บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ขบวนการตรึงไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่จำเป็น ซึ่งสิ่งมีชีวิตต้องใช้เพื่อสังเคราะห์ชีวโมเลกุลหลายชนิดในขณะเจริญเติบโต ณ.ที่ความดันหนึ่งบรรยากาศบนผิวโลก ปริมาณก๊าซไนโตรเจนจะมีอยู่มากมายถึง 80 เปอร์เซนต์ แต่เนื่องจากโมเลกุลของมันประกอบด้วยอะตอมไนโตรเจนจับกันด้วยพันธะตรีคูณ จึงทำให้ก๊าซนี้มีคุณสมบัติเป็นก๊าซเฉื่อย การที่จะทำลายพันธะตรีคูณของโมเลกุลไนโตรเจน เพื่อที่จะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของอิออน หรือสารประกอบต่าง ๆ เช่น อนุมูลแอมโมเนียมได้ ต้องอาศัยพลังงานจำนวนมาก นิยมเรียกขบวนการเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นอนุมูลแอมโมเนียมโดยสิ่งมีชีวิตว่า ขบวนการตรึงไนโตรเจน พบว่า โพรคาริโอท (Prokaryote)บางชนิดเท่านั้น ที่มีความสามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Quispel,A.1974) ขบวนการนี้อาศัยเอนไซม์ไนโตรจีเนสพลังงานในรูปของ ATP และอำนาจการรีดิวส์ (reducing power) เพื่อการเปลี่ยนแปลง ดังสมการ

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

ความสำคัญของขบวนการตรึงไนโตรเจนในปัจจุบันและในอนาคต

ปัจจุบัน การขาดแคลนอาหารโปรตีน กำลังเป็นปัญหาสำคัญซึ่งท้าทายมวลมนุษย์ทั่วโลก และนับวันปัญหานี้จะยิ่งทวีความรุนแรงขึ้น อันสืบเนื่องจากการเพิ่มจำนวนประชากรโลกอย่างรวดเร็วและไม่หยุดยั้ง แหล่งสำคัญที่ป้อนอาหารโปรตีนแก่มนุษย์และสัตว์ขณะนี้ ได้จากผลิตผลทางการเกษตร และยึดจำกัดอันหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร คือ การขาดแคลนอนุมูลไนโตรเจนในพื้นดิน ปัญหานี้แก้ไขได้โดยการเติมปุ๋ยไนโตรเจน หรือ นิยมเรียก

ว่าปุ๋ยวิทยาศาสตร์ ลงไปบนพื้นที่เพาะปลูก ปุ๋ยไนโตรเจนนี้ผลิตได้จากขบวนการ Haber Bosch (Haber,L.F.1968) ด้วยหลักการคือ อัดก๊าซไฮโดรเจนให้รวมกับก๊าซไนโตรเจน ภายใต้อุณหภูมิ และความดันสูง ๆ ดังนั้น ขบวนการนี้จึงต้องการพลังงาน ซึ่งนิยมใช้ในรูปของน้ำมันปิโตรเลียมเป็นปริมาณมาก Sweeny,G.C.(1975) เป็นผู้ประมาณว่า โลกต้องใช้น้ำมันถึง 2 ล้านบาร์เรลต่อวัน ในการใช้ผลิตปุ๋ยไนโตรเจน สำหรับบ้อนการเกษตร ขณะที่ราคาน้ำมันในตลาดโลกกำลังพุ่งสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน และมีแนวโน้มที่จะสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในอนาคต ควบคู่กับปริมาณน้ำมันซึ่งนับวันจะหมดไปจากโลกทุกที ทำให้การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนเพื่อการเกษตร ต้องถูกจำกัดลงด้วย จากวิกฤตการณ์ที่กล่าวมา ชักนำให้นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกตื่นตัวในความพยายามที่จะค้นหาวิธีการใหม่ ในการเพิ่มแอมโมเนียมให้แก่พืช โดยหันความสนใจมาที่ความสำคัญของขบวนการตรึงไนโตรเจนโดยจุลินทรีย์บางชนิด และเชื่อว่า จะเป็นจุดสำคัญที่จะช่วยผ่อนคลายความตึงเครียดของวิกฤตการณ์นี้ได้ เนื่องจากขบวนการนี้อาศัยพลังงานจากแสงอาทิตย์ ซึ่งเป็นพลังงานหมุนเวียน นำมาใช้ใหม่ได้ไม่สิ้นสุด (Renewable energy form)

ชนิดของจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ (Burns,R.C.,and Hardy,R.W.F.1975)

จุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เท่าที่ค้นพบจนถึงปัจจุบัน แบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1. จุลินทรีย์อิสระ (Free-living microorganisms) จุลินทรีย์พวกนี้ จะตรึงไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของตัวเอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสิ่งแวดล้อมมีปริมาณไนโตรเจนลดต่ำลง พบทั่วไปทั้งในดินและน้ำ เช่น แบคทีเรียตระกูล Klebsiella, Azotobacter, Spirillum, Clostridium และสาหร่ายพวก Nocardia หรือ Actinomyces เป็นต้น

2. จุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Symbiosis) จุลินทรีย์พวกนี้จะตรึงไนโตรเจน แล้วส่งให้แก่พืชเพื่อใช้สังเคราะห์โปรตีน ขณะเดียวกันพืชจะให้พลังงานที่ได้จากขบวนการสังเคราะห์แสงแก่จุลินทรีย์ในรูปของสารต้นตอคาร์บอน

เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ตัวอย่าง เช่น ไรโซเบียม ซึ่งอยู่ในปมของรากพืชตระกูลถั่ว , สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ซึ่งอยู่ร่วมกับไลเคนส์ หรือ Anabaena azollae ซึ่งอยู่ร่วมกับแหนแดง เป็นต้น

ความรู้ทางชีวเคมีของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

ไนโตรจีเนสเป็นเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนเชิงซ้อนสองส่วน คือ Component I และ Component II คุณสมบัติเด่นของ Component I คือ มีโมลิบดินัม และ เหล็กเป็นส่วนประกอบ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 220,000 ดัลตัน ประกอบด้วยโปรตีนสี่หน่วยย่อย คุณสมบัติเด่นของ Component II คือ มีเหล็กเป็นส่วนประกอบ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55,000 ดัลตัน ประกอบด้วยโปรตีนสองหน่วยย่อย (Hardy,R.W.F.,et al.1975) แอคติวิตี้ของโปรตีนทั้งสอง component จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วภายใน 1 - 15 นาที เมื่อกระทบกับก๊าซออกซิเจน (Zumft,W.G., and Mortenson,L.E.1975) คุณลักษณะเด่นอีกข้อหนึ่งของเอนไซม์นี้ คือ ความสามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารประกอบที่มีฟันธะตรีคูณต่าง ๆ เช่น ไนโตรเจน อะเซทีลีน ไซยาไนด์ และ เอไซด์ เป็นต้น เมื่อไม่มีสับสเตรทอื่นใด เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะรีดิวส์โปรตอนเป็นไฮโดรเจน โดยต้องการพลังงานในรูปของ ATP ด้วย (ATP-dependent Hydrogen Evolution)การทำงานของเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งโดยคาร์บอนมอนอกไซด์ ยกเว้น ปฏิกิริยาการรีดิวส์โปรตอนเป็นไฮโดรเจนเท่านั้น(Schrauzer,G.N.1975)

บทบาทของจุลินทรีย์อิสระในการศึกษาขบวนการตรึงไนโตรเจน

จากการศึกษาที่ผ่านมา การคลี่คลายความรู้ระดับโมเลกุลเกี่ยวกับขบวนการตรึงไนโตรเจนได้อาศัยจุลินทรีย์ที่ตรึงไนโตรเจนแบบอิสระเป็นตัวแบบ ในขณะที่จุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับพืชยังไม่มีหนทางนำมาใช้เป็นตัวแบบได้ เนื่องจากกลไกของการตรึงไนโตรเจนในจุลินทรีย์ประเภทหลังนั้น มีความสัมพันธ์อย่างลึกซึ้งกับพืช เมื่อแยกมันออกมาให้อยู่ในสภาพอิสระ ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะหมดไป หรือ เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมอย่างมากมาย (Keister,D.L.1975 , Kurz,W.G.W.,and

LaRue,T.A.1975 , Pagon,J.D.et al.1975) ส่วนจุลินทรีย์อิสระนั้น มีปัจจัยจำเป็นสำหรับการตรึงไนโตรเจนรวมทั้งระบบควบคุมการทำงานครบถ้วนในตัวของมันเอง จึงเหมาะสมทุกประการ ในการใช้เป็นตัวแบบเพื่อศึกษากลไกของการตรึงไนโตรเจน จนถึงปัจจุบัน ความรู้เรื่องการตรึงไนโตรเจนระดับโมเลกุล อาจสรุปได้ดังนี้

1. พันธุกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

จุลินทรีย์อิสระที่นิยมใช้เป็นตัวแบบในการศึกษาพันธุกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส คือ Klebsiella pneumoniae ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในครอบครัวเดียวกันกับ Escherichia coli ที่เรารู้จักพันธุกรรมของมันดีที่สุด เมื่อเทียบกับแบคทีเรียอื่น ๆ (Bachmann,B.J.,Low,K.B.,and Taylor,A.S.1976) เท่าที่ผ่านมา พบว่าความรู้เกี่ยวกับแผนผังกรรมพันธุ์ของ Escherichia coli ใช้เป็นแม่แบบในการศึกษาพันธุกรรมของไนโตรจีเนสจาก Klebsiella pneumoniae ได้ (Matsumoto,H., and Tazaki,T.1970)

การศึกษาด้านพันธุกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส เริ่มต้นในราวปี 1971 เมื่อ Streicher,S.;Gurney,E.;and Valentine,R.C. พบว่า ยีนการตรึงไนโตรเจนอยู่ใกล้ยีนการสังเคราะห์ฮีสติดีน โดยใช้วิธีการเหนี่ยวนำยีนที่บกพร่องการตรึงไนโตรเจนด้วย Phage P1 และในปีเดียวกัน Dixon,R.A.,and Postgate,J.R. (1971) ก็ได้ใช้วิธีคอนจูเกชั่นหาตำแหน่งยีนนี้ แล้วให้ผลแบบเดียวกัน ต่อมาจากการเคลื่อนย้ายยีนการตรึงไนโตรเจนระหว่าง Klebsiella pneumoniae เข้าสู่ Klebsiella aerogenes หรือ Escherichia coli ซึ่งตรึงไนโตรเจนไม่ได้ และได้คอนจูแกนท์ที่ตรึงไนโตรเจนได้ พบว่า การถอดระหัสของเอนไซม์นี้ถูกกดดันโดยปริมาณแอมโมเนียมที่สูงขึ้น ชี้แนะว่า ยีนการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด ไม่ว่ายีนควบคุม หรือยีนโครงสร้าง ควรอยู่รวมกันเป็นโอเปอรอนใหญ่ ที่ตำแหน่งใกล้ ๆ กับยีนการสังเคราะห์ฮีสติดีน (Dixon,R.A.,and Postgate,J.R.1972 , Tubb,R.S.,and Postgate,J.R. 1973) ส่วนตำแหน่งและจำนวนยีนหน่วยย่อยบนโอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนสถูกศึกษาในภายหลัง โดยใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์ คือ สร้าง nif มิวแตนท์ ซึ่งผิด

ปรกติที่ยีนตำแหน่งต่าง ๆ แล้วนำมาวิเคราะห์การทดแทนยีนที่ขาดไป โดยวิธี Complementation analysis , การใช้ Transducing phage ในการหาตำแหน่งยีนโดยละเอียด (Fine structure mapping) พบว่า โอเปอรอนของเอนไซม์นี้ประกอบด้วยยีนหน่วยย่อย 15 ตัว โดยเรียงลำดับนับจากยีนการสังเคราะห์ฮีสติดีน เป็นดังนี้ nif Q,B,A,L,F,M,V,S,U,N,E,K,D,H,J (St.John,R.T.,et al.1975 , Kennedy,C.1977 , MacNeil,T.,et al.1978 , Merrick,M.,et al.1978) นอกจากนี้ ยังพบความสัมพันธ์ของยีนหน่วยย่อยกับโปรตีน ของเอนไซม์นี้บางหน่วยแล้ว เช่น พบว่า nif K และ nif D จะถอดระหัสสำหรับโปรตีนที่ประกอบกันเป็น Component I , nif H จำเป็นสำหรับโปรตีนของ Component II เป็นต้น (Roberts,G.P.,et al 1978)

2. พลังงานที่ใช้ในขบวนการตรึงไนโตรเจน

ขบวนการตรึงไนโตรเจน ต้องการพลังงานในรูปของ ATP สูงมาก การศึกษาด้านพลังงานที่ใช้สำหรับขบวนการตรึงไนโตรเจน in vitro พบว่า ในการรีดิวส์ไนโตรเจน 1 โมล ต้องการ ATP อย่างน้อย 12 - 15 โมล (Burns,R.C.,and Hardy,R.W.F.1975)

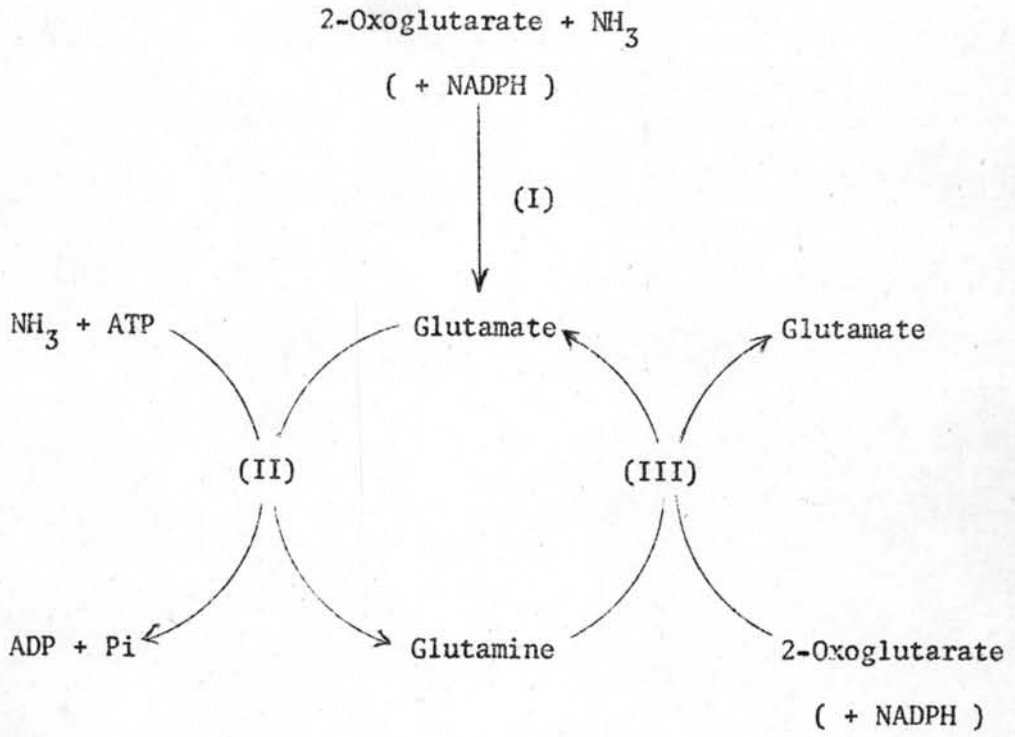
สำหรับการศึกษาใน in vivo ให้ผลแตกต่างกันตามวิธีการที่ใช้ เช่น โดยการเปรียบเทียบการเจริญสูงสุดต่อโมลของกลูโคสที่ใช้ เมื่อจุลินทรีย์เติบโตภายใต้ภาวะการตรึงไนโตรเจน พบว่า สำหรับ Azotobacter chroococcum ต้องการ 4 - 5 ATP สำหรับการรีดิวส์ไนโตรเจน 1 โมล (Dalton,H.,and Postgate,J.R.1969) ขณะที่ Klebsiella pneumoniae ต้องการถึง 29 ATP ต่อการรีดิวส์ไนโตรเจนปริมาณเท่ากัน (Hill,S.1976) การที่พบค่า ATP ที่ต้องการของ Azotobacter chroococcum ค่อนข้างต่ำ ควรเนื่องมาจากจุลินทรีย์ชนิดแรกนี้ ใช้พลังงานจากขบวนการลูกโซ่การหายใจเป็นหลัก (obligatory aerobe) และสันนิษฐานว่า ยังสามารถนำก๊าซไฮโดรเจนที่สูญเสียไปพร้อมกับขบวนการตรึงไนโตรเจนกลับมาใช้ได้ใหม่อีก (Yates,M.G.,and Jones,C.W.1974) ส่วนแบคทีเรียพวกหลัง สามารถตรึง

ไนโตรเจนได้ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน โดยพลังงานส่วนมากมาจากขบวนการไกลโคไลซิส และ ฟอสโฟโรคลาสติค (Benemann,J.R.,and Valentine,R.C. 1972)

3. การควบคุมการถอดระหัสของขบวนการตรึงไนโตรเจน

แบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้นั้น นอกจากจะต้องมียีนที่ถอดระหัสเป็นเอนไซม์ไนโตรจีเนสที่ดื่นตัวแล้ว ยังต้องอาศัยสภาวะที่เหมาะสมในปลดปล่อยการถอดระหัสของยีนอีกด้วย จากการศึกษาโดยใช้ Klebsiella pneumoniae เป็นตัวแบบ พบว่า เอนไซม์ไนโตรจีเนสจะถอดระหัสได้ ต่อเมื่อสิ่งแวดล้อมมีปริมาณอนุมูลแอมโมเนียม หรือ กรดอะมิโนต่ำ ๆ เท่านั้น (Parejko,R.A.,and Wilson,P.W. 1970) การค้นพบมิวแตนท์ซึ่งสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไนโตรจีเนสได้ แม้สิ่งแวดล้อมมีปริมาณอนุมูลแอมโมเนียมสูง (Shanmugam,K.T.,Chan,I.,and Morandi,C. 1975) แสดงว่า อนุมูลแอมโมเนียมไม่ใช่ตัวการสำคัญในการควบคุมการถอดระหัสของเอนไซม์นี้ และการศึกษาต่อมา มีข้อมูลซึ่งสนับสนุนว่า การถอดระหัสของเอนไซม์ไนโตรจีเนสเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเปลี่ยนอนุมูลแอมโมเนียมเป็นกรดอะมิโน(Shanmugam, K.T.,and Morandi,C.1976)

ปรกติแล้ว การเปลี่ยนอนุมูลแอมโมเนียมเป็นกรดอะมิโนในแบคทีเรีย เกี่ยวข้องกับเอนไซม์สามตัว คือ Glutamate dehydrogenase , Glutamine synthetase และ Glutamate synthase ดังแสดงในรูปที่ 1 (Tempest,D.W.,and Meers,J.L. 1970) การศึกษาค่า Km สำหรับอนุมูลแอมโมเนียม พบว่า เอนไซม์ Glutamate dehydrogenase มีค่า Km เท่ากับ 12 มิลลิโมลาร์ (Meers,J.L.,and Pederson, L.K.1972) ขณะที่ค่า Km ของเอนไซม์ Glutamine synthetase ต่ำกว่า คือ 1.8 มิลลิโมลาร์ (Woolfolk,C.A.;Shapiro,B.;and Stdtman,E.R.1966) ดังนั้น จึงเชื่อว่า อนุมูลแอมโมเนียมที่ได้ภายใต้ภาวะการตรึงไนโตรเจน จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน โดยผ่านการทำงานของเอนไซม์ Glutamine synthetase และ Glutamate synthase



รูปที่ 1 ขบวนการเปลี่ยนอนุมูลแอมโมเนียมเป็นกรดอะมิโน ใน Klebsiella aerogenes

I = Glutamate dehydrogenase

II = Glutamine synthetase

III = Glutamate synthase

จากการศึกษามิวแตนท์ของ Klebsiella pneumoniae ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ Glutamine synthetase พบว่า มิวแตนท์พวกนี้ ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Streicher,S.L.,et al.1974 , Tubb,R.S.1972) นอกจากนี้ ยังพบว่า Klebsiella pneumoniae ที่มีความบกพร่องที่ยีนโครงสร้างของ Glutamine sybthetase (gln A$^-$)ไม่สามารถจะตรึงไนโตรเจนได้ ความสามารถนี้จะหวลคืน เมื่อเคลื่อน F'133 ซึ่งเป็นอิพิโซมที่มียีน Glutamine synthesis อยู่ด้วยเข้าไป (Streicher,S.L.,et al.1974) เหตุการณ์ทั้งหมดนี้ชี้แนะว่า เอนไซม์ Glutamine synthetase น่าจะมีบทบาทสำคัญอย่างใดอย่างหนึ่งต่อการควบคุมการถอดระหัสของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

มิวแตนท์ของขบวนการตรึงไนโตรเจน

เท่าที่ผ่านมา ความรู้เกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจนหลายขั้นตอน ถูกคลี่คลายได้โดยอาศัยมิวแตนท์ของการตรึงไนโตรเจน เช่น ปี 1971 Streicher,S.;Gurney,E.; and Valentine,R.C. ได้แยก nif มิวแตนท์จำนวนหลายร้อยตัว โดยการกลายพันธุ์ Klebsiella pneumoniae แล้วใช้ประโยชน์จากมิวแตนท์เหล่านี้ แสดงตำแหน่งยีนการตรึงไนโตรเจนว่า อยู่ใกล้ยีนการสังเคราะห์ฮีสติดีน หลังการค้นพบนี้แล้ว ความรู้ด้านพันธุกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนส จึงได้รับการศึกษาต่อไปอย่างรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการและเทคนิคทางพันธุศาสตร์ ควบคู่กับการสร้าง nif มิวแตนท์ ที่มีความบกพร่องที่ยีนตำแหน่งต่าง ๆ บนโอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ปัจจุบันทราบแล้วว่า ยีนบนโอเปอรอนนี้มีอยู่ 15 ยีน นอกจากนี้ nif มิวแตนท์ยังได้ใช้เป็นเครื่องมือหาความสัมพันธ์ระหว่างหน่วยของยีนกับเอนไซม์อีกด้วย (Roberts,G.P.,et al.1978)

มิวแตนท์อีกพวกหนึ่ง ชื่อว่า nif-derepressed mutants ซึ่งมีความผิดปรกติที่การควบคุมการถอดระหัสของยีนไนโตรจีเนส ก็ได้ใช้ในการศึกษาพลังงานที่ต้องการในขบวนการตรึงไนโตรเจน และใช้ในการศึกษากลไกควบคุมการถอดระหัสของเอนไซม์นี้ด้วย

ประโยชน์ของ nif มิวแตนท์ที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นความสำคัญของ nif มิวแตนท์ที่มีต่อการศึกษาขบวนการตรึงไนโตรเจน และแม้ว่าจะมีการค้นพบ nif มิวแตนท์มาแล้วเป็นจำนวนมาก แต่ความสลับซับซ้อนของขบวนการตรึงไนโตรเจนก็ยังคงคลี่คลายได้เพียงบางส่วน กลไกการทำงานของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอีกหลายอย่างยังเป็นปัญหาอยู่ ซึ่งยังต้องการ nif มิวแตนท์ลักษณะอื่น ๆ มาช่วยคลี่คลาย อาทิเช่น ปัญหาเกี่ยวกับตำแหน่งเกาะติด (binding site) ของสับสเตรทของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งจากการศึกษาทาง in vitro พบว่า มีอย่างน้อย 5 ตำแหน่งนั้น (Zumft,W.G., and Mortenson,L.E.1975) การสร้าง nif มิวแตนท์ที่มีความผิดปรกติที่ตำแหน่งเกาะติดต่างกัน จะช่วยยืนยันผล in vitro ดังกล่าวได้อย่างดี หรือ ในด้านความสำคัญของปฏิกิริยา ATP-dependent Hydrogen Evolution ซึ่งพบว่า มีผลให้ประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนลดลง 40 - 60 เปอร์เซนต์นั้น (Schubert,K.R.,and Evans, H.J.1976) ยังหาข้อสรุปไม่ได้ว่า ปฏิกิริยาดังกล่าว จำเป็นต้องเกิดขึ้นควบคู่กับปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนเสมอ หรือ เป็นเพียงปฏิกิริยาที่เข้ามาเกี่ยวข้องโดยธรรมชาติเท่านั้น การสร้าง nif มิวแตนท์ จะเป็นทางหนึ่งซึ่งช่วยคลี่คลายปัญหานี้ได้เช่นกัน

การสร้างมิวแตนท์ของขบวนการตรึงไนโตรเจน

เท่าที่ผ่านมา การสร้าง nif มิวแตนท์ที่ใช้ในการศึกษาขบวนการตรึงไนโตรเจน ได้มาจากการกลายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยใช้มิวตาเจนต่าง ๆ เช่น N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine , Hydroxylamine , Diethyl sulfate เป็นต้น การคัดเลือก nif มิวแตนท์ จะทำโดยตรงหลังการกลายพันธุ์ หรือ โดยผ่านวิธีการใช้ Penicillin enrichment หลักการที่สำคัญ คือ เลือกโคโลนีโดยการสังเกตขนาดและสีบนเพลทคัดเลือก ซึ่งมีต้นตอไนโตรเจนจำกัด โดยทั่วไป nif มิวแตนท์จะให้โคโลนีขนาดเล็ก และใสกว่า wild type เนื่องจากการเจริญเติบโตหยุดชะงักภายหลังจากใช้ต้นตอไนโตรเจนที่มีในอาหารหมดไป ขณะที่ wild type ยังคงเจริญต่อไปได้ โดยการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ การกลายพันธุ์ที่โครโมโซมของจุลินทรีย์โดยตรงแบบนี้ มีข้อเสียเปรียบ คือ ขนาดโคโลนีที่เล็กและใสนี้ มิได้หมายความว่า เป็น nif มิวแตนท์

เพราะถูกกลายพันธุ์ที่โอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนสอย่างเดียว แต่ความผิดปรกติของมัน อาจเกิดที่ยีนตำแหน่งอื่น ซึ่งมีความเกี่ยวพันกับการทำงานของขบวนการตรึงไนโตรเจนก็ได้ อีกประการหนึ่ง มิวตาเจนที่มีฤทธิ์รุนแรง อาจก่อให้เกิด double mutation ซึ่งทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่ปรารถนาได้

การวัดการตรึงไนโตรเจนในจุลินทรีย์อิสระ

การวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไนโตรจีเนสในจุลินทรีย์อิสระ อาจทำได้หลายวิธี คือ อาศัยหลักการวัดปริมาณ $^{15}N_2$ ที่ถูกใช้ไปในขบวนการตรึงไนโตรเจนด้วย Mass Spectrophotometer (Burris,R.H.,and Wilson,P.W.1957) , การวัดอัตราการออกซิไดส์โซเดียมไดไทโอไนท์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นรีดิคแทนต์ของปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน (Ljones,T.,and Burris,R.H.1972) , การวัดปริมาณแอมโมเนียมที่เพิ่มขึ้นภายใต้การตรึงไนโตรเจน โดยวิธีของKjeldahl (Pietro,A.S.1972) และ การวัดอัตราการรีดิวส์อะเซทีลีนเป็นเอทีลีน โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟฟี (Koch,B.,and Evans,H.J.1966 , Hardy,R.W.F.,et al.1968) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการศึกษาการตรึงไนโตรเจนทั้งหมดนี้ วิธีหลังจะเป็นวิธีที่ดีที่สุด ด้วยเหตุผลดังต่อไปนี้

1. มีความไวสูงมาก สามารถตรวจพบก๊าซเอทีลีน แม้จะมีจำนวนน้อยกว่า 10^{-12} โมล

2. ทำได้ง่าย ทั้งใน in vivo และ in vitro

3. มีความจำเพาะสูง เพราะก๊าซเอทีลีนที่เกิดขึ้น มีความคงตัว (stable) และ สามารถแยกจากก๊าซอื่น ๆ เช่น อะเซทีลีน มีเทน ไดซัดเจน เมื่อใช้ก๊าซโครมาโตกราฟฟี

4. ทำได้รวดเร็วกว่าวิธีอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น ภายในหนึ่งชั่วโมง อาจวัดได้ถึง 20 ตัวอย่าง เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเสนอวิธีการสร้างมิวแตนท์ ที่มีความผิดปรกติที่โอเปอรอนของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของ Klebsiella pneumoniae M5a1 โดยการกลายพันธุ์โครโมโซม ซึ่งบรรจุอยู่ใน generalized transducing phage P1 แล้วเหนี่ยวนำเข้าฮีสติดีนออก-โซโทรพ ของ Klebsiella pneumoniae M5a1 รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นบางประการของมิวแตนท์ที่คัดเลือกได้