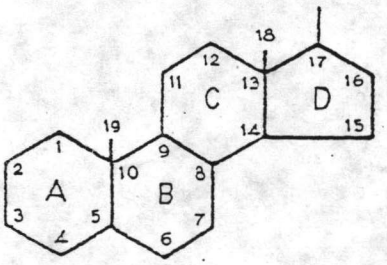
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

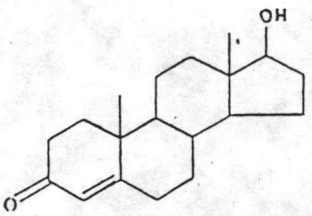
บทนำ

สเตียรอยด์ (steroid) เป็นสารประกอบอินทรีย์กลุ่มหนึ่ง จัดเป็นสารประเภทไขมัน มีโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนเปอร์ไฮโดรไซโคลเพนทาโนฟีแนนทรีน (perhydrocyclopentanophenanthrene ring) โดยมีวงแหวน A B และ C เป็นวงแหวนไซโคลเฮกเซน (cyclohexane ring) ส่วน D เป็นวงแหวนไซโคลเพนเทน (cyclopentane ring) (รูปที่ 1)



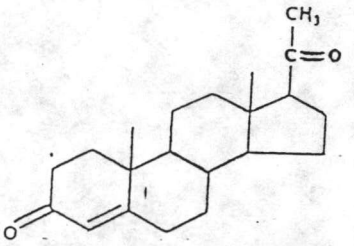
รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างหลักของสเตียรอยด์

สเตียรอยด์แต่ละชนิดมีแอคติวิตีต่าง ๆ กัน ขึ้นอยู่กับหมู่ข้างเคียงหรือแขนงข้างเคียง (side group หรือ side chain) บางตัวมีคุณสมบัติเป็นฮอร์โมน เช่น โปรเจสเตอโรน (progesterone) และเทสโทสเตียโรน (testosterone) ฯลฯ บางตัวเป็นกรดน้ำดี เช่น กรดโคลิก (cholic acid) และกรดดีออกซีโคลิก (deoxycholic acid) ฯลฯ นอกจากนี้บางตัวยังเป็นสเตียรอล (สเตียรอยด์แอลกอฮอล์) เช่น สติกมาสเตียรอล (stigmasterol) และเออโกสเตียรอล (ergosterol) ฯลฯ (Lehninger, 1975; Muerray, 1976; Gower, 1979) (รูปที่ 2)



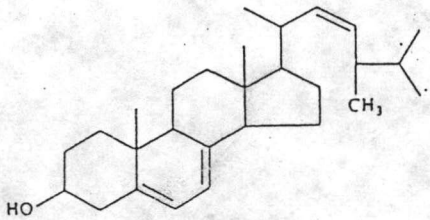
เทสโทสเตียโรน

(testosterone)



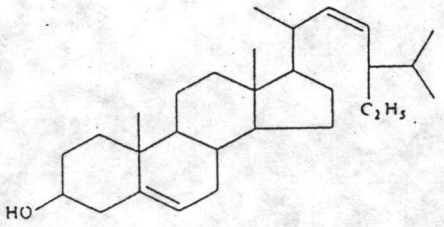
โปรเจสเตอโรน

(progesterone)



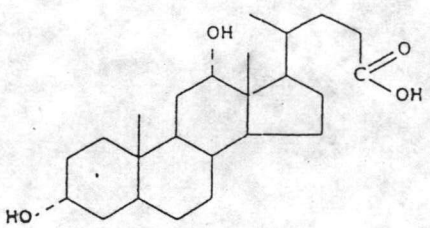
เออโกสเตียรอล

(ergosterol)



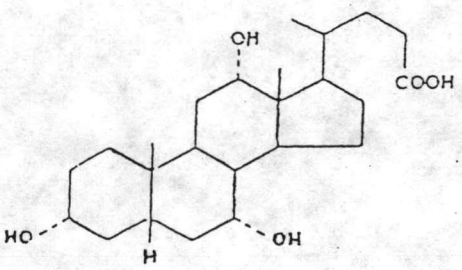
สติกมาสเตียรอล

(stigmasterol)



