หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

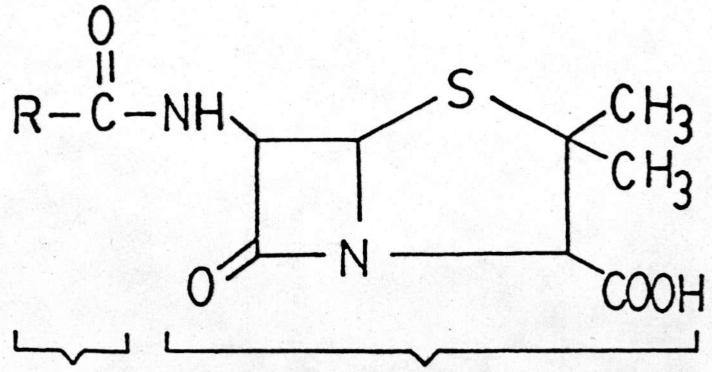
บทที่ 1

บทนำ

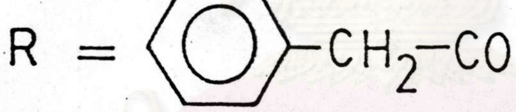
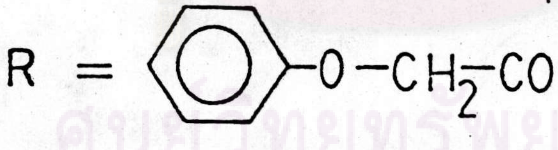
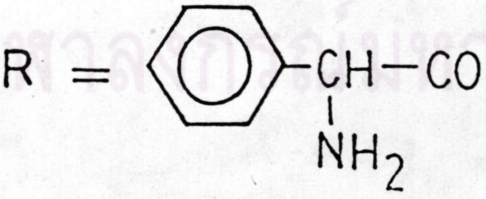
ปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของการรักษาโรคโดยใช้ยาปฏิชีวนะจำพวกเพนนิซิลิน (เพนนิซิลิน จี และเพนนิซิลิน วี) กันอย่างแพร่หลาย ด้วยเหตุผลที่พบว่าจุลชีพสามารถพัฒนาตัวเองให้สามารถทนต่อฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะจำพวกเพนนิซิลินนี้ได้ สำหรับประเทศไทยแล้ว นอกเหนือจากเหตุผลดังกล่าว ยังเป็นการที่จะวิจัยเพื่อทำการผลิตยาปฏิชีวนะภายในประเทศ เพื่อลดการนำเข้าของยาปฏิชีวนะ อีกทั้งยังหวังผลถึงการส่งออกเพื่อลดการขาดดุลทางการค้าได้ด้วย

ประสิทธิภาพและชนิดของยาปฏิชีวนะจำพวกเพนนิซิลิน จะขึ้นกับหมู่ข้างเคียง (side chain group) ที่แปรเปลี่ยนไป (รูปที่ 1) แต่องค์ประกอบหลักของยาปฏิชีวนะจำพวกเพนนิซิลินคือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซลานิก ซึ่งเป็นนิวเคลียสหลักที่สำคัญ ดังนั้นจุดเริ่มของการผลิตยาปฏิชีวนะจำพวกเพนนิซิลินชนิดใหม่จึงต้องเริ่มต้นด้วยการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ซึ่งปัจจุบันนี้สามารถทำได้ 2 วิธี คือกระบวนการทางเคมีซึ่งเป็นวิธีที่นิยมทำกันอยู่ในอุตสาหกรรมปัจจุบัน แต่พบว่ามีขั้นตอนที่ซับซ้อนและยุ่งยากต่อการควบคุมแนวโน้มการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกปัจจุบันและอนาคตจึงมุ่งไปสู่การใช้กระบวนการทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ชื่อเพนนิซิลิน เอซิเลส (penicillin acylase E.C. 3.5.1.11) (รูปที่ 2) (Self และ Lilly, 1969; Carrington, 1971; Carleysmith และคณะ, 1980; Vandamme, 1980; Poulsen, 1984; Dammy และคณะ, 1985)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

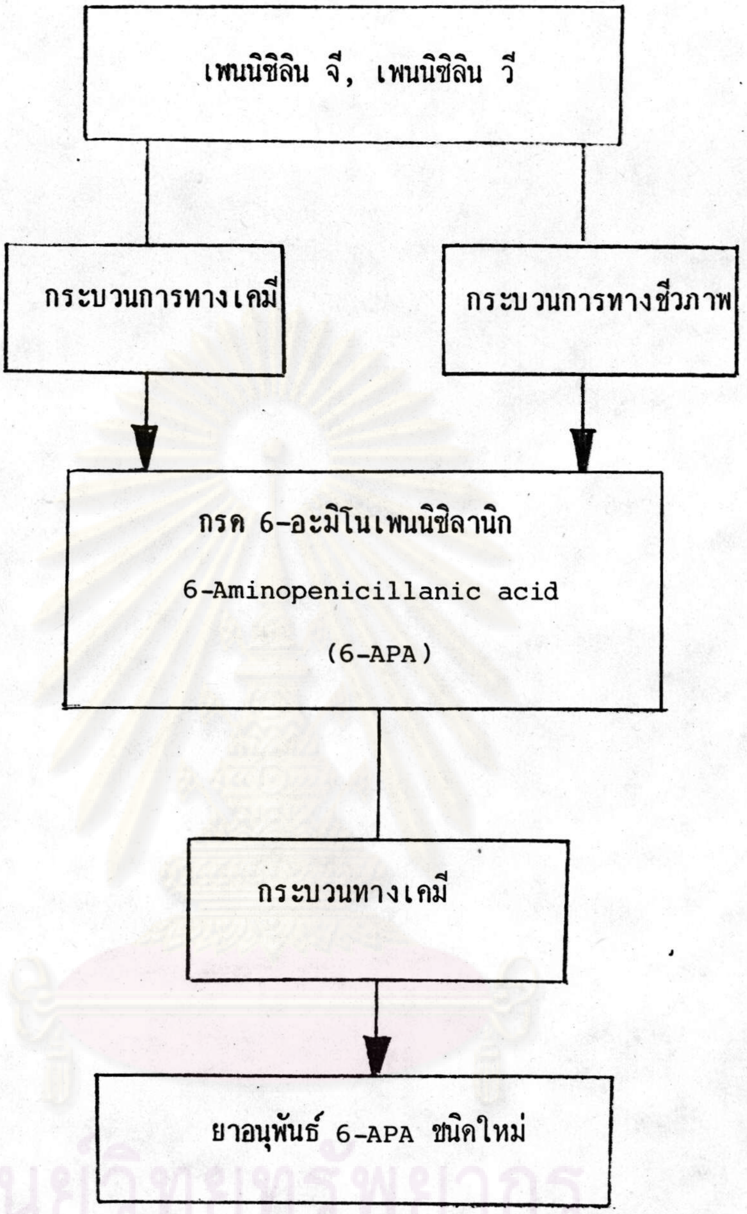


หมู่ข้างเคียง (side chain) | กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-aminopenicillanic acid)

หมู่ข้างเคียง	ชื่อยาเพนนิซิลิน
	เพนนิซิลิน จี (benzylpenicillin)
	เพนนิซลิน วี (phenoxymethypenicillin)
	แอมพิซิลิน (D-α-aminobenzylpenicillin)

<u>รูปที่</u> 1 โครงสร้างของเพนนิซิลิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่</u> 2 แสดงกระบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก และยาอนุพันธ์กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

เพนนิซลิน เอซิเลส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินที่ตำแหน่งพันธะเอไมด์ซึ่งเชื่อมหมู่ข้างเคียง (acyl side chain group) กับส่วนของโมเลกุลกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1950 โดย Sakaguchi กับ Murao (รูปที่ 3) ปัจจุบันมีการจำแนกชนิดของเพนนิซิลิน เอซิเลส ได้ตามความจำเพาะต่อสับสเตรต (Vandamme, 1974; Votes, 1975) ออกเป็น 3 ชนิด ที่นิยมศึกษากันมากที่สุดได้แก่ เพนนิซิลิน จี เอซิเลส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี พบส่วนใหญ่ในแบคทีเรียสายพันธุ์เอสเคอริเคีย (Escherichia) เพราะว่าในตลาดปัจจุบันเพนนิซลิน จี มีการผลิตมากกว่ายาปฏิชีวนะเพนนิซิลินชนิดอื่น ๆ อีกทั้งยังราคาถูก (Self และคณะ, 1969) เพนนิซิลินเอซิเลสอีก 2 ชนิดได้แก่ เพนนิซิลิน วี เอซิเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะสูงต่อสับสเตรตเพนนิซิลิน วี และแอมพิซิลิน เอซิเลส ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรตเพนนิซิลิน ซึ่งพบไม่มากนักในธรรมชาติ

จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ (1986) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเพนนิซิลิน จี เอซิเลส ในเซลล์ E. coli ATCC 9637 พบว่า

1. เป็น intracellular enzyme

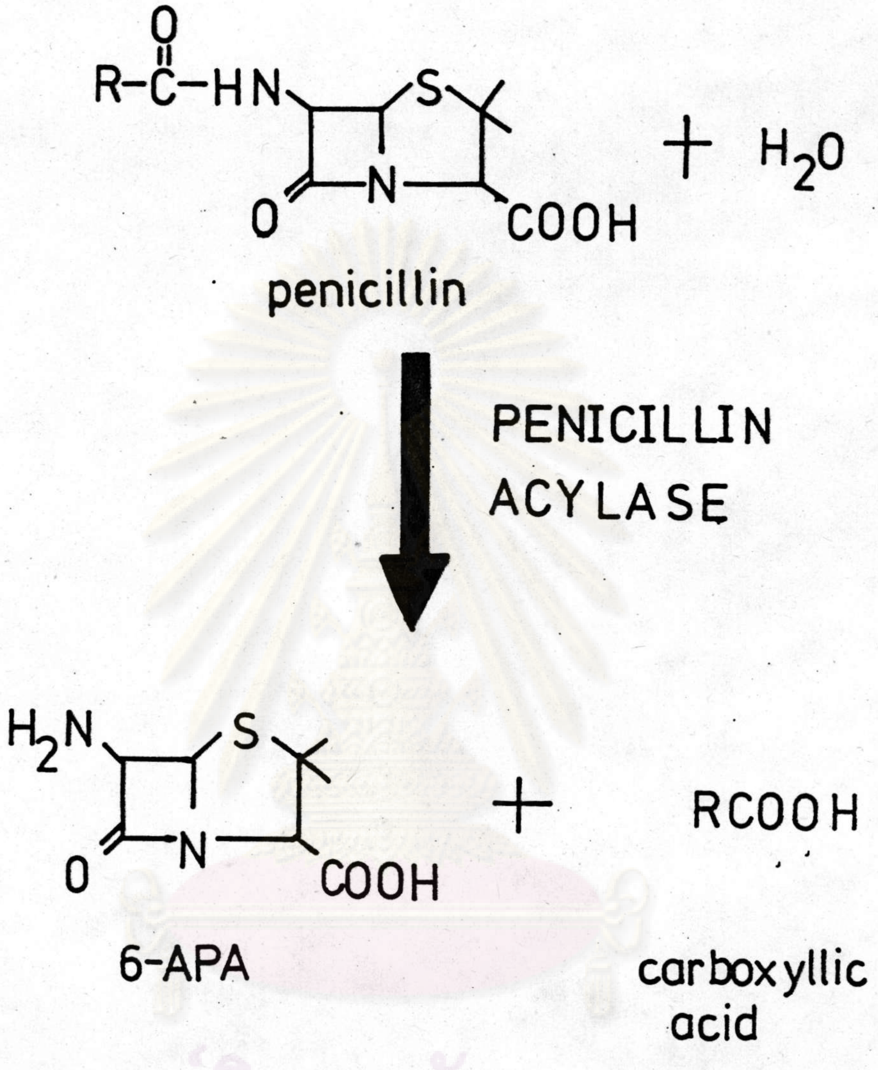
2. ต้องการตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ในการสร้างเอนไซม์คือ กรดฟีนิลอะซีติก

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์คือ อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยง E. coli ซึ่งมีค่าประมาณ 30 องศาเซลเซียส

4. การสร้างเอนไซม์จะถูก catabolite repression ด้วยกลูโคสและคาร์โบไฮเดรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. กรดฟีนิลอะซีติก และกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขัน (competitive inhibition) และแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) ตามลำดับ

6. ไม่พบว่ามีการผลิต เบต้า-แลคแตมเบส ซึ่งมีผลรบกวนต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก



รูปที่ 3 ปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินเป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซลานิก ด้วยเอนไซม์เพนนิซลิน เอซิเลส (Vandamme, 1980)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1 พัฒนาการของการใช้เพนนิซลิน เอซิเลส เพื่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

ในระยะแรกเริ่ม เมื่อปี ค.ศ. 1960 ได้มีการศึกษาความเป็นไปได้ของการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก โดยใช้เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในรูปของเซลล์อิสระ หรือเอนไซม์อิสระ พบว่าผลผลิตที่ได้ต่ำมากประมาณ 0.5-1 กิโลกรัม กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกต่อน้ำหนักเซลล์เปียก 1 กิโลกรัม (Rolinson และคณะ, 1960; Kaufmann และ Bauer, 1969) นอกจากนี้แล้วยังมีข้อเสียอื่น ๆ อีก เช่น สามารถใช้เอนไซม์หรือเซลล์ได้เพียงครั้งเดียว เสถียรภาพของเอนไซม์ต่ำต้องควบคุมสภาวะให้ดี การนำเซลล์อิสระมาใช้อาจมีเอนไซม์อื่นหรือสารชนิดอื่นที่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้ เช่น เบต้า-แลคแตมเมส ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์ เพนนิซิลิน จี ได้ทำให้ผลผลิตของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกต่ำลง ขั้นตอนการผลิตและทำให้กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกบริสุทธิ์นั้นยุ่งยากขึ้น

เพื่อที่จะหลีกเลี่ยงข้อเสียดังกล่าว จึงได้มีการศึกษาปรับปรุงกระบวนการดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยการแปรรูปเอนไซม์หรือเซลล์ให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมต่อการผลิต กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก นั่นคือ การนำเทคนิคการตรึงเอนไซม์มาประยุกต์ (Chibata และคณะ, 1974; Tosa และคณะ, 1974; Yamamoto และคณะ, 1976, 1977; Jack และ Jajic, 1977; Poulsen, 1984)

1.2 การตรึงเอนไซม์หรือเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส

เทคนิคการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์คือ การทำให้เอนไซม์หรือเซลล์เคลื่อนที่ไปมาไม่ได้ หรือเคลื่อนที่ได้ในพื้นที่จำกัด จึงสามารถนำเอนไซม์หรือเซลล์นั้นมาทำปฏิกิริยาซ้ำได้หลายครั้ง นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์หรือเซลล์ภายหลังจากการตรึงแล้ว มีคุณสมบัติบางประการเปลี่ยนไป เช่น ความเสถียรต่อการความร้อนและการเก็บรักษา เป็นต้น

วิธีการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์สามารถแบ่งออกเป็นวิธีใหญ่ ๆ ได้ 4 วิธีคือ

1.2.1 การตรึงด้วยพันธะอิออนนิก

เป็นการตรึงเอนไซม์หรือเซลล์เข้ากับวัสดุที่ใช้ตรึง (matrix) โดยใช้พันธะอิออนนิกหรืออาจจะมีอิออนโลหะบางชนิดรวมอยู่ด้วย เช่น Cu(II), CO(II) และ Ni(II) เรียกว่า พันธะโคออดิเนชั่นอิออนนิกวัสดุที่ใช้ตรึงก็มีหลายชนิด เช่น

- อนุพันธ์ของ โพลี แซคคาไรด์ เช่น DEAE-เซลลูโลส (Lilly, และคณะ, 1972; Warburton และคณะ, 1980)

1.2.2 การตรึงด้วยพันธะโควาเลนท์

เป็นการเชื่อมเอนไซม์หรือเซลล์กับวัสดุที่ใช้ตรึงโดยใช้สารพวก bi- หรือ multifunctional reagent เช่น กลูตารัลดีไฮด์ ไซยานูริกคลอไรด์ ฯลฯ (Boemer และคณะ, 1973)

สภาวะที่ใช้ในการตรึงเซลล์วิธีนี้ค่อนข้างจะรุนแรง ถึงแม้ว่าพันธะโควาเลนท์ทำให้การยึดเกาะแน่นกว่าพันธะอิออนนิกก็ตาม แต่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและบริเวณเร่งเอนไซม์หรือทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เสียไป (Chibata, 1978)

1.2.3 การตรึงโดยวิธี Crosslinking (Amotz, 1974; Vojtisek และคณะ, 1979)

เป็นการเชื่อมโมเลกุลของเอนไซม์หรือเซลล์เข้าด้วยกันเป็นกลุ่ม โดยใช้สารพวก bi หรือ multifunctional reagent เป็นตัวเชื่อมโดยตรง เช่น กลูตารัลดีไฮด์ เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ฯลฯ

1.2.4 การตรึงวิธีกักขัง (entrapping method)

เป็นการขังเอนไซม์หรือเซลล์ไว้ในเนื้อเยื่อบาง ๆ หรือร่างแหที่มีพื้นที่จำกัดของวัสดุที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งวิธีนี้จะไม่มีพันธะใด ๆ เกิดขึ้นเลย วัสดุตรึงที่ใช้ก็มีเช่น โพลีอะคิริลลาไมด์เจล (Ekstrom และคณะ, 1974) โพลีเมอร์พวกเรซินอีพอกซี (Klein กับ Eng, 1979) และโพลีเมอร์ของสารสังเคราะห์ชนิดอื่น ๆ (Dinelli, 1972; Klein และคณะ, 1981 Ching และ Wang, 1982)

การตรึงเอนไซม์หรือเซลล์ต่างก็มีข้อดี ข้อเสีย แตกต่างกันออกไป เช่น การตรึงเซลล์ได้เปรียบเนื่องจากสามารถตัดขั้นตอนการสกัดแยกทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ แต่ก็มีข้อเสียคือ การใช้อาจทำให้มีเอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการลดลง ดังนั้นการเลือกว่าจะตรึงเอนไซม์หรือเซลล์ต้องคำนึงถึงความเหมาะสมต่าง ๆ ด้วย

1.3 การผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในหอปฏิกิริยา โดยใช้เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงที่ผลิตเอนไซม์

การนำเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงมาใช้ในกระบวนการผลิตมักจะทำในหอปฏิกิริยา (reactor) หรือขยายการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป การผลิตโดยใช้หอปฏิกิริยาสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทตามชนิดของการผลิต

1.3.1 การผลิตด้วยระบบไม่ต่อเนื่อง

หอปฏิกิริยาที่ใช้ในการผลิตแบบนี้คือ ถังกวน (stirred tanked reactor) โดยจะใส่เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงลงไปในถังกวนพร้อมกับสับสเตรต จากนั้นก็จะปล่อยให้เกิดการผลิตในสภาวะที่เหมาะสม เมื่อได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการแล้วก็จะนำผลิตภัณฑ์ทั้งหมดออกจากถังกวน แล้วใส่สับสเตรตใหม่ลงไปดำเนินการผลิตต่อไปจนกว่าแอคติวิตีของเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงลดลง โดยสามารถแบ่งตามหลักการออกได้เป็น 2 แบบ (Bailey และ Ollis, 1977)

1.3.1.1 การผลิตแบบไม่ต่อเนื่องโดยปริมาตรคงที่

ให้ปริมาณเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงคงที่ทำปฏิกิริยากับสับสเตรตที่มีปริมาตรคงที่ แต่จะแปรเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาขึ้นกับแอคติวิตีของเอนไซม์หรือเซลล์ตรึง (Cordoso และ Costa, 1983)

1.3.1.2 การผลิตแบบไม่ต่อเนื่องโดยให้เวลาคงที่

ให้ปริมาณเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงและเวลาในการทำปฏิกิริยาคงที่ แต่จะแปรเปลี่ยนปริมาณของสับสเตรตที่ใช้ในแต่ละครั้งตามแอคติวิตีของเอนไซม์หรือเซลล์ตรึง (Cordoso และ Costa, 1983)

การผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกโดยการใช้ถังกวนแบบไม่ต่อเนื่องก็เป็นที่นิยมมาก แต่มีข้อเสียคือ การกวนทำให้เม็ดเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงเกิดการฉีกขาด สูญเสียแอคติวิตีไปได้ง่ายโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงที่ใช้จะต้องมีความเสถียรและ strength สูง (Warburton และคณะ, 1972; Chibata และคณะ, 1974; Nelson, 1976; Apolinary และคณะ, 1979; Zurkova และคณะ, 1983)

1.3.2 <u>การผลิตด้วยระบบต่อเนื่อง</u>

หอปฏิกิริยาที่ใช้ในการผลิตนี้มีหลายแบบ โดยมีหลักการว่าจะใส่เอนไซม์หรือเซลล์ตรึงลงในหอปฏิกิริยาพร้อมกับสับสเตรต แต่ในระหว่างการผลิตนั้นจะมีการนำสับสเตรตใหม่เข้าสู่หอปฏิกิริยาตลอดเวลา ในขณะเดียวกันก็จะเก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ออกจากหอปฏิกิริยาตลอดเวลาเช่นกัน (Bailey และ Ollis, 1973) ชนิดของหอปฏิกิริยาแบ่งได้เป็น

1.3.2.1 <u>หอปฏิกิริยาแบบถังกวนต่อเนื่อง</u> (continuous stirred tanked reactor)

ใช้หลักการเดียวกับถังกวนทั่วไป แต่จะทำการผลิตต่อเนื่องมีหลายชนิด อาจเป็นแบบ single stage หรือ multi stage (di-; tetra-; hexa-; etc.) โดยที่ multi stage continuous stirred tank จะให้ผลผลิตของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสูงกว่าแบบ single stage และยังสามารถผลิตอย่างต่อเนื่องได้นาน 400 ชั่วโมง ในทุกถังกวน (Carleysmith และ Lilly, 1979)

1.3.2.2 <u>หอปฏิกิริยาแบบเบดคงที่</u> (fixed bed reactor)

เป็นหอปฏิกิริยาทรงสูงที่บรรจุเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงไว้ด้วยปริมาณคงที่ จากนั้นจะผ่านสับสเตรตเข้าทางด้านล่างของหอปฏิกิริยา ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในระหว่างที่สับสเตรตผ่านเอนไซม์หรือเซลล์ตรึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกเก็บออกทางด้านบนของหอปฏิกิริยา หอปฏิกิริยาชนิดนี้มีทั้ง single และ multi stage โดยที่พบว่าแบบ multi stage จะให้ผลผลิตที่สูงกว่า วิธีนี้นิยมใช้ในการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกเช่นกัน แต่จะต้องใช้ปริมาณเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงค่อนข้างสูง (Self และคณะ, 1969; Sato และคณะ, 1976; Sun และคณะ, 1980; Yasushi และคณะ, 1980; Park และคณะ, 1983)

1.3.2.3 <u>หอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดซ์เบด</u> (fluidized bed reactor)

เป็นหอปฏิกิริยาที่เม็ดเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงเกิดสภาวะฟลูอิด-ไดซ์เซชัน คือสภาวะที่ทำให้ของแข็งมีสภาพเป็นของไหลโดยการให้อากาศ หรือของเหลวผ่านเข้าทางใต้ของหอปฏิกิริยา มีการใช้หอปฏิกิริยาชนิดนี้ในการผลิตสารอย่างอื่น เช่น แอล-ไอโซลิวซีน, แอล-ซอโบส และเอทานอล เป็นต้น (Wada และคณะ, 1979; Yoshida และคณะ, 1981; Damronglerd และคณะ, 1983; วาสนา, 1986)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นการผลิตโดยใช้หอปฏิกิริยาแบบถังกวนและเบดคงที่ (Poulsen, 1984) แต่ยังไม่มีการทดลองผลิตโดยใช้หอปฏิกิริยาแบบฟลูอิดไดซ์เบด ซึ่งมีข้อดีคือ

1. เม็ดเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงมีการเคลื่อนที่ตลอดเวลา ทำให้เกิดการผสมกันได้อย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอ อุณหภูมิภายในหอปฏิกิริยาจะคงที่ตลอด

2. พื้นที่สัมผัสระหว่างเม็ดเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงกับสับสเตรตจะมีมากกว่า

3. เสียพลังงานเพราะมีแรงเสียดทานน้อยกว่า และช่วยลดค่าความดันของการไหล

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษากระบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบด โดยใช้เซลล์ E. coli ATCC 9637 ที่ถูกตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น อันจะเป็นแม่แบบของการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขั้นตอนการวิจัยมีดังนี้

1. ศึกษาการเจริญและการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลสของ E. coli ATCC 9637 ในถังหมักขนาดบรรจุ 5 ลิตร

2. ศึกษาสภาวะของการตรึงเซลล์ E. coli ATCC 9637 โดยใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนผสมวุ้น เพื่อให้ได้การทำงานของเพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์ตรึงในการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ที่เหมาะสม

3. ศึกษาสมบัติทางกายภาพ เคมี และจลน์ศาสตร์ของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ตรึง

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ในหอปฏิกิริยาฟลูอิดไดซ์เบดโดยเซลล์ตรึง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย