สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติมหมู่ไฮดรอกซีบนกรดลิโทโคลิกโดย Absidia sp. BA 16

นางสาว สุนันทา คเชศะนันทน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-567-836-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012475

I 10293826

THE OPTIMUM CONDITIONS FOR THE HYDROXYLATION OF LITHOCHOLIC ACID BY *ABSIDIA* SP. BA 16

Miss Sununta Cajesanun

A Thesis Submitted in Partial Fulfilments of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-567-836-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบหมู่ไฮดรอกซีบนกรดลิโทโคลิก โดย Absidia sp. BA 16
โดย	นางสาวสุนันทา คเชศะนันทน์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
	รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

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

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

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ.ดิมหมู่ไฮดรอกซีบนกรดลิโทโคลิก โดย Absidia sp. BA 16

ชื่อนิสิต นางสาวสุนันทา คเชศะนันทน์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล

รองศาสตราจารย์ ดร.สั่งศรี กุลปรีชา

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2529

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง 3α,15β-dihydroxy -5β-cholanic acid (3α,15β-DHC) จากกรดลิโทโคลิกโดยเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในขวดแก้วทรงกรวยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 40 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและโซเดียมไนเตรทปริมาณ 5 กรัม/ลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์คือที่อุณหภูมิ 30^{o}ซ. ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์อยู่ระหว่าง 30^{o}-45^{o}ซ. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์เมื่อศึกษาโดยใช้เซลระยะพักคือที่พีเอช 8.5 และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมที่สุดคือไดออกเซนในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร)

สำหรับการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในถังหมักพบว่า เชื้อสามารถเจริญได้ดีในการหมักที่ควบคุมสภาวะความเป็นกรดด่างที่พีเอช 6.0-8.0 การหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างเชื้อจะสามารถเจริญได้ดีใกล้เคียงกับการหมักโดยการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 แต่ปริมาณเซลจะต่ำกว่าโดยคิดเป็นร้อยละ 89 ของการหมักโดยการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 ส่วนการหมักโดยการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.5 การเจริญของเชื้อจะต่ำโดยคิดเป็นร้อยละ 38 ของการเจริญในการหมักโดยการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 จากการเปรียบเทียบการสร้างผลิตภัณฑ์

ระหว่างการหมักโดยการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 และการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างพบว่า การหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างมีแนวโน้มว่าสามารถทำให้สร้างผลิตภัณฑ์สูงกว่าการหมักโดยการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 ประมาณร้อยละ 8 แต่จะให้ผลิตภัณฑ์สูงสุดช้ากว่าประมาณ 12 ชม.

ในการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างและไม่เติม LCA ระหว่างการหมักพบว่าสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้ 0.54 กรัม/ลิตร (คิดเป็นร้อยละ 54 ของปริมาณ LCA) ในชม. ที่ 66-78 ของการหมัก เมื่อเติม LCA ปริมาณ 0.80กรัม/ลิตร ลงไปในถังหมักในชม.ที่ 56 ของการหมักพบว่า สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้สูงสุด 1.20กรัม/ลิตร (คิดเป็นร้อยละ 65 ของปริมาณ LCA) ในชม. ที่ 90 ของการหมัก การเติม LCA ปริมาณ 1.2 กรัม/ลิตร ร่วมกับไดออกเซนปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในชม. ที่ 56 ของการหมักทำให้สร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดได้ 1.80 กรัม/ลิตร (คิดเป็นร้อยละ 82 ของปริมาณ LCA) ในชม. ที่ 78-96 ของการหมัก และการเติม LCA ในระหว่างการหมัก 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เติม LCA ปริมาณ 1.22 กรัม/ลิตร ร่วมกับไดออกเซนปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในชม. ที่ 56 ของการหมัก ส่วนครั้งที่ 2 และ 3 เติม LCA ปริมาณ 1.01 และ 1.46 กรัม/ลิตร ในชม. ที่ 72 และ 84 ของการหมักตามลำดับ สามารถสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดได้ 2.87 กรัม/ลิตร (คิดเป็นร้อยละ 62 ของปริมาณ LCA) ในชม. ที่ 90 ของการหมัก อย่างไรก็ตามหลังจากชม. ที่ 90 ของการหมักพบว่าปริมาณของผลิตภัณฑ์ลดลงอย่างรวดเร็วและตรวจพบว่ามีผลิตภัณฑ์อื่นเกิดขึ้นในชม. ที่ 96 ของการหมัก

