

การเติมกลุ่มไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอน 11 ของ  
สเตอรอยด์โปรเกสเทอโรนและเฮโคเจนิน โดยวิธีทางชีวภาพ  
Hydroxylation at C<sub>11</sub> Steroid Progesterone and Hecogenin  
by Biotransformation

พรสวรรค์ ดิษยบุตร<sup>1</sup> วันเชิญ โพธาเจริญ<sup>1</sup>  
สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์<sup>1</sup> และ ลาวัลย์ ชนนานนท์<sup>1</sup>

Pronsawarn Disyaboot Wanchern Pothacharaen Suparp  
Artijariyasripong and Lawan Chananond

ABSTRACT

Expressed juice from sisal wastes (*Agave sisalana* Perr.) is a more attractive source material for the extraction of hecogenin and tigogenin steroids. Hecogenin is supposed to be interested in strating material for the production of 11-oxygenated steroids, and can be used in drug industry namely corticosteroids group. This work has been carried out to C<sub>11</sub>-OH biotransform of progesterone and hecogenin by the ability of 11-hydroxylase *Rhizopus stolonifer* TISTR 3428 and *Rhizopus arrhizus* TISTR 3427. The results, characterized by reference standard, TLC and NMR spectra, indicated that the TISTR 3428 could transformed the progesterone and hecogenin in 3-10 days incubation at room temperature. Further work will be continued to combined the biosynthesis and chemical synthesis together, and to scale-up the batch size.

บทคัดย่อ

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ได้วิจัยและสกัดสเตอรอยด์จากวัสดุเหลือทิ้งอุตสาหกรรมป่านศรนารายณ์ คือ hecogenin และ tigogenin ซึ่งเป็นสารที่ใช้สังเคราะห์สารตั้งต้น (precursor) ของยากกลุ่ม corticosteroid ในอุตสาหกรรมยา ในการสังเคราะห์การเติมกลุ่มไฮดรอกซิลโดยวิธีทางชีวภาพ จะลดขั้นตอนลงกว่าวิธีทางเคมี วท. จึงได้ศึกษาวิจัยโดยใช้จุลินทรีย์ *Rhizopus stolonifer* TISTR 3428 และ *R. arrhizus* TISTR 3427 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเติมกลุ่มไฮดรอกซิลของสาร progesterone และสารที่มีนิวเคลียสคล้ายคลึงกัน โดยประสิทธิภาพของเอนไซม์ 11-hydroxylase ผลการทดลองพบว่า เชื้อ TISTR 3428 สามารถเติมกลุ่มไฮดรอกซิลได้ที่เวลาเลี้ยงเชื้อ 3-10 วัน โดยการตรวจวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานด้วยวิธี TLC และ NMR

งานวิจัยนี้จะดำเนินต่อไปสู่อุตสาหกรรม โดยนำวิธีการสังเคราะห์ทั้งเคมีและชีวภาพ เพื่อผลิตยากอดิโคสเตอโรน และขยายขนาดการทดลองขึ้นอีก

<sup>1</sup> สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย 196 พหลโยธิน จตุจักร กทม.

Thailand Institute of Scientific and Technological Research 196 Phahonyothin Road, Chatuchak, Bangkok

## คำนำ

การเปลี่ยนสารสเตอรอยด์ไปเป็นสารต่าง ๆ ที่ใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรม ได้ใช้ทั้งวิธีทางเคมีและชีวภาพมาประมาณ 50-60 ปีมาแล้ว ซึ่งการสังเคราะห์ทางเคมี บางวิธีมีการใช้หลายขั้นตอน และบางครั้งยุ่งยากมาก เช่น การเติมออกซิเจนที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 11 ของสเตอรอยด์นิวเคลียสของโปรเกสเตอโรน ทางเคมีใช้ 17 ขั้นตอน แต่จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเติมออกซิเจนที่ตำแหน่ง 11 ได้โดยประสิทธิภาพของเอนไซม์นอกเซลล์ (extracellular enzyme) Hydroxylase เช่น

*Aspergillus saitoi* LAM R-1216

*Aspergillus ochraceus* NRRL 405

*Aspergillus awamori* LAM K-0625

*Rhizopus nigricans* ATCC 62276

*Rhizopus reflexus* ATCC 1225

*Streptomyces fradiae*

*Cephalothecium roseum* ATCC 8685

*Cunninghamella echinulata*

*Colonectria decora*

*Fusarium solani* เป็นต้น

Peterson & Murray (1952) ได้รายงานการใช้เชื้อ *Rhizopus nigricans* เติม 11-OH เป็นครั้งแรก และบริษัท Upjohn ได้ผลิตสเตอรอยด์ระดับอุตสาหกรรมตั้งแต่ปี 1953

ปัญหาสำคัญในการแปรเปลี่ยนสเตอรอยด์โดยวิธีชีวภาพ คือ เป็นโมเลกุลใหญ่ มีคาร์บอน 19-29 อะตอม และค่อนข้างไม่ละลายในน้ำ (aqueous system) ต้องละลายในตัวทำละลายก่อน จึงเติมลงในจุลินทรีย์ที่เจริญแล้ว 24 ชั่วโมง (growth phase) ตัวทำละลายจะใช้ในระหว่าง 2-10% เพื่อจะไม่เป็นอันตรายต่อเชื้อ เช่น acetone, N, N-dimethylformamide (DMF), DMSO, ethylene glycol, ethanol, methylene chloride เป็นต้น

ชนิดของการแปรเปลี่ยนสเตอรอยด์โดยจุลินทรีย์ แบ่งเป็น

### 1. Oxidative processes

- Introduction of secondary hydroxyl on steroid nucleus

### 2. Reductive processes

- Hydroxylation of double bond at positions 4-5 of ring A and 5-6 of ring B

### 3. Hydrolytic processes

- Saponification of steroid esters

### 4. Esterification processes

- Acetylation

วท. ได้เริ่มโครงการใช้ประโยชน์และกำจัดวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร โดยได้รับงบประมาณตั้งแต่ปี 2531-2535 และได้คัดเลือกวัสดุเหลือทิ้งที่มีศักยภาพสูงจากอุตสาหกรรมป่านศรนารายณ์ นำมาผลิตสเตอรอยด์ hecogenin และ tigogenin สำหรับสังเคราะห์สารตั้งต้น (Precursor) เพื่อสังเคราะห์เป็นกลุ่มยาออกติโคสเตอโรน ซึ่งมีอุตสาหกรรมนี้ในประเทศที่ผลิตเส้นใยจากป่านศรนารายณ์แล้ว โดยเป็นโครงการต่อเนื่องของ วท.การใช้ประโยชน์ป่านศรนารายณ์ครบวงจร

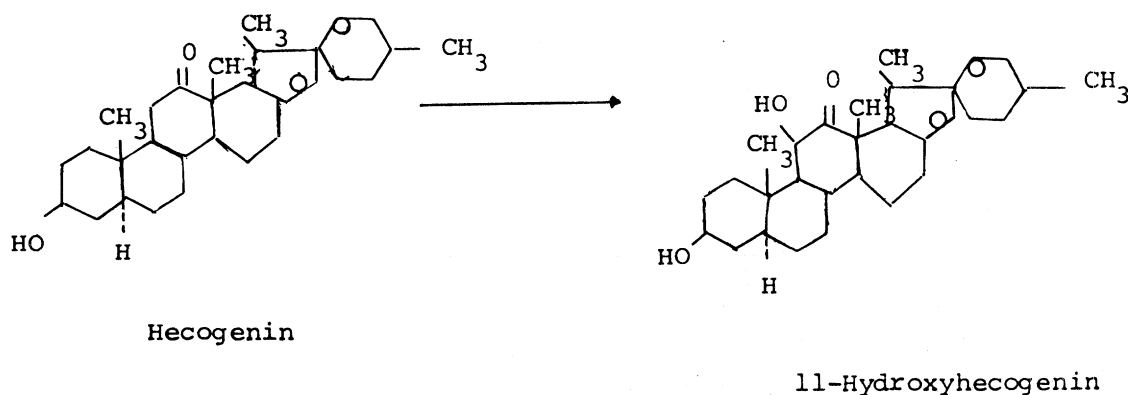
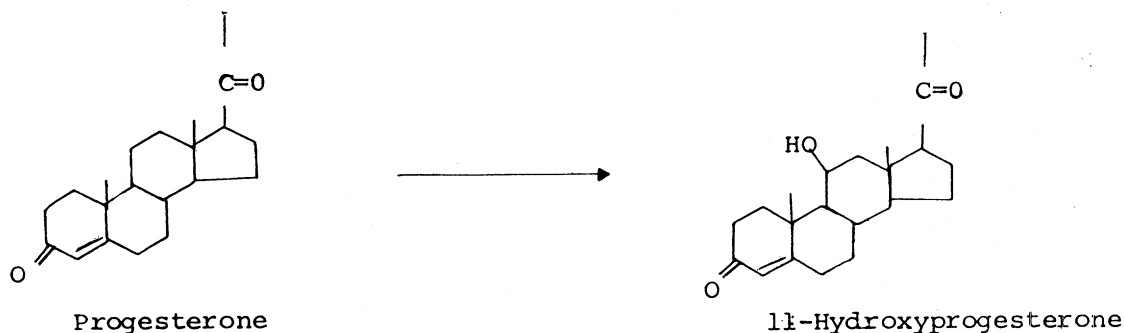
(2536-2537) ซึ่งจากสถิติกรมศุลกากรได้นำเข้ากลุ่มยาฮอร์โมนปีละ 176 ล้านบาท (1991) งานวิจัยนี้เมื่อเป็นผลสำเร็จจะสามารถลดการนำเข้าหรือส่งออกได้ ซึ่งเป็นการพึ่งตนเองทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีได้อีกทางหนึ่ง โดยเฉพาะประเทศไทยกำลังเผชิญกับปัญหาสิทธิบัตรยาขึ้นเรื่อย ๆ วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ใช้จุลินทรีย์ *Rhizopus stolonifer* TISTR 3428 และ *Rhizopus arrhizus* TISTR 3427 เติมกลุ่มไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอน 11 ของสาร Progesterone และ Hecogenin

2. การเติมกลุ่มไฮดรอกซิลโดยวิธีชีวภาพ จะลดขั้นตอนทางเคมีลง ในขบวนการสังเคราะห์ยา Corticosteroid และไม่ยุ่งยากซับซ้อน

3. สารสเตอรอยด์ที่เติมกลุ่มไฮดรอกซิลแล้ว จะนำไปสังเคราะห์ทางเคมีร่วมกับชีวภาพ เพื่อเป็นกลุ่มยาออกติโคสเตอรอยด์ในอุตสาหกรรมต่อไป

ปฏิกิริยาการเติมกลุ่มไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอน 11 ควรเป็นดังนี้



## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. สารสเตอรอยด์มาตรฐาน

- Hecogenin

- 11-Hydroxyprogesterone

บริษัท Sigma Chemical Corporation, U.S.A.

### 2. จุลินทรีย์ *Rhizopus stolonifer* TISTR 3428

*R. arrhizus* TISTR 3427

ศูนย์รวบรวมจุลินทรีย์ (Bangkok-MERCEN) แห่งภาคพื้นเอเชียอาคเนย์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

จุลินทรีย์ที่ทดลองเก็บเพาะเชื้อใน PDA (Difco)

### 3. การเตรียมสปอร์

เพาะเชื้อ *Rhizopus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง 5-7 วัน จนสปอร์ขึ้นเต็มที่ นับสปอร์โดยใช้ Neuberg haemocytometer ให้ได้  $1.5 \times 10^7$  สปอร์ ต่อ 150 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1) Medium H (Peterson *et al* 1952) ประกอบด้วย

Edamin	20 กรัม
Cornsteep liquor	3.0 กรัม
Deatrose	50 กรัม
Distilled water g.s.	1 ลิตร

ปรับ pH 4.3 ด้วยกรดเกลือ ใส่ขวดละ 150 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°เซลเซียส

#### 2) Medium (Pavanasasivam & Jarvis 1983) ประกอบด้วย

Glucose	20 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 กรัม
NH <sub>4</sub> Cl	3 กรัม
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 กรัม
Peptone	2 กรัม
Yeast extract	2 กรัม
Malt extract	2 กรัม
Distilled water g.s.	1 กรัม

ใส่ขวดละ 150 มิลลิลิตร นำเชื้อที่ 121°เซลเซียส

### 5. กระบวนการหมักแบบเดิมอากาศ

เติมสารสเตอรอยด์ 20 มิลลิกรัมต่อขวดเลี้ยงเชื้อภายหลังการเจริญ 24 ชั่วโมง นำใส่ในเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้องในเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 3-10 วัน รวมทั้งได้ทำการทดลองควบคุมจุลินทรีย์สารสเตอรอยด์ไม่เติมจุลินทรีย์ ทั้งเขย่าและไม่เขย่าด้วย

#### 6. การสกัดสเตอรอยด์

นำขวดทดลองออกจากเครื่องแช่เยือกแข็ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ล้างส่วนสกัดด้วยน้ำกลั่น และระเหยไล่คลอโรฟอร์มด้วยเครื่อง Rotavap<sup>R</sup> จะได้ผงสีค่อนข้างขาว นำไปวิเคราะห์ต่อไป

7. นำตัวอย่างที่เป็นผงแห้งละลายในคลอโรฟอร์มเล็กน้อย หยดบนแผ่น TLC (Kieselgel 60 ขนาด 20×20 ซม. × 0.25 มม. E. Merck AG, Darmstadt) แล้วใส่ใน TLC Tank ที่มี Hexane : Acetone 1:1 เป็น developer เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

นำไปดูภายใต้แสง U.V. ดูการเรืองแสง แล้ว spray ด้วยสารละลายของ Vanillin : Ethanol : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3:100:3 อบในตู้อบ 1-2 นาที จะเห็นจุด (spot) สีส้มแดง-ส้ม โดยเทียบกับสารมาตรฐาน (วัด Rf) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ NMR (โปรตอน, C<sup>13</sup>) เพื่อยืนยันผล

#### ผลการทดลอง

1. เชื้อ TISTR 3428 สามารถเติมกลุ่มไฮดรอกซิลของสารโปรเกสทีโรนได้ โดยมีสีของ spot และมี Rf เหมือนสารมาตรฐาน (11-OH Progesterone) ตั้งแต่เวลาเลี้ยงเชื้อบนเครื่องแช่เยือกแข็ง 3-10 วัน ดังแสดงในตารางที่ 1 และในโครมาโตแกรมต่าง ๆ 1-6 ดู spot ที่มีเครื่องหมายดอกจัน (\*) ในโครมาโตแกรม 1-2 รูปที่ 1 และรูปที่ 2 โครมาโตแกรม 4 รูปที่ 3 โครมาโตแกรม 5 ซึ่งจะต้องนำสารที่ได้ผลเบื้องต้นนี้ไปตรวจวิเคราะห์ยืนยันด้วย NMR อีกทีหนึ่ง (สเปกตรัมของ NMR จะแสดงในโปสเตอร์)

2. เชื้อ TISTR 3427 ยังไม่สามารถเติมกลุ่มไฮดรอกซิลได้ ดังในโครมาโตแกรม 2

3. การปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 4.3-6.3 และไม่ปรับเลย ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังในโครมาโตแกรม 2, 3

4. การใช้เฟอร์รัสไอออนเพื่อเหนี่ยวนำเอนไซม์ให้มากขึ้น ยังไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงนัก แต่ดู spot ที่ถูก transform จะสมบูรณ์ขึ้น ดูโครมาโตแกรม 1 เทียบกับ 5

5. การเปลี่ยนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจาก Medium H มาเป็นสูตรที่มีไอออนต่าง ๆ เพิ่มขึ้น ทำให้ spot ของเฮโคเจนินเปลี่ยนไปจากสารตั้งต้นในระยะเวลา 7-9 วัน ดูโครมาโตแกรม 6

