4. การวิจารณ์ผล

4.1 การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่ถูกลำเลียงในต้นข้าว

นำต้นข้าวที่ตัดให้มีปล้องที่ P, P-1 และ P-2 ดังในข้อ 2.2.2 แล้วนำมาแช่ลงในน้ำ น้ำตาลที่ถูกลำเลียงอยู่ภายในต้น จะเคลื่อนที่ลงมาได้ตามรอยตัดทาง sieve tube ของ phloem โดยผ่านมาทางรูของ sieve plate ส่วนน้ำตาลที่มีอยู่ในเซลล์ชนิดอื่น เช่น parenchyma, fiber, etc. จะแพร่ออกมาจากภายในเซลล์ได้น้อย เนื่องจากคุณสมบัติของ membrane ที่เป็น differentially permeable membrane น้ำจากภายในภาชนะสามารถ osmosis ผ่านเข้าไปในเซลล์เหล่านี้ได้ (Esau, 1965) เมื่อนำสารที่ได้ภายหลังจากตั้งทิ้งไว้ 5 ชั่วโมง มาแยกโดยวิธี Paper Chromatography พบว่าน้ำตาลที่ใช้ลำเลียงภายในต้นข้าวมีชนิดเดียว คือ sucrose. Zimmermann (1961, 1963) พบว่าน้ำตาลที่ได้จากการสังเคราะห์แสงของพืชพวก linden tree มีการเคลื่อนที่ไปตามท่อลำเลียงอาหาร (Phloem) และยังศึกษาในพืชตระกูลถั่ว 50 ชนิด พบว่าน้ำตาลที่ลำเลียงอยู่ภายในพืชเหล่านี้ประกอบด้วย sucrose เท่านั้น ในพืชบางชนิด เช่น Family Bignoniaceae, Oleaceae และ Verbenaceae มีน้ำตาลที่เคลื่อนที่อยู่ในรูป Raffinose type ซึ่งประกอบด้วย sucrose และ D-galactose จะไม่พบน้ำตาลพวก hexose อยู่ หรือถ้าจะมีอยู่ จะมีในปริมาณที่น้อยมาก

4.2 การตรวจสอบชนิดน้ำตาลที่ได้จาก initial extract

initial extract ที่ได้จากปล้องที่ P ของข้าวเจ้าพันธุ์ ก.ข.1 นำมาหาน้ำตาลโดยวิธี Paper Chromatography ปรากฏว่าแยกน้ำตาลได้ 3 ชนิด คือ sucrose, glucose และ fructose (ตารางที่ 2)

Glasziou (1966) หาน้ำตาลจากเอนไซม์อินเวอเทสที่สะกัด

ได้จากออยโดยวิธี Paper Chromatography พบว่ามีน้ำตาล 3 ชนิด อยู่ในเนื้อเยื่อ คือ glucose, fructose และ sucrose ซึ่งน้ำตาลเหล่านี้มีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์อินเวอเทสภายในปล้องของอ้อย เมื่อ glucose ภายในเนื้อเยื่อมีความเข้มข้นสูงกว่า 0.05 M จะทำให้การสังเคราะห์อินเวอเทสลดลง

Glasziou (1961) และ Akazawa (1965) ให้เหตุผลว่าการที่พบน้ำตาล reducing sugars (glucose + fructose) เนื่องมาจากเอนไซม์อินเวอเทสในต้นไปย่อย sucrose ให้ได้ glucose และ fructose.

4.3 การวัดความยาวของปล้องข้าว

การเจริญเติบโตของต้นข้าวเกิดจากการแบ่งตัวที่บริเวณ shoot apex ของต้นข้าว และเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดใบด้วย shoot apex นี้มีลักษณะเป็นแผ่น (disc) และจะมีการเจริญเกิดขึ้นที่ฐานของแผ่นเหล่านี้ การเกิดข้อ (nodes) เกิดจากส่วนของ leaf trace บริเวณ shoot apex (Metcalfe, 1960) และระหว่างข้อจะมีการเจริญเติบโตแบบ intercalary growth ให้ได้เป็นปล้อง (internodes) ยืดยาวขึ้น (Esau, 1965)

จากการสังเกตการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในระยะ vegetative phase นั้น เมื่ออายุได้ 6-7 อาทิตย์ นับจากวันปักดำ จะเริ่มเห็นการแตกกอของต้นข้าวเริ่มจากข้อล่างขึ้นมา ในต้นแม่เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่สามารถแตกกอได้ 5-8 ต้น ซึ่งใน 1 กอ จะมีข้าวทั้งหมดอยู่ประมาณ 25-30 ต้น เมื่อข้าวอายุได้ 11 อาทิตย์ เริ่มมีการเจริญเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ reproductive phase โดยปรากฏ inflorescence primordium ขึ้น ระหว่างอาทิตย์ที่ 11-14 จะมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงของดอกข้าวภายในกาบใบ จนมีอวัยวะต่าง ๆ เกิดขึ้นครบ และมีการเจริญเติบโตต่อไปจนกระทั่งข้าวตั้งท้องและออกรวง (อักษร เสกธีระ, 2504) เมื่อข้าวชูรวงแล้วโดยปกติจะมีการผสมพันธุ์แบบ self pollination ให้เมล็ดข้าว และหลังจากนั้นเมื่อเมล็ดข้าวแก่จัดประมาณอาทิตย์ที่ 17-18 ก็เริ่มทำการเก็บเกี่ยวได้

