3. ผลการทดลอง

3.1. สภาพของบ่อน้ำร้อนและธารน้ำจากบ่อน้ำร้อน

จากการสำรวจสภาพของบ่อน้ำร้อนและธารน้ำจากบ่อน้ำร้อนที่ อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง พบว่าบ่อน้ำร้อนเป็นบ่อดิน ลักษณะกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 เมตร ลึก 1.5 เมตร (รูปที่ 7) และมีธารน้ำไหลจากบ่อน้ำร้อนซึ่งก่อสร้างด้วยซีเมนต์ ความยาวประมาณ 20 เมตร ทำให้อุณหภูมิของน้ำในลำธารมีความแตกต่างกัน คืออยู่ในช่วง 55 องศาเซลเซียส จากในบ่อและลดลงเรื่อยๆจนถึงปลายธารน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ลักษณะของน้ำในบ่อและในธารน้ำมีลักษณะใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นซัลเฟอร์ pH ของน้ำในธารน้ำร้อนอยู่ในช่วง 7.4-8.9 แต่ pH ในบ่อ มีค่า 7.4 และเมื่อนำตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์ปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ พบว่าในแหล่งน้ำดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนของไนเตรตและไนไตรต์

ตารางที่ 1 : ลักษณะของบ่อน้ำร้อน/ธารน้ำร้อน ที่ อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง

สภาพที่สำรวจบ่อน้ำร้อน/ธารน้ำร้อน	ลักษณะบ่อน้ำร้อน/ธารน้ำร้อน
สีของน้ำ	ใส ไม่มีสี
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
อุณหภูมิในบ่อ/ธารน้ำร้อน (องศาเซลเซียส)	55 / 55-30
pH ในบ่อ/ธารน้ำร้อน	7.4/7.4-8.9
ปริมาณไนเตรต	ไม่พบ
ปริมาณไนไตรต์	ไม่พบ

รูปที่ 7. ลักษณะของบ่อน้ำร้อน ใน อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง

3.2. ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรต ไนไตรต์ในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย และปริมาณไนเตรต และไนไตรต์ในเซลล์

เมื่อนำสาหร่ายที่เก็บมาจากบ่อน้ำร้อน ซึ่งเป็นสาหร่ายหลายชนิดที่อยู่รวมกัน มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ที่มีไนเตรตความเข้มข้น 17.6 มิลลิโมลาร์ ให้แสงความเข้ม 175 μmole m^{-2} s^{-1} และเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที ตลอดเวลา ระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการเก็บตัวอย่างอาหารที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายและเซลล์สาหร่ายทุกวัน เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของไนเตรต ไนไตรต์ ในอาหารและในเซลล์สาหร่าย เพื่อดูว่าสาหร่ายสามารถใช้ไนเตรตในการเจริญได้หรือไม่ จากการทดลองปริมาณไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย (เห็นผลไม่ชัดเจน) โดยปริมาณไนเตรตในอาหารเริ่มต้นมีค่าประมาณ 20 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายไปได้ 7 วัน ปริมาณไนเตรตที่หาได้มีค่าประมาณ 16.5 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 8A) ส่วนปริมาณไนเตรตในเซลล์สาหร่ายเริ่มต้นมีค่า 0.5 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายนานขึ้น (รูปที่ 8C) ส่วนปริมาณไนไตรต์ในอาหารจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จากเริ่มต้นเพาะเลี้ยงสาหร่ายไม่มีไนไตรต์ในอาหารเลย จนเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ 7 วัน มีปริมาณไนไตรต์ในอาหารประมาณ 15 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 8B) แต่ผลจากการหาปริมาณไนไตรต์ในเซลล์สาหร่ายพบว่าไม่มีการสะสมของไนไตรต์ในเซลล์ (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

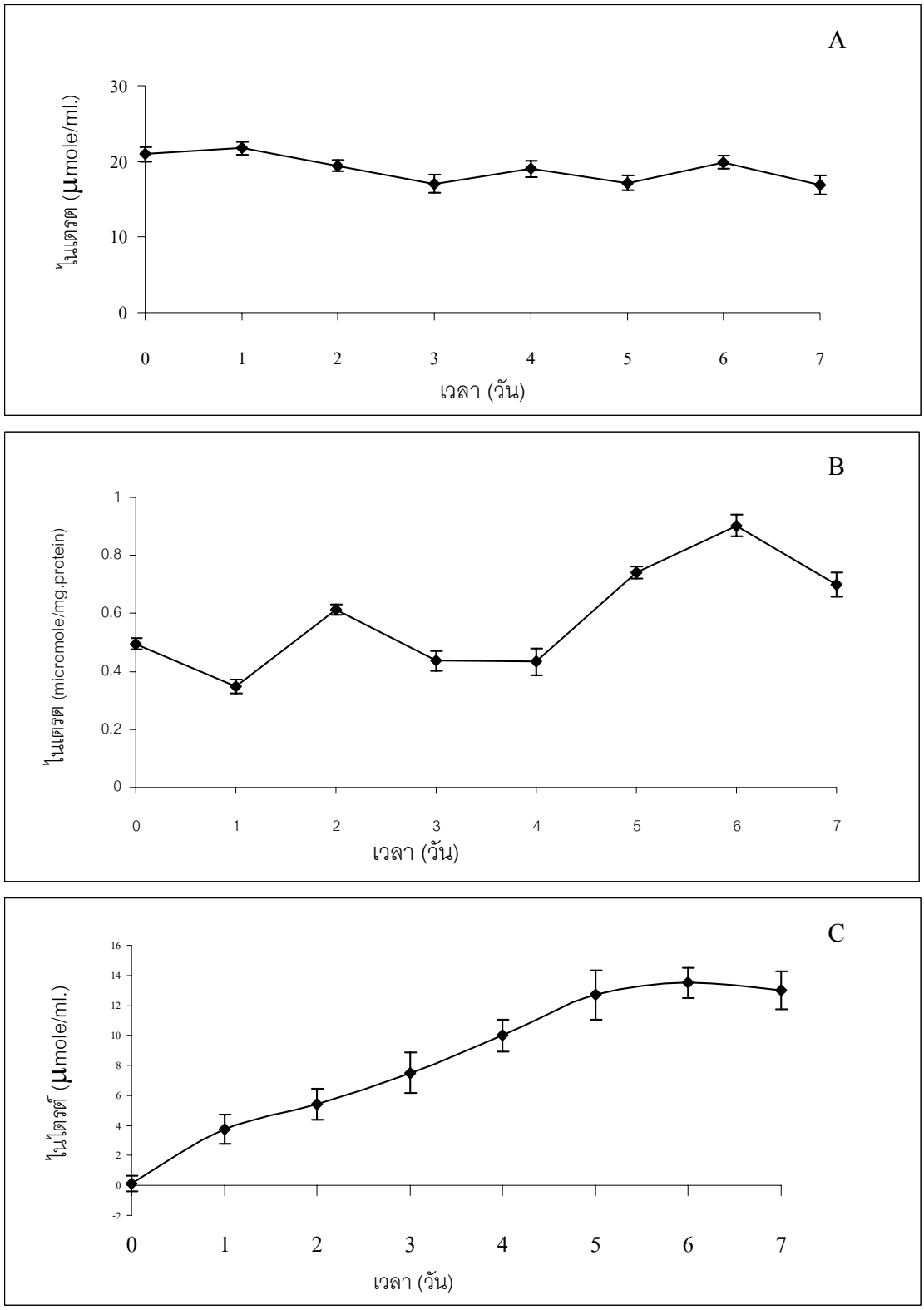
จากปริมาณไนเตรตที่ลดลงและปริมาณไนไตรต์ที่เพิ่มขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย แสดงว่าสาหร่ายสามารถเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ และใช้ในการเจริญได้ และสาหร่ายจะขับไนไตรต์ที่เหลือออกจากเซลล์ จึงทำให้ไม่มีการสะสมของไนไตรต์ในเซลล์

3.3 การแยกสาหร่ายให้เป็นชนิดเดี่ยว ๆ และวิเคราะห์การทำงาน (activity) ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส แบบ in vivo

เมื่อนำสาหร่ายที่เก็บได้ มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X พบว่ามีสาหร่าย 3 ชนิดอยู่รวมกัน คือ สาหร่ายชนิดเซลล์เดี่ยว, ชนิดสายขนาดใหญ่ และชนิดสายขนาดเล็ก โดยสาหร่ายชนิดเซลล์เดี่ยวมีปริมาณมากที่สุด จึงได้แยกสาหร่ายชนิดเซลล์เดี่ยวออกมาได้ โดยวิธีการทำเจือจาง ส่วนชนิดสายขนาดเล็กและขนาดใหญ่แยกได้จากการนำมาขีดลากบนอาหารแข็ง

หลังจากแยกได้สาหร่ายชนิดเดี่ยวๆ 3 ชนิดแล้วได้นำสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG-11 ให้แสง 175 μmole m^{-2} s^{-1} ตลอดเวลาเป็นเวลา 3 วัน แล้วเก็บตัวอย่างสาหร่ายมาวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสแบบ in vivo ได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 2

จากผลการหาแอคติวิตีของสาหร่ายชนิดต่างๆ พบว่า มีสาหร่ายเพียงชนิดเดียวที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส คือสาหร่ายชนิดสายขนาดเล็ก จึงได้เลือกสาหร่ายชนิดนี้มาศึกษาในขั้นตอนต่อไป ซึ่งสามารถระบุชนิดของสาหร่ายชนิดสายขนาดเล็กได้เป็น *Phormidium tenue* (Menegh.) Gomont (รูปที่ 9)



รูปที่ 8. การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่ความเข้มแสง 175 µmole m^{-2} s^{-1} ตลอดเวลา (A) ปริมาณไนเตรตในอาหารเลี้ยงสาหร่าย (B) ปริมาณไนเตรตในเซลล์ (C) ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงสาหร่าย ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ ± S.D.

รูปที่ 9. ลักษณะของสาหร่าย *Phormidium tenue* (Menegh) Gomont

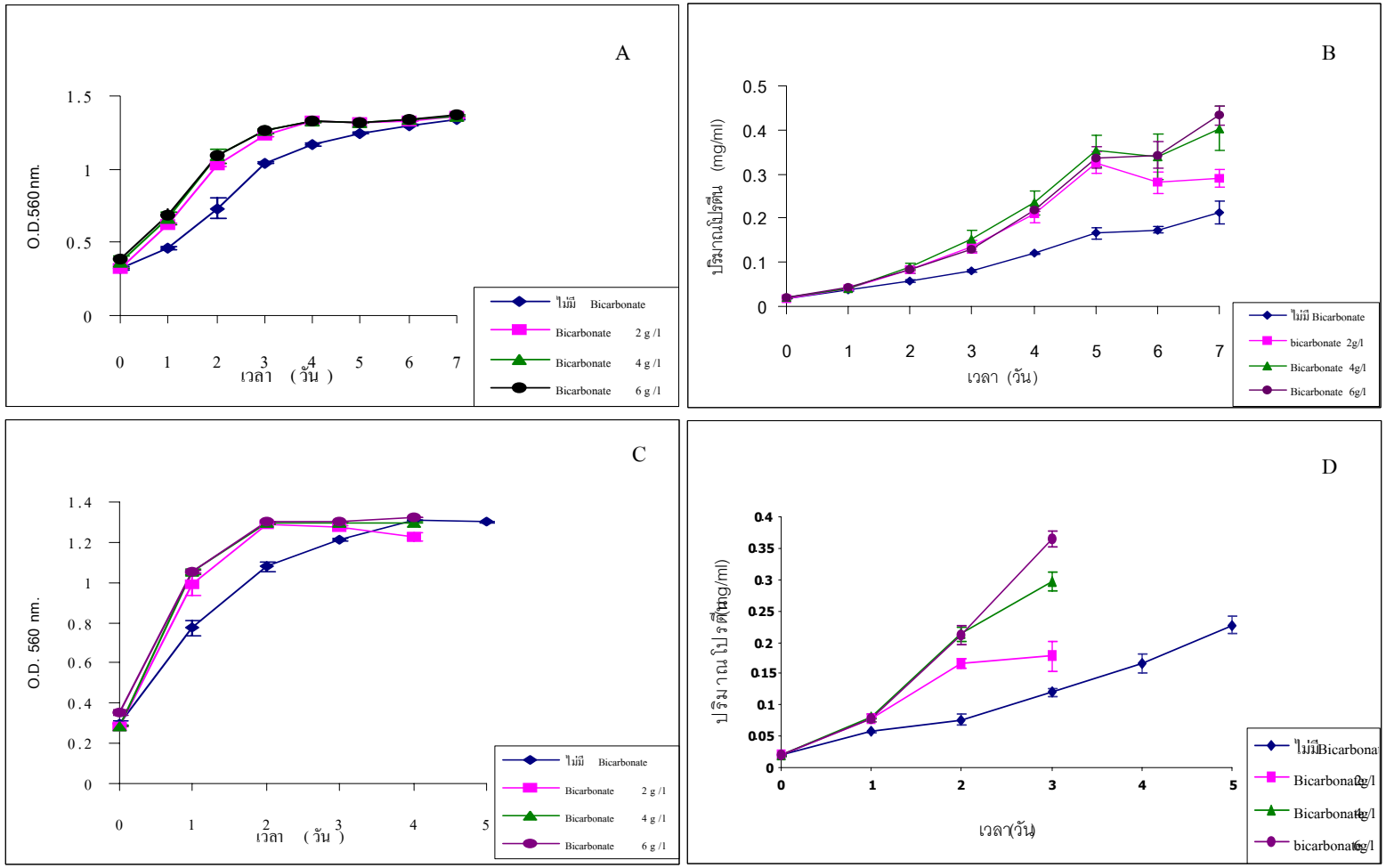
ตารางที่ 2. แสดงแอคติวิตีของสาหร่ายชนิดต่างๆ

ชนิดของสาหร่าย	แอคติวิตี (nmole/min/mg.protein)
สาหร่ายที่อยู่รวมกัน	0.23
สาหร่ายชนิดเซลล์เดี่ยว	ไม่มี
สาหร่ายชนิดสายขนาดเล็ก	0.74
สาหร่ายชนิดสายขนาดใหญ่	ไม่มี

3.4. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Phormidium tenue*

เมื่อเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหาร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 2 , 4 และ 6 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสงที่มีความเข้ม 2 ระดับ คือ 175 μmole m^{-2} s^{-1} และ 622 μmole m^{-2} s^{-1} ตลอดเวลา พบว่าเมื่อในอาหารมีไบคาร์บอเนต สาหร่ายจะเจริญได้ดีกว่าในอาหารที่ไม่มีไบคาร์บอเนต แต่ปริมาณไบคาร์บอเนตไม่ได้มีผลกับอัตราการเจริญของสาหร่าย จะเห็นได้จากเมื่อในอาหารมีไบคาร์บอเนต 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญของสาหร่ายซึ่งดูได้จากค่า OD. ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรและปริมาณโปรตีนมีค่าไม่แตกต่างกันแต่จะแตกต่างจากชุดที่ใช้อาหารที่ไม่มีไบคาร์บอเนต (รูปที่ 10) ($P \leq 0.05$, ตารางที่ 5, 6 ภาคผนวก) ดังนั้นจึงใช้โซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดในการเลี้ยงสาหร่ายต่อไป

เมื่อให้แสงที่ความเข้ม 622 μmole m^{-2} s^{-1} ตลอดเวลา สาหร่ายเจริญได้ดีกว่าเมื่อให้แสงความเข้ม 175 μmole m^{-2} s^{-1} ตลอดเวลา คือเจริญได้เต็มที่ในวันที่ 2 และตายเร็วกว่า (ในวันที่ 4) แต่ถ้าให้



รูปที่ 10. อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกัน (A) เมื่อเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสง 175 μmole m^{-2} s^{-1} และวัดอัตราการเจริญโดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (B) โดยวิธีการหาปริมาณโปรตีน (C) เมื่อเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสง 622 μmole m^{-2} s^{-1} และวัดอัตราการเจริญโดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (D) โดยวิธีการหาปริมาณโปรตีน ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D.

แสงความเข้ม 175 μmole m^{-2} s^{-1} ตลอดเวลาสาหร่ายเจริญเติบโตช้ากว่า คือได้ค่า OD. คงที่สูงสุดในวันที่ 3 และตายในวันที่ 7 (รูปที่ 10)

ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรตในอาหารเมื่อเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสงที่ความเข้ม 622 μmole m^{-2} s^{-1} ตลอดเวลา พบว่าปริมาณไนเตรตมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย แต่เมื่อเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสงความเข้ม 175 μmole m^{-2} s^{-1} ตลอดเวลา ไม่สามารถเห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรตในอาหารได้ชัดเจน (รูปที่ 11A, B) เนื่องจากมีไนเตรตในปริมาณมากเกินพอและสาหร่ายสามารถใช้ไนเตรตได้ในปริมาณน้อยเท่านั้น จึงได้ทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่มีไนเตรตปริมาณน้อยๆ ต่อไป

ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนไตรต์ในอาหาร พบว่าปริมาณไนไตรต์ในอาหารมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในชุดที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีไบคาร์บอเนต ซึ่งปริมาณไนไตรต์จะเพิ่มขึ้นสูงที่สุด ส่วนในชุดการทดลองอื่นๆ ที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างๆ คือ 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้นมีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 12) แสดงว่าสาหร่ายสามารถเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ได้แล้วขับออกจากเซลล์เนื่องจากไม่มีการสะสมของไนไตรต์ ในเซลล์ (จากการทดลองไม่พบไนไตรต์ในเซลล์)

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรตในอาหารเลี้ยงสาหร่ายเมื่อให้แสงความเข้ม 175 μmole m^{-2} s^{-1} ตลอดเวลา ไม่สามารถเห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรตได้ชัดเจน (รูปที่ 11A) เนื่องจากมีไนเตรตในปริมาณมากเกินพอ แต่สาหร่ายสามารถใช้ไนเตรตได้ในปริมาณน้อย จึงได้ทดลองโดยเพาะเลี้ยงสาหร่ายในอาหารที่มีไนเตรตปริมาณต่างๆต่อไป โดยใช้อาหารที่มีโซเดียมไนเตรตความเข้มข้นต่ำและสูงต่าง ๆ กัน คือ 1.1, 8.82, 17.6 และ 35.30 มิลลิโมลาร์และมีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 กรัมต่อลิตร เพื่อดูอัตราการเจริญของสาหร่าย การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ในอาหาร พบว่าอัตราการเจริญที่ดูจากค่า OD. ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และความเข้มข้นของโปรตีนของสาหร่าย ไม่แตกต่างกัน แม้ว่าในอาหารมีปริมาณไนเตรตต่างกัน ($P \leq 0.05$, ตารางที่ 7 ภาคผนวก) คือสาหร่ายจะเจริญได้เต็มที่หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 6 วันและตายในวันที่ 10 ในทุกชุดการทดลอง (รูปที่ 13) เป็นไปได้ว่าสาหร่ายจะใช้ไนเตรตในปริมาณน้อยๆเท่านั้นหรือมีปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่งที่จำกัดการเจริญเติบโต ดังนั้นแม้ว่าในอาหารมีไนเตรตปริมาณสูงแต่การเจริญจะไม่แตกต่างจากในชุดที่ในอาหารมีไนเตรตปริมาณน้อย

จากชุดการทดลองที่ในอาหารมีไนเตรตความเข้มข้นต่ำ (1.1 มิลลิโมลาร์) เห็นการเปลี่ยนแปลงปริมาณไนเตรตที่ลดลงได้ชัดเจน (รูปที่ 14A) และเมื่อเติมโซเดียมไนเตรตเพิ่มอีก 7.5 มิลลิกรัมในวันที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของไนเตรตในอาหารมีแนวโน้มลดลงเช่นเดิม (รูปที่ 14B) แสดงว่าสาหร่ายชนิดนี้ใช้ไนเตรตในการเจริญในปริมาณน้อยๆ เท่านั้น ส่วนความเข้มข้นของไนไตรต์ในอาหารมีแนวโน้มเพิ่ม

สูงขึ้นเรื่อยๆ (รูปที่ 15) แต่ในชุดการทดลองที่ใช้อาหารที่มีไนเตรต 1.1 มิลลิโมลาร์ หลังจากเพาะเลี้ยงสาหร่ายไปได้ 8 วัน ปริมาณไนไตรต์ลดลง อาจเกิดจากเมื่อไนเตรตในอาหารถูกใช้ไปจนหมดสาหร่ายจะใช้ไนไตรต์ที่มีในอาหารในการเจริญต่อไปได้

3.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน (activity) ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

3.5.1 ผลการศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในเซลล์

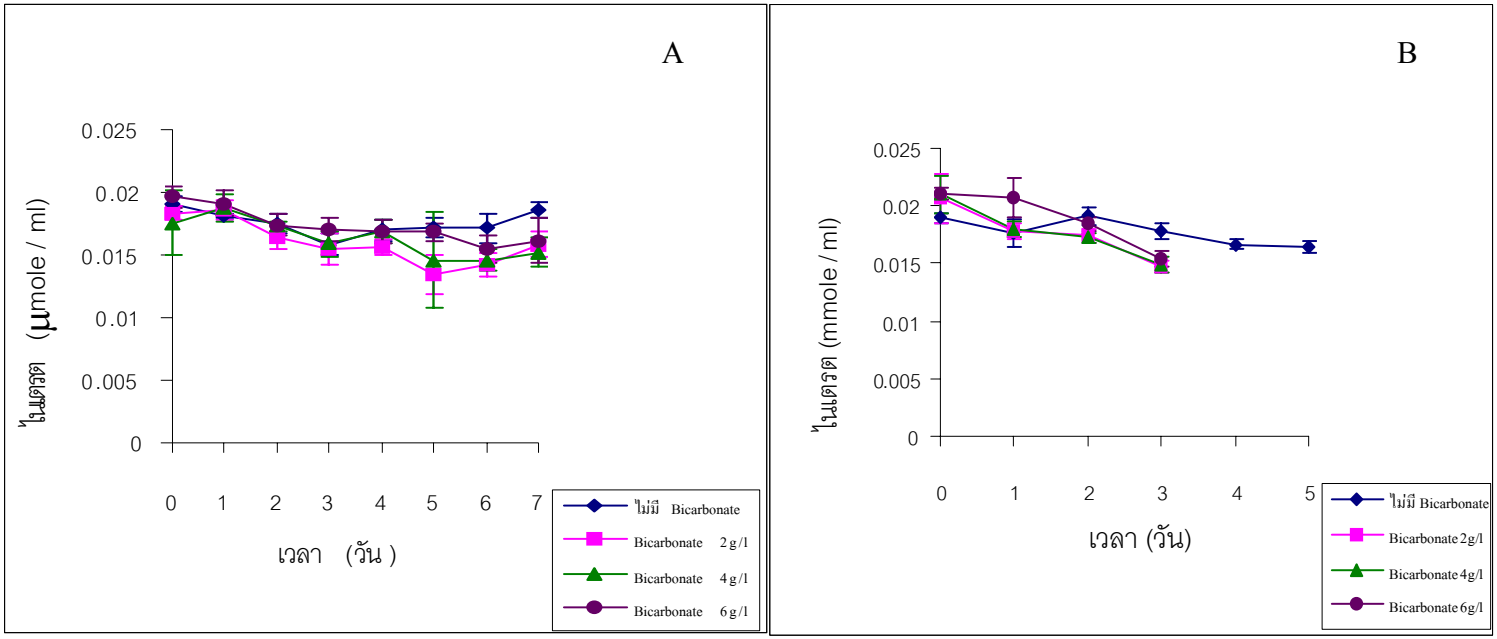
เมื่อทำให้เซลล์สาหร่ายแตกโดยการบดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วบดกับบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 ที่มี EDTA 1 มิลลิโมลาร์ PMSF 1 มิลลิโมลาร์ และ DTT 0.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที แยกสารละลายส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของไซโตพลาสซึมของเซลล์ และส่วนตะกอนซึ่งเป็นส่วนของเมมเบรนของเซลล์สาหร่ายไปละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วนไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส พบว่า ในส่วนเมมเบรนมีแอคติวิตี 0.3 nmole NO_2^-/min/mg protein แต่ในส่วนไซโตพลาสซึมไม่มีแอคติวิตีแสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิดนี้เกาะติดอยู่กับเมมเบรนของเซลล์

3.5.2 ผลการศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดและใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์

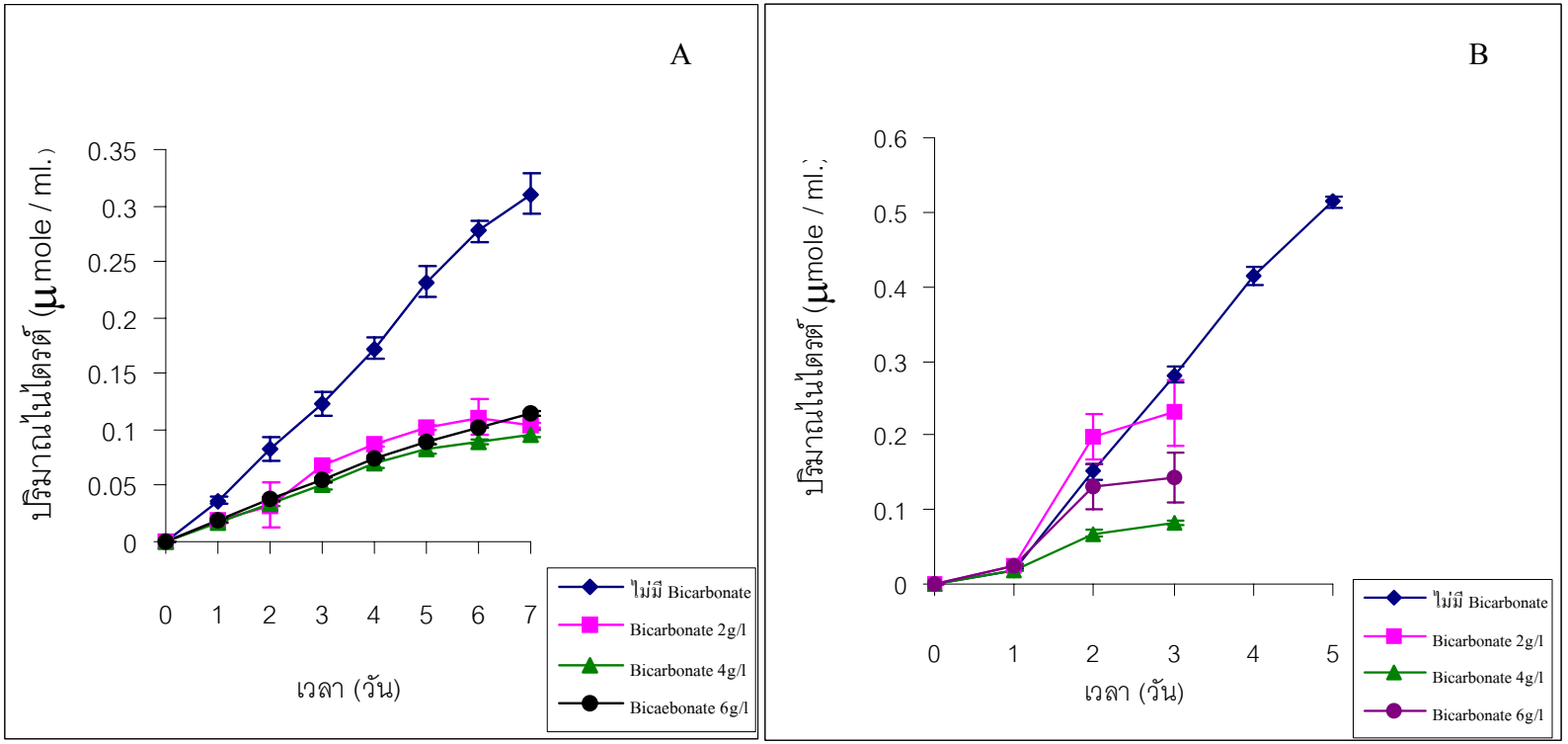
จากการทดลองสกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *P. tenue* โดยใช้บัฟเฟอร์ ต่างๆ กัน 4 ชุด คือ

- 50 mM MOPS pH 7.5 + 1mM EDTA + 1 mM PMSF + 0.5 mM DTT + 10 μM Chymostatin
- 50 mM MOPS pH 7.5 + 1mM EDTA + 1 mM PMSF + 0.5 mM DTT
- 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 + 1mM EDTA + 1 mM PMSF + 0.5 mM DTT + 10 μM Chymostatin
- 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 + 1mM EDTA + 1 mM PMSF + 0.5 mM DTT

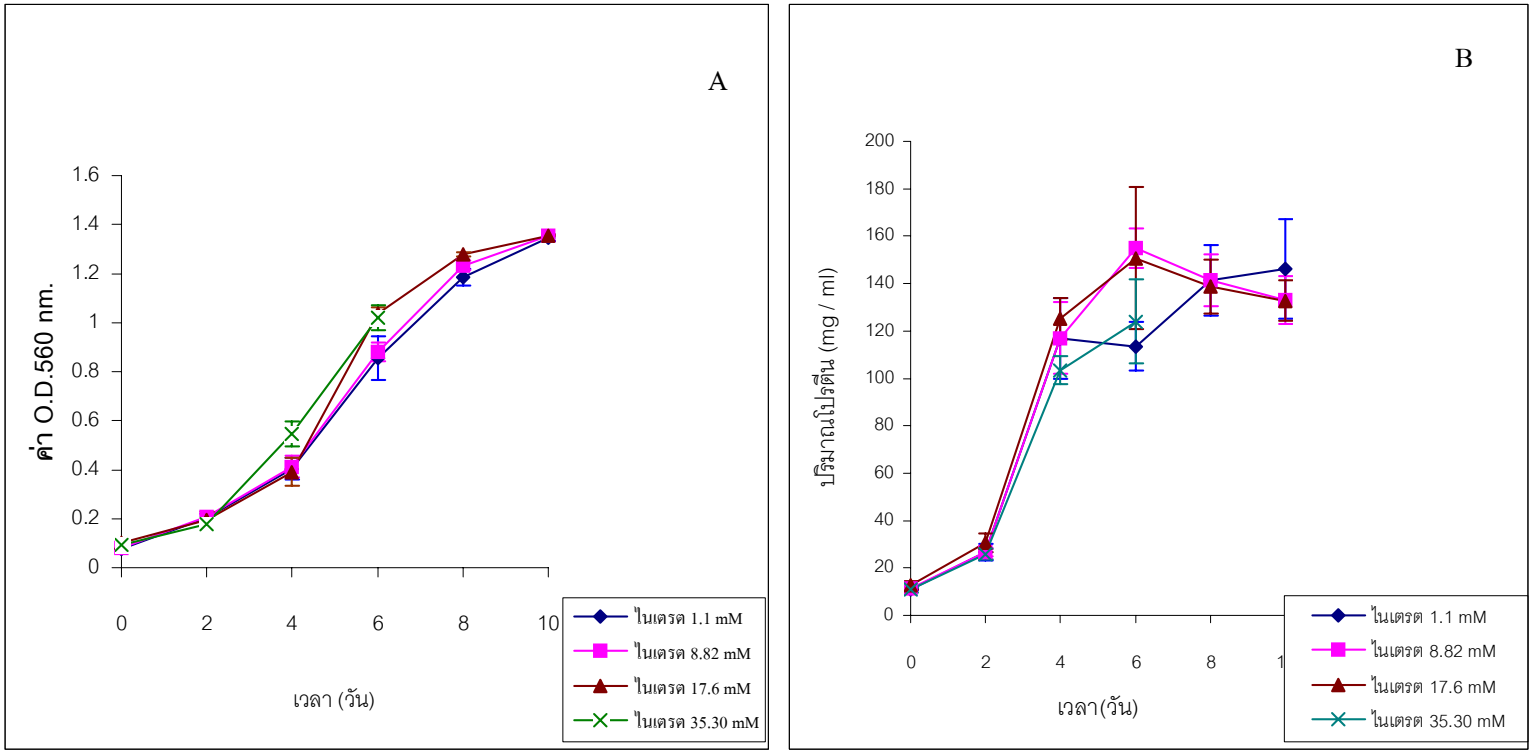
และวิเคราะห์แอคติวิตี ด้วยบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 และ 50 mM MOPS buffer pH 7.5 พบว่า เมื่อใช้บัฟเฟอร์ 50 mM MOPS pH 7.5 สกัดเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจะให้ค่าแอคติวิตีสูงกว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.5 แต่ถ้าในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดมี chymostatin ด้วยจะทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีน้อยกว่าในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี chymostatin ในการวิเคราะห์แอคติวิตี พบว่าถ้าใช้ 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 จะทำให้ได้แอคติวิตีสูงกว่าการใช้บัฟเฟอร์ 50 mM MOPS pH 7.5 (รูปที่ 9) ดังนั้นชุดการทดลองที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงที่สุดคือ ชุดที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM MOPS pH 7.5 + 1mM EDTA + 1 mM PMSF + 0.5 mM DTT และวิเคราะห์แอคติวิตีด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5 ($P \leq 0.05$, ตารางที่ 8. ภาคผนวก) จึงใช้บัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดนี้ในการสกัดและวิเคราะห์แอคติวิตีต่อไป



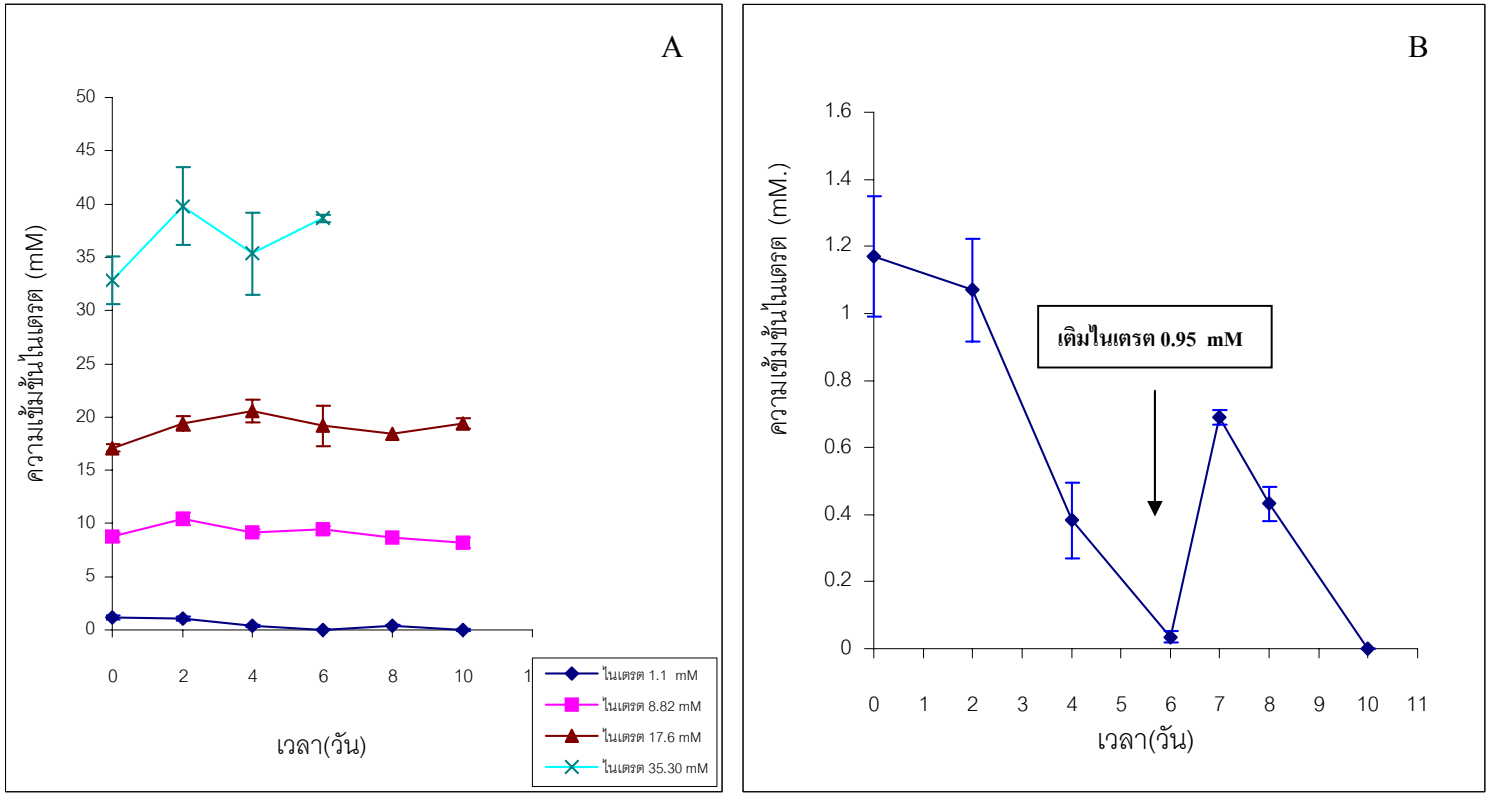
รูปที่ 11. ปริมาณไนเตรตในอาหารเลี้ยงสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกัน (A) เมื่อเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสง 175 µmole m^{-2} s^{-1} (B) เมื่อเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสง 622 µmolem^{-2} s^{-1} ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D.



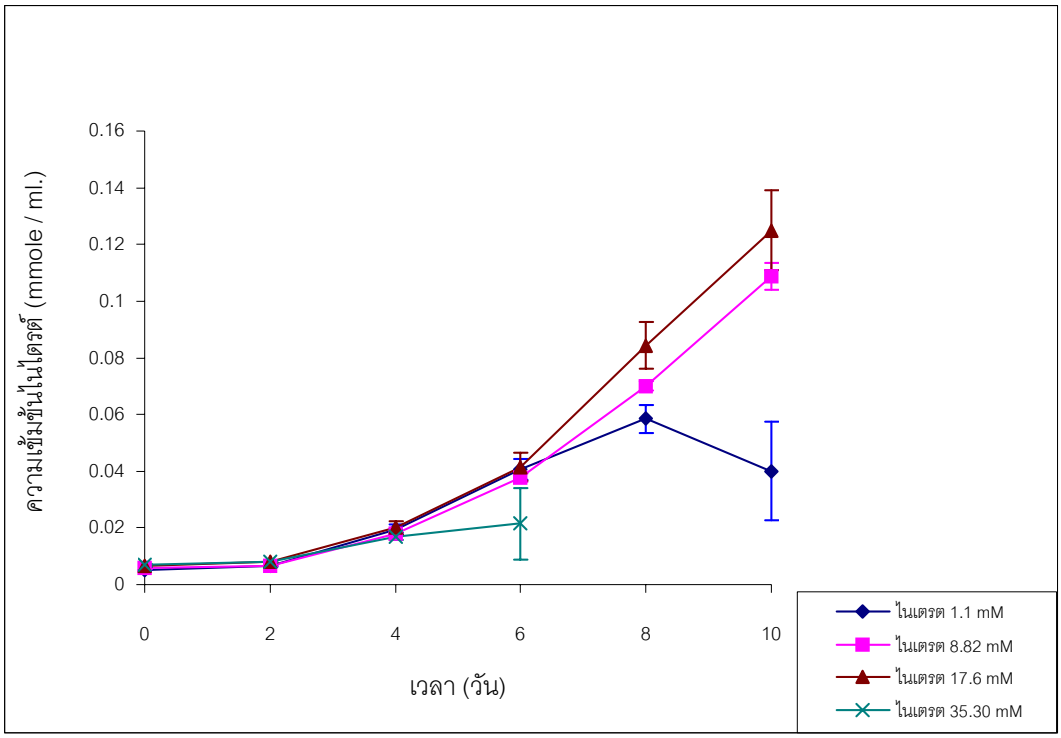
รูปที่ 12. ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงสาหร่าย เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกัน (A) เมื่อเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสง 175 µmole m^{-2} s^{-1} (B) เมื่อเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสง 622 µmole m^{-2} s^{-1} ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D.



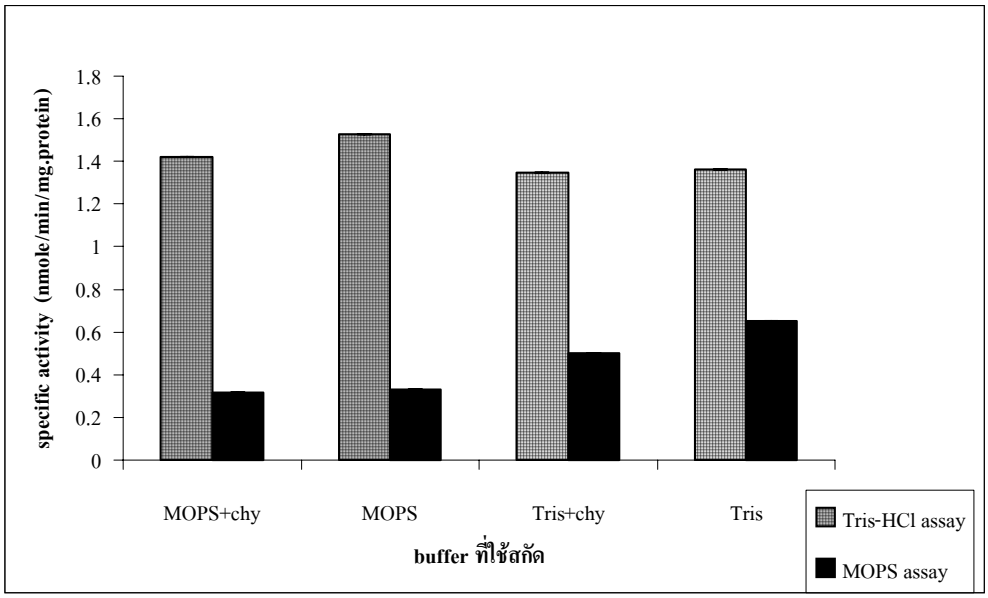
รูปที่ 13 . อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไนเตรตน้อยกว่าสูตรมาตรฐาน และให้แสงที่ความเข้มแสง 175 μmole m^{-2} s^{-1} (A) โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (B) โดยวิธีการหาค่าปริมาณโปรตีน ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D.



รูปที่ 14. ปริมาณไนเตรตในอาหารเลี้ยงสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไนเตรตน้อยกว่าสูตรมาตรฐาน และให้แสงที่ความเข้มแสง 175 μmole m^{-2} s^{-1} (A) เมื่อในอาหารมีไนเตรต 1.1 8.82 17.6 และ 35.3 mM (B) เมื่อในอาหารมีไนเตรต 1.1 mM และเติมไนเตรตเพิ่มในวันที่ 7 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D.



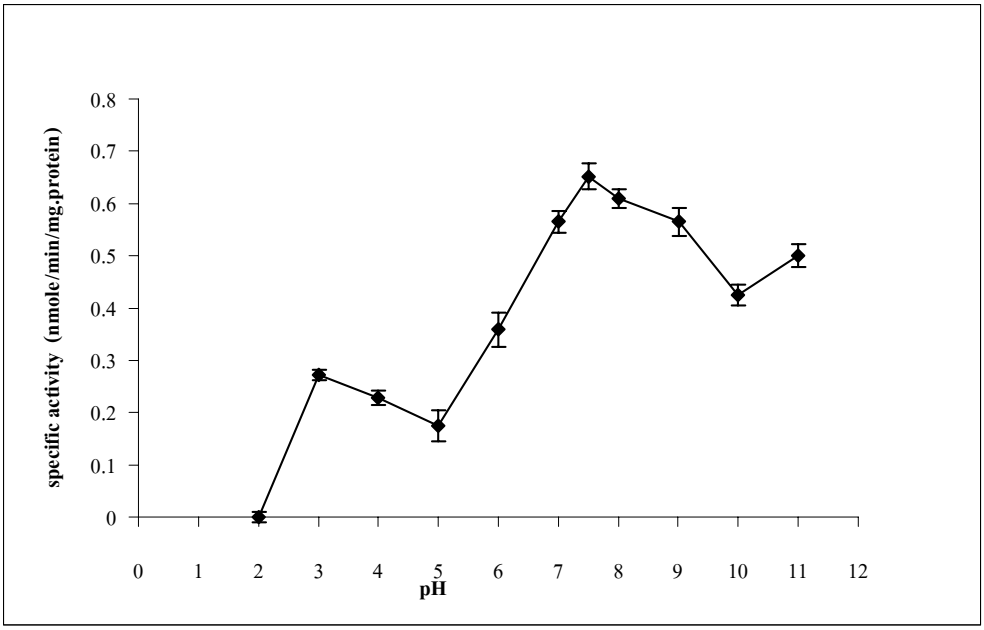
รูปที่ 15. ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไนเตรตน้อยกว่าสูตรมาตรฐาน และให้แสงที่ความเข้มแสง 175 μmole m^{-2} s^{-1} ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D.



รูปที่ 16. ค่าแอคติวิตีของ NR จากสาหร่ายเมื่อใช้บัฟเฟอร์ในการสกัดและวิเคราะห์แอคติวิตีต่างกัน ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D.

