หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

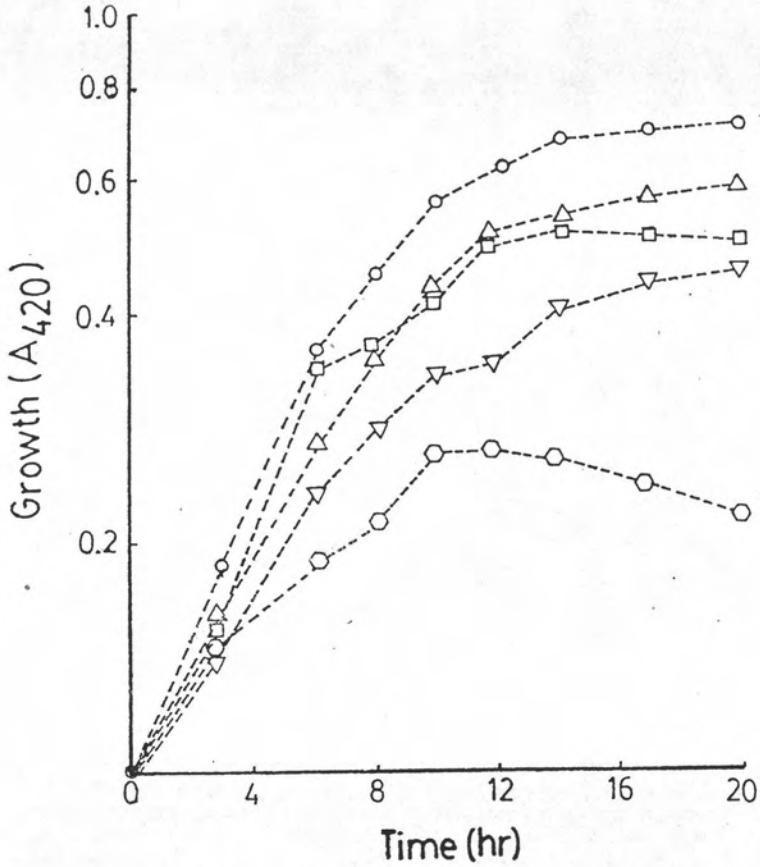
ผลการทดลอง

4.1 ผลของสารต้นตอไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตโปรตีเอสใน B. subtilis TISTR 25

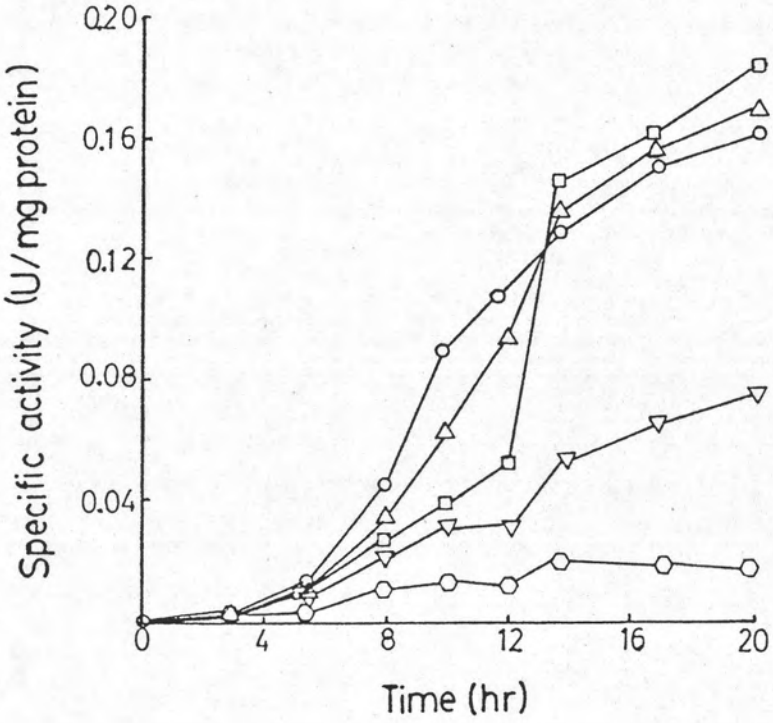
4.1.1 ผลของการใช้สารต้นตอไนโตรเจนบางชนิด

เมื่อเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยใช้สารต้นตอไนโตรเจน 10 ชนิด แล้วติดตามการเจริญ และแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอส จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 สารต้นตอไนโตรเจนแต่ละชนิดให้ผลแตกต่างกันบ้าง ผลการทดลองในรูปที่ 1 อาจแบ่งสารนี้ตามผลที่ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรกคือ ยูเรีย และ ฮิสติดีน ทำให้ทั้งการเจริญและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ค่อนข้างต่ำ ในขณะที่กลุ่มที่สอง คือ กลูตาเมท โพรลีนและอาร์จินีน ส่งผลให้การเจริญและแอคติวิตี ของเอนไซม์อยู่ในระดับสูง เมื่อเปรียบเทียบรูปที่ 1 ก และ 1 ข จะพบว่า แอคติวิตีจำเพาะในทุกระบบอยู่ในระดับต่ำ ในช่วงต้นของ log phase สารต้นตอไนโตรเจนกลุ่มที่สอง สนับสนุนให้แอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสสูงขึ้นในช่วง late log phase แอคติวิตีนี้ยังคงสูงขึ้นอีกแม้เมื่อแบคทีเรียเจริญเข้าสู่ stationary phase แล้วก็ตามจนถึงชั่วโมงที่ 20 สารต้นตอไนโตรเจนในกลุ่มที่สองสามารถส่งผลให้แอคติวิตีจำเพาะ สูงกว่าสารในกลุ่มแรก 1 ถึง 7 เท่าและยังไม่มีแนวโน้มว่าจะลดลง

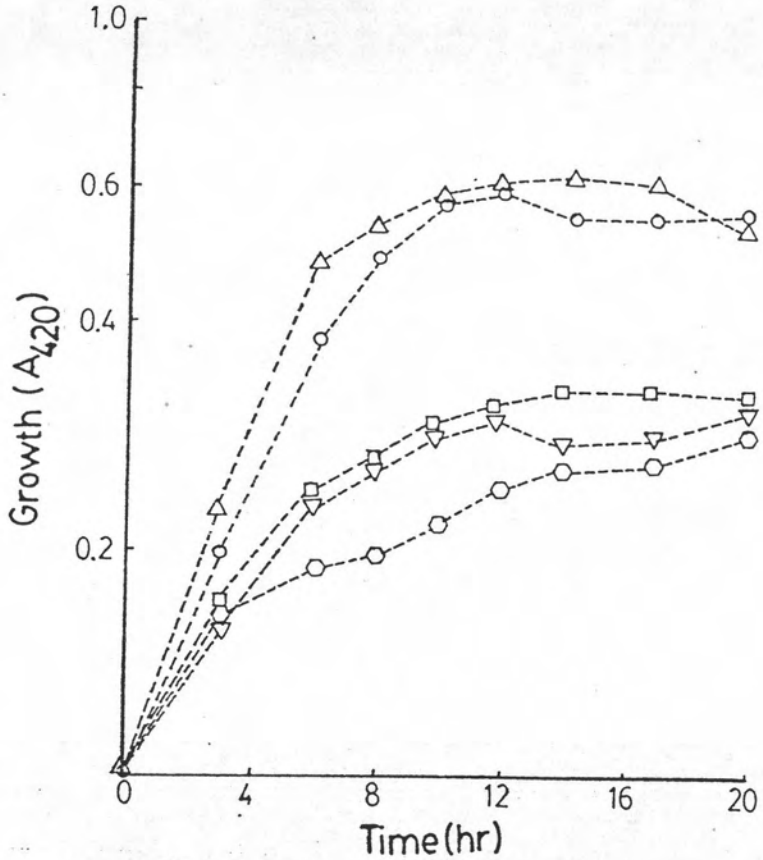
ผลการทดลองในรูปที่ 2 แบ่งสารต้นตอไนโตรเจนออกได้เป็น 2 กลุ่มคือในกลุ่มของเคซีนไฮโดรไลเสท และแอสปาราจีน มีผลให้ทั้งการเจริญ และแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ค่อนข้างสูง ส่วนในกลุ่มของ แอมโมเนียมคลอไรด์ กลูตามีน และซีรีน มีผลให้ทั้งการเจริญและแอคติวิตีจำเพาะมีค่าต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบรูป 2 ก และ 2 ข จะพบว่าแอคติวิตีจำเพาะในทุกระบบอยู่ในระดับต่ำในช่วงต้นของ log phase และสารต้นตอไนโตรเจนในกลุ่มของเคซีนไฮโดรไลเสท และแอสปาราจีน สนับสนุนให้แอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสสูงขึ้นในช่วง late log phase โดยแอคติวิตียังคงสูงจนเข้าสู่ช่วง stationary phase ก็ยังสูงขึ้นอีกแม้ถึงชั่วโมงที่ 20 โดยสารต้นตอไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิดสามารถส่งผลให้แอคติวิตีจำเพาะ สูงกว่า


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
Growth (A_{420})
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

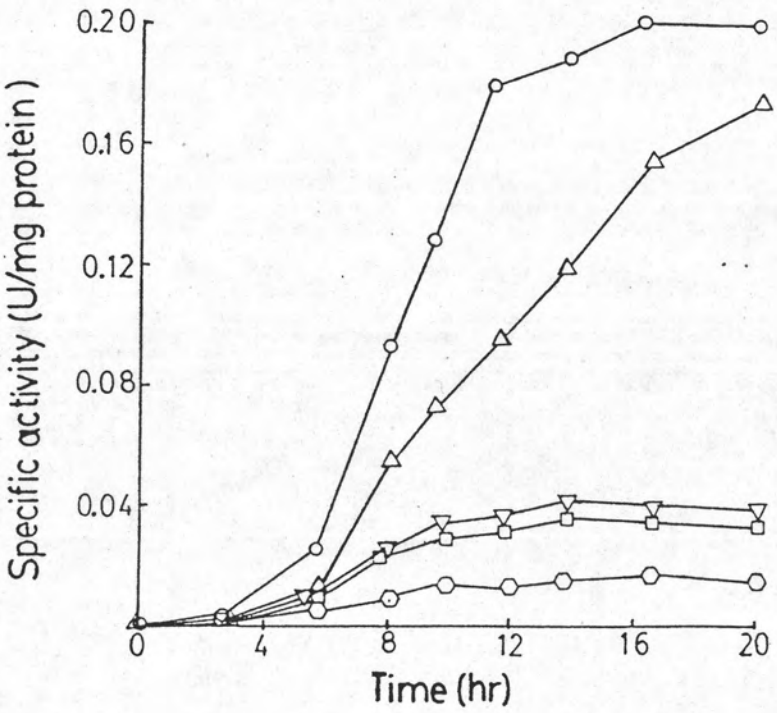
รูปที่ 1ก


0.20
0.16
0.12
0.08
0.04
Specific activity (U/mg protein)
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

รูปที่ 1ข


1.0
0.6
0.4
0.2
Growth (A_{420})
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

รูปที่ 2ก


0.20
0.16
0.12
0.08
0.04
Specific activity (U/mg protein)
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

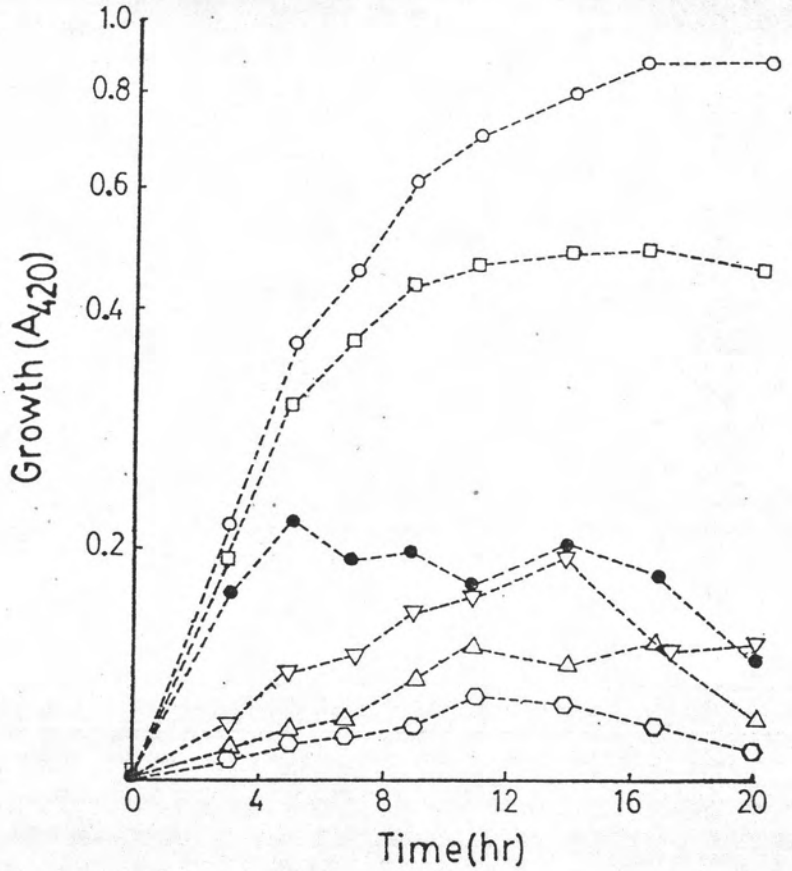
รูปที่ 2ข

ในกลุ่มแรก 1 ถึง 5 เท่า และก็ยังไม่มีแนวโน้มว่าจะลดลง

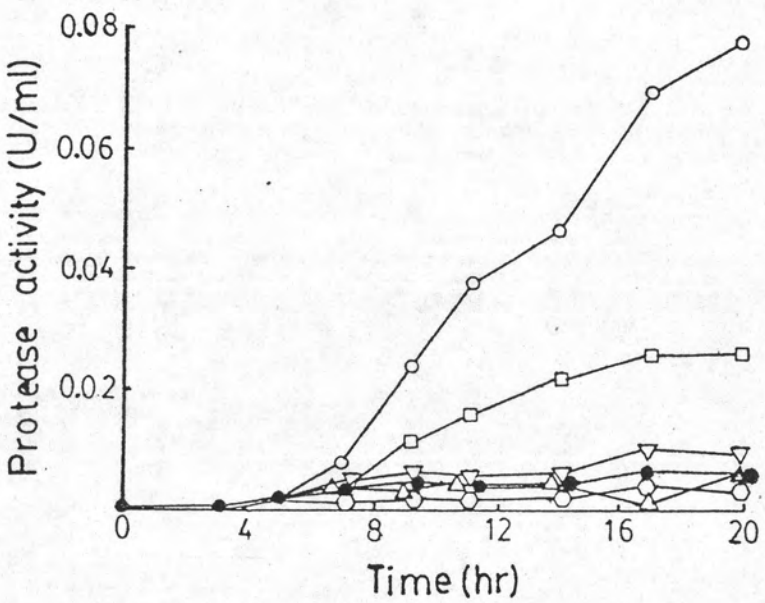
จะเห็นได้ว่าสารต้นตอไนโตรเจนบางชนิด สามารถสนับสนุนการเจริญ และการผลิตโปรตีเอสใน B. subtilis TISTR 25 ในลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่เคซีนไฮโดรไลเสท ซึ่งเป็นสารต้นตอไนโตรเจนที่ให้แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด จะให้รูปแบบของการเพิ่มแอคติวิตีค่อนข้างต่างจากสารอื่น กล่าวคือระดับของเอนไซม์ขึ้นถึงระดับสูงสุดเมื่อเวลาประมาณ 14 ชั่วโมงและคงระดับจนถึงชั่วโมงที่ 20 ในขณะที่เวลาเดียวกันนี้ระดับเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากสารอื่นยังคงมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นอีก อย่างไรก็ตาม ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุด เนื่องจากสารต้นตอไนโตรเจนในทั้ง 2 กลุ่ม จะมีค่าใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 0.16-0.20 U/mg protein เมื่อเวลาการเจริญชั่วโมงที่ 20

4.1.2 ผลของการใช้กรดอะมิโนผสมเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนชนิดเดียว

เลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ตามวิธีในข้อ 3.3.1 แต่ล้างเซลล์เริ่มต้นเพื่อแยกอาหารจาก rich medium ออกในขั้นตอนการถ่ายเชื้อ แล้วจึงนำไปเลี้ยงตามขั้นตอนต่อไปโดยใช้สารต้นตอไนโตรเจนที่เป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ 16 ชนิด (ยกเว้นกรดอะมิโน ที่มีผลไปรบกวนการวัดแอคติวิตีของโปรตีเอส เช่นพวกกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติกคือ เฟนิลอะลานีน, ทริปโตเฟน และไทโรซีน และกรดอะมิโนบางชนิด ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น ซิสเตอีน) จากการติดตามการเจริญและแอคติวิตีของโปรตีเอส กรดอะมิโนผสม 4 ชนิด 4 กลุ่ม และ 16 ชนิด 2 กลุ่มนั้นจะพบว่ามีอยู่เพียง 2 กลุ่ม ที่มีความแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ สามารถสนับสนุนให้มีการเจริญและค่าแอคติวิตี ของโปรตีเอสสูง โดยพบว่าในกลุ่มของกรดอะมิโนผสม 16 ชนิด ที่มีความเข้มข้นกรดอะมิโน แต่ละชนิด 0.313 มก./มล. จะมีผลให้การเจริญและค่าแอคติวิตีสูงสุด และกลุ่มของ กลูตาเมท กลูตามีน แอสปาร์เตท และแอสปาราจีนจะมีค่าการเจริญและแอคติวิตีของโปรตีเอสรองลงมา แต่มีค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสต่ำกว่าในกลุ่มกรดอะมิโนผสม 16 ชนิด อยู่ 1-4 เท่า ส่วนในกลุ่มกรดอะมิโนผสมกลุ่มอื่นๆ มีค่าการเจริญและแอคติวิตีต่ำมาก รวมทั้งกรดอะมิโนผสม 16 ชนิด ที่มีปริมาณกรดอะมิโน แต่ละชนิด 0.016 มก./มล. ก็จะต่ำกว่าเมื่อมีปริมาณ 0.313 มก./มล. ประมาณ 10 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบรูปที่ 3 ก และ 3 ข ก็จะพบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะมีค่าต่ำในช่วงแรกของการเจริญ log phase และมีค่าสูงมากขึ้น ในเวลาการเจริญชั่วโมงที่ 9 เป็นต้นไป ในช่วงการเจริญ


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
Growth (A_{420})
0
4
8
12
16
20
Time(hr)

รูปที่ 3ก


0.08
0.06
0.04
0.02
Protease activity (U/ml)
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

รูปที่ 3ข

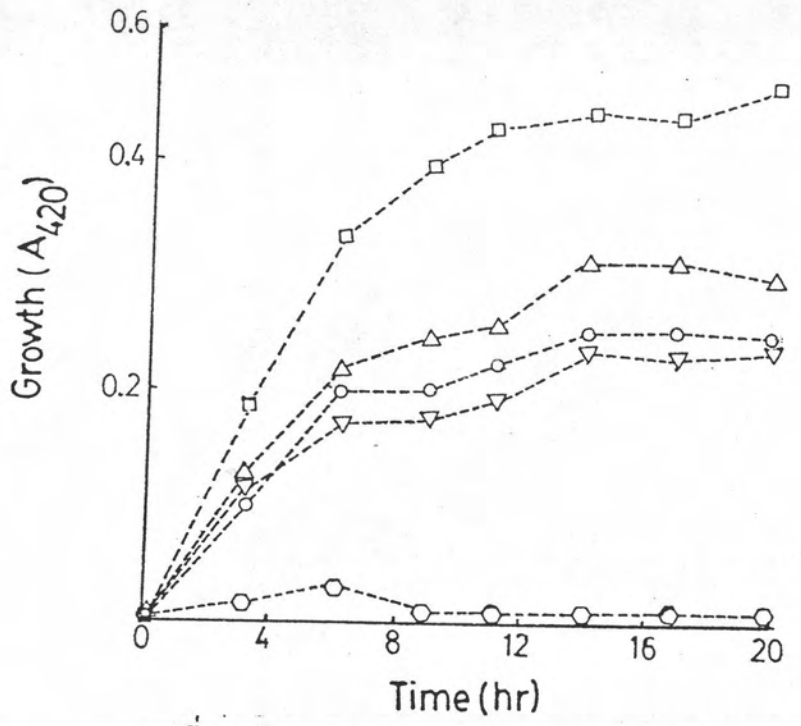
stationary phase ในกรณีของกรดอะมิโนผสม 16 ชนิด โปรตีเอสแอคติวิตียังสูงขึ้นเรื่อยๆ แต่ในกรณีกลุ่มกลูตาเมท,กลูตามีน,แอสปาร์เตท และแอสปาราจีน แอคติวิตีเริ่มคงที่การทดลองนี้สรุปได้ว่าชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนจะมีผลต่อการเจริญ และแอคติวิตีของโปรตีเอสใน B. subtilis TISTR 25

เมื่อเปรียบเทียบผลของการใช้กรดอะมิโนผสม กับกรดอะมิโนชนิดเดียว โดยเลี้ยงเซลล์ที่ล้างเอา rich medium ออกแล้วดังกล่าวข้างต้น ได้ผลดังแสดงใน รูปที่ 4 โดยกรดอะมิโนจะให้ผลแตกต่างกันบ้าง แต่อาจแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือในกลุ่มของกรดอะมิโนเดี่ยวแต่ละชนิดยกเว้น กลูตามีน มีผลทั้งการเจริญ และแอคติวิตีของโปรตีเอส ใกล้เคียงกันและต่ำกว่าเมื่อใช้กรดอะมิโนผสมของทั้งกลุ่ม โดยเปรียบเทียบผลจากรูปที่ 4 ก และ 4 ข จะพบว่าค่าแอคติวิตีจะมีค่าต่ำ ในช่วงแรกของการเจริญ log phase และจะมีค่าสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 6 และจะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 17 แล้วจะเริ่มลดลง เมื่อถึงชั่วโมงที่ 20 ของการเจริญ โดยค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสเมื่อใช้กรดอะมิโนผสม 4 ชนิดนี้จะมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้เฉพาะ กลูตาเมท แอสปาร์เตท หรือ แอสปาราจีน ประมาณ 1-3 เท่า สำหรับในสารต้นตอไนโตรเจนที่เป็นกรดอะมิโนเดี่ยว และกรดอะมิโนผสม จะพบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ โปรตีเอส จะสัมพันธ์กับความสามารถในการเจริญของเชื้อในสารต้นตอต่างๆเหล่านี้ ถ้ามีการเจริญได้ดีก็มักมีค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสสูงด้วย และกรดอะมิโนผสมจะมีผลต่อทั้งการเจริญและค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสมากกว่ากรดอะมิโนเดี่ยว

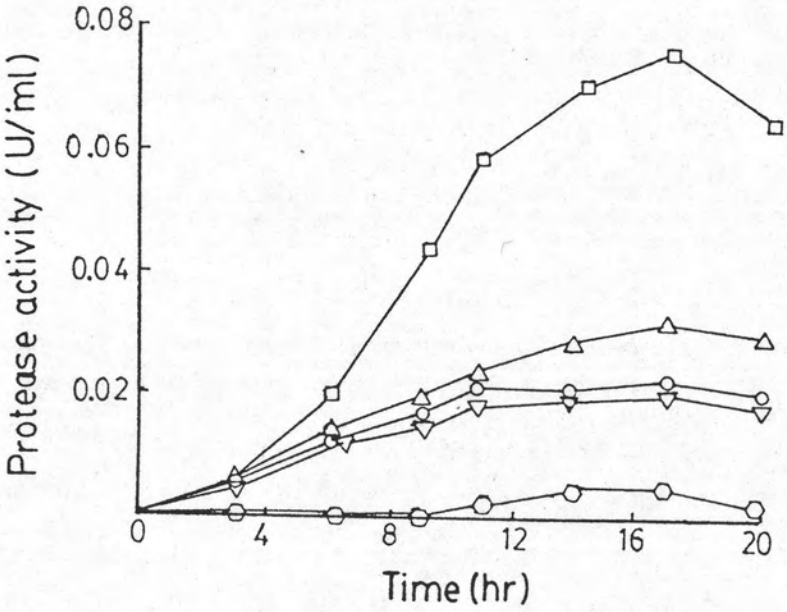
เมื่อเปรียบเทียบผลการใช้ washed cell และการใช้ cell suspension ที่มี rich medium ปนอยู่ถึง 10 เปอร์เซนต์ พบว่าการเจริญของเชื้อเมื่อใช้ washed cell ต่ำกว่าเมื่อใช้ cell suspension อย่างเห็นได้ชัด (รูป 4ก กับ รูป 1ก และ รูป 2ก) ส่วนการผลิตโปรตีเอส เมื่อเปรียบเทียบกับในกรณีเลี้ยงด้วยกลูตาเมท พบว่าที่เวลาการเจริญ 20 ชั่วโมง ค่าโปรตีเอสแอคติวิตีเมื่อใช้ washed cell มีค่าประมาณ 0.055 U/ml ส่วนในกรณีใช้ cell suspension มีค่าสูงกว่าเล็กน้อยคือประมาณ 0.080 U/ml (รูปที่ 5)

4.1.3 ผลของความเข้มข้นของกรดอะมิโน

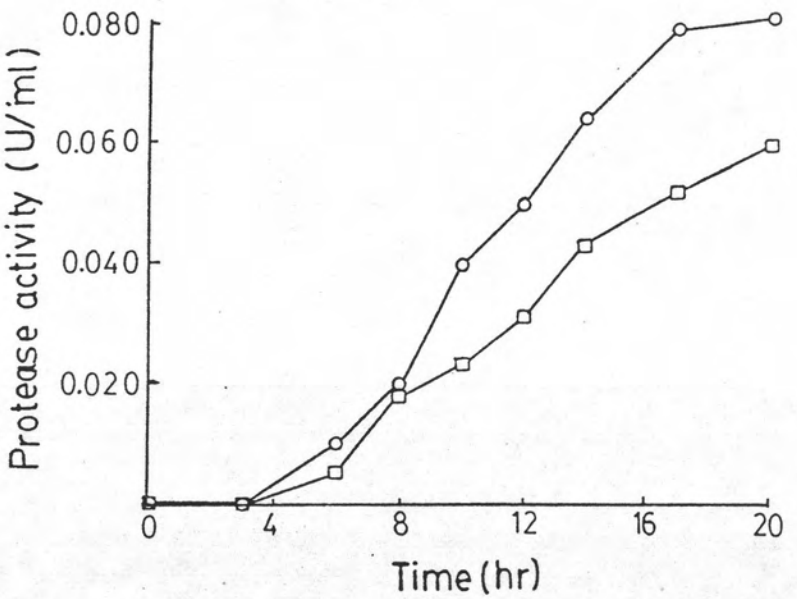
ในการเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 โดยวิธีใช้ washed cell เหมือนข้อ 4.1.2 โดยใช้สารต้นตอไนโตรเจน เคซีน ไฮโดรไลเสท ในปริมาณความเข้มข้นต่างๆกัน


0.6
0.4
0.2
Growth (A_{420})
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

รูปที่ 4ก

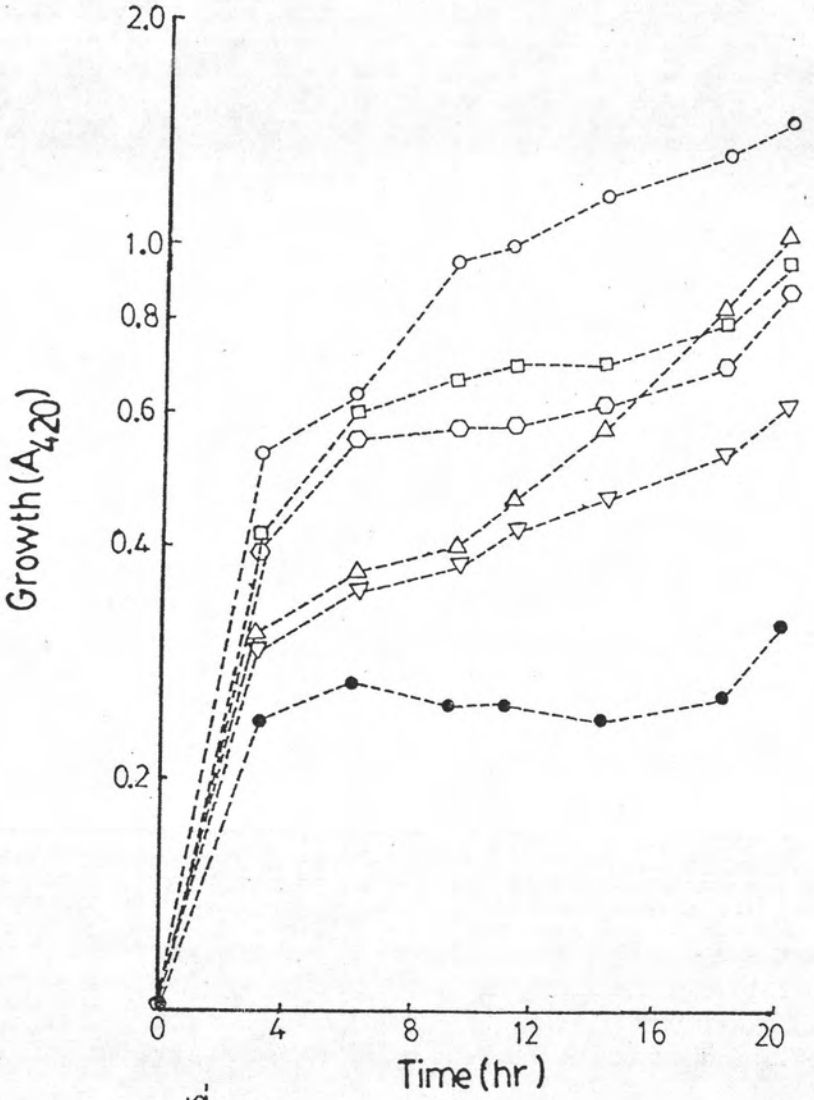

0.08
0.06
0.04
0.02
Protease activity (U/ml)
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

รูปที่ 4ข

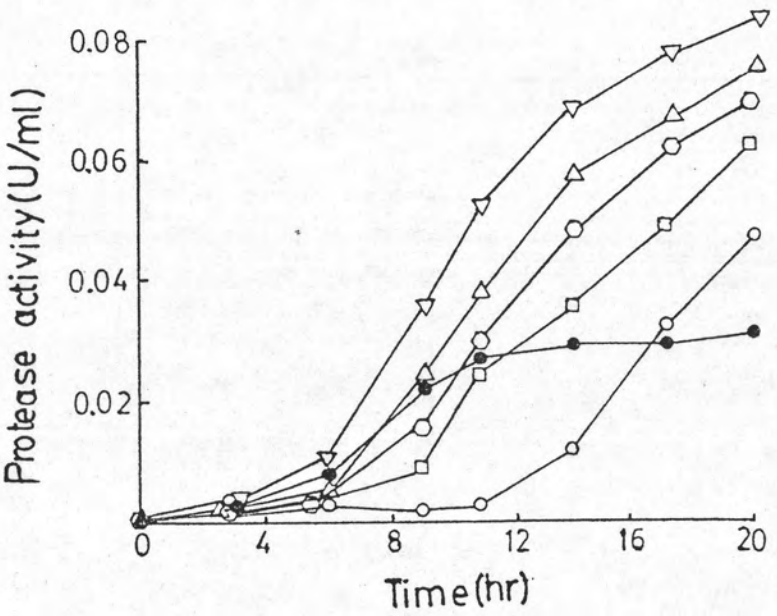


รูปที่ 5 เปรียบเทียบโปรตีเอสแอคติวิตี ของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ ที่เสริมด้วย กลูตาเมท 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ washed cell (□—□) และ cell suspension ที่มี rich medium ปนอยู่ 10 เปอร์เซนต์ (○—○)

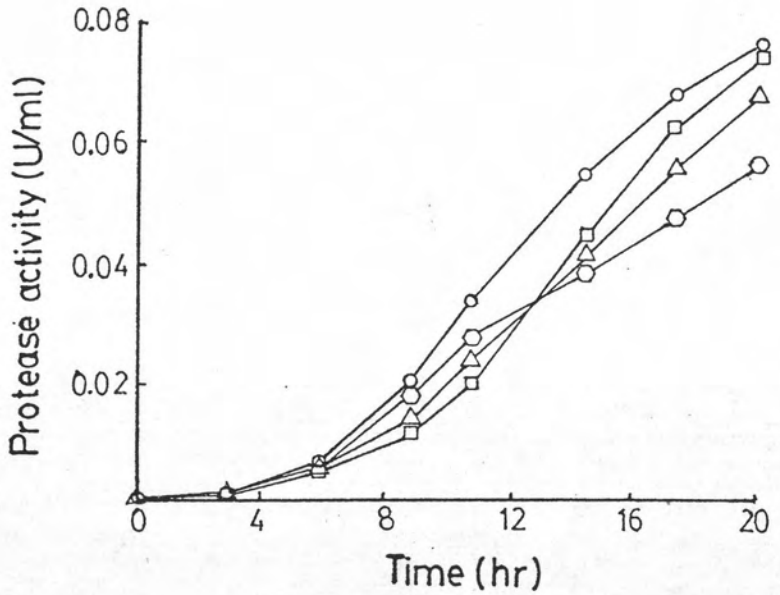
คือ 0.1,0.5,1.0,2.0,3.0 และ 5.0 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แล้วติดตามการเจริญและแอคติวิตีของโปรตีเอสจะได้ผลดังแสดงใน รูปที่ 6 โดยความเข้มข้นที่ต่างกันมีผลให้มีความแตกต่างกันใน 2 ลักษณะ คือ ในส่วนแรกเป็นช่วงที่ เคซีนไฮโดรไลเสท มีความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.5 เปอร์เซนต์ ในช่วงนี้การเพิ่มความเข้มข้นของเคซีนไฮโดรไลเสท (จากการเปรียบผลในรูปที่ 6ก และ 6ข) เป็นผลให้ทั้งระบบมีการเจริญและค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสสูงขึ้น ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.0,2.0,3.0 และ 5.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับนั้น จะพบว่าความสัมพันธ์ของการเจริญและค่าแอคติวิตีของโปรตีเอส จะเป็นไปในลักษณะผกผัน คือ เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น การเจริญของเชื้อจะสูงขึ้น แต่ขณะเดียวกันค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสจะกลับต่ำลง ยิ่งความเข้มข้นสูงค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสก็จะยิ่งต่ำ และจะพบว่าทุกค่าความเข้มข้นในการทดลองนี้ มีค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสต่ำ ในช่วงแรกของการเจริญ log phase และสูงขึ้นในช่วง stationary phase และยังคงสูงต่อไปจนชั่วโมงที่ 20 ของการเจริญก็ยังคงมีแนวโน้มว่าจะยังคงเพิ่มต่อไปอีก(ยกเว้นที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์) จากผลการทดลองเมื่อใช้เคซีนไฮโดรไลเสท 0.5 เปอร์เซนต์ จะมีผลให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด และสูงกว่าเมื่อใช้ 0.1 เปอร์เซนต์ อยู่ประมาณ 3 เท่า หลังจากนั้นความแตกต่างจะน้อยลง ในปริมาณความเข้มข้นที่สูงขึ้น และก็ได้ผลเช่นเดียวกับผลการทดลองใน รูปที่ 7 ซึ่งแสดงค่าแอคติวิตีเมื่อใช้กลูตาเมทเป็นสารต้นตอไนโตรเจน โดยมีค่าความเข้มข้นต่างๆ คือ 10,100,200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าโปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดที่ กลูตาเมท ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และต่ำสุดที่ 10 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ค่าแอคติวิตีของโปรตีเอส จะมีค่าต่ำลงกว่าเมื่อใช้ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับค่าความแตกต่างของค่าแอคติวิตีที่เวลา 20 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันมากเช่นในเคซีนไฮโดรไลเสท จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การผลิตโปรตีเอสไม่จำเป็นต้องแปรตามการเจริญของแบคทีเรียเสมอไป และค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ เคซีนไฮโดรไลเสทและกลูตาเมทสามารถให้ค่าแอคติวิตีได้สูงสุดเท่าๆกัน คือ 0.08 U/ml


2.0
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
Growth (A_{420})
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

รูปที่ 6ก


0.08
0.06
0.04
0.02
Protease activity (U/ml)
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

รูปที่ 6ข



รูปที่ 7 เปรียบเทียบโปรตีเอสแอคติวิตี ของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ที่เสริมด้วยสารต้นตอไนโตรเจนกลูตาเมท มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (○—○), 100 มิลลิโมลาร์(○—○), 200 มิลลิโมลาร์ (□—□)และ 300 มิลลิโมลาร์ (△—△)

4.2 ผลของสารต้นตอคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ใน B. subtilis TISTR 25

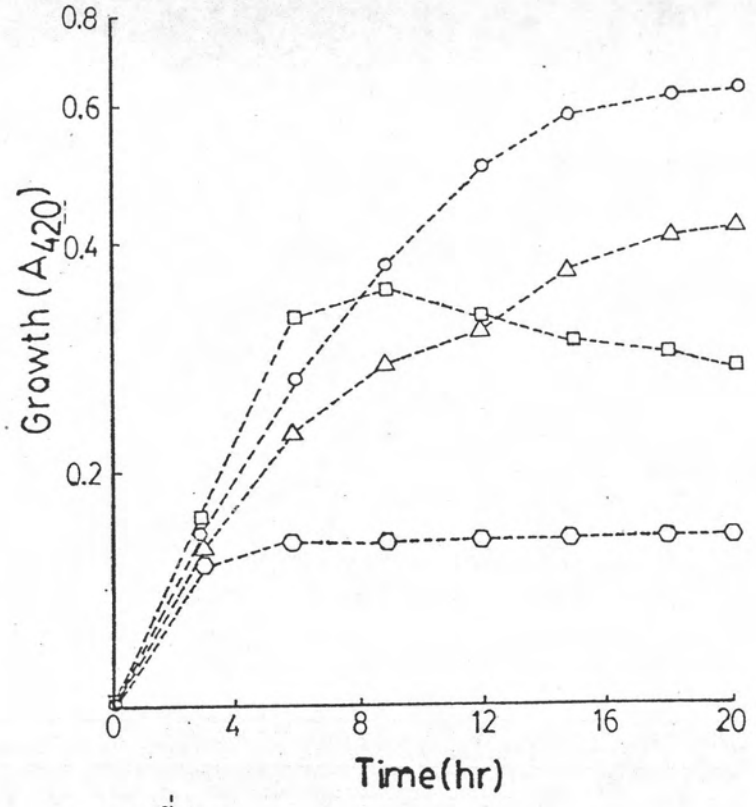
4.2.1 ผลของซิเตรท ซัคซิเนท กลีเซอรอล และแอลฟาคีโตกลูตาเรท

เมื่อเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ตามวิธีข้อ 3.3.1 โดยใช้สารต้นตอคาร์บอน 4 ชนิด แล้วติดตามการเจริญ และแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสจะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งสารต้นตอคาร์บอนแต่ละชนิดให้ผลแตกต่างกัน คือ ซิเตรทจะมีผลสนับสนุนให้ทั้งการเจริญและแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสมีค่าสูง ในขณะที่ ซัคซิเนท และกลีเซอรอล มีผลให้ทั้งการเจริญ และแอคติวิตีจำเพาะค่อนข้างต่ำ ส่วนแอลฟาคีโตกลูตาเรท ทำให้เชื้อเจริญไม่ดีและแอคติวิตีจำเพาะต่ำสุด จากการเปรียบเทียบรูปที่ 8 ก และ 8 ข จะพบว่า สารต้นตอคาร์บอนจะมีแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสต่ำในช่วงแรกของการเจริญ log phase และสูงขึ้นเมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase ในขณะที่ ซิเตรท มีผลสนับสนุนให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะมีแนวโน้มสูงขึ้นอีกแม้จะถึงเวลาการเจริญชั่วโมงที่ 20 ซึ่งแตกต่างไปจาก ซัคซิเนท กลีเซอรอล ที่ค่าแอคติวิตีจำเพาะจะมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเมื่อเข้าสู่ stationary phase จนถึงชั่วโมงที่ 20 ของการเจริญ แม้ว่ารูปแบบของการเจริญ และค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอส จะคล้ายกับเมื่อใช้สารต้นตอไนโตรเจน แต่ผลที่ปรากฏคือเมื่อใช้สารต้นตอคาร์บอน ค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอส ต่ำกว่าเมื่อใช้สารต้นตอไนโตรเจน โดยเฉพาะซิเตรทซึ่งมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสสูงกว่าสารต้นตอคาร์บอน อื่นๆ ในกลุ่ม 1-3 เท่า แต่มีค่าต่ำกว่าในสารต้นตอไนโตรเจนเกือบ 2 เท่า

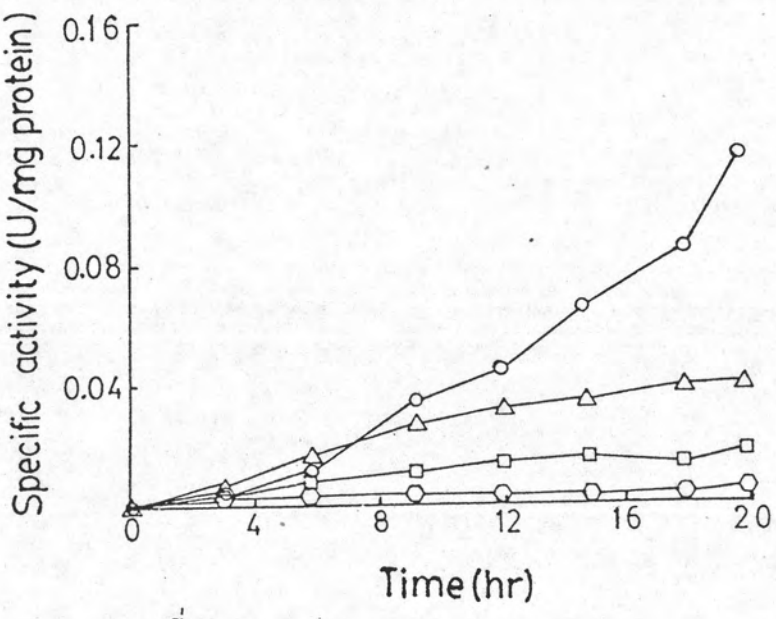
4.3 การเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ของ B. subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในสารต้นตอคาร์บอน ชนิดต่างๆเสริมกับ กลูตาเมท

4.3.1 ผลของ ซิเตรท ซัคซิเนท แอลฟาคีโตกลูตาเรท กลีเซอรอล เมื่อเสริมด้วยกลูตาเมท

เมื่อทำการเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยใช้สารต้นตอคาร์บอนต่างๆ 4 ชนิด เสริมกับกลูตาเมทเปรียบเทียบกับเมื่อใช้เฉพาะสารต้นตอคาร์บอนอย่างเดียว แล้วติดตามการเจริญ และแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอส จะพบว่าเมื่อเสริม


0.8
0.6
0.4
0.2
Growth (A_{420})
0
4
8
12
16
20
Time(hr)

รูปที่ ๘ก


0.16
0.12
0.08
0.04
Specific activity (U/mg protein)
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

รูปที่ ๘ข

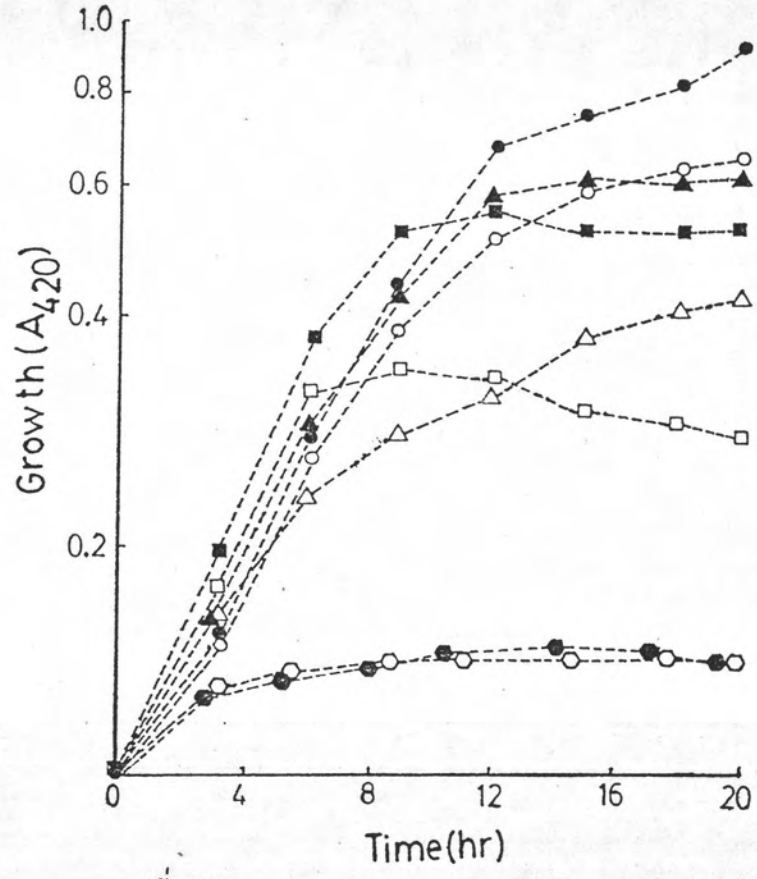
กลูตาเมท การเจริญ และค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสเพิ่มขึ้น (ยกเว้นกรณีแอลฟาคีโตกลูตาเรท) ค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำในช่วงแรกของการเจริญ log phase แต่เมื่อเริ่มเข้าสู่ช่วงการเจริญชั่วโมงที่ 12 จะพบว่าในระบบที่เสริมด้วยสารต้นตอคาร์บอนและกลูตาเมท มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าเมื่อใช้สารต้นตอคาร์บอนเพียงอย่างเดียวและจะแตกต่างมากขึ้นเมื่อเวลา 14 ชั่วโมง และมีแนวโน้มสูงขึ้นจนถึง ชั่วโมงที่ 20 ก็ยังคงเพิ่มขึ้นอีก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบในรูปที่ 1 และ รูปที่ 9 จะพบว่าในกรณีที่เลี้ยงโดยใช้เฉพาะกลูตาเมทเพียงอย่างเดียวมีผลการเจริญ และแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสที่ใกล้เคียงกับเมื่อใช้ซิเตรทหรือซัคซิเนทเสริมกับ กลูตาเมท แต่ในสารต้นตอคาร์บอนอื่นๆใน กลุ่มที่เสริมกับกลูตาเมท มีผลให้ทั้งการเจริญ และค่าแอคติวิตีจำเพาะมีค่าต่ำกว่า เมื่อใช้เฉพาะกลูตาเมทเพียงอย่างเดียว และเป็นที่น่าสังเกตว่า ในกรณีของซัคซิเนทเสริมด้วยกลูตาเมท จะมีผลเพิ่มค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงกว่าการไม่เสริมอย่างชัดเจนมากที่สุด ทั้งซิเตรท และ ซัคซิเนท จึงเป็นสารต้นตอคาร์บอนที่ดีที่สุดในกลุ่มนี้ที่เสริมกับ กลูตาเมท แล้วสนับสนุนให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้น

4.3.2 <u>ผลของกลูโคส เมื่อเสริมกับสารต้นตอไนโตรเจน</u>

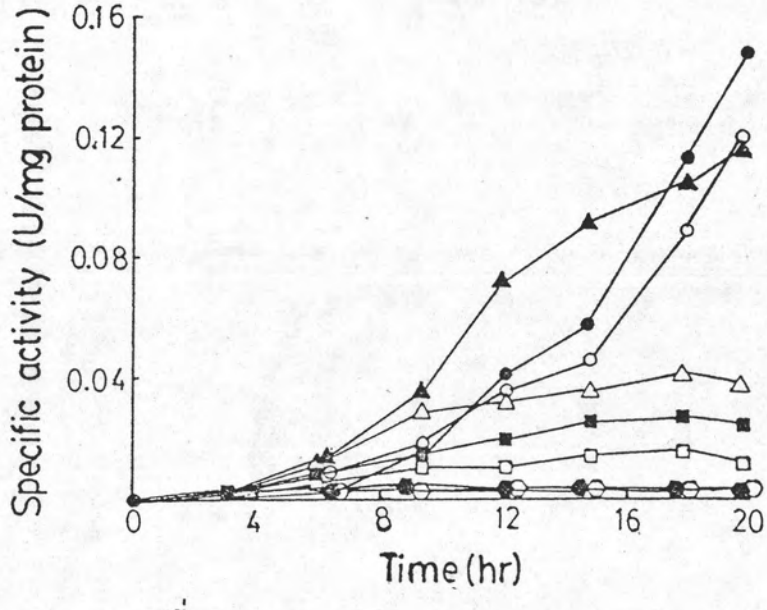
ในการเลี้ยง <u>B. subtilis</u> TISTR 25 ตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยใช้สารต้นตอไนโตรเจนที่ให้ผลดีจากการทดลองในข้อ 4.1.1 คือ อาร์จินีน เคซีนไฮโดรไลเสทและแอสปาราจีน เมื่อมีและไม่มีกลูโคส แล้วติดตามการเจริญและค่าแอคติวิตี จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 10ก และ 10ข กล่าวคือเมื่อเสริมกลูโคส การเจริญจะสูงขึ้นแต่ค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสจะมีค่าลดลง และพบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะจะมีค่าต่ำมากในช่วงแรกของการเจริญ log phase และจะเริ่มสูงขึ้นในช่วง late log phase ที่ชั่วโมงที่ 9 เมื่อไม่มีกลูโคส แต่ในกรณีที่เติมกลูโคส ค่าแอคติวิตีจำเพาะจะมีค่าสูงเมื่อเริ่มเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นค่าก็จะสูงขึ้นเรื่อยๆ จนชั่วโมงที่ 20 ในกรณีของเคซีนไฮโดรไลเสท ส่วนในอาร์จีนีน และแอสปาราจีน จะมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย หลังจากชั่วโมงที่ 12 และที่ ชั่วโมงที่ 20 มีค่าต่ำกว่าในกรณีเคซีนไฮโดรไลเสทประมาณ 3 เท่า ดังนั้นก็จะสอดคล้องกับการทดลอง ข้อ 4.1.3 ที่พบว่าการผลิตโปรตีเอสไม่แปรตามค่าการเจริญของแบคทีเรียอีกเช่นกัน

4.3.3 <u>ผลของความเข้มข้นของกลูโคส</u>

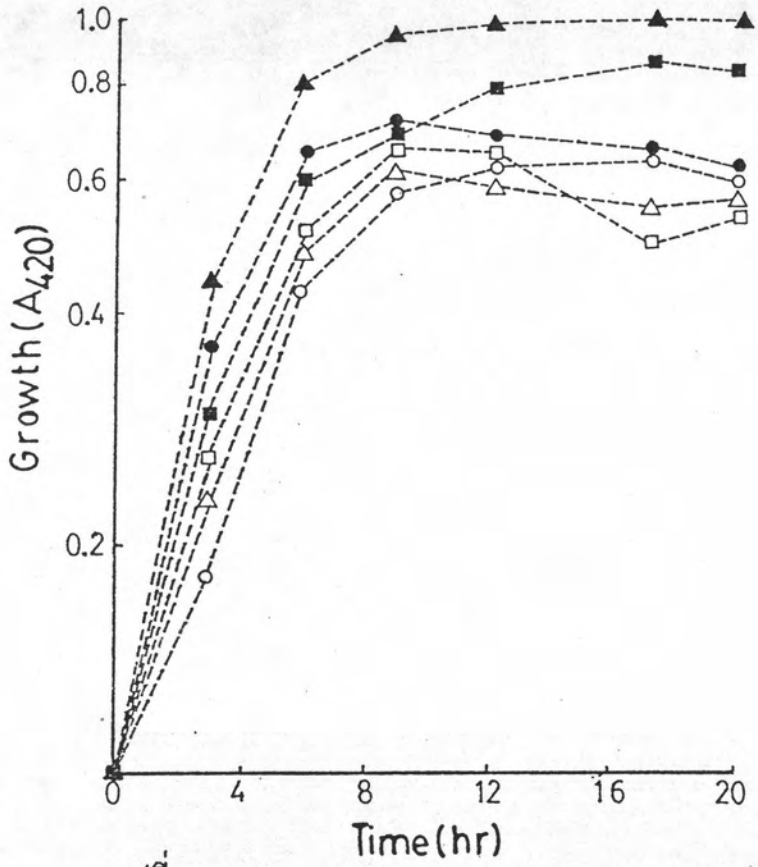
จากการเลี้ยง <u>B. subtilis</u> TISTR 25 ตามวิธีการเลี้ยงในข้อ 3.3.1


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
Growth (A_{420})
0
4
8
12
16
20
Time(hr)

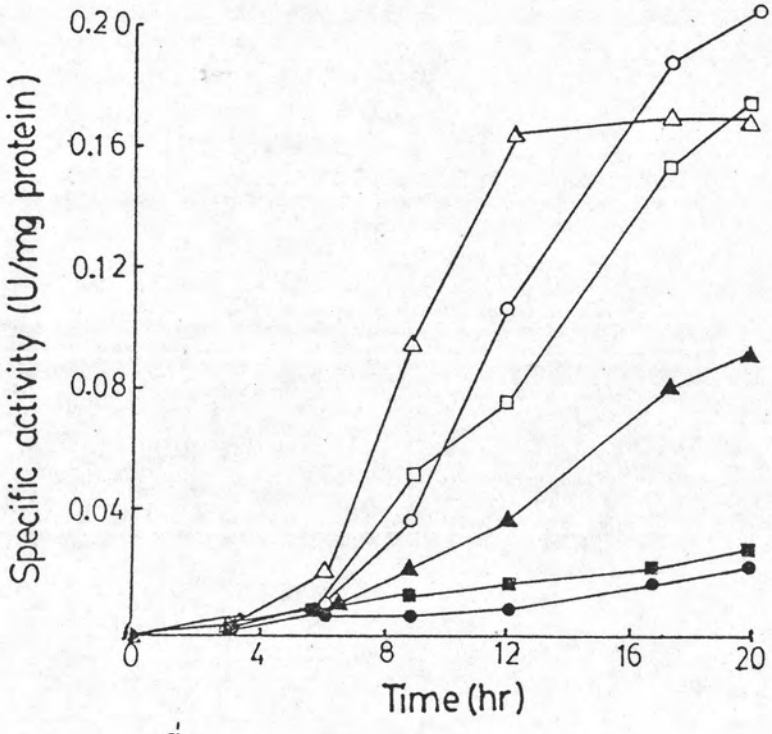
รูปที่ 9ก


0.16
0.12
0.08
0.04
Specific activity (U/mg protein)
0
4
8
12
16
20
Time (hr)

รูปที่ 9ข



รูปที่ 10ก



รูปที่ 10ข

จะพบว่าเมื่อใช้สารต้นตอไนโตรเจน คือ กลูตาเมท 100 มิลลิโมลาร์ และกลูโคสในปริมาณต่างๆกันคือ 0,15,50,100 และ 200 มิลลิโมลาร์ จะได้ผลที่แตกต่างกัน ในการติดตามการเจริญ และค่าแอคติวิตีจำเพาะ ดังแสดงในรูปที่ 11 โดยการเจริญจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะจาก 0-15 มิลลิโมลาร์ แต่ค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสจะต่ำลง เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นจาก 50 ถึง 200 มิลลิโมลาร์ จะมีผลให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของโปรตีเอสต่ำลงกว่าเมื่อมีกลูโคส 15 มิลลิโมลาร์ถึง 2 เท่าค่าแอคติวิตีจำเพาะจะมีค่าต่ำทุกระบบในช่วงแรกของการเจริญ log phase แต่ในช่วงก่อน stationary phase ในทุกระบบที่เติมกลูโคส มีผลให้การเพิ่มของค่าแอคติวิตีจำเพาะช้ากว่า เมื่อไม่ได้เติมกลูโคสจากชั่วโมงที่ 6 เป็นชั่วโมงที่ 9

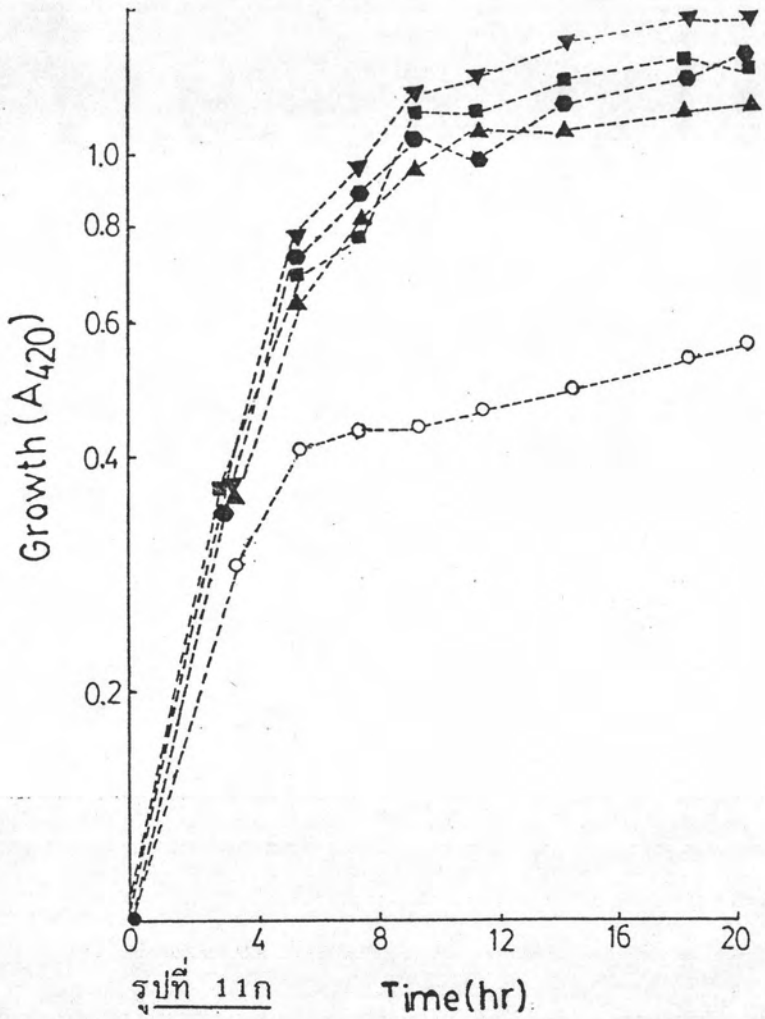
4.3.4 ผลของการเติมกลูโคสในระยะ stationary phase

เลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ตามวิธีข้อ 3.3.1 โดยใช้สารต้นตอไนโตรเจน กลูตาเมท เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ แล้วเติม กลูโคสลงในน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อการเจริญของเชื้อเข้าสู่ช่วง stationary phase แล้วติดตามค่าแอคติวิตีของโปรตีเอส ดังแสดงในรูปที่ 12 ผลการทดลองพบว่า หลังการเติมกลูโคส 1 ชั่วโมง การผลิตโปรตีเอสลดลงเพียงเล็กน้อย และจากการเปรียบเทียบกับผลการทดลองในรูปที่ 11 สรุปได้ว่าการเติมกลูโคสความเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ (ประมาณ 100 มิลลิโมลาร์) ในช่วง stationary phase จะทำให้การผลิตโปรตีเอสลดลงไม่มากนัก แต่ถ้าเติมเมื่อเริ่มแรก คือในช่วงการถ่ายเชื้อ จะทำให้การผลิตโปรตีเอสลดลงอย่างมาก

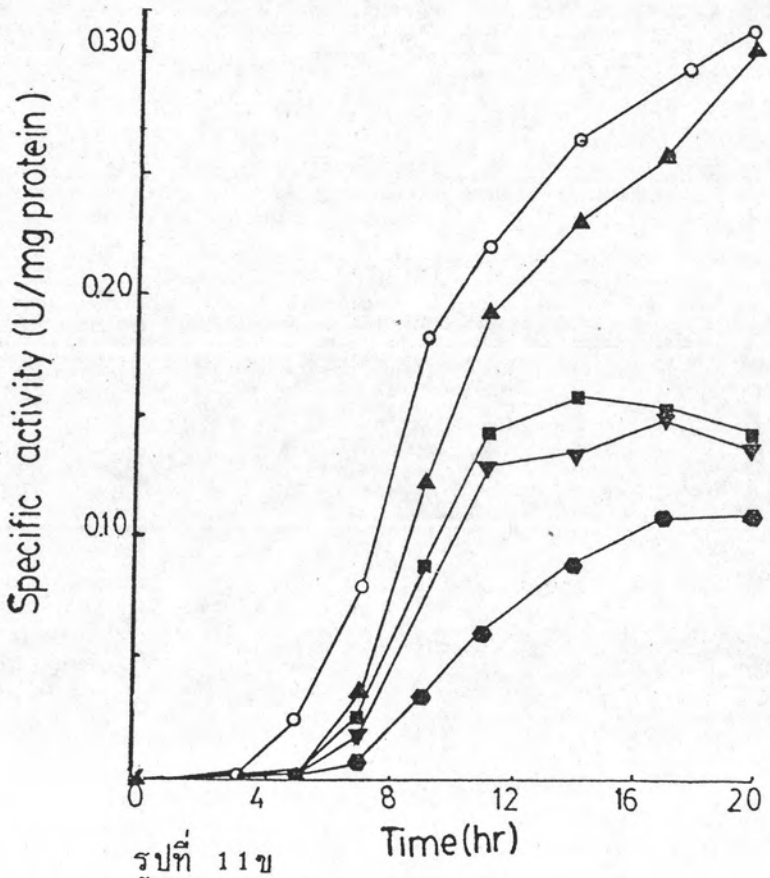
4.4 ผลของสารยับยั้งต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตโดย B. subtilis TISTR 25

4.4.1 ผลของ rifampin

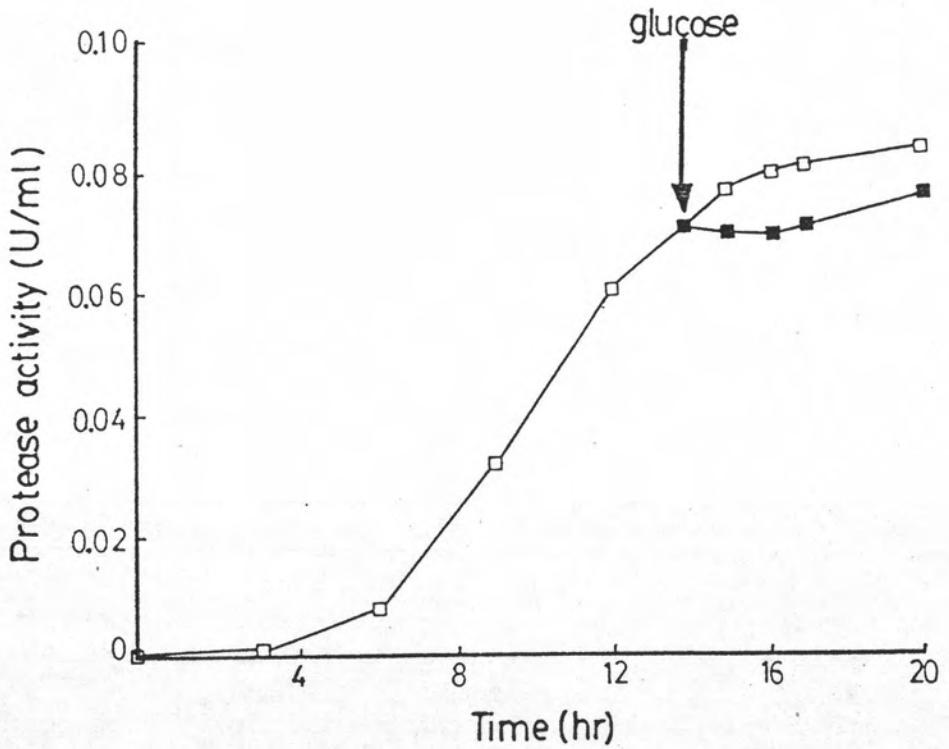
เลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 3.3.1 โดยเสริมด้วย กลูตาเมท 100 มิลลิโมลาร์ และเติม rifampin ลงไปในช่วงการเจริญ late log phase (รูปที่ 13) พบว่า การผลิตโปรตีเอสจะดำเนินต่อไปอีกประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากเติมตัวยับยั้ง rifampin และหลังจากนั้นการผลิตโปรตีเอสจะคงที่ตลอดไป



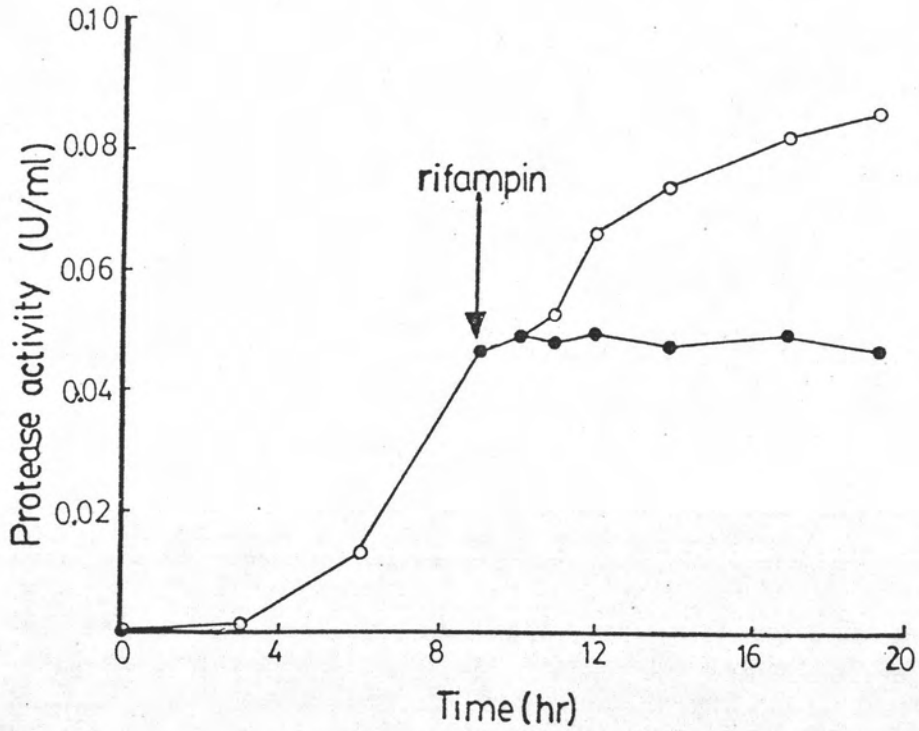
รูปที่ 11ก



รูปที่ 11ข



รูปที่ 12 ผลของการเติมกลูโคสในระยะ stationary phase ต่อการผลิตโปรตีเอส ใน *B. subtilis* TISTR 25 ซึ่งเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ pH 6.0 อุณหภูมิ 30°ซ เสริมด้วยกลูตาเมท (□—□) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และเติมกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2 เปอร์เซนต์ (100 มิลลิโมลาร์) (■—■) ที่เวลาการเจริญชั่วโมงที่ 14



รูปที่ 13 ผลของ rifampin ต่อการผลิตโปรตีเอส ใน B. subtilis TISTR 25 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ pH 6.0 อุณหภูมิ 30 °ซ เสริมด้วยกลูตาเมทความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยเติม rifampin ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ที่เวลาการเจริญชั่วโมงที่ 9

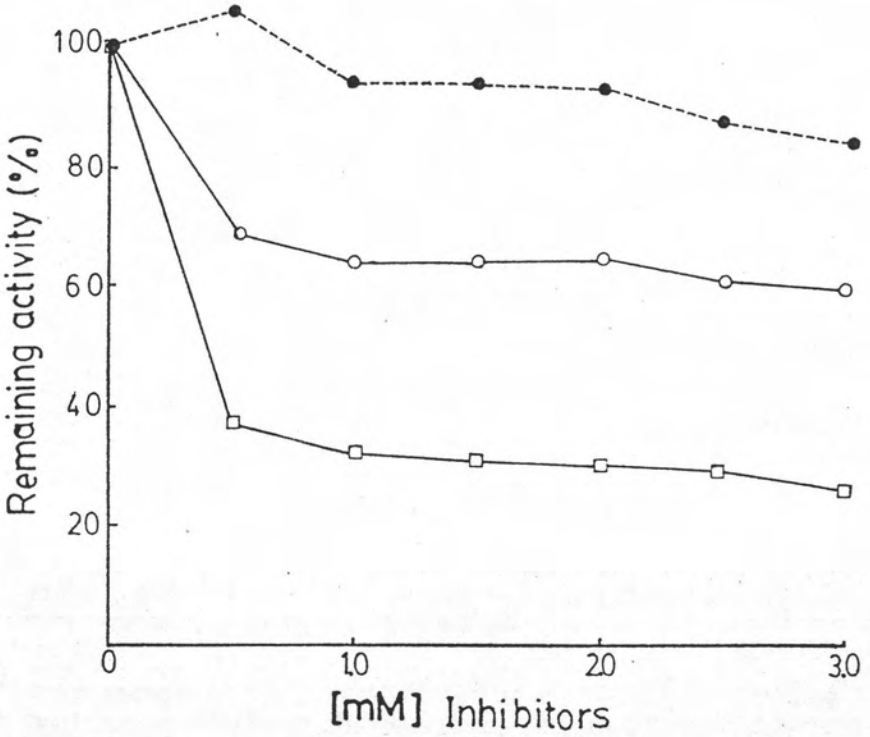
4.4.2 ผลของ EDTA และ PMSF

เลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 3.3.1 โดยเสริมด้วยสารต้นตอไนโตรเจนกลูตาเมท ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ศึกษาความเข้มข้นของ EDTA และ PMSF ต่อแอคติวิตีของโปรตีเอสในน้ำเลี้ยงเชื้อหลังจากตกตะกอนเซลล์แล้ว (รูปที่ 14) จะพบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 1 ถึง 3 มิลลิโมลาร์ ให้ผลในการยับยั้งได้ใกล้เคียงกัน และเพียงพอที่จะยับยั้งแอคติวิตีของโปรตีเอสได้ถึง 70 เปอร์เซนต์ ของแอคติวิตีทั้งหมด ขณะที่ PMSF ที่มีความเข้มข้น 1 ถึง 3 มิลลิโมลาร์ ก็มีผลในการยับยั้งได้ไม่แตกต่างกัน จะมีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงสุดประมาณ 40 เปอร์เซนต์ ของแอคติวิตีทั้งหมด

4.5 อัตราส่วนของการผลิตเมตัลและซีรีนโปรตีเอส

4.5.1 ผลของกลูโคส

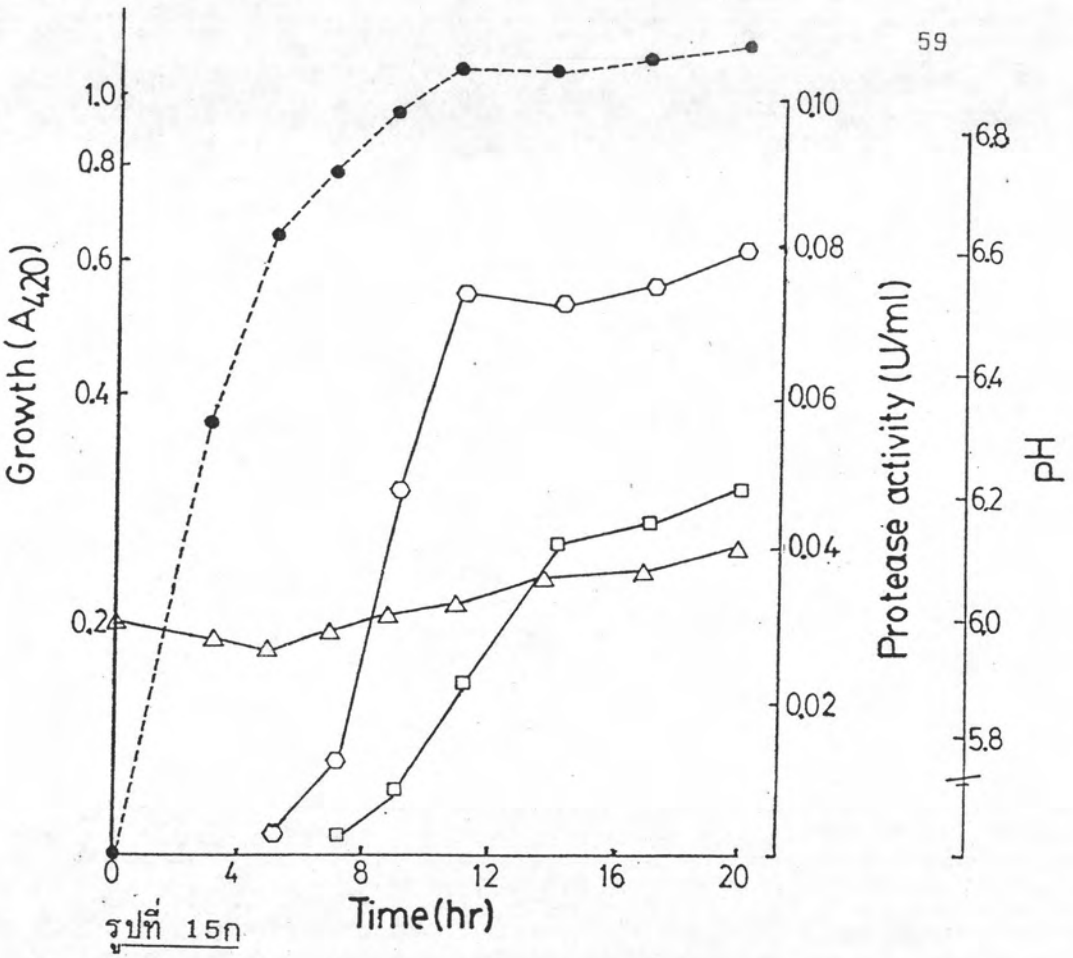
เลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ตามวิธีข้อ 3.3.1 โดยใช้สารต้นตอไนโตรเจน กลูตาเมท ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีและไม่มีกลูโคสความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ แล้วติดตามการเจริญ ค่าแอคติวิตีของโปรตีเอส ค่า pH และ ปริมาณของเมตัลและ ซีรีนโปรตีเอส ดังแสดงในรูปที่ 15 ก และ ข ผลของการเจริญ และแอคติวิตีเมื่อมีและไม่มีกลูโคส จะสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา ในข้อ 4.3.3 และมีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน ในค่าความเป็น กรด ด่าง ของน้ำเลี้ยง ที่พบว่าในการเสริมกลูโคสในน้ำเลี้ยงจะเป็นผลให้ค่า pH ของน้ำเลี้ยงลดลงจากจุดเริ่มต้นที่ pH 6.00 ในช่วงการเจริญ 4 ชั่วโมงแรก 0.04 หน่วยและหลังจากนั้นจนกระทั่งชั่วโมงที่ 20 ค่า pH ก็เพิ่มขึ้นโดยตลอด โดยมีค่าประมาณ 6.10 ที่เวลา 20 ชั่วโมง แต่กรณีไม่มีกลูโคสค่า pH สูงขึ้นถึงประมาณ pH 6.30 และพบว่าอัตราส่วนของเมตัลต่อซีรีนโปรตีเอส มีแนวโน้มลดลง ในกรณีที่เสริมด้วยกลูโคส เพราะปริมาณซีรีนโปรตีเอสไม่แตกต่างกันในทั้ง 2 กรณี แต่ปริมาณเมตัลโปรตีเอสจะต่ำกว่าเมื่อมีเฉพาะกลูตาเมท ดังนั้นในสภาวะที่มีกลูโคสจะมีผลอย่างชัดเจน ในการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของน้ำเลี้ยง และสอดคล้องกับช่วงเวลา ที่แอคติวิตีของโปรตีเอสต่ำ



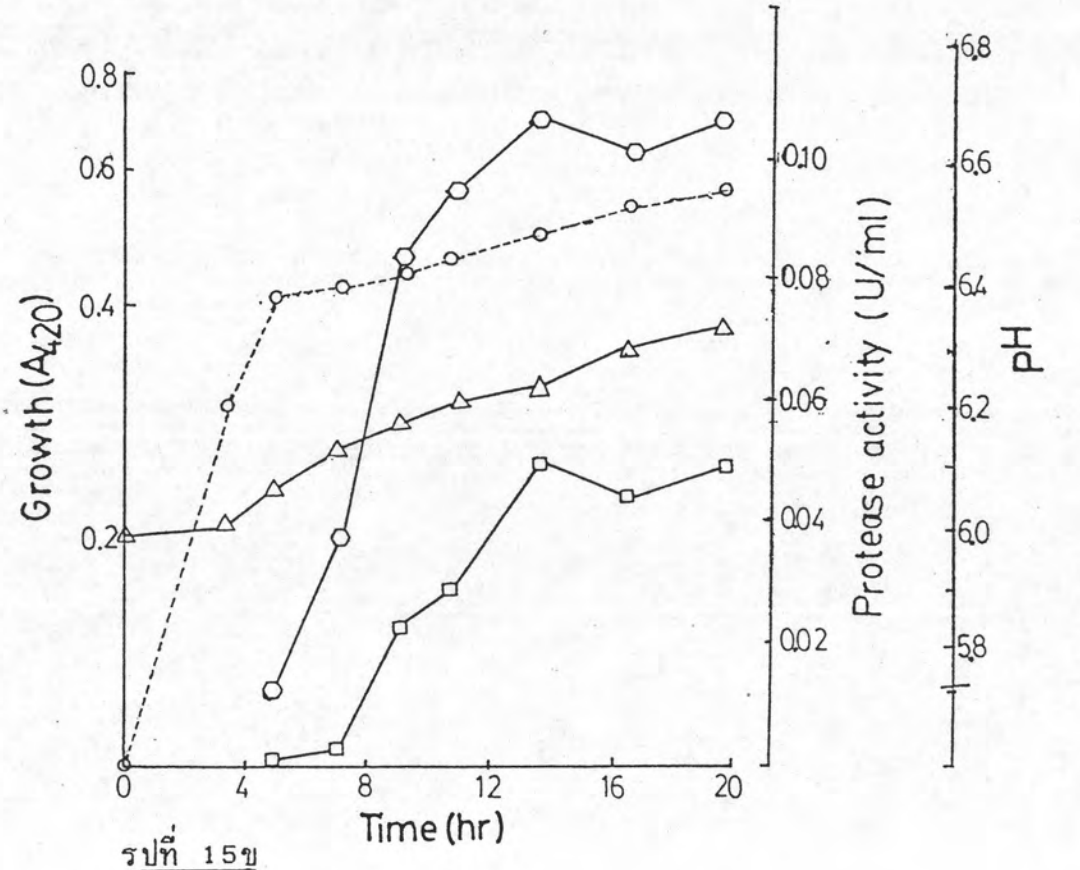
รูปที่ 14 ผลของ EDTA และ PMSF ต่อแอคติวิตีของโปรตีเอส ที่สกัดจาก B. subtilis TISTR 25 ซึ่งเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย กลูตาเมท 10 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 อุณหภูมิ 30°ซ เวลา 14-20 ชั่วโมง วัดการยับยั้งแอคติวิตีด้วยวิธีในข้อ 3.4.5 โดยแปรความเข้มข้นของ PMSF (O——O) และ EDTA (□——□) ดังระบุในรูป และแอคติวิตีเริ่มต้นของโปรตีเอสมีค่า 0.03 หน่วย/มล. เส้นประ (●----●) เป็นผลรวมของแอคติวิตีที่เหลืออยู่

รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ของการเจริญ (O---O), การเปลี่ยนแปลงค่า pH (△——△), ปริมาณโปรตีเอสชนิด เมตัลโปรตีเอส (O——O)และซีรีนโปรตีเอส (□——□) ตลอดช่วงการเจริญ 20 ชั่วโมงของ B. subtilis TISTR 25 ซึ่งเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ pH 6.0 อุณหภูมิ 30°ซ เสริมด้วยกลูตาเมทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และกลูโคส 15 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 15 ก) และไม่มีกลูโคส (รูปที่ 15 ข)

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสอง ทำโดยแบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อออกมาที่เวลาต่างๆ ตกตะกอนเซลล์ แล้วจึงนำส่วนน้ำใสมาวัดแอคติวิตีด้วยวิธีในข้อ 3.4.5



รูปที่ 15ก



รูปที่ 15ข

4.5.2 ผลของสารต้นตอไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 3.3.1 โดยใช้สารต้นตอไนโตรเจนต่างๆ 5 ชนิด พบว่าสารต้นตอไนโตรเจน กลูตาเมท แอสปาราจีน อาร์จินีน โพรลีน (ยกเว้นเคซีนไฮโดรไลเสท) จะมีผลให้อัตรส่วนของ เมตัล ต่อ ซีรีนโปรตีเอสที่เวลาการเจริญ 12 ชั่วโมง เป็น 1.50 และเมื่อเวลา 24 ชั่วโมงเป็น 1.20 โดยเฉลี่ยตามลำดับ (ตารางที่ 3) เคซีนไฮโดรไลเสท มีค่าแตกต่างออกไปเล็กน้อยคือ เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง จะมีค่า 1.28 และค่าที่ 24 ชั่วโมง ประมาณ 1.20 เท่ากับในสารต้นตอไนโตรเจนอื่นๆ ดังนั้นจากการทดลองนี้ค่าแอคติวิตีของเมตัลต่อ ซีรีนโปรตีเอส จะไม่แตกต่างกันในสารต้นตอที่สามารถมีผลให้ค่าแอคติวิตีรวมของโปรตีเอสไม่แตกต่างกัน ซึ่งจากผลการทดลองในรูปที่ 1 และ 2 จะพบว่าค่าแอคติวิตีรวมในทุกสารต้นตอไนโตรเจนดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกัน

4.6 ความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส กับเอนไซม์ในวิถีไนโตรเจน ใน B. subtilis TISTR 25

จากรูปที่ 16 ก จะพบว่าในการเลี้ยงเชื้อตามวิธีข้อ 3.4.2 สารต้นตอไนโตรเจน คือ กลูตาเมท,แอสปาราจีน,อาร์จินีน และเคซีนไฮโดรไลเสท เป็นสารต้นตอในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีและในปริมาณที่ไม่ต่างกัน ในขณะที่ แอคติวิตีของ GS,GOGAT และ GDH ค่อนข้างต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบในรูปที่ 16 ข ในสารต้นตอที่มีผลให้มีการผลิตโปรตีเอสในปริมาณต่ำ เช่นในอาหารเสริมกลูตาเมทผสมกลูโคส หรือในกลูโคสผสมแอมโมเนียจะยังผลให้แอคติวิตีของ GS,GOGAT และ GDH สูงขึ้น แสดงถึงความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันของโปรตีเอสแอคติวิตีและเอนไซม์ในวิถีไนโตรเจน เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของแอคติวิตีของ GS และ GOGAT เทียบกับ GDH ในทั้ง 2 กรณีนี้ จะเห็นว่า แอคติวิตีของ GS และ GOGAT เพิ่มขึ้นมากกว่าการเพิ่มของ GDH อย่างเห็นได้ชัด ผลการทดลองนี้ จึงสรุปได้ว่า วิถีที่สำคัญในการนำไนโตรเจนเข้าสู่ขบวนการเมแทบอลิซึมของ B. subtilis TISTR 25 น่าจะเป็นวิถีที่เร่งโดย GS - GOGAT มากกว่าวิถีที่เร่งโดย GDH

ตารางที่ 3 อัตราส่วนของ เมตัล ต่อ ซีรีน โปรตีเอส

N-Source	GROWTH (A_{420})		ACTIVITY RATIO (METAL:SERINE)	
	12 hrs.	24 hrs.	12 hrs.	24 hrs.
glutamate	0.671 ± 0.021	0.728 ± 0.032	1.56 ± 0.21	1.23 ± 0.17
proline	0.654 ± 0.020	0.796 ± 0.016	1.46 ± 0.26	1.17 ± 0.12
arginine	0.574 ± 0.017	0.551 ± 0.024	1.44 ± 0.27	1.16 ± 0.25
asparagine	0.601 ± 0.027	0.595 ± 0.009	1.56 ± 0.25	1.28 ± 0.06
casein hydrolysate	0.514 ± 0.014	0.565 ± 0.013	1.28 ± 0.18	1.24 ± 0.16

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการเจริญหรือแอคติวิตี ± S.D.จากผลการทดลอง 5 ครั้ง

รูปที่ 16 ก เปรียบเทียบผลของการผลิตโปรตีเอส (▨),กลูตามีน ซินเทส, ▥ ,กลูตาเมท ซินเทส (□) และกลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส (▦)เมื่อเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย กลูตาเมท, แอสปาราจีน อาร์จินีน ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์และเคซีนไฮโดรไลเสทความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์

รูปที่ 16 ข เปรียบเทียบผลของการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (▨), กลูตามีน ซินเทส (▥) กลูตาเมท ซินเทส (□) และ กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส (▦) เมื่อเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ในอาหารสูตรปรับต่ำ ที่เสริมด้วย กลูตาเมท ความเข้มข้น 10 และ 100 มิลลิโมลาร์, กลูตาเมท ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เสริมด้วยกลูโคส 15 มิลลิโมลาร์ หรือแอมโมเนียคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ หรือ ซิเตรท 15 มิลลิโมลาร์ และ กลูโคส ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์เสริมด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์

รูปที่ 16ก

รูปที่ 16ข