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดลองที่สภาวะต่าง ๆ กัน

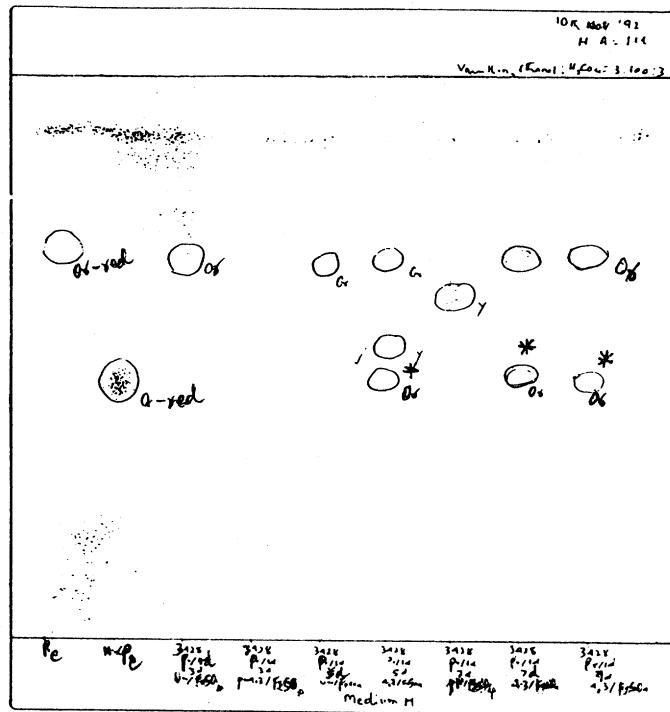
สภาวะการทดลอง	ผลการทดลอง	หมายเหตุ จุด**
1. การปรับ pH 4.3, 5.3, 6.3 และไม่ปรับเลย	การปรับ pH ไม่มีผลแตกต่างกัน เนื่องจากสภาพยังเป็นกรด-กลางอยู่เช่นเดิม	โครมาโตแกรม 2, 3
2. ระยะเวลาทดลองในเครื่องเขย่า 3, 5, 7, 10 วัน	เชื้อ TISTR 3427 ยังไม่สามารถเติมไฮดรอกซิลได้ตั้งแต่เวลา 3-10 วัน ส่วนเชื้อ TISTR 3428 สามารถเติมได้ใน Progesterone และมี spot ที่ผิดปกติไปสำหรับ Hecogenin ที่เวลา 7-10 วัน	โครมาโตแกรม 1, 2, 4
3. การเติมเฟอร์รัสไอออนเพื่อเหนี่ยวนำเอนไซม์	เชื้อ TISTR 3428 กับ Progesterone ยังไม่เห็นความแตกต่างนัก	โครมาโตแกรม 1, 5
4. การใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไอออน ฟอสเฟต แมกนีเซียม และเฟอร์รัสเพื่อเหนี่ยวนำเอนไซม์	เชื้อ TISTR 3427 และ TISTR 3428 ให้ spot ของ hecogenin ที่มี Rf ต่างจากสารมาตรฐาน ระยะเวลา 7-9 วัน	โครมาโตแกรม 6
5. Rf ของ 11-OH Progesterone และ hecogenin เทียบกับ สารมาตรฐาน	<div> <div>Progesterone RF</div> <div>11-OH Progesterone Rf</div> <div>P3428 Rf</div> <div>H3428 Rf</div> <div>Hecogenin Rf</div> </div> <div> <div>= 0.7</div> <div>= 0.37</div> <div>= 0.37</div> <div>= 0.34</div> <div>= 0.77</div> </div>	โครมาโตแกรม 1 และ 4



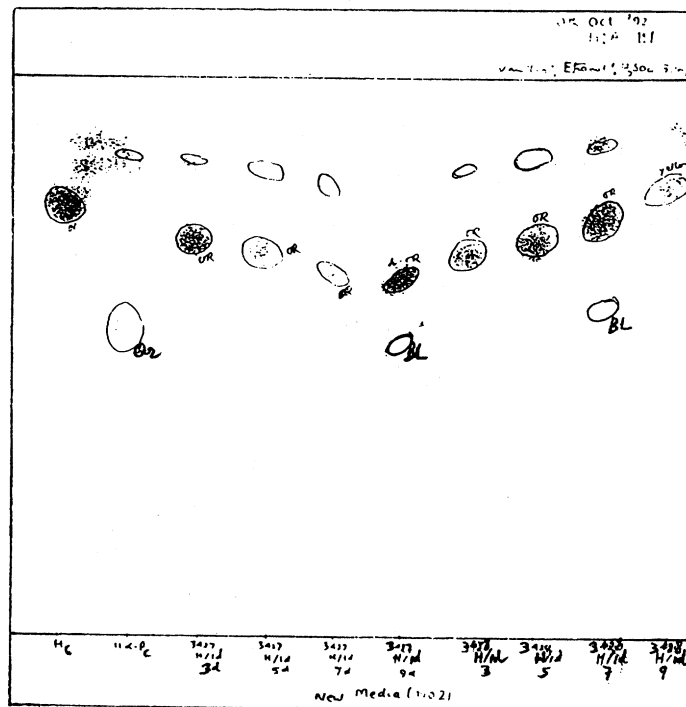




รูปที่ 3 โครมาโตแกรม 5 และ 6



6



## วิจารณ์

### 1. โปรเจสเตอโรน

- มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับสารตั้งต้น และจากการเทียบกับสาร 11-OH-Progesterone โดยดูที่ค่า Rf และสีของจุด\* ดูโครมาโตแกรม 1

- จากโครมาโตแกรม 1, 2 ยังพบจุดอื่น ๆ อีก แสดงว่าอาจมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น เกิดสารอื่น แต่ยังไม่สามารถให้คำตอบได้ เพราะยังไม่มีสารเทียบ และจะต้องทำการทดลองต่ออีก

