# 1. บทนำ

## บทนำต้นเรื่อง

ข้าวไร่ (upland rice หรือ dryland rice) เป็นพืชที่มีการปลูกอยู่ทั่วไป คิดเป็นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ของข้าวปลูกทั้งหมดในโลก ในประเทศแถบอเมริกาใต้, อเมริกากลาง และอาฟริกา มีการปลูกข้าวไร่กันถึง 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด ข้าวไร่จึงนับเป็นพืชที่สำคัญที่สุดที่ปลูกในประเทศแถบละตินอเมริกา ในเอเซียมีการปลูกข้าวไร่ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด และได้รับผลผลิตเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตข้าวรวม สำหรับข้าวไร่ในประเทศไทย พบว่ามีการปลูกอย่างแพร่หลายทั่วประเทศ โดยปลูกบนพื้นที่ราบหรือที่ลาดเช่นเดียวกับการปลูกพืชไร่อื่นๆ ในภาคใต้เกษตรกรนิยมปลูกข้าวไร่ เป็นพืชแซมระหว่างแถวยางพาราในช่วงที่ยางมีอายุ 1-3 ปี (ฉกรรจ์ แสงรักษาวงศ์, 2528 อ้างโดย ยุทธนา พงศ์พิริยะเดชะ, 2532) ข้อดีของการปลูกข้าวไร่มีหลายประการ เช่น ไม่ต้องทำคันนากักน้ำ อาศัยน้ำฝนอย่างเดียวเหมือนพืชไร่อื่นๆ ทนแล้งได้ดีพอสมควร สามารถปลูกเป็นพืชหมุนเวียนสลับกับพืชชนิดอื่นได้ ไม่มีปัญหาด้านการตลาด และ มีโปรตีนสูงกว่าข้าวนาดำ (ชัยฤกษ์ มณีพงษ์, 2524)

โดยทั่วไปข้าวไร่จะให้ผลผลิตต่ำ อันเนื่องจาก ส่วนใหญ่เป็นการปลูกโดยเกษตรกรรายย่อยเพื่อใช้บริโภค และเป็นการปลูกโดยใช้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้กันมาเป็นเวลานาน มีการกำจัดวัชพืชและกำจัดโรคพืชไม่มากนัก รวมทั้งเกษตรกรปลูกข้าวไร่ในลักษณะของการปลูกเป็นพืชแซม ร่วมกับ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง ยางพารา เป็นต้น เพื่อจะได้ไม่เสี่ยงต่อการปลูกข้าวไร่เพียงอย่างเดียว การกระทำดังกล่าวมีผลให้การปลูกข้าวไร่ได้ผลผลิตน้อย ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพในการผลิตข้าวไร่ให้สูงขึ้น จึงจำเป็นที่จะต้องมีการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่ ตลอดจนการให้ปุ๋ยที่เหมาะสมกับต้นข้าวในระบบปลูก ก็จะช่วยแก้ปัญหาทางด้านเศรษฐกิจ และสังคมของเกษตรกรด้วย

สำหรับในพื้นที่ภาคใต้นั้น พันธุ์ข้าวที่ทางกรมวิชาการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรปลูกคือ พันธุ์กู้เมืองหลวง และดอกพยอม (ชาญ มงคล, 2536) ซึ่งข้าวทั้งสองพันธุ์นี้ เป็นพันธุ์พื้นเมืองของภาคใต้ ที่มีความสามารถในการปรับตัวได้ดีทั้งในสภาพที่มีความอุดม

สมบูรณ์ของดินสูง และสภาพที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินต่ำ (ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, 2528) อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ได้โดยเฉลี่ยยังค่อนข้างต่ำ ซึ่งอาจเป็นผลจากข้อจำกัดที่เกี่ยวกับการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยซึ่งนับว่ามีการศึกษากันน้อยในพื้นที่ปลูกภาคใต้ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ De Datta (1981) ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน และระยะเวลาที่เหมาะสมจะทำให้ผลผลิตข้าวไร่ได้สูงสุด

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณสูง เพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิดอกออกผล พืชได้รับไนโตรเจนจากดินในรูปที่ละลายช้า เช่นแอมโมเนียมไอออน (ammonium ion, $NH_4^+$) ไนเทรต ไอออน (nitrate ion, $NO_3^-$) หรือสารประกอบอินทรีย์ เช่น ยูเรีย หลังจากนั้นจะเปลี่ยนสารเหล่านี้ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน,กรดนิวคลีอิก และสารอื่นๆ ต่อไป

ในนาข้าวซึ่งมีน้ำขัง ปุ๋ยไนโตรเจนที่ได้รับการแนะนำให้ใช้เป็นปุ๋ยนา อาจอยู่ในรูปของปุ๋ยเดี่ยว เช่น ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต (20 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน) ปุ๋ยแอมโมเนียมคลอไรด์ (25 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน) และปุ๋ยยูเรีย (45 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน) หรือปุ๋ยรวม เช่น ปุ๋ยสูตร 16-20-0, 18-22-0, 20-20-0 และ 16-16-8 (ประพาส วีระแพทย์, 2531) สำหรับปุ๋ยไนโตรเจนในรูปไนเทรต ไม่แนะนำให้ใช้เป็นปุ๋ยนาเพราะ ในภาวะที่มีน้ำขัง ชั้นดินที่มีรากข้าวอยู่จะไม่มีออกซิเจน ซึ่งสภาวะดังกล่าว ไนโตรเจนในรูปไนเทรตจะกลายเป็นก๊าซไนโตรเจนโดยกระบวนการ denitrification โดยจุลินทรีย์บางชนิด และจะสูญหายไปในอากาศ (สรสิทธิ์, 2517 อ้างโดย ชาญ มงคล, 2536)นอกจากนี้ ไนเทรตยังเป็นอนุมูลประจุลบจึงไม่ยึดเกาะกับอนุภาคของดินซึ่งเป็นประจุลบเช่นกัน ดังนั้น จึงถูกชะล้างไปกับน้ำได้ง่าย (ชาญ มงคล, 2536) อย่างไรก็ตามการให้ปุ๋ยในระยะที่ต้นข้าวโตพอสมควรแล้วจะสามารถใช้ได้ทั้งรูปของไนเทรต และแอมโมเนียม (De Datta, 1981) อย่างไรก็ตาม ในทางเกษตรกรรม ได้มีการพัฒนาการใช้ปุ๋ยไนเทรตเพื่อเพิ่มผลผลิตในกลุ่มของพืชไร่

เนื่องจาก ไนเทรตในรูปสารละลาย สามารถถูกชะล้างจากดินไปสะสมที่น้ำผิวดิน ซึ่งมีผลต่อสุขภาพของมนุษย์เนื่องจากไนเทรตจะถูกรีดิวซ์โดยแบคทีเรีย ไปเป็น nitrous oxide และสารพิษชนิดอื่นๆ โดยจะเกิดขึ้นผ่านกระบวนการ denitrification ในดิน เป็นเหตุให้เกิด greenhouse gas (Campbell and Kinghorn, 1990) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า nitrate assimilation pathway มีความสำคัญทั้งทางด้านเศรษฐศาสตร์ นิเวศน์วิทยา เกษตร

กรรม และทางการแพทย์ จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวกับ nitrate assimilation กันมาก เพื่อปรับปรุงปริมาณผลผลิตโดยใช้กระบวนการที่จะลดราคาทุนของเกษตรกร และเอาชนะผลลบทางนิเวศน์วิทยาที่เป็นผลจากปุ๋ยไนเทรต

เมื่อพืชได้รับไนโตรเจนจากดินในรูปไนเทรต พืชจะเปลี่ยนให้เป็นแอมโมเนียซึ่งเป็นรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ต่างๆได้ต่อไป กระบวนการเปลี่ยนไนเทรตเป็นแอมโมเนีย เป็นปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน โดยมีเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (nitrate reductase, NR) และเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทส (nitrite reductase, NiR) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งมีไนไทรต์ (nitrite, $NO_2^-$)เป็นตัวกลาง การเปลี่ยนไนเทรตเป็นไนไทรต์โดยการเร่งของ NR เป็นจุดแรกและเป็นขั้นตอนที่ควบคุมปฏิกิริยา และเนื่องจากไนเทรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญสำหรับธัญพืช ดังนั้นการเข้าใจกลไกการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในพืชชั้นสูงจึงมีความสำคัญต่อทางเศรษฐกิจมาก

ความรู้ทางด้านชีวเคมี และสรีระวิทยาของพืช สามารถนำมาใช้เป็นตัวโยงศักยภาพในการสร้างผลผลิตต่างๆ ภายในต้นพืชไปยังศักยภาพในการสร้างอาหาร การเจริญเติบโต และการพัฒนาของพืช กล่าวคือ การที่พืชมีศักยภาพในการผลิตสูง และปัจจัยแวดล้อมไม่ถูกจำกัด พืชจะสามารถสร้างอาหารได้สูงด้วย ซึ่งศักยภาพในการสร้างอาหารของพืช จะขึ้นกับความว่องไว (activity) และความไว (sensitivity) ต่อสิ่งแวดล้อมของเอนไซม์ในวิถีหรือกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โมเลกุลชนิดต่างๆ ดังนั้นถ้าทราบปัจจัยที่เหมาะสมในการสร้างผลผลิตในต้นพืชเช่น เอนไซม์บางชนิด ก็จะสามารถปรับปรุงและส่งเสริมการแสดงออกของเอนไซม์และนำไปสู่การพัฒนาในส่วนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องอันเป็นกระบวนการต่อเนื่องกับเอนไซม์นี้ได้ต่อไป

กระบวนการนำไนเทรตไปใช้ในต้นพืช มีเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไนเทรตเป็นไนไทรต์ การทำงานของเอนไซม์ไนเทรต รีดักเทสในธรรมชาติมีความสัมพันธ์กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปริมาณไนเทรต ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ ความเข้มแสง ช่วงเวลาของการได้รับแสง ความเค็มของดิน ฯลฯ ผลผลิตสุดท้ายจากกระบวนการนำไนเทรตมาใช้ในพืช คือ แอมโมเนียมไอออน ซึ่งจะถูกใช้ไปในกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์พืชต่อไปเช่น การสร้างกรดอะมิโน โดยผ่านทาง glutamine synthetase - glutamate synthase cycle (GOGAT- cycle)

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ข้าวไร่จึงเป็นพืชที่มีโอกาสปรับปรุงและพัฒนาผลผลิตให้ดีขึ้นได้ ซึ่งจะมีผลต่อเกษตรกรในแง่เศรษฐกิจได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มผลผลิตในข้าวไร่ยังมีน้อย โดยการศึกษาที่ผ่านมาจะมุ่งประเด็นไปยังการใช้ปริมาณปุ๋ยหรือวิธีการใส่ปุ๋ย มากกว่าที่จะศึกษาลงไปถึงระบบการควบคุมการเจริญเติบโต และการใช้อาหารในต้นข้าวไร่

ผู้วิจัยได้เล็งเห็นว่าการทำความเข้าใจถึงระบบที่เกี่ยวข้องกับการเจริญในต้นพืช อาจเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาผลผลิตได้ ดังนั้นการศึกษาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของต้นข้าวไร่ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำมาซึ่งวิธีการปรับปรุงและพัฒนาผลผลิตของข้าวไร่ได้ต่อไป งานวิจัยนี้จึงได้ ศึกษาถึงรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส รวมไปถึงผลของแสง และแร่ธาตุต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในข้าวไร่พันธุ์ต่างๆ ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่สกัดจากต้นข้าวไร่

## การตรวจเอกสาร

### 1.1 ไนเทรตรีดักเทส (nitrate reductase)

#### 1.1.1 ประวัติการค้นพบเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี 1953 โดยพบเอนไซม์ชนิดนี้ในรากและใบของพืชชั้นสูง และได้มีการทดลองสกัดเอนไซม์จากใบถั่วเหลืองเพื่อทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติ ซึ่งต่อมาในปี 1969 มีการเสนอว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสนี้ เป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการใช้ไนเทรต (nitrate assimilation) นอกจากนี้ยังอาจเป็นตัวที่ควบคุมความเร็วของปฏิกิริยาอีกด้วย และหลังจากนั้นในปี 1976 มีการรายงานการค้นพบคุณสมบัติ NAD(P)H-bispecific ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในต้นข้าว นั่นคือ พบว่าเอนไซม์สามารถรับอิเล็กตรอนได้ทั้งจาก NADH และ NADPH เพื่อใช้ในการรีดิวซ์ไนเทรตให้เป็นไนไทรต์ และในช่วงเวลาสองปีต่อมาได้มีรายงานการพบคุณสมบัติ NAD(P)H-bispecific ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในข้าวโพด หลังจากนั้นในปี 1979 มีการรายงานว่าส่วนใบของพืชชั้นสูง เป็นตำแหน่งหลักในการเกิด nitrate assimlation และในปี 1980 ก็พบว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในถั่วเหลืองก็มีคุณสมบัติ NAD(P)H–bispecific เช่นกัน หลังจากนั้นในปี 1983 ได้มีรายงาน

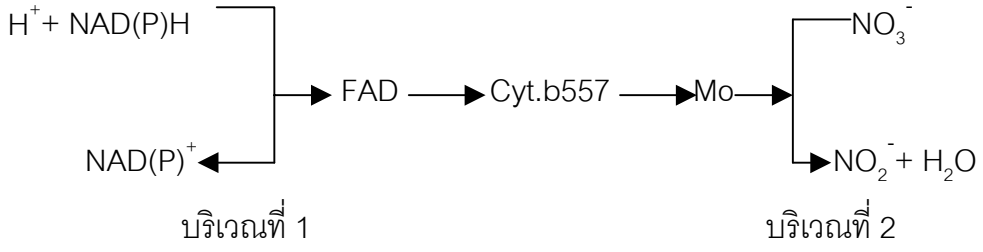
เกี่ยวกับผลของสิ่งแวดล้อมต่อการรีดิวซ์ไนเทรต, การรีดิวซ์ไนไทรต์ และกระบวนการเปลี่ยนแอมโมเนียมไปเป็นกลูตาเมต จำเป็นต้องมีกระบวนการสังเคราะห์แสงร่วมด้วย นอกจากนี้ในปัจจัยภายในต้นพืชก็ได้มีการศึกษา โดยในปี 1985 มีการรายงานว่ารากมีส่วนเสริมความสามารถรวมของพืชในการรีดิวซ์ไนเทรตในพืชบางชนิด (Wray and Fido, 1990)

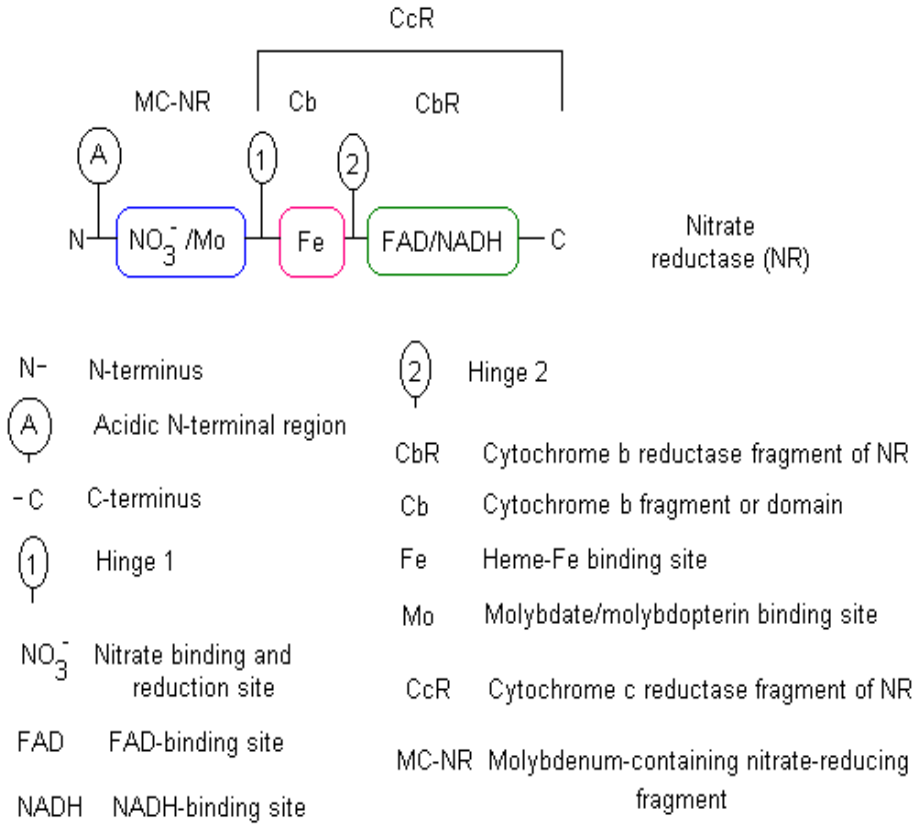
จากการศึกษาโดยนักวิทยาศาสตร์กลุ่มต่างๆ จากอดีตมาจนถึงปัจจุบัน ความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสได้ก้าวหน้ามากขึ้น โดยครอบคลุมในสิ่งมีชีวิตหลายๆชนิด ได้แก่ ในพืชชั้นสูง สาหร่าย แบคทีเรีย และ รา

### 1.1.2 โครงสร้างของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส เป็น soluble enzyme พบในส่วนไซโทซอล โครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อยสองหน่วยที่เหมือนกัน จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ประกอบด้วย 900 residuesซึ่งแต่ละหน่วยย่อยมีขนาดประมาณ 100 กิโลดาลตันประกอบด้วย FAD domain, heme(cyt.b557) domain และ molybdenum domain (Mo-pterin) ในอัตราส่วน 1:1:1 ดังรูปที่ 1 (Redinbaugh and Campbell, 1985 และ Campbell, 2001) ซึ่ง Campbell (1996) ได้จำแนกเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเป็นสองส่วนตามตำแหน่งที่เร่งปฏิกิริยา ดังนี้

1. บริเวณที่มีการถ่ายอิเล็กตรอนจาก NADH ไปยัง FAD เพื่อเริ่มต้นในการส่งอิเล็กตรอนผ่าน heme-Fe ไปยัง Mo/Mo-pterin
2. บริเวณที่ไนเทรตถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไทรต์






**รูปที่ 1** แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (Campbell, 1996)

### 1.1.3 หน้าที่ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิต

ไนเทรตรีดักเทสเป็น soluble และ multi center redox enzyme ซึ่งทำหน้าที่เร่งการรีดิวซ์ด้วย 2 อิเล็กตรอนเพื่อเปลี่ยนไนเทรต ไปเป็นไนไทรต์ โดยใช้ pyridine nucleotide เป็นตัวให้อิเล็กตรอน สำหรับหน้าที่ทางสรีระวิทยาของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส คือการเร่งปฏิกิริยาการรีดิวซ์ไนเทรต ซึ่งเป็นกลไกในการใช้ไนโตรเจนในพืชชั้นสูง รา และ สาหร่าย นอกจากการทำหน้าที่ดังกล่าวแล้ว เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในธรรมชาติยังสามารถทำงานเกี่ยวกับการรีดิวซ์เหล็กได้โดยการเร่งปฏิกิริยา NADH ferric:citrate reduction เช่นเดียวกับเอนไซม์อีกหลายตัวที่สามารถเร่งปฏิกิริยานี้ได้ในพืช นอกจากนี้ ในธรรมชาติยังมีปฏิกิริยาอื่นที่เร่งโดยไนเทรตรีดักเทสเพียงอย่างเดียว โดยใช้ สารตั้งต้นต่างๆกัน เช่น chlorate, bromate และ iodate ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น chlorite, bromite และ iodide สำหรับ กรณีของ chlorate ซึ่งปกติจะใช้ในการกำจัดวัชพืช หากไม่มีไนเทรตรีดักเทส หรือ nitrate transport system ก็จะทำให้พืชตายได้ หรือ การรีดิวซ์ของ iodate โดยไนเทรตรีดักเทสในพวกสาหร่าย ก็เป็นกลไกในการรักษาสมดุลย์ของ iodate-iodide ในน้ำทะเล นอกจากนี้ยังเคยพบว่าไนเทรตรีดักเทสในถั่วเหลืองสามารถทำงานได้ที่พีเอช 6.5 โดยไม่ปรากฏว่ามีไนเทรต (Campbell, 1999) และจากการศึกษาพบว่าไนเทรตรีดักเทสยังสามารถทำหน้าที่ในการเร่งการ reduction ของไนไทรต์ ได้เป็น nitric oxide แต่กระบวนการที่เกิดขึ้นยังไม่ได้รับการศึกษาถึงรายละเอียดขั้นตอนที่เกิดขึ้น รวมทั้งประโยชน์ที่มีต่อพืช (Yamasaki and Sakihama, 2000 )

### 1.1.4 การทำงานของเอนไซม์

Campbell (1999) ได้จำแนกรูปแบบการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสโดยพิจารณาจากลักษณะการรับอิเล็กตรอนจาก NADH หรือ NADPH หรือการมีคุณสมบัติ NAD(P)H bispecific โดยแบ่งเป็น 3 รูปแบบ คือ

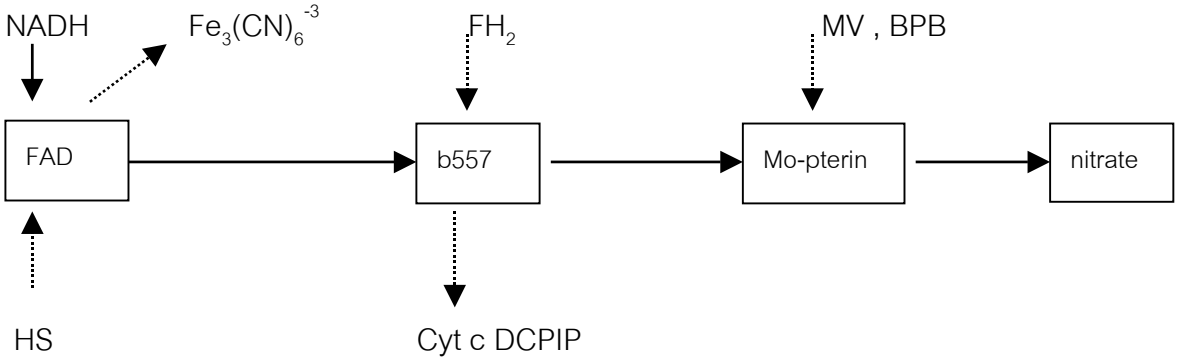
1. NADH-NR เป็นรูปแบบทั่วไปพบในพืชชั้นสูง และสาหร่าย
2. NAD(P)H-NR พบในพืชบางชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าว และข้าวบาร์เล่ย์
3. NADPH-NR พบในรา

นอกจากการจำแนกรูปแบบการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสตามแบบดังกล่าวแล้ว ไนเทรตรีดักเทส ยังเป็นเอนไซม์ที่มีการทำงานได้เป็นส่วนย่อยโดยเรียกว่า partial

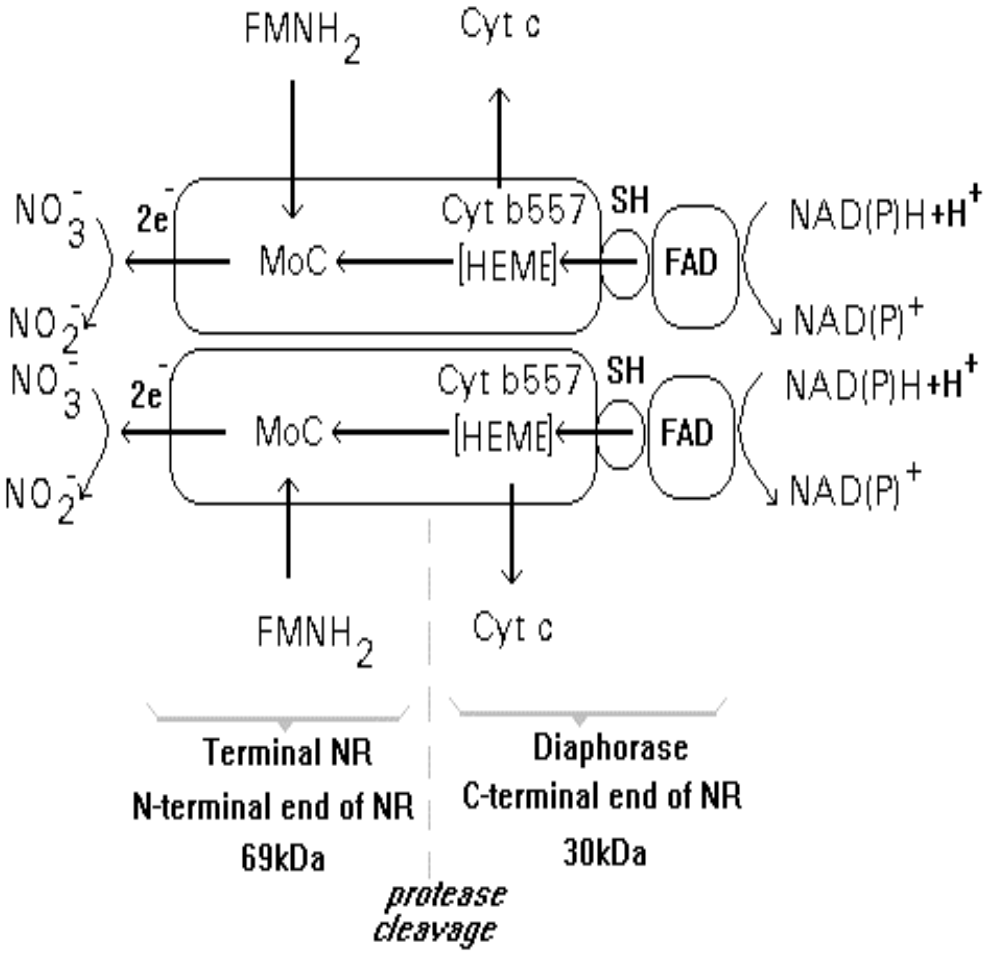
activity (Kramer *et al*., 1987) ซึ่ง เมื่อพิจารณาจากตำแหน่งการเร่งที่จำเพาะเฉพาะบางส่วนบนโมเลกุลของเอนไซม์แล้ว สามารถแบ่งได้ เป็น 2 กลุ่มกว้างๆ (รูปที่ 2)คือ

1. NADH dehydrogenase ซึ่งจะเกิดรีดักชันของ ferricyanide จากการทำงานของเอนไซม์ NADH: ferricyanide reductase หรือ รีดักชัน ของ cytochrome c จากการทำงานของเอนไซม์ NADH: cytochrome c reductase หรือรีดักชันของ dichlorophenol indophenol จากการทำงานของเอนไซม์ NADH: dichlorophenol indophenol reductase

2. activity ที่เกิดจากมีการให้อิเล็กตรอน จาก $FADH_2$ หรือ $FMNH_2$: nitrate reductase โดยผ่าน heme redox center หรือโดยการให้อิเล็กตรอนจาก dithionite reduced methyl viologen (MV: nitrate reductase) หรือ bromophenol blue (BPB: nitrate reductase โดยผ่าน molybdenum redox center)




**รูปที่ 2** แสดง partial activity ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (Kramer *et al*.,1987)




**รูปที่ 3** แสดงโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในพืชชั้นสูง (Kleinhofs *et al*., 1989)

### 1.1.5 วิธีการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส และกลไกการเกิดปฏิกิริยา

วิธีการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมีหลายวิธีด้วยกันได้แก่

#### 1.1.5.1 การใช้ NAD(P)H เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

จากปฏิกิริยา $NO_3^- + NAD(P)H \xrightarrow{NR} NO_2^- + OH^- + NAD^+$

หลักการ : 1. วัดปริมาณ ไนไทรต์ ($NO_2^-$) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส เทียบกับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา โดยการทำให้ไนไทรต์เปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยากับ *N*-(1-napthyl) ethylenediamide dihydrochloride ในสภาวะที่เป็นกรด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (Nakamura and Ikawa,1993, Feil *et al*., 1993, Ramalho *et al*., 1995 และ Larios *et al*., 2001)

2. วัดอัตราการลดลงของสารตั้งต้น ได้แก่ NAD(P)H โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ NAD(P)H ที่ 340 นาโนเมตรเทียบกับเวลา (Lillo *et al*., 1997)

#### 1.1.5.2 การใช้ methyl viologen เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

หลักการ : reduced methyl viologen จะถูกออกซิไดส์ได้โดย molybdenum domain ซึ่งเป็น domain ส่วนสุดท้ายของโมเลกุลเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส จากนั้นอิเล็กตรอนจะถูกส่งต่อไปใช้ในการรีดิวซ์ไนเทรต ไปเป็นไนไทรต์ได้ การวัดปฏิกิริยาทำได้โดยการวัดปริมาณไนไทรต์ที่เกิดขึ้นจากการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับเวลา (Coombs and Hall, 1982 และ Antipov *et al*., 2000)

1.1.6 การแพร่กระจายของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิต

**ได้มีการศึกษาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในสิ่งมีชีวิตหลายพวก ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้**

#### *1.1.6.1 ไนเทรตรีดักเทสในพวกยูคาริโอต*

<u>ขนาดโมเลกุล</u> 200-300 กิโลดาลตัน

<u>องค์ประกอบในโมเลกุล</u> - flavin (FAD)

- heme (cytochrome b557)
- molybdenum-pterin

ตำแหน่งในเซลล์ ในพวก eukaryotic algae และ เนื้อเยื่อของพืชชั้นสูงที่สังเคราะห์แสง จะพบเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในส่วนไซโทซอล หรือติดอยู่กับด้านนอกของคลอโรพลาสต์ และจะได้รับอิเล็กตรอนจากการสังเคราะห์แสงหรือ การสลายคาร์โบไฮเดรต

***1.1.6.2 ไนเทรตรีดักเทสในพวกโปรคาริโอต***

ขนาดโมเลกุล 75,000 ดาลตัน

องค์ประกอบในโมเลกุล - molybdenum ไม่มี FAD หรือ heme

ตำแหน่งในเซลล์ จับอยู่ที่ thylakoids และใช้ FADH จากการสังเคราะห์แสง แต่ไม่ใช้ NAD(P)H เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

1.1.7 การทำบริสุทธิ์

Solomonson (1975) ได้สกัดแยกเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสให้บริสุทธิ์จากสาหร่ายสีเขียว (*Chlorella vulgaris*) พบว่า ตำแหน่งที่จับกับ NADH ของเอนไซม์มีความจำเพาะในการชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ชนิด affinity–medium ได้แก่ Blue Dextran-Sepharose โดยใช้ NADH ในระดับความเข้มข้นเป็นไมโครโมลาร์ อย่างไรก็ตามพบว่าในพืชชั้นสูง เอนไซม์นี้มีความจำเพาะในการจับกับตัวกลางดังกล่าวได้น้อย และในช่วงเวลาใกล้กัน Campbell (1976) พบว่าการชะเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ที่สกัดจากพืชชั้นสูง จำเป็นต้องใช้เกลือความเข้มข้นสูงช่วยในการชะด้วย ต่อมาได้มีการพัฒนา affinity–medium มาเป็น Blue Sepharose ซึ่งมีความสามารถในการจับกับเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสได้สูงขึ้น และได้ใช้ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์นี้จากพืชชั้นสูงหลายๆชนิด เช่น ถั่วเหลือง (Jolly *et al.*, 1976 และ Campbell *et al.*, 1987 ) ข้าวบาร์เล่ย์ (Campbell and Wray, 1983) และในผักโขม (Jawali and Sane, 1984)

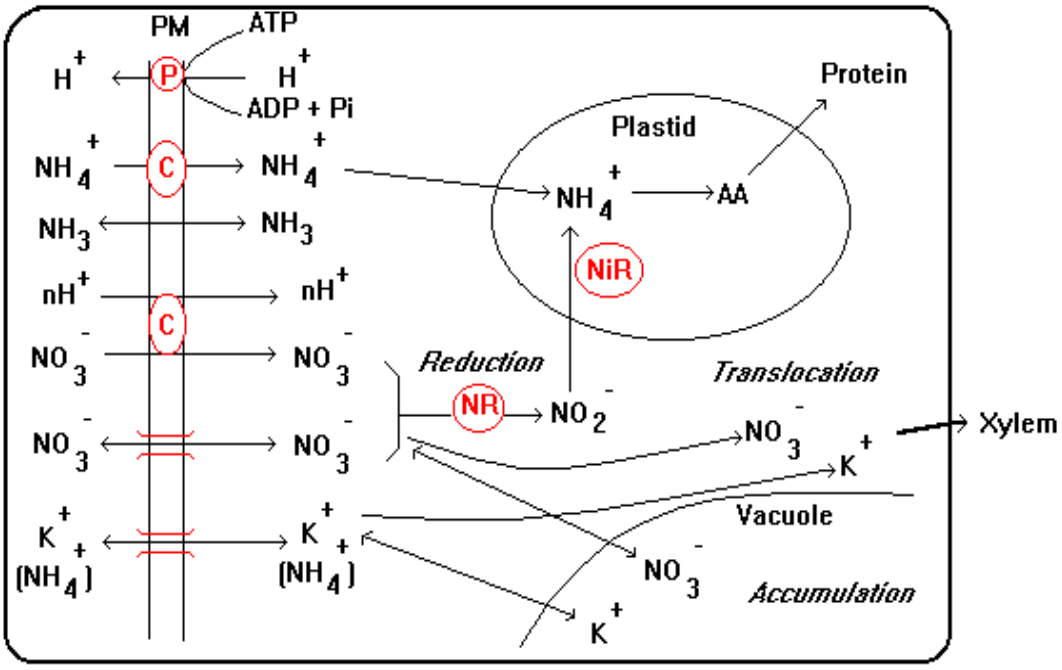
สำหรับตัวกลางชนิดอื่นที่ได้เคยทดลองใช้ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ได้แก่ hydroxyapatite butyl, Toyopearl 650-M, NADH-Sepharose, zinc chelate AMP-Sepharose (Wray and Fido, 1990) และ (Redinbaugh and Campbell, 1983)

Kramer *et al*. (1987) รายงานว่า การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในพืชชั้นสูงจะพบว่ามีการสูญหายขององค์ประกอบพวก FAD และ molybdenum ระหว่างขั้นตอนการสกัด และทำบริสุทธิ์ และปริมาณเอนไซม์ที่ได้จะต่ำ (น้อยกว่า 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสดของพืชหนึ่งกิโลกรัม)

1.2 ไนเทรตรีดักเทสในพืช

### *1.2.1 การนำไนเทรตเข้าสู่พืช*

ไนเทรตในดินจะถูกนำผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์รากพืชโดยอาศัยความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งมีค่าประมาณ 100-250 มิลลิโวลต์ หรืออาศัยความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของเกลือภายในและภายนอกเซลล์ราก นอกจากนี้ยังสามารถอาศัยโปรตีนขนส่ง (carrier protein) เป็นตัวนำเข้าสู่รากพืช หลังจากนั้นไนเทรตบางส่วนอาจถูกเก็บไว้ในแวคิวโอล อยู่เป็นอิสระในไซโทซอล ถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไทรต์ในบริเวณราก หรือถูกส่งไปยังส่วนลำต้นโดยผ่านทางท่อลำเลียงน้ำ (Crawford, 1995)




**Scheme of proposed transport mechanisms for nitrate (nitrite) and ammonium at the plasmalemma of a plant cell. PM = plasma membrane (plasmalemma); Ⓟ = proton pump ($H^+$ATPase) acting mainly in charge balance; Ⓒ = carrier protein; ≡ = channels, serving for pH and charge balance.**

**รูปที่** 4 แสดงกลไกการขนส่งไนเทรตและแอมโมเนียมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์รากพืช (Crawford, 1995)

### *1.2.2 การขนส่งไนเทรตในพืช*

*จากการศึกษาโดย Crispeels* et al. *(1999) Forde (2000)และ Glass* et al. *(2001) ได้รายงานถึงระบบการขนส่งไนเทรตในรากพืชประกอบด้วย 3 ระบบ คือ*

ระบบที่ 1 inducible high-affinity transport system (iHATS)

ระบบนี้จะทำงานเมื่อได้รับการชักนำจากไนเทรต หรือไนไทรต์ภายนอกลำต้น และจะถูกควบคุมโดยระดับไนเทรตในเนื้อเยื่อ หรือผลผลิตที่ได้จากกระบวนการใช้ไนเทรตในพืช

ระบบที่ 2 constitutively high-affinity transport system (cHATS)

ระบบนี้จะทำงานได้เอง แม้ว่าจะไม่มีไนเทรตจากภายนอกมากระตุ้นและมีความจำเพาะต่อไนเทรตสูง นอกจากนี้ในพืชบางชนิดพบว่าแอคติวิตียังสามารถกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้หลายเท่าเมื่อได้รับไนเทรต

ระบบที่3 low-affinity transport system (LATS)

ระบบนี้จะทำงานได้เอง แต่ต้องมีระดับไนเทรตภายนอกเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิโมลาร์

ในธรรมชาติการนำไนเทรตเข้ามาใช้ในเซลล์พืชจะต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของระบบการขนส่งไนเทรตทั้ง 3 ระบบ โดยจะพบว่า iHATS และ LATS ในพืชบางชนิดจะมีการควบคุมแบบ negative feedback regulation อย่างไรก็ตามแม้ว่าความสามารถในการดูดซึมและขนส่งไนเทรตในต้นจะมีความแตกต่างกันตามแต่ชนิดพืช แต่การศึกษาพืชสายพันธุ์ที่สามารถดูดซึมไนเทรตได้ดี ก็จะเป็นทางเลือกในการให้ปุ๋ยไนเทรตแก่สายพันธุ์นั้นซึ่งจะช่วยเพิ่มความประสิทธิภาพในการใช้ไนโตรเจนได้อีกทางหนึ่ง (Hirel *et al.,* 2001)

### *1.2.3 ขั้นตอนการใช้ไนเทรตในพืช*

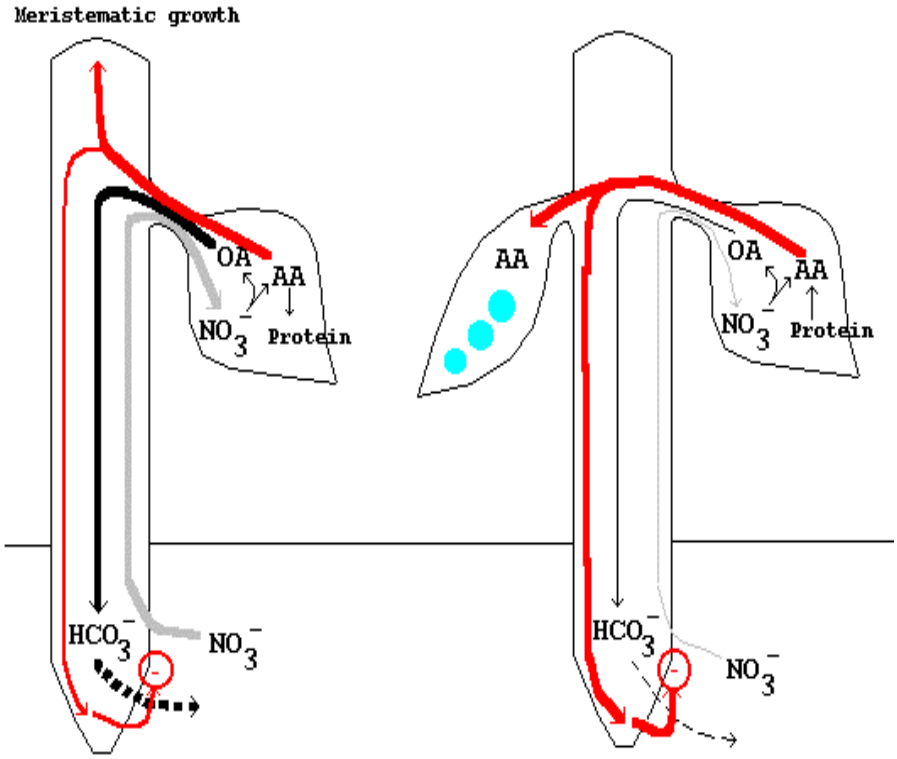
เมื่อพืชได้รับไนเทรต จะมีการตอบสนองให้ NR-gene มีการถอดรหัส เพื่อเพิ่มปริมาณ mRNA ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (Campbell, 1996) ขณะเดียวกัน การได้รับไนเทรตแม้ในปริมาณน้อย (ต่ำกว่า 10 ไมโครโมลาร์) จะมีผลให้เซลล์มีการสังเคราะห์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ไนไทรต์รีดักเทส กลูตามีนซินเธเทส และ กลูตาเมทซินเทส ไนเทรตอิสระที่อยู่ในไซโทซอล จะถูกรีดิวซ์ให้เป็นไนไทรต์โดยการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส จากนั้นไนไทรต์จะถูกนำเข้าไปในส่วนของคลอโรพลาสต์ หรือพลาสติด และถูกรีดิวซ์ให้เป็นแอมโมเนียม ซึ่งจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนเพื่อใช้ในพืชต่อไป โดยผ่านทาง glutamine synthetase glutamate synthase cycle (GOGAT-cycle)

(Crawford, 1995) ดังแผนผัง

$NO_3^{-}$ $\xrightarrow{(+5)\ NR\ (+2e^-)}$ $NO_2^{-}$ $\xrightarrow{(+3)\ NiR(+6e^-)}$ $NH_4^{+}$ $\xrightarrow{(-3)}$ GOGAT cycle

NR= nitrate reductase , NiR= nitrite reductase

GOGAT= glutamine synthetase glutamate synthase




**รูปที่ 5** แสดงการนำไนเทรตเข้าสู่พืช และการขนส่งไนเทรตในพืช (Crawford, 1995)

### 1.2.4 สมบัติบางประการของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในพืช

#### 1.2.4.1 จลนศาสตร์ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

Campbell and Smarrelli (1978 ) ได้ศึกษาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในพืชพวกแตง (Squash) และ ข้าวโพด โดยนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาศึกษา พบว่า เอนไซม์นี้มีกลไกการทำงานแบบ two-site pingpong โดยNRที่ได้รับอิเล็กตรอนจะมีการส่งผ่านอิเล็กตรอน จาก NADH-site ไปยัง nitrate-site จากการศึกษาค่า $K_m$ ของ squash และ ยาสูบ โดย Lillo *et al*. (1997) พบว่า $K_m$ ของ NADH อยู่ในช่วง 1.5-2.0 μM และ $K_m$ ของไนเทรตอยู่ในช่วง 50 – 60 μM นอกจากนี้ Ahmad and Abdin (1999) ได้รายงานการหาค่า $K_m$ ของ substrate สำหรับเอนไซม์ NAD(P)H-NR ที่สกัดจากต้นอ่อนของต้นมัสตาร์ด (mustard) และผ่านการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ โดยใช้ Blue-sepharose สามารถแบ่งเอนไซม์เป็น 2 กลุ่ม คือ

1) NAD(P)H:NR ซึ่งมี $K_m$ ของ $KNO_3$ เท่ากับ 2.5 mM , ค่า $K_m$ ของ NADPH เท่ากับ 0.05 mM และ ค่า $K_m$ ของ NADH เท่ากับ 0.2 mM

2) NADH: NR ซึ่งมี $K_m$ ของ $KNO_3$ เท่ากับ 0.1 mM และ ค่า $K_m$ ของ NADH เท่ากับ 0.01 mM

#### 1.2.4.2 ความเสถียรของเอนไซม์

ไนเทรตรีดักเทสเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรต่ำ ซึ่งจากการศึกษาในส่วนรากพืชพบว่าตำแหน่งของรากบริเวณที่ปลายรากจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสค่อนข้างเสถียรกว่าบริเวณส่วนรากที่เจริญเต็มที่แล้ว โดยเชื่อว่าการที่เอนไซม์มีความเสถียรต่ำเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ endopeptidase ภายในราก (Oaks, 2000)

เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่บริสุทธิ์สามารถเก็บได้นานหลายเดือนโดยเก็บในกลีเซอ-รอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (Solomonson *et al*., 1975)

#### 1.2.4.3 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

Ahmad and Abdin (1999) ได้รายงานการศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (NAD(P)H: NR) ที่ได้จากต้น mustard พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์คือ pH 6.8

### 1.2.5 การแสดงออกของเอนไซม์และการควบคุมการทำงานของเอนไซม์

#### 1.2.5.1 การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสโดยแสง

แสงมีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส โดยแสงมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ตั้งแต่การสังเคราะห์ mRNA ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ซึ่งจะพบว่า NR-mRNA มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับแสง และจะมีระดับต่ำในที่มืด (Crawford, 1995) นอกจากนี้แสงยังมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยในสภาวะที่มีแสงจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ protein phosphatase ซึ่งทำหน้าที่ในการตัดฟอสเฟตออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ (active-form) (Huber *et al*., 1992 )

ในเรื่องของอิทธิพลของแสงต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสนี้ ได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายๆ กลุ่มให้ความสนใจ และทำการศึกษาในแง่ต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจากการศึกษาโดย Strater and Hachtel (2000) ได้ศึกษาการถอดรหัสของไนเทรตรีดักเทสยีนในต้น birch (*Betula pendula* Roth) พบว่าเมื่อได้รับแสง จะมีการตอบสนองไนเทรตรีดักเทสยีนทั้งในส่วนใบและราก Haba *et al*. (2001) ได้รายงานว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบแตงกวามีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นเมื่อมีแสงและลดลงเมื่อไม่มีแสง

#### 1.2.5.2 ผลของปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์

Su *et al*. (1996) ได้รายงานผลของการลดระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส จากต้น Arabidopsis โดยในสภาวะดังกล่าว พบว่า เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรวดเร็วโดยกระบวนการ phosphorylation ที่ serine ตำแหน่งที่ 543 ซึ่งอยู่บริเวณ hinge I region ของเอนไซม์ และ Larios *et al.* (2001) ได้ทำการทดลองผลของคาร์บอนไดออกไซด์ระดับต่างๆ กัน ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสจากต้นแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) พบว่าภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นจะมีการเพิ่มปริมาณแป้ง และ soluble sugar ในใบ รวมทั้งลดปริมาณไนเทรต ขณะเดียวกัน พบว่าเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมีแอคติวิตีสูงขึ้น และจากการศึกษา NR-mRNA ผู้ทดลองได้สรุปว่า อัตราการใช้ คาร์บอนไดออกไซด์ จะมีผลไปควบคุมที่การแสดงออกของยีนบริเวณใบ รวมถึงควบคุมแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยมีความเกี่ยวข้องกับน้ำตาล ซึ่งมีลักษณะเป็น regulatory metabolite

### 1.2.5.3 **ผลของสภาวะเครียดของพืช**

ในสภาวะเกิดความเครียด เช่น การขาดน้ำ หรือขาดออกซิเจนพบว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการรีดิวซ์ของไนเทรตเพิ่มขึ้นควบคู่ไปด้วย ซึ่ง Huber and Kaiser (1996) ได้อธิบายว่า ในสภาวะดังกล่าวจะมีการเปลี่ยน ATP ให้อยู่ในรูปของสารที่มีพลังงานต่ำ คือ AMP ซึ่งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเป็นผลจากการตอบสนองต่อสัญญาณของ AMP นั่นเอง และในปี 2001 Haba *et al.* ได้ผลการทดลองที่สนับสนุนในทำนองเดียวกันนี้โดยพบว่า สภาวะที่ขาดออกซิเจนจะมีผลต่อการเสริมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในรากของพืชกลุ่มแตงกวา ขณะที่การให้ออกซิเจนในปริมาณสูงจะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

แต่จากการศึกษาในรากข้าวโพดพบว่ามีผลตรงกันข้าม กล่าวคือแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสลดลง ซึ่งผู้ทดลองได้อธิบายว่าสภาวะที่แห้งแล้งจะมีผลให้การนำไนเทรตเข้ามาในรากเกิดน้อยลง อย่างไรก็ตามการได้รับน้ำชดเชยเป็นเวลา 2 วันจะทำให้รากข้าวโพดทั้งรากเก่าและใหม่สามารถดูดซึมเอาไนเทรตในดินมาใช้ได้ซึ่งจะช่วยให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเพิ่มขึ้นได้ (Buljovcic and Engels, 2001)

นอกจากการขาดน้ำหรือขาดออกซิเจนจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสแล้ว ความเค็มก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ โดย Lorenzo *et al*. (2001) ได้ศึกษาในต้นกุหลาบลัมบาดา (*Rosa hybrida* ) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิคพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบกุหลาบมีค่าลดลงเมื่อได้รับแอมโมเนียมไอออนในสารละลายธาตุอาหาร ซึ่งการนำแอมโมเนียมเข้าสู่ต้นกุหลาบเป็นการตอบสนองต่อความเค็มเมื่อมีแอมโมเนียมไอออนเป็นแหล่งของไนโตรเจนในสารละลาย

### 1.2.5.4 **ผลของอุณหภูมิ**

จากการทดลองของ Aslam *et al*. (2001) ซึ่งได้ศึกษาในต้นฝ้าย พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการนำไนเทรตเข้ามาใช้ในพืช ซึ่งปริมาณไนเทรตที่มีการขนส่งในต้นพืชนี้จะเป็นตัวควบคุมแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส และจากการทดลองของ Sakamoto and Bryant (1999) ได้รายงานว่า ที่อุณหภูมิต่ำ 15 องศาเซลเซียส เซลล์จะมีการนำไนเทรตมาใช้ได้ต่ำแม้ว่าจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสก็ตาม ซึ่งอาจสรุปได้ว่าอุณหภูมิไม่ได้มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสโดยตรง แต่จะมีผลต่อการนำไนเทรตเข้าสู่

เซลล์มากกว่า และไนเทรตจะเป็นปัจจัยในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสต่อไป

### 1.2.5.5 ผลของไนโตรเจนในรูปไนเทรตไอออน และแอมโมเนียมไอออนที่พืชได้รับ

ผลของไนเทรต ( $NO_3^-$ )

Lin *et al*. (1994) ได้ศึกษากลไกการกระตุ้น NR-gene ในพืชชั้นสูง พบว่า บริเวณ promoter ของ NR-gene จากต้น Arabidopsis มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยไนเทรต

ผลของแอมโมเนียม ( $NH_4^+$ )

Kronzycker *et al*. (1999) รายงานว่า ปริมาณไนเทรตสะสมในต้นอ่อนข้าว จะลดลงเมื่อมีแอมโมเนียม ซึ่งจะเป็นผลให้มีการลดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ซึ่งต่อมา Vidmar *et al*. (2000) ได้เสนอว่า แอมโมเนียมอาจไปยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้าง high-affinity $NO_3^-$-transporter ในข้าวบาร์เล่ย์ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งการนำไนเทรตเข้าสู่ต้น

### 1.2.5.6 ผลของ สารเคมี ไอออน และ metabolite บางตัวต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

ผลของ casein และ DTT

Lewis *et al*. (1982) พบว่า การเติม 1% casein ลงใน สารละลายที่ใช้สกัดเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วย phosphate buffer pH 7.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ DTT ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะทำให้ เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่สกัดจากใบและรากของข้าวบาร์เล่ย์ มีความเสถียรได้นานหลายชั่วโมง แต่จะลดลงเมื่อไม่มี DTT

ผลของ glucose-6-phosphate (G-6-P)

McMichael *et al*. (1995) ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ที่ได้จากผักโขม (*Spinacia oleracea* L.) พบว่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์โปรตีนไคเนส จะถูกยับยั้งได้โดย glucose-6-phosphate นอกจากนี้ พวก metabolic phosphate ตัวอื่นเช่น dihydroxyacetone phosphate และ fructose-1,6-bisphosphate ก็สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนไคเนสได้เช่นกัน (Bachmann *et al*. ,1995)

ผลของ 5′-AMP(adenosine 5′- monophosphate)

Huber and Kaiser (1996) ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของ 5′ AMP กับเอนไซม์ไนเทรต รีดักเทส โดยจากการศึกษาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากส่วนใบของผักโขม และถั่วลันเตา ในหลอดทดลองพบว่าการเกิด dephosphorylation ของ phospho-NR ถูกเร่งโดยเอนไซม์ฟอสฟาเทสภายในเซลล์ และเอนไซม์ฟอสฟาเทสนี้จะถูกเร่งโดย 5′-AMP นอกจากนี้ยังชี้ว่า การเพิ่มของ 5′-AMP ในไซโทซอล อาจเพียงพอต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในเซลล์พืช

ผลเช่นเดียวกันนี้ ได้มีการรายงานในปี 1999 โดย Agüera *et al*. และในปี 2001 โดย Haba *et al*. ซึ่งได้ ศึกษาผลของ 5′-AMP ต่อการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ได้จากใบของพืชกลุ่มแตงกวาพบว่าการเติม 5′-AMP ลงในเอนไซม์สกัดที่ถูก pre-incubate ด้วย ATP เพื่อให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่ไม่ทำงาน มีผลให้เกิดการกระตุ้นให้ทำงานได้อย่างรวดเร็ว และได้อธิบายว่า 5′-AMP มีผลไปเร่งการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟาเทส ทำให้เอนไซม์ฟอสฟาเทสสามารถทำงานได้ โดยไปกระตุ้นอัตราการ dephosphorylation ของ phospho-NR (pNR) ส่งผลให้เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่ถูกยับยั้งการทำงานโดย ATP สามารถกลับมาทำงานได้

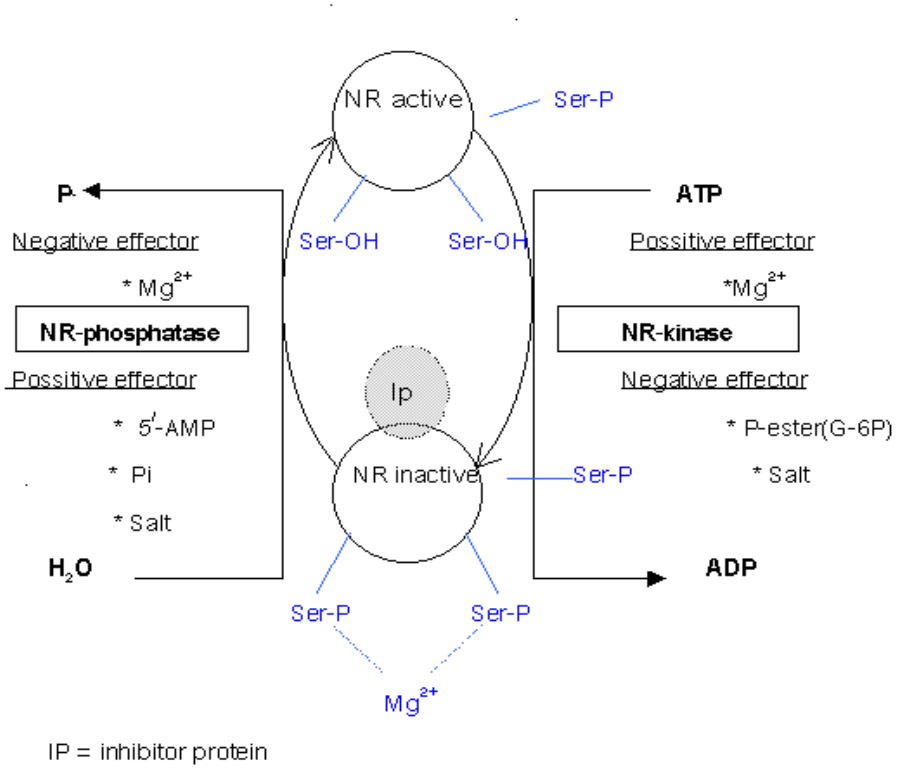
ผลของ divalent cation

การใช้ $Mg^{2+}$ ความเข้มข้น 5 mM พบว่าสามารถยับยั้ง pNR ได้ ในขณะที่ ไม่มีผลยับยั้ง dephospho-NR ดังนั้นการวัดการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่มี $Mg^{2+}$ จึงเป็นค่าที่เกี่ยวเนื่องกับกลไกการเกิด phosphorylation/dephosphorylation และมีความสัมพันธ์กับค่าที่เกิดขึ้นในเซลล์พืช เนื่องจากภายในไซโทซอลจะมี$Mg^{2+}$ อิสระอยู่ Bachmann *et al*. (1995) ต่อมา Athwal *et al*.(1998) ได้ศึกษากลไกการจับกันระหว่างโปรตีน 14-3-3 กับเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสที่อยู่ในรูปที่จับอยู่กับฟอสเฟต (pNR) และได้เสนอว่า กลไกที่เป็นไปได้คือ มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน 14-3-3 ก่อนจะมาจับกับโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งจากการทดลองพบว่า divalent cation ได้แก่ $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ และ $Mn^{2+}$ สามารถจับกับ 14-3-3 โปรตีนโดยตรง มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของโปรตีน 14-3-3 โดยเพิ่มสมบัติไฮโดรโฟบิกที่ผิวเอนไซม์และมีผลต่อการจับกับ pNR ได้ดีขึ้น ส่งผลให้มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส อย่างไรก็ตามแม้ว่าการมี $Ca^{2+}$ จะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสได้ แต่จากการรายงานของ Lavon (1999) ได้แสดงให้เห็นว่าใน

สภาวะที่ใบพืชขาด $Ca^{2+}$ จะมีผลให้มีการสะสมของไนโตรเจน ไนเทรต และ กรดอะมิโนอิสระลดลง ส่งผลให้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสต่ำ

**1.2.5.7 กลไกการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในพืช**

Hoff *et al*.(1995) และ Crawford (1995) ได้เสนอว่าการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส แบ่งได้เป็น 2 ระดับคือ ระดับ transcription และระดับ protein turnover ซึ่งในเวลาต่อมา Douglas *et al.(*1995) , Bachmann *et al*.(1996) , Su *et al.* (1996) และ Lillo *et al*. (1997) ได้แสดงให้เห็นว่า post-translation modification ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส โดยการเกิด phosphorylation เป็นกระบวนการหลักในการควบคุมแอคติวิตีของเอนไซม์ การเกิด phosphorylation และ dephosphorylation ของเอนไซม์นี้จะมีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง โดยเอนไซม์โปรตีนฟอสฟาเทส (protein phosphatase) ทำหน้าที่ในการตัดหมู่ฟอสเฟต ซึ่งโปรตีนนี้จะถูกกระตุ้นโดยแสงในขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีน (Huber *et al*., 1992) นอกจากนี้ยังพบว่ามีโปรตีนยับยั้ง (inhibitor protein, IP) ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสนี้ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ในสภาวะที่มี divalent cation (เช่น $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ และ $Mn^{2+}$) ภายหลังจากเอนไซม์ถูกเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่ง Ser-543 แล้ว และต่อมา inhibitor protein ดังกล่าวเป็นที่รู้จักกันในนามของโปรตีน 14-3-3 (Bachmann *et al.,* 1996 และ Moorhead *et al*., 1996) จากการศึกษาโดย Bachmann *et al*.(1995) ได้ชี้ว่า NADH-NR ในใบผักโขมถูกควบคุมโดยวิธี protein phosphorylation ทั้งในหลอดทดลอง และ เซลล์ของใบ และเมื่อศึกษาในใบยาสูบ ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่มีการสะสม phosphate ester ซึ่งได้แก่ G-6-P และ fructose-1,6-bisphosphate ในระหว่างช่วงเวลาที่ได้รับแสง พบว่า metabolite ดังกล่าวจะมีผลไปลดการควบคุมการเกิด NR-inactivation นอกจากนี้ยังคาดว่า $Ca^{2+}$ ที่อยู่อย่างอิสระในไซโทซอล อาจทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส ในพืช โดย Kaiser and Huber (1994) ได้แสดงแบบจำลองการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในใบและรากพืช ในระดับ protein turn over ดังรูปที่ 6




**รูปที่ 6** แสดงแบบจำลองการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส (Kaiser and Huber,1994)

นอกจากการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังได้มีรายงานโดย Ogawa *et al*. 2000 ถึงการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสว่า มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนไทรต์รีดักเทสด้วย โดย mRNA ของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสอาจเป็นปัจจัยที่ช่วยเสริมให้เอนไซม์ไนไทรตรีดักเทสเกิดการปรับโครงสร้างให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้

## 1.3 ไนเทรตรีดักเทสในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

Nakamura and Ikawa (1993) รายงานการทำบริสุทธิ์ NADH-NR จาก *Porphyra yezoensis* โดยใช้ PEG-treatment, ammonium sulfate fractionation, chromatography บนคอลัมน์ butyl Toyopearl 650-M, Blue sepharose CL-6B, DEAE-cellulose ( DE52 ) และ hydroxyapatite, gel filtration บน Sephacryl S-400 ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 5,700เท่า และมีค่า specific activity 12.5 μmol/min/mg.Protein และจากการทำ Native-Polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมดู nitrate reductase activity พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 220,000 ดาลตัน และเมื่อทำ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าน้ำหนักของแต่ละหน่วยย่อยเท่ากับ 100 กิโลดาลตัน นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าค่า $K_m$ ของ NADH = 23 μM และ $K_m$ ของ $KNO_3$ = 64 μM , ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ อยู่ในช่วง 7.0-8.5

Martinez-Espinasa *et al*. (2001) ได้รายงานการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในแบคทีเรีย *Halferax mediterranei* พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย มีขนาดต่างกันคือ 105$\pm$1.3 กิโลดาลตัน และ 50$\pm$1.3 กิโลดาลตัน มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่พีเอช 9.0 โดยเอนไซม์จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นี้สามารถรับอิเล็กตรอนมาจาก reduced methyl viologen ซึ่งต่างจากสภาพธรรมชาติที่พืชใช้ NADH หรือ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

## 1.4 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทส

เนื่องจากในการวัดไนเทรตในแหล่งน้ำทั่วไป พบว่าการวัดมักถูกรบกวนจากไอออนอื่นๆ ในสิ่งแวดล้อมที่นำตัวอย่างน้ำมาวัด ดังนั้นจึงได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มพยายามนำเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมาประยุกต์ใช้ในการวัดไนเทรตในน้ำ เช่น Mori *et al*., (2000) ได้ประยุกต์นำเอาเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสมาใช้ในการหาปริมาณไนเทรต โดยใช้วิธีการนำไนเทรตผ่านท่อที่มีเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสอยู่ภายใน และใช้ตัวพาคือ NADPH จากนั้นวัดปริมาณการลดลงของ NADPH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ซึ่งวิธีการดังกล่าว ผู้ทดลองได้นำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณไนเทรตที่อยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ

## 1.5 ข้าวไร่

ข้าวจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledon) อยู่ในวงศ์หญ้า (Gramineae) เผ่าพันธุ์ (tribe) โอไรซี่ (Oryzae) เผ่าพันธุ์นี้มี 25 ชนิด แต่มีเพียงสองชนิดที่ปลูกไว้เป็นอาหาร คือ *Oryza sativa* L. และ *Oryza glaberrima* ส่วนที่เหลือเป็นข้าวป่า (ชาญ มงคล, 2536) สำหรับข้าวพันธุ์ *Oryza sativa* นี้ เป็นพันธุ์ที่ปลูกแพร่หลายในประเทศต่างๆ และยังสามารถแบ่งออกได้ตามการปรับตัวและวิวัฒนาการการกำเนิดเป็น 3 พวก คือ *japonica, indica* และ *javanica* ซึ่งพันธุ์ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นพวก *indica* ยกเว้นข้าวไร่ทางภาคเหนือซึ่งมีลักษณะบางอย่างของข้าว japonica รวมอยู่ด้วย (ประพาส วีระแพทย์, 2531) ข้าวที่ปลูกโดยทั่วไปแบ่งตามสภาพการปลูกได้เป็นสองพวก คือ ข้าวที่ปลูกในนาข้าวทั่วไป และข้าวที่ปลูกบนที่ดอนหรือในไร่ ซึ่งเรียกว่าข้าวไร่

ข้าวไร่เป็นพืชที่ต้องการน้ำน้อย และปลูกขึ้นง่ายโดยไม่ต้องมีน้ำหล่อเลี้ยงลำต้น จึงเป็นที่รู้จักและปลูกกันอย่างแพร่หลายในหมู่เกษตรกรชาวไร่และชาวเขาในภาคต่างๆ สำหรับในภาคใต้ นิยมปลูกข้าวไร่ในที่ดอนทั่วไป และปลูกแซมในสวนยางระหว่างที่ต้นยางมีอายุ 1-4 ปี (ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, 2528) การปลูกข้าวไร่ทำได้สองวิธีคือ วิธีหว่าน และวิธีขุดหลุมหยอดเมล็ด โดยวิธีหลังเป็นวิธีที่ให้ผลดีและนิยมมากกว่าวิธีหว่าน นอกจากนี้การใส่ปุ๋ยก็ยังเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งเพราะดินทั่วๆไปที่ใช้ปลูกพืชมาหลายปีจะมีธาตุอาหารพืชในดินน้อยลง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องเพิ่มปุ๋ยและธาตุอาหารพืชลงไป เพื่อต้นข้าวจะสามารถนำไปสร้างเป็นสารอาหารได้อย่างเพียงพอ เพื่อนำไปสร้างลำต้นให้สมบูรณ์แข็งแรงและติดเมล็ดได้อย่างเต็มที่ ปุ๋ยชนิดต่างๆที่มีการแนะนำให้ใช้มีดังนี้ (กองส่งเสริมพืชพันธุ์ กรมวิชาการเกษตร, 2520)

1. ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ หรือ ปุ๋ยเคมี ควรแบ่งใส่ 2 ครั้งๆ ละเท่าๆกัน คือ ครั้งที่หนึ่งใส่เมื่อข้าวมีอายุได้ประมาณ 20-25 วัน หรือหลังจากดายหญ้าและพรวนดินครั้งแรกเสร็จเรียบร้อย และครั้งที่สองเมื่อข้าวมีอายุประมาณ 45-50 วัน

2. ปุ๋ยคอก ได้แก่ ปุ๋ยมูลสัตว์ โดยใส่ก่อนปลูก ใช้ปุ๋ยคลุกกับดินระหว่างเตรียมดิน

3. ปุ๋ยหมัก ใช้ไร่ละ 600-700 กิโลกรัม ใส่ก่อนปลูกเช่นเดียวกับการใช้ปุ๋ยคอก

4. ปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยคอก ควบคู่ไปกับการใช้ปุ๋ยเคมี

ผลผลิตของข้าวไร่จะมากหรือน้อยย่อมขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ สภาพดินฟ้าอากาศ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน และการบำรุงรักษา ถ้าหากได้มีการใช้ปุ๋ยในอัตราที่เหมาะสม และทำการบำรุงรักษาให้ถูกวิธี จะสามารถเพิ่มผลผลิตข้าวไร่ได้สูงกว่าไร่ละ 400-500 กิโลกรัม

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวที่นำมาใช้ในการวิจัย ซึ่งได้แก่ข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอม และกู้เมืองหลวง ซึ่งเป็นข้าวไร่ที่ทางกรมวิชาการเกษตรแนะนำให้ใช้เป็นพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับปลูกในพื้นที่ภาคใต้ โดยเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีการปลูกโดยทั่วไปในนาน้ำขัง และมีคุณสมบัติในการทนแล้งได้ดีพอสมควรจึงสามารถนำมาปลูกในลักษณะของข้าวไร่ได้ในบางพื้นที่ เช่นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย

**ตารางที่1** ความแตกต่างของข้าวพันธุ์ดอกพยอม กู้เมืองหลวง และ ขาวดอกมะลิ105 (วิชา ธิติประเสริฐ และคณะ, 2544)

| หัวข้อ | ลักษณะประจำพันธุ์ข้าว | | |
|---|---|---|---|
| 1. จีเอสนัมเบอร์ | 04003 | 04002 | 04020 |
| 2. ชื่อพันธุ์ | ดอกพยอม | กู้เมืองหลวง | ขาวดอกมะลิ105 |
| 3. ชื่อพันธุ์ (อังกฤษ) | Dakphayawm | KooMuang Luang | Khaodokmali105 |
| 4. ความยาวของแผ่นใบ (ซม.) | 60.00 | 69.60 | 56.20 |
| 5.ความกว้างของแผ่นใบ (ซม.) | 1.66 | 1.66 | 1.54 |
| 6. ขนบนแผ่นใบ | มีบ้าง | มีบ้าง | มีบ้าง |
| 7. สีแผ่นของใบ | เขียว | เขียว | เขียวเข้ม |
| 8.สีของกาบใบ | เขียว | เขียว | เขียว |
| 9. มุมของยอดแผ่นใบ | ตก | ตก | ตั้งตรง |
| 10. ลักษณะใบธง | หักลง | หักลง | ปานกลาง |
| 11. การแก่ของใบ | ปานกลาง | ปานกลาง | ปานกลาง |
| 12. ความยาวของลิ้นใบ (มม.) | 21.60 | 25.20 | 10.00 |
| 13. สีของลิ้นใบ | ขาว | ขาว | ขาว |
| 14. รูปร่างของลิ้นใบ | แหลม | แหลม | แหลม |
| 15. สีของข้อต่อใบ | เขียวอ่อน | เขียวอ่อน | เขียวอ่อน |
| 16. สีของหูใบ | เขียว | เขียว | เขียว |
| 17. ทรงกอ | กอตั้ง | กอตั้ง | กอตั้ง |
| 18. ความยาวของลำต้น (ซม.) | 178.80 | 171.80 | 93.00 |
| 19. เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น (มม.) | 4.00 | 5.00 | 4.00 |
| 20. สีปล้อง | เขียว | เหลืองอ่อน | เหลืองอ่อน |
| 21. ความแข็งของลำต้น | แข็งปานกลาง | แข็งปานกลาง | ค่อนข้างแข็ง |
| 22. ความยาวของรวง (ซม.) | 24.60 | 26.40 | 26.30 |
| 23. ลักษณะรวง | ปานกลาง | ปานกลาง | ปานกลาง |
| 24. การแตกระแง้ | ปานกลาง | ปานกลาง | ระแง้ถี่ |
| 25. การยืดของคอรวง | คอรวงยาว | คอรวงยาว | สั้น |
| 26. ก้านรวง | อ่อน | อ่อน | อ่อน |

**ตารางที่1 (ต่อ)**

| หัวข้อ | ลักษณะประจำพันธุ์ข้าว | | |
|---|---|---|---|
| ชื่อพันธุ์ | ดอกพยอม | กู้เมืองหลวง | ขาวดอกมะลิ105 |
| 27. การร่วงของเมล็ด | ร่วงง่าย | ร่วงง่าย | ร่วงน้อย |
| 28. การนวด | ง่าย | ปานกลาง | ง่าย |
| 29. จำนวนรวง | - | - | - |
| 30. หางข้าว | ไม่มี | ไม่มี | ไม่มี |
| 31. สีของหางข้าว | - | - | - |
| 32. สียอดดอก | ดำ | ฟาง | ขาว |
| 33. สีของยอดเกสรต้วเมีย | ขาว | ขาว | ขาว |
| 34. สีเปลือกเมล็ด | สีฟาง | สีฟาง | - |
| 35. ขนบนเปลือกเมล็ด | - | - | - |
| 36. สีกลีบรองดอก | ฟาง | ฟาง | ฟาง |
| 37. ความยาวของกลีบรองดอก (มม.) | - | - | - |
| 38. การติดเมล็ด | ติดปานกลาง (75-90%) | ติดปานกลาง (75-90%) | ติดปานกลาง (75-90%) |
| 39. ความยาวเมล็ดข้าวเปลือก (มม.) | 7.30 | 8.40 | - |
| 40. ความกว้างเมล็ดข้าวเปลือก(มม.) | - | - | - |
| 41. สีข้าวกล้อง | - | - | - |
| 42. ชนิดของข้าวสาร | ข้าวเจ้า | ข้าวเจ้า | - |
| 43. กลิ่นหอม | - | - | - |
| 44. รูปร่างข้าวกล้อง | เรียว | เรียว | - |
| 45. การเป็นท้องไข่ | น้อย | มาก | - |
| 46. จำนวนวันตกกล้าถึงออกดอก 50% | - | - | - |
| 47. วันออกดอก | - | 3 พย. | 30 ตค. |
| 48. เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด (%) | - | - | - |
| 49. จำนวนต้นต่อกอ | - | - | - |
| 50. นน. 100 เมล็ด | 2.58 | 3.64 | - |

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสในต้นข้าวไร่พันธุ์กู้เมือง-หลวง และดอกพยอม โดยใช้พันธุ์ขาวดอกมะลิ105 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ซึ่งมีผลมาจากการได้รับไนเทรต และอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม
2. แยกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไนเทรตรีดักเทสเพื่อศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์นี้