

การศึกษาเบื้องต้นของ เอนไซม์อินเวอเทสในต้นข้าว

นางสาวนันทนา ปัทมพงศ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาพฤกษศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๑๕

001184

I1592A230

A PRELIMINARY STUDY ON INVERTASE IN RICE STEMS

Miss Nantana Patamapongse

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Botany

Graduate School

Chulalongkorn University

1972

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเบื้องต้นของเอนไซม์อินเวอเทสในต้นข้าว
ชื่อ นางสาวนันทนา บัณฑพงศ์
แผนกวิชา พืชเกษตร
ปีการศึกษา 2514

บทคัดย่อ

ศึกษา Activity ของอินเวอเทสกับการเจริญเติบโตในระยะแรก
ของปล่องข้าวพันธุ์ ก.ช.1 (*Oryza sativa* variety R.D.1) ซึ่งเป็น
ข้าวพันธุ์ผสมระหว่างข้าวพันธุ์เหลืองทองกับไออาร์8 มี sucrose เป็นน้ำ
ตาลที่ไหลดำเลี้ยงภายในต้นข้าว และอินเวอเทสไปทำหน้าที่สลาย sucrose
ให้ได้ glucose และ fructose ซึ่งเมื่อมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้น
ที่จุดหนึ่งจะไปยับยั้ง Activity ของอินเวอเทสภายในต้นข้าวได้ แหล่งที่มี
อินเวอเทสมากที่สุดภายในต้นข้าวคือระยะที่กำลังมีดอก ซึ่งก้านช่อดอก (P) มีความ
ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ในเมื่อต้นข้าวนั้นมีอายุได้ 13 อาทิตย์นับ
จากวันปักดำ แลวนำอินเวอเทสที่สกัดได้จากก้านช่อดอกนี้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการ
ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 20 - 45 เปอร์เซ็นต์ และตามด้วยวิธี dialysis
ต่อไป จะทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.2 เท่า นำอินเวอเทสที่บริสุทธิ์มาศึกษา
ทาง kinetics ต่อไป โดยวัด Activity ของอินเวอเทสจาก reducing
sugars (glucose + fructose) ที่เกิดขึ้นโดย Nelson - Somogyi
method ใช้ sucrose ที่ความเข้มข้น 0.05 M เป็น substrate
มี optimum pH 3.4, citrate phosphate buffer อุณหภูมิ 50 องศา
เซนติเกรด ในเวลา 1 ชั่วโมง จะมีค่า $K_m = 33 \times 10^{-3} M$, $V_{max} =$
285.7 unit และมี glucose, mercuric chloride, silver nitrate,
potassium iodide และ potassium chloride เป็นสารที่ไปยับยั้งการทำงาน
ของอินเวอเทส

Thesis Title A Preliminary Study on Invertase in Rice Stems.

Name Miss Nantana Patamapongse

Department Botany

Academic Year 1971



ABSTRACT

A study was made on the invertase activity in relation to the developmental stages of rice stem, Oryza sativa variety R.D.1, an improved variety derived from a cross between Leuang Tawng and IR 8 varieties. It was found that sucrose was essentially the only form of the sugar translocated in the rice stem, where it was hydrolyzed into glucose and fructose by action of the invertase, until the end product concentrations had reached a certain level, then they exerted an inhibitory effect on the enzyme. The highest activity of the rice stem invertase was found in the peduncle at the early stage of floral development when the peduncle was approximately one centimeter long. This period corresponded to the thirteenth week after transplantation of the seedling. The enzyme was extracted from the internode with citrated phosphate buffer pH 7.0. A 4.2 fold increase in purity of the enzyme over the crude extract was obtained by using ammonium sulfate fractionation

at 20-45 % saturation followed by a six-hour dialysis against the neutral buffer solution. An enzyme kinetics study was carried out on the purified invertase using the Nelson-Somogyi method for measuring the enzyme activity at the sucrose substrate concentration of 0.05 M . The optimum pH in citrate phosphate buffer was 3.4, whereas the optimum temperature was 50°C for a one-hour reaction time. The Michaelis-Menten constant (Km) and the maximum velocity (Vmax) were $33 \times 10^{-3} \text{M}$ and 285.7 unit respectively. Glucose, mercuric chloride, silver nitrate, potassium iodide and potassium chloride were all found to be non-competitive inhibitors of the isolated invertase.

กิติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ รัชณี วีรพถิน อาจารย์ผู้ควบคุม
 การวิจัย ศาสตราจารย์วิรุฬห์ สุวรรณกิตติ หัวหน้าแผนกวิชาพฤกษศาสตร์
 รองศาสตราจารย์ไววิทย์ พุทธิสาร อาจารย์รัชนิกร อุตระกุล Dr. Ben R.
 Jackson ผู้เชี่ยวชาญการผสมพันธุ์ข้าวแห่งมูลนิธิโรอกกีเฟลเดอร์ คุณสมหมาย
 อมรศิลป์ แห่งสถานีทดลองข้าวบางเขน กรมการข้าว กระทรวงเกษตร
 ศาสตร์และสหกรณ์นายแพทย์กรมไทร สุวรรณิก คุณเนงนุช ฉาสุก ผู้ช่วยศาสตราจารย์
 กำจักษ์ มงคลกุล อาจารย์ไพเราะ ทิพย์ทัศน์ อาจารย์ปรีดา อันประเสริฐ
 ซึ่งได้ให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลืออำนวยความสะดวก
 มาทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้เขียนขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงแก่
 ทุกท่านที่กล่าวนามมาแล้วไว้ ณ ที่นี้ด้วย .

สารบัญ

								หน้า
	บทคัดย่อภาษาไทย	ก
	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
	กิตติกรรมประกาศ	น
	รายการตารางประกอบ	ข
	รายการตารางภาพประกอบ	ฉ
	รายการรูปภาพประกอบ	ฉ
	บทที่							
1	บทนำ	1
2	อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	7
3	ผลการทดลอง	26
4	การวิจารณ์ผล	58
5	สรุปผลการวิจัยและขอเสนอแนะ	77
	บรรณานุกรม	79
	ประวัติการศึกษา	88

รายการตารางประกอบ

ตารางที่

หน้า

1.	แสดงค่า R_F ของน้ำตาลที่ถูกดําเลี้ยงในต้นข้าว ...	26
2.	แสดงค่า R_F ของน้ำตาลที่ได้จาก initial extract	27
3.	แสดงความยาวของปล้องต้นข้าวที่อายุต่างกัน	29
4.	ผลการ dialysis ของ initial extract ...	39
5.	ผลของการทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์โดยไซแอมโมเนียม ซัลเฟตตกตะกอนโปรตีนจาก initial extract fraction ละ 10% saturation	42
6.	ผลของการทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์โดยไซแอมโมเนียม ซัลเฟตตกตะกอนโปรตีนจาก initial extract fraction ละ 10% saturation และ dialyse ในเวลา 3 ชั่วโมง	43
7.	ผลของการทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	44
8.	ผลของการทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ dialyse ในเวลา 3 ชั่วโมง	44
9.	แสดงผลความเข้มข้นของ glucose ทด Invertase Activity	53
10.	แสดงผลของควํ่าหามปฏิกิริยาอินเวอเทสในรูปของ K_m และ V_{max}	57

รายการตารางภาพประกอบ

ภาพที่

หน้า



1.	การวัดปริมาณ Glucose ที่ใช้เป็นมาตรฐานโดยวิธี Nelson-Somogyi Method.	22
2.	การวัดปริมาณโปรตีน โดยใช้ Bovine Serum Albumin เป็นมาตรฐาน โดยวิธี Lowry Method	25
3.	แสดงความยาวของปล่องขาวที่อายุต่างกัน	30
4.	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของ P-2 กับ Invertase Activity	33
5.	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของ P-1 กับ Invertase Activity	34
6.	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของ P กับ Invertase Activity	35
7.	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของปล่องขาวที่ P , P-1 และ P-2 กับ Invertase Activity	36
8.	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Invertase Activity กับ Reducing sugars ใน P และ P-1	37
9.	แสดงผลของ incubation time ต่อ Invertase Activity ทดลองที่ pH 3.4 อุณหภูมิ 50 องศาเซนติเกรด ความเข้มข้นของ substrate 0.05 M	46
10.	แสดงผลของ pH ต่อ Invertase Activity ความเข้มข้นของ substrate 0.05 M วัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซนติเกรด ในเวลา 1 ชั่วโมง	47
11.	แสดงผลของอุณหภูมิต่อ Invertase Activity วัดปฏิกิริยา	

รายการตารางภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

	ที่ pH 3.4 ความเข้มข้นของ substrate 0.05 M	
	ในเวลา 1 ชั่วโมง	50
12.	แสดงผลความเข้มข้นของ Sucrose ต่อ Invertase Activity	51
13.	แสดงการหาค่า Km และ Vmax ของอินเวอเทส โดยใช้ Lineweaver and Burk's Plot	52
14.	แสดงผลความเข้มข้นของ Glucose ต่อ Invertase Activity	54
15.	แสดงผลการศึกษาความสัมพันธ์ของ Km และ Vmax ในรูปของ	56

รายการรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1.	แสดงการแตกกอของต้นข้าว	9
2.	แสดงส่วนประกอบของช่อดอกข้าว	10
3.	แสดงลักษณะของต้นข้าวที่กำลังมีดอก	17
	ก. Longitudinal section ของต้นข้าวที่กำลังมีดอก	
	ข. Section ที่ไซตะกัก	