

สมบัติของไนโตรตรึงที่พืชของ Bradyrhizobium japonicum ที่เลี้ยงในสภาวะ  
ไมโครแอโรบิกที่มีไนเตรตและในแบคทีเรียที่รอยค้ำจากปมรากถั่วเหลือง (Glycine max)

นางสาว เนาวรัตน์ ศรีวงศ์พานิช



ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531


ISBN 974-569-261-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014419

147 010 240

CHARACTERS OF NITRATE REDUCTASE IN Bradyrhizobium japonicum  
GROWN MICROAEROBICALLY WITH NITRATE AND IN BACTERIOD  
FROM SOYBEAN NODULES (Glycine max)



Miss Naowarat Srivongphanish

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Biochemistry

Graduate School


Chulalongkorn University

1988

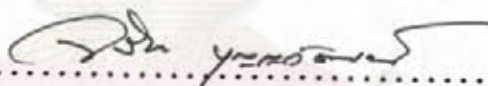
ISBN 974-569-261-1

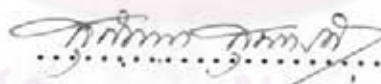
หัวข้อวิทยานิพนธ์ สมบัติของไนโตรตรึงที่เสถียรของ Bradyrhizobium japonicum ที่เลี้ยง  
ในสภาพอะไมโครแอโรบิกที่มีไนโตรเจนและไนแบคทีเรียจากปมรากถั่วเหลือง  
(Glycine max)  
โดย นางสาว เนาวรัตน์ ศรีวงศ์พานิช  
ภาควิชา ชีวเคมี  
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.สุกัญญา สุนทรส


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


  
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรภักย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จรรยา บุญวัฒน์)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(อาจารย์ ดร.สุกัญญา สุนทรส)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรดา สิริจินตกานต์)

  
..... กรรมการ  
(ดร.นันทกร บุญเกิด)





พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

เนาवरत्न ศรีวงค์พานิช : สมบัติของไนเตรตรีดักเตสของ *Bradyrhizobium japonicum* ที่เลี้ยงในสภาวะไมโครแอโรบิกที่มีไนเตรดและในแบคทีรียอดจากปมรากถั่วเหลือง (*Glycine max*) [CHARACTERS OF NITRATE REDUCTASE IN *Bradyrhizobium japonicum* GROWN MICROAEROBICALLY WITH NITRATE AND IN BACTEROID FROM SOYBEAN NODULE (*Glycine max*)] อ.ที่ปรึกษา : อ.ดร.สุกัญญา สุทรส, 108 หน้า.

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเตสของแบคทีโรโซเบียมจาโปนิคัม สายพันธุ์ 122 สามารถถูกเหนี่ยวนำขึ้นได้ ทั้งเมื่อเลี้ยงในสภาวะไมโครแอโรบิกที่มีไนเตรดที่เชื่อมไนเตรดความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ และสภาวะในแบคทีรียอดในปมรากถั่วเหลือง (*Glycine max*) ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรดที่เชื่อมไนเตรดความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์เช่นกัน

จากการศึกษาพบว่า ไนเตรตรีดักเตสที่ถูกเหนี่ยวนำขึ้นในทั้งสองสภาวะนี้ จัดเป็นไนเตรตรีดักเตสประเภท dissimilatory ซึ่งทำงานในการหายใจแบบใช้ในเตรด (nitrate respiration) และมีรูปแบบการใช้ตัวให้อิเล็กตรอนเหมือนกัน โดยมีลำดับความสามารถในการใช้ตัวให้อิเล็กตรอนดังนี้ NADH (0.3 มิลลิโมลาร์) เบนซิลไวโอโลเจน (0.05 มิลลิโมลาร์) เมทิลไวโอโลเจน (1 มิลลิโมลาร์) โซเดียมซัคซิเนต (12.5 มิลลิโมลาร์) และโซเดียมฟอร์มเมต (5 มิลลิโมลาร์)

การวิเคราะห์ทางสัณตติพบว่ามีปมรากถั่วเหลืองในสภาวะที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรดที่เชื่อมไนเตรดมีแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรดรีดักเตสสูง แต่มีน้ำหนักปมและจำนวนปมลดลง (4 เท่า และ 2 เท่า ตามลำดับ) แสดงว่าไนเตรตรีดักเตสที่เพิ่มขึ้นไม่ได้ควบคุมไนเตรดรีดักเตสในปมรากถั่วเหลือง การที่ไนเตรดที่เติมในอาหารที่เลี้ยงต้นถั่วทำให้น้ำหนักต้นถั่วเพิ่มขึ้น 3 เท่า แสดงว่าอาจมี assimilatory nitrate reductase ในส่วนของพืชที่มีบทบาทในการดึงไนเตรดไปใช้สำหรับการเจริญของพืช

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... ชีวเคมี  
สาขาวิชา ..... ชีวเคมี  
ปีการศึกษา ..... 2530

ลายมือชื่อนิสิต ..... 11009145 อ.สุกัญญา  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... [ลายมือ]

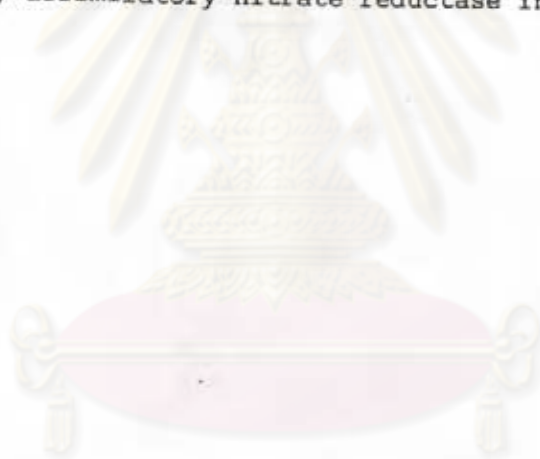
พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเพียงแผ่นเดียว

Naowarut Srivongphanish : CHARACTERS OF NITRATE REDUCTASE IN Bradyrhizobium japonicum GROWN MICROAEROBICALLY WITH NITRATE AND IN BACTEROID FROM SOYBEAN NODULES (Glycine max). THESIS ADVISOR : SUGANYA SOONTAROS, Ph.D., 108 PP.

Nitrate reductase (NR) was induced in Bradyrhizobium japonicum 122 which was grown in two different conditions : in vitro microaerobic condition in the presence of 6 mM  $KNO_3$  and as bacteroid in soybean (Glycine max) root nodules grown in medium containing the same concentration of  $KNO_3$ .

Detail studies showed that the enzymes induced in both conditions are dissimilatory enzyme functioning in nitrate respiration and possess the same order of electron donor preference : NADH > benzylviologen > methylviologen > sodium succinate > sodium formate.

When 6 mM  $KNO_3$  was introduced to the nodules inoculated with R. japonicum 122, significant reduction in nodule number and weight was observed, in spite of the increase in plant dry weight. Nitrogenase activity remained unchanged therefore showed no correlation to the induction of dissimilatory nitrate reductase. Elevation of plant dry weight was tentatively suggested to be enhanced by assimilatory nitrate reductase in other parts of plant.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....ชีวเคมี.....  
สาขาวิชา .....ชีวเคมี.....  
ปีการศึกษา .....2530.....

ลายมือชื่อนิสิต ..... 1๒๖๑๒๗ ๗๕๖๗๘๙๐.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... [ลายมือ].....

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุกัญญา สุนทรส เป็นอย่างยิ่งที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำและความช่วยเหลือ ตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่ในภาควิชาชีวเคมี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญวัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา สิริจินตกานต์ ที่ให้ความกรุณาและคำแนะนำต่อผู้เขียน รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณ ดร. นันทกร บุญเกิด ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องใช้ในการทำวิจัย และกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ในภาควิชาชีวเคมี ที่ให้ความกรุณาและความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ

ขอบคุณนิสิตหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต และคุณฐิบัณฑิต ในภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี และศิริโร โขเบียม กองประพืวิทยา กรมวิชาการ เกษตร สำหรับความช่วยเหลือระหว่างการทำวิจัย

และขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนสำหรับการวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญตารางประกอบ .....	ณ
สารบัญรูปประกอบ .....	ญ
คำย่อ .....	ร
บทที่	
1. บทนำ .....	1
2. วิธีการทดลอง	
1. วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง .....	10
2. สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ .....	11
3. สูตรอาหารที่ใช้ปลูกคั้นตัว .....	12
4. การเลี้ยงเชื้อ <u>เบรคทีโรโซเบียม จาโปนิกัม</u> สายพันธุ์ 122 .....	13
5. การเตรียมสารละลายเซลล์และเอนไซม์ .....	14
6. การปลูกคั้นตัวเหลืองและการตีพิมพ์รา .....	14
7. การเตรียมแบคทีรียคจากพิมพ์รา .....	17
8. การแยกส่วนประกอบของเซลล์ .....	17
9. การทดสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ .....	19
10. การวัดปริมาณไนเตรต .....	23
11. การวัดปริมาณโปรตีน .....	23
3. ผลการทดลอง	
1. การเหนี่ยวนำเอนไซม์ไนเตรรีดักเตสใน <u>เบรคทีโรโซเบียม จาโปนิกัม</u> สายพันธุ์ 122 .....	24

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2. การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีคัลเทสของเซลล์สมบูรณ์ ...	26
3. การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีคัลเทสในส่วนไฮโมจิเนต ..	34
4. การศึกษาสภาวะการสกัดและการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีคัลเทส .....	38
5. การศึกษาคำแห่งของเอนไซม์ในเตรตรีคัลเทสในเซลล์ .....	42
6. ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ในเตรตรีคัลเทสและพอร์มเมตติไฮโคโร- จิเนสพอร์ม N .....	44
7. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ในเตรตรีคัลเทสในส่วนเยื่อเซลล์ ...	44
8. การศึกษาเปรียบเทียบผลของตัวให้อิเล็กตรอนต่อแอกติวิตีของในเตรตรีคัลเทส ในเซลล์สมบูรณ์ และในส่วนเยื่อเซลล์ .....	54
9. ผลของอนุมูลในเตรตต่อปมรากถั่วที่ inoculated ด้วยเชื้อแบคที- ไรโซเบียม จากปมถั่ว สายพันธุ์ 122 และต่อเอนไซม์ในเตรตรีคัลเทส และไนโตรจิเนสในปมราก .....	57
4. วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย .....	69
เอกสารอ้างอิง .....	80
ภาคผนวก .....	89
ประวัติผู้เขียน .....	108



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงค่าธาตุอาหารในโตรเจนในดินในประเทศไทยโดยประมาณ .....	27
2	ผลของออกซิเจนในบรรยากาศต่อการสกัดและการวัดแอกติวิตีของไนเตรดรีดักเทสในส่วนเยื่อเซลล์ (100,000xg pellet) และส่วนไซโตซอล (cytosol fraction; 100,000xg Supernatant) .....	41
3	การศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ไนเตรดรีดักเทสในส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ และผลของไลโซโซม และ EDTA ต่อการแยกส่วนประกอบของเซลล์ ...	43
4	ผลของตัวให้อิเล็กตรอนต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรดรีดักเทสในเซลล์-สมบูรณ์ .....	58
5	ผลของตัวให้อิเล็กตรอนต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรดรีดักเทสในส่วนเยื่อเซลล์ (100,000xg Pellet) .....	59
6	การศึกษาเปรียบเทียบแอกติวิตีของไนเตรดรีดักเทสและปริมาณไนเตรดในส่วนต่าง ๆ ของปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรด ความเข้มข้น 2, 6 มิลลิโมลาร์ และไม่มีโปตัสเซียมไนเตรด .....	61
7	ผลของตัวให้อิเล็กตรอนต่อแอกติวิตีของไนเตรดรีดักเทสในส่วนแบคทีรียักษ์ และส่วนของพีช (cytosol) ของปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีและมีโปตัสเซียมไนเตรดความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ .....	63
8	การศึกษาเปรียบเทียบน้ำหนักปม จำนวนปม น้ำหนักคันทัง และแอกติวิตีของอะเซทิลีน ระหว่างปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรด 2, 6 มิลลิโมลาร์ และไม่มีโปตัสเซียมไนเตรด .....	67
9	การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักปมสด จำนวนปม แอกติวิตีของอะเซทิลีนรีดักชันและไนเตรดรีดักเทสของปมรากถั่วเหลืองอายุ 40 วัน ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปตัสเซียมไนเตรด ความเข้มข้น 2, 6 มิลลิโมลาร์ และไม่มีโปตัสเซียมไนเตรด .....	68

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	วิธีต่าง ๆ ภายใต้อาหารปราศจากออกซิเจนที่มีไนเตรต ใน <u>เอสเคอริเชีย โคลิ</u> .....	7
2	Ruk Flask .....	13
3	ลีโอนาร์ค จาร์ .....	16
4	ปฏิกิริยาของการวัดปริมาณไนโตรต .....	20
5	ลักษณะการเจริญและแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสของเชื้อ <u>เบรคที-โรโซเบียม จาโปนิคัม</u> สายพันธุ์ 122 เมื่อเลี้ยงในสภาวะแอโรบิกและไมโคร-แอโรบิก เมื่อมีและไม่มีโปคัสเซียมไนเตรต ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส .	25
6	ผลของความเข้มข้นของโปคัสเซียมไนเตรตต่อรูปแบบการเจริญและแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสของเชื้อ <u>เบรคทีโรโซเบียม จาโปนิคัม</u> สายพันธุ์ 122 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไรโครแอโรบิก ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส...	28
7	เวลาสำหรับการขนส่งอนุมูลไนเตรตเข้าสู่เซลล์ .....	
8	ผลของเวลาต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส เมื่อทำการวัดในขณะที่เซลล์สมบูรณ์ เมื่อใช้ไซเทียมซัคซิเนตเป็นตัวให้อิเล็กตรอน .....	31
9	ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของไนเตรรีดักเทสและปริมาณโปรตีนของเซลล์สมบูรณ์ .....	32
10	ผลของความเข้มข้นของโปคัสเซียมไนเตรตต่อการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสเมื่อทำการวัดในขณะที่เซลล์สมบูรณ์ .....	33
11	ผลของ NADH ต่อการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส .....	35
12	ผลของเวลาต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส เมื่อทำการวัดในขณะที่เซลล์สมบูรณ์ และใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน .....	36
13	ความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส เมื่อเก็บเซลล์สมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส .....	37

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	ผลของเวลาต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรครีคัลเทสในส่วนไฮโมจิเนต เมื่อใช้โซเดียมซัคซิเนตเป็นตัวให้อิเล็กตรอน .....	39
15	ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรครีคัลเทสกับปริมาณโปรตีน ในส่วนไฮโมจิเนต .....	40
16	ลักษณะการเจริญ แอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรครีคัลเทส และแอกติวิตีของ เอนไซม์ฟอร์มเมตดีไฮโดรจิเนส ฟอร์ม N ของเซลล์สมบูรณ์ .....	45
17	ผลของฟอร์มเมตต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรครีคัลเทส เมื่อทำการวัดใน ขณะที่เซลล์สมบูรณ์ โดยใช้ฟอร์มเมตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวให้อิ เล็กตรอน .....	46
18	ผลของเวลาต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรครีคัลเทสในส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วน ตะกอน 100,000xg) เมื่อใช้โซเดียมซัคซิเนตเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ....	48
19	ความสัมพันธ์ระหว่างแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรครีคัลเทสและปริมาณโปรตีนในส่วน เยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) .....	49
20	ผลของ pH ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรครีคัลเทสในส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วน ตะกอน 100,000xg) .....	50
21	ผลของความเข้มข้นของโปดัสเซียมในเตรครีคัลเทสต่อการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ ในเตรครีคัลเทสในส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) .....	51
22	Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ในเตรครีคัลเทสในส่วนเยื่อเซลล์ กับ สารตั้งต้นโปดัสเซียมในเตรครีคัลเทส .....	52
23	ความเสถียรของเอนไซม์ในเตรครีคัลเทส ในส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) และส่วนไซโทซอล (ส่วนใส 100,000xg) เมื่อเก็บในสาร ละลายโปดัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, 100 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส ภายใต้อาร์กอนและไนโตรเจน	53



## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
24	ผลของความเข้มข้นของตัวให้อิเล็กตรอนต่อแอกติวิตีของไนเตรรีดักเตส ในเซลล์สมบูรณ์ และส่วนเยื่อเซลล์ (ส่วนตะกอน 100,000xg) . . . . .	55
25	ผลของฟอร์มเมตต่อแอกติวิตีของ เอนไซม์ไนเตรรีดักเตสในส่วนแบคทีรียักษ์ และส่วนของพืชจากปมรากถั่วเหลืองที่เลี้ยงด้วยไนโตรเจนในเตรต ความ เข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ และอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนในเตรต . . . . .	63
26	ลักษณะปมรากถั่วเหลือง จากต้นถั่วเหลืองอายุ 40 วัน ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ มีไนโตรเจนในเตรต (+NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) เปรียบเทียบกับปมรากถั่วเหลืองจากต้นถั่ว- เหลืองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนในเตรต (- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) . . . . .	66
27	การถ่ายทอคือเลคตรอนใน assimilatory nitrate reductase ...	73
28	การถ่ายทอคือเลคตรอนใน dissimilatory nitrate reductase ..	73

  
 ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คำย่อ

ADP	=	Adenosine-5'-diphosphate
ATP	=	Adenosine-5'-triphosphate
DCPI	=	2,6-Dichlorophenolindophenol
EDTA	=	Ethylene diamine tetraacetic acid
FAD	=	Flavin adenine dinucleotide
FDH <sub>N</sub>	=	Formate dehydrogenase form N
NADH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form
NAD <sup>+</sup>	=	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
NR	=	Nitrate reductase
OD	=	Optical density
Pi	=	Inorganic phosphate
PFL	=	Pyruvate formatelyase
PMS	=	Phenazine methosulfate
TCA	=	Tricarboxylic acid
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย