ผลของสารต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจน ต่อการผลิตโปรตีเอส และเอนไซม์ในไนโตรเจน เมแทบอลิซึม ของ บาซิลลัส สับติลิส TISTR 25

นาย สนธยา ศรีเมฆ

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2533

ISBN 974-577-803-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016699

i 10312110

EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON PROTEASE PRODUCTION AND SOME NITROGEN METABOLIC ENZYMES IN *BACILLUS SUBTILIS* TISTR 25

Mr. Sontya Srimake

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1990

ISBN 974-577-803-6

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารต้นตอคาร์บอน และไนโตรเจน ต่อการผลิตโปรตีเอสและเอนไซม์ในไนโตรเจนเมแทบอลิซึมของ<u>บาซิลลัส สับติลิส</u> TISTR 25
โดย	นาย สนธยา ศรีเมฆ
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. สุกัญญา สุนทรส)

สนธยา ศรีเมฆ : ผลของสารต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตโปรตีเอสและเอนไซม์ในไนโตรเจนเมแทบอลิซึมของ บาซิลลัส สับติลิส TISTR 25 (EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON PROTEASE PRODUCTION AND SOME NITROGEN METABOLIC ENZYMES IN BACILLUS SUBTILIS TISTR 25) อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. พีรดา มงคลกุล , รศ.ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ , 86 หน้า.
ISBN 974-577-803-6

ในการเลี้ยง Bacillus subtilis TISTR 25 ในอาหารสูตรปรับต่ำ pH 6.0 อุณหภูมิ 30 °ซ และเสริมด้วยสารต้นตอไนโตรเจน พบว่า กลูตาเมท แอสปาราจีน อาร์จินีนโพรลีน และ เคซีนไฮโดรไลเสท มีผลให้การเจริญและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสสูงกว่าในกลุ่มอื่นๆ ที่ศึกษา ส่วนสารต้นตอคาร์บอนเช่น ซิเตรทและซัคซิเนท พบว่ามีบทบาทหรือ ความสำคัญต่อการผลิตโปรตีเอสน้อยกว่ากลุ่มของสารต้นตอไนโตรเจน และพบว่าสารต้นตอคาร์บอนเหล่านี้ รวมทั้งกลูโคส เมื่อเสริมในน้ำเลี้ยงร่วมกับกลูตาเมท ยังมีผลไปลดการผลิตโปรตีเอสโดยขบวนการแคแทบอไลท์รีเพรสชันอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า กรดอะมิโนที่มีความเข้มข้นสูงพอเหมาะ เช่น เคซีนไฮโดรไลเสทที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 0.5 เปอร์เซนต์ และกลูตาเมทที่ความเข้มข้นสูงกว่า 100 มิลลิโมลาร์ ก็สามารถลดการผลิตโปรตีเอสได้ ในการศึกษาผลของกรดอะมิโนผสมและกรดอะมิโนเดี่ยว ต่อการผลิตโปรตีเอสพบว่า กรดอะมิโนผสมสามารถสนับสนุนการเจริญ และค่าแอคติวิตีของโปรตีเอสได้สูงกว่ากรดอะมิโนเดี่ยวอย่างชัดเจน เมื่อศึกษาผลของกรดอะมิโนเดี่ยวแต่ละชนิดพบว่า ในกรณีที่ใช้ กลูตาเมทแอสปาราจีน โพรลีน หรือเคซีนไฮโดรไลเสท จะมีผลให้เชื้อผลิตโปรตีเอสในปริมาณเท่าๆกัน และยังเป็นผลให้อัตราส่วนของ ซีรีนต่อเมตัลโปรตีเอสที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกันอีกด้วย

การศึกษาโดยใช้สารยับยั้ง rifampin และการเปรียบเทียบผลจากการเติมกลูโคสที่ช่วงการเจริญต่างกัน ทำให้สันนิษฐานได้ว่า การควบคุมการผลิตโปรตีเอส ของ Bacillus subtilis TISTR 25 น่าจะเกิดขึ้นที่ระดับการถอดรหัสของจีนส์ที่เกี่ยวข้อง

เนื่องมาจากสารต้นตอไนโตรเจน มีอิทธิพลต่อการผลิตโปรตีเอสมากกว่าสารต้นตอคาร์บอน จึงได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการผลิตโปรตีเอส กับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีไนโตรเจน พบว่าวิถีที่เร่งโดย GS-GOGAT มีความสำคัญในการนำสารต้นตอไนโตรเจน เข้าสู่ขบวนการเมแทบอลิซึม มากกว่าวิถีที่เร่งโดย GDH และการผลิตโปรตีเอสมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับแอคติวิตีของเอนไซม์ GS และ GOGAT

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา ๒๕๓๒

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

SONTYA SRIMAKE : EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON PROTEASE PRODUCTION AND SOME NITROGEN METABOLIC ENZYMES IN BACILLUS SUBTILIS TISTR 25 THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. PEERADA MONGKOLKUL, Ph.D., ASSOC. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D., 86 pp. ISBN 974-577-803-6

A chemical defined medium at pH 6.0 , 30 °C , supplemented with nitrogen sources was more effective than that with carbon sources in increasing growth and specific activity of protease of B. subtilis TISTR 25. Glutamate , asparagine , arginine , proline , and casein hydrolysate were good nitrogen sources , whereas citrate and succinate were good carbon sources. These carbon sources including glucose , when supplemented with glutamate , decreased protease production through the process of catabolite repression. It was also found that high concentration of amino acids such as casein hydrolysate , at concentration higher than 0.5 percent, and glutamate , at concentration higher than 100 mM , were also able to decrease protease production. Moreover ,growth and protease activity in amino acid mixtures were higher than when cultured in single amino acid . Glutamate , asparagine , proline , and casein hydrolysate were comparable when using as nitrogen sources for the ability to induce protease and also for the production ratio of serine to metal protease.

Studies of rifampin inhibitor and the effect of adding glucose at different growth phases suggest that the control of protease production in B. subtilis TISTR 25 should be at the transcriptional level.

Due to the high influence of nitrogen source on protease production, the relationship between activities of protease and enzymes in nitrogen metabolism was studied. The results indicate that the pathway catalyzed by GS-GOGAT was more important than the GDH pathway in nitrogen metabolism. In addition ,protease production was inversely related to GS and GOGAT activities.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา ๒๕๓๘ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิรดา มงคลกุล ที่ได้ให้ความกรุณา เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ในภาควิชาชีวเคมี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล รองศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ อาจารย์ ดร.สุกัญญา สุนทรส ที่กรุณาให้คำแนะนำต่อผู้เขียน รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้อำนวยการกองงานวิทยาลัยพยาบาล อาจารย์ชุมศรี ชำนาญพูด ผู้อำนวยการวิทยาลัยพยาบาลราชบุรี ที่กรุณาสนับสนุนให้ลาศึกษาต่อจนสำเร็จการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา คุณยุทธ ศรีเมฆ คุณทองสุข ศรีเมฆ ที่ให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนเงินระหว่างการศึกษา

ขอขอบคุณ คุณปริศนา หนูเอี่ยม ที่ช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ขอขอบคุณนิสิตหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต และดุษฎีบัณฑิต ในภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยี ชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ฏ

คำย่อ..... ฒ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 ครุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์

2.1 ครุภัณฑ์..... 14

2.2 เคมีภัณฑ์..... 15

2.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 16

3 วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย..... 17

3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 20

3.3 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย..... 21

3.4 การแยกเอนไซม์โปรตีเอส..... 22

3.5 การเตรียมเซลล์และการแยกเอนไซม์กลูตามีน ซินเทส (GS) กลูตาเมท ซินเทส (GOGAT) และกลูตาเมท ดีไฮโดรจิเนส (GDH) 22

3.6 วิธีการหาแอคติวิตีของเอนไซม์..... 22

3.7 การหาอัตราส่วนของซีรีน และ เมตัลโปรตีเอส..... 25

3.8 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry, 1959)..... 25

4 ผลการทดลอง

4.1 ผลของสารต้นตอไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญและการผลิตโปรตีเอสใน B. subtilis TISTR 25..... 27

4.2 ผลของสารต้นตอคาร์บอนชนิดต่างๆต่อการเจริญ และ การผลิตโปรตีเอส ใน B. subtilis TISTR 25..... 43

4.3 การเจริญ และ การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของ B. subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงด้วยสารต้นตอคาร์บอนชนิดต่างๆเสริมกับกลูตาเมท..... 43

4.4 ผลของสารยับยั้งต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตโดย B. subtilis TISTR 25..... 53

4.5 อัตราส่วนของการผลิตเมตัลและซีรีนโปรตีเอส..... 56

4.6 ความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์ โปรตีเอสกับเอนไซม์ในวิถีไนโตรเจน ใน B. subtilis TISTR 25..... 60

5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 64

เอกสารอ้างอิง..... 75

ภาคผนวก..... 83

กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี..... 84

กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแกรมมากลูตามิล ไฮดรอกซามิกแอซิด..... 85

ประวัติผู้เขียน..... 86

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 การใช้เอนไซม์โปรติเอสจากพืชและสัตว์..... 1

2 แบคทีเรียในสกุลบาซิลลัสที่มีการสร้างและขับเอนไซม์ที่สำคัญ..... 3

3 อัตราส่วนของเมตัลต่อซีรีนโปรตีเอส..... 61

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1ก	เปรียบเทียบการเจริญของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอไนโตรเจน กลูตาเมท โพรลีน อาร์จินีน ฮีสติดีน และยูเรีย.....	29
1ข	เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสจากการเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 1ก.....	29
2ก	เปรียบเทียบการเจริญของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอไนโตรเจน แอสปาราจีน แอมโมเนียมคลอไรด์ กลูตามีน ซีรีน และเคซีนไฮโดรไลเสท.....	31
2ข	เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสจากการเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 2ก.....	31
3ก	เปรียบเทียบการเจริญของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกรดอะมิโนผสมในปริมาณต่างๆ.	36
3ข	เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสจากการเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 3ก.....	36
4ก	เปรียบเทียบการเจริญของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกรดอะมิโนผสมและกรดอะมิโนชนิดเดี่ยวของ แอสปาราจีน,แอสปาร์เตท,กลูตาเมท,กลูตามีน.....	37
4ข	เปรียบเทียบแอคติวิตีของ เอนไซม์โปรตีเอสจากการเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 4ก.....	37
5	เปรียบเทียบโปรตีเอสแอคติวิตีของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงโดยใช้ washed cell และ cell suspension.....	39

6ก เปรียบเทียบการเจริญของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอไนโตรเจน เคซีนไฮโดรไลเสท ที่มีความเข้มข้นต่างๆ..... 41

6ข เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสจากการเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 6ก 41

7 เปรียบโปรตีเอสแอคติวิตีของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอไนโตรเจนกลูตาเมทที่มีความเข้มข้นต่างๆ..... 42

8ก เปรียบเทียบการเจริญของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอคาร์บอน ซิเตรท ซัคซิเนท กลีเซอรอล,แอลฟา คีโตกลูตาเรท..... 45

8ข เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสจากการเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 8ก..... 45

9ก เปรียบเทียบการเจริญของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอคาร์บอน ซิเตรท ซัคซิเนท กลีเซอรอล แอลฟาคีโตกลูตาเรท เมื่อมีและไม่มี กลูตาเมท.. 48

9ข เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสจากการเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 9ก..... 48

10ก เปรียบเทียบการเจริญของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย อาร์จินีน แอสปาราจีน เคซีนไฮโดรไลเสท เมื่อมีและไม่มีกลูโคส..... 50

10ข เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสจากการเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 10ก..... 50

11ก เปรียบเทียบการเจริญของ Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูตาเมทและกลูโคส ที่มีความเข้มข้นต่างๆ..... 52

11ข เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสจากการเลี้ยงเชื้อในรูปที่ 11ก..... 52

12 แสดงผลของกลูโคสต่อการลดการผลิตโปรตีเอสใน Bacillus subtilis TISTR 25 เมื่อเติมกลูโคสจากภายนอกลงในน้ำเลี้ยงเมื่อเวลาการเจริญช่วง stationary phase..... 54

13 แสดงผลของ rifamin ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสใน Bacillus subtilis TISTR 25..... 55

14 ผลของ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ phenylmethylsulfonylfluoride ต่อโปรตีเอสแอคติวิตีใน crude enzyme จาก Bacillus subtilis TISTR 25..... 57

15ก แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่า pH และปริมาณการผลิตเมตัลและซีรีนโปรตีเอสเมื่อเลี้ยง Bacillus subtilis TISTR 25 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย กลูตาเมท และ กลูโคส. 59

15ข แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญ,การเปลี่ยนแปลงค่า pH และปริมาณการผลิตเมตัลและซีรีนโปรตีเอส เมื่อเลี้ยง Bacillus subtilis TISTR 25 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูตาเมท..... 59

16ก ความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและเอนไซม์กลูตามีน ซินเทส กลูตาเมท ซินเทส กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอไนโตรเจน..... 63

16ข ความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและเอนไซม์กลูตามีน ซินเทส กลูตาเมท ซินเทส กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอไนโตรเจนและสารต้นตอคาร์บอน..... 63

คำย่อ

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

°ซ = องศาเซลเซียส

A = Absorbance

hr = ชั่วโมง

mg = milligram

µg = microgram

mM = millimolar