



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาการสะสมน้ำตาลซูโครส และกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสในอ้อย

Study on Sucrose Accumulation and Invertase Enzyme Activity in Sugarcane

นามผู้วิจัย นางสาวบุษรินทร์ ตานะ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ณรงค์กัญจน์ เทียนเสรี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทน์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สุคันทรส ชาติกิตติสาร, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทน์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาการสะสมน้ำตาลซูโครส และกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสในอ้อย

Study on Sucrose Accumulation and Invertase Enzyme Activity in Sugarcane

โดย

นางสาวบุษรินทร์ ตานะ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2558

บุษรินทร์ ตานะ 2558: การศึกษาการสะสมน้ำตาลซูโครส และกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสในอ้อย ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์นงลักษณ์ เทียนเสรี, Ph.D. 79 หน้า

ตรวจสอบการสะสมน้ำตาลซูโครส และกิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) neutral invertase (NI) และ cell wall invertase (CWI) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของกิจกรรมของเอนไซม์ SAI NI และ CWI ที่มีต่อการสะสมน้ำตาลซูโครส ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน ในลำต้นส่วนยอดเป็นส่วนที่เนื้อเยื่อระยะอ่อนวัย (immature) ในลำต้นส่วนกลางเป็นส่วนที่เนื้อเยื่ออยู่ในระยะแก่ (maturing) และลำต้นส่วนล่างเป็นส่วนที่เนื้อเยื่ออยู่ในระยะแก่แล้ว (mature) พบว่า ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์มีรูปแบบของการสะสมน้ำตาลซูโครสและกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสแตกต่างกันในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 ปริมาณน้ำตาลซูโครสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของอายุ (6 ถึง 12 เดือน) และพบการสะสมสูงที่สุดในส่วนล่างและมีแนวโน้มลดลงในส่วนกลางและส่วนยอดของลำต้น ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ SAI NI และ CWI มีแนวโน้มลดลงตามการเพิ่มขึ้นของอายุ (6 ถึง 12 เดือน) และพบกิจกรรมของเอนไซม์ SAI NI และ CWI สูงในส่วนยอดและมีแนวโน้มลดลงในส่วนกลางและส่วนล่างของลำต้น ตามลำดับ ซึ่งมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมอย่างมีนัยสำคัญ ในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 พบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครส มีการสะสมสูงที่สุดที่อายุ 8 เดือนและมีแนวโน้มลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น (8 ถึง 12 เดือน) พบการสะสมสูงที่สุดในลำต้นส่วนกลาง และไม่แตกต่างกันในลำต้นส่วนยอดและ ส่วนล่าง กิจกรรมของเอนไซม์ SAI และ CWI เพิ่มขึ้นเมื่ออ้อยมีอายุเพิ่มขึ้น ยกเว้น NI พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ พบกิจกรรมของเอนไซม์ SAI NI และ CWI สูงในส่วนยอด และลดลงในส่วนกลางและส่วนล่างของลำต้น กิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่เอนไซม์ NI และ CWI มีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามอย่างไม่มีความนัยสำคัญ

Bootsarin Tana 2015: Study on Sucrose Accumulation and Invertase Enzyme Activity in Sugarcane. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Ms. Nongluk Teinseree, Ph.D. 79 pages.

Sucrose content and enzyme activities of soluble acid invertase (SAI), neutral invertase (NI) and cell wall invertase (CWI) in cultivated sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), line 20-2248 and *S. spontaneum*, line S98-244 at various developmental stages, six to twelve-month after planting (MAP) stems, were monitored and the correlation among them were analysed. In each stem, the three parts of internodes the top, middle and bottom representing relatively immature, maturing and mature internode, respectively were collected for the experiment. The results showed that sugarcane stems of different species revealed different patterns of sucrose accumulation and enzyme activities. In line 20-2248, the sucrose content was increased with increasing of the month after planting (from 6 to 12 MAP) and was highest in the bottom part and decreased in the middle and top part, respectively. The activities of SAI, NI and CWI decreased with increasing of month after planting (from 6 to 12 MAP) and was highest in the top part and decreased in the middle and bottom part, respectively. There were significantly negative correlations between sucrose content and the activities of SAI, NI and CWI. In line S98-244, the sucrose content peaked at 8 MAP and then declined toward the maturity of 12 MAP. The mid-part of stem was marked higher in the concentration of sucrose over the middle and bottom parts. The activities of SAI and CWI increased with increasing of month after planting (from 6 to 12 MAP) except NI, that stable in all stages. The activities of SAI, NI and CWI was highest in the top part and decreased in the middle and bottom parts. Only the SAI activity gave negatively significant correlation for sucrose content while the correlation between NI and CWI activity for sucrose content showed negative correlation but was not significant.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร. นงลักษณ์ เทียนเสรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ. ดร. สนธิชัย จันทน์เปรม และ ดร. สุคันทรส ธาดากิตติสาร ที่ให้ความรู้ให้คำปรึกษาในระหว่างการทำงานวิจัย และการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ รวมถึงการให้ความช่วยเหลือในด้านอื่นๆ ด้วยดีเสมอมา จนกระทั่งงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรศิริ เลี้ยงสกุล ประธานการสอบ และ ดร. พนิดา คงสวัสดิ์วีรกุล ผู้ทรงคุณทรงวุฒิภายนอก ที่ได้ให้ความกรุณา ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ให้การสนับสนุนทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัยและงบประมาณในการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ จากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและถ่ายยีนและห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกๆ ฝ่าย ของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และพี่ๆ น้องๆ จากหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยี เทคโนโลยีเอนไซม์ และการจัดการของเสีย ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ และคอยเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยจนกระทั่งงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจ ให้แก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา ประโยชน์อันใดที่จะได้รับเนื่องจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ข้าพเจ้าขอมอบให้นายสมบูรณ์ และนางสมพร ตานะ ผู้เป็นบิดาและมารดาของข้าพเจ้า ตลอดจนญาติพี่น้อง ครู-อาจารย์ เพื่อนๆ และผู้ให้การสนับสนุนข้าพเจ้าทุกคน

บุษรินทร์ ตานะ

ธันวาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
อุปกรณ์	14
วิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	21
สรุป	53
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	55
ภาคผนวก	62
ภาคผนวก ก ข้อมูลผลการทดลอง	63
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี	72
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	79

สารบัญตาราง

ตารางหมวดที่		หน้า
ก1	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อย สายพันธุ์ 20-2248	64
ก2	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อย สายพันธุ์ S98-244	65
ก3	กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) ของอ้อยปลูก สายพันธุ์ 20-2248	66
ก4	กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) ของอ้อยป่า สายพันธุ์ S98-244	67
ก5	กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) ของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248	68
ก6	กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) ของอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244	69
ก7	กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI) ของอ้อยปลูก สายพันธุ์ 20-2248	70
ก8	กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI) ของอ้อยป่า สายพันธุ์ S98-244	71
ข1	สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสมาตรฐานและตัวอย่าง ด้วยเครื่อง HPLC	74

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการสร้าง และเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสไปยังแหล่งเก็บสะสมในพืช	7
2	ปฏิกิริยาจากการทำงานของเอนไซม์ SuSy และ invertase	9
3	บทบาทของอินเวอร์เวสในการเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสใน phloem unloading pathway แต่ละส่วนของเซลล์พืช	10
4	หน้าที่ของอินเวอร์เทสแต่ละรูปแบบ (isoform) ในเซลล์พืช	11
5	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ในอ้อยปลูก 20-2248 และ อ้อยป่า S98-244	25
6	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยของอ้อยปลูก 20-2248 (A) และอ้อยป่า S98-244 (B)	26
7	ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยในแต่ละอายุของอ้อยปลูก 20-2248 (A) และอ้อยป่า S98-244 (B)	27
8	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B) ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือนหลังปลูก	28
9	กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ soluble acid invertase ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 และอ้อยป่า S98-244	32
10	กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ soluble acid invertase ในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244(B)	33
11	กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ soluble acid invertase ในแต่ละอายุของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)	34
12	กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B) ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน	35
13	กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ neutral invertase (NI) (นาโน โมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในอ้อยปลูก 20-2248 และ อ้อยป่า S98-244 ของอ้อยอายุ 6 8 10 และ 12 เดือนหลังปลูก	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248(A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)	39
15	กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในแต่ละอายุของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)	40
16	กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248(A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B) ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือนหลังปลูก	41
17	กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ cell wall invertase (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในอ้อยปลูก 20-2248 และ อ้อยป่า S98-244	46
18	กิจกรรมของเฉลี่ยเอนไซม์ cell wall invertase (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98- 244 (B)	47
19	กิจกรรมของเฉลี่ยเอนไซม์ cell wall invertase (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในแต่ละอายุของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)	48
20	กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248(A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B) ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน	49
21	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสและกิจกรรมของเอนไซม์ SAI, CWI และ NI ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (a, b และ c ตามลำดับ) และในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (c, d และ f ตามลำดับ)	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพนกที่		หน้า
ข1	กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายซูโครสมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	74
ข2	กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายฟรุกโตสต่อกลูโคส มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 40 80 120 160 180 และ 200 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร	76
ข3	กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร	78

การศึกษาการสะสมน้ำตาลซูโครส และกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสในอ้อย

Study on Sucrose Accumulation and Invertase Enzyme Activity in Sugarcane

คำนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทย โดยมีพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 9 ล้านไร่ ผลผลิตประมาณ 100 ล้านตันต่อปี โดยให้ผลผลิตเฉลี่ย 11.32 ตันต่อไร่ มีค่าความหวานประมาณ 11.64 CCS สามารถผลิตน้ำตาลได้ประมาณ 10 ล้านตัน (สำนักคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล, 2557) ซึ่งนับว่าต่ำมากเมื่อเทียบกับประเทศคู่แข่ง ข้อจำกัดที่ทำให้ผลผลิตอ้อยของไทยต่ำ เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่ปลูกอ้อยโดยอาศัยน้ำฝน ขาดแคลนเทคโนโลยีที่เหมาะสม ขาดการวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์อ้อยเพื่อให้ได้อ้อยพันธุ์ที่เหมาะสมต่อแต่ละพื้นที่ รวมทั้งข้อจำกัดของพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง ซึ่งปัจจุบันพันธุ์อ้อยของประเทศไทยมีค่าความหวานสูงสุดอยู่ประมาณ 11-12 CCS (Commercial Cane Sugar)

ค่าความหวานของอ้อยนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ที่สำคัญคือ ความสามารถในการสร้างและสะสมน้ำตาลซูโครสของอ้อย ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์อย่างน้อย 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการสร้างน้ำตาลซูโครส ได้แก่ เอนไซม์ซูโครสฟอสเฟตซินเทส (sucrose-phosphate synthase: SPS) เอนไซม์ซูโครสฟอสฟาเทส (sucrose phosphatase: SPP) และเอนไซม์กลุ่มที่สอง เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายซูโครส ได้แก่ เอนไซม์ซูโครสซินเทส (sucrose synthase: SuSy) และเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase: Inv) เพื่อใช้น้ำตาลซูโครสสำหรับการเจริญเติบโตและพัฒนาการทางด้านลำต้น จากผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เอนไซม์อินเวอร์เทสที่พบในอ้อยมี 3 รูปแบบ (isoform) ได้แก่ เอนไซม์อินเวอร์เทสจากผนังเซลล์ (cellwall invertase: CWI/ insoluble acid invertase: AI) เอนไซม์อินเวอร์เทสจากแวคิวโอล (vascuolar invertase: VI/ soluble acid invertase: SAI) และเอนไซม์อินเวอร์เทสจากไซโทพลาซึม (cytoplasmic invertase: CI/ neutral invertase: NI) แต่อย่างไรก็ตาม รายงานที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของเอนไซม์อินเวอร์เทสแต่ละรูปแบบ (isoform) ที่มีต่อการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสยังมีข้อขัดแย้ง ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสแต่ละรูปแบบ (isoform) กับการสะสมน้ำตาลซูโครสเพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ดังกล่าวของอ้อยตั้งแต่ช่วงเริ่มมีการสะสมน้ำตาลซูโครส (ช่วงปลายของการเจริญเติบโตในระยะอย่างปล้อง) จนถึงช่วงที่อ้อยมีการสะสมน้ำตาล

ชูโครสสูงที่สุด (ระยะสุกแก่) เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์อ้อยที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลชูโครสในลำต้นสูงต่อไป



วัตถุประสงค์

1. เพื่อทราบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นอ้อยสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง และอ้อยสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสต่ำ

2. เพื่อทราบกิจกรรมของเอนไซม์ SAI NI และ CWI ในลำต้นอ้อยสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง และอ้อยสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสต่ำ

3. เพื่อทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสจากแวคิวโอล (vacuolar invertase :VI/ soluble acid invertase: SAI) เอนไซม์อินเวอร์เทสจากไซโทพลาซึม (cytoplasmic invertase: CI/ neutral invertase: NI) และเอนไซม์อินเวอร์เทสจากผนังเซลล์ (cell wall invertase: CWI) กับการสะสมน้ำตาลซูโครสในอ้อยสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง และอ้อยสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสต่ำ

การตรวจเอกสาร

อ้อย

อ้อยเป็นพืชตระกูลหญ้าอยู่ในวงศ์ Poaceae (ชื่อเดิมคือ Gramineae) อยู่ในสกุล (genus) *Saccharum* การจำแนกชนิด (species) ตามที่ได้รับการยอมรับโดยทั่วไป คือ สามารถจำแนกได้ เป็น 4 ชนิด (species) ดังต่อไปนี้

1. อ้อยปลูกดั้งเดิม (*Saccharum officinarum* L.) เป็นอ้อยที่เกิดในแถบเกาะนิวกินี อ้อยชนิดนี้มีลักษณะสำคัญ คือลำใหญ่ ใบยาวและกว้าง มีน้ำตาลมาก เปลือกและเนื้อนิ่ม โดยทั่วไปมักเรียกว่า อ้อยเคี้ยว เหาที่มีอยู่ในประเทศไทย คืออ้อยมอริเชียส (Mauritius) และอ้อยบาดิลลา (Badila) ในอดีตชาวคัทซ์ที่อยู่ในชวาเรียกอ้อยชนิดนี้ว่า noble cane ต่อมาในปี 1956 Brandes เรียกว่า native garden sugarcane หรือ native sugarcane อ้อยชนิดนี้มีลักษณะเด่นคือ ให้ความหวานสูง จึงเป็นอ้อยที่มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมน้ำตาลทรายของโลกอย่างมาก อ้อยที่ปลูกเป็นการค้าปัจจุบันก็มักมีพันธุกรรมที่มาจากอ้อยชนิดนี้ (เกษม, 2527; ประเสริฐ และคณะ, 2544; นพพร และคณะ, 2547)

2. อ้อยป่าแถบร้อน (*Saccharum spontaneum* L.) พบทั่วไปในเขตร้อนและชุ่มชื้น มีอยู่หลายร้อยชนิดแตกต่างกันตามถิ่นกำเนิด แต่มีลักษณะสำคัญที่คล้ายคลึงกัน คือมีอายุหลายปี ขึ้นอยู่เป็นกอ มีลำต้นใต้ดิน ลำต้นเหนือดินพอมและแข็ง ใ้สีม่วง และมีลักษณะเด่นคือ มีความสามารถในการต้านทานโรค แมลงและทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีจึงมีบทบาทสำคัญมาก ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ ในประเทศไทยเรียกอ้อยชนิดนี้ว่า แคมพงหรืออ้อยป่า (wild cane) (เกษม, 2527; ประเสริฐ และคณะ, 2544; นพพร และคณะ, 2547)

3. อ้อยอินเดีย (*Saccharum barberi* Jeswiet) เป็นอ้อยที่มีถิ่นกำเนิดในอินเดียตอนเหนือ นักวิชาการเชื่อกันว่าอ้อยชนิดนี้เป็นอ้อยที่เกิดจากการผสมกันตามธรรมชาติ ระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่าแถบร้อน มีลักษณะลำต้นเล็ก ใบเล็ก ข้อโป่ง มีความหวานสูง เปลือกและเนื้อนิ่ม อ้อยขาไก่ ในประเทศไทยจัดเป็นอ้อยในกลุ่มนี้ (ประเสริฐ และคณะ, 2544; นพพร และคณะ, 2547)

4. อ้อยป่าวิวกินี (*Saccharum robustum* Brandes et Jeswiet Ex Grassl) เป็นอ้อยป่าแถบเกาะนิวกินี เปลือกแข็ง ใส่ฟาม มีลำต้นใหญ่ แข็งแรง อาจสูงถึง 10 เมตร มีความหวานต่ำ อ้อยชนิดนี้ไม่พบในประเทศไทย นักวิชาการเชื่อกันว่าเป็นต้นตระกูลของอ้อยปลูกดั้งเดิม (นพพร และคณะ, 2547)

5. อ้อยจีน (*Saccharum sinense* Roxb. Amend, Jeswist) เป็นอ้อยที่มีลำต้นแข็ง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีน้ำตาลซูโครสค่อนข้างสูง และต้านทานต่อโรคบางชนิด แต่ผลผลิตมักจะต่ำมาก อ้อยจีนเป็นอ้อยที่ออกดอกน้อยและมักจะเป็นหมัน (นพพร และคณะ, 2547)

แต่ทั้งนี้พันธุ์อ้อยที่ปลูกเป็นการค้าเพื่ออุตสาหกรรมน้ำตาลส่วนใหญ่ในปัจจุบัน เป็นพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่าง *S. officinarum* กับชนิดอื่นๆ ในสกุล *Saccharum* ที่เป็นอ้อยป่า เช่น *S. spontaneum* และ *S. robustum* และในสกุลใกล้เคียง (นพพร และคณะ, 2547)

การเจริญเติบโตของอ้อย (นพพร และคณะ, 2547)

อ้อยเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตทางลำต้นและการสะสมน้ำตาลเกิดขึ้นไม่พร้อมกันในขณะที่อ้อยมีการเจริญเติบโตทางลำต้นอย่างรวดเร็ว นั้น ปริมาณน้ำตาลที่สะสมภายในลำต้นจะมีปริมาณต่ำมาก แต่เมื่ออ้อยมีอายุมากขึ้นการเจริญเติบโตทางลำต้นจะลดลง การสะสมน้ำตาลในลำต้นก็จะเพิ่มสูงขึ้น โดยการเจริญเติบโตของอ้อยสามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังต่อไปนี้

1. ระยะงอก (germination phase) เริ่มตั้งแต่ปลูกจนถึงหน่อ โผล่พ้นผิวดินใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์

2. ระยะแตกกอ (tillering phase) เป็นลักษณะพิเศษของอ้อย เริ่มตั้งแต่อายุ 2-4 เดือน การแตกกอเกิดจากตาอ้อยบริเวณลำต้นใต้ดิน การเจริญเติบโตระยะนี้ต้องการแสงแดดจัด อุณหภูมิสูงและต้องการน้ำมากกว่าระยะงอก

3. ระยะย่างปล้อง (elongation phase) เป็นระยะที่ต่อเนื่องจากรยะแตกกอ เริ่มตั้งแต่อายุประมาณ 3-4 เดือน และเจริญเติบโตได้เร็วที่สุดเมื่ออายุ 6-7 เดือน เป็นระยะที่อ้อยมีการเจริญเติบโตทางลำต้นอย่างรวดเร็ว

4. ระยะแก่และสุก (maturity and ripening phase) ระยะแก่ เป็นระยะที่อ้อยมีการเจริญเติบโตทางลำต้นลดลง และมีการสะสมน้ำตาลในลำต้นเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งเข้าสู่ระยะสุก ซึ่งเป็นระยะที่อ้อยมีการสะสมน้ำตาลสูงที่สุด

การสังเคราะห์และสะสมน้ำตาลซูโครสในพืช

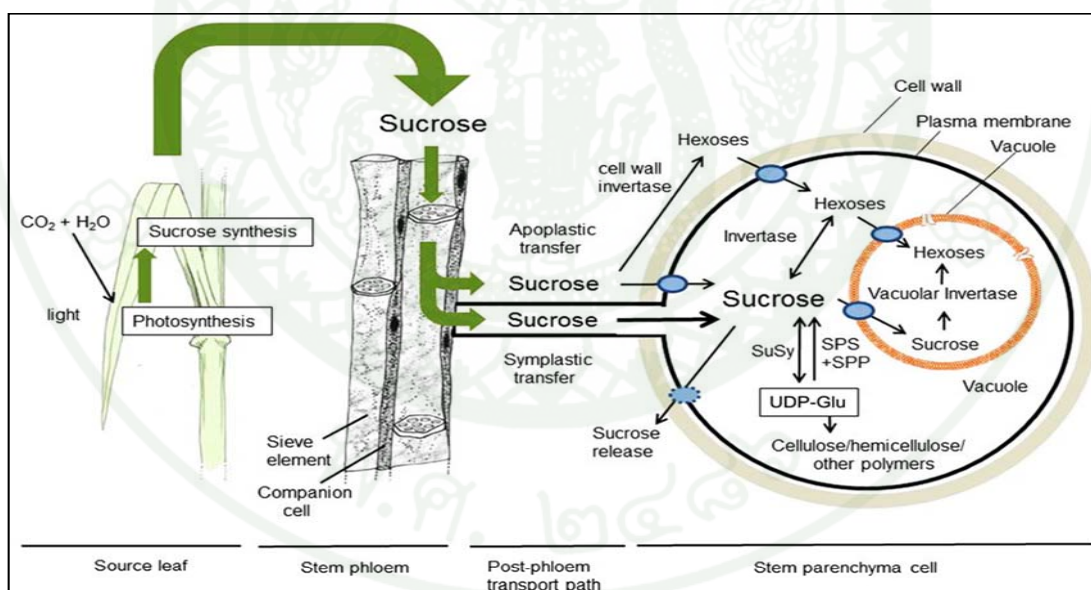
อ้อยจัดว่าเป็นพืชที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล เนื่องจากเป็นพืชที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลสูงซึ่งเก็บสะสมน้ำตาลในรูปแบบของน้ำตาลซูโครส โดยอ้อยสามารถสะสมน้ำตาลซูโครสได้มากกว่า 25 % ของน้ำหนักสด (Moore, 1995)

น้ำตาลซูโครส (cane sugar, disaccharide, 0- α -D-glucopyranosyl-(1, 2)- β -D-fructofuranose, compound sugar) เป็นไดแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ D-glucose เชื่อมต่อกับ โมเลกุลของ D-fructose ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) จัดเป็นไดแซ็กคาไรด์ชนิดที่ไม่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (non-reducing sugar) (Halford *et al.*, 2010) และเป็นรูปแบบของคาร์โบไฮเดรตในพืชเกือบทุกชนิดที่ใช้ในการขนส่งหรือเคลื่อนย้ายออกจากแหล่งผลิตไปยังส่วนต่างๆ ของพืช เพื่อนำไปใช้ในเมแทบอลิซึมและเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการสร้างสารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช

น้ำตาลซูโครสที่พบในอ้อยและพืชเกือบทุกชนิด เป็นผลผลิตที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช (Roitsch and Gonzalez, 2004) รูปแบบของการสังเคราะห์และการสะสมน้ำตาลซูโครสในลำต้นอ้อยนั้นถูกเสนอขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Glasziou and Gayler (1972) โดยพบว่า น้ำตาลซูโครสที่เกิดขึ้น เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์แสงที่บริเวณใบ (source organ) และถูกส่งเข้าสู่ท่ออาหาร (phloem) โดย proton-sucrose symporter (Chiou and Bush, 1998) จากนั้นเอนไซม์อินเวอร์เทสที่อยู่บริเวณผนังเซลล์จะย่อยสลายซูโครสให้อยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เพื่อส่งผ่านพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ไปยังเนื้อเยื่อพาราไคมาของลำต้น เนื่องจากพลาสมาเมมเบรนจะยอมให้สาร โมเลกุลเดี่ยวเท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าออกได้ จากนั้นซูโครสจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่อีกครั้งและเก็บไว้ที่แวคิวโอล (vacuole) (Antonio *et al.*, 1980; Marta *et al.*, 1981; Fernando *et al.*, 1982) (ภาพที่ 1) โดยในปฏิกิริยาการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสในพืชนั้น พบว่ามีเอนไซม์หลักอย่างน้อย 2 ชนิดที่เข้ามาเร่งปฏิกิริยา

เพื่อให้เกิดการสร้างน้ำตาลซูโครส คือ sucrose phosphate synthase (SPS) และ sucrose synthase (SuSy)

อย่างไรก็ตาม sucrose 6'-phosphate ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะถูกเคลื่อนย้ายออกไป ทำให้ความเข้มข้นของ sucrose 6'-phosphate ภายในเซลล์ต่ำอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ SPS จึงมีแนวโน้มที่จะไม่ย้อนกลับ ในขณะที่ปฏิกิริยาที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ SuSy นั้น จะสามารถย้อนกลับได้ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า เอนไซม์ SPS เป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสทั้งในเนื้อเยื่อที่สามารถสังเคราะห์แสงได้และเนื้อเยื่อที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ กล่าวคือ ในการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสในพืชรวมทั้งในอ้อย ส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ SPS โดยกลูโคสจาก UDP-glucose จะถูกย้ายไปยัง fructose-6-phosphate จากนั้นเอนไซม์ sucrose phosphatase (SPP) จะตัดหมู่ phosphate (Pi) ออกได้ซูโครสอิสระเป็นผลผลิตสุดท้าย ส่วนเอนไซม์ SuSy จัดว่าเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายซูโครส (Huber and Huber, 1996; อ้างใน ปีพามา, 2546)

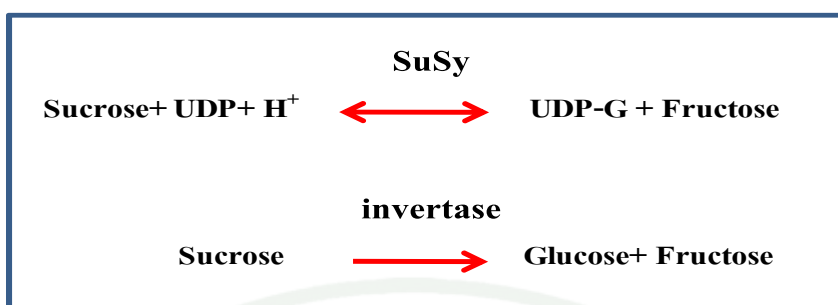


ภาพที่ 1 กระบวนการสร้าง และเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสไปยังแหล่งเก็บสะสมในพืช

ที่มา: Wang *et al.* (2013)

การย่อยสลายน้ำตาลซูโครสในพืช

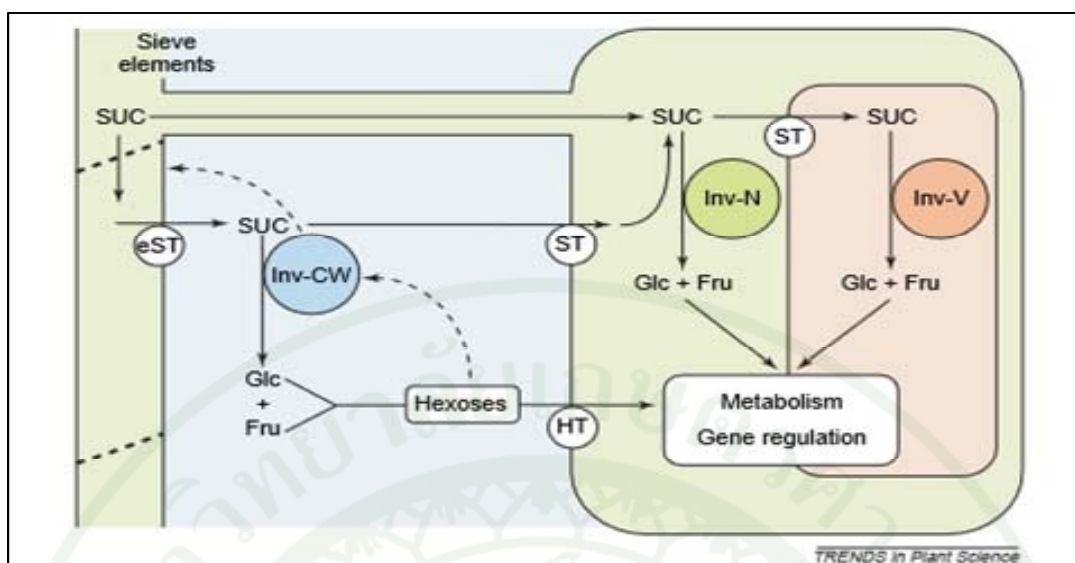
เนื่องจากพืชมีลักษณะสำคัญประการหนึ่ง คือ สามารถสร้างอาหารได้เอง ด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสงจากแหล่งผลิต (source organ) เช่น บริเวณใบ ดังที่กล่าวไว้แล้วในข้างต้น แล้วส่งไปยังบริเวณเนื้อเยื่อที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (sink organ) เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และการพัฒนาการของพืช เช่น ส่วนปลายยอด ปลายราก และส่วนที่ทำหน้าที่ในการเก็บสะสมอาหาร เช่น หัว (tuber) และเมล็ด (grain) ซึ่งในอ้อยนั้นน้ำตาลที่สร้างขึ้นจะถูกขนส่งและเก็บสะสมอยู่ในรูปของน้ำตาลซูโครส ดังนั้นการใช้น้ำตาลซูโครสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมรวมถึงการเคลื่อนย้ายน้ำตาลไปยังส่วนต่างๆ ของพืชจะขึ้นอยู่กับกระบวนการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลเฮกโซส (hexose) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ sucrose synthase (SuSy) ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้อยู่ในรูปของ UDP-glucose + fructose โดย UDP-glucose ที่ได้จากการทำงานของ SuSy จะถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการสร้างสารโพลีแซ็กคาไรด์ตัวอื่นๆ เช่น แป้งและองค์ประกอบของผนังเซลล์ เป็นต้น โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ SuSy เป็นปฏิกิริยาที่สามารถย้อนกลับได้ เอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง คือ เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้อยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสองโมเลกุล คือ กลูโคสและฟรุกโทส โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส เป็นปฏิกิริยาที่ไม่สามารถย้อนกลับได้ (ภาพที่ 2) และนอกจากนี้ เอนไซม์อินเวอร์เทสยังเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยกลูโคสและฟรุกโทสที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทสจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ของพืช เช่น เข้าสู่กระบวนการไกลโคลิซิส (glycolysis) ใช้ในกระบวนการหายใจ และใช้เป็น signal ในการตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมของพืช เป็นต้น (Sturm, 1999; Roitsch and Gonzalez, 2004)



ภาพที่ 2 ปฏิกริยาจากการทำงานของเอนไซม์ SuSy และ invertase

เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

อินเวอร์เทส (invertase หรือ β -Fructofuranosidase, E.C 3.2.1.26) คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้แก่ กลูโคสและฟรุกโทส ซึ่งในพืชสามารถพบเอนไซม์อินเวอร์เทสได้หลายรูปแบบ (isoform) ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical) และแหล่งที่พบ (subcellular location) (Strum, 1999) เอนไซม์อินเวอร์เทสแต่ละรูปแบบมีบทบาทและหน้าที่ภายในเซลล์หลายอย่างแตกต่างกัน (ภาพที่ 3) ถ้าจำแนกตามคุณสมบัติการละลายน้ำสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรก คือ soluble invertase ประกอบด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสที่พบในแวคิวโอล เรียกว่า vascular invertase (Inv-V) สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกรด pH ~ 5 หรือเรียกว่า soluble acid invertase (SAI) และเอนไซม์อินเวอร์เทสที่พบในไซโทพลาซึม เรียกว่า cytoplasmic invertase (Inv-C) สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกลางหรือเบส pH ~ 7.0 - 7.8 หรือเรียกว่า neutral/ alkaline invertase (NI) (Ma *et al.*, 2000; Sherson *et al.*, 2003; Pramanik *et al.*, 2004) กลุ่มที่สอง คือ insoluble invertase ได้แก่ เอนไซม์อินเวอร์เทสที่พบในผนังเซลล์ เรียกว่า cell wall invertase (Inv-CW) หรือ extracellular invertase สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกรด pH ~3.5 - 4.5 หรือเรียกว่า acid invertase (AI) (Zhou, 2000; Andersen *et al.*, 2002 อ้างใน รัชนี, 2550)



ภาพที่ 3 บทบาทของเอนไซม์อินเวอร์เทสในการเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสใน phloem unloading pathway ในแต่ละส่วนของเซลล์พืช

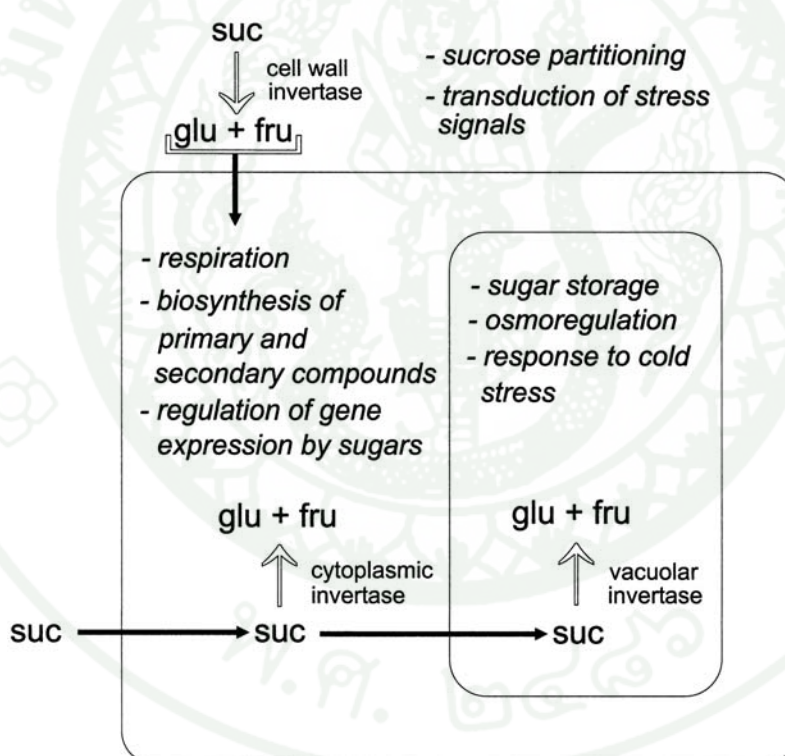
ที่มา: Roitsh and Gonzalez (2004)

บทบาทของเอนไซม์อินเวอร์เทส

ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นเกี่ยวกับหน้าที่หลักของเอนไซม์อินเวอร์เทส (ภาพที่ 4) ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายซูโครสให้อยู่ในรูปของน้ำตาลเฮกโซส (hexose) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน และเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ ของเซลล์ โดยการย่อยสลายซูโครสให้อยู่ในรูปของกลูโคสและฟรุกโทสนั้น จะทำให้เซลล์มีแรงดันเพิ่มขึ้น จึงเป็นไปได้ว่า เอนไซม์อินเวอร์เทสมีบทบาทต่อการยึดตัวของเซลล์ การเจริญเติบโตและการเก็บสะสมน้ำตาลไว้ที่ sink organ เช่น เมล็ด หัว ผล และราก (Gibeaut *et al.*, 1990) เนื่องจากเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว หรือลำต้นที่กำลังยึดตัวจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ acid invertase สูง (Sacher *et al.*, 1963) แต่จะมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นหน้าที่ของเอนไซม์ acid invertase ในเนื้อเยื่อเหล่านี้ คือ การย่อยสลายน้ำตาลซูโครสภายใต้สภาพที่มีความต้องการ hexose สูง เช่นเดียวกับในอ้อยซึ่งในช่วงที่อ้อยมีการเจริญเติบโตทางลำต้นนั้นจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ acid invertase ในระดับสูง และ neutral invertase ในระดับปานกลาง ทำให้มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมต่ำ ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ acid invertase เป็นตัวควบคุมกิจกรรมการเปลี่ยนรูปร่าง และโครงสร้างของอวัยวะต่างๆ แต่เมื่ออ้อยโตเต็มที่แล้วจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase ในระดับสูง

ซึ่งคาดว่าอาจจะมีบทบาทในการเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสไปเก็บยังแวคิวโอล (Hatch and Glasziou, 1963; Marta *et al.*, 1981; Fernando *et al.*, 1982; Venkataramana and Naidu, 1993; Vorster and Botha, 1998)

สำหรับในอ้อย เอนไซม์อินเวอร์เทสเกี่ยวข้องกับกลไกการสะสมน้ำตาล โดยซูโครสที่สะสมในส่วนของปล้องจะเป็นน้ำตาลซูโครสที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ หลังจากที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส และส่งออกจากท่ออาหารไปยังส่วนต่างๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ cell wall (apoplastic space) cytoplasm (metabolic compartment) และ vacuole (storage compartment) (Sacher *et al.*, 1963) ซึ่งส่วนต่างๆ ในเซลล์นี้ประกอบไปด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสในรูปแบบ (isoform) ที่แตกต่างกัน ตามที่กล่าวไว้ในข้างต้น



ภาพที่ 4 หน้าที่ของเอนไซม์อินเวอร์เทสแต่ละรูปแบบ (isoform) ในเซลล์พืช

ที่มา: Sturm (1999)

ปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่สะสมในส่วนของปล้องอ้อยจะมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสและอายุของลำอ้อย (Zhu *et al.*, 1997) จากรายงานของ Miron and Schaffer (1990) พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ acid invertase สูงในส่วน apoplast และ vacuole ของปล้องที่ยังอ่อนและมีการเจริญเติบโต และพบกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวต่ำมากในส่วนของปล้องแก่ ส่วนเอนไซม์ neutral invertase พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำในส่วนของเนื้อเยื่อที่อ่อนมากและมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นในเนื้อเยื่อที่เจริญมากขึ้น (Batta and Singh, 1986) จึงมีความเป็นไปได้ว่า เอนไซม์ neutral invertase จะมีบทบาทในการควบคุมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสจากท่อน้ำเลี้ยงอาหารไปยังเนื้อเยื่อที่เก็บสะสมในลำแก่ หรือเกี่ยวข้องกับการ turnover ของ hexose ในเนื้อเยื่อที่เจริญเต็มที่ (Gayler and Glasziou, 1972; Bosch *et al.*, 2004) โดยในอ้อยที่มีการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง จะพบกิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase ต่ำในส่วน of meristematic cell และเพิ่มขึ้นพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลซูโครสที่สะสมในเนื้อเยื่อที่สะสมน้ำตาล

Terauchi (1997) กล่าวว่า เอนไซม์ soluble acid invertase ไม่ได้มีบทบาทสำคัญในการสะสมน้ำตาลซูโครส แต่เอนไซม์ที่มีบทบาทดังกล่าวคือเอนไซม์ sucrose phosphate synthase เนื่องจากตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase สูงเกือบทุกระยะการเจริญเติบโต และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ sucrose phosphate synthase เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ระยะของการเจริญเติบโตทางลำต้นจนถึงระยะเก็บเกี่ยว โดยวัดจากค่าบrix (brix) ของน้ำตาลอินเวอร์ท (invert sugar) ของอ้อยพันธุ์ Ni 4 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง แต่ในขณะที่ Lingle (1997; 1999) ศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ sucrose phosphate synthase และ soluble acid invertase กับปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและเอนไซม์ sucrose synthase กับอัตราการสะสมน้ำตาลซูโครสของอ้อย 7 พันธุ์ กลับพบว่า อัตราการทำงานของเอนไซม์ sucrose synthase ไม่มีส่วนสัมพันธ์กับอัตราการสะสมน้ำตาลซูโครส ในขณะที่เอนไซม์ sucrose phosphate synthase และ soluble acid invertase มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในลำต้นอ้อยที่โตเต็มที่แล้ว และเมื่อศึกษาในระดับโปรตีนที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิดนี้ พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในทุกสายพันธุ์ ดังนั้น หากยึดกิจกรรมของเอนไซม์เป็นดัชนีเพียงอย่างเดียวสำหรับคัดเลือกสายพันธุ์อ้อยที่มีความสามารถในการสะสมปริมาณน้ำตาลซูโครสได้สูงอาจจะไม่ประสบผลสำเร็จเช่นเดียวกับ Zhu *et al.* (1997) พบว่า เอนไซม์ soluble acid invertase และ sucrose phosphate synthase มีบทบาทสำคัญในการสะสมน้ำตาลซูโครสในลำต้นของอ้อย โดยพบความสัมพันธ์ในทางลบระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase กับการสะสมน้ำตาลซูโครส นั่นคือ ถ้ากิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid

invertase มีมาก การสะสมน้ำตาลซูโครสจะน้อย ต่อมา Zhu *et al.* (2000) ได้หาลำดับของเปปไทด์ของเอนไซม์ soluble acid invertase จากอ้อยพันธุ์ที่สะสมน้ำตาลซูโครสสูงเปรียบเทียบกับพันธุ์ที่สะสมน้ำตาลซูโครสต่ำ พบว่า มีความเหมือนกันถึง 98 % ในขณะที่ Gutierrez-Miceli *et al.* (2002) พบว่า การสะสมน้ำตาลซูโครสในอ้อยมีความสัมพันธ์อย่างมากกับการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase และ neutral invertase ต่อมา Bosch *et al.* (2004) พบว่า ในเนื้อเยื่อของลำต้นอ้อยที่มีน้ำตาลซูโครสต่ำ และมี hexose สูงจะพบ mRNA และ โปรตีนของเอนไซม์ neutral invertase สูงกว่าเนื้อเยื่อที่มีการเก็บสะสมน้ำตาลซูโครสมาก จากผลการทดลองที่ขัดแย้งกันนี้จึงยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์อินเวอร์เทสแต่ละรูปแบบ (isoform) ที่มีความสัมพันธ์ต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในอ้อย ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์อินเวอร์เทสแต่ละรูปแบบ (isoform) กับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมของอ้อยทั้งสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง และสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสต่ำเพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

อ้อยปลูก (*Saccharum officinarum* L.) สายพันธุ์ 20-2248 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง และอ้อยป่า (*Saccharum spontaneum*) สายพันธุ์ S98-244 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสต่ำ ได้รับความอนุเคราะห์สายพันธุ์อ้อยจากรศ.ดร.ประเสริฐ นัตถวิระวงษ์ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน

2. วัสดุและอุปกรณ์

2.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

วัสดุอุปกรณ์สำหรับศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครส เช่น โกร่งบดตัวอย่าง ช้อนตักสาร (spatula) หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 3 มิลลิลิตร ขวด vial พร้อมชุดฝาปิด กระดาษกรองชนิด cellulose acetate ขนาด 0.45 ไมครอน ตัวกรอง (syringe filter) ชนิด cellulose acetate ขนาด 0.2 ไมครอน ชุดกรองสารระบบสูญญากาศ (glass vacuum filter holder) และ เครื่องแก้วต่างๆ เช่น ขวดใส่สาร ปีกเกอร์ กระจบอกดวง เป็นต้น

เครื่องมือที่ใช้สำหรับศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครส เช่น เครื่องชั่งสาร (balance) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เครื่องกวน (vortex) คอลัมน์สำหรับแยกสารยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น Aminex HPX-87P และ เครื่อง HPLC ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น LC – CLASS10 เป็นต้น

2.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส

วัสดุอุปกรณ์สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสเช่น โกร่งบดตัวอย่าง ซ้อนตักสาร (spatula) หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเครื่องแก้วต่างๆ เช่น ปีกเกอร์ และกระบอกตวง เป็นต้น

เครื่องมือที่ใช้สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส เช่น เครื่องชั่งสาร (balance) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เครื่องกวน (vortex) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เครื่องวัดอุณหภูมิ (thermometer) และเครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) เป็นต้น

2.3 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีโซโมจาย-เนลสัน (Somogyi-Nelson method)

วัสดุและอุปกรณ์สำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หม้อต้มน้ำ ไมโครเวลเพลท (microwell plate) ชนิด 96 หลุม และเครื่องแก้วต่างๆ เช่น ปีกเกอร์ และกระบอกตวง เป็นต้น

เครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่น เตาแก๊สเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น spectra MAX 190 เป็นต้น

2.4 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม ด้วยวิธีลารี (Lowry method)

วัสดุและอุปกรณ์สำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณรวม เช่น หลอดทดลองพร้อมฝาปิด ซ้อนตักสาร และเครื่องแก้วต่างๆ เช่น ปีกเกอร์ และกระบอกตวง เป็นต้น

เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวม เช่น เครื่องกวน (vortex) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Jasco V-350 เป็นต้น

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดน้ำตาลซูโครส และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วยเครื่อง HPLC ตามภาคผนวก ข

3.2 สารเคมีที่ใช้สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส

3.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีโซโมจาเย-เนลสัน ตามภาคผนวก ข

3.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม ด้วยวิธีลาวรี ตามภาคผนวก ข

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง

ปลูกอ้อยที่คัดเลือกไว้ 2 สายพันธุ์ ในแปลงทดลอง เก็บตัวอย่างจากส่วนของลำต้นอ้อยที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน แบ่งตัวอย่างในแต่ละลำออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนยอด (top) ส่วนกลาง (medium) และส่วนล่าง (bottom) โดยตัวอย่างแต่ละส่วนที่ใช้ศึกษาจะใช้เฉพาะส่วนของปล้อง (internode) ที่ถูกแยกเอาส่วนของข้อ (node) และเปลือก (bark) ออกไป จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละส่วนไปใช้เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส และปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วยเทคนิค HPLC ต่อไป

2. การศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครส ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

2.1 สกัดน้ำตาลซูโครสจากลำต้นอ้อย โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lu *et al.* (2011). ดึงน้ำบดตัวอย่างพืชประมาณ 1.0 - 2.0 กรัม ให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว เติม 80 % เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกตะกอนออกโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกเก็บ

สารละลายส่วนใสไว้และนำตะกอนที่เหลือไปสกัดน้ำตาลซูโครสซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มารวมกัน กำจัดเอทานอลด้วยการนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 60 นาที จนมั่นใจว่าเอทานอลถูกกำจัดออกไปหมด บันทึกปริมาตรสุดท้าย และนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปเตรียมวิเคราะห์หาปริมาณซูโครสด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

2.2 นำสารละลายน้ำตาลที่สกัดแยกได้มาเจือจางในระดับความเจือจางที่เหมาะสม ซึ่งผ่านการทดสอบหาระดับความเจือจางที่เหมาะสมเรียบร้อยแล้ว กรองผ่านตัวกรองชนิด cellulose acetate ขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นนำตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง HPLC ที่มีสถานะในการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ ใช้คอลัมน์สำหรับแยกน้ำตาล ยี่ห้อ BIO-RAD ชื่อรุ่น Aminex HPX-87P Detector ชนิด reflective index (RID) ใช้น้ำกลั่น 18 เมกะโอมเป็นเฟสเคลื่อนที่ และกำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และใช้ตัวอย่างในการฉีด ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตามวิธีการในภาคผนวก ข จากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลซูโครสจากการนำไปคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสที่สร้างจากสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ทราบค่า (ภาพผนวกที่ ข1)

3. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) neutral invertase (NI) และ cell wall invertase (CWI)

3.1. สกัดแยกเอนไซม์อินเวอร์เทส โดยดัดแปลงตามวิธีของ Lontom *et al.* (2008) ดังต่อไปนี้ นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ประมาณ 2-3 กรัม บดให้เป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวในโถรงที่แช่เย็น จากนั้นเติมสารละลาย extraction buffer I ที่ประกอบด้วย 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 0.05% (w/v) Triton-X, 5 mM Na-EDTA, 10 mM MgCl₂ และ 5 mM DTT ปริมาตร 8 มิลลิลิตร กวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในโถรง จากนั้นย้ายสารละลายใสในหลอดเซนต์ริฟิวจ์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสวัดปริมาตรส่วนใสที่ได้ และนำส่วนตะกอนที่ได้ไปสกัดแยกเอนไซม์อินเวอร์เทส ชนิด insoluble ในขั้นตอนต่อไป

นำส่วนใสมาคะกอนด้วยสารละลายอะซิโตนที่แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรสารละลายส่วนใสที่ได้ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลาย extraction buffer II ที่ประกอบด้วย 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 0.5 mM Na-EDTA, 5 mM MgCl₂ และ 2.5 mM DTT ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จะได้สารละลายเอนไซม์ชนิด soluble สำหรับใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) และ neutral invertase (NI) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในส่วน soluble โดยวิธีลาวรี่ (Lowry *et al.*, 1951) ตามวิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ข

เติมสารละลาย extraction buffer III ที่ประกอบด้วย 100 mM HEPES-NaOH, 0.05% (w/v) Triton-X, 5 mM Na-EDTA, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT และ 1 M NaCl ปริมาตร 2 มิลลิตร ลงในส่วนตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงข้างต้นจากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมกั้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนออกและเก็บสารละลายส่วนใส วัดปริมาตรส่วนใสที่ได้ ซึ่งจะได้สารละลายเอนไซม์ชนิด insoluble สำหรับใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในส่วน insoluble โดยวิธีลาวรี่ (Lowry *et al.*, 1951) ตามวิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ข

3.2 ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ SAI NI และ CWI โดยดัดแปลงจากวิธีของ Lontom *et al.* (2008) ดังต่อไปนี้ กำหนดปริมาตรสารผสมในปฏิกิริยาทั้งหมดเท่ากับ 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 50 mM สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ (Na-citrate) pH 3.5 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI) 50 mM สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ (Na-citrate) pH 5.0 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) และ 50 mM สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (K-pi) pH 7.5 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร, 125 mM สารละลายซูโครส (sucrose) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรสำหรับใช้เป็นสารตั้งต้น (substrate) ของปฏิกิริยา และสารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

นำสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 50 mM สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ (Na-citrate) pH 3.5 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI) 50 mM สารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ (Na-citrate) pH 5.0 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) และ 50 mM สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (K-pi) pH 7.5

สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร 125 mM สารละลายซูโครส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเตรียมให้อุณหภูมิของสารผสมปฏิกิริยาพร้อมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์อินเวอร์เทสเมื่อครบกำหนดเวลาเติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทสตัวอย่าง ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงทำปฏิกิริยา จากนั้นบ่มต่อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เริ่มหยุดปฏิกิริยาที่นาที่ที่ 0 สำหรับ sample blank และหยุดปฏิกิริยาที่นาที่ที่ 20 สำหรับตัวอย่างปกติ โดยหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์อินเวอร์เทสด้วยการเติม alkaline copper reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีโซโมจาย-เนลสัน (Somogyi-Nelson method)

จากปฏิกิริยาในข้อ 3.2 หลังจากหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์อินเวอร์เทสแล้วจากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อินเวอร์เทสที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น (substrate) โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Nelson (1944) ตามวิธีการวิเคราะห์ในภาคผนวก ข

หนึ่งหน่วยของกิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทส คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์น้ำตาลซูโครสทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์ 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนดดังนี้ สารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 50 mM สารละลายโซเดียมซิเตรดบัฟเฟอร์ (Na-citrate) pH 3.5 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI) 50 mM สารละลายโซเดียมซิเตรดบัฟเฟอร์ (Na-citrate) pH 5.0 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) และ 50 mM สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (K-pi) pH 7.5 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร 125 mM สารละลายซูโครส (sucrose) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีโซโมจาย-เนลสัน โดยใช้สารละลายฟรุคโทสและกลูโคสมาตรฐานในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักเป็นสารมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ ข2)

4. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) neutral invertase (NI) และ cell wall invertase (CWI) กับปริมาณน้ำตาลซูโครส

4.1 นำข้อมูลที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสแต่ละรูปแบบ (isoform) และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในช่วงเวลาต่างๆ ของการเจริญเติบโตของอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ โดยใช้แผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และใช้โปรแกรม R version 2.10.1. ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

4.2 วิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์ SAI NI และ CWI ตามวิธีการของ Pearson (Pearson's product moment correlation) ด้วยโปรแกรม R version 2.10.1.

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสในลำต้นอ้อยที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสในอ้อยปลูกลายพันธุ์ 20-2248 และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 พบว่า อ้อยทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อ้อยปลูกลายพันธุ์ 20-2248 มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ย 123.87 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งมีปริมาณมากกว่าในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ย 62.01 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด (ภาพที่ 5)

ส่วนของลำต้นอ้อย (section of internode) ได้แก่ ส่วนยอด ส่วนกลาง และส่วนล่างของอ้อยทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือในอ้อยปลูกลายพันธุ์ 20-2248 พบว่า ลำต้นส่วนล่างมีปริมาณการสะสมของน้ำตาลซูโครสเฉลี่ยมากที่สุด โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ยเท่ากับ 145.42 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กับส่วนกลางของลำต้นที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ยคือ 140.69 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด และพบว่าส่วนยอดของลำต้นเป็นส่วนที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ยต่ำที่สุดเท่ากับ 85.50 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ซึ่งแตกต่างจากส่วนกลางและส่วนล่างของลำต้นอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 6A) ในขณะที่อ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 พบว่าส่วนของลำต้นที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ยมากที่สุดคือ ลำต้นส่วนกลาง โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ยเท่ากับ 74.75 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ ลำต้นส่วนล่างมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยเท่ากับ 59.43 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด และพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับลำต้นส่วนยอดซึ่งเป็นส่วนที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมต่ำที่สุด โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยเท่ากับ 51.86 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด และไม่มีความแตกต่างกับลำต้นส่วนกลาง (ภาพที่ 6B)

ที่อายุของอ้อย 6 8 10 และ 12 เดือน มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ อ้อยปลูกลายพันธุ์ 20-2248 มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมสูงที่สุดที่อายุ 12 เดือน มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ยเท่ากับ 153.16 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ อายุ 8 10 และ 6 เดือน โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยเท่ากับ 143.18

122.31 และ 76.81 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ โดยพบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยของอ้อยที่อายุ 12 และ 8 เดือน ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 7A) ในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 พบว่า อ้อยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมสูงสุดที่อายุ 8 เดือน มีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยเท่ากับ 83.44 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ อายุ 6 10 และ 12 เดือน โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ยเท่ากับ 74.34 45.28 และ 44.99 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ โดยพบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยของอ้อยป่าที่อายุ 8 และ 6 เดือน ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 7B)

ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยในแต่ละส่วนของลำต้น ที่อายุต่างๆของอ้อย พบว่า บริเวณส่วนยอดของลำต้นอ้อย (top) มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ยในแต่ละอายุแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ บริเวณส่วนยอดจะมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมมากที่สุดเมื่ออ้อยมีอายุ 12 เดือน มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเท่ากับ 127.58 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ อายุ 10 8 และ 6 เดือน จะมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมต่ำที่สุด โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเท่ากับ 96.40 84.18 และ 33.84 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ บริเวณส่วนกลางของลำต้น (middle) ของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเฉลี่ยในแต่ละอายุของอ้อยที่ศึกษาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่า มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมมากที่สุดเมื่ออ้อยมีอายุ 12 เดือน 169.76 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ไม่แตกต่างกันกับอ้อยอายุ 8 และ 10 เดือน ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสม 167.20 และ 150.42 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมต่ำสุดที่อายุ 6 เดือน คือ 75.36 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด เนื่องจากบริเวณส่วนกลางของลำต้นเป็นลำต้นส่วนที่มีการเริ่มเข้าสู่ระยะสุกแก่ ทำให้โดยภาพรวมแล้วจะบ่งบอกให้เห็นถึงความแก่ของลำที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในแต่ละอายุตั้งแต่ 8 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่อ้อยเริ่มสะสมน้ำตาลถึง 12 เดือน ไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณน้ำตาลซูโครสของอ้อยอายุ 6 เดือน ซึ่งยังมีการเจริญเติบโตทางลำต้น ส่วนล่างของลำต้น (bottom) ของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 พบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมสูงสุด ที่อายุ 8 เดือน รองลงมาคือ 12 6 และ 10 เดือน โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเท่ากับ 178.18 162.15 121.23 และ 120.11 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ แต่พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสดังกล่าว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากส่วนล่างของลำต้นเป็นส่วนที่แก่ที่สุดของลำต้นอ้อยในแต่ละอายุ ดังนั้นบริเวณดังกล่าวจึงมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมแต่ละอายุที่ค่อนข้างจะใกล้เคียงกัน ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 8A และตารางผนวกที่ ก1)

ในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยในแต่ละส่วนของลำต้นที่อายุต่างๆ พบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งบริเวณส่วนยอด ส่วนกลางและส่วนล่างของลำต้น มีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมสูงสุดบริเวณส่วนกลางของลำต้นที่อายุ 8 เดือน 78.71 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ อายุ 6 12 และ 10 เดือน มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเท่ากับ 73.03 37.66 และ 18.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ บริเวณส่วนกลางของลำต้น ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมสูงสุดที่อายุ 8 เดือน 91.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ อายุ 6 10 และ 12 เดือน มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเท่ากับ 81.35 65.09 และ 61.51 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ บริเวณส่วนล่างของลำต้นปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมสูงสุดที่อายุ 8 เดือน 80.55 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ อายุ 6 10 และ 12 เดือน มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเท่ากับ 68.65 52.71 และ 35.79 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ (ภาพที่ 8B และตารางผนวกที่ ก2)

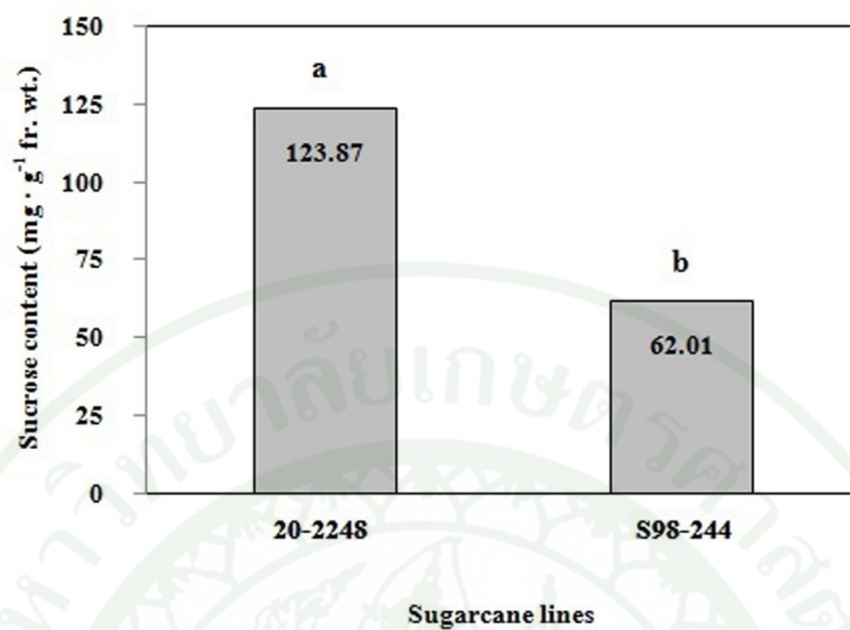
ปริมาณการสะสมน้ำตาลซูโครสในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของอายุ ทั้งในส่วนยอด ส่วนกลาง และส่วนล่างของลำต้น โดยปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเพิ่มขึ้นชัดเจนในส่วนยอดของลำต้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Batta *et al.* (2011) ศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสในลำต้นอ้อยที่ปลูกปกติและปลูกไว้ตอพบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ได้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากระยะย้ายปล่องและเพิ่มสูงสุดที่ระยะสุกแก่ของทั้งอ้อยปลูกปกติและอ้อยปลูกไว้ตอ และจากการศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสในอ้อยของ Verma *et al.* (2011) พบว่าในอ้อยพันธุ์ที่มีการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง (high-sucrose accumulation cultivars) มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมเพิ่มขึ้นจาก 240 วันหลังปลูก ซึ่งเป็นช่วงปลายของระยะย้ายปล่องที่จะเข้าสู่ระยะสุกแก่ และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 390 วันหลังปลูก ซึ่งเป็นระยะที่อ้อยมีการสุกแก่เต็มที่ทั้งในส่วนของลำต้นที่เป็น immature และ mature มีปริมาณน้ำตาลซูโครสของอ้อยในแต่ละส่วนที่ระยะสุกแก่เต็มที่ใกล้เคียงกัน จากการทดลองพบว่าในทุกอายุของการเจริญเติบโตของอ้อยปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นมีการสะสมเพิ่มขึ้นจากส่วนยอด ส่วนกลาง และส่วนล่าง ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดลองของ Batta and Singh (1986) ซึ่งพบว่าน้ำตาลซูโครสที่สะสมในแต่ละส่วนของอ้อย มีปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบว่ามีการสะสมน้ำตาลซูโครสสูงสุดที่ส่วนล่างของลำต้น รองลงมาคือ ส่วนกลาง และส่วนยอด ตามลำดับ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลซูโครสจะเริ่มขึ้นหลังจากสิ้นสุดระยะย้ายปล่องหลังจากอายุ 6 เดือน และมีการสะสมน้ำตาลซูโครสมากในบริเวณส่วนล่างลำต้น

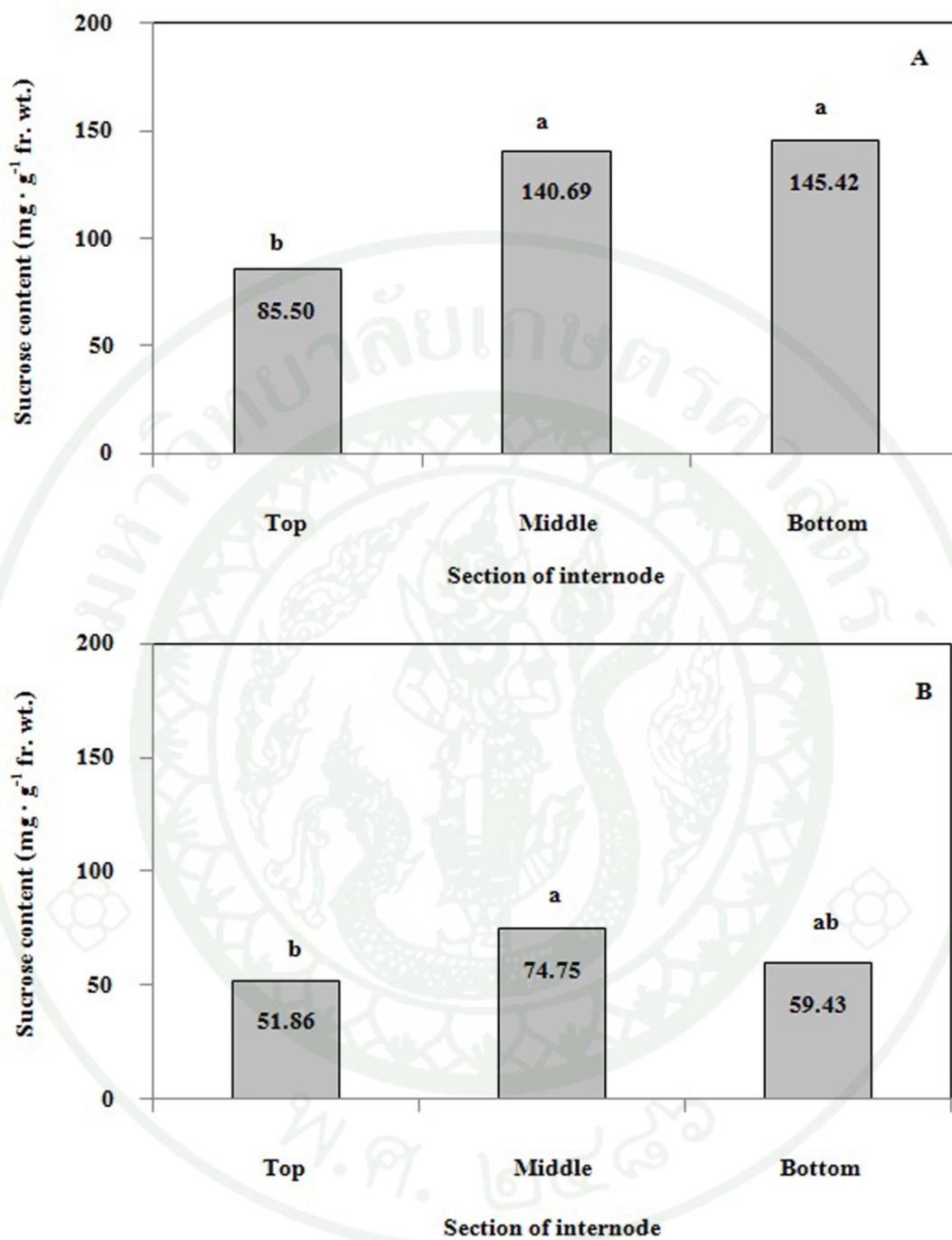
ซึ่งมีเนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะสุกแก่ (mature internode) เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่น ทั้งนี้เนื่องมาจาก ระยะอย่างปล้อง และส่วนยอดของลำต้นยังเป็นระยะที่เนื้อเยื่อยังอยู่ในสภาพที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature) ยังมีความต้องการน้ำตาล hexose เพื่อให้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการแบ่งตัวและ ยืดขยายตัวของเซลล์ระหว่างที่ปล้องมีการพัฒนา (Batta and Singh,1986; Gutierrez *et al.*,2002) จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สร้างขึ้นในระยะนี้ถูกใช้ไปเพื่อกระบวนการดังกล่าว

สำหรับในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 ซึ่งเป็นอ้อยที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาล ซูโครสต่ำ พบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากอายุ 6 เดือน ซึ่งเป็นช่วงปลายของ ระยะอย่างปล้อง และเพิ่มสูงสุดที่อายุ 8 เดือน (เข้าสู่ระยะสุกแก่) หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลซูโครส ในอ้อยป่ามีแนวโน้มลดลงในเดือนที่ 10 และเดือนที่ 12 หลังปลูก ทั้งส่วนยอด ส่วนกลางและ ส่วนล่างของลำต้นเช่นเดียวกับ Verma *et al.* (2011) ศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในอ้อย พันธุ์ที่สะสมน้ำตาลซูโครสต่ำ (low-sucrose accumulation cultivars) พบว่า อ้อยพันธุ์ดังกล่าวมีการ สะสมน้ำตาลซูโครสสูงสุดที่อายุ 240 วันหลังปลูก (ประมาณ 8 เดือน) และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ เมื่ออ้อยมีอายุ 390 วันหลังปลูก

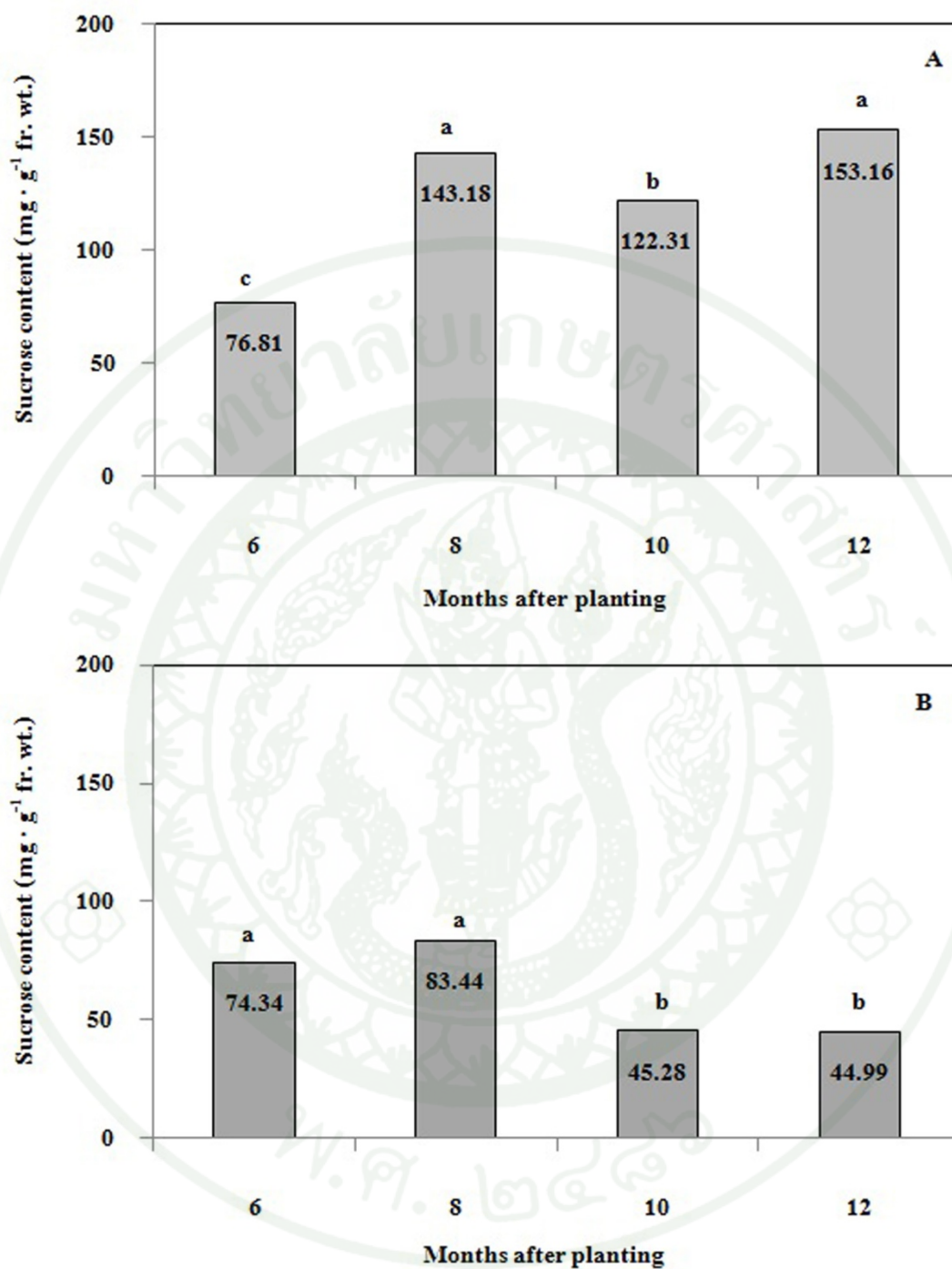
จากการลดลงของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่อายุ 10 และ 12 เดือนของอ้อยสายพันธุ์ S98-244 ในการทดลองนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะประจำพันธุ์ของอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 คือ มีลักษณะ เป็นอ้อยที่มีการออกดอกเร็ว ซึ่งในการทดลองนี้ พบว่าอ้อยสายพันธุ์ดังกล่าวมีการออกดอกในช่วง 9-10 เดือนหลังปลูก จึงอาจเป็นไปได้ว่า ช่วงอายุหลังจาก 8 เดือน ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่อ้อย สะสมและสร้างขึ้นมาใหม่ถูกนำไปใช้ สำหรับกระบวนการสร้างช่อดอก และการออกดอกของอ้อย จึงมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในช่วงเวลาดังกล่าวมีแนวโน้มลดลง



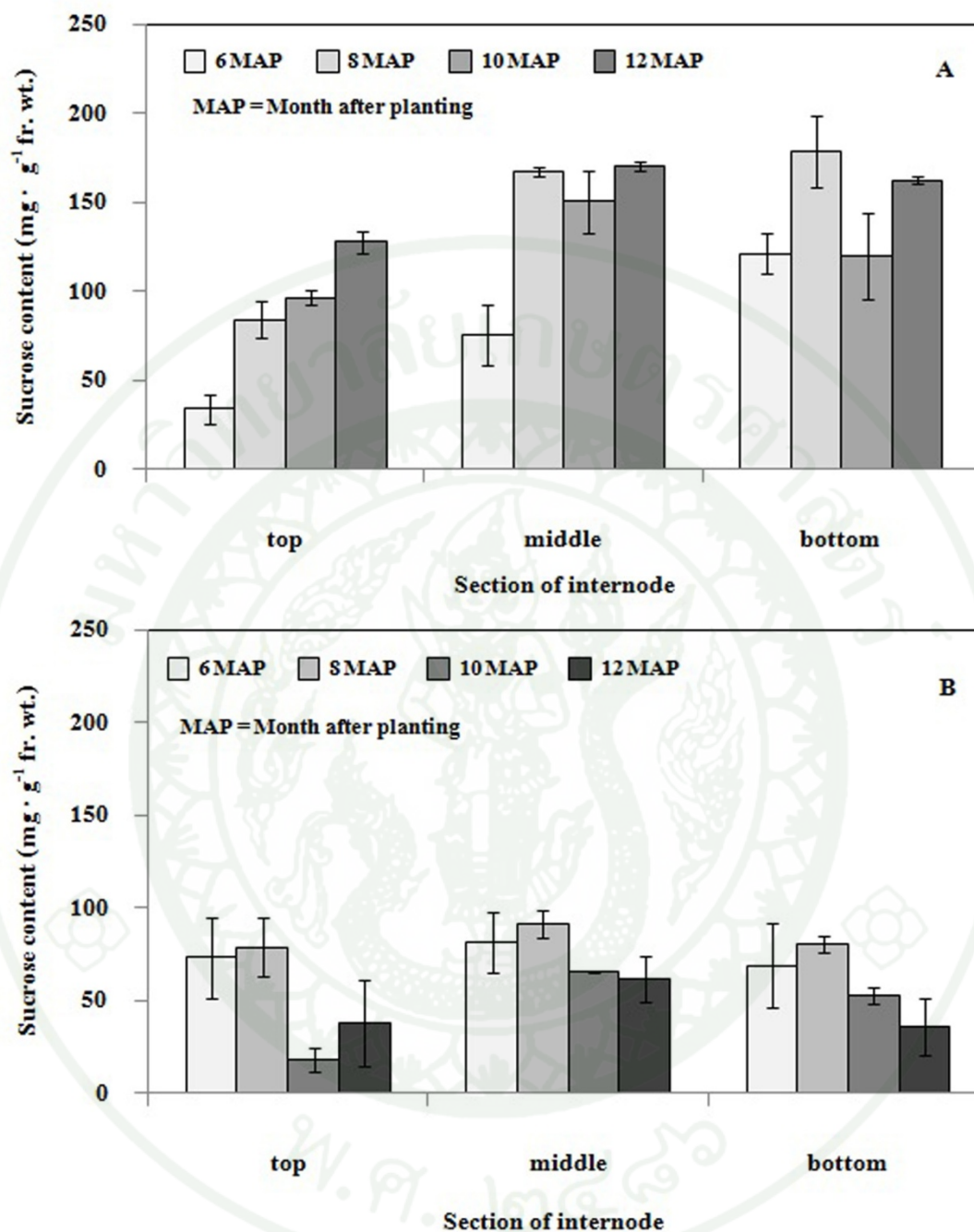
ภาพที่ 5 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ย (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 และ อ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244



ภาพที่ 6 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อย (มีผลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักสด) ของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)



ภาพที่ 7 ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมเฉลี่ยในแต่ละอายุ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)



ภาพที่ 8 ปริมาณน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B) ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือนหลังปลูก

2. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) neutral invertase (NI) และ cell wall invertase (CWI)

2.1 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI)

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ SAI ในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 พบว่า อ้อยทั้งสองสายพันธุ์มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ SAI ในลำต้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ SAI 46.48 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2244 ที่มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ SAI 18.12 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 9)

ส่วนของลำต้นอ้อย (section of internode) ได้แก่ ส่วนยอด ส่วนกลาง และส่วนล่างของลำต้นอ้อย พบว่ามีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ SAI แตกต่างกัน ทั้งในอ้อยปลุกและในอ้อยป่า ในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 พบว่า ลำต้นส่วนกลางของลำต้นอ้อย มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ SAI สูงที่สุด 22.56 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ไม่แตกต่างกันกับส่วนยอดมีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ SAI เท่ากับ 21.12 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และส่วนล่างพบว่า มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ SAI เฉลี่ยต่ำที่สุด โดยมีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์เท่ากับ 10.68 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 10A) ในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 พบว่า มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ SAI สูงสุดที่ลำต้นส่วนยอด 88.51 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ ส่วนกลางของลำต้น 42.21 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และส่วนล่างของลำต้นพบว่า มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ SAI ต่ำที่สุด 8.72 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เช่นเดียวกับอ้อยปลุก (ภาพที่ 10B)

กิจกรรมของเอนไซม์ SAI ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI ในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 ไม่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในอ้อยป่า S98-244 โดยในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ 23.79 19.61 15.85 และ 14.07 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า กิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มที่ลดลงเมื่ออายุของอ้อยเพิ่มขึ้นจาก 6 เดือน ไป 12 เดือน ตามลำดับ (ภาพที่ 11A) ในอ้อยป่า S98-244 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ 8.39 48.46 53.20 และ 75.88 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม

โปรตีน โดยพบว่าที่อายุ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างจากอายุ 10 และ 8 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI ในอ้อยปามีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามอายุของอ้อยที่เพิ่มขึ้น จาก 6 เดือนถึง 12 เดือน (ภาพที่ 11B)

ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ในแต่ละส่วนของลำต้นที่อายุต่างๆ พบว่า บริเวณส่วนยอดของลำต้นอ้อย (top) ที่อ้อยอายุต่างๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่อายุ 8 เดือนจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงที่สุด 26.21 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ อายุ 6 10 และ 12 เดือน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI เท่ากับ 23.65 21.99 และ 12.62 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ บริเวณกลางของลำต้น ที่อายุของอ้อยแตกต่างกัน พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่า ที่ อายุ 6 เดือนของอ้อยมีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงที่สุด ที่ 41.69 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ ที่อายุ 8 และ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI เท่ากับ 26.18 และ 18.19 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และที่อายุ 10 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ต่ำที่สุด 4.19 นาโนโมลต่อ นาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน บริเวณส่วนล่างของลำต้น พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SAI ที่อายุต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI เท่ากับ 21.36 8.86 6.44 และ 6.05 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่อายุ 10 12 8 และ 6 เดือน ตามลำดับ (ภาพที่ 12A และ ตารางผนวกที่ ก3)

ในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ที่อายุต่างๆ ในแต่ละส่วนของลำต้น พบว่า บริเวณส่วนยอดของลำต้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงที่สุดที่อายุ 12 เดือนของอ้อย 140.46 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ อายุ 10 8 เดือน และต่ำที่สุดที่อ้อยอายุ 6 เดือน โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 136.73 65.53 และ 11.33 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับบริเวณส่วนกลางของลำต้น ที่อายุของอ้อยแตกต่างกัน พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบว่า ที่อายุ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงที่สุด 74.37 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ไม่แตกต่างกับ อ้อยอายุ 8 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI 66.35 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมา คืออายุ 10 และ 6 เดือน มีกิจกรรมเอนไซม์ SAI เท่ากับ 19.24 และ 8.89 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนล่างของลำต้น พบว่า ที่อายุต่างๆ ของอ้อย มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่า มีกิจกรรมของ

เอนไซม์ SAI เท่ากับ 13.49 12.82 4.96 และ 3.64 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม โปรตีน ที่ส่วนล่างของอ้อยอายุ 8 12 6 และ 10 เดือน ตามลำดับ (ภาพที่ 12B และตารางผนวกที่ ก4)

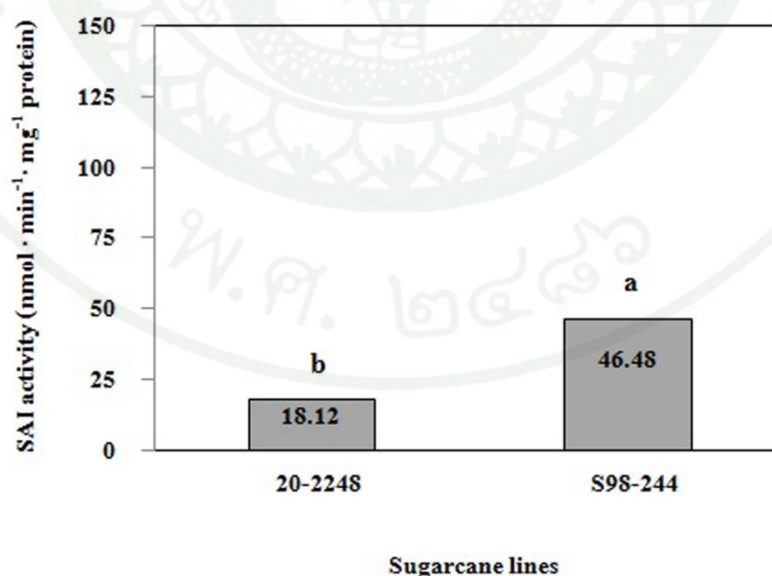
จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 ซึ่งเป็นอ้อยที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีแนวโน้มลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น ทั้งในส่วนยอด ส่วนกลางและส่วนล่างของลำต้น และพบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงในลำต้นส่วนยอด และลดลงในส่วนกลาง และส่วนล่างตามลำดับ กล่าวคือ กิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีแนวโน้มลดลง เมื่ออ้อยสิ้นสุดระยะอย่างปล้องและเมื่ออ้อยเข้าสู่ระยะสุกแก่ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Batta and Singh (1986) ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI จะสูงในลำต้นที่อยู่ในระยะอย่างปล้องและสูงสุดในส่วนยอด และลดลงในส่วนกลางและส่วนล่างของลำต้นตามลำดับ Batta *et al.* (2011) ได้ศึกษาการศึกษาของเอนไซม์ SAI ในระยะการเจริญต่างๆ ของลำต้นอ้อย ได้แก่ ระยะอย่างปล้อง ระยะแก่ และระยะสุกแก่เต็มที่ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SAI จะสูงที่สุดในระยะอย่างปล้องและลดลงเมื่ออ้อยเข้าสู่ระยะแก่ และสุกแก่เต็มที่ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับระดับปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ในการทดลองนี้ซึ่งมีปริมาณลดลงเช่นกัน และการศึกษาของ Verma *et al.* (2011) พบว่า การเพิ่มขึ้นของอายุอ้อยมีผลต่อการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ SAI และจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ที่ส่วนยอดของลำต้นสูงกว่าส่วนล่างของลำต้น

จากผลการทดลอง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SAI ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 มีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสม กล่าวคือ ในช่วงที่อ้อยอยู่ในระยะอย่างปล้องพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI เกิดขึ้นสูง ในขณะที่เดียวกันพบว่าในระยะดังกล่าวมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมต่ำ และกิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ เมื่ออ้อยเข้าสู่ระยะสุกแก่ สวนทางกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมซึ่งจะเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่ออ้อยเข้าสู่ระยะสุกแก่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Verma *et al.* (2011) ซึ่งพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ SAI และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้าม

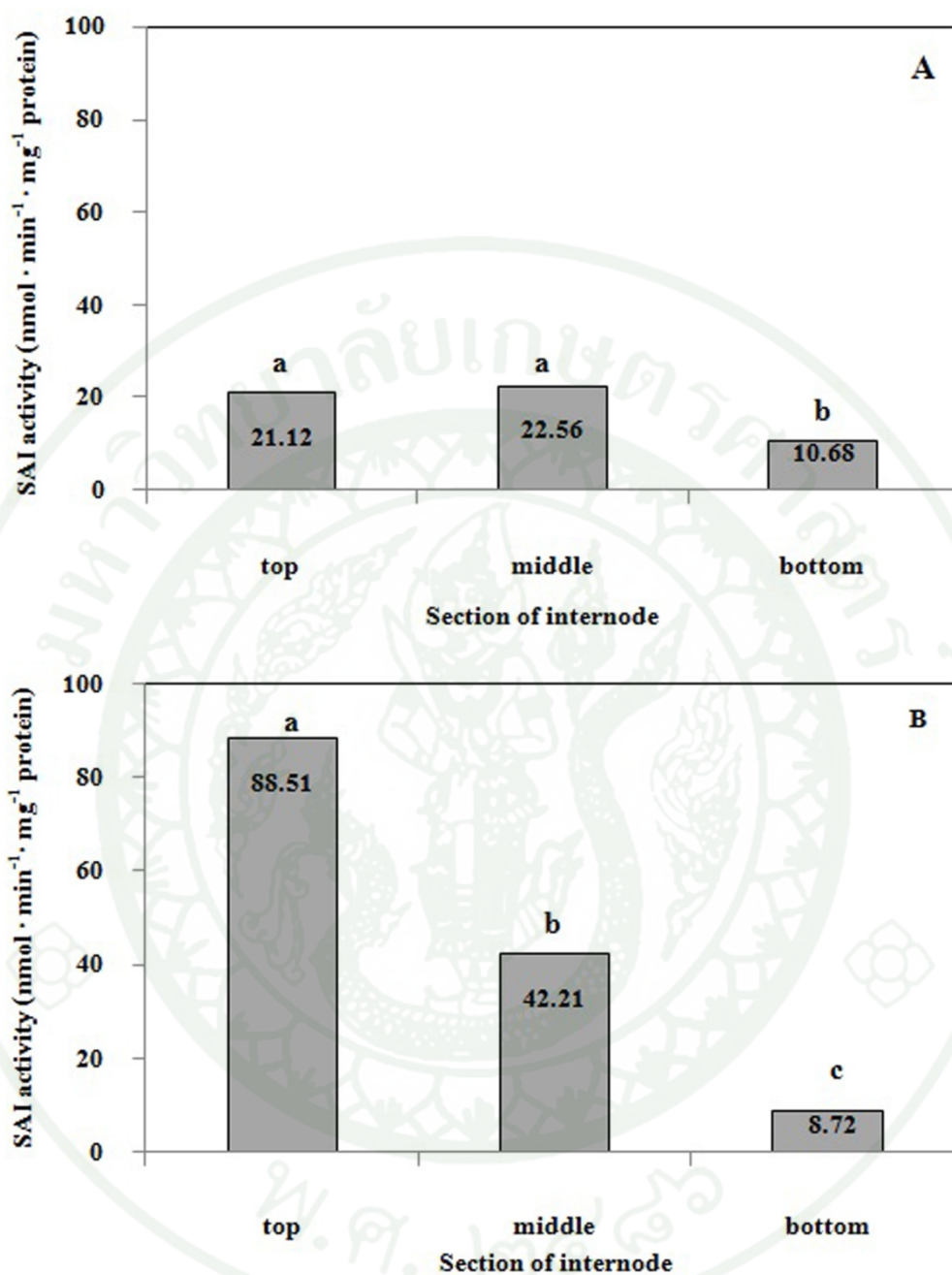
จากความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำตาลซูโครสและกิจกรรมของเอนไซม์ SAI การมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมต่ำในช่วงที่อ้อยอยู่ในระยะอย่างปล้องนั้น อาจเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ SAI เนื่องจาก SAI เป็นเอนไซม์ที่ถูกระบุไว้ว่าพบในแวคิวโอล ซึ่งเป็นโครงสร้างหนึ่งในเซลล์ (organelle) ที่สำคัญสำหรับเป็นแหล่งเก็บสะสมน้ำตาลซูโครสของอ้อย (sink organ)

(Verma *et al.*, 2011) SAI จึงมีบทบาทสำคัญในควบคุมการเคลื่อนย้ายน้ำตาล (remobilization) ออกจากส่วนที่เก็บสะสม (sink organ) เพื่อใช้ hexose เป็นแหล่งพลังงานสำหรับกระบวนการที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของอ้อย (Sacher *et al.*, 1963; Verma *et al.*, 2011) และนอกจากนี้ ยังเชื่อว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI ยังเป็นตัวที่ควบคุมระดับของ hexose ในเนื้อเยื่ออีกด้วย (Venkataramana *et al.*, 1991; Verma *et al.*, 2011)

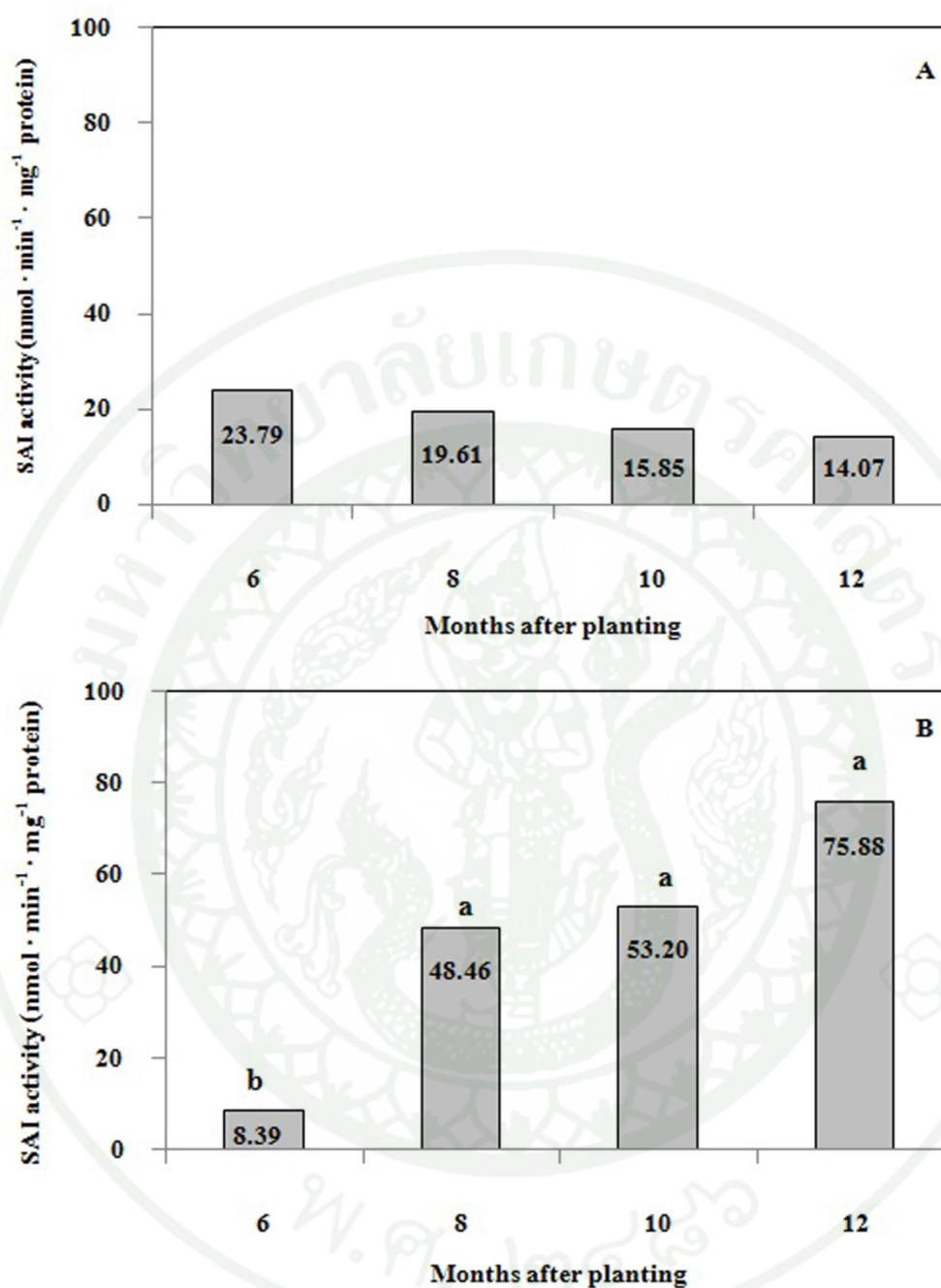
ในอ้อยป่า S98-244 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่ำในช่วง อายุ 6 และ 8 เดือน และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่ออ้อยมีอายุ 10 และ 12 เดือนตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ลดลงเมื่ออ้อยมีอายุ 10 และ 12 เดือน ทั้งนี้การลดลงของปริมาณน้ำตาลซูโครสในช่วงเวลาดังกล่าว อาจเป็นผลมาจากการทำงานของกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ในช่วงที่อ้อยมีความต้องการใช้ hexose เพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำหรับกระบวนการออกดอก และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีแนวโน้มลดลงเมื่อเนื้อเยื่อของลำต้นมีอายุมากขึ้นกล่าวคือ จะพบกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงในส่วนยอดของลำต้นซึ่งเป็นส่วนที่เนื้อเยื่อยังอยู่ในระยะ immature ของอ้อยทุกๆ อายุที่ศึกษา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Verma *et al.* (2011) พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงในลำต้นส่วนยอดของอ้อยพันธุ์ที่มีการสะสมน้ำตาลซูโครสต่ำ (low-sucrose accumulation) และลดลงในลำต้นที่มีอายุของเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นตามลำดับ



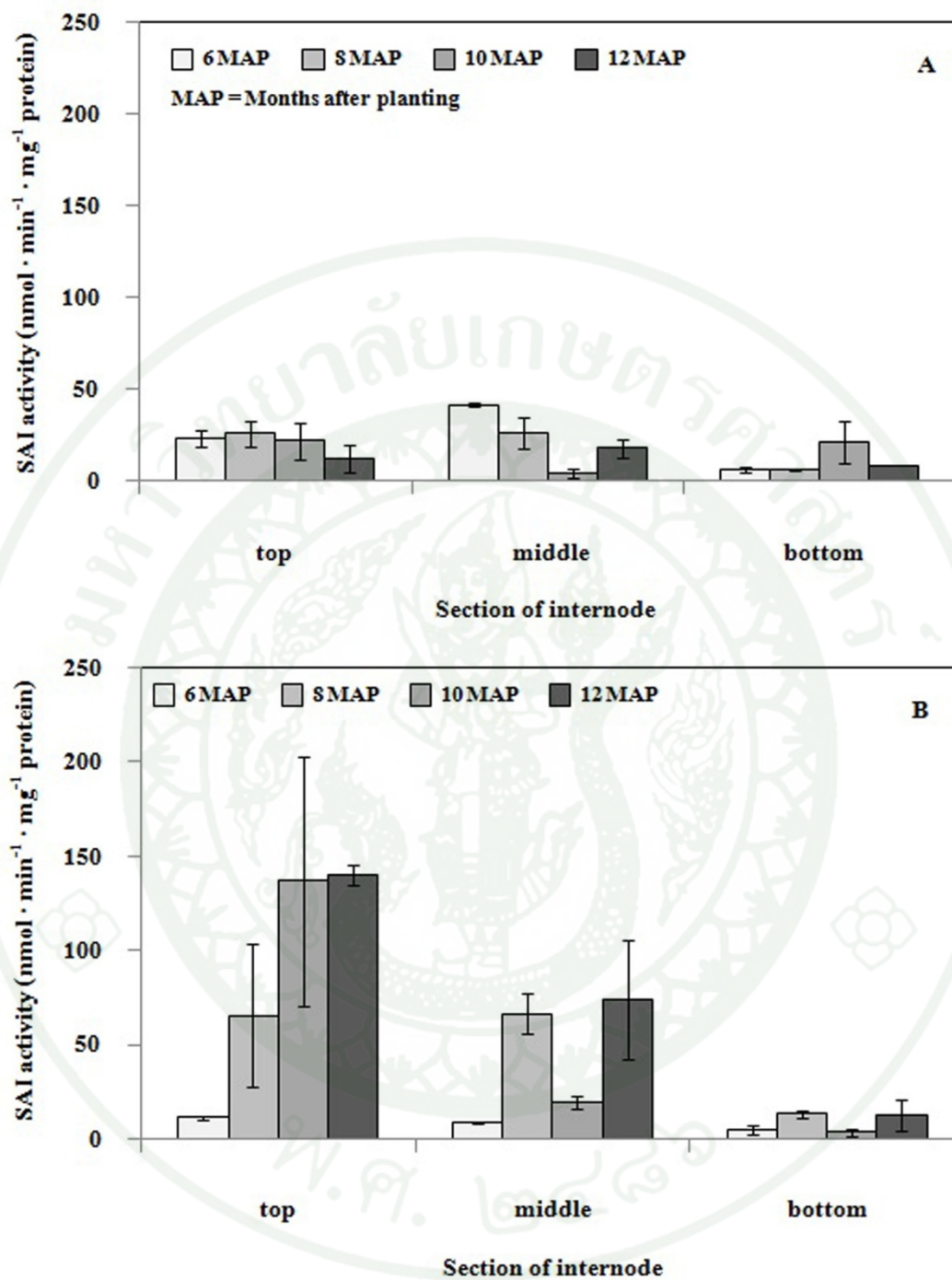
ภาพที่ 9 กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 และอ้อยป่าสายพันธุ์ 98-244



ภาพที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)



ภาพที่ 11 กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในแต่ละเดือนของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)



ภาพที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่า สายพันธุ์ S98-244 (B) ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือนหลังปลูก

2.2 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI)

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) ในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 พบว่า กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ NI ในลำต้นอ้อย ทั้งสองสายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกัน โดยในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 มีกิจกรรมของเอนไซม์ NI เฉลี่ยเท่ากับ 37.44 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ย 39.87 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 13)

กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ NI ในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อย (section of internode) ได้แก่ ส่วนยอด ส่วนกลาง และส่วนล่างของลำต้นอ้อย พบว่าแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยมีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ NI แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ อ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ NI สูงที่สุดที่ลำต้นส่วนยอด 59.31 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ ลำต้นส่วนกลางและส่วนล่างมีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 34.47 และ 18.55 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยในลำต้นส่วนกลางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กับลำต้นส่วนล่าง (ภาพที่ 14A) อ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์สูงสุดในลำต้นส่วนยอด 86.81 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนรองลงมาคือ ลำต้นส่วนกลางและลำต้นส่วนล่าง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 27.17 และ 5.64 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ (ภาพที่ 14B)

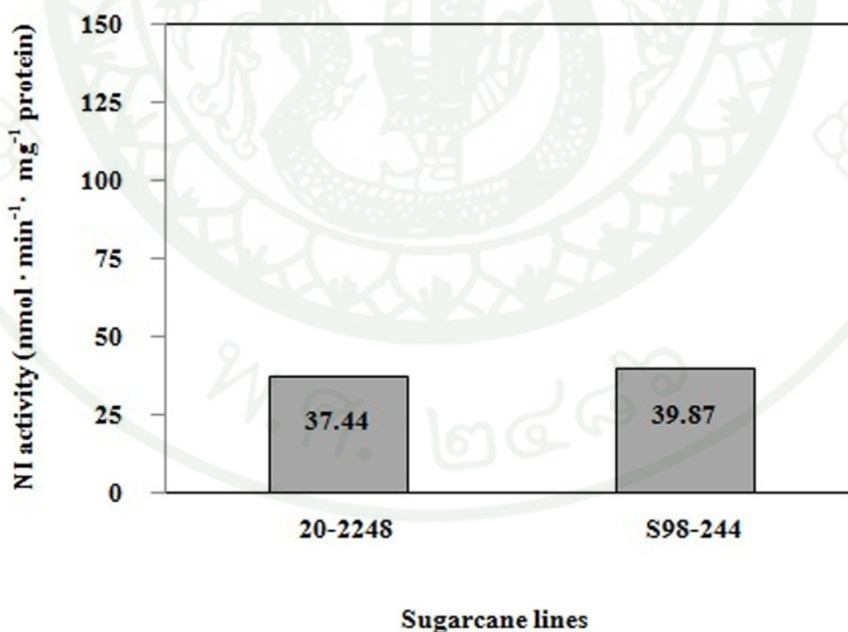
กิจกรรมของเอนไซม์ NI ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน พบว่า ที่อายุต่างๆ ของอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 กิจกรรมของเอนไซม์ NI มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในอ้อยป่า S98-244 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ NI สูงที่สุดที่ อายุ 6 เดือน 74.61 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นลดลงตามลำดับที่อายุ 8 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 32.25 21.97 และ 20.95 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยของอ้อยที่อายุ 8 10 และ 12 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 15A) ในอ้อยป่า S98-244 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ที่อายุ 10 เดือน 47.35 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ ที่อายุ 12 6 และ 8 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 42.34 36.08 และ 33.72 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ภาพที่ 15B)

ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ NI ในแต่ละส่วนของลำต้นที่อายุต่างๆ ของอ้อย พบว่า บริเวณส่วนยอดของลำต้นกิจกรรมของเอนไซม์ NI เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ NI เฉลี่ยสูงที่สุดที่อายุ 6 เดือน 127.47 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นลดลงตามลำดับที่อายุ 8 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 48.94 30.96 และ 29.91 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนกลางของลำต้น พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อายุ 6 เดือน 65.25 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นลดลงตามลำดับที่อายุ 8 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 26.76 24.60 และ 21.02 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนล่างของลำต้นอ้อยพบว่าการกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อย มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่อายุ 6 เดือน 30.86 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นลดลงตามลำดับที่อายุ 8 12 และ 10 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 21.06 11.92 และ 10.38 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุ 8 เดือนไม่แตกต่างกับอายุ 6 10 และ 12 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 16A และตารางผนวกที่ ก5)

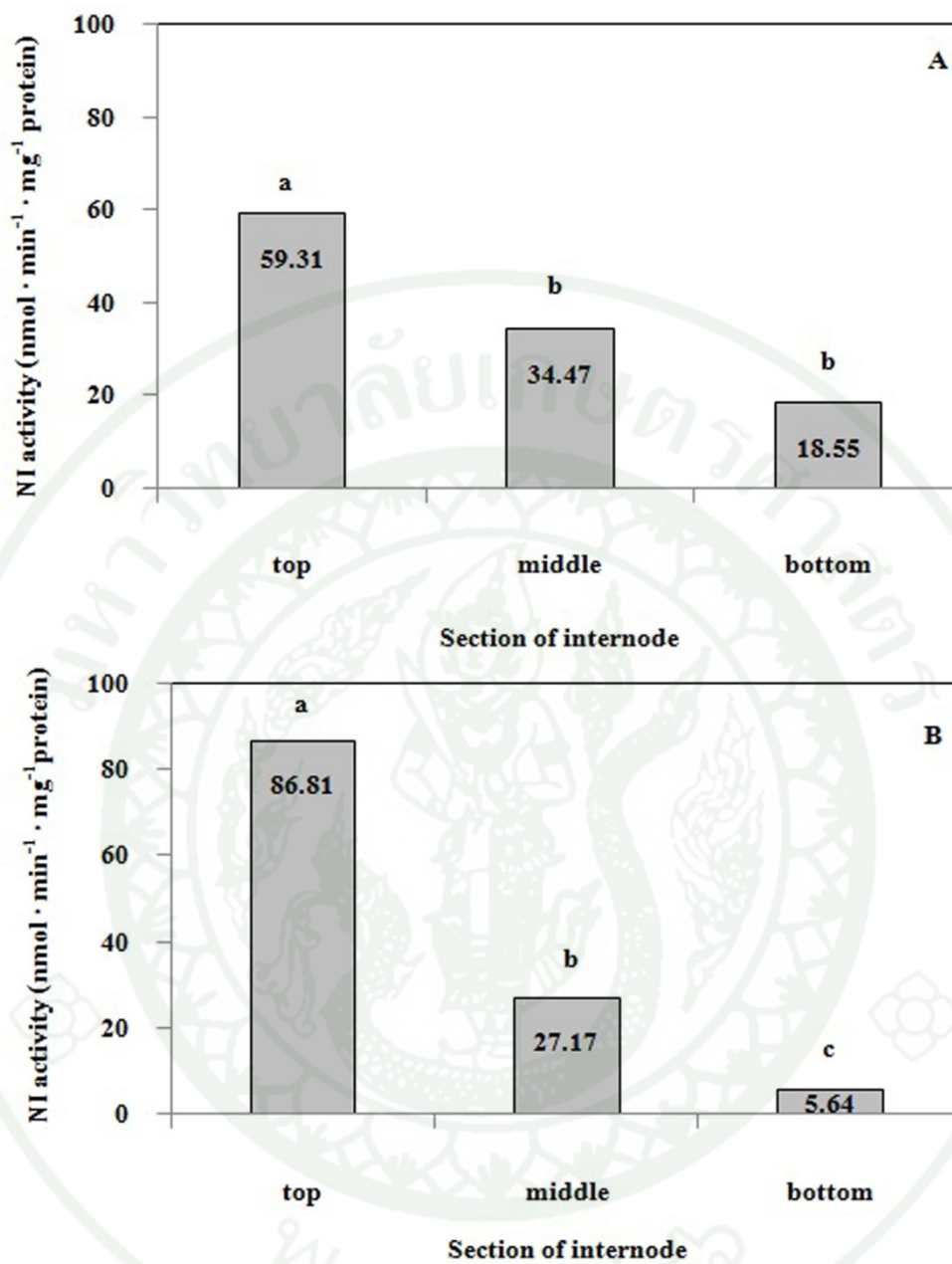
ในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ NI ในแต่ละส่วนของลำต้นที่อายุต่างๆ ของอ้อย พบว่า บริเวณส่วนยอดของลำต้นกิจกรรมของเอนไซม์ NI เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ NI เฉลี่ยสูงที่สุดที่อายุ 10 เดือน 120.70 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นลดลงตามลำดับที่อายุ 12 6 และ 8 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 100.84 78.45 และ 47.28 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนกลางของลำต้น กิจกรรมของเอนไซม์ NI เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อย มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยสูงที่สุดที่ อายุ 8 เดือน 53.34 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ อายุ 6 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 20.75 18.06 และ 16.53 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุ 6 10 และ 12 เดือน ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนล่างของลำต้นอ้อยกิจกรรมของเอนไซม์ NI เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ NI สูงที่สุดที่อายุ 12 เดือน 9.65 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมา คือที่อายุ 6 10 และ 8 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์ NI

เฉลี่ยเท่ากับ 9.06 3.30 และ 0.54 นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน ตามลำดับ (ภาพที่ 16B และตารางผนวกที่ ก6)

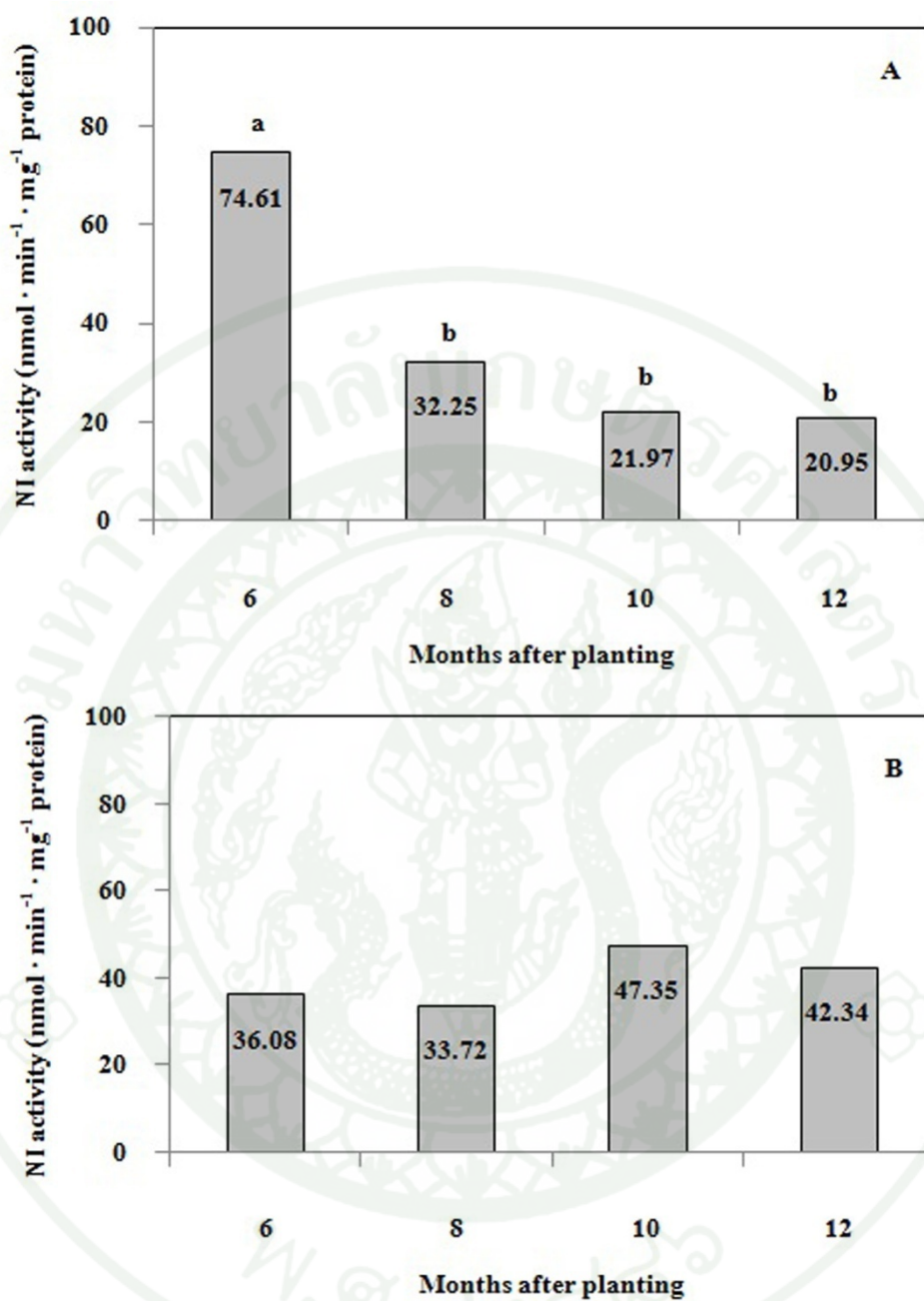
จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 ซึ่งเป็นอ้อยที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง พบว่า ทั้งในส่วนยอด ส่วนกลางและส่วนล่างของลำต้นกิจกรรมของเอนไซม์ NI มีแนวโน้มลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น ทำนองเดียวกับ Joshi *et al.* (2013) ที่ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ NI ในอ้อยอายุ 9 ถึง 13 เดือน โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ NI มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่ออ้อยมีอายุเพิ่มขึ้น ส่วนในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 พบว่า เมื่ออ้อยมีอายุเพิ่มขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ NI ก่อนข้างจะคงที่ และเมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ NI ในแต่ละส่วนของลำต้นพบว่าในลำต้นส่วนยอดซึ่งเป็นบริเวณที่เนื้อเยื่อยังมีการเจริญเติบโตจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ NI ในระดับที่สูง และจะลดลงในเนื้อเยื่อส่วนกลางและส่วนล่างซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีความสุกแก่มากขึ้น ทำนองเดียวกับการศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์ NI ในอ้อยของ Dendsay *et al.* (1995) และ Rossouw *et al.* (2010) ที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ NI ในระดับที่ต่ำในเนื้อเยื่อของลำต้นที่อยู่ในระยะสุกแก่



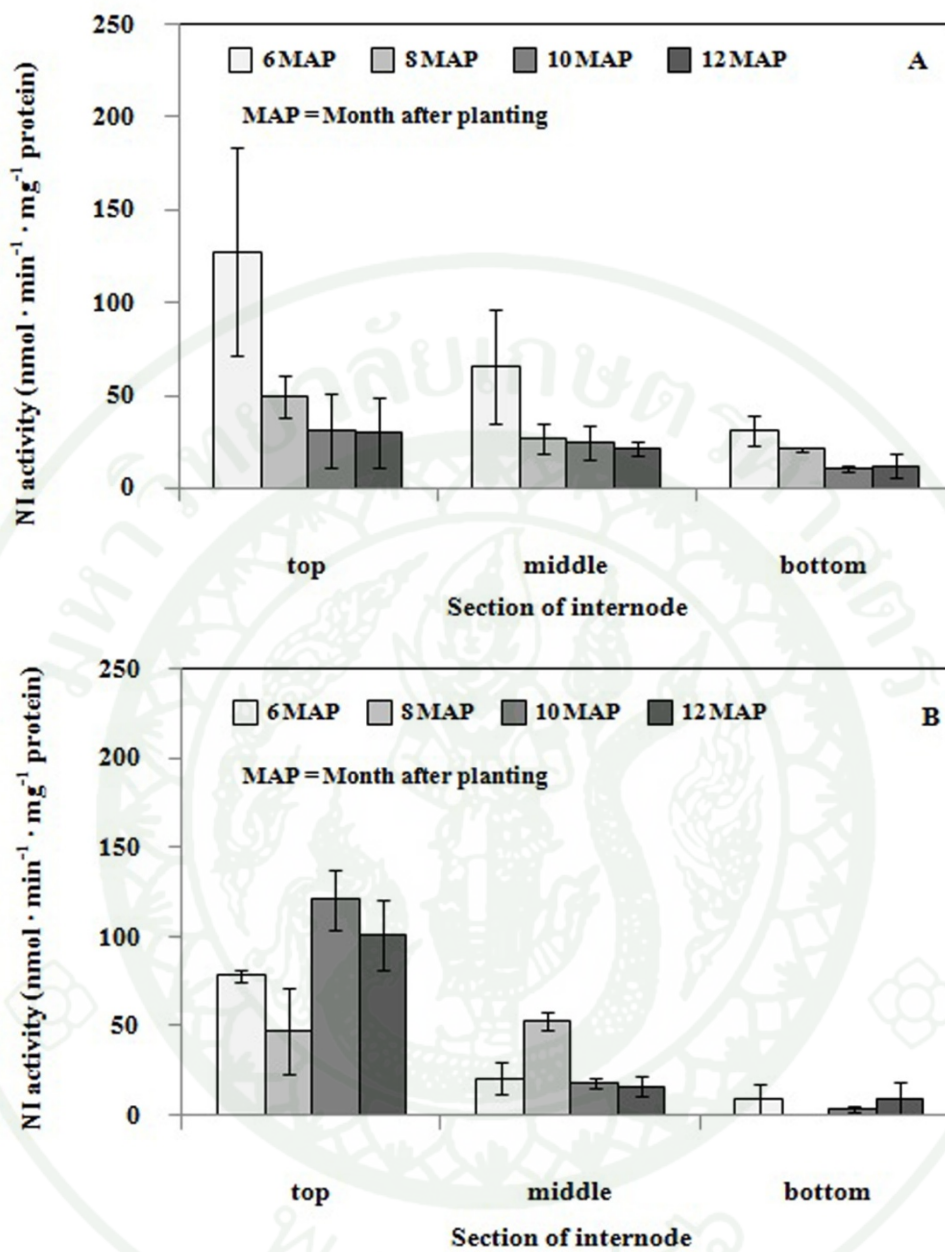
ภาพที่ 13 กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ neutral invertase (NI) (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 และ อ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244



ภาพที่ 14 กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ neutral invertase (NI) (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)



ภาพที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ในแต่ละเดือนของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)



ภาพที่ 16 กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B) ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือนหลังปลูก

2.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI)

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI) ในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 พบว่า กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ CWI ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ CWI สูงกว่าในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 กล่าวคือ ในอ้อยปลุก 20-2248 มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์เฉลี่ย 48.47 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีปริมาณสูงเป็นสองเท่าของในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ 24.33 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 17)

กิจกรรมของเอนไซม์ CWI ในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อย (section of internode) ได้แก่ ส่วนยอด ส่วนกลาง และส่วนล่างของลำต้นอ้อยพบว่าแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยมีกิจกรรมของเอนไซม์ CWI แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ อ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์สูงที่สุดที่ส่วนยอด 60.01 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ไม่แตกต่างจากส่วนกลาง ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ย 57.94 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยต่ำสุดที่ส่วนล่างของลำต้น 33.09 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 18A) ในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 มีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ CWI สูงที่สุดในลำต้นส่วนยอด 39.95 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ ลำต้นส่วนกลาง และลำต้นส่วนล่าง โดยมีกิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์เท่ากับ 27.64 และ 5.40 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ภาพที่ 18B)

กิจกรรมของเอนไซม์ CWI ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน พบว่า ที่อายุต่างๆ ของอ้อยมีกิจกรรมของเอนไซม์ CWI แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์ โดยในอ้อยปลุกสายพันธุ์ 20-2248 มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยสูงที่สุดที่ อายุ 6 เดือน 131.90 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นจึงลดลงตามลำดับที่อายุ 8 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 42.70 9.26 และ 8.21 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยของอ้อยที่อายุ 10 และ 12 เดือน ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 19A) ส่วนในอ้อยป่า S98-244 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ที่อายุ 12 เดือน 40.43 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นจึงลดลงที่อายุ 10 8 และ 6 เดือน ตามลำดับ มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 26.91 17.45 และ 12.53 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยพบว่า กิจกรรมของ

เอนไซม์เฉลี่ยที่อายุ 12 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันกับกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุ 10 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ และกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุ 10 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันกับกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุ 8 และที่อายุ 6 เดือน ซึ่งเป็นอายุที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยต่ำสุด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่อายุ 8 เดือน (ภาพที่ 19B)

ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ CWI ในแต่ละส่วนของลำต้นที่อายุต่างๆ ของอ้อย พบว่า บริเวณส่วนยอดของลำต้น กิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยสูงสุดที่อายุ 6 เดือน 175.20 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคืออายุ 8 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 44.13 10.25 และ 9.93 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยพบว่า ที่อายุ 8 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกลางของลำต้น (middle) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ อายุ 6 เดือน 138.02 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ อายุ 8 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 56.54 9.15 และ 5.49 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยพบว่าที่อายุ 10 และ 12 เดือน กิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนล่างของลำต้นอ้อย กิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยมีค่าต่ำ โดยที่อายุต่างๆ ของอ้อย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อายุ 6 เดือน 81.98 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมา คือที่อายุ 8 12 และ 10 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 32.79 9.23 และ 8.39 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยพบว่าที่อายุ 8 10 และ 12 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 20A และตารางผนวกที่ ก7)

ในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ CWI ในแต่ละส่วนของลำต้นที่อายุต่างๆ ของอ้อย พบว่า บริเวณส่วนยอดของลำต้นกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อย ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยสูงสุดที่อายุ 10 เดือน 68.71 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคืออายุ 12 6 และ 8 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 64.01 14.49 และ 12.59 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนกลางของลำต้นกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยสูงสุดที่ อายุ 12 เดือน 51.95 นาโนโมล

ต่อหน้าที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ อายุ 8 6 และ 10 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 34.03 15.34 และ 9.24 นาโนโมลต่อหน้าที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุ 6 และ 10 เดือน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนล่างของลำต้นอ้อย กิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยที่อายุต่างๆ ของอ้อยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่อายุ 6 เดือน 7.77 นาโนโมลต่อหน้าที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือที่อายุ 8 12 และ 10 เดือน มีกิจกรรมของเอนไซม์เฉลี่ยเท่ากับ 5.74 5.31 และ 2.79 นาโนโมลต่อหน้าที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ภาพที่ 20B และตารางผนวกที่ ก8)

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI) ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 ซึ่งเป็นอ้อยที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูงพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CWI มีแนวโน้มลดลงตามการเพิ่มขึ้นของอายุ ทั้งในส่วนยอด ส่วนกลางและส่วนล่างของลำต้น และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CWI สูงในลำต้นส่วนยอดซึ่งเป็นส่วนที่เนื้อเยื่อยังมีเจริญเติบโต และเซลล์ยังมีการยืดขยายตัว และลดลงในส่วนกลาง และส่วนล่างตามลำดับ กล่าวคือ กิจกรรมของเอนไซม์ CWI มีแนวโน้มลดลงเมื่ออ้อยสิ้นสุดระยะอย่างปล้องและอ้อยเข้าสู่ระยะสุกแก่

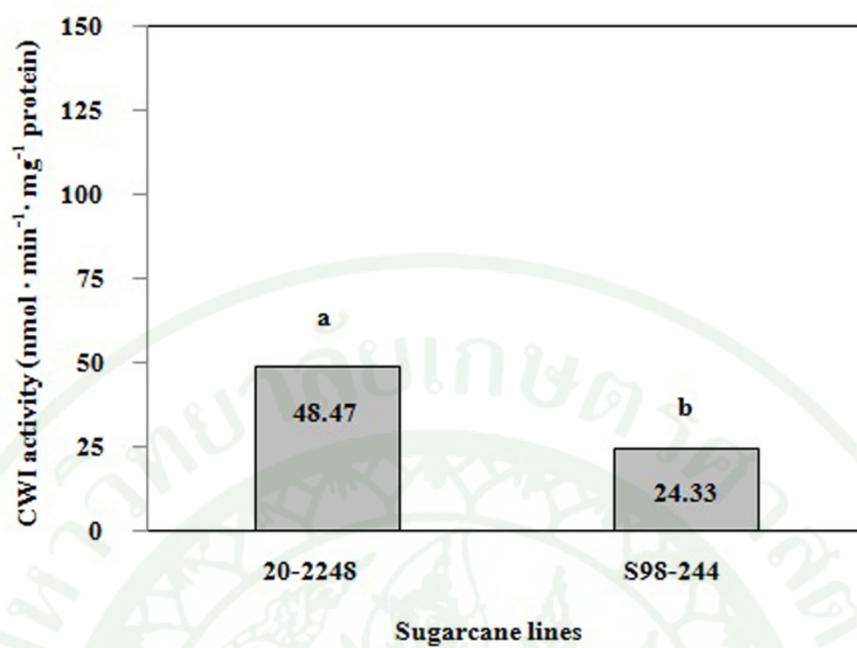
จากผลการทดลอง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CWI ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 มีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสม กล่าวคือ ในช่วงที่อ้อยอยู่ในระยะอย่างปล้องพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ CWI เกิดขึ้นสูง ในทุกส่วนของลำต้น ในขณะที่เดียวกันพบว่าในระยะดังกล่าวมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสะสมต่ำ และกิจกรรมของเอนไซม์ CWI มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ เมื่ออ้อยเข้าสู่ระยะสุกแก่ สวนทางกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสม ซึ่งจะเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่ออ้อยเข้าสู่ระยะสุกแก่ จากผลการทดลองดังกล่าว พบว่า ผลการทดลองที่ได้มีความขัดแย้งกับผลการทดลองที่เคยมีรายงานมา เช่นจากรายงานของ Batta and Singh (1986) ที่ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ CWI ในอ้อยซึ่งพบว่าในระหว่างที่อ้อยอยู่ในระยะอย่างปล้องจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ CWI ต่ำในทุกส่วนของลำต้นและกิจกรรมของเอนไซม์ CWI จะเพิ่มขึ้นเมื่ออ้อยเข้าสู่ระยะสุกแก่

อย่างไรก็ตาม จากบทบาทและหน้าที่ของเอนไซม์ cell wall invertase ซึ่งพบว่าเป็นเอนไซม์ที่พบในส่วนของ apoplast และเป็นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสที่อยู่บริเวณนอกเซลล์ (extracellular sucrose) เพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในรูปของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสซึ่งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวจะมีผลทำให้ระดับของน้ำตาล

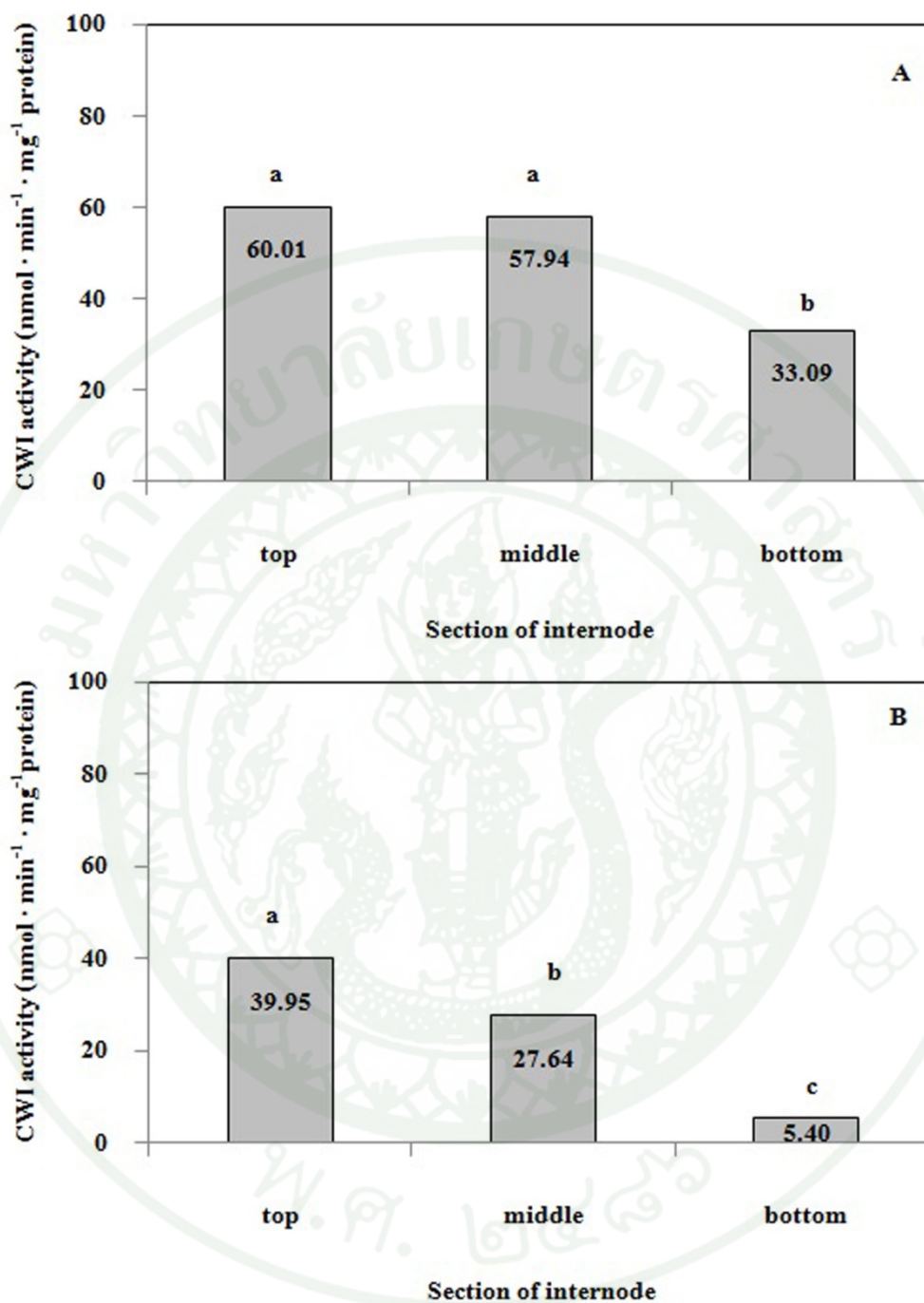
กลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสภายนอกเซลล์เพิ่มสูงขึ้น (Roitsch and Gonzalez, 2004) และมีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์ภายใต้การทำงานร่วมกันกับ hexose transporter ในรูปแบบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งเป็นรูปแบบของน้ำตาลที่พืชสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน จากการทดลอง ซึ่งพบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวสูงในระยะที่อ้อยอยู่ในช่วงระยะอย่างปล้องและสูงในทุกๆ ส่วนของลำต้นและลดลงเมื่ออ้อยเข้าสู่ระยะสุกแก่ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในช่วงระยะอย่างปล้องของอ้อยนั้น ภายในเซลล์มีความต้องการ hexose ในปริมาณที่สูง ซึ่งรูปแบบที่พืชสามารถนำไปใช้ได้และง่ายต่อการเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์จึงอยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จึงมีผลทำให้ในระยะนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ CWI สูง เช่นเดียวกับรายงานของ Borisjuk *et al.* (1998) ได้กล่าวว่าในระยะที่เมล็ดมีการพัฒนาซึ่งเซลล์ที่มีการแบ่งตัวจะพบว่ามีการทำงานของ CWI สูง และจากรายงานของ Miron and Schaffer (1990) พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ acid invertase ในส่วนของ apoplast สูง ในเนื้อเยื่อ ส่วนของปล้องที่ยังอ่อนและมีการเจริญเติบโต

ในช่วงที่อ้อยยังมีการเจริญเติบโตทางลำต้น สัดส่วนของการนำน้ำตาลซูโครสที่พืชสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตย่อมมีมากกว่าการนำไปเก็บสะสมในแควคิวโอล (sink organ) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ CWI ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในส่วน apoplast กับเอนไซม์ SAI ซึ่งทำหน้าที่หลักในส่วนของแควคิวโอล จึงพบว่า ในช่วงระยะที่อ้อยมีการเจริญเติบโตทางลำต้น ซึ่งในการทดลองนี้คือ ระยะอย่างปล้อง จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ CWI ที่สูงมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ในอ้อยป่า S98-244 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CWI มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น ในทุกส่วนของลำต้นและชัดเจนในลำต้นส่วนยอด ซึ่งมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมของอ้อยซึ่งพบว่าจะลดลงที่อายุ 10 และ 12 เดือน

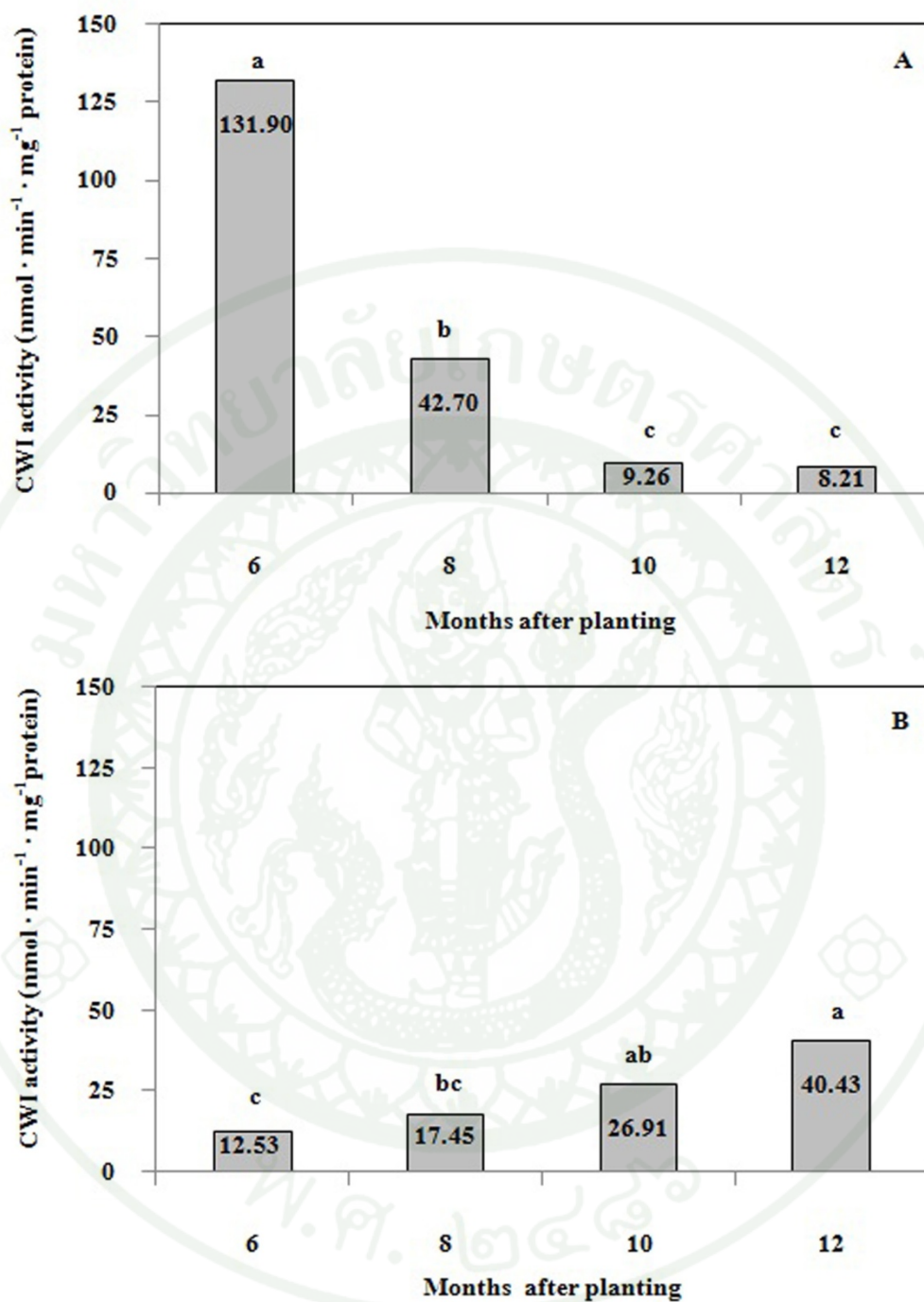
เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ CWI ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 กิจกรรมของ CWI ในอ้อยปลูกจะมีสูงกว่าในอ้อยป่า ตามสัดส่วนของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่พบซึ่งพบในอ้อยปลูกสูงกว่าอ้อยป่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหน้าที่ของเอนไซม์ CWI ซึ่งอยู่ในส่วน apoplast ในการควบคุมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ (Roitsch and Gonzalez, 2004) ดังนั้นในอ้อยปลูกซึ่งเป็นอ้อยที่มีความสามารถในการสร้างและสะสมน้ำตาลซูโครสสูง และมีการเจริญเติบโตทางลำต้นที่ดี ลำต้นสูงใหญ่ ย่อมส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ CWI ซึ่งอยู่ภายนอกเซลล์เกิดขึ้นสูงเช่นกัน และย่อมสูงกว่าในอ้อยป่าซึ่งเป็นอ้อยที่มีความสามารถในการสร้างและสะสมน้ำตาล ได้ต่ำและมีลำต้นเรียวเล็ก



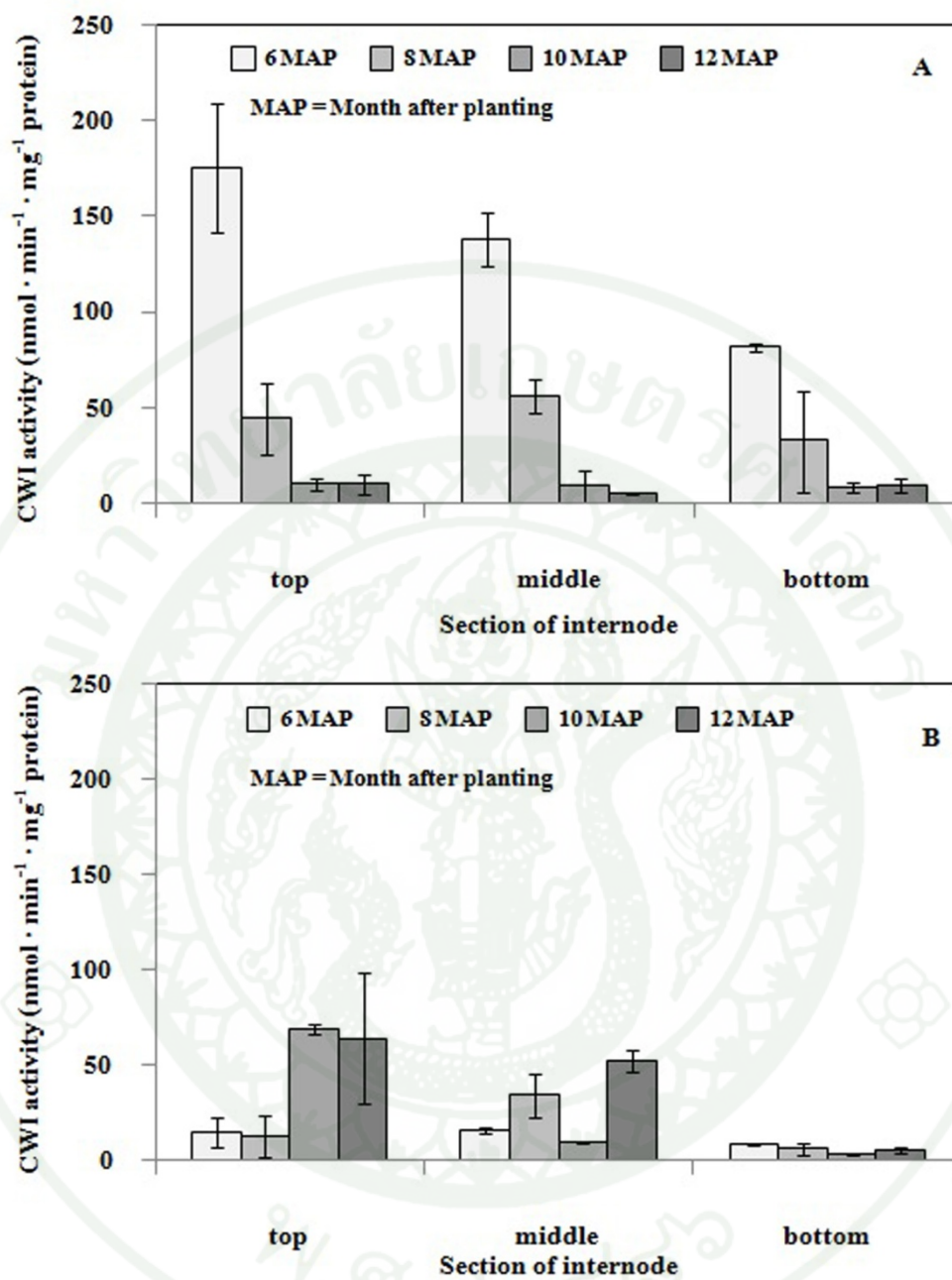
ภาพที่ 17 กิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ cell wall invertase (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244



ภาพที่ 18 กิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ cell wall invertase (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อย ของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)



ภาพที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ cell wall invetase (นาโน โมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัม โปรตีน) ในแต่ละเดือนของอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B)



ภาพที่ 20 กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248(A) และอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (B) ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน

3. ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) neutral invertase (NI) และ cell wall invertase (CWI) กับปริมาณน้ำตาลซูโครส

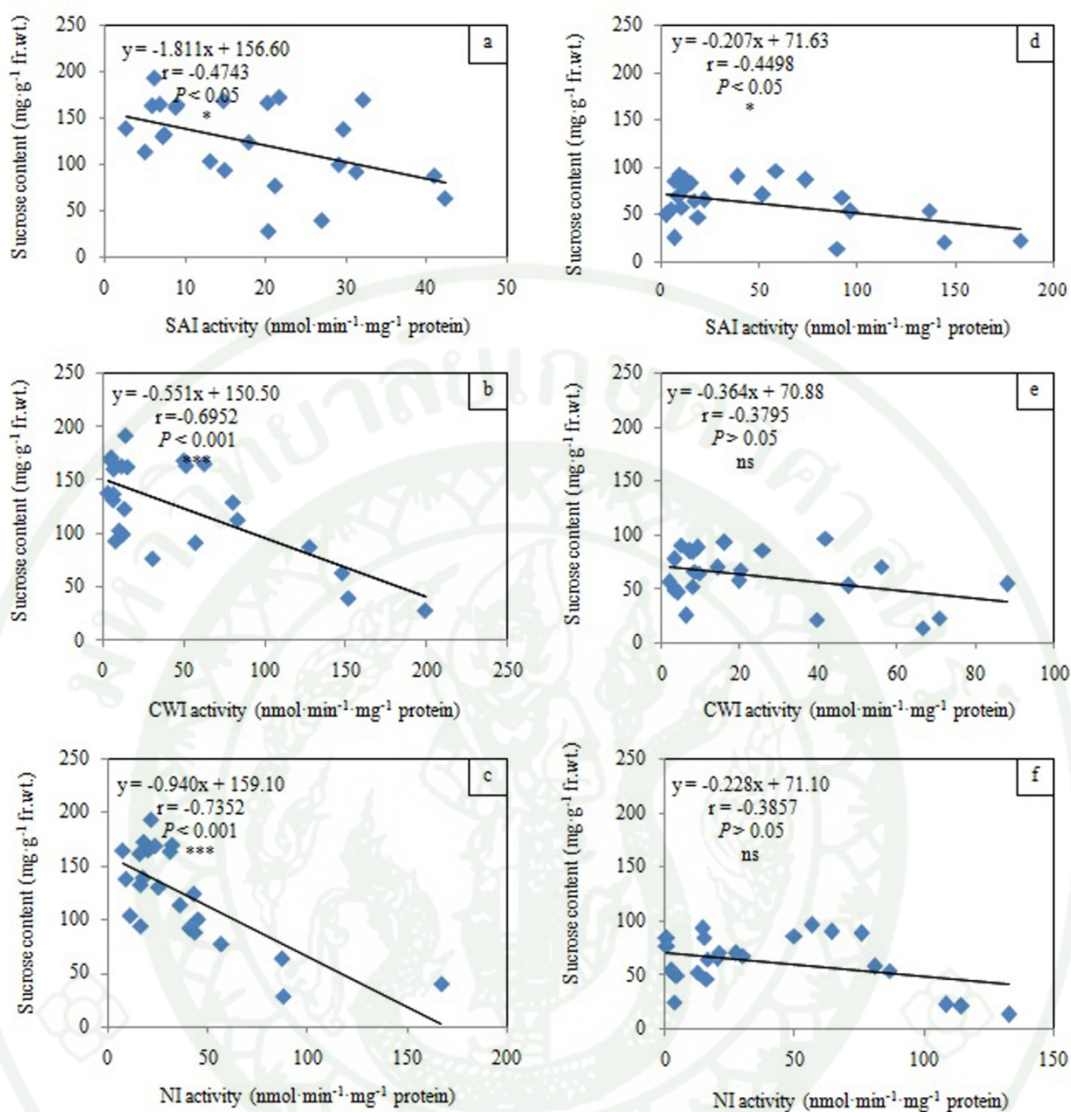
จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสและกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส (SAI NI และCWI) ในอ้อยปลูกสายพันธุ์20-2248 ซึ่งเป็นอ้อยที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญกับกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ($r = -0.4743$, $P < 0.05$) NI ($r = -0.7352$, $P < 0.001$) และ CWI ($r = -0.6952$, $P < 0.001$) ส่วนในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 ซึ่งเป็นอ้อยที่มีการสะสมน้ำตาลซูโครสต่ำ พบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญกับกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ($r = -0.4498$, $P < 0.05$) และมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามอย่างไม่มีนัยสำคัญ กับกิจกรรมของเอนไซม์ NI ($r = -0.3857$, $P > 0.05$) และ CWI ($r = -0.3795$, $P > 0.05$) (ภาพที่ 21) จากการศึกษาจะเห็นได้ว่า เมื่อกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสสูงขึ้นปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นจะลดต่ำลง ทำนองเดียวกับการศึกษาของ Lontom *et al.* (2008) พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมของอ้อยระหว่างอ้อยอยู่ในระยะสุกแก่จะมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญกับกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ในอ้อยทั้งสองพันธุ์ที่ใช้ศึกษา (HoCP, $r = -0.449^{**}$ และ L97-128, $r = 0.503^{**}$) เช่นเดียวกับ Pan *et al.* (2009) ที่พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับกิจกรรมของเอนไซม์ SAI และ NI

และจากผลการทดลอง ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI เกิดขึ้นต่ำที่สุดในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-224 ซึ่งเป็นอ้อยที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสสูงเปรียบเทียบกับเอนไซม์อินเวอร์เทสชนิดอื่น และในขณะเดียวกันก็จะพบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI เกิดขึ้นสูงที่สุดในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 ซึ่งเป็นอ้อยที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสต่ำ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า เอนไซม์ SAI อาจจะเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Ma *et al.* (2000) ที่พบความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นและเอนไซม์ SAI มีความสำคัญต่อการสะสมน้ำตาลซูโครสของอ้อย

ในอ้อยปลูกซึ่งเป็นอ้อยที่มีความสามารถการสะสมน้ำตาลซูโครสสูง พบกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ต่ำที่สุด และกิจกรรมของ CWI สูงที่สุด ซึ่งแตกต่างจากในอ้อยป่าที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงที่สุดและกิจกรรมของ CWI ต่ำที่สุด ส่วนกิจกรรมของ NI นั้นไม่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์ SAI ในอ้อยปลูกในระดับที่ต่ำในทุกกระบวนการเจริญเติบโตที่ศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยป่าที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงในทุกกระบวนการเจริญเติบโตที่ศึกษา

ดังนั้นจากผลการศึกษาคือความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ SAI กับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นของอ้อยปลูกและอ้อยป่าเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ CWI และ NI จะเห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้น อย่างมีนัยสำคัญทั้งในอ้อยปลูกและในอ้อยป่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เอนไซม์ SAI อาจเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้น ซึ่งจากความสัมพันธ์ที่พบนี้ อาจใช้เป็นข้อมูลประกอบในการพัฒนาเอนไซม์ SAI เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีที่บ่งบอกถึงลักษณะของพันธุ์อ้อยในแง่ของความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสในลำต้นของอ้อยต่อไป



ภาพที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสและกิจกรรมของเอนไซม์ SAI, CWI และ NI ในอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 (a, b และ c ตามลำดับ) และในอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 (c, d และ f ตามลำดับ) (r = correlation coefficient)

สรุป

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส ทั้ง 3 ชนิด คือ soluble acid invertase (SAI) neutral invertase (NI) และ cell wall invertase (CWI) และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 และอ้อยป่า S98-244 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

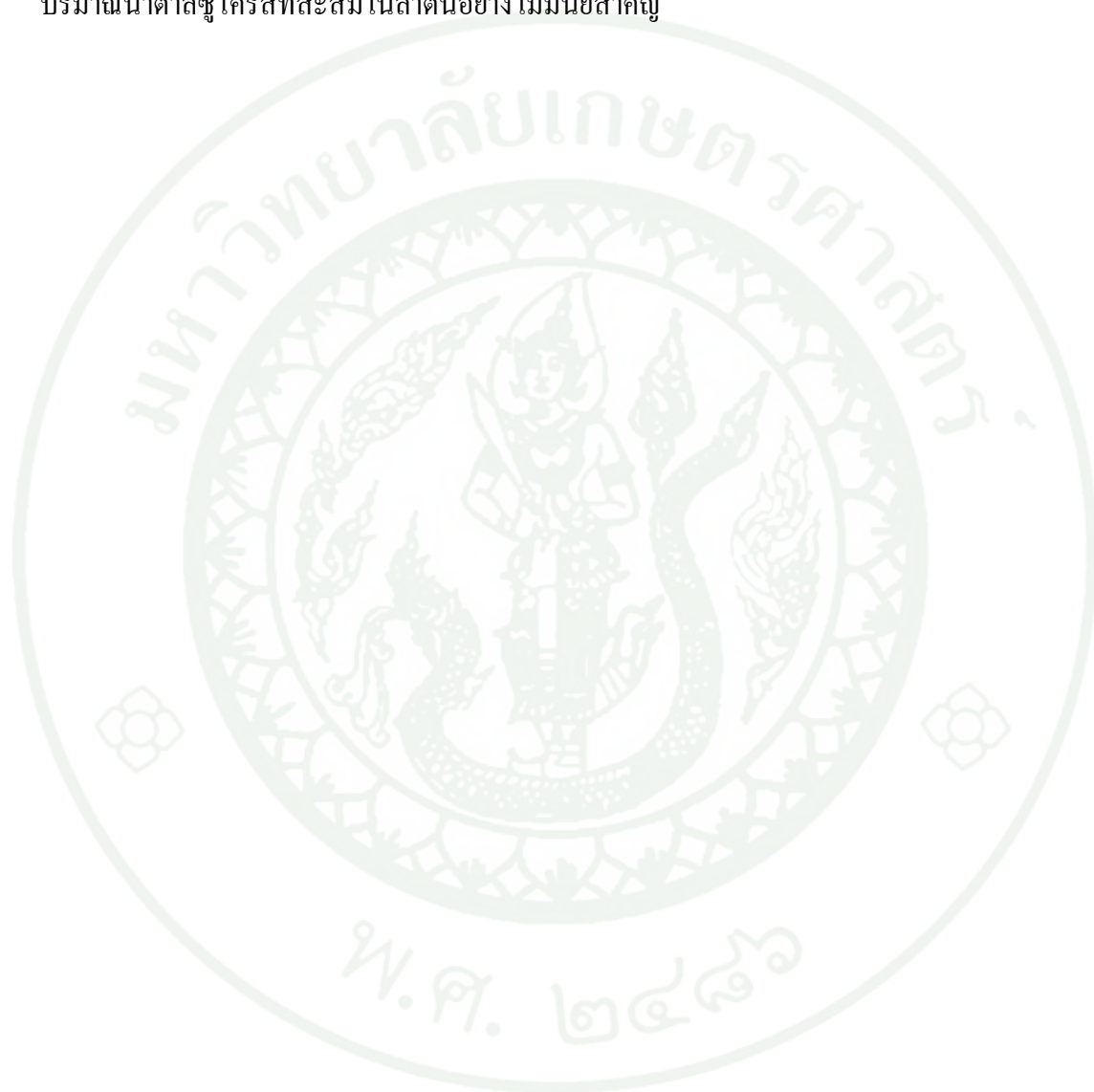
1. ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในอ้อยปลูกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของอายุ (6 ถึง 12 เดือน) และพบการสะสมสูงที่สุดในส่วนล่างและมีแนวโน้มลดลงในส่วนกลางและส่วนยอดของลำต้น ตามลำดับ และในอ้อยป่าพบว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครส มีการสะสมสูงที่สุดที่อายุ 8 เดือน และมีแนวโน้มลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น (8 ถึง 12 เดือน) และพบการสะสมสูงที่สุดในลำต้นส่วนกลาง และไม่แตกต่างกันในลำต้นส่วนยอด และส่วนล่าง

2. กิจกรรมของเอนไซม์ SAI พบในอ้อยป่าสูงกว่าในอ้อยปลูก ในอ้อยปลูกกิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีแนวโน้มลดลงเมื่ออ้อยมีอายุเพิ่มขึ้น ส่วนในอ้อยป่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของอายุอ้อย ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์พบกิจกรรมของเอนไซม์ SAI สูงในส่วนยอด และมีแนวโน้มลดลงในส่วนกลาง และส่วนล่างของลำต้น ตามลำดับ

3. กิจกรรมของเอนไซม์ NI ในอ้อยปลูกและในอ้อยป่า พบกิจกรรมของเอนไซม์ NI เฉลี่ย ไม่แตกต่างกัน ในอ้อยปลูกกิจกรรมของเอนไซม์ NI มีแนวโน้มลดลงเมื่ออ้อยมีอายุเพิ่มขึ้น และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ NI สูงในช่วงปลายของระยะอย่างปล้อง (6 เดือน) ส่วนในอ้อยป่า กิจกรรมของเอนไซม์ NI เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของอายุอ้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์พบกิจกรรมของเอนไซม์ NI สูงในส่วนยอดและมีแนวโน้มลดลงในส่วนกลาง และส่วนล่างของลำต้น ตามลำดับ

4. กิจกรรมของเอนไซม์ CWI พบในอ้อยปลูกสูงกว่าในอ้อยป่า และในอ้อยปลูกกิจกรรมของเอนไซม์ CWI มีแนวโน้มลดลงตามการเพิ่มขึ้นของอายุอ้อย ส่วนในอ้อยป่ากิจกรรมของเอนไซม์ CWI เพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของอายุอ้อย ในอ้อยทั้งสองสายพันธุ์พบกิจกรรมของเอนไซม์ CWI สูงในส่วนยอดและมีแนวโน้มลดลงในส่วนกลาง และส่วนล่างของลำต้น ตามลำดับ

5. กิจกรรมของเอนไซม์ SAI NI และ CWI ในอ้อยปลูกมีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในอ้อยป่า กิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ NI และ CWI มีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในลำต้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกษม สุขสถาน. 2527. อ้อย.พืชเศรษฐกิจ เล่ม 2.ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์, เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, รังสฤษฎี กาวีตะ และสนธิชัย จันทน์เปรม. 2547.
พืชเศรษฐกิจ. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

ประเสริฐ นัทรวิระวงษ์, อุดม เดียววัน และอดุลย์ พงษ์พั้ว.2544. การปรับปรุงพันธุ์อ้อย
ในประเทศไทย-อดีต ปัจจุบัน และอนาคต. วารสารอ้อยและน้ำตาลไทย8(2): 12-34.

ปัทมา ศรีน้ำเงิน.2546. การถ่ายยีนบางส่วนของ antisense invertase เข้าสู่อ้อย. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชนีภัทรวาโย. 2550. ผลของน้ำตาลในสารละลายยี่ดอายุที่มีต่อเมแทบอลิซึมของน้ำตาล
และกิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เตสในดอกกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล.2557. ตารางแสดงข้อมูลพื้นที่เพาะปลูกและผลผลิตอ้อย
ปีการผลิต 2555/2556. แหล่งที่มา: <http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-5826.pdf>, 19 กุมภาพันธ์ 2555.

Andersen, M.N., F. Asch, Y. Wu, C.R. Jensen, H. Naested, V.O. Mogensen and K.E.Koch. 2002.
Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical,
abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. **Plant Physiol.**
130: 591-604.

Antonio, R.S., A.V. Marta and E.P. Fernando. 1980. A regulatory invertase from sugarcane leaf-
sheaths. **Phytochem.** 19: 1637-1642.

- Batta, S.K. and R. Singh. 1986. Sucrose metabolism in sugarcane grown under varying climatic conditions: Synthesis and storage of sucrose in relation to the activities of sucrose synthase, sucrose-phosphate synthase and invertase. **Phytochem.** 25: 2431–2437.
- Batta, S.K., B. Kaur, J.S. Sital, S.K. Sandhu and S.K. Uppal. 2011. Sucrose accumulation and internodal soluble invertase isoenzymes in plant and ratoon crops of sugarcane. **Sugar Tech.** 13(1): 51–59.
- Borisjuk, L., S. Walenta, H. Weber, W.M. Klieser and U. Wobus. 1998. High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. 15(4): 583-591.
- Bosch, S., C.P.L. Grof and F.C. Botha. 2004. Expression of neutral invertase in sugarcane. **Plant Sci.** 166: 1125-1133.
- Chiou, T.J. and D.R. Bush. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 4784-4788.
- Dendsay, J.P.S., P. Singh, A.K. Dhawan and H.L. Sehtiya. 1995. Activities of internodal invertases during maturation of sugarcane stalks. **Sugarcane.** 6: 17–19.
- Fernando, E.P., O.L. Fleischmacher, A.V. Marta and R.S. Antonio. 1982. Cell wall invertase of sugarcane. **Phytochem.** 21: 2825-2828.
- Gayler, K. and K.T. Glasziou. 1972. Physiological functions of acid and neutral invertase in growth and sugar storage in sugarcane. **Plant Physiol.** 27: 25-31.

- Gibeaut, D.M., N. Karuppiyah, S.R. Chang, T.G. Brock, B. Vadlamudi, D. Kim, N.S. Ghoseh, D.L. Rayle, N.C. Carpita and P.B. Kaufman. 1990. Cell wall and enzyme changes during graviresponse of the leaf-sheath pulvinus of oat (*Avena sativa*). **Plant Physiol.** 94: 411-416.
- Glasziou, K.T. and K.R. Gayler. 1972. Sugar accumulation in sugarcane. Role of cell wall in sucrose transport. **Plant Physiol.** 49: 912-913.
- Gutierrez-Miceli, F.A., M.A. Rodriguez-Mendiola, N.Ochoa-Alejo, R. Mendez-Salas, L. Dendooven and C. Arias- Castro. 2002. Relationship between sucrose accumulation and activities sucrose-phosphatase, sucrose synthase, neutral invertase and soluble acid invertase in micropropagated sugarcane plants. **Acta Physiol. Plant.** 24 (4): 441-446.
- Halford, N.G., T.Y. Curtis, N. Muttucumaru, J. Postles and D.S. Mottram. 2010. Sugar in crop plant. **Ann. Appl. Biol.** 158: 1-25.
- Hatch, M.D. and K.T. Glasziou. 1963. Sugar accumulation cycle in sugarcane. II relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plant growth in controlled environment. **Plant Physiol.** 38: 344-348.
- Huber, S.C. and J.L. Huber. 1996. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plant. **Ann. Rev. Plant Mol. Biol.** 47: 431-444.
- Joshi, J.B., S. Krishnaveni, D. Vijayalakshmi, R. Sudhagar and M. Raveedran. 2013. Activities of enzyme involved in synthesis and degradation of sucrose in popular sugarcane varieties. **Asian J. Exp. Biol. Sci.** 4(2): 237-244.
- Lingle, S.E. 1997. Seasonal internode development and sugar metabolism in sugarcane. **Crop Sci.** 37: 1222-1227.

- Lingle, S.E. 1999. Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internode. **Crop Sci.** 39: 480-486.
- Lontom, M., M. Kosittrakun and S.E. Lingle. 2008. Relationship of acid invertase activities to sugarcane internode during ripening and after harvest. **Thai J. Agric. Sci.** 41(3-4): 143-151.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Lu, P.J., R.C. Dai, B.Y. Ye and R.H. Lin. 2011. HPLC determination of fructose, glucose and sucrose in sugarcane internode. **J. Food Sci.** 32(2): 198-200.
- Ma, H., H.H. Albert, R. Paull and P.H. Moore. 2000. Metabolic engineering of invertase activities in different subcellular compartments affects sucrose accumulation in sugarcane cell. **Aust. J. Plant Physiol.** 27: 1021-1030.
- Marta, A.V., E.P. Fernando and R.S. Antonio. 1981. Cell wall invertase from sugarcane. **Phytochem.** 20: 189-191.
- Miron, D. and A.A. Schaffer. 1990. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill and sucrose accumulating *Lycopersicon hisutum*. **Plant Physiol.** 95: 623-627.
- Moore, P.H. 1995. Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane. **Aust. J. Plant Physiol.** 22: 661-679.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153: 375-380.

- Pan, Y.Q., H.L. Luo and Y.R. Li. 2009. Soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase: Key enzymes in regulation sucrose accumulation in sugarcane stalk. **Sugar Tech.** 11(1): 28-33.
- Pramanik, B.K., T. Matsui, H. Suzuki and Y. Kosugi. 2004. Changes in acid invertase activity and sugar distribution during postharvest senescence in broccoli. **J. Biol. Sci.** 7: 679-684.
- Rausch, T and S. Greiner. 2004. Plant protein inhibitors of invertase. **Biochem. Biophys. Acta.** 1696: 253-261.
- Roitsch, T. and M.C. Gonzalez. 2004. Function and regulation of plant invertase: sweet sensations. **Trends Plant Sci.** 9(12): 606-613.
- Rossouw, D., J. Kossmann, F.C. Botha and J.H. Groenewald. 2010. Reduced neutral invertase activity in the culm tissues of transgenic sugarcane plants results in a decrease in respiration and sucrose cycling and an increase in the sucrose to hexose ratio. **Funct. Plant Biol.** 37: 22-31.
- Sacher, J.A., M.D. Hatch and K.T. Glasziou. 1963. Sugar accumulation cycle in sugar cane. III. Physical and metabolic aspects of cycle in immature storage tissues. **Plant Physiol.** 39: 348-354.
- Sherson, S.M., H.L. Alford, S.M. Forbes, G. Wallace and S. Smith. 2003. Role of cell allinvertase and monosaccharide transporters in growth and development of *Arabidopsis*. **J. Exp. Bot.** 54: 525-531.
- Strum, A. 1999. Invertase, primary structure, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiol.** 121: 1-7.

Terauchi, T. 1997. Enzyme activity of early maturing high sugar content sugarcane stalks.

Available

Source:<http://ss.jircas.affrc.go.jp/engpage/annualreport/1997/divisions/ossdivision2.htm>, January 15, 2003.

Venkataramana, S., K.M. Naidu and S. Singh. 1991. Invertases and growth factors dependent sucrose accumulation in sugarcane. **Plant Sci.** 74: 65–72.

Venkataramana, S. and K.M. Naidu. 1993. Invertase-sucrose relationship in young and mature stem of sugarcane. **Phytochem.** 32: 821–822.

Verma, A.K., S.K. Upadhyay, M.K. Srivastava, P.C. Verma, S. Solomon and S.B. Singh. 2011. Transcript expression and soluble acid invertase activity during sucrose accumulation in sugarcane. **Acta Physiol. Plant.** 33: 1749–1757.

Vorster, D.J. and F.C. Botha. 1998. Partial purification characterization of sugarcane neutral invertase. **Phytochem.** 49: 651–655.

Wang, J., S. Nayak, K. Koch and R. Ming. 2013. Carbon partitioning in sugarcane (*Saccharum species*). **Plant Sci.** 201(4): 1–6.

Zhou, Y. 2000. **Development and assimilate partitioning in wildtype and miniature phenotype maize kernels.** Ph.D. thesis, The Pennsylvania State University, USA.

Zhu, Y.J., E. Komor and P.H. Moore. 1997. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate. **Plant Physiol.** 115: 609–616.

Zhu, Y.J., H.H. Albert, and P.H. Moore. 2000. Differential expression of soluble acid invertase genes in the shoots of high-sucrose and low-sucrose species of *Saccharum* and their hybrids. **Aust. J. Plant Physiol.** 27 (3): 193–199.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ก1 ปริมาณน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน

อายุ (เดือน)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส ^{1/} (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)		
	ส่วนยอด	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง
6	33.84 ± 8.17 c	75.36 ± 17.14 b	121.23 ± 11.64
8	84.18 ± 10.53 b	167.20 ± 2.22 a	178.18 ± 19.88
10	96.40 ± 4.34 b	150.42 ± 17.28 a	120.11 ± 24.14
12	127.58 ± 5.91 a	169.76 ± 2.26 a	162.15 ± 1.95
<i>F</i> -test	**	**	ns

^{1/}ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ LSD

** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

± = Standard deviation

ตารางผนวกที่ ก2 ปริมาณน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด) ที่สะสมในแต่ละส่วน
ของลำต้นอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน

อายุ (เดือน)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)		
	ส่วนยอด	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง
6	73.03 ± 21.68	81.35 ± 16.26	68.65 ± 22.94
8	78.71 ± 16.05	91.05 ± 7.12	80.55 ± 4.68
10	18.04 ± 6.18	65.09 ± 0.42	52.71 ± 4.58
12	37.66 ± 23.52	61.51 ± 12.41	35.79 ± 15.31
<i>F</i> -test	ns	ns	ns

ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

± = Standard deviation

ตารางผนวกที่ ก3 กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) (นาโนโมลต่อนาที่ต่อ มิลลิกรัม โปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน

อายุ (เดือน)	กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase ^{1/} (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน)		
	ส่วนยอด	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง
6	23.65 ± 4.72	41.69 ± 0.93 a	6.05 ± 1.58
8	26.21 ± 7.16	26.18 ± 8.41 b	6.44 ± 0.50
10	21.99 ± 10.07	4.19 ± 2.33 c	21.36 ± 11.76
12	12.62 ± 7.43	18.19 ± 4.94 b	8.86 ± 0.13
<i>F</i> -test	ns	**	ns

^{1/}ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ LSD

** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

± = Standard deviation

ตารางผนวกที่ ก4 กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) (นาโนโมลต่อนาที่ต่อ มิลลิกรัม โปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน

อายุ (เดือน)	กิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase ^{1/} (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน)		
	ส่วนยอด	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง
6	11.33 ± 1.05	8.89 ± 0.16 b	4.96 ± 2.65
8	65.53 ± 38.09	66.35 ± 10.66 a	13.49 ± 1.99
10	136.73 ± 66.09	19.24 ± 3.55 b	3.64 ± 1.95
12	140.46 ± 5.44	74.37 ± 31.68 a	12.82 ± 8.56
<i>F</i> -Test	ns	**	ns

^{1/}ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ LSD

* = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

± = Standard deviation

ตารางผนวกที่ ก5 กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) (นาโน โมลต่อนาที่ต่อ มิลลิกรัม โปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือน

อายุ (เดือน)	กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase ^{1/} (นาโน โมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน)		
	ส่วนยอด	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง
6	127.47 ± 55.85	65.52 ± 30.82	30.86 ± 7.63 a
8	48.94 ± 11.19	26.76 ± 8.11	21.06 ± 1.14 ab
10	30.96 ± 20.17	24.60 ± 9.49	10.38 ± 1.52 b
12	29.91 ± 18.87	21.015 ± 4.00	11.92 ± 6.05 b
<i>F</i> -test	ns	ns	*

^{1/}ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ LSD

* = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

± = Standard deviation

ตารางผนวกที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (NI) (นาโนโมลต่อนาที่ต่อ มิลลิกรัม โปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือนหลังปลูก

อายุ (เดือน)	กิจกรรมของเอนไซม์ neutral invertase (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน)		
	ส่วนยอด	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง
6	78.45 ± 3.60	20.75 ± 9.02 b	9.06 ± 8.37
8	47.28 ± 24.30	53.34 ± 4.90 a	0.54 ± 0.06
10	120.70 ± 17.04	18.06 ± 2.69 b	3.3 ± 1.63
12	100.84 ± 19.64	16.53 ± 6.06 b	9.65 ± 8.88
<i>F</i> -test	ns	*	ns

^{1/}ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย แบบ LSD

* = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

± = Standard deviation

ตารางผนวกที่ ๗ กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI) (นาโนโมลต่อนาที่ต่อ มิลลิกรัมโปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2248 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือนหลังปลูก

อายุ (เดือน)	กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase ^{1/} (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน)		
	ส่วนยอด	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง
6	175.72 ± 33.62 a	138.02 ± 14.25a	81.98 ± 2.04 a
8	44.13 ± 18.74 b	56.54 ± 8.89 b	32.79 ± 26.49 b
10	10.25 ± 3.26 b	9.15 ± 8.63 c	8.39 ± 2.61 b
12	9.93 ± 4.94 b	5.49 ± 0.25 c	9.23 ± 3.50 b
<i>F</i> -test	**	**	*

^{1/}ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ LSD

** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

* = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

± = Standard deviation

ตารางผนวกที่ ก8 กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase (CWI) (นาโนโมลต่อนาที่ต่อ มิลลิกรัม โปรตีน) ที่สะสมในแต่ละส่วนของลำต้นอ้อยป่าสายพันธุ์ S98-244 ที่อายุ 6 8 10 และ 12 เดือนหลังปลูก

อายุ (เดือน)	กิจกรรมของเอนไซม์ cell wall invertase ^{1/} (นาโนโมลต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน)		
	ส่วนยอด	ส่วนกลาง	ส่วนล่าง
6	14.49 ± 7.48	15.34 ± 1.29 c	7.77 ± 0.51
8	12.59 ± 10.78	34.03 ± 11.33 b	5.74 ± 3.35
10	68.71 ± 3.04	9.24 ± 0.74 c	2.79 ± 0.81
12	64.01 ± 34.25	51.95 ± 5.72 a	5.31 ± 1.37
<i>F</i> -Test	ns	**	ns

^{1/}ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ LSD

** = แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

± = Standard deviation



ภาคผนวก ข
วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลายน้ำตาลซูโครสมาตรฐานความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.1.2 น้ำกลั่น 18 เมกะโอม

1.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์

1.2.1 เตรียมน้ำกลั่น 18 เมกะโอมสำหรับใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ด้วยการนำไปกรองโดยใช้ชุดกรองและใช้แผ่นกรองชนิด Cellulose Acetate Membrane Filter ขนาด 0.45 ไมครอน ยี่ห้อ Satorius

1.2.2 เจือจางตัวอย่างในระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยน้ำกลั่น 18 เมกะโอม จากนั้นกรองตัวอย่างผ่านตัวกรองชนิด Cellulose Acetate Syringe Filter ขนาด 0.2 ไมครอน ใส่ขวด vial เตรียมไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

1.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC

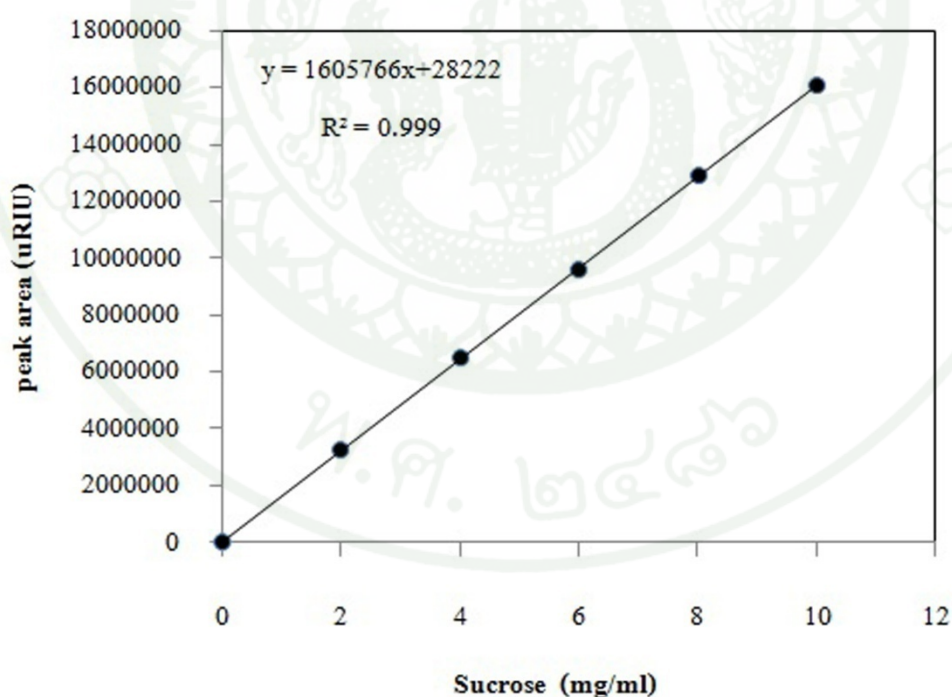
1.3.1 นำสารละลายน้ำตาลซูโครสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยกำหนดให้มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ดังตารางผนวกที่ ข1 ฉีดสารละลายตัวอย่างซูโครสมาตรฐานเข้าเครื่อง HPLC เพื่อหาเวลาที่ตัวอย่างน้ำตาลมาตรฐานถูกดูดซับอยู่ในคอลัมน์ (retention time) จากนั้นจึงฉีดสารละลายน้ำตาลซูโครสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เข้าเครื่อง HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ของสารละลายน้ำตาลซูโครสมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น มาสร้างกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาพผนวกที่ ข1

1.3.2 ฉีดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยให้มีพื้นที่ใต้กราฟอยู่ในช่วงของสารละลายซูโครสมาตรฐาน จากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาคำนวณหาความ

เข้มข้นของน้ำตาลซูโครสโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสที่ทราบความเข้มข้น (ภาพผนวกที่ ข1)

ตารางผนวกที่ ข1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครสมาตรฐานและตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC

รายการ	สภาวะที่ใช้วิเคราะห์
Mobile phase	น้ำกลั่น 18 เมกะโอม
Injection volume	20 ไมโครลิตร
Column	ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น Aminex HPX-87P
Detector	reflective index (RID)
Column temperature	80 องศาเซลเซียส
Flow rate	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 2 4 6 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีโซโมจาย-เนลสัน (Nelson, 1944)

2.1 สารเคมี

2.1.1 Alaline copper reagent ประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	71 กรัม
- NaK Tartate	40 กรัม
- NaOH 1N	100 มิลลิลิตร
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8 กรัม
- Na_2SO_4	180 กรัม

ละลายสารข้างต้นตามลำดับในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร โดยเริ่มให้ความร้อนเมื่อเติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ จนหมดแล้วจึงเติม Na_2SO_4 จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมากรองตะกอนออกก่อนนำไปใช้งาน

2.1.2 Nelson reagent ประกอบด้วยสารดังต่อไปนี้

- $(\text{NH}_4)_8\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	53.2 กรัม
- H_2SO_4 (96%)	21 มิลลิลิตร
- NaHASO ₄ ·7H ₂ O (12%)	50 มิลลิลิตร

ละลายสารตามลำดับในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1 ลิตร นำสารไปเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง จึงนำมากรองก่อนใช้

เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยใช้สารละลายฟรุกโตสต่อกลูโคสมาตรฐาน อัตราส่วน 1:1 เป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0, 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

2.2 วิธีการวิเคราะห์ (สำหรับใช้ไมโครเพลท)

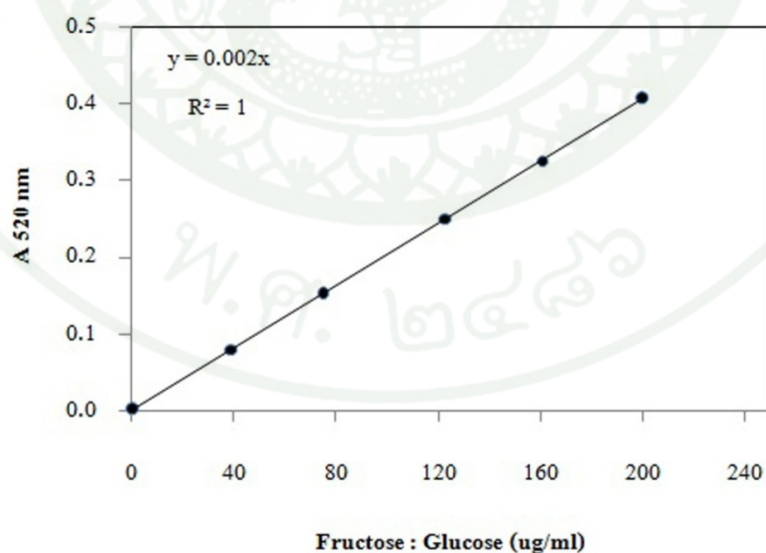
2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์

2.2.2 เติม Alkaline copper reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที และนำไปแช่ในน้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาที

2.2.3 เติม Nelson reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

2.2.4 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

2.2.5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โดยใช้ฟรุกโตสต่อกลูโคสมาตรฐานในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก เป็นสารมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ ข2)



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายฟรุกโตสต่อกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 40 80 120 160 180 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี (Lowry *et al.*, 1951)

3.1 สารเคมี

3.1.1 สารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 1 % จำนวน 100 มิลลิลิตร

3.1.2 สารละลายโซเดียมโปแตสเซียมทาร์เตรต ความเข้มข้น 2 % จำนวน 100 มิลลิลิตร

3.1.3 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 2 % ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จำนวน 1 ลิตร

3.1.4 สารละลาย A (ด่างคอปเปอร์) เตรียมโดยใช้สารละลายในข้อ 3.1.1, 3.1.2 และ 3.1.3 ในอัตราส่วน 1:1:100 (จะต้องเตรียมใหม่ก่อนนำไปใช้วิเคราะห์เท่านั้น)

3.1.5 สารละลาย B โดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

3.1.6 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้สารละลายโปรตีนของ BSA (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร

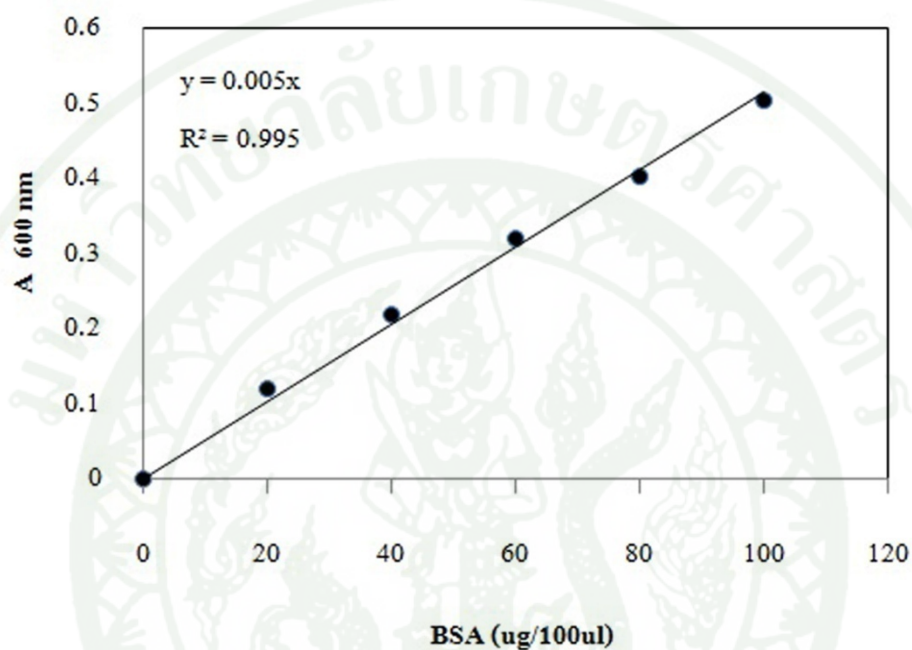
3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.2.2 เติมสารละลาย A ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

3.2.3 เดิมสารละลาย B จำนวน 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

3.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-สกุล	นางสาวบุษรินทร์ ตานะ
เกิดวันที่	1 ธันวาคม 2529
สถานที่เกิด	จังหวัดลำปาง
ประวัติการศึกษา	ระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2551 สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัย จากศูนย์ความเป็นเลิศ ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนา บัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ การอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