1. บทนำ

ในปัจจุบันมีไนเตรตปนเปื้อนในแหล่งน้ำตามธรรมชาติมากขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำที่นำมาใช้ในการอุปโภค บริโภคในครัวเรือน การบริโภคน้ำที่มีไนเตรตเหล่านี้จะเป็นอันตรายต่อสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทารกในครรภ์ (Canter,1997) และเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 6 เดือน (Sharon, 1998) เนื่องจากการบริโภคน้ำที่มีไนเตรตสูงส่งผลให้เกิดภาวะ methemoglobinemia หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า blue baby syndrome โดยไนเตรตจะถูกแบคทีเรียในร่างกายเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ และสารกลุ่มไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารพิษและจะแย่งจับออกซิเจนทำให้ร่างกายมีอาการเหมือนขาดออกซิเจน นอกจากโรคดังกล่าวแล้วการบริโภคน้ำที่มีปริมาณไนเตรตสูงอย่างต่อเนื่องมีผลต่อพัฒนาการของเด็กและอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งในระบบทางเดินอาหารอีกด้วย (Puckett, 1995, Kross *et al*., 1993 และ Campbell, 1999) นอกจากนี้ไนเตรตที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำต่าง ๆ ยังทำให้พืชน้ำ และสาหร่ายเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วปกคลุมผิวน้ำ ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลง ส่งผลให้เกิดน้ำเน่าเสีย (เพริศพิชญ์ คณาธารณา, 2529)

การปนเปื้อนไนเตรตในแหล่งน้ำมีหลายสาเหตุ โดยสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการใช้ปุ๋ยไน-เตรตทางการเกษตร การปล่อยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม รวมถึงน้ำทิ้งจากอาคารบ้านเรือน ทำให้มีการปนเปื้อนไนเตรตในน้ำมากขึ้นทุกปี ดังนั้น การวัดปริมาณไนเตรตจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อจะได้หาทางควบคุมและป้องกันไม่ให้ปริมาณไนเตรตในน้ำสูงเกิน จนเป็นอันตรายต่อสุขภาพ ซึ่งองค์กร The Environmental Protection Agency (EPA) ได้กำหนดระดับไนเตรตในน้ำที่ใช้ในการบริโภคควรไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (Davis, 1990) และระดับไนไตรต์ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Nolan *et al*., 1997)

ในการตรวจสอบหาปริมาณไนเตรตสามารถทำได้หลายวิธี ส่วนใหญ่เป็นวิธีทางเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น การผ่านไนเตรตในคอลัมน์แคดเมี่ยม เพื่อรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ (Clesceri *et al*., 1989, Clinch *et al*., 1987) หรือการใช้กรดซาลิไซลิกในกรดกำมะถันเข้มข้น ทำให้เกิดอนุพันธ์ไนเตรต (Cataldo *et al*., 1975) เป็นต้น ส่วนวิธีการที่มีการปรับปรุงใช้ในปัจจุบันที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม คือ การใช้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Nitrate reductase) โดยเตรียมเป็น sol-gel immobilized nitrate reductase (Aylott, 1997) หรือ Nitrate Reductase Kit (The Nitrate Elimination Company., Inc., NECi) ซึ่งใช้ NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) เป็นตัวให้อิเล็กตรอนจึงไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และสะดวกในการปฏิบัติงาน

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (NR) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแรกในกระบวนการ nitrate assimilation ในพืช สาหร่าย และราบางชนิด ไนเตรตจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ และแอมโมเนียม หลังจากนั้นจะถูกนำไปใช้สังเคราะห์ กรดอะมิโน โปรตีน และสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ต่อไป ปริมาณและคุณสมบัติของ NR ในสิ่งมีชีวิต ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปริมาณหรือความเข้มข้นของไนเตรตที่ได้รับ ความเข้มแสง (Crawford, 1995) และปริมาณสารคาร์โบไฮเดรต (Larios *et al.*, 2001) จากการศึกษาของ Hyde และคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่สกัดได้จากใบของข้าวโพดมีค่าความว่องไวจำเพาะ (specific activity) สูง จึงมีการผลิตในปริมาณมากเพื่อนำไปใช้เป็นชุดวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตในทางการค้า (NECi) แต่ยังไม่มีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและทนต่อความร้อนได้ดี

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีความเสถียร คงทนต่อความร้อน มีศักยภาพในการกำจัดไนเตรต และสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับเอนไซม์อื่น ๆ เช่น ไน-ไตรต์รีดักเทส, ไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทส และไดไนโตรเจนออกไซด์รีดักเทส เพื่อขจัดไนเตรตจากน้ำเสียโดยเปลี่ยนไนเตรตเป็นก๊าซไนโตรเจน (www.nitrate.com/eznet1.htm, Somers *et al.*, 1997 และ Campbell, 2001) แหล่งของเอนไซม์ที่ทำงานได้ในอุณหภูมิสูงน่าจะได้มาจากสิ่งมีชีวิตที่สามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง เช่น บ่อน้ำพุร้อนที่มีอุณหภูมิสูง และสิ่งมีชีวิตที่มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงได้ เรียก thermophilic organism ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย สาหร่าย เป็นต้น โดยทั่วไปสาหร่ายหลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งสาหร่ายเหล่านี้อยู่ในกลุ่ม thermophilic algae และคุณสมบัติที่ทำให้สาหร่ายกลุ่มนี้สามารถทนอยู่ในอุณหภูมิส่งได้ เนื่องจากสาหร่ายสามารถสร้างเมือกหุ้ม และโมเลกุลของโปรตีนจับตัวกันแน่น ส่วนใหญ่สาหร่ายดังกล่าวที่พบในน้ำพุร้อนจะเป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae)

ผู้วิจัยจึงสนใจคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ทนต่ออุณหภูมิสูง (thermophilic blue-green algae) จากธารน้ำอุ่นใน จ.ระนอง เนื่องจากสาหร่ายกลุ่มนี้น่าจะมีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีคุณสมบัติสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง และนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ในกระบวนการวิเคราะห์ไนเตรต หรือพัฒนาเพื่อใช้กำจัดไนเตรตในน้ำเสียต่อไปและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายกลุ่มนี้อาจช่วยในการประหยัดต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายกลุ่มนี้ไม่ต้องใช้ระบบควบคุมอุณหภูมิ และยังเป็นการป้องกันการเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกด้วย (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2544)

การตรวจเอกสาร

ธาตุไนโตรเจน (N) เป็นธาตุพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตเพราะไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของโมเลกุล โปรตีนต่าง ๆ และกรดนิวคลีอิก ธาตุไนโตรเจนมีเลขออกซิเดชันตั้งแต่ N(V) และ N(-III) ซึ่งสถานะเหล่านี้สามารถพบในวัฏจักรไนโตรเจน และมีการเปลี่ยนเลขออกซิเดชันโดยกระบวนการทางชีววิทยา ซึ่งมีสิ่งมีชีวิตพวกแบคทีเรียเป็นตัวกลางในการเปลี่ยนรูปแบบไนโตรเจนเหล่านี้ Richardson และ Watmough (1999) สารอนินทรีย์ไนโตรเจนจะเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการ dinitrogenfixation หรือ nitrate assimilation ซึ่งกระบวนการ dinitrogenfixation ก๊าซไนโตรเจน (N_2) จะถูกตรึงไปเป็นแอมโมเนียมจากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นไน-เตรตในกระบวนการ nitrification และ ไนเตรตจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์ ไนโตรเจนออกไซด์ (NO และ NO_2) และก๊าซโตรเจน (N_2) โดยกระบวนการ denitrification ส่วนกระบวนการ nitrate assimilation เป็นกระบวนการที่เปลี่ยนไนเตรตกลับไปเป็นแอมโมเนียม ดังรูปที่ 1.1 การลดไน-เตรตเป็นกุญแจหลักในวัฏจักรไนโตรเจน ซึ่งมีความสำคัญต่อเกษตรกรรม สิ่งแวดล้อม และสุขภาพ โดยการลดไนเตรตส่วนใหญ่เกิดจากนำไนเตรตไปใช้โดยแบคทีเรีย รา สาหร่าย และพืชชั้นสูง

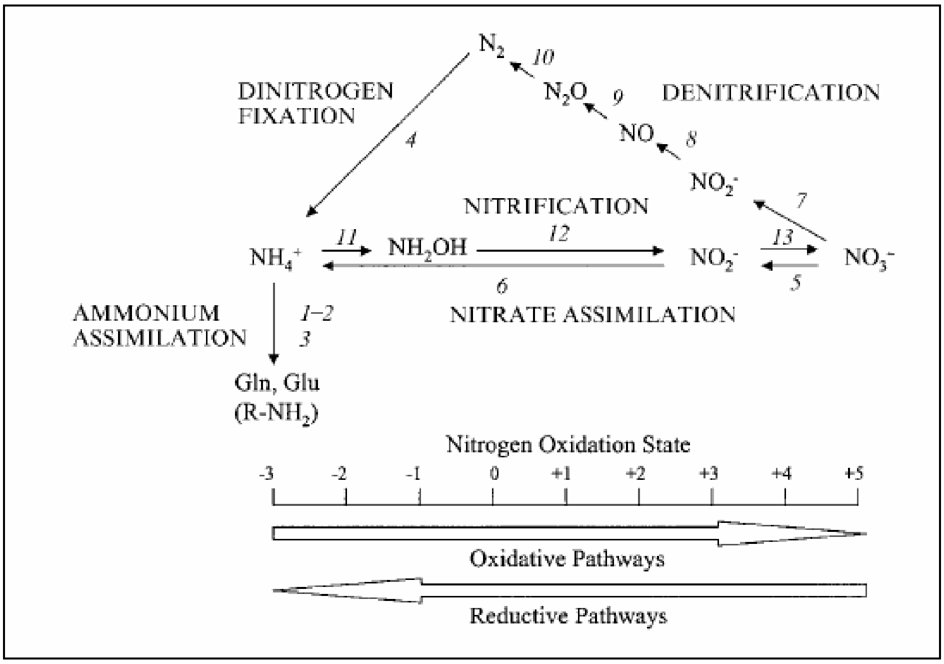
กระบวนการเปลี่ยนรูปแบบไนโตรเจนจากไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ที่เกิดจากการใช้ปุ๋ยทางการเกษตรที่เป็นสาเหตุหลักของการสะสมไนเตรตในน้ำ ดังนั้นการวัดปริมาณไนเตรตเป็นสิ่งสำคัญ เพราะการบริโภคน้ำที่มีระดับไนเตรตที่สูง เป็นสาเหตุของภาวะโรค methemo-globinemia และมะเร็งในกระเพาะ โดยแบคทีเรียในทางเดินอาหารจะเปลี่ยนไนเตรตเป็นสารที่อันตรายในกลุ่มสารประกอบ N-nitroso (Van *et al*, 1996)

การลดไนเตรตในสิ่งแวดล้อมโดยสิ่งมีชีวิตมีด้วยกัน 3 กระบวนการที่แตกต่างกันได้แก่

1. การใช้ปุ๋ยไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญเติบโต (nitrate assimilation)
2. การใช้ไนเตรตเป็นพลังงานสำหรับเซลล์ โดยใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (nitrate respiration)
3. การกระจายพลังงานสำหรับสมดุลรีดอกซ์ (nitrate dissimilation)

ในแบคทีเรียใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ซึ่งจะเปลี่ยนไนเตรตไปเป็นไน-ไตรต์ และสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ต่อไป โดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิดได้แก่

1. cytoplasmic assimilatory reductase (Nas)
2. membrane-bound respiratory reductase (Nar)
3. periplasmic dissimilatory nitrate reductase (Nap)



รูปที่ 1.1 การเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนในวัฏจักรไนโตรเจน (nitrogen cycle)

ตัวเลขต่าง ๆ คือ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวัฏจักรไนโตรเจน (Cabello *et al.*, 2004)

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

โครงสร้างทั่วไปของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในยูคาริโอตและแบคทีเรียทุกชนิดจะมี molybdenum (Mo) เป็นcofactor ที่บริเวณ active site และโครงสร้างพื้นฐานของ cofactor ของยูคาริโอตเป็น molybdopterin, ที่มีอนุมูลของ 6-alkyl pterin, phosphorylate C_4 chain และ กลุ่ม thiol 2 กลุ่ม จับกับ Mo ซึ่งต่างจาก cofactor ที่พบในเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแบคทีเรีย molybdopterin ซึ่งประกอบด้วย FAD, cytochrome $_{557}$ และ Mo cofactor บางชนิดอยู่ในรูปของ bis-molybdoperin guanine dinucleotide (MGD) นอกจากนี้ membrane bound Nar มีลำดับอะ-มิโนคล้ายกับเอนไซม์ไนไตรต์ออกซิเดสของ nitrifying bacteria และจับกับ MGD เอนไซม์นี้เร่งการออกซิเดชันไนไตรต์ไปเป็นไนเตรต ในการเจริญแบบ chemoautotrophic และไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับ (Sundermeyer *et al.*,1984)

Assimilation nitrate reductase ในยูคาริโอต พบในไซโตซอล ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่เหมือน ๆ กัน ซึ่งใช้ pyridine nucleotide เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในแต่ละหน่วยย่อย มีมวลโมเลกุล 100-120 kDa ที่ประกอบด้วย prosthetic 3 กลุ่ม โดยมี Mo cofactor อยู่ที่ปลาย N, heme อยู่ตรงกลาง และ มี FAD อยู่ตรงปลาย C (รูปที่ 1.2) และโครงสร้างยีนที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส, ไนไตรต์รีดักเทส, high affinity nitrate และ nitrite transporters พบได้ทั่วไปในยูคารีโอตหลายชนิด

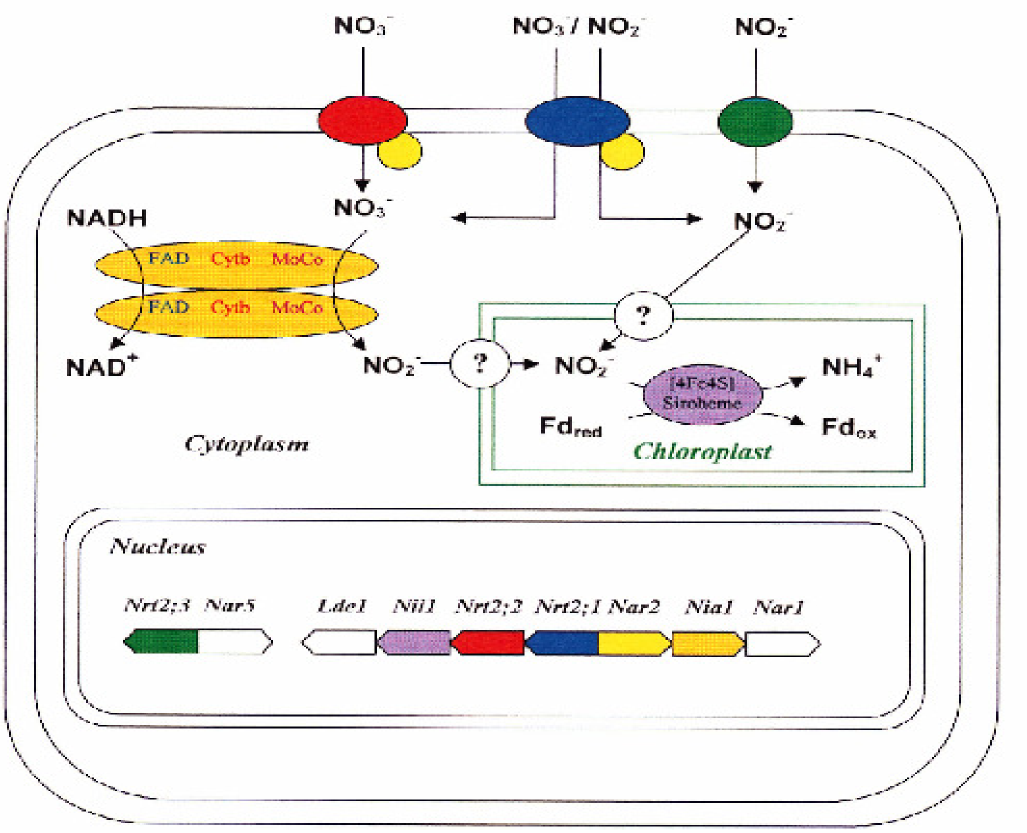
การทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

Campbell (1999) ได้จำแนกการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยพิจารณาจากคุณสมบัติของเอนไซม์ที่จะรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH หรือ รับได้ทั้ง 2 อย่าง (NAD(P)H bispecific ได้ 3 รูปแบบ คือ

1. NADH-NR (EC 1.6.6.1) เป็นรูปแบบที่สามารถพบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูง หรือสาหร่ายบางชนิด

2. NAD(P)H (EC 1.6.6.2) พบในพืชกลุ่มข้าว เช่น ข้าวโพด ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าว และสาหร่ายบางชนิด

3. NADPH (EC 1.6.6.3) พบในราบางชนิด



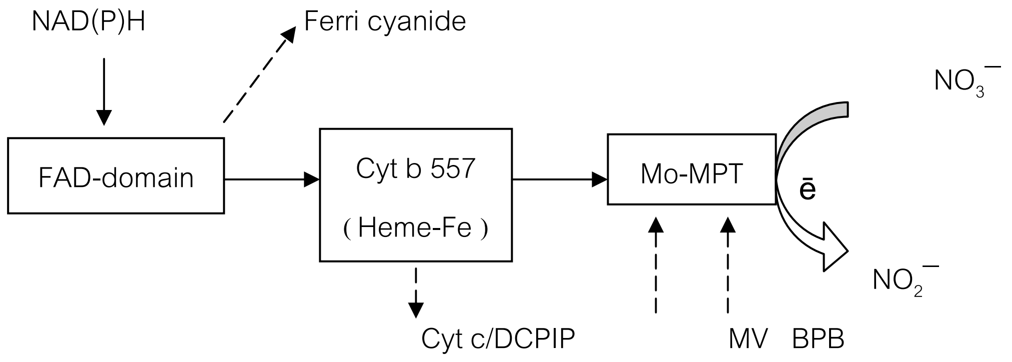
รูปที่ 1.2 Nitrate assimilation pathway ในสาหร่ายสีเขียวชนิด *Chlamydomonas Reinhardtii*

Nitrate และ nitrite transport system, NAD(P)H dependent nitrate reductase ferredoxin-dependent nitrite reductase และเอนไซม์ไนเตรต-รีดักเทสที่ประกอบด้วย Cyt b (cytochrome b), Fd (ferredoxin), MoCo (molybdenum cofactor) และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องใน nitrate assimilation pathway (Moreno-Vivian *et al*., 1999)

โมเลกุลของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสามารถแบ่งเป็นส่วนย่อยได้ เมื่อพิจารณาจากตำแหน่งการรับอิเล็กตรอนเฉพาะส่วนบนเอนไซม์ หรือเรียกว่า partial activity (Kramer *et al*., 1987) ได้ดังนี้คือ

1. NADH dehydrogenase สามารถรีดิวซ์ ferricyanide จากการทำงานของเอนไซม์ NADH: ferricyanide reductase หรือ การรีดิวซ์ cytochrome c จากการทำงานของเอนไซม์ NADH: cytochrome c reductase หรือ การรีดิวซ์ dichlorophenol indophenol จากการทำงานของเอนไซม์ NADH: dichlorophenol indophenol reductase

2. ส่วนของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องจากการให้อิเล็กตรอนจาก $FADH_2$ หรือ $FMNH_2$: nitrate reductase โดยผ่าน heme redox center หรือจากการให้อิเล็กตรอนจาก dithionite reduced methyl viologen (MV: nitrate reductase) หรือ bromophenol blue (BPB: nitrate reductase)โดยผ่าน molybdenum redox center ดังรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 แสดงส่วนย่อยในโมเลกุลของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตพร้อมตำแหน่งการรับ-ส่งอิเล็กตรอนกับ artificial electron acceptor-donors (Kleinhofs *et al*,1987)

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในยูคาริโอต

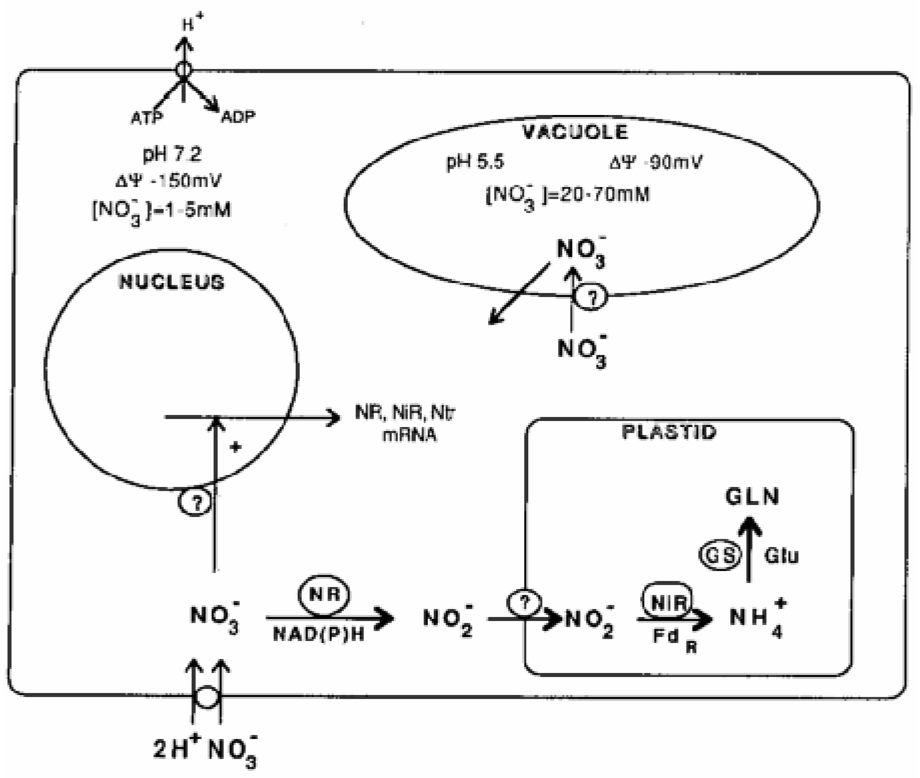
Assimilatory nitrate reductase ในพืช

Rufty และคณะ (1986) หลังจากการดูดซับไนเตรตเข้าสู่เซลล์พืช กระบวนการ nitrogen assimilation จะเกิดขึ้นโดยการรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ในขั้นตอนนี้ต้องแข่งขันกันระหว่างการไหลของไนเตรตจากเซลล์ และการขนส่งไนเตรตเข้าสู่ vacuole (รูปที่ 1.4) เอนไซม์ไนเตรตรี-ดักเทสอยู่ใน cytosol ของเซลล์ชั้นนอกสุดของราก, คอร์เท็กซ์ และเซลล์ mesophyll ในส่วนของยอดพืช (Vaughn and Campbell,1988; Fedorova *et al.*,1994) เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจะขนส่งอิเล็กตรอน 2 ตัวจาก NAD(P)H ไปสู่ไนเตรตโดยผ่าน ส่วนประกอบที่ซับซ้อนของ redox center 3 ตัว ซึ่งประกอบด้วย prosthetic group 2 กลุ่ม (Flavin adenine dinucleotide (FAD) และ heme) และ Mo cofactor ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนของ molybdate และ pterin โดยทั่วไปเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในพืชเป็น homodimer หรือ homotetramer ซึ่งแต่ละหน่วยมีขนาด 110 kDa และมี redox center ช่วยในการทำงานของเอนไซม์กับส่วนอื่น ๆ (รูปที่ 1.5)

Campbell และ Smarrelli (1978) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแตงและข้าวโพด พบว่าเอนไซม์มีการทำงานแบบ two-site pingpong โดยรับอิเล็กตรอนจาก NADH ส่งผ่าน ไปยังไนเตรต

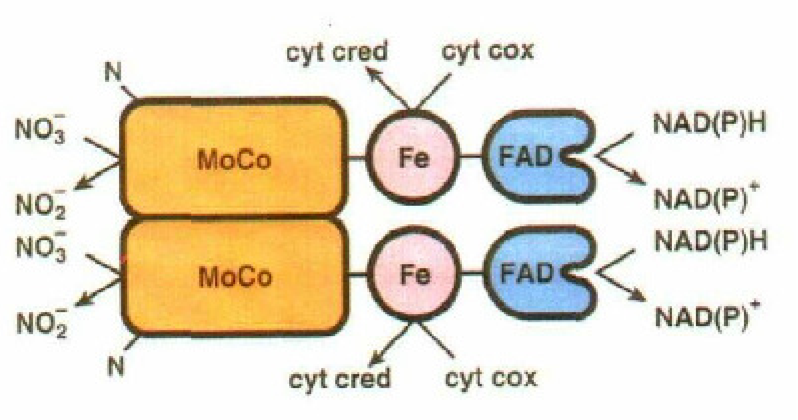
Andrea และ คณะ (2000) ศึกษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในใบละหุ่ง และใบผักโขม พบว่า Mg^{2+} เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ทั้งในใบละหุ่งและใบผักโขม แต่ 14-3-3 protein ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในใบผักโขม โดยจับที่ตำแหน่ง ser 543 แต่ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในใบละหุ่ง เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในละหุ่งมีกิจกรรมต่ำมากที่ค่า pH เท่ากับ 7.6 (มี Mg^{2+} ร่วมอยู่ด้วย) แต่มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH เท่ากับ 6.5 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในละหุ่งมีความไวต่อ Mg^{2+} เพิ่มขึ้นเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสยังขึ้นอยู่กับช่วงแสงกลางวัน-กลางคืนอีกด้วย

Mackintosh และ Meek (2001) พบว่า การควบคุมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในยูคาริโอต เป็นการควบคุมแบบ posttranslational regulation โดย Ca^{2+}, protein kinase, protein phosphatase, 14-3-3 protein และ protease อย่างไรก็ตามสิ่งมีชีวิตพวกยูคารีโอตมีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีความเสถียรต่ำ จากการศึกษาของ Oaks ในปี 2000 เชื่อว่าความเสถียรที่ต่ำของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ endopeptidase ในปี 1975 Solomonson พบว่า เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่บริสุทธิ์มีความเสถียรสูงขึ้นเมื่อเก็บไว้ในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และสามารถรักษากิจกรรมเอนไซม์ไว้ได้หลายเดือน



รูปที่ 1.4 Nitrate assimilation Pathway

กระบวนการ assimilatory nitrate reductase ในพืชประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ NR (nitrate reductase) , NiR (nitrite reductase) , GS (glutamine synthase) (Crawford,1995)



รูปที่ 1.5 แสดงโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

โครงสร้างเอนไซม์เป็น homodimer ซึ่งแต่ละหน่วยประกอบด้วย FAD (flavin domain), Fe (heme domain) และ MoCo (molybdenum cofactor) (Crawford,1995)

การควบคุม assimilatory nitrate reductase ในพืช

Crawford (1995) พบว่าการควบคุมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในพืชชั้นสูงมีปัจจัยหลายปัจจัย ได้แก่ ระดับ substrate, carbon skeletons, nitrogen metabolites, CO_2 และ แสง นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมได้ทั้งในระดับ transcription และ post-transcription (Warner *et al.*, 1981; Vaucheret *et al.*,1990; Wilkinson and Crawford, 1991; Dorbe *et al.*,1993) กระบวนการการควบคุมกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเกิดในช่วง post-translation (Douglase *et al*. 1995; Bachmann *et al*.,1996; Su *et al*.,1996; Lillo *et al*.,1997) เป็นกระบวนการหลักในการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการเกิด phosphorylation และ dephosphorylation ของเอนไซม์ ซึ่งมีเอนไซม์ protein phosphatase ทำหน้าที่ในการตัดหมู่ฟอสเฟต นอกจากนี้ยังมีโปรตีนยับยั้งที่ทำหน้าที่ยับยั้งและควบคุมการทำงานของเอนไซม์นี้ที่รู้จักกันในชื่อของ โปรตีน 14-3-3 (Huber *et al*., 1992)

Assimilatory nitrate reductase ในสาหร่าย กลุ่มยูคาริโอต

ในปี 1975 Solomonson และคณะ สกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *Chlorella vulgaris* พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือน ๆ กัน 3 หน่วยย่อย (homotrimer) โดยแต่ละหน่วยย่อย มีขนาด 90 $\pm$ 5 kDa และเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาส่วนย่อยได้ จากการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยการรีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ ทำให้เกิดผลผลิตคือ NAD^+ และไนไตรต์ ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ โดยทั้งสองตัวสามารถยับยั้งการทำงานเอนไซม์ เช่นเดียวกับ ADP และ ไธโอไซยาเนต (thiocyanate) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันเช่นกัน ในปี 1981 De la Rosa และ Vega ศึกษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายสีเขียว *Ankistrodesmus braunii* พบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีมวลโมเลกุล 467 kDa ประกอบด้วย 8 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 58 kDa นอกจากนี้ยังพบ FAD จำนวน 4 หน่วย, heme group 4 หน่วย และ molybdenum 2 อะตอม

Lopes และคณะ ปี 2002 ศึกษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายสีแดง *Gracilaria tenuistipitata* เอนไซม์ได้บริสุทธิ์ 500 เท่าใน 4 ขั้น คือ ion exchange (Q-Sepharose), ammonium sulfate precipitation, gel filtration (Sephacryl S-300) และ affinity chromatography (Affigel-blue resin) และการทำเจลอิเล็กโตรฟอริซิสแบบเสียสภาพ พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 110 kDa นอกจากนี้ยังมีการทำเจลอิเล็กโตรฟอริซิสแบบไม่เสียสภาพ พบว่าเอนไซม์มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 440 kDa ทำให้ทราบว่า เอนไซม์ไนเตรตรี-

ดักเทสในสาหร่ายสีแดง *G. tenuistipitata* ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่เหมือน ๆ กัน (homotetramer)

การควบคุม assimilatory nitrate reductase **ในสาหร่ายกลุ่มยูคาริโอต**

การควบคุมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายคล้ายกันกับที่พบในพืชชั้นสูง แต่ในบางครั้งในการสังเคราะห์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสไม่จำเป็นต้องมีไนเตรตเป็นตัวชักนำเอนไซม์ในสาหร่ายสีเขียว และ ไดอะตอม (diatom) เนื่องจากพบว่ามีการสังเคราะห์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสขึ้น ขณะที่เซลล์สาหร่ายเจริญในอาหารที่มีแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน (Kessler and Osterheld, 1970; Amy and Garrett, 1974) ในสาหร่ายยังมีกระบวนการ phosphorylation ของ nitrate reductase ซึ่งเป็นการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ไม่พบกระบวนการดังกล่าวในไดอะตอมทะเล (Gao *et al.*,1993) และ dinoflagellates บางชนิด (Harrison, 1976; Collos and Slawyk, 1980; Hochman, 1982) อาจเป็นเพราะเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของไดอะตอมทะเล และ dinoflagellates อยู่ในส่วนของ chloroplast ซึ่งต่างจากสาหร่ายอื่นที่มีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในส่วนของไซโตพลาสซึม (Fritz *et al.*,1996)

Weidner และ Kiefer (1981) ศึกษาการควบคุมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายสีน้ำตาล *Giffordia mitchellae* พบว่าช่วงวันของการให้แสงสามารถควบคุมระดับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส Cramer และ Myers (1948) พบว่าแสง และ carbon metabolism มีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เซลล์มีการสังเคราะห์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ในสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการ nitrate assimilation ของสาหร่ายสามารถเกิดในช่วงมืดได้อีก

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในโปรคาริโอต

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแบคทีเรียสามารถจำแนกได้ 3 ชนิด คือ

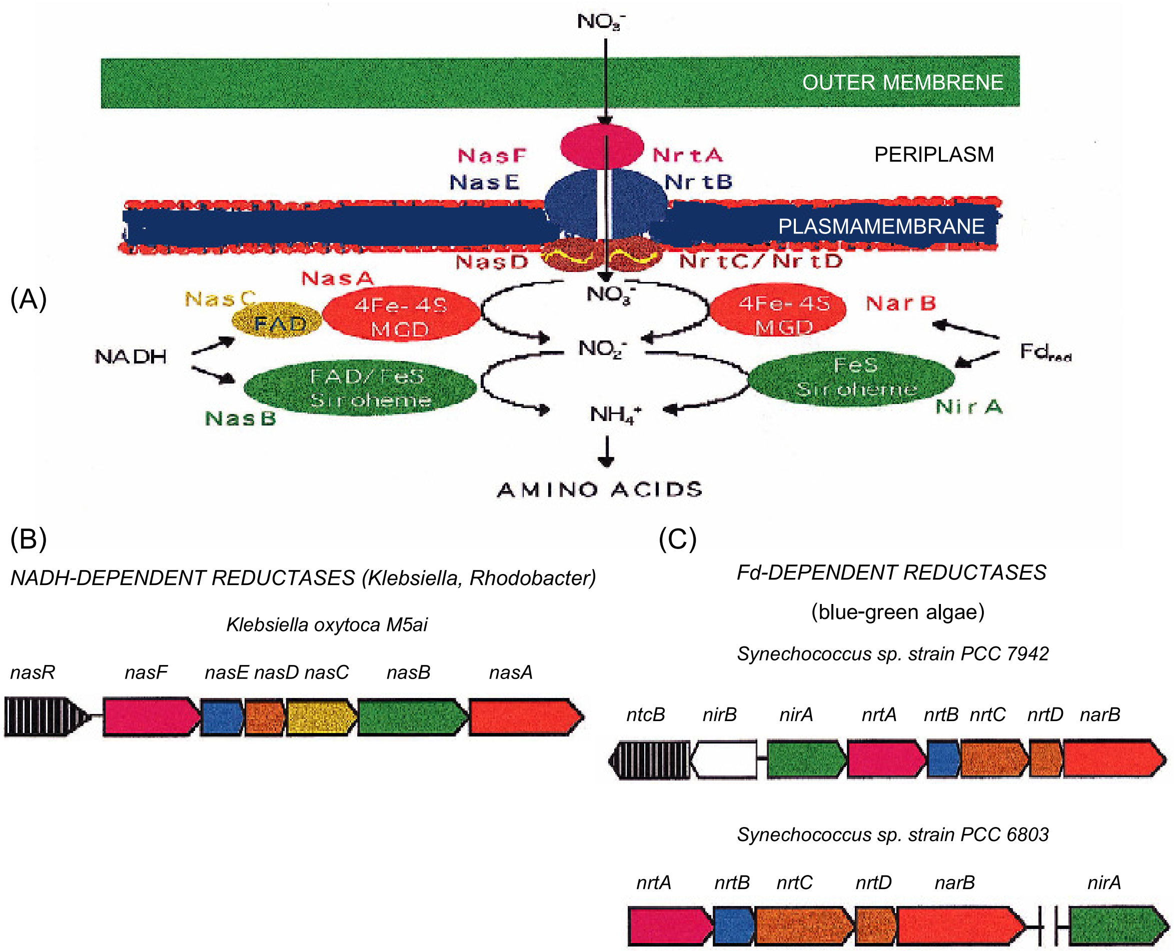
1. Bacterial assimilatory nitrate reductase (Nas)
2. Respiratory membrane-bound nitrate reductase (Nar)
3. Dissimilatory periplasmic nitrate reductase (Nap)

Bacterial assimilatory nitrate reductase (Nas)

โครงสร้างและคุณสมบัติของ assimilatory nitrate reductase

การศึกษา assimilatory nitrate reductase ในระดับชีวเคมี และ ระดับยีน พบว่าในแบคทีเรียเหล่านี้มี assimilatory nitrate reductase 2 ชนิด คือ ferredoxin- หรือ flavodoxin dependent Nas และ NADH-dependent enzyme (รูปที่ 1.6) ซึ่งทั้ง 2 ชนิด มี MGD cofactor และ [Fe-S] ที่ปลาย N แต่ไม่มี heme group เมื่อเทียบกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในยูคาริโอตหรือแบคทีเรียอื่น ๆ ในไซยาโนแบคทีเรีย Ferredoxin Nas เป็นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบหน่วยเดียวที่มีมวลโมเลกุล 75-85 kDa (Mikimi and Ida, 1984, Rubio *et al.*,1996) ในขณะที่ flavodoxin-Nas ของ *Azotobactor vinelandii* มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 105 kDa (Gangeswaran and Eady, 1996; Gangeswaran *et al.*,1993) และจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ พบว่ามี Cys motif ที่ปลาย N ของโมเลกุลเอนไซม์ ซึ่งอาจจะจับกับ [4Fe-4S] หรือ [3Fe-4S] center นอกจากนี้ยังพบ ferredoxin Nas ในแบคทีเรียชนิดอื่น อีก เช่น *Azotobacter chroococcum*, *Clostridium perfringens* และ *Ecthiorhodospira shaposhnikovii* (Guerrero *et al.*, 1981) ส่วน NADH-Nas ซึ่งพบใน *Klebsiella pneumoniae* (Lin *et al.*, 1994) และ *Rhodobacter capsulatus* (Blasco *et al.*, 1997) เป็น heterodimers ซึ่งประกอบด้วย FAD diaphorase ที่มีขนาด 45 kDa และ catalytic subunit ที่มี MGD cofactor มีมวลโมเลกุล 95 kDa นอกจากนี้ยังมี [4Fe-4S] center ที่ปลาย N อีกด้วย NADH-Nas ของ *Klebsiella* มี [2Fe-2S] center จับกับอะมิโน Cys ที่ปลาย C ที่คล้ายกับลำดับอะมิโนของโปรตีน NifU (Lin and Stewart, 1998) ซึ่งทำหน้าที่แทน ferredoxin ในการขนส่งอิเล็กตรอน ในเอนไซม์ที่ไม่มี ferredoxin-Nas Ogawa และคณะ (1995) พบว่า โปรตีน Nas ใน *Bacillus subtilis* ไม่มีโปรตีน NifU ใน catalytic subunit แต่มี NifU-like modules 2 โมเลกุล ที่เรียงกันในส่วนกลางของ FAD-containing Diaphorase

อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่กล่าวมาสามารถใช้ viologen เป็นสารให้อิเล็กตรอน และสามารถใช้ bromophenol blue เป็น artificial reductant ในกระบวนการ nitrate assimilation (Blasco *et al*.,1997; Gangeswaran *et al*.,1993) นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ ใน *R. capsulatus* ถูกยับยั้งโดย cyanide และ azide แต่ cyanate และ chlorate ไม่มีผลต่อเอนไซม์



รูปที่ 1.6 เปรียบเทียบกลุ่มยีน nitrate assimilation ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน กับแบคทีเรีย (Moreno-Vivian *et al*., 1999)

(A) : วิถี nitrate assimilation

ซ้าย : NADH-dependent nitrate และ nitrite reductase ของแบคทีเรีย *Klebseilla* และ *Rhodobacter*

ขวา : ferredoxin(Fd)-dependent nitrate และ nitrite reductase ของไซยาโนแบคทีเรีย

(B) : กลุ่มยีนที่ควบคุมassimilatory nitrate ในแบคทีเรีย *Klebseilla* และ*Rhodobacter*

(C) : กลุ่มยีนที่ควบคุม assimilatory nitrate ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechococcus sp.* strain PCC 7942 และ *Synechococcus sp.* strain PCC 6803

หมายเหตุ : ลูกศรแสดงทิศทางใน transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ nitrate assimilation

การควบคุม assimilatory nitrate reductase ในแบคทีเรีย

การแสดงออกของยีน nas ของ *Klebsiella* ถูกควบคุมโดย nitrogen regulatory system (Ntr) โดยมีแอมโมเนียมเป็นตัวกด ส่วนการชักนำการแสดงออกของยีนมีเพียง ไนเตรต และ ไนไตรต์ เท่านั้นที่สามารถชักนำการแสดงออกของยีนได้ (Goldman *et al.*,1994; Lin and Stewart, 1998) ส่วนใหญ่การควบคุมไนโตรเจนของเซลล์ ต้องการแหล่งไนโตรเจนในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน และสิ่งมีชีวิตที่เจริญที่มีปริมาณไนโตรเจนจำกัด พบว่า โปรตีน NtrB จะกระตุ้นโปรตีน NtrC โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต แล้ว Ntc จะจับกับ upstream sequence ของ promoter เพื่อการกระตุ้นการ transcription ของยีนที่ควบคุมไนโตรเจน (Merrick *et al.*, 1995) เนื่องจาก ไนเตรต หรือ ไนไตรต์ เท่านั้นที่เป็นตัวชักนำในการแสดงออกของยีน NasR ในแบคทีเรีย *Klebsiella sp* ดังนั้น ไนเตรต หรือ ไนไตรต์ จึงเป็น positive regulator ที่ทำหน้าที่ในการเพิ่มกระบวน transcription ให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ได้เร็วขึ้น Castillo และคณะ (1996) พบว่าไนเตรตชักนำกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และถูกกดด้วยอัตราส่วนของ C/N ที่ต่ำโดยผ่านสมดุลของ 2-oxoglutarate กับ glutamine ส่วนแอมโมเนียมเป็นตัวยับยั้งการขนส่งไนเตรตเข้าสู่เซลล์ ซึ่งไม่มีผลต่อการชักนำในการสังเคราะห์เอนไซม์ (Dobao *et al.*, 1994)

ในสาหร่ายสีเขียวแกนน้ำเงิน *Synechococcus sp.* strain PCC7942 พบว่าแอมโมเนียมเป็นตัวกดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนำไนเตรตไปใช้ ได้แก่ กลุ่มยีน nirA-nrtABCD-narB ส่วนไนเตรตและไนไตรต์เป็นตัวกระตุ้นการ transcription ของยีนกลุ่ม nitrate assimilation (Vega-Palas *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการควบคุมระบบไนโตเจนโดยโปรตีน Ntc A และ Ntc B ซึ่งโปรตีน Ntc A จะกระตุ้นกระบวนการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำไนเตรตไปใช้ทั้งหมด ส่วนโปรตีน Ntc B จะกระตุ้นการแสดงออกของยีน nirA ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อไนไตรต์เพื่อลดปริมาณไนไตรต์ภายในเซลล์ (Aichi and Omata, 1997)

Respiratory membrane-bound nitrate reductase (Nar)

โครงสร้างและคุณสมบัติของ membrane-bound nitrate reductase

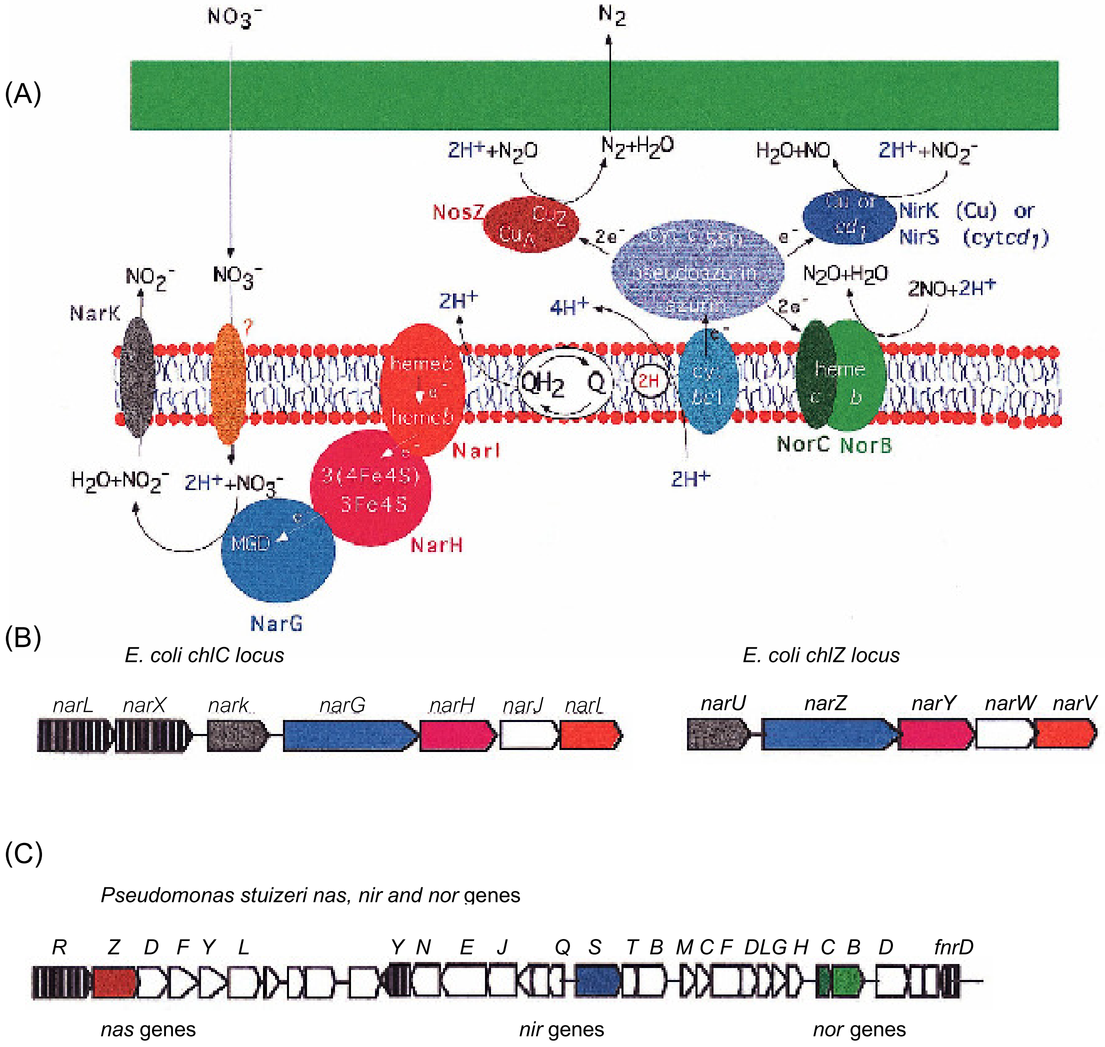
เอนไซม์ตัวนี้เกี่ยวข้องกับ denitrification และ anaerobic nitrate respiration รูปที่ 1.7 ซึ่งพบได้ใน *E. coli* และ *Paracoccus denitrificans* (Zumft,1997) Ramirez และคณะ (1998) พบว่า *Thermus thermophilus* มีโปรตีน Nar ที่เป็น thermophilic ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับทำกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 80 องศาเซลเซียส ใน *E. coli* พบ membrane-bond nitrate reductase 2 ชนิดที่ต่างกัน ได้แก่ NRA และ NRZ เอนไซม์ทั้ง 2 มีความคล้ายกันมาก และสามารถเกิดเป็น hybrid complex (Blasco *et al*.,1992) NRA เป็นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่แสดงออกในสภาวะ anaerobiosis และมีกิจกรรมเอนไซม์คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด อีกชนิด คือ NRZ เป็นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีอยู่ตลอดเวลา (Blasco *et al*., 1990; Bonnefoy *et al*., 1994)

โดยทั่วไปเอนไซม์ Nar ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ได้แก่ catalytic α subunit (NarG) มีมวลโมเลกุล 112-140 kDa มี MGD cofactor, หน่วยย่อยที่ 2 คือ soluble β subunit (NarH) มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 52-64 kDa และมี [3Fe-4S] 1 โมเลกุล และ [4Fe-4S] center และสุดท้ายคือ biheme b quinol-oxidizing γ subunit (NarI) มีขนาดโมเลกุล 19-25 kDa α และ β subunit เป็น soluble enzyme ซึ่งอยู่ในส่วนของไซโตพลาสซึม โดยมี γ subunit ยึดติดกับเมมเบรน และถูกทำลายได้ โดยสาร detergent และความร้อน เพราะ NarI มีความไวต่อความร้อน และอาจเสียสภาพได้ในกระบวนการ purification ซึ่งจะเหลือเพียง soluble $\alpha\beta$ complex และยังสามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้โดยใช้ viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอน นอกจากนี้ยังมี δ polypeptide (NarJ) ซึ่งไม่พบเป็นองค์ประกอบในเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แต่มีส่วนสำคัญในการทำให้ $\alpha\beta$ complex มีความเสถียรก่อนที่จะมาจับกับ membrane (Blasc, 1992; Dubourdieu and Demoss, 1992)

Nar สามารถรีดิวซ์ chlorate ได้บ้างและจะถูกยับยั้งโดย azide, chlorate, cyanide และ thiocyanate (Hochstein and Tomlinson, 1998) ระบบ Nar ของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ nitrosation ซึ่งสารประกอบ N-nitroso เป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ในกลุ่มนี้ด้วย

เอนไซม์ NRA ใช้ quinol pool เป็นตัวให้อิเล็กตรอน และผลิต PMF (proton motive force) โดยกลไกของ redox loop (Berk *et al*.,1995; Richard *et al*., 1998) ในการใช้ quinol pool เป็นตัวให้อิเล็กตรอน NarI จะออกซิไดซ์ quinol ในส่วนของ periplasmic ใน

membrane และจะปล่อยโปรตอน 2 ตัว ไปในส่วนของ periplasm จากนั้นอิเล็กตรอนที่ได้จะถูกส่งผ่าน Fe-S center และ NarG เพื่อรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ในที่สุด



รูปที่ 1.7 (A) : Nitrate respiration และ denitrification ในแบคทีเรียและกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้อง (Moreno-Vivian *et al.*, 1999)

(B) : กลุ่มยีนที่ควบคุม assimilatory nitrate ในแบคทีเรีย *E. coli*

(C) : กลุ่มยีนที่ควบคุม respiratory nitrate reductase ในแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri*

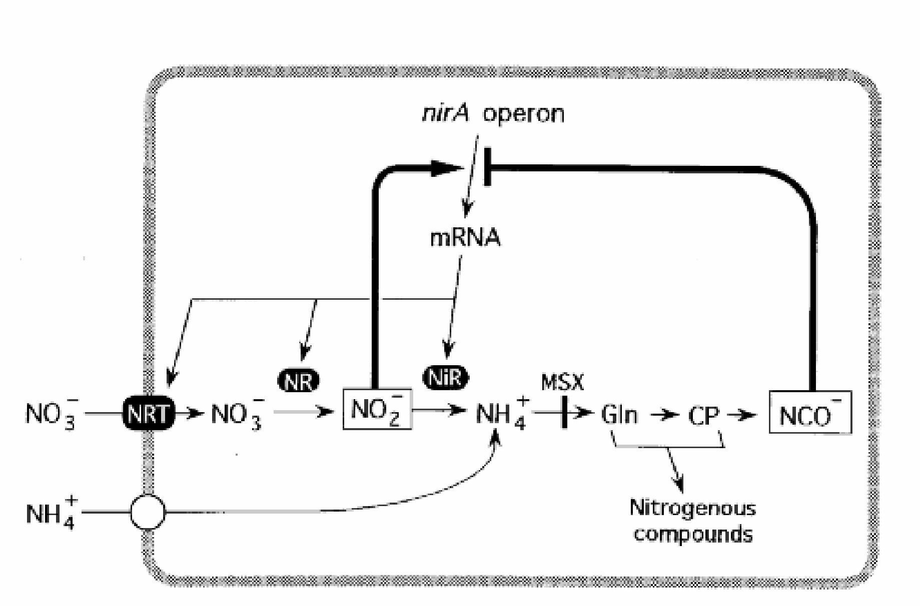
หมายเหตุ : ลูกศรแสดงทิศทางในกิจกรรม transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ nitrate respiration และ denitrification pathway

การควบคุม Respiratory membrane-bound nitrate reductase

ปริมาณไนเตรต และ ไนไตรต์ภายในเซลล์ *E. coli* ถูกควบคุมโดยยีน nar ซึ่งพบว่ามีโปรตีนตัวกลาง 2 ตัว ที่ใช้ความคุมการแสดงออกของยีนดังกล่าว คือ membrane sensor protein (NarX และ NarQ) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการตอบสนองต่อไนเตรตและไนไตรต์ในไซโตพลาสซึม โดยโปรตีน NarX และ NarQ จะควบคุมการ phosphorylation โปรตีน NarL และ NarP และโปรตีน NarL กับ NarP ที่ถูกกระตุ้นจะสามารถจับบริเวณที่จำเพาะบนสาย DNA และเพิ่มกระบวนการ transcription (Darwin and Stewart, 1995; Stewart, 1994) จากการศึกษากิจกรรมของ sensor protein ในสภาวะที่ไม่มีไนเตรต และ ไนไตรต์พบว่า NarQ เป็นตัวตัดหมู่ฟอสเฟตจาก NarP ส่วน NarX เป็นตัวตัดหมู่ฟอสเฟตจาก NarL ในสภาวะที่มีไนเตรต NarQ และ NarX จะเติมฟอสเฟตให้ทั้ง NarP และ NarL แต่เมื่อมีไนไตรต์ปรากฏ พบว่า NarX จะเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับเฉพาะ NarP ดังนั้นในการตอบสนองต่อไนไตรต์ NarX จึงเป็น positive regulator ของ NarP และเป็น negative regulator ของ NarL ในทางตรงกันข้าม NarQ จะเติมหมู่ฟอสเฟตให้ทั้ง NarL และ NarP ในการตอบสนองทั้งไนเตรตและไนไตรต์ (Williams and Stewart, 1997)

อย่างไรก็ตามในบาง operon เช่น ไนเตรตรีดักเทส narGHJ, fumarate reductase frdABCD และ nitrite export narK ถูกควบคุมโดยโปรตีน NarL เพียงชนิดเดียว ในขณะที่operon อื่น ๆ เช่น nitrite reductase nrfABCDEFG และ periplasmic nitrate reductase ถูกควบคุมโดยโปรตีนทั้ง 2 ตัว (NarL และ NarP) (Darwin *et al*., 1995)

Kikuchi และ คณะ (1996) ได้ศึกษาการควบคุมการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 พบว่าไนไตรต์เป็นตัวกระตุ้นในการสร้าง mRNA และไอโซไซยาเนตเป็นตัวยับยั้งการสร้าง mRNA ในการผลิตเอนไซม์ และตัวขนส่งไนเตรต ดังนั้นไอโซไซยาไนด์จึงเป็นตัวควบคุมในกระบวนการ feedback inhibition ในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ (รูปที่ 1.8)



รูปที่ 1.8 การควบคุม operon ของเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechococcus sp.* strain PCC 7942 (Kikuchi *et al.*,1996)

CP = carbamoylphosphate

NRT = nitrate transporter ที่ถูกแปรรหัสมาจากยีน nrt ABCD

NCO^- = Isocyanate ion

nirA operon = ยีนที่ใช้ในการผลิต mRNA ของ nitrate reductase, nitrite reductase และ nitrate transporter

MSX = L-methionine-DL-sulfoximine

Dissimilatory periplasmic nitrate reductase (Nap)

โครงสร้างและคุณสมบัติของ periplasmic nitrate reductase

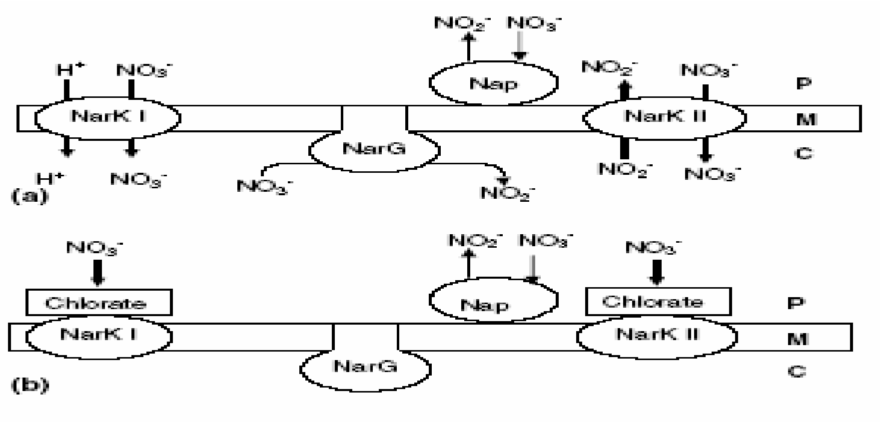
Periplasmic nitrate reductase เป็นเอนไซม์ตัวแรกที่มีการศึกษาใน phototrophic และ denitrifying bacteria ซึ่งพบเอนไซม์นี้ในแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด กิจกรรมของเอนไซม์ Nap ไม่เกี่ยวข้องกับ nitrate assimilation และ anaerobic respiration ถึงแม้ว่าไนไตรต์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ Nap จะสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน หรือสารตั้งต้นในการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) ในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ตำแหน่งของเอนไซม์ periplasmic nitrate reductase อยู่ในส่วนของ periplasm แต่ในกระบวนการนี้ไม่ทำให้เกิด PMF ระบบ Nap เป็นระบบที่อิสระจาก energy-conserving cytochrome bc_1 complex แต่จะเชื่อมกับการสร้าง PMF ขณะที่อิเล็กตรอนจาก NADH ส่งผ่าน proton-translocating NADH dehydragenase (Berks *et al.*, 1995: Richardson and Watmough, 1999) อย่างไรก็ตาม จะพบระบบดังกล่าวในสิ่งมีชีวิตที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน และมีไนเตรต เช่น ใน *Rhodobacter sphaeroides* (Kerber and Cardenass, 1982; Moreno and Ferguson,1998)

Nap มีหลายหน้าที่ แต่ที่เด่นชัดที่สุด คือ Nap เป็น dissimilatory enzyme ที่ใช้สำหรับปรับสมดุลรีดอกซ์ (redox balanceing) (Berk *et al.*,1995; Moreno and Ferguson, 1998; Richardson *et al.*,1988; Scars *et al.*,1997) การรักษาสมดุลรีดอกซ์มีความจำเป็นสำหรับการเติบโตของแบคทีเรียที่เหมาะสมในบางสภาวะ เช่น กระบวนการหมักใน enteric bacteria, การรีดิวซ์คาร์บอนใน aerobic heterotrophs หรือ การเจริญแบบ photoheterotrophic ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทั้งนี้ออกซิเจนเป็นยับยั้งตัวแรกในกระบวนการ denitrification ในการขนส่งไนเตรตในแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสง (Denis *et al.*, 1990)

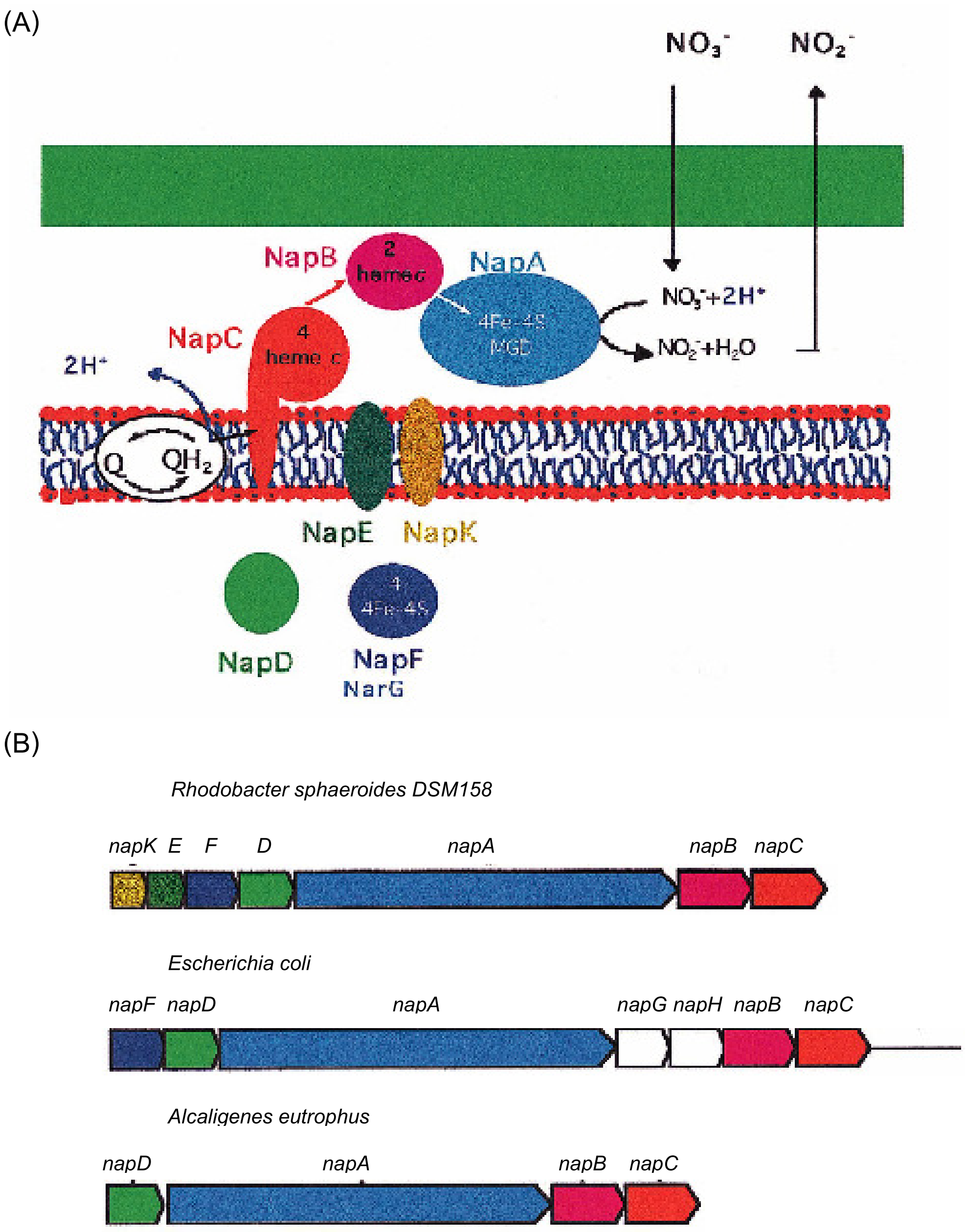
จากการศึกษา Nap ใน *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonis eutropha*), *T. pantotropha* (*P. denitrificans*), *E. coli* และ *Rhodobacter sp.* พบว่าเอนไซม์ Nap เป็น heterodimer ที่ประกอบด้วย catalytic subunit (NapA) ซึ่งมีขนาด 90 kDa และมี MGD cofactor เป็นส่วนประกอบ และหน่วยย่อย biheme cytochrome c (NapB) มีขนาด 15 kDa มี N-terminal [4Fe-4S] center และรับอิเล็กตรอนจาก NapC ซึ่งเป็น membrane-bound tetraheme cytochrome c มีขนาด 25 kDa (Berks *et al.*, 1994; Reyes *et al.*,1996) ในกระบวนการ purification ของ NapB subunit ทำให้กิจกรรมในการรีดิวซ์ด้วย viologen ลดลงใน *R. capsulatus* (McEwan *et al.*, 1987) ในการศึกษาของ Reyes และ คณะ (1996) พบว่า NapC มีหน้าที่ในการขนส่งอิเล็กตรอนให้ periplasmic enzyme complex และมีความเกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนจาก quinol ในเมมเบรน (รูปที่ 1.10.) นอกจากนี้พบว่ากิจกรรมของ Nap ไม่ถูก

ยับยั้งโดย cyanide และไม่สามารถรีดิวซ์ chlorate แต่ถูกกระตุ้นโดย thiocyanate และ azide ได้บ้าง (Berks *et al*., 1995; Hochstein *et al*., 1988) อย่างไรก็ตาม ก็ยังมีกิจกรรม Nap ใน *R. sphaeroides* ที่ถูกยับยั้งโดย chlorate อย่างสมบูรณ์

Iman และ David (2004) ใช้คลอเรต (chlorate) เป็นตัวยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์และสามารถใช้ในการจำแนกเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส 2 ชนิด คือ membrane-bound nitrate reductase (Nar) และ periplasmic nitrate reductase (Nap) โดยคลอเรตมีผลต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแบคทีเรีย 2 ชนิดต่างกัน คือ *Comamonas testosterone* ซึ่งเป็น denitrifier ที่มีทั้ง membrane-bound nitrate reductase และ periplasmic nitrate reductase ส่วน *Klebsiella pneumoniae* เป็น nitrate ammonifier ที่มีเฉพาะ periplasmic nitrate reductase พบว่า คลอเรตสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสใน *K. pneumoniae* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใน *C. testosterone* สามารถยับยั้งได้เพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ได้ตั้งสมมติฐานว่า คลอเรตอาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสใน *K. pneumoniae* ที่ตัวขนส่งไนเตรต ดังรูป 1.9



รูปที่ 1.9 แสดงสมมติฐานการยับยั้งกิจกรรมของNar (a) ไม่มีคลอเรตยับยั้ง (b) มีคลอเรตยับยั้ง, P = periplasm, M = membrane, C= cytoplasm



รูปที่ 1.10 Periplasmic nitrate reducing system

(A) : periplasmic nitrate reducing system ใน *R. sphaeroides* เอนไซม์ periplasmic nitrate reductase มี quinone pool (QH_2) เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

(B) : กลุ่มยีน nap ในแบคทีเรีย *R. sphaeroides*, *E. coli* และ *A. eutrophus* (Moreno-Vivian *et al.*, 1999)

หมายเหตุ : ลูกศรแสดงทิศทางในการ transcription ของยีน periplasmic nitrate reducing system

การควบคุม dissimilatory periplasmic nitrate reductase

ยีน nap จะมีความแตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิต โดยที่แอมโมเนียมและออกซิเจนไม่มีผลต่อระบบ Nap เพราะกิจกรรมของ Nap เกิดขึ้นได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน เซลล์จะถูกกระตุ้นด้วยไนเตรต แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยแอมโมเนียมหรือสมดุลของคาร์บอนและไนโตรเจนภายในเซลล์ (Dobao *et al*., 1994; Reyes *et al*., 1996) อย่างไรก็ตาม *P. denitrificans* เจริญได้แม้ไม่มีไนเตรต และจะมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อมีการรีดิวซ์แหล่งคาร์บอน เช่น butyrate ซึ่งเป็นการควบคุม Nap ในการตอบสนองต่อ redox state ในแบคทีเรีย (Sears *et al*., 1997) และคล้ายกันกับระบบ Nap ที่ไม่ถูกชักนำโดยไนเตรตใน *A. eutrophus* ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในสภาวะที่มีออกซิเจน และอยู่ใน stationary phase (Siddiqui *et al*., 1993)

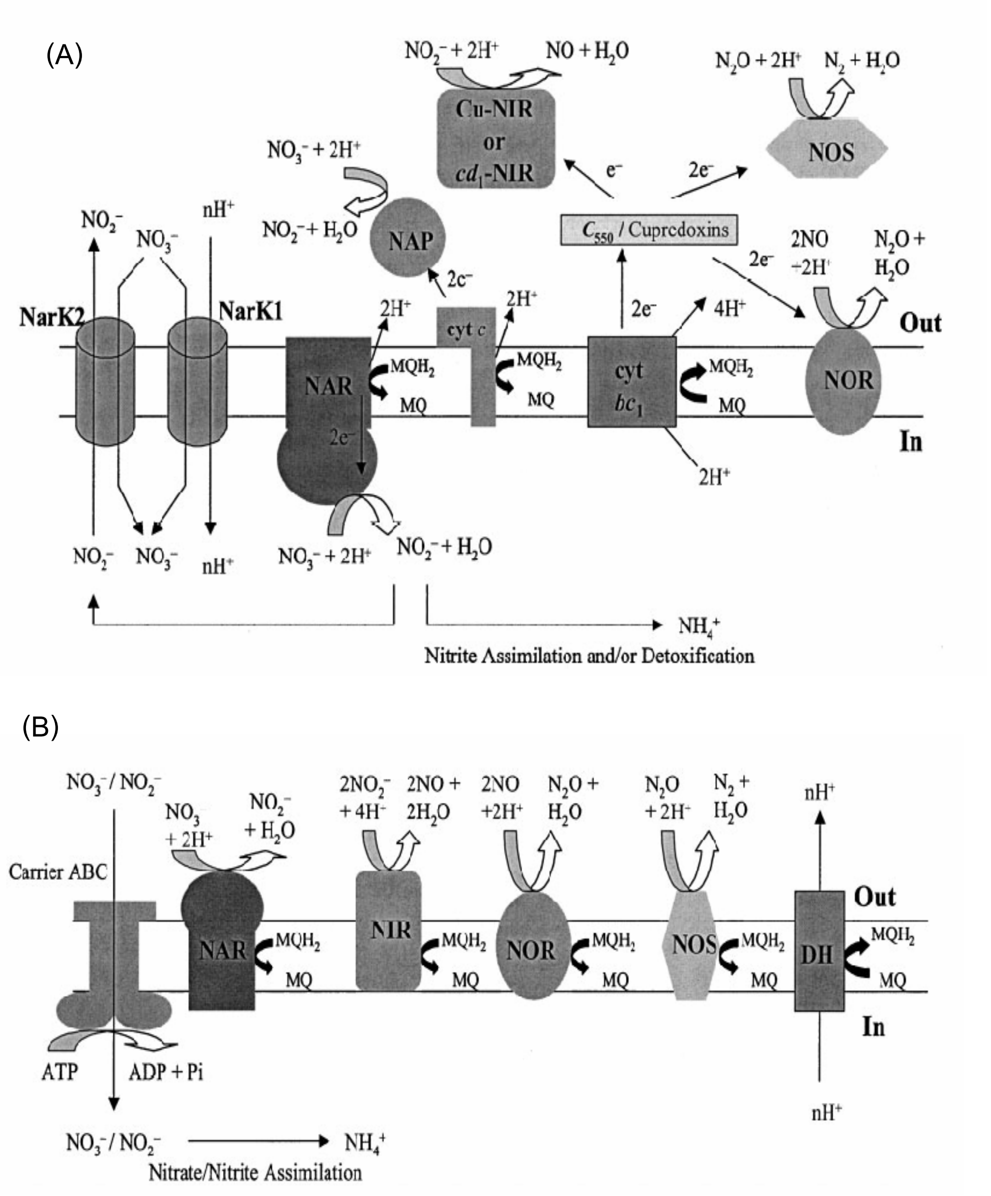
เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสใน Archaea

Archaea เป็นแบคทีเรียโบราณที่สามารถรีดิวซ์สารประกอบไนโตรเจนในวัฏจักรไนโตรเจน กระบวนการ assimilation ได้แก่ nitrate assimilation และ N_2 fixation และ dissimilation reaction ได้แก่ nitrate respiration และ denitrification

Assimilatory nitrate reductase ใน archaea

Archaea ส่วนใหญ่ใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ในการศึกษา assimilation nitrate reductase และ nitrite reductase ใน *Haloferax mediterranie* ซึ่งเป็น archaea ที่เจริญในสภาวะที่เค็มจัด พบว่า archaea ตัวนี้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน และใช้ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว แต่ในขณะเดียวกันมันสามารถเกิดกระบวนการ denitrification ได้ด้วยเนื่องจากมีเอนไซม์ทั้ง Nas และ Nar

Nas ใน archaea เป็น heterodimer ที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 105 kDa และ 50 kDa และใช้ ferridoxin เป็น reductant แต่ไม่ใช้ NAD(P)H (Martienz-Espinosa *et al*., 2001b) Km ของไนเตรต เท่ากับ 0.95 mM และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเกลือเท่ากับ 3.1 M NaCl Smith และ คณะ (1997) ศึกษา Nas ใน *Methanothermobacter thermautotrophicus* มีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่โครงสร้างเหมือนกับ Nas ในแบคทีเรีย Kawashima และ คณะ (2000); Ruepp และ คณะ (2000) ศึกษา Nas ใน *Thermoplasma strains* พบว่า เอนไซม์เตรตรีดักเทสคล้ายกันกับ NADPH ไนเตรตรีดักเทส ของยูคาริโอต แต่เอนไซม์ใน archaea มีขนาดเล็กกว่ามาก (ประมาณ 200 residues)



รูปที่ 1.11 เปรียบเทียบ assimilation nitrate reductase ในแบคทีเรียและ archaea (Cabello *et al*., 2004)

(A) : assimilation nitrate reductase ในแบคทีเรีย

(B) : assimilation nitrate reductase ใน archaea

Respiratory nitrate reductase ใน archaea

ความสามารถในการใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการเผาผลาญพลังงานพบได้ใน halophilic และ hyperthrmophilic archaea ใน archaea หลายชนิดสามารถทำงานในกระบวนการ denitrification เพราะมีเอนไซม์ respiration Nar จากการศึกษาใน *Haloferax sp.* 3 ชนิด และ *Haloarcula marismortui* พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 89 องศาเซลเซียส ในความเข้มข้นเกลือ 3.2 M NaCl มีค่า Km ของไนเตรตอยู่ในช่วง 2.5-6.7 mM ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเกลือ (Alvarez-Ossirio *et al.*, 1992) Nar membrane-bound ซึ่งเป็น *Haloferax denitrificans* ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีขนาดต่างกัน คือ 116 kDa และ 60 kDa มีค่า Km ของไนเตรตเท่ากับ 0.2 mM และเอนไซม์มีความเสถียรขึ้นเมื่อไม่มีเกลือ และกิจกรรมเอนไซม์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้น (Hochstein and Lang, 1991) *Haloferax volcanii* มี membrane-bound Nar ที่มี 3 หน่วยย่อย ที่มีขนาด 100 kDa, 61 kDa และ 31 kDa กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้น มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 80 องศาเซลเซียส มีค่า Km ของไนเตรตเท่ากับ 0.36 mM (Bickel-Sandkotter and Ufer, 1995) ส่วน *Haloarcula marismortui* มี Nar ที่มีค่า Km ของไนเตรตเท่ากับ 80 μM ที่ความเข้นข้นเกลือเท่ากับ 2.0 M NaCl เป็น homotetramer ที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 63 kDa (Yoshimatsu *et al.*, 2000) H. marismortui อีก strain หนึ่งมี membrane-bound Nar ที่เอนไซม์ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ NarGH ในแบคทีเรีย แต่ไม่มี NarI membrane-associated protein และ NarGH complex มีลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างของเอนไซม์คล้ายกับ dissimilatory selenate reductase จาก *Thauera selenatis* แต่ไม่สามารถรีดิวซ์ selenate ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มี Asp ligands กับ Mo cofactor เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์อีกด้วย (Jormakka *et al.*, 2004) NarGH complex จาก *H. marismortui* ไม่มี quinol-oxidizing cytochrome b แต่จะมี MGD cofactor แทน จากการศึกษาของ Klenk และ คณะ (1997) พบว่า *Archaeoglobus fulgidus* มียีน AF0176 ที่แปลรหัสเป็นโปรตีนที่คล้ายกับ NarG ใน *E. coli* แต่โปรตีน NarG ใน *A. fulgidus* มีขนาดเล็กกว่ามาก (ประมาณ 80 kDa) และมี arginine 1 คู่ และคาดว่าผลผลิตจากยีน AF0175 สามารถจับกับ [4Fe-4S] ในขณะที่ยีน AF0174 เป็นโปรตีนที่จับกับ membrane แต่ไม่มีกลุ่ม heme จับกับโปรตีนนี้ (Klenk *et al.*,1997; Richardsons *et al.*, 2001) hyperthermophilic archaea บางชนิดสามารถใช้ไนเตรตในกระบวนการหายใจได้ เช่น *Pyrobaculum aerophilum* ใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ (Volkl *et al.*,1993) และพบว่าเอนไซม์มีค่า Km ของไน-เตรตเท่ากับ 58 μM มี optimum temperature เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส และในกิจกรรมของเอนไซม์มี

tungstate ร่วมอยู่ด้วย ใน *P. aerophilum* มี Nar เป็น heterotrimer ที่มีขนาด 130 kDa, 52 kDa และ 32 kDa มี cytochrome b, Mo cofactor และ Fe-S center เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ (Afshar *et al*., 2001)

Regulation of nitrogen metabolism in archaea

กลไกในการควบคุมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสใน respiratory nitrate reduction และ denitrification ใน achaea ยังไม่มีหลักฐานแน่ชัด และน่าจะคล้ายกันกับการควบคุม nitrate reduction ในแบคทีเรีย ซึ่งมีโปรตีน FNR, NNR, NarR, NarXL เป็นต้น ที่ควบคุม nitrate reduction แต่ใน archaea ไม่พบยีนที่จะแปรรหัสเป็นโปรตีนดังกล่าว ดังนั้นอาจจะมีระบบใหม่ในการควบคุม nitrate reduction ใน archaea จากการศึกษาของ Studholme และ Pau (2003) พบว่า molybdenum สามารถกระตุ้นการ transcription ModE factor ใน archaea บางชนิด ดังนั้น Mo อาจเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีนใน archaea

ชนิดของสาหร่ายที่ศึกษา

Phylum	Cyanophyta
Order	Chroococcales
Family	Synechococcaceae
Sub Family	Aphanothecoideae
Genera	Cyanobacterium
Species	*Synechococcus minervae*
หรือ	*Cyanobacterium minervae*

ลักษณะทั่วไป

เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน มีทั้งอยู่เป็นเซลล์เดียว หรืออยู่เป็นคู่ขณะแบ่งเซลล์ (พบอยู่เป็นคู่บ่อย แต่จะแยกกันก่อนจะแบ่งเซลล์อีกครั้งเสมอ) การแบ่งเซลล์บางครั้งไม่สมมาตร มีสีเขียวมะกอก หรือสีเขียวแกมน้ำเงิน รูปร่างเซลล์มีทั้งรูปร่าง กลม, ทรงไข่หรือทรงกระบอก มีขอบสีเขียวแกมน้ำเงินหรือสีเขียวมะกอก ปกติจะพบเส้น chromatoplasm ตามแนวยาวของเซลล์ ขนาดเซลล์มี ความยาวตั้งแต่ 4 - 10 ไมโครเมตร และกว้าง 2.2 -4.5 ไมโครเมตร และมีเมือกหุ้ม (หนามากที่สุดประมาณ 0.8 ไมโครเมตร) นอกจากนี้ยังพบธาตุเหล็ก และตะกอนสีน้ำตาล สามารถทนความร้อนได้ดี พบได้ในน้ำพุร้อนที่เป็นด่าง ที่อุณหภูมิ 23.5 -64.1ทุกแห่งทั่วโลก ชื่อของสาหร่ายชนิดนี้มีหลายชื่อ เช่น *Cyanobacterium minervae* (Komarak *et al*.,1999), *Synechococcus minervae*, *Cyanothece minervae* (Copeland)

(Komarak, 1976) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบสาหร่ายชนิดนี้ทางภาคเหนือตอนบนของไทยโดย ยุวดี พีรพรพิศาล (2544) พบสาหร่ายชนิดนี้ทั้ง 9 แหล่งที่เก็บตัวอย่าง และพบในน้ำพุร้อนที่เป็นด่างที่มีอุณหภูมิประมาณ 30-60 องศาเซลเซียส

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. สำรวจหาสาหร่ายที่มีเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่มีคุณสมบัติเสถียรที่อุณหภูมิปกติ หรือมีคุณสมบัติเป็น thermostable enzyme
2. ศึกษาและสกัดเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งธารน้ำอุ่น
3. ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ทนต่ออุณหภูมิสูง

4 หาวิธีการในการเก็บรักษาไนเทรตรีดักเทสให้คงทน