ชื่อวิทยานิพนธ์	เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Synechococcus* sp. จากบ่อน้ำพุร้อนจังหวัดกระบี่
ผู้เขียน	นางสาวอุไรวรรณ ขุนจันทร์
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2549

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด *Synechococcus* sp. ที่แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนเค็ม จังหวัดกระบี่ สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BG-11 ที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 g/l ภายใต้สภาวะที่มีแสง 120 μphoton $m^{-2}s^{-1}$ มีก๊าซออกซิเจนต่ำและอุณหภูมิ 30±1 °C

อาหารเลี้ยงสาหร่ายที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.25 g/l และโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 35.2 mM มีผลให้สาหร่ายเจริญเติบโตได้ดีที่สุด (p<0.05) แต่ไม่มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสูงสุด แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเมื่อสาหร่ายมีอายุ 10 วัน และเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์และมีโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 17.6 mM นอกจากนี้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. แปรผันตามการรับแสงในช่วงวัน โดยแอคติวิตีของเอนไซม์ลดต่ำลงเมื่อสาหร่ายได้รับแสง และสูงขึ้นเมื่อไม่ได้รับแสงโดยแอคติวิตีสูงที่สุดเมื่อสาหร่ายไม่ได้รับแสงนาน 12 ชั่วโมง

เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. เป็นเอนไซม์ชนิดที่ติดกับส่วนของเมมเบรนอย่างแน่นหนาไม่สามารถสกัดได้ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีอะซีโตน นอกจากนี้บัฟเฟอร์ดังกล่าวยังมีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสไม่สามารถรับอิเล็กตรอนได้จาก NADH และ NADPH แต่รับอิเล็กตรอนจากควินอลที่อยู่ในเมมเบรน นอกจากนี้เอนไซม์ชนิดนี้สามารถรับอิเล็กตรอนได้จาก hydroquinone และ methyl viologen ที่ถูกรีดิวซ์ด้วย sodium dithionite ถึงแม้ว่าเอนไซม์จะมีการเสียสภาพไปบางส่วนจากการสกัดด้วยบัฟเฟอร์ที่มีอะซีโตน แต่ก็ยังสามารถรับอิเล็กตรอนจากสารให้อิเล็กตรอนดังกล่าวได้ จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 35 และ 40 °C ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 8 และ 9 นอกจากนี้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสมีค่า K_m สำหรับ $NaNO_3$ เท่ากับ 185 μM และ V_{max} เท่ากับ 200 μmole/min/mg protein แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจะถูกยับยั้งด้วย sodium azide, arsenic trioxide และ sodium thiocyanate เท่ากับ 100, 69.6 และ 52.4 % ขณะที่ potassium ferricyanide ไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์

การบ่มสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 30 นาที ก่อนทำการวิเคราะห์แอคติวิตีมีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น ขณะที่อุณหภูมิที่สูงและต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง (0, 4, -20, -80, 50, 60, 70 °C) มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง

สารสกัดหยาบเอนไซม์ไม่สามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิที่ต่ำมาก ๆ (-80°C) แต่สามารถเก็บไว้ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 10 และ 15 % ที่อุณหภูมิ -20 °C นอกจากนี้ L-proline เข้มข้น 1 M สามารถเก็บรักษาสารสกัดหยาบเอนไซม์ไว้ได้ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ -20 °C โดยที่แอคติวิตีของเอนไซม์ยังคงอยู่

การทดสอบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสของใบข้าวโพดกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบสาหร่ายชนิด *Synechococcus* sp. พบว่า สารสกัดเอนไซม์สามารถเกิด cross reaction กับแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในใบข้าวโพดได้ แสดงว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Synechococcus* sp. มีโครงสร้างบางส่วนเหมือนกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าวโพด

ผลจากการโคลนส่วนของยีน nar จากเซลล์สาหร่าย *Synechococcus* sp. ได้ยีนที่มีขนาด 534 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนได้ 178 กรดอะมิโน มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตชนิด cyanobacteria มากที่สุดคือ 67-68 % และ 67-75% ตามลำดับ

Thesis Title	Nitrate Reductase from *Synechococcus* sp., a Blue Green Alga Isolated from a Hot Spring in Krabi
Author	Miss Uraiwan Khunjun
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2006

ABSTRACT

The blue-green alga, *Synechococcus* sp., isolated from a salty hot-spring in Krabi Province, was cultured in modified BG-11 medium plus sodium bicarbonate 2 g/l as carbon source under light (120 µphoton $m^{-2}s^{-1}$) and low oxygen conditions at 30±1 degree Celsius.

Effects of sodium chloride (NaCl) and sodium nitrate ($NaNO_3$) supplements on growth of the alga were examined. It was shown that addition of 6.25 g/l of NaCl and 32.5 mM $NaNO_3$ brought about maximum growth rate ($p<0.05$), however these concentrations of NaCl and $NaNO_3$ did not produce the highest activity of nitrate reductase (NR). All the algal cells showed highest NR activities on the 10th day of culture but the highest NR activity was obtained from the non-NaCl supplemented medium and the addition of 17.6 mM of $NaNO_3$. The *Synechococcus* NR activity also varied during the day, being low in light and increased in the dark reaching a maximal level after 12 hours in darkness.

NR is a membrane-bound enzyme and it has not been possible to solubilize from the algal membrane by buffers containing acetone. The enzyme could not use NADH and NADPH as electron donor but it could utilize electrons from quinone pool in the cell membrane. In addition, the enzyme could accept electrons from hydroquinone and dithionite-reduced methyl viologen, eventhough the NR was partially denatured by acetone buffer. Optimum temperature and pH for enzyme activity were 35 - 40 ºC and pH 8 - 9. K_m and V_{max} values for $NaNO_3$ obtained from kinetics study were 185 µM and 200 µmole/min/mg protein respectively. Sodium azide, arsenic trioxide and sodium thiocyanate inhibited enzyme activity by 100, 69.6 and 52.4 % respectively, whereas potassium ferricyanide could not inhibit NR activity. Furthermore ammonium ions at concentrations of 4.0 to 5.0 mM could suppress activity of enzyme. Activity of NR decreased when crude extract was incubated at condition lower and higher than room

temperature (0, 4, -20, -80, 50, 60, 70 °C). NR activity was highest when crude extract was incubated at 40 °C for 30 min before enzyme activity assay.

Activity of NR decreased when crude extract was stored at low temperature (-80 °C) but NR activity could be maintained when crude extract was kept in 10 and 15% glycerol at -20 °C. Furthermore the NR activity could be prolonged if the crude extract was kept at 4 or -20 °C with an addition of 1 M proline.

Crude extract of *Synechococcus* sp. showed cross reactivity with rabbit antibody against purified NR from corn leaf, indicating some similarity between the structure of *Synechococcus* sp. NR and that of corn NR.

Finally, partial fragment of *nar* gene from *Synechococcus* sp. was cloned and its sequence was analyzed. The fragment obtained was 543 nucleotide in length which was equivalent to 178 amino acid residuces. The *nar* fragment of this blue-green alga exhibited the highest identity of both nucleotide and amino acid sequence to other cyanobacteria by 67-68% and 67-75% respectively.