บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การเจริญ และการผลิตเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ E. coli

เพาะเลี้ยงเซลล์ E. coli ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria-Bertani (LB) (วิธีข้อ 2.6.3) ดูดเซลล์แขวนลอยที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ตามต้องการ นำไปวัดการเจริญโดยการวัดความขุ่นและนับเซลล์มีชีวิต (viable cell count) (วิธีข้อ 2.6.4)

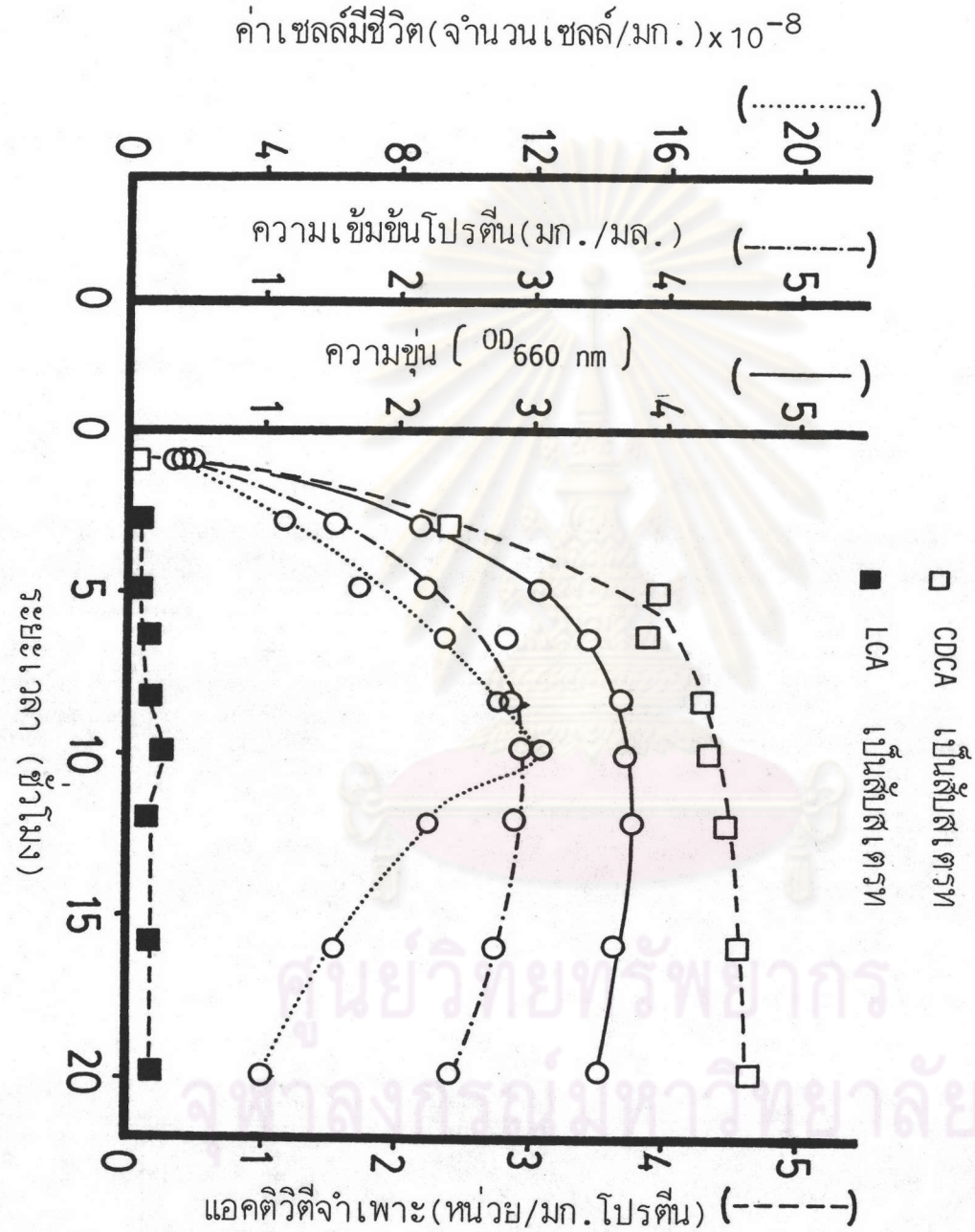
ผลการทดลอง (รูปที่ 5) แสดงให้เห็นว่า E. coli เจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดซึ่งมีค่าการเจริญคงที่ (stationary phase) ภายใน 7 ชั่วโมง (OD_{660nm}~3.8) รูปแบบของจำนวนเซลล์มีชีวิตที่นับได้ตลอดช่วงของการเจริญคล้ายคลึงกับค่าความขุ่นที่วัดได้ คือจะเพิ่มขึ้นตามเวลาของการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งช่วงเวลาที่มีค่าการเจริญสูงสุด (7 ชั่วโมง) หลังจากนั้นจึงลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งเหลือเซลล์เพียง 4×10^8 เซลล์ (30 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์มีชีวิตที่นับได้เมื่อมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 10 ชั่วโมง) เมื่อเซลล์เจริญไปได้นาน 20 ชั่วโมง

ได้ศึกษาเอนไซม์โดยเซนตริฟิวจ์แยกเก็บเฉพาะเซลล์ซึ่งได้จากการทดลองข้างต้น นำไปเตรียมสารละลายเอนไซม์ และวัดความเข้มข้นของโปรตีน (วิธีข้อ 2.7 และ 2.9.2) วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส โดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรท (วิธีข้อ 2.8.1)

ความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ในช่วงต่าง ๆ ของการเจริญจะแปรผันตามค่าการเจริญและลดลงเพียงเล็กน้อยหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยง 15 ชั่วโมง รูปแบบของการผลิตเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งแสดงด้วยค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อวัดโดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรทจะคล้ายคลึงกับการเจริญ มีค่าสูงสุดที่ช่วงเวลาเดียวกันคือ หลังจากเจริญไปแล้วประมาณ 7 ชั่วโมง ทั้งนี้วัดแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด (specific activity) ของแอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อใช้กรดคีโตดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรทได้สูงถึง 4.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อมีกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรทมีค่าเพียง 0.15 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน แสดงว่า E. coli น่าจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮจีเนสได้สูงกว่า 3 แอลฟา-

รูปที่ 5. ลักษณะการเจริญและผลิตเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ E.coli ที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิก เป็นสับสเตรท รายละเอียดตามข้อ 3.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรท) ประมาณ 30 เท่า ซึ่งค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสต่ำมากเมื่อเทียบกับค่าที่วัดได้โดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท

3.2 การศึกษาชนิดของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่แยกได้จาก E. coli โดยเทคนิคโพลีอะไครละไมด์เจล

ผลการทำเจลอีเลคโตรโฟริซิสของสารละลายเอนไซม์จากเซลล์ E. coli (ปริมาณโปรตีน 150 ไมโครกรัม) และย้อมสีแอคติวิตีด้วยไนโตรบลูเตตราโซเลียม และฟีนาซีนเมทโธซัลเฟตโดยมีกรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรทตามวิธีในข้อ 2.8.3 พบว่าเกิดแถบสีม่วงขึ้น 2 แถบ คือ ที่ค่า R_f ประมาณ 0.34-0.36 และ R_f ประมาณ 0.58-0.60 (รูปที่ 6)

เมื่อทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ย้อมสีแอคติวิตีของเอนไซม์ในเจลโดยใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรท จะพบแต่แถบสีที่ R_f 0.34-0.36 โดยไม่ปรากฏแถบสีที่ R_f 0.58-0.60 จึงคาดเดาว่าแถบสีที่ R_f 0.34-0.36 น่าจะเป็นแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส และแถบสีที่ R_f 0.58-0.60 น่าจะเป็นแอคติวิตีของเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

ผลการวัดเอนไซม์แอคติวิตีของเจลที่ตัดเป็นท่อนแล้วนำมาบดในสารละลายบัฟเฟอร์ยืนยันว่าช่วง R_f 0.34-0.36 มีแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อใช้กรดลิโทโคลิก, คีโนดีออกซีโคลิก และเอทธานอลเป็นสับสเตรท ทั้งนี้แอคติวิตีเมื่อใช้กรดลิโทโคลิกและคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรทจะใกล้เคียงกันประมาณ 1.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าแอคติวิตีเมื่อใช้เอทธานอลเป็นสับสเตรทเล็กน้อย (1.12 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ช่วงของเจล R_f 0.58-6.0 จะให้แอคติวิตีของแอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสเมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรทเท่านั้น (6.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร) แต่ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ วัดแอคติวิตีโดยใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรท

3.3 การศึกษาการเหนี่ยวนำการผลิต แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ E. coli ด้วยกรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิก

เพาะเลี้ยง E. coli ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ซึ่งเสริมด้วยกรดคีโนออกซีโคลิก 0.5 กรัมต่อลิตร ติดตามการเจริญโดยการวัดความขุ่น และวัดแอคติวิตีของแอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ตามวิธีข้อ 2.8.1 วิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ ตามวิธีข้อ 2.9.2

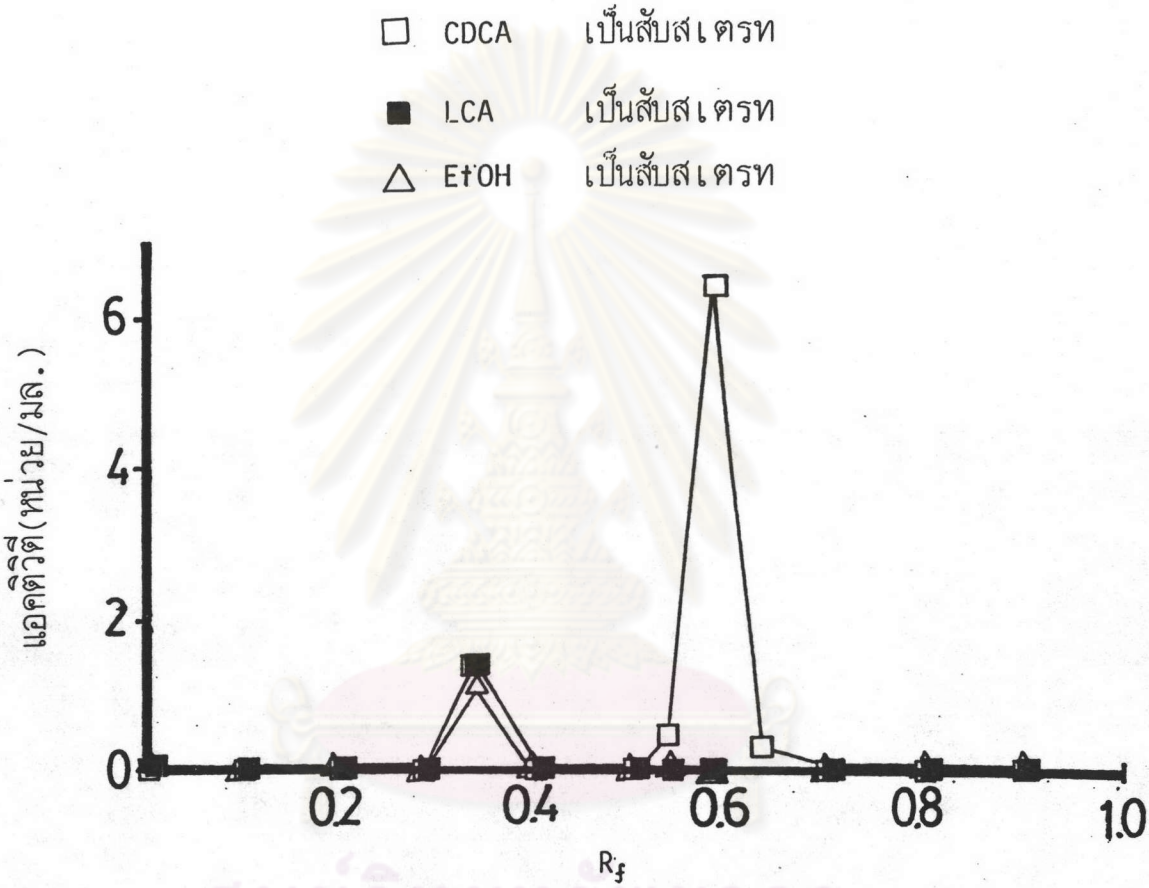
รูปที่ 6. ชนิดของเอนไซม์ แอลฟา - ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่แยกได้จาก E. coli โดยเทคนิคโพลีอะไครละไมด์เจล วัดแอคติวิตีของเจลที่ตัดเป็นท่อน (รูป ก.) วิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีข้อ 2.8.1 และย้อมสีแอคติวิตีในแท่งเจล (รูป ข.) เมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดลิโท-โคลิก 3 มิลลิโมลาร์ เป็นสับสเตรท

2 = กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท

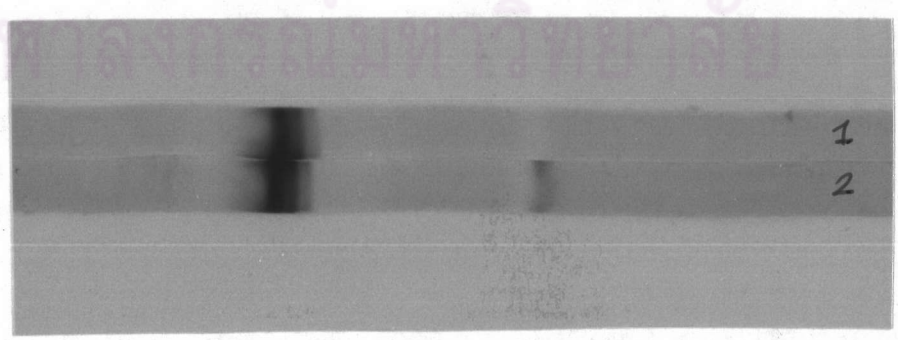
1 = กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูป ก.


CDCA เป็นสับสเตรท
LCA เป็นสับสเตรท
EtOH เป็นสับสเตรท
แอคติวิตี้(หน่วย/มล.)
6
4
2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Rf

รูป ข.


1
2

ผลการทดลอง (รูปที่ 7 และ 8) แสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างในด้านการเจริญของเชื้อ, ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ในเซลล์ E. coli ซึ่งเจริญในอาหารสูตร LB อาหารสูตรอุดมเสริมกรดคีโนดีออกซีโคลิก และอาหาร LB เสริมกรดลิโทโคลิก แสดงว่า แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ใน E. coli นี้ ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้แอคติวิตีสูงขึ้นด้วยกรดลิโทโคลิกหรือกรดคีโนดีออกซีโคลิก ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส และ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ในสภาวะของการเพาะเลี้ยงที่กำหนดได้

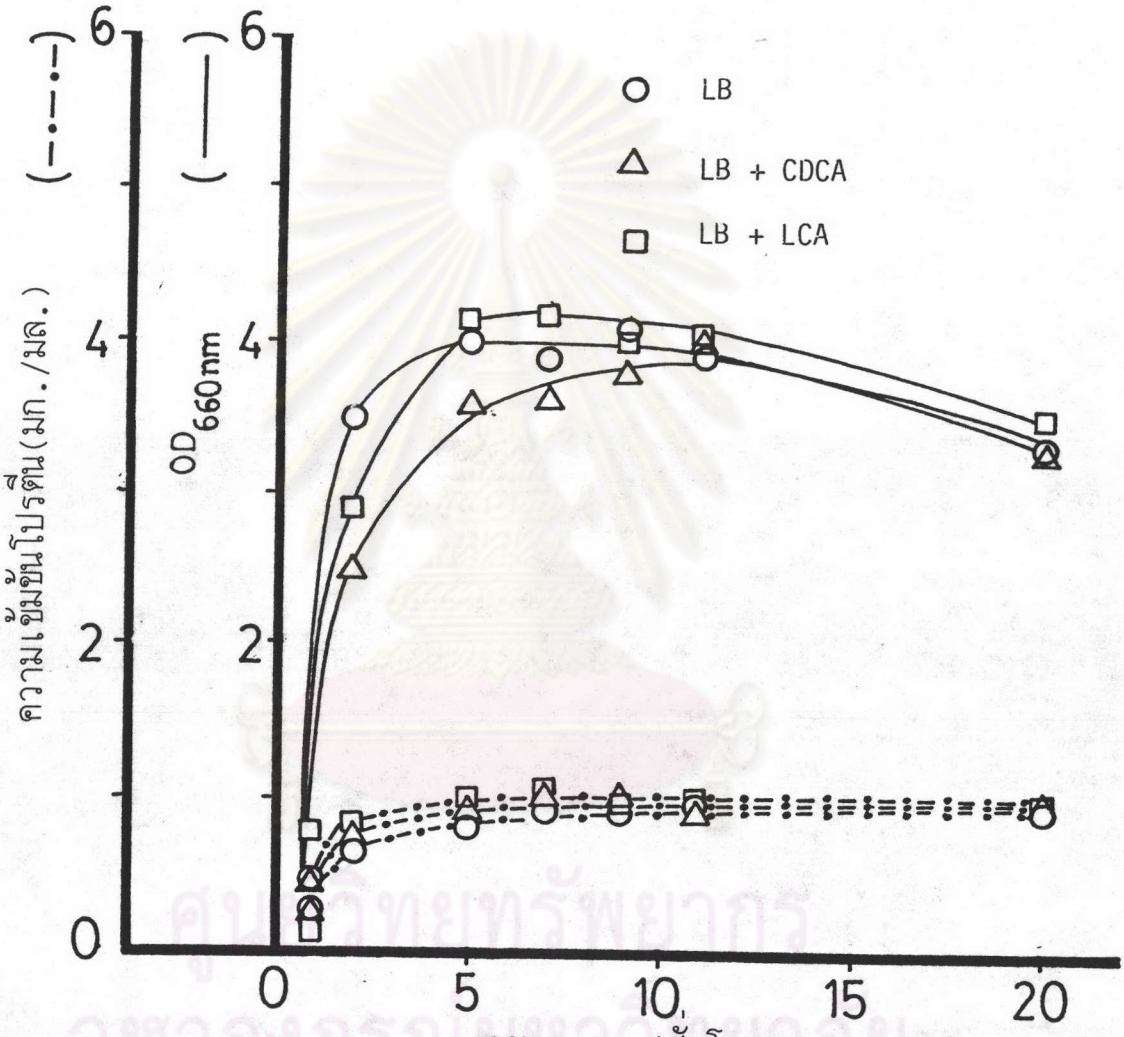
3.4 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก E. coli

เตรียมสารละลายเอนไซม์ของ E. coli (วิธีข้อ 2.7) แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 2 แบบ (วิธีข้อ 2.8) ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่นเมื่อมีกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรทในช่วงพีเอชระหว่าง 3 ถึง 8 (พีเอช 3 ถึง 6 ใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์) (พีเอช 6 ถึง 8 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) (ตามวิธีข้อ 2.8.2) ปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่นใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรทในช่วงพีเอชระหว่าง 6 ถึง 11 (พีเอช 6 ถึง 8 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) (พีเอช 8 ถึง 11 ใช้ไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์) (ตามวิธีข้อ 2.8.1)

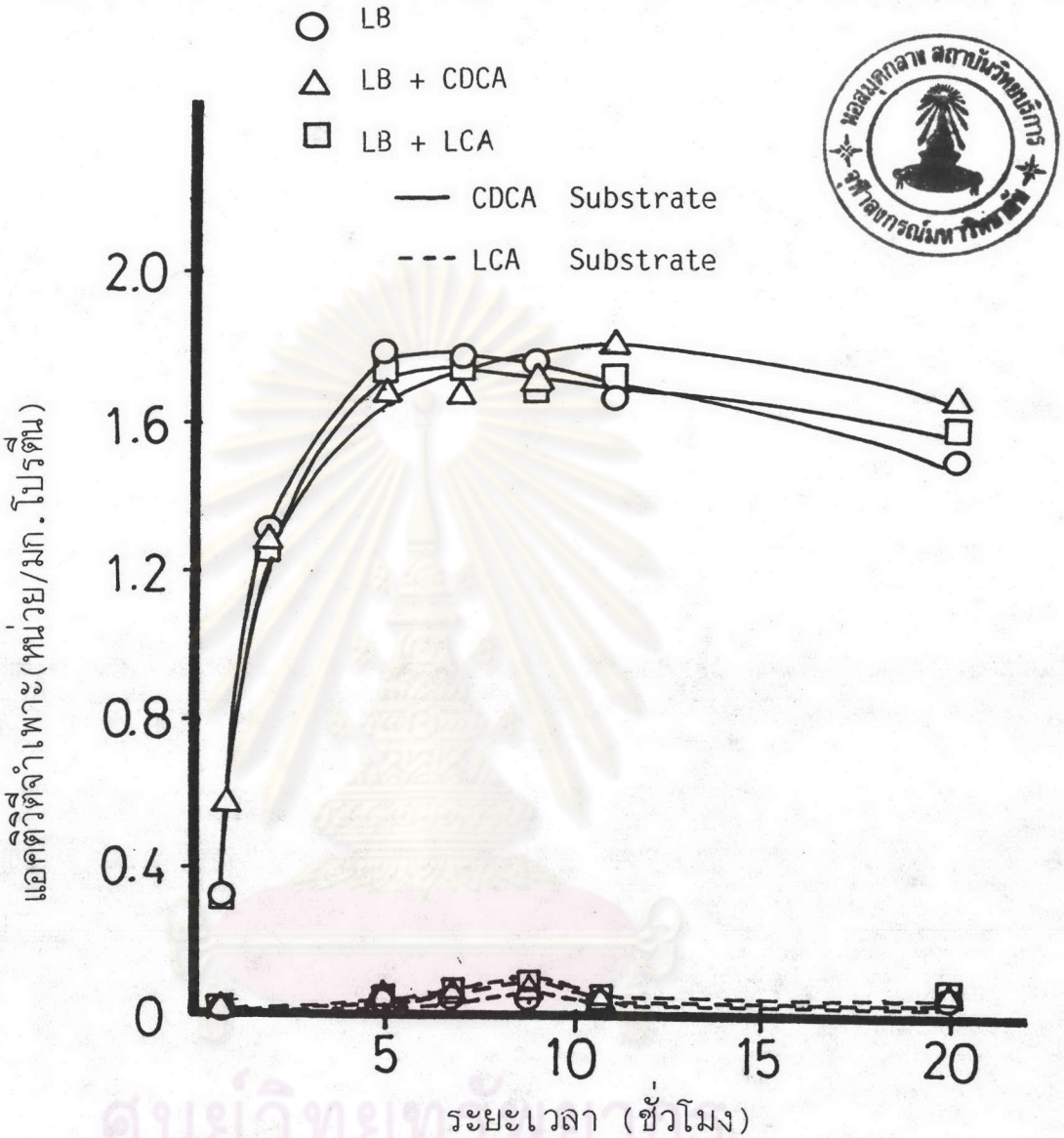
จากรูปที่ 9 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่นของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จาก E. coli อยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกรด คือพีเอชประมาณ 5 ช่วงพีเอช 9.5-10 เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ในทิศทางตรงข้าม คือปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น

3.5 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก E. coli

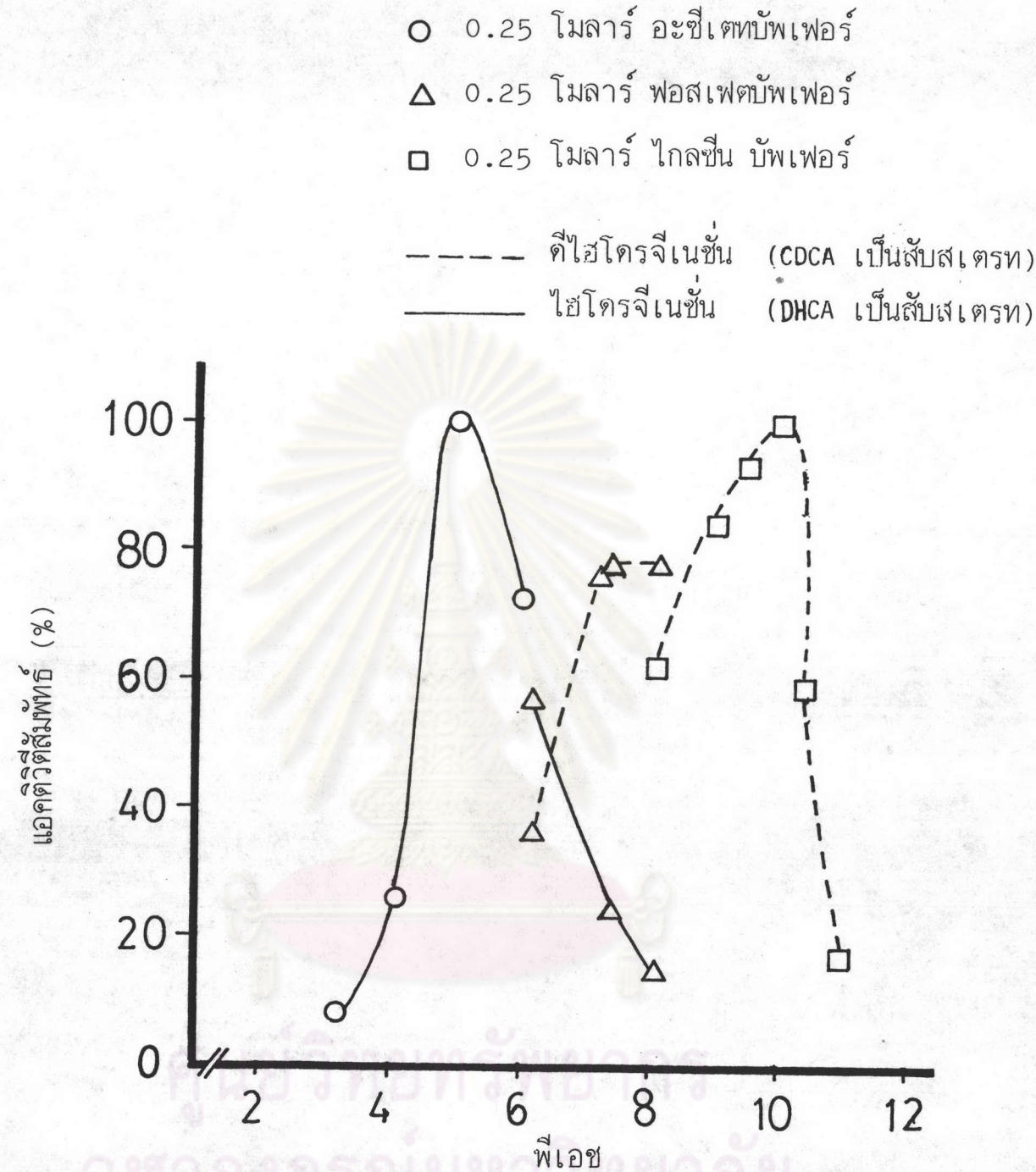
เตรียมสารละลายเอนไซม์ที่ได้จาก E. coli ตามวิธีข้อ 2.7 (0.1 กรัมต่อมิลลิกรัมบัฟเฟอร์) สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ประกอบด้วย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0, 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์นี้มาวิเคราะห์แอคติวิตีของแอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส โดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท (ข้อ 2.8) เป็นระยะ ๆ นาน 50 วัน



รูปที่ 7. เปรียบเทียบการเจริญ วัดด้วยค่าความขุ่น(OD_{660nm}) และความเข้มข้นโปรตีนที่สังเคราะห์ในเซลล์ของ E. coli ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB และอาหารสูตร LB เสริมด้วยกรดคีโนดีออกซีโคลิก และอาหารสูตร LB เสริมด้วยกรดลิโทโคลิก ที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (วิธีข้อ 2.9.2)



รูปที่ 8. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีจำเพาะของ เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส ที่ผลิตโดย E.coli เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร LB อาหารสูตร LB ที่เสริมด้วยกรดคีโนดีออกซีโคลิก และอาหารสูตรอุดมเสริมด้วยกรดลิโทโคลิก



รูปที่ 9. กราฟแสดงผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก E.coli วัดแอคติวิตีของปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น (กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท) ตามวิธีข้อ 2.8.1 และปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น (กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท) ตามวิธีข้อ 2.8.2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

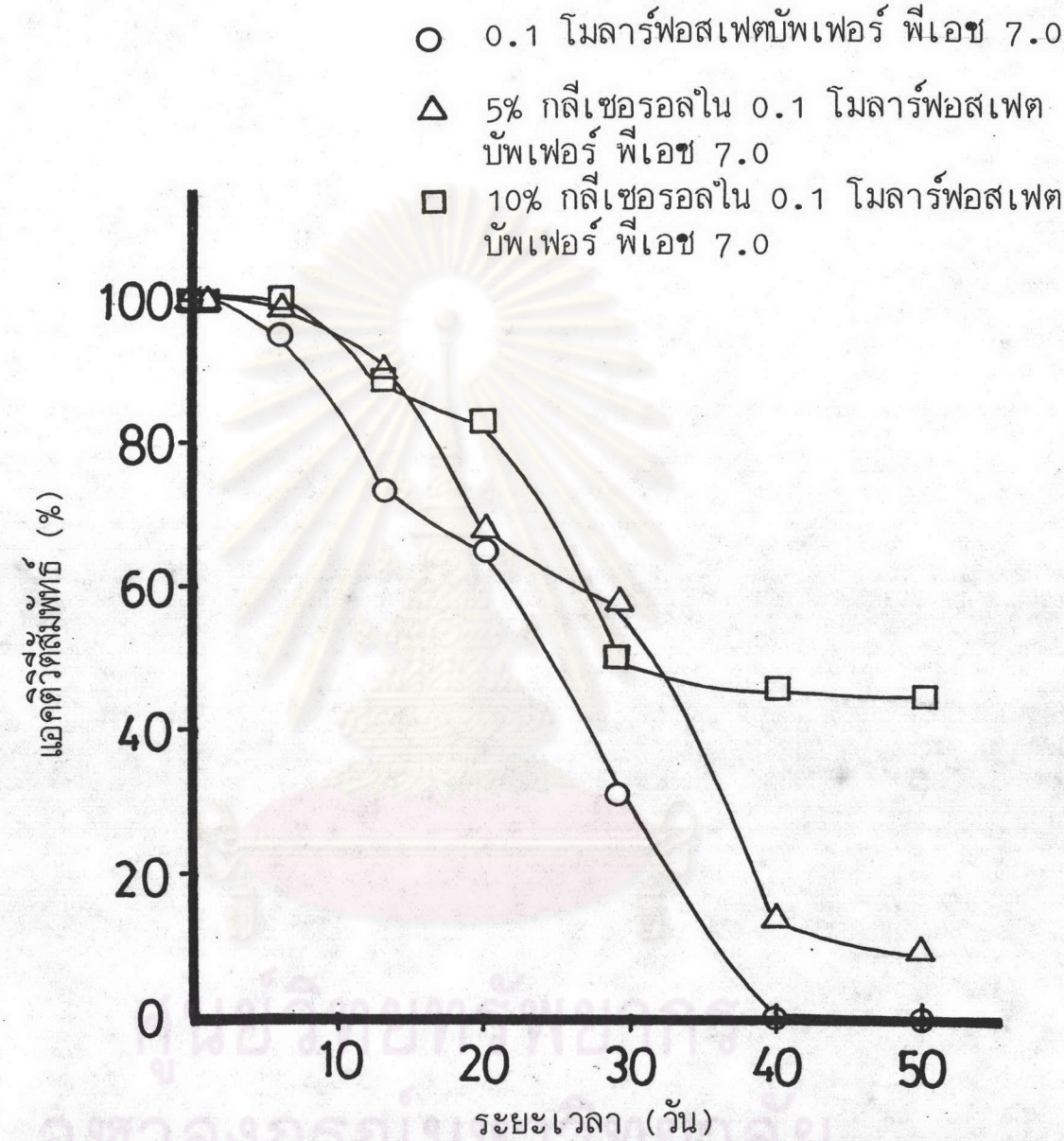
I10294259

จากรูปที่ 10 และ 11 จะเห็นได้ว่า เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไม่ว่าจะใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิก หรือกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรทก็ตาม จะพบรูปแบบของการลดแอคติ-วิตีคล้ายคลึงกัน คือพบว่าเมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์จะลดต่ำลงด้วยอัตราเร็วสูงกว่า เมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งมีกลีเซอรอล 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดต่ำลงเป็นศูนย์ในเวลา 40 วัน เมื่อเก็บรักษาใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเหลือประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 40 วัน และคงที่ไปถึง 50 วัน เมื่อเก็บรักษาใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอล 5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเก็บรักษาเอนไซม์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ อัตราการลดลงของเอนไซม์แอคติวิตีในช่วง 30 วัน จะใกล้เคียงกันกับการลดลงเมื่ออยู่ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอล 5 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากแอคติวิตีลดลงไปประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์แล้ว อัตราการลดแอคติวิตีจะช้าลงจนเกือบคงที่ตลอดการเก็บรักษาในระยะเวลา 50 วัน

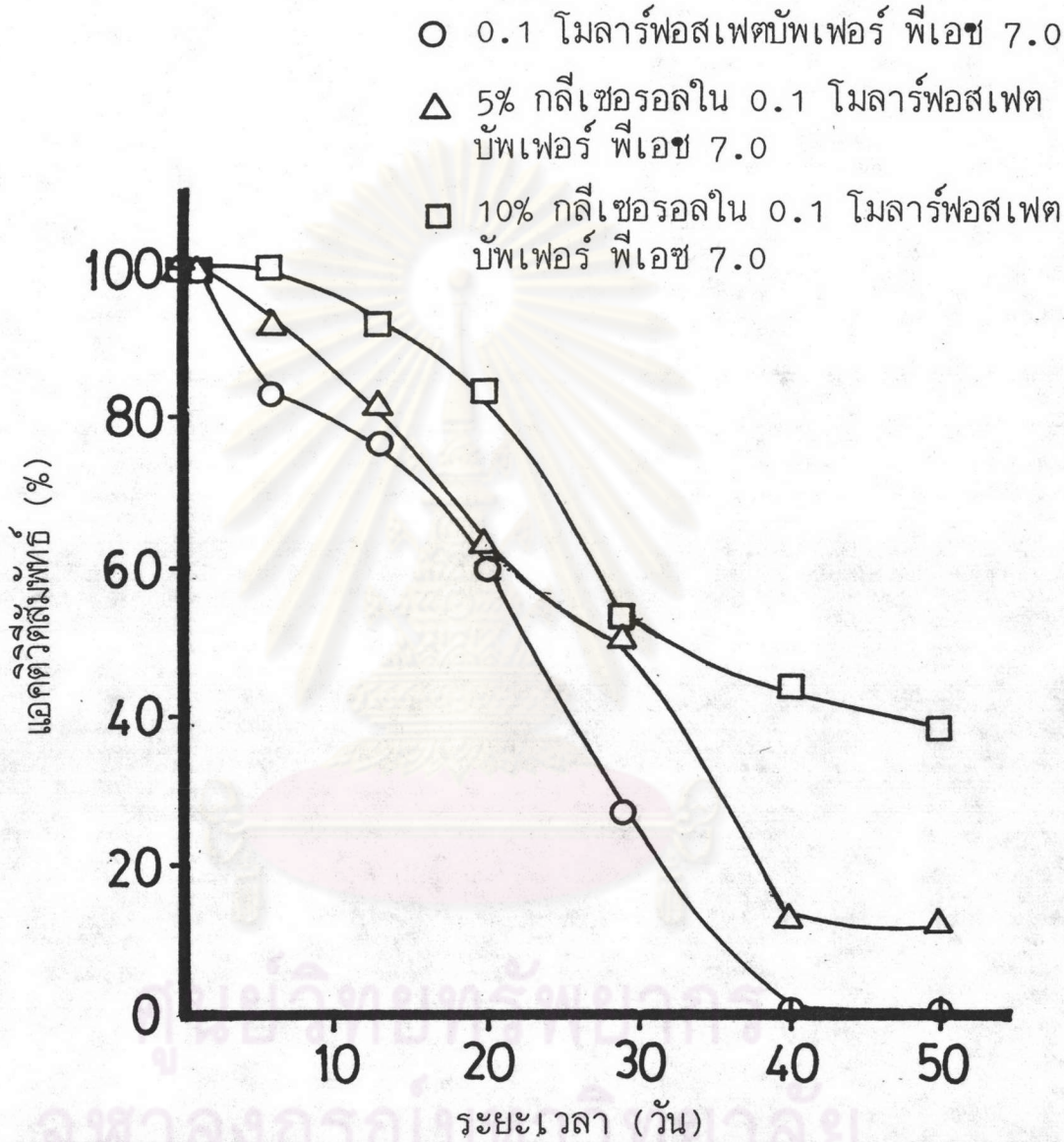
3.6 การศึกษาความเสถียรของเซลล์และความเสถียรของเอนไซม์ภายในเซลล์ของ E. coli

เพาะเลี้ยง E. coli ในอาหารสูตร LB ตามวิธีข้อ 2.6.3 กระจายเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 0.03 กรัมต่อมิลลิลิตร (4×10^9 เซลล์/มิลลิลิตร) โดยเทคนิคปลอดเชื้อในนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 โดยแยกใส่หลอดทดลองขนาด 16×100 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส ตามวิธีข้อ 2.8 เป็นระยะ ๆ นาน 70 วัน

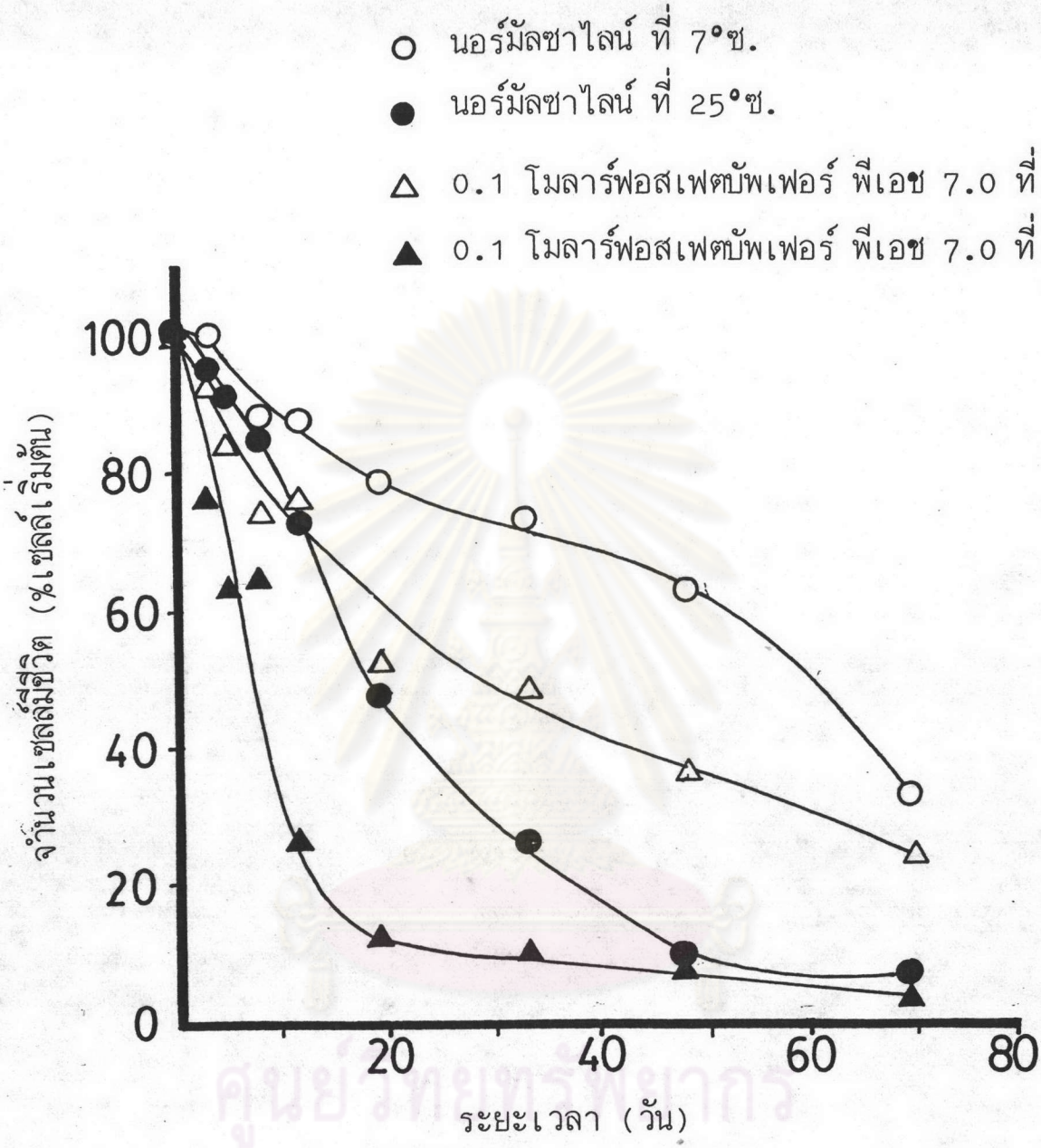
จากรูปที่ 12 จะเห็นได้ว่า ที่อุณหภูมิเดียวกัน ไม่ว่าที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส หรือ 25 องศาเซลเซียส ก็ตาม เซลล์ E. coli ในนอร์มัลซาไลน์ จะมีความเสถียรสูงกว่าใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 คืออัตราการลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในนอร์มัลซาไลน์จะช้ากว่าใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ในทุกช่วงเวลา ในทำนองเดียวกันหากพิจารณาความเสถียรของเซลล์ในสารละลายชนิดเดียวกัน พบว่าการเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส อัตราการลดลงของจำนวนเซลล์มีชีวิตจะช้ากว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อย่างเห็นได้ชัด



รูปที่ 10. เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จากเซลล์ E.coli เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลายต่างชนิด ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรทที่ช่วงเวลาต่างๆ กันจนครบ 50 วัน



รูปที่ 11. เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก E.coli เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลายต่างชนิด ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรทที่ช่วงเวลาต่างๆ กันจนครบ 50 วัน



รูปที่ 12. เปรียบเทียบความเสถียรของเซลล์ E.coli เมื่อเก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส และติดตามวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เปอร์เซนต์) ที่ช่วงเวลาต่างๆ จนครบ 70 วัน

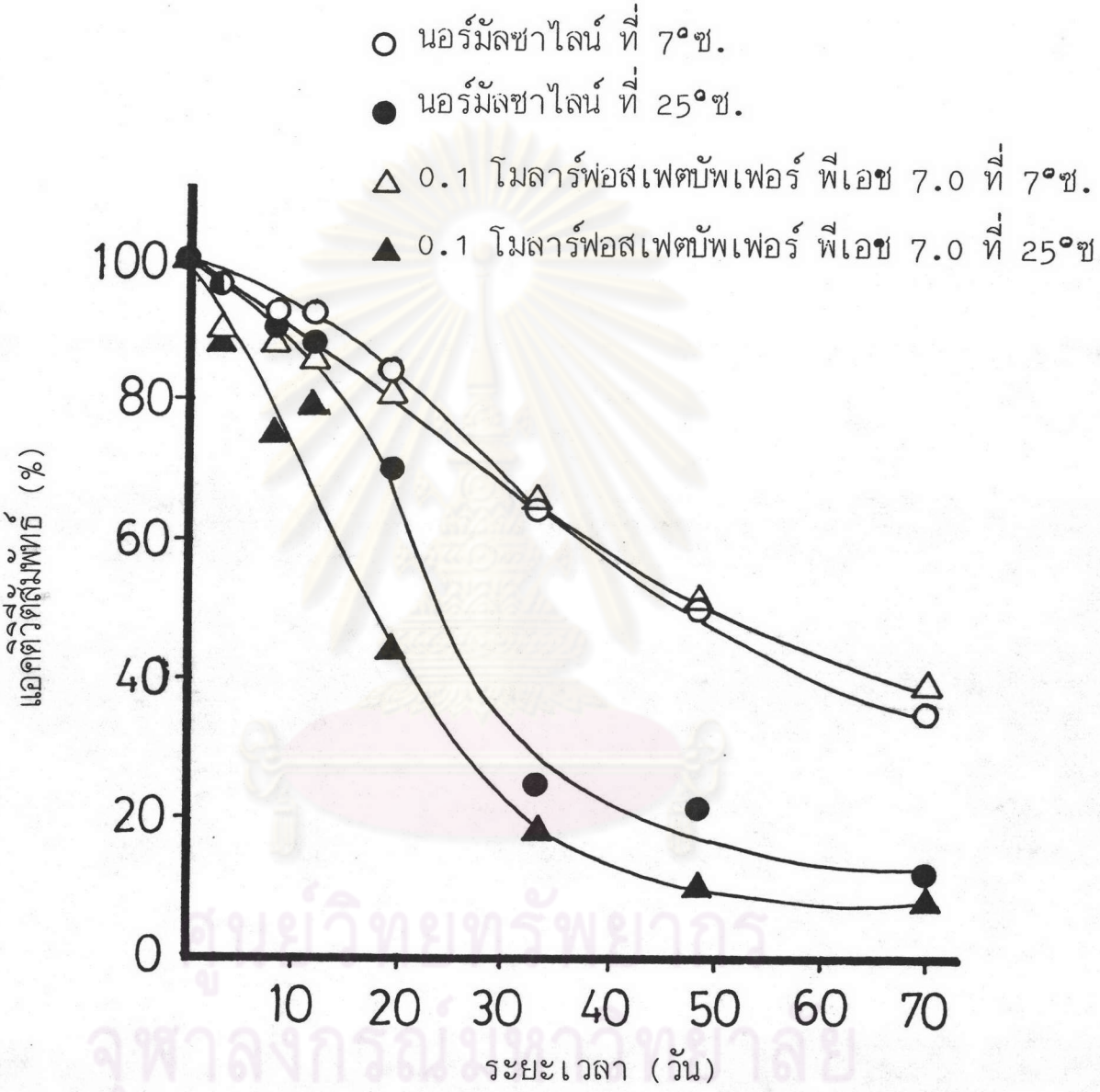
เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก E. coli ซึ่งเก็บรักษาในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 โดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท (ปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น) (รูปที่ 13) และปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น (กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท) (รูปที่ 14) จะเห็นได้ว่ารูปแบบการลดแอคติวิตีของเอนไซม์จะคล้ายคลึงกันในปฏิกิริยาทั้ง 2 ทิศทางคือ อัตราการลดแอคติวิตีจะมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ทั้งในนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 การเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สารละลายนอร์มัลซาไลน์จะให้ความเสถียรของเอนไซม์สูงกว่าในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0

อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ไม่ว่าจะอยู่ในสารละลายชนิดใดก็ตาม จะยังพบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของเอนไซม์จาก E. coli เหลืออยู่สูงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีเริ่มต้น ซึ่งสูงกว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้จากเซลล์ E. coli ที่เก็บในสารละลายชนิดเดียวกันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 3-4 เท่า

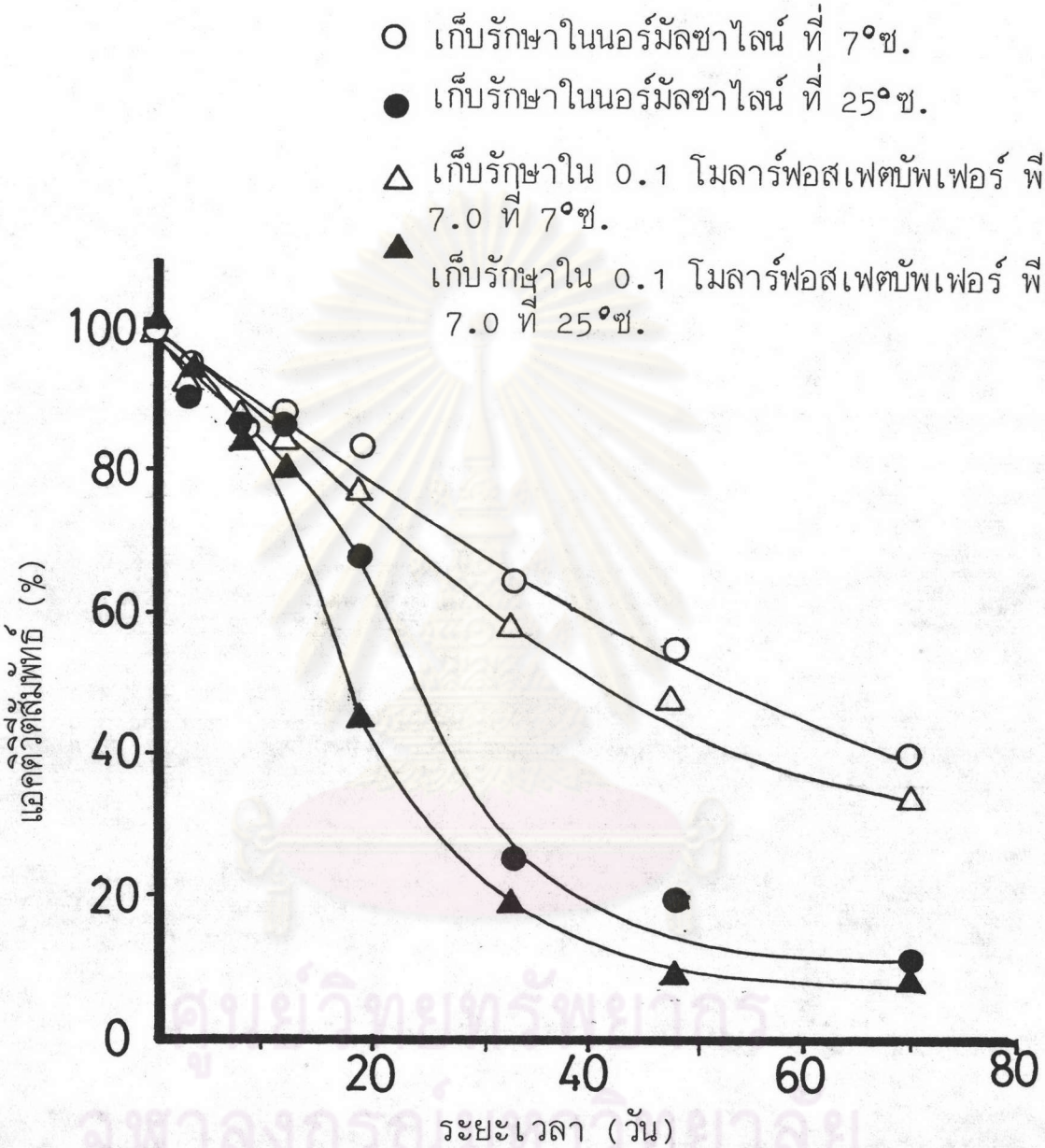
3.7 รูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ของ P. testosteroni ATCC 11996 ในอาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเสริมด้วยเทสโทสเทอโรนหรือโซเดียมโคเลท

ในการวิจัยได้ทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ P. testosteroni ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซนต์ อาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่เสริมด้วยเทสโทสเทอโรน 0.5 กรัมต่อลิตร และอาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่เสริมด้วยโซเดียมโคเลท 0.5 กรัมต่อลิตร แล้วติดตามการเจริญโดยการวัดความขุ่น ($OD_{660\ nm}$) น้ำหนักเซลล์แห้ง, จำนวนเซลล์มีชีวิต, แอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ตามวิธีข้อ 2.8.1 และวัดความเข้มข้นโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.9.2

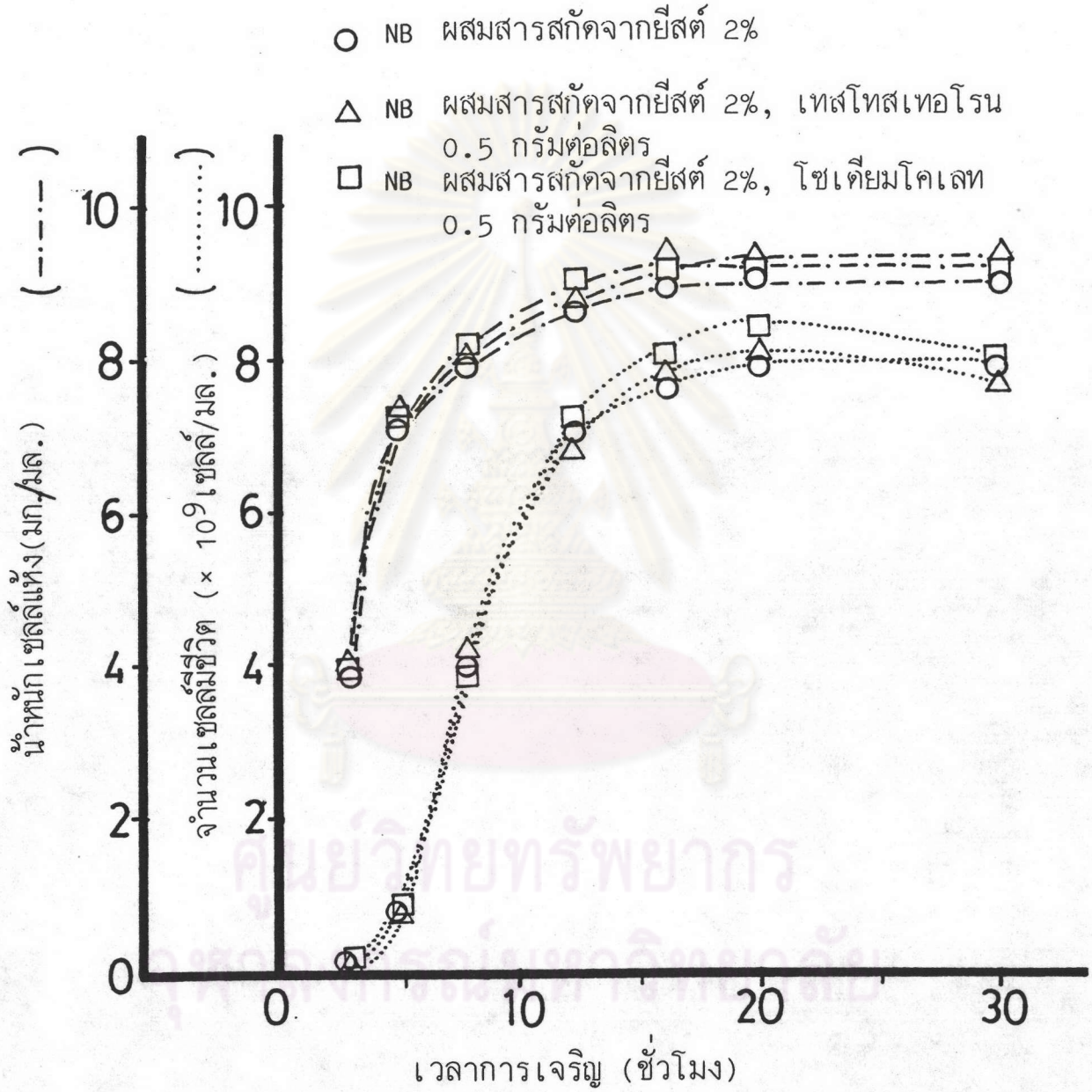
เมื่อ P. testosteroni เจริญในอาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ และอาหารชนิดเดียวกันเสริมด้วยโซเดียมโคเลทเป็นสารต้นตอคาร์บอน จะไม่พบความแตกต่างของการเจริญไม่ว่าจะวัดออกมาเป็นความขุ่นของเชื้อ (OD_{660nm}) น้ำหนักแห้งของเซลล์ จำนวนเซลล์มีชีวิต หรือความเข้มข้นโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ก็ตาม (รูปที่ 15 และ 16) เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท (รูปที่ 16) พบว่าเอนไซม์



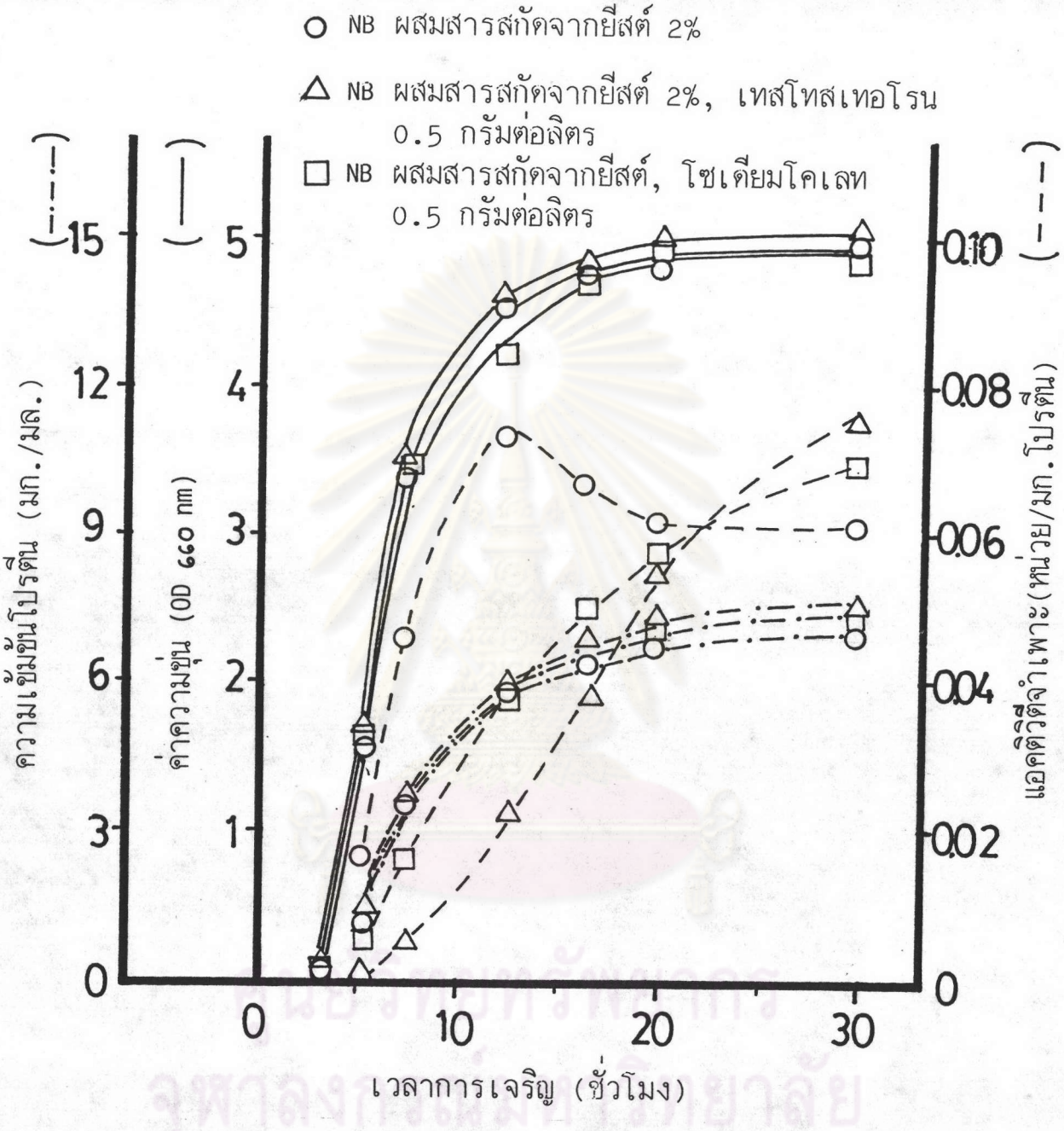
รูปที่ 13. เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ไฮโดรจีเนสที่ได้จากเซลล์ E.coli เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลายต่างชนิด ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรทที่ช่วงเวลาต่างๆ จนครบ 70 วัน



รูปที่ 14. เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จากเซลล์ E.coli เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลายต่างชนิด ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท ที่ช่วงเวลาต่างๆ จนครบ 70 วัน



รูปที่ 15. ลักษณะการเจริญของ P. testosteroni แสดงด้วยจำนวนเซลล์มีชีวิต และน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ และอาหารชนิดเดียวกัน ซึ่งเสริมด้วยเทสโทสเทอโรนหรือโซเดียมโคเลท 0.5 กรัมต่อลิตร

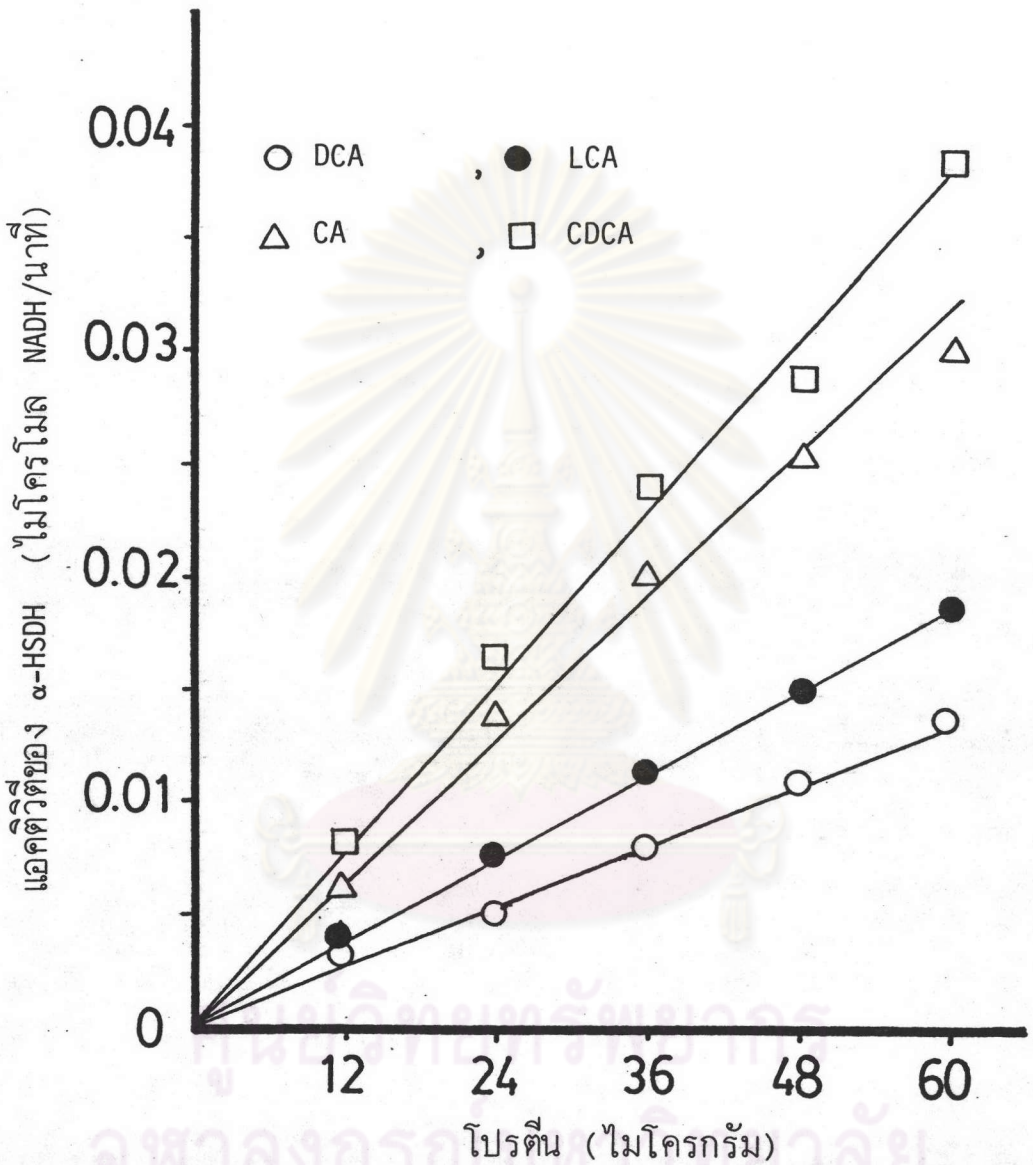


รูปที่ 16. ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH (เมื่อใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท) กับค่าการเจริญของ P. testosteroni แสดงด้วยค่าความขุ่นและความเข้มข้นโปรตีน เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์และอาหารชนิดเดียวกัน ซึ่งเสริมด้วยเทสโทส-เทอโรนหรือโซเดียมโคเลท 0.5 กรัม/ลิตร

แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จาก P. testosteroni ที่เลี้ยงในอาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ จะให้แอคติวิตีจำเพาะสูงสุด ประมาณ 0.075 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนในเวลาเพียง 12 ชั่วโมง ในขณะที่ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดมีค่าประมาณ 0.075 และ 0.069 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเพาะเลี้ยง P. testosteroni ในอาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซนต์ที่เสริมด้วยเทสโทสเทอโรน และโซเดียมโคเลทตามลำดับ เป็นเวลานาน 30 ชั่วโมง ผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า เทสโทสเทอโรน และโซเดียมโคเลท ไม่สามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P. testosteroni เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่มีผลทำให้เซลล์ใช้เวลาในการผลิตเอนไซม์สูงสุดนานขึ้น

3.8 การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดร-จีเนส ที่แยกจาก P. testosteroni ATCC 11996

เมื่อทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ในสารละลายที่สกัดแยกได้จาก P. testosteroni (วิธีข้อ 2.8.1) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้สับสเตรทชนิดต่าง ๆ กัน คือ กรดดีออกซีโคลิก, กรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดโคลิก (รูปที่ 17) จะเห็นได้ว่าสารละลายเอนไซม์ที่สกัดแยกได้จากเซลล์ P. testosteroni ซึ่งเจริญถึงช่วงปลายของการเจริญทวิคูณจะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสต่อสับสเตรททั้ง 4 ชนิด ต่างกันคือ แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อใช้กรดคีโนดีออกซี-โคลิก และกรดโคลิกจะให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าเมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรทประมาณ 2 เท่า (0.22 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน สำหรับกรดดีออกซีโคลิก และ 0.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสำหรับกรดลิโทโคลิกมีค่าเพิ่มเป็น 0.63 กับ 0.53 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดโคลิกเป็นสับสเตรท ตามลำดับ) จึงอาจเป็นไปได้ว่า เอนไซม์ที่แยกจากเซลล์ P. testosteroni ATCC 11996 มีแอคติวิตีของทั้ง 3 แอลฟา- และ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสอยู่รวมด้วยกัน



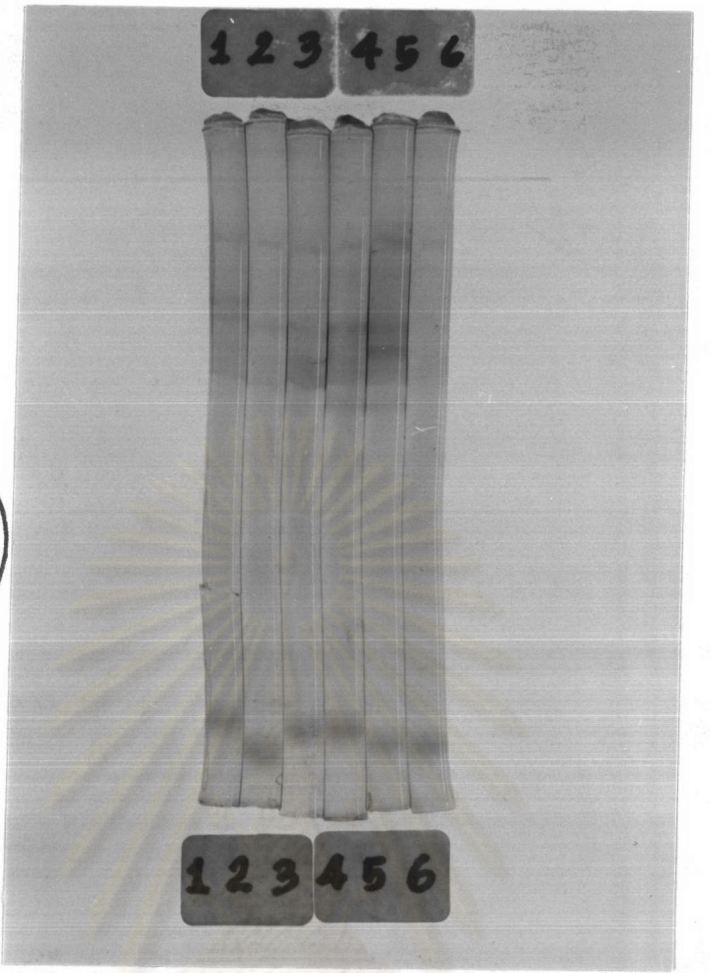
รูปที่ 17. ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ของ P. testosteroni กับปริมาณโปรตีน เมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิก, กรดลิโทโคลิก, กรดโคลิก และกรดคีโนดีออกซีโคลิก เป็นสับสเตรท

3.9 การศึกษาชนิดของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่แยกได้จาก P. testosteroni โดยเทคนิคโพลีอะไครละไมด์เจล

ผลการทำเจลอีเลคโตรโฟรีซิสของสารละลายเอนไซม์จาก P. testosteroni (120 ไมโครกรัม) และติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส โดยการย้อมสีด้วยไนโตรบลูเตตราโซเลียม และฟีนาซีนเมทโธซัลเฟต ตามวิธีในข้อ 2.8.3 แสดงในรูปที่ 18 เมื่อย้อมสีแอคติวิตีของเอนไซม์บนแท่งเจลโดยใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท จะพบว่าแถบสีม่วง 3 แถบ (แสดงถึงเอนไซม์ แอคติวิตี) มีค่า R_f 0.32, 0.36 และ 0.42 เมื่อใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรทดูเหมือนว่าเกิดแถบสีม่วง 3 แถบ คือที่ R_f 0.33, 0.37 และ 0.42 เช่นกัน แต่แถบสีจางมากเมื่อเทียบกับแถบสีที่เกิดจากการย้อมสีแอคติวิตี เมื่อใช้กรดดีออก-ซีโคลิกเป็นสับสเตรท เมื่อใช้กลุ่มสับสเตรทที่มีหมู่ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซิลในโมเลกุล ในการย้อมสีแอคติวิตีของเอนไซม์บนแท่งเจล พบว่าจะเกิดแถบสีขึ้น 4 แถบ มี R_f 0.32, 0.35, 0.43 และ 0.49 (กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท) และ R_f 0.32, 0.35, 0.41 และ 0.48 (กรดโคลิกเป็นสับสเตรท) โดยที่มีแถบสีที่ R_f 0.48-0.49 เพิ่มขึ้นมาจากเมื่อย้อมสีแอคติวิตีด้วยสับสเตรทที่มีหมู่ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซิลบนโมเลกุล จึงเชื่อว่าแถบสีนี้เกิดเนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อใช้เทสโทสเทอโรน (สับสเตรทสำหรับเบตาเอนไซม์) เป็นสับสเตรทในการย้อมสีแอคติวิตี พบว่าเกิดแถบสี 4 แถบ เช่นกัน ที่ R_f 0.28, 0.32, 0.37 และ 0.43 โดยมีแถบสีพิเศษเพิ่มขึ้นมาที่ R_f 0.28 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแถบสีที่เกิดจากแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อทำการย้อมสีแท่งเจลที่แยกเอนไซม์ด้วยวิธีอีเลคโตรโฟลีซีส โดยใช้เอทธานอลเป็นสับสเตรท โดยไม่มีกรดน้ำดีชนิดอื่นเลย จะพบแถบสีที่ R_f 0.32, 0.36 (จางมากเกือบมองไม่เห็น) และ 0.42 เท่านั้น จึงสันนิษฐานว่า แถบสีที่ R_f 0.36 น่าจะเป็นแถบสีที่ได้จากแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

3.10 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก P. testosteroni ATCC 11996

เตรียมสารละลายเอนไซม์ของ P. testosteroni(0.05 กรัมเซลล์ต่อมิลลิลิตรบัฟ-เฟอร์) ตามวิธีข้อ 2.7 ทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) มีกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท (วิธีข้อ 2.8.2) ในช่วงพีเอช 3-6 (อะซีเตทบัฟเฟอร์),



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18. ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดร-จีเนส จาก P. testosteroni โดยการแยกชนิดของเอนไซม์ด้วยเทคนิคโพลีอะไคร์ละไมด์เจล (โปรตีน 120 ไมโครกรัม) ย้อมสีแอคติวิตี ตามวิธีข้อ 2.8.3

1. เทสโทสเทอโรน เป็นสับสเตรท
2. เอทธานอลเป็นสับสเตรท
3. กรดดีออกซีโคลิก เป็นสับสเตรท
4. กรดโคลิก เป็นสับสเตรท
5. กรดคีโนดีออกซีโคลิก เป็นสับสเตรท
6. กรดลิโทโคลิก เป็นสับสเตรท

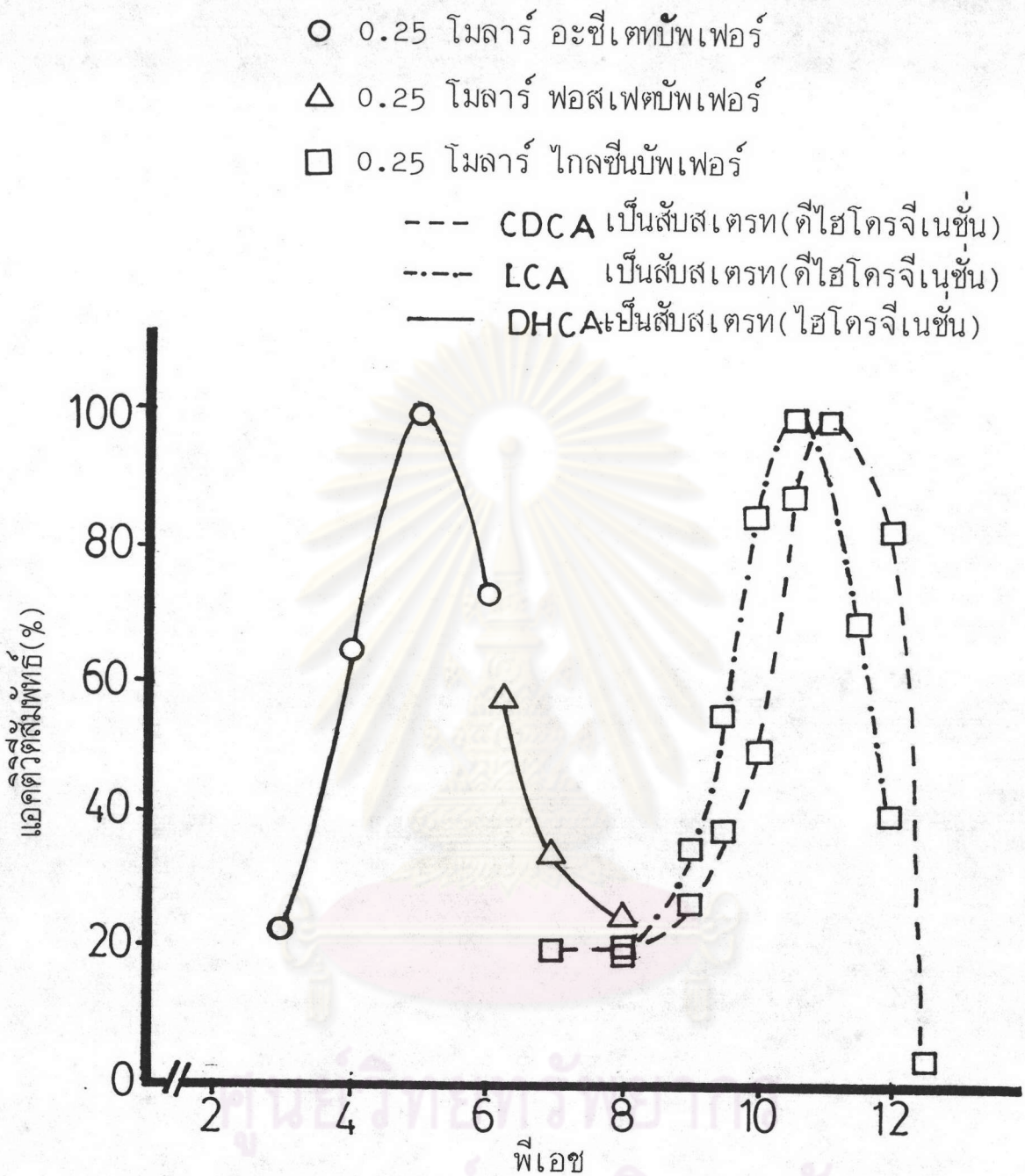
พีเอช 6-8 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้ปฏิกิริยาเร่งไปข้างหน้า (ดีไฮโดรจีเนชั่น) มีกรดลิโทโคลิก และกรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท ในช่วงพีเอช 6-8 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และพีเอช 8-12.5 (ไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์) (ตามวิธีข้อ 2.8.1)

ผลการทดลอง (รูปที่ 19) พบว่า พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท (ไฮโดรจีเนชั่น) คือที่พีเอช 5 ในขณะที่พีเอช 10.5 เหมาะสมกับการเร่งปฏิกิริยา เมื่อใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรท (ดีไฮโดรจีเนชั่น) และพีเอช 11 เหมาะสมกับการเร่งปฏิกิริยาดีไฮ-โดยจีเนชั่นของเอนไซม์ เมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ที่ใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรทเป็น 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์ที่ใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งเป็นการยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่าเอนไซม์ที่แยกได้จาก P. testosteroni มีเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย

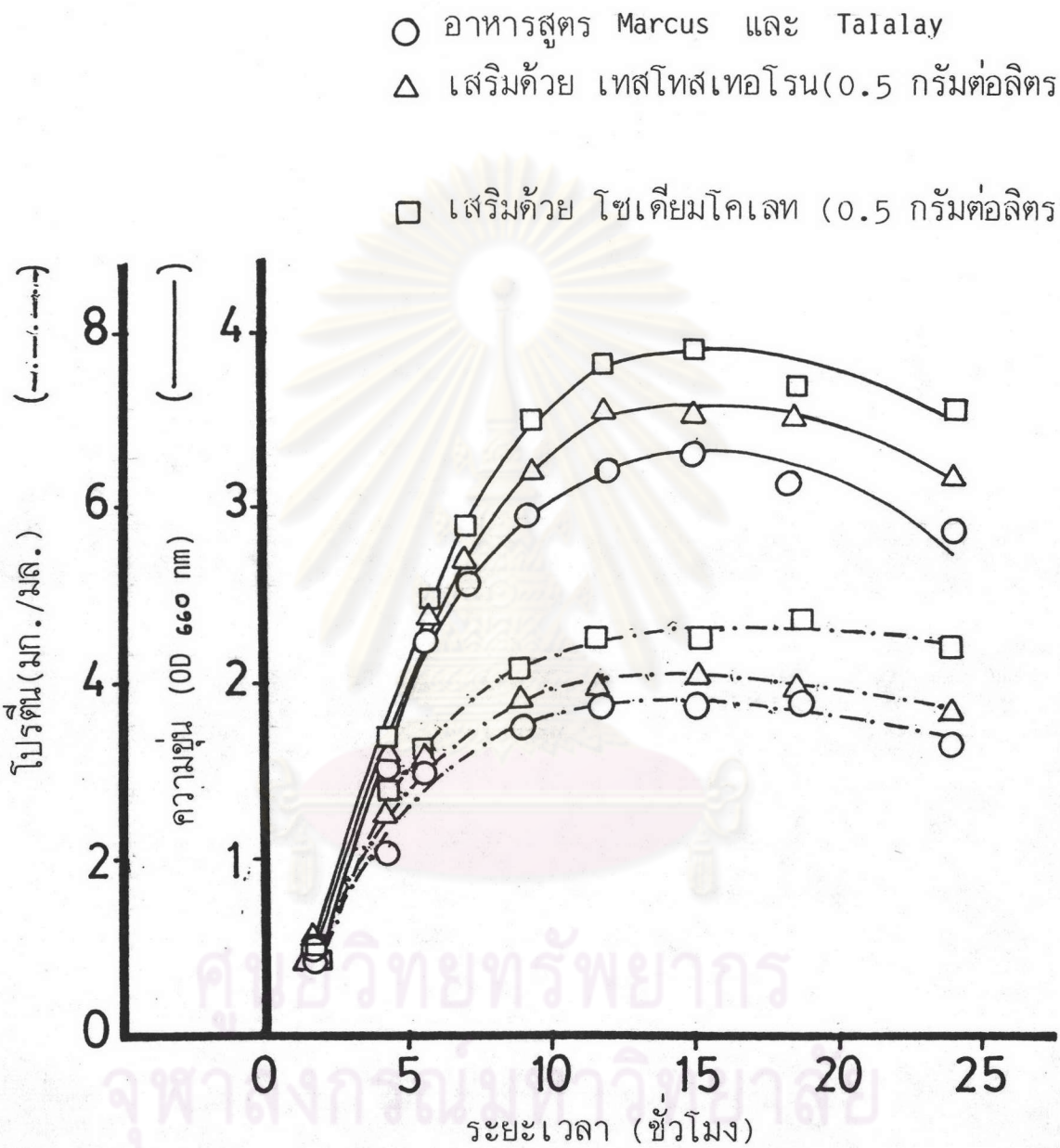
3.11 การเจริญ และการผลิตเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P. testosteroni เมื่อเสริมด้วยเทสโทสเทอโรนและโซเดียมโคเลทในอาหารสูตร Marcus และ Talalay

เพาะเลี้ยงเซลล์ P. testosteroni ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Marcus และ Talalay และอาหารสูตรชนิดเดียวกันที่เสริมด้วยเทสโทสเทอโรนหรือโซเดียมโคเลท ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ติดตามการเจริญโดยการวัดความขุ่น (OD_{660nm}) วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.8 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ ตามวิธีข้อ 2.9.2

ผลการเพาะเลี้ยง P. testosteroni ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay , อาหารสูตรเดียวกันที่เสริมด้วยเทสโทสเทอโรน หรือโซเดียมโคเลท 0.5 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 20) ค่าการเจริญซึ่งวัดด้วยค่าความขุ่น (OD_{660nm}) และความเข้มข้นโปรตีน ของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay มีค่าต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกันที่เสริมด้วยเทสโทสเทอโรน หรือโซเดียมโคเลทเล็กน้อย โดยได้ค่าความขุ่นสูงสุด ที่เวลา 12 ชั่วโมง (OD_{660nm}) เป็น 3.3, 3.6 และ 3.9 สำหรับการเจริญในอาหารที่ไม่ได้เสริมและเสริมด้วยเทสโทสเทอโรน หรือโซเดียมโคเลท ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีน ซึ่งจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเซลล์ จนได้ค่าสูงสุดที่เวลาประมาณ 12 ชั่วโมงเช่น



รูปที่ 19. กราฟแสดงผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P. testosteroni วัดแอคติวิตีของปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น (กรดลิโทโคลิกและคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท) ตามวิธีข้อ 2.8.1 และปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น (กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท) ตามวิธีข้อ 2.8.2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



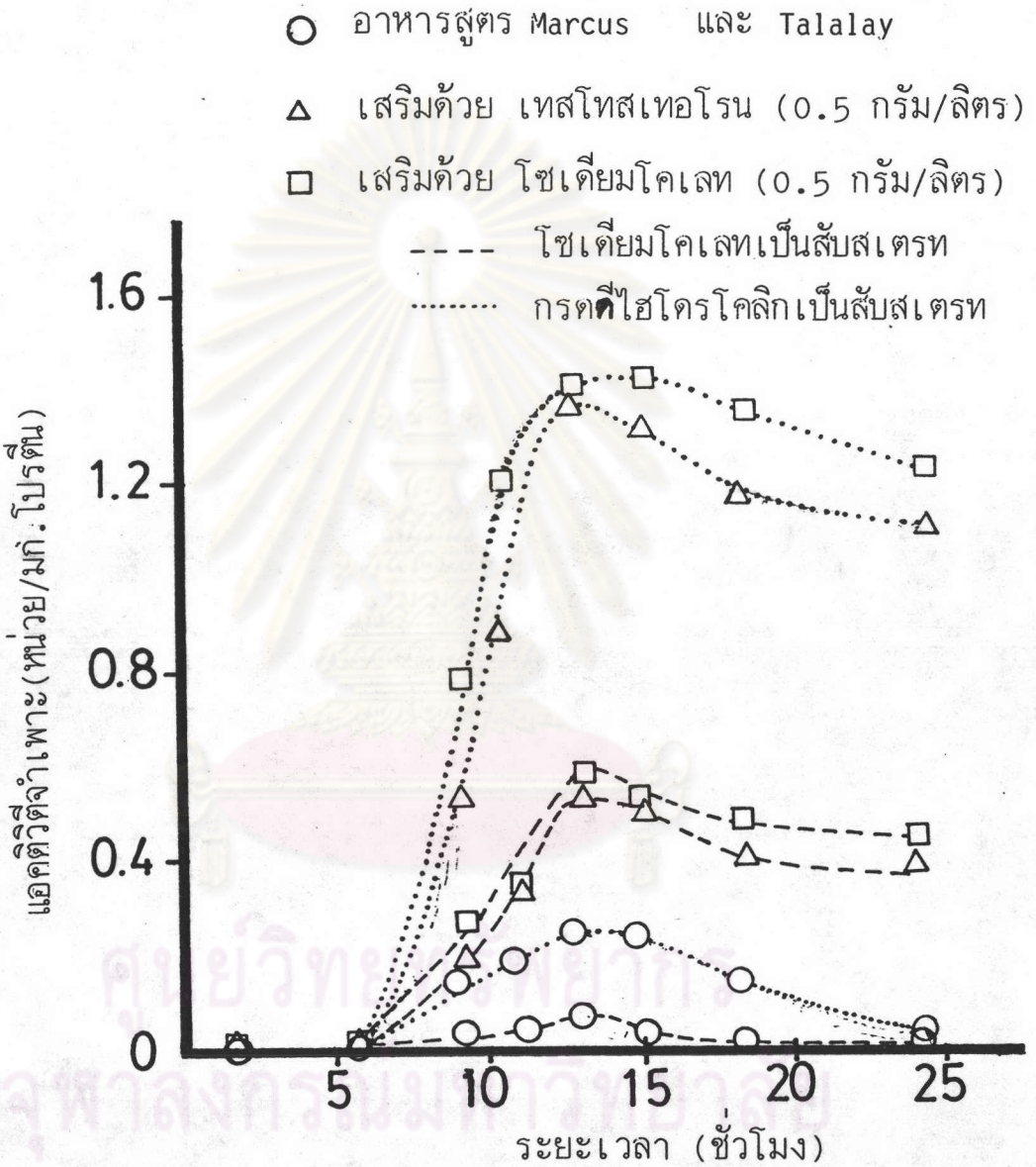
รูปที่ 20. รูปแบบการเจริญของ P. testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารต่างชนิด แสดงความเจริญด้วยค่าความขุ่นที่แสดงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และความเข้มข้นโปรตีนตามวิธีข้อ 2.9.2

เดียวกัน

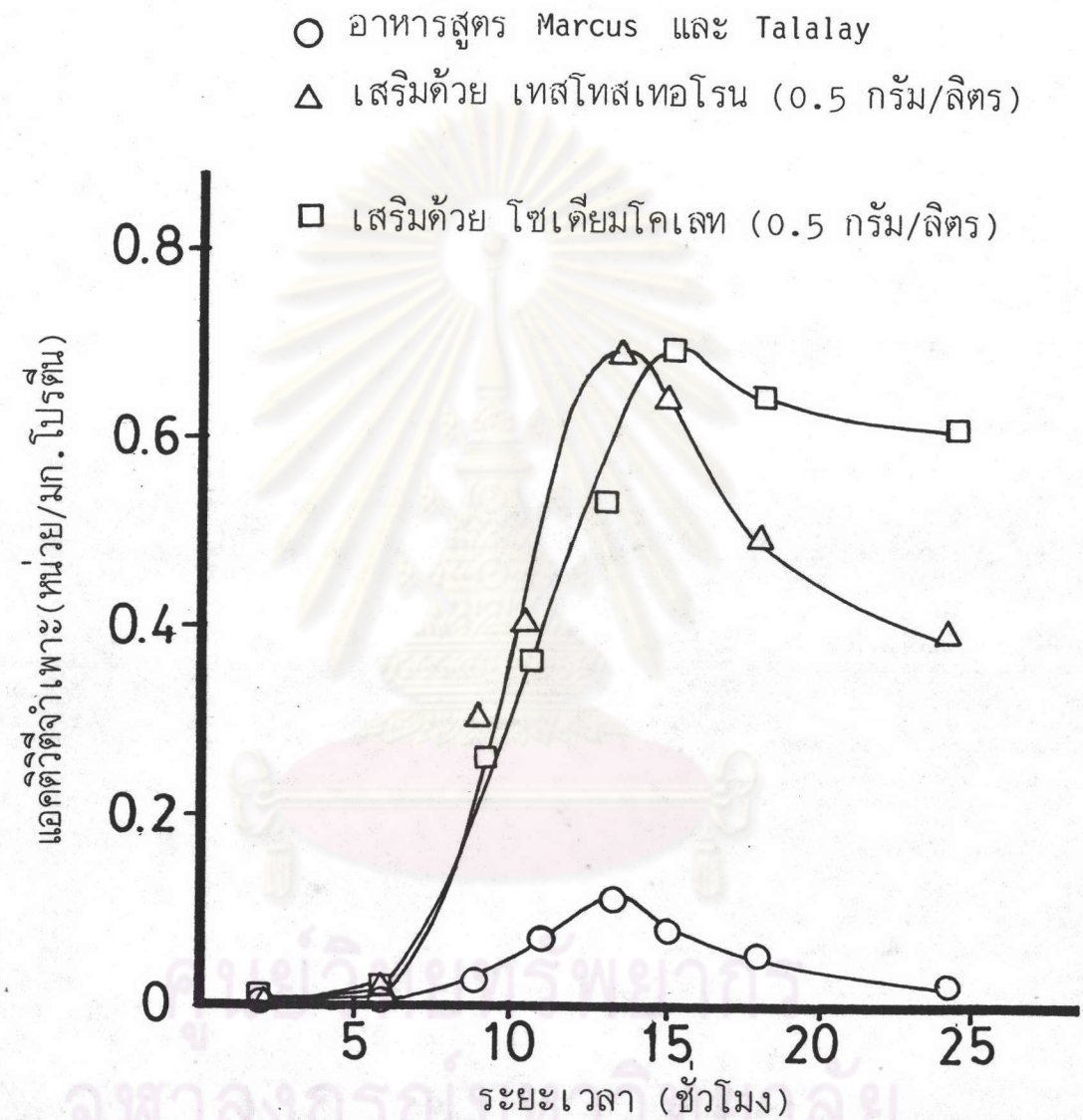
เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 21) พบว่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดของเอนไซม์ที่ได้จากเซลล์ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay มีค่าเพียง 0.06 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่อาหารสูตรชนิดเดียวกันเสริมด้วยเทสโทสเทอโรน และเสริมด้วยโซเดียมโคเลท ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดถึง 0.48 และ 0.58 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส สามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยเทสโทสเทอโรนประมาณ 8 เท่า ในขณะที่โซเดียมโคเลทสามารถเหนี่ยวนำแอคติวิตีของเอนไซม์ได้สูงถึง 9 เท่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน

เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสในปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) ใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 21) พบว่า แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดในปฏิกิริยาย้อนกลับนี้จะสูงกว่าในปฏิกิริยาเร่งไปข้างหน้าประมาณ 1 เท่าตัว คือ แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเป็น 0.24, 1.35 และ 1.4 เมื่อเลี้ยง P. testosteroni ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay, อาหารสูตรเดียวกันที่เสริมด้วยเทสโทสเทอโรน และอาหารสูตรซึ่งเสริมโซเดียมโคเลท ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เทสโทสเทอโรนกับโซเดียมโคเลทก็สามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์-ดีไฮโดรจีเนส ได้ประมาณ 8-9 เท่าเช่นเดิม

ผลการวัดแอคติวิตีของ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (รูปที่ 22) โดยใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับสเตรท (ปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น) พบว่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด ซึ่งมีค่าเพียง 0.12 ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay ถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มขึ้นเป็น 0.7 และ 0.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่เสริมด้วยเทสโทสเทอโรน และเสริมด้วยโซเดียมโคเลท ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ถูกเหนี่ยวนำโดยเทสโทสเทอโรน และโซเดียมโคเลทได้ต่ำกว่าแอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (ประมาณ 6 เท่าของแอคติวิตีเริ่มต้น)



รูปที่ 21. รูปแบบของการผลิต เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตอรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ของ P.testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างชนิด วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้โซเดียมโคเลทและกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรทสำหรับปฏิกิริยา ดีไฮโดรจีเนชั่นและไฮโดรจีเนชั่น ตามวิธีข้อ 2.8.1 และ 2.8.2



รูปที่ 22. รูปแบบของการผลิตเอนไซม์ เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดร-จีเนส ของ P. testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด และวัดแอคติวิตีเอนไซม์ โดยใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับ-สเตรทตามวิธีข้อ 2.8.1

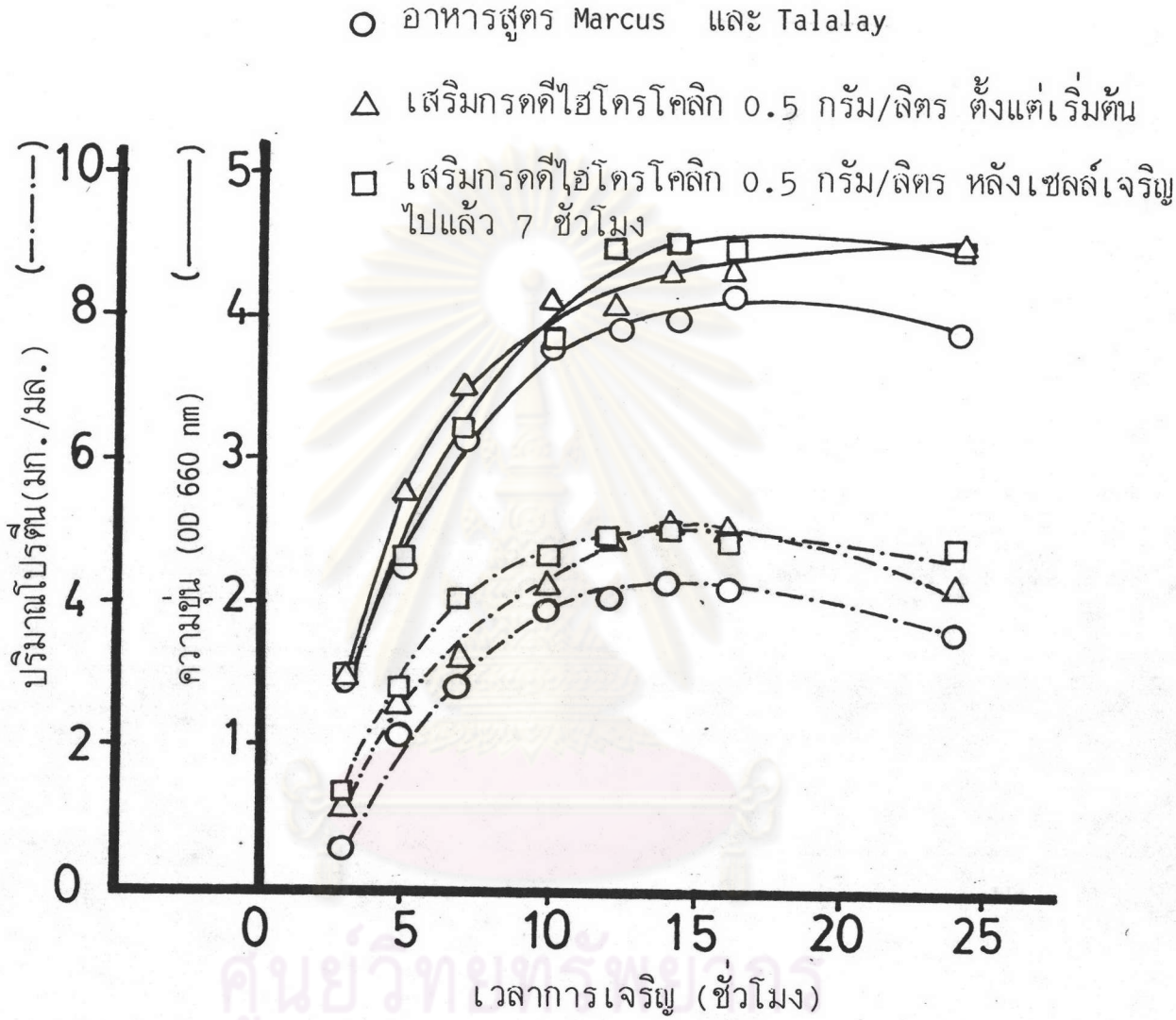
3.12 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ของ P. testosteroni ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay เสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก

เพาะเลี้ยงเซลล์ P. testosteroni ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay เดี่ยว และสูตรอาหารเดียวกันเสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก 0.5 กรัมต่อลิตร 2 แบบ คือ เสริมตั้งแต่ต้นและเสริมเมื่อให้เซลล์ P. testosteroni เจริญไปแล้ว 7 ชั่วโมง ติดตามการเจริญโดยการวัดความขุ่น วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ตามวิธีข้อ 2.8 และปริมาณโปรตีนตามวิธีข้อ 2.9.2

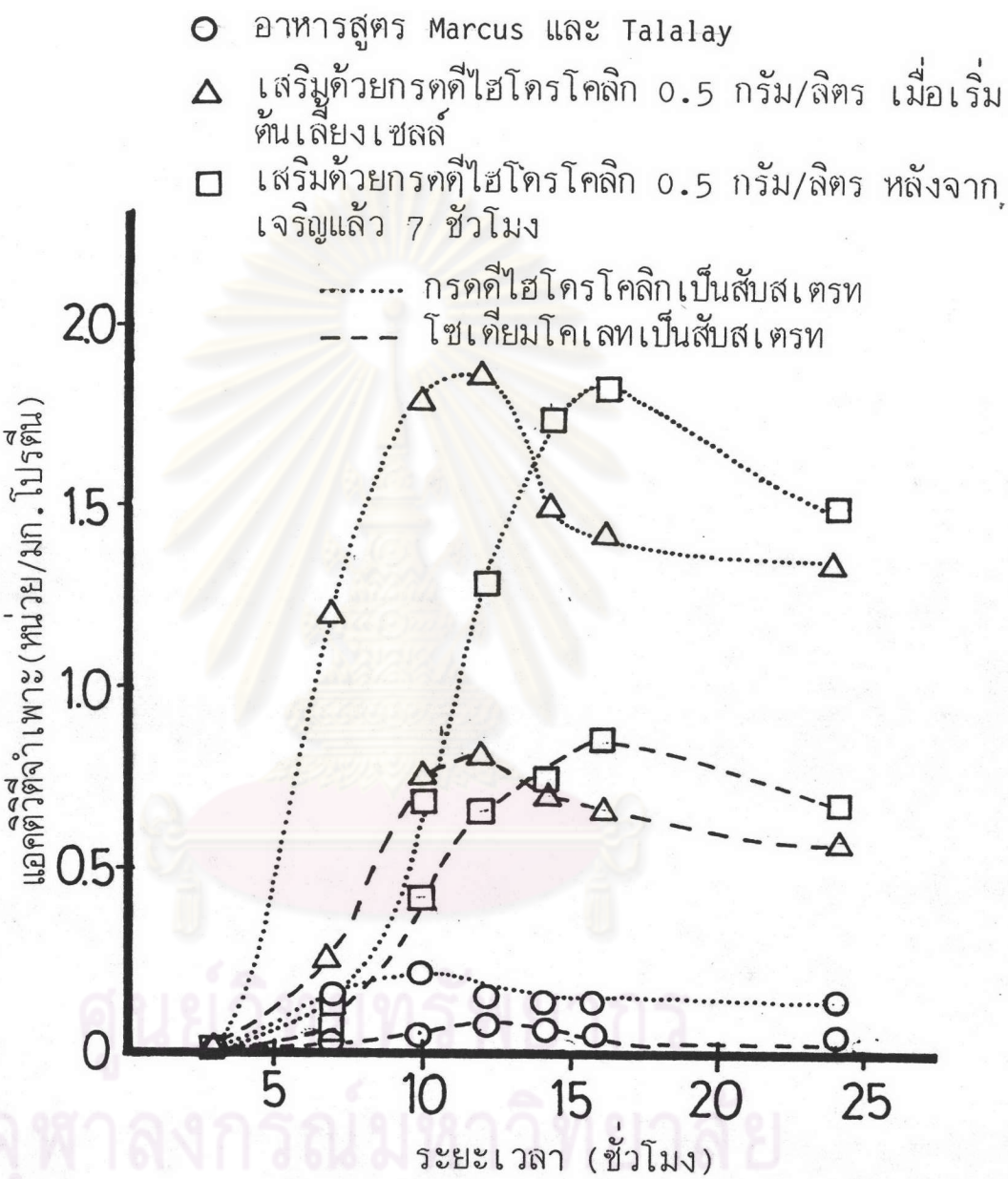
เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ P. testosteroni ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay และสูตรอาหารชนิดเดียวกันที่เสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก ตั้งแต่เริ่มเลี้ยงเซลล์และเมื่อเซลล์เจริญไปแล้ว 7 ชั่วโมง (รูปที่ 23) พบว่าค่าความขุ่นของเซลล์ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay เดี่ยว จะต่ำกว่าในอาหารที่เสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกเล็กน้อย และค่าความขุ่นของเซลล์ซึ่งเจริญในอาหารสูตร Marcus และ Talalay ไม่ว่าจะเติมกรดดีไฮโดรโคลิกก่อนหรือหลังเซลล์เจริญแล้ว 7 ชั่วโมง จะมีค่าใกล้เคียงกัน รวมทั้งรูปแบบของความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จากเซลล์ในช่วงต่าง ๆ ของการเจริญก็คล้ายคลึงกับค่าความขุ่นด้วยเช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส โดยใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท (ดีไฮโดรจีเนชั่น) มี NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเพียง 0.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนที่เวลาของการเพาะเลี้ยงนาน 12 ชั่วโมง เซลล์ P. testosteroni ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay ที่เสริมกรดดีไฮโดรโคลิกแต่ต้น และหลังการเจริญไปแล้ว 7 ชั่วโมง จะให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดถึง 0.8 และ 0.85 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (10 เท่าของสูตรอาหารที่ไม่ได้เสริมกรดดีไฮโดรโคลิก) ตามลำดับ (รูปที่ 24) แต่ช่วงเวลาของการเจริญสูงสุดต่างกันคือ 12 ชั่วโมง สำหรับอาหารที่เสริมกรดดีไฮโดรโคลิกตั้งแต่เริ่มต้น และ 16 ชั่วโมง สำหรับอาหารที่เสริมหลังจากเลี้ยงไปแล้ว 7 ชั่วโมง

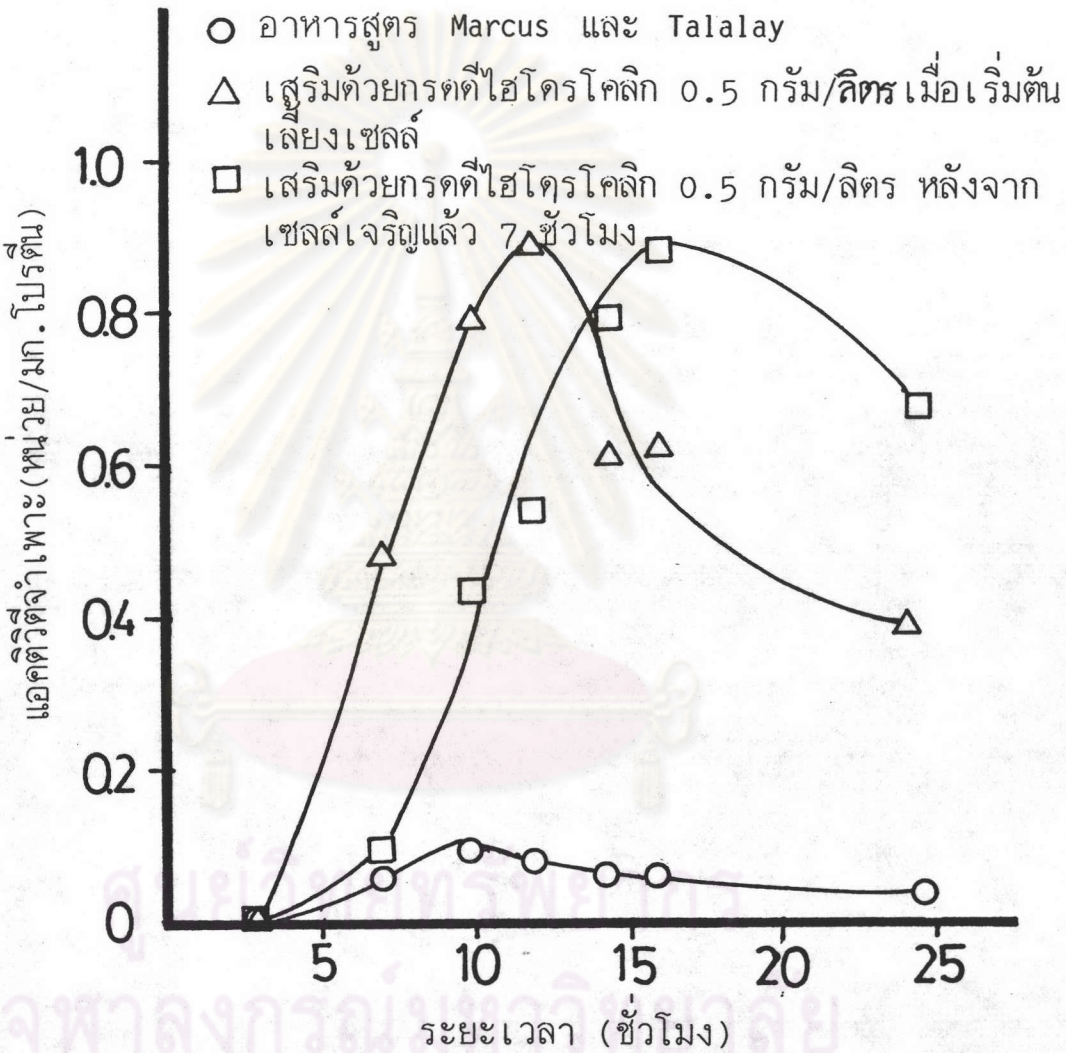
ผลการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสในปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) ซึ่งมี NADH เป็นโคเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท พบว่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดในปฏิกิริยาย้อนกลับนี้จะสูงกว่า



รูปที่ 23. รูปแบบการเจริญของ P. testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารต่างชนิด แสดงค่าการเจริญด้วยความขุ่นที่แสดงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และความเข้มข้นโปรตีน ตามวิธีข้อ 2.9.2



รูปที่ 24. รูปแบบของการผลิตเอนไซม์ แอลฟาไฮดรอกซีสเตอรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อเพาะเลี้ยง P. testosteroni ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างชนิด วัดแอคติวิตีเอนไซม์ โดยใช้โซเดียมโคเลท(ดีไฮโดรจิเนชัน) กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท (ไฮโดรจีเนชั่น) ตามวิธีข้อ 2.8.1 และ 2.8.2



รูปที่ 25. รูปแบบการผลิตเอนไซม์ เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ของ P. testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิด และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับสเตรท ตามวิธีข้อ 2.8.1

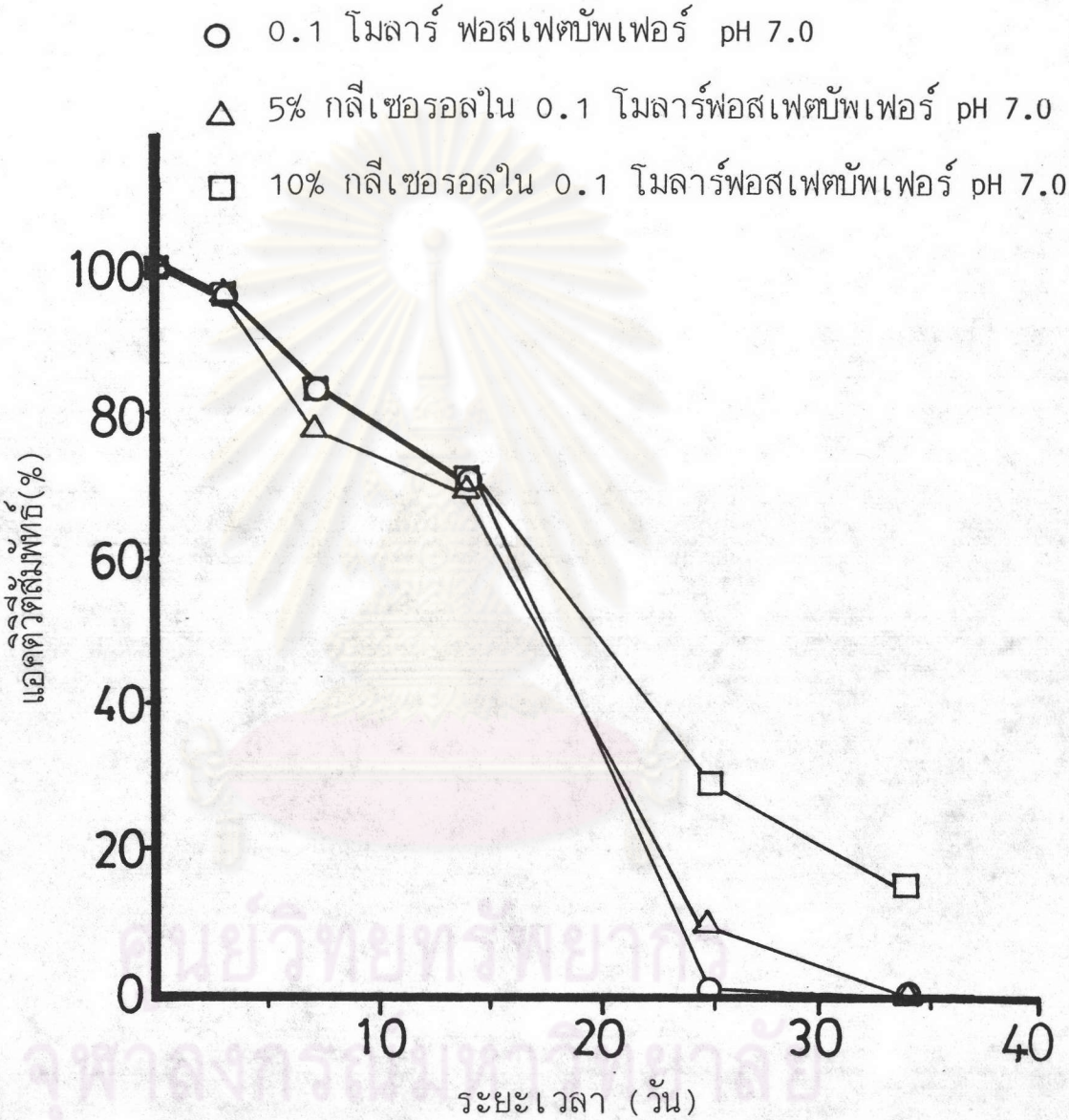
ในปฏิกิริยาไปข้างหน้า (ดีไฮโดรจีเนชั่น) ประมาณ 1 เท่าตัว เช่นเดียวกันกับผลการทดลองในข้อ 3.11 คือได้แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเป็น 0.2, 1.8 และ 1.9 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่เวลา 10, 12 และ 16 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยง P. testosteroni ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay เดี่ยว และอาหารชนิดเดียวกันเสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกตั้งแต่ต้น และเสริมหลังเซลล์เจริญไปแล้ว 7 ชั่วโมง (รูปที่ 24) แสดงว่ากรดดีไฮโดรโคลิกสามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสได้ประมาณ 9-10 เท่าเช่นเดียวกัน

ผลการทดลองในรูป 25 แสดงถึงแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนชั่น โดยใช้เทสโทสเทอโรน เป็นสับสเตรท (ดีไฮโดรจีเนชั่น) มี NAD^+ เป็นโค-เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเป็น 0.1, 0.9 และ 0.9 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่เวลาของการเจริญ 10, 12 และ 16 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเซลล์ P. testosteroni ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay เดี่ยว และอาหารสูตรเดียวกันที่เสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกแต่ต้น และหลังจากเซลล์เจริญไปแล้ว 7 ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจะถูกเหนี่ยวนำโดยกรดดีไฮโดรโคลิกได้ใกล้เคียงกัน (ประมาณ 9 เท่าของแอคติวิตีในอาหารที่ไม่ได้เสริมกรดดีไฮ-โดรโคลิก)

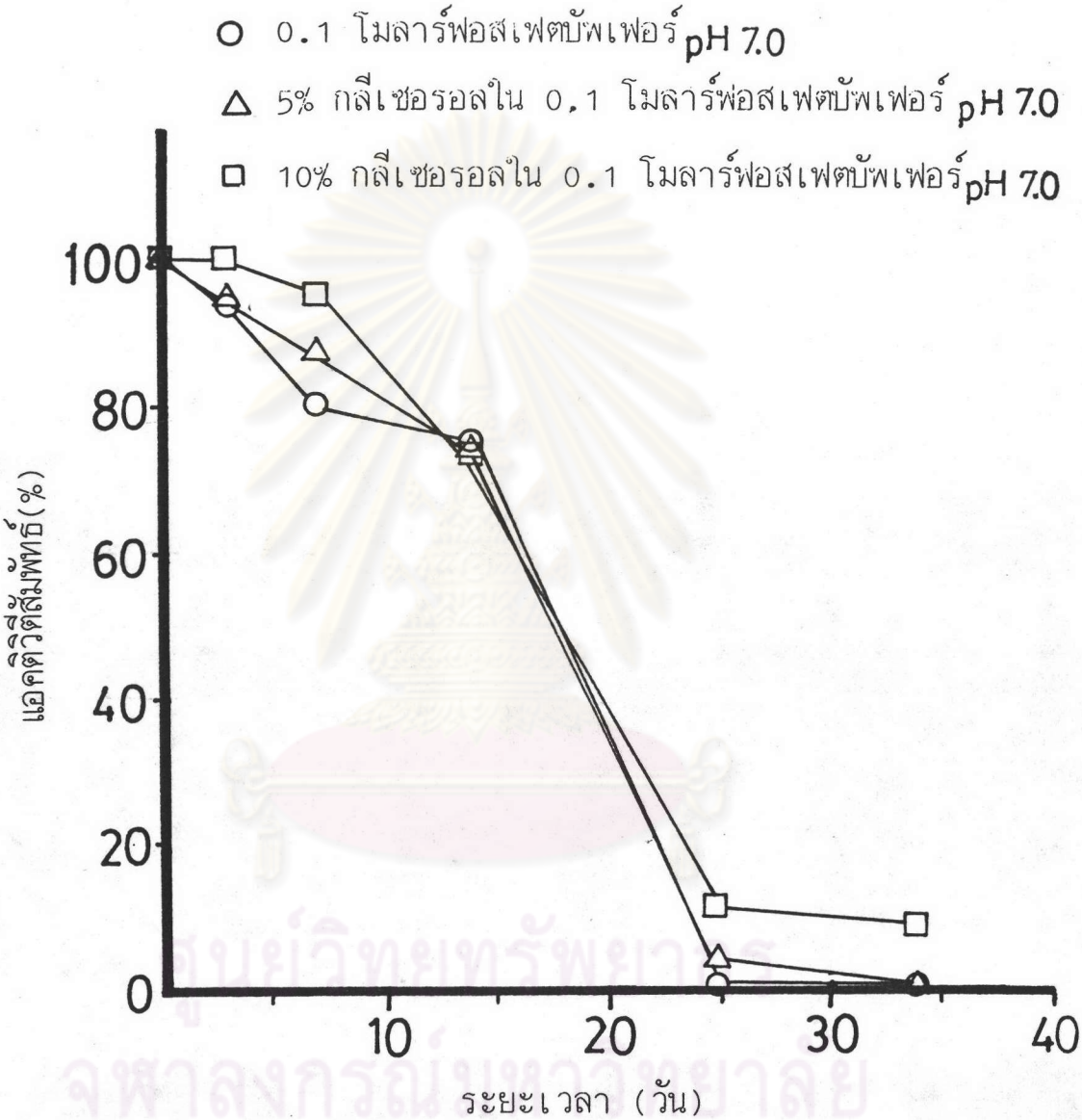
3.13 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จาก P. testosteroni ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส

เตรียมสารละลายเอนไซม์ของ P. testosteroni ตามวิธีข้อ 2.7 (0.1 กรัม เซลล์ต่อ 10 มิลลิลิตรบัฟเฟอร์) ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างกัน 3 ชนิดคือ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0, 5 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และ 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 องศา-เซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด มาวิเคราะห์แอคติวิตีเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ตามวิธีข้อ 2.8 โดยใช้โซเดียมโคเลท, กรดดีไฮโดรโคลิก และเทสโทสเทอโรน เป็นสับสเตรท เป็นระยะ ๆ นาน 34 วัน

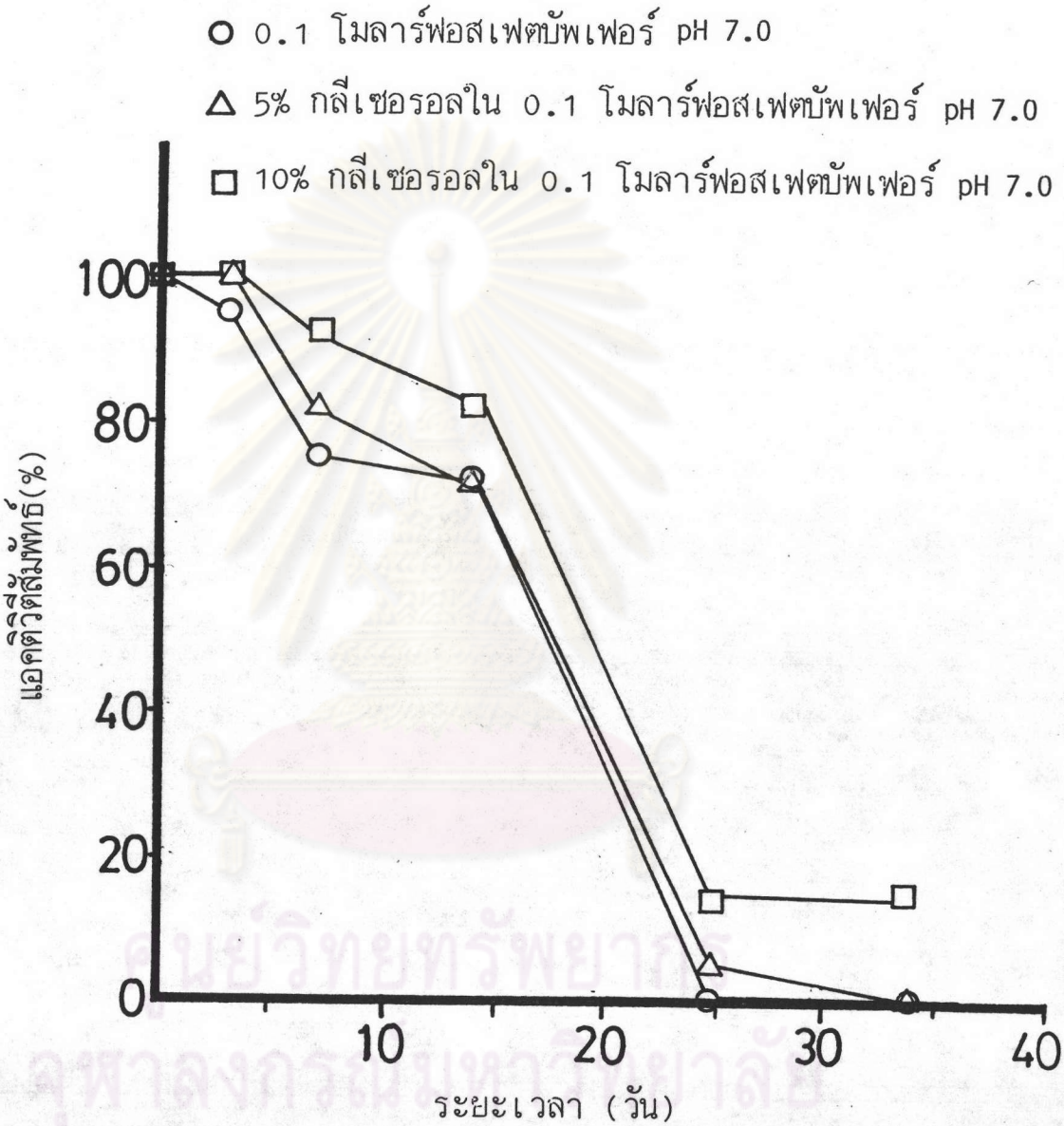
เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ โดยมีโซเดียมโคเลท เป็นสับสเตรท (ดีไฮโดร-จีเนชั่น) (รูปที่ 26) และกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท (ไฮโดรจีเนชั่น) (รูปที่ 27) จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ชนิดใดก็ตาม แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้ทั้ง 2 ทิศทาง



รูปที่ 26. เปรียบเทียบชนิดของสารละลายที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา เอนไซม์ α-HSDH ของเซลล์ P. testosteroni ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท (ดีไฮโดรจีเนชั่น) ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน จนครบ 34 วัน



รูปที่ 27. เปรียบเทียบชนิดของสารละลายที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเอนไซม์ α-HSDH ของเซลล์ P. testosteroni ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท (ไฮโดรจีเนชั่น) ที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน จนครบ 34 วัน



รูปที่ 28. เปรียบเทียบชนิดของสารละลายที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเอนไซม์ β-HSDH ของเซลล์ P. testosteroni ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับสเตรท ดีไฮโดรจีเนชั่น ที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน จนครบ 34 วัน

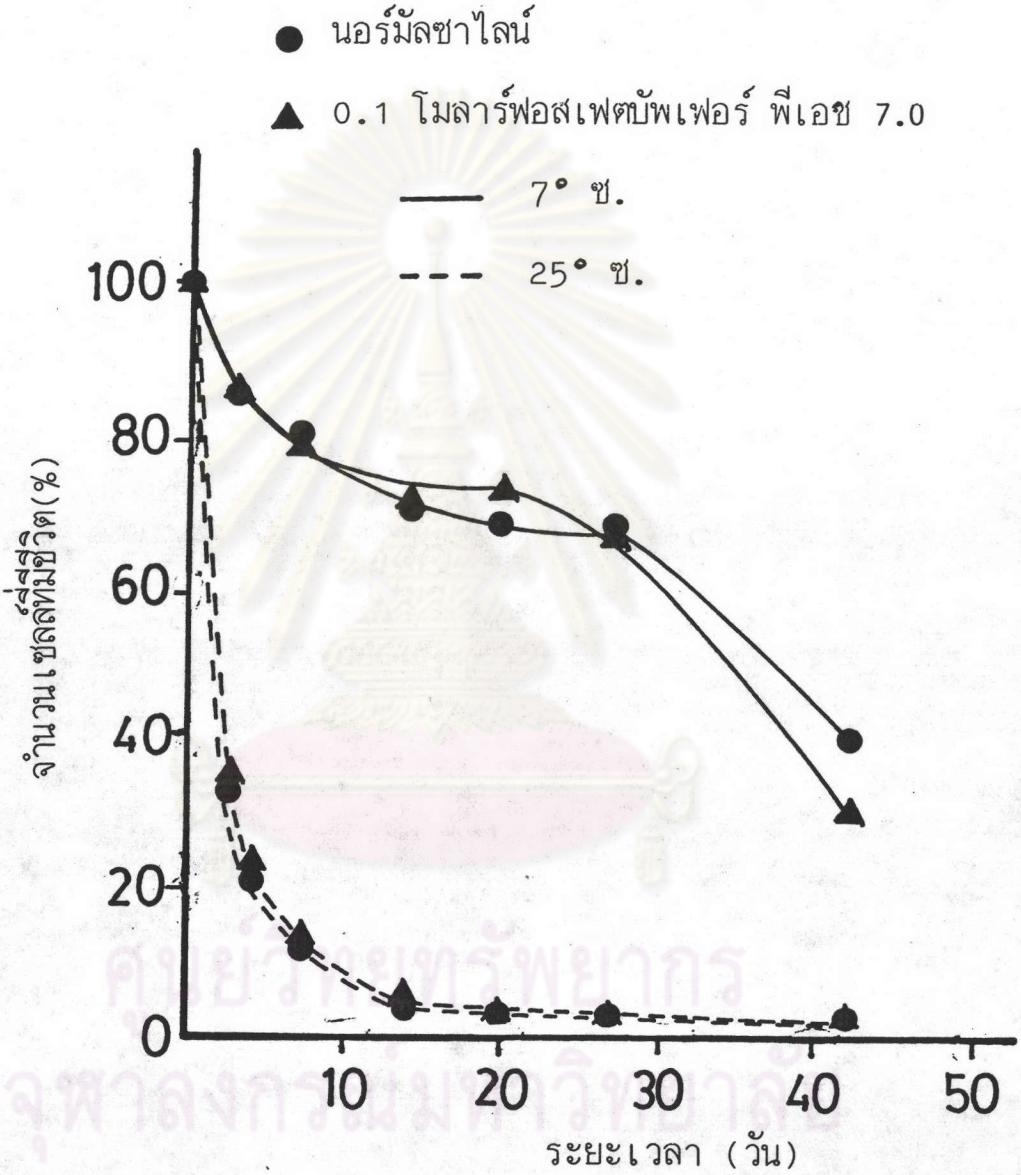
จะลดลงค่อนข้างเร็ว อัตราการลดลงของแอคติวิตีมีค่าใกล้เคียงกันในบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด สำหรับช่วงระยะ 15 วันแรกของการเก็บรักษา(เหลือประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีเริ่มต้น) หลังจากเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นาน 25 วัน แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงจนมีค่าใกล้ศูนย์ การเก็บรักษาเอนไซม์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 10 เปอร์-เซ็นต์กลีเซอรอลจะให้ค่าความเสถียรสูงกว่าบัฟเฟอร์ 2 ชนิดแรก คือจะพบแอคติวิตีของเอนไซม์เหลือประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีเริ่มต้นในวันที่ 34 ของการเก็บรักษา เอนไซม์ที่อุณหภูมิเดียวกัน

ในการทดลองแบบเดียวกัน แต่ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสโดยใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับสเตรท พบว่ารูปแบบของความเสถียรของเอนไซม์คล้ายคลึงกับเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เว้นแต่ว่าเอนไซม์เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจะมีความเสถียรใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 สูงกว่าบ้างเล็กน้อย (รูปที่ 28)

3.14 <u>การศึกษาความเสถียรของเซลล์และเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก *P. testosteroni*</u>

เพาะเลี้ยง *P. testosteroni* ตามวิธีข้อ 2.6.3 กระจายเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 0.03 กรัมเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเทคนิคปลอดเชื้อในนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แยกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมานับจำนวนเซลล์มีชีวิต และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้เซลล์ (วิธีข้อ 2.8) เป็นระยะ ๆ นาน 42 วัน

ผลการทดลอง (รูปที่ 29) แสดงว่าอุณหภูมิเป็นตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ *P. testosteroni* ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ หรือ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ก็ตาม คือ ค่าเซลล์มีชีวิตที่วัดได้ทุกช่วงระยะเวลาของการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียสจะมีค่าสูงกว่าเก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพของการรักษาชีวิตเซลล์โดยสารละลายนอร์มัลซาไลน์ หรือ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส มีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่าค่อนข้างสูง คือจะมีเซลล์มีชีวิตเหลือถึงเกือบ 70 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์เริ่มต้น เมื่อเก็บไว้ที่สภาวะที่นาน 27 วัน และลดต่ำลงเหลือ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ใน 42 วัน ในขณะที่เก็บเซลล์ในสารละลายทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จำนวนเซลล์ที่



รูปที่ 29. เปรียบเทียบความเสถียรของเซลล์ P. testosteroni ซึ่งเก็บรักษาไว้ไว้ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ข้อ 2.6.4) ที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน นาน 42 วัน

มีชีวิตจะลดลงอย่างรวดเร็ว เหลือเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเซลล์ไว้นาน 5 วัน และ 14 วัน ตามลำดับ หลังจากนั้นจะไม่พบค่าเซลล์มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญ

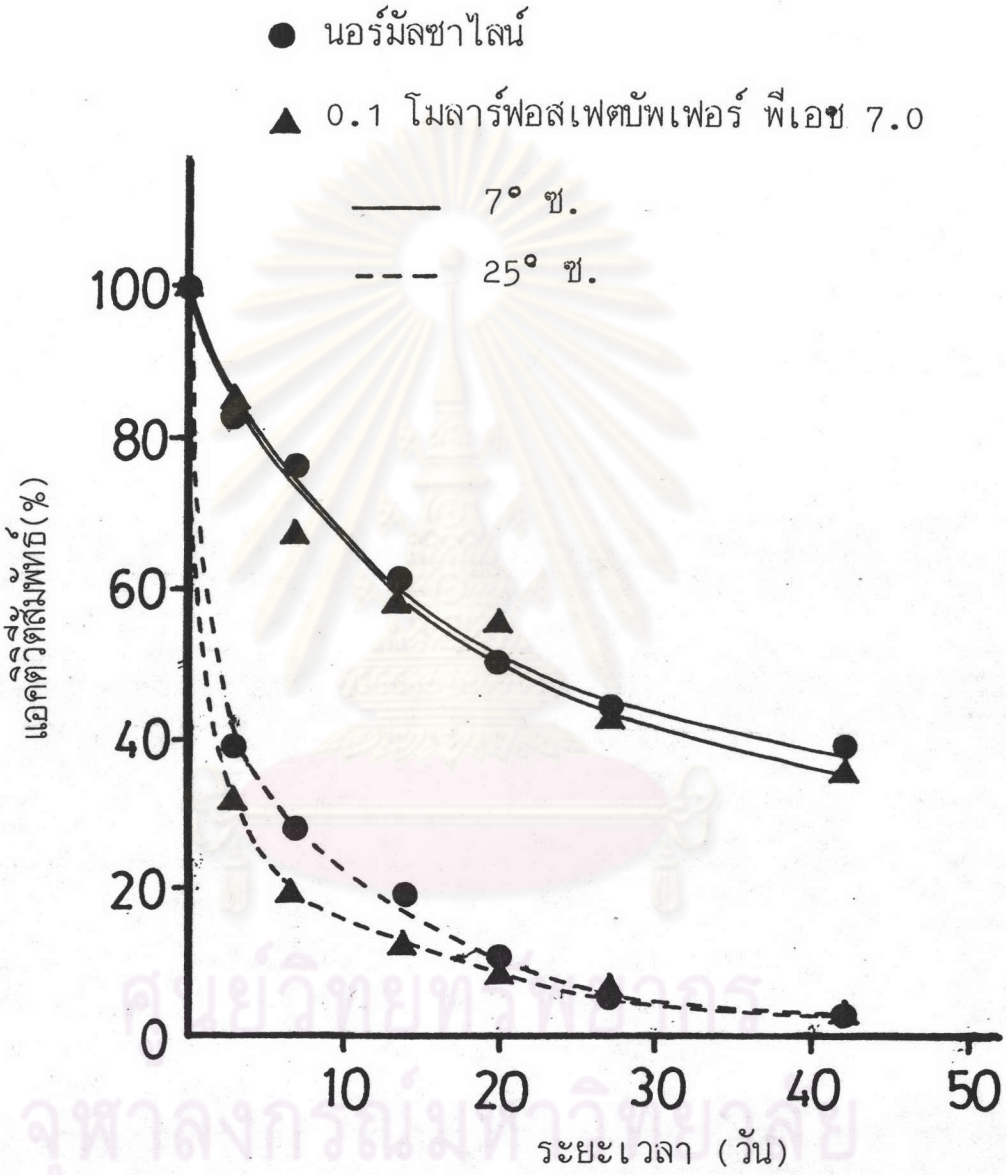
เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ของเซลล์ P. testosteroni ที่เก็บรักษาในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยใช้โซเดียมโคเลท เป็นสับสเตรท (ดีไฮโดรจีเนชั่น) (รูปที่ 30) และใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท (ไฮโดรจีเนชั่น) (รูป 31) จะเห็นได้ว่าค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ลดลงของเอนไซม์ที่เก็บในสารละลายทั้ง 2 ชนิด จะมีค่าใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิเดียวกัน แอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้จากเซลล์ P. testosteroni ซึ่งเก็บที่ 7 องศาเซลเซียส จะมีค่าสูงกว่าแอคติวิตีที่ 25 องศาเซลเซียส อย่างเห็นได้ชัดที่สุดช่วงระยะเวลาของการเก็บรักษาเซลล์

แอคติวิตีของเอนไซม์ ไม่ว่าจะวัดแบบไฮโดรจีเนชั่น หรือดีไฮโดรจีเนชั่น จะยังคงเหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 20 วัน ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะมีแอคติวิตีเหลือเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

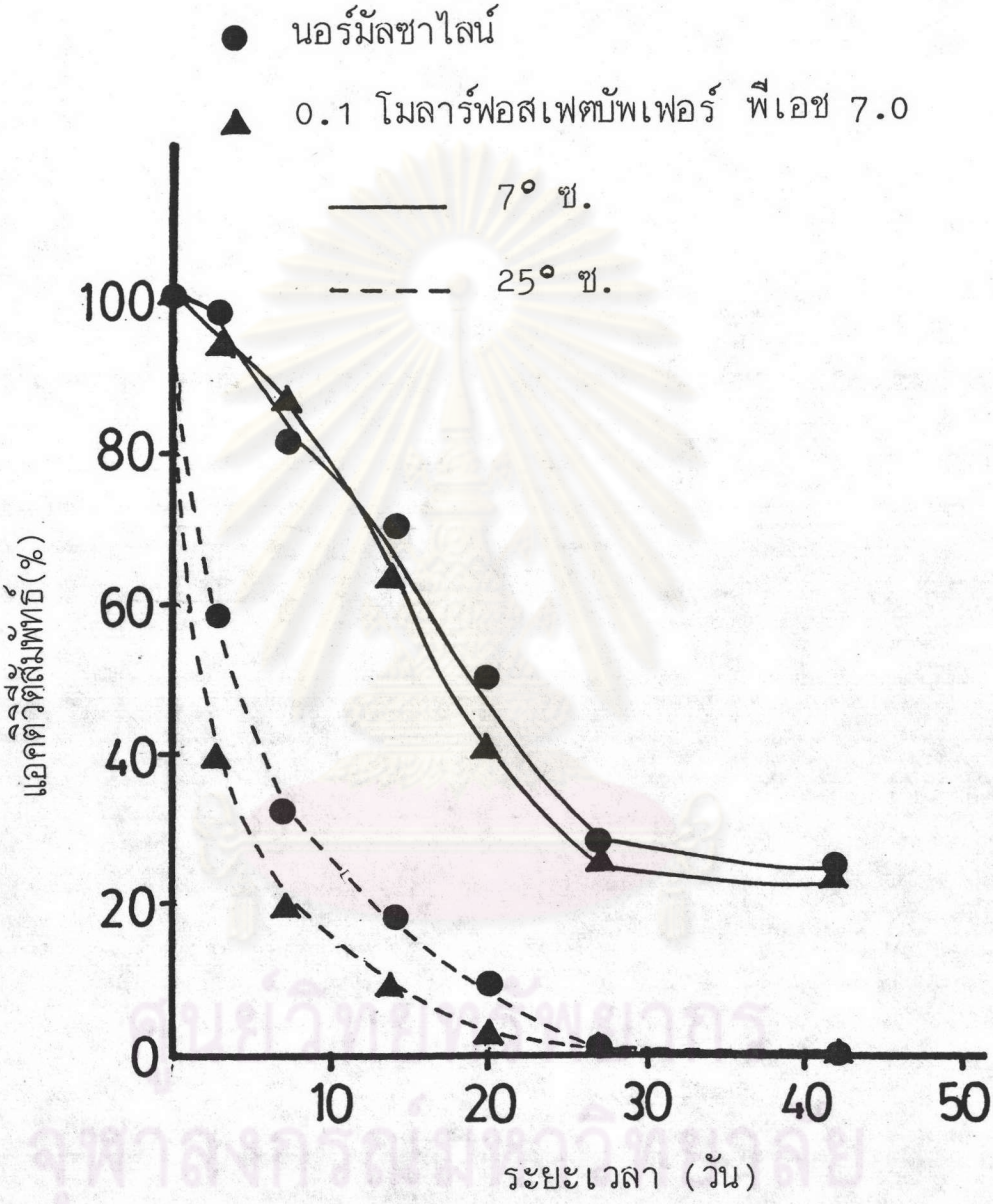
รูปแบบของการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดร-จีเนส ภายในเซลล์ของ P. testosteroni ที่เก็บรักษาไว้ ณ สภาวะเดียวกันกับแอลฟาเอนไซม์ (รูปที่ 32) เมื่อใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับสเตรทก็ยังคงให้ผลยืนยันว่าเซลล์ P. testosteroni เมื่อเก็บในนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 จะให้ค่าเอนไซม์แอค-ติวิตีใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิการเก็บรักษาเดียวกัน ไม่ว่าที่ 7 หรือ 25 องศาเซลเซียส ก็ตาม การเก็บที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียสจะรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลล์ได้ดีกว่าเซลล์ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แอคติวิตีสัมพัทธ์เป็น 0 และ 35-40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาการเก็บเป็น 42 วัน

3.15 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก P. testosteroni และ E. coli

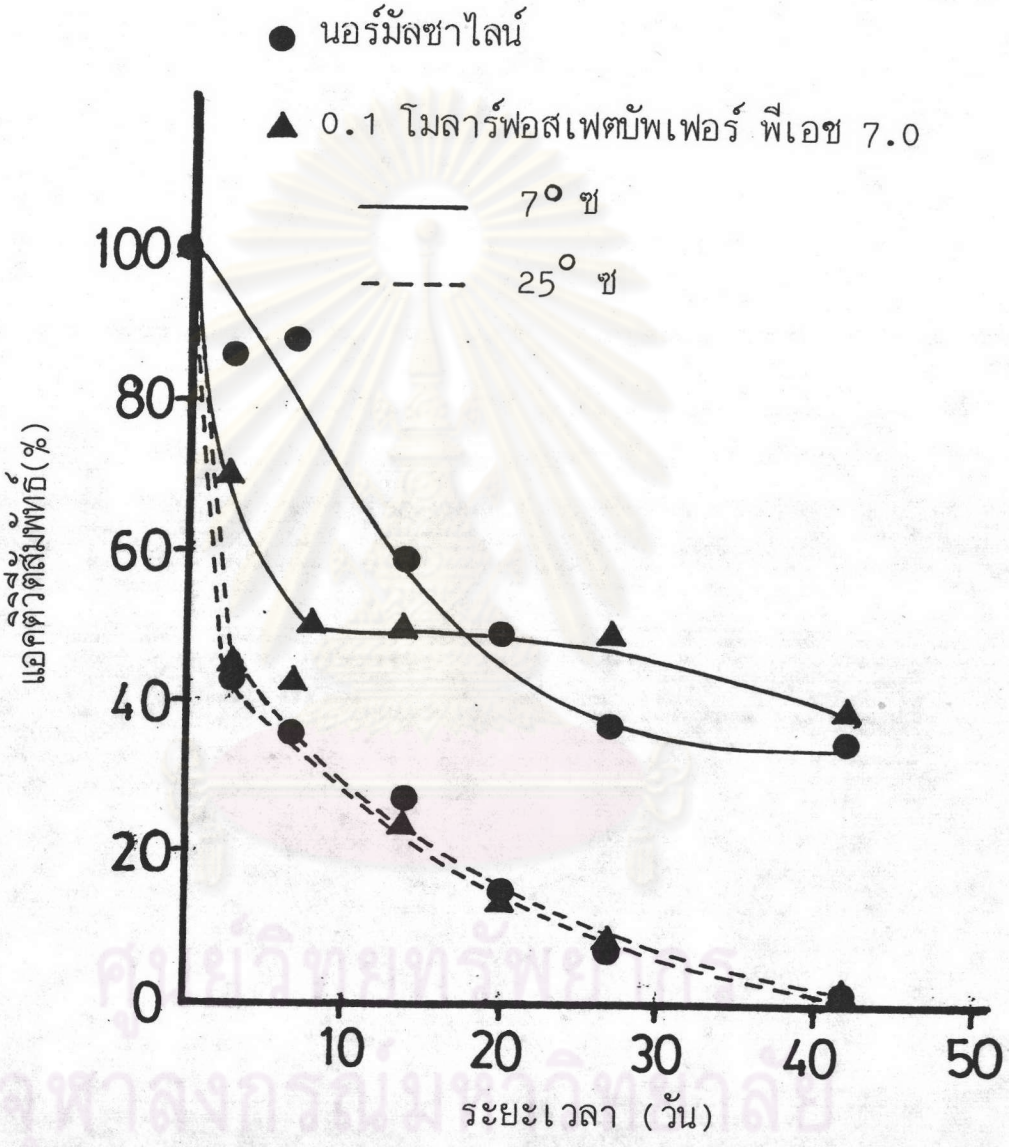
เตรียมสารละลายเอนไซม์ของ P. testosteroni และ E. coli ตามวิธีข้อ 2.7 (0.05 กรัมเซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตรบัฟเฟอร์) โดยใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์คงที่ 0.25 โมลาร์ แต่แปรเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์ตามช่วงของพีเอชที่ใช้คือ อะซีเตทบัฟเฟอร์ (พีเอช 5-6) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-8) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส หลังจาก



รูปที่ 30. เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ 3 α-HSDH ภายในเซลล์ P. testosteroni ซึ่งเก็บรักษาไว้ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท (ดีไฮโดรจิเนชั่น) ที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน จนครบ 42 วัน



รูปที่ 31. เปรียบเทียบชนิดของสารละลายที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเซลล์ P. testosteroni ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรทที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน จนครบ 42 วัน



รูปที่ 32. เปรียบเทียบชนิดของสารละลายที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเซลล์ P. testosteroni ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับสเตรทที่ช่วงเวลาต่างๆ กัน จนครบ 42 วัน

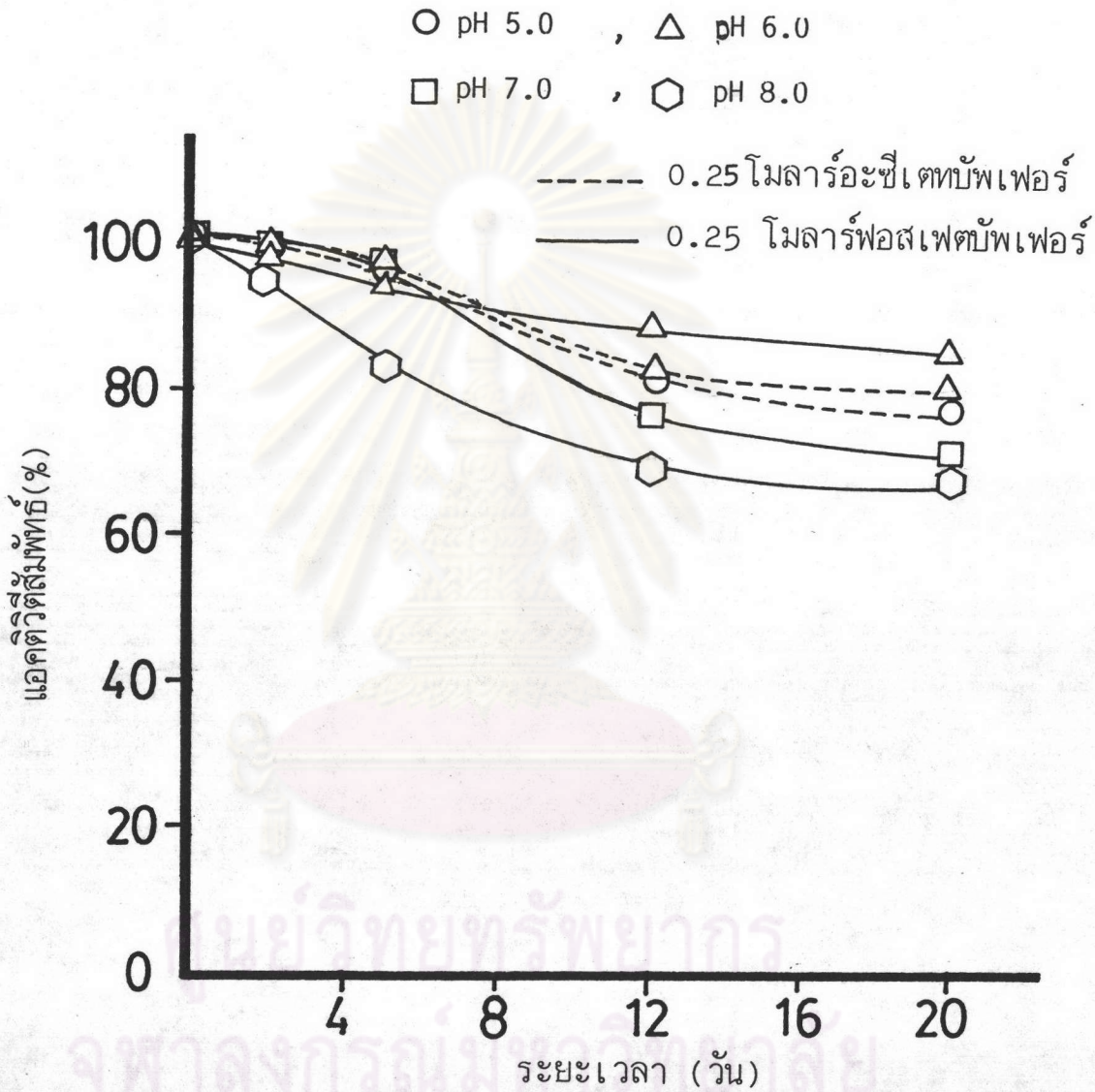
นั้นนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีข้อ 2.8.2 โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท เป็นระยะ ๆ นาน 20 วัน

ผลการทดลอง (รูปที่ 33 และ 34) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ที่ได้จาก E. coli จะมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส สูงมาก และสูงกว่าที่ 25 องศาเซลเซียส อย่างชัดเจน ไม่ว่าจะเก็บรักษาไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดใดก็ตาม เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิเดียวกัน ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก E. coli จะมีความเสถียรสูงที่พีเอช 5-6 ไม่ว่าจะอยู่ในอะซีเตท หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แอคติวิตีเหลือเกือบ 90 เปอร์เซ็นต์ ของแอคติวิตีเริ่มต้นหลังจากเก็บนาน 12 วัน ที่อุณหภูมิเดียวกันนี้เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จาก E. coli จะสูญเสียแอคติวิตีไปช้ามาก จะเห็นได้จากเอนไซม์ที่เก็บรักษาไว้นาน 20 วัน ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ซึ่งมีความเสถียรต่ำสุด ก็ยังคงมีแอคติวิตีเหลือประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์เทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น อะซีเตทบัฟเฟอร์

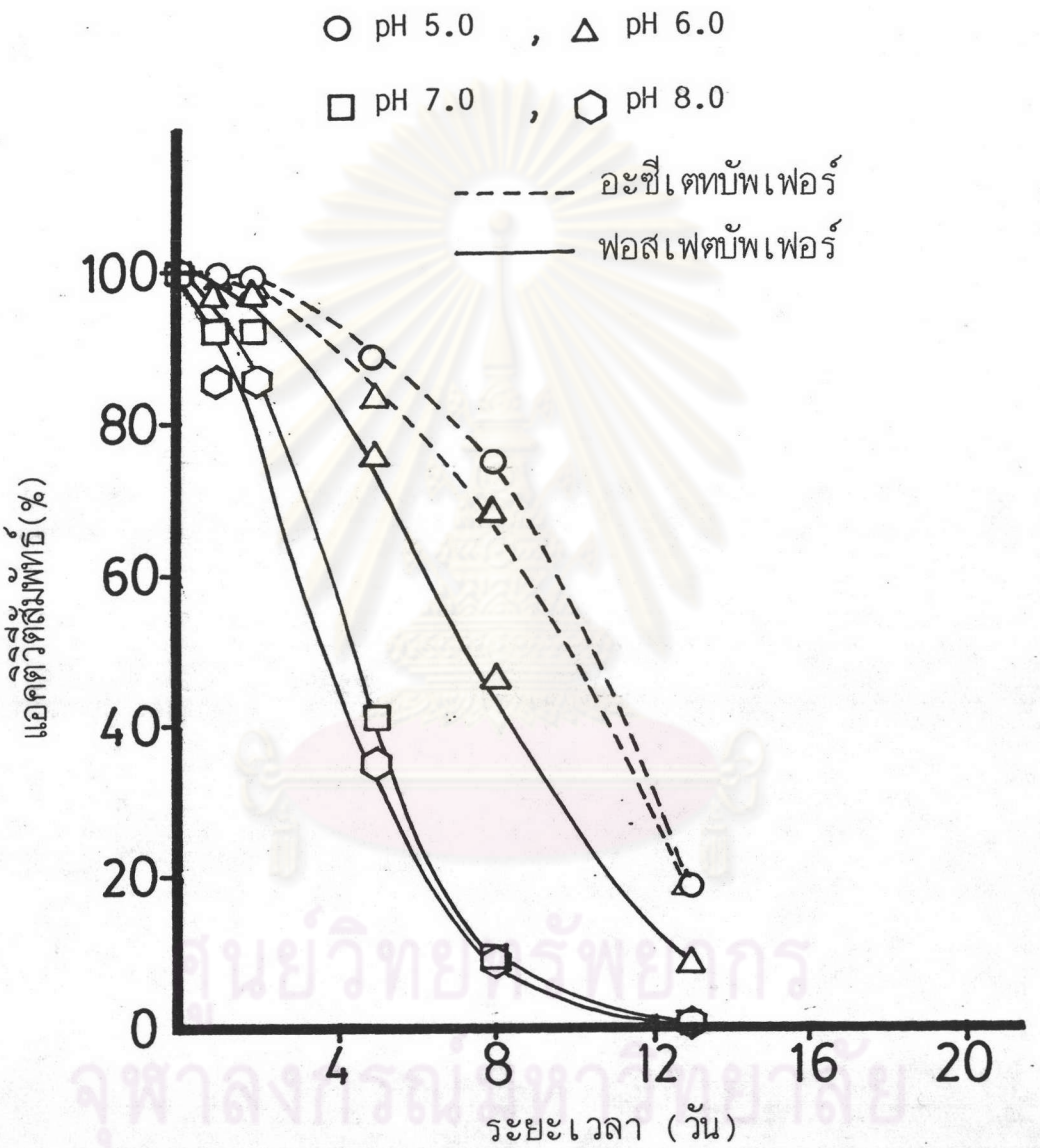
ในทำนองเดียวกัน พีเอช 5-6 ก็ยังเป็นพีเอชซึ่งในค่าความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก E. coli สูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6, 7 และ 8 จะรักษาความเสถียรของเอนไซม์ได้ต่ำลงตามลำดับ อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นี้ เอนไซม์ที่ได้จาก E. coli มีความเสถียรต่ำมากเทียบกับการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส (แอคติวิตีลดเหลือเพียง 0-20 เปอร์เซ็นต์หลังจากระยะเวลา 12 วัน)

ในการทดลองที่สภาวะของอุณหภูมิ พีเอช และชนิดของบัฟเฟอร์ แบบเดียวกันกับข้างต้น 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก P. testosteroni (รูปที่ 35 และ 36) จะให้รูปแบบของความเสถียรคล้ายกันกับเอนไซม์ที่ได้จาก E. coli คือความเสถียรที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ในช่วงพีเอช 5-8 จะสูงกว่าที่ช่วงพีเอชเดียวกัน ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

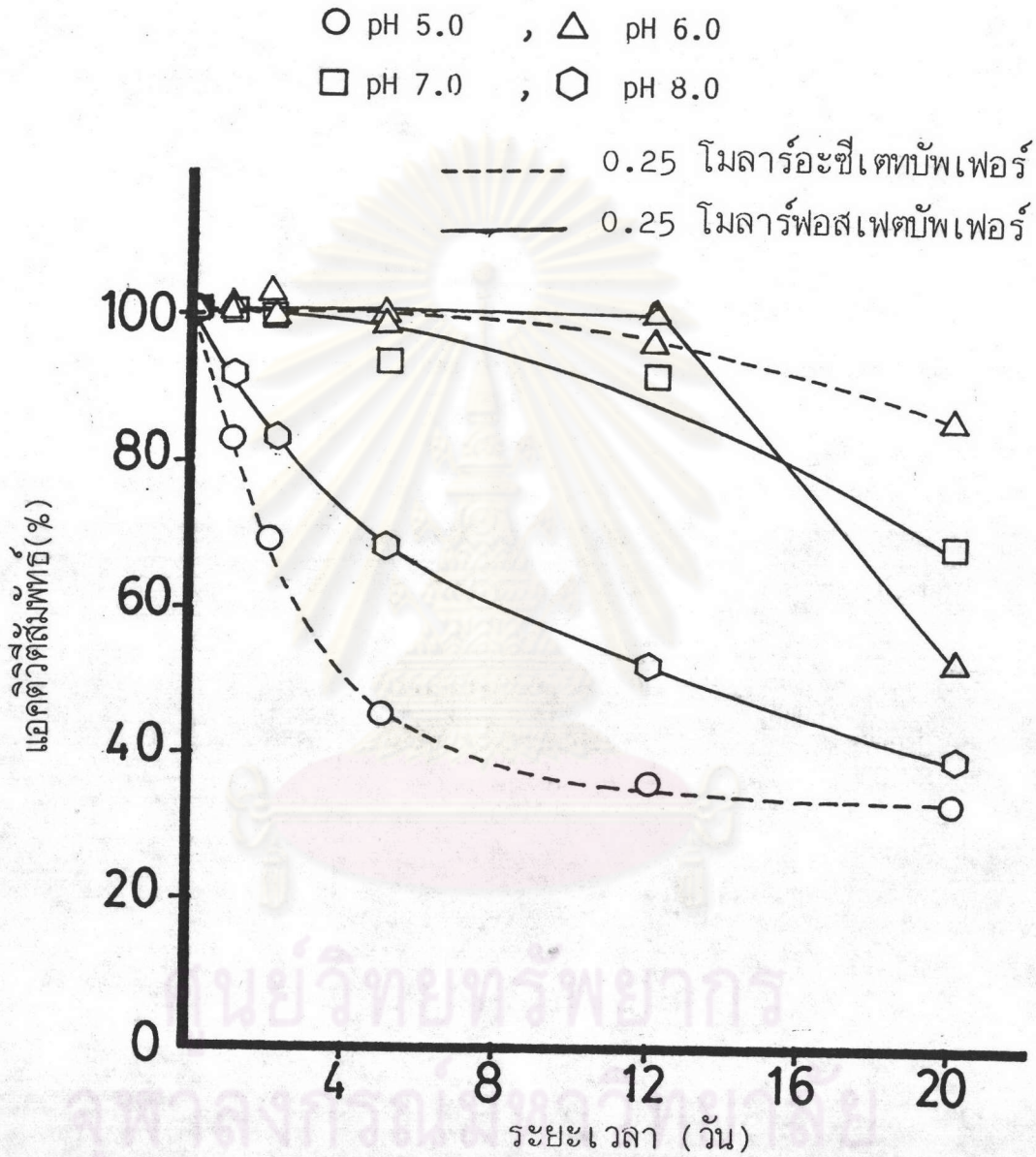
ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อความเสถียรของเอนไซม์ อยู่ในช่วงระหว่าง 6-7 ของทั้งอะซีเตท และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.25 โมลาร์เอนไซม์จาก P. testosteroni จะมีความเสถียรต่ำลง เมื่อเก็บไว้ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7 และ 8



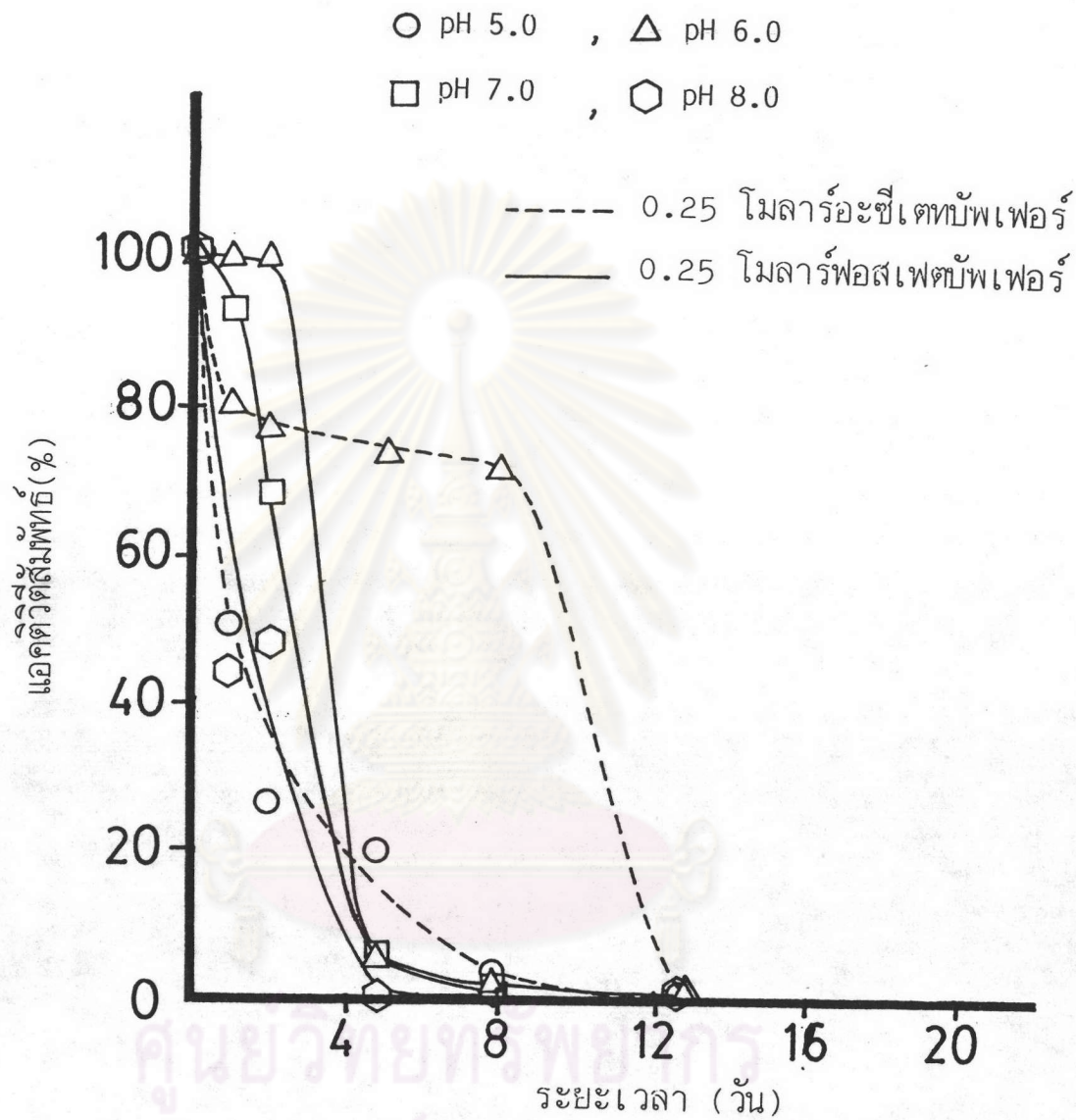
รูปที่ 33. กราฟแสดงผลกระทบของพีเอช ต่อความเสถียรของเอนไซม์ α-HSDH ที่ได้จาก E.coli ซึ่งเก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ในสารละลายอะซิเตทและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่างพีเอชในเวลาต่างๆ กัน เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท



รูปที่ 34. กราฟแสดงผลกระทบของ พีเอช ต่อความเสถียรของเอนไซม์ α-HSDH ที่ได้จากเซลล์ E.coli ซึ่งเก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสารละลายอะซีเตทและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่างพีเอชที่เวลาต่างๆ กัน เมื่อติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท



รูปที่ 35. กราฟแสดงผลกระทบของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ α-HSDH ที่ได้จากเซล P.testosteroni เมื่อเก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ในสารละลายอะซีเตทและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ต่างพีเอชในเวลาต่างๆ กัน ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท



รูปที่ 36. กราฟแสดงผลกระทบของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่ได้จากเซลล์ P. testosteroni เมื่อเก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสารละลายอะซีเตทและฟอสเฟตต่างพีเอชในเวลาต่างๆ กัน ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท

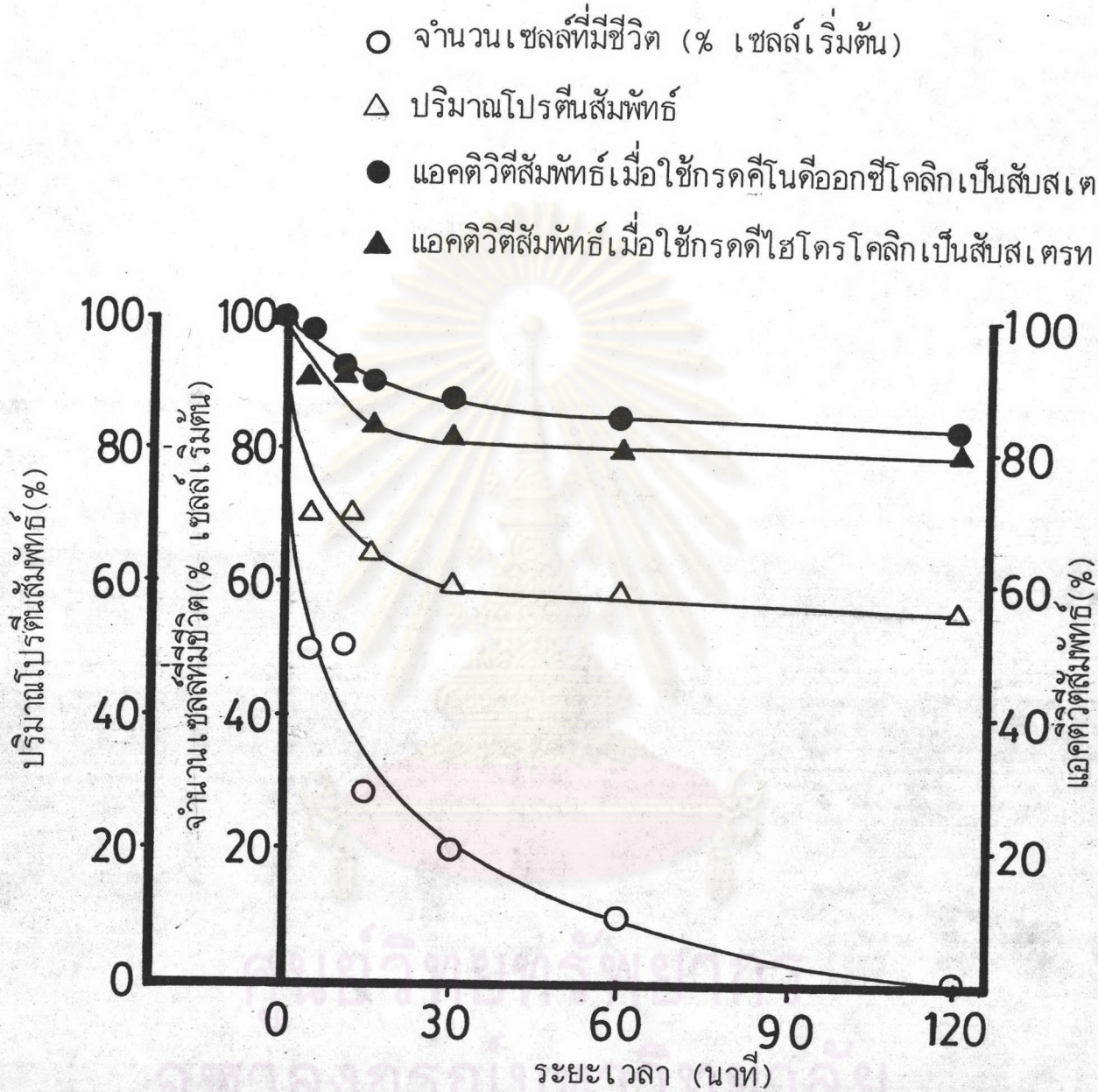
ค่าความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก P. testosteroni ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด ค่าพีเอชที่เอนไซม์นี้เสถียรมากที่สุดคือ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 (แอคติวิตีคงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเก็บนาน 8 วัน) รองลงไปคือ พีเอช 6 และ 7 ของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (รูปที่ 36) ในขณะที่อะซีเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 จะช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ได้ต่ำที่สุดพบว่าที่สภาวะนี้เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีไปทั้งหมด เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 5 วัน

3.16 การศึกษาความเสถียรของเซลล์ E. coli และ P. testosteroni ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เนื่องจากการวิจัยนี้ตั้งวัตถุประสงค์ที่จะใช้เซลล์ตรึงร่วมของ E. coli และ P. testosteroni ในแคปปาคาร์ราจีแนน ซึ่งต้องมีการผสมเซลล์กับแคปปาคาร์ราจีแนนที่อุณหภูมิสูงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาหนึ่งจึงได้ทำการทดลองวัดความเสถียรของเซลล์ที่สภาวะนี้

เตรียมเซลล์ E. coli และ P. testosteroni ในนอร์มัลซาไลน์ (0.05 กรัมต่อมิลลิลิตร) แบ่งใส่ในหลอดทดลองเกลียวขนาด 16×100 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร โดยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วนำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส พร้อมทั้งวัดปริมาณโปรตีน (วิธีข้อ 2.8.1, 2.8.2 และ 2.9.2) ในช่วงเวลาต่าง ๆ

ผลการทดลอง (รูปที่ 37) พบว่าเซลล์ E. coli มีชีวิตจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ และจะไม่สามารถตรวจพบเซลล์มีชีวิตเหลืออยู่เลย หลังจากเก็บเซลล์ไว้ที่สภาวะนี้นาน 120 นาที เมื่อติดตามวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นโปรตีนที่วัดได้ก็ลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน (เหลือประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเก็บไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และคงที่ไปตลอดจนถึง 120 นาที)



รูปที่ 37. กราฟแสดงผลกระทบของอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ต่อเซลล์ E.coli เมื่อทำการศึกษาวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตตามวิธีข้อ 2.6.4 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ HSDH ตามวิธีข้อ 2.8 และปริมาณโปรตีน ตามวิธีข้อ 2.9.2

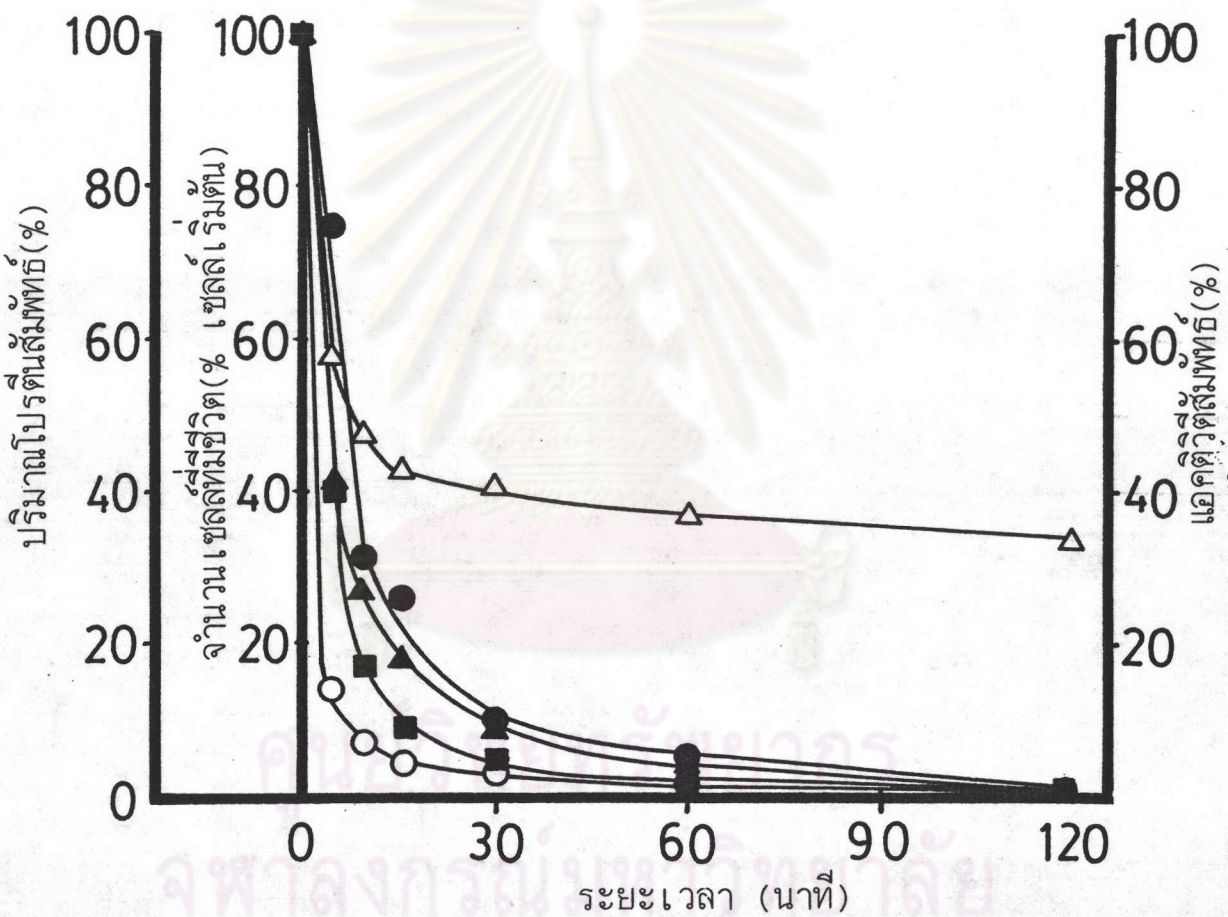
เซลล์ P. testosteroni จะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ (50 องศาเซลเซียส) ต่ำมาก เมื่อเทียบกับ E. coli (รูปที่ 38) ผลการทดลองในสภาวะเช่นเดียวกัน คือ เก็บรักษาที่อุณหภูมิคงที่ 50 องศาเซลเซียส จะพบว่าเซลล์ P. testosteroni จะมีชีวิตเหลือเพียง 14 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเซลล์เริ่มต้น เมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที หลังจากนั้นเซลล์จะตายจนเกือบหมดเมื่อเก็บที่สภาวะนี้นาน 30 นาที ในขณะที่ปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 58 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้น เมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที และคงที่ตลอดไปหลังจากเวลาผ่านไป 30 นาที (40 เปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีนเริ่มต้น) การทดลองวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จากเซลล์ P. testosteroni ต่อสับสเตรทโซเดียมโคเลท, เทสโทสเทอโรน และกรดดีไฮโดรโคลิก จะให้ผลแตกต่างจากแอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้จากเซลล์ E. coli ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกัน ในที่นี้จะพบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อใช้สับสเตรททั้ง 3 ชนิดจะลดลงอย่างรวดเร็ว ตรวจพบแอคติวิตีเหลือเพียง 10-20 เปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีเริ่มต้นเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และลดลงจนเกือบเป็นศูนย์หลังจากเก็บไว้นาน 30 นาที

3.17 การศึกษาผลกระทบของโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก P. testosteroni และ E. coli

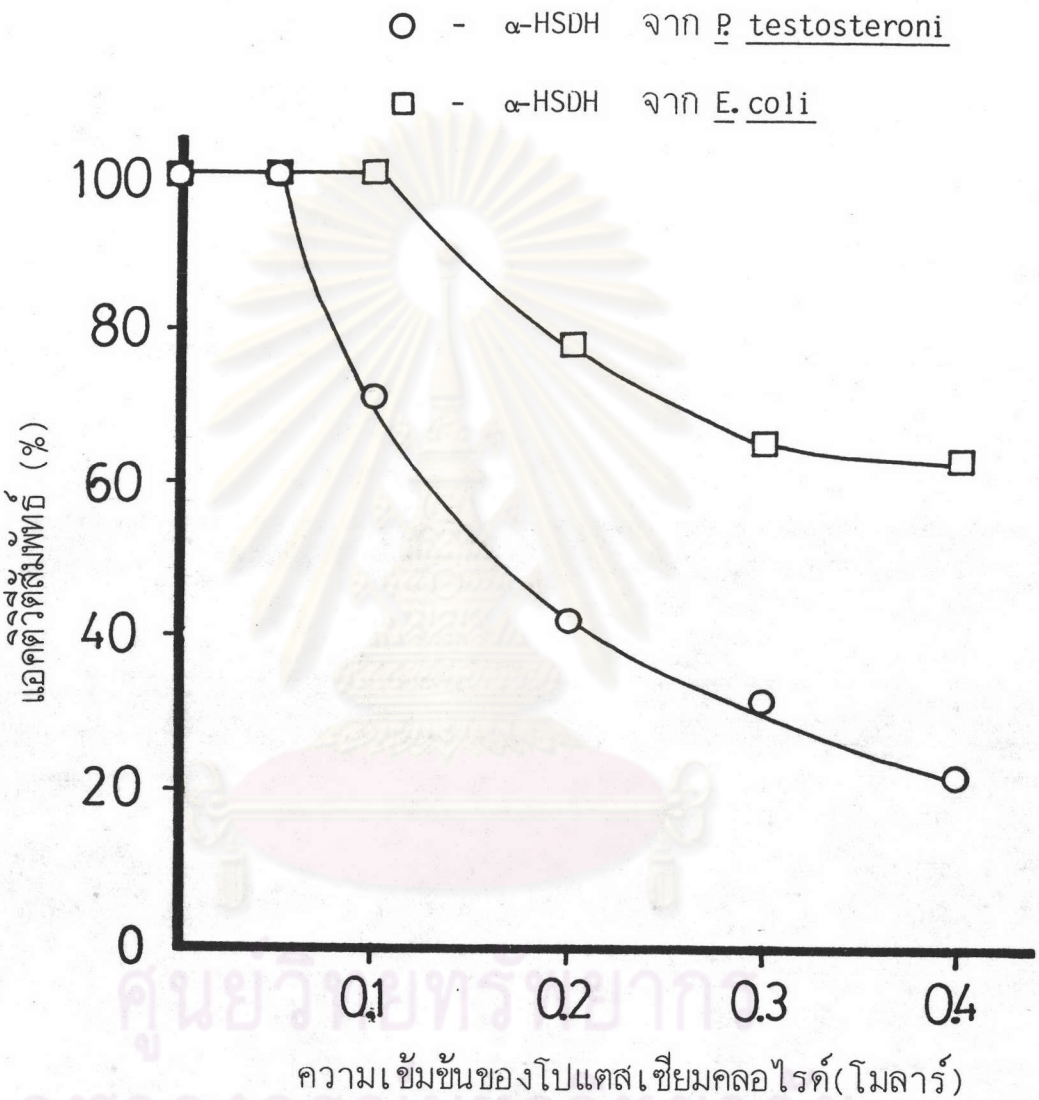
เนื่องจากความคงตัวของเม็ดเจลเซลล์ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนนจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ในสารละลายที่เสริมด้วยโปแตสเซียมคลอไรด์ ในการทดลองจึงได้ศึกษาผลกระทบของโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของเซลล์เสียก่อน

เตรียมสารละลายเอนไซม์จากเซลล์ E. coli และ P. testosteroni ตามวิธีข้อ 2.7 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสเมื่อไม่มีโปแตสเซียมคลอไรด์ และเมื่อมีโปแตสเซียมคลอไรด์ (ความเข้มข้นจาก 0-0.4 โมลาร์) โดยใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท (แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส) สำหรับเอนไซม์จาก P. testosteroni และกรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท (แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส) สำหรับเอนไซม์จาก E. coli

ผลการทดลองในรูปที่ 39 จะเห็นได้ว่าโปแตสเซียมคลอไรด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งได้จาก P. testosteroni และ E. coli ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดี-



รูปที่ 38. กราฟแสดงผลกระทบของอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ต่อเซลล์ P.testosteroni เมื่อทำการศึกษาวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตตามวิธีข้อ 2.6.4 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ HSDH ตามวิธีข้อ 2.8 และปริมาณโปรตีนตามวิธีข้อ 2.9.2



รูปที่ 39. ผลกระทบของความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อเอนไซม์ α-HSDH ของ P. testosteroni เมื่อใช้กรดโซเดียมโคเลทเป็นสับเตรทและเอนไซม์ α-HSDH ของ E. coli เมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.8.1

ไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก P. testosteroni โดยโปแตสเซียมคลอไรด์จะเริ่มเห็นได้ชัด เริ่มตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ขึ้นไป (แอคติวิตีของเอนไซม์ลดเหลือเพียง 70 เปอร์เซ็นต์ และ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นโปแตสเซียมคลอไรด์เป็น 0.1 และ 0.4 โมลาร์ ตามลำดับ) โปแตสเซียมคลอไรด์มีผลกระทบต่อเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก E. coli น้อยกว่าเอนไซม์จาก P. testosteroni เมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท โดยสังเกตพบว่า โปแตสเซียมคลอไรด์จะเริ่มมีอิทธิพลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 โมลาร์ (แอคติวิตียังลดลงเหลือถึง 62 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นโปแตสเซียมคลอไรด์เป็น 0.4 โมลาร์)

3.18 การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบลักษณะการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีด้วยเซลล์ E. coli อิสระ เซลล์ E. coli ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น และเซลล์ E. coli ตรึงด้วยแอจจิเนต

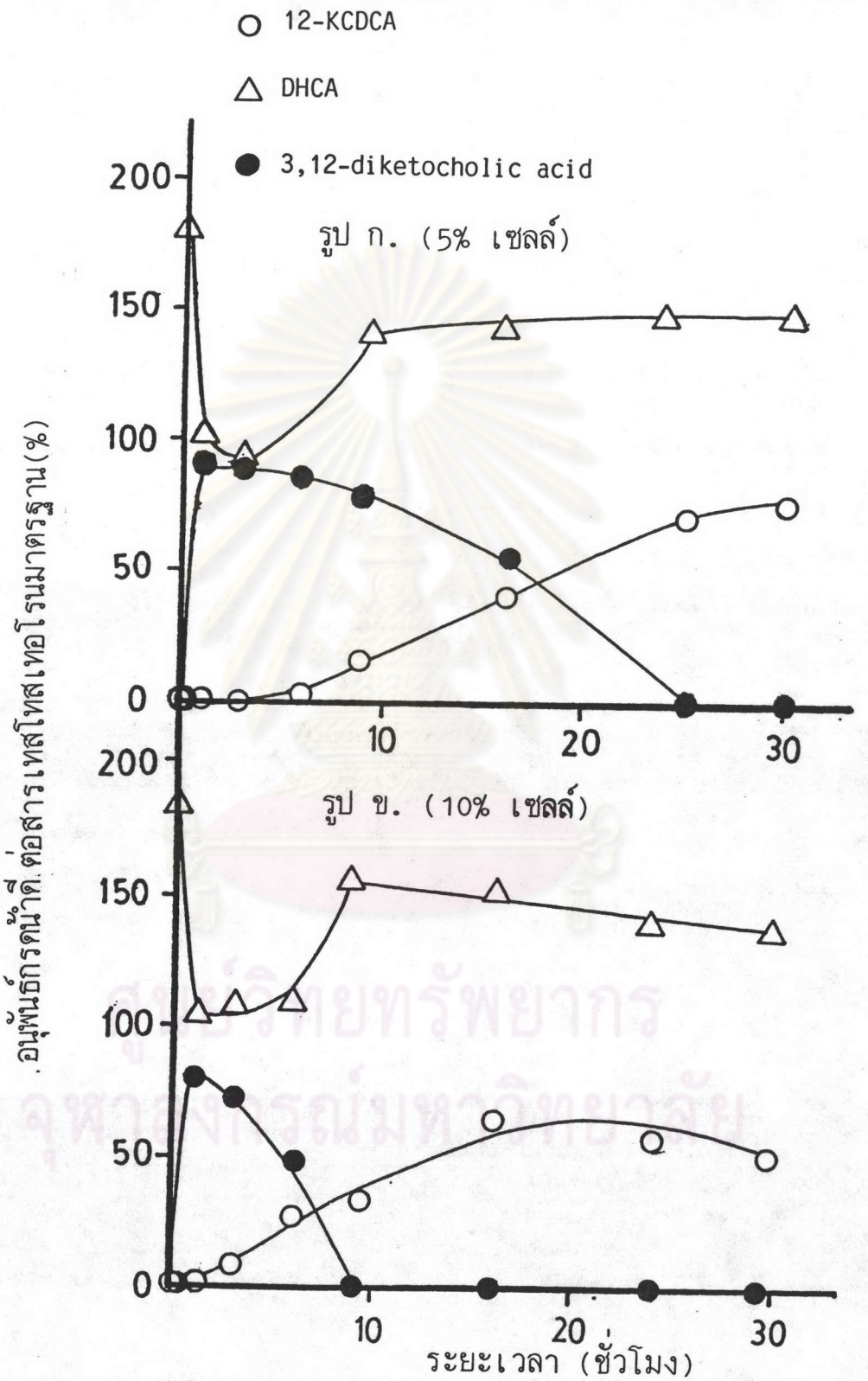
แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น (4 เปอร์เซ็นต์) (วิธีข้อ 2.10.1) ใช้ความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก 1 กรัม/ลิตร 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.05 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ ติดตามการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ นาน 30 ชั่วโมง ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2

ผลการทดลอง (รูปที่ 40) แสดงให้เห็นว่าเซลล์อิสระ E. coli 5, 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกให้เป็นผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดยผ่านสารตัวกลาง (intermediate) วิเคราะห์ได้จากตำแหน่งและค่าเวลาของการอยู่ในคอลัมน์ HPLC (5.8 นาที) เปรียบเทียบกับรายงานของ Sawada และคณะ (1980) คาดว่าเป็นกรด 3,12 ไดคีโตโคลิก (3,12-diketocholic acid) โดยสารตัวกลางนี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วแล้วลดปริมาณลงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยานานขึ้นในขณะที่ผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ก็จะค่อย ๆ เกิดเพิ่มมากขึ้น เป็นปฏิภาคโดยตรงกับเวลาที่ใช้ และปริมาณสารตัวกลางที่เกิดขึ้นนี้จะถูกใช้ไปจนหมดก่อนที่ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ถูกสังเคราะห์สูงสุด

เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณกรดดีไฮโดรโคลิก ซึ่งเป็นสับสเตรทของปฏิกิริยาจะลดลงเป็นปฏิภาคกับเวลาในช่วงระยะแรกของการเกิดผลิตภัณฑ์ตัวกลาง และกรด 12-คีโตคีโนดีออก

รูปที่ 40. ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์อิสระ E. coli 5% และ 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.05 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ ติดตามเปอร์เซนต์อนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐานด้วยเครื่อง HPLC ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


12-KCDCA
DHCA
3,12-diketocholic acid
รูป ก. (5% เซลล์)
รูป ข. (10% เซลล์)
200
150
100
50
0
10
20
30
(%)ปริมาณของโคเลสเทรอลที่เปลี่ยนไป
ระยะเวลา (ชั่วโมง)

ซีโคลิก หลังจากนั้นดูเสมือนว่าปริมาณกรดดีไฮโดรโคลิกที่วัดได้จะเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาของปฏิกิริยาเกิดนานขึ้น จากผลการทดลองพิจารณารูปแบบของการเกิดผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก และผลิตภัณฑ์สารตัวกลาง อย่างละเอียด จะเห็นได้ว่า ช่วงที่ดูเหมือนมีการเพิ่มปริมาณกรดดีไฮโดรโคลิก จะสอดคล้องกับช่วงเวลาของการลดของปริมาณสารตัวกลาง (กรด 3,12 ไดคีโตโคลิก) และการเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกด้วย จึงเชื่อว่าในปฏิกิริยานี้มีการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (by products) ซึ่งมีระยะเวลาของการอยู่ในคอลัมน์ HPLC (retention time) ตรงหรือใกล้เคียงกับตำแหน่งของกรดดีไฮโดรโคลิกพอดี

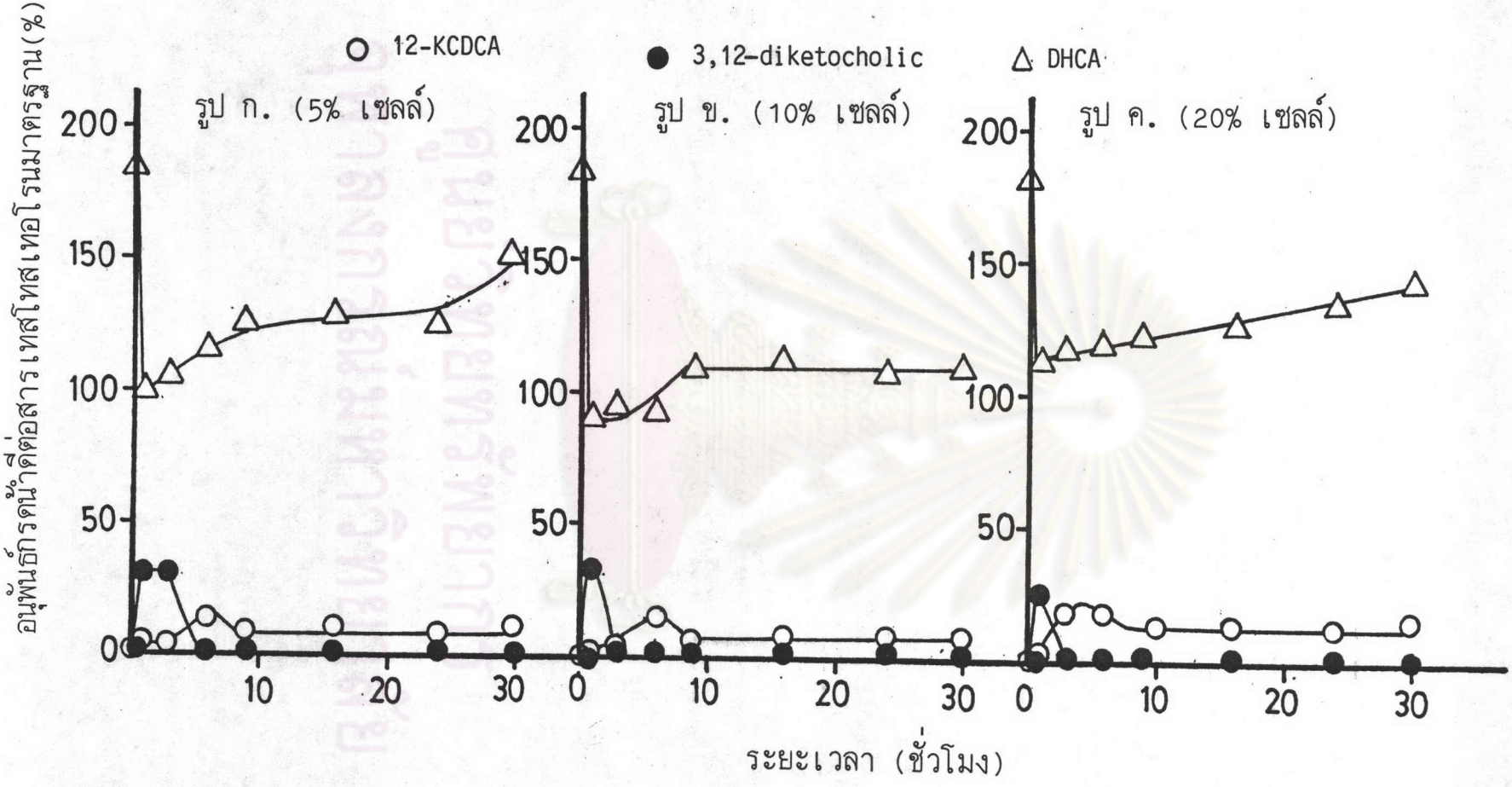
อย่างไรก็ตามผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเซลล์ E. coli อิสระ ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) สามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก ค่อนข้างสูงใกล้เคียงกัน (70-75 เปอร์เซ็นต์เทียบกับสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน)

เมื่อศึกษาลักษณะการสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีจากกรดดีไฮโดรโคลิก โดยใช้เม็ดเจลเซลล์ตรึง E. coli ด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น (4 เปอร์เซ็นต์) 10 กรัม ซึ่งมีเซลล์ E. coli อยู่ 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์เซลล์ (น้ำหนักต่อปริมาตรสารละลายปฏิกิริยา) ในสภาวะเช่นเดียวกันกับเซลล์อิสระ (รูปที่ 41) จะเห็นได้ว่าเซลล์ E. coli ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น จะให้ผลผลิตของอนุพันธ์กรดน้ำดีต่ำกว่าเมื่อใช้เซลล์อิสระมากถึงแม้ว่าจะเพิ่มปริมาณเซลล์ขึ้นไปถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ก็ยังไม่สามารถเพิ่มผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาให้มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญได้เลย (ประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับสารมาตรฐานเทสโทสเทอโรน) อย่างไรก็ตามวิถีของการผลิตกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกก็ยังคล้ายกับเซลล์อิสระคือมีการสะสมของสารตัวกลาง ที่คาดว่าเป็น 3,12-ไดคีโตโคลิก และมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงเกิดขึ้นภายหลังที่ตำแหน่งเดียวกันกับกรดดีไฮโดรโคลิก เช่นเดียวกัน

ผลการศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี โดยใช้เซลล์อิสระ E. coli (ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์) ในสภาวะเดียวกับที่กล่าวถึงในขั้นตอนแรก เว้นแต่ว่าแทนที่ 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ ในสารละลายปฏิกิริยาด้วย 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวกที่ 6) รูปแบบการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดน้ำดีคล้ายกันกับเมื่อมี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ แต่ปริมาณ

รูปที่ 41. ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์ กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์ E. coli (5%, 10% และ 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ตรึงด้วยคาร์ราจีแนน-วุ้น (4%) (วิธี 2.10.1) ด้วยปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.5 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ติดตามเปอร์เซนต์อนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน ด้วยเครื่อง HPLC ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


○ 12-KCDCA
● 3,12-diketocholic
△ DHCA
รูป ก. (5% เซลล์)
รูป ข. (10% เซลล์)
รูป ค. (20% เซลล์)
200
150
100
50
0
10
20
30
ระยะเวลา (ชั่วโมง)
(%)ปริมาณการเปลี่ยนแปลงของกรดน้ำดี

กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจะเพิ่มปริมาณสูงกว่าเป็น 4 เท่า (350 เปอร์เซ็นต์ต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน) ที่ความเข้มข้นเซลล์เป็น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นที่น่าสังเกตว่าการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจะเป็นปฏิภาคส่วนกลับกับความเข้มข้นของเซลล์ คือเมื่อความเข้มข้นของเซลล์สูงขึ้น (10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่สังเคราะห์ได้จะต่ำลง (210 และ 130 เปอร์เซ็นต์ ต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน)

ในช่วงแรกของปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิก พบว่าจะมีการลดลงอย่างรวดเร็วของกรดดีไฮโดรโคลิกแล้วจึงเพิ่มปริมาณขึ้น ที่ความเข้มข้นเซลล์เป็น 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่มีช่วงเวลาการอยู่ในคอลัมน์ตรงหรือใกล้เคียงกับตำแหน่งของกรดดีไฮโดรโคลิก พบว่า จะลดปริมาณลงเมื่อความเข้มข้นของเซลล์สูงขึ้น (10 และ 20 เปอร์เซ็นต์) เช่นเดียวกับกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ด้วย

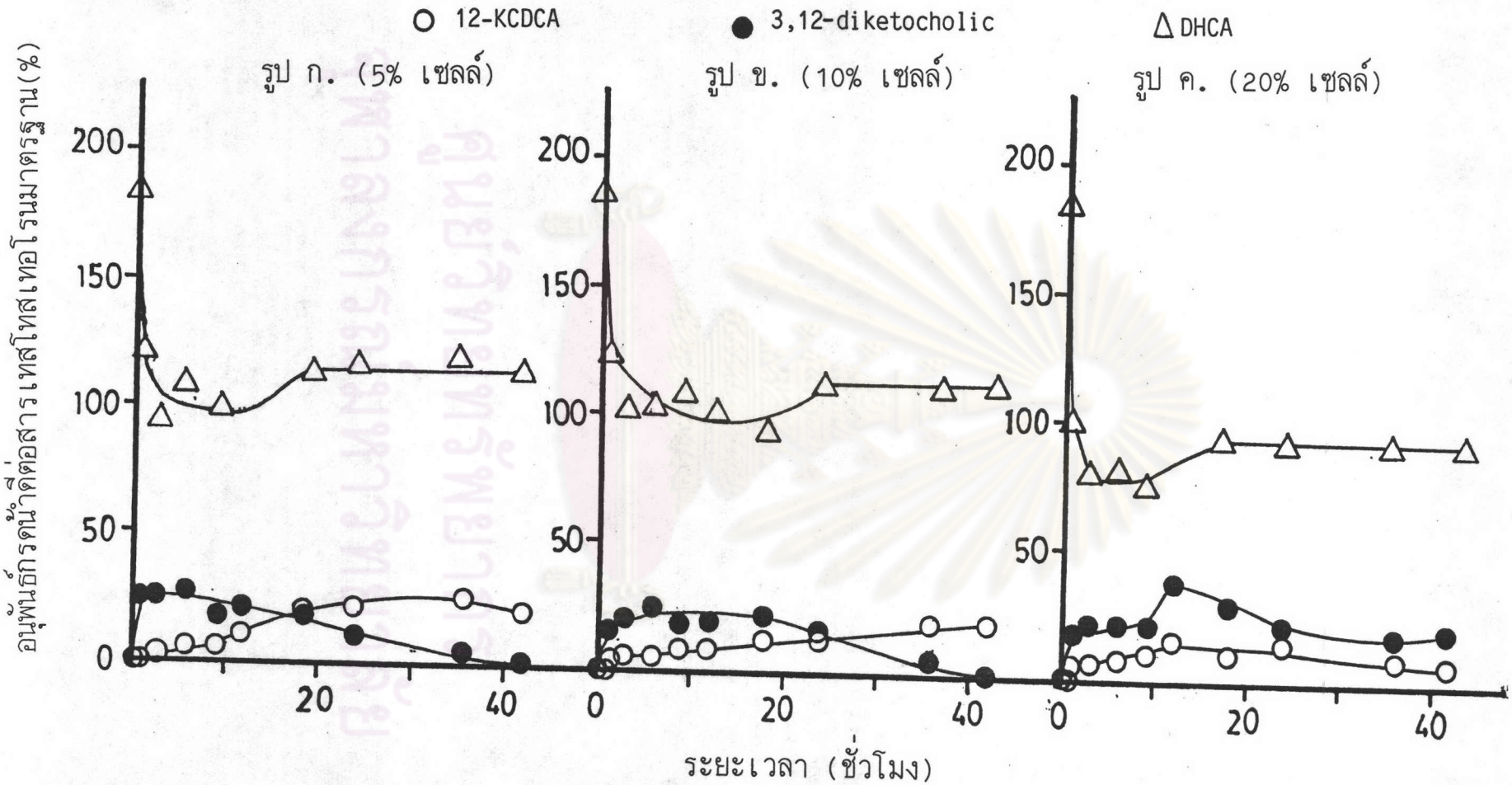
เมื่อทำการทดลองโดยเปลี่ยนมาใช้เซลล์ E. coli ตรึงด้วยแอลจิเนต (1 เปอร์เซ็นต์) แทนเซลล์ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น ติดตามปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีที่เกิดขึ้น โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ และสภาวะการทดลองเช่นเดียวกันทุกอย่าง เว้นแต่ ในสารละลายปฏิกิริยามี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ แทน 0.05 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ (รูปที่ 42) จะเห็นได้ว่าผลการทดลองก็ยืนยันรูปแบบและวิถีของการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกเหมือนเดิม คือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีค่าค่อนข้างต่ำที่ความเข้มข้นเซลล์ (ตรึงแอลจิเนต) 20 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายปฏิกิริยาก็ยังให้ค่าของผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าเซลล์อิสระ ประมาณ 3 เท่า (ค่าผลผลิต 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐานประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์) โดยวิถีการสังเคราะห์ผ่านสารตัวกลาง 3,12 ไดคีโตโคลิกเช่นเดียวกัน

3.19 <u>การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบลักษณะการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีด้วยเซลล์ P. testosteroni อิสระ เซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น และ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต</u>

ใช้วิธีการศึกษาและทดลองในสภาวะเดียวกันกับข้อ 3.18 แต่ใช้เซลล์ P. testosteroni อิสระ เซลล์ P. testosteroni ตรึงคาร์ราจีแนน-วุ้น และ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนต แทนเซลล์ E. coli ในทุกสภาวะ

รูปที่ 42. ผลกระทบของความเข้มข้นของเซลล์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกและอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์ E.coli (5%, 10% และ 20%) ตรึงด้วยแอลจิเนต (1%) (วิธีข้อ 2.10.2) ด้วยปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ ติดตามเปอร์เซนต์อนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐานด้วยเครื่อง HPLC ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


○ 12-KCDCA
● 3,12-diketocholic
△ DHCA
รูป ก. (5% เซลล์)
รูป ข. (10% เซลล์)
รูป ค. (20% เซลล์)
200
150
100
50
0
20
40
ระยะเวลา (ชั่วโมง)
(%)ปริมาณการเปลี่ยนแปลงของกรดน้ำดี

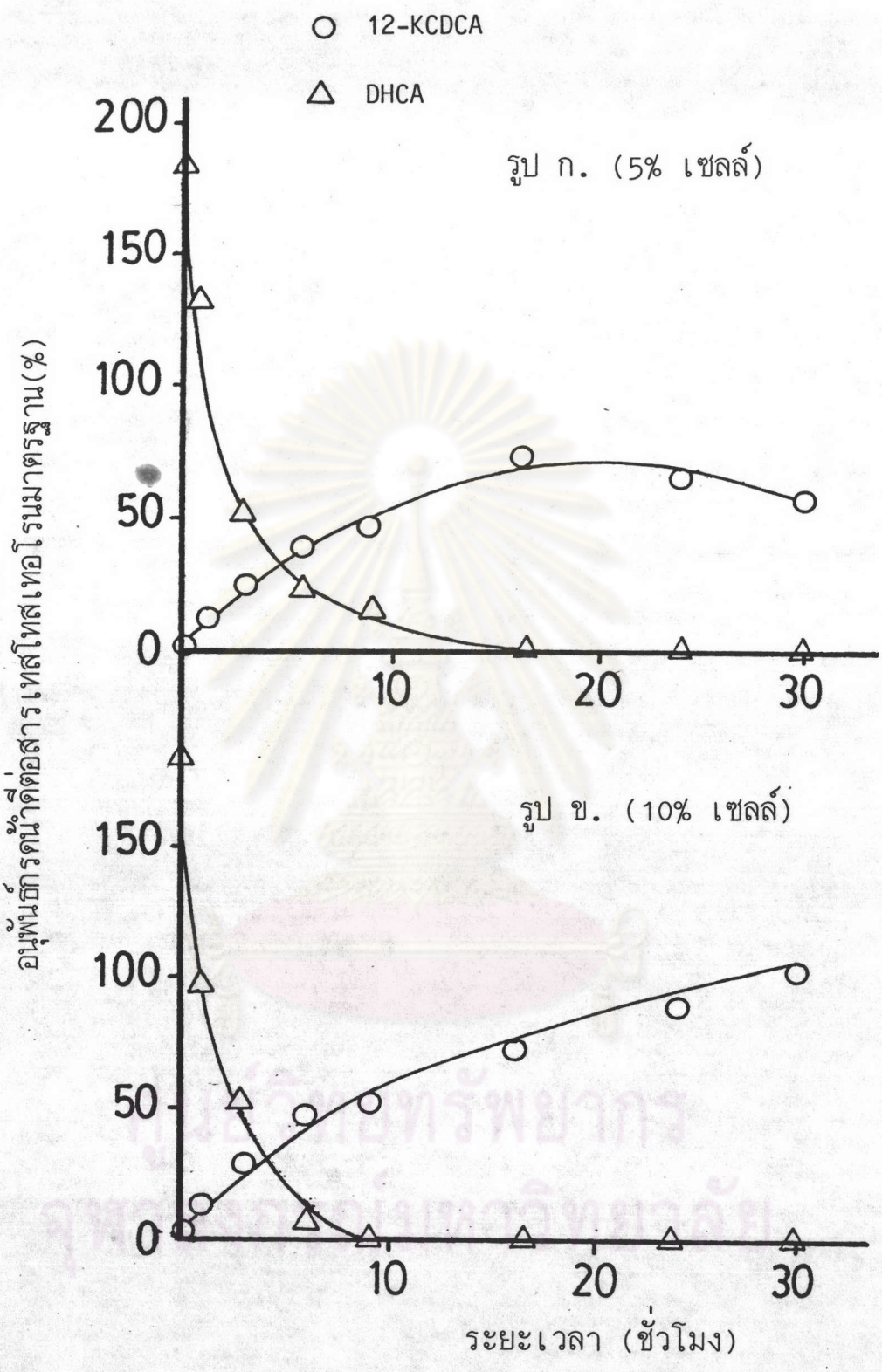
ผลการทดลอง (รูปที่ 43) จะเห็นได้ว่าที่สภาวะเดียวกับเซลล์ E. coli อิสระ (สารละลายปฏิกิริยาที่มี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์) เซลล์ P. testosteroni อิสระสามารถสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้เช่นกัน โดยที่อัตราการสังเคราะห์และปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุดเมื่อใช้เซลล์ 5 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าใกล้เคียงกับเมื่อใช้เซลล์ E. coli อิสระ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (75 เปอร์เซ็นต์อนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน) แต่เมื่อใช้เซลล์อิสระ P. testosteroni สูงขึ้นเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้อัตราเร็วของการสังเคราะห์และปริมาณผลิตภัณฑ์สูงขึ้น เมื่อเวลาของปฏิกิริยามากขึ้น และสูงมากกว่าเมื่อใช้เซลล์ E. coli อิสระ 10 เปอร์เซ็นต์ (100 เปอร์เซ็นต์อนุพันธ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน) ปริมาณกรดคีไฮโดรโคลิกที่ใช้เป็นสับสเตรทในแต่ละความเข้มข้นเซลล์ที่ใช้จะลดระดับลงอย่างรวดเร็ว และจะถูกใช้หมดไปในเวลาประมาณ 15 ชั่วโมง และ 10 ชั่วโมง สำหรับ P. testosteroni 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ในการศึกษาและทดลองที่สภาวะเดียวกัน เมื่อใช้เซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น (4 เปอร์เซ็นต์) (รูปที่ 44) แทนเซลล์ P. testosteroni อิสระ และใช้ความเข้มข้นของเซลล์ในปฏิกิริยาเท่ากัน (5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์) ก็จะให้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์คือกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และกรดน้ำดีต่ำมาก คล้ายกันกับที่พบในเซลล์ E. coli ตรึงด้วย แคปปาคาร์ราจีแนน เมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากันคือ ค่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ อนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารละลายเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน และค่าที่วัดได้นี้ไม่แปรผันตามความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ ในขณะที่ปริมาณกรดคีไฮโดรโคลิก ซึ่งเป็นสับสเตรทก็ถูกใช้ไปเพียงเล็กน้อยเช่นกัน

ผลการศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี โดยใช้เซลล์อิสระ P. testosteroni (ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์) ในสภาวะเดียวกับที่กล่าวถึงในขั้นตอนแรก เว้นแต่ว่าแทนที่ 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ในสารละลายปฏิกิริยาด้วย 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ (รูปที่ 45) จะเห็นได้ว่า ลักษณะการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดน้ำดีจะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างสิ้นเชิงโดยมีการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดน้ำดีเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกปริมาณผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีอีกตัวหนึ่ง (วิเคราะห์ด้วยตำแหน่งและค่าเวลาของการอยู่ในคอลัมน์ HPLC (5.4 นาที) คาดว่าเป็น 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิก (7.12-diketolithocholic acid) ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ของปฏิกิริยา (Sawada และคณะ,

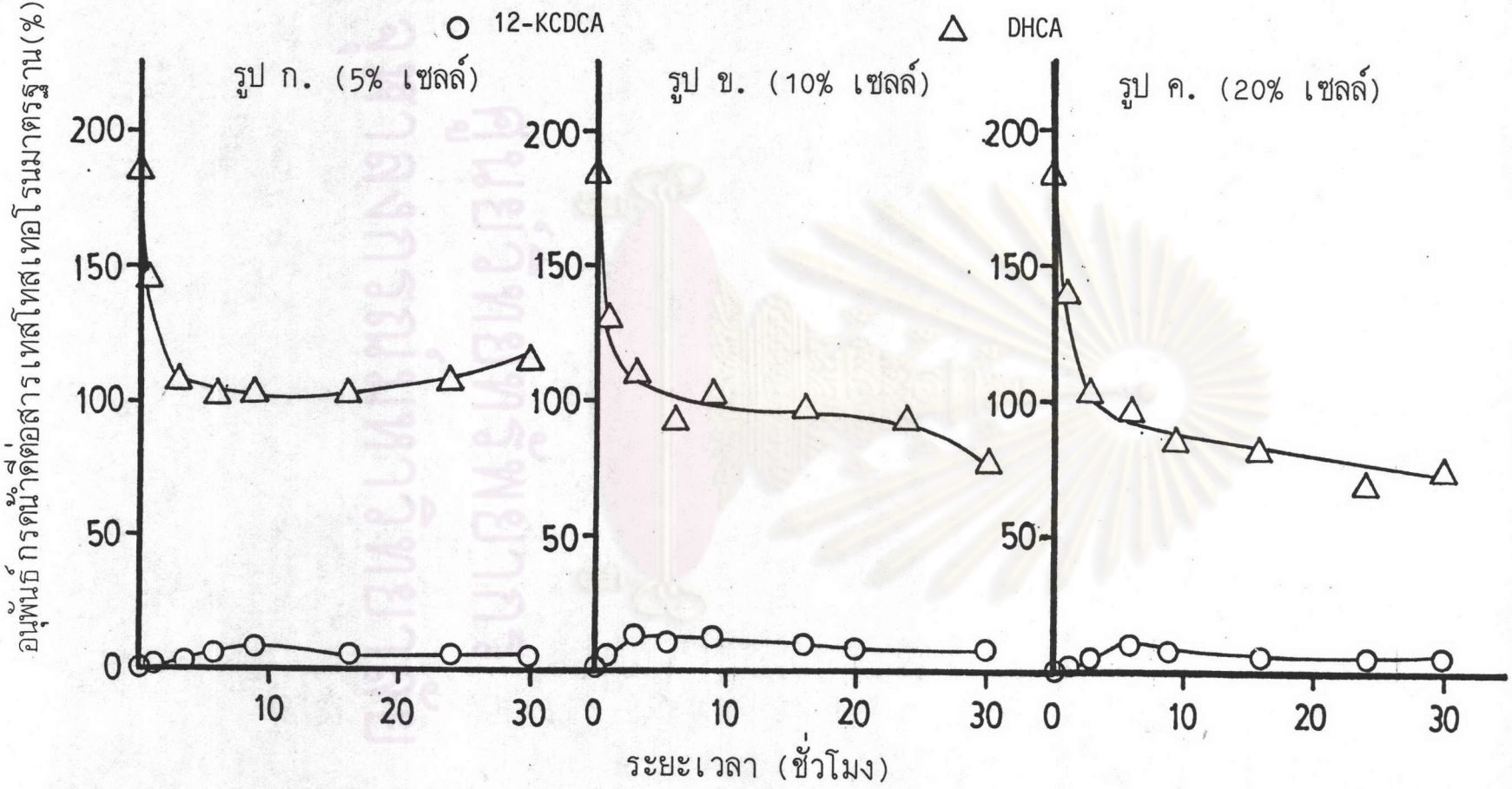
รูปที่ 43. ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์ กรด 12-คีโต-โนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์อิสระ P. testosteroni 5% และ 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.5 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ติดตามเปอร์เซนต์อนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน ด้วยเครื่อง HPLC ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


O 12-KCDCA
Δ DHCA
รูป ก. (5% เซลล์)
รูป ข. (10% เซลล์)
ความเข้มข้นของสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน(%)
200
150
100
50
0
10
20
30
ระยะเวลา (ชั่วโมง)

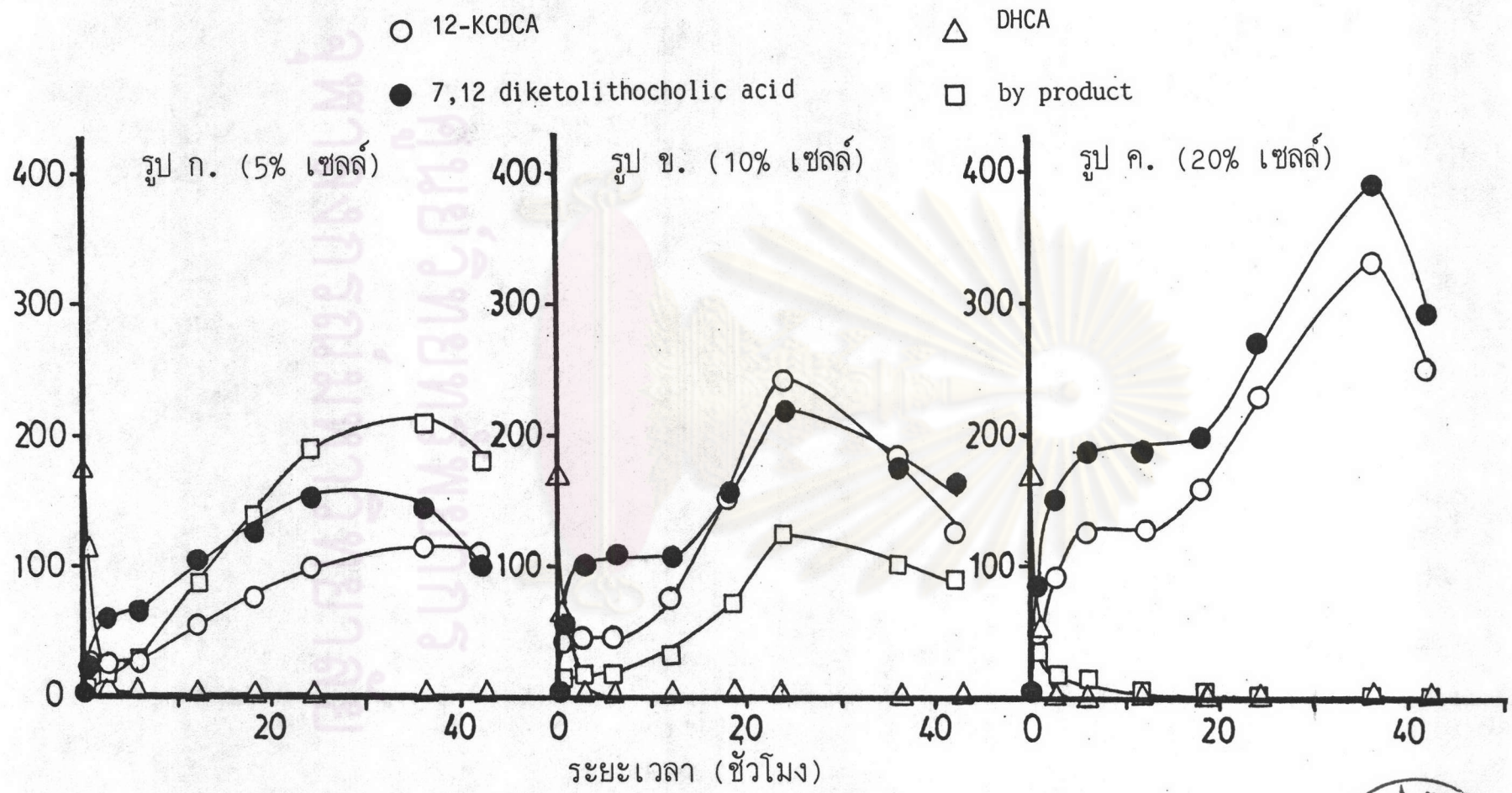
รูปที่ 44. ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์ กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์ P. testosteroni (5%, 10% และ 20%) ตรึงด้วยคาร์ราจีแนน-วุ้น (4%) (วิธี 2.10.1) ด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ และ 0.05 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ ติดตามเปอร์เซนต์อนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐานด้วยเครื่อง HPLC ตามรายละเอียดวิธี ข้อ 2.11.1 และ 2.11.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


12-KCDCA
DHCA
รูป ก. (5% เซลล์)
รูป ข. (10% เซลล์)
รูป ค. (20% เซลล์)
200
150
100
50
0
10
20
30
ระยะเวลา (ชั่วโมง)
ปริมาณการดูดซึมกรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน (%)

รูปที่ 45. ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์อิสระ P.testosteroni 5%, 10%, 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ ติดตามเปอร์เซนต์อนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน ด้วยเครื่อง HPLC ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

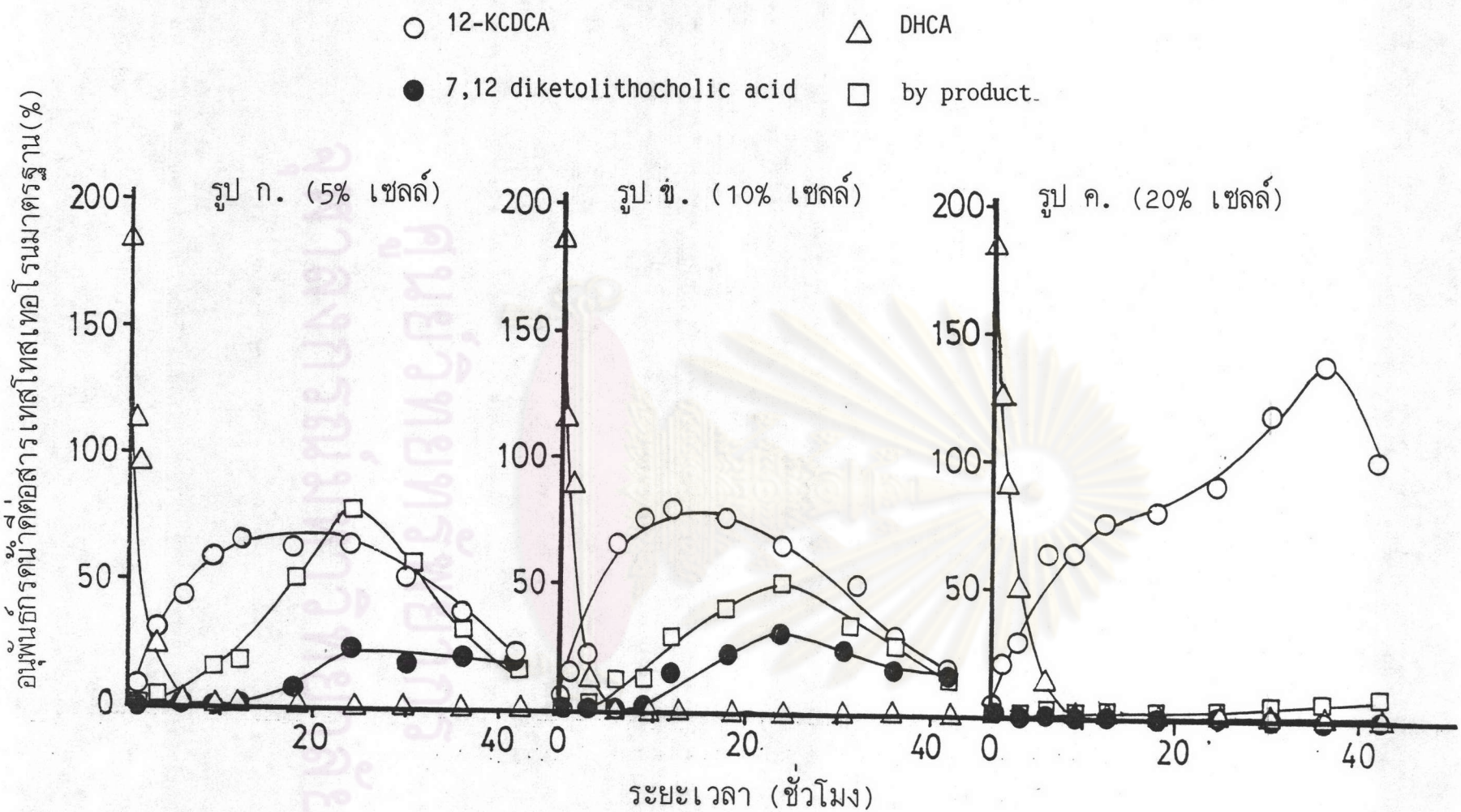
1980) จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และจะมีค่าคงที่ในระยะเวลาอันสั้นในช่วงประมาณ 3-10 ชั่วโมง (แปรผันตามความเข้มข้นของเซลล์ P. testosteroni ที่ใช้) หลังจากนั้นปริมาณผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดจะเพิ่มขึ้นไปใหม่ด้วยอัตราการเพิ่มที่ช้ากว่าขั้นตอนแรก แต่ผลรวมจะให้ค่าผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกสูงกว่า เมื่อทำการทดลองโดยมี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ในสารละลายปฏิกิริยาประมาณ 1-2 เท่า (ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐานวัดได้สูงสุดประมาณ 120, 250 และ 330 เมื่อใช้เซลล์อิสระ 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ)

นอกจากพบผลิตภัณฑ์ที่คาดว่าเป็นกรด 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิก ยังพบอนุพันธ์กรดน้ำดีที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีตำแหน่งในโครมาโตแกรม และค่าเวลาของการอยู่ในคอลัมน์ HPLC (6.6 นาที) อาจจะคาดเดาได้ว่าน่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียง (by product) ซึ่งเกิดจากแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

เมื่อใช้เซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต (1 เปอร์เซ็นต์) สังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี โดยการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกที่สภาวะของการทดลองเช่นเดียวกันกับเซลล์อิสระ คือมี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายปฏิกิริยา (รูปที่ 46) จะเห็นได้ว่าปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดในปฏิกิริยาโดยใช้เซลล์ตรึงแอลจิเนตจะมีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้เซลล์ P. testosteroni อิสระที่ทุกความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ คือ ปริมาณอนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน ลดลงเหลือประมาณ 70 และ 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนต 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเท่านั้น ซึ่งค่าที่ได้นี้จะใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากใช้เซลล์อิสระในสารละลายปฏิกิริยาซึ่งมี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อใช้เปอร์เซ็นต์ เซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนตในสารละลายปฏิกิริยาสูงขึ้นเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ปริมาณอนุพันธ์กรดน้ำดีสูงขึ้นเกือบเท่าตัวของเมื่อใช้เซลล์ตรึง 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันเกือบตรวจไม่พบอนุพันธ์กรดน้ำดีชนิดอื่น ในสภาวะที่ใช้เซลล์ตรึง 20 เปอร์เซ็นต์นี้เลย

รูปที่ 46. ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์ กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์ P.testosteroni (5%, 10%, 20% น้ำหนักต่อปริมาตร) ตรึงด้วยแอลจิเนต (1%) (วิธีข้อ 2.10.2) ด้วยปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิก ในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ ติดตามเปอร์เซนต์อนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน ด้วยเครื่อง HPLC ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


○ 12-KCDCA
△ DHCA
● 7,12 diketolithocholic acid
□ by product
รูป ก. (5% เซลล์)
รูป ข. (10% เซลล์)
รูป ค. (20% เซลล์)
อัตราการผลิตสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน (%)
200
150
100
50
0
20
40
ระยะเวลา (ชั่วโมง)

3.20 การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบลักษณะการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี โดยการตรึงเซลล์ร่วมของ E. coli และ P. testosteroni

เมื่อทำการตรึงเซลล์ E. coli ร่วมกับ P. testosteroni ในแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น (4 เปอร์เซ็นต์) หรือแอลจิเนต (1 เปอร์เซ็นต์) โดยใช้เซลล์อย่างละเท่ากัน แล้วนำเม็ดเจลเซลล์ตรึงเหล่านี้ไปศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีจากกรดดีไฮโดรโคลิก โดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะเช่นเดียวกับข้อ 3.18 และ 3.19

ผลการศึกษา (รูปที่ 47) พบว่าเซลล์ตรึงแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น ของ E. coli ร่วมกับ P. testosteroni ความเข้มข้น 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายปฏิกิริยาที่มี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์จะให้ผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกใกล้เคียงกัน และปริมาณต่ำมาก คือที่เวลาของปฏิกิริยา 30 ชั่วโมง ให้ค่าผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐานเพียง 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

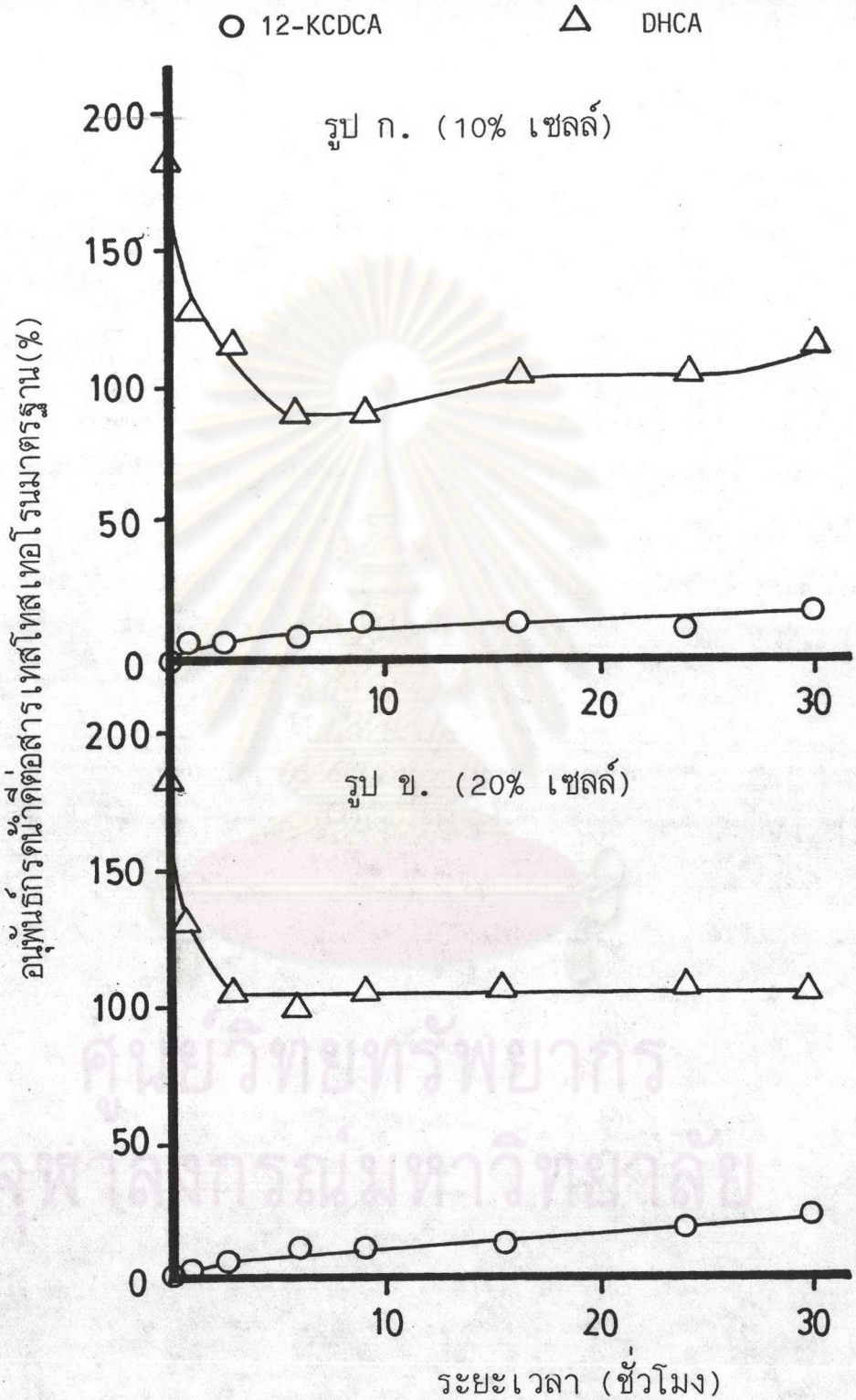
แต่เมื่อใช้เซลล์ตรึงแอลจิเนตของ E. coli ร่วมกับ P. testosteroni ที่ความเข้มข้นของเซลล์ 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน (รูปที่ 47) ศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดน้ำดี ด้วยการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกในสารละลายที่มี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ ผลปรากฏว่า ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ที่เกิดจากการใช้เซลล์ตรึงร่วม 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้เซลล์ตรึงร่วม 20 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะเดียวกัน (ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐานสูงสุด 70 และ 50 เปอร์เซ็นต์ต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐานสำหรับ 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์เซลล์ตรึงแอลจิเนตในสารละลายปฏิกิริยา ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการตรึง P. testosteroni เดี่ยวในแอลจิเนต เมื่อใช้เซลล์ 5 เปอร์เซ็นต์)(รูปที่ 48)

3.21 การศึกษาผลกระทบของ NADH ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกด้วยเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่เกิดขึ้น (วิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2) ในสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก 1 กรัมต่อลิตร, 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ และ 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาเมื่อไม่มี NADH

รูปที่ 47. ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ตรึงร่วมของ E.coli และ P.testosteroni (10% และ 20% น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยคาร์ราจีแนนต่อการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกและอนุพันธ์กรดน้ำดีด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ติดตามเปอร์เซนต์อนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน ด้วยเครื่อง HPLC ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2

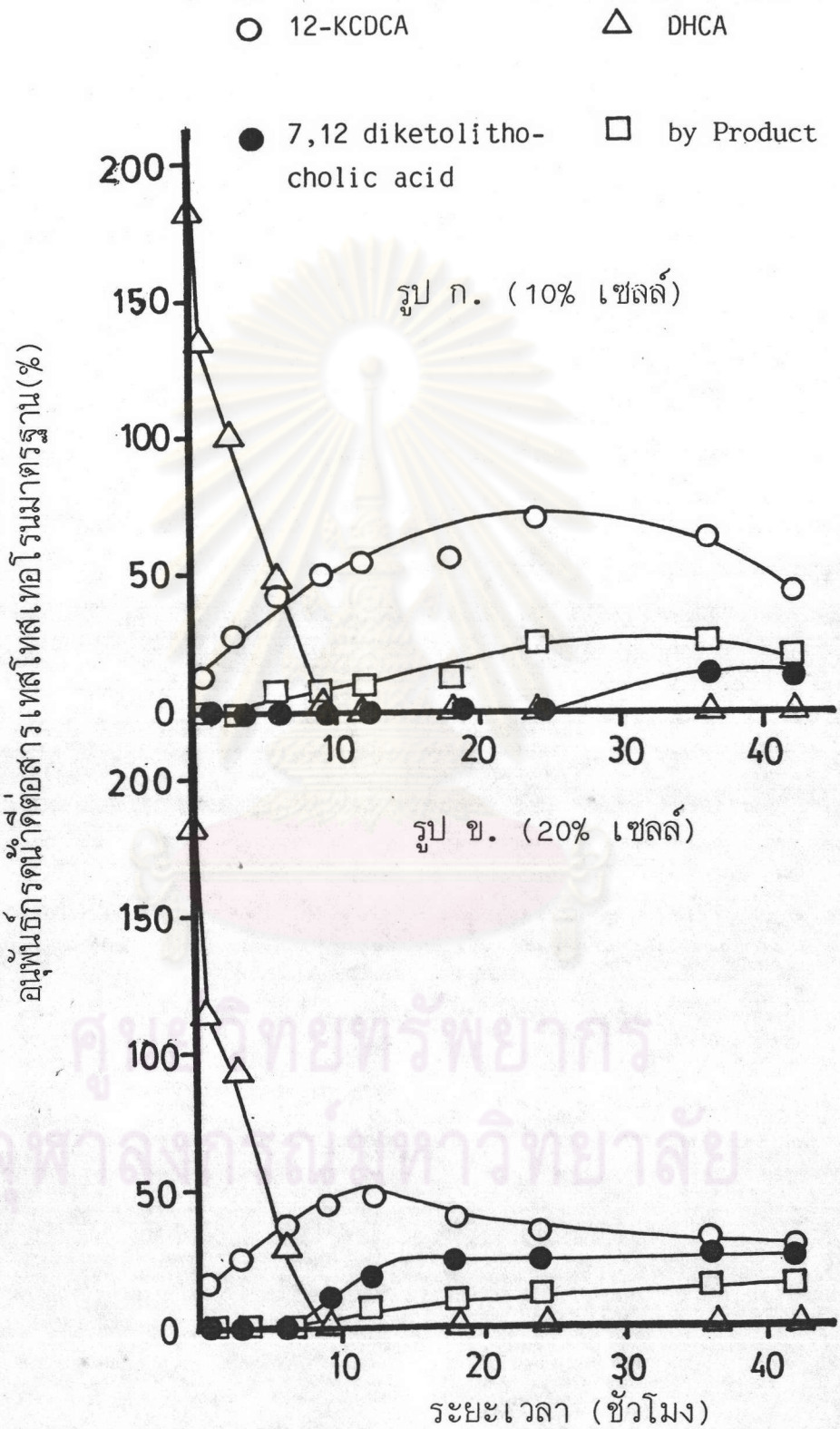
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 48. ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ตรึงร่วมของ E.coli และ P.testosteroni (10% และ 20% น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยแอลจิเนตในการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11 ติดตามเปอร์-เซนต์อนุพันธ์กรดน้ำดี ต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน ด้วยเครื่อง HPLC ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

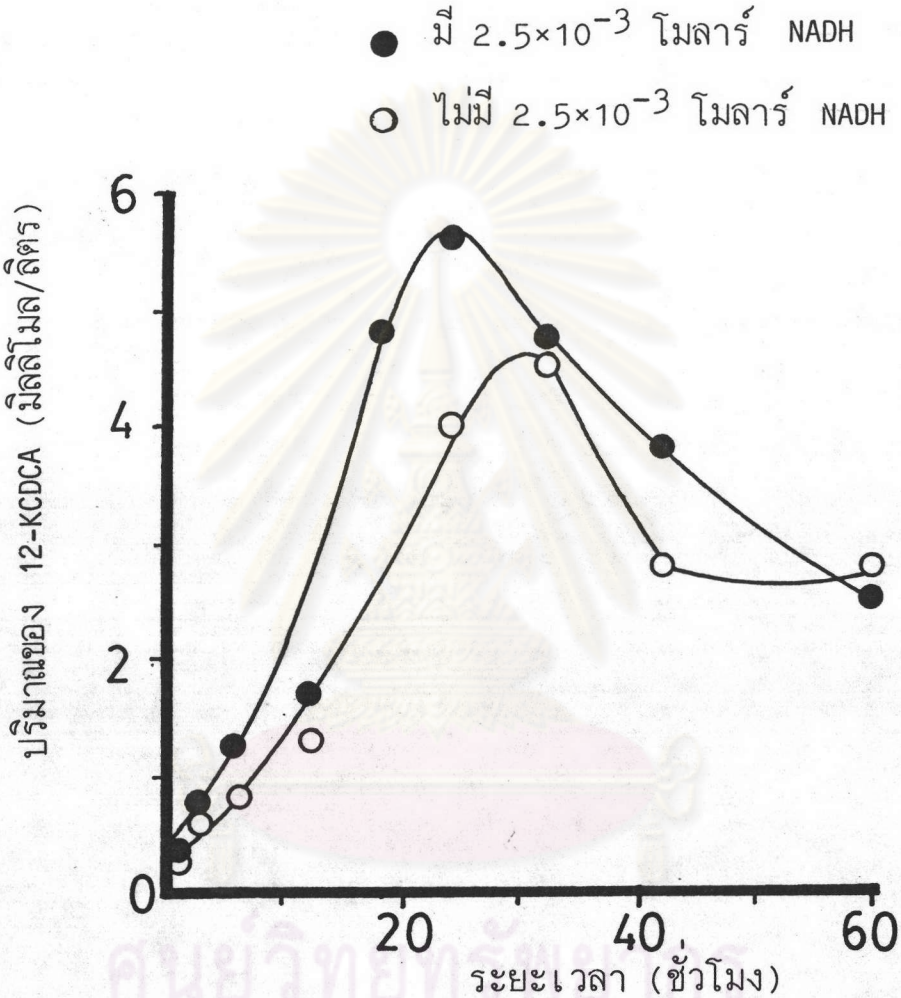
โดยใช้เซลล์ตรึงด้วยแอลจิเนตของ P. testosteroni 20 เปอร์เซ็นต์เซลล์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

พบว่าปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปของกรดดีไฮโดรโคลิก โดยเซลล์ตรึงแอลจิเนต P. testosteroni (รูปที่ 49) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อไม่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH P. testosteroni ในเซลล์ตรึงแอลจิเนตก็สามารถผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ได้ค่อนข้างสูง ถึงแม้ว่าจะต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาซึ่งมี NADH อยู่บ้างเล็กน้อย (4.6 มิลลิโมลต่อลิตร เมื่อไม่มี NADH และ 5.5 มิลลิโมลต่อลิตรเมื่อมี NADH) แสดงว่าเซลล์ตรึงแอลจิเนตของ P. testosteroni สามารถเปลี่ยนกรดดีไฮโดรโคลิกไปเป็นกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้เองโดยไม่ต้องการ NADH จากแหล่งภายนอก นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราเร็วของการเกิดผลิตภัณฑ์และปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด เมื่อไม่มีจะต่ำกว่าเมื่อมี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH บ้างเล็กน้อย (82 เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูป เมื่อมี NADH 2.5 มิลลิโมลต่อลิตร)

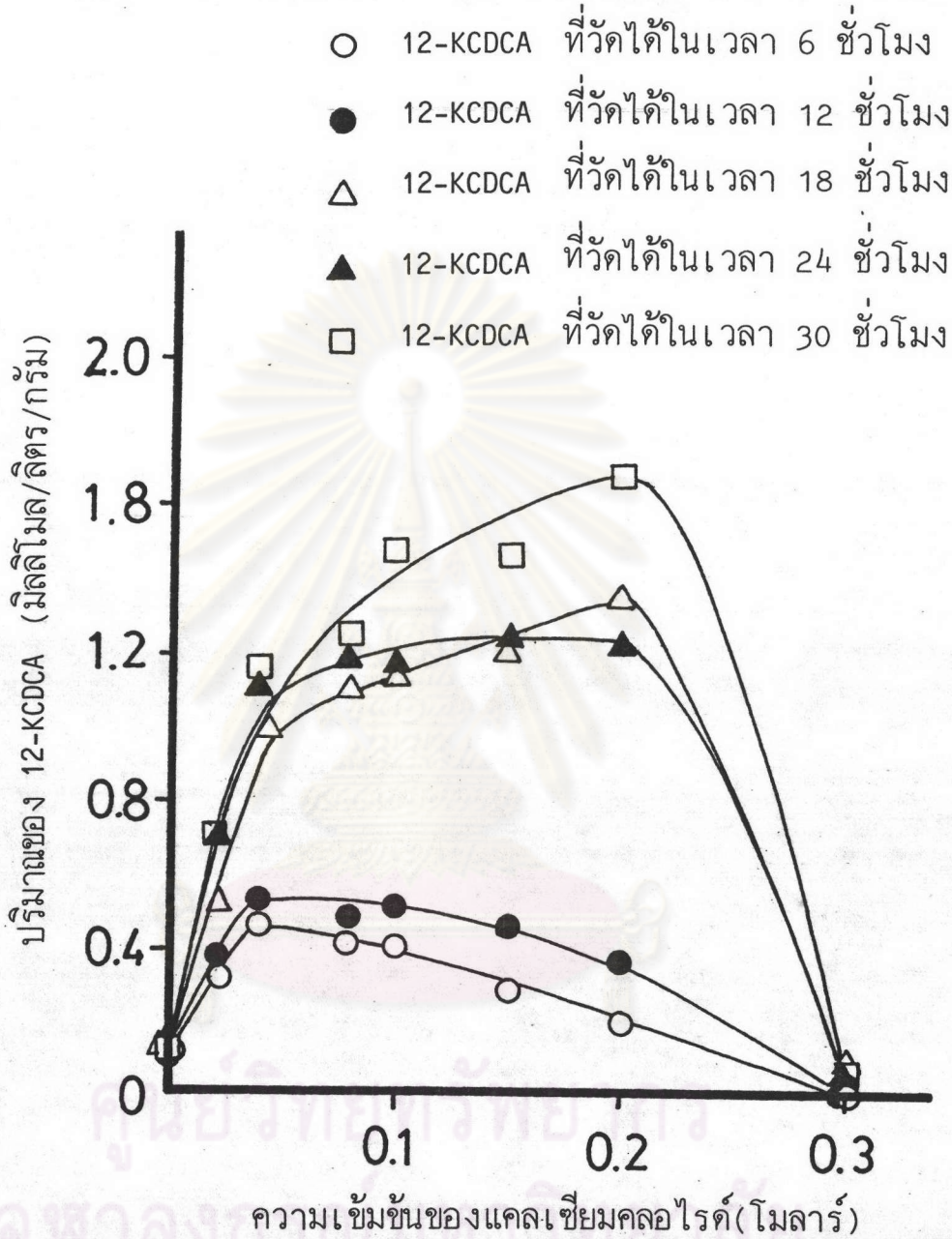
3.22 การศึกษาผลกระทบของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ด้วยเซลล์ P. testosteroni อิสระ และเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนต

เมื่อติดตามวัดปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ที่สังเคราะห์ได้จากการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกด้วยเซลล์ P. testosteroni อิสระ เปรียบเทียบกับเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนต 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายสำหรับการเปลี่ยนรูปซึ่งมีกรดดีไฮโดรโคลิก (1 กรัมต่อลิตร) และ 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในช่วง 0-0.3 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษา (รูปที่ 50) จะเห็นได้ว่าที่ระยะเวลาของการเกิดปฏิกิริยาสั้น (0-12 ชั่วโมง) ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ซึ่งสังเคราะห์ได้จากกรดดีไฮโดรโคลิกจะแปรผันตามความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ใช้ในปฏิกิริยา จนกระทั่งถึงความเข้มข้นประมาณ 0.05 โมลาร์ หลังจากนั้นการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก จะมีค่าค่อนข้างคงที่ หรือลดลงเล็กน้อยจนกระทั่งความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูงถึง 0.2 โมลาร์ จะเริ่มสังเกตเห็นผลกระทบโดยการยับยั้งปฏิกิริยา (เหลือแอคติวิตี 50 เปอร์เซ็นต์) ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ จะไม่สามารถตรวจพบคุณสมบัติในการเปลี่ยนรูปของกรด



รูปที่ 49. ผลกระทบของ NADH ต่อการสังเคราะห์ กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก จากกรดดีไฮโดรโคลิก เมื่อมีเซลล์ตรึงแอลจิเนต P.testosteroni 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายที่มี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ และ 0.25 โมลาร์อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อติดตามการวัดปริมาณกรด 12-KCDCA ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2



รูปที่ 50. ผลกระทบของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ต่อปริมาณของ 12-KCDCA ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปของกรดดีไฮโดรโคลิกที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้เซลล์อิสระ P.testosteroni 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามวัดปริมาณด้วยวิธีข้อ 2.11

ดีไฮโดรโคลิกด้วยเซลล์ P. testosteroni อิสระเหลืออยู่เลย

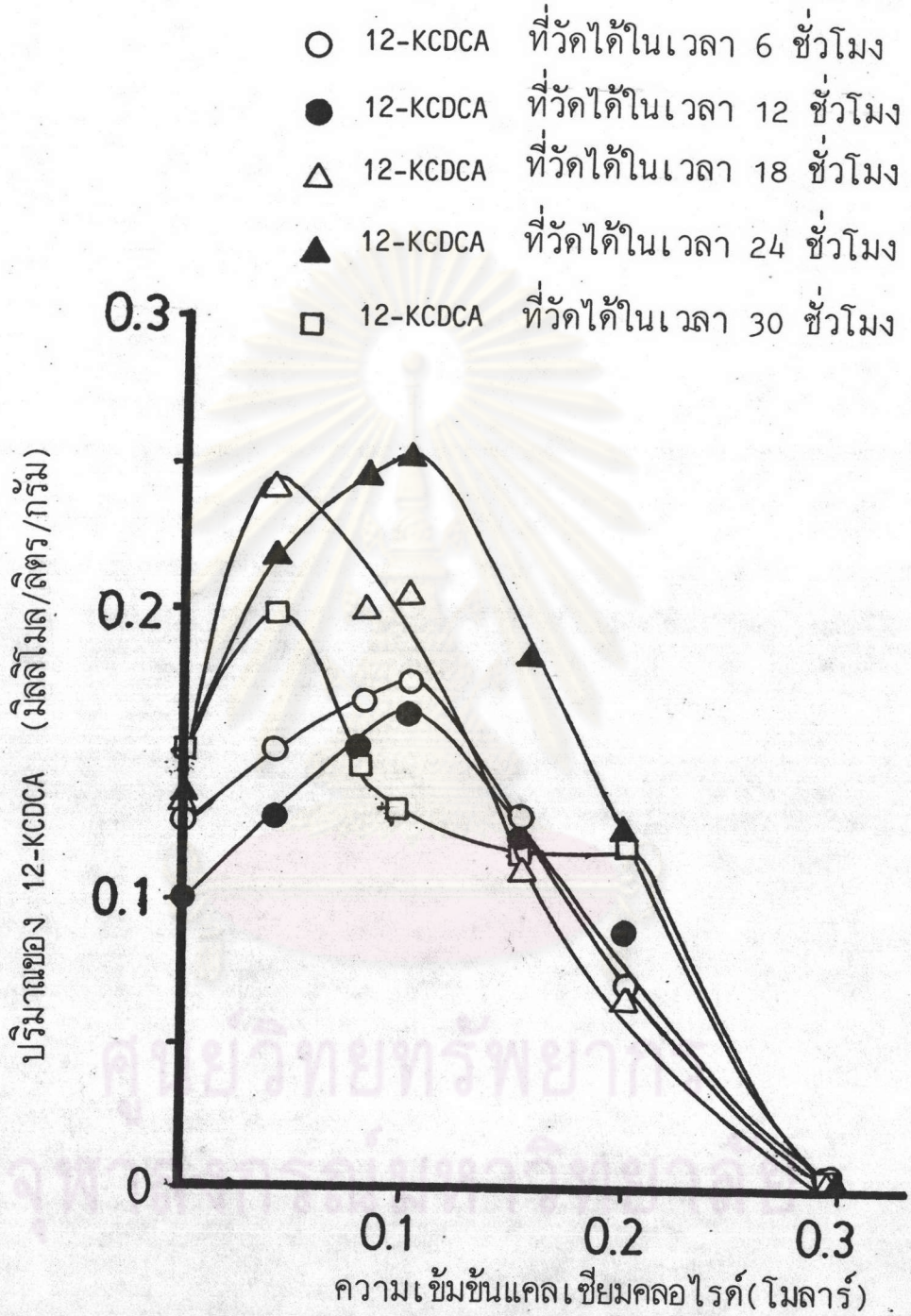
เมื่อศึกษาอิทธิพลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกในช่วงเวลาของการเกิดปฏิกิริยานานขึ้นเป็น 18, 24 และ 30 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าแคลเซียมคลอไรด์จะมีส่วนช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ได้สูงขึ้นจนถึงความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สูงถึง 0.3 โมลาร์ จะยับยั้งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยเซลล์ P. testosteroni อย่างสมบูรณ์

ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์จะมีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนตเช่นเดียวกัน (รูปที่ 51) พบว่าปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจะถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้น เมื่อมีแคลเซียมคลอไรด์ในสารละลายปฏิกิริยาในช่วง 0.01-0.1 โมลาร์ ที่ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์สูงกว่า 0.1 โมลาร์ ความสามารถในการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกของเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนตจะถูกยับยั้งอย่างเห็นได้ชัดและลดลงจนเป็นศูนย์ที่ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เช่นกัน

3.23 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นกรดดีไฮโดรโคลิกต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกของเซลล์ P. testosteroni อิสระ เทียบกับเซลล์ตรึงแอลจิเนต

วัดปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกในสารละลายปฏิกิริยา 20 มิลลิลิตร ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตามวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2 โดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดดีไฮโดรโคลิก $(0.5-7.5) \times 10^{-3}$ โมลาร์ โดยใช้ P. testosteroni อิสระ และเซลล์ตรึงแอลจิเนต 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

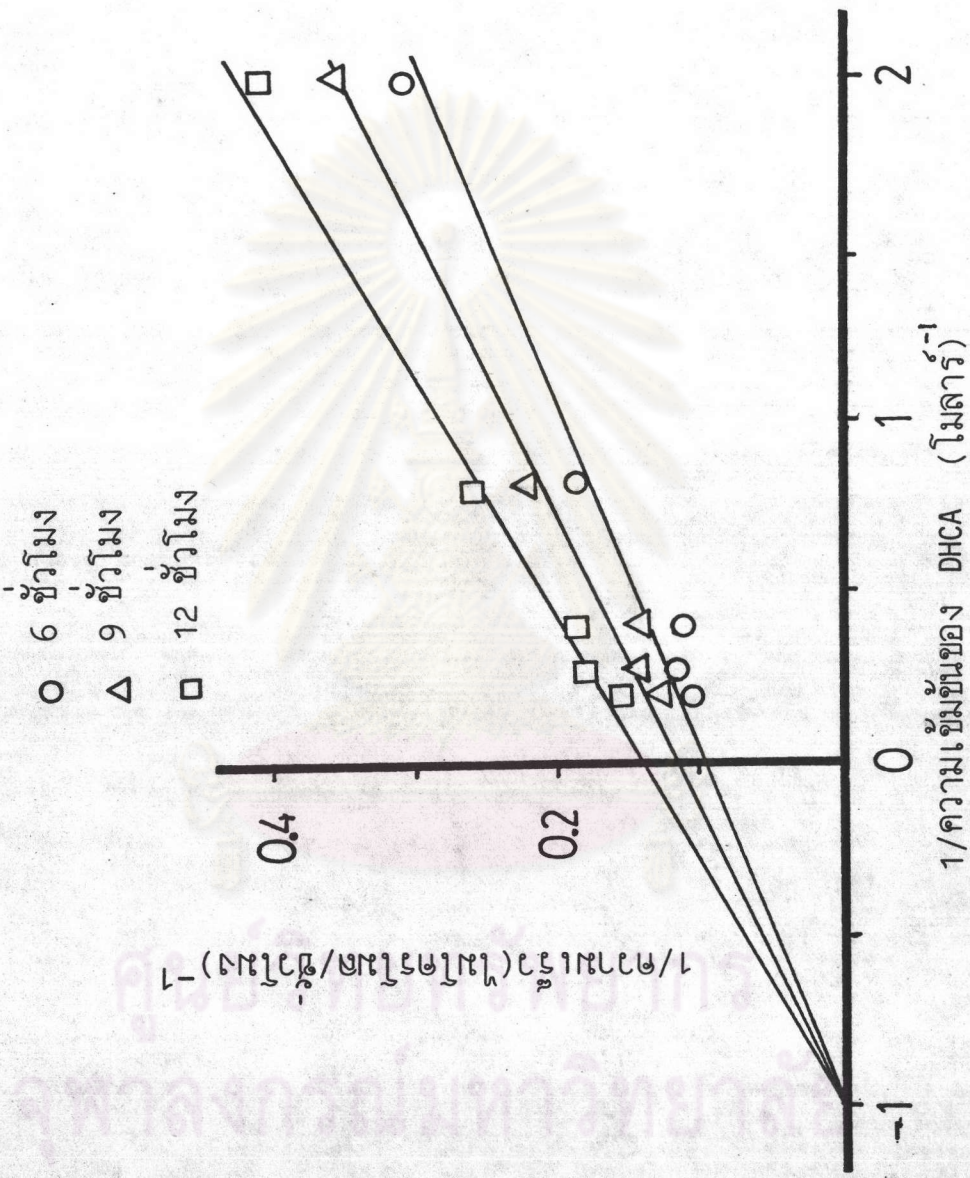
ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นกรดดีไฮโดรโคลิก ต่อส่วนกลับของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดในเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อใช้เซลล์ P. testosteroni อิสระ (รูปที่ 52) เปรียบเทียบกับเซลล์ตรึงแอลจิเนต (20 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) โดย Lineweaver-Burk plot จะเห็นได้ว่าเซลล์ P. testosteroni อิสระมีความสามารถในการเร่งการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดดีไฮโดรโคลิกได้ดีกว่าเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนตเกือบ 3 เท่า (รูปที่ 53) (Km ต่อกรดดีไฮโดรโคลิกมีค่า 1.0 มิลลิโมลาร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ สำหรับเซลล์อิสระกับเซลล์ตรึงแอลจิเนต ตามลำดับ)



รูปที่ 51. ผลกระทบของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ต่อปริมาณของ 12-KCDCA ที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปของกรดดีไฮโดรโคลิกที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้เซลล์ตรึงแอลจิเนตของ P.testosteroni 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามวัดปริมาณด้วยวิธีข้อ 2.11

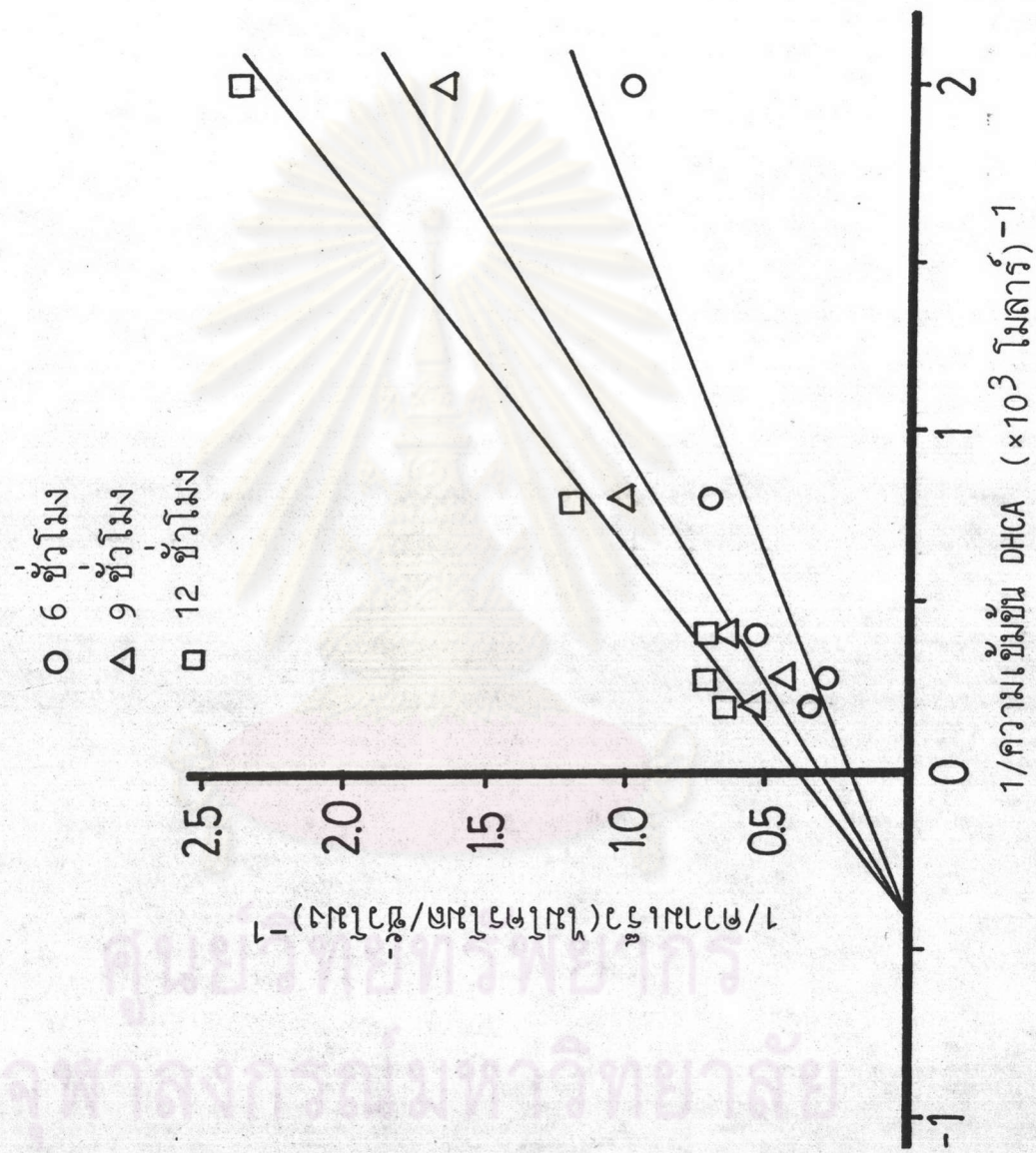
รูปที่ 52. Lineweaver-Burk plot ของการเกิดกรด 12-คีโตคีไนดีออกซีโคลิก ของเซลล์อิสระ P. testosteroni 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายปฏิกิริยา 20 มิลลิลิตร ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิก ความเข้มข้นต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0.5-7.5 มิลลิโมลาร์ วัดการเกิดผลิตภัณฑ์ที่เวลา 6,9 และ 12 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


6 ข้าโพด
9 ข้าโพด
12 ข้าโพด
0.4
0.2
0
-1
1
2
1/ความเข้มข้นของ DHCA (โมลาร์)-1
1/ความเร็ว(ไมโครโมล/นาที)-1

รูปที่ 53. Lineweaver-Burk plot ของการเกิดกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกของเซลล์ตรึงแอลจิเนต ของ P.testosteroni 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายสับสเตรทสำหรับ Bioconversion 20 มิลลิลิตร ที่มี 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH และ 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-7.5 มิลลิโมลาร์ วัดการเกิดผลิตภัณฑ์ที่เวลา 6,9,12 ชั่วโมง ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.24 การศึกษานำกลับมาใช้ซ้ำของเม็ดเจลเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ในสารละลายปฏิกิริยาที่ได้จากการเปลี่ยนรูปกรดคีไฮโดรโคลิกที่มี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ และ 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เซลล์ตรึง P. testosteroni ด้วยแอลจิเนต 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11 หลังจากนั้นศึกษาความเสถียรของเซลล์ P. testosteroni โดยการศึกษา 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 การนำกลับมาใช้อย่างต่อเนื่อง นำเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนต ซึ่งใช้แล้วมาล้างด้วยสารละลายนอร์มัลซาไลน์ 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำกลับมาเปลี่ยนรูปกรดคีไฮโดรโคลิกซ้ำและวัดปริมาณผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่เกิดขึ้นภายในระยะ 9 ชั่วโมง ทำการทดลองสลับต่อเนื่องกันไปจนกว่าจะสังเกตพบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก

วิธีที่ 2 นำเซลล์ตรึงแอลจิเนตที่ใช้แล้วไปกระตุ้นด้วยอาหารสูตร Marcus และ Talalay ที่มีและไม่มี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ นาน 6 ชั่วโมง และนำกลับมาใช้ผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกซ้ำในสารละลายปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกับวิธีแรก ติดตามวัดปริมาณผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่เกิดขึ้นในระยะเวลานาน 9 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ตรึงแอลจิเนตที่ได้ไปล้างด้วยนอร์มัลซาไลน์ 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้กลับมาใช้สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกซ้ำใหม่ ทำเช่นนี้สลับต่อเนื่องกันไป

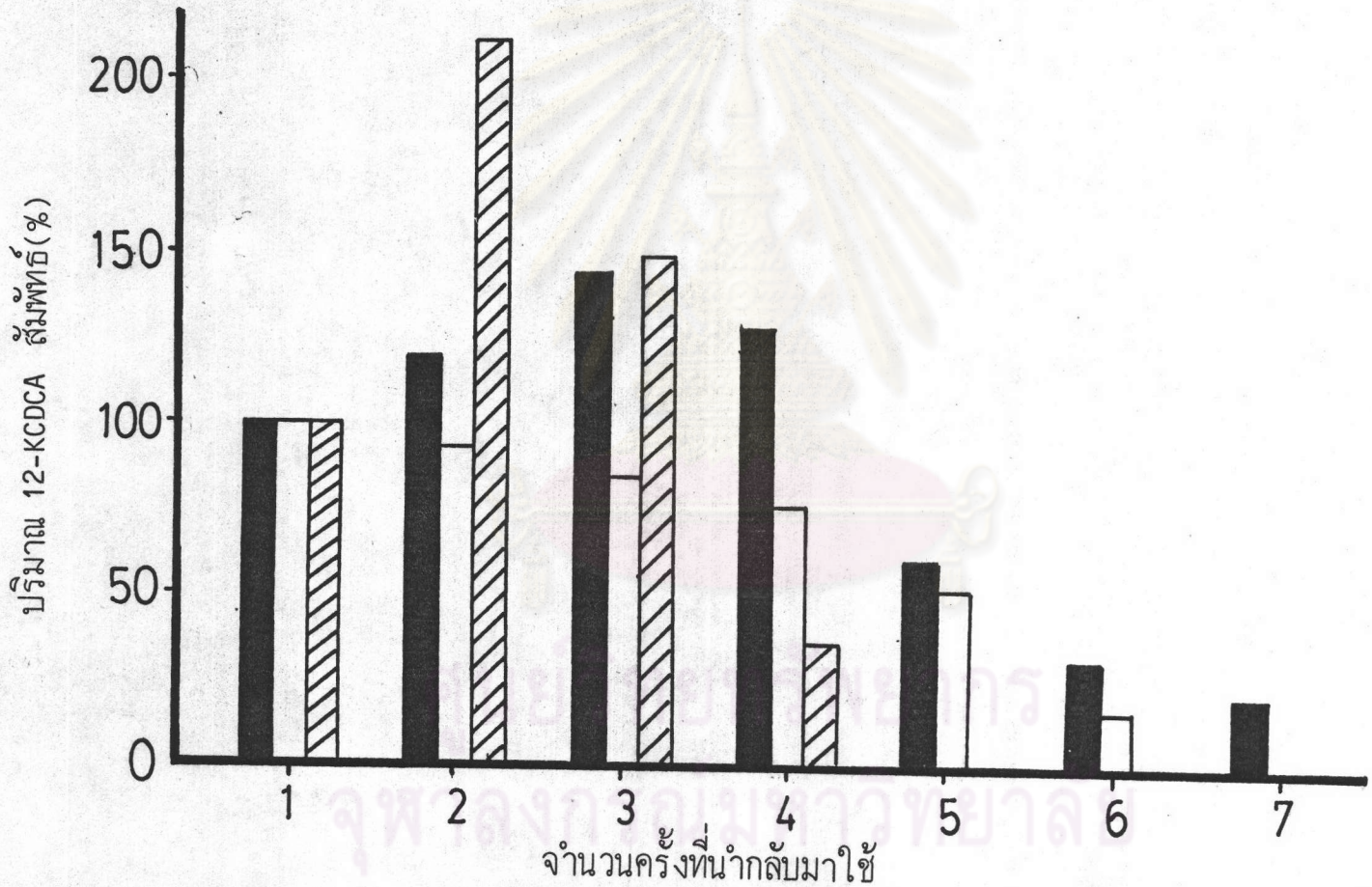
ผลการศึกษาการนำกลับมาใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่อง (รูปที่ 54) ของเม็ดเจลเซลล์ตรึง P. testosteroni ด้วยแอลจิเนต เมื่อมี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ และ 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH พบว่าปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกสัมพัทธ์สูงขึ้นเป็น 120, 142, 127 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกตั้งต้น เมื่อใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่อง 4 ครั้ง ความสามารถในการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก จึงเริ่มลดลง (ใช้ซ้ำครั้งที่ 5, 6 และ 7 เหลือความสามารถในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์เพียง 60, 30 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

เมื่อนำเม็ดเจลเซลล์ตรึง P. testosteroni ที่ใช้ครั้งแรกแล้วมากระตุ้นด้วยอาหารสูตร Marcus และ Talalay ที่ไม่มี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ นาน 6 ชั่วโมง เสียก่อนแล้วจึงนำมาใช้ซ้ำในครั้งที่ 2 พบว่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ค่อย ๆ ลดลงเป็น 92, 84, 76, 52, 16 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกตั้งต้น เมื่อใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องครั้งที่ 2, 3,

รูปที่ 54. การศึกษาความเสถียรของเม็ดเจลเซลล์ตรึงของ P.testosteroni ด้วยแอลจิเนต โดยติดตามปริมาณ 12-KCDCA ที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปของกรดดีไฮโดรโคลิกที่เวลา 9 ชั่วโมง ตามรายละเอียดวิธีข้อ 2.11 และ 3.24 เมื่ออยู่ในสภาวะ - ใช้อย่างต่อเนื่อง ■

- กระตุ้นด้วยอาหารสูตร Marcus และ Talalay ที่ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ □
- ถูกกระตุ้นด้วยอาหารสูตร Marcus และ Talalay ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ▨

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปริมาณ 12-KCDCA สัมพัทธ์(%)
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
จำนวนครั้งที่นำกลับมาใช้

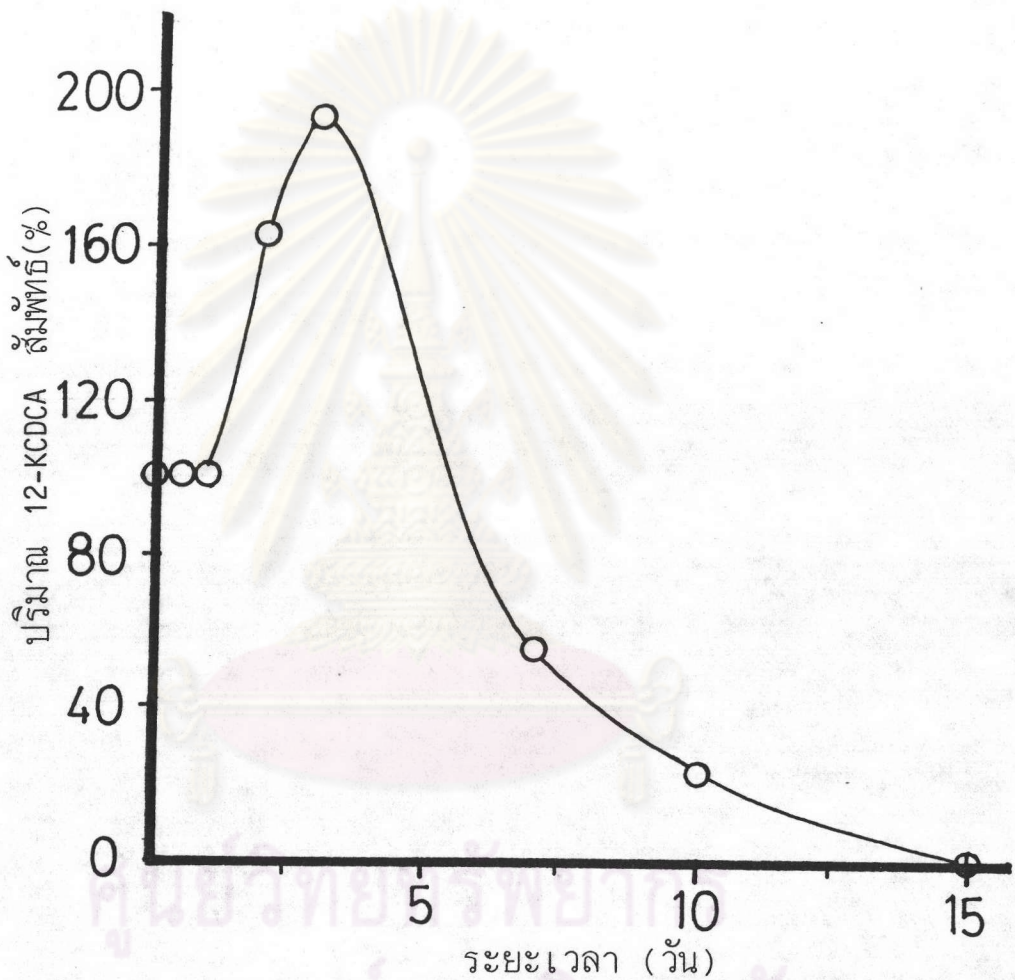
4, 5 และ 6 ตามลำดับ

ในทำนองเดียวกันหากนำเม็ดเจลเซลล์ตรึง P. testosteroni ด้วยแอลจิเนตที่ใช้ครั้งแรกแล้ว มากระตุ้นด้วยอาหารสูตร Marcus และ Talalay ที่มี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์เสียก่อน แล้วจึงนำไปศึกษาความสามารถในการใช้ซ้ำ พบว่าความสามารถในการผลิตกรด 12-คีโตโนดีออกซีโคลิกจะเพิ่มเป็น 210, 148 และ 35 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกตั้งต้น เป็น 135 ไมโครโมลต่อกรัมเซลล์ต่อลิตร) เมื่อใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องครั้งที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ หลังจากนั้นเซลล์ตรึง P. testosteroni ในแอลจิเนตจะสูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกไปอย่างสมบูรณ์

3.25 การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของเซลล์ตรึง P. testosteroni ด้วยแอลจิเนต

เก็บรักษาเม็ดเจลเซลล์ตรึง P. testosteroni ด้วยแอลจิเนตไว้ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ซึ่งมี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ เป็นระยะเวลา 15 วัน วิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก ในสารละลายปฏิกิริยาที่มี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ และ 2.5×10^{-3} โมลาร์ NADH ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อมีเซลล์ตรึง P. testosteroni ด้วยแอลจิเนต 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ช่วงเวลานาน 9 ชั่วโมง เป็นระยะ ๆ

ผลการทดลอง (รูปที่ 55) แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาเม็ดเจลเซลล์ตรึง P. testosteroni ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ที่มี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส จะเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก ในช่วงแรกของการเก็บรักษา (4 วัน) หลังจากนั้นความสามารถในการสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกด้วยการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกค่อย ๆ ลดลงจนสูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์อย่างสมบูรณ์เมื่อเก็บไว้นาน 15 วัน



รูปที่ 55. แสดงความเสถียรของเม็ดเจลเซลล์ P.testosteroni ตรึงแอลจิเนต เมื่อทำการเก็บรักษาเม็ดเจลเซลล์ตรึงของ P.testosteroni ในนอร์มัลซาไลน์ ที่มี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 15 วัน ติดตามความเสถียรโดยวัดปริมาณ 12-KCDCA ที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปของกรดดีไฮโดรโคลิกในเวลา 9 ชั่วโมง ตามวิธีข้อ 2.11.1 และ 2.11.2