1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การปนเปื้อนของไนเตรต (nitrate, NO_3^-) ในแหล่งน้ำธรรมชาติ น้ำใต้ดิน จะมีผลต่อเนื่องมาถึงน้ำที่ใช้ในการบริโภค ปริมาณไนเตรตที่สูงในน้ำดื่มมีอันตรายต่อสุขภาพ โดยก่อให้เกิดภาวะ methemoglobinemia หรือ blue baby syndrome ซึ่งเกิดจากการจับตัวกันแน่นระหว่างไนไตรต์ที่ได้จากไนเตรตในระบบทางเดินอาหาร กับ hemoglobin และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอะตอมเหล็กศูนย์กลาง (iron center) ภาวะดังกล่าวอาจทำให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กอ่อน (อันตรายอื่น ๆ ต่อสุขอนามัยของประชาชน อันเกิดจากการได้รับไนเตรตปริมาณสูงในระยะยาวยังไม่อาจสรุปได้ชัดเจน แม้จะมีความพยายามเชื่อมโยงว่าอาจเป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็ง (Addiscott *et al*., 1991, Campbell, 1999)) ในประเทศแคนาดา,สหรัฐอเมริกา และหลายประเทศในยุโรปกำหนดให้ระดับไนเตรตในน้ำบริโภคไม่เกิน 10 mg/l (ppm.) และระดับไนไตรต์ไม่เกิน 1mg/l (ppm.) (Nolan *et al*., 1998) การปนเปื้อนของไนเตรตในแหล่งน้ำธรรมชาติเกิดจากสาเหตุหลักคือ การใช้ปุ๋ยไนโตรเจน (N) เกินควรในการเกษตรกรรม หรือปลดปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรมหรือจากไอเสียของรถยนต์ ทำให้เกิดการชะล้างสู่ผิวดินและแหล่งน้ำธรรมชาติ ดังนั้นจึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องตรวจวัดไนเตรตในน้ำเพื่อระวังไม่ให้มีระดับสูงเกินไป การตรวจสอบหาปริมาณไนเตรตสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การใช้คอลัมน์แคดเมี่ยมเพื่อรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ (Clesceri *et al*., 1989, Clinch *et al*., 1987) หรือการใช้กรดซาลิไซลิกในกรดกำมะถันเข้มข้น ทำให้เกิดอนุพันธ์ไนเตรต (Cataldo *et al*., 1975) แต่วิธีการเหล่านี้ต้องใช้สารที่ก่อพิษและเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม วิธีการที่มีการปรับปรุงขึ้นใช้ในปัจจุบันคือ การใช้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Nitrate Reductase, NR) เพื่อตรวจสอบหาไนเตรต โดยเตรียมเป็น sol-gel immobilized nitrate reductase (Aylott., 1997) หรือ Nitrate reductate Test Kit (The Nitrate Elimination Company., Inc., NECi) ซึ่งใช้ NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อการรีดิวซ์ไนเตรตจึงไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และสะดวกในการปฏิบัติงาน

ไนเตรตรีดักเทส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแรกของกระบวนการ nitrate assimilation ในพืช รวมทั้งสาหร่าย และเชื้อราบางชนิด ไนไตรต์ที่ได้จากปฏิกิริยาดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียซึ่งพืชจะใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ต่อไป ปริมาณและคุณสมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในพืชขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปริมาณหรือความเข้มข้น

ของไนเตรตที่พืชได้รับ ความเข้มของแสง (Crawford., 1995) และปริมาณสารคาร์โบไฮเดรตในพืช (Larios *et al*., 2001) จากการศึกษาของ Hyde และคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่สกัดได้จากใบของข้าวโพดมีค่าความว่องไวจำเพาะ (specific activity) สูง และมีความเสถียรสูง สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ จึงมีการผลิตในปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ผลิต ชุดวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตในทางการค้า (NECi)

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีความเสถียรสูงและคงทนต่อความร้อนมีความน่าสนใจและมีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการตรวจหาไนเตรตและประยุกต์ร่วมกับเอนไซม์อื่น (ไนไตรต์รีดักเทส, ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทส และไดไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทส) เพื่อการขจัดไนเตรตจากน้ำเสียโดยเปลี่ยนไนเตรตเป็นก๊าซไนโตรเจน (www.nitrate.com/enzet1.htm; Somers *et al*., 1997 และ Campbell., 2001) แหล่งของเอนไซม์ที่ทำงานได้ในที่มีอุณหภูมิสูงน่าจะได้จากสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตดีในบริเวณธารน้ำอุ่นและบ่อน้ำพุร้อน

ผู้วิจัยได้เล็งเห็นว่าการศึกษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายจากบ่อน้ำร้อนจะก่อให้เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย และรูปแบบการเก็บรักษาให้คงทนเพื่อการพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ไนเตรตด้วยเทคโนโลยีสะอาด(clean technology) ต่อไป ซึ่งจะเกิดประโยชน์ต่อชุมชนและสังคมโดยรวม งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส รวมไปถึงผลของแหล่งไนโตรเจนและผลของแสง ตลอดจนศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่สกัดได้จากสาหร่าย

การตรวจเอกสาร

ไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิต เพราะเป็นส่วนประกอบของสารชีวโมเลกุลที่สำคัญหลายชนิด เช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิค ไนโตรเจนที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมจะอยู่ในรูปออกซิไดซ์ มีประจุจาก +5 ถึง -3 โดยการเปลี่ยนรูปของไนโตรเจนจะเป็นไปตามวัฏจักรไนโตรเจน (nitrogen cycle) (รูปที่ 1) ซึ่งแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในวัฏจักรนี้

ปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction) มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรไนโตรเจน และมีความสำคัญในทางการเกษตร สิ่งแวดล้อม และเกี่ยวกับสุขภาพ ซึ่งการเกิด nitrate reduction ในสิ่งมีชีวิต มีประโยชน์ 3 ประการ คือ

1. ใช้ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโต (nitrate assimilation)

2. ทำให้เกิดพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (nitrate respiration)

3. ทำให้เกิดการสลายตัวของไนโตรเจนที่เหลือเพื่อความสมดุล (nitrate dissimilation)

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (nitrate reductase, NR) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแรกของกระบวนการ nitrate assimilation โดยเปลี่ยนไนเตรต (NO_3^-) ไปเป็นไนไตรต์ (NO_2^-) ในพืชรวมทั้งสาหร่าย และเชื้อราบางชนิด ไนไตรต์ที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมซึ่งพืชจะใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ ต่อไป

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส มี 4 ชนิด คือ

1.Eukaryotic assimilatory nitrate reductase

2. Cytoplasmic assimilatory nitrate reductase (Nas)

3. Membrane-bound respiratory nitrate reductase (Nar)

4. Periplasmic dissimilatory nitrate reductase (Nap)

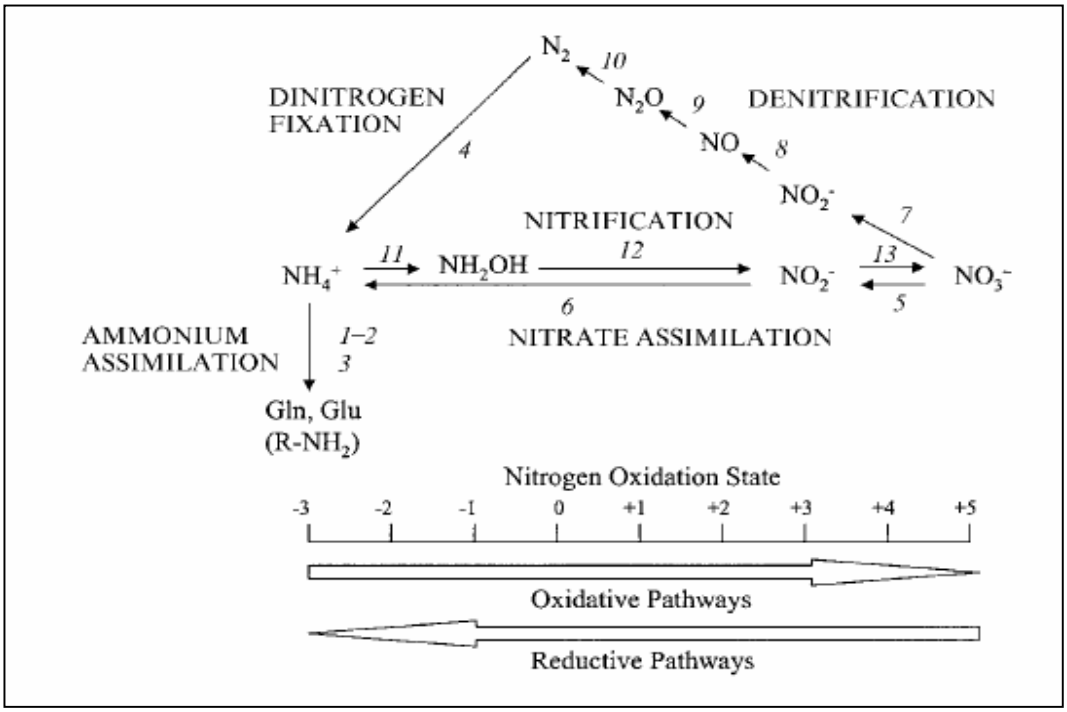
เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ชนิดที่ 2-4 คือ Nas, Nar และ Nap เป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตจำพวก prokaryote คือแบคทีเรีย

1. Eukaryotic assimilatory nitrate reductase

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสชนิดนี้เร่งปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนเตรต ซึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้ไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโตใน พืชชั้นสูง สาหร่ายและรา

แบ่งเป็น 3 ชนิดตามตัวให้อิเล็กตรอน (Campbell., 1999) คือ

1. NADH-NR (EC 1.6.6.1) เป็นชนิดที่พบในพืชชั้นสูงและสาหร่าย รับอิเล็กตรอนจาก NADH
2. NAD(P)H-NR (EC 1.6.6.2) เป็นชนิดที่พบในพืชชั้นสูง สาหร่าย และรา มีสมบัติเป็น bispecific คือ รับอิเล็กตรอนได้ทั้งจาก NADH และ NADPH
3. NADPH-NR (EC 1.6.6.3) พบเฉพาะในราและมีความจำเพาะต่อ NADPH



รูปที่ 1. แสดงวัฏจักรการเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจน (nitrogen cycle) (Cabello *et al.*, 2004)

ตัวเลขต่างๆ คือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการโดย

1-2 = glutamine synthetase-glutamate synthase (GS-GOGAT)

3 = glutamate dehydrogenes (GDH)

4 = nitrogenase

5 = assimilatory nitrate reductase (Nas)

6 = assimilatory nitrite reductase (siroheme-Nir)

7 = dissimilatory and respiratory nitrate reductase (Nap and Nar)

8 = respiratory nitrite reductase (Cu-Nir and cd_1-Nir)

9 = nitric oxide reductase (Nor)

10 = nitrous oxide reductase (Nos)

11 = ammonia monooxygenase

12 = hydroxylamine oxidase

13 = nitrite oxidase

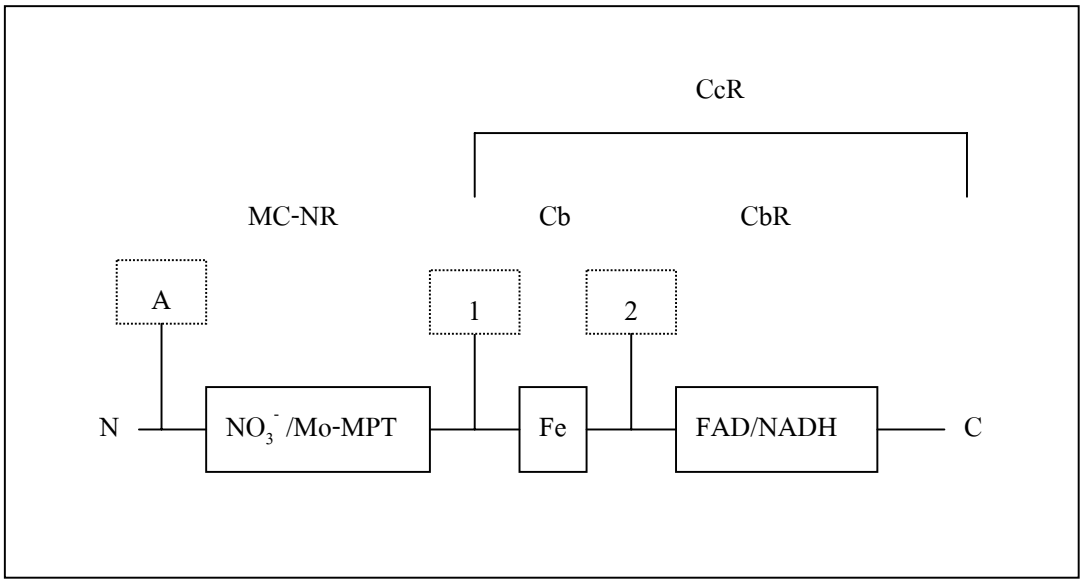
1.1 โครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เป็น soluble enzyme พบในส่วนไซโตซอล โมเลกุลของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ที่ทำงานได้ประกอบด้วยเปปไทด์สองหน่วยที่เหมือนกัน (homodimer) โดยเปปไทด์แต่ละหน่วยมีขนาดประมาณ 100 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยศูนย์เร่งปฏิกิริยารีดอกซ์ 2 ศูนย์ (domain) (รูปที่ 2.)ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยไซโตโครมบี 557 (Cyt. B557) Hinge 1 และ Hinge 2 โดยศูนย์ แรก คือ FAD-domain มี flavin adenine dinucleotide (FAD) เป็นองค์ประกอบทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก NAD(P)H และศูนย์ที่สองคือ Mo-MPT มี molybdenum-molybdopterin (Mo-MPT) เป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนให้ไนเตรตเพื่อเปลี่ยนเป็นไนไตรต์

1.2 การทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

นอกจากจำแนกรูปแบบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสตามลักษณะการรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH แล้วเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ยังเป็นเอนไซม์ที่มีการทำงานได้เป็นส่วนย่อยโดยเรียกว่า partial activity (Kramer *et al.*, 1987) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากตำแหน่งการเร่งที่จำเพาะเฉพาะบางส่วนบนโมเลกุลของเอนไซม์แล้ว สามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มกว้างๆ (รูปที่ 3) คือ

1. NADH dehydrogenase ซึ่งจะเกิดรีดักชันของ ferricyanide จากการทำงานของเอนไซม์ NADH : ferricyanide reductase หรือรีดักชั่นของ cytochrome c จากการทำงานของเอนไซม์ NADH : cytochrome c reductase หรือรีดักชั่นของ dichlorophenol indophenol จากการทำงานของเอนไซม์ NADH : dichlorophenol indophenol reductase
2. แอคติวิตีที่เกิดจากการให้อิเล็กตรอน จาก $FADH_2$ หรือ $FMNH_2$: nitrate reductase โดยผ่าน heme redox center หรือโดยการให้อิเล็กตรอนจาก dithionite reduced methyl viologen (MV : nitrate reductase) หรือ bromophenol blue (BPB : nitrate reductase โดยผ่าน molybdenum redox center)



A = Acidic N-terminal region CbR = Cytochrome b reductase fragment

N- = N-terminus

-C = C-terminus Cb = Cytochrome b fragment or domain

1,2 = Hinge 1,2 Fe = Heme-Fe binding site

NO_3^- = nitrate binding and reduction site

Mo-MPT = Molybdate/molybdopterin binding site

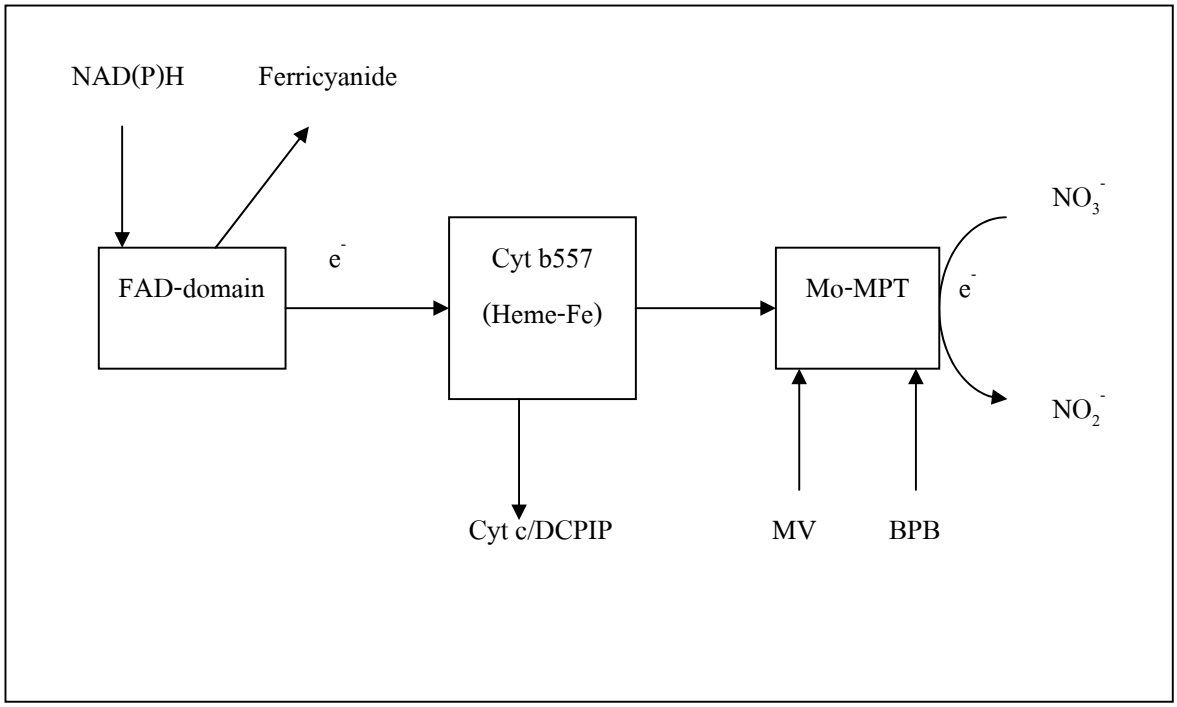
FAD = FAD-binding site

CcR = Cytochrome c reductase fragment of NR

NADH = NADH-binding site

MC-NR = Molybdenum-containing nitrate- reducing fragment

รูปที่ 2. แสดงส่วนประกอบสำคัญและศูนย์เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Campbell, 1996)



Cyt c = cytochrome c

DCPIP = dichlorophenol indophenol

MV = reduced methyl viologen

BPB = reduced bromphenol blue

รูปที่ 3. โครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แสดงตำแหน่งรับ-ส่งอิเล็กตรอนระหว่างศูนย์เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสารต่างๆ (Kramer *et al* ., 1987)

1.3 เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย

1.3.1 โครงสร้างและสมบัติทางจลนศาสตร์

ในสาหร่ายพบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ทั้งในส่วนไซโตซอลและแบบที่ติดกับเยื่อพลาสมา (plasma membrane) (Jones and Morel, 1988 ; Tischner *et al*., 1989) แม้ว่าลักษณะและขนาดของเปปไทด์หน่วยย่อย อาจแตกต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของพืชชั้นสูงอยู่บ้าง (Berges., 1997)

1.3.1.1 เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายสีเขียว

ในปี 1975 Solomonson และคณะได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* พบว่าเอนไซม์มี 3 หน่วยย่อย (trimer) โดยแต่ละหน่วยย่อย

(subunit) มีขนาด 90,000 ± 5,000 ดาลตัน และเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาส่วนย่อยได้ จากการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยการรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ ทำให้เกิดผลผลิตคือ NAD^+ และไนไตรต์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ โดยทั้งสองตัวเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน เช่นเดียวกับ ADP และ ไธโอไซยาเนต (thiocyanate) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันเช่นกัน เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายสีเขียวชนิดเซลล์เดียว *Ankistrodesmus braunii* ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 467,400 ดาลตัน ประกอบด้วย 8 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 58,750 ดาลตัน นอกจากนี้ยังมี FAD จำนวน 4 โมเลกุล, heme group 4 โมเลกุล และ molybdenum 2 อะตอม (De la Rosa and Vega., 1981)

1.3.1.2 เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายสีแดง

ในปี 1993 Nakamura และ Ikawa ได้ศึกษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายสีแดง *Porphyra yezoensis* พบว่ามีขนาด 220 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 100 กิโลดาลตัน ทำงานได้ดีที่ pH 8.3 มีค่า K_m สำหรับ NADH และ KNO_3 เป็น 23 และ 64 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ สารที่ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ได้คือ sulfhydryl reagent เช่น *p*-hydroxymercuribenzoic และ *N*-ethylmaleimide สามารถยับยั้งการทำงานส่วยย่อยของเอนไซม์ในขั้นตอนที่ใช้ NADH (NADH-utilizing partial activity) ได้อย่างสมบูรณ์ โดยหมู่ sulfhydryl จะจับกับส่วน diaphorase ทำให้ส่วนนี้ของเอนไซม์สูญเสียบทบาทไป ในขณะที่ไซนาไนด์ (cyanide) และเอไซด์ (azide) สามารถยับยั้งแอคติวิตีในส่วนที่เกิดการรีดิวซ์ไนเตรตได้ ต่อมาในปี 2004 Granbom และคณะพบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายทะเล *Kappaphycus alvarezii* ซึ่งเป็นสาหร่ายสีแดงขนาดใหญ่และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพราะสามารถนำมาผลิตเจลและคาราจีแนนได้ ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส pH 8.0 โดยในส่วนปลายยอด (apical) ของสาหร่ายจะให้ค่าแอคติวิตีสูงกว่าในส่วนโคน (basal) ถึง 1.5 เท่า และเอนไซม์เป็นแบบ NADH- specific มีค่า K_m สำหรับ NO_3^- และ NADH เป็น 30 และ 5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาความเสถียรของเอนไซม์โดยเก็บเอนไซม์ที่เป็นสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ได้ 1 สัปดาห์

1.3.1.3 การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ในปี 1972 Jeschmann และคณะ พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียว *C. vulgaris* ที่สกัดได้จะอยู่ในรูปที่ทำงานไม่ได้ (inactive form) จึงได้ทดลองเปลี่ยนแปลงเพื่อให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่ทำงานได้ (active form) โดยกระตุ้นด้วยสารออกซิไดส์ คือ ไซยาไนด์ พบว่าสามารถเปลี่ยนเอนไซม์ที่อยู่ในรูปโปรเอนไซม์ (proenzyme) ให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้โดยใช้เวลาเพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และพบว่าออกซิเจนสามารถกระตุ้นเอนไซม์

ได้แต่ใช้เวลานานกว่า เพราะต้องใช้เวลาหลายชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ยังพบว่า CO สามารถยับยั้งการใช้ออกซิเจนกระตุ้นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

1.3.1.4 ผลของฟอสเฟต และ flavin adenosine dinucleotide (FAD) ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

Howard และ Solomonson (1981) พบว่าฟอสเฟตสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *C. vulgaris* ให้มีแอคติวิตีสูงขึ้น 2 เท่าได้โดยฟอสเฟตมีผลทำให้ V_{max} เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีผลต่อค่า K_m สำหรับไนเตรต (Howard and Solomonson, 1981) และในปี 1984 Everest และคณะได้ศึกษาผลของฟอสเฟตและ FAD ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายทะเลเซลล์เดียว พบว่า บัฟเฟอร์ Tris เพียงอย่างเดียวไม่เหมาะสมที่จะใช้วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แต่ถ้ามีการเติมฟอสเฟตและ FAD ลงไปด้วยทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายบางชนิด เช่น *Brachiomonas submarine* Bohlin, *Nannochloropsis oculata* Droop และ *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin เพิ่มสูงที่สุด จากผลการทดลองนี้ คือเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายทะเลบางชนิดต้องการ FAD เพื่อให้มีแอคติวิตีสูงที่สุดในขณะที่สาหร่ายบางชนิดไม่ต้องการ FAD ซึ่งอธิบายได้ว่า FAD อาจจะเกาะติดกับเอนไซม์ด้วยพันธะที่แข็งแรงต่างกัน

สำหรับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน (partially purified enzyme) ในสาหร่าย *P. tricornutum* นอกจากต้องการ FAD และฟอสเฟตในการวิเคราะห์แอคติวิตีแล้ว ยังพบว่า การเติมอาร์ซีเนต (arsenate) หรือ EDTA ร่วมกับ FAD จะมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ด้วย แต่ถ้าเติมแมงกานีสลงในสารสกัดเอนไซม์ พบว่าจะมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Everest *et al*., 1984)

1.3.1.5 ผลของค่า ionic strength ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

ในปี 1986 ได้มีการศึกษาผลของ ionic strength ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย*Chlorella* พบว่าเมื่อค่า ionic strength เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นการทำงานของ NADH: NR โดยจะเพิ่มทั้ง V_{max} และ K_m ของไนเตรต นอกจากนี้ค่า ionic strength ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสส่วนย่อยด้วย คือ เมื่อค่า ionic strength เพิ่มขึ้นหรือลดลง มีผลยับยั้งหรือกระตุ้นแอคติวิตีส่วน NADH: cytochrome NR และ reduced flavin NR ตามลำดับ ในขณะที่ค่า ionic strength ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของ NADH: fericyanide NR และส่วน reduced methyl viologen NR (Kay and Barber, 1986)

1.3.2 การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายจะแตกต่างจากในพืชชั้นสูง เมื่อได้ทดลองย้ายสาหร่ายสีเขียวและไดอะตอม (diatom) ที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน ปรากฏว่ายังสามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ (Kessler and Osterheld, 1970; Amy and Garret, 1974) ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ ไนเตรตรีดักเทสไม่ได้ถูกชักนำด้วยไนเตรตเหมือนในพืชชั้นสูง เช่นในข้าว และ ข้าวโพด (เขมิกา โขมพัตร์, 2545; Pulsuk, 2004)

สำหรับการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ด้วยแสง ได้มีการศึกษาในสาหร่าย *Kappaphycus alvarezii* โดยให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าการแสดงออกของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีลักษณะเป็นวงจรในช่วงวัน (circadian) คือในช่วงที่มีแสงเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงกว่าในช่วงไม่มีแสง โดยแอคติวิติของเอนไซม์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงมีแสงและมีค่าสูงที่สุดเมื่อให้แสงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นแอคติวิตีจะลดลงเรื่อยๆ จนมีค่าต่ำสุดและค่อนข้างคงที่ในช่วงไม่มีแสง (Granbom *et al*., 2004) ซึ่งแสดงว่าการทำงานของเอนไซม์ในสาหร่ายชนิดนี้ควบคุมโดยวงจรแสงในช่วงวัน แต่ใน *Dunaliella salina* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่ทนเค็ม พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิดนี้มีการชักนำให้แสดงออกได้ในช่วงไม่มีแสง (Delrio *et al*., 1994)

2. Prokaryotic nitrate reductase

2.1 Bacterial assimilatory nitrate reductase (Nas)

2.1.1 โครงสร้างและสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์

Nas แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ (รูปที่4.)

1. ferredoxin หรือ Flavodoxin- dependent Nas
2. NADH-dependent Nas

ทั้ง 2 ชนิดมี MGD (*bis*-molybdopterin guanine dinucleotide) เป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) และ N-terminal มีหมู่ iron-sulfur แต่ไม่มีหมู่ heme ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (eukaryote) และเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในพวกไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ซึ่งเป็น ferredoxin -Nas ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเดี่ยวขนาด 75-85 กิโลดาลตัน (Mikami and Ida., 1984 ; Rubio *et al*., 1996) ในขณะที่ flavodoxin-Nas ของ *Azotobacter vinelandii* เป็นโพลีเปปไทด์ที่มีขนาด 105 กิโลดาลตัน (Gangeswaran and Eady., 1996) และเป็นเอนไซม์ flavodoxin-Nas ชนิดเดียวกันกับที่พบใน *Azotobacter chroococcum*, *Clostridium perfringens* และ *Ectothiohodospira shaposhnikovii* (Guerrero *et al*., 1981) แต่แตกต่างจาก

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่พบใน *Klebsiella pneumoniae* (Lin *et al*., 1994) และใน *Rhodobacter capsulatus* (Blasco *et al*., 1997) ซึ่งเป็น NADH-Nas ที่มีลักษณะเป็น heterodimer ประกอบด้วยส่วนที่เป็น diaphorase ที่มี FAD เป็นโคแฟคเตอร์ มีขนาด 45 กิโลดาลตันและส่วนที่เป็นหน่วยย่อยที่ทำปฏิกิริยา (catalytic subunit) มีขนาด 95 กิโลดาลตัน โดยในส่วนนี้จะมี MGD เป็นโคแฟคเตอร์ และ มี N-terminal ที่มีศูนย์กลางเป็นหมู่ [4Fe-4S]

ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม archaea ที่ทนเค็มได้ เช่น *Haloferax mediterranei* ซึ่งเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจน พบว่า Nas มีลักษณะเป็น dimer ที่มีขนาด 105 และ 50 กิโลดาลตัน ไม่สามารถใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ใช้ ferredoxin ได้ (Martinez-Espinosa *et al*., 2001) แสดงว่า Nas ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม archaea มีลักษณะแตกต่างจาก Nas ของแบคทีเรีย เพราะ ferredoxin-Nas ของแบคทีเรียมีลักษณะเป็นหน่วยเดี่ยว (monomer) แต่ถ้าเป็น NADH-Nas จึงจะมีลักษณะเป็น dimer จากการศึกษาสมบัติของ Nas ใน *H. mediterranei* ได้ค่า K_m สำหรับไนเตรตเป็น 0.95 มิลลิ โมลาร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 80 องศาเซลเซียสเมื่อมี NaCl ความเข้มข้น 3.1 โมลาร์ แต่ถ้ามี NaCl 1.3 โมลาร์ จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยการทำงานของเอนไซม์ถูกชักนำได้ด้วยไนเตรต และกดดันได้ด้วยแอมโมเนียม เช่นเดียวกับในแบคทีเรีย

Nas ใน *R. capsulatus* ถูกยับยั้งได้ด้วยไซยาไนด์ (cyanide) และเอไซด์ (azide) แต่ไซยาเนต (cyanate) และคลอเรต (chlorate) ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ นอกจากนี้ NADH ยังมีผลทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนโดยการทำให้เกิด superoxide anion ตรงตำแหน่งที่เป็น diaphorase (Blasco *et al*.,1997)

2.1.2 การขนส่งไนเตรตในระบบ Nas ของแบคทีเรีย

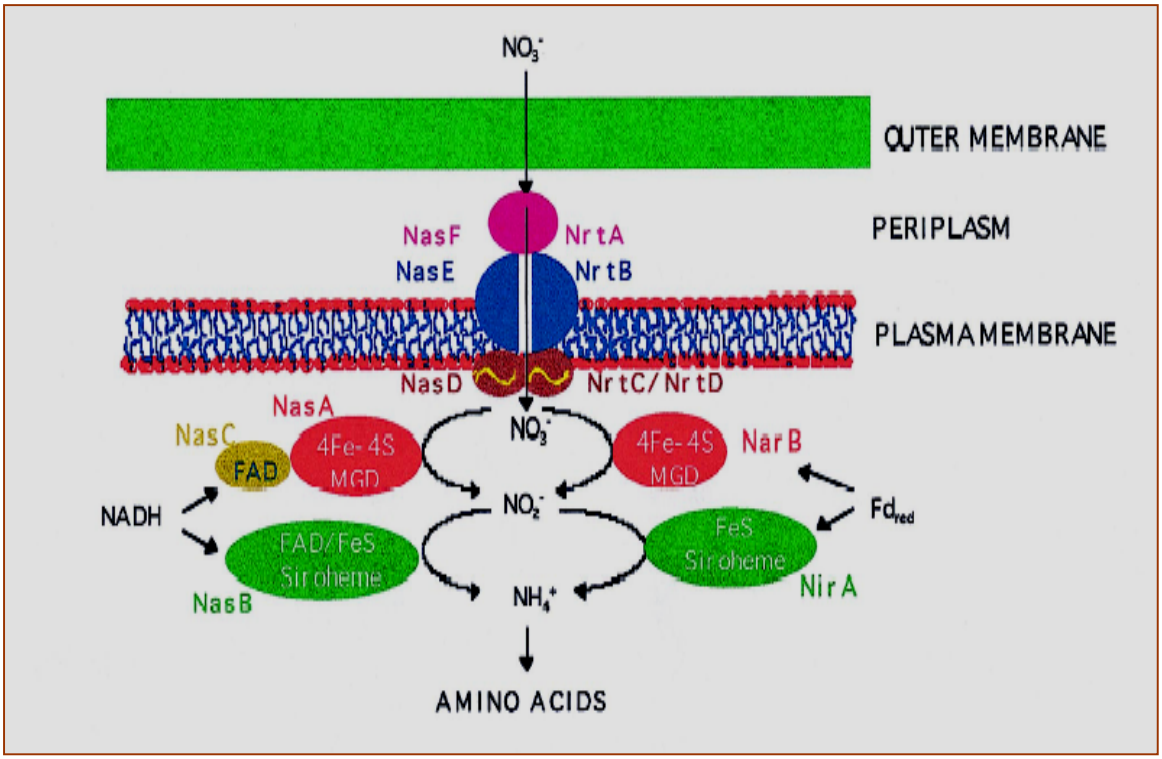
เนื่องจาก Nas เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ดังนั้นจึงต้องมีการขนส่งไนเตรตเข้ามาภายในเซลล์ โดยการขนส่งในแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้ ตัวขนส่งชนิด ABC (ABC-type transporter) ซึ่งเป็นโปรตีนที่จับอยู่กับเพอริพลาสมิกเมมเบรน (periplasmic membrane) จากการศึกษาใน *Synechococcus* พบว่าตัวขนส่งไนเตรตประกอบด้วยโปรตีนที่จับอยู่กับเพอริพลาสมิกเมมเบรน (ถอดรหัสจาก *nrtA* gene), โปรตีนที่อยู่ในเมมเบรน (ถอดรหัสจาก *nrt B* gene) และโปรตีน 2 ตัวที่จับอยู่กับ ATP (ถอดรหัสจาก *nrt C* และ *nrtD*) (Luque and Herrero., 1994 ; Omata., 1995)

2.1.3 การควบคุมการแสดงออกของ Nas

จากการศึกษาการแสดงออกของ *nas* gene ใน *K. pneumoniae* พบว่าการแสดงออกของ *nas* gene ถูกควบคุมด้วย 2 ระบบ คือ

1. การกด (repression) ด้วยแอมโมเนีย ซึ่งเป็นระบบการควบคุมการใช้ไนโตรเจนทั่วไป (Ntr) โดย Ntr จะควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งหลายที่เกี่ยวกับการใช้แหล่งไนโตรเจน ในระหว่างที่แบคทีเรียเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมที่มีไนโตรเจนจำกัดโดยจะมีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับโปรตีน NtrC ซึ่งเป็นการกระตุ้น NtrC ให้จับกับตำแหน่งที่เป็น upstream ของ promoter จึงกระตุ้น transcription ของ gene ที่ควบคุม Ntr (Merrick and Edwards., 1995)

2. การชักนำด้วยไนเตรตหรือไนไตรต์ต่อการแสดงออกของ *nas* genes ใน *Klebsiella* ผ่านโปรตีน NasR เป็นการควบคุมทางบวกที่ทำให้เกิด transcription น้อยลง โดยในสภาวะที่ไม่มีไนเตรตหรือไนไตรต์ จะมีปัจจัยที่ทำให้ทำให้ไม่เกิด transcription ของ *nas* gene แต่เมื่อมีไนเตรตหรือไนไตรต์ จะไม่มีปัจจัยดังกล่าว ทำให้มีการแสดงออกของ *nas* gene ได้ ดังนั้นการควบคุมด้วยไนเตรตไม่ได้เป็นการควบคุมจุดเริ่มต้นของ transcription แต่เป็นการควบคุมจุดสิ้นสุด (Lin and Stewart,. 1996)



รูปที่ 4. การเกิด assimilation ของไนเตรตในแบคทีเรีย (Moreno-Vivian *et al*., 1999)

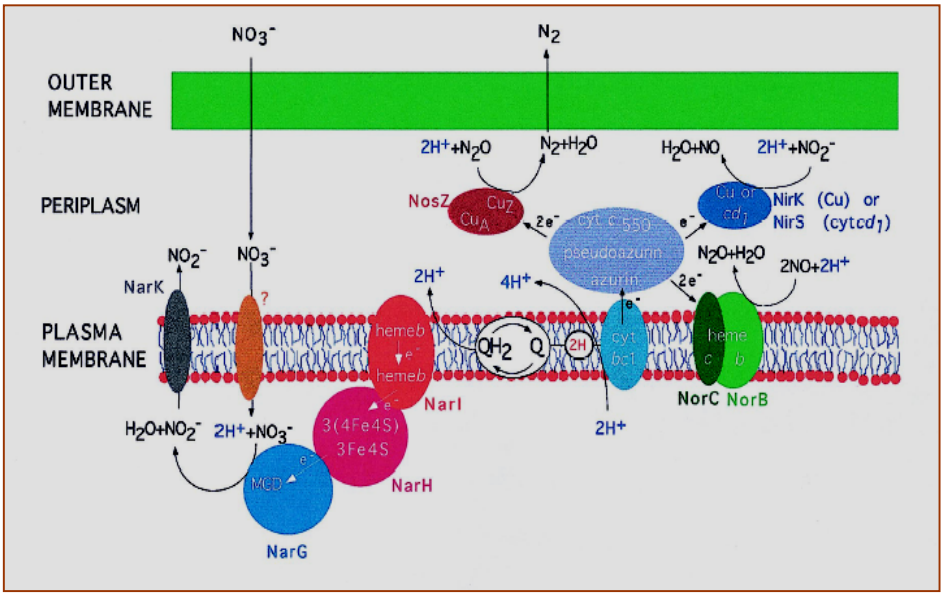
ขวา : ferredoxin (Fd)-dependent assimilatory nitrate และ nitrite reductase จาก cyanobacteria

ซ้าย : NADH-dependent nitrate และ nitrite reductase จาก *Klebsiella* และ *Rhodobacter*

2.2 Respiratory membrane-bound nitrate reductase (Nar)

2.2.1 โครงสร้างและสมบัติทางชีวเคมีของ Nar

Nar เกี่ยวข้องกับกระบวนการ denitrification และ nitrate respiration ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ได้มีการทำบริสุทธิ์ Nar จากแบคทีเรียที่ทนร้อนได้คือ *Thermus thermophilus* (Ramirez *et al*., 1998) พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และจากการศึกษา Nar ใน *E. coli* พบว่ามีไอโซไซม์ 2 ชนิด คือ NRA จะแสดงออกภายใต้สภาวะที่มีไนเตรตแต่ไม่มีออกซิเจนคิดเป็น 90% ของแอคติวิตีทั้งหมด และ NRZ ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (Blasco *et al*., 1992) (รูปที่ 5.)



รูปที่ 5. กระบวนการ nitrate respiration และ denitrification pathways ในแบคทีเรีย (Moreno-Vivian *et al*., 1999)

กระบวนการ nitrate respiration จะเกี่ยวข้องกับ Nar ซึ่งมี 3 หน่วยย่อย คือ

1. หน่วยย่อย γ (NarI) มีหน้าที่รีดิวซ์ควินอล

2. หน่วยย่อย β (NarH) ขนส่งอิเล็กตรอนจาก NarI ไปยัง NarG

3. หน่วยย่อย α (NarG) รับอิเล็กตรอนจาก NarH และรับโปรตอนจากไซโตพลาสซึมเพื่อรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์

หลังจากนั้นไนไตรต์จะถูกขนส่งออกนอกเซลล์โดยโปรตีน NarK

ในกระบวนการ denitrification เกี่ยวข้องกับการทำงานของ Nap ไม่เกี่ยวกับกระบวนการ nitrate assimilation หรือ nitrate respiration ไนไตรต์ที่เกิดขึ้นจึงถูกส่งต่อไปยังกระบวนการรีดิวซ์ไนไตรต์ (เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ nitrite reductase, Nir และการรีดิวซ์ ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ nitric oxide reductase, Nor)

เอนไซม์ Nar ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือหน่วยย่อย α (NarG) มีขนาด 112 ถึง 140 กิโลดาลตัน มี MGD เป็นโคแฟคเตอร์, หน่วยย่อย β (NarH) เป็นส่วนที่เร่งปฏิกิริยามีขนาด 52 ถึง 64 กิโลดาลตัน ในส่วนนี้จะมีหมู่ [3Fe-4S] 1 กลุ่มกับ [4Fe-4S] 3 กลุ่มเป็นศูนย์กลาง และหน่วยย่อย γ (NarI) เป็นส่วนที่ใช้ออกซิไดส์ควินอล (quinol) มีขนาด 19 ถึง 25 กิโลดาลตัน โดยส่วนหน่วยย่อย α และ β เป็นส่วนที่ละลายได้แต่มีส่วนที่ยึดเกาะกับเมมเบรนด้านที่ติดกับไซโตพลาสซึม ในขณะที่หน่วยย่อย γ จะเป็นส่วนที่ฝังอยู่ในเมมเบรนและละลายออกมาได้เมื่อใช้สารดีเทอร์เจนต์หรือใช้ความร้อน แต่ NarI จะไวต่อความร้อนทำให้สูญเสียได้ในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ (Blasco *et al*., 1992)

โดยทั่วไปเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ที่เกาะติดกับเมมเบรนสามารถรีดิวซ์ คลอเรตและถูกยับยั้งได้ด้วยเอไซด์, คลอเรต, ไซยาไนด์และไธโอไซยาเนต (Hochstein and Tomlinson., 1988)

เอนไซม์ Nar ใช้ควินอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและทำให้เกิด proton motive force (PMF) โดย NarI จะออกซิไดส์ควินอลตรงตำแหน่งที่ติดกับเพอริพลาสซึมของเมมเบรนจึงปล่อยโปรตอน 2 ตัวเข้าสู่ด้านเพอริพลาสซึม ส่วนอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปรีดิวซ์ไนเตรตโดยรับโปรตอน 2 ตัวจากด้านไซโต-พลาสซึม จึงเกิดความต่างศักย์ระหว่าง 2 ด้านของ NarI ซึ่งเรียงตัวขวางเมมเบรนอยู่ทำให้ขนส่งอิเล็กตรอนผ่านเมมเบรนได้ (Berks *et al*., 1995)

จากการศึกษาเอนไซม์ Nar ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม archaea หลายชนิด เช่น Nar ของ *Haloferax denitrificans* ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีขนาด 116 และ 60 กิโลดาลตัน มีค่า K_m สำหรับไนเตรตเป็น 0.2 มิลลิโมลาร์ มีความเสถียรเมื่อไม่มีเกลือและแอคติวิตีจะลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือมากขึ้น (Hochstein and Lang., 1991) ส่วน Nar ใน *Haloferax volcanii* มีลักษณะเป็น trimer ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีขนาด 100, 61 และ 31 กิโลดาลตัน แอคติวิตีของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับเกลือ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้คือ 80 องศาเซลเซียส มี K_m สำหรับไนเตรตเป็น 0.36 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสมบัติของ Nar ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม archaea ที่ทนร้อนได้ คือ *Pyrobaculum aerophilum* พบว่าเอนไซม์ Nar ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือหน่วยย่อยที่มีขนาด 130, 52 และ 32 กิโลดาลตัน โดยมีโมลิบดินัม (molybdenum), เหล็ก (iron) และ ไซโตโครม บี (cytochrome *b*) เป็นโคแฟคเตอร์ สามารถใช้ benzyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ไนเตรตและ chlorate ได้ โดย K_m สำหรับไนเตรตและคลอเรต เป็น 58 และ 140 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ มีเอไซด์เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันและไซยาไนด์เป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้มีค่ามากกว่า 95 องศาเซลเซียส แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์แล้วไว้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์มี haft-life เพียง 1.5 ชั่วโมง เพราะเอนไซม์จะมีความเสถียรเมื่อติดอยู่กับเมมเบรน ดังนั้นเมื่อสกัดด้วยสารดีเทอร์เจนต์ ทำให้เอนไซม์สูญเสียความเสถียรไป

ได้มีการทำบริสุทธิ์ Nar จาก *Paracoccus denitrificans* โดยใช้ non-ionic detergent พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 3 โพลีเปปไทด์ คือ α, β และ γ มีขนาดโมเลกุล 127, 61 และ 21 กิโลดาลตัน สามารถใช้ duroquinol หรือ reduced-viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยในเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ผ่านการทำบริสุทธิ์จะมีไซโตโครม บี ซึ่งใช้ duroquinol เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ แต่เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วจะไม่มีไซโตโครม บี และไม่มีหน่วยย่อย γ ทำให้ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนจาก duroquinol ได้แต่ยังสามารถรับจาก reduced viologen ได้ จึงสรุปได้ว่าในเมมเบรนของ *P. denitrificans* หน่วยย่อย γ ทำหน้าที่เร่งการขนย้ายอิเล็กตรอนที่ได้จาก duroquinol ระหว่างหน่วยย่อย α และ β ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส จากการศึกษาต่อมาพบว่าภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนเอนไซม์จะมีความไวต่อไนเตรตความเข้มข้นต่ำๆในช่วงไมโครโมลาร์ได้ และสามารถใช้คลอเรตเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาได้ โดยมีค่า K_m สำหรับไนเตรตเป็น 13 ไมโครโมลาร์ และ K_m สำหรับคลอเรตเป็น 470 ไมโครโมลาร์ เมื่อใช้ duroquinol เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่เมื่อใช้ viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอนจะได้ค่า K_m สำหรับไนเตรตเป็น 283 ไมโครโมลาร์ และ K_m สำหรับคลอเรตเป็น 470 ไมโครโมลาร์ สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้คือเอไซด์ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน โดยมีค่า K_i เป็น 0.55 ไมโครโมลาร์

ใน *Micrococcus denitrificans* มีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส 2 ชนิด คือ assimilatory NR และ respiratory NR โดยทั้ง 2 ชนิดจะเกาะติดอยู่กับเมมเบรน เมื่อนำส่วนเมมเบรนมาศึกษาพบว่าเอนไซม์ใช้ NADH และ succinate เป็นตัวให้อิเล็กตรอน มี K_m สำหรับ NADH เป็น 1.8×10^{-5} และ 2×10^{-5} โมลาร์ เมื่อใช้ไนเตรตและออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ตามลำดับ แต่เมื่อสกัดเอนไซม์ออกจากเมมเบรนและทำบริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์จะเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์โดยใช้ reduced benzyl viologen และ reduced methyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแต่ใช้ NADH, succenate และ reduced cytochrome c เป็นตัวให้อิเล็กตรอนไม่ได้ สารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้คือไธโอไซยาเนต (KCNS) และ toluene-3,4- dithiol เพราะสารทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเกิด chelate กับโมลิบดินัมได้ สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ ที่ pH 6.3 โดยมีค่า K_m สำหรับไนเตรตเป็น 9.6×10^{-4} โมลาร์ เมื่อใช้ reduced benzyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Lam and Nicholas, 1968)

2.2.2 การขนส่งไนเตรตในระบบ Nar

เนื่องจากตำแหน่ง active site ของ NarG อยู่ในส่วนไซโตพลาสซึม ดังนั้นไนเตรตจึงต้องถูกขนย้ายเข้าไปในเซลล์ก่อนจะถูกรีดิวซ์และมีการขับไนไตรต์ออกมาในเพอริพลาสซึม ด้วยระบบการขับที่จำเพาะกับไนไตรต์ ส่วนการดูดซับไนเตรตในกระบวนการ respiratory ยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก แต่เป็นที่เข้าใจกันแล้วว่าช่องทางในการขนส่งไนเตรตจะมีความจำเพาะต่อไนเตรตสูงและถูก

ยับยั้งได้ด้วยออกซิเจน (Denis., 1990) ซึ่งแตกต่างจากการดูดซับไนเตรตในกระบวนการ assimilatory ที่ใช้ตัวขนส่งไนเตรตเป็น ABC-type

2.2.3 การควบคุมการแสดงออกของ Nar

ใน *E. coli* มีการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน Nar 2 ระบบ คือ 1) ระบบที่ขึ้นอยู่กับออกซิเจน โดยมีโปรตีน FNR (fumarate and nitrate reductase regulation) เป็นตัวควบคุม และ 2) ระบบที่ขึ้นอยู่กับไนเตรตหรือไนไตรต์ในสิ่งแวดล้อม ด้วยระบบการควบคุมที่มี 2 ส่วนโดยส่วนแรกเป็นโปรตีนที่ส่งสัญญาณ 2 ตัว คือ NarX กับ NarQ และส่วนที่สองเป็นตัวโปรตีนที่ควบคุมการจับกับ DNA 2 ตัว คือ NarL กับ NarP

ใน *E. coli* บทบาทของ FNR ในการควบคุม transcription คือเป็นศูนย์กลางในการแสดงออกของ gene ที่เกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดย FNR จะจับตรงตำแหน่ง upstream ของ promotor ที่ควบคุม FNR ทำให้เกิดการกระตุ้นหรือการกดขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่จับ โดยภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน FNR จะจับกับ DNA และกระตุ้น transcription ของ *nas* gene และ gene ที่เกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมในสภาวะไม่มีออกซิเจนต่างๆ แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจนกลุ่มของ $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ จะเปลี่ยนเป็น $[3Fe\text{-}4S]^{2+}$ หรือ $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ ทำให้ FNR อยู่ในรูปที่ทำงานไม่ได้

สำหรับการควบคุมการแสดงออกของ *nas* gene ด้วยไนเตรตหรือไนไตรต์ ใน *E. coli* เกิดขึ้นโดยไนเตรตและไนไตรต์จะจับกับ periplasmic domain ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ระหว่างโปรตีน NarX และ NarQ ทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนทั้งสองและเป็นผลให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน NarL กับ NarP ด้วย ทำให้ NarL และ NarP อยู่ในรูปที่ทำงานได้ หลังจากนั้น NarL และ NarP จะจับจำเพาะกับ DNA ทำให้กระตุ้นการแสดงออกของ *nas* gene ได้ (Chiang *et al*., 1997)

2.3 Dissimilatory periplasmic nitrate reductases (Nap)

2.3.1 โครงสร้างและสมบัติทางชีวเคมีของ Nap

เอนไซม์ Nap พบในแบคทีเรียที่เป็น phototrophic และ denitrifying แบคทีเรีย และแบคทีเรีย แกรมลบหลายชนิดโดยพบในส่วนเพอริพลาสซึมของเซลล์ (รูปที่ 6.) การทำงานของ Nap ไม่เกี่ยวข้องกับ nitrate assimilation หรือ nitrate respiration ดังนั้นไนไตรต์ที่เกิดขึ้นจึงใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน หรือเป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการ anaerobic respiration ขึ้นอยู่กับแบคทีเรียแต่ละชนิด การทำงานของเอนไซม์ Nap ไม่ทำให้เกิด PMF โดยตรงแต่ Nap จะเกี่ยวข้องกับการเกิด PMF เมื่อมีการส่งอิเล็กตรอนจาก NADH ไปให้ NADH dehydrogenase (Berks *et al*., 1995) แต่ใน *Pseudomonas* sp. เอนไซม์ Nap เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแรกในกระบวนการ denitrification ซึ่ง

เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดพลังงาน ดังนั้นกลไกการทำงานของ Nap ที่ทำให้เกิดพลังงานจึงยังไม่เป็นที่เข้าใจกันนัก (Bedzyk *et al*., 1999) นอกจากนี้บทบาททางด้านกายภาพของ Nap ยังมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียต่างชนิดกัน หรือแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่อยู่ในสภาวะต่างกัน แต่บทบาทที่ชัดเจนของ Nap คือเป็น dissimilatory เอนไซม์ที่ช่วยรักษาสมดุลของสภาวะแวดล้อมให้เหมาะกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

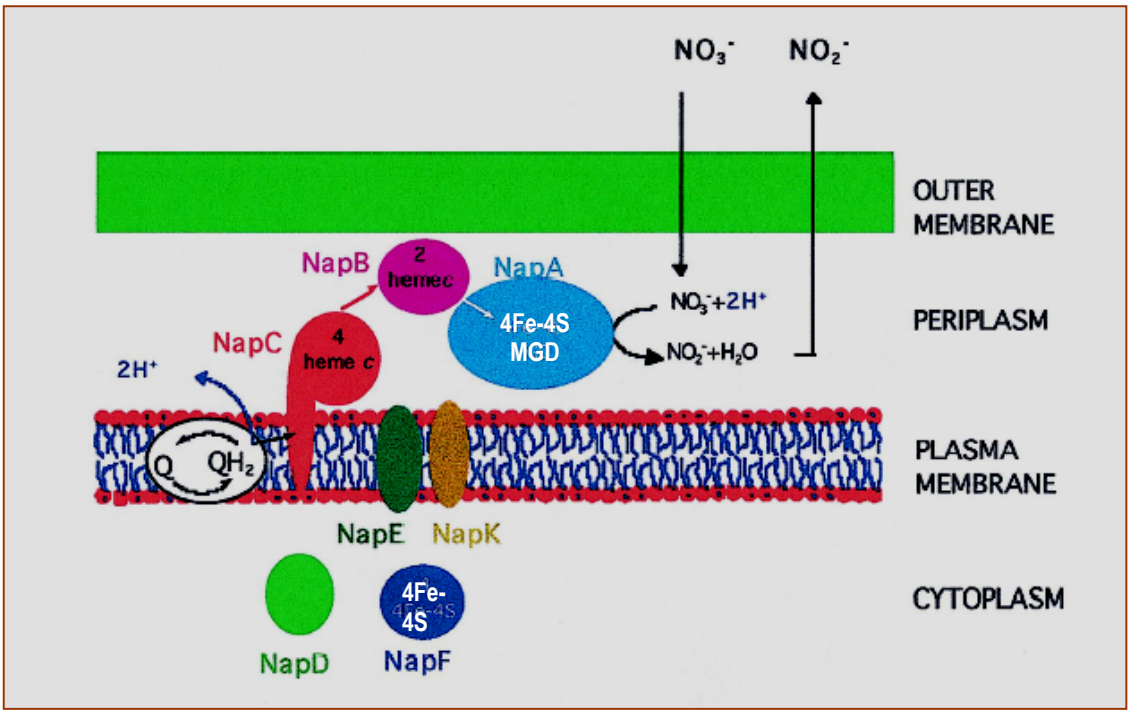
Nap ใน *Haloarcula marismortui* มี K_m สำหรับไนเตรตเป็น 80 ไมโครโมลาร์ เมื่อมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์โดยเกลือจะเป็นตัวสนับสนุนแอคติวิตีของเอนไซม์ ในช่วงแรกมีรายงานว่าเอนไซม์นี้เป็นโพลีเปปไทด์ ที่มีขนาด 63 กิโลดาลตัน (Yoshimatsu *et al*., 2000) แต่ต่อมาพบว่าเอนไซม์นี้เป็น dimer ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีขนาด 117 และ 47 กิโลดาลตัน (Yoshimatsu *et al*., 2002) แต่จากการศึกษาเอนไซม์ Nap ใน *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*), *Thiosphaera pantotropha*, *E. coli* และ *Rhodobacter* พบว่าเป็น heterodimer ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ทำปฏิกิริยาขนาด 90 กิโลดาลตัน (NapA) โดยมี MGD เป็นโคแฟคเตอร์ มี N-terminal ที่มีหมู่ [4Fe-4S] เป็นศูนย์กลาง และมีหน่วยย่อยเป็นไซโตโครม ซี ที่มีลักษณะเป็น biheme (NapB) ขนาด 15 กิโลดาลตัน โดยหน่วยย่อยนี้จะรับอิเล็กตรอนจาก NapC ซึ่งมีขนาด 25 กิโลดาลตันและเป็นไซโตโครม ซี ที่มีลักษณะเป็น tetraheme ยึดเกาะอยู่กับเมมเบรน (Berks *et al*., 1994 ; Berks *et al*., 1995) Nap แตกต่างจาก Nar คือ Nap ไม่ไวต่อการยับยั้งด้วยไซยาไนด์ อีกทั้งไม่สามารถใช้คลอเรตเป็นสารตั้งต้นได้และถูกกระตุ้นด้วยไธโอไซยาเนต และเอไซด์ได้เล็กน้อย (Berks *et al*., 1995)

จากการศึกษา Nap ใน *Paracoccus pantotrophus* และ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีทังสเตน (tungsten) เปรียบเทียบกับเมื่อในอาหารมีโมลิบเดต (molybdate) พบว่า Nap จาก *P. pantotrophus* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีโมลิบเดต สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้โดยมีค่า V_{max} = 3.41±0.16 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ K_m สำหรับไนเตรตเป็น 0.24±0.05 ไมโครโมลาร์ นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังมีความเสถียรที่อุณหภูมิมากกว่า 50 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจาก Nap ของ *P. pantotrophus* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มี tungsten ที่รีดิวซ์ไนเตรตได้ด้วยความเร็วที่ต่ำกว่าและมีความจำเพาะกับไนเตรตน้อยกว่าด้วย คือ มี V_{max}= 0.05±0.002ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนและ K_m = 3.91±0.45 ไมโครโมลาร์ ทั้งยังไม่เสถียรเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส และ Nap จาก *E. coli* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธ์ที่ใช้ไนเตรตในการเจริญเติบโต และสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของ Nap เพียงอย่างเดียว พบว่า Nap จาก *E. coli* สายพันธุ์แรกถูกยับยั้งได้เมื่อในอาหารที่เพาะเลี้ยงมี tungsten ความเข้มข้นในระดับน้อยกว่ามิลลิโมลาร์ แต่ Nap ในสายพันธ์ที่สองถูก tungsten ยับยั้งได้บางส่วนเมื่อมีความเข้มข้นของ tungsten ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากข้อมูลที่ผ่านมาไม่มีรายงานว่า tungsten สามารถแทนที่ molybdate ที่ตำแหน่ง active

site ได้แต่สามารถทำหน้าที่ตรงตำแหน่ง active site ได้ใน molybdoenzymes จากแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น (Gates *et al*., 2003)

2.3.2 การควบคุมการแสดงออกของ Nap

ถึงแม้ว่าการแสดงออกของ *nap* gene จะมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียต่างชนิดกันแต่โดยทั่วไปแล้วแอมโมเนียมและออกซิเจนไม่ก่อให้เกิดผลกระทบใดๆ ต่อระบบของ Nap โดยพบว่าใน phototrophic แบคทีเรียมีการทำงานของ Nap ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนโดยไม่ได้รับผลกระทบจากแอมโมเนียม และความสมดุลย์ของคาร์บอนและไนโตรเจนในเซลล์ นอกจากนี้ถึงแม้ว่าจะมีการทำงานของ Nap ในสภาวะที่ไม่มีไนเตรตแต่ถ้าในสภาวะที่มีไนเตรต พบว่าไนเตรตสามารถกระตุ้นการทำงานของ Nap ได้ (Reyes *et al*,. 1996) จากการศึกษาใน *P. denitrificans* พบการทำงานของ Nap ในระหว่างการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนแม้ว่าจะไม่มีไนเตรต โดยจะมี แอคติวิตีสูงเมื่อมีแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปรีดิวซ์ เช่น butyrate (Sears and Richardson., 1997) เช่นเดียวกับ Nap ที่พบใน *A. eutrophus* ที่ไม่ได้ถูกชักนำด้วยไนเตรตและแสดงออกสูงในสภาวะที่มีออกซิเจนในช่วงการเจริญเติบโตช่วง stationary phase (Siddiqui *et al*., 1993)



รูปที่ 6. การรีดิวซ์ไนเตรตในส่วนเพอริพลาสซึม ใน *R.sphaeroides* (Moreno-Vivian *et al*., 1999)

Nap มี หน่วยย่อย คือ

1. NapC มีหน้าที่รีดิวซ์ควินอล
2. NapB ขนส่งอิเล็กตรอนจาก NapC ไปยัง NapA
3. NapA เป็นศูนย์เร่งปฏิกิริยารีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ โดยรับอิเล็กตรอนจาก NapB และโปรตอนจากในส่วนเพอริพลาสซึม
4. NapE และ NapK เป็น transmembrane โปรตีนที่ยังไม่รู้หน้าที่ที่แน่ชัด
5. NapF เป็น โปรตีนที่ละลายน้ำได้มีกรดอะมิโน Cys 4 กลุ่มซึ่งอาจจะจับกับหมู่ [4Fe-4S] ซึ่งเกี่ยวข้องกับศูนย์กลางของ NapA ที่เป็นหมู่ [4Fe-4S]
6. NapD เป็นโปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสซึมและมีส่วนร่วมในการทำงานของ NapA

3. สาหร่ายในบ่อน้ำร้อน

ปัจจุบันได้มีการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบ่อน้ำพุร้อนกันมาก เช่นที่ Yellowstone Park ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการสำรวจพบว่ามีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอยู่รวมกับแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic bacteria) โดยอยู่รวมกันเป็นแผ่นเกาะอยู่ตามพื้นผิว (Madigan and Brock, 1977) ในบางแห่งอาจพบสาหร่ายสีเขียวบางชนิดด้วย ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ได้ที่อุณหภูมิที่ไม่สูงมากนัก สาหร่ายน้ำพุร้อนส่วนใหญ่จะเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีขนาดเล็ก (Kullberg,

1968) สาหร่ายและสิ่งมีชีวิตอื่นสามารถดำรงชีพอยู่ได้ในน้ำพุร้อนเพราะน้ำพุร้อนมีธาตุอาหารที่อุดมสมบูรณ์ และเมื่อสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นได้รับแสงอย่างเพียงพอทำให้สามารถสังเคราะห์แสงได้ดีซึ่งมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตเบื้องต้น (primary production) ของระบบนิเวศนั้น ๆ (ปราโมทย์ ทัศนาสุวรรณ., 2529; Castenholz., 1969)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นพวกโพรคาริโอต (prokaryote) ดิวิชันไซยาโนไฟตา (Cyanophyta) อาณาจักรโมเนรา (Monera) เซลล์สิ่งมีชีวิตพวกนี้จะไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ถ้ามีสารสีก็จะกระจัดกระจายอยู่ในโพรโตพลาซึม เม็ดพลาสติดสีไม่มีเยื่อหุ้ม

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนออกจากอากาศมาเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ ซึ่งจะช่วยเพิ่มผลผลิตข้าวในนาได้อีกด้วย (Allen and Stainer., 1968) แต่สาหร่ายบางชนิดที่ลอยอยู่ในน้ำถ้ามีมากเกินไปจะทำให้น้ำเปลี่ยนสีได้ เช่น สีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นต้น ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า “วอเตอร์บลูม” ซึ่งอาจก่อให้เกิดน้ำเสียขึ้นได้

สำหรับสาหร่ายบางชนิดที่สามารถเจริญได้ดีในบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมเช่น ในน้ำพุร้อน จะพบว่าโครงสร้างของเซลล์จะมีลักษณะพิเศษ โดยมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่หนาและมีเอนไซม์ที่พัฒนาสามารถทำงานได้หรือไม่เสียสภาพแม้อยู่ในช่วงอุณหภูมิสูง ๆ ถึงแม้ว่าบางส่วนของเซลล์จะถูกทำลายไปก็ตาม แต่เซลล์ก็สามารถสร้างส่วนประกอบเหล่านั้นขึ้นมาทดแทนได้อย่างรวดเร็ว (ประวิทย์ พิทักษ์วาปี., 2533) สาหร่ายกลุ่มนี้สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพที่ไม่เหมะสมได้ดี จากคุณสมบัติพิเศษดังกล่าวของสาหร่ายกลุ่มนี้ถ้ามีการค้นคว้ากันอย่างจริงจังก็น่าจะนำมาใช้ประโยชน์ต่อมนุษย์ได้

บ่อน้ำพุร้อนพบอยู่ในที่ต่าง ๆ ทั่วโลกทั้งในยุโรป ในประเทศสหรัฐอเมริกา นิวซีแลนด์หรือในเอเชีย เช่น ในประเทศมาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่นและไทย เป็นต้น น้ำพุร้อนที่รู้จักกันดีก็คือ น้ำพุร้อนที่ Yellowstone National Park ในประเทศสหรัฐอเมริกา น้ำพุร้อนสามารถจำแนกตามแหล่งกำเนิด (Castenholz., 1969) ได้ดังนี้

1. Volcanic – Na, Cl – hot spring เป็นน้ำพุร้อนที่มีแหล่งกำเนิดมาจากภูเขาไฟ น้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 7 สารที่พบมากในน้ำ คือ โซเดียม (Na) คลอไรด์ (Cl) ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) และซิลิเกต ค่าความเค็มอยู่ในช่วง 1,000-3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. Volcanic – acid SO_4 hot spring เป็นน้ำพุร้อนที่มีแหล่งกำเนิดมาจากภูเขาไฟ น้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 1-4 สารที่พบมากในน้ำคือ กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) และ ซัลไฟด์ (S^{2-}) ค่าความเค็มอยู่ในช่วง 35,000-100,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. Calcareous travertine – depositing hot spring เป็นน้ำพุร้อนที่มีแหล่งกำเนิดมาจากภูเขาหินปูน น้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 7 สารที่พบมากในน้ำคือ แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และ ไบคาร์บอเนต ในบางแห่งอาจพบปริมาณซัลไฟด์ที่สูง

4. Meteoric – Low Salinity hot spring น้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 9 สารที่พบมากในน้ำคือ โซเดียม และแคลเซียม ปริมาณคลอไรด์จะพบน้อย นอกจากนี้จะพบแก๊สไนโตรเจนเป็นจำนวนมาก อุณหภูมิของน้ำค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ Calcareous spring

5. Thermal brine hot spring เป็นน้ำพุร้อนที่มีแหล่งกำเนิดติดกับทะเลน้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 ค่าความเค็มมีค่ากระจายตั้งแต่น้อยจนถึงเท่ากับความเค็มของน้ำทะเล มีปริมาณแก๊สมีเทนค่อนข้างสูง

3.1 ชนิดของสาหร่ายในบ่อน้ำร้อนขึ้นกับปัจจัยหลัก 2 ประการ คือ อุณหภูมิและ แสง

3.1.1 อุณหภูมิ

ในการสำรวจน้ำพุร้อนที่ Yellowstone Park พบว่าที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสพบสาหร่าย 5 ชนิด ในขณะที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสจะพบสาหร่ายเพียง 1 ชนิดเท่านั้น (Castenholz, 1969 อ้างถึง Copeland, 1936) นอกจากจะพบสาหร่ายแล้วยังพบแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้เป็นจำนวนมาก Castenholz (1977) ได้ศึกษาน้ำพุร้อน Mammoth spring ที่ Yellowstone Park พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Spirulina labyrinthiformis* รวมอยู่กับแบคทีเรีย *Chloroflexus sp*. โดย *Chloroflexus sp*. จะขึ้นอยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และ *S. labyrinthiformis* จะขึ้นอยู่ในที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังอาจพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่นด้วย เช่น *Synechococcus sp. Mastigocladus* เป็นต้น จากการสำรวจน้ำพุร้อนในเมืองไทย ที่บ้านโป่ง อ้อม อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ พบว่าเมื่ออุณหภูมิต่ำ(ฤดูฝนและฤดูหนาว) จะพบสาหร่ายมากกว่า 65 ชนิด ในขณะที่อุณหภูมิสูง (ฤดูร้อน) จะพบสาหร่ายเพียง 35 ชนิดเท่านั้น (ประวิทย์ พิทักษ์วาปี., 2533) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อชนิดของสาหร่าย

3.1.2. แสง

Madigan และ Brock (1977) ได้ศึกษาการสังเคราะห์แสงของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechococcus lividus* และแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้คือ *Chloroflexus sp*. ที่อยู่รวมกันในน้ำพุร้อนที่ Yellowstone Park โดยให้ความเข้มแสงต่างกัน พบว่าการสังเคราะห์แสงของ *S. lividus* จะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มแสงมาก ๆ (8000 แรงเทียน) ในขณะที่ *Chloroflexus sp*. จะสังเคราะห์แสงได้ดีส่วนค่าความเข้มแสงที่ *S. lividus* สังเคราะห์แสงได้ดีที่สุดมีค่าประมาณ 5600 แรงเทียน (Madigan and Brock., 1977)

4. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

การเลี้ยงสาหร่ายน้ำพุร้อนยังทำกันไม่มากนักเพราะยังไม่สามารถหาอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมได้ โดยในระยะแรกจะใช้อาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายทั่ว ๆ ไปเลี้ยงสาหร่ายน้ำพุร้อน ต่อมา Allen (1968) ได้คิดสูตรอาหารเลี้ยงสาหร่ายน้ำพุร้อนซึ่งจะใช้เลี้ยงสาหร่ายเซลล์เดียว เช่น *Anacystis*

nidulans ได้ดี (Castenholz., 1969; Allen., 1968) อาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายนั้นมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายที่จะนำมาเลี้ยง อาหารชนิดแรกที่นำมาเลี้ยงสาหร่ายน้ำพุร้อนคือ D-medium ซึ่งสามารถเลี้ยงสาหร่ายได้บางชนิดเท่านั้น และสารที่เป็นองค์ประกอบในอาหารซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนนั้น เหมาะสมสำหรับการเติบโตของแบคทีเรีย *E. coli* และแบคทีเรียเหล่านั้นจะไปยับยั้งการเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Castenholz., 1969) นอกจาก D-medium แล้วยังมีอาหารเลี้ยงสาหร่ายน้ำพุร้อนอีกหลายชนิดเช่น S-1 medium และ NT-medium ซึ่งใช้ในการเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. labyrinthiformis*_ โดย S-1 medium จะเหมาะสำหรับใช้แยกสาหร่ายเซลล์เดียวซึ่งอาศัยอยู่ในน้ำพุร้อนที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 (Castenholz., 1977)

นอกจากอาหารดังกล่าวแล้ว อาจใช้อาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายทั่ว ๆ ไปในการแยกสาหร่ายน้ำพุร้อน ได้ เช่น Cg –10 medium (Castenholz., 1969) สำหรับ *Synechococcus sp.* จะเติบโตได้ดีในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูง (pH = 8.2) แต่อุณหภูมิจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Synechococcus sp.* มากกว่าความเป็นกรด-ด่าง เพราะสาหร่ายน้ำพุร้อนชนิดนี้จะเติบโตได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส (Castenholz., 1969) อย่างไรก็ดีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. lividus*_ จะมีอัตราการเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส และสามารถเติบโตได้ดีในที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส (Brock and Brock., 1968)

วัตถุประสงค์

1. สำรวจหาสาหร่ายที่มีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิปกติหรือมีคุณสมบัติ thermostable

2. ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของ thermostable NR ที่สกัดได้จากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธารน้ำอุ่นในภาคใต้ (จ.นครศรีธรรมราช และ จ. พัทลุง)

3. หาแนวทางและรูปแบบการเก็บรักษาเอนไซม์ NR ให้คงทน