ชื่อวิทยานิพนธ์ การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในต้นข้าวไร่
ผู้เขียน นางสาวเขมิกา โขมพัตร
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2545

บทคัดย่อ

ไนเทรตรีดักเทสเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่อยู่ในวิถีการใช้ไนเทรต มีหน้าที่รีดิวซ์ไนเทรตไปเป็นไนไทรต์ และขั้นตอนนี้จัดเป็นขั้นตอนสำคัญที่สุดในการควบคุมวิถีการใช้ไนเทรตในพืชรา สาหร่าย และแบคทีเรียบางชนิด

จากการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในต้นข้าว (*Oryza sativa* L.) จำนวนสามสายพันธุ์ได้แก่ กู้เมืองหลวง ดอกพยอม และขาวดอกมะลิ 105 พบว่า เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวทั้งสามสายพันธ์ที่ปลูกตามธรรมชาติมีแอคติวิตีสูงที่สุดในช่วงระยะเวลาแรกของการปลูก จากนั้นจะเปลี่ยนแปลงโดยมีความสัมพันธ์กับการได้รับปุ๋ยไนเทรต และปริมาณไนเทรตที่สะสมในใบ ข้าวทั้งสามสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อปุ๋ยไนเทรตต่างกัน โดยข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์ดอกพยอม ตามลำดับ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่ บ่งชี้ว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวมีแอคติวิตีแปรผันตามช่วงวัน โดยมีค่าสูงในช่วงเวลาที่ได้รับแสง และลดต่ำลงในที่มืด อย่างไรก็ตามในการเปรียบเทียบผลของระยะเวลาที่ได้รับแสงในหนึ่งวัน พบว่าต้นข้าวที่ได้รับแสงเป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวันมีแอคติวิตีของเอนไซม์มากกว่า ต้นข้าวที่ได้รับแสงเป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวันเพียงเล็กน้อย และต้นข้าวที่ได้รับธาตุอาหารปริมาณสูงจะมีรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสสูงขึ้นอย่างรวดเร็วใน 3 ชั่วโมงแรกหลังจากเริ่มได้รับแสง และค่อนข้างคงที่ไปอีกประมาณ 6 ชั่วโมงก่อนจะลดลง แต่ในต้นข้าวที่ได้รับธาตุอาหารปริมาณน้อยแอคติวิตีของเอนไซม์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นหลังจากเริ่มได้รับแสงจนถึงจุดสูงสุดที่เวลาเที่ยงวัน จากนั้นจึงลดลง อย่างไรก็ตามพบว่า การได้รับธาตุอาหารน้อย หรือมาก ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับแอคติวิตีของเอนไซม์

จากการเปรียบเทียบผลของการได้รับไนโตรเจนในรูปแตกต่างกันในสารละลายปลูก พบว่า การได้รับเฉพาะไนเทรต หรือการได้รับไนเทรตร่วมกับแอมโมเนียม มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวทั้งสามสายพันธุ์แต่ถ้าได้รับเฉพาะแอมโมเนียมไม่พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวทั้งสามสายพันธุ์

การศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส พบว่า การเก็บตัวอย่างใบข้าวที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสสามารถเก็บได้นานมากกว่า 30 วัน ในขณะที่การเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถเก็บรักษาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสได้ประมาณ 1 สัปดาห์

เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่สกัดในบัฟเฟอร์ที่มี PMSF 0.5 มิลลิโมลาร์ มีความเสถียรได้นานประมาณ 5 ชั่วโมงเมื่อเก็บบนน้ำแข็ง

การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ 20-50 เปอร์เซ็นต์ของความอิ่มตัว จะทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.61 เท่า และการเก็บเอนไซม์บนน้ำแข็งในรูปที่จับอยู่กับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจะรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ดีกว่าการเก็บในรูปที่เอาเกลือออกแล้ว และระหว่างการสกัดและตกตะกอนโปรตีนพบว่าส่วนของ molybdenum จะสูญหายไปได้มากกว่าส่วนของ FAD

เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส สามารถใช้ได้ทั้ง NADH และ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน โดยมีค่า K_m ของ NADH เท่ากับ 0.018 มิลลิโมลาร์, ค่า K_m ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน เท่ากับ 0.109 มิลลิโมลาร์ , ค่า K_m ของ NADPH = 0.05 มิลลิโมลาร์ และ ค่า K_m ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน เท่ากับ 2.5 มิลลิโมลาร์

ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสคือ ที่พีเอช 7.5 โดยแอคติวิตีของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้ด้วย Mg^{2+} และ sodium azide

Thesis Title	Regulation of Nitrate Reductase Activity in Upland Rice Plants
Author	Miss Khemiga Khompat
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2002

Abstract

Nitrate reductase (NR) is a key enzyme in the first step of nitrate assimilation. It catalyzes the reduction of nitrate to nitrite, which is the most important step in nitrate assimilation pathway in higher plant, fungi, algae and some bacteria.

Factors regulating nitrate reductase activity (NRA) in 3 cultivars of upland rice (*Oryza sativa* L.) Koo Muang Luang, Dokphayom and Kaodokmali105 were studied. All cultivars showed maximum levels of NRA at the early stage of growth when grown in pots under artificial lighting as well as in the greenhouse. The result showed that NRA was related to the levels of N-fertilizer applied and nitrate contents in the leaves.

Leaf NRA varied with the time of day. It was low during the night and increased in the light to a maximal level at mid-day then it declined slowly to the lowest level after dark. NRA in leaves receiving 10 hours/day illumination was lower than NRA in leaves with 12 hours/day illumination. Nutrient availability effected NRA-pattern during the day but did not correlate with NRA levels in the leaves.

Comparison of effects of nitrogen source on nitrate reductase activity by using nitrate, nitrate with ammonium and ammonium as nitrogen sources in the nutrient solution revealed that NRA in rice leaves responded to nitrate-N or nitrate-N supplied with ammonium-N but NRA could not be detected if ammonium-N was supplied alone.

NR in rice leaves stored at -20^0C remained active for more than 30 days while NR in leaves kept at 4^0C could retain NRA for only 1 week. Crude enzyme extract was stable on ice for about 5 hours in the presence of 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF).

The specific activity of enzyme increased 3.61 fold after the protein was precipitated from the crude extract with ammonium sulphate at 20-50% saturation. The enzyme could be kept on ice in the form of ammonium sulphate precipitate for a longer period (1 month) than in dialysed form (20 days). Molybdenum component of NR rather than flavin adenine dinucleotide (FAD) may be lost during the extraction and precipitation processes.

Both reduced nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate could act as electron donors for NR. The NADH:NR has a K_m of 0.018 mM for NADH and K_m of 0.106 mM for KNO_3 and NADPH:NR has a K_m of 0.05 mM for NADPH and K_m of 2.5 mM for KNO_3. The pH optima for NRA was 7.5. NRA was inhibited by Mg^{2+} and sodium azide.