กรดดีออกซีโคลิก

(dioxycholic acid)



กรดโคลิก

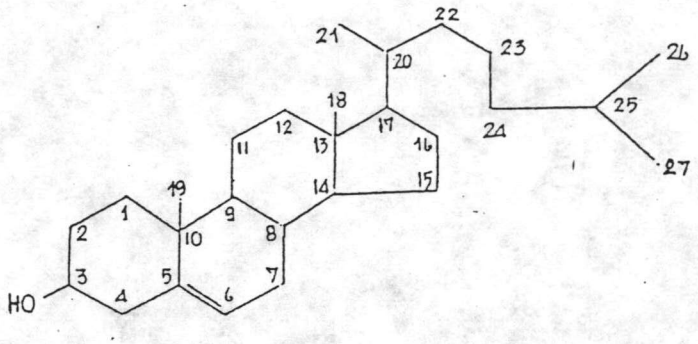
(cholic acid)

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของสเตียรอยด์ชนิดต่าง ๆ

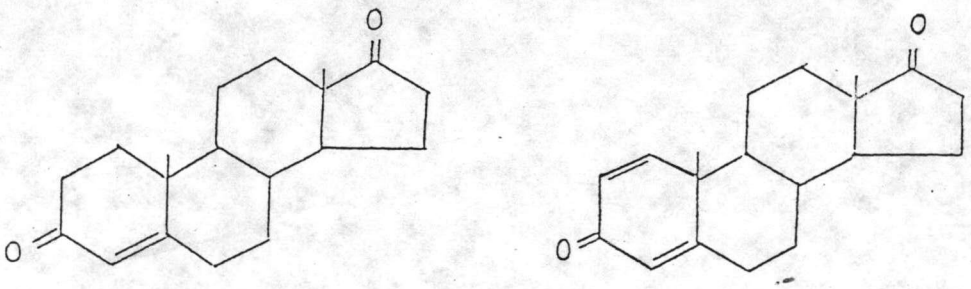
ฮอร์โมนสเตียรอยด์เป็นกลุ่มสารอินทรีย์ที่มีประโยชน์มากในทางการแพทย์ เพราะสามารถใช้เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ เช่น ไขข้ออักเสบ การแพ้ต่อสารบางชนิด ตลอดจนใช้เป็นยาทดแทนฮอร์โมนที่ขาดหายไป หรือใช้เป็นยาคุมกำเนิดในสตรี ฯลฯ การผลิตฮอร์โมนสเตียรอยด์ มักทำได้โดยสกัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ คือ เซลล์สัตว์ ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายและต้นทุนในการผลิตสูง ปัจจุบันเนื่องจากความต้องการฮอร์โมนสเตียรอยด์มีสูงขึ้นจึงมีผู้พยายามผลิตจากสารตั้งต้นบางชนิดที่ราคาถูก โดยผ่านกระบวนการแปลงรูปทางชีวภาพ (biotransformation) โดยใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ สารตั้งต้นที่ใช้มักจะมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันกับสเตียรอยด์ อาทิเช่น คอเลสเทอรอล (cholesterol) ซึ่งได้จากเซลล์สัตว์ สติกมาสเตียรอล (stigmasterol) โซลาซิดีน (solasidine) และไดออสเจนิน (diosgenin) ได้จากเซลล์พืช เป็นต้น (Kieslish, 1980; Hill และคณะ 1982; Crueger และคณะ, 1984; Watanabe และคณะ, 1986)

ปัจจุบันมีการใช้จุลินทรีย์เป็นตัวช่วยในการแปลงรูปทางชีวภาพกันอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เพราะวิธีทางชีวภาพมีข้อได้เปรียบกระบวนการทางเคมีหลายประการ อาทิเช่น ค่าใช้จ่ายต่ำ ปฏิกิริยาทางชีวภาพมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง สามารถเกิดปฏิกิริยาในสภาวะปกติไม่รุนแรง โดยมีปฏิกิริยาข้างเคียงเกิดขึ้นน้อย และเมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นแล้ว สามารถแยกสารผลิตภัณฑ์และทำให้บริสุทธิ์ง่าย (Peterson,1963 ; Kieslich,1980 ; Watanabe และคณะ ,1986)

คอเลสเทอรอลเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญชนิดหนึ่งสำหรับการผลิตฮอร์โมนสเตียรอยด์ เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่มีอยู่ในธรรมชาติ (รูปที่ 3) การผลิตสเตียรอยด์จากคอเลสเทอรอลจะต้องผ่านขั้นตอนการตัดหมู่ข้างเคียงออกก่อน เพื่อที่จะได้สารตัวกลางที่มีคาร์บอน 19 ตัว คือ 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน (4-Androstene-3,17-dione, AD) หรือ 1,4-แอนโดรสตาไดอีน-3,17-ไดโอน (1,4-Androstadiene-3,17-dione, ADD) (รูปที่ 4) ขั้นตอนนี้อาจทำได้โดยการใช้วิธีการทางเคมีและวิธีทางชีวภาพ



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของคอเลสเทอรอล



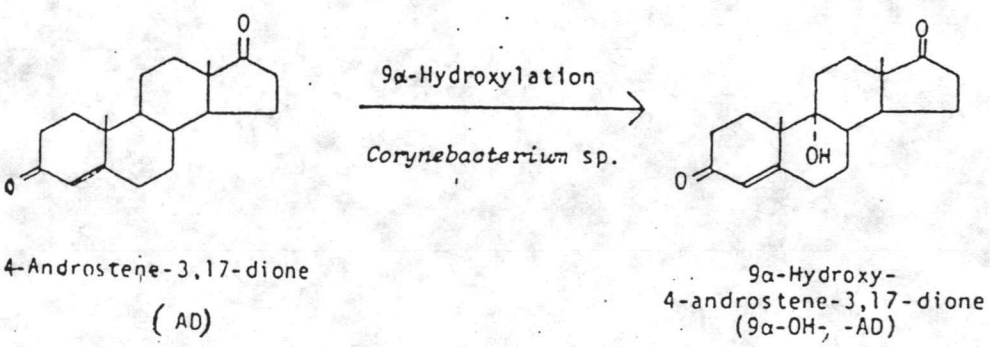
ก. ข.

รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของ ก) 4-Androstene-3,17-dione (AD) และ
ข) 1,4-Androstadiene-3,17-dione (ADD)

การใช้ปฏิกิริยาเคมี เช่น ปฏิกิริยาโครมิกออกซิเดชั่น (chromic oxidation) ในการตัดหมู่ข้างเคียงของคอเลสเทอรอลจะได้ผลเป็นสารชนิดอื่น ๆ แต่ไม่ได้สารตัวกลาง AD หรือ ADD เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีความจำเพาะ ในขณะที่การใช้ปฏิกิริยาของจุลินทรีย์จะให้ผลเป็นสารตัวกลาง AD หรือ ADD เนื่องจากมีการตัดหมู่ข้างเคียงไม่สมบูรณ์ และเป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะ คือ เป็นการตัดหมู่ข้างเคียงที่กลุ่มอัลคีน ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เท่านั้น โดยไม่ตัดส่วนนิวเคลียสของคอเลสเทอรอล (Nagasawa และคณะ, 1969; Murray, 1976; Crucger, 1984; Martin, 1984)

ในการแปลงรูปของสเตียรอยด์ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์ บางกรณีต้องใส่สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 9-อัลฟา-ไฮดรอกซิเลส (9α-hydroxylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการไฮโดรไลซ์นิวเคลียสของสเตียรอยด์ สารยับยั้งจะเป็นตัวป้องกันมิให้เกิดการย่อยนิวเคลียสของสเตียรอยด์ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ การแปลงรูปทางชีวภาพมักจะยังคงรูปของโมเลกุลหลักที่ประกอบด้วยวงแหวนเปอร์ไฮโดรไซโคลเพนทาโนพิแนนทรีน โดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปของหมู่ข้างเคียง ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 หรือที่คาร์บอนตำแหน่งอื่น ๆ ของโมเลกุล นอกจากนี้ยังอาจใช้สารไดไพริดิล (α-α'-dipyridyl) เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 9 อัลฟา-ไฮดรอกซิเลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Nagasawa และคณะ, 1970; Nakamatsu และคณะ, 1979; Saunders และคณะ, 1986; Prome และคณะ, 1987)

สาร AD และ ADD เป็นสารสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 19 ตัว ใช้เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการผลิตฮอร์โมนสเตียรอยด์ชนิดอื่น ๆ ที่สำคัญ กล่าวคือ จากสาร AD สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ เทสโทสเตียโรน และบางกรณีเมื่อใช้ปฏิกิริยาการแปลงรูปทางชีวภาพ โดย *Corynebacterium* sp. จะได้ 9-แอลฟา-ไฮดรอกซี-4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน (9 α-hydroxy-4-Androstene-3,17-dione) ซึ่งสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ คอติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid) หลายชนิดโดยวิธีทางเคมี เช่น ไฮโดรคอติโซน อะซิเตท (hydrocortisone acetate) (Peterson, 1963; Sonomoto และคณะ, 1983; Martin, 1984)

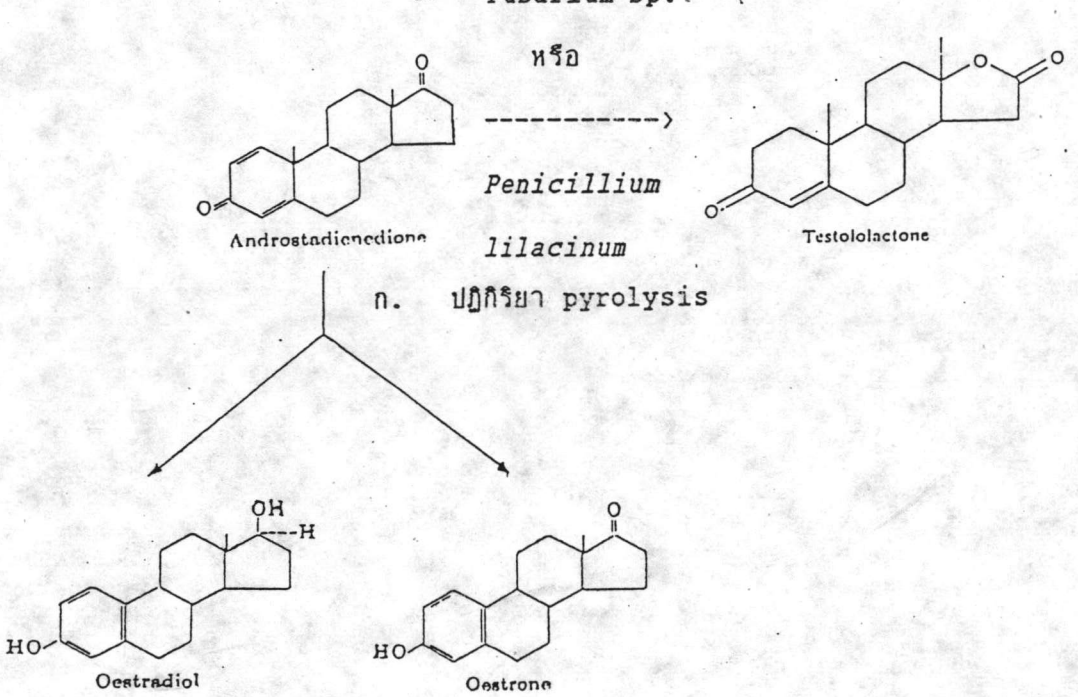


4-Androstene-3,17-dione
(AD)

9α-Hydroxy-
4-androstene-3,17-dione
(9α-OH-, -AD)

รูปที่ 5 การแปลงรูปทางชีวภาพของ AD เป็น 9 -hydroxy-4-Androstene-3,17-dione โดย *Corynebacterium* sp.

