หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1. การตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่ว

การตรึงไนโตรเจนเชิงชีวภาพ (biological nitrogen fixation) หมายถึง การเปลี่ยนรูปไนโตรเจนจากก๊าซไนโตรเจนในบรรยากาศหรืออากาศ ในดิน ในน้ำ ให้อยู่ในรูปของสารประกอบไนโตรเจน (combined nitrogen) เช่น กรดอะมิโน ปฏิกิริยาการตรึง-ไนโตรเจน ซึ่งจะเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นอนุมูลแอมโมเนียม มีเอนไซม์ไนโตรจิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ

$$N_2 + 29\ ATP + 6\ e^- + 6H^+ \xrightarrow{Nitrogenase} 2NH_3 + 29\ ADP + 29\ Pi$$

เชื้อไรโซเบียม (Rhizobium) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดิน และในปมรากของพืชตระกูลถั่ว (วังใน, 1982) มีรูปร่างเป็นท่อนยาว (rod) แกรมลบ (gram negative) เคลื่อนที่ได้ (motile) มีขนาดประมาณ 0.5-1.0×2.0 ไมครอน ซึ่งจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและเปลี่ยนรูปร่างเป็นลักษณะคล้ายตัวอักษร X และ Y เมื่ออยู่ในปมรากของพืชตระกูลถั่ว ซึ่งเรียกว่า แบคทีรอยด์ (bacteroid) เมื่ออยู่ในดินสามารถใช้น้ำตาลหลายชนิด (pentoses และ hexoses) เป็นแหล่งของคาร์บอน ได้แก่ มอลโตส ซูโครส กลูโคส แมนนิทอล และสามารถใช้เกลือไนเตรต หรือแอมโมเนียมเป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ เมื่ออยู่ในปมราก แบคทีรอยด์จะสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้แก่พืช ขณะเดียวกันก็รับพลังงานสำหรับปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจากพืชในรูปของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ซึ่งสารเหล่านี้จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์กรดอะมิโนของแบคทีรอยด์ โดยจะเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ เช่น แอลฟา-คีโตกลูตาเรท แอสปาร์เตท ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียโดยกระบวนการ transamination ได้กรดอะมิโนต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีรอยด์และพืชตระกูลถั่ว (Henzell E.F. และ Wallis I., 1977) ดังนั้นการศึกษาปัจจัยที่ควบคุมกระบวนการตรึงไนโตรเจนจึงมีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตในพืชตระกูลถั่วเป็นอย่างมาก ดังจะเห็นได้ว่า การตรึงไนโตรเจนแก่พืชตระกูลถั่วโดยไรโซเบียมนั้นเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญ

เนื่องจากมีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 200 กก.ไนโตรเจน/ไร่/ปี (ร้อยละ 50 ของการตรึงไนโตรเจนเชิงชีวภาพ) ซึ่งจะช่วยลดปริมาณปุ๋ยที่ต้องใช้สำหรับต้นพืชในปีหนึ่ง ๆ ลงอย่างมากมาย (Allen O.N. และ Allen E.K., 1981)

1.1 การจำแนกกลุ่มของเชื้อไรโซเบียม

มีการจำแนกได้หลายวิธี ตัวอย่างวิธีการจำแนกได้แก่

1.1.1 จำแนกตามการเจริญเติบโตของเชื้อ (Elkan, 1981) กลุ่มที่เจริญอย่างรวดเร็ว (fast grower) จะพบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็งยีสต์แมนนิทอลภายในเวลา 3-5 วัน มี generation time 2-4 ชั่วโมง ได้แก่ R. lupini, R. leguminosarum และกลุ่มที่เจริญอย่างช้า (slow grower) จะพบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็งยีสต์แมนนิทอลภายในเวลา 5-10 วัน หรือมากกว่า มี generation time 6-8 ชั่วโมง ได้แก่ R. japonicum

1.1.2 จำแนกโดยบรีด (Breed และคณะ, 1957) ได้แก่ กลุ่มที่เปลี่ยน Litmus milk ให้เป็นด่าง เช่น R. leguminosarum, R. phaseoli, R. trifolii, R. lupini, R. japonicum และกลุ่มที่เปลี่ยน Litmus milk ให้เป็นกรด ได้แก่ R. meliloti

1.1.3 จำแนกตามความสามารถในการทำให้เกิดปมกับถั่วกลุ่มต่าง ๆ (cross-inoculation group) ได้เป็นกลุ่มของ Alfalfa ได้แก่ R. meliloti กลุ่มของ clover ได้แก่ R. trifolii กลุ่มของ Bean ได้แก่ R. phaseoli กลุ่มของ Soybean ได้แก่ R. japonicum และกลุ่มของ Pea และ Vetch ได้แก่ R. leguminosarum

ดังกล่าวแล้วว่า การศึกษาการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่ว มีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มผลผลิตและการเจริญเติบโตของพืชตระกูลถั่ว โดยใช้ประโยชน์จากเชื้อไรโซเบียมแทนการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนเป็นสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากพืชตระกูลถั่วมีโปรตีนสะสมค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับพืชอื่น ๆ จึงเป็นแหล่งของโปรตีน พลังงาน แร่ธาตุ และวิตามินในแง่ที่เป็นอาหารที่มีคุณภาพสูงของมนุษย์และสัตว์ การศึกษาเกี่ยวกับเมตาบอลิสมของเชื้อไรโซเบียมจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะเชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม ซึ่งเป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญในการตรึงไนโตรเจนให้กับถั่วเหลือง ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีบทบาททางเศรษฐกิจสูงมากในปัจจุบัน

ในขณะที่แบคทีรอยด์ตรึงไนโตรเจนให้แก่ต้นถั่วโดยใช้เอนไซม์ไนโตรจิเนสนั้น มันต้องการสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (low oxygen tension) เนื่องจากเอนไซม์ไนโตรจิเนสไวต่อออกซิเจน leghaemoglobin ซึ่งอยู่ที่ membrane envelope ของแบคทีรอยด์จะทำหน้าที่ควบคุมปริมาณ

ออกซิเจนภายในแบคทีรอยด์ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ โมเลกุล leghaemoglobin ประกอบด้วยโปรตีนพวก globin รวมกับ pyrrole ring จำนวน 4 วง และมีเหล็กอยู่ตรงกลาง ทำหน้าที่ถ่ายทอดออกซิเจนหรือรับอิเลคตรอนภายในปมขณะตรึงไนโตรเจน (Haratyunyan, E. และคณะ, 1981) นอกจากนี้ไนโตรจิเนสยังต้องการ chemical reductant ที่เหมาะสม และระบบผลิตพลังงาน ATP (ATP generating system) ซึ่งจะใช้ ATPถึง 12-15 โมลต่อการรีดิวส์ไนโตรเจน 1 โมล (Bergersen, F.J. และ AH. Gibson, 1977; Shaumugam และคณะ,1978)

2. ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ไนโตรจิเนสและไนเตรตรีดัคเทสในปมรากถั่วเหลือง

นอกจากเอนไซม์ไนโตรจิเนสแล้วยังพบเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์จากปมรากถั่วเหลืองในระดับสูงด้วย (Daniel และ Appleby, 1972: J. Rigaud และคณะ, 1979; Manhart และ Wong, 1979)

Chi-ying huang (1982) พบว่าแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์ได้ ความสัมพันธ์ระหว่างไนเตรตรีดัค-เทสและไนโตรจิเนสจึงเป็นที่น่าสนใจ ถึงแม้หน้าที่ของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์ยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก ก็มีผู้พยายามศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสและไนโตรจิเนสของแบคทีรอยด์ในปมรากพืชตระกูลถั่ว โดยมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนให้แก่แบคทีรอยด์ สามารถสรุปความสัมพันธ์ของเอนไซม์ทั้งสองได้ดังต่อไปนี้

2.1 ความสัมพันธ์แบบแปรตามกัน Rigaud และคณะ (1973) ศึกษาแบคทีรอยด์จากปมรากถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อ<u>เบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม</u> สายพันธุ์ CC 705 และ CBI 809 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์แบบแปรตามกัน (positive correlation) โดยอะเซทิลีนรีดัคชั่นจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณไนเตรตจนถึงความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ จึงคงที่ และอะเซทิลีนรีดัคชั่นแปรตามไนเตรตรีดัคชั่นเห็นได้จากสายพันธุ์ CBI 809 ซึ่งมีไนเตรตรีดัคชั่นต่ำก็จะมีอะเซทิลีนรีดัคชั่นต่ำเช่นกัน ความสัมพันธ์ดังกล่าวทำให้ตั้งสมมติฐานว่าไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์อาจทำหน้าที่เกี่ยวกับ nitrate respiration เป็นแหล่งของ reducing power ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนและผลิต ATP สำหรับปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนของเอนไซม์ไนโตรจิเนส นอกจากนี้ยังช่วยให้แบคทีรอยด์ดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะปราศจากออกซิเจนได้ การศึกษาแบคทีรอยด์จาก cowpea ก็พบความสัมพันธ์เช่นเดียวกันนี้ (Zablotowicz และ Focht, 1979) และการศึกษา respiration-driven traslocation พบว่าเชื้อ<u>เบรดี-ไรโซเบียม จาโปนิคัม</u> สายพันธุ์ 505 ในสภาวะปราศจากออกซิเจน สามารถใช้ไนเตรตเป็น

ตัวรับอิเลคตรอนสำหรับกระบวนการ proton translocation ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเอทีพี (Daniel และคณะ, 1980) สนับสนุนสมมติฐานดังกล่าว

2.2 <u>ความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกัน</u> Vance และคณะ (1979) ทดลองปลูกต้น Alfalfa ในอาหารที่ปราศจากต้นตอไนโตรเจน และทำให้เกิดปมด้วยเชื้อ <u>R. meliloti</u> จนผลิดอก จากนั้นจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างต้นที่ตัดส่วน shoot ออกร้อยละ 70-80 (harvested plants) กับต้นปกติ (control plant) เป็นเวลา 26 วัน พบว่าใน harvested plants จะมีความสัมพันธ์ของไนเตรตรีดัคเทสและไนโตรจิเนสแบบแปรผกผันกัน (negative correlation)คือแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในปมรากสูงขึ้น ขณะที่แอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชั่นลดลง อาจอธิบายได้ว่าแอคติวิตีของไนโตรจิเนสลดลงเนื่องจากตัวให้อิเลคตรอนและสารต้นตอคาร์บอนจากในส่วน shoot ซึ่งจะนำมาใช้ในกระบวนการตรึงไนโตรเจนลดลง แต่ไนเตรตรีดัคเทสไม่ต้องการสารดังกล่าวจากส่วน shoot ตัวให้อิเลคตรอนสำหรับไนเตรตรีดัคเทสอาจได้จากไมโตคอนเดรียในส่วนของรากเอง จึงเพียงพอที่จะป้อนให้แก่ไนเตรตรีดัคเทส ยิ่งกว่านั้นรากสามารถปรับเมตาบอลิสมของไนโตรเจน เพื่อให้มีต้นตอไนโตรเจนเพียงพอต่อการคงอยู่ของพืชและแบคทีรอยด์ โดยการเหนี่ยวนำให้ไนเตรตรีดัคเทสสูงขึ้นด้วย การศึกษาในปมรากถั่วเหลืองก็ได้ผลเช่นเดียวกัน กล่าวคือ แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสเพิ่มขึ้นเมื่อไนโตรจิเนสลดลง และเมื่อเติม ^{15}N-$NaNO_3$ แก่ส่วนราก จะตรวจพบ ^{15}N อยู่ใน exudate ของพืชเป็นจำนวนมาก แสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในปมรากถั่วเหลืองน่าจะทำหน้าที่ป้อนสารประกอบไนโตรเจนให้แก่พืชในขณะที่การตรึงไนโตรเจนลดลง (Randall และคณะ, 1978)

นอกจากนี้การศึกษา<u>เบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม</u> สายพันธุ์ USDA110, 61A76 และไรโซเบียมกลายพันธุ์ของมัน ซึ่งไม่มีแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทส (Vasconcelos และคณะ, 1979; Stephen และ Neyra, 1983) พบว่าไรโซเบียมกลายพันธุ์สามารถติดปมและตรึงไนโตรเจนได้สูงกว่าสายพันธุ์แม่ แสดงถึงความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกันของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเช่นกัน และตั้งสมมติฐานว่าแอคติวิตีของไนโตรจิเนสลดลง เนื่องจากการสะสมของไนไตรต์ แต่ข้อสมมติฐานนี้ยังไม่ได้รับการพิสูจน์

2.3 <u>ไม่มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน</u> Autoun และคณะ (1980) ไม่พบความสัมพันธ์ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดเมื่อทำการศึกษาปมรากของต้น Alfalfa Manhart และ Wong (1980) ทำการศึกษาเชื้อไรโซเบียมกลายพันธุ์ (mutant) ที่ไม่มีเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสใน cowpea

และ lupine พบว่าไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์จากปมรากของพืชทั้งสองชนิดทำหน้าที่รีดิวส์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ และแอคติวิตีของไนโตรจิเนสถูกยับยั้งเมื่อมีไนเตรต ไม่ว่าจะเป็นปมรากจากเชื้อที่กลายพันธุ์หรือเชื้อปกติ แสดงให้เห็นว่าไนไตรต์ซึ่งเป็นผลผลิตของไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์ไม่มีบทบาทยับยั้งแอคติวิตีของไนโตรจิเนส นั่นคือการลดลงของแอคติวิตีของไนโตรจิเนสไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส และเมื่อเติมไนเตรตร่วมกับน้ำตาลให้แก่ปมรากของ Lentil แอคติวิตีของไนโตรจิเนสจะไม่ลดลง

3. สมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส

ไนเตรตรีดัคเทส เป็นเอนไซม์ประเภทออกซิโดรีดัคเทส (oxidoreductase) ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่มีการขนส่งอิเลคตรอน เอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสมีอยู่ในพืช รา และแบคทีเรียต่าง ๆ (W.J. Payne, 1973) และมีสมบัติแตกต่างกัน สามารถจำแนกเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสออกตามหน้าที่ของมันได้ดังนี้

3.1 Assimilatory nitrate reductase เอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสชนิดนี้จะเปลี่ยนอนุมูลไนเตรตให้เป็นอนุมูลไนไตรต์ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลแอมโมเนียมสำหรับนำไปสังเคราะห์กรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจนต่าง ๆ ต่อไป Assimilatory nitrate reductase จึงเป็นเอนไซม์สำคัญที่จะสร้างแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต

$$NO_3^- \xrightarrow[\text{nitrate reductase}]{2e^-} NO_2^- \xrightarrow[\text{nitrite reductase}]{6e^-} NH_4^+ \xrightarrow[\text{glutamine synthetase}]{} \text{glutamine}$$

ในการเปลี่ยนอนุมูลไนเตรตให้เป็นอนุมูลไนไตรต์นี้จะมีกระบวนการถ่ายทอดอิเลคตรอนจากตัวให้อิเลคตรอนแก่อนุมูลไนเตรต จึงมีการจำแนกเอนไซม์ตามความจำเพาะ (specificity) ของตัวให้อิเลคตรอนได้เป็น 2 ประเภท (Guerrero และคณะ, 1981) คือ

3.1.1 Ferredoxin-nitrate reductase พบใน Cyanobacteria (Blue-green algae) และ Photosynthetic bacteria ในขณะที่เกิดไนเตรตรีดัคชั่นเอนไซม์นี้จะต้องอาศัย reduced Ferredoxin ช่วยรับอิเลคตรอนจาก NAD(P)H ลักษณะโมเลกุลของเอนไซม์เป็น molybdoprotein ที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์เพียงสายเดียว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 75 กิโลดาลตัน (Kdal)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 NAD(P)H-nitrate reductase พบในสาหร่ายสีเขียว (green algae) พืชชั้นสูง (higher plant) และรา (fungi) ใช้ NADPH หรือ NADH ช่วยในการเร่งปฏิกิริยารีดักชั่นของอนุมูลไนเตรต ลักษณะโมเลกุลของเอนไซม์เป็น oligomeric enzyme ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 197 ถึง 460 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยชนิดเดียวกันหลาย ๆ หน่วย มี FAD, ไซโตโครมชนิดบี (cytochrome b) และโมลิบดีนัมเป็น prosthetic group แบ่งเอนไซม์ตามความจำเพาะของตัวให้อิเลคตรอนได้เป็น 3 ชนิด (Campbell และ Smarrelli, 1984; Hewitt และ Notton, 1980) ได้แก่ NADH-dependent nitrate reductase พบในพืชชั้นสูง (higher plant) เช่น ถั่วเหลือง (Jolly และ Tolbert, 1978) และสาหร่ายสีเขียว Chlorella, NAD(P)H-dependent nitrate reductase พบในยีสต์ (yeast) และสาหร่ายสีเขียว Ankistrodesmus braunii และ NADPH-dependent nitrate reductase พบในรา Aspergillus และ Neurospora

3.2 Dissimilatory nitrate reductase หรือไนเตรตรีดักเทสที่มีหน้าที่ในกระบวนการหายใจในสภาวะปราศจากออกซิเจน (B.A. Bryan, 1981) พบในแบคทีเรียส่วนใหญ่ เช่น E. coli, Vullonella alcalescens, Achromobacter fisheri (D.M. Yordy และ K.L. Ruoff, 1981) เป็นต้น กระบวนการนี้เรียกว่า Nitrate respiration ทำให้เกิด intermediate product ได้แก่ อนุมูลไนไตรต์ ไนตริกออกไซด์ และไนตรัสออกไซด์ ซึ่งแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของแบคทีเรีย

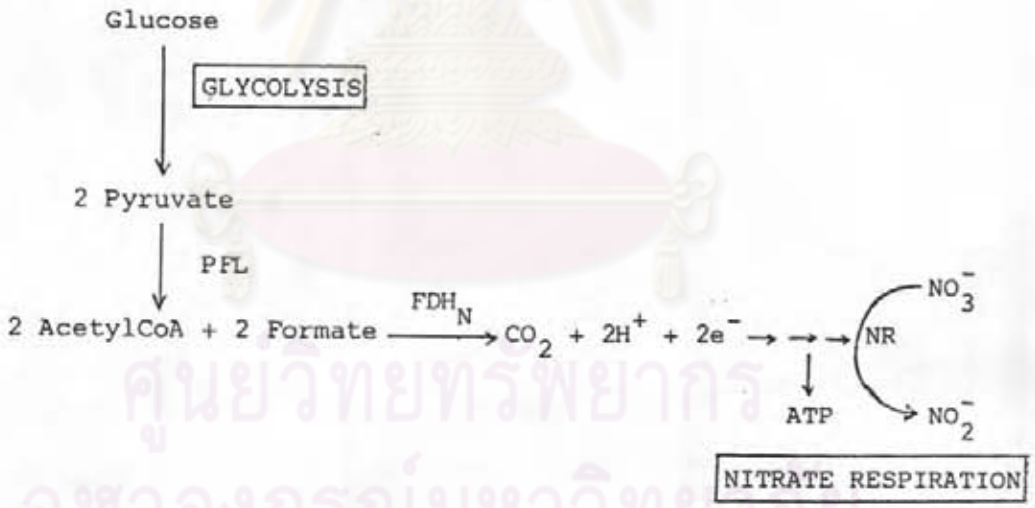
$$NO_3^- \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow NO \longrightarrow N_2O \longrightarrow N_2$$

เอนไซม์นี้อยู่บนเยื่อเซลล์ ในสภาวะปกติจะถูกกดดันไว้ด้วยออกซิเจนเสมอ (C.C. Delwiche และ B.A. Bryan, 1976) แต่จะถูกเหนี่ยวนำและทำงานได้ในสภาวะปราศจากออกซิเจนและมีไนเตรตเท่านั้น

4. กระบวนการ nitrate respiration ของเอสเคอริเคีย โคไล (E. coli) และความสัมพันธ์กับ dissimilatory nitrate reductase

E. coli สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำและไนเตรตสูง โดยใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายแทนออกซิเจนในสภาวะแอโรบิกซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า nitrate respiration โดยใช้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ถูกเหนี่ยวนำขึ้นมาในสภาวะดังกล่าว

เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสุดท้ายของกระบวนการนี้ ในกระบวนการ nitrate respiration นี้ ไพรูเวตจาก glycolysis จะถูกเปลี่ยนเป็นอะเซทิลโคเอนไซม์เอ และฟอร์มเมต (ดังรูปที่ 1) โดยเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์มเมตไลเอส (PFL) ฟอร์มเมตที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์โดยเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N (FDH_N) พร้อมกับมีอิเลคตรอนเกิดขึ้น อิเลคตรอนที่เกิดขึ้นนี้จะถูกส่งไปยังกระบวนการขนส่งอิเลคตรอน ซึ่งมีไซโตโครมชนิดบี และยูบิควินโนนเป็นองค์ประกอบ อนุมูลไนเตรตจะทำหน้าที่รับอิเลคตรอนเป็นตัวสุดท้าย และถูกรีดิวส์เป็นอนุมูลไนไตรต์ ซึ่งปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดยเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส (NR) ดังกล่าวแล้ว (Showe และ De Moss, 1968; Ruiz-Herrera และ De Moss, 1969; MacGregor, 1975) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า FDH_N และ NR เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการ nitrate respiration ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการสร้าง ATP โดยปฏิกิริยาที่ควบคู่กับการขนส่งอิเลคตรอน ATP จะเกิดขึ้น 2-3 โมลต่อไนเตรต 1 โมล



รูปที่ 1 วิถีต่าง ๆ ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนที่มีไนเตรตในเอสเคอริเคีย โคไล (Pascal และคณะ, 1981)

4.1 สมบัติของเอนไซม์ dissimilatory nitrate reductase ในเอสเคอริเคีย โคไล

นอกจากสมบัติของ dissimilatory nitrate reductase ที่กล่าวแล้วในข้อ 2.2 Michael และคณะ (1984) ยังศึกษาพบว่า dissimilatory nitrate reductase ใน E. coli ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย (subunits) คือ α-subunit มีน้ำหนักประมาณ 150 กิโลดาลตัน เป็นหน่วยเร่งปฏิกิริยา มีโมลิบดีนัม และ non-heme iron เป็นองค์ประกอบ β-subunit มีน้ำหนักประมาณ 60 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่เกี่ยวกับการจับตัวของเอนไซม์เข้ากับส่วนเยื่อเซลล์ และ γ-subunit มีน้ำหนักประมาณ 20 กิโลดาลตัน เป็นไซโตโครมชนิดบี

4.2 สมบัติของเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N ในเอสเคอริเคีย โคไล

เป็นรูปแบบหนึ่งของเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนส ซึ่งนับเป็นเอนไซม์หลักในnitrate respiration ดังกล่าวแล้ว ถูกเหนี่ยวนำด้วยอนุมูลไนเตรตและถูกกดดันด้วยออกซิเจนเช่นเดียวกับ dissimilatory nitrate reductase พบอยู่ที่ส่วนเยื่อเซลล์ มีความจำเพาะต่อตัวรับอิเลคตรอนสังเคราะห์ฟีนาซีนเมทโธซัลเฟต (Phenazine methosulfate : PMS) ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 3 ชนิด คือ α β และ γ ซึ่งมีน้ำหนักโมลเกุลประมาณ 110, 32 และ 20 กิโลดาลตัน โดยมีอัตราส่วน α:β:γ เท่ากับ 1:1.2:0.55 นอกจากนี้ยังประกอบด้วยฮีม, โมลิบดินัม, ซิลีเนียม, non-heme iron และซัลไฟด์

จากรายงานดังกล่าวแล้วในข้อ 2 พบความสัมพันธ์ระหว่างไนเตรตรีดัคเทสกับไนโตรจิเนสในรูปแบบต่าง ๆ กัน จึงยากต่อการสรุปความสัมพันธ์ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ สิ่งที่ทำให้เกิดความแตกต่างอันนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณแบคทีเรียที่สกัดจากปมรากน้อยมาก และมีสิ่งปนเปื้อนจากส่วนของพืชบริเวณปมรากด้วย ดังนั้นสิ่งที่ต้องการในการขจัดปัญหานี้คือ ไนเตรต-รีดัคเทสจำนวนมากเพียงพอต่อการวัดแอคติวิตี และปราศจากการปนเปื้อนจากส่วนของพืช ปัญหาอีกอันหนึ่งคือ ถึงแม้ว่ารายงานดังกล่าวจะแสดงความสัมพันธ์ของเอนไซม์ทั้งสองดังกล่าวแล้ว แต่ยังไม่ได้ศึกษาหน้าที่อย่างชัดเจนว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสเป็นเอนไซม์ที่ทำงานในระบบการ – หายใจของแบคทีเรียในสภาวะปราศจากออกซิเจน (dissimilatory enzyme) หรือในระบบการป้อนสารประกอบไนโตรเจนแก่พืช (assimilatory enzyme) ดังกล่าวแล้ว จึงเป็นการยากต่อการอธิบายว่าเอนไซม์นี้ทำงานเกี่ยวข้องกับไนโตรจิเนสอย่างไร

มีผู้พยายามที่จะสร้างสภาวะในหลอดทดลองให้มีสภาวะเหมือนในปมราก เพื่อสะดวกในการศึกษาการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมและพืชตระกูลถั่ว พบว่าเชื้อไรโซเบียมหลายสายพันธุ์สามารถตรึงไนโตรเจนได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (J.D. Pagan และคณะ, 1975; D.L. Keister, 1975; A.K. Agarwal และ D.L. Keister; 1983) Kurz และ LaRue (1975) พบว่าเชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม 61A76 เมื่อเลี้ยงในสภาวะปราศจากออกซิเจนที่มีไนเตรตจะสามารถสร้างเอนไซม์ไนโตรจิเนส และ haemo-protein ชนิดเดียวกับที่พบในแบคทีรอยด์ได้ แต่จะไม่พบสมบัติเช่นนี้ในเชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 32H1 งานวิจัยนี้ได้พยายามหาสภาวะในหลอดทดลองสำหรับเชื้อเบรดี-ไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 ที่คล้ายสภาวะแบคทีรอยด์ในปมราก เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส ก่อนที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของไนเตรตรีดัคเทสและไนโตรจิเนสต่อไป

5. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

5.1 ทำการทดลองเหนี่ยวนำเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสของเชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 ภายใต้สภาวะไมโครแอโรบิก ซึ่งเป็นสภาวะที่คล้ายปมรากถั่ว

5.2 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในสภาวะไมโครแอโรบิก

5.3 ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N และไนเตรตรีดัคเทส

5.4 ศึกษาอิทธิพลของไนเตรตต่อการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย