บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับสารฟีนาซีนมาเป็นเวลามากกว่า 60 ปีแล้ว แต่มีรายงานเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่สามารถอธิบายเกี่ยวกับคุณสมบัติและประโยชน์ของสารฟีนาซีนได้ (Watson et al., 1986; Laursen and Nielsen, 2004) ในปี 1890 Gessard ได้ศึกษาสมบัติของสารฟีนาซีนเป็นครั้งแรก จากนั้นในปี 1929 Wred และ Stack ได้ศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง และสมบัติทางเคมีของสารฟีนาซีน (Ohfuji et al., 2004) และได้มีการศึกษาเรื่อยมา จนในปัจจุบันสารฟีนาซีนและอนุพันธ์ของสารฟีนาซีนกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสารฟีนาซีนมีสมบัติที่สำคัญ ได้แก่ เป็นสารปฏิชีวนะ สารต้านเชื้อแบคทีเรีย สารต้านมะเร็ง สารต้านปรสิต และสามารถเกิดการรีดอกซ์ได้ง่าย เป็นต้น (Laursen and Nielsen, 2004) จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงสามารถนำมาประยุกต์เพื่อใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง เช่น ด้านการเกษตร พบว่าสามารถใช้สารฟีนาซีนในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในพืช หรือด้านการแพทย์สามารถใช้สารฟีนาซีนบางชนิดในการเป็นยาต้านมะเร็งได้ (Lee et al., 2004)

สารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีน เป็นสารประกอบเฮเทอโรไซคลิกที่มีไนโตรเจนอะตอมอยู่ในโมเลกุล (Pierson III and Pierson, 1996) นอกจากนั้นยังเป็นสารประเภทรีดอกซ์ไซคลิก ที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้อย่างอัตโนมัติ และมีลักษณะพิเศษที่สามารถเกิดการถ่ายโอนประจุได้ดี เนื่องจากในโครงสร้างหลักของฟีนาซีนนั้นมีไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว จึงพบว่า สารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนนั้น มีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ สารต้านมาเลเรีย สารต้านเนื้องอก และสารต้านปรสิต เป็นต้น (Laursen and Nielsen, 2004) สารฟีนาซีนได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Pseudomonas, Streptomyces, Nocardia, Sorangium, Brevibacterium, Pelasiobacter* และ *Burkholderia* เป็นต้น (Turner and Messenger, 1986) และพบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถผลิตสารฟีนาซีนได้มากกว่า 3 อนุพันธ์ เช่น Pyocyanin (PYO), Phenazine-1-carboxylic acid (PCA), 1-hydroxyphenazine (1-OH-Ohz) และ Phenazine-1-carboxamide (PCN) เป็นต้น (Brisbane et al., 1987) ซึ่งชนิดของสารฟีนาซีนแตกต่างกัน เนื่องจากการแทนที่ด้วยหมู่แทนที่ซึ่งแตกต่างกันบนโครงสร้างหลักของฟีนาซีน การที่หมู่แทนที่แตกต่างกัน ทำให้ได้อนุพันธ์ของสารฟีนาซีนหลายชนิดที่มีสมบัติแตกต่างกันออกไป รวมถึงสมบัติในทางปฏิชีวนะ และการนำไปประยุกต์ใช้ที่แตกต่างกันด้วย (Mavrodi et al., 2001)

ในส่วนของงานวิจัยนี้ได้ศึกษา Pyocyanin ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ฟีนาซีนชนิดหนึ่งที่มีสีน้ำเงินมีประโยชน์และความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต ทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอตเซลล์โดยทำหน้าที่เคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในเมมเบรนของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของสิ่งมีชีวิตและพืชสีเขียว โดยทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการ Phosphorylation มีสมบัติเป็นสารต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย สารต้านปฏิชีวนะ ซึ่งมีประโยชน์ในด้านเภสัชกรรม อีกทั้ง Pyocyanin ยังเป็นสารตัวอย่างที่น่าสนใจในการศึกษาทางด้านสเปกโทรสโกปี (Ohfuji et al., 2004) นอกจากนั้นสารอีกชนิดหนึ่งที่ศึกษา คือ 1-hydroxyphenazine มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะที่สำคัญ ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิด *Candida albicans* และ *Aspergillus fumigatus* ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรค pulmonary candidiasis ในคน (Kerr et al., 1999)

การศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* เลี้ยงในอาหารเหลว KA โดยมีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งสารฟีนาซีนเกิดจากการที่เซลล์แบคทีเรียหยุดแบ่งตัวและมีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้า ๆ เมื่อแบคทีเรียผลิตสารฟีนาซีนออกมาแล้ว ทำการตกตะกอนโปรตีนโดยการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปให้มากเกินพอซึ่งจะเป็นการตกตะกอนเอนไซม์อื่นออกไปด้วยจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) เพื่อแยกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์อื่นๆออกไป หลังจากนั้นแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลว เรียกว่า "ซูเปอร์นาแทนต์ฟีนาซีน" ไปผ่านคอลัมน์แก้วที่บรรจุวัสดุดูดซับ Amberlite XAD-16 resin ซึ่งกลไกการแยกเป็นการสกัดแบบเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction) สารฟีนาซีนจะถูกดูดซับไว้บนเรซิน หลังจากนั้นจะถูกชะออกมาด้วย 70% อะซิโทไนไทรล์ในน้ำปราศจากไอออน แล้วนำสารละลายที่ได้ไปลดปริมาตรด้วยการกลั่นแบบลดความดัน สารที่ได้ เรียกว่า "ครูดฟีนาซีน" และนำครูดฟีนาซีนไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารฟีนาซีนอย่างคร่าวๆ โดยใช้เทคนิค TLC เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ได้ใช้เทคนิคการแยกของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) หรือเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) โดยในงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นในการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ปริมาณการผลิตฟีนาซีนสูงสุด ตลอดจนการพัฒนากระบวนการในการแยกและการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีน เพื่อให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด และเกิดประโยชน์สูงสุดในการศึกษาเกี่ยวกับสารฟีนาซีน

แม้ปัจจุบันจะทราบโครงสร้างทางเคมีของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนจำนวนมากแล้วก็ตาม แต่ก็จำเป็นต้องศึกษาหาลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนที่บริสุทธิ์ เนื่องจาก *Pseudomonas* spp. ในแต่ละสายพันธุ์ที่สนใจ ซึ่งสามารถผลิตสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนออกมาที่แตกต่างกัน ภายใต้สภาวะนั้นๆ การเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. นั้น สามารถผลิตสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนได้ดีที่สุดในสภาวะใด จากงานวิจัยโครงการอื่นๆ และเนื่องจากการศึกษาหาลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีน รวมทั้งสมบัติทางกายภาพและเคมี จำเป็นต้องใช้สารตัวอย่างจำนวนมากพอสมควร ประมาณหลายกรัม ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเพิ่มปริมาณของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีน ด้วยการขยายการผลิตให้มากขึ้น ซึ่งการแยกสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนออกจากสารละลายซุเปอร์นาแทนต์ได้นั้น ส่วนใหญ่อาศัยเทคนิคการแยกสกัดแบบของเหลว-ของเหลว (Liquid-liquid Extraction) ซึ่งมีนักวิจัยกลุ่มอื่น ๆ ได้ดำเนินการศึกษามาแล้ว การศึกษางานวิจัยของโครงการนี้ ทำให้ทราบสมบัติทางกายภาพและทางเคมี เช่น การละลาย จุดหลอมเหลว ลักษณะของสเปกตรา น้ำหนักโมเลกุล หมู่ฟังชันภายใน พันธะที่เกิดขึ้น เป็นต้น รวมทั้งข้อมูลที่ได้นี้ และจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์ในการใช้เครื่องมือและวิเคราะห์ผลเป็นอย่างมาก เพื่อให้ได้ลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่แท้จริง ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านอื่นๆ โดยที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พร้อมทั้งบุคลกรและเครื่องมือที่ใหม่ ทันสมัย อย่างเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer และ เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometer เป็นต้น

ตัวอย่างของสารฟีนาซีนและอนุพันธ์ของสารฟีนาซีนที่สามารถยับยั้งเชื้อราต่างๆ ได้ เช่น สาร Phenazine-1-carboxylic acid (PCA) ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* และ *P. aureofaciens* สามารถยับยั้งเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ในข้าวสาลีได้ (Pierson III and Pierson, 1996) ส่วนสาร Phenazine-1-carboxamide (PCN) ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *P. chlororaphis* สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* ในมะเขือเทศได้ (Bolwerk et al., 2003) รวมทั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่ผลิตสาร Pyocyanin นั้น สามารถยับยั้งเชื้อรา *Septoria tritici* ในข้าวสาลีได้ด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะพยายามนำเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. เช่น *P. aeruginosa, P. fluorescencs* เป็นต้น มาผลิตสารฟีนาซีนและอนุพันธ์ของสารฟีนาซีน แล้วนำมาทดสอบเพื่อใช้เป็นสารยับยั้งหรือควบคุมเชื้อต่าง ๆ ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในด้านเกษตรกรรม และการแพทย์

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อทราบถึงกระบวนการเลี้ยงเชื้อและการสกัดสารฟีนาซีนซึ่งผลิตจากเชื้อ *P. aeruginosa* เพื่อนำไปศึกษาต่อไป
2. เพื่อเพิ่มปริมาณของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนให้ได้ปริมาณมาก จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ด้วยสภาวะที่เหมาะสม

3. เพื่อศึกษาวิธีการแยกและการทำบริสุทธิ์ของสารฟีนาซีนที่ผลิตได้

4. เพื่อพัฒนาวิธีการแยกและทำสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนให้บริสุทธิ์ โดยการใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

5. เพื่อศึกษาหาวิธีการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ตลอดจนการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

6. เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนที่ได้ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) และ เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

7. เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาทางด้านเคมีวิเคราะห์ ตลอดจนเป็นแนวทางการวิจัยประยุกต์ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1. ผลิตสารฟีนาซีนจากเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ รวมทั้งเพิ่มปริมาณของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนให้ได้ปริมาณมาก

2. สรุปผลการทดลองหาปริมาณของสารฟีนาซีนที่ผลิตได้ ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร KA 1 ลิตรว่าได้ครูดฟีนาซีนปริมาณเท่าใด และครูดฟีนาซีน 1 กรัมเมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์ แล้วให้สารฟีนาซีนบริสุทธิ์ปริมาณเท่าใด

3. ทำการแยกและทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ด้วยกระบวนการทางโครมาโทกราฟี เช่น เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ และเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง

4. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนที่ได้ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) และ เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตสารฟีนาซีนรวมทั้งเพิ่มปริมาณของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนให้ได้มาก จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ที่มีความบริสุทธิ์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

2. ทำให้ทราบถึงกระบวนการในการแยกและการทำบริสุทธิ์สารฟีนาซีนจากเชื้อแบคทีเรีย *P.* aeruginosa

3. ทำให้ทราบถึงหลักการและวิธีการทางโครมาโทกราฟี เช่น เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบ

แผ่นบาง เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง และเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ

4. ทราบวิธีการแยกและทำสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนให้บริสุทธิ์ โดยตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารฟีนาซีนและสารอนุพันธ์ของฟีนาซีนที่ได้ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC โดยการใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งสมัยใหม่ ประหยัดสารเคมี ลดต้นทุน ลดมลภาวะที่อาจเกิดขึ้น และสะดวกรวดเร็วในการวิเคราะห์