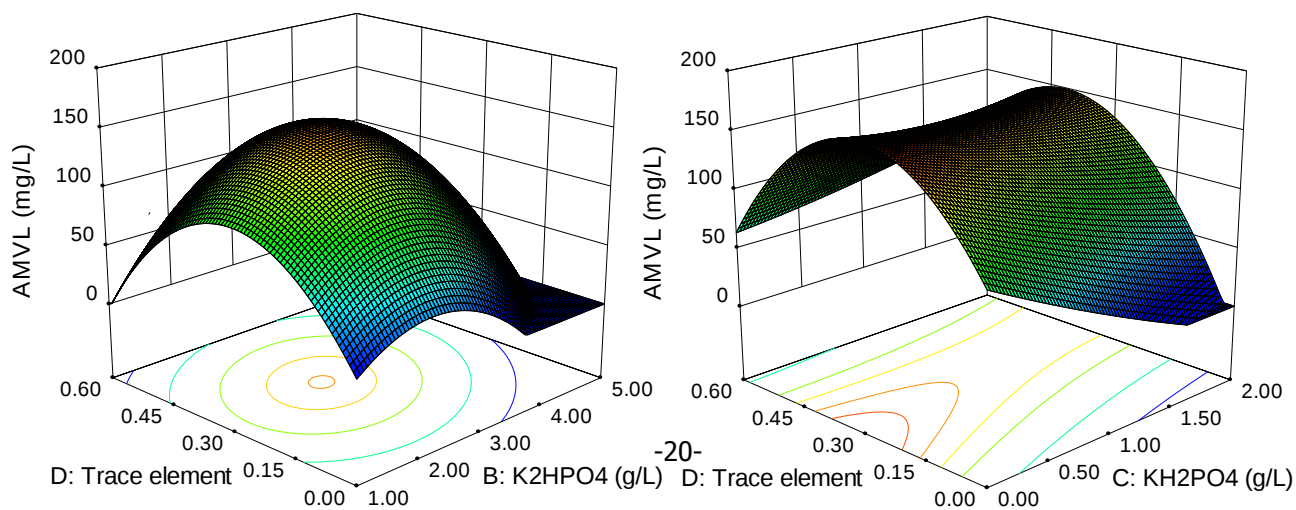
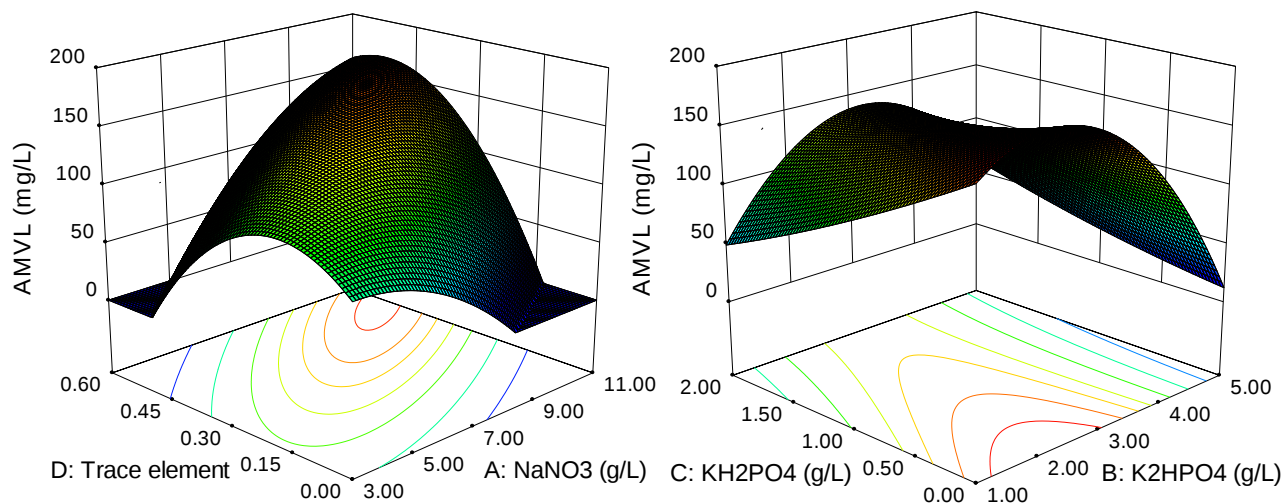
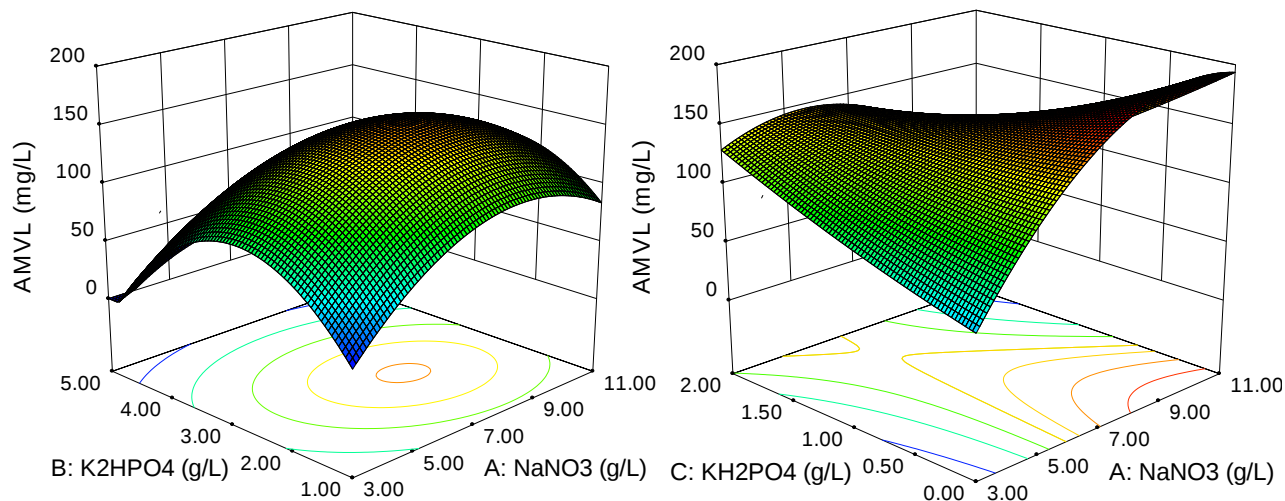
$H_1 : \beta_1, \beta_2, \beta_3 \dots \beta_{14} \neq 0$ มีตัวแปรอิสระอย่างน้อยหนึ่งตัวที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

โดยตัวสถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานคือ p-value ที่ระดับนัยสำคัญ α นั้นจะปฏิเสธ H_0 ก็ต่อเมื่อค่า p-value ของตัวแปรอิสระมีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด คือเท่ากับ 0.05 จากการหาค่า p-value ของตัวแปรอิสระแต่ละตัวที่ได้จากตารางที่ 9 พบว่าค่า p-value ของ linear term ได้แก่ A, B, C, และ D มีค่าน้อยกว่า 0.05 ส่วน interaction term และ square term นั้น p-value จะมีค่าน้อยกว่า 0.05 ทุกเทอม ยกเว้น AB และ C^2 โดยเทอมที่มีค่า p-value < 0.05 เหล่านี้ไปใช้ในการทำนายการผลิต AMVL (mg/L) ได้ถูกต้องที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนเทอมที่มีค่า p-value > 0.05 หมายถึง เทอมเหล่านี้มีผลต่อการผลิต AMVL อย่างไม่มีนัยสำคัญ และอาจเกิดความผิดพลาดได้หากนำเทอมเหล่านี้มารวมไว้ในสมการ จากการพิจารณาความสำคัญของตัวแปรแต่ละเทอมที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นั้น สามารถลดรูปของสมการได้ดังสมการที่ (2)

$$\begin{aligned}\text{Anhydromevalonolactone (mg/L)} = & 151.33+7.82A-17.59B-8.21C+12.88D-13.77AC \\ & +27.93AD+10.45BC+9.34BD+9.68CD-12.4A^2-20.84B^2 \\ & -23.83D^2 \quad \dots\dots\dots(3)\end{aligned}$$

7.3.5 การวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรอิสระ และการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต AMVL

อิทธิพลของความเข้มข้นของ NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 และ Trace element ต่อปริมาณการผลิต AMVL ใน *A. oryzae* MTG4 สามารถแสดงในรูปแบบของ 3-dimension และ response surface plot ดังภาพที่ 2 ดังนี้



ภาพที่ 2 Response surface plot แสดงความเข้มข้นของตัวแปรอิสระ NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 และ Trace element ที่มีต่อปริมาณการผลิต AMVL จาก *A. oryzae* MTG4

จากภาพที่ 2 จะเห็นได้ว่า AMVL จะมีการผลิตมากขึ้นตามลำดับเมื่อใช้ NaNO_3 ในปริมาณ 7 g/L จนถึงประมาณ 9 g/L จากนั้นปริมาณ AMVL จะลดลงเมื่อใช้ NaNO_3 ในปริมาณที่มากกว่า 9 g/L ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากเกิด substrate inhibition หรือเนื่องจากการที่มีไนโตรเจนในปริมาณมากนี้จะไปลดระดับการผลิต secondary metabolite ของเซลล์ ในส่วนของตัวแปรอิสระตัวอื่น ๆ ได้แก่ K_2HPO_4 , KH_2PO_4 และ Trace element ที่เป็นแหล่งของฟอสเฟต และแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ นั้น พบว่า ต้องมีระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งจะทำให้ AMVL สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของตัวแปรดังกล่าวให้มากขึ้นก็จะมีผลทำให้ปริมาณ AMVL ที่ผลิตได้มีค่าลดลง โดยปริมาณของ K_2HPO_4 ควรอยู่ในช่วงประมาณ 2-2.5 g/L ปริมาณ KH_2PO_4 ควรอยู่ระหว่าง 0-0.5 mg/L และ Trace element ควรเติมประมาณ 0.3-0.4 mL/flask

อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต AMVL นั้น เป็นการนำเอาริธีที่เรียกว่า simultaneous optimization technique มาใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งจะต้องกำหนด constraints ดังต่อไปนี้

1. Maximize ค่าของตัวแปรตาม ในที่นี้คือ maximize ค่าของ AMVL ที่ผลิตได้
2. ค่าขอบเขตบนและล่าง (lower-upper limit) ในที่นี้ได้กำหนดขอบเขตบนและล่างของตัวแปรอิสระให้เท่ากับช่วงของความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองของแต่ละตัวแปร
3. ค่า weight (lower-upper weight) ค่า weight นี้เป็นตัวกำหนดรูปแบบของ desirability functions ในที่นี้กำหนดให้มีค่าเท่ากับ 1

เมื่อกำหนด constraints แล้วจะสามารถประมวลผลหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต AMVL ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 และ Trace element ต่อการผลิต AMVL

ชนิด	Coded value	Uncoded value
NaNO_3	1.562	9.687 g/L
K_2HPO_4	-0.568	2.432 g/L
KH_2PO_4	-1.706	0.147 g/L
Trace element	0.647	0.397 mL/flask

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละตัวแปรตามตารางที่ 11 นั้น สามารถคำนวณหาค่า predicted AMVL ได้จากสมการที่ 3 เท่ากับ 216.9 mg/L อย่างไรก็ตาม ในสูตรอาหารจะเติม 70 g/L sucrose, 0.25 g/L KCl, 0.75 g/L MgSO₄·7H₂O และ 2 g/L Na₃C₆H₅O₇·2H₂O เมื่อคิดราคาของการผลิต AMVL โดยใช้ optimized และ unoptimized medium จะสามารถเปรียบเทียบได้ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบราคาของ medium และ ปริมาณของ AMVL ที่ผลิตได้ระหว่าง optimized และ unoptimized medium

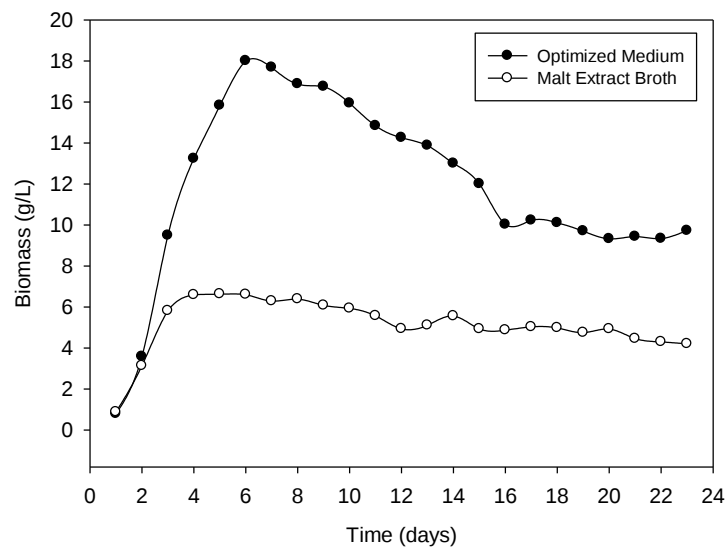
ชนิดอาหาร	ปริมาณที่ใช้	ราคา	ราคาอาหาร (บาท/L)	ปริมาณ AMVL ที่ ผลิตได้โดยเฉลี่ย (mg/L)	ราคา AMVL ที่ ผลิตได้ (บาท/mg)
Optimized medium					
NaNO ₃	9.687 (g/L)	0.750 (บาท/g)			
K ₂ HPO ₄	2.432 (g/L)	0.500 (บาท/g)			
KH ₂ PO ₄	0.147 (g/L)	0.500 (บาท/g)			
Trace element	0.397 (mL/flask)	0.836 (บาท/L)	18.563	204	0.091
Sucrose	70 (g/L)	0.024 (บาท/g)			
KCl	0.25 (g/L)	0.482 (บาท/g)			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.75 (g/L)	0.600 (บาท/g)			
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	2 (g/L)	0.560 (บาท/g)			
Unoptimized medium					
MEB	20 (g/L)	10.600 (บาท/g)	212.00	60	3.533

จากตารางที่ 12 จะเห็นได้ว่าราคาของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* MTG4 สำหรับการผลิต AMVL ที่ผ่านการ optimization แล้วนั้นจะมีราคาถูกกว่าอาหาร (MEB) ที่ใช้อยู่เดิมถึง 11.4 เท่า และสามารถผลิต AMVL ได้มากกว่าประมาณ 3.4 เท่า ทำให้การใช้อาหารชนิดใหม่นั้นจะทำให้มีการต้นทุนการผลิตคิดเป็นบาท/มิลลิกรัม AMVL ที่ผลิตได้ ถูกกว่าการใช้อาหารเดิมถึง 38.8 เท่า ซึ่งนับว่าสูตรอาหารชนิดใหม่นี้ช่วยเพิ่มปริมาณและลดต้นทุนการผลิต AMVL ได้

7.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* MTG4 และการผลิต AMVL ใน optimized medium และ unoptimized medium

7.4.1 การเจริญเติบโตของ *A. oryzae* MTG4

ในการศึกษาการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* MTG4 นั้นได้ทำการเพาะเลี้ยงราดังกล่าวในอาหารที่ผ่านการ optimization แล้วในขวดเขย่า โดยอาหารจะประกอบไปด้วย 70 g/L sucrose, 9.687 g/L NaNO₃, 2.432 g/L K₂HPO₄, 0.147 g/L KH₂PO₄, 0.25 g/L KCl, 0.75 g/L MgSO₄·7H₂O, 2 g/L Na₃C₆H₅O₇·2H₂O และ 0.397 mL/flask Trace element เก็บตัวอย่างวัดน้ำหนักแห้งตลอดช่วงการทดลองเปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งของ *A. oryzae* MTG4 ที่ทำการเพาะเลี้ยงใน unoptimized medium (malt extract broth) ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ปริมาณน้ำหนักแห้งที่วัดได้แสดงได้ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำหนักรวมของ *A. oryzae* MTG4 ใน optimized medium และ unoptimized medium (MEB)

จากภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่ารูปแบบการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* MTG4 ในอาหาร optimized medium นั้นจะมีการเจริญเติบโตเป็น 2 ช่วง คือในช่วง 1-6 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่มีการใช้ sucrose เป็นแหล่งของ carbon source และมีการเพิ่มของ biomass แบบ exponential จากประมาณ 1 g/L ที่เวลา 1 วันเป็น 18 g/L ที่เวลา 6 วัน หลังจากนั้นปริมาณ biomass จะลดลงตามลำดับ เนื่องจาก sucrose ซึ่งเป็นแหล่งของ carbon ได้ถูกใช้จนหมด แต่ *A. oryzae* จะใช้สารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่ผลิตขึ้นในช่วงแรก ได้แก่ ethanol, acetate, succinate ฯลฯ มาใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโต ซึ่ง biomass จะลดลงจนถึงที่ระดับ 10 g/L ที่เวลา 23 วัน ในกรณีของ *A. oryzae* MTG4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร unoptimized medium หรือ malt extract broth นั้นพบว่าจะมีช่วง exponential phase เพียง 3 วัน ซึ่งมีปริมาณ biomass สูงสุด 6.6 g/L ที่เวลา 5 วัน หลังจากนั้นปริมาณ biomass ที่ค่อนข้างคงที่และจะลดลงอย่างช้า ๆ จนถึง 4.2 g/L ที่เวลา 23 วัน อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* MTG4 ในช่วง exponential phase เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิดนี้ สามารถหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate, μ_{max}) ได้จากสมการที่ (4)

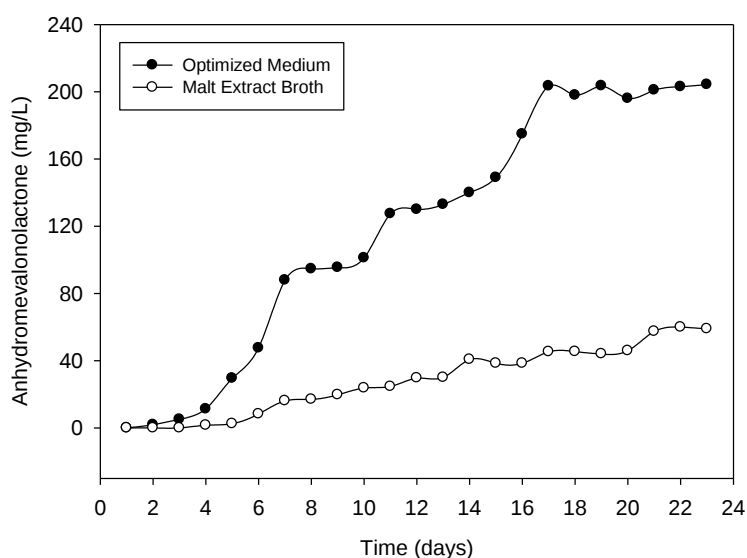
$$dX/dt = \mu_{max} X \quad \dots\dots\dots(4)$$

เมื่อ X = ปริมาณ biomass (g/L)
 t = เวลา (hr)

จากการหาค่า $\mu_{\max}$ ของ *A. oryzae* MTG4 ใน optimized medium มีค่าเท่ากับ 0.052 hr^{-1} ส่วนในอาหาร MEB มีค่าเท่ากับ 0.039 hr^{-1} ซึ่งถือว่าเป็นมีการเจริญเติบโตช้ากว่าในอาหาร optimized medium เล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากใน optimized medium จะมีสารอาหารที่สมบูรณ์และเหมาะกับการเจริญเติบโตของรามมากกว่าอาหาร MEB

7.4.2 การศึกษาการผลิต AMVL จาก *A. oryzae* MTG4 ใน optimized medium

การศึกษาถึงปริมาณของ AMVL ที่ผลิตได้จาก *A. oryzae* MTG4 ใน optimized medium นั้นทำได้โดยการเก็บน้ำหมักของ *A. oryzae* MTG4 ใน optimized medium ในช่วงเวลาต่าง ๆ กันมาทำการสกัดด้วย ethyl acetate จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC พบว่าปริมาณของ AMVL ที่ผลิตได้มีการเปลี่ยนแปลงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ปริมาณ anhydromevalonolactone ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* MTG4 ใน optimized medium และ unoptimized medium (MEB)

การผลิต AMVL ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) นั้นจะเป็น non-growth associated คือ จะไม่เพิ่มในเวลาเดียวกันกับ biomass แต่จะผลิตภายหลัง exponential phase ผ่านไปแล้วสักระยะหนึ่ง จากภาพที่ 4 จะเห็นได้ว่า AMVL ที่ผลิตจาก optimized medium นั้นจะผลิตน้อยในช่วง 4 วันแรก หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ถึงประมาณ 90 mg/L ที่เวลาประมาณ 7 วัน และจะเริ่มคงที่ในช่วงวันที่ 7-10 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่ sucrose เริ่มหมดและเริ่มเข้าสู่ second exponential phase หลังจากนั้นปริมาณ AMVL จะเพิ่มมากขึ้นอีกครั้ง และผลิตมากที่สุดในช่วง 17-23 วัน ที่ประมาณ 200 mg/L ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ทำนายได้จากสมการทางคณิตศาสตร์ (สมการที่ 3) ว่าเมื่อใช้ optimized medium ในการผลิต AMVL แล้วจะสามารถผลิต AMVL ได้ในปริมาณ 216.9 mg/L ส่วนการผลิต AMVL ใน unoptimized medium หรือ malt extract broth นั้นพบว่าปริมาณ AMVL จะได้น้อยในช่วง 6 วันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ในอัตราที่ค่อนข้างคงที่จนมีระดับสูงสุดที่ 60 mg/L ที่เวลา 21-23 วัน ซึ่งจะผลิตได้น้อยกว่าใน optimized medium ประมาณ ในส่วนของค่าผลได้ของ AMVL เทียบกับน้ำหนักแห้ง

(Y_{xp}, mg/g dw) และค่าอัตราการผลิต (production rate, mg/L/day) นั้นพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลอง Y_{xp} ของ optimized medium และ unoptimized medium จะมีค่าประมาณ 21 และ 14 mg/g dw ตามลำดับ ส่วน production rate ของ optimized medium และ unoptimized medium จะมีค่าประมาณ 10.5 และ 3 mg/L/day ตามลำดับ

8.

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน รวมถึงปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตสาร anhydromevalonolactone (AMVL) จาก *A. oryzae* MTG4 โดยทำการทดลองแบบ Factorial Design และ Plackett-Burman Design พบว่า NaNO₃, K₂HPO₄, KH₂PO₄ และ Trace element เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ช่วยในการผลิต AMVL อย่างมีนัยสำคัญ
2. ในการวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดโดยวิธี Response Surface Methodology ซึ่งออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design พบว่าระดับความเข้มข้นของสารอาหารชนิดต่าง ๆ ที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิต AMVL ประกอบไปด้วย NaNO₃ 9.687 g/L, K₂HPO₄ 2.432 g/L, KH₂PO₄ 0.147 g/L, Trace element 0.397 mL/flask, sucrose 70 g/L, KCl 0.25 g/L และ MgSO₄·7H₂O 0.75 g/L และ Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 2 g/L สามารถผลิต AMVL ได้ประมาณ 200 mg/L ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสูตรเดิม Malt Extract Broth (MEB) ถึง 3.4 เท่า
3. แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สามารถใช้ในการทำนายการผลิต AMVL เมื่อใช้สารอาหารในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้อย่างถูกต้องที่ระดับความเชื่อมั่น 99% คือ

$$\begin{aligned} \text{Anhydromevalonolactone (mg/L)} = & 151.33 + 7.82A - 17.59B - 8.21C + 12.88D - 13.77AC \\ & + 27.93AD + 10.45BC + 9.34BD + 9.68CD - 12.4A^2 - \\ & 20.84B^2 - 23.83D^2 \end{aligned}$$

เมื่อ A = ความเข้มข้นของ NaNO₃ (coded value)

B = ความเข้มข้นของ K₂HPO₄ (coded value)

C = ความเข้มข้นของ KH₂PO₄ (coded value)

D = ความเข้มข้นของ Trace element (coded value)

4. เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* MTG4 ใน optimized medium พบว่ามี exponential phase ในช่วง 1-6 วัน ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ($\mu_{\max}$) เท่ากับ 0.052 hr⁻¹ น้ำตาล sucrose

ซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนจะเริ่มหมดที่เวลาประมาณ 6 วัน หลังจากนั้น *A. oryzae* MTG4 จะใช้สารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นในช่วงแรกเป็นแหล่งอาหารแทน *A. oryzae* MTG4 จึงเจริญเติบโตต่อไปได้ในช่วงที่สอง ซึ่งเป็นช่วงที่มีการผลิต AMVL ในปริมาณมากขึ้นถึง 200 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เวลาประมาณ 16-24 วัน ส่วนการเจริญเติบโตของ *A. oryzae* MTG4 ใน Malt Extract Broth (MEB) นั้นพบว่ามี exponential phase ในช่วง 1-3 วัน และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ($\mu_{\max}$) เท่ากับ 0.039 hr^{-1} ซึ่งต่ำกว่าค่า $\mu_{\max}$ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงราในอาหาร optimized medium และมีการผลิต AMVL ที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับ optimized medium

5. งานวิจัยนี้ช่วยให้ได้สูตรอาหารสำหรับผลิต AMVL ทำให้ได้ AMVL ในปริมาณมากกว่า และมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการใช้อาหารชนิดเดิม AMVL นี้สามารถใช้เป็นตัวยับยั้งการสร้างโคเลสเตอรอลใน mevalonate biosynthetic pathway นอกจากนี้ AMVL ยังใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด เช่น lineatin ที่ใช้เป็นฟีโรโมนสำหรับสำหรับกำจัดแมลงมอดไม้ และเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตสารประกอบพวก pyrone ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งในช่องปากได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามในการผลิต AMVL ควรมีการพัฒนาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้ในการผลิตชนิดต่าง ๆ เช่นการใช้ complex medium สำหรับการผลิต AMVL แต่ทั้งนี้จำเป็นที่จะต้องพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิตด้วยเช่นกัน เนื่องจาก complex medium ส่วนใหญ่จะมีราคาที่สูงค่อนข้างแพง นอกจากนี้อาจเพิ่มการผลิต AMVL ได้โดยทำการพัฒนาระบบการ fermentation ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น fed-batch และ chemostat fermentation เพื่อทำให้สามารถผลิต AMVL ได้มากขึ้น และมีปริมาณเพียงพอที่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

-
- Box GEF, Wilson KB. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. J of the Royal Statistical Society Series B 13(1): 1-45.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. The fungi, 2nd edition. Academic Press. 588 p.
- Cohen J, Cohen P, West SG, Aiken LS. 2003. Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences. (2nd ed.) Hillsdale, NJ. Lawrence Erlbaum Associates.
- Demain AL, 2000. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. Biotechnology Advances 18: 499-514.
- Frisvad JC. 1981. Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric Penicillia. Applied and Environmental microbiology 41: 568-579.
- Fujii I, Ono Y, Tada H, Gomi K, Ebizuka Y, Sankawa U. 1996. Cloning of the polyketide synthase gene atX from *Aspergillus terreus* and its identification as the 6-methylsalicylic acid synthase gene by heterologous expression. Mol. Gen. Genet. 253:1-10.
- Ibrahim HM, Yusoff WMW, Hamid AA, Illias RM, Hassan O, Omar O. 2005. Optimization of medium for the production of β -cyclodextrin glucanotransferase using Central Composite Design (CCD). Process Biochemistry 40(2): 753-758
- Kealey JT, Liu L, Santi DV, Betlach MC, Barr PJ. 1998. Production of a polyketide natural product in nonpolyketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 505-509.

- Opanowicz M, Blaha J, Grube M. 2006. Detection of paralogous polyketide synthase genes in *Parmeliaceae* by specific primers. *Lichenologist* 38: 47-54.
- Pitt JI. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, UK.
- Raper KB, Thom C. 1949. A manual of the *Penicillia*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Samson RA, Frisvad JC. 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxin and other extrolites. *Studies in Mycology* 49. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Schmitt I, Martín MP, Kautz S, Lumbsch HT. 2005. Diversity of non-reducing polyketide synthase genes in the Pertusariales (lichenized Ascomycota): a phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 66(11):1241-53.
- Wattanachaisaereekul S, Lantz AE, Nielsen ML, Andrésson ÓS, Nielsen J. 2007. Optimization of heterologous Production of the polyketide 6-MSA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 97(4): 893-900.
- Xiong ZQ, Tu XR, Tu GQ. 2008. Optimization of medium composition for actinomycin X2 production by *Streptomyces* spp JAU4234 using response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 35(7):729-734.
- Yuan LL, Li YQ, Wang Y, Zhang XH, Xu YQ. 2008. Optimization of Critical Medium Components Using Response Surface Methodology for Phenazine-1-Carboxylic Acid Production by *Pseudomonas* sp. M-18Q. *J Biosci Bioeng*. 105(3): 232-237.

