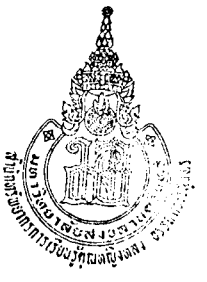

การเตรียมชุดทดสอบไนเตรตจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ของสาหร่ายที่ทนต่อความร้อน

Preparation of Nitrate Test Kit from Thermostable Algal Nitrate Reductase

ธันยพร พลประสิทธิ์

Thanyaporn Ponprasit

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biochemistry
Prince of Songkla University
2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เลขหมู่ QR99.Y.S8 ธ13 ส551 ธ.
Bib Key 372306
- 6 ก.พ. 2552

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเตรียมชุดทดสอบไนเตรตจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของสาหร่ายที่ทนต่อความร้อน

ผู้เขียน นางสาวธันยพร พลประสิทธิ์

สาขาวิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์พิมพรรณ ตันสกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อโนชา ตั้งโพธิธรรม)

.....กรรมการ

(ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์พิมพรรณ ตันสกุล)

.....กรรมการ

(ดร.จงรักษ์ อรรถรัฐ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเตรียมชุดทดสอบไนเตรตจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของสาหร่ายที่ทนต่อความร้อน

ผู้เขียน นางสาวธันยพร พลประสิทธิ์

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Phormidium tenue* เพื่อให้ได้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงสุด คือเพาะเลี้ยงเซลล์สาหร่ายในอาหารสูตร BG-11 ที่มีไนเตรตความเข้มข้นต่ำ (1 มิลลิโมลาร์) และเติมโซเดียม-ไบคาร์บอเนต 2 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มแสง 622 μmole $m^{-2}s^{-1}$ ในเครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน โดยวิเคราะห์แอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993)

เมื่อเติม hydroquinone สามารถส่งอิเล็กตรอนเพิ่มให้แก่เอนไซม์ทำให้เกิดการรีดิวซ์ไนเตรตมากขึ้น มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้น 9.78 เปอร์เซ็นต์ การใช้ benzyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงกว่าการใช้ methyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ยังให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสน้อยกว่าการวิเคราะห์โดยวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993)

การทดลองสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสออกจากเมมเบรนของเซลล์ *P. tenue* โดยใช้สารที่ทำลายโครงสร้างเมมเบรนและผนังเซลล์ ยังผลให้ลดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรต-รีดักเทส ยกเว้น Tween 20 ที่ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อแอคติวิตีและไม่สามารถสกัดเอนไซม์ให้หลุดออกจากเมมเบรนได้ ส่วนการใช้ Triton X-100 0.025 เปอร์เซ็นต์, lysozyme 0.025-0.1 เปอร์เซ็นต์ และการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) นาน 6 นาที รวมทั้งการบ่มสารสกัดหยาบเซลล์สาหร่ายในอะซิโตน 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสลดลง

สารสกัดหยาบเซลล์ *P. tenue* ทั้งในรูปธรรมชาติและที่ผ่านกรรมวิธีทำลายเมมเบรนแล้วสามารถเกิดปฏิกิริยาจับกับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดที่เตรียมจากกระต่าย แต่จากการทดสอบโดยวิธี Immunodot assay และ Western blot บ่งชี้ว่าการจับกันระหว่างสารสกัดหยาบ *P. tenue* กับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดที่เตรียมจากกระต่ายเป็นแบบไม่จำเพาะกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

การศึกษาเซลล์สาหร่าย *P. tenue* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างเซลล์ปกติกับเซลล์ที่ผ่านการสกัดด้วยอะซิโตน 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อดูภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ Transmission electron microscopy เซลล์ *P. tenue* ตามสภาพธรรมชาติมีผนังเซลล์ (cell wall) ที่บางแต่มี sheath ที่หนาหุ้มสายของเซลล์ที่เรียงต่อกันเป็น filament และหลังจากบ่มเซลล์ด้วย lysozyme ซึ่งย่อย glycoprotein ทำให้ส่วน sheath และผนังเซลล์หายไป เซลล์แยกกันเป็นอิสระ และการบ่มด้วยอะซิโตนทำให้เซลล์แยกจาก sheath และยังพบว่าส่วน periplasm หายไป ทำให้ผนังเซลล์มาชิดกับ plasma membrane ภาพ TEM ของ *P. tenue* ที่ผ่าน sonication นาน 6 นาที แสดงความเสียหายของโครงสร้างทั้งหมด เซลล์แตกและ cytoplasmic membrane ที่มีรงควัตถุ (phycobilisome) กระจายทั่วไป

การสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของ *P. tenue* สัมพันธ์กับการสูญเสียโครงสร้างของเซลล์ เนื่องจากเอนไซม์อยู่ที่ plasma membrane เมื่อทดลองผสมส่วนสกัดเซลล์หลังการบ่มกับ lysozyme 0.025 เปอร์เซ็นต์ กับ L-α Phosphotidylcholine ให้เป็น micelle และใช้ reduced viologen (ทั้ง methyl และ benzyl) เป็นตัวให้อิเล็กตรอนไม่สามารถทำให้แอคติวิตีกลับคืนมา

การใช้ Hydroquinone เข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากเซลล์สาหร่าย *P. tenue* ที่ผ่านการสกัดด้วยอะซิโตน 15 เปอร์เซ็นต์ ได้ 21.11 เปอร์เซ็นต์ และใช้ไนเตรตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ตามวิธีของ Nakamura และ Ikawa (1993) ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลเบื้องต้นมาทดสอบปริมาณของไนเตรตโดยใช้เอนไซม์ในเซลล์สาหร่ายที่สกัดด้วยอะซิโตน ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง แสดงความแตกต่างของความเข้มของสีชมพูในสารละลายตามช่วงความเข้มข้นของไนเตรตและสามารถตรวจวัดไนเตรตที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้ในช่วง 0.025-0.3 โมลาร์

ส่วนการเก็บรักษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในรูปของการทำ freeze-drying ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากการเสียสภาพของเอนไซม์ ส่งผลให้ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์หลังการทำ freeze-drying

Thesis Title	Preparation of nitrate test kit from thermostable algal nitrate reductase
Author	Miss Thanyaporn Ponprasit
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2008

ABSTRACT

The blue-green alga, *Phormidium tenue*, isolated from a hot spring in Phatalung Prvince, was cultured to obtain nitrate reductase of the highest specific activity using the modified BG-11 medium at a low nitrate concentration (1 mM) and supplemented with sodium bicarbonate at 2 g/L under optimum conditions, which were 622 μmole m^{-2} s^{-1} light intensity and continuous shaking at 160 rpm, at 45 degree Celsius for 2 days. The nitrate reductase activity associated with the particulate fraction was measured by the method of Nakamura and Ikawa (1993) at 55 degree Celsius.

The nitrate reductase activity could be increased by 9.78 % with the addition of hydroquinone which could donate its electrons for the reduction of nitrate. The use of reduced viologen as an electron donor for the nitrate reductase assay showed a lower activity than the method of Nakamura and Ikawa (1993). The activity assay using reduced benzyl viologen resulted in a higher value than that of reduced methyl viologen.

Attempts in extracting the nitrate reductase enzyme from the *P. tenue* particulate fraction by various agents, which degrade the membrane and cell wall structure, resulted in lowering of nitrate reductase activity. With the exception of Tween 20, at 5-20 percent, did not affect the activity and was not effective for nitrate reductase extraction from the algal membrane. The activity of nitrate reductase was decreased by incubating the algal particulate with Triton X-100 at 0.25-1.0 percent, or lysozyme at 0.025-0.1 percent, or 15-20 percent acetone and by sonication for 6 minutes.

The *P. tenue* particulate fraction either in native form or that treated with various membrane destructive reagents showed cross reaction with the rabbit antibody against corn nitrate reductase. However, both the immunodot and the Western blot

assays indicated that the binding between the algal particulate and the rabbit antibody was not specific to nitrate reductase.

Light microscopy of *P. tenue* cells at X1000 magnification could not distinguish between normal cells and those treated with 15% acetone. Transmission electron microscopy (TEM) showed that the cell wall of *P. tenue* was thin and the cells arranged in a long filament were covered with a thick sheath. When the *P. tenue* filaments were incubated with lysozyme the sheath and cell wall disappeared and the algal cells became free. After treatment with 15% acetone the sheath became detached, the periplasm also disappeared and the cell wall became appressed to the plasma membrane. TEM study after sonication for 6 minutes showed that *P. tenue* cells were destroyed and the cytoplasmic membrane with phycobilisome became loose.

The loss of nitrate reductase activity of *P. tenue* particulate fraction was related to membrane destruction as for most membrane-associated enzymes. An attempt on enzyme reconstilution by mixing the lysozyme-treated cell fractions with L-α-phosphatidylcholine to form micelles, using reduced viologen (methyl or benzyl) as an electron donor, could not restore the nitrate reductase activity.

Addition of hydroquinone as an electron donor, at 4 μM, increased the nitrate reductase activity of *P. tenue* cells previously treated with 15% acetone by 21.11%, employing 0.1 M nitrate as the most appropriate concentration of substrate for analysis by the method of Nakamura and Ikawa (1993). A primary test conducted for detection of nitrate contamination, using the acetone treated algal cells, showed that the resultant pink-colour solution could be differentiated within 1 hour and the limit of detection is in the range of 0.025-0.3 M nitrate.

Freeze-drying of the algal cells resulted in loss of nitrate reductase activity due to enzyme denaturation.