หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การเลี้ยงสาหร่าย C. reinhardtii สายพันธุ์(137c)เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้านพาราควอท(PPQ-10/3) ซึ่งสามารถเจริญในพาราควอทที่มีความเข้มข้นถึง 6 ไมโครโมลาร์ โดยให้เซลล์เจริญแบบ Synchronous Growth ในขวดก้นชมพู่ขนาด 4 ลิตร ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ที่พ่นอากาศปลอดเชื้อที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผสมอยู่ประมาณ 2-5% โดยปริมาตร จำนวนเซลล์เริ่มต้น 3-5 x 10^5 เซลล์/มล.อาหาร การเจริญของสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิมนี้จะสูงสุดและมีค่าคงที่ที่อายุ 5-6 วัน มีจำนวนเซลล์สูงสุดประมาณ 5 x 10^6 เซลล์/มล.อาหาร (รูปที่4.1) เช่นเดียวกับรายงานของ Surzycki(1971) ในสภาพการเลี้ยงเช่นเดียวกัน แต่ในสายพันธุ์ต้านพาราควอทจะมีจำนวนเซลล์สูงสุดประมาณครึ่งหนึ่งของสายพันธุ์ดั้งเดิมคือ 2.4 x 10^6 เซลล์/มล.อาหาร แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ในสายพันธุ์ดั้งเดิมจะมีค่าสูงสุดประมาณ 31 ไมโครกรัม/10^7 เซลล์ แต่สายพันธุ์ต้านพาราควอทจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ถึงประมาณ 54 ไมโครกรัม/10^7 เซลล์ โดยที่ค่าการดูดแสงแล้วมีค่าใกล้เคียงกัน 0.9-1.0 ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการที่จำนวนเซลล์ของสายพันธุ์ต้านพาราควอทมีน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ประมาณ 2เท่านั้น อาจเป็นได้ว่าเซลล์สาหร่ายสายพันธุ์ต้านพาราควอท อาจมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของเซลล์ของสายพันธุ์ดั้งเดิม หรือมีการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ที่ทำให้ค่าการดูดแสงของสายพันธุ์ต้านพาราควอทมีค่าสูงขึ้น จากรายงานของ Nuchadomrong (1991) ที่พบว่าขนาดของเซลล์สายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 เท่า จากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นด้วยว่า สาหร่ายสายพันธุ์

ต้านพาราควอทจะเจริญถึงจุดสูงสุดช้ากว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 วัน คือใช้เวลาประมาณ 7-8 วัน ทั้งนี้พอสรุปได้ว่าพาราควอทมีผลกระทบต่อกลไกการเจริญ ซึ่งในพืชอัตราการเจริญย่อมขึ้นกับอัตราเร็วของการเกิดการสังเคราะห์แสง จากผลที่พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ต่อเซลล์ของเซลล์ต้านพาราควอทสูงกว่าในเซลล์ของสายพันธุ์ดั้งเดิมเกือบ2เท่า แสดงให้เห็นว่า ผลกระทบของพาราควอทน่าจะมีส่วนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของการสังเคราะห์แสงของเซลล์สาหร่ายอย่างแน่นอน อย่างไรก็ตาม Nuchadomrong(1991)ได้รายงานว่า การมีพาราควอทในอาหารเลี้ยงเซลล์จะมีผลไปลดอัตราการถ่ายเทอิเลคตรอนใน Photosystem I (PS I) ทั้งในเซลล์ดั้งเดิมและเซลล์ต้านพาราควอท เมื่อวัดโดยวิธี DCPIP

ผลการทดลองดังกล่าว จึงยิ่งเป็นที่น่าสนใจและสนับสนุนข้อคิดที่จะศึกษาและวิจัยให้ลึกซึ้งลงไปถึงบริเวณเป้าหมายบนวิถีของ PS I ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงและมีผลกระทบสืบเนื่องจากการออกฤทธิ์ของพาราควอท ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกเอนไซม์เป้าหมายคือ เฟอริดอกซินเอนเอดีพีรีดักเตส (FNR) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการส่งผ่านอิเลคตรอนจากเฟอริดอกซินไปยัง NADP ซึ่งค่า reduction potential (E_o) ของเฟอริดอกซิน มีค่าใกล้เคียงกับค่า E_o ของพาราควอท ซึ่งยังไม่เคยมีใครทดลองเอนไซม์เป้าหมายชนิดนี้ในสายพันธุ์พืชที่ต้านพาราควอทที่สามารถวัดองศาของการต้านทานได้อย่างถูกต้องและแน่นอนมาก่อนเลย

ในการศึกษาเอนไซม์ FNR ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้ใน C. reinhardtii มาก่อน จึงต้องเริ่มต้นจากการหาวิธีการสกัดแยกเอนไซม์แจากเซลล์ด้วยวิธีการที่เหมาะสม ในการทดลองนี้จะใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ที่เสริมด้วย บีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์, EDTA 1.0 มิลลิโมลาร์ และ PMSF 10 ไมโครโมลาร์ (Spano และ Schiff,1987 และ Gozzer และคณะ,1977) โดยบีตา-

เมอร์แคปโตเอทานอล นั้นจะเป็นสารประกอบ thiol ซึ่งจะป้องกันการออกซิเดชั่นของหมู่ sulfhydryl ที่บริเวณเร่ง (active sites) ของเอนไซม์ การเกิด ionization ของหมู่ sulfhydryl จำเป็นสำหรับการเกิดเอนไซม์ FNR ในรูปที่มีประสิทธิภาพสูงในการเร่ง (Carillo และคณะ ,1981) ส่วน EDTA นั้นจะเป็นสารที่เข้าไปคีเลต (chelate) พวก counter ion ให้อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ทำให้เอนไซม์ FNR ไม่สามารถจับกับเยื่อไธลาคอยด์ ละลายออกมาอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ เนื่องจากการจับของ FNR บนเยื่อไธลาคอยด์ต้องการประจุบวก (Vallejos และคณะ,1984; Carrillo และ Vallejos,1982) ส่วนPMSFนั้นเติมลงไปเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Protease (Gozzer และคณะ,1977) ซึ่ง Protease จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตลอดจนทำลายคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR (Gadda และคณะ,1990)

การสกัดแยกเอนไซม์เพื่อศึกษารูปแบบสังเคราะห์เอนไซม์ FNR ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญของ C. reinhardtii นั้น จะดูดแยกเซลล์ออกมาตรวจสอบจำนวนน้อยที่สุด โดยจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาตรในภาชนะที่เลี้ยงเซลล์น้อยที่สุด จึงเลือกใช้วิธีการแยกเอนไซม์จากเซลล์ด้วยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (Sonicator) โดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเอนไซม์ออกมาจากเซลล์ให้มากที่สุด จากการทดลองพบว่าสภาวะการใช้เครื่องที่ 50 % duty cycle, output 6 เป็นเวลานาน 2 นาที โดยมีปริมาตรของสารละลายเซลล์ 6-10 มล. พบว่าจะแยกเอนไซม์ FNR ออกมาอยู่ในส่วนสารละลายใส มีแอคติวิตีรวมสูง (87.6 % ของแอคติวิตีทั้งหมด) และแอคติวิตีจำเพาะไม่ต่ำลงมากนัก (1.068) (ตารางที่ 1)

แต่ในการเตรียมเอนไซม์เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์นั้น จะต้องใช้ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาวิธีการที่เหมาะสมในการแยกเอนไซม์

จากเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เครื่องทำให้เซลล์แตกชนิดแรงดันสูงแบบเฟรนช์ (French Pressure Cells) ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับเซลล์ที่มีขนาดเล็ก (แบคทีเรียและเซลล์พืช) โดยสามารถเตรียมปริมาณมากขึ้น (5-40 มล.) สำหรับวิธีการสกัดเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ขั้นแรกต้องหาสัดส่วนจำนวนเซลล์ต่อบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่สัดส่วน 1:3 นั้น จะแยกเอนไซม์ FNR จากเซลล์ C. reinhardtii ให้ละลายอยู่ในส่วนสารละลายใสมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด ซึ่งสภาวะสำหรับการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำให้เซลล์แตกชนิดแรงดันสูงแบบเฟรนช์ จะใช้ความดัน 8,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อัตราการไหลผ่านของเซลล์ในเครื่องประมาณ 3-5 มล./นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นแยกส่วนใสและตะกอนออกจากกัน ซึ่งพบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ได้นั้นจะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะใกล้เคียงกับการใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ซึ่งเอนไซม์ส่วนนี้จะใช้เป็นเอนไซม์เริ่มต้นในการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

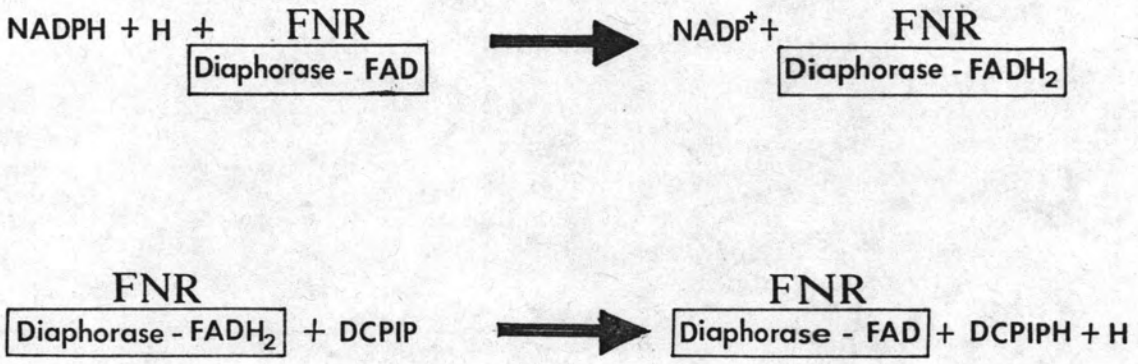
จากการทำให้เซลล์แตกเพื่อเตรียมสารละลายเอนไซม์นั้น ในขั้นแรกสารละลายที่ได้หลังจากทำให้เซลล์แตกคือสารละลายโฮโมจีเนตทั้งหมด ซึ่งเมื่อนำไปปั่นแยกส่วนตะกอนและส่วนใส (10,000 rpm, 1 ชั่วโมง) พบว่าใน C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอทจะมีปริมาณแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR ในส่วนสารละลายใสมากกว่าในส่วนตะกอนถึง 5 เท่า โดยเปรียบเทียบที่ระยะปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (late log)นี้ มีแอคติวิตีสูงสุด

เอนไซม์ FNR เป็น flavoprotein ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อไธลาคอยด์ (thylakoid membrane) เกี่ยวข้องในกระบวนการเคลื่อนย้ายอิเลคตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสง การวัดปริมาณของเอนไซม์มีหลายวิธี (Zanetti และ Curti,1980) ได้แก่ 1) การรีดิวส์ NAD^+ ด้วย NADH ในสภาพมีแสงโดยมีเฟอริดอกซิน(Ferredoxin) เป็นตัวให้อิเลคตรอน 2)การรีดิวส์

NAD^+ ด้วย NADPH เรียกปฏิกิริยา Transhydrogenase 3) การออกซิไดซ์ NADPH ด้วย $K_3Fe(CN)_6$ หรือ DCPIP (Dichlorophenolindolphenol) หรือ INT [2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenye)-5-phenyltetrazolium chloride] เรียกปฏิกิริยาไดอะโฟเรส (Diaphorase) ซึ่งในการทดลองนี้ได้เลือกปฏิกิริยาไดอะโฟเรสของการรีดิวส์ DCPIP ด้วย NADPH โดยเอนไซม์ FNR จะทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADPH ไปให้สี DCPIP ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{600} ของ DCPIP ที่ถูกรีดิวส์ลดลง ดังสมการ รูปที่ 5.1

จากรายงานของ Melamed-Harel และคณะ (1985) ได้เสนอไว้ว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลในการเร่งปฏิกิริยาไดอะโฟเรสของเอนไซม์ FNRในการรีดิวส์ DCPIP ด้วย NADPH ดังนั้นในการทดลองแปรค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR ของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น ซึ่งผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ แอคติวิตีเพิ่มขึ้นตามลำดับจนสูงสุดที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ และจะค่อยๆ ลดลง โดยที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ จะมีแอคติวิตีเท่ากับเมื่อไม่ได้เติมโซเดียมคลอไรด์ (รูปที่ 4.2) ดังนั้นทุกขั้นตอนในการหาแอคติวิตีของ FNR จึงเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์

และเมื่อได้ทดลองแปรเปลี่ยนค่าโซเดียมคลอไรด์ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR ในสารละลายเอนไซม์บริสุทธิ์สูง กลับไม่พบความสัมพันธ์ดังเช่นที่พบในสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นดังกล่าว ซึ่งอาจจะเนื่องจากในเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์สูงนั้นไม่มีเฟอริดอกซินซึ่งมีส่วนช่วยในการเร่งปฏิกิริยาให้เร็วขึ้น(Melamed-Harel และคณะ, 1985) โดยเฉพาะเมื่อมีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นพอเหมาะเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาของ FNR ในการส่งผ่านอิเลคตรอนระหว่างเฟอริดอกซินและNADP นั้น เฟอริดอกซินจะจับกับเอนไซม์ FNR ด้วยพันธะอิออนนิค (Shin, 1971;



รูปที่ 5.1 สมการแสดงการเกิดปฏิกิริยาไดอะโฟเรสในการรีดิวซ์ DCPIP ของ NADPH โดยเอนไซม์ FNR ซึ่งมี FAD เป็นโคเอนไซม์ ทำหน้าที่ในการส่งผ่านอิเลคตรอน

Zanetti และคณะ, 1988) ดังนั้นค่า ionic strength ที่เหมาะสมจึงมีส่วนช่วยในการจับกันระหว่างเฟอริดอกซินกับเอนไซม์ FNR ให้เร็วขึ้น(Nakamura และ Kimura,1971) จึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ FNR ในสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นเพิ่มขึ้นดังกล่าว

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการผลิตเอนไซม์ของ C. reinhardtii 2 สายพันธุ์พบว่าสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีรูปแบบการผลิตเอนไซม์สูงขึ้นตามการเจริญของเซลล์และจะลดลงเมื่อถึงระยะปลายของการเจริญแบบทวีคูณ(late log) โดยจะเก็บเซลล์สายพันธุ์ต้านพาราควอทเพื่อเตรียมเอนไซม์ได้ช้ากว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2 วัน คือจะเก็บเซลล์สายพันธุ์ดั้งเดิมเพื่อเตรียมเอนไซม์ที่อายุประมาณ 3-4 วัน โดยจะมีแอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.01 หน่วย/มล.อาหาร สายพันธุ์ต้านพาราควอทจะเก็บเซลล์ที่อายุประมาณ 5-6 วัน โดยมีแอคติวิตีสูงสุดประมาณ 0.075 หน่วย/มล.อาหาร แต่เมื่อดูจากปริมาณแอคติวิตีต่อเซลล์พบว่า สายพันธุ์ดั้งเดิมจะมีค่าประมาณ 0.021 หน่วย/10^7 เซลล์ ในขณะที่สายพันธุ์ต้านพาราควอทมีแอคติวิตีถึง 0.031 หน่วย/10^7 เซลล์ เนื่องจากขนาดของเซลล์ใหญ่ปริมาณเอนไซม์ต่อเซลล์ของสายพันธุ์ต้านพาราควอทจึงสูงขึ้นด้วย จากความแตกต่างเพียงส่วนหนึ่งซึ่งยังไม่ชัดเจนนักจำเป็นต้องเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ FNR ที่แยกจาก C. reinhardtii ทั้ง 2 สายพันธุ์ ต่อไปอีก

ผลการเปรียบเทียบขั้นตอนการทำให้เอนไซม์FNRจาก C. reinhardtii บริสุทธิ์ การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ จะต้องรวบรวมเซลล์เพื่อสกัดแยกเอนไซม์เริ่มต้นให้มีปริมาณเพียงพอต่อการที่จะนำไปผ่านขั้นตอนต่างๆของการทำให้บริสุทธิ์ โดยการรวบรวมเซลล์จากการเลี้ยงหลาย ๆ ครั้ง เพื่อให้ได้เซลล์ประมาณ 100-200 กรัม เนื่องจากผลผลิตของเซลล์จะได้ประมาณ 15-20 กรัม/10 ลิตร ในสายพันธุ์ดั้งเดิม และ 12-16 กรัม/10 ลิตร ในสายพันธุ์ต้านพาราควอท ซึ่งการเลี้ยงแต่ละครั้งจะ

เตรียมได้มากที่สุดเพียง 30 ลิตร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเก็บเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้สูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยที่สุด ซึ่งผลการทดลองพบว่าเก็บที่อุณหภูมิช่องแช่แข็ง(-4° ซ.)ได้นานถึง 1 เดือน โดยแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แยกได้จากเซลล์จะไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ เพราะที่อุณหภูมินี้นอกจากจะรักษาสภาพของเอนไซม์ให้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดแล้ว ยังควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราทำให้การวัดแอคติวิตีไม่แน่นอนอีกด้วย

นำเซลล์ C. reinhardtii ที่รวบรวมเก็บไว้ที่ -4° ซ. จำนวน 100-200 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ที่เสริมด้วยบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์, EDTA 1.0 มิลลิโมลาร์และ PMSF 10 ไมโครโมลาร์ ด้วยสัดส่วน 1:3 แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำให้เซลล์แตกแบบเฟรนช์ ปั่นแยกเอาส่วนสารละลายใส ซึ่งจะใช้เป็นสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นเพื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่างๆ โดยทุกขั้นตอนจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 4-10° ซ.

เมื่อศึกษาจำนวนไอโซไซม์ของ FNR ที่แยกจากสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นของ C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิม (137c) และสายพันธุ์ต้านพาราควอท โดยวิธีโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส โดยการย้อมสีแอคติวีตีสามารถตรวจพบจำนวนโอโซไซม์ของ FNR สูงสุด 17 แบบ (รูป 4.5) ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง 2 สายพันธุ์ได้ และยังพบว่ามีแถบสำคัญ (major band) อยู่ 2 แถบที่ Rf0.20 และ0.28 ทั้ง 2สายพันธุ์ จากรายงานต่างๆ พบว่า FNR มีหลายแถบเช่นกัน โดย Shin และ Oshino(1978)แยก FNR จากผักโขมฝรั่งได้2แถบ แต่ในอีกหลายรายงานพบว่าFNRที่แยกได้บริสุทธิ์จากผักโขมฝรั่งเมื่อนำมาตรวจสอบโดยวิธีIsoelectric focusing พบแถบFNRถึง8แถบ (Gozzer และคณะ,1977, EllefsonและKrongmann,1979,Hasumiและคณะ,1983) ส่วนในสไปรูไลนา

(Spirulina platensis) แยก FNR ได้บริสุทธิ์ 2 รูปแบบ

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ในขั้นแรก นำสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น นำมาตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต จะใช้ความเข้มข้นอิ่มตัว 0-70% โดยจากการทดลองเมื่อเพิ่มความเข้มข้นอิ่มตัวของผงแอมโมเนียมซัลเฟต ตั้งแต่ 0-30% ถึง 0-80% โดยเข้มข้นแฟรดชั้นละ 10% ผลปรากฏว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในตะกอนจะค่อย ๆ สูงขึ้นตามลำดับจนกระทั่งสูงสุดคงที่ที่ความเข้มข้น0-70% และ 0-80% โดยปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับเช่นกัน และจะสูงสุดที่ 0-80% (ตารางที่3) โดยจะได้เอนไซม์ละลายน้อยในช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 0-70% ที่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.14 เท่า จะเห็นได้ว่าบริสุทธิ์ขึ้นเพียงเล็กน้อย เนื่องจากลักษณะการตกตะกอนของเอนไซม์ FNR จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 41.4% จนถึง 98.5% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวตั้งแต่ 0-30% ถึง 0-80% ดังนั้นจึงไม่ได้ตกตะกอนในช่วงแรก ทิ้งไปก่อนเนื่องจากที่ 0-30% แอคติวิตีของFNRในตะกอนก็มีถึง 41.4% แล้วดังนั้นหากทิ้งตะกอนส่วนนี้ไปแม้ว่าจะทิ้งโปรตีนแต่ก็จะเสียแอคติวิตีไปเกือบครึ่ง ดังนั้นจึงเลือกที่จะตกตะกอนทั้งหมดนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

ในการแยกเอนไซม์ในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสชาคริล ครั้งที่ 1 จากรูปแบบของเอนไซม์ FNR (รูป4.6) จะเห็นว่าแถบสำคัญคือที่ Rf 0.2 และ 0.28 เมื่อผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว นำมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสชาคริล ขั้นแรกเมื่ออิควิลิเบรทและชะคอลัมน์ด้วยสารละสายทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ (Gozzer และคณะ 1977) เอนไซม์จะหลุดออกจากคอลัมน์ทั้งหมด ดังนั้นจึงได้ลดความเข้มข้นของสารละลายทริสบัฟเฟอร์ลงเหลือ 10 มิลลิโมลาร์ (Morigasaki และคณะ,1990 และ Spano และ Schiff,1987) ปรากฏว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่จับคอลัมน์ แสดงว่าเอนไซม์จับคอลัมน์

ด้วยแรงที่อ่อนมาก ในสภาวะนี้ใช้ทดลองคือ ความเข้มข้นของทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ จะมีเอนไซม์ส่วนน้อยซึ่งมีปริมาณไม่แน่นอนประมาณ 1.12% (ตารางที่ 4) หลุดออกมาจากคอลัมน์ รวมทั้งชนิดของไอโซไซม์ ที่ได้จากการศึกษาด้วยโพลีอะไครลาไมด์ก็ไม่แน่นอนด้วย อย่างไรก็ตามสังเกตได้ว่ามีอยู่ 1 แถบ ที่เป็นแถบสำคัญถูกไล่ออกมาด้วยทุกครั้งคือที่ Rf 0.20 ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ แถบนี้เป็นไอโซไซม์ที่มีลักษณะของประจุต่างกับชนิดอื่นอย่างชัดเจน เป็นที่น่าสังเกตว่า แอคติวิตีของแถบของไอโซไซม์ในส่วนนี้จะเปลี่ยนไปเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น จากนั้นเมื่อชะคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริล เมื่อใช้เกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้นระหว่าง 30-100 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 500 มล. ก็จะแยกเอนไซม์ FNR ส่วนใหญ่ที่ติดกับคอลัมน์ออกมาที่ความเข้มข้นของสารละลายทริสบัฟเฟอร์ ในช่วง 30-80 มิลลิโมลาร์ โดยเฉพาะแถบที่ Rf 0.28 จะเป็นแถบที่เห็นชัดแถบเดียวที่ออกมาได้ แต่ลักษณะของพีคที่แยกออกมาจากคอลัมน์นั้นมีช่วงแอคติวิตีที่กว้างมาก ลักษณะพีคแบ่งเป็น 3 ช่วง (รูปที่ 4.6) D_1, D_2 และ D_3

ผลการศึกษาไอโซไซม์ของFNR (รูป 4.7ก.)ทั้ง 3 ส่วน ที่แยกไว้พบว่าจะพบแถบที่ Rf 0.28 เป็นแถบเข้มที่สุดทั้ง 3 ส่วน โดยมีแถบอื่นๆกระจายอยู่ในลักษณะปะปนกันไปบ้างเมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีน (รูป 4.7ข) จะพบว่านอกจากแถบ Rf 0.28 จะพบแถบโปรตีนที่ Rf 0.16 ไม่มีแอคติวิตีและความเข้มของแถบสีจะเข้มกว่าแถบที่ Rf 0.28 มาก พบอยู่ทั้ง D_1 D_2 และ D_3 แต่ที่ D_3 จะจางที่สุด นอกจากนั้นยังพบแถบโปรตีนอื่น กระจายอยู่ใน D_2 แต่ก็ยังน้อยกว่าใน D_1 และD_3 ดังนั้นการที่จะทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นต่อไปจึงต้องรวมเอนไซม์บริเวณที่มีแอคติวิตีสูงสุดและมีโปรตีนอื่นเจือปนอยู่น้อยที่สุด โดยรวมตรงบริเวณ D_2 และ D_3 เพราะส่วน D_1 มีไอโซไซม์ที่เคลื่อนที่ช้า Rf น้อยกว่า 0.28 มากกว่าบริเวณ D_2 และ D_3 โดยเฉพาะ Rf 0.16 ใน D_1 จะเข้มมาก หลังจากรวมเอนไซม์จากคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริลแล้วจะให้ผลผลิตประมาณ 15% ของเอนไซม์เริ่มต้น จะเห็นได้ว่ามีเอนไซม์สูญหายไปในคอลัมน์นี้มาก เพราะจากขั้นตอนการตกตะกอน

แอมโมเนียมซัลเฟตได้ผลผลิต 72.47% ซึ่งคาดว่าอาจจะติดอยู่ในคอลัมน์ก็เป็นไปได้ ดังนั้นจึงได้ลองล้างคอลัมน์ต่อด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ที่เพิ่มความเข้มข้นถึง 500 มิลลิโมลาร์ แต่ก็ไม่พบแอคติวิตีของ FNR ออกมาจากคอลัมน์เลย ได้พยายามเพิ่ม ionic strength โดยเปลี่ยนไปใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นระหว่าง 0-500 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 500 มิลลิโมลาร์ ก็ไม่สามารถพบแอคติวิตีของ FNR ในสารละลายที่ชะจากคอลัมน์แต่อย่างใด Morigasaki และคณะ (1990) ได้ตั้งข้อสังเกตไว้ว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR ที่แยกจากหัวผักกาด (Radish, Raphanus sativus) เมื่อแยกในคอลัมน์ดีอีเออี จะมีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ไปมากกว่า 70% เช่นกันโดยได้ผลผลิตออกมาเพียง 28.7% เท่านั้น อย่างไรก็ตามจากลักษณะของโพลีอะไครลาไมด์ เจลอิเลคโตรโฟรีซีส จะพบแถบไอโซไซม์ที่ Rf 0.28 เป็นแถบส่วนใหญ่ ซึ่งจะสามารถแยกออกจากแถบไอโซไซม์อื่นได้ไม่ยากนัก โดยเฉพาะโปรตีนที่ Rf 0.16 ก็ยังเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่อยู่ด้วยด้วยเช่นกัน

การแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์ พี11 ฟอสโฟเซลลูโลส โดยนำสารละลายที่ประกอบไปด้วยเอนไซม์ FNR ที่แยกได้จากคอลัมน์ ดีอีเออี ทริสซาคริล เมื่อนำไปแยกในคอลัมน์ พี11 ฟอสโฟเซลลูโลส สามารถแยกโปรตีนอื่นที่ปนอยู่ออกไปได้ โดยเมื่ออิควิลิเบรทและชะคอลัมน์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีแอคติวิตีของเอนไซม์ออกมาเล็กน้อย (ประมาณ 4%) แต่ไม่สม่ำเสมอทุกครั้ง และมีค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำ โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่จะจับกับคอลัมน์ เมื่อชะต่อด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (10-250 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 500 มล. เอนไซม์FNR ส่วนใหญ่จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ประมาณ 80 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นในการแยกเอนไซม์ FNR ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ฟอสโฟเซลลูโลสนี้ ภายหลังได้ลดเกรเดียนท์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลง มาใช้ความเข้มข้นระหว่าง 30-120 มิลลิโมลาร์ โดยปริมาตรเท่าเดิม ซึ่งสภาวะดังกล่าวก็สามารถ

แยกเอนไซม์ FNR ส่วนใหญ่ออกมาได้ผลผลิตประมาณ 10% บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 14 เท่าจากเอนไซม์เริ่มต้น (ตารางที่ 4) เมื่อศึกษาลักษณะไอโซไซม์พบว่าแถบเอนไซม์ที่ Rf0.28 เป็นแถบส่วนใหญ่ โดยมีแถบเอนไซม์จางๆ อีก 2 แถบ (Rf 0.31 และ 0.34) และเมื่อย้อมโปรตีนยังคงพบแถบโปรตีนแถบเข้มที่ Rf 0.16 เช่นเดิม (รูป 4.9) โดยมีความเข้มประมาณ 2เท่าของแถบเอนไซม์ที่ Rf 0.28 และมีแถบจางๆของโปรตีนอื่น ๆ กระจายอยู่ประมาณ 2 แถบ (Rf 0.07,0.32) จะเห็นได้ว่าจากเอนไซม์เริ่มต้นซึ่งมีแถบโปรตีนถึง 24 แถบ ลดลงเหลือเพียง 3 แถบโปรตีน และ 3 แถบเอนไซม์แอคติวิตี แสดงว่าแยกโผรตีนส่วนใหญ่ออกไปได้มาก แต่อย่างไรก็ตามยังต้องหาวิธีการกำจัดโปรตีนที่ Rf 0.07,0.16 และ 0.32 เนื่องจากความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโปรตีน เมื่อแยกในโพลีอะไครลาโมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส อาจจะเกิดจากความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลหรือประจุภายในโมเลกุลของโปรตีนเองก็ได้ จึงน่าไปลองแยกในคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-100 เพื่อทดลองแยกโปรตีนที่มีความแตกต่างของขนาดโมเลกุลออกจากกัน

เมื่อทำการแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-100 นำส่วนของโปรตีนที่มี FNR เป็นองค์ประกอบซึ่งแยกได้จากคอลัมน์ พี11 ฟอสโฟเซลลูเลสไปแยกในคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-100 ผลปรากฏว่าสามารถแยกโปรตีนส่วนหนึ่งออกไปได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 2 เท่า ผลผลิตเหลือ 5.6% (ตารางที่ 4) และเมื่อศึกษาไอโซไซม์ พบว่าโปรตีนที่ Rf 0.32 หายไป Rf 0.07 เหลืออยู่น้อยเกือบไม่เห็นส่วน Rf 0.16 ยังมีอยู่แต่ลดลงจากเดิมซึ่งมีความเข้มเป็น 2 เท่าของ Rf 0.28 นั้น เหลือความเข้มของแถบสีใกล้เคียงกัน (รูปที่4.9) แสดงว่าแม้คอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-100 สามารถแยกโปรตีนบางชนิดออกไปได้บ้างแต่ก็ยังต้องหาวิธีการกำจัดโปรตีนที่ Rf 0.16 ออกไปให้หมดด้วยวิธีการอื่นอีก ยิ่งไปกว่านั้นการใช้คอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ มีข้อกำจัดคือปริมาณตัวอย่างที่แยกต้องมีปริมาณความเข้มข้นมากพอและต้องใช้ปริมาตรไม่มาก ดังนั้นสารละลายเอนไซม์ที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์

จะต้องใช้ค่อนข้างมากที่จะนำในทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป อีกประการหนึ่งพบว่ามีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ในการแยกด้วยคอลัมน์นี้มาก ขั้นตอนนี้จึงตัดทิ้งออกไปจากวิธีการทำให้เอนไซม์ FNR บริสุทธิ์และได้ลองแยกในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริลซ้ำอีกครั้ง

เมื่อนำเอนไซม์ FNR ที่ได้จากคอลัมน์ พี11 ฟอสโฟเซลลูโลส ไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริล ซ้ำเป็นครั้งที่ 2 โดยลดขนาดของคอลัมน์ลง(0.9 x 1.5 ซม.) เพื่อให้เหมาะสมกับปริมาณโปรตีนที่ใช้ อิควิลิเบรทด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม และชะต่อด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นระหว่าง 30-100 มิลลิโมลาร์ ผลการแยก (รูปที่ 4.11 ค.) ในสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท จะเห็นได้ว่าเอนไซม์จะออกมาที่ความเข้มข้นของทริสบัฟเฟอร์ประมาณ 30 มิลลิโมลาร์ ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.25 เท่า และ 2.5 เท่า ผลผลิตที่ได้ 10.5% และ 4.38% ในสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ 6) การแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์ดีอีเออี-ทริสซาคริล ครั้งที่ 2 นี้ ช่วยแยกโปรตีนอื่นๆออกไปได้ดีเนื่องจาก FNR ที่แยกออกมาในขั้นตอนแรกเป็นเอนไซม์ที่จับกับคอลัมน์ ดีอีเออี ทริสซาคริล ในสภาวะที่กำหนด เมื่อเอนไซม์ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น เมื่อไล่ด้วยบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงถูกไล่ออกมาจากคอลัมน์ได้โดยกำจัดโปรตีนส่วนหนึ่งออกไป นำเอนไซม์ที่แยกได้ไปศึกษาไอโซไซม์ (รูป 4.12) พบว่าสามารถแยกโปรตีนที่ Rf 0.07 ออกไปได้หมด ส่วนแถบที่ Rf 0.31 ปรากฏขึ้นมา เนื่องจากโปรตีนที่ไม่มีแอคติวิตีถูกแยกออกไปเมื่อใช้ประมาณโปรตีนเท่ากันแถบโปรตีนที่มีอยู่น้อยจึงปรากฏให้เห็นได้ โดยแถบเอนไซม์นี้จะเห็นได้ในโพลีอะไครลาไมด์เจลที่ย้อมแอคติวิตี เนื่องจากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ มุ่งที่จะเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ FNR จาก 2 สายพันธุ์ เฉพาะแถบไอโซไซม์ที่เป็นแถบสำคัญแถบเดียวกัน ซึ่งในที่นี้ คือ แถบที่เป็น

องค์ประกอบสำคัญ (Rf 0.28) ดังนั้นจำต้องหาวิธีกำจัดแถบโปรตีนอื่นออกให้หมด หรือออกให้มากที่สุด

ผลการแยกโปรตีนด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลแล้วย้อมสีโปรตีนและสีแอคติวิตี จะเห็นว่ามีแถบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบใหญ่อยู่ 2 แถบ มีความเข้มใกล้เคียงกัน ซึ่งเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าได้ห่างกันพอสมควร แต่เมื่อย้อมสีแอคติวิตีจะพบเฉพาะแถบที่ Rf 0.28 เท่านั้น ดังนั้นจึงได้ตัดสินใจทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ โดยใช้ขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วยวิธีโพลีอะไครลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซีส หลังตัดเจลเป็นชิ้นย่อย ๆ ขนาดกว้างแถบละ 0.5 ซ.ม. นำไปบดด้วยการอัดเจลผ่านกระบอกฉีดยา ขนาด 5 มล. ด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ที่เสริมด้วยบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1 มิลลิโมลาร์ แล้วบดต่อด้วยโฮโมจีไนเซอร์แก้วอิควิลิเบรทค้างคืน นำไปปั่นแยกตะกอนเจลออกไป นำส่วนใสไปทำให้แห้งด้วยการไลโอฟิลไลซ์ (lyophilize) รวมแถบบริเวณเดียวกันแล้วละลายด้วยบัฟเฟอร์เดิม หากมี ตะกอนให้ปั่นแยกออกไปอีก แล้วนำสารละลายที่ได้ไปหาโปรตีนและแอคติวิตีของ FNR เอนไซม์ที่เอาเก็บไว้เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์สูง ซึ่งจะนำไปเปรียบเทียบคุณสมบัติของ FNR ที่แยกได้จาก C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิม กับสายพันธุ์ต้านพาราควอทโดยเชื่อว่าไม่มีผลกระทบจากโปรตีน และไอโซไซม์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องรบกวนเลย ทั้งนี้พิสูจน์ได้จากผลการนำเอนไซม์ที่แยกได้จากแผ่นโพลีอะไครลาไมด์เจล ทั้ง 2 สายพันธุ์ไปแยกด้วย โพลีพะไครลาไมด์เจลซ้ำ แล้วย้อมสีโปรตีนกับแอคติวิตี (รูปที่4.12) ผลปรากฏว่าจะได้แถบสีของโปรตีนเป็นแถบเดียวกับแถบสีที่นำไปย้อมแอคติวิตี (Rf 0.28) แสดงให้เห็นว่า ในการวิจัย นี้สามารถสกัดแยกและทำให้เอนไซม์ FNR เฉพาะแถบ ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์ดั้งเดิมและต้านพาราควอทออกมาได้บริสุทธิ์สูง จนไม่สามารถ ตรวจพบโปรตีนชนิดอื่นเลย

แต่เนื่องจากกระบวนการแยกโปรตีนในโพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่นอาจมีสารประกอบที่อาจทำลายคุณสมบัติของเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น แอมโมเนียมเปอร์ซัล-เฟตซึ่งเป็นองค์ประกอบในการโพลีเมอร์ไรซ์เจล อาจจะรบกวนการทำงานของเอนไซม์ FNR โดยเฉพาะหมู่อนุมูลซัลเฟต ซึ่งจากรายงานของ Sancho และ Gomez-Moreno (1991) ได้ศึกษาการจับกันระหว่างเอนไซม์ FNR กับสับสเตรต NADPH พบว่าFNR จะใช้บริเวณที่เป็นประจุบวกของกรดอะมิโนอาร์จินีน(Arginine) จับกับหมู่ 2′-phosphate ของ NADPH ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าหมู่ซัลเฟตอาจจะไปแย่งจับตรงบริเวณประจุบวกของ FNR ทำให้ NADPH เข้าไปตรงบริเวณทำการไม่ได้สะดวกหรือไม่อาจจับได้ นอกจากนั้นขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ FNR บริสุทธิ์ขั้นตอนสุดท้ายโดยการอัดเจลผ่านกระบอกฉีดยานั้นค่อนข้างรุนแรง แล้วบดต่อด้วยโฮโมจีไนเซอร์แก้วอีก แล้วจึงนำไปทำแห้งด้วยวิธี Freeze Dry นับเป็นการรบกวนโครงสร้างของเอนไซม์ทั้งสิ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเอนไซม์ที่ใช้แยกนี้เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์สูง ขั้นตอนที่รุนแรงจะมีผลต่อเอนไซม์โดยตรง เอนไซม์จึงสูญเสียแอคติวิตีไปมาก จากตารางที่ 5 จะเห็นว่า ในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้ FNR ของ C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิมบริสุทธิ์สามารถแยกโปรตีนออกไปได้ถึง 10 เท่า จากขั้นตอนก่อนหน้านี้ แต่แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยไม่ถึง 2 เท่า ซึ่งไม่สอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ถูกแยกออกไปได้ สายพันธุ์ต้านพาราควอทแยกโปรตีนออกไปประมาณ 6 เท่า แต่แอคติวิตีจำเพาะไม่เพิ่มขึ้นเลย อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าโปรตีนที่ Rf 0.28 ซึ่งเป็นเอนไซม์บริสุทธิ์นั้น มีแอคติวิตีจำเพาะใกล้เคียงกัน คือ 1.18 และ 1.25 หน่วย/มก.โปรตีน เป็นไอโซไซม์สำคัญที่แยกออกมาจากสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอทตามลำดับ ดังนั้นวิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยแยกจากโพลีอะไครลาไมด์เจลนี้ สามารถแยกโปรตีนออกไปได้มาก แต่ต้องหาวิธีการทำให้แอคติวิตีสูญเสียน้อยที่สุด จากผลการทำให้เอนไซม์FNR ใน C. reinhardtii บริสุทธิ์นั้น จะเห็นว่าที่ขั้นตอนต่างๆของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ทุกขั้นตอนไม่สามารถสังเกตพบความแตกต่างของเอนไซม์ที่แยกได้ในแต่ละสาย

พันธุ์อย่างเด่นชัด ทั้งนี้จำนวนของไอโซไซม์และรูปแบบของการแยกด้วยคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ หากจะมีเพียงค่าแอคติวิตีต่อจำนวนเซลล์ของเอนไซม์ที่แยกได้จากเซลล์ ในผลการทดลองอาจเกิดเนื่องจากเซลล์สร้างเอนไซม์ได้ต่างกันที่สภาวะการแตกต่างกันก็เป็นได้

จากการทดลองนี้เมื่อได้เอนไซม์ FNR บริสุทธิ์สูงแล้ว น่าไปศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ เริ่มจากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไดอะโฟเรสของเอนไซม์ FNR ของ C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR ใกล้เคียงกันทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ ประมาณ 65-70° ซ. ดังรูป 4.15 เป็นที่น่าสังเกตว่าจากการติดตามเอกสารการวิจัยยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการวัดปฏิกิริยาไดอะโฟเรสของเอนไซม์ FNR จากแหล่งของเซลล์ชนิดใดเลย

การศึกษาพีเอชที่เหมาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR เมื่อเปรียบเทียบพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR จาก C. reinhardtii ที่ได้จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท พบว่ามีพีเอชที่เหมาะสมที่ประมาณ 8.5 - 9.0 (รูปที่ 4.14) รายงานของ Avron และ Jagendorf (1956) และ Carillo และคณะ(1981) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมของ FNR จากใบผักโขมฝรั่ง (Spinacea oleracea) อยู่ที่พีเอช 9.0

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR ที่มีความบริสุทธิ์สูงในปฏิกิริยาไดอะโฟเรสของ C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท เมื่อใช้ NADPH เป็นสับสเตรตเมื่อกำหนดให้ DCPIP คงที่และอิ่มตัว โดยใช้เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์

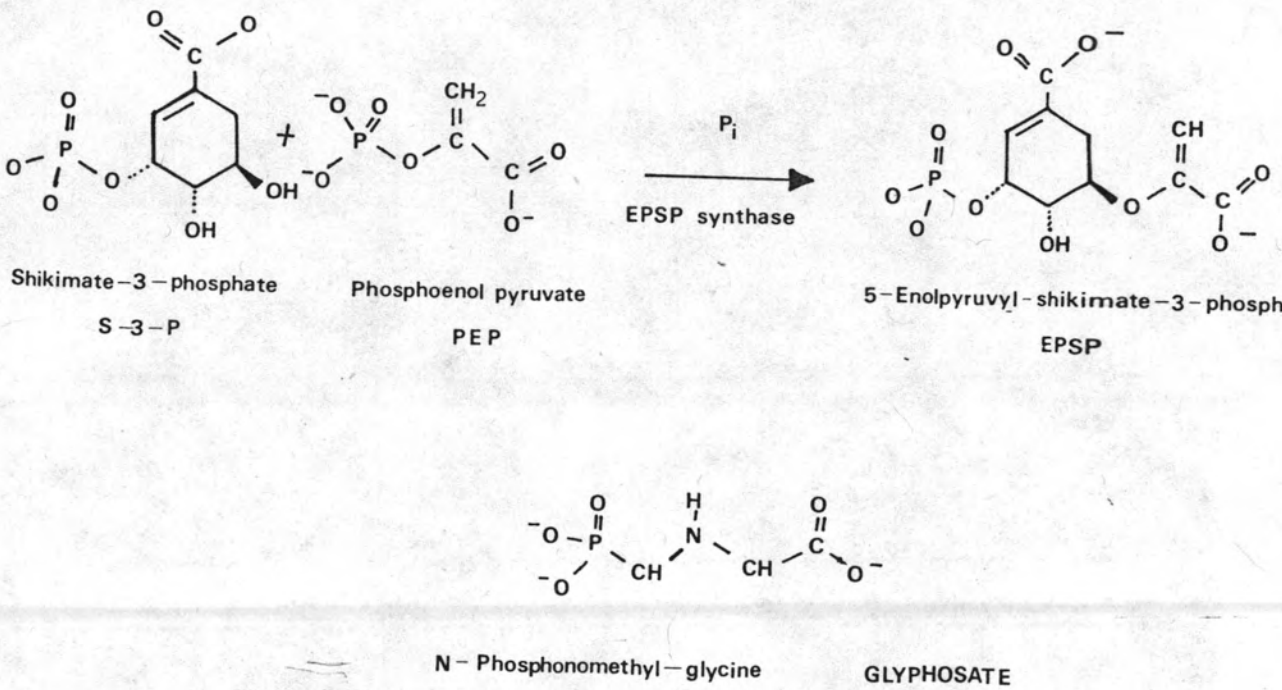
ถึงขั้นดีอีเออี ทริสชาคริล ครั้งที่ 2 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ได้แยกจากโพลีอะไครละไมด์เจล แล้วนำไปทำ Lineweaver-Burk plot ผลปรากฏว่า เอนไซม์จากสายพันธุ์ 137c ที่ความบริสุทธิ์ต่างกันจะให้ค่าคงที่ของ Michaelis Menten (K_m) ของ NADPH = 12.5 $\pm$ 0.78 ไมโครโมลาร์ และในสายพันธุ์ต้านพาราควอท PPQ-10/3 ในทำนองเดียวกัน ให้ค่า K_m ของ NADPH = 13.3$\pm$ 0.89 ไมโครโมคาร์แตกต่างกันเล็กน้อย (รูป 4.16) มีรายงานว่าค่า K_m ของ NADPH โดยปฏิกิริยาการรีดิวซ์ FNR จากผักโขมฝรั่งมีค่าประมาณ 2.2 ไมโครโมลาร์ (Nakamura และ Kimura,1971) ส่วนในสไปรูไลนา (Spirulina platensis) ซึ่งแยกได้ 2 รูปแบบ คือ FNR I และ FNR II พบว่ามีค่า K_m ของ NADPH = 59 และ 67 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Masaki และคณะ 1979)

เมื่อนำเอนไซม์ FNR ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกในโพลีอะไครลาไมด์เจลจาก C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท มาศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะไครละไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซีส (รูป 4.17) นำมาเขียนค่าการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของหน่วยย่อยโปรตีน เขียนกราฟเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (รูป 4.18) พบว่า เอนไซม์ FNR บริสุทธิ์สูงที่แยกออกจาก C. reinhardtii ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 33,000 ดาลตัน มีรายงานว่า เมื่อใช้วิธีการเดียวกันในการหาน้ำหนักโมเลกุลของFNR ของหัวผักกาด (Raphanus sativus) (Morigasaki และคณะ,1990) มีค่าประมาณ 33,000 ดาลตัน ส่วนในผักโขมฝรั่งนั้นมีการศึกษามากมาย และพบว่า FNR มีหลายรูปแบบ ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันออกไป อาทิเช่น ขนาดของเอนไซม์ 32,000-34,000 ดาลตัน (Hasumi และคณะ 1983) Gozzer และคณะ (1977) แยกเอนไซม์ FNR ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 33,000-34,000 ดาลตัน และกลุ่มที่สองขนาด 36,000-38,000 ดาลตัน ในมะเขือเทศ (Lycopersican

esculentum cv. VFNT) พบว่า FNR จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34,700 ดาลตัน (Green และคณะ,1991). ในถั่ว (pea, Pisum sativum CV Feltham First) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34,000 ดาลตัน (Newman และ Gray,1988) ส่วนในพืชชั้นต่ำ เช่น ยูกลีนา (Euglena glacilis kiebs) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36,000 ดาลตัน (Spano และ Schiff,1987) ส่วนใน Cyanobacterium Anabaena variabillis มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34,000-35,000 ดาลตัน (Scherer และคณะ ,1988) และในสไปรูไลนา (Spirulina platesis) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33,000 ดาลตัน (Masaki และคณะ,1979) ซึ่งในการหาน้ำหนักโมเลกุลอาจใช้วิธีอื่น ๆ ควบคู่ไปด้วย เช่นการแยกในคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ แต่เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่แยกให้บริสุทธิ์ออกมาด้วยวิธีการที่ใช้ในการวิจัยนี้ให้ผลผลิตของเอนไซม์มีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอที่จะนำไปศึกษาด้วยวิธีการอื่น ๆ ได้ จึงได้รายงานผลน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีเดียวเท่านั้น

จากผลการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบคุณลักษณะเอนไซม์ FNR ของสาหร่าย C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิม (137c) และสายพันธุ์ต้านพาราควอท PPQ-10/3 ซึ่งต้านพาราควอทได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 20 เท่า โดยการเปรียบเทียบลักษณะการผลิตเอนไซม์,ไอโซไซม์,การแยกโดยคอลัมน์โครมาโตรกราฟฟีตลอดจนศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างอันจะนำไปสู่คำอธิบายถึงสาเหตุกลไกการต้านพาราควอทของ C. reinhardtii สายพันธุ์ PPQ-10/3 อาจมีการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการส่งผ่านอิเลคตรอนจากเฟอริ-ดอกซินในปฏิกิริยารีดอกซ์ เอนไซม์ FNR ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการส่งผ่านอิเลคตรอนจากเฟอริดอกซินไปยัง $NADP^+$ นั้น ถ้า FNR มีปริมาณ มากขึ้น หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้สามารถแย่งรับอิเลคตรอนได้เร็วขึ้น ทำให้พาราควอทแย่งได้น้อยลง C. reinhardtii สามารถต้านพาราควอทได้ ในทำนองเดียวกันกับกลไกการต้านไกลโฟเสท (Glyphosate) เช่น พิทูเนีย และผักกาดหัว ฯลฯ

(Streinrucken และคณะ, 1986 และ Nafziger และคณะ,1984) จากผลการวิจัยนี้ไม่พบความแตกต่างดังกล่าวของเอนไซม์ FNR อย่างเด่นชัด เมื่อลองวิเคราะห์เปรียบเทียบปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR กับปฏิกิริยาของเอนไซม์ 5-Enolpyruvyl Shikimate – 3-Phosphate synthase (EPSP Synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายของไกโฟเสทพบว่าปฏิกิริยาของ EPSP synthase ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่าง Phosphoenalpyruvate (PEP) และ Shikimate-3-phosphate(S-3-P)ดังรูปที่ 5.2 จะเห็นได้ว่าโครงสร้างของไกลโฟเสทคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ PEP ดังนั้นจึงเข้าไปแย่งจับกับเอนไซม์ EPSP Synthase ตรงบริเวณที่ PEP จับอยู่ได้ (Streinrucken และ Amrhein,1980) ในขณะที่พาราควอทไม่มีโครงสร้างใด ๆ ใกล้เคียงกับสับสเตรตของเอนไซม์ FNR เลย การที่พาราควอทเข้าไปแย่งรับอิเลคตรอนนั้น ๆ จากรายงานส่วนใหญ่จะกล่าวถึงตำแหน่งที่พาราควอทเข้าไปแย่งว่าอยู่ตรงบริเวณ bound ferredoxin ที่ Fe-S center B (Fuji และคณะ,1990) แต่ก็มีรายงานว่าพาราควอทสามารถแย่งรับโดยตรงจากเฟอริดอกซินได้ (Bowyer และคณะ,1988) ดังนั้นการแย่งรับอิเลคตรอนอาจมีโปรตีนชนิดอื่นมาแทรกหรือเกี่ยวข้องกับการรับและส่งอิเลคตรอนระหว่างเฟอริดอกซินกับ NADP และพาราควอทก็เป็นได้ หรืออาจเป็นได้ว่า พาราควอทไม่ได้มีผลในการยับยั้งการทำงานของ PS I ที่ตำแหน่งของเฟอริดอกซิน หรือถ้าเป็นไปได้เซลล์อาจมีกลไกการกำจัดพาราควอทด้วยวิธีอื่นเป็นสำคัญทำให้เหลือพาราควอทเข้ามาถึงบริเวณเป้าหมายนี้น้อยมาก หรืออาจเป็นเพราะว่าเซลล์มีวิธีการเอาชนะการแย่งรับส่งอิเลคตรอนโดยวิธีอื่นที่ไม่ใช่การเพิ่มหรือเปลี่ยนคุณลักษณะของเอนไซม์ซึ่งเป็นเป้าหมายก็ได้ ในการต้านไกลโฟเสทนั้นเนื่องจากเมื่อ EPSP Synthase ถูกไกลโฟเสทแย่งจับทำให้สับสเตรต PEP เข้ามาจับกับเอนไซม์ไม่ได้ แต่พืชสามารถสร้างเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น PEP จึงเพิ่มโอกาสในการจับเอนไซม์ได้มากขึ้นเกิดปฏิกิริยาได้ดังเดิมกระบวนการสังเคราะห์กรดอะโรเมติกก็ไม่ถูกยับยั้ง หรือถ้าไม่เพิ่ม ปริมาณ เอนไซม์แต่เอนไซม์อาจเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้ไกลโฟ



รูปที่ 5.2 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ EPSP synthase แสดงโครงสร้างทางเคมี ของสับสเตรต และไกลโฟเสท (Anderson และคณะ, 1988)

เสทจับกับเอนไซม์ได้น้อยลง PEP ยังจับได้ดีอยู่ปฏิกิริยาก็ไม่ถูกยับยั้งเช่นกัน แต่ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR นั้นการเพิ่มหรือเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์ก็ไม่สามารถยับยั้งการแย่งรับอิเลคตรอนของพาราควอทได้ เนื่องจากพาราควอทไม่ได้เข้ามาแย่งจับเอนไซม์แต่แย่งตรงสับสเตรตของเอนไซม์(Summer,1980)เป็นที่ทราบกันดีว่า ลักษณะการออกฤทธิ์ของพาราควอทและไกลโฟเสทนั้นต่างกัน โดยไกลโฟเสทจะออกฤทธิ์เมื่อเข้าไปถึงบริเวณเป้าหมาย โดยยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ EPSP synthase ยับยั้งกระบวนการผลิตกรดอะมิโนอะโรเมติก ทำให้การเจริญของพืชชะงักและตายในที่สุด แต่จะไม่ทำอันตรายกับบริเวณที่ดูดซึมผ่านเข้าไป ในขณะที่พาราควอทจะทำลายเซลล์ที่สัมผัสกับพาราควอท เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างพาราควอทกับ ออกซิเจนทำให้เกิดเรดิกัลของออกซิเจน ซึ่งเป็นอันตรายต่อเยื่อเซลล์ต่าง ๆ ทำให้เซลล์รั่วและตายในที่สุด ดังนั้นลักษณะการต้านสารทั้ง 2 ชนิดนี้น่าจะต่างกันพาราควอทนั้นเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ทุกเซลล์ที่สัมผัส ดังนั้นจึงสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ตั้งแต่การไม่เข้าสู่เซลล์ ซึ่งก็มีรายงานในพืช Conyza bonariensis มีการดูดพาราควอทติดฉลาก ^{14}Cเข้าสู่เซลล์ในสายพันธุ์ต้านพาราควอทน้อยกว่าสายพันธุ์ปกติ (Fuerst,1985) และในพืช Hordeum glaucum ก็พบปรากฏการณ์ทำนองเดียวกัน (Bishop และคณะ ,1987) การยับยั้บการออกฤทธิ์ของพาราควอทควรเกี่ยวข้องกับการนำเข้าพาราควอทในเซลล์ ในขณะเดียวกันในพันธุ์ต้านพาราควอทจะต้องหาวิธีกำจัดพิษที่เกิดขึ้นเนื่องจากพาราควอทที่เข้าไปสู่เซลล์ด้วย โดยผ่านกระบวนการกำจัดพิษของเอนไซม์ SOD, peroxidase และ catalase (Nakano และ Asada,1981) ผลงานวิจัยของ Nuchadomrong, 1991 พบว่า C. reinhardtii สายพันธุ์ PPQ-10/3 มีกลไกประกอบด้วย การกำจัดพาราควอทออกจากคลอโรพลาสต์ โดยมีแวคคูโอล (vacuole) เพิ่มขึ้น การนำพาราควอทเข้าสู่คลอโรพลาสต์ ของเซลล์สายพันธุ์ต้านพาราควอท PPQ-10/3 มีค่าน้อยกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 60% การป้องกันพิษของเรดิกัลของออกซิเจน โดยผ่านเอนไซม์ 3 ชนิดโดยพบการเพิ่มแอคติวิตีของ เอนไซม์ Superoxide dismutase

(SOD), Ascorbate peroxidase และ catalase ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าการจัดเรียงตัวของผนังเซลล์ชั้นนอกสุดของคลอโรพลาสต์เปลี่ยนแปลงไปโดยมีการเพิ่มปริมาณการเรียงตัวของเยื่อไธลาคอยด์ (stacking of thylakoid) คลอโรฟิลล์ เอ เพิ่มเป็น 2 เท่า ค่า K_m ของการนำเข้าของพาราควอทผ่านเยื่อเซลล์มีค่าสูงกว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ในเยื่อเซลล์ของสายพันธุ์ดั้งเดิม 7 เท่า

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แม้ว่าจะไม่ได้ผลเป็นไปตามแนวสมมติฐานที่คาดไว้แต่ก็ได้ผลสรุปที่ชัดเจนออกมาเป็นการพิสูจน์และยืนยันว่า เอนไซม์ FNR ที่ได้แยกให้บริสุทธิ์สูงนี้ไม่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านพาราควอทของ C. reinhardtii สาหร่ายสีเขียวที่ใช้เป็นแบบอย่างในการศึกษาผลกระทบของพาราควอทต่อการทำงานของ PS I ซึ่งข้อมูลนี้ได้อธิบายเป็นการยืนยันถึงกลไกการต้านทานพวกพาราควอทใน C. reinhardtii สายพันธุ์ PPQ-10/3 ว่าเป้าหมายแรกของการทำงานของพาราควอทไม่ได้อยู่ที่การแย่งรับอิเลคตรอนที่ PS I โดยผ่านเอนไซม์ FNR โดยตรง หรือถ้าจะมีผลกระทบบ้างก็ไม่น่าจะเป็นเป้าหมายหลัก การรับอิเลคตรอนที่ตำแหน่งของเฟอริดอกซิน และหรือ iron-sulfur center อาจเป็นผลกระทบที่เกิดขึ้นภายหลังก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามผลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาและอธิบายถึงลักษณะการต้านทานสารเคมีอื่น ๆ ต่อไปได้ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลวิจัยที่ได้รู้ถึงลักษณะการเจริญของ C. reinhardtii ที่สัมพันธ์กับการผลิตเอนไซม์ FNR ตลอดจนศึกษาวิธีการทำให้บริสุทธิ์ การแยกไอโซไซม์ และคุณสมบัติต่าง ๆ ซึ่งไม่เคยมีการศึกษาเอนไซม์ FNR ใน C. reinhardtii มาก่อนเลย

สรุปผลการทดลอง

1. ลักษณะการเจริญของ C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิม(137c) ในสภาพการเลี้ยงในขวดก้นชมพู่ ขนาด 4 ลิตร ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ที่พ่นอากาศปลอดเชื้อที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ ผสมอยู่ 2-5 % จะมีจำนวนเซลล์สูงสุดประมาณ $5x10^6$ เซลล์/มล.อาหาร เป็น 2 เท่าของสายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3) สายพันธุ์ต้านพาราควอท มีการเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดช้ากว่าสายพันธุ์ 137c อยู่ 2 วัน มีจำนวนเซลล์สูงสุดประมาณ $2.4x10^6$ เซลล์/มล. อาหาร

2. การผลิตเอนไซม์ FNR ของทั้ง 2 สายพันธุ์จะสูงขึ้นควบคู่กับการเจริญของเซลล์และจะลดลงเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะปลายของการเจริญแบบทวิคูณ โดยมีปริมาณแอคติวิตีต่อจำนวนเซลล์ ประมาณ 0.021 หน่วย/10^7 เซลล์ ในสายพันธุ์ดั้งเดิม และ 0.031 หน่วย/10^7 เซลล์ ในสายพันธุ์ต้านพวกควอท การเก็บรักษาเซลล์ C. reinhardtii ให้สามารถคงรักษาระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ที่ -4° ซ. เป็นเวลานานถึง 4 สัปดาห์

3. ปฏิกิริยาไดอะโฟเรสของเอนไซม์ FNR ในสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นจะถูกกระตุ้นด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 60 มิลลิโมลาร์

4. เอนไซม์ FNR ของ C. reinhardtii มีการวิเคราะห์ได้หลายไอโซไซม์ (17 ไอโซไซม์) โดยมีองค์ประกอบของไอโซไซม์สำคัญอยู่ 2ไอโซไซม์ (Rf 0.20 และ 0.28)

5. สามารถแยกเอนไซม์ FNR จากสายพันธุ์ 137c และ PPQ-10/3 ให้บริสุทธิ์ได้โปรตีนแถบเดี่ยวเป็นไอโซไซม์ องค์ประกอบที่สำคัญด้วยขั้นตอนและสภาวะเดียวกันดังนี้

ก. ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นอิ่มตัว 0-70%

ข. ดีอีเออี ทริสชาคริล ชะด้วยทริสพัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ และ

เกรเดียนท์เส้นตรงทริสบัฟเฟอร์ (30-100 มิลลิโมลาร์)

ค. พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส ชะด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลิโมลาร์ และเกรเดียนท์เส้นตรงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (30-120 มิลลิโมลาร์)

ง. โพลีอะไครลาโมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีสแบบแผ่นบาง

6. เอนไซม์ FNR ที่แยกได้จากทั้ง 2 สายพันธุ์ มีแอคติวิตีจำเพาะใกล้เคียงกันคือ 1.18 และ 1.25 หน่วย/มก. โปรตีนในสายพันธุ์ 137c และสายพันธุ์ PPQ-10/3 ตามลำดับ และRfของไอโซไซม์แยกได้มีค่าเท่ากัน (0.28)

7. คุณลักษณะอื่นๆ ของ FNR ที่แยกได้จาก C. reinhardtii 137c และ PPQ-10/3 มีค่าใกล้เคียงกันมาก ดังนี้

ก. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR ในสายพันธุ์ 137c และ PPQ-10/3 ประมาณ 65-70° ซ

ข. พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNRในทั้ง 2 สายพันธุ์คือ พีเอช 8.5 - 9.0

ค. ค่าคงที่ของ Michaelis Menten (K_m) ใกล้เคียงกันโดยใน สายพันธุ์ 137c มีค่า K_m ของ NADPH = 12.5 ± 0.78 ไมโครโมลาร์ และ 13.3 ± 0.89 ไมโครโมลาร์ ในสายพันธุ์ต้านพาราควอท PPQ-10/3

8. น้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของ FNR จากทั้ง 2 สายพันธุ์ = 33,000 ดาลตัน

9. ผลงานวิจัยทั้งหมดให้ผลใช้ในการอธิบายถึงกลไกการทำงานของพาราควอทในด้านที่เกี่ยวข้องกับการแย่งรับอิเลคตรอนใน PS I ได้