จากการศึกษาทางอนุกรมวิธานของเชื้อ Absidia sp. BA 16 พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ Absidia corymbifera IFO 4009 และ Absidia butleri (Gongronella butleri) IFO 8080 แต่ก็มีลักษณะบางประการแตกต่างกัน เช่น ลักษณะของอับสปอร์ ขนาดและรูปร่างของสปอร์ เป็นต้น จึงคาดว่า Absidia sp. BA 16 อาจเป็นเชื้อราชนิดใหม่ในสกุล "Absidia"

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	The Optimum Conditions for the Hydroxylation of Lithocholic Acid by Absidia sp. BA 16
Name	Miss Sununta Cajesanun
Thesis Advisors	Associate Professor Naline Nilubol Ph.D.
	Associate Professor Songsri Kulprecha Ph.D.
Department	Microbiology
Academic Year	1986

Abstract

The optimum conditions for the hydroxylation of LCA to 3α, 15β - dihydroxy - 5β - cholanic acid (3α, 15β-DHC) by Absidia sp. BA 16 were determined. The medium containing 40 g/l casava starch and 5 g/l sodium nitrate was found to be the best for the product formation. The optimum temperature for the cell growth was 30°C while the optimum temperature for the hydroxylation was in the range of 30° - 45°C. The maximum activity of 15β - hydroxylation by resting cells was at pH 8.5. Dioxane was found to be the most effective solvent with the optimum concentration of 1% (V/V) for enhancing 15-β hydroxylation.

When Absidia sp. BA 16 was cultivated in a 5 - L fermentor, the optimum pH for the cell growth was in the range of 6.0 - 8.0 while at pH 8.5 the cell growth was reduced to 38%. Cultivation under uncontrolled pH yielded approximately 89% of the cell mass as compared to that obtained from the cultivation at pH 8.0 but the amount of the product was about 8% higher. However, the product formation reached the maximum about 12 hours slower than that from the controlled pH.

At the optimum conditions, the production of 3α, 15 β-DHC in a jar fermentor yielded 0.54 g/l (54% conversion) at 66 - 72 hour of cultivation. Feeding of LCA (0.8 g/l) to the culture medium at 56 hour of cultivation resulted in an increase of the product yielded from 0.54 g/l to 1.20 g/l at 90 hour of cultivation (65% conversion). When LCA (1.20 g/l) was added with 1% dioxane (V/V) at 56 hour of cultivation, the product formation was enhanced to 1.80 g/l (82% conversion) during 78 - 96 hour of cultivation. If LCA was further added to the culture medium at 72 hour (1.01 g/l) and 84 hour (1.46 g/l) after the first addition in the presence of dioxane, the product increased to 2.87 g/l (62% conversion) at 90 hour. However, the sharp decline of the product and the formation of another by-product was observed at 96 hour of cultivation.

The morphological and cultural characteristics of Absidia sp. BA 16 was studied in comparison with two reference strains, Absidia corymbifera IFO 4009 and Absidia butleri (Gongronella butleri) IFO 8080. Though some morphological and cultural characteristics of the strain BA 16 were resembled to these reference strains, other different characteristics were also observed. Therefore Absidia sp. BA 16 might be a new species of the genus "Absidia".

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล และรองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ และให้แนวความคิดอย่างดียิ่งในการทำวิทยานิพนธ์นี้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร และรองศาตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และให้ความสะดวกในการใช้เครื่องแกสโครมาโตกราฟและขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสถาบันฯทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณท่านคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งเพื่อนๆและพี่ๆที่มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

ขอขอบคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และพี่อั๋บ ตลอดจนสมาชิกในครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ในการทำวิทยานิพนธ์นี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย . . . . . ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ . . . . . ฉ

กิตติกรรมประกาศ . . . . . ช

สารบัญรูปภาพ . . . . . ญ

สารบัญตาราง . . . . . ฏ

สารบัญรูปกราฟ . . . . . ฐ

คำย่อ . . . . . ฒ

บทที่

1. บทนำ 1

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 14

3. ผลการวิจัย 21

4. อภิปรายผลการวิจัยและสรุป 62

เอกสารอ้างอิง 68

ภาคผนวก 72

ประวัติผู้เขียน 74

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
๑.	สูตรโครงสร้างของเปอร์ไฮโดรไซคลอเพนทาโนฟีแนนทรีน	1
2.	สูตรโครงสร้างของ scymnol	1
3.	สูตรโครงสร้างของ 3α, 7α, 12α-trihydroxy-coprostanoic acid	2
4.	สูตรโครงสร้างของกรดโคลิก	2
5.	การสร้างกรดน้ำดีจากโคเลสเตอรอลและการเปลี่ยนรูปจากกรดน้ำดีเป็นเกลือน้ำดี.	3
6.	ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของกรดน้ำดี 2 ชนิดที่อยู่ในรูปไกลซีนคอนจูเกตและทอรีนคอนจูเกต คือ กรดไกลโคโคลิก และกรดทอโรโคลิก	4
7.	สูตรโครงสร้างกรดน้ำดีบางชนิด คือกรดดีโนดีออกซีโคลิก กรดโคลิก กรดดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิก	4
8.	การเปลี่ยนโครงสร้างของ compound-F 3 ไปเป็น triamcinolone โดย A. simplex	5
9.	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของกรดโคลิก โดยเชื้อ A. faecalis	6
10.	ปฏิกิริยาดีไฮดรอกซิเลชันของกรดโคลิกโดย E. coli.	6
11.	ปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันของกรดลิโทโคลิก โดย B. cereus และ E. coli	7
12.	ปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซีบนโมเลกุลของ LCA โดย F. equiseti M 41 และ C. blakesleeana ST 22	8
13.	ปฏิกิริยาการดัดนิวเคลียสของ LCA โดย A. simplex	9
14.	การเติมหมู่ไฮดรอกซีบน LCA โดย Absidia sp. BA 16.	12
15.	เชื้อ Absidia sp. BA 16 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA อายุ 2 วัน แสดงก้านชูสปอร์ อับสปอร์ และไรซอยด์ (x40)	60
16.	เชื้อ Absidia sp. BA 16 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA อายุ 3 วัน แสดงอับสปอร์ (x200).	60

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

17. เชื้อ Absidia Corymbifera IFO 4009 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA อายุ 3 วัน แสดงอับสปอร์และ สปอร์ (x200) 61

18. เชื้อ Absidia butleri (Gongronella butleri) IFO 8080 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA อายุ 3 วัน แสดงอับสปอร์และสปอร์ (x400) 61

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ผลของการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆต่อการเจริญของเชื้อ และการสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 เมื่อใช้โซเดียมไนเตรท ปริมาณ 15 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน 22

2. ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆต่อการเจริญของเชื้อ และการสร้าง 3α,15β-DHC โดย Absidia sp. BA 16 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 40 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน. 23

3. ผลของการผันแปรปริมาณของแป้งมันสำปะหลังและโซเดียมไนเตรทต่อการเจริญของเชื้อ และการสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 ที่อายุการหมัก 48 และ 72 ชม. 25

4. ผลของการผันแปรปริมาณของแป้งมันสำปะหลังและโซเดียมไนเตรทต่อการเจริญของเชื้อ และการสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 แสดงปริมาณของแหล่งอาหารที่เหลือหลังจากการหมัก เปรียบเทียบกับการเจริญและการสร้าง 3α,15β-DHC 27

5. ผลของการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆกันต่อการสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดยเซลระยะพักของ Absidia sp. BA 16 29

6. ลักษณะของเชื้อ Absidia sp. BA 16 เปรียบเทียบกับ A. Corymbifera IFO 4009 และ A. butleri (Gongronella butleri) IFO 8080 . . 59

สารบัญรูปกราฟ

กราฟรูปที่ หน้า

1. เปรียบเทียบปริมาณ 3α,15B-DHC ที่สร้างจาก LCA โดยเซลระยะพักของ Absidia sp. BA 16 เมื่อผันแปรปริมาณของไดออกเซน 30

2. เปรียบเทียบปริมาณ 3α,15β-DHC ที่สร้างจาก LCA โดยเซลระยะพักของ Absidia sp. BA 16 ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆกันโดยกำหนดค่าแอคติวิตี (activity) สูงสุดเป็นร้อยละ 100 32

3. รูปแบบการเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ 33

4. การเจริญของ Absidia sp. BA 16 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ เมื่อเชื้อมีอายุ 30 ชม. 34

5. รูปแบบการเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3α,15β-DHC ที่อุณหภูมิต่าง ๆกัน. 36

6. การเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3α,15β-DHC ที่อุณหภูมิต่าง ๆเมื่อเชื้อมีอายุ 54 ชม. . . 37

7. เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3α,15β-DHC ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เมื่อใช้หัวเชื้อซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 30°และ 45°ซ. เป็นหัวเชื้อ 39

8. เปรียบเทียบการสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดยเซลระยะพักของ Absidia sp. BA 16 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 40

9. รูปแบบการเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 6.0 7.0 8.0 และ 8.5 . . . 43

10. เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่พีเอช 6.0 7.0 8.0 และ 8.5 เมื่อเชื้อมีอายุ 90 ชม. 44

11. เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 และไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง และรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการหมักในการทดลองที่ไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง. 45

สารบัญรูปกราฟ(ต่อ)

กราฟรูปที่ หน้า

12. การสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 47

13. การสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง. 48

14. การสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง และเติม LCA ในชม. ที่ 56 ของการหมัก 50

15. การสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง โดยเติม LCA ร่วมกับไดออกเซนในชม. ที่ 56 ของการหมัก 52

16. การสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 โดยเติม LCA ร่วมกับไดออกเซนในชม. ที่ 56 ของการหมัก 53

17. การสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง และเติม LCA ร่วมกับไดออกเซนในชม. ที่ 56 เติม LCA อีกครั้งหนึ่งในชม. ที่ 72 ของการหมัก 55

18. การสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดย Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง เติม LCA ร่วมกับไดออกเซนในชม. ที่ 56 และเติม LCA อีก 2 ครั้ง ในชม. ที่ 72 และ 84 ของการหมัก 57

คำย่อ

LCA	= กรดลิโทโคลิก (lithocholic acid)
CA	= กรดโคลิก (cholic acid)
CDCA	= กรดคีโนดีออกซีโคลิก (chenodeoxycholic acid)
UDCA	= กรดอูโซดีออกซีโคลิก (ursodeoxycholic acid)
DCA	= กรดดีออกซีโคลิก (deoxycholic acid)
3α , 15β-DHC	= 3α , 15β dihydroxy-5β-cholanic acid
DMF	= ไดเมทิลฟอร์มามีด (dimethylformamide)
DMSO	= ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide)
HFIP	= เฮกซะฟลูออโรไอโซโพรพานอล (1,1,1,3,3-hexafluoro -2- propanol)
TFA	= กรดไตรฟลูออโรอะซีติก แอนไฮดรายด์ (trifluoroacetic acid anhydride)
°ซ.	= องศาเซลเซียส
มล.	= มิลลิลิตร
ชม.	= ชั่วโมง
มก.	= มิลลิกรัม
กก.	= กิโลกรัม
ซม.	= เซนติเมตร
ม.	= เมตร
น.น.	= น้ำหนัก