

การตรึงไนโตรเจนในพอร์นิคัสไฮโดรจีเนส มีบทบาทของ

Klebsiella pneumoniae M5a1

นางสาว นิภา เลขสุนทรภกร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีพเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2526

ISBN 974-562-689-9

015198

NITROGEN FIXATION IN FORMIC DEHYDROGENASE MUTANTS OF

Klebsiella pneumoniae M5a1

Miss Nipa Leksuntrakorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1983

ISBN 974-562-689-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การตรึงไนโตรเจนในพอร์นิคทีไฮโดรจีเนสไมวแทนท์ของ
Klebsiella pneumoniae M5a1

โดย

นางสาว นีลา เดชสุนทรากกร

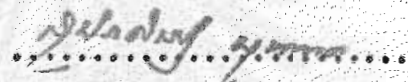
ภาควิชา

ชีวเคมี


อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพย์ทัศน์


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประคิษฐ์ มุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา สิริจินตกานต์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพย์ทัศน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ มินพานิชสาร)

..... กรรมการ
(ดร.นันทพร บุญเกิด)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรึงไนโตรเจนในพอร์มิกทีไฮโดรจีเนสมิวแทนท์ของ <u>Klebsiella pneumoniae</u> K5a1
รื้อนิติต	นางสาวนิภา เดชสุนทรภาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพย์ทัศน์
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2526

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 2 ประการ คือ หนึ่ง เพื่อศึกษาคุณสมบัติของพอร์มิกทีไฮโดร-
จีเนสมิวแทนท์ของโคลนเชื้อยาลิวโมบีดี K5a1 สอง ใช้มิวแทนท์บางตัวเป็นตัวแทนในการ
ศึกษาการควบคุมการตรึงไนโตรเจน

คุณสมบัติของพอร์มิกทีไฮโดรจีเนสมิวแทนท์ที่ไคศึกษาในนี้ตั้งต่อไปนี้

1. รูปแบบการ เจริญของมิวแทนท์ในอาหารสูตรปรับค่าที่มิกลูโคสเป็นแหล่งต้นคอ
คาร์บอน

1.1 การเจริญสูงสุดของมิวแทนท์เกือบทุกตัวต่ำกว่าไวคไทพ์ เมื่ออิมโมเนียม
ทำหน้าที่เป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน

1.2 การเจริญสูงสุดของ 10F, 16A และ 2F ยังคงค่าเดิม แม้จะเสริม
ด้วยไนเตรคในอาหารด้วยอีกอย่างหนึ่ง ซึ่งตรงกันข้ามกับไวคไทพ์อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้
มิวแทนท์แทบทุกตัวยังแสดงคุณสมบัติกานคดอเรด ยกเว้น 24A ซึ่งมีค่าการเจริญสูงสุด สูงกว่า
เดิม และพบว่า 24A ก็ไวคคดอเรดเช่นเดียวกับไวคไทพ์

2. ในระหว่างการเจริญในทุกกรณีที่ผ่านมา มิวแทนท์ทุกตัว ไม่สามารถผลิตก๊าซ
ไฮโดรเจนได้ ในขณะที่ไวคไทพ์ ณ ที่ค่าการเจริญสูงสุด OD_{420nm} 1.1 หน่วย จะให้ก๊าซ
ไฮโดรเจนในปริมาณถึง 97 ไมโครโมลต่อกิลเจอร์

3. มิวแทนท์ทุกตัวยังสามารถเจริญได้ เมื่อมียูเรียเป็นแหล่งต้นคอคาร์บอน และ
มีก๊าซไฮโดรเจนหรือพอร์เมคเป็นตัวให้อิเล็กตรอน

4. แอคติวิตีของเอนไซม์พอร์มิกดีไฮโดรจีเนสพอร์ม "H" ถูกพบในส่วนเยื่อเซลล์ของไวต์โพรเป็นส่วนใหญ่ และในไซโทซอลเป็นส่วนน้อย ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในส่วนเยื่อเซลล์สูงกว่าในส่วนของไซโทซอล ประมาณ 8 เท่า ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนในส่วนของเยื่อเซลล์ เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงของความเข้มข้นโปรตีน 0.44-2.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในช่วงของแอคติวิตี 70-297 นาโนโมลต่อนาที ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์พอร์มิกดีไฮโดรจีเนสพอร์ม "H" ในส่วนเยื่อเซลล์ ของไมโทคอนทริคัล

5. สำหรับแอคติวิตีของเอนไซม์พอร์มิกดีไฮโดรจีเนสพอร์ม "H" มีปรากฏเฉพาะในส่วนของเยื่อเซลล์ ความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ และความเข้มข้นของโปรตีน เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง ของความเข้มข้นโปรตีน 0.96-10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในช่วงของแอคติวิตี 8-70 นาโนโมลต่อนาที ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ในไมโทคอนทริคัล สายพันธุ์ 10F, 16A และ 2F ยกเว้นหมายเลข 24A ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ใน 24A ต่ำกว่าไวต์โพรประมาณ 10 เท่า

การศึกษากลไกการควบคุม กระบวนการตรึงไนโตรเจนในพอร์มิกดีไฮโดรจีเนสไมโทคอนทริคัล

สำหรับไมโทคอนทริคัลสายพันธุ์ 2F และ 24A ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ได้เพิ่มขึ้น nif เข้าไปในไมโทคอนทริคัลหนึ่งชุด ในรูปของพลาสมิด (RP41) พบว่าคอนจูแกนตทุกตัวสามารถตรึงไนโตรเจนได้ ส่วนคุณสมบัติของการเป็นพอร์มิกดีไฮโดรจีเนสยังคงเดิม ดังนั้นจึงคาดว่าไมโทคอนทริคัลทั้งสองสายพันธุ์ น่าจะมีความผิดปกติ แบบ double mutation ซึ่งจากการศึกษา reversion frequency ก็ไม่สอดคล้องกันด้วย

สำหรับไมโทคอนทริคัลสายพันธุ์ 10F ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน พบว่า มันสามารถเจริญได้ภายใต้สภาวะที่ปลดปล่อยการก่อกวนของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยให้ค่าการเจริญสูงสุดดีกว่าไวต์โพรเล็กน้อย รูปแบบของอะเซทิลซัลฟิไดร็อกซัน ที่พบในคลอโรฟิลล์ของทั้งไมโทคอนทริคัลและไวต์โพรไม่แตกต่างกัน แต่จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในรูปแบบของกาซโซลไนโตรเจน กล่าวคือ ปริมาณก๊าซไนโตรเจนที่พบใน 10F มีค่าต่ำกว่าไวต์โพรประมาณ 3 เท่า ที่ stationary phase คือมีค่า 56 และ 16 ไมโครโมลต่อคลอโรฟิลล์สำหรับไวต์โพรและ 10F ตามลำดับ

ในสภาพที่เสริมโซเดียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ลงในอาหาร ไวท์โพรจะเจริญได้ดี เพราะใช้ในเครตเป็นสารแทนตอไนโตรเจนได้โดยพบไนโตรเจนในอาหาร แต่ในสภาวะดังกล่าว 10F จะเจริญได้ช้ากว่า พบ lag period จากนั้น ค่าความขุ่นจะเพิ่มขึ้นช้า ๆ จนกระทั่งถึงความขุ่นสูงสุด OD_{420nm} 0.45 หน่วย แต่พบว่า ตรวจสอบค่าแอกติวิตีของอะเซทีลดีนรีกัตชันโค ในคัลเจอร์ ทั้งแต่เริ่มต้นเจริญ จนถึงจุดสูงสุด การทดลองนี้แสดงว่า ไนเตรตมิได้เป็นตัวกักคั้นที่แท้จริงของการถอดรหัสของเฮนไซม์ไนโตรจีเนส

นอกจากนี้โดยอาศัย 10F เป็นต้นแบบ ยังพบว่าไนโตรเจนที่อาจมิใช่ตัวกักคั้นที่แท้จริงของการถอดรหัสของเฮนไซม์ไนโตรจีเนสอีกด้วย ตรงกันข้าม สภาพการกักคั้นของไนโตรเจนคล้ายกับของอิมโมเนียมมาก และอิมโมเนียมก็เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่ได้รับการยืนยันว่า ไม่ใช่ตัวกักคั้นของการถอดรหัสของเฮนไซม์ไนโตรจีเนส



Thesis Title Nitrogen Fixation in Formic Dehydrogenase
Mutants of Klebsiella pneumoniae M5a1
Name Miss Nipa Leksuntrakorn
Department Biochemistry
Thesis Advisor Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.
Academic Year 1983

Abstract

This reasearch composed of two main objectives ; the first aimed at characterizing the formic dehydrogenase (fdh) mutants of Klebsiella pneumoniae M5a1 and the second focused on the study of the regulation of nitrogen fixation of some selected mutants.

The relative properties of the formic dehydrogenase mutants were revealed as follows:-

1. Patterns of anaerobic growth under minimal medium containing glucose as the sole source of carbon.

1.1 Maximal growth yields of all mutant strains were discovered to be lower than that of their WT when ammonium ion served as the sole source of nitrogen

1.2 Difference in growth-yield was negative, when there was nitrate supplemented into the medium, detected in the cultures of majority of fdh strains.... with the exception of those derived from the 24A and WT. Identical growth-yield profiles were again attained even there was chlorate supplemented into the medium.

2. During the multiplication stage of mutants, obviously there was no hydrogen gas detected which was noticed in different manner from the WT whereas 97 micromole of hydrogen per culture were measured from WT inoculum at the turbidity of 1.1 unit of OD_{420nm}.

3. When fumarate supplemented with either formate or hydrogen was substituted with glucose, then all mutants, as well as WT, could be cultivated under such restricted conditions.

4. The specific activity of the formic dehydrogenase form H detected from membrane fraction prepared from WT cells was found to be eight fold larger than that of the corresponded cytosol. A linear correlation was when protein concentrations of 0.44-2.0 milligrams were plotted against the enzymatic product of 70-297 nmole per minute. Within this protein range, no detectable activities of formic dehydrogenase form H were detected from the membranes prepared from all strains of fdh mutant.

5. Resultingly, we found that the activity of formic dehydrogenase form N was resided within the membrane fraction only. A linear correlation between protein concentration, and the enzymatic activities were found in the range of 0.96-10.00 milligrams protein and 8-70 nmole product per minute respectively. Under this protein range, no detectable activities of formic dehydrogenase form N were found in the membrane prepared from mutants' cells, except those from the 24A's. In conclusion, the specific activity obtained from 24A's membrane fraction was only one-tenth of that which obtained from the WT's.

Below is the result of regulatory mechanism of nitrogen fixation in the formic dehydrogenase mutants:-

We selected 2F and 24A to serve as representatives for fdh of fixing inability. When a copy of nif gene which has been deposited to the drug-resistant plasmid so-called RP41 was transferred into strains of fdh, we observed that, their nitrogen fixing abilities were reconciled. The total conjugant-resistants which harbor two copies of nif gene, still retained the fdh properties, as identical to their corresponding parental-strains. With this result featuring that we could not find any revertants coming up from the plates, incubated under nitrogenase derepressed condition, having been inoculated with the seventh-subculturing inoculum; we, therefore arrived at the conclusion that the nitrogen-fixing inability of both 2F and 24A might owing to the defection of a double mutation.

We selected 10F as representative for the strains of fixing ability and found that 10F could be either equally-well or

D

a little bit better cultivated under a normal nitrogenase derepressed condition when comparing to that of its wild strain. The profiles, plotted from the specific activity of the acetylene-reduction versus the incubated-time, of both 10F and WT were concurrently parallel. Much to our surprise, the hydrogen gas mentioned in the case of acetylene-reduction activity were different. The total amount of hydrogen produced, as measured from the stationary phase inoculum of 10F was only 16 micromole per culture while the WT was 56 micromole per culture.

Despite the remarkable rapid growth of WT which was noted when it was cultivated under the minimal medium having nitrate as the sole nitrogen source; consequently there was no detectable activity of acetylene reduction from WT-culture whatsoever. In the opposite case, the growth of 10F of the corresponding condition disclosed a lag-period effect and rise gradually up to the maximal point after the culture produced detectable activities of acetylene reduction. The above evidence certainly witnessed that nitrate itself was not the direct repressor of the nitrogenase-gene expression. Under the similar application of this mutant, we further observed that nitrite might not be the nif repressor, simply because the evidence obtained was in point of fact well matched with that of the established one, in case of ammonium ion.

กิติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณของศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ พิตยทัศน์ เป็น
อย่างยิ่ง ที่ได้ให้ความกรุณาและความเข้าใจ ค่อยเขียน ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษา
อยู่ในภาควิชาชีวเคมี

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิรดา สิริจินตภานต์ รองศาสตราจารย์
ดร.สุมาลี พิธญากร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และดร.เนนทร
บุญเกิด ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ปวีณา ชัยศิริ และ รองศาสตราจารย์ ดร.จริยา
บุญธรรม ในความกรุณาเรื่องการใช้เครื่องถ่ายภาพโครมาโตกราฟและถ่ายภาพอิเล็กตรอน
ตลอดจนกำลังใจจากอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี

ขอบคุณ คุณจุฑาทันท์ พินสวัสดิ์ เป็นอย่างยิ่ง ในความกรุณาเรื่องมิวแทนท์ และ
ความช่วยเหลือต่าง ๆ

ขอบคุณศูนย์ซ่อมเครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ที่ได้กรุณาให้ยืมเครื่องชุดสูญญากาศ
ขอบคุณสมาคมนิสิตเก่าจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบัณฑิตวิทยาลัยสำหรับการสนับสนุนด้านทุนวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกคน ในความช่วยเหลือเรื่องทั่วไปในระหว่าง
การทำวิจัย

นอกจากนี้ ผู้เขียนขอขอบคุณเพื่อน ๆ ที่ ๆ และน้อง ๆ ในภาควิชาชีวเคมีทุกคน
สำหรับกำลังใจ และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำกาวิจัยนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ช
กิตติกรรมประกาศ.....	ญ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	๑
สารบัญรูป.....	๓
คำย่อ.....	ณ
บทที่	

1. บทนำ.....	1
2. วิธีการทดลอง	
1. วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	11
2. จุดเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง.....	12
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	12
4. การเตรียมสารละลาย.....	13
5. การเก็บรักษาจุดเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง.....	14
6. การเจริญของเชื้อภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน.....	14
7. การวัดปริมาณผลิตภัณฑ์จากการเจริญเติบโต.....	15
8. การทดสอบออกฤทธิ์ของเฮนไซม์เฟอร์มิคทีไฮโดรจีเนส.....	16
9. การหั่งไนโตรเจน.....	19
10. การผสมพันธุ์แบคทีเรียโดยวิธีคอนจูเกชัน.....	20
11. Reversion frequency.....	21
12. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีดอร์.....	23
3. ผลการทดลอง	
1. การแจกแจงคุณสมบัติของเฟอร์มิคทีไฮโดรจีเนสในวัฒนธรรมที่เลี้ยงกัน..	24

สารบัญ (ต่อ)

บท

หน้า

2. สรีรวิทยาของฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียที่สร้างไนโตรเจนได้..... 26

3. สรีรวิทยาของฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียที่สร้างไนโตรเจนไม่ได้..... 30

4. การทดสอบแอสทิวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนส..... 34

5. การเจริญของเชื้อเมื่อมีพลาสมาเรคเป็นแหล่งคาร์บอน..... 40

6. การสร้างไนโตรเจนของฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรีย..... 45

7. การศึกษามิโทคอนเดรียที่สร้างไนโตรเจนไม่ได้..... 63

4. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย..... 70

เอกสารอ้างอิง..... 85

ประวัติผู้เขียน..... 93

สงวนลิขสิทธิ์
 ๒๕๖๓
 ๒๕๖๓

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจำแนกทีโนไทป์เบื้องต้น.....	25
2	ปริมาณก๊าซไฮโครเจนที่เกิดขึ้นของไวคัสไทป์และมิวแทนท์.....	31
3	Reversion frequency.....	35
4	ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของเอนไซม์ FDH _H กับปริมาณโปรตีนของไวคัสไทป์.....	37
5	แอกติวิตีของเอนไซม์ FDH _H ของไวคัสไทป์และมิวแทนท์ที่เชื้อเซลล์.....	39
6	ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของเอนไซม์ FDH _H กับปริมาณโปรตีนของไวคัสไทป์ และมิวแทนท์หมายเลข 24A.....	41
7	แอกติวิตีของเอนไซม์ FDH _H ของไวคัสไทป์และมิวแทนท์ที่เชื้อเซลล์.....	43
8	การเจริญของไวคัสไทป์ และมิวแทนท์ในอาหารที่มีหมู่คาร์บอเนต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมีฟอร์เมต 10 มิลลิโมลาร์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในสภาวะต่าง ๆ กันที่ 30° ซ.....	46
9	เปรียบเทียบปริมาณของแหล่งคาร์บอนไฮโครเจนที่ปลดปล่อยการลดระดับของเอนไซม์ไนโตรจิเนส.....	64
10	เปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ระหว่างสายพันธุ์เดิม (parent strain) กับคอนจูแกนต์.....	67

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1	5
2	22
3	27
4	29
5	32
6	38
7	42
8	44
9	47
10	48

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
11 ลักษณะการเจริญ และแอคติวิตีของอะเซทิลมีทิลกันของไวต์ไลท์ และมิวแทนท์ หมายเลข 10F และ 16A.....	50
12 ลักษณะการเกิดก๊าซไฮโครเจน ภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจนในไวต์ไลท์ และ 10F.....	52
13 ผลกระทบของอนุมูลไนเตรต คลอเรต และไนไตรต์ ต่อการตรึงไนโตรเจน ในไวต์ไลท์ และมิวแทนท์หมายเลข 10F.....	53
14 ผลกระทบของโซเดียมไนไตรต์ต่อการตรึงไนโตรเจนในมิวแทนท์ หมายเลข 10F.....	55
15 เปรียบเทียบผลกระทบของ NaNO_2 และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในปริมาณที่เท่ากัน ต่อการตรึงไนโตรเจนในมิวแทนท์หมายเลข 10F.....	58
16 ผลกระทบของแมกนีทอล 25 มิลลิโมลาร์ และกลูโคส 25 มิลลิโมลาร์ต่อการ ตรึงไนโตรเจนใน 10F.....	61
17 ผลกระทบของ โซเดียมไนไตรต์ 0.5 มิลลิโมลาร์ ต่อการตรึงไนโตรเจนใน มิวแทนท์หมายเลข 10F เมื่อเปลี่ยนแหล่งต้นคอคาร์บอนจากกลูโคส 25 มิลลิโมลาร์ เป็นแมกนีทอล 25 มิลลิโมลาร์.....	62
18 ลักษณะการเจริญและแอคติวิตีของอะเซทิลมีทิลกันในไวต์ไลท์ และมิวแทนท์ หมายเลข 24A และ 2F.....	65
19 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญและการเจริญสูงสุด ของคอนจูแกนด์กับสายพันธุ์ เดิมในอาหารสูตรปรับค่า ที่มีกลูโคสจำกัด 10 มิลลิโมลาร์ ภาวะอาหารต่าง กัน ในสภาวะปราศจากออกซิเจนที่ 30 °ซ.....	69

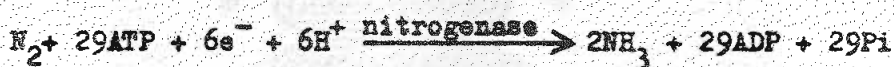
คำย่อ

ADP	=	Adenosine-5'-di phosphate
ATP	=	Adenosine-5'-triphosphate
Carb ^R	=	Carbenicillin resistance or Ampicillin resistance
DCPI	=	Dichlorophenolindophenol
<u>gnd</u> ⁺	=	Gluconate-6-phosphate dehydrogenase
<u>his</u> ⁻	=	Histidine auxotroph
Km ^R	=	Kanamycin resistance
NAD ⁺	=	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form
NADP ⁺	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
<u>nif</u> ⁺	=	Nitrogen fixation
OD	=	Optical density
Pi	=	Inorganic phosphate
<u>rec A46</u>	=	Recombination
<u>rfb</u> ⁺	=	Thymidinediphosphoglucose pyrophosphorylase
<u>shi</u> A ⁺	=	Shikimate
Spe ^R	=	Spectinomycin resistance
Tc ^R	=	Tetracycline resistance
<u>trp</u> ⁻	=	Tryptophan auxotroph

1. ความหมายและความสำคัญของกระบวนการตรึงไนโตรเจน

กระบวนการตรึงไนโตรเจน หมายถึง ความสามารถของจุลินทรีย์บางชนิดที่ใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ในการสร้างชีวโมเลกุลต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีน กระบวนการนี้เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทั้งที่เจริญโดยอิสระหรืออาศัยอยู่กับสิ่งมีชีวิตอื่น

กระบวนการดังกล่าวประกอบด้วยวิถีสำคัญ ๆ หลายวิถี รวมทั้งปฏิกิริยาที่สำคัญที่เรียกว่าปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจน หมายถึง การเปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนให้เป็นแอมโมเนียมไอออน โดยมีเอนไซม์ไนโตรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังสมการ



ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนนี้ จะทำงานร่วมกับวิถีต่าง ๆ หลายวิถี กลายเป็นกระบวนการตรึงไนโตรเจนวิถีดังกล่าวนี้ประกอบด้วย

1. วิถีการสังเคราะห์พลังงานในรูปเอทีพี
2. วิถีการสังเคราะห์ห่ออนุกริวิซ
3. วิถีการนำแอมโมเนียมไอออนไปใช้สังเคราะห์กรดอะมิโน (ammonium assimilation)
4. การควบคุมการตรึงไนโตรเจน

วิถีแต่ละวิถีเหล่านี้ มีลักษณะที่แตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ นีผล ทำให้วิถีในกระบวนการตรึงไนโตรเจน แตกต่างกันไปด้วย

ประมาณว่า สารประกอบแอมโมเนียมที่เป็นต้นตอของสิ่งมีชีวิต ร้อยละ 70 ได้จากกระบวนการตรึงไนโตรเจน มีเพียงร้อยละ 30 เท่านั้น ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี

(Sprent, 1979) โดยได้จากการอัครมรยาภาสไนโตรเจนและไฮโดรเจนเข้าด้วยกันที่ความดันสูง การสังเคราะห์ทางเคมีนี้มีชื่อเรียกว่า Haber Bosch Process และต้องการพลังงานในรูปของน้ำมีไนโตรเจนสูงมาก

ด้วยเหตุนี้จึงเป็นความหวังอย่างหนึ่งว่า การศึกษากระบวนการตรึงไนโตรเจนจะเป็นหนทางช่วยเพิ่มปุ๋ยไนโตรเจนให้แก่พืช แทนปุ๋ยที่สังเคราะห์ขึ้นจากวิธีทางเคมี และผลพลอยได้ที่สำคัญมากคือการเพิ่มปริมาณโปรตีนของโลก

กระบวนการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นเฉพาะในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ Kingdom Monera ได้แก่สิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอตเฉพาะใน Division Bacteria และ Cyanobacteria หรือ Blue-green algae (วารุณีและคณะ, 2523) มีทั้งที่อาศัยอยู่เป็นอิสระและอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น

2. ชนิดของโพรคาริโอตที่ตรึงไนโตรเจนได้

Sprent (1979) ได้แบ่งโพรคาริโอตที่ตรึงไนโตรเจนได้ต่อไปนี้

2.1 กลุ่มที่อยู่เป็นอิสระ

2.1.1 แบคทีเรีย

1. Non-photosynthetic, non-filamentous forms

โตนก Azotobacter, Rhizobium, Klebsiella, Bacillus

2. Photosynthetic forms โตนก Rhodospirillum,

Chromatium

3. Actinomycetes and associated forms โตนก

Mycobacterium, Frankia

2.1.2 Blue-green algae

โตนก Nostocaceae

2.2 กลุ่มที่อยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (Symbiosis)

2.2.1 แบคทีเรียมี 2 พวก คือ

1. พวกที่อาศัยรากพืช และสร้างปม (Legume root nodules)

ได้แก่ Rhizobium

2. พวกที่อาศัยรากพืช และไม่สร้างปม ได้แก่ Frankia

2.2.2 Blue-green algae

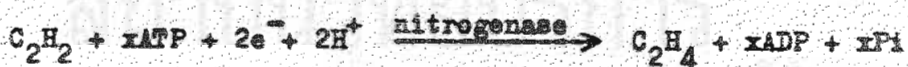
Blue-green algae

อาศัยอยู่ร่วมกับพืช แค่เจริญได้

เป็นอิสระ ได้แก่ Nostocaceae, Oscillatoriaceae

ตั้งแต่ปีค.ศ. 1857 ซึ่งเป็นที่ที่ผู้คนพบว่า การตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้นในปมของรากพืช (วงใน, 2525) ความรู้เรื่องการตรึงไนโตรเจนในแบคทีเรียได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางมาก จนถึงระดับวิวัฒนาการของเอนไซม์ไนโตรจีเนส และกระบวนการตรึงไนโตรเจน (Brill, 1980)

วิธีการหนึ่งที่ทำให้ความรู้เกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจน ได้รับการเปิดเผยอย่างกว้างขวางก็คือ การที่ Hardy และคณะ (1968) ได้ค้นพบวิธีการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยการใส่ก๊าซอะเซทิลีนเป็นสับสเตรต ดังปฏิกิริยา



ก่อนหน้านี้ การศึกษาเกี่ยวกับการตรึงไนโตรเจน จะต้องใช้วิธีอื่น โดยการสังเกตการเพิ่มขึ้นของโปรตีนหรือน้ำหนักพืช เป็นหลัก มีวิธีวิเคราะห์การตรึงไนโตรเจนโดยตรง คือใช้ $^{15}\text{N}_2$ เป็นสับสเตรต และศึกษามวลที่เกิดขึ้นโดยการวัด $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ การวิเคราะห์เหล่านี้ต้องใช้เครื่อง Mass spectrometer ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก ตรงกันข้ามกับวิธีอะเซทิลีนที่กล่าวถึง ที่เมื่อใส่ทศอนแอกติวิตีของไนโตรจีเนสในเซลล์หรือโฮโมจีเนตแล้ว จะสามารถวัดแอกติวิตีได้ง่ายกว่า คือเพียงตรวจสอบก๊าซอะเซทิลีนที่เกิดขึ้นจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี

(Gas chromatography)

3. กระบวนการตรึงไนโตรเจนในเคลมเซียลาไมนีส (Klebsiella pneumoniae)

เคลมเซียลาไมนีส เป็นแบคทีเรียประเภท facultative อยู่ในตระกูล (family) Enterobacteriaceae ซึ่งเป็นตระกูลเดียวกับเอสเคอริเชียโคไล (Escherichia coli) มันสามารถตรึงไนโตรเจนได้ในสภาพที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน และได้รับความนิยมนำมาใช้เป็นตัวแบบเพื่อศึกษากลไกการตรึงไนโตรเจน

การตรึงไนโตรเจน ของเคลมเซียลาไมนีส ประกอบด้วยวัฏจักรย่อย ๆ ซึ่งมีลักษณะ ดังนี้

3.1 วิถีการสังเคราะห์พลังงานในรูปเอทีพี

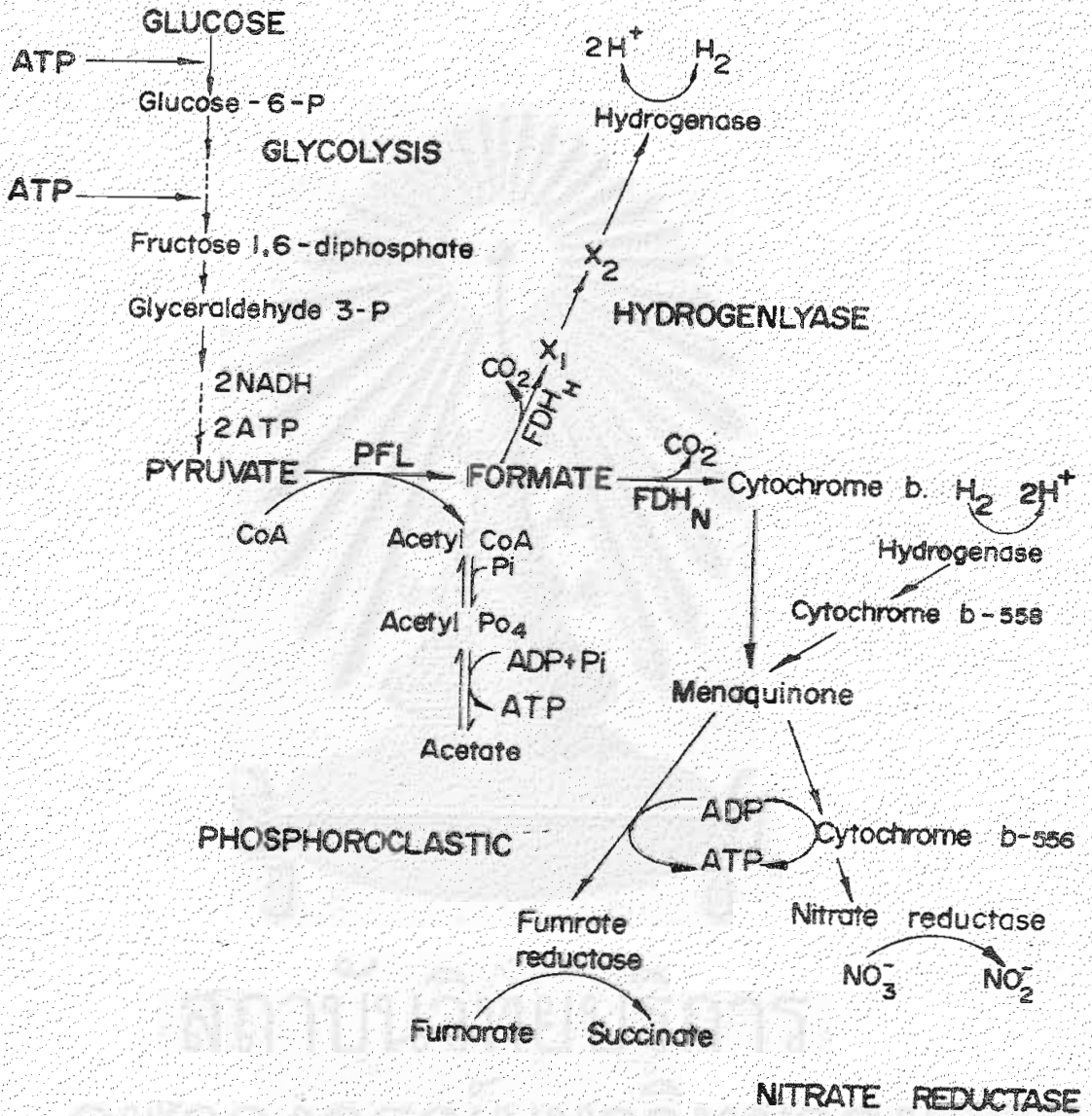
เมื่อเคลมเซียลาไมนีส ตรึงไนโตรเจนในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน เอทีพีส่วนใหญ่ที่ใช้ในการตรึงไนโตรเจน ได้มาจากวิถีไกลโคไลซิส และฟอสโฟโกลิกลาสติก (รูปที่ 1) ข้อสันนิษฐานเรื่องนี้ ได้มาจากการทดลองในหลอดทดลอง กล่าวคือ เมื่อนำไฮโมจิเนตของเคลมเซียลาไมนีสซึ่งเจริญในอาหารที่ปราศจากแหล่งต้นตอไนโตรเจน ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน เมื่อมีไฮเดียมโคโทไฮไดรเจนเป็นตัวรีดิวซ์ จะพบว่าไฮโมจิเนตดังกล่าวสามารถรีดิวซ์อะเซทิลดีไฮด์ ต่อเมื่อมีกลูโคสหรือโพวเวคอยู่ด้วย (Streicher และ Valentine, 1973)

3.2 วิถีการสังเคราะห์อานาจารีคิวซ์

อานาจารีคิวซ์ที่แบ่งอยู่ในโมเลกุลของน้ำคาล ได้รับแปรสภาพให้เปลี่ยนมาอยู่ในรูป $NAD^+/NADH$ หรือ $NADP^+/NADPH$ เป็นส่วนมาก จากการทดลองในหลอดทดลอง ของ Yoch (1974) พบว่า ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนจะเกิดขึ้นได้ เมื่อใช้เซลล์ที่เจริญเต็มโตภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจนมาทำเป็นไฮโมจิเนต และเติมระบบผลิตเอทีพีลงไป ส่วนอะเซทิลดีไฮด์ก็จะเกิดขึ้น ถ้าเติมอานาจารีคิวซ์ซึ่งคือไปนีนคือ โพวเวค, พอร์เมต, มาเลต, โคโทไฮไดรเจน และระบบผลิต $NADPH$

การที่โพวเวค และพอร์เมตสามารถใช้เป็นสัมสเทรตในการป้อนอานาจารีคิวซ์ให้ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนในหลอดทดลองได้เช่นนี้ จึงเป็นที่น่าสนใจว่า วิถีการที่ให้อานาจารีคิวซ์ในเซลล์ ควรจะมีแหล่งต้นตอมาจากโพวเวคหรือพอร์เมตเท่านั้นหรือไม่

รูปที่ 1 วิถีทาง ๆ ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจนใน *Escherichia coli* (Adams และคณะ, 1981., Peck และ Gest, 1957., Ruiz-Herrera และคณะ, 1972)

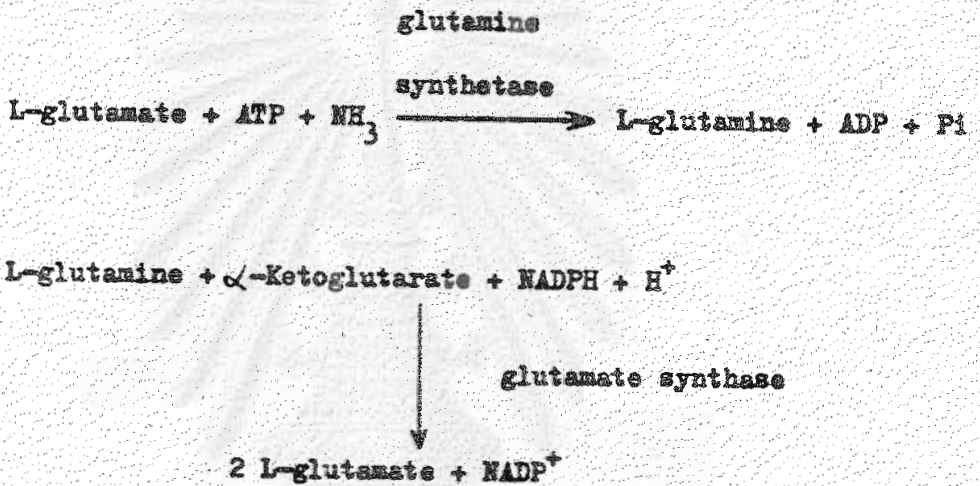


Abbreviation

- FDH_H = Formate dehydrogenase H
- FDH_N = Formate dehydrogenase N
- PFL = Pyruvate formatelyase

