รายงานการวิจัย

การตรวจเลือกเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่มีความเสถียรต่อความร้อน ในสาหร่ายจากแหล่งธารน้ำอุ่น

Screening for Thermostable Nitrate Reductase from Hot Spring Algae

งบประมาณแผ่นดิน 2547-48

รหัส 04114294-0010

คณะผู้วิจัย

รพีพร	โสตถิพันธุ์	หัวหน้าโครงการ
สุพัตรา	หนูนวล	ผู้ร่วมวิจัย
สิริศักดิ์	วิประกษิต	ผู้ร่วมวิจัย
อุไรวรรณ	ขุนจันทร์	ผู้ร่วมวิจัย

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างสาหร่ายชนิดต่าง ๆ จากบ่อน้ำพุร้อนและธารน้ำอุ่นที่ไหลจากบ่อน้ำพุร้อน ในจังหวัดระนอง ชุมพร สุราษฎร์ธานี พัทลุง และกระบี่ สามารถคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ 3 สปีชีส์ คือ *Phormidium tenue* (Menegh.) Gomont, *Synechococcus minervae* และ *Synechococcus* sp. ซึ่งตรวจพบเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่มีคุณสมบัติเสถียรต่อความร้อน

การเจริญของเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาเพาะเลี้ยงต้องอาศัยไบคาร์บอเนต และไนเทรต โดยที่อัตราการเจริญของเซลล์ในระยะ 6 วันแรกไม่แตกต่างกันเมื่อใช้ไนเทรตในช่วงความเข้มข้น 0.5 – 52.9 mM ในอาหารสูตร BG-11 ที่เติมด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ถ้าใช้ไนเทรตที่ความเข้มข้นสูง 35 – 52.9 mM เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเริ่มตายในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

P. tenue เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด periphytic แบบเส้นสาย ต้องใช้เครื่องเขย่าในการเพาะเลี้ยง สามารถตรวจพบแอคทิวิตีของไนเทรตรีดักเทส (NR activity) สูงสุด (12 nmole/min/mg protein) ในระยะต้นของ log phase (วันที่ 2 – 4 ของการเพาะเลี้ยง) หลังจากนั้นจะมีค่าลดลง ในวันที่ 8 เหลือประมาณ 10 % ของค่าสูงสุด

S. minervae และ *Synechococcus* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดเซลล์เดี่ยว ตรวจพบ NR activity ได้เมื่อใช้ไนเทรตในระดับต่ำ (0.5 -1 mM) ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ

ไนเทรตรีดักเทสของเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้ง 3 สปีชีส์ เป็นเอนไซม์ที่เกาะอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ วัดค่า NR activity ได้สูงสุดในช่วง pH 8 – 9 เอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. tenue* ให้ค่า NR activity สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 – 60 °C ส่วนเอนไซม์สกัดหยาบจากสาหร่าย Synechococcus มีแอคทิวิตีสูงในช่วง 45 – 50 °C และการเติมสารซึ่งเป็น cofactor ในปฏิกิริยา คือ flavin adenine dinucleotide (FAD) และ molybdate (ที่ความเข้มข้น 20 μM) สามารถเพิ่ม NR activity ได้อีกประมาณ 10 % ในกรณีของ *Synechococcus* sp.

สารประเภท electron transport inhibitors ได้แก่ sodium azide (NaN_3), potassium cyanide (KCN) และ sodium thiocyanate (NaSCN) มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส โดย NaN_3 มีผลยับยั้งมากที่สุด คือ NaN_3 ที่ความเข้มข้น 0.2 mM ทำให้ NR activity เหลือเพียง 42% ในขณะที่ถ้ามี KCN หรือ NaSCN ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ NR activity จะเหลือ 48% และ 76 % ตามลำดับ

ไนเทรตรีดักเทสของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสามสปีชีส์สามารถเกิด cross reaction กับแอนติบอดีต่อไนเทรตรีดักเทสของข้าวโพด แสดงว่าโมเลกุลของเอนไซม์ชนิดนี้ในสิ่งมีชีวิตทั้งสองกลุ่มมีลักษณะโครงสร้างคล้ายกัน

ความเสถียรของสารสกัดเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมีความแตกต่างกันระหว่างสารสกัดของ *S. minervae* กับ *P. tenue* สารสกัดเอนไซม์จาก *S. minervae* มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30 - 40 $^{\circ}$C ขณะที่สารสกัดเอนไซม์จะสูญเสีย NR activity ประมาณ 80 - 90 % เมื่อบ่มที่ 60 - 70 $^{\circ}$C หนึ่งชั่วโมง แต่แอคทิวิตีค่อย ๆ ลดลงถ้าเก็บในที่เย็น 0 – 4 $^{\circ}$C และสูญเสียแอคทิวิตีทั้งหมดเมื่อแช่แข็ง ส่วนสารสกัดเอนไซม์จาก *P. tenue* สูญเสีย NR activity ประมาณ 30 % เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องเพียงหนึ่งวัน และเกือบหมดแอคทิวิตีหลังเก็บไว้ 7 วัน สารสกัดเอนไซม์จาก *P. tenue* ยังมี NR activity ในระดับใกล้เคียงกับตอนเริ่มต้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 ถึง -80 $^{\circ}$C ถ้าเติม 40 % กลีเซอรอลในสารสกัด

การใช้สารประเภทดีเทอร์เจนต์ต่างๆ และacetone เพื่อสกัดแยกเอนไซม์ออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Synechococcus* sp. ทำให้ NR activity ลดลง แต่หลังการสกัดด้วย acetone 10 % ยังสามารถเพิ่มแอคทิวิตีได้อีกประมาณ 20 % โดยการเติม FAD และ molybdate นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มแอคทิวิตีของเอนไซม์ที่สกัดด้วย acetone 10 % ได้อีก 30 % โดยใช้ hydroquinone เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

Abstract

Algal samples were collected from various sites of hot springs and warm streams in 5 southern Thailand provinces: Ranong, Chumporn, Surat Thanee, Phathalung and Krabi. Screening through the green and blue-green algae collected for thermostable nitrate reductase (NR) activity, three species of blue-green algae were isolated in axenic culture, i.e. *Phormidium tenue* (Menegh.) Gomont, *Synechococcus minervae* and *Synechococcus* sp., and maintained in the laboratory.

Growth of all three species of blue-green algae required bicarbonate and nitrate ions with no difference in growth rate for the first 6-day period when nitrate was supplied at 0.5 - 52.9 mM in the BG-11 growth medium plus 2 g/l $NaHCO_3$. At high concentrations of nitrate (35 - 52.9 mM), cell death was detected on the 7^{th} day of culture.

The filamentous *P. tenue*, also a periphytic species, required constant shaking to prevent cells from adhering to the culture flasks. Its NR activity appeared early in the log phase (days 2 -4) reaching 12 nmole/min/mg protein, its highest value, after which it was reduced to 10 % on the 8^{th} day of culture. For the unicellular *Synechococcus* spp., the NR activity was found when low concentrations of nitrate was supplied under low oxygen environment.

The NR activity detected in all 3 species was membrane-associated and active at pH 8 – 9. Crude pellet of *P. tenue* showed highest activity at 55 – 60 ^{o}C, while high activities of Synechococcus spp. were between 45 – 50 ^{o}C, and could be increased 10 % by adding FAD and molybdate at 20 μM.

Electron transport inhibitors such as NaN_3, KCN and NaSCN could inhibit the algal NR activity; the highest inhibition found was by 0.2 mM NaN_3 which reduced NR activity to about 42 %. At this concentration, KCN and NaSCN respectively lowered *P. tenue* NR activity down to about 48 % and 76 %.

Cross reaction could be observed between NR enzymes of the three algal species and the antibody against corn NR enzyme. This result indicated that the molecular structure of NR enzymes is similar in both groups of organisms.

Differences in stability of the NR activity in algal extracts were observed amongst the algal species. Enzyme extract from *S. minervae* was stable at 30 – 40 ^{o}C, while 80 –

90 % loss of NR activity was found after one hour incubation at 60 – 70 °C. The NR activity slowly decreased if the extract was kept at 0 – 4 °C, and all activity was lost after freezing. *P. tenue* crude extract, kept at room temperature for one day, would lose about 30 % of its NR activity and almost all was lost after one week. However, nearly all the NR activity of *P. tenue* extract could be maintained at -20 to -80 °C by adding 40 % glycerol.

All attempts in extracting the NR enzymes from the algal membranes with acetone and various detergents rendered inhibition of NR activity. Only after extraction with 10 % acetone, *Synechococcus* NR activity could be increased 20 % with the addition of FAD and molybdate. When hydroquinone was used as electron donor, the NR activity was furthermore increased about 30 %.