5

การผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดยการตรึงเซลล์ร่วมของเอสเคอริเคีย โคไล HD-1 และซูโดโมนาส เทสโทสเทอโรไน (ATCC 11996)

นางสาว พิศมัย เปี่ยมทิพย์มนัส

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-209-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012587

I10294259

PRODUCTION OF 12-KETOCHENODEOXYCHOLIC ACID BY CO-IMMOBILIZED CELLS OF *ESCHERICHIA COLI* HD-1 AND *PSEUDOMONAS TESTOSTERONI* (ATTCC 11996)

Miss Pismai Piamthipmanus

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programe Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1987

ISBN 974-568-209-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดยการตรึงเซลล์ร่วมของเอสเคอ-ริเคีย โคไล HD-1 และซูโดโมนาส เทสโทสเทอโรไน (ATCC 11996)
โดย	นางสาว พิศมัย เปี่ยมทิยพ์มนัส
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดยการตรึงเซลล์ร่วมของ เอสเคอริเคีย โคไล HD-1 และซูโดโมนาส เทสโทสเทอโรน ใน (ATCC 11996)

ชื่อ นางสาว พิศมัย เปี่ยมทิพย์มนัส

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาศักยภาพของการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก (12-ketochenodeoxycholic acid, 12-KCDCA) โดยใช้เซลล์ตรึงร่วมของเอสเคอริเคีย โคไล HD-1 (Escherichia coli HD-1) และซูโดโมนาส เทสโทสเทอโรไน (ATCC 11996) (Pseudomonas testosteroni, ATCC 11996) ผลการวิจัยพบว่า E. coli สายพันธุ์ HD-1 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (α-hydroxysteroid dehydrogenase, α-HSDH) ซึ่งมีแอคติวิตีต่อสับสเตรทกรดคีโนดีออกซีโคลิก (chenodeoxycholic acid, CDCA) สูงกว่ากรดลิโทโคลิก (lithocholic acid, LCA) ถึง 30 เท่า ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์ให้ผลยืนยันว่า เอนไซม์ที่ได้จาก E. coli ประกอบด้วย 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (7α-HSDH) และ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (3 -HSDH) เมื่อเลี้ยง E. coli ในอาหารสูตร LB จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ได้ค่อนข้างสูง (แอคติวิตีจำเพาะ 4.8 หน่วยต่อมก.โปรตีน, ใช้ CDCA เป็นสับสเตรท) การเสริม CDCA และ LCA (0.5 กรัมต่อลิตร) ไม่สามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ α-HSDH ใน E. coli ได้ พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่นของเอนไซม์ α- HSDH อยู่ในช่วง 9.5-10.0 ส่วนการเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) จะเกิดได้ดีที่พีเอช 5.0 หลังจากเก็บรักษา α-HSDH ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มีกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 50 วัน จะเหลือแอคติวิตีของ

เอนไซม์อยู่ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าแอคติวิตีของ α-HSDH ในเซลล์ E. coli จะลดลงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเซลล์ไว้ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 70 วัน

P. testosteroni (ATCC 11996) สามารถผลิตเอนไซม์ HSDH ได้ระดับต่ำ (แอคติวิตีจำเพาะสูงสุด 0.08 หน่วยต่อ มก. โปรตีน, ใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ แอคติวิตีของเอนไซม์ HSDH ของ P. testosteroni สามารถถูกเหนี่ยวนำให้สูงขึ้นประมาณ 9-10 เท่า (แอคติวิตีจำเพาะ 1.8 หน่วยต่อ มก.โปรตีน, ใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Marcus และ Talalay เสริมด้วยโซเดียมโคเลท (sodium cholate) กรดดีไฮโดรโคลิก (dehydrocholic acid, DHCA) หรือเทสโทสเทอโรน (testosterone) อย่างใดอย่างหนึ่ง เทียบกับแอคติวิตีในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันที่ไม่ได้เสริม

ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์ที่ผลิตโดย P. testosteroni ให้ข้อสรุปว่า นอกจากเอนไซม์ 3 แอลฟา- และ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งมีรายงานว่าพบในเซลล์ชนิดนี้แล้ว P. testosteroni ยังสามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งจำเพาะต่อหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 7 ของสารจำพวกกรดน้ำดีได้อีกด้วย พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ HSDH เมื่อเร่งปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น (DHCA เป็นสับสเตรท) คือ พีเอช 5.0 เอนไซม์ 3α- และ 7α-HSDH จะเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่นได้ดีที่พีเอช 10.5 และ 11.0 เมื่อมี LCA และ CDCA เป็นสับสเตรทตามลำดับ เซลล์ P. testosteroni ที่เก็บในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 42 วัน จะเหลือแอคติวิตีของเอนไซม์สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ แต่จำนวนเซลล์มีชีวิตจะมีค่าเพียง 30-40 เปอร์เซนต์ของเซลล์เริ่มต้น ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ HSDH ซึ่งเก็บไว้ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มีกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 34 วัน จะลดลงเหลือเพียง 15 เปอร์เซ็นต์

เอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจากเซลล์ P. testosteroni จะมีความเสถียรค่อนข้างสูงเมื่อเก็บอยู่ใน 0.1 โมลาร์อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เซลล์และเอนไซม์ ∝-HSDH ที่ได้จากเซลล์ E. coli จะมีความเสถียรสูงกว่าเซลล์และเอนไซม์ที่ได้จาก P. testosteroni (เซลล์มีชีวิตลดลงเหลือ 30 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แอคติวิตีลดลงเหลือ 95 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อให้ความ

ร้อนที่อุณหภูมินี้นาน 10 นาที) เอนไซม์ ∝-HSDH จาก E. coli จะเริ่มถูกยับยั้งเมื่อใช้ความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์สูงกว่า 0.1 โมลาร์ ในขณะที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 โมลาร์ของโปแตสเซียมคลอไรด์จะลดแอคติวิตีของเอนไซม์จาก P. testosteroni ได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพของการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก (12-KCDCA) จากการเปลี่ยนรูปสับสเตรทกรดดีไฮโดรโคลิก (DHCA) โดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงรูปของ E. coli และ P. testosteroni ปรากฏว่า วิถีการสังเคราะห์ 12-KCDCA ด้วยเซลล์ E. coli อิสระ, เซลล์ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น (2.5 เปอร์เซ็นต์แคปปาคาร์ราจีแนน กับ 1.5 เปอร์เซ็นต์วุ้น) และเซลล์ตรึงด้วยแอลจิเนต (1 เปอร์เซ็นต์) จะเป็นแบบเดียวกัน คือ มีการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ 12-KCDCA โดยผ่านสารตัวกลาง (intermediate) กรด 3,12-ไดคีโตลิโทโคลิก (3,12-diketolithocholic acid) เสียก่อน เซลล์ E. coli อิสระเมื่อมี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์จะเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ 12-KCDCA ได้สูงกว่าเมื่อมี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ถึง 4 เท่า ในขณะที่เซลล์ E. coli ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น จะให้ผลผลิตของ 12-KCDCA ต่ำกว่าเมื่อใช้เซลล์ตรึงด้วยแอลจิเนตประมาณ 2-3 เท่า และปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้เกือบไม่แปรผันตามความเข้มข้นของเซลล์ตรึง E. coli ที่ใช้เลย (5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเซลล์ต่อปริมาตร) อย่างไรก็ตาม ค่าผลิตภัณฑ์ของ 12-KCDCA ที่ได้จากการใช้เซลล์ตรึงแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น ก็ยังมีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้เซลล์อิสระประมาณ 3 เท่า เช่นกัน

เซลล์ P. testosteroni อิสระสามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดผลิตภัณฑ์ 12-KCDCA ในสภาวะซึ่งมี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ได้สูงกว่าเมื่อมี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ ส่วนเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น จะให้ปริมาณ 12-KCDCA ต่ำมากเมื่อเทียบกับเซลล์อิสระในปฏิกิริยาที่มี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์เท่ากัน ความเข้มข้นของเซลล์ P. testosteroni (5 และ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักเซลล์ต่อปริมาตร) ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น ไม่มีผลต่อปริมาณ 12-KCDCA ที่เกิดในปฏิกิริยา แต่ผลจะตรงข้ามหากตรึงเซลล์ด้วยแอลจิเนต เมื่อใช้เซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต ความเข้มข้นเซลล์ 20 เปอร์เซ็นต์ จะให้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ 12-KCDCA สูงกว่าเมื่อใช้ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์เซลล์ตรึงด้วยสารชนิดเดียวกันประมาณ 2 เท่า โดยไม่พบผลิตภัณฑ์ตัวกลางหรืออนุพันธ์กรดน้ำดีชนิดอื่นใดเกิดควบคู่ไปกับ 12-KCDCA เลย

