4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 สภาพของบ่อน้ำร้อน ธารน้ำจากบ่อน้ำร้อน และลักษณะของสาหร่ายจากบ่อน้ำร้อน

สภาพของบ่อน้ำร้อนที่ อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง เป็นบ่อดิน อุณหภูมิในบ่อน้ำร้อน 55 องศาเซลเซียสและในธารน้ำจากบ่อน้ำร้อนมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 55-30 องศาเซลเซียส ค่าของ pH ในบ่อน้ำร้อนคือ 7.4 และในธารน้ำร้อนมีค่า 7.4-8.9 เนื่องจากมีการก่อปูนเป็นทางให้น้ำไหล จึงมีความเป็นด่างเพิ่มขึ้น สีของน้ำใส ไม่มีกลิ่นซัลเฟอร์ จากการเก็บตัวอย่างน้ำในบ่อน้ำร้อนและธารน้ำร้อน มาวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ พบว่าไม่มีไนเตรตและไนไตรต์ในแหล่งน้ำ (ตารางที่ 1) จากข้อมูลลักษณะของบ่อน้ำร้อนเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายจะเห็นว่าใกล้เคียงกัน คือในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย จะเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH ของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงคือ 7.4 ไม่มีซัลเฟอร์ในอาหาร แต่ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีไนเตรตถึง 17.6 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่น้ำในบ่อน้ำร้อนตรวจไม่พบไนเตรต นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายจะให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง แตกต่างจากแสงที่มีในธรรมชาติ ทั้งนี้เป็นเพราะข้อจำกัดของเครื่องมือที่มีใช้

ลักษณะของสาหร่ายในบ่อน้ำร้อน เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เป็นแท่งๆ ยึดเกาะกับด้านข้าง และก้นบ่อ แท่งของสาหร่ายมีลักษณะเป็นเมือกๆ หุ้มอยู่ ซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยให้สาหร่ายสามารถมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงได้ โดยสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมนี้ได้ต้องมีโครงสร้างของเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษ คือมี เยื่อหุ้มเซลล์ที่หนาและมีเอนไซม์ที่พัฒนาให้สามารถทำงานหรือไม่เสียสภาพในช่วงอุณหภูมิสูง (ประวิทย์ พิทักษ์วาปี, 2533)

4.2 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรต ไนไตรต์ ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย และปริมาณไนเตรต ไนไตรต์ในเซลล์

เมื่อเก็บตัวอย่างสาหร่ายจากบ่อน้ำร้อนและธารน้ำร้อนมาแล้ว ได้นำสาหร่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหาร BG-11 ที่มีไนเตรตความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (วิรัชนีย์ ภูษิตวิทย์, 2534) และเพื่อตรวจสอบดูว่าสาหร่ายสามารถใช้ไนเตรตในการเจริญเติบโตหรือไม่ จึงได้วัดปริมาณไนเตรตที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่าปริมาณไนเตรตในอาหารมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 8A) (เห็นผลไม่ชัดเจน) แสดงว่าสาหร่ายอาจใช้ไนเตรตในการเจริญเติบโตได้ และที่เห็นผลไม่ชัดเป็นเพราะในอาหารมีปริมาณไนเตรตมากเกินไป แต่สาหร่ายใช้ไนเตรตในปริมาณน้อยเท่านั้น ซึ่งเมื่อลดปริมาณไนเตรตในอาหารให้มีเพียง 1.1 มิลลิโมลาร์ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงของไนเตรตได้ชัดเจน (รูปที่ 13) ส่วนปริมาณไนไตรต์ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเริ่มต้น (รูปที่ 8B) แสดงว่าสาหร่ายสามารถเปลี่ยนไนเตรต

ไปเป็นไนไตรต์ และขับไนไตรต์ที่เหลือออกจากเซลล์ด้วยระบบที่มีความจำเพาะ (Moreno-Vivian *et al*, 1999) จึงทำให้ตรวจพบไนไตรต์เพิ่มมากขึ้นในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ในขณะที่ตรวจไม่พบไนไตรต์ในเซลล์ (ไม่ได้แสดงผล) ซึ่งแสดงว่าไม่มีการสะสมของไนไตรต์ในเซลล์

