## 2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 2.1 อุปกรณ์

#### 2.1.1 วัสดุที่ใช้

พืชที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือข้าวเจ้าพันธุ์ ก. ข. 1 (กรมการข้าว 1) (Oryza sativa var. R.D.I.) ได้มาจากลูกผสมของข้าวเจ้าพันธุ์เหลืองทองกับ พันธุ์ไออาร์ 8

พันธุ์เหลืองทอง เป็นข้าวนาปรังพันธุ์ดีของกรมการข้าว ต้นสูง มีคุณภาพเมล็ดข้าวสารดีได้มาตรฐาน แต่มีข้อเสียคือ เป็นโรคใบสีส้มง่ายหนอนกอชอบทำลาย และถ้าปลูกในที่ดินดีหรือใส่ปุ๋ยมากจะเฝือใบและล้มง่าย

พันธุ์ไออาร์ 8 เป็นข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์เปตาข้าวขยายพันธุ์ของฟิลิปปินส์ แต่มีพื้นเพจริงๆ อยู่ในประเทศอินโดนีเซีย และพันธุ์ดีจีวเจน ข้าวต้นเตี้ยได้จากไต้หวัน ข้าวพันธุ์ไออาร์ 8 นี้ บางแห่งเรียกว่าข้าวมหัศจรรย์บ้าง ข้าวผลผลิตสูงบ้าง มีหลายประเทศได้นำข้าวพันธุ์นี้ไปปลูกเพื่อที่จะเพิ่มผลผลิตของตนสำหรับประเทศไทย ได้รับข้าวพันธุ์นี้มาปลูกนานแล้ว ก่อนที่จะมีข้าวเป็นที่แตกตื่นของประชาชนเสียอีก ลักษณะที่ดีคือ ต้นเตี้ย สูงไม่เกิน 1 เมตร ใบตั้งตรงสีเขียวเข้ม ต้านทานโรคใบสีส้มดีพอใช้ ไม่ล้มง่าย เป็นพันธุ์ไม่ไวแสง ขนาดเมล็ดยาวปานกลาง แต่ปรากฏว่าข้าวพันธุ์นี้มีข้อเสีย คือเมล็ดข้าวสารมีท้องไข่มาก เมื่อสีเป็นข้าวสาร ข้าวจะหักมาก และยังไม่เหมาะสมกับสภาพที่นาของประเทศไทยหลายแห่ง กรมการข้าว กระทรวงเกษตร ได้พยายามหาพันธุ์ข้าวขึ้นใหม่ ให้มหัศจรรย์ไปยิ่งกว่า ไออาร์ 8 โดยมีคุณภาพเหนือกว่า และมีความเหมาะสมที่จะให้ชาวนาทั่วไปปลูกได้

จากการทดลองผสมพันธุ์ข้าวเหลืองทองกับไออาร์ 8 ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ปรากฏว่าข้าวพันธุ์ผสมสายพันธุ์ BKN 56-1-2 เรียกชื่อทั่วไปว่า R.D.1 นั้น ให้ผลผลิตสูงถึง 741 กิโลกรัมต่อไร่ ขณะที่ข้าวพันธุ์ IR8 ให้ผลผลิตสูง 715 กิโลกรัมต่อไร่ และข้าวพันธุ์ผสม ก.ข. 1 นี้ มีลักษณะที่ดีของพ่อแม่รวมกันแต่ไม่มีลักษณะเลวที่ไม่ต้องการ คือมีลักษณะรูปแบบของลำต้นและความต้านทานโรคเหมือนไออาร์ 8 แต่มีคุณภาพเมล็ดข้าวสารเหมือน**เหลืองทอง** และเป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง เป็นผลดีที่จะนำมาปลูกในฤดู**กาล**ใดก็ได้ เมื่อถึงอายุประมาณ 120 วัน นับจากตกกล้าก็สามารถเก็บเกี่ยวได้

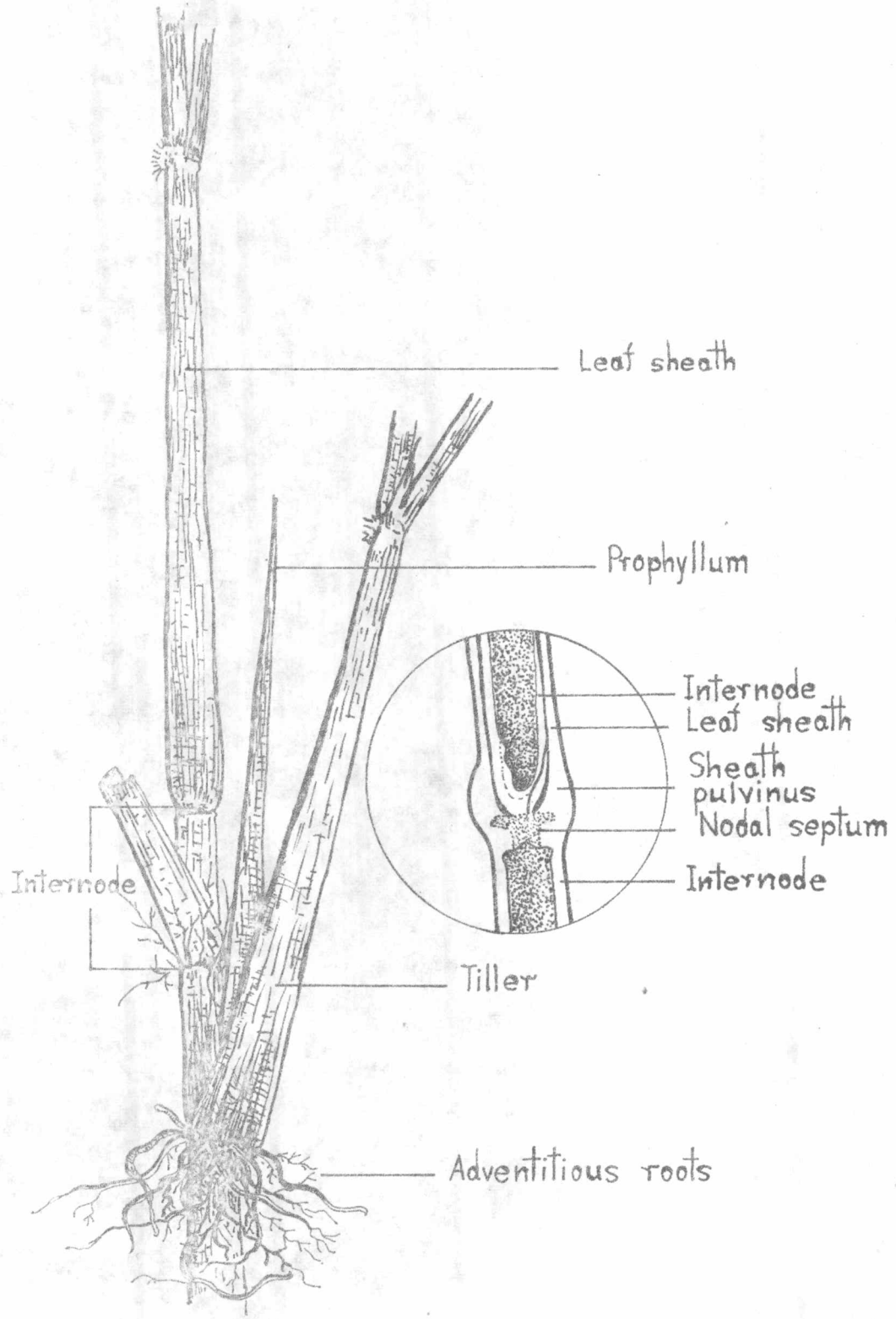
คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ของกระทรวงเกษตรได้พิจารณาและลงมติให้พันธุ์ข้าว ก.ข. 1 ซึ่งค้นคว้าได้โดยกรมการข้าว เป็นข้าวพันธุ์ดีให้ส่งเสริมและเผยแพร่ให้กสิกรชาวนาใช้ทำพันธุ์ได้เมื่อวันที่ 15 ธันวาคม พ.ศ. 2512 เป็นข้าวลูกผสมรุ่นแรกที่ได้รับการพิจารณาให้ส่งเสริมเผยแพร่ให้ชาวนาใช้ทำพันธุ์ได้ (ไพบูลย์ ตราชู, 2513 ผลงานทดลองของกองบำรุงพันธุ์ 2511 )

2.1.2 <u>ลักษณะของข้าว</u>

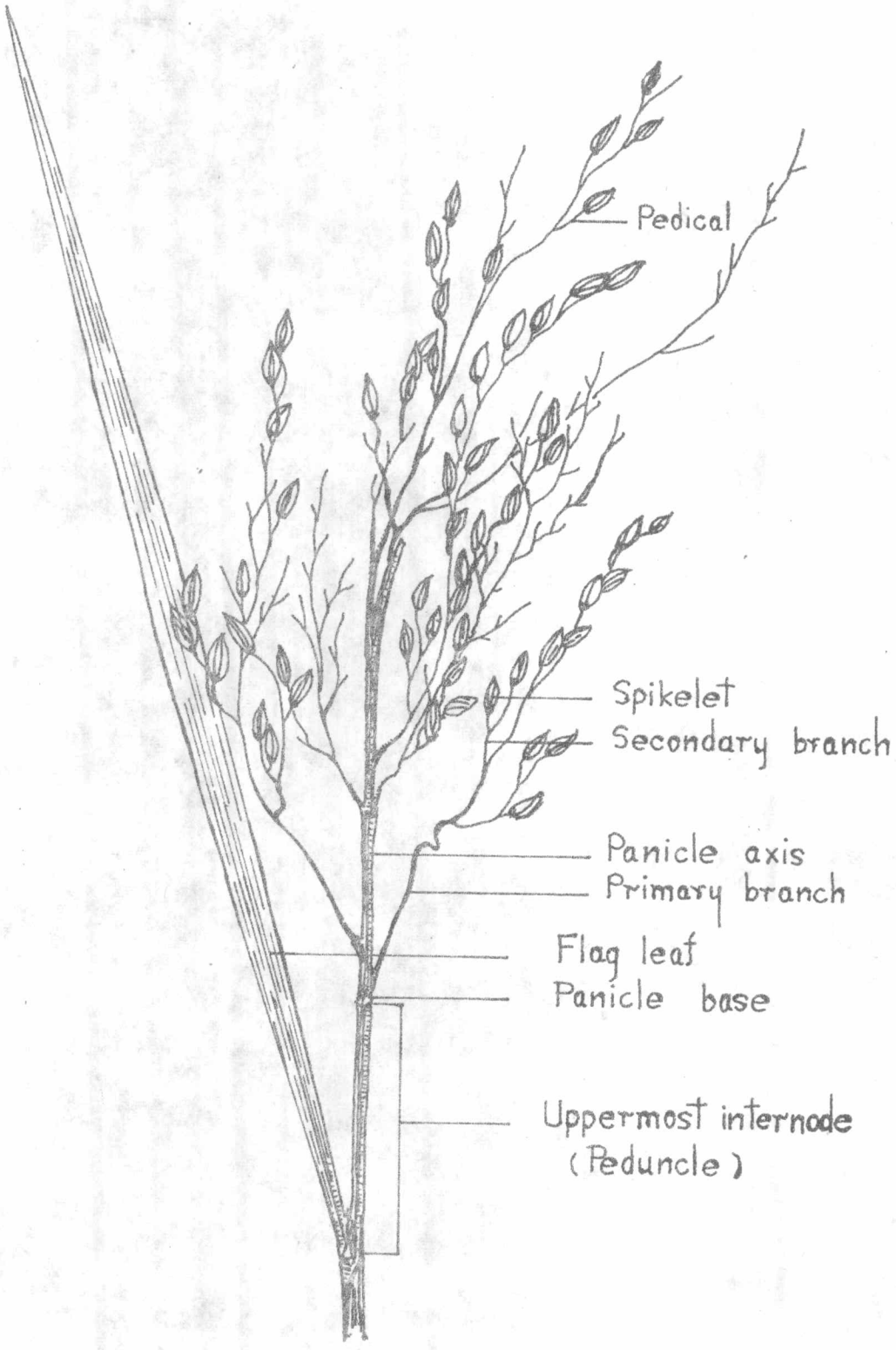
Kaufman (1960), Tanaka (1964) และ Tanaka (1966 ) ศึกษาลักษณะทั่วไปและการเจริญเติบโตของข้าวเจ้า <u>Oryza sativa</u>

<u>ต้น</u> เห็นลักษณะข้อและปล้องชัดเจน มีใบเกิดขึ้นที่บริเวณข้อและที่ตาจะมีการแตกกอ (Tiller) เจริญเป็นต้นขึ้นมาอีก เมื่อต้นข้าวเจริญเต็มที่จะมีลักษณะกลวงเป็นช่อง ปกติปล้องของข้าวจะมีการยืดตัวจากปล้องล่างขึ้นมาก่อน แล้วข้อที่อยู่ข้างบนจึงจะเจริญยืดยาวขึ้นทีหลัง ปล้องล่างจะมีลักษณะสั้นและหนากว่าปล้องข้างบน

การแตกกอของต้นใหม่เกิดแบบ Alternate (รูปที่ 1 ) จะเจริญจากข้อที่ต่ำสุดขึ้นมา และข้อที่มีการแตกกอของข้าวจะเห็นมี




รูปที่ 1 แสดงการแตกกอของต้นข้าว




รูปที่ 2 แสดงส่วนประกอบของช่อดอกข้าว

รากฝอยเกิดขึ้นรอบๆ บริเวณข้อนั้น

ใบ เกิดขึ้นติดกับข้อโดยมีกาบใบหุ้มขึ้นมา และใบสุดท้ายที่เกิดขึ้นต่ำกว่าช่อดอก เรียกว่า ใบธง (Flag leaf)

ช่อดอก เป็นกลุ่มของ spikelets เกิดบนข้อสุดท้ายของต้น ข้อที่อยู่ระหว่างปล้องสุดท้ายหรือที่เรียกว่าก้านช่อดอก กับแกนของช่อดอก จะเห็นมีลักษณะเป็นขนอยู่รอบข้อเป็นวงใช้เป็นที่สังเกตุในการวัดความยาวของก้านช่อดอก ซึ่งเหนือจากข้อนี้ขึ้นไปจะเป็นช่อดอก (รูปที่ 2)

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การปลูก

การปลูกข้าว ก.ข. 1 ที่ใช้ในการศึกษานี้ ใช้เมล็ดพันธุ์ข้าวเพาะบนกระดาษฟางเพาะเชื้อที่มีความชื้นใน Petri dish ที่อุณหภูมิ 29 - 30 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 3 วัน เมล็ดจะเริ่มงอก ย้ายต้นออนเหล่านี้ซึ่งเรียกว่าข้าวกล้า ลงในกระถางดินที่มีน้ำขังอยู่สูงประมาณ 2 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ยแอมโมฟอส ( N-P-K ) ในอัตรา 7-10 กิโลกรัมต่อไร่ ภายหลังจากหว่านข้าวกล้าแล้ว 7-10 วัน

เมื่อข้าวกล้ามีอายุระหว่าง 20-25 วัน ย้ายต้นกล้าไปปักดำในแปลงเพาะพันธุ์ที่มีขนาดยาว 6.4 เมตร กว้าง 2.3 เมตร ซึ่งเตรียมดินและใส่ปุ๋ยแอมโมฟอส 6-6-6 กิโลกรัมต่อไร่ เรียบร้อยแล้ว ใส่น้ำลงในแปลงเพาะพันธุ์ให้มีระดับสูง 5-10 เซนติเมตร การปักดำข้าวกล้าแต่ละต้นเว้นระยะห่างระหว่างต้น 20-25 เซนติเมตร เรียกต้นแรกนี้ว่าต้นแม่ เมื่อต้นข้าวตั้งตัวได้แล้วประมาณ 6-7 อาทิตย์หลังปักดำ จะเริ่มมีการแตกกอ (Tiller) จากต้นแม่ออกไป เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะสามารถแตกกอได้สูงสุดถึง 30 ต้น

หลังจากปักดำ 35-40 วัน ถ้าต้นข้าวมีสีเหลืองเริ่มจากใบล่างขึ้นไปหรือเจริญเติบโตไม่ดีเท่าที่ควรให้ใส่ปุ๋ยเพิ่มเติมอีก จะได้ต้นข้าวที่แข็งแรง

ข้าวที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้าวที่มีอายุระหว่าง 11-17 อาทิตย์ นับจากวันปักดำ โดยการถอนข้าวทั้งกอในเวลา 7.30-8.00 น. ซึ่ง Slack(1965 ) พบว่าเป็นเวลาที่ข้าวมี Activity ของอินเวอเทสสูงที่สุด

2.2.2 การตรวจสอบน้ำตาลที่ใช้ลำเลียงภายในต้น

นำต้นข้าวที่เก็บจากแปลงทดลองข้าวที่สถานีทดลองข้าวบางเขน กรมการข้าว นำมาล้างดินออกให้หมดด้วยน้ำประปา ลอกใบที่ไม่ต้องการทิ้ง แบ่งข้าวออกเป็น 3 ชุด แต่ละชุดใช้ต้นข้าว 10 ต้น

ชุดที่ 1 ใช้มีดโกนตัดบริเวณข้อที่ 1 ของต้นข้าวจะมีใบธงติดอยู่ 1 ใบ

ชุดที่ 2 ใช้มีดโกนตัดบริเวณข้อที่ 2 ของต้นข้าวจะมีใบธงติดอยู่ 1 ใบ และใบที่ถัดลงมาอีก 1 ใบ

ชุดที่ 3 ใช้มีดโกนตัดบริเวณข้อที่ 3 ของต้นข้าว จะมีใบธงติดอยู่ 1 ใบ และใบที่ถัดลงมาอีก 2 ใบ

นำข้าวทั้ง 3 ชุด แช่ใน 10% Clorox เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง จนหมดกลิ่น Clorox นำข้าวแต่ละชุดไปใส่ไว้ในกระบอกตวงขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุน้ำกลั่นไว้ 50 มิลลิลิตร ขณะใส่ต้นข้าวระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นที่ปลายของปล้องต้นข้าว จะทำให้การเคลื่อนที่ของน้ำและน้ำตาลถูกขัดขวาง ปิดปากกระบอกตวงด้วยกระดาษดีบุกเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำระเหยออกทางปากกระบอกตวงนั้น นำไปตั้งไว้ที่เรือนกระจกอุณหภูมิ 30 องศาเซนติเกรด มีแสงแดดจ้าพอสมควร สารที่ได้จากการสังเคราะห์แสงจะเคลื่อนที่ลงมาตามท่อลำเลียงอาหาร ( Zimmermann 1961, 1963) ลงไปในน้ำในกระบอกตวง และในขณะเดียวกัน น้ำภายในกระบอกตวงจะเคลื่อนที่ขึ้นไปสู่ใบ โดยผ่านทางท่อลำเลียงน้ำ ทิ้งให้มีการเคลื่อนที่ของสารเช่นนี้เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง นำสารละลายในกระบอกตวงใส่ใน beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร ตั้งบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซนติเกรด เพื่อระเหยน้ำออกไปให้หมด จะได้สารติดค้างอยู่ใน beaker นั้น เมื่อจะนำไปแยกสารโดยวิธี Paper Chromatography ละลายในน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เพื่อหาน้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายนี้

2.2.3 การตรวจสอบน้ำตาลโดยวิธี Paper Chromatography

2.2.3.1 น้ำตาลที่ใช้เป็นมาตรฐาน (Smith, 1960)

| | |
|---|---|
| Glucose | 0.5 % |
| Fructose | 0.5 % |
| Sucrose | 0.7 % |

2.2.3.2 Solvent (Bacon, 1955)

2.2.3.2.1 Solvent ที่ใช้ในการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่ถูกลำเลียงในต้นข้าว คือ

n-butanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 5

เตรียม 2-3 วัน ก่อนใช้ และใช้ upper phase ส่วน lower phase นั้น จะนำเอาไปใช้ในข้อ 2.2.3.5 ซึ่งจะกล่าวต่อไป

2.2.3.2.2 Solvent ที่ใช้ในการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่ได้จาก initial extract คือ

n-butanol : ethanol : water = 4 : 1 : 5

ใช้ upper phase

Solvent ที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 เป็นการตรวจสอบน้ำตาล ชนิด monosaccharides และ disaccharides เท่านั้น

2.2.3.3. Spraying agent (Smith, 1960)

ใช้ Aniline - Diphenylamine reagent ซึ่งประกอบด้วย

1% Aniline 1 ml + 1% diphenylamine reagent in acetone 10 Vol.

Phosphoric acid 85% 1 Vol.

เวลาผสม Amine phosphates บางครั้งอาจเกิดการตกตะกอนเล็กน้อย ทำให้ละลายโดยการคนหรือเขย่าหรือเติมน้ำลงไป 2-3 หยด

2.2.3.4 วิธีหยดสารละลายบนกระดาษ นำน้ำตาลที่ละลายในน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายน้ำตาลที่ใช้เป็นมาตรฐาน ดังกล่าวข้างต้น หยดลงบนกระดาษกรอง Whatman No.I มีขนาด 19.0 x 40.0 เซนติเมตร แต่ละจุดเว้นระยะให้ห่างกัน 3 เซนติเมตร การหยดสารละลายลงบนกระดาษ ใช้ไมโครปิเปต ขนาด 10 ไมโครลิตร แต่ละจุดใช้น้ำตาลจำนวน 20 ไมโครลิตร โดยค่อย ๆ หยดสารละลายลงบนแผ่นกระดาษ หยดละ ประมาณ 1 ไมโครลิตร ใช้เครื่องเป่าให้แห้ง แล้วหยดสารละลายซ้ำต่อไปอีกจนกระทั่งครบ 20 ไมโครลิตร ตามต้องการ

2.2.3.5 การ Run solvent

ใช้กระดาษกรอง 2 แผ่น ใส่วางไว้ด้านตรงกันข้ามที่ผนังด้านในของตู้กระจกสี่เหลี่ยมที่ใช้สำหรับทำ Chromatogram พร้อมกันนั้น นำกระดาษกรองที่ได้หยดสารละลายไว้แล้วในข้อ 2.2.3.4 แขวนไว้ในตู้กระจกนี้ด้วย นำ Solvent ส่วน lower phase ซึ่งได้แยกมาดังกล่าวข้างต้น เทราดลงไปเฉพาะแต่ที่กระดาษกรอง 2 แผ่น ที่อยู่ที่ผนังด้านในของตู้กระจกนั้นจนเปียกชุ่ม ปิดฝาตู้กระจกให้แน่น ปล่อยให้กระดาษกรองทั้งหมดถูกทิ้งรวมกันอยู่ในตู้กระจกนั้นอย่างน้อย 2 ชั่วโมง กระดาษกรองทั้งหมดจะอิ่มตัวด้วยน้ำ ( equilibrate )

เปิดจุกบนฝาตู้กระจกสี่เหลี่ยม แล้วเท Solvent upper phase ซึ่งได้แยกมาตามข้อ 2.2.3.2 ลงบนรางสำหรับใส่ Solvent ซึ่งจะไหลซึมเข้าไปในเนื้อกระดาษกรองที่ได้หยดสารละลายไว้ โดยระมัดระวังมิให้เกิดการกระเทือนเพราะอาจเป็นเหตุให้การเคลื่อนที่ของ Solvent ไม่สม่ำเสมอ การ run Solvent นี้ ใช้วิธีแบบ Descending chromatography

001184

Solvent ส่วน upper phase นี้จะซึมเคลื่อนที่จากส่วนบนของแผ่นกระดาษกรอง ตำลงมาตามพื้นหน้าของกระดาษ ปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง

นำกระดาษกรองที่ได้หยดสารละลายและมี Solvent upper phase ซึมอยู่ ทั้งหมด ไปทำเครื่องหมายตำแหน่งของ Solvent ซึ่งหยุดการเคลื่อนที่เมื่อถูกนำออกมาจากตู้กระจก แล้วนำไปแขวนอบในตู้จนแห้งสนิท เอามาจุ่มลงใน Aniline Diphenylamine reagent ในที่สุด ก็เอาเข้าอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 95 - 100 องศาเซนติเกรด นานประมาณ 2-3 นาที เมื่อนำกระดาษกรองออกจากตู้อบแล้ว จะพบว่ามีจุดสีต่างๆ เกิดขึ้น ถ้าเป็น glucose จะให้สีเขียวปนน้ำเงิน ถ้าเป็น sucrose หรือ fructose จะให้สีน้ำตาล เป็นจุดบนแผ่นกระดาษกรอง

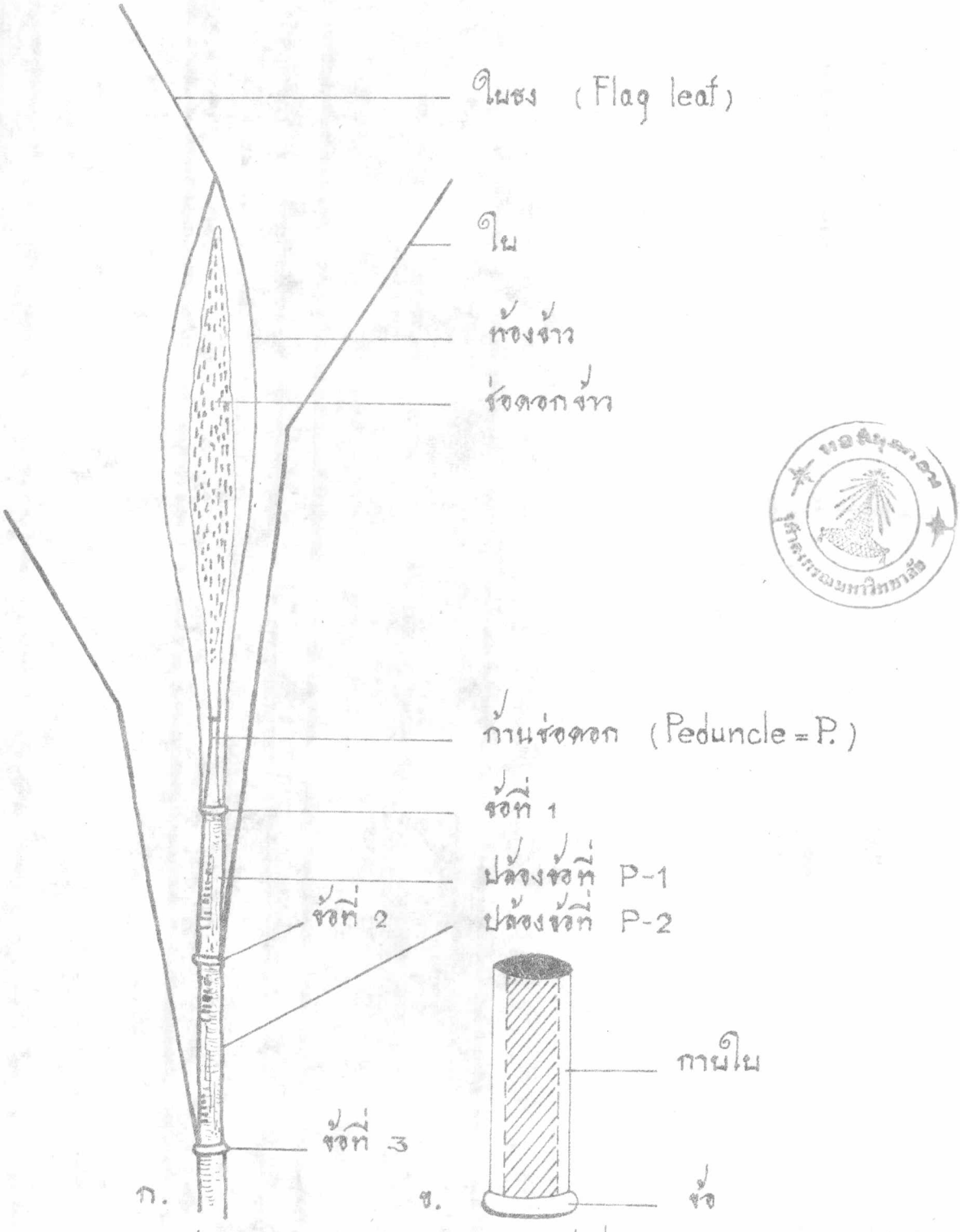
2.2.4 <u>การวัดความยาวของต้นข้าว</u>

เริ่มวัดความยาวของต้นข้าวเมื่ออายุได้ 11 อาทิตย์นับจากวันปักดำ จะสังเกตเห็นข้าวทุกข้อและทุกปล้องชัดเจน และเริ่มเกิดคอกข้าว การวัดแต่ละครั้งใช้ต้นแม่เป็นต้นแรกที่เกิดขึ้น ไม่ใช้ต้นที่แตกกอมาภายหลัง ใช้ต้นข้าว 20 ต้น มาวัดความยาวของปล้องต่างๆ เป็นเซนติเมตร และนำมาหาค่าเฉลี่ย วัดตั้งแต่ปลายข้อล่างขึ้นไปจนถึงส่วนที่เป็นฐานของข้อบนถัดไป กล่าวคือ วัดรวมทั้งส่วนที่เป็นข้อและปล้องของต้นข้าว

ตัวอย่าง เช่น ต้องการวัดความยาวของปล้องที่ P หมายถึงปล้องที่เป็นก้านช่อดอก จะวัดตั้งแต่ฐานของข้อที่ 1 ขึ้นไปจนถึงส่วนที่มีขนอยู่รอบๆ ซึ่งใช้เป็นเขตที่แสดงว่า เหนือจากบริเวณนี้ขึ้นไปเป็นส่วนของช่อดอก

เมื่อต้องการวัดความยาวของปล้องที่ P-1 หมายถึงปล้องที่ถัดลงมาจากก้านช่อดอก วัดจากปลายของ P ลงมาจนถึงฐานของข้อถัดไป

เมื่อวัดความยาวของปล้องที่ P-2 เป็นปล้องที่ถัดลงมาจาก P-1 จนถึงฐานของข้อถัดไป




รูปที่ 3 แสดงต้นข้าวขณะที่กำลังตั้งท้อง
ก. แสดงลักษณะของปล้องข้าวที่กำลังตั้งท้อง เมื่อผ่าตามยาว
ข. ส่วนของปล้องข้าวที่ใช้สะกัด

จะวัดความยาวของปล้องที่ P, P-1 และ P-2 เท่านั้น ส่วนปล้องที่ถัดลงมาไม่วัดเนื่องจากมีการแตกกอเกิดขึ้น (รูปที่ 3 ก)

ตัดส่วนของ P, P-1 และ P-2 ที่วัดความยาวแล้ว แบ่งเป็น 2 ชุด ชุดหนึ่งนำไปหาน้ำหนักแห้ง และชุดหนึ่งนำไปสะกัดเอนไซม์อินเวอเทส

2.2.5. การสะกัดเอนไซม์อินเวอเทส

นำต้นข้าวที่ล้างสะอาด ดังในข้อ 2.2.2. และวัดความยาวเรียบร้อยแล้ว ตัดเป็นปล้องที่ P, P-1 และ P-2 ใช้ปากคีบที่สะอาดล้างด้วย 10 % Clorox ดึงส่วนที่เป็นกาบใบออกให้หมด (รูปที่ 3 ข) นำไปชั่งหาน้ำหนักสด น้ำหนักสดของข้าวที่ใช้ 1 กรัม ต่อ citrate phosphate buffer pH 7.0 25 มิลลิลิตร บดข้าวในกรกที่เย็นจัด ด้วยทรายบริสุทธิ์ครึ่งช้อนชา ขณะสะกัดมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 0 - 4 องศาเซนติเกรด และค่อย ๆ ใส่ citrate phosphate buffer จนมีปริมาตรครบถ้วนตามต้องการ นำสารละลายที่ได้เข้าเครื่อง Refrigerated automatic superspeed centrifuge ของบริษัท Ivan Servall Model SS - 34 ด้วยแรง 12,000 xg เป็นเวลา 20 นาที ตะกอนที่ได้ทิ้งไป สารละลายที่ได้เรียกว่า initial extract

2.2.6. การทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์

2.2.6.1. Dialysis

เป็นวิธีที่ใช้แยกสารต่างชนิดออกจากกัน เนื่องจากมีความแตกต่างในการแพร่ แยกน้ำตาล เกลือ และสารที่มีโมเลกุลเล็กออกจากสารที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน

ใช้ dialysing tube ขนาด 1 นิ้ว ใส่เอนไซม์ ที่สะกัดได้ครั้งแรก หรือจากที่ตกตะกอนลงมาด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้ยางรัดปลายทั้ง 2ข้างให้แน่นไม่ให้เอนไซม์รั่วออกไปข้างนอก นำไปใส่ในกระบอกแก้วทรงสูง ซึ่งบรรจุ citrate - phosphate buffer ที่ทำให้เจือจางในน้ำกลั่น 1:1 คนสารละลายด้วย magnetic stirror ตลอดเวลา และทำที่อุณหภูมิ 3-6 องศาเซนติเกรด และเปลี่ยน buffer นี้ ทุกๆ 15 นาที นำสารที่ได้ภายหลังจาก dialysis แล้วนำมาหา Invertase Activity

2.2.6.2 ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำ initial extract มาค่อยๆ เติมผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดแล้วพร้อมทั้งกนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซนติเกรดด้วย magnetic stirror ตามน้ำหนักที่ต้องการ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซนติเกรด เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงเป็นอย่างน้อย นำไป centrifugeด้วยแรง 15,000 xg 15 นาที ตะกอนที่ได้เป็นเปอร์เซนต์ fraction ตามที่ต้องการ ส่วน supernatant เมื่อต้องการจะทำให้ saturation เพิ่มขึ้น ก็นำมาตกตะกอนด้วยการเติมผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตต่อไปอีก นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายใน citrate - phosphate buffer และนำ fraction ต่างๆ ที่ได้มาหา Invertase Activity

การสะกัดเอนไซม์อินเวอเทส และการทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์ใช้ citrate phosphate buffer pH 7.0

2.2.7 การเตรียมสารละลาย Nelson-Somogyi Reagent

2.2.7.1 Copper Reagent A ละลาย potassium sodium tartrate 25 กรัม, sodium carbonate 25 กรัม

sodium bicarbonate 20 กรัม และ sodium sulfate anhydrous 200 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมน้ำให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

2.2.7.2 Copper Reagent B ละลาย copper sulfate 15 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หยดกรดซัลฟุริกเข้มข้น 1-2 หยด

2.2.7.3 Arsenomolybdate Color Reagent ละลาย ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 21 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม 3 กรัมของ di-sodium hydrogen arsenate ( $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ ) ที่ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซนติเกรด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

2.2.8 การเตรียมสารละลาย citrate phosphate buffer

นำสารละลาย 0.1 M citric acid ผสมกับ 0.2 M disodium hydrogen phosphate ปริมาตรต่างๆ กัน ตาม pH ที่ต้องการ (Dunn, 1968)

2.2.9 การวัด Activity ของอินเวอเทส

Activity ของอินเวอเทสวัดโดยตรวจหา reducing sugars (glucose + fructose) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการสลายตัวของ sucrose โดย Nelson - Somogyi Method

การวัด Activity ของอินเวอเทสทำโดยใส่สารละลาย 0.05 M sucrose ใน citrate - phosphate buffer pH 3.4 0.8 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซนติเกรด ประมาณครึ่งชั่วโมง เติมเอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใส่ Copper reagent 1 มิลลิลิตร ( Copper reagent A 25 มิลลิลิตร + Copper reagent B 1 มิลลิลิตร) เขย่าให้สารละลายเข้ากัน แล้วทำให้ร้อนโดยวางลงในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที จะเกิดตะกอนสีแดงขึ้น ยกหลอดทดลองออกวางในน้ำเย็น เติม 1 มิลลิลิตร ของ Arsenomolybdate reagent และเขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน Arsenomolybdate reagent จะไปละลายตะกอนสีแดงที่เกิดขึ้นได้เป็นสารละลายสีน้ำเงิน เติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีน้ำเงินที่มีสีคงที่มาก นำไปอ่านด้วย Photoelectric Colorimeter ของบริษัท Klett Summerson ใช้ filter สีเขียว No. 54 สามารถวัดปริมาณ reducing sugars ซึ่งการศึกษาครั้งนี้วัดในรูปของปริมาณ glucose

การวัดปริมาณ reducing sugars โดยวิธีนี้ สามารถวัดปริมาณ glucose ได้สูงสุดถึง 0.3 มิลลิกรัม ( 300 ไมโครกรัม)

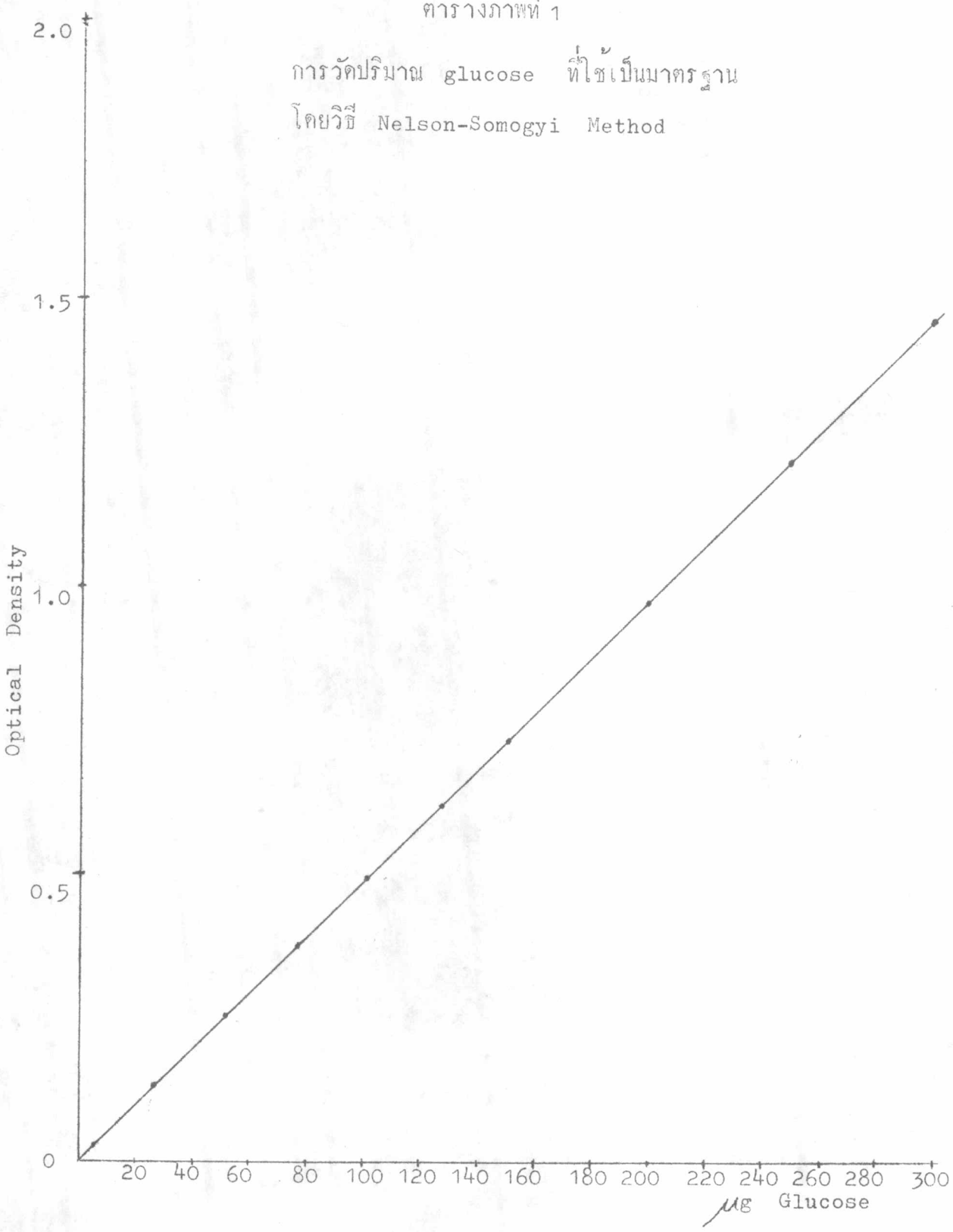
ค่าที่อ่านได้จาก Photoelectric Colorimeter เป็นค่า Klett Reading เปลี่ยนเป็นค่า Optical density จากสูตร

$$\text{Optical density (O.D)} = \frac{\text{Klett Reading} \times 2}{1000}$$

ค่า O.D. ที่ได้ นำไปหาปริมาณ glucose จากตารางภาพที่ 1 ซึ่งใช้ D(+) glucose เป็นสารมาตรฐาน

ตารางภาพที่ 1

การวัดปริมาณ glucose ที่ใช้เป็นมาตรฐาน
โดยวิธี Nelson-Somogyi Method



Invertase Activity วัดในรูปของ microgram (µg) glucose equivalent per milligram dry weight per hour (unit)

Specific Activity วัดในรูปของ microgram (µg) glucose equivalent per milligram protein per hour

Control ของการทดลอง คือหลอดทดลองที่เติมสารทุกอย่างเหมือนหลอดทดลองที่วัด Invertase Activity แต่เอนไซม์ที่ใช้จะถูกต้มเสียก่อนในน้ำเดือดเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

2.2.10. <u>การวัดปริมาณโปรตีน</u>

วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry et al (1951) เอนไซม์ที่จะนำมาวัดปริมาณโปรตีนทำให้เจือจางลง โดยปิเปตมา 0.1 มิลลิลิตร และเติมน้ำ 0.9 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีนี้สามารถวัดความเข้มข้นของโปรตีนได้ 10-200 ไมโครกรัม

โปรตีนที่นำมาทำให้เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย reagent C (2% $Na_2CO_3$ 50 มิลลิลิตร ใน 0.1 N NaOH ผสมกับ 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ ใน 1 % Sodium potassium tartrate) เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติม 0.5 มิลลิลิตรของ reagent E (Folin-Ciocalteus Phenol reagent ของบริษัท E. Merck Ag Darmstadt ที่ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:1.2) ลงไปอย่างรวดเร็ว และเขย่าให้เข้ากันทันที ตั้งไว้ 30 นาที วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วย filter สีแดง No. 66 ด้วยเครื่อง Photoelectric Colorimeter (klett - Summerson)

Blank ของการทดลอง คือหลอดที่เติมสารทุกอย่างเหมือนกับหลอดทดลองที่วัดโปรตีน แต่ไม่ใส่โปรตีน ที่ต้องการวัดลงไป ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรใส่ลงไปแทน

จากค่า Klett Reading ที่อ่านได้เปลี่ยนเป็นค่า Optical density จากสูตร ข้อ 2.2.9 และอ่านค่าโปรตีนเป็นมิลลิกรัม จากตารางภาพที่ 2 ซึ่งใช้ Bovine serum albumin ของบริษัท Sigma Chemical Company เป็นมาตรฐาน

ตารางภาพที่ 2

การวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ Bovine serum albumin เป็นมาตรฐาน โดยวิธี Lowry Method