การใช้เซลล์อิสระและเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนตเปลี่ยนรูป DHCA ให้เป็น 12-KCDCA ในปฏิกิริยาที่มี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ จะปรากฏผลิตภัณฑ์กรดน้ำดีเพิ่มขึ้นจากเดิมอีก 2 ชนิด ซึ่งคาดว่าอาจเป็นกรด 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิก และ 3 เบตา, 7 แอลฟา , 12-คีโตโคลิก (3β , 7α , 12-ketocholic acid)

เซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนตสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ 12-KCDCA ได้โดยปราศจาก NADH จากแหล่งภายนอก (82 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณซึ่งสังเคราะห์ได้เมื่อมี NADH 2.5 มิลลิโมลาร์) แคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำ (0-0.1 โมลาร์) จะกระตุ้นการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ 12-KCDCA แต่ที่ความเข้มข้นสูง (มากกว่า 0.1 โมลาร์) จะยับยั้งการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เป็นเพราะแคลเซียมคลอไรด์ยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก E. coli และ P. testosteroni

ค่า K_m ต่อกรดดีไฮโดรโคลิกในการผลิต 12-KCDCA มีค่า 1.0 มิลลิโมลาร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ สำหรับเซลล์อิสระและเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนตสามารถนำกลับมาใช้ใหม่อย่างต่อเนื่องได้ถึง 4 ครั้ง โดยไม่มีการสูญเสียความสามารถในการผลิต 12-KCDCA เลย ความเสถียรของเซลล์ตรึงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ ซึ่งมี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ นาน 7 วัน จะมีคุณสมบัติในการสังเคราะห์ 12-KCDCA อยู่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Production of 12-Ketochenodeoxycholic acid by Co-immobilized Cells Escherichia coli HD-1 and Pseudomonas testosteroni (ATCC 11996)

Name Miss Pismai Piamthipmanus

Thesis Advisor Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.

Department Biotechnology

Academic Year 1986

ABSTRACT

The aim of this research is to study the potential of 12-ketochenodeoxycholic acid (12-KCDCA) production by co-immobilized cells of Escherichia coli HD-1 and Pseudomonas testosteroni (ATCC 11996). The results revealed that our strain of E. coli HD-1 was able to synthesize α-hydroxysteroid dehydrogenase (α-HSDH). The enzyme activity when chenodeoxycholic acid (CDCA) used as the substrate was 30 times higher than that obtained when lithocholic acid (LCA) was used. The enzymes extracted from E. coli consisted of 7α-hydroxysteroid dyhydrogenase (7α-HSDH) and 3α-hydroxysteroid dehydrogenase (α-HSDH). E. coli grown in LB medium would yield rather high activity of α-HSDH (specificity activity 4.8 units/mg protein using CDCA as a substrate.) The supplement of CDCA and LCA (0.5 g/l) could not induce α-HSDH synthesis in E. coli. α-HSDH had an optimum pH of 9.5-10.0 in the dehydrogenation system and 5.0 for the hydrogenation reaction. The remaining activity of α-HSDH after 50 days storage at 7°C in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 consisting of 10% glycerol was 50 percent. Additionally, it was found that the activity of α-HSDH in E. coli cells decreased about

40 percent when stored in normal saline at 7°C for 70 days.

P. testosteroni (ATCC 11996) could produce HSDH at low level (maximal specific activity 0.08 unit/mg protein, using sodium cholate as a substrate) in nutrient broth plus 2 % yeast extract. The activity of HSDH of P. testosteroni could be induced higher by 9-10 times (specific activity 1.8 unit/mg protein using sodium cholate as a substrate) when grown in Marcus and Talalay media supplemented with either sodium cholate, dehydrocholic acid (DHCA) or testosterone comparing to the activity in the same medium but without any supplement.

The studies of types of enzyme produced by P. testosteroni concluded that besides 3α- and 7β-hydroxy steroid dehydrogenase which had been reported that they were found, P. testosteroni was also able to produce enzyme specific to hydroxyl group at 7 th position of bile acids. The optimal pH of HSDH in the hydrogenation direction (using DHCA as a substrate) was 5.0. The pH of 10.5 and 11.0 were the optimal pH for 3α- and 7α-HSDH to catalyse the dehydrogenation reaction when having LCA and CDCA as substrates, respectively. The remaining enzyme activity of P. testosteroni stored in normal saline at 7°C for 42 days was as high as 80 percent but the number of viable cells was only about 30-40 percent compared to the initial value; whereas when HSDH stored in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 (containing 10% glycerol) at 7°C for 34 days, the enzyme activity was left only 15 percent.

The stability of hydroxysteroid dehydrogenase from P. testosteroni was rather high when kept in 0.1 M acetate buffer, pH 6.0, at 7°C. Futhermore, at 50°C, the stability of cells and α-HSDH of E. coli were higher than that of P. testosteroni (viable cells remained 30 and 6

percent while activity remained 95 and 30 percent, respectively) when maintained at this temperature for 10 minutes. The inhibitory effect of α-HSDH from E. coli started when the concentration of potassium chloride was higher that 0.1 M. The enzyme activity from P. testosteroni decreased about 30 percent when the concentration of potassium chloride used was higher than 0.1 M.

The potential of the transformation of dehydrocholic acid (DHCA) to 12-ketochenodeoxycholic acid (12-KCDCA) was compared between free cells and immobilized cells of E. coli and P. testosteroni. The results showed that E. coli free cells, kappa carrageenan-agar (2.5% kappa carrageenan plus 1.5% agar) immobilized cells and alginate (1%) immobilized cells had same pattern of 12-KCDCA biosynthetic pathway via the intermediate of 3,12-diketolithocholic acid. The catalytic activity of E. coli free cells in the 12-KCDCA production when containing 0.1 M calcium chloride in the reaction was 4 times higher than when containing 0.05 M potassium chloride. On the contrary, kappa carrageenan-agar immobilized E. coli cells produced 12-KCDCA about 2-3 times lower than the alginate immobilized cells. The amount of this product was rather constant at the various concentration of E. coli cells (5,10 and 20% W/V). Nevertheless, the 12-KCDCA synthesized by kappa carrageenan-agar immobilized cells was still 3 times lower than by free cells.

P. testosteroni free cells could produce higher level of 12-KCDCA in the presence of 0.1 M calcium chloride than 0.05 M potassium chloride. At the same potassium chloride concentration, P. testosteroni immobilized with kappa carrageenan-agar synthesized very low amount of 12-KCDCA in comparison to free cells. The concentration of P. testosteroni

immobilized cells with kappa carrageenan-agar (5 and 10% W/V) had no effect on the production of 12-KCDCA but the opposite results obtained when using alginate immobilized cells. The value of 12-KCDCA obtained when using 20% cells of alginate immobilized P. testosteroni was 2 folds higher than 5 and 10 % immobilized cells without any appearance in bile acid derivatives.

The transformation reaction of DHCA to 12-KCDCA in the presence of 0.1 M calcium chloride was observed 2 additional bile acids when using free cells and alginate immobilized P. testosteroni. They were suggested to be 7,12-diketolithocholic acid and 3β, 7α, 12-ketocholic acid.

Without exogeneous NADH, alginate immobilized P. testosteroni cells could transform DHCA to 12-KCDCA with 82 percent of the same reaction adding 2.5 mM NADH. The activation of 12-KCDCA production was demonstrated at lower concentration of calcium chloride (0-0.1 M). The concentration of calcium chloride higher than 0.2 M remarkedly inhibited the product formation due to the action on enzyme α-HSDH in both E. coli and P. testosteroni.

The K_m for the transformation of dehydrocholic acid to 12-KCDCA were found to be 1.0 mM and 2.5 mM for free P. testosteroni cells and the alginate immobilized cells, respectively. Moreover, the alginate immobilized P. testosteroni could be reused continuously for 4 times without any loss of the ability to produce 12-KCDCA. The stability of P. testosteroni immobilized by alginate was considerably high with the 50% remaining activity of the 12-KCDCA synthesis after kept in normal saline solution containing 0.1 M calcium chloride at 7^{o}C for 7 days.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล เป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำในการวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล และรองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา และอาจารย์วินิจ ขำวิวรรธน์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอบคุณ คุณสุพร นุชคำรงค์, คุณธนาภรณ์ ตันเจริญ และ คุณนิตยา ว่องนราธิวัฒน์ เป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ในภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับมิตรภาพ ความช่วยเหลือต่าง ๆ และกำลังใจต่อผู้เขียน

ขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี ที่ให้ความสนับสนุนทางด้านสารเคมี อุปกรณ์ ตลอดจนเอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย

ขอบคุณ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ทุนสนับสนุนทางด้านสารเคมีบางส่วน

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ในความช่วยเหลือเรื่องทั่ว ๆ ไปในระหว่างทำงานวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ท้ายสุดนี้ ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ-คุณแม่ และพี่-น้อง ของผู้เขียน ที่ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ ตลอดจนความรัก ความอบอุ่น อันมีค่ายิ่งต่อผู้เขียนตลอดระยะเวลาในการศึกษา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ช

กิตติกรรมประกาศ..... ฎ

สารบัญตาราง..... ฑ

สารบัญรูป..... ฒ

คำย่อ..... ฝ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วิธีการทดลอง..... 12

2.1 ครุภัณฑ์..... 12

2.2 วัสดุและเคมีภัณฑ์..... 13

2.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 13

2.2.2 เคมีภัณฑ์..... 14

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์..... 15

2.4 การเตรียมสารละลาย..... 16

2.5 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์..... 18

2.6 วิธีการเลี้ยงเชื้อและวัดการเจริญของเชื้อ..... 19

2.7 วิธีการเตรียมสารละลายเอนไซม์..... 20

2.8 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส..... 20

2.9 การวิเคราะห์โปรตีน..... 22

2.10 วิธีการตรึงเซลล์..... 23

2.11 วิธีการศึกษาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี..... 24

บทที่ หน้า

3 ผลการทดลอง..... 28

3.1 การเจริญและผลิตเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ของ E.coli 28

3.2 การศึกษาชนิดของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่แยกได้จาก E.coli โดยเทคนิคโพลีอะไครละไมด์เจล..... 30

3.3 การศึกษาการเหนี่ยวนำการผลิต แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮ-โดรจีเนสของ E.coli ด้วยกรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดลิโทโคลิก..... 30

3.4 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก E.coli 32

3.5 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก E.coli 32

3.6 การศึกษาความเสถียรของเซลล์และความเสถียรของเอนไซม์ภายในเซลล์ของ E. coli 36

3.7 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P.testosteroni ATCC 11996 ในอาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเสริมด้วยเทสโทสเทอโรนหรือโซเดียมโคเลท..... 40

3.8 การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่แยกจาก P.testosteroni ATCC 11996.. 45

3.9 การศึกษาชนิดของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดร-จีเนสที่แยกได้จาก P.testosteroni โดยเทคนิคโพลีอะไคร-ละไมด์เจล..... 47

3.10 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก P.testosteroni ATCC 11996 47

บทที่ หน้า

3.11 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ของ P.testosteroni เมื่อเสริมด้วยเทสโทสเทอโรนและโซเดียมโคเลทในอาหารสูตร Marcus และ Talalay..... 49

3.12 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ของ P.testosteroni ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay เสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก..... 55

3.13 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จาก P.testosteroni ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส..... 59

3.14 การศึกษาความเสถียรของเซลล์และเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก P.testosteroni 63

3.15 การศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก P.testosteroni และ E.coli 65

3.16 การศึกษาความเสถียรของเซลล์ E.coli และ P.testosteroni ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส..... 74

3.17 การศึกษาผลกระทบของโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก P.testosteroni และ E.coli..... 76

3.18 การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบลักษณะการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซี-โคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีด้วยเซลล์ E.coli อิสระ เซลล์ E.coli ตรึงด้วย แคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น และเซลล์ E.coli ตรึงด้วยแอลจิเนต..... 79

3.19 การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบลักษณะการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซี-โคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีด้วยเซลล์ P.testosteroni อิสระ เซลล์ P.testosteroni ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น และ P.testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต..... 83

บทที่ หน้า

3.20 การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบลักษณะการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซี-โคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี โดยการตรึงเซลล์ร่วมของ E.coli และ P.testosteroni 91

3.21 การศึกษาผลกระทบของ NADH ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ด้วยเซลล์ P.testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต 91

3.22 การศึกษาผลกระทบของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ด้วยเซลล์ P.testosteroni อิสระ และเซลล์ P.testosteroni ตรึงแอลจิเนต 94

3.23 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นกรดดีไฮโดรโคลิกต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกของเซลล์ P.testosteroni อิสระเทียบกับเซลล์ตรึงแอลจิเนต 97

3.24 การศึกษาการนำกลับมาใช้ซ้ำของเม็ดเจลเซลล์ P.testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต 101

3.25 การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของเซลล์ตรึง P.testosteroni ด้วยแอลจิเนต 103

4 สรุปและวิจารณ์ 105

เอกสารอ้างอิง..... 129

ภาคผนวก 138

1 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี 139

2 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ NADH 140

3 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ E.coli กับความเข้มข้นโปรตีนเมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิก และลิโทโคลิก ความเข้มข้น 1.5×10^{-2} โมลาร์ เป็นสับสเตรท 141

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ หน้า

4 เส้นกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดดีไฮโดรโคลิกบริสุทธิ์กับเปอร์เซนต์ของกรดดีไฮโดรโคลิกต่อเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน เมื่อสกัดและไม่สกัดด้วยเอทธิลอะซีเตท 142

5 เส้นกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกบริสุทธิ์กับเปอร์เซนต์ของกรด 12-คีโตดีโนดีออกซี-โคลิกต่อเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน เมื่อสกัดและไม่สกัดด้วย เอทธิลอะซีเตท..... 143

6 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อปริมาณการสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโน-ดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์ E.coli อิสระ เมื่อมี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ในสารละลายเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิก..... 144

7 ผลกระทบของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก P.testosteroni ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส..... 145

8 ลักษณะของโครมาโตแกรมของกรดน้ำดีมาตรฐานชนิดต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยการฉีดเข้าเครื่อง HPLC 146

9 ลักษณะของโครมาโตแกรมของกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี ที่ได้จากปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิก ของ E. coli และ P. testosteroni 147

10 ลักษณะของโครมาโตแกรมของกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี กับสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน เมื่อเติมสารมาตรฐานกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในสารละลายปฏิกิริยาที่ได้จากการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิก ด้วยเซลล์ E. coli 148

11 ลักษณะของโครมาโตแกรมของกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดี กับสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน เมื่อเติมสารมาตรฐานกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิก ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในสารละลายปฏิกิริยาที่ได้จากการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิก ด้วยเซลล์ P. testosteroni 149

ประวัติผู้เขียน 150

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างเอกสารที่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟา–ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส.....	6
2	เปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ 3 แอลฟา–และ 3 เบตา– ไฮดรอกซี–สเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส.....	8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ และสเตียรอยด์ฮอร์โมนบางชนิด..	2
2	การสังเคราะห์ กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิก โดยวิธีทางเคมี.....	4
3	แผนภาพการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกโดย B.fuscum และ L.xylosus	9
4	วิธีการตรึงเซลล์แบคทีเรียด้วยแคลเซียมแอลจิเนต.....	25
5	ลักษณะการเจริญและผลิตเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดร-จีเนสของ E.coli ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร LB	29
6	การศึกษาชนิดของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก E.coli โดยเทคนิคโพลีอะไครล์ละไมด์เจล.....	31
7	เปรียบเทียบการเจริญของเซลล์ E.coli เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB และอาหารสูตร LB ที่เสริมด้วยกรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดลิโทโคลิก.....	33
8	ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซี-สเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ผลิตโดย E.coli เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร LB อาหารสูตร LB ที่เสริมด้วยกรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดลิโทโคลิก.....	34
9	ผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ E.coli	35
10	เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดี-ไฮโดรจีเนสที่ได้จากเซลล์ E.coli เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลายต่างชนิดที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท	37