4.3 ลักษณะของสาหร่ายจากบ่อน้ำร้อนและการใช้ไนเตรตในการเจริญเติบโตของสาหร่าย

จากการนำสาหร่ายที่เก็บจากบ่อน้ำร้อนมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นสาหร่ายชนิดสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) อยู่รวมกัน 3 ชนิด ซึ่งมีลักษณะต่างๆ กัน คือ ชนิดที่เป็นเส้นสายขนาดเล็ก ชนิดที่เป็นเส้นสายขนาดใหญ่ และชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาชนิดและชีววิทยาของสาหร่ายในบ่อน้ำร้อน อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง โดย วิรัชนีย์ ภูษิตวิทย์ ในปี พ.ศ. 2534 ที่สำรวจพบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 5 ชนิดคือ *Synechococcus elongates* Nag., *Phormidium ambium* Gom., *Synechocystis aquatilis* Sauv., *Democarpa sphaerica* Setchell et Gardner และ *Stigonema hormotides* Kutz.สาหร่ายที่ยึดเกาะส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นสาย ส่วนพวกแขวนลอยเป็นเซลล์เดี่ยวและกลุ่มเซลล์

จากนั้นตรวจสอบดูว่าสาหร่ายที่เก็บจากบ่อน้ำร้อนมีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสหรือไม่ ด้วยการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แบบ in vivo โดยใช้ตัวอย่างสาหร่ายทั้งที่เป็นสาหร่ายที่อยู่รวมกันและสาหร่ายที่ได้จากการแยกเป็นชนิดเดี่ยวๆ แล้ว ทั้ง 3 ชนิด คือ ชนิดที่เป็นสายขนาดเล็ก เป็นสายขนาดใหญ่ และ ชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ปรากฏว่าตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรต- รีดักเทสในสาหร่ายชนิดสายขนาดเล็กเพียงชนิดเดียวเท่านั้น จึงได้ศึกษาเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิดนี้ต่อไป และสามารถระบุชนิดสาหร่ายชนิดนี้ได้เป็น *Phormidium tenue* (Menegh) Gomont.

4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่าย *P. tenue* (Menegh) Gomont

ปัจจัยในการเจริญเติบโตที่ศึกษา คือ ปริมาณโซเดียมไนเตรตและโซเดียมไบคาร์บอเนตในอาหารเพาะเลี้ยง และความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าสาหร่ายจะเจริญเติบโตในอาหารที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนตได้ดีกว่าในอาหารที่ไม่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต (รูปที่ 9) เพราะโซเดียม- ไบคาร์บอเนตจะให้ส่วนที่เป็นโครงสร้างที่เป็นคาร์บอน (carbon skeleton) ของสารประกอบต่างๆ จากกระบวนการ nitrogen assimilation ผ่านทาง glutamine synthetase-glutamate synthase cycle ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนและกรดนิวคลิอิค (Vazquez-Bermudez *et al*., 2003) ดังนั้นสาหร่ายจึงเจริญเติบโตได้ดีขึ้นเมื่อมีโซเดียมไบคาร์บอเนตในอาหาร แต่สาหร่ายจะใช้โซเดียม

ไบคาร์บอเนตในปริมาณน้อยเท่านั้น ดังจะเห็นได้จากถึงแม้จะมีโซเดียมไบคาร์บอเนตในอาหารปริมาณมากขึ้น แต่การเจริญเติบโตของสาหร่ายยังคงไม่แตกต่างกัน

เมื่อศึกษาผลของแสงต่อการเจริญเติบโตจะเห็นว่าเมื่อลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสงความเข้ม 175 μmole $m^{-2}s^{-1}$ สาหร่ายจะเจริญเติบโตช้ากว่าโดยจะเจริญเติบโตเต็มที่ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงแต่ถ้าให้แสงความเข้ม 622 μmole $m^{-2}s^{-1}$ สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงและตายในวันที่ 3 ซึ่งเร็วกว่าเมื่อให้แสงความเข้มต่ำกว่าที่สาหร่ายเริ่มตายในวันที่ 7(รูปที่ 9C, D) จะเห็นว่าในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในการทดลองนี้ให้แสงแก่สาหร่ายมากเกินไป โดยในธรรมชาติสาหร่ายจะได้รับแสงความเข้มประมาณ 270 μmole $m^{-2}s^{-1}$ เพียง 10-12 ชั่วโมงต่อวัน แต่ในการทดลองนี้มีการให้แสงความเข้มถึง 622 μmole $m^{-2}s^{-1}$ ตลอดเวลา เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องมือ ซึ่งเมื่อมีความเข้มแสงมากเกินไปพืชหรือสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้จะดูดซับพลังงานแสงที่เหลือ มีผลให้โมเลกุลของคลอโรฟิลล์เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งเป็นการทำลายศูนย์กลางในการเกิดปฏิกิริยาสังเคราะห์แสง และโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เหล่านี้จะชักนำให้เกิด reactive oxygen species ที่สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน ไขมันและกรดนิวคลิอิคได้ จึงเป็นสาเหตุให้เกิดการทำลายโครงสร้างและหน้าที่ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Im and Grossman, 2001)

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่มีโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 1.10, 8.82, 17.60 และ 35.30 มิลลิโมลาร์ อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายไม่แตกต่างกัน เป็นเพราะสาหร่ายใช้โซเดียมไนเตรตในการเจริญเติบโตได้ในปริมาณน้อย แต่ในอาหารมีโซเดียมไนเตรตมากเกินพอ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองติดตามปริมาณไนเตรตในอาหารในระหว่างการเพาะลี้ยง เมื่อในอาหารมีโซเดียม-ไนเตรตความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 1.1 มิลลิโมลาร์ เห็นได้ชัดว่าโซเดียมไนเตรตในอาหารมีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 13A, B) และเมื่อเติมโซเดียมไนเตรตเพิ่มในระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรตในอาหารยังคงลดลงอีก จึงสรุปได้ว่าสาหร่าย *P. tenue* (Menegh) Gomont สามารถใช้โซเดียมไนเตรตที่มีในอาหารในการเจริญเติบโตได้จริงแต่ใช้ในปริมาณน้อย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในการทดลองต่อไปจึงให้มีโซเดียมไนเตรตในอาหารเพียง 1.1 มิลลิโมลาร์เท่านั้น

4.5 สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *P.tenue*

4.5.1 ตำแหน่งของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์สาหร่าย

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *P. tenue* อยู่ในส่วนของเมมเบรนเพราะเมื่อทดลองหาแอคติวิตีของเอนไซม์จากส่วนที่เป็นเมมเบรนและส่วนไซโตพลาสซึม พบว่าเฉพาะส่วนของเมมเบรนเท่านั้นที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายชนิดอื่นๆ คือ จากสาหร่ายสีเขียว *Chlorella* และ *Ankistrodesmus braunii* ที่เอนไซม์อยู่ในส่วน

ไซโตพลาสซึม และเป็น assimilatory nitrate reductase (Solomonson and Vennesland, 1971: Herrero *et al*, 1980) แต่มีลักษณะเช่นเดียวกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในแบคทีเรีย *Micrococcus denitrificans* ซึ่งเป็น respiratory nitrate reductase (Nar) และสามารถสกัดเอนไซม์ออกจากเมมเบรนได้โดยใช้สารดีเทอร์เจนต์ sodium deoxycholate (Lam and Nicholus, 1968) เช่นเดียวกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากแบคทีเรีย *Paracoccus denitrificans* ที่เป็น respiratory nitrate reductase และสกัดเอนไซม์จากเมมเบรนได้โดยใช้สาร non-ionic detergent Nonidet P-40 (Craske and Ferguson, 1986) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสซึ่งเป็น assimilatory nitrate reductase และมีลักษณะเป็น plasma–membrane–bound nitrate reductase (PM-NR) พบในส่วนรากและใบของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsum) สกัดเอนไซม์จากเมมเบรนได้โดยใช้ Triton X-114 และเอนไซม์สามารถใช้ NADH และ succinate เป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อรีดิวซ์ไนเตรตให้เปลี่ยนเป็นไนไตรต์ (Stohr and Ullrich, 1997)

4.5.2 pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue* ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง คือในช่วง pH 7-9 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่เป็นกลางค่อนไปทางเป็นด่างเล็กน้อย และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 7.5 (รูปที่ 16) ซึ่งสอดคล้องกับสภาวะที่สาหร่ายเจริญเติบโตในธรรมชาติ คือ pH อยู่ในช่วง 7.4-8.9 และในสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงที่มี pH เป็น 7.4 นอกจากนี้ยังมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานใกล้เคียงกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ คือ เอนไซม์จากต้นข้าว ในส่วนที่เป็น crude extract พบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 7.5 (เขมิกา โขมพัตร, 2545) ส่วนเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายสีแดง *Porphyra yezoensis* ทำงานได้ดีที่ pH 8.3 (Nakamura and Ikawa, 1993) และเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายทะเล *Kappaphycus alvarezii* สามารถทำงานได้ดีที่ pH 8.0 (Granbom,2004) แต่ในแบคทีเรีย *Micrococcus denitrificans* เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสทำงานได้ดีที่ pH 6.3 (Lam and Nicholus, 1968)

4.5.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue*

จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue* ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง คือที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (รูปที่ 17) แตกต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิดอื่นๆ เช่น ในสาหร่าย *Kappaphycus alverezii* ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส (Granbom, 2004) หรือเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในพืชชนิดอื่น เช่นในมะเขือเทศ ที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Piero *et al.,* 2003) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะในธรรมชาติสาหร่าย *P. tenue* ที่เก็บจากบ่อน้ำร้อนและธารน้ำร้อนสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงคือ 30-55 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 1) ดังนั้นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อยู่ในเซลล์

สาหร่ายชนิดนี้จึงทำงานได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง เพราะสำหรับสาหร่ายบางชนิดที่สามารถเจริญได้ดีในบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมเช่น ในน้ำพุร้อน โครงสร้างของเซลล์จะมีลักษณะพิเศษ โดยมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่หนาและมีเอนไซม์ที่พัฒนาสามารถทำงานได้หรือไม่เสียสภาพ แม้อยู่ในช่วงอุณหภูมิสูง ถึงแม้ว่าบางส่วนของเซลล์จะถูกทำลายไปก็ตาม แต่เซลล์ก็สามารถสร้างส่วนประกอบเหล่านั้นขึ้นมาทดแทนได้อย่างรวดเร็ว (ประวิทย์ พิทักษ์วาปี., 2533) เช่นเดียวกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตโบราณที่เจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง เช่น *Pyrobacculum aerophilum* ซึ่งมีเอนไซม์ ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงด้วย (Afhar *et al*., 2001) หรือในสิ่งมีชีวิตโบราณที่เจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือ *Haloferax denitrifican* โดยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตนี้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 80 องศาเซลเซียส และขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือ (Hochstein and Lang., 1991)

4.5.4 ผลของสารดีเทอร์เจนต์ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการศึกษาที่พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue* อยู่ในส่วน เมมเบรนของเซลล์ จึงได้ทดลองสกัดเอนไซม์จากเมมเบรนของเซลล์ แต่ไม่สามารถสกัดออกมาได้ และยังพบว่าสารดีเทอร์เจนต์ มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยสารดีเทอร์เจนต์ที่ใช้มี CHAP, Octyl-β-D glucopyranoside, Deoxycholate, Triton X-100, ([octyl phenoxy] polyethoxyethanol), Tween-20 และ SDS แตกต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อยู่ในส่วนเมมเบรนของมะเขือเทศ ที่สามารถใช้สารดีเทอร์เจนต์ β-octylglucoside และ Triton X-100 สกัดออกมาได้และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้อีกด้วย เพราะเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีส่วนโครงสร้างที่แตกต่างจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในมะเขือเทศ ดังนั้นเมื่อใช้สารดีเทอร์เจนต์สกัดอาจทำให้เอนไซม์สูญเสียโครงสร้างบางส่วนไป จึงไปมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ (Piero., 2003)

4.6 สภาวะในการเพาะเลี้ยง *P. tenue* ที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงที่สุด

4.6.1 แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายที่มีอายุต่างกัน

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่มีแอคติวิตีสูงที่สุดเป็นเอนไซม์ที่ได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้ 2 วัน แต่ถ้าเพาะเลี้ยงไปนานกว่านี้ จะได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีลดลง (รูปที่ 19) ทั้งนี้เพราะในช่วง 2 วันแรก เป็นช่วงการเจริญเติบโตที่อยู่ในช่วง log phase สอดคล้องกับการศึกษาของ Campbell และคณะในปี 1984 ที่ได้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Chenopodium rubrum* และพบว่าในช่วง log phase จะมีอัตราการสลายของไนโตรเจน (N assilmilation) มากที่สุด และในช่วงนี้จะมีการสะสมของคลอโรฟิลล์ โปรตีน เอนไซม์ไนเตรต-รีดักเทสและเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส (glutamine synthetase) ในอัตราที่เร็วมาก

4.6.2 ผลของโซเดียมไนเตรตที่มีในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรต-รีดักเทส

เมื่อเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหาร BG-11 ที่มีโซเดียมไนเตรตความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ ไม่มีโซเดียมไนเตรต มีโซเดียมไนเตรต 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 และ 5 มิลลิโมลาร์พบว่าสาหร่ายที่มีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแอคติวิตีสูงที่สุด คือสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์ และถ้าในอาหารมีโซเดียมไนเตรตมากขึ้นกว่านี้ เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ได้จะมีแอคติวิตีลดลงตามลำดับ (รูปที่ 20) แสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายนี้ถูกชักนำได้ด้วยไนเตรตความเข้มข้นต่ำๆ ถ้าใช้ไนเตรตความเข้มข้นสูงนอกจากไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้แล้วยังเป็นการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์อีกด้วย เพราะเมื่อในอาหารมีโซเดียมไนเตรตความเข้มข้นสูง เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจะเปลี่ยนไนเตรตไปเป็นไนไตรต์ แล้วขับไนไตรต์ออกจากเซลล์มาสะสมอยู่ในอาหารที่เพาะเลี้ยง (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งไนไตรต์จะไปมีผลเป็นพิษกับเซลล์ ทำให้เซลล์และองค์ประกอบของเซลล์ทำงานได้น้อยลง หรือไนไตรต์ไปมีผลยับยั้งแบบย้อนกลับ (feed back inhibition) สอดคล้องกับการศึกษาของ Loque และ คณะ ในปี 2003 ซึ่งได้ศึกษาการแสดงออกของยีน nitrate transporter (NRT1.1) และยีน nitrate reductase (NIA1) ในรากของ Arabidopsis เมื่อเพาะเลี้ยง Arabidopsis ในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วหลังจากนั้นจึงเพิ่มไนเตรตในรูปของโพแทสเซียมไนเตรตในอาหารให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าเมื่อมีไนเตรตความเข้มข้นสูงขึ้น จะมีผลทำให้การถอดรหัส (transcription) ของยีนทั้ง 2 ชนิดลดลงอย่างเห็นได้ชัด นอกจากการเติมไนเตรตแล้ว ยังพบว่าการเติมไนไตรต์ในรูปของโพแทสเซียมไนไตรต์ลงในอาหารจะให้ผลเหมือนกันกับการเติมไนเตรตด้วย

4.6.3 ผลของโซเดียมไบคาร์บอเนตในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

เมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีโซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายมีแอคติวิตีสูงขึ้นด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Maria Felix และคณะ (2003) ที่พบว่าการเติม inorganic carbon เช่นไบคาร์บอเนตหรือคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถชักนำเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 ได้ และสามารถใช้ 2-oxoglutarate แทน inorganic carbon ได้ โดยสารทั้ง 2 ชนิดจะไปมีผลในระดับการถอดรหัส (transcription) ของเอนไซม์ (Vincentz *et al*., 1993) เช่นเดียวกับการศึกษาการเพิ่มแหล่งคาร์บอนโดยการเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลาสั้นๆให้กับต้นแตง (*Cucumis sativa*.) จะไปมีผลเพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรตในใบ และไปมีส่วนทำให้การแสดงออกและแอคติวิตี ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเพิ่มขึ้น (Larios, 2001)

4.6.4 ผลของระดับแสงต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสงความเข้มต่างกัน พบว่าเมื่อให้แสงความเข้มสูงขึ้นทำให้ได้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีแอคติวิตีสูงขึ้น และสูงที่สุดเมื่อให้แสงความเข้ม 622 μmole m^{-2} s^{-1} (รูปที่ 22) เกิดจากเมื่อให้แสงความเข้มสูงขึ้น สาหร่ายสามารถสังเคราะห์แสงได้มากขึ้น ทำให้ได้ผลผลิตจากการสังเคราะห์แสงซึ่งเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตมากขึ้นจึงไปมีส่วนทำให้การแสดงออกและแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเพิ่มขึ้น (Larios, 2001) โดยผลของแสงจะไปมีผลควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสทั้งในระดับการถอดรหัส และระดับหลังการแปลรหัส (posttranslation)

4.7 สมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue*

4.7.1 ความเสถียรของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบการเก็บรักษาเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% กับบัฟเฟอร์ที่ไม่มี glycerol พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิดนี้มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องในระดับหนึ่ง เห็นได้จากเมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน แอคติวิตีของเอนไซม์ยังเหลืออีก 70% ทั้งในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% และบัฟเฟอร์ที่ไม่มี glycerol แต่ถ้าเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำคือ 4, -20 และ –80 องศาเซลเซียส พบว่าในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol เอนไซม์จะมีความเสถียรมากกว่าในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี glycerol (รูปที่ 24) โดยการเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4, -20 และ –80 องศาเซลเซียส ในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol เอนไซม์จะมีความเสถียรไม่แตกต่างกันแต่ถ้าเก็บในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี glycerol พบว่าการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสมีความเสถียรที่สุด เพราะการเก็บที่อุณหภูมิ –20 และ –80 องศาเซลเซียส เมื่อนำเอนไซม์มาใช้ ทำให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียโครงสร้างบางส่วนจากการ freeze-thraw

4.7.2 ผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

เนื่องจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมี FAD และ molybdenum เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ ดังนั้นการเติม FAD และ molybdenum จึงน่าจะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น แต่จากการศึกษาพบว่าการเติม FAD หรือ การเติม molybdenum หรือการเติม FAD ร่วมกับ molybdenum ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยจะเห็นได้จากในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมทั้ง FAD และ molybdenum หรือในชุดที่เติม FAD หรือในชุดที่เติม molybdenum หรือในชุดที่เติม FAD ร่วมกับ molybdenum ได้ค่าแอคติวิตีที่มีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 25)

4.7.3 ผลของแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการศึกษา พบว่าแอมโมเนียมในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ โดยแอมโมเนียมซัลเฟตในระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์มีผลให้

แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงได้ถึง 50% (รูปที่ 26) ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสามารถถูกควบคุมแบบย้อนกลับได้โดยผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนแมตตาบอลิซึมของไนโตรเจนเช่น แอมโมเนียม หรือกรดอะมิโน (Loque *et al*., 2003)

4.7.4 ผลของ Mg^{2+} และ PO_4^{3-} ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการทดลองพบว่า Mg^{2+} ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แตกต่างจากผลการทดลองของ Aguera *et al*., 1999, Weiner *et al*., 2000, Larios 2001 และ Haba *et al*., 2001 ซึ่งพบว่า Mg^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และได้อธิบายไว้ว่าในสภาวะที่มี Mg^{2+} จะช่วยเสริมการทำงานของเอนไซม์ kinase ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวสามารถเติมฟอสเฟตให้กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ และส่งผลให้โปรตีน 14-3-3 ซึ่งเป็นโปรตีนยับยั้งสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ เอนไซม์จึงไม่สามารถทำงานได้ และในการทดลองครั้งนี้จึงได้ลองเติม PO_4^{3-} ในส่วนผสมสำหรับหาแอคติวิตีด้วย และพบว่า PO_4^{3-} มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เล็กน้อย โดยเมื่อมี PO_4^{3-} ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือ 81.5 % (รูปที่ 27)

4.7.5 ผลของ Sodium azide (NaN_3), Potassium cyanide (KCN) และ Sodium thiocyanate (NaSCN) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากผลการทดลองการใช้สารที่มีสมบัติเป็นตัวยับยั้ง (inhibitor) คือ NaN_3, KCN และ NaSCN พบว่า NaN_3 มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ดีที่สุด โดยเมื่อมี NaN_3 0.2 มิลลิโมลาร์ ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เหลือเพียง 41.67% ในขณะที่ถ้ามี KCN หรือ NaSCN ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ แอคติวิตีของเอนไซม์จะเหลือ 47.62% และ 75.60% ตามลำดับ (รูปที่ 28) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Yamamoto และคณะ ในปี 1986 ซึ่งได้รายงานผลของ NaN_3 ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสใน *Mitsuokella multiacidus*. ได้ถึง 88% นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า KCN และ NaN_3 สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Ankistrodesmus braunii* ในช่วงสุดท้ายของปฏิกิริยา คือช่วง reduced methyl viologen-nitrate reductase (Herrero *et al*, 1980)

4.7.6 ความจำเพาะต่อ NADH และ NADPH ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย ไม่จำเป็นต้องรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH เพราะถึงแม้ว่าไม่มี NADH หรือ NADPH เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสยังสามารถทำงานได้ แต่ถ้ามี NADH หรือ NADPH จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 29) อาจเป็นเพราะว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสโดยทั่วไปที่เกาะติดกับเมมเบรนสามารถใช้ quinol เป็นตัวให้

อิเล็กตรอนได้ (Berks *et al,.* 1995) ดังนั้นเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue* ที่ศึกษาซึ่งยังอยู่ในรูปที่เกาะติดกับเมมเบรน จึงใช้ quinol ที่มีอยู่ในเมมเบรนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน ทำให้เอนไซม์ทำงานได้แม้ว่าไม่ได้เติม NADH หรือ NADPH แต่จากการหาค่า K_m ของสับสเตรท ได้แก่ KNO_3 , NADH และ NADPH โดยการหาจาก Lineweaver-Burk double reciprocal plot ดังรูปที่ 29 –32 พบว่าค่า K_m ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน มีค่า 40 มิลลิโมลาร์ และค่า K_m ของ NADH มีค่า 0.039 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน พบว่าค่า K_m ของ KNO_3 มีค่า 43.48 มิลลิโมลาร์ และค่า K_m ของ NADPH มีค่า 0.126 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสามารถใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้ดีกว่า NADPH และถ้าใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนจะต้องใช้ไนเตรตในปริมาณที่มากกว่าการใช้ NADH เช่นเดียวกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวแต่เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในต้นข้าวมีความจำเพาะต่อสับสเตรททั้ง 3 ตัวดังกล่าวมากกว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue* (เขมิกา โขมพัตร, 2545) ที่ใช้ในการทดลองนี้

4.8 ผลของไนโตรเจนในรูปของไนเตรต , แอมโมเนียม และ ไนเตรตร่วมกับแอมโมเนียมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

4.8.1 ผลของการได้รับไนโตรเจนในรูปของไนเตรตต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue*

จากการทดลองพบว่าสาหร่ายสามารถใช้ไนเตรตในการเจริญเติบโตได้โดยเห็นได้จากปริมาณไนเตรตในอาหารที่มีแนวโน้มลดลง แต่เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรตความเข้มข้นสูงจะมีแอคติวิตีต่ำกว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรตความเข้มข้นต่ำ ซึ่งอาจจะมีผลมาจากปริมาณไนไตรต์ที่สูงขึ้นในอาหาร โดยในชุดที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรตความเข้มข้นต่ำจะมีปริมาณไนไตรต์ในอาหารต่ำกว่าในชุดที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรตความเข้มข้นสูง (รูปที่ 33) เพราะฉะนั้นปริมาณไนไตรต์ที่ถูกขับออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายน่าจะมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายเช่นที่ได้วิจารณ์ไว้แล้วในหัวข้อ 4.6.2

4.8.2 ผลของการได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากรูปที่ 34 จะเห็นว่าถ้าในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีแหล่งไนโตรเจนที่เป็นแอมโมเนียมความเข้มข้นไม่เกิน 1.0 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายสามารถใช้แอมโมเนียมในการเจริญเติบโตได้ โดยสาหร่ายจะเปลี่ยนแอมโมเนียมไปเป็นไนเตรตได้ ซึ่งเห็นได้จากเริ่มต้นในอาหารไม่มีไนเตรตเลยแต่หลังจากเพาะเลี้ยงสาหร่ายไปได้ 1 วัน สามารถตรวจพบไนเตรตในอาหารได้ และสาหร่ายอาจจะใช้ไนเตรตที่ได้นี้ในการเจริญเติบโตด้วยเพราะในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงปริมาณไนเตรตในอาหารเริ่ม

ลดลงและลดลงอย่างต่อเนื่องทุกวัน ส่วนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าถ้าในอาหารมีแอมโมเนียมความเข้มข้นต่ำจะได้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีแอคติวิตีสูงกว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมความเข้มข้นสูง ซึ่งเกิดจากผลของแอมโมเนียมที่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้บางส่วน ดังผลการทดลองที่ผ่านมา (ผลการทดลองที่ 3.7.3 การศึกษาผลของแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส)

4.8.3 ผลของการได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมร่วมกับไนเตรตต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากผลการทดลอง พบว่าสาหร่ายสามารถใช้ไนเตรตในรูปของแอมโมเนียมไนเตรตในการเจริญเติบโตได้ โดยจะเห็นว่าปริมาณไนเตรตในอาหารลดลงอย่างต่อเนื่องทุกวัน (รูปที่ 35) ในขณะที่ในชุดที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นสูงจะมีปริมาณไนไตรต์ในอาหารเพิ่มขึ้นและค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นสูงมีค่าต่ำกว่าเอนไซม์ในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเกิดจากผลของทั้ง ไนไตรต์และแอมโมเนียม ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้ให้ผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้เช่นเดียวกัน

4.9 การเกิด cross reaction ระหว่างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย

เมื่อนำแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดมาทำปฏิกิริยา cross reaction กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายโดยดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) พบว่าสามารถเกิด cross reaction ได้ (ดังรูปที่ 36) จากผลการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *P. tenue* อาจจะมีลักษณะและลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าวโพด ทำให้แอนติบอดีต่อไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดสามารถจดจำลักษณะโมเลกุลของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของ *P. tenue* ได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Gruber และคณะ (1992) ที่ได้ศึกษาลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย Volvox พบว่าลำดับกรดอะมิโนของส่วน FAD domain, heme, molybdenum-pterin มีความคล้ายคลึงกับในพืชชั้นสูงมาก แต่จะแตกต่างกันในส่วน N-terminal และส่วน hinge