หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 สภาวะการผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum

จากการวิเคราะห์เอกสารซึ่งมีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ α-HSDH (ตารางที่ 1) พบว่าเอนไซม์ α-HSDH ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ หมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่ง 3 (3α-HSDH), ตำแหน่ง 7 (7α-HSDH) และตำแหน่ง 12 (12α-HSDH) ของสารประกอบจำพวกสเตียรอยด์ให้เป็นหมู่คีโต ส่วนใหญ่ผลิตได้โดยกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ (Intestinal microoganisms) มีเพียงส่วนน้อยที่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์ในดิน การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 3α-HSDH, 7α-HSDH และ 12α-HSDH ใน Brevibacterium fuscum DC 33 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในดิน

ผลการทดลองพบว่า B. fuscum สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์และกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนและคาร์บอนที่สำคัญ ในสภาวะการเพาะเลี้ยงโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ และมีระยะเวลาการเจริญสูงสุดประมาณ 40 ชั่วโมง การผลิตเอนไซม์ α-HSDH โดย B. fuscum จะเกิดควบคู่ไปกับการเจริญ และมีจุดสูงสุดของการผลิตที่ระยะการเจริญ 23 ชั่วโมง (รูปที่ 7 ก) ซึ่งสารละลายเอนไซม์ที่สกัดแยกได้จากเซลล์ที่จุดนี้ สามารถเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันของสับสเตรตกรดคีโนดีออกซีโคลิก (3α, 7α- dihydroxy-5β-cholanoic acid) ได้ดีกว่ากรดดีออกซีโคลิก (3α, 12α-dihydroxy-5β-cholanoic acid) และกรดลิโทโคลิก (3α-hydroxy-5β-cholanoic acid) ประมาณ 2 เท่า แสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารปกติ B. fuscum น่าจะผลิตเอนไซม์ α-HSDH ที่มีแอคติวิตีของ 7α-HSDH สูงกว่าแอคติวิตีของ 12α-HSDH และ 3α-HSDH ประมาณ 2 เท่า

จุลินทรีย์บางชนิดในตารางที่ 1 สามารถผลิตเอนไซม์ α-HSDH โดยอาศัยการเหนี่ยวนำของสารประกอบจำพวกสเตียรอยด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดน้ำดี บางชนิดก็สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ α-HSDH ได้โดยไม่ต้องการการเหนี่ยวนำ และก็มีบางชนิดอีกเช่นกันที่การสังเคราะห์

เอนไซม์ α-HSDH ถูกกดกัน (repress) โดยกรดน้ำดี ในจำนวนจุลินทรีย์ที่ได้มีการศึกษาการเหนี่ยวนำเอนไซม์ 12α-HSDH โดยกรดน้ำดี คือ Bifidobacterium, Clostridium group P, Clostridium leptum, Clostridium perfringens และ Eubacterium lentum พบว่ามี Bifidobacterium เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์ 12α-HSDH ได้โดยอาศัยการเหนี่ยวนำของกรดน้ำดี (กรดโคลิก) (Aries และ Hill, 1970) จุลินทรีย์ที่นอกเหนือจากนี้อีก 4 ชนิด ล้วนแล้วแต่มีการสังเคราะห์เอนไซม์ 12α-HSDH ที่ไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำได้โดยกรดน้ำดี นอกจากกรดน้ำดีแล้วเอนไซม์ 12α-HSDH ยังอาจถูกเหนี่ยวนำได้โดยสารชนิดอื่นอีก เช่น ฟรุคโตส หรือกลูโคสใน Clostridium group P และอาร์จีนีนใน Eubacterium lentum (Macdonald และคณะ, 1977; 1979)

เนื่องจากมีรายงานว่า B. fuscum สามารถใช้กรดน้ำดี 2 ชนิด คือกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก เป็นสับสเตรตของเอนไซม์ α-HSDH ในจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้ และยังมีผู้รายงานอีกด้วยว่ากรดน้ำดีทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมอยู่ในกระบวนการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดยกรดดีไฮโดรโคลิกทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น และกรดโคลิกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Sawada และคณะ, 1980) (รูปที่ 3) ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้กรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิกเป็นสาร-เหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ใน B. fuscum ซึ่งผลการทดลองพบว่าการเสริมกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิกในปริมาณ 0.1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร หรือ 0.05 เปอร์เซนต์ ไม่ว่าจะเป็นการเสริมตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ หรือเสริมหลังจากที่เจริญเชื้อ B. fuscum ไปแล้ว 23 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ให้สูงขึ้นได้ใกล้เคียงกัน คือมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเพิ่มขึ้นจากเมื่อไม่มีการเหนี่ยวนำมากกว่า 4 เท่า ในขณะที่เอนไซม์ 7α-HSDH และ 3α-HSDH ไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีแอคติวิตีสูงขึ้นได้โดยกรดน้ำดีทั้ง 2 ชนิด และผลกลับทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงด้วย ปรากฏการณ์ที่ B. fuscum สามารถผลิตเอนไซม์ 12α- HSDHเพิ่มขึ้นได้โดยอาศัยการเหนี่ยวนำของกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก อาจอธิบายได้ถึงความจำเป็นของเอนไซม์ชนิดนี้ต่อกระบวนการเปลี่ยนรูปกรดน้ำดี แต่ก็ยังไม่สามารถอธิบายได้ ณ ที่นี้ว่าทำไมในจำนวนเอนไซม์ α-HSDH ทั้ง 3 ชนิด (3α-HSDH, 7α-HSDH และ 12α-HSDH) ที่ผลิตโดย B. fuscum จึงมีเพียงเอนไซม์ 12α-HSDH เพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ถูกเหนี่ยวนำได้โดยกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก อย่างไรก็ตาม การเสริมกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิกในสภาวะที่ใช้ไม่พบว่ามีผลต่อรูปแบบและความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ในแต่ละระยะการเจริญของ B. fuscum แต่จะมีผลต่อการเจริญซึ่งแสดงในรูปของค่า

ความขุ่นบ้างเล็กน้อย Sawada และคณะ (1980) ได้รายงานไว้ว่าการเสริมกรดดีไฮโดรโคลิกความเข้มข้นสูงจะให้ผลยับยั้งการเจริญของ B. fuscum ได้ Floch และคณะ (1971) ตั้งข้อสังเกตว่ากรดน้ำดีอาจมีผลกระทบต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิดได้ สำหรับผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า การเสริมกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิกเข้มข้น 0.05 เปอร์เซนต์ ตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อจะมีผลยับยั้งการเจริญของ B. fuscum โดยเฉพาะในระยะแบ่งตัวแบบทวีคูณของเซลล์ (ระยะ log) โดยที่กรดโคลิกจะสามารถยับยั้งการเจริญได้ดีกว่ากรดดีไฮโดรโคลิก (รูปที่ 6) และผลการยับยั้งจะหมดไปเมื่อ B. fuscum เจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดโดยจะยังพบค่าการเจริญสูงสุดใกล้เคียงพอกันกับการเจริญเมื่อไม่ได้เสริมด้วยอนุพันธ์กรดน้ำดีเหล่านี้ ด้วยเหตุนี้การเสริมกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิกที่ความเข้มข้นเดียวกันหลังจากที่เจริญเชื้อไปเป็นเวลา 23 ชั่วโมง จึงมีข้อได้เปรียบมากกว่าเมื่อเสริมอนุพันธ์กรดน้ำดีลงไปตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ เพราะไม่มีผลกระทบต่อการเจริญสูงสุดของ B. fuscum (รูปที่ 8) จากผลดังกล่าวสรุปได้ว่ากรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิกเข้มข้น 0.05 เปอร์เซนต์ สามารถยับยั้งการเจริญของ B. fuscum ได้เพียงบางส่วน หรือบางระยะของการเจริญเท่านั้น นอกจาก B. fuscum แล้ว การยับยั้งการเจริญโดยกรดน้ำดียังพบได้ในจุลินทรีย์ที่มีการผลิตเอนไซม์ α-HSDH อีกหลายชนิด เช่น Clostridium perfringens, Eubacterium lentum, Clostridium group P (Macdonald และคณะ, 1976; 1977; 1979) และ Clostridium limosum (Sutherland และ Williams, 1985) ซึ่งผลของการยับยั้งจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของกรดน้ำดี โดยทั่ว ๆ ไปการที่กรดน้ำดีจะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หรือไม่นั้น นอกจากจะขึ้นกับชนิดของกรดน้ำดีแล้ว ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดน้ำดีที่ใช้ และความไว (susceptibility) ของจุลินทรีย์ (Floch และคณะ, 1971) นอกจากนี้สภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เช่น พีเอช ก็พบว่ามีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยกรดน้ำดีเช่นเดียวกัน (Binder และคณะ, 1975)

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของเอนไซม์ α-HSDH โดย B. fuscum โดยวิธีการเหนี่ยวนำด้วยสับสเตรตกรดน้ำดีตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 7) และการเหนี่ยวนำเฉพาะที่ (ทำการเหนี่ยวนำหลังจากที่เจริญเชื้อ B. fuscum ไปเป็นเวลา 23 ชั่วโมง) (รูปที่ 8) จะเห็นว่าการเหนี่ยวนำทั้ง 2 วิธี สามารถเหนี่ยวนำแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ให้สูงสุดได้ใกล้เคียงกัน แม้จะใช้เวลาต่างกัน คือการเหนี่ยวนำตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อจะใช้เวลาเพียง 14 และ 17 ชั่วโมงสำหรับการเหนี่ยวนำโดยกรดดีไฮโดรและกรดโคลิกตามลำดับ ในขณะที่การเหนี่ยวนำ

เฉพาะที่จะใช้เวลาทั้งสิ้น 26 ชั่วโมง (23 ชั่วโมง สำหรับการเพาะเลี้ยง B. fuscum ให้เจริญถึงระยะที่จะทำการเหนี่ยวนำ (ค่าความขุ่นประมาณ 6-7) และอีก 3 ชั่วโมง สำหรับช่วงการเหนี่ยวนำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ถึงจุดสูงสุด) แต่จากการที่จุดสูงสุดของการผลิตเอนไซม์ 12α-HSDH ของการเหนี่ยวนำตั้งแต่เริ่มเลี้ยงเชื้ออยู่ในระยะต้น ๆ ของการเจริญ ซึ่งเซลล์มีค่าการเจริญต่ำ (ค่าความขุ่นประมาณ 1-2) การเพาะเลี้ยง B. fuscum ด้วยวิธีนี้จึงให้ปริมาณเซลล์ ณ จุดที่มีการผลิตเอนไซม์ 12α-HSDH สูงสุดที่รวบรวมได้ในแต่ละรอบของการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงโดยวิธีการเหนี่ยวนำเฉพาะที่ ซึ่งมีจุดสูงสุดของการผลิตเอนไซม์ 12α-HSDH อยู่ในระยะที่ B. fuscum เริ่มเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ และมีค่าความขุ่นของเซลล์สูงกว่า (ประมาณ 7) ในงานวิจัยนี้จึงเลือกเพาะเลี้ยง B. fuscum เพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์โดยวิธีเหนี่ยวนำเฉพาะที่

สำหรับการเลือกใช้ชนิดของสารเหนี่ยวนำเอนไซม์นั้น พิจารณาได้จากการที่กรดดีไฮโดร-โคลิก, กรดโคลิก และเกลือของกรดโคลิกต่างก็ให้ผลการเหนี่ยวนำเอนไซม์ 12α-HSDH ได้ดีพอ ๆ กันซ้ำยังมีราคาใกล้เคียงกัน แต่งานวิจัยนี้ก็ได้เลือกใช้โซเดียมโคเลทซึ่งเป็นสารที่หาง่ายและราคาถูก สามารถละลายได้ในน้ำ สะดวกแก่การเตรียมและที่สำคัญคือให้ผลการเหนี่ยวนำได้ดีเช่นเดียวกับกรดโคลิก เป็นสารเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ 12α-HSDH ใน B. fuscum และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธีเหนี่ยวนำเฉพาะที่ โดยเสริมโซเดียมโคเลท (0.1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร หรือ 0.05 เปอร์เซนต์) หลังจากที่เจริญเชื้อ B. fuscum ไปเป็นเวลา 23 ชั่วโมง (ค่าความขุ่นประมาณ 6-7) แล้วทำการเขย่าเพื่อให้เชื้อเจริญต่อไปอีก 3 ชั่วโมง จึงเก็บเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ ผลการเตรียมโดยวิธีนี้พบว่าเชื้อปริมาตร 1 ลิตร จะให้จำนวนกรัมของเซลล์เปียกประมาณ 10 กรัม และมีปริมาณเอนไซม์ 16.05 หน่วย/กรัมน้ำหนักเซลล์เปียก สำหรับใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ 12α-HSDH เพื่อการศึกษาและการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum กับปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น เมื่อใช้กรดโคลิก, กรดดีออกซีโคลิก, กรดดีโนดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรตจะให้กราฟมีลักษณะเป็นเส้นตรง แต่ไม่ผ่านจุดศูนย์ (รูปที่ 9) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจาก B. fuscum มีโปรตีนหรือสารบางชนิดที่ให้ผลรบกวนต่อสภาวะการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ในทิศทางที่จะทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร สูงกว่าที่เป็นจริงโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อปริมาณโปรตีนที่ใช้วัดแอคติวิตีมีค่าต่ำกว่า 10 ไมโครกรัม ดังจะเห็นได้จากสามารถตรวจพบเอนไซม์ในกลุ่มดีไฮโดรจีเนส

และไฮโดรจีเนสหลายชนิด ซึ่งสามารถใช้ NAD^+ และสับสเตรตที่มีอยู่แล้วภายในเซลล์ (endogeneous substrate) หรือสับสเตรตที่เติมจากภายนอก เช่น เอทานอล ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของกรดน้ำดี โดยเฉพาะเอนไซม์แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งผลการทดลองย้อมสีแอคติวิตีของเอนไซม์ (รูปที่ 10 ช้อ 4.5) เมื่อใช้เอทานอลแต่เพียงอย่างเดียวเป็นสับสเตรต จะพบแถบสีที่แสดงถึงแอคติวิตีของเอนไซม์มีจำนวนถึง 3 แถบ นอกจากนี้สภาวะในการวัดแอคติวิตีของ α-HSDH เช่น พีเอช หรืออุณหภูมิที่ใช้ก็อาจมีส่วนทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum กับปริมาณโปรตีนมีลักษณะดังกล่าวได้เช่นกัน

ผลการจำแนกชนิดของเอนไซม์ α-HSDH ที่สกัดได้จาก B. fuscum โดยวิธีอีเลคโตรโฟรีซิส เมื่อทำการย้อมสีแอคติวิตีโดยใช้สับสเตรตชนิดต่าง ๆ (รูปที่ 10) สามารถสรุปได้ว่าแถบสี 3 แถบที่พบบนแท่งเจลที่ค่า R_f 0.62, 0.86 และ 0.98 น่าจะแสดงถึงแอคติวิตีของเอนไซม์ 3α-HSDH, 7α-HSDH และ 12α-HSDH ตามลำดับ โดยเฉพาะแถบสีที่ค่า R_f 0.86 และ 0.98 นั้นยืนยันได้โดยผลการวิเคราะห์แอคติวิตีในแท่งเจลว่าเป็นของเอนไซม์ 7α-HSDH และ 12α-HSDH (รูปที่ 11) ลักษณะและตำแหน่งการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ 3α-HSDH และ 7α-HSDH จาก B. fuscum ที่แยกได้ด้วยเทคนิคโพลีอะไครลาไมด์เจลนี้จะสอดคล้องกับเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่แยกได้จาก E. coli (พิศมัย เปี่ยมทิพย์มนัส, 2530) คือแถบสีของเอนไซม์ 7α-HSDH เคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่าแถบสีของเอนไซม์ 3α-HSDH เมื่อทำการแยกด้วยเทคนิคเดียวกันที่สภาวะการทดลองเดียวกัน

เอนไซม์ α-HSDH ที่สกัดได้จาก B. fuscum มีความเสถียรต่ำมาก จะเห็นได้จากเมื่อทำการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ในสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 6.8) ที่อุณหภูมิ 7 °ซ จะสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดภายในเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาผลของกลีเซอรอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 2-เมอร์แคปโตเอทานอลคงที่ (รูปที่ 12 ก และ ข) พบว่าที่อุณหภูมิ 7 °ซ สารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้นสูง 20 เปอร์เซนต์ สามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ดีกว่าสารละลายที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่ำ (5 และ 10 เปอร์เซนต์) อย่างเห็นได้ชัด และเมื่อเปรียบเทียบผลการเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ระหว่างกลีเซอรอล และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลที่อุณหภูมิ 7 °ซ เช่นเดียวกัน (รูปที่ 12 ก ข และ ค ง) พบว่าเอนไซม์ α-HSDH ในสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เสริมด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ เพียงอย่างเดียวยังคงมีแอคติวิตี

สูงประมาณ 50 เปอร์เซนต์ ณ วันที่ 12 ของการเก็บรักษา ในขณะที่ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล เข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ เพียงอย่างเดียวไม่สามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ได้เกิน 2 วัน จากผลอันนี้น่าจะชี้ให้เห็นว่ากลีเซอรอลเพิ่มความเสถียรได้ดีกว่า 2-เมอร์แคปโตเอทานอล แต่ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ก็จำเป็นสำหรับความเสถียรของเอนไซม์เช่นเดียวกัน ดังจะเห็นได้ว่า การเสริม 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ความเข้มข้นที่เหมาะสม (0.1 เปอร์เซนต์) เข้ากับกลีเซอรอล ความเข้มข้นสูง 20 เปอร์เซนต์ ในสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะช่วยส่งเสริมความเสถียรของเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น จากการที่เอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum ต้องอาศัยทั้งกลีเซอรอล และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลร่วมกันเพื่อเพิ่มความเสถียร จึงเชื่อว่าเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่มีความไวสูงต่อปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเช่นเดียวกับเอนไซม์ 3α-HSDH และ 7α-HSDH จาก L. xylosus (Kinoshita และคณะ, 1983) ซึ่งต้องเพิ่มความเสถียรด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล เข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ เช่นเดียวกัน ในขณะที่เอนไซม์ α-HSDH ส่วนใหญ่ในตารางที่ 1 มักต้องการใช้ EDTA และหรือ ไดไทโอทรีอิทอล (dithiothreitol) สำหรับเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ ในงานวิจัยนี้ได้พยายามเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ด้วย EDTA ด้วยเช่นเดียวกัน (ไม่ได้รายงานผล) แต่พบว่า EDTA ที่ความเข้มข้นสูงถึง 10 มิลลิโมลาร์ ไม่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์แต่อย่างใด

การมีสารเพิ่มความเสถียร (stabilizer) ของเอนไซม์เช่น กลีเซอรอล และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลอยู่ด้วย จะช่วยเพิ่มความเสถียรของสารละลายเอนไซม์ได้ดี อาจเป็นได้ว่ากลีเซอรอลจะช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ได้โดยไปล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน เพิ่มความหนืดให้กับสารละลาย จึงลดการเปลี่ยนแปลงโครงร่าง (conformation) ของโปรตีน อีกประการหนึ่งก็คือ การมีกลีเซอรอลความเข้มข้นสูงจะไปช่วยลดการละลายของออกซิเจนในสารละลายซึ่งเป็นการหลีกเลี่ยงปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอีกด้วย ส่วน 2-เมอร์แคปโตเอทานอลนั้นเป็นรีดิวซิ่ง เอเจนท์ จะช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นของหมู่ซัลไฟดริลในโครงสร้างโมเลกุลเอนไซม์โดยเฉพาะที่ตำแหน่งเร่ง (active site) อันจะมีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีได้

5.2 การทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์

เมื่อนำเอนไซม์ที่สกัดแยกจาก B. fuscum ในขั้นต้นมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยเริ่มต้นจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-80 เปอร์เซนต์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแฟรคชั่น ๆ ละ 10 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 3) พบว่าความเข้มข้นอิ่มตัว 0-30 เปอร์เซนต์ และ 0-40 เปอร์เซนต์ ไม่มีการตกตะกอนของโปรตีน การตกตะกอนโปรตีนจะเกิดมากที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-70, 0-75 และ 0-80 เปอร์เซนต์ ซึ่งเมื่อทำการวัดแอคติวิตีในส่วนน้ำใสและส่วนของตะกอนก็พบว่าแอคติวิตีเกือบทั้งหมดของเอนไซม์ 3α-, 7α- และ 12α-HSDH อยู่รวมกันในส่วนตะกอนของโปรตีน แสดงว่าเอนไซม์ α-HSDH เหล่านี้น่าจะมีคุณสมบัติของการละลายที่เดียวกันหรือใกล้เคียงกันมาก ด้วยเหตุที่การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-70, 0-75 และ 0-80 เปอร์เซนต์ ต่างก็ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะ, ปริมาณโปรตีนรวมตลอดจนเปอร์เซนต์ผลผลิตของเอนไซม์ 3α-, 7α- และโดยเฉพาะเอนไซม์ 12α-HSDH สูงใกล้เคียงกันทั้ง 3 ความเข้มข้น (แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ 12α-HSDH สูงกว่าเอนไซม์ 7α-HSDH ประมาณ 2-3 เท่า และสูงกว่าเอนไซม์ 3α-HSDH ประมาณ 13-14 เท่า) ในการทดลองจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 75 เปอร์เซนต์ ในการตกตะกอนโปรตีนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH เห็นได้จากตารางที่ 4 ว่าวิธีนี้จะช่วยกำจัดโปรตีนที่ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ได้เกือบครึ่งหนึ่งของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น โดยสูญเสียเปอร์เซนต์ผลผลิตเพียงเล็กน้อย (เปอร์เซนต์ผลผลิต 92 เปอร์เซนต์ สำหรับเอนไซม์ 12α-HSDH) จากนั้นนำโปรตีนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ไปแยกให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (I) ซึ่งในขั้นตอนแรกนี้จำเป็นต้องใช้คอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร เพื่อแก้ปัญหาการอุดตันของคอลัมน์อันเนื่องมาจากโปรตีนองค์ประกอบที่มีขนาดใหญ่ เช่น พวกไกลโคโปรตีนหรือนิวคลีโอโปรตีนที่ยังกำจัดไปไม่หมดโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ผลพบว่าโดยอาศัยความแตกต่างของประจุ สามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกไปได้บางส่วน และแยกโปรตีนส่วนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 3α-, 7α- และ 12α-HSDH (แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ 12α-HSDH มีค่าสูงกว่าเอนไซม์ 7α-HSDH ประมาณ 2-3 เท่า และสูงกว่า 3α-HSDH ประมาณ 13 เท่า) นำมาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร อีกครั้งหนึ่งโดยอาศัยความแตกต่างของประจุอีกเช่นกัน สามารถแยกเอนไซม์ α-HSDH ทั้ง 3 ชนิดออกจากกันที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน (แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ 12α-HSDH มีค่าเป็น 2 เท่าของเอนไซม์ 7α-HSDH และมีค่าเป็น 13 เท่าของเอนไซม์

3α-HSDH) ผลการทดลองเหล่านี้ทำให้มองเห็นศักยภาพของการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์ ปลอดจาก 3α- และ 7α-HSDH ว่ามีทางเป็นไปได้เพราะน่าจะเป็นเอนไซม์คนละตัว และน่าจะมีประจุสุทธิแตกต่างกัน จึงถูกแยกออกมาที่คนละตำแหน่งของดีอีเออีคอลัมน์ ขั้นตอนนี้สามารถแยกเอนไซม์ 12α-HSDH ให้ปลอดจากการปนเปื้อนของเอนไซม์ 3α- และ 7α-HSDH ได้เป็นผลสำเร็จ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4 เท่า ผลการแยกโปรตีนโดยวิธีอีเลคโตรโฟรีซิส (รูปที่ 18) ก็แสดงให้เห็นว่าแถบของโปรตีนเริ่มลดจำนวนลงพร้อมทั้งเริ่มสังเกตเห็นแถบโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นเอนไซม์ 12α-HSDH ปรากฏติดกับแถบของสีตามรอย

มีรายงานว่า การใช้คอลัมน์แอฟฟินิตีเป็นขั้นตอนที่ดีในการทำให้เอนไซม์ในกลุ่ม α-HSDH บริสุทธิ์ขึ้น เช่น คอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (Kinoshita และคณะ, 1983) คอลัมน์กรดคีออกซีโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (Harris และ Hylemon, 1978), คอลัมน์ NAD-เซฟาโรส 4 บี, NADH-เซฟาโรส 4 บี (Macdonald และคณะ, 1979) และคอลัมน์ Procion red และ Cibacron blue (Macdonald และ Rochon, 1983) ในจำนวนคอลัมน์แอฟฟินิตีเหล่านี้พบว่ามีปัญหาในการใช้คอลัมน์กรดคีออกซีโคลิก-เซฟาโรส 4 บี เนื่องจากเอนไซม์จับกับลิแกนด์แน่นเกินไป คอลัมน์แอฟฟินิตีกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (Kinoshita และคณะ, 1983) โดยอาศัยความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรตกรดดีไฮโดรโคลิก สามารถแยกเอนไซม์ 12α-HSDH ให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 6 เท่า เมื่อทำการชะด้วย linear salt gradient การแยกเอนไซม์ 12α-HSDH ในขั้นตอนต่อไปด้วยคอลัมน์แอฟฟินิตีกรดดีไฮโดร-โคลิก-เซฟาโรส 4 บี แต่ทำการชะด้วยโซเดียมโคเลทซึ่งเป็นสับสเตรตชนิดหนึ่งของเอนไซม์ สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ขึ้นถึง 23 เท่า (ในการวิจัยนี้ได้พยายามที่จะชะเอนไซม์ด้วยสับสเตรตอีกชนิดหนึ่งคือโซเดียมคีออกซีโคเลท ซึ่งคาดว่าน่าจะมีความจำเพาะต่อเอนไซม์สูงมากเช่นกัน แต่ผลการทดลองพบว่าการชะด้วยโซเดียมคีออกซีโคเลทไม่สามารถกระทำได้ เพราะเมื่อละลายโซเดียมคีออกซีโคเลทในสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.8 ที่เสริมด้วย 20 เปอร์เซนต์ กลีเซอรอล และ 0.1 เปอร์เซนต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล อันเป็นสารละลายที่ใช้รักษาสภาพของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 7 °ซ โซเดียมคีออกซีโคเลทจะทำให้สารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวมีลักษณะเป็นวุ้นหนืดไม่สามารถนำมาใช้เป็นตัวชะได้ สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 เพื่อพยายามแยกเอนไซม์ 12α-HSDH ให้มีความบริสุทธิ์ปลอดจากแถบของโปรตีนที่อยู่ชิดติดกัน โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล นั้นดูเหมือนไม่สามารถช่วยให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นแต่ประการใด

ผลการทดลองทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่าง ๆ ที่กล่าวมานี้ชี้ให้เห็นว่าถึงแม้จะไม่สามารถแยกเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum ให้บริสุทธิ์อย่างแท้จริงได้ แต่เอนไซม์ก็บริสุทธิ์ขึ้นมาก ที่เห็นได้ชัดเจนคือ สามารถกำจัดโปรตีนทั้งที่มีและไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH โดยเฉพาะโปรตีนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 3α-HSDH และ 7α-HSDH ถูกกำจัดออกไปอย่างสมบูรณ์ และโปรตีนที่เหลืออยู่เป็นโปรตีนที่มีลักษณะของการเคลื่อนที่โดยอำนาจของสนามไฟฟ้าตลอดจนขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกันมาก

ผลการจำแนกชนิดของเอนไซม์ α-HSDH ของสารละลายเอนไซม์หลังจากที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) ที่คาดว่ามีเฉพาะแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH และสารละลายเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยคอลัมน์แอฟฟินิตีกรดดีไฮโดร-โคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) สามารถยืนยันได้ว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ 3α-HSDH และ 7α-HSDH ถูกกำจัดออกไปหลังจากที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) เป็นต้นไป ทั้งนี้ผลการย้อมสีแอคติวิตีเมื่อใช้กรดโคลิกที่ละลายในเอทานอลเป็นสับสเตรต (รูปที่ 19) จะพบเฉพาะแถบสีของเอนไซม์ 12α-HSDH(R_f 0.98) เพียงแถบเดียวเท่านั้น และไม่สามารถตรวจพบแถบสีอื่น ๆ ที่คาดว่าเป็นของเอนไซม์ 3α-HSDH (R_f 0.62) เอนไซม์ 7α-HSDH (R_f 0.86) ตลอดจนแถบสีที่คาดว่าเป็นของเอทานอล (R_f 0.62, 0.83 และ 0.92) ได้อีกเลย จากการเปรียบเทียบตำแหน่งของแถบสีแอคติวิตีที่ได้กับตำแหน่งของแถบสีโปรตีน (รูปที่ 19 และ 20) แสดงให้เห็นว่าแถบของโปรตีนที่มีตำแหน่งติดกับแถบสีตามรอย (และเริ่มปรากฏขึ้นหลังจากที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II)) เป็นของเอนไซม์ 12α-HSDH อย่างที่คาดไว้

ถ้าต้องการจะแยกเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum ให้บริสุทธิ์อย่างแท้จริง จำเป็นต้องใช้ขั้นตอนมากกว่านี้ เช่น preparative gel electrophoresis (Kinoshita และคณะ, 1983) isoelectric focusing เหล่านี้เป็นต้น แต่เนื่องจากความจำกัดของเวลาและเครื่องมือที่ใช้เตรียมเซลล์แบคทีเรียจำนวนมาก เพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์เริ่มต้นขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ดังกล่าวจึงไม่อยู่ในขอบเขตที่สามารถครอบคลุมไปถึงได้ในงานวิจัยนี้

5.3 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum ที่มีความบริสุทธิ์สูง

ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 12α-HSDH โดยวิธีกรองผ่านเจลเซฟาเด็กซ์ จี-150 และวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (รูปที่ 22 และ 23) พบว่าเอนไซม์ 12α-HSDH มีน้ำหนักโมเลกุล 110,000 ดาลตัน โดยวิธีของเซฟาเด็กซ์ จี-150 สำหรับวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิสนั้น แม้ว่าผลที่ได้จะไม่ชัดเจนดีนัก เพราะเอนไซม์ที่นำมาศึกษายังไม่บริสุทธิ์อย่างแท้จริง แต่ก็พอจะคาดเดาได้ว่าเอนไซม์ 12α-HSDH น่าจะประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 64,000 และ/หรือ 58,000 ดาลตัน ซึ่งเมื่อรวมกันแล้ว (122,000 ดาลตัน) ก็มีขนาดใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลที่หาได้โดยวิธีของเซฟาเด็กซ์ จี-150 (110,000 ดาลตัน) ขนาดของเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum ที่แยกได้นี้พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกันกับเอนไซม์ 12α-HSDH จาก Clostridium group P ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 100,000 ดาลตัน (Macdonald, Jellet และ Mahony, 1979) แต่มีขนาดเล็กกว่าเอนไซม์ 12α-HSDH จาก Clostridium leptum ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 225,000 ดาลตัน (Harris และ Hylemon, 1978) สำหรับการศึกษาถึงขั้นองค์ประกอบของเอนไซม์ยังไม่พบว่ามีรายงานในเอนไซม์ชนิดนี้มาก่อน เชื่อว่าอุปสรรคที่สำคัญก็คือ ยังไม่มีเอนไซม์ที่บริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำมาศึกษาได้นั่นเอง

ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา (รูปที่ 24) พบว่าเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน ซึ่งมีกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรตและมี NADH เป็นโคเอนไซม์ได้ดีในช่วงพีเอชที่ค่อนข้างเป็นกรด คือพีเอชประมาณ 5-6 โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ α-HSDH สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 2 ทิศทาง คือปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันและปฏิกิริยาย้อนกลับ (ไฮโดรจีเนชัน) โดยขึ้นกับตัวแปรต่าง ๆ หลายชนิด ที่สำคัญคือพีเอช (Aries และ Hills, 1970) ซึ่งผลจากการทดลองนี้พบว่าช่วงพีเอชที่ค่อนข้างเป็นด่าง คือพีเอชประมาณ 10.5 จะเหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันเมื่อมีกรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตและมี NAD^+ เป็นโคเอนไซม์

เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ 12α-HSDH จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่าเอนไซม์ 12α-HSDH จาก Clostridium perfringens และ Eubacterium lentum เร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (กรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต) ได้ดีที่พีเอช 10.5 และ 8.5-10.5 ตามลำดับ (Macdonald และคณะ, 1976; 1977) ขณะที่เอนไซม์จาก Clostridium group P

และ Clostridium leptum เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.8 และ 8.5-9 (Macdonald และคณะ, 1979; Harris และ Hylemon, 1978)

ผลกระทบของพีเอชต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum ในแต่ละทิศทางจะเห็นได้จากการที่ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเมื่อวัดในทิศทางไฮโดรจีเนชัน (NADH เป็นโคเอนไซม์) จะลดต่ำลงที่พีเอชมากกว่า 7 (แอคติวิตีที่วัดได้มีค่าลดต่ำเหลือประมาณ 65 เปอร์เซนต์ของค่าที่วัด ณ ที่พีเอช 8.2) ในทำนองเดียวกันที่พีเอชต่ำกว่า 10 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาในทิศทางดีไฮโดรจีเนชัน (NAD^+ เป็นโคเอนไซม์) ก็จะลดลงมากเช่นเดียวกัน (แอคติวิตีวัดได้ประมาณ 50 เปอร์เซนต์ของค่าที่วัดได้ที่พีเอช 8) มีรายงานว่า NADH เป็นสารประกอบที่ไม่เสถียรในสภาพพีเอชที่เป็นกรด ในทางกลับกัน NAD^+ ก็เป็นสารประกอบที่ไม่เสถียรในพีเอชที่เป็นด่าง และในสภาวะที่สารละลายเป็นกลางโคเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะมีความเสถียรมากขึ้น แต่ NADH จะมีความเสถียรมากกว่า NAD^+ (Lowry, Passonneau และ Rock, 1961) ดังนั้นจึงเชื่อว่าผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ส่วนหนึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับกันระหว่างโคเอนไซม์ (NAD^+ หรือ NADH) กับเอนไซม์มากกว่าอิทธิพลของสับสเตรตต่อเอนไซม์แต่เพียงอย่างเดียว

ผลของการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ 12α-HSDH (รูปที่ 25) เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ นาน 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum จะมีความเสถียรได้ดีในช่วงพีเอชค่อนข้างกว้าง (พีเอช 5-8) โดยเกือบจะไม่มีการลดลงของแอคติวิตีเลย (แอคติวิตีวัดได้มีค่ามากกว่า 90 เปอร์เซนต์ของค่าสูงสุด) ความเสถียรต่อพีเอชของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อพีเอชต่ำกว่า 5 (แอคติวิตีวัดได้เพียง 20 เปอร์เซนต์ ของค่าเริ่มต้นเมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ที่พีเอช 4 นาน 24 ชั่วโมง) ในขณะที่ความเสถียรของเอนไซม์เมื่อเพิ่มพีเอชให้เป็นด่างมากขึ้นจะมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก (แอคติวิตียังวัดได้ถึง 70 เปอร์เซนต์ ของค่าเริ่มต้นเมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ที่พีเอชสูงกว่า 10 นาน 24 ชั่วโมง)

ผลการทดลองในรูปที่ 24 และ 25 อาจแสดงให้เห็นว่าบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ 12α-HSDH น่าจะมีกรดอะมิโนประเภทที่หมู่ข้างเคียง (side chain) มีประจุเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์และพีเอชที่เป็นกรดหรือด่างก็จะมีผลทำให้ประจุหรือรูปร่างบริเวณเร่งของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ยังผลให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถที่จะจับกับสับสเตรตได้ และการที่เอนไซม์ 12α-HSDH สามารถทนต่อพีเอชที่เป็นด่างได้ดีกว่าพีเอชที่เป็น

กรดก็น่าจะชี้ให้เห็นว่าในจำนวนกรดอะมิโนประเภทที่มีประจุที่เกี่ยวข้องในตำแหน่งเร่งน่าจะมีกรดอะมิโนที่มีความเสถียรต่อภาวะที่เป็นกรดได้ต่ำ เช่น เมทไธโอนีนหรือซิสเทอีนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยก็ได้ จึงทำให้การลดลงและการสูญเสียแอคติวิตีในพีเอชที่เป็นกรดเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าพีเอชที่เป็นด่าง

เอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (กรดคีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรต และ NADH เป็นโคเอนไซม์) ที่ 25 °ซ แตกต่างจากปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต และ NAD^+ เป็นโคเอนไซม์) ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 55 °ซ (รูปที่ 26) ชี้ให้เห็นว่านอกจากพีเอชแล้ว อุณหภูมิก็น่าจะเป็นตัวแปรอีกตัวหนึ่งที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาในแต่ละทิศทางของเอนไซม์ 12α-HSDH เนื่องจากความสามารถของการเร่งปฏิกิริยาในทิศทางไฮโดรจีเนชัน (NADH เป็นโคเอนไซม์) จะลดต่ำลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 °ซ (สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ที่ 45 °ซ) ในขณะที่ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาในทิศทางดีไฮโดรจีเนชัน (NAD^+ เป็นโคเอนไซม์) ที่อุณหภูมิ 45 °ซ มีค่าสูงมาก และมีค่าสูงสุดที่ 55 °ซ โดยลดต่ำลงจนเป็นศูนย์ที่อุณหภูมิ 60 °ซ จึงเชื่อว่าผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ในปฏิกิริยาแต่ละทิศทางน่าจะมาจากการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับกันระหว่างโคเอนไซม์ (NAD^+ หรือ NADH) กับเอนไซม์ และ/หรืออิทธิพลของการจับระหว่างสับสเตรตต่อเอนไซม์เช่นเดียวกับในกรณีของพีเอช

เมื่อศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ (รูปที่ 27) พบว่าเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum มีความเสถียรพอสมควรที่อุณหภูมิ 30 °ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีได้นานถึง 50 นาที โดยสูญเสียแอคติวิตีแต่เพียงเล็กน้อย (แอคติวิตีเหลือ 86 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บที่เวลา 50 นาที; $t_{\frac{1}{2}}$ 5.78 ชั่วโมง) ในขณะที่ความเสถียรต่ออุณหภูมิจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ($t_{\frac{1}{2}}$ ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 °ซ มีค่า 2.31, 0.96, 0.46 และ 0.09 ชั่วโมง ตามลำดับ) มีรายงานว่าเอนไซม์ 12α-HSDH จาก Eubacterium lentum จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 50 °ซ ภายในเวลา 30 นาที (Macdonald และคณะ, 1977)

จากผลการทดลองเรื่องผลของอุณหภูมิในงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าที่อุณหภูมิ 55 °ซ เอนไซม์ 12α-HSDH เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด แต่มีความเสถียรต่ำมาก ถึงแม้ที่อุณหภูมินี้สับสเตรตอาจจะจับกับเอนไซม์ได้ดี แต่ก็ไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการใช้ศึกษาหรือวัดแอคติวิตีสำหรับเอนไซม์ ในการทดลองนี้

ได้ใช้อุณหภูมิ 30 °ซ ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งในทิศทางของดีไฮโดรจีเนชันและไฮโดรจีเนชัน ผลการทดลองยังพอเป็นข้อบ่งชี้ได้อีกว่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของ 12α-HSHD ในทิศทางดีไฮโดรจีเนชันที่ลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 55 °ซ นั้น อาจเป็นไปได้ที่ว่า ณ อุณหภูมิดังกล่าวนี้ ความสามารถในการจับหรือเร่งปฏิกิริยาจะลดลงเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของประจุที่บริเวณเร่ง และ/หรืออาจมีผลต่อพลังงานกระตุ้น (activation energy) ของเอนไซม์ต่อสับสเตรตโดยตรงก็ได้

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์หลังจากที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) และที่แยกได้จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) กับสารละลายเอนไซม์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งสกัดแยกจาก B. fuscum (crude enzyme) ที่อุณหภูมิ 7 °ซ ในรูปที่ 37 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ 12α-HSDH ในสารละลายเอนไซม์ก่อนทำให้บริสุทธิ์มีความเสถียรต่ำกว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว แอคติวิตีของ 12α-HSDH ในสารละลายที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จะมีค่า $t_{\frac{1}{2}}$ 24.8 วัน ในขณะที่ค่า $t_{\frac{1}{2}}$ มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 80.6 และ 91.2 วัน สำหรับเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) และที่แยกได้จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) ตามลำดับ ซึ่งเชื่อว่าอาจเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์บางชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzyme) หรืออาจเป็นไปได้ว่าอาจมีสารบางอย่างซึ่งสามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ เมื่อเก็บรักษาไว้นานจนเกินไป และสารประกอบเหล่านี้น่าจะถูกกำจัดไปในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จึงทำให้เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มขึ้น รูปแบบการลดลงของแอคติวิตีตลอดจนค่า $t_{\frac{1}{2}}$ ที่ใกล้เคียงกันระหว่างเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 และที่แยกได้จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี น่าจะชี้ให้เห็นว่าสารประกอบที่มีอิทธิพลต่อความเสถียรในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์นั้นได้ถูกกำจัดไปอย่างสมบูรณ์ตั้งแต่ขั้นตอนหลังจากผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 แล้ว

Macdonald และคณะ (1977) รายงานไว้ว่า เอนไซม์ 12α-HSDH ในสารละลายเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จาก Eubacterium lentum แม้จะเพิ่มความเสถียรด้วย EDTA ได้บ้าง แต่ก็จะสูญเสียแอคติวิตีถึง 75 เปอร์เซนต์ ภายในระยะเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในขณะที่สารละลายเอนไซม์ชนิดเดียวกันจากงานวิจัยนี้ที่แยกจาก B. fuscum (เพิ่มความเสถียรด้วยกลีเซอรอลและเมอร์แคปโตเอทานอล ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ ในระยะเวลาเดียวกันจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH แต่อย่างใด นอกจากนี้ความเสถียร

ของเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4 เท่า โดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ($t_{\frac{1}{2}}$ 80.6 วัน) และบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 23 เท่า โดยคอลัมน์กรดคีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี ($t_{\frac{1}{2}}$ 91.2 วัน) เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ จะมีค่าสูงกว่าความเสถียรของเอนไซม์ 12α-HSDH จาก Clostridium leptum ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 63 เท่า ($t_{\frac{1}{2}}$ เพียง 11 วัน เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 °ซ และ 20 วัน เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ) (Harris และ Hylemon, 1978)

จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์ 12α-HSDH ที่มีความบริสุทธิ์สูงนี้ไม่สามารถจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปกรดน้ำดีที่ไม่มีหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 12 (กรดคีโนดีออกซีโคลิกและอนุพันธ์, กรดอูโซดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิก) ได้ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ 12α-HSDH จะมีความจำเพาะต่อกรดน้ำดีประเภทที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (ปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน) หรือหมู่คาร์บอนิล (ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่ง 12 เท่านั้น และโดยการเปรียบเทียบค่า K_m และ V_{max} ของกรดน้ำดีประเภทนี้ (ตารางที่ 5) พบว่าในปฏิกิริยาดีไฮ-โดรจีเนชัน เอนไซม์ 12α-HSDH สามารถใช้กรดคีออกซีโคลิกและกรดโคลิกเป็นสับสเตรตได้ดีพอ ๆ กัน (K_m 2.94×10^{-5} โมลาร์ และ 3.33×10^{-5} โมลาร์ ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่ง 7 ในกรดโคลิก (ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไม่ใช่สับสเตรตของเอนไซม์) ที่เพิ่มมาจากตำแหน่ง 3 และ 12 ของกรดคีออกซีโคลิกไม่น่ามีผลต่อความจำเพาะของการจับหรือการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มากนัก สมมติฐานดังกล่าวได้รับการสนับสนุนจากการคำนวณค่าความเร็วสูงสุดของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากันจะให้ค่า V_{max} (0.09 หน่วย/นาที/มก.โปรตีน) คงที่เท่ากันทุกค่า จากการวิเคราะห์ค่า K_m แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการใช้สับสเตรตกรดโคลิกและกรดคีออกซีโคลิกจะลดลงเล็กน้อยเมื่อหมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่งปลาย (terminal carboxyl group) ของกรดโคลิกและกรดคีออกซีโคลิกถูกแทนที่ด้วยไกลซีนหรือเทารีน ซึ่งทั้งนี้เชื่อว่าอาจเป็นผลเนื่องมาจากอิทธิพลของกลุ่มไกลซีนหรือเทารีนไปบดบังหมู่ไฮดรอกซิล ณ ตำแหน่ง 12 ของสเตียรอยด์นิวเคลียส ยังผลให้เอนไซม์มีความสามารถในการจับกับกรดน้ำดีประเภทนี้ (conjugated bile acid) ลดลงหรืออาจเป็นผลเนื่องจากไอออไนเซชั่นของหมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่งปลายมีอิทธิพลต่อการจับระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตโดยตรงก็ได้ แต่เมื่อพิจารณาค่า K_m ของกรดน้ำดีที่มีหมู่คาร์บอกซิลจับกับไกลซีนหรือเทารีนก็ตามจะให้ค่า K_m เท่ากันแล้วก็น่าสรุปได้ว่าผลกระทบของการมีกลุ่มมาจับที่หมู่คาร์บอกซิลตำแหน่งปลายน่าจะเป็นอิทธิพลจากการไอโอไนซ์ของหมู่คาร์บอกซิลต่อการจับระหว่างสับสเตรตกับเอนไซม์มากกว่าผลจากการบดบังบริเวณเร่ง

ในปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน พบว่าความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรตกรดดีไฮโดร-โคลิกจะน้อยกว่ากรดโคลิกและกรดดีออกซีโคลิกในปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันเล็กน้อยที่สภาวะของการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (K_m ของกรดดีไฮโดรโคลิกเท่ากับ 4.76×10^{-5} โมลาร์) สำหรับโคเอนไซม์ NAD^+ (ปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันเมื่อกรดดีออกซีโคลิกเข้มข้นคงที่เป็นสับสเตรต) และ NADH (ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันเมื่อกรดดีไฮโดรโคลิกเข้มข้นคงที่เป็นสับสเตรต) นั้นจะมีความจำเพาะใกล้เคียงกัน แต่น้อยกว่าค่าของสับสเตรตคืออนุพันธ์กรดน้ำดีประมาณ 10 เท่า (ค่า K_m สำหรับ NAD^+ และ NADH เท่ากับ 2.5×10^{-4} โมลาร์ และ 2.00×10^{-4} โมลาร์ ตามลำดับ)

จะเห็นได้ว่าการศึกษาค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ดังกล่าวข้างต้นนั้นเป็นค่าที่ได้จากการอนุมานว่า เมื่อให้ความเข้มข้นของโคเอนไซม์คงที่และอิ่มตัว อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะแปรผันตามความเข้มข้นของสับสเตรตแต่เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม ค่าคงที่ซึ่งได้จากการอนุมานดังกล่าวไม่ใช่ค่าคงที่แท้จริงของคู่เอนไซม์-สับสเตรตนั้น เพราะการกำหนดให้ความเข้มข้นของโคเอนไซม์ ซึ่งก็คือสับสเตรตอีกตัวหนึ่งนั้นอิ่มตัวจะเป็นสภาวะที่ทำได้ยาก และจะต้องใช้โคเอนไซม์ปริมาณสูงมาก โดยเฉพาะถ้าสารนั้นมีราคาแพงยิ่งไม่คุ้มกับการลงทุนวิจัย ดังนั้นสิ่งซึ่งทำได้จึงมักให้โคเอนไซม์คงที่ แต่ไม่ใช่สภาวะที่อิ่มตัวอย่างสมบูรณ์ ด้วยเหตุนี้ค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ที่แท้จริงของสับสเตรตและโคเอนไซม์จะต้องทำการทดลองและคำนวณปฏิกิริยาแบบสับสเตรต 2 ชนิด (bisubstrate reaction) โดยถือว่าโคเอนไซม์ NAD^+ หรือ NADH เป็นสับสเตรตอีกตัวหนึ่ง ผลการทดลองแสดงดังข้อ 4.9.8

เมื่อทำการศึกษาจลน์ศาสตร์ของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 12α-HSDH แบบ Two-substrate enzyme catalysed reaction โดยการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดน้ำดีที่ความเข้มข้นหนึ่ง ๆ ของ NAD^+ (ปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน, กรดโคลิกหรือกรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต) หรือ NADH (ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน, กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรต) พบว่าการพลอตปฐมภูมิ (primary plot) ซึ่งเป็นการพลอตระหว่างส่วนกลับของอัตราเร็วของปฏิกิริยากับส่วนกลับของความเข้มข้นของกรดน้ำดี (รูปที่ 31) จะให้เส้นกราฟที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของ NAD^+ หรือ NADH มีค่าความชันแตกต่างกัน แสดงว่ากลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 12α-HSDH น่าจะเป็นแบบ compulsory-order หรือ random-order ternary complex mechanism แบบใดแบบหนึ่งใน 2 แบบนี้ แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่าเป็นแบบใด ถ้าต้องการจะทราบกลไกการเร่งปฏิกิริยาที่แน่นอนยิ่งขึ้นจะต้องใช้การศึกษาทางจลน์ศาสตร์

ที่ลึกซึ้งกว่านี้ เช่นวิธี product inhibition หรือ isotope exchange เป็นต้น (Dalziel, 1975) ซึ่งปริมาณเอนไซม์ที่แยกทำให้บริสุทธิ์ได้และเวลาที่ต้องใช้เป็นข้อจำกัดของการวิจัยนี้ในการศึกษาถึงกลไกดังกล่าว

Compulsory-order หรือ random-order เป็นกลไกการเร่งปฏิกิริยาที่มักพบในเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสทั่ว ๆ ไป (Dalziel, 1975) รวมทั้งเอนไซม์ 3α- และ 7α-HSDH จาก L. xylosus ก็ใช้กลไกแบบนี้เช่นเดียวกัน (Kinoshita และคณะ, 1983) กลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบ compulsory-order หรือ random-order นี้แตกต่างจากแบบ ping pong bi bi ตรงที่การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ต้องอาศัยการเกิด ternary complex ระหว่างเอนไซม์และสับสเตรตอีก 2 ชนิด ซึ่งในที่นี้คือกรดน้ำดี และโคเอนไซม์ (NAD^+ หรือ NADH) ในขณะที่แบบ ping pong bi bi จะอาศัยการเกิด binary complex ระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตทีละชนิดซึ่งจะต้องมีการปลดปล่อยสารผลิตภัณฑ์ก่อนที่สับสเตรตอีกชนิดหนึ่งจะเข้าไปจับกับเอนไซม์ ดังนั้นผลการทดลองอีกประการหนึ่ง (ไม่ได้รายงาน) ที่พบว่าเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีเฉพาะโคเอนไซม์ NAD^+ หรือ NADH เป็นสับสเตรตแต่เพียงชนิดเดียว (โดยไม่มีสับสเตรตอื่นอยู่อีกเลย) ก็อาจจะช่วยยืนยันได้ว่าเอนไซม์ชนิดนี้ไม่ได้ใช้กลไกแบบ ping pong bi bi ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน

การศึกษาจลน์ศาสตร์แบบ two-substrate enzyme catalysed reaction นอกจากจะบอกให้ทราบอย่างคร่าว ๆ ถึงกลไกการเร่งปฏิกิริยาดังได้กล่าวมาแล้ว เมื่อทำการพลอตทุติยภูมิ (secondary plot) ซึ่งเป็นการพลอตระหว่างจุดตัดแกน y (ordinate) และ slope ที่ได้จากการพลอตปฐมภูมิกับความเข้มข้นของ NAD^+ หรือ NADH (รูปที่ 32, 33 และ 34) จะทำให้ทราบถึงค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ที่ถูกต้องของปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเร่งปฏิกิริยาอีกหลายค่า ดังสรุปไว้ในตารางที่ 6 ซึ่งจากการเปรียบเทียบค่า K_a (Michaelis-Menten constant ของโคเอนไซม์) และ K_{ia} (dissociation constant ของเอนไซม์-โคเอนไซม์ คอมเพล็กซ์) บอกได้ว่าความจำเพาะของเอนไซม์ 12α-HSDH ต่อโคเอนไซม์ และความสามารถในการแตกตัวของเอนไซม์-โคเอนไซม์ คอมเพล็กซ์ น่าจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของสับสเตรตที่ใช้ โดยในปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันที่มีกรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต เอนไซม์ 12α-HSDH จะมีความจำเพาะต่อ NAD^+ ดีกว่าเมื่อใช้กรดโคลิกเป็นสับสเตรตเล็กน้อย (K_a เมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิกและกรดโคลิกเป็นสับสเตรตมีค่า 1.06×10^{-4} และ 1.61×10^{-4} โมลาร์ ตามลำดับ) อีกทั้งความสามารถในการแตกตัวของเอนไซม์-NAD คอมเพล็กซ์ เมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตก็ต่ำกว่าเมื่อใช้

กรดโคลิกเป็นสับสเตรต (K_{ia} เมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิกและกรดโคลิกเป็นสับสเตรตมีค่า 1.43×10^{-4} และ 2.56×10^{-4} โมลาร์ ตามลำดับ) สำหรับค่า K_a และ K_{ia} ของเอนไซม์ในปฏิกิริยาไฮโดร-จีเนชันเมื่อใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรตมีค่า 7.04×10^{-5} และ 5.88×10^{-4} โมลาร์ ตามลำดับ

ผลการเปรียบเทียบค่า K_b (Michaelis-Menten constant ของกรดน้ำดี) พบว่าเอนไซม์ 12α-HSDH น่าจะมีความจำเพาะต่อกรดดีออกซีโคลิกดีกว่ากรดโคลิกเล็กน้อย (K_b ของกรดดีออกซีโคลิกและกรดโคลิกมีค่า 2.79×10^{-4} และ 3.40×10^{-4} โมลาร์ ตามลำดับ) แต่ความจำเพาะต่อสับสเตรตกรดน้ำดีทั้ง 2 ชนิด (กรดดีออกซีโคลิกและกรดโคลิก) ก็ยังน้อยกว่าความจำเพาะต่อโคเอนไซม์ NAD^+ (K_a เมื่อใช้สับสเตรตกรดดีออกซีโคลิกและกรดโคลิกมีค่า 1.06×10^{-4} และ 1.61×10^{-4} โมลาร์ ตามลำดับ) ในทางตรงข้ามในปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันเมื่อกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรตนั้นพบว่าเอนไซม์ 12α-HSDH จะมีความจำเพาะต่อกรดดีไฮโดรโคลิกต่ำกว่าโคเอนไซม์ NADH อย่างเห็นได้ชัด (K_a และ K_b เมื่อใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรตมีค่า 7.04×10^{-5} และ 1.20×10^{-4} โมลาร์ ตามลำดับ)

เนื่องจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อาจทำได้โดยใช้สารประกอบที่มีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรตไปแย่งจับกับสับสเตรต ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาดูว่าสารจำพวกที่มีโครงสร้างคล้ายกับกรดดีออกซีโคลิก (สับสเตรต) แต่ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 12 และไม่สามารถใช้เป็นสับสเตรตของเอนไซม์ 12α-HSDH ได้นั้น จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้หรือไม่ และการยับยั้งนั้นจะเป็นไปในรูปแบบใด ซึ่งผลปรากฏว่ากรดดีโนดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์, กรดอูโซดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิก สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 12α-HSDH ได้ในแบบแข่งขัน (competitive inhibition) (รูปที่ 35 และ 36) ผลการเปรียบเทียบค่า K_i ของกรดน้ำดีที่ใช้เป็นสารยับยั้งเหล่านี้ (ตารางที่ 7) พบว่ากรดดีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิกสามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ได้ดีพอ ๆ กัน (K_i ประมาณ 1×10^{-3} โมลาร์) และดีกว่าอนุพันธ์ไกลซีนหรือเทารีนของตัวเองถึง 4 เท่า ในขณะที่กรดลิโท-โคลิกที่เป็นอนุพันธ์กรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3α- เพียงหมู่เดียวจะให้ค่า K_i ใกล้เคียงกับอนุพันธ์กรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ ที่ตำแหน่ง 3α- และ 7α- ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3α- แต่เพียงหมู่เดียวก็เพียงพอที่จะทำให้อนุพันธ์กรดน้ำดีจับกับเอนไซม์ 12α-HSDH ได้ดี หมู่ 7α- ไม่มีความจำเป็นต่อการจับของสับสเตรตกรดน้ำดีกับเอนไซม์ 12α-HSDH การมีกลุ่มของไกลซีนหรือเทารีนที่หมู่คาร์บอกซิลตำแหน่งปลายของกรดน้ำดีจะมีผลต่อการจับที่รุนแรงกว่า นับเป็นการยืนยันผลการทดลองอีกครั้งหนึ่งว่าหมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่ง

ปลายของกรดน้ำดีจะมีความสำคัญต่อการจับและการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 12α-HSDH อย่างแท้จริง

จากที่กล่าวไว้ในบทนำของงานวิจัยนี้ว่า ปัญหาของการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกโดย B. fuscum เกิดจากการสูญเสียสารดังกล่าว ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลมาจากการเร่งปฏิกิริยาในทิศทางไฮโดรจีเนชั่นของเอนไซม์ 12α-HSDH ด้วยเหตุนี้เอนไซม์ชนิดนี้จึงถือเสมือนเป็นเอนไซม์ส่วนเกินนอกเหนือจาก 3α-HSDH และ 7α-HSDH ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกใน B. fuscum อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ตั้งความหวังว่า ถ้าสามารถแยกเอนไซม์ 12α-HSDH ออกจากเอนไซม์ 3α-HSDH และ 7α-HSDH และเอนไซม์ชนิดนี้มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในทิศทางดีไฮโดรจีเนชันจากกรดโคลิกไปเป็นกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้แล้ว การสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกโดยวิธีทางชีวภาพอาจทำได้ง่ายและประหยัดเวลามากขึ้น โดยใช้เอนไซม์ 12α-HSDH เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างจากกรดโคลิกไปเป็นกรด 12-คีโตคีโน-ดีออกซีโคลิกได้ภายในขั้นตอนเดียวโดยไม่ต้องผ่านสารตัวกลางให้ยุ่งยากเหมือนกับกระบวนการสังเคราะห์แบบเดิมของ B. fuscum หรือ L. xylosus (รูปที่ 3) และเพื่อให้บรรลุถึงวัตถุประสงค์ดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาเบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกโดยใช้เอนไซม์ 12α-HSDH ที่แยกและทำให้บริสุทธิ์จาก B. fuscum ผลจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาโดยวิธี HPLC พบว่าเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างจากกรดโคลิกไปเป็นกรด12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้ตามที่คาดหวังไว้ (รูปที่ 38)

เมื่อศึกษาถึงตัวแปรที่จะมีผลต่อการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก ซึ่งงานวิจัยนี้ได้เลือกทำการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของ NAD^+ (เพราะ NAD^+ มีราคาแพงกว่าสารตั้งต้นกรดโคลิกและอาจเป็นข้อจำกัดที่สำคัญของการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกด้วยวิธีนี้) 0-5 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยกรดโคลิกเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และเอนไซม์ 12α-HSDH ที่บริสุทธิ์ หลังจากนำมาสกัดและวิเคราะห์ผลโดยวิธี HPLC จะได้กราฟแสดงดังรูปที่ 39 จะเห็นว่า NAD^+ เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ จะให้ปริมาณของสารผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกสูงที่สุด (0.8 มิลลิโมลาร์) ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ NAD^+ ให้สูงเกินกว่านี้ NAD^+ ที่มากเกินพออาจมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 12α-HSDH ทำให้สังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกได้น้อยลง จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกโดยเอนไซม์ 12α-HSDH ต้องการอัตราส่วนความเข้มข้นที่

เหมาะสมระหว่างกรดโคลิกและ NAD^+ ซึ่งในที่นี้คือ 1 ต่อ 3 นอกจากนี้แล้วความเสถียรของเอนไซม์ และ NAD^+ ในสภาวะที่ทำการสังเคราะห์ก็เป็นสิ่งที่น่าจะต้องคำนึงถึงเช่นเดียวกัน

เป็นที่น่าสังเกตว่าเอนไซม์ 12α-HSDH ที่จะนำมาใช้ในจุดประสงค์การสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิก อาจไม่จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์มากนัก เพียงแต่ให้ปลอดจากการปนเปื้อนของเอนไซม์ 3α-HSDH และ 7α-HSDH ดังนั้นเอนไซม์ 12α-HSDH ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ก็น่าจะพอเพียงสำหรับจุดประสงค์นี้ การทดลองนี้เป็นเพียงจุดเริ่มต้นของการศึกษาถึงความเป็นไปได้ของการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกโดยอาศัยความจำเพาะของเอนไซม์ 12α-HSDH ซึ่งอาจใช้เป็นแนวทางเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงกระบวนการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดย B. fuscum ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นได้ต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

1. เชื้อ B. fuscum เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ α-HSDH 3 ชนิดที่มีแอคติวิตีของ 7α-HSDH สูงกว่า 12α-HSDH และ 3α-HSDH ประมาณ 2 เท่า

2. การเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ใน B. fuscum โดยเสริมอนุพันธ์กรดน้ำดี 2 ชนิด คือกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิกเข้มข้น 0.05 เปอร์เซนต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่ว่าจะเป็นการเสริมตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อหรือเสริมหลังจากที่เจริญเชื้อไปเป็นเวลา 23 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ 12α-HSDH ใน B. fuscum ให้สูงขึ้นมากกว่า 4 เท่า จากเมื่อไม่มีการเหนี่ยวนำ ในขณะที่เอนไซม์ 7α-HSDH และ 3α-HSDH ไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้มีแอคติวิตีสูงขึ้นได้

3. สามารถเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum ได้ด้วยกลีเซอรอล และเมอร์แคปโตเอทานอลความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 20 เปอร์เซนต์ และ 0.1 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

4. เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดแยกได้จาก B. fuscum มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 75 เปอร์เซนต์ แล้วตามด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 จะสามารถแยกเอนไซม์ 3α-HSDH, 7α-HSDH และ 12α-HSDH ออกจากกันได้เป็นผลสำเร็จ และเอนไซม์ 12α-HSDH ที่แยกได้จะมีความบริสุทธิ์สูงหลังจากที่ผ่านคอลัมน์แอฟฟินิตีกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี

5. เอนไซม์ 12α-HSDH มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 110,000 ดาลตัน โดยวิธีกรองผ่านเจลเซฟาเด็กซ์ จี-150 และ 122,000 ดาลตัน โดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจลอีเลคโตรโฟรีซิสตามลำดับ และหนึ่งโมเลกุลประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (dimer)

6. พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาในทิศทางไฮโดรจีเนชันของเอนไซม์ 12α-HSDH คือพีเอช 5-6 ในขณะที่พีเอชประมาณ 10.5 จะเหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาในทิศทางดีไฮโดรจีเนชัน

7. อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาในทิศทางไฮโดรจีเนชันของเอนไซม์ 12α-HSDH คืออุณหภูมิ 25 °ซ ในขณะที่อุณหภูมิ 55 °ซ จะเหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาในทิศทางดีไฮโดรจีเนชัน

8. เอนไซม์ 12α-HSDH มีความเสถียรต่อพีเอชที่เป็นด่างได้ดีกว่าพีเอชที่เป็นกรดและมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30 °ซ ได้นาน 50 นาที โดยสูญเสียแอคติวิตีประมาณ 10 เปอร์เซนต์

9. การวิเคราะห์ค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์เมื่อใช้วิธีการ two substrate reaction approach จะให้ค่า Michaelis-Menten constant ของกรดโคลิก, กรดดีออกซีโคลิก และกรดดีไฮโดรโคลิก 3.4×10^{-4}, 2.27×10^{-4} และ 1.20×10^{-4} โมลาร์ ตามลำดับ Michaelis-Menten constant ของ NAD^+ เมื่อใช้สับสเตรตกรดโคลิกและกรดดีออกซีโคลิกมีค่า 1.61×10^{-4} และ 1.06×10^{-4} โมลาร์ Michaelis-Menten constant ของ NADH เมื่อใช้สับสเตรตกรดดีไฮโดรโคลิกมีค่า 7.04×10^{-5} dissociation constant ของ enzyme-NAD^+ complex เมื่อใช้สับสเตรตกรดโคลิกและกรดดีออกซีโคลิก มีค่า 2.56×10^{-4} และ 1.43×10^{-4} โมลาร์ และ dissociation constant ของ enzyme-NADH complex เมื่อใช้สับสเตรตกรดดีไฮโดรโคลิกมีค่า 5.88×10^{-4} โมลาร์

10. เอนไซม์ 12α-HSDH มีความจำเพาะต่อกรดน้ำดีที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 12 ซึ่งได้แก่กรดโคลิกและกรดดีออกซีโคลิกรวมทั้งอนุพันธ์ไกลซีนและเทารีนของกรดน้ำดีทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วย ทั้งนี้ K_m ของกรดโคลิกมีค่าใกล้เคียงกับกรดดีออกซีโคลิก (3.33×10^{-5} และ 2.94×10^{-5} โมลาร์) K_m ของอนุพันธ์ไกลซีนและเทารีนของกรดน้ำดีมีค่าสูงกว่าของกรดน้ำดีอิสระและไม่พบว่ามีความแตกต่างของค่า K_m ระหว่างอนุพันธ์ไกลซีนและเทารีนภายในกรดน้ำดีชนิดเดียวกัน

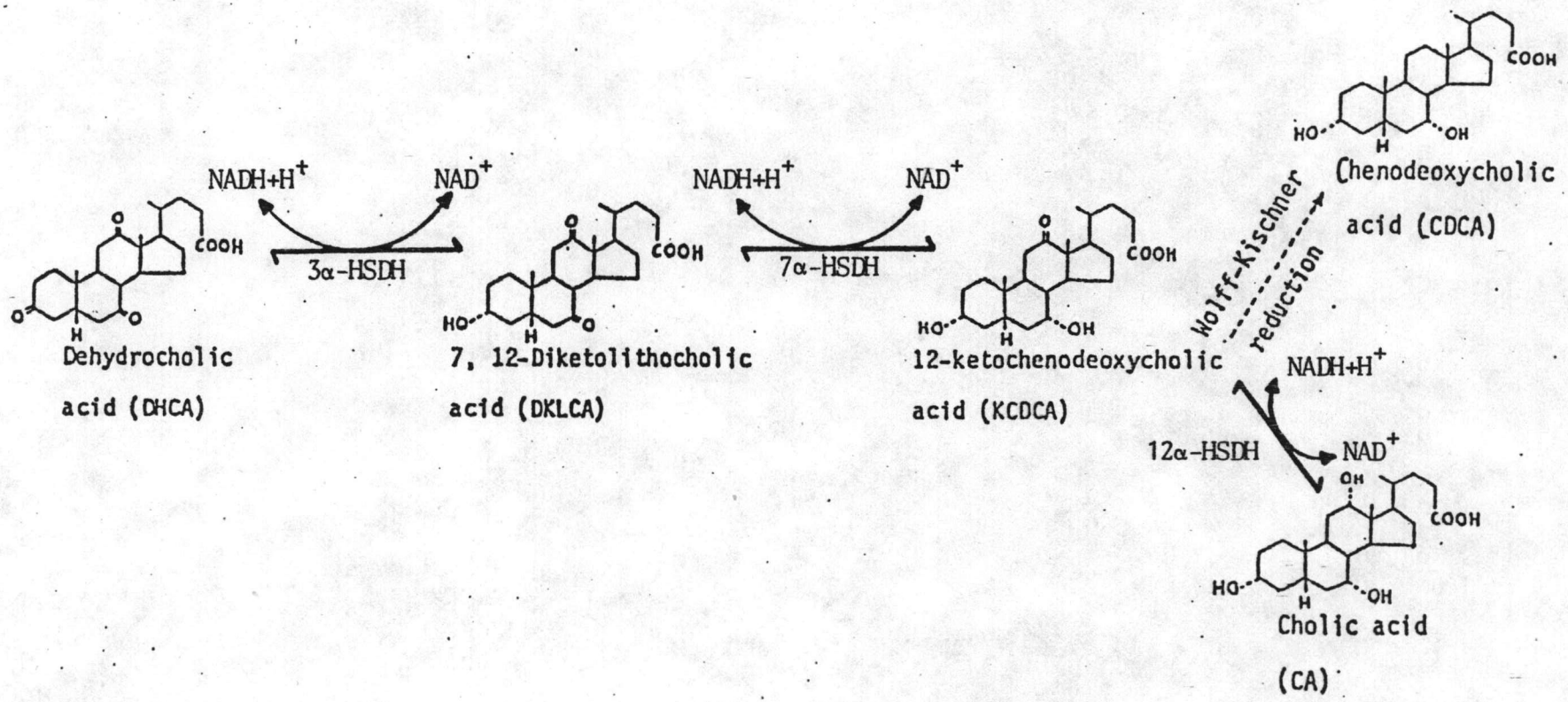
11. เอนไซม์ 12α-HSDH สามารถถูกยับยั้งแบบแข่งขันได้ด้วยอนุพันธ์กรดน้ำดีที่ไม่มีหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 12 ซึ่งได้แก่ กรดคีโนดีออกซีโคลิกและอนุพันธ์ไกลซีน และเทารีน, กรดอูโซดีออกซีโคลิกและกรดลิโทโคลิก โดย K_i ของกรดคีโนดีออกซีโคลิก, กรดอูโซดีออกซีโคลิกและกรดลิโทโคลิกจะมีค่าใกล้เคียงกัน (ประมาณ 1.0×10^{-3} โมลาร์) K_i ของอนุพันธ์ไกลซีนและเทารีนของกรดคีโนดีออกซีโคลิกมีค่าเท่ากันและสูงกว่า K_i ของกรดคีโนดีออกซีโคลิก 4 เท่า

12. เอนไซม์ 12α-HSDH มีกลไกการเร่งปฏิกิริยาทั้งในทิศทางไฮโดรจีเนชันและดีไฮโดรจีเนชันเป็นแบบ ordered หรือ random bi bi

13. เอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum หลังจากที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 และคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ ได้นาน 80 วัน โดยสูญเสียแอคติวิตีประมาณ 50 เปอร์เซนต์ ในขณะที่สารละลายเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จะสูญเสียแอคติวิตีทั้งหมดภายในระยะเวลา 30 วัน

14. เอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum สามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกได้โดยใช้ NAD^+ เป็นโคเอนไซม์และศักยภาพของการสังเคราะห์จะสูงสุดเมื่ออัตราส่วนความเข้มข้นระหว่างกรดโคลิกและ NAD^+ มีค่าเป็น 1:3 มิลลิโมลาร์

15. ผลการวิจัยทั้งหมดที่ได้กระทำมาสามารถจะช่วยเสริมสมมติฐานของ Sawada (รูปที่ 3) ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น กล่าวคือ ปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนของการสังเคราะห์กรด 12-คีโต-คีโนดีออกซีโคลิกใน B. fuscum จะถูกเร่งโดยเอนไซม์ α-HSDH 3 ชนิด ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งของหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิลของกรดน้ำดีต่างกัน ได้แก่ เอนไซม์ 3α-HSDH, 7α-HSDH และ 12α-HSDH โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถจะเร่งปฏิกิริยาได้ทั้ง 2 ทิศทาง (ไฮโดรจีเนชันและดีไฮโดรจีเนชัน) แสดงดังรูปที่ 40



รูปที่ 40 แผนภาพที่สมบูรณ์ของการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดย B. fuscum