รูปที่ หน้า

11 เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จากเซลล์ E.coli เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลายต่างชนิดที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท..... 38

12 เปรียบเทียบความเสถียรของเซลล์ E.coli เมื่อเก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส และติดตามวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)..... 39

13 เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อเก็บรักษาเซลล์ E.coli ไว้ในสารละลายต่างชนิด ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้กรดดีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรท..... 41

14 เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อเก็บรักษาเซลล์ E.coli ไว้ในสารละลายต่างชนิด ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท..... 42

15 ลักษณะการเจริญของ P.testosteroni เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร NB ผสม 2 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ และอาหารชนิดเดียวกันซึ่งเสริมด้วยเทสโทสเทอโรน หรือโซเดียมโคเลท..... 43

16 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (เมื่อใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท) กับค่าการเจริญของ P.testosteroni เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร NB ผสม 2 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ และอาหารชนิดเดียวกันซึ่งเสริมด้วยเทสโทสเทอโรน หรือ โซเดียมโคเลท..... 44

17 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P.testosteroni กับความเข้มข้นโปรตีน เมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิก, กรดลิโทโคลิก, กรดโคลิก และกรดดีโนดีออกซีโคลิก

รูปที่		หน้า
	เป็นสับสเตรท.....	46
18	การศึกษาชนิดของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จาก P.testosteroni โดยเทคนิคโพลีอะไคร์ละไมด์เจล.....	48
19	ผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P.testosteroniวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่นและปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น	50
20	รูปแบบการเจริญของ P.testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay และอาหารชนิดเดียวกันซึ่งเสริมด้วยเทสโทส-เทอโรน หรือโซเดียมโคเลท.....	51
21	รูปแบบของการผลิตเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P.testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay และอาหารชนิดเดียวกันซึ่งเสริมด้วยเทสโทสเทอโรน หรือโซเดียมโคเลท วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่นและไฮโดรจีเนชั่น.....	53
22	รูปแบบของการผลิตเอนไซม์ เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P.testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay และอาหารชนิดเดียวกัน ซึ่งเสริมด้วยเทสโทสเทอโรนหรือโซเดียมโคเลท วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับสเตรท.....	54
23	รูปแบบการเจริญของ P.testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay และอาหารชนิดเดียวกันซึ่งเสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก ตั้งแต่เริ่มต้นและหลังเซลล์เจริญไปแล้ว 7 ชั่วโมง	56
24	รูปแบบของการผลิตเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดร-จีเนสของ P.testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay และอาหารชนิดเดียวกันซึ่งเสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก ตั้งแต่เริ่มต้น และหลังเซลล์เจริญไปแล้ว 7 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่นและไฮโดรจีเนชั่น....	54

รูปที่ หน้า

25 รูปแบบของการผลิตเอนไซม์เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ของ P.testosteroni เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay และอาหารชนิดเดียวกัน ซึ่งเสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก ตั้งแต่เริ่มต้นและหลังเซลล์เจริญไปแล้ว 7 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีของเอน-ไซม์ โดยใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับสเตรท..... 58

26 เปรียบเทียบชนิดของสารละลายที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของเซลล์ P.testosteroni ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้ โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท (ดีไฮโดรจีเนชั่น)..... 60

27 เปรียบเทียบชนิดของสารละลายที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของเซลล์ P.testosteroni ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท (ไฮโดรจีเนชั่น)..... 61

28 เปรียบเทียบชนิดของสารละลายที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเอนไซม์เบตา -ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของเซลล์ P.testosteroni ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เมื่อติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดย ใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับสเตรท..... 62

29 เปรียบเทียบความเสถียรของเซลล์ P.testosteroni ซึ่งเก็บรักษาไว้ ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดจำนวนเซลล์ มีชีวิต..... 64

30 เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส เมื่อเก็บรักษา P.testosteroni เซลล์ในสารละลาย นอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้ โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท (ดีไฮโดรจีเนชั่น)..... 66

รูปที่ หน้า

31 เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อเก็บรักษา P.testosteroni เซลล์ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท (ไฮโดรจีเนชั่น)..... 67

32 เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ 3 เบตา - ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสเมื่อเก็บรักษาเซลล์ P.testosteroni ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ณ อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้เทสโทสเทอโรนเป็นสับสเตรท (ดีไฮโดรจีเนชั่น)..... 68

33 ผลกระทบของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก E.coli เมื่อเก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส..... 70

34 ผลกระทบของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก E.coli เมื่อเก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..... 71

35 ผลกระทบของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก P.testosteroni เมื่อเก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส 72

36 ผลกระทบของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ได้จาก P.testosteroni เมื่อเก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..... 73

37 ผลกระทบของอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสต่อเซลล์ E.coli เมื่อทำการศึกษาวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, แอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน 75

รูปที่ หน้า

38 ผลกระทบของอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสต่อเซลล์ P.testosteroni เมื่อทำการศึกษาวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต, แอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน 77

39 ผลกระทบของความเข้มข้นโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P.testosteroni และ E.coli 78

40 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์กรด 12 - คีโตคีโน-ดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์อิสระ E.coli เมื่อมี 0.05 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์..... 80

41 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออก-ซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์ E.coli ตรึงด้วยคาร์ราจีแนน-วุ้น เมื่อมี 0.05 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์..... 82

42 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดี-ออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์ E.coli ตรึงด้วยแอลจิเนต เมื่อมี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์..... 84

43 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออก-ซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์อิสระ P.testosteroni เมื่อมี 0.05 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์..... 86

44 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออก-ซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์ P.testosteroni ตรึงด้วยคาร์ราจีแนน-วุ้น เมื่อมี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์..... 87

45 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดี-ออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์อิสระ P.testosteroni เมื่อมี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์..... 88

46 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดี-ออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีของเซลล์ P.testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต เมื่อมี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์..... 90

รูปที่ หน้า

47 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ตรึงร่วมของ E.coli และ P.testosteroni ด้วยคาร์ราจีแนน-วุ้น เมื่อมี 0.05 โมลาร์โปแตส-เซียมคลอไรด์..... 92

48 ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ตรึงร่วมของ E.coli และ P.testosteroni ด้วยแอลจิเนต เมื่อมี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์

49 ผลกระทบของ NADH ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ของเซลล์ P.testosteroniตรึงด้วยแอลจิเนต..... 95

50 ผลกระทบของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกของเซลล์อิสระ P.testosteroni..... 96

51 ผลกระทบของความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์ต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกของเซลล์ P.testosteroni ตรึงด้วย แอลจิเนต..... 98

52 Lineweaver-Burk Plot ของการเกิดกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ต่อกรดดีไฮโดรโคลิก ของเซลล์อิสระ P.testosteroni..... 99

53 Lineweaver-Burk Plot ของการเกิดกรด 12-คีโตคีโนดีออกซี-โคลิก ต่อกรดดีไฮโดรโคลิกของเซลล์ P.testosteroni ตรึงด้วย แอลจิเนต 100

54 การศึกษาความเสถียรของเม็ดเจลเซลล์ P.testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต เมื่อนำกลับมาใช้ซ้ำ..... 102

55 การศึกษาความเสถียรของเม็ดเจลเซลล์ P.testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต เมื่อเก็บรักษาในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ที่มี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ 104

คำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
°ซ.	=	องศาเซลเซียส
NAD^+	=	Nicotinamide adenosine dinucleotide, oxidized form
NADH	=	Nicotinamide adenosine dinucleotide, reduced form
HSDH	=	Hydroxysteroid dehydrogenase
α-HSDH	=	α-Hydroxysteroid dehydrogenase
3α-KSDH	=	3α-Hydroxysteroid dehydrogenase
7α-HSDH	=	7α-Hydroxysteroid dehydrogenase
12α-HSDH	=	12α-Hydroxysteroid dehydrogenase
3β-HSDH	=	3β-Hydroxysteroid dehydrogenase
12-KCDCA	=	12-ketochenodeoxycholic acid
DHCA	=	dehydrocholic acid
CDCA	=	chenodeoxycholic acid
Na-CA	=	sodium-cholate
LCA	=	lithocholic acid
DCA	=	deoxycholic acid
นอร์มัลซาไลน์	=	สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย