3. ผลการทดลอง

3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างสาหร่าย

จากการสำรวจสภาพของบ่อน้ำร้อนและธารน้ำร้อนเมื่อวันที่ 13 – 15 มีนาคม 2547 ใน จ.ระนอง พบว่า แหล่งน้ำส่วนใหญ่ที่เก็บตัวอย่างเป็นแหล่งน้ำร้อนตามธรรมชาติที่ได้รับความร้อนจากใต้พิภพ แต่บางแหล่งที่เก็บตัวอย่างได้มีการปรับปรุงให้เป็นสถานที่ท่องเที่ยว จึงมีสิ่งก่อสร้างอยู่บ้าง

3.2 สภาพของบ่อน้ำร้อนและธารน้ำจากบ่อน้ำร้อน

มีลักษณะน้ำใส ไม่มีสี บางแหล่งความเค็ม บางแหล่งมีกลิ่นซัลเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำอยู่ในช่วง 6.82 – 8.05 และมีอุณหภูมิระหว่าง 26 – 67 องศาเซลเซียส และจากการตรวจวัดความเข้มข้นไนเตรตและไนไตรต์ในห้องปฏิบัติการ ไม่พบไนเตรตและไนไตรต์ในแหล่งน้ำดังกล่าว ส่วนอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างของแหล่งน้ำสรุปเป็นตารางดังนี้

ตารางที่ 3.1 แสดงแหล่งที่เก็บตัวอย่างน้ำ อุณหภูมิ แลค่าความเป็นกรด-ด่าง

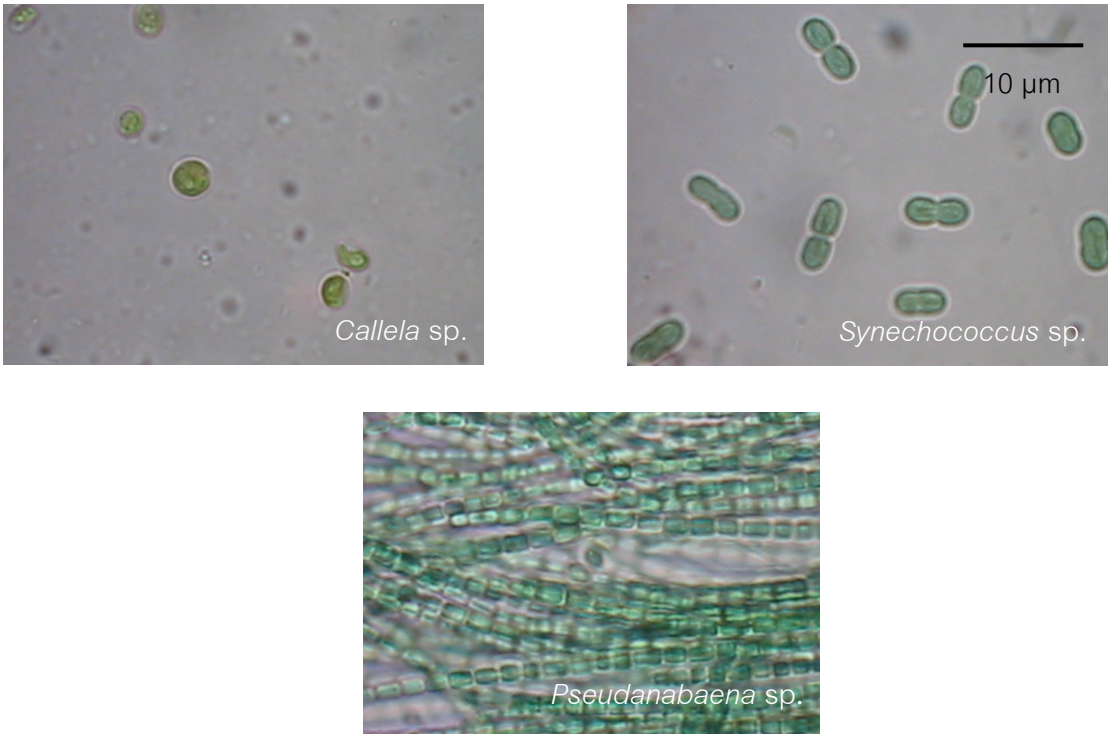
ลำดับ	แหล่งของตัวอย่าง	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH (pH meter)
1.	บ่อน้ำร้อนรักษะวาริน จ. ระนอง ริมบ่อพ่อ	63	7.38
2.	” ขอบบ่อพ่อ	67	7.58
3.	” ข้างบ่อลวกไข่	54.7	7.87
4.	” ในบ่อลวกไข่	61.3	8.05
5.	” ข้างบ่อบำบัด	46.6	7.89
6.	” ข้างแท่งหินวางเท้าบ่อบำบัด	54.9	8.22
7.	” ปากท่อจากบ่อพ่อ	65.2	7.86
8.	” กลางทางน้ำไหล	57	7.76
9.	” ปลายทางน้ำไหล	40.6	7.35
10.	” ปากท่อจากบ่อแม่	48	7.70

11.	” ห่างปากท่อ 1 เมตร	47.5	7.74
12.	” ข้างลำธารใหญ่	37	7.17
13.	” ก้อนหินในลำธารใหญ่	26	7.50

หมายเหตุ : ค่าความเค็มเท่ากันหมดทุกแหล่ง มีค่าเป็น 1.0 (ไม่มีเกลือ)

3.3 ผลการแยกสาหร่ายให้เป็นชนิดเดียว

จากตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้จากสถานที่ดังกล่าว พบสาหร่ายหลายชนิด เช่น สาหร่ายสีเขียว, สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และ ไดอะตอม เป็นต้น และจากการแยกสาหร่ายโดยวิธีการ streak plate บนอาหารแข็งสูตร BG-11 พบว่ามีสาหร่ายที่เติบโตบนอาหารแข็งได้ดีมีสาหร่ายเซลล์เดียว 2 ชนิด และสาหร่ายที่เป็นเส้นสาย 1 ชนิด ที่สามารถเติบโตได้ดีบนอาหารแข็งสูตรดังกล่าว สาหร่ายเซลล์เดียวที่แยกได้ได้แก่ *Chrolellla* sp. จากตัวอย่างที่ 13, *Synechococcus* sp. จากตัวอย่างที่ 13 ส่วนสาหร่ายที่เป็นเส้นสายได้แก่ *Pseudanabaena* sp. จากตัวอย่างน้ำที่ 10 ดังรูป



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างเซลล์สาหร่ายที่สามารถแยกได้ด้วยวิธี streak plate

3.4 ผลการหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายตัวอย่างที่แยกได้แบบ *in vivo*

จากการหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vivo* พบว่าสาหร่าย *Synechococcus* sp. มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเท่ากับ 0.5 (ตารางที่ 3.2) ส่วน *Pseudanabaena* sp. ไม่มีกิจกรรมเอนไซม์เลย จึงใช้สาหร่าย *Synechococcus* sp. มาจำแนกชนิด และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.2 แสดงชนิดของสาหร่ายและค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่วัดได้จากวิธี *in vivo*

ชนิดสาหร่าย	กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (nmole/min/mg.protein)
Synechococcus sp.	0.5
Pseudanabaena sp.	-

จากการจำแนกทำให้ทราบว่าสาหร่ายดังกล่าวมีชื่อว่า *Synechococcus minervae*(Komarak) และจากการศึกษาตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากสถานที่ต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบสาหร่าย *Synechococcus minervae* ชนิดนี้ในตัวอย่างจากแหล่งอื่นอีก 2 แหล่ง ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงแหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่างที่พบสาหร่าย *S. minervae* ทั้ง 2 แหล่ง

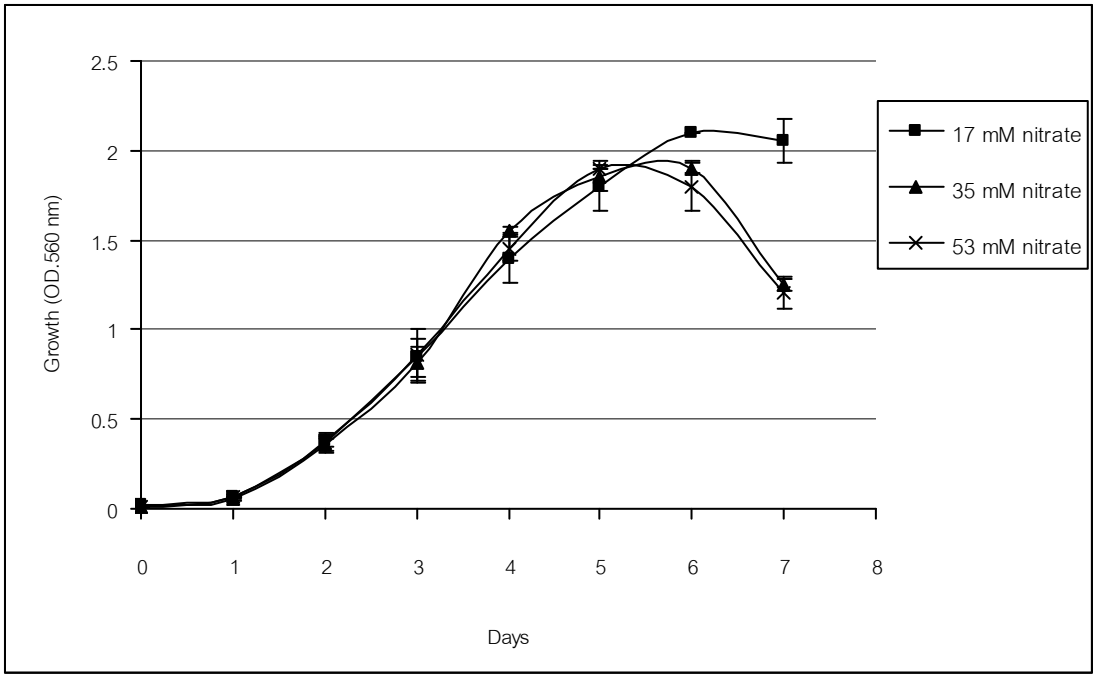
ลำดับ	แหล่งของตัวอย่าง	อุณหภูมิ (^{o}C)	pH (pH meter)
1.	บ่อน้ำร้อนรักษะวาริน จ.ระนอง ปากท่อจากบ่อแม่	48	7.70
2.	” ห่างปากท่อ 1 เมตร	47.5	7.74

หมายเหตุ : ค่าความเค็มเท่ากันหมดทุกแหล่ง มีค่าเป็น 1.0

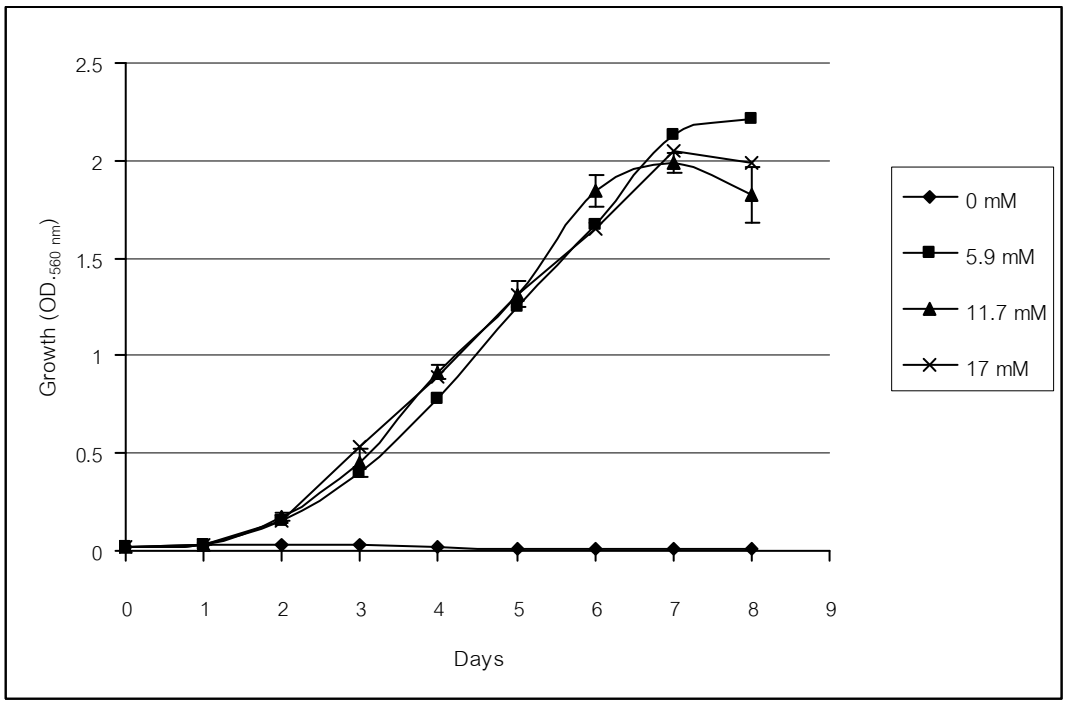
3.5 ความเข้มข้นไนเตรตที่สาหร่าย *Synechococcus minervae* สามารถเติบโตได้ดีที่สุด

เมื่อนำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง BG-11ที่มีโซเดียมไนเตรต 0, 5.9, 17, 35, 53 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ พบว่าสาหร่ายมีการ

เติบโตอยู่ช่วง lag phase ใน 2 วันแรก หลังจากนั้นจะเข้าสู่ช่วง log phase จนถึงวันที่ 6 สาหร่ายที่เติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นไนเตรตสูง (35 และ 53 มิลลิโมลาร์) (รูปที่ 3.2) มีการตายของสาหร่าย (ค่าการดูดกลืนแสงลดลง) อาจเนื่องจากมีความเข้มข้นของไนไตรต์ในอาหารสูงอาจเป็นพิษต่อเซลล์สาหร่าย ส่วนสาหร่ายที่เติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นไนเตรต 5.9-17 มิลลิโมลาร์ ค่า OD.ยังเพิ่มขึ้น ในอาหารที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรตเท่ากับ 5.9 มิลลิโมลาร์ วัดค่า OD.560 nm ได้สูงสุด เท่ากับ 2.3 ในวันที่ 8 ส่วน อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรตอยู่ระหว่าง 5.9 - 17 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายมีการเติบโตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และในความเข้มข้นนี้สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไว้ได้นานหลายเดือน โดยค่า OD. ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงมากนัก (รูปที่ 3.3) และจากการทดลองทำให้ทราบว่าสาหร่ายชนิดนี้ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ เนื่องจากไม่มีการเติบโตของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีโซเดียมไนเตรต (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.2 การเติบโตของสาหร่าย *S.minervae* ในอาหาร BG-11 สูตรดัดแปลงที่มีไนเตรต 11.7(1.5 กรัมต่อลิตร), 35 (3.0 กรัมต่อลิตร) และ 53 มิลลิโมลาร์ (4.5 กรัมต่อลิตร) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D

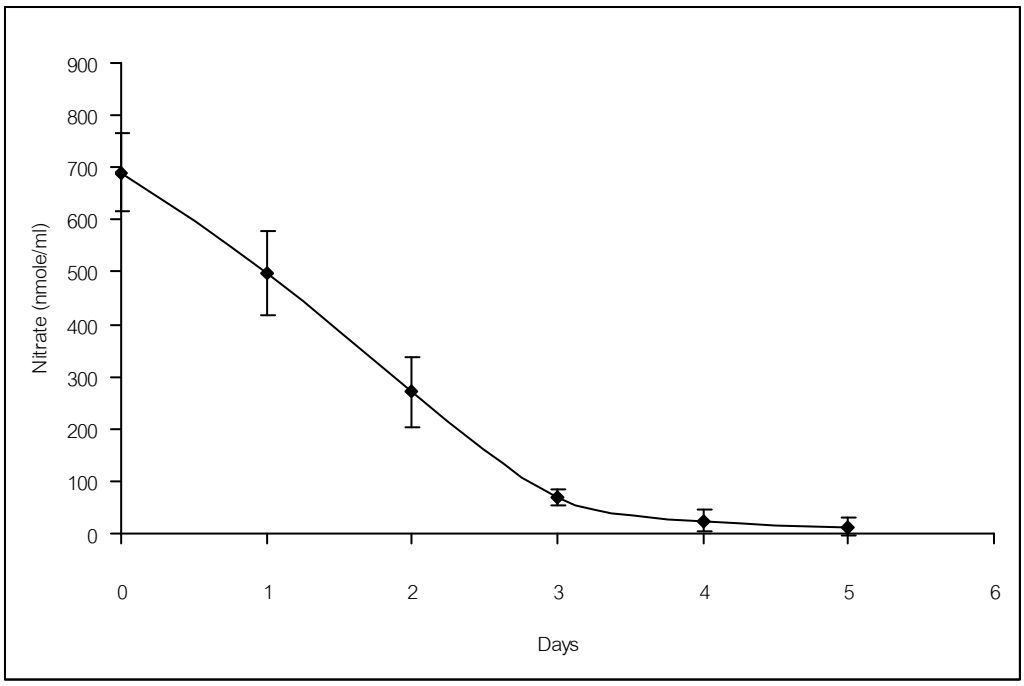


รูปที่ 3.3 การเติบโตของสาหร่าย *S.minervae* ในอาหาร BG-11 สูตรดัดแปลงที่มีไนเตรต 0, 5.9 (0.5 กรัมต่อลิตร), 11.7 (1.0 กรัมต่อลิตร) และ 17 มิลลิโมลาร์ (1.5 กรัมต่อลิตร) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D

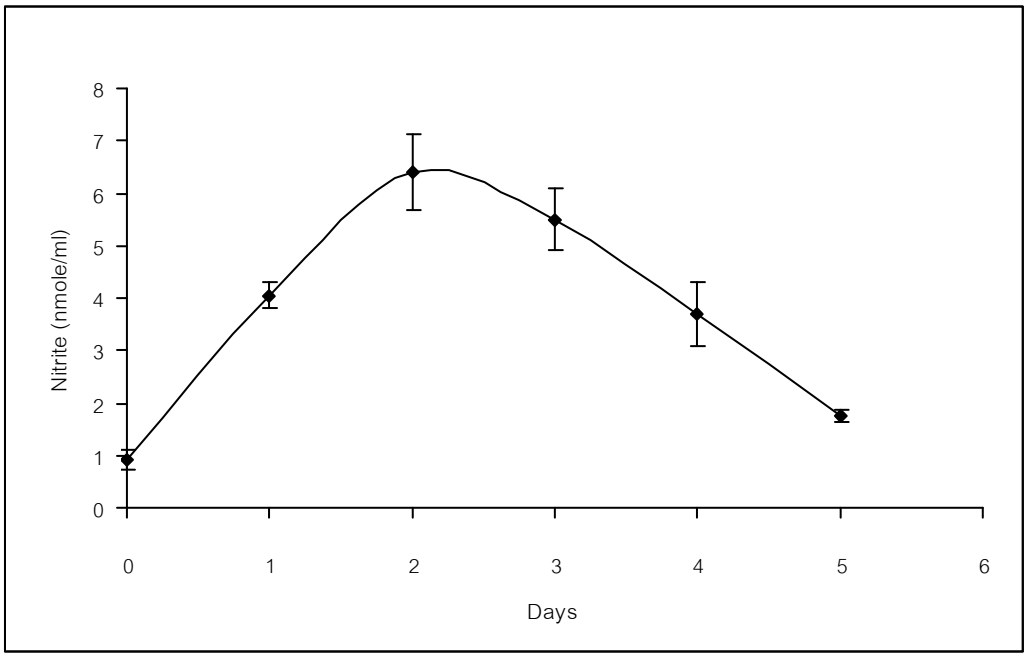
3.6 การผลิตเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ไนเตรตที่ความเข้มข้นต่ำ

จากการทดสอบเบื้องต้น พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเฉพาะส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และพบว่าสาหร่ายชนิดนี้ในอาหารที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรต 500 ไมโครโมลาร์ มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในวันที่ 1 ของการทดลอง (รูปที่ 3.6) ซึ่งสาหร่ายยังอยู่ในช่วง lag phase (รูปที่ 3.7) และกิจกรรมเอนไซม์ลดลงในวันที่ 2 ของการทดลอง หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นมาสูงสุดในวันที่ 4 (รูปที่ 3.6) ส่วนความเข้มข้นไนเตรตในอาหารลดลงเรื่อย ๆ ตลอดการทดลองจากความเข้มข้นเริ่มต้น 500 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 3.4) ขณะที่ความเข้มข้นไนไตรต์ในอาหารเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และสูงสุดในวันที่ 2 ของการทดลอง หลังจากนั้นความเข้มข้นไนไตรต์ก็ลดลงอาจเนื่องจากสาหร่ายนำไนไตรต์ไปใช้ในการเติบโต (รูปที่ 3.5) นอกจากนี้สังเกตได้ว่าสาหร่ายมีการสร้างเอนไซม์เมื่อมีไนไตรต์ในอาหารเข้มข้นไม่เกินประมาณ 2 นาโนโมลาร์ (รูปที่ 3.5 และ 3.6) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นไนไตรต์มีส่วนในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานของ Kikuchi และ คณะ (1996) ที่ทดลองในไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 ที่พบว่าเมื่อความเข้มข้นไนไตรต์สูงขึ้น เซลล์สาหร่ายจะนำไนไตรต์ไปผลิตเป็นสารประกอบในกลุ่มไซยาไนด์ และสารกลุ่มไซยาไนด์จะยับยั้งการสร้าง mRNA ในการสังเคราะห์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ไนไตรต์รีดักเทส และตัวขนส่งไนเตรต

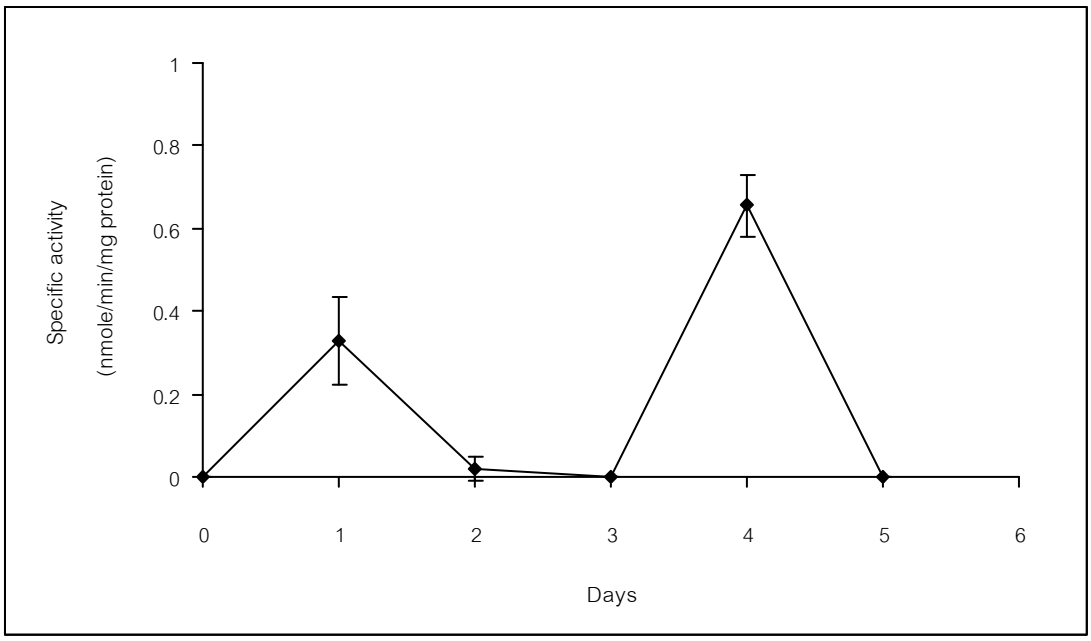
เมื่อพิจารณาการเติบโตของสาหร่ายในอาหารสูตรดังกล่าว พบว่าการเติบโตของสาหร่ายสูงสุดในวันที่ 4 แต่มีความหนาแน่นของเซลล์น้อยเพราะค่าการดูดกลืนแสงที่สาหร่ายเติบโตได้สูงสุดเท่ากับ 2.3 จึงหาสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นไนเตรตพอเหมาะสำหรับการเติบโตของสาหร่ายได้เต็มที่และใช้ไนเตรตหมดพอดีในการทดลองต่อไป



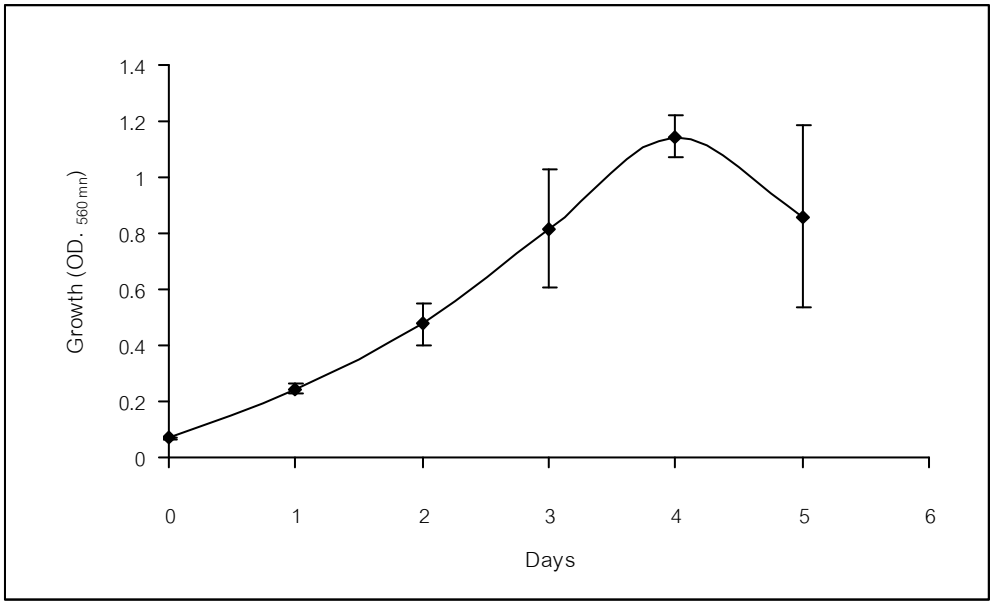
รูปที่ 3.4 ความเข้มข้นไนเตรตที่ลดลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เริ่มต้นด้วยไนเตรต 500 ไมโครโมลาร์ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3ซ้ำ ± S.D



รูปที่ 3.5 ความเข้มข้นไนไตรต์ที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเพาะเลี้ยงในที่มีไนเตรต 500 ไมโครโมลาร์ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ ± S.D



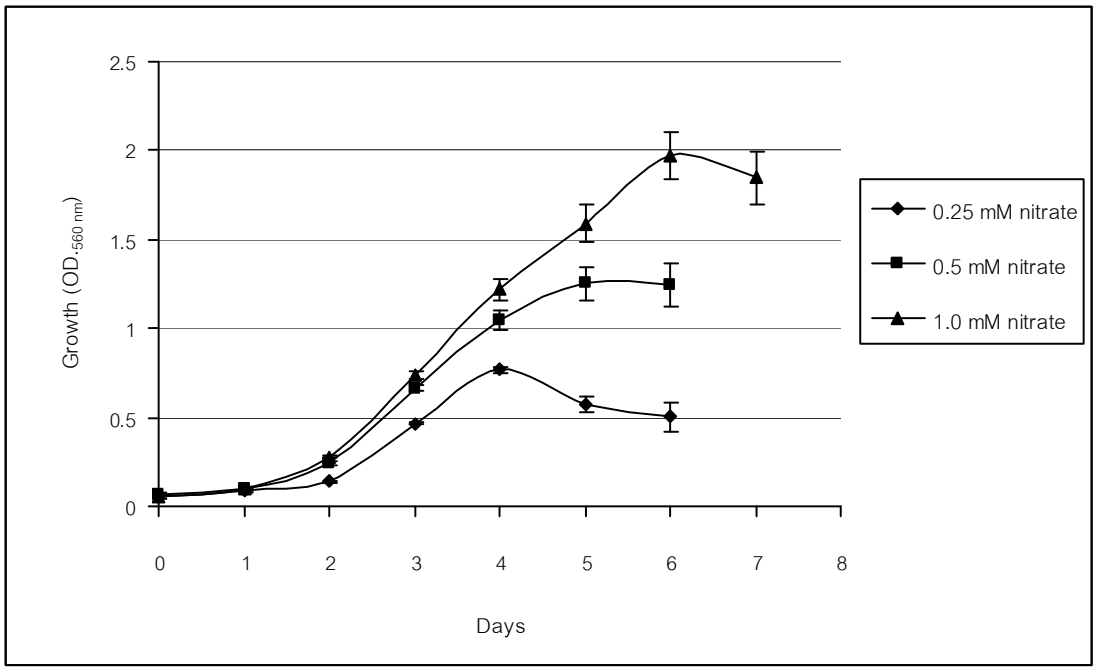
รูปที่ 3.6 แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแต่ละวัน ที่เพาะเลี้ยง *S. minervae* ในอาหาร BG-11 สูตรดัดแปลงที่มีความเข้มข้นไนเตรตเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์
ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D



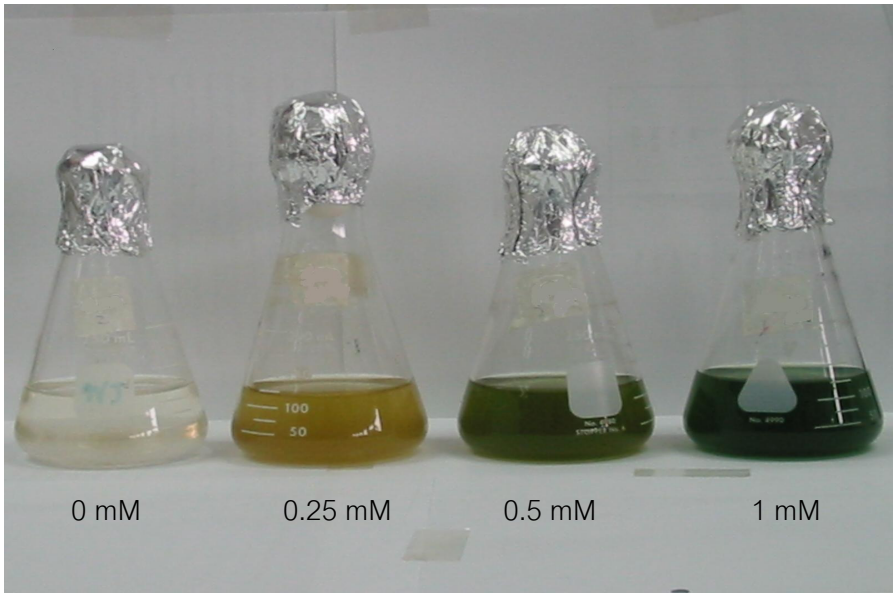
รูปที่ 3.7 การเติบโตของสาหร่าย *S. minervae* ในอาหาร BG-11 สูตรดัดแปลงที่มีไนเตรต 0.5 มิลลิโมลาร์
ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D

3.7 อิทธิพลของไนเตรตต่อการเติบโตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. minervae*

เมื่อทดสอบการเติบโตของสาหร่ายในอาหารที่มีไนเตรต 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าการเติบโตของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 0.25 มิลลิโมลาร์ จะเติบโตสูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลอง หลังจากนั้นสาหร่ายจะเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีหลือง แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายชนิดนี้ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ ซึ่งสาหร่ายเหล่านี้จะมีประสิทธิ์ภาพในการกำจัดไนเตรตในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าสาหร่ายที่สามารถใช้ไนเตรตและตรึงไนโตรเจนในอากาศ (Qiang *et al.*,1999) อย่างไรก็ตามการเติบโตของสาหร่ายในสองความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ มีการเติบโตน้อยกว่าในอาหารที่มีไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งพบว่าการเติบโตเติมโตของสาหร่ายสูงสุดในวันที่ 6 และอ่านค่า $OD._{560nm}$ เท่ากับ 2.0 หลังจากนั้นสาหร่ายก็เริ่มเปลี่ยนสี (รูปที่ 3.8 และ 3.9) ส่วนสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไนเตรต พบว่าไม่มีการเติบโตของสาหร่ายเพราะค่า OD คงที่ตลอดการทดลอง (ไม่แสดงข้อมูล)



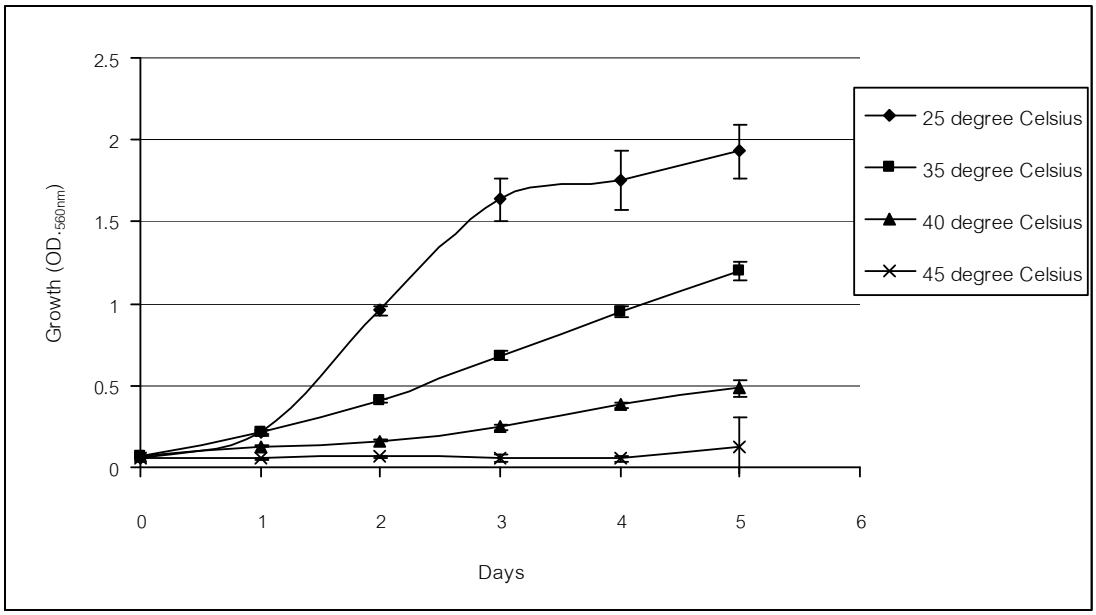
รูปที่ 3.8 การเติบโตของสาหร่าย *S. minervae* ในอาหาร BG-11 สูตรดัดแปลงที่มีไนเตรต 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D



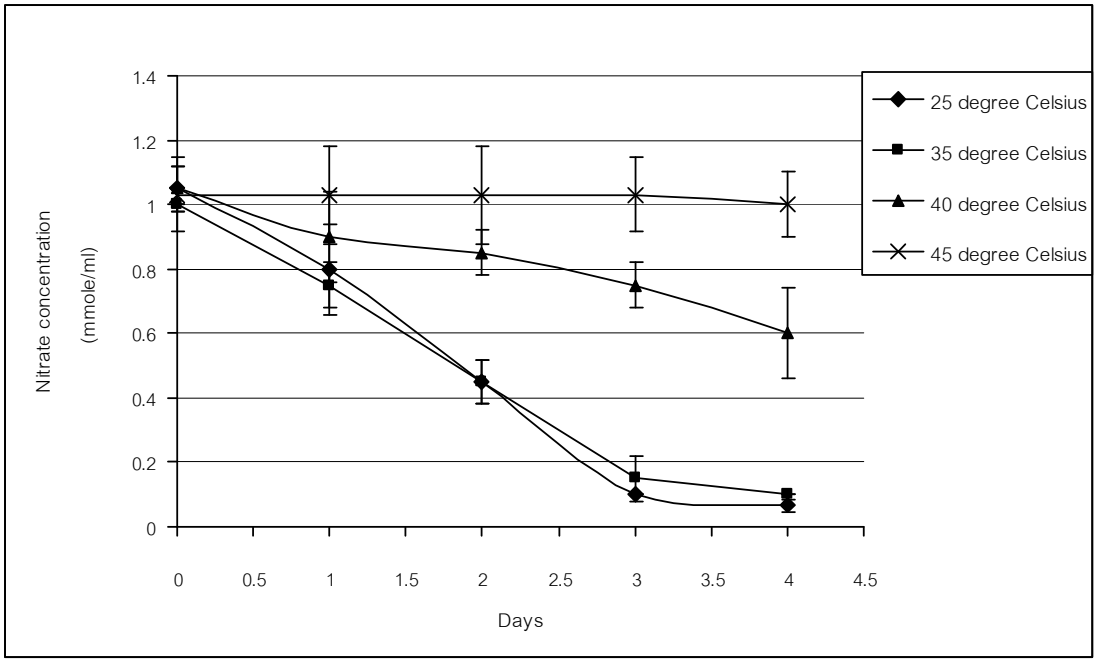
รูปที่ 3.9 สภาพของสาหร่าย *S. minervae* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่มี 0, 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไนเตรตในวันที่ 6

3.8 การเติบโต การดูดซับไนเตรตและการผลิตไนไตรต์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *S. minervae* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 25, 30, 35 และ 45 องศาเซลเซียส

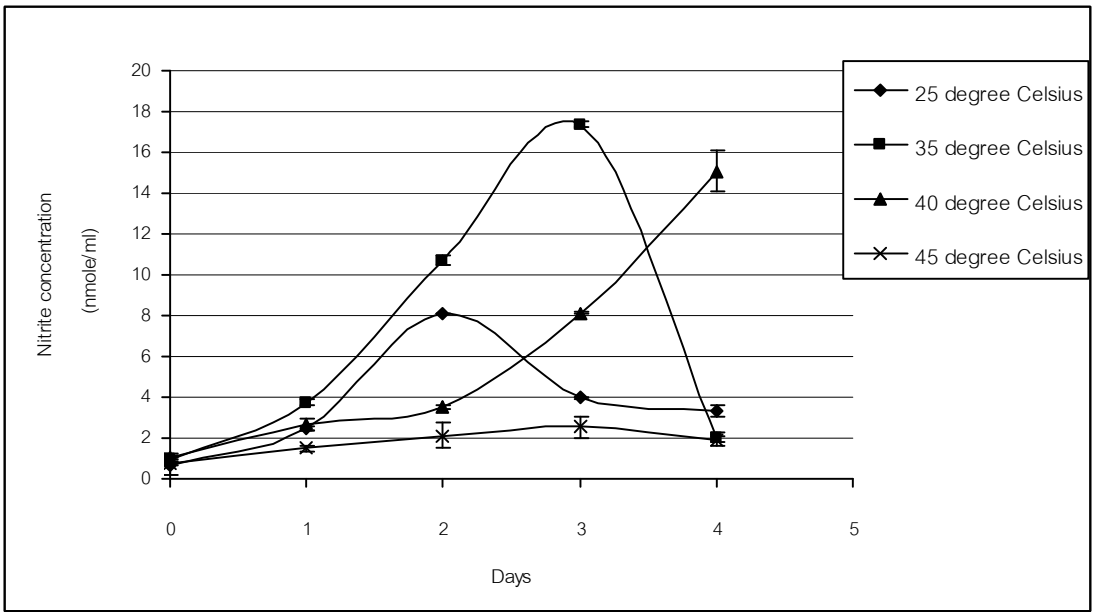
จากการวัดการเติบโต การดูดซับไนเตรต และการปล่อยไนไตรต์ในอาหารของเซลล์สาหร่ายสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมไบคาร์บอเนต 23.8 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าสาหร่ายสามารถเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเข้าสู่ stationary phase เร็วขึ้นถัดมา คือ ที่อุณหภูมิ 35, 40, และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (รูปที่ 3.10) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการดูดซับและการนำไนเตรตไปใช้ โดยสาหร่ายสามารถดูดซับไนเตรตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ทั้ง 2 อุณหภูมินี้สาหร่ายดูดซับไนเตรตได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3.11) อย่างไรก็ดีพบว่าการสะสมไนไตรต์ในอาหารที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสทั้งนี้อาจเป็นเพราะการทำงานของเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสอาจทำงานได้ไม่ดีที่อุณหภูมิสูง จึงทำให้มีการสะสมไนไตรต์ในอาหารในการเพาะเลี้ยงที่อุณภูมิสูงมากกว่าอุณหภูมิต่ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สาหร่ายดูดซับไนเตรตได้ลดลง ส่วนที่ 45 องศาเซลเซียส ไม่มีการดูดซับไนเตรตของสาหร่าย (รูปที่ 3.11) เมื่อดูความเข้มข้นไนไตรต์ที่สาหร่ายปล่อยออกมาในอาหาร พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นสาหร่ายมีแนวโน้มที่จะมีการปล่อยไนไตรต์ในอาหารเพิ่มขึ้น ซึ่งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสมีการปล่อยไนไตรต์ในอาหารมากที่สุดในวันที่ 3 ของการทดลองหลังจากนั้นจะเริ่มลดลง ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีการปล่อยไนไตรต์ในอาหารเรื่อย ๆ แต่ในช่วง 3 วันแรกความเข้มข้นไนไตรต์ที่ปล่อยในอาหารน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสในสาหร่ายทำงานได้ไม่ดีที่อุณหภูมิสูง ๆ จึงเกิดการสะสมไนไตรต์ภายในเซลล์และปล่อยไนไตรต์ออกมานอกเซลล์เมื่อมีความเข้มข้นสูง (รูปที่ 3.12) ส่วนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งไนเตรตและไนไตรต์ในอาหารเพาะเลี้ยง



รูปที่ 3.10 การเติบโตของสาหร่าย *S. minervae* ใน BG-11mdiumeที่มีไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงที่ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส
ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ±S.D



รูปที่ 3.11 การดูดซับไนเตรตของสาหร่าย *S. minervae* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรตเริ่มต้น 1 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส
ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D

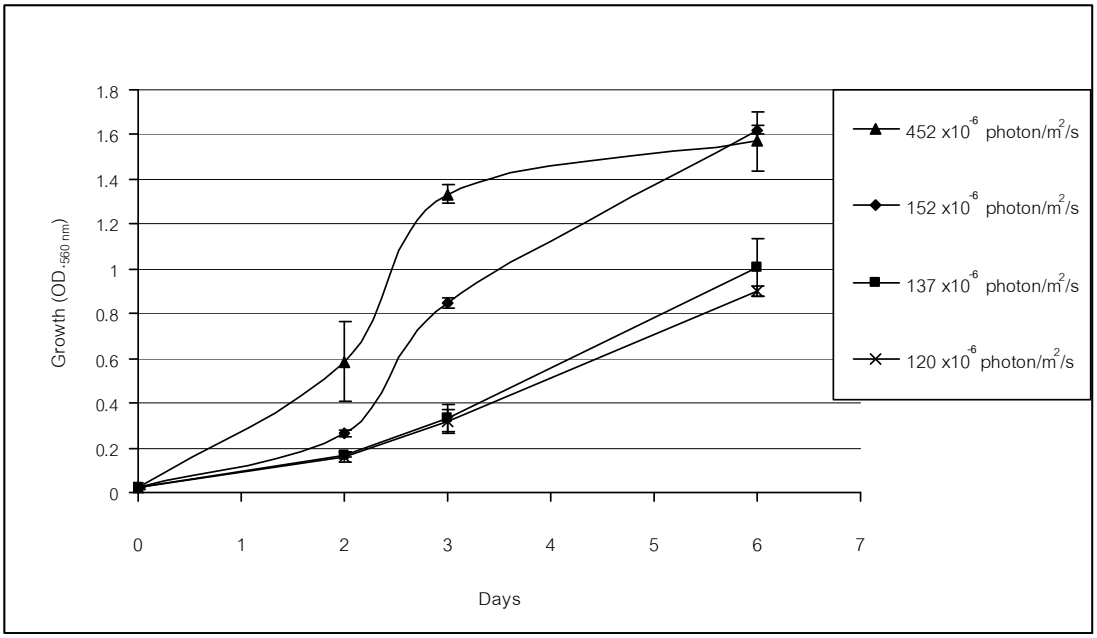


รูปที่ 3.12 ความเข้มข้นไนไตรต์ที่ปล่อยออกมาจากการเพาะเลี้ยง *S. minervae* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรต 1 มิลลิโมร์ และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส

ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D

3.9 ผลความเข้มแสงต่อการเติบโตของสาหร่าย *S. minervae*

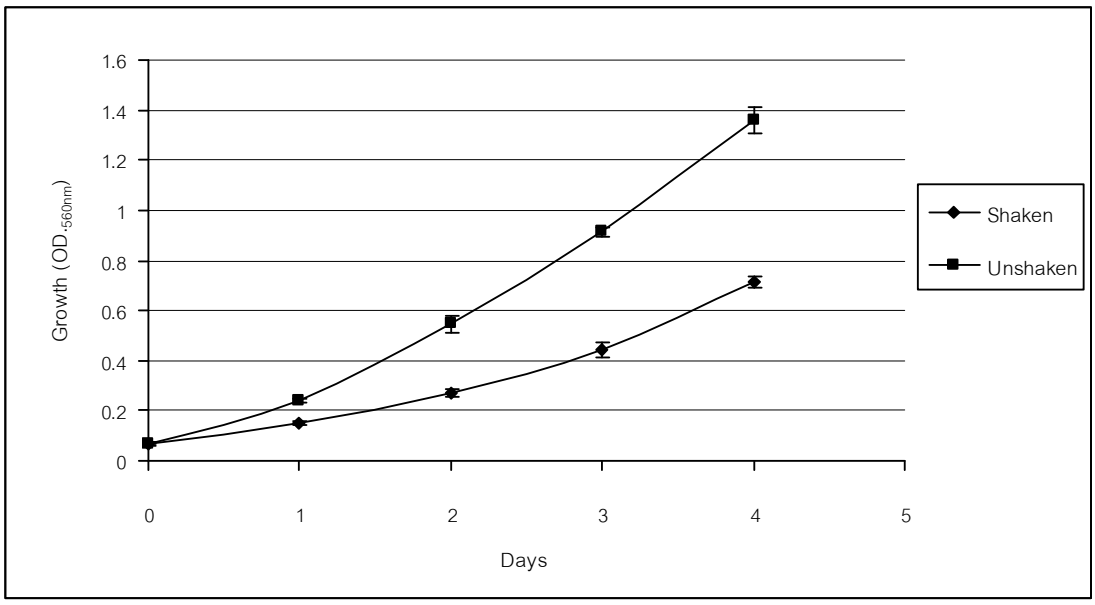
จากการศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการเติบโตของสาหร่าย *S. minervae* โดยใช้ความเข้มแสง 120, 137, 152 และ 452 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที ในอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรตเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมไบคาร์บอเนต 23.8 มิลลิโมลาร์ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มแสงการเติบโตของสาหร่ายยิ่งเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มแสงที่ 120 และ 137 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที มีการเติบโตของสาหร่าย *S.minervae* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 152 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที การเติบโตของสาหร่ายเร็วขึ้นมาก แต่เมื่อเพิ่มความเข้มแสงเป็น 452 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าสาหร่ายจะเติบโตได้เร็วกว่าความเข้มแสง 152 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที และจะเข้าสู่ stationary phase เร็วกว่าโดยเข้าสู่ stationary phase ในวันที่ 3 ของการทดลอง (รูปที่ 3.13) แสดงว่าที่ความเข้มข้นโซเดียมไนเตรตสูง เซลล์ได้รับพลังงานแสงมากพอที่จะเติบโต สร้างสารรงควัตถุเพิ่มขึ้น และเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เร็วและเข้าสู่ stationary phase ได้เร็ว



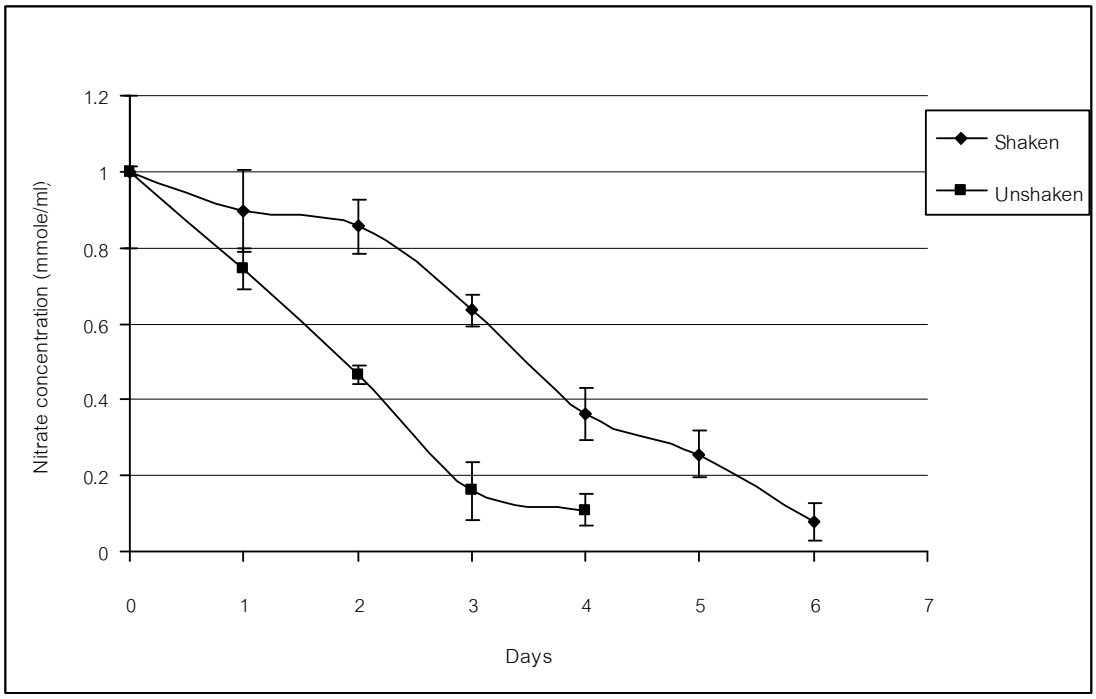
รูปที่ 3.13 การเติบโตของสาหร่าย *S.minervae* ที่ความเข้มแสง 120, 137, 152 และ 452 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที
ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D

3.10 ผลการเติบโต การดูดซับไนเตรต และการปล่อยไนไตรต์ในอาหาร จากการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. minervae* แบบเขย่า และไม่เขย่า

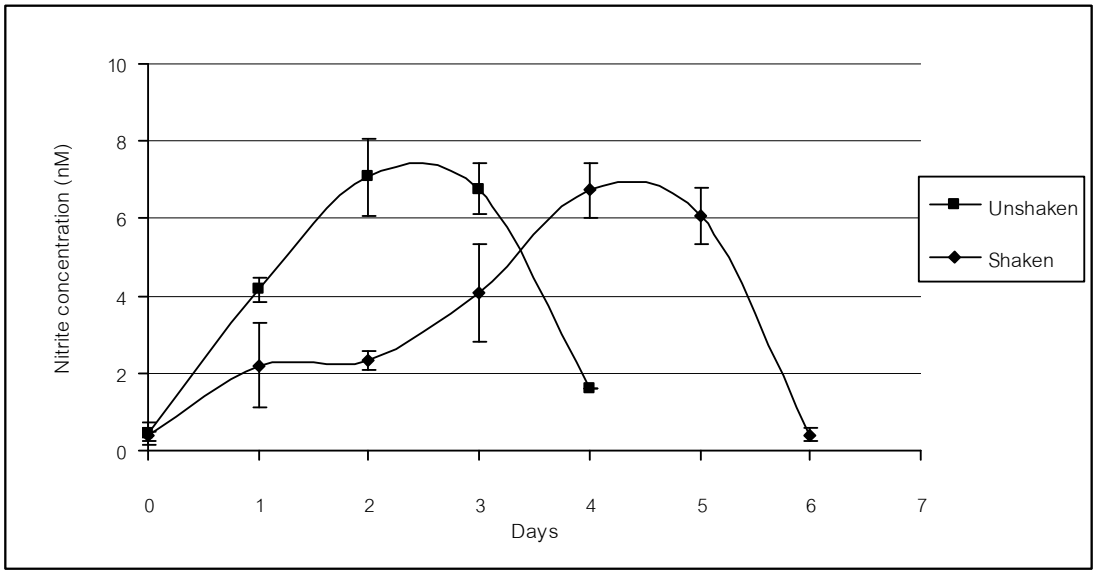
จากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายแบบเขย่าและไม่เขย่า ในอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.1 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความเข้มแสง 152 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที พบว่าการเติบโตของสาหร่ายที่ไม่เขย่าเติบโตได้เร็วกว่าการเพาะเลี้ยงที่เขย่า (รูปที่ 3.14) อาจเนื่องจากการดูดซับไนเตรตแบบเขย่าเป็นการเพิ่มออกซิเจนในอาหาร ซึ่งจะไปรบกวนการดูดซับไนเตรตทำให้สาหร่ายดูดซับไนเตรตได้น้อยลง (รูปที่ 3.15) จึงส่งผลให้มีการปล่อยไนไตรต์ในอาหารและการเติบโตของสาหร่ายช้ากว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เขย่า ดังรูปที่ 3.16



รูปที่ 3.14 การเติบโตของสาหร่าย *S. minervae* ที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D



รูปที่ 3.15 การดูดซับไนเตรตของสาหร่าย *S. minervae* ที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D

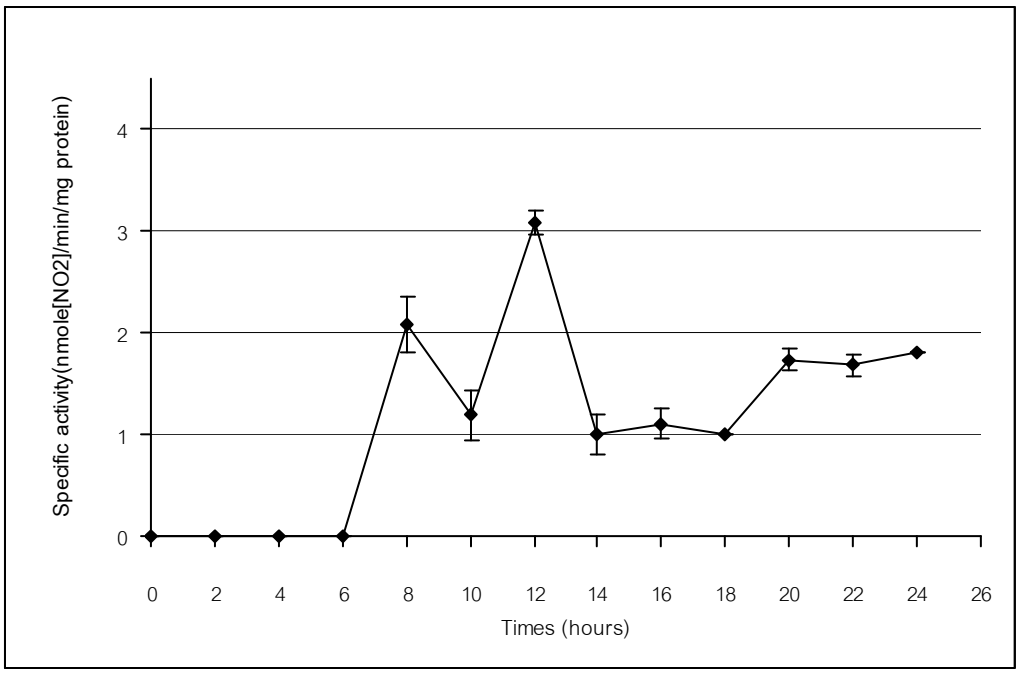


รูปที่ 3.16 ความเข้มข้นไนไตรต์ที่ปล่อยในอาหารของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. minervae* ที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่า และไม่เขย่า

ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D

3.11 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายในรอบวัน

เพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นโซเดียมไบคาร์บอเนต 23.8 มิลลิโมลาร์ และไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์ ปรับให้ค่า OD_{560nm} เท่ากับ 0.07 ตอนเริ่มต้นเพาะเลี้ยงสาหร่ายนาน 14 วัน หลังจากนั้นให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างสาหร่ายทุก ๆ 2 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างสาหร่ายมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg นาน 10 นาที เก็บตะกอนเซลล์สาหร่ายมาล้างด้วยน้ำปราศจากเชื้อและนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วเท่าเดิมอีก 2 ครั้ง นำตะกอนสาหร่ายที่ได้มาบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว จนสาหร่ายแตกละเอียด เติมบัฟเฟอร์ในการสกัดที่มี MOPS 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.5, EDTA เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ PMSF 1 มิลลิโมลาร์ และ DTT 0.5 มิลลิโมลาร์ บดผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000xg นาน 20 นาที เก็บส่วนตะกอนสาหร่ายนำมาละลายในบัฟเฟอร์สกัดอีกครั้งได้เป็นสารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมาหากิจกรรมแบบ *in vitro* ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์หลังจากได้รับแสงนาน 6 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และจะลดลงในชั่วโมงที่ 10 หลังจากนี้จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 3.2 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และกิจกรรมเอนไซม์จะลดลงอีกครั้งที่ชั่วโมงที่ 14 หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 18 เซลล์มีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 20 และกิจกรรมเอนไซม์จะคงที่ตลอด (รูปที่ 3.17) ส่วนสาหร่ายที่ไม่ได้รับแสงไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (ไม่แสดงข้อมูล) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแสงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งในการชักนำให้เซลล์สาหร่ายสังเคราะห์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และขาดแหล่งพลังงาน ซึ่งจะรีดิวซ์ quinone pool ซึ่งเชื่อมต่อกับ electron transport chain และเอนไซม์นี้เชื่อมโยงอยู่ด้วย



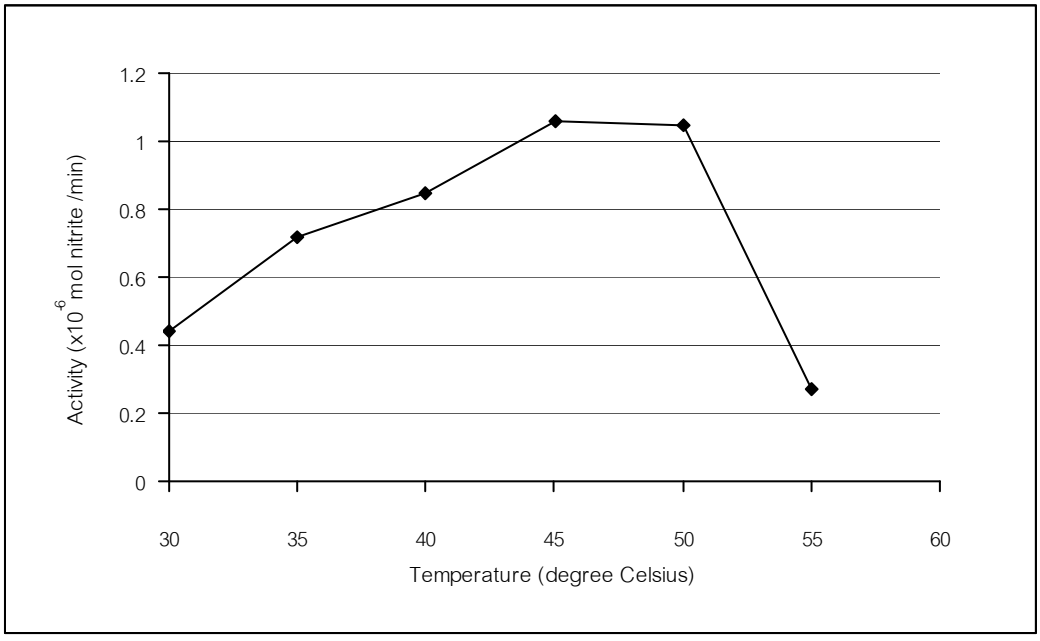
รูปที่ 3.17 แสดงการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์สาหร่ายตลอด 24 ชั่วโมงและให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ ± S.D

3.12 คุณสมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

3.12.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

เมื่อนำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมาหากิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบทำงานได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น และมีกิจกรรมสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีกกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง (รูปที่ 3.20) อาจเป็นเพราะอุณหภูมิสูงจนเกินไปจึงทำให้เอนไซม์เสียสภาพในการทำงาน



รูปที่ 3.18 การทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 -55 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ โดยใช้โปรตีนประมาณ 9 กรัมในการหากิจกรรม

3.12.2 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

เมื่อนำสารสกัดหยาบมาหากิจกรรมเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 3 – 11 โดยใช้บัฟเฟอร์ต่อไปนี้

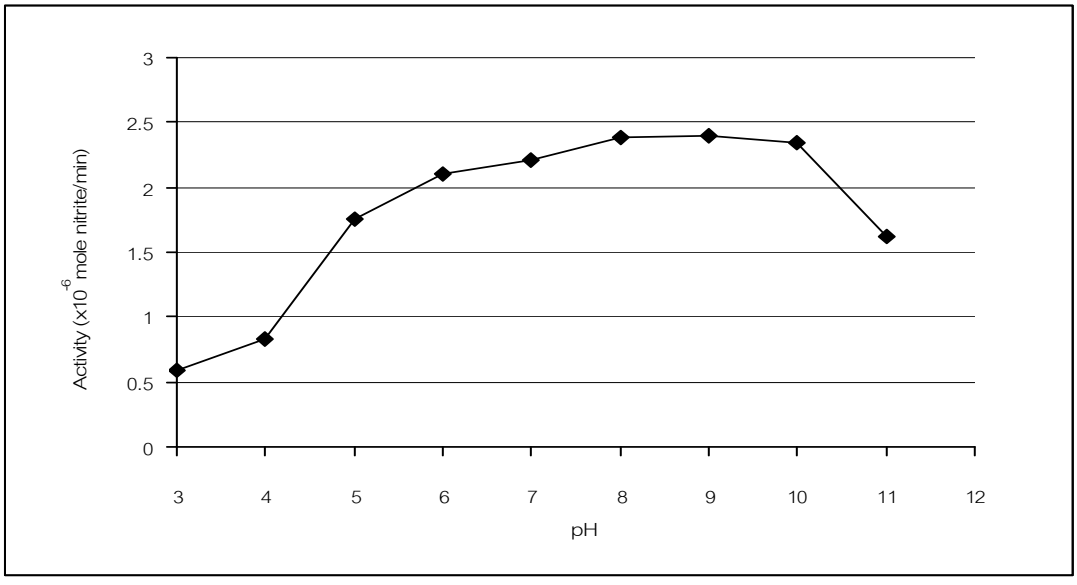
ในช่วง pH 3-6 ใช้ 0.1 โมลาร์ acetate buffer

ในช่วง pH 7-9 ใช้ 0.1 โมลาร์ Tris buffer

และที่ pH 10 และ 11 ใช้ 0.1 โมลาร์ carbonate buffer

หากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) โดยกำหนดให้อุณหภูมิในการทำกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด

จากผลการทดลอง พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่อความเป็นกรด-ด่าง เพิ่มขึ้นจาก 3 และสูงสุดที่เป็นกลาง-ด่าง ในช่วงpH 6-10 และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่านี้ กิจกรรมเอนไซม์จะเริ่มลดลงเมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างอีก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงมาก ๆ ทำให้เอนไซม์เสียสภาพในการทำงาน (รูปที่ 3.21)

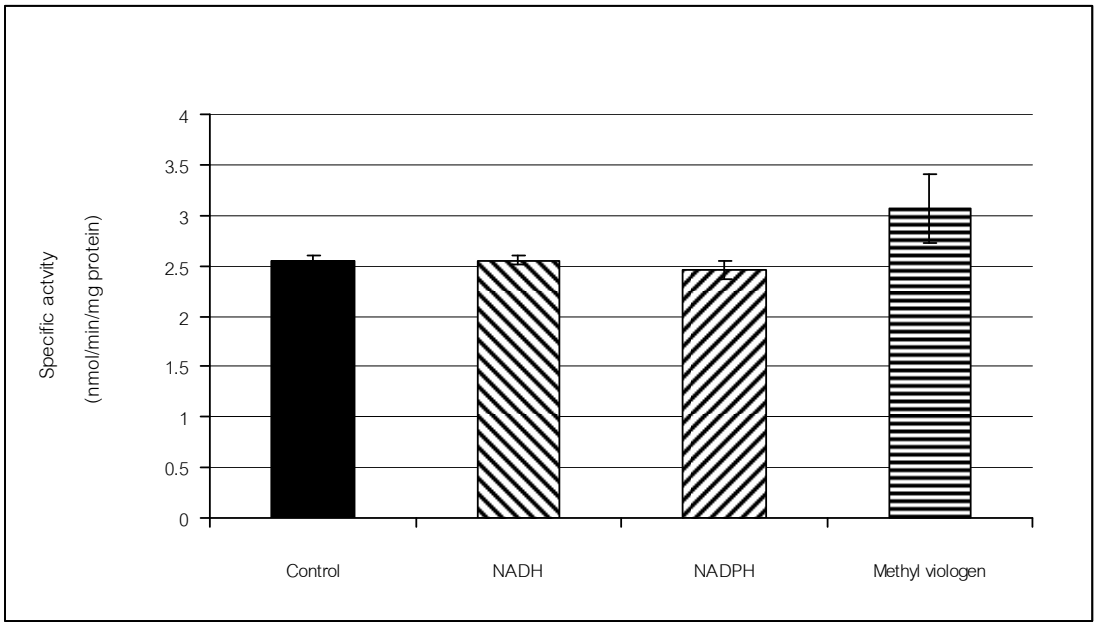


รูปที่ 3.19 อิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบระหว่าง pH 3 -11

ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ โดยใช้โปรตีนประมาณ 9 กรัมในการหากิจกรรม

3.12.3 ผลของ NADH, NADPH และ Methyl viologen ต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เมื่อนำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมาศึกษาการให้อิเล็กตรอนของ H_2O(Control), NADH, NADPH และ Methyl viologen โดยนำสารสกัดหยาบมาหากิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) พบว่า การทดลองชุดควบคุมและ ชุดที่มีการเติม NADH มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเท่ากัน เท่ากับ 2.55 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนชุดการทดลองที่มีการเติม NADPH มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงมีเท่ากับ 2.46 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนที่มีการเติม Methyl viologen มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 3.06 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (รูปที่ 3.22) จะสังเกตได้ว่าการเติม NADH และ NADPH มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสไม่ต่างจากกลุ่มทดลองที่ไม่มีการเติมสารให้อิเล็กตรอน แต่ในกลุ่มที่มีการเติม Methyl viologen พบว่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะทางด้านปลาย C ของเอนไซม์ที่มีตำแหน่งของ FAD ของเอนไซม์ ฝังอยู่บนเมมเบรนและเชื่อมต่อกับ quinol pool จึงไม่สามารถรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH ส่วน Methyl viologen อาจจะสามารถให้อิเล็กตรอนแก่เอนไซม์ได้บ้างโดยผ่านทาง molybdopterin reductase



รูปที่ 3.20 กิจกรรมเอนไซม์ที่เติม NADH, NADPH และ Methyl viologen เปรียบเทียบกับ Control (น้ำ) ที่ไม่มีการเติมสารให้อิเล็กตรอน
ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง

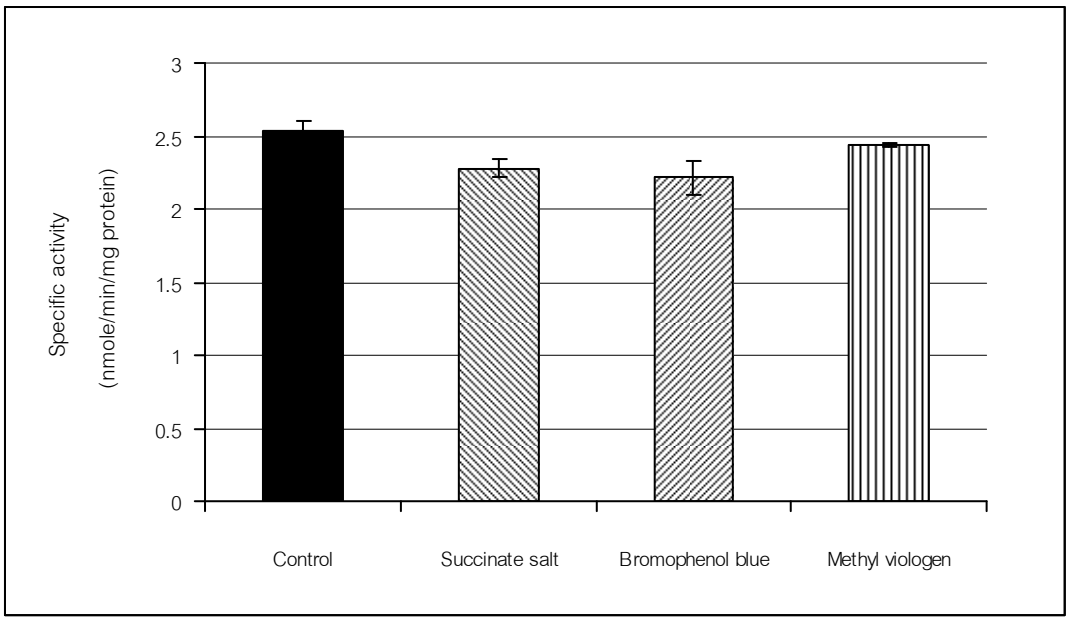
จำนวน 2 ซ้ำ ± S.D.

3.13.4 ผลของ Succinate, Bromophenol blue และ Methyl viologen ต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

จากการใช้ Bromophenol blue, Succinic acid (diasodium salt) และ Methyl viologen เป็นสารที่อาจจะให้อิเล็กตรอนต่อเอนไซม์โดยใช้ Bromophenol blue 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ Succinic acid และ Methyl viologen 25 มิลลิโมลาร์ และหากิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) ในสารผสมต่าง ๆ ดังนี้

$NaNO_3$	0.1 มิลลิโมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
Tris-HCL pH 9.0	0.1 โมลาร์	ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
สารให้อิเล็กตรอนอื่น ๆ	25 มิลลิโมลาร์	ปริมาตร 100ไมโครลิตร
สารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส		ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

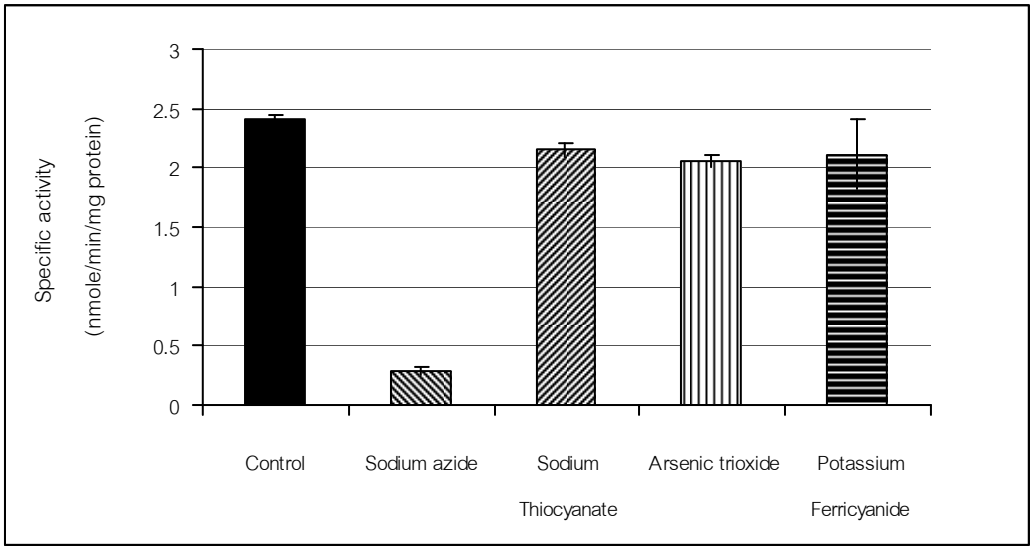
พบว่าในชุดควบคุมที่ไม่การเติมสารให้อิเล็กตรอนมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2.53 นาโนโมลต่อนาที ส่วนในการทดลองที่มีการเติมสารให้อิเล็กตรอนมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงจากชุดควบคุมโดยชุดที่มีการเติม Succinic acid, Bromophenol blue และ Methyl viologen มีกิจกรรมเอนไซม์ 2.28, 2.21 และ 2.44 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ (รูปที่ 3.23) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสไม่สามารถใช้อิเล็กตรอนจากสารที่เติมให้และจากผลการทดลอง พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม อย่างไรก็ตามกิจกรรมเอนไซม์ที่ลดลงอาจเป็นเพราะสารให้อิเล็กตรอนขัดขวางการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้บ้าง ส่วน Methyl viologen มีกิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกันกับชุดควบคุมเนื่องจากในการทดลองนี้ไม่มีการเติม Na_2SO_4 ซึ่งเป็นสารที่จะรีดิวซ์ Methyl viologen เพื่อให้อิเล็กตรอนกับเอนไซม์ นั้นหมายถึงเอนไซม์ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนที่ไม่อยู่ในรูปรีดิวซ์ Methyl viologen



รูปที่ 3.21 กิจกรรมเอนไซม์ที่เติม Succinate salt, Bromophenol blue และ Methyl viologen เปรียบเทียบกับ Control (น้ำ) ที่ไม่มีการเติม สารให้อิเล็กตรอน ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ $\pm$ S.D.

3.12.5 ศึกษาสารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

พบว่าสารทั้ง 4 ชนิด มีผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โดย NaN_3 สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงที่สุด เท่ากับ 88.09 เปอร์เซ็นต์ ส่วน NaSCN, As_2O_3 และ $K_3Fe[CN]_6$ สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ 10.92, 14.89 และ 12.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 3.24)

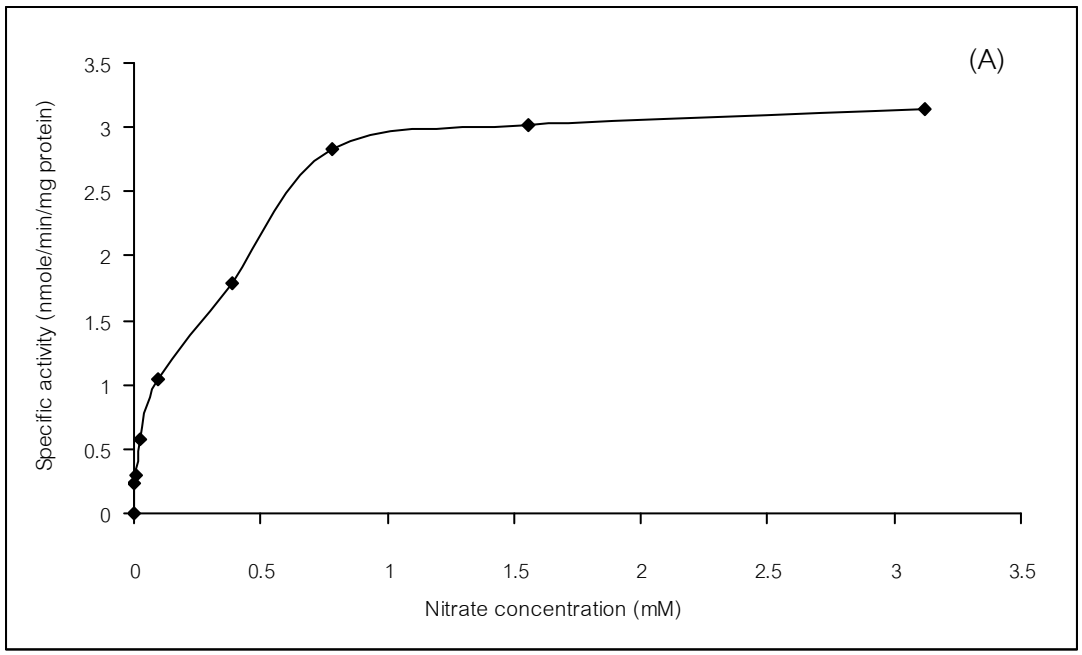


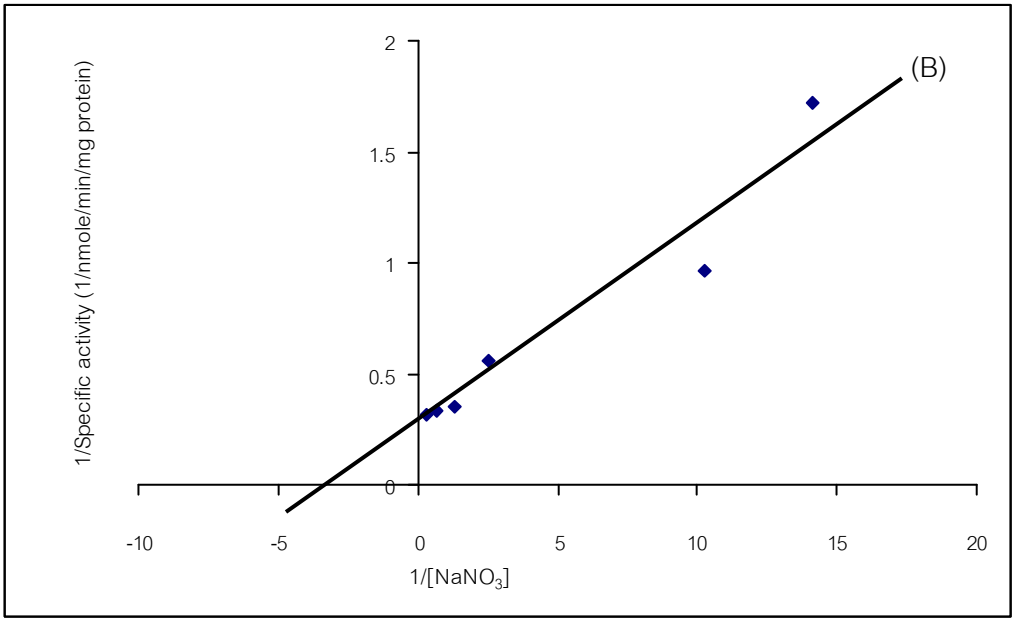
รูปที่ 3.22 กิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดย NaN_3, NaSCN, As_2O_3 และ $K_3Fe[CN]_6$ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (final concentration)
ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ $\pm$ S.D.

3.12.6 ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบไม่จำเป็นต้องใช้ NADH หรือ NADPH ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งเอนไซม์สามารถรับอิเล็กตรอนจาก quinol pool ได้ ดังนี้ในการทดลองนี้จึงไม่มีการเติมสารให้อิเล็กตรอน นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมาศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตต่ออัตราเร็วในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ โดยใช้ไนเตรตเข้มข้น 0, 1.52×10^{-3}, 6.09×10^{-3}, 2.43×10^{-2} M, 9.75×10^{-2} , 3.9×10^{-1}, 7.8×10^{-1}, 1.56 และ 3.12 มิลลิโมลาร์ หากิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993)

จากกราฟ สามารถหาค่า K_m และ V_{max} ได้ จากจุดตัดแกน X และจุดตัดแกน Y ตามลำดับ โดยจุดตัดแกน X เท่ากับ $-1/K_m$ และ จุดตัดแกน Y เท่ากับ $1/V_{max}$ ดังนั้น ค่า K_m เท่า 0.33 มิลลิโมลาร์ และ ค่า V_{max} เท่ากับ 3.33 นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน (รูปที่ 3.25)





รูปที่ 3.23 ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่อกิจกรรมเอนไซม์

(A) แสดง saturation curve ของไนเตรตต่อกิจกรรมของเอนไซม์

(B) Lineweaver-Burk double reciprocal plot

K_m = 0.33 มิลลิโมลาร์

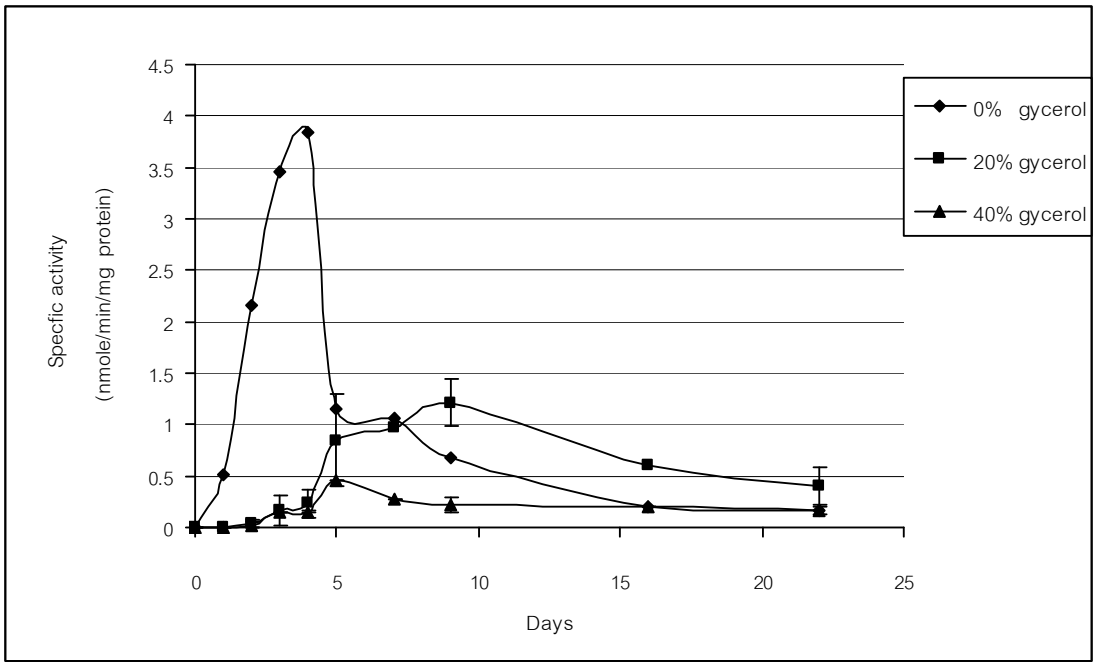
V_{max} = 3.33 นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

3.13 การเก็บรักษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

3.13.1 เก็บรักษาเอนไซม์โดยการเติม glycerol

ก. เติม glycerol ทันทีหลังจากการสกัดเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์

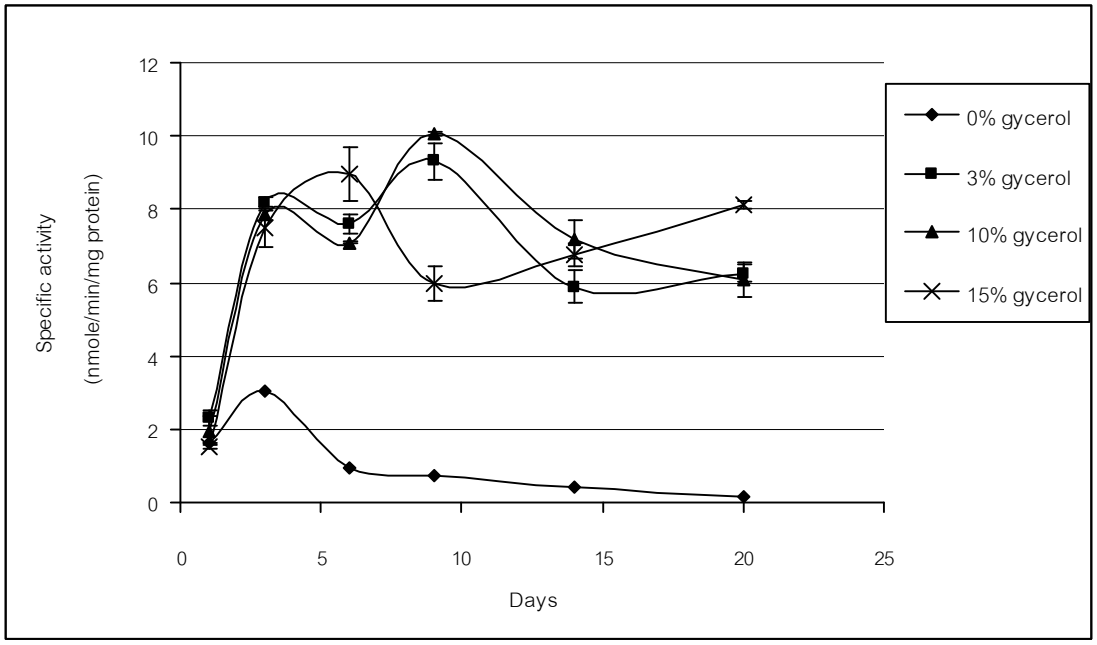
สารสกัดหยาบที่ไม่มีการเติม glycerol มีกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการทดลองมีค่าเท่ากับ 3.84 nmole/min/mg protein หลังจากนั้นจะลดลงเรื่อย ๆ อาจเนื่องจากเอนไซม์เริ่มเสียสภาพจึงทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง ส่วนสารสกัดหยาบที่มี glycerol เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่าสารสกัดหยาบที่ไม่มี glycerol และมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 9 ของการทดลอง มีค่าเท่ากับ 1.25 nmole/min/mg protein แต่กิจกรรมเอนไซม์ลดลงในอัตราที่ช้ากว่าสารสกัดหยาบที่ไม่มีการเติมglycerol และสารสกัดหยาบที่ glycerol เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีกิจกรรมเอนไซม์ (รูปที่ 3.18) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเติมglycerol ความเข้มข้นสูงในสารสกัดหยาบ ทำให้สารสกัดหยาบมีความหนืดมากขึ้นและมีผลต่อการเผยของเมมแบรนในส่วนที่เป็นที่อยู่ของเอนไซม์จึงยากขึ้น อย่างไรก็ตาม glycerol ยังสามารถรักษากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้บางซึ่งสังเกตได้จากสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น glycerol 20 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมเอนไซม์สามารถอยู่ได้นานกว่าสารสกัดหยาบที่ไม่มีเติม glycerol เลย ดังนั้นในการทดลองถัดไปจึงปรับความเข้มข้นของ glycerol ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในการรักษากิจกรรมของเอนไซม์



รูปที่ 3.24 กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบหลังจากการเติม glycerol ทันที ที่ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์
ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ $\pm$ S.D

ข. เติม glycerol หลังจากบ่มการสกัดเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ที่ความเข้มข้น 0, 3, 10, และ 15 เปอร์เซ็นต์

สารสกัดหยาบที่ไม่การเติม glycerol มีกิจกรรมเอนไซม์คล้ายกันกับการทดลอง ก. ส่วนสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น glycerol 3, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าสารสกัดหยาบที่ไม่มีการเติม glycerol โดยสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น 3 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 9 หลังจากนั้นกิจกรรมจะลดลงเรื่อย ๆ ส่วนสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้น glycerol 15 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 6 ของการทดลอง และลดลงมาในวันที่ 9 (รูปที่ 3.19) การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีการเติม glycerol มีความเข้มข้นต่าง ๆ อาจเป็นเพราะการเติม glycerol ช่วยในการรักษาโครงสร้างเอนไซม์และช่วยให้การจับของเอนไซม์กับไนเตรตดีขึ้น



รูปที่ 3.25 กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ เมื่อเติม glycerol ที่ความเข้มข้น 0, 3, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ หลังจากตั้งสารสกัดหยาบไว้ 1 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ $\pm$ S.D

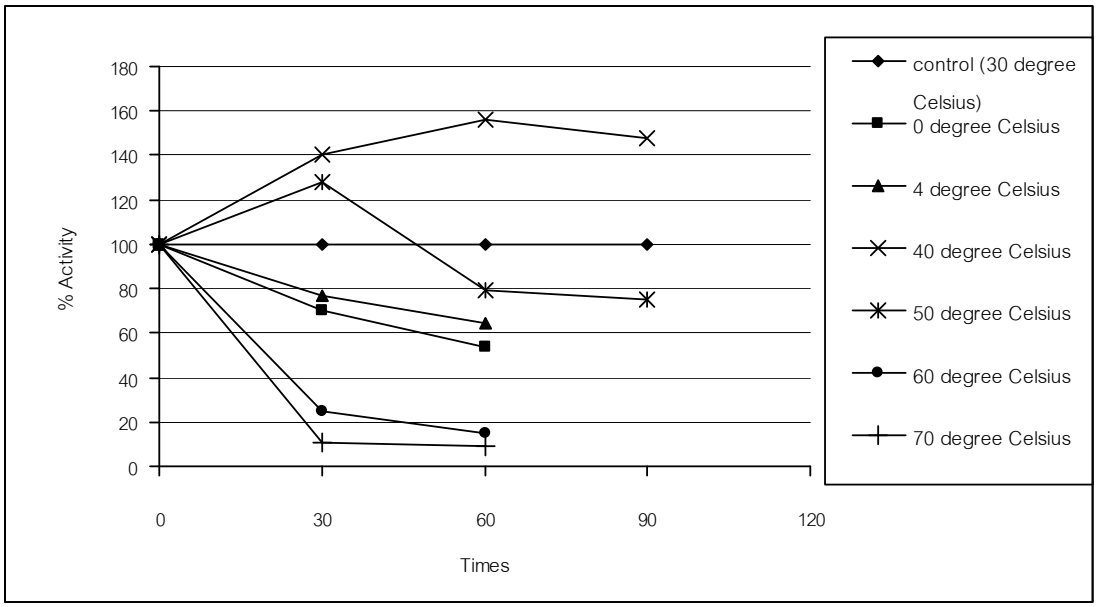
3.13.2 เก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4, 0, -20 และ -80 องศาเซลเซียส

การเก็บสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 4, 0, -20 และ -80 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากเก็บสารสกัดหยาบเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว ความเย็นเปลี่ยนคุณสมบัติของเมมเบรน เมื่อละลายกลับทำให้การจัดระเบียบเอนไซม์หรือรูปร่างเอนไซม์ไม่เหมือนเดิมทำให้สารสกัดหยาบสูญเสียกิจกรรม (ไม่แสดงข้อมูล)

3.14 ความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อุณหภูมิ 0, 4, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส

จากการนำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนตรตรีดักเทสมาบ่มที่อุณหภูมิ 0, 4, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30, 60 และ 90 นาที และนำสารสกัดหยาบดังกล่าวมาตั้งพักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 -15 นาที หลังจากนั้นหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993)

พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบที่บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นสูงกว่าในกลุ่มควบคุม (30 องศาเซลเซียส) โดยกิจกรรมสูงสุดอยู่ที่นาทีที่ 60 และเริ่มลดลงมานาทีที่ 90 สารสกัดหยาบที่บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสมีกิจกรรมสูงกว่าในกลุ่มควบคุมเฉพาะนาทีที่ 60 หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์จะเริ่มลดลงทั้งนี้อาจเป็นเพราะการบ่มสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 40 และ 50 มีผลต่อโครงสร้างลิปิดในเมมเบรนจึงเกิดการกระตุ้นการให้อิเล็กตรอนใน quinol pool แก่เอนไซม์ แต่เมื่อบ่มนานเกินไปอาจจะทำให้เอนไซม์เริ่มเสียสภาพการทำงาน สารสกัดหยาบที่บ่มที่อุณหภูมิ 0 และ 4 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมลดลงเช่นกัน โดยสารสกัดหยาบที่บ่มที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทั้ง 2 จะมีไม่กิจกรรมของเอนไซม์เมื่อบ่มในอุณหภูมิดังกล่าวนาน 24 ชั่วโมง (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการผลทดลองที่ 3.12.2 ในการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4, 0, -20 และ -80 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ในสารสกัดหยาบหายไปเมื่อเก็บสารสกัดหยาบในอุณหภูมิดังกล่าวนานเกิน 24 ชั่วโมง ส่วนที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมต่ำที่สุดในการทดลอง (รูปที่ 3.26) ทั้งนี้เป็นเพราะอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มสารสกัดหยาบสูงเกินไปจึงทำให้เอนไซม์เสียสภาพการทำงาน

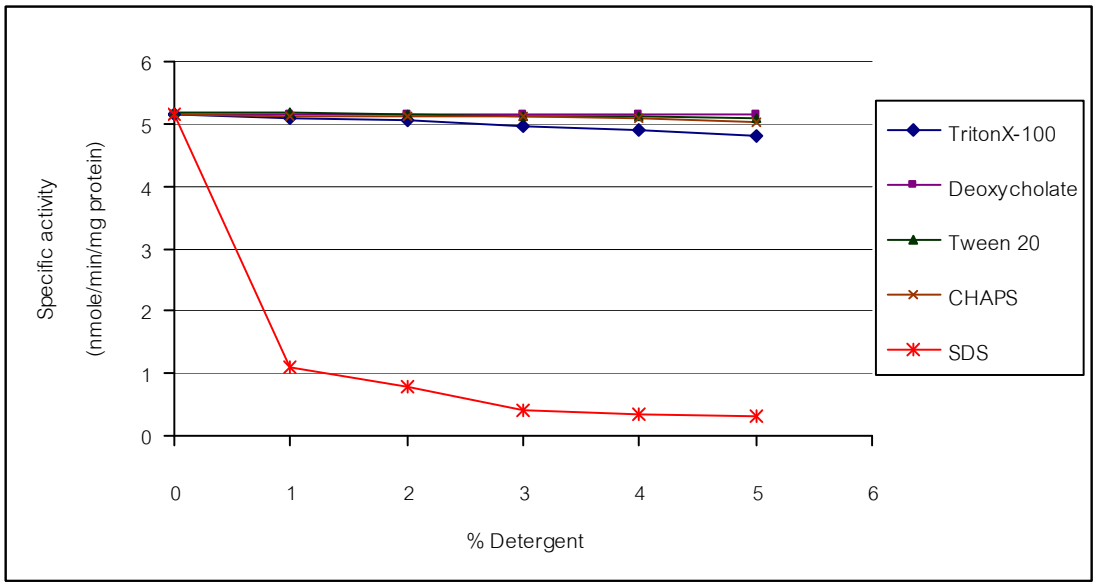


รูปที่ 3.26 ความเสถียรของเอนไซม์ในสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 0, 4, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส

ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ ± S.D.

3.15 ผลของดีเทอร์เจนต์ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

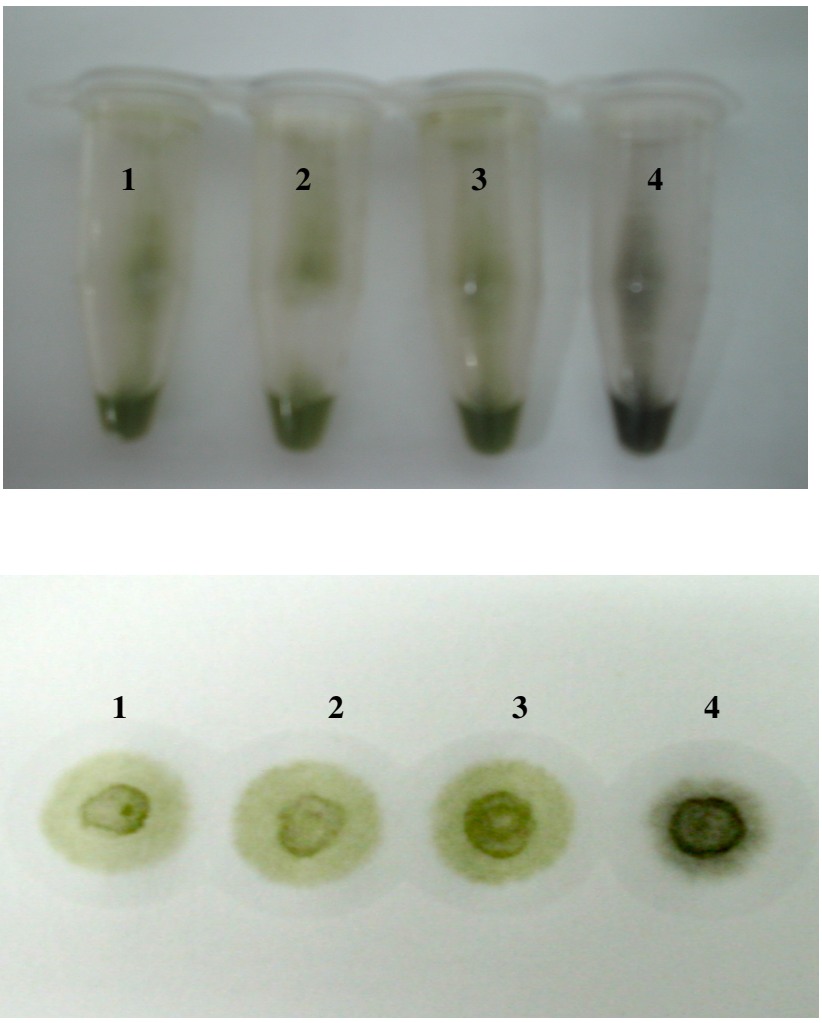
การบ่มสารสกัดหยาบกับดีเทอร์เจนต์ Triton X-100, Deoxycholate, Tween-20, 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS) และ Sodium dodecyl sulphate (SDS) ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 ชั่วโมง (เขย่าตลอดเวลา) แล้วกำจัดดีเทอร์เจนต์ออกก่อนจะนำมาหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) พบว่าดีเทอร์เจนต์ Deoxycholate, Tween-20 และ 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS) ไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส Triton X-100 สามารถลดกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้เพียงเล็กน้อย โดยกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสลดลงประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ ส่วน SDS สามารถลดกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้สูงที่สุด โดยที่ความเข้มข้น SDS ที่ 1 เปอร์เซ็นต์สามารถลดกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสประมาณ 79 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า SDS ทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ



รูปที่ 3.27 ผลของดีเทอร์เจนต์ต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ

3.16 การเกิด cross reaction ระหว่างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ

จากการใช้แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดมาทำปฏิกิริยา cross reaction กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *S. minervae* โดยหลอดที่ 1 ไม่มีการบ่มทั้งแอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทส (primary antibody) และ แอนติบอดีต่อIgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase (secondary antibody) หลอดที่ 2 บ่มเฉพาะ แอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทส หลอดที่ 3 บ่มเฉพาะ แอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase ส่วนหลอดที่ 4 บ่มทั้งแอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทสและ แอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase หลังจากนั้นเติมสับสเตรตของ alkaline phosphatase พบว่าในหลอดที่ 1 ถึง 3 ไม่มีการเปลี่ยนสีของสารสกัดหยาบ แต่ในหลอดที่ 4 เกิดสีม่วง ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้substrate ของalkaline phosphatase ทำให้ทราบว่าแอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทส และแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase สามารถจับกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ และสามารถจับกันแบบ sandwich สามารถสังเกตได้จากหลอดที่ 3 ที่ไม่เกิดสีจากการใช้ substrate ของ alkaline phosphatase ทั้งนี้เพราะแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase ไม่สามารถจับกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้โดยตรง จะต้องมีแอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทสมาเป็นตัวเชื่อมก่อนแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase จึงจะสามารถจับได้ (รูปที่ 3.28)



รูปที่ 3.28 การเกิด cross reaction ระหว่างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของสาหร่าย *S. minervae* กับแอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพด แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase และใช้ substrate ของ alkaline phosphatase เปรียบเทียบผลด้วยการนำตัวอย่าง 1, 2, 3 และ 4 มาหยดลงบนกระดาษกรอง (จำนวน 2 ซ้ำ)

จุดที่ 1 สารสกัดหยาบที่ไม่ได้บ่ม 1^{o} และ 2^{o} แอนติบอดี

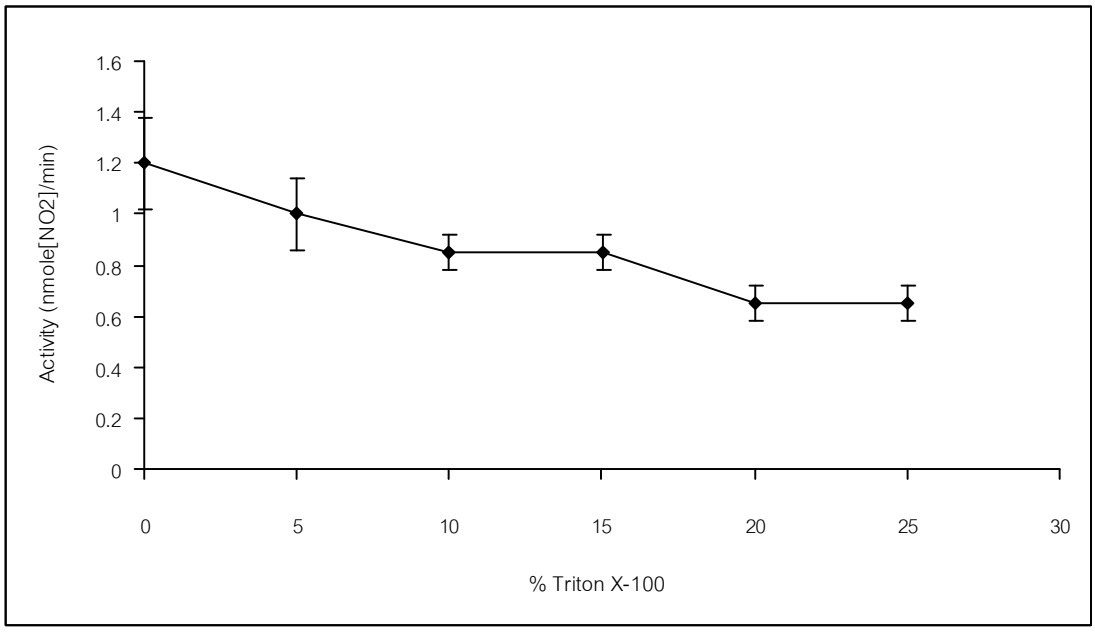
จุดที่ 2 สารสกัดหยาบที่บ่มเฉพาะ 1^{o} แอนติบอดี

จุดที่ 3 สารสกัดหยาบที่บ่มเฉพาะ 2^{o} แอนติบอดี

จุดที่ 4 สารสกัดหยาบที่บ่มทั้ง 1^{o} และ 2^{o} แอนติบอดี

3.17 ความคงรูปของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบหลังจากใช้ Triton X-100 และ SDS

เมื่อนำสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมาศึกษากิจกรรมเอนไซม์หลังจากเติม Triton X-100 ให้ได้ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขย่านาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างดีเทอร์เจนต์ออกก่อนจะนำมาหากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสด้วยวิธีดัดแปลงของ Nakamura และ Ikawa (1993) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสลดลง เมื่อเพิ่มความเข้นข้น Triton X- 100 และที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมทั้งหมด (รูปที่ 3.29)

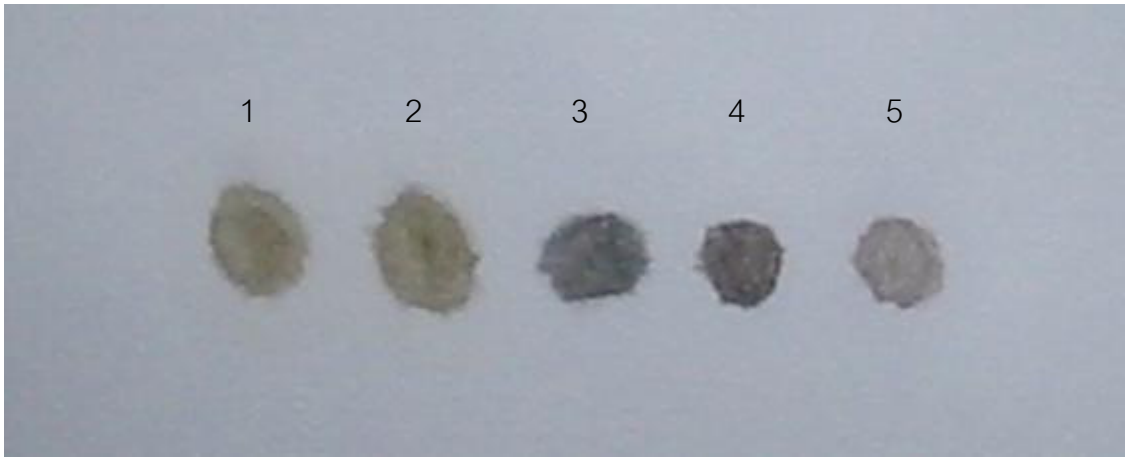


รูปที่ 3.29 กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ความเข้มข้น Triton X-100 ตั้งแต่ 0 - 25 เปอร์เซ็นต์ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำ $\pm$ S.D.

หลังจากนั้นใช้สารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วย Triton X-100 ที่ 25 เปอร์เซ็นต์ นำสารสกัดหยาบมาศึกษา cross reaction กับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase

เมื่อใช้สารสกัดหยาบเอนไซม์ที่ผ่านการสกัดด้วย SDS ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 – 5 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบการเกิด cross reaction ระหว่างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.15 พบว่าที่ความเข้มข้น Triton X-100 ที่ 25 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดหยาบสามารถเกิด cross reaction

กับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase (รูปที่ 3.30) เมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ผ่านการสกัดด้วย SDS ที่ความเข้มข้น 1 – 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่เกิด cross reaction กับ แอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ SDS อาจทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ (รูปที่ 3.31) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบลดลงในผลการทดลองที่ 3.15



รูปที่ 3.30 แสดงผลของแอนติเจนต่อแอนติบอดีด้วยวิธีดัดแปลงจาก ELISA (จำนวน 2 ซ้ำ)

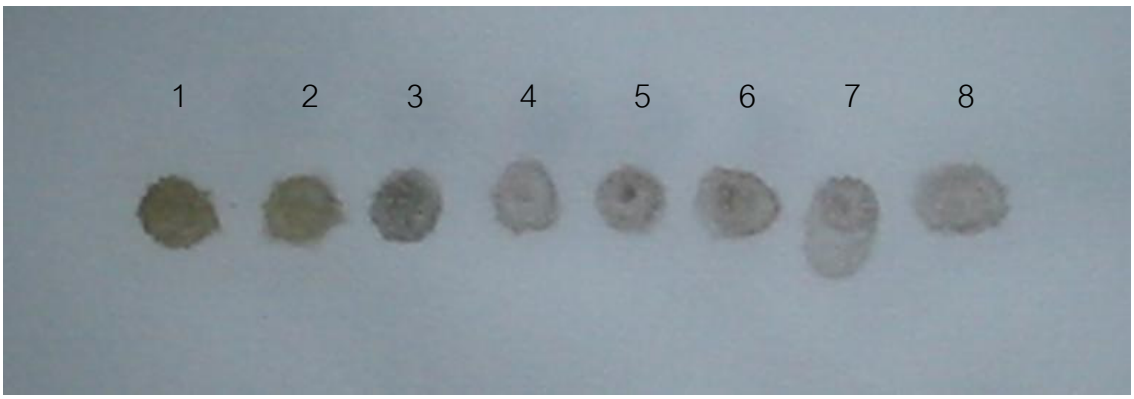
จุดที่ 1 สารสกัดหยาบที่บ่มเฉพาะ 1° แอนติบอดี

จุดที่ 2 สารสกัดหยาบที่บ่มเฉพาะ 2° แอนติบอดี

จุดที่ 3 สารสกัดหยาบที่บ่มทั้ง 1° และ 2° แอนติบอดี

จุดที่ 4 สารสกัดหยาบที่บ่มใน 25 เปอร์เซ็นต์ Triton X-100, 1° และ 2° แอนติบอดี

จุดที่ 5 สารสกัดหยาบที่บ่มใน 5 เปอร์เซ็นต์ SDS, 1° และ 2° แอนติบอดี



รูปที่ 3.31 แสดงผลของการให้ SDS เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และแอนติเจนต่อแอนติบอดีด้วยวิธีดัดแปลงจาก ELISA (จำนวน 2 ซ้ำ)

จุดที่ 1 สารสกัดหยาบที่บ่มเฉพาะ 1^{o} แอนติบอดี

จุดที่ 2 สารสกัดหยาบที่บ่มเฉพาะ 2^{o} แอนติบอดี

จุดที่ 3 สารสกัดหยาบที่บ่มทั้ง 1^{o} และ 2^{o} แอนติบอดี

จุดที่ 4 สารสกัดหยาบที่บ่มใน 1 เปอร์เซ็นต์ SDS, 1^{o} และ 2^{o} แอนติบอดี

จุดที่ 5 สารสกัดหยาบที่บ่มใน 2 เปอร์เซ็นต์ SDS, 1^{o} และ 2^{o} แอนติบอดี

จุดที่ 6 สารสกัดหยาบที่บ่มใน 3 เปอร์เซ็นต์ SDS, 1^{o} และ 2^{o} แอนติบอดี

จุดที่ 7 สารสกัดหยาบที่บ่มใน 4 เปอร์เซ็นต์ SDS, 1^{o} และ 2^{o} แอนติบอดี

จุดที่ 8 สารสกัดหยาบที่บ่มใน 5 เปอร์เซ็นต์ SDS, 1^{o} และ 2^{o} แอนติบอดี