

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	23
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	24
วัสดุ	24
สารเคมี	24
อุปกรณ์	26
วิธีการ	27
3. ผลการทดลอง	38
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	77
5.สรุป	87
เอกสารอ้างอิง	89
ภาคผนวก	97
ประวัติผู้เขียน	107

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ลักษณะของป้อนน้ำร้อน/ธารน้ำร้อนที่ อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง	38
2. แสดงแอคติวิตีของสาหร่ายชนิดต่างๆ	41
3. สูตรอาหาร BG-11	100
4. ส่วนประกอบของ Trace metal mix A5	100
5. อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (วัดโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการตัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกันและให้แสง $175 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{HCO}_3^-$	101
6. อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (วัดโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการตัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกันและให้แสง $622 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{HCO}_3^-$	102
7. อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่าย (วัดโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการตัดแปลงให้มีไนเตรตความเข้มข้นต่างกันและให้แสง $175 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{HCO}_3^-$	103
8. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายเมื่อใช้บัฟเฟอร์ในการสกัดต่างกันและใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ในการวิเคราะห์	104
9. ผลของสารดีเทอร์เจนต์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส	104
10. ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ NR เมื่อเก็บเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol 40% ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน	105
11. แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสเมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีโดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์และมีการเติม FAD, molybdenum และ FAD ร่วมกับ molybdenum ในปฏิกิริยา	106
12. ผลของ $\text{Mg}^{2+}$ และ $\text{PO}_4^{3-}$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส	106

## รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดงวัฏจักรการเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจน (nitrogen cycle)	4
2. แสดงส่วนประกอบสำคัญและศูนย์เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทส	6
3. โครงสร้างของเอนไซม์ในไตรตรีดักเทส แสดงตำแหน่งรับ-ส่งอิเล็กตรอนระหว่างศูนย์เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสารต่างๆ	7
4. การเกิด assimilation ของไนเตรตในแบคทีเรีย	12
5. กระบวนการ nitrate respiration และ denitrification pathways	13
6. การรีดิวซ์ไนเตรตในสเฟอริพลาสซึมใน <i>R. sphaeroides</i>	19
7. ลักษณะของบ่อน้ำร้อน ใน อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง	38
8. การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารระหว่างการเพาะเลี้ยงสาหร่าย เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่ความเข้มแสง $175.1 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ตลอดเวลา	40
9. ลักษณะของสาหร่าย <i>Phormidium tenue</i> (Menegh) Gomont	41
10. อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกัน	42
11. ปริมาณไนเตรตในอาหารเลี้ยงสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกัน	45
12. ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงสาหร่าย เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไบคาร์บอเนตความเข้มข้นต่างกัน	46
13. อัตราการเจริญเติบโตของสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงให้มีไนเตรตน้อยกว่าสูตรมาตรฐานและให้แสงที่ความเข้มแสง $175 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$	47
14. ปริมาณไนเตรตในอาหารเลี้ยงสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่ดัดแปลงให้มีไนเตรตน้อยกว่าสูตรมาตรฐาน และให้แสงที่ความเข้มแสง $175 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$	48
15. ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงสาหร่ายเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย ด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไนเตรต น้อยกว่าสูตรมาตรฐาน และให้แสงที่ความเข้มแสง $175 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$	49
16. ค่าแอกติวิตีของ NR จากสาหร่ายเมื่อใช้ฟิเฟอรีในการสกัดและวิเคราะห์ แอกติวิตีต่างกัน	50

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
17. ค่าแอกติวิตีของ NR จากสาหร่ายที่ pH ต่างๆ	51
18. ค่าแอกติวิตีของ NR จากสาหร่ายที่อุณหภูมิต่างๆ	52
19. ผลของสารดีเทอร์เจนต์ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส	53
20. ผลของปริมาณไนเตรตต่อการเจริญของสาหร่ายและแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสเมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไนเตรตความเข้มข้นต่างกัน ที่ความเข้มแสง $175 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$	55
21. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไนเตรตในอาหารกับค่าแอกติวิตีของ NR	56
22. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไบคาร์บอเนตในอาหารกับค่าแอกติวิตีของ NR	57
23. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มแสงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายกับค่าแอกติวิตีของ NR	58
24. ค่าแอกติวิตีของสารสกัดหยาบเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสจากสาหร่ายเมื่อเก็บรักษาในสภาวะต่างๆ	60
25. ผลของ FAD และโมลิบดีนัมต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส	61
26. ผลของแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส	62
27. ผลของ $\text{Mg}^{2+}$ และ $\text{PO}_4^{3-}$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส	63
28. ผลของ Sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ), Potassium cyanide (KCN) และ Sodium thiocyanate ( $\text{NaSCN}$ ) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส	64
29. ผลของความเข้มข้นของ NADH ต่อแอกติวิตีของ NR	66
30. ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่อแอกติวิตีของ NR เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน	67
31. ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่อแอกติวิตีของ NR เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน	68
32. ผลของความเข้มข้นของ NADPH ต่อแอกติวิตีของ NR	69

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
33. ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่มีไนเตรต 0.05, 1.0 และ 17.6 mM	71
34. ผลของระดับแอมโมเนียมต่อแอกติวิตีของ NR ความเข้มข้นของไนไตรต์ และไนเตรตในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่าย	73
35. ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงเมื่อเลี้ยงสาหร่ายด้วยอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรต 0.1 และ 1.0 mM	75
36. การเกิด cross reaction ระหว่างแอนติบอดีต่อเอ็นไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวโพดกับเอ็นไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย	76

## ตัวย่อและสัญลักษณ์

DTT	= dithiothreitol
EDTA	= ethylenediaminetetra acetic acid
FAD	= flavin adenine dinucleotide
$K_m$	= Michaelis constant
M	= molar
mg	= Milligram
ml	= Milliliter
mM	= Millimolar
$\mu$ M	= micromolar
NADH	= reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	= reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NiR	= nitrite reductase
nmole	= nanomole
NR	= nitrate reductase
OD.	= optical density
pH	= - log hydrogen ion concentration
PMSF	= phenylmethylsulfonylfluoride
$\mu$ mole	= micromole
CHAPS	= 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate
SDS	= sodium dodecyl sulphate