สำหรับสาร ADD สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมนเพศ (sex hormone) เช่น เอสโตรน (estrone) และเอสตราดิโอล (estradiol) โดยวิธีทางเคมี หรือเปลี่ยนเป็นเทสโทโลแลคโตน (testololactone) โดย *Fusarium* sp. หรือ *Penicillium lilacinum* (Peterson, 1963; Martin; 1984) (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 การใช้สาร ADD เป็นสารตั้งต้นในการผลิตฮอร์โมนเพศ โดยใช้ปฏิกิริยาเคมี (ก) และการใช้จุลินทรีย์ (ข)

ได้มีรายงานว่า จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถแปลงรูปคอเลสเทอรอลด้วยวิธีทางชีวภาพได้ เช่น *Arthrobacter Bacillus Brevibacterium Corynebacterium Microbacterium Streptomyces Mycobacterium* และ *Nocardia* (Arima และคณะ, 1969; Rose, 1980; Iizuka และคณะ, 1981)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการใช้จุลินทรีย์เพื่อศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
Practinomycetes crythropolis	ก. 3-oxoetiocholest-4 enoic acid ข. A-nor-3,5-secocholest-5-en-3-oic acid ค. isocaroic acid	Turfitt (1947)
Azotobacter sp.	ก. cholestenone ข. 7-dehydrocholesterol	Horvath และคณะ (1947)
Nocardia sp.	ก. pregn-4-en-3-oxo-20-carboxylic acid ข. AD ค. ADD	Whitmarsh (1964)
Nocardia restrictus	ก. 3-hydroxy-19-bisnor-chola-1, 3,5-trien-22-oic acid ข. 3-hydroxy-19-bis-norchola-1, 3,5, tetraen-22-oic acid	Sih และคณะ (1967)
Nocardia restrictus	3-oxochola-1,4-dien-24-oic acid	Sih และคณะ (1968)
Arthrobacter simplex I.A.M.1660	ADD	Nagasawa และคณะ (1969)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
Arthrobacter simplex-I.A.M.1660 และ *Nocardia corallina*-I.F.O. 3338	ADD และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ	Nagasawa และคณะ (1970)
Nocardia sp.	ก. pregna-1,4-dien-3-one-20-carboxylic acid ข. ADD	Arima และคณะ (1978)
Corynebacterium sp. ATCC 31384	ก. 20-carboxy-pregna-1,4-diene-3-one(BNC) ข. ADD ค. cholestenone	Hill และคณะ (1982)
Pseudomonas sp. NCIB 10590	ก. cholest-4-en-3-one ข. AD ค. ADD ง. chol-4-en-3-one-24-oic acid จ. chola-1,4-dien-3-one-24-oic acid ฉ. preg-4-en-3-one-20-carboxylic acid ช. pregna-1,4-dien-3-one-20-carboxylic acid	Robert และคณะ (1983)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการแปลงรูปทางชีวภาพของสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ โดยจุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ AD และ ADD

สารตั้งต้น	จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
cholesterol (cholest-s-en-3 -ol)	*Nocardia* sp.	AD และ ADD	Whitmarsh (1964) Arima และคณะ (1978)
5 -cholestan-3 -ol	*Mycobacterium phlei*	ADD	Wix และคณะ (1968)
5 -cholestan-3-one	*Mycobacterium phlei*	ADD	Wix และคณะ (1968)
choles-5-en-3-one	*Mycobacterium phlei*	ADD	Wix และคณะ (1968)
cholesta-1,4-dien-3-one	*Mycobacterium phlei*	ADD	Wix และคณะ (1968)
ergosta-4,22-dien-3-one	*Mycobacterium phlei*	ADD	Wix และคณะ (1968)
5 -ergost-22-en-3-one	*Mycobacterium phlei*	ADD	Wix และคณะ (1968)
stigmast-5-en-3 -ol	*Mycobacterium phlei*	ADD	Wix และคณะ (1968)
3 -acetoxycholest-5-ene	*Mycobacterium phlei*	ADD	Wix และคณะ (1968)
cholest-4-en-3-one	*Mycobacterium phlei*	ADD	Wix และคณะ (1968)
	Mycobacterium sp. B-3683		
cholesterol		AD	Wix และคณะ (1968)
		ADD	Marsheck และคณะ (1972)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สารตั้งต้น	จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
cholest-4-en-3-one	*Mycobacterium butyrieum* *Mycobacterium fortuitum* *Mycobacterium phlei* *Mycobacterium smegmatis* *Mycobacterium* sp. B-3683 *Mycobacterium thermophylus*	ADD	Wix และคณะ (1968)
sapogenin	*Mycobacterium fortuitum* *Mycobacterium phlei*	ADD	Ambrus และคณะ (1969)
cholesterol	*Arthrobacter simplex* I.A.M.1660	ADD	Nagasawa และคณะ (1970)
cholesterol	*Arthrobacter simplex* *Nocardia corallina* I.F.O. 3338	ADD	Nagasawa และคณะ (1970)
sitosterol	*Mycobacterium* sp. B-3683	AD	Marsheck และคณะ (1972)
stigmast-4-en-3-one	*Mycobacterium* sp. B-3683	ADD	Marsheck และคณะ (1972)
stigmasta-1,4-dien-3-one	*Mycobacterium* sp. B-3683	ADD	Marsheck และคณะ (1972)
stigmasta-4,22-dien-3-one	*Mycobacterium* sp. B-3683	ADD	Marsheck และคณะ (1972)

