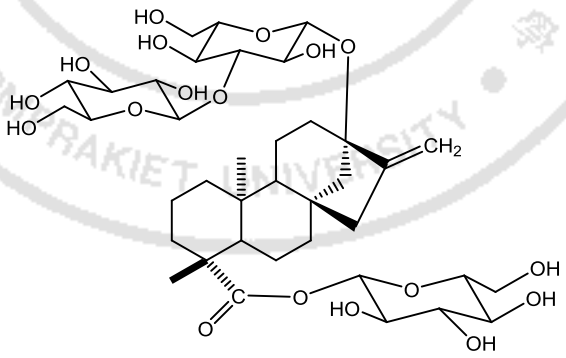
# บทที่ 2
# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ต้นหญ้าหวาน

หญ้าหวานมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Stevia rebaudiana* (Bertoni) เป็นพืชที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ทางอเมริกากลางและอเมริกาใต้ เป็นไม้ล้มลุก มีพุ่มเตี้ยสูง 30-90 เซนติเมตร ใบเป็นใบเดี่ยว รูปใบหอกกลับ ขอบใบหยัก มีช่อดอกสีขาว สารหลักที่มีปริมาณมากที่มีอยู่ในต้นหญ้าหวานคือสตีวิโอไซด์ (stevioside; **1**) มีอยู่ 5-10% ของน้ำหนักแห้ง รีโบไดโอไซด์ เอ (rebaudioside A) มี 2-4% รีโบไดโอไซด์ ซี (rebaudioside C) มี 1-2% และไกลโคไซด์มีอยู่ 0.4-0.7% (Wood et al, 1995) หญ้าหวานมีความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครสประมาณ 300 เท่า (Soejarto et al,1983) ไม่มีแคลอรี ใช้เป็นสารให้ความหวานในอาหาร เครื่องดื่ม ลูกกวาด ผักดอง และอาหารทะเล และใช้เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และโรคอ้วน หญ้าหวานจึงเป็นที่นิยมในการนำมาใช้บริโภค นอกจากนี้สารจากหญ้าหวานยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญคือ รักษาระดับน้ำตาลในเลือด รักษาระดับความดันโลหิตสูง (Chen et al. 2000) ต้านอนุมูลอิสระ (Xi et al. 1998) ต้านการอักเสบ ต้านเนื้องอก (Jayaraman et al. 2008) เป็นต้น Roberts and Renwick (2008) ศึกษาถึงความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง พบว่าไม่มีผลกระทบต่อสัตว์ทดลอง แม้ให้กินในปริมาณสูงมากก็ตาม

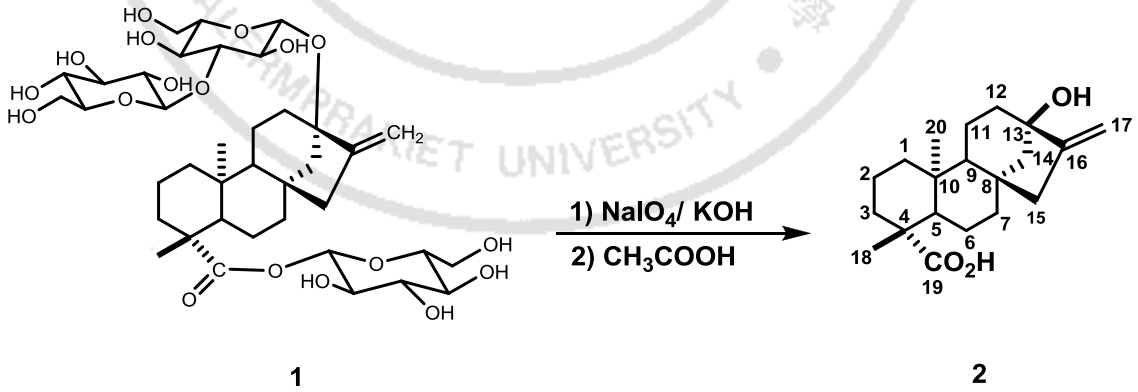



1

**ภาพที่** 2-1 โครงสร้างของสารสตีวิโอไซด์ (1)

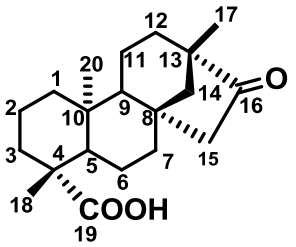
## 2.2 การปรับเปลี่ยนทางเคมีของแอนาลอกของสตีวิโอไซด์

