หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

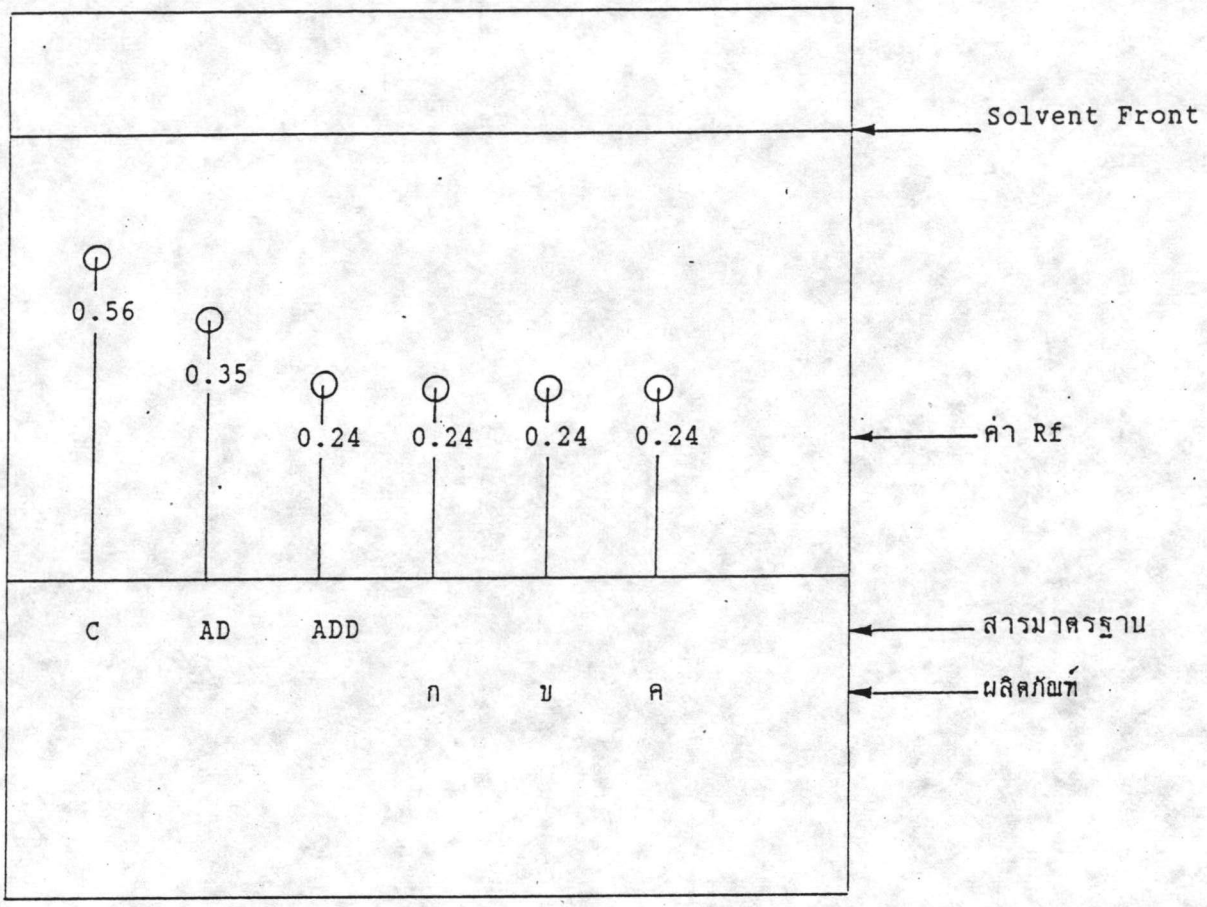
บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD

3.1.1 <u>เปรียบเทียบความสามารถในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลอเทอรอลโดยจุลินทรีย์ จำนวน 8 สายพันธุ์</u>

เลี้ยงจุลินทรีย์ 8 สายพันธุ์ โดยใช้อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ สูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 (ข้อ 2.3) และใช้อาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพ 2 ชนิด ได้แก่ สูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 (ข้อ 2.3) ทำการทดลองโดยเติมและไม่เติมสารไดไพริดิลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชม. สกัดแยกสารที่ได้ และวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง ผลการทดลอง (รูปที่ 7) พบว่า มีจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ คือ *Mycobacterium* sp. BJ-153 กับ *Mycobacterium* sp. BJ-157 ที่ให้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีสีและค่า Rf บนแผ่นโครมาโตแกรมตรงกับค่า Rf ของสารมาตรฐาน ADD คือมีค่า Rf เท่ากับ 0.24 เมื่อพิจารณาระยะเวลาที่ใช้ในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล พบว่า *Mycobacterium* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งเจริญในอาหารเหลวเตรียมหัวเชื้อ สูตรที่ 1 ใช้เวลาในการเริ่มต้นสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์นานกว่าในอาหารเหลวเตรียมหัวเชื้อสูตรที่ 2 เกือบ 4 เท่า (168 และ 48 ชม. ตามลำดับ) (ตารางที่ 5)



รูปที่ 7 ค่า Rf ของสารมาตรฐานและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-153 และ BJ-157 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง

C : คอเลสเทอรอล

AD : 4-แอนโดรสตีน-3,17-ไดโอน

ADD : 1,4-แอนโดรสตาไดอีน-3,17-ไดโอน

ก : ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก *Mycobacterium* sp. BJ-153 เมื่อเลี้ยงเชื้อนานเป็นเวลา 168 ชม.

ข : ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก *Mycobacterium* sp. BJ-153 เมื่อเลี้ยงเชื้อนานเป็นเวลา 48 ชม.

ค : ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อเลี้ยงเชื้อนานเป็นเวลา 48 ชม.

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบความสามารถในการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดยจุลินทรีย์จำนวน 8 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ กัน มีการเติมและไม่เติมไดไนริดิลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดสารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด แล้ววิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง

จุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ		เติมไดไนริดิล		ไม่เติมไดไนริดิล		เวลาในการแปลงรูปทางชีวภาพ (ชม.)
	อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อ	อาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพ	สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท	สกัดด้วยเมทิลีนคลอไรด์	สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท	สกัดด้วยเมทิลีนคลอไรด์	
Mycobacterium	1	1	-	-	-	-	-
sp. BJ-153		2	+	-	-	-	168
	2	1	-	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	48
Mycobacterium	1	1	-	-	-	-	-
sp. BJ-157		2	-	-	-	-	-
	2	1	-	-	-	-	-
		2	+	-	-	-	48
Mycobacterium	1	1,2	-	-	-	-	-
phlei BJ-158	2	1,2	-	-	-	-	-
Mycobacterium	1	1,2	-	-	-	-	-
fortuitum BJ-683	2	1,2	-	-	-	-	-
Mycobacterium	1	1,2	-	-	-	-	-
fortuitum BJ-805	2	1,2	-	-	-	-	-
Arthrobacter	1	1,2	-	-	-	-	-
simplex BJ-069	2	1,2	-	-	-	-	-
Nocardia sp.	1	1,2	-	-	-	-	-
BJ-070	2	1,2	-	-	-	-	-

+ คือ ตรวจพบผลิตภัณฑ์ (สาร ADD)

- คือ ตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์ (สาร ADD)

3.2 เปรียบเทียบศักยภาพของการแปลงรูปของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. สายพันธุ์ BJ-153 และสายพันธุ์ BJ-157

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-153 และ *Mycobacterium* sp. BJ-157 ในอาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อ สูตรที่ 2 และอาหารเหลวสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพสูตรที่ 2 ซึ่งมีคอเลสเทอรอล ความเข้มข้น 0.5 มก./มล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชม. โดยเริ่มจากชั่วโมงที่ 48 หลังจากเติมไดไพริดิลความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ สกัดสาร ADD ด้วยเอทิลอะซิเตทแล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟ

ผลการทดลอง (ตารางที่ 6) พบว่า ที่เวลา 48-120 ชม. ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดยเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-157 มีระดับสูงกว่าที่ได้จากเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-153 ประมาณ 2 เท่า ที่ทุกระยะของการเจริญ

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดยเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-153 และ *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ กัน

จุลินทรีย์	เวลาในการแปลงรูปทางชีวภาพ (ชม.)	สาร ADD (มก./มล.)
Mycobacterium sp. BJ-153	48	0.08
	72	0.08
	96	0.06
	120	0.06
Mycobacterium sp. BJ-157	48	0.14
	72	0.14
	96	0.11
	120	0.09

3.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ ADD ที่ผลิตได้โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157

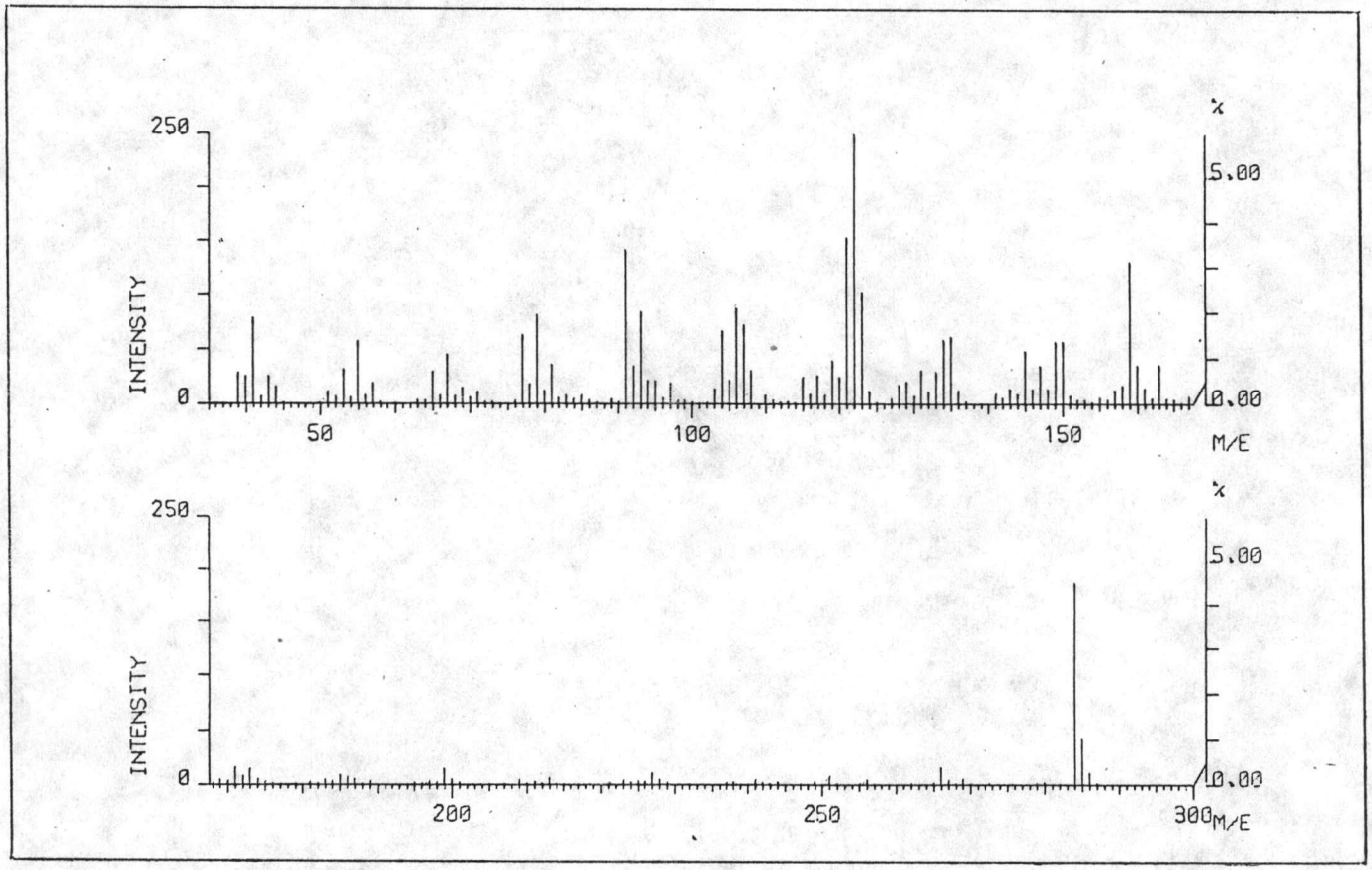
จากการทำให้สาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลโดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 บริสุทธิ์ เพื่อวิเคราะห์ทางเคมี โดยใช้สารที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ น้ำหนัก 3.39 กรัม (วิธี 2.9.1) ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปทำให้ตกผลึก ได้สารบริสุทธิ์ในรูปผลึก คิดเป็นน้ำหนัก 1.33 กรัม เพื่อนำผลึกของสาร ADD ที่ได้ไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและโครงสร้างทางเคมีต่าง ๆ

