4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 สภาพบ่อน้ำร้อน และลักษณะเซลล์ของสาหร่าย

สภาพบ่อน้ำร้อนที่ จ.ระนอง เป็นบ่อหินปูน บ่อน้ำร้อนที่สำรวจมีอุณหภูมิสูงสุด 67 องศาเซลเซียส ส่วนธารน้ำไหลจากบ่อน้ำร้อนมีอุณหภูมิตั้งแต่ 26-65.2 องศาเซลเซียส สภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำอยู่ระหว่าง 6-8 ลักษณะน้ำใส มีสีเขียวอ่อน ไม่มีกลิ่นซัลเฟอร์ และเมื่อนำน้ำมาวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ในห้องปฏิบัติการไม่พบไนเตรตและไนไตรต์ ส่วนสาหร่าย *Synechococcus minervae* ที่แยกได้ พบในแหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิ ตั้งแต่ 26 - 47.7 องศาเซลเซียส แต่จากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายในห้องปฏิบัติการ พบว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. minervae* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 – 35 องศาเซลเซียส Komarak และคณะ(1999) พบสาหร่ายชนิดนี้ได้ในน้ำพุร้อนทั่วไป (ยุวดี และคณะ, 2544) ที่มีความเป็นด่าง อุณหภูมิที่พบอยู่ที่ระหว่าง 23.5 -64.1 องศาเซลเซียส พบสาหร่ายชนิดนี้ที่ภาคเหนือตอนบนของไทยในน้ำพุร้อนที่เป็นด่างที่มีอุณหภูมิประมาณ 30-60 องศาเซลเซียส ลักษณะเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีทั้งอยู่เป็นเซลล์เดียว และอยู่เป็นคู่ มีสีเขียวมะกอก หรือสีเขียวแกมน้ำเงิน รูปร่างเซลล์มีทั้งรูป กลม, ทรงไข่หรือทรงกระบอก ปกติจะพบเส้น chromatoplasm ตามแนวยาวของเซลล์

4.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในห้องปฏิบัติการ

4.2.1 ปริมาณไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยง

สาหร่าย *S. minervae* เจริญได้ดีในอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรต 5,9 มิลลิโมลาร์ (0.5 กรัมต่อลิตร) และมีโซเดียมไบคาร์บอเนต 23.8 มิลลิโมลาร์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งในอาหารสูตรนี้สาหร่ายมีชีวิตอยู่ในอาหารนี้ได้นานหลายเดือนเพราะสาหร่ายใช้ไนเตรตในปริมาณที่น้อยจึงเห็นผลของการดูดซับไนเตรตได้ไม่ชัดเจน และเพื่อศึกษาการดูดซับไนเตรตจึงลดความเข้มข้นโซเดียมไนเตรตลงเหลือ 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถศึกษาการดูดซับไนเตรตและการปล่อยไนไตรต์ในอาหารได้ดี และจากการทดลองทำให้ทราบว่าสาหร่าย *S. minervae* เป็นสาหร่ายที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ (non-nitrogen-fixing) เนื่องจากพบว่าเมื่อสาหร่ายใช้ไนเตรตและไนไตรต์ในอาหารเพาะเลี้ยงหมดเซลล์สาหร่ายจะเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองหรือสีน้ำตาล Qiang และคณะ (1999) พบว่าสาหร่ายที่ใช้ไน

เตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวจะมีประสิทธิ์ภาพในการกำจัดไนเตรตได้ดีกว่าสาหร่ายที่สามารถใช้ไนเตรต และตรึงไนโตรเจนในอากาศได้

4.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S minervae*

จากผลการทดลองที่ 3.8 ทำให้ทราบว่าสาหร่ายสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่างจากแหล่งที่เก็บตัวอย่าง และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่านี้อัตราการเจริญของสาหร่ายลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติสาหร่ายจะอยู่รวมกันกับสาหร่ายชนิดอื่น และเซลล์สาหร่ายเองจะมีการสร้างเมือกออกมาหุ้ม (Komarak *et al*.,1999) เพื่อปรับตัวให้สามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงได้ ดังนั้นที่อุณหภูมิสูงสาหร่ายอาจจะพอมีชีวิตอยู่ได้แต่การเจริญอาจจะไม่ดีเพราะจากการศึกษาการดูดซับไนเตรตและการปล่อยไนไตรต์ในอาหารของเซลล์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิสูงขึ้น การดูดซับไนเตรตลดลง และการปล่อยไนไตรต์ในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสามารถทำงานที่อุณหภูมิสูงได้ดี แต่เอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสอาจทำงานที่อุณหภูมิสูงได้ไม่ดี จึงมีการสะสมไนไตรต์ภายในเซลล์และเมื่อมีความเข้มข้นไนไตรต์สูงขึ้นจะเป็นพิษต่อเซลล์จึงมีการปล่อยไนไตรต์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงมากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่อุณหภูมิสูง

4.2.3 อิทธิพลของความเข้มแสงต่อการเจริญของ *S. minervae*

ความเข้มแสงมีผลต่อการเจริญของสาหร่าย เพราะเมื่อมีแสงมาก การเจริญของสาหร่ายก็จะเพิ่มขึ้นด้วย และจากผลการทดลองที่ 3.9 พบว่าการเจริญของสาหร่าย *S. minervae* เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มแสง และความเข้มแสงที่ทำให้สาหร่ายเติบโตได้ดีที่สุดเท่ากับ 452 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที แต่เลือกใช้ความเข้มแสงที่ 152 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เพื่อง่ายในการติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไนเตรตและไนไตร์ในอาหารเพาะเลี้ยง การเพิ่มความเข้มแสงที่สูงมากทำให้เซลล์สาหร่ายมีการนำไนเตรตไปใช้ในการสร้างรงควัตถุ เพื่อป้องกันการฟอกขาวของเซลล์มากกว่าการเจริญของเซลล์สาหร่าย และการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสงสูงมาก ๆ จะทำให้การศึกษาการดูดซับไนเตรตและการปล่อยไนไตรต์ในอาหารเพาะเลี้ยงได้ไม่ชัดเจน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายทะเลสีแดง *K. alvarezii* ใช้ความเข้มแสง 55 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที เนื่องจากสาหร่ายสีแดงเป็น

สาหร่ายทะเลน้ำลึกจึงต้องการแสงน้อยกว่าสาหร่ายชนิดอื่น (Malena *et al*., 2003) Qiang และคณะ (1999) เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechococcus* sp. strain 7942 ภายใต้ความเข้มแสง 180 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าความเข้มแสงมีผลต่ออัตราการดูดซับไนเตรต โดยเฉลี่ย 0.05 มิลลิโมลาร์ต่อชั่วโมง แต่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่นมีการดูดซับไนเตรตในอัตราที่ต่ำกว่า ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Phormidium tenue* ใช้ความเข้มแสง 621.9 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ซึ่งเป็นความเข้มแสงที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงสุด (สุพัตรา หนูนวล, 2548)

4.2.4 อิทธิพลของปริมาณออกซิเจนต่อการเจริญของ *S. minervae*

ผลการทดลองที่ 3.10 พบว่าการเขย่าเซลล์สาหร่าย 150 รอบต่อนาที ขณะเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นการให้ออกซิเจนกับเซลล์สาหร่าย ทำให้เซลล์สาหร่ายมีการดูดซับไนเตรต การปล่อยไนไตรต์ และการเจริญของเซลล์สาหร่ายลดลงกว่าไม่มีการเขย่า แสดงว่าการให้ออกซิเจนเป็นการขัดขวางการดูดซับไนเตรตของเซลล์สาหร่าย เขมิกา โขมพัตร (2545) ได้ทดลองปลูกข้าวในระบบไฮโดรโพนิค และมีการเติมออกซิเจนให้กับสารละลายอาหารที่ใช้ปลูก พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจะต่ำกว่าการปลูกข้าวในสารละลายที่มีออกซิเจนต่ำ Haba และคณะ(2001) พบว่าเมื่อมีการเติมออกซิเจนในสารละลายอาหารทำให้กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสลดลงในขณะที่ระดับ ATP เพิ่มขึ้น ซึ่ง ATP ที่เพิ่มขึ้นจะมีผลต่อการเติมฟอสเฟตให้กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส Stewart และ Pearson (1970) ศึกษาการตรึงไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในไซยาโนแบคทีเรียพบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่มีระดับออกซิเจนสูงจะยับยั้งการตรึงไนโตรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ เพราะออกซิเจนมีผลกดการแสดงออกของยีน nifDHK ซึ่งมีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับไนโตรเจนใน *Anabaena* sp. PCC 7120 (Elhia and Wolk, 1991) ในการทดลองนี้อาจเป็นไปได้ว่าออกซิเจนอาจจะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส จึงมีผลต่อ การดูดซับไนเตรต และการปล่อยไนไตรต์ในอาหาร ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเซลล์สาหร่าย

4.2.5 ผลของไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยงต่อเซลล์สาหร่ายในการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

การแสดงออกของยีนในการสังเคราะห์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสใน *Synechococcus* sp strain 7942 ถูกกระตุ้นโดยไนเตรตและไนไตรต์ (Kikushi *et al*., 1996) แต่เมื่อไนเตรตภายในเซลล์สูงมากจนอาจจะเป็นพิษต่อเซลล์ได้เซลล์จะสร้างไอโซไซยาเนตขึ้นมาเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน nirA ทำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ไตรตรีดักเทส ไนไตรต์รีดักเทสและตัวขนส่งไนเตรตลดลง การนำไนเตรตเข้าสู่เซลล์และการผลิตไนไตรตภายในเซลล์ลดลงตามมา ซึ่งเรียกกลไกนี้ว่า feedback inhibition (Hiroyuki *et al*., 1996) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 3.6 พบว่าเซลล์สาหร่าย *S. mineravae* จะสร้างเอนไซม์ในช่วงที่มีปริมาณไนไตรต์ต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นไนไตรต์ในอาหารอาจจะมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสภายในเซลล์ และอาจเป็นกลไกลป้องกันความเป็นพิษของไนไตรต์ เพื่อไม่ให้มีปริมาณไนไตรต์สะสมภายในเซลล์มากเกินไป สุพัตรา หนูนวล (2548) ได้เพาะเลี้ยงสาหร่าย *P. tenue* เพื่อให้มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงสุด ในอาหาร BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรตเท่ากับ 0.05 มิลลิโมลาร์ และถ้าในอาหารมีความเข้มข้นไนเตรตสูงกว่านี้ กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจะลดลง

4.2.6 ตำแหน่งของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *S . minervae*

กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *S.minervae* พบเฉพาะส่วนของเมมเบรน ซึ่งเป็นลักษณะของ respiratory membrane-bound nitrate reductase และเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสชนิดนี้สามารถพบได้ใน *E. coli*, *P. denitrificans*, *T. thermophilus* นอกจากนี้ยังสามารถพบ respiratory membrane-bound nitrate reductase ใน denitrifying bacteria และ nitrate respiring bacteria เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *P. tenue* (menegh) Gomont มีกิจกรรมเอนไซม์เฉพาะส่วนของเมมเบรนเช่นกัน (สุพัตรา หนูนวล, 2548) ซึ่งต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าวที่เป็นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสชนิด assimilatory nitrate reductase และตำแหน่งของเอนไซม์มักพบอยู่ในส่วนของไซโตพลาสซึม (เขมิกา โขมพัตร, 2545)

4.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

4.3.1 อุณหภูมิ

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบจาก *S. minervae* สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง คือ 45 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.20) แสดงว่าเอนไซม์ทนความร้อนได้และเซลล์สาหร่ายสามารถใช้ไนเตรตในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงได้ เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่อุณหภูมิสูง เช่นเดียวกันกับ *P. tenue* จากการศึกษาของสุพัตรา หนูนวล (2548) พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจาก *T. thermophilus* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (Ramierez-Arcos *et al*., 1998) และเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจาก Hyperthermophilic archaeon ที่ชื่อ *P. aerophilum* สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 95 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์เท่ากับ 90 นาที (Afshar *et al*., 2001) แต่เอนไซมไนเตรตรีดักเทสจาก *Synechococcus* sp strain RF-1 และ *E. coli* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Wang *et al*.,2003)

4.3.2 ความเป็นกรด-ด่าง

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. minervae* ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางถึงด่างได้ดี (รูปที่ 3.21) ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายสีแดง *Porphyra yezoensis* ที่ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.3 (Nakamura and Ikawa, 1993) *Synechococcus* sp strain RF-1 และ *E. coli* ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง คือช่วง pH 8-10 (Wang *et al*.,2003) ซึ่งต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจาก *P. aerophilum* มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 6.5 ส่วนสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *P. tenue* ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง คือ 7.5 (สุพัตรา หนูนวล, 2548) เช่นเดียวกันกับข้าว ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7.5 (เขมิกา โขมพัตร, 2545) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบที่ได้จากสาหร่าย *S. minervae* มีกิจกรรมสูงในช่วงที่เป็นกลางถึงค่อนข้างเป็นด่างได้ดี ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสารสกัดหยาบสามารถทนต่อสภาวะความเป็นด่างได้ดี

4,4 ผลของ NADH, NADPH และ Methyl viologen ต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนกับเอนไซม์ไนเตรตรีดัก-เทส

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบไม่สามารถรับอิเล็กตรอนจาก NADH, NADPH, Succinate, Methyl viologen และ Bromophenol blue ได้โดยตรงทั้งนี้อาจเป็นเพราะปลาย C ของเอนไซม์ฝังอยู่ในส่วนของเมมเบรนเพื่อรับอิเล็กตรอนจาก quinol pool จึงไม่สามารถรับอิเล็กตรอนจากสารให้อิเล็กตรอนอื่น เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Ramirez และคณะ (1998) พบว่า เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส *T. thermophilus* ใช้ quinol pool เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและผลิต PMF โดยกลไกของ redox loop ซึ่ง NarI จะเป็นตัวออกซิไดซ์ quinol เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *P. tenue* สามารถทำงานได้แม้ไม่มี NADH หรือ NADPH เพราะเอนไซม์เกาะติดอยู่กับเมมเบรนสามารถใช้ quinol ที่อยู่บนเมมเบรนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่เมื่อมี NADH หรือ NADPH กิจกรรมเอนไซม์จะสูงขึ้นเล็กน้อย(สุพัตรา หนูนวล, 2548) ซึ่งต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าวที่สามารถใช้อิเล็กตรอนได้จากทั้ง NADH และ NADPH โดยใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ดีกว่า NADPH

จากผลการทดลองที่ 3.13.3. เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบจาก *S. minervae* สามารถรับอิเล็กตรอนจาก Methyl viologen ที่ถูกรีดิวซ์โดย dithionite ได้บ้าง โดยอาจผ่านทาง molybdenum redox center (Kleinhofs *et al*., 1987) ค่า K_m ของไนเตรตเท่ากับ 0.33 มิลลิโมลาร์ และ V_{max} ของไนเตรตเท่ากับ 3.33 มิลลิโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

4.5 สารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

สารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส NaN_3, NaSCN, As_2O_3 และ $K_3Fe[CN]_6$ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โดย NaN_3 สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงที่สุด เท่ากับ 88.09 เปอร์เซ็นต์ ส่วน NaSCN, As_2O_3 และ $K_3Fe[CN]_6$ สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ 10.92, 14.89 และ12.66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (รูปที่ 3.24) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hochstein และ Tomlinson (1988) โดยทั่วไป azide, chlorate, cyanide และ thiocyanate สามารถยับยั้งกิจกรรมของ membrane-bound nitrate reductase ได้ และสอดคล้องกับการศึกษาของ สุพัตรา หนูนวล (2548) ซึ่งพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบจาก สาหร่าย *P. tenue* สามารถถูกยับยั้งโดย NaN_3 ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ซึ่งทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงมากที่สุด เท่ากับ 58.33

เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ KCN และ NaSCN ที่ความเข้มข้นเดียวกันทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง 52.38 และ 24.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.6 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของสาหร่ายในรอบวัน

จากผลการทดลองที่ 3.11 พบว่าเซลล์สาหร่ายเริ่มกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสภายหลังจากได้รับแสงนานกว่า 6 ชั่วโมง และเซลล์จะมีกิจกรรมเอนไซม์เฉพาะการทดลองที่มีการให้แสง แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมเอนไซม์น่าจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงของเซลล์ ในข้าวบาร์เลย์ และยาสูบ มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงในช่วงที่พืชได้รับแสง โดยมีกิจกรรมสูงสุดในช่วงกลางวัน และมีกิจกรรมต่ำที่สุดในช่วงกลางคืน (Lillo,1984 ; Deng *et al*., 1990) ใน *Kappaphycus alvarezii* กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงสุดหลังจากได้รับแสงนานกว่า 6 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีแสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมืด 12 ชั่วโมง (ความเข้มแสง 55 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) แต่เมื่อเปลี่ยนสภาวะให้มีการให้แสงอย่างต่อเนื่อง (ความเข้มแสง 25 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที) กิจกรรมเอนไซม์จะลดลงหลังได้รับแสงนาน 24 ชั่วโมง ในสาหร่าย *P. tenue* ที่ได้รับแสง 621.9 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที นาน 12 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นในช่วงที่ได้รับแสงและลดลงในช่วงมืด แต่เมื่อมีการให้แสงตลอดเวลา พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างสม่ำเสมอ (สุพัตรา หนูนวล, 2548)

4.7 การเก็บรักษากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น glycerol 3,10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงกว่าสารสกัดหยาบที่ไม่มีการเติม glycerol ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ glycerol ที่เติมสามารถรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ในเมมเบรนและรักษาสภาพเมมเบรน และอาจจะช่วยในการจับกันของเอนไซม์กับไนเตรตได้ดียิ่งขึ้น และการเก็บสารสกัดหยาบไว้ใน glycerol สามารถรักษากิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้นานกว่า 20 วัน ส่วนการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำได้แก่ 4, 0, -20 และ -80 องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดหยาบสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเย็นอาจเปลี่ยนคุณสมบัติของเมมเบรนและเมื่อละลายสารสกัดหยาบกลับทำให้การจัดระเบียบหรือรูปร่างเอนไซม์ไม่เหมือนเดิมทำให้สูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งต่างจากสาหร่าย *P. tenue* พบว่าสารสกัดหยาบที่เติม glycerol 40 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่เสถียรกว่าไม่มี glycerol เมื่อเก็บสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิ 4, -20 และ -80 องศาเซลเซียส (สุพัตรา หนูนวล, 2548)

4.8 ความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

สารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *S. minervae* ที่บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สูงกว่าในชุดควบคุม (30 องศาเซลเซียส) และรักษากิจกรรมเอนไซม์ได้ดี และนานกว่า 90 นาที การบ่มสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 60 นาที การบ่มสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 60 และ 70 กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 22 และ 11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในเวลา 30 นาที และการบ่มสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 4 และ 0 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 62 และ 57 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการบ่มสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ช่วยให้โครงสร้างเอนไซม์และการจัดระเบียบในเมมเบรนมีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากขึ้น ส่วนการบ่มสารสกัดหยาบที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส อาจทำให้เอนไซม์เริ่มเสียสภาพ และการบ่มสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิต่ำอาจทำให้คุณสมบัติของเมมเบรนเปลี่ยนแปลงดังที่กล่าวในข้อ 4.7 และยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ต่างจากสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *K. alvarezii* (Malena *et al.*, 2003) มีความเสถียรสูงขึ้นเมื่อเก็บสารสกัดหยาบที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถรักษากิจกรรมเอนไซม์ได้ดีนาน 1 สัปดาห์ ส่วนสารสกัดหยาบที่เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส สูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสไป 40 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ของการทดลอง และอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์เสถียรที่สุดคือ -70 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ได้นานกว่า 10 วัน เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจาก *P. aerophilum* เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องนานหลายสัปดาห์ เมื่อบ่มเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 65 และ 85 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 32 และ 16 ชั่วโมง และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านไป 90 นาที

4.9 ผลของดีเทอร์เจนต์ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ดีเทอร์เจนต์ Deoxycholate, Tween-20, CHAPS และ Triton X-100 ไม่สามารถสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสออกจากเมมเบรนได้ เนื่องจากไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในส่วนใสที่สะกัดด้วยดีเทอร์เจนต์ดังกล่าว และ Deoxycholate, Tween-20 และ CHAPS เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ในสารสกัดหยาบ ส่วน Triton X-100 เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ลดกิจกรรมเอนไซม์ 50 เปอร์เซ็นต์ SDS เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลดกิจกรรมเอนไซม์ 80 เปอร์เซ็นต์ เห็นได้ว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเกาะกับเมมเบรนอย่างแข็งแรงอาจเนื่องจากสาหร่ายเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง ทำให้เอนไซม์ต้องยึดเกาะกับเมมเบรนอย่างเหนียวแน่น ส่วน

Triton X-100 และ SDS เป็นดีเทอร์เจนต์ที่สามาถทำลายโครงร่างของเอนไซม์ได้จึงอาจทำให้สูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ ส่วนเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *P. tenue* พบว่าดีเทอร์เจนต์ Deoxycholate, Tween-20, CHAPS, SDS และ Triton X-100 ไม่สามารถสกัดเอนไซม์ออกจากเมมเบรนได้เช่นกัน และดีเทอร์เจนต์เหล่านี้มีผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสอีกด้วย (สุพัตรา หนูนวล, 2548)

4.10 การเกิด cross reaction ระหว่างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดกับเอนไซม์ในสารสกัดหยาบ *S. minervae*

จากผลการทดลองที่ 3.16 พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบสามารถเกิด cross reaction กับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดได้ แสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *S. minevae* อาจมีโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าวโพด และจากการทดลองนำสารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วย Triton X-100 และ SDS พบว่าสารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วย Triton X-100 สามารถเกิด cross reaction กับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพด ซึ่งต่างจากสารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วย SDS ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า SDS ทำลายโครงสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบสูญเสียไป