บทที่ 4

บทวิจารณ์และสรุป

4.1 สภาวะการผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก Escherichia coli HD-1

จากการวิเคราะห์เอกสารซึ่งมีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (ตารางที่ 1) พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส แต่สำหรับเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งสามารถออกซิไดส์หมู่ แอลฟา-ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่ง 7 ให้เป็นคีโตกรุ๊ป ส่วนใหญ่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม Escherichia coli (Macdonald และคณะ, 1973; 1974; 1975b) ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จากสายพันธุ์ Escherichia coli HD-1 พบว่า E. coli สายพันธุ์ที่ศึกษาสามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตร LB ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ ทริปโตน (Tryptone) และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจน พบว่า ระยะเวลาการเจริญสูงสุดของ E. coli คือ 7 ชั่วโมง แต่เมื่อเจริญไปถึง 10 ชั่วโมง แล้ว จำนวนเซลล์มีชีวิตจะเริ่มลดลง (3-4 เท่าของเซลล์ที่นับได้ในระยะการเจริญคงที่) ซึ่งอาจเป็นเพราะมีการสร้างสารผลิตภัณฑ์บางชนิดซึ่งมีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์โดยตรง แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (ประมาณ 4.5 หน่วยต่อมก.โปรตีน เมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีเป็นสับสเตรท) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลย แสดงให้เห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะยังคงเสถียร ถึงแม้เซลล์จะตายไปแล้วก็ตาม (รูปที่ 5) เอนไซม์ที่สกัดแยกได้จากเซลล์ E. coli สายพันธุ์ที่ศึกษานี้สามารถเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่นของสับสเตรทกรดคีโนดีออกซีโคลิก (3α. 7α-dihydroxy-5β-cholanic acid) ได้ดีกว่าเมื่อใช้กรดลิโทโคลิก (3α-hydroxy-5β-cholanic acid) ประมาณ 30-40 เท่า Macdonald รายงานว่า E. coli B ไม่สามารถใช้กรดน้ำดีซึ่งมีกลุ่มไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 และ 12-แอลฟา ได้ แต่ส่วนใหญ่จะใช้กรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 7-แอลฟาได้

จากการศึกษาชนิดของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสใน E. coli โดยการติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งแยกด้วยวิธีโพลีอะไครล์ละไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส และย้อมสีด้วยปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรท (รูปที่ 6) พบว่ามีแถบสีที่คาดว่าเกิดจากแอค-ติวิตีของเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ R_f 0.58-0.60 และ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ R_f 0.34-0.36 และยังพบแอคติวิตีของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสชนิดอื่นที่สามารถใช้เอทธานอลเป็นสับสเตรท ซึ่งอาจเป็นแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และหรือเอนไซม์ NAD oxido-reductase (R_f ประมาณ 0.34-0.36) อีกด้วย ผลการทดลองวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส โดยการชะเอนไซม์ออกจากแท่งโพลีอะไครล์ละไมด์เจลเป็นส่วน ๆ ยืนยันว่าเอนไซม์ที่ตำแหน่ง R_f 0.34-0.36 สามารถใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรทได้ แต่เอนไซม์ที่ตำแหน่ง R_f 0.58-0.60 ไม่สามารถใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรทได้เลย ในขณะที่เอนไซม์ที่ตำแหน่ง R_f 0.58-0.60 นี้สามารถใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรทและให้แอคติวิตีสูงกว่าเอนไซม์ที่ตำแหน่ง R_f 0.34-0.36 เกือบ 30 เท่า จึงเชื่อว่า E. coli สายพันธุ์ที่ใช้นี้สามารถผลิตเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสได้ถึงแม้ว่าจะมีแอคติวิตีค่อนข้างต่ำก็ตาม Machida (1953) รายงานว่า E. coli บางสายพันธุ์สามารถผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก จากการเมตาบอไลซ์กรดดีไฮโดรโคลิกได้ แม้ว่าจะใช้เวลานานถึง 40 วัน

จุลินทรีย์บางชนิด เช่น Clostridium absonum ATCC 27555 (Macdonald และคณะ, 1983) สามารถผลิตเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส โดยอาศัยการเหนี่ยวนำด้วยสารประกอบจำพวกสเตียรอยด์ได้ ในขณะที่บางชนิดก็สามารถสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสได้โดยไม่ถูกเหนี่ยวนำ เช่น E. coli B (Macdonald และคณะ, 1973) จากการทดลองเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ E. coli ด้วยกรดน้ำดี 2 ชนิดคือ กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดลิโทโคลิก ในอาหารสูตร LB พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดคือ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส และ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้แอคติวิตสูงขึ้นได้ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ถูกสร้างโดยเซลล์ E. coli

ตลอดเวลา เป็น constitutive enzyme ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบของการผลิตเอนไซม์ที่พบในรูป 8 ซึ่งค่าเอนไซม์แอคติวิตีที่วัดได้แปรผันตามการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้อาจมีเหตุผลอย่างอื่นที่เอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำได้ เช่น สภาวะที่ใช้เหนี่ยวนำยังไม่เหมาะสม อาจเป็นไปได้ว่าในอาหารสูตร LB มีสารบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเหนี่ยวนำแอคติวิตีของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสใน E. coli อย่างไรก็ตาม กรดน้ำดีทั้ง 2 ชนิด (กรดคีโนดีออกซีโคลิก และลิโทโคลิก) ที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ E. coli ซึ่งแสดงในรูปของความขุ่น และโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ (รูปที่ 7) ตลอดจนการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสอีกด้วย

โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 2 ทิศทาง คือปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น และปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) โดยขึ้นกับตัวแปรต่าง ๆ หลายชนิด ที่สำคัญคือ พีเอช (Hiroshi, 1976) ดังนั้นจึงได้ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก E. coli พีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ต่อการเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น เมื่อมี NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ อยู่ในช่วงที่เป็นด่างค่อนข้างสูง คือประมาณ 9.5-10.0 (รูปที่ 9) มีรายงานว่า พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่นของเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่พบในจุลินทรีย์โดยทั่วไป อยู่ในช่วงพีเอช 9.0-10.5 (Macdonald และคณะ 1973; 1975; Hylemon และคณะ, 1975) สำหรับปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) เมื่อมี NADH เป็นโคเอนไซม์ ผลจากการทดลองพบว่า พีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จะมีค่าตรงข้ามกับพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น คืออยู่ที่ พีเอช 5 (พีเอชด้านที่เป็นกรด) Aries และ Hill (1976) รายงานว่า พีเอชที่เหมาะสมกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ Clostridium welchii CC 377 อยู่ในช่วงพีเอช 6.5-7.0 จะเห็นได้ว่าที่พีเอชสูงกว่า 5.0 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสเมื่อวัดในทิศทางไฮโดรจีเนชั่น (NADH เป็นโคเอนไซม์) จะลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว พีเอช 7.0 หรือมากกว่า แอคติวิตีเอนไซม์จะลดลงเหลือต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ในทำนองเดียวกันเมื่อพิจารณาผลกระทบของพีเอชต่อการเร่งปฏิกิริยาในทิศทางดีไฮโดรจีเนชั่นก็จะเห็นได้ว่า ที่พีเอชต่ำกว่า 7.0 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเมื่อมี NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ก็จะลดลงเหลือ

ต่ำมากเช่นเดียวกัน (พีเอช 6.0 แอคติวิตีเอนไซม์เหลือ 30 เปอร์เซ็นต์) มีรายงานว่า NADH เป็นสารประกอบที่ไม่เสถียรในสภาพที่พีเอชเป็นด่าง ในทางกลับกัน NAD^+ ก็เป็นสารประกอบที่ไม่เสถียรในพีเอชที่เป็นกรด (Talalay และ Marcus, 1956) ดังนั้นจึงเชื่อว่าผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส น่าจะเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับกันระหว่างโคเอนไซม์ (NAD^+ หรือ NADH) กับเอนไซม์มากกว่าอิทธิพลของสับสเตรทต่อเอนไซม์แต่เพียงอย่างเดียว

เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก E. coli มีความเสถียรต่ำ แม้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ก็จะสูญเสียแอคติวิตีไปเกือบหมดในเวลาประมาณ 40 วัน สารละลายที่มีกลีเซอรอลสูงจะช่วงเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ได้ดี เชื่อว่ากลีเซอรอลช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ได้โดยไปล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน เพิ่มความหนืดให้กับสารละลายจึงลดการเปลี่ยนแปลงโครงร่าง (conformation) ของโปรตีน อีกประการหนึ่งการมีกลีเซอรอลความเข้มข้นสูงจะไปช่วยลดการละลายของออกซิเจนในสารละลาย ซึ่งเป็นการหลีกเลี่ยงปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอีกด้วย Talalay, (1964) พบว่ากลีเซอรอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ จะช่วยรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก P. testosteroni ได้ดี

Macdonald และคณะ (1973; 1974) รายงานว่าเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจากสายพันธุ์ E. coli B จะสูญเสียแอคติวิตีกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน และสูญเสียแอคติวิตีไปเกือบหมดทันทีที่เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส

เมื่อศึกษาความเสถียรของเซลล์ และเอนไซม์ ภายในเซลล์ของ E. coli ที่อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 พบว่าที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีความเสถียรมากกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตได้จากการติดตามวัดค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (ปฏิกิริยาทั้ง 2 ทิศทาง) เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของสารละลายที่ใช้เก็บเซลล์ E. coli ที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่าสารละลายนอร์มัลซาไลน์จะรักษาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้ดีกว่าสารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 เล็กน้อย ความเสถียรของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาทั้ง 2 ทิศทางในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ก็จะสูงกว่าใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ด้วย ที่เป็นเช่นนี้เพราะสารละลายนอร์มัลซาไลน์

มีคุณสมบัติเป็น isotonic solution จึงรักษาสภาพของเซลล์ไว้ได้ดีด้วยปริมาณโซเดียมไอออนที่เหมาะสมในการรักษาสมดุลย์ที่ผนังเซลล์ จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ (2529) รายงานว่าการเก็บรักษาเซลล์ E. coli ในนอร์มัลซาไลน์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นสภาะที่เซลล์เสถียรที่สุด

4.2 การศึกษาสภาวะของการผลิต และคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก Pseudomonas testosteroni (ATCC 11996)

แม้ว่าจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ผลิตเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสได้ แต่จุลินทรีย์เหล่านั้นก็จะผลิตเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสชนิดอื่นควบคู่ไปด้วย เชื้อ Pseudomonas testosteroni ATCC 11996 เป็นเชื้อแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่มีความจำเพาะต่อหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของสารประกอบจำพวกสเตียรอยด์ (3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส และ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (Talalay และ Dobson (1953)) นอกจากนี้ยังมี 3 คีโต-สเตียรอยด์ไอโซเมอเรสอีกตัวหนึ่ง เมื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จากสายพันธุ์ Pseudomonas testosteroni ATCC 11996 ที่สั่งซื้อจากบริษัท American Type Culuture Collection ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่งที่ 3 ได้สูง ผลการวิจัยให้ผลที่น่าสนใจดังต่อไปนี้

อาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นอาหารที่บริษัท American Type Culture Collection เสนอแนะให้ใช้เลี้ยง P. testosteroni ATCC 11996 (A (ATCC 15th ed., 1982) เป็นอาหารที่เหมาะกับการเจริญเซลล์ P. testosteroni ให้ได้จำนวนเซลล์มาก แต่ไม่เหมาะกับการผลิตเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อ P. testosteroni เจริญในอาหารสูตร NB ผสมสารสกัดจากยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ จะไม่สามารถเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์เอนไซม์เพิ่มมากขึ้น โดยใช้อนุพันธ์ของกรดน้ำดีและสารจำพวกสเตียรอยด์ เช่น เทสโทสเทอโรน หรือโซเดียมโคเลทได้

เมื่อศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P. testosteroni ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay ซึ่งมีแอมโมเนียมเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) และ 1 เปอร์เซ็นต์ สารสกัด

จากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน พบว่าการเจริญต่ำกว่า เมื่อเจริญเชื้อ P. testosteroni ในอาหารสูตร NB ผสม 2 เปอร์เซ็นต์สารสกัดจากยีสต์ ซึ่งมีสารสกัดจากเนื้อวัว (beef extract) และโปรตีนไฮโดรไลเสตเปบโตน (peptone) เป็นสารต้นตอไนโตรเจนอินทรีย์ (organic nitrogen)

เมื่อเสริมเทสโทสเทอโรน หรือโซเดียมโคเลท (0.5 กรัมต่อลิตร) ลงในอาหารสูตร Marcus และ Talalay (รูปที่ 20, 21 และ 22) พบว่า P. testosteroni สามารถเจริญได้ดีกว่าในอาหารสูตร Marcus และ Talalay อย่างเดียวเพียงเล็กน้อย แต่จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสเพิ่มสูงขึ้น 8-9 เท่า ทั้งในปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น และปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) นอกจากนี้โซเดียมโคเลทและเทสโทสเทอโรนยังเหนี่ยวนำแอคติวิตีของเอนไซม์ เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนชั่นได้ประมาณ 6 เท่าด้วย สำหรับในปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสต่อสับสเตรท กรดดีไฮโดรโคลิก (หมู่คีโต 3 หมู่ที่ตำแหน่ง 3, 7, 12) เมื่อมี NADH เป็นโคเอนไซม์จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าในปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสภาวะที่ใช้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ (พีเอช, อุณหภูมิ ฯลฯ) ที่ใช้กับปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น มีความเหมาะสมมากกว่าปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น หรืออาจเป็นไปได้ว่าในปฏิกิริยาย้อนกลับ กรดดีไฮโดรโคลิกสามารถเป็นสับสเตรทได้ทั้งเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส และเบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ในปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) ได้พร้อมกัน (Marcus และ Talalay, 1956; Talalay และ Marcus, 1956)

จากผลการศึกษาที่พบว่า โซเดียมโคเลทซึ่งเป็นกรดน้ำดีที่มีคาร์บอน 24 อะตอม และมีโครงสร้างใกล้เคียงกับเทสโทสเทอโรน สามารถเหนี่ยวนำแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จึงได้ทำการทดลองใช้กรดดีไฮโดรโคลิก ซึ่งก็เป็นกรดน้ำดีที่คาร์บอน 24 อะตอม เช่นเดียวกับโซเดียมโคเลท ซ้ำเป็นสารหาง่ายและราคาถูก และมีผู้รายงานว่าสามารถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกทางชีวภาพได้ (Sawada และคณะ, 1980; 1981a; 1981b) เป็นสารเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส พบว่าการเสริมด้วย 0.5 กรัมต่อลิตร กรดดีไฮโดรโคลิกตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยง และหลังจากเลี้ยงเชื้อ P. testosteroni ไปแล้ว 7 ชั่วโมง ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay กรดดีไฮโดรโคลิกสามารถเหนี่ยวนำแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสได้เช่นเดียวกับเทสโทสเทอโรนและโซเดียมโคเลทในอาหาร

สูตร Marcus และ Talalay แต่จะให้แอคติวิตีสูงที่สุดเป็น 10 เท่า ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เสริมแหล่งคาร์บอน แต่การเสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกหลังจากเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 7 ชั่วโมง จะให้แอคติวิตีเอนไซม์สูงสุดช้าไปกว่าการเติมกรดดีไฮโดรโคลิกตั้งแต่เริ่มต้นนานถึง 4 ชั่วโมง ในการวิจัยนี้จึงเลือกเลี้ยง P. testosteroni ในอาหารสูตร Marcus และ Talalay ที่เสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก 0.5 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่จะใช้ศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

เมื่อทำการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก P. testosteroni พบว่าเมื่อใช้กรดน้ำดีจำพวกที่มีหมู่ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซิล (กรดลิโทโคลิก) เป็นสับสเตรทจะตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำกว่าเมื่อใช้กรดน้ำดีจำพวกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลตำแหน่ง 3 และ 7 แอลฟา (กรดคีโนดีออกซีโคลิก) เป็นสับสเตรท ประมาณ 2 เท่า การใช้กรดดีออกซีโคลิก ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 แอลฟา และ 12 แอลฟา จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำกว่าเมื่อใช้กรดลิโทโคลิกเล็กน้อย เช่นเดียวกันกับเมื่อใช้กรดโคลิกหรือโซเดียมโคเลทก็จะให้แอคติวิตีต่ำกว่าเมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเล็กน้อยเช่นกัน จึงน่าจะเป็นได้ว่า P. testosteroni สามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งมีแอคติวิตีของ 3 แอลฟา และ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสแต่ไม่น่าจะมีแอคติวิตีของ 12 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

เมื่อทำการแยกชนิดของโปรตีนด้วยสนามไฟฟ้า ในแท่งโพลีอะไครัลละไมด์เจล ที่มีอะไครัลละไมด์อยู่ 28 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 8.3 และย้อมสีแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสด้วยไนโตรบลูเตตราโซเลียม และฟีนาซีนเมทโธซัลเฟต เมื่อใช้สับสเตรทต่างชนิด คือ กรดลิโทโคลิก, ดีออกซีโคลิก, คีโนดีออกซีโคลิก, โคลิก, เทสโทสเทอโรน และเอทธานอล (รูปที่ 18) จะพบแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสบนแท่งเจล 3 ชนิด ซึ่งเชื่อว่าเป็นแถบของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (R_f 0.36), 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (R_f 0.48) และ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (R_f 0.28) แถบสีที่เกิดจากแอคติวิตีของ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส (R_f 0.28) รูปแบบและตำแหน่งของเอนไซม์จาก P. testosteroni ที่แยกได้ด้วยเทคนิคของโพลีอะไครละไมด์เจลนี้จะสอดคล้องกับรายงานของ Roe และ Kaplan (1969) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่แยกได้จาก P. testosteroni จะ

เคลื่อนที่บนแท่งโพลีอะไครล์ละไมด์เจลได้ช้ากว่า 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อแยกในสนามไฟฟ้าที่พีเอช 8.3 เช่นเดียวกัน

เป็นที่น่าสังเกตว่า ลักษณะแถบสีบนแท่งเจลที่เกิดจากแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ค่อนข้างกว้าง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส มี 2 ไอโซไซม์ (isozyme) ซึ่งมีค่าไอโซอีเลคทริคพีเอช (pI) ที่ 5.8 และ 6.2 (Skalhegg, 1974) แถบสีที่เกิดจากแอคติวิตีของ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก P. testosteroni มีตำแหน่งบนแท่งเจลสอดคล้องกับเอนไซม์ที่ได้จาก E. coli คือแถบสีม่วง 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่า แถบสีของ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อแยกด้วยเทคนิคเดียวกันที่สภาวะเดียวกัน

จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของแอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก P. testosteroni ในปฏิกิริยาเร่งไปข้างหน้า (ดีไฮโดรจีเนชั่น) พบว่าพีเอชซึ่งเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เมื่อใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรทมีค่า 10.5 ในขณะที่พีเอช 11 เป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก P. testosteroni เมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิก เป็นสับสเตรท

จากการศึกษาของ Macdonald และคณะ (1977) รายงานว่า พีเอชที่เหมาะสมกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จาก Eubacterium lentum ATCC 25559 แม้ว่าจะวิเคราะห์ด้วยสับสเตรทต่างชนิดกัน จะมีค่าเท่ากัน (พีเอช 10.5) ซึ่งก็เป็นการยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่า P. testosteroni ATCC 11996 สามารถผลิตเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ควบคู่ไปกับ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสได้

สำหรับพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก P. testosteroni ในปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) ของ P. testosteroni อยู่ที่ 5.0 ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ ซึ่งตรงกับค่าพีเอชเหมาะสมกับการทำงานในปฏิกิริยาย้อนกลับ (ดีไฮโดรจีเนชั่น) ของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก E. coli เมื่อใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรท ดังนั้นไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮ-

โครจีเนสชนิดใด ค่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสในการเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) จะอยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกรดมากกว่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาไปข้างหน้า (ดีไฮโดรจีเนชั่น) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับข้อสรุปและรายงานของ Aries และ Hill (1976)

เมื่อทำการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จาก P. testosteroni ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส (รูปที่ 26, 27 และ 28) พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงจนเกือบหมด ในเวลาเพียง 25 วัน เชื่อว่าเป็นเพราะความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้ต่ำเกินไป จึงไม่สามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ Marcus และ Talalay (1956) รายงานว่าเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจะสูญเสียแอคติวิตีไปหมดทันทีที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง และการทำให้เอนไซม์แห้งเป็นผงด้วยวิธีระเหยที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (lyophilization) ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดในเวลา 2-3 สัปดาห์ เมื่อเก็บในทริส-บัฟเฟอร์ พีเอช 8.2 ที่มี 2 เปอร์เซ็นต์บิวทิลแอลกอฮอล์ (Squire และคณะ, 1964; Delin และคณะ, 1964) Talalay (1964) รายงานว่าเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จะมีความเสถียรสูงมากเมื่อเก็บรักษาใน 50 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล เอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสหลายชนิดสามารถเพิ่มความเสถียรได้ โดยใช้ EDTA และไดไทโอทรีริทอล (dithiothreitol) ซึ่งเชื่อว่ามีผลในการกำจัดอิทธิพลของโลหะหนักและป้องกันซัลไฮดริลกรุ๊ปที่บนโมเลกุลของเอนไซม์โดยเฉพาะที่ตำแหน่งเร่ง (active site) (Skalhegg, 1974b)

เมื่อศึกษาความเสถียรของเซลล์และเอนไซม์ภายในเซลล์ของ P. testosteroni ที่อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 พบว่าที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีความเสถียรสูงกว่าที่อุณหภูมิ-25 องศาเซลเซียส ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษานาน 45 วัน ซึ่งผลการทดลองนี้คล้าย-คลึงกับการศึกษาความเสถียรของเซลล์ E. coli (ข้อ 3.6) เมื่อพิจารณาถึงชนิดของสารละลายที่เหมาะสมในการใช้เก็บเซลล์ที่อุณหภูมิเดียวกัน รูปแบบของความเสถียรของเซลล์ P. testos-teroni ในแง่ของจำนวนเซลล์มีชีวิตและแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อเก็บในสารละลายนอร์มัลซาไลน์

จะมีรูปแบบคล้ายกับเมื่อเก็บใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

ผลการศึกษาเกี่ยวกับพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 3 แอลฟา- และ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่า หากต้องการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดยใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรทในปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชั่น) โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้แล้ว ค่าพีเอชที่เหมาะสมกับการผลิตกรดน้ำดีชนิดนี้น่าจะอยู่ที่พีเอช 5.0 ของสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ แต่อย่างไรก็ตามพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ อาจไม่ใช่พีเอชที่เหมาะสมต่อการรักษาความเสถียรของแอคติวิตีของเอนไซม์ก็ได้ เอนไซม์ แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก P. testosteroni และ E. coli มีความเสถียรที่สุดใน 0.25 โมลาร์อะซีเตทบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจากเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด จะมีความเสถียรในอะซีเตทบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 มากกว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอนุมูลอะซีเตทสามารถช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ได้ดีกว่าอนุมูลฟอสเฟต Delin และคณะ (1964) รายงานว่าเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก P. testosteroni จะมีความเสถียรในช่วงพีเอช 6-10 และแอคติวิตีจะลดลงเหลือเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 30 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 5.5 เอนไซม์ 3 เบต้า-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จะไม่เสถียรในช่วงพีเอชที่เป็นด่าง (Talalay และ Dobson, 1953) เอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก E. coli จะมีความเสถียรสูงในช่วงพีเอช 5-8 (Macdonald และคณะ, 1973)

เมื่อสรุปผลลากข้อมูลข้างต้น จึงได้เลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปสับสเตรทกรดดีไฮโดรโคลิกให้เป็นกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดยใช้สารละลาย 0.25 โมลาร์อะซีเตทบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 แม้ว่าการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอช 6.0 นี้ จะให้ค่าผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาต่ำกว่าสภาวะที่ใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ก็ตาม

ข้อจำกัดของการตรึงเซลล์ด้วยแคปปาคาร์ราจีแนนคือ อุณหภูมิสูงสุดสำหรับการแข็งตัวของเจล (gelling temperature) จะอยู่ระหว่าง 50-55 องศาเซลเซียส ขึ้นกับชนิดของคาร์ราจีแนนที่ใช้ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เซลล์ E. coli จะเสถียรมากกว่า P. testosteroni (เซลล์มีชีวิตเหลือประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ E. coli เมื่อถูกทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในขณะที่เซลล์ P. testosteroni ลดลงจน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกือบหาไม่พบ) เอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ E. coli เมื่ออยู่ในเซลล์มีความเสถียรสูงกว่าเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ P. testosteroni มาก (เอนไซม์จาก E. coli ยังมีแอคติวิตีสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเซลล์ไว้ ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง)

โปแตสเซียมคลอไรด์มีผลต่อความแข็งและเหนียว (strength) ของเม็ดเจลแคปปา-คาร์ราจีแนน (Tosa และคณะ, 1979) เมื่อศึกษาผลของโปแตสเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสจาก E. coli และ P. testosteroni โดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิก และโซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรท ตามลำดับ พบว่าโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ ไม่มีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดเลย จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกด้วยเซลล์ E. coli และ P. testosteroni

4.3 การศึกษารูปแบบและสภาวะการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกด้วยเซลล์ E. coli และเซลล์ P. testosteroni ตรึงเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ

แม้ว่าการตรึงเซลล์มีด้วยกันหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์มีชีวิตกันมากที่สุด คือ วิธีการกักขัง (entrapment) เซลล์ หรือการจำกัดเซลล์ในพื้นที่จำกัด โดยเลือกชนิดของสารที่นำมาใช้ตรึง (matrix) ให้เหมาะสม สารเหล่านี้เมื่อหุ้มเซลล์แล้วจะมีคุณสมบัติยอมให้สารตั้งต้น (สับสเตรท) และผลิตภัณฑ์ผ่านเข้าออกได้ ในขณะเดียวกันก็ต้องสามารถขังเซลล์ไว้ภายในได้ด้วยสารที่นิยมใช้ในการกักขังเซลล์ได้แก่ แคปปาคาร์ราจีแนน (K-carragenan), โซเดียมแอลจิเนต (sodium algenate), เยลาติน (gelatin), วุ้น (agar) เป็นต้น (Tosa และคณะ, 1979)

ในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความเป็นไปได้และรูปแบบการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดดีไฮโดรโคลิก โดยใช้เซลล์ E. coli, P. testosteroni หรือเซลล์ร่วมของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดกักขังใน 4 เปอร์เซ็นต์ของแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น (2.5 เปอร์เซ็นต์ แคปปาคาร์ราจีแนนกับวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์) (น้ำหนักต่อปริมาตร), แอล-จิเนต (1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกและอนุพันธ์กรดน้ำดีชนิดอื่น ๆ ด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปสับสเตรท (กรดดีไฮโดรโคลิก) โดยเซลล์ E. coli อิสระ เทียบกับเซลล์ E. coli ตรึงแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น จะเห็นได้ว่า เซลล์ E. coli อิสระ (ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) เมื่อมีโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์ สามารถเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกให้เป็นผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้ (ผลการทดลองข้อ 3.18) Sawada และคณะ (1980) ได้เสนอว่า วิถีการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดย Brevibacterium fuscum DC 33 และ Lactobacillus xylosus DC 1115 จะต้องผ่านตัวกลางเป็นกรด 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิกเสียก่อน ดังปฏิกิริยา

$$\text{กรดดีไฮโดรโคลิก} \xrightarrow{\text{I}} \text{กรด 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิก} \underset{\text{II}'}{\overset{\text{II}}{\rightleftharpoons}} \text{กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก}$$

จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า มีการสะสมสารตัวกลางของวิถีการสังเคราะห์เป็นกรด 3,12-ไดคีโตโคลิก มากกว่าที่จะเป็นกรด 7,12-ไดคีโตโคลิก ซึ่งน่าจะเป็นไปได้เพราะเชื่อว่าแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 7 สูงกว่าตำแหน่งที่ 3 มาก (ข้อ 3.1) (ประมาณ 30-40 เท่า) ดังนั้นกรดดีไฮโดรโคลิกจึงถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลางกรด 3,12-ไดคีโตโคลิกได้รวดเร็วและมีการสะสมของสารตัวกลางชนิดนี้ อัตราเร็วของปฏิกิริยาการสังเคราะห์จึงถูกจำกัดด้วยระดับของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 3 ดังจะเห็นได้จากว่า เมื่อเวลาของการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มมากขึ้นระดับของสารตัวกลางกรด 3,12-ไดคีโตโคลิกจะลดลงควบคู่ไปกับการค่อย ๆ เพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจนคงที่ในเวลา 30 ชั่วโมง (แปรผันเป็นอัตราส่วนผกผันกับปริมาณสารตัวกลาง) การเพิ่มปริมาณเซลล์ (จาก 5 เปอร์เซ็นต์เซลล์เป็น 10 เปอร์เซ็นต์เซลล์) ในปฏิกิริยาไม่มีผลเพิ่มปริมาณสารผลิตภัณฑ์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ต่อสารมาตรฐานเทสโทสเทอโรน) แต่ดูเหมือนว่าจะทำให้ช่วงเวลาของการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกสูงสุดจาก 30 ชั่วโมงลงมาเหลือเพียง 18-20 ชั่วโมง และการลดลงของปริมาณสารตัวกลางกรด 3,12-ไดคีโตโคลิกก็เกิดขึ้นด้วยอัตราเร็วสูงกว่า (รูปที่ 40) ซึ่งเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงรูปกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจำเป็นต้องผ่านสารตัวกลางกรด 3,12-ไดคีโตโคลิก หลังจากนั้นจึงเกิดสมดุลย์ระหว่างการเปลี่ยนสารดังกล่าวไปเป็นผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่สมบูรณ์ โดยสังเกตได้จากค่าคงที่ของผลิตภัณฑ์หลังจากมีการสังเคราะห์

สูงสุดแล้วดังปฏิกิริยา

$$\text{กรดดีไฮโดรโคลิก} \xrightarrow{I} \text{กรด 3,12-ไดคีโตโคลิก} \underset{II'}{\overset{II}{\rightleftharpoons}} \text{กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก}$$

ผลการทดลองที่พบว่ามีกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกเกิดขึ้นในปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกโดยใช้เซลล์ E. coli ได้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการสนับสนุนข้อเสนอที่ว่า เซลล์ E. coli สายพันธุ์ที่ใช้นี้สามารถผลิตเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ควบคู่ไปกับการผลิตเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

เซลล์ E. coli ที่ถูกตรึงด้วย แคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น (4 เปอร์เซ็นต์) เมื่อมีความเข้มข้นของเซลล์ในปฏิกิริยาเป็น 5, 10 และ 20 เปอร์เซนต์เซลล์ จะให้ผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกต่ำมาก แม้เมื่อใช้เซลล์สูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ก็ยังคงให้ผลิตภัณฑ์ต่ำกว่าใช้เซลล์อิสระถึง 3 เท่า อย่างไรก็ตามจากวิถีการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก เชื่อว่ามีการสังเคราะห์และสะสมของสารตัวกลางกรด 3,12-ไดคีโตโคลิกก่อนที่จะมีการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเช่นกัน

การที่เซลล์ E. coli ตรึงแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้ต่ำ เชื่อว่าเป็นผลเนื่องจากวิธีการตรึงซึ่งจำเป็นต้องหลอมเหลวเจลแล้วผสมกับเซลล์ที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะทำให้เย็นเพื่อสร้างเม็ดเจล จากผลการทดลองเบื้องต้น (ข้อ 3.16) ซึ่งพบว่าเซลล์ E. coli มีชีวิตจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อให้ความร้อน 50 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาอันสั้น ถึงแม้ว่าจะยังพบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสคงเหลืออยู่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของแอคติวิตีเริ่มต้นก็ตาม แต่เซลล์ที่ตายแล้วย่อมสูญเสียคุณสมบัติของการนำเข้าของสับสเตรท (กรดดีไฮโดรโคลิก) และ/หรือโคเอนไซม์ NADH ผลจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นเกิดได้น้อย แต่จะสังเกตเห็นว่าในการใช้เซลล์ E. coli ตรึงแทนเซลล์ E. coli อิสระจะทำให้ผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ถูกสังเคราะห์ได้สูงสุดในช่วงเวลาเพียงประมาณ 5-8 ชั่วโมงเท่านั้น

นอกจากผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และกรด 3,12-ไดคีโตโคลิกที่ถูกสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิก ยังพบผลิตภัณฑ์ข้างเคียงของกรดน้ำดี ซึ่งเมื่อเกิดขึ้นแล้วจะมีตำแหน่งบนโครมาโตแกรมและเวลาซึ่งอยู่ในคอลัมน์ที่เดียวกับตำแหน่งซึ่งตรวจพบกรดดีไฮโดรโคลิก (พบทั้งในปฏิกิริยาของเซลล์ E. coli อิสระ และเซลล์ E. coli ตรึง)

แต่ในการวิจัยมิได้ทำการติดตามศึกษารายละเอียดของสารประกอบชนิดนี้แต่อย่างใด เหตุผลอีกประการของการเกิดผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกต่ำ เมื่อตรึงเซลล์ E. coli ด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้นอาจเนื่องมาจากปริมาณของสับสเตรท (กรดคีไฮโดรโคลิก) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลค่อนข้างใหญ่ และละลายในน้ำได้น้อย จึงถูกจำกัดปริมาณที่นำเข้าสู่เซลล์อันเป็นผลเนื่องจากการเข้าออกของสับสเตรทรวมทั้งผลิตภัณฑ์ผ่านรูพรุนของผิวเจล (Larrson และคณะ, 1979) จะสังเกตได้จากการเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์ในสารละลายจะไม่แปรผันตามปริมาณของเซลล์ที่ใช้มากนัก

การสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกด้วยเซลล์ E. coli ตรึงแอลจิเนต (1 เปอร์เซ็นต์) เมื่อมีแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ แทนโปแตสเซียมคลอไรด์ จะเกิดขึ้นได้เร็วและให้ปริมาณผลิตภัณฑ์กรดน้ำดีที่เป็นสารตัวกลาง กรด 3,12-ไดคีโตโคลิก และกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกสูงกว่าเมื่อใช้เซลล์ E. coli ตรึงแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น ปริมาณการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดน้ำดีสูงสุด จะแปรผันโดยกลับกับปริมาณเซลล์ที่ใช้ แต่ช่วงเวลาของการเกิดผลิตภัณฑ์สูงสุดจะสั้นมากขึ้น เมื่อจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้น การมี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ ไม่มีผลเพิ่มปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกมากนัก (ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกต่อสารมาตรฐานเทสโทสเทอโรน) แต่จะเพิ่มระดับของสารตัวกลางกรด 3,12-ไดคีโตโคลิกขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์กรด 3,12-ไดคีโตโคลิกต่อสารมาตรฐานเทสโทสเทอโรน) ซึ่งก็ยังมีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้เซลล์ E. coli อิสระปริมาณเท่ากันในการเร่งปฏิกิริยา จะเห็นได้ว่าการตรึงเซลล์ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์แอลจิเนตจะเป็นสภาวะซึ่งรุนแรงน้อยกว่าด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน ซึ่งไม่น่ามีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ ดังนั้นเหตุผลของการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ด้วยเซลล์ E. coli ตรึงแอลจิเนตได้ต่ำ ส่วนใหญ่น่าจะเป็นผลเนื่องมาจากความจำกัดของการเข้าออกของสับสเตรทกรดคีไฮโดรโคลิกผ่านรูพรุนของเจล จึงทำให้เซลล์สามารถสร้างผลิตภัณฑ์น้อยลง และตัวแปรนี้น่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนรูปสับสเตรทโดยตรงมากกว่าตัวแปรอื่น ๆ

เซลล์ E. coli อิสระเมื่อมีแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ สามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้สูงกว่าเมื่อให้เกิดปฏิกิริยาโดยมีโปแตสเซียมคลอไรด์หลายเท่า เชื่อว่าแคลเซียมคลอไรด์สามารถสนับสนุนการนำกรดน้ำดีเข้าสู่เซลล์ โดยกระตุ้นผ่านเอนไซม์ Ca^{2+}, Mg^{2+} - ATP_{ase} หรือเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์พลังงานชนิดอื่นซึ่งมีผลต่อ

การนำเข้าของสับสเตรทกรดดีไฮโดรโคลิกโดยตรง Burman และคณะ (1972) รายงานว่า วงเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของเซลล์ E. coli จะปกป้องการเข้าออกอย่างอิสระของสารจำพวกโคเลท ดังนั้นกระบวนการนำสารในกลุ่มโคเลทเข้าเซลล์จึงต้องขึ้นกับพลังงาน ซึ่งหมายถึงขบวนการ active transport อย่างไรก็ตามผลการทดลองเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกโดยใช้เซลล์ E. coli อิสระ หรือเซลล์ E. coli ตรึงรูปก็ยังยืนยันขั้นตอนของวิถีการสังเคราะห์ว่าจำเป็นต้องผ่านสารตัวกลางกรด 3,12-ไดคีโตโคลิกเสียก่อน

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกและผลิตภัณฑ์กรดน้ำดีโดยเซลล์ P. testosteroni อิสระพบว่า P. testosteroni สามารถสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกได้ใกล้เคียงกับการสังเคราะห์กรดชนิดเดียวกันของ E. coli (75 เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกต่อสารมาตรฐานเทสโทสเทอโรน) เมื่อใช้เซลล์ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่จะสูงกว่า E. coli เล็กน้อยเมื่อใช้เซลล์ 10 เปอร์เซ็นต์ (110 เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกต่อสารมาตรฐานเทสโทสเทอโรน)ในขณะที่ปริมาณกรดดีไฮโดรโคลิกซึ่งเป็นสับสเตรทจะถูกใช้หมดไปในเวลา 10-15 ชั่วโมง การที่เซลล์ P. testosteroni สามารถสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกด้วยการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกได้เป็นการสนับสนุนข้อเสนอข้างต้นที่ว่า P. testosteroni มีการสังเคราะห์เอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งมีความจำเพาะต่อหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 7 แอลฟา- ของกรดน้ำดีได้

ผลการทดลองในทำนองเดียวกันแต่ใช้เซลล์ตรึง P. testosteroni ด้วยแคปปาคาร์-ราจีแนน-วุ้น แทนเซลล์อิสระพบกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกเพียงเล็กน้อย (ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของอนุพันธ์กรดน้ำดีต่อสารมาตรฐานเทสโทสเทอโรน) ซึ่งค่าที่วัดได้นี้ต่ำกว่าปริมาณกรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกที่สังเคราะห์ได้จากเซลล์ P. testosteroni อิสระหลายเท่า ยิ่งไปกว่านั้นระดับของผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกจะไม่แปรผันตามปริมาณเซลล์ P. testosteroni ตรึงแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น ที่ใช้ในปฏิกิริยาอีกด้วย ปริมาณของสับสเตรทกรดดีไฮโดรโคลิกที่ถูกใช้ไปจะลดลงเล็กน้อย (ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์) แล้วคงที่ และไม่พบสารตัวกลาง หรืออนุพันธ์กรดน้ำดีชนิดอื่นใดในปฏิกิริยาเลย อาจอธิบายได้ว่าการสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกด้วยเซลล์ P. testosteroni ตรึงแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น และให้

ค่าอนุพันธ์กรดน้ำดีต่ำ เป็นผลเนื่องมาจากวิธีการตรึงเซลล์เช่นเดียวกับในกรณีของ E. coli เซลล์ P. testosteroni ที่ถูกทำให้ร้อนถึง 50 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 นาที และเซลล์สัมผัสโดยตรงกับนอร์มัล-บิวทิลอะซีเตท (มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อแบคทีเรีย) จะมีผลทำให้จำนวนเซลล์มีชีวิตของ P. testosteroni ลดลงอย่างรวดเร็ว (ผลการทดลองข้อ 3.16) นอกจากนี้การสูญเสียสภาวะการมีชีวิตของเซลล์ P. testosteroni จะมีผลโดยตรงต่อการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสควบคู่ไปด้วย จึงไม่น่าสงสัยว่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจึงลดต่ำลงอย่างมาก ทั้งนี้ยังไม่นับรวมถึงผลกระทบอันเนื่องจากการจำกัดปริมาณเข้าออกของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์เมื่อเซลล์ถูกห้อมล้อมไว้ด้วยเจลอีกชั้นหนึ่ง (Larsson และคณะ, 1979) ซึ่งเป็นตัวแปรที่มีความสำคัญต่อการเกิดผลิตภัณฑ์มากเช่นกัน

เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์กรดน้ำดีโดยใช้เซลล์ P. testosteroni อิสระ (ความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์) ในสภาวะเดียวกับการศึกษาในเซลล์ P. testosteroni ในตอนแรก เว้นแต่แทนที่ 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ด้วย 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ (รูปที่ 45) พบว่า เซลล์ P. testosteroni อิสระสามารถสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกเพิ่มมากขึ้นกว่า 2 เท่าของปฏิกิริยาเมื่อมี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ รูปแบบการสังเคราะห์อนุพันธ์กรดน้ำดีเปลี่ยนไปอย่างสิ้นเชิง (ข้อ 3.19) นอกจากนี้ยังพบผลิตภัณฑ์ซึ่งเชื่อว่าเป็นกรดน้ำดีเพิ่มขึ้นอีก 2 ชนิด โดยที่ชนิดหนึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยตำแหน่งและค่าเวลาของการอยู่ในคอลัมน์ HPLC (5.4 นาที) คาดว่าเป็นกรด 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิก (7,12-diketolithocholic acid) (Sawada และคณะ, 1980) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการเปลี่ยนรูปกรดคีโนดีออกซีโคลิกให้เป็นกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก รูปแบบและลักษณะของการเกิดสารตัวกลางชนิดนี้ในปฏิกิริยาจะคล้ายคลึงกับการเกิดผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกด้วยการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์กรดน้ำดีทำภายนอกเซลล์ ดังนั้นการเกิดกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้มากหรือน้อย นอกจากขึ้นกับแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสแล้ว ยังขึ้นกับความสามารถและปริมาณการเข้าและออกจากเซลล์ของกรดคีโนดีไฮโดรโคลิกและผลิตภัณฑ์ด้วย

ในกรณีที่พบว่า 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิก ให้เป็นผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และสารตัวกลาง 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิกได้สูง เชื่อว่าเป็นเพราะแคลเซียมไอออน (calcium ion) มีผลต่อขบวนการนำสารผ่านเข้าออกจากเซลล์ดังอธิบายแล้วข้างต้น ทำให้กรดดีไฮโดรโคลิกซึ่งเป็นสับสเตรท สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้น (กลไกเช่นเดียวกันกับที่อธิบายแล้วในเซลล์อิสระ) จึงถูกเปลี่ยนรูปเป็นกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกมากขึ้นถึง 2 เท่า หรือมากกว่า

การสะสมของ 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิกนั้น เชื่อว่าเกิดได้เพราะอัตราเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสสูงกว่า ปฏิกิริยาของเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นวิถีการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกใน P. testosteroni จึงแตกต่างกับ E. coli แต่อาจคล้ายกันกับวิธีที่เสนอโดย Sawada และคณะ (1981a) ที่พบว่าจะมีการสะสมของสารตัวกลางคือ กรด 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิกในปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกของ B. fuscum สำหรับรูปแบบของการเกิดผลิตภัณฑ์ทั้งกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และกรด 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิกที่แบ่งเป็น 2 ช่วงนั้น อาจอธิบายได้ว่า เกิดเนื่องจากอิทธิพลของแคลเซียมไอออน โดยที่ช่วงแรกแคลเซียมไอออนจะไปเร่งการนำเข้าของกรดดีไฮโดรโคลิกซึ่งใช้เป็นสับสเตรทให้มากขึ้น แล้วถูกเปลี่ยนรูปโดยเอนไซม์ไฮดรอกซี-สเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสภายในเซลล์อย่างรวดเร็ว ผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่เกิดขึ้น ส่วนหนึ่งถูกปลดปล่อยออกภายนอก แต่มีอีกส่วนหนึ่งถูกสะสมอยู่ภายในเซลล์ และด้วยอิทธิพลของแคลเซียมไอออนนี้อีกเช่นกันที่เวลานานพอ อาจมีผลให้ผนังเยื่อเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ยอมให้อนุพันธ์ของกรดน้ำดี ซึ่งสะสมอยู่ถูกส่งออกภายนอกด้วยอัตราเร็วสูงขึ้นก็ได้

นอกจากกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และสารตัวกลาง 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิก ซึ่งเกิดขึ้นได้จากปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกด้วยเซลล์ P. testosteroni อิสระ เมื่อมีแคลเซียมคลอไรด์อยู่ด้วยแล้ว ยังพบว่ามีอนุพันธ์กรดน้ำดีอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีค่าเวลาอยู่ในคอลัมน์ HPLC นาน 6.6 นาที ตามเงื่อนไขสภาวะที่ศึกษา จึงคาดเดาว่า น่าจะเป็นอนุพันธ์กรดน้ำดีที่เกิดจากแอคติวิตีของเอนไซม์ 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส คือกรด 3 เบตา, 7 แอลฟา-ไดไฮดรอกซี,12-คีโตโคลิก (3β, 7α-dihydroxy,12-ketocholic acid) ซึ่งพบว่ารูปแบบการเกิดอนุพันธ์กรดน้ำดีที่เป็น 3 เบตา-อิพิเมอร์ (3β-epimer) กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกนี้เป็นปฏิภาคส่วนกลับกับความเข้มข้นของเซลล์ P. testosteroni อิสระ

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากไม่เคยมีรายงานหรือเอกสารอ้างอิงถึงคุณสมบัติของอนุพันธ์กรดน้ำดีชนิดนี้ในที่ใดมาก่อน ประกอบกับไม่สามารถหาสารมาตรฐานชนิดนี้ได้ จึงไม่ได้ทำการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของสารนี้แต่อย่างใด

ลักษณะรูปแบบการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกโดยเซลล์ P. testosteroni ที่ตรึงด้วยแอลจิเนต เมื่อมี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ คล้ายคลึงกับการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกด้วยเซลล์ P. testosteroni อิสระ คือจะมีการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกเป็น 2 ช่วง ช่วงแรก มีการเพิ่มกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกอย่างรวดเร็ว (0-6 ชั่วโมง) แล้วจึงคงที่ (6-12 ชั่วโมง) ก่อนจะมีการเพิ่มผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก (12-36 ชั่วโมง) ซึ่งน่าจะเป็นผลสืบเนื่องมาจากอิทธิพลของแคลเซียมไอออนดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น เป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้เซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนตความเข้มข้นเซลล์ในสารละลายปฏิกิริยา 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ค่าผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกสูงประมาณ 150 เปอร์เซ็นต์ ต่อสารมาตรฐานเทสโทสเทอโรน โดยที่เกือบไม่พบอนุพันธ์กรดน้ำดีที่เป็นสารตัวกลางใด ๆ ในปฏิกิริยาเลย

เมื่อศึกษาการตรึงเซลล์ร่วมของ E. coli และ P. testosteroni (อัตราส่วนเซลล์เท่ากัน) ด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน – วุ้น ใช้ความเข้มข้นเซลล์ร่วมเป็น 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจะมีค่าต่ำมาก การเพิ่มเปอร์เซ็นต์เซลล์ร่วม จาก 10 เปอร์เซ็นต์เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ เกือบไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกเลย (ผลิตภัณฑ์ที่ได้สูงกว่าผลที่ได้จากการตรึงเซลล์ E. coli หรือ P. testosteroni เดี่ยวเพียงเล็กน้อย)

เมื่อเปลี่ยนชนิดของสารตรึงเซลล์ร่วมของ E. coli และ P. testosteroni จากแคปปาคาร์ราจีแนนมาเป็นแอลจิเนต พบว่าเมื่อเปอร์เซ็นต์เซลตรึงร่วมเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ จะได้ค่าของผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก (75 เปอร์เซ็นต์ต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน) ใกล้เคียงกับ ผลที่ได้จากการตรึงเซลล์เดี่ยว P. testosteroni เมื่อใช้ความเข้มข้นเซลล์เพียง 5 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ตรึงร่วมเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่วิเคราะห์ได้จากปฏิกิริยากลับลดต่ำลงเหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐานเท่านั้น ในขณะที่มีการสะสมของสารตัวกลาง 7,12-ไดคีโตลิโทโคลิกเพิ่มมากขึ้นด้วย ดังนั้นการตรึงเซลล์ร่วมของ E. coli และ

P. testosteroni จึงไม่เหมาะกับการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก

จากข้อมูลที่ได้ทำการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกด้วยปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกด้วยเซลล์ E. coli และ P. testosteroni อิสระ, ตรึงด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น (4 เปอร์เซ็นต์), ตรึงด้วยแอลจิเนต (1 เปอร์เซ็นต์) และการตรึงเซลล์ E. coli ร่วมกับ P. testosteroni โดยศึกษาอนุพันธ์กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นเมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของเซลล์ จะเห็นได้ว่าการตรึงเซลล์ P. testosteroni ด้วยแอลจิเนต (1 เปอร์เซ็นต์) เมื่อใช้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ น่าจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้ในการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกมากที่สุด

4.4 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีกักขังในแอลจิเนต เป็นการตรึงเซลล์ในสภาวะที่ไม่รุนแรง สารตรึงเซลล์ไม่มีพิษต่อเซลล์ (Ohlson และคณะ, 1979) จึงเหมาะกับการใช้ตรึงในสภาวะที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ พบว่าเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนตสามารถสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดยการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิก เมื่อไม่มี NADH ได้สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ เมื่อมี NADH 2.5×10^{-3} โมลาร์ อธิบายได้ว่าเซลล์มีชีวิตของ P. testosteroni สามารถใช้ NADH ซึ่งสังเคราะห์ได้เองในเซลล์โดยวิถีเมตาโบลิสม (metabolic pathway) มาเป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดดีไฮโดรโคลิกให้เป็นผลิตภัณฑ์ กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีข้อหนึ่งของการตรึงเซลล์มีชีวิต (Kolot, 1982)

โดยที่แคลเซียมไอออนมีความสำคัญต่อการแข็งตัวและความเสถียรของเม็ดเจลแอลจิเนต (Cheetham, 1977) จึงได้ทำการศึกษาผลกระทบของแคลเซียมคลอไรด์ต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกของเซลล์ P. testosteroni อิสระ พบว่าการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจะแปรผันตามปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้นต่ำ ๆ (0.01-0.2 โมลาร์) ความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์สูงกว่า 0.2 โมลาร์ จะยับยั้งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กรดน้ำดี ผลการทดลองเช่นนี้เชื่อว่าเป็นผลเนื่องมาจากแคลเซียมคลอไรด์มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กรดน้ำดีโดยเซลล์ P. testosteroni เป็น 2 แบบ คือช่วยให้สับสเตรทกรดดีไฮโดรโคลิกเข้าเซลล์มากขึ้น โดยเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมเข้าออกของสับสเตรทที่เยื่อเซลล์ ขณะเดียวกันก็สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์แอลฟา-

ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสได้ (ภาคผนวกที่ 7) ในขณะที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่ำอิทธิพลในการยับยั้งการทำงานยังไม่มากจึงพบว่าอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปมีค่าสูงกว่า แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมคลอไรด์มากขึ้นไปจะมีผลของการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์แสดงออกมากกว่า ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่ำกว่า 0.1 โมลาร์ เซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนตจะสังเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้ต่ำลง เมื่อใช้ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์คงที่ (0.1 โมลาร์) ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่ผลิตโดยเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนตจะแปรผันตามเวลาของการเกิดปฏิกิริยาจนถึง 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะสังเกตเห็นการลดลงของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก เมื่อใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทคือ กรดดีไฮโดรโคลิกคงที่ (1 กรัมต่อลิตร)

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของการเกิดกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ในเซลล์ P. testosteroni อิสระ เทียบกับเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต พบว่าค่า K_m ต่อกรดดีไฮโดรโคลิกของเซลล์ P. testosteroni อิสระจะมีค่าต่ำ (1.0 มิลลิโมลาร์) กว่า K_m ของเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต (2.5 มิลลิโมลาร์) แสดงให้เห็นชัดว่าการเกิดผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกโดยเซลล์ตรึง P. testosteroni ด้วยแอลจิเนต มีความจำกัดของการนำสับสเตรทเข้า และผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกจากเม็ดเจลที่ถูกตรึง ซึ่งเป็นข้อเสียของการตรึงเซลล์แบบกักขังโดยทั่วไป (Klein และ Wagner, 1980)

การตรึงเซลล์มีชีวิตมีข้อดีหลายประการ แต่ประการที่สำคัญเมื่อเทียบกับการใช้เซลล์อิสระคือ การนำกลับมาใช้ซ้ำ และการกระตุ้นเซลล์ซึ่งใช้ไประยะหนึ่ง จะมีประสิทธิภาพต่ำให้กลับสู่สภาวะเดิมได้โดยอาหารที่เหมาะสม (Larrson และคณะ, 1976; Atrat และคณะ, 1978; Kolot, 1982)

เมื่อศึกษาการนำกลับมาใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องของเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนต พบว่าเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนตสามารถเพิ่มระดับการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกขึ้นไปได้ตลอดช่วงการผลิตซ้ำถึง 4 ครั้ง หลังจากนั้นความสามารถในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์จึงเริ่มลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเสียสภาพของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสที่สภาวะของการทดลองนี้ หากสามารถหาวิธีรักษาความเสถียรของเอนไซม์ได้ก็อาจจะใช้ต่อไปได้อีกหลายครั้ง

เมื่อกระตุ้นเซลล์ P. testosteroni ซึ่งใช้มาแล้วด้วยอาหารสูตร Marcus และ Talalay โดยไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ พบว่าเม็ดเจลเซลล์ตรึง P. testosteroni ด้วยแอลจิเนตมีการบวม (swell) เนื่องจากมีการละลายของแคลเซียมไอออนออกจากเม็ดเจล (มีฟอสเฟตไอออนในอาหารสูตร Marcus และ Talalay) โดยที่แคลเซียมไอออนจะมีผลต่อการแข็งตัวของแอลจิเนต (Bucke และ Wiseman, 1981) ดังนั้นเมื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่แบบต่อเนื่องเหมือนวิธีแรก จึงมีการลดลงของปริมาณผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง แม้ว่าเม็ดเจลแอลจิเนตจะแข็งตัวได้อีกเมื่อนำมาใช้ซ้ำในสารละลายเปลี่ยนรูปปฏิกิริยา ซึ่งมีแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์อยู่ด้วยก็ตาม

เมื่อกระตุ้นเซลล์ P. testosteroni ตรึงด้วยแอลจิเนตในอาหารสูตร Marcus และ Talalay ซึ่งมี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์อยู่ด้วย นาน 6 ชั่วโมง แล้วนำไปทำปฏิกิริยาเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกซ้ำแบบต่อเนื่อง จะเห็นได้ว่าปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 2 และ 1.5 เท่าของปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่วัดได้ในครั้งแรกเมื่อใช้ครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 ตามลำดับ หลังจากนั้นความสามารถในการเปลี่ยนรูปกรดดีไฮโดรโคลิกของเซลล์ P. testosteroni ตรึงจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 36 เปอร์เซ็นต์ในการใช้ครั้งที่ 4 แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนตด้วย 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจมีผลกระทบต่อลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นบางส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นได้

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมกับการรักษาความเสถียรของเซลล์และเอนไซม์ภายในเซลล์ P. testosteroni (ข้อ 3.14) พบว่าเซลล์ P. testosteroni จะมีความเสถียรค่อนข้างสูง คือเก็บรักษาไว้ได้นาน 20 วัน มีจำนวนเซลล์มีชีวิตเหลืออยู่ 70 เปอร์เซ็นต์ และแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เหลืออยู่ 52-56 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกที่จะเก็บรักษาเซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนตในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ที่มี 0.1 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เพื่อความหวังว่าจะสามารถเก็บรักษาเซลล์ตรึงรูปดังกล่าวไว้ได้นานก่อนที่จะนำมาใช้ใหม่ ผลปรากฏว่าในช่วง 3 วันแรกของการเก็บ

รักษา เซลล์ P. testosteroni ตรึงแอลจิเนตสามารถเพิ่มปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดี-ออกซีโคลิกได้ เมื่อใช้เปลี่ยนรูปกรดคีไฮโดรโคลิก ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากแคลเซียมไปมีผลต่อการเข้าออกของสับสเตรทผ่านผนังเซลล์ได้ดีขึ้น แต่ขณะเดียวกันแคลเซียมก็มีผลต่อการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสด้วย จึงทำให้ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาลดลงจนเป็นศูนย์ในเวลา 15 วัน ซึ่งจะเป็นเวลาที่นานกว่าการนำกลับมาใช้ซ้ำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส แคลเซียมอิออนจะทำปฏิกิริยาซึ่งมีผลกระทบต่อกระบวนการนำเข้าหรือต่อแอคติวิตีของแอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสได้ช้ากว่าที่ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทสรุป

E. coli HD-1 สามารถผลิตเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส และ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส โดยที่เอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ชนิด ไม่ถูกเหนี่ยวนำแอคติวิตีให้สูงขึ้นด้วยกรดน้ำดี พบว่า พีเอช 5.0 เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสในปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น และพีเอช 9.5-10 เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสในปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น ที่ได้จาก E. coli จะมีความเสถียรสูงขึ้นเมื่อเก็บรักษาใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่ 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เซลล์ E. coli จะมีความเสถียรสูงเมื่อเก็บรักษาในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส

P. testosteroni (ATCC 11996) สามารถผลิตเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส, 3 เบตา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส และ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส โดยที่พีเอช5.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น, พีเอช 10.5 เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ 3 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์-ดีไฮโดรจีเนสในปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชั่น และพีเอช 11.0 เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ 7 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสทั้ง 3 ชนิด พบว่าถูกเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์แอคติวิตีให้สูงได้ด้วย เทสโทสเทอโรน, โซเดียมโคเลท และกรดดีไฮโดรโคลิก โดยที่กรดดีไฮโดรโคลิกจะเป็นสารเหนี่ยวนำที่ดีที่สุด เอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสทั้ง 3 ชนิดที่พบใน P. testosteroni จะมีความเสถียรดีที่สุด เมื่อเก็บรักษาใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส และเซลล์ P. testosteroni จะมีความเสถียรดีที่สุดเมื่อเก็บรักษาในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการรักษาความเสถียรของแอคติวิตีเอนไซม์จาก E. coli และ P. testosteroni อยู่ที่ 0.1 โมลาร์อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ทั้งที่อุณหภูมิ 7 และ 25 องศาเซลเซียส ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีผลต่อการลดจำนวนเซลล์มีชีวิตและต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสใน E. coli น้อย เมื่อเทียบกับเซลล์และเอนไซม์ที่ได้จาก P. testosteroni ซึ่งการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจะมีผลต่อการลดจำนวนเซลล์และแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส

ลงอย่างรวดเร็ว โปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จะไม่มีผลในการยับยั้งแอคติวิตี ของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสของ E. coli และ P. testosteroni

ความสามารถในการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ของเซลล์อิสระ E. coli และ P. testosteroni ในสภาวะที่มี 0.05 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ จะต่ำกว่าในสภาวะที่มี 0.1 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์อย่างเห็นได้ชัด การตรึงเซลล์ด้วยแอลจิเนตจะสามารถผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้สูงกว่าการตรึงเซลล์ด้วยแคปปาคาร์ราจีแนน-วุ้น โดยที่เซลล์ P. testosteroni ที่ตรึงด้วยแอลจิเนตจะให้ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกมากกว่าเซลล์ตรึงแอลจิเนตของเซลล์ E. coli ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ของเซลล์ตรึงร่วม E. coli และ P. testosteroni (อัตราส่วนเท่ากัน) จะมีค่าต่ำกว่าเซลล์ตรึงเดี่ยวของ E. coli หรือ P. testosteroni เมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากัน

ในสภาวะที่ไม่มี NADH จากแหล่งภายนอก เซลล์ตรึงด้วยแอลจิเนตของ P. testosteroni สามารถผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้ต่ำกว่าเมื่อมี NADH 2.5×10^{-3} โมลาร์ เล็กน้อย แคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง E. coli และ P. testosteroni ขณะเดียวกันก็มีผลต่อการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนสอิสระอีกด้วย K_m ต่อกรดดีไฮโดรโคลิกในการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกมีค่า 1.0 มิลลิโมลาร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ สำหรับเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงด้วยแอลจิเนตของ P. testosteroni ตามลำดับ เซลล์ตรึงด้วยแอลจิเนตของ P. testosteroni สามารถเก็บรักษาในสารละลายนอร์มัลซาไลน์ที่มี 0.1 โมลาร์แคลเซียม-คลอไรด์ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส โดยที่ความสามารถในการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซี-โคลิกไม่ลดลงเลยในเวลา 5 วัน และเซลล์ตรึงด้วยแอลจิเนตของ P. testosteroni จะใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องได้ถึง 5 ครั้ง โดยที่ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่ผลิตได้จะลดลงไป 50 เปอร์เซ็นต์