

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(15)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	27
2. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ	28
วัสดุ	28
อุปกรณ์	28
สารเคมี	29
วิธีการ	30
3. ผลการทดลอง	47
4. วิจารณ์	94
5. สรุป	108
เอกสารอ้างอิง	111
ภาคผนวก	120
ประวัติ	126

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ความแตกต่างของข้าวพันธุ์ภูเมืองหลวง ข้าวดอกมะลิ105 และ ดอกพยอม	25
2 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในเทอร์ตริคเทศจากใบข้าวไร่ โดยการตกตะกอน โปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตครั้งที่ 1	73
3 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในเทอร์ตริคเทศจากใบข้าวไร่ โดยการตกตะกอน โปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตครั้งที่ 2	74
4 ผลของ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเทอร์ รีคเทศ	91
5 ผลของ sodium azide (NaN_3) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันต่อแอกติวิตีของ เอนไซม์ในเทอร์ตริคเทศ	92
6 สูตรอาหาร Hoagland and Arnon, (1950)	124

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างของเอนไซม์ในเทอร์ตริคัทเทส	6
2	แสดง partial activity ของเอนไซม์ในเทอร์ตริคัทเทส	8
3	แสดงโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ในเทอร์ตริคัทเทสในพีชชั้นสูง	9
4	แสดงกลไกการขนส่งไนเตรตและแอมโมเนียมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์รากพีช	12
5	แสดงการนำไนเตรตเข้าสู่พีช และการขนส่งไนเตรตในพีช	14
6	แสดงแบบจำลองการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในเทอร์ตริคัทเทส	21
7	ปฏิกิริยาสองขั้นตอนในการเกิดสีของไนโตริต์	32
8	การเติมอากาศให้กับระบบการปลูกข้าวในสารละลายธาตุอาหาร	36
9	ไดอะแกรมการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในเทอร์ตริคัทเทส จากใบข้าวไร่	40
10	แอกติวิตีของเอนไซม์ในเทอร์ตริคัทเทสในใบข้าว (รูป A) และปริมาณไนเตรตในใบข้าว (รูป B) ที่อายุต้นข้าวต่างๆกัน	49
11	แสดงค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในเทอร์ตริคัทเทสในใบข้าวไร่พันธุ์กุ่มเมืองหลวงที่ปลูกในดินที่มีไนเตรต $2.67 \mu\text{mol}$ ต่อน้ำหนักดินแห้ง 1 กรัมและได้รับแสงตามธรรมชาติและที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น $\frac{1}{4}$ เท่า และได้รับแสง $270 \mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน	51
12	แอกติวิตีของเอนไซม์ในเทอร์ตริคัทเทสในใบข้าวไร่พันธุ์กุ่มเมืองหลวงอายุ 2 สัปดาห์ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland 's solution ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ เท่า (high nutrient, เส้นทึบ) และความเข้มข้น $\frac{1}{20}$ เท่า (low nutrient, เส้นประ) โดยได้รับแสง $270 \mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมงต่อวัน (A) และ 10 ชั่วโมงต่อวัน (B)	54
13	แอกติวิตีของเอนไซม์ในเทอร์ตริคัทเทสในใบและรากข้าวไร่พันธุ์กุ่มเมืองหลวงซึ่งปลูกในระบบไฮโดรโปนิคในอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น $\frac{1}{4}$ เท่า ในกลุ่มที่ปลูกโดยมีการเติมอากาศ และไม่เติมอากาศให้กับระบบ	56

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	ความสูงของต้นข้าว ความยาวราก และปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบและรากของต้นข้าวพันธุ์กู่เมืองหลวงที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิคเป็นเวลา 16 วัน ในอาหารสูตร Hoagland's solution ความเข้มข้น $\frac{1}{4}$ เท่า ในกลุ่มที่ปลูกโดยมีการเติมอากาศ และไม่เติมอากาศให้กับระบบ	57
15	แอกติวิตีของเอนไซม์ในเทรตรีดักเทสในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปแบบของไนเตรตความเข้มข้น ต่างๆกัน ได้แก่ 0 , 1.25 , 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ เท่า และได้รับธาตุอาหารเดิมอีกครั้งในวันที่ 40 ของการปลูก	61
16	ปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (A) และปริมาณไนเตรตในสารละลายธาตุอาหารที่ใช้ปลูกข้าว (B) ที่ระยะเวลาการปลูกต่างๆกัน	62
17	แอกติวิตีของเอนไซม์ในเทรตรีดักเทส ในใบข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิคโดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปแบบของไนเตรตความเข้มข้น ต่างๆกัน ได้แก่ 0 , 1.25 , 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ เท่า และได้รับอาหารเดิมอีกครั้งในวันที่ 40 ของการปลูก	63
18	ปริมาณไนเตรตที่สะสมในใบข้าวพันธุ์ดอกพยอม (A) และปริมาณไนเตรต (B) ในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้น 0, 1.25, 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์	64
19	แอกติวิตีของเอนไซม์ในเทรตรีดักเทส ในใบข้าวไร่พันธุ์กู่เมืองหลวง ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปแบบของไนเตรตความเข้มข้นต่างๆกัน ได้แก่ 0, 1.25, 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ เท่า และได้รับธาตุอาหารเดิมอีกครั้งในวันที่ 40 ของการปลูก	65

รายการรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
20	ปริมาณไนเตรดที่สะสมในใบข้าวพันธุ์กู่เมืองหลวง (A) และปริมาณไนเตรด (B) ในสารละลายธาตุอาหารที่มีความเข้มข้นของไนเตรดเริ่มต้น 0, 1.25, 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์	66
21	แอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส ในใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรดคือมีทั้งไนเตรดร่วมกับแอมโมเนียม ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 , 1.25 , 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ เท่า	69
22	แอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในใบข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอม ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรดคือมีทั้งไนเตรดร่วมกับแอมโมเนียม ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 , 1.25 , 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ในธาตุอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ เท่า	70
23	แอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทส ในใบข้าวไร่พันธุ์กู่เมืองหลวงที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิค โดยต้นข้าวได้รับไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรดคือมีทั้งไนเตรดร่วมกับแอมโมเนียม ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 , 1.25 , 2.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ในธาตุอาหารสูตรดัดแปลงจาก Hoagland's solution ความเข้มข้น $\frac{1}{2}$ เท่า	71
24	แสดงค่า specific activity ของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสในใบข้าวที่เก็บตัวอย่างใบที่อุณหภูมิห้อง, อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	77
25	ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ไนเตรรีดักเทสใน crude extract ที่เวลาต่างๆกัน โดยเก็บเอนไซม์บนน้ำแข็งตลอดการทดลอง เปรียบเทียบระหว่างการเติมและไม่เติม PMSF	79

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
26	ค่า specific activity ของเอนไซม์ในเทรตรีดักเทสที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วย กลีโกลิเอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว โดยเส้นทึบเป็นการเก็บเอนไซม์ในรูปที่เอาเกล็ดออกก่อนเก็บบนน้ำแข็ง และเส้นประแสดงการเก็บเอนไซม์ในรูปที่จับอยู่กับเกลีโกลิเอมโมเนียมซัลเฟตโดยเอาเกล็ดออกก่อนการวัดแต่ละครั้ง	81
27	saturation curveจากการศึกษา K_m ของ NADH ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reduction	83
28	saturation curve จากการศึกษา K_m ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reduction	84
29	Saturation curve จากการศึกษา K_m ของ NADPH ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reduction	85
30	saturation curve จากการศึกษา K_m ของ KNO_3 เมื่อใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่ปฏิกิริยา nitrate reduction	86
31	ผลของ pH ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ในเทรตรีดักเทส จากใบข้าวพันธุ์กุ่มเมืองหลวงใน crude extract และในส่วนของตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลีโกลิเอมโมเนียมซัลเฟต	87
32	ผลของการเติม 5 μ M FAD, 5 μ M molybdenum และ 2.5 μ M FADร่วมกับ 2.5 μ M molybdenum ใน assay mixture ต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในเทรตรีดักเทส	89
33	ผลการเติม FAD ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ และไม่เติม FAD ต่อค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ในเทรตรีดักเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลีโกลิเอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 % ของความอิ่มตัว และเก็บบนน้ำแข็ง ที่เวลาต่างๆ กัน	90

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
34	ผลของ 5'AMP ต่อแอกติวตีของเอนไซม์ในเทรตรีดักเทสเมื่อมี 10มิลลิโมลาร์ MgCl ₂ และไม่มี MgCl ₂ ในส่วนผสมของแต่ละ assay	93
35	แสดงปฏิกิริยาการเกิดไนโตรซาลิซิดิก	122
36	การปลูกข้าวในสารละลายธาตุอาหารในห้องทดลอง	125

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ADH	= alcohol dehydrogenase
DTT	= dithiothreitol
EDTA	= ethylenediaminetetraacetic acid
FAD	= flavin adenine dinucleotide
GOGAT	= glutamine synthetase - glutamate synthase
K_m	= Michaelis constant
M	= molar
mg	= milligram
ml	= milliliter
mM	= millimolar
μM	= micromolar
NADH	= reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	= reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NiR	= nitrite reductase
nmole	= nanomole
NNEDA	= N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride
NR	= nitrate reductase
OD.	= optical density
pH	= -log hydrogen ion concentration
PMSF	= phenylmethylsulfonylfluoride
pNR	= phosphorylated nitrate reductase (phospho-NR)
TEMED	= N,N,N',N',-tetramethylethylenediamine
μmole	= micromole
wt.	= weight
น.	= นาฬิกา