ชื่อวิทยานิพนธ์ สมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายจากบ่อน้ำร้อน

ผู้เขียน นางสาวสุพัตรา หนูนวล

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ในสาหร่าย *Phormidium tenue* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่เจริญได้ดีในบ่อน้ำร้อน ที่ อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง กับสภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อใช้อาหารเหลวสูตร BG-11 ซึ่งมีไนเตรต 17.6 มิลลิโมลาร์ในการเพาะเลี้ยง คือ ปริมาณโซเดียมไบคาร์บอเนตและความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร การเจริญเติบโตของสาหร่ายไม่แตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) แต่ดีกว่าเมื่อไม่มีไบคาร์บอเนต เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ความเข้มแสง 622 μmole m^{-2} s^{-1} สาหร่ายจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 175 μmole m^{-2} s^{-1} เพราะฉะนั้นในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจึงใช้อาหารเหลวสูตร BG-11 ที่มีไบคาร์บอเนต 2 กรัมต่อลิตร (25 มิลลิโมลาร์) ที่ระดับความเข้มแสง 622 μmole m^{-2} s^{-1} จากผลการติดตามปริมาณไนเตรตและ ไนไตรต์ในอาหารในระหว่างการเจริญเติบโต พบว่าปริมาณไนเตรตมีแนวโน้มลดลง ส่วนปริมาณไนไตรต์จะเพิ่มขึ้น สาหร่ายจึงน่าจะใช้ไนเตรตในการเจริญเติบโตและมีการขับไนไตรต์ส่วนเกินออกจากเซลล์

สภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงที่สุด คือ ใช้อาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงให้มีโซเดียมไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์และโซเดียมไบคาร์บอเนต 25 มิลลิโมลาร์ และเพาะเลี้ยงที่ความเข้มแสง 622 μmole m^{-2} s^{-1}

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue* เป็นเอนไซม์นี้เกาะติดอยู่กับส่วนเมมเบรนของเซลล์แต่ไม่สามารถใช้สารดีเทอร์เจนต์ต่างๆ เช่น CHAPS, octyl β-D-glucopyranoside, deoxycholate, Triton X-100, ([octylphenoxy] polyethoxyethanol), Tween-20 และ SDS สกัดออกมาได้เนื่องจากสารดีเทอร์เจนต์เหล่านี้มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์

แอมโมเนียมไอออนในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้ไนโตรเจนในรูปไนเตรต, แอมโมเนียม และแอมโมเนียมร่วมกับไนเตรต มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้เหมือนกัน

การศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายมีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องในระดับหนึ่ง คือเมื่อเก็บไว้ 1 วัน เอนไซม์ยังมีแอคติวิตีเหลืออีก 70% จากเริ่มต้น และการเก็บสารสกัดหยาบของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% จะทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากกว่าการเก็บในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี glycerol เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ –80, -20 และ 4 องศาเซลเซียส

แอคติวิตีของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้ด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมเอไซด์, โซเดียมไซยาไนด์ และโซเดียมไธโอไซยาเนต ในขณะที่แมกนีเซียมไอออนและฟอสเฟตไอออนมีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนการเติม FAD และ molybdenum พบว่าไม่ได้มีผลให้แอคติวิตีเพิ่มสูงขึ้น

จากการทดสอบผลของตัวให้อิเล็กตรอนคือ NADH และ NADPH ในการรีดิวซ์ไนเตรตของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส พบว่า NADH และ NADPH มีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีค่า K_m ของ NADH เท่ากับ 0.039 มิลลิโมลาร์, ค่า K_m ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน มีค่า 40 มิลลิโมลาร์, ค่า K_m ของ NADPH เท่ากับ 0.126 มิลลิโมลาร์ และ K_m ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน มีค่า 43.48 มิลลิโมลาร์

การทดสอบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของข้าวโพดกับสารสกัดหยาบของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *P. tenue* พบว่าสามารถเกิด cross reaction ได้แสดงว่าโครงสร้างบางส่วนของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *P. tenue* เหมือนกันกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวโพด

Thesis Title Properties of Nitrate Reductase from Hot Spring Algae
Author Miss Supatra Nunuan
Major Program Biochemistry
Academic Year 2005

Abstract

Nitrate reductase (NR) activities of *Phormidium tenue*, a blue green alga found abundant in hot-water spring at Kao Chai-Son District in Phatthalung Province, were investigated in relation to growth conditions.

Using the BG-11 medium as culture base for *P. tenue*, effects of sodium bicarbonate and sodium nitrate supplements as well as light regimen on the growth rate were examined. It was found that addition of sodium bicarbonate at 2, 4 and 6 g/l brought about the same algal growth rate ($P \leq 0.05$). Culturing with light intensity at 622 μmole $m^{-2}s^{-1}$ resulted in a more rapid growth rate than that at 175 μmole m^{-2} s^{-1} light intensity. The optimal condition for culturing *P. tenue* cells was that using BG-11 medium containing 25 mM bicarbonate at light intensity 622 μmole m^{-2} s^{-1}. It was found that the concentration of nitrite in medium increased while that of nitrate decreased during culturing. This result indicated that nitrate could be metabolized by the alga and nitrite, the product of nitrate reduction, was secreted into the culture medium.

The highest activity of *P. tenue* was obtained two days after culturing at the optimal conditions.

P. tenue NR is a membrane-bound enzyme and it has not been possible to solubilize it from the algal membrane by various detergents, such as CHAPS, octyl β-D-glucopyranoside, deoxycholate, Triton X-100, Igepal CA-630 (([octylphenoxy] polyethoxyethanol)), Tween-20 and SDS.

The activity of the enzyme was not affected by the presence of ammonium ion as seen by the addition of ammonium ion or a mixture of nitrate and ammonium in the culture media could activate *P. tenue* NR to the same extent.

The stability of *P. tenue* NR was also examined and it was found to be partially stable after extraction. Only 70% of the activity was retained after storage at room temperature for one day. The stability of the crude particulate fraction could be prolonged with the addition of 40% glycerol when kept at -80, -20 and 4°C. The addition of FAD and molybdate could not increase *P. tenue* NR activity.

The activity of enzyme could be inhibited by ammonium sulphate, sodium azide, sodium cyanide and sodium thiocyanate. Magnesium and phosphate ions slightly reduced the enzyme activity.

The influence of NADH or NADPH as an electron donor for nitrate reduction was investigated and it was found that an addition of NADH or NADPH slightly increased NR acivity. The apparent K_m of NR was 0.039 mM for NADH while the K_m value for KNO_3 using NADH as an electron donor was 40 mM. The K_m for NADPH and that for KNO_3 with NADPH as an electron donor were 0.126 mM and 43.48 mM, respectively.

Finally, the particulate fraction of NR from *P. tenue* showed cross reactivity with rabbit antibody against purified nitrate reductase from corn, indicating some similarity between the structure of *P. tenue* NR and that of corn NR.