3. ผลการทดลอง

3.1 การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่ถูกสำเลียงในต้นข้าว

จากการทดลองแยกน้ำตาลโดยวิธี Paper Chromatography ด้วยการใช้ n-butanol : acetic acid : water 4:1:5 เป็น solvent เปรียบเทียบน้ำตาลที่ได้จากต้นข้าวกับน้ำตาลที่ใช้เป็นมาตรฐาน ในรูปของ R_F

$$R_F = \frac{\text{ระยะทางที่น้ำตาลเคลื่อนที่ไปจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่ไปจากจุดเริ่มต้น}}$$

น้ำตาลต่างชนิดกันจะมีค่า R_F ต่างกัน การทดลองโดยวิธีนี้ได้ผลปรากฏว่า น้ำตาลที่ถูกสำเลียงภายในต้นข้าว ก็อ sucrose ไม่ว่าในต้นข้าวนั้น จะมีจำนวนปล้องข้าว และจำนวนใบเท่าใดก็ตาม (ตารางที่ 1)

สารละลาย	R_F
glucose	0.23
fructose	0.27
sucrose	0.19
น้ำตาลที่ได้จากข้าวชุดที่1	0.19
น้ำตาลที่ได้จากข้าวชุดที่2	0.19
น้ำตาลที่ได้จากข้าวชุดที่3	0.18

ตารางที่ 1 แสดงค่า R_F ที่ได้จากการเคลื่อนที่ของสารละลาย

3.2 การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่ได้จาก initial extract

เมื่อนำ initial extract มาแยกน้ำตาลโดยวิธี Paper Chromatography ด้วยการใช้ n-butanol:ethanol:water =4:1:5 เป็น Solvent เปรียบเทียบน้ำตาลที่แยกได้กับน้ำตาลที่ใช้เป็นมาตรฐานในรูปของค่า R_F ผลปรากฏว่าสามารถแยกน้ำตาลได้ 3 ชนิดคือ Glucose, Fructose และ Sucrose (ตารางที่ 2)

สารละลาย	R_f
Glucose	0.18
Fructose	0.25
Sucrose	0.13
initial extract จุดที่ 1	0.17
initial extract จุดที่ 2	0.22
initial extract จุดที่ 3	0.13

ตารางที่ 2 แสดงว่า R_F ที่ได้จาก initial extract

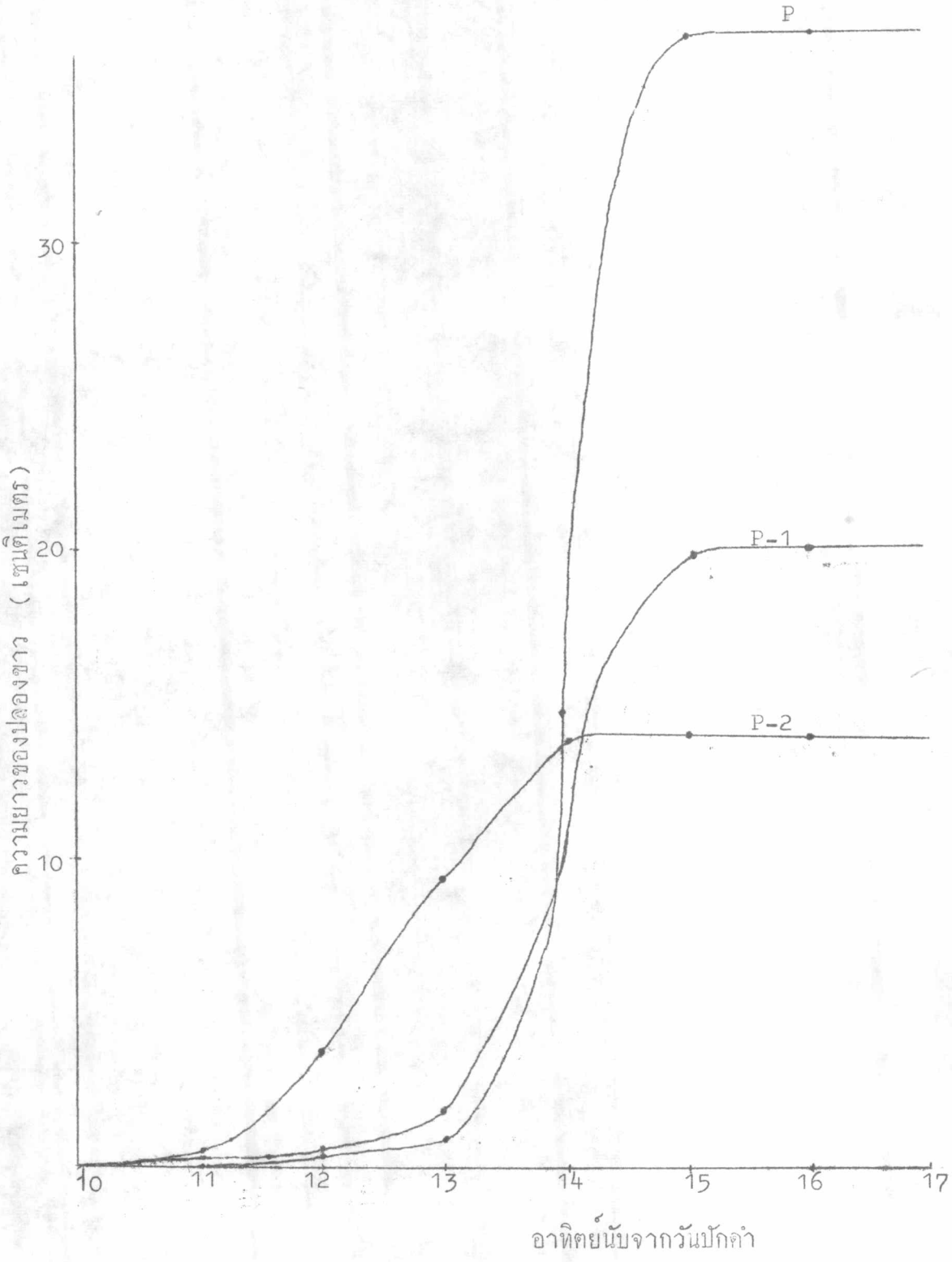
3.3 การวัดความยาวของปล้องต้นข้าว

โดยการเริ่มวัดความยาวของปล้องข้าวเมื่อข้าวอายุได้ 11 อาทิตย์นับจากวันปักดำ เป็นระยะที่ข้าวปล้องที่ P-2 กำลังมีการเจริญเติบโตยืดยาวอยู่ ส่วนปล้องที่ P-1 และ P ยังไม่มีการยืดตัวยังอยู่ในระยะที่มีการแบ่งเซลล์ของ Apical meristem เมื่ออายุข้าวได้ 12 อาทิตย์ เริ่มเห็นข้อและปล้องของ P-1 และ P ชัดเจนขึ้น และเป็นระยะที่เริ่มเกิดดอกข้าว เมื่อปล้องที่ P มีความยาวได้ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ขณะที่ P-1 ยาว 0.9 และ P-2 ยาว 4.0 เซนติเมตร ตามลำดับ นั้น ใบธงของต้นข้าวจะมีความยาวประมาณ 21 เซนติเมตร และเมื่ออายุย่างเข้าอาทิตย์ที่ 13 ปล้องที่ P มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร P-1 ยาว 1.75 และ P-2 ยาว 9.35 เซนติเมตร ใบธงจะมีความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ระหว่างอาทิตย์ที่ 13-15 จะมีการยืดตัวของข้าวปล้องที่ P, P-1 และ P-2 เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว P-2 ยืดตัวได้ยาวถึง 15 เซนติเมตร P-1 21 เซนติเมตร และ P 37 เซนติเมตร (ตารางที่ 3) เมื่อถึงอาทิตย์ที่ 14-15 ดอกข้าวเริ่มโผล่ออกมาจากกาบใบของใบธงและเริ่มมีการผสมพันธุ์ของดอกข้าวในวันนั้น ซึ่งนับว่าเป็นระยะที่ข้าวมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว และจะไม่มีการยืดตัวของปล้องข้าวอีกต่อไป และประมาณอาทิตย์ที่ 18 ก็จะเริ่มเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ข้าวนั้น

