หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

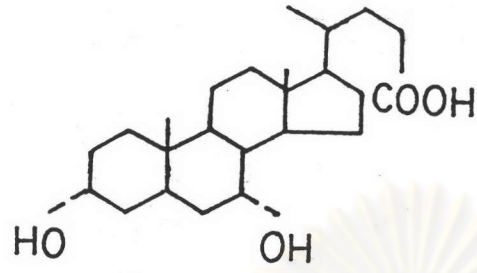
บทนำ

โรคนิ่วโคเลสเตอรอล (cholesterol gallstone) ซึ่งมีสาเหตุมาจากการสะสมโคเลสเตอรอลในถุงน้ำดี เป็นปัญหาที่สำคัญของประชากรโลกมาช้านานแล้ว เช่นในประเทศญี่ปุ่นมีผู้ป่วยเป็นโรคนี้ถึง 10 เปอร์เซนต์ (Kanazawa และคณะ, 1955) และในประเทศสหรัฐอเมริกาก็มีผู้ป่วยเป็นโรคนี้สูงเช่นกัน (Thistie และ Hofmann, 1973)

การรักษาโรคนิ่วโคเลสเตอรอล ทำได้โดยใช้สารประกอบจำพวกกรดน้ำดี (bile acid) บางชนิด เช่น กรดคีโนดีออกซีโคลิก (chenodeoxycholic acid, CDCA) (รูปที่ 1) ซึ่งเป็นกรดน้ำดีชนิดหนึ่งที่พบในคนและสัตว์ สามารถละลายก้อนนิ่วให้มีขนาดเล็กลงได้ (Admirad และ Small, 1968; Thistle และ Hofmann, 1973) กรดน้ำดีอีกชนิดซึ่งเป็น 7 β-hydroxy epimer คือ กรดอูโซดีออกซีโคลิก (ursodeoxycholic acid, UDCA) สามารถละลายก้อนนิ่วโคเลสเตอรอลได้เช่นเดียวกับกรดคีโนดีออกซีโคลิก (Makino และคณะ, 1975; Stiehl, 1973) แต่กรดคีโนดีออกซีโคลิก ละลายก้อนนิ่วได้ดีกว่ากรดอูโซดีออกโซ-โคลิก (Igimi และ Carey, 1981)

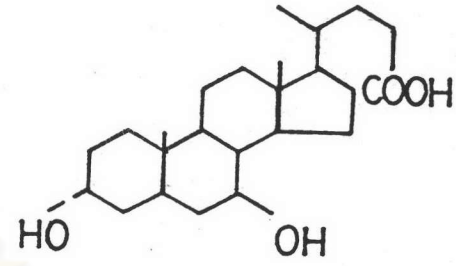
ในปัจจุบันการผลิตกรดน้ำดีเพื่อละลายก้อนนิ่วทั้ง 2 ชนิด ในเชิงพาณิชย์ ทำได้โดยใช้วิธีสังเคราะห์ทางเคมี (Hofmann, 1963) เริ่มจากกรดโคลิก (cholic acid, CA) เป็นสารตั้งต้น ผ่านขบวนการยุ่งยากถึง 5 ขั้นตอน และให้ผลผลิตต่ำเพียง 10-15 เปอร์เซนต์ สำหรับกรดคีโนดีออกซีโคลิก และขบวนการ 7 ขั้นตอนสำหรับกรดอูโซดีออกซีโคลิก ให้ผลผลิตต่ำเพียง 9-14 เปอร์เซนต์ (Kanazawa และคณะ, 1955) ทั้งนี้เพราะต้องมีการป้องกันกลุ่มบางกลุ่มที่ไวต่อปฏิกิริยาในโมเลกุล เพื่อป้องกันการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ (รูปที่ 2)

Murray และ Perterson (1967) พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเปลี่ยนรูปสารประกอบกลุ่มสเตียรอยด์ เช่น คอร์ติโคสเตอโรนให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ นับเป็นการเริ่มต้นของการศึกษาปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปของสารประกอบกลุ่มสเตียรอยด์โดยจุลินทรีย์ (microbial transformation of steroids) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดโดยเอนไซม์ในจุลินทรีย์ จึงมีความ



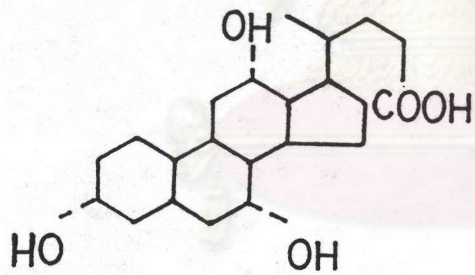
กรดคีโนดีออกซีโคลิก

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



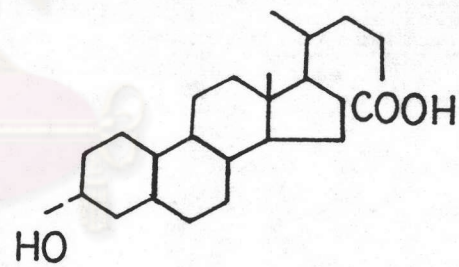
กรดอูโซดีออกซีโคลิก

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



กรดโคลิก

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

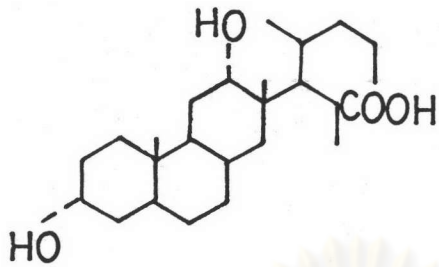


กรดลิโทโคลิก

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

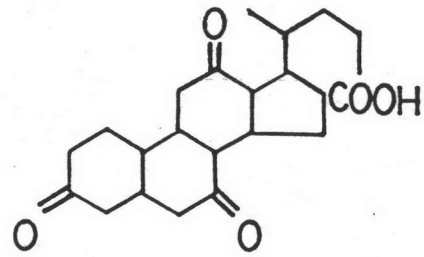
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1. แสดงสูตรโครงสร้างของน้ำดีชนิดต่างๆ และสเตียรอยด์ฮอร์โมนบางชนิด



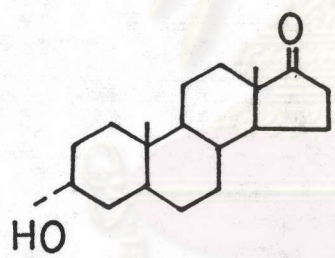
กรดดีออกซีโคลิก

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



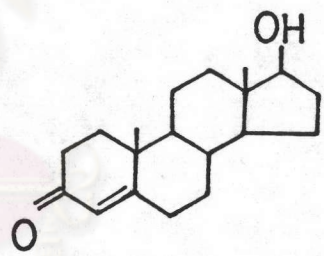
กรดดีไฮโดรโคลิก

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



อันโดรสเทอโรน

(androsterone; 3α-hydroxy-17-androstanone)

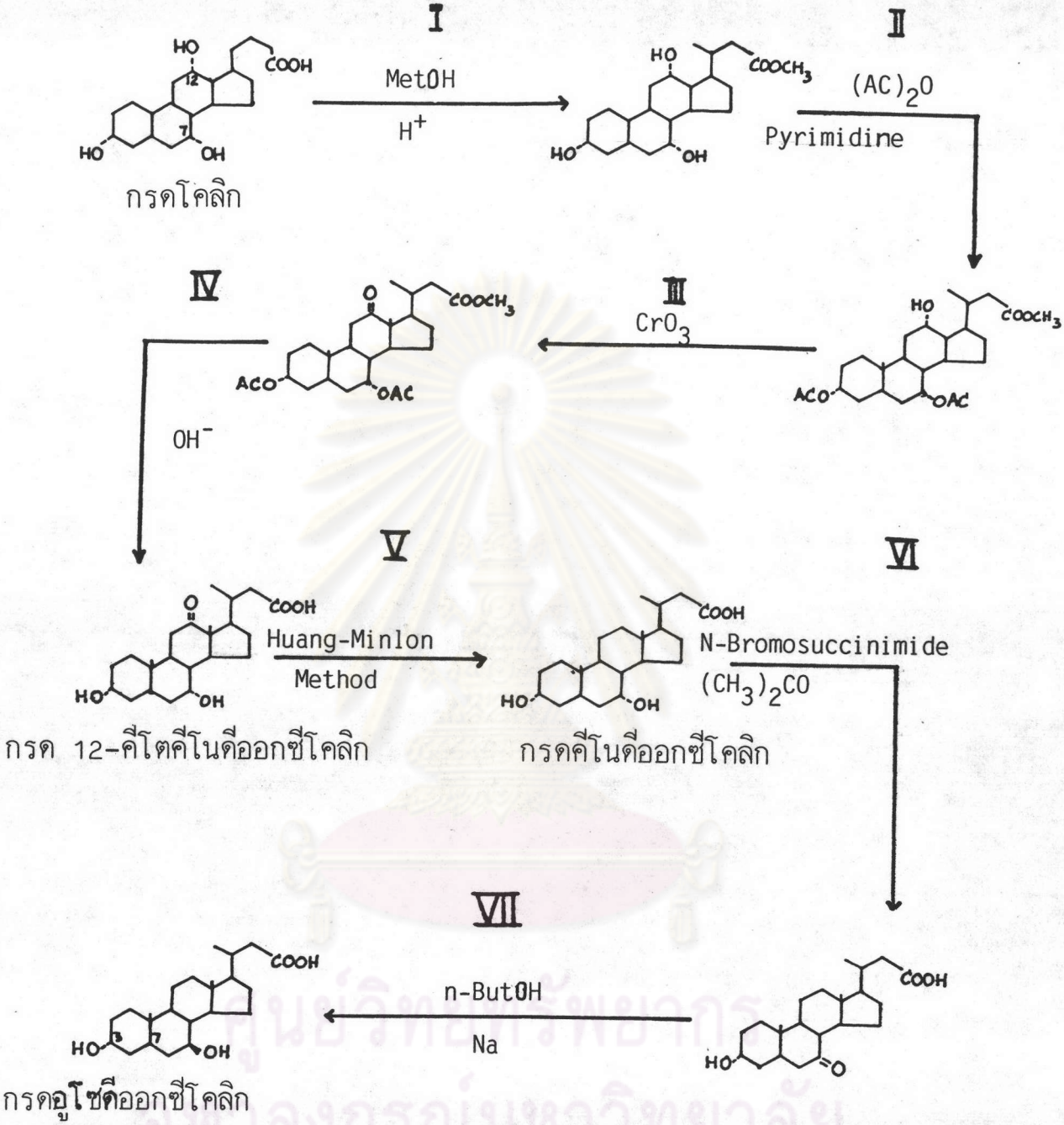


เทสโทสเทอโรน

(testosterone; 17β-dihydroxy-4-androsten-3-one)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1. (ต่อ) แสดงสูตรโครงสร้างของกรดน้ำดีชนิดต่างๆ และสเตียรอยด์ฮอร์โมนบางชนิด



รูปที่ 2. การสังเคราะห์ กรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดอูโซดีออกซีโคลิก โดยวิธีทางเคมี (Kanazawa และคณะ, 1955)

จำเพาะต่อสับเสตรท ปฏิกิริยาข้างเคียงเกิดขึ้นน้อย ผลผลิตของปฏิกิริยาจึงสูง และขั้นตอนการสกัดแยกผลิตภัณฑ์ก็ทำได้ง่ายอีกด้วย

ปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปสารกลุ่มสเตียรอยด์มีหลายแบบ เช่น การเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้แก่สับเสตรท (hydroxylation) โดยเอนไซม์จำพวกไฮดรอกซีเลส (hydroxylase) (Meister และคณะ 1954; Sawada และคณะ, 1982; Kulprecha และคณะ, 1985) การดึงหมู่ไฮดรอกซิลออกจากสับสเตรท (dehydroxylation) โดยเอนไซม์ดีไฮดรอกซีเลส (dehydroxylase) (Samuelson, 1960) การดึงอะตอมของไฮโดรเจนออกจากสับสเตรท (dehydrogenation) การเติมอะตอมของไฮโดรเจนให้แก่สับสเตรท (hydrogenation) (Hiroshi, 1967) ซึ่งต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์จำพวกไฮโดรจีเนส (hydrogenase) และดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังสามารถเปลี่ยนรูปสารสเตียรอยด์ด้วยปฏิกิริยาอื่น ๆ ได้อีก (Meister และคณะ, 1954; Hayakawa, 1973)

