บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสาหร่าย *Synechococcus* sp. การทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสภายใต้สภาวะต่าง ๆ ตลอดจนข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์เอนไซม์ไนเตรต รีดักเทส
สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. สภาวะในห้องทดลองที่สาหร่าย *Synechococcus* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ สภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนต่ำ (เลี้ยงโดยไม่มีการเขย่าฟลาสก์) มีความเข้มแสง 120 μphoton m^{-2} s^{-1} ในอาหารสูตร BG-11 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6.25 g/l และโซเดียมไนเตรต 35.2 mM สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงสาหร่ายที่ส่งผลให้เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายมีแอคติวิตีสูงสุด คือ ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ในอาหารและมีโซเดียมไนเตรตความเข้มข้น 17 mM

2. เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. เป็นเอนไซม์ที่ติดแน่นอยู่กับส่วนเมมเบรนของเซลล์ ไม่สามารถสกัดด้วยอะซีโตน และสารดังกล่าวยังมีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง

3. เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่ายที่มีอายุ 10 วันของการเพาะเลี้ยงมีแอคติวิตีสูงที่สุด

4. การตอบสนองของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในภาวะที่มีแสงสว่าง 12 ชั่วโมงพบว่า ช่วงไม่มีแสงสามารถชักนำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีกว่าช่วงที่ได้รับแสง โดยเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงที่สุดเมื่อสาหร่ายไม่ได้รับแสง 12 ชั่วโมง

5. สภาวะที่เหมะสมในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสคือ pH 8-9 และอุณหภูมิ 35-40 °C รวมทั้งมีจลนศาสตร์แบบ hyperpola มีค่า K_m สำหรับ $NaNO_3$ เท่ากับ 185 μM และค่า V_{max} เท่ากับ 200 μmole/min/mg protein

6. เอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. สามารถรับอิเล็กตรอนได้จาก Hydroquinone และ dithionite-reduced methyl viologen แต่ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนได้จาก NADH และ NADPH

7. สารที่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้มากที่สุดคือ sodium azide รองลงมาคือ arsenic trioxide และ sodium thiocyanate ตามลำดับ ขณะที่ potassium ferricyanide ไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์

8. การบ่มสารสกัดหยาบเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 1 ชั่วโมงก่อนวิเคราะห์แอคติวิตีมีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ขณะที่อุณหภูมิ -80, -20, 0, 4, 50, 60 และ 70 °C มีผลให้แอคติวิตีลดลง

9. การบ่มสารสกัดจากเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30นาที มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นมากที่สุด

10. การทดสอบการเกิด cross reaction ของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสบริสุทธิ์จากใบข้าวโพดกับสารสกัดหยาบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. พบว่าสามารถเกิด cross reaction ได้ แสดงว่าโครงสร้างบางส่วนของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในสาหร่าย *Synechococcus* sp. เหมือนกับเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสในข้าวโพด

11. อุณหภูมิ 4 และ -20 °C สามารถเก็บรักษาเอนไซม์ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิห้องและ -80 °C

12. เมื่อเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 % ระยะเวลา 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 แอคติวิตีของสารสกัดเอนไซม์เหลือ 8, 11, 17, 17 และ 9 % และที่อุณหภูมิ -20 °C แอคติวิตีของสารสกัดเอนไซม์เหลือ 7, 24, 49, 45 และ 26 %

13. เมื่อเก็บรักษาสารสกัดเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มี L-Proline ความเข้มข้น 1 M ระยะเวลา 1 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 และ-20 °C แอคติวิตีของสารสกัดเอนไซม์เหลือ 35 และ 33 % ขณะที่สารสกัดเอนไซม์ที่เก็บในบัฟเฟอร์ที่ไม่มี L-Proline แอคติวิตีของเอนไซม์เหลือ 8 และ 7 %

14. การทำให้สารสกัดแห้งก่อนเก็บรักษาด้วยเทคนิค Freeze-dry มีผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสลดลง

15. ยีนที่โคลนโดยใช้ primer forward primer I และ reverse primer I ได้สายนิวคลีโอไทด์ขนาด 534 bp แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 178 residues โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับยีน nar จากสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria เท่ากับ 67-68 % และเหมือนกันกับกลุ่มแบคทีเรียน้อยกว่า 50% และลำดับกรดอะมิโนที่แปลได้มีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตกลุ่ม cyanobacteria เท่ากับ 67-75% และสิ่งมีชีวิตแบคทีเรียน้อยกว่า 65% ขณะที่ยีนที่โคลนโดยใช้ primer forward II และ III และ reverse primer II และ III ได้สายนิวคลีโอไทด์ขนาด 675 และ 748 bp เมื่อทำการตรวจสอบพบว่าไม่มีความเหมือนกับยีน nar