

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจเลือกเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่เสถียรต่อความร้อนจากสาหร่ายที่ได้
จากบ่อน้ำพุร้อน
ผู้เขียน นายศิริศักดิ์ วิประภษิต
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2549

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechococcus minervae* ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อน ในจังหวัดระนอง เติบโตได้ดีในอาหารดัดแปลงสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรดเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมไบคาร์บอเนตเข้มข้น 23.8 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 152 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของสาหร่าย *S. minervae* เป็นชนิด membrane-bound nitrate reductase ซึ่งสารสกัดหยาบเอนไซม์ไม่สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (4, 0, -20 และ -70 องศาเซลเซียส) ได้เพราะจะทำให้สารสกัดหยาบสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ แต่เมื่อเก็บสารสกัดหยาบเอนไซม์ไว้ใน glycerol 3, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถรักษากิจกรรมเอนไซม์ไว้ได้นานกว่า 20 วัน นอกจากนี้ glycerol ยังทำให้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีกด้วย

สารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมที่ 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง 8-9 โดยกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ไม่สามารถใช้อิเล็กตรอนจาก NADH, NADPH, succinate, และ bromophenolblue แต่จะใช้อิเล็กตรอนจาก quinol pool ที่เกาะอยู่บนเมมเบรน นอกจากนี้การใช้ Methyl viologen ที่ถูกรีดิวซ์ด้วย dithionite สามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ในสารสกัดหยาบได้ sodium azide, sodium thiocyanate, arsenic trioxide และ potassium ferricyanide สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบได้ 88.62, 12.2, 16.27 และ 14.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่า K_m ของไนเตรดเท่ากับ 0.33 มิลลิโมลาร์ V_{max} เท่ากับ 3.33 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่านี้เอนไซม์จะเสียสภาพ

การใช้สารดีเทอร์เจนต์ Triton X-100, Deoxycholate, Tween 20 และ CHAPS ไม่สามารถสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสออกจากเมมเบรน และการใช้สารดีเทอร์เจนต์เหล่านี้ที่ 5

เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ การใช้ Triton X-100 เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่การใช้ Sodium dodecyl sulphate (SDS) เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดกิจกรรมเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสของข้าวโพดกับเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *S. minervae* พบว่าสารสกัดหยาบเอนไซม์สามารถเกิด cross reaction กับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสของข้าวโพดได้ แสดงว่าเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในข้าวโพดมีโครงสร้างบางส่วนเหมือนกันกับเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *S. minervae* และจากการนำสารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วย Triton X-100 และ SDS มาทดสอบการเกิด cross reaction พบว่าสารสกัดหยาบเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสที่ผ่านการสกัดด้วย Triton X-100 ที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ยังสามารถเกิด cross reaction กับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสของข้าวโพดได้ แต่สารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วย SDS ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถเกิด cross reaction ได้ ทั้งนี้เนื่องจาก SDS ทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

Thesis Title Selection of a Thermostable Nitrate Reductase from Hot-Spring Algae
Author Mr.Sirisak Wiprakasit
Major Program Biochemistry
Academic Year 2006

ABSTRACT

Synechococcus minervae, a blue-green algae isolated from a hot spring in Ranong Province, cells were transferred and cultured in modified BG-11 medium (supplemented with 1 mM sodium nitrate and 23.8 mM sodium bicarbonate) under light (152 $\mu\text{photon}/\text{m}^2/\text{s}$) and anaerobic conditions at 35 degree Celsius.

Crude extract of nitrate reductase lost its activity when it was kept at low temperature (4, 0, -20 and -70 degree Celsius). But nitrate reductase activity of crude extract could be prolonged with the addition of 3, 5 and 10 percents glycerol at 30 degree Celsius for more than 20 days and increased activity of enzyme.

Optimum temperature and pH for enzyme activity were 45 degree Celsius and 9.0 respectively. The enzyme could not use NADH, NADPH, succinate and bromphenol blue as electron donor but it could use electrons from quinol pool in the cell membrane. Furthermore, the enzyme could use electrons from dithionite-reduced methyl viologen. Nitrate reductase activity was inhibited by sodium azide, sodium thiocyanate, arsenic trioxide and potassium ferricyanide at 88.62, 12.2, 16.27 and 14.63 percent respectively. K_m and V_{max} values of nitrate was 0.33 mM and 3.33 nmole/min/mg protein. Stability of *S. minervae* NR was high at 40 degree Celsius. The enzyme would be denatured after incubation at more than 40 degree Celsius.

NR of *S. minervae* is a membrane-bound nitrate reductase and it was not possible to extract it from the membrane by various detergents such as Triton X-100, deoxycholate, Tween 20 and CHAPS. These detergents at 5 percent could not inhibit nitrate reductase activity. But at 25 percent Triton X-100 and 1 percent sodium dodecyl sulphate (SDS) could inhibit nitrate reductase activity by 50 and 80 percent respectively.

Finally, the crude extract of *S. minervae* NR showed cross reactivity with rabbit antibody against purified nitrate reductase from corn, indicating some similarity between the structure of *S. minervae* NR and that of corn NR. The particulate fraction extracted by 25 percent of Triton X-100, still showed cross reactivity with rabbit antibody against purified NR from corn. But the particulate fraction extracted by 1 percent of SDS could not cross react with rabbit antibody against purified NR from corn. This result indicated that NR structure was completely destroyed by SDS.