สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการตารางภาคผนวก	(10)
รายการรูป	(12)
สัญลักษณ์ คำย่อและตัวย่อ	(16)
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	28
2. วัสดุ อุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง	
อุปกรณ์	29
สารเคมี	30
วิธีการทดลอง	33
3. ผลการทดลอง	48
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	85
5. สรุปผลการทดลอง	94
เอกสารอ้างอิง	96
ภาคผนวก	109
ประวัติผู้เขียน	129

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงแหล่งที่เก็บตัวอย่างน้ำ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความเค็ม	48
3.2	แสดงชนิดของสาหร่ายและค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่วัดได้จากวิธี *in vivo*	50
3.3	แสดงแหล่งน้ำที่เก็บตัวอย่างที่พบสาหร่าย *S. minervae* ทั้ง 2 แหล่ง	50

รายการตารางภาคผนวก

ตารางที่		หน้า
6.1	สูตรอาหาร BG-11	110
6.2	ส่วนประกอบของ Trace metal mix A5	110
6.3	อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรต17 (1.5 กรัมต่อลิตร), 35 (3.0 กรัมต่อลิตร) และ 53 มิลลิโมลาร์ (4.5 กรัมต่อลิตร)	111
6.4	อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรต 0, 5.9 (0.5 กรัมต่อลิตร), 11.7 (1.0 กรัมต่อลิตร) และ 17 มิลลิโมลาร์ (1.5 กรัมต่อลิตร)	112
6.5	อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรต 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์	113
6.6	อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส	114
6.7	การดูดซับไนเตรตของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส	115
6.8	การปล่อยไนไตรต์ในอาหารของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลง BG-11ที่มีความเข้มข้นไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส	116
6.9	สาหร่ายเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์ ภายใต้ความเข้มแสง 120, 137, 152 และ 452 μmole m^{-2} s^{-1}	117
6.10	อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่เขย่าและไม่เขย่า	118
6.11	การดูดซับไนเตรตของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่เขย่าและไม่เขย่า	119

รายการตารางภาคผนวก(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
6.12	การปล่อยไนไตรต์ในอาหารของสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลง BG-11 ที่มีความเข้มข้นไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์ ที่เขย่าและไม่เขย่า	120
6.13	กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เมื่อเก็บเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol เข้มข้น 0, 20, และ 40 เปอร์เซ็นต์	121
6.14	กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เมื่อเก็บเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol เข้มข้น 0, 3, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์	122
6.15	กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เมื่อใช้ NADH, NADPH และ Methyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอน	123
6.16	กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เมื่อใช้ Succinate salt, Bromophenol blue, Methyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอน	123
6.17	กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เมื่อใช้ Sodium azide, Sodium Thiocyanate, Arsenic trioxide และ Potassium Ferricyanide เป็นตัวยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์	124
6.18	กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เมื่อบ่มสารสกัดหยาบเอนไซม์อุณหภูมิ 0, 4, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส	124

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.1	แสดงวัฏจักรการเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนในวัฏจักรไนโตรเจน	4
1.2	แสดง nitrate assimilation pathway ในสาหร่ายสีเขียวชนิด *Chlamydomonas*	6
1.3	แสดงส่วนย่อยในโมเลกุลของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต พร้อมตำแหน่งการรับ-ส่งอิเล็กตรอนกับ artificial electron acceptor-donors	7
1.4	แสดง Nitrate assimilation Pathway	9
1.5	แสดงโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสซึ่งเป็น homodimer แต่ละหน่วยประกอบด้วย FAD (flavin domain) , Fe (heme domain) และ MoCo (molybdenum cofactor) (Crawford,1995)	9
1.6	วิถี nitrate assimilation และ เปรียบเทียบกลุ่มยีน nitrate assimilation ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน กับแบคทีเรีย 7. วิถี nitrate respiration และ denitrification pathway ในแบคทีเรียและกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้อง	14
1.7	nitrate respiration และ denitrification ในแบคทีเรียและกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้อง	17
1.8	การควบคุม operon ของเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Synechococcus sp.* strain PCC 7942	19
1.9	แสดงสมมติฐานการยับยั้งกิจกรรมของNar (a) ไม่มีคลอเรตยับยั้ง (b) มีคลอเรตยับยั้ง, P = periplasm, M = membrane, C= cytoplasm	21
1.10	periplasmic nitrate reducing system ใน *R. sphaeroides* 11. เปรียบเทียบ assimilation nitrate reductase ในแบคทีเรียและ archaea	22
1.11	เปรียบเทียบ assimilation nitrate reductase ในแบคทีเรียและ archaea	25
2.1	แสดงวิธีการขีดตัวอย่างสาหร่ายบนอาหารแข็ง	34
2.2	แผนภาพการบ่มสารสกัดหยาบที่บ่มด้วยแอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทสและแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase	46
3.1	ตัวอย่างเซลล์สาหร่ายที่สามารถแยกได้ด้วยวิธีการ streak plate	49
3.2	การเจริญของสาหร่าย *S.minervae* ในอาหาร BG-11 สูตรดัดแปลงที่มีไนเตรต 11.7(1.5 กรัมต่อลิตร), 35 (3.0 กรัมต่อลิตร) และ 53 มิลลิโมลาร์ (4.5	51

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
	กรัมต่อลิตร)	
3.3	การเจริญของสาหร่าย *S.minervae* ในอาหาร BG-11 สูตรดัดแปลงที่มีไนเตรต 0, 5.9 (0.5 กรัมต่อลิตร), 11.7 (1.0 กรัมต่อลิตร) และ 17 มิลลิโมลาร์ (1.5 กรัมต่อลิตร)	52
3.4	ปริมาณไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยง 500 ไมโครโมลาร์ ที่ลดลง	54
3.5	ปริมาณไนไตรต์ที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเพาะเลี้ยงในที่มีไนเตรต 500 ไมโครโมลาร์	54
3.6	แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแต่ละวัน ในอาหาร BG-11 สูตรดัดแปลงที่มีความเข้มข้นไนเตรตเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์	55
3.7	การเจริญเติบโตของสาหร่าย *S. minervae* ในอาหาร BG-11 สูตรดัดแปลงที่มีไนเตรต 0.5 มิลลิโมลาร์	55
3.8	การเจริญของสาหร่าย *S.minervae* ในอาหาร BG-11 สูตรดัดแปลงที่มีไนเตรต 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิโมลาร์	57
3.9	สาหร่าย *S. minervae* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 0, 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไนเตรตในวันที่ 6	57
3.10	การเจริญของสาหร่าย *S. minervae* ใน BG-11mdiume ที่มีไนเตรต 1 มิลลิโมลาร์เพาะเลี้ยงที่ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส	59
3.11	การดูดซับไนเตรตของสาหร่าย *S. minervae* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรตเริ่มต้น 1 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส	59
3.12	ปริมาณไนไตรต์ที่ปล่อยออกมาจากการเพาะเลี้ยง *S. minervae* ในอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรต 1 มิลลิโมร์ และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส	60
3.13	การเจริญของสาหร่าย *S.minervae* ที่ความเข้มแสง 120, 137, 152 และ 452 ไมโครโฟตอนต่อตารางเมตรต่อวินาที	61

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.14	การเจริญของสาหร่าย *S. minervae* ที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า	62
3.15	การดูดซับไนเตรตของสาหร่าย *S. minervae* ที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า	63
3.16	ปริมาณไนไตรต์ที่ปล่อยในอาหารของการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *S. minervae* ที่เพาะเลี้ยงแบบเขย่า และไม่เขย่า	63
3.17	แสดงการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์สาหร่ายตลอด 24 ชั่วโมงและให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง	65
3.18	การทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 -55	66
3.19	อิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบระหว่าง pH 3 -11	67
3.20	กิจกรรมเอนไซม์ที่เติม NADH, NADPH และ Methyl viologen เปรียบเทียบกับ Control (น้ำ) ที่ไม่มีการเติมสารให้อิเล็กตรอน	68
3.21	กิจกรรมเอนไซม์ที่เติม Succinate salt, Bromophenol blue และ Methyl viologenเปรียบเทียบกับ Control (น้ำ) ที่ไม่มีการเติม สารให้อิเล็กตรอน	70
3.22	กิจกรรมเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดย NaN_3, NaSCN, As_2O_3 และ $K_3Fe[CN]_6$ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (final concentration)	71
3.23	ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่อกิจกรรมเอนไซม์ (A) แสดง saturation curve ของไนเตรตต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (B) Lineweaver-Burk double reciprocal plot	73
3.24	กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสหลังจากการเติม glycerol ทันที ที่ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์	75
3.25	กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสหลังจากการเติม glycerol ที่ความเข้มข้น 0, 3, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์	76
3.26	ความเสถียรของเอนไซม์ในสารสกัดหยาบ 0, 4, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศา-เซลเซียส	78

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.27	ผลของดีเทอร์เจนต์ต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ	79
3.28	แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายที่ยึดติดกับ alkaline phosphatase และใช้ substrate ของ alkaline phosphatase	81
3.29	กิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ความเข้มข้น Triton X- 100 ตั้งแต่ 0 - 25 เปอร์เซ็นต์	82
3.30	แสดงผลของแอนติเจนต่อแอนติบอดีด้วยวิธีดัดแปลงจาก ELISA	83
3.31	แสดงผลของการให้ SDS เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และแอนติเจนต่อแอนติบอดีด้วยวิธีดัดแปลงจาก ELISA	84

คำย่อและตัวย่อ

BSA	=	bovine serum albumin
CHAPS	=	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate
DTT	=	dithiothreitol
EDTA	=	ethylenediaminetetra acetic acid
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
M	=	molar
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NiR	=	nitrite reductase
nmole	=	nanomole
NR	=	nitrate reductase
OD	=	optical density
PMSF	=	phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
TBS	=	tris buffer saline
Tris	=	tris(hydroxymethyl)aminomethane
µM	=	micromolar
µmole	=	micromole