บทที่ 4

บทวิจารณ์และสรุป

ในงานวิจัยนี้ได้ตั้งเป้าประสงค์ที่จะศึกษาวิจัยถึงศักยภาพของวิธีการตริงสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ Cunninghamella blakesleeana ST-22 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้ในประเทศไทย (Kulpreecha และคณะ, 1984) ให้สายใยที่สามารถแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการละลายนิ่วโคเลสเตอรอลได้ ทั้งนี้ยังได้ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติต่างๆของสายใยตริงกับสายใยอิสระ และยังครอบคลุมไปถึงการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อการเจริญ เพื่อให้สายใยที่ผลิตกรด 3α,15β-DHC ได้สูงสุดอีกด้วย

4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็น กรด 3α,15β-DHC ของ Cunninghamella blakesleeana ST-22

Kulpreecha และคณะ (1985a) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา C.blakesleeana ST-22 ในระดับขวดเขย่านาน 3 วัน พบว่าสายใยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อมีความสามารถในการแปรรูปสารตั้งต้น LCA ไปเป็นผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC ได้ในระดับค่อนข้างต่ำคือ 50 เปอร์เซนต์ของLCA เมื่อศึกษาลักษณะและรูปแบบการเจริญของเชื้อรา C.blakesleeana ST-22 โดยใช้ขวดเขย่ารูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรอย่างละเอียด (รูปที่ 6) จะเห็นได้ว่าสายใยของเชื้อรา C.blakesleeana ST-22 สามารถแปรรูป LCA ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นด้วยอัตราเร็วสูงสุดในช่วงต้นของระยะการเจริญแบบทวีคูณ(early log phase) (1.0 กรัมสายใยแห้งต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) คือ ประมาณ 16-20 ชั่วโมง หลังจากเริ่มเพาะเชื้อด้วยสปอร์ (1.7 ไมโครโมลกรด 3α,15β-DHC ต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมง หรือ 85.36 เปอร์เซนต์ของ LCA) หลังจากนั้นความสามารถของสายใยในการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว จนเหลืออัตราเร็วของการแปรรูปประมาณ 0.1 ไมโครโมลกรด

3α,15β-DHC ต่อกรัมสายใยเปียกต่อชั่วโมงในเวลา 36-40 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อราเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดก่อนที่จะถึงระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) (6-7 กรัมสายใยแห้งต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือ 160-180 กรัมสายใยเปียกต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) หลังจากนั้นดูเหมือนว่าความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ กรด 3α,15β-DHC ของเชื้อรา C.blakesleeana ST-22 เกือบจะคงที่ตลอดช่วงการเจริญในระยะนี้ ซึ่งสอดคล้องกับค่า LCA ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่วัดได้ว่า จะมีค่าลดลงสัมพันธ์กับการสร้างผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC ในช่วงแรก และเมื่อสายใยของเชื้อราที่เจริญจนถึงระดับการเจริญสูงสุด และเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่แล้วจะมีการใช้ LCA ไปน้อยมาก จนเกือบไม่สังเกตเห็นการลดลงของระดับ LCA ในอาหารเลี้ยงเชื้อเลย ซึ่งรูปแบบของการเจริญและการสังเคราะห์ระบบเอนไซม์เพื่อแปรรูปสารตั้งต้น LCA เช่นนี้ อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ C.blakesleeana ST-22 นี้สามารถใช้ LCA เป็นสารเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ผลิตกรด 3 ,15 -DHC หรือถูกนำไปแปรรูปเป็นกรด 3α,15β-DHC หรือเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอน ในระยะต้นของการเจริญจากสปอร์เป็นสายใย อย่างไรก็ตามการที่รูปแบบการเจริญและการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC จะแตกต่างไปจาก รายงานของ Kulpreecha และคณะ (1985a) ซึ่งรูปแบบการผลิตกรด 3α,15β-DHC จะเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเชื้อรา ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของวิธีการทดลองและการเลี้ยงเชื้อก็ได้ ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าพิจารณาศึกษาและวิจัยต่อไป

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์จำพวกสเตียรอยด์ไฮดรอกซีเลส (steroidal hydroxylase) ได้โดยถูกเหนี่ยวนำ (induce) ด้วยสารตั้งต้น (Breskvar และ Hudnik-Plavnik, 1978, 1981; Ghosh และ Samanta, 1971; Kulpreecha และคณะ, 1985b) แต่ก็มีรายงานว่าระบบการสังเคราะห์เอนไซม์ไฮดรอกซีเลสของจุลินทรีย์บางชนิดก็เป็นแบบสร้างขึ้นคงที่ตลอดเวลา (Constitutive) (Tokyo Cooperative Gallstone Study Group, 1980; Vezina และคณะ, 1964) ผลจากการวิจัยในที่นี้ (รูปที่ 7) แสดงให้เห็นว่า เมื่อไม่มี LCA ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย สายใยที่ได้จะมีความสามารถในการแปรรูป LCA ได้ต่ำกว่า เมื่อมี LCA 1-2 กรัมต่อลิตร กว่า 2 เท่า ในขณะที่การเจริญของสายใยมีค่าใกล้เคียงกัน ก็น่าจะกล่าวได้ว่าเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC น่าจะมีระบบการสังเคราะห์ที่ถูกเหนี่ยวนำได้โดยที่ปริมาณ LCA 1 กรัมต่อลิตรก็เพียงพอในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ซึ่งมี

หน้าที่เติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 15β ของ LCA (15β-hydroxylase) ได้อย่างเต็มที่แล้ว

จากการศึกษาอุณหภูมิในการเจริญของ C.blakesleeana ST-22 ให้ผลสอดคล้องกับ Kulpreecha และคณะ (1985a) ซึ่งพบว่าเชื้อรานี้จะเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-37 °ซ และจะไม่พบการเจริญของเชื้อเลยเมื่ออุณหภูมิเป็น 45 °ซ ซึ่งช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้และไม่ได้นี้เป็นอุณหภูมิปกติในการเจริญของราทั่วไป(พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2525) เมื่อพิจารณาค่า พีเอช ของอาหารเหลวในการงอกเป็นสายใยก็จะได้ค่า พีเอช 6.5 เหมาะแก่การเจริญของเชื้อ C.blakesleeana ST-22 มากที่สุด ซึ่งใกล้เคียงกับผลงานของ Kulpreecha และคณะ (1985a) ว่าเชื้อรานี้จะเจริญเป็นสายใยได้ดีที่ พีเอช 7.0 หรือต่ำกว่านี้ ปฏิกิริยาการแปรรูปสารตั้งต้น LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC จะแปรผันตามเวลาในช่วง 27 ชั่วโมงแรกของการแปรรูป เมื่อใช้ LCA ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 8, 9 และ 10)

4.2 สภาวะที่เหมาะสมของการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนเพื่อผลิตกรด 3α,15β-DHC

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 โดยวิธีกักขัง (entrapment) ในแคปปา-คาร์ราจีแนนต่างชนิดกัน ด้วยการหยดแคปปา-คาร์ราจีแนนลงใน 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ และโดยวิธี two phase system แล้วนำเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับสารเสริมความแข็งของเจล ในที่นี้ใช้โพแตสเซียมคลอไรด์ กลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เพื่อให้เกิด cross-linking ระหว่างผนังสปอร์กับผนังสปอร์ (spore wall) หรือผนังสปอร์กับเจล หรือเจลกับเจล

การตรึงเซลล์มีชีวิตโดยวิธีกักขังเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษากันมากในปัจจุบัน ทั้งนี้เพราะมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีตรึงเซลล์อื่นๆหลายประการ (Wadaและคณะ,1979; Mattisson, 1983; Scott,1987) อาทิเช่น

ก. เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและสะดวกในการกักขังเซลล์ไว้ให้อยู่ภายในร่างแหโพลีเมอร์

ข. เป็นวิธีที่เก็บเซลล์ไว้ได้ดี มีการรั่วไหลออกภายนอกได้น้อย ในขณะที่สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถผ่านเข้าและออกจากร่างแหโพลีเมอร์ได้

ค. เป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้สภาวะการตรึงเซลล์รุนแรง จึงเหมาะกับการตรึงเซลล์มีชีวิตได้

ง. เป็นวิธีที่ตรึงเซลล์ได้ครั้งละมากๆ

แคปปา-คาร์ราจีแนนได้ถูกใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ Brevibacterium flavum ในการผลิตกรดมาลิก(L-Malic acid) ทางการค้ามาตั้งแต่ปี ค.ศ.1977 (Takata และคณะ, 1979, 1980) และในปี ค.ศ.1978 นักวิทยาศาสตร์กลุ่มเดียวกันนี้ได้ใช้คาร์ราจีแนนเป็นวัสดุตรึง เพื่อการผลิตกรดแอสพาติก (L-Aspartic acid) ในอุตสาหกรรมเช่นกัน (Takata และคณะ, 1982) เหตุผลที่สำคัญอื่นๆ ที่เลือกใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนเป็นวัสดุตรึงสปอร์ในงานวิจัยนี้มีอีกหลายประการเช่น เป็นสารอาหารที่ได้จากธรรมชาติ เมื่อใช้ตรึงแล้วผลผลิตที่ได้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับมนุษย์หรือสัตว์ได้ โดยไม่มีผลกระทบข้างเคียง และสภาวะที่ใช้ตรึงสปอร์ทำให้มีความอยู่รอดของเซลล์มีชีวิตสูง(Fukui และ Tanaka, 1982) การตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ได้เลือกวิธีการตรึงเป็น 2 แบบคือ วิธีการตรึงสปอร์โดยใช้เข็มฉีดยา(syringe) ซึ่ง Takata และคณะ (1977) ได้รายงานว่าการตรึงเซลล์ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนโดยวิธีนี้ ให้เปอร์เซนต์แอคติวีตีสัมพัทธ์ (Relative activity)สูง ความแข็งของเม็ดเจลดีและการเจริญของเชื้อดีกว่าเซลล์อิสระ (Wada และคณะ, 1979) แต่จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้มีข้อสรุปแสดงให้เห็นว่า การตรึงสปอร์ด้วยวิธีนี้มีจุดอ่อนและความยุ่งยากในการตรึงสปอร์อยู่หลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการสูญเสียแคปปา-คาร์ราจีแนนและสปอร์บางส่วนที่ติดอยู่ในหลอดฉีดยาในแต่ละครั้งของการตรึงเซลล์ค่อนข้างมาก ดังแสดงในหัวข้อ 3.3 เม็ดเจลที่ได้มีรูปร่างไม่กลมเท่าที่ควร ต้องใช้เวลานานในการตรึงสปอร์ และได้ปริมาณกรด $3\alpha,15\beta$-DHC น้อย ไม่ว่าจะใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนชนิดใดก็ตาม (ตารางที่ 3, 4 และรูปที่ 12)

วิธีการตรึงสปอร์แบบที่ 2 ใช้วิธี two phase system ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีตรึงเซลล์แบบกักขังอื่นๆที่ได้เม็ดเจลลักษณะสัณฐานกลมเป็นส่วนใหญ่มีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการผลิตแบบต่อเนื่องในคอลัมน์ได้ดี (Nilsson และคณะ, 1983) ผลการทดลองสรุปได้ว่า ขนาด รูปร่างลักษณะ และความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่เตรียมได้ จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง อาทิเช่น ความเร็วในการกวนด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก ชนิดของวัสดุตรึงสปอร์ ความเข้มข้นของวัสดุตรึงสปอร์ เป็นต้น (Ohlson และคณะ, 1979 ; Wang และ Hettwer, 1982; Maddox และคณะ, 1981) ล้วนเป็นปัจจัยที่ต้องทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในแคปปา-คาร์ราจีแนนแต่ละชนิดต่อไป

เนื่องจากในการวิจัยนี้จำเป็นต้องได้เม็ดเจลสปอร์ตรึงที่สปอร์ยังมีชีวิตสามารถนำไปใช้งอกให้เกิดเป็นสายใยได้ จึงต้องอาศัยการตรึงสปอร์โดยใช้เทคนิคการปลอดเชื้อในขั้นตอน

การตรึงสปอร์ตลอดจนกระทั่งการงอกจากสปอร์เป็นสายใย ดังนั้นจึงไม่สามารถแยกเม็ดเจลขนาดต่างๆออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้เม็ดเจลที่มีคุณลักษณะเหมาะแก่การทำงานในกระบวนการผลิตโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ต่อไปในอนาคต จึงต้องทำการทดลองเลือกความเร็วในการกวนสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนแต่ละชนิด ตลอดจนความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เม็ดเจลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกัน และไม่โตเกินไปนักโดยเลือกใช้ขนาด 1-2 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่เชื่อว่าจะมีผลกระทบต่อการผ่านเข้าออกของสารตั้งต้น และผลิตภัณฑ์น้อยที่สุด (จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 1986) จากผลการทดลอง (ข้อ 3.4.1) จะเห็นได้ว่า ถ้าเลือกใช้ความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่นเท่ากับ 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ควรใช้ความเร็วในการกวนเท่ากับ 420, 420 และ 450 รอบต่อนาที (เมื่อใช้เครื่องกวนแท่งแม่เหล็กจาก Laboratory Hot Plate PC-101, Corning Glass Works, Corning, N.Y.14830, U.S.A. หมายเลข 6.0, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ) แคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Sigma สหรัฐอเมริกา ความเข้มข้น 2.5, 3.0 และ 3.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ความเร็วในการกวน 420, 420 และ 450 รอบต่อนาที ตามลำดับ และแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก ความเข้มข้น 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้ความเร็วในการกวน 420, 450 และ 450 รอบต่อนาที ตามลำดับ จึงจะได้ขนาดของเม็ดเจลตามต้องการ

Nilsson และคณะ (1983) รายงานว่า วิธีการตรึงเซลล์แบบที่ใช้นี้ ไฮโดรโฟบิกเฟส (Hydrophobic phase) ที่ใช้ตรึงเซลล์ (ในที่นี้คือ นอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต) แทบจะไม่มีผลกระทบต่อการใช้ออกซิเจนของเซลล์ที่ถูกตรึง และยังได้เสนอแนะต่อไปอีกว่าการสัมผัสระหว่างเซลล์กับสารไฮโดรโฟบิกเฟสไม่ควรจะนานเกินกว่า 10 นาที Sonomoto และคณะ (1983a) ได้รายงานว่า การเพิ่มปริมาณของสารไฮโดรโฟบิกซิตี (gel hydrophobicity) จะมีผลต่อแอคติวิตีของเซลล์ตรึง ในการวิจัยนี้นอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตที่ใช้เป็นสารร่วมในการตรึงสปอร์ เมื่อสัมผัสกับสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ในช่วงเวลา 2 นาที ไม่มีผลต่อการงอกเป็นสายใยและการแปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ของสายใยเลย (รูปที่ 15) แต่ถ้านานกว่านี้ นอร์มอล-บิวทิลอะซีเตตจะมีผลบ้างเล็กน้อย และปริมาณของนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ตั้งแต่ 1 ถึง 50 เปอร์เซนต์ก็ไม่มีผลต่อวิธีการวิเคราะห์กรด $3\alpha,15\beta$-DHC เมื่อใช้วิธีแกสโครมาโตกราฟฟี โดยมีกรดดีออกซีโคลิกเป็นสารมาตร

ฐานเปรียบเทียบ (internal standard) (รูปที่ 16)

ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ใช้มีผลกระทบต่อการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์และความแข็งของเม็ดเจลทั้ง 3 ชนิดของแคปปา-คาร์ราจีแนน (รูปที่ 17) โดยที่เม็ดเจลสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนทั้ง 3 ชนิด เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีความแข็งของเม็ดเจลสูงขึ้น ในขณะที่ปริมาณการแปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ไม่ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนที่เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามจะแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ได้ลดลง ซึ่งสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลแต่ละชนิด จะมีค่าผลิตภัณฑ์สูงสุดที่ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนต่างกัน ดังนี้คือ 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนนของบริษัท Wako และ Sigma และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนนของบริษัท Copenhagen Pectin จะเห็นได้ว่า ความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์กรด $3\alpha,15\beta$-DHC แตกต่างกันไป ถึงแม้จะใช้จำนวนสปอร์เท่ากันก็ตาม โดยที่สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ค่าผลิตภัณฑ์สูงสุด รองลงไปได้แก่ บริษัท Copenhagen Pectinเมื่อใช้ความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนน 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) และบริษัท Sigma ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)ตามลำดับ เมื่อใช้เวลาของการแปรรูป LCA นาน 24 ชั่วโมงเท่ากัน ซึ่งค่าผลิตภัณฑ์ที่ได้สูงสุดเมื่อตรึงสปอร์ในแคปปา-คาร์ราจีแนนทั้ง 3 ชนิด จะมีค่าต่ำกว่าค่าผลิตภัณฑ์สูงสุด เมื่อใช้สปอร์อิสระจำนวนเท่ากันมางอกเป็นสายใย ทั้งนี้สาเหตุอาจเนื่องมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนสูงขึ้น จะมีผลต่อขนาดของรูพรุน(pore size)ของผนังของผิวเจล ยิ่งความเข้มข้นสูงขึ้นขนาดรูพรุนจะเล็กลง ซึ่งจะมีผลต่อการซึมผ่านเข้าออกของสารตั้งต้น สารอาหาร ตลอดจนออกซิเจน ซึ่งมีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการแปรรูป LCA ของสายใยของเชื้อ C.blakesleeana ST-22 โดยตรงก็ได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากแคปปา-คาร์ราจีแนนแต่ละบริษัทล้วนเป็นสารธรรมชาติที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลซึ่งมีชนิดและแหล่งต่างๆกัน ดังนั้นขนาดของโมเลกุล และองศาของการโพลีเมอร์ไรซ์(polymerlize) ก็แตกต่างกันไปด้วย

Tosa และคณะ (1979) รายงานว่ามีอิออนของโลหะหลายชนิดเช่น โพแตสเซียม รูบิเดียม ซีเซียม รวมทั้ง aliphatic diamine หลายชนิด เช่น เมทธิลลีนไดอามีน (methylenediamine) เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (hexamethylenediamine) ออกตา

เมทธิลลีนไดอามีน (octamethylenediamine) สามารถเพิ่มความแข็งของเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลได้ ผลการวิจัยในรูปที่ 18 และ 19 แสดงให้เห็นชัดเจนว่า ความเข้มข้นของโพแตสเซียมคลอไรด์จะไม่มีผลกระทบต่อการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 ที่ช่วงความเข้มข้นต่ำๆ (0.1-0.3 โมลาร์) แต่เมื่อความเข้มข้นสูงกว่านี้จะมีผลกระทบบ้างเล็กน้อย Kulpreecha และคณะ (1985b) รายงานว่า โพแตสเซียมอิออนความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 โมลาร์ จะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซีเลส (hydroxylase) ใน Fusarium equiseti M.41 เมื่อศึกษาผลกระทบของเกลือโพแตสเซียมคลอไรด์ ต่อประสิทธิภาพของการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล ความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนนบริษัท Wako และ Sigma และใช้เพียง 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Copenhagen Pectin ผลจากการทดลองยืนยันว่า โพแตสเซียมคลอไรด์สามารถช่วยเพิ่มทั้งความแข็งให้แก่เม็ดเจลสปอร์ตรึงที่งอกสายใยแล้วมากขึ้นประมาณ 2-3 เท่า และในขณะเดียวกันสามารถเพิ่มปริมาณการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC ให้มีค่าสูงขึ้นกว่าเมื่อไม่มีโพแตสเซียมคลอไรด์ประมาณ 2-3 เท่าตัวเช่นกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากอิออนของโพแตสเซียมมีผลช่วยในการแข็งตัวของแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล ทำให้ได้เนื้อเจลที่มีความแข็งสูง และเมื่อใช้ในปฏิกิริยาการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC แล้วจะทำให้เม็ดเจลแตกสลายน้อยลง หรืออาจมีผลต่อการเปลี่ยนโครงสร้างอย่างใดอย่างหนึ่งของระบบเอนไซม์ไฮดรอกซีเลส

การตรึงสปอร์แบบกักขังสปอร์นี้ นอกจากการใช้สารตรึงสปอร์และวิธีการตรึงสปอร์ที่เหมาะสมเพื่อให้สปอร์มีชีวิตที่จะเจริญเป็นสายใยได้นั้น ยังต้องคำนึงถึงปริมาณออกซิเจนที่สปอร์สามารถสัมผัสได้ด้วย โดยเฉพาะ C.blakesleeana ST-22 ที่เป็น aerobic microorganism และปฏิกิริยาการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC เป็นปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่น(Hydroxylation) ซึ่งปริมาณออกซิเจนในสารละลายจะมีผลต่อการแปรรูปสารตั้งต้นโดยระบบเอนไซม์ไฮดรอกซิเลสโดยตรง จึงมีผลต่ออัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา (Heinrichs และคณะ, 1967; Clark และคณะ, 1982; Kulpreecha และคณะ, 1985b) ดังนั้นการละลายของออกซิเจนในสารอาหารเลี้ยงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 จึงมีส่วนสำคัญในการงอกเป็นสายใยของสปอร์อิสระและสปอร์ตรึง ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการแปรรูป LCA

เป็นกรด 3α,15β-DHC ผลจากการวิจัยนี้ (รูปที่ 20-23) จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณกาซออกซิเจนในสารอาหาร โดยการเปลี่ยนรูปร่างภาชนะที่ใช้จากขวดรูปชมพู่ธรรมดา เป็นขวดรูปชมพู่ก้นบุบ (Aiba และคณะ, 1973) ซึ่งเป็นภาชนะที่ออกแบบให้มีปริมาณออกซิเจนละลายลงไปในสารละลายในภาชนะได้สูงขึ้นเมื่อทำการเขย่า และการเพิ่มความเร็วของการเขย่า จะช่วยทำให้สายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ได้สูงขึ้น และช่วงเวลาที่ใช้ในการแปรรูปก็สั้นลง เมื่อเทียบกับการเขย่าที่ใช้ขวดรูปชมพู่ธรรมดาและความถี่ของการเขย่า 250 รอบต่อนาที โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 3 ชนิดเมื่อใช้ขวดรูปชมพู่ก้นบุบเป็นภาชนะสำหรับงอกสายใย และใช้ความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที จะให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกับเมื่อใช้สายใยอิสระ ถึงแม้ว่าเวลาที่ใช้ในการงอกเป็นสายใยของสปอร์ตริงจะยาวนานกว่าสปอร์อิสระไปบ้าง ผลการทดลองนี้ยังเป็นการสนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่าการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์สูงสุดของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลต่างชนิดกันนั้นเป็นผลเนื่องมาจากขนาดรูพรุนที่ผิวของเจลแต่ละชนิดไม่เท่ากัน อันเป็นผลทำให้การซึมผ่านของออกซิเจนและสารอาหารเข้าไปสู่สปอร์เพื่อเกิดการงอกเป็นสายใยได้ไม่เท่ากัน ซึ่งเป็นผลกระทบโดยตรงต่อการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC ได้ต่างกัน เป็นที่น่าสังเกตว่าการงอกสายใยเมื่อเจริญมากขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง จะมีผลต่อความเสถียรของเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลแบบกักขังนี้ เนื่องจากสายใยที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เม็ดเจลแตกออกไม่สามารถคงรูปเดิมได้ (Mattiasson, 1983; Sonomoto และคณะ, 1983a) เมื่อทำการสังเกตลักษณะภายนอกของเม็ดเจลสปอร์ตริง C.blakesleeana ST-22 ของแคปปา-คาร์ราจีแนนทั้ง 3 ชนิดที่งอกสายใยแล้ว และติดตามชั่งน้ำหนักของเม็ดเจลทั้งก่อนและหลังการทำปฏิกิริยาในช่วงเวลาของการงอกสายใยต่างๆกัน พบว่า เม็ดเจลสปอร์ตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin หลังงอกเป็นสายใย ในช่วงเวลา 45 ชั่วโมงที่สภาวะต่างกัน ไม่ว่าจะเขย่าในขวดรูปชมพู่ธรรมดาหรือในขวดรูปชมพู่ก้นบุบที่ความถี่ของการเขย่า 250-300 รอบต่อนาที เกือบไม่มีการสูญเสียของเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิดเลย ในขณะที่เม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Sigma เมื่อให้เวลาของการงอกสายใยเพิ่มขึ้นมากกว่า 10 ชั่วโมงขึ้นไปโดยการเขย่าที่สภาวะเดียวกันกับที่กล่าวข้างต้น จะเริ่มมีการสูญเสียเม็ดเจลเนื่องจากเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลแตก สังเกตได้จากทั้งลักษณะภายนอก และการลดลงของน้ำหนักเม็ดเจล(รวมสายใย) ที่ชั่งได้ทั้ง

3 สภาวะของการงอกเป็นสายใยของสปอร์ตริง ซึ่งสอดคล้องกับค่าความแข็งของเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Sigma ที่วัดได้จากการใช้ค่าเฉลี่ยของมือจับที่พบว่า มีความแข็งน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลอีก 2 ชนิด ทั้งนี้สันนิษฐานว่า อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของคาร์ราจีแนนจากบริษัท Sigma มีแคปปา-คาร์ราจีแนนเพียง 80 เปอร์เซนต์ ในขณะที่คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin มีเนื้อแคปปา-คาร์ราจีแนนสูงมากกว่า 90 เปอร์เซนต์ ดังนั้นจากสภาวะการงอกเป็นสายใยของสปอร์ตริงที่ได้ จึงได้เลือกใช้สปอร์ของ C.blakesleeana ST-22 ซึ่งตริงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin ในการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติอื่นๆ ระหว่างสายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลต่อไป ทั้งนี้จะใช้สภาวะของการงอกเป็นสายใยคงที่โดยเขย่าในขวดรูปชมพู่ก้นบุบ ด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 และ 40 ชั่วโมงสำหรับแคปปา-คาร์ราจีแนนของบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin ตามลำดับ และ 15 ชั่วโมงสำหรับสปอร์ C.blakesleeana ST-22 อิสระ

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 24) แสดงให้เห็นถึงปริมาณการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลไม่ได้ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของสายใย กล่าวคือ สายใยปริมาณมากไม่ได้ทำให้มีการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์มากขึ้น แต่น่าจะขึ้นอยู่กับปริมาณสายใยที่เหมาะสมต่อพื้นที่ผิวสัมผัสกับปริมาณสารตั้งต้น LCA และกาซออกซิเจน หรือเป็นช่วงที่สายใยที่ได้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ผลิตกรด 3α,15β-DHC สูงสุด ความแตกต่างของเวลาที่เหมาะสมของการงอกสายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล ที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC สามารถบ่งบอกได้ด้วยภาพจากกล้องจุลทรรศน์นี้ โดยที่เวลาของการเริ่มงอกเป็นสายใยจากสปอร์อิสระเห็นได้ชัดเมื่อเวลาของการงอกสายใยผ่านไปเพียง 3 ชั่วโมง ในขณะที่สปอร์ตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนจะเห็นได้เมื่อเวลาของการงอกเป็นสายใย 10 ชั่วโมง และหลังจากเวลาของการงอกผ่านไป 20 ชั่วโมงสปอร์ตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนจะงอกให้กลุ่มสายใยปริมาณน้อยกว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มสายใยอิสระที่เวลา 15 ชั่วโมง (ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผลิตกรด 3α,15β-DHC สูงสุด) นับเป็นการสนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่า การกักขังสปอร์ไว้ในร่างแหโพลีเมอร์ (ในที่นี้คือ แคปปา-คาร์ราจีแนน) จะมีผลต่อการซึมผ่านเข้าออกของสารอาหารต่างๆ รวมทั้งกาซออกซิเจนด้วย ทำให้สปอร์ของ C.blakesleeana

ST-22 ในเม็ดเจลมีการเจริญเป็นสายใยได้ช้ากว่าในสปอร์อิสระซึ่งสามารถสัมผัสกับสารต่างๆได้โดยตรง สปอร์ตรึงในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลเมื่อเพาะเลี้ยงให้งอกเป็นสายใยนาน 55 ชั่วโมง จะมีปริมาณสายใยเต็มเม็ดเจลซึ่งที่เวลานี้เองจะสังเกตเห็นการแตกของเม็ดเจลเกิดขึ้น แสดงว่า เมื่อมีปริมาณสายใยมากเกินไปเม็ดเจลไม่สามารถคงสภาพเดิมอยู่ได้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำหรับการตรึงเซลล์มีชีวิตแบบกักขัง(Mattiasson, 1983; Scott, 1987)

นอกจากการเพิ่มการละลายของกาซออกซิเจนในสูตรอาหารสำหรับการงอกเป็นสายใยแล้ว ความหนาแน่นของเม็ดเจล(รวมสายใย)ในสารผสมปฏิกิริยา ก็มีผลต่อการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC เช่นกัน ผลการทดลองในรูปที่ 25-27 จะเห็นได้ว่า เมื่อใช้สารผสมปฏิกิริยา 20 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วแปรผันความหนาแน่นของเม็ดเจล(รวมสายใย) ที่ค่าต่างๆกัน พบว่า เมื่อมีเม็ดเจล(รวมสายใย)หนัก 2 กรัมจะแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ได้ในอัตราเร็วสูงสุด ในขณะที่การเพิ่มความหนาแน่นของเม็ดเจล(รวมสายใย) ขึ้นไปถึง 4 และ 5 กรัมในสภาวะอย่างเดียวกัน จะมีอัตราการแปรรูปต่ำลง ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่ามีความจำกัดของสารตั้งต้น คืออัตราการกระจายสารตั้งต้นไปยังเม็ดเจลเกิดได้ช้าลง เม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล(รวมสายใย)หนัก 1 กรัม ก็มีอัตราการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต่ำ เนื่องจากมีปริมาณเม็ดเจลน้อยเกินไปทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสของสารตั้งต้นกับสายใยของเชื้อมีน้อย อัตราการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์จึงต่ำกว่า จะเห็นว่า ปริมาณเม็ดเจลที่งอกสายใยแล้วหนัก 2 กรัม มีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ในการวิจัยนี้ ส่วนสายใยอิสระจะมีอัตราการแปรรูปสูงที่สุด เมื่อใช้สายใยหนัก 0.05 กรัม (เท่ากับสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลหนัก 1 กรัม) อาจเป็นเพราะพื้นที่ผิวรวมของสายใยอิสระมีปริมาณสูงกว่าสายใยจากสปอร์ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน จึงมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้สูงกว่า แต่เมื่อเพิ่มปริมาณสายใยขึ้นในขณะที่สารตั้งต้นมีจำกัด จึงมีผลทำให้อัตราการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC มีค่าลดลงด้วยเช่นกัน

Wada และคณะ (1979) ทำการตรึงเซลล์ E.coli ด้วยคาร์ราจีแนน พบว่า การเรียงตัวของเซลล์ในเม็ดเจลเซลล์ตรึงจะอยู่ที่ผิวของเม็ดเจลเพื่อรับการแพร่กระจายของอาหารอย่างมีประสิทธิภาพเต็มที่ อันจะมีผลทำให้การเจริญของเซลล์ดีที่สุด ดังนั้นการแปรผันความเข้มข้นของสปอร์ในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล จึงมีผลต่ออัตราแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์และปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด ปรากฏการณ์ดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้ (รูปที่

28-30) แสดงให้เห็นว่าอัตราการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC จะมีค่าสูงสุดและใกล้เคียงกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของสปอร์ C.blakesleeana ST-22 เป็น 0.75×10^6 และ 1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อความเข้มข้นของสปอร์เพิ่มสูงขึ้นเป็น 2.5×10^6 และ 5.0×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร อัตราเร็วของการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิดจะลดลง แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นของสปอร์ 0.75×10^6-1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเจริญเป็นสายใยแล้ว มีปริมาณสายใยพอเหมาะที่จะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น LCA ทำให้อัตราการแปรรูปเกิดได้อย่างอิสระและใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสปอร์ขึ้นเป็น 2.5×10^6 และ 5.0×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเจริญเป็นสายใยแล้ว จะมีปริมาณสายใยภายในเม็ดเจลสูงเกินไปทำให้เกิดความแออัด และทำให้พื้นที่ผิวของสายใยในเม็ดเจลบางส่วนถูกกีดกัน ไม่สามารถสัมผัสกับ LCA ได้อย่างอิสระเต็มที่ จึงมีอัตราการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ลดลง เมื่อเทียบกับการใช้ความเข้มข้นสปอร์ 0.75×10^6-1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาความแข็งของเม็ดเจล จะพบว่า เม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล(รวมสายใย) มีความแข็งลดลงเมื่อความเข้มข้นของสปอร์มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากการเจริญของสปอร์เป็นสายใยยิ่งมากก็จะยิ่งมีผลทำให้เม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลขยายตัวมากขึ้น จึงมีความแข็งลดลง (Mattiasson, 1983) ในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นของสปอร์ในเม็ดเจลสปอร์ตริงเป็น 1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในการวิจัยขั้นต่อไป เนื่องจากให้อัตราการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC สูงสุด และยังให้ความแข็งของเม็ดเจลสูงอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล (0.75×10^6-1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) จะเห็นได้ว่า สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhegen Pectin (1.5 เปอร์เซนต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ค่าการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์สูงกว่าสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako (3.0 เปอร์เซนต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) และสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสายใยอิสระที่น้ำหนักเท่ากันด้วย

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า การตรึงเซลล์โดยวิธีกักขังนี้ สามารถเสริมความแข็งของเม็ดเจลให้เพิ่มขึ้นได้ด้วยการใช้สารพวก polyfunctional reagents (Klein และ Wagner, 1983) Takata และคณะ (1977) แสดงการตรึงเซลล์ Streptomyces phaeochromogenes ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนแล้ว crosslinked ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ หรือ

กลูตารัลดีไฮด์กับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน พบว่าสามารถเพิ่มความแข็งของเม็ดเจล และแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ Tosa และคณะ (1979) ได้แสดงให้เห็นว่า เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนสามารถช่วยทำให้ความแข็งของเซลล์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเพิ่มได้เช่นกัน ในการวิจัยนี้พยายามเพิ่มความแข็งของเม็ดเจลที่ใช้ตรึงสปอร์ของ C.blakesleeana ST-22 ของแคปปา-คาร์ราจีแนนทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 31-33) ผลปรากฏว่า กลูตารัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียวจะไม่มีส่วนช่วยในการเพิ่มความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเลย แม้จะใช้ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์สูงขึ้นถึง 0.25 โมลาร์ ไม่ว่าจะเสริมกลูกตารัลดีไฮด์ให้กับเม็ดเจลสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนก่อนนำไปงอกสายใย หรือนำเม็ดเจลสปอร์ตรึงนี้ไปงอกสายใยเสียก่อนแล้วจึงนำมาเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ก็ตาม ในขณะเดียวกันกลูตารัลดีไฮด์มีผลในการยับยั้งความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์จะลดความสามารถในการแปรรูปลงกว่า 70 เปอร์เซนต์ อย่างไรก็ตามการเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ในสปอร์ตรึงก่อนนำไปงอกเป็นสายใย จะมีผลกระทบต่อการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์น้อยกว่า เมื่อนำสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนไปงอกเป็นสายใยก่อนแล้วจึงนำมาเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์หลังจากเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นเท่ากันแล้ว สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Copenhagen Pectin จะยังคงเหลือแอคติวิตีในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC สูงกว่า สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako ไม่ว่าจะเป็นก่อนหรือหลังทำการงอกเป็นสายใยแล้วก็ตาม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลูตารัลดีไฮด์ซึ่งมีอัลดีไฮด์สามารถ crosslink กับสารประกอบอื่นๆที่มีหมู่อะมิโนได้ (Wiseman, 1985) ซึ่งสารประกอบดังกล่าวอาจจะเป็นโปรตีน หรือสารอื่นๆ เช่น กลูโคซามีน(glucosamine) เป็นต้น Bilgrami และ Verma (1981);Sussman และ Halrorson (1966) ได้รายงานไว้ว่า ผนังของสปอร์(spore wall) โดยส่วนใหญ่แล้วจะประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ซึ่งอาจจะเป็น เซลลูโลส(cellulose) ไคติน(chitin) กลูโคซามีน และมีโปรตีนและไขมันเป็นบางส่วน ในขณะที่สปอร์เริ่มงอกเป็นสายใย ผนังสปอร์จะมีปริมาณของกลูโคซามีนเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อเสริมกลูตารัลดีไฮด์ให้กับเม็ดเจลสปอร์ตรึงก่อนงอกสายใย กลูตารัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับกลูโคซามีน หรือโปรตีนที่ผนังสปอร์ ซึ่งอาจทำให้สปอร์ไม่สามารถงอกเป็นสายใย อันเป็นผลให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้มีค่าลดลง เมื่อเสริมเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่งอกสายใยแล้วด้วยกลูตารัลดีไฮด์ จะให้ปริมาณกรด 3α,15β-DHC ลดลง อาจจะเป็นเพราะกลูตารัลดีไฮด์

ไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ผนังเซลล์(cell wall) (Garraway และ Evans, 1984) ทำให้เซลล์(สายใย)สูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผลิตกรด 3α,15β-DHC เมื่อเลือกใช้ความเข้มข้นกลูตารัลดีไฮด์เพียง 0.05 โมลาร์ มาตรึงสปอร์ร่วมกับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนความเข้มข้นต่างๆกัน ก่อนนำสปอร์ของ C.blakesleeana ST-22 ไปงอกเป็นสายใย จะสูญเสียความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ไปอย่างสิ้นเชิง แต่จะสังเกตพบความแข็งของเม็ดเจลเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ตามความเข้มข้นของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนมีหมู่อะมิโนสามารถเกิด crosslink ได้กับโมเลกุลของแคปปา-คาร์ราจีแนนที่เป็นวัสดุตรึงสปอร์ ทำให้แคปปา-คาร์ราจีแนนยึดกันแน่นมากขึ้น ซึ่งเป็นผลทำให้เม็ดเจลสปอร์ตรึงมีความแข็งเพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนก็สามารถเกิด crosslink กับกลูตารัลดีไฮด์ได้อีกด้วย ทำให้เกิด crosslink ระหว่างผนังสปอร์กับแคปปา-คาร์ราจีแนนได้ และระหว่างผนังสปอร์กับผนังสปอร์โดยกลูตารัลดีไฮด์เอง ซึ่งผลจากการที่กลูตารัลดีไฮด์จับกับกลูโคซามีนหรือโปรตีนที่ผนังสปอร์ ทำให้สปอร์ไม่สามารถงอกเป็นสายใยได้เท่าที่ควร หรือการที่แคปปา-คาร์ราจีแนนยึดกันแน่นมากขึ้น ทำให้ขนาดของรูพรุนของเม็ดเจลลดลง ซึ่งมีผลกระทบต่อการนำสารอาหารและกาซออกซิเจนเข้าในเม็ดเจล ทำให้สปอร์งอกเป็นสายใยได้น้อย (Durand และ Navarro, 1978)

4.3 เปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ที่แปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล จากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin และสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22

ในการวิจัยนี้ได้ตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ความเข้มข้น 1.25×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin โดยใช้ความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนนเท่ากับ 3.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ เปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยที่ได้จากสปอร์ตรึง และสายใยอิสระ

Yang และ Studebaker (1978) รายงานว่า อุณหภูมิและ พีเอช ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์Δ^1-dehydrogenation ของ Reichstein's substance S ของเซลล์ตรึง Pseudomonas testosteroni จะมีค่าเพิ่มขึ้นกว่าเซลล์อิสระ Sonomoto และคณะ (1983a) พบว่า เอนไซม์ 11β-hydroxylation ของสปอร์ตรึง Curvularia

lunata มี พีเอช ที่เหมาะสมต่อการทำงานกว้างกว่าเอนไซม์ในสปอร์อิสระ Sonomoto และคณะ(1979) รายงานว่าเอนไซม์ Δ^1-dehydrogenationของเซลล์ตรึง Arthrobacter simplex มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานกว้างกว่าเอนไซม์ของเซลล์อิสระ Omata และคณะ(1979) พบว่าเซลล์ตรึง Arthrobacter simplex จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เปลี่ยน hydrocortisone เป็น prednisolone ที่อุณหภูมิและ พีเอช ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ catalyse และ alcohol oxidase ในเซลล์ตรึงของยีสต์ Klocchera sp. No.2201 จะแตกต่างไปจากในเซลล์อิสระ

ในการศึกษาผลกระทบของ พีเอช ต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการแปรรูป LCAเป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC จะเห็นได้ว่า (รูปที่ 34) พีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาโดยสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako มีค่า พีเอช เดียวกัน คือประมาณ พีเอช 8.5 แต่ พีเอช ที่เหมาะสมสำหรับการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Copenhagen Pectin มีค่าสูงกว่า คือ พีเอช 8.5-9.0 Kulpreecha และคณะ (1985a) พบว่า พีเอช ที่เหมาะสมของสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 คือ พีเอช 8.4 แสดงให้เห็นว่าการตรึงสปอร์ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน จะทำให้ พีเอช ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ภายในสายใยกว้างขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีค่าสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเกี่ยวเนื่องกับการไอโอไนซ์ (ionized) ของกลุ่มบางกลุ่มที่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ในสิ่งแวดล้อมที่อยู่ภายในเจลเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมได้บ้าง

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่แปรรูปLCA เป็นกรด$3\alpha,15\beta$-DHC อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 34-38 °ซ ทั้งสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 35) เช่นเดียวกับรายงานของ Kulpreecha และคณะ (1985a) ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ของ C.blakesleeana ST-22 อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 33-40 °ซ แสดงให้เห็นว่า การตรึงสปอร์ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนไม่น่าจะมีผลกระทบต่อการจับ หรือรวมตัวของสารตั้งต้นที่บริเวณเร่งของเอนไซม์มากนัก

เมื่อเปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้แปรรูป LCA เป็นกรด$3\alpha,15\beta$-DHC ของสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลในช่วง พีเอช ต่างๆกัน (รูปที่ 36) พบว่าเอนไซม์ในสายใยของเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนน

เจลมีความเสถียรต่อ พีเอช สูงกว่าเอนไซม์ในสายใยอิสระอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 48 ชั่วโมง เอนไซม์ในสายใยอิสระมีความเสถียรอยู่ที่ พีเอช 8.5 ในขณะที่เอนไซม์ในสายใยจากเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin มีช่วงความเสถียรต่อ พีเอช ต่ำได้กว้างขึ้น เป็น พีเอช 6.5-7.5 และ 6.5-8.0 ตามลำดับ นับเป็นข้อได้เปรียบของการใช้สายใยที่ได้จากการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ในแคปปา-คาร์ราจีแนนเพื่อการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC เหนือการใช้สายใยอิสระ ทั้งนี้เพราะความเสถียรต่อ พีเอช กว้างขึ้น ยืนยันถึงการปกป้องการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มที่ไอโอไนซ์ได้ที่บริเวณเร่ง หรือบริเวณอื่นๆของเอนไซม์ไฮดรอกซิเลสได้บางส่วน

ในการวิจัยเพื่อศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการแปรรูป LCA เป็น กรด 3α,15β-DHC ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ในสายใยอิสระ เมื่อเก็บไว้นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30, 34 และ 40 °ซ จะมีความเสถียรต่ำกว่าเอนไซม์ในสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิดอย่างเห็นได้ชัด ไม่ว่าจะอยู่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ที่มี 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ หรือใน 0.1 โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริกพีเอช 8.4 ที่ผสม 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ก็ตาม (รูปที่ 37 และ 38) และ LCA ที่เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ไม่มีส่วนช่วยให้เอนไซม์ในสายใยอิสระและเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด มีความเสถียรเพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะอยู่ในสภาวะของการเก็บรักษาอย่างใดก็ตาม (รูปที่ 39) ผลการวิจัยดังกล่าวอาจพอสรุปได้ว่าแคปปา-คาร์ราจีแนน น่าจะมีส่วนช่วยปกป้องการรวมจับกลุ่ม หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ที่ผลิตกรด 3α,15β-DHC ภายในสายใยของ C.blakesleeana ST-22 ได้ดี (Klibinov, 1983) นอกจากนี้การกักขังสปอร์ไว้ในแคปปา-คาร์ราจีแนนจะทำให้เอนไซม์ต้องอยู่ในรูปแบบโครงสร้างที่แน่นอน จึงมีความเสถียรต่อ พีเอช และอุณหภูมิมากขึ้น

เมื่อพิจารณาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยจากเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด และสายใยอิสระ จะเห็นได้ว่าค่า K_m ของการแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นับเป็นการยืนยันอีกครั้งหนึ่งว่า การตรึงเซลล์โดยวิธีกักขังด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนในสภาวะที่ใช้นี้ ไม่มีผลกระทบต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ในการจับกับสารตั้งต้น LCA หรือออกซิเจน ในปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 15β ของ LCA มากนัก และในขณะเดียวกันการตรึงเซลล์ในสภาวะเช่นนี้ไม่น่าจะมีผลต่อโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์

ด้วย ค่า V_{max} ของการแปรรูปLCA ของเอนไซม์จากสายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด ก็ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ปริมาณของสปอร์เท่ากัน เป็นการยืนยันว่าไม่น่าจะมีข้อจำกัดของการซึมผ่านเข้าออกของสารตั้งต้น LCA และผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC จากเม็ดเจลที่ใช้ในการตรึงสปอร์ ในสภาวะที่ใช้ในการตรึงที่กำหนดให้ในงานวิจัยนี้ (Klein และ Wagner, 1980; Sonomoto และคณะ, 1983b) (รูปที่ 40)

จากการศึกษาความเสถียร ในการเก็บรักษาสปอร์อิสระของ C.blakesleeana ST-22 พบว่า สามารถเก็บรักษาสปอร์อิสระไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในนอร์มอลซาลีนได้นานถึง 70 วัน โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของการงอกเป็นสายใย และการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยเลย (รูปที่ 41) ส่วนสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 ที่เก็บไว้ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 สารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ และสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จะรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผลิตกรด 3α,15β-DHC ไว้ได้เพียง 24 ชั่วโมง ในขณะที่สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin สามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้นานกว่าคือ 72 ชั่วโมง ในสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ และสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และความสามารถในการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด จะมีความเสถียรสูงสุดเมื่อเก็บรักษาอยู่ในสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ในขณะที่พบว่าสายใยอิสระและสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด จะสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC อย่างเห็นได้ชัด เมื่ออยู่ในสารละลายทั้งสามที่อุณหภูมิห้อง(25-32 °ซ) นานกว่า 24 ชั่วโมง (รูปที่ 42)

เมื่อศึกษาความเป็นไปได้ ของการนำสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลกลับมาใช้ใหม่ ปรากฏว่าสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้งจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin สามารถนำมาใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องได้ถึง 3 ครั้ง โดยที่ยังคงแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ถึงกว่า 80 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 43) และความสามารถในการแปรรูปสารตั้งต้น LCA จะลดลงเหลือประมาณ 15-20 เปอร์เซนต์ เมื่อใช้แปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์กรด 3α, 15β-DHC ซ้ำอย่างต่อเนื่อง 10 ครั้ง เปรียบเทียบกับสายใยอิสระจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์

เหลือเพียง 25 เปอร์เซนต์เมื่อใช้ซ้ำในครั้งที่ 1 และไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เลยเมื่อใช้ซ้ำในครั้งที่ 3 จึงเป็นข้อได้เปรียบอีกประการหนึ่งว่า อาจใช้สายใยจากสปอร์ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนผลิตกรด 3α,15β-DHC อย่างต่อเนื่องได้ในขณะที่สายใยอิสระไม่มีทางทำได้เลย

Sonomoto และคณะ (1983a) ; Larson และคณะ (1976) ; Kolot(1982) รายงานว่า เซลล์มีชีวิตที่ถูกตรึง เมื่อถูกใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ในระยะหนึ่งแล้วจะมีประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ต่ำลง แต่ในบางกรณีสามารถกระตุ้นให้กลับสู่สภาวะของการสังเคราะห์เดิมได้ โดยให้ได้รับอาหารที่เหมาะสมในช่วงเวลาที่สมควร ในการวิจัยนี้ได้ทดลองนำเอาสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด หลังจากใช้ในปฏิกิริยาการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC 3 ครั้งอย่างต่อเนื่องแล้ว มากระตุ้นโดยให้ได้รับอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยนาน 6 ชั่วโมง แล้วนำกลับไปทำปฏิกิริยาแปรรูป LCA ซ้ำใหม่หลายๆครั้ง พบว่า สามารถกระตุ้นสายใยของ C.blakesleeana ST-22 ที่ถูกตรึงในแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลให้กลับมีประสิทธิภาพดีขึ้นได้ โดยสามารถแปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ได้ใกล้เคียงกับการแปรรูปครั้งแรก หลังจากกระตุ้นด้วยสูตรอาหารดังกล่าวได้ 2 ครั้งแล้ว สูตรอาหารสำหรับการงอกเป็นสายใยจะไม่มีผลในการกระตุ้นอีก ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด มีการเจริญของสายใยเพิ่มมากขึ้นเมื่ออยู่ในอาหารเหลวนี้ สายใยส่วนใหญ่พัฒนาการเจริญเข้าสู่ระยะซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC นี้มีแอคติวิตีลดลง เมื่อนำกลับมาใช้แปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่จึงมีผลทำให้การแปรรูปน้อยลง (รูปที่ 44)

บทสรุป

1. สายใยของ C.blakesleeana ST-22 สามารถแปรรูป LCA เป็นกรด 3α, 15β-DHC ได้สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงสปอร์ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยที่ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที และ 15 ชั่วโมงในขวดรูปชมพู่ก้นบุบ (baffled flask) ความเร็วในการเขย่า 300 รอบต่อนาที

2. เอนไซม์ในสายใยของ C.blakesleeana ST.22 ที่เกี่ยวข้องในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 15β ของ LCA เป็นเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยสารตั้งต้น LCA ซึ่งความเข้มข้นของ LCA 1 กรัมต่อลิตรก็เพียงพอแก่การเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ผลิตกรด 3α,15β-DHC ได้สูงสุดแล้ว

3. วิธีการตรึงสปอร์แบบ two phase system สามารถทำได้ง่าย สะดวกต่อการตรึงสปอร์ปริมาณมากๆ ให้เม็ดเจลที่มีลักษณะกลม ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูง เหมาะที่จะนำไปใช้ตรึงสปอร์ในระดับอุตสาหกรรม มากกว่าวิธีการตรึงสปอร์แบบเข็มฉีดยาซึ่งใช้เวลานาน เม็ดเจลมีรูปร่างไม่แน่นอน และให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำ

4. สภาวะเหมาะสมในการงอกเป็นสายใยและให้การแปรรูป LCA เป็นกรด 3α, 15β-DHC ของสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน จากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น และบริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก โดยวิธี two phase system คือ เมื่อความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนเท่ากับ 3.0 และ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อปริมาตร)ตามลำดับ เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยที่เสริมด้วย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ ในขวดรูปชมพู่ก้นบุบ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 20 และ 40 ชั่วโมง ตามลำดับ จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผลิตกรด 3α,15β-DHC ประมาณ 95 เปอร์เซนต์ ของสายใยอิสระ

5. การเสริมเม็ดเจลสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ 0.05 โมลาร์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน จะช่วยทำให้ความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตรึงเพิ่มขึ้น แต่จะสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ไปอย่างสิ้นเชิง ในขณะที่เสริมด้วย 0.05 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์ชนิดเดียว ไม่ช่วยเพิ่มความแข็งของเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลเลย

6. พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC ตลอดจนความเสถียรของเอนไซม์ต่อ พีเอช และอุณหภูมิของสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิดเป็นดังนี้

สภาวะของเชื้อ	Optimum pH	Optimum Temperature (°ซ)	pH Stability	Temperature Stability (°ซ)
สายใยอิสระ	8.5	34-38	8.5	4 °ซ 12 ชม.
สายใยในเม็ดคาร์ราจีแนนเจล Wako	8.5	34-38	6.5-7.5	4 °ซ 24 ชม.
สายใยในเม็ดคาร์ราจีแนนเจล Copenhagen Pectin	8.5-9.0	34-38	6.5-8.0	4 °ซ 24 ชม.

7. เก็บรักษาสปอร์อิสระของ C.blakesleeana ST-22 ไว้ในนอร์มอลซาลีน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จะดีที่สุด สามารถเก็บได้นาน 70 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีของการงอกเป็นสายใยและเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC เลย

8. เก็บรักษาสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako ประเทศญี่ปุ่น และบริษัท Copenhagen Pectin ประเทศเดนมาร์ก ไว้ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ และสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นาน 24, 72 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด $3\alpha,15\beta$-DHC เท่ากับ 90 เปอร์เซนต์

9. สปอร์ C.blakesleeana ST-22 ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนจากบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin เมื่องอกสายใย และนำมาใช้แปรรูป LCA เป็นผลิตภัณฑ์กรด 3α,15β-DHC แล้ว สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องได้ถึง 3 ครั้ง โดยยังคงแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ไว้ถึง 80 เปอร์เซนต์ ในขณะที่สายใยอิสระไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ แต่ถ้าหากทำการกระตุ้นแอคติวิตีของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลทั้ง 2 ชนิด โดยใช้สูตรอาหารสำหรับการงอกเป็นสายใย จะมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ให้สูงขึ้นจากเดิมได้อีกอย่างน้อย 2 ครั้ง