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สารตั้งต้น	จุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
stigmasta-5,22-dien--3 -ol (stigmasterol)	*Mycobacterium* sp. B-3683 *Mycobacterium* phlei	ADD	Marsheck และคณะ (1972)
soy bean sterols	*Mycobacterium* sp. B-3683 *Mycobacterium* sp. NRRL-B-3683	AD ADD	Conner และคณะ (1976)
tall oil sterols	*Mycobacterium* sp. NRRLB-3683	AD ADD	Conner และคณะ (1976)
cholesterol	*Pseudomonas* sp. NCIB 10590	ADD	
pregnenolone	*Arthrobacter simplex*	ADD	Srivastava และคณะ (1985)
sugar-cane sterols	*Arthobacter globiformis*	ADD	Srivastava และคณะ (1985)
diosgenin	*Mycobacterium fortuitum* NTCC-1542 *Mycobacterium fortuitum* NTCC-10394 *Mycobacterium phlei* MUCOB-MUCOB-346	AD ADD	Saunders และคณะ (1986)
7 -hydroxycholesterol	*Mycobacterium aurum*	AD ADD	Prome และคณะ (1987)
7-oxocholesterol	*Mycobacterium aurum*	AD ADD	Prome และคณะ (1987)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการแปลงรูปทางชีวภาพของสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ เป็นสาร ADD ด้วย *Arthrobacter simplex* (Nagasawa และคณะ, 1970)

สารตั้งต้น	ปริมาณสารตั้งต้น (ร้อยละ)	ADD เทียบจากสารตั้งต้น (ร้อยละ)
pregnenolone	0.05	85.4
lithocholic acid	0.05	62.6
cholesterol	0.05	57.5
soyasterol	0.05	46.4
β-sitosterol	0.05	39.2
campesterol	0.05	37.9
cholestanol	0.05	33.0
stigmasterol	0.05	28.8
7-dehydrocholesterol	0.05	16.2
ergosterol	0.05	4.5
cholesteroly acetate	0.05	17.0
cholesteryl benzoate	0.05	0
cholesteryl betainate	0.05	เล็กน้อย
cholesteryl polyoxyethylene ether (24 units)	0.05	เล็กน้อย
cholesteryl chloride	0.05	0
progesterone	0.05	82.0
desoxycorticosterone (OAc)	0.05	12.0
desoxycorticosterone (OH)	0.05	เล็กน้อย

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สารตั้งต้น	ปริมาณสารตั้งต้น (ร้อยละ)	ADD เทียบจากสารตั้งต้น (ร้อยละ)
16-dehydroprogesterone	0.05	17.5
17-hydroxyprogesterone (OH)	0.05	เล็กน้อย
17-hydroxyprogesterone (OAc)	0.05	0
Reichsteins compound S (OH)	0.05	เล็กน้อย
Reichsteins compound S (OAc)	0.05	0
methyltestosterone	0.05	0
ethynyltestosterone	0.05	0
diosgenine	0.05	0
tigogenine	0.05	0

ตารางที่ 4 ตัวอย่างการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการแปลงรูปทางชีวภาพของสารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ เป็นสาร AD และ ADD ด้วย *Pseudomonas* sp. NCIB 10590 (Owen และคณะ, 1983)

สารตั้งต้น	สารยับยั้งเอนไซม์	ผลิตภัณฑ์
choles-5-en-3-one	α, α'-dipyridyl	AD
		ADD
cholest-4-en-3-one	α, α'-dipyridyl	AD
		ADD
26-hydroxychlest-4-en-3-one	α, α'-dipyridyl	AD

ตารางที่ 4 (ต่อ)

สารตั้งต้น	สารยับยั้งเอนไซม์	ผลิตภัณฑ์
chol-4-en-3-one-24-oic acid	α,α'-dipyridyl	AD ADD
cholesta-4-en-3-one-24-oic acid	α,α'-dipyridyl	AD ADD
cholesta-1,4-dien-3-one-24-oic acid	α,α'-dipyridyl	ADD
pregn-4-en-3-one-20-carboxylic acid	α,α'-dipyridyl	AD ADD
pregna-1,4-dien-3-one-20-carboxylic acid	α,α'-dipyridyl	ADD

การปรับสภาวะต่าง ๆ ในการเลี้ยงจุลินทรีย์และสภาวะในการแปลงรูปทางชีวภาพให้เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการแปลงรูปทางชีวภาพได้มากขึ้น (Ryu และคณะ, 1975) มีผลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการปริมาณสูงขึ้น ได้ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อการแปลงรูปทางชีวภาพของสารประกอบประเภทสเตียรอยด์มีมากมายหลายชนิด อาทิเช่น ปริมาณของสารตั้งต้น ทั้งนี้เนื่องจากสเตียรอยด์เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย ทำให้การทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์เป็นไปได้ยาก ในทางปฏิบัติมักจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดช่วยให้การละลายดีขึ้น ก่อนเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ได้แก่ เอทานอล (ethanol) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide) เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) และไดออกเซน (dioxane) เป็นต้น ดังนั้นการเลือกชนิดและปริมาณของตัวทำละลายให้เหมาะสมจึงเป็นส่วนสำคัญประการหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตของสารกลุ่มฮอร์โมนสเตียรอยด์ได้ (Lee และคณะ, 1969; Watanabe และคณะ, 1986) นอกจากนี้การเติมสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 9 อัลฟา-ไฮดรอกซิเลสก็มีส่วนสำคัญ ในการเพิ่มผลผลิตของ AD

และ ADD ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เช่นกัน (Martin, 1984)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ นับเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่สามารถเพิ่มผลผลิตสารประกอบสเตียรอยด์ได้ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สำคัญได้แก่ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน การเลือกใช้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ และชนิดของปฏิกิริยา ถ้าเป็นการผลิตในเชิงพาณิชย์จะต้องคำนึงถึงต้นทุนในการผลิต จึงควรเลือกใช้แหล่งอาหารที่หาง่ายและมีราคาถูก เช่น กลูโคส (glucose) กลีเซอรอล (glycerol) ซูโครส (sucrose) แป้งละลายน้ำ (soluble starch) กากน้ำตาล (molasses) เป็นต้น ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่มีผู้ศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ เปปโตน (peptone) ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) กากถั่วเหลือง (soy bean meal) และสารประกอบแอมโมเนียม (ammonium compounds) เป็นต้น (Marsheck และคณะ, 1973; Martin และ Wagner, 1975; Worcha และ Brooks, 1980; Watanabe และคณะ, 1986)

นอกจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้นแล้วสภาวะในการเลี้ยงเชื้อก็มีความสำคัญต่อการผลิตจุลินทรีย์เพื่อการแปลงรูป เช่น อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง มีรายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ในการแปลงรูปทางชีวภาพของสารตั้งต้น ควรอยู่ในช่วง 25-37°ซ และช่วงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 4.5-8.0 (Marsheck และคณะ,1973; Worcha และ Brooks, 1980; Kulprecha และคณะ,1985)

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ รวมทั้ง *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ที่แปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD ได้สูงแล้วทำการสกัดแยกสาร ADD ให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังจะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อและเพื่อแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD ให้ได้ผลผลิตสูงยิ่งด้วย

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการแปลงรูปคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD ด้วยวิธีทางชีวภาพ
2. ทำให้สาร ADD บริสุทธิ์ และวิเคราะห์ทางเคมี เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์
3. หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแปลงรูปคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD ด้วยวิธีทางชีวภาพ

016288