ลักษณะการผลิต คุณสมบัติ และชนิดของจุลินทรีย์ซึ่งผลิตเอนไซม์ 3α-, 7α- และ 12α-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ได้รับการศึกษาและวิจัยอย่างกว้างขวางตามตัวอย่างเอกสารที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 1

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จำเป็นต้องใช้โค-เอนไซม์นิโคตินาไมด์อะดีโนซีนไดนิวคลีโอไทด์ออกซิไดซ์ (Nicotinamide adenosine dinucleotide, oxidized form, NAD^+) ร่วมด้วย ในทางกลับกัน เอนไซม์ตัวเดียวกันนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับได้โดยใช้โคเอนไซม์นิโคตินาไมด์อะดีโนซีนไดนิวคลีโอไทด์รีดิวซ์ (Nicotinamide adenosine dinucleotide, reduced form, NADH) แทน NAD^+

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเอกสารที่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิต และคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟาไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

Microorganism	Hydroxysteroid dehydrogenase	Reference
Bacteroides fragilis	7α-HSDH	Macdonald และคณะ, 1975 a
Bacteroides thetaiotaomicron	7α-HSDH	Sherrod และ Hylemon, 1977
Brevibacterium fuscum	3α,7α,12α-HSDH	Sawada และคณะ, 1980
Clostridium perfringens	3α,7α,12α-HSDH	Macdonald และคณะ,1976
Clostridium group P-strain C48-50	12α-HSDH	Mahony และคณะ, 1977
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	Hylemen และ Stellwag, 1976 Sherrod และ Hylemon
Eubacterium leutum 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	12α-HSDH	Skalhegg, 1974 a
Peptostreptococus productus	7α-HSDH	Hirano และ Haslewood, 1976

Macdonald และคณะ (1973, 1974) รายงานว่าสายพันธุ์ E. coli ส่วนใหญ่ รวมทั้งสายพันธุ์ E. coli B สามารถผลิตเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (7α-hydroxysteroid dehydrogenase, 7α-HSDH) แต่ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟาไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสชนิดอื่น ๆ ในสายพันธุ์ E. coli เลย 7α-HSDH เป็นเอนไซม์ที่สร้างและทำงานภายในเซลล์(intracellular enzyme) มีความจำเพาะกว้าง สามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิด

P. testosteroni เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้สเตียรอยด์ที่มีคาร์บอน 19 อะตอม หรือสเตียรอยด์ที่มีโครงสร้างข้างเคียง เป็นต้นตอคาร์บอนในการเจริญและเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ 2 ชนิด (Talalay และ Dobson, 1953; Marcus และ Talalay, 1956) คือ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (3α-hydroxysteroid dehydrogenase, 3α-HSDH) ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 3 ของสเตียรอยด์ที่มีคาร์บอน 19, 21 หรือ 24 ได้ และ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (3β-hydroxysteroid dehydrogenase, 3β-HSDH) ซึ่งสามารถออกซิไดซ์ไฮดรอกซิลกรุ๊ปที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 หรือ 17 ของสเตียรอยด์เทสโทสเทอโรนเท่านั้น

นอกจากไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิดแล้วยังพบเอนไซม์ 3 คีโต-สเตียรอยด์ไอโซเมอเรส (3-ketosteroid Δ^4-Δ^5 isomerase) จาก P. testosteroni ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนตำแหน่งของพันธะคู่ (double bond) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และ 5 (Ward และ Engel, 1966) ของเทสโทสเทอโรน (17β-hydroxy-4-androsten-3-one) ให้เป็น 17β-hydroxy-5-androsten-3-one ได้อีกด้วย คุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ 3 แอลฟา- และ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสได้สรุปไว้ในตารางที่ 2

