บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การเหนี่ยวนำเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122

นำเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 มาทดลองเหนี่ยวนำเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสด้วยอนุมูลไนเตรต โดยเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะไมโครแอโรบิกในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรข้อ 2.2 ของวิธีการทดลอง เปรียบเทียบกับเชื้อที่เจริญในสภาวะแอโรบิก และสภาวะไมโครแอโรบิกที่ไม่มีอนุมูลไนเตรต

1.1 รูปแบบการเจริญของเชื้อและรูปแบบการเกิดเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในสภาวะไมโครแอโรบิก

จากรูปที่ 5 เห็นได้ว่าเชื้อในสภาวะแอโรบิกเจริญได้ดีกว่า ทั้งอัตราการเจริญและปริมาณ กล่าวคือในสภาวะแอโรบิก เบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 ซึ่งเป็นแบคทีเรียเจริญช้า (slow-growing bacteria) เจริญถึงระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) ในวันที่ 5 และมีค่าการเจริญสูงสุดโดยดูจาก OD_{680} เป็น 1.2 ในขณะที่สภาวะไมโครแอโรบิกนั้นไรโซเบียมไม่มีการเจริญในช่วงต้น แต่เริ่มเจริญหลังวันที่ 3 และเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ในวันที่ 7

การเหนี่ยวนำเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสด้วยโปตัสเซียมไนเตรตเกิดได้ในสภาวะไมโครแอโรบิกเท่านั้น และมีรูปแบบการเกิดเอนไซม์คล้ายกับรูปแบบการเจริญของเชื้อ กล่าวคือ แม้การเจริญของเชื้อในสภาวะแอโรบิกจะสูงมากกว่าในสภาวะไมโครแอโรบิกถึง 3 เท่า (OD_{680} เท่ากับ 1.2) แต่แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ต่ำมาก (0.6 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และมีค่าคงที่ตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 9 ของการเจริญของเชื้อ ส่วนในสภาวะไมโครแอโรบิก เอนไซม์มีแอคติวิตีจำเพาะสูงถึง 5.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนในวันที่ 5 การเพิ่มของแอคติวิตีนี้คล้ายกับรูปแบบการเจริญของเชื้อคือสูงที่สุดในวันที่ 7 และหลังจากนั้นจะคงที่ตลอดการทดลอง ไม่พบการเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงในสภาวะไมโครแอโรบิกที่ไม่มีอนุมูลไนเตรต รูปแบบการเกิดของเอนไซม์นี้ชี้ให้เห็นความสำคัญของเอนไซม์ต่อการเจริญของเชื้อในสภาวะไมโครแอโรบิก

รูปที่ 5 ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทสของเชื้อ เบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 เมื่อเลี้ยงในสภาวะแอโรบิก และไมโครแอโรบิก เมื่อมีและไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตามรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 4 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.1

สัญญลักษณ์ : ○—○ OD_{680} เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะแอโรบิก

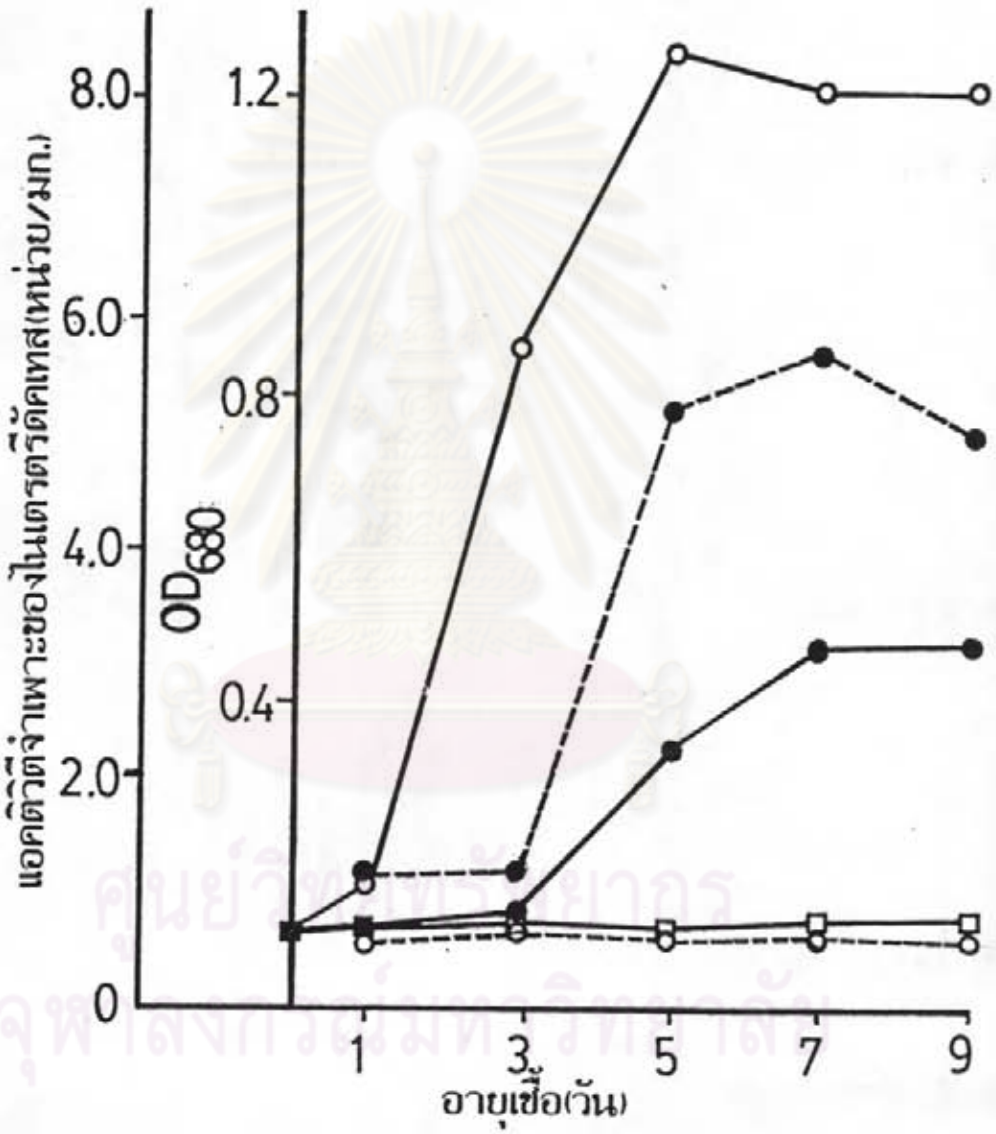
●—● OD_{680} เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะไมโครแอโรบิก ที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์

□—□ OD_{680} เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะไมโครแอโรบิก ที่ไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต

○--○ แอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดัคเทสเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะแอโรบิก

●--● แอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดัคเทสเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะไมโครแอโรบิกที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


แอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดัคเทส(หน่วย/มก.)
8.0
6.0
4.0
2.0
0
1.2
0.8
0.4
OD680
1
3
5
7
9
อายุเชื้อ(วัน)

1.2 ผลของความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรตต่อรูปแบบการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส

ได้เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของเชื้อและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยอนุมูลไนเตรตความเข้มข้น 2 และ 6 มิลลิโมลาร์ (ร้อยละ 0.012 และ 0.037) ซึ่งเป็นค่าโดยประมาณของแร่ธาตุไนโตรเจนในดินของประเทศไทย (ดังแสดงในตารางที่ 1) จากรูปที่ 6 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรตสูงขึ้นจะทำให้การเจริญของเชื้อในวันที่ 5 ถึง 9 สูงขึ้น แต่แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันมากนัก และรูปแบบการเพิ่มของเอนไซม์ก็คล้ายกันด้วย

ในการทำการทดลองทุกครั้ง ได้เลือกใช้ความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรตเป็น 6 มิลลิโมลาร์ ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ เพราะได้ปริมาณของเอนไซม์ในการเตรียมแต่ละครั้งมากกว่า

2. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสของเซลล์สมบูรณ์

จุดประสงค์หลักของการศึกษาไนเตรตรีดัคเทสนี้คือการติดตามตรวจวัดเอนไซม์จากแบคทีเรียยีสต์และรา เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาของการปนเปื้อนจากโปรตีนของพืช การทดลองจะทำได้สะดวกและสรุปผลได้ถูกต้องกว่า หากสามารถวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสได้โดยตรงจากเซลล์สมบูรณ์ ดังนั้นจึงทดลองวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จากเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยง in vitro ในสภาวะไมโครแอโรบิกดังกล่าวในข้อ 4 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจวัดแอคติวิตีต่อไป การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในเซลล์สมบูรณ์ แตกต่างจากการวัดในเอนไซม์อิสระในสารละลาย เพราะผนังเซลล์จะสามารถจำกัดการผ่านเข้าออกของสารตั้งต้นของเอนไซม์ได้ ดังนั้นจึงต้องหาเวลาอินคิวเบตที่เหมาะสมที่สารตั้งต้นและตัวให้อิเลคตรอนจะสามารถผ่านผนังเซลล์เข้าไปถึงเอนไซม์จนความเข้มข้นอิ่มตัวต่อเอนไซม์ (saturate concentration) ดังนี้

2.1 อัตราการเข้าสู่เซลล์ของอนุมูลไนเตรต

ได้ทำการอินคิวเบตเซลล์ปริมาณ 0.3 มก.โปรตีน/มล. กับตัวให้อิเลคตรอนโซเดียมซัคซิเนต ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งโซเดียมซัคซิเนตเข้าสู่เซลล์ให้อิ่มตัวต่อเอนไซม์แล้ว (รูปที่ 7) จากนั้นจึงเติมโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ให้กับเซลล์ หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เวลาต่าง ๆ วัดปริมาณ

ตารางที่ 1 แสดงค่าธาตุอาหารไนโตรเจนในดินในประเทศไทยโดยประมาณ (เกษตรและสหกรณ์, 1963)

ภาค	ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)
ภาคเหนือ	0.04 - 0.07
ภาคกลาง	0.05 - 0.10
ภาคตะวันออก	0.03 - 0.07
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	0.02 - 0.08
ภาคใต้	0.03 - 0.08

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 ผลของความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรตต่อรูปแบบการเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสของเชื้อ เบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไมโครแอโรบิกที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเติมโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้นต่าง ๆ กันลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 4.2 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.2

สัญญลักษณ์: สำหรับเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์

●—● การเจริญของเชื้อเมื่อวัดที่ OD_{680}

●--● แอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดัคเทส

○--○ แอคติวิตีทั้งหมดของไนเตรตรีดัคเทส

สำหรับเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

▲—▲ การเจริญของเชื้อเมื่อวัดที่ OD_{680}

▲--▲ แอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดัคเทส

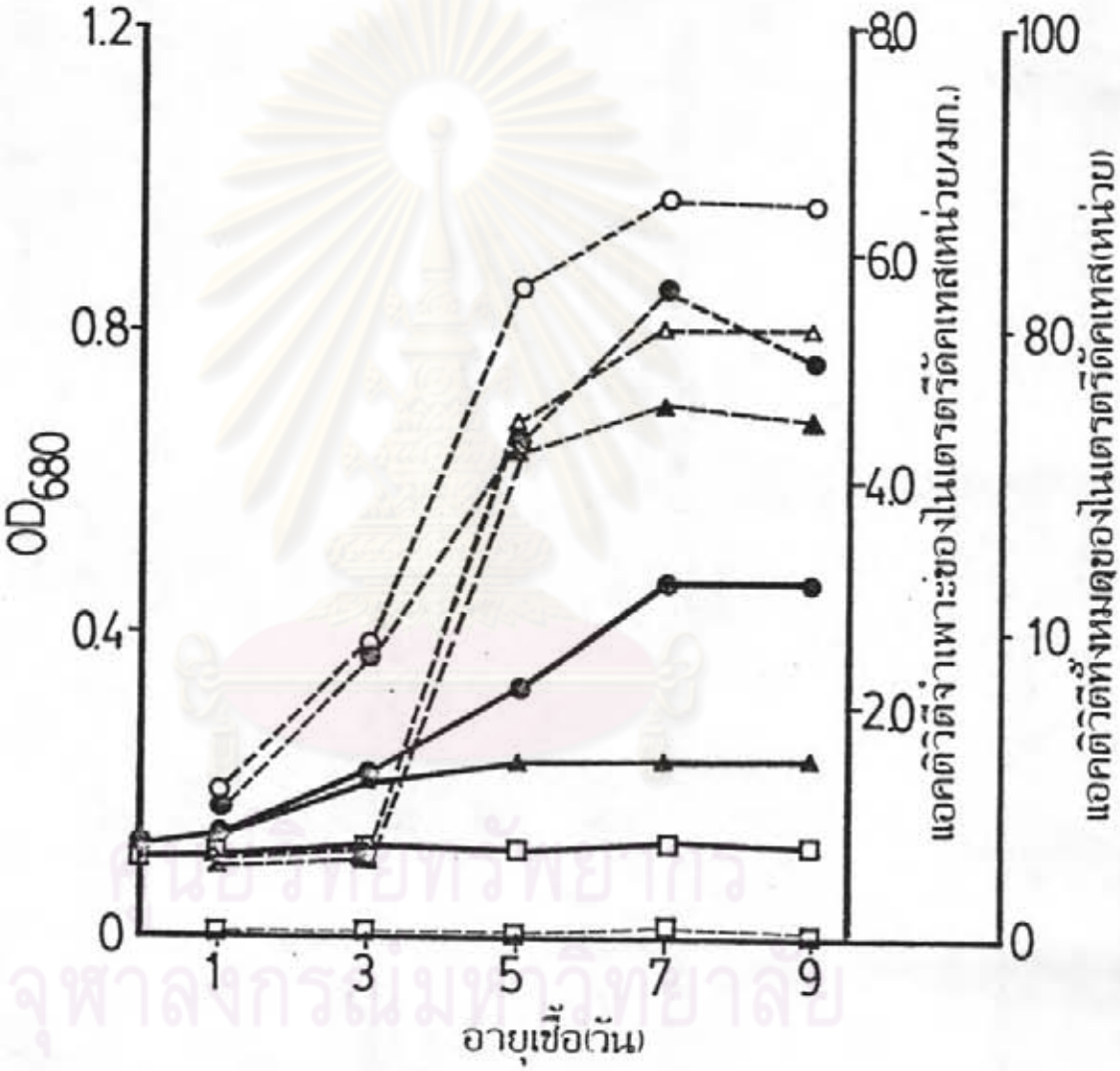
△--△ แอคติวิตีทั้งหมดของไนเตรตรีดัคเทส

สำหรับเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต

□—□ การเจริญของเชื้อเมื่อวัดที่ OD_{680}

□--□ แอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดัคเทส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

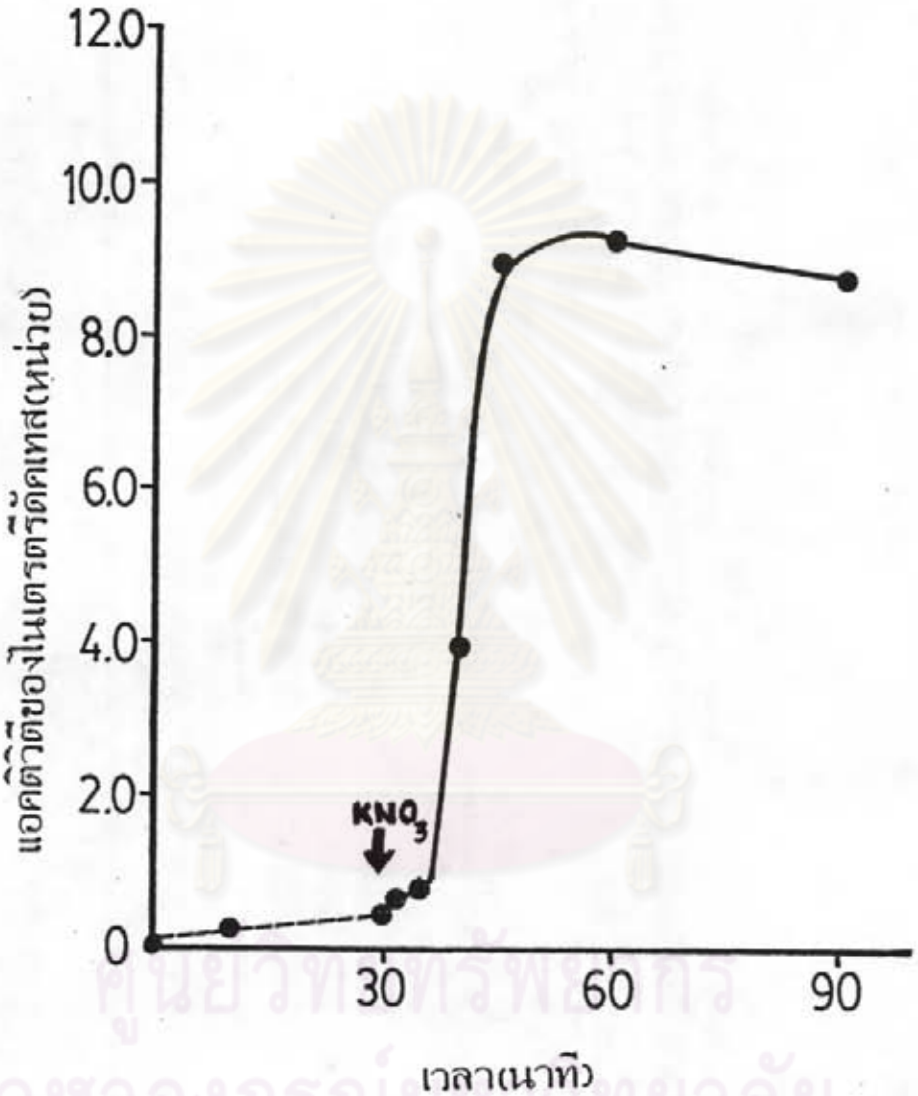

1.2
0.8
0.4
0
OD680
8.0
6.0
4.0
2.0
0
แอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดิคเทสหน่วย/มก.
100
80
10
0
แอคติวิตีทั้งหมดของไนเตรตรีดิคเทสหน่วย
1
3
5
7
9
อายุเชื้อ(วัน)

รูปที่ 7 เวลาสำหรับการขนส่งอนุมูลไนเตรตเข้าสู่เซลล์ โดยอินคิวเบตเซลล์แขวนลอยกับโซเดียมซัคซิเนตและบัฟเฟอร์ ทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.2 ที่เวลา 10 และ 30 นาที แล้วจึงเติมโปตัสเซียมไนเตรตและวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทส ที่เวลาต่าง ๆ กันต่อไปเป็นเวลา 60 นาที รายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 9.2.2

สัญญลักษณ์: ●---● เมื่ออินคิวเบตเซลล์แขวนลอยกับโซเดียมซัคซิเนต

●—● เมื่อเติมโปตัสเซียมไนเตรต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลิตภัณฑ์ในไตรด์ที่เกิดขึ้น รูปที่ 7 แสดงให้เห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทส จะสูงสุดหลังจากเติมโปตัสเซียมไนเตรตให้กับเซลล์เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจะคงที่ถึงแม้จะอินคิวเบตต่ออีกนานถึง 90 นาที แสดงว่าโปตัสเซียมไนเตรตใช้เวลา 15 นาที ในการเข้าสู่เซลล์ให้จนมีความเข้มข้นอิ่มตัวต่อเอนไซม์

2.2 ผลของเวลาต่อแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในเซลล์สมบูรณ์

เมื่อใช้เซลล์ที่มีปริมาณโปรตีน 0.52, 1.62 และ 3.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 8) อินคิวเบตกับโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และตัวให้อิเลคตรอนโซเดียมซัคซิเนตความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ พบว่าทุกความเข้มข้นของโปรตีนให้ผลิตภัณฑ์ในไตรด์สูงสุดเมื่อเวลาอินคิวเบตเท่ากันคือ 30 นาที ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการขนส่งหรือแพร่สารตั้งต้นทั้งสองเข้าสู่เซลล์จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดต่อเอนไซม์จึงไม่ควรน้อยกว่า 30 นาที

2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสกับปริมาณโปรตีนของเซลล์สมบูรณ์

จากรูปที่ 9 เมื่อวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสที่เวลา 30 นาที เหมือนการทดลองในข้อ 2 โดยใช้ปริมาณโปรตีนของเซลล์ตั้งแต่ 0 จนถึง 3.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์ที่มีปริมาณโปรตีนในช่วง 0 ถึง 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีความสัมพันธ์กับแอคติวิตีของเอนไซม์เป็นลักษณะเส้นตรง โดยมีแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ในช่วง 0 ถึง 4 หน่วย เมื่อเพิ่มเซลล์โปรตีนขึ้น แอคติวิตีจะไม่เพิ่มขึ้นอีก อธิบายได้ว่า ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและตัวให้อิเลคตรอนเพียงพอ สำหรับเอนไซม์ในช่วงโปรตีน 0 ถึง 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น การทดลองต่อไปได้เลือกใช้ปริมาณเซลล์เป็น 0.3 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตรเสมอ

2.4 ผลของความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรตต่อแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทส

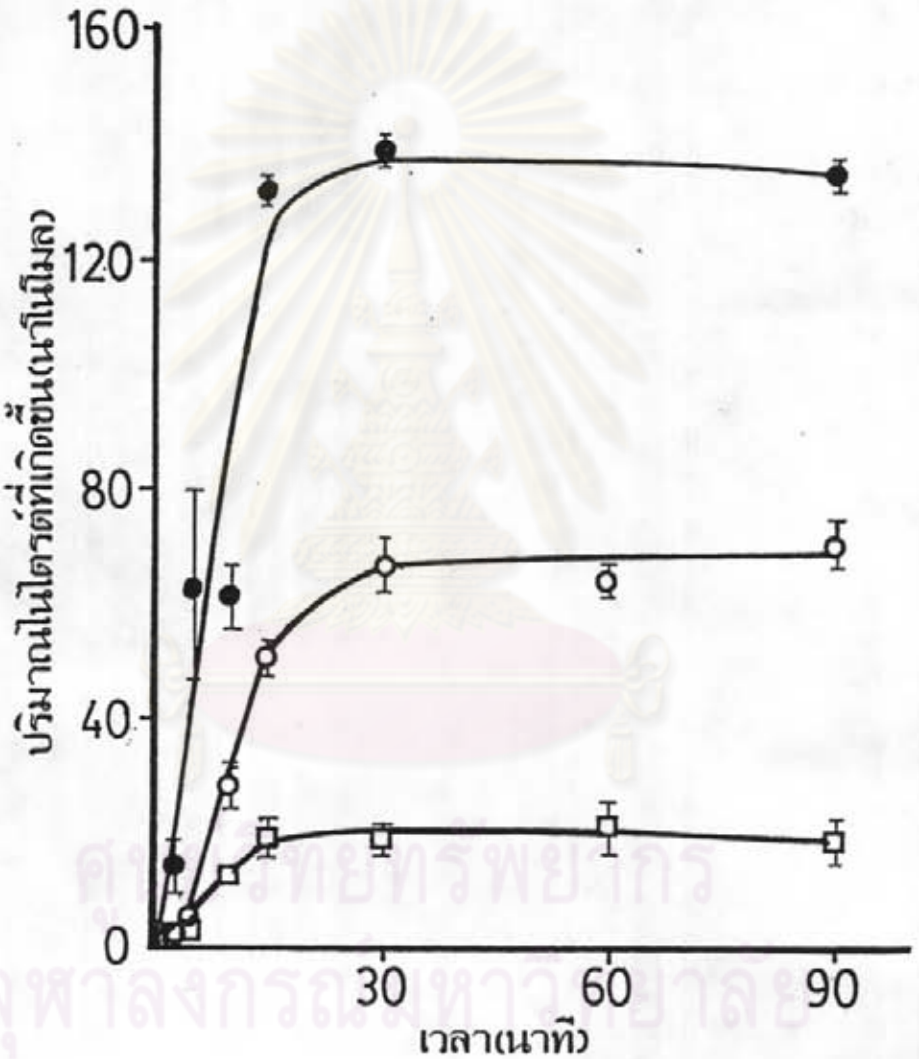
เมื่อควบคุมปริมาณเซลล์ที่ 0.3 มก.โปรตีน/มล. และใช้โปตัสเซียมไนเตรตซึ่งเป็นสารตั้งต้นความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 30 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 10) พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้โปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้นตั้งแต่ 3 มิลลิโมลาร์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรตอีกแอคติวิตีจะไม่สูงขึ้นอีก และไม่พบว่าสารตั้งต้นปริมาณมากจะยับยั้งเอนไซม์ได้ (substrate inhibition) ดังนั้นในการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในเซลล์สมบูรณ์ จึงได้เลือกใช้โปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นสารตั้งต้นตลอดการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ผลของเวลาต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทส เมื่อทำการวัดใน เซลล์สมบูรณ์ เมื่อใช้โซเดียมซัคซิเนตเป็นตัวให้อิเลคตรอน

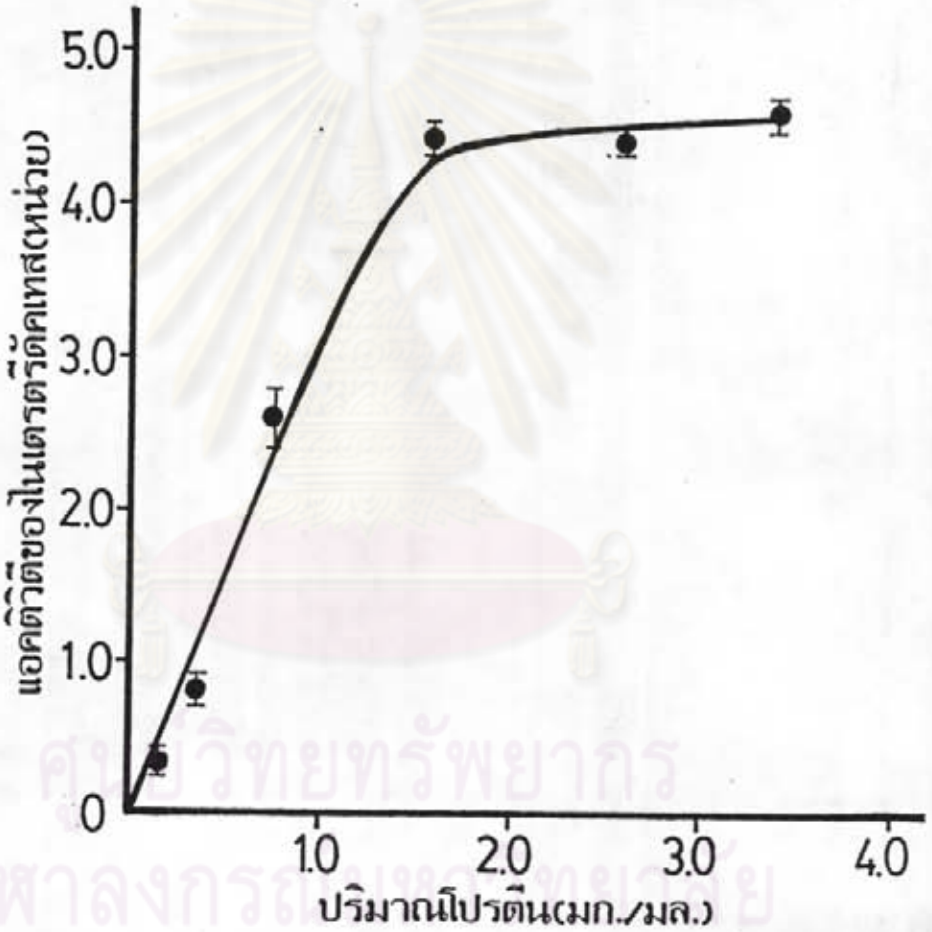
อินคิวเบตเซลล์ปริมาณ 0.52 (□), 1.62 (○) และ 3.67 (●) มก.โปรตีน/มล. ตามลำดับ กับสารทำปฏิกิริยา ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 9.2.2 เมื่อถึงเวลาต่าง ๆ จึงหยุดปฏิกิริยาและวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


160
120
80
40
0
30
60
90
ปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้น(นาโนโมล)
เวลา(นาที)

รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสและปริมาณโปรตีนของเซลล์สมบูรณ์ เมื่อใช้เวลาในการอินคิวเบต 30 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.2

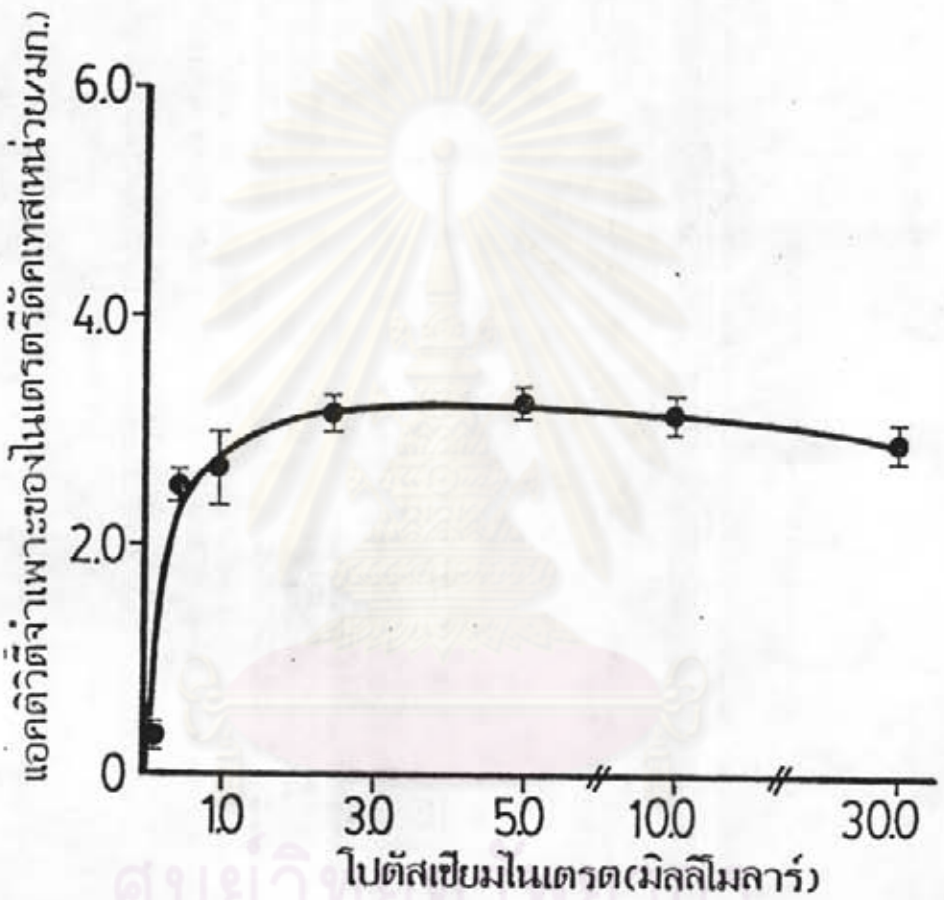
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 ผลของความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรตต่อการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส เมื่อทำการวัดในเซลล์สมบูรณ์ โดยใช้โปตัสเซียมไนเตรตซึ่งเป็นสารตั้งต้นในสารทำปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน รายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 9.2.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 ผลของเวลาต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเลคตรอน

เนื่องจาก nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (NADH) มีผลรบกวนต่อการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ไนไตรต์ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ (รูปที่ 11) ดังนั้นหลังจากหยุดปฏิกิริยาแล้วจึงต้องขจัด NADH ที่หลงเหลืออยู่ โดยการเติมฟีนาซีนเมทโธซัลเฟต (PMS) ความเข้มข้น 0.005 มิลลิโมลาร์ PMS จะทำงานโดยออกซิไดส์ NADH ให้เป็น NAD^+ (nicotinamide adenine dinucleotide) ซึ่งต้องใช้เวลาในการขจัด NADH 2 ชั่วโมง ก่อนที่จะทำการวัดผลิตภัณฑ์ไนไตรต์ที่เกิดขึ้น

จากรูปที่ 12 แสดงเวลาที่ใช้สำหรับการขนส่ง NADH เข้าสู่เซลล์ เมื่อใช้เซลล์ที่มีปริมาณโปรตีน 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ NADH ความเข้มข้น 0.3 และ 0.67 มิลลิโมลาร์ จะให้ผลิตภัณฑ์ไนไตรต์สูงสุดเมื่อเวลา 30 นาที และมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการขนส่งหรือแพร่ NADH เข้าสู่เซลล์จนได้ความเข้มข้นเหมาะสมที่สุดต่อเอนไซม์จึงไม่ควรน้อยกว่า 30 นาที

สภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้จะนำไปใช้เพื่อหาแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทสเมื่อแปรชนิดของตัวให้อิเลคตรอนต่อไป

2.6 ความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของเซลล์สมบูรณ์ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

รูปที่ 13 แสดงค่าแอคติวิตีที่เหลืออยู่เมื่อเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์จะคงที่ในช่วง 15 วันแรก แล้วจึงเริ่มลดลงเรื่อย ๆ โดยลดลงเหลือประมาณร้อยละ 50 เมื่อเก็บเป็นเวลานาน 40 วัน และเหลือประมาณร้อยละ 15 เมื่อเก็บเป็นเวลานาน 60 วัน ในการศึกษาเอนไซม์จากเซลล์จึงใช้เซลล์ใหม่หรือเซลล์ที่เก็บไว้ไม่เกิน 15 วันเสมอ

3. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในส่วนโซโมจิเนต

ในบางการทดลองจำเป็นต้องติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ในส่วนของโซโมจิเนต จึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการวัดแอคติวิตีในโซโมจิเนตดังนี้

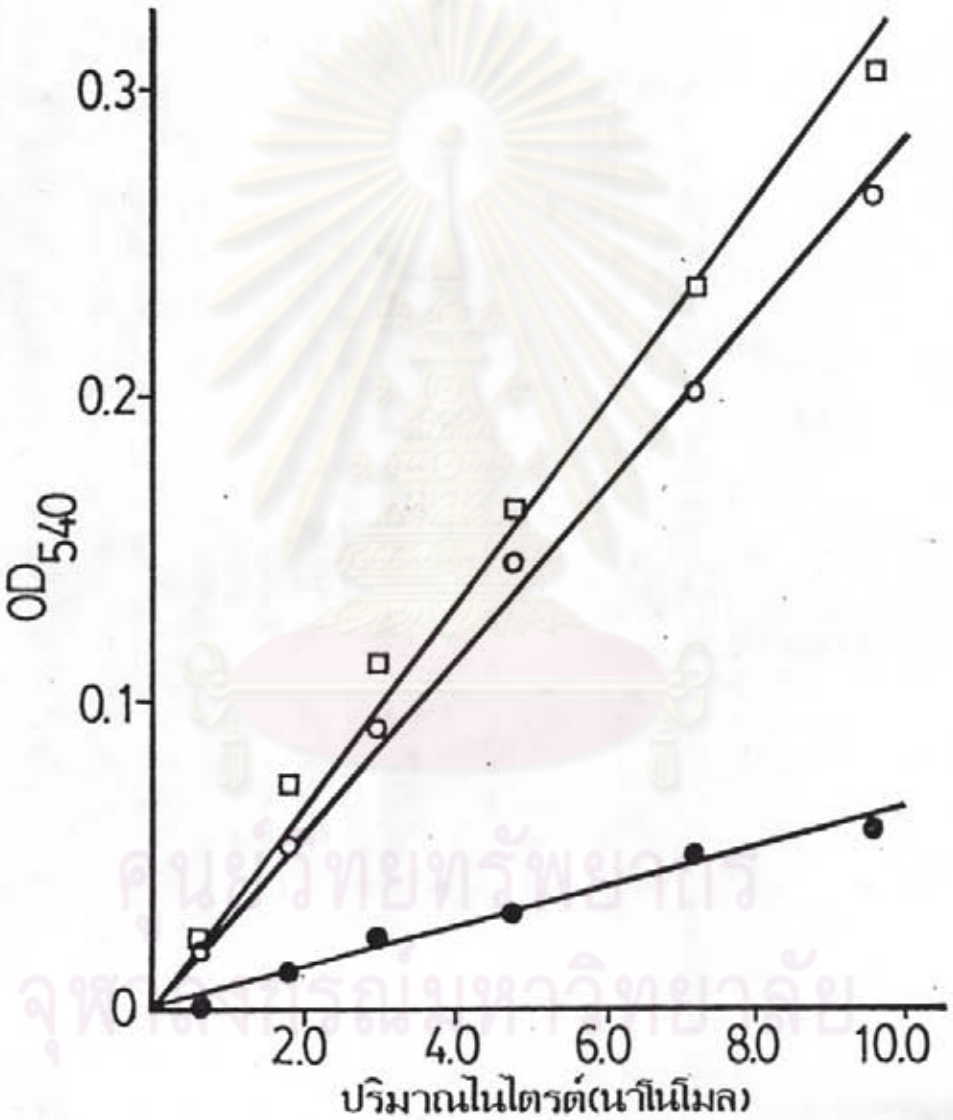
รูปที่ 11 ผลของ NADH ต่อการวัดปริมาณไนไตรต์ ซึ่งเป็นการวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายซัลฟานิลามีด ร้อยละ 1 และสารละลาย N-(1-naphthyl) ethylenediamine hydrochloride ร้อยละ 0.02 ใช้โซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ สร้างกราฟมาตรฐาน

สัญญลักษณ์ : ●—● NADH ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

○—○ NADH ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ และเติม PMS ความเข้มข้น 0.005 มิลลิโมลาร์

□—□ โซเดียมซัคซิเนตความเข้มข้น 12.5 โมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17448868

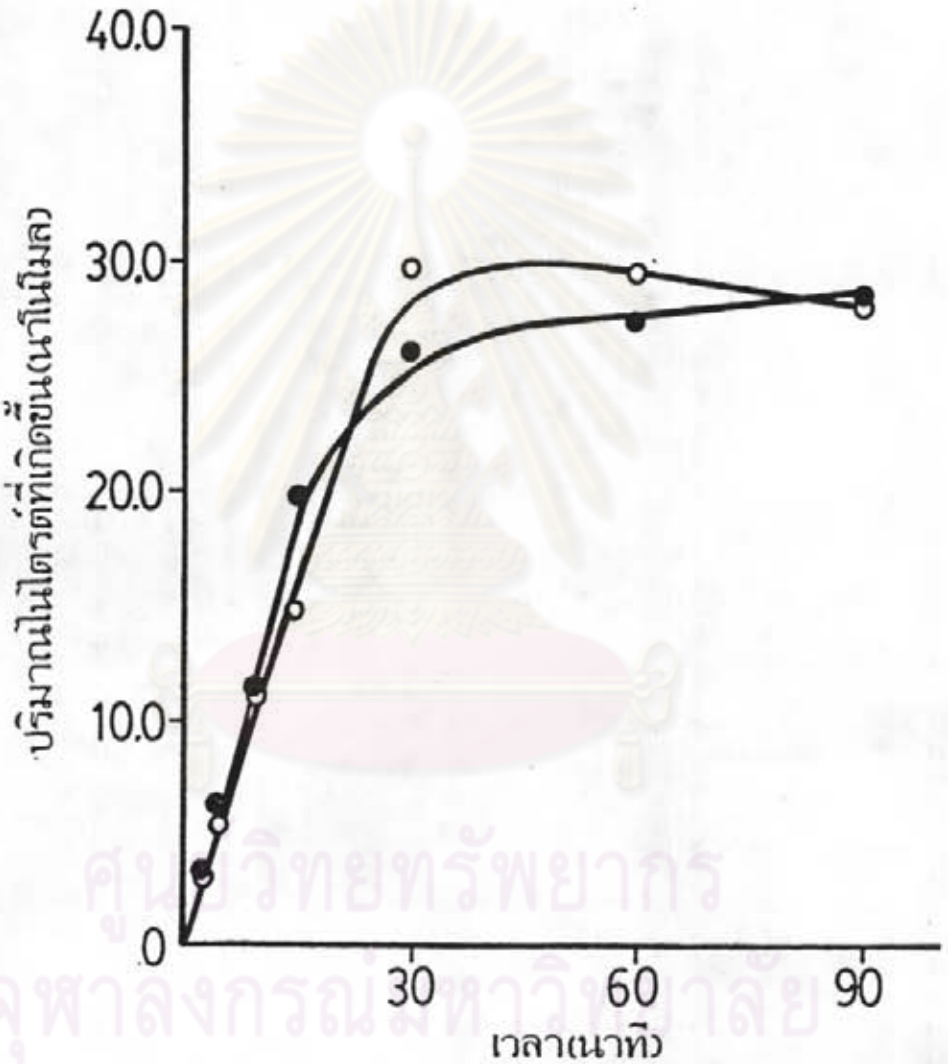
รูปที่ 12 ผลของเวลาต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตตรีดัคเทส เมื่อทำการวัดในขณะที่เซลล์สมบูรณ์ โดยใช้ NADH เป็นตัวให้อิเลคตรอนแทนโซเดียมซัคซิเนต

อินคิวเบต เซลล์ที่มีปริมาณโปรตีน 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารทำปฏิกิริยา ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 9.2.2 เมื่อถึงเวลาต่าง ๆ จึงหยุดปฏิกิริยา แล้วเติม PMS ความเข้มข้น 0.005 มิลลิโมลาร์ เพื่อกำจัด NADH ที่หลงเหลืออยู่ ซึ่งรบกวนการวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้น อินคิวเบตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงทำการวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้น

สัญญลักษณ์: ●—● เมื่อใช้ NADH ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

○—○ เมื่อใช้ NADH ความเข้มข้น 0.67 มิลลิโมลาร์

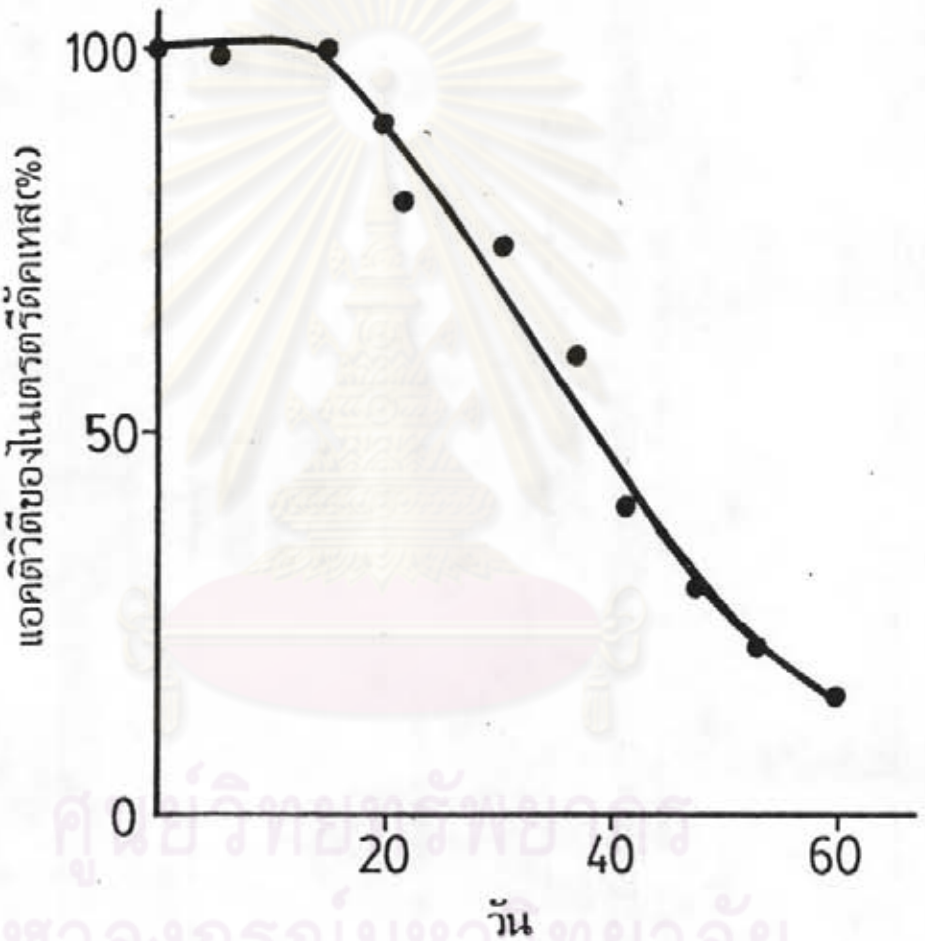
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 ความเสถียรของเอนไซม์ในเตตรีดัคเทส เมื่อเก็บเซลล์สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.2 ในช่วงเวลาต่าง ๆ กันนาน 60 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 ผลของเวลาต่อแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสเมื่อวัดในส่วนโฮโมจิเนต

เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรต และโซเดียมซัคซิเนต ที่ 7.5 และ 12.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แล้วแปรค่าโปรตีนของโฮโมจิเนตเป็น 0.18, 0.37 และ 1.22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่สองความเข้มข้นสุดท้ายนั้น ปริมาณผลิตภัณฑ์ไนไตรต์ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 4 นาที และเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น แอคติวิตีจะเริ่มเบี่ยงเบนออกจากความสัมพันธ์อันนี้ เห็นได้ชัดว่าเวลาที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีในเซลล์และโฮโมจิเนตแตกต่างกัน ในการทดลองต่อไปได้เลือกเวลา 4 นาที ซึ่งเป็นความเร็วเริ่มต้นในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในโฮโมจิเนต และเพื่อใช้คำนวณหาค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์อื่น ๆ ต่อไป (รูปที่ 14)

3.2 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสกับปริมาณโปรตีนของส่วนโฮโมจิเนต

รูปที่ 15 เมื่อวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสที่เวลา 4 นาที โดยแปรปริมาณโปรตีนของโฮโมจิเนตตั้งแต่ 0 ถึง 4.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าช่วงปริมาณโปรตีนของโฮโมจิเนตที่เหมาะสมสำหรับการวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสอยู่ในช่วงปริมาณโปรตีน 0 ถึง 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การศึกษาสภาวะการสกัดและการวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทส

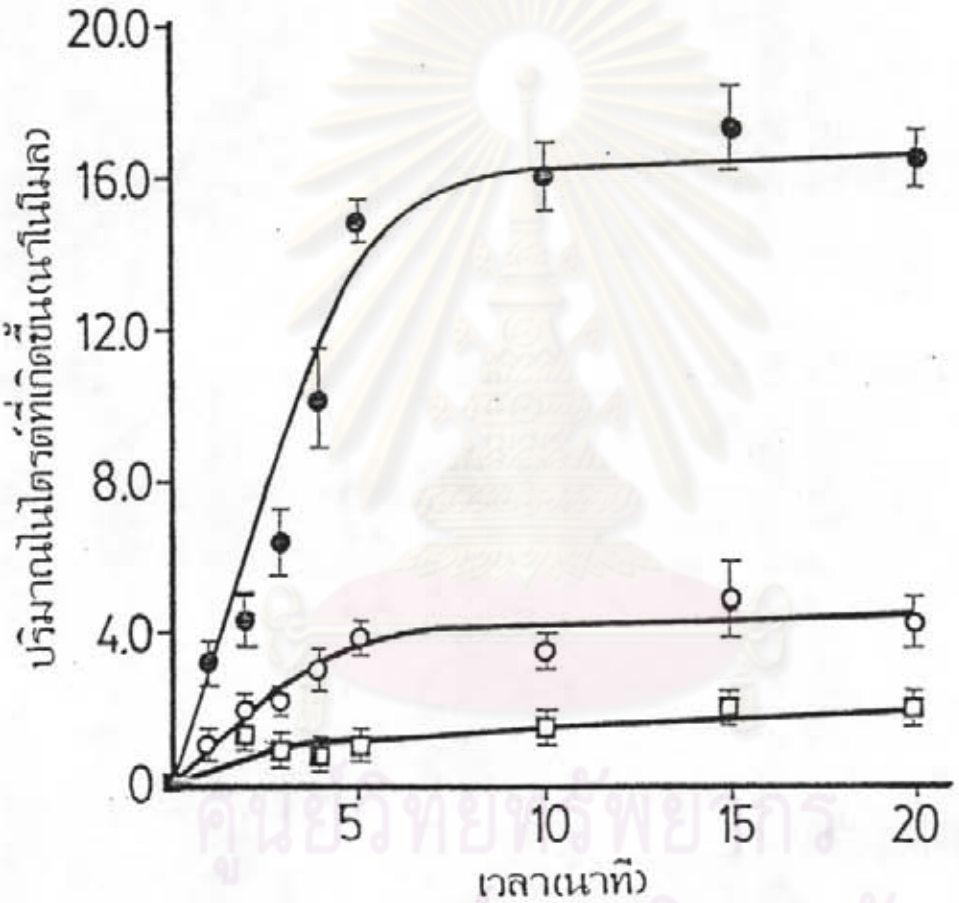
Enoch และ Lester (1975) ได้เคยรายงานว่าเมื่อสกัดไนเตรตรีดัคเทสจาก E.coli ในสภาวะที่มีออกซิเจน แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง และ Payne (1981) ได้รายงานว่าออกซิเจนยังสามารถยับยั้งแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสขณะที่วัดด้วย จึงได้ทดลองสกัดเอนไซม์จากเซลล์(ตามวิธีการเตรียมสารละลายเอนไซม์ในวิธีการทดลองข้อ 5.2) และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

จากตารางที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะในส่วนเยื่อเซลล์ พบว่าหากทำการวัดแอคติวิตีในสภาวะที่มีออกซิเจน และทำการสกัดพร้อมกับวัดแอคติวิตีในสภาวะที่มีออกซิเจน แอคติวิตีจะลดลงประมาณร้อยละ 65 (จาก 5.44 เป็น 2.54 และ 2.72 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ) สำหรับเอนไซม์ในส่วนไซโตซอล ออกซิเจนไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์และการสกัด ทั้งนี้คาดว่าออกซิเจนอาจรบกวนการขนส่งอิเลคตรอนของระบบเอนไซม์บนเยื่อเซลล์ในขณะวัดแอคติวิตี

รูปที่ 14 ผลของเวลาต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทสในส่วนโฮโมจิเนต เมื่อใช้โซเดียมซัคซิเนตเป็นตัวให้อิเลคตรอน

อินคิวเบตเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 0.18 (□), 0.37 (○) และ 1.22 (●) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับกับสารทำปฏิกิริยา ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 9.2.1 เมื่อถึงเวลาต่าง ๆ จึงหยุดปฏิกิริยาและวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้น

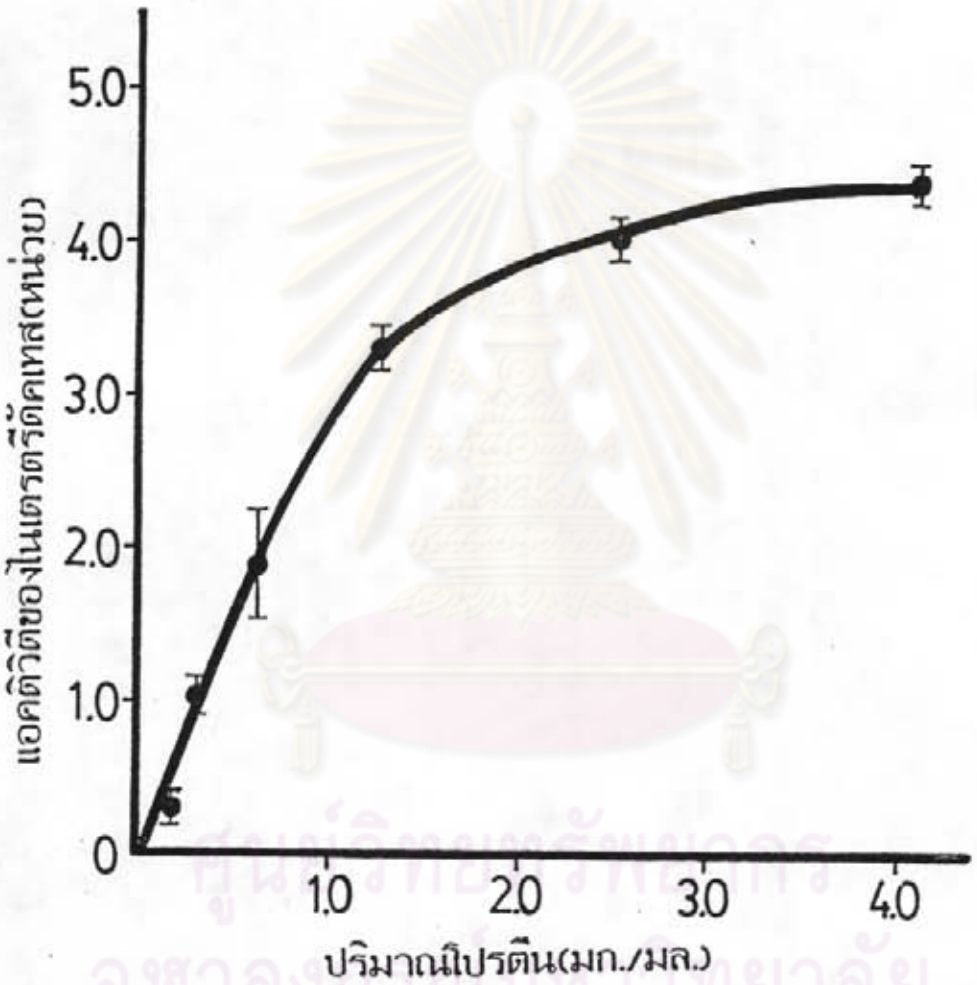
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทสกับปริมาณโปรตีนในส่วนโฮโมจิเนต เมื่อใช้เวลาในการอินคิวเบต 4 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ผลของออกซิเจนในบรรยากาศต่อการสกัดและการวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนเยื่อเซลล์ (100,000xg Pellet) และส่วนไซโตซอล (cytosol fraction; 100,000xg Supernatant) ได้แยกส่วนเยื่อเซลล์และส่วนไซโตซอลจากเซลล์ในสภาวะที่มี (บรรยากาศ, +) และไม่มีออกซิเจน (ไล่ด้วยไนโตรเจน, -) แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในทั้งสองสภาวะเช่นกัน รายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 9.2.1

บรรยากาศออกซิเจนในการทดลอง		ส่วนเยื่อเซลล์ (100,000xg Pellet)		ส่วนไซโตซอล (100,000xg Supernatant)	
การสกัด	การวัดแอคติวิตี	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (%)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตี (%)
-	-	6.44	100	1.39	100
-	+	2.54	34.9	1.36	97.8
+	+	2.72	42.2	1.42	102.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองนี้ ในการสกัดและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุกครั้งจึงได้ทำภายใต้บรรยากาศอาร์กอนเสมอ

5. <u>การศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์</u>

โดยการใช้ differential centrifugation เพื่อแยกส่วนต่าง ๆของเซลล์ และใช้เอทีพีเอส เป็นเอนไซม์บ่งชี้ของเยื่อเซลล์ ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าแอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดักเทสและเอทีพีเอสสูงที่สุดในส่วนตะกอน 100,000xg จึงสรุปได้ว่าไนเตรตรีดักเทสส่วนใหญ่ในเซลล์อยู่บนส่วนเยื่อเซลล์ ถึงแม้จะวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทสในส่วนใส 100,000xg ได้บ้าง แต่เป็นปริมาณเพียงร้อยละ 21 ของเอนไซม์ทั้งหมด ซึ่งน้อยมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์ในส่วนเยื่อเซลล์ (ร้อยละ 63)

ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ไลโซไซม์ และ EDTA ไม่สามารถทำให้เซลล์แตกมากขึ้น ทั้งนี้แอคติวิตีทั้งหมดของไนเตรตรีดักเทสและเอทีพีเอสในตะกอน 10,000xg และ 100,000xg ไม่เปลี่ยนแปลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 การศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ในเครตรีดัคเทสในส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ และผลของไลโซไซม์ และ EDTA ต่อการแยกส่วนประกอบของเซลล์ โดยแยกส่วนประกอบของเซลล์ตามวิธีการทดลองข้อ 8 สำหรับการทดลองผลของไลโซไซม์ และ EDTA เติมไลโซไซม์ และ EDTA (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ) ลงในสารละลายเซลล์ อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงทำการแยกส่วนประกอบของเซลล์ นำส่วนต่าง ๆ ของเซลล์มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในเครตรีดัคเทส และเอทีพีเอส ตามรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 9.2.1 และ 9.4 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	-ไลโซไซม์-EDTA						+ไลโซไซม์+EDTA					
	ไนเตรตรีดักเทส			เอทีพีเอส			ไนเตรตรีดักเทส			เอทีพีเอส		
	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีทั้งหมด (%)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีทั้งหมด (%)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีทั้งหมด (%)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีทั้งหมด (%)
โฮโมจิเนต	4.11	102.75	100	0.06	0.19	100	4.33	130	100	0.08	0.23	100
ส่วนตะกอน 100,000xg	8.3	64.66	63	0.24	0.19	100	9.8	70.89	54	0.27	0.20	87
ส่วนใส 100,000xg	2.37	22.58	21	0.07	0.06	33	2.17	21.45	16	0.07	0.07	31

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N

6.1 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N ในเซลล์สมบูรณ์

โดยอาศัย FDH_N เป็นเอนไซม์บ่งชี้ในกระบวนการหายใจในสภาวะปราศจากออกซิเจน จึงได้ตรวจวัดการเหนี่ยวนำเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N ในเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 ด้วย พบว่า (รูปที่ 16) รูปแบบการเจริญ แอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทสและฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N คล้ายกัน คือเมื่อเซลล์มีการเจริญสูงสุด เมื่ออายุ 7 วัน (stationary phase) จะมีแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองสูงสุด เท่ากับ 5.0และ 2.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์ทั้งสองสามารถถูกเหนี่ยวนำด้วยอนุมูลไนเตรต เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะปราศจากออกซิเจนเช่นเดียวกับใน E.coli ดังได้กล่าวแล้ว การพบเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N ในสภาวะปราศจากออกซิเจนที่มีไนเตรตนี้สามารถระบุหน้าที่ของไนเตรตรีดักเทสในเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 ว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจในสภาวะดังกล่าว

6.2 ผลของฟอร์มเมตต่อแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทสในเซลล์สมบูรณ์

เพื่อจะสนับสนุนความสัมพันธ์ของไนเตรตรีดักเทสและฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N จึงทำการวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้นโดยไนเตรตรีดักเทสในเซลล์สมบูรณ์ เมื่อใช้ฟอร์มเมตเป็นตัวให้อิเลคตรอน พบว่าฟอร์มเมตสามารถเพิ่มการเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ได้ถึงร้อยละ 40 ได้ (รูปที่ 17) แสดงถึงการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งสอง อย่างไรก็ตามเมื่อไม่ใส่ฟอร์มเมตยังพบว่ามีการผลิตไนไตรต์ได้บ้าง ซึ่งคาดว่าเนื่องมาจากตัวให้อิเลคตรอนที่มีอยู่ภายในเซลล์สามารถทำงานส่งอิเลคตรอนให้กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ด้วย

7. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในส่วนเยื่อเซลล์

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทสในส่วนเยื่อเซลล์เพื่อนำไปใช้เป็นพื้นฐานในการติดตามเอนไซม์ในแบคทีรอยด์จากปมรากต่อไป

7.1 ผลของเวลาต่อแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทส

เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยใช้ปริมาณโปรตีนเอนไซม์ตั้งแต่ 0.03 ถึง 0.21 มก./มล. โดยกำหนดความเข้มข้นของโปตัสเซียม 7.5 มิลลิโมลาร์

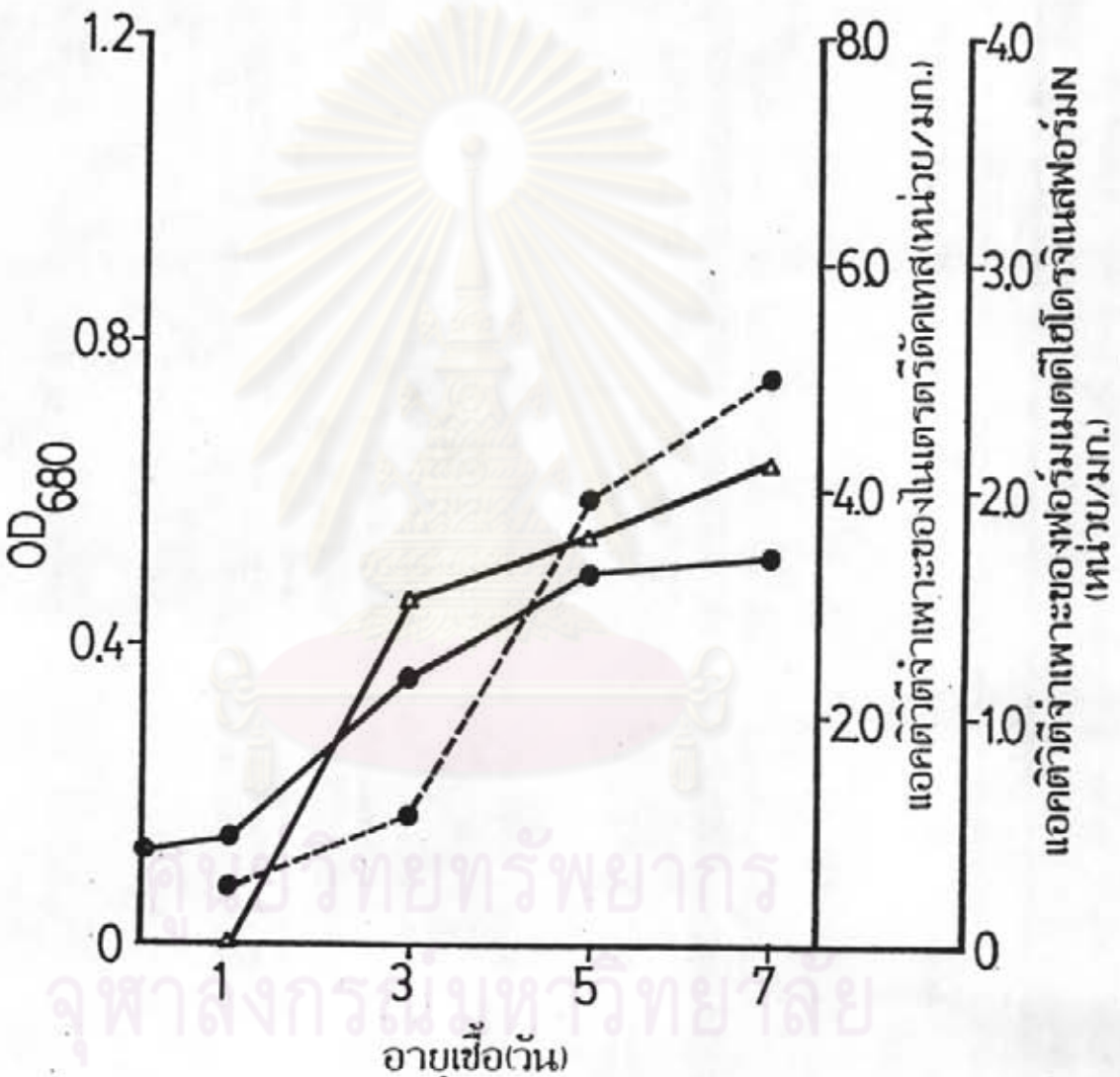
รูปที่ 16 ลักษณะการเจริญแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทส และแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนส ฟอร์ม N ของเซลล์สมบูรณ์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะไมโครแอโรบิกที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตามรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 4.2 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทส และฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนส ฟอร์ม N ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.2 และ 9.3 ตามลำดับ

สัญญลักษณ์ : ●—● การเจริญของเชื้อเมื่อวัดที่ OD_{680}

●···● แอคติวิตีจำเพาะของไนเตรตรีดัคเทส

△—△ แอคติวิตีจำเพาะของฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

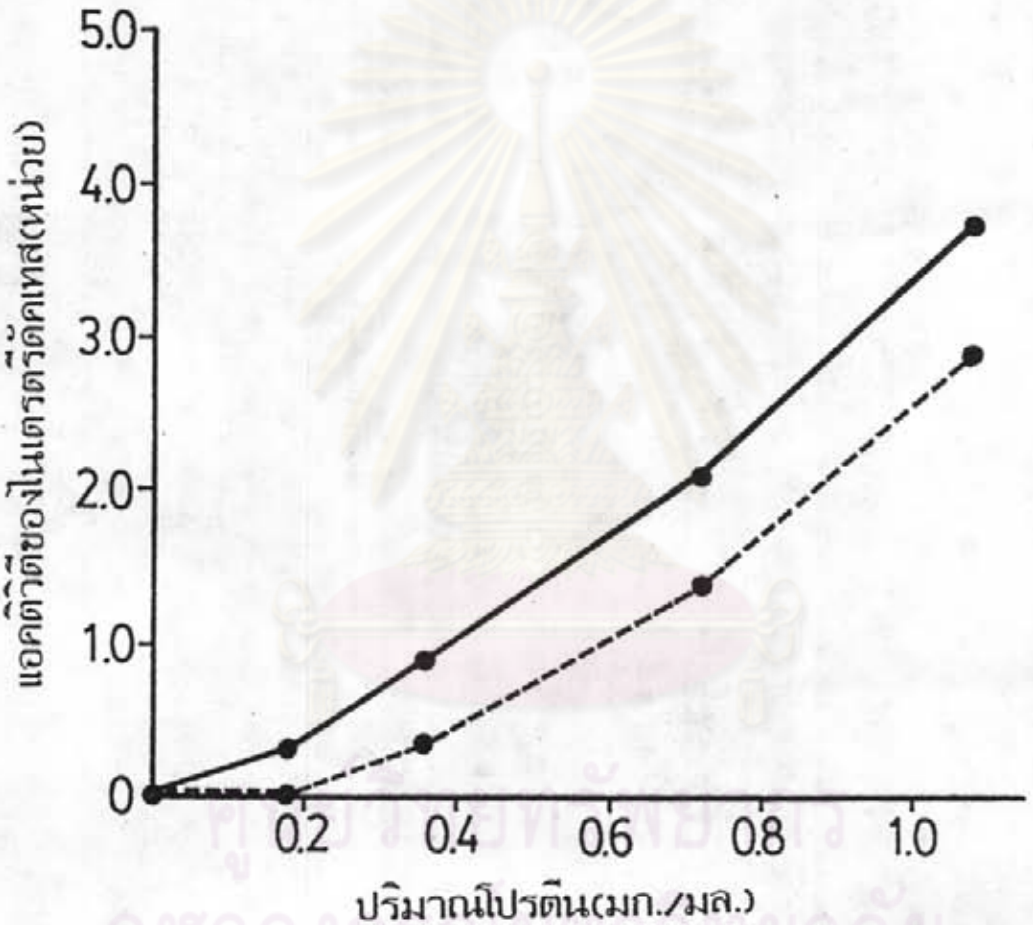

1.2
0.8
0.4
0
OD680
8.0
6.0
4.0
2.0
0
แอคติโนไมซีสในดินต่อกรัมดินแห้ง(หน่วย/มก.)
4.0
3.0
2.0
1.0
0
แบคทีเรียในดินต่อกรัมดินแห้ง (หน่วย/มก.)
1
3
5
7
อายุเชื้อ(วัน)

รูปที่ 17 ผลของฟอร์มเมตต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตตรีตัคเทส เมื่อทำการวัดในเซลล์สมบูรณ์ โดยใช้ฟอร์มเมตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวให้อิเลคตรอนแทนโซเดียมซัคซิเนต วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.2

สัญญลักษณ์ : ●—● เมื่อมีฟอร์มเมต

●---● เมื่อไม่มีฟอร์มเมต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทส(หน่วย)
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
ปริมาณโปรตีน(มก./มล.)

และของโซเดียมซัคซิเนต 12.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าปริมาณผลิตภัณฑ์ในไตรต์ที่เกิดจากเอนไซม์ทั้งสามความเข้มข้นมีความสัมพันธ์กับเวลาเป็นลักษณะเส้นตรงตั้งแต่ 0 ถึง 4 นาที เหมือนในโซโมจิเนต และหลังจากเวลาดังกล่าวผลิตภัณฑ์จะคงที่ (รูปที่ 18)

7.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสกับปริมาณโปรตีน

จากรูปที่ 19 เมื่อวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทสที่เวลา 4 นาที โดยแปรปริมาณโปรตีนของส่วนเยื่อเซลล์ตั้งแต่ 0 ถึง 3.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสัดส่วนระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้น (initial rate) ของปฏิกิริยาของเอนไซม์กับปริมาณโปรตีนของเอนไซม์อยู่ภายในช่วงปริมาณโปรตีน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

7.3 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ใน pH ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 4.0 ถึง 9.0 พบว่าเอนไซม์ในส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) มีแอคติวิตีสูงสุดในช่วง pH 7.5 ถึง 8.0 ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ในส่วนใส (100,000xg) ด้วย (รูปที่ 20)

7.4 ผลของความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรตต่อแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทส

เมื่อแปรความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรตตั้งแต่ 0 ถึง 15 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทส (รูปที่ 21) พบว่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้โปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้นมากกว่า 3 มิลลิโมลาร์ และเมื่อเพิ่มไนเตรตมากขึ้น ไม่พบว่ามีการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ (substrate inhibition) จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรต 7.5 มิลลิโมลาร์ ตลอดการทดลองของเอนไซม์ในส่วนเยื่อเซลล์ ค่า Km ของเอนไซม์ต่อไนเตรตสามารถคำนวณได้จาก Lineweaver Burk Plot ในรูปที่ 22 มีค่า 1.0×10^{-4} มิลลิโมลาร์ V_{max} มีค่า 5.26 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

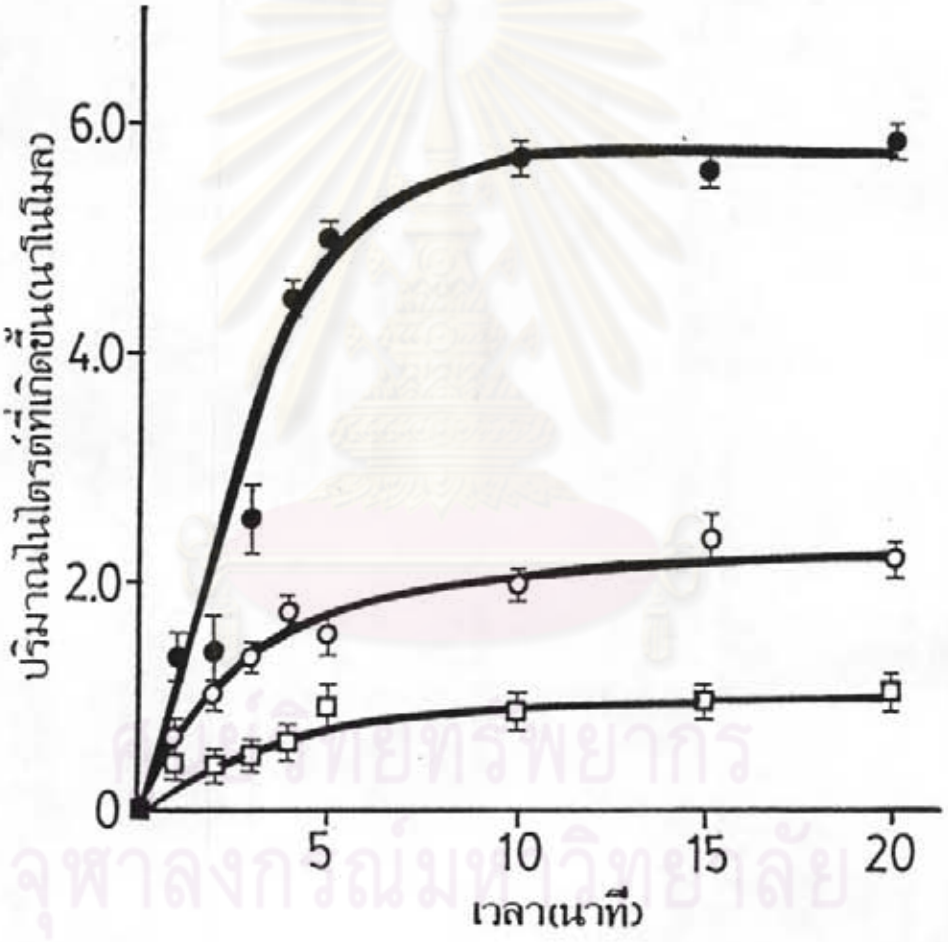
7.5 ความเสถียรของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส

ทำการวัดแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทสในส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) และส่วนใส (100,000xg) ซึ่งเก็บไว้ในสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 23) เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในส่วนเยื่อเซลล์สามารถเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

รูปที่ 18 ผลของเวลาต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตตรีดัคเทสในส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) เมื่อใช้โซเดียมซัคซิเนตเป็นตัวให้อิเลคตรอน

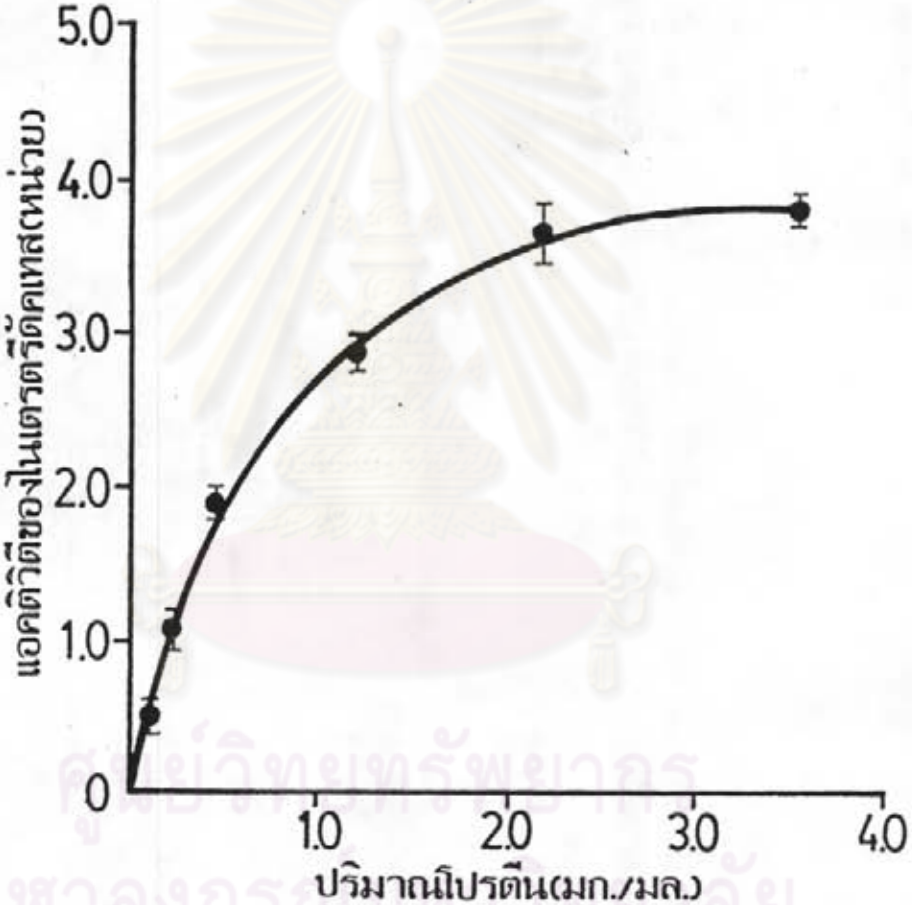
อินคิวเบตเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 0.03 (□), 0.06 (○) และ 0.21(●) มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กับสารทำปฏิกิริยา ดังรายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 9.2.1 เมื่อถึงเวลาต่าง ๆ จึงหยุดปฏิกิริยาและวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้น(นาโนโมล)
6.0
4.0
2.0
0
5
10
15
20
เวลา(นาที)

รูปที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสและปริมาณโปรตีนใน
ส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) เมื่อใช้เวลาในการอินคิวเบต
4 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทสในส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) และส่วนไซโตซอล (ส่วนใส 100,000xg) เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สำหรับการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ในช่วง pH 4.0 - 6.0 และโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สำหรับการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วง pH 6.0 - 9.0 วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.1

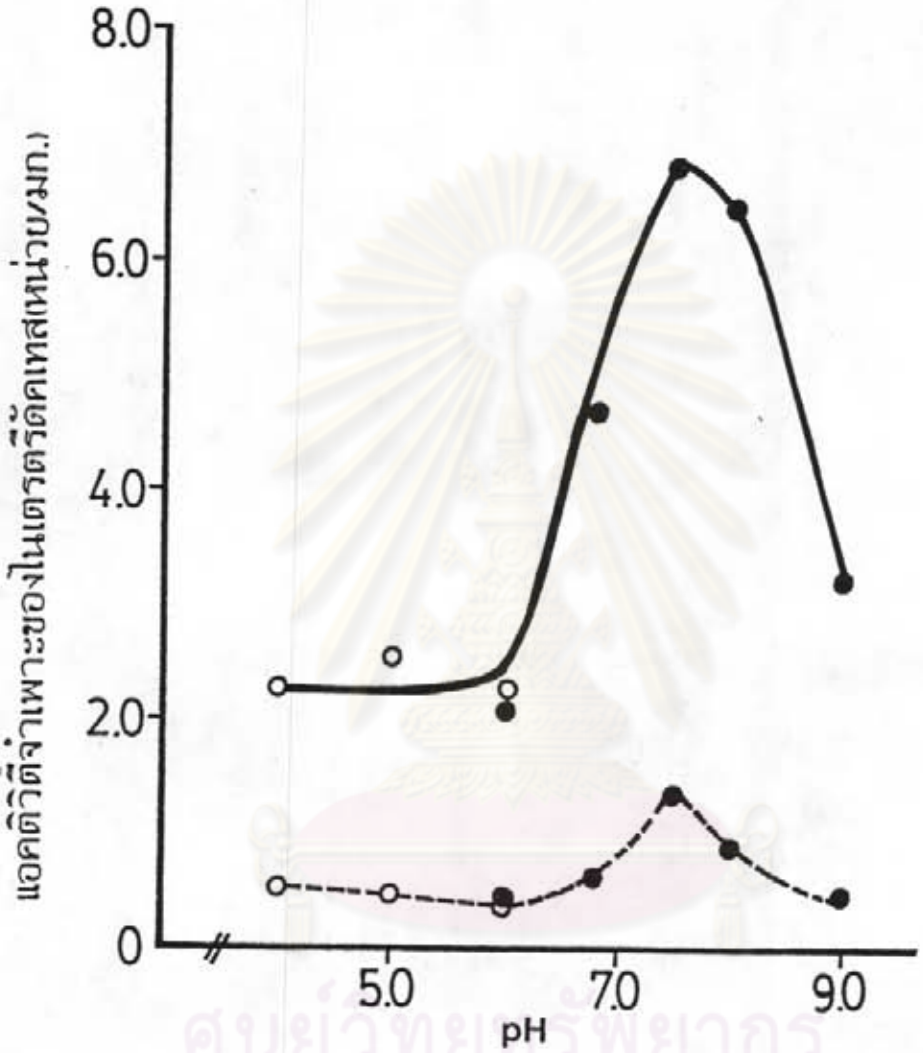
สัญญลักษณ์: —o— โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

—●— โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

—— แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนเยื่อเซลล์

--- แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนไซโตซอล ซึ่งทำให้เข้มข้นขึ้น 5 เท่า

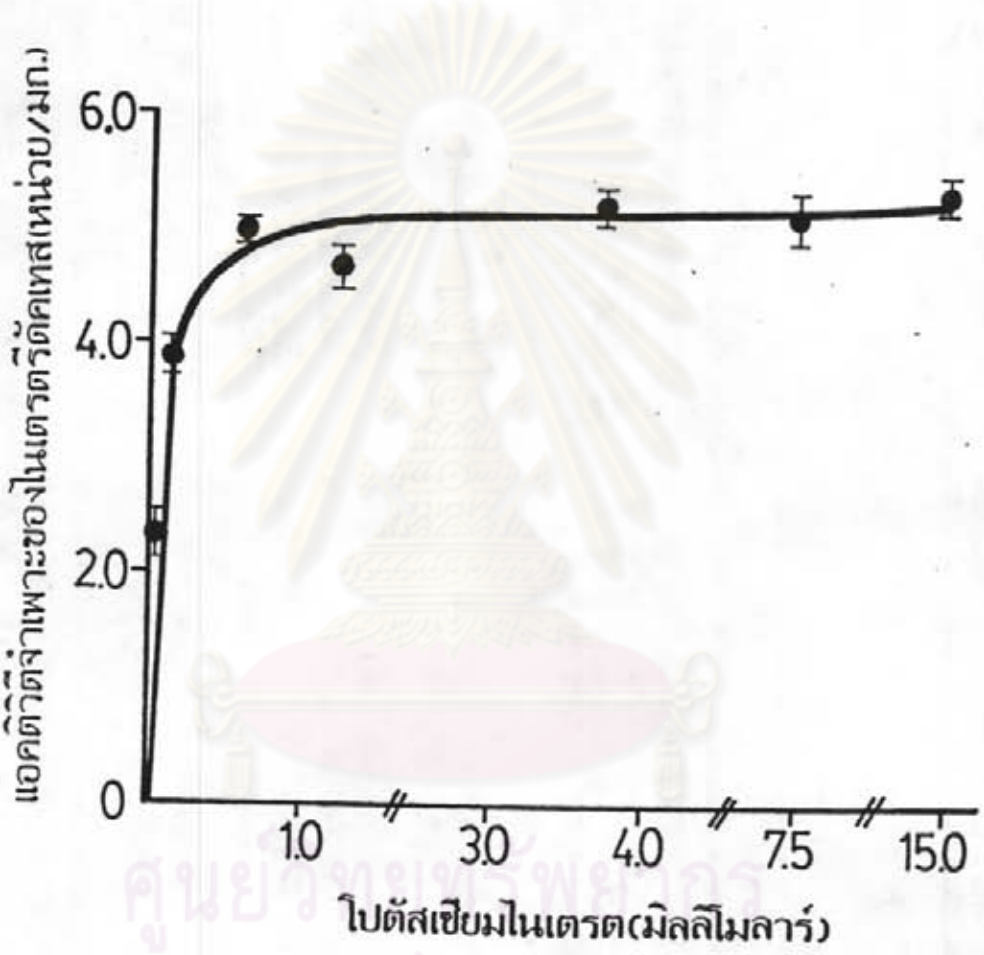
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



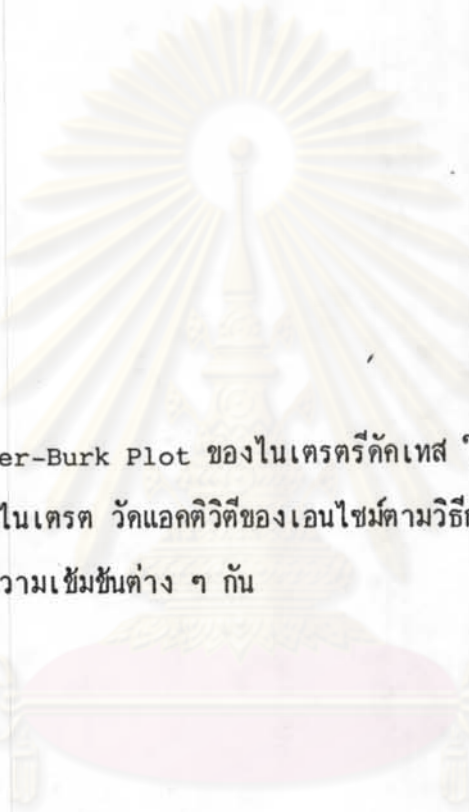
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 ผลของความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรตต่อการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.1 เมื่อใช้โปตัสเซียมไนเตรตซึ่งเป็นสารตั้งต้นในสารทำปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

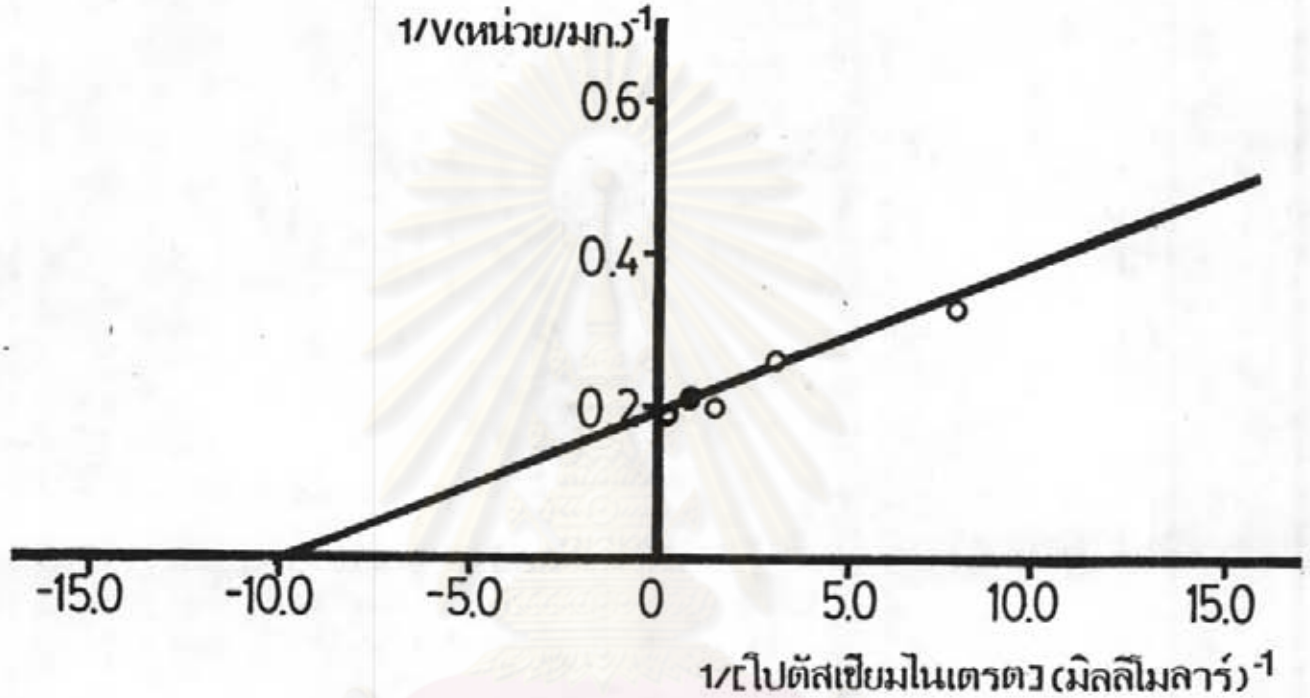


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 Lineweaver-Burk Plot ของไนเตรตรีดักเทส ในส่วนเยื่อเซลล์ กับสารตั้งต้นโปตัสเซียมไนเตรต วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.1 โดยใช้สารตั้งต้นความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



K_m = 1.0×10^{-4} โมลาร์

V_{max} = 5.26 หน่วย/มก.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 23 ความเสถียรของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทส ในส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) และส่วนไซโตซอล (ส่วนใส 100,000xg) เมื่อเก็บในสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 100 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส ภายใต้อาร์กอนหรือไนโตรเจน วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.1 ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน นาน 10 วัน

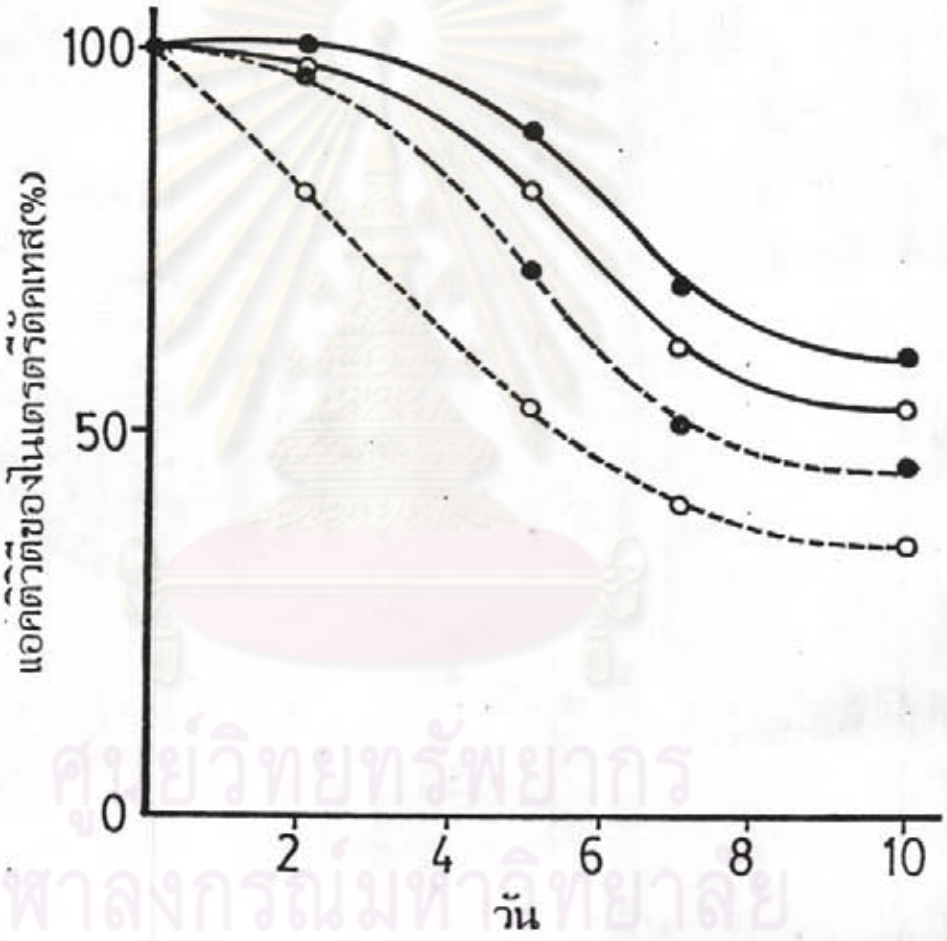
สัญญลักษณ์ : ●—● ส่วนเยื่อเซลล์ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

●---● ส่วนเยื่อเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

○—○ ส่วนไซโตซอล ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

○---○ ส่วนไซโตซอล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้ประมาณ 3 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตี การเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเร็วกว่า และพบแอคติวิตีลดลงประมาณร้อยละ 60 ภายใน 10 วัน แอคติวิตีของเอนไซม์ในส่วนใสจะเริ่มลดลงในวันที่ 2 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส และลดลงประมาณร้อยละ 50 ภายใน 10 วันเช่นกัน

8. <u>การศึกษาเปรียบเทียบผลของตัวให้อิเลคตรอนต่อแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทสในเซลล์สมบูรณ์ และในส่วนเยื่อเซลล์</u>

เนื่องจากตัวให้อิเลคตรอนที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส สามารถระบุสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ และเป็นแนวทางติดตามเอนไซม์จากแบคทีรอยด์ในปมรากอีกทั้งสามารถบ่งชี้ถึงชนิดและบทบาทของเอนไซม์ได้ จึงทำการศึกษาตัวให้อิเลคตรอนชนิดต่าง ๆ สำหรับเอนไซม์จากเซลล์สมบูรณ์ และเอนไซม์จากส่วนเยื่อเซลล์ โดยหวังว่าจากรูปแบบของตัวให้อิเลคตรอนของเอนไซม์จากสองแหล่งนี้เหมือนกัน เมื่อเราต้องการติดตาม dissimilatory nitrate reductase บนเยื่อเซลล์แบคทีรอยด์จากปมราก เราจะสามารถทำได้โดยการวัดแอคติวิตีโดยตรงจากเซลล์สมบูรณ์

ได้แปรความเข้มข้นของตัวให้อิเลคตรอนชนิดต่าง ๆ โดยจำกัดความเข้มข้นของเซลล์สมบูรณ์ ที่ 0.3 มก.โปรตีนต่อมล. และของเยื่อเซลล์ที่ 0.1 มก.โปรตีนต่อมล. รูปที่ 24 (ก-ข) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบของแอคติวิตี (electron-donor saturation curve) ของเอนไซม์จากทั้งสองแหล่ง เมื่อแปรชนิดและความเข้มข้นของตัวให้อิเลคตรอนนั้นเหมือนกันมากกล่าวคือตัวให้อิเลคตรอนบางตัวเมื่อความเข้มข้นสูงสามารถลดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ เช่น เบนซิลไวโอโลเจน, NADH ในขณะที่เมทธิลไวโอโลเจน โซเดียมซัคซิเนต และโซเดียมฟอร์มเมตไม่ลดแอคติวิตีของเอนไซม์จากทั้งสองแหล่งเหมือนกัน นอกจากนี้ยังมีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด (optimum concentration) ของตัวให้อิเลคตรอนที่จุดเดียวกัน (โซเดียมซัคซิเนต 12.5 มิลลิโมลาร์) โซเดียมฟอร์มเมต 5 มิลลิโมลาร์ เมทธิลไวโอโลเจน 1 มิลลิโมลาร์ เบนซิล-ไวโอโลเจน 0.05 มิลลิโมลาร์) หรือใกล้เคียงกันมาก (NADH ประมาณ 0.2 มิลลิโมลาร์)

ผลอันนี้ทำให้เราสามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าไนเตรตรีดักเทสทั้งหมดในเซลล์เป็น dissimilatory enzyme อยู่บนเยื่อเซลล์ เพราะหากเอนไซม์ในเซลล์มีมากกว่าหนึ่งชนิด และใช้ตัวให้อิเลคตรอนที่แตกต่างกัน รูปแบบตัวให้อิเลคตรอนของเอนไซม์จากทั้งสองแหล่งย่อมแตกต่างกันด้วย

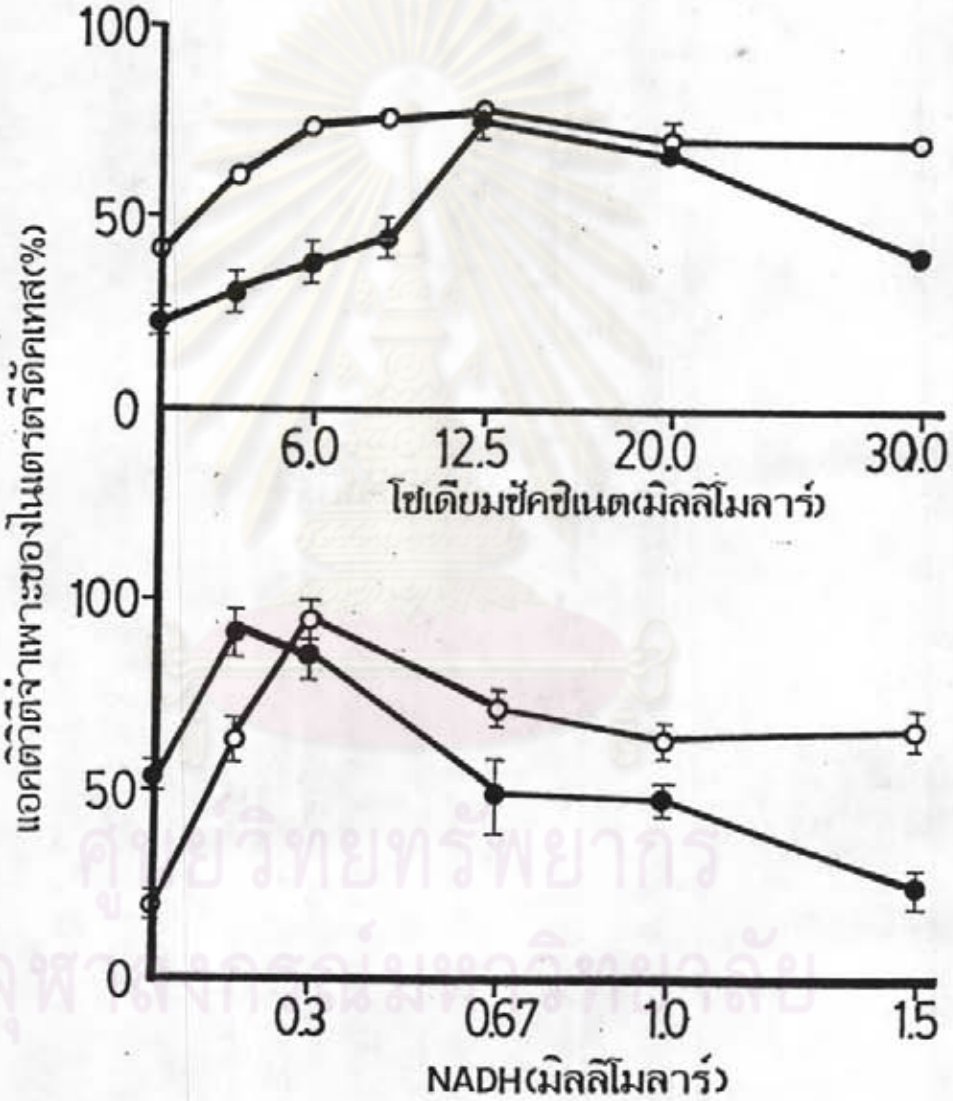
รูปที่ 24 ผลของความเข้มข้นของตัวให้อิเลคตรอนต่อแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในเซลล์สมบูรณ์ และส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) วัดแอคติวิตีเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2 เมื่อใช้ตัวให้อิเลคตรอนต่าง ๆ กัน ใช้เวลาในการอินคิวเบต 30 นาที

สำหรับ NADH เติม PMS ความเข้มข้น 0.005 มิลลิโมลาร์ หลังจากหยุดปฏิกิริยา เพื่อขจัด NADH ซึ่งรบกวนการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ อินคิวเบตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงทำการวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้น

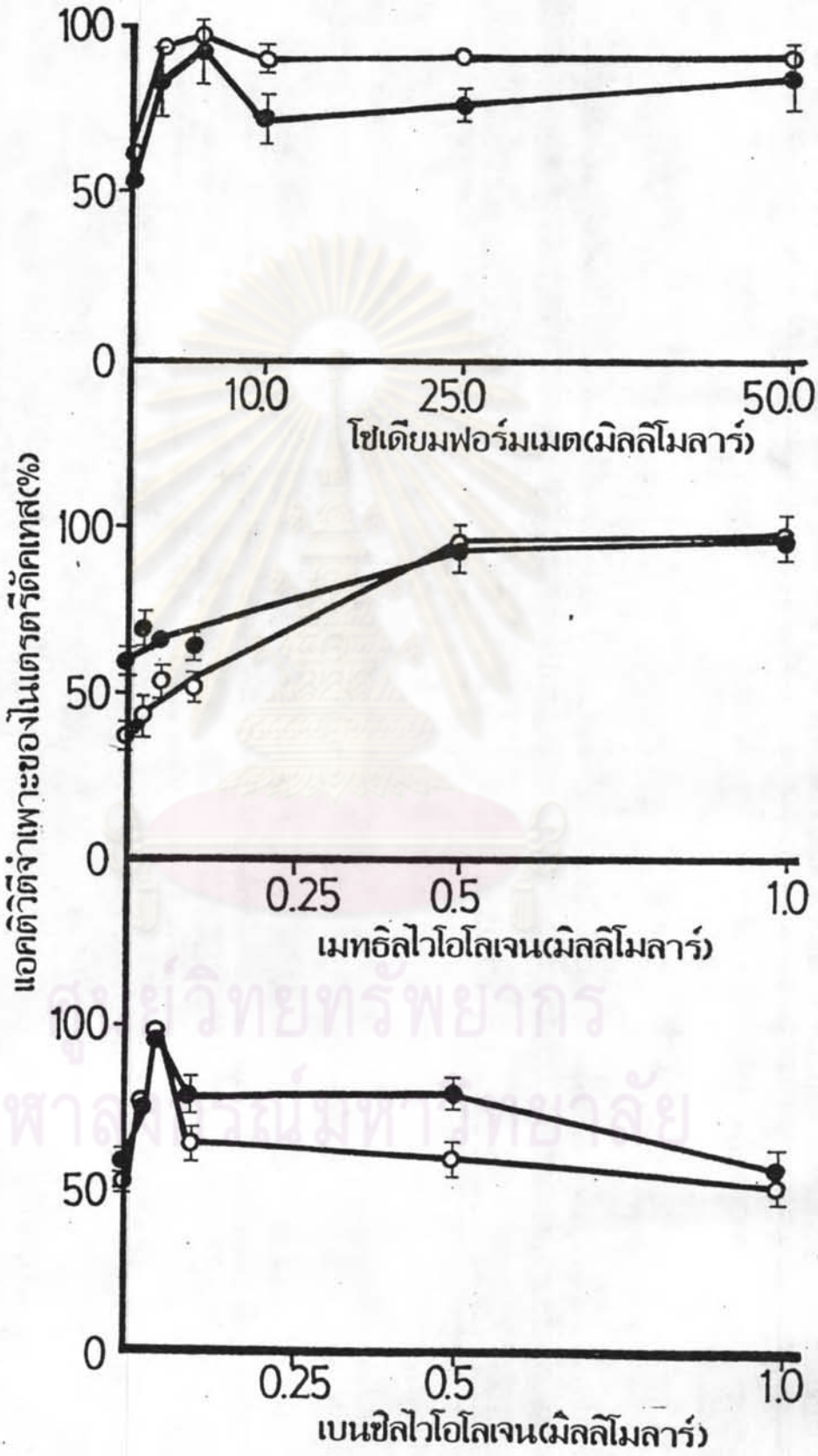
สำหรับเมทธิลไวโอโลเจนและเบนซิลไวโอโลเจน จะเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมไดไธโอไนต์ 50 มิลลิลิตร (0.05 กรัม/1 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 มิลลิลิตร/บัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร) อินคิวเบต 30 °C เขย่าแรง ๆ จนโซเดียม-ไดไธโอไนต์ถูกออกซิไดส์หมด (สีหายไป) จึงทำการวัดปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้น

สัญญลักษณ์ : ●—● แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในเซลล์สมบูรณ์

○—○ แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนเยื่อเซลล์


100
50
0
6.0
12.5
20.0
30.0
โซเดียมซัคซิเนต(มิลลิโมลาร์)
แอคติวิตี้จำเพาะของไนเตรตรีดัคเทส(%)
100
50
0
0.3
0.67
1.0
1.5
NADH(มิลลิโมลาร์)

รูปที่ 24 ก.


100
50
0
10.0
25.0
50.0
โซเดียมฟอร์มเมต(มิลลิโมลาร์)
100
50
0
0.25
0.5
1.0
เมทธิลไวโอโลเจน(มิลลิโมลาร์)
100
50
0
0.25
0.5
1.0
เบนซิลไวโอโลเจน(มิลลิโมลาร์)
แอคติวิตี้จำเพาะของไนเตรตรีดัคเทส(%)

รูปที่ 24 ข.

ตารางที่ 4,5 แสดงตัวให้อิเลคตรอนที่ดีที่สุด (electron-donor preference) ของเอนไซม์จากทั้งสองแหล่งยิ่งสนับสนุนข้อความข้างต้น เนื่องจากที่ความเข้มข้นของตัวให้อิเลคตรอนที่เหมาะสมต่อการวัดแอคติวิตีที่สุด เอนไซม์จากแหล่งทั้งสองใช้ตัวให้อิเลคตรอนเรียงตามลำดับความสามารถในการทำงานจากสูงไปต่ำเหมือนกัน คือ NADH เบนซิลไวโอโลเจน เมทธิลไวโอโลเจน โซเดียมซัคซิเนต และโซเดียมฟอร์มเมต ตามลำดับ

ผลจากการศึกษาอันนี้ยังชี้ให้เห็นว่า หากเราต้องการติดตาม dissimilatory nitrate reductase จากแบคทีรอยด์ในปมรากถั่วแล้ว เราสามารถวัดแอคติวิตีโดยตรงจากเซลล์สมบูรณ์ไม่จำเป็นต้องสกัดเยื่อเซลล์ออกมาเพื่อศึกษาเอนไซม์

ในขณะนี้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทสจากเซลล์ที่เลี้ยงในหลอดทดลองเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการติดตามเอนไซม์จากแบคทีรอยด์ในปมรากต่อไป

9. ผลของอนุมูลไนเตรตต่อปมรากถั่วที่ inoculated ด้วยเชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 และต่อเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทสและไนโตรจิเนสในปมราก

Streeter (1982) ได้รายงานว่าไนเตรตปริมาณ 6.4 มิลลิโมลาร์ ที่เติมลงในอาหารที่ใช้ปลูกต้นถั่วเหลืองนั้น สามารถรบกวนการเกิดปมและการตรึงไนโตรเจนโดยเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 76CR6 ได้ ผลอันนี้อธิบายว่าไนเตรตอาจลดผลผลิตที่เกิดจากการตรึงไนโตรเจนได้ ดังนั้นจึงศึกษาเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทสและไนโตรจิเนสจากปมราก เพื่อหาคำตอบว่า ปรากฏการณ์เช่นเดียวกันนี้จะเกิดในเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 และต้นถั่วเหลืองสายพันธุ์ สจ.5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เกษตรกรไทยใช้อย่างแพร่หลายด้วยหรือไม่ และหากเกิดปมรากขึ้นในเตรตจะสามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์ได้หรือไม่ และไนเตรตที่ถูกเหนี่ยวนำนี้จะมีผลอย่างไรต่อเอนไซม์ไนโตรจิเนส ตลอดจนถึงการเจริญเติบโตของต้นถั่ว

จากการทดลองในต้นถั่วเหลืองจำนวน 20 ต้น ซึ่ง inoculate ด้วยเชื้อเบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 พบว่าต้นถั่วที่เลี้ยงในอาหารปกติ (ปราศจากต้นตอไนโตรเจน) จะสามารถติดปมได้ในวันที่ 7 แต่ต้นถั่วที่เลี้ยงในไนเตรตปริมาณเพียง 2 มิลลิโมลาร์ จะไม่สามารถติดปมได้เลย ผลอันนี้อาจเนื่องจากไนเตรตไปรบกวนระบบการควบคุมของยีนพืชที่มีต่อการสร้างปม ซึ่งการควบคุมนี้ mRNA ของพืชจะควบคุมหรือกระตุ้นให้เซลล์ไรโซเบียมมีการสังเคราะห์สารกระตุ้นการเจริญ หรือแบ่งเซลล์ของพืชขึ้นกลายเป็นปมในที่สุด

ตารางที่ 4 ผลของตัวให้อิเลคตรอนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทสในเซลล์สมบูรณ์ ทำการวัดแอคติวิตของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.2 โดยใช้ตัวให้อิเลคตรอนต่าง ๆ ซึ่งได้เลือกความเข้มข้นของตัวให้อิเลคตรอนที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด จากรูปที่ 24

ตัวให้อิเลคตรอน	แอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทส	
	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
0.3 mM NADH	13.56	100
0.05 mM Benzyl viologen	10.76	79.3
1.0 mM Methyl viologen	9.65	71.1
12.5 mM Sodium succinate	5.07	37.4
5.0 mM Sodium formate	3.09	22.8

หมายเหตุ ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในเตรตรีดัคเทส เมื่อไม่เติมตัวให้อิเลคตรอนในสารทำปฏิกิริยามีค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) = 0.22, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) = 0.02

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลของตัวให้อิเลคตรอนต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในส่วนเยื่อเซลล์ (100,000xg Pellet) ทำการวัดแอคติวิตีตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.1 โดยใช้ตัวให้อิเลคตรอนต่าง ๆ ซึ่งได้เลือกความเข้มข้นของตัวให้อิเลคตรอนที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด จากรูปที่ 24

ตัวให้อิเลคตรอน	แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทส	
	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
0.3 mM NADH	14.61	100
0.05 mM Benzyl viologen	9.44	64.6
1.0 mM Methyl viologen	8.01	54.8
12.5 mM Sodium succinate	7.37	50.4
5 mM Sodium formate	4.88	33.4

หมายเหตุ ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส เมื่อไม่เติมตัวให้อิเลคตรอนในสารทำปฏิกิริยา มีค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) = 0.1, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) = 0.02

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองต่อไปจึงเป็นการดูผลของไนเตรตที่เติมลงในอาหารปลูกถั่วหลังจากต้นถั่วสามารถติดปมแล้ว ได้ทำการทดลองโดยปลูกถั่วโดยวิธีการปกติ แล้ว inoculate ด้วย เบรดีไรโซเบียม จาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 จนต้นถั่วติดปมหมดแล้วในวันที่ 14 ของการปลูก จึงเติมไนเตรตลงในอาหารปลูกถั่วให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 และ 6 มิลลิโมลาร์ เก็บปมรากเมื่อต้นถั่วมีอายุได้ 40 วัน เพื่อนำมานับจำนวนปม วัดน้ำหนักปม และวัดแอคติวิตีของไนโตรจีเนส และไนเตรตรีดัคเทส ได้ผลดังนี้

9.1 แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทส ในส่วนต่าง ๆ ของปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 2 และ 6 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 6 แสดงแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทส และปริมาณไนเตรตในส่วนต่าง ๆ ของปมถั่วเหลืองที่อยู่ในอาหารที่มีไนเตรตความเข้มข้นต่างกันสามสภาวะคือ 0, 2 และ 6 มิลลิโมลาร์ ในส่วนโฮโมจิเนตซึ่งมีทั้งส่วนที่เป็นพืชและแบคทีรอยด์ปนกันนั้น จากทั้งสามสภาวะพบแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทส และไนเตรต เอนไซม์และไนเตรตมีปริมาณที่สัมพันธ์กัน กล่าวคือในต้นถั่วที่ไม่เติมไนเตรตจากภายนอกจะมีไนเตรตในโฮโมจิเนตต่ำ (34.7 นาโนโมล/มก.) และเอนไซม์ก็มีแอคติวิตีต่ำด้วย (0.5 หน่วย/มก.) และเมื่อเพิ่มไนเตรตในอาหารปลูกถั่วปริมาณไนเตรตและเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสจะเพิ่มขึ้นประมาณสองเท่าคือ 64.2 นาโนโมล/มก. และ 0.9 หน่วย/มก. ตามลำดับ ไนเตรตจากภายนอก 2 มิลลิโมลาร์ ไม่สามารถทำให้ไนเตรตรีดัคเทสในโฮโมจิเนตเพิ่มขึ้นได้ สามารถสรุปได้ว่าแม้ไม่เติมไนเตรตในอาหารปลูกถั่วก็จะมีไนเตรตรีดัคเทสในปมรากอยู่แล้ว และเมื่อไนเตรตในอาหารสูงขึ้นถึง 6 มิลลิโมลาร์ ไนเตรตจะสามารถเคลื่อนย้ายเข้าไปภายในปมราก และเหนี่ยวนำให้เกิดไนเตรตรีดัคเทสมากขึ้นด้วย

เมื่อติดตามแอคติวิตีจำเพาะพบว่า ไม่ว่าจะเติมไนเตรตจากภายนอกหรือไม่ แอคติวิตีจำเพาะจะสูงที่สุดในส่วนแบคทีรอยด์กล่าวคือ ในสภาวะที่ไม่มีไนเตรตจากภายนอก จะสูงกว่าในโฮโมจิเนตถึง 2.4 เท่า และสูงกว่าในส่วนของพืชถึง 8 เท่า ในสภาวะที่มีไนเตรตจากภายนอก 6 มิลลิโมลาร์ จะสูงกว่าโฮโมจิเนต 2.2 เท่า และสูงกว่าในส่วนของพืชถึง 13 เท่า บอกให้รู้ว่าตำแหน่งของไนเตรตรีดัคเทสนี้อยู่ในแบคทีรอยด์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนว่าแอคติวิตีสุทธิในแบคทีรอยด์สูงถึง 42.39 และ 45.98 นาโนโมล ตามลำดับ และพบความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างปริมาณของไนเตรตและแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์ด้วย

ตารางที่ 6 การศึกษาเปรียบเทียบแอคติวิตีของไนเตรตรีดักเทส และปริมาณไนเตรตในส่วนต่าง ๆ ของปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรต ความเข้มข้น 2, 6 มิลลิโมลาร์ และไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต โดยนำปมรากมาแยกส่วนต่าง ๆ ตามวิธีการทดลองข้อ 7 แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณไนเตรตในส่วนต่าง ๆ ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.2 และข้อ 11

หมายเหตุ ND = ไม่ได้ทำการวัด

แอคติวิตีทั้งหมด (total activity) = นาโนโมล/มล./นาที × ปริมาตร (มล.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สภาวะที่เลี้ยงต้นอ่อน	ไม่มีไนเตรต			ไนเตรต 2 มิลลิโมลาร์			ไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์		
	ไนเตรตรีดักเทส		ปริมาณไนเตรต (นาโนโมล/มก.)	ไนเตรตรีดักเทส		ปริมาณไนเตรต (นาโนโมล/มก.)	ไนเตรตรีดักเทส		ปริมาณไนเตรต (นาโนโมล/มก.)
	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)		แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)		แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	
โฮโมจิเนต	0.5	76.3	34.7	0.49	71.76	ND	0.9	75.66	64.2
ส่วนตะกอน 500xg	0.84	28.24	87.6	0.43	5.16	ND	0.89	6.42	152.7
ส่วนใส 500xg	0.74	32.72	55.6	1.01	28.26	ND	0.92	32.09	66.5
ส่วนแบคทีรอยด์	1.22	42.39	64.1	1.57	32.32	ND	2.66	45.98	140.8
ส่วนของพืช (Cytosol)	0.15	4.87	62.4	0.15	3.66	ND	0.17	5.19	90.6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นที่น่าสนใจว่าถึงแม้จะเพิ่มไนเตรตให้อาหารปลูกถั่วถึง 6 มิลลิโมลาร์แล้ว แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนของพืชเกือบไม่เปลี่ยนแปลงเลย แสดงให้เห็นว่าในสภาวะนี้เราไม่สามารถเหนี่ยวนำไนเตรตรีดัคเทสให้แก่พืชได้

จะเห็นได้ว่าในส่วนแบคทีรอยด์ทุกสภาวะมีเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส แม้แต่ในสภาวะที่ไม่เติมไนเตรตให้แก่ต้นถั่ว และยังพบไนเตรตในส่วนแบคทีรอยด์ จึงเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสนี้จำเป็นสำหรับการดำรงชีพของแบคทีรอยด์ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำภายในปมและเป็น dissimilatory enzyme

9.2 <u>ผลของตัวให้อิเลคตรอนต่อแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนแบคทีรอยด์และส่วนของพืช (cytosol) ของปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์</u>

เพื่อจะแสดงให้เห็นว่าไนเตรตรีดัคเทสในแบคทีรอยด์จากปมรากเป็น dissimilatory enzyme เหมือนแบคทีเรียที่เลี้ยงในหลอดทดลองภายใต้สภาวะไมโคร-แอโรบิก ได้เลือกทดสอบสมบัติของเอนไซม์ในการรับอิเลคตรอนจากตัวให้ต่าง ๆ กันดังที่เคยศึกษามาแล้ว โดยทำการทดลองที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแต่ละตัวให้อิเลค-ตรอน (optimum concentration, รูปที่ 24) พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในส่วนแบคทีรอยด์ของต้นถั่วทั้งสองสภาวะใช้ตัวให้อิเลคตรอนเรียงตามลำดับความสามารถในการทำงานจากสูงไปต่ำเหมือนกับเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในเซลล์สมบูรณ์ และส่วนเยื่อ-เซลล์ (ตารางที่ 7) ดังนั้นเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในส่วนแบคทีรอยด์นี้น่าจะเป็น dissimilatory enzyme เช่นกัน

สำหรับส่วนของพืชมีค่าแอคติวิตีต่ำมาก และตัวให้อิเลคตรอนไม่มีผลต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในส่วนนี้

จากรูปที่ 25 จะเห็นว่าโซเดียมฟอร์มเมตสามารถเพิ่มการเปลี่ยนไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ได้ในส่วนแบคทีรอยด์แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในส่วนของพืช แสดงถึงบทบาทของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสในส่วนแบคทีรอยด์น่าจะมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนสฟอร์ม N เช่นเดียวกับในเซลล์สมบูรณ์

ตารางที่ 7 ผลของตัวให้อิเลคตรอนต่อแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนแบคทีเรียอยด์ของปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีและมีโปตัสเซียมไนเตรต ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.2 โดยใช้ตัวให้อิเลคตรอนต่าง ๆ กัน ซึ่งเลือกความเข้มข้นของตัวให้อิเลคตรอนตามการทดลองในเซลล์สมบูรณ์ (ตารางที่ 4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาวะที่ปลูกถั่วเหลือง		อาหารที่ไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต		อาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์	
ส่วน	ตัวให้อิเลคตรอน	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (%)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (%)
แบคทีรอยด์	0.3 มิลลิโมลาร์ NADH	3.08	100	5.07	100
	0.5 มิลลิโมลาร์ เบนซิลไวโอโลเจน	2.94	95.4	4.47	88.1
	1.0 มิลลิโมลาร์ เมทธิวไวโอโลเจน	2.90	94.1	4.27	84.2
	12.5 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซัคซิเนต	1.20	38.9	2.14	42.2
	5.0 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอร์เมต	0.99	32.1	1.25	24.6

หมายเหตุ สำหรับส่วนแบคทีรอยด์ของปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทส เมื่อไม่เติมตัวให้อิเลคตรอนในสารทำปฏิกิริยามีค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) = 0.12, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D) = 0.02

สำหรับส่วนแบคทีรอยด์ของปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสเมื่อไม่เติมตัวให้อิเลคตรอนในสารทำปฏิกิริยา มีค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) = 0.20, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D) = 0.12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 25 ผลของฟอร์มเมตต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตตรีดัคเทสในส่วนแบคทีรอยด์ และส่วนของพืชจากปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต (25 ก.) และอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ (25 ข.) ทำการแยกส่วนแบคทีรอยด์และส่วนของพืชตามวิธีการทดลองข้อ 7 วัดแอคติวิตีเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 9.2.2 โดยใช้โซเดียมฟอร์มเมตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวให้อิเลคตรอน

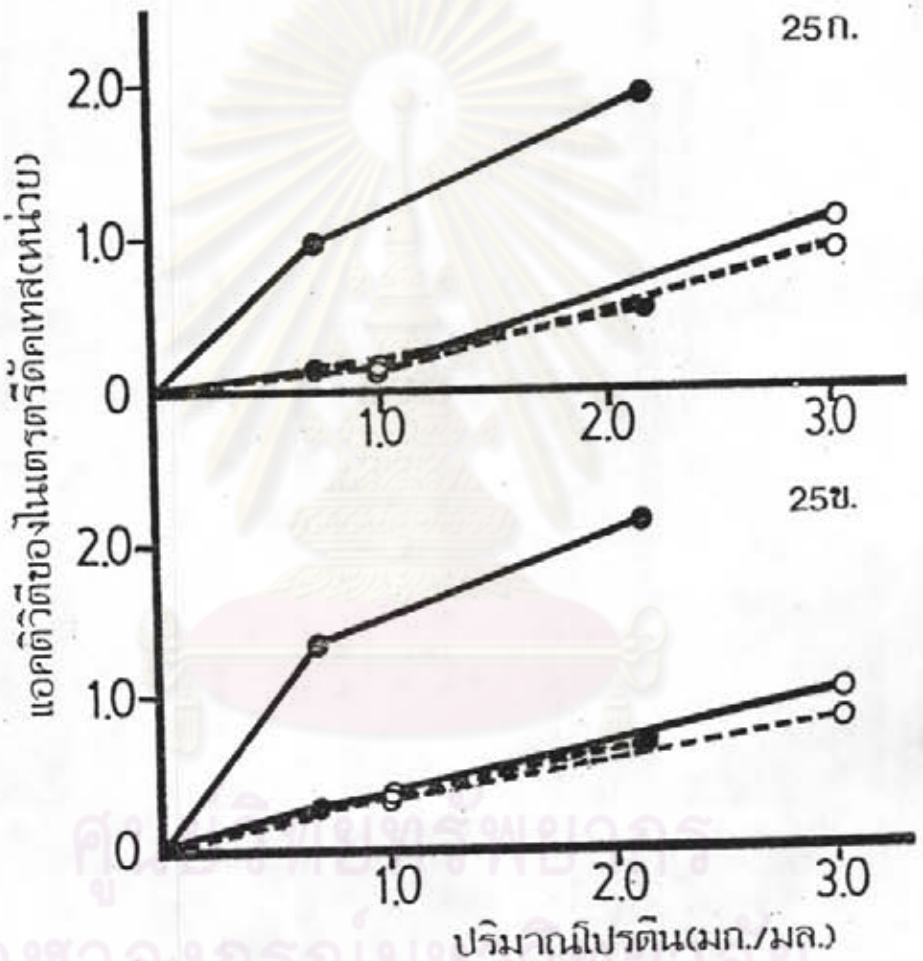
สัญญลักษณ์ : ●—● ส่วนแบคทีรอยด์ เมื่อมีฟอร์มเมต

●---● ส่วนแบคทีรอยด์ เมื่อไม่มีฟอร์มเมต

○—○ ส่วนของพืช เมื่อมีฟอร์มเมต

○---○ ส่วนของพืช เมื่อไม่มีฟอร์มเมต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


25ก.
2.0
1.0
0
1.0
2.0
3.0
25ข.
2.0
1.0
0
1.0
2.0
3.0
แอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทส(หน่วย)
ปริมาณโปรตีน(มก./มล.)

9.3 ผลของไนเตรตต่อน้ำหนักปมสด จำนวนปม แอคติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจิเนส และไนเตรตรีดัคเทส

รูปที่ 26ก. แสดงลักษณะปมรากของต้นถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัส-เซียมไนเตรตความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต และรูป 26ข. แสดงลักษณะปมรากของต้นถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต จะเห็นได้ว่าปมรากของต้นถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรต มีขนาดค่อนข้างเล็กกว่าปมรากของต้นถั่วที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต ยิ่งปริมาณไนเตรตมากขึ้น ขนาดปมยิ่งแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ทำการวัดน้ำหนักปมสด นับจำนวนปม ชั่งน้ำหนักต้นแห้งเพื่อดูผลผลิตสุดท้าย และวัดอะเซทิลีนรีดัคชัน เพื่อดูแอคติวิตีของไนโตรจีเนส ดังแสดงในตารางที่ 8

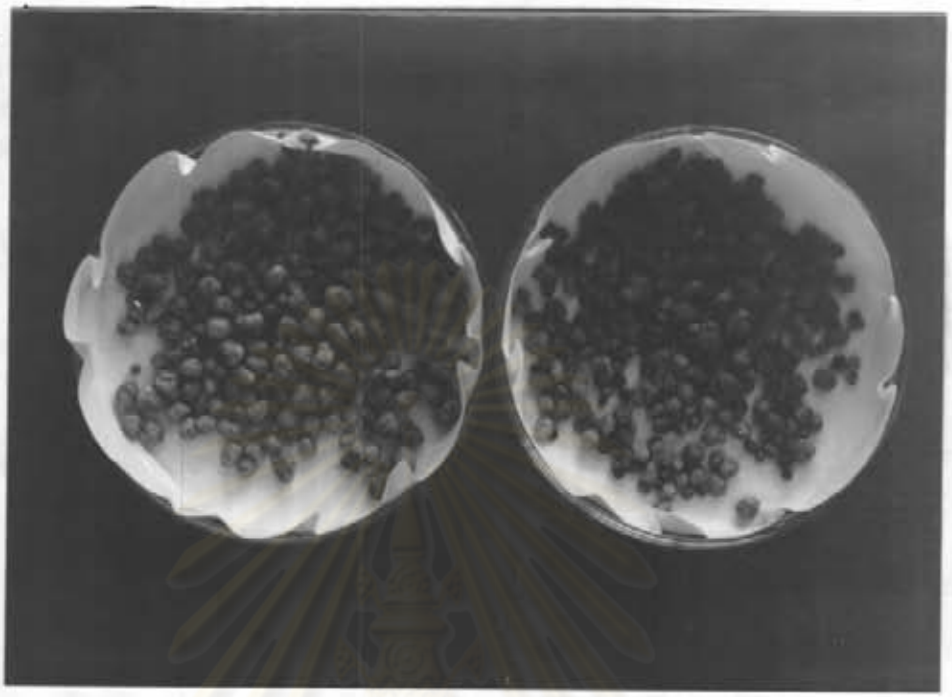
ตารางที่ 9 แสดงค่าตัวเลขทางสถิติที่คำนวณได้ (ดูการคำนวณในภาคผนวก) พบว่าที่อันตรภาคความเชื่อมั่น 95% น้ำหนักปมและจำนวนปมของต้นถั่วที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 2 และ 6 มิลลิโมลาร์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ต้ากว่าของต้นถั่วที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีโปตัสเซียมไนเตรตประมาณ 3 เท่า ความแตกต่างอันนี้มีนัยสำคัญทางสถิติ ในทำนองกลับกันน้ำหนักต้นแห้งของต้นถั่วที่เลี้ยงในไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ สูงกว่าในต้นถั่วที่ไม่มีไนเตรตประมาณ 3 เท่า และความแตกต่างอันนี้ก็มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน สำหรับแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดัคชันของต้นถั่วทั้งสามสภาวะ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่อันตรภาคความเชื่อมั่น 95% ส่วนแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสซึ่งวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี t test พบว่าในส่วนแบคทีรอยด์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่อันตรภาคความเชื่อมั่น 95% ซึ่งมีค่าแอคติวิตีสูงสุดในแบคทีรอยด์จากปมรากถั่วที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ส่วนของพืชไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่า เมื่อเติมโปตัสเซียมไนเตรตให้แก่ต้นถั่ว จะมีผลทำให้น้ำหนักปมและจำนวนปมลดลง ที่สำคัญคือสามารถเหนี่ยวนำแอคติวิตีของไนเตรตรีดัคเทสในส่วนแบคทีรอยด์ ซึ่งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปตัสเซียมไนเตรต และเอนไซม์ไนเตรตรีดัคเทสที่เพิ่มขึ้นนี้ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของไนโตรจิเนสแต่อย่างไร

รูปที่ 26 ลักษณะปมรากถั่วเหลือง จากต้นถั่วเหลืองอายุ 40 วัน ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรต($+NO_3^-$) เปรียบเทียบกับปมรากถั่วเหลืองจากต้นถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต ($-NO_3^-$)

26 ก. เมื่อเลี้ยงต้นถั่วด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

26 ข. เมื่อเลี้ยงต้นถั่วด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 ก.

รูปที่ 26 ข.

ตารางที่ 8 การศึกษาเปรียบเทียบน้ำหนักปม จำนวนปม น้ำหนักต้นแห้ง และแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชั่น ระหว่างปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรต 2, 6 มิลลิโมลาร์ และไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต โดยปลูกต้นถั่วเหลืองให้เกิดปมที่ราก ตามวิธีการทดลองข้อ 6 สำหรับต้นถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 2 และ 6 มิลลิโมลาร์ จะเปลี่ยนอาหารที่เลี้ยงต้นถั่วเป็นอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตในวันที่ 14 ของการปลูก ทำการเก็บต้นถั่วเหลืองเมื่ออายุ 40 วัน นำส่วนรากซึ่งมีปมมาวัดแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชั่น ตามวิธีการทดลองข้อ 9.1 จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักปม น้ำหนักต้นแห้ง และนับจำนวนปม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับ	น้ำหนักปมสด (กรัม)			จำนวนปม			น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม)		อะเซทิลีนรีดิวซ์ (นาโนโมล.ชั่วโมง$^{-1}$.กรัมน้ำหนักปม$^{-1}$)		
	ไม่มีไนเตรต	ไนเตรต 2 มิลลิโมลาร์	ไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์	ไม่มีไนเตรต	ไนเตรต 2 มิลลิโมลาร์	ไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์	ไม่มีไนเตรต	ไนเตรต 2 มิลลิโมลาร์	ไม่มีไนเตรต	ไนเตรต 2 มิลลิโมลาร์	ไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์
1	2.416	1.086	0.715	67	39	38	4.952	11.168	0.085	0.184	0.027
2	1.464	0.75	0.505	58	27	32	2.637	7.451	0.063	0.231	0.065
3	2.342	0.859	0.600	97	31	43	3.808	9.416	0.067	0.005	0
4	1.458	0.159	0.537	55	8	34	2.714	11.60	0.034	0.027	0.024
5	1.881	0.58	0.444	68	22	25	3.20	10.566	0.147	0.011	0.024
6	1.822	0.962	0.237	81	34	18	2.987	11.061	0.034	0.020	0.018
7	2.079	0.845	0.477	63	30	38	3.842	10.588	0.043	0.437	0.027
8	1.625	0.783	0.701	72	28	49	3.008	8.442	0.059	0.012	0.008
9	3.0	0.644	0.532	111	23	36	5.117	9.774	0.197	0.024	0.077
10	2.315	0.433	0.517	76	16	45	3.509	7.6	0.118	0.044	0.022
11	2.381	0.777	0.558	126	28	41	3.855	10.796	0.180	0.169	0.026
12	3.326	1.249	0.725	117	42	37	5.654	7.838	0.073	0.014	0.055
13	2.058		0.678	73		46	3.717	11.7	0.047		0.010
14	1.581		0.753	101		39	2.8	12.35	0.007		0.009
15	1.978		0.551	93		24	3.324	10.92	0.038		0.042
16	2.044		0.447	63		33	3.58	12.433	0.064		0.026

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักปมสด จำนวนปม แอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชัน และไนเตรตรีดักเทสของปมถั่วเหลืองอายุ 40 วัน ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรตความเข้มข้น 2, 6 มิลลิโมลาร์ และไม่มีโปตัสเซียมไนเตรต โดยใช้ข้อมูลจากตารางที่ 8 (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก)

(1) การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธีของ Duncan's new multiple range test กลุ่มที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะแสดงด้วยตัวอักษร "ก" เหมือนกัน

(2) การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี F'test ค่าแอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชั่นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(3) การวิเคราะห์ทางสถิติโดย t test ค่า t-value เป็นค่าที่เปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีไนเตรต ที่อันตรภาคความเชื่อมั่น 95%

ค่า t-value จากตาราง = $\pm$ 1.96

ดังนั้น (-) ไม่ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (อยู่ภายในขอบเขต $\pm$ 1.96)

(+) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาวะที่เลี้ยงต้นถั่ว	จำนวนปม[1]	น้ำหนักปมสด[1] (กรัม)	น้ำหนักต้นแห้ง[3] (กรัม)		แอคติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชัน[2] (หน่วย/กรัม น.น.ปม)	แอคติวิตีของไนเตรตรีดูเทสในส่วนแบคทีรอยด์[3] (หน่วย/มก.)	
			น้ำหนัก	t-value		แอคติวิตี	t-value
ไม่มีไนเตรต	82.56	2.11	3.65		0.08	1.22	
ไนเตรต 2 มิลลิโมลาร์	27.33 ก	0.76 ก	-		0.10	1.57	6.55(+)
ไนเตรต 6 มิลลิโมลาร์	36.12 ก	0.56 ก	10.23	14.23 (+)	0.03	2.26	18.91(+)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย