บทที่ 1

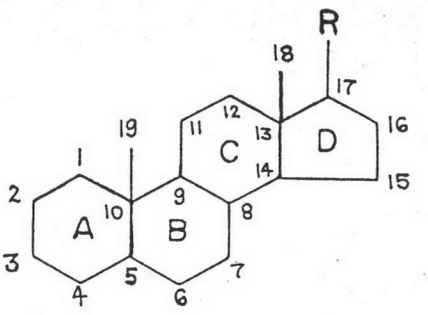
บทนำ

1. ประวัติความเป็นมา

ในปัจจุบันการใช้สารประกอบสเตียรอยด์ในทางการแพทย์เป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายและมีความต้องการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ สารประกอบสเตียรอยด์ที่ใช้กันมาก ได้แก่ คอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid) และฮอร์โมนเพศ คอร์ติโคสเตียรอยด์ ได้แก่ คอร์ติโซน (cortisone) และไฮโดรคอร์ติโซน (hydrocortisone) ซึ่งมีประโยชน์ในการใช้เป็นยารักษาอาการแพ้ต่อสารต่างๆและยังใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับไขข้ออักเสบและโรคหืด ฮอร์โมนเพศ ได้แก่ ฮอร์โมนเพศชาย คือ เทสทอสเทอโรน (testosterone) ใช้ในผู้ป่วยที่ขาดฮอร์โมนนี้ ฮอร์โมนเพศหญิง คือ อีสตราไดออล (estradiol) อีสโตรน (estrone) และโปรเจสเตอโรน (progesterone) ใช้ทดแทนการขาดฮอร์โมน และประโยชน์ที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ ใช้เป็นยาคุมกำเนิดซึ่งปัจจุบันมีความต้องการสูงในการแก้ปัญหาประชากรที่มีเพิ่มมากขึ้น (Crueger, 1984)

ฮอร์โมนสเตียรอยด์จากธรรมชาติได้จากสัตว์ซึ่งสังเคราะห์โดยเริ่มจากอะซีเตท (acetate) ผ่านกระบวนการมีวาโลเนท (mevalonate) จนได้คอเลสเตียรอล (cholesterol) และถูกเปลี่ยนต่อไปให้ฮอร์โมนสเตียรอยด์ในที่สุด การที่จะได้มาซึ่งฮอร์โมนสเตียรอยด์โดยวิธีสกัดจากเนื้อเยื่อของสัตว์ ตัวอย่างเช่น อีสโตรน โปรเจสเตอโรน และเทสทอสเทอโรน สกัดได้จากปัสสาวะของม้า รังไข่ของหมู และอัณฑะของวัวตามลำดับนั้น (Murray, 1976) จะต้องใช้วัตถุดิบปริมาณมากจึงทำให้ต้นทุนในการผลิตฮอร์โมนสเตียรอยด์สูงมาก อีกทั้งยังมีปัญหาสำคัญอีกประการหนึ่ง คือ ความจำกัดของวัตถุดิบ ดังนั้นจึงมีผู้คิดค้นนำวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีเลียนแบบธรรมชาติขึ้น แต่ก็ยังเป็นการลงทุนที่สูงอยู่ เพราะต้องผ่านกระบวนการสังเคราะห์หลายขั้นตอน (Nagasawa และคณะ, 1969) ได้มีรายงานถึงการสังเคราะห์จากสารตั้งต้นที่ได้จากพืชหรือสัตว์ เรียกว่าสารตั้งต้นสเตียรอยด์ (steroid precursor) (Fieser,L. และ Fieser,M., 1959) ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกับสเตียรอยด์ดังแสดง

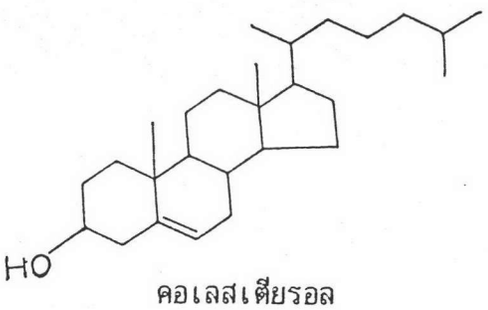
ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างพื้นฐานหรือส่วนที่เป็นนิวเคลียสของสเตียรอยด์

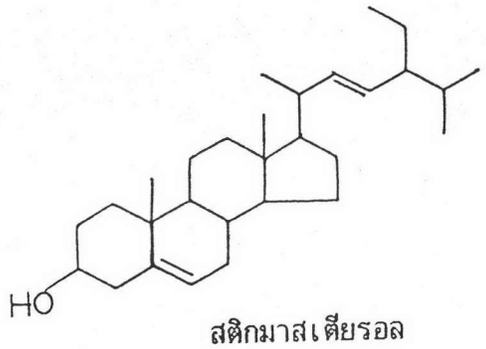
สารตั้งต้นสเตียรอยด์เหล่านี้ ได้แก่ ไดออสจินิน (diosgenin) คอเลสเตียรอล สติกมาสเตียรอล (stigmasterol) ซิโตสเตียรอล (sitosterol) เออโกสเตียรอล (ergosterol) และกรดน้ำดี เป็นต้น ดังแสดงสูตรโครงสร้างในรูปที่ 2 ทำให้ลดขั้นตอนการสังเคราะห์ทางเคมี และต้นทุนในการผลิตสารสเตียรอยด์ซึ่งวิธีการนี้จัดเป็นวิธีการกึ่งสังเคราะห์ (Peterson, 1968 ; Murray, 1976)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



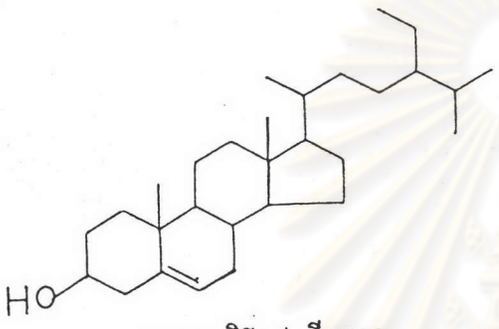
คอเลสเตียรอล

(cholesterol)



