การแยกให้บริสุทธิ์และสมบัติของ 12 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส จาก Brevibacterium fuscum DC 33

นางสาว กิตติวรรณ เทวัต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN 974-569-304-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014418

I17503346

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 12α-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE FROM *BREVIBACTERIUM FUSCUM* DC 33

Miss Kittiwon Tawat

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-569-304-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยกให้บริสุทธิ์และสมบัติของ 12 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ดีไฮโดรจีเนส จาก Brevibacterium fuscum DC 33

โดย นางสาว กิตติวรรณ เทวัต

ภาควิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.จริยา บุญญวัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติวรรณ เทวัต : การแยกให้บริสุทธิ์และสมบัติของ 12 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส จาก Brevibacterium fuscum DC 33 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF 12α-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE FROM Brevibacterium fuscum DC 33) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สัณห์ พณิชยกุล, 129 หน้า.

จากการศึกษากลไกการสังเคราะห์เอนไซม์ 3 แอลฟา-, 7 แอลฟา- และ 12 แอลฟา-ไฮดรอกซีสเตียรอยด์ ดีไฮโดรจีเนส (α-HSDH) ใน Brevibacterium fuscum พบว่า กรดโคลิกและกรดดีไฮโดรโคลิกสามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ 12α-HSDH ให้เพิ่มขึ้น 4 เท่า และเอนไซม์นี้มีความบริสุทธิ์ขึ้น 23 เท่า เมื่อตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและแยกโดยโครมาโตกราฟฟีคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50, คอลัมน์แอฟฟินิตีกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี และเซฟาเด็กซ์ จี-150 น้ำหนักโมเลกุลของ 12α-HSDH ซึ่งวิเคราะห์โดยใช้เซฟาเด็กซ์ จี-150 โครมาโตกราฟฟีมีค่า 11 KD การวิเคราะห์ด้วย เอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส แสดงว่าเอนไซม์ 12α-HSDH ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 58-64 KD ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาในทิศทางไฮโดรจีเนชันและดีไฮโดรจีเนชันคือพีเอช 5-6 และพีเอชประมาณ 10.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันและดีไฮโดรจีเนชันคืออุณหภูมิ 25 °ซ และ 55 °ซ เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วนี้จะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ จากการศึกษาค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์ต่อสับสเตรตหลายชนิด (K_m) (กรดโคลิก, กรดดีออกซีโคลิก และอนุพันธ์คอนจูเกตของไกลซีนและเทารีน) ตลอดจนค่าคงที่ของการยับยั้งเอนไซม์ (K_i) โดยใช้สารยับยั้งหลายชนิด (กรดคีโนดีออกซีโคลิกและอนุพันธ์คอนจูเกต, กรดอูโซดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิก) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของหมู่คาร์บอกซิลที่บริเวณปลายด้านหนึ่งของสับสเตรต (กรดน้ำดี) ต่อความจำเพาะของการจับ ในขณะที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 7 แอลฟา ไม่มีความเกี่ยวข้องกับความจำเพาะในการจับกับเอนไซม์เลย ในงานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกโดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์ได้อีกด้วย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต กิตติวรรณ เทวัต

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2530 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

KITTIWON TAWAT : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OR 12α-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE FROM Brevibacterium fuscum DC 33. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D., 129 PP.

The biosynthesis of 3α, 7α- and 12α-hydroxysteroid dehydrogenases (α-HSDH) were studied in Brevibacterium fuscum. Only 12α-HSDH was induced (~4 folds) by either dehydrocholic acid (DHCA) or cholic acid (CA). 12α-HSDH was partially purified 23 folds from cholic acid-induced cultures of B. fuscum by using ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-50 chromatography, DHCA-Sepharose 4B and Sephadex G-150 column. A relative molecular weight of 11 KD was estimated for 12α-HSDH by the Sephadex G-150 chromatography. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the 23 fold-purified 12α-HSDH showed 2 major polypeptide bands with the molecular weight in between 58 and 64 KD, indicating that the enzyme is the dimer. The hydrogenation reaction catalyzed by 12α-HSDH using NAD as the coenzyme was maximum at pH 5-6, while the reverse reaction rate was highest at pH 10.5. Optimum temperature for hydrogenase and dehydrogenase activity were 25°C and 55°C, respectively. The highly purified enzyme showed higher temperature stability in comparison to the crude enzyme. Kinetic studies including the determination for Michaelis constants of various substrate (cholic acid, deoxycholic acid and their glyco- and tauro-conjugates) and inhibitor constants for several types of cholic acid derivatives (chenodeoxycholic acid and conjugated forms, ursodeoxycholic acid and lithocholic acid) cleary demonstrated the significant involvement of the bile acid's carboxyl group in the specific binding of the substrates to the enzyme. The presence of 7α-hydroxyl group did not involve in the binding specificity. The possible application of the enzyme for the synthesis 12-ketochenodeoxycholic acid from cholic acid has also been demonstrated.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต กิตติวรรณ เทวัฒ

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2530 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล ที่ได้กรุณารับเป็นผู้ควบคุมการวิจัยและให้คำแนะนำจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จริยา บุญญวัฒน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณาให้คำแนะนำแก่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือ อุปกรณ์การทดลอง ตลอดจนความสะดวกแก่งานวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณสถาบัน International Center of Cooperative Research and Development in Microbial Engineering, Osaka University, Osaka, Japan ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์เชื้อที่ใช้ทำการวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูป ..... ฏ

คำย่อ ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ 1

2. เคมีภัณฑ์และเครื่องมือ 9

2.1 เคมีภัณฑ์ 9

2.2 เครื่องมือ 10

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 11

3. วิธีการทดลอง .....

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 12

3.2 การเตรียมสารละลาย 12

3.3 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ 16

3.4 การติดตามการเจริญของเชื้อ 17

3.5 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ 17

3.6 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ 17

3.7. การวัดปริมาณโปรตีน 19

3.8 การศึกษาธรรมชาติของการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ใน B. fuscum โดยการเหนี่ยวนำด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก 19

3.9 ขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์ 20

บทที่ หน้า

3.10 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ 12 α-HSDH ที่บริสุทธิ์ 29
3.11 การสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิก ... 31
4. ผลการทดลอง .....
4.1 ผลการศึกษาธรรมชาติของการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ใน B. fuscum โดยการเหนี่ยวนำด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก 33
4.2 ผลการศึกษาวิธีเตรียมเชื้อ B. fuscum ปริมาณมาก 39
4.3 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมต่อผลผลิตและแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH 39
4.4 ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์ α-HSDH ที่แยกได้จาก B. fuscum 40
4.5 ผลการใช้เทคนิคโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิสในการจำแนกชนิดของเอนไซม์ α-HSDH ที่แยกได้จาก B. fuscum ... 43
4.6 การศึกษาผลกระทบของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลและกลีเซอรอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ α-HSDH 47
4.7 ผลการศึกษาวิธีทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum บริสุทธิ์ 49
4.8 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยเทคนิคโพลีอะไคร-ลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส 60
4.9 ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่บริสุทธิ์ 64
4.10 ผลการศึกษาศักยภาพในการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกโดยเอนไซม์ 12α-HSDH ที่บริสุทธิ์ 87
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 92
เอกสารอ้างอิง 115
ภาคผนวก .....
1 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ NADH 122
2 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี 123
3 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 124

ภาคผนวก หน้า

4 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปแตสเซียมคลอไรด์ 125
5 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดคีไฮโดรโคลิก 126
6 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรด 12-คีโตคีโนคีออกซีโคลิก 127
7 ลักษณะของโครมาโตแกรมของกรดน้ำดีมาตรฐานชนิดต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยการฉีดเข้าเครื่อง HPLC 128
ประวัติผู้เขียน 129

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างเอกสารที่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์ α-HSDH	7
2	ผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อผลผลิตและแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH	41
3	ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-80 เปอร์เซนต์ .	50
4	สรุปผลการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์	59
5	สรุปค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ และอนุพันธ์เป็นสับสเตรต	76
6	สรุปค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อวัดแอคติวิตีของสับสเตรตกรดน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของโคเอนไซม์	83
7	สรุปค่า K_i ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ และอนุพันธ์เป็นสารยับยั้ง	86

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ	2
2	การสังเคราะห์กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิกโดยวิธีทางเคมี	3
3	แผนภาพการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดย L. xylosus และ B. fuscum	5
4	แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์	21
5	แสดงปฏิกิริยา carbodiimide coupling ระหว่าง AH-Sepharose 4B และกรดคีไฮโดรโคลิก	24
6	ลักษณะการเจริญของ B. fuscum ในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ, อาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยกรดคีไฮโดรโคลิก และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยกรดโคลิก	34
7	ลักษณะการเจริญ, ความเข้มข้นของโปรตีน และรูปแบบการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของ B. fuscum ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ, อาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยกรดคีไฮโดรโคลิก และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยกรดโคลิก	36
8	ลักษณะการเจริญ, ความเข้มข้นของโปรตีน และรูปแบบการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ที่เวลาต่าง ๆ หลังจากที่เจริญ B. fuscum ไปเป็นเวลา 23 ชั่วโมง แล้วเหนี่ยวนำโดยการเสริมกรดคีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิก	38
9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ของ B. fuscum กับปริมาณโปรตีน	42
10	ผลการจำแนกชนิดของเอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum โดยเทคนิคโพลี-อะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส	44
11	ผลการจำแนกชนิดของเอนไซม์ α-HSDH ที่แยกได้จาก B. fuscum โดยเทคนิคโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส	46
12	แสดงผลกระทบของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลและกลีเซอรอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum ที่อุณหภูมิ 7°ซ	48

รูปที่		หน้า
13	ผลการแยกโปรตีนจาก 75% แอมโมเนียมซัลเฟตแฟรกชั่น โดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (I)	52
14	ผลการแยกเอนไซม์ 3α-HSDH, 7α-HSDH และ 12α-HSDH จากโปรตีนส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (I) โดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II)	54
15	ผลการแยกเอนไซม์ 12α-HSDH จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) โดยคอลัมน์แอฟฟินิตีกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (I)	55
16	ผลการแยกเอนไซม์ 12α-HSDH จากคอลัมน์ดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (I) โดยคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II)	57
17	ผลการแยกเอนไซม์ 12α-HSDH จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) โดยคอลัมน์เซฟาโรส จี-150	58
18	รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์ แยกโดยเทคนิคโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส	61
19	เปรียบเทียบผลการย้อมสีโปรตีนและผลการย้อมสีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) โดยวิธีโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส	62
20	เปรียบเทียบผลการย้อมสีโปรตีนและผลการย้อมสีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่แยกได้จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) โดยวิธีโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส	63
21	รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ 12α-HSDH ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 12α-HSDH โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150	65
22	เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 12α-HSDH โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150	66
23	เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 12α-HSDH โดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส	66

รูปที่		หน้า
24	ผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH	68
25	ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ 12α-HSDH	69
26	ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH	71
27	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ 12α-HSDH	72
28	Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรต	73
29	Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรต	74
30	Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรต	75
31	primary plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่ได้จากการวัดแอคติวิตีโดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของโคเอนไซม์	79
32	Secondary plot ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของ NAD^+ กับจุดตัดแกน y และ slope ที่ได้จาก primary plot รูปที่ 31 (วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดคีออกซีโคลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ของ NAD^+)	80
33	Secondary plot ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของ NAD^+ กับจุดตัดแกน y และ slope ที่ได้จาก primary plot รูปที่ 31 (วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดโคลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ของ NAD^+)	81
34	Secondary plot ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของ NADH กับจุดตัดแกน y และ slope ที่ได้จาก primary plot รูปที่ 31 (วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดคีไฮโดรโคลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของ NAD^+).....	82
35	Reciprocal plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อถูกยับยั้งโดยกรดคีโนดีออกซีโคลิก, กรดไกลโคคีโนดีออกซีโคลิก และกรดเทาโรคีโนดีออกซีโคลิก ..	84

รูปที่		หน้า
36	Reciprocal plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อถูกยับยั้งโดยกรดอูโซดี-ออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิก	85
37	เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ 12α-HSDH ใน crude enzyme, ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) และที่แยกได้จากคอลัมน์กรดคีไซโครโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ นาน 80 วัน	88
38	ลักษณะของโครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปกรดโคลิกโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของโคเอนไซม์ NAD^+ ในสารละลายปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน	90
39	การศึกษาผลกระทบของ NAD^+ ต่อการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกโดยเอนไซม์ 12α-HSDH	91
40	แผนภาพที่สมบูรณ์ของการผลิตกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก โดย B. fuscum	114

คำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส
NAD^+	=	Nicotinamide adenine dinucleotide , oxidized form
NADH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide , reduced from
HSDH	=	Hydroxysteroid dehydrogenase
α-HSDH	=	α-Hydroxysteroid dehydrogenase
3α-HSDH	=	3α-Hydroxysteroid dehydrogenase
7α-HSDH	=	7α-Hydroxysteroid dehydrogenase
12α-HSDH	=	12α-Hydroxysteroid dehydrogenase
12-KCDCA	=	12-Ketochenodeoxycholic acid
DLKCA	=	7,12-Diketolithocholic acid
CA	=	Cholic acid
12-KCDCA	=	12-Ketochenodeoxycholic acid
DHCA	=	Dehydrocholic acid
CDCA	=	Chenodeoxycholic acid
DCA	=	Deoxycholic acid
LCA	=	Lithocholic acid