2. วิธีดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

2.1 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1.1 เชื้อรามาตรฐาน

เชื้อรามาตรฐาน *Aspergillus terreus* ATCC 20542 ซื้อจาก American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) เชื้อรามาตรฐานในรูป 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 (β-hydroxyacid form) (ความบริสุทธิ์ ≥98 เปอร์เซ็นต์) จาก Sigma Chemical, Co. (St. Louis, MO) อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อราประกอบด้วย yeast extract (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland), lactose (Ajax Finechem, NSW, Australia), KH_2PO_4 (Fisher Scientific, Leicestershire, UK) $MgSO_4.7H_2O$ (Merck KGaA), NaCl (Merck KGaA), $ZnSO_4.H_2O$ (Merck KGaA), $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ (Merck KGaA) และ biotin (Merck KGaA) สารละลาย trace elements ประกอบด้วย $NaB_4O_7.10H_2O$ (Ajax Finechem), $MnCl_2.4H_2O$ (Ajax Finechem), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (Ajax Finechem) และ $CuSO_4.5H_2O$ (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 KH_2PO_4 (Fisher Scientific) 0.26 กรัม, Na_2HPO_4 (Merck KGaA) 2.17 กรัม และ NaCl (Merck KGaA) 8.71 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.0 ด้วย HCl (Lab-scan)

ตาราง 1 รายละเอียดต่างๆ ของน้ำมันพืชที่ใช้ในการศึกษา

น้ำมันพืช (Vegetable oil)	ชนิด	ปริมาณน้ำมัน	ปริมาณไขมัน (g)				บริษัทผู้ผลิต
			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
Corn oil (น้ำมันข้าวโพด)	Refined	14 g	14	2	4	8	Lam Soon (Thailand) Pcl., Samutprakarn, Thailand
Olive oil (น้ำมันมะกอก)	Extra virgin	-	n/a	n/a	n/a	n/a	Rafael Salgado SA, Madrid, Spain
Palm olein oil (น้ำมันปาล์มโอเลอิน)	Refined	15 mL	14	6	n/a	n/a	P. S. Pacific Co., Ltd., Petchburi, Thailand

ตาราง 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	Ouiheng 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 Pcl., Samutprakarn, Thailand
Sunflower oil (น้ำมันดอกทานตะวัน)	Refined	15 mL	15	2	5	8	Thanakorn Vegetable Oil Products Co., Ltd. Samutprakarn, Thailand

n/a = Not available

2.1.3 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 ส่วนเชื้อราที่เหลือนำมาอบแห้งแล้วชั่งน้ำหนักหาน้ำหนักแห้ง

(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-μL sample loop โดยใช้ ODS Hypersil® C18 column (250×4.6 mm i.d.; 5 μm 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 μm 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 ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในโครมาโตแกรมกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน lovastatin

(3) การวิเคราะห์กราฟมาตรฐาน

ละลายสารมาตรฐาน lovastatin 25 มิลลิกรัม ด้วย methanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น standard stock solution (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) เตรียมสารละลาย lovastatin 6 ความเข้มข้นดังนี้ 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, KH_2PO_4 1.51 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.52 กรัม, NaCl 0.40 กรัม, $ZnSO_4.H_2O$ 2 มิลลิกรัม, $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ 2 มิลลิกรัม และ biotin 0.04 มิลลิกรัม และสารละลาย trace elements ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย (ต่อลิตร) $NaB_4O_7.10H_2O$ 100 มิลลิกรัม, $MnCl_2.4H_2O$ 50 มิลลิกรัม, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 50 มิลลิกรัม, และ $CuSO_4.5H_2O$ 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 (เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืช) เลี้ยงเชื้อราดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน (แต่ละการทดลองทำการศึกษาซ้ำ 5 ครั้ง) เก็บตัวอย่างและสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ lovastatin ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน lovastatin กรองเก็บเชื้อราทั้งในรูปแบบสปอร์และเส้นใยที่ได้จากการทดลองทั้งหมดนำมาอบแห้ง 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 หรือน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 %w/v (เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืช) เลี้ยงเชื้อราดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 220 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 7 วัน (แต่ละการทดลองทำการศึกษาซ้ำ 5 ครั้ง) เก็บตัวอย่างและสกัดเพื่อวิเคราะห์หา

ปริมาณ lovastatin ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน lovastatin กรองเก็บเชื้อราทั้งในรูปแบบสปอร์และเส้นใยที่ได้จากการทดลองทั้งหมด นำมาอบแห้ง และชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณ

2.1.7 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักต่อการผลิต lovastatin

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

2.1.8 การศึกษาผลของการใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและเสริมต่อการผลิต lovastatin

แบ่งเชื้อรา *Aspergillus terreus* ในรูปแขวนตะกอนในข้อ 2.1.4 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมลงในอาหารเหลวมาตรฐานปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นส่วนประกอบ ได้แก่ น้ำมันมะพร้าว หรือ น้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 1 %w/v โดยที่อาหารเหลวมาตรฐานดังกล่าวมีและไม่มี lactose เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันพืช) 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

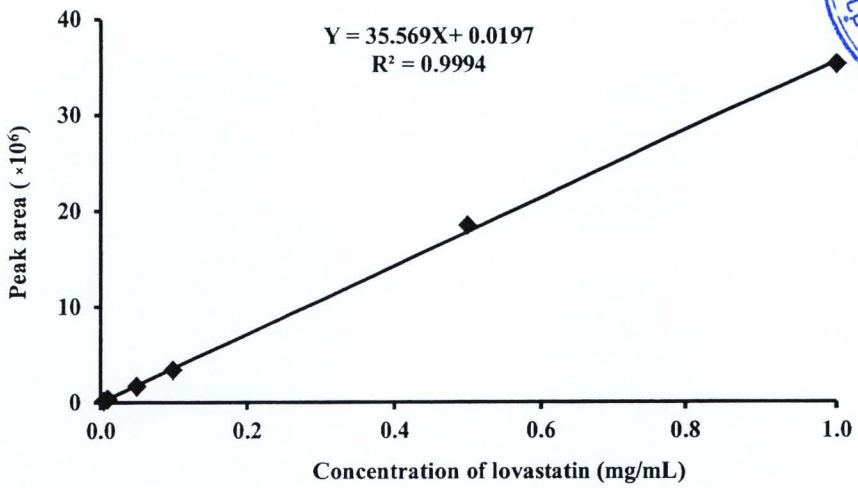
การวิเคราะห์ lovastatin ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า peak ของสารสำคัญปรากฏในโครมาโต-แกรมที่เวลา 15-16 นาที โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละครั้งประมาณ 20 นาที ผลการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน lovastatin กับพื้นที่ใต้ peak ดังตาราง 2 สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ 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

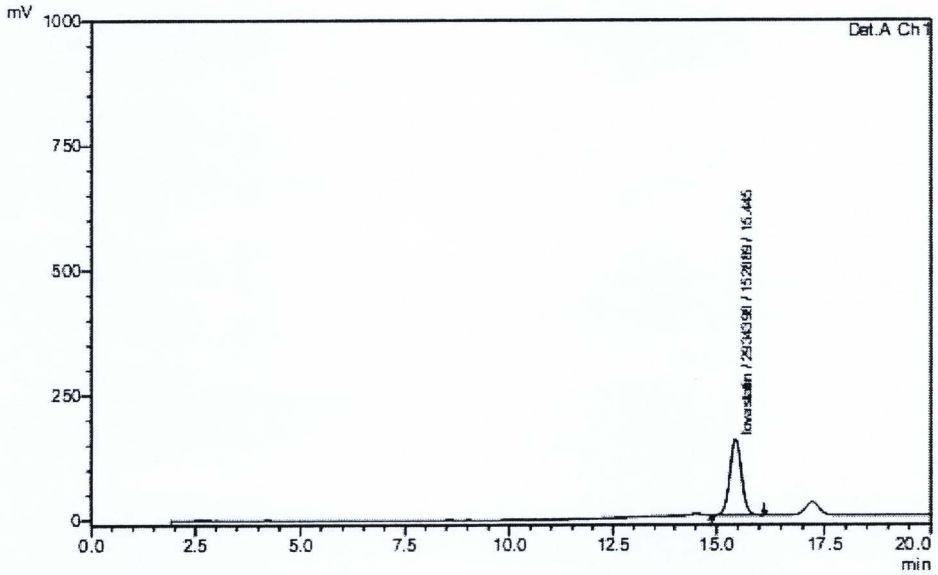
ตาราง 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน lovastatin กับพื้นที่ใต้ peak

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	

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



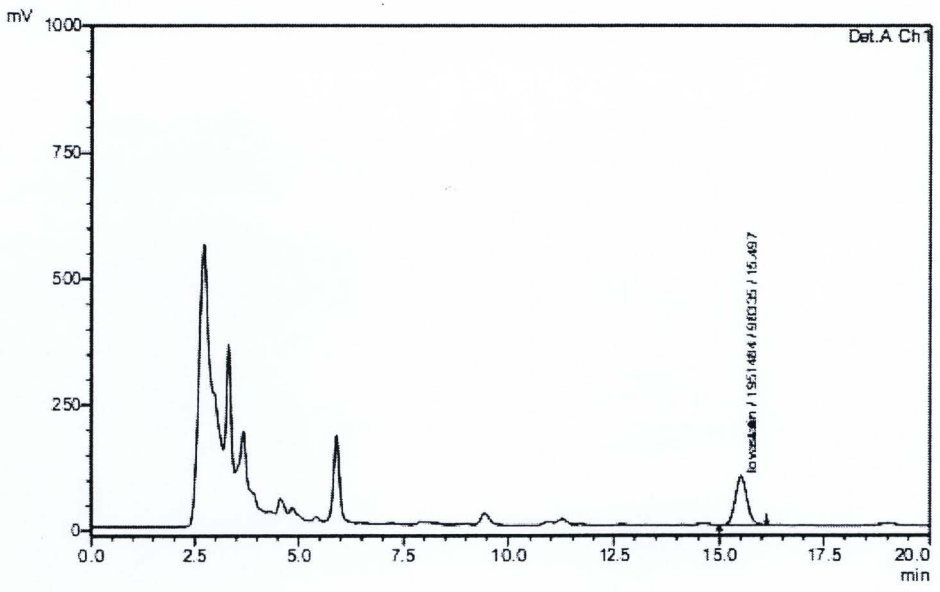
รูป 2 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน lovastatin กับพื้นที่ใต้ peak



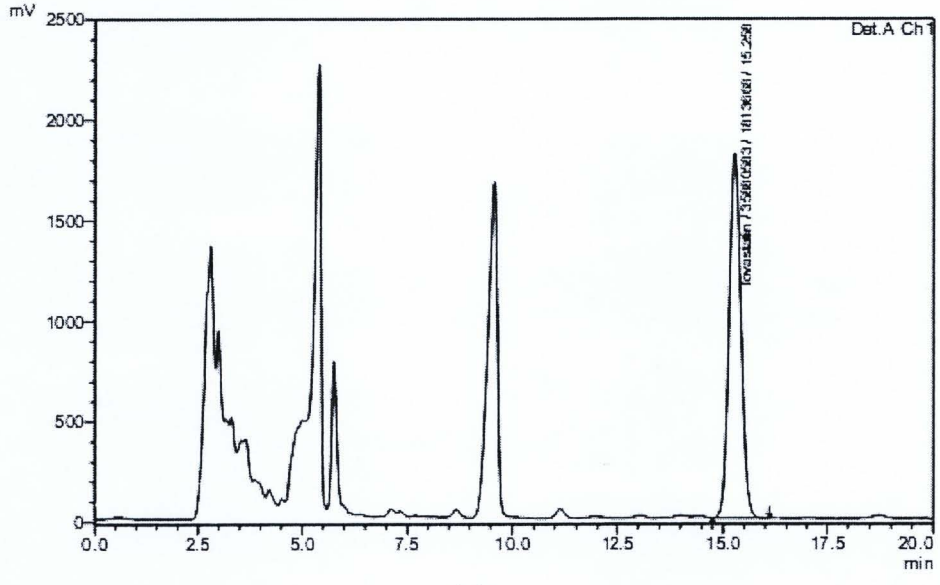
(A)

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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
วันที่ 18 ก.ย. 2555
เลขทะเบียน 248106
เลขเรียกหนังสือ



(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 โดยใช้ชนิดแหล่งคาร์บอนหลักเป็น lactose และแหล่งคาร์บอนเสริมเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ปริมาณความเข้มข้น 1 %w/v ได้ผลโครมาโตรแกรมและผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin ที่เกิดขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 กับการใช้ น้ำมันเมล็ดชา 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 โดยใช้น้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอเลอิน และน้ำมันรำข้าว 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 โดยใช้น้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์มโอเลอิน และน้ำมันรำข้าว 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 โดยใช้น้ำมันเมล็ดดอกคำฝอย น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน 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 โดยใช้น้ำมันเมล็ดดอกคำฝอย 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 โดยใช้ชนิดแหล่งคาร์บอนหลักเป็น lactose และแหล่งคาร์บอนเสริมเป็นน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาณต่างๆ ดังนี้ 1 2 3 4 และ 5 %w/v ได้ผลโครมาโตรแกรมและผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ 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 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ 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 โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ 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 ได้ผลโครมาโตรแกรมและผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ 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 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ 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

ตาราง 14 การเปรียบเทียบความเข้มข้น lovastatin และน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันมะพร้าวปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก

น้ำมันพืช	ความเข้มข้น Lovastatin (mg/L)	น้ำหนักเชื้อราแห้ง (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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ บรรณสารสนเทศ

ตาราง 15 ค่าพื้นที่ใต้ peak ของผลิตภัณฑ์ lovastatin ที่ได้จากโครมาโตแกรมและน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ 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 โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ 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 ได้ผลโครมาโตรแกรมและผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ lovastatin ที่เกิดขึ้นจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* ATCC 20542 แสดงดังตาราง 17 และ 18 ตามลำดับ

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

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