บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. กระบวนการตรึงไนโตรเจนเชิงชีวภาพ

กระบวนการตรึงไนโตรเจนเชิงชีวภาพ หมายถึง การเปลี่ยนกาซไนโตรเจนให้เป็นอนุมูลแอมโมเนียมอิออนโดยใช้พลังงานในรูปของเอทีพี (ATP) และอำนาจรีดิวซ์ (reducing power) โดยมีเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากกาซไนโตรเจนเป็นธาตุที่ประกอบด้วยพันธะตรีคูณ (triple bond) การทำลายพันธะนี้จึงต้องการพลังงานมาก รวมทั้งสภาวะของอำนาจรีดิวซ์ที่ช่วยในการเปลี่ยนสภาวะออกซิเดชัน (oxidation state) จะต้องเป็นสารที่มีอิเลคโตรโพเทนเชียล (electropotential) เป็นลบสูง เช่น เฟอร์รีดอกซิน (ferredoxins) และฟลาโวดอกซิน (flavodoxins) เป็นต้น

เนื่องจากแอมโมเนียมอิออนที่ได้จากการตรึงไนโตรเจนนี้ เป็นต้นตอสำคัญของการสร้างอินทรียสารของสิ่งมีชีวิต เพราะมันอาจรวมตัวกับอินเทอรมิดิเอท (intermediate) โดยกระบวนการทางชีวเคมีเกิดเป็นกรดอะมิโนขึ้น เมื่อกรดอะมิโนร้อยต่อกันจะได้โปรตีน ดังนั้นจึงเปรียบการตรึงไนโตรเจนเสมือนต้นตอไนโตรเจนหรือต้นตอของโปรตีน ซึ่งเป็นสารอาหารที่สำเป็นของพืช สัตว์ และมนุษย์

มีหลักฐานน่าเชื่อว่ากระบวนการตรึงไนโตรเจนอุบัติขึ้นในระยะต้น ๆ ของกำเนิดชีวิต ซึ่งพบในแบคทีเรียที่อยู่กับพืชและสัตว์ชั้นต่ำโดยทั่วไปอีกด้วย โดยทั่วไปนิยมแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนได้เป็น 3 กลุ่ม (Burns, R.C. and Hardy, R.W.F. 1975)

1.1 พวกที่อาศัยร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (obligatory symbiotic type) พวกนี้จะไม่ตรึงไนโตรเจนหรือตรึงไนโตรเจนลดลงอย่างมากเมื่ออยู่เป็นอิสระ ตรงกันข้ามการตรึงไนโตรเจนจะเกิดขึ้นอย่างมากมายเมื่ออยู่ร่วมกับเจ้าเรือนของมัน ตัวอย่างเช่น ไรโซเบียมที่อยู่ร่วมกับพืชตระกูลถั่ว โดยไรโซเบียมจะตรึงไนโตรเจนแล้วส่งให้แก่พืชเพื่อประกอบการใช้สังเคราะห์

โปรตีน ขณะเดียวกันพืชจะให้พลังงานในรูปของสารต้นตอคาร์บอนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แล่งให้แก่ไรโซเบียม หรือสารประกอบอื่น ๆ ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของไรโซเบียม (Ronson, C.W. and Primrose, S.B. 1979)

1.2 พวกที่อยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นอย่างหลวม ๆ (associative symbiotic type) เป็นพวกที่พึ่งพาสิ่งมีชีวิตอื่นอย่างหลวม ๆ กล่าวคือ มันสามารถเจริญเติบโตในเซลเจ้าเรือนได้ แต่ปริมาณการแบ่งตัวภายในเซลเจ้าเรือนน้อยมาก เมื่อเทียบกับพวกแรก เช่น อะโซโตแบคเตอร์พาสพาไล (Azobabacterpaspaphali) ที่อยู่ร่วมกับรากหญ้าพาสพาสัม โนทาทัม (Paspalum notatum) หรืออะโซสไปริลลัม (Azospirillum) ที่อยู่ร่วมกับรากข้าว เป็นต้น (Sprent, J.I. 1979)

1.3 พวกที่ตรึงไนโตรเจนอย่างอิสระ (free-living type) นิยมแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามยีดจำกัดของการเจริญเติบโต เมื่อมีและไม่มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน

1.3.1 พวกที่เจริญเติบโตได้ในภาวะที่มีออกซิเจน (obligatory aerobic diazotroph) เช่น อะโซโตแบคเตอร์พวกนี้ตรึงไนโตรเจนได้จะต้องมีออกซิเจนอยู่ด้วยเป็นกลุ่มที่ต้องมีคุณสมบัติพิเศษที่จะกีดกันออกซิเจนไม่ให้ไปทำลายเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส มีชื่อเรียกได้อีกแบบหนึ่งว่า aerobic nitrogen-fixing organism (Dalton, H. and Postgate, J.R. 1969)

1.3.2 พวกที่เจริญได้เมื่อมีและไม่มีกาซออกซิเจน (facultative diazotroph) พวกนี้เจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน แต่จะตรึงไนโตรเจนได้ในภาวะที่ปราศจากออกซิเจนเท่านั้น ตัวอย่างเช่นเคลบเซียลลา (Klebsiella) มีชื่อเรียกอีกแบบหนึ่งว่า anaerobic nitrogen-fixing organism

1.3.3 พวกที่เจริญในภาวะปราศจากออกซิเจนเท่านั้น (anaerobic diazotroph) พวกนี้จะเจริญเติบโตหรือตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนเท่านั้น เช่น คลอสตริเดียม (Clostridium)

2. บทบาทของไรโซเบียมต่อการเกษตร

ปัจจุบันการขาดแคลนอาหารโปรตีนกำลังเป็นปัญหาสำคัญ และนับวันจะทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น อันสืบเนื่องจากการเพิ่มจำนวนประชากรโลกอย่างรวดเร็ว และไม่หยุดยั้ง แหล่งสำคัญที่ป้อนอาหารโปรตีนแก่มนุษย์และสัตว์ขณะนี้ ได้จากผลิตผลทางการเกษตรซึ่งส่วนใหญ่เป็นพืชตระกูลถั่ว (leguminosae) พบว่าถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีโปรตีนสูง ใช้แทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ได้ (สุวิทย์ สระทองคำ, 2519, บุญยืน สาริกะภูติ, 2522) นอกจากนี้เมล็ดถั่วเหลืองยังมีเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันสูงกว่าเมล็ดพืชอื่น ๆ คุณค่าของน้ำมันถั่วเหลืองมีคุณภาพดีกว่าน้ำมันของเมล็ดพืชที่มนุษย์ใช้บริโภค (สุวิทย์ สระทองคำ, 2519, วิรัช ศศิวงศ์ภักดี, 2520) ดังนั้นวิธีทางหนึ่งที่จะเพิ่มปริมาณสารประกอบไนโตรเจนในดินคือ การนำแบคทีเรียปมถั่ว (nodule bacteria) หรือคือไรโซเบียมนั่นเอง มาช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศเพื่อสร้างอนุมูลแอมโมเนียมให้แก่ต้นถั่วที่มันอาศัยอยู่ และพบว่าถั่วเหลืองมีความจำเพาะกับไรโซเบียม จาโปนิคัม (Rhizobium japonicum) นอกจากนี้ยังพบว่าไรโซเบียม จาโปนิคัม แต่ละสายพันธุ์ (strain) มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนต่างกันอีกด้วย ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน จึงเป็นสิ่งสำคัญในการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง จะเห็นได้ว่าประโยชน์โดยตรงที่ได้จากไรโซเบียมคือการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลือง แต่ประโยชน์ทางอ้อมที่ไรโซเบียมให้แก่มนุษย์และสัตว์ในรูปของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองมีดังนี้

2.1 เมล็ดใช้ประกอบอาหาร ทำเนย นม ซอส ขนม

2.2 น้ำมันถั่วเหลืองใช้บริโภค ทำน้ำมัน สบู่ ฉนวนไฟฟ้า หมึกพิมพ์

2.3 ถั่วเหลืองสกัดน้ำมันออกแล้วเป็นต้นตอของโปรตีน เพิ่มคุณค่าอาหาร ทำน้ำยาดับเพลิง ผ้า กระดาษ เส้นใย ยา อาหารสัตว์ เป็นต้น

2.4 ต้นสด ใช้เป็นพืชคลุมดิน หรือพืชหมุนเวียน เพราะทำให้ดินมีความสมบูรณ์ดียิ่งขึ้น ใช้เป็นอาหารสัตว์ มีปริมาณโปรตีนสูงมากในระยะตั้งแต่เริ่มติดฝักเป็นต้นไป

2.5 วัสดุเหลือใช้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองทางอุตสาหกรรม (agro-industry) สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตวิตามินบี 12

3. คุณลักษณะและการจำแนกชนิดของไรโซเบียม

3.1 คุณลักษณะโดยทั่วไปของไรโซเบียมมีดังต่อไปนี้คือ

3.1.1 เป็น gram-negative rods มีขนาด 0.5 - 0.9 x 1.2 - 3.0 ไมโครเมตร

3.1.2 มักอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ ๆ

3.1.3 ปกติเคลื่อนไหวได้ โดยมีหนวด (flagella) อาจเป็น peritrichous, polar หรือ subpolar แล้วแต่ชนิดของไรโซเบียม

3.1.4 มีแหล่งสะสมอาหารภายในเซลล์ส่วนใหญ่เป็นพวกเม็ดไขมัน (lipid granules) เช่น โพลี - เบต้า - ไฮดรอกซีบิวทีเรท (poly - β - hydroxybutyrate) นอกจากนี้มีไกลโคเจน และโพลีฟอสเฟต

3.1.5 ไม่มีเอนโดสปอร์ (endospores)

3.2 การจำแนกชนิดของไรโซเบียมที่นิยมใช้มีอยู่ 3 วิธี (Vincent, J.M. 1970, 1977)

3.2.1 ใช้ลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นหลัก แบ่งเป็น 2 พวกคือ

3.2.1.1 พวกเจริญเติบโตเร็ว (fast growers) ได้แก่ ไรโซเบียม เลกูมิโนซารัม (R. leguminosarum), ไรโซเบียม ไตรโฟลิไอ (R. trifolii), ไรโซเบียม ฟาส์ซีโอไล (R. phaseoli), ไรโซเบียม เมลิโลไต (R. meliloti) และไรโซเบียม คาวพี (R. cowpea) บางสายพันธุ์ลักษณะที่สำคัญของพวกนี้คือ

- มักจะมีช่วงการแบ่งตัว (mean generation time) ประมาณ 2-4 ชั่วโมง

- มีโคโลนีขนาดเล็กบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งภายใน 24 ชั่วโมง และจะให้โคโลนีขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร) ภายใน 3-5 วัน

- โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือก ไม่มีสีหรือสีขาว

3.2.1.2 พวกเจริญเติบโตช้า (slow growers) ได้แก่ ไรโซเบียม จาโปนิคัม (R. japonicum), ไรโซเบียม ลูพิไน (R. lupini), สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของไรโซเบียม คาวพี (R. cowpea) และไรโซเบียมพวกโลโตโนบีส์ เบนีซีไอ (lotononis bainesii) ลักษณะ

ลักษณะที่สำคัญของพวกนี้คือ

- มีช่วงการแบ่งตัวประมาณ 6-8 ชั่วโมง
- เกิดโคโลนีขนาดเล็กภายใน 7-10 วันให้โคโลนีขนาดใหญ่ภายใน 17-20 วัน
- ปกติโคโลนีจะไม่มีสี เป็นสีขาว หรือสีครีมยกเว้นโลโตโนนีล่ เบนซีไอ มีโคโลนีเป็นสีชมพู
- การขับเมือกจะมีปริมาณน้อยกว่าพวกเติบโตเร็ว แต่ลักษณะเมือกจะหนาแน่นและเหนียวกว่า (dense and sticky)

3.2.2 ใช้การเปลี่ยนสีของลิทมัสมิลค์ (litmus milk) เป็นหลัก โดยในสภาวะเป็นกรดจะเป็น สีแดงหรือสีชมพู ถ้าสภาวะเป็นด่างจะเป็นสีน้ำเงินหรือสีฟ้า แบ่งเป็น 2 พวกคือ

3.2.2.1 พวกที่ทำให้ลิทมัสมิลค์เปลี่ยนฤทธิ์เป็นด่าง ได้แก่พวกไรโซเบียมส่วนใหญ่

3.2.2.2 พวกที่ทำให้ลิทมัสมิลค์เปลี่ยนฤทธิ์เป็นกรด มีอยู่ชนิดเดียวคือไรโซเบียม เมลิโลไต

3.3 จัดแบ่งตามกลุ่มของถั่วที่ไรโซเบียมสามารถเข้าไปสร้างปมข้ามพันธุ์กันได้ เรียกว่าการจำแนกตาม Cross Inoculation group ซึ่งหมายถึงกลุ่มของถั่วที่จะเกิดปมได้จากเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกจากถั่วในกลุ่มเดียวกัน เช่น เชื้อที่แยกจากถั่วเขียวสามารถเอาไปเพาะเชื้อให้เกิดปมในถั่วฝักยาว ดังนั้นถั่วเขียว ถั่วฝักยาว จึงเป็นกลุ่มที่ต้องการเชื้อไรโซเบียมชนิดเดียวกัน เป็นต้น การแบ่งเชื้อไรโซเบียมโดยวิธีนี้แบ่งออกเป็น 8 ชนิดด้วยกันคือ

3.3.1 ไรโซเบียม เมลิโลไต เป็นเชื้อไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปสร้างปมได้ในถั่วพวกอัลฟัลฟา หรือเมดิคาโก (Alfalfa group or Medicago spp.)

3.3.2 ไรโซเบียม ไตรโฟลิไอ เป็นเชื้อไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปสร้างปมได้ในถั่วพวกโคลเวอร์หรือไตรโฟเลียม (Clover group or Trifolium spp.)

3.3.3 ไรโซเบียม เลกูมิโนซารัม เป็นเชื้อไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปสร้างปมได้ในถั่วพวก ถั่วลันเตา หรือพวกพิซัม วิเซีย และลาทีรัส (Pea and Vetch group or Pisum, Vicia and Lathyrus spp.)

3.3.4 ไรโซเบียม ฟาสซี ล เป็นเชื้อไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปสร้างปมได้ในถั่วพวกถั่วผี หรือฟาสซีโอลัส (Bean group or Phaseolus spp.)

3.3.5 ไรโซเบียม จาโปนิคัม เป็นเชื้อไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปสร้างปมได้ในถั่วพวก ถั่วเหลืองหรือไกลซีน แมกซ์ (soybean or Glycine max)

3.3.6 ไรโซเบียม ลูพิไน เป็นเชื้อไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปสร้างปมได้ในถั่วพวกลูพิน หรือลูพินัส (Lupine group or Lupinus spp.)

3.3.7 ไรโซเบียม คาวพี เป็นเชื้อไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปสร้างปมได้ในถั่วพวกถั่วกระด้างหรือวิกนา(Cowpea group or Vigna spp.)

3.3.8 ไรโซเบียมสายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจง (Specific R. spp.) เป็นเชื้อไรโซเบียมที่สามารถเข้าไปสร้างปมได้ในถั่วที่เฉพาะเจาะจงมากได้แก่เชื้อไรโซเบียมของโสน

4. กระบวนการตรึงไนโตรเจนในไรโซเบียม

การตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะคือ

4.1 เมื่ออยู่ร่วมกับรากถั่วหรืออยู่ในสภาพของแบคทีรอยด์ กระบวนการตรึงไนโตรเจนจะเกิดขึ้นที่บริเวณปมของรากถั่ว ลักษณะของปมถั่วที่แท้จริงนั้นจะต้องเป็นปมที่ยื่นออกจากตัวราก และสามารถปลิดออกจากรากได้ง่าย เมื่อนำมาผ่าดู พบสีขาวอยู่ภายในปมแสดงว่าเป็นพวกปมเทียม (false nodule) (Vincent, J.M. 1970) ถ้าพบสีแดงหรือสีชมพูบริเวณตรงกลาง (central part) ของปมแสดงว่าเป็นพวกปมแท้หรือปมสมบูรณ์ (true nodule or effective nodule) แต่ถ้าสีแดงหรือสีชมพูอยู่บริเวณส่วนนอก (outer part) ของปมแสดงว่าเป็นพวกปมไม่สมบูรณ์ (ineffective nodule) (Brockwell, J.A. 1956, 1958) หรือถ้าพบมีสีเขียวภายในปมแสดงว่าเป็นพวกเซลแก่ (Senescing cells) (Newcomb, W. 1976)

เมื่อเอาปมพวกปมแท้มาศึกษากระบวนการตรึงไนโตรเจนแบบ in vitro พบว่าในการรีดิวซ์ไนโตรเจนหนึ่งโมลต้องการเอทีพีอย่างน้อย12-16 โมล (Burns, R.C.,and Hardy, R.W.F. 1975, Phillips, D.A. 1980) ซึ่งพลังงานนี้ส่วนใหญ่จะได้มาจากวิถีเอ็นท์เนอร์-ดูโดรอฟฟ์ (Entner-Doudoroff pathway) และวัฏจักรเครบ (Krebs cycle)

ซึ่งจะให้สารที่มีอำนาจรีดิวซ์สูงแล้วส่งผ่านลูกโซ่การหายใจ (Respiratory chain) เพื่อผลิตพลังงานเอทีพี โดยวิธีการควบคู่ จากกระบวนการลูกโซ่หายใจ (coupling) เรียกกระบวนการนี้ว่า ออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (Oxidative phosphorylation) (Keele, B.B. Hamilton, P.B.; and Elkan, G.H. 1969, 1970, Martinez-De Drets, G. and Arias, A. 1971, Appleby, C.A. 1969, Appleby, C.A.; Turner, G.L.; and Macnicol, P.K. 1975) นอกจากนี้ยังสามารถได้เอทีพีจากกาซไฮโดรเจนที่เกิดจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสอีกด้วย หรืออาจส่งอิเลคตรอนที่ได้จากขบวนการนี้เข้าสู่กระบวนการตรึงไนโตรเจนโดยตรงเลยก็ได้ (Emerich et al. 1979) อย่างไรก็ตาม นอกจากเอทีพีและสารที่มีอำนาจรีดิวซ์สูงแล้ว ยีนไนโตรจีเนสจะถอดรหัสเป็นเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสที่ตื่นตัวนั้น จะต้องอาศัยสภาวะที่เหมาะสมเพื่อปลดปล่อยการถอดรหัสของยีน (derepress) อีกด้วย จากการศึกษาซึ่งมีข้อมูลสนับสนุนว่าการถอดรหัส (transcription) ของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเปลี่ยนอนุมูลแอมโมเนียมเป็นกรดอะมิโน (Ammonium assimilation) (Shanmugam, K.T. and Morandi, C. 1976) และจากการศึกษาในแบคทีรอยด์พบว่าในขณะที่แบคทีรอยด์ตรึงไนโตรเจนนั้นจะไม่พบเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนอนุมูลแอมโมเนียมเป็นกรดอะมิโน (Ammonium assimilatory enzymes) เลย (Brown, C.M. and Dilworth, M.J. 1975, Kurz, W.G.W.; Rokosh, D.A.; and LaRue, T.A. 1975, Robertson, J.G.; Warburton, M.P.; and Farnden, K.J.F. 1975)

4.2 เมื่ออยู่ในสภาพอิสระ แต่เดิมเคยเชื่อกันว่าไรโซเบียมจะตรึงไนโตรเจนได้ก็ต่อเมื่ออยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืชที่มันอาศัยอยู่เท่านั้น ความพยายามที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ไรโซเบียมตรึงไนโตรเจนในสภาพเชื้ออิสระนั้นต้องประสบกับความล้มเหลวตลอดมา จนกระทั่งได้มีการเลี้ยงไรโซเบียมในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีคอลลัสหรือเซลที่ยังไม่เปลี่ยนแปลง (Callus or undifferentiated cells) ของพืชต่าง ๆ พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้ (Holsten et al. 1971, Child, J.J. and LaRue, T.A. 1974, Phillips, D.A. 1974, Child, J.J. 1975, Scowcroft, W.R. and Gibson, A.H. 1975) ซึ่งลารู, เครซ, ชายด์ (LaRue, T.A.: Kurz,; W.G.W.; and Child, J.J. 1975) ได้พิสูจน์ว่าการเหนี่ยวนำเอ็นไซม์นี้จะเกิดได้ต่อเมื่อมีปัจจัยบางอย่างที่หลั่งออกมาจากพืช

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้แก่แมตาบอไลท์ของพืช (plant metaboti s) น้ำตาล รวมทั้งตัวกลางในวัฏจักรเครบ (Krebs cycle intermediates) ดังนั้นจึงได้มีการเลี้ยงไรโซเบียมในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีน้ำตาลหลายชนิด พบว่าอาหารบางชนิดเท่านั้นที่สามารถเหนี่ยวนำเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสได้ (Pagan et al. 1975, Kurz, W.G.W., and LaRue, T.A. 1975, McComb, J.A.; Elliott, J.; and Dilworth, M.J. 1975) แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลาพบว่าความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ ๆ เท่านั้นที่จำเป็นในการเหนี่ยวนำเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส (Keister, D.L. 1975, Tjepkema, J. and Evans, H.J. 1975, Keister, D.L. and Evans, W.R. 1976, Bergersen, F.J. and Turner, G.L. 1976, Bergersen et al. 1976, Gibson et al. 1976)

5. สมบัติของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสในไรโซเบียม

อำนาจการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ถ้าหากถูกกระทบด้วยกาซออกซิเจนแม้ด้วยปริมาณเพียงเล็กน้อย ด้วยเหตุนี้การทำเอ็นไซม์ตัวนี้ให้บริสุทธิ์จึงถูกรบกวนด้วยออกซิเจนตลอดเวลา แม้กระนั้นก็ตามได้มีความพยายามทำเอ็นไซม์ตัวนี้ให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้อิสระ เช่น อะโซโตแบคเตอร์ ไวน์แลนดิไอ (Azotobacter vinelandii) (Bulen, W.A., and Lecomte, J.R. 1966) จากคลอสตริเดียม พาส-ทูเรียนัม (Clostridium pasteurianum) (Mortenson, L.E.; Morris, J.A.; and Yeng, D.Y. 1967, Vandercasteele, J.P., and Burris, R.H. 1970) จากเคลบเซียลลานิวโมนิอี (Klebsiella pneumoniae) (Eady et al. 1972) รวมทั้งจากแบคทีรอยด์ (Klucus et al. 1968) พบว่าเอ็นไซม์ที่แยกจากแหล่งต่าง ๆ เหล่านี้มีคุณสมบัติทางเคมีคล้ายกัน (Eady, R.R. and Postgate, J.R. 1974) กล่าวคือ เอ็นไซม์นี้ประกอบโปรตีนเชิงซ้อน 2 ส่วน ส่วนแรกเรียกว่าคอมโพเนนท์หนึ่งหรือโมลิบดีนัมเหล็กโปรตีนหรือไนโตร-จีเนส (Component I or MoFe protein or Nitrogenase) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 - 250,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโมลิบดีนัม 2 อะตอม สารประกอบที่มีเหล็กแต่ปราศจากฮีม (nonheme iron)

28 - 34 อะตอม และหมู่อนุมูลซัลไฟด์ที่ไม่เสถียรในกรด (Acid-labile sulfides) 26 - 28 อะตอม นอกจากนี้คอมโพเนนท์ส่วนนี้ยังประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่ต่างกันโดยมีค่ามวลสารสัมพัทธ์ (Stoichiometry) เป็นแบบ $\alpha_2\beta_2$ ส่วนที่สองเรียกว่าคอมโพเนนท์สองหรือเหล็กโปรตีนหรือไนโตรจีเนสรีดักเตส (Component II or Fe protein or Nitrogenase reductase) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55,000 - 65,000 ดาลตัน ประกอบด้วยเหล็กที่ปราศจากซีน 4 อะตอม และหมู่อนุมูลซัลไฟด์ที่ไม่เสถียรในกรด 4 อะตอม คอมโพเนนท์ที่สองนี้มีหน่วยย่อยอยู่หน่วยเดียว แต่ค่ามวลสารสัมพัทธ์พบว่าเป็นไดเมอร์ (dimer) (Brill, W.J. 1980)

นอกจากนี้เอ็นไซม์ไนโตรจีเนสยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ ดังนี้คือ

- ความไวต่อกาซออกซิเจน พบว่าเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วภายใน 1 - 15 นาที เมื่อกระทบกับกาซออกซิเจน

- ความไวต่ออุณหภูมิต่ำ พบว่าแอคติวิตี้ของเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสจะลดลงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์เมื่อเก็บไว้ที่ 0 ° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- อำนาจการเร่งปฏิกริยา สามารถเร่งปฏิกริยาการเปลี่ยนแปลงสารประกอบที่มีพันธะตรีคูณต่าง ๆ เช่น อะเซทีลีน ไซยาไนด์ ไอโซไซยาไนด์ และเอไซด์ เป็นต้น

6. <u>การเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในต้นถั่ว</u>

การเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน เป็นกระบวนการเพิ่มการตรึงไนโตรเจนให้แก่ไรโซเบียม อันอาจจะส่งผลกระทบไปยังพืชตระกูลถั่วให้เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณผลิตผลได้ การที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในต้นถั่วได้นั้น สิ่งแรกที่จะต้องคำนึงถึงคือการเลือกสายพันธุ์ของไรโซเบียมและต้นถั่วให้มีความจำเพาะต่อกันเสียก่อน พบว่าที่บริเวณผิวรากขนอ่อนมีสารชนิดหนึ่งเรียกว่า ไฟโตฮีแมกกลูตินินหรือเลคติน (phytohemagglutinins or lectins) เป็นสารพวกไกลโคโปรตีน ซึ่งส่วนที่เป็นโพลีแซคคาไรด์จะมีบริเวณยึดเกาะ (binding sites) ไปจับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ของไรโซเบียมซึ่งอยู่ที่ผนังเซล ทำให้ไรโซเบียมสามารถเข้าไปสร้างปมในรากถั่วได้

ในปัจจุบันพบว่ามีถั่วเหลืองหลายสายพันธุ์ขาดเลคติน และบางสายพันธุ์ของไรโซเบียมจาโปนิคัมสามารถสร้างปมในรากถั่วเหลืองได้ แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนหรืออาจตรึงไนโตรเจนได้แต่มีประสิทธิภาพต่ำ (Brill, W.J. 1980) ดังนั้นการเลือกสายพันธุ์ของต้นถั่วให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ของไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งอาจจะเลือกโดยวิธีธรรมชาติ หรือเลือกโดยใช้เทคนิคของพันธุศาสตร์เชิงวิศวกรรม (Phillips, D.A. 1980) ก็จะเป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมให้กับต้นถั่วได้ นอกจากนี้ไรโซเบียมที่ใช้ควรจะเป็นพวกเคลื่อนไหวได้ เพราะการเคลื่อนไหวอาจจะเป็นสิ่งสำคัญที่จำเป็นในการแย่งยันกับพวกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพต่ำในการตรึงไนโตรเจนที่มีอยู่ในดิน นอกจากนี้ไรโซเบียมนั้นต้องเป็นสายพันธุ์ที่เมื่อตรึงไนโตรเจนแล้วจะต้องส่งอนุมูลแอมโมเนียมที่ตรึงได้ให้แก่พืช

อีกวิธีหนึ่งที่อาจจะเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้คือ การเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์แสงของพืช เพราะการสังเคราะห์แสงเป็นแหล่งผลิตสารประกอบคาร์บอน ซึ่งจะส่งให้แบคทีรอยด์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสังเคราะห์พลังงานในรูปของเอทีพีต่อไป (Kuykendall, L.D., and Elkan, G.H. 1976) และยังพบอีกว่าอัตราการตรึงไนโตรเจนจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อพืชมีการเจริญเติบโตและมีการสังเคราะห์แสงมากขึ้น (Wilson, P.W.; Fred, E.B.; and Salmon, M.R. 1933, Hardy, R.W.F., and Havelka, U.D. 1976, Bethenfalvay, G.J.; Abu-Shakra, S.S.; and Phillips, D.A. 1978) ดังนั้นการเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนจะต้องเป็นสายพันธุ์ที่ใช้พลังงานและสารประกอบคาร์บอนที่พืชส่งให้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด จึงจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนได้

ปกติปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนมักจะเกิดพร้อมกับเอทีพี-ดีเพนเดนท์ ไฮโดรเจนเอฟโวลูชัน (ATP - dependent hydrogen evolution) เสมอดังสมการ

$$N_2 + 16ATP + 8\bar{e} + 10H^+ \xrightarrow{\text{Nitrogenase}} 2NH_4^+ + H_2 + 16ADP + 16P_i$$

จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาเอทีพี-ดีเพนเดนท์ไฮโดรเจนเอฟโวลูชันนี้จะสูญเสียอิเลคตรอน 40 - 60 เปอร์เซ็นต์ (Phillips., D.A. 1980) ในขณะเดียวกันสูญเสียเอทีพีอย่างน้อยที่สุด 25 เปอร์เซ็นต์ (Adams, M.W.W.; Mortenson, L.E.; and Chen, J. 1981)

อย่างไรก็ตามในแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนได้หลายชนิดรวมทั้งไรโซเบียมบางสายพันธุ์มีเอ็นไซม์ชนิดหนึ่งเรียกว่าไฮโดรจีเนส (hydrogenase) ซึ่งสามารถเร่งการเปลี่ยนแปลงดังนี้

$$H_2 \xrightleftharpoons{\text{Hydrogenase}} 2H^+ + 2\bar{e}$$

พบว่าอิเลคตรอนที่ได้นี้สามารถเข้าสู่ขบวนการออกซิเดทีฟฟอสโฟริเลชั่นเพื่อควบคู่เป็นเอทีพีหรือเก็บรักษาไว้เพื่อป้อนปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนต่อไป (Emerich et al. 1979)

ในปัจจุบันพบว่าไฮโดรเจนเป็นตัวชักนำ (induced) และซัคซิเนทเป็นตัวกดดัน (repressed)การสร้างเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนส ก้าวต่อไปที่จะศึกษาคือการควบคุมการถอดรหัสของเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสอันอาจจะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมต่อไป (Adams, M.W.W.: Mortenson, L.E. and Chen, J. 1981)

จะเห็นได้ว่าประโยชน์ทางตรงที่ได้จากไฮโดรจีเนสคือ ให้พลังงานและอิเลคตรอนชดเชยแก่ส่วนที่เสียไปในปฏิกิริยาไฮโดรเจนเอชั่วคราวลูชัน ประโยชน์ทางอ้อมคือสามารถป้องกันออกซิเจนไปทำลายเอ็นไซม์ไนโตรจีเนส และป้องกันไฮโดรเจนไปยับยั้งการทำงานของไนโตรจีเนสอีกด้วย ได้มีผู้ศึกษาในถั่วเหลืองโดยใช้ไรโซเบียมสายพันธุ์ที่มีไฮโดรจีเนสเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่มีไฮโดรจีเนส พบว่าสามารถเพิ่มการตรึงไนโตรเจนได้ถึง 49 เปอร์เซ็นต์ และให้มีน้ำหนักถั่วเพิ่มขึ้น 32 เปอร์เซ็นต์ (Adams, M.W.W.; Mortenson, L.E. and Chen, J. 1981) ดังนั้นการเลือกสายพันธุ์ของไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนจะต้องเป็นสายพันธุ์ที่มีเอ็นไซม์ไฮโดรจีเนสอยู่ด้วย จึงจะเป็นสายพันธุ์ที่เพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนได้อย่างแท้จริง

7. ความสำคัญของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 และไรโซเบียม จาโปนิคัม 122

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่นิยมปลูกในประเทศไทยมานาน แต่ก็มิได้แพร่หลายจนถึงกับจัดว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทยได้ จนกระทั่งปี พ.ศ. 2519 สถานีทดลองพืชไร่แม่โจ้ กองพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร ได้พยายามคัดเลือกถั่วเหลืองให้ได้พันธุ์ที่มีเมล็ดโตสม่ำเสมอ ความงอกดี อายุการปลูกสั้น และมีความต้านทานต่อโรคและแมลง รวมทั้งสร้างปมได้ดี ในที่สุดก็คัดเลือกถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์ Acadian และพันธุ์ 64 - 104 (Tainung 4) ซึ่งพันธุ์

Acadian นี้ เป็นพันธุ์ที่มีต้นสูง ฝักไม่แตกง่าย ลำต้นแข็งแรง ส่วนสายพันธุ์ Tainung 4 เป็นสายพันธุ์ที่ติดฝักดก เมล็ดโต ฝักมีเมล็ดมาก ทนทานต่อโรคราสนิม (soybean rust) ได้ดี ฝักแตกเมื่อแก่ สำหรับถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 นี้พบว่ามีความต้านทานต่อโรคราสนิม และราน้ำค้าง (downy mildew) ได้ดี ให้ผลผลิตสูง ฝักไม่แตกและเมล็ดโต นอกจากนี้ยังสามารถปลูกได้ดีในทุกภาคทุกฤดูกาลของประเทศไทยอีกด้วย ปัจจุบันเป็นพันธุ์ที่กรมส่งเสริมการเกษตรได้ใช้เป็นพันธุ์ที่เผยแพร่สู่เกษตรกรของประเทศไทย

ไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 เป็นสายพันธุ์ที่ได้นำมาจากสหรัฐอเมริกาเมื่อปี 2516 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างปมกับถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 เป็นอย่างดี เนื่องจากในดินของไทยมีเชื้อสายพันธุ์นี้อยู่น้อยมาก ดังนั้นการปลูกถั่วเหลืองจึงต้องการคลุกเชื้อก่อนการปลูก พบว่าไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 นี้ เป็นสายพันธุ์ที่สามารถให้ปมกับถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 เป็นอย่างดี ผลผลิตถั่วเหลืองมีปริมาณสูงถึง 250 - 300 กิโลกรัมต่อไร่ (ความแปรปรวนขึ้นกับดินฟ้าอากาศที่ปลูก) ด้วยเหตุนี้สาขาบักเตรีวิทยาและจุลินทรีย์ดิน กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร จึงได้ใช้สายพันธุ์นี้เผยแพร่แก่เกษตรกรไทย เพื่อใช้ประกอบการทำไร่ถั่วเหลือง อันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทยในปัจจุบัน

8. วิธีวัดการตรึงไนโตรเจนในต้นถั่ว

การหาปริมาณการตรึงไนโตรเจนในต้นถั่วอาจทำได้หลายวิธีคือ การวัดปริมาณ $^{15}N_2$ ที่ถูกใช้ไปในกระบวนการตรึงไนโตรเจนด้วย Mass spectrophotometer (Burris, R.H., and Wilson, P.W. 1957) การวัดปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นทั้งหมด (Mortenson, L.E. 1961) การวัดอัตราการออกซิไดซ์ โซเดียมไดไทโอไนท์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นรีดัคแตนท์ของปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน (Ljones, T. and Burris, R.H. 1972) การวัดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเคลดาล์ (Pietro, A.S. 1972) การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธีไบยูเรท (Gornall, A.G.; Bardawill, C.J.; and David, M.M. 1949) การหาปริมาณเอทีลีนที่เกิดขึ้นภายใต้ภาวะการตรึงไนโตรเจน โดยการออกซิไดซ์เอทีลีนให้เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ แล้ววัดสีที่เกิดขึ้นโดยให้ฟอร์มาลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากับสารละลายแนชรีเอเยนต์ (Nash reagent) ด้วยเครื่อง

Colorimeter (LaRue, T.A.,and Kurz, W.C.W. 1973) และการวัดอัตราการรีดิวซ์อะเซทีลีนเป็นเอทีลีนโดยเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสด้วยเครื่องกาซโครมาโตกราฟฟี (Koch, B. and Evans, H.J. 1966, Hardy et al. 1968) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการศึกษาการตรึงไนโตรเจนทั้งหมดนี้วิธีหลังจะเป็นวิธีที่ดีที่สุด ด้วยเหตุผลดังต่อไปนี้คือ

- มีความไวสูง สามารถตรวจพบกาซเอทีลีน แม้จะมีจำนวนน้อยกว่า 10^{-12} โมล
- ทำได้ง่าย ทั้งใน in vivo และ in vitro
- มีความจำเพาะสูง เพราะกาซเอทีลีนที่เกิดขึ้นมีความคงตัว และสามารถแยกจากกาซอื่น ๆ เช่น อะเซทีลีน มีเทน ได้ชัดเจน เมื่อใช้กาซโครมาโตกราฟฟี
- ทำได้รวดเร็วกว่าวิธีอื่น ๆ

อีกวิธีหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจในปัจจุบันคือ การชั่งน้ำหนักแห้งของต้นอ่อน (shoot) เนื่องจากดูอิก; เมลตัน และบัลเทนสเปอร์เกอร์ (Duhigg, P.; Melton, B.; and Baltensperger, A. 1978) พบว่าอัตราการรีดิวซ์อะเซทีลีนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับน้ำหนักแห้งของต้นอ่อน ซึ่งวิธีนี้ เป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็วกว่าวิธีอื่น ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น

9. <u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

เพื่อศึกษาการเจริญของไรโซเบียม ลาโปนิคัม 122 ในอาหารเลี้ยงต่าง ๆ รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนและอิทธิพลต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อการตรึงไนโตรเจน และการปรับปรุงพันธุ์ใหม่ให้มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงขึ้น แนววิธีการศึกษามีดังต่อไปนี้คือ

9.1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมนนิทอล กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส และซัคซีเนทเป็นสารต้นตอคาร์บอนทั้งในอาหารสูตรอุดมและอาหารสูตรปรับต่ำ

9.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เกิดเอ็นไซม์ไนโตรจีเนสทั้งในสภาพจุลินทรีย์อิสระและแบคทีรอยด์

9.3 ศึกษาอิทธิพลของการตรึงไนโตรเจนในไรโซเบียมที่มีต่อถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4

9.4 ทดสอบการผสมพันธุ์กับเอสเคอริเชีย โคไล เค 12 เจฮี 5466 (พีอาร์ที 1) ซึ่งมีพลาสมิดต้านยาเชื่อมต่อกับนีฟยีน

9.5 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง สจ. 4 ระหว่างไม่คลุกเชื้อ คลุกเชื้อไรโซเบียม จาโปนิคัม 122 และ คอนจูแกนท์ที่แยกได้

จากการศึกษานี้ อาจจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมต่อไป