

## 5. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสาหร่าย *P. tenue* และการทำงานของ เอนไซม์ในไตรตรีคเทสจากสาหร่ายชนิดนี้ ตลอดจนข้อมูลทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในไตรตรีคเทส สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. สภาพธรรมชาติในบ่อน้ำร้อนที่สาหร่ายสามารถเจริญเติบโตได้คือ อุณหภูมิอยู่ในช่วง 30-55 องศาเซลเซียส, pH อยู่ในช่วง 7.4-8.9 ไม่มีซัลเฟอร์, ไนเตรตและไนไตรต์ โดยสาหร่ายจะอยู่รวมกัน 3 ชนิด คือ สาหร่ายชนิดเซลล์เดี่ยว, ชนิดสายขนาดใหญ่และชนิดสายขนาดเล็ก และสาหร่ายชนิดที่มี เอนไซม์ในไตรตรีคเทสคือสาหร่ายชนิดสายขนาดเล็ก ซึ่งระบุชนิดได้เป็น *Phormidium tenue* (Menegh.) Gomont

2. สภาพะในหึ่งทดลองที่สาหร่าย *P. tenue* เจริญเติบโตได้ดีที่สุด คือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้รับแสงความเข้ม  $622 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ตลอดเวลา และเขย่าด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BG-11 pH 7.4 ที่ดัดแปลงให้มีโซเดียมไบคาร์บอเนต 25 มิลลิโมลาร์หรือ 2 กรัมต่อลิตร

3. เอนไซม์ในไตรตรีคเทสในสาหร่าย *P. tenue* เป็นเอนไซม์ที่ติดอยู่กับส่วนเมมเบรนของเซลล์และไม่สามารถสกัดได้ด้วยสารดีเทอร์เจนต์ เช่น CHAPS, octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside, deoxycholate, Triton X-100, ([octylphenoxy] polyethoxyethanol), Tween-20 และ SDS เพราะสารดีเทอร์เจนต์มีผลไปยังแอคติวิตีของเอนไซม์ในการศึกษาเอนไซม์นี้จึงใช้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปตะกอนแขวนลอยในบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ MOPS pH 7.5 ที่มี EDTA 1.0 มิลลิโมลาร์, PMSF 1.0 มิลลิโมลาร์ และ DTT 0.5 มิลลิโมลาร์

4. สภาพะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ในไตรตรีคเทส คือ ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

5. สภาพะในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ทำให้ได้เอนไซม์ในไตรตรีคเทสที่มีแอคติวิตีสูงที่สุด คือ ใช้อาหารเพาะเลี้ยงสูตร BG-11 ที่มีการดัดแปลงให้มีไนเตรต 0.05 มิลลิโมลาร์และมีไบคาร์บอเนต 25 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มแสง  $622 \mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ตลอดเวลา

6. เอนไซม์ในไตรตรีคเทสในสาหร่ายมีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องระดับหนึ่ง คือ เมื่อเก็บไว้ 1 วันยังมีแอคติวิตีเหลืออีก 70% การเก็บในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอล 40% สามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ดีกว่าการเก็บเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี glycerol และการเก็บที่สามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ได้ดีที่สุด คือ เก็บในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอล 40% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. FAD และ molybdenum ไม่มีผลต่อการเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส
8. สารที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสคือ โซเดียมเอไซด์, โพแทสเซียมไฮยาไนด์, โซเดียมไฮโอไฮยาเนตและแอมโมเนียมซัลเฟต นอกจากนี้ แมกนีเซียมไอออนและ ฟอสเฟตไอออนมีผลให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อยด้วย
9. การศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย พบว่าเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ไม่จำเป็นต้องใช้ NADH และ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ถ้าใช้จะมีผลให้แอกติวิตีเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดย  $K_m$  ของ NADH เท่ากับ 0.039 มิลลิโมลาร์, ค่า  $K_m$  ของ  $KNO_3$  เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน มีค่า 40 มิลลิโมลาร์, ค่า  $K_m$  ของ NADPH เท่ากับ 0.126 มิลลิโมลาร์ และ  $K_m$  ของ  $KNO_3$  เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน มีค่า 43.48 มิลลิโมลาร์
10. แอมโมเนียมไอออนในอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายไม่มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายโดยให้ไนโตรเจนในรูป ไนเตรต, แอมโมเนียม และแอมโมเนียมร่วมกับไนเตรต มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้เหมือนกัน
11. การทดสอบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์ของข้าวโพดกับสารสกัดหยาบของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *P. tenue* พบว่าสามารถเกิด cross reaction ได้แสดงว่าโครงสร้างบางส่วนของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากสาหร่าย *P. tenue* เหมือนกันกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสจากข้าวโพด