ในปี ค.ศ. 1931 Bridel และ Lavieille ศึกษาโครงสร้างของสตีวิโอไซด์ (1) พบว่าเป็นไดเทอร์ปีนไกลโคไซด์ โครงสร้างหลักประกอบด้วยส่วนที่เป็นอะไกลโคน และส่วนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส 3 หน่วยเกาะอยู่ดังภาพที่ 2-1 มีการนำสตีวิโอไซด์ (1) มาไฮโดรไลส์โดยใช้เอนไซม์จากน้ำย่อยของหอยทาก (*Helix pomatia*) สามารถไฮโดรไลส์ส่วนน้ำตาลได้ส่วนอะไกลโคนคือสตีวิออล (2) และใช้สารละลายกรดซัลฟุริกเจือจางไฮโดรไลส์ส่วนน้ำตาลได้ส่วนอะไกลโคนคือไอโซสตีวิออล (3) ดังภาพที่ 2-3 สารทั้งสองชนิดถูกนำมาเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์แอนาลอกของสตีวิโอไซด์เป็นจำนวนมาก ในส่วนของสารสตีวิออล (2) ที่ได้จากการไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์นั้นสามารถแยกออกมาในปริมาณที่น้อยจึงเป็นข้อจำกัดในการนำมาสังเคราะห์เป็นแอนาลอกอื่นๆ ในปี ค.ศ. 1980 Ogawa และคณะได้ใช้วิธีการทางเคมีในการสังเคราะห์ ดังภาพที่ 2-2 สามารถสังเคราะห์สารสตีวิออล (2) ได้ในปริมาณที่มากกว่าการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ ในปัจจุบันจึงมีการใช้การสังเคราะห์โดยวิธีการทางเคมีเพื่อให้ได้สตีวิออล (2) และไอโซสตีวิออล (3) ในการศึกษาแอนาลอกของสตีวิโอไซด์และฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ การศึกษาการสังเคราะห์แอนาลอกในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ของสตีวิโอไซด์ ในปัจจุบันเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากพบว่าแอนาลอกของสตีวิโอไซด์บางชนิดยังคงมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิตสูง ต้านการอักเสบ ต้านการเกิดเนื้องอก และต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น

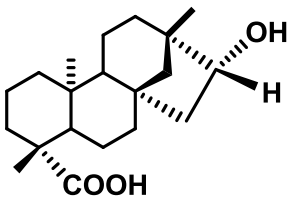



**1** **2**

**ภาพที่** 2-2 ภาพแสดงการสังเคราะห์สตีวิออล (2) จากสตีวิโอไซด์ (1)




**3**




**4**

**ภาพที่** 2-3 โครงสร้างสารไอโซสตีวิออล (3) และสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออล (4)

ในปี ค.ศ. 2000 Al'fonsov และคณะได้นำสารไอโซสตีวิออลมาทำปฏิกิริยารีดักชัน ได้สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออล (4) ที่มีฤทธิ์ในการลดระดับความดันโลหิตสูงได้ดี ในปี ค.ศ 2008 Chatsudthipong และคณะ ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร 1 สาร 2 สาร 3 และสาร 4 ในการลดการสูญเสียคลอไรด์ไอออนในลำไส้เล็ก ในโรคท้องร่วง ซึ่งสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตเกิดจากการสูญเสียเกลือแร่ในร่างกายมากเกินไป จากการทดลองพบว่าสาร 2 สาร 3 และสาร 4 สามารถปิดช่องคลอไรด์ไอออน ลดการสูญเสียคลอไรด์ได้ โดยเฉพาะสาร 4 มีฤทธิ์ค่อนข้างสูงมาก ในขณะที่สารหลักคือสตีวิโอไซด์ (1) ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้เลย

## 2.3 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Bacillus megaterium*

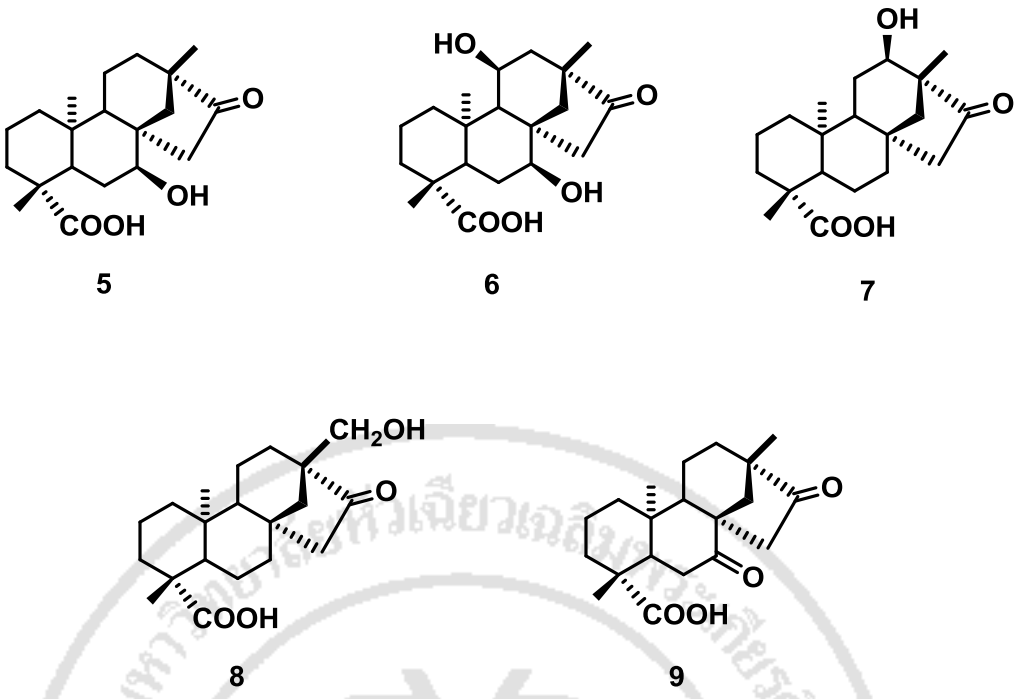
เชื้อ *Bacillus megaterium* จัดอยู่ใน Familly Bacillaceae เช่นเดียวกับ เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อแกรมบวก เซลล์รูปท่อน จัดเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ หรือใช้อากาศเล็กน้อย (aerobe or facultative) เชื้อ *Bacillus megaterium* สามารถสร้างกรดได้จากน้ำตาลอะราบิโนส ไซโลส และแมนนิทอล ย่อยเจลาตินได้ดีที่อุณหภูมิ 22 $^{O}$C และสามารถสร้างสปอร์ได้ภายในเซลล์ (endospore forming) โดยเอนโดสปอร์มีความทนต่อสภาวะตามธรรมชาติ และการเกิดเอนโดสปอร์จะเริ่มสร้างเมื่อสารอาหารลดลงหรือเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ (stationary phase) โดยเซลล์หนึ่งเซลล์จะมีเพียงหนึ่งเอนโดสปอร์เท่านั้น เมื่อเอนโดสปอร์เจริญเต็มที่จะสามารถปล่อยสู่ภายนอกโดยการแตกออกของเซลล์แม่ เมื่อมีอาหารที่เหมาะสมสปอร์จะงอกใหม่เป็น vegetative cell อีกครั้ง และสามารถเจริญได้ในอาหารสูตรขั้นต่ำ (minimal medium) โดยไม่จำเป็นต้องมีสารจำเพาะหรือสารเร่งการเจริญ (Vary. 1994) และสามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปในดินและบริเวณที่มีการเพาะปลูก เนื่องจากความสามารถที่หลากหลายของเชื้อ *Bacillus megaterium* จึงได้มีการประยุกต์ใช้งานเชื้อนี้ในด้านต่างๆ รวมทั้งทางด้านอาหาร และอุตสาหกรรมยา เนื่องจากเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค

ซึ่งตรงข้ามกับเชื้อ *Escherichia coli* และเนื่องจากเชื้อดังกล่าวสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย จึงเป็นที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมที่สามารถเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกได้ โดยเชื้อ *Bacillus megaterium* สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ($\alpha$-amylase) และบีต้าอะไมเลส ($\beta$-amylase) ซึ่งใช้งานในอุตสาหกรรมขนมปัง (Nigam, P. and Singh, D. 1995) ยิ่งกว่านั้นยังสามารถผลิตเอนไซม์ penicillin G acylases ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์สาร $\beta$-lactam เพื่อใช้ในการผลิตยาปฏิชีวนะ (Panbangred et al. 2000) เอนไซม์โปรติเอส (protease) ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมหนัง ยิ่งกว่านั้นเชื้อ *Bacillus megaterium* ยังสามารถผลิตสาร polyhydroxybutyrate (PHB) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตพลาสติกทางชีวภาพที่ย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (Hori et al. 2002) หรือความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ทั้งสภาพที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศได้ (Raux et al. 1998)

จากความสามารถที่หลากหลายของเชื้อ *Bacillus megaterium* จึงมีความสนใจในการนำมาปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารแอนาลอกของสตีวิโอไซด์ (stevioside, **1**) เพื่อให้ได้สารเมแทบอไลท์ ที่มีโครงสร้างหลากหลายและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงขึ้น

**2.4 การปรับเปลี่ยนโดยกระบวนการทางชีวภาพ**

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารโดยใช้แอนาลอกของสตีวิโอไซด์ (stevioside, **1**) ด้วยกระบวนการทางชีวภาพได้มีการศึกษามานานพอสมควรแล้ว โดยในปี ค.ศ. 2004 Akihisa และคณะ รายงานถึงการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารไอโซสตีวิออล (isosteviol, **3**) ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยกรดของสารสตีวิโอไซด์ ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญคือ ลดระดับน้ำตาลในเลือดและยับยั้งการเกิดเซลล์เนื้องอก โดยใช้เชื้อราที่แตกต่างกัน 3 ชนิดได้แก่ *Aspergillus niger, Glomerella cingulata* และ *Moriteirella elongate* ซึ่งสารไอโซสตีวิออล (**3**) ถูกปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* ได้สารผลิตภัณฑ์คือ 7$\beta$-hydroxyisosteviol (**5**), 7$\beta$,11$\beta$-dihydroxyisosteviol (**6**) และ 12$\beta$-hydroxyisosteviol (**7**) ในส่วนของเชื้อ *Glomerella cingulata* ได้สารผลิตภัณฑ์คือ 17-hydroxyisosteviol (**8**) และสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการปรับเปลี่ยนด้วยเชื้อ *Moriteirella elongate* คือ 7-oxoisosteviol (**9**) พบว่าสาร **5**, **6**, **7**, **8** และ **9** มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดเซลล์เนื้องอกมากกว่าสารไอโซสตีวิออล (**3**) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น

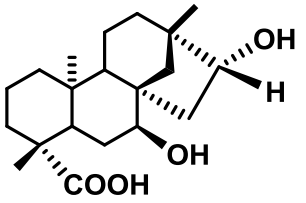



5 6 7

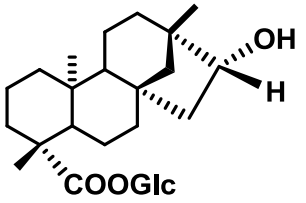
8 9

**ภาพที่** 2-4 โครงสร้างสารแอนาลอกของสตีวิโอไซด์ สาร 5-9

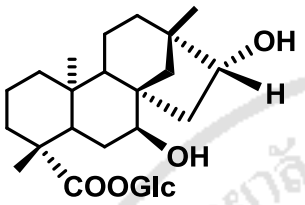
ในปีเดียวกัน (2004) Yang และคณะ รายงานการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร ไดไฮโดรไอโซสตีวิออล (dihydroisosteviol, 4) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยารีดักชันของสารไอโซสตีวิออล สาร 4 ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในการลดความดันโลหิตสูง การทดลองนี้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือ *Bacillus megaterium* และ *Aspergillus niger* กล่าวคือสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออล ถูกปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยเชื้อ *Bacillus megaterium* ได้สารผลิตภัณฑ์คือ สาร 7β-hydroxydihydroisosteviol (10), สาร dihydroxyisosteviol glucopyranosyl ester (11) และ 7β-hydroxydihydroisosteviol glucopyranosyl ester (12) ในส่วนของเชื้อ *Aspergillus niger* ได้สารผลิตภัณฑ์คือสาร 1α,7β-dihydroxydihydroisosteviol (13) และ 1α,7β-dihydroxyisosteviol (14) พบว่าสารผลิตภัณฑ์ดังกล่าว แสดงฤทธิ์ในการลดความดันโลหิตสูง โดยที่สาร 12 และ สาร 13 แสดงฤทธิ์ที่สูงกว่าสารตั้งต้น



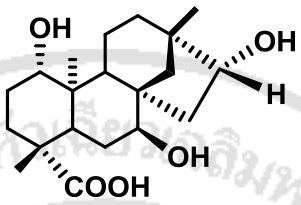

**10**



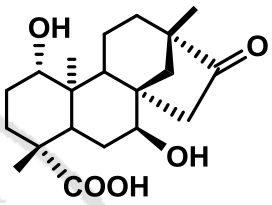

**11**




**12**



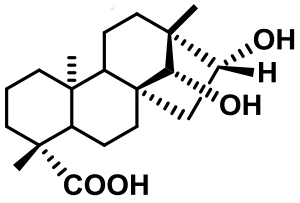

**13**



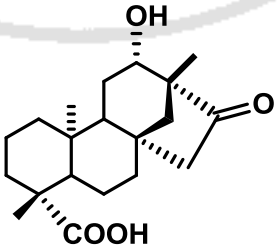

**14**

**ภาพที่** 2-5 โครงสร้างสารแอนาลอกของสตีวิโอไซด์ สาร 10-14

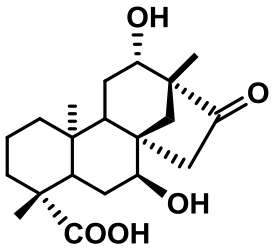
สารไดไฮโดรไอโซสตีวิออล (4) นอกจากพบว่ามีฤทธิ์สูงในการลดระดับความดันโลหิตแล้ว ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งอีกด้วย โดย Lin และคณะ (2007) ได้นำสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลมาปรับเปลี่ยนโดยกระบวนการทางชีวภาพ ด้วยเชื้อ *Mortierella isabellina* ได้สารผลิตภัณฑ์คือ สาร 10,14$\alpha$-hydroxydihydroisosteviol (15), 12$\alpha$-hydroxyisosteviol (16) และ 7$\beta$,12$\alpha$-dihydroxyisosteviol (17) พบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้




**15**



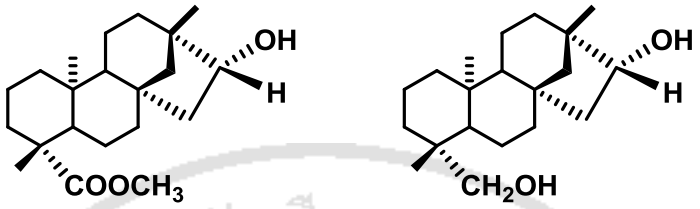

**16**




**17**

**ภาพที่** 2-6 โครงสร้างสารแอนาลอกของสตีวิโอไซด์ สาร 15-17

ในส่วนของการศึกษาถึงความสามารถของเชื้อ *Bacillus megaterium* ที่ใช้ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์ (dihydroisosteviol methyl ester, **18**) และแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (19-alcoholic analogues, **19**) ที่ดำเนินการวิจัยครั้งนี้ยังไม่มีการศึกษามาก่อน




**18** **19**

**ภาพที่** 2-7 โครงสร้างสารแอนาลอกของสตีวิโอไซด์ สาร 18 และ 19

## 2.5. **กรอบแนวคิดในการวิจัย** (Conceptual Framework)

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่มสตีวิโอไซด์และแอนาลอกของ สตีวิโอไซด์ ที่ผ่านมาพบว่าสารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและมีความหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิตสูง ต้านมะเร็ง ต้านเชื้อจุลินทรีย์ต้านการอักเสบ ลดอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการเร่งการเจริญเติบโตของพืช และพบว่าสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออล (สาร **4**) มีผลในการลดการสูญเสียคลอไรด์ไอออนในผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วง

การนำสารในกลุ่มนี้มาทำการปรับเปลี่ยนโดยกระบวนการทางชีวภาพด้วยการใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าวิธีการทางเคมี จะได้สารเมแทบอไลท์ที่เกิดขึ้นได้ยากโดยวิธีการทางเคมี เช่นเมแทบอไลท์ที่เกิดไฮดรอกซิเลตที่ตำแหน่งต่างๆ ของโครงสร้าง ซึ่งทางเคมีเกิดได้ยากมาก สารเมแทบอไลท์ที่เกิดการไฮดรอกซิเลตดังกล่าวมีความเฉพาะเจาะจงทางสเตอริโอเคมี และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย อาจทำให้ได้สารใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าเดิม และได้สารแอนาลอกเพิ่มขึ้น เป็นแนวทางในการนำไปสังเคราะห์เพื่อให้ได้แอนาลอก และสารใหม่

กลุ่มวิจัยได้เห็นประโยชน์ที่จะนำแอนาลอกของสารในกลุ่มนี้มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้นและได้แอนาลอกที่มีจำนวนมากขึ้นเพื่อนำไปพัฒนาเป็นยาและสารออกฤทธิ์ต่อไป โดยได้นำสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออลเมทิลเอสเตอร์ (สาร **18**) และแอลกอฮอลแอนาลอกที่ตำแหน่ง 19 (สาร **19**) ซึ่งมีโครงสร้างหลักเหมือนสารไดไฮโดรไอโซสตีวิออล (สาร **4**) ที่มีผลในการลดการสูญเสียคลอไรด์ไอออนในผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่วงซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต

มาทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดย *Bacillus megaterium* NRRL B-938 ซึ่งคาดว่าจะได้สารเมแทบอไลท์ที่เกิดขึ้นได้ยากโดยวิธีการเคมี ซึ่งอาจเป็นสารใหม่ที่ไม่มีการศึกษามาก่อน และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่าสารเริ่มต้นและสามารถนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายมากขึ้น