หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โปรตีเอส (Protease) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งการสลายโปรตีนเป็น กรดอะมิโน และเปปไทด์สายสั้นๆ เอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร ฟอกหนัง ผงซักฟอก (Ward,1983) เป็นต้น แหล่งของเอนไซม์โปรตีเอสที่สำคัญในระยะแรกของการศึกษา ได้จากพืชและสัตว์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากพืชและสัตว์ (Aunstrup,1983)

Application	Protease	Source
Cheese manufacture	Rennin	animal
Bating	Trypsin	animal
Chill haze prevention	Papain	plant
Meat tenderization	Papain	plant
Brewing	Malt protease	plant
Protein hydrolysis	Pancreatin	animal
	Pepsin	animal

ในระยะต่อมาได้พัฒนาแหล่งผลิตนอกเหนือจากพืชและสัตว์ โดยใช้จุลชีพซึ่งนับว่าเป็นแหล่งผลิตสำคัญ เนื่องจากเอนไซม์สามารถแยกออกมาได้ง่าย ได้เอนไซม์โปรตีเอส ที่มีความบริสุทธิ์สูงและต้นทุนการผลิตต่ำกว่า (Aunstrup, 1980) แบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิดสามารถผลิตโปรตีเอสได้ แต่มีเพียง 2-3 ชนิดเท่านั้นที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม ได้แก่

บาซิลลัสและรา Aspergillus เนื่องจากจุลชีพเหล่านี้สามารถขับเอนไซม์โปรตีเอสออกมาภายนอกเซลล์(Extracellular หรือ Exoenzyme) ในปริมาณที่สูงมีผู้ศึกษาถึงความสามารถในการผลิตของแบคทีเรีย ในสกุลบาซิลลัส (genus Bacillus) กันอย่างกว้างขวาง ดังในตารางที่ 2 (Priest, 1977)เพราะนอกจากขับเอนไซม์โปรตีเอสออกมาแล้ว ยังมีเอนไซม์อื่น ๆ ที่มีประโยชน์มากในทางอุตสาหกรรมถูกขับออกมาพร้อมกันอีกด้วย เช่น ใน Bacillus licheniformis พบว่านอกจากเอนไซม์โปรตีเอสแล้วจะขับ แอลฟา อะไมเลส (α-amylase), เพนิซิลินเนส (penicillinase) และ antibiotic bacitracin ออกมาด้วย (Coleman,1967) จากรายงานการสำรวจปริมาณการใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลชีพในปี 1981 ในอุตสาหกรรมต่างๆ พบว่ามีปริมาณการใช้เป็น 40 เปอร์เซนต์ของปริมาณเอนไซม์ทั้งหมด ที่มีการซื้อขายกันในตลาดโลก (Ward, 1983)

โปรตีเอสจากจุลชีพ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ตามกลไกพื้นฐานการเกิดปฏิกิริยา คือ

1. ซีรีนโปรตีเอส (serine protease)
2. เมตัลโปรตีเอส (metal protease or metal-chelator sensitive protease)
3. ไธออลโปรตีเอส (thiol protease)
4. แอซิดโปรตีเอส (acid protease)

เอนไซม์โปรตีเอสที่ถูกขับออกมาโดยสกุลบาซิลลัส ส่วนใหญ่เป็นซีรีนโปรตีเอส หรือเมตัลโปรตีเอส ซึ่งนับว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางการค้ามากที่สุด แบคทีเรียที่เป็นแหล่งของเอนไซม์อาจเป็น neutrophilic หรือ alkalophilic bacilli (Aunstrup, 1979; Horikoshi และ Akiba, 1982; Markland, 1971)

คุณสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอส

1. ซีรีนโปรตีเอส (serine protease) (EC. 3.4.21) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่

ตารางที่ 2 แบคทีเรียในสกุลบาซิลลัสที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่สำคัญ(Priest, 1977)

Species	Enzyme	Main characters of enzyme
B. amyloliquefaciens B. cereus B. licheniformis B. megaterium B. polymyxa B. subtilis B. subtilis var. amylosaccharitícus B. thuringinesis	Metal protease	Enzyme requires Ca^{2+} for stability and Zn^{2+} for activity, pH optimum at or near neutrality
B. amyloliquefaciens B. licheniformis B. pumilus B. subtilis B. subtilis var. amylosaccharitícus	Serine protease	alkaline pH optima, serine residue at or near the active site

ในช่วง 25,000-30,000 ดาลตัน โครงสร้างของเอนไซม์เป็นโปรตีนสายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโนซีรีน (serine) อยู่ที่บริเวณเร่ง (catalytic site) (Priest, 1977) ดังนั้นการเร่งปฏิกิริยาของมันจึงถูกยับยั้งโดยสารที่เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ซีรีนที่บริเวณเร่งเช่น di-isopropyl fluorophosphate (DFP) และ phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)ไอออนของโลหะไม่มีความจำเป็นต่อความเสถียรและการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มนี้(Priest, 1977) ดังนั้นสาร chelating agent เช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) จึงไม่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซีรีนโปรตีเอสจากจุลชีพมี esterase activity บ้างเล็กน้อย (Priest, 1977)คุณสมบัติที่สำคัญในการย่อยโปรตีนเหมือนเอนไซม์ที่ได้จากสัตว์ คือ trypsin และ chymotrypsin ซีรีนโปรตีเอสอาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าอัลคาไลน์โปรตีเอส (alkaline protease) เนื่องจากมีค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ค่า pH 9.0 ถึง 11.0 ซีรีนโปรตีเอสจากจุลชีพแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม(Priest, 1977) คือกลุ่ม A เป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรน้อยที่ค่า pH ต่ำกว่า 9.5 และมี esterase activity มากกว่าในกลุ่ม B ได้แก่เอนไซม์จาก B. licheniformis คือ subtilisin carlsberg และจาก B. pumilus และจากรายงานของปกรณ์(1989)พบว่า B. subtilis TISTR 25 ก็ผลิตซีรีนโปรตีเอสที่มีคุณสมบัติคล้ายกับกลุ่มนี้ ในขณะที่ กลุ่ม B ได้แก่เอนไซม์ subtilisin NOVO และ subtilisin BPN (Smith และคณะ, 1968)ซึ่งได้จาก B. amyloliquefaciens รวมทั้งเอนไซม์ซีรีนโปรตีเอสจาก B. subtilis Marburg และ B. subtilis SAC (Keay, 1972)

2. เมตัลโปรตีเอส (Metal protease)(EC.3.4.24)จัดเป็นเอนไซม์ประเภท endopeptidase (Matsubara และ Feder, 1971) มีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH เป็นกลางหรือค่อนข้างเป็นกลาง สาร chelating agent เช่น EDTA จะมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา เมตัลโปรตีเอสไม่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ esterase เมตัลโปรตีเอสจาก B. subtilis จะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 38,000-40,000ดาลตัน โดยทุกๆโมเลกุลของเอนไซม์จะประกอบด้วยสังกะสี (Zn) 1 กรัมอะตอม ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยา แคลเซี่ยม(Ca)จะมีผลทำให้เอนไซม์เมตัลโปรตีเอส มีความเสถียรมากขึ้น บาซิลลัสหลายชนิดสร้างเอนไซม์นี้ได้ เช่น B. subtilis, B. cereus, B. megaterium และ B. stereothermophilus

หรืออาจพบในเชื้อรา (fungi) เช่น Aspergillus oryzae ซึ่งเมตัลโปรตีเอสจะเกิดร่วมกับ acid protease และ serine protease

3. ไธออลโปรตีเอส (Thiol protease) (EC. 3.4.22) เป็นโปรตีเอสที่ได้จากพืชได้แก่ papain,ficin และ bromelain เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีหมู่ของ cysteine ที่ active site (Ward, 1983)

4. แอซิดโปรตีเอส (Acid protease) (EC. 3.4.23) เป็นเอนไซม์ที่มี acid residue ที่บริเวณ active site (Ward, 1983) แหล่งของเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ จุลินทรีย์สกุล Aspergillus และมักจะรวม rennets และ pepsin ซึ่งเป็น acid protease ที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเข้าในกลุ่มนี้ด้วย

การผลิตโปรตีเอสในจุลชีพ

การผลิตโปรตีเอสรวมกลไกการสังเคราะห์ตลอดจนถึงการขับเอนไซม์ออกจากเซลล์ ขั้นแรกจะเริ่มจาก mRNA ที่ถูกสร้างขึ้นมาจะเคลื่อนที่ไปจับกับไรโบโซม ซึ่งอยู่บริเวณผนังเซลล์เพื่อเริ่มสังเคราะห์เอนไซม์ ในระหว่างที่การสังเคราะห์กำลังดำเนินอยู่นั้น เอนไซม์ส่วนที่สร้างขึ้นแล้วจะผ่านผนังเซลล์ออกมา พร้อมกับการจัดโครงร่างโมเลกุลในระดับตติยภูมิ (tertiary structure) (Ward, 1983) Sander และ May (1975)ได้รายงานไว้ว่าการสังเคราะห์โปรตีเอสใน B. amyloliquefaciens นั้น เอนไซม์ที่ถูกขับออกมายังไม่ถูกปลดปล่อยอย่างสมบูรณ์ เป็นเอนไซม์ซึ่ง inactive และจะถูกย่อยโดย trypsin แล้วเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในรูป active form ในที่สุด

บาซิลลัสจะขับโปรตีเอสออกมาภายนอกเซลล์ ในช่วงการเจริญระยะ late exponential phase (Shaeffer, 1969; Dawson และ Kurz, 1969) เช่นเมื่อเลี้ยง B. subtilis Marburg ในอาหารสูตรอุดมหรือกลูตาเมทเสริมกับซิเตรท จะไม่สามารถวัดโปรตีเอสที่ถูกขับออกมาในช่วงการเจริญ log phase ได้ (Millet, 1970; Prestidge, 1971) แต่พบเอนไซม์เมื่อสิ้นสุดการเจริญ log phase ซึ่งเป็นระยะเริ่มมีการสร้างสปอร์ ในการวิเคราะห์ปริมาณของเมตัลและซีรีนโปรตีเอสที่ถูกขับออกมาโดย B. amyloliquefaciens

และ B. subtilis SAC พบว่ามีปริมาณของซีรีนโปรตีเอสมากกว่าเล็กน้อย (Uehara และคณะ, 1974) ส่วนใน B. subtilis NAT จะขับเมตัลโปรตีเอสออกมาเป็นส่วนใหญ่ ความแตกต่างของอัตราส่วนของเมตัลต่อซีรีนโปรตีเอสนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากองค์ประกอบในน้ำเลี้ยง(Priest, 1977)ใน B. megaterium ซึ่งขับเมตัลโปรตีเอสเป็นส่วนใหญ่เมื่อเลี้ยงใน minimal medium เอนไซม์จะถูกขับออกมาตลอดช่วงการเจริญ แต่เมื่อเลี้ยงใน complex medium เอนไซม์จะถูกกดดันระหว่างช่วงการเจริญในระยะ log phase โดยจะเริ่มสร้างในช่วงก่อนการสร้างสปอร์ (Priest, 1977)

การควบคุมการสังเคราะห์โปรตีเอส

การผลิตโปรตีเอสใน บาซิลลัส นั้นมีขบวนการควบคุมที่สำคัญ อยู่ที่ระดับการถอดรหัสของจีนส์ที่เกี่ยวข้อง(transcriptional control) Both และคณะ (1972)ได้รายงานว่า B. amyloliquefaciens จะสังเคราะห์และขับเมตัลโปรตีเอสในน้ำเลี้ยง ที่มีความเข้มข้นของกรดอะมิโนต่ำ แต่ในน้ำเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของกรดอะมิโนสูง จะกดดันการสังเคราะห์และขับโปรตีเอสที่ระดับการสร้าง mRNA ในการศึกษาขบวนการสังเคราะห์โปรตีเอสโดยใช้สารยับยั้ง rifampin และ actinomycin D ซึ่งเป็นตัวยับยั้งจำเพาะสำหรับการสังเคราะห์ RNA และ chloramphenicol เป็นตัวยับยั้งสำหรับขบวนการ translation พบว่าการยับยั้งจะเกิดขึ้นหลังจากที่เริ่มเติม rifampin ลงในน้ำเลี้ยง ประมาณ 80 นาที สาเหตุที่การยับยั้งไม่เกิดขึ้นในทันทีที่เติมตัวยับยั้งเนื่องจากยังมี mRNA ที่ถูกสะสมอยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่งยังสามารถทำการสังเคราะห์โปรตีเอสต่อไปได้ และเมื่อเติม chloramphenicol ที่ 100 ไมโครกรัม/มล. จะสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีเอสได้อย่างสมบูรณ์ (Both และคณะ, 1972; Coleman, 1967) mRNA ที่ถูกสังเคราะห์ในช่วงการเจริญ exponential phase ของ B. amyloliquefaciens จะมีประมาณ 3 เปอร์เซนต์ ของ mRNA ทั้งหมดในเซลล์ และเมื่ออัตราการเจริญลดลง การสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุด mRNA ทั้งหมดจะมีปริมาณสูงเป็น 2 เท่าของในช่วงการเจริญระยะ exponential phase mRNA ที่ถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้นเป็นส่วนที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนภายนอกเซลล์(exoprotein)เป็นส่วนใหญ่ (Brown

และ Coleman, 1975a)

กลไกการควบคุมการสร้างโปรตีเอสที่ระดับ transcription ดังกล่าวมีผลเนื่องมาจากการควบคุม 2 แบบ ที่สำคัญได้แก่ environmental control และ genetic control (Priest, 1977)

การควบคุมทางสภาวะแวดล้อม (Environmental control)

การเปลี่ยนแปลงสารอาหารเป็นการเปลี่ยนแปลงในสภาวะแวดล้อม ซึ่งมีผลให้เกิดการควบคุม 3 ขบวนการสำคัญกล่าวคือ

1. Catabolite repression เป็นการกดดันจีนส์ ที่มีหน้าที่สร้างเอนไซม์ไม่ว่าจะเป็นชนิด inducible หรือ constitutive enzyme เนื่องจากมีกลูโคสหรือสารต้นตอคาร์บอนใดๆ ที่สามารถถูกเมแทบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็ว เช่น ใน B. licheniformis กลูโคสจะมีผลในการกดดัน(repress)การผลิตโปรตีเอส โดยที่ระดับของการกดดันจะขึ้นอยู่กับปริมาณกลูโคสในน้ำเลี้ยง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสจะเพิ่มการกดดันโปรตีเอส(Hanlon และคณะ, 1982) จากรายงานการทดลองใน B. licheniformis NIRB 8874 เมื่อใช้กลูโคสหรือกลีเซอรอลเป็นสารต้นตอคาร์บอน จะมีผลให้มีอัตราการเจริญสูง แต่การผลิตโปรตีเอสในช่วงการเจริญระยะ exponential phase ต่ำมาก เมื่อเทียบกับการใช้สารต้นตอคาร์บอนที่เป็น ซิเตรท หรือ ไพรูเวท ซึ่งมีผลให้อัตราการเจริญที่ต่ำกว่า แต่สามารถผลิตโปรตีเอสออกมาในปริมาณที่สูงกว่า (Schaeffer และคณะ, 1965; Laishley และ Bernlohr, 1968) Coleman (1967) ได้รายงานว่าเมื่อเลี้ยง B. subtilis ในน้ำเลี้ยงที่มีสารต้นตอคาร์บอน เป็น มอลโตส, แป้ง หรือ กลีเซอรอล จะมีการผลิตโปรตีเอสปริมาณต่ำในช่วงการเจริญ exponential phase แต่จะมีปริมาณสูงในช่วงการเจริญคงที่ (stationary phase) นอกจากนี้ยังพบว่า การกดดันการผลิตโปรตีเอสโดยสารคะแทบอไลต์นั้น ถ้าเมื่อใดก็ตามในน้ำเลี้ยงมีกรดอะมิโน(ซึ่งมีผลไปกดดันการผลิตโปรตีเอสได้เช่นกัน) ในปริมาณความเข้มข้นสูงๆ ผลการกดดันของสารคะแทบอไลต์จะเกิดได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อใดก็ตามที่กรดอะมิโนมีความเข้มข้นต่ำ สารคะแทบอไลต์หรือกลูโคสจะมีผลน้อยหรือไม่มีผลในการกดดันเลย (Hanson และคณะ, 1964)

ในการศึกษาสายพันธุ์ B. subtilis Marburg เมื่อเลี้ยงในกลูโคส และกลูตาเมทพบว่า นอกจากโปรตีเอสถูกกดดันแล้ว aconitase ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) และมีความสำคัญในขบวนการสร้างสปอร์ก็ถูกกดดันด้วย จึงเป็นผลให้การสร้างสปอร์ถูกกดดันขณะที่มีกลูโคสในน้ำเลี้ยง แต่เมื่อการเจริญเข้าสู่ช่วง late exponential phase การใช้กลูโคสหมดลงจึงเกิดขบวนการยกเลิกการกดดัน(derepress) การสร้างสปอร์ และขับโปรตีเอสพร้อมๆกัน (Hanson และคณะ, 1964)

ในการศึกษาสารตัวกลาง (effector) สำคัญที่ไปมีผลที่ระดับจีนส์เมื่อเกิดการควบคุมการสร้างโปรตีเอสโดยขบวนการ catabolite repression นั้นพบว่า cAMP และ cGMP อาจไม่มีบทบาท ซึ่งต่างกับการสังเคราะห์ exoenzyme ใน E. coli ที่พบว่าเมื่อเพิ่มกลูโคสเซลล์มีการเจริญดี ระดับ cAMP จะต่ำ แต่เมื่อกลูโคสลดลงปริมาณ cAMP สูงขึ้น จะไปช่วยทำให้ RNA polymerase จับจีนส์ส่วนที่สนับสนุนการสังเคราะห์เอนไซม์ได้ดีขึ้น มีผลไปยกเลิกการกดดัน (derepression) การถอดรหัสของ mRNA ที่จำเป็นสำหรับ exoenzyme (Priest, 1977) แต่เนื่องจากในสกุลบาซิลลัสไม่สามารถวัดปริมาณ cAMP ในเซลล์ได้(Priest,1977) ในขณะเดียวกันก็ไม่พบ adenyl cyclase และ cyclic AMP phosphodiesterase ซึ่งจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์และสลาย cAMP เมื่อตรวจวัดใน B. licheniformis และ B. subtilis (Bernlohr และ Maddox, 1974; Ide, 1971) ส่วน cGMP นั้นแม้ว่าจะพบ ใน B. licheniformis แต่มีปริมาณต่ำกว่าที่พบใน E. coli ประมาณ 5 เท่า และปริมาณ cGMP จะเป็นสัดส่วนผกผันกับอัตราการเจริญเช่นเดียวกับ cAMP สรุปได้ว่าไม่มีหลักฐานยืนยันแน่นอนว่า cGMP เป็นสารตัวกลางสำคัญของขบวนการควบคุมแบบ catabolite repressionใน B. licheniformis (Bernlohr และคณะ, 1974) ส่วนใน E. coli cGMP จะมีผลไปยับยั้งที่ระดับ transcription ของ mRNA ที่จำเป็นสำหรับสังเคราะห์ β- galactosidase (Emmer และคณะ, 1970; Zubay และคณะ, 1970)

นิวคลีโอไทด์ชนิดอื่นที่มีรายงานว่า อาจเกี่ยวข้องกับคะแทบอไลต์รีเพรสชัน ได้แก่ nucleotide ที่ถูก phosphorylate ในปริมาณสูง เช่น ppGpp (guanosine tetra phosphate)(Rhaese และคณะ, 1975, 1976) แต่ผลจากการทดลองของ Dowdsและคณะ (1978) พบว่ามิวแตนท์ที่ไม่สามารถสร้างนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ ยังคงแสดงสมบัติเหมือนสายพันธุ์

ปกติ (wild type) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส ดังนั้นกลไกในระดับโมเลกุลของปรากฏการณ์ catabolite repression ในบาซิลลัส จึงไม่เป็นที่สรุปได้แน่ชัด

2. End product repression เกิดขึ้นเนื่องจากผลผลิต ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ คือ กรดอะมิโน หรือ เปปไทด์ในน้ำเลี้ยง มีผลไปกดดันการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส (Ward, 1983) สารต้นตอไนโตรเจน คือกรดอะมิโนหรือเปปไทด์แต่ละชนิดมีผลไปกดดันจีนส์ ในการสังเคราะห์และขับเอนไซม์โปรตีเอสได้แตกต่างกัน กรดอะมิโนชนิดเดียวกันแต่ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ผลของการกดดันก็จะไม่เท่ากันด้วย(Coleman, 1967) นอกจากนี้ผลของกรดอะมิโน ในการกดดันในต่างสกุลบาซิลลัสก็ต่างกันไป เช่น B. amyloliquefaciens จะสังเคราะห์โปรตีเอสเมื่อเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มี casein hydrolysate ความเข้มข้นต่ำ (0.25 มก./มล.) แต่จะถูกกดดันการสังเคราะห์โปรตีเอส เมื่อเลี้ยงในน้ำเลี้ยงที่มี casein hydrolysate ความเข้มข้นสูง (0.5 มก./มล.) (May และ Elloitt, 1968) การกดดันจีนส์เนื่องมาจากกรดอะมิโน ที่มีความเข้มข้นสูงพบว่า กรดอะมิโนไปกดดันการสังเคราะห์ mRNA ซึ่งจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีเอส(Both และคณะ, 1972) ใน B. megaterium การขับโปรตีเอสถูกกดดันอย่างสมบูรณ์โดยการเติม casamino acid 2 เปอร์เซนต์ ในน้ำเลี้ยง (May และ Elliott, 1968) และกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีผลต่อการกดดันได้แตกต่างกัน คือ ไอโซลูซีน และ ทรีโอนีน จะมีผลในการกดดันสูงสุด

ในการศึกษาผลของสารต้นตอคาร์บอน และ สารต้นตอไนโตรเจนต่อการขับเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ของ B. subtilis NRRL-B3441 พบว่าสารต้นตอไนโตรเจน จะมีผลมากต่อการสร้างและขับซีรีนและเมตัลโปรตีเอส ในขณะที่สารต้นตอคาร์บอนจะมีผลมากต่อการสร้างและขับ แอลฟา อะไมเลส (α-amylase) (Heineken และ O'Connor, 1972)

สำหรับกลไกการควบคุมไนโตรเจนเมแทบอลิซึม ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น E. coli และ B. subtilis นั้นมีสารตัวกลางเป็น ppGpp และ pppGpp (guanosine pentaphosphate) หรือเรียกว่า magic spot (MS) โดยเริ่มแรกมีการศึกษาใน E. coli K12 (Priest, 1977) พบว่าทั้ง ppGpp (MS I) และ pppGpp (MS II) จะถูกสะสมมากขึ้น ในช่วงการเจริญที่น้ำเลี้ยงเชื้อขาดแคลนกรดอะมิโน โดยไม่จำเพาะกับกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งโดยเฉพาะ ในการทดลองในหลอดทดลองพบว่า ppGpp เข้าทำปฏิกิริยากับ

RNA polymerase ทำให้ไม่สามารถไปจับกับ operons ของ ribosomal RNA ในขณะ pppGpp ที่มีความเข้มข้นในระดับเดียวกันไม่มีผลในการยับยั้ง(Cashel และคณะ, 1970)การศึกษาใน B. subtilis พบว่า pppGpp มีปริมาณสูงกว่า ppGpp แต่ใน E. coli มี ppGpp สูงกว่า pppGpp ประมาณ 3 เท่า สำหรับใน B. subtilis นี้มีรายงานว่านิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ชนิด ไม่มีส่วนในการควบคุมการสร้างสปอร์ (Priest, 1977)แต่ในบทบาทควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ยังไม่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางนัก

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างโปรตีเอส และการสร้างสปอร์มีรายงานว่าการสร้างเอนไซม์ใน TCA cycle ถูกกดดันโดยสารต้นตอไนโตรเจน เช่น กลูตาเมท หรืออาร์จินีน ได้อีกด้วย ส่วนไลซีน จะกดดันได้เล็กน้อย ขณะที่แอสปาราจีน ไม่มีผลในการกดดัน (Ramos และคณะ, 1962; Hanson และคณะ, 1964) มีผู้เสนอแนวคิดว่ากลูตาเมทและอนุพันธุ์ของกลูตาเมทจะมีผลร่วมกดดันการสร้างเอนไซม์ใน TCA cycle (Freundlich และคณะ, 1962)จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การกดดันการสร้างโปรตีเอสและสร้างสปอร์เกิดขึ้นพร้อมกัน และด้วยสารกดดันตัวเดียวกัน Kawamura และ Doi (1984) พบว่า B. subtilis ซึ่งขาดจีนส์สำหรับสังเคราะห์เมตัลและซีรีนโปรตีเอส สามารถสร้างสปอร์ได้ตามปกติ จึงแสดงอย่างแน่ชัดว่าโปรตีเอสทั้ง 2 ชนิด ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ แต่อาจมีจีนส์บางส่วนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีเอส เกี่ยวข้องหรือมีบทบาทร่วมกับจีนส์ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสร้างสปอร์

3. End product inhibition เป็นแบบแผนการยับยั้งอัตราเร่งของเอนไซม์ด้วยผลิตภัณฑ์สุดท้ายของวิถี อาจมีกลไกเป็นแบบป้อนกลับ (feedback - inhibition) ปฏิกิริยาที่ถูกควบคุมมักจะเป็นปฏิกิริยาแรก (first reaction) หรือปฏิกิริยาที่ branched point ของวิถีอะนาบอลิซึม (Stryer, 1981)

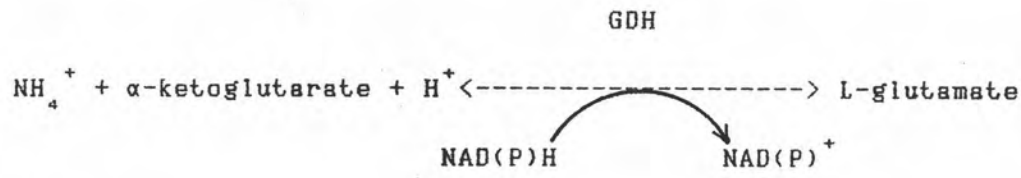
การควบคุมทางพันธุกรรม (Genetic control)

การควบคุมการผลิตโปรตีเอสในสกุลบาซิลลัสนั้น นอกจากขึ้นอยู่กับสภาวะการเลี้ยง (environmental control) แล้วยังขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของสายพันธุ์(genetic control)

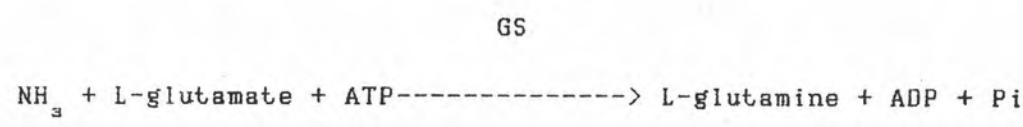
กล่าวคือจีนส์ (genes) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีเอสต่างกันเช่นใน B. subtilis NAT จะผลิตโปรตีเอสมากกว่า B. subtilis 6160 15-20 เท่า ซึ่งปริมาณที่แตกต่างกันเนื่องมาจากเมตัลโปรตีเอส ที่ถูกสร้างและขับออกมาในปริมาณที่สูงกว่าโดย B. subtilis NAT นั่นเอง (Uehara และคณะ, 1974) อัตราส่วนของเมตัลโปรตีเอสต่อซีรีนโปรตีเอสใน B. subtilis 6160 เป็น 1.1 ในขณะที่อัตราส่วนใน B. sutilis NAT เป็น 13.0โดยที่คุณสมบัติของซีรีนโปรตีเอสและเมตัลโปรตีเอสของบาซิลลัสทั้ง 2 ชนิด เหมือนกันทุกประการ (Uehara และคณะ, 1974) ในการทำ tranformationโดยนำ DNA จาก B. subtilis NAT ไปใส่ให้กับ B. subtilis 168 พบว่า B. subtilis 168 สามารถผลิตโปรตีเอสได้ในระดับเดียวกับ B. subtilis NAT โดยมีเมตัลโปรตีเอสในปริมาณสูงเช่นกัน(Ueharaและคณะ, 1974)

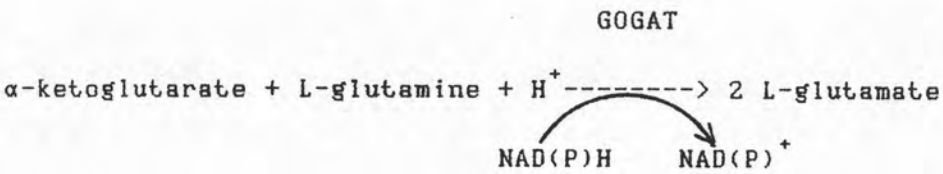
จากข้อมูลเบื้องต้นจึงใช้เป็นแนวทางการศึกษาวิจัยสภาวะการเลี้ยง Bacillus subtilis TISTR 25 ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศไทย และเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกที่มีผลต่อการผลิตโปรตีเอสในปริมาณสูง โดยศึกษาผลของสารต้นตอ คาร์บอน และ ไนโตรเจน ต่อการเจริญและการผลิตโปรตีเอส และทำการศึกษาต่อไปจนถึงวิถีการใช้ไนโตรเจน เมื่อทำการเลี้ยงในสารต้นตอต่างๆ แล้ววัดปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ กลูตามีน ซินเทส (glutamine synthase; GS),กลูตาเมท ซินเทส (glutamate synthase; GOGAT) และ กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส (glutamate dehydrogenase; GDH)ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นตัวเร่งที่สำคัญเพื่อนำสารต้นตอไนโตรเจนนั้นไปเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่จำเป็นต่อเซลล์เช่น กรดนิวคลีอิก โปรตีน เป็นต้น (Tyler, 1978) การทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ ในขบวนการนำแอมโมเนียเข้าสู่เซลล์ (ammonium assimilation) เพื่อเข้าสู่ขบวนการเมแทบอลิซึมต่อไป มีอยู่ 2 วิถี กล่าวคือ

1. เร่งปฏิกิริยาโดย กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส (GDH)



2. กลูตามีน ซินเทส (GS) เป็นตัวเร่งควบคู่ไปกับ กลูตาเมท ซินเทส (GOGAT)





ถ้าในน้ำเลี้ยงมีแอมโมเนียในปริมาณสูง จุลชีพส่วนใหญ่ใช้วิถีซึ่งเร่งโดย GDH แต่ในสภาวะที่น้ำเลี้ยงมีปริมาณแอมโมเนียจำกัด หรือความเข้มข้นต่ำ หรือเมื่อใช้ nitrate หรือ N_2 เป็นสารต้นตอไนโตรเจน จุลชีพมักใช้วิถี GS-GOGAT เนื่องจาก GS มีค่า Km สำหรับ NH^+_4 ต่ำกว่า GDH (Karamori และคณะ, 1987) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ในสภาวะที่มีแอมโมเนียเป็นสารต้นตอ B. subtilis 168 สามารถสร้าง กลูตามีน ซินเทส (GS) ได้และ L-glutamine ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาซึ่งเร่งด้วย กลูตามีน ซินเทส สามารถกดดันการสร้างเอนไซม์นั้นได้ แต่ถ้ามี กลูตาเมทในน้ำเลี้ยง กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส จะช่วยเร่งการสลาย กลูตาเมท (Kane และคณะ, 1981) ในวิถีกลูตามีน ซินเทส และกลูตาเมท ซินเทส

เอนไซม์ เร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยแหล่งพลังงานจาก ATP และ NADPH ในขณะที่ กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส อาศัยแหล่งพลังงานจากตัวขนส่งอิเลกตรอนคือ NADPH เพียงอย่างเดียว ความเข้าใจถึงวิถีการใช้ไนโตรเจนและความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ ในวิถีไนโตรเจนกับเอนไซม์โปรตีเอส อาจช่วยให้สามารถควบคุมการสังเคราะห์โปรตีเอส ใน B. subtilis TISTR 25 ต่อไป

ในการศึกษานี้จุดมุ่งหมายอีกประการหนึ่งคือศึกษาถึงอัตราส่วนของ ซีรีนโปรตีเอสต่อเมตัลโปรตีเอสในสารต้นตอต่างๆเพื่อเป็นแนวทางในการเลือกสภาวะการผลิตโปรตีเอสให้เกิดประโยชน์ต่อการนำเอนไซม์ไปใช้งานได้อย่างเหมาะสมต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในสารต้นตอไนโตรเจนต่างชนิด
2. เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในสารต้นตอคาร์บอนต่างชนิด
3. ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณเอนไซม์ กลูตามีน ซินเทส กลูตาเมท ซินเทส กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส กับ ปริมาณการขับเอนไซม์โปรตีเอสออกมาภายนอกเซลล์
4. หาอัตราส่วนของปริมาณซีรีนโปรตีเอส ต่อเมตัลโปรตีเอสเมื่อมีสารต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนแตกต่างกัน