บทที่ 4

วิจารณ์ผลการศึกษา

4.1 สภาพของบ่อน้ำร้อน

สภาพของบ่อน้ำร้อนในพื้นที่หมู่ที่ 2 ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง มีลักษณะเป็นบ่อปูนซีเมนต์ ปูกระเบื้อง น้ำในบ่อมีอุณหภูมิ 40.2 °C ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 น้ำใสไม่มีสี ไม่มีกลิ่นซัลเฟอร์ มีความเค็ม 12.5 g/l เนื่องจากบ่อดังกล่าวเป็นบ่อที่ไม่มีน้ำไหลและมีประชาชนใช้น้ำในบ่อเพื่ออาบชำระร่างกายอาจทำให้เกิดการสะสมของความเค็มภายในบ่อ

สภาพของน้ำในบริเวณน้ำตกร้อนหมู่ที่ 4 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อมเหนือ พบว่าทั้งสามจุดที่เก็บตัวอย่างน้ำในบ่อมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 38 ถึง 39.7 °C ค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 7.7 ถึง 8.0 น้ำใสไม่มีสี ไม่มีกลิ่นซัลเฟอร์และไม่มีความเค็ม

สภาพของน้ำในสระมรกตหมู่ที่ 2 ต.คลองท่อมเหนือ อ.คลองท่อมเหนือ พบว่าน้ำในบ่อมีอุณหภูมิ 35 °C ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 น้ำใสไม่มีสี ไม่มีกลิ่นซัลเฟอร์และไม่มีความเค็ม

สระมรกตและน้ำตกร้อนมีระยะทางไม่ไกลกันนักเมื่อเทียบกับสถานที่อื่น ดังนั้นสภาพของน้ำในบ่อจึงไม่แตกต่างกันมากและเนื่องด้วยบริเวณทั้งสองอยู่ในพื้นที่ ๆ เป็นป่า เชื่อมโยงกับลำธารและห่างไกลจากทะเล ทำให้น้ำในบริเวณดังกล่าวเป็นน้ำจืดและเป็นแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญของจังหวัด

สภาพของน้ำในบริเวณน้ำพุร้อนเค็มหมู่ที่ 7 ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อมพบว่า ทั้งสี่บ่อที่เก็บตัวอย่างน้ำในบ่อมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 44.3 ถึง 46.1 °C มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 6.6 ถึง 6.8 น้ำใสไม่มีสี มีค่าความเค็มอยู่ในช่วง 13.5 ถึง 19 g/l มีกลิ่นซัลเฟอร์และมีแก๊สผุดอยู่ที่ก้นบ่อตลอดเวลาภายในบ่อที่ 1, 2 และ 4 บริเวณดังกล่าวอยู่ในพื้นที่ของป่าโกงกางและแสมทำให้น้ำทะเลสามารถหนุนถึง ส่งผลให้น้ำในบ่อมีความเค็ม

จากการตรวจสอบไม่พบปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ เนื่องจากบริเวณเหล่านี้อยู่ไกลจากโรงงานอุตสาหกรรม แหล่งปศุสัตว์และการเกษตร จึงไม่มีการปนเปื้อนของสารดังกล่าว ประกอบกับในพื้นที่เหล่านี้มีระบบนิเวศน์ที่สมบูรณ์ จึงมีสิ่งมีชีวิตมากมายอาศัยอยู่ก่อให้เกิดวัฏจักรไนโตรเจนทำให้สารมีการเปลี่ยนรูปเป็นสารอื่นตลอดเวลา

4.2 การแยกตัวอย่างให้เป็นสาหร่ายชนิดเดี่ยวๆ

พิมพรรณ ตันสกุล (2534) ได้เสนอวิธีแยกสาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae) ให้เป็นหน่วยเดี่ยว (unit) หลายวิธีแต่วิธีที่ให้ผลดีที่สุดคือ คาปิลลารี ปิเปต (capillary pipette) และวิธีขีดลากบนอาหารแข็งในจาน (streak plate) แต่วิธี streak plate เป็นที่นิยมใช้กันมากกว่า เมื่อนำตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บได้ มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียวจึงทำการแยกสาหร่ายให้เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ โดยใช้วิธีขีดลากบนอาหารแข็ง (streak plate)

4.3 คัดเลือกตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการศึกษา

4.3.1 ผลการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ *in vivo*

เมื่อได้ตัวอย่างสาหร่ายที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่เพาะเลี้ยง10 ตัวอย่าง จึงนำมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์เพื่อตรวจหาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสพบว่า ตัวอย่างมีแอคติวิตี 9 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.2) โดยตัวอย่างที่มีแอคติวิตีดีที่สุดคือ ม4 และ รค3.4ข เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดจำแนกเพื่อระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บมาจากสระมรกตเป็นชนิด *Cholorella* sp. และตัวอย่างที่เก็บมาจากบ่อน้ำร้อนใน ต.เหนือคลอง และน้ำพุร้อนเค็มเป็นชนิดเดียวกันคือ *Synechococcus* sp.

Cholorella sp. เป็นสาหร่ายสีเขียว ในดิวิชัน Chlorophyta อาศัยในแหล่งน้ำจืด (ลัดดา วงรัตน์, 2544) สระมรกตซึ่งเป็นแหล่งน้ำจืดจึงมีสิ่งมีชีวิตชนิดนี้อาศัยอยู่ สำหรับบ่อน้ำร้อนใน ต.เหนือคลอง และบ่อน้ำพุร้อนเค็ม ต.ห้วยน้ำขาว สภาพของน้ำในบ่อมีความเค็ม (12.5-19 g/l) และมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง (40-46 ºC) จึงไม่มีสาหร่าย *Chlorella* sp. อาศัยอยู่ แต่พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Synechococcus* sp. อาศัยอยู่ สอดคล้องกับคำเสนอแนะของลัดดา วงรัตน์ (2544) สาหร่ายกลุ่ม cyanobacteria สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในพื้นที่ ๆ มีอุณหภูมิสูงและความเค็ม และจากการศึกษาของ Castenholz (1977) พบว่า มีสาหร่ายชนิด *Synechococcus mastigocladus* อาศัยอยู่ในบ่อน้ำพุร้อน Mammoth Spring ที่ Yellowstone Park ซึ่งน้ำภายในบ่อมีอุณหภูมิเท่ากับ 50 °C

4.3.2 การศึกษาความเสถียรที่อุณหภูมิห้องของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. และ *Chlorella* sp.

เมื่อนำส่วนสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของสาหร่ายทั้งสองชนิด และส่วนสารละลายของสาหร่ายชนิด *Chlorella* sp. บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์แอคติวิตีเทียบกับก่อนบ่มพบว่า แอคติวิตีของส่วนสารละลายเอนไซม์ในสาหร่าย *Chlorella* sp. หลังจากบ่มไม่มีแอคติวิตีเหลืออยู่และแอคติวิตีในส่วนสารสกัดหยาบเหลือเพียง

23 % ขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ในสารสกัดหยาบสาหร่าย *Synechococcus* sp. ลดลงไม่มาก (ตารางที่ 3.3) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติการติดกับเมมเบรนของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ในสาหร่าย *Synechococcus* sp. อาจติดแน่นกับเมมเบรนและเสียสภาพได้ยาก จากการศึกษาของประวิทย์ พิทักษ์วาปี (2533) พบว่าสิ่งมีชีวิตที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่นบ่อน้ำพุร้อน พบว่าโครงสร้างของเซลล์มีลักษณะพิเศษ โดยมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่หนา และมีเอนไซม์ที่พัฒนาสามารถทำงานได้และไม่เสียสภาพแม้อยู่ในอุณหภูมิที่สูง

ดังนั้นด้วยคุณสมบัติความเสถียรของสาหร่าย *Synechococcus* sp. จึงมีความน่าสนใจจึงคัดเลือกสาหร่ายชนิดนี้เป็นตัวอย่างสำหรับงานวิจัย

4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

4.4.1 ผลของก๊าซออกซิเจนต่ออัตราการเจริญเติบโต

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะเดียวกัน แต่ลักษณะการเลี้ยงแตกต่างกันคือ แบบที่ 1 เลี้ยงสาหร่ายในเครื่อง Illuminated shaker เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm และแบบที่ 2 วางฟลาสก์ตัวอย่างสาหร่ายไว้เฉย ๆ โดยไม่มีการเขย่าพบว่า อัตราการเจริญเติบโต ปริมาณการดูดซับไนเตรตไปใช้และการผลิตไนไตรต์ออกสู่อาหารสอดคล้องกันคือ การเลี้ยงแบบที่ 2 ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายดีกว่าแบบที่ 1 นอกจากนี้ความเข้มข้นของไนเตรตในอาหารลดลงได้มากกว่าและสามารถผลิตไนไตรต์ได้ดีกว่าเช่นเดียวกัน แสดงว่าสภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนต่ำชักนำให้สาหร่าย *Synechococcus* sp. เกิดกระบวนการ nitrate respiration จากการศึกษาของ Berks *et al*., 1995 พบว่า Nar protein ใน *E.coli* ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic) นอกจากนี้สภาวะตามธรรมชาติที่สาหร่ายเจริญเติบโตเป็นบ่อที่มีน้ำนิ่งและสาหร่ายเกาะติดกับขอบบ่อ เป็นไปได้ว่าสาหร่ายชนิดนี้ชอบสภาวะแบบนิ่งในการดำรงชีพมากกว่าแบบเขย่า

4.5 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมไนเตรตต่ออัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. พบว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 6.25 g/l ส่งผลให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่สุด เนื่องมาจากแหล่งที่อยู่ในธรรมชาติของสาหร่ายก่อนนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีความเค็ม ดังนั้นอาหารที่มีความเค็มจึงทำให้สาหร่ายชนิดนี้เติบโตได้ดี แต่ความเค็มระดับนี้ต่ำกว่าในธรรมชาติที่สาหร่ายเจริญเติบโต อาจเป็นไปได้ว่าในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงหลังจากที่เก็บตัวอย่างมาไม่ได้เลี้ยงในอาหารที่มีความ

เค็ม จึงอาจส่งผลให้สาหร่ายเกิดการปรับตัวให้ชอบอาศัยในสภาวะที่มีความเค็มลดลง สำหรับความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตที่ส่งผลให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ 32.5 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ทำการศึกษา ชี้ให้เห็นว่าเมื่อปริมาณไนเตรตในอาหารสูงมีผลกระตุ้นให้อัตราการใช้ไนเตรตเพื่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายสูงด้วย จากการศึกษาของ Wang และคณะ (2003) พบว่า เมื่อมีไนเตรตในอาหารสูงส่งผลให้อัตราการนำไนเตรตเข้าสู่เซลล์สาหร่าย *Synechococcus* strain RF-1 เพิ่มขึ้น

4.6 สภาวะต่าง ๆ ที่ส่งผลให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. ทำงานได้สูงสุด

4.6.1 ตำแหน่งของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *Synechococcus* sp. อยู่ในส่วนของเมมเบรน เพราะเมื่อศึกษาหาแอคติวิตีของเอนไซม์จากส่วนที่เป็นเมมเบรนและส่วนไซโตพลาสซึม พบว่าเฉพาะส่วนของเมมเบรนเท่านั้นที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายชนิดอื่นๆ คือ *Ankistrodesmus braunii* ที่เอนไซม์อยู่ในส่วนไซโตพลาสซึมและเป็น assimilatory nitrate reductase (Herrero *et al*., 1980) แต่มีลักษณะเช่นเดียวกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแบคทีเรีย *Micrococcus denitrificans* ซึ่งเป็น respiratory nitrate reductase (Nar) และสามารถสกัดเอนไซม์ออกจากเมมเบรนได้โดยใช้สารดีเทอร์เจนต์ sodium deoxycholate (Lam and Nicholas, 1968) เช่นเดียวกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากแบคทีเรีย *Paracoccus denitrificans* ที่เป็น respiratory nitrate reductase และสกัดเอนไซม์จากเมมเบรนได้โดยใช้สาร non-ionic detergent Nonidet P-40 (Craske and Ferguson, 1986)

4.6.2 ผลของความเค็มในอาหารเลี้ยงสาหร่ายต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการศึกษาพบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ (6.25 และ 12.5 g/l) ที่เสริมลงไปในอาหารไม่มีผลให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสทำงานได้สูงสุด แต่มีผลกระตุ้นให้เอนไซม์ทำงานได้เร็วขึ้น สำหรับการศึกษาในพืชชั้นสูงพบว่า ความเค็มมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ประทุม ฤทธิสุนทร (2547) ทำการศึกษาผลของความเค็มต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าว โดยให้ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ในอาหารเป็น 25, 50, 75 และ105 mM สำหรับการปลูกข้าวสามสายพันธุ์ได้แก่ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, กู้เมืองหลวงและดอกพะยอม พบว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และกู้เมืองหลวงมีแอคติวิตีลดลงเมื่อได้รับเกลือความเข้มข้นตั้งแต่ 50 mM ขณะที่ข้าวพันธุ์ดอกพะยอมเกลือมีผลให้แอคติวิตีลดลงทุกความเข้มข้น และมีแอคติวิตีต่ำ

ที่สุดเมื่อเทียบกับข้าวอีกสองสายพันธุ์ และจากการศึกษาของ Ghoulam และคณะ (2002) ความเค็มมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในใบของ sugar beets และเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นส่งผลให้การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเช่นกัน เนื่องจากเกลือไปรบกวนการทำงานของเนื้อเยื่อบริเวณราก ทำให้การดูดซึมไนเตรตเข้าสู่ไซเลมลดลง ส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง (Silveira *et al*., 2001) แต่สำหรับสาหร่าย *Synechococcus* sp. ความเค็มที่มีในอาหารอาจจะไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์มากเท่ากับในพืชชั้นสูง เนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้อาศัยในสภาพแวดล้อมในธรรมชาติที่เค็ม และจากการศึกษาผลของความเค็มในอาหารต่อการเจริญเติบโต พบว่า ความเค็มสามารถกระตุ้นให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตที่ทนเค็มชนิด archaeon (*Haloarcula marismortui*) ที่เพาะลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 125 g/l

4.6.3 ผลของไนเตรตในอาหารเลี้ยงสาหร่ายต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 4.4, 8.8, 17.6 และ 35.2 mM เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า ความเข้มข้นไนเตรตในอาหารมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยไนเตรตความเข้มข้นสูงมีผลกระตุ้นให้เอนไซม์ทำงานได้ก่อนและดี แต่ไม่มีผลให้เอนไซม์ทำงานได้สูงสุด และเมื่ออาหารมีความเข้มข้นของไนเตรตต่ำส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำด้วยเช่นกัน แต่อาหารที่มีความเข้มข้นของไนเตรตเท่ากับ 17.6 mM มีผลให้เอนไซม์ทำงานได้สูงที่สุด จากการศึกษาของ Wang และคณะ (2003) ถ้าในอาหารไม่มีไนเตรตส่งผลลดการเกิดกระบวนการตรึงไนโตรเจนของสาหร่าย *Synechococcus* strain RF-1 แต่เมื่อมีไนเตรตในอาหารส่งผลให้เพิ่มอัตราการนำไนเตรตเข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น ชักนำให้การทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงขึ้น

ดังนั้นอาหารที่เลี้ยงสาหร่ายควรมีความเข้มข้นของไนเตรตที่ส่งผลให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์ทำงานได้สูงสุด คือ 17.6 mM

4.6.4 ผลของอายุของสาหร่ายต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. พบว่า เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่มีแอคติวิตีสูงที่สุดเป็นเอนไซม์ที่ได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้ 10 วัน (รูปที่ 3.18) โดยลักษณะการแสดงของเอนไซม์ในสาหร่ายชนิดนี้แตกต่างกับสาหร่าย *P. tenue* (Menegh.) ที่มีแอคติวิตีสูงสุดในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้ 2 วัน (สุพัตรา หนูนวล, 2549) และจากการศึกษาของ Campbell และคณะในปี 1984 ที่ได้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Chenopodium rubrum* และพบว่าวันแรก ๆ ซึ่งเป็นช่วง log phase จะมีอัตราการสร้าง

สารประกอบของไนโตรเจน (nitrogen assilmilation) มากที่สุด และในช่วงนี้จะมีการสะสมของคลอโรฟิลล์ โปรตีน เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส (glutamine synthetase) ในอัตราที่เร็วมาก

4.6.5 ผลของช่วงเวลาที่ได้รับแสงต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

จากการศึกษาเพาะเลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะที่มีความเข้มแสง 120 μphoton/m^2/s เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวันพบว่า ความมืดชักนำให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสทำงานได้ดีกว่าสภาวะที่มีแสง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Delrio และคณะ (1994) พบว่า การทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่ทนเค็มชนิด *Dunaliella salina* ชักนำให้แสดงออกได้ในช่วงที่ไม่มีแสง แต่ต่างจากผลการศึกษาในสาหร่าย *Kappaphycus alvarezii* พบว่า ในช่วงที่มีแสงแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงกว่าในช่วงที่ไม่มีแสง โดยแอคติวิตีสูงสุดเมื่อให้แสง 6 ชั่วโมง แล้วค่อย ๆ ลดลงต่ำสุดในช่วงที่ไม่มีแสง สำหรับในพืชชั้นสูงเช่น ข้าว แอคติวิตีของเอนไซม์สูงในช่วงที่มีแสงและต่ำสุดในช่วงมืด (เขมมิกา โขมพัตร, 2545)

4.6.6 pH ที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างเล็กน้อยคือในช่วง pH 8-9 ซึ่งสูงกว่าสภาวะที่สาหร่ายเจริญเติบโตในธรรมชาติเล็กน้อย คือ pH อยู่ในช่วง 6.6-6.8 และในสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงที่มี pH เป็น 7.4 แต่ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานใกล้เคียงกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ คือ สาหร่าย *P. tenue* ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 7.5 (สุพัตรา หนูนวล, 2549) เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายสีแดง *Porphyra yezoensis* ทำงานได้ดีที่ pH 8.3 (Nakamura and Ikawa, 1993) และเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายทะเล *K. alvarezii* สามารถทำงานได้ดีที่ pH 8.0 (Granbom, 2004) แต่ในแบคทีเรีย *Micrococcus denitrificans* เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสทำงานได้ดีที่ pH 6.3 (Lam and Nicholas, 1968)

4.6.7 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 35 และ 40 °C (รูปที่ 3.21) ซึ่งต่ำกว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue* ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 °C (สุพัตรา หนูนวล, 2549) เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสใน archaeon ที่เจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง คือ *P. aerophilum* ซึ่งมีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 75 °C (Afhar *et al*., 2001) หรือ archaeon ที่เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือ *Haloferax denitrifican* โดยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตนี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 80 °C (Hochstein and Lang, 1991) แต่สูงกว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *K. alverezii* ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 23 °C (Granbom, 2004) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะในธรรมชาติสาหร่าย *Synechococcus* sp. ที่เก็บจากบ่อน้ำร้อนเค็มสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงคือ 44.3 ถึง 46.1 °C (ตารางที่ 1.1) ดังนั้นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อยู่ในเซลล์ของสาหร่ายชนิดนี้จึงทำงานได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงและใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง

4.7 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

4.7.1 ผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการศึกษาพบว่า การเติม FAD หรือ molybdenum เพียงอย่างเดียวไม่มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเพิ่มขึ้น แต่ถ้าเติม FAD ร่วมกับ molybdenum อัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมี FAD และ molybdenum เป็นส่วนประกอบของโมเลกุล อาจมีการเสียโคแฟคเตอร์ระหว่างเตรียมสารสกัดเอนไซม์ ดังนั้นการเติม FAD และ molybdenum จึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นและการส่งผ่านอิเล็กตรอนภายในเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเป็นไปอย่างต่อเนื่องจึงทำให้เอนไซม์ต้องการทั้ง FAD และ molybdenum พร้อม ๆ กัน

4.7.2 ผลของ Hydroquinone ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการศึกษาเมื่อเติม Hydroquinone ลงในสารผสมสำหรับวิเคราะห์แอคติวิตี พบว่า Hydroquinone มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น โดยปกติที่ไม่เติมสาร Hydroquinone เอนไซม์จะใช้ reduced quinone ที่อยู่ในเมมเบรนเป็นสารให้อิเล็กตรอนโดยมี γ subunit เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจาก quinine แล้วส่งต่อไปยัง β และ α sununit เพื่อใช้อิเล็กตรอนในรีดิวซ์ไนเตรตให้เปลี่ยนเป็นไนไตรต์ (Blasco *et al*., 1992) ดังนั้นการเติม Hydroquinone เพิ่มเข้าไป สามารถส่ง

อิเล็กตรอนเพิ่มให้แก่เอนไซม์ทำให้เกิดการรีดิวซ์ของไนเตรตมากขึ้นทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น

4.7.3 ผลของ β-NADH และ β-NADPH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิดนี้ ไม่จำเป็นต้องรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH เพราะถึงแม้ว่าไม่มี NADH หรือ NADPH เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสยังสามารถทำงานได้ (รูปที่ 3.24) เพราะว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยทั่วไปที่เกาะติดกับเมมเบรนสามารถใช้ quinol เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ (Berks *et al.,* 1995) ดังนั้นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechocoocus* sp. ซึ่งอยู่ในรูปที่เกาะติดกับเมมเบรนจึงใช้ quinol ที่มีอยู่ในเมมเบรนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ แม้ว่าไม่ได้เติม NADH หรือ NADPH

4.7.4 ผลของ Methyl viologen ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

จากการศึกษาผลของ reduced methyl viologen ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส พบว่า เอนไซม์สามารถรับอิเล็กตรอนได้จาก methyl viologen ที่ถูกรีดิวซ์ด้วย sodium dithionite จากการศึกษาเอนไซม์ Nar ใน *Micrococcus denitrificans* พบว่า เอนไซม์ Nar บริสุทธิ์สามารถใช้ reduced benzyl viologen และ reduced methyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ (Lam and Nicholas, 1968) และจากการศึกษาของ Yoshimatsu และคณะ (2000) โดยทำการสกัดเอนไซม์ Nar ออกจากเมมเบรนของ *E.coli* ด้วยความร้อนทำให้เอนไซม์สูญเสีย γ subunit ไป ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนจาก duroquinone และ NADH ได้ แต่สามารถรับอิเล็กตรอนจาก methyl viologen ได้ โดยเอนไซม์ใช้สองอิเล็กตรอนที่ได้รับมาจาก methyl viologen ที่ถูกรีดิวซ์ด้วย dithionite ในการรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์

4.7.5 ผลของ Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$), Sodium thiocyanate (NaSCN), Arsenic trioxide (As_2O_3) และ Sodium azide (NaN_3) ต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งแอคติวิตี (inhibitor) ต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสพบว่า Sodium thiocyanate, Arsenic trioxide และ Sodium azide มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง 52.4, 69.6 และ 100 % ตามลำดับ แต่ Potassium ferricyanide ไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (รูปที่ 3.26) ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ สุพัตรา หนูนวล (2549) พบว่า NaN_3 ความเข้มข้น 0.2 mM มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ดีที่สุดโดยทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เหลือเพียง 41.67% ส่วน KCN และ NaSCN ที่ระดับความ

เข้มข้นเดียวกันมีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์เหลือ 47.62% และ 75.60% ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Yamamoto และคณะ (1986) พบว่า NaN_3 ความเข้มข้น 100 μM สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสใน *Mitsuokella multiacidus*. ได้ถึง 88% นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า KCN และ NaN_3 สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *A. braunii* ในช่วงสุดท้ายของปฏิกิริยา คือช่วง reduced methyl viologen-nitrate reductase (Herrero *et al.*, 1980)

4.7.6 ผลของอะซีโตนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

อะซีโตนที่ผสมในบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในสาหร่ายลดลงแปรผันตรงกับความเข้มข้นของอะซีโตนที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่านอก จากคุณสมบัติในการละลายไขมันแล้ว อะซีโตนยังมีคุณสมบัติทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ โดยทำให้โปรตีนเสียสภาพและยากต่อการกลับมาคืนรูปได้ (www.piercenet.com) ถ้าโปรตีนมีการเสียสภาพไปบางส่วนเมื่อเติมสารให้อิเล็กตรอนแก่เอนไซม์ส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น (บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของอะซีโตน 10-30%) แต่ถ้าโครงสร้างของเอนไซม์มีการเสียสภาพทั้งหมดทำให้เอนไซม์ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนจากสารให้อิเล็กตรอนได้ (บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของอะซีโตน 40%)

4.8 การศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสเมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เมื่อนำสารสกัดเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH และบัฟเฟอร์ MOPS-NaOH ที่มี 10% acetone บ่มที่อุณหภูมิ -80, -20, 4, 0, RT(30), 40, 50, 60 และ 70 ºC นาน 1 ชั่วโมง ก่อนวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์พบว่า การบ่มที่อุณหภูมิ 40 ºC นาน 1 ชั่วโมง มีผลให้การสกัดหยาบเอนไซม์ทั้งสองมีแอคติวิตีสูงขึ้น ขณะที่อุณหภูมิที่สูงกว่านี้ส่งผลให้แอคติวิตีลดลงและเสียสภาพในที่อุณหภูมิ 70 ºC เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเพิ่มพลังงานจลน์ช่วยทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรตได้เร็วขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกินไปมีผลทำโครงรูปของเอนไซม์เปลี่ยนไป ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดลงจนไม่สามารถย่อยสับสเตรตได้เมื่อเกิดการแปลงสภาพ (Nelson and Cox, 2005)

และอุณหภูมิที่ต่ำที่สุดคือ -80 ºC ส่งผลให้แอคติวิตีลดลงมีความเป็นไปได้ว่าการ freeze-thaw อาจทำให้เอนไซม์เสียโครงสร้างบางส่วนไป จึงทำให้การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรตลดลง

4.9 การศึกษาความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์เมื่อถูกบ่มที่อุณหภูมิ 40 ºC ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

เมื่อบ่มสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 40 ºC นาน 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที พบว่าบ่มที่เวลา 30 นาที มีผลให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นและลดลงเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น แอคติวิตีจะค่อย ๆ ลดลง (รูปที่ 3.32) เมื่อเอนไซม์ได้รับความร้อนนาน ๆ ส่งผลให้โครงรูปของเอนไซม์เปลี่ยนไปทำให้การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรตลดลง

4.10 การศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี ELISA แบบดัดแปลงตามวิธีของ Towbin และคณะ (1979)

เมื่อนำแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดมาทำปฏิกิริยา cross reaction กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายโดยดัดแปลงตามวิธีของ Towbin และคณะ (1979 พบว่าสามารถเกิด cross reaction ได้ (รูปที่ 3.30) จากผลการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. อาจจะมีลักษณะและลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าวโพด ทำให้แอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดสามารถจดจำลักษณะโมเลกุลของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของ *Synechococcus* sp. ได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Gruber และคณะ (1992) ที่ได้ศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย Volvox พบว่าลำดับกรดอะมิโนของส่วน FAD domain, heme, molybdenum-pterin มีความคล้ายคลึงกับในพืชชั้นสูงมาก แต่จะแตกต่างกันในส่วน N-terminal และส่วน hinge

4.11 จลนศาสตร์

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. มีค่า K_m สำหรับ $NaNO_3$ เท่ากับ 185 µM และค่า V_{max} เท่ากับ 200 µmole/min/mg protein จากการศึกษาใน Nar ในสิ่งมีชีวิต *Haloferax denitrificans* มีค่า K_m สำหรับ $NaNO_3$ เท่ากับ 0.2 mM (Hochstein and Lang, 1991) ส่วนใน *Haloferax volcanii* มีค่า K_m สำหรับ $NaNO_3$ เท่ากับ 0.36 mM ส่วนใน *Pyrobaculum aerophilum* มีค่า K_m สำหรับ $NaNO_3$ เท่ากับ 50 µM

4.12 การศึกษาวิธีการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

4.12.1 ผลของการเก็บรักษาสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการศึกษาวิธีการเก็บสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิห้อง, 4, -20 และ-80 ºC เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์พบว่า สารสกัดเอนไซม์ไม่สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิห้องนานเกิน 2 วัน เนื่องจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ทั้งนี้เพราะอุณหภูมิห้องเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ดังนั้นเมื่อเซลล์ตายจึงเกิดการย่อยสลายของจุลินทรีย์ สำหรับแอคติวิตีของสารสกัดหยาบที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, -20 และ -80 ºC ไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และสามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ โดยอุณหภูมิที่เก็บรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ดีที่สุดคือ 4 ºC รองลงมาคือ -20 และ -80 ºC ตามลำดับ เห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เย็นจัดส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอาจเกิดขึ้นมาจากการ freeze-thaw ซึ่งทำให้โครงรูปของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง

4.12.2 การเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสในกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

แอคติวิตีของสารสกัดหยาบเอนไซม์ เมื่อเก็บในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ -20 ºC สูงกว่าแอคติวิตีของสารสกัดที่อยู่ในบัฟเฟอร์ที่ไม่มีกลีเซอรอล แสดงว่ากลีเซอรอลสามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ จากการศึกษาของสุพัตรา หนูนวล (2549) เมื่อเก็บสารสกัดหยาบเอนไซม์ด้วยกลีเซอรอลความเข้มข้น 40% ที่อุณหภูมิ -80, -20 และ 4 ºC มีความเสถียรมากกว่าเก็บในบัฟเฟอร์ที่ไม่มีกลีเซอรอล เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จาก *Chlorella vulgaris* สามารถเก็บรักษาในกลีเซอรอล 50% ที่อุณหภูมิ -20 ºC ได้หลายเดือน (Solomonson *et al*., 1975)

4.12.3 ผลของการเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสใน L-Proline ที่ระดับความเข้มข้น 1 โมลาร์

จากการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเอนไซม์โดยเก็บสารสกัดหยาบเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี L-Proline ความเข้มข้น 1 M พบว่า L-Proline สามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีสารดังกล่าว Wang และคณะ (1999) เสนอแนะว่า Proline เป็นสารกลุ่มสาร osmolytes หรือ compatible solute ที่พืชสามารถสร้างขึ้นได้เพื่อตอบสนองต่อ abiotic ต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมที่อาจเป็นพิษต่อพืชได้ Hare และคณะ (1999) เสนอแนะว่า Proline มีคุณสมบัติป้องกันแรงดันออสโมติก ป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน ช่วยรักษาโครงรูปของเอนไซม์ รักษาแอคติวิตีของเอนไซม์และป้องกันเมมเบรนจากการทำลายของกระบวนการ reactive oxygen species (ROS) นอกจากพบว่า Proline ช่วยรักษาสภาพของเอนไซม์ไม่ให้เสียสภาพภายใต้

ภาวะการกดดันต่าง ๆ (Saunder *et al*., 2000) ด้วยคุณสมบัติที่น่าสนใจของ Proline จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

4.12.4 การเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์แบบแห้งจากวิธีการ freeze dry

เทคนิค Freeze-dry เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ทำให้สารแห้งโดยใช้ความเย็นเพื่อให้เก็บรักษาสารได้นาน ๆ จึงนำวิธีนี้มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส พบว่า เทคนิคดังกล่าวส่งผลให้แอคติวิตีลดลงมาก จึงไม่สามารถใช้วิธีดังกล่าวเก็บรักษาเอนไซม์ได้ เป็นไปได้ว่าความเย็นมีผลให้โครงสร้างของเมมเบรนและเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปทำให้การทำปฏิกิริยากับสับสเตรตลดลง

4.13 การศึกษาการโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน nar สำหรับเอนไซม์ NR ในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp.

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน nar สำหรับสาหร่าย *Synechococcus* sp. สามารถที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวได้บางส่วนซึ่งขนาดของยีนที่หาได้มีขนาด 534 bp สามารถแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน 178 residues และเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่นพบว่ามีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria มากที่สุด ซึ่งขนาดของลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีขนาดเล็กกว่าของยีน narβ ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacterium ชนิด *Oscillatoria chalybea* ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 737 residues (Unthan *et al*., 1996) และเล็กกว่าขนาดของยีน narβ ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacterium ชนิด *Synechococcus* sp. PCC 7942 มีลำดับกรด อะมิโน 2 ชุดคือ 715 และ 729 residues (Andriesse *et al*., 1990)

ส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 675 และ 748 bp ไม่มีความเหมือนกับยีน nar ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ แม้แต่สิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ยีนที่โคลนได้ในสาหร่าย *Synechococcus* sp. ไม่ใช่ ยีน nar และอาจเกิดจาก primer ที่ออกแบบไม่มีความจำเพาะกับยีน nar ที่จะเพิ่มจำนวน ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน nar ได้