การศึกษาวิธีการผลิตกรดคีโนดีออกซีโคลิกทางชีวภาพ ได้รับความสนใจมานาน เริ่มตั้งแต่ Machida (1953) พบว่า E. coli สามารถเมตาบอไลซ์กรดดีไฮโดรโคลิก ให้เป็นกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้ เมื่อเจริญเชื้อนาน 40 วัน Matsubara (1956) แยกกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ซึ่งเป็นเมตาบอไลซ์ของกรดโคลิกจากเชื้อ Neurospora crassa ได้หลังจากเพาะเชื้อนาน 60 วัน กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกสามารถเปลี่ยนเป็นกรดคีโนดีออกซีโคลิกได้ง่ายโดยปฏิกิริยา Wolff-Kischner Reduction (Huang-Minlon, 1949) Pye (1975) ได้ให้ข้อเสนอแนะว่า กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกน่าจะ

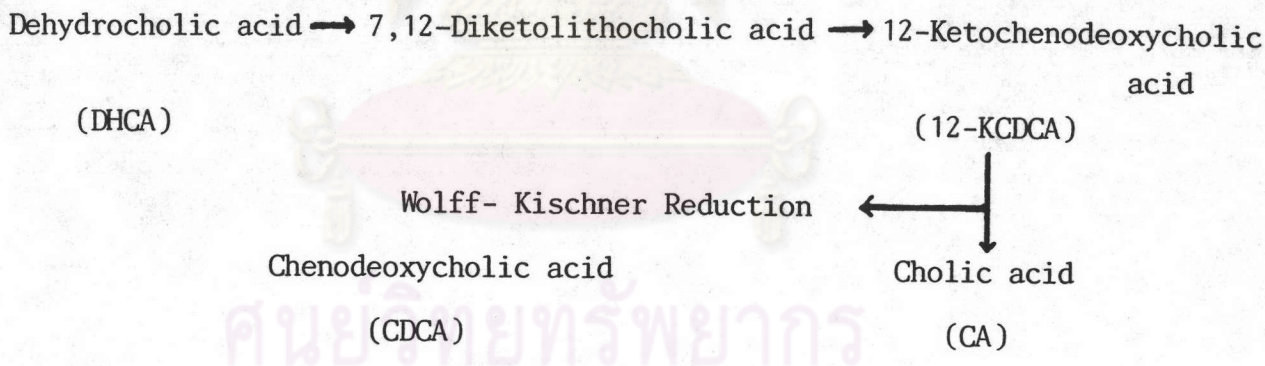
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ 3 แอลฟา และ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

	แอลฟาเอนไซม์	เบตาเอนไซม์	Reference
Molecular weight	47100 ± 1500	100000 ± 600	Squire และคณะ, 1964
Isoelectric point	6.1	6.5	Squire และคณะ, 1964
pH stability	Stable ในช่วงพีเอช 6-10	ไม่ stable ในช่วงพีเอชด่าง	Delin และคณะ, 1964 Talalay and Dobson, 1953
Thermal Stability ที่ 40 °ซ, 15 นาที	เสียแอคติวิตีไปเล็กน้อย	เสียแอคติวิตีไป 80-90 เปอร์เซนต์	Skalhegg, 1974 b

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สังเคราะห์ได้จากกรดดีไฮโดรโคลิก ด้วยวิธีตรึงร่วมของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส และ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส โดยใช้ NADH เป็นโคเอนไซม์ แต่ไม่มีการตีพิมพ์ผลงานวิจัยเผยแพร่ ข้อเสียของวิธีนี้คือ ปฏิกิริยาของเอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์ตรึง จะต้องมีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนเสียก่อน อีกประการหนึ่งปฏิกิริยานี้ต้องใช้โคเอนไซม์ราคาแพง และหายาก หากไม่มีทางนำเอาโคเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่แล้ว จะไม่คุ้มค่ากับการผลิตในเชิงพาณิชย์

Sawada และคณะ (1980) รายงานว่า กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก สามารถเตรียมจากกรดดีไฮโดรโคลิกได้โดยใช้เซลล์Lactobacillus xylosus DC 1115 โดยตรงในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic) ได้ค่าผลิตภัณฑ์สูงสุดในเวลาเพียง 24 ชั่วโมง แต่ถ้าใช้ Brevibacterium fuscum DC 33 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) โดยสามารถผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้สูงสุดที่เวลา 52 ชั่วโมง โดยเชื่อว่าวิถีการสังเคราะห์ต้องผ่านสารตัวกลางคือ กรด 7, 12-ไดคีโตลิโทโคลิก (7,12-diketolithocholic acid) เสียก่อน (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แผนภาพการผลิต กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดย B. fuscum และ L. xylosus (Sawada และคณะ, 1980)

การใช้เซลล์ตรึงเพื่อเปลี่ยนรูปสารจำพวกสเตียรอยด์มีข้อได้เปรียบเอนไซม์อิสระเอนไซม์ตรึง และเซลล์อิสระหลายประการ อาทิเช่น ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ มีการใช้โคเอนไซม์จากแหล่งภายนอกน้อยลง โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์จะเสถียรเมื่อคงอยู่ภายในเซลล์ เซลล์ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลายครั้ง และสามารถใช้ในกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง

ได้ดี ในกรณีที่สูญเสียแอคติวิตีไปชั่วคราว อาจนำมาทำให้ว่องไวในปฏิกิริยา (reactivated) ขึ้นใหม่ได้ (Kolot, 1953)

Sawada และคณะ (1981 a; 1981 b) ได้พยายามปรับปรุงการผลิต กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดยแบคทีเรียให้ได้ผลผลิตมากขึ้น โดยใช้เทคนิคการตรึงเซลล์(immobilized cell) ของ B. fuscum และ L. xylosus ด้วย 5 เปอร์เซนต์แคปปาคาร์ราจีแนน

Morikawa และคณะ (1978) ได้รายงานถึงความสำเร็จในการตรึงแอลกอฮอล์-ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) ร่วมกับแลคเตทดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase) โดยใช้เยื่อคอลลาเจน (Collagen membrane) พบว่าวิธีการนี้จะช่วยในการนำเอาโคเอนไซม์ NAD^+ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาบางส่วนกลับมาใช้ได้ใหม่ Godbole และคณะ (1983) พบว่าการตรึงเซลล์ยีสต์ที่มีแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสร่วมกับมาเลทดีไฮโดร-จีเนส (Malate dehydrogenase) โดยใช้โพลีอะไครละไมด์ (Polyacrylamide) เป็นสารตรึงเซลล์จะมีผลทำให้ปริมาณ NAD^+ ที่ถูกใช้ในปฏิกิริยาน้อยกว่าเมื่อตรึงเอนไซม์อิสระถึง 4 เท่า Hartmeier (1984) ได้ศึกษาเทคนิคการตรึงร่วม (Co-immobilization) พบว่าการตรึงเซลล์ร่วมของ Saccharomyces cerevisiae และ Aspergillus oryzae ด้วยแอลจิเนตจะมีผลให้ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการผลิตแอลกอฮอล์ได้

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพของการผลิต กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดคีโนดีออกซีโคลิกที่ใช้เป็นกรดน้ำดีในการรักษาโรคนิ่วโคเลสเตอรอล เริ่มต้นจากกรดดีไฮโดรโคลิกซึ่งเป็นสารราคาถูก และหาซื้อง่าย โดยใช้เซลล์ E. coli และหรือ P. testosteroni ที่ถูกตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนนและแอลจิเนต

ขั้นตอนการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. การศึกษาสภาวะของการผลิต และคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จาก E. coli

2. การศึกษาสภาวะของการผลิต และคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จาก P. testosteroni

3. ศึกษารูปแบบและสภาวะการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดยใช้ E. coli และ P.testosteroni เซลล์ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน และแอลจีเนต เทียบกับเซลล์อิสระ

4. ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางจลนศาสตร์บางประการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย