บทคัดย่อ

หัวเชื้อไรโซเบียมถูกนำมาใช้กับการปลูกพืชตระกูลถั่วเพื่อทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ได้ ทั้งนี้นอกจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแล้ว เชื้อไรโซเบียมบางสายพันธุ์ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ 1-minocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase เพื่อช่วยในการส่งเสริมการเจริญให้กับพืชภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตามระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อกลุ่มไรโซเบียมมีไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับเชื้อในกลุ่ม Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ดังนั้นการใช้เทคนิค metabolic evolution ซึ่งเป็นการปรับปรุงเชื้อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยอาศัยการปรับตัว และการคัดเลือกทางธรรมชาติเพื่อให้ได้เชื้อที่มีลักษณะหรือคุณสมบัติตามต้องการโดยไม่อาศัยการตัดต่อพันธุกรรม โดยในโครงการวิจัยนี้ได้นำเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ซึ่งเป็นเชื้อที่เข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้ดีกับถั่วเศรษฐกิจหลายชนิด โดยได้พัฒนาให้เชื้อเกิดการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อ ACC และยังสามารถใช้ ACC เป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ โดยเมื่อตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 2.92 ± 0.16 µmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein และเมื่อเชื้อดังกล่าวผ่านกระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 3.20 ± 0.78 และ 3.98 ± 0.04 µmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein ในสายพันธุ์ SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0 ตามลำดับ ทั้งนี้ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acdS* ซึ่งเป็นยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC deaminase ในแบคทีเรียชนิดนี้ที่เปลี่ยนแปลงไปในเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evoluation ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไป 2 ตำแหน่ง คือ G (ลำดับเบสที่ 419) และ C (ลำดับเบสที่ 843) เปลี่ยนไปเป็น A และ T เมื่อเทียบกับเชื้อดั้งเดิม และผลจากการเปลี่ยนไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งที่ 419 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปจาก S หรือ serine (Ser/S) ใน SUTN9-2 ดั้งเดิม ไปเป็น N หรือ Asparagine (Asn/N) ในเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ทั้งสองสายพันธุ์ และเมื่อทดสอบความเสถียรของกิจกรรมเอนไซม์นี้ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่วัดจากเชื้อ SUTN9-2_2.5 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่คงที่ เมื่อเลี้ยงติดต่อกัน 3 รุ่น ในขณะที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ใน SUTN9-2_3.0 ไม่มีความเสถียร โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Abstract

Rhizobium inoculant was applied with legumes in order to fix nitrogen from the air and turn to be fertilizer for the plant. Some strains of rhizobium not only contain nitrogen fixation ability but also having the activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase enzyme to promote plant growth under stress conditions. However, the level of ACC deaminase activity in rhizobia is usually lower than that of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). To improve the activity of this enzyme in rhizobium, the metabolic evolution technique which is the technique that can improve the ability of strain through the natural adaptation under the selected pressure was interested to be used to improve the ACC deaminase activity of rhizobial strain without genetic engineering method. *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 was used as a model in this study since this strain could symbiosis well with several economic legumes. The results showed that the metabolic evoluted strains could adapt itself tolerate to high concentration of ACC and used it as N-source. The ACC deaminase activity of SUTN9-2 wild-type was 2.92 ± 0.16 µmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein, while the enzyme activity of metabolic evoluted strains, SUTN9-2_2.5 and SUTN9-2_3.0 increased into 3.20 ± 0.78 and 3.98 ± 0.04 µmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein, respectively. The nucleotide sequence of *acdS* which involved in biosynthesis of ACC deaminase enzyme in these bradyrhizobia was determined. The result showed that both metabolic evoluted strains had 2 positions of nucleotide change, at position 419 changed from G to A, and at position 843 changed from C to T. Base changes resulted in changing amino acid in one position from serine (S) to asparagene (N) in both metabolic evoluted strains. The stability of enzyme activity was also investigated and it was found that the enzyme activity of metabolic evoluted strain SUTN9-2_2.5 was stable after 3 consecutive generations of growth, while the enzyme activity significantly decreased in strain SUTN9-2_3.0.