ระยะที่ต้นข้าวเริ่มตั้งท้องประมาณอาทิตย์ที่ 13 นับจากวันปักดำ ปรากฏว่ามีปล้องข้าวอยู่ 3 ปล้องที่กำลังมีการเจริญเติบโตยืดตัวอยู่ คือก้านช่อดอก (P) และปล้องที่ถัดลงมาอีก 2 ปล้องคือ P-1 และ P-2 ส่วนปล้องที่ถัดลงมาจาก P-2 คือ P-3 ลงไปนั้นมีการแตกกอของต้นข้าวต้นใหม่ขึ้นมา และไม่มีการยืดตัวขึ้นอีกจะมีลักษณะกลวงและแข็ง การยืดตัวของปล้องที่ P-2 เริ่มเมื่อใบธงยังไม่โผล่พ้นขึ้นมาจากกาบใบของใบถัดไป และเมื่อใบธงชูขึ้นมาจากกาบใบแล้ว เป็นระยะที่ปล้อง P-1 และ P มีการยืดตัวขึ้นเกือบ

พร้อม ๆ กัน อัตราการยืดตัวของปล้อง P สูงมาก ในระหว่างอาทิตย์ที่ 13 ถึง 15 คิดเป็นอัตราการยืดตัว 2.6 เซนติเมตรต่อวัน ขณะที่ P-1 มีอัตราการยืดตัวได้ 1.3 เซนติเมตรต่อวัน และ P-2 มีอัตราการยืดตัว 0.4 เซนติเมตรต่อวัน P สามารถยืดตัวได้ยาวที่สุดประมาณ 37 เซนติเมตร ในอาทิตย์ที่ 15 นับจากวันปักดำ ส่วน P-1 และ P-2 มีการเจริญเติบโตยืดตัวได้น้อยกว่า P คือยืดตัวได้สูงสุดประมาณ 21 และ 14 เซนติเมตรในอาทิตย์ที่ 15 นับจากวันปักดำตามลำดับ

Kaufman (1960) ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นข้าวเจ้า Oryza sativa variety Century Patna 231 พบว่าการเจริญเติบโตของต้นข้าวระหว่าง Vegetative phase เป็นไปอย่างช้า ๆ และในช่วงระหว่างที่มีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ reproductive phase นั้นจะมีการเจริญยืดตัวของปล้องข้าวอย่างรวดเร็ว และก้านช่อดอก (P) จะเป็นข้อสุดท้ายที่มีการยืดตัวและเจริญได้ดีที่สุด ส่วน Tanaka (1964) ศึกษาถึงการยืดตัวของปล้องข้าวเจ้า Oryza sativa variety Peta ผลการศึกษาออกมาเช่นเดียวกันคือ ที่ก้านช่อดอก (P) จะมีการยืดตัวได้มากที่สุด และปล้องที่ถัดลงมาคือ P-1 และ P-2 จะมีการยืดตัวน้อยกว่าปล้องที่ P

4.4 การตรวจสอบ Invertase Activity ในระยะแรกของการเจริญเติบโตของปล้องข้าว

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของปล้องข้าวปล้องที่ P-2, P-1 และ P พบว่า ปล้องที่ P-2 มีการเจริญเติบโตก่อนปล้องที่ P-1 และ P ส่วน P-1 มีการเจริญเติบโตขึ้นก่อนปล้องที่ P เล็กน้อย(ตารางภาพที่ 3) เมื่อสะกัดเอนไซม์จากปล้องเหล่านี้ในช่วงความยาวต่างกันพบว่ามี Activity ของอินเวอเทสทุกช่วงความยาวที่ยังเป็นเนื้อเยื่อเจริญอยู่ แต่ Activity ของอินเวอเทสจะขึ้นสูงสุดและเริ่มลดลงก่อนที่ปล้องข้าวนั้นจะมีการยืดตัวขึ้น Activity ของอินเวอเทสในปล้องที่เกิดทีหลังคือ P จะมี Activity สูงกว่าในปล้องข้าวที่เกิดขึ้นมาก่อนคือ P-1 และ P-2 (ตารางภาพที่ 4-6)

ขณะที่ปล้องข้าวมีความยาว 0.9 ± 0.1 เซนติเมตร ในปล้องของ P, P-1 และ P-2 จะมี Activity ของอินเวอเทสสูงที่สุด ซึ่ง P สูงกว่า P-1 และ P-2 ตามลำดับ และเมื่อปล้องข้าวมีการยืดตัวมากกว่า 1 เซนติเมตร ปรากฏว่า Activity ของอินเวอเทสจะลดลงเรื่อย ๆ (ตารางภาพที่ 7)

ปล้องข้าวแต่ละปล้องมาจากการแบ่งตัวของเนื้อเยื่อ Apical meristem เนื้อเยื่อนี้จะมีการแบ่งตัวและขยายขนาดของเซลล์ออกไปทำให้เกิดเป็นปล้องขึ้น และเมื่อปล้องนั้นมีการเจริญเติบโตต่อไปจะเป็นผลเนื่องมาจาก intercalary meristem ที่อยู่บริเวณส่วนที่เป็นฐานของปล้องนั้น ซึ่งมีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และเมื่อมีการเจริญยืดตัวต่อไป intercalary meristem จะเหลืออยู่บริเวณฐานของข้อเท่านั้น ส่วนบริเวณปล้องของต้นข้าวจะมีลักษณะกลวงและแข็งเมื่อเจริญเต็มที่แล้ว และ meristem ที่อยู่บริเวณฐานของข้อนี้จะทำให้มีการเจริญเติบโตของต้นใหม่ที่แตกออกไปต่อไป (Esau, 1965) พบอินเวอเทสมี Activity ในบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของ intercalary meristem เมื่อเนื้อเยื่อนั้นเจริญสูงขึ้นจนปล้องข้าวเริ่มมีลักษณะกลวง Activity ของอินเวอเทสจะเริ่มลดลง ซึ่ง Sacher (1963) ศึกษาอินเวอเทสในปล้องอ้อยพบว่า Activity ของอินเวอเทสจะสูงเมื่อเนื้อเยื่อนั้นยังเจริญไม่เต็มที่ และ Activity ของอินเวอเทสจะหมดไปเมื่อเนื้อเยื่อเจริญเต็มที่แล้ว Hatch (1963, 1963 b) พบว่าอินเวอเทสของต้นอ้อยในเนื้อเยื่อเจริญนั้นไม่ได้หายไปไหน เพียงแต่มีการทำงานที่ optimum pH ต่างกัน คือในเนื้อเยื่อเจริญมี optimum pH ที่ 5.0 - 5.5 และเมื่อเนื้อเยื่อนั้นเจริญเต็มที่แล้วจะทำงานที่ optimum pH 7.0 ความยาวของปล้องอ้อยจะมีความสัมพันธ์ต่อ Activity ของอินเวอเทสเป็นเส้นตรงในเนื้อเยื่อเจริญ และอินเวอเทสจะลดลงเมื่อเนื้อเยื่อเจริญนั้นกลายเป็นเนื้อเยื่อถาวรแล้ว สำหรับการศึกษา Activity ของอินเวอเทสในครั้งนี้ เป็นอินเวอเทสที่สะกัดจากบริเวณเนื้อเยื่อเจริญเป็นส่วนมาก ซึ่งจาก

ผลการทดลองพบว่ามี optimum pH อยู่ระหว่าง 3.4 - 4.0 ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในสภาพที่เป็นกรด ให้ผลใกล้เคียงกับ optimum pH ของอินเวอเทส ในบริเวณเนื้อเยื่อของอ้อย

เมื่อเปรียบเทียบ Activity ของอินเวอเทสในปล้องที่ P, P-1 กับ reducing sugars ที่พบในปล้องข้าว ในขณะที่มีความยาวต่างกัน (ตารางภาพที่ 8) พบว่าในช่วงระยะแรกของการเจริญเติบโตของ P และ P-1 ประมาณ 0.5 เซนติเมตร Activity ของอินเวอเทสจะเพิ่มขึ้นให้ได้ glucose และ fructose ซึ่งเป็น reducing sugars ในปล้องข้าว ควรจะมีมากด้วย แต่จากผลการทดสอบ reducing sugars ในปล้องข้าวพบว่ายังไม่มีการเพิ่ม reducing sugars ในช่วงระยะนี้ ซึ่งอาจจะเนื่องมาจาก reducing sugars ที่เกิดขึ้นนี้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ทันที เช่น ใช้ในการสร้างพลังงานในช่วงขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตร เป็นช่วงที่ยังมีการแบ่งเซลล์มาก ซึ่งจำเป็นต้องใช้พลังงานมาก หรือ glucose อาจถูกเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate, glucose-1-phosphate; UDPG เพื่อใช้ในการสร้าง cellulose และสารอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการสร้างผนังเซลล์ต่อไป (Lehninger, 1970)

เมื่อปล้องข้าวมีการเจริญเติบโตขึ้นถึง 0.5 - 1.0 เซนติเมตร อินเวอเทสในปล้องของ P และ P-1 จะมี Activity เพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุด และ reducing sugars ในปล้องของ P จะเพิ่มขึ้นด้วยตาม Activity ของอินเวอเทส แต่ในปล้องของ P-1 ยังไม่มีการเพิ่ม reducing sugars มากนัก อาจจะเนื่องจากอินเวอเทสในปล้องของ P-1 ที่เพิ่มขึ้นนั้นไปสลาย sucrose ให้ได้ glucose และ fructose และถูกนำไปใช้ได้เกือบหมด จึงไม่พบ reducing sugars เพิ่มขึ้นจากเดิม ส่วนอินเวอเทสที่มีอยู่ใน P มี Activity สูงกว่า P-1 มากมาย ทำให้มี reducing sugars เกิดขึ้นมากกว่าที่ถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของพืชหรือ

การเกิดดอกข้าว reducing sugars ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อทั้ง P และ P-1 ขณะที่มีความยาว 0.5 - 1.0 เซนติเมตร มีปริมาณที่พอกับความต้องการภายในต้นข้าว ไม่สูงเกินไปที่จะไปยับยั้งการทำงานของการสังเคราะห์อินเวอเทส จะไม่ทำให้ระดับของอินเวอเทสลดลง (glasziou, 1964)

เมื่อปล้องข้าวมีการเจริญเติบโตสูงกว่า 1 เซนติเมตร จะเริ่มมีลักษณะกลวงภายในปล้องข้าว และพบว่าอินเวอเทสในปล้องข้าวทั้ง P และ P-1 ลดลงขณะที่ reducing sugars ยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆคงจะเป็นผลเนื่องมาจาก reducing sugars ที่เพิ่มขึ้นนี้มีคุณสมบัติไปยับยั้งการสังเคราะห์อินเวอเทสภายในเนื้อเยื่อ ซึ่ง Glasziou (1964,1966) ได้ทำการทดลองในอ้อย พบว่า glucose ที่ความเข้มข้น 0.05 M ขึ้นไปจะไปลดการสร้าง messenger RNA ที่ specify ต่อ amino acid sequence ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์อินเวอเทส

เมื่อปล้องข้าวที่ P ยาว 1.5 - 4.0 เซนติเมตร และปล้องที่ P-1 ยาว 2.0 - 4.0 เซนติเมตร อัตราการเพิ่ม reducing sugars ลดลง คงจะเนื่องจากอินเวอเทสที่มีอยู่ในปล้องของ P และ P-1 ลดลง ซึ่งจะทำให้การสลายตัวของ sucrose ไปเป็น glucose และ fructose ลดลงด้วยและ reducing sugars ทั้งหมดที่มีอยู่อาจจะถูกเปลี่ยนหรือไปใช้ในการสร้างสารที่มีโมเลกุลใหญ่ขึ้น เพราะในระยะนี้เป็นระยะที่เซลล์อยู่ในภาวะที่กำลังมีการยืดตัว และยังมีคุณสมบัติเป็น substrate ที่สำคัญต่อขบวนการหายใจและพลังงาน ทำให้มีการสร้าง reducing sugars อยู่เรื่อยๆ แต่จากการศึกษาที่พบว่าเมื่อเนื้อเยื่อเจริญเริ่มยืดตัวมากขึ้นอินเวอเทสลดลง reducing sugars ที่พืชต้องการอยู่ตลอดเวลานั้น Hatch (1963) ได้ศึกษาพบว่าอินเวอเทสเมื่อเนื้อเยื่อเจริญกลายเป็นเนื้อเยื่อถาวรแล้ว Activity ของอินเวอเทสจะมีการเปลี่ยน optimum pH จากภาวะที่เป็นกรดเป็นภาวะที่เป็นกลางซึ่งมีหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในต้นต่อไป

ผลการตรวจสอบ Invertase Activity ในระยะแรกของการเจริญเติบโตของปล้องข้าว พบว่าในก้านชอดอกที่มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จะมี Activity ของอินเวอเทสสูงที่สุดซึ่งจะนำไปศึกษาในการทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์และใช้ในการศึกษาทาง Kinetics ต่อไป

4.5 การทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์

อินเวอเทสที่สะกัดได้จากปล้องของก้านช่อดอก (P) จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์ขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาทาง kinetics ต่อไป เนื่องจากการสะกัดอินเวอเทสออกมาโดยวิธีการบดนั้น มีสารอื่นนอกเหนือจากอินเวอเทสปนมาด้วย เช่น reducing sugars และโลหะหนักบางชนิดซึ่งอาจจะมีผลไปยับยั้ง Activity ของอินเวอเทส (Neuberg, 1946 ; Myrbäck, 1960) การแยกเอนไซม์ที่ต้องการศึกษาจากสารที่สะกัดออกมาได้นั้น นับว่าเป็นวิธีการที่ยากมาก เนื่องจากเอนไซม์ denature ได้ง่าย วิธีการสะกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จึงต้องทำอย่างระมัดระวังไม่รุนแรง เพื่อรักษาโมเลกุลของเอนไซม์ให้เหมือนเดิมและมี Activity สูง

4.5.1 Dialysis

จากการศึกษาเวลาที่ใช้สำหรับ Dialysis initial extract พบว่าในเวลา 1 ชั่วโมง เกือบจะไม่มีความแตกต่างระหว่าง initial extract กับ dialyzable ไม่ว่าจะเป็น Activity หรือปริมาณโปรตีน เนื่องจากการแพร่ของสารที่มีโมเลกุลเล็กใน initial extract ออกมาได้น้อย เพราะถุงที่ใช้มีขนาดใหญ่เกินไปเมื่อเทียบกับปริมาณสารที่ใส่เข้าไป และเวลาที่ใช้สำหรับ dialysis น้อยเกินไป เมื่อ dialyse ต่อไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สารที่มีโมเลกุลเล็กสามารถแพร่ออกไปจากภายในถุงที่ใช้ dialyse มากขึ้น จาก reducing sugars ที่มีอยู่เดิมใน initial extract 620 µg/ml. หลังจาก dialyse ผ่านไปแล้ว 3 ชั่วโมง พบว่ามี reducing sugars เหลืออยู่เพียง 200 µg/ml. เมื่อศึกษา Total Activity ของอินเวอเทสพบว่าสูงขึ้นประมาณ 0.6 เท่า ได้ yield 180 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า แต่ปริมาณโปรตีนลดลงจาก initial extract 0.06 mg/ml. และเมื่อ dialyse ต่อไปจนครบ 6 ชั่วโมง

ปรากฏว่าไม่มี reducing sugars อยู่ใน dialyzable เลย และ Total Activity ของอินเวอเทสสูงขึ้นประมาณ 1.6 เท่าของ initial extract ได้ yield 225 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 3.16 เท่า แต่มีการสูญเสียโปรตีนไปจากเดิม 0.15 mg/ml

วิธีการ dialysis เป็นวิธีการที่อาศัยหลักของ diffusion สารที่มีโมเลกุลเล็กจะผ่านผนังของ cellophane ออกมาข้างนอกได้ เช่น คาโบไฮเดรต หรือ soluble substances ต่าง ๆ แต่น้ำตาลพวก polysaccharides ก็ dialyse ออกไปได้ยาก ส่วนโปรตีนเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ และ มีคุณสมบัติเป็น non-dialyzable ดังนั้นวิธีการ dialysis เป็นวิธีที่ใช้กำจัดสารต่าง ๆ ออกจากโปรตีน (Glick, 1962) และผลการทดลอง ปรากฏว่าได้ yield สูงขึ้นกว่าเมื่อยังไม่ได้ผ่านวิธีการ dialysis เป็นผลเนื่องมาจากสารที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสออกไปข้างนอกได้ เช่น reducing sugars, โลหะหนักบางชนิด และเกลือแร่ จากผลการทดลองในหัวข้อ 3.6.5 และ 3.6.6 พบว่า glucose และ โลหะหนักบางชนิด สามารถยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสยิ่งความเข้มข้นสูงขึ้น จะมีความสามารถยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสมากขึ้นด้วย ในกานของซอดอก (P) พบว่าใน initial extract มีความเข้มข้นของ reducing sugar สูงถึง .004 (ประมาณ 700 µg/ml) ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสมากกว่า 50 เปอร์เซนต์

แต่วิธีการ dialysis นี้ไม่สามารถแยกโปรตีนต่างชนิดกันออกจากกันได้ ดังนั้นสารที่ได้ภายหลังจาก dialysis แล้วจะมีเอนไซม์หลายชนิดปนกันอยู่นอกเหนือจากอินเวอเทส ซึ่งจะมีผลทำให้การวัด Activity ผิดพลาดได้ เอนไซม์ที่มีอยู่ใน dialyzable นี้ อาจจะมีบางตัวที่ไปเปลี่ยน end product ที่เกิดขึ้น เช่น glucose, fructose ให้เป็นสารอื่นต่อไป หรือไปทำให้เกิด reducing sugars เพิ่มขึ้นจากสารโมเลกุลอื่นที่

มีปนอยู่และไม่สามารถ dialyse ออกไปได้เช่น แป้ง อาจถูกเปลี่ยนให้เป็น glucose-1- phosphate และ glucose-6- phosphate ซึ่งวิธีการนำ initial extract มาทำให้บริสุทธิ์โดยการ dialysis นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาทาง kinetics

4.5.2. การทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต

นำตะกอนที่ได้ภายหลังจากตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตละลายใน citrate - phosphate buffer แล้วมาทดสอบ Activity ของอินเวอเทสไม่ใช้ Supernatant มาทดสอบ Activity เนื่องจาก fraction หลังมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตสูงและเป็นสาเหตุหนึ่งที่ไปรบกวนการวัดปฏิกริยาของเอนไซน์และโปรตีน (Dixon, 1964) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อตกตะกอน แอมโมเนียมซัลเฟต fraction ละ 10 เปอร์เซนต์ ปรากฏว่า fraction ที่ 30-40 เปอร์เซนต์ให้ yield สูงที่สุด และ fraction ที่ 10-20 และ 40-50 เปอร์เซนต์ ได้ yield รองลงมา (ตารางที่ 5) แต่ yield ที่ได้นั้นน้อยมากและมีความบริสุทธิ์น้อยกว่าใน initial extract เนื่องจากแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนนั้นปะปนลงมาด้วย และไปรบกวนการวัด Activity ของอินเวอเทสและโปรตีน ทำให้ Activity ของอินเวอเทสและความบริสุทธิ์ลดลง เมื่อนำ fraction ต่าง ๆ มา dialyse เอาแอมโมเนียมซัลเฟตออก ผลปรากฏว่า yield และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์สูงขึ้น ที่ fraction 0-10 เปอร์เซนต์ ก่อนและหลัง dialysis พบว่าไม่มี Activity ของอินเวอเทสอยู่เลย แต่วัดปริมาณโปรตีนได้ 0.035 mg/ml เป็นโปรตีนชนิดอื่นที่ปนมาใน initial extract การวัดโปรตีนโดยวิธี Lowry Method นี้เป็นการวัดปริมาณ Tyrosine และ Tryptophan ที่มีอยู่ในส่วนประกอบของโปรตีนเป็นส่วนมาก (Lowry,1951) ที่ fraction ตั้งแต่ 10-60 เปอร์เซนต์ สามารถวัด Activity ของอินเวอเทสได้หมดทุก fraction

เพราะฉะนั้นอินเวอเทส สามารถตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตได้ในช่วงความเข้มข้นที่กว้างมาก และ fraction ที่ให้ผลดีที่สุดภายหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ dialyse แล้วคือ fraction ที่ 30 - 40 เปอร์เซนต์ ให้ Activity และ Specific Activity สูงที่สุด ได้ Yield 92.6 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.8 เท่า และ fraction ที่ 20 - 30 และ 40 - 50 เปอร์เซนต์ ให้ Yield และความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นรองลงมา (ตารางที่ 6) จากผลการทดลองนี้ นำ fraction ที่ให้ Yield สูง และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจาก initial extract มารวมกันเป็น fraction ที่ 0 - 20, 20 - 45 และ 45 - 60 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ผลจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำมาศึกษา Activity ของอินเวอเทส พบว่า ที่ fraction 0 - 20 และ 45 - 60 เปอร์เซนต์ก่อนและหลัง dialyse มี Activity ของอินเวอเทสต่ำมาก และมีความบริสุทธิ์น้อยเมื่อเทียบกับ initial extract ส่วนใหญ่โปรตีนที่ตกตะกอนใน fraction เหล่านี้เป็นโปรตีนของเอนไซม์ชนิดอื่น มีเอนไซม์อินเวอเทสบ้างเป็นส่วนน้อย ซึ่งอินเวอเทสส่วนใหญ่จะตกตะกอนลงมาใน fraction ที่ 20 - 45 เปอร์เซนต์ fraction ที่ 20 - 45 เปอร์เซนต์ ก่อนที่จะ dialysis พบว่า มี yield และความบริสุทธิ์น้อยกว่าใน initial extract และภายหลังจากที่ dialysis เอาแอมโมเนียมซัลเฟตออกแล้ว ปรากฏว่าได้ yield สูงขึ้น และมีความบริสุทธิ์มากขึ้น เช่นเดียวกับเมื่อทำการทดลองใน fraction ละ 10 เปอร์เซนต์ yield ที่ได้ภายหลังจาก dialysis แล้วสูงถึง 133.4 เปอร์เซนต์ ซึ่งสูงกว่าเมื่อยังไม่ได้ dialyse ถึง 100.6 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์ 4.2 เท่า มากกว่ายังไม่ได้ dialyse ถึง 3.6 เท่า

การที่โปรตีนตกตะกอนเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากโปรตีนเป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่และมีคุณสมบัติเป็น electrolyte แอมโมเนียมซัลเฟตจะไป neutralysed charge ทำให้โปรตีนตกตะกอน

แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างกันจะมีความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนต่างกัน และสิ่งเจือปนต่างๆที่มีใน initial extract ส่วนใหญ่จะไม่ตกตะกอนลงมาด้วย และยังไม่มีผลกระทบกระเทือนต่อเอนไซม์ส่วนมากด้วย แต่อาจมีการเสียเอนไซม์ที่ต้องการศึกษาไปบ้างใน fraction ที่ทิ้งไป (Dixon, 1964)

การทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตนับว่าเป็นวิธีที่ดีกว่า dialyse เนื่องจากมีความบริสุทธิ์มากกว่าและสามารถแยกอินเวอเทสจากโปรตีนชนิดอื่นได้โดยที่ไม่มีการเสียสภาพโปรตีน (denature) ทำให้การวัด Activity ของอินเวอเทสและการศึกษาทาง kinetics มีผลถูกต้องกว่า ซึ่งเป็นการทำงานของอินเวอเทสอย่างแท้จริง ไม่ใช่เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่นด้วย แต่แอมโมเนียมซัลเฟตก็ยังมีผลไปรบกวนการวัดปฏิกริยา ซึ่งจำเป็นต้อง dialyse เอาแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากโปรตีนอีกครั้งหนึ่งด้วย ในการศึกษา kinetics ของอินเวอเทส จะใช้ fraction ที่ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 20-45 เปอร์เซนต์ และ dialyse ใน citrate phosphate buffer ที่อุณหภูมิต่ำอีกประมาณ 3 ชั่วโมง

4.6 Enzyme Kinetics.

4.6.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการ incubate

การศึกษาเวลาที่ใช้ในการ incubate ปรากฏว่า ในช่วงระยะเวลา 2 ชั่วโมงแรกได้กราฟเป็นเส้นตรง (ตารางภาพที่ 9) เมื่อใช้เวลา incubation นานขึ้น ปรากฏว่า Activity ของอินเวอเทส ไม่เพิ่มเป็นสัดส่วนต่อเวลาเหมือนใน 2 ชั่วโมงแรก กราฟจะเริ่มเบนลงในแนวนอน ในการศึกษาปฏิกริยาของอินเวอเทส สมควรที่จะใช้เวลาสำหรับ incubation ใน 2 ชั่วโมงแรก และเพื่อไม่ให้เสียเวลามากเกินไป จึงทำในเวลาเพียง 1 ชั่วโมง แต่ถ้าใช้เวลา incubation น้อยกว่านี้ ค่า Klett Reading ก็จะน้อยมากเกินไปจนทำให้เกิดผิดพลาดมาก และถ้าจะศึกษาผลของอินเวอเทสในภาวะอื่น ๆ จะทำให้เห็นความแตกต่างไม่ชัดเจน

4.6.2 ผลของ pH ต่อ Invertase Activity

โดยทั่วไปการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วงของ pH ที่จำกัด เนื่องมาจากการอยู่ตัวของเอนไซม์ซึ่งอาจถูกทำลายได้ที่ pH อื่นนอกเหนือจากค่า optimum หรือเนื่องมาจากไปลด affinity ในการรวมตัวของเอนไซม์กับ substrate (Dixon and Webb, 1964) pH-activity จะมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ขึ้นอยู่กับค่า pK ของ ionizing group ที่ active site ของเอนไซม์ที่จะยึดกับ substrate และ pK ของ functional group ของ substrate ในการที่ยึดกับเอนไซม์ด้วย ค่า pH นี้ถ้าเปลี่ยนแปลงไปจะทำให้ Km ของเอนไซม์นั้นเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Lehninger, 1970) Neuberg (1946) กล่าวว่า อินเวอเทสโดยทั่วไปมีค่า optimum pH อยู่ระหว่าง 3.5-5.5 แต่ในบางครั้ง pH optimum อาจมีค่าสูงขึ้นถึง 6 หรือ 8 เช่นใน Aspergillus oryzae หรือที่ Hatch (1963 a) พบในเนื้อเยื่อที่เจริญดาวรแล้วใน Saccharum sp ซึ่งมี optimum pH ที่ 7.0

จากการศึกษา Activity ของอินเวอเทสจากเนื้อเยื่อเจริญของ Oryza sativa L. variety R.D. 1 เมื่อใช้ citrate-phosphate buffer ที่ pH 3.4-4.0 เป็นช่วงที่มี Activity สูงที่สุด และเมื่อ pH สูงหรือต่ำกว่านี้ Activity ของอินเวอเทสจะลดลง (ตารางภาพที่ 10) แสดงว่าอินเวอเทสในเนื้อเยื่อเจริญของ Oryza sativa นี้มี Activity ดีในสภาพ pH ที่เป็นกรด จากผลการทดลองนี้ แสดงว่าอิทธิพลของ pH ต่อ Activity ของอินเวอเทสใกล้เคียงกับผลที่ Straus (1962) ศึกษาอินเวอเทสใน Pyrus และ Libocidrus ซึ่งมี optimum pH ที่ 3.4 และ Cupressus ซึ่งมี optimum pH ที่ 3.6

นอกจากนี้ปรากฏว่ามีการศึกษา pH ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ กัน เช่นในยีสต์พบว่ามี optimum pH อยู่ระหว่าง 4.0-5.5 (Myrbäck, 1960) ใน Helianthus tuberosus จะมี optimum pH ที่ 5.0 (Barmann, 1969) ใน Avena sativa จะมี optimum pH ที่ 5.0 (Kaufman, 1968) จึงเห็นได้ว่า อินเวอเทสที่มาจากแหล่งกำเนิดต่างกันจะมีค่า optimum pH ต่างกัน ถึงแม้ว่าจะมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน แต่จากเนื้อเยื่อที่มีอายุต่างกัน ก็พบว่า optimum pH จะต่างกันด้วย ดังเช่นที่ Glasziou และ Hatch ศึกษาเนื้อเยื่อเจริญและเนื้อเยื่อถาวรของ Saccharum แล้วพบว่า เนื้อเยื่อเจริญจะมีค่า optimum pH ที่ 5.0-5.5 แต่เมื่อเนื้อเยื่อเจริญนั้นเจริญเติบโตขึ้นจนเป็นเนื้อเยื่อถาวรแล้ว ค่า optimum pH จะเปลี่ยนไป คือมี optimum pH ที่ 7.0

4.6.3 ผลของอุณหภูมิต่อ Invertase Activity

ผลของอุณหภูมิมีความแตกต่างกันเนื่องจากการอยู่ตัวของเอนไซม์, การแตกตัวของ complex และความร้อนมีผลต่อปฏิกริยาการทำงานของเอนไซม์ (Dixon and Webb, 1964) เมื่อศึกษาผลการทำงานของอินเวอเทสที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน พบว่าอัตราการสลายตัวของ sucrose จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น จนถึงที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซนติเกรด Activity

ของอินเวอเทสจะขึ้นสูงที่สุด และถ้าเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปอีก Activity ของอินเวอเทสจะลดลงอย่างรวดเร็ว (ตารางภาพที่ 11) Slack (1965) ศึกษาพบว่าอินเวอเทสจะเสียคุณสมบัติในการสลาย sucrose ให้ได้ glucose และ fructose ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซนติเกรด Hatch (1963 b) ศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 18 องศาเซนติเกรด Activity ของอินเวอเทสจะมีค่าใกล้เคียงกับเมื่อไม่ได้ใช้เวลาในการ incubate (เวลา 0 นาที) ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซนติเกรด Activity ของอินเวอเทสจะสูงขึ้น Kaufman (1968) พบว่า optimum temperature ในข้าวโอต Avena sativa เท่ากับ 30 องศาเซนติเกรด ซึ่งต่ำกว่าในข้าวเจ้าที่ทำการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากภาวะแวดล้อมของข้าวที่เพาะปลูกต่างกัน ข้าวโอตเป็นข้าวที่ขึ้นในเขตหนาว อบอุ่น ส่วนข้าวเจ้าพันธุ์นี้ เป็นข้าวที่ขึ้นได้ดีในเขตร้อน ดังนั้น ความต้องการอุณหภูมิที่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ในข้าวเจ้าจึงได้สูงกว่า

4.6.4. ผลความเข้มข้นของ substrate ต่อ Invertase Activity

เมื่อศึกษาอินเวอเทสกับความเข้มข้นของ sucrose ที่ใช้เป็น substrate จะปรากฏผลว่า เมื่อ sucrose มีความเข้มข้น 0.1 M Activity ของอินเวอเทสจะสูงที่สุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ sucrose ให้สูงกว่านี้ Activity ของอินเวอเทสจะไม่เพิ่มขึ้น เมื่อ sucrose saturation แล้วจะไม่ทำให้ปฏิกริยาของอินเวอเทสขึ้นกับความเข้มข้นของ sucrose อีกต่อไป แต่จะขึ้นกับปริมาณของเอนไซม์แทนเมื่อภาวะต่าง ๆ คงที่ ในการทดลองศึกษาใช้ sucrose ที่ความเข้มข้น 0.05 M นับว่าเป็นความเข้มข้นที่พอเหมาะค่าหนึ่ง ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้กราฟเริ่มเป็นเส้นนอน (ตารางภาพที่ 12)

Ruchti (1964) ศึกษาอัตราการไฮโดรไลส์ของ sucrose มี velocity เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น และจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ sucrose มากกว่า 0.2 M เนื่องจาก viscosity

effect หรือ substrate inhibition

เมื่อนำ Activity ที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง $\frac{1}{v}$ กับ $\frac{1}{[S]}$ โดยใช้วิธีของ Lineweaver and Burk's Plot ได้ค่า Km (Michaelis Menten constant) เท่ากับ 33×10^{-3}M และ Vmax เท่ากับ 285.7 unit (µg Glucose/mg dry weight/hr.) (ตารางภาพที่ 13) Km เป็นค่าแสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ที่มี affinity ต่อ substrate concentration ค่า Km เปลี่ยนแปลงได้เนื่องจากโครงสร้างของ substrate, pH และอุณหภูมิ ส่วน Vmax เป็นค่า velocity constant ในการ breakdown enzyme-substrate ซึ่งมีค่าเปลี่ยนแปลงได้เนื่องจากโครงสร้างของ substrate, pH และอุณหภูมิเช่นเดียวกับ Km แสดงว่าคุณสมบัติทาง Kinetics ของเอนไซม์ชนิดเดียวกันอาจแตกต่างกันได้เนื่องจากความแตกต่างของภาวะที่ใช้ในการทดลอง Myrbäck(1960) ศึกษา affinity ของอินเวอเทสต่อ sucrose มีค่า Km = 30×10^{-3} M และ Hellebust (1962) พบว่า yeast invertase มีค่า Km อยู่ระหว่าง 17×10^{-3} M - 40×10^{-3} M Barman (1969) ศึกษา Km ของ yeast ที่ pH 4.6 = 9.1×10^{-3}M ค่า Km ที่ได้จากเอนไซม์ที่มาจากแหล่งต่างกัน ที่ pH ต่างกัน จะมีค่าไม่เท่ากัน ผลการทดลอง Km ของอินเวอเทสในข้าวเจ้าจะมี affinity ใกล้เคียงกับ yeast invertase

4.6.5 <u>ผลความเข้มข้นของ Glucose ต่อ Invertase Activity</u>

มีการศึกษาคุณสมบัติของ glucose ต่ออินเวอเทสกันมาก Glasziou (1964, 1966) พบว่า glucose มีผลไปควบคุมการสังเคราะห์อินเวอเทสภายในเนื้อเยื่อ โดยไปลดการสังเคราะห์ messenger RNA ที่ specific ต่อ amino acid sequence สำหรับอินเวอเทส และเมื่อ reducing sugars ในเนื้อเยื่อสูงมากขึ้นยังจะมีผลไปยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสเพื่อให้เกิดสมดุลย์ขึ้นภายในเนื้อเยื่อนั้น

glucose ไม่มีผลเป็น competitive inhibitor (Glasziou, 1964 b) คือจะไม่รวมตัวกับเอนไซน์อินเวอเทสที่ active site แต่จากผลการทดลองพบว่า glucose มีผลเป็น non-competitive inhibitor ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งอินเวอเทสจะรวมตัวกับ monosaccharide ได้ง่ายกว่า disaccharide แต่ไม่ใช่ที่บริเวณ active site ของเอนไซน์อินเวอเทสนั้น (Neuberg, 1946) glucose สามารถยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสได้ทุกความเข้มข้น (ตารางภาพที่ 14) และที่ความเข้มข้น 5×10^{-4} M สามารถยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสได้ 53 เปอร์เซนต์ มีค่า Km เท่ากับเมื่อไม่ได้ใส่ glucose ลงไปในปฏิกริยาคือเท่ากับ 33×10^{-3}M แต่ค่า Vmax ลดลงเหลือเพียง 113.6 unit (ตารางภาพที่ 15)

4.6.6. ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารบางชนิดที่เป็นตัวห้ามของอินเวอเทส

การทำงานของอินเวอเทสถูกขัดขวางเนื่องจากโลหะหนัก เช่น silver และ mercury เพราะสารเหล่านี้ไปทำปฏิกริยากับ -SH groups ของ amino acid เช่น cysteine ซึ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของเอนไซน์โดย silver และ mercury เหล่านี้ไปทำปฏิกริยากับ -SH groups ได้เป็น mercaptides ขึ้น (Lehninger, 1970) การเกิด complex ขึ้นเช่นนี้ทำให้อัตราการสลายตัวของ enzyme-substrate complex ช้ากว่าปกติ เป็นเหตุให้ Maximum velocity ของอินเวอเทสลดลง นั่นคือ Vmax ลดลงแต่ค่า Km ยังคงที่อยู่ เนื่องจากสารตัวห้ามเหล่านี้ไม่มีผลต่อการเกิด enzyme-substrate complex. mercuric chloride ที่ความเข้มข้น 2×10^{-3}M สามารถไปยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสได้ 83.9 เปอร์เซนต์ และ silver nitrate ที่ความเข้มข้น 10×10^{-3}M จะไปยับยั้งการทำงานของอินเวอเทส 86.7 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 10)

Potassium iodide มีผลทำให้ได้สารใหม่ขึ้น คือ iodo-invertase เป็นผลเนื่องมาจาก iodination ของ ring structures (Tyrosine,etc.) ในโมเลกุล จะทำให้เกิด Activity เพียง 60 เปอร์เซนต์ของปฏิกริยาที่ไม่มี iodine (Myrbäck, 1960) ผลการทดลองเมื่อใส่ 0.3 M potassium iodide จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของอินเวอเทส 25 เปอร์เซนต์ และทำให้ Maximum velocity ของอินเวอเทสลดลง คือ Vmax ลดลง แต่ค่า Km คงที่ (ตารางที่ 10)

Potassium chloride อาจเป็นต้นเหตุให้ Activity ของอินเวอเทสลดลงเช่นเดียวกับ glucose แต่ glucose มีผลไปยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสมากกว่า potassium chloride (Glasziou, 1964) จากผลการทดลอง potassium chloride จะทำให้ Activity ของอินเวอเทสลดลงเช่นเดียวกับสารตัวห้ามปฏิกริยาอื่น ๆ ที่ทดลอง. potassium chloride ที่ความเข้มข้น 0.3 M จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของอินเวอเทส 29 เปอร์เซนต์ มีค่า Vmax ลดลง และ Km คงที่ (ตารางที่ 10)

จากการศึกษาสารที่เป็นตัวห้ามปฏิกริยาต่าง ๆ เช่น silver nitrate, mercuric chloride, potassium iodide และ potassium chloride เมื่อนำมาเขียนกราฟโดยวิธี Lineweaver and Burk's Plot จะแสดงว่า Km ของอินเวอเทสเมื่อไม่ได้ใส่สารที่เป็นตัวห้ามปฏิกริยา และที่ใส่สารที่เป็นตัวห้ามปฏิกริยา จะมีค่าเดียวกันคือ 33×10^{-3} M ส่วนค่า Vmax ของอินเวอเทสเมื่อใส่สารที่เป็นตัวห้ามปฏิกริยาจะมีค่าลดลง จะลดลงมากน้อยเท่าใดแล้วแต่ชนิดของสารนั้น (ตารางภาพที่ 15) จากผลการทดลองแสดงว่าสารต่าง ๆ ที่ยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสดังที่กล่าวมาแล้วมีคุณสมบัติเป็น non-competitive inhibitors ทั้งหมด