บทที่ 1

บทนำ

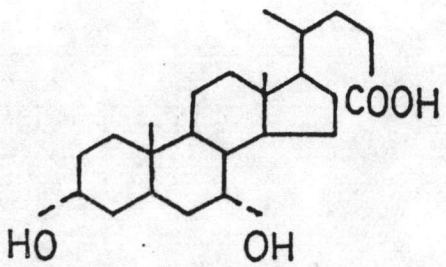
1.1 ความสำคัญของกรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิก

นิ่วโคเลสเตอรอล (cholesterol gallstone) เป็นโรคที่มีสาเหตุเกิดจากการสะสมของโคเลสเตอรอลในถุงน้ำดีจนถึงขั้นตกตะกอนรวมตัวกันเป็นก้อนนิ่ว (Thristle และ Hofmann, 1973) นิ่วชนิดนี้เป็นปัญหาในทางการแพทย์มาเป็นเวลานาน เช่น ในประเทศญี่ปุ่น (Kanazawa และคณะ, 1955) และสหรัฐอเมริกา (Thristle และ Hofmann, 1973) มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคนี้สูงกว่าโรคนิ่วที่เกิดจากสาเหตุอื่น

การรักษาโรคนิ่วโคเลสเตอรอลที่ได้ผลดี คือการใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิก (chenodeoxycholic acid, CDCA) (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นกรดน้ำดีชนิดหนึ่งที่สามารถถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ในร่างกายของคนและสัตว์ คุณสมบัติของกรดคีโนดีออกซีโคลิกในการละลายก้อนนิ่วโคเลสเตอรอลได้รับการศึกษาและวิจัยกันอย่างแพร่หลายจนเป็นที่ยอมรับในวงการแพทย์ กรดน้ำดีชนิดนี้สามารถจะไปละลายก้อนนิ่วให้มีขนาดเล็กลง และในผู้ป่วยบางรายจะสามารถรักษาให้หายขาดได้ด้วยกรดคีโนดีออกซีโคลิกเพียงอย่างเดียว (Thristle และ Hofmann, 1973) นอกจากกรดคีโนดีออกซีโคลิกแล้ว กรดน้ำดีอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็น 7β-epimer คือกรดอูโซดีออกซีโคลิก (ursodeoxycholic acid, UDCA) (รูปที่ 1) ก็สามารถละลายก้อนนิ่วโคเลสเตอรอลได้เช่นเดียวกัน (Stiehl, 1973) แต่กรดคีโนดีออกซีโคลิกจะให้ผลในการละลายก้อนนิ่วได้ดีกว่ากรดอูโซดีออกซีโคลิก (Igimi และ Carey, 1981)

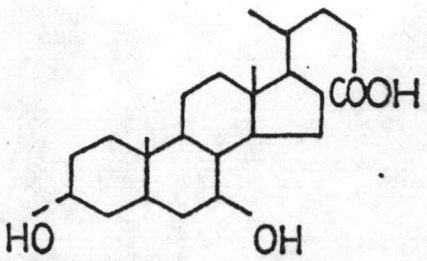
1.2 การสังเคราะห์กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิก

ในปัจจุบันการสังเคราะห์กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิกเชิงพาณิชย์ทำได้ด้วยวิธีการทางเคมี โดยเริ่มต้นจากกรดโคลิก (cholic acid, CA) (รูปที่ 1 และ 2) ซึ่งมีกระบวนการที่ยุ่งยากถึง 5 ขั้นตอน สำหรับกรดคีโนดีออกซีโคลิก และให้ผลผลิตประมาณ 10-15 เปอร์เซนต์ (Hofman, 1963) ในขณะที่กระบวนการสังเคราะห์กรดอูโซดีออกซีโคลิกต้องเพิ่มขั้นตอนเป็น 7 ขั้น จึงให้ผลผลิตลดลงเหลือเพียง 9-10 เปอร์เซนต์เท่านั้น (Kanazawa



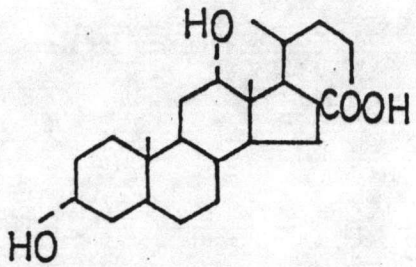
กรดคีโนดีออกซีโคลิก

(Chenodeoxycholic acid; 3α , 7α-dihydroxy-5β-cholanic acid)



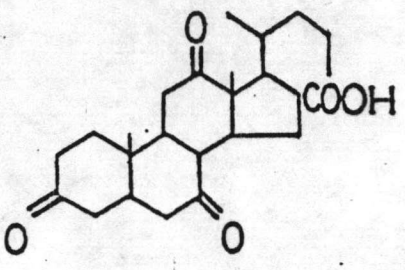
กรดอูโซดีออกซีโคลิก

(Ursodeoxycholic acid; 3α , 7β-dihydroxy-5β-cholanic acid)



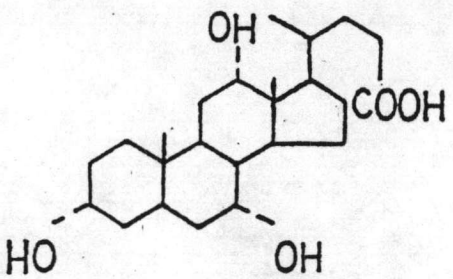
กรดดีออกซีโคลิก

(deoxycholic acid; 3α, 12α-dihydroxy-5β-cholanic acid)



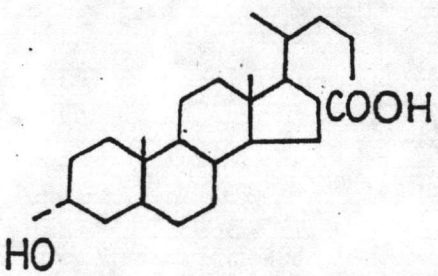
กรดดีไฮโดรโคลิก

(dehydrocholic acid; 3,7, 12 tri-oxo-5β-cholanic acid)



กรดโคลิก

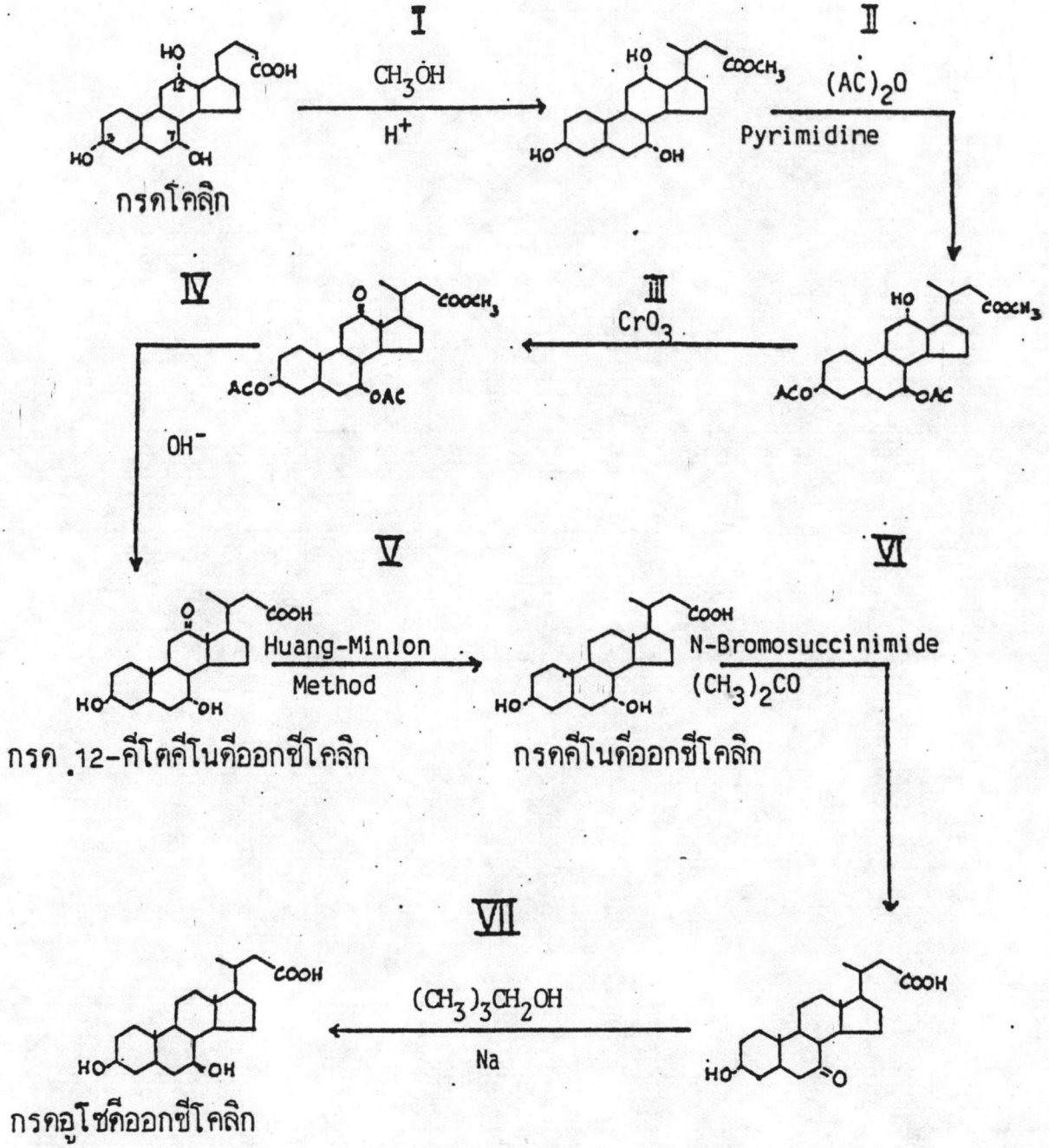
(Cholic acid; 3α, 7α, 12α-trihydroxy 5β-cholanic acid)



กรดลิโทโคลิก

(Lithocholic acid; 3α-hydroxy 5β-cholanic acid)

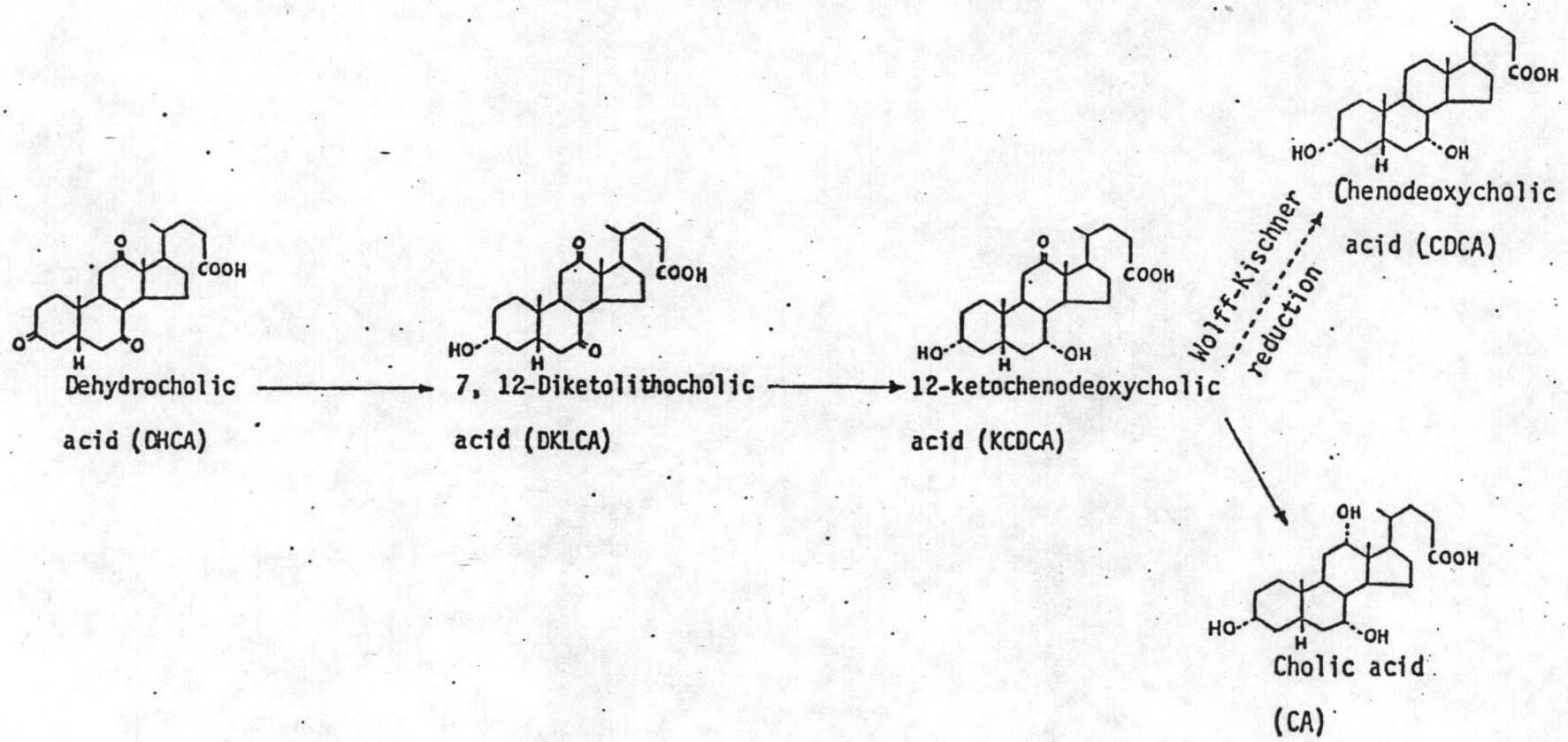
รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 2 การสังเคราะห์กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิก โดยวิธีทางเคมี (Kanazawa และคณะ, 1955)

และคณะ, 1955) ทั้งนี้เพราะการสังเคราะห์ทางเคมีมีความจำเพาะต่ำ จึงต้องมีการป้องกันกลุ่มบางกลุ่มในโมเลกุลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงที่ไม่ต้องการ (รูปที่ 2)

เนื่องจากการผลิตกรดคีโนดีออกซีโคลิกโดยวิธีทางเคมีมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและให้ผลผลิตต่ำ จึงได้มีผู้หันมาสนใจศึกษาวิธีการผลิตกรดคีโนดีออกซีโคลิกโดยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งมีความจำเพาะสูงกว่า เพราะเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ ปฏิกิริยาข้างเคียงจึงเกิดขึ้นน้อยและให้ผลผลิตสูง การศึกษาเกี่ยวกับสารกลุ่มสเตียรอยด์โดยใช้เอนไซม์จากจุลชีพได้รับความสนใจกันมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1963 เมื่อ Murray และ Peterson ได้ค้นพบว่าเชื้อราบางชนิดสามารถเปลี่ยนรูปสารจำพวกสเตียรอยด์ได้ Bergström และคณะ (1959) ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างเมตาบอลิสมของสารจำพวกกรดน้ำดีกับกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ ซึ่งถือได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญของการศึกษาปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปของกรดน้ำดีโดยจุลินทรีย์ Machida (1953) ได้พบว่า Escherichia coli สามารถเมตาบอไลซ์กรดดีไฮโดรโคลิก (dehydrocholic acid, DHCA) ให้เป็นกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก (12-Ketochenodeoxycholic acid, KCDCA) เมื่อเจริญเชื้อไว้นาน 40 วัน Matsubara (1956) สามารถแยกกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ซึ่งเป็นเมตาบอไลท์ของกรดโคลิกจากเชื้อ Neurospora crassa หลังจากที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 60 วัน (กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกสามารถจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดคีโนดีออกซีโคลิกได้ง่ายโดยปฏิกิริยาเคมีที่ชื่อว่า Wolff-Kischner reduction (Huang-Minlon, 1949) Pye และคณะ (1975) ได้ให้ข้อเสนอแนะว่ากรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกน่าจะสังเคราะห์ได้จากกรดดีไฮโดรโคลิกด้วยวิธีตรึงร่วมของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส (3α-HSDH) และ7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส (7α-HSDH) โดยใช้ NADH เป็นโคเอนไซม์ แต่ก็ไม่มีการตีพิมพ์ผลงานวิจัยเผยแพร่ จนกระทั่ง Sawada และคณะ (1980) ได้รายงานถึงความเป็นไปได้ของการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกโดยจุลินทรีย์ 2 ชนิด ที่แยกได้จากดิน คือ Lactobacillus xylosus DC 1115 (anaerobic bacteria) และ Brevibacterium fuscum DC 33 (aerobic bacteria) เมื่อมีกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสารตั้งต้น ทั้งนี้ L. xylosus และ B. fuscum สามารถจะผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้สูงสุดที่เวลาการเพาะเลี้ยง 24 และ 52 ชั่วโมง ตามลำดับ และเชื่อว่าวิถีการสังเคราะห์ต้องผ่านสารตัวกลาง (intermediate) คือกรด 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิก (7,12-diketolithocholic acid, DKLCA) เสียก่อน (รูปที่ 3) นักวิทยาศาสตร์กลุ่มเดียวกันนี้ยังได้รายงานถึงวิธีการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกโดยวิธีการตรึงเซลล์ B. fuscum ด้วยคาราจีแนน



รูปที่ 3 การสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดย L. xylosus และ B. fuscum

(Sawada และคณะ, 1980)

(Sawada และคณะ, 1981) ซึ่งจะให้ผลผลิตสูงถึง 80 เปอร์เซนต์ และคงที่ในช่วงเวลา 4-14 วัน

1.3 บทบาทและคุณสมบัติในการทำงานของไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส

ปฏิกิริยาหลักของการเปลี่ยนรูปกรดน้ำดีที่พบในจุลินทรีย์ ได้แก่ ปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) โดยเอนไซม์ไฮดรอกซีเลส (hydroxylase) เช่น ใน Clostridium perfringens (Nair, Gordon และ Reback, 1967) และ Bacteroides fragillis (Stellwag และ Hylemon, 1976) ปฏิกิริยาดีไฮดรอกซีเลชัน (dehydroxylation) โดยเอนไซม์ดีไฮดรอกซีเลส (dehydroxylase) เช่น ใน Eubacterium species (Hylemon และคณะ, 1980) และ Clostridium leptum (Stellwag และ Hylemon, 1979) ปฏิกิริยาสุดท้ายที่จะกล่าวถึงคือ ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction) ที่จำเพาะต่อหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิล (α-OH group) ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3, 7 และ 12 โดยเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส (3α-HSDH) (E C 1.1.1.50), 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส (7α-HSDH) (E C 1.1.1.159) และ 12 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส (E C 1.1.1.176)

ลักษณะการผลิต คุณสมบัติ และชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ 3α, 7α- และ 12α-HSDH ได้รับการศึกษาและวิจัยอย่างกว้างขวางตามตัวอย่างเอกสารที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 1

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ α-HSDH จำเป็นต้องใช้โคเอนไซม์นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ ในรูปออกซิไดซ์ (nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form, NAD^+) หรือนิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปออกซิไดซ์ (nicotinamide adenine dinucleotidephosphate, oxidized form, $NADP^+$) ร่วมด้วย และในทางกลับกัน เอนไซม์ตัวเดียวกันนี้อาจเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับได้โดยใช้โคเอนไซม์ดังกล่าวในรูปรีดิวซ์ (NADH หรือ NADPH)

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ 7α-HSDH ที่แหล่งที่พบในจุลินทรีย์มากชนิดกว่า รวมทั้งได้รับการศึกษามากกว่าเอนไซม์ 3α- และ 12α-HSDH อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่มักเน้นหนักในเรื่องที่คล้าย ๆ กัน คือ คุณสมบัติการถูกเหนี่ยวนำโดยกรดน้ำดี คุณสมบัติทางกายภาพและจลน์ศาสตร์ เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้หาปริมาณกรดน้ำดีที่มีหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิล ที่ตำแหน่ง 3 หรือ 7 หรือ 12 ในซีรัม น้ำดี หรือปัสสาวะ สำหรับการศึกษาคุณสมบัติการถูกเหนี่ยวนำโดยกรดน้ำดี ตลอดจนคุณสมบัติทางกายภาพและจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์ 12α-HSDH ได้กระทำในเชื้อ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเอกสารที่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิต และคุณสมบัติของเอนไซม์ 3, 7 และ 12 แอลฟาไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

Microorganism	Hydroxysteroid dehydrogenase	Reference
Bacteroides fragilis	7α-HSDH	Macdonald และคณะ, 1975-a
Bacteroides thetaiotaomicron	7α-HSDH	Sherrod และ Hylemon, 1977
Bifidobacterium	3α,7α-,12α-HSDH	Aries และ Hills, 1970
Clostridium limosum	7α and 7β-HSDH	Sutherland และ Williams, 1985
Clostridium perfringens	3α,7α,12α-HSDH	Macdonald และคณะ, 1976
Clostridium group P-strain C48-50	12α-HSDH	Macdonald และคณะ, 1979
Clostridium leptum	12α-HSDH	Harris และ Hylemon, 1978
Clostridium absonum	7α and 7β-HSDH	Macdonald และคณะ, 1983
Escherichia coli B	7α-HSDH	Macdonald และคณะ, 1973
Eacherichia coli strain 23	7α-HSDH	Macdonald และคณะ, 1975 b
Escherichia coli strain 018 ack? H^-	7α-HSDH	Haslewood และ Haslewood, 1976
Eubacterium aerofaciens	7α-HSDH	Hylemon และ Stellwag, 1976
Eubacterium lentum ATCC No. 25559	3α,12α-HSDH	Macdonald และคณะ, 1977
Lactobacillus xylosus	3α and 7α HSDH	Sawada และคณะ, 1980
Pseudomonas testosteroni	3α and 3β-HSDH	Marcus และ Talalay, 1956
Pseudomonas testosteroni	3α-,12α-HSDH	Skalhegg, 1974 a
Peptostreptococus productus	7α-HSDH	Hirano และ Masuda,1976

Clostridium perfringens, Eubacterium lentum, Clostridium group P (Macdonald และคณะ, 1976; 1977; 1979) และ Clostridium leptum (Harris และ Hylemon, 1978)

Kinoshita และคณะ (1983) ได้ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติของเอนไซม์ α-HSDH ที่แยกได้จาก L. xylosus และแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่แยกได้คือ 3α-HSDH และ 7α-HSDH โดยไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ปะปนอยู่ด้วยเลย จึงเชื่อว่าเอนไซม์ 3α-HSDH และ 7α-HSDH จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนของการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ใน L. xylosus Sawada และคณะ (1980) รายงานว่าการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซี-โคลิก ด้วยวิธีการเปลี่ยนรูปกรดคีไฮโดรโคลิกโดย B. fuscum นั้นจะไม่มีทางได้ผลผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกอย่างเต็มที่ได้ ทั้งนี้เนื่องจากสารผลิตภัณฑ์ชนิดนี้จะถูกรีดิวซ์ต่อไปอีกขั้นตอนหนึ่งได้ผลผลิตเป็นกรดโคลิกเพิ่มขึ้นมาแทน (รูปที่ 3) ดังนั้นในกรณีนี้อาจสัณนิษฐานได้ว่านอกจากเอนไซม์ 3α-HSDH และ 7α-HSDH ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกเช่นเดียวกับ L. xylosus แล้ว B. fuscum ยังน่าจะมีเอนไซม์ 12α-HSDH ที่จะเร่งปฏิกิริยารีดักชั่นของหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่ง 12 ของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกต่อไปอีก ทำให้ได้กรดโคลิกอันเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการและจะมีผลในการลดผลผลิตของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกโดยตรง ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างมากที่จะวิเคราะห์ถึงธรรมชาติของการผลิต ตลอดจนคุณสมบัติของเอนไซม์ α-HSDH ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกใน B. fuscumซึ่งได้แก่เอนไซม์ 3α-, 7α- และ 12α-HSDH โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ 12α-HSDH ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกไปเป็นกรดโคลิก (รูปที่ 3) ทั้งนี้เพื่อความเข้าใจถึงปฏิกิริยาที่ถูกเร่งด้วยเอนไซม์ α-HSDH ในแต่ละขั้นตอนเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงกระบวนการผลิตกรด 12-คีโตคี-โนดีออกซีโคลิกโดย B. fuscum ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น และยังอาจนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์และขั้นตอนงานวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. ศึกษาธรรมชาติของการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ในเชื้อ B. fuscum
2. ศึกษาหาวิธีทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์
3. ศึกษาสมบัติทางกายภาพและจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่บริสุทธิ์
4. ศึกษาศักยภาพของการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกโดยใช้เอนไซม์ 12α-HSDH ที่บริสุทธิ์สูง