บทที่ 1

บทนำ

สารเคมีบริสุทธิ์ (fine chemicals) เป็นสิ่งที่จำเป็นในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น ในอุตสาหกรรมยา ปัจจุบันมีโรงงานผลิตสารเคมีบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ เป็นจำนวนมาก ซึ่งมุ่งเน้นเพื่อการพัฒนา และเพิ่มปริมาณผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด Stephen (2000) รายงานว่าในปี 1999 ยอดจำหน่ายสารเคมีบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ยามีมูลค่าสูงถึง 22 พันล้านดอลลาร์ มียอดจำหน่ายสูงขึ้น 7-8 เปอร์เซ็นต์ต่อปี จนถึงปัจจุบัน

ในการสังเคราะห์ยาชนิดต่างๆ จะใช้สารเคมีบริสุทธิ์เหล่านี้ทำหน้าที่ ดังนี้

1. basic building blocks มีมูลค่า 3-4 ล้านดอลลาร์ต่อปี ยอดจำหน่ายเพิ่มขึ้น 3 เปอร์เซ็นต์ทุกปี จำหน่ายกิโลกรัมละ 5-10 ดอลลาร์ ปริมาณผลผลิตทั้งหมดประมาณ 100,000-1 ล้านกิโลกรัมต่อปี
2. advanced intermediates มีมูลค่า 6 ล้านดอลลาร์ต่อปี ยอดจำหน่ายเพิ่มขึ้นมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ทุกปี จำหน่ายกิโลกรัมละ 10-1,000 ดอลลาร์ ปริมาณผลผลิตทั้งหมดประมาณ 1,000-100,000 กิโลกรัมต่อปี
3. standard bulk active compounds มีมูลค่า 12 ล้านดอลลาร์ต่อปี ยอดจำหน่ายเพิ่มขึ้น 5-6 เปอร์เซ็นต์ทุกปี จำหน่ายกิโลกรัมละ 5-1,000 ดอลลาร์ ปริมาณผลผลิตทั้งหมดประมาณ 1,000-100,000 กิโลกรัมต่อปี

จากยอดจำหน่ายที่เพิ่มสูงเป็นลำดับ เห็นได้ว่าสารเคมีบริสุทธิ์เป็นสิ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในระดับอุตสาหกรรม แต่เนื่องจากผลิตได้จากปฏิกิริยาเคมี ในกระบวนการผลิตจำเป็นที่จะต้องใช้สารเคมีปริมาณมาก ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันจึงได้มีการผลิตสารเคมีบริสุทธิ์เหล่านี้จากจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิด จัดว่าเป็นการลดต้นทุน และเป็นการรักษาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

(R)-(-)-3-hydroxycarboxylic acids ซึ่งสูตรโครงสร้างคือ $R\text{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}\text{-}CH_2\text{-}\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}\text{-}OH$ สามารถใช้เป็น chiral building blocks ในการสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์ เช่น ยาปฏิชีวนะ วิตามิน อะโรมาติก ฟีโรโมน (Lee และคณะ, 1999) สารกลุ่มนี้มี chiral center ประกอบด้วยหมู่

ไฮดรอกซี และหมู่คาร์บอกซีลิก ซึ่งง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี จึงนำไปสังเคราะห์สารประกอบชนิดใหม่ตามที่ต้องการได้โดยตรง กรดคาร์บอกซีลิกจำนวนมากกว่า 120 ชนิด สามารถเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ตำแหน่ง 3-, 4-, 5- หรือ 6- ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้งหมดอยู่ในรูป (R)-(-)-configuration บริเวณหมู่ไฮดรอกซีของกรดเหล่านี้เป็น chiral center ซึ่งสามารถพอลิเมอไรซ์เป็นพอลิเมอร์ได้ (Lee, 1996b; Steinbuchel และ Valentin, 1995) พอลิเมอร์ดังกล่าวนี้คือ พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates; PHAs) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะผลิต (R)-(-)-3-hydroxycarboxylic acids ในรูปอีแนนทิโอเมอร์ (enantiomer) ที่บริสุทธิ์โดยปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันของ PHAs

พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต หรือ พอลิ(3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) หรือ PHB เป็นโฮโมพอลิเมอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต และเป็นสารในกลุ่ม PHAs ที่สังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด PHB ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นถูกเก็บไว้ในแกรนูลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ แกรนูล PHB ถูกหุ้มด้วยเมมเบรนที่มีไขมันและโปรตีนหนาประมาณ 2 ไมโครเมตร PHB ที่แยกได้จากเซลล์แบคทีเรียมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากประมาณ 10^5-10^6 และมีระดับความเป็นผลึก (degree of crystallinity) สูง มีอุณหภูมิหลอมละลายประมาณ 180 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากพอลิเมอร์ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่น โปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ (Byrom,1987; Doi,1990) แบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถสะสม PHB ได้มากถึง 30-80% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเจริญภายใต้ภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนมากเกินพอ และมีการจำกัดปริมาณสารอาหารจำเป็น (Lee,1996(a); Madison และ Huisman,1999) PHB สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีในกลุ่ม R-(-)-3-hydroxycarboxylic acids ได้ (Lee และคณะ,1999)

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยการดีพอลิเมอไรเซชันในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ซึ่งแยกได้จากดิน โดยรัตนศิริ มุทิตากุล (2538) พบว่าสามารถผลิต PHB ได้ R-(-)-3-hydroxybutyric acid หรือ R3HB ซึ่งเป็นสารชนิดหนึ่งในกลุ่ม R-(-)-3-hydroxycarboxylic acids ที่สามารถนำไปใช้เป็น chiral building blocks ในการสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์หลายชนิดที่มีประโยชน์ เช่น ยา antiglaucoma (Fishman และ คณะ,2001) ใช้ช่วยลดความดันภายในลูกตา รักษาโรคต้อหิน ซึ่งเป็นโรคที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ตาบอด หากไม่ได้รับการรักษา และ 4-acetoxyazetidinone ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของยาปฏิชีวนะในกลุ่ม carbapenem ซึ่งมีมูลค่าเป็นพันล้านบาทต่อปี

การผลิตโมโนเมอร์ R3HB สามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางชีวภาพได้แก่ ปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันของ PHB ภายในเซลล์จุลินทรีย์ และวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีมีขั้นตอนที่ซับซ้อน และต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมาก ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตต่ำ และมีต้นทุนการผลิตสูง (Lee และคณะ,1999) ดังนั้นการใช้วิธีทางชีวภาพในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB จะช่วยลดขั้นตอนการผลิต และลดการใช้สารเคมี โดยถ้าสามารถพัฒนากระบวนการผลิตจากจุลินทรีย์ให้มีผลผลิตสูง จะช่วยให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง

ปัญหาที่สำคัญในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันของ PHB ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ คือโมโนเมอร์ R3HB ที่ได้จะถูกเมตาบอไลซ์ต่อไปโดยเอนไซม์ R3HB dehydrogenase เนื่องจาก PHB ถูกย่อยสลายโดยระบบเอนไซม์ดีพอลิเมอเรส (depolymerase) ที่มีอยู่ในเซลล์ คือ PHB depolymerase และ dimer hydrolase (Doi, 1990; Lee และคณะ, 1999) โดย PHB จะถูกดีพอลิเมอไรซ์ไปเป็นโมโนเมอร์ R3HB โมโนเมอร์นี้สามารถถูกเมตาบอไลซ์โดยเซลล์จุลินทรีย์ต่อไปได้อีกโดยเอนไซม์ R3HB dehydrogenase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโมโนเมอร์ R3HB ไปเป็นอะซิโตอะซิเตต (acetoacetate) เข้าสู่วัฏจักร TCA เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานต่อไป ดังนั้นในการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ให้ได้ปริมาณผลผลิตสูงโดยศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ PHB depolymerase และลดกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase ให้มีน้อยที่สุดหรือไม่มีเลย

งานวิจัยนี้มุ่งหมายที่จะศึกษาการผลิตโมโนเมอร์ R3HB โดยปฏิกิริยาภายในเซลล์ของ *Bacillus* sp. BA-019 ให้ได้ปริมาณมาก โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ ทำโดยศึกษาผลของอุณหภูมิ, การเขย่า และค่า pH ที่มีต่อการผลิตโมโนเมอร์ R3HB ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนเมอร์ที่ผลิตได้ด้วยโปรตอน NMR เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการผลิตโมโนเมอร์สำหรับใช้ในการสังเคราะห์สารเคมีบริสุทธิ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์จุลินทรีย์ โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดีพอลิเมอไรเซชัน รวมทั้งศึกษาลักษณะของโมโนเมอร์ R3HB ที่ผลิตได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนการวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. เลี้ยง *Bacillus* sp. BA-019 ในภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำเซลล์ที่มีการสะสม PHB มาใช้ผลิตโมโนเมอร์ R3HB ภายในเซลล์
3. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อการผลิตโมโนเมอร์ R3HB
4. ศึกษาผลของการเขย่าต่อการดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อการผลิตโมโนเมอร์ R3HB
5. ศึกษาผลของค่า pH ต่อการดีพอลิเมอไรเซชันภายในเซลล์ *Bacillus* sp. BA-019 เพื่อการผลิตโมโนเมอร์ R3HB
6. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ R3HB dehydrogenase
7. ศึกษาลักษณะสมบัติของโมโนเมอร์ที่ผลิตได้ด้วยโปรตอน NMR
8. จำแนกสปีชีส์ (species) ของ *Bacillus* sp. BA-019

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย