หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



# บทที่ 5

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 5.1 ผลของสารต้นตอไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตโปรตีเอสใน Bacillus subtilis TISTR 25

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ที่ใช้ในอุตสาหกรรมปัจจุบันส่วนใหญ่ได้จากจุลชีพ โดยเฉพาะจากแบคทีเรีย กลุ่มบาซิลลัส การวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการเจริญและการผลิตโปรตีเอสของ Bacillus subtilis TISTR 25 ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศไทย โดยศึกษาผลของสารต้นตอต่างๆ ที่มีต่อการเจริญและการผลิตโปรตีเอส

จากผลการเลี้ยง Bacillus subtilis TISTR 25 โดยใช้สารต้นตอไนโตรเจนกลุ่มแรก 5 ชนิด แล้วติดตามการเจริญ และ แอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอส จากรูปที่ 1ก และ 1ข นั้นผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยูเรียและฮิสติดีน ไม่เหมาะสมในการเป็นสารต้นตอไนโตรเจน สำหรับการเลี้ยงเชื้อนี้ เนื่องจากผลของการเจริญและแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอส มีค่าต่ำเมื่อเทียบกับ กลูตาเมท โพรลีน และอาร์จินีน สารต้นตอไนโตรเจนสามชนิดหลังนี้สามารถเหนี่ยวนำทั้งการเจริญและแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสให้มีค่าสูงใกล้เคียงกัน ทั้งนี้มีรายงานของ Romos และคณะ (1962) ได้ทำการศึกษาพบว่าสามารถที่จะใช้ โพรลีน หรือ อาร์จินีน แทนกลูตาเมทในน้ำเลี้ยงได้ เนื่องจากขบวนการสลายของกรดอะมิโนนี้ จะมีผลเปลี่ยนทั้ง อาร์จินีน และโพรลีน ไปเป็นกลูตาเมทในที่สุด เพื่อเปลี่ยนไปเป็นสารต้นตอไนโตรเจนที่จำเป็นต่อเซลล์ต่อไป ส่วนฮิสติดีนนั้นมีวิถีเปลี่ยนไปเป็นกลูตาเมทได้เช่นกัน (Stryer, 1981) แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำ ให้มีการเจริญและการผลิตโปรตีเอสได้ดีในกรณีของ Bacillus subtilis TISTR 25 นี้ สาเหตุอาจเนื่องมาจากการบกพร่องในองค์ประกอบที่จำเป็นต่อขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงฮิสติดีนไปเป็น กลูตาเมทของสายพันธุ์นี้ ดังนั้นเซลล์จึงไม่สามารถนำฮิสติดีนไปใช้ประโยชน์ได้ สำหรับยูเรียซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในขบวนการเมแทบอ

ลิซีมของกรดอะมิโนที่เซลล์ไม่ต้องการและจะถูกขับออก จึงไม่เหมาะสมต่อการเป็นสารต้นตอไนโตรเจน เพื่อการเจริญของเชื้อ

