# 3. ผลการทดลอง

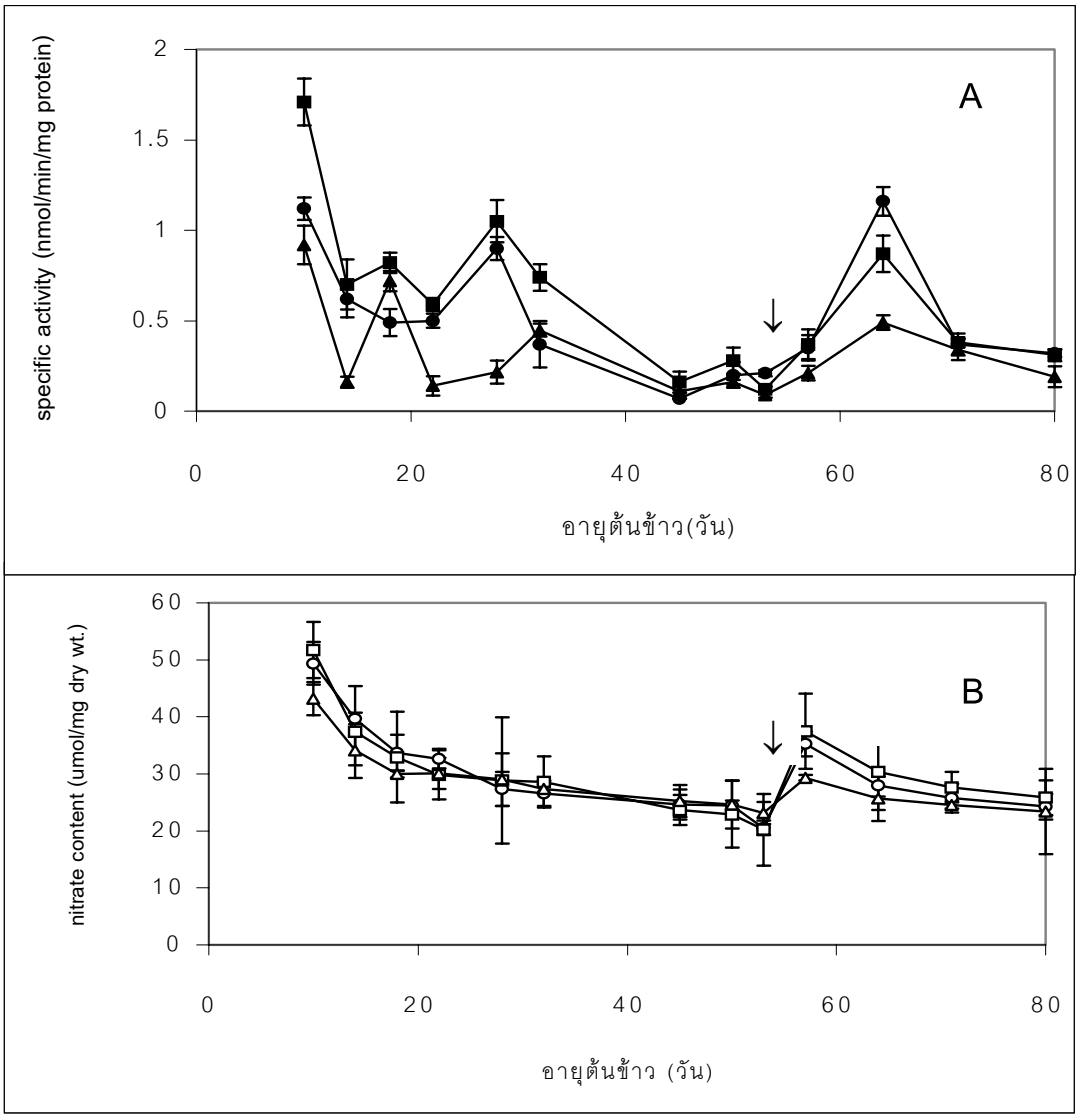
ในการทดลองนี้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสด้วยวิธี spectrophotometry โดยการเติมสับสเตรทของปฏิกิริยา แล้ววัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ซึ่งได้แก่ ไนไทรต์ ที่เวลาต่างๆ นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นค่าแอคติวิตีของเอนไซม์

## 3.1 ผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไนเทรทรีดักเทสและความสัมพันธ์กับปริมาณไนเทรตที่สะสมอยู่ในใบข้าวไร่

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส จากใบข้าวไร่สายพันธุ์กู้เมืองหลวง ดอกพยอม และ ขาวดอกมะลิ105 ที่ปลูกในดิน และได้รับแสงแดดตามธรรมชาติ (ปลูกในช่วงต้นเดือนมิถุนายน –ปลายเดือนกันยายน) โดยตัดใบข้าวในช่วงเวลา 10.00น.-11.00น. นำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในใบข้าวที่มีอายุการปลูกต่างๆกัน ตั้งแต่เริ่มลงปลูกจนถึงระยะต้นข้าวเริ่มแตกกอ และเปรียบเทียบปริมาณไนเทรตที่สะสมอยู่ในใบข้าวไร่ทั้งสามสายพันธุ์ พบว่า ระดับแอคติวิตีในใบข้าวทั้งสามสายพันธุ์จะมีค่าสูงสุดในช่วงแรกของการปลูก และจะมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นๆลงๆ จากระดับเดิมจนอยู่ในระดับต่ำค่อนข้างคงที่เมื่อต้นข้าวมีอายุ 45 - 53 วัน (รูปที่ 10-A) โดยข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอมมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับอีกสองสายพันธุ์ และเมื่อมีการเติมปุ๋ยสูตร 20-20-0 ลงไปในภาชนะปลูก พบว่าต้นข้าวทั้งสามสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อปุ๋ยโดยมีการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสอย่างชัดเจน และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ข้าวแล้วจะพบว่า ข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงมีการตอบสนองต่อการได้รับปุ๋ยมากที่สุดโดยดูจากการมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเพิ่มขึ้นมากที่สุด รองลงมาได้แก่พันธุ์ขาวดอกมะลิ105และพันธุ์ดอกพยอมตามลำดับ อย่างไรก็ตามการตอบสนองของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวทั้งสามสายพันธุ์ต่อปุ๋ยที่เติมลงไปครั้งที่ 2 นี้จะเป็นการตอบสนองให้เห็นเฉพาะในช่วงเวลาสั้นๆ และจะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 10 วัน

เมื่อพิจารณาปริมาณไนเทรตในใบข้าวทั้งสามสายพันธุ์ (รูปที่ 10-B) พบว่าระดับไนเทรตที่สะสมในใบข้าวจะมีมากที่สุดในช่วงต้นของการปลูก และปริมาณไนเทรตสะสมนี้จะค่อยๆลดลงไปเรื่อยๆเมื่อต้นข้าวอายุเพิ่มมากขึ้น ซึ่งข้าวทั้งสามสายพันธุ์มีการแสดงออกของ

ระดับไนเทรตในรูปแบบที่เหมือนกัน ต่อมาเมื่อได้มีการเติมปุ๋ยให้กับต้นข้าวพบว่าระดับปริมาณไนเทรตในใบข้าวทั้งสามสายพันธุ์เพิ่มขึ้น และจะเห็นว่ามีปริมาณไนเทรตสะสมเพิ่มขึ้นในใบข้าวก่อนที่จะมีการเพิ่มของแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส โดยข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105มีปริมาณไนเทรตในใบสูงขึ้นมากที่สุด รองลงมาได้แก่พันธุ์กู้เมืองหลวง และพันธุ์ดอกพยอม อย่างไรก็ตามปริมาณไนเทรตที่เพิ่มขึ้นจะค่อยๆลดลงต่อไปอีกเมื่อต้นข้าวมีอายุมากขึ้น



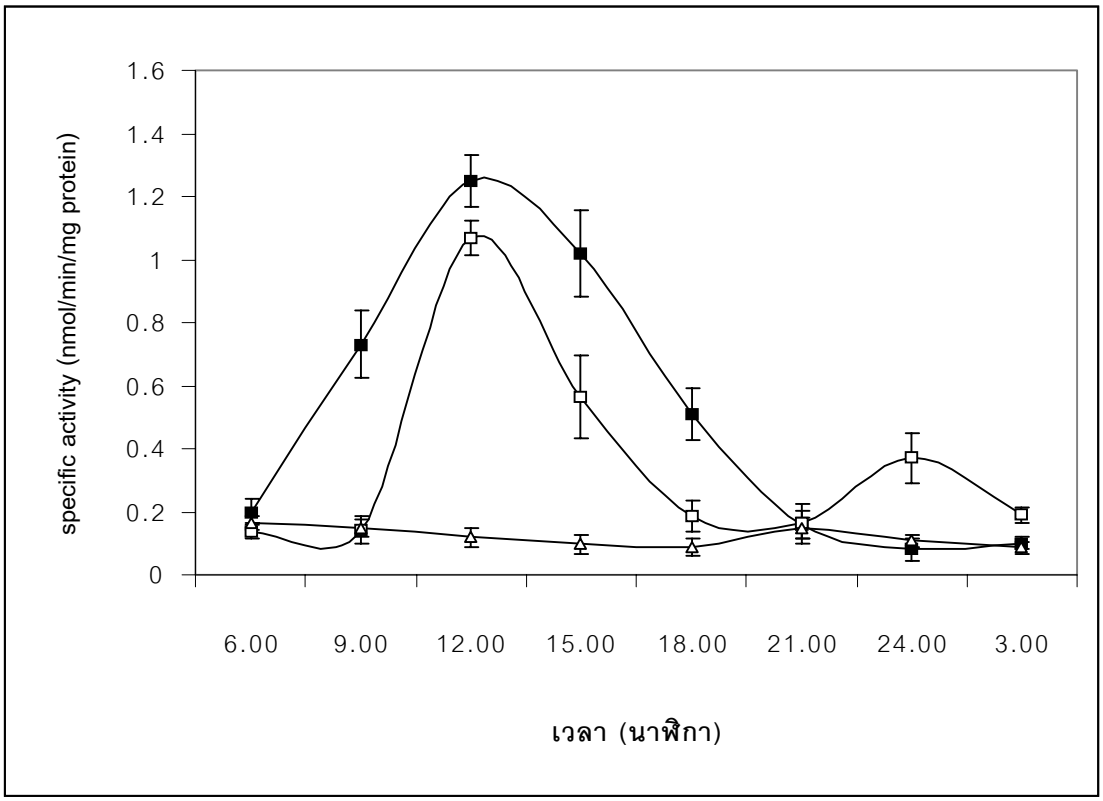

**รูปที่ 10** แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าว ( รูป A ) และปริมาณไนเทรตในใบข้าว (รูป B) ที่อายุต้นข้าวต่างๆกัน : พันธุ์ดอกพยอม (▲,Δ ), พันธุ์กู้-เมืองหลวง ( ●, ○) และพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 105 ( ■,□) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SE. จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ
ลูกศร (↓) แสดงวันที่มีการเติมปุ๋ยสูตร 20-20-0 ปริมาณ 2 กรัม/ถัง

## 3.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมต่อแอคติวิตี ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

### 3.2.1 รูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในช่วงวัน

จากการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่สายพันธุ์กู้เมือง-หลวงซึ่งปลูกในดิน และได้รับแสงตามธรรมชาติที่เวลาต่างๆกันทุก 3 ชั่วโมงในรอบหนึ่งวัน พบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์นี้มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (รูปที่ 11)โดยค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังจากเวลา 06.00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ต้นข้าวเริ่มได้รับแสง และมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเวลา 12.00 น. หลังจากนั้นแอคติวิตีของเอนไซม์จะค่อยๆลดลงในช่วงบ่ายไปจนมีค่าต่ำค่อนข้างคงที่ในช่วงเวลาหลังจาก 18.00 น.ซึ่งเป็นช่วงเวลากลางคืน แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในช่วงเวลาหลังจาก 21.00 น.จะมีค่าต่ำมากอย่างชัดเจนตลอดทั้งคืน เมื่อเทียบกับค่าแอคติวิตีในช่วงเวลากลางวัน

สำหรับรูปแบบการแสดงของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในหนึ่งวันในต้นข้าวกลุ่มที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิคพบว่าในใบข้าวมีการแสดงออกของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในลักษณะที่คล้ายคลึงกับกลุ่มที่ปลูกตามธรรมชาติ นั่นคือ มีการเพิ่มของแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสสูงขึ้นเมื่อได้รับแสง และมีค่าสูงที่สุดที่เวลาเที่ยงวันจากนั้นค่าแอคติวิตีจะค่อยๆลดลงจนอยู่ในระดับต่ำในช่วงเวลาที่ต้นข้าวไม่ได้รับแสง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในส่วนของรากข้าวพบว่า มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำมากคือไม่เกิน $2.0 \times 10^{-5}$ μmol/min/mg proteinซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าต่ำสุดของแอคติวิตีของเอนไซม์ภายในส่วนของใบ นอกจากนี้รูปแบบการแสดงออกของแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในรากข้าวยังมีลักษณะที่แตกต่างอย่างชัดเจนจากแอคติวิตีของเอนไซม์ในส่วนใบทั้งในกลุ่มที่ปลูกในห้องทดลอง



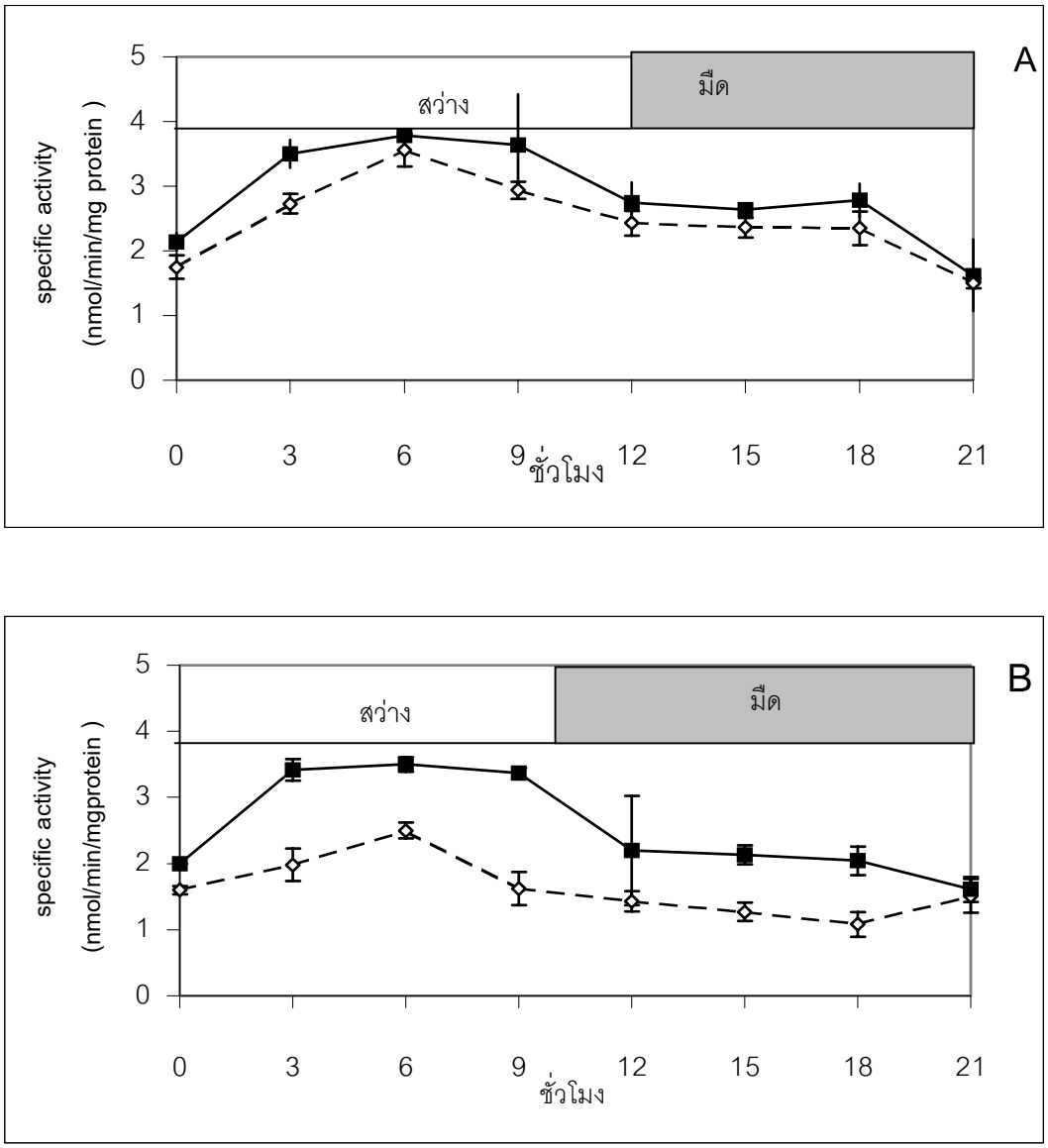

**รูปที่ 11** แสดงค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง ที่ปลูกในดินที่มีไนเทรต 2.67µmolต่อน้ำหนักดินแห้ง 1 กรัมและได้รับแสงตามธรรมชาติ(■),ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรHoagland 's solution ความเข้มข้น ¼ เท่า และได้รับแสง 270 µmol.$m^{-1}s^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน; ใบ (□), ราก(Δ) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 6 ซ้ำ $\pm$ SE.

### 3.3.2 ผลของช่วงเวลาที่ได้รับแสงและความสมบูรณ์ของธาตุอาหารต่อการทำงานของ เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับธาตุอาหารแตกต่างกันคือ กลุ่มที่ได้รับธาตุอาหารที่สมบูรณ์ (สูตรอาหาร Hoagland's solution ความเข้มข้น ½ เท่า) และกลุ่มที่ได้รับแร่ธาตุอาหารในปริมาณน้อย (สูตรอาหาร Hoagland's solution ความเข้มข้น 1/20 เท่า) เมื่อนำต้นข้าวทั้งสองกลุ่มไปปลูกให้ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวันกับ 10 ชั่วโมงต่อวันจากนั้นได้เก็บตัวอย่างใบข้าวเมื่อต้นข้าวมีอายุได้ 2 สัปดาห์ โดยระหว่างการปลูกได้เปลี่ยนอาหารทุกๆ 4วัน และเปลี่ยนอาหารใหม่ครั้งสุดท้ายแก่ต้นข้าว 12 ชั่วโมงก่อนเก็บตัวอย่างใบข้าว พบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวกลุ่มที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน (รูปที่ 12-A) ในกลุ่มของต้นข้าวที่ปลูกโดยได้รับธาตุอาหารสมบูรณ์จะมีแอคติวิตีสูงกว่ากลุ่มที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีธาตุอาหารปริมาณน้อยในทุกช่วงเวลา และ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของทั้งสองกลุ่มนี้ พบว่าต้นข้าวที่เติบโตโดยได้รับธาตุอาหารในปริมาณน้อยมีการเพิ่มของแอคติวิตีของเอนไซม์ไปยังจุดสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 หลังจากได้รับแสง และลดลงไปเรื่อยๆ ในชั่วโมงถัดไป จนอยู่ในระดับที่ค่อนข้างคงที่ภายหลังจากไม่มีแสง ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับธาตุอาหารอย่างสมบูรณ์พบว่ามีการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสอย่างรวดเร็วหลังจากเริ่มได้รับแสงในชั่วโมงที่ 3 และค่าแอคติวิตีจะค่อนข้างคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 9 หลังจากเริ่มได้รับแสง จากนั้นจึงลดลงและอยู่ในระดับค่อนข้างคงที่ในที่มืดโดยแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจะมีค่าลดลงต่ำที่สุดในชั่วโมงที่ 9 ของการอยู่ในที่มืด สำหรับต้นข้าวในกลุ่มที่ปลูกโดยได้รับแสง 10 ชั่วโมงต่อวัน (รูปที่ 12-B) พบว่า เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในกลุ่มต้นข้าวที่เติบโตโดยได้รับธาตุอาหารปริมาณมากมีค่าแอคติวิตีสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับธาตุอาหารปริมาณน้อย

นอกจากนี้เมื่อพิจารณารูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ในหนึ่งวัน พบว่าต้นข้าวกลุ่มที่เติบโตในสารละลายธาตุอาหารที่มีปริมาณธาตุอาหารน้อยจะมีค่าแอคติวิตีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆหลังจากเริ่มได้รับแสง และมีค่าสูงสุดที่ในชั่วโมงที่ 6 ของการได้รับแสงจากนั้นจะค่อยๆลดลงอยู่ในระดับค่อนข้างคงที่ในที่มืด ในขณะที่ต้นข้าวกลุ่มที่เติบโตในสารละลายธาตุอาหารที่มีปริมาณธาตุอาหารมาก พบว่ามีลักษณะการแสดงออกเหมือนในชุดที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน คือ จะมีการเพิ่มของแอคติวิตีอย่างรวดเร็วภายในชั่วโมงที่ 3 หลังจาก

ได้รับแสง และค่าจะค่อนข้างคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 9 ของการได้รับแสง จากนั้นในชั่วโมงที่ 10 ซึ่งเป็นช่วงสิ้นสุดการได้รับแสง พบว่าค่าแอคติวิตีจะค่อนข้างคงที่ และลดลงต่ำที่สุดในชั่วโมงที่ 11 ในที่มืด อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสระหว่างกลุ่มที่ได้รับแสงต่างกัน พบว่าพืชที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวันจะมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมากกว่ากลุ่มที่ได้รับแสง 10 ชั่วโมงต่อวันแม้ว่าจะได้รับธาตุอาหารในความเข้มข้นระดับเดียวกันก็ตามซึ่งจะเห็นได้ชัดในพืชที่ได้รับธาตุอาหารระดับต่ำ (เส้นประ)



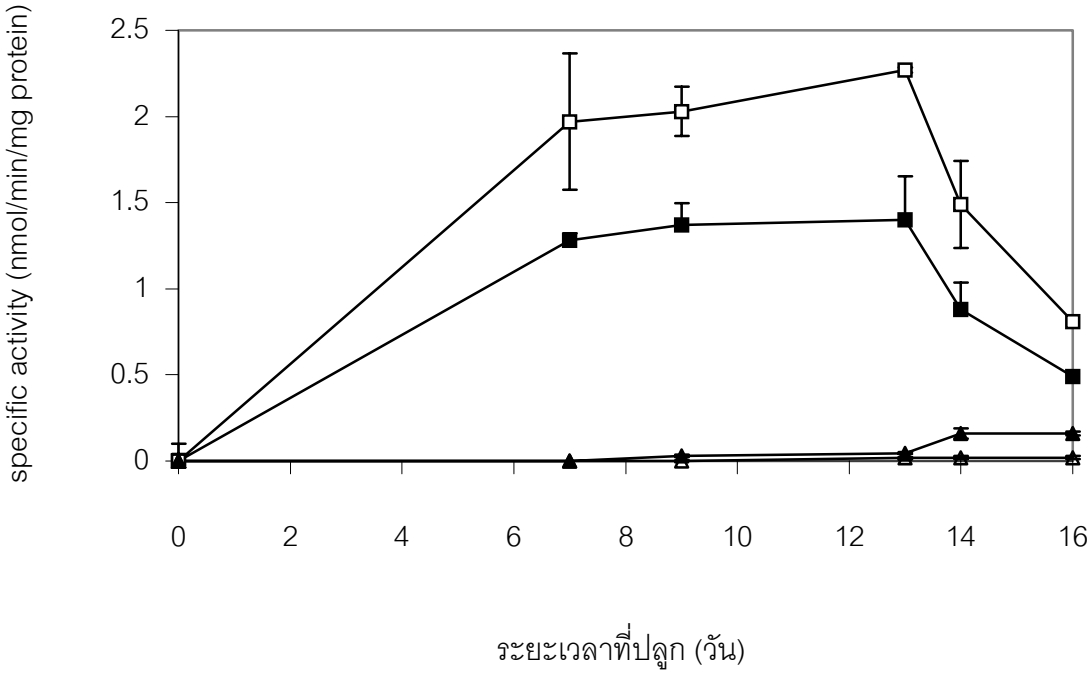

**รูปที่** 12 แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง อายุ 2สัปดาห์ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland 's solution ความเข้มข้น ½ เท่า(high nutrient, เส้นทึบ) และความ เข้มข้น 1/20 เท่า (low nutrient, เส้นประ)โดยได้รับแสง 270 $\mu mol.m^{-1}.s^{-1}$ เป็นเวลา12ชั่วโมงต่อวัน(A) และ 10 ชั่วโมงต่อวัน (B) ข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ S.Eจากจำนวนตัวอย่าง 4 ซ้ำ

.

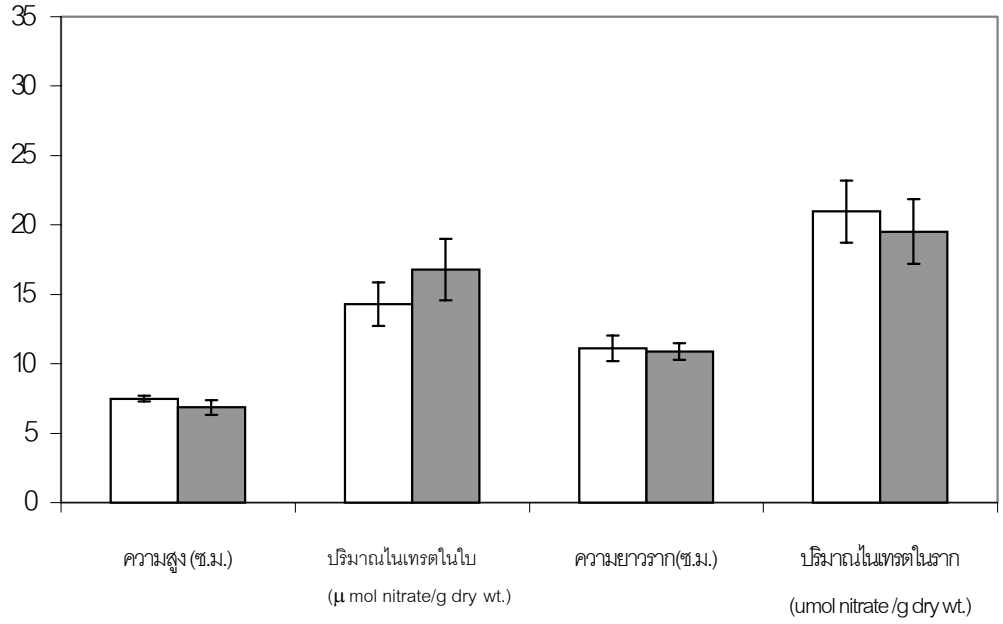
### 3.2.3 ผลการเติมอากาศในระบบการปลูกในสารละลายธาตุอาหารต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการเติมอากาศให้กับระบบปลูก และ ไม่เติมอากาศให้กับระบบปลูก โดยพิจารณาจากการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบ และรากต้นข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (เก็บตัวอย่างพืชในช่วงเวลา 11.00 -12.00 นาฬิกา จำนวน 3 ซ้ำ) ในช่วงที่ยังเป็นต้นอ่อน พบว่ากลุ่มต้นข้าวที่มีการเติมอากาศให้แก่ระบบปลูกซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณอากาศในสารละลายมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบต่ำกว่ากลุ่มที่ปลูกโดยไม่ได้มีการเติมอากาศ (รูปที่13) โดยสามารถสังเกตความแตกต่างได้อย่างชัดเจนตั้งแต่เริ่มนำต้นข้าวลงปลูกแล้วได้ 7 วัน สำหรับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในส่วนรากข้าวพบว่ามีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับในส่วนของใบ นอกจากนี้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในช่วงแรกของการปลูกในส่วนของรากที่ปลูกในระบบที่มีการเติมอากาศยังมีระดับไม่แตกต่างจากแอคติวิตีในรากข้าวในกลุ่มที่ไม่ได้เติมอากาศให้กับระบบปลูก อย่างไรก็ตามเมื่อต้นข้าวอายุเพิ่มมากขึ้น จะเริ่มเห็นความแตกต่างระหว่างแอคติวิตีในรากต้นข้าวระหว่าง 2 กลุ่มนี้ได้ โดยเห็นความแตกต่างได้ชัดเจนในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของการปลูก

จากการเปรียบเทียบขนาดของต้นข้าว ทั้งในกลุ่มที่ปลูกโดยเติมอากาศให้กับระบบปลูก และกลุ่มที่ไม่ได้เติมอากาศ โดยพิจารณาจากความสูงของลำต้น (วัดจากโคนต้น ถึง ส่วนที่สูงที่สุดของต้น) และ ความยาวราก (วัดจากโคนรากถึงปลายรากส่วนที่ยาวที่สุด) รวมทั้ง ปริมาณไนเทรตที่สะสมในส่วนใบและรากของแต่ละกลุ่ม โดยคิดเป็นค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ $\pm$ ค่าความแปรปรวน (รูปที่ 14) พบว่า ต้นข้าวในกลุ่มที่ปลูกโดยมีการเติมอากาศให้กับระบบ มีความสูงของต้นความยาวของรากโดยเฉลี่ยไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่เติมอากาศอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปริมาณไนเทรตที่สะสมในใบข้าวและในรากพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม อย่างไรก็ตามจะพบว่า ต้นข้าวจากทั้งสองกลุ่มมีปริมาณไนเทรตในรากโดยเฉลี่ยสูงกว่าในใบ




**รูปที่ 13** แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงซึ่งปลูกในระบบไฮโดรโพนิคในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น¼เท่าในกลุ่มที่ปลูกโดยมีการเติมและไม่เติมอากาศให้กับระบบ (■,□)และแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในรากที่เติมอากาศและไม่เติมอากาศให้กับระบบ(▲,Δ)ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± S.E.จากจำนวนตัวอย่าง3 ซ้ำ




**รูปที่ 14** ความสูงของต้นข้าว ความยาวราก และปริมาณไนเทรตที่สะสมในใบและราก ของต้นข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิคเป็นเวลา 16 วันในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น ¼ เท่าในกลุ่มที่ปลูกโดยมีการเติมอากาศ ( ■ )และไม่เติมอากาศ (□)ให้กับระบบ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± S.E. จากจำนวน ตัวอย่าง 6 ซ้ำ

## 3.3 ผลของไนโตรเจน ในรูปของ ไนเทรต แอมโมเนียม และไนเทรตร่วมกับแอมโมเนียม

จากการศึกษาเบื้องต้นถึงวิธีการปลูกข้าว และ ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเลือกเก็บตัวอย่างใบข้าวแล้ว (ปลูกโดยไม่ต้องเติมอากาศเพิ่ม และเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาเที่ยงวัน) จึงได้นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาผลของไนโตรเจนที่เป็นธาตุอาหารพืชในรูปแบบต่างๆกัน ได้แก่ไนเทรต ,แอมโมเนียม หรือ ไนเทรตร่วมกับแอมโมเนียม ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในต้นข้าวไร่สามสายพันธุ์ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของชนิดปุ๋ย และรูปแบบการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส(แอคติวิตี)เมื่อได้รับปุ๋ยในข้าวแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งจะนำไปสู่การเลือกใช้ปุ๋ยในการปลูกข้าวไร่ต่อไป

### 3.3.1 ผลของการได้รับไนโตรเจนในรูปของไนเทรตต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 พันธุ์ดอกพยอมและพันธุ์กู้เมืองหลวง

จากการทดลองปลูกข้าวทั้งสามสายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์กู้เมืองหลวง และ พันธุ์ดอกพยอมในระบบไฮโดรโพนิค โดยให้แหล่งไนโตรเจนที่ต้นข้าวได้รับอยู่ในรูปของไนเทรตความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0, 1.25, 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ เก็บตัวอย่างใบข้าวในช่วงเวลา 11.00น.-13.00น. จำนวนตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และสารละลายธาตุอาหารพืชจะเตรียมในตอนแรกเพียงครั้งเดียว จากนั้นปรับปริมาตรและค่าพีเอชของสารละลายธาตุอาหารทุกวันเพื่อรักษาสภาพไอออนต่างๆในสารละลาย เก็บตัวอย่างใบข้าวในช่วงอายุการปลูกต่างๆกัน นำมาหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส พบว่า ข้าวทั้งสามสายพันธุ์มีการแสดงออกแตกต่างกัน คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (รูปที่15) เมื่อได้รับอาหารที่มีไนเทรตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์จะมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วโดยเพิ่มแอคติวิตีขึ้นสูงในเวลาช่วงสั้นๆ จากนั้นจะลดลงและเพิ่มขึ้นอีกครั้งแต่อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าแอคติวิตีที่เพิ่มขึ้นครั้งแรก ซึ่งต่างจากต้นข้าวที่ได้รับไนเทรต 1.25 มิลลิโมลาร์ และ 2.5 มิลลิโมลาร์ คือในสองกลุ่มดังกล่าวมีแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆโดยไม่มีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาสั้นๆเหมือนกลุ่มแรก อย่างไรก็ตามแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวที่ได้รับไนเทรตทั้งสามความเข้มข้นจะมีค่าลดลงหลังสัปดาห์ที่ 2 ของการปลูกเหมือนๆกัน สำหรับใบข้าวกลุ่มที่ไม่ได้รับไนโตรเจนเลยพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมีค่าน้อยมากตลอดระยะเวลาการปลูกอย่างไรก็ตามยังสามารถเห็นแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรต

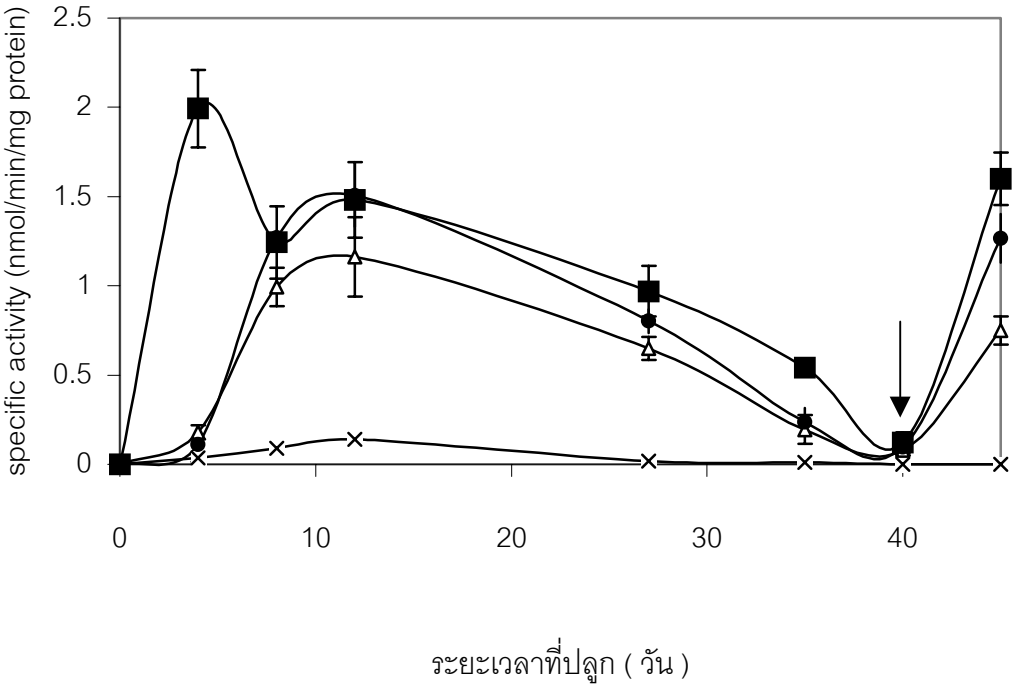
รีดักเทสได้เล็กน้อยแม้จะไม่มีไนเทรตในสารละลายโดยสามารถวัดได้ในช่วงประมาณวันที่ 10 ของการปลูก (<0.3 nmol/min/mg protein) และหลังจากที่แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวทุกกลุ่มลดลงในระดับใกล้เคียงค่าศูนย์ เมื่อได้ทดลองให้สารละลายธาตุอาหารที่เตรียมใหม่อีกครั้งพบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ในใบข้าวสามารถเพิ่มขึ้นได้อีกครั้ง โดยขึ้นอยู่กับระดับปริมาณไนเทรตที่ได้รับ

สำหรับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวพันธุ์ดอกพยอม (รูปที่ 17) พบว่า การได้รับไนเทรตปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกันมีผลให้ต้นข้าวทั้งสามกลุ่มที่ได้รับไนเทรต 1.25 , 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์มีการเพิ่มแอคติวิตี 2 ครั้ง โดยครั้งแรกจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในช่วงเวลา 4 วันของการได้รับอาหาร และจะลดลง โดยอัตราการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ในครั้งแรกนี้มีความสัมพันธ์กับระดับไนเทรตที่ได้รับ นั่นคือเมื่อได้รับไนเทรตความเข้มข้นสูงจะมีการเพิ่มของแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างรวดเร็วตามไปด้วย และการเพิ่มแอคติวิตีจะไม่มากเมื่อมีความเข้มข้นของไนเทรตลดลงมา อย่างไรก็ตามหลังจากมีการเพิ่มของแอคติวิตีในช่วงแรกแล้ว แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวในกลุ่มที่ได้รับไนเทรตทั้งสามความเข้มข้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอีกครั้งแล้วเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 2 โดยจะลดลงไปเรื่อยๆ จนอยู่ในระดับศูนย์ แต่จะสามารถเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ขึ้นมาได้อีกครั้งเมื่อได้รับธาตุอาหารที่มีไนเทรตเพิ่มอีก สำหรับข้าวในกลุ่มที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีไนเทรต พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเพียงเล็กน้อย (<0.1nmol/min/mg protein) ในช่วง 10 วันแรกของการปลูก

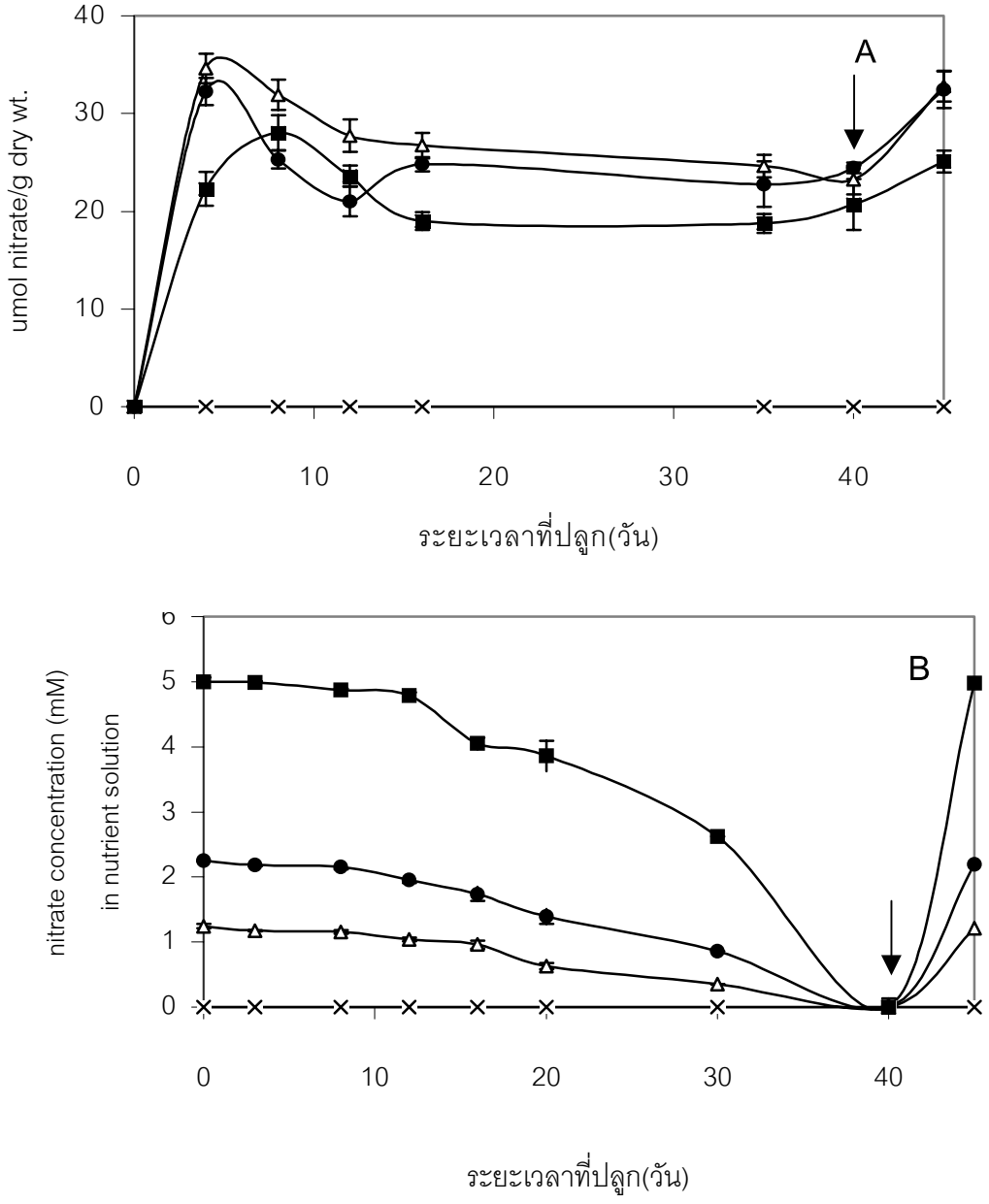
สำหรับข้าวในสายพันธุ์กู้เมืองหลวง (รูปที่ 19 ) พบว่า ต้นข้าวในกลุ่มที่มีไนเทรตอยู่ในสารละลายธาตุอาหาร จะมีการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสโดยไม่มีลักษณะการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับปริมาณไนเทรตมากเหมือนกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์ดอกพยอม ค่าแอคติวิตีที่เพิ่มขึ้น จะมีความสัมพันธ์กับระดับไนเทรตในสารละลายธาตุอาหาร คือ กลุ่มที่ได้รับไนเทรต 5 มิลลิโมลาร์จะมีค่าแอคติวิตีสูงที่สุดในขณะที่เวลาเดียวกันนั้นค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่มที่ได้รับไนเทรตน้อยจะมีค่าต่ำลงมาตามลำดับ สำหรับต้นข้าวในกลุ่มที่ปลูกโดยไม่ได้รับธาตุอาหารไนโตรเจนเลยพบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำมากโดยค่าที่มากที่สุดของแอคติวิตีในกลุ่มนี้มีค่าต่ำกว่า 0.1nmol/min/mg protein อย่างไรก็ตามพบว่าข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงมีลักษณะเหมือนกับอีกสองสายพันธุ์แรกคือ ภายหลังจาก

ที่แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือศูนย์แล้ว ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ยังสามารถเพิ่มได้อย่างรวดเร็วเมื่อได้รับอาหารที่มีไนเทรตอีกครั้ง

จากการเปรียบเทียบระดับค่าปริมาณไนเทรตที่สะสมในส่วนใบของต้นข้าวทั้งสามสายพันธุ์ (รูปที่ 16-A, 18-A และ 20-A) พบว่า ปริมาณไนเทรตที่สะสมในใบมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อยตลอดช่วงเวลาที่ปลูก และในจุดที่แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงมากที่สุด พบว่าปริมาณไนเทรตที่สะสมในใบยังคงมีค่าค่อนข้างคงที่ แต่จะเพิ่มขึ้นได้เมื่อได้รับไนเทรตเพิ่มเข้ามาในสารละลายธาตุอาหารและเมื่อพิจารณาถึงระดับปริมาณไนเทรตที่อยู่ในสารละลายธาตุอาหารที่เวลาต่างๆ (รูปที่ 16-B, 18-B และ 20-B) ควบคู่ไปกับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส พบว่ามีลักษณะคล้อยตามกัน คือระดับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจะลดลงเมื่อปริมาณไนเทรตในสารละลายธาตุอาหารลดลงด้วยและจะพบความสัมพันธ์ในลักษณะเดียวกันนี้ในข้าวทั้งสามสายพันธุ์ที่ทำการทดลอง

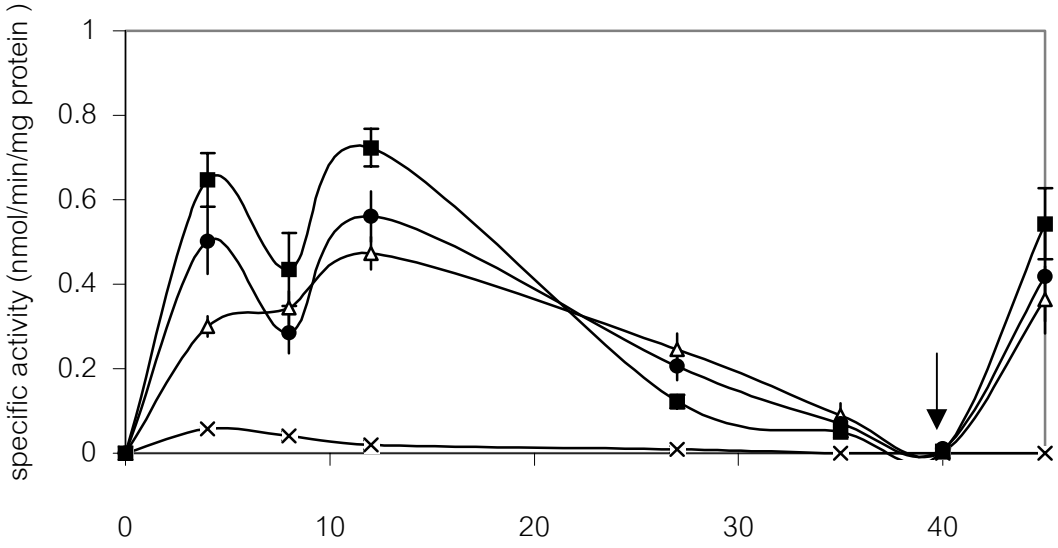



**รูปที่15** แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปของไนเทรตความเข้มข้นต่างๆกัน ได้แก่ 0 (x), 1.25 (Δ) , 2.5 (●) และ 5(■) มิลลิโมลาร์ในธาตุอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น ½ เท่าและได้รับธาตุอาหารเดิมอีกครั้งในวันที่ 40 ของการปลูก (↓) โดยค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย±S.E. จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ

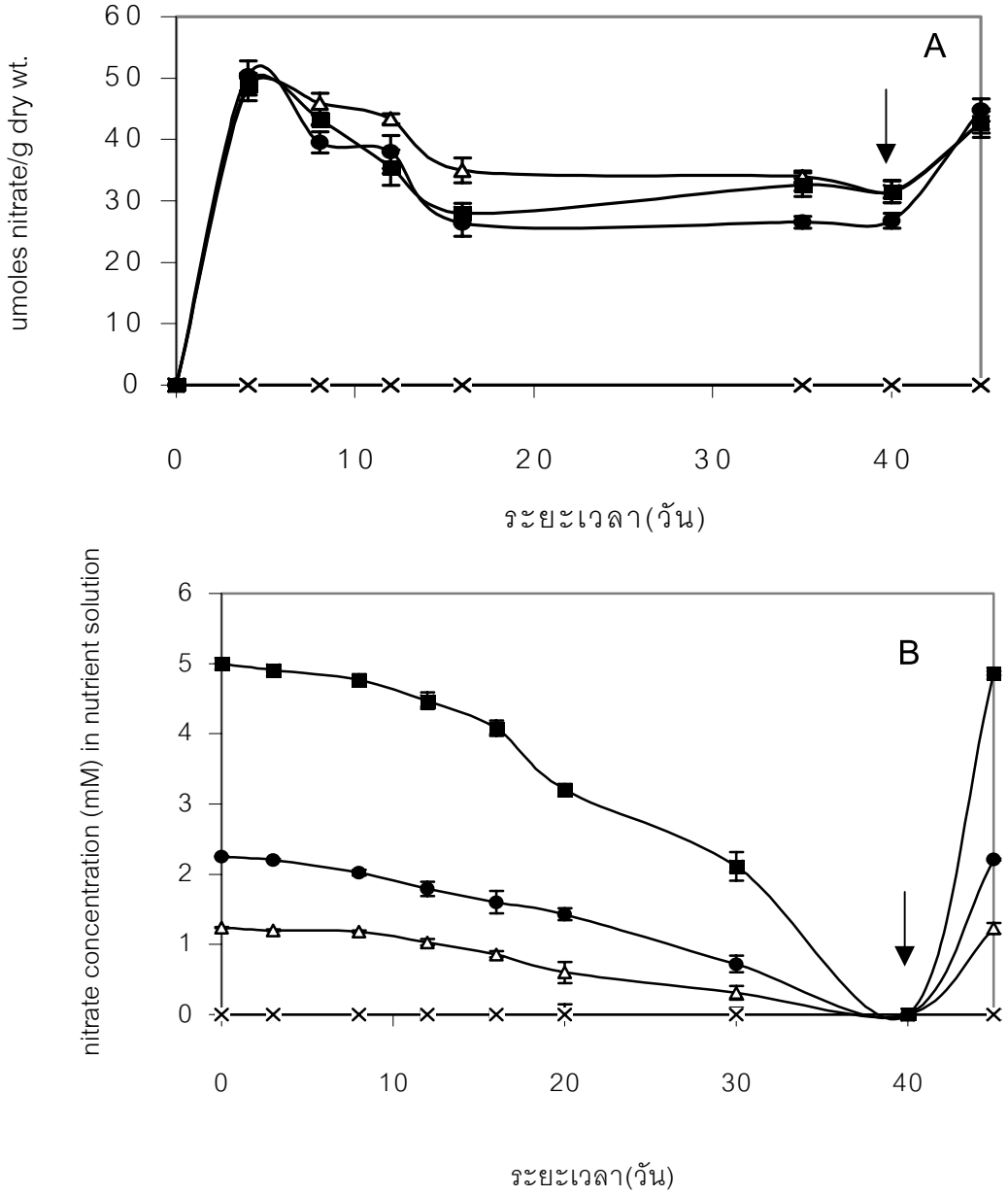



**รูปที่ 16** ปริมาณไนเทรตที่สะสมในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105( A ) และปริมาณไนเทรต( B ) ในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของไนเทรตเริ่มต้น 0 (x), 1.25 (Δ) , 2.5 (●) และ 5(■) มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลาการปลูกต่างๆกัน ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย±S.E. จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ

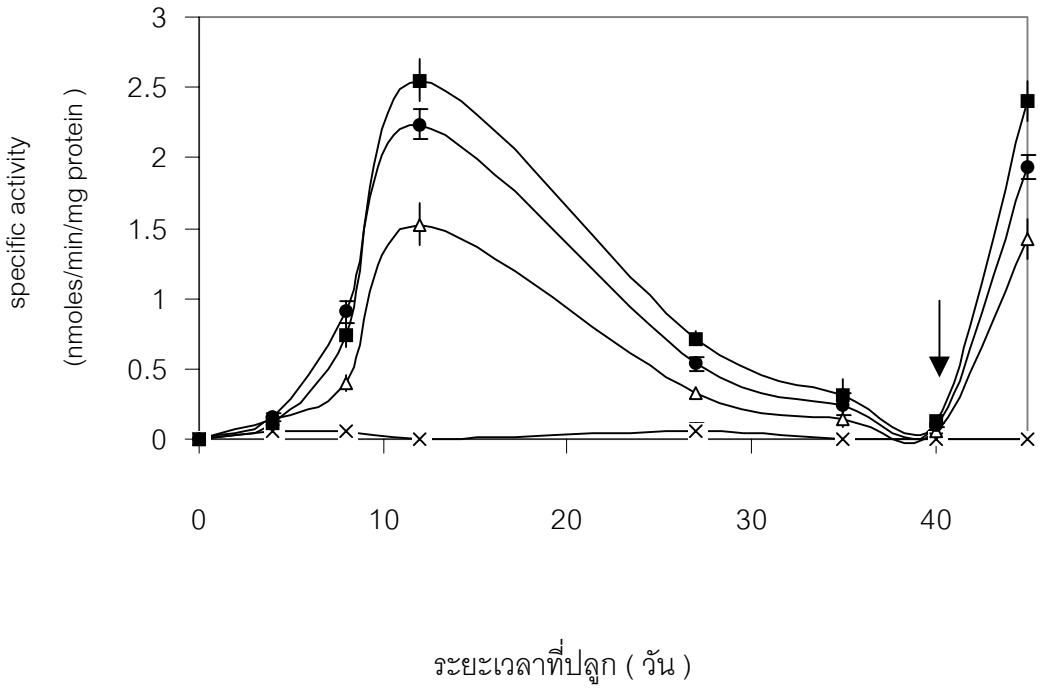
ลูกศร ( ↓) แสดงวันที่ได้รับธาตุอาหารเดิมอีกครั้งในวันที่ 40 ของการปลูก



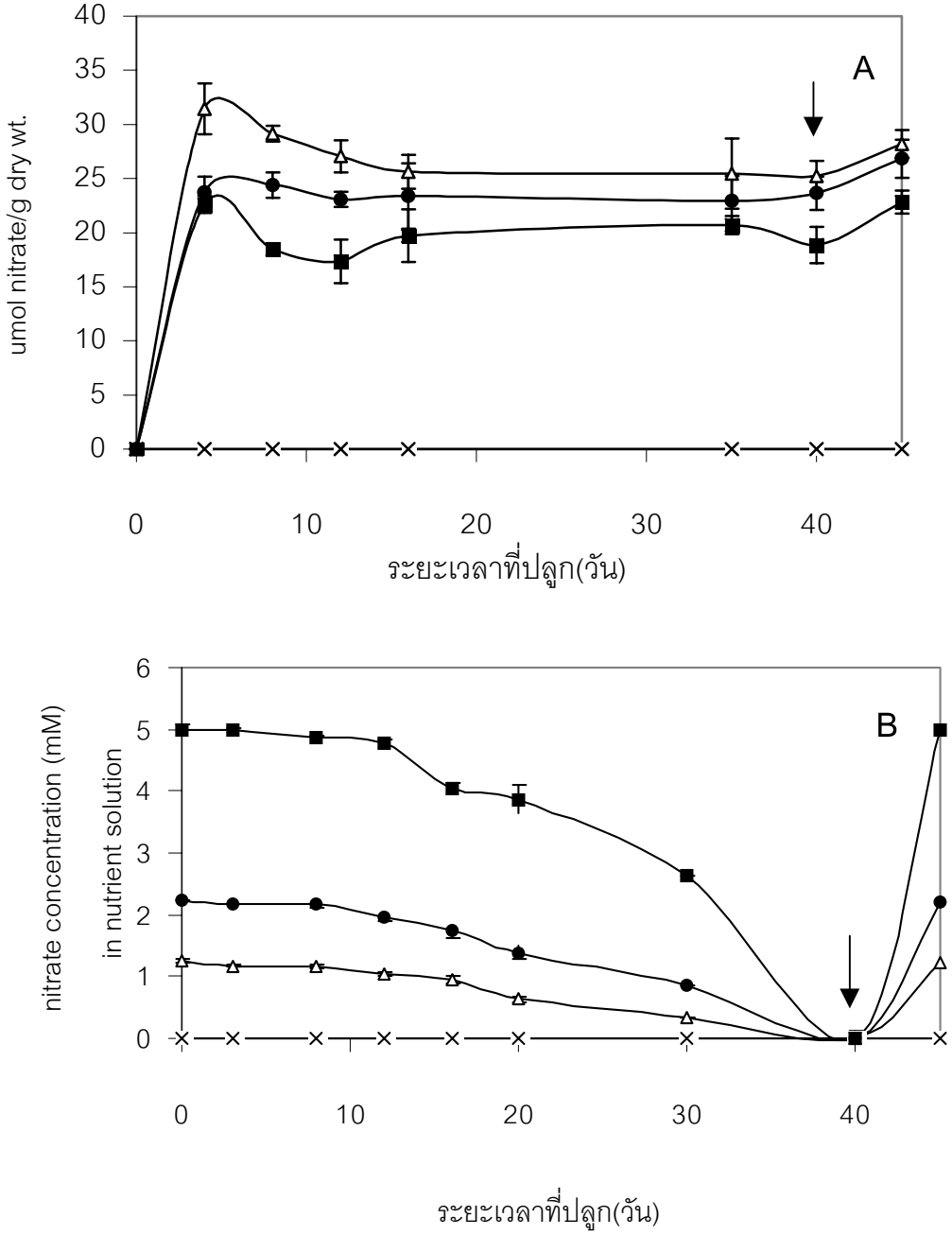

**รูปที่ 17** แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในใบข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิคโดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปของไนเทรตความเข้มข้นต่างๆกัน ได้แก่ 0 (x), 1.25 (Δ) , 2.5 (●) และ 5(■)มิลลิโมลาร์ ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น ½ เท่าและได้รับธาตุอาหารเดิมอีกครั้งในวันที่ 40 ของการปลูก (↓) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย±S.E. จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ




**รูปที่ 18** ปริมาณไนเทรตที่สะสมในใบข้าวพันธุ์ดอกพยอม( A ) และปริมาณไนเทรต( B ) ในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของไนเทรตเริ่มต้น 0 (x),1.25 (Δ) , 2.5(●) และ 5(■) มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลาการปลูกต่างๆกันค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย±S.E. จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ
ลูกศร ( ↓) แสดงวันที่ได้รับธาตุอาหารเดิมอีกครั้งในวันที่ 40 ของการปลูก




**รูปที่ 19** แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปของไนเทรตความเข้มข้นต่างๆกัน ได้แก่ 0 (x), 1.25 (Δ) , 2.5 (●) และ 5(■)มิลลิโมลาร์ ในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น ½ เท่าและได้รับธาตุอาหารเดิมอีกครั้งในวันที่ 40 ของการปลูก ( ↓)ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย±S.E. จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ




**รูปที่ 20** ปริมาณไนเทรตที่สะสมในใบข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง(A) และปริมาณไนเทรต(B) ในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของไนเทรตเริ่มต้น 0 (x), 1.25 (Δ) , 2.5 (●) และ 5(■) มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลาการปลูกต่างๆกัน ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย±S.E.จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ

ลูกศร ( ↓) แสดงวันที่ได้รับธาตุอาหารเดิมอีกครั้งในวันที่ 40 ของการปลูก

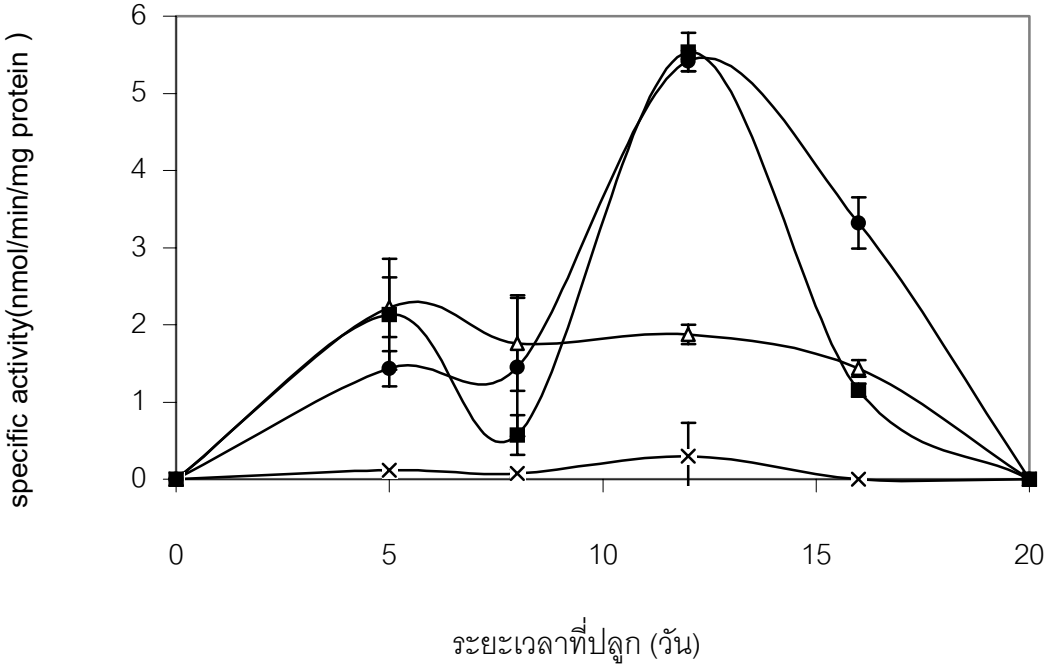
### 3.3.2 ผลของการได้รับไนโตรเจน ในรูปของไนเทรตร่วมกับแอมโมเนียม ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์ดอกพยอม และ พันธุ์กู้เมืองหลวง

จากการทดลองปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ดอกพยอม และกู้เมืองหลวง ในระบบไฮโดรโพนิค โดยให้แหล่งไนโตรเจนที่ต้นข้าวได้รับอยู่ในรูปของแอมโมเนียมไนเทรต ความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเก็บตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำที่เวลา 11.00-13.00 น. นำมาวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบของข้าวทั้งสามสายพันธุ์พบว่า ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 (รูปที่21) แอคติวิตีของเอนไซม์มีการเพิ่มขึ้นสองครั้ง โดยการเพิ่มครั้งแรกมีค่าแอคติวิตีต่ำกว่าครั้งที่สอง แต่ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะไม่สัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเทรตที่ได้รับ อย่างไรก็ตามพบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในกลุ่มนี้จะมีค่าค่อนข้างสูงโดยเฉพาะช่วงสัปดาห์ที่สองของการปลูกจะมีค่าแอคติวิตีสูงสุดมากกว่า 5 nmol/min/mg protein ซึ่งค่าดังกล่าวจะพบในใบข้าวที่ได้รับแอมโมเนียมไนเทรตความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ และหลังจากสัปดาห์ที่ 2 แล้วค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจะลดลงจนเป็นศูนย์ภายในเวลา 20 วันนับจากวันปลูก สำหรับค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวกลุ่มที่ไม่ได้รับไนโตรเจนพบว่ามีค่าต่ำมากและจะเห็นแอคติวิตีได้เล็กน้อยในช่วงประมาณวันที่ 12 ของการปลูก สำหรับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอม (รูปที่ 22) พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับในพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 คือมีการเพิ่มแอคติวิตีสองครั้ง และมีค่าแอคติวิตีสูงสุดในวันที่ 12 ของการปลูก โดยค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในใบข้าวที่ได้รับแอมโมเนียมไนเทรตทั้ง 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ มีค่าไม่ต่างกันคืออยู่ในช่วง 4 nmol/min/mg protein แต่จะมีค่ามากว่าในใบข้าวที่ได้รับแอมโมเนียมไนเทรต 1.25 มิลลิโมลาร์ ขณะที่ใบข้าวในกลุ่มที่ไม่ได้รับไนโตรเจนเลยพบว่ามีแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยในช่วงสิบวันแรกของการปลูก และสำหรับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวง (รูปที่ 23) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นสองครั้งเช่นเดียวกับสองพันธุ์แรก โดยต้นข้าวที่ได้รับแอมโมเนียมไนเทรตในระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ จะมีค่าแอคติวิตีสูงสุดมากกว่า 6 nmol/min/mg protein ในวันที่ 12 ของการปลูก และในใบข้าวกลุ่มที่ได้รับแอมโมเนียมไนเทรต 1.25 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ พบว่า มีค่าแอคติวิตีใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 2 nmol/min/mg protein หลังจากนั้นค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวจะลดลงภายในวันที่ 20 ของการ

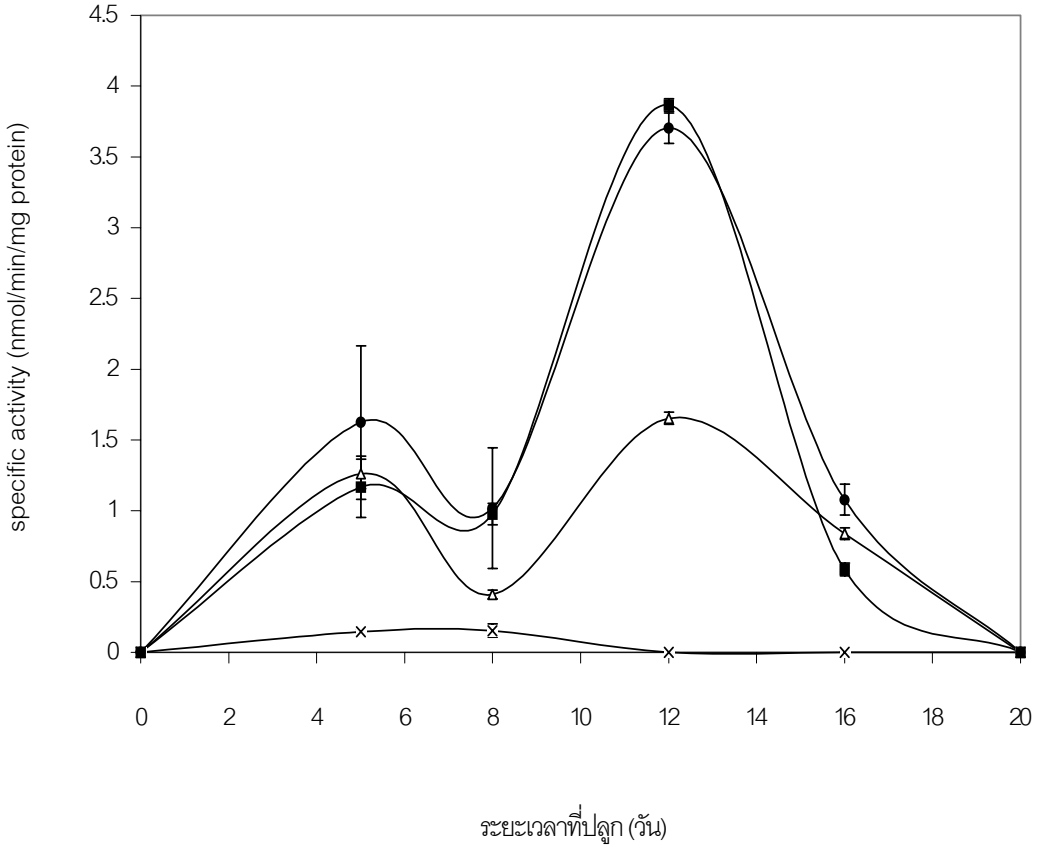
ปลูก สำหรับกลุ่มที่ไม่ได้รับแอมโมเนียมไนเทรต พบว่า มีแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยในช่วง10 วันแรกของการปลูกเช่นเดียวกับในพันธุ์ดอกพยอม

### 3.3.3 ผลของการได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105พันธุ์ดอกพยอม และ พันธุ์กู้เมืองหลวง

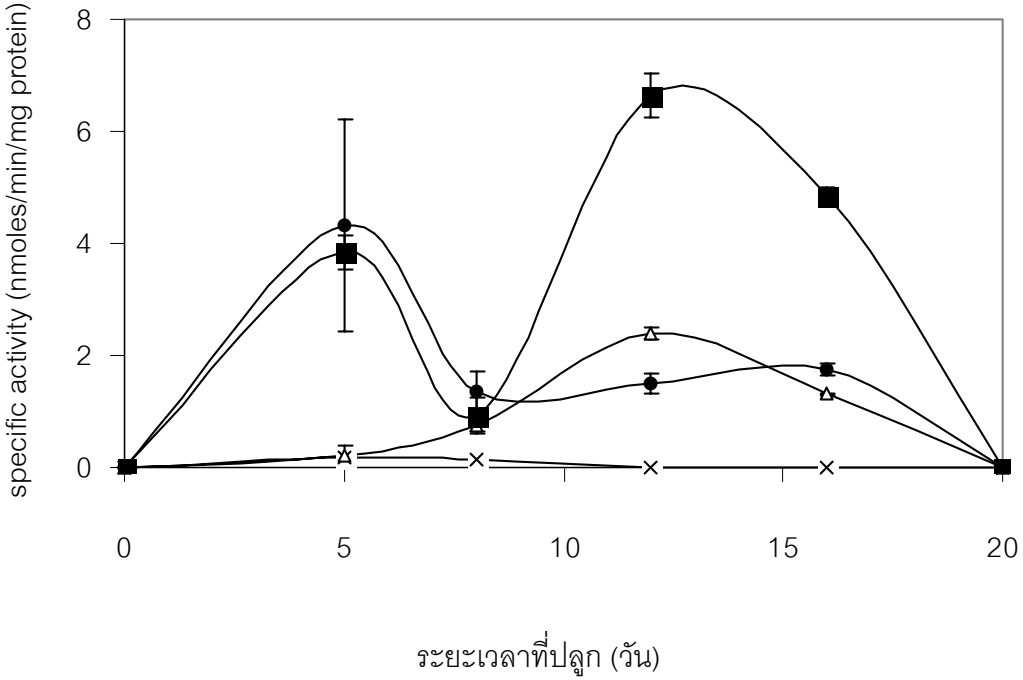
จากการทดลองปลูกข้าวไร่พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ดอกพยอม และกู้เมืองหลวง ในระบบไฮโดรโพนิคโดยให้ไนโตรเจนในสารละลายธาตุอาหารในรูปของ แอมโมเนียมเพียงอย่างเดียวในระดับความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ พบว่า ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในต้นข้าวทั้งสามสายพันธุ์ ตลอดช่วงระยะเวลาปลูก 30 วัน




**รูปที่ 21** แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเทรต คือมีทั้งไนเทรตร่วมกับแอมโมเนียม ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 (x), 1.25(Δ), 2.5(●) และ 5(■) มิลลิโมลาร์ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น ½ เท่า ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย±S.E. จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ




**รูปที่ 22** แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในใบข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอม ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเทรต คือมีทั้งไนเทรตร่วมกับแอมโมเนียม ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 (x), 1.25 (Δ) , 2.5 (●) และ 5(■)มิลลิโมลาร์ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น ½ เท่า ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย±S.E. จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ




**รูปที่ 23** แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวง ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเทรต คือมีทั้งไนเทรตร่วมกับแอมโมเนียม ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 (x), 1.25 (Δ) , 2.5 (●) และ 5(■)มิลลิโมลาร์ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น ½ เท่า ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย±S.E. จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ

### 3.4 ผลการสกัดเอนไซม์ และทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากผลการศึกษาในข้อ 3.1 ซึ่งทราบว่าการใส่ปุ๋ยมีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ดังนั้นในการสกัดเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากใบข้าวไร่พันธุ์กู้เมืองหลวงที่ปลูกในดิน จึงได้ทำการให้ปุ๋ยสูตร 20-20-0แก่ต้นข้าวก่อนการเก็บใบข้าวเป็นเวลา7วันเพื่อชักนำให้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมากขึ้น

เมื่อนำใบข้าวไร่ 150 กรัม มาเตรียม crude extract จะได้โปรตีนในส่วนนี้ประมาณ 3,845 มิลลิกรัม มีแอคติวิตีทั้งหมด 2.510 µmol/min และมี specific activity 6.527 x $10^{-4}$ µmol/min/mg protein จากนั้นเมื่อนำส่วนของ crude extract ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 0-30 % ของความอิ่มตัว และนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที, 30 นาที นำส่วนตะกอนโปรตีนมาละลายกลับได้เป็น สารละลาย P1(0-30%)นำไปหาค่าปริมาณโปรตีนได้ 1360 มิลลิกรัม, yield 42.8% มีแอคติวิตีทั้งหมด 1.075 µmol /min และมีค่า specific activity 0.825x$10^{-3}$ µmol/min/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 1.26 เท่า ส่วนสารละลายใสที่ได้จากการปั่นนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น30-50%ของความอิ่มตัว เมื่อปั่นแล้วนำส่วนตะกอนโปรตีนมาละลายกลับได้เป็นสารละลาย P2(30-50%) นำไปหาค่าปริมาณโปรตีนได้ 1141.36 มิลลิกรัม, yield 46.81% มีแอคติวิตีทั้งหมด 1.175 µmol /min และมีค่า specific activity 1.029 x $10^{-3}$µmol/min/mg protein มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น1.56 เท่า และสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้น 50-70%ของความอิ่มตัว หลังจากปั่นแล้วเก็บส่วนตะกอนมาละลายกลับได้เป็นสารละลาย P3(50-70%) นำไปหาค่าปริมาณโปรตีนได้ 1,220 มิลลิกรัม แต่ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในสารละลาย P3 นี้ (ตารางที่2)

จากการทดลองตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในครั้งแรกได้ค่าความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำ โดยในการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 0-30% ของความอิ่มตัว จะได้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ใกล้เคียงกับการใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 30-50 % ดังนั้นจึงได้ทำการสกัดเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากใบข้าวไร่โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0 -20% ของความอิ่มตัวและ 20 –50 % ของความอิ่มตัว พบว่าจากการสกัดใบข้าวไร่ 63.96 กรัม ได้ crude extract ที่มีโปรตีน 722.8 มิลลิกรัม มีแอคติวิตีทั้งหมด 1.337x$10^{-1}$µmol/min และมีค่าspecific activity1.731 x$10^{-4}$µmol

/min/mg protein เมื่อนำส่วนที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 0-20 % ของความอิ่มตัวมาทดสอบพบว่าไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส และส่วนที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว พบว่ามีปริมาณโปรตีน 213 มิลลิกรัม yield 99.62 มีแอคติวิตีทั้งหมด 1.332 x $10^{-1}$ µmol /min และมีค่า specific activity 6.254 x $10^{-4}$ µmol/min/mg protein มีความบริสุทธิ์มากกว่าตอนเริ่มต้น 3.61 เท่า
(ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 2 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากใบข้าวไร่ โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-30%, 30-50% และ 50-70% ของความอิ่มตัว (ครั้งที่ 1)**

| Purification step | Total protein (mg) | Total activity (µmol/min) | Yield (%) | Specific activity (µ mol/min/mg protein) | Purification (fold) |
|---|---|---|---|---|---|
| Leaf extract | 3845 | 2.510 | 100 | 6.527 x $10^{-4}$ | 1 |
| P1 [$(NH_4)_2SO_4$ 0-30%of saturation] | 1360 | 1.075 | 42.8% | 0.825x$10^{-3}$ | 1.26 |
| P2 [$(NH_4)_2SO_4$ 30-50%of saturation] | 1141.36 | 1.175 | 46.81 | 1.029 x $10^{-3}$ | 1.56 |
| P3 [$(NH_4)_2SO_4$ 50-70%of saturation] | 1220 | - | - | - | - |

**ตารางที่ 3 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากใบข้าวไร่ โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0-20%, 20-50% และ 50-70% ของความอิ่มตัว (ครั้งที่ 2)**

| Purification step | Total protein (mg) | Total activity (μmol/min) | Yield (%) | Specific activity (μ mol/min/mg protein) | Purification (fold) |
|---|---|---|---|---|---|
| Leaf extract | 722.8 | $1.337 \times 10^{-1}$ | 100 | $1.731 \times 10^{-4}$ | 1 |
| P1 [$(NH_4)_2SO_4$ 0-20%of saturation] | 200 | - | - | - | - |
| P2 [$(NH_4)_2SO_4$ 20-50%of saturation] | 213 | $1.332 \times 10^{-1}$ | 96.63 | $6.254 \times 10^{-4}$ | 3.61 |
| P3 [$(NH_4)_2SO_4$ 50-70%of saturation] | 220 | - | - | - | - |

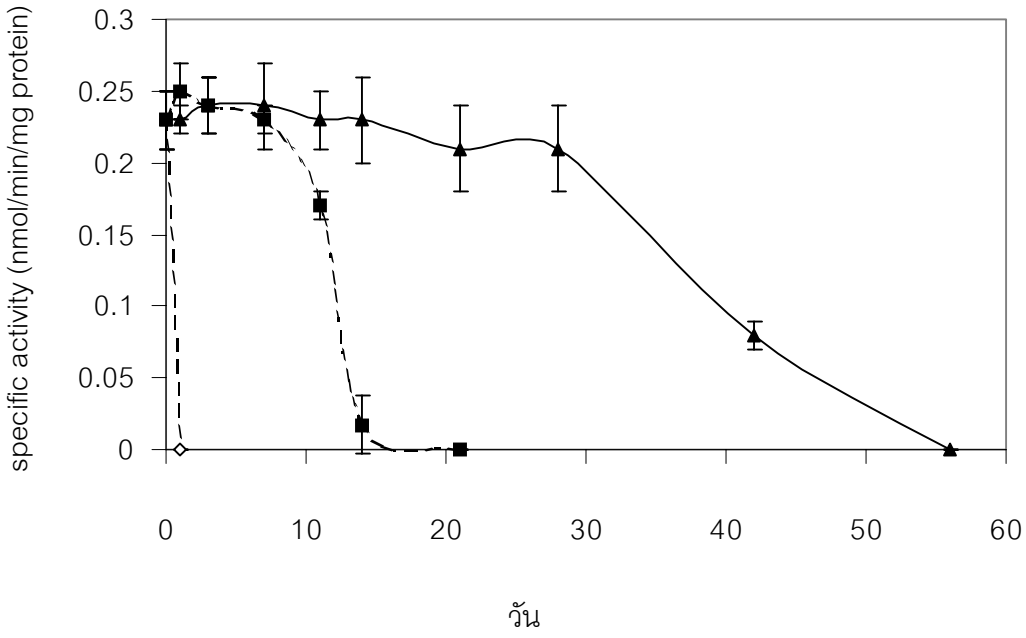
### 3.5 **การย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสบนแผ่นเจล** (activity staining)

จากการทดลองย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส พบว่า ไม่สามารถย้อมได้ เนื่องจากสีชมพูอมม่วงที่เกิดจากไนไทรต์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาจับกับสีย้อม ไม่ได้ติดอยู่ตรงส่วนเจล แต่กลับแพร่กระจายออกมาในส่วนของสารละลายที่ย้อม ทำให้มีสีชมพูอมม่วงในสารละลาย

## 3.6 ผลการศึกษาข้อมูลพื้นฐาน และคุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากใบข้าวไร่

### 3.6.1 ผลของอุณหภูมิต่อการรักษาสภาพของเอนไซม์ในตัวอย่างที่ยังไม่ได้สกัดที่อุณหภูมิห้อง,อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

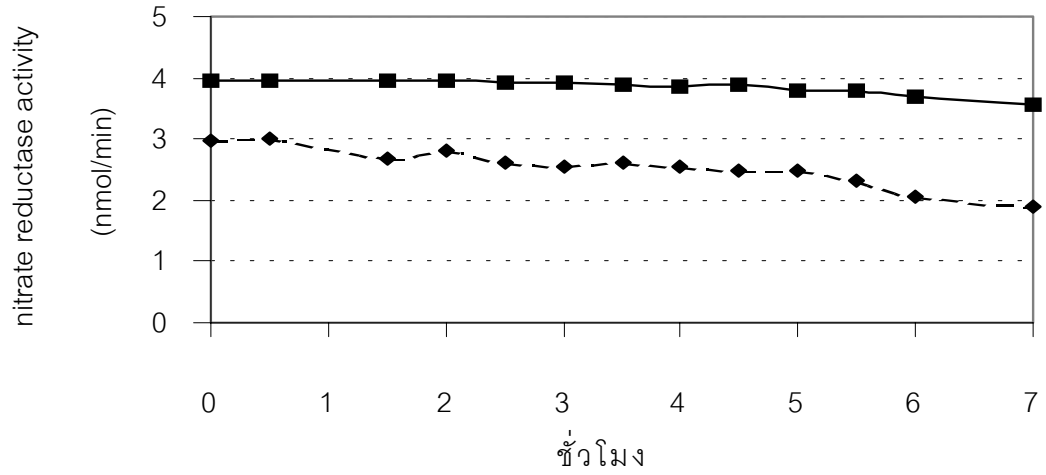
จากการเก็บตัวอย่างใบข้าวไร่เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บใบข้าวไร่ที่บดเป็นผงด้วยไนโตรเจนเหลว พบว่าเมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องปรากฏว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสสูญเสียแอคติวิตีภายใน 1 วัน ในขณะที่การเก็บใบข้าวที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส จะมีผลให้เอนไซม์มีความเสถียรอยู่ได้ในช่วงเวลา ประมาณ 1 สัปดาห์จากนั้น ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะค่อยๆลดลงอย่างรวดเร็วและหมดลงในช่วงเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ สำหรับตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส พบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจะคงที่อยู่ได้เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน จากนั้นจะค่อยๆลดลงจนหมดในเดือนที่ 2 (รูปที่ 24)




**รูปที่ 24** แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบข้าวที่เก็บตัวอย่างใบที่อุณหภูมิห้อง (◊), อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส(■) และอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (▲) ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย±S.E. จากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ

### 3.6.2 ผล PMSF ต่อความเสถียรของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสใน crude extract

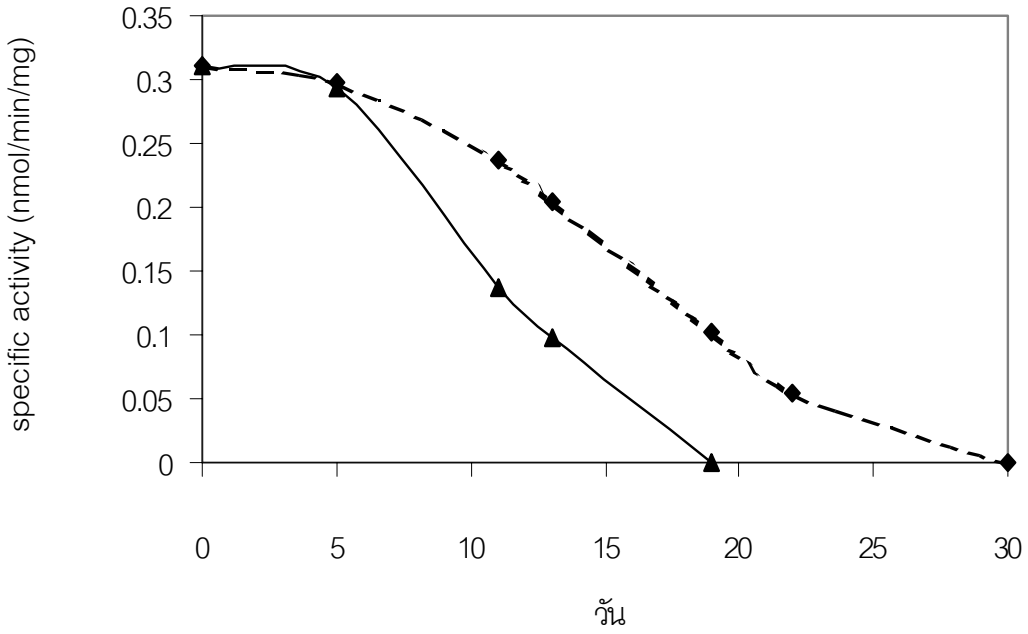
จากการวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสใน crude extract ซึ่งสกัดด้วย Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์,pH 7.5 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ EDTA โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติม 0.5 มิลลิโมลาร์ PMSF ซึ่งเป็น proteinase inhibitor ลงในบัฟเฟอร์สกัดพบว่า หลังจากหมุนเหวี่ยงและนำ crude extract มาวัดค่า specific activity ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในทันที พบว่าในกลุ่มที่ใส่ PMSF มีค่า specific activity ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติม PMSF ประมาณ 33 %และเมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่เวลาต่างๆกัน (รูปที่ 25) โดยเก็บเอนไซม์บนน้ำแข็งตลอดเวลาการทดลอง พบว่า ใน crude extract ที่ไม่มี PMSF จะมีความเสถียรอยู่ไม่เกิน 1 ชั่วโมง ในขณะที่ crude extract ที่มี PMSF มีความเสถียรอยู่ได้นานประมาณ 5 ชั่วโมง และมีการสูญเสียแอคติวิตีค่อนข้างช้าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติม PMSF




**รูปที่ 25** ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสใน crude extract ที่เวลาต่างๆกัน โดยเก็บเอนไซม์บนน้ำแข็งตลอดการทดลอง เปรียบเทียบระหว่างการ เติม PMSF 0.5มิลลิโมลาร์ (■) และไม่เติม PMSF(▲)

### 3.6.3 ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ผ่านการทำบริสุทธิโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว ในรูปของ dialysate และในรูปที่จับกับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

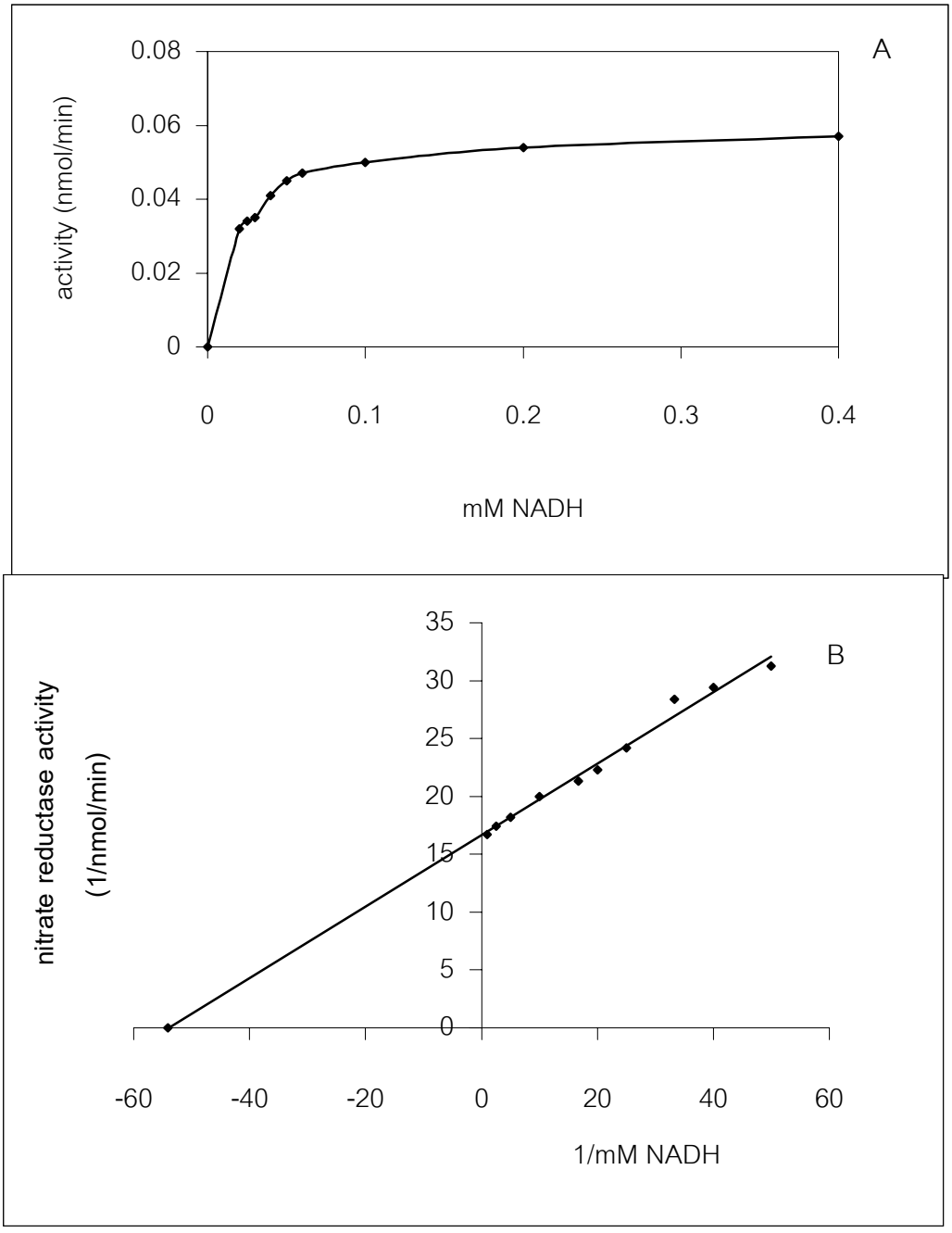
จากการศึกษาวิธีการเก็บเอนไซม์หลังจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 20-50% ของความอิ่มตัว โดยเปรียบเทียบระหว่างการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปของเอนไซม์ที่ไดอะไลซ์ เอาเกลือออกตั้งแต่แรก กับเอนไซม์ในรูปที่จับอยู่กับ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 50 % ของความอิ่มตัว โดยนำมาไดอะไลซ์ก่อนการวัดแอคติวิตี ในแต่ละครั้ง ซึ่งในการเก็บรักษาเอนไซม์ทั้ง 2 ชุดนี้ได้เก็บบนน้ำแข็งตลอดเวลาของการทดลอง (รูปที่ 26)พบว่าเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มจะมีความเสถียรของแอคติวิตีในช่วงเวลาประมาณ 5 วันหลังจากเริ่มทดลอง สำหรับการเก็บเอนไซม์ในรูปที่ไม่ได้จับอยู่กับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจะสามารถเก็บรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ ไม่เกิน 20 วัน ในขณะที่การเก็บในรูปที่เอนไซม์จับอยู่กับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต สามารถเก็บรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้นานกว่า คือ ประมาณ 30 วัน



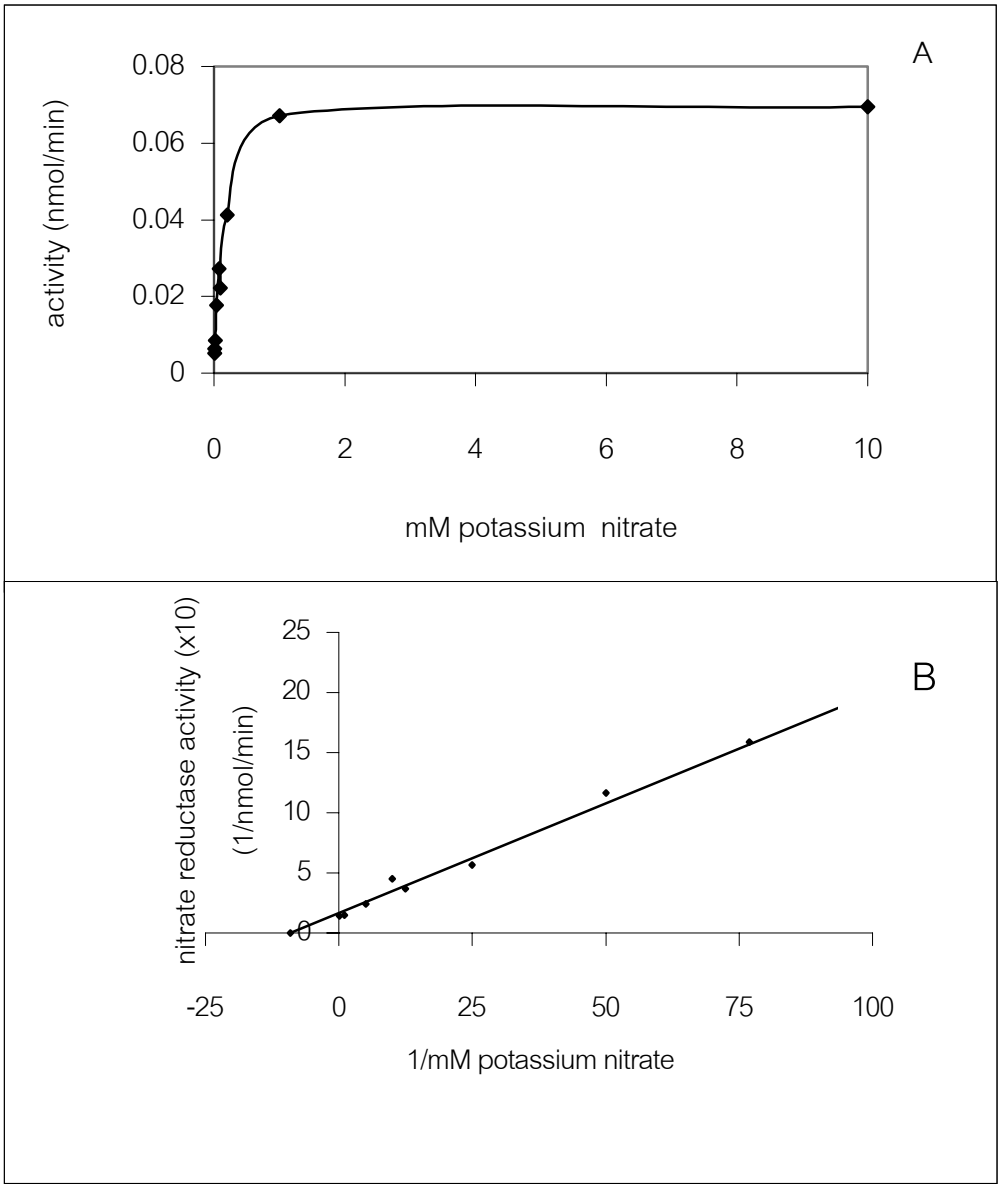

**รูปที่ 26** ค่า specific activity ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว โดยเส้นทึบเป็นการเก็บเอนไซม์ในรูปที่เอาเกลือออกก่อนเก็บบนน้ำแข็ง(▲) , เส้นประแสดงการเก็บเอนไซม์ในรูปที่จับอยู่กับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยเอาเกลือออกก่อนการวัดแต่ละครั้ง(◆)

### 3.6.4 ผลการศึกษาคุณสมบัติ NAD(P)H–bispecificของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

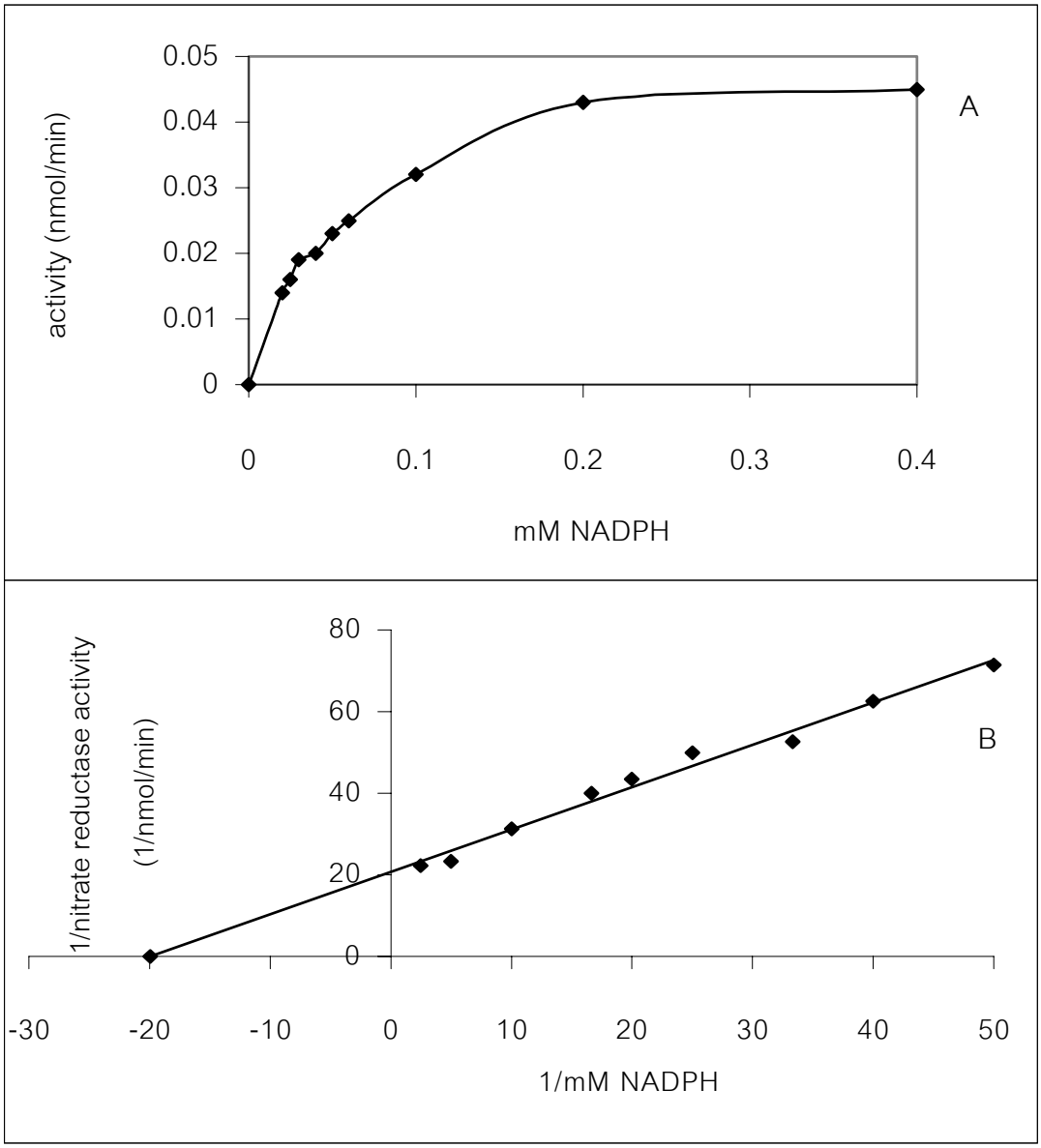
จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในข้าวมีคุณสมบัติเป็น NAD(P)H-bispecific คือสามารถรับอิเล็กตรอนได้ทั้งจาก NADH และ NADPH โดยจากการทดลองเมื่อนำค่าความเข้มข้นของสับสเตรตกับแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ไป plot แบบ Lineweaver-Burk double reciprocal plot เพื่อหาจุดตัดแกน x ซึ่งเป็นจุดเดียวกันกับค่า $-1/K_m$ พบว่า ค่า $-1/K_m$ ของ NADH มีค่า – 54.1 คำนวณค่า $K_m$ ได้ =0.018 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 27), ค่า $-1/K_m$ ของ $KNO_3$ เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนมีค่า –9.15 คำนวณค่า $K_m$ ได้ = 0.109 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 28), ค่า $-1/K_m$ ของ NADPH มีค่า -19.95 คำนวณค่า $K_m$ ได้ = 0.05 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 29) และ ค่า $-1/K_m$ ของ $KNO_3$ เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนมีค่า -0.425 คำนวณค่า $K_m$ ได้ = 2.5 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 30)



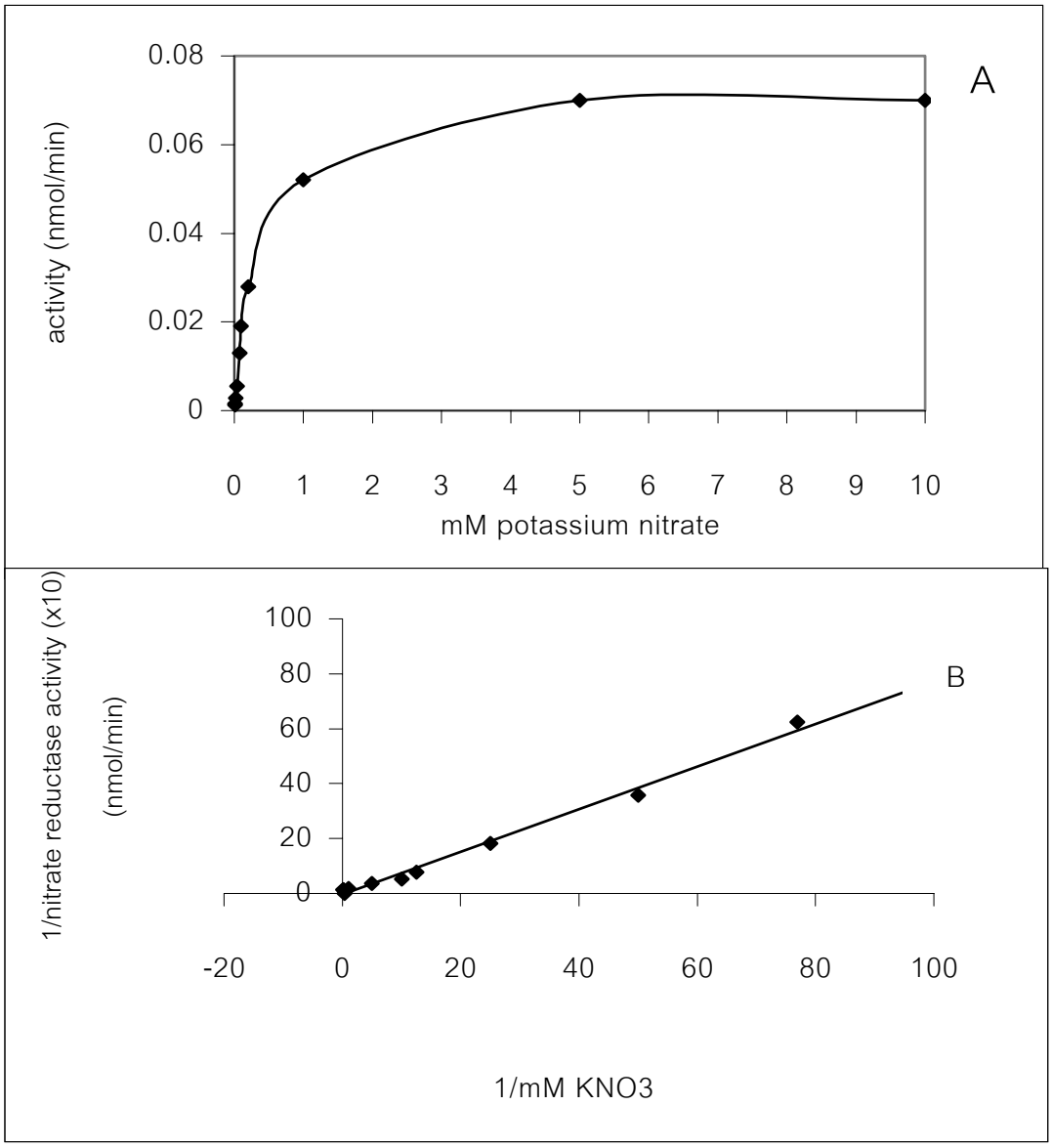

**รูปที่ 27** saturation curve จากการศึกษา $K_m$ ของ NADH ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยาnitratereductionโดยการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 %ของความอิ่ม ตัวโดยการ plot ระหว่าง แอคติวิตีของเอนไซม์กับความเข้มข้นของสับสเตรท (A), Lineweaver-Burk double reciprocal plot (B)




**รูปที่ 28** saturation curve จากการศึกษา $K_m$ ของ $KNO_3$ เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reductionโดยการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสซึ่งได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัวโดยการ plot ระหว่าง แอคติวิตีของเอนไซม์กับความเข้มข้นของสับสเตรท (A), Lineweaver-Burk double reciprocal plot (B)



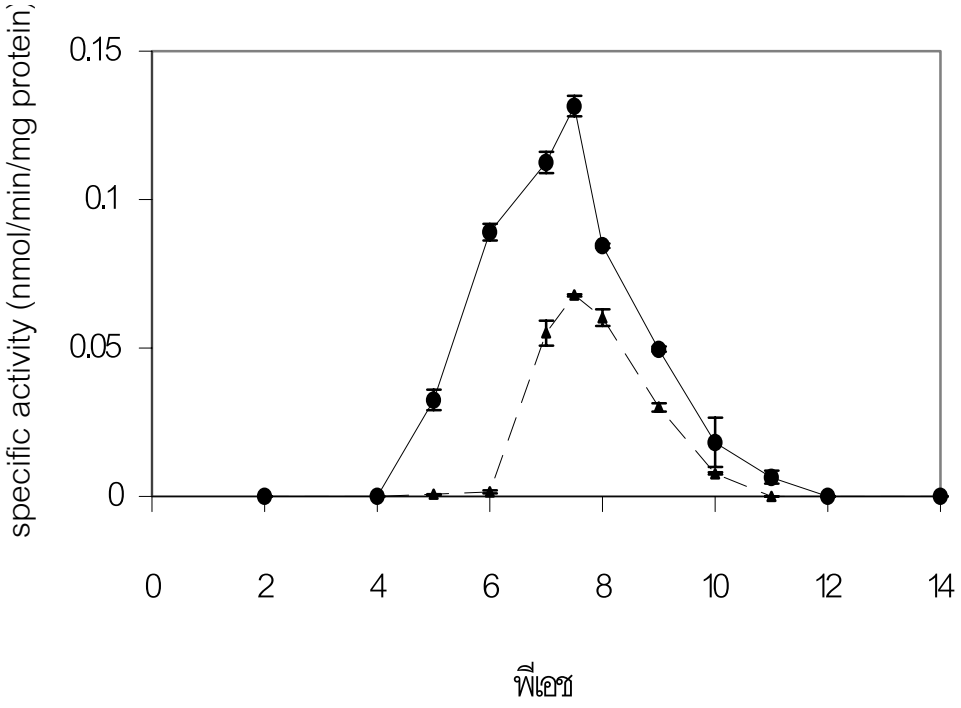

**รูปที่ 29** saturation curve จากการศึกษา $K_m$ ของ NADPH ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reduction โดยการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว โดยการ plot ระหว่าง แอคติวิตีของเอนไซม์กับความเข้มข้นของสับสเตรท (A), Lineweaver-Burk double reciprocal plot (B)




**รูปที่ 30** saturation curve จากการศึกษา $K_m$ ของ $KNO_3$ เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเลคตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reduction โดยการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสซึ่งได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว โดยการ plot ระหว่าง แอคติวิตีของเอนไซม์กับความเข้มข้นของสับสเตรท (A), Lineweaver-Burk double reciprocal plot (B)

### 3.6.5 ผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดัก-เทสใน crude extract และ 20-50% ammonium sulphate precipitate

จากการศึกษาผลของค่า pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส โดยเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ที่ pH 2.0 – 14.0 ทั้งในส่วนของ crude extract และส่วนที่ทำบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว พบว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่มมีค่าสูงสุดที่ pH 7.5 แสดงดังรูปที่ 31

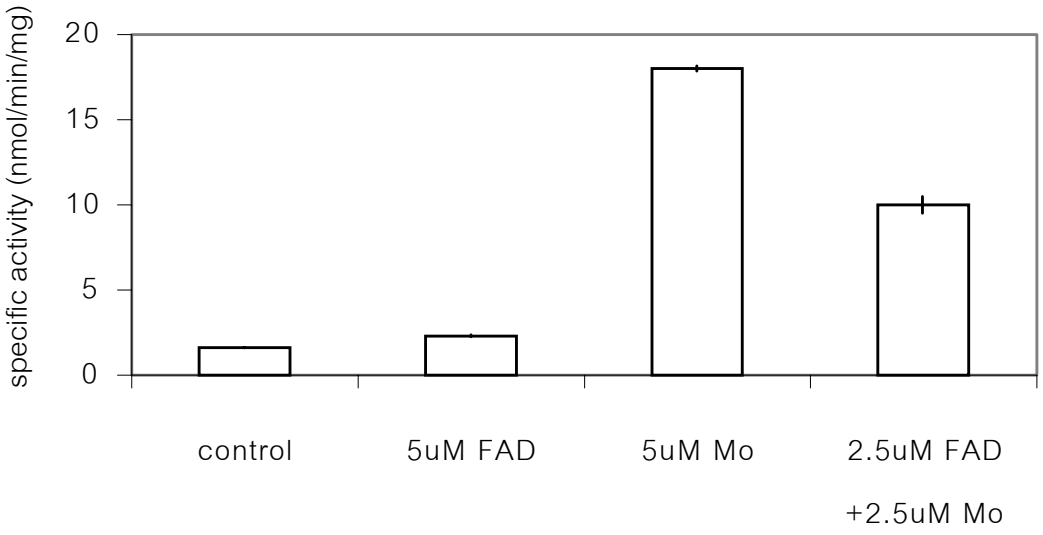



**รูปที่ 31** ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส จากใบข้าวพันธุ์กู้เมืองหลวงในcrude extract (▲) และในส่วนที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว(●) โดยค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย ± SE. จากการวัด 3 ซ้ำ

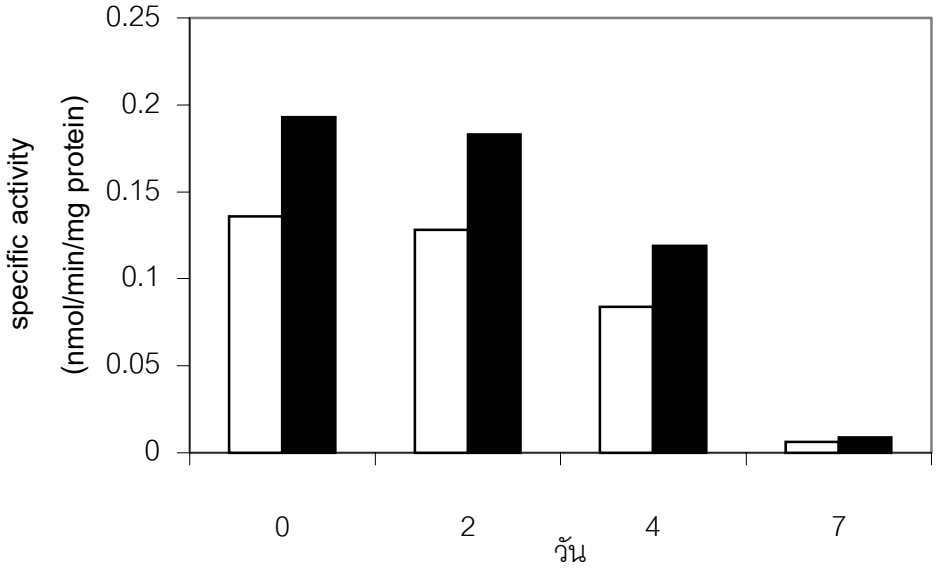
### 3.6.6 ผลของ FAD และ molybdenum ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากการศึกษาพบว่า การเติม FAD หรือ molybdenum หรือการเติม FAD ร่วมกับ Molybdenum มีผลต่อการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสารทั้งสองชนิดนี้ โดยการเติมเฉพาะ 5 ไมโครโมลาร์ FAD จะเปลี่ยนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ประมาณ 1.4 เท่าจากค่าแอคติวิตีในชุดควบคุม ขณะที่การเติมเฉพาะ 5 ไมโครโมลาร์ molybdenum จะช่วยเพิ่มค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ประมาณ 11 เท่าจากชุดควบคุม และเมื่อเติม ทั้ง FAD และ molybdenum ร่วมกันอย่างละ 2.5 ไมโครโมลาร์ พบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นประมาณ 6 เท่าจากชุดควบคุม (รูปที่ 32)

จากผลการทดลองที่พบว่าการเติม FAD ในส่วนผสมที่วัดแอคติวิตี มีผลต่อการเพิ่มค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส จึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมถึงผลของ FAD ต่อการรักษาสภาพของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่สกัดได้ โดยนำเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว ซึ่งเก็บบนน้ำแข็ง และมีค่า specific activity ของเอนไซม์เหลืออยู่ 0.136 nmol/min/mg protein มาทดสอบเปรียบเทียบระหว่างการเติม FAD ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ กับไม่เติม พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มหมดไปในช่วงระยะเวลาเดียวกันคือ ประมาณ 7 วัน แต่ในชุดที่เติม FAD มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์มากกว่าชุดที่ไม่เติม FAD ตลอดระยะเวลาที่เก็บเอนไซม์ (รูปที่ 33)




**รูปที่ 32** ผลของการเติม 5μM FAD, 5μM molybdenum และ 2.5μM FADร่วมกับ 2.5 μM molybdenum ใน assay mixture ต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสโดยค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SE. จากการวัด 3 ซ้ำ




**รูปที่ 33** ผลการเติม FAD ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ (■) และไม่เติม FAD (□) ต่อค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว และเก็บบนน้ำแข็ง ที่เวลาต่างๆ กัน

### 3.6.7 ผลของ $Mg^{2+}$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากการศึกษาพบว่า $Mg^{2+}$ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส โดยแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมีค่าลดลงเมื่อมี $Mg^{2+}$ อยู่ในส่วนประกอบที่ใช้ในการวัดแอคติวิตี ซึ่งจะเห็นว่าการใช้ $Mg^{2+}$ ในระดับความเข้มข้น 10 มิลลิลิโมลาร์มีผลให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** ผลของ $Mg^{2+}$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส โดยค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SE. จากการวัด 3 ซ้ำ

| ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ (mM) | Nitrate reductase specific activity (nmol/min/mg protein) |
|---|---|
| 0 | 0.606 $\pm$ 0.021 |
| 2 | 0.579 $\pm$ 0.025 |
| 4 | 0.524 $\pm$ 0.008 |
| 6 | 0.423 $\pm$ 0.004 |
| 8 | 0.314 $\pm$ 0.004 |
| 10 | 0.283 $\pm$ 0.013 |

### 3.6.8 ผลการศึกษาผลของ sodium azide ($NaN_3$) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันต่อแอคติวิตี ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

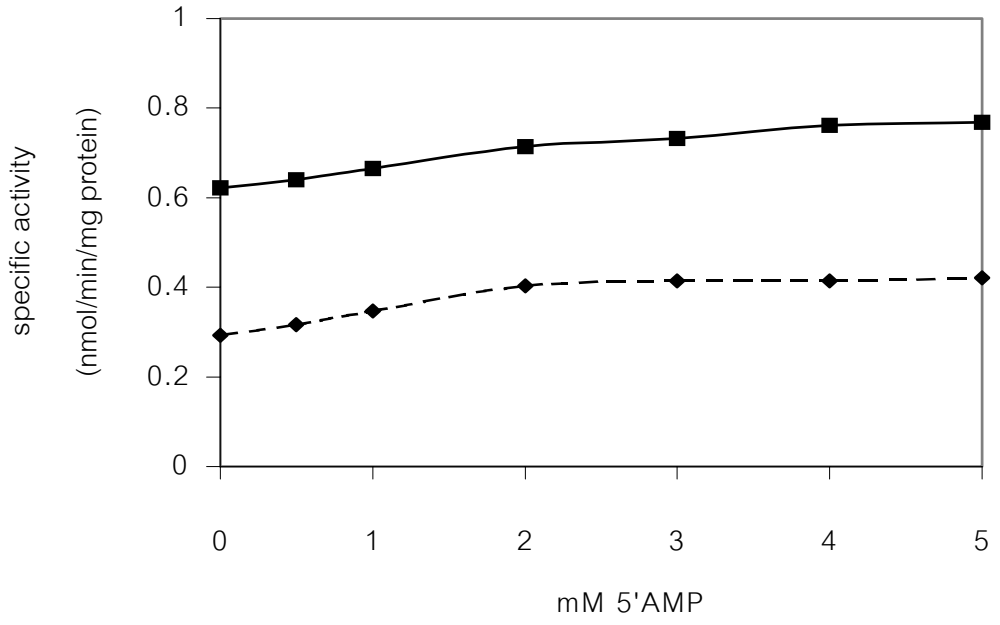
จากการศึกษาพบว่า $NaN_3$ มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสแม้จะใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ คือ ระดับไมโครโมลาร์ โดยจากตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจะลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อมี $NaN_3$ ความเข้มข้นเพียง 50 ไมโครโมลาร์ และค่าแอคติวิตีจะหมดไปเมื่อมี $NaN_3$ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์อยู่ในส่วนประกอบที่ใช้วัดแอคติวิตี

**ตารางที่ 5** ผลของ sodium azide ($NaN_3$) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสโดยค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SE. จากการวัด 3 ซ้ำ

| ความเข้มข้นของ $NaN_3$ (μM) | Nitrate reductase specific activity (nmol/min/mg protein) |
|---|---|
| 0 | 0.516 $\pm$ 0.002 |
| 50 | 0.205 $\pm$ 0.004 |
| 100 | 0.052 $\pm$ 0.001 |
| 150 | 0.020 $\pm$ 0.002 |
| 200 | 0.000 $\pm$ 0.000 |

### 3.6.9 ผลการศึกษาผลของ 5′ AMP ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

จากการศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ 5'AMP 0 – 2 มิลลิโมลาร์มีผลในการกระตุ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสให้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยทั้งในกลุ่มที่มี $Mg^{2+}$ ซึ่งเป็นกลุ่มที่เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานไปบางส่วน และกลุ่มที่ไม่มี $Mg^{2+}$ซึ่งเป็นกลุ่มที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ตามปกติ จากนั้นเมื่อความเข้มข้นของ 5'AMP เพิ่มมากขึ้นพบว่าค่าแอคติวิตีของทั้งสองกลุ่มมีค่าค่อนข้างคงที่โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ 5'AMP




**รูปที่ 34** ผลของ 5'AMP ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส เมื่อมี 10 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ (◆) และไม่มี $MgCl_2$ (■)ในส่วนผสมของแต่ละ assay