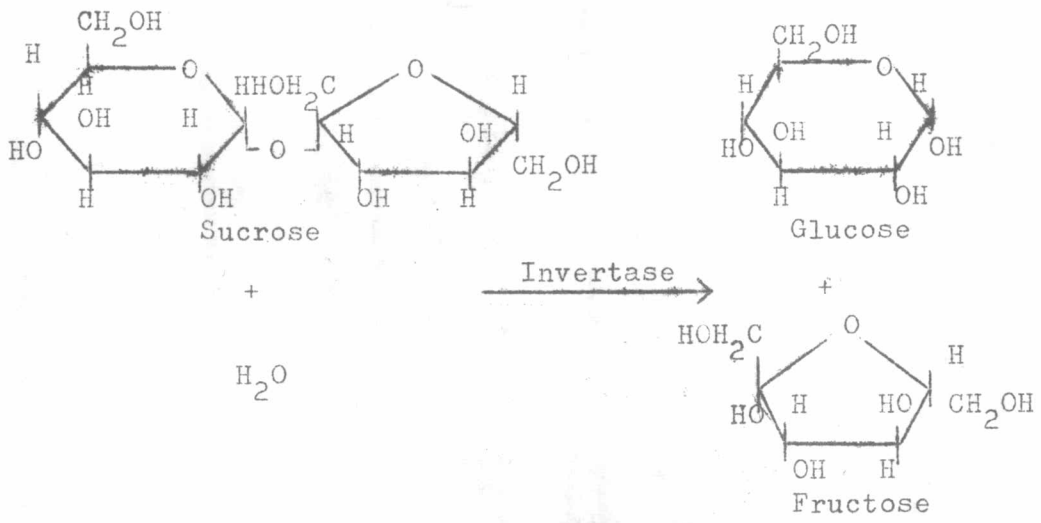
1. บทนำ

การศึกษาเอนไซม์เป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นพิเศษ เพราะว่า สิ่งมีชีวิตทุกชนิดอาศัยเอนไซม์เป็น catalysis ในปฏิกริยาเคมี เริ่มมีการศึกษาเอนไซม์ที่สะกัดได้จากแหล่งต่าง ๆ ที่มีในธรรมชาติตั้งแต่ศตวรรษที่ 16 ตลอดมาจนกระทั่งในศตวรรษที่ 19 แต่เริ่มมีการค้นคว้าอย่างจริงจังเมื่อ 40 กว่าปีที่ผ่านมานี้เอง การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์เริ่มต้นในกระบวนการ Fermentation และเริ่มใช้คำว่าเอนไซม์ครั้งแรกในยีสต์ ต่อมาในปี 1890 Cornelines O' Sullivan และ F.W. Tompson ได้เขียนหนังสือเกี่ยวกับอินเวอเทสขึ้น เป็นผลให้รู้จักเอนไซม์นี้กันอย่างแพร่หลาย (Segal, 1959)

อินเวอเทส (invertase) หรือที่เรียกชื่ออื่น ๆ ว่า invertin, saccharase, sucrase, α-glucosidase, β-fructofuranosidase เป็นเอนไซม์ชนิด constitutive enzymes (Glasziou, 1964 b) สามารถไฮโดรไลส์ sucrose ให้ได้ glucose และ fructose จาก 1 โมเลกุลของ sucrose ได้ 1 โมเลกุลของ glucose และ 1 โมเลกุลของ fructose. (Tauber, 1950)



แต่ glucose และ fructose ไม่สามารถสังเคราะห์ sucrose ได้โดยอินเวอเทส เพราะการสังเคราะห์ sucrose ต้องอาศัยเอนไซม์ sucrose phosphorylase หรือ sucrose synthetase หรือ sucrose phosphate synthetase (Devlin, 1969).

อินเวอเทสสามารถไฮโดรไลส์น้ำตาลชนิดอื่นได้อีกนอกจาก sucrose คือ raffinose, methyl β-fructofuranoside, etc. และยังแสดงคุณสมบัติเป็น transferase โดยเกิดสาร oligosaccharides ขึ้นระหว่าง sucrose hydrolysis ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นคือ transfer fructofuranosyl residues จาก substrate ไปยัง receptors (cosubstrate) มี sucrose เป็น receptors ได้สารพวก fructans เช่น levan, inulin ซึ่งเป็นไปได้ที่เกิดปฏิกริยา transfer ขึ้น สาเหตุอาจจะเนื่องมาจากมีสารอื่นเจือปนมาในเอนไซม์ที่สะกัดได้ แต่จากการเตรียมอินเวอเทสที่บริสุทธิ์ที่สุดก็จะแสดง transfer reactions เช่นเดียวกับ initial extract (Myrbäck, 1960)

ปฏิกริยา hydrolysis และ transfer เขียนสมการได้ 2 steps ขึ้นอยู่กับ affinity ของเอนไซม์

$$\text{Fructosyl-O-glucosyl} + \text{enzyme-OH} \rightleftharpoons \text{Fructosyl-O-enzyme} + \text{glucose}$$

$$\text{Fructosyl-O-enzyme} + H_2O \longrightarrow \text{Fructose} + \text{enzyme-OH}$$

เป็นปฏิกริยาเนื่องจาก hydrolysis ให้ glucose และ fructoseเป็น product ออกมา

ส่วนปฏิกริยาเนื่องจาก transfer นั้นจะได้สารพวก fructans เป็น product

$$\text{Fructosyl-O-glucosyl} + \text{enzyme-OH} \rightleftharpoons \text{Fructosyl-O-enzyme} + \text{glucose}$$

$$\text{Fructosyl-O-enzyme} + \text{R-OH} \rightleftharpoons \text{Fructosyl-O-R} + \text{enzyme-OH}$$

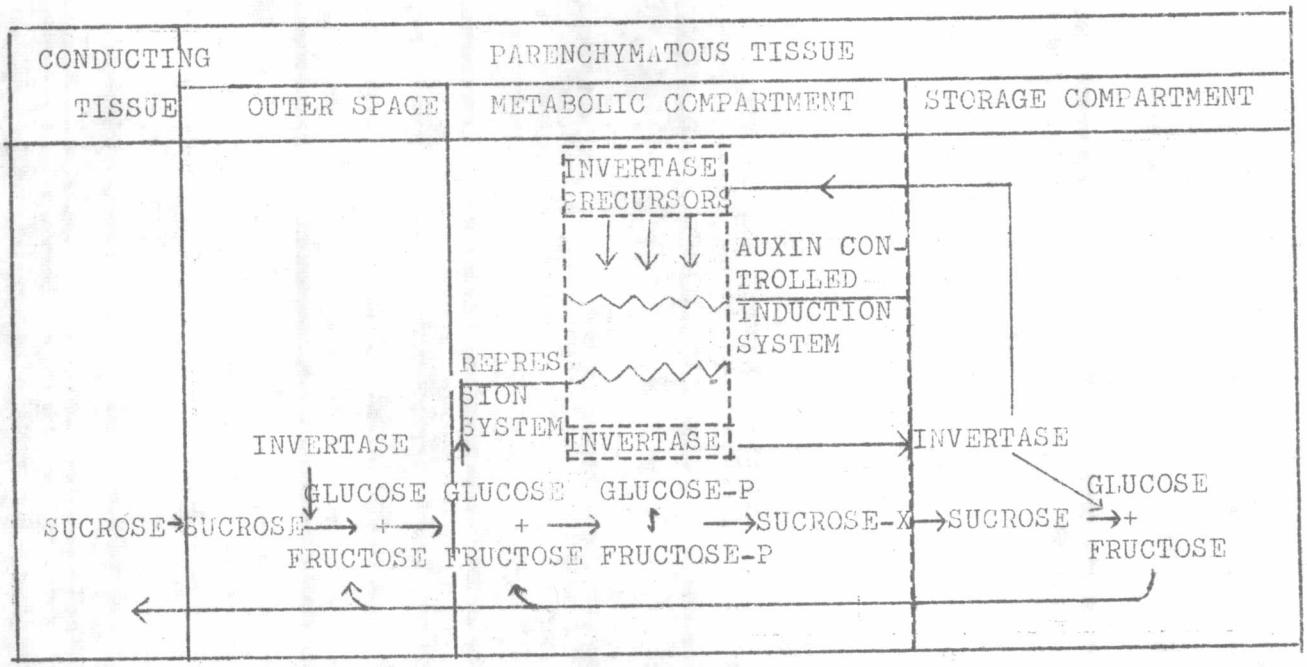
(Myrbäck, 1960)

Neuberg (1946) วิจัยคุณสมบัติของอินเวอเทสว่าเป็นกรดอ่อน ประกอบด้วย carboxyl และ basic amino group มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000 และ isoelectric point ที่ pH 5.0

อินเวอเทสพบมีอยู่ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และมีมากในสิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์ แหล่งที่พบอินเวอเทสมากที่สุดคือยีสต์ นอกจากนี้ยังพบในเชื้อราต่าง ๆ เช่น Aspergillus, Mucors และ Penicillium ในแบคทีเรียพบใน Bacillus subtilis (Myrbäck, 1960)

อินเวอเทสที่พบในสัตว์มักพบในแมลงต่าง ๆ เช่น ผึ้ง cockroach (Blattella germanica) (Bacon, 1955) ในลำไส้ของสัตว์ เช่น หมู หนู และใน jejunum ของคน (Dahlqvist, 1966)

อินเวอเทสในพืชชั้นสูง พบว่ามีอยู่ทั่วไปในลำต้น ใบ และ ในรากของพืชบางชนิด (Akazawa, 1965) มีอยู่ทั้งในส่วนที่เป็น outer space (cell wall, cytoplasm) และ inner space (vacuole) ของเซลล์ แต่อินเวอเทสส่วนมากจะมีอยู่ในส่วนที่เป็น outer space และมีส่วนน้อยที่อยู่ภายใน inner space (Sacher, 1963)



ในอ้อยพบว่าอินเวอเทสมีหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของน้ำตาล sucrose (Hatch, 1963) ซึ่ง sucrose เป็นน้ำตาลที่ได้จากการสังเคราะห์แสง และเคลื่อนที่ได้ภายในลำต้นของพืชทั่วไป (Akazawa, 1965) sucrose จาก conducting tissue เคลื่อนที่เข้าไปสะสมอยู่ใน storage tissue โดยอาศัยพลังงาน และมีอินเวอเทสที่อยู่ในบริเวณ outer space มีหน้าที่ไปควบคุมการเคลื่อนที่ของ sucrose จาก conducting tissue ไปใช้ในการเจริญเติบโตหรือเก็บสะสมไว้ ส่วนอินเวอเทสที่พบใน inner space มีความสามารถทำให้ sucrose ที่เก็บสะสมไว้สามารถนำไปใช้ในขบวนการ metabolism ภายในพืชได้ เมื่อพืชนั้นมีการสังเคราะห์แสงไม่เพียงพอ (Glasziou, 1961-1964), Kivilaan (1961)และ Newcomb (1963) ค้นพบว่าอินเวอเทสมีอยู่ในส่วนของ primary cell wall ใน coleoptiles ของข้าวโพด Zea mays. Straus (1962)พบว่าอินเวอเทสส่วนใหญ่อยู่ที่ cell wall และมีเป็นส่วนน้อยที่อยู่ใน cytoplasm ในพืชบางชนิด เช่น Nicotiana tabacum variety M-222 ไม่พบอินเวอเทสภายใน cytoplasm เลย พบแต่ในส่วนของ cell wall เท่านั้น แต่ไม่ว่าอินเวอเทสจะอยู่ในส่วนที่เป็น outer space หรือ inner space ก็ตาม จะมีคุณสมบัติเหมือนกัน (Glasziou, 1964 b)

Glasziou (1964 a, 1966) ศึกษาพบว่า IAA และ synthetic auxin ที่ความเข้มข้นต่ำ (10^{-5} - 10^{-7} M) ไปเพิ่มระดับของอินเวอเทส ขณะที่ความเข้มข้นสูงไปลดระดับของอินเวอเทส ในเนื้อเยื่อของอ้อย โดยที่ auxin ไปทำให้การสังเคราะห์ messenger RNA เปลี่ยนแปลงไป และจากการศึกษาพบว่า glucose ที่มีในเนื้อเยื่อมีผลในการควบคุมระดับของอินเวอเทสด้วย โดยไปลดการสร้าง messenger RNA ที่ specific ต่อ amino-acid sequence ที่ใช้สำหรับการสร้างอินเวอเทส Sacher (1963) ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ในเนื้อเยื่อพบว่าขึ้นกับ plant hormone ที่ควบคุม และ

ผลที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์มีคุณสมบัติเป็น feed back repression ในธรรมชาติด้วย Edelman (1964) ศึกษาว่า plant hormone เหล่านี้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ใน cell walls ของพืช แต่ไม่มีผลโดยตรงต่อ Activity ของอินเวอเทส Sacher (1963) พบว่า auxin มีผลไปเพิ่มหรือลดระดับของอินเวอเทสในเนื้อเยื่อเจริญของ Sacharum officinarum และ auxin นี้อาจจะไปควบคุมระดับน้ำตาลที่มีอยู่ใน metabolic compartment (cell cytoplasm) ได้ Kaufman (1965, 1968) ศึกษาผลของ gibberellic acid มีผลไปกระตุ้นการยืดตัวของปล้องข้าวโอต Avena sativa และชักนำให้เกิด invertase activity ขึ้น ทดสอบโดยการวัด Reducing sugars ที่เพิ่มขึ้น

ต้นข้าวที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีจำนวนข้อประมาณ 12-13 ข้อ เมื่อต้นข้าวมีการเจริญเติบโตขึ้นถึงระยะหนึ่งจะมีการแตกกอเกิดต้นใหม่แยกออกไปจากข้อของต้นข้าว บริเวณข้อที่ต้นใหม่เกิดขึ้นมานี้ รอบ ๆ ข้อจะมีรากฝอยเกิดขึ้น และเมื่อต้นข้าวมีอายุมากจนถึงระยะหนึ่งก็จะเริ่มออกดอกข้าว ดอกข้าวที่เริ่มเกิดในระยะแรกจะถูกหอหุ้มด้วยกาบใบของใบธง (Flag leaf) ซึ่งเรียกระยะที่ดอกข้าวยังอยู่ในกาบใบนี้ว่าเป็นระยะที่กำลังตั้งท้อง (Tanaka, 1964) ในพืชทั่วไประยะที่เริ่มเกิดดอกนี้มีการเปลี่ยนแปลงสารต่าง ๆ เกิดขึ้น ทั้ง plant hormone และเอนไซม์ (Leopold, 1965)

Kaufman (1960) ศึกษาการเจริญเติบโตของข้าวเจ้า (Oryza sativa var. Century Patna 231) พบว่า อัตราการเจริญในปล้องข้าวส่วนมากจะใกล้เคียงกันยกเว้นที่ก้านช่อดอก (Peduncle) จะมีอัตราการยืดตัวได้ดีที่สุด และนับเป็นปล้องที่ยาวที่สุดเมื่อเจริญเต็มที่แล้ว Tanaka (1964) ศึกษาการยืดตัวของปล้องข้าวเจ้า (Oryza sativa var. Peta) ก้านช่อดอก (P) จะมีอัตราการยืดตัวได้สูงที่สุด และเป็นปล้องที่ยาวที่สุด เมื่อเทียบกับปล้องถัดลงมาคือ P-1, P-2 ..

วัตถุประสงค์ ศึกษา Activity ของอินเวอเทส กับการเจริญเติบโต ของปล้องข้าวเจ้าตั้งแต่เริ่มเข้าสู่ระยะที่เป็น Reproductive stage เพื่อหาแหล่งที่มีอินเวอเทสมากที่สุด และทำให้บริสุทธิ์ขึ้นสำหรับศึกษาทาง kinetics ต่อไป