3.5.3. การหา pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์

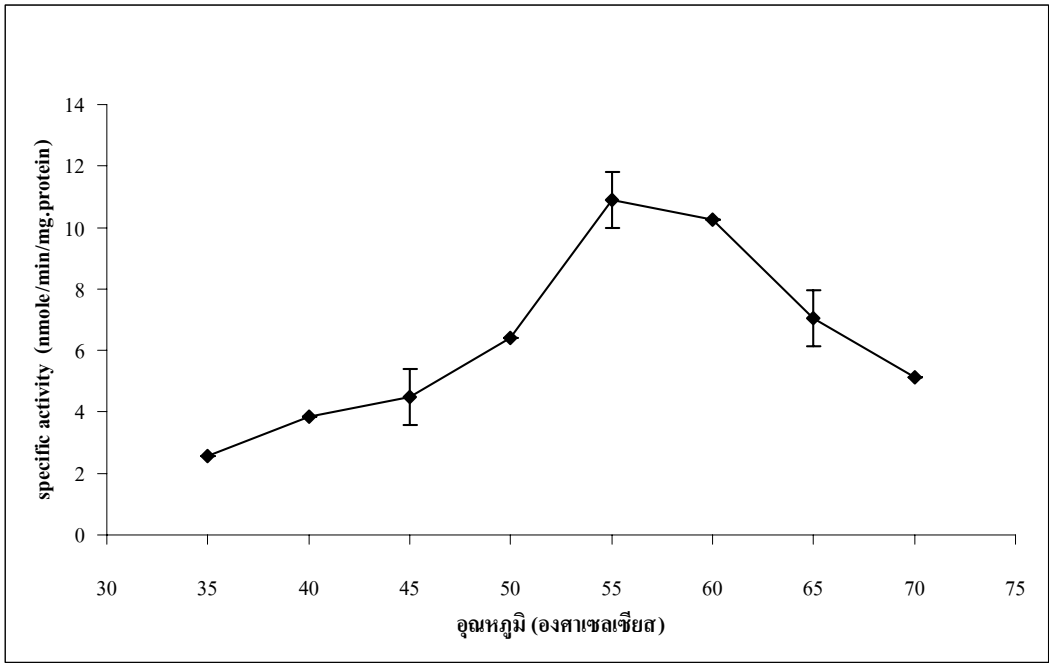
โดยใช้ช่วง pH 2-11 ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) และทำการทดลอง 2 ซ้ำ พบว่าเมื่อวัดแอคติวิตีของ NR ในช่วง pH 2-7.5 แอคติวิตีของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ pH 7.5 เมื่อเพิ่ม pH คือช่วง pH 8-11 แอคติวิตีของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 16)



รูปที่ 17 . ค่าแอคติวิตีของ NR จากสาหร่ายที่ pH ต่างๆ
ในการวิเคราะห์แอคติวิตี ในช่วง pH 2-6 ใช้บัฟเฟอร์ acetate, ช่วง pH 6.5-9 ใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl และในช่วง pH 9.5-11 ใช้บัฟเฟอร์ carbonate ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D.

3.5.4. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์แอคติวิตีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 35-70°C และทำการทดลอง 2 ซ้ำ พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงขึ้น โดยเอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้ แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง (รูปที่ 17) ดังนั้นในการทดลองต่อๆไปจึงใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในการวิเคราะห์แอคติวิตีเพราะที่อุณหภูมินี้เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด

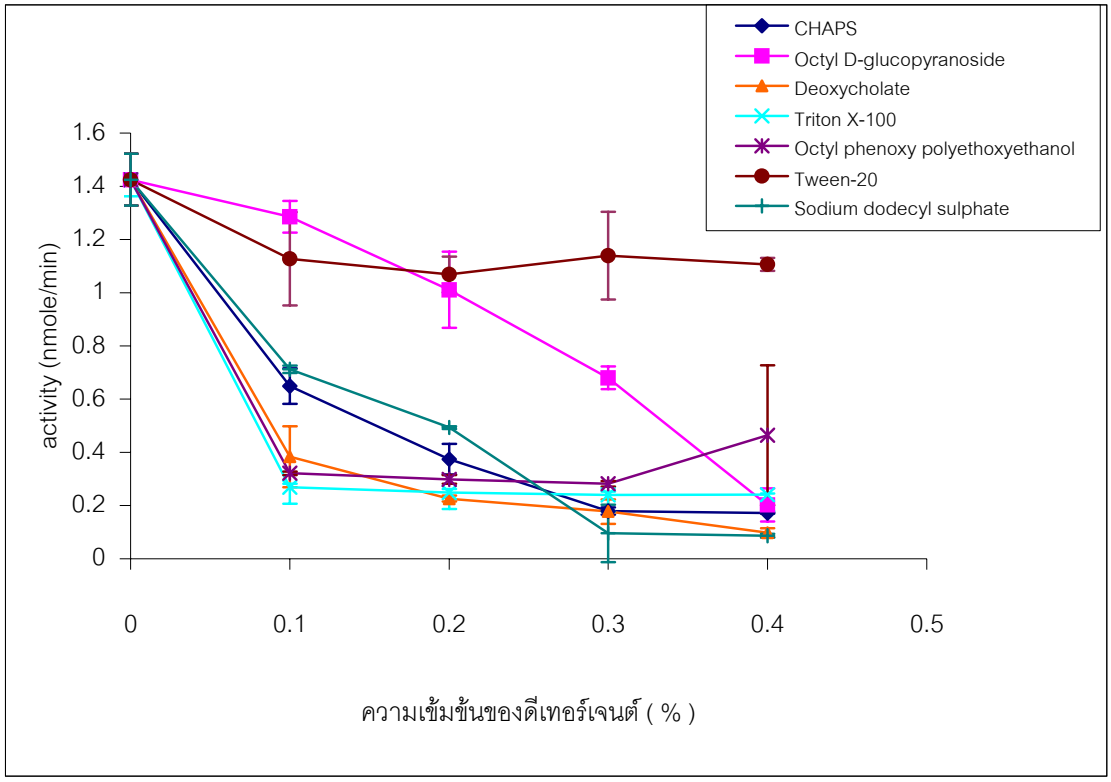


รูปที่ 18. ค่าแอคติวิตีของ NR จากสาหร่ายที่อุณหภูมิต่างๆ ใช้ Digital Dry Bath ซึ่งสามารถปรับอุณหภูมิได้ และใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ในการวิเคราะห์แอคติวิตี ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D.

3.5.5 ผลการศึกษาผลของสารดีเทอร์เจนต์ต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการทดลองสกัดเอนไซม์ออกจากส่วนเมมแบรนของเซลล์สาหร่ายด้วยสารดีเทอร์เจนต์ต่างๆ โดยการใช้บัฟเฟอร์ 50 mM MOPS pH 7.5 + 1mM EDTA + 1 mM PMSF + 0.5 mM DTT ที่มีสารดีเทอร์เจนต์ต่างๆ ละลายส่วนตะกอนซึ่งเป็นส่วนของเมมเบรนและเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ตลอดเวลาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความแรง 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนใสซึ่งเป็นส่วนที่สกัดออกจากเมมเบรน และส่วนตะกอนซึ่งเป็นส่วนเมมเบรนมาวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส พบว่าเมื่อใช้ดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้นต่ำ (0.2-1%) ยังมีแอคติวิตีในส่วนของตะกอน แสดงว่าไม่สามารถใช้สารดีเทอร์เจนต์สกัดเอนไซม์ออกจากเมมเบรนได้ แต่เมื่อใช้สารดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้นสูงขึ้น (1.5-5%) ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งในส่วนใสและ

ส่วนตะกอน จึงเป็นไปได้ว่าสารดีเทอร์เจนต์มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส จึงได้ทดลองเติมสารดีเทอร์เจนต์ความเข้มข้นต่างๆ ลงในส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยาหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ปรากฏว่าสารดีเทอร์เจนต์ส่วนใหญ่มีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง โดย deoxycholate, Triton X-100 และ [octyl phenoxy] polyethoxyethanol ให้ผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ดีที่สุด ($P \leq 0.05$ ตารางที่ 9. ภาคผนวก) เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 0.1% เท่ากัน และเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 0.4 % SDS มีผลให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงมากที่สุดถึง 93.92% เช่นเดียวกับเมื่อใช้ Deoxycholate ($P \leq 0.05$ ตารางที่ 9. ภาคผนวก) รองลงมาเป็น CHAPS, octyl β-D-glucopyranoside, Triton X-100, ([octyl phenoxy] polyethoxyethanol) และ Tween-20 ที่ทำให้แอคติวิตีลดลง 87.93, 85.82, 83.09, 67.44 และ 22.35 % ตามลำดับ (ดังรูปที่ 18) ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้สารดีเทอร์เจนต์ในการสกัดเอนไซม์ออกจากส่วนเมมเบรนได้



รูปที่ 19. ผลของสารดีเทอร์เจนต์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ในการวิเคราะห์แอคติวิตีใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และใช้โปรตีนประมาณ 0.12 มิลลิกรัม ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D.

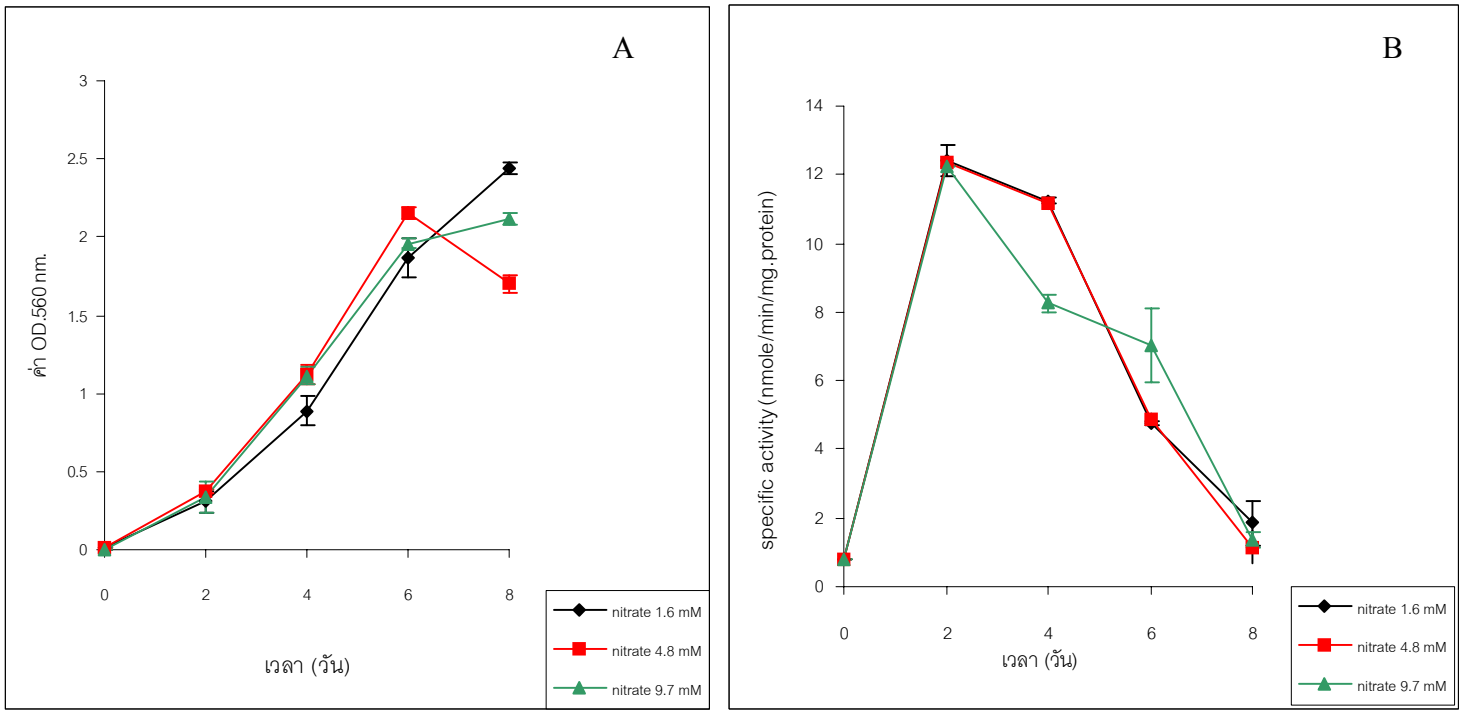
3.6. การศึกษาสภาวะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงที่สุด

3.6.1 การศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายที่มีอายุต่างกัน

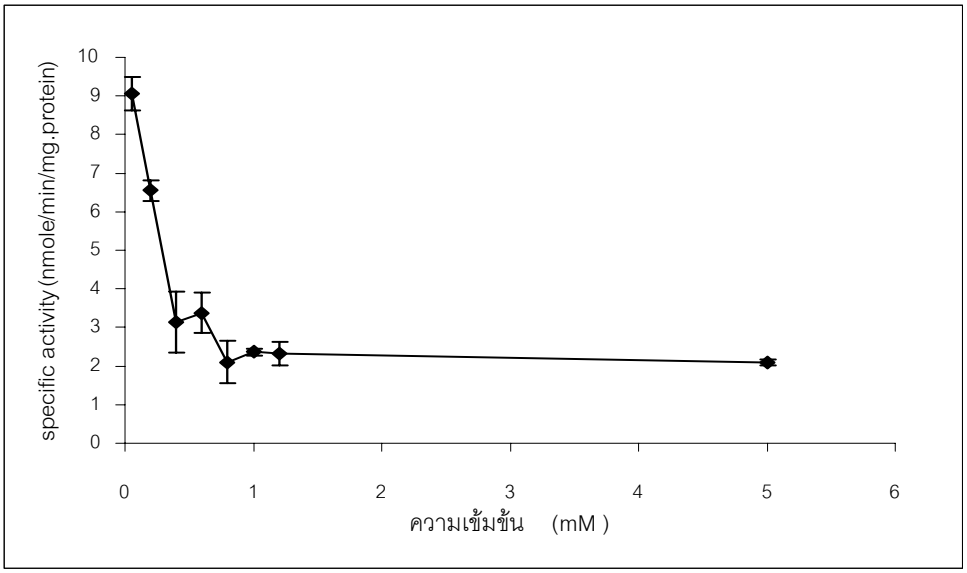
จากการศึกษาความสัมพันธ์ของอายุสาหร่ายกับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่าสาหร่ายที่ให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีแอคติวิตีสูงที่สุด คือสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงได้ 2 วัน ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรประมาณ 0.3 (รูปที่19A) แต่เมื่อสาหร่ายมีอายุมากขึ้นเอนไซม์ที่ได้จะมีแอคติวิตีลดลงเรื่อยๆ (รูปที่ 19B) ดังนั้นในการศึกษาตอนต่อไปจึงเก็บตัวอย่างสาหร่ายหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 2 วัน หรือจนให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรประมาณ 0.3 เพราะเป็นช่วงที่สาหร่ายอยู่ในขั้นการเจริญเติบโตเดียวกัน

3.6.2 ผลการศึกษาผลของไนเตรตในอาหารต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการทดลองให้มีไนเตรตในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 และ 5 มิลลิโมลาร์ พร้อมทั้งมีไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างสาหร่ายเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรประมาณ 0.3 พบว่าเมื่อใช้อาหารที่ไม่มีไนเตรตเพาะเลี้ยงสาหร่าย สาหร่ายไม่สามารถเจริญได้ และเมื่อใช้อาหารที่มีไนเตรตความเข้มข้นต่างๆ กันทำให้เอนไซม์ที่ได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยไนเตรตที่มีความเข้มข้นสูงกว่ามีค่าแอคติวิตีน้อยกว่าเอนไซม์ที่ได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรตความเข้มข้นต่ำกว่า โดยเอนไซม์ที่ได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์มีแอคติวิตีสูงที่สุด คือ 9.06 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาเป็นเอนไซม์ที่ได้จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรต 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 และ 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งให้ค่าแอคติวิตีเป็น 6.55, 3.15, 3.37, 2.1, 2.36, 2.32 และ 2.09 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (รูปที่ 20) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้อาหารที่มีไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายต่อไป



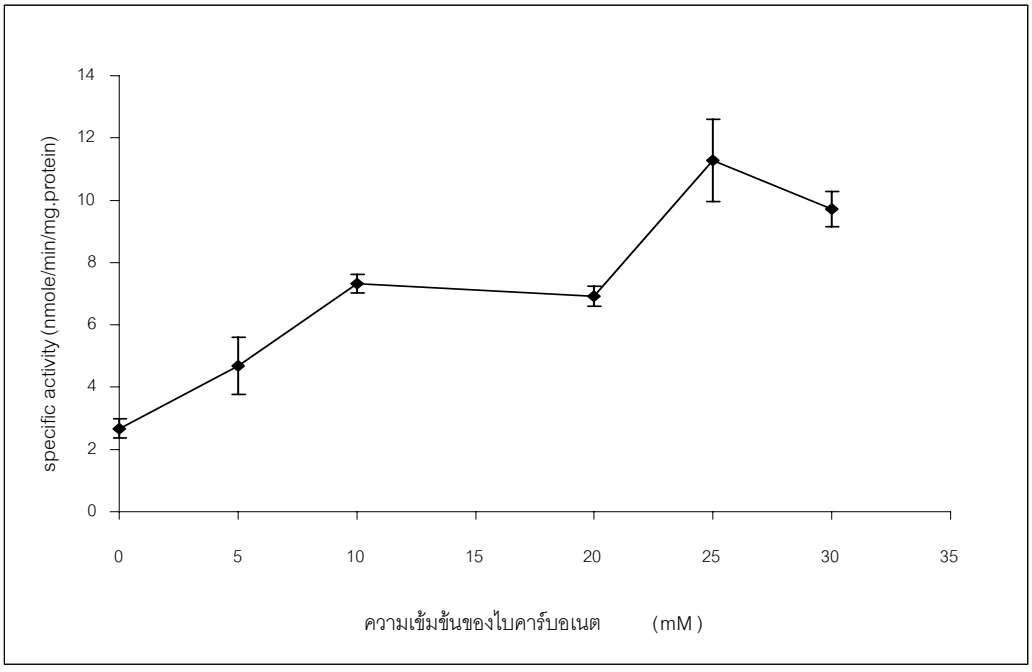
รูปที่ 20. ผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญของสาหร่ายและแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไนเตรตความเข้มข้นต่างกัน ที่ความเข้มแสง 175.1 μmole m^{-2} s^{-1} (A) อัตราการเจริญของสาหร่ายเมื่อวัดโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (B) แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายที่มีอายุต่างกัน ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D.



รูปที่ 21. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนเตรตในอาหารกับค่าแอคติวิตีของ NR เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไนเตรตความเข้มข้นต่างกัน ที่ความเข้มแสง 175.1 μmole m^{-2} s^{-1} โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรเป็น 0.3 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D.

3.6.3 การศึกษาผลของไบคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงสาหร่ายต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

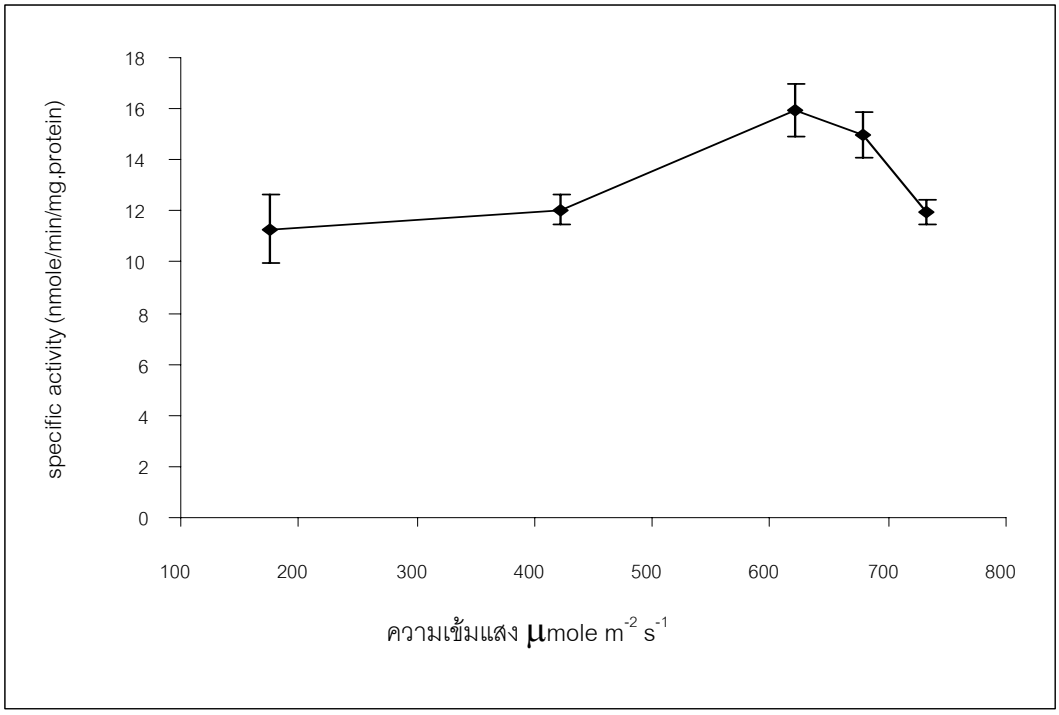
จากผลการทดลองโดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่มีไบคาร์บอเนต 0, 5, 10, 20, 25 และ 30 มิลลิโมลาร์ และมีไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์ทุกชุดการทดลอง เก็บตัวอย่างสาหร่ายเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรประมาณ 0.3 พบว่าสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นสูงขึ้น จะให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีแอคติวิตีสูงขึ้น และสูงที่สุดเมื่อในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงมีไบคาร์บอเนต 25 มิลลิโมลาร์ คือมีค่าแอคติวิตี 11.29 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และน้อยที่สุดเมื่อในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายไม่มีไบคาร์บอเนต ซึ่งให้แอคติวิตี 2.67 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ถ้าในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายมีไบคาร์บอเนต มากกว่า 25 มิลลิโมลาร์ แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเช่นกัน (รูปที่ 21) ดังนั้นความเข้มข้นของไบคาร์บอเนตที่เหมาะสมคือ 25 มิลลิโมลาร์ จึงใช้ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาขั้นต่อไป



รูปที่ 22. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไบคาร์บอเนตในอาหารกับค่าแอคติวิตีของ NR เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกัน ที่ความเข้มแสง 175.1 μmole m^{-2} s^{-1} โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เป็น 0.3 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D.

3.6.4 การศึกษาผลของระดับแสงต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่มีไบคาร์บอเนต 25 มิลลิโมลาร์และไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์ และให้แสงแตกต่างกัน คือ 175, 421, 622, 679 และ 732 μmol $m^{-2}s^{-1}$ เก็บตัวอย่างเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรประมาณ 0.3 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสงความเข้มสูงทำให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ได้มีแอคติวิตีสูงและสูงที่สุดเมื่อให้แสงความเข้ม 622 μmol $m^{-2}s^{-1}$ คือมีค่า 14.97 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และให้ค่าแอคติวิตีน้อยที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แสงความเข้ม 175 μmol $m^{-2}s^{-1}$ คือมีค่า 11.29 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่เมื่อให้แสงมากกว่า 622 μmol $m^{-2}s^{-1}$ คือให้แสงความเข้ม 732 μmol $m^{-2}s^{-1}$ เอนไซม์ไนเตรตรีดัก-เทสที่ได้จะมีแอคติวิตีลดลง (รูปที่ 22) ดังนั้นความเข้มแสงที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคือ 622 μmol $m^{-2}s^{-1}$

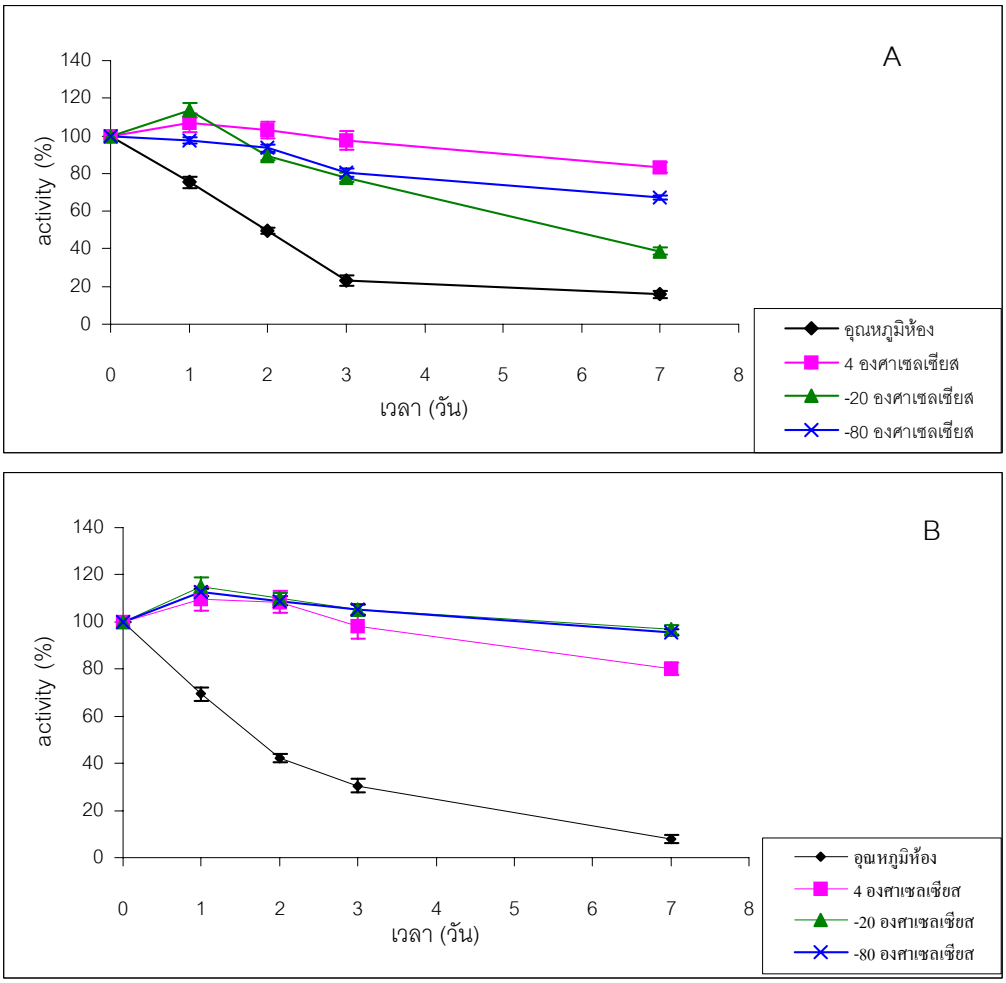


รูปที่ 23. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายกับค่าแอคติวิตีของ NR เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้ไนเตรตความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มแสง 175 -732 μmole m^{-2} s^{-1} โดยเก็บตัวอย่างสาหร่ายเมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เป็น 0.3 ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ ± S.D.

3.7. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

3.7.1 การศึกษาความเสถียร (stability) ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

การทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบการเก็บรักษาเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดผสมเอนไซม์ (50 mM MOPS pH 7.5 + 1 mM EDTA + 1 mM PMSF + 5 mM DTT) กับการเก็บรักษาเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40 % ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส), 4, -20 และ –80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันแล้ววิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเมื่อเก็บเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่อยู่ในบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิดที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 วันเอนไซม์ยังมีแอคติวิตีเหลืออีกประมาณ 70 % จากเริ่มต้น แต่เมื่อเก็บไว้นานกว่านั้นแอคติวิ-ตีของเอนไซม์จะลดลงเรื่อยๆจนหมดในเวลา 7 วัน ส่วนเอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิอื่นๆ ในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี glycerol แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงมากกว่าที่เก็บในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40 % โดยเอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสแอคติวิตีลดลงมากที่สุด รองลงมาเป็นเอนไซม์ที่เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส และที่ 4 องศาเซลเซียสตามลำดับ (รูปที่ 24) แต่เอนไซม์ที่เก็บในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40 % แอคติวิตีจะลดลงเพียงเล็กน้อย โดยเอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียสสามารถรักษาแอคติวิตีไว้ได้ดีที่สุด ($P \leq 0.05$ ตารางที่ 10. ภาคผนวก) รองลงมาเป็นเอนไซม์ที่เก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

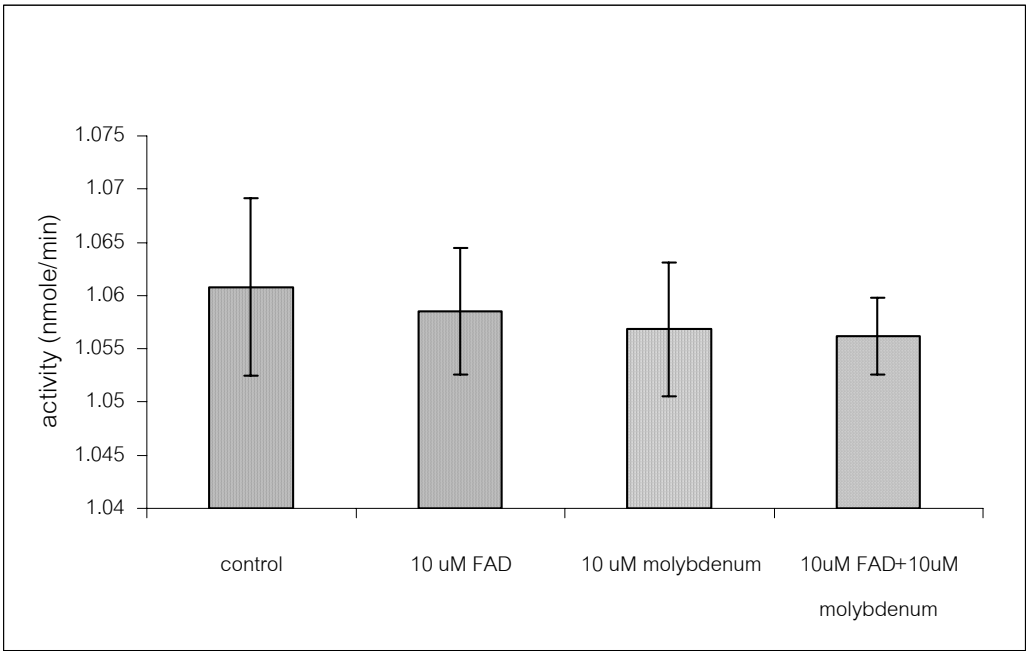


รูปที่ 24. ค่าแอคติวิตีของสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย เมื่อเก็บรักษาในสภาวะต่างๆ

เตรียมสารสกัดหยาบโดยบดกับไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นบดด้วยบัฟเฟอร์ MOPS ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ที่มี EDTA 1 มิลลิโมลาร์, PMSF 1 มิลลิโมลาร์ และ DTT 0.5 มิลลิโมลาร์ แล้วเก็บสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิต่างๆ วิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เก็บไว้ 0, 1, 3 และ 7 วัน (A) เก็บเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี glycerol (B) เก็บเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D.

3.7.2 การศึกษาผลของ FAD และโมลิบดินัมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

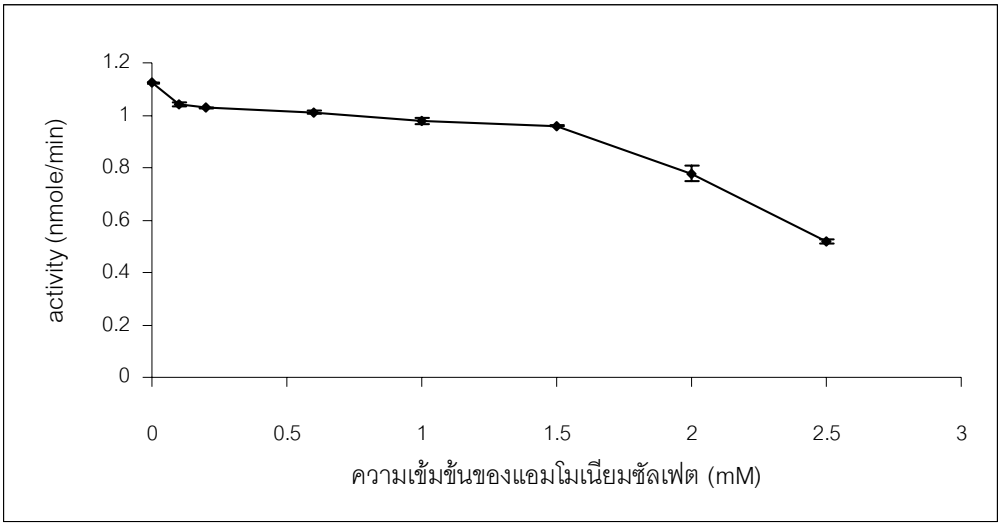
จากการศึกษา พบว่าการเติม FAD หรือโมลิบดินัมในรูป Na_2MoO_4หรือการเติม FAD ร่วมกับ molybdenum ไม่มีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยจะเห็นว่าแอคติวิตีในชุดควบคุม, ชุดที่เติม FAD, ชุดที่เติม molybdenum และชุดที่เติม FAD ร่วมกับ molybdenum ไม่แตกต่างกัน ($P \leq 0.05$ ตารางที่ 11. ภาคผนวก) คือมีค่าประมาณ 1.055-1.06 นาโนโมลต่อนาที (รูปที่ 25)



รูปที่ 25. ผลของ FAD และโมลิบดินัมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส วิเคราะห์แอคติวิตีโดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์และมีการเติม FAD, molybdenum และ FAD ร่วมกับ molybdenum ในปฏิกิริยา ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 0.09 มิลลิกรัม ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D.

3.7.3 การศึกษาผลของแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

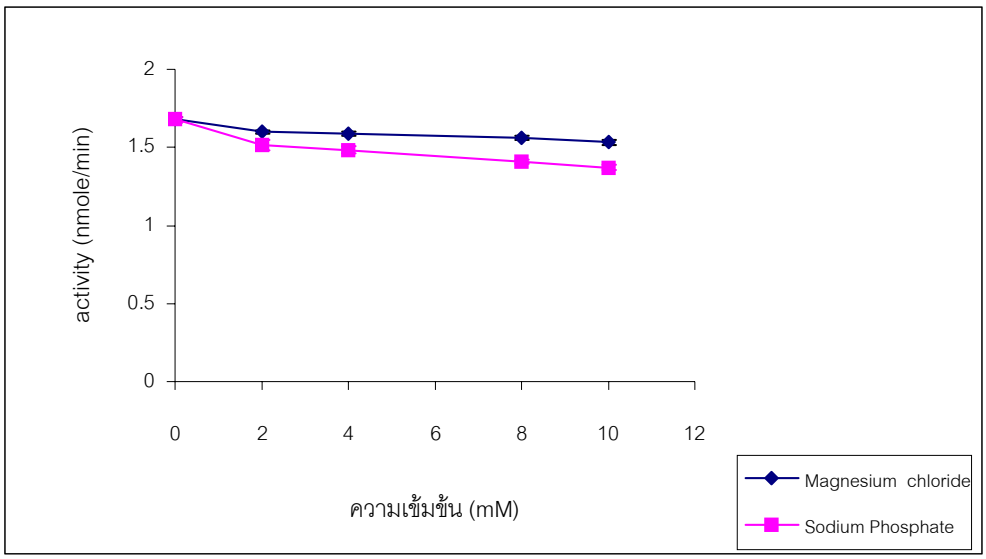
การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ลงในส่วนผสมสำหรับวัดแอคติวิตี พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดยแอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าลดลงเมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตอยู่ในสารละลายที่ใช้ในการวัดแอคติวิตี ซึ่งจะเห็นว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์มีผลให้ค่าแอคติวิตีลดลงถึง 50 % ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26. ผลของแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส วิเคราะห์แอคติวิตีโดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างกันในปฏิกิริยา ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 0.088 มิลลิกรัม ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D.

3.7.4 การศึกษาผลของ Mg^{2+} และ PO_4^{3-} ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

การเติม $MgCl_2$ และ Na_2HPO_4 ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ลงในส่วนผสมสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่า Mg^{2+} และ PO_4^{3-} มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อย คือ เมื่อมี PO_4^{3-} ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในส่วนผสมสำหรับการวัดแอคติวิตีทำให้แอคติวิตีเหลือ 81.55 % ซึ่งลดลงมากกว่าเมื่อมี Mg^{2+} ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ($P \leq 0.05$ ตารางที่ 12. ภาคผนวก) ที่ทำให้แอคติวิตีเหลือเพียง 91.07 % ดังรูปที่ 27

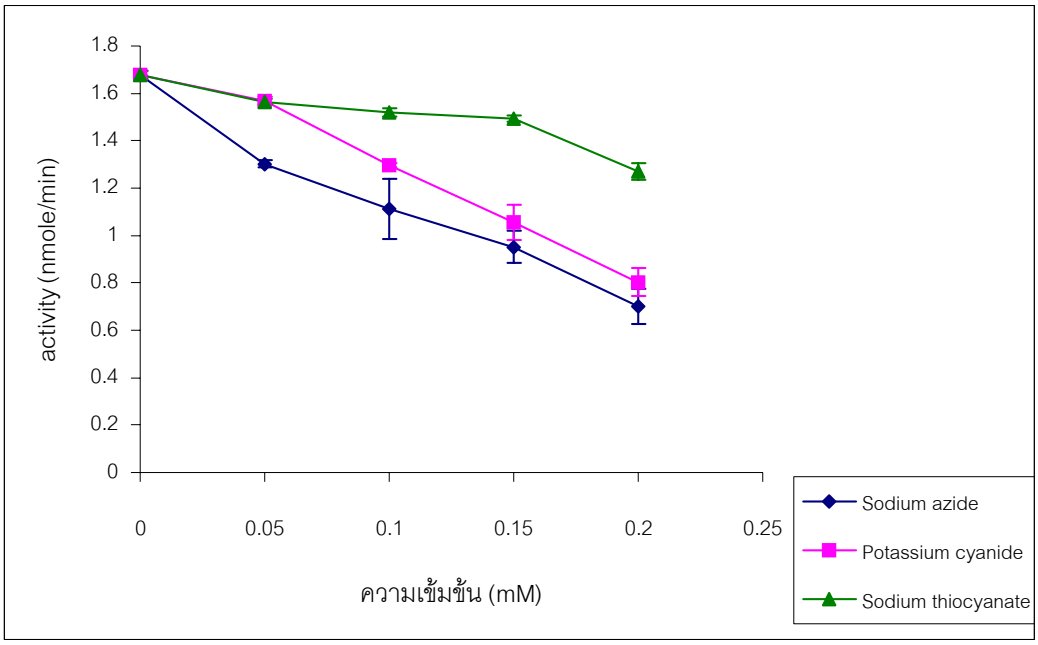


รูปที่ 27. ผลของ Mg^{2+} และ PO_4^{3-} ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

วิเคราะห์แอคติวิตีโดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์และมีการเติม $MgCl_2$ และ Na_2HPO_4 ความเข้มข้นต่างกันในปฏิกิริยา ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 0.148 มิลลิกรัม ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D.

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

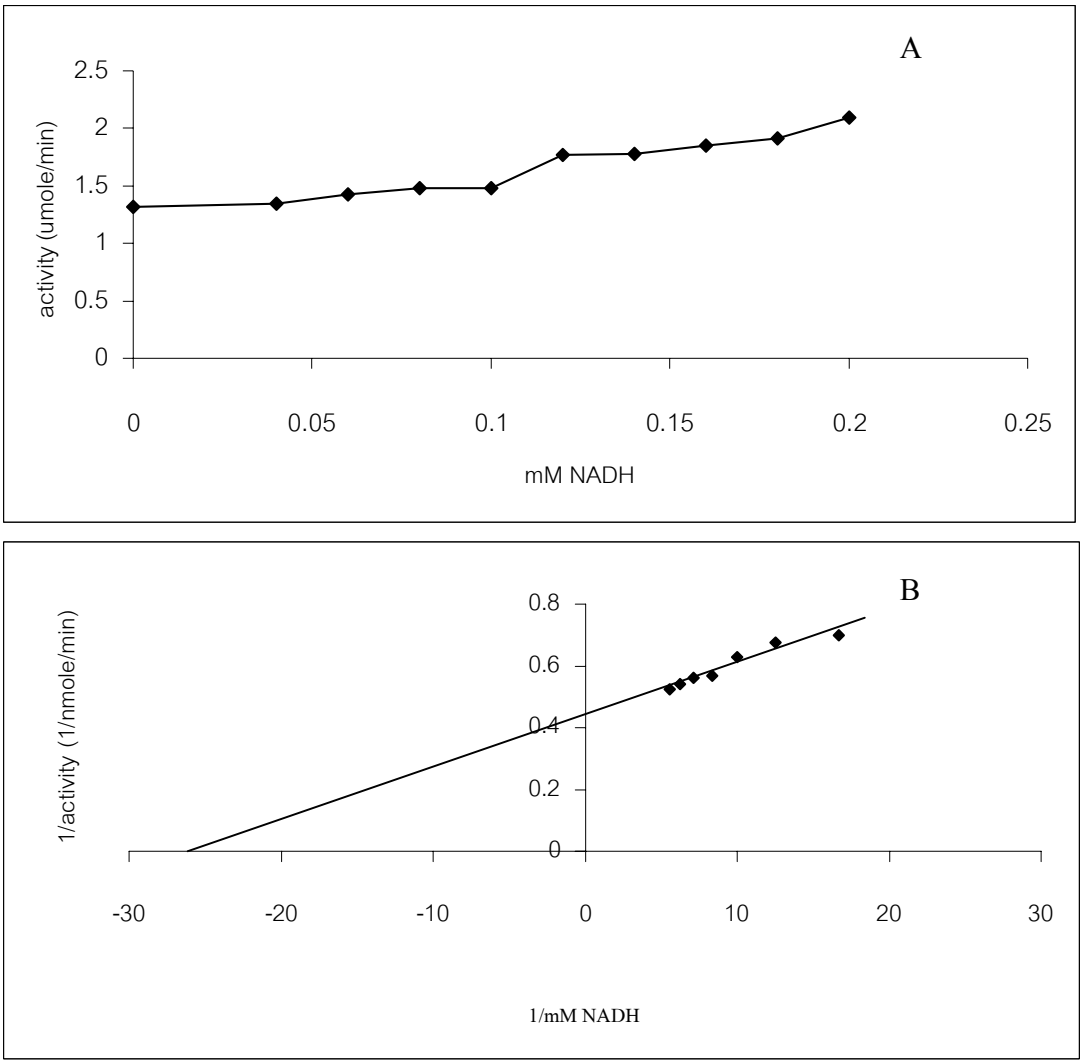
จากการศึกษาโดยการเติม NaN_3, KCN และ NaSCN ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ลงในส่วนผสมสำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดย NaN_3 มีผลยับยั้งมากที่สุด คือเมื่อมี NaN_3 ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เหลือเพียง 41.67% ในขณะที่ถ้ามี KCN หรือ NaSCN ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้แอคติวิตีของเอนไซม์จะเหลือ 47.62% และ 75.60 % ตามลำดับ ดังรูปที่ 28



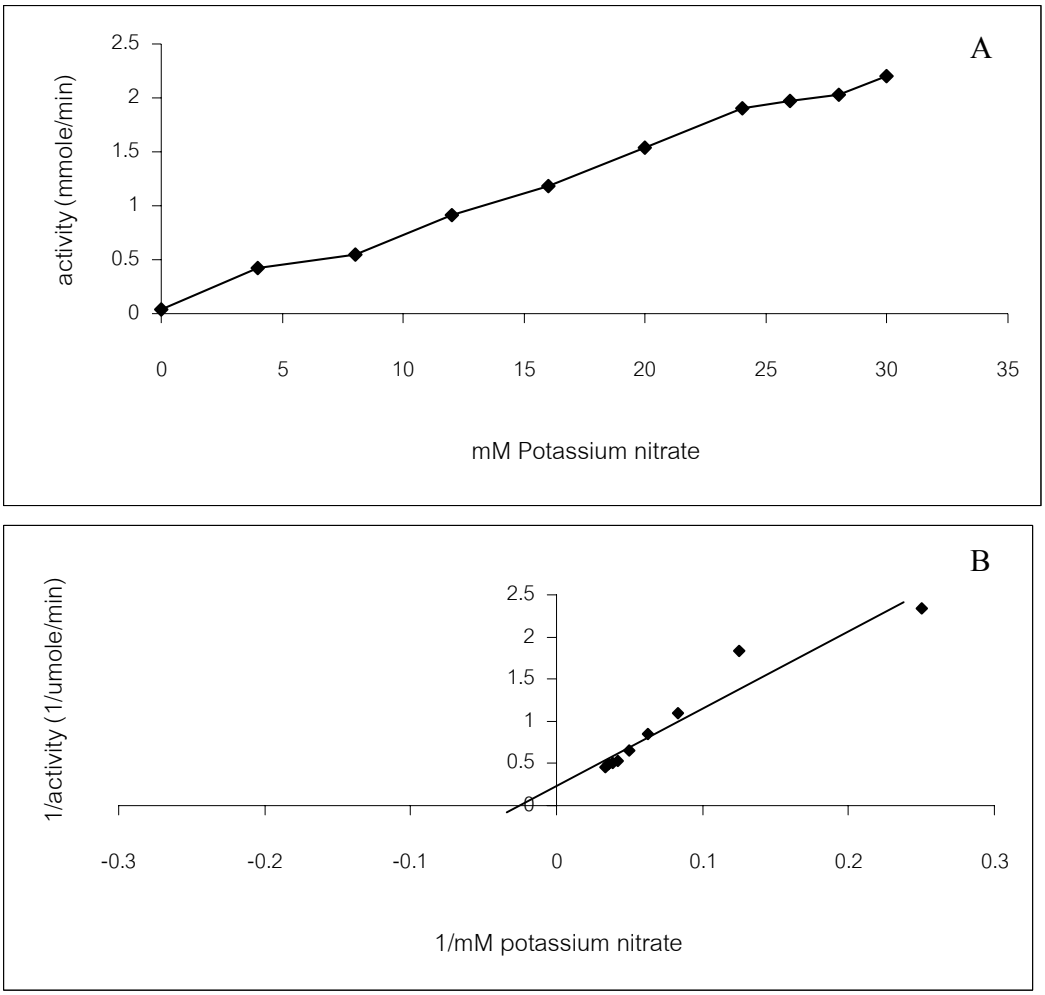
รูปที่ 28. ผลของ Sodium azide (NaN_3), Potassium cyanide (KCN) และ Sodium thiocyanate (NaSCN) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส วิเคราะห์แอคติวิตีโดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์และมีการเติม NaN_3, KCN และ NaSCN ความเข้มข้นต่างกันในปฏิกิริยา ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา 0.151 มิลลิกรัม ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ $\pm$ S.D.

