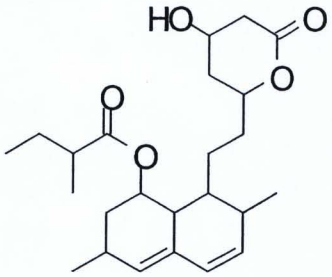
1. บทนำ

1.1 การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

Lovastatin (mevinolin, monacolin K หรือ Mevacor™) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{24}H_{36}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล (M.W.) 404.55 จัดอยู่ในกลุ่มยาลดคลอเลสเตอรอล (cholesterol-lowering drug) ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน lovastatin เป็นยาตัวแรกของกลุ่ม statins สำหรับใช้ลดระดับคลอเลสเตอรอลที่ได้ผ่านคณะกรรมการอาหารและยา (FDA) ของประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1987 [1] โดยยาดังกล่าวออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ hydroxymethylglutary coenzyme A (HMG-CoA) reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้น HMG-CoA ไปเป็นผลิตภัณฑ์ mevalonate ของกระบวนการสังเคราะห์คลอเลสเตอรอลในร่างกาย [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 อีกชนิดหนึ่งซึ่งใช้สำหรับลดระดับคลอเลสเตอรอลเช่นกัน [6]



รูป 1 โครงสร้างของ lovastatin (lactone form)

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

ไนโตรเจน และเกลือแร่ต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตและเมตาบอลิสม น้ำมันพืชเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในสารอาหารเลี้ยงเซลล์ในการผลิต secondary metabolite เนื่องจากน้ำมันพืชมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดฟอง เป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริม ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะ และใช้สำหรับการเจริญเติบโตและรักษาสภาพของเซลล์ [14-15] มีตัวอย่างของรายงานวิจัยต่างๆ ที่ประสบผลสำเร็จในการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อราของการผลิตยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ 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 โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมในสารอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อการผลิต lovastatin ของ *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นต้น ซึ่งมีแนวโน้มในการเพิ่มปริมาณการผลิต หรือน้ำมันพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถหามาทดสอบได้ง่าย

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันพบผู้ป่วยโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ทำให้การใช้ยารักษาโรคดังกล่าวมีความจำเป็นเพิ่มขึ้น lovastatin เป็นยาในกลุ่มลดคลอเลสเตอรอล (cholesterol-lowering drug) ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด lovastatin ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อรา *Aspergillus terreus* ยาดังกล่าวมีราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากผลิตแต่ละครั้งได้ปริมาณน้อย การพัฒนาเทคโนโลยีการหมักให้มีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญต่อผลผลิตเพื่อให้ได้ยาปริมาณสูงขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้วชนิดของสารอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อรามีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น น้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นสารอาหารชนิดหนึ่งซึ่งมีประโยชน์ต่อกระบวนการหมักของยาหลายชนิด เช่น erythromycin tetracycline cephamycin C clavulanic acid และ gentamicin เป็นต้น การประยุกต์ใช้น้ำมันพืชต่อการพัฒนาการผลิต lovastatin จากเชื้อรา *Asperillus 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 การตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณโดยเทคนิค 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 มิลลิลตร ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลตร 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 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 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 มาระเหยแห้งบนwater bath

(4) ละลายส่วนที่เหลือด้วย solvent ที่เหมาะสม

(5) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

1.6 ทฤษฎีและแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

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

ความรู้ใหม่ที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมการผลิตยา lovastatin ส่งผลให้ได้ยาปริมาณที่สูงขึ้น และทำให้ยามีราคาถูกลง

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการระดับชาติ ระดับนานาชาติ หรือการจดสิทธิบัตร

1.7.2 เผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมระดับชาติหรือระดับนานาชาติ

1.7.3 เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตและนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

1.7.4 เป็นองค์ความรู้ในการทำวิจัยต่อไป