3.3 วิธีการนำอัมโมเนียมาไปใช้สังเคราะห์กรดอะมิโน (ammonium assimilation)

อัมโมเนียที่ได้อาจมาจากกระบวนการตรึงไนโตรเจน จะถูกนำไปใช้สร้างกรดอะมิโน โดยการเปลี่ยนให้เป็นกลูตามีนและกลูตาเมต เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนแปลงนี้ชื่อว่า glutamine synthetase และ glutamate synthase ทั้งปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Tyler, 1978)



3.4 คุณสมบัติของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

Eady และคณะ (1972) ศึกษาเอนไซม์ไนโตรจีเนส จากเคลมเซียลาเนียโมนิอัสที่บริสุทธิ์ พบว่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ตัวนี้ไวต่อออกซิเจน ความจำเพาะต่อซับสเตรตค่อนข้างกว้าง ในเซลล์ เอนไซม์ไนโตรจีเนสสามารถรีดิวซ์ซับสเตรตได้ถึง 3 ชนิด คือ ไนโตรเจน อะเซทิลีน และโปรทอน และในหลอดทดลอง ชนิดของซับสเตรตนั้นสามารถรีดิวซ์ได้มีเพิ่มมากขึ้นอีก โดยที่เอนไซม์ดังกล่าวสามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซับสเตรตที่มีพันธะตรีคูณได้เกือบทุกชนิด เช่นซับสเตรตที่มีหมู่ทำปฏิกิริยา เอไซค์, ไฮยาไลต์, ไอโซไฮยาไลต์ เป็นต้น

เอนไซม์ไนโตรจีเนสของเคลมเซียลาเนียโมนิอัส แบ่งออกเป็นสองส่วน (two components) เดิมเรียกว่า Kp1 และ Kp2 Kp1 มีน้ำหนักโมเลกุล 218,000 ประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) 2 ชนิด มีขนาด 50,000 และ 60,000 รวมกันเป็น 4 หน่วยย่อย (tetramer) Kp1 มีไม่ลิบคินัม, เหล็ก และ acid-labile sulfide

เป็นองค์ประกอบ ชนิดละ 2, 34 และ 24 อะตอมตามลำดับ ส่วนนี้จะทำหน้าที่รีดิวซ์-
สเตอริ์ให้เป็นผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงได้ชื่อใหม่ว่า nitrogenase (Hageman และ Burris,
1978)

ส่วน Kp2 มีน้ำหนักโมเลกุล 66,800 ประกอบด้วยสองหน่วยย่อยที่เหมือนกัน
แต่ละหน่วยย่อยหนัก 34,000 Kp2 มีเหล็กและ acid-labile sulfide เป็น
องค์ประกอบอย่างละ 4 อะตอม ส่วนนี้ทำหน้าที่รวบรวมพลังงาน และอำนาจรีดิวซ์ให้แก่ Kp1
ดังนั้นจึงได้ชื่อใหม่ว่า nitrogenase reductase (Hageman และ Burris, 1978)

3.5 การควบคุมการตรึงไนโตรเจน

การควบคุมการตรึงไนโตรเจน มีสองระดับคือ ในระดับเอนไซม์ จะเกิดจากการ
แข่งขันระหว่างสับสเตรตซึ่งมีค่า K_m ของสับสเตรตแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น K_m ของ
ก๊าซไนโตรเจน, ไฮโดรเจน และอะเซทิลีนเท่ากับ 0.04 - 0.2, 6 - 40 x 10⁻⁴ และ
0 - 0.15 atm ตามลำดับ (Burn และ Hardy, 1975)

ในระดับยีนโมโครโมโซมพบว่า มีหลายปัจจัยที่มีอิทธิพลก่อให้เกิดการกดกั้นการถอด
รหัสของเอนไซม์ เช่น ก๊าซออกซิเจน (St John และคณะ, 1974) หรือ ฮมูบิล
อิมโมเนียมไนไตรมาสูง ๆ (Tubb และ Postgate, 1973) เนื่องจากพบว่าในสภาวะ
ดังกล่าว การสร้างไนโตรจีเนสถูกยับยั้ง และผลกระทบนี้นี้คล้ายกับเมื่อเกิดขึ้นโดยการให้
rifampicin เป็นตัวยับยั้ง

ต่อมา Shanmugam และคณะ (1975) ได้แยก ammonium derepress mu-
tants ของเคลมเซียลาโนไมนีอัส พบว่ามีแถบที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้เมื่อมีฮมูบิล
ไนไตรมาสูง ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า ฮมูบิลอิมโมเนียมไนไตรใช้ควบคุมการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตร-
จีเนสโดยตรง

แหล่งต้นกอนไนโตรเจนชนิดอื่น เช่น ไนเตรต กรดอะมิโนบางชนิด เช่น L-glu-
tamine, L-aspartate ก็สามารถกดกั้นการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้
(Shanmugam และคณะ, 1978)

Streicher และคณะ (1974) พบว่า glutamine synthetase (GS) อาจเป็นตัวควบคุมการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจีเนส โดยพบว่า $glu\ C^-$ มีบทบาทในเคลมเซียมดิวโมนิอ์ ซึ่งเป็นมิวแทนท์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ glutamine synthetase อยู่ตลอดเวลา สามารถปลดปล่อยการถอดรหัสการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้เมื่อมีอิมโมเนียมไนเตรตสูง แต่ glutamine auxotroph ซึ่งมีความผิดปกติที่เอนไซม์ glutamine synthetase จะไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนสได้เมื่อมีอิมโมเนียมอยู่ด้วย

แต่อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่น่าเชื่อถือเกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการถอดรหัสของเอนไซม์ไนโตรจีเนส Wimpenny และ Cole (1967) ได้เสนอว่า อาจมีการควบคุมที่เรียกว่า "redox control" ซึ่งหมายถึง การควบคุมด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสมของอำนาจรีดิวซ์ที่ใช้ในการสร้างและการทำลาย ซึ่งคาดว่าอยู่ในรูปของ NADPH และ NADH โดยเขาได้พบว่าในคลอโรพลาสต์ของเฮลลอปซิสแลส เมื่อมีไนเตรตจะมีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ต่างไปจากในคลอโรพลาสต์ที่มีอิมโมเนียม เช่นเอนไซม์ isocitrate dehydrogenase, aconitase ในKreb's cycle ค้าง และไม่มี hydrogenase ใน Hydrogenlyase pathway ในขณะที่ nitrate reductase, cytochrome b_1 กลับมีแอกทิวิตีสูงขึ้น

4. บทบาทของเอนไซม์เฟอร์ริกไฮโดรจีเนส ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน

4.1 ในสภาพที่ปราศจากตัวรับอิเล็กตรอนอื่นใด เอนเทอร์โมแบคทีเรีย เช่นเฮลลอปซิสแลส และเคลมเซียมดิวโมนิอ์ จะสามารถสร้างพลังงานในรูปเอทีพีขึ้นใช้ในการเจริญเติบโต จากวิถีไกลโคไลซิส และวิถีฟอสโฟโกลิโคลิติก (รูปที่ 1) เมื่อไม่มีออกซิเจนแบคทีเรียจะชักนำการถอดรหัสเอนไซม์เฟอร์ริกไฮโดรจีเนสขึ้นมาทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนกรดเฟอร์ริกให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และส่งอิเล็กตรอนที่ไปยังวิถีขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อไปเปลี่ยนเป็นก๊าซไฮโดรเจน วิธีการกำกับอำนาจรีดิวซ์แบบนี้เรียกว่า Hydrogenlyase pathway (Peck และ Gest, 1957)

4.2 ในสภาพที่มีตัวรับอิเล็กตรอนเป็นไนเตรต แบคทีเรียดังกล่าวจะสร้างเอทีพีเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เอทีพี (Wimpenny และ Cole, 1967) โดยใช้อำนาจรีดิวซ์ที่

ส่งมาจากเอนไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนส นำไปควบคู่กับไนเตรตได้ผลิตภัณฑ์เป็นไนไตรต์ วิธีที่ใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนนี้เรียกว่า Nitrate reductase pathway (Iida และ Taniguchi, 1959., Showe และ De Moss, 1968) หรือ anaerobic respiration (รูปที่ 1)

เนื่องจากเอนไซม์สำคัญในการกำจัดอานาโรบิกของแบคทีเรียในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน คือ ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน (multienzyme complex) ดังนั้นจึงนิยมเรียกฟอร์มิคไฮโดรจีเนสใน Hydrogenlyase pathway ว่า Formic dehydrogenase H (FDH_H) และใน Nitrate reductase pathway ว่า Formic dehydrogenase N (FDH_N) (Rais-Bazzaz และคณะ, 1972)

4.3 การเจริญของแบคทีเรียในพุ่มาเรต พุ่มาเรตเป็นอินทรีย์สารที่สามารถทำหน้าที่เป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ ในปี ค.ศ. 1937 Krebs พบว่าเอสเคอริเคียโคไลจะใช้พุ่มาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ภายใต้บรรยากาศของไฮโดรเจน โดยพุ่มาเรตจะรับอิเล็กตรอนจากก๊าซไฮโดรเจนเพื่อเปลี่ยนเป็นซัคซิเนต Wolin และคณะ (1961) ได้พบแบคทีเรียที่น่าสนใจตัวหนึ่งจาก bovine rumen fluid ให้อาหารว่า Vibrio succinogenes เป็น obligatory anaerobic bacteria ที่สามารถเจริญได้ทั้งในพุ่มาเรตหรือมาเดต โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่ได้จากการออกซิโคซ์ฟอร์เฟต และโคแสดงว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีการเจริญที่จำกัด ตัวให้อิเล็กตรอนเป็นไฮโดรเจน และฟอร์เมตเท่านั้น ส่วนตัวรับอิเล็กตรอนที่จำกัดกว่าจะต้องเป็นพุ่มาเรต มาเดต หรือ ไนเตรต แบคทีเรียที่เจริญโดยใช้ฟอร์เมตและพุ่มาเรตต้องเสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศด้วย แต่ถ้าไฮโดรเจนเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแล้ว ไม่จำเป็นต้องเสริมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และคาดว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างน้อยหนึ่งโมเลกุลในวิถีที่ออกซิโคซ์ไฮโดรเจนด้วยพุ่มาเรต (Barton และคณะ, 1970)

จากการศึกษาในเอสเคอริเคียโคไลโดย Macy และคณะ (1976) พบว่าเอนไซม์พุ่มาเรตที่สกัดพิเศษซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนพุ่มาเรตเป็นซัคซิเนตนั้น ใช้ให้อิเล็กตรอนที่มาจากทั้งฟอร์เมต และไฮโดรเจนได้

เนื่องจากฟอร์เมต และไฮโดรเจนต่างก็สัมพันธ์กับเอนไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสดังกล่าวมาแล้ว ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษากระบวนการดังกล่าวโดยอาศัยฟอร์มิคไฮ-

โครจีเนสมิวแทนท์ของเคลมเซียลาไมนอ์

4.4 คุณสมบัติของเอนไซม์พอร์มิกทีไฮโครจีเนส Enoch และ Lester (1975) รายงานคุณสมบัติของพอร์มิกทีไฮโครจีเนสฟอร์ม "M" ในเอสเคอริเคียโคโคคิงนี้ เอนไซม์ดังกล่าวถูกชักนำการถอดรหัสโดยไนเตรต เป็นเอนไซม์ในเยื่อเซลล์ (membrane-bound) และไวต่อออกซิเจน มีลักษณะเป็น globular protein มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 600,000 ประกอบด้วยหน่วยย่อยแตกต่างกันคือ α , β และ γ และทั้งสามชนิดนี้ รวมกันเป็น 4 หน่วยย่อยในอัตราส่วน $\alpha:\beta:\gamma = 1.0:1.2:0.55$. มีโมลิบดีนัม, ซีรีเนียม, heme, non-heme iron, acid-labile sulphide สำหรับซีรีเนียมพบอยู่เฉพาะใน α -subunit ซึ่งมีขนาด 110,000 (Gox และคณะ, 1981)

5. ความสำคัญของพอร์มิกทีไฮโครจีเนสมิวแทนท์

จากบทบาทของเอนไซม์พอร์มิกทีไฮโครจีเนสดังกล่าวมาแล้ว และจากสมมติฐานของ Yocb (1974) ว่า ไทรูเวทหรือฟอร์เมตคาร์โบเป็นแหล่งต้นคออานาโรจีควซ์ให้ปฏิกิริยาการตรึงไนโตรเจนในหลอดทดลองได้ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าวิถีแบบเดียวกันจะเกิดในเซลล์หรือไม่ ในฐานะที่เอนไซม์พอร์มิกทีไฮโครจีเนสจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนฟอร์เมตเป็นอิลีกตรอน โปรตอน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาวะปราศจากออกซิเจนในเคลมเซียลาไมนอ์ ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกับที่ผลการตรึงไนโตรเจนเกิดขึ้น

โดยคุณสมบัติของพอร์มิกทีไฮโครจีเนส มิวแทนท์ของเคลมเซียลาไมนอ์ที่แยกโดย พินส์วอล์ (2526) อาจมีความนิยปกคักทั้ง Hydrogenlyase pathway และ Nitrate reductase pathway ทำให้มิวแทนท์ดังกล่าวเป็นต้นแบบที่ดีในการศึกษากระบวนการตรึงไนโตรเจน

6. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

6.1 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของพอร์มิกทีไฮโครจีเนสมิวแทนท์ ในเคลมเซียลาไมนอ์ ที่แยกโดยนางสาว จุฬาทันนุ์ พินส์วอล์ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

6.2 เพื่อศึกษาความสามารถของการตรึงไนโตรเจนในพอร์มิกทีไฮโครจีเนสมิวแทนท์ และผลกระทบของไนเตรต และไนไตรต์ต่อการควบคุมกระบวนการตรึงไนโตรเจน

วิธีการทดลอง

1. วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ภาชนะที่ใช้

คาร์บอนไดออกไซด์ของ	กรมวิทยาศาสตร์ทหารบก
ไนโตรเจน	ของ บริษัทไทยอินดัสเทรียลจากัด
อะเซทิลีน	ของ บริษัทสหวิโชคเอนจิเนียริง จากัด
อาร์กอน	ของ บริษัทไทยอินดัสเทรียลจากัด
อากาศอัด	ของ กรมวิทยาศาสตร์ทหารบก
ไฮโดรเจน	ของ กรมวิทยาศาสตร์ทหารบก
เอทิลีนมาตรฐาน	ของ SUPELCO
ไฮโดรเจนมาตรฐาน	ของ SUPELCO

1.2 เครื่องมือที่ใช้

เครื่องวัดการดูดแสง Spectronic 20 ของ Bosch & Lomb
เครื่องบันทึกการดูดแสงของ ISCO
เครื่องบันทึกความเร็วต่ำของ International Equipment
เครื่องบันทึกแรงสูงของ Beckman Model J 21C
เครื่องเขย่าอ่างการดูดของอุณหภูมิ (Shaking waterbath) ของ Forma
Scientific Company
เครื่องทำดาบเซลล์ French Pressure Cell Press ของ American
Instrument Company
เรซินดียาขนาด 20 G X 3 $\frac{1}{2}$ " ของ Rolon
เครื่องถ่ายภาพโครมาโตกราฟ ของ Varian Model 3700

1.3 เคมีภัณฑ์

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเกรดวิเคราะห์

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 Klebsiella pneumoniae H5a1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการตรึงไนโตรเจน (nif^+) อยุ่ด้วย

2.2 Escherichia coli K 12 JC 5466 (Spc^R , trp^- , his^- , $rec A46$)
 RP 41 (Km^R , $Carb^R$, To^R , rfb^+ , gnd^+ , his^+ , nif^+ , $xhi A^+$) (ศิริกสิติก, 2524)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 L-Broth หรือ LB-agar (Luria และคณะ, 1960) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้ออุดม (rich medium) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tryptone	10 กรัม
Yeast Extract	5 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ทรายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto-agar 15 กรัมต่อลิตร

3.2 Minium medium (ปรับปรุงจาก Streicher และคณะ, 1971) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่า ใช้ในทุกการทดลอง ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

ไตรโซเดียมไดโครเจนฟอสเฟต	6.25 กรัม
โพแทสเซียมไดโครเจนฟอสเฟต	0.75 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.00 กรัม
อิมโมเนียมซัลเฟต	1.00 กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต	0.01 กรัม
โซเดียมโมลิบเดต	0.01 กรัม

แมกนีเซียมซัลเฟต	0.01 กรัม
โซเดียมเบริไนต์	1.75 มิลลิกรัม
กลูโคส	5.00 กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.6 ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม Bacto-agar 15 กรัมต่อลิตร สำหรับการทดลองการตรึงไนโตรเจนจะไม่เติม อิมโมเนียมซัลเฟต

4. การเตรียมสารละลาย

4.1 สารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951) เรียกว่า สารละลายทางมี 2 ชนิด

4.1.1 ผสมโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 จำนวน 50 มิลลิกรัมกับคลอโรฟอร์มร้อยละ 0.5 และโซเดียมโพลีแคสซีเมตเรทร้อยละ 1 จำนวน 1 มิลลิกรัม

4.1.2 ผสมโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 3 จำนวน 50 มิลลิกรัมกับสารละลายคลอโรฟอร์มร้อยละ 0.5 และโซเดียมโพลีแคสซีเมตเรทร้อยละ 1 จำนวน 2 มิลลิกรัม

4.2 สารละลายสำหรับวัดปริมาณไนโตรเจน (Snell และ Snell, 1961)

4.2.1 สารละลายซัลฟานิลีนรีดร้อยละ 1 ในกรดไฮโดรคลอริกที่เจือจาง 1 : 4 v/v

4.2.2 สารละลาย N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride ร้อยละ 0.2

4.3 สารละลายไฟโรแกลลอนสำหรับวัดปริมาณออกซิเจน (Gary, 1980)

ละลายไฟโรแกลลอน 10 กรัม ในสารละลายทาง โพลีแคสซีเมตเรทร้อยละ 40 จำนวน 150 มิลลิกรัม

5. การเก็บรักษาอุณหภูมิต่ำที่ใช้ในภาชนะทดลอง

5.1 การเก็บรักษากระยะสั้น

5.1.1 slant LB-agar ใช้สำหรับภาชนะเก็บเชื้อทั่วไป บรรจุอยู่ในภาชนะที่เป็นขวด (vial) ซึ่งบรรจุด้วยอาหารที่ปนเหลว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ.

5.1.2 slant minimum media-agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิคลิน คานามัยซิน และเตตราซัยคลิน ปริมาณ 20, 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ และทริบิโคแทน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ใช้สำหรับเก็บ Escherichia coli K12 JC 5466 (RP41)

5.2 การเก็บรักษากระยะยาว ใช้สำหรับภาชนะเก็บเชื้อทุกชนิด เคียงเชื้อให้เจริญในอาหารอุทุม แล้วเก็บเชื้อโดยใส่กลีเซอรอลร้อยละ 15 ในขวดที่ปิด (vial) ซึ่งบรรจุด้วยอาหารที่ปนเหลว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ.

6. การเจริญของเชื้อภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจน

6.1 การเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง

เตรียมเชื้อคั่งก้นโดยเชื้อเชื้อ 1 โคโลนีจากจานแม่ (master plate) ลงในอาหารสุกปรับค่าพีเอช L-Broth ร้อยละ 1 ซึ่งบรรจุเต็มในหลอดที่บรรจุเกลียวขนาด 10 มิลลิกรัม เมื่อ 30 ซ. 18 ชั่วโมงหรือค้างคืน

นำเชื้อคั่งก้นที่เตรียมไว้ใส่ลงในอาหารที่คองกลาง ด้วยอัตราส่วนระหว่างเชื้อต่ออาหารเท่ากับ 1 : 50 สภาวะที่ทดลองเป็นเช่นเดียวกับที่เตรียมเชื้อคั่งก้น บันทึกความขุ่นของเชื้อที่เพิ่มขึ้นโดยการอ่านค่าความขุ่นของสารละลายที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

6.2 การเลี้ยงเชื้อในจานทดลอง

สตรีค (Streak) เชื้อด้วยฉวยเรียบเชื้อลงบนอาหารแข็งที่คองกลางในจานเพาะเชื้อ เติมเชื้อในเคสซิเคเตอร์ ชนิดที่มีปากสามารถต่อเข้ากับเครื่องปั๊มและเปลี่ยนบรรยากาศได้ โดยการทำให้เป็นสูญอากาศ แล้วปรับบรรยากาศด้วยก๊าซอาร์กอน หรือไนโตรเจนตามต้องการ เปลี่ยนบรรยากาศซ้ำ 4 - 5 ครั้ง

6.3 การเลี้ยงเชื้อในขวดทดลอง

เตรียมเชื้อทั้งต้นโดยแช่เชื้อ 1 โคโลนีจากจานแม่ ลงในอาหารสูตรปรับ ทำที่มี L-Broth ร้อยละ 1 ซึ่งบรรจุเต็มในหลอดที่มีจุลภาณวขนาด 10 มิลลิลิตร เมื่อที่ 30° ซ. 18 ชั่วโมงหรือค้างคืน

นำเชื้อทั้งต้นมาล้างหนึ่งครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 แล้วกระจายเชื้อทาบสารละลายเดียวกัน

ใส่เชื้อที่เตรียมแล้วลงในอาหารที่ตองการด้วยอัตราส่วนระหว่างเชื้อต่ออาหารเท่ากับ 1 : 50 นำเชื้อ 5 มิลลิลิตร ไปลงในขวดทดลองเฮเลนแมเยอร์ที่มีขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร ปิดทาบจุยกยางแล้วหมักอย่างควบคุมกระต่ายอาหารทันที

นำไปเปลี่ยนบรรยากาศ โดยการทำให้เป็นสูญอากาศ แล้วปรับบรรยากาศกลับคืนด้วยก๊าซอาร์กอน ไนโตรเจนหรือไฮโดรเจนตามตองการ เปลี่ยนบรรยากาศซ้ำ 4 - 5 ครั้ง เมื่อเชื้อที่ 30° ซ.

เมื่อเชื้อเจริญถึงเวลาที่ตองการ นำไปวัดความทึบ โดยถ่ายเชื้อจากขวดลงในหลอดทดลอง แล้วอ่านค่าความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

ในกรณีที่ตองนับเชื้อภายในบรรยากาศของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ในขวดทดลองเฮเลนแมเยอร์ขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร จะตูกักในขวดทดลองออก 1.5 มิลลิลิตรด้วยเข็มพิเศษ แล้วใส่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในจำนวนเท่ากันลงไปแทนที่

7. การวัดปริมาณยีสต์จากการเจริญเติบโต

7.1 การหาปริมาณไนโตรค (Snell และ Snell, 1961)

หยุดการเจริญของเชื้อในเวลาที่ตองการ โดยการปรับที่ความถี่ 5,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใส 1 มิลลิลิตรไปวัดปริมาณไนโตรคโดยเติมสารละลายซัสฟาโนลีนิก 2 มิลลิลิตร และ N-(1-naphthyl)-ethylenediamine hydrochloride 2 มิลลิลิตรตามลำดับ วัดความเข้มของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

7.2 การตรวจสอบก๊าซไฮโดรเจน

7.2.1 ปริมาณไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นภายใต้การเจริญของเชื้อในสภาวะปราศจากออกซิเจน (ปรับปรุงจาก Daday และคณะ, 1977)

การเตรียมเชื้อกึ่งคน และการเลี้ยงเชื้อทำควมวิเคราะห์ทดลองที่ระบุไว้ในข้อ 6.3 บรรจุภาชนะที่โชนมเชื้อคือบรรจุภาชนะของก๊าซอาร์กอน เมื่อครบเวลาที่ต้องการ นำไปวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น ไซขนาดตัวอย่าง 0.10 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ ที่มี detector ชนิด Thermal conductivity คอลัมน์ Molecular sieve 5A ขนาด $2.0 \text{ m} \times \frac{1}{8}$ " ไซอาร์กอนเป็นก๊าซพาด้วยความเร็ว 30 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 60 °C.

7.2.2 ปริมาณไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ (ปรับปรุงจาก Anderson และ Shanmugam, 1977)

การเจริญเชื้อภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจน ทำควมวิเคราะห์ทดลองที่ระบุไว้ในข้อ 9 โดยเลี้ยงเชื้อภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน โชนเชื้อที่ 30 ชม. เมื่อเชื้อเจริญถึงเวลาที่ต้องการ นำไปวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นโดยตรง โดยไซขนาดตัวอย่าง 0.10 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ ที่มี detector ชนิด Thermal conductivity คอลัมน์ Molecular sieve 5A ขนาด $2.0 \text{ m} \times \frac{1}{8}$ " ไซไนโตรเจนเป็นก๊าซพาด้วยความเร็ว 30 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 60 °C.

ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนทั้งในข้อ 7.2.1 และ 7.2.2 คำนวณได้จากความสูงของ peak เทียบกับก๊าซไฮโดรเจนมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน และแสดงปริมาณเป็นจำนวนไมโครโมลของก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นต่อจำนวนเชื้อทั้งหมด (culture)

8. การทดสอบแยกวิถีของเอนไซม์ฟอสโฟริกไฮโดรจีเนส

8.1 การเตรียมเซลล์

เลี้ยงเชื้อกึ่งคน 1 โคโลนีใน L-Broth 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ขนาด 10 มิลลิลิตรที่ 30 ชม. หรืออุณหภูมิห้องค้างคืน แล้วถ่ายเชื้อลงใน L-Broth ที่บรรจุเกือบเต็มในขวดทดลอง เอเดนเมเยอร์ขนาดความจุ 50 มิลลิลิตร เลี้ยงต่อไปอีกประมาณ

6 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายใส่ขวดทดลองเอเลนเมเยอร์ขนาดความจุ 1,000 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าที่มีเคสอะมิโนแอซิดร้อยละ 1 เต็มขวด นำเชื้อที่ 30 ชม. หรืออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน นำเชื้อไปปั่นที่ความถี่ 5,000 รอบต่อนาทีด้วยเครื่องปั่นของ Beckman เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์สองครั้งด้วยทริสบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ pH 7.8

การเตรียมเซลล์เพื่อการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ ฟอรั่มิกทีไฮโดรจีเนส ฟอรั่ม "H" ชักนำโดยการเติมโซเดียมฟอสเฟตร้อยละ 0.5 ส่วนการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟอรั่มิกทีไฮโดรจีเนสฟอรั่ม "M" ชักนำโดยการเติมโปแตสเซียมไนเตรทร้อยละ 1.0 (Lester และ De Moss, 1971)

8.2 การสกัดเอนไซม์ (ปรับปรุงจาก Schnaitman, 1981)

กระจายเซลล์ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 30 ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.2 จำนวน 10 มิลลิลิตร เติมกลูโคส เมกแคปโทเอทานอล ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.00 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นเติมกลูโคสออกซิเดสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายของเซลล์ไปใส่ใน French Pressure Cell ที่เย็น 4 ชม. เพื่อความถกกันเข้า French Pressure Cell ที่ความดัน 17,400 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ทำลายเซลล์ด้วยความดันสูงนี้ โดยการปล่อยสารละลายของเซลล์สู่ความดันปกติด้วยความเร็วประมาณ 40 หกต่อวินาที รวบรวมสารละลายไฮโมจีเนทด้วยหลอดเซนทริฟิวซ์ขนาด 50 มิลลิลิตรของ Beckman ซึ่งวางอยู่บนน้ำแข็ง พร้อมทั้งอยู่ในบรรยากาศของก๊าซไนโตรเจนที่อ้อมตัว ดังนั้นสารละลายไฮโมจีเนทจะอยู่ภายใต้สภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนรบกวน นำไปปั่นที่ความถี่ 5,000 รอบต่อนาทีด้วยเครื่องปั่นของ Beckman เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนของเซลล์ที่ไม่แตกหัก นำส่วนของเหลวไปปั่นที่ความถี่ 17,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนใส (soluble) และส่วนตะกอน (Pellet) ซึ่งเป็นส่วนเยื่อเซลล์ (crude large membrane) ไปหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ต่อไป

8.3 การหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ฟอรั่มิกทีไฮโดรจีเนสฟอรั่ม "H" (FDH_H)

(Lester และ De Moss, 1971)

โดยหลักการ ใช้เบนซิลไวโอโลเจน (Benzyl viologen) (ไม่มีสี) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนสังเคราะห์ รับอิเล็กตรอนจากการเร่งปฏิกิริยาของ FDH_H ในการเปลี่ยนฟอร์เมตเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อิเล็กตรอนและโปรตอน วัฏจักรโฟร์มที่เพิ่มขึ้นของเบนซิลไวโอโลเจน(มีสี) โดยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ในการทดลองสารทำปฏิกิริยาทั้งหมดมีปริมาตร 4.30 มิลลิลิตร ประกอบด้วยโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 50 มิลลิโมลาร์และเบนซิลไวโอโลเจน 1.25 มิลลิโมลาร์ในปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยางเปลี่ยนบรรยากาศเป็นก๊าซอาร์กอน เติมสารละลายโซเดียมโคโคโกลิโอส-โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.12-0.26 มิลลิโมลาร์ จำนวน 0.10 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 20G X 3/8" แล้วจึงเติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ระหว่าง 0.50-2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.10 มิลลิลิตร วัด endogenous rate เป็นเวลา 1 นาที และวัดปฏิกิริยาโดยเติมสัมเสกต โซเดียมฟอร์เมต 0.10 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.18 มิลลิโมลาร์

วัฏจักรเร็วของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของการถูกแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ควบคุมด้วย Spectrophotometer หรือด้วย recorder extinction coefficient ของเบนซิลไวโอโลเจนมีค่า 7.4 มิลลิโมลาร์⁻¹ เซนติเมตร⁻¹

วัดแอกติวิตีของปฏิกิริยาเป็นค่า initial velocity (ไม่พบ endogenous rate) แสดงเป็นค่าจำนวนนาโนโมลของวัฏจักรโฟร์มของเบนซิลไวโอโลเจนที่เพิ่มขึ้นต่อนาที และแอกติวิตีจำเพาะเป็นจำนวนนาโนโมลของวัฏจักรโฟร์ม ของเบนซิลไวโอโลเจนที่เพิ่มขึ้นต่อนาที ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

6.4 การหาแอกติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสฟอร์ม "H" (FDH_H)

(Lester และ De Moss, 1981)

โดยหลักการ ใช้ฟีนาซีนเมทโซซัลเฟต (Phenazine methosulfate) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนสังเคราะห์รับอิเล็กตรอนจากการเร่งปฏิกิริยาของ FDH_H ในการเปลี่ยนฟอร์เมตเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อิเล็กตรอนและโปรตอน ฟีนาซีนเมทโซซัลเฟต ถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับ DCPI (2, 6-Dichlorophenol indophenol) ปฏิกิริยานี้จะวัฏจักรออกซิไดซ์-รีดิวซ์ของ DCPI (มีสี) ที่ทดลองด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

ในการทดลองสารทำปฏิกิริยาทั้งหมดมีปริมาตร 4.20 มิลลิลิตร ประกอบด้วย โซเดียมฟอสเฟตเฟสฟเฟอร์ pH 7.2 50 มิลลิโมลาร์ DCPI 0.078 มิลลิโมลาร์ และทีนาซีนเมโทซัลเฟต 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รวมกันในปริมาตร 4.00 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง เปลี่ยนบรรยากาศเป็นก๊าซอาร์กอน เติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ระหว่าง 1.00-7.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.10 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 20 X 3/8" วัด endogenous rate เป็นเวลา 1-2 นาที และวัดปฏิกิริยา โดยเติมสับสเตรตโซเดียมฟอสเฟต 0.10 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.18 มิลลิโมลาร์

วัดอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรด้วย Spectrophotometer พร้อมด้วย recorder extinction coefficient ของ DCPI มีค่า 21.0 มิลลิโมลาร์⁻¹ เซนติเมตร⁻¹

วัดแอกทิวิตีของปฏิกิริยาเป็นค่า initial velocity (ไม่พบ endogenous rate) แสดงเป็นค่าจำนวนนาโนโมลของออกซิโคซิมของ DCPI ที่ลดลงต่อนาที และแอกทิวิตีค่าเพาะเป็นจำนวนนาโนโมลของออกซิโคซิมของ DCPI ที่ลดลงต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

9. การทิ้งไนโตรเจน (เจนเจริอุสม, 2522)

9.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เตรียมเชื้อตั้งต้นโดยเชื้อหนึ่งโคโคไลมาจากจามแมลง ในอาหารสูตรปรับค่าที่มี L-Broth ร้อยละหนึ่งซึ่งบรรจุเต็มในหลอดที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร นมที่ 30 ซ. 18 ชั่วโมงหรือค้างคืน อาหารเช่นนี้ การสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนสถูกกักกัน ก่อนใช้ นำไปล้างเช ลควายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 หนึ่งครั้งแล้วกระจายเชื้อด้วยสารละลายเดียวกัน กรณีที่แหล่งต้นอาหารหมักเป็นแอมโมนิออล จะเตรียมเชื้อตั้งต้นโดยใช้แอมโมนิออล 5 กรัมต่อลิตร

9.2 การวัดแอกทิวิตีอะเซทีลีนรีดักชัน

ใส่เชื้อตั้งต้นที่เตรียมลงในอาหารสูตรปรับค่า ที่ปราศจาก อิมโมเนียมซัลเฟตในอัตราส่วน 1 : 50 แบ่งเชื้อนี้เป็น 5 มิลลิลิตร แยกไปหมักในขวดทดลองเฮเลนเมเยอร์

ที่มีขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร บิดด้วยจุกยาง แล้วหุ้มจุกยางด้วยกระดาษพาราฟิน นำไปเปลี่ยนบรรยากาศ โดยการทำให้เป็นสูญญากาศ แล้วปรับบรรยากาศกลับคืนด้วยก๊าซไนโตรเจน เปลี่ยนบรรยากาศซ้ำ 4 - 5 ครั้ง ปล่อยให้ 30 ชม. เมื่อเชื้อเจริญถึงเวลาที่ต้องการวัดแอกทิวิตี นำไปเปลี่ยนบรรยากาศเป็นก๊าซอาร์กอนที่มอดะเซทีดินร้อยละ 10 โดยไซเข็มฉีดบาทุก๊าซในขวดทดลองออก 3.0 มิลลิลิตร แล้วใส่ก๊าซอะเซทีดินในจำนวนเท่ากันลงไปแทนที่ ปล่อยให้อีกหนึ่งชั่วโมง จึงนำไปวัดก๊าซอะเซทีดินที่เกิดขึ้นจากการรีดิวซ์อะเซทีดิน โดยเฮนไซม์ไนโตรจิเนส ไซขนาดของตัวอย่าง 0.10 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ ที่มี detector ชนิด Flame Ionization คอลัมน์ Porapak N ขนาด 2.0 m x 1/8" ไซไนโตรเจน (OFN) เป็นก๊าซพาด้วยความเร็ว 30 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 90° C.

ปริมาณก๊าซอะเซทีดิน คำนวณได้จากความสูงของ peak เทียบกับก๊าซอะเซทีดินมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน วัดความสูงของเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร และหาปริมาณโปรตีนของเชื้อโดยวิธีของดอร์ แอกทิวิตีจำเพาะของการรีดิวซ์อะเซทีดินแสดงค่าเป็นนาโนโมลของอะเซทีดินที่เกิดขึ้นต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเชื้อต่อชั่วโมง

10. การผสมพันธุ์แบคทีเรียโดยวิธีคอนจูเกชัน (ปรับปรุงจาก Miller, 1972)

ผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อตัวให้ ที่มีพลาสมิด (F^+ bacteria) กับเชื้อตัวรับที่ไม่มีพลาสมิดซึ่งมีโปรตีนตัวรับ (receptor protein) สำหรับ F^+ strain ชนิดนั้น ๆ

เชื้อตัวให้คือ *Escherichia coli* K12 JC 5466 (Spo^+ , trp^- , his^- , $rec A46$) RP41 (Km^R , $Carb^R$, Tc^R , rfb^+ , gnd^+ , his^+ , nif^+ , $shiA^+$)

เชื้อตัวรับคือ *Klebsiella pneumoniae* M5a1 มี 3 สายพันธุ์คือ Wild type (WT), 24A และ 2F

เลี้ยงเชื้อตัวให้และตัวรับใน L-Broth ปล่อยให้ 37° C. จนถึง late log phase หรือเมื่อกำหนด ผสมเชื้อตัวให้และตัวรับอย่างละ 0.50 มิลลิลิตรในขวดทดลอง เอเลนแมเยอร์ขนาดความจุ 30 มิลลิลิตร เติมน้ำ L-Broth ที่มีกลูโคสร้อยละ 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร ตั้งนิ่งไว้ที่ 37° C. เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาเจือจางให้มีปริมาณคอนจูเกชันต่าง ๆ กัน แล้วนำมา ความเข้มข้นละ 0.10 มิลลิลิตร กระจายเชื้อลงในอาหารสุก

ปรับค่าแข็งที่มีแอมพิซิลลิน คานามัยซิน และเตตราซัยคลินปริมาณ 20, 20 และ 10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หนึ่งที่ 37° ซ. แล้วคัดเลือกคอนจูแกนส์ที่เจริญในจานเพาะเชื้อใหม่โดย กริด (grid) เชื้อถ้วยไม้จิ้มฟันจำนวนประมาณ 15 - 25 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ หนึ่งที่ 37° ซ. ภายใต้บรรยากาศไมโครเจน คัดเลือกคอนจูแกนส์ที่สามารถเจริญได้ไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

11. Reversion frequency

11.1 การสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{420nm} กับ log colonies.ml⁻¹ (รูปที่ 2)

เลี้ยงเชื้อ (ไวคโท) ในอาหารสูตรปรับค่าโดยใช้เชื้อตั้งต้นต่ออาหาร ในอัตราส่วน 1 : 50 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดทดลองเฮลมเมเยอร์ขนาดความจุ 500 มิลลิลิตร เชื้อที่ 37° ซ. เมื่อถึงเวลาที่ทองกวว นำมาวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร และเจือจางด้วยความเข้มข้นของเซลล์ต่าง ๆ กัน นำ 0.10 มิลลิลิตร ของแต่ละความเข้มข้น ไปกระจายให้เจริญบนจานเพาะเชื้ออาหารอุดม หนึ่งที่ 37° ซ. จากนั้นคำนวณปริมาณโคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่ความขุ่นของเซลล์แต่ละเวลาที่วัด

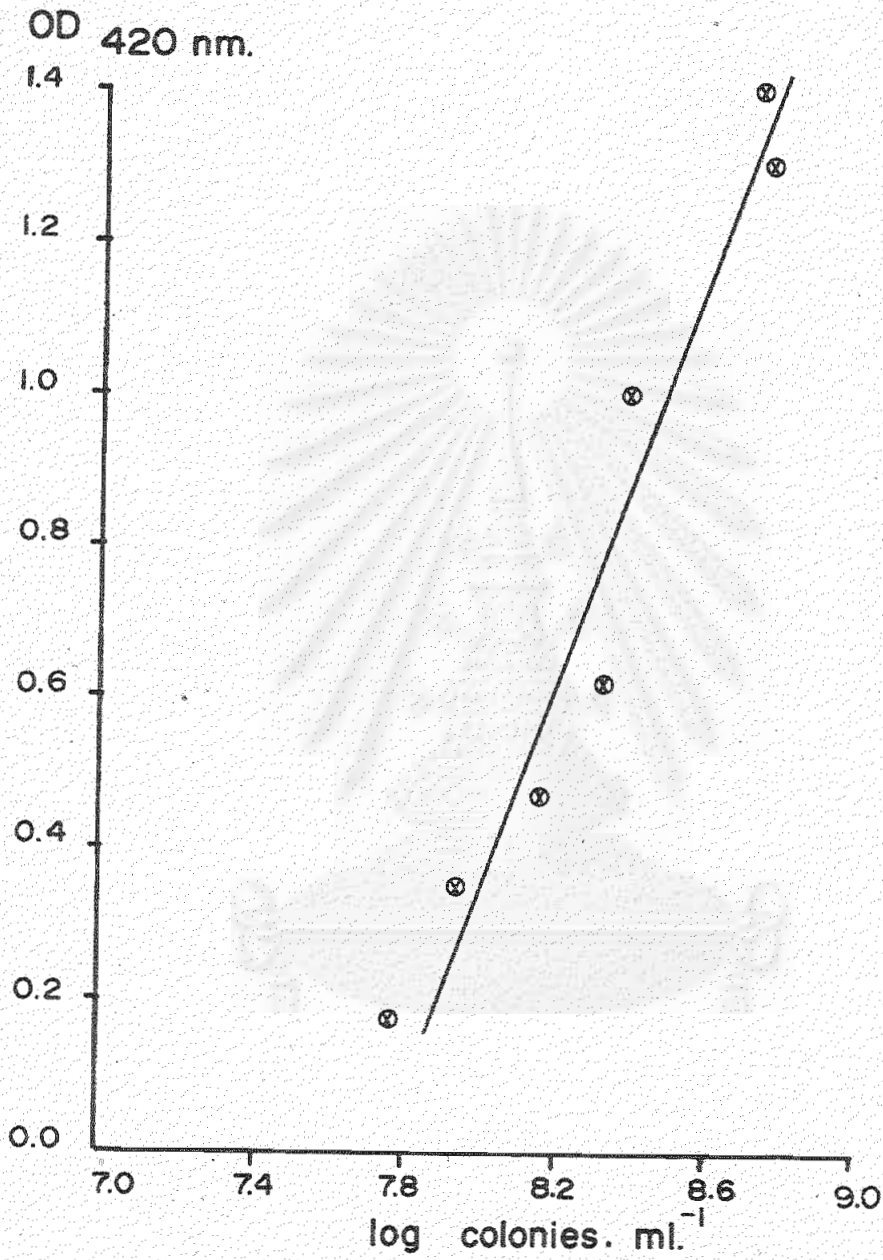
11.2 การเลี้ยงเซลล์และการคัดเลือกรีเวอร์แตนท์

โดยหลักการเลี้ยงเซลล์ในอาหารอุดมหรือมีตัวชักนำให้เกิดรีเวอร์แตนท์ ได้ง่ายขึ้น รวมทั้งการเปลี่ยนอาหารใหม่หลาย ๆ ครั้ง (subculture) ส่วนการคัดเลือกรีเวอร์แตนท์ใช้อาหารสูตรปรับค่าที่ไม่มีแหล่งต้นคอไมโครเจนเป็น selective pressure เมื่อเชื้อมีความเข้มข้นของเซลล์ต่าง ๆ กันโดยใช้ปริมาณ 0.10 มิลลิลิตร ต่อจานเพาะเชื้อภายใต้บรรยากาศไมโครเจนที่ 30° ซ.

11.3 กษคำนวณ

$$\text{Reversion frequency} = \frac{\text{revertant colonies}}{\text{parent colonies}}$$

parent colonies เป็นจำนวนเซลล์เริ่มต้นก่อนที่จะนำไปเจือจาง
ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{420nm} กับ log colonies.ml⁻¹



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{420nm} กับ log colonies.ml⁻¹ ของ Klebsiella pneumoniae M5a1

revertant colonies ได้จากการคำนวณจำนวนโคโลนีของ revertants
ที่พบใน 1 มิลลิลิตร

12. การหาปริมาณโปรตีนโคยวีรีลอร์ (Lowery และคณะ, 1951)

12.1 สารละลายเฮนโซม

ความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 10 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้
สารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายข้างในข้อ 4.1.1 จำนวน 5 มิลลิลิตร
ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย Folin Ciocalteu (เจือจาง 1 : 2) ลงไป
ทันที 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้อีก 30 นาที วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น ที่ความยาวแสง
600 นาโนเมตร

12.2 เชื้อ (culture)

ล้างเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วกระจายเซลล์
ใหม่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 100 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เซลล์ที่เตรียม
ไว้ 0.5 มิลลิลิตร ผสม 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำ
เดือด 5 นาที ทำให้เป็นเค็มสารละลายข้างในข้อ 4.1.2 จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้
ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย Folin Ciocalteu (เจือจาง 1 : 2) 0.5
มิลลิลิตร ทิ้งไว้อีก 30 นาที วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวแสง 500 นาโนเมตร

ผลการวิจัย

1. การแจกแจงคุณสมบัติของพอร์มิกัลไฮโดรจีเนสมิวแทนท์เบื้องต้น

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการนำมิวแทนท์ที่กลุ่กัวส์ (2526) แยกไว้มาศึกษากระบวนการตรึงไนโตรเจน การทดลองแรกสุดที่จำเป็นคือ แจกแจงสรีรวิทยาเบื้องต้นของมิวแทนท์อีกครั้งหนึ่ง เพื่อยืนยันว่ามิวแทนท์ที่เป็นโพสเหมือนเดิม

จากการนำมิวแทนท์มาทดสอบใหม่ (preliminary result) พบว่าคุณสมบัติของมิวแทนท์ส่วนใหญ่ยังคงเดิม (ตารางที่ 1) กล่าวคือ

มิวแทนท์กลุ่มที่ 1 (ตารางที่ 1) มี 5 ตัวคือหมายเลขสายพันธุ์ 27A 29A 35A 18E และ 21E เปลี่ยนสีเบนซิลไวโอไลต์เจเนบนอาหารแข็งเมื่อมีฟอร์เมตจากสีชาเป็นสีม่วง และสามารถตรึงไนโตรเจนได้

มิวแทนท์กลุ่มที่ 2 (ตารางที่ 1) มี 1 ตัวคือหมายเลขสายพันธุ์ 2F สามารถเปลี่ยนสีเบนซิลไวโอไลต์เจเนบนอาหารแข็งเมื่อมีฟอร์เมต จากสีชาเป็นสีม่วงและไม่เจริญในอาหารที่ปราศจากแหล่งกักตุนไนโตรเจนภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน

มิวแทนท์กลุ่มที่ 3 (ตารางที่ 1) มี 9 ตัวคือหมายเลขสายพันธุ์ 14A, 16A, 18A, 3F, 6F, 8F, 9F, 10F, และ 13F ไม่สามารถเปลี่ยนสีเบนซิลไวโอไลต์เจเนบนอาหารแข็งเมื่อมีฟอร์เมต และสามารถตรึงไนโตรเจนได้

มิวแทนท์กลุ่มที่ 4 (ตารางที่ 1) มี 1 ตัวคือหมายเลข 24A ไม่สามารถเปลี่ยนสีเบนซิลไวโอไลต์เจเนบนอาหารแข็งเมื่อมีฟอร์เมต และไม่เจริญในอาหารที่ปราศจากแหล่งกักตุนไนโตรเจนภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน

ตารางที่ 1 การจำแนกฟีโนไทป์เบื้องต้น

กลุ่ม (1)	จำนวน สายพันธุ์	หมายเลข สายพันธุ์	การตรึง (2) ไนโตรเจน	การเกิดสีเบนซิด (3) ไวโอโดเซน		ก๊าซ (4)	ความ (5) ต้านทานต่อ คลอเรท
				-	ฟอร์เมต		
Wild type	1	WT	+	ม่วง	ม่วง	+	-
1	5	27A, 29A, 35A, 18E, 21E	+	ขาว	ม่วง	-	+
2	1	2F	-	ขาว	ม่วง	-	+
3	9	14A, 16A, 18A 3F, 6F, 8F, 9F, 10F, 13F	+	ขาว	ขาว	-	+
4	1	24A	-	ขาว	ขาว	-	-

สถาบันวิจัยพืชไร่
ภาควิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่

เมื่อเจริญมิวแทนทุกสายพันธุ์ในอาหารสูตรปรับค่า ทั้งที่มีและไม่มีฟอริเมค อยู่ด้วย เป็นเวลา 2 วัน ไม่พบพองการเกิดขึ้นแต่อย่างใด นอกจากนี้เกือบทุกตัว แสดงคุณสมบัติต้านทานคอโคลอสเตรต ยกเว้นหมายเลขสายพันธุ์ 24A

จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น และจากรายงานของพิณสวัสดิ์ (2526) จึงเลือก มิวแทนที่กลุ่มที่ครึ่งไนโคโรเจนไม่ได้ มาศึกษา 2 ตัว คือ หมายเลขสายพันธุ์ 2F จาก กลุ่มที่ 2 และหมายเลขสายพันธุ์ 24A จากกลุ่มที่ 4 เพื่อค้นหาสาเหตุว่าทำไมจึงครึ่ง ไนโคโรเจนไม่ได้ และเลือกมิวแทนที่กลุ่มที่ครึ่งไนโคโรเจนได้ 2 ตัวคือ หมายเลขสายพันธุ์ 16A และ 10F จากกลุ่มที่ 3 สาเหตุที่เลือกมิวแทนที่ 2 สายพันธุ์นี้ ก็เพราะเป็นตัวแทน กลุ่มที่มีคุณสมบัติในการ เปลี่ยนสี เบนซิลไวโอไลโอเจนแตกต่างจากกลุ่มที่ 1 ซึ่งพิณสวัสดิ์ได้ศึกษา อย่างลึกซึ้งไปแล้ว

2. สรีรวิทยาของฟอริมิคทีไฮโคโรจิเนสมิวแทนท์ กลุ่มที่ครึ่งไนโคโรเจนได้

2.1 การเจริญของเชื้อในภาวะอาหาร ค้างกัน

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการ เจริญของมิวแทนท์ หมายเลขสายพันธุ์ 10F และ 16A เทียบกับไวคโท (WT) ในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคส จำกัด และมีแหล่งคาร์บอนไนโคโรเจนแตกต่างกัน ได้แก่ อนุบลอัมโมเนียม และไนเตรต รวมทั้งศึกษาลักษณะของอนุบลออสเตรตอีกด้วย พบว่าการเจริญของเชื้อหมายเลขสายพันธุ์ 10F และ 16A ในอาหารสูตรปรับค่าสภาวะปราศจากออกซิเจนที่ 30°ซ. เมื่อมีอัมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งคาร์บอนไนโคโรเจน จะคล้ายกับ WT เพียงแต่ 16A เจริญได้ช้ากว่า 10F และ WT เล็กน้อย (รูปที่ 3a) ทั้ง 10F และ 16A มีค่าการเจริญสูงสุด (growth yield) (รูปที่ 3e) ใกล้เคียงกัน แต่ช้ากว่า WT เล็กน้อย มีค่าการเจริญสูงสุดที่สอดคล้องกัน กล่าวคือ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคส 2, 5, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ OD_{420nm} สำหรับ WT เท่ากับ 0.36, 0.62, 0.84 และ 0.90 หน่วย สำหรับ 10F เท่ากับ 0.31, 0.58, 0.74 และ 0.80 หน่วย และสำหรับ 16A เท่ากับ 0.29, 0.54, 0.70 และ 0.76 หน่วย ตามลำดับ

รูปที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญและการเจริญสูงสุดระหว่าง ไวคิโทฟ และ มิวแทนท์ หมายเลข 10F และ 16A ในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคสจำกัด 10 มิลลิโมลาร์ ภาวะอาหารต่างกัน ปราศจากออกซิเจน ที่ 30 °ซ.

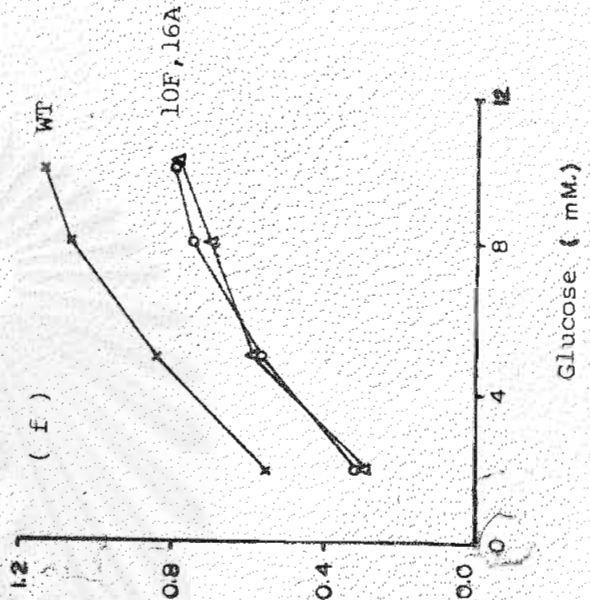
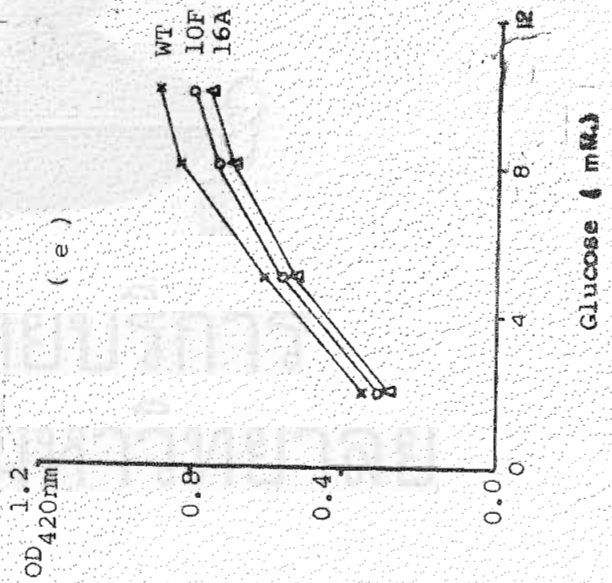
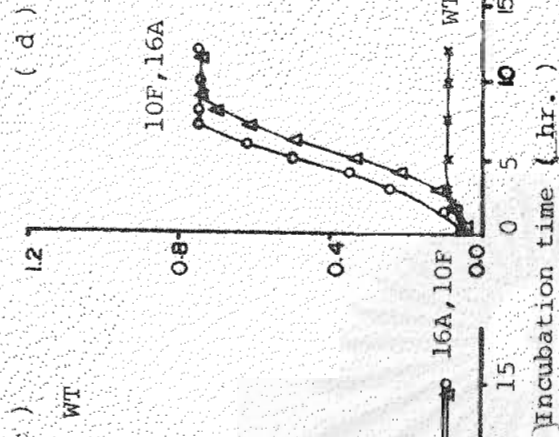
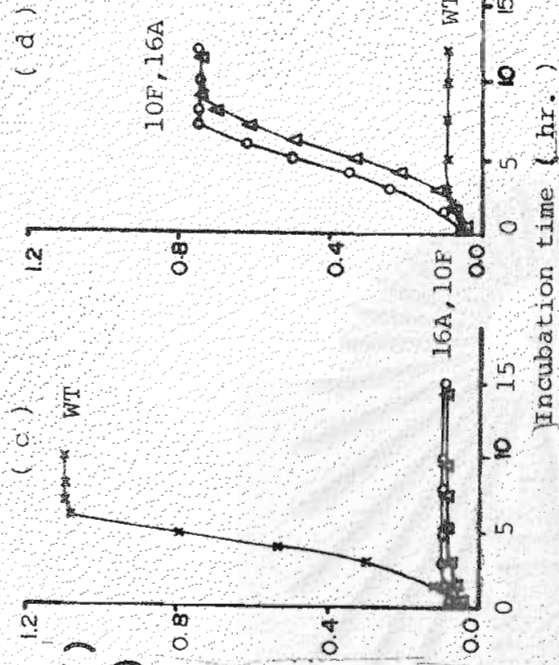
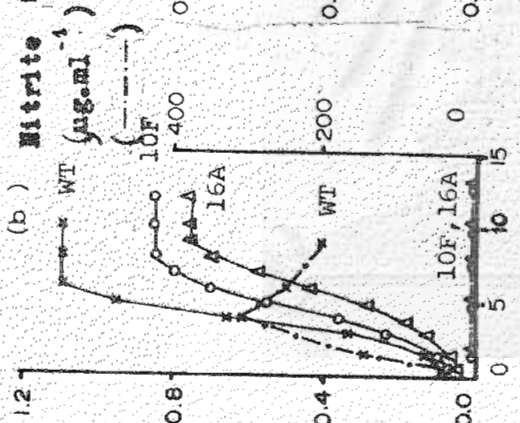
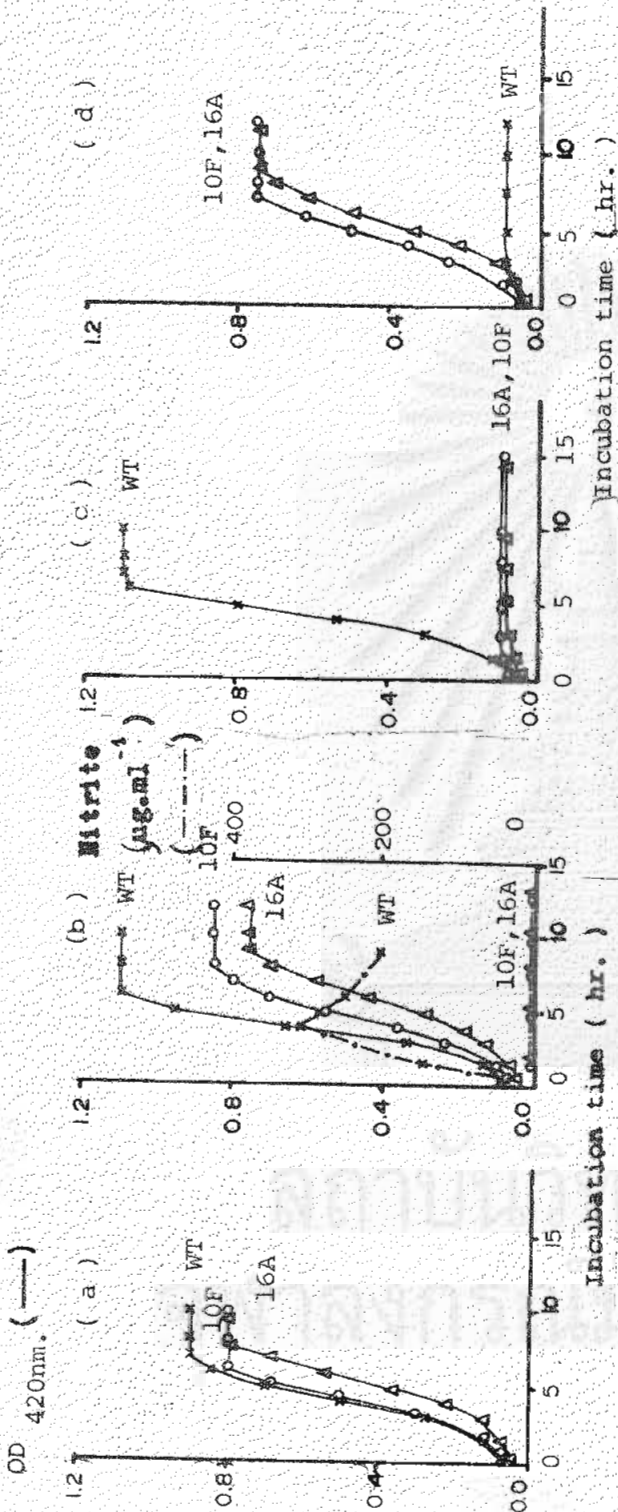
- a) อัมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน
- b) อัมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์ และโปแตสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน
- c) โปแตสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน
- d) ผลกระทบของโปแตสเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ในอาหารที่มี อัมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์ และโปแตสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน
- e) การเจริญสูงสุดในอาหารที่มีกลูโคส 2, 5, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ มี อัมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน
- f) การเจริญสูงสุดในอาหารที่มีกลูโคส 2, 5, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ มี อัมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์ และโปแตสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน

การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6.1 และ 7.1

x = Wild type (WT)

o = Mutant strain 10F

Δ = Mutant strain 16A



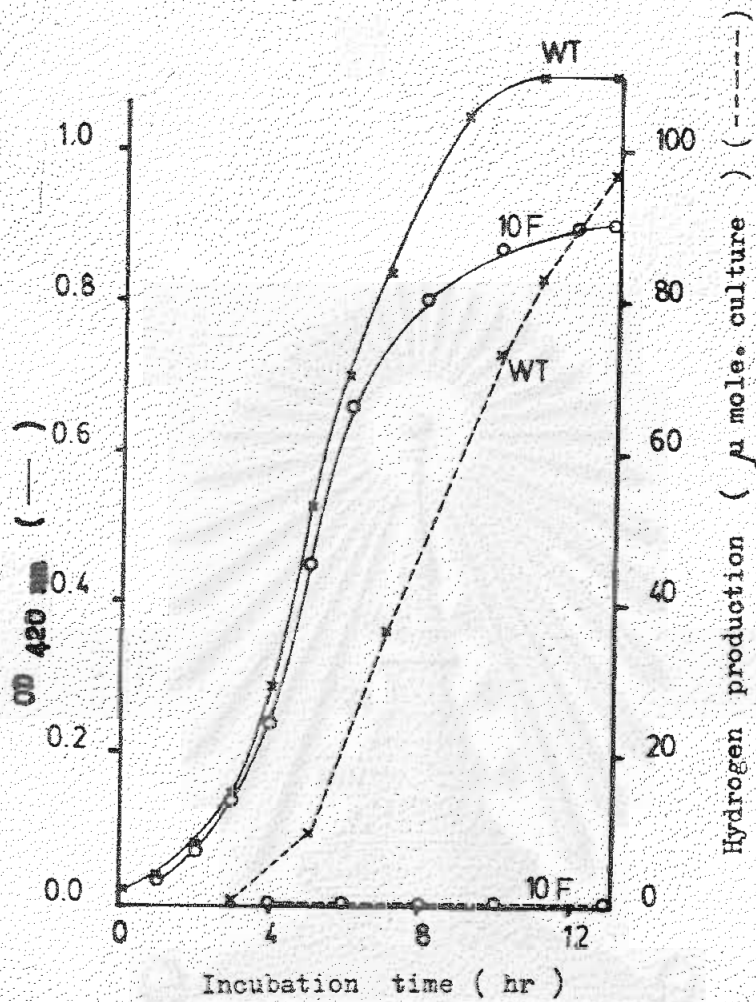
เมื่อเสริมโปแคสเติมในเครตในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย พบว่าการเจริญของ WT จะเร็วกว่า 10F และ 16A อย่างชัดเจน (รูปที่ 3b) ในขณะที่ 10F และ 16A ยังคงมีการเจริญเหมือนเดิม นอกจากนี้ยังพบอนุพลไนโตรคเกิดขึ้นใน WT ตั้งแต่ early log phase และมีปริมาณสูงสุดที่ประมาณ mid log phase และค้างที่ stationary phase แต่ไม่พบไนโตรคใน 10F และ 16A แยกอย่างใด ครั้นเมื่อให้เจริญในอาหารสูตรปรับค่าที่มีแคโรตีน เป็นแหล่งกักไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว (รูปที่ 3c) จะพบว่า 10F และ 16A ไม่มีการเจริญในขณะที่ WT เจริญได้ และคล้าย ๆ กับการเจริญเมื่อมีอิมโมเนียบซัลเฟตอยู่ในอาหารด้วย (รูปที่ 3b และ 3c)

ที่น่าสนใจก็คือค่าการเจริญสูงสุดของ 10F และ 16A เมื่อเทียบกับ WT ในอาหารที่ทั้ง อิมโมเนียบซัลเฟตและโปแคสเติมในเครต เป็นแหล่งกักไนโตรเจนโดยมีกลูโคส 2, 5, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 3f) มีค่า OD_{420nm} สำหรับ WT เท่ากับ 0.56, 0.85, 1.08 และ 1.15 หน่วย สำหรับ 10F เท่ากับ 0.32, 0.58, 0.75 และ 0.80 หน่วย และสำหรับ 16A เท่ากับ 0.30, 0.59, 0.70 และ 0.80 หน่วยตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่าการเจริญสูงสุดของ WT เมื่อเสริมด้วยโปแคสเติมในเครตจะให้ค่าสูงกว่าเดิม (รูปที่ 3a และ 3b) และสูงกว่า 10F และ 16A อย่างชัดเจน

เมื่อทดสอบถึงผลกระทบของคอเรต ค่าการเจริญของ WT 10F และ 16A ในอาหารที่ทั้ง อิมโมเนียบซัลเฟตและโปแคสเติมในเครตเป็นแหล่งกักไนโตรเจน (รูปที่ 3d) ก็พบว่า WT ไม่สามารถเจริญได้ ในขณะที่ทั้ง 10F และ 16A สามารถเจริญได้ และมีการเจริญคล้ายกับ เมื่อมีโคไลคอเรต

2.2 การเกิดก๊าซไฮโดรเจน

ผลจากการแจกแจงคุณสมบัติของพอร์มิกไฮโดรจีเนสมีวแทนท์ มีดังนี้ในข้อ 1 ไม่ปรากฏพองก๊าซเกิดขึ้นเลยใน 10F และ 16A เมื่อเทียบกับ WT ในอาหารสูตรปรับค่าที่ใส่และไม่ใส่พอร์เมค เพื่อความแน่ใจ จึงทำการทดลองใหม่โดยการเจริญทั้ง WT และมีวแทนท์ ในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคสร้อยละ 0.5 ศึกษาก๊าซไฮโดรเจนที่อาจเกิดขึ้น โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี เริ่มตรวจพบก๊าซไฮโดรเจนในคัลเจอร์ (culture) ของ WT ในช่วง log phase (รูปที่ 4) ปริมาณที่ตรวจพบสูงขึ้นเรื่อย ๆ มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่



รูปที่ 4 ลักษณะการเกิดก๊าซไฮโดรเจนของไวลด์ไทป์ และมิวแทนท์ หมายเลข 10F ในอาหารสูตรปรับค่า บนภายใต้บรรยากาศคาร์บอนที่ 30 ไร่.

การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 7.2.1

x = Wild type (WT)

o = Mutant strain 10F

ตรวจสอบเป็นเส้นตรง และสูงสุดที่ stationary phase ภายหลังจากเริ่ม 13 ชั่วโมง ซึ่งพบก๊าซไฮโดรเจน 97 ไมโครโมลต่อกิโลเจอร์ โดยการทดลองรูปแบบเดียวกัน ไม่พบก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้นเลยในคัลเจอร์ของ 10F (รูปที่ 4) และจากการตรวจสอบก๊าซไฮโดรเจนที่ stationary phase ของ 16A ก็ไม่ปรากฏก๊าซไฮโดรเจนเช่นกัน (ตารางที่ 2)

3. สรีรวิทยาของพอร์มิกไฮโดรจีเนสในหมักแบบที่ตรงไปไฮโดรเจนไม่ได้

3.1 การเจริญของเชื้อในภาวะอาหารคางกัน

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญของมิวแทนท์หมายเลขสายพันธุ์ 10F และ 16A เทียบกับ WT ในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคสจำกัด และมีแหล่งต้นคอโคโรเจนแตกต่างกัน โคแกอุมมัลดีโมเนียมและไนเตรต รวมทั้งศึกษามลภาวะของอุมมัลดีอเรตอีกด้วย พบว่าการเจริญของเชื้อหมายเลขสายพันธุ์ 2F และ 24A ในอาหารสูตรปรับค่าภาวะปราศจากออกซิเจนที่ 30 °C. เมื่อมีอุมมัลดีโมเนียม เป็นแหล่งต้นคอโคโรเจน (รูปที่ 5a) พบว่า 2F และ 24A มีการเจริญที่ช้ากว่า WT เวลาที่ใช้ในการเริ่มเชื้อจนถึง stationary phase สำหรับ WT 2F และ 24A เท่ากับ 7, 10 และ 13 ชั่วโมงตามลำดับ ค่าการเจริญสูงสุดของ 2F ใกล้เคียงกับ WT ส่วน 24A จะต่ำกว่า WT มาก เมื่อใช้ปริมาณกลูโคส 2, 5, 8, และ 10 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 5a) มีค่า OD_{420nm} สำหรับ WT เท่ากับ 0.36, 0.62, 0.84 และ 0.90 หน่วย สำหรับ 2F เท่ากับ 0.28, 0.50, 0.78 และ 0.84 หน่วย และสำหรับ 24 เท่ากับ 0.25, 0.49, 0.60 และ 0.86 หน่วยตามลำดับ

เมื่อเสริมไปแคสเซียมีไนเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อคางกัน (รูปที่ 5b) พบว่า WT และ 24A มีการเจริญที่ต่ำกว่าเดิมอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 5a, 5b) และมีไนเตรตเกิดขึ้นในระหว่างการเจริญ ในลักษณะที่คล้ายกันคือ เริ่มปรากฏไนเตรตตั้งแต่ early log phase มีปริมาณสูงสุดที่ประมาณ mid log phase และต่ำลงที่ stationary phase สำหรับ 2F มีการเจริญเหมือนเมื่อเจริญในอาหารที่มีแหล่งต้นคอโคโรเจน เป็นอุมมัลดีโมเนียมชนิดพิเศษเพียงชนิดเดียว เพียงแต่เจริญถึง stationary phase ช้าไปเล็กน้อย ไม่พบไนเตรตเกิดขึ้นแต่อย่างใด

ตารางที่ 2 ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นของไวต์โทป และมิวแทนท์

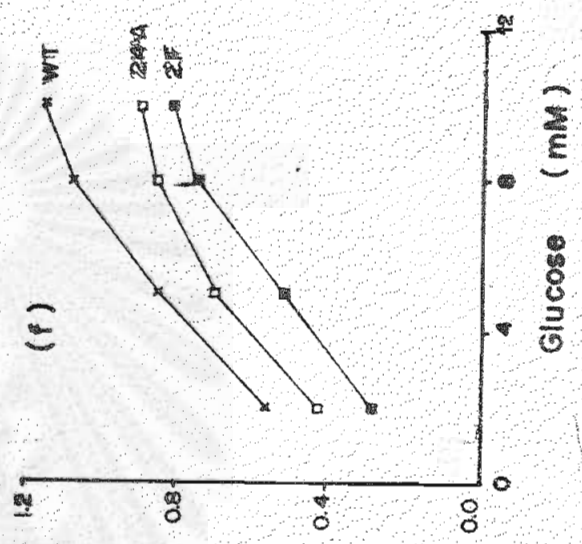
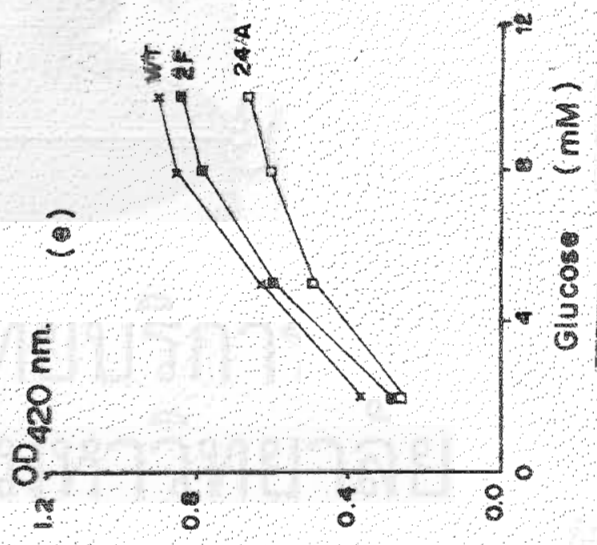
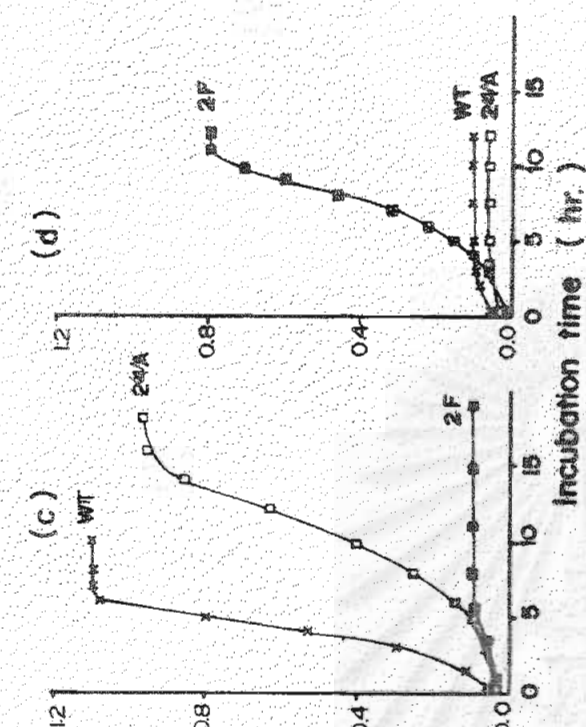
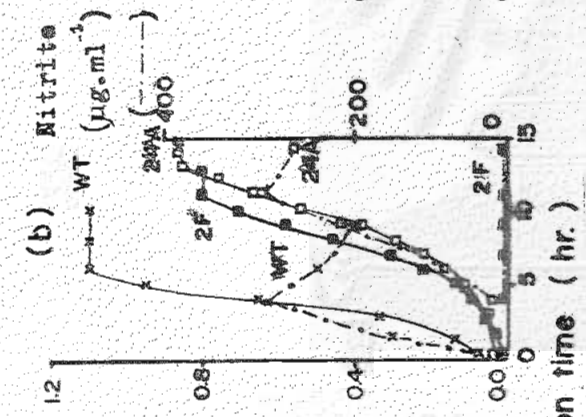
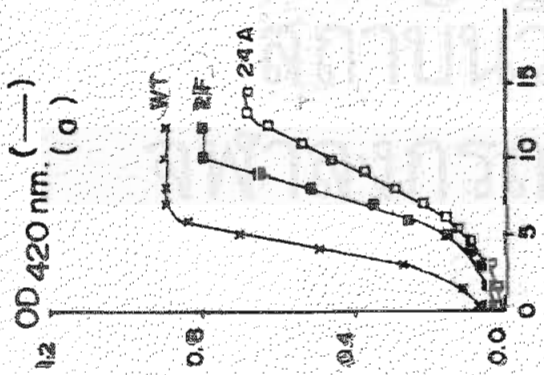
หมายเลขสายพันธุ์	การตรึงไนโตรเจน	OD ₄₂₀ (1)	การเกิดไฮโดรเจน (2) (μ mole. culture ⁻¹)	Hydrogenlyase pathway
WT	+	1.10	97	+
16A	+	0.80	0	-
10F	+	0.90	0	-
24A	-	0.68	0	-
2F	-	0.90	0	-

1. ความสูงของเชื้อที่ได้จากการเจริญในอาหารสูตรปรับค่า บ่มภายใต้บรรยากาศอาร์กอนที่ 30 ช. ที่ stationary phase

2. ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้น เมื่อเวลาประมาณ 13 ชั่วโมง หรือเมื่อการเจริญของเชื้อเข้าสู่ stationary phase

การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 หรือ 7.2.1

สถาบันวิจัยประชากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



เมื่อให้เชื้อเจริญในอาหารสูตรปรับค่าที่มีแต่ในเตรคเป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 5c) พบว่า 24A สามารถเจริญได้แต่ยังคงมีการเจริญที่ช้ากว่า WT ส่วน 2F ไม่สามารถเจริญได้

ที่น่าสนใจก็คือการเจริญสูงสุดของ 2F และ 24A เมื่อเปรียบกับ WT ในอาหารที่มีทั้ง อิมโมเนียมซัลเฟต และโปแตสเซียมในเตรค เป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน โดยมีกลูโคส 2, 5, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 5f) มีค่า OD_{420nm} สำหรับ WT เท่ากับ 0.56, 0.85, 1.08 และ 1.15 หน่วย สำหรับ 2F เท่ากับ 0.28, 0.52, 0.75 และ 0.82 หน่วย และสำหรับ 24A เท่ากับ 0.42, 0.70, 0.85 และ 0.90 หน่วยตามลำดับ ซึ่งพบว่า WT และ 24A ให้ค่าการเจริญสูงสุดที่สูงกว่า เมื่อมีอิมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวอย่างชัดเจน ในขณะที่ 2F มีค่าการเจริญสูงสุดใกล้เคียงกัน (รูปที่ 5e, 5f)

เมื่อทดสอบถึงผลกระทบของคอเรคกการเจริญของ WT 2F และ 24A ในอาหารสูตรปรับค่าที่มีทั้ง อิมโมเนียมซัลเฟตและโปแตสเซียมในเตรคเป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน (รูปที่ 5a) พบว่า WT และ 24A ไม่สามารถเจริญได้ ในขณะที่ 2F สามารถเจริญได้ และมีการเจริญคล้ายกับ เมื่อมีโคโคเรค

3.2 การเกิดก๊าซไฮโดรเจน

ผลจากการแจกแจงคุณสมบัติของพอร์มิกไฮโดรจีเนสในข้อ 1 ไม่ปรากฏพองก๊าซเกิดขึ้นเลยใน 2F และ 24A เมื่อเทียบกับ WT ในอาหารสูตรปรับค่าที่ใส่และไม่ใส่ฟอร์เมต เพื่อความแน่ใจ จึงทำการทดลองใหม่ โดยการเจริญทั้ง WT และมิวแทนต์ในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคสร้อยละ 0.5 วัดความก๊าซไฮโดรเจนที่อาจเกิดขึ้น โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี

ลักษณะการเกิดก๊าซไฮโดรเจน โค้กแล้วในข้อ 2.2 จากการตรวจสอบก๊าซไฮโดรเจนที่ stationary phase ของ 2F และ 24A ก็ไม่ปรากฏก๊าซไฮโดรเจนเช่นกัน (ตารางที่ 2) นั่นก็คือค่าการเจริญสูงสุดที่ stationary phase เป็นค่า OD_{420nm} ของ WT 2F และ 24A เท่ากับ 1.1, 0.90 และ 0.68 หน่วยตามลำดับ (ตารางที่ 2)

3.5 Reversion frequency

FTG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine) เป็นตัวคัดเลือกเอเจนต์ ที่มีฤทธิ์กลายพันธุ์ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหมู่เบสทำปฏิกิริยากับเพปทิวรีน จึงทำให้เกิดทั้ง transversion และ transition ดังนั้นมีวณคมที่แยกโคโรจิงอาจมีโอกาสเกิดปกติที่ขึ้นมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง โคโรจิงทดสอบหาความผิดปกติของมิวแทนท์กลุ่มที่ตรงไนโคโรเจนไม่ได้คือหมายเลขสายพันธุ์ 2F และ 24A โดยใช้การเจริญในสภาพที่ปราศจากแหล่งต้นตอไนโคโรเจนเป็น selective pressure

จากผลการทดลองในตารางที่ 3 ไม่ปรากฏรีเวอร์แตนต์เกิดขึ้นเลยทั้งรายละเอียดต่อไปนี้

การทดลองครั้งที่ 1 - 3 เติบโตเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วย L-Broth ร้อยละ 1 แต่ subculture (นำคัลเจอร์ที่เจริญครั้งแรกมาเป็นตัวตั้งต้นในการเจริญครั้งที่ 2) 1, 2 และ 3 ครั้ง ตามลำดับ โคโรจิงประมาณ $2 - 3 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ครั้งที่ 4 เติบโตเชื้อในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยฟอร์เมทร้อยละ 0.5 subculture 1 ครั้ง โคโรจิงเริ่มต้นประมาณ 2×10^8 เซลล์ต่อ มิลลิลิตร

ครั้งที่ 5 เติบโตเชื้อใน L-Broth subculture 1 ครั้ง โคโรจิงเริ่มต้นประมาณ 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ครั้งที่ 6 และ 7 เติบโตเชื้อใน L-Broth ที่เสริมด้วยกลูโคส subculture 2 และ 7 ครั้ง โคโรจิงประมาณ $2 - 5 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

การทดลองทั้งหมดนี้ใช้เวลาในการบ่มเชื้อในอาหารที่ปราศจากแหล่งต้นตอไนโคโรเจนภายใต้บรรยากาศไนโคโรเจนเท่ากันคือ 7 วัน แต่ก็ไม่ปรากฏมีรีเวอร์แตนต์เกิดขึ้น

4. การทดสอบแอนติบอดีของแอนติบอดีที่มีต่อโคโรจิง

จากสรีรวิทยาเบื้องต้นที่ผ่านมา บ่งชี้ว่ามิวแทนท์ที่ศึกษา มีโอกาสเกิดปกติที่แอนติบอดีที่มีต่อโคโรจิง จึงได้นำมาตรวจสอบแอนติบอดีของแอนติบอดีเป็นครั้งสุดท้าย

ตารางที่ 3 Reversion frequency

ลำดับที่ ทดลอง	สภาวะที่ทดลอง			หมายเลข สายพันธุ์	จำนวน (4) เซลล์เริ่ม ต้นต่อ มิลลิลิตร	จำนวน (5) รีเวอร์ แตนท์	Rever- sion frequen- cy (6)
	อาหาร (1)	subculture (2) (ครั้ง)	ช่วงเวลา (3) บนเชื้อ (วัน)				
1	GMM:LB (100:1)	1	7	24A	1.7×10^8	0	-
				2F	2.1×10^8	0	-
2	GMM:LB (100:1)	2	7	24A	1.8×10^8	0	-
				2F	2.3×10^8	0	-
3	GMM:LB (100:1)	3	7	24A	2.5×10^8	0	-
				2F	2.9×10^8	0	-
4	GMM + Formate	1	7	24A	1.5×10^8	0	-
				2F	2.2×10^8	0	-
5	LB	1	7	24A	1.2×10^8	0	-
				2F	1.1×10^8	0	-
6	LB + Glucose	2	7	24A	3.3×10^8	0	-
				2F	2.4×10^8	0	-
7	LB + Glucose	7	7	24A	3.5×10^8	0	-
				2F	5.0×10^8	0	-

การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 11

เนื่องจากความผิดปกติอาจเกิดขึ้นทั้งฟอร์มิกไฮโดรจิเนสฟอร์ม "H" (FDH_H) และฟอร์ม "N" (FDH_N) จึงต้องทดสอบแอกทิวิตีของ เอนไซม์ทั้งสองฟอร์มแยกกัน

4.1 ฟอร์มิกไฮโดรจิเนสฟอร์ม "H" (FDH_H)

ได้ทดลองศึกษาหาแอกทิวิตีของ FDH_H ในเยื่อเซลล์ และไซโทซอลตามวิธีการทดลองที่ระบุไว้ในข้อ 8 พบว่า จะพบแอกทิวิตีของ FDH_H ใน WF ทั้งส่วนไซโทซอลและเยื่อเซลล์ (ตารางที่ 4 และรูปที่ 6) ความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีกับความเข้มข้นของโปรตีนปรากฏเป็นเส้นตรง

ในส่วนของไซโทซอล จะมีโปรตีนอยู่ในช่วง 1.07 - 5.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีแอกทิวิตีอยู่ในช่วง 32 - 140 นาโนโมลค่อนาที และแอกทิวิตีจำเพาะอยู่ในช่วง 196 - 303 นาโนโมลค่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน การหาแอกทิวิตีของ FDH_H โดยใช้ตัวบิอดีคเอนสังเคราะห์เป็นเบนซิลไวโอไลเจน ทั้งกล่าวแล้วในวิธีการทดลองข้อ 8 ปรากฏ lag period นานอยู่ช่วง 0.5 - 3.0 ชั่วโมง สำหรับในชั้นของเยื่อเซลล์ ความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีของ เอนไซม์กับปริมาณโปรตีน อยู่ในช่วงเส้นตรงเมื่อความเข้มข้นของโปรตีน เท่ากับ 0.44 - 2.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีแอกทิวิตีอยู่ในช่วง 70 - 297 นาโนโมลค่อนาที และแอกทิวิตีจำเพาะอยู่ในช่วง 1416 - 1597 นาโนโมลค่อนาทีต่อมิลลิกรัม ปรากฏ lag period นานประมาณ 0.2 - 1.5 ชั่วโมง

จากการที่ค่าแอกทิวิตีจำเพาะในชั้นเยื่อเซลล์มีค่าสูงกว่าในชั้นของเหลว ~ 5 - 8 เท่า จึงตัดสินใจเลือกใช้ชั้นของเยื่อเซลล์ในการหาแอกทิวิตีในมิวแทนท์ต่อไป

ผลการหาแอกทิวิตีของ FDH_H ในมิวแทนท์หมายเลขสายพันธุ์ 16A, 10F, 24A และ 2F ไม่ปรากฏแอกทิวิตีแต่อย่างใด (ตารางที่ 5)

4.2 ฟอร์มิกไฮโดรจิเนสฟอร์ม "N" (FDH_N)

ได้ทดลองศึกษาหาแอกทิวิตีของ FDH_N ในเยื่อเซลล์ และไซโทซอล จากวิธีการทดลองที่ระบุไว้ในข้อ 8 พบว่า แอกทิวิตีของ FDH_N ใน WF (ตารางที่ 6 และ

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของเอนไซม์ FDH_H กับปริมาณโปรตีนของไวคโท

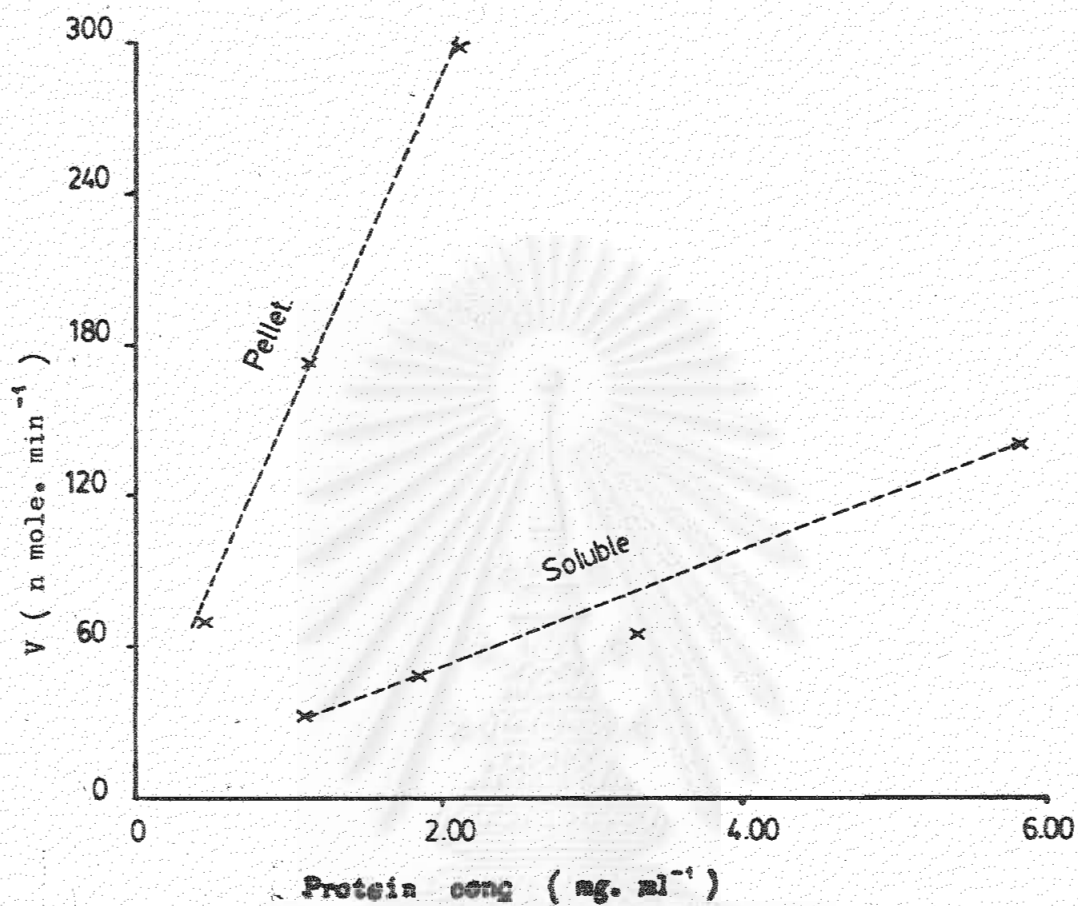
ชั้น	ช่วงเวลาดำเนิน (1) เกิดขึ้น (ชั่วโมง)	ปริมาณโปรตีน มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แอกติวิตี (2)	แอกติวิตีจำเพาะ (3)
ของเหลว	0.45	5.80	140	242
	1.50	3.30	65	196
	1.00	1.85	49	263
	3.00	1.07	32	303
เยื่อเซลล์	0.22	2.10	297	1416
	0.50	1.15	173	1504
	1.50	0.44	70	1597

(1) ช่วงเวลาดำเนินเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ FDH_H กับเบนซิลไวโอไลเจน (lag period)

(2) แอกติวิตี (Velocity) $V = \text{nmole. min}^{-1}$

(3) แอกติวิตีจำเพาะ (Specific activity) $\text{Sp. act} = \text{nmole. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีของเอนไซม์ FDH_H กับปริมาณโปรตีนของไวคัสโท

การทดลองทำตามวิธีบไวโนบทที่ 2 ข้อ 8

Pellet = ส่วนเยื่อเซลล์

Soluble = โซโคซอด

ตารางที่ 5 แอคติวิตีของเอนไซม์ FDH_H ของไวคิโอท์ และมิวแทนท์ที่เยื่อเซลล์

หมายเลขสายพันธุ์	การตรึง (1) ไนโตรเจน	แอกติวิตี (2)	แอกติวิตีจำเพาะ (3)
WT	+	70 - 297	1416 - 1597
16A	+	0	0
10F	+	0	0
24A	-	0	0
2F	-	0	0

(1) การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6.2 และ 6.3

(2) แอกติวิตี (Velocity) $V = \text{nmole. min}^{-1}$

(3) แอกติวิตีจำเพาะ (Specific activity) $\text{Sp. act} = \text{nmole. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

การทดลองใน (2) และ (3) ทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8.

สถาบันวิจัยประชากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7) จะพบเฉพาะในส่วนของเยื่อเซลล์ ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีกับความเข้มข้นของโปรตีน ในชั้นของไซโทซอลปรากฏแอกติวิตีเป็นศูนย์ ถึงแม้จะใช้โปรตีนสูงอยู่ในช่วง 5 - 26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 6) ในทางตรงกันข้าม ในชั้นของเยื่อเซลล์ (รูปที่ 7) ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์กับความเข้มข้นของโปรตีนจะเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 0.96 - 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีแอกติวิตีอยู่ในช่วง 8 - 70 นาโนโมลค่อนาที และแอกติวิตีจำเพาะอยู่ในช่วง 60 - 96 นาโนโมลค่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ผลการหาแอกติวิตีของ FDH_N ในมิวแทนท์หมายเลขสายพันธุ์ 16A, 10F และ 2F ในเยื่อเซลล์ (ตารางที่ 7) ไม่ปรากฏแอกติวิตี ยกเว้นสายพันธุ์ 24A ให้แอกติวิตีของ FDH_N ซึ่งจุดศาสตร์ของมันเป็นเส้นตรง (รูปที่ 7) ในช่วงความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 2.25 - 7.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีแอกติวิตีอยู่ในช่วง 4 - 8 นาโนโมลค่อนาที และแอกติวิตีจำเพาะอยู่ในช่วง 10 - 17 นาโนโมลค่อนาทีต่อมิลลิกรัม ซึ่งต่ำกว่าประมาณ 4 - 10 เท่า

5. การเจริญของเชื้อเมื่อมีฟูมาเรตเป็นแหล่งต้นคอคาร์บอน

โดยทั่วไปภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน แบคทีเรียจะใช้ฟูมาเรตเป็นสารต้นคอคาร์บอนได้ เมื่อมีตัวให้อิเล็กตรอน ในแอสเคอริเคียโคไล มันจะสามารถเจริญเติบโตได้ในฟูมาเรต โดยมีไฮโดรเจน หรือฟอร์เมตเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Macy และคณะ, 1976) จึงน่าสนใจที่จะนำฟอร์มิคไฮโดรจีเนสมาศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิถีการให้อิเล็กตรอนเช่นกัน

ได้ทดลองเจริญพร และมิวแทนท์หมายเลขสายพันธุ์ 10F, 16A, 2F และ 24A ในอาหารสูตรปรับค่าที่ฟูมาเรต 10 มิลลิโมลาร์ภายใต้บรรยากาศไฮโดรเจน ตามผลการทดลองที่ระบุไว้ในข้อ 6.3 ผลการทดลอง (รูปที่ 8) ปรากฏว่าเชื้อทุกตัวเจริญได้แก่ค่อนข้างช้า ค่า OD_{420nm} ที่ 48 ชั่วโมงสำหรับ พร, 10F, 16A, 2F และ 24A เท่ากับ 0.75, 0.64, 0.66, 0.79 และ 0.34 ตามลำดับ

โดยอาศัยการทดลองแบบเดียวกัน เพียงแค่เปลี่ยนตัวให้อิเล็กตรอนจากไฮโดรเจนเป็นฟอร์เมต 10 มิลลิโมลาร์ ภายใต้บรรยากาศไฮโดรเจนที่มีคอคาร์บอนโคออกไซไรออล 5

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของเอนไซม์ FDH_N กับปริมาณโปรตีนของไวโคโทท และมิวแคนท์หมายเลข 24A

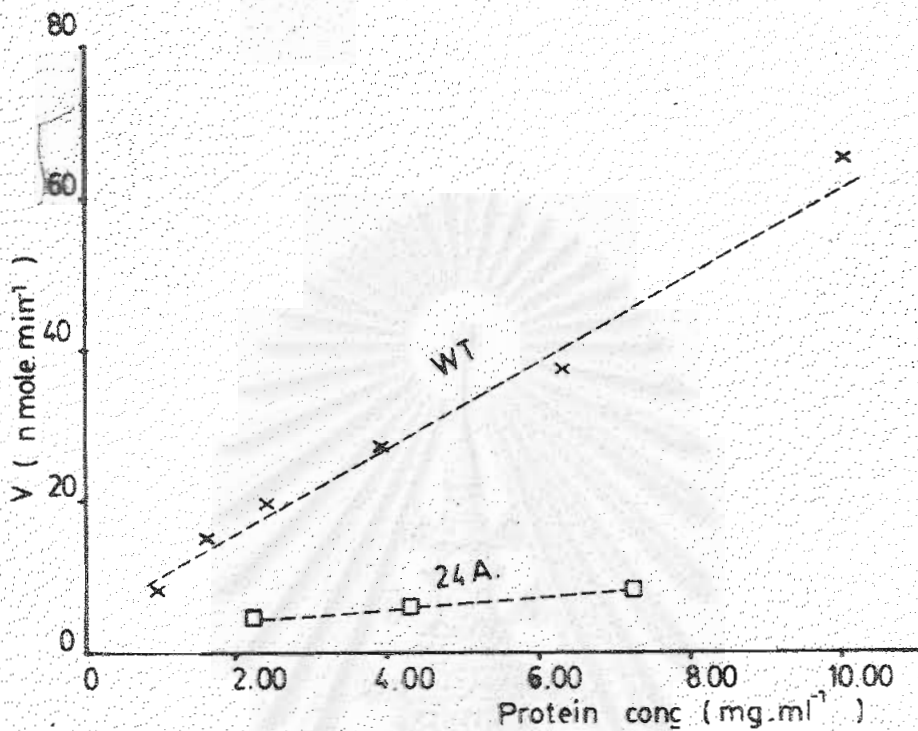
หมายเลขสายพันธุ์	ชั้น	ปริมาณโปรตีน มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แอกติวิตี (1)	แอกติวิตี (2) จำเพาะ
WT	ของเหลว	26.00	0	0
		13.00	0	0
		5.60	0	0
		5.50	0	0
	เบือเซลล์	10.00	70	70
		6.40	38	60
		3.90	27	68
		2.40	19	79
		1.59	15	96
		0.96	8	79
24A	(3) เบือเซลล์	7.20	8	10
		4.30	6	13
		2.25	4	17

(1) แอกติวิตี (Velocity) $V = \text{nmole. min}^{-1}$

(2) แอกติวิตีจำเพาะ (Specific activity) $\text{Sp. act} = \text{nmole. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

(3) วัดแอกติวิตีของ FDH_N ของ 24A เฉพาะในเบือเซลล์

การทดลองเป็นไปตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างแอกทิวิตีของเอนไซม์ FDE_N กับปริมาณโปรตีนของไวคโทต์ และมิวแทนท์หมายเลข 24A ในชั้นเยื่อเซลล์

การทดลองทำตามวิธีระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8

× = Wild type (WT)

□ = Mutant strain 24A

ตารางที่ 7 แอคติวิตีของเอนไซม์ FDH_N ของไวคโทพี และมิวแคนทีเปื่อเซลล์

หมายเลข สายพันธุ์	การตรึง (1) ไนโตรเจน	แอกติวิตี (2)	แอกติวิตีจำเพาะ (3)
WT	+	8 - 70	60 - 96
16A	+	0	0
10F	+	0	0
24A	-	4 - 8	10 - 17
2F	-	0	0

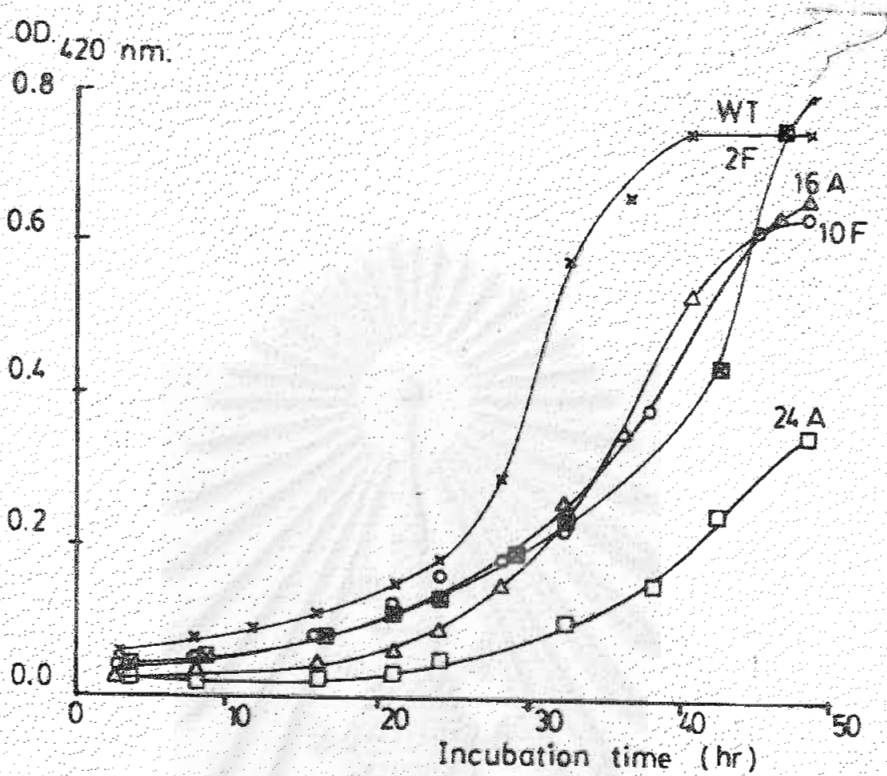
(1) การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6.2 และ 6.3

(2) แอกติวิตี (Velocity) $V = \text{nmole. min}^{-1}$

(3) แอกติวิตีจำเพาะ (Specific activity) $Sp. act = \text{nmole. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

การทดลองใน (2) และ (3) ทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 8

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ลักษณะการเจริญของไวคิโท และมิวแทนท์ ในอาหารสูตรปรับค่าที่มีอนุภาค 10 มิลลิโบลาร์ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนบนภายใต้บรรยากาศไฮโดรเจนที่ 30 °ซ.

การทดลองทำตามวิธีระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6.3

- x = Wild type (WT)
- = Mutant strain 10F
- △ = Mutant strain 16A
- = Mutant strain 24A
- = Mutant strain 2F

(ตารางที่ 8) พบว่าทั้ง WT และมิวแทนท์เจริญได้และมีความจำเป็นต้องเสริมด้วยฟอสเฟตและคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของก๊าซ มีไซในรูปของไบคาร์บอเนต ลักษณะการเจริญของ WT และมิวแทนท์ค่อนข้างเหมือนกัน ไซแสดงลักษณะการเจริญของมิวแทนท์ ซึ่งมีความผิดปกติของเฮโมโสมิโทริคไฮโดรจีเนสทั้งฟอร์ม "H" และ "H" โดยไซหมายเลขสายพันธุ์ 16A เป็นตัวแทนซึ่งมีลักษณะคล้ายกัน พบว่า 16A มีลักษณะการเจริญที่ช้ากว่า WT (รูปที่ 9) เพียงแต่ต้องการเวลาปรับตัวที่นานกว่า ค่า lag period ของ WT ประมาณ 10 ชั่วโมง ส่วนของ 16A ประมาณ 22 ชั่วโมง ค่าการเจริญสูงสุด OD_{420nm} ของ WT และ 16A เท่ากับ 0.54 และ 0.48 หน่วยตามลำดับ เมื่อให้เชื้อทุกตัวเจริญในภาวะเดียวกัน เพียงแต่ไม่ให้แหล่งคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหาร ปรากฏว่าทั้ง WT และมิวแทนท์ไม่สามารถเจริญได้ (ตารางที่ 8)

6. การตรึงไนโตรเจนของฟอริมิคไฮโดรจีเนสมิวแทนท์

รูปที่ 10 เป็นการสรุปวิวัฒนาการของการเจริญในภาวะอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์แตกต่างกัน ของมิวแทนท์กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้ เทียบกับ WT ในรูปที่ 10a 10b และ 10c เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของ WT 10P และ 16A ตามลำดับ

อีกครั้งหนึ่งจะเห็นว่าสายพันธุ์ 10P และ 16A มีรูปแบบการเจริญในอาหารแต่ละชนิดสอดคล้องคล้ายกันหมด และทั้งสองสายพันธุ์ยังมีคุณสมบัติที่แตกต่างจาก WT คล้ายกันอีกด้วย

คุณสมบัติที่แตกต่างจาก WT สรุปได้ดังนี้คือ

1. ในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยไนเตรต ค่าการเจริญสูงสุดของ WT จะสูงกว่าของมิวแทนท์ทั้งสองสายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญ
2. ในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยไนเตรต และมีคลอเรต ค่าการเจริญสูงสุดของมิวแทนท์ทั้งสองสายพันธุ์จะเป็นปกติในขณะที่ WT เจริญเติบโตไม่ได้ รายละเอียดทดลองไวแล้วในผลการทดลองข้อ 2

คุณสมบัติที่เหมือนกับ WT ที่ศึกษาเพิ่มเติมก็คือมิวแทนท์ทั้งสอง สามารถเจริญได้ในอาหารสูตรปรับค่า ที่มีแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์เป็นไซเคียมไนไตรต์ (รูปที่ 10) เพียงแต่ให้การเจริญที่ช้ากว่า WT เล็กน้อย การเจริญโดยไซเคียมไนไตรต์เป็นแหล่งคาร์บอนไดออกไซด์มีลักษณะ

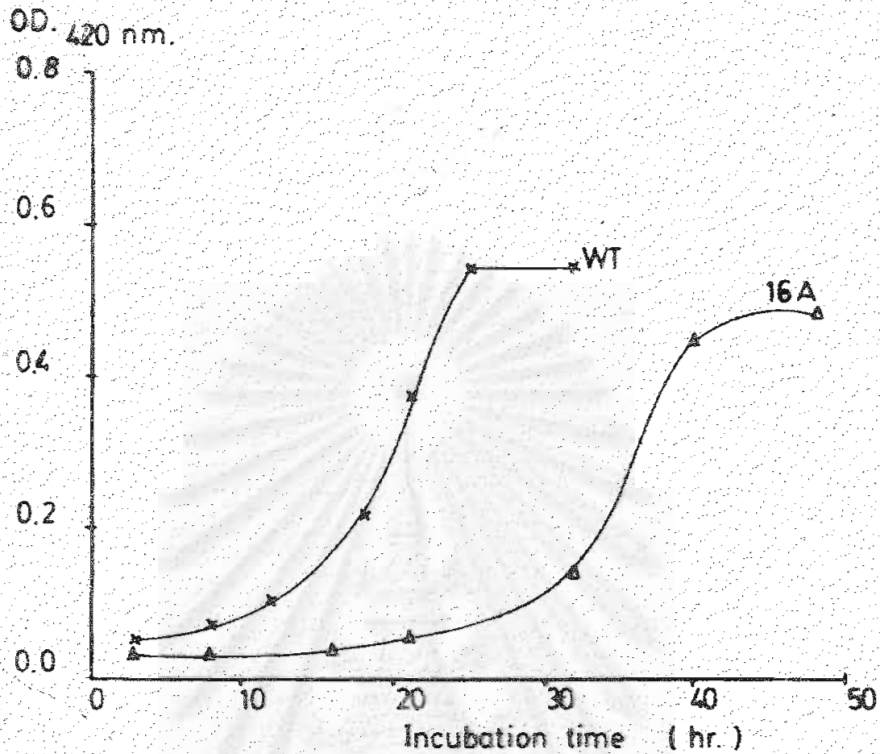
ตารางที่ 8 การเจริญของไวคโทพี และไมตาเคนท์ในอาหารที่มีพุ่มาเรค 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งต้นคอคาร์บอน และมีฟอร์เมต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในภาวะอาหารต่าง ๆ กัน ที่ 30 °ซ. ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน

สภาวะ การเจริญ สายพันธุ์	พุ่มาเรค 5% CO ₂	ฟอร์เมต พุ่มาเรค	ฟอร์เมต พุ่มาเรค 5% CO ₂	พุ่มาเรค ฟอร์เมต NaHCO ₃ 3.7 mM	การตรึงไนโตรเจน* ฟอร์เมต พุ่มาเรค 5% CO ₂
WT	-	-	+	-	-
16A	-	-	+	-	-
10F	-	-	+	-	-
24A	-	-	+	-	-
2F	-	-	+	-	-

* การเจริญเติบโตในอาหารที่ปราศจากต้นคอไนโตรเจน

การทดลองเป็นไปตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6.3

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 ลักษณะการเจริญของไวรัสและนิวเคลียส หมายเลข 16A ในอาหารสูตรปรับค่า ที่มีฟูมาเรต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งต้นกอกคาร์บอน และมีฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ในสภาพโคจรบรรยากาศของไนโตรเจน ซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 ที่ 30° ซ.

การทดลองเป็นไปตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6.3

x = Wild type (WT)

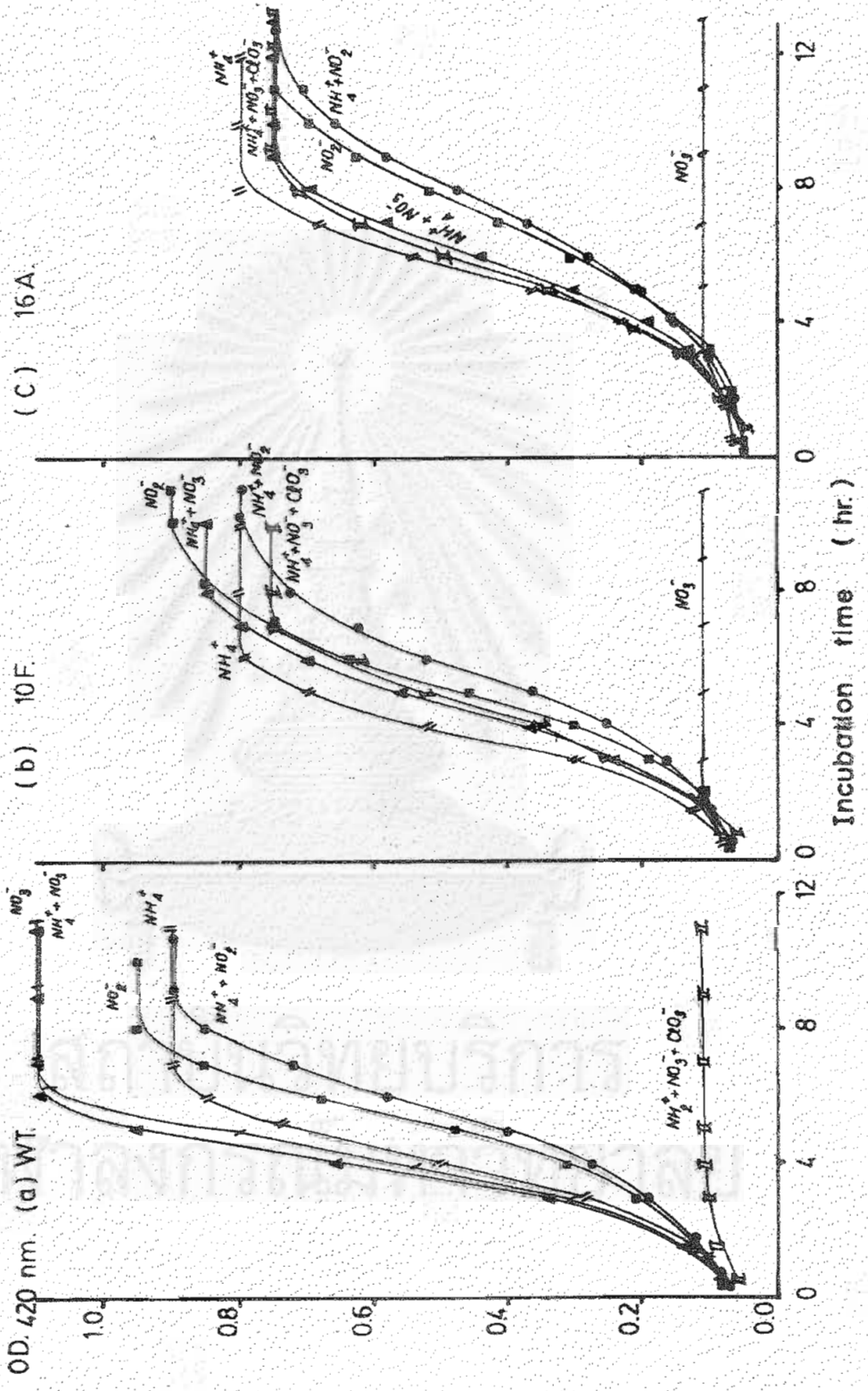
Δ = Mutant strain 16 A

รูปที่ 10 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญของไวรัลไทป์และนิวแกนท์หมายเลข 10F และ 16A ในอาหารสูตรปรับค่าที่มีกลูโคสจำกัด 10 มิลลิโมลาร์ และมีแหล่ง 탄소ไนโตรเจนต่างกัน สภาวะปราศจากออกซิเจนที่ 30 °ซ.

a) WF	b) 10F	c) 16A
ต้นคอไนโตรเจน		สัญญาณ
อัมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์.....		— — —
โปแตสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์.....		+ + +
โซเดียมไนไตรต์ 10 มิลลิโมลาร์.....		■ ■ ■
อัมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์.....		▲ ▲ ▲
และโปแตสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์		
อัมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์.....		● ● ●
และโซเดียมไนไตรต์ 10 มิลลิโมลาร์		
ผลกระทบของโปแตสเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์.....		— — —
ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนไนโตรเจนเป็นอัมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์ และโปแตสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์		

การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6.1

สถาบันวิจัยจุลินทรีย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



คล้ายอิมโมเนียมชนิดเพค แต่เวลาที่ไข่มุ่เชื้อจนถึง stationary phase ในไนโตรเจนต่ำกว่า ในอิมโมเนียม เล็กน้อย ส่วนการเจริญสูงสุดเมื่อมีไซเคียมไนโตรเจนเป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจน เพียงชนิดเดียวหรือเสริมด้วย อิมโมเนียมชนิดเพค เมื่อใช้กลูโคสจำกัด 10 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่าให้ค่าการเจริญสูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

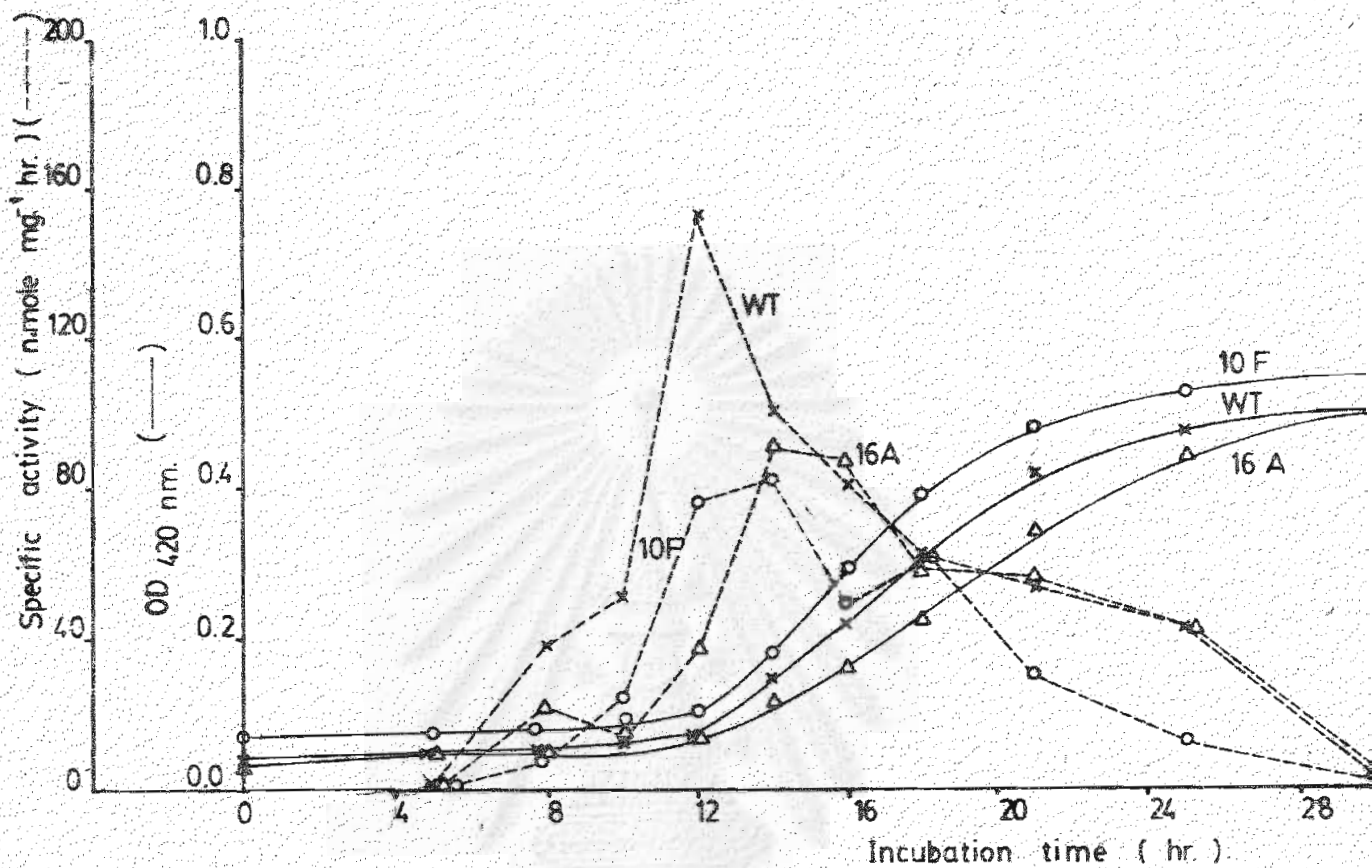
6.1 รูปแบบการตรึงไนโตรเจน

เนื่องจากมีวแทนท์ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถเจริญได้ในอาหารแข็ง และอาหารเหลวที่ปราศจากแหล่งต้นคอไนโตรเจน ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน จึงนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะการเจริญโดยแสดงเป็นค่าความสูงของเชื้อ กับแอกทิวิตีของอะเซทิลรีดักชันภายใต้สภาวะดังกล่าว

การทดลองทำตามวิธีทั่วไปในบทที่ 2 ข้อ 9 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 11 พบว่า ลักษณะการเจริญของทั้ง WT และมิวแทนท์หมายเลขสายพันธุ์ 10F และ 16A ภายใต้สภาวะดังกล่าว จะคล้ายคลึงกัน คือ มี lag period นานประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงมีการเจริญในระยะ log phase และถึง stationary phase ในเวลาประมาณ 30 ชั่วโมง ให้ค่าการเจริญสูงสุด โดย แสดงเป็นค่า OD_{420nm} สำหรับ WT, 10F และ 16A เท่ากับ 0.50, 0.55 และ 0.50 หน่วย ตามลำดับ รูปแบบของแอกทิวิตีอะเซทิลรีดักชันของ WT และมิวแทนท์ คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ จะเริ่มปรากฏแอกทิวิตีในช่วงกึ่งกลางของ lag period คือช่วงเวลาที่มีเชื้อได้ประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นจะมีแอกทิวิตีสูงขึ้น และสูงสุดในช่วง early log phase สำหรับ WT, 10F และ 16A เมื่อมีเชื้อนาน 12, 14 และ 14 ชั่วโมง ซึ่งแสดงค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 152, 82 และ 90 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นแอกทิวิตีจะต่ำลงที่ stationary phase

6.2 รูปแบบของการเกิดก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจน

เนื่องจากในสภาวะปราศจากออกซิเจน ภายใต้การเจริญปกติที่มี อิมโมเนียมเป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจนในเฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนสมิวแทนท์หมายเลขสายพันธุ์ 10F และ 16A นั้น ไม่ปรากฏก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้น ทั้งผลการทดลองที่ได้แสดงไว้แล้วในข้อ 2.2 และด้วยเหตุผลที่ว่า ใน *in vivo* เอนไซม์ไนโตรจีเนส สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนโปรตอนเป็นก๊าซไฮโดรเจนได้ จึงน่าสนใจว่าเฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนสมิวแทนท์ ซึ่งมีความผิดปกติของกระบวนการ



รูปที่ 11 ลักษณะการเจริญ และแอกติวิตีของอะเซทิลโคลีนเนส ของไวคิโอโท และมิวแทนท์ หมายเลข 10F และ 16A

การทดลองทำตามที่ได้ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9

x = Wild type (WT)

o = Mutant strain 10F

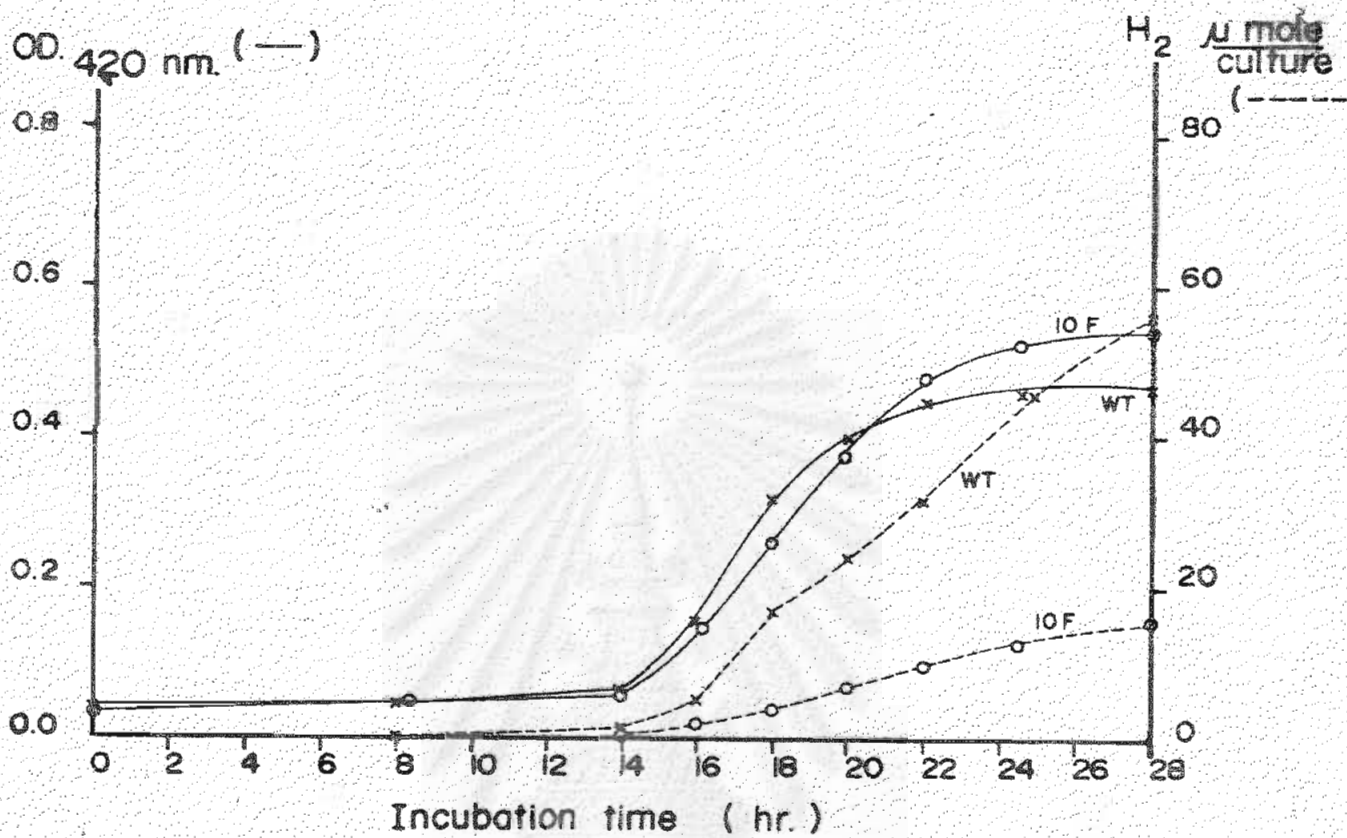
Δ = Mutant strain 16A

Hydrogenlyase จะเกิดก๊าซไฮโดรเจนภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจนหรือไม่ จากผลการทดลองในมิวแทนท์หมายเลขสายพันธุ์ 10F ซึ่งใช้เป็นตัวแทน (รูปที่ 12) ก็พบว่ามีการไฮโดรเจนเกิดขึ้นภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจน ลักษณะการเกิดก๊าซไฮโดรเจนเหมือน WT กล่าวคือ เริ่มปรากฏก๊าซตั้งแต่ early log phase และสูงขึ้นเรื่อยในระยะเวลา stationary phase แต่ปริมาณก๊าซที่เกิดใน 10F ต่ำกว่า WT มาก โดยที่ stationary phase เมื่อเวลา 28 ชั่วโมง วัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนใน WT และ 10F ได้เท่ากับ 56 และ 16 ไมโครโมลต่อลิตเจอร์ตามลำดับ ค่าการเจริญสูงสุด โดยแสดงเป็นค่า OD_{420nm} ของ WT และ 10F เท่ากับ 0.47 และ 0.54 หน่วย

6.3 ผลกระทบของอุณหภูมิในเครต, คลอเรต และไนโตรต์ในปริมาณสูงต่อการตรึงไนโตรเจน

เนื่องจากทั้ง 10F และ 16A มีสรีรสมติของการเจริญในอาหารต่าง ๆ คล้ายกันทุกประการ ดังนั้นจึงใช้ 10F เป็นตัวแทนของมิวแทนท์ในการศึกษาการตรึงไนโตรเจน

และเนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า การตรึงไนโตรเจนในอาหารที่มีไนเตรตจะเกิดขึ้นไม่ได้ (Tubb และ Postgate, 1973) ดังนั้น ปัจจัยแรกที่น่าสนใจศึกษา คือผลกระทบของการตรึงไนโตรเจนเมื่อเติมไนเตรตลงในอาหาร ใน 10F เมื่อเทียบกับ WT ตามผลการทดลองที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9 ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 13a ปรากฏว่าในอาหารที่เสริมด้วยโปแตสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ จะเจริญอย่างรวดเร็ว ใช้เวลาไม่ถึงจนถึง stationary phase เพียง 12 ชั่วโมง ค่าการเจริญสูงสุด OD_{420nm} เท่ากับ 1.2 หน่วย แต่ไมพบแอกทิวิตีอะเซทิลีนรีดักชันตลอดการเจริญ ตรงกันข้ามใน 10F มีการเจริญที่ช้าแต่พบแอกทิวิตีอะเซทิลีนรีดักชันตลอดการเจริญ กล่าวคือมี lag period นานประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นมีการเจริญในระยะ log phase และถึง stationary phase ในเวลาประมาณ 25 ชั่วโมง ให้ค่าการเจริญสูงสุด OD_{420nm} เท่ากับ 0.45 หน่วย รูปแบบของอะเซทิลีนรีดักชันของ 10F จะเริ่มปรากฏแอกทิวิตีในช่วงกึ่งกลางของ lag period คือช่วงเวลาที่เริ่มเชื้อได้ประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นจะมีแอกทิวิตีสูงขึ้นเรื่อย ๆ (ยกเว้นชั่วโมงที่ 14) และสูงสุดในช่วง log phase เมื่อเริ่มเขื่อนาน 21 ชั่วโมง ซึ่งแสดงค่าแอกทิวิตีจำเพาะ เท่ากับ 40 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง หลังจากนั้นแอกทิวิตีจะต่ำลงที่ stationary phase



รูปที่ 12 ลักษณะการเกิดก๊าซไฮโดรเจน ภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจนใน WT (x) และ 10F (o)

การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9 และ 7.2.2

x = Wild type (WT)

o = Mutant strain 10F

รูปที่ 13 ผลกระทบของขนาดไมโทคอนเดรีย, คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย ต่อแอกติวทีของเซทีลินรีดักชัน

ในไวรัลโพรท และไมโทคอนเดรีย หมายเลข 10F

- a) เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโปแตสเซียมไมโทคอนเดรีย 10 มิลลิโมลาร์
- b) เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโปแตสเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์
- c) เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโซเดียมไนไตรต์ 5 มิลลิโมลาร์

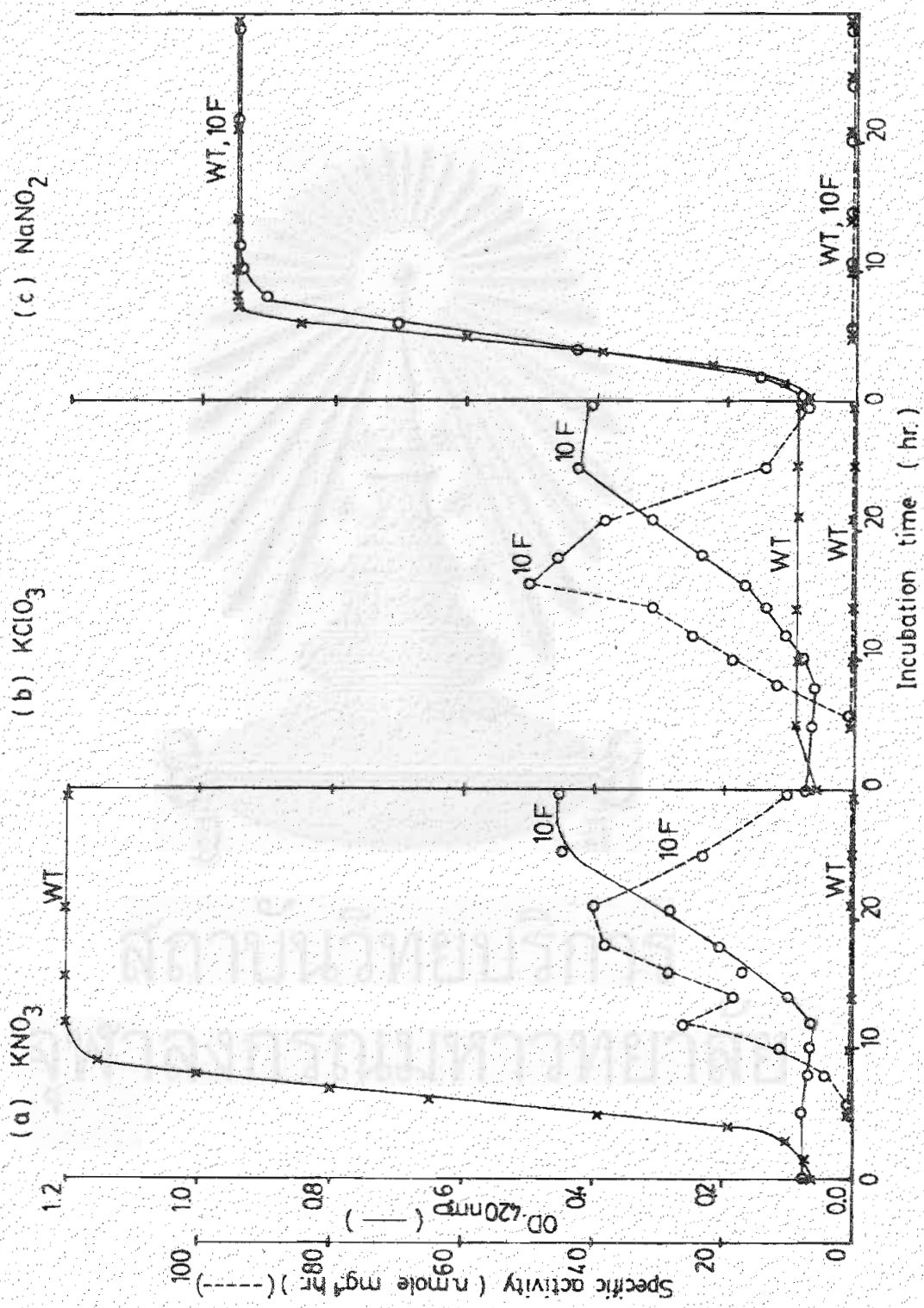
การทดลองทำตามวิธีระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9

x = Wild type (WT)

o = Mutant strain IOF

สถาบันวิจัยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13b แสดงผลกระทบของกลอเรียภายใต้สภาวะที่ปลดปล่อยการครึ่งไนโตรเจน การทดลองได้ทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9 ซึ่งในสภาวะนี้ WT จะเจริญได้ตามปกติหากไม่เติมกลอเรต (รูปที่ 11) แต่การทดลองครั้งนี้พบว่า WT ไรต์กลอเรตมากจึงไม่มีการเจริญแต่อย่างใด ซึ่งก็ทำให้ไมพบแอกติวิตีอะเซทีลีนรีกักชันไปท้าย ตรงกันข้ามกับสายพันธุ์ 10F พบว่า แม้จะมีไปแคสเติมบลอเรตสูงถึง 10 มิลลิโมลาร์ มันก็ยังเจริญได้ในสภาวะเช่นนี้ โดยมี lag peroid นานประมาณ 10 ชั่วโมง จากนั้นมีการเจริญในระยะ log phase และถึง stationary phase ในเวลาประมาณ 25 ชั่วโมง ให้ค่าการเจริญสูงสุด OD_{420nm} เท่ากับ 0.43 หน่วย รูปแบบของอะเซทีลีนรีกักชัน จะเริ่มปรากฏแอกติวิตีในช่วงกึ่งกลางของ lag peroid คือช่วงเวลาที่มีเชื้อได้ประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นจะมีแอกติวิตีสูงขึ้นและสูงสุดในช่วง log phase เมื่อมีเชื้อนาน 16 ชั่วโมง ซึ่งแสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 50 นาโนโมลต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง หลังจากนั้นแอกติวิตีจะต่ำลงที่ stationary phase

ไท้ทดลองเสริมโซเดียมไนไตรต์ 5 มิลลิโมลาร์ลงในอาหารตามการทดลองที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9 ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 13c พบว่า ทั้ง WT และ 10F มีการเจริญอย่างรวดเร็วเท่า ๆ กัน ใช้เวลานานขึ้นจนถึง stationary phase เพียง 7 ชั่วโมงสำหรับ WT และ 10 ชั่วโมงสำหรับ 10F โดยมีค่าการเจริญสูงสุดเท่ากันคือ OD_{420nm} เท่ากับ 0.95 หน่วย และไม่ปรากฏแอกติวิตีอะเซทีลีนรีกักชันแต่อย่างใดทั้งใน WT และ 10F

6.4 ผลกระทบของโซเดียมไนไตรต์ต่อการครึ่งไนโตรเจน

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 6.3 ได้แสดงว่าโซเดียมไนไตรต์ในปริมาณสูงเพียง 5 มิลลิโมลาร์ มีอับยั้งการครึ่งไนโตรเจนอย่างสมบูรณ์ใน 10F ซึ่งคล้ายกับ WT จึงน่าสนใจที่จะศึกษาผลกระทบของโซเดียมไนไตรต์ในปริมาณที่ต่ำกว่า ๆ กันคือ 5, 2, 1 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ต่อการครึ่งไนโตรเจน โดยใช้ 10F เป็นตัวแบบ การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9 และผลการทดลองแสดงในรูปที่ 14 กล่าวคือ

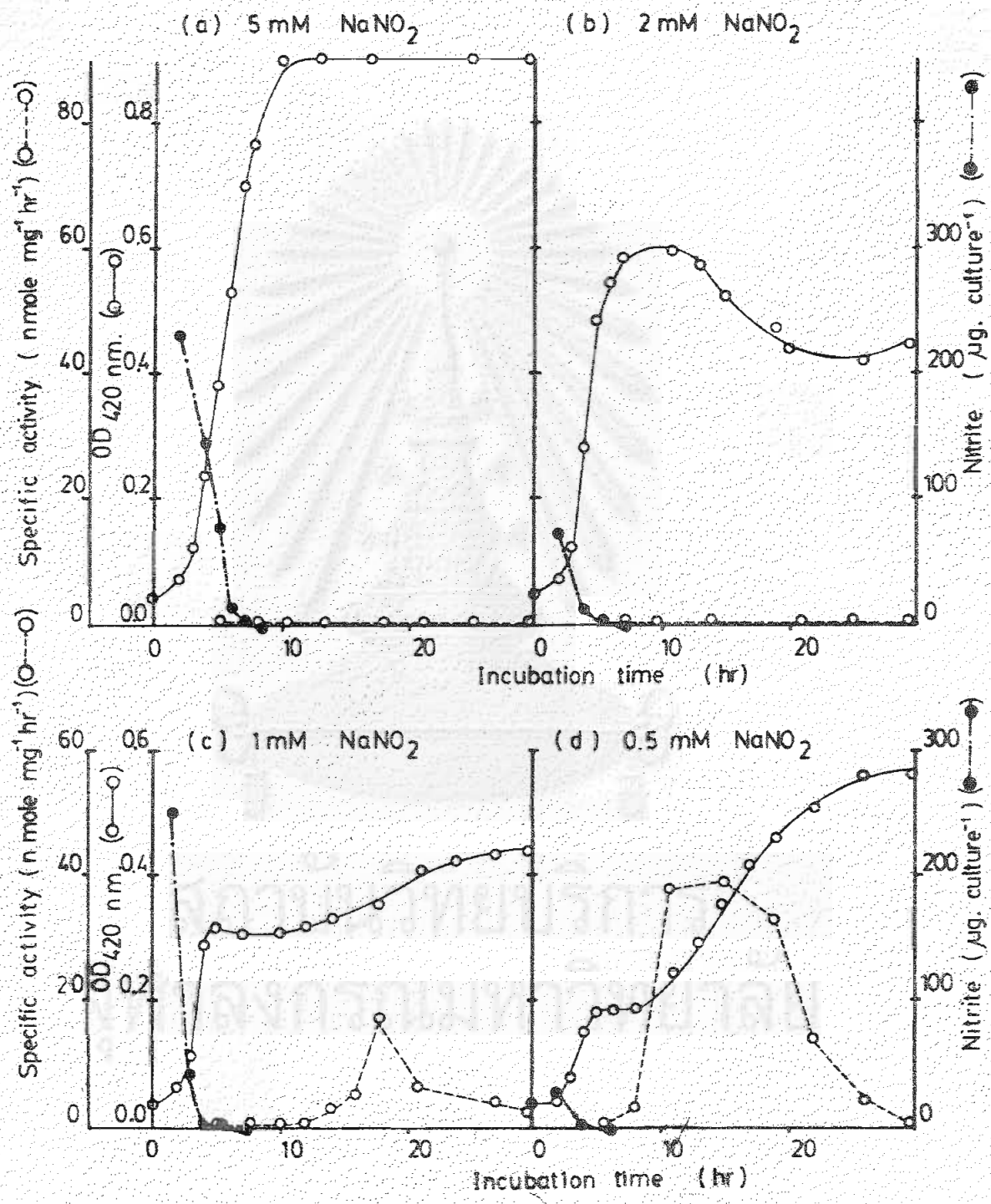
ในรูป 14a แสดงผลกระทบของโซเดียมไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พบว่า จะมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ใช้เวลานานขึ้นจนถึง stationary phase เพียง 10 ชั่วโมง ค่าการเจริญสูงสุด OD_{420nm} เท่ากับ 0.90 หน่วย และคงที่ตลอดจนถึงชั่วโมง

รูปที่ 14 ผลกระทบของโซเดียมไนไตรต์ต่อแอกทีวิตีอะเซทีลีนรีกชันในนิวเคลียสหมายเลข 10F

- a) เมื่อมีในสถานะที่มีโซเดียมไนไตรต์ 5 มิลลิโมลาร์
- b) เมื่อมีในสถานะที่มีโซเดียมไนไตรต์ 2 มิลลิโมลาร์
- c) เมื่อมีในสถานะที่มีโซเดียมไนไตรต์ 1 มิลลิโมลาร์
- d) เมื่อมีในสถานะที่มีโซเดียมไนไตรต์ 0.5 มิลลิโมลาร์

การทดลองเป็นไปตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อที่ 9

สถาบันวิจัยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ที่ 30 ในช่วงที่ 10F มีการเจริญ จะมีการใช้โซเดียมไนไตรต์ โดยพบว่าปริมาณไนไตรต์ในอาหารลดลงเรื่อย ๆ จนหมดในชั่วโมงที่ 8 ตลอดระยะเวลาที่เนื้อจะไม่ปรากฏแอกติวิตีของอะเชทีลมีรีคักชันแต่อย่างใด

รูปที่ 14b แสดงผลกระทบบของโซเดียมไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ พบว่า 10F จะมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ใช้เวลาเนื้อถึง stationary phase เพียง 7 ชั่วโมง ค่าการเจริญสูงสุด OD_{420nm} เท่ากับ 0.59 หน่วย หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 13 ความขุ่นของเนื้อจะลดลงเล็กน้อย จนถึงชั่วโมงที่ 30 OD_{420nm} มีค่าประมาณ 0.42 หน่วย และพบว่าปริมาณไนไตรต์ในอาหารลดลงเรื่อย ๆ จนหมดในชั่วโมงที่ 7 ตลอดระยะเวลาที่เนื้อจะไม่ปรากฏแอกติวิตีของอะเชทีลมีรีคักชันอีก เช่นเดิม

รูปที่ 14c แสดงผลกระทบบของโซเดียมไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ช่วงแรกของการเจริญ 10F จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วเช่นเดิม จนถึงชั่วโมงที่ 5 ซึ่งให้ค่า OD_{420nm} เท่ากับ 0.32 หน่วย ค่าความขุ่นจะคงที่อยู่ที่ระดับหนึ่ง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 ความขุ่นจึงเริ่มเพิ่มขึ้นอีกอย่างช้า ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 30 ให้ค่า OD_{420nm} เท่ากับ 0.44 หน่วย การเจริญของ 10F อย่างรวดเร็วในช่วงแรกพบว่าปริมาณโซเดียมไนไตรต์ในอาหารลดลงจนหมดในชั่วโมงที่ 6 หลังจากโซเดียมไนไตรต์หมดไปประมาณ 6 ชั่วโมง ก็ปรากฏแอกติวิตีของอะเชทีลมีรีคักชัน และสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดเมื่อเนื้อเนื้อนาน 18 ชั่วโมง ซึ่งแสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 17 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง หลังจากเนื้อจะลดค่าลักษณะการเจริญและแอกติวิตีของอะเชทีลมีรีคักชันที่ปรากฏในช่วงหลังของการเจริญนี้ มีลักษณะคล้ายกับที่ปรากฏในคลเจอร์ซึ่งปราศจากไนไตรต์ในสภาพปลอดปล่อย การลดกระทบบของโซเดียมไนไตรต์ (รูปที่ 11)

และในรูปที่ 14d แสดงผลกระทบบของโซเดียมไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ช่วงแรกของการเจริญ จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วเช่นเดิม จนถึงชั่วโมงที่ 5 ซึ่งให้ค่า OD_{420nm} เท่ากับ 0.18 หน่วย ค่าความขุ่นจะคงที่อยู่ที่ระดับหนึ่ง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 8 ความขุ่นจึงเริ่มเพิ่มขึ้นอีก อย่างช้า ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 30 ให้ค่า OD_{420nm} เท่ากับ 0.56 หน่วย การเจริญของ 10F อย่างรวดเร็วในช่วงแรก พบว่าปริมาณโซเดียมไนไตรต์ในอาหารลดลง จนหมดในชั่วโมงที่ 4 หลังจากโซเดียมไนไตรต์หมดไปเพียง 1 ชั่วโมง ก็เริ่ม

ปรากฏแอกติวิตีของอะเซทีลสเตรกซ์ และสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุด เมื่อเมเชื่อนาน 15 ชั่วโมง ซึ่งแสดงค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 39 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง หลังจากนั้นจะลดต่ำลง ลักษณะการเจริญและแอกติวิตีของอะเซทีลสเตรกซ์ที่ปรากฏในช่วงหลังของการเจริญมีลักษณะคล้ายกับที่ปรากฏในคลอเรลซึ่งปราศจากไนโตรเจนในสภาพปลอดปล่อย การดอกระหัสเฮโมไนโตรจีเนส (รูปที่ 11)

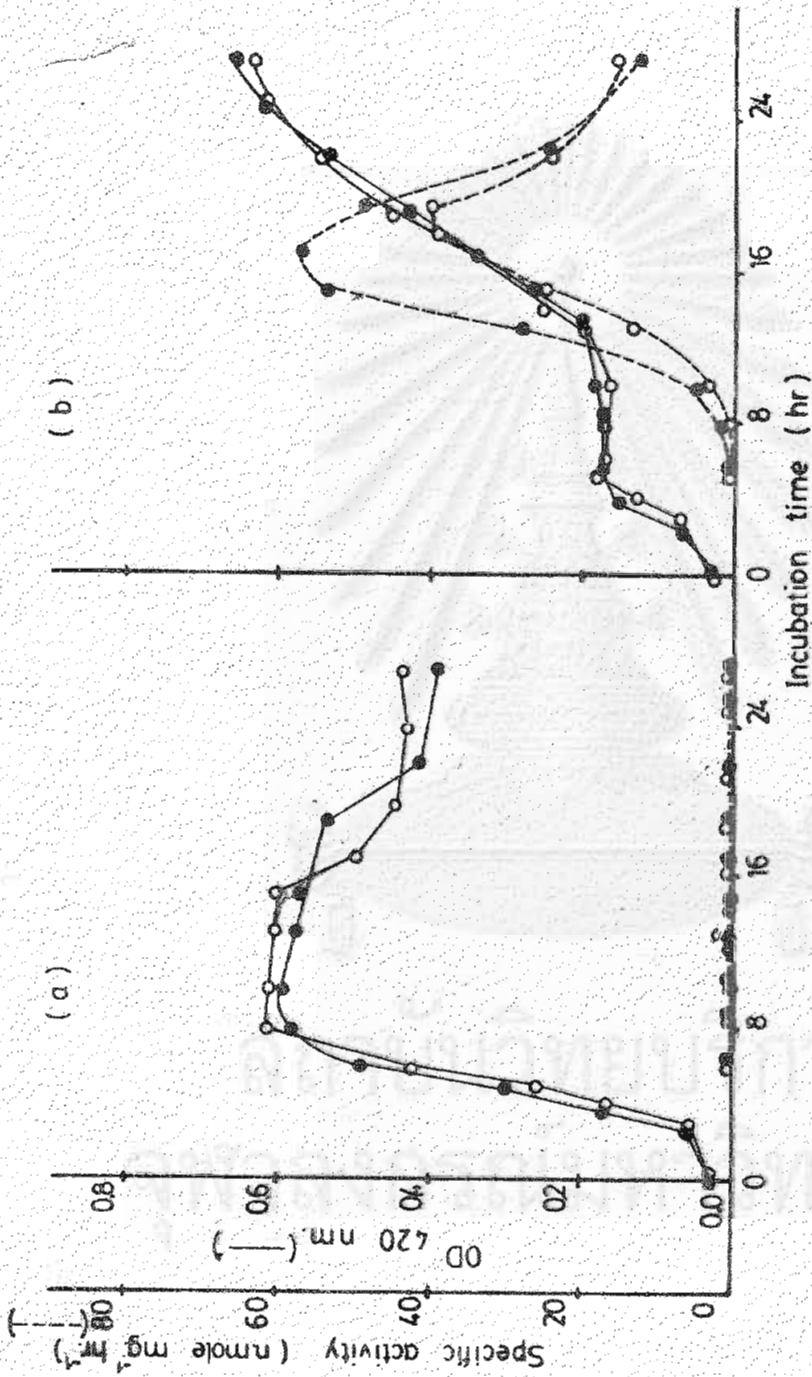
6.5 ผลกระทบของโซเดียมไนไตรต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ อัมโมเนียมซัลเฟตใน ปริมาณที่เท่ากันต่อการตรึงไนโตรเจน

ทราบกันดีแล้วว่า อัมโมเนียมซัลเฟตปริมาณสูง ๆ คือที่ความเข้มข้นประมาณ 0.45 มิลลิโมลาร์จะกีดกันการดอกระหัสไนโตรเจนของการสร้างเฮโมไนโตรจีเนสได้ (Parejko และ Wilson, 1970) จากเหตุผลที่ไม่สามารถตรวจพบ แอกติวิตีของอะเซทีลสเตรกซ์ ได้ที่ความเข้มข้นของ อัมโมเนียมซัลเฟตดังกล่าว ต่อเมื่อโซเดียมไนไตรต์ลดลงจากจุดวิกฤตนี้จึงสามารถตรวจพบแอกติวิตีของอะเซทีลสเตรกซ์ได้

จากผลการทดลองที่ผ่านมาจึงทำให้นักคิดว่า อนุมูลไนไตรต์ จะให้ผลกระทบต่อการตรึงไนโตรเจนในลักษณะเดียวกับอนุมูล อัมโมเนียม จึงได้เปรียบเทียบผลกระทบของโซเดียมไนไตรต์และ อัมโมเนียมซัลเฟต ต่อการตรึงไนโตรเจนใน 10F

ได้เลือกโซเดียมไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 2.0 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ และ อัมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1.0 และ 0.25 มิลลิโมลาร์ การทดลองทำตามวิธีระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9 ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 15

รูปที่ 15a แสดงผลกระทบของโซเดียมไนไตรต์ 2.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งให้ค่าการสะสมของไนโตรเจนเท่ากับ อัมโมเนียมซัลเฟต 1.0 มิลลิโมลาร์ 10F มีการเจริญอย่างรวดเร็วทั้งในอาหารที่เสริมด้วยโซเดียมไนไตรต์และ อัมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งมีลักษณะการเจริญคล้ายกันมาก เวลาที่ข้ามเข้าสู่ stationary phase เท่า ๆ กันคือประมาณ 8 - 10 ชั่วโมง และให้ค่าการเจริญสูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ สำหรับโซเดียมไนไตรต์ OD_{420nm} เท่ากับ 0.61 หน่วย และสำหรับ อัมโมเนียมซัลเฟต OD_{420nm} เท่ากับ 0.59 หน่วย ลักษณะของการเจริญเช่นนี้เหมือนกับผลการเจริญของเชื้อในอาหารสูตรปรับค่า



รูปที่ 15 เปรียบเทียบผลการทดลองของ NaNO_2 (○—○) และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (●—●) ในปริมาณที่ต่างกันต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลอง

แกนพหุคูณเลข 10X

- ๑) เมื่อเติมเชื้อในสภาวะที่มี NaNO_2 2 มิลลิโมลาร์ (○—○) และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 มิลลิโมลาร์ (●—●)
- ๒) เมื่อเติมเชื้อในสภาวะที่มี NaNO_2 0.5 มิลลิโมลาร์ (○—○) และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 มิลลิโมลาร์ (●—●)

การทดลองเป็นไปตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9

กึ่งแสงไว้ในรูปที่ 10b แต่ต่างกันที่ว่าภายหลังจากที่ความสูงของเข็ชองที่อยู่ระยะหนึ่งคือประมาณ 6 ชั่วโมง ความสูงของเข็ชองจะลดลง ตลอดระยะเวลาที่เม็ชองไม่ปรากฏแอกติวิตีของอะเซทีลีนรีกักชันแต่อย่างใด

รูปที่ 15b แสดงผลกระทบทของไซเคียมไนไตรต์ 0.5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งให้ค่ากับสมมุติของไนโตรเจนเท่ากับ อัมโมเนียมซัลเฟต 0.25 มิลลิโมลาร์ ช่วงแรกของการเจริญ 10F จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วทั้งในอาหารที่เสริมด้วยไซเคียมไนไตรต์และอัมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งมีลักษณะการเจริญคล้ายกันมาก จนถึงประมาณชั่วโมงที่ 5 - 6 ซึ่งให้ค่า OD_{420nm} เท่ากับ 0.18 หน่วยสำหรับไซเคียมไนไตรต์และเท่ากับ 0.17 หน่วยสำหรับอัมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นค่าความสูงจะทรงตัวอยู่ระยะหนึ่ง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 13 ความสูงจึงเริ่มเพิ่มขึ้นอีกอย่างช้า ๆ หรือม ๆ กันทั้งในอาหารที่เสริมด้วยไซเคียมไนไตรต์และ อัมโมเนียมซัลเฟต จนถึงชั่วโมงที่ 28 ให้ค่า OD_{420nm} เท่ากับ 0.64 หน่วย สำหรับไซเคียมไนไตรต์และ 0.66 หน่วย สำหรับ อัมโมเนียมซัลเฟต เริ่มปรากฏแอกติวิตีของอะเซทีลีนรีกักชัน ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 และสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุด สำหรับไซเคียมไนไตรต์เมื่อเม็ชองนาน 19 ชั่วโมง มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 40 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง และสำหรับอัมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเม็ชองนาน 17 ชั่วโมง มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 57 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ แสดงว่า ไซเคียมไนไตรต์ให้ผลกระทบทต่อการลดกันการถอดรหัสยีนไนโตรจีเนสได้เช่นเดียวกับ อัมโมเนียมซัลเฟต แต่กลไกการลดกันอาจจะแตกต่างกันเล็กน้อย

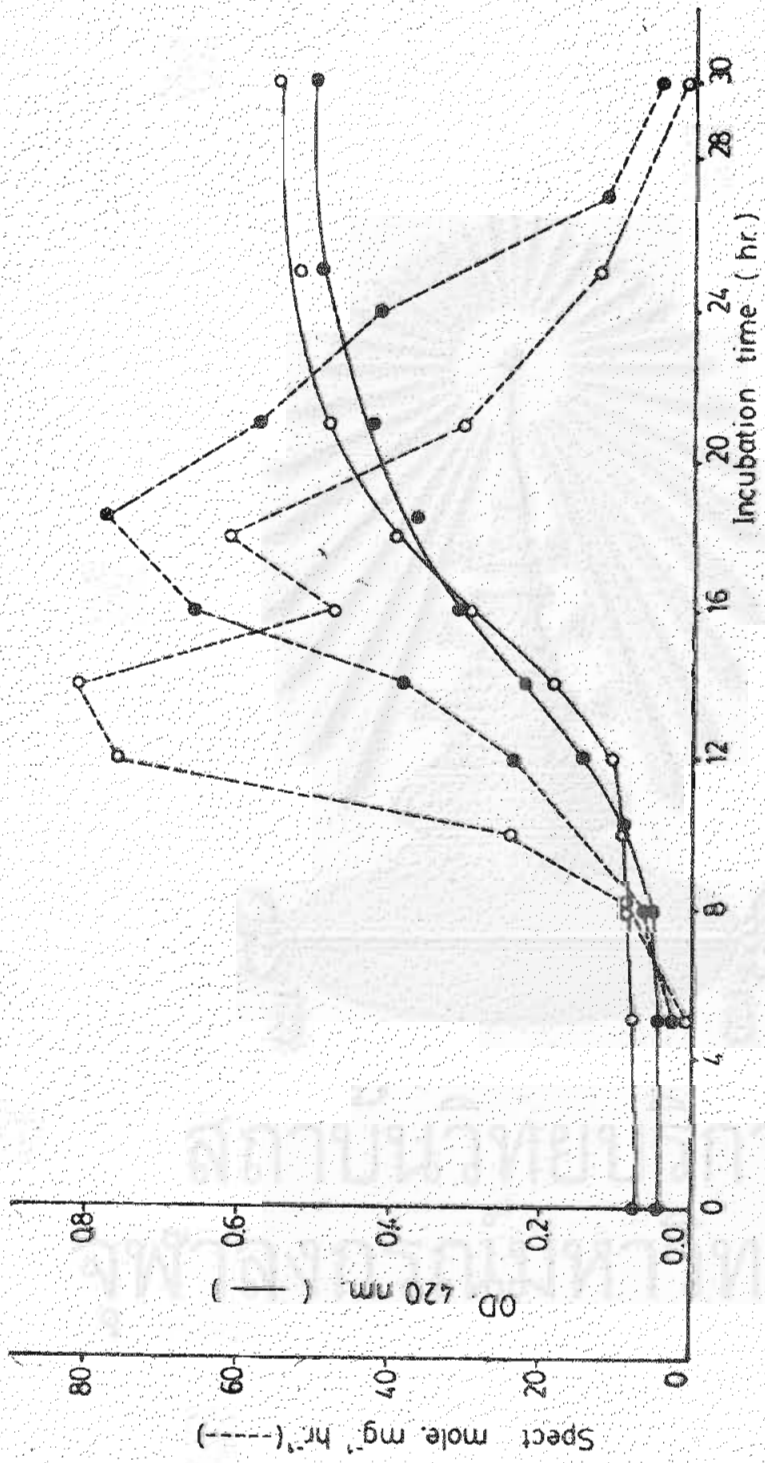
6.6 ผลกระทบทของแมนนิทอล เมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคส ต่อการตรึงไนโตรเจน

เนื่องจากแมนนิทอล (sugar alcohol) เป็นน้ำตาลที่มีหมู่รีดิวซ์ปริมาณสูงกว่ากลูโคส (sugar aldehyde) อยู่หนึ่งหมู่ แบคทีเรียไซแมนนิทอลเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ โดยเปลี่ยนหมู่แอลกอฮอล์เป็นแอลดีไฮด์ เพื่อเปลี่ยนแมนนิทอล - 6 - ฟอสเฟตให้เป็นฟรุกโตส - 6 - ฟอสเฟต (Mahler และ Cordes, 1971) จึงน่าสนใจว่า พอร์นิคิไฮโดรจีเนส-นิวแกนท์ ซึ่งมีความนิคปคิตีที่ตัวให้อิเล็กตรอน จะมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน แตกต่างกันหรือไม่ระหว่างการไซแมนนิทอลกับกลูโคส การทดลองหาคำถามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 16 และ 17

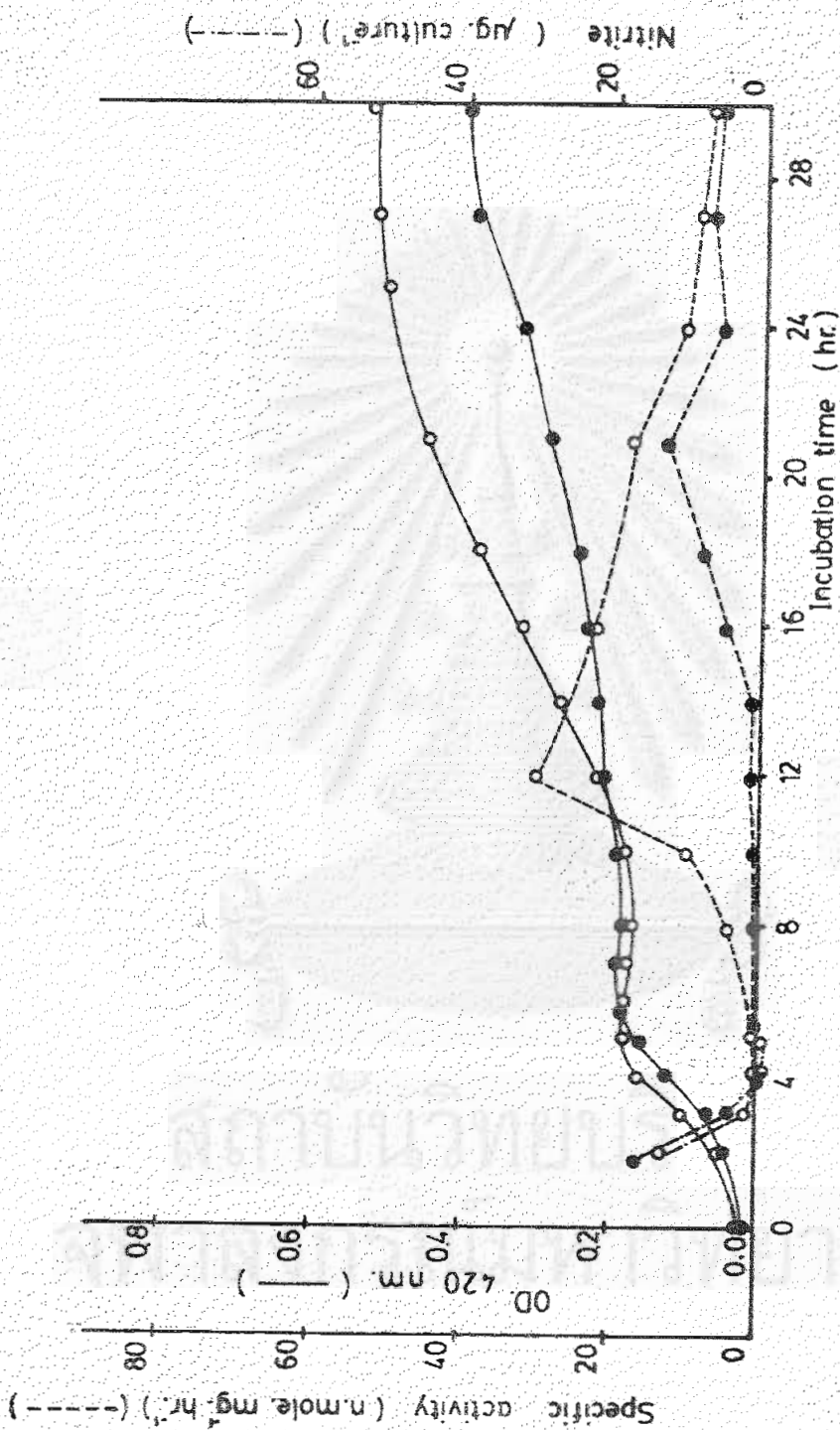
รูปที่ 16 จากการศึกษาการเจริญในโครโมโซมในแมงกิ้งก่า เปรียบเทียบกับกลูโคสในปริมาณที่เท่ากัน พบว่าลักษณะการเจริญในแมงกิ้งก่า และกลูโคสมี lag period นานเท่า ๆ กันคือประมาณ 10 - 12 ชั่วโมง มีการเจริญในช่วง log phase คล้ายคลึงกัน และเจริญถึง stationary phase ในเวลาประมาณ 30 ชั่วโมง ให้ค่าการเจริญสูงสุด โดยแสดงเป็นค่า OD_{420nm} สำหรับแมงกิ้งก่าและกลูโคสเท่ากับ 0.50 และ 0.55 หน่วยตามลำดับ

รูปแบบของแอกติวิตีของอะเซทิลโคเอ็นไซม์ต่างกันเล็กน้อย เริ่มปรากฏแอกติวิตีในเวลาใกล้เคียงกันคือในช่วงกึ่งกลางของ lag period คือช่วงเวลาที่เริ่มเข้าได้นานประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นจะมีแอกติวิตีสูงขึ้น และสูงสุดในช่วง early log phase ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับแมงกิ้งก่า เมื่อเริ่มเขื่อนาน 18 ชั่วโมง มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 78 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง และสำหรับกลูโคสเมื่อเริ่มเขื่อนาน 12 ชั่วโมง มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 82 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง จากนั้นแอกติวิตีจะต่ำลงที่ stationary phase

รูปที่ 17 แสดงผลกระทบบของโซเดียมไนไตรต์ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ต่อการเจริญในโครโมโซม เปรียบเทียบระหว่างการใช้แมงกิ้งก่า และกลูโคสเป็นแหล่งกักคาร์บอน พบว่าในช่วงแรกของการเจริญ 10 ชั่วโมงมีการเจริญอย่างรวดเร็ว กรณีแมงกิ้งก่า เมื่อเจริญถึงชั่วโมงที่ 7 ซึ่งให้ค่า OD_{420nm} เท่ากับ 0.19 ค่าความขุ่นจะคงที่อยู่ที่ระยะหนึ่ง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 ความขุ่นจึงเริ่มเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 30 ให้ค่า OD_{420nm} เท่ากับ 0.40 หน่วย และในกรณีของกลูโคส เมื่อเจริญถึงชั่วโมงที่ 5 ซึ่งให้ค่า OD_{420nm} เท่ากับ 0.18 ค่าความขุ่นจะคงที่อยู่ที่ระยะหนึ่ง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 ความขุ่นจึงเริ่มเพิ่มขึ้น จนถึงชั่วโมงที่ 30 ให้ค่า OD_{420nm} เท่ากับ 0.53 หน่วย การเจริญของ 10F อย่างรวดเร็วในช่วงแรก พบว่าปริมาณโซเดียมไนไตรต์ในอาหารลดลง จนหมดประมาณชั่วโมงที่ 4 - 5 พร้อม ๆ กันทั้งในแมงกิ้งก่าและกลูโคส รูปแบบแอกติวิตีค่อนข้างต่างกัน สำหรับแมงกิ้งก่า จะเริ่มปรากฏแอกติวิตีของอะเซทิลโคเอ็นไซม์หลังจากโซเดียมไนไตรต์หมดไปประมาณ 4 ชั่วโมง และสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดเมื่อเริ่มเขื่อนาน 21 ชั่วโมง มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 13 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง หลังจากนั้นจะลดต่ำลง และสำหรับกลูโคส จะเริ่มปรากฏแอกติวิตีของอะเซทิลโคเอ็นไซม์หลังจากโซเดียมไนไตรต์หมดไปเพียงชั่วโมงเดียว และจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดเมื่อเริ่มเขื่อนาน 12 ชั่วโมง มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 30 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมต่อชั่วโมง หลังจากนั้นก็จะต่ำลง



รูปที่ 16 ผลกระทบของแอมโมเนีย 25 มิลลิโมลาร์ (●) และกลูโคส 25 มิลลิโมลาร์ (○) ต่อการทิ้งไนโตรเจนใน 10 F การทดลองทำสามครั้งซ้ำไว้แบบที่ 2 ข้อที่ 9



รูปที่ 17 ผลกระทบของไซเทียมไนไตรต์ 0.5 มิลลิโมลาร์ ต่อการสังเคราะห์โปรตีนในหัวตะกอนหมายเลข 10F เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอน จากกลูโคส 25 มิลลิโมลาร์ (○) เป็น แมนนิทอล 25 มิลลิโมลาร์ (●)

การทดลองนี้เป็นไปตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อที่ 9

จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วข้างต้น 10P มีการเจริญในกลูโคสที่ต่ำกว่าแมนนิทอล และโดยเฉพาะการเจริญภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจน ซึ่งเห็นได้ชัดในการทดลองที่ผลผลิต กระเพาะของไซเคียมไนโตรต 0.5 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่าแมนนิทอลมีการตรึงไนโตรเจนที่ต่ำกว่ากลูโคส

6.7 เปรียบเทียบปริมาณของสารต้นตอไนโตรเจนที่ปลดปล่อยการถดถอยของ เอนไซม์ไนโตรจีเนส

ตารางที่ 9 ได้สรุปผลกระทบบนของสารต้นตอไนโตรเจน ต่อการปลดปล่อย การถดถอยของเอนไซม์ไนโตรจีเนส ซึ่งได้จากการใช้ 10P เป็นต้นแบบในการศึกษา จะเห็น ได้ว่า ในกรณีที่ได้มีผลโดยตรงต่อการปลดปล่อยการถดถอยของเอนไซม์ตัวนี้แต่อย่างใด ทั้งนี้เพราะว่า แม้ในอาหารที่เสริมด้วยไปแคสซีมไนเตรตถึง 10 มิลลิโมลาร์ การตรึงไน- ไโตรเจนใน 10P ก็คงเป็นไปได้ตามปกติ

สำหรับไซเคียมไนโตรต 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีจำนวนกรัมสมมูลของไนโตรเจน เท่ากับ อัมโมเนียมซัลเฟต 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นปริมาณที่ไม่ส่งผลกระทบต่อการถดถอยของ เอนไซม์ตัวนี้ ถ้าปริมาณสูงกว่านี้ ผลกระทบจึงจะเห็นชัดขึ้น

7. การศึกษามิวแทนท์กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนไม่ได้

7.1 รูปแบบของการตรึงไนโตรเจน

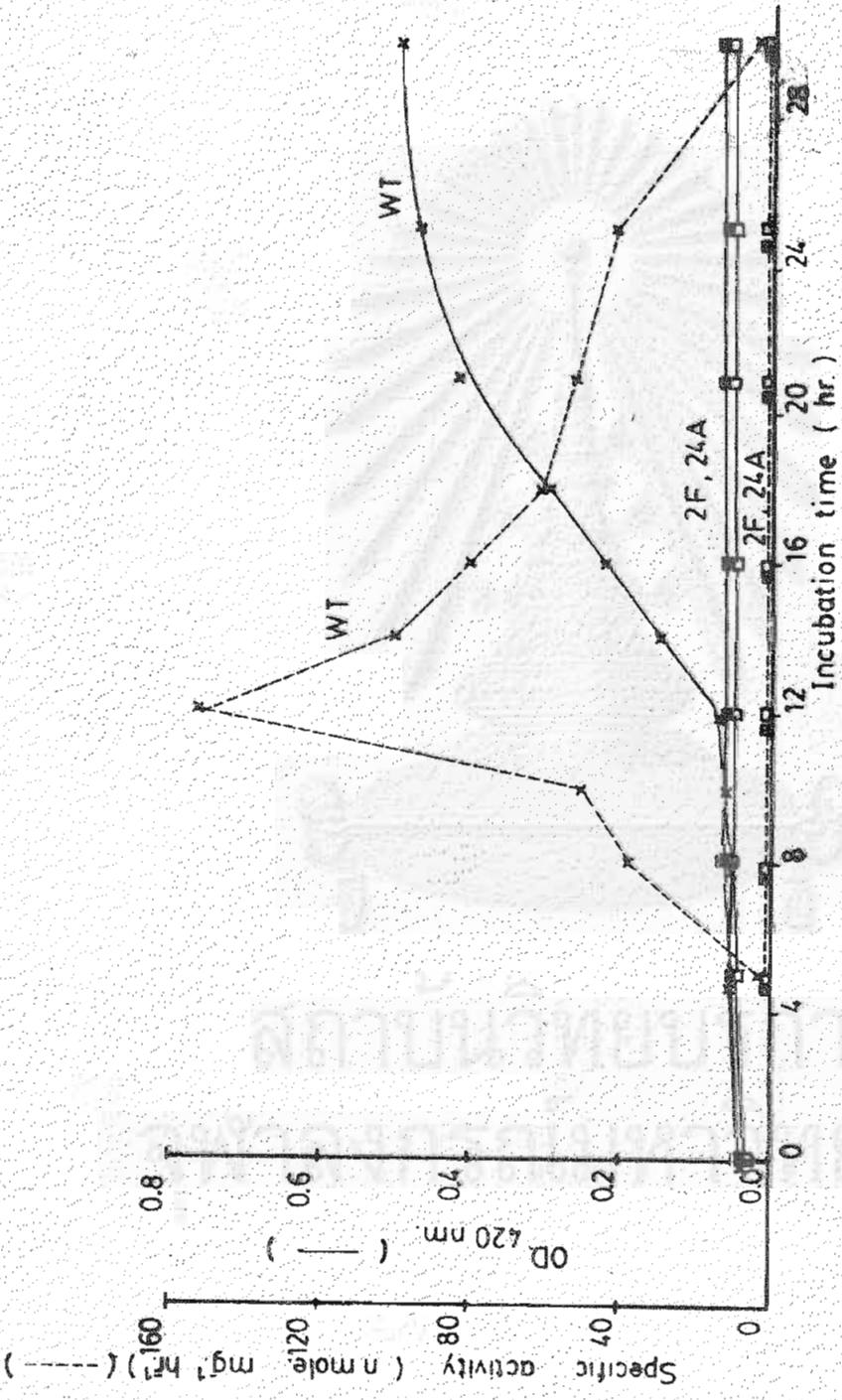
จากการศึกษาลักษณะการเจริญและแอกทิวิตีของอะเชทีลีนีตักซ์ชันตามการทดลอง ที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 9 พบว่า (รูปที่ 18) ในขณะที่ 5P สามารถตรึงไนโตรเจนได้ มีรูปแบบของการเจริญดังกล่าวแล้วในข้อ 6.1 แต่ปรากฏว่ามีแอกทิวิตีที่ 2P และ 24A ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะการตรึงไนโตรเจน และด้วยสาเหตุที่ไม่สามารถหาค่า Reversion frequency ได้ จึงทำให้ข้อทดลองเคลื่อนเป็น การตรึงไนโตรเจนอีกชุดหนึ่ง เข้าไปใน มิวแทนท์ทั้งสองสายพันธุ์นี้ เพื่อทดสอบว่า ถ้าคุณสมบัติของการตรึงไนโตรเจนกลับคืนมาแล้ว สรีรสมบัติต่าง ๆ ที่แสดงเป็นฟีโนไทป์ของฟอร์มิคัสไฮโดรจีเนสมิวแทนท์จะแตกต่างกันหรือไม่

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณของแหล่งต้นตอไนโตรเจนที่ปลดปล่อยการปลดปล่อยของเฮนไซม์ไนโตรจีเนสในมิแทนท์หมายเลข 10F

แหล่งต้นตอไนโตรเจน	ปริมาณ มิลลิโมลาร์	การเจริญ (1)	อะเซทีลีน (2) วิกฤต	การเจริญภายใต้ (3) อะเซทีลีนวิกฤต
KNO ₃	1.00	-	+	+
	10.00	-	+	+
NaNO ₂	0.50	+	+	+
	1.00	+	+	+
	2.00	+	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.25	+	+	+
	0.50	+	+	+
	1.00	+	-	-

- (1) การเจริญ หมายถึงความสามารถของเชื้อในการเจริญในอาหารสูตรปรับค่าที่มีแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณที่กำหนด
- (2) อะเซทีลีนวิกฤต คือ ค่าแอกติวิตีของการวิฤตอะเซทีลีน ที่พบในคัลเจอร์ ซึ่งมีการเจริญของเชื้อในอาหารที่สอดคล้องกับ 1
- (3) การเจริญภายใต้อะเซทีลีนวิกฤต หมายถึงเส้นโค้งการเจริญที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์กับอะเซทีลีนวิกฤต เหมือนกับการเจริญที่สภาวะที่ปราศจากแหล่งต้นตอไนโตรเจน การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในข้อ 9 โดยเติมแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณที่กำหนด

การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อที่ 9



รูปที่ 18 ลักษณะการเจริญและแอกติวิตีของอะเซทิลโคกซิมในไวต์ไทป์ และมิวแทนท์ หมายเลข 24A และ 2F

การทดลองเป็นไปตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ของ 9

- x = Wild type (WT)
- = Mutant strain 24A
- ⊠ = Mutant strain 2F

7.2 การผสมพันธุ์ระหว่าง *Escherichia coli* K12 JC 5466 (RP41)

กับพอร์มิคทีไฮโดรจีเนสมีวแกนทหมายเลข 2F และ 24A

โดยอาศัยคุณสมบัติที่ต่างกันของแบคทีเรียตัวให้ และตัวรับ ผสมพันธุ์โดยวิธีคอนจูเกชันแบบที่เรียกว่าให้คือ *Escherichia coli* K12 JC5466(RP41) ที่โครโมโซมมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอแทนออกไซโทป ส่วนพลาสมิด RP41 มีถิ่นที่อยู่มากานานัมยีนแอมพิซิซิลลิน และเตตราซัยคลิน รวมทั้งยีนการตรึงไนโตรเจนเชื่อมติดอยู่กับแบคทีเรียตัวรับคือไวคโท และพอร์มิคทีไฮโดรจีเนสมีวแกนทหมายเลขสายพันธุ์ 2F และ 24A ของ *Klebsiella pneumoniae* M5a1 เมื่อผสมพันธุ์ข้ามชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีคอนจูเกชัน แล้วคัดเลือกคอนจูแกนต์ในอาหารสูตรปรับค่าที่มียาปฏิชีวนะทั้งสามชนิด โคคอนจูแกนต์เกิดขึ้นด้วยความถี่ประมาณ $2 - 9 \times 10^{-7}$ ต่อแบคทีเรียตัวรับหนึ่งตัว คอนจูแกนต์สามารถเจริญได้ในอาหารคิงกธาร์ ในขณะที่ *Escherichia coli* K12 JC5466 (RP41) WT และมีวแกนต์สายพันธุ์เดิมคือหมายเลข 2F และ 24A เจริญไม่ได้ แสดงว่ายีนที่ถ่ายทอดเคลื่อนเข้ามาอยู่ใน WT 2F และ 24A ได้ หลังจากนั้นโคสุมตัวอย่างประมาณร้อยละ 10 มาทดสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจน โดยให้คอนจูแกนต์เจริญในอาหารสูตรปรับค่าที่ปราศจากแหล่งต้นตอไนโตรเจน ปรากฏว่าคอนจูแกนต์ทุกตัวที่ทดสอบสามารถเจริญได้ ซึ่งแสดงว่า ยีนการตรึงไนโตรเจนได้เคลื่อนเข้ามาอยู่ใน WT 2F และ 24A พร้อมกับยีนที่ถ่ายทอดเข้ามาจากนั้นโคสุมตัวอย่างคอนจูแกนต์ชนิดละ 2 ตัวมาศึกษาคุณสมบัติต่อไป โดยให้ชื่อตามหมายเลขของสายพันธุ์เดิมว่า

WT₁ WT₂ 2F₁ 2F₂ 24A₁ และ 24A₂

7.3 คุณสมบัติของคอนจูแกนต์

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ระหว่างคอนจูแกนต์กับสายพันธุ์เดิมในการเจริญบนอาหารแข็งที่มีเอสโตรมีโนแซ็คหรือร้อยละ 1 พบว่าการให้สีเบเนซิลไวโอไลเจนของคอนจูแกนต์ทุกตัว ยังคงสภาพเดิม เช่นเดียวกับสายพันธุ์เดิม คุณสมบัติที่ต่างจากเดิมคือความสามารถตรึงไนโตรเจนได้เท่านั้น

นำคอนจูแกนต์ตัวแทน (2F₁ , 24A₁) ไปศึกษาสรีรสมบัติ เพื่อทดสอบว่ายังคงสภาพที่ไนโทเพ็ดหรือไม โดยเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเมื่อมีแหล่งต้นตอไนโตรเจนเป็น อัมโมเนียมซัลเฟต และเสริมด้วยโปแตสเซียมไนเตรต ในอาหารที่บ่งชี้โคสจากัดในสภาวะปราศจากออกซิเจนที่ 30° C. พบว่า

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ระหว่างสายพันธุ์เดิม (parent strain) กับคอนจูแกนต์

คุณสมบัติเดิม				คุณสมบัติของคอนจูแกนต์			
หมายเลขสายพันธุ์	การใช้สี (1) กับเบนซิดไวโอไลเจน	การตรึง (2) ไนโตรเจน	การเจริญ (3) ในพุ่มาเรต H_2	หมายเลขสายพันธุ์	การใช้สี (1) กับเบนซิด-ไวโอไลเจน	การตรึง (2) ไนโตรเจน	การเจริญ (3) ในพุ่มาเรต H_2
WT	ม่วง	+	+	WTC ₁	ม่วง	+	+
				WTC ₂	ม่วง	+	+
24A	ขาว	-	+	24Ac ₁	ขาว	+	+
				24Ac ₂	ขาว	+	+
2F	ขาว	-	+	2Fc ₁	ขาว	+	+
				2Fc ₂	ขาว	+	+

- (1) การทดลองเป็นไปตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6.2 โดยใช้เคมเบนซิดไวโอไลเจน 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเคสอะมิโนแอซิด 10 กรัมต่อลิตร
- (2) การทดลองเป็นไปตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ในข้อ 6.2 และ 6.3
- (3) การทดลองเป็นไปตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ข้อ 6.3 โดยมีพุ่มาเรต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอน

ประการแรกในอาหารที่มีแอมโมเนียม เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน (รูปที่ 19a) $2F_0$ มีการเจริญที่ช้ากว่า WT_0 เล็กน้อย ส่วน $24A_0$ เจริญช้ากว่า WT_0 มาก เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อจนถึง stationary phase สำหรับ WT_0 , $2F_0$ และ $24A_0$ เท่ากับ 12, 15 และ 26 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งมีรูปแบบของการเจริญเปรียบเทียบกันคล้ายสายพันธุ์เดิม (รูปที่ 19a') ส่วนค่าการเจริญสูงสุด (รูปที่ 19c) สำหรับ $2F_0$ ใกล้เคียงกับ WT_0 มาก ส่วน $24A_0$ ยังคงต่ำกว่า WT_0 อย่างชัดเจน เมื่อใช้กลูโคส 2, 5, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีค่า OD_{420nm} สำหรับ WT_0 เท่ากับ 0.18, 0.35, 0.49 และ 0.58 หน่วย สำหรับ $2F_0$ เท่ากับ 0.17, 0.33, 0.51 และ 0.56 หน่วย และสำหรับ $24A_0$ เท่ากับ 0.13, 0.29, 0.40 และ 0.46 หน่วย ซึ่งมีรูปแบบการเจริญสูงสุดเปรียบเทียบ เหมือนกับสายพันธุ์เดิม (รูปที่ 19c') เพียงแต่ในคอนจูแกนซ์จะมีค่าการเจริญสูงสุดต่ำกว่าในสายพันธุ์เดิม

ประการที่สองเมื่อเสริมไปแคสเซียมลงในอาหารถ้วย (รูปที่ 19b) พบว่า WT_0 และ $24A_0$ มีการเจริญที่ต่ำกว่าเดิมอย่างชัดเจน (รูปที่ 19a, 19b) และมีไนโตรคเกิดขึ้นในระหว่างการเจริญ ในลักษณะที่คล้ายกัน รูปแบบการเจริญที่ถูกกระทบด้วยไนเตรตก็ รูปแบบของการเกิดไนโตรคก็ มีลักษณะคล้ายตามสายพันธุ์เดิมทุกประการ (รูปที่ 19b') ส่วนค่าการเจริญสูงสุด (รูปที่ 19a) เมื่อใช้กลูโคส 2, 5, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีค่า OD_{420} สำหรับ WT_0 เท่ากับ 0.34, 0.60, 0.70 และ 0.75 หน่วย สำหรับ $2F_0$ เท่ากับ 0.20, 0.34, 0.48 และ 0.52 หน่วย และสำหรับ $24A_0$ เท่ากับ 0.27, 0.46, 0.60 และ 0.63 หน่วยตามลำดับ ซึ่งพบว่า WT_0 และ $24A_0$ ให้ค่าการเจริญสูงสุดที่สูงกว่าเมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวอย่างชัดเจน ในขณะที่ $2F_0$ มีค่าการเจริญสูงสุดใกล้เคียงกัน (รูปที่ 19c, 19a) ซึ่งมีรูปแบบการเจริญสูงสุดเปรียบเทียบ เหมือนกับสายพันธุ์เดิม (รูปที่ 19a') เพียงแต่ในคอนจูแกนซ์จะมีค่าการเจริญสูงสุดต่ำกว่าในสายพันธุ์เดิม

จากการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาหลาย ๆ อย่าง ทำให้กล่าวได้ว่าคอนจูแกนซ์ $2F_0$ และ $24A_0$ ยังมีคุณสมบัติเหมือนสายพันธุ์เดิมคือ $2F$ และ $24A$ จึงสรุปได้ว่าได้เกิดความผิดปกติขึ้นเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนสด้วย

รูปที่ 19 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญและการเจริญสูงสุดของคอนจูแกนต์ กับสายพันธุ์เดิม ในอาหารสูตรปรับค่า ที่มีกลูโคสจำกัด 10 มิลลิโมลาร์ ภาวะอาหารต่างกัน ในสถานะปราศจากออกซิเจนที่ 30 °ซ.

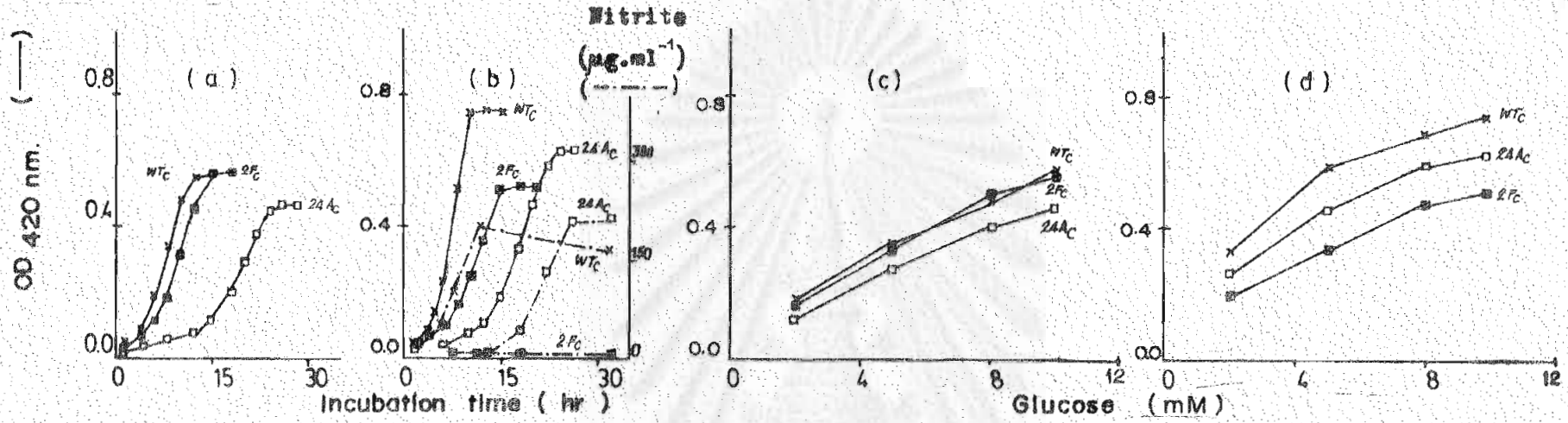
- a) อิมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนในโคโรเจน
- b) อิมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์ และโปแตสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนในโคโรเจน
- c) การเจริญสูงสุดในอาหารที่มีกลูโคส 2, 5, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีอิมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนในโคโรเจน
- d) การเจริญสูงสุดในอาหารที่มีกลูโคส 2, 5, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีอิมโมเนียมซัลเฟต 7.6 มิลลิโมลาร์ และโปแตสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนในโคโรเจน

การทดลองทำตามที่ระบุไว้ในบทที่ 2 ในข้อ 6.1 และ 7.1

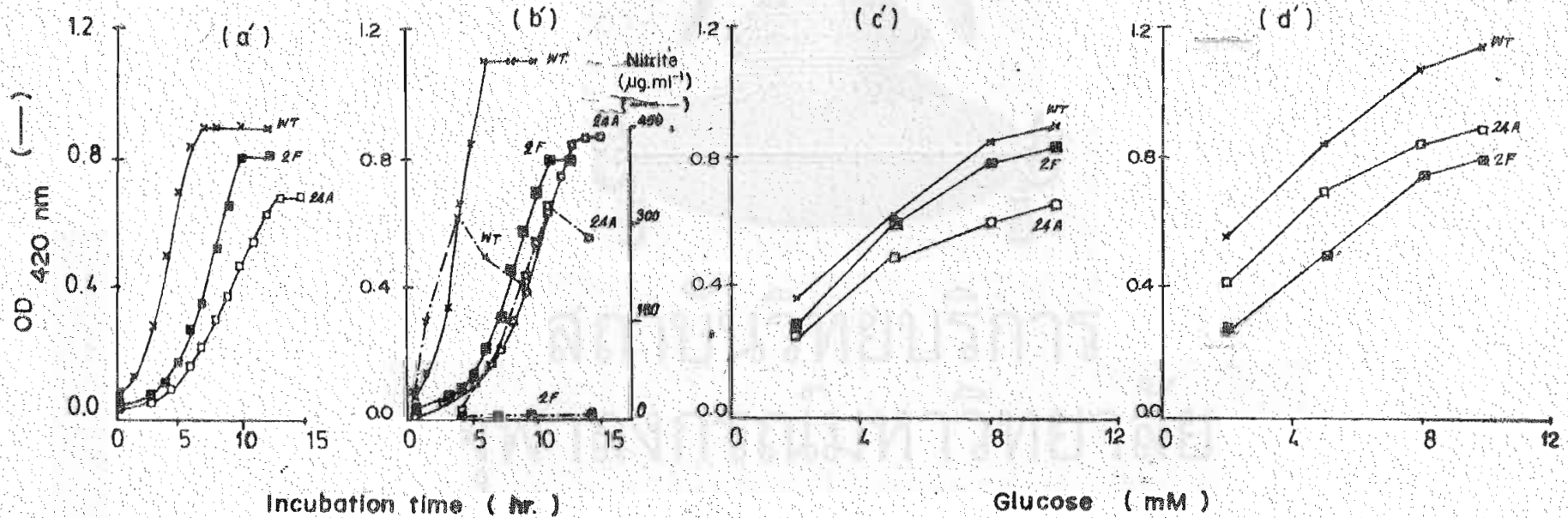
หมายเหตุ a, b, c, d แทน คอนจูแกนต์ (Conjugant)
a', b', c', d' แทน สายพันธุ์เดิม (Parent)

- x = Wild type (WT)
- = Mutant strain 24 A
- ⊗ = Mutant strain 2F

Conjugants



Parents



วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

1. พีโนไทท์ของพอร์มิกติไฮโดรจีเนสมีวแทนท์

การที่พินส์วักส์ (2526) ได้แยกพอร์มิกติไฮโดรจีเนสของเคลมเซียลามิวไมนอ และแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยหลักความแตกต่างของการ เปลี่ยนสีเบนซิลไวโอไลเจน เมื่อมีและไม่มีพอร์เมตกับความสามารถในการตรึงไนโตรเจน และเมื่อนำมีวแทนท์เหล่านี้มา ศึกษาซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ปรากฏว่ามีวแทนท์ทั้งกล่าวก็ยังคงรักษาคุณสมบัติเดิม (ตารางที่ 1)

การวิจัยนี้ได้เสริมงานวิจัยของพินส์วักส์ (2526) โดยได้นำมีวแทนท์กลุ่มที่เหลือนมา ศึกษาเพิ่มเติมให้สมบูรณ์ขึ้น ทั้งนี้เพื่อหาคำตอบว่าเหตุใดมีวแทนท์ที่มีความนิคปลกิตทางสรีรวิทยา ที่คล้ายกันว่า จะนิคปลกิตที่เอนไซม์พอร์มิกติไฮโดรจีเนสตัวเดียวกัน กลับมีความสามารถในการ ตรึงไนโตรเจนได้ต่างกัน และได้นั้นศึกษาการตรึงไนโตรเจนในมีวแทนท์เป็นเป้าหมายสำคัญ สำหรับการจำแนกคุณสมบัติของมีวแทนท์ที่ศึกษาเพิ่มเติมนั้นได้แยกกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนไปเป็นกลุ่ม หนึ่ง และแยกกลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนไม่ได้ ออกเป็นอีกกลุ่มหนึ่ง

1.1 มีวแทนท์กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้

ในการวิจัยนี้ ได้เลือกมีวแทนท์กลุ่มที่ตรึงไนโตรเจนได้ ซึ่งเป็นกลุ่มที่ 3 (ตารางที่ 1) มาศึกษาสองสายพันธุ์คือหมายเลข 10F และ 16A คุณสมบัติเบื้องต้นคือไม่มีการ เปลี่ยนสีเบนซิลไวโอไลเจนในพอร์เมต

หลักการเลือกตัวแปรที่ใช้ในการศึกษานี้ คล้ายกับที่พินส์วักส์ (2526) ได้ศึกษา มาแล้ว การวิจารณ์จึงใช้หลักการเดียวกัน ดังนั้นจึงวิจารณ์แบบสรุปดังต่อไปนี้

1.1.1 การเจริญในอาหารที่มีกลูโคสจำกัด มีอิมโมเนียงซัลเฟตเป็นแหล่งต้นตอ ไนโตรเจน ทว่า 10F และ 16A มีการเจริญที่ใกล้เคียงกับ WT แต่เมื่อเสริมไปแคสเซียม ดิงในอาหาร WT กลับมีการเจริญที่เร็วและให้ค่าการเจริญสูงสุดที่มากกว่าเดิม และพบไนไครต์

ในระหว่างการเจริญเติบโต ในขณะที่ 10F และ 16A ยังคงมีการเจริญที่ไม่แตกต่างจากเดิม อย่างมีนัยสำคัญ และก็ไม่ปรากฏไนโตรเจนเกิดขึ้น ทั้งนี้ก็แสดงว่า พืช มีวิถี Nitrate reductase ที่ปกติ ไนเตรตจึงได้รับอิเล็กตรอน เพื่อเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับคุณสมบัติความไวต่อคลอโรพลาสต์ของ พืช กล่าวคือเมื่อวิถี Nitrate reductase ปกติ คลอโรพลาสต์จะใช้อิเล็กตรอนและเปลี่ยนเป็นคลอไรด์ กลายเป็นพืชที่เขียวสด นอกจากนี้การที่ พืช มีการเจริญที่ขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเสริมไนเตรตนั้น เนื่องจากวิถี Nitrate reductase เป็นวิถีที่ให้พลังงานในรูปของเอทีพีประมาณ 2 โมเลกุล ต่อโมเลกุลของกลูโคส (Wimpenny และ Cole, 1967) และเนื่องจากเป็นวิถีที่ ความรู้พลังงานตนเอง จึงเรียกกันอีกอย่างหนึ่งว่า anaerobic respiration (Showe และ De Moss, 1968)

เหตุการณ์ที่พบใน พืช ดังกล่าว ตรงข้ามกับที่พบในมิวแทนท์หมายเลข 10F และ 16A จึงสามารถกล่าวได้ว่ามิวแทนท์ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความผิดปกติที่วิถี Nitrate reductase

1.1.2 โดยปกติแล้วไนเตรตในสารอาหารทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน แต่จากการที่ พืช สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีไนเตรตเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีสารต้นคอกไนโตรเจนอื่น ๆ อยู่ จึงคล้ายกันว่าไนเตรตทำหน้าที่เป็นสารต้นคอกไนโตรเจนไปโดยปริยาย เหตุการณ์นี้อธิบายได้ว่า แบคทีเรียได้เปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ และแบคทีเรียสามารถใช้ไนเตรตเป็นสารต้นคอกไนโตรเจนได้

สำหรับมิวแทนท์หมายเลข 10F และ 16A นั้น ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีไนเตรตเพียงอย่างเดียวในอาหาร แสดงว่าไนเตรตไม่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ จึงไม่ทำให้เกิดไนไตรต์ ดังนั้นแบคทีเรียก็จะขาดสารต้นคอกไนโตรเจนไปด้วย

1.1.3 เนื่องจากไม่พบแอสทิวทิกของ เอ็นไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสส์ฟอร์ม CH_3COOH ในมิวแทนท์หมายเลข 10F และ 16A ดังนั้นผลการทดลองนี้สอดคล้องกับคุณสมบัติทางสรีรวิทยาที่กล่าวมาข้างต้น กล่าวคือมีความผิดปกติที่เอ็นไซม์ดังกล่าว ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดฟอร์มิกเป็นอิเล็กตรอนให้แก่วิถี Nitrate reductase ได้

1.1.4 การที่มีวแทนทั้งสองสายพันธุ์ไม่ให้อาซไฮโดรเจน เมื่อเจริญถึง stationary phase ซึ่งแตกต่างจากไวคโหลอย่างเด่นชัด สรีรวิทยาลักษณะนี้ สันนิษฐานข้อสรุปที่ว่า วแทนทั้งสองสายพันธุ์มีความผิดปกติที่วิถี Hydrogenlyase ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ว่า ไมพบแอคทิวิตีของ เอนไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสฟอร์ม "H" ดังนั้นเอนไซม์ดังกล่าวจึงไม่สามารถเปลี่ยนกรดฟอร์มิคเป็นอิเล็กตรอนให้ออกฤทธิ์ Hydrogenlyase เพื่อรวมตัวกับโปรตอนให้เป็นก๊าซไฮโดรเจนได้

เนื่องด้วยเหตุดังกล่าวข้างต้น จึงน่าจะมีความเหมาะสมที่จะนำวแทนทั้งสองสายพันธุ์ เป็นตัวแบบเพื่อศึกษากลไกของการควบคุม การตรึงไนโตรเจนโดยเฉพาะเป็นการควบคุมที่มี ผลกระทบของไนโตรเจนและไนโตรด

1.2 มิวแทนที่ตรึงไนโตรเจนไม่ได้

ได้เลือกมิวแทนที่หมายเลขสายพันธุ์ 2F ซึ่งมีคุณสมบัติเปลี่ยนสีเบเนดิกต์ไวโอลิน เมื่อมีฟอร์เมต กับสายพันธุ์ 24A ซึ่งไม่สามารถเปลี่ยนสีเบเนดิกต์ไวโอลิน เมื่อมีฟอร์เมต เพื่อนำมาศึกษาให้ลึกซึ้งต่อไป ผลปรากฏว่ามิวแทนทั้งสองสายพันธุ์ มีคุณสมบัติเหมือนกัน และแตกต่างกัน สรุปได้ต่อไปนี้

1.2.1 มิวแทนที่หมายเลขสายพันธุ์ 2F มีคุณสมบัติเด่นคือ ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ แต่คุณสมบัติอื่น ๆ จะคล้ายกับมิวแทนที่ตรึงไนโตรเจนได้ ทั้งนี้รวมความถึง

1. การแสดงสรีรสมบัติที่ไม่สามารถใช้ไนโตรดได้หรือต้านทานต่อคลอเรต ซึ่งแสดงว่าวิถี Nitrate reductase ผิดปกติ
2. การที่พบว่า เอนไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสฟอร์ม "H" ผิดปกติ ทำให้สันนิษฐานสรีรสมบัติดังกล่าวในข้อ 1
3. ไม่ปรากฏก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้น ซึ่งแสดงว่าวิถี Hydrogenlyase ผิดปกติ
4. การที่พบว่า เอนไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสฟอร์ม "H" ผิดปกติ ก็ทำให้สันนิษฐานสรีรสมบัติดังกล่าวในข้อ 3

1.2.2 มีวแทนท์หมายเลขสายพันธุ์ 24A มีคุณสมบัติบางอย่างที่เหมือนและต่างจาก 2F เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของ 24A กับ WT พบว่า

1. สามารถใช้ไนเตรตได้หรือมีความไวต่อคลอเรตคล้าย WT ซึ่งแสดงว่าวิถี Nitrate reductase ปกติ

2. พบแอกติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนสฟอร์ม "H" แต่มีความแอกติวิตีต่ำกว่า WT ประมาณ 7 เท่า ซึ่งก็แสดงว่าเอนไซม์ตัวนี้ ยังอาจมีความผิดปกติเกิดขึ้น โดยความผิดปกตินี้จะแสดงแอกติวิตีบางส่วน (partial activity)

3. การที่ไม่ให้ก๊าซไฮโดรเจน ก็แสดงว่าวิถี Hydrogenlyase ผิดปกติ

4. ไม่ปรากฏแอกติวิตีของฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนสฟอร์ม "H" ซึ่งสอดคล้องกับสรีรสมมติข้อ 3

1.2.3 เมื่อเพิ่มภาวะความกดดัน (selective pressure) ที่ทำให้มีวแทนท์สายพันธุ์ 2F และ 24A กลับมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน แต่ความสามารถดังกล่าวก็มีขีดจำกัดกลับคืน จึงน่าจะสงสัยว่าอาจมีความผิดปกติของยีนมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง เพราะโดยทั่วไปแล้ว หากมีความผิดปกติของยีนเพียงตำแหน่งเดียว ควรแสดงสมบัติของ Spontaneous mutation ด้วย การพบ reversion frequency ในอัตรา 10^{-5} - 10^{-7} คอเชดล (Luria และ Delbrück, 1943)

1.2.4 และเมื่อเพิ่มยีน nif เข้าไปในมีวแทนท์ทั้งสองอีกหนึ่งชุด พบว่าถึงแม้มีวแทนท์ทั้งสอง กลับสามารถตรึงไนโตรเจนได้ แต่คุณสมบัติในการเป็นฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนสมีวแทนท์ ยังคงรูปเดิม ทำให้คาดคะเนได้ว่า เอนไซม์ไนโตรจีเนสในมีวแทนท์ทั้งสอง ผิดปกติไปด้วย จากการที่สามารถตรึงความผิดปกติของยีน ของฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนส ในเอสเคอริเคียโคไลได้หลายตำแหน่ง เช่นที่ 40 นาที (Mandrard-Berthelot และคณะ, 1978) และ 80 นาที (Bachmann และ Low, 1980) จากการทดลองของ Mandrard-Berthelot ไค่งชี้ว่า ยีนของฟอร์มิคัลไฮโดรจีเนสที่ตำแหน่งหนึ่งอยู่ใกล้กับ his operon

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า his operon นี้ยู่ติดกับ nif operon (Shanmugam และคณะ, 1974) จึงอาจเป็นไปได้ว่า เกิดความผิดปกติของยีนทั้งในโครโมโซม และพอร์มิกติไฮโคร- จีเนสซึ่งพร้อม ๆ กัน

พินดี (2526) ค้นพบว่าค่า Cotransduction frequency ของความผิดปกติของนิวคลีโอไทด์กลุ่มที่ 1 (ตารางที่ 1) คือสายพันธุ์ 18E, 27A และ 35A เมื่อเทียบกับ mt1 เป็นตัววัดมีค่าแปรปรวนอยู่ระหว่าง 15 - 45% (พินดี, 2526) การที่นิว- แตนกลุ่มที่ 1 ให้ค่า cotransduction frequency ที่ต่างกันขนาดนี้ แสดงว่าน่าจะ มีความผิดปกติที่โปรตีนคนละตัว และด้วยเหตุที่โปรตีนตัวหนึ่งมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลต่อ หนึ่ง subunit ไม่ควรเกิน 50 - 60 K ดังนั้นเอนไซม์พอร์มิกติไฮโครจีเนสคงมีขนาด ใหญ่มาก

คุณสมบัติที่คล้ายกันของนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ เป็นการสนับสนุนว่าเอนไซม์พอร์มิกติไฮโคร- จีเนสน่าจะเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน ซึ่งก็สอดคล้องกับคุณสมบัติทางชีวเคมี กล่าวคือเอนไซม์พอร์มิก- ตีไฮโครจีเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยารีดอกซ์ และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง อีกทั้งยังมีความซับซ้อน ที่ยังไม่ได้รับการเปิดเผย จนปัจจุบันทราบแต่เพียงว่า เอนไซม์พอร์มิกติไฮโครจีเนสพอร์ม "H" มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 600,000 ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย (α, β, γ) มี heme, non-heme iron โมลิบดีนัม และซีรีเนียมเป็น cofactor (Snook และ Lester, 1975) เอนไซม์พอร์มิกติไฮโครจีเนสทั้งพอร์ม "H" และ "N" น่าจะเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิ- รยาเดียวกัน แต่อาจเป็นเอนไซม์คนละตัว หรืออาจเป็นเอนไซม์สองตัว รวมเป็นโมเลกุลใหญ่ ที่ซับซ้อน

สำหรับคุณสมบัติทางชีวเคมี ที่จะทำให้มีแผนที่เกิดความแตกต่างกันนั้น นอกจากจะ ศึกษาการสูญเสียอิเล็กตรอนของเอนไซม์โดยตรง แล้วยังควร อยุ่ถึงคุณสมบัติทางชีวเคมีด้านอื่น ๆ อีก ตัวอย่างเช่น เอนไซม์อาจมีความผิดปกติที่ binding site เพราะโดยทั่วไปแล้ว binding site ของรีดอกซ์เอนไซม์อาจมีได้หลายตำแหน่ง ตัวอย่างเช่น NADH dehydro- enase complex เป็นรีดอกซ์เอนไซม์ที่มี iron-sulfur center ถึง 7 ตำแหน่ง โดยทำหน้าที่เป็นทั้ง substrate binding site, coupling site หรือ transferring site ซึ่งมีค่า redox potential ที่แตกต่างกันถึง 5 ค่า -380 ± 10 , -250 ± 10 , -30 ± 15 ,

-245 \pm 10, -270 \pm 10 โดยมีตำแหน่ง -380 \pm 10 อาจทำหน้าที่เป็น coupling site เป็นคน (Baltscheffsky และ Baltscheffsky, 1974) ดังนั้นความผิดปกติอาจเกิดขึ้นที่ตำแหน่งใด ๆ ก็ได้แม้แต่ coupling site หรือ transferring site ซึ่งจะทำให้โค มิวแทนท์กลุ่มแตกต่างกันไปอีกด้วย โดยทั่วไปรีคอมบิเนชันจะเร่งปฏิกิริยาการ เกิดอิลเลกตรอนที่มีพลังงานแตกต่างกัน พลังงาน ที่ติดตัวอิลเลกตรอนไปนี้ จะถูกถ่ายเทให้โปรตีนตัวอื่น ๆ และถ้าหากพลังงานหลุดออกจากกระบวนการถ่ายเท และมีค่าสูงพอ ก็อาจจะนำไป coupling เพื่อสร้างถึงที่มีคุณค่าแก่เซลล์เช่นเอทีพีเป็นคน ปัจจุบันยอมรับกันโดยทั่วไปว่า coupling site หรือ transferring site จากโปรตีนตัวหนึ่งไปสู่อีกตัวหนึ่ง เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน และไม่ทราบกลไกที่แท้จริง แต่ก็คาดคะเนว่าตำแหน่งต่าง ๆ คงมีใช้ตำแหน่งเกี่ยว ยกตัวอย่างเช่น transferring site ของ NADH dehydrogenase complex มีถึง 2 ตำแหน่ง (Baltscheffsky และ Baltscheffsky, 1974) ควบเหตุนี้รีคอมบิเนชันในไทพอยส์รีคอมบิเนชันอย่างเกี่ยวจึงหมายความว่าหาวิธีการทดสอบเชิงชีวเคมี การที่มิวแทนท์ทั้งกลาง แสดงความสามารถในการ เปลี่ยนสีเบสซิลไวโอไลโอเจเนติกแตกต่างกัน ก็อาจนำไปสู่การค้นพบที่ลึกซึ้งต่อไปได้

อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติทางชีวเคมีหลายประการในเอนไซม์เฟอร์ริกไฮโดรจีเนสยังคงมีการศึกษาน้อย และโคเคยกกล่าวมาแล้วว่าเฟอร์ริกไฮโดรจีเนสเป็นรีคอมบิเนชันที่มีโมเลกุลใหญ่มาก จึงอาจได้มิวแทนท์หลายจีโนไทป์ และหลายฟีโนไทป์ ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเช่นในการแยกเฟอร์ริกไฮโดรจีเนสมิวแทนท์ของ Salmonella typhimurium โดย Chippaux และคณะ (1972) พบว่านอกจากมิวแทนท์ทุกตัวทั้งกลาง จะมีความผิดปกติที่เอนไซม์เฟอร์ริกไฮโดรจีเนส พอร์ม "H" แล้ว ยังพบวาร์ยณะ 25 จะมีเอนไซม์เฟอร์ริกไฮโดรจีเนส พอร์ม "N" ผิดปกติไปด้วย วาร์ยณะ 42 มีความผิดปกติของทั้งเอนไซม์เฟอร์ริกไฮโดรจีเนส พอร์ม "N" และ เอนไซม์ในแคตทิกคัพเพสด้วย และประมาณวาร์ยณะ 8 มีความผิดปกติของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสด้วย แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ก็ยังไม่มีใครทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ทั้งกลาง

2. การเจริญของแบคทีเรียในพู่มาเรค

ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เคมบ เรียตานิโมโนีเป็นเอนเพอโรแบคทีเรีย เช่นเดียวกับเอสเคอริเคียโคไล สามารถเจริญได้เมื่อมีพู่มาเรคเป็นแหล่งศุนกคาร์บอน และเป็นตัว

รับอิเล็กตรอนจากไฮโดรเจนหรือฟอร์เมต ตามกระบวนการที่ควรจะเกิดขึ้นในรูปที่ 1 เพียง
แต่มีอัตราการเจริญที่ช้าเมื่อเทียบกับการเจริญในกลูโคส ทั้งนี้เพราะการเจริญในกระบวนการ
ที่ช้ากว่าเรต มีอัตราการปฏิกิริยาเอนไซม์แอโรแมคทีเรีย จะเจริญได้ดี แคตตาล็อกเป็นแบค-
ทีเรียที่ชอบใช้กระบวนการดังกล่าว เช่น Vibrio succinogenes ก็จะมีอัตราการเจริญ
ที่เร็วกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ

การเจริญของเคลมเซียลาไมโนอี ในพุ่มาเรตเมื่อมีฟอร์เมตเป็นตัวให้อิเล็กตรอน
ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน จำเป็นต้องมีคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยร้อยละ 5 ไม่งั้นเป็นที่
ต้องเสริมด้วยไซเคียมไบคาร์บอเนต และพบว่า ไซเคียมไบคาร์บอเนตใช้แทนคาร์บอนได-
ออกไซด์เพื่อการเจริญไม่ได้ แสดงว่าแบคทีเรียมีการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของก๊าซ
สภาวะดังกล่าวเหมือนกับที่ Wolin และคณะ (1961) ได้ทดลองแยก Vibrio succino-
genes และ Kröger (1978) ได้เสนอปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังนี้



โดยที่เราไม่พบผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปไบคาร์บอเนตเลย มีระบบลำเลียงอิเล็กตรอนใน Formate-
Fumarate system โดย Kröger และ Innerhofer (1976) พบว่ามี Mena-
quinone และ cytochrome ในระบบนี้ด้วย

การเจริญในระบบดังกล่าว เคลมเซียลาไมโนอี ไม่มีความสามารถในการตรึงไน-
โตรเจน ทั้งนี้ก็ยังไม่มียุติภาคนกระทั่งถึงปัจจุบัน Hahtela และคณะ (1983) ได้ศึกษา
เกี่ยวกับแหล่งต้นตอคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรึงไนโตรเจนของเคลมเซียลาไมโนอี
ก็ยังมีโลกดาร์ถึงระบบดังกล่าวมา

ส่วนในกระบวนการที่ใช้ไฮโดรเจนเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่พุ่มาเรต พบว่าฟอร์มิค-
ทีไฮโดรจีเนสมีแอมแทนทุกตัวสามารถเจริญได้ ซึ่งแสดงว่ากระบวนการที่ปกติ กังนั้นเอนไซม์
ไฮโดรจีเนสของปกติด้วย ซึ่งอาจอนุมานได้ว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในกระบวนการ Hydro-
genlyase ซึ่งที่เร่งปฏิกิริยาการให้ก๊าซไฮโดรเจน ก็ปกติไปด้วย โดยจากการที่ Trait
และคณะ (1981) ได้พบว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เร่งปฏิกิริยาการให้และการให้ก๊าซไฮโดรเจน
เป็นตัวเดียวกัน (รูปที่ 1)

เมื่อพิจารณาความสามารถในการเจริญของฟอร์มิคิโอโครจีเนสไมวแทนท์ ที่มี ความผิดปกติทั้งเอนไซม์ฟอร์มิคิโอโครจีเนสฟอร์ม "H" และฟอร์ม "H" ในพลาสมิด เมื่อมี ตัวให้อิเล็กตรอนเป็นฟอร์เมต ปรากฏว่าไมวแทนท์ดังกล่าว สามารถเจริญได้ เพียงแต่ต้องใช้ เวลาปรับตัวที่นานกว่าประมาณสองเท่า อย่างไรก็ตามการที่ไมวแทนท์ดังกล่าวเจริญได้ ก็แสดงว่า เอนไซม์ฟอร์มิคิโอโครจีเนส ที่เร่งปฏิกิริยาการให้อิเล็กตรอน แก่พลาสมิดควร ปกติ นั้นย่อมหมายความว่า อาจมีเอนไซม์ฟอร์มิคิโอโครจีเนสอีกฟอร์มหนึ่ง ทำหน้าที่เร่ง ปฏิกิริยาใน Formate-Pumarate system ดังที่ Kröger (1978) ได้เสนอ(หน้า 76)

มีข้อสันนิษฐานว่าน่าจะมี เอนไซม์อีกฟอร์มหนึ่งจริงคือเป็นผลการทดลองโดย Kröger และคณะ (1979) พบว่าเมื่อได้ทำให้เอนไซม์ฟอร์มิคิโอโครจีเนสใน Vibrio succinogenes บริสุทธิ์ พบว่ามันเป็น membrane-bound enzyme ประกอบด้วย 2 subunit ที่ คล้ายกัน มีน้ำหนักโมเลกุล 110,000 ประกอบด้วยโมลิบดีนัมและ iron sulphur อย่างละอะตอม แต่ไม่พบซีรีเนียม

จากการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์พบว่า การใช้ตัวรับอิเล็กตรอนสังเคราะห์ที่เป็น เมททีลีนบลูให้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะสูงกว่า เบนซิลไวโอไลเจน, ฟีนานีนเมทิลซัลเฟต และ DCPI ถึงสองเท่า และค่า K_m ของปฏิกิริยา เมื่อใช้เมททีลีนบลู ก็น้อยกว่า เบนซิล-ไวโอไลเจนถึง 7 เท่า (Kröger และคณะ, 1979)

3. การตรึงไนโตรเจนในฟอร์มิคิโอโครจีเนสไมวแทนท์

ในขั้นแรกพบว่า ฟอร์มิคิโอโครจีเนสไมวแทนท์ที่แยกได้ มีทั้งกลุ่มที่สามารถตรึง ไนโตรเจนได้และไม่ได้ จากผลการแจกแจงเบื้องต้นนี้ ทำให้เราหวังว่า คงจะสามารถใช้ ไมวแทนท์ทั้งสองกลุ่มนี้ นำมาศึกษากลไกของการตรึงไนโตรเจนได้ แต่ครั้งเมื่อพบว่าฟอร์มิคิโอ-โครจีเนสไมวแทนท์ ที่ตรึงไนโตรเจนไม่ได้นั้น (ซึ่งมีสองกลุ่ม) สามารถหวนกลับคืน ความ สามารถในการตรึงไนโตรเจนได้ หลังจากเคลื่อนยีน nif เข้าไปอีกหนึ่งชุด ผลจากข้อมูลนี้ รวมกับที่ไม่สามารถจะแยก revertant ได้ หลังจากที่ใช้ selective pressure แล้ว กล่าวคือการนำเชื้อมาเจริญในสภาวะของการตรึงไนโตรเจน และจากการที่ subculture เชื้อหลาย ๆ ครั้ง ทำให้คงกล่าวได้ว่า ฟอร์มิคิโอโครจีเนสไมวแทนท์ ยังคงมีความสามารถ

ในการตรึงไนโตรเจนได้ และการตรึงไนโตรเจนไม่ว่าจะต้องการอาศัยเอนไซม์ใดที่ส่งไปจาก
วิถีของ Hydrogenlyase หรือ Nitrate reductase

ถึงอย่างไรก็ตาม กลไกการตรึงไนโตรเจนในส่วนของมิวแทนท์ที่ได้ศึกษา ก็ให้
ข้อมูลที่น่าสนใจดังต่อไปนี้

1. การที่รูปแบบของการตรึงไนโตรเจนใน 10F และ 16A คล้ายกันกับ WT
มาก การเจริญสูงสุดของ 10F สูงกว่า WT เล็กน้อย และการเจริญสูงสุดของ 16A
เท่ากับ WT ถึงแม้ว่า จะเป็นการเจริญที่เหมือนไม่มีนัยสำคัญ แต่กรณีเมื่อลองเปรียบเทียบ
กับการเจริญภายใต้สภาวะที่มีการกักกันการตรึงไนโตรเจน คือสภาวะที่มีการเจริญในอาหาร
สูตรปรับค่าและเสริมด้วยอิมโมเนียมซัลเฟต หรือที่เสริมด้วยสารแทนที่ไนโตรเจนอื่น ๆ จะ
พบว่าทั้ง 10F และ 16A ต่างเจริญได้ดีกว่า WT ทั้งสิ้น

เมื่อการตรึงไนโตรเจนเป็นกระบวนการที่ต้องการพลังงานสูง เช่น
รายงานจาก Hill (1976) กล่าวว่า เคนเซียมเวลาโมนิอ์ ต้องการพลังงานเอทีพีถึง
29 โมเลกุล ต่อการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไนโตรเจนหนึ่งโมเลกุลให้เป็นอิมโมเนียม
ดังนั้นการที่รูปแบบการเจริญของ 10F ภายใต้สภาวะการตรึงไนโตรเจน กลับแสดงค่าที่
คล้ายกันมีความรุนแรงกว่า WT เรายัง ก็แสดงว่าใน 10F ที่เมื่อขาดกระบวนการ Hydro-
genlyase แล้ว น่าจะมีการปรับเมตาบอลิซึมบางอย่าง ที่สามารถทำให้มีกระบวนการ
ตรึงไนโตรเจนที่ดีกว่า WT ได้

จากการทดลองของ Anderson และ Shanmugam (1977) เมื่อนำ
ammonium derepress mutant ไปใส่สายพันธุ์แบคทีเรียที่ควบคุมพันธุกรรมของคลอโรเฟลล
ออกมาได้และได้ค้นพบว่า สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้นี้ทุกตัว เมื่อตรึงไนโตรเจน จะมีการเกิด
ก๊าซไฮโดรเจน และการเกิดอิมโมเนียมในอัตราค่าอนึ่งข้างคั้งที่คือ molar ratio ของ H_2 :
 NH_4^+ โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.65

เนื่องจากการเกิดก๊าซไฮโดรเจน และอิมโมเนียม ซึ่งเป็นสับสเทนท์
บริเวณต่างกัน (Hwang และคณะ, 1973) ดังนั้นเมื่อมีข้อมูลจาก Anderson และ Shanmugam
(1977) มิวแทนท์หมายเลข 10F หรือ 16A ควรจะตรึงไนโตรเจน และผลิตก๊าซไฮโดรเจนได้
ในอัตราที่สอดคล้องกับ WT ด้วย

ผลการทดลองพบว่าก๊าซไฮโดรเจนที่ผลิตได้จากมิวแทนท์หมายเลข 10F น้อยกว่าที่ผลิตได้จาก WT ในขณะที่ อีกครั้งหนึ่ง เราจะพบว่า ค่าความขุ่นสูงสุด สุกท้ายของ 10F ก็ยังคงเหนือกว่า WT รูปแบบการเกิดก๊าซไฮโดรเจน รวมทั้งความขุ่นสูงสุดที่รายงานนี้ เป็นข้อมูลที่ reproducible เพราะเมื่อทำซ้ำแล้วได้ค่าเท่าเดิม

น่าเสียดายที่ เราไม่อาจศึกษาลักษณะการเกิดก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะที่มีการตรึงไนโตรเจน ใกล้เคียง ๆ กับภาวะวัฏรูปแบบของอะเซทีลีนรีดักชัน ทั้งนี้เพราะ เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ มีอยู่เพียงเครื่องเดียวเท่านั้น ในเมื่อการวัดก๊าซไฮโดรเจนจะ ต้องใช้ detector คนละชนิดกับเมื่อวัดอะเซทีลีนรีดักชัน แต่ทว่า ค่าแอกทิวิตีจำเพาะของอะเซทีลีนรีดักชัน แปรปรวนอยู่บ้าง คือบางครั้งค่าสูงสุดของ WT ก็ลดลงมาใกล้เคียงกับของ 10F

ถ้าข้อมูลที่เบื้องต้นนี้ น่าจะกล่าวได้ว่า ความผิดปกติที่ *Hydrogenase* จะมีผลทำให้ การผลิตก๊าซไฮโดรเจนในกระบวนการตรึงไนโตรเจนต่ำลง และดังนั้นเซลล์ก็จะประหยัดพลังงานในการสร้างก๊าซไฮโดรเจน แต่กลับนำไปสร้างอิมโมเนียมได้เพิ่มขึ้น จึงทำให้ความขุ่นสูงสุดเพิ่มขึ้น การทดลองนี้เป็นเครื่องชี้ว่า แมพอร์มิกไฮโดรจีเนส ไม่มีผลโดยตรงต่อการตรึงไนโตรเจน คือยังคงทำให้แบคทีเรียตรึงไนโตรเจนได้ แต่ก็มีผลโดยอ้อม คือสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงไนโตรเจนได้เล็กน้อย

2. Kennedy และ Postgate (1977) ได้ทดลองโดยอาศัย *nitrate reductase mutant* ซึ่งมี *nif* (*nar A*, *nar B*) พบว่ายังคงมีแอกทิวิตีของอะเซทีลีนรีดักชัน เขาได้ตั้งข้อสมมุติฐานว่า ในเซลล์เองมีได้เป็น *co-repressor* ของการสร้างเฮโมไซมไนโตรจีเนส แต่อาจเป็นผลิตภัณฑ์ของมันเองคือ ไนไตรต์ ดังนั้นแมพอร์มิกไฮโดรจีเนส มิวแทนท์ ซึ่งแสดงสมบัติที่มีความผิดปกติของ *nitrate reductase* จึงให้ผลการทดลอง ตรงตามเป้าหมาย กล่าวคือแอกทิวิตีของอะเซทีลีนรีดักชันของ 10F ยังคงปกติ ในขณะที่ไม่พบแอกทิวิตีของอะเซทีลีนรีดักชันเลยใน WT น่าตั้งเกตุว่าความขุ่นสูงสุดใน 10F ลดลงจากเดิมในขณะที่เติมไนเตรทหรือคลอไรด์ ข้อสันนิษฐานว่า น่าจะเป็นผลเนื่องจาก *ionic strength* เพราะไนเตรทเจอร์เพียง 5 มิลลิโมลาร์ก็เติมไปแคสเซียมนไนเตรทหรือโปแตสเซียมคลอไรด์ลงไปถึง 10 มิลลิโมลาร์ และด้วยเหตุที่ข้อมูลดังกล่าวมีได้ถูกใช้ไปเลย

จากการทดลองของ Hom และคณะ (1980) ได้ใช้ ammonium derepress mutant ของเคลบเชิปลานิวโมอีเป็นตัวแบบ และพบว่าทั้งไนเตรต และไนไตรต์ สามารถกักตุนการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนสอย่างสมบูรณ์ โดยเชื่อว่าทั้งไนเตรต และไนไตรต์ ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และอาจเป็นไปไ้กว่า การตรึงไนโตรเจนที่ถูกกักตุนโดยอนุมูล ทั้งสองนี้ ผ่านกระบวนการควบคุมอย่างหนึ่งที่เรียกว่า "redox control"

ในการทดลองผลกระทบของไนไตรต์ต่อการตรึงไนโตรเจน ในนิวแบคทีเรียหมายเลข 10 พบว่า เมื่อเสริมไนไตรต์ปริมาณ 5 มิลลิโมลาร์ลงในคลัสเจอร์ ไม่นพบแอกติวิตีของอะเซทิลไนโตรจีเนสแต่อย่างใด การทดลองนี้คล้ายกับว่าไนไตรต์เป็น co-repressor ของการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนสเหมือนอย่างที่ Kennedy และ postgate (1977) ได้ศึกษาของไนเตรตไว้ และตรงกับข้อมูลของ Hom และคณะ (1980) ด้วย แต่เหตุการณ์ต่างเป็นเช่นนั้นไม่ เพราะเมื่อลดปริมาณไซเคียมไนไตรต์ลงเหลือ 1 มิลลิโมลาร์ กลับพบแอกติวิตีของอะเซทิลไนโตรจีเนส น่าสังเกตว่า วิธีการวัดปริมาณไนไตรต์จากคลัสเจอร์ เป็นวิธีการที่มีความไวถึง 0.02 - 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เมื่อทดสอบไนไตรต์ไม่พบเช่นนี้ ก็มักจะแสดงว่าไนไตรต์ต้องไม่มีจริง ๆ ผลก็ยังปรากฏว่าแอกติวิตีจำเพาะของอะเซทิลไนโตรจีเนสที่พบใน 10F เมื่อเสริมด้วยไซเคียมไนไตรต์ 1 มิลลิโมลาร์สูงไม่มากนัก ตรงกันข้ามกับ ถ้าลดไนไตรต์ลงเหลือ 0.5 มิลลิโมลาร์ เมื่อไนไตรต์ถูกใช้หมดแล้ว กลับพบแอกติวิตีจำเพาะของอะเซทิลไนโตรจีเนสสูงขึ้นมาก เราคงจะระลึกเสมอว่า ค่าแอกติวิตีจำเพาะคือค่าที่แสดงก่อกหน่วยของโปรตีน ทั้งนี้ในกรณีที่เสริมไนไตรต์ลงไปถึง 1 มิลลิโมลาร์ ใกล้เคียง OD_{420nm} เคมีขณะที่ไนไตรต์ถูกใช้หมดเท่ากับ 0.32 หน่วย ซึ่งมีค่าของโปรตีนสูงอยู่แล้ว เมื่อนำมาหารกับค่าแอกติวิตีของอะเซทิลไนโตรจีเนส ผลจึงทำให้ค่าแอกติวิตีจำเพาะของอะเซทิลไนโตรจีเนสต่ำลงด้วย ในที่นี้ค่าแอกติวิตีของอะเซทิลไนโตรจีเนสจึงน่าจะมีความสำคัญมากกว่า ค่าแอกติวิตีจำเพาะของอะเซทิลไนโตรจีเนส กล่าวคือเมื่อใกล้ความที่ตรวจพบ อะเซทิลไนโตรจีเนสในคลัสเจอร์ ก็มักจะแสดงว่า เอนไซม์ไนโตรจีเนสได้ถูกกระตุ้นแล้ว ๆ กันตลอดเวลา ถึงอย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ ก็ยังคงสัมพันธ์กับการทดลองของ Hom และคณะ (1980) อยู่แน่นอน นั่นคือ ไนไตรต์น่าจะจะเป็น co-repressor ของการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส

เนื่องจากอิมโมเนียมเป็นสารกักตุนไนโตรเจนที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าไม่ใช่ตัว co-repressor ของการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส (Shanmugasam และคณะ, 1975)

ดังนั้นจึงได้ทำการทดลอง ศึกษาผลกระทบของอิมโมเนียมความคู่กับไนโตริต ผลการทดลองที่แสดงว่า ไนโตริตและอิมโมเนียมที่มีกรรมสมมูลย์เท่ากัน ให้ผลกระทบต่อการสร้างเฮโมไซม์ ไนโตริตเจเนสโคในลักษณะเดียวกัน เหตุการณ์เช่นนี้แสดงว่าไนโตริตก็อาจมี λ oo-repressor ที่แท้จริงเหมือนอิมโมเนียมก็ได้

3. ข้อสงสัยที่ว่า "redox control" ควบคุมการถอดรหัส ของเฮโมไซม์ ไนโตริตเจเนสหรือไม่ โดยข้อสมมุติฐาน "redox control" หมายถึงการปรับอัตราส่วนของ NADPH/NADH ดังนั้น "redox control" นี้ น่าจะมีส่วนกระทบต่อการควบคุม การตรึงไนโตรเจนโคโดยตรง ถ้าหากได้มีการปรับ "redox control" เสียใหม่โดยเปลี่ยน แหล่งคนต่อคาร์บอนจากกลูโคสเป็นแมนนิทอล โดยที่ manitol มีสภาพรีดิวซ์ที่สูงกว่ากลูโคส ดังนั้นน่าจะส่งผลอย่างใดอย่างหนึ่งให้เห็นในรูปของการตรึงไนโตรเจน ผลการทดลองเป็นไปตามที่ข้อสมมุติฐานไว้ กล่าวคือ เมื่อใช้แมนนิทอลเป็นแหล่งคนต่อคาร์บอน รูปแบบการตรึงไนโตรเจนใน 10P ค้างออกไป และตรึงไนโตรเจนโคไม่เท่ากับกลูโคส โดยที่ค่าความสูงสูงสุดต่ำกว่าเล็กน้อย และเมื่อใส่ไนโตริต ให้เป็นตัวแปรอีกตัวหนึ่ง ข้อมูลที่ได้ก็สอดคล้องกับข้อมูลเดิมอย่างชัดเจน ผลการทดลองนี้อาจอนุมานได้ว่า แมนนิทอลซึ่งมีอำนาจรีดิวซ์สูงกว่ากลูโคส แบคทีเรียจะต้องเปลี่ยน แมนนิทอลให้เป็น manitol-6-p แล้วเปลี่ยนอีกครั้งหนึ่ง เป็น D-fructose-6-P โดยใช้ NAD^+ เป็น co-factor ให้ผลิตภัณฑ์เป็น NADH และผลจากการรบกวนของอัตราส่วนระหว่าง NADPH/NADH นี้จึงทำให้รูปแบบของการตรึงไนโตรเจนค้างออกไป แต่ว่าการนี้ต่อไปจะก้าวไกลเกินจริงอย่างไรนั้น ยังเป็นปัญหาอยู่

กระบวนการตรึงไนโตรเจน เป็นกระบวนการที่มีองค์ประกอบมาต (complex process) จึงเป็นการยากที่จะชี้แน่ชัดว่า มีการควบคุมอย่างไร หรือมีแหล่งคนต่ออิเล็กตรอนที่แท้จริงจากไหน เหล่านี้ยังเป็นคำถามที่หาหาคำตอบได้ของมนุษย์อยู่

4. สรุปผลการวิจัย

1. ทำให้ทราบว่า เคนเบรียลาไมโครอิมโมเนียมพอร์นิคิตไฮโดรเจเนสฟอร์ม "H" กระจายอยู่ในไซโทพลาซึมและเมมเบรน และเฮโมไซม์พอร์นิคิตไฮโดรเจเนสฟอร์ม "H" กระจายอยู่เฉพาะในส่วนของเมมเบรน

2. ทำให้ทราบว่า แหล่งต้นตอ อานาจีรีควซ์ของเอนไซม์ไนโตรจีเนส มีได้มาจาก การเร่งปฏิกิริยาการ เปลี่ยนฟอร์เมตไปเป็นอิเล็กตรอนโปรตอน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนส ทั้งในวิถีของ Hydrogenlyase (FDH_H) และ Nitrate reductase (FDH_N)

3. พบว่าในแคต ไมตกั้นการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส และไนไทร์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของในแคตเอง ก็อาจมีใช้ *co-repressor* ที่จริงของการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส

4. ปริมาณของแหล่งต้นตอไนโตรเจนที่ไมตกั้น การสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนส ในฟอร์มิคไฮโดรจีเนสมีวแทนท์ ที่มีความนิยปกติของวิถี Nitrate reductase มีดังนี้ ไปแคสเซียในแคต 10 มิลลิโมลาร์, โซเดียมไนไทร์ปริมาณค่าเพียง 1 มิลลิโมลาร์ และ อิมโมเนียมซัลเฟตปริมาณค่าเพียง 0.5 มิลลิโมลาร์

5. ได้ตั้งข้อสมมุติฐานว่า อาจมีเอนไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสอีกฟอร์มหนึ่ง ที่เร่งปฏิกิริยาการ เปลี่ยนฟอร์เมตเป็นอิเล็กตรอน ให้แก่ฟูมาเรตซึ่งเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในสภาวะปราศจากออกซิเจน ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ในบรรยากาศของไนโตรเจน เรียกว่าเอนไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสฟอร์ม "F" เร่งปฏิกิริยาใน Formate-Fumarate system และไม่พบการ ครึ่งไนโตรเจนเกิดขึ้นในระดับดังกล่าว

6. ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสมีวแทนท์บางตัวมีข้อบ่งชี้ว่า อาจมีการครึ่งไนโตรเจนได้ ก็กว่าไวคไทป์ในแง่ที่ว่ามีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนในสภาวะ ที่มีการครึ่งไนโตรเจนได้ต่ำกว่าไวคไทป์

5. ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาผลกระทบของไนไทร์ต่อการครึ่งไนโตรเจนโดยการสร้างมีวแทนท์

1.1 สร้างมีวแทนท์ที่มีความนิยปกติเฉพาะเอนไซม์ไนไทร์ที่สกัดได้ ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการ เปลี่ยนไนไทร์ไปเป็นสารประกอบไนโตรเจนตัวอื่น ในเอสเคอริเคียโคโคโล แล้วนำมาศึกษาการครึ่งไนโตรเจนโดยการใส่ nit (เช่นพลาสมิด RP41 ของเคลบเซย์ดาวิ-

โมโน) Abou-Jaoude และคณะ (1978) ได้แยก Nitrite reductase จาก Escherichia coli K12 CB 900 (thr, leu, lac, ana, rpsL) ใช้ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine เป็นมิวตาเจนต์ แล้วคัดเลือกมิวแทนต์ โดยอาศัยคุณสมบัติของ ana strain ของ CB900 โดยคัดเลือกโคโลนีที่ไม่สามารถใช้ไนไตรต์ได้

1.2 เพื่อการศึกษาผลกระทบของสารประกอบไนโตรเจนต่อการตรึงไนโตรเจนให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นโดยใช้มิวแทนต์ที่มีความผิดปกติ ทั้งโซลโมโมเนียมและไนไตรต์เป็นแหล่งต้นของไนโตรเจนไม่ได้จะทำให้ทราบแน่ชัดว่า ไนไตรต์มีผลกระทบโดยตรงต่อการตรึงไนโตรเจนหรือไม่

2. น่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับ Formate-flumarate system โดยเฉพาะเอนไซม์ฟอร์มิคไฮโดรจีเนสฟอร์ม "F" แบบที่เรียกที่นิยมศึกษาการเจริญในระบบนี้มากที่สุดคือ Vibrio succinogenes ซึ่งมีกระบวนการ oxidative-phosphorylation ที่ง่ายที่สุดในสิ่งมีชีวิตที่นิยมใช้ศึกษา

3. จากการที่ไนเตรตไม่มีผลกระทบโดยตรงต่อการสร้างเอนไซม์ไนโตรจีเนสในเคลมเบียลนาโนบีนี ซึ่งเป็น free-living ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ เป็นตัวแบบในการศึกษาเรื่องการตรึงไนโตรเจนโดยทั่วไป ดังนั้นน่าจะมีผลกระทบในลักษณะที่คล้ายกันต่อการตรึงไนโตรเจนใน prokaryote ชนิดอื่น ๆ จากการศึกษาน่าสนใจของ Gaurangakumar (1982) ในปมรากของพืชจำพวกถั่วเขียว (mung-bean plant) ชื่อ (Vigna radiata) ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่ดีของประเทศในแถบ tropical หรือ subtropical ของโลก พบว่าไนเตรตในปริมาณต่ำ ๆ คือ 0.5 มิลลิโมลาร์ จะกระตุ้นปมรากให้ใหญ่ขึ้น มี leghaemoglobin สะสมมากขึ้น และมีออกติวิตีของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงขึ้น และน้ำหนักแห้งของพืชมีปริมาณสูงสุด ที่ความเข้มข้นของไนเตรตดังกล่าว แต่ถ้ามปริมาณไนเตรตสูงคือประมาณ 4.5 มิลลิโมลาร์ จะไม่ปรากฏปมรากขึ้นเลย

ชี้ให้เห็นว่าไนเตรตอันเป็นแหล่งของสารต้นของไนโตรเจนซึ่งมักพบโดยทั่วไปในดินหรือสิ่งแวดล้อมในปริมาณที่เหมาะสม กลับเพิ่มประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนใน symbiotic nitrogen fixation organisms โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากความต้องการที่จะประหยัดพลังงานของโลก

4. เพื่อการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณก๊าซไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นกับความสามารถของไนโตรเจน ให้ศึกษาการสังเคราะห์ *partial nif* mutant ที่มีวิธี Hydrogenlyase ปกติ และศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวข้างต้น พร้อมกันคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ไนโตรจีเนส

เอกสารอ้างอิง

จุฬาพันธุ์ พิณสวัสดิ์ "การแยกและศึกษาคุณสมบัติของพอร์โมนิกไฮโดรจีเนสในสปีซของ
Klebsiella pneumoniae N5a1" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2526

รัตนา เจนเจริญธรรม "การกลายพันธุ์ของแบคทีเรียที่โอเปอรอนของเฮนไซม์ไนโตรจีเนส
โดยวิธีการเหนี่ยวนำด้วยไนโตรส" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี
วิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2522

พุดพิงศ์ วรวิชัย และคณะอนุกรรมการปรับปรุงหลักสูตรชีววิทยา ชีววิทยา เล่ม 2 พิมพ์
ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ วิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2523

สมศักดิ์ วัจโน การตรึงไนโตรเจน : ไรโซเบียม-พืชตระกูลถั่ว พิมพ์ครั้งที่ 4 กรุงเทพฯ
ภาควิชาปฐพี คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2525

อชิป ลิขิตลิลิต "การศึกษาศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม จากปมคัม
สายพันธุ์ 122 และสายพันธุ์ใหม่" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี
วิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2524

Adams, M.W.W., Mortenson, L. E. and Chen, J-S. "Hydrogenase".
Biochimica et Biophysica Acta. 594 (1981) : 105 - 176.

Abou - Jaoude, A., Pascal, M.C., Casse, F. and Chippaux, M.
"Isolation and Phenotypes of Mutants from Escherichia coli
K-12 Defective in Nitrite - Reductase Activity". FEMS
Microbiology Letters. 3 (1978) : 235 - 239.

Anderson, K. and Shanmugam, K.T. "Energetics of Biological Nitrogen
Fixation Determination of the Ratio of H_2 to NH_4^+ Catalyzed
by Nitrogenase of Klebsiella pneumoniae in vivo". Journal
of General Microbiology. 103 (1977) : 107 - 122.

- Bachmann, E.J. and Low, K.B. "Linkage Map of Escherichia coli K-12" (Edition 6) Microbiological Review. 44 (1980) : 1-56
- Baltscheffsky, H. and Baltscheffsky, K. "Electron Transport Phosphorylation". Annual Review of Biochem. 43 (1974) : 871 - 897.
- Barton, L.L., LeGall, J. and Peck, H.D. Jr. "Phosphorylation Coupled to Oxidative of Hydrogen with Fumarate in Extracts of the Sulphate Reducing Bacterium Desulfovibrio gigas". Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 (1970) : 1036 - 1042.
- Brill, W.J. "Biochemical Genetics of Nitrogen Fixation". Microbiological Review. 44 (1980) : 449 - 467.
- Burn, R.C. and Hardy, R.W.F. in Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plant, Spring Verlag, New York, 1975.
- Chippaux, F., Casse, F. and Pascal, M.C. "Isolation and Phenotypes of Mutants from Salmonella Typhimurium Defective in Formate Hydrogenlyase Activity". Journal of Bacteriology. 110 (1972) : 766 - 768.
- Cox, J.C., Edwards, E.S. and De Moss, J.A. "Resolution of Distinct Selenium - Containing Formate Dehydrogenase from Escherichia coli". Journal of Bacteriology. 145 (1981) : 1317 - 1324.
- Daday, A., Platz, R.A. and Smith, G.D. "Anaerobic and Aerobic Hydrogen Gas Formation by the Blue-Green Alga Anabaena cylindrica". Applied and Environmental Microbiology. 34 (1977) : 478 - 482
- Eady, R.R., Smith, B.E., Cook, K.A. and Postgate, J.R. "Nitrogenase of Klebsiella pneumoniae : Purification and Properties of the Component Proteins". Biochem Journal. 128 (1972) : 655 - 675.

- Enoch, H.G. and Lester, R.L. "The Purification and Properties of Formate Dehydrogenase and Nitrate Reductase from Escherichia coli". Journal of Biochemistry. 250 (1975) : 6693 - 6705.
- Gary, D.C. in Analytical Chemistry, Illus, New York, 1980.
- Gaurangakumar, D. "A Stimulatory Effect of Low Nitrate Levels on Nodulation, Leghaemoglobin Content, Nitrogenase Activity, and Growth of Mung - bean Plants (Vigna radiata)". Canadian Journal Botany. 60 (1982) : 1907 - 1912.
- Hahtela, K., Kari, K. and Sundman, V. "Nitrogenase Activity (Acetylene Reduction) of Root Associated, Cold Climate Azospirillum, Enterobacter, Klebsiella, and Pseudomonas Species During Growth on Various Carbon Sources at Various Partial Pressures of Oxygen". Applied and Environmental Microbiology. 45 (1983) : 563 - 570.
- Hageman, R.V. and Burris, R.H. "Nitrogenase and Nitrogenase Reductase Associate and Dissociate with Each Catalytic Cycle". Proceedings of the National Academy of Sciences. 75 (1978) : 2699 - 2702.
- Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. and Burns, R.C. "The Acetylene Ethylene Assay for N_2 Fixation : Laboratory and Field Evaluation". Plant Physiology. 43 (1968) : 1185 - 1207.
- Hill, S. "The Apparent ATP Requirement for Nitrogen Fixation in Growing Klebsiella pneumoniae". Journal of General Microbiology. 95 (1976) : 297 - 312.

- Hom, S.S.M., Hennecke, H. and Shanmugam, K.T. "Regulation of Nitrogenase Biosynthesis in Klebsiella pneumoniae : Effect of Nitrate". Journal of General Microbiology. 117, 169 - 179.
- Hwang, J.C., Chen, C.H. and Burris, R.H. "Inhibition of Nitrogenase-Catalyzed Reductions". Biochimica et Biophysica Acta. 292 (1973) : 256 - 270.
- Iida, K. and Taniguchi, S. "Studies on Nitrate Reductase System of Escherichia coli. I. Particulate Electron Transport System". Journal of Biological Chemistry. 46 (1959). 1041 - 1055.
- Kennedy, C. and Postgate, J.R. "Expression of Klebsiella pneumoniae Nitrogen Fixation Genes in Nitrate Reductase Mutants of Escherichia coli". Journal General Microbiology. 98 (1977) 551 - 557.
- Krebs, H.A. "The Role of Fumarate in the Respiration of Bacterium coli". Commune. Biochem. Journal. 31 (1937) : 2095 - 2124.
- Kröger, A. "Fumarate as Terminal Acceptor of Phosphorylative Electron Transport". Biochimica et Biophysica Acta. 505 (1978) : 129 - 145.
- Kröger, A., Winkler, E., Innerhofer, A., Hackenberg, H. and Schagger, H. "The Formate Dehydrogenase Involved in Electron Transport from Formate to Fumarate in Vibrio succinogenes". European Journal Biochemistry. 94 (1979) : 465 - 475.
- Lester, R.L. and De Moss, J.A. "Effects of Molybdate and Selenite on Formate and Nitrate Metabolism in Escherichia coli". Journal of Bacteriology. 105 (1971) : 1006 - 1014.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis, F.A. and Randall, R.J.
"Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent".
Journal of Biological Chemistry. 193 (1951) : 265 - 275.
- Luria, S.E., Adams, J.N. and Teng, R.C. "Transduction of Lactose Utilizing Ability Among Strains of Escherichia coli and Shigella dysenteriae and the Properties of the Transducing Phage Particles". Virology. 12 (1960) : 348 - 390
- Luria, S.E. and Delbrück, M. "Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance". Genetics 28 (1943) : 491 - 511.
- Macy, J.; Kulla, H. and Gottschalk, G. " H_2 - Dependent Anaerobic Growth of Escherichia coli on L - Malate : Succinate Formation". Journal of Bacteriology. 125 (1976) : 423 - 428.
- Mahler, H.R. and Cordes, E.H. in Biological Chemistry, Harper & Row, New York, 1971.
- Mandrand - Berthelot, M.A., Wee, M.Y.K. and Haddock, B.A. "An Improved Method for the Identification and Characterization of Mutants of Escherichia coli Deficient in Formate Dehydrogenase Activity". FEMS Microbiology Letters. 4 (1978) : 37 - 40
- Miller, J.H. in Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1976.
- Parejko, R.A. and Wilson, P.W. "Regulation of Nitrogenase Synthesis by Klebsiella pneumoniae". Canadian Journal Microbiology. 16 (1970) : 681 - 685.

- Peck, H.D.Jr. and Gest, H. "Formic Dehydrogenase and the Hydrogen-lyase Enzyme Complex in Coli - Aerogenes Bacteria". Journal of Bacteriology. 73 (1957) : 706 - 721.
- Ruiz-Herrera, J., Alvarez, A. and Figueroa, I. "Solubilization and Properties of Formate Dehydrogenase from the Membrane of Escherichia coli". Biochimica et Biophysica Acta. 289
- Schnaitman, C.A. Cell Fractionation, in Manual of Methods for General Bacteriology (Gerhardt, P. ed.) pp. 52 - 61, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1981.
- Shanmugam, K.T., Loo, A.S. and Valentine, R.C. "Deletion Mutants of Nitrogen Fixation in Klebsiella pneumoniae : Mapping of a Cluster of nif Genes Essential for Nitrogenase Activity". Biochimica et Biophysica Acta. 338 (1974) : 545 - 553.
- Shanmugam, K.T., O'Gara, F., Anderson, K. and Valentine, R.C. "Biological Nitrogen Fixation". Annual Review of Plant Physiology. 29 (1978) : 263 - 276.
- Showe, M.K. and De Moss, J.A. "Localization and Regulation of Synthesis of Nitrate Reductase in Escherichia coli". Journal of Bacteriol. 95 (1968) : 1305 - 1313.
- Snell, F.D. and Snell, C.T. in Colorimetric Methods of Analysis 3rd ed., Van Nostrand, Princeton, New York, 1961.
- Sprent, J.I. in The Biology of Nitrogen - Fixing Organisms, Mc Graw-Hill, London, 1979.
- St John, R.T., Shah, V.K., and Brill, W.J. "Regulation of Nitrogenase Synthesis by Oxygen in Klebsiella pneumoniae". Journal of Bacteriology. 119 (1974) : 266 - 269.

- Streicher, S., Gurney, E. and Valentine, R.C. "Transduction of the Nitrogen Fixation Genes in Klebsiella pneumoniae". Proceedings of the National Academy of Science. 68 (1971) : 1174 - 1177.
- Streicher, S.L. and Valentine, R.C. "Comparative Biochemistry of Nitrogen Fixation". Annual Review of Biochemistry. 42 (1973) : 279 - 302.
- Streicher, S.L., Shanmugam, K.T., Ausubel, F., Morandi, C. and Goldberg, R.B. "Regulation of Nitrogen Fixation in Klebsiella pneumoniae : Evidence for a Role of Glutamine Synthetase as a Regulator of Nitrogenase Synthesis". Journal of Bacteriology. 120 (1974) : 815 - 821.
- Trait, R.C., Anderson, K., Candelost, G. and Shanmugam, K.P. Hydrogenase Genes in Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemical (Hollaender, A. ed) pp. 279-303, Plenum Press, 1981.
- Tubb, R.S. and Postgate, J.R. "Control of Nitrogenase Synthesis in Klebsiella pneumoniae". Journal of General Microbiology. 79 (1973) : 103 - 117.
- Tyler, B. "Regulation of the Assimilation of Nitrogen Complex". Annual Review of Biochem. 47 (1978) : 1127 - 1162.
- Wimpenny, J.W.T. and Cole, J.A. "The Regulation of Metabolism in Facultative Bacteria III. The Effect of Nitrate". Biochimica et Biophysica Acta. 148 (1967) : 233 - 242.
- Wolin, M.J., Wolin, E.A. and Jacobs, N.J. "Cytochrome - Producing Anaerobic Vibrio, Vibrio succinogenes, SP.N.". Journal of Bacteriology. 81 (1961) : 911 - 917.

Yoch, D.C. "Electron Transport Carriers Involved in Nitrogen Fixation by the Coliform, Klebsiella pneumoniae". Journal of General Microbiology, 83 (1974) : 153 - 164.

ประวัติผู้เขียน

นางสาว นิกา เลขสุนทรภกร เกิดวันที่ 20 มีนาคม 2499 ณ จังหวัดนนทบุรี
สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหา-
วิทยาลัย เมื่อปีพ.ศ. 2523

สถาบันวิจัยประชากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย