การแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็น
กรด 3 แอลฟา 15 เบตา-ไดไฮดรอกซี-5 เบตา-โคลานิก
ด้วย คันนิงฮาเมลลา เบลคสลีอานา เอสที-22 ที่ถูกตรึง

นางสาว กุสุมา วงศ์ศรีศาสตร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2531

ISBN 974-569-132-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013914

Bioconversion of Lithocholic Acid to $3\alpha,15\beta$-Dihydroxy-5β-Cholanic Acid by Immobilized Cunninghamella blakesleeana ST-22

Miss Kusuma Vongsrisart

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Gruduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-569-132-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3 แอลฟา 15 เบตา-ไดไฮดรอกซี-5 เบตา-โคลานิก ด้วย คันนิงฮาเมลลา เบลคสลีอานา เอสที-22 ที่ถูกตรึง

โดย นางสาว กุสุมา วงค์ศรีศาสตร์

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล

รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขำวิวรรธน์)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

กุสุมา วงศ์ศรีศาสตร์ : การแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3 แอลฟา 15 เบตา-ไดไฮดรอกซี-5 เบตา-โคลานิก ด้วย Cunninghamella blakesleeana เบลคสลีอาน่า เอสที-22 ที่ถูกตรึง (Bioconversion of Lithocholic Acid to 3α,15β-Dihydroxy-5β-Cholanic Acid by Immobilized Cunninghamella blakesleeana ST-22) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สัณห์ พณิชยกุล และ รศ.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา, 129 หน้า

ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติและศักยภาพในการแปรรูปกรดลิโทโคลิก (LCA) เป็นกรด 3 แอลฟา 15 เบตา-ไดไฮดรอกซี-5 เบตา-โคลานิก (กรด 3α,15β-DHC) โดยสายใยของรา Cunninghamella blakesleeana ST-22 ที่ถูกตรึง ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน 3 ชนิด

ผลการทดลองสนับสนุนสมมติฐานที่ว่าการสังเคราะห์เอนไซม์ 15β-ไฮดรอกซิเลชันของสายใย C.blakesleeana ST-22 น่าจะถูกเหนี่ยวนำด้วยสารตั้งต้น (LCA) สปอร์ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนของบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin (3.0 และ 1.5 % น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ) โดยวิธี two phase system จะให้สายใยที่สามารถแปรรูป LCA เป็นกรด 3α,15β-DHC ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากสายใยอิสระ(ประมาณ 85 %ของLCA 1 กรัมต่อลิตร) ส่วนสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลของบริษัท Sigma จะให้ประสิทธิภาพและความเสถียรในการแปรรูปต่ำที่สุด สภาวะที่เหมาะสมในการงอกเป็นสายใยเพื่อผลิตกรด 3α,15β-DHC สูงสุดคือเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใยในขวดรูปชมพู่กันบุบ เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 15 20 และ 40 ชั่วโมง สำหรับสายใยอิสระ สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลของบริษัท Wako และบริษัท Copenhagen Pectin ตามลำดับ

ค่า K_m พีเอช และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในสายใยอิสระและสายใยในเม็ดเจล ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าความเสถียรต่อ พีเอช และอุณหภูมิ ความสามารถในการนำกลับมาใช้ใหม่ จะต่างกันอย่างชัดเจน สายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลสามารถนำมาใช้ได้ใหม่อย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 3 ครั้ง ให้การแปรรูปสูงประมาณ 80 %ของการแปรรูปเริ่มต้น ในขณะที่สายใยอิสระมีการแปรรูปได้เพียง 30 %หลังจากแปรรูปครั้งแรก และสามารถกระตุ้นแอคติวิตีของสายใยในเม็ดเจลในการผลิตกรด 3α,15β-DHC ให้เพิ่มขึ้นได้ใกล้เคียงกับแอคติวิตีเริ่มต้น โดยใช้อาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต กุสุมา วงศ์ศรีศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2530 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

Kusuma Vongsrisart : Bioconversion of Lithocholic Acid to 3α,15β-Dihydroxy-5β-Cholanic Acid by Immobilized Cunninghamella blakesleeana ST-22. Thesis Advisor : Asso. Prof. Sanha Panichajakul, Ph.D. and Asso. Prof. Songsri Kulpreecha, Ph.D., 129 pp.

The aim of this research is to study the potential and to compare the properties of 3α,15β-dihydroxy-5β-cholanic acid (3α,15β-DHCA) production by the mycelia of C.blakesleeana ST-22 immobilized with three kinds of K-carrageenan.

The results supported the hypothesis that the enzymes, 15β-hydroxylation, in the mycelia of C.blakesleeana ST-22 could be induced by substrate, lithocholic acid (LCA). The mycelia immobilized with K-carrageenan, Wako Company (3.0% w/v) and Copenhagen Pectin Company (1.5% w/v), by two phase system method could produce the product as much as that produced by the free mycelia (about 85% of LCA 1 g/l). But the mycelia immobilized with K-carrageenan from Sigma Company gave the lowest production. The optimal conditions for growth and 3α,15β-DHCA production were established in germination medium in baffled flasks, 300 rpm shaking rate at 30 °C for 15, 20 and 40 hours for free mycelia, mycelia immobilized with K-carrageenan from Wako Company and Copenhagen Pectin Company, respectively.

There were no significant differences in K_m, optimal pH and optimal temperature of the enzymes in immobilized mycelia and free mycelia. But there were remarkable differences in pH stability, thermal stability and number of reuse. The immobilized mycelia could be reused at least 3 times with over 80% of the initial product retained, in contrast with the free mycelia that 30% of the initial activity was found only after the first use. The activity of immobilized mycelia for 3α,15β-DHCA production could be reactivated for several times by the germination medium.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ .....

ปีการศึกษา 2530 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล และรองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ ให้แนวความคิด กำลังใจ และความเข้าใจ อันมีค่ายิ่งตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ Dr.T.Nihira แห่งมหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น ที่ได้ให้คำแนะนำบางส่วนในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ชำวิวรรธน์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และสารเคมี จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันฯ และภาควิชาชีวเคมีฯ ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณท่านคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอขอบคุณ พี่ เพื่อน และน้อง ทุกคนที่ได้มีส่วนช่วยเหลือ และให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ท้ายสุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องของข้าพเจ้า ที่ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ กำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ในการทำวิทยานิพนธ์นี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญรูป..... ฏ
คำย่อ..... ด
บทที่
1 บทนำ..... 1
2 วิธีการทดลอง
2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 14
2.1.1 อุปกรณ์..... 14
2.1.2 สารเคมี..... 15
2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 16
2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อรา Cunninghamella blakesleeana ST-22..... 17
2.4 วิธีเก็บและการเลี้ยงเชื้อ Cunninghamella blakesleeana ST-22..... 18
2.5 วิธีการตรึงสปอร์ Cunninghamella blakesleeana ST-22 โดยใช้แคปปา-คาร์ราจีแนน 18
2.6 วิธีวัดความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตรึง..... 20
2.7 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์กรด 3 แอลฟา 15 เบตา-ไดไฮดรอกซี-5 เบตา-โคลานิก..... 22

บทที่ หน้า

2.8 การตรวจวัดการเจริญของเชื้อรา C.blakesleeana ST-22... 23

3 ผลการทดลอง

3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญสปอร์อิสระของ C.blakesleeana ST-22 เป็นสายใย เพื่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC..... 25

3.2 ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22..... 30

3.3 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนโดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา..... 30

3.4 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนโดยวิธี two phase system..... 39

3.5 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ต่อความแข็งและการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยของ C.blakesleeana ST-22 ที่ตรึงในแคปปา-คาร์ราจีแนน..... 68

3.6 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนต่อความแข็งของเม็ดเจลและการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล.... 72

3.7 เปรียบเทียบคุณสมบัติในการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระ C.blakesleeana ST-22 และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล..... 72

3.8 สภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาสปอร์อิสระของ C.blakesleeana ST-22..... 85

3.9 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล..... 85

บทที่ หน้า

3.10 การศึกษาความเป็นไปได้ของการนำสายใยของ C.blakesleeana ST-22 ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนมาใช้แปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ซ้ำหลายๆครั้ง..... 88

3.11 การศึกษาศักยภาพของการนำกลับมาใช้ซ้ำของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลเมื่อกระตุ้นด้วยสารอาหาร..... 91

4 บทสรุปและวิจารณ์..... 93

เอกสารอ้างอิง..... 113

ภาคผนวกที่

1 ลักษณะโครมาโตแกรมของกรด 3 แอลฟา 15 เบตา-ไดไฮดรอกซี-5 เบตา-โคลานิก ที่ได้จากปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกของ C.blakesleeana ST-22 เมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสารมาตรฐาน วิเคราะห์โดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี..... 125

2 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรด 3α,15β-DHC..... 126

3 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดลิโทโคลิก..... 127

4 รูปแบบการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของ C.blakesleeana ST-22 ในสารผสมปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นกรดลิโทโคลิก เท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตร..... 128

ประวัติผู้เขียน..... 129

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ตัวอย่างเอกสารที่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการผลิต กรดคีโนดีออกซีโคลิก และ กรดอูโซดีออกซีโคลิก โดยจุลินทรีย์..... 7

2 ตัวอย่างเอกสารที่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการตรึงเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยวิธีกักขังเซลล์..... 10

3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กกับรูปร่างและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจล เมื่อตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนต่างชนิดกัน โดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา..... 34

4 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างจากปลายเข็มฉีดยาถึงสารละลาย 0.3 โมลาร์โพแตสเซียมคลอไรด์กับรูปร่างและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจลเมื่อตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนนต่างชนิดกัน โดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา..... 35

5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการกวนด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดเจล เมื่อตรึงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน ชนิดและความเข้มข้นต่างกัน โดยวิธี two phase system..... 40

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของกรดน้ำดีต่างๆ.....	2
2	การสังเคราะห์กรดคีโนดีออกซีโคลิก และกรดอูโซดีออกซีโคลิก โดยวิธีทางเคมี.....	4
3	ประเภทของปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปสารกลุ่มสเตียรอยด์แบบต่างๆ โดยจุลินทรีย์.....	5
4	โครงสร้างทางเคมีของแคปปา-คาร์ราจีแนน.....	9
5	เครื่องมือวัดความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตริง.....	21
6	รูปแบบการเจริญ ประสิทธิภาพของสายใยในการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC และการใช้กรดลิโทโคลิก ของ C.blakesleeana ST-22 เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารสำหรับการงอกเป็นสายใย.....	26
7	ปริมาณกรด 3α,15β-DHC ที่ได้จากการแปรรูปกรดลิโทโคลิกโดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของกรดลิโทโคลิกแตกต่างกัน.....	28
8	การเจริญของ C.blakesleeana ST-22 และปริมาณกรด 3α,15β-DHC ที่ได้จากการแปรรูปกรดลิโทโคลิกโดยสายใยอิสระ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย ที่อุณหภูมิต่างๆกัน.....	29
9	การเจริญของ C.blakesleeana ST-22 และปริมาณกรด 3α, 15β-DHC ที่ได้จากการแปรรูปกรดลิโทโคลิกโดยสายใยอิสระ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย ที่ พีเอช ต่างๆกัน.....	31

รูปที่ หน้า

10 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณกรด 3α,15β-DHC ที่ได้จากการแปรรูปโดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 และปริมาณกรดลิโทโคลิกที่เหลือในสารผสมปฏิกิริยา..... 32

11 ลักษณะของเม็ดเจลสปอร์ตริง C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน โดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา..... 36

12 ผลของความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนน เมื่อตริงสปอร์ของ C.blakesleeana ST-22 โดยวิธีหยดจากเข็มฉีดยา ต่อความแข็งของเม็ดเจลสปอร์ตริง และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล..... 38

13 ลักษณะของเม็ดเจลตริงสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน โดยวิธี two phase system..... 42

14 ลักษณะของเม็ดเจลสปอร์ตริง C.blakesleeana ST-22 ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน โดยวิธี two phase system ก่อนและหลังการงอกเป็นสายใย..... 44

15 เปรียบเทียบการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระ ที่สปอร์ C.blakesleeana ST-22 สัมผัสกับนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ในช่วงเวลาต่างๆกัน..... 45

16 ปริมาณกรดลิโทโคลิก และกรดดีออกซีโคลิกที่วิเคราะห์ได้ในสารผสมปฏิกิริยา เมื่อมีนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ความเข้มข้นแตกต่างกัน..... 47

17 ประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล และความแข็งของเม็ดเจลก่อนและหลังการงอกสายใย เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนต่างๆกัน ตริงสปอร์โดยวิธี two phase system..... 48

18 ผลกระทบของความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์ ต่อความสามารถในการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 51

รูปที่ หน้า

19 ผลกระทบของความเข้มข้นโพแตสเซียมคลอไรด์ ต่อความแข็งและการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลแต่ละชนิด..... 52

20 ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยอิสระ ที่สภาวะของการงอกสายใยในขวดรูปชมพู่และความเร็วของการเขย่าแตกต่างกัน ในช่วงเวลาต่างๆ... 54

21 ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Wako ที่สภาวะของการงอกสายใยในขวดรูปชมพู่และความเร็วของการเขย่าแตกต่างกัน ในช่วงเวลาต่างๆ..... 55

22 ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Sigma ที่สภาวะของการงอกสายใยในขวดรูปชมพู่และความเร็วของการเขย่าแตกต่างกัน ในช่วงเวลาต่างๆ..... 55

23 ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลจากบริษัท Copenhagen Pectin ที่สภาวะของการงอกสายใยในขวดรูปชมพู่และความเร็วของการเขย่าแตกต่างกัน ในช่วงเวลาต่างๆ... 55

24 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงการงอกสายใยจากสปอร์อิสระ และสปอร์ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนของเชื้อรา C.blakesleeana ST-22 ในอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย ที่ช่วงเวลาของการเจริญแตกต่างกัน..... 57

25 ประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยอิสระ เมื่อน้ำหนักของสายใยแตกต่างกันในสารผสมปฏิกิริยา.. 67

รูปที่ หน้า

26 ประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako เมื่อน้ำหนักของเม็ดเจล(รวมสายใย)แตกต่างกันในสารผสมปฏิกิริยา..... 67

27 ประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin เมื่อน้ำหนักของเม็ดเจล(รวมสายใย)แตกต่างกันในสารผสมปฏิกิริยา.... 67

28 ผลกระทบของความเข้มข้นสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยอิสระ..... 69

29 ผลกระทบของความเข้มข้นสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ต่อความแข็งของเม็ดเจล และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Wako..... 70

30 ผลกระทบของความเข้มข้นสปอร์ C.blakesleeana ST-22 ต่อความแข็งของเม็ดเจล และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลบริษัท Copenhagen Pectin... 71

31 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ต่อการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล และความแข็งของเม็ดเจล..... 73

32 ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์กับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ต่อความแข็งของเม็ดเจล และการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล..... 74

33 เปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของเม็ดเจลสปอร์ตริงแคปปา-คาร์ราจีแนนที่เสริมและไม่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน..... 75

34 การแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช ต่างๆกัน โดยสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล..... 77

รูปที่ หน้า

35 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิ ต่อปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิก เป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล..... 79

36 ผลของ พีเอช ต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่แปรรูปกรดลิโทโคลิก เป็นกรด 3α,15β-DHC ในสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล..... 80

37 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล เมื่ออยู่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0..... 82

38 เปรียบเทียบผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล เมื่ออยู่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ทริส-กรดไฮโดรคลอริก พีเอช 8.4..... 83

39 ผลกระทบของกรดลิโทโคลิกต่อความเสถียรของเอนไซม์ ในปฏิกิริยาการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล..... 84

40 Linewever-Burk Plot ของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยอิสระของ C.blakesleeana ST-22 และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล..... 86

41 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยของ C.blakesleeana ST-22 เมื่อเก็บรักษาสปอร์อิสระในสารละลายนอร์มอลซาลีน เป็นเวลาต่างๆกัน..... 87

42 เปรียบเทียบความเสถียรของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC ของสายใยอิสระ และสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายต่างชนิด และอุณหภูมิต่างๆกัน.... 89

รูปที่ หน้า

43 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจลเมื่อนำมาใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่อง..... 90

44 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการแปรรูปกรดลิโทโคลิกเป็นกรด 3α,15β-DHC โดยสายใยในเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนเจล เมื่อใช้ซ้ำอย่างต่อเนื่องและกระตุ้นด้วยอาหารเหลวสำหรับการงอกเป็นสายใย.... 92

คำย่อ

°ซ	=	องศาเซลเซียส
กรด 3α,15β-DHC	=	กรด 3 แอลฟา 15 เบตา-ไดไฮดรอกซี-5 เบตา-โคลานิก
°c	=	องศาเซลเซียส
mm.	=	มิลลิเมตร
m.	=	เมตร
kg.	=	กิโลกรัม
cm.	=	เซนติเมตร
LCA	=	กรดลิโทโคลิก
CDCA	=	กรดคีโนดีออกซีโคลิก
UDCA	=	กรดอูโซดีออกซีโคลิก
DCA	=	กรดดีออกซีโคลิก
3α,15β-DHCA	=	กรด 3 แอลฟา 15 เบตา-ไดไฮดรอกซี-5 เบตา-โคลานิก
max	=	สูงสุด
initial	=	เริ่มต้น
μmole	=	ไมโครโมล
%	=	เปอร์เซนต์
w	=	น้ำหนัก
v	=	ปริมาตร