- จากโครมาโตแกรม 4 สภาวะที่ 7 วัน จะให้สารที่ transform ก่อนข้างสมบูรณ์ ส่วน การเติมสารภายหลัง 1 วัน ยังมีจุดสีม่วงติดอยู่กับจุดสีส้ม แสดงว่ายังไม่สมบูรณ์

- โครมาโตแกรม 5 เติมเฟอรัสไอออน พบว่าจุด \* ที่ 5, 7 วัน pH 4.3 การ transform ก่อนข้างสมบูรณ์

### 2. เฮโคเจนิน

- มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับสารตั้งต้น ดูโครมาโตแกรม 1, 3, 4 จุดของเฮโคเจนินโดย เชื้อ TISTR 3428 เขย่าในเครื่อง 7, 10 วัน ให้สีส้มและ Rf ต่างจากสารตั้งต้น ซึ่งจะต้องทำการทดลองต่อไป

- จากโครมาโตแกรม 1, 3, 4, 6 ยังมีสารตั้งต้นเหลืออยู่มากเมื่อเทียบกับสารที่ไม่ทำ transform

- จากโครมาโตแกรม 6 เฮโคเจนินที่ 7, 9 วัน โดยเชื้อ 3428, 3427 ให้จุดสีน้ำตาลที่มี Rf ต่างจากสารตั้งต้น ซึ่งจะต้องทดลองปรับเปลี่ยนสภาวะต่อไป

- การวิเคราะห์เนื่องจากไม่มีสารเทียบ จะต้องนำไปแยกและวิเคราะห์ด้วย NMR และ MS

## สรุป

1. งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาต่อโดยปรับเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ เพื่อให้การ transformation สมบูรณ์ และมีประสิทธิภาพสูง เช่น ไม่ปรับ pH และระยะเวลาระหว่าง 3-5 วัน

2. เนื่องจากเฮโคเจนินไม่มีสารมาตรฐานที่เติม 11-ไฮดรอกซิล แล้วเทียบ จึงต้องแยกสาร จาก spot ที่มี Rf ต่างกันกับสารเฮโคเจนินเดิม ตรวจวิเคราะห์ด้วย NMR อีกทีหนึ่งเพื่อยืนยันผล

3. สารสเตอรอยด์ที่เติม 11-ไฮดรอกซิลแล้ว จะนำมาสังเคราะห์ร่วมโดยวิธีเคมีและชีวภาพ เพื่อผลิตยาในกลุ่มคอติโคสเตอโรน สำหรับอุตสาหกรรมยาต่อไป

## สัญลักษณ์

Q, Qr	= สีส้ม
Y	= สีเหลือง
V	= สีม่วง
P	= Progesterone
3428, 3427	= เลขที่เชื้อไรโซปัส
H	= Hecogenin
d	= day
B, BL	= สีน้ำตาล
P <sub>C11</sub>	= 11-OH-progesterone

## เอกสารอ้างอิง

- Abul-Hajj, Y.J. (1972). Stercochemistry of C-1,2-dehydrogenation of 5 B-pregnane-3, 11-20, trione by *Septomyxa affinis* J. Biol. Chem 247 686-691.
- Applez Weig (1962). Steroid Drug 83 47-49, 66-70.
- Blunden, G. Miss Culling and K. Jewers (1975). Steroidal sapogenins a review of actual and potential plant sources, tropical science. 17
- Callow, R.K., Cornforth, J.W. and Spensley, P.C. (1951). A source of hecogenin. Chem. and Ind. 699-700.
- EL-Refai, A.M.L. Sallam and I.A. El-Kady (1970) Transformation of progesterone by *Rhizopus nigricans* REE 129 as influenced by modification of the fermentation medium. Bull chem. Soc. Jph 43, 2878-2884.
- Gowsala Pavanadasivam and Bruce B. Jarvis (1983). Microbial Transformation of Macrocyclic Trichothecenes. App. & Env. Microbiology Vol. 46 No. 2, pp. 480-483.
- Hanson, F.R., K.M. Mann, E.D. Neilson, H.V. Anderson, M.P. Brunner, J.N. Karnemat, D.R. Colingsworth and W.J. Haines (1953) Microbiological transform of steroids J. Am. Chem. Soc. 75. 5369-5370.
- Ringold, H.J., M. Hayano, and V. Stefanovic (1963). Concerning the stercochemistry and mechanism of the bacterial C-1, 2-dehydrogenation of steroids. J. Biol. Chem. 238, 1960-1965.
- Peterson D.H., et. al. (1953); Microbial Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at C-11 of Progesterone. J. of the Amer. Chem. Soc. 74, 1953.