3.7.6 การศึกษาความจำเพาะต่อ NADH และ NADPH ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิดนี้ ไม่จำเป็นต้องรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH เพราะแม้ว่าในส่วนผสมสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไม่มี NADH หรือ NADPH ยังคงมีแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่ถ้ามี NADH หรือ NADPH ในส่วนผสมสำหรับหาแอคติวิตีจะทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงขึ้นเล็กน้อย (ดังรูป 29) จากการทดลองเมื่อนำค่าความเข้มข้นของสับ-สเตรต กับแอคติวิตีของเอนไซม์ไปเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk double reciprocal plot เพื่อหาจุดตัดแกน 1/S ซึ่งเป็นจุดเดียวกับค่า $-1/K_m$ พบว่าค่า $-1/K_m$ ของ NADH มีค่า –25.964 mM^{-1} คำนวณค่า K_m ได้เท่ากับ 0.039 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 29), ค่า $-1/K_m$ ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนมีค่า –0.025 mM^{-1} คำนวณค่า K_m ได้เท่ากับ 40 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 30), ค่า $-1/K_m$ ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนมีค่า –0.023 mM^{-1} คำนวณค่า K_m ได้เท่ากับ 43.48 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 31) และ $-1/K_m$ ของ NADPH มีค่า –7.917 mM^{-1} คำนวณค่า K_m ได้เท่ากับ 0.126 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 32)

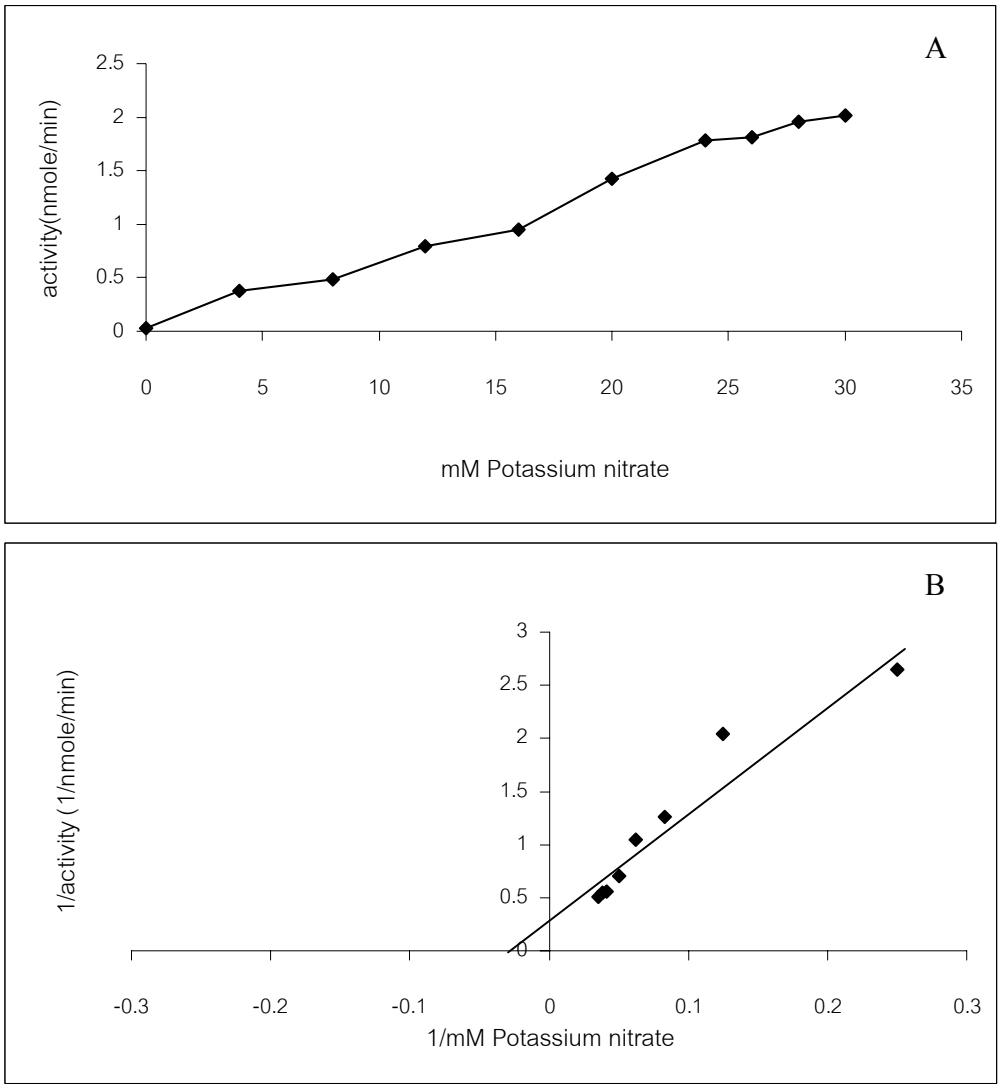


รูปที่ 29. ผลของความเข้มข้นของ NADH ต่อแอคติวตีของ NR
(A) saturation curve จากการศึกษา K_m ของ NADH ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reduction โดยการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส
(B) Lineweaver-Burk double reciprocal plot



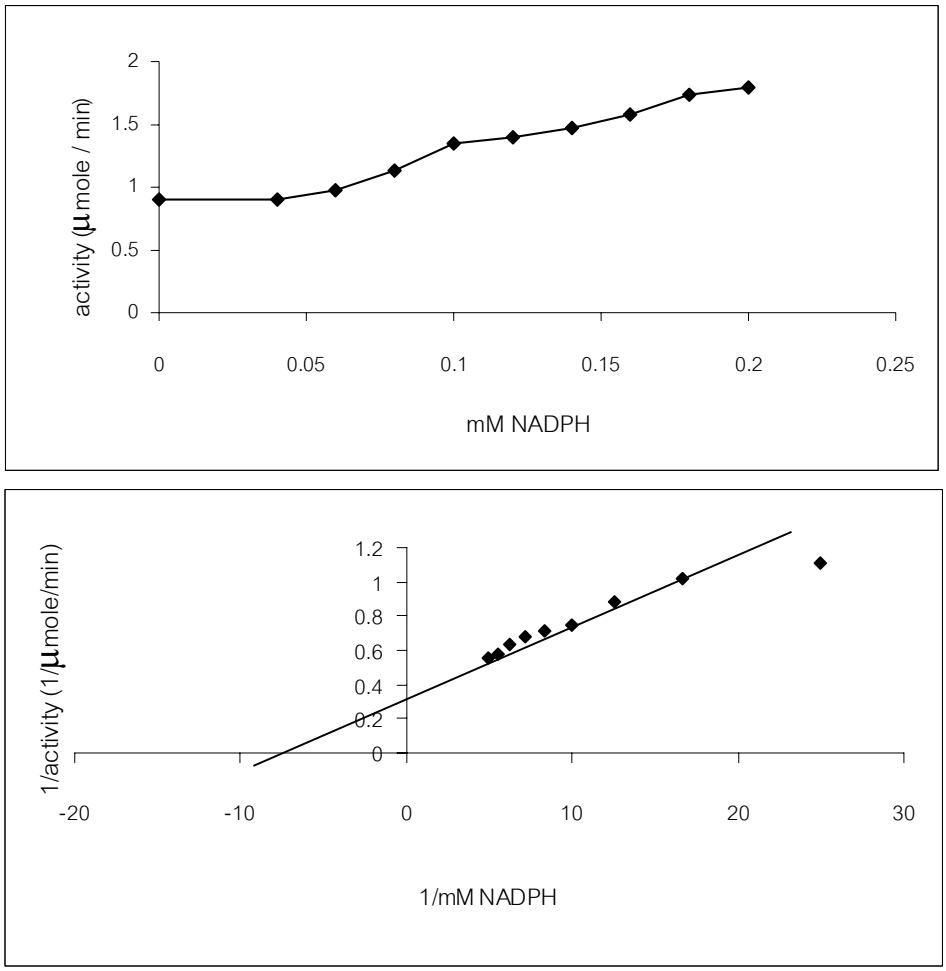
รูปที่ 30. ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่ออคติวิตีของ NR เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

(A) saturation curve จากการศึกษา K_m ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADH ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reduction โดยการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (B) Lineweaver-Burk double reciprocal plot



รูปที่ 31. ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่อแอคติวิตีของ NR เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

(A) saturation curve จากการศึกษา K_m ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADPH ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reduction โดยการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (B) Lineweaver-Burk double reciprocal plot



รูปที่ 32. ผลของความเข้มข้นของ NADPH ต่อแอคติวิตีของ NR (A) saturation curve จากการศึกษา K_m ของ NADPH ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reduction โดยการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (B) Lineweaver-Burk double reciprocal plot

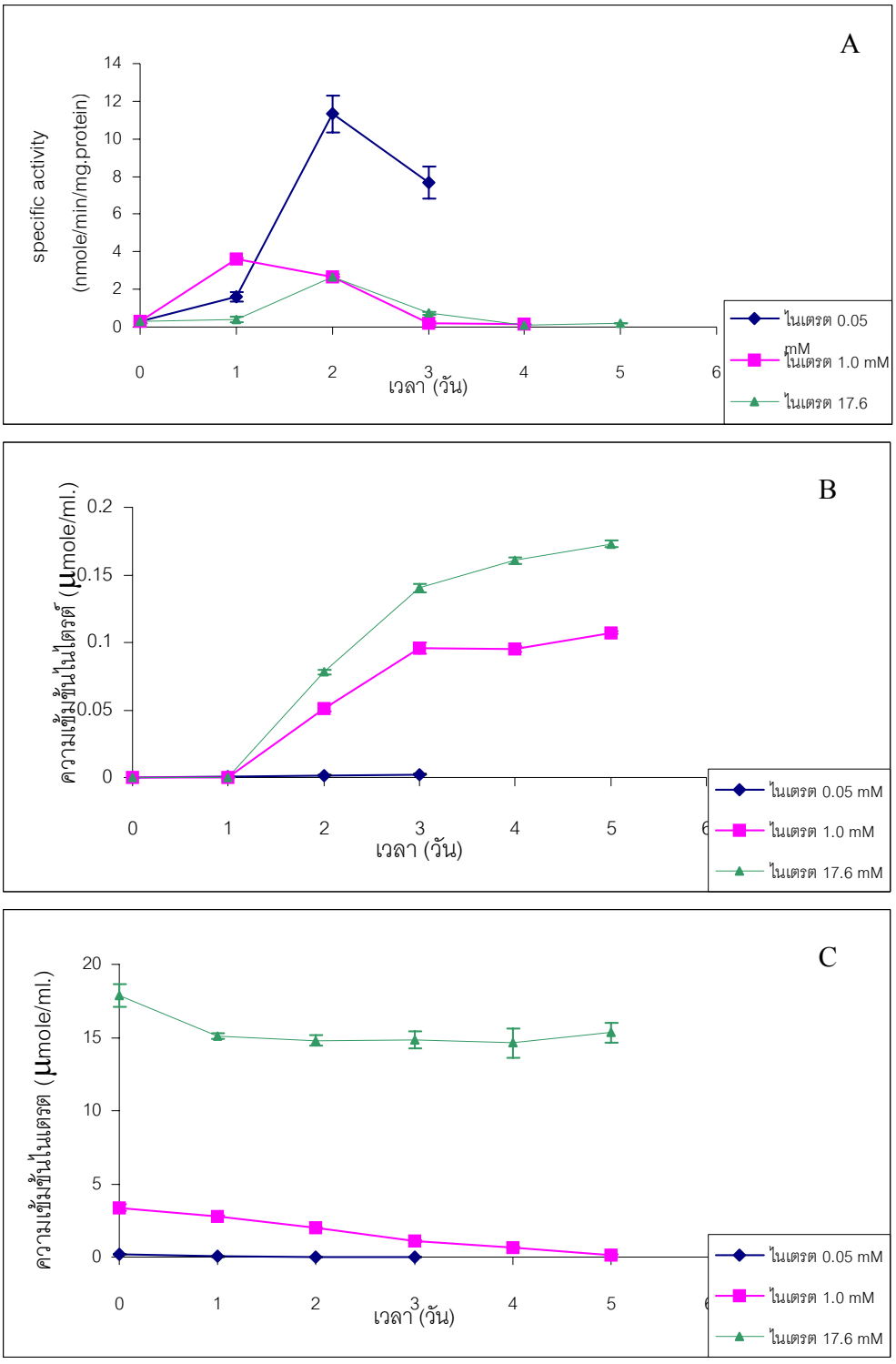
3.8. การศึกษาผลของไนโตรเจนในรูปของไนเตรต, แอมโมเนียม และ ไนเตรตร่วมกับแอมโมเนียม

หลังจากศึกษาเบื้องต้นถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เพื่อให้ได้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่มีแอคติวิตีสูงแล้ว จึงได้นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาผลของไนโตรเจนที่เป็นธาตุอาหารในรูปแบบต่างๆกัน ได้แก่ ไนเตรต, แอมโมเนียม และ ไนเตรตร่วมกับแอมโมเนียม ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของแหล่งไนโตรเจน และรูปแบบการทำงาน (แอคติวิตี) ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

3.8.1 ผลของการได้รับไนโตรเจนในรูปของไนเตรตต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย

จากการทดลองเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้แหล่งไนโตรเจนเป็นไนเตรตความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 0, 0.05, 1.0 และ 17.6 มิลลิโมลาร์ และเก็บตัวอย่างสาหร่ายทุกวันในช่วงเวลาเดียวกัน เพื่อนำสาหร่ายมาหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และเก็บอาหารที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายมาวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตและไนไตรต์ พบว่าสาหร่ายไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีไนเตรต และเมื่อสาหร่ายได้รับไนเตรตความเข้มข้นต่ำๆ (0.05 มิลลิโมลาร์) จะมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วโดยเพิ่มแอคติวิตีขึ้นสูงในช่วงเวลาสั้นๆ โดยมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงแล้วจึงลดลงและตายในวันที่ 4 แต่เมื่อสาหร่ายได้รับอาหารที่มีไนเตรตความเข้มข้นสูงขึ้น แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงโดยแอคติวิตีของเอนไซม์จากสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์ สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีไนเตรต 17.6 มิลลิโมลาร์ แต่สาหร่ายจะตายเร็วกว่า คือตายในวันที่ 5 ในขณะที่ถ้าในอาหารมีไนเตรต 17.6 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายจะตายในวันที่ 7 (ดังรูปที่ 33A)

สำหรับปริมาณไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย พบว่าปริมาณไนเตรตในอาหารที่เพาะเลี้ยงมีแนวโน้มลดลงจนหมด โดยในชุดที่มีไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์ ไนเตรตในอาหารจะหมดในวันที่ 3 และในชุดที่มีไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์ ไนเตรตจะหมดในวันที่ 5 แต่ในชุดที่มีไนเตรต 17.6 มิลลิโมลาร์ยังมีไนเตรตเหลืออีกประมาณ 15 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 33C) ส่วนปริมาณไนไตรต์จะมีแนวโน้มตรงข้ามกับไนเตรตคือมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยจะเริ่มเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและในชุดที่มี ไนเตรตในอาหารสูง จะเกิดไนไตรต์ขึ้นปริมาณสูงเช่นกัน ดังนั้นในชุดที่เพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยใช้อาหารที่มีไนเตรต 17.6 มิลลิโมลาร์ จึงมีไนไตรต์เกิดขึ้นมากกว่าในชุดที่เพาะลี้ยงด้วยอาหารที่มี ไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์และ 0.05 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ (รูปที่ 33B)

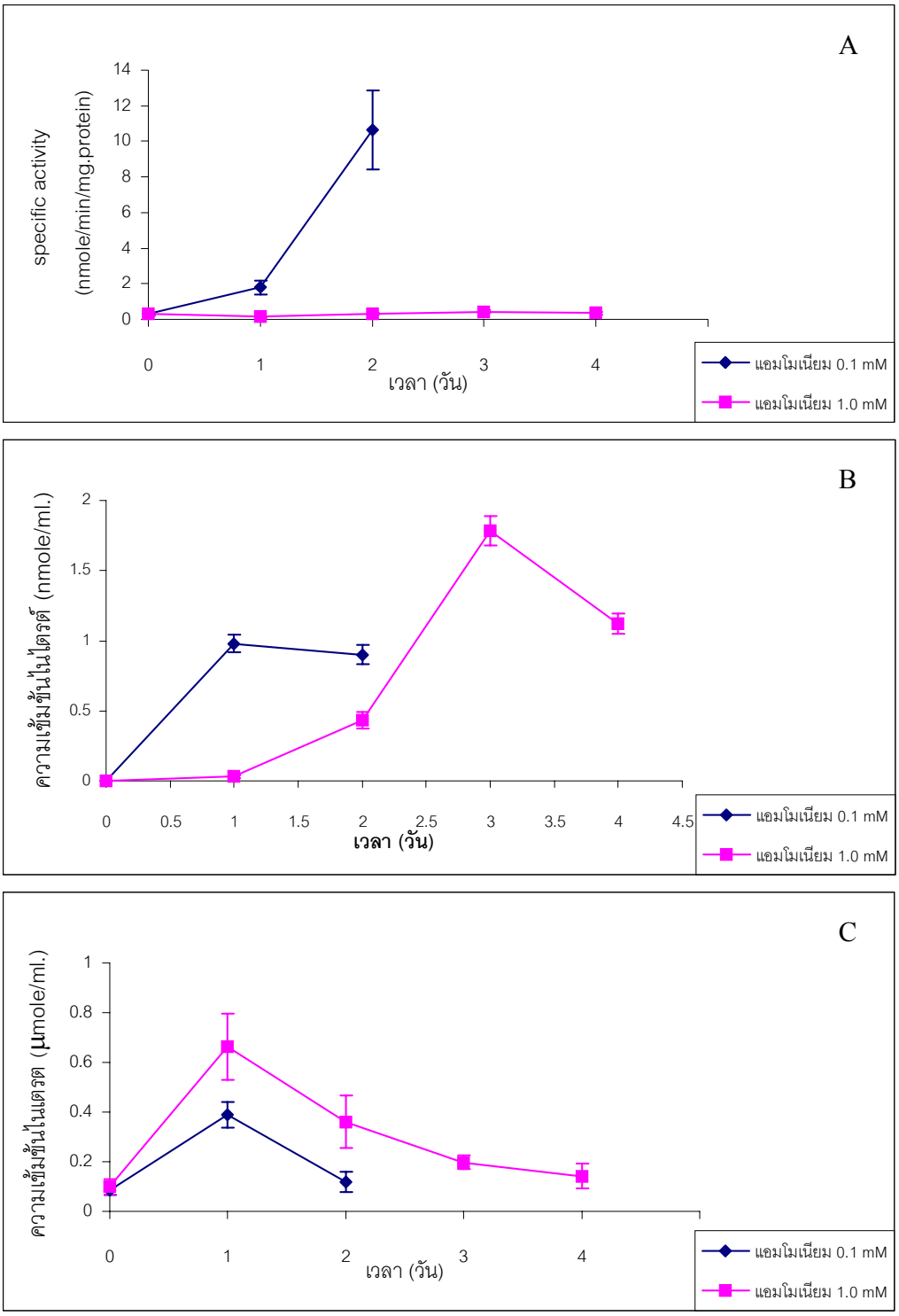


รูปที่ 33. ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่มีไนเตรต 0.05, 1.0 และ 17.6 mM (A) ค่า activity ของ NR (B) ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงสาหร่าย (C) ปริมาณไนเตรตในอาหารเลี้ยงสาหร่าย ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ ± S.D.

3.8.2 ผลของการได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่ไม่มีไนเตรตแต่ให้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 0.1, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าสาหร่ายไม่สามารถเจริญในอาหารที่ไม่มีแอมโมเนียมและในอาหารที่มีแอมโมเนียม 5.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แต่เมื่อในอาหารมีแอมโมเนียม 0.1 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่าสาหร่ายสามารถใช้แอมโมเนียมเพื่อใช้ในการเจริญได้แต่สาหร่ายจะตายเร็วกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไนเตรตความเข้มข้นเดียวกันนี้เป็นแหล่งไนโตรเจน ถ้าในอาหารมีแอมโมเนียม 0.1 มิลลิโมลาร์ สาหร่ายจะตายในวันที่ 3 หลังจากเพาะเลี้ยง และถ้าในอาหารมีแอมโมเนียม 1.0 มิลลิโมลาร์สาหร่ายจะตายในวันที่ 5 ในการเจริญของสาหร่าย สาหร่ายจะเปลี่ยนแอมโมเนียมในอาหารเป็นไนเตรต เห็นได้จากการติดตามปริมาณไนเตรตในอาหารทุกวันที่พบว่ามีไนเตรตในอาหารเพิ่มขึ้นเป็น 0.65 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรหลังจากเพาะเลี้ยงสาหร่ายไปได้ 1 วันจากเริ่มต้นที่ในอาหารไม่มีไนเตรตเลย แสดงว่าสาหร่ายสามารถเปลี่ยนแอมโมเนียมเป็นไนเตรตได้และอาจจะใช้ไนเตรตในการเจริญได้เช่นกันเพราะในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงปริมาณไนเตรตเริ่มลดลงและลดลงอย่างต่อเนื่องทุกวัน ดังรูปที่ 34C ส่วนปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายในช่วงแรกเพิ่มขึ้นและลดลงในช่วงหลังของการเจริญ ในอาหารที่มีแอมโมเนียม 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาณไนไตรต์ลดลงในวันที่ 2 ของการเพาะลี้ยงแต่ในอาหารที่มีแอมโมเนียม 1.0 มิลลิโมลาร์ ปริมาณไนไตรต์ลดลงในวันที่ 4 ดังรูปที่ 34B

สำหรับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ได้จากสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมสูง (1.0 มิลลิโมลาร์) จะมีค่าค่อนข้างคงที่ในทุกวันของการเพาะเลี้ยง คืออยู่ในช่วง 0.1-0.4 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมต่ำ (0.1 มิลลิโมลาร์) ที่มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีค่าแอคติวิตีเท่ากับ 10.63 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (รูปที่ 34A)



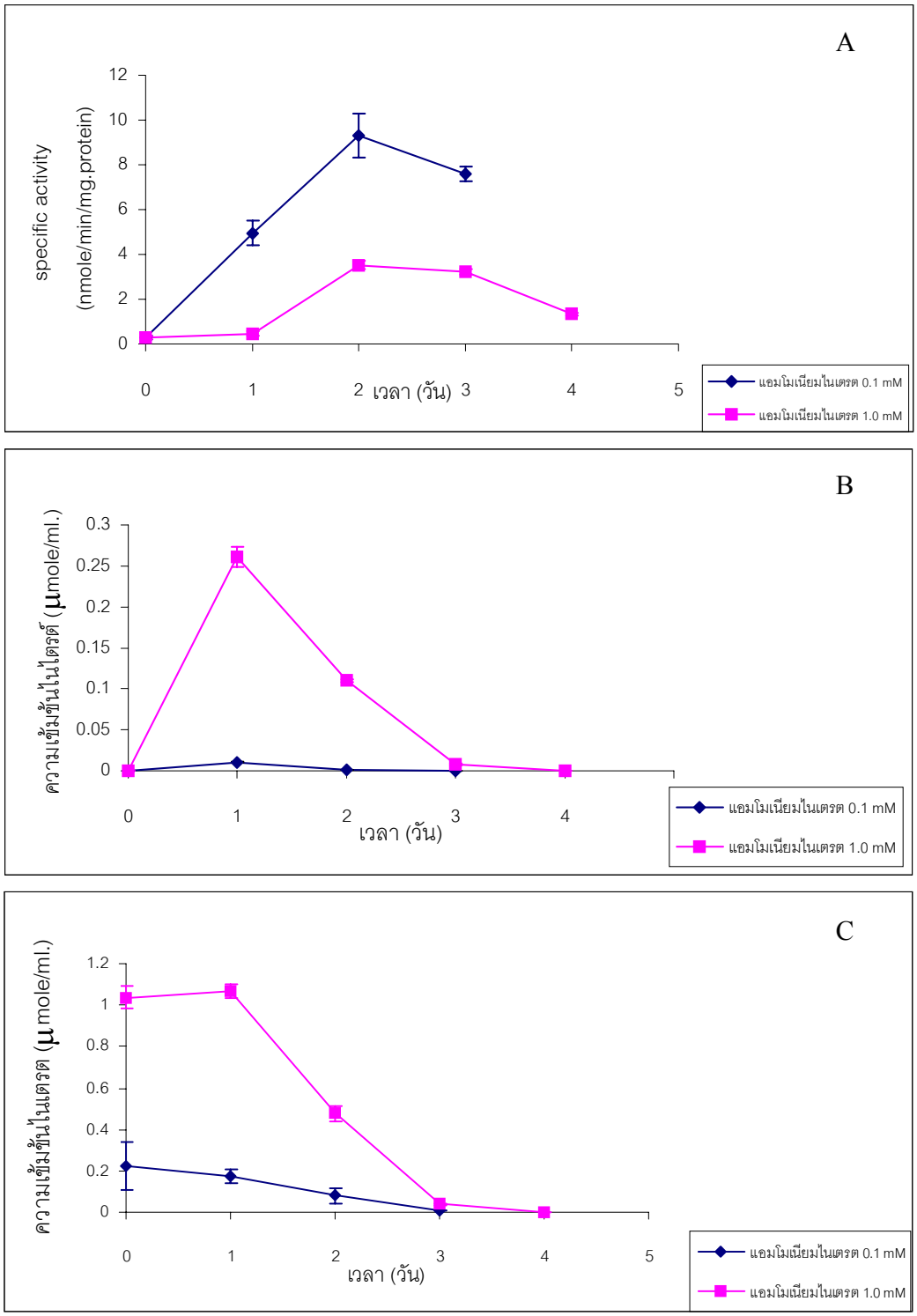
รูปที่ 34. ผลของระดับแอมโมเนียมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ความเข้มข้นของไนไตรต์และไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

(A) ค่า activity ของ NR (B) ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายและ (C) ปริมาณไนเตรตอาหารเลี้ยงสาหร่าย ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ ± S.D.

3.8.3 ผลของการได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมร่วมกับไนเตรตต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่ใช้แอมโมเนียมร่วมกับไนเตรตโดยให้แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 0.1, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายใช้สภาวะเดียวกับเมื่อใช้ไนเตรต และแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสาหร่ายไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีแอมโมเนียมไนเตรตและในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรต 5.0 และ 10 มิลลิโมลาร์ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แต่เมื่อในอาหารมีแอมโมเนียมไนเตรต 0.1 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่าสาหร่ายสามารถใช้แอมโมเนียมไนเตรตในการเจริญได้เช่นเดียวกับเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียม และเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์จะมีแอคติวิตีสูงกว่าเอนไซม์ในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นในช่วง 2 วันแรกของการเพาะเลี้ยงและมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 2 โดยเอนไซม์ในสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรต 0.1 มิลลิโมลาร์ มีค่าสูงกว่า คือ 9.3 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่เอนไซม์ในสาหร่ายที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ มีค่า 3.5 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และหลังจากวันที่ 2 ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในสาหร่ายจะลดลงจนถึงวันที่สาหร่ายตายคือในชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรต 0.1 มิลลิโมลาร์ ตายในวันที่ 4 และชุดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรต 1.0 มิลลิโมลาร์ ตายในวันที่ 5 (รูปที่ 35A) จะเห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีค่าสูงเมื่อให้แหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นต่ำๆ โดยค่าแอคติวิตีที่สูงที่สุดมีค่า 11.33 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เป็นเอนไซม์ในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้ไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งไนโตรเจน รองลงมาคือเอนไซม์ในสาหร่ายที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียม 0.1 มิลลิโมลาร์ มีค่า 10.63 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเอนไซม์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ มีค่า 9.3 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่ายปริมาณไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยงลดลงเรื่อยๆ จนหมดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงทั้งชุดที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรต 0.1 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 35C) สำหรับปริมาณไนไตรต์ในอาหาร จะเกิดขึ้นในอาหารหลังจากเลี้ยงสาหร่ายไปได้ 1 วันแต่หลังจากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ จนหมดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน (รูปที่ 35B)

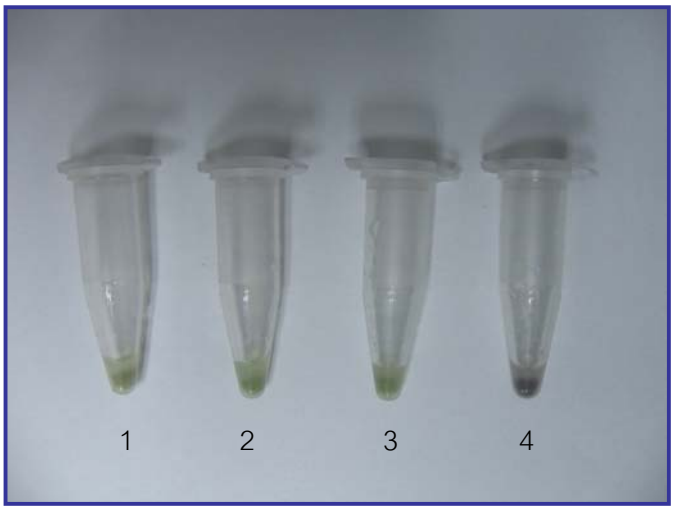


รูปที่ 35. ผลของระดับแอมโมเนียมไนเตรตต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ NR ความเข้มข้นของไนไตรต์และไนเตรตใน อาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย

(A) ค่า activity ของ NR (B) ปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงสาหร่ายและ (C) ปริมาณไนเตรต อาหารเลี้ยงสาหร่าย ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ ± S.D.

3.9 การเกิด cross reaction ระหว่างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย

เมื่อนำแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของข้าวโพดมาทำปฏิกิริยา cross reaction กับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายโดยดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) โดยบ่มเมมเบรนของเซลล์สาหร่ายซึ่งมีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเกาะติดอยู่ด้วยแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับ alkaline phosphatase แล้วย้อมด้วยสับสเตรตของเอนไซม์ alkaline phosphatase จากการทดลองพบปฏิกิริยาการจับของแอนติบอดีกับเมมเบรนของเซลล์สาหร่ายได้ชัดเจน (หลอดที่ 4 ในรูปที่ 36) คือให้สีม่วง แตกต่างจากชุดควบคุมในหลอดที่ 1-3 ในรูปที่ 36 โดยหลอดที่ 1 ไม่เติม 1° และ 2° แอนติบอดี หลอดที่ 2 เติม 1° แอนติบอดีอย่างเดียว หลอดที่ 3 เติม 2° แอนติบอดีอย่างเดียว ที่ไม่เกิดสีม่วงแสดงว่าไม่มีการจับกันของแอนติบอดีกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของเซลล์สาหร่าย



รูปที่ 36. การเกิด cross reaction ระหว่างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวโพดกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย (1) เป็นชุดควบคุม ไม่เติมแอนติบอดี (2) เป็นชุดควบคุม เติม1°แอนติบอดีอย่างเดียว (3) เป็นชุดควบคุม เติม 2°แอนติบอดีอย่างเดียว และ (4) เป็นชุดทดสอบการเกิด cross reaction ระหว่างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวโพดกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย