บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ไนเตรตเป็นสารปนเปื้อนที่พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ ก่อให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสียส่งผลให้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำนั้นได้รับอันตราย นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำที่ใช้ในการเกษตร การปศุสัตว์ และน้ำอุปโภคบริโภคในครัวเรือน การปนเปื้อนของไนเตรตในแหล่งน้ำธรรมชาติเกิดจากสาเหตุหลัก คือ การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการเกษตรที่มากเกินไป การปลดปล่อยจากโรงงานอุตสาหกรรม ไอเสียรถยนต์ และของเสียจากสัตว์และมนุษย์ ทำให้เกิดการชะล้างลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ในประเทศแคนนาดา สหรัฐอเมริกา และหลายประเทศในทวีปยุโรป รวมถึงองค์การอนามัยสิ่งแวดล้อม (WHO) ได้กำหนดปริมาณไนเตรตในน้ำบริโภคไม่เกิน 10 mg/l (Ward *et al*., 2005) เมื่อมนุษย์ได้รับปริมาณไนเตรตที่สูงเกินไปก่อให้เกิดโรค methemoglobinemia ในทารก (blue baby syndrome) และโรคเกี่ยวกับระบบการหายใจในผู้สูงอายุ เนื่องจากไนเตรตที่เข้าสู่ร่างกายจะไปทำปฏิกิริยากับอะตอมเหล็กศูนย์กลางในฮีโมโกลบิน ทำให้ฮีโมโกลบินไม่สามารถขนส่งออกซิเจนได้ นอกจากนี้พบว่าการรับไนเตรตเป็นประจำหรือในปริมาณสูงอาจเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งหรือเนื้องอกที่อวัยวะต่าง ๆ ได้ เช่น ในท้อง ลำไส้ กระเพาะอาหาร ระบบท่อน้ำเหลือง และระบบเลือด เนื่องจากไนเตรตสามารถเป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารประกอบกลุ่ม *N*-nitroso (NOC) ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มสารพิษต่อยีน (genotoxic compound) และยังส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1 และอาจนำไปสู่โรคไทรอยด์ได้ (Ward *et al*., 2005) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบปริมาณไนเตรตในแหล่งน้ำธรรมชาติ และน้ำบริโภคในครัวเรือนเป็นประจำ เพื่อความปลอดภัยของสิ่งมีชีวิตและได้หาแนวทางในการกำจัด เพื่อลดปัญหาที่จะเกิดขึ้น ซึ่งวิธีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตในปัจจุบันมีหลายวิธีได้แก่ ion chromatography (Campbell *et al*., 2000) High Performance Liquid Chromatography (Xia *et al*., 2003) เทคนิค colorimetric ซึ่งใช้แคดเมี่ยมเป็นตัวรีดิวซ์ไนเตรตและการใช้กรดซาลิซิลิคในกรดกำมะถันเข้มข้นทำให้เกิดอนุพันธุ์ไนเตรต (Clesceri *et al*., 1989; Chinch *et al*., 1987) โดยเทคนิคดังกล่าวต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้นและไม่สามารถวิเคราะห์ในสถานที่จริงได้ การลงทุนสูง วิธีการวิเคราะห์ค่อนข้างยาก ผู้ปฏิบัติต้องมีความรู้และความชำนาญในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างดี ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ไม่มีความแม่นยำเท่าที่ควรถ้าในตัวอย่างมี

สารอื่นรบกวน และบางเทคนิคไม่สามารถวิเคราะห์ได้ถ้าตัวอย่างมีความขุ่นสูง มีอนุภาคอื่นปนเปื้อน และมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูง ๆ นอกจากนี้สารที่ใช้ร่วมในการวิเคราะห์มักเป็นอันตรายและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Champbell *et al*., 2000)

ปัจจุบันได้มีการปรับปรุงเทคนิคใหม่นำมาตรวจสอบปริมาณไนเตรต ซึ่งเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ได้ง่าย มีความจำเพาะและความแม่นยำสูง ราคาถูก และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม นั่นคือการใช้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเพื่อรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ โดยดูสีที่เกิดขึ้นเพื่อบ่งบอกปริมาณไนเตรตที่มีในตัวอย่างวิเคราะห์ โดยเตรียมเป็น sol-gel immobilized nitrate reductase (Aylott, 1997) หรือเป็น NR test kit (The Nitrate Elimination Company.,Inc.,NECi)

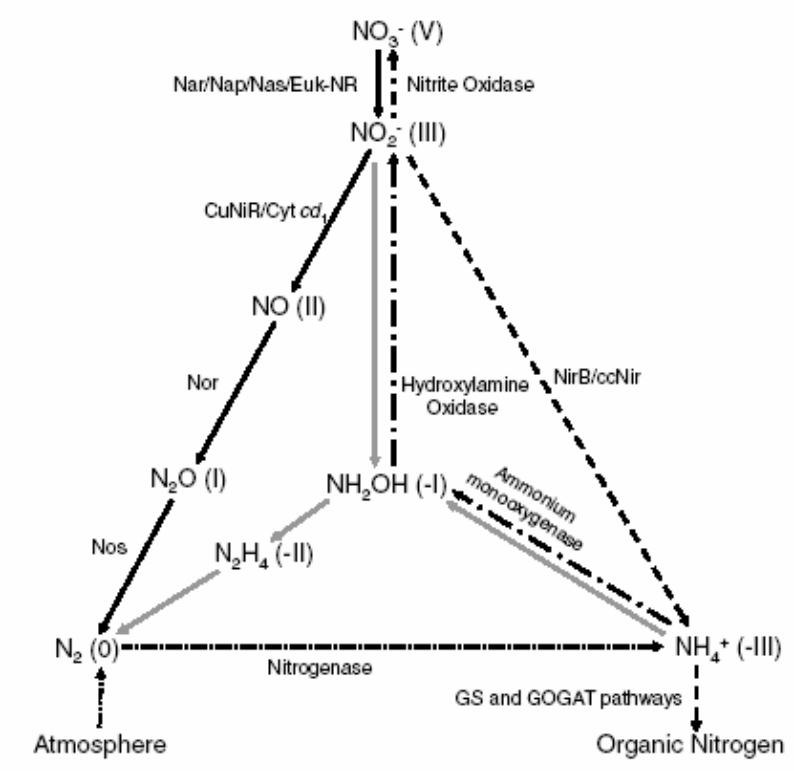
จากการศึกษาของ Campbell และคณะ (2001) พบว่าสามารถใช้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธ์จากใบข้าวโพดมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตในสิ่งแวดล้อมได้และสามารถนำมาใช้แทนการใช้เทคนิค colorimetric ซึ่งใช้แคดเมี่ยมเป็นตัวรีดิวซ์ไนเตรตและการใช้กรดซาลิซิลิคในกรดกำมะถันเข้มข้นทำให้เกิดอนุพันธุ์ไนเตรตได้ บริษัท NECi ได้ผลิต NR test kit จากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ซึ่งแยกได้จากใบของข้าวโพด โดยเทคนิค monoclonal antibody-based immunoaffinity chromatography (Campbell, 2002) และเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากใบของข้าวโพดมีค่า specific activity สูง (40-60 μmole/min/mg protein) มีความเสถียรสูงสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ จึงมีการผลิตในปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ผลิตชุดวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตในสิ่งแวดล้อม (Hyde *et al*., 1989)

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีความเสถียรสูงและคงทนต่อความร้อน จึงมีความน่าสนใจนำมาสร้างชุดทดสอบไนเตรตในสิ่งแวดล้อมได้ (Somer *et al*., 1997; Campbell, 2001) แหล่งของเอนไซม์ที่ทำงานได้ในที่อุณหภูมิสูง น่าจะได้จากสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณธารน้ำอุ่นหรือบ่อน้ำพุร้อน เช่น สาหร่ายชนิดต่าง ๆ

ผู้วิจัยเล็งเห็นว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีคุณสมบัติทำงานได้ดี และเสถียรที่อุณหภูมิห้องจึงมีความน่าสนใจ เนื่องจากสะดวกในการนำไปใช้และเก็บรักษาได้ง่าย เพื่อพัฒนาไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ไนเตรตโดยไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะเกิดประโยชน์ต่อชุมชนและสังคมโดยรวม งานวิจัยนี้จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากบ่อน้ำพุร้อนและคัดเลือกตัวอย่างสาหร่ายที่มีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย สภาวะที่ส่งผลให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายทำงานได้สูงสุด ศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส รูปแบบการเก็บรักษาเอนไซม์ และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน nar สำหรับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เพื่อเป็นประโยชน์และแนวคิดสำหรับผู้วิจัยที่จะศึกษาเรื่องนี้ต่อไปในอนาคต

2. การตรวจเอกสาร

ไนโตรเจนเป็นแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต เพราะเป็นสารประกอบของสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีนและกรดนิวคลีอิค ไนโตรเจนที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมอยู่ในรูปซึ่งมีประจุจาก +5 ถึง -3 โดยการเปลี่ยนรูปของไนโตรเจนเป็นไปตามวัฏจักรไนโตรเจน (nitrogen cycle) ดังรูปที่ 1.1 ซึ่งแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญในวัฏจักรนี้



รูปที่ 1.1 วัฏจักรไนโตรเจน (nitrogen cycle)
ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไนโตรเจนเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ในวงเล็บแสดงถึงเลขออกซิเดชั่นของสารประกอบแต่ละตัว เส้นทึบ แสดงวิถีการหายใจ (denitrification) เส้นประ แสดงกระบวนการ dissimilatory และ assimilatory ammonification (กระบวนการรีดักชั่นไนเตรต แสดงโดยลูกศรทึบ) เส้นจุด แสดง nitrogen fixation เส้นประจุด แสดงกระบวนการ nitrification และเส้นทึบสีเทา แสดง ปฏิกิริยาของเอนไซม์ ammonium monooxygenase (ANAMOX)

ที่มา Gonzalez *et al*. (2006)

ปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนเตรต (nitrate reduction) มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรไนโตรเจนและมีความสำคัญทางการเกษตร สิ่งแวดล้อม และเกี่ยวกับสุขภาพของมนุษย์ ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นได้โดยสิ่งมีชีวิตกลุ่มแบคทีเรีย, เชื้อรา, สาหร่าย และพืช

Nitrate reduction ในสิ่งมีชีวิตมีประโยชน์ 3 ประการคือ

1.ใช้ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโต (nitrate assimilation)

2.ทำให้เกิดพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (nitrate respiratory)

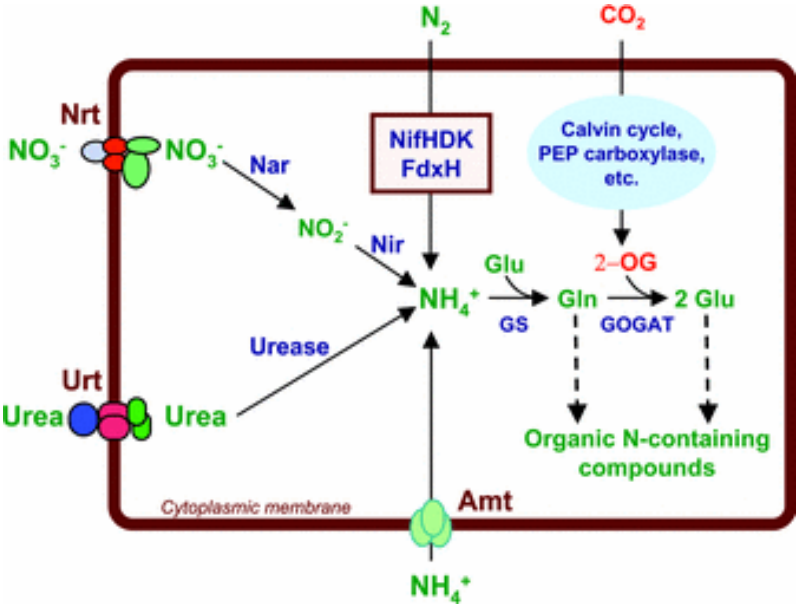
3.ทำให้เกิดการสลายตัวของไนโตรเจนที่เหลือเพื่อความสมดุล (nitrate dissimilation) (Moreno-Vivian *et al*., 1999)

nitrate assimilation ในสิ่งมีชีวิตต้องอาศัยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาดังรูปที่ 1.2 เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีดังกล่าวและเป็นตัวควบคุมความเร็วของปฏิกิริยา (rate-limiting step) มีความสำคัญโดยเปลี่ยนไนเตรต (NO_3^-) เป็นไนไตร์ต (NO_2^-) และไนไตร์ตถูกเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียม ซึ่งจะใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจนอื่นต่อไป (Campbell, 1999)

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมี 4 ชนิด คือ

1. Eukaryotic assimilatory nitrate reductase
2. Cytoplasmic assimilatory nitrate reductase (Nas)
3. Membrane-bound respiratory nitrate reductase (Nar)
4. Periplasmic dissimilatory nitrate reductase (Nap)

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสชนิดที่ 1 พบในสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต และชนิดที่ 2-4 พบในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต (Moreno-Vivian *et al*., 1999)



รูปที่ 1.2 วิถีการใช้ไนเตรต (Nitrate assimilation pathway) ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria สารประกอบไนโตรเจนต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงเป็นแอมโมเนียม แล้วแอมโมเนียมเข้าร่วมในวิถี glutamine synthetase-glutamate synthase เพื่อสร้างสารประกอบกลูตามีนและกลูตาเมต สารประกอบไนโตรเจนจากกลูตามีนและกลูตาเมตเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนต่อไป Nrt คือ ตัวขนส่งไนเตรตและไนไตรต์ชนิด ABC Urt คือ ตัวขนส่งยูเรียชนิด ABC Amt คือ เอนไซม์ ammonium permease Nar คือ เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส Nir คือเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส NifHDR คือเอนไซม์ nitrogenase complex FdxH คือ heterocyst-specific ferredoxin PEP carboxylase คือ phosphoenolpyruvate carboxylate 2-OG คือ 2-Oxoglutarate GS คือ เอนไซม์ glutamine synthetase GOGAI คือ glutamine synthase

ที่มา Flores and Herrero (2005)

1. Eukaryotic assimilatory nitrate reductase

Campbell (1999)ได้รายงานว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต เป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการนำไนเตรตไปใช้ และเป็นตัวควบคุมความเร็วของปฏิกิริยา ในพืชชั้นสูงพบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในรากและใบ เอนไซม์จะถูกชักนำโดยไนเตรตถ้าปริมาณไนเตรตสูงทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงด้วย

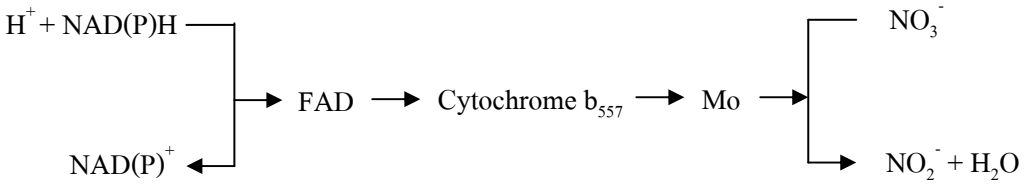
1.1 โครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในยูริคาริโอตเป็น soluble enzyme พบในส่วนไซโทซอล โครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วยสองหน่วยย่อยที่เหมือนกัน จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ประกอบด้วย 900 residues ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยมีขนาดประมาณ 100 KDa ประกอบด้วย FAD domain, heme (cyt b557) domain และ molybdenum domain (Mo–pterin) ในอัตราส่วน 1:1:1 ดังรูปที่ 1.3 (Redinbaugh and Campbell, 1985 ; Campbell, 2001)

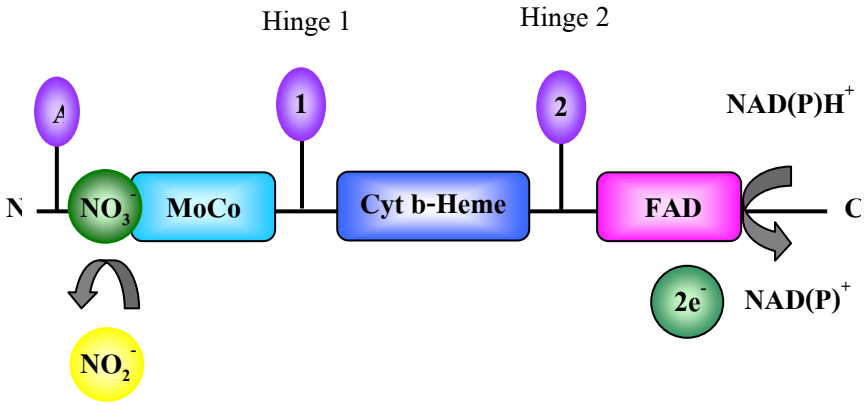
Campbell (1996) ได้แบ่งเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเป็นสองส่วนตามตำแหน่งที่เร่งปฏิกิริยา คือ

1) บริเวณที่มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก NADH ไปยัง FAD เพื่อเริ่มต้นในการขนส่งอิเล็กตรอนผ่าน heme-Fe ไปยัง Molybdate- Molybdopterin

2) บริเวณที่ไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์



บริเวณที่ 1 บริเวณที่ 2



N	N-terminus
A	Acedic N-terminal region
C	C-terminus
1	Hinge 1
2	Hinge 2
MoCo	Molybdate/Molybdopterin binding-site
NO_3^-	Nitrate binding and reduction site
FAD	FAD-binding site
Cyt b-Heme	Cytochrome b fragment and Heme-Fe binding site

รูปที่ 1.3 โครงสร้างของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต ประกอบด้วย FAD domain heme (cyt b557) domain และmolybdenum domain ทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ ที่มา Campbell (1999)

1.2 หน้าที่และการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสทำหน้าที่เร่งการรีดิวซ์ด้วยสองอิเล็กตรอน เพื่อเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ โดยใช้ pyridine nucleotide เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ซึ่งเป็นกลไกการใช้ไนโตรเจนในพืชชั้นสูง รา และสาหร่าย (Campbell,1999) ควบคุมการเปลี่ยนสารอนินทรีย์ให้เป็นสารอินทรีย์ในพืช (Beever and Hageman, 1969)

Campbell (1999) จำแนกรูปแบบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยพิจารณาจากลักษณะการรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH หรือการมีคุณสมบัติ NAD(P)H bispecific โดยแบ่งได้ 3 รูปแบบ คือ

1.NADH-NR (EC 1.6.6.1) เป็นชนิดที่พบในพืชชั้นสูงและสาหร่าย รับอิเล็กตรอนจาก NADH

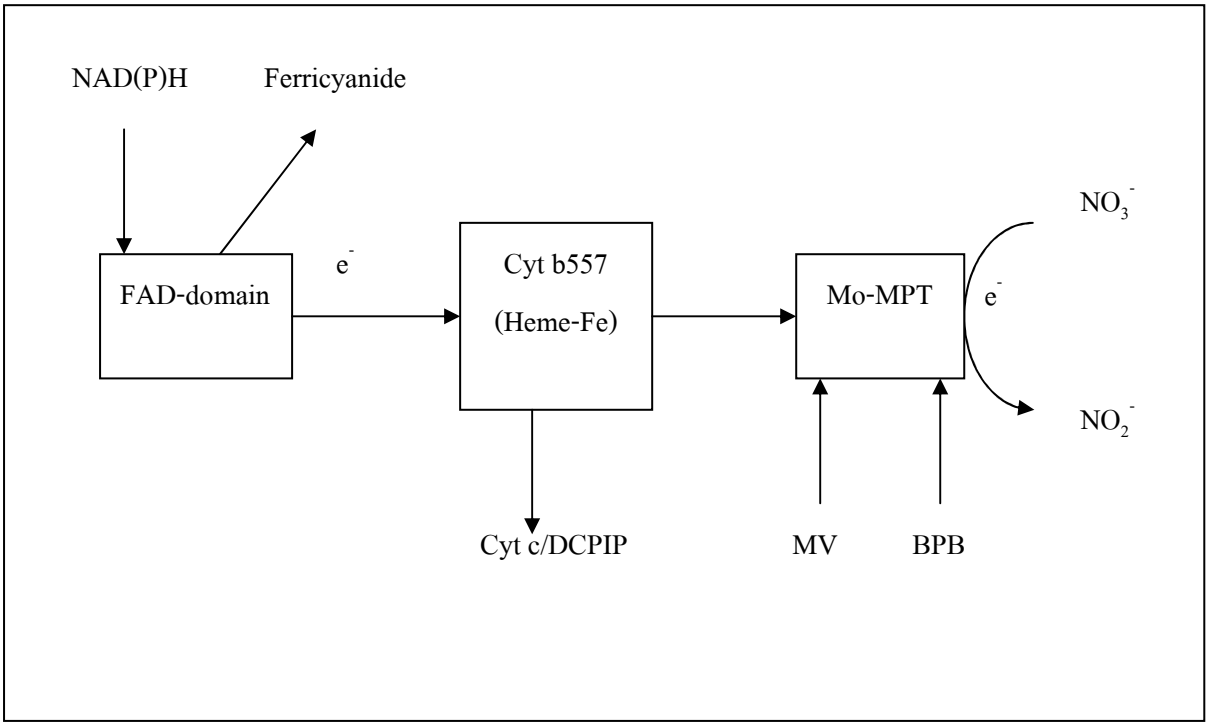
2.NAD(P)H-NR (EC 1.6.6.2) เป็นชนิดที่พบในพืชชั้นสูง สาหร่าย และรา มีสมบัติเป็น bispecific คือ รับอิเล็กตรอนได้ทั้งจาก NADH และ NADPH

3.NADPH-NR (EC 1.6.6.3) เป็นชนิดที่พบเฉพาะในราและมีความจำเพาะต่อ NADPH

นอกจากการจำแนกรูปแบบการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ตามรูปแบบดังกล่าวแล้ว เอนไซม์มีการทำงานได้เป็นส่วนย่อยโดยเรียกว่า partial activity (Kramer *et al*., 1987) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากตำแหน่งการเร่งที่จำเพาะเฉพาะบางส่วนบนโมเลกุลของเอนไซม์แล้ว สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มกว้าง ๆ (รูปที่ 1.4) คือ

1. NADH dehydrogenase ซึ่งจะเกิดรีดักชันของ ferricyanide จากการทำงานของเอนไซม์ NADH : ferricyanide reductase หรือรีดักชั่นของ cytochrome c จากการทำงานของเอนไซม์ NADH : cytochrome c reductase หรือรีดักชั่นของ dichlorophenol indophenol จากการทำงานของเอนไซม์ NADH : dichlorophenol indophenol reductase

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



Cyt c = cytochrome c

DCPIP = dichlorophenol indophenol

MV = reduced methyl viologen

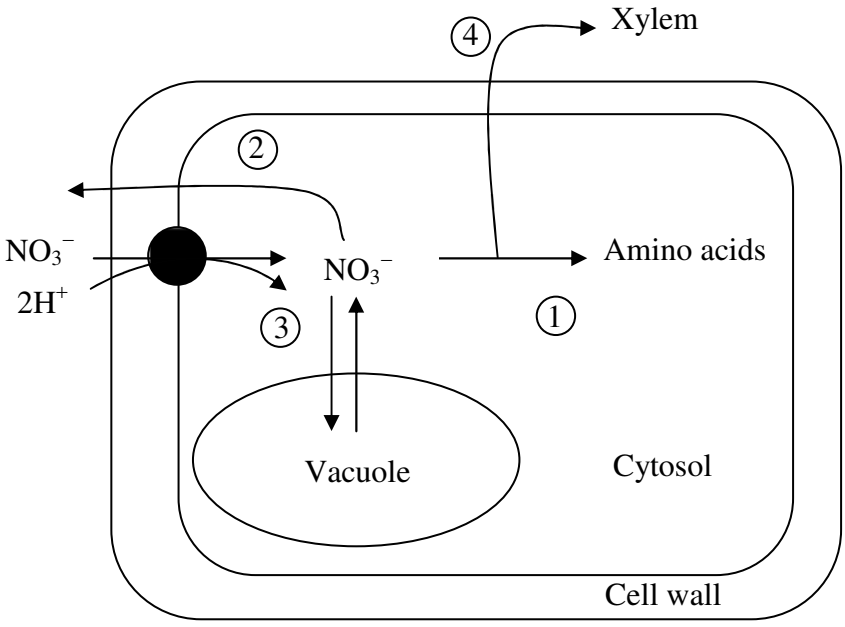
BPB = reduced bromphenol blue

รูปที่ 1.4 โครงสร้างของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส แสดงตำแหน่งรับ-ส่งอิเล็กตรอนระหว่างศูนย์เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสารต่างๆ

ที่มา Kramer *et al*. (1987)

1.3 ระบบการขนส่งและการใช้ไนเตรตในพืช

จากการศึกษาของ Crawford and Glass (1998) พบว่า ไนเตรตที่ละลายอยู่ในดินจะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์รากและมีการขนส่ง 4 ทางคือ 1) เปลี่ยนเป็นไนไตรต์โดยอาศัยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อยู่ในไซโทพลาสซึม 2) นำกลับออกข้างนอกเซลล์ผ่านพลาสมาเมมเบรนไปยัง apoplasm 3) นำเข้าไปในเซลล์และเก็บไว้ในแวคิวโอล หรือ 4) ขนส่งไปยังใบและยอดโดยผ่านทางไซเลม (xylem) ซึ่งเป็นการขนส่งในระยะยาว (long-distance translocation) ดังรูปที่ 1.5 สำหรับการขนส่งแบบสุดท้ายพบว่า ไนเตรตจะออกจากไซเลมผ่าน leaf apoplasm เข้าสู่เซลล์ชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll cells) ของใบเพื่อดูดซึมไนเตรตอีกครั้ง และอาจเปลี่ยนเป็นไนไตรต์หรือเก็บไว้ในแวคิวโอล แม้กระบวนการขนส่งและดูดซึมไนเตรตในใบจะน้อย แต่ไนเตรตที่ความเข้มข้นสูงที่อยู่ในของเหลวภายในไซเลม (xylem sap) และที่ระดับต่ำในโฟลเอม (phloem) ถือว่ามีความสำคัญต่อการดูดซึมไนเตรตทั้งสิ้น



รูปที่ 1.5 เส้นทางการเข้า-ออกของไนเตรต (NO_3^-) ภายในเซลล์
ที่มา Crawford and Glass (1998)

การขนส่งไนเตรตเข้าสู่เซลล์พืชจะต้องอาศัยตัวขนส่งไนเตรต (nitrate transporter) ซึ่งจะอยู่ที่เมมเบรน ตัวขนส่งไนเตรตดังกล่าวมียีน 2 กลุ่มควบคุม ได้แก่ 1) *RT*2 เป็น high-affinity carrier ประกอบด้วยกรดอะมิโน 503-507 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 54-55 KDa และ 2) *NRT*1 เป็น dual- or low-affinity transporter ประกอบด้วยกรดอะมิโน 590 ตัว

จากการศึกษาโดย Chrispeels และคณะ (1999), Forde (2000) และ Glass และคณะ (2001) พบว่าระบบการขนส่งไนเตรตในรากพืชประกอบด้วย 3 ระบบ คือ

ระบบที่ 1 inducible high-affinity transport system (iHATS) ระบบนี้จะทำงานเมื่อได้รับการชักนำจากไนเตรต หรือไนไตรต์ภายนอก ลำต้น และถูกควบคุมโดยระดับไนเตรตในเนื้อเยื่อหรือผลผลิตที่ได้จากกระบวนการใช้ไนเตรตในพืช ความเข้มข้นไนเตรตที่เหมาะสมจะอยู่ระหว่าง 0.2-0.5 mM, K_m 10-100 μM

ระบบที่ 2 constituitive high-affinity transport system (cHATS) เป็นระบบที่ทำงานได้เอง แม้ว่าไม่มีไนเตรตจากภายนอกมากระตุ้นและมีความจำเพาะต่อไนเตรตสูง นอกจากนี้ในพืชบางชนิดพบว่าแอคติวิตียังสามารถกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้หลายเท่าเมื่อได้รับไนเตรต

ระบบที่ 3 low-affinity transport system (LATS) เป็นระบบที่ทำงานได้เองแต่ต้องมีระดับไนเตรตภายนอกเข้มข้นมากกว่า 1 mM

ในธรรมชาติพบว่า การนำไนเตรตเข้ามาใช้ในเซลล์พืชจะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของระบบการขนส่งไนเตรตทั้ง 3 ระบบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดซึมและขนส่งไนเตรตในต้นพืช ซึ่งจะแตกต่างกันตามชนิดของพืชด้วย

1.4 การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แบ่งได้เป็น 2 ระดับ คือ ระดับ transcription และระดับ protein turnover (Hoff *et al*., 1995; Crawford, 1995) ทั้งนี้ Douglas และคณะ (1995) Bachmann และคณะ (1996) Su และคณะ (1996) และ Lillo และคณะ (1997) แสดงให้เห็นว่า post-translation modification ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีกระบวนการ phosphorylation ซึ่งเป็นกระบวนการหลักในการควบคุมแอคติวิตีของเอนไซม์ สำหรับปฏิกิริยาการเกิด phosphorylation และ dephosphorylation ของเอนไซม์นี้มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง โดย protein phosphatase ทำหน้าที่ในการตัดหมู่ฟอสเฟต โปรตีนนี้ถูกกระตุ้นโดยแสงในขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีน (Huber *et al*., 1992) นอกจากนี้ยังพบว่ามี inhibitor protein ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสภาวะที่มี divalent cations เช่น Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} ภายหลังจากเอนไซม์ถูกเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่ง Ser-543 แล้ว ต่อมาพบว่า inhibitor protein ดังกล่าวคือ โปรตีน 14-3-3 (Bachmann *et al*., 1996; Moorhead *et al*., 1996) จากการศึกษาของ

Weiner และKaiser (1999) ในใบผักโขมพบว่า โปรตีน 14-3-3 มีบทบาทในการสลายเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และได้ตรวจสอบการจับกันของโปรตีน 14-3-3 กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดจากใบผักโขม พบว่าหมู่ฟอสเฟตของโปรตีน 14-3-3 จะจับกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (phospho-NR) บริเวณเซรีนตำแหน่งที่ 543 (Ser^{543}) และการจับกันของโปรตีนและเอนไซม์ดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของช่วงแสง (light/dark transition) ส่งผลให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีแอคติวิตีต่ำ (low activity) ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ได้ (MacKintosh *et al*., 1995)

2. Prokaryotic nitrate reductase

2.1 Cytoplasmic assimilatory nitrate reductase (Nas)

2.1.1 โครงสร้างและสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์

Nas แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ (รูปที่ 1.6)

1. ferredoxin หรือ flavodoxin-dependent Nas

2. NADH-dependent Nas

Nas ทั้งสองชนิดมี MGD (*bis* – molybdopterin guanine dinucleotide) เป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) และ N-terminal มีหมู่ iron-sulfur แต่ไม่มีหมู่ heme ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (eukaryote) เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในพวกไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ซึ่งเป็น ferredoxin-Nas ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเดี่ยวขนาด 75-85 KDa (Mikami and Ida, 1984; Rubio *et al*., 1996) ในขณะที่ flavodoxin-Nas ของ *Azotobacter vinelandii* เป็นโพลีเปปไทด์ที่มีขนาด 105 KDa (Gangeswaran and Eady, 1996) และเป็นเอนไซม์ flavodoxin-Nas ชนิดเดียวกันกับที่พบใน *Azotobacter chroococcum*, *Clostridium perfringens* และ *Ectothiohodospira shaposhnikovii* (Guerrero *et al*., 1981) แต่แตกต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่พบใน *Klebsiella pneumoniae* (Lin *et al*., 1994) และใน *Rhodobacter capsulatus* (Blasco *et al*., 1997) ซึ่งเป็น NADH-Nas ที่มีลักษณะเป็น heterodimer ประกอบด้วย ส่วนที่เป็น diaphorase ที่มี FAD เป็นโคแฟคเตอร์ มีขนาด 45 KDa และส่วนที่เป็นหน่วยย่อยที่ทำปฏิกิริยา (catalytic subunit) มีขนาด 95 KDa โดยในส่วนนี้จะมี MGD เป็นโคแฟคเตอร์และ มี N-terminal ที่มีศูนย์กลางเป็นหมู่ [4Fe-4S]

ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม archaea ที่ทนเค็มได้ เช่น *Haloferax mediterranei* ซึ่งเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจน พบว่า Nas มีลักษณะเป็น dimer ที่มีขนาด 105 และ 50 KDa ไม่สามารถใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ใช้ ferredoxin ได้ (Martinez-Espinosa *et al*., 2001)

แสดงว่า Nas ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม archaea มีลักษณะแตกต่างจาก Nas ของแบคทีเรีย เพราะ ferredoxin-Nas ของแบคทีเรียมีลักษณะเป็นหน่วยเดี่ยว (monomer) แต่ถ้าเป็น NADH-Nas จะมีลักษณะเป็น heterodimers (Moreno-Vivian *et al*., 1999) จากการศึกษาสมบัติของ Nas ใน *H. mediterranei* ได้ค่า K_m สำหรับไนเตรตเป็น 0.95 mM อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เมื่อมี NaCl ความเข้มข้น 3.1 M คือ 80 ºC แต่ถ้ามี NaCl 1.3 M จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 ºC โดยการทำงานของเอนไซม์ถูกชักนำได้ด้วยไนเตรต และกดได้ด้วยแอมโมเนียมเช่นเดียวกับในแบคทีเรีย (Martinez-Espinosa *et al*., 2001)

จากการศึกษาของ Blasco และคณะ (1997) พบว่า Nas ใน *R. capsulatus* ถูกยับยั้งได้ด้วยไซยาไนด์ (cyanide) และเอไซด์ (azide) แต่ไซยาเนต (cyanate) และคลอเรต (chlorate) ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ นอกจากนี้ NADH ยังมีผลทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนโดยการทำให้เกิด superoxide anion ตรงตำแหน่งที่เป็น diaphorase flavin ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase

2.1.2 การขนส่งไนเตรตในระบบ Nas ของแบคทีเรีย

เนื่องจาก Nas เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ดังนั้นจึงต้องมีการขนส่งไนเตรตเข้ามาภายในเซลล์ ดังรูปที่ 1.6 โดยการขนส่งในแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้ตัวขนส่งชนิด ABC (ABC-type transporter) ซึ่งเป็นโปรตีนที่จับอยู่กับเพอริพลาสมิกเมมเบรน (periplasmic membrane) จากการศึกษาใน *Synechococcus* พบว่าตัวขนส่งไนเตรตประกอบด้วยโปรตีนที่จับอยู่กับเพอริพลาสมิกเมมเบรน (ถอดรหัสจาก *nrtA* gene) โปรตีนที่อยู่ในเมมเบรน (ถอดรหัสจาก *nrt B* gene) และโปรตีน 2 ตัวที่จับอยู่กับ ATP (ถอดรหัสจาก *nrt C* และ *nrtD*) (Luque and Herrero, 1994; Omata, 1995) ซึ่งผลที่ได้เหมือนกับกลุ่มยีน *nrt* ที่ได้จากศึกษาใน *Synechocyti*s (Kaneko *et al*., 1996), *Anabaena* (Cai and Wolk, 1997; Frias *et al*., 1997) *Phormidium laminosarum* (Merchan *et al*., 1995) สำหรับการศึกษาใน *Klebsiella* พบว่า ตัวขนส่งชนิด ABC (ถอดรหัสจาก Nas FED genes) ประกอบด้วยโปรตีนที่มีขนาด 46 KDa จับอยู่กับเพอริพลาสมิกเมมเบรน (ถอดรหัสจาก Nas F gene) โปรตีนสองตัวที่จับอยู่กับ ATP (ถอดรหัสจาก Nas D gene) (Lin and Steward, 1998; Wu and Steward, 1998)

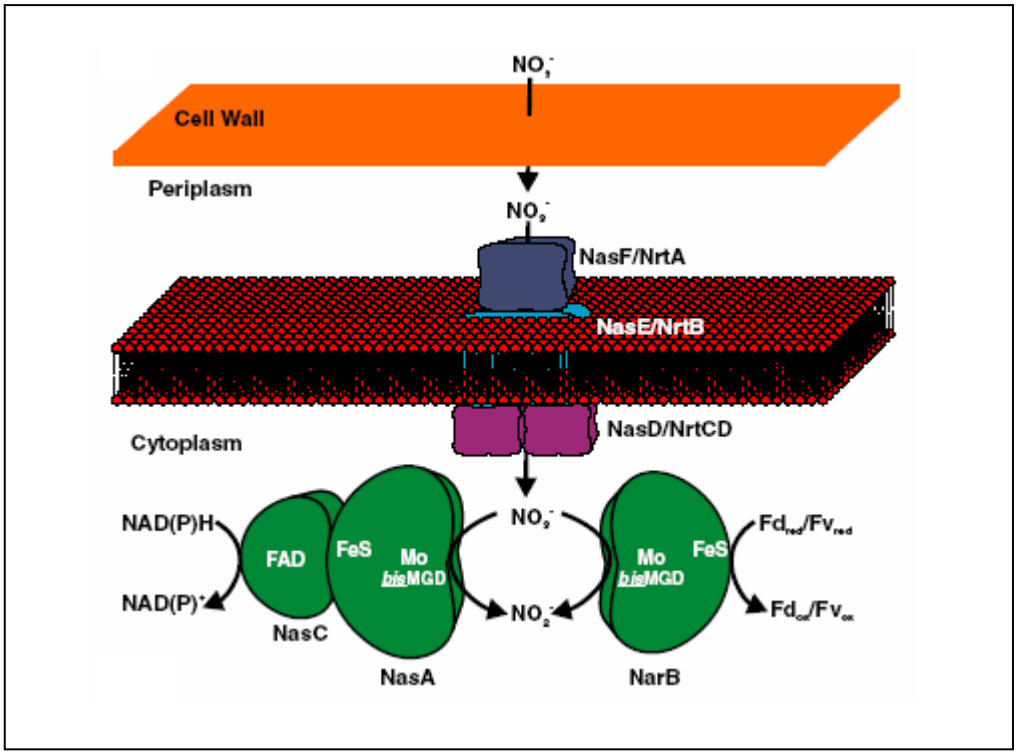
2.1.3 การควบคุมการแสดงออกของ Nas

จากการศึกษาการแสดงออกของ *nas* gene ใน *K. pneumoniae* พบว่าการแสดงออกของ *nas* gene ถูกควบคุมด้วย 2 ระบบ คือ

1. การกด (repression) ด้วยแอมโมเนีย ซึ่งเป็นระบบการควบคุมการใช้ไนโตรเจนทั่วไป (Ntr) โดย Ntr จะควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ทั้งหลายที่เกี่ยวกับการใช้แหล่ง

ไนโตรเจน ในระหว่างที่แบคทีเรียเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมที่มีไนโตรเจนจำกัด โดยจะมีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับโปรตีน NtrC ซึ่งเป็นการกระตุ้น NtrC ให้จับกับตำแหน่งที่เป็น upstream ของ promoter จึงกระตุ้น transcription ของ gene ที่ควบคุม Ntr (Merrick and Edwards, 1995)

2. การชักนำด้วยไนเตรตหรือไนไตรต์ต่อการแสดงออกของ *nas* genes ใน *Klebsiella* ผ่านโปรตีน NasR เป็นการควบคุมทางบวกที่ทำให้เกิด transcription น้อยลง โดยในสภาวะที่ไม่มีไนเตรตหรือไนไตรต์จะมีปัจจัยที่ทำให้ไม่เกิด transcription ของ *nas* gene แต่เมื่อมีไนเตรตหรือไนไตรต์ จะไม่มีปัจจัยดังกล่าว ทำให้มีการแสดงออกของ *nas* gene ได้ ดังนั้นการควบคุมด้วยไนเตรตไม่ได้เป็นการควบคุมจุดเริ่มต้นของ transcription แต่เป็นการควบคุมจุดสิ้นสุด (Lin and Stewart, 1996)



รูปที่ 1.6 การเกิด assimilation ของไนเตรตในแบคทีเรีย

ขวา : ferredoxin (Fd)-dependent assimilatory nitrate และ nitrite reductase จาก cyanobacteria

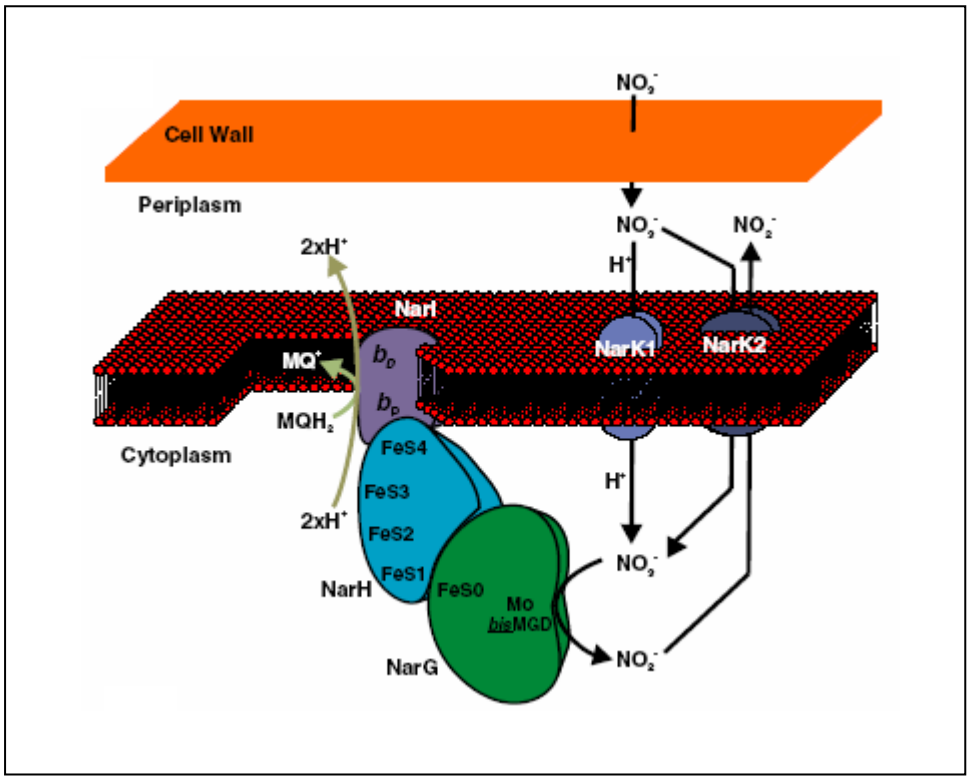
ซ้าย : NADH-dependent nitrate จาก *Klebsiella* และ *Rhodobacter*

ที่มา Gonzalez *et al.* (2006)

2.2 Respiratory membrane-bound nitrate reductase (Nar)

2.2.1 โครงสร้างและสมบัติทางชีวเคมีของ Nar

Nar เกี่ยวข้องกับกระบวนการ nitrate respiration ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic nitrate respiration) ดังรูปที่ 1.7 Ramirez และคณะ (1998) ได้มีการทำบริสุทธิ์ Nar จากแบคทีเรียที่ทนร้อนได้คือ *Thermus thermophilus* พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 80 ºC และจากการศึกษา Nar ใน *E. coli* พบว่ามีไอโซไซม์ 2 ชนิด คือ NRA จะแสดงออกภายใต้สภาวะที่มีไนเตรตแต่ไม่มีออกซิเจนคิดเป็น 90% ของแอคติวิตีทั้งหมด และ NRZ ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (Blasco *et al*., 1992; Bonnefoy *et al*., 1994)



รูปที่ 1.7 กระบวนการ respiratory nitrate reduction โดยเอนไซม์ Respiratory membrane-bound nitrate reductase (Nar)

ที่มา Gonzalez *et. al*. (2006)

กระบวนการ nitrate respiration เกี่ยวข้องกับ Nar ซึ่งประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย (รูปที่ 1.8) คือ

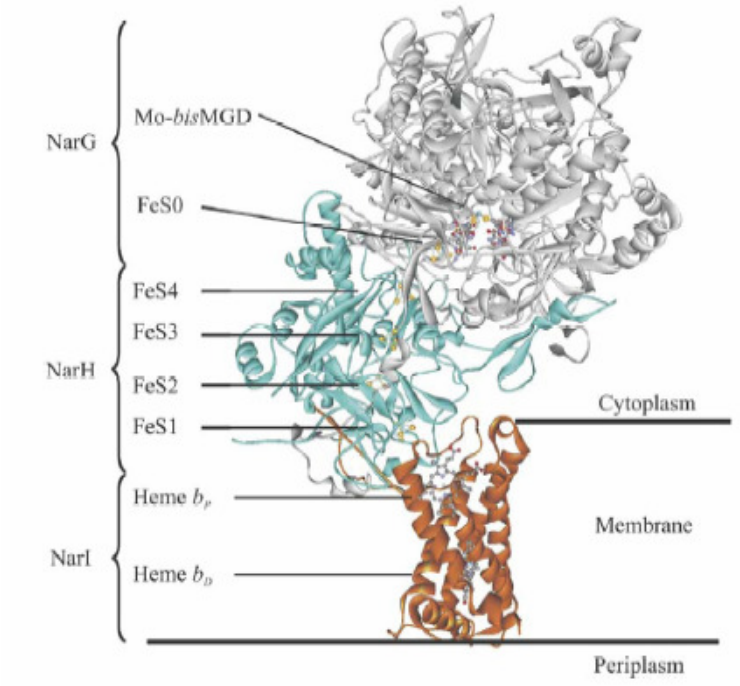
1. หน่วยย่อย γ (NarI) มีขนาดประมาณ 9 ถึง 25 KDa ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจากรีดิวซ์ควินอลที่อยู่ในเมมเบรน

2. หน่วยย่อย β (NarH) มีขนาดประมาณ 52 ถึง 64 KDa มี [3Fe-4S] 1 ชุด และ [4Fe-4S] 3 ชุด เป็นศูนย์กลาง ทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนจาก NarI ไปยัง NarG

3. หน่วยย่อย α (NarG) มีขนาดประมาณ 112 ถึง 140 KDa มี MGD เป็นโคแฟค-เตอร์ ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจาก NarH และรับโปรตอนจากไซโตพลาสซึมเพื่อรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์

หลังจากนั้นไนไตรต์จะถูกขนส่งออกนอกเซลล์โดยโปรตีน NarK

หน่วยย่อย α และ β เป็นส่วนที่ละลายได้ (soluble) โดยมีส่วนหนึ่งอยู่ในส่วนไซโตพลาสซึมและอีกส่วนติดกับเมมเบรน ขณะที่หน่วยย่อย γ เป็นส่วนที่ฝังอยู่ในเมมเบรนและจะหลุดออกมาได้เมื่อใช้ดีเทอร์เจนต์หรือใช้ความร้อน แต่หน่วยย่อยนี้จะไวต่อความร้อนและเสียสภาพได้ง่ายในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ (Blasco *et al*., 1992)



รูปที่ 1.8 โครงสร้างแบบ 3 มิติของเอนไซม์ NarGHI ใน E.*coli* K 12
ลูกศรแสดงชื่อของแต่ละหน่วยย่อย และโคแฟคเตอร์
ที่มา Gonzalez *et al*. (2006)

โดยทั่วไปเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ที่เกาะติดกับเมมเบรนสามารถรีดิวซ์คลอเรตและถูกยับยั้งได้ด้วยเอไซด์, คลอเรต, ไซยาไนด์และไธโอไซยาเนต (Hochstein and Tomlinson, 1988)

เอนไซม์ Nar ใช้ควินอลเป็นตัวให้อิเล็กตรอนและทำให้เกิด proton motive force (PMF) โดย NarI จะออกซิไดส์ควินอลตรงตำแหน่งที่ติดกับเพอริพลาสซึมของเมมเบรนจึงปล่อยโปรตอน 2 ตัวเข้าสู่ด้านเพอริพลาสซึม ส่วนอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปรีดิวซ์ไนเตรตโดยรับโปรตอน 2 ตัวจากด้านไซโตพลาสซึม จึงเกิดความต่างศักย์ระหว่าง 2 ด้านของ NarI ซึ่งเรียงตัวขวางเมมเบรนอยู่ทำให้ขนส่งอิเล็กตรอนผ่านเมมเบรนได้ (Berks *et al*., 1995)

จากการศึกษาเอนไซม์ Nar ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม archaea หลายชนิด เช่น Nar ของ *Haloferax denitrificans* ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีขนาด 116 และ 60 KDa มีค่า K_m สำหรับไนเตรตเป็น 0.2 mM มีความเสถียรเมื่อไม่มีเกลือและแอคติวิตีจะลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือมากขึ้น (Hochstein and Lang, 1991) ส่วน Nar ใน *Haloferax volcanii* มีลักษณะเป็น trimer ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีขนาด 100, 61 และ 31 KDa แอคติวิตีของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับเกลือ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้คือ 80 ºC มี K_m สำหรับไนเตรตเป็น 0.36 mM นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสมบัติของ Nar ในสิ่งมีชีวิตกลุ่ม archaea ที่ทนร้อนได้ คือ *Pyrobaculum aerophilum* พบว่าเอนไซม์ Nar ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือหน่วยย่อยที่มีขนาด 130, 52 และ 32 KDa โดยมีโมลิบดินัม (molybdenum), เหล็ก (iron) และ ไซโตโครม บี (cytochrome *b*) เป็นโคแฟคเตอร์สามารถใช้ benzyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ไนเตรตและคลอเรตได้ โดย K_m สำหรับไนเตรตและคลอเรต เป็น 58 และ 140 mM ตามลำดับ มีเอไซด์ เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันและไซยาไนด์เป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้มีค่ามากกว่า 95 ºC แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์แล้วไว้ที่อุณหภูมิ 100 ºC พบว่าเอนไซม์มี haft-life เพียง 1.5 ชั่วโมง เพราะเอนไซม์จะมีความเสถียรเมื่อติดอยู่กับเมมเบรน ดังนั้นเมื่อสกัดด้วยสารดีเทอร์เจนต์ทำให้เอนไซม์สูญเสียความเสถียรไป

Craske and Ferguson (1986) ได้ทำบริสุทธิ์และศึกษา Nar จาก *Paracoccus denitrificans* โดยใช้ non-ionic detergent พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 3 โพลีเปปไทด์ คือ α, β และ γ มีขนาดโมเลกุล 127, 61 และ 21 KDa สามารถใช้ duroquinol หรือ reduced-viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยในเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ผ่านการทำบริสุทธิ์จะมีไซโตโครม บี ซึ่งใช้ duroquinol เป็นตัวให้อิเล็กตรอนและใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ แต่เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วจะไม่มีไซโตโครม บี และไม่มีหน่วยย่อย γ ทำให้ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนจาก duroquinol ได้แต่ยังสามารถรับจาก reduced viologen ได้ จึงสรุปได้ว่า ในเมมเบรนของ *P. denitrificans* หน่วยย่อย γ

ทำหน้าที่เร่งการขนย้ายอิเล็กตรอนที่ได้จาก duroquinol ระหว่างหน่วยย่อย α และ β ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส จากการศึกษาต่อมาพบว่า ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนเอนไซม์จะมีความไวต่อไนเตรตความเข้มข้นต่ำ ๆ ในระดับ μM ได้ และสามารถใช้คลอเรตเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาได้ โดยมีค่า K_m สำหรับไนเตรตเป็น 13 μM และ K_m สำหรับคลอเรตเป็น 470 μM เมื่อใช้ duroquinol เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่เมื่อใช้ viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอนจะได้ค่า K_m สำหรับไนเตรตเป็น 283 μM และ K_m สำหรับคลอเรตเป็น 470 μM สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้คือเอไซด์ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน โดยมีค่า K_i เป็น 0.55 μM

ใน *Micrococcus denitrificans* มีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส 2 ชนิด คือ assimilatory NR และ respiratory NR โดยทั้ง 2 ชนิดจะเกาะติดอยู่กับเมมเบรน เมื่อนำส่วนเมมเบรนมาศึกษาพบว่าเอนไซม์ ใช้ NADH และ succinate เป็นตัวให้อิเล็กตรอน มี K_m สำหรับ NADH เป็น 18 μM และ 20 μM เมื่อใช้ไนเตรตและออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตามลำดับ แต่เมื่อสกัดเอนไซม์ออกจากเมมเบรนและทำบริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์จะเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์โดยใช้ reduced benzyl viologen และ reduced methyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแต่ใช้ NADH, succenate และ reduced cytochrome c เป็นตัวให้อิเล็กตรอนไม่ได้ สารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้คือไธโอไซยาเนต (KCNS) และ toluene-3,4- dithiol เพราะสารทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเกิด chelate กับโมลิบดินัมได้ สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ ที่ pH 6.3 โดยมีค่า K_m สำหรับไนเตรตเป็น 9.6 μM เมื่อใช้ reduced benzyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Lam and Nicholas, 1968)

2.2.2 การขนส่งไนเตรตในระบบ Nar

เนื่องจากตำแหน่ง active site ของ NarG อยู่ในส่วนไซโตพลาสซึม ดังนั้นไนเตรตจึงต้องถูกขนย้ายเข้าไปในเซลล์ก่อนจะถูกรีดิวซ์และมีการขับไนไตรต์ออกมาในเพอริพลาสซึม ด้วยระบบการขับที่จำเพาะกับไนไตรต์ ส่วนการดูดซับไนเตรตในกระบวนการ respiratory ยังไม่เป็นที่เข้าใจนัก แต่เป็นที่เข้าใจกันแล้วว่าช่องทางในการขนส่งไนเตรตจะมีความจำเพาะต่อไนเตรตสูงและถูกยับยั้งได้ด้วยออกซิเจน (Denis, 1990) ซึ่งแตกต่างจากการดูดซับไนเตรตในกระบวนการ assimilatory ที่ใช้ตัวขนส่งไนเตรตเป็น ABC-type

2.2.3 การควบคุมการแสดงออกของ Nar

ใน *E. coli* มีการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน Nar 2 ระบบ คือ 1) ระบบที่ขึ้นอยู่กับออกซิเจน โดยมีโปรตีน FNR (fumarate and nitrate reductase regulation) เป็นตัวควบคุม และ 2) ระบบที่ขึ้นอยู่กับไนเตรตหรือไนไตรต์ในสิ่งแวดล้อม ด้วยระบบการควบคุมที่มี 2 ส่วนโดยส่วน

แรกเป็นโปรตีนที่ส่งสัญญาณ 2 ตัว คือ NarX กับ NarQ และส่วนที่สองเป็นตัวโปรตีนที่ควบคุมการจับกับ DNA 2 ตัว คือ NarL กับ NarP

ใน *E. coli* บทบาทของ FNR ในการควบคุม transcription คือเป็นศูนย์กลางในการแสดงออกของ gene ที่เกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดย FNR จะจับตรงตำแหน่ง upstream ของ promotor ที่ควบคุม FNR ทำให้เกิดการกระตุ้นหรือการกด ซึ่งขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่จับ โดยภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน FNR จะจับกับ DNA และกระตุ้น transcription ของ *nar* gene และ gene ที่เกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมในสภาวะไม่มีออกซิเจนต่างๆ แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจนกลุ่มของ $[4Fe\text{-}4S]^{2+}$ จะเปลี่ยนเป็น $[3Fe\text{-}4S]^{2+}$ หรือ $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ ทำให้ FNR อยู่ในรูปที่ทำงานไม่ได้

2.3 Dissimilatory periplasmic nitrate reductases (Nap)

2.3.1 โครงสร้างและสมบัติทางชีวเคมีของ Nap

เอนไซม์ Nap พบในแบคทีเรียที่เป็น phototrophic และ denitrifying แบคทีเรีย และแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดโดยพบในส่วนเพอริพลาสซึมของเซลล์ (รูปที่ 1.9) การทำงานของ Nap ไม่เกี่ยวข้องกับ nitrate assimilation หรือ nitrate respiration ดังนั้นไนไตรต์ที่เกิดขึ้นจึงใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน หรือเป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการ anaerobic respiration ขึ้นอยู่กับแบคทีเรียแต่ละชนิด การทำงานของเอนไซม์ Nap ไม่ทำให้เกิด PMF โดยตรงแต่ Nap จะเกี่ยวข้องกับการเกิด PMF เมื่อมีการส่งอิเล็กตรอนจาก NADH ไปให้ NADH dehydrogenase (Berks *et al*., 1995) แต่ใน *Pseudomonas* sp. เอนไซม์ Nap เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแรกในกระบวนการ denitrification ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดพลังงาน ดังนั้นกลไกการทำงานของ Nap ที่ทำให้เกิดพลังงานจึงยังไม่เป็นที่เข้าใจกันนัก (Bedzyk *et al*., 1999) นอกจากนี้บทบาททางด้านกายภาพของ Nap ยังมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียต่างชนิดกันหรือแบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่อยู่ในสภาวะต่างกัน แต่บทบาทที่ชัดเจนของ Nap คือเป็น dissimilatory เอนไซม์ที่ช่วยรักษาสมดุลของสภาวะแวดล้อมให้เหมาะกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

Nap ใน *Haloarcula marismortui* มี K_m สำหรับไนเตรตเป็น 80 μM เมื่อมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 2.0 M โดยเกลือจะเป็นตัวสนับสนุนแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วงแรก จากการศึกษาของ Yoshimatsu และคณะ (2000) พบว่าเอนไซม์นี้เป็นโพลีเปปไทด์ที่มีขนาด 63 KDa แต่ต่อมาพบว่าเอนไซม์นี้เป็น dimer ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีขนาด 117 และ 47 KDa แต่จากการศึกษาเอนไซม์ Nap ใน *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*), *Thiosphaera pantotropha*, *E. coli* และ *Rhodobacter* พบว่าเป็น heterodimer ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่ทำปฏิกิริยาขนาด 90 KDa (NapA) (รูปที่ 1.10) โดยมี MGD เป็นโคแฟคเตอร์ มี N-terminal ที่มีหมู่

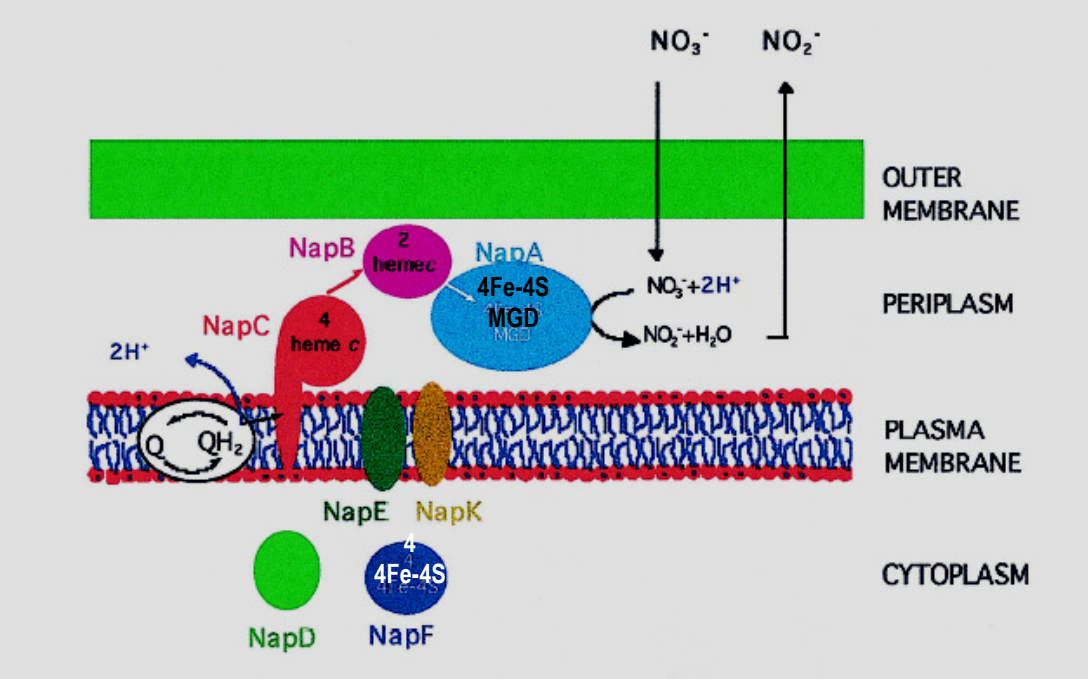
[4Fe-4S] เป็นศูนย์กลาง และมีหน่วยย่อยเป็นไซโตโครม ซี ที่มีลักษณะเป็น biheme (NapB) ขนาด 15 KDa โดยหน่วยย่อยนี้จะรับอิเล็กตรอนจาก NapC ซึ่งมีขนาด 25 KDa และเป็นไซโตโครม ซี ที่มีลักษณะเป็น tetraheme ยึดเกาะอยู่กับเมมเบรน (Berks *et al*., 1994 ; Berks *et al*., 1995) Nap แตกต่างจาก Nar คือ Nap ไม่ไวต่อการยับยั้งด้วยไซยาไนด์ อีกทั้งไม่สามารถใช้คลอเรตเป็นสารตั้งต้นได้ นอกจากนี้ยังถูกกระตุ้นด้วยไธโอไซยาเนตและเอไซด์ได้เล็กน้อย (Berks *et al*., 1995)

จากการศึกษา Nap ใน *Paracoccus pantotrophus* และ *E. coli* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีทังสเตน (tungsten) เปรียบเทียบกับเมื่อในอาหารมีโมลิบเดต (molybdate) พบว่า Nap จาก *P. pantotrophus* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีโมลิบเดต สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้โดยมีค่า V_{max} เท่ากับ 3.41±0.16 μmole/min/mg protein และ K_m สำหรับไนเตรตเป็น 0.24±0.05 μM นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังมีความเสถียรที่อุณหภูมิมากกว่า 50 ºC ซึ่งแตกต่างจาก Nap ของ *P. pantotrophus* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มี tungsten ที่รีดิวซ์ไนเตรตได้ด้วยความเร็วที่ต่ำกว่าและมีความจำเพาะกับไนเตรตน้อยกว่าด้วย คือ มี V_{max} เท่ากับ 0.05±0.002 μmole/min/mg protein และ K_m เท่ากับ 3.91±0.45 μM ทั้งยังไม่เสถียรเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 ºC และ Nap จาก *E. coli* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ใช้ไนเตรตในการเจริญเติบโตและสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของ Nap เพียงอย่างเดียว พบว่า Nap จาก *E. coli* สายพันธุ์แรกถูกยับยั้งได้เมื่อในอาหารที่เพาะเลี้ยงมี tungsten ความเข้มข้นในระดับน้อยกว่ามิลลิโมลาร์ แต่ Nap ในสายพันธุ์ที่สองถูก tungsten ยับยั้งได้บางส่วนเมื่อมีความเข้มข้นของ tungsten ความเข้มข้น 10 mM จากข้อมูลที่ผ่านมาไม่มีรายงานว่า tungsten สามารถแทนที่ molybdate ที่ตำแหน่ง active site ได้ แต่สามารถทำหน้าที่ตรงตำแหน่ง active site ได้ใน molybdoenzymes จากแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น (Gates *et al*., 2003)

2.3.2 การควบคุมการแสดงออกของ Nap

ถึงแม้ว่าการแสดงออกของ *nap* gene จะมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียต่างชนิดกัน แต่โดยทั่วไปแล้วแอมโมเนียมและออกซิเจนไม่ก่อให้เกิดผลกระทบใด ๆ ต่อระบบของ Nap โดยพบว่าใน phototrophic แบคทีเรียมีการทำงานของ Nap ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน โดยไม่ได้รับผลกระทบจากแอมโมเนียมและความสมดุลย์ของคาร์บอนและไนโตรเจนในเซลล์ นอกจากนี้ถึงแม้ว่าจะมีการทำงานของ Nap ในสภาวะที่ไม่มีไนเตรตแต่ถ้าในสภาวะที่มีไนเตรตพบว่า ไนเตรตสามารถกระตุ้นการทำงานของ Nap ได้ (Reyes *et al*., 1996) จากการศึกษาใน *P. denitrificans* พบการทำงานของ Nap ในระหว่างการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนแม้ว่าจะไม่มีไนเตรต โดยจะมีแอคติวิตีสูงเมื่อมีแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปรีดิวซ์ เช่น butyrate (Sears and Richardson, 1997) เช่นเดียวกับ Nap ที่พบใน *A. eutrophus* ที่ไม่ได้ถูกชักนำ

ด้วยไนเตรตและแสดงออกสูงในสภาวะที่มีออกซิเจนในช่วงการเจริญเติบโตช่วง stationary phase (Siddiqui *et al*., 1993)

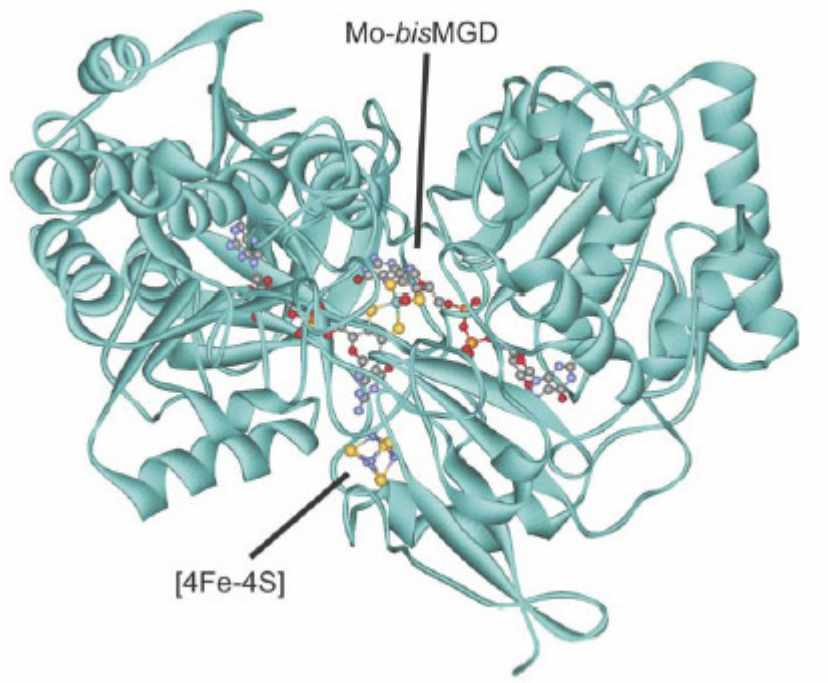


รูปที่ 1.9 การรีดิวซ์ไนเตรตในส่วนเพอริพลาสซึม ใน *R.sphaeroides* Nap

มีหน่วยย่อยที่เกี่ยวข้องกับการรีดิวซ์ไนเตรตในส่วนเพอริพลาสซึม คือ

1. NapC มีหน้าที่รีดิวซ์ควินอล
2. NapB ขนส่งอิเล็กตรอนจาก NapC ไปยัง NapA
3. NapA เป็นศูนย์เร่งปฏิกิริยารีดิวซ์ไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ โดยรับอิเล็กตรอนจาก NapB และโปรตอนจากในส่วนเพอริพลาสซึม (รูปที่ 1.10)
4. NapE และ NapK เป็น transmembrane โปรตีนที่ยังไม่รู้หน้าที่ที่แน่ชัด
5. NapF เป็น โปรตีนที่ละลายน้ำได้มีกรดอะมิโน Cys 4 กลุ่มซึ่งอาจจะจับกับหมู่ [4Fe-4S] ซึ่งเกี่ยวข้องกับศูนย์กลางของ NapA ที่เป็นหมู่ [4Fe-4S]
6. NapD เป็นโปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสซึมและมีส่วนร่วมในการทำงานของ NapA

ที่มา Moreno-Vivian *et al.* (1999)



รูปที่ 1.10 โครงสร้างแบบ 3 มิติ ของ NapA ใน *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774
ที่มา Gonzalez *et. al*. (2006)

3. บ่อพุน้ำร้อนและสาหร่ายในบ่อน้ำพุร้อน

บ่อน้ำพุร้อนพบอยู่ในที่ต่าง ๆ ทั่วโลกทั้งในยุโรป ในประเทศสหรัฐอเมริกา นิวซีแลนด์หรือในเอเชีย เช่น ในประเทศมาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่นและไทย เป็นต้น น้ำพุร้อนที่รู้จักกันดีก็คือ น้ำพุร้อนที่ Yellowstone National Park ในประเทศสหรัฐอเมริกา Castenholz (1969) ได้จำแนกชนิดของบ่อน้ำพุร้อนตามแหล่งกำเนิดได้ดังนี้

1. Volcanic – NaCl hot spring เป็นน้ำพุร้อนที่มีแหล่งกำเนิดมาจากภูเขาไฟ น้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 7 สารที่พบมากในน้ำ คือ โซเดียม (Na), คลอไรด์ (Cl), ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) และซิลิเกต ค่าความเค็มอยู่ในช่วง 1,000-3,000 mg/l

2. Volcanic – acid SO_4 hot spring เป็นน้ำพุร้อนที่มีแหล่งกำเนิดมาจากภูเขาไฟ น้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 1-4 สารที่พบมากในน้ำคือ กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) และ ซัลไฟด์ (S^{2-}) ค่าความเค็มอยู่ในช่วง 35,000-100,000 mg/l

3. Calcareous travertine – depositing hot spring เป็นน้ำพุร้อนที่มีแหล่งกำเนิดมาจากภูเขาหินปูน น้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 7 สารที่พบมากในน้ำคือ แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) และ ไบคาร์บอเนต ในบางแห่งอาจพบปริมาณซัลไฟด์ที่สูง

4. Meteoric – Low Salinity hot spring น้ำที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 9 สารที่พบมากในน้ำคือ โซเดียมและแคลเซียม ปริมาณคลอไรด์จะพบน้อย นอกจากนี้จะพบแก๊สไนโตรเจนเป็นจำนวนมาก อุณหภูมิของน้ำค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ Calcareous spring

5. Thermal brine hot spring เป็นน้ำพุร้อนที่มีแหล่งกำเนิดติดกับทะเลน้ำมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 ค่าความเค็มมีค่ากระจายตั้งแต่น้อยจนถึงเท่ากับความเค็มของน้ำทะเล มีปริมาณแก๊สมีเทนค่อนข้างสูง

ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในบ่อน้ำพุร้อนกันเป็นจำนวนมาก เช่น สำรวจสาหร่ายจากบ่อน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ ทางภาคเหนือของประเทศไทย (บ่อน้ำพุร้อนสันกำแพงและแม่ฝาง) โดยระบุชนิดของสาหร่ายโดยอาศัยการศึกษาทั้งทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาพบว่าสาหร่ายที่เก็บได้เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ทนร้อนได้ (thermophillic cyano-bacteria) ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 50 °C (Hayashi *et al*., 1994) และจากการศึกษาในบ่อน้ำพุร้อน Yellowstone National Park ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอยู่รวมกับแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic bacteria) โดยอยู่รวมกันเป็นแผ่นเกาะอยู่ตามผิวน้ำ (Madigan and Brock, 1977) นอกจากนี้ Bateson and Ward (1988) สำรวจสิ่งมีชีวิตในบ่อน้ำพุร้อน Mushroom spring ใน Yellowstone National Park ซึ่งน้ำมีอุณหภูมิ 55-58 ºC พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ได้แก่ *Synechococcus lividus* สาหร่ายบ่อน้ำพุร้อนส่วนใหญ่เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีขนาดเล็ก แต่ถ้าเป็นบริเวณที่น้ำมีอุณหภูมิไม่สูงมากพบสาหร่ายสีเขียวด้วย (Kullberg, 1968)

5. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือ Cyanobacteria เป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอต อยู่ในอาณาจักรโมเนรา (Monera) ดิวิชันไซยาโนไฟตา (Cyanophyta) มีคลอโรฟลด์ เอ สามารถสังเคราะห์แสงได้ และได้ก๊าซออกซิเจนเป็นผลิตผลจากกระบวนการดังกล่าว (Wang *et al*., 2003)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีรูปร่างลักษณะ 2 แบบ คือ

1) เป็นเซลล์ที่ไม่มีหนวดที่เรียกว่า คอคคอยด์ (coccoid form) ซึ่งพบทั้งเซลล์เดี่ยว ๆ (unicellular), โคโลนี (colony) และ 2) แบบเส้นสาย (filamentous form) เซลล์สาหร่าย

สีเขียวแกมน้ำเงินประกอบด้วยผนังเซลล์ 2 ชั้น และรอบนอกเป็นชีทซึ่งเป็นสารเมือกหุ้มอยู่ ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปข้างในเป็นเยื่อบาง ๆ เรียกว่า เยื่อพลาสมา (plasma membrane) หุ้มไซโตพลาสซึมไว้ ไซโตพลาสซึมส่วนนอกที่อยู่ใกล้ผนังเซลล์มักมีสารสีกระจายอยู่เป็นจำนวนมาก เรียกส่วนนี้ว่า โครโมพลาสซึม (chromoplasm) ส่วนไซโตพลาสซึมเป็นส่วนในที่มีลักษณะคล้ายนิวเคลียสแต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส เรียกว่า เซนโตรพลาสซึม ในส่วนของโครโมพลาสซึม จะมีไซยาโนไฟซินแกรนูลซึ่งเป็นเม็ดเล็ก ๆ ทำหน้าที่สะสมแป้งกระจายอยู่ทั่วไป และมีแก๊สแวคคิวโอล (gas vacuole) ซึ่งภายในมีแก๊สไนโตรเจนหรือสารประกอบไนโตรเจนพวกเอมีนบรรจุอยู่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้แก่ การแบ่งเซลล์ เป็นการเพิ่มจำนวนจาก 1 เป็น 2 จาก 2 เป็น 4 .....และการสร้างสปอร์ (ลัดดา วงรัตน์, 2544)

การเคลื่อนที่ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นการเคลื่อนไหวแบบลื่นไหล (gliding movement) การเคลื่อนไหวอาจเป็นแบบถอยหน้าถอยหลัง (backward and forward gliding) หรือเป็นแบบแกว่งไปข้างซ้ายและข้างขวาสลับกัน โดยเคลื่อนไหวเฉพาะปลายเส้นสาย เคลื่อนไหวแบบเป็นคลื่น (moving movement) หรือหมุนเป็นเกลียวแบบควงสว่าน (spiral movement) สาเหตุของการเคลื่อนไหวแบบนี้ อาจเกิดจากการผลิตสารเมือกภายในเซลล์แล้วปล่อยออกทางรูเล็กของผนังเซลล์ การแลกเปลี่ยนสารภายในเซลล์กับน้ำภายนอก นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมยังเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ ได้แก่ แสงและอุณหภูมิ โดยถ้าแสงและอุณหภูมิมากขึ้น การเคลื่อนที่จะมากขึ้น (Desikachary, 1959)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีธาตุอาหารต่ำได้ สามารถใช้ไนเตรต ก๊าซไนโตรเจน และแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ สามารถสังเคราะห์แสงและได้ก๊าซออกซิเจนจากกระบวนการนี้ด้วย นอกจากนี้สามารถสร้างพลังงานได้จากกระบวนการตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในวัฏจักรคาลวิน (Calvin cycle) โดยใช้คลอโรฟิลล์ เอ เรียกว่า ไฟโคบิลิน (phycobilins) เป็นตัวดูดซับแสง ขณะที่ยูคาริโอตใช้คลอโรฟิลล์ บี ใน ระบบแสง 1 และระบบแสง 2 เป็นตัวดูดซับแสง แต่ phycobilins ใน *Synechococcus* สามารถดูดซับแสงในช่วงคลื่นได้กว้างกว่า (Fahnenstiel and Carrick, 1991)

3. วัตถุประสงค์

3.1 สำรวจหาสาหร่ายที่มีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (NR) ในบ่อน้ำพุร้อน จ.กระบี่

3.2 คัดเลือกตัวอย่างสาหร่ายที่มีเอนไซม์ NR ที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องและระบุชนิดของสาหร่าย

3.3 ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ NR ที่สกัดได้จากสาหร่ายเซลล์เดี่ยวชนิด *Synechococcus* sp.

3.4 ศึกษารูปแบบและวิธีการเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์ NR

3.5 โคลนและศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน nar สำหรับเอนไซม์ NR