บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหาการวิจัย

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างหรือสเตอริโอเคมีของสารโดยกระบวนการทางชีวภาพ ได้มีการศึกษากันมานานแล้ว ทั้งจากการเปลี่ยนสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสารสังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่างๆ โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ปฏิกิริยาดีไฮเดรชัน รีดักชัน ออกซิเดชัน ไฮดรอกซิเลชัน และไอโซเมอไรเซชัน เป็นต้น เนื่องจากกระบวนการเปลี่ยนสารทางชีวภาพมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีทางเคมีมาก เพราะปฏิกิริยาของเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่ได้มากกว่าปฏิกิริยาทางเคมี ดังนั้นการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จึงมีประสิทธิภาพสูงโดยเอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาในตำแหน่งของโครงสร้างสารประกอบที่เกิดได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับการสังเคราะห์ทางเคมีที่อาจจะไม่สามารถทำได้หรืออาจต้องผ่านหลายขั้นตอน เช่น การเกิดปฏิกิริยาบนคาร์บอนอะตอมที่อยู่ในตำแหน่งที่ไม่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี หรือในตำแหน่งที่ต้องใช้กระบวนการที่ยุ่งยาก หรือมีข้อจำกัดของปฏิกิริยาเคมี ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นจะมีความจำเพาะเจาะจงในการเข้าทำปฏิกิริยา สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิ ความดันปกติ และพีเอชเป็นกลาง จากข้อดีเหล่านี้กระบวนการปรับเปลี่ยนสารทางชีวภาพจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการสังเคราะห์หรือปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารประกอบทางเคมีอินทรีย์ เพื่อให้ได้สารเมแทบอไลท์ที่เกิดขึ้นได้ยากโดยวิธีการทางเคมีและมีโครงสร้างที่หลากหลายเพื่อเป็นแนวทางในการหาสารประกอบทางเคมีตัวใหม่ ในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ เช่น ทางการสังเคราะห์ยา สารเคมีทางการเกษตร และเป็นสารเคมีที่ใช้ประโยชน์ทั้งในห้องปฏิบัติการ และทางอุตสาหกรรม เป็นต้น (Faber. 2004)

ต้นหญ้าหวาน *Stevia rebaudiana* Bertoni เป็นพืชที่ให้สารที่มีความหวานคือไกลโคไซด์ (glycoside) สารประกอบหลักที่มีอยู่คือ สตีวิโอไซด์ (stevioside) มีอยู่ 5-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักใบแห้ง พบว่ามีความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครส ประมาณ 300 เท่า สามารถละลายน้ำ ทนต่อความร้อน ทนต่ออากาศและแสงสว่างได้ดี โครงสร้างทางเคมีของสตีวิโอไซด์ ประกอบด้วย สตีวิออล (steviol) และน้ำตาลกลูโคส 3 หน่วย (Ogawa et al. 1980) มีการใช้แทนน้ำตาลเพื่อให้ความหวานในอาหาร เครื่องดื่ม ลูกกวาด ผักดอง และอาหารทะเล ในผู้ที่เป็นโรคอ้วน โรคเบาหวาน และโรคหัวใจ หญ้าหวานจึงเป็นที่นิยมในหมู่ของผู้บริโภค และอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มลดความหวาน เนื่องจากหญ้าหวานให้รสหวานมากและมีคุณสมบัติของสารรสหวานที่ไม่มีแคลอรี่ จึงไม่อ้วนเหมือนการ

บริโภคน้ำตาลโดยทั่วไป (Al'fonsov et al. 2000) มีการศึกษาทดลองในสัตว์ทดลองพบว่าไม่มีผลกระทบทางชีวภาพต่อหนูทดลองแต่อย่างใด แม้จะให้สัตว์ทดลองกินในปริมาณที่สูงก็ไม่มีความเป็นพิษทั้งเฉียบพลัน (acute) และเรื้อรัง (chronic) ต่อสัตว์ทดลอง (Roberts and Renwick. 2008)

นอกจากนี้ยังพบว่าสตีวิโอไซด์และแอนาลอกมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น รักษาระดับความดันโลหิต รักษาระดับน้ำตาลในเลือด ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ รักษาอาการฟันผุ ต้านการเกิดเนื้องอก ยังพบอีกว่ามีผลต่อกระบวนการเมแทบอไลต์ของกลูโคสและการทำงานของไต มีการรายงานว่าสตีวิออล ไอโซสตีวิออล ไดไฮโดรไอโซสตีวิออล และไอโซสตีวิออลออกซีม ซึ่งเป็นแอนาลอกของสตีวิโอไซด์ช่วยลดการสูญเสียคลอไรด์ไอออนที่อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตเนื่องจากการสูญเสียน้ำในผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วง (diarrhea) (Chatsudthipong et al. 2008) และยังมีฤทธิ์ในการเร่งการเจริญเติบโตของพืชด้วย (Hershenhorn et al. 1997)

จากประโยชน์ดังกล่าวของสารในกลุ่มนี้ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์และแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 โดยอาศัยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 เพื่อให้ได้สารเมแทบอไลท์ที่หลากหลายและอาจเกิดได้ยากโดยปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งจะเป็นแนวทางในการนำไปศึกษาแอนาลอกของสารที่ได้และฤทธิ์ทางชีวภาพในโอกาสต่อไป

1.2 **วัตถุประสงค์ของการวิจัย** (Objectives)

1. เพื่อทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์และแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 โดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus megaterium* NRRL B-938
2. เพื่อหาสูตรโครงสร้างสารเมแทบอไลท์ที่ได้ถูกปรับเปลี่ยนโดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* NRRL B-938

1.3 **ขอบเขตของการวิจัย** (Scope of the Research)

ทำการสังเคราะห์สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์และแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 แล้วนำมาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus megaterium* NRRL B-938 และหาสูตรโครงสร้างสารเมแทบอไลท์ที่ได้

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ (Definition of Terms)

กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (Biotransformation) คือ การปรับเปลี่ยนสารโดยกระบวนการทางชีวภาพจากสารหนึ่งไปสู่อีกสารหนึ่งโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ เป็นต้น

แอนาลอกของสตีวิโอไซด์ (Stevioside analogues) คือ สารที่มีโครงสร้างหลักเหมือนหรือคล้ายคลึงกับอะไกลโคน (aglycone) ของสตีวิโอไซด์ (stevioside) แต่มีส่วนของหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกัน

ไอโซสตีวิออล (Isosteviol) คือ สารประกอบไดเทอร์ปีนที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยกรดของสารสตีวิโอไซด์

ไดไฮโดรไอโซสตีวิออล (Dihydroisosteviol) คือ สารประกอบไดเทอร์ปีนที่ได้จากปฏิกิริยารีดักชันของสารไอโซสตีวิออล

จุลินทรีย์ (Microorganism) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น จำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ในการมองเห็น เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์

เมแทบอไลท์ (Metabolite) คือ สารที่เป็นผลผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิสมภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

1.5 สมมติฐานของการวิจัย (Hypothesis)

สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์และแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 ที่สังเคราะห์ได้สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นโดย *Bacillus megaterium* NRRL B-938

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected Benefits)

1. ทราบวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีของสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์และแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19

2. ทราบวิธีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์และแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 โดยกระบวนการทางชีวภาพ

3. ได้ความรู้พื้นฐานที่จะนำสารที่ได้จากการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยกระบวนการทางชีวภาพไปสังเคราะห์แอนาลอกเพิ่มเติมและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เพื่อหาความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในโอกาสต่อไป