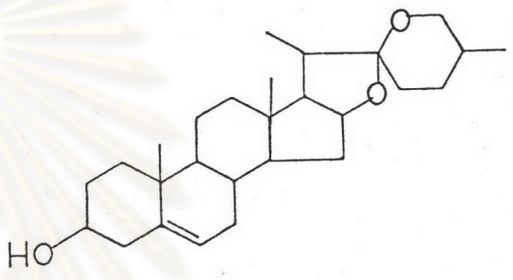
สติกมาสเตียรอล

(stigmasterol)



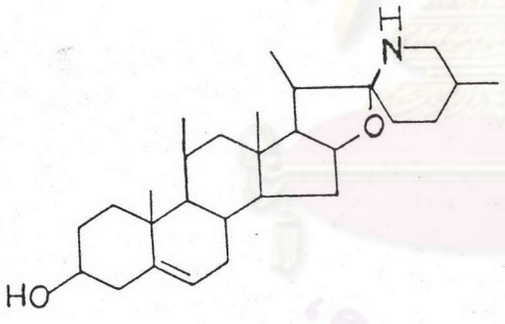
เบตา-ซิโตสเตียรอล

(β-sitosterol)



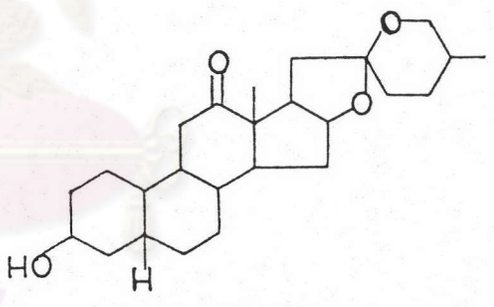
ไดออสจินิน

(diosgenin)



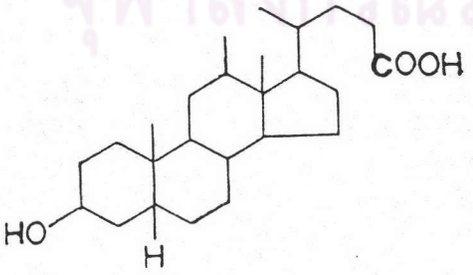
โซลาซาดีน

(solasadine)



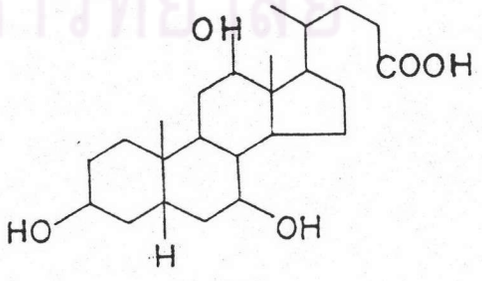
ฮีโคจินิน

(hecogenin)



กรดดีออกซีโคลิก

(deoxycholic acid)



กรดโคลิก

(cholic acid)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 สารตั้งต้นสเตียรอยด์

สเตียรอยด์เป็นสารประกอบที่เป็นของแข็งมีสูตรโครงสร้างประกอบด้วย Cyclopentanoperhydrophenanthrene หรือ steroid nucleus (Capek, 1966) ดังแสดงในรูปที่ 1 สารประกอบสเตียรอยด์ที่พบมาก ได้แก่ สเตียรอล (sterol) กรดน้ำดี แซบโปจินิน (sapogenin) ฮอร์โมนเพศและแอดรีนอลคอร์เทกฮอร์โมน (adrenalcortex hormones) สารประกอบทั้งหมดนี้มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานที่เหมือนกันคือมีคาร์บอน 17 อะตอมรวมตัวกันเป็นวงแหวนเชื่อมกัน 4 วง คือ A B C และ D สารประกอบเหล่านี้จะต่างกันที่หมู่ข้างเคียง (side chain group) ที่มาเชื่อมโครงสร้างพื้นฐาน

2. สารตั้งต้นสเตียรอยด์

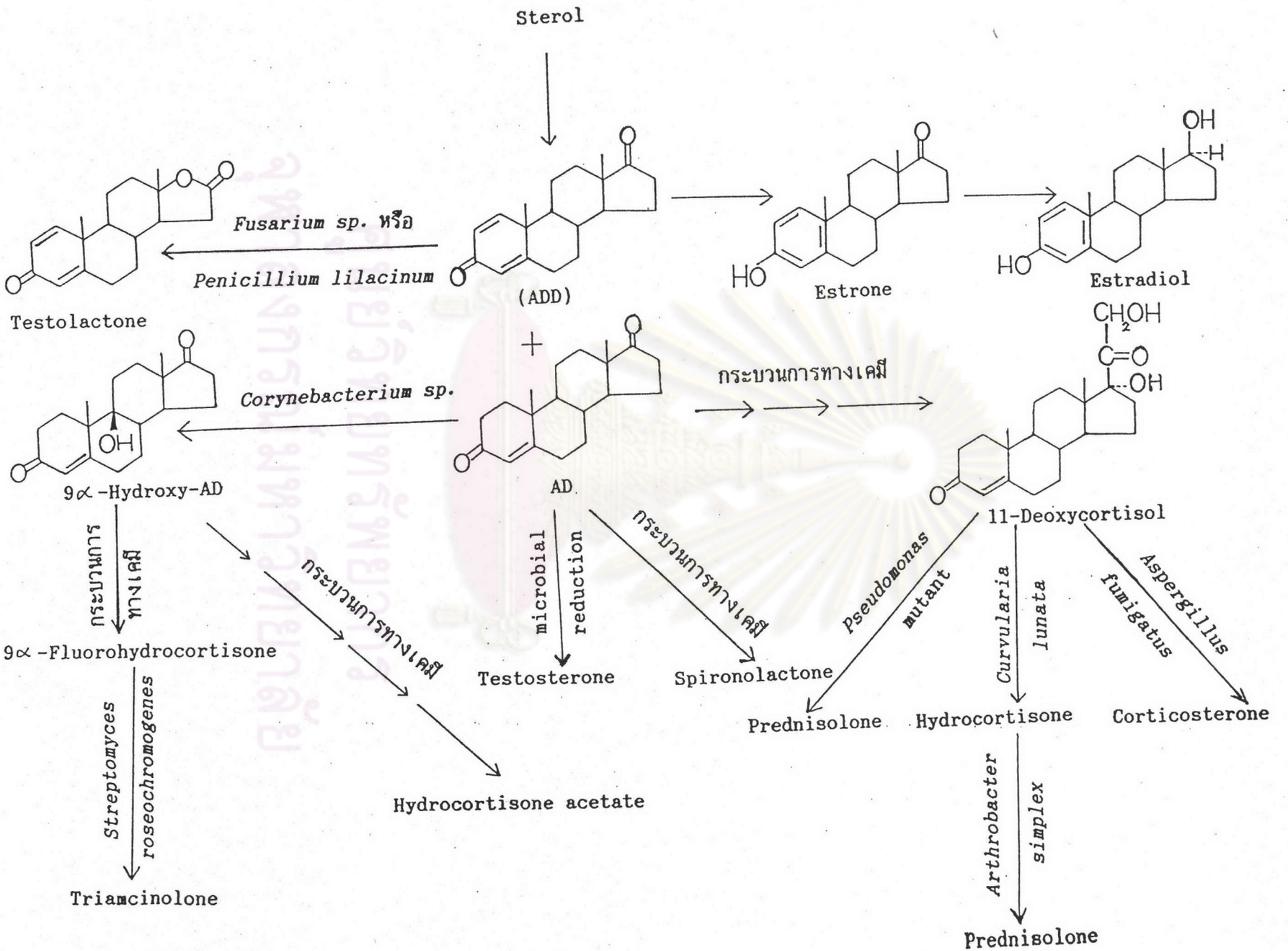
ไดออสจินินเป็นสารตั้งต้นธรรมชาติที่สำคัญของสเตียรอยด์ที่ใช้มาเป็นเวลานานโดยสามารถแยกได้จากเหง้าของพืชในสกุล Dioscoreaceae ซึ่งพบในพื้นที่เขตร้อนชื้น เช่น เม็กซิโก จีน อินเดีย กัวเตมาลา (Bammi และ Randhawa, 1972) แต่ปัจจุบันพบว่าเริ่มมีการขาดแคลนวัตถุดิบทำให้ราคาของไดออสจินินสูงขึ้นมาก (Miller, 1972) ดังนั้นจึงได้มีการค้นหาแหล่งสารตั้งต้นสเตียรอยด์อื่นๆโดยพบว่าสเตียรอลเป็นแหล่งที่ได้รับความสนใจสูง เพราะเป็นสารที่พบมากในธรรมชาติทั้งในพืชและสัตว์ สเตียรอลทุกชนิดจะมีสูตรโครงสร้างหลักเหมือนกันโดยมี หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่ตำแหน่ง C-3 และพันธะคู่ระหว่างตำแหน่ง C-5 และ C-6 แต่จะแตกต่างกันที่หมู่ข้างเคียงที่ตำแหน่ง C-17 สเตียรอลที่ใช้เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์สเตียรอยด์ที่สำคัญ คือ คอเลสเตียรอลได้มาจากไขมันของสัตว์ สติกมาสเตียรอลและซิโตสเตียรอลจะพบมากในพืชทั่วไป โดยสติกมาสเตียรอลสามารถสกัดได้จากเมล็ดฝ้าย (Wallis และ Chakravati, 1937-1938) เมล็ดถั่วเหลือง (Lehman และ Embree, 1951) ส่วนซิโตสเตียรอลเริ่มมีความสำคัญ เนื่องจากสามารถเปลี่ยนได้ง่ายโดยจุลินทรีย์ไปเป็น 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน (4-androstene-3,17-dione, AD) และ 1,4-แอนโดรสแตดไดอีน-3,17-ไดโอน (1,4-androstadiene-3,17-dione, ADD) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์สเตียรอยด์ (Conner และคณะ, 1976) ซิโตสเตียรอลผลิตได้จากน้ำมันเมล็ดฝ้าย (Wallis และ Chakravati, 1937-1938) ยีผึ้งที่ได้จากอ้อย (Mhaskar และ Kulkarni, 1956 ; Srivastana และคณะ, 1985)

และจากทอลออย (tall oil) ซึ่งเป็นผลพลอยได้ของอุตสาหกรรมกระดาษ (Hillis, 1967; Conner และคณะ, 1976) และเออโกสเตียรอลได้จากยีสต์ที่ชื่อ *Saccharomyces cerevisiae* (Fiesher, 1959 ; Kreslich, 1980) สำหรับการสังเคราะห์สเตียรอยด์จากสเตียรอลจะต้องผ่านขั้นตอนการตัดหมู่ข้างเคียงของสเตียรอยด์ออกก่อนเพื่อให้ได้สารประกอบตัวกลาง (intermediate) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสเตียรอยด์อื่นๆที่สำคัญ คือ 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน และ 1,4-แอนโดรสแตดไดอีน-3,17-ไดโอน ซึ่งเป็นสารประกอบ 17-คีโตสเตียรอยด์ (17-ketosteroid) การสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ที่สำคัญต่างๆจากสารตั้งต้นเหล่านี้ได้แสดงในรูปที่ 3 คือ AD สามารถเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เทสทอสเทอโรน(testosterone) โดยยีสต์ (Kieslish, 1980 ; Miller, 1980 ;Miesher และ Fischer, 1941) หรือถูกเปลี่ยนโดย *Corynebacterium sp.* ไปเป็น 9-แอลฟา-ไฮดรอกซี-4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน (9α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione) (Sonomoto และคณะ, 1983) หรือใช้กระบวนการทางเคมีได้สไปโรโนแลคโตน (spironolactone)(Miller, 1980) และ 11-ดีออกซีคอร์ติซอล (11-Deoxycortisol) (Miller, 1980) ซึ่งจาก 9-แอลฟาไฮดรอกซี-4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอนสามารถเปลี่ยนได้ไฮโดรคอร์ติโซนอะซีเตท (Hydrocortisone acetate) (Kans และคณะ, 1979) หรือ 9 แอลฟา-ฟลูออโรไฮโดรคอร์ติโซน (9 α - Fluorohydrocortisone) โดยกระบวนการทางเคมี (Martin, 1984) แล้วเปลี่ยนต่อโดย *Streptomyces roseochromogenes* ได้เป็นไตรแอมซิโนโลน (Triamcinolone) (Thoma และคณะ, 1957) นอกจากนี้จาก 11- ดีออกซีคอร์ติซอล สามารถเปลี่ยนโดย *Pseudomonas* mutant ไปเป็นเพรดนิโซโลน (Prednisolone) (Takeda และคณะ, 1959) หรือโดย *Aspergillus fumigatus* ไปเป็นคอร์ติโคสเตียโรน (corticosterone) (Hzuka และ Naito, 1967) หรือโดย *Curvularia lunata* ไปเป็นไฮโดรคอร์ติโซน (Mann และคณะ, 1955 ; O'Connell และคณะ, 1955) ซึ่งจะเปลี่ยนต่อโดย *Arthrobacter simplex* ได้เป็นเพรดนิโซโลน (Sih และ Bennet, 1962; Thoma และคณะ, 1957; Koepsell, 1962)

สำหรับ 1,4-แอนโดรสแตดไดอีน -3,17-ไดโอน สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมนเพศ เช่น อีสโตรนและอีสตราไดออลโดยวิธีทางเคมี (Kick, 1983)

หรือเปลี่ยนเป็นเทสโทแลคโตน (testolactone) โดย *Fusarium sp.* หรือ *Penicillium lilacinum* (Martin, 1984)

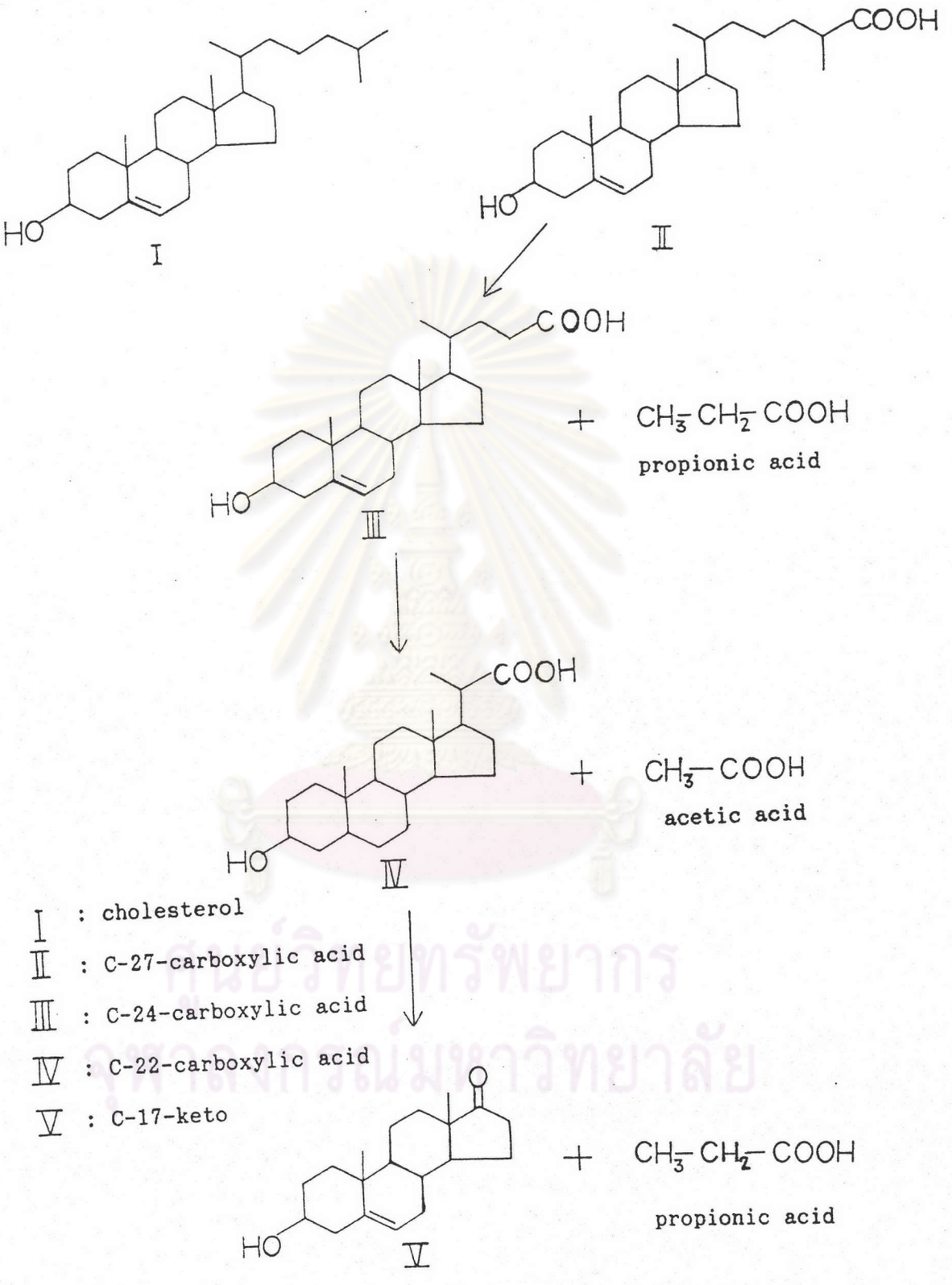
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 แผนผังแสดงการผลิตสารประกอบสเตียรอยด์จากสเตียรอล

มีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสเตียรอลได้อย่างสมบูรณ์ให้ได้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยใช้สเตียรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ *Arthobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia* และ *Streptomyces* (Martin, 1984; Marsheck และคณะ, 1972; Arima และคณะ, 1969) ต่อมา Sih และคณะ (1968) ได้ศึกษากระบวนการตัดหมู่ข้างเคียงที่ C-17 ของสเตียรอลโดยไม่สลายสเตียรอยด์นิวเคลียสด้วยจุลินทรีย์ได้ 17 - คีโตสเตียรอยด์ คือ AD, ADD ดังรูปที่ 4 โดยจุลินทรีย์จะตัดหมู่ข้างเคียงของคอเลสเตียรอลโดยกลไกเหมือนกับการเกิดเบตา-ออกซิเดชั่น (β -oxidation) ของกรดไขมัน (fatty acid) จากการเกิดคาร์บอน-27-ไฮดรอกซิเลชัน (C-27-hydroxylation) ต่อด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันจะได้กรดคาร์บอน-27-คาร์บอกซิลิค (II)ขั้นต่อไปกรดโพรพิโอนิคจะถูกดึงออกจากสารประกอบ II ได้เป็นกรดคาร์บอน-24-คาร์บอกซิลิค (III) กับกรดโพรพิโอนิค และขั้นต่อไปกรดอะซิติคจะถูกดึงออกจากสารประกอบ III ได้เป็นกรดคาร์บอน-22-คาร์บอกซิลิค (IV) กับกรดอะซิติค สุดท้ายกรดโพรพิโอนิคจะถูกดึงออกมาจากสารประกอบ IV ได้เป็นสารประกอบคาร์บอน-17-คีโต (V) กับกรดโพรพิโอนิค (Martin, 1984)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 การตัดหมู่ข้างเคียงของคอเลสเตียรอลโดยจุลินทรีย์

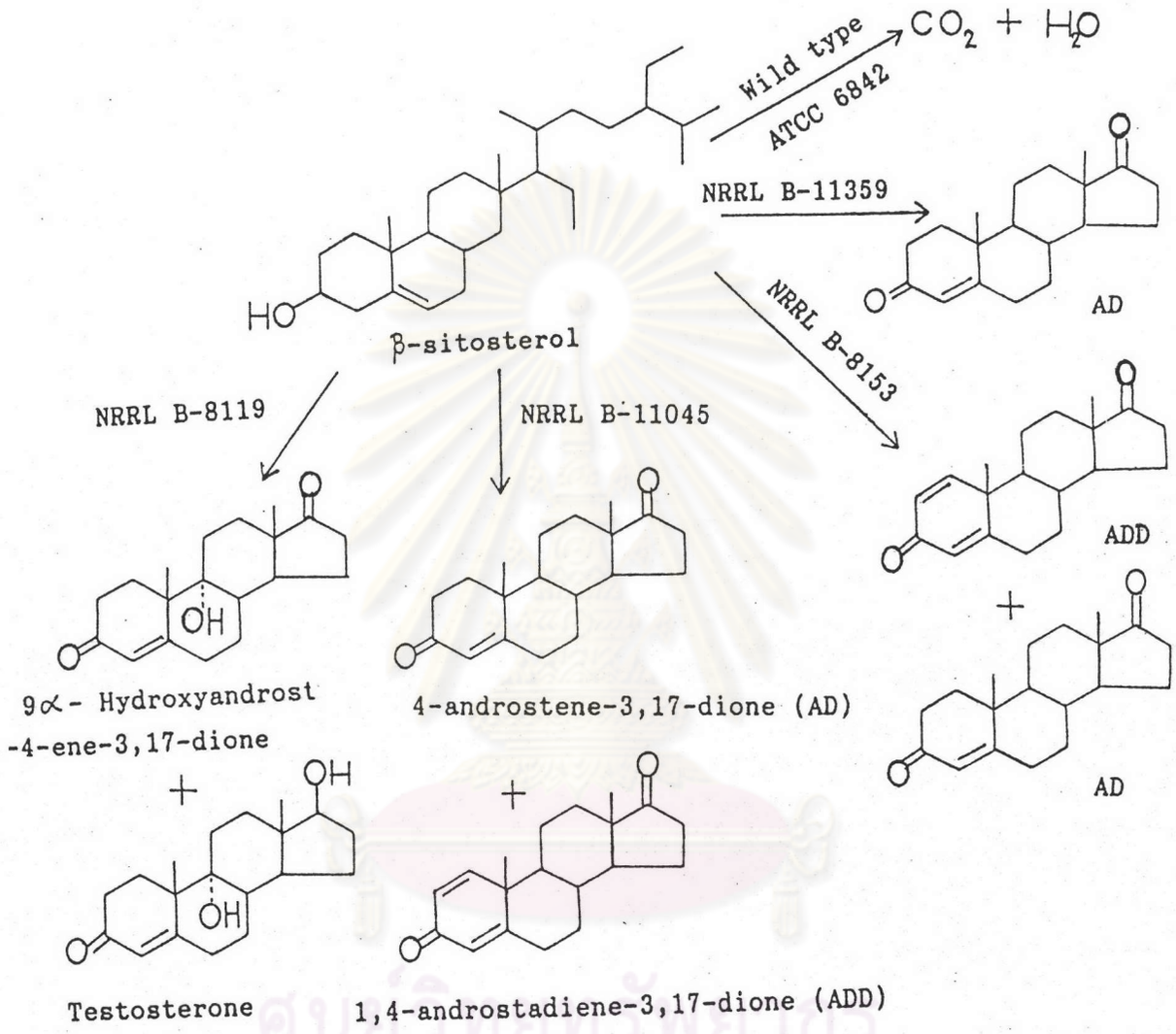
นอกจากนั้นยังมีผู้รายงานว่าในการที่จะให้จุลินทรีย์บางชนิดตัดเฉพาะหมู่ข้างเคียงของสเตียรอลให้ได้ AD และ ADD และสะสมสารดังกล่าวไว้โดยไม่สลายต่อไป จะต้องใช้สารยับยั้งเอนไซม์ เช่น 8-ไฮดรอกซีควิโนลีน (8-hydroxyquinoline) (Nagasawa และคณะ, 1969; Whitmarsh, 1964) แอลฟา-ไดไพริดิล (α,α'-dipyridyl) และอาร์เซนิค แอซิด (arsenic acid) เป็นต้น (Martin และ Wagner, 1976; Nagasawa และคณะ, 1969) หรืออาจเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสเตียรอลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ เช่น ในปี 1980 Boehme และ Hoerhold (1980) รายงานว่าเมื่อใช้สเตียรอลที่เปลี่ยนให้อยู่ในรูปสเตียรอล-3-ออกซีม (sterol-3-oxime) *Mycobacterium sp.* จะไม่สามารถย่อยสเตียรอยด์นิวเคลียสได้อย่างสมบูรณ์แต่จะตัดเฉพาะหมู่ข้างเคียงของสารประกอบสเตียรอลนี้ให้ได้ AD และพบว่าการกลายพันธุ์จุลินทรีย์ก็สามารถทำให้ได้จุลินทรีย์ที่สามารถตัดเฉพาะหมู่ข้างเคียงของสเตอรอลได้โดยไม่ย่อยสลายสเตียรอยด์นิวเคลียส ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับสารที่จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้ ได้แก่ แสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet) และไนโตรโซกัวนิดีน (nitrosoguanidine) เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ผ่าเหล่าที่ตัดเฉพาะหมู่ข้างเคียงของสเตียรอล (Martin, 1984)

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่	บริษัท
Mycobacterium sp. NRRL B-3683	1, 4-Androstadiene-3, 17-dione (ADD)	Searle
Mycobacterium fortuitum NRRL B-8153	ADD	Upjohn
M. vaccae FERM P-4739, 4740, 4753	ADD	Mitsubishi
M. diernhoferi FERM P-4927, 4928	ADD	Mitsubishi
Arthrobacter simplex FERM P-4261	ADD	Mitsubishi
Brevibacterium lipolyticum FERM P-4474	ADD	Mitsubishi
Mycobacterium sp. NRRL B-3805	4-Androstene-3, 17-dione (AD)	Searle
M. fortuitum NRRL B-11359, 11045	AD	Upjohn
M. parafortuitum MCI 0807	AD	Mitsubishi

Wovcha และคณะ (1978) ได้รายงานถึงการนำสายพันธุ์ผ่าเหล่าของ *Mycobacterium fortuitum* ATTC 6842 ที่สามารถเปลี่ยนเบตา-ซิโตสเตียรอลไปเป็นสเตียรอยด์ต่าง ๆ รวมทั้ง 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน และ 1,4-แอนโดรสแตดไดอีน-3,17-ไดโอน ซึ่งเป็นสารประกอบตัวกลาง (intermediate) ที่สำคัญในการผลิตยาสเตียรอยด์ ดังแสดงในรูปที่ 5



<u>รูปที่ 5</u> การเปลี่ยนเบตา-ซิโตสเตียรอลไปเป็นสเตียรอยด์โดยจุลินทรีย์ผ่าเหล่าของ *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842

3. <u>สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารประกอบตัวกลาง 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน (AD) และ 1,4-แอนโดรสแตดไดอีน-3,17-ไดโอน (ADD) โดยจุลินทรีย์</u>

เอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบประเภทสเตียรอลเพื่อให้ได้ 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน (AD) และ 1,4-แอนโดรสแตดไดอีน-3,17-ไดโอน (ADD) ส่วนใหญ่พบว่าเป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยการชักนำ (inducible enzyme) การปรับสภาวะต่างๆในการเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ประเภทนี้ได้มากขึ้น (Ryu และคณะ, 1975; Martin และ Wagner; 1976) ปัจจัยต่างๆในการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการผลิต AD และ ADD ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

3.1 <u>องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

องค์ประกอบที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน ซึ่งมีรายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนสเตียรอลให้เป็น AD และADD ได้แก่ กลูโคส (glucose) (Martin และ Wagner, 1976) และกลีเซอรอล (glycerol) (Wovcha และคณะ, 1978) ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่รายงานไว้ ได้แก่ เปปโตน (peptone) (Wovcha และ Brooks, 1979) ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) (Arima และคณะ, 1969) คอร์นสตีพลิเคอร์ (corn steep liquor) (Nagasawa และคณะ, 1970) แป้งถั่วเหลือง (soy flour) (Wovcha และ Biggs, 1982) และเกลือแอมโมเนียม เช่น แอมโมเนียมไนเตรท (Arima และคณะ, 1969) ไดแอมโมเนียมซัลเฟต (Martin และ Wagner, 1976) สำหรับแหล่งเกลือแร่ที่มีรายงานไว้ได้แก่ โปแตสเซียม มักเนเซียม แคลเซียม โซเดียม และเหล็ก (Wovcha และ Biggs, 1986) การเลือกใช้ชนิดของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน เกลือแร่ รวมทั้งปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของจุลินทรีย์นั้น ๆ Martin(1984) รายงานว่าปัจจัยหนึ่งที่มีผลในการลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนสเตียรอลโดยจุลินทรีย์ คือ การเกาะกัน (aggregation) ของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหานี้ จึงมีการเติมสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ Tween ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Tween 20 ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร หรือ Tween 40 ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้

Mycobacterium sp. NRRL B-3683 ผลิต ADD ได้ 19% และ 46% ตามลำดับ (Marsheck และคณะ, 1972) สำหรับสารตั้งต้นสเตียรอยด์ที่ใช้ ได้แก่ สเตียรอลต่าง ๆ เช่น เบตา-ซิโตสเตียรอล สติกมาสเตียรอล คอเลสเตียรอล และ แคมเพสเตียรอล Wovcha และ Biggs (1982) เติมสเตียรอลชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วมกัน สำหรับความเข้มข้นของสเตียรอลที่นิยมเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ในช่วงความเข้มข้น 0.1 - 100 กรัมต่อลิตร (Wovcha และ Brooks, 1979) มีรายงานว่าคอเลสเตียรอลละลายน้ำได้มากที่สุด เท่ากับ 1.8 กรัมต่อลิตร (Martin, 1984) ดังนั้นเพื่อให้สเตียรอลกระจายได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นนั้น จึงละลายสเตียรอลในตัวทำละลายอินทรีย์ก่อนเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ได้แก่ เอทธานอล (ethanol) อะซิโตน (acetone) ไดเมทธิลฟอร์มามาด์ (dimethyl-formamide, DMF) ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) เอทธิลีนไกลคอล (ethylene glycol) (Miller 1980; Lee และคณะ, 1970 ; Watanabe และคณะ, 1986) ในการเติมสเตียรอลที่ความเข้มข้นสูงกว่าการละลายของมันในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้สเตียรอลตกตะกอน (precipitate) ในรูปเป็นอนุภาคเบาบางหรือเป็นผลึก นอกจากนั้นตัวทำละลายที่ใช้โดยปกติจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ได้มีรายงานถึงการแก้ปัญหาการไม่ละลายน้ำของสเตียรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ เช่น มากกว่า 2 กรัมต่อลิตร คือ การทำให้อยู่ในรูปอนุพันธ์สเตียรอยด์ที่ละลายน้ำได้ Kominek (1973) ได้รายงานการใช้สเตียรอยด์ 21-เฮมิซัคซิเนท (21-hemisuccinate)ซึ่งเป็นอนุพันธ์สเตียรอยด์ที่ละลายน้ำได้เป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์โดยจุลินทรีย์ พบว่าได้ผลิตผลสูงกว่าที่ใช้สารตั้งต้นในรูปเดิม และในการที่จะให้จุลินทรีย์บางชนิดตัดเฉพาะหมู่ข้างเคียงของสเตียรอลให้ได้ AD และ ADD และสะสมสารดังกล่าวไว้โดยไม่สลายต่อไป จะต้องใช้สารยับยั้งเอนไซม์ (Martin, 1977) ทั้งยังมีการใช้สารเคมีหลายชนิด ตัวอย่างเช่น น้ำมัน หรือ ตัวดูดซับ (adsorbent) (Schoemer และ Martin, 1980) ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าทำให้เพิ่มผลิตผลของ AD และ ADD

ตารางที่ 2 การย่อยสเตียรอลโดยจุลินทรีย์เมื่อใช้สารยับยั้งเอนไซม์ น้ำมัน และตัวดูดซับ (Martin, 1977; Schoemer และ Martin, 1980)

สารยับยั้งเอนไซม์	ผลิตภัณฑ์
สารคีเลตติ้ง (Chelating agent)	4-Androstene-3,17-dione (AD)
α,α'- Dipyridyl	1,4-androstadiene-3,17-dione (ADD)
1,10 - Phemanthroline	other androstane derivatives
8-Hydroxyquinoline	23,24-dinorcholanic acids
สารคีเลตติ้งและแอคทีพคาร์บอน	ADD
สารคีเลตติ้งและสไตรีน-ไดวินิล-เบนซีน-โคโพลิเมอร์	AD, ADD, 23,24-dinorcholanic acid
สารคีเลตติ้ง, ไขมัน, น้ำมัน และกลีเซอรายด์	ADD, 1-dehydrotestosterone
สารคีเลตติ้งและยาปฏิชีวนะ	ADD
อิออนอนินทรีย์ (Inorganic ions)	AD, ADD, other androstane derivative
สีรีดอกซ์ (Redox dyes)	ADD
แรมโนลิปิด (Rhamnolipids)	AD, ADD

สำหรับความเข้มข้นของตัวยับยั้งเอนไซม์ที่นิยมใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือในช่วง 0.1-1.0 มิลลิโมลาร์ (Martin, 1984) ตัวยับยั้งเอนไซม์ที่นิยมใช้คือ แอลฟาไดไพริดิล (α,α' - Dipyridyl) Martin และ Wagner (1976) รายงานว่าแอลฟาไดไพริดิลเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลให้ *Nocardia sp.* M 29 เปลี่ยนเบตา-ซิโตสเตียรอล ได้ AD และ ADD 22% ส่วนอิออนอนินทรีย์สาร (inorganic ions)หรือสีรีดอกซ์ ใช้กันน้อย (Martin, 1984) สิ่งสำคัญคือจะต้องปรับความเข้มข้นของตัวยับยั้งเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมเพื่อได้ผลผลิตสูง สำหรับตัวดูดซับจะมีความสามารถในการสะสม 17-คีโตสเตียรอยด์โดยเฉพาะ ส่วนสเตียรอลจะไม่ถูกดูดซับ

017443

เพราะฉะนั้นจะเป็นการป้องกันไม่ให้ 17-คีโตสเตียรอยด์ถูกย่อยอีกต่อไป ตัวอย่าง สไตรีน-ไดวินิลเบนซีน-โคโพลิเมอร์ แอดซอบแบนท์ (Styrene-divinylbenzene-copolymers adsorbents) คือ Amberlite XAD-2 ในการเติมตัวดูดซับนี้มีผลทำให้ ADD เพิ่มขึ้น 2-3 เท่า Martin และ Wagner (1976) รายงานว่า *Nocardia sp.* M 29 ให้ผลผลิต AD และ ADD สูงถึง 50% เมื่อมี Amberlite XAD-2 3 กรัมต่อลิตร แต่จะให้ AD และ ADD 22% เท่านั้น เมื่อไม่มีตัวดูดซับนี้ และพบว่าในการเติมน้ำมันหรือไขมันในปริมาณเล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับตัวยับยั้งเอนไซม์ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง หรือไข่แดง จะเพิ่มผลิตผล ADD จากสเตียรอล (Sauerbaum และคณะ, 1978)

3.2 <u>สภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ</u>

มีรายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียและActinomycetes เพื่อผลิต AD คือ 30° ซ. และความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 7.0 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของราและยีสต์เพื่อผลิต AD คือ 26.5° ซ. และความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 6.0 (Arima และคณะ, 1969) มีรายงานว่าโดยปกติอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต AD และ ADD อยู่ในช่วง 25-37° ซ.(Wovcha และคณะ, 1982) และอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 คือ ที่ 30° ซ. (Wovcha และ Brooks, 1979) Wovcha และ Brooks (1979) รายงานว่า ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องพอเหมาะด้วยอากาศที่ปลอดเชื้อและมีการกวน (agitation) ของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดเวลาเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีและทำให้การผลิต AD และ ADD มีประสิทธิภาพ สำหรับระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิต AD และ ADD มีรายงานว่าตั้งแต่ 72 ชม. ถึง 15 วันหรือมากกว่า (Wovcha และคณะ,1982) Arima และคณะ (1969) รายงานระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อรา แบคทีเรีย ยีสต์ และ Actinomycetes ในการผลิต AD คือ 7 วัน และ Martin และ Wagner (1976) พบว่า *Nocardia sp.* M 29 สามารถเปลี่ยนเบตา-ซิโตสเตียรอลให้เป็น AD และ ADD ได้ถึง 50 % โดยใช้เวลา 8 วัน

4. <u>การสกัดแยกและการทำให้ AD และ ADD บริสุทธิ์</u>

AD และ ADD ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีอยู่ในกลุ่มสเตียรอยด์และมีความสามารถ

ในการละลายน้ำต่ำ คือ น้อยกว่า 100 มก. ต่อลิตร แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (Miller,1980) Nagasawa และคณะ (1970) รายงานว่าใช้เอทธิลอะซีเตทเป็นตัวทำละลายในการสกัด ADD จากน้ำหมักโดยใช้อัตราส่วนปริมาตรน้ำหมักต่อเอทธิลอะซีเตท เท่ากับ 1 ต่อ 1 สกัดซ้ำ 3 ครั้ง ได้ผลิตผล ADD เท่ากับ 11.02 % และต่อมามีผู้รายงานถึงการใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันนี้ในการสกัดแยก ADD จากน้ำหมักแต่ใช้อัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 2 ได้ผลิตผล ADD เท่ากับ 54 % (Srivastava และคณะ, 1985) Marsheck และคณะ (1972) รายงานว่าใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลายในการสกัด AD และ ADD จากน้ำหมัก เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสม คือ จุดเดือดต่ำจึงระเหยได้ทันทีโดยไม่จำเป็นต้องให้ความร้อน โดยใช้อัตราส่วนปริมาตรน้ำหมัก ต่อ ไดคลอโรมีเทน เท่ากับ1ต่อ3 สกัดซ้ำ 2 ครั้ง ได้ผลิตผล ADD เท่ากับ 48 % (% เทียบกับสารตั้งต้นซิโตสเตียรอลที่ใช้ไป) นอกจากนี้ Wovcha และคณะ (1978) ก็ใช้ไดคลอโรมีเทนในการสกัดเช่นกันแต่ใช้อัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 4 ได้ผลิตผล 9 แอลฟา-ไฮดรอกซี-4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอนเท่ากับ 40 % Martin และWagner (1976) รายงานถึงการใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายในการสกัด แต่ก่อนสกัดจะปรับความเป็นกรดด่างในน้ำหมักให้เท่ากับ 1-2 ด้วยกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) หลังจากนั้นสกัด AD และ ADD จากน้ำหมักในอัตราส่วน ปริมาตรน้ำหมักต่อคลอโรฟอร์ม เท่ากับ 1 ต่อ 1 โดยสกัดซ้ำ 3 ครั้ง ได้ผลิตผล AD และ ADD เท่ากับ 22 % Murray (1976) พบว่าตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสมในการสกัด AD และ ADD ออกจากน้ำหมัก ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม อีเทอร์ และเบนซีน เพราะตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดมีความเป็นขั้ว (polarity) ต่ำ แต่ AD และ ADD จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง การทำ AD และADD ที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์นิยมใช้วิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Silica gel column chromatography) โดยมีระบบตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ต่างๆกันได้แก่ เอทธิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม (15:85 ปริมาตรต่อปริมาตร) (Wovcha และBrooks, 1979) เบนซีน-เอทธิลอะซีเตท (80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร) (Marsheck และคณะ, 1972) เอทธิลอะซีเตท-ไซโคลเฮกเซน (2:3 ปริมาตรต่อปริมาตร) (Wovcha และ Biggs, 1982) เอทธิลอะซีเตท-ไซโคลเฮกเซน (20:80 ปริมาตรต่อปริมาตร) (Wovcha และBiggs, 1982) เบนซีน-เอทธิลอะซีเตท (5:1 ปริมาตรต่อปริมาตร) (Srivastava และคณะ, 1985) ในทางการค้านั้นการสกัดสารประกอบสเตียรอยด์จะทำ

กันอย่างต่อเนื่อง (continuous extraction processes) โดยใช้อะซีโตน สกัดเอาสเตียรอยด์จากส่วนไมซีเลียม และไดคลอโรมีเทนสกัดส่วนน้ำหมัก หลังจากระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการขจัดสีออกด้วยคาร์บอน และตกผลึกด้วยอะซีโตน-เมทธานอล หรือ ไดคลอโรมีเทน (Murray, 1976)

5. <u>เหตุจูงใจในการทำวิจัย</u>

เนื่องจากในประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่มีสารประกอบประเภทสเตียรอล ซึ่งสามารถสกัดแยก และนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบสเตียรอยด์ที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ เดิมการสังเคราะห์สเตียรอยด์จากสเตียรอลใช้ปฏิกริยาทางเคมี แต่ปัจจุบันพบว่า มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถเปลี่ยนสเตียรอลจากพืชได้เป็นสารประกอบตัวกลางที่สำคัญ คือ 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน และ 1,4-แอนโดรสแตดไดอีน-3,17-ไดโอน ซึ่งจะเปลี่ยนให้ได้สารประกอบสเตียรอยด์ได้ง่าย ซึ่งเป็นการลดขั้นตอนการสังเคราะห์ทางเคมีได้หลายขั้นตอน จากการศึกษาเบื้องต้นที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่า *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 สามารถเปลี่ยนสเตียรอลที่สกัดจากกวาวเครือขาว *(Pueraria mirifica)* ไปเป็น 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอนได้ (วาสนา แสงพิทักษ์ และคณะ, 2531)

ดั้งนั้นโครงการวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพของ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในการเปลี่ยนสเตียรอลที่สกัดจากกวาวเครือขาวไปเป็น 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า

6. <u>ขั้นตอนการวิจัย</u>

6.1 ศึกษาองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงหัวเชื้อในการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในระดับขวดเขย่า

6.2 ศึกษาระบบการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้าง AD ของเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79

6.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง AD จากสเตียรอลโดย *Mycobacterium fortuitum* CBS 313.79 ในระดับขวดเขย่า

6.4 ศึกษาวิธีการสกัดแยกและทำ AD ให้บริสุทธิ์