หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

บทสรุปและวิจารณ์

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อ และอาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพชนิดต่าง ๆ กันที่มีคอเลสเทอรอลปริมาณ 0.5 มก./มล. ละลายในเอทิลอะซิเตทเป็นสารตั้งต้น เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง พบว่ามีจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ คือ *Mycobacterium* sp. BJ-153 และ *Mycobacterium* sp. BJ-157 ให้ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีสีและค่า Rf ตรงกับค่า Rf ของสารมาตรฐาน ADD คือมีค่า Rf เท่ากับ 0.24 เมื่อใช้อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อสูตรที่ 1 กับอาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพสูตรที่ 2 และอาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อสูตรที่ 2 กับอาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพสูตรที่ 2 ในเวลา 168 และ 48 ชม. ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าอาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 สามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงหัวเชื้อได้ทั้ง 2 ชนิด การใช้อาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพสูตรที่ 2 จะใช้ระยะเวลาสั้นกว่าเมื่อใช้อาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพสูตรที่ 1 (168 และ 48 ชม. ตามลำดับ) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในอาหารสูตรที่ 2 มีองค์ประกอบของสารอาหารที่สมบูรณ์มากกว่า โดยจะเห็นได้ว่ามีแหล่งไนโตรเจนและเกลือแร่มากชนิดกว่าในอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งจะเป็นผลให้จุลินทรีย์มีความสามารถในการสังเคราะห์ระบบของเอนไซม์เพื่อแปลงรูปทางชีวภาพได้ดีกว่าเมื่อใช้สูตรอาหารที่มีความสมบูรณ์น้อยกว่า และนอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ว่าในสูตรอาหารสำหรับหัวเชื้อสูตรที่ 2 และสูตรอาหารสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพสูตรที่ 2 มีทวีน 80 ประกอบอยู่ด้วย และทวีน 80 นี้อาจทำหน้าที่ช่วยให้การกระจายตัวของคอเลสเทอรอลได้ดีขึ้น จึงทำให้เซลสามารถแปลงรูปคอเลสเทอรอลได้มากขึ้น และจากที่มีผู้รายงานไว้ว่า ต้องมีการเติมสารไดไพริดิล ซึ่งใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ 9 อัลฟา-ไฮดรอกซิเลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงมีการสะสมสาร ADD ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Nagasawa และคณะ, 1970; Saundors และคณะ, 1986; Prome และคณะ, 1987) แต่ในบางกรณีอาจไม่มีความจำเป็นที่จะต้องใส่สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (Marsheck และคณะ, 1971; Watanabe และคณะ 1986) สำหรับงานวิจัยนี้ก็ได้

พบว่าจำเป็นต้องเติมไดไพริดิล จึงจะสามารถตรวจพบ ADD ได้ เอนไซม์ 9 อัลฟา-ไฮดรอกซีเลส นี้เป็นเอนไซม์โมโนออกซีจีเนสชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเฟอรัสอิออนเป็นอิออนของโลหะที่สำคัญ การดึงหรือการย้ายอิออนเหล่านี้ออกไปจากโมเลกุลของโปรตีนจะมีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์นี้โดยสมบูรณ์ สารไดไพริดิลเป็นสารที่ยับยั้งแอคติวิตีดังกล่าวของเอนไซม์โดยทำหน้าที่เป็นสารคีเลทติ้ง (clelating agent) สำหรับเฟอรัสอิออนดังกล่าว (Martin, 1984)

สภาวะทางกายภาพเพื่อการแปลงรูปทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากที่มีผู้รายงานไว้นั้น การควบคุมอุณหภูมิอยู่ในช่วง 25-37°ซ และความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วงพีเอช 4.5-8.0 (Mersheck และคณะ, 1973; Worcha และ Brooks, 1980; Kulprecha และคณะ, 1985) จากการวิจัยนี้ก็ได้พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 คือ 30°ซ และมีค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7.0-8.0 ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้มีผู้รายงานไว้

สำหรับการเตรียมคอเลสเทอรอลเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น เนื่องจากมีรายงานว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (water miscible organic solvents) บางชนิดช่วยในการละลายสารตั้งต้นประเภทสเตียรอยด์ จะทำให้การสร้างผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น (Sonomoto และคณะ, 1983; Kulprecha และคณะ, 1985) ในตอนเริ่มต้นของการวิจัยนี้ได้ใช้เอทิลอะซิเตท (ในปริมาณร้อยละ 1) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ช่วยในการละลายคอเลสเทอรอลปริมาณ 0.5 มก./มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้ปริมาณสาร ADD จากการแปลงรูปทางชีวภาพเท่ากับ 0.14 มก./มล. เมื่อเปลี่ยนมาใช้ไดออกเซนในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นตัวทำละลายคอเลสเทอรอลปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพเพิ่มขึ้นเป็น 0.20 มก./มล. ซึ่งคิดเป็นแอคติวิตีสัมพัทธ์ร้อยละ 142.86 ของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล เมื่อใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาเรื่องการสร้าง 3α-15β-DHC (3α,15β-dihydroxy-5 -cholanic acid) ซึ่งเป็นสเตียรอยด์ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นกรดน้ำดี โดยใช้เซลระยะพักตัวของ *Absidia* sp. BA.16 ซึ่งได้รายงานไว้ว่า ไดออกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในการช่วยละลายกรดลิโทโคลิก (lithocholic acid, LCA) โดยใช้ไดออกเซนในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ทำให้สร้าง 3α,15β-DHC ได้เป็นแอคติวิตีสัมพัทธ์ร้อยละ 184 ของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สร้างโดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (สุนันทา ค. เชศะนันท์ 2530) แต่จะ

ต่างกันกับการสร้าง 3α,15β-DHC โดย *Cunninghamella blakesleeana* ST 22 ซึ่งใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ในปริมาณร้อยละ 2-4 เป็นตัวทำละลาย LCA ที่เหมาะสมที่สุด โดยที่ DMSO ในปริมาณร้อยละ 2 ทำให้ปริมาณการละลายของ LCA เพิ่มจาก 13 มก./ลิตร เป็น 18 มก./ลิตร และการสร้างผลิตภัณฑ์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ DMSO ต่ำกว่าร้อยละ 2 หรือสูงกว่าร้อยละ 4 (Kulprecha และคณะ, 1985) ซึ่งการทดลองนี้เมื่อใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าการแปลงรูปทางจะได้เพียง 0.02 มก./มล. เท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก DMSO มีผลเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ หรืออาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล จึงทำให้ได้สาร ADD ในปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อใช้ไดออกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ และในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ไดออกเซนปริมาณมากกว่าร้อยละ 1 พบว่าการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD จะลดลง ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากปริมาณของไดออกเซนมากเกินไป มีผลให้เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (Leuenberger, 1984) ทำให้ประสิทธิภาพในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD ลดลง

จากที่มีผู้รายงานไว้เกี่ยวกับปริมาณคอเลสเทอรอลซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นมีปริมาณตั้งแต่ 0.5-5 กรัม/ลิตร (Wix และคณะ, 1967; Nagasawa และคณะ, 1969; Arima และคณะ, 1969; Owen และคณะ, 1983) ในการวิจัยนี้เมื่อแปรผันปริมาณของคอเลสเทอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ปริมาณคอเลสเทอรอล 1.0 กรัม/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแปลงรูป คอเลสเทอรอลถูกแปลงรูปทางชีวภาพเป็นสาร ADD ได้ 0.32 มก./มล. ในเวลา 72 ชม. พบว่าถ้าปริมาณคอเลสเทอรอลสูงหรือต่ำกว่านี้ การแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลจะต่ำลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อปริมาณคอเลสเทอรอลสูงขึ้นเป็น 2.0 และ 2.5 กรัม/ลิตร การแปลงรูปของคอเลสเทอรอลจะต่ำลงมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อมีสารตั้งต้นในปริมาณสูง และเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ มักมีผลในการยับยั้งเอนไซม์แอคติวิตีและการเจริญของเซล เช่นเดียวกับที่ Sonomoto ได้รายงานไว้ (Sonomoto, 1982)

สำหรับเวลาที่เหมาะสมในการเติมคอเลสเทอรอลนั้น ในช่วงต้นของการวิจัยนี้ได้เติมคอเลสเทอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น (0 ชม.ของการเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งเป็นวิธีการเช่นเดียวกับผู้วิจัยบางคณะ (Owen และคณะ 1983; Hesslink และคณะ, 1989) ในขณะที่มีรายงานโดยผู้วิจัยคณะอื่นได้เติมคอเลสเทอรอล ที่เวลา 20 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ (Wix และคณะ, 1967; Nagasawa และคณะ 1970) และเนื่องจากการใช้คอเลสเทอรอลเป็นสารตั้งต้นนี้ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ช่วยในการละลายคอเลสเทอรอลซึ่งอาจมีพิษต่อจุลินทรีย์ จึงได้ทำการ

เปรียบเทียบผลของการเติมคอเลสเทอรอลที่เวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยงเชื้อ (โดยเติมไดไพริดิล ที่เวลา 26 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อในทุกตัวอย่าง) จากผลการวิจัยที่ได้พบว่า ได้ปริมาณสาร ADD สูงที่สุด (0.32 มก./มล.) เมื่อเติมคอเลสเทอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ตั้งแต่เริ่มต้น (0 ชม.ของการเลี้ยงเชื้อ) และปริมาณสาร ADD ที่ได้ลดลงตามลำดับในกรณีที่เติมคอเลสเทอรอล ที่เวลา 6 12 และ 24 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเหตุผล 2 ประการ ประการแรกอาจเป็นไปได้ว่าในกรณีที่เติมคอเลสเทอรอลตั้งแต่เริ่มต้น คอเลสเทอรอลมีส่วน เหนี่ยวนำให้เซลล์ของ *Mycobacterium* sp. BJ-157 สร้างหรือกระตุ้นการทำงานของ เอนไซม์ที่ใช้ในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD ได้มากกว่าในกรณีที่ เติมคอเลสเทอรอลภายหลัง และอีกประการหนึ่ง อาจเนื่องมาจากในตัวอย่างที่เติมคอเลส-เทอรอลตั้งแต่เริ่มต้นนั้นจะทำให้ไดไพริดิลทำงานยับยั้งเอนไซม์ 9 อัลฟา-ไฮดรอกซีเลสได้ก่อน ตัวอย่างที่เติมคอเลสเทอรอลภายหลังคือ นานกว่า 6 6 และ 12 ชม. ตามลำดับ (ตัวอย่าง แรกเติมคอเลสเทอรอลที่ 0 ชม. หลังจากนั้นเติมไดไพริดิลที่ 26 ชม. ตัวอย่างที่สองเติม คอเลสเทอรอลที่ 6 ชม. และหลังจากนั้นเติมไดไพริดิลที่ 20 ชม. เป็นต้น)

ในการใช้ไดไพริดิลเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ 9 อัลฟา-ไฮดรอกซีเลส นั้น ปริมาณของ ไดไพริดิล และเวลาที่เติมไดไพริดิลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลสำคัญต่อปริมาณสาร ADD ที่ได้ (Martin, 1984) จากการที่มีรายงานไว้ว่ามีการใช้ไดไพริดิลในปริมาณ 1.0-10.0 มิลลิโมลาร์ โดยที่จุลินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ *Pseudomonas* sp. *Mycobacterium fortuitum* *Mycobacterium aurum* เป็นต้น โดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 26-28 ชม. (Wix, และคณะ 1967, Nagasawa และคณะ, 1969; Owen และคณะ, 1983; Prome และคณะ, 1987) ในงานวิจัย นี้ก็ได้พบว่าปริมาณไดไพริดิลที่เหมาะสมเท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ไดไพริดิลปริมาณมากหรือ น้อยกว่านี้ปริมาณสาร ADD ที่ได้จะลดลง ส่วนเวลาที่เติมสารไดไพริดิล พบว่า เติมที่เวลา 14 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อจะให้ผลดีที่สุด ซึ่งเป็นเวลาที่เร็วกว่าจากที่มีผู้รายงานไว้ดังกล่าวมาแล้ว

สำหรับชนิดของแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการแปลงรูปทางชีวภาพของสาร สเตียรอยด์โดยจุลินทรีย์นั้นมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของสารตั้งต้น และ ชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ดังที่มีผู้รายงานไว้ว่า คอร์นสตีพลิเคอร์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการ แปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD และ androsta-1,4-diene-3,11,17-trione โดย *Mycobacterium phlei* (Wix, 1967) อิโนซิทอลและแมนิทอลถูกใช้เป็นแหล่ง คาร์บอน โดย *Mycobacterium* sp. ในการแปลงรูปทางชีวภาพของซิโทสเตียรอล แล้วได้เป็น

สาร ADD (Marsheck, 1971) และมีการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดยเชื้อ *Arthrobacter simplex* (Nagawawa, 1970) เป็นต้น ในงานวิจัยนี้แหล่งอาหารคาร์บอนที่มีผลให้มีการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 ได้ดีที่สุด (ได้ปริมาณสาร ADD 0.62 มก./มล.) ได้แก่ คอร์นสตีพลิเคอร์ (ในปริมาณ 20 กรัม/ลิตร) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคอร์นสตีพลิเคอร์เป็นสารอินทรีย์ที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นสารอาหารต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ เช่น เกลือแร่ และวิตามิน หลายชนิด และนอกจากนี้แล้ว ผลการวิเคราะห์โดยเทคนิคแกสโครมาโตกราฟีเพื่อหาองค์ประกอบของสารสเตียรอยด์บางชนิด ซึ่งอาจจะมีปนเปื้อนอยู่ในคอนสตีพลิเคอร์ได้ พบว่ามีพีคซึ่งปรากฏที่นาทีที่ 3.0 ซึ่งต่างจากตำแหน่งของคอเลสเทอรอล และของสาร ADD ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า ในคอนสตีพลิเคอร์มีสารสเตียรอยด์บางอย่างที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับคอเลสเทอรอลปะปนอยู่ และอาจจะถูกแปลงรูปเป็นสาร ADD โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้นี้ จึงมีผลให้สาร ADD มีปริมาณสูงขึ้นอย่างเป็นที่น่าสังเกต เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้จำเป็นจะต้องมีการศึกษาต่อไป

จากผลการวิจัยนี้ พบว่า กากถั่วเหลือง (ในปริมาณ 10 กรัม/ลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 ส่วนที่มีผู้รายงานไว้มีการใช้สารอื่นเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ เช่น ผงสกัดยีสต์ เปปโตน แอมโมเนียมไนเตรต เป็นต้น (Arima, 1969; Marsheck, 1971; Watanabe, 1986;) ทั้งนี้มีความแตกต่างกันในส่วนของชนิดของจุลินทรีย์ สารตั้งต้น และสารผลิตภัณฑ์ จากการวิจัยนี้ เมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น ได้พบว่า ความสามารถในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สิ่งที่น่าจะคำนึงถึงก็คือกากถั่วเหลืองเป็นส่วนที่เหลือจากการสกัดน้ำมันถั่วเหลือง ซึ่งยังอาจมีสารสเตียรอยด์ที่สำคัญคือ สติกมาสเตียรอล เหลืออยู่ และสติกมาสเตียรอลนี้มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับคอเลสเทอรอล จึงอาจเป็นไปได้ว่า นอกจากคอเลสเทอรอลแล้ว สติกมาสเตียรอลยังอาจถูกแปลงรูปทางชีวภาพ โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 จึงเป็นผลให้ได้สาร ADD ปริมาณสูงขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากถั่วเหลืองในปริมาณเท่ากันกับที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ไม่พบว่ามีสติกมาสเตียรอลอยู่เลย จึงสรุปได้ว่าการที่ความสามารถในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD เพิ่มขึ้นนั้น เนื่องจากกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นสำหรับจุลินทรีย์

สายพันธุ์ที่ใช้นี้

เมื่อทำการแปรผันปริมาณของเกลือแร่แต่ละชนิด พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมของเกลือแร่แต่ละชนิด มีผลต่อปริมาณสาร ADD ที่ได้ แต่เมื่อนำปริมาณที่เหมาะสมของเกลือแร่แต่ละชนิดนั้นมารวมกัน ผลที่ได้คือสาร ADD ที่เกิดจากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 มีปริมาณลดลง เมื่อเทียบกับปริมาณของเกลือแร่ที่ใช้อยู่เดิม ซึ่งอาจเกิดจากผลรวมข้างเคียง (combined effect) ที่เกิดจากการที่เกลือแร่แต่ละชนิดในปริมาณดังกล่าวมารวมกัน แล้วเกิดการแลกหมู่หรือมีการแลกเปลี่ยนอิออนเกิดขึ้นจึงมีผลทำให้ปริมาณเกลือแร่ที่สามารถจะถูกนำไปใช้ได้เปลี่ยนไป ดังนั้นปริมาณที่เหมาะสมในช่วงแรกจึงเปลี่ยนแปลงไปจึงมีผลกระทบต่อการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล ทำให้ปริมาณสาร ADD สูงสุดที่ได้ไม่เท่ากับเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้เกลือแร่แต่ละชนิด

ได้มีผู้รายงานไว้ว่า เบตา-ไซโคลเดกซ์ตริน มีผลในการเพิ่มการสะสมของสาร AD และสาร ADD (Hesselink และคณะ, 1989) แต่จากผลการวิจัยนี้พบว่า สาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อมีไซโคล-เดกซ์ตรินอยู่ด้วยมีปริมาณลดลง ทั้งนี้เบตา-ไซโคลเดกซ์ตรินอาจจะมีผลไปยับยั้งการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล ซึ่งกลไกหรือการทำงานของไซโคลเดกซ์ตรินนั้นยังไม่ทราบแน่นอน ได้มีรายงานวิจัยว่าสารนี้มีหน้าที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำสารตั้งต้นเข้าสู่เซลของจุลินทรีย์ โดยช่วยให้สารตั้งต้นกระจายได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อในกรณีที่ไม่ได้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Bar, 1989; Hesselink และคณะ, 1989) แต่เนื่องจากในการวิจัยนี้ได้ใช้ไดออกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ละลายคอเลสเตอรอลเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ยังได้ใช้สภาวะที่เพิ่มให้คอเลสเทอรอลและปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ (ได้แก่ ไดออกเซน) ที่เหมาะสม ดังนั้นไซโคล-เดกซ์ตรินจึงอาจจะไม่ได้ทำหน้าที่ดังกล่าว กรณีการเติมไซโคลเดกซ์ตรินจึงไม่มีผลกระทบต่อการแปลงรูปคอเลสเทอรอลเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด และยังอาจมีผลไปยับยั้งการแปลงรูปชีวภาพโดยวิธีการใดวิธีการหนึ่งก็เป็นได้ สำหรับผลของน้ำมันละหุ่งและน้ำมันถั่วเหลืองนั้นก็อาจจะเป็นไปในทำนองเดียวกันกับเหตุผลข้างต้น ซึ่งข้อสันนิษฐานเหล่านี้จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยกันต่อไป

สรุปผลของงานวิจัยนี้

1. คัดเลือกได้เชื้อจุลินทรีย์ *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ BJ-157 ซึ่งมีความสามารถในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลได้เป็นสาร ADD

2. สารที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลโดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 ได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าเป็นสาร ADD

3. สภาวะแวดล้อมทางกายภาพที่เหมาะสมในการแปลงรูปทางชีวภาพคือ อุณหภูมิที่ 30°ซ และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0-8.0

4. การเตรียมสารตั้งต้น ได้แก่ คอเลสเทอรอล โดยการละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ไดออกเซน ในปริมาณร้อยละ 1 และใช้คอเลสเทอรอลในปริมาณ 1 กรัม/ลิตร โดยเติมคอเลสเทอรอลที่เตรียมดังกล่าวนี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น (0 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ)

5. ใช้ไดไพริดิลเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 9 อัลฟาไฮดรอกซีเลส ในปริมาณ 1.0 มิลลิโมลาร์ และเติมที่เวลา 14 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ

6. องค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ได้แก่ คอร์นสตีพริเคอร์ ในปริมาณ 20 กรัม/ลิตร แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ กากถั่วเหลือง ในปริมาณ 10 กรัม/ลิตร

7. ปริมาณที่เหมาะสมของเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ที่รวมกันเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใน 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 0.5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ปริมาณ 2.0 กรัม โซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 0.4 กรัม และแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณ 3.0 กรัม

8. การเติมสารบางชนิด ได้แก่ เบตา-ไซโคลเดกซ์ตริน น้ำมันละหุ่ง และน้ำมันถั่วเหลือง ในปริมาณ 1 กรัม/ลิตร ไม่มีผลในการเพิ่มความสามารถในการแปลงรูปทางชีวภาพ และยังมีผลในการทำให้ลดความสามารถในการแปลงรูปทางชีวภาพลงด้วย

9. เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการวิจัยนี้ สามารถเพิ่มการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล จาก 0.14 เป็น 0.83 มก./มล.