จากผลการเลี้ยง Bacillus subtilis TISTR 25 โดยใช้สารต้นตอไนโตรเจนกลุ่มที่สองจำนวน 5 ชนิด จากการติดตามการเจริญและแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสในรูปที่ 2 ก และ 2 ข พบว่า แอมโมเนียมคลอไรด์ กลูตามีน และซีรีน ให้ผลของการเจริญและแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสต่ำกว่า เคซีนไฮโดรไลเสท และ แอสปาราจีน ซึ่งให้ผลการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกัน แต่เคซีนไฮโดรไลเสทซึ่งประกอบด้วย เปปไทด์สายสั้น หรือกรดอะมิโนหลายชนิด จะมีผลให้มีการเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีเอสได้ดีกว่าเมื่อมีเฉพาะกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง (รูปที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ May และ Elliott (1968) พบว่าในน้ำเลี้ยงที่เสริมด้วยกรดอะมิโนผสม 16 ชนิด จะเหนี่ยวนำให้ Bacillus subtilis ผลิตโปรตีเอสได้ดีกว่าเมื่อมีเฉพาะกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือกรดอะมิโนผสมที่มีจำนวนน้อยกว่า ส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ มีผลให้การเจริญและแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสต่ำพอๆ กับ กลูตามีน และซีรีน ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ หรือ $NH_4^+$ เป็นสารต้นตอไนโตรเจนที่ดี สำหรับแบคทีเรียหลายชนิด เช่น E. coli หรือสกุลบาซิลลัส (Tyler, 1978) แต่ในการเลี้ยง Bacillus subtilis TISTR 25 นี้ $NH_4^+$ ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งของสารต้นตอไนโตรเจนเพื่อการเจริญที่ดีได้ ซึ่งน่าจะเกิดจากสาเหตุการขาดสารต้นตอคาร์บอนในน้ำเลี้ยง ซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอน และพลังงานที่จำเป็นเพื่อให้ขบวนการนำ $NH_4^+$ เข้าสู่เซลล์ไปใช้ประโยชน์ได้อย่างสมบูรณ์ ข้อสันนิษฐานนี้อาจยืนยันโดยผลการทดลองของ ปกรณ์ (1989) ซึ่งพบว่าการเจริญ และแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอส ใน Bacillus subtilis เมื่อเลี้ยงในกลูตาเมท ไม่ต่างกับเมื่อเลี้ยงใน $NH_4^+$ ร่วมกับกลูตาเมท แสดงว่า $NH_4^+$ ไม่สามารถเหนี่ยวนำการเจริญ และการผลิตโปรตีเอสได้ดีสำหรับสายพันธุ์นี้ และเป็นที่น่าสังเกตว่า กลูตามีน ซึ่งเป็นแหล่งของสารต้นตอไนโตรเจนที่สำคัญตัวหนึ่ง (Tyler, 1978) แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการเจริญ และผลิตโปรตีเอสที่ดีได้นั้นอาจจะเป็นไปได้ว่ากลูตามีน เป็นรูปที่เซลล์ไม่สามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ได้และเซลล์ขาดองค์ประกอบสำคัญ ที่จำเป็นต่อการแปลงกลูตามีนไปอยู่ในรูปที่เซลล์จะใช้ได้ เพื่อจะพิสูจน์สมมุติฐานนี้จะต้องมีการศึกษากันต่อไป

ในการศึกษาผลการใช้กรดอะมิโนผสม เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนเดี่ยว พบว่าเมื่อเลี้ยง Bacillus subtilis TISTR 25 ในน้ำเลี้ยงเสริมด้วยกรดอะมิโนผสม 16 ชนิด ที่ความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละชนิดเท่ากับ 0.313 มก./มล. การเจริญและการผลิตโปรตีเอสสูงกว่าเมื่อปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดเท่ากับ 0.016 มก./มล. และสูงกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงในกรดอะมิโนผสม 4 ชนิด ทั้ง 4 กลุ่ม ที่มีระดับความเข้มข้นกรดอะมิโนแต่ละชนิด 0.313 มก./มล. ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า อิทธิพลที่มีต่อการผลิตโปรตีเอสของ Bacillus subtilis TISTR 25 นี้ขึ้นอยู่กับชนิด จำนวน และปริมาณกรดอะมิโนที่เสริมในน้ำเลี้ยงซึ่งการทดลองนี้ก็สอดคล้องกับการรายงานของ May และ Elliott(1967) ที่ใช้กรดอะมิโนผสม 16 ชนิดเสริมลงในน้ำเลี้ยง Bacillus subtilis แล้วมีผลให้การผลิตโปรตีเอสสูงกว่าเมื่อเสริมด้วยกรดอะมิโนผสม 4 ชนิด และในรูปที่ 4 ก และ 4 ข เป็นผลของกรดอะมิโนผสม 4 ชนิด ของแอสปาราจีน แอสปาร์เตท กลูตาเมท และ กลูตามีน ที่เสริมลงในน้ำเลี้ยงแล้วเปรียบเทียบกับเมื่อเสริมเฉพาะกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งลงในน้ำเลี้ยง จะพบว่าทั้งค่าการเจริญและการผลิตโปรตีเอสในน้ำเลี้ยงที่เสริมด้วยกรดอะมิโนผสม จะมีค่าสูงกว่าเมื่อเสริมด้วยกรดอะมิโนแต่ละชนิดอย่างชัดเจน และกรดอะมิโนแต่ละชนิดก็ยังมีอิทธิพลต่อการควบคุมการผลิตโปรตีเอสได้แตกต่างกันอีกด้วย Chaloupka และคณะ (1963) ได้รายงานไว้ว่าใน Bacillus megaterium อิทธิพลของกรดอะมิโนเดี่ยวต่อการผลิตโปรตีเอสอาจแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ ในกลุ่มแรก ได้แก่ อะลานีน อาร์จินีน แอสปาร์ติก ซีสเตอีน ฟีนิลอะลานีน ไกลซีน กลูตามิก และโพรลีน จะสามารถกดดันการผลิตโปรตีเอสได้น้อยกว่า 30 เปอร์เซนต์ กลุ่มที่สองคือ ลูซีน และวาลีน จะกดดันได้ในช่วง 30-60 เปอร์เซนต์และกลุ่มสุดท้าย ไอโซลูซีน และทรีโอนีน จะกดดันการผลิตโปรตีเอสได้มากกว่า 60 เปอร์เซนต์

นอกจากนี้ผลการทดลองในรูปที่ 6 ก และ 6 ข พบว่าเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของสารต้นตอไนโตรเจน คือเคซีนไฮโดรไลเสทโดยเพิ่มจาก 0.1 เปอร์เซนต์ ถึง 5 เปอร์เซนต์ จะพบว่าการเจริญของเชื้อสูงขึ้น แต่เมื่อพิจารณาการผลิตโปรตีเอสจะพบว่า ไม่แปรตามความเข้มข้นของเคซีนไฮโดรไลเสทเสมอไป กล่าวคือ ต่ำสุดในน้ำเลี้ยงที่เสริมด้วย เคซีนไฮโดรไลเสท 0.1 เปอร์เซนต์ และสูงสุดเมื่อเสริมในปริมาณ 0.5 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเคซีนไฮโดรไลเสทขึ้นไปอีกเป็น 1.0 , 2.0, 3.0 และ 5.0 เปอร์เซนต์ ตามลำ

ดับนั้น การผลิตโปรตีเอสโดยเชื้อนี้กลับมีปริมาณลดลงเป็นลำดับ การทดลองใน รูปที่ 7 โดยกลูตาเมทที่ความเข้มข้น 10-300 มิลลิโมลาร์ ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน สรุปได้ว่าปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการผลิตโปรตีเอสคือความเข้มข้นของกรดอะมิโน จากการศึกษาของChaloupka และ Kreckova (1966) ได้รายงานไว้ว่า เมื่อเติม casamino acid 2 เปอร์เซนต์ลงในน้ำเลี้ยงของ Bacillus megaterium จะมีผลให้เชื้อหยุดการผลิตโปรตีเอสนอกจากนี้ยังสรุปไว้ว่า อิทธิพลของกรดอะมิโนแต่ละชนิด และปริมาณที่มีความเข้มข้นเหมาะสมเหล่านี้จะเปลี่ยนแปลง หรือแตกต่างกันไปในจุลชีพแต่ละชนิด และกรดอะมิโนจะมีผลกดดันมากขึ้นเมื่อนำมาผสมกัน (Neumark และ Citri, 1962)

5.2 ผลของสารต้นตอคาร์บอน ชนิดต่างๆต่อการเจริญ และการผลิตโปรตีเอสใน Bacillus subtilis TISTR 25

ผลของการเลี้ยง Bacillus subtilis TISTR 25 โดยใช้สารต้นตอคาร์บอนในรูปที่ 8 ก และ 8 ข มีเฉพาะซิเตรทเท่านั้นที่ให้ผลการเจริญ และแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสสูงสุด ส่วนกลีเซอรอล และซัคซิเนท แม้ว่าจะเจริญได้ปานกลางแต่การผลิตโปรตีเอสก็อยู่ในระดับที่ต่ำเท่าๆ กับ แอลฟาคีโตกลูตาเรท ที่มีการเจริญและการผลิตโปรตีเอสต่ำมาก สารต้นตอในกลุ่มนี้ทั้งหมดจะให้ค่าการเจริญ และการผลิตโปรตีเอสที่ต่ำกว่าในกลุ่มของสารต้นตอไนโตรเจน โดยเฉพาะ กลูตาเมทในรูปที่ 1 ก และ 1 ข ซึ่งสอดคล้องกับผลของการศึกษาของ Heineken และ O'Connor (1972) ซึ่งรายงานไว้ใน Bacillus subtilis NRRL-B 3441 ว่าสารต้นตอไนโตรเจนจะมีผลมากต่อการผลิต ซีรีน และเมตัลโปรตีเอส ในขณะที่สารต้นตอคาร์บอน จะมีผลมากต่อการสร้างและขับแอลฟาอะไมเลส Hanlon และ Hodges (1981 b) ได้รายงานไว้ว่าระดับการผลิตโปรตีเอสของ Bacillus licheniformis เมื่อเลี้ยงในสารต้นตอชนิด poor nitrogen sources เช่น ไนเตรท อะลานีน หรือกลูตาเมทจะมีปริมาณสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในสารต้นตอชนิด poor carbon sources เช่น กลีเซอรอล ไพรูเวท ซิเตรท หรือ แลคเตท ในสารต้นตอคาร์บอนเหล่านี้ โปรตีเอสจะถูกผลิตขึ้นในช่วงการเจริญ exponential phase และปริมาณการขับโปรตีเอสจะสัมพันธ์กับอัตราการเจริญ ผลการทดลองในรูปที่ 9 ก และ 9 ข ซึ่งทำการเสริมกลูตาเมทลงในน้ำ

เลี้ยงควบคู่กับสารต้นตอคาร์บอนแต่ละชนิด พบว่ากลูตาเมทอย่างเดียวสามารถเพิ่มค่าการเจริญและการผลิตโปรตีเอสได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าสารต้นตอคาร์บอน ในกลุ่มนี้มีผลไปกดดันการผลิตโปรตีเอสใน Bacillus subtilis TISTR 25 โดยที่สารในกลุ่มนี้เป็นสารที่เกิดขึ้นในขบวนการสลายกลูโคส แล้วสามารถกดดันการสังเคราะห์โปรตีเอสได้ ( คะแทบอไลต์ รีเพรสชัน ) Coleman (1967) ได้รายงานว่าการสังเคราะห์ exoenzyme ใน Bacillus subtilis มีปริมาณต่ำในช่วงการเจริญ logarithmic phase ซึ่งเป็นขณะที่มีการสะสมตัวกลาง ที่เกิดจากขบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสในน้ำเลี้ยง เมื่อเวลาผ่านไปสารตัวกลางเหล่านี้ก็จะถูกเผาผลาญหมดไป ดังนั้นในช่วงการเจริญระยะ post-logarithmic phase exoenzyme จึงเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Mandelstan (1961,1962) ยังได้ศึกษาพบว่าสารประกอบซึ่งจุลชีพใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานหลายชนิด สามารถเป็นสาเหตุของการเกิด คะแทบอไลต์ รีเพรสชัน ได้ทั้งสิ้น

5.3 ผลของกลูโคสต่อการเจริญ และผลิตโปรตีเอสใน Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเสริมในน้ำเลี้ยงร่วมกับสารต้นตอไนโตรเจนต่างๆ

จากผลทดลองในรูปที่ 10 ก และ 10 ข เมื่อเลือกทดลองกับสารต้นตอไนโตรเจนที่ให้การผลิตโปรตีเอสในปริมาณสูงเช่น อาร์จินีน เคซีนไฮโดรไลเสท และแอสปาราจีน พบว่าเมื่อเสริมกลูโคส การเจริญของเชื้อในทุกสารต้นตอไนโตรเจนจะสูงขึ้น แต่การผลิตโปรตีเอสจะมีปริมาณต่ำลง

การกดดันการผลิตโปรตีเอสโดยกลูโคสนั้น ยังขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของกลูโคสในน้ำเลี้ยงอีกด้วย (รูปที่ 11) และมีลักษณะเหมือนกับในกรณีของกรดอะมิโน ที่มีระดับความเข้มข้นสูง ตามรูปที่ 6 ข และรูปที่ 7 ดังนั้นขบวนการผลิตโปรตีเอสจึงไม่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารอาหารหรือการจำกัดปริมาณสารอาหารเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับระดับของปริมาณสารอาหารที่มากเกินพอในน้ำเลี้ยงนั้นอีกด้วย ซึ่ง Hanlon และคณะ (1982) ได้รายงานผลการทดลองเช่นเดียวกันนี้ไว้ด้วย จากการศึกษาของ Heineken และ O'Connor (1972) ใน Bacillus subtilis NRRL-B 3411 กลูโคสและสารต้นตอไนโตรเจนซึ่งกดดันการผลิตโปรตีเอสนี้ ยังมีผลไปกดดันเอนไซม์ใน Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle)

อีกด้วย จึงคาดว่าทั้งการผลิตโปรตีเอสและการทำหน้าที่ของ TCA cycle เกิดขึ้นในเวลาเดียวกันระหว่างการเจริญและการสร้างสปอร์ และเอนไซม์ทั้งหมดนี้ก็จะถูกควบคุมโดยตัวควบคุมอันเดียวกัน และตัวควบคุมนั้นอาจได้แก่สารตัวกลางใน TCA cycle นั่นเอง จากรูปที่ 15 ก และ 15 ข พบว่ากลูโคสที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารต้นตอไนโตรเจนเป็นกลูตาเมทนั้น สามารถทำให้ค่า pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปถึง 0.3 หน่วย ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการสะสมสารตัวกลาง ใน TCA cycle ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรด เป็นผลให้ค่า pH ของน้ำเลี้ยงลดลง (Coleman, 1967) การเปลี่ยนแปลงเฉพาะความเป็น กรด - ด่าง ของน้ำเลี้ยงนี้ไม่มีผลต่อการควบคุมการผลิต exoenzyme รวมทั้งโปรตีเอส โดย Coleman(1967) ได้ศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลง pH ต่อการผลิต exoenzyme ใน Bacillus subtilis โดยเติมกลูโคสลงในน้ำเลี้ยงแล้วควบคุมให้ค่า pH ของน้ำเลี้ยงคงที่อยู่ตลอดเวลาของช่วงการเลี้ยงพบว่า pH ที่เปลี่ยนไปไม่ทำให้ปริมาณโปรตีเอสรวมทั้ง exoenzyme อื่นๆเปลี่ยนแปลง ผลการทดลองในรูปที่ 12 ทำให้คาดได้ว่า การกดดันการผลิตโปรตีเอสโดยกลูโคสนั้นเป็นการควบคุมที่ระดับ transcription เนื่องจากว่ากลูโคสจะสามารถกดดันการผลิตโปรตีเอสเฉพาะเมื่อเติมลงในน้ำเลี้ยงในช่วงต้นของการเจริญเท่านั้น แต่จะไม่มีผลถ้าเติมในช่วงการเจริญคงที่แล้ว (รูปที่ 10,12)

5.4 การควบคุมการผลิตโปรตีเอสใน Bacillus subtilis TISTR 25

จากผลการทดลองใน รูปที่ 13 rifampin ซึ่งโดยทั่วไปใช้เป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์ RNA (transcription)โดยมีผลต่อการเกิด ester bond ของสาย RNA ที่เริ่มสังเคราะห์ แต่ไม่มีผลต่อ RNA ที่สังเคราะห์เรียบร้อยแล้ว เมื่อเติม rifampin ในน้ำเลี้ยงที่ช่วงการเจริญ late exponential phase จะมีผลให้แอคติวิตีของโปรตีเอสเพิ่มขึ้นได้ต่อไปอีกประมาณ 1 ชั่วโมง แต่หลังจากนั้นแอคติวิตีจะเริ่มคงที่ จากผลนี้อาจวิเคราะห์ได้ว่า rifampin ยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA ที่จำเป็นสำหรับการผลิตโปรตีเอส โดยที่ผลการยับยั้งไม่เกิดผลทันทีที่เติม rifampin ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับรายงานของ Both และคณะ (1972) ว่า Bacillus amyloliquefacien จะมีแหล่งสะสมของ mRNA ภายในเซลล์จำนวนมากที่สามารถสนับสนุนการสังเคราะห์โปรตีเอสต่อไปอีก 80 นาที และมีรายงานทำนองเดียวกัน

ใน Bacillus subtilis 168 ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่ากลูตาเมทควบคุมการผลิตโปรตีเอสใน Bacillus subtilis TISTR 25 ที่ระดับ transcription และเกี่ยวข้องกับ de novo synthesis ของเอนไซม์

ในการศึกษาเอนไซม์โปรตีเอสที่ Bacillus subtilis TISTR 25 ผลิต 2 ชนิด คือ เมตัล และซีรีนโปรตีเอส โดยใช้ EDTA และ PMSF ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองตามลำดับ (รูปที่ 14) เมื่อใช้สารต้นตอไนโตรเจน 5 ชนิด ที่ให้ผลผลิตโปรตีเอสสูงคือ กลูตาเมท โพรลีน อาร์จินีน แอสปาราจีนและเคซีนไฮโดรไลเสท (ตารางที่ 3) อัตราส่วนของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดไม่แตกต่างกันมากนัก อัตราส่วนของ เมตัล ต่อซีรีนโปรตีเอสอยู่ประมาณ 1.28-1.56 และเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์นานขึ้นจาก 12 ชั่วโมง เป็น 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราส่วนของเอนไซม์จากสารต้นตอทั้ง 5 ชนิด ยังคงไม่แตกต่างกันแต่มีค่าลดลงเป็นประมาณ 1.16-1.28 ค่าของอัตราส่วนที่ลดลงนั้นเนื่องจากปริมาณของซีรีนโปรตีเอสเพิ่มขึ้นนั่นเอง จึงเป็นข้อสังเกตได้ว่า ในช่วงแรกของการเจริญคือ log phase จนถึง late log phase เมตัลโปรตีเอส จะถูกผลิตออกมาในปริมาณมาก ซึ่งความจำเป็นหรือหน้าที่ของเอนไซม์ชนิดนี้ก็ยังไม่มีการรายงานอย่างชัดเจน ส่วนซีรีนโปรตีเอสจะถูกผลิตขึ้นมามากในช่วงการเจริญคงที่ สำหรับซีรีนโปรตีเอสในช่วงแรกที่มีการศึกษา คาดว่ามีหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างสปอร์ เนื่องจากจะพบว่ามีปริมาณซีรีนโปรตีเอสสูงพร้อมๆ กับการสร้างสปอร์ แต่ต่อมาได้มีการศึกษาใน Bacillus subtilis สายพันธุ์ที่ผ่าเหล่า (mutant) ซึ่งบกพร่องที่จีนส์มีหน้าที่สังเคราะห์เมตัลและซีรีนโปรตีเอส การสร้างสปอร์ยังคงเกิดได้ตามปกติ (Kawamura และ Doi, 1984) นอกจากนี้ยังพบว่า จากผลการทดลองในรูปที่ 15 ก และ 15 ข กลูโคสเมื่อเสริมร่วมกับกลูตาเมท จะมีผลให้อัตราส่วนของเมตัลต่อซีรีนโปรตีเอสเปลี่ยนแปลงไปในช่วงการเจริญคงที่เท่านั้น โดยสังเกตได้ว่าเมื่อเวลาการเจริญ 11 ชั่วโมง จะมีอัตราส่วนของเมตัลต่อซีรีนโปรตีเอสค่อนข้างคงที่ ในทั้งกรณีเสริมและไม่เสริมกลูโคส คือเท่ากับค่า 3.2 และที่เวลา 20 ชั่วโมงอัตราส่วนเมตัลต่อซีรีนโปรตีเอส เปลี่ยนจาก 2.4 เป็น 1.70 นั่นคือกลูโคสมีผลให้ปริมาณ เมตัลโปรตีเอสต่ำลงกว่าเมื่อเลี้ยงในกลูตาเมทอย่างเดียวขณะที่ซีรีนโปรตีเอสไม่เปลี่ยนแปลง ยังผลให้อัตราส่วนของเมตัลต่อซีรีนโปรตีเอสต่ำลงในช่วงการเจริญคงที่ แต่จากรายงานที่ปรากฏจะพบว่านอกจากสภาวะการเลี้ยงแล้วยังขึ้นอยู่กับจีนที่มีหน้าที่สังเคราะห์

เอนไซม์นั้นๆโดยตรงอีกด้วย Uehara และคณะ (1974) ได้ทำการทดลองพบว่า Bacillus subtilis NAT จะผลิตเมตัล ต่อ ซีรีน ในอัตราส่วน 13.0 ส่วนสายพันธุ์ Bacillus subtilis 6160 เป็น 1.1 ซึ่งคุณสมบัติของเอนไซม์ทั้ง2 ชนิดในทั้ง 2 สายพันธุ์เหมือนกันทุกประการ และในการทำ transformation โดยนำ DNA จาก Bacillus subtilis NAT ไปใส่ให้กับ Bacillus subtilis 168 จะพบว่า Bacillus subtilis 168 สามารถผลิตโปรตีเอสได้ในระดับเดียวกับ Bacillus subtilis NAT โดยมีเมตัลโปรตีเอสในปริมาณสูงเช่นกัน จึงสรุปได้ว่าชนิดของโปรตีเอสขึ้นกับพันธุกรรมของสายพันธุ์ Bacillus ด้วย

5.5 ความสัมพันธ์ของ การผลิตโปรตีเอส และเอนไซม์ในวิถีไนโตรเจน

จากผลการทดลองในรูปที่ 16 ก ในการเลี้ยงเชื้อในสารต้นตอไนโตรเจน กลูตาเมท,แอสปาราจีน,อาร์จินีน และ เคซีนไฮโดรไลเสท ปริมาณของเอนไซม์โปรตีเอสจะมีระดับเท่าๆ กันในทุกสารต้นตอ แต่ต่ำลงเล็กน้อยใน เคซีนไฮโดรไลเสท ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของ กลูตามีน ซินเทส (GS) ซึ่งจะมีปริมาณที่เท่าๆกันในทุกสารต้นตอไนโตรเจน และต่ำลงเล็กน้อยในเคซีนไฮโดรไลเสท เช่นกัน และกลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งมากกว่า กลูตาเมท ซินเทส เล็กน้อยในทุกสารต้นตอ แต่ต่ำกว่า กลูตามีน ซินเทส จากผลในรูป 16 ข พบว่าในกรณีที่โปรตีเอสแอคติวิตีต่ำลงอย่างมาก เช่นเมื่อเลี้ยงในกลูโคสเสริมกลูตาเมท หรือกลูโคสเสริมแอมโมเนีย ค่าแอคติวิตีของ GS และ GOGAT เพิ่มอย่างมากเมื่อเทียบกับการเพิ่มของ GDH จึงอาจสรุปได้ว่า Bacillus subtilis TISTR 25 มีวิถีการนำไนโตรเจนเข้าสู่เซลล์ สู่ขบวนการเมแทบอลิซึมได้โดยผ่านวิถีที่สำคัญ 2 วิถี วิถีแรกเป็นวิถีที่เร่งด้วย GS-GOGAT และวิถีที่ 2 เป็นวิถีที่เร่งด้วย GDH และวิถีที่เร่งด้วย GS-GOGAT น่าจะมีความสำคัญมากกว่า เมื่อดูจากปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องซึ่ง Deshpande และคณะ (1981) ได้รายงานว่า Bacillus subtilis จะนำ inorganic nitrogen ไปเปลี่ยนเป็น organic nitrogen โดยผ่านวิถีของ GS-GOGAT ในขณะที่ GDH ซึ่งก็พบใน Bacillus subtilis เช่นกันนั้นไม่น่าทำหน้าที่ในการนำแอมโมเนียเข้าสู่ขบวนการเมแทบอลิซึม เพราะว่าค่า Km ของ GDH สำหรับ $NH_4^+$ เป็น 0.17 โมลาร์ ซึ่งมีค่าสูงกว่า GS หลายเท่า และในสาย

พันธุ์ Bacillus แอคติวิตีของ GOGAT จะลดลงในการเลี้ยงเซลล์โดยใช้กลูตาเมทเป็นแหล่งของสารต้นตอไนโตรเจน Kane และคณะ (1981) ได้รายงานไว้ว่าใน Bacillus subtilis นั้น GDH จะถูกควบคุมโดยสารต้นตอคาร์บอนมากกว่าสารต้นตอไนโตรเจนเนื่องจากค่า Km สำหรับ $NH_4^+$ มีค่าสูง ซึ่งก็สอดคล้องกับในการทดลองรูปที่ 16 ข ในสภาวะที่เสริมสารต้นตอคาร์บอน กลูโคส หรือซิเตรทจะมีผลให้ปริมาณ GDH สูงขึ้น สำหรับวิถี GS-GOGAT ที่คาดว่าน่าจะมีบทบาทสำคัญในวิถีไนโตรเจน ใน Bacillus subtilis TISTR 25 นั้น Fisher และคณะ (1984) ได้รายงานไว้ว่า GS แอคติวิตีจะขึ้นอยู่กับแหล่งต้นตอไนโตรเจน และจะมีการควบคุม 2 ระดับ คือเมื่อแอมโมเนียมากเกินพอจะไป express จีนส์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ GS และปฏิกิริยาที่โมเลกุลของ GS เกิด adenylation เป็นผลให้เอนไซม์อยู่ในรูป inactive แต่พบว่าใน Bacillus subtilis จะไม่เกิด adenylation (Deuel และ Stadman,1970; Fisher และ Sonenshein, 1984) แต่ GS จะถูกยับยั้งได้โดยผลของปฏิกิริยา คือ กลูตามีน และ AMP สำหรับ GOGAT นั้นจากการทดลองนี้ใน รูปที่ 16 ข ก็ถูกยับยั้งด้วยกลูตาเมทซึ่งเป็นผลของปฏิกิริยาได้เช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบผลใน รูปที่ 16 ก และ 16 ข จะพบว่าความสัมพันธ์ ระหว่างการผลิตโปรตีเอส และปริมาณ GS-GOGAT และ GDH มีลักษณะผกผันกัน จากความสัมพันธ์ของการผลิตโปรตีเอสและเอนไซม์ในวิถีไนโตรเจน และกลไกในการควบคุมต่างๆที่เกี่ยวข้อง อาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการควบคุมการเลี้ยง Bacillus subtilis TISTR 25 เพื่อให้มีการผลิตโปรตีเอสในระดับสูงต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ในน้ำเลี้ยงอาหารสูตรปรับต่ำ อุณหภูมิ 30 °ซ ที่ pH 6.0 เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าสารต้นตอไนโตรเจน ที่เหมาะสมมีผลให้เชื้อมีการเจริญดีขณะเดียวกันก็ผลิตโปรตีเอสในปริมาณสูง (ค่า แอคติวิตีจำเพาะ ประมาณ 0.16 ถึง 0.20 หน่วย/มก.โปรตีน) ได้แก่ กลูตาเมท แอสปาราจีน อาร์จินีน โพรลีน และเคซีนไฮโดรไลเสท

2. ในน้ำเลี้ยงอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอคาร์บอนต่างๆนั้น ซิเตรทจะมีผล ให้มีการเจริญได้ดีกว่า และสามารถผลิตโปรตีเอสในปริมาณที่สูงกว่า กลีเซอรอล,ซัคซิเนท และแอลฟา คีโตกลูตาเรท

3. ในน้ำเลี้ยงอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริม กลูตาเมทร่วมกับสารต้นตอคาร์บอน ที่ใช้ในการทดลอง ซิเตรท และซัคซิเนทมีผลเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ทั้งการเจริญและการผลิตโปรตีเอส แต่ก็ยังต่ำกว่าเมื่อเสริมเฉพาะ กลูตาเมทเพียงอย่างเดียว

4. กรดอะมิโนผสม 16 ชนิดจะมีผลให้การเจริญและผลิตโปรตีเอสได้สูงกว่ากรดอะมิโนผสม 4 ชนิดในขณะที่กรดอะมิโนผสม 16 ชนิด ที่มีระดับความเข้มข้น 0.313 มก./มล.จะมีผลให้การเจริญและการผลิตโปรตีเอสของเชื้อได้ดีกว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.016 มก./มล.

5. กรดอะมิโนผสม 4 ชนิดของกลูตาเมท,กลูตามีน,แอสปาร์เตท และแอสปาราจีน จะมีค่าการเจริญ และ การผลิตโปรตีเอสสูงกว่ากรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งในกลุ่มนี้

6. ในน้ำเลี้ยงอาหารสูตรปรับต่ำ ที่เสริมด้วยกลูตาเมท เมื่อเสริมกลูโคสร่วมลงไปในน้ำเลี้ยง จะมีผลไปกดดันการผลิตโปรตีเอส โดยระดับของการถูกกดดันขึ้นอยู่กับ ระดับความเข้มข้นของกลูโคส โดยที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ จะมีผลในการกดดันได้สูงด้วย

7. ในการเลี้ยงเชื้อจนเข้าสู่ช่วง stationary phase เมื่อเติมกลูโคส ลงในน้ำเลี้ยงจะไม่มีผลไปลดการผลิตโปรตีเอส แต่จะมีผลอย่างชัดเจนเมื่อเติมกลูโคสตั้งแต่เริ่มการเจริญ log phase

8. จากการติดตามผลของการเปลี่ยนแปลงค่า pH กับช่วงเวลาของการเจริญ และปริมาณโปรตีเอสในน้ำเลี้ยงที่เสริมด้วย กลูตาเมท และ กลูโคส ค่า pH จะลดลงในช่วงแรก

ของการเจริญในขณะที่เมื่อเสริมด้วย กลูตาเมท ตามลำพัง ค่า pH จะสูงขึ้นตลอดช่วงการเจริญและค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสก็สูงกว่า เมื่อเสริมร่วมกับกลูโคส

9. 1-3 มิลลิโมลาร์ ของ EDTA หรือ PMSF สามารถยับยั้งแอคติวิตีของโปรตีเอสได้ในระดับสูงสุด 70 เปอร์เซนต์และ 40 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

10. ในน้ำเลี้ยงอาหารสูตรปรับต่ำ สารต้นตอไนโตรเจนที่มีผลให้การเจริญ และการผลิตโปรตีเอสได้ในระดับใกล้เคียงกัน จะมีผลให้อัตราส่วนของ เมตัล ต่อซีรีน ใกล้เคียงกันอีกด้วย

11. ในการศึกษาความสัมพันธ์ของการผลิตโปรตีเอส กับ กลูตามีน ซินเทส (GS) กลูตาเมท ซินเทส (GOGAT) และ กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส (GDH)พบว่าในการนำสารต้นตอไนโตรเจนเข้าสู่ขบวนการ เมแทบอลิซึมของ B. subtilis TISTR 25 วิถี GS-GOGAT มีความสำคัญกว่าวิถีที่เร่งด้วย GDH และการผลิตโปรตีเอสมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับแอคติวิตีของเอนไซม์ในวิถีไนโตรเจน