3.3.1 ตรวจหาจุดหลอมเหลว

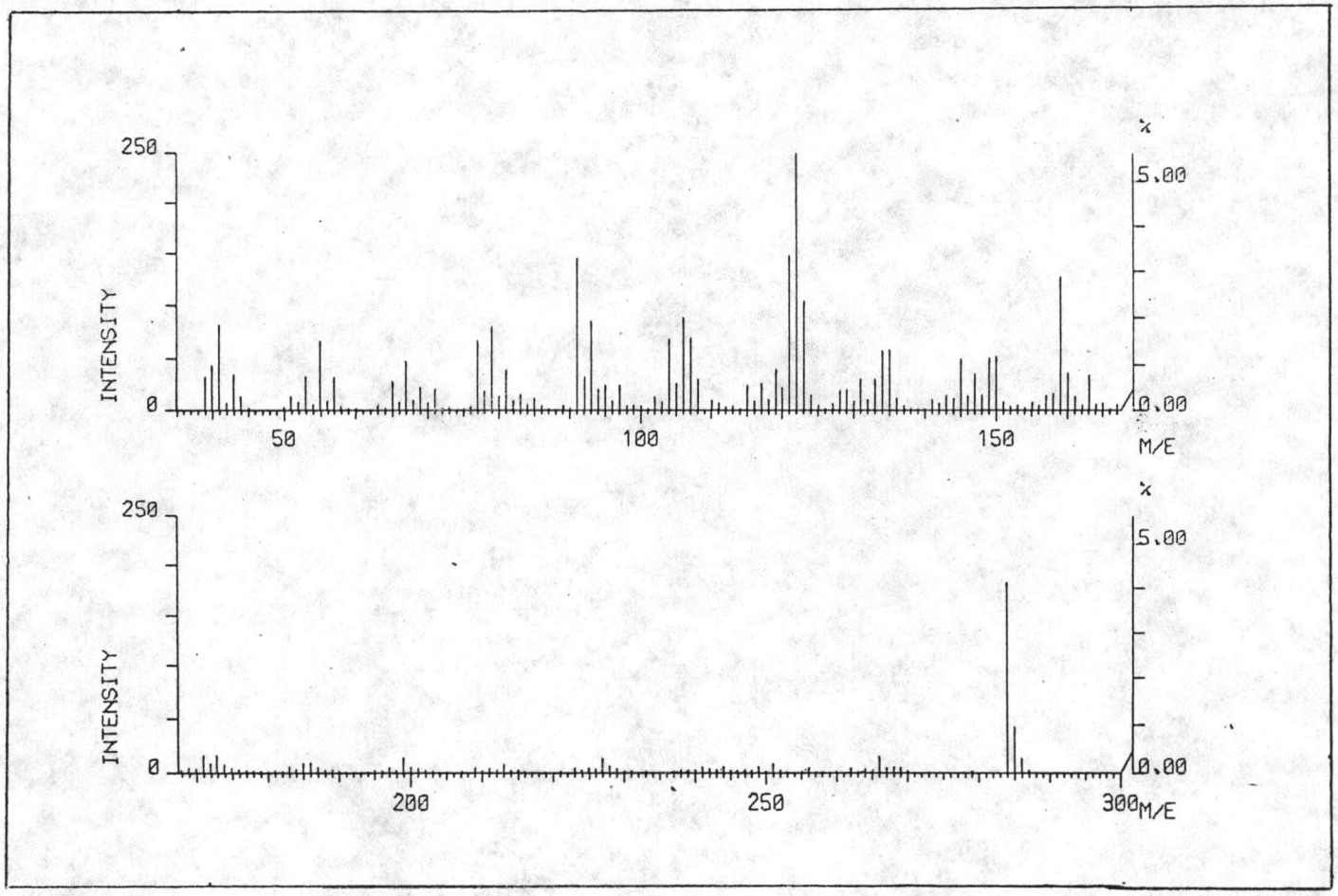
นำสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์มาตรวจหาจุดหลอมเหลว ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 (ข้อ 2.9.2.1) ในการวิจัยนี้พบว่า จุดหลอมเหลวของสารตัวอย่างคือ 139-141°ซ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของผู้วิจัยที่เคยมีรายงานว่า สาร ADD มีจุดหลอมเหลวที่ 141-143°ซ (Dodson และ Muir, 1961) 139-141°ซ (Marsheek และคณะ, 1972) และ 141°ซ (Srivastava และคณะ, 1985) ซึ่งจุดหลอมเหลวของสารตัวอย่างนี้ มีค่าอยู่ในช่วงเดียวกันกับจุดหลอมเหลวของสารมาตรฐาน ADD คือ 138-139°ซ

3.3.2 ตรวจโครงสร้างของโมเลกุล ADD ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

นำสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ ตามวิธีที่กล่าวตามข้อ 2.9.2.2 พบว่าสารตัวอย่างมีมวลโมเลกุล 284 ซึ่งเท่ากับมวลโมเลกุลของ ADD และรูปแบบการแตกตัวเหมือนกันทุกประการกับรูปแบบการแตกตัวของสารมาตรฐาน ADD ดังแสดงในรูปที่ 8 และ 9



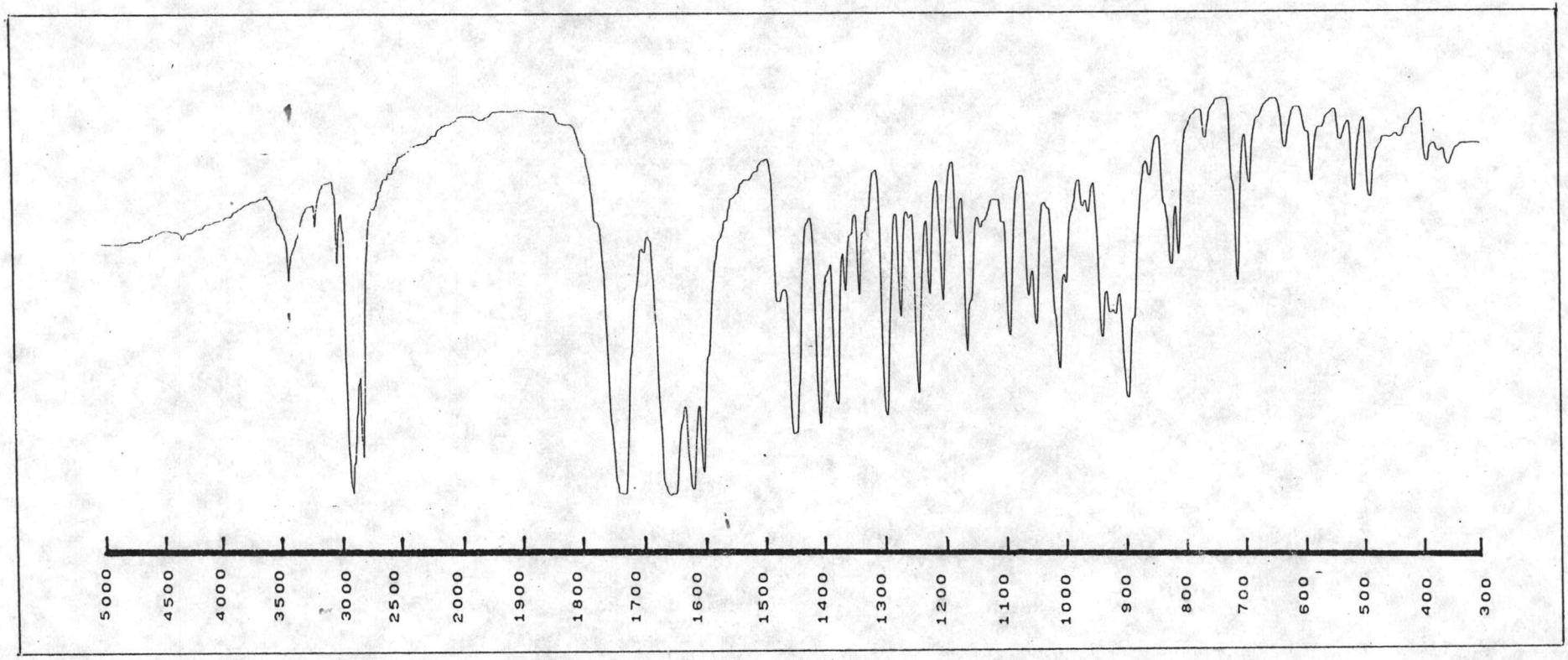
รูปที่ 8 แมสสเปกตรัมของสารมาตรฐาน ADD



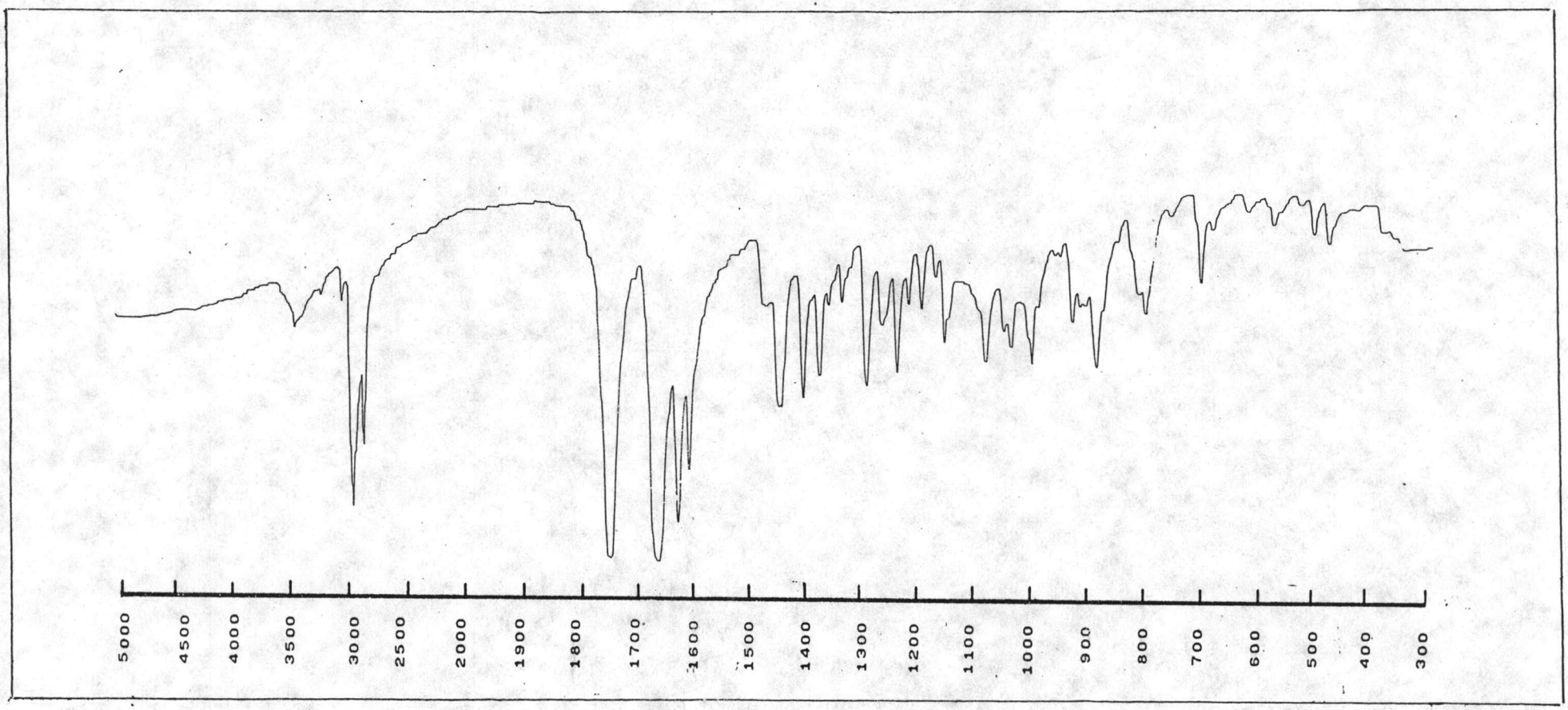
รูปที่ 9 แมสสเปกตรัมของสารตัวอย่าง ที่ได้จากการแปลงรูปคอเลสเทอรอล ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157

3.3.3 ตรวจโครงสร้างของโมเลกุลโดยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์

เตรียมสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์สำหรับตรวจหาหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ตามวิธีการข้อ 2.9.2.3 พบว่า จากอินฟราเรดสเปกตรัม แสดงว่าสารตัวอย่างมีหมู่คาร์บอนิลสองหมู่คือ พีคที่เลขคลื่น 1740 ซม.$^{-1}$ (หมู่คาร์บอนิลเสรี) และพีคที่เลขคลื่น 1653 ซม$^{-1}$ (หมู่คอนจูเกรทดคาร์บอนิล) นอกจากนี้สารตัวอย่างยังมีหมู่พันธะคู่ C=C ซึ่งปรากฏให้เห็นด้วยพีคที่เลขคลื่น 1602 และ 1620 ซม$^{-1}$ จากการเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของสารตัวอย่างกับอินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐาน ADD พบว่า อินฟราเรดสเปกตราทั้งสองเหมือนกันทุกประการ ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11



รูปที่ 10 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐาน ADD



รูปที่ 11 อินฟราเรดสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่ได้จากการแปลงรูปคอเลสเทอรอล ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157

3.3.4 <u>ตรวจโครงสร้างของโมเลกุลด้วยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปก-โตรมิเตอร์</u>

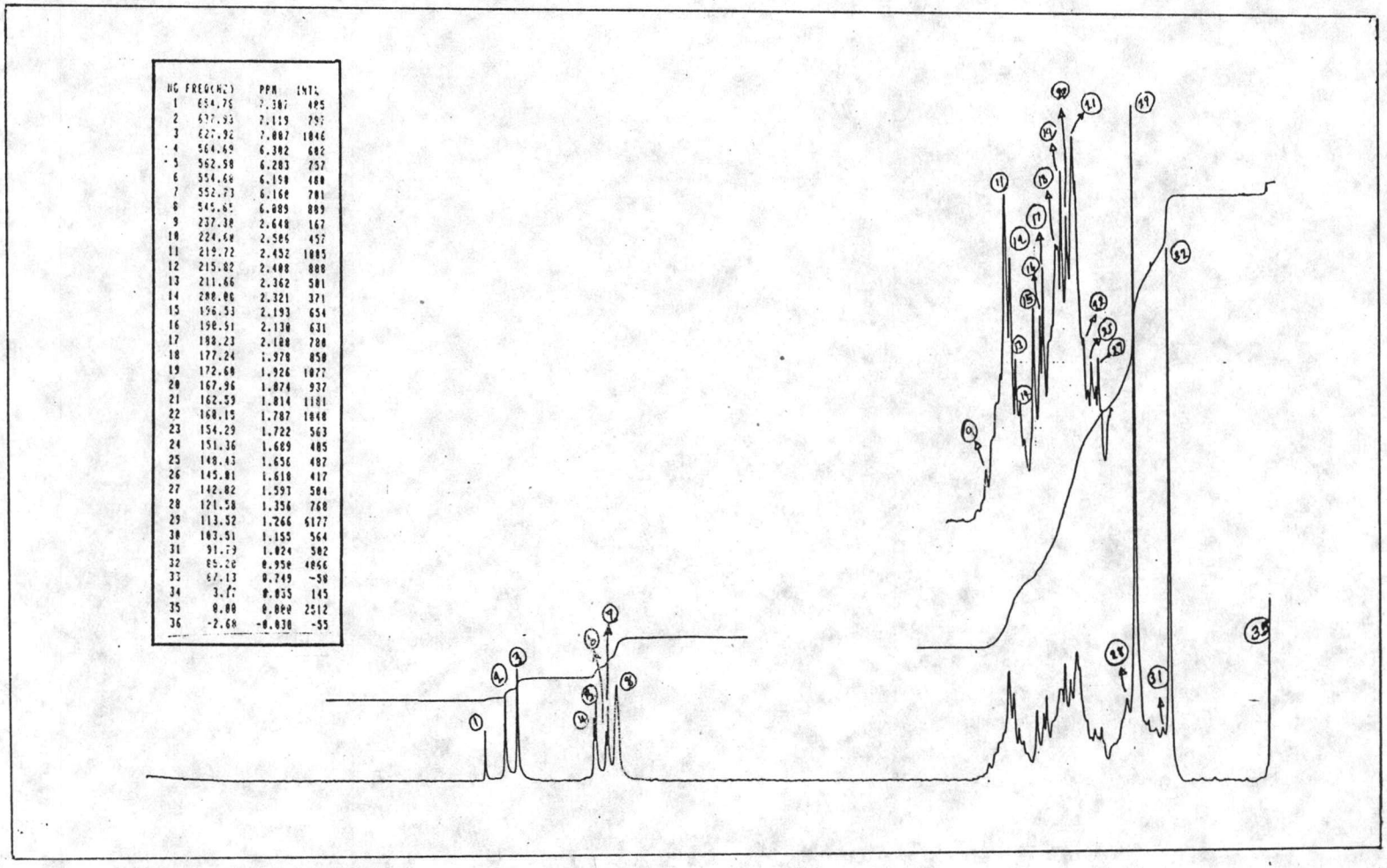
นำสารตัวอย่างที่บริสุทธิ์มาวิเคราะห์ ตามวิธีการที่กล่าวตามข้อ 2.9.2.4 พบว่า

1. โปรตอน นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{1}H-NMR) จากสเปกตรัมของสารตัวอย่าง (รูปที่ 14) แสดงว่าสารตัวอย่างมีหมู่เมธิลสองหมู่คือ ที่ 0.95 พีพีเอม (3H,S) และ 1.26 พีพีเอม (3 H, S) และมีโปรตอนในวงแหวนในช่วงจาก 1.04-2.67 พีพีเอม (15 H, m) นอกจากนี้สารตัวอย่างยังมีโอเลฟินิกโปรตอนที่ 6.09 พีพีเอม (1 H, br.s) 6.22 พีพีเอม (1 H, dd, J = 1.7, 10.0 Hz) และ 7.05 พีพีเอม (1H, d, J = 10.00 Hz)

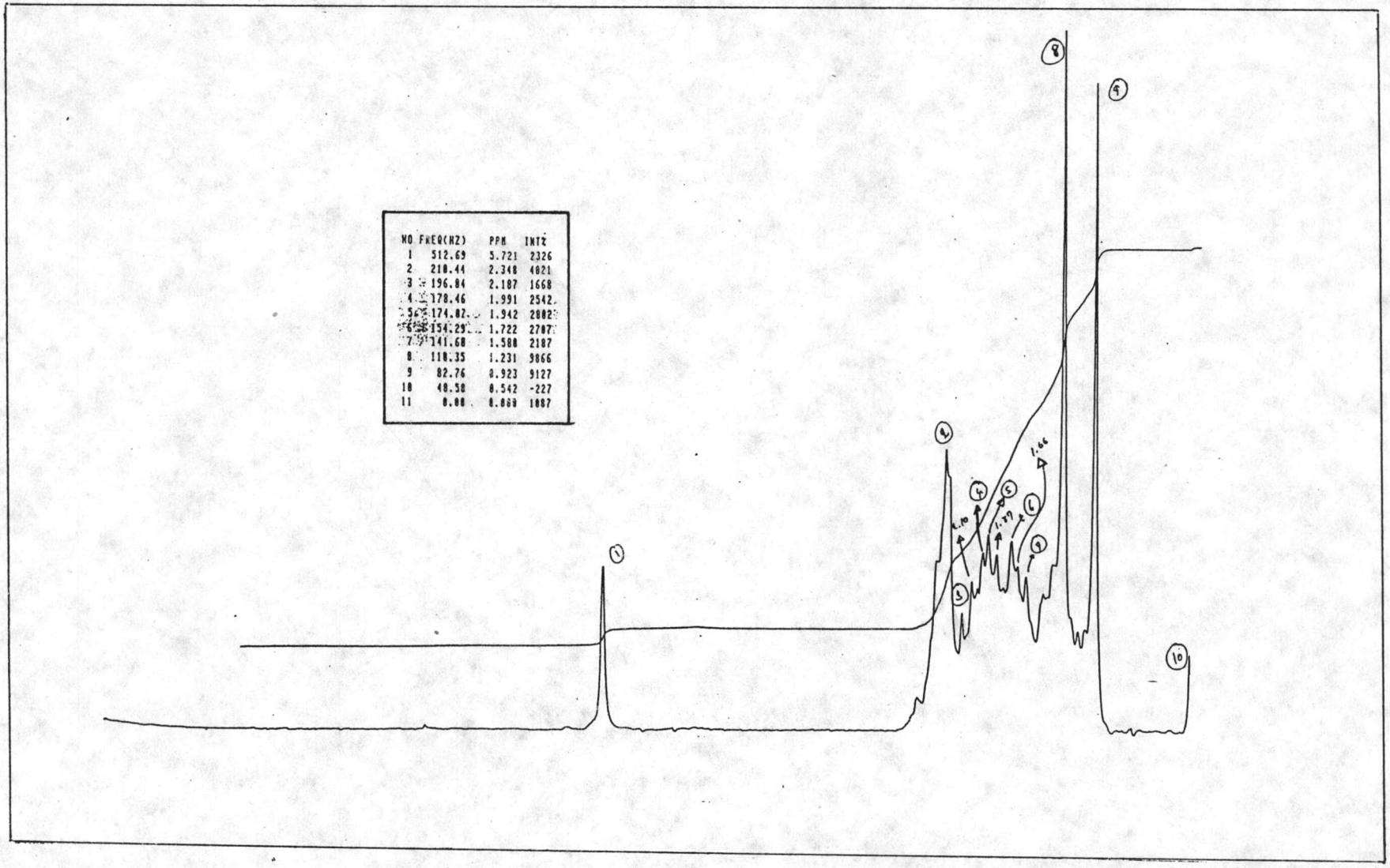
พบว่า ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน ADD (รูปที่ 12) มีลักษณะเหมือนกันทุกประการกับ ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสารตัวอย่าง และต่างจากสเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD อย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 13)

2. คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ จาก ^{13}C-NMR สเปกตราของสารตัวอย่างพบว่า มีสัญญาณของ ^{13}C ปรากฏให้เห็นเพียง 14 คาร์บอนเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากใช้ปริมาณของสารตัวอย่างน้อยเกินไป (รูปที่ 17) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับ ^{13}C-NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน ADD (รูปที่ 15) พบว่า สเปกตรัมทั้งสองมีลักษณะใกล้เคียงกัน ยกเว้นคาร์บอนบางตำแหน่งที่ปรากฏให้เห็นอย่างไม่ชัดเจนใน ^{13}C-NMR ของสารตัวอย่าง นั่นคือพีกที่ 219.23, 185.62 และ 168.22, 47.73 และ 43.32 พีพีเอม ซึ่งเป็นลักษณะโดยปกติ เนื่องมาจากคาร์บอนทั้งห้าเป็นคาร์บอนชนิดควอเทอร์แนรี คาร์บอนที่มักมีความเข้มต่ำอันเนื่องมาจากการมีเวลาในการเกิดรีแลกเซชัน (relaxation time) ที่ยาวนาน นอกจากนี้ ^{13}C-NMR ของสารตัวอย่างยังแตกต่างจาก ^{13}C-NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD (รูปที่ 16) อย่างเด่นชัด

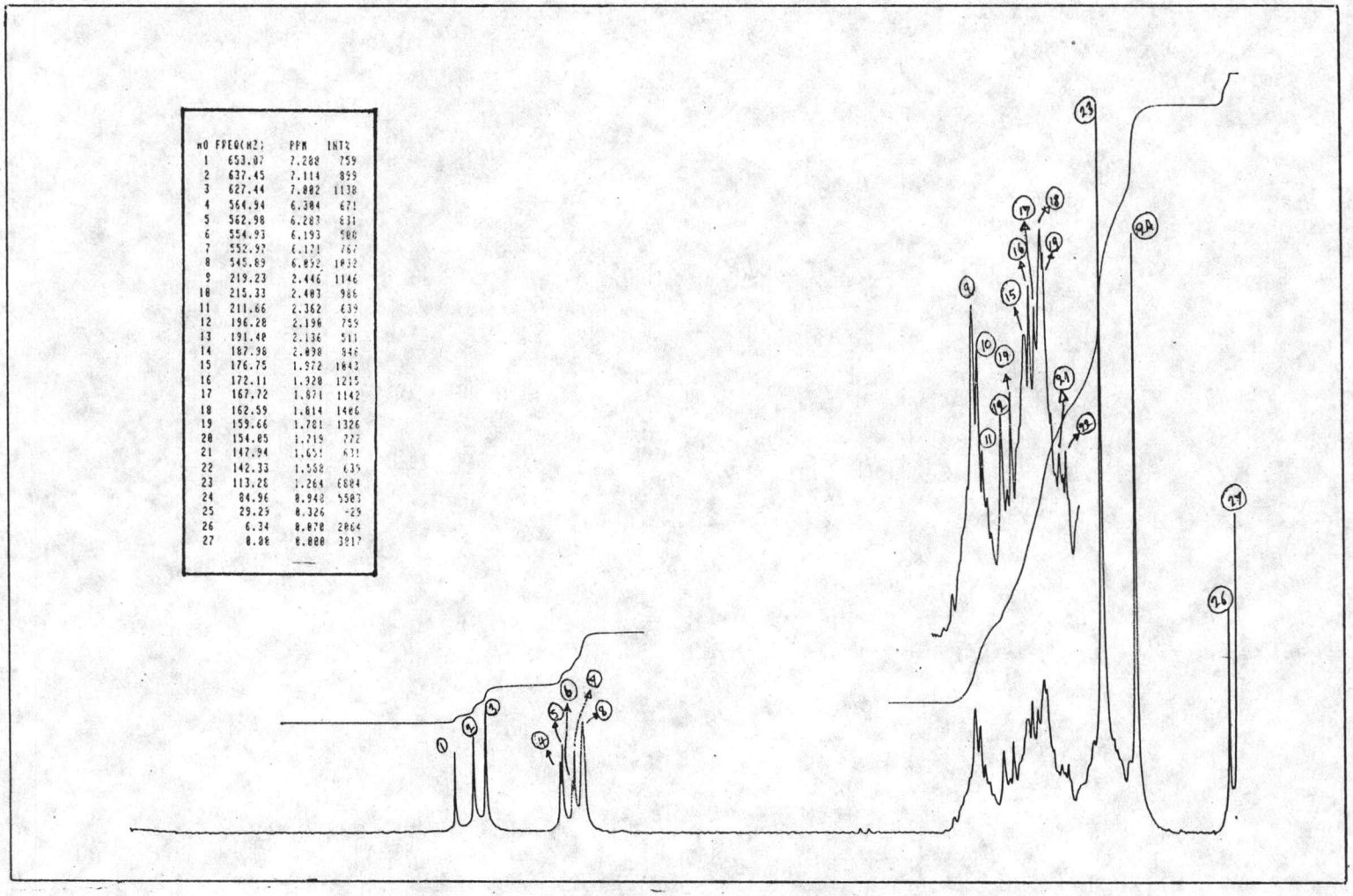
จากการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารตัวอย่างที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 พบว่าสารตัวอย่างมีจุดหลอมเหลว แมสสเปกตรัม อินฟราเรดสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR เหมือนกันทุกประการกับสารมาตรฐาน ADD ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารตัวอย่างที่ได้นั้นคือ สาร ADD



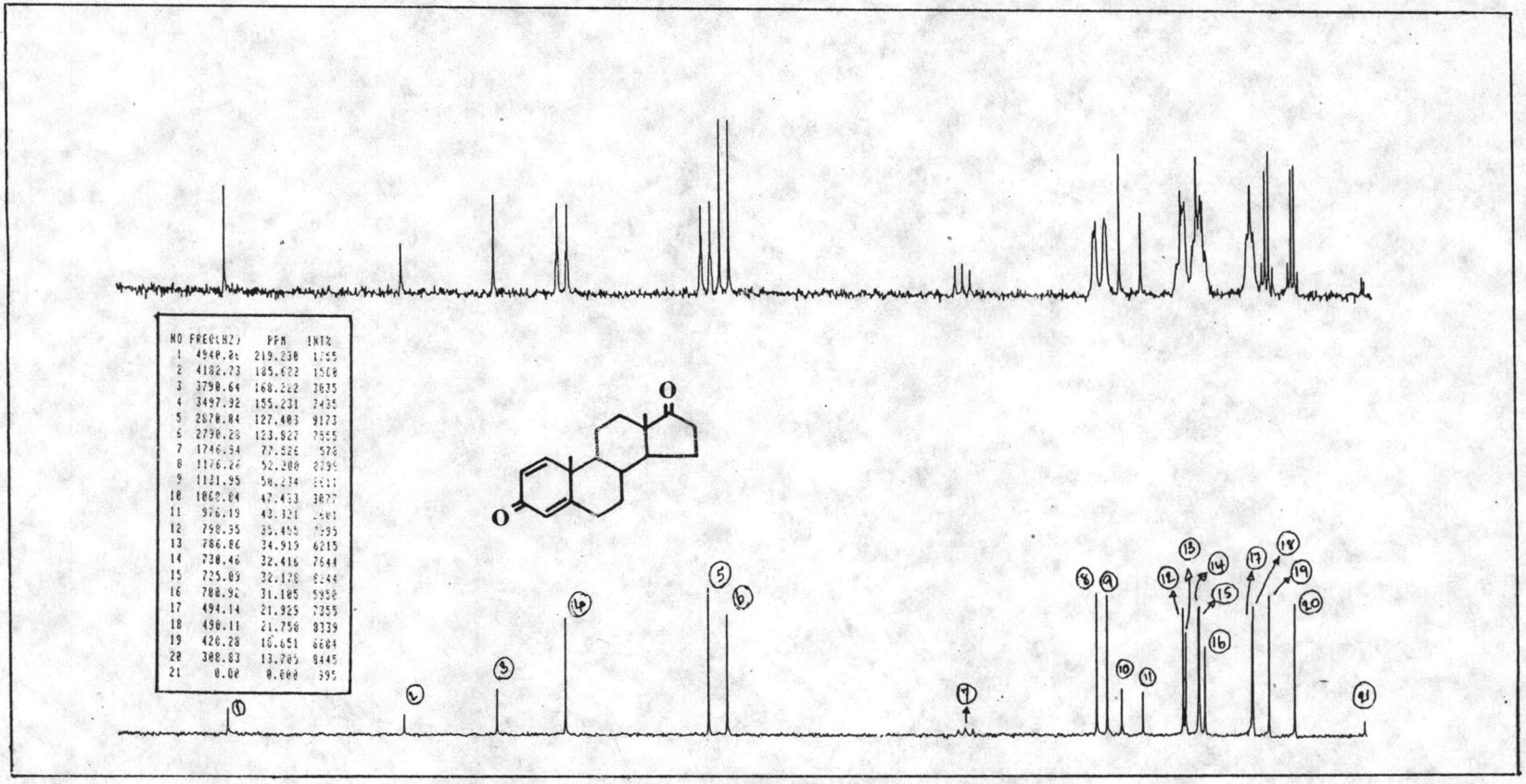
รูปที่ 12 NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน ADD (วัดด้วย ^{1}H-NMR)



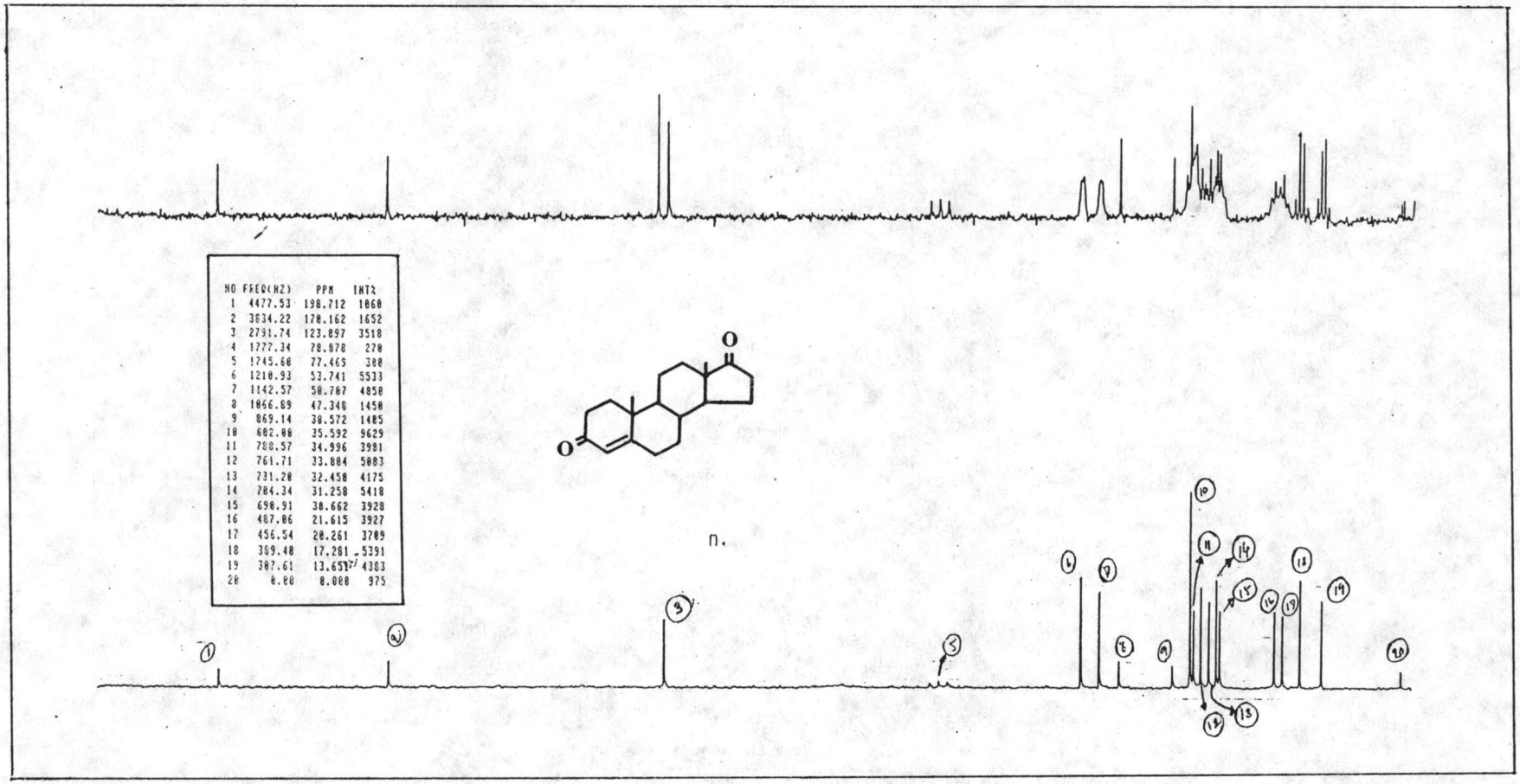
รูปที่ 13 NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD (วัดด้วย ^{1}H-NMR)



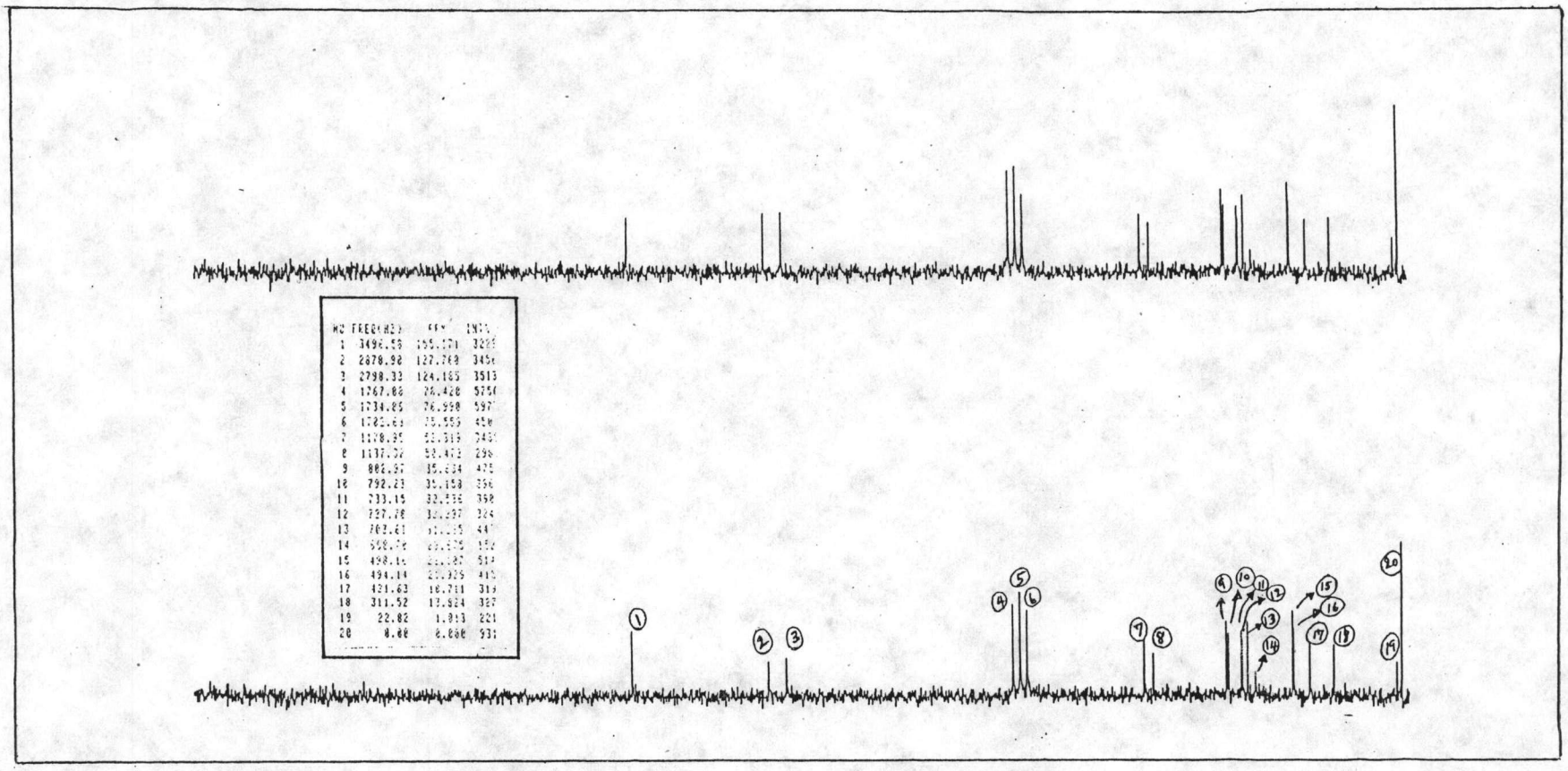
รูปที่ 14 NMR สเปกตรัมของสารตัวอย่างที่ได้จากการแปลงรูปคอเลสเทอรอล ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 (วัดด้วย ^{1}H-NMR)



รูปที่ 15 NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน ADD (วัดด้วย ^{13}C-NMR)



รูปที่ 16 NMR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน AD (วัดด้วย ^{13}C-NMR)



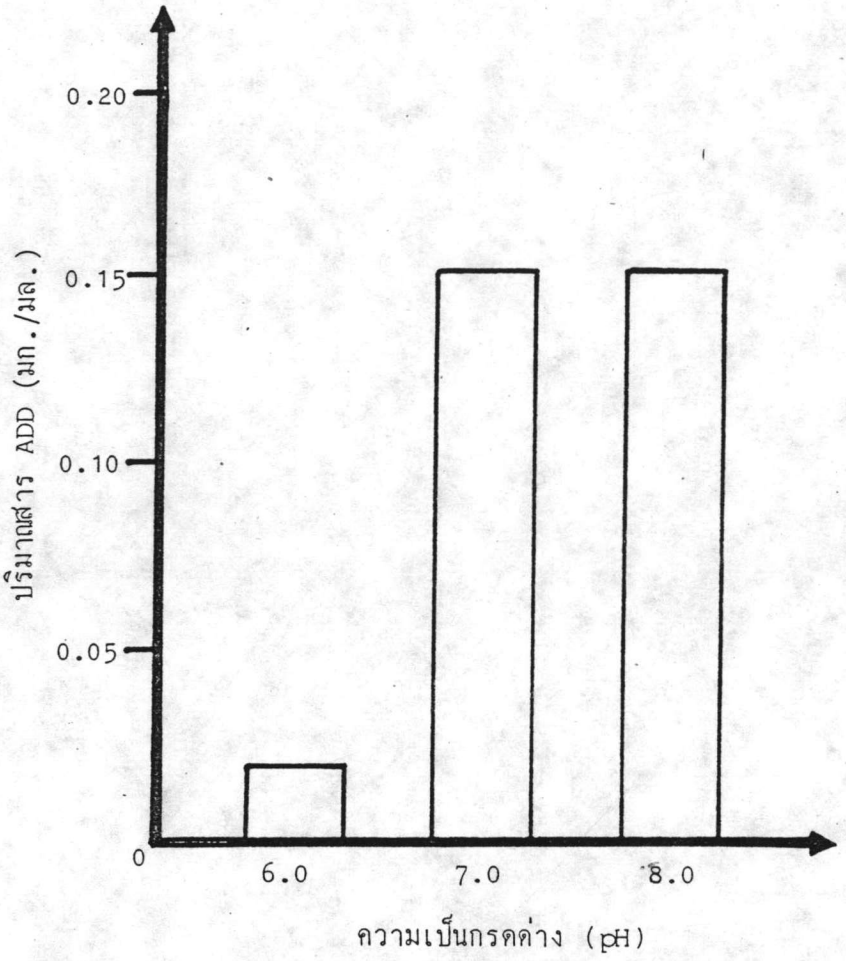
รูปที่ 17 NMR สเปกตรัมของสารตัวอย่างที่ได้จากการแปลงรูปคอเลสเทอรอล ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 (วัดด้วย ^{13}C-NMR)

3.4 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157

3.4.1 สภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.4.1.1 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

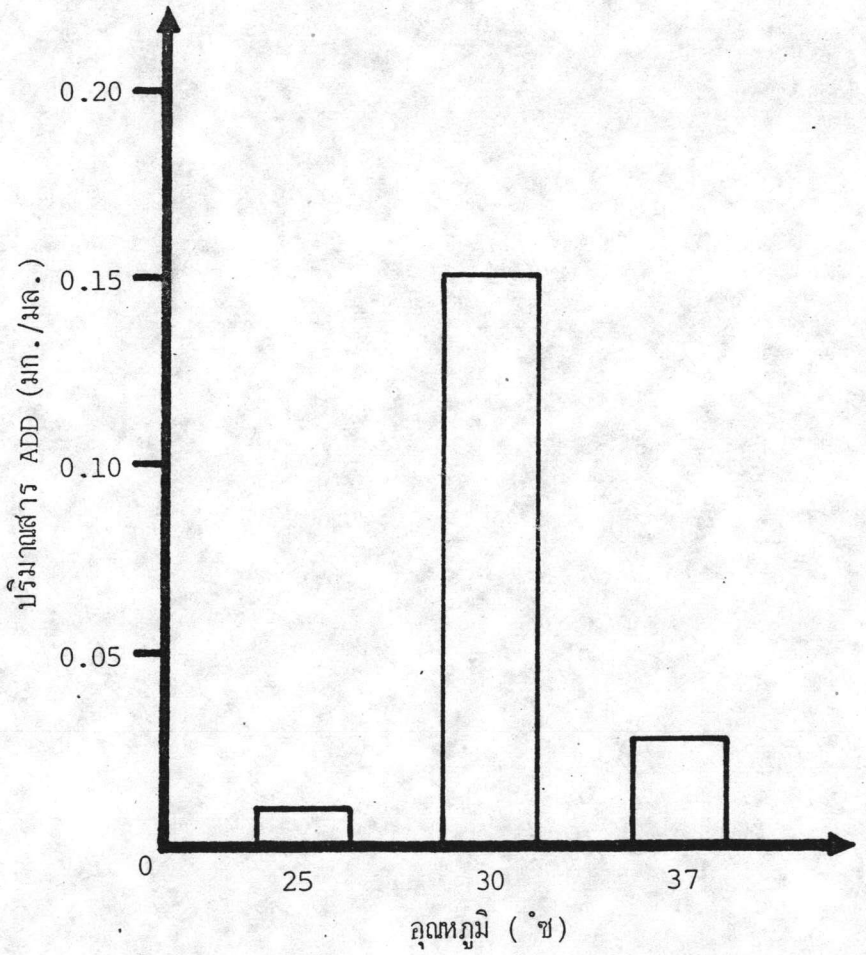
เมื่อแปรผันความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่ 6.0-8.0 แล้วเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-157 (ตามวิธีข้อ 2.4.3) เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชม. หลังจากเติมไดไพริดิล นำไปสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้ววิเคราะห์ปริมาณสาร ADD ด้วยเทคนิคของแกสโครมาโตกราฟี (วิธีข้อ 2.7) ผลการทดลอง (รูปที่ 18) พบว่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารผลิตภัณฑ์ ADD อยู่ในช่วง 7.0-8.0 โดยปริมาณของสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลได้สูงสุดมีปริมาณเท่ากันคือ 0.15 มก./มล.



รูปที่ 18 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 ที่อุณหภูมิ 30°ซ

3.4.1.2 อุณหภูมิ

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-157 (ตามวิธีข้อ 2.4.3) โดยปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 7.0 ที่อุณหภูมิต่างกันคือ 25 30 และ 37°ซ เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชม. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปสกัดแยกผลิตภัณฑ์และวิเคราะห์ปริมาณ ADD โดยเทคนิคแกสโครมาโตกราฟี ผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD คือ อุณหภูมิ 30°ซ ได้ปริมาณสาร ADD 0.15 มก./มล. เช่นเดิม (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อต่อการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

3.4.2 ผลกระทบของคอเลสเทอรอลต่อความสามารถในการแปลงรูปคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157

3.4.2.1 การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการละลายคอเลสเทอรอล

เนื่องจากสารตั้งต้น คือ คอเลสเทอรอล เป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย (0.2 มก./100 มล.) (Fieser และคณะ 1983; Watanabe, 1987; Hesselink และคณะ, 1989) ในการวิจัยจึงได้พยายามใช้ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดเพื่อช่วยเพิ่มการละลายของคอเลสเทอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มากขึ้น โดยคาดว่าอาจจะช่วยให้การสร้างสาร ADD เพิ่มขึ้นได้

ก. ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์

จากการวิเคราะห์ปริมาณของสาร ADD ที่เกิดจากแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อใช้คอเลสเทอรอล 0.5 มก./มล. โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อละลายคอเลสเทอรอลในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ ไดออกเซน เอทานอล ไดเมทิลซัล-ฟอกไซด์ เอทิลอะซิเตท และเปรียบเทียบกับที่ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ทุกชนิดสามารถละลายคอเลสเทอ-รอลได้หมด แต่สังเกตพบว่าไดออกเซนละลายคอเลสเทอรอลได้ดีที่สุด โดยใช้ระยะเวลาสั้นที่สุด รองลงมาได้แก่ เอทิลอะซิเตท เอทานอล และ DMSO ตามลำดับ ผลการศึกษา (ตารางที่ 7) พบว่าไดออกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ละลายคอเลสเทอรอล ได้ดีที่สุดและได้ปริมาณสาร ADD เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 142.86 (แอคติวิตีสัมพัทธ์) โดยเทียบกับผลการทดลองควบคุมที่ใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายของคอเลสเทอรอล

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อละลายคอเลสเทอรอลด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ กัน

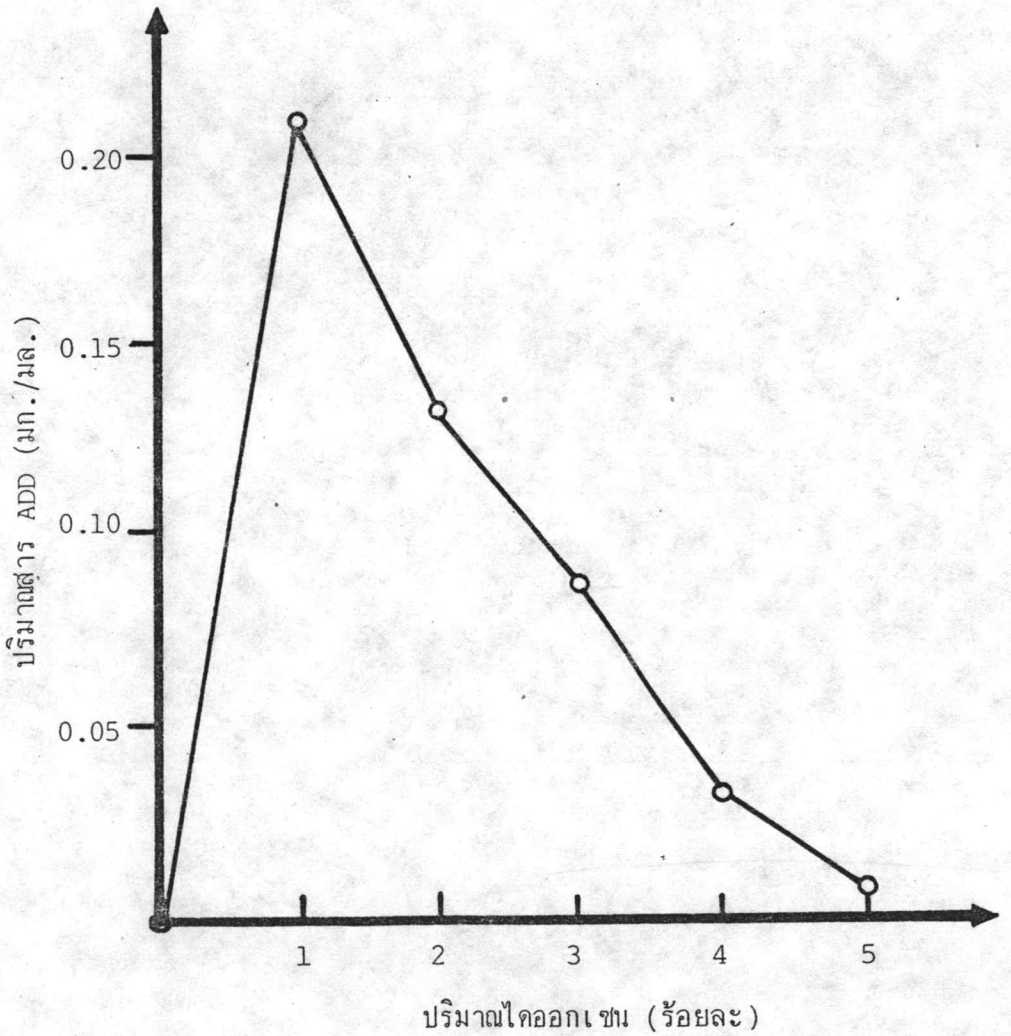
ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ ร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร)	การละลายของคอเลสเทอรอล	ปริมาณสาร ADD (มก./มล.)	ร้อยละของสาร ADD (แอคติวิตีสัมพัทธ์)
ไดออกเซน	++++	0.20	142.86
เอทิลอะซิเตท	+++	0.14	100.00
เอทานอล	++	0.06	42.86
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์	++	0.02	14.29
ไม่เติมตัวทำละลายอินทรีย์	-	0	0

ข. ปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์

จากการวิเคราะห์ปริมาณของสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 โดยแปรผันปริมาณของไดออกเซนตั้งแต่ร้อยละ 0-5 (ปริมาตร/ปริมาตร) ผลการทดลอง (รูปที่ 20) พบว่าปริมาณไดออกเซนร้อยละ 1 เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแปลงรูปคอเลสเทอรอลไปเป็น ADD ได้มากที่สุด จากผลการทดลอง คอเลสเทอรอล (0.5 มก./มล.) ถูกแปลงรูปทางชีวภาพไปเป็นสาร ADD ได้ถึง 0.21 มก./มล.

ข. ปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์

จากการวิเคราะห์ปริมาณของสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 โดยแปรผันปริมาณของไดออกเซนตั้งแต่ร้อยละ 0-5 (ปริมาตร/ปริมาตร) ผลการทดลอง (รูปที่ 20) พบว่าปริมาณไดออกเซนร้อยละ 1 เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแปลงรูปคอเลส-เทอรอลไปเป็น ADD ได้มากที่สุด จากผลการทดลอง คอเลสเทอรอล (0.5 มก./มล.) ถูกแปลงรูปทางชีวภาพไปเป็นสาร ADD ได้ถึง 0.21 มก./มล.



รูปที่ 20 เปรียบเทียบปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อแปรผันปริมาณของไดออกเซน

ค. <u>ความเข้มข้นของคอเลสเทอรอลที่เหมาะสม</u>

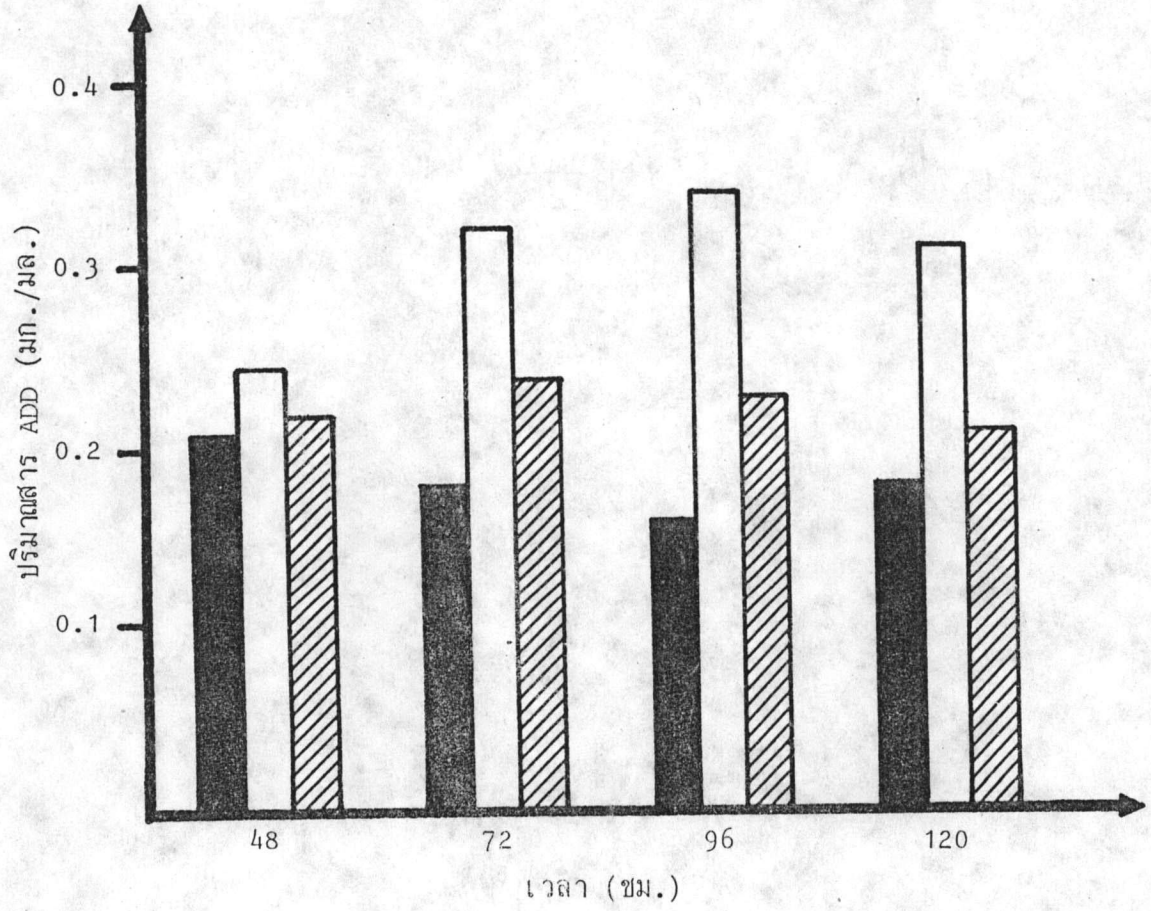
จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อใช้ไดออกเซน ปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นตัวทำละลายคอเลสเทอรอล 0.5 มก./มล. แล้วได้ปริมาณสาร ADD เพิ่มขึ้น (จาก 0.14 มก./มล. เป็น 0.20 มก./มล.) แสดงว่าไดออกเซนสามารถละลายคอเลสเทอรอลได้ดีกว่าเอทิลอะซิเตต และละลายคอเลสเทอรอลได้มากขึ้น จึงคาดว่าอาจเพิ่มปริมาณของคอเลสเทอรอลที่ใช้ให้มากกว่า 0.5 มก./มล. ได้อีกเพื่อเพิ่มอัตราการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล ดังนั้นจึงแปรผันปริมาณคอเลสเทอรอลตั้งแต่ 0.5-2.5 กรัม/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ผลการทดลอง (ตารางที่ 8) พบว่าความเข้มข้นของคอเลสเทอรอล 1.0 กรัม/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุดโดยเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-157 สามารถแปลงรูปคอเลสเทอรอลไปเป็น ADD ได้สูงถึง 0.24 มก./มล.

ง. <u>ช่วงระยะเวลาของการเจริญที่เหมาะสมต่อการแปลงรูปของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD</u>

เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ โดยใช้คอเลสเทอรอลเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม/ลิตรแล้วเก็บตัวอย่างทุก 24 ชม. เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48-120 ชม. หลังจากเติมไดไพริดิล แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสาร ADD พบว่าเมื่อใช้คอเลสเทอรอล 1.0 มก./มล. ที่เวลา 72 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อ คอเลสเทอรอลถูกแปลงรูปทางชีวภาพเป็นสาร ADD ได้สูงถึง 0.32 มก./มล. เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 96 ชม. การสังเคราะห์สาร ADD เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (0.34 มก./มล.) (รูปที่ 21)

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อแปรผันปริมาณของคอเลสเทอรอล เก็บตัวอย่างที่เวลา 48 ชม. ของการเลี้ยงเชื้อหลังจากเติมไดไพริดิล

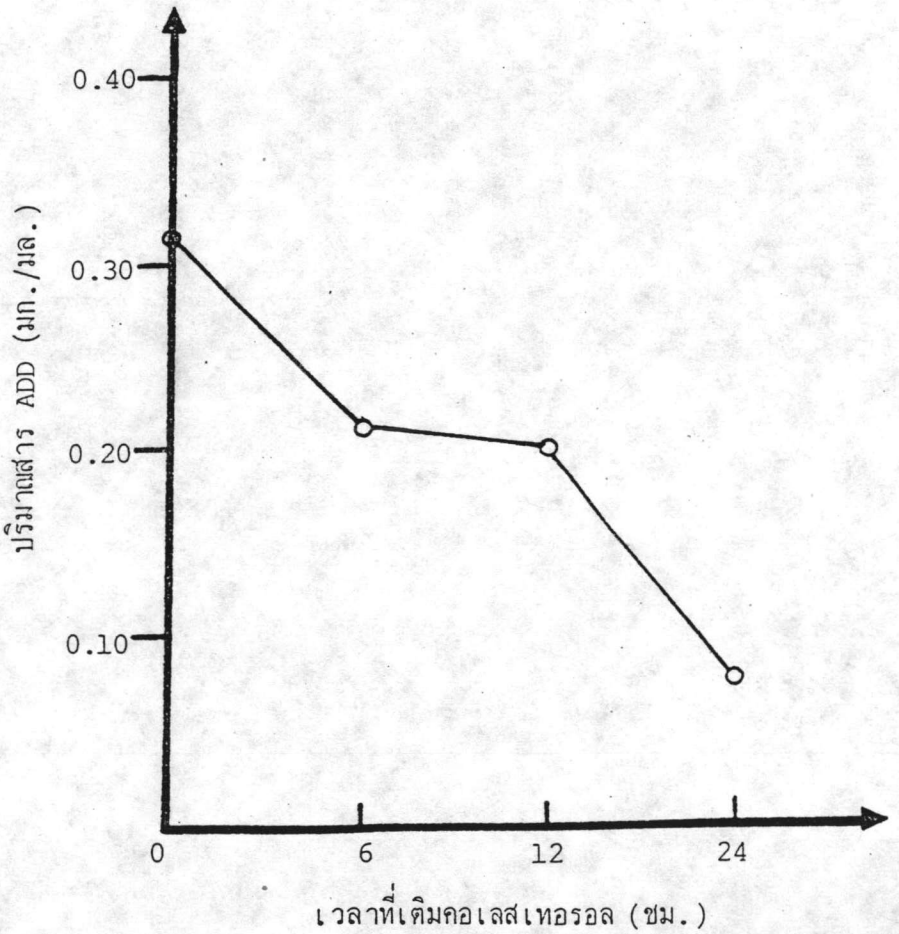
ปริมาณคอเลสเทอรอล (กรัม/ลิตร)	ปริมาณสาร ADD (มก./มล.)
0.5	0.21
1.0	0.24
1.5	0.22
2.0	0.17
2.5	0.02



รูปที่ 21 เปรียบเทียบปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อใช้คอเลสเทอรอล 0.5 กรัม/ลิตร ■ 1.0 กรัม/ลิตร □ และ 1.5 กรัม/ลิตร ▨ เป็นสารตั้งต้น และใช้เวลาการแปลงรูปทางชีวภาพต่าง ๆ กัน

จ. <u>ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเติมคอเลสเทอรอล</u>

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อเติมคอเลสเทอรอลปริมาณ 1.0 กรัม/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-24 ชม. เติมไดไพริดิลที่เวลา 26 ชม. หลังการเลี้ยงเชื้อ แล้วเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไปจนกระทั่งครบ 72 ชม. เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์ระดับสาร ADD พบว่า การเติมคอเลส-เทอรอลที่เวลา 0 ชม. คือ เติมคอเลสเทอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ต้น เป็นช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด ได้สาร ADD จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลปริมาณ 0.32 มก./มล. ในทุกการทดลองต่อจากนี้จึงเติมคอเลสเทอรอลตั้งแต่ต้นในปริมาณ 1.0 กรัม/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (รูปที่ 22)



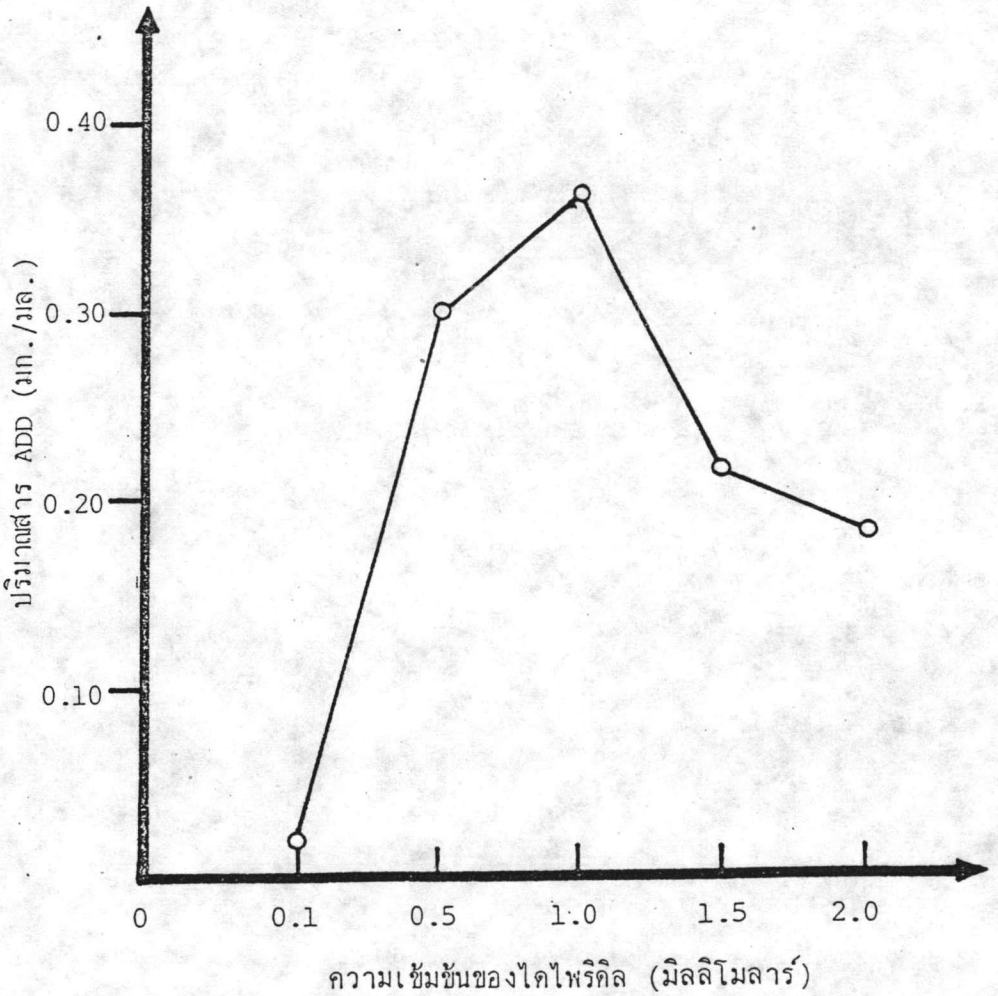
รูปที่ 22 ปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อเติมคอเลสเทอรอลที่เวลาต่าง ๆ กัน แล้วทำการวิเคราะห์สาร ADD ที่เกิดขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน 72 ชม.

3.4.3 ผลกระทบของไดไพริดิลต่อการแปลงรูปคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD

จากการที่มีผู้ศึกษา (Nagawa และคณะ, 1970; Nakamatsu และคณะ, 1979; Saunders และคณะ, 1986; Prome และคณะ, 1987) และรายงานไว้ว่าสารไดไพริดิลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 9-อัลฟา-ไฮดรอกซีเลส เพื่อให้เกิดการสะสมของสาร ADD และจากการวิจัยเบื้องต้นของผู้วิจัยได้พบว่า ตรวจพบสาร ADD ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมไดไพริดิลเท่านั้น ส่วนในตัวอย่างที่ไม่เติมไดไพริดิลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์ ADD เลย จึงน่าจะเป็นไปได้ว่า การทำงานของเอนไซม์ 9-อัลฟา ไฮดรอกซิเลส ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ ถูกยับยั้งด้วยไดไพริดิล แล้วจึงมีการสะสมของสาร ADD ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาถึงปริมาณของไดไพริดิลที่ใช้ และเวลาที่เติมไดไพริดิลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. ปริมาณที่เหมาะสมของไดไพริดิล

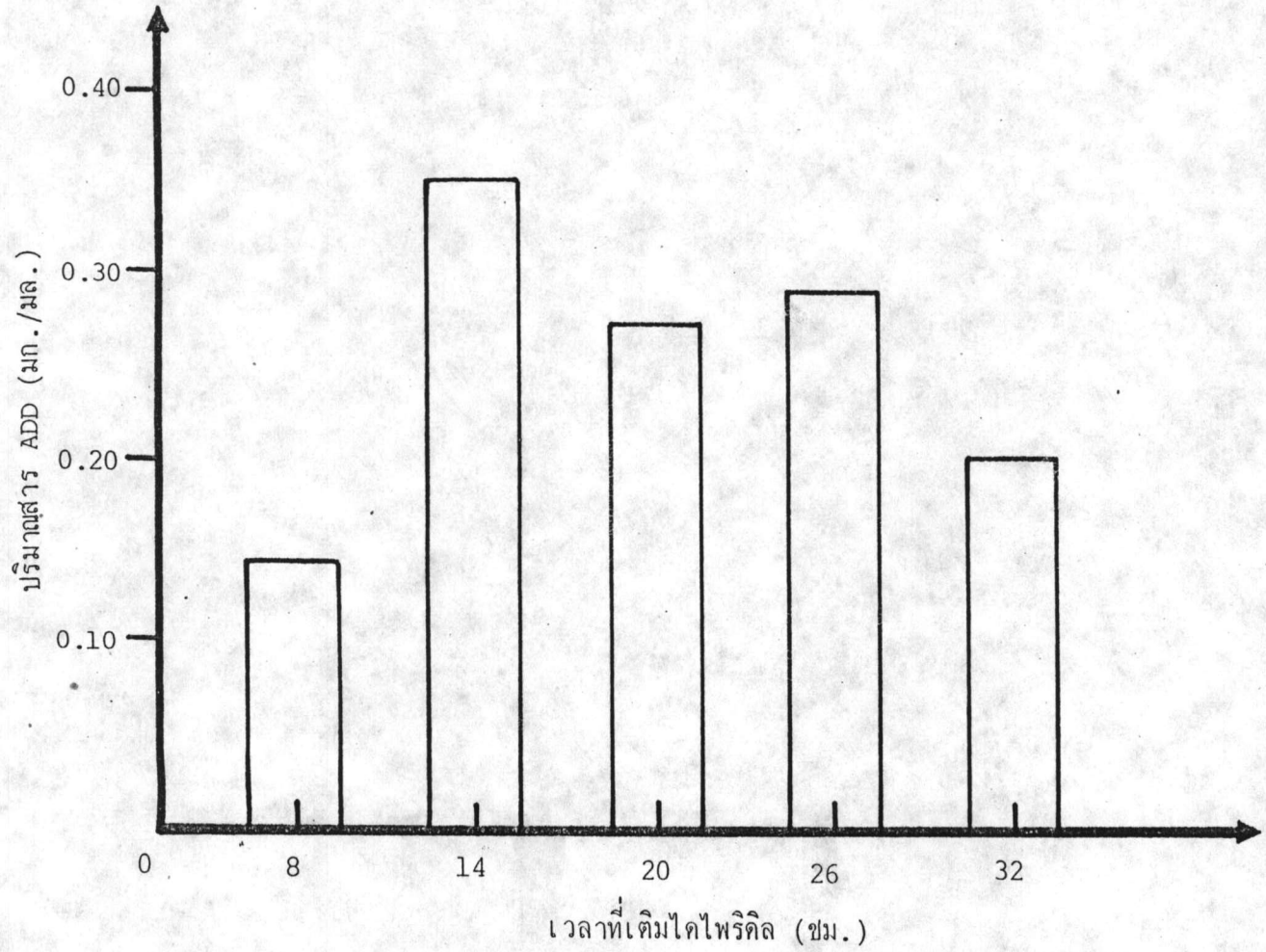
จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 ซึ่งเพาะเลี้ยงตามวิธีข้อ 2.4.3 โดยแปรผันปริมาณของไดไพริดิลตั้งแต่ 0.1-2.0 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลอง (รูปที่ 23) พบว่าไดไพริดิลที่เข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นปริมาณที่เหมาะสม กล่าวคือได้สาร ADD สูงถึง 0.36 มก./มล.



รูปที่ 23 ปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลอเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อแปรผันปริมาณของไดไพริดิล ตั้งแต่ 0.1-2.0 มิลลิโมลาร์

ข. เวลาที่เหมาะสมในการเติมไดไพริดิล

จากการวิเคราะห์ปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อใช้ไดไพริดิลปริมาณ 1.0 มิลลิโมลาร์ เติมลงในอาหารเหลวสำหรับแปลงรูปทางชีวภาพ ที่เวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-32 ชม. พบว่า ที่เวลา 14 ชม. หลังจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับแปลงรูปทางชีวภาพ เป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุด (รูปที่ 24) กล่าวคือ ได้สาร ADD 0.35 มก./มล.

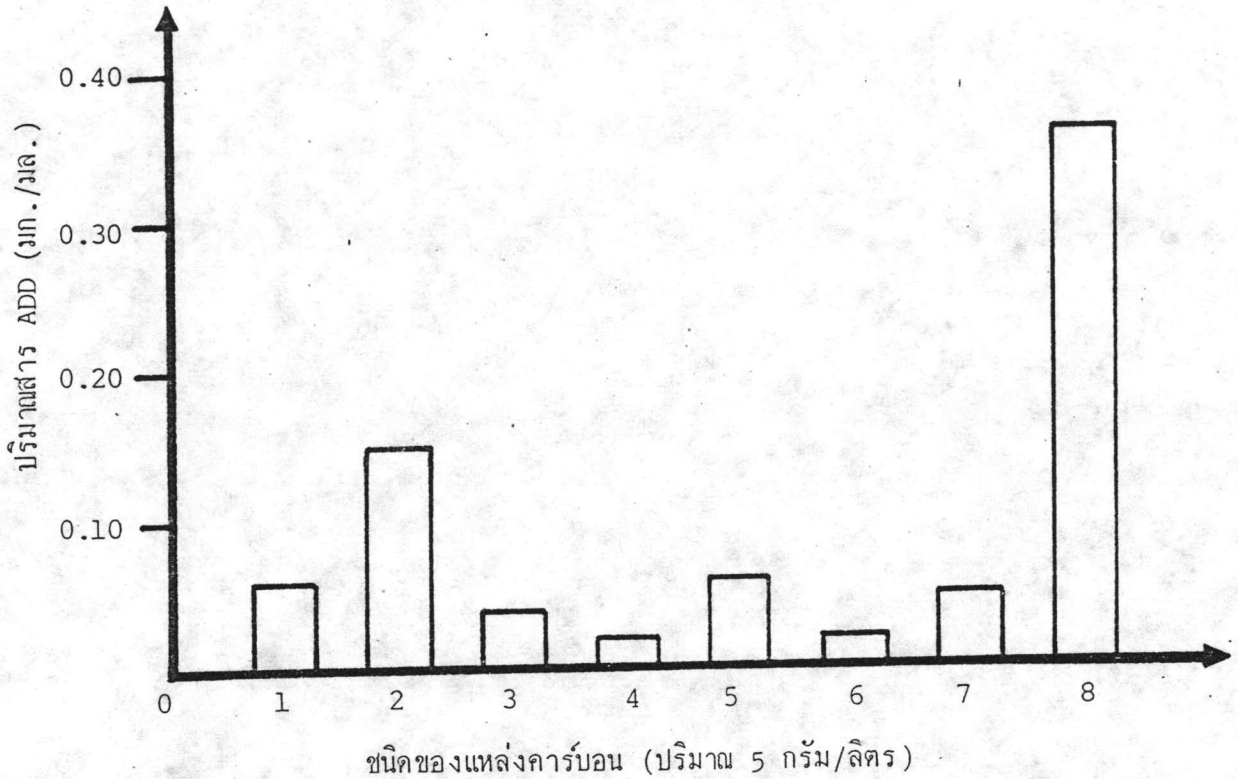


รูปที่ 24 ปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อเติมไดไพริดิล ที่เวลาต่าง ๆ กัน

3.4.4 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157

3.4.4.1 ชนิดของแหล่งอาหารคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-157 ในขวดแก้วทรงกรวย (วิธีข้อ 2.4.3) โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ ไดแอมโมเนียมซิเตรท และยูเรีย ปริมาณรวม 5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้แหล่งคาร์บอนปริมาณ 5 กรัม/ลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน 8 ชนิด ได้แก่ คอร์นสตีพลิเคอร์ กลูโคส กากน้ำตาล กลีเซอรอล ซูโครส แป้งละลายน้ำ อิโนซิทอล และแมนิทอล แล้ววิเคราะห์ปริมาณของสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล ผลการทดลอง (รูปที่ 25) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคอร์นสตีพลิเคอร์ให้ปริมาณสาร ADD สูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ คือ 0.36 มก./มล. จึงเลือกใช้คอร์นสตีพลิเคอร์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิจัยในขั้นต่อไป

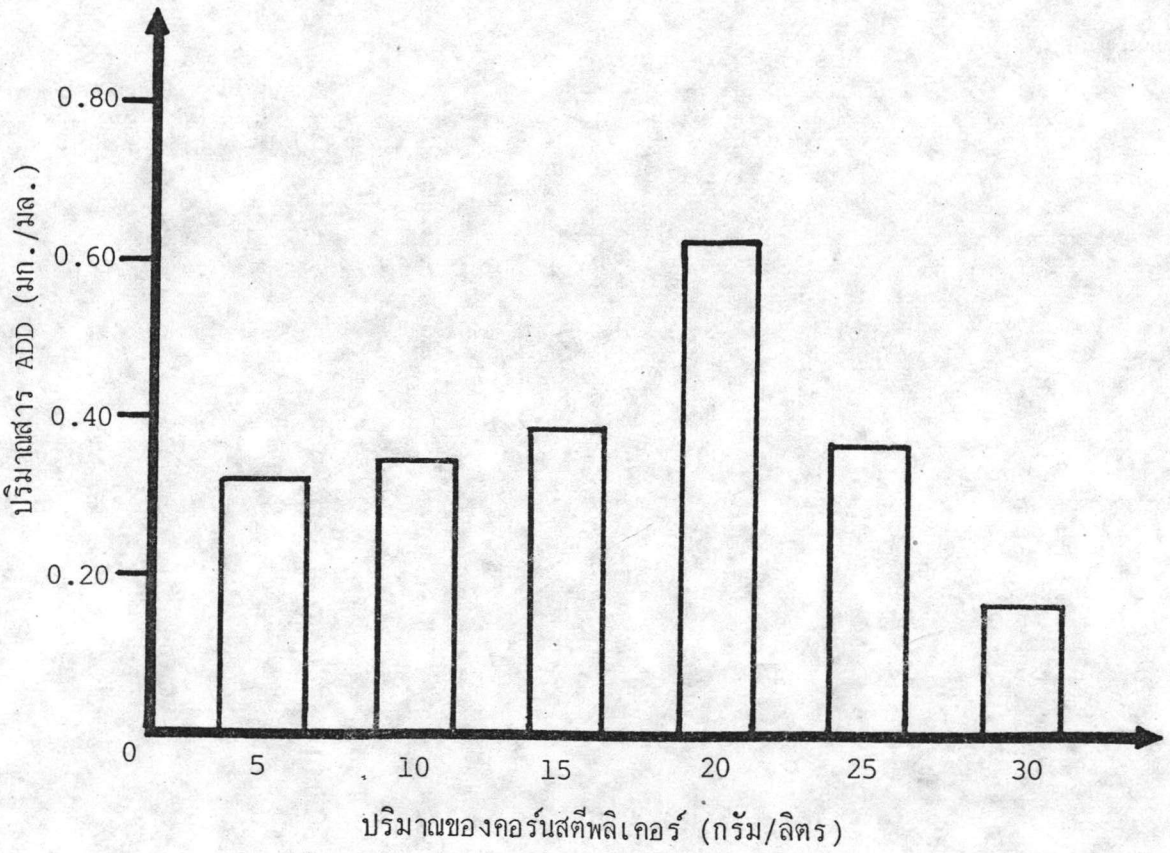


รูปที่ 25 ผลของแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล เป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 ที่ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ ไดแอมโมเนียมซิเตรท และยูเรีย ปริมาณรวม 5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

1 คือ กลูโคส
2 " กากน้ำตาล
3 " กลีเซอรอล
4 " ซูโครส
5 คือ แป้งละลายน้ำ
6 " อิโนซิทอล
7 " แมนิทอล
8 " คอร์นสติพลิเคอร์

3.4.4.2 <u>ความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอร์นสตีพลิเคอร์ต่อการแปลงรูปคอเลสเทอรอล เป็นสาร ADD</u>

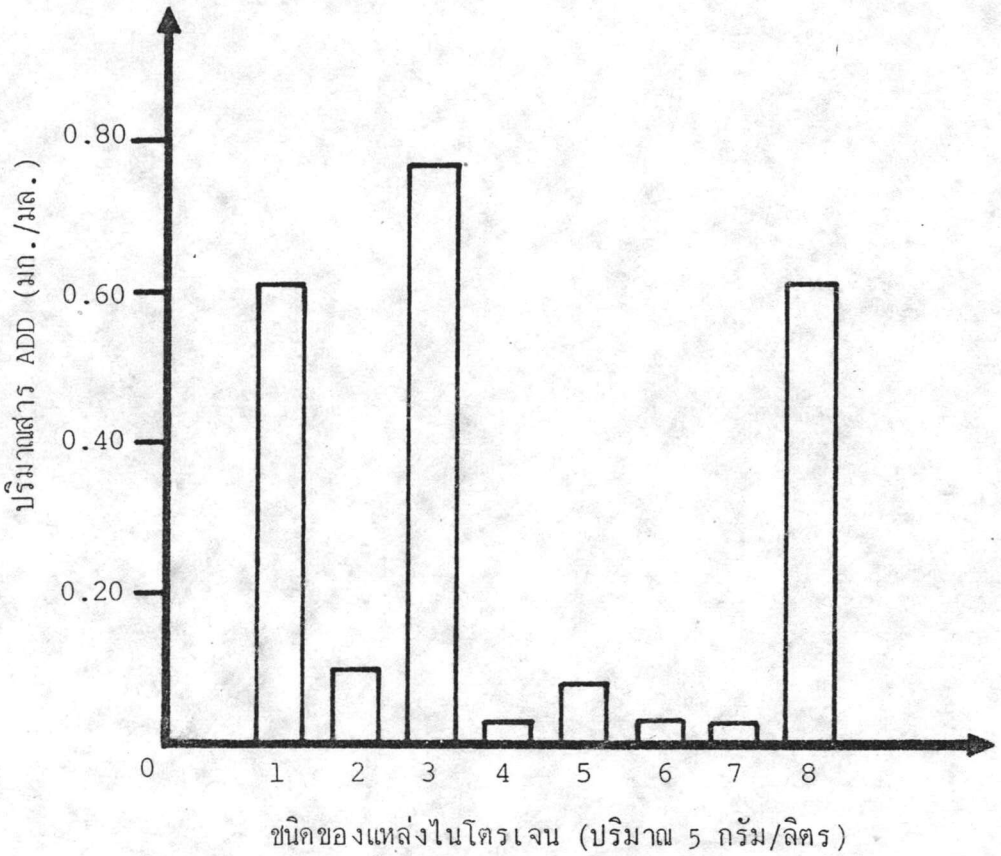
เลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-157 ในขวดแก้วทรงกรวย (ข้อ 2.4.3) โดยใช้คอร์นสตีพลิเคอร์ เป็นแหล่งคาร์บอน แปรผันปริมาณคอร์นสตีพลิเคอร์เป็น 5-30 กรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล ผลการทดลอง (รูปที่ 26) พบว่าคอร์นสตีพลิเคอร์ปริมาณ 20 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่จะให้สารสูงที่สุดคือ ได้ปริมาณสาร ADD เท่ากับ 0.62 มก./มล. จึงเลือกใช้คอร์นสตีพลิเคอร์ ปริมาณ 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิจัยต่อไป



รูปที่ 26 ผลการแปรผันปริมาณของคอร์นสตีพลิเคอร์ ที่มีต่อการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157

3.4.4.3 ชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-157 (วิธีข้อ 2.4.3) โดยใช้คอร์นสตีพลิเคอร์ ปริมาณ 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แหล่งไนโตรเจน 5 กรัม/ลิตร โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ กัน 8 ชนิด ได้แก่ ผงสกัดยีสต์ เปปโตน กากถั่วเหลือง ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ ไดแอมโมเนียมซิเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์รวมกับไดแอมโมเนียมซิเตรทและยูเรีย วิเคราะห์ปริมาณของสาร ADD ผลการทดลอง (รูปที่ 27) พบว่า กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตของ ADD สูงที่สุด คือได้ปริมาณสาร ADD ถึง 0.77 มก./มล. จึงเลือกใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิจัยต่อไป

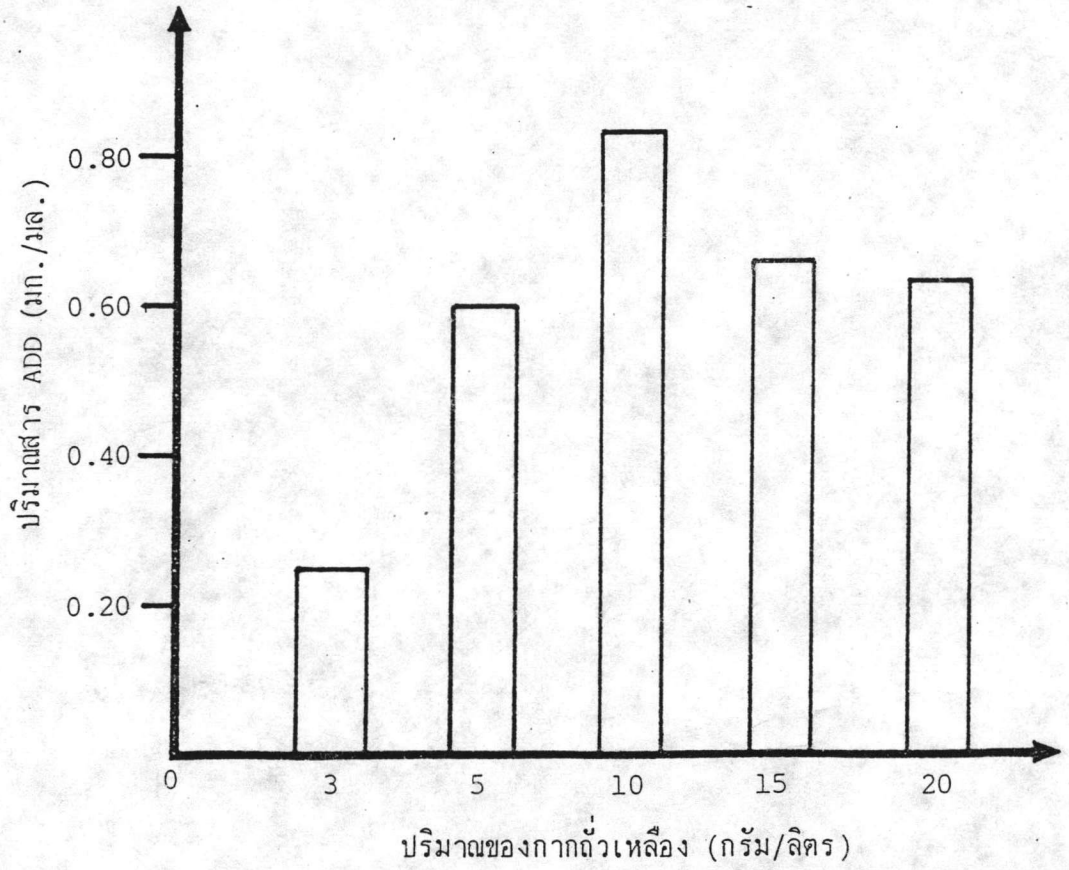


รูปที่ 27 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อใช้คอร์นสตีพลิเคอร์ปริมาณ 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

1 คือ ผงสกัดยีสต์
2 " เปปโตน
3 " กากถั่วเหลือง
4 " ยูเรีย
5 คือ แอมโมเนียมคลอไรด์
6 " ไดแอมโมเนียมซิเตรท
7 " แอมโมเนียมซัลเฟต
8 " แอมโมเนียมคลอไรด์รวมกับไดแอมโมเนียมซิเตรทและยูเรีย (ควบคุม)

3.4.4.4 <u>ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองในการแปลงรูปคอเลส-เทอรอลเป็นสาร ADD</u>

เลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-157 (วิธีข้อ 2.4.3) โดยใช้คอร์นสตีพลิเคอร์ ปริมาณ 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน แปรผันปริมาณของกากถั่วเหลืองในปริมาณต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 3-20 กรัม/ลิตร วิเคราะห์ปริมาณ ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล ผลการทดลอง (รูปที่ 28) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากถั่วเหลืองปริมาณ 10 กรัม/ลิตร จะเหนี่ยวนำให้เกิด ADD ปริมาณที่สูงที่สุด คือได้ปริมาณสาร ADD 0.83 มก./มล. จึงเลือกใช้กากถั่วเหลืองปริมาณ 10 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 28 ผลการแปรผันปริมาณของกากถั่วเหลืองที่มีต่อการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157

3.4.4.5 ปริมาณที่เหมาะสมของเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ

เลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-157 (วิธีข้อ 2.4.3) แล้วทำการศึกษาผลของการเติมเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แคลเซียม-คาร์บอเนต แมกนีเซียมซัลเฟต และโซเดียมคลอไรด์ โดยแปรผันปริมาณตั้งแต่ 0.4-2.0 กรัม/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร (ตารางที่ 9) พบว่าโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาณ 1.0 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด คือได้สาร ADD 0.86 มก./มล. สำหรับแคลเซียม-คาร์บอเนตปริมาณที่เหมาะสมที่สุดคือ 3.0 กรัม/ลิตร ได้ปริมาณสาร ADD 0.83 กรัม/มล. และได้ปริมาณสาร ADD 0.80 มก./มล. เมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 กรัม/ลิตร สำหรับโซเดียมคลอไรด์ปริมาณที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.4 กรัม/ลิตร ได้ปริมาณสาร ADD 0.80 มก./มล. จึงเลือกใช้เกลือแร่ชนิดต่าง ๆ ดังกล่าวในปริมาณข้างต้นในการเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป โดยเปรียบเทียบกับปริมาณที่เหมาะสมของเกลือแร่ที่ใช้ในสูตรอาหารเริ่มต้น พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมของเกลือแร่แต่ละชนิดที่ใช้ในสูตรอาหารเริ่มต้นเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อแปรผันปริมาณเกลือแร่แต่ละชนิดให้มีความเข้มข้น 0.5-3.0 กรัม/ลิตร โดยให้ปริมาณของเกลือแร่ชนิดอื่น ๆ เท่ากับชุดควบคุม (สูตรอาหารการแปลงรูปทางชีวภาพสูตรที่ 2)

เกลือแร่		สาร ADD (มก./มล.)
ชนิด	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจน	0.5	0.80
ฟอสเฟต	1.0	0.86
	1.5	0.77
	2.0	0.31
	2.5	0.00
	3.1	0.00

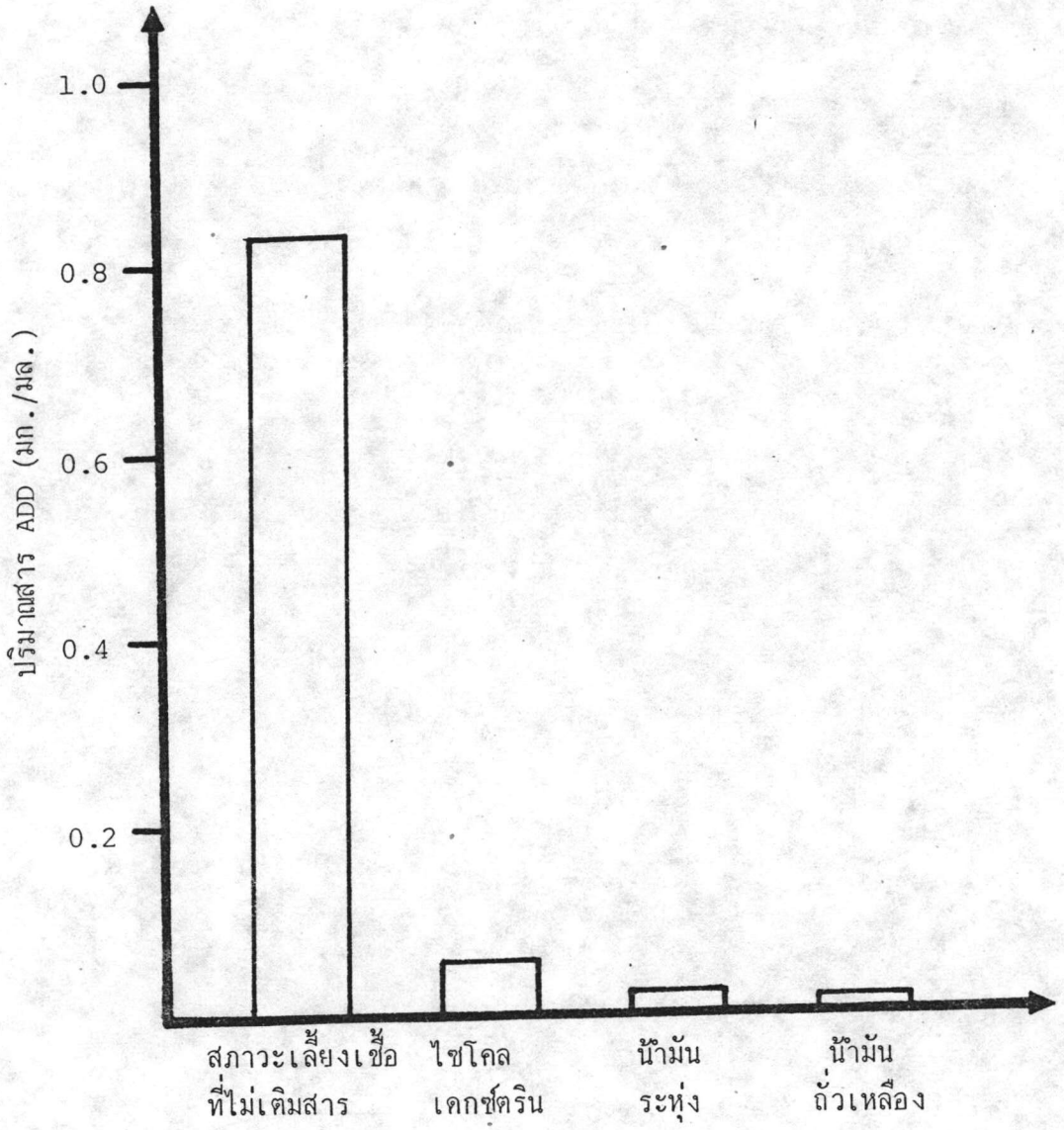
ตารางที่ 9 (ต่อ)

เกลือแร่		สาร ADD (มก./มล.)
ชนิด	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)	
แคลเซียมคาร์บอเนต	0.5	0.00
	1.0	0.32
	1.5	0.40
	2.0	0.62
	2.5	0.62
	3.0	0.83
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	0.17
	1.0	0.48
	1.5	0.65
	2.0	0.80
	2.5	0.41
	3.0	0.36
โซเดียมคลอไรด์	0.5	0.80
	1.0	0.60
	1.5	0.52
	2.0	0.48
	2.5	0.48
	3.0	0.00

3.4.5 ผลของสารบางชนิดต่อการเพิ่มอัตราการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD

จากการที่มีผู้ศึกษาและรายงานไว้ว่าสารบางชนิด เช่น เบตา-ไซโคลเดกซ์ตริน น้ำมันละหุ่ง และน้ำมันถั่วเหลือง ในปริมาณ 1 กรัม/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ช่วยเพิ่มอัตราการแปลงรูปทางชีวภาพ เพื่อให้ได้เกิดการสะสมของสาร ADD มากขึ้น (Martin, 1984; Hesselink และคณะ, 1989) การวิจัยนี้จึงได้นำสารดังกล่าวมาศึกษาเปรียบเทียบโดยมีจุดมุ่งหมายที่จะเพิ่มอัตราการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD

จากการเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium* sp. BJ-157 ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 (วิธีข้อ 2.4.3) แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอล โดยใช้เบตา-ไซโคลเดกซ์ตริน น้ำมันละหุ่ง และน้ำมันถั่วเหลืองในปริมาณ 1 กรัม/อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ผลการทดลอง (รูปที่ 29) พบว่าสารดังกล่าวแต่ละชนิดไม่มีผลต่อการเพิ่มอัตราการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 และปริมาณสาร ADD ที่ได้จากการแปลงรูปยังมีปริมาณต่ำกว่าการทดลองที่ไม่ได้ใส่สารดังกล่าวด้วย



รูปที่ 29 ผลของสารบางชนิดต่ออากรเพิ่มอัตราการแปลงรูปทางชีวภาพของคอเลสเทอรอลเป็นสาร ADD โดย *Mycobacterium* sp. BJ-157 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารดังกล่าว