ตารางที่ 3 แสดงความยาวของปล้องข้าวที่อายุต่างกัน

อาทิตย์ที่ปลูกข้าวนับจากวันปักดำ	ความยาวของปล้องข้าว (เซนติเมตร)		
	P	P-1	P-2
11	0.1	0.2±0.02	0.4 ± 0.02
12	0.3 ± 0.02	0.45 ± 0.02	3.7 ± 0.16
12 อาทิตย์ + 4 วัน	0.5 ± 0.02	0.94 ± 0.03	3.9 ± 0.23
13	0.9 ± 0.02	1.75 ± 0.04	9.35 ± 0.25
13 อาทิตย์ + 4 วัน	2.3 ± 0.18	3.9 ± 0.23	11.8 ± 0.34
14	12.8 ± 0.23	10.84 ± 0.34	14.14 ± 0.36
15	36.64± 0.45	20.19 ± 0.39	14.74 ± 0.41
16	36.76± 0.45	21.12 ± 0.45	14.83 ± 0.43
17	36.80± 0.46	21.2 ± 0.45	14.85 ± 0.43

ตารางภาพที่ 3
แสดงความยาวของปล้องข้าวที่อายุต่างกัน



3.4 การตรวจสอบ Invertase Activity ในระยะแรกของการเจริญเติบโตของปล้องข้าว

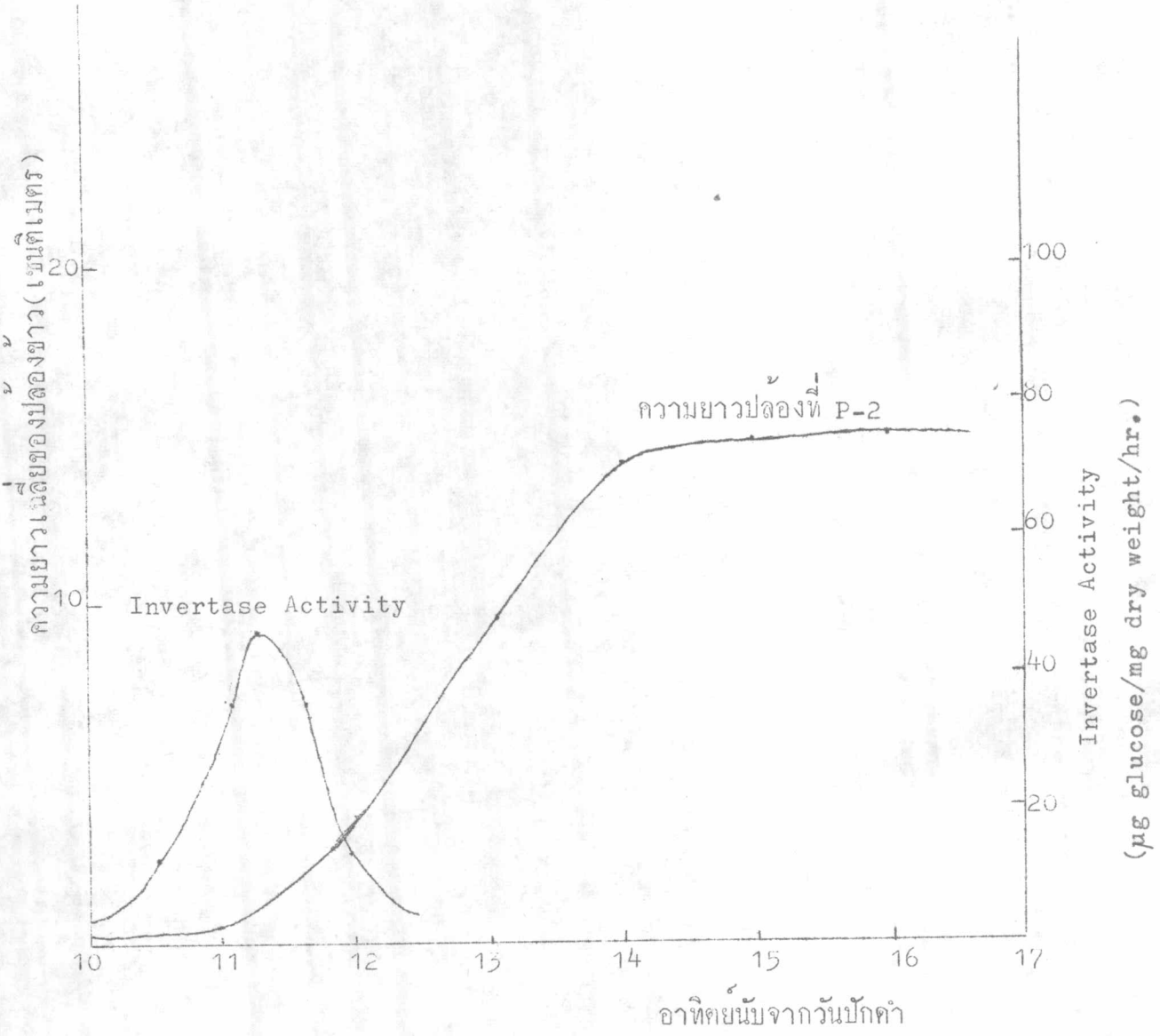
นำปล้องข้าวปล้องที่ P, P-1 และ P-2 ที่มีอายุและความยาวต่างกันมาศึกษาหา Invertase Activity ที่มีในปล้องข้าว โดยนำมาสะกัดเอนไซม์อินเวอเทสและทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต fraction 20 - 45 เปอร์เซนต์ ศึกษาอินเวอเทสในปล้องข้าวเมื่อ incubate กับ sucrose 0.05 M, pH 3.4 อุณหภูมิ 50 องศาเซนติเกรด ในเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าอินเวอเทสในปล้องของ P-2, P-1 และ P จะมี Activity ขึ้นสูงสุดลดหลั่นกันไป เมื่อต้นข้าวมีอายุอยู่ระหว่าง อาทิตย์ที่ 11-12 หลังปักดำ พบว่ามีอินเวอเทสในปล้องของ P-2 สูงที่สุดเท่ากับ 46 µg glucose/mg dry weight/hr. (ตารางภาพที่ 4) ขณะที่อินเวอเทสในปล้อง P-2 ลดลงเมื่ออายุมากขึ้น อินเวอเทสในปล้องของ P-1 จะมี Activity สูงขึ้น และขึ้นสูงเมื่อถึงอาทิตย์ที่ 12 นับจากวันปักดำ เท่ากับ 65 µg glucose/mg dry weight/hr. และหลังจากนั้น Activity ของอินเวอเทสจะลดลง (ตารางภาพที่ 5) อินเวอเทสในปล้องของ P จะมี Activity เพิ่มขึ้นตั้งแต่อาทิตย์ที่ 11 และขึ้นสูงสุดในอาทิตย์ที่ 13 เท่ากับ 132 µg glucose/mg dry weight/hr. หลังจากอาทิตย์ที่ 13 อินเวอเทสจะมี Activity ลดลง (ตารางภาพที่ 6) Activity ของอินเวอเทสจะขึ้นสูงสุดทั้งใน P, P-1 และ P-2 เมื่อปล้องต่างๆเหล่านี้มีความยาวอยู่ระหว่าง 0.9 ± 0.1 เซนติเมตร ที่ความยาวของปล้องข้าวสั้นหรือยาวกว่านี้อินเวอเทสจะลดลง ซึ่งอินเวอเทสใน P จะมี Activity สูงกว่าใน P-1 และ P-2 มาก ซึ่งอินเวอเทสใน P-1 และ P-2 มีปริมาณใกล้เคียงกัน (ตารางภาพที่ 7) และจากการวัดปริมาณ reducing sugars ในปล้องของ P และ P-1 ที่ความยาวต่างกันพบว่า reducing sugars ใน P จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความยาวเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงที่ความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร อัตราการเพิ่ม reducing sugars ลดลง ส่วน reducing sugars ใน P-1 พบว่าในช่วงระยะ 1 เซนติเมตรแรกของความยาวของปล้อง

ข้าว reducing sugars เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และเมื่อความยาวมากกว่า 1.0 เซนติเมตร จนถึงประมาณ 2 เซนติเมตร อัตราการเพิ่ม reducing sugars จะลดลง และ reducing sugars ในปล้องของ P สูงกว่า ในปล้องของ P-1 (ตารางภาพที่ 8)

ตารางภาพที่ 4

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของ

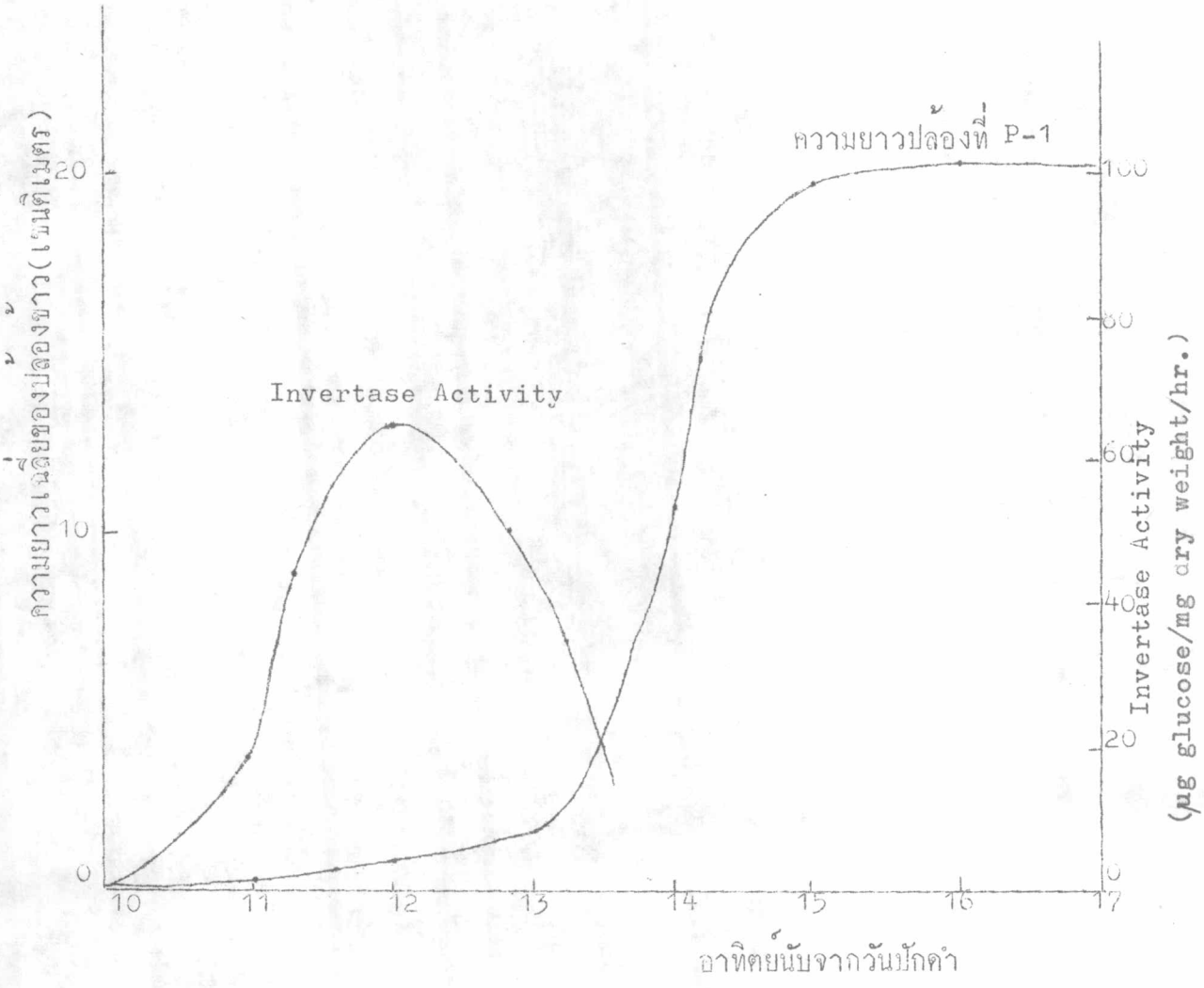
P-2 กับ Invertase Activity



ตารางภาพที่ 5

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของ

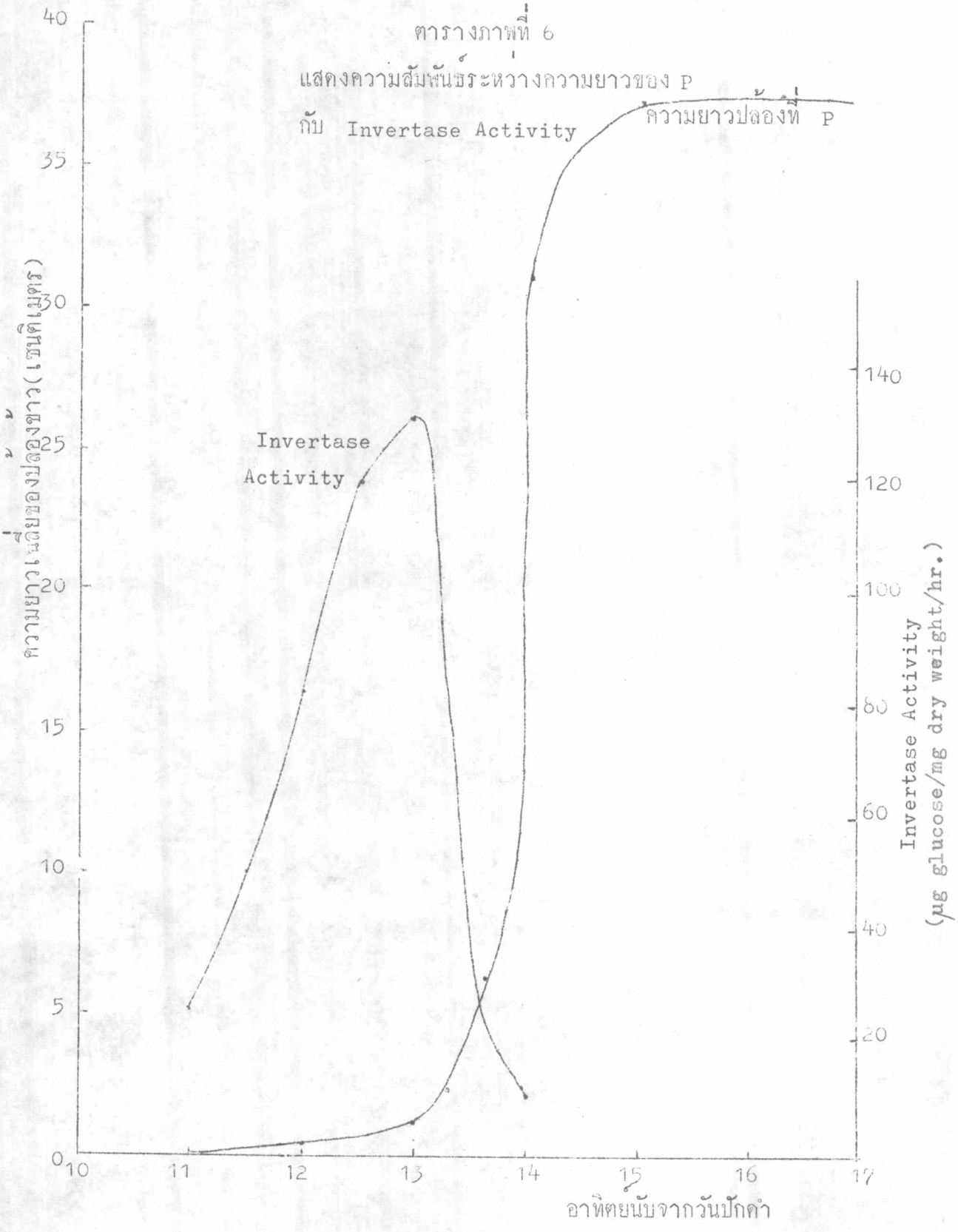
P-1 กับ Invertase Activity



ตารางภาพที่ 6

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของ P

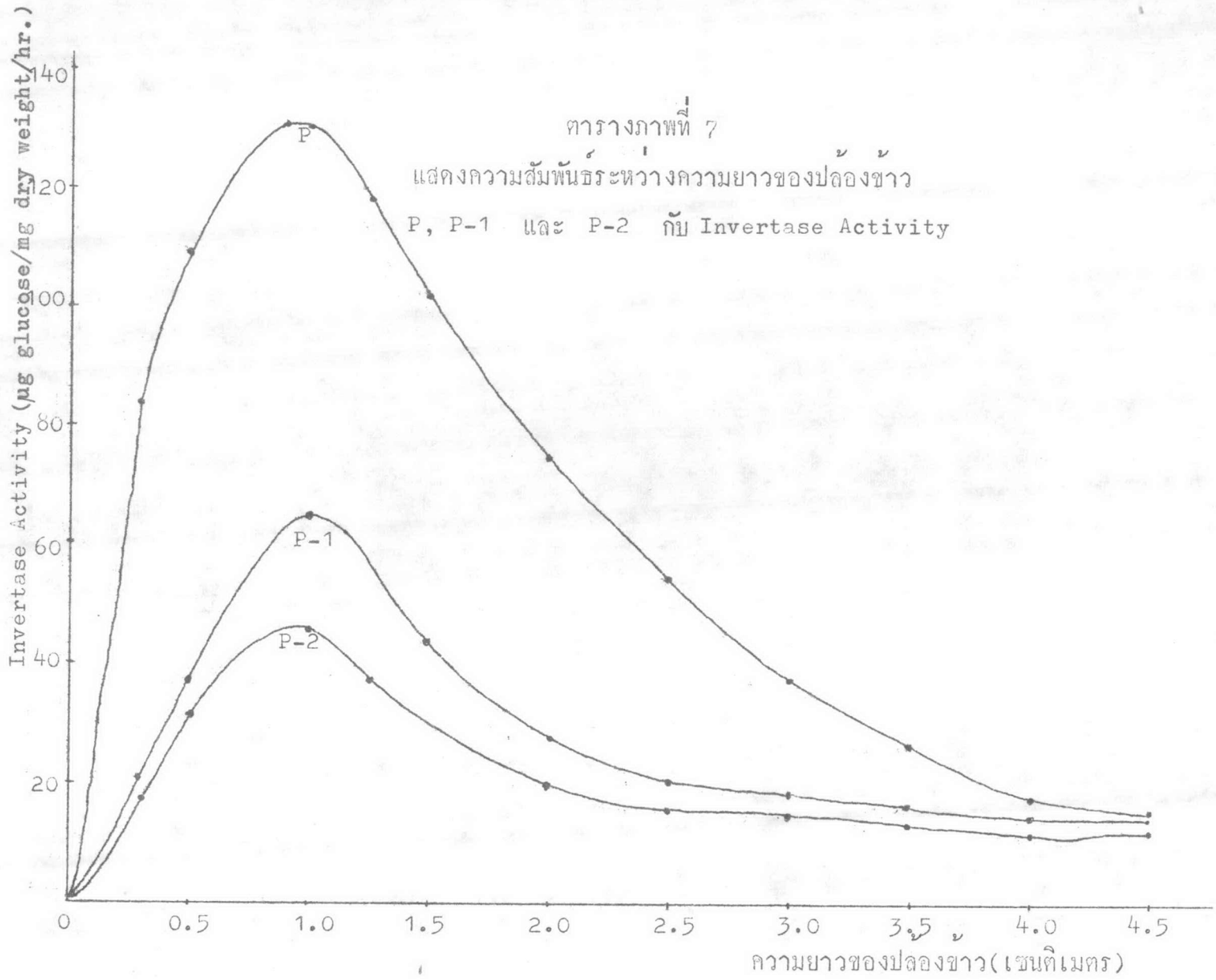
กับ Invertase Activity



I 15924270

ตารางภาพที่ 7

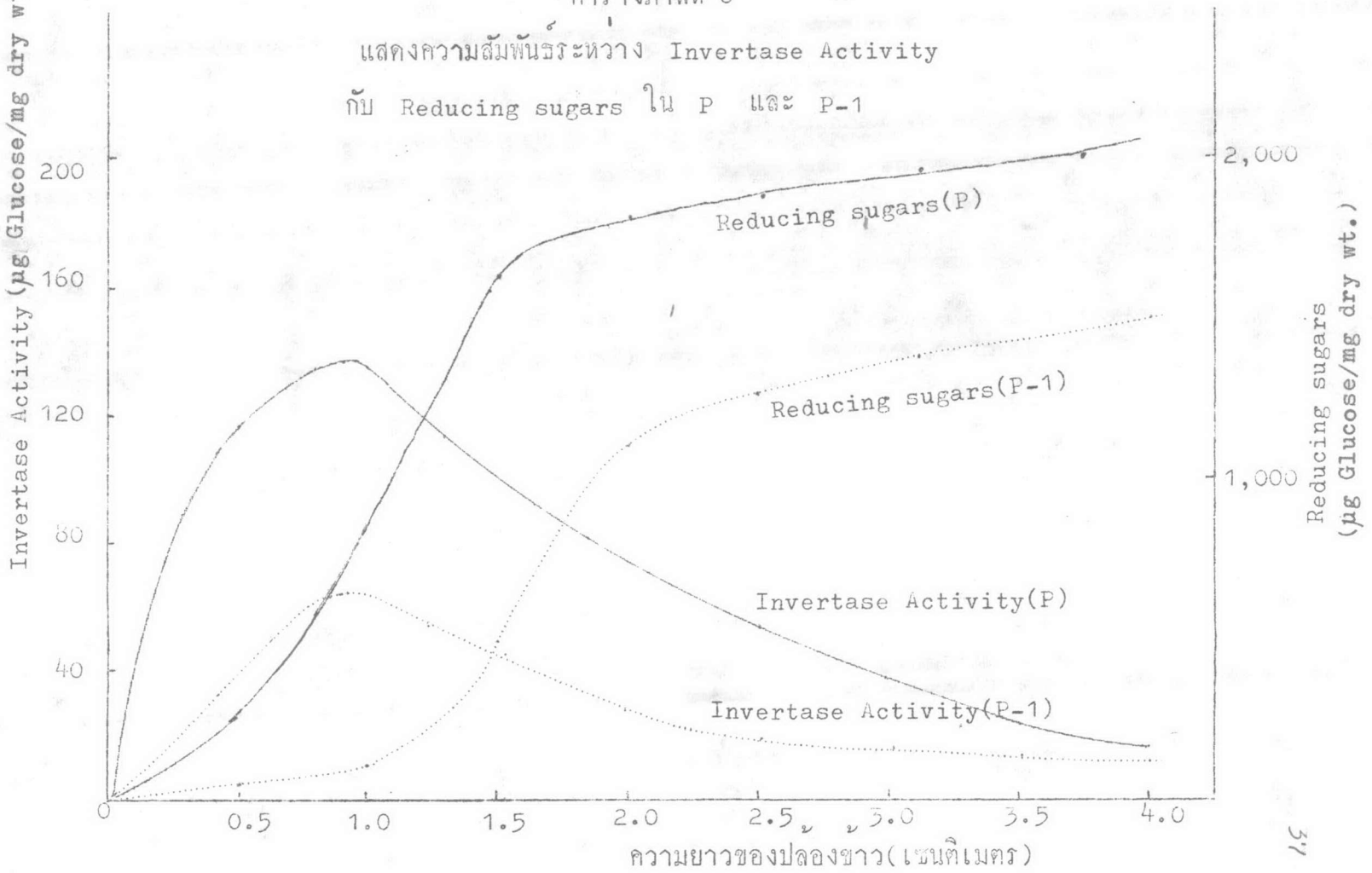
แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของปล้องข้าว P, P-1 และ P-2 กับ Invertase Activity



ตารางภาพที่ 8

แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Invertase Activity

กับ Reducing sugars ใน P และ P-1



3.5 การทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์

3.5.1 Dialysis

โดยวิธีนำ initial extract ที่สะกัดจากก้านชอดอก (P) ขนาด 0.9±0.1 เซนติเมตร ใส่ในถุง dialysing tube ขนาด 1 นิ้ว dialyse ใน citrate phosphate buffer pH 7.0 ในเวลา 1,3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 3-6 องศาเซนติเกรด ผลปรากฏในตารางที่ 4 แสดงว่าในเวลา 1 ชั่วโมง เกือบจะไม่มีความแตกต่างระหว่าง initial extract และ dialyzable ทั้ง Activity ของอินเวอเทสและปริมาณโปรตีน เมื่อ dialyse ต่อไปอีกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปรากฏว่า Activity ของอินเวอเทสสูงขึ้น ได้ yield 180 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า แต่ปริมาณโปรตีนลดลงจาก initial extract บ้างเล็กน้อย และเมื่อ dialyse ต่อไปอีกจนครบ 6 ชั่วโมง สามารถ dialyse น้ำตาลจาก initial extract ออกได้หมด เนื่องจากหลอดทดลองที่ใส่เอนไซม์ต้มแล้วลงไป เมื่อตรวจสอบ reducing sugars โดย Nelson-Somogyi Method จะไม่พบ reducing sugars อยู่ในหลอดทดลองนั้น Activity ของอินเวอเทสสูงขึ้น ได้ yield 225 เปอร์เซนต์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.16 เท่า แต่มีการสูญเสียโปรตีนไปจาก 0.51 mg/ml เหลือเพียง 0.365 mg/ml

ตารางที่ 4

ผลการ dialysis ของ initial extract

Procedure	Vol (ml)	Activity unit/ml	Total Activity	Protein mg/ml	Specific Activity	Yield %	Purification (Folds)
initial extract	10	1.5	15	0.510	2.94	100	1
Dialysis 1 ชม.	10	1.615	16.45	0.50	3.23	100	1.1
3 ชม.	10	2.15	21.5	0.45	4.8	180	1.6
6 ชม.	10	3.38	33.8	0.365	9.28	225.4	3.16

3.5.2 การทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การทำครั้งแรกได้ทดลองตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต fraction ละ 10 เปอร์เซนต์ ผลปรากฏว่า fraction ที่ 0-10 เปอร์เซนต์ ไม่มี Activity ของอินเวอเทสเลย ส่วน fraction ที่ 10-60 เปอร์เซนต์ พบว่าทุก fraction มี Activity ของอินเวอเทสอยู่ ซึ่ง fraction ที่ 30-40 เปอร์เซนต์ สามารถให้ yield สูงสุด 26.4 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.44 เท่า ส่วน fraction ที่ 20-30 และ 10-20 เปอร์เซนต์ ได้ yield สูงรองลงมาตามลำดับ แต่พบว่ามีความบริสุทธิ์น้อยกว่าความบริสุทธิ์ของ initial extract (ตารางที่ 5) นำ fraction ที่ได้ภายหลังจากตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตไป dialyse ใน citrate-phosphate buffer เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาหา Activity ของอินเวอเทส ดังในตารางที่ 6 ปรากฏว่า fraction ที่ 0-10 เปอร์เซนต์ ไม่พบ Activity ของอินเวอเทส และ fraction ที่ 10-60 เปอร์เซนต์ มี Activity ของอินเวอเทสเช่นเดียวกับที่พบใน fraction ที่ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตก่อน dialysis แต่มีข้อแตกต่างกัน คือ ที่ fraction 30-40 เปอร์เซนต์ พบว่าได้ yield สูงเพิ่มขึ้นเป็น 92.6 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์ถึง 5.83 เท่า และที่ fraction นี้ ให้ Total Activity และ Specific Activity สูงที่สุด ส่วน fraction ที่ 20-30 และ 40-50 เปอร์เซนต์ ได้ yield รองลงมาคือ 61 และ 7.4 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์ถึง 3.35 และ 1.26 เท่า ตามลำดับ

การทดลองต่อมาแบ่งการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น fraction ที่ 0-20, 20-45 และ 45-60 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ผลปรากฏว่า ที่ fraction 20-45 เปอร์เซนต์ มี Activity สูงกว่า fraction ที่ 0-20 และ 45-60 เปอร์เซนต์ ได้ yield 22.8 เปอร์เซนต์ แต่มีความบริสุทธิ์เพียง 0.61 เท่า (ตารางที่ 7) เมื่อนำ fraction เหล่านี้มา dialyse เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปรากฏว่า fraction ที่ 20-45 เปอร์เซนต์ ได้ yield สูง 133.4 เปอร์เซนต์ และมีความบริสุทธิ์ 4.2 เท่า ให้ Activity และ Specific Activity สูงที่สุด ส่วน fraction ที่ 0-20 และ 45-60 เปอร์เซนต์ มี Activity และ Specific Activity น้อยมากเมื่อเทียบกับ fraction ที่ 20-45 เปอร์เซนต์ เพราะฉะนั้น fraction ที่ 20-45 เปอร์เซนต์ จะใช้ในการศึกษา Enzyme Kinetics ต่อไป

ตารางที่ 5

ผลของการทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ตกตะกอนโปรตีนจาก initial extract fraction ละ 10% saturation

Procedure	Vol (ml)	Activity unit/ml	Total Activity	Protein (mg/ml)	Specific Activity	Yield %	Purification
initial extract	10	1.5	15	0.510	2.94	100	1
0-10%$(NH_4)_2SO_4$	3	0	0	0.055	-	-	-
10-20%$(NH_4)_2SO_4$	3	0.22	0.66	0.365	0.60	4.4	0.20
20-30%$(NH_4)_2SO_4$	3	0.92	2.76	0.420	2.19	18.4	0.74
30-40%$(NH_4)_2SO_4$	3	1.32	3.96	0.310	4.26	26.4	1.44
40-50%$(NH_4)_2SO_4$	3	0.14	0.42	0.105	1.33	2.8	0.45
50-60%$(NH_4)_2SO_4$	3	0.009	0.027	0.02	1.35	0.18	0.45

ตารางที่ 6

แสดงผลของการทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ตกตะกอนโปรตีนจาก initial extract fraction ละ 10 % saturation และ dialyse เวลา 3 ชั่วโมง

Procedure	Vol (ml)	Activity unit/ml	Total Activity	Protein (mg/ml)	Specific Activity	Yield (%)	Purification
initial extract	10	1.5	1.5	0.510	2.94	100	1
0-10%$(NH_4)_2SO_4$	3	0	0	0.035	-	-	-
10-20%$(NH_4)_2SO_4$	3	0.14	0.42	0.270	0.51	2.8	0.17
20-30%$(NH_4)_2SO_4$	3	3.05	9.15	0.310	9.84	61.0	3.35
30-40%$(NH_4)_2SO_4$	3	4.63	13.89	0.270	17.15	92.6	5.83
40-50%$(NH_4)_2SO_4$	3	0.37	1.11	0.100	3.7	7.4	1.26
50-60%$(NH_4)_2SO_4$	3	0.08	0.24	0.025	3.2	1.6	1.08

ตารางที่ 7

ผลของการทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

Procedure	Vol (ml)	Activity unit/ml	Total Activity	Protein (mg/ml)	Specific Activity	Yield (%)	Purification
initial extract	10	1.5	15	0.510	2.94	100	1
0-20%$(NH_4)_2SO_4$	3	0.37	1.11	0.500	0.74	7.4	0.25
20-45%$(NH_4)_2SO_4$	3	1.14	3.42	0.630	1.8	22.8	0.61
45-60%$(NH_4)_2SO_4$	3	0.09	0.27	0.060	1.5	1.8	0.51

ตารางที่ 8

ผลของการทำอินเวอเทสให้บริสุทธิ์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต หลังจาก dialysis เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Procedure	Vol (ml)	Activity unit/ml	Total Activity	Protein (mg/ml)	Specific Activity	Yield (%)	Purification
initial extract	10	1.5	15	0.510	2.94	100	1
0-20%$(NH_4)_2SO_4$	3	0.22	0.66	0.275	0.80	4.4	0.27
20-45% "	3	6.67	20.01	0.54	12.35	133.4	4.20
45-60% "	3	0.14	0.42	0.050	2.8	2.8	0.95

3.6 Enzyme Kinetics

3.6.1 ผลของเวลาที่ใช้ในการ incubate

ในการทดลองเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้วัด Activity ของอินเวอเทสโดยการ incubate ด้วย 0.05 M sucrose, pH 3.4 อุณหภูมิ 50 องศาเซนติเกรด เริ่มวัด Activity ของอินเวอเทส เมื่อ incubate ไว้ 15 นาที จนถึง 7 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในตารางภาพที่ 9 การทดลองของอินเวอเทสในระยะเวลา 2 ชั่วโมงแรก จะมีอัตราการเพิ่ม Activity คงที่ แต่หลังจาก 2 ชั่วโมงแล้ว อัตราการเพิ่ม Activity ของอินเวอเทสจะลดลง

ดังนั้นควร incubate เอนไซม์อินเวอเทสให้เกิดปฏิกริยาภายในเวลา 2 ชั่วโมง ในการทดลองศึกษาเอนไซม์อินเวอเทสทั้งหมด incubate ไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.6.2 ผลของ pH ต่อ Invertase Activity

การทดลองศึกษา Invertase Activity ที่ pH ต่าง ๆ โดยใช้ citrate-phosphate buffer ตั้งแต่ pH 2.8 ถึง pH 6.0 โดยใช้ความเข้มข้นของ sucrose 0.05 M ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซนติเกรด นั้น ได้ผลดังในตารางภาพที่ 10 จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าอินเวอเทสมี Activity สูงที่สุดระหว่าง pH 3.4-4.0 ซึ่งถือเป็น optimum pH ของอินเวอเทสในข้าวเจ้าพันธุ์ ก.ข.1 นี้ ดังนั้น ในการทดลองทั้งหมด จึงใช้ pH ที่ 3.4 วัดปฏิกริยาการทำงานของอินเวอเทส

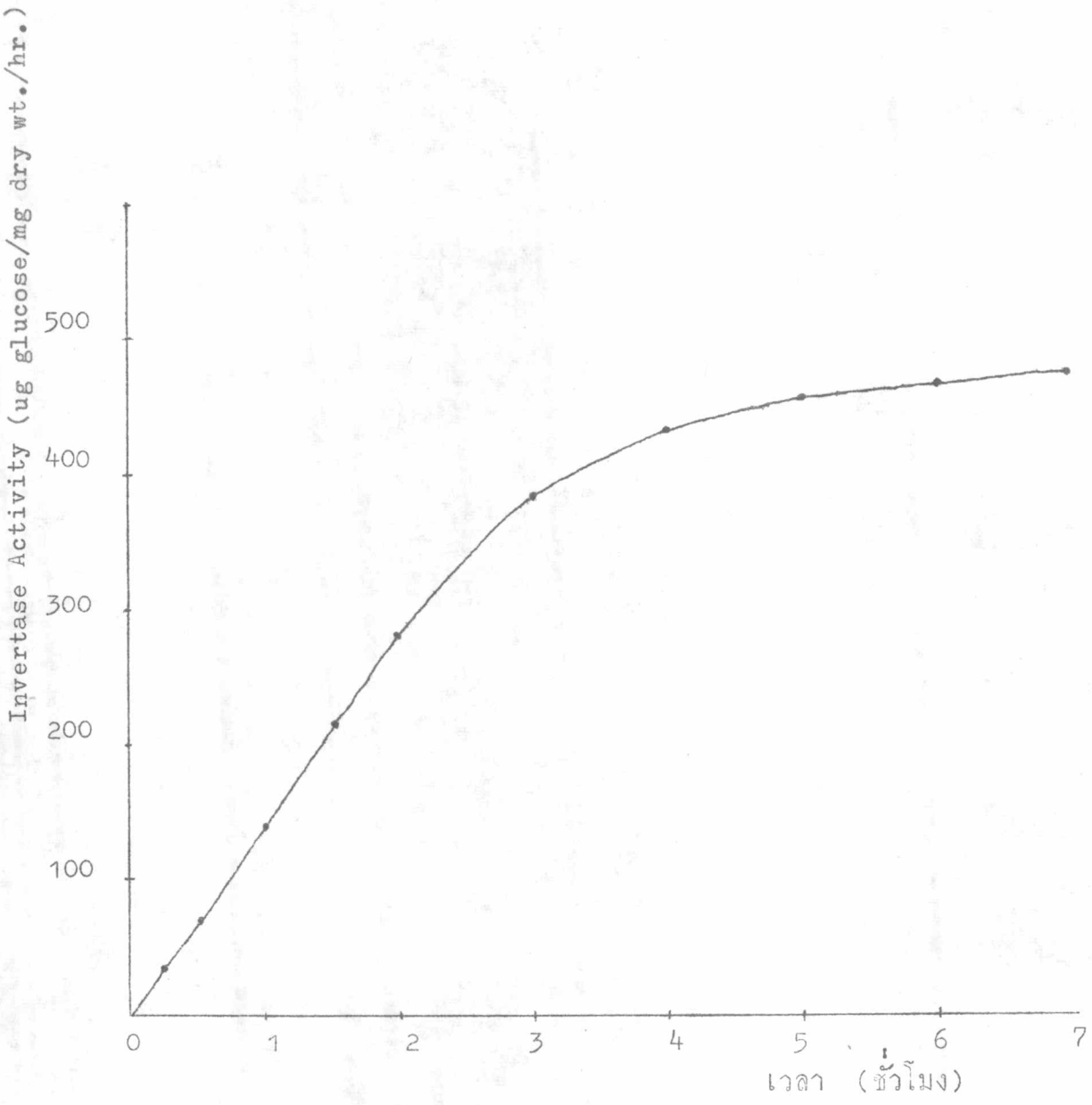
ตารางภาพที่ 9

แสดงผลของ incubation time

ต่อ Invertase Activity

ทดลองที่ pH 3.4 อุณหภูมิ 50 องศาเซนติเกรด

ความเข้มข้นของ substrate 0.05 M

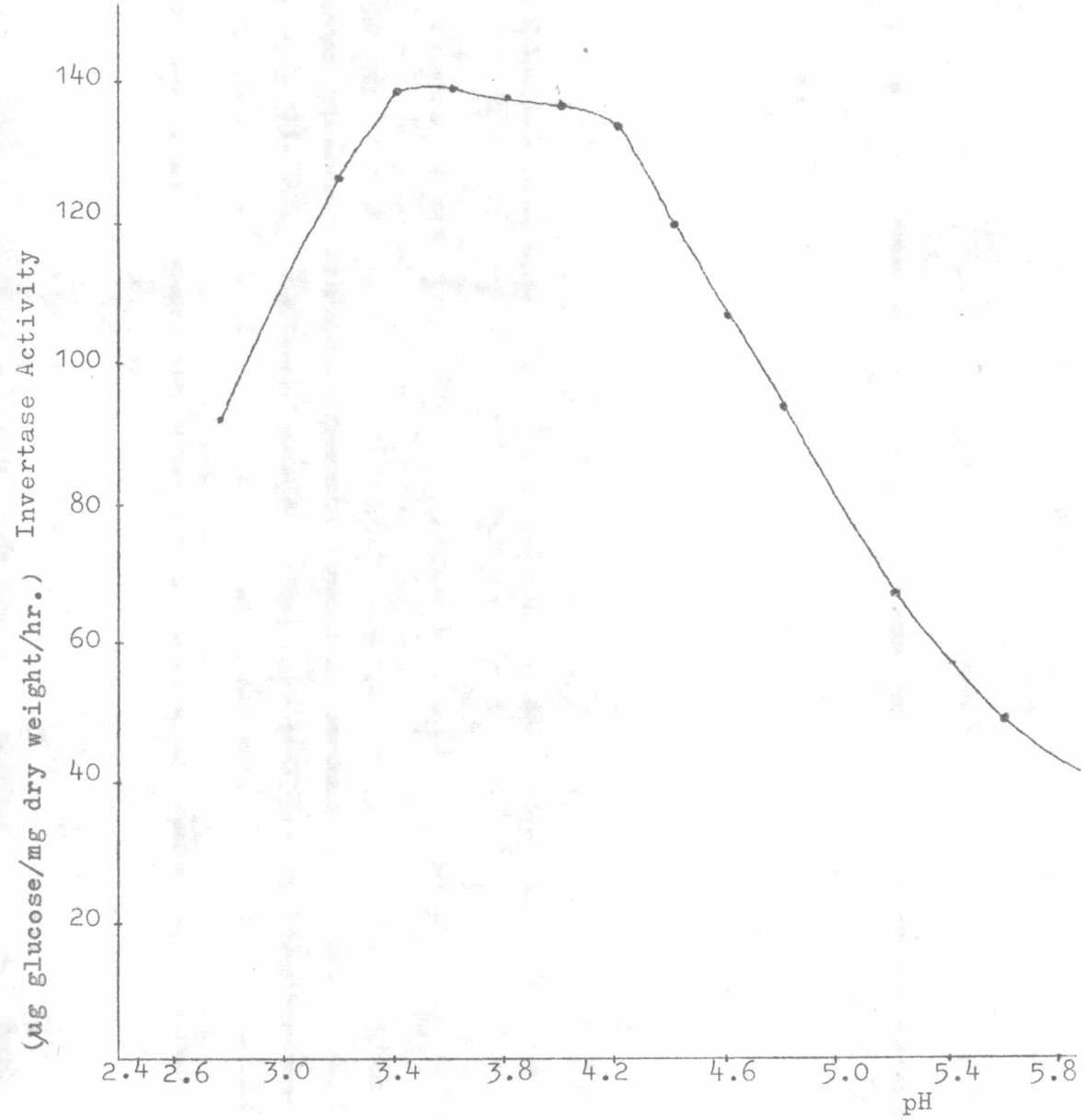


ตารางภาพที่ 10

แสดงผลของ pH ต่อ Invertase Activity

วัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซนติเกรด ความเข้มข้นของ

substrate 0.05M ในเวลา 1 ชั่วโมง



3.6.3 ผลของอุณหภูมิต่อ Invertase Activity

โดยวิธีการ ศึกษา Activity ของอินเวอเทสที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 10 ถึง 70 องศาเซนติเกรด เมื่อทดลองใช้ sucrose ที่ความเข้มข้น 0.05 M, pH 3.4 ในเวลา 1 ชั่วโมง จะพบว่าอินเวอเทสมี Activity สูงสุดที่อุณหภูมิระหว่าง 45-50 องศาเซนติเกรด และที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ Activity ของอินเวอเทสจะลดลง (ตารางภาพที่ 11)

3.6.4 ผลความเข้มข้นของ Substrate ต่อ Invertase Activity

โดยนำ substrate ที่เลือกใช้ในการทดลองนี้ คือ sucrose ศึกษาที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.01 M ถึง 0.5 M แล้ววัด Activity ของอินเวอเทสที่ pH 3.4 อุณหภูมิ 50 องศาเซนติเกรด ในเวลา 1 ชั่วโมง Activity ของอินเวอเทสจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ sucrose และ Activity ของอินเวอเทสจะคงที่เมื่อความเข้มข้นของ sucrose เท่ากับ 0.1 M เป็นต้นไป (ตารางภาพที่ 12) ความเข้มข้นของ sucrose เริ่ม saturation ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05 M ในการทดลองศึกษาคุณสมบัติของอินเวอเทส ใช้ sucrose เป็น substrate ที่ความเข้มข้น 0.05 M

[S] = sucrose concentration

velocity = v = Total Activity ของอินเวอเทส

หลังจากนั้นนำ $\frac{1}{[S]}$ กับ $\frac{1}{v}$ มาเขียนกราฟโดยวิธีของ Lineweaver and Burk's Plot เพื่อคำนวณหาค่า Michaelis-Menten Constant (Km) จะได้ผลดังตารางภาพที่ 13

$$\text{Intercept} = \frac{1}{V_{max}} = 3.5 \times 10^{-3} \text{ unit}^{-1}$$

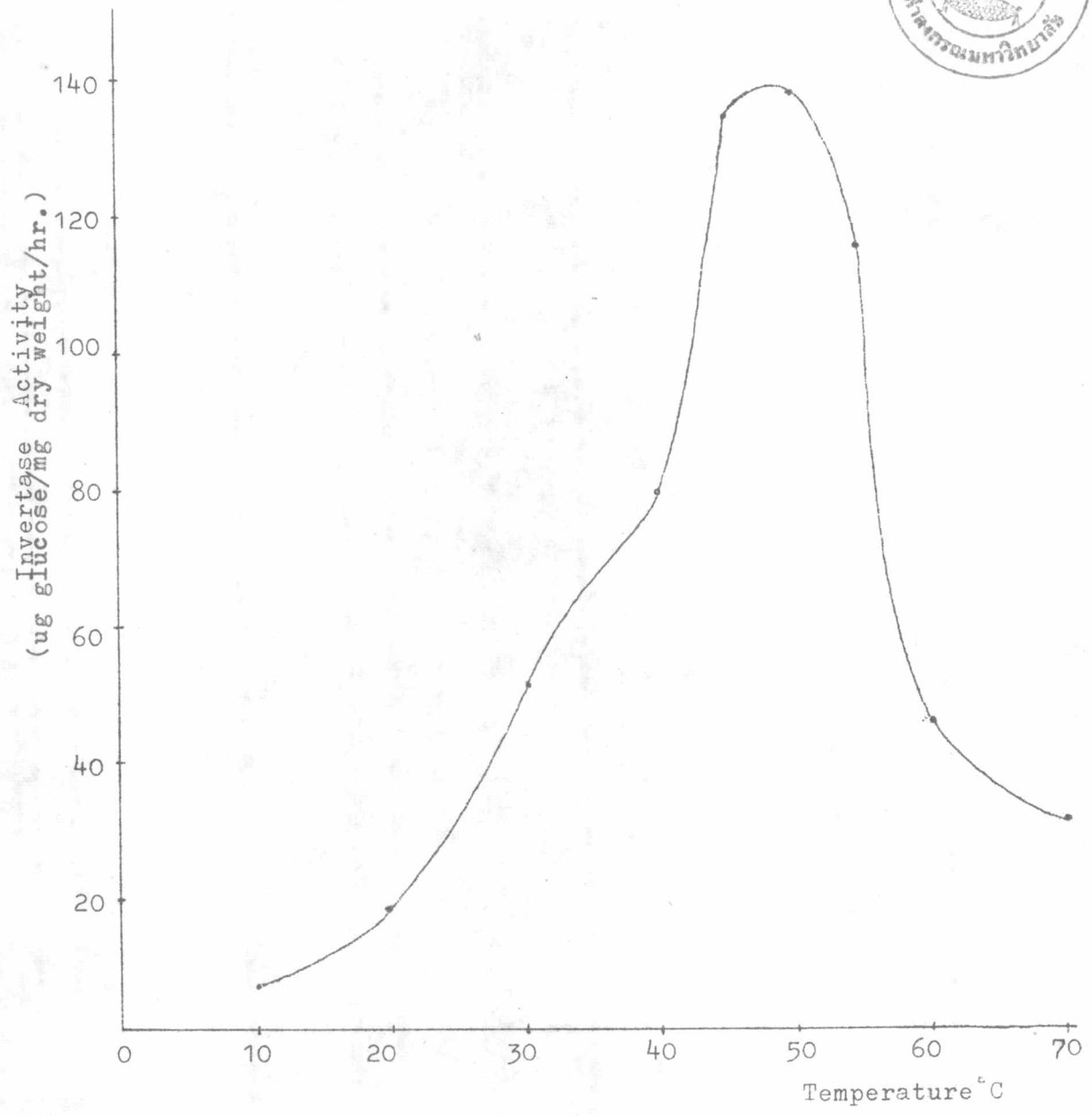
$$\therefore V_{max} = 285.7 \text{ unit}$$

$$\text{slope} = \frac{K_m}{V} = 1.15 \times 10^{-4}$$

$$\therefore \text{Michaelis-Menten Constant } (K_m) = 33 \times 10^{-3} \text{ M}$$

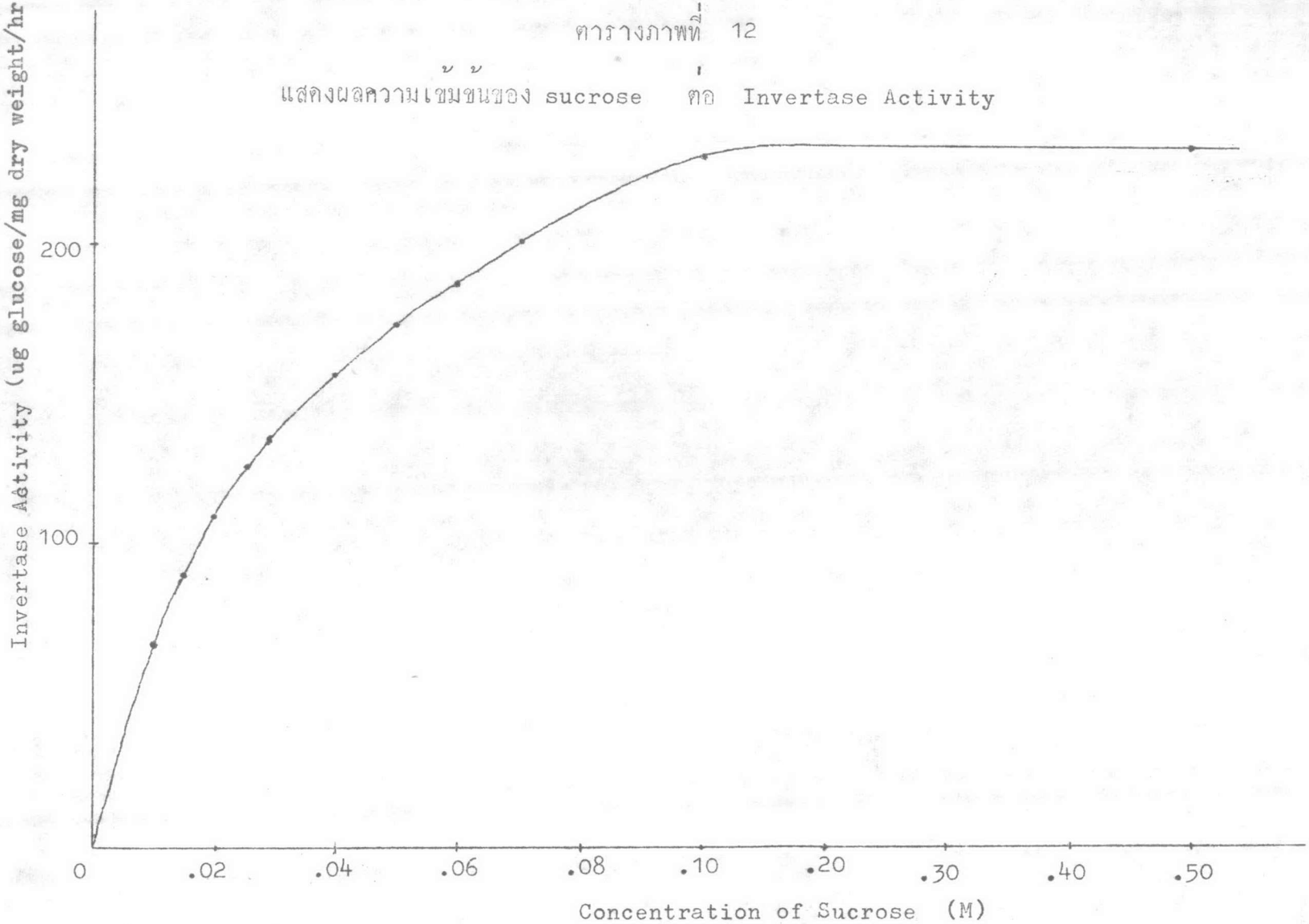
ตารางภาพที่ 11

แสดงผลของอุณหภูมิ ต่อ Invertase Activity
วัดปฏิกริยาที่ pH 3.4 ความเข้มข้นของ substrate 0.05 M
ในเวลา 1 ชั่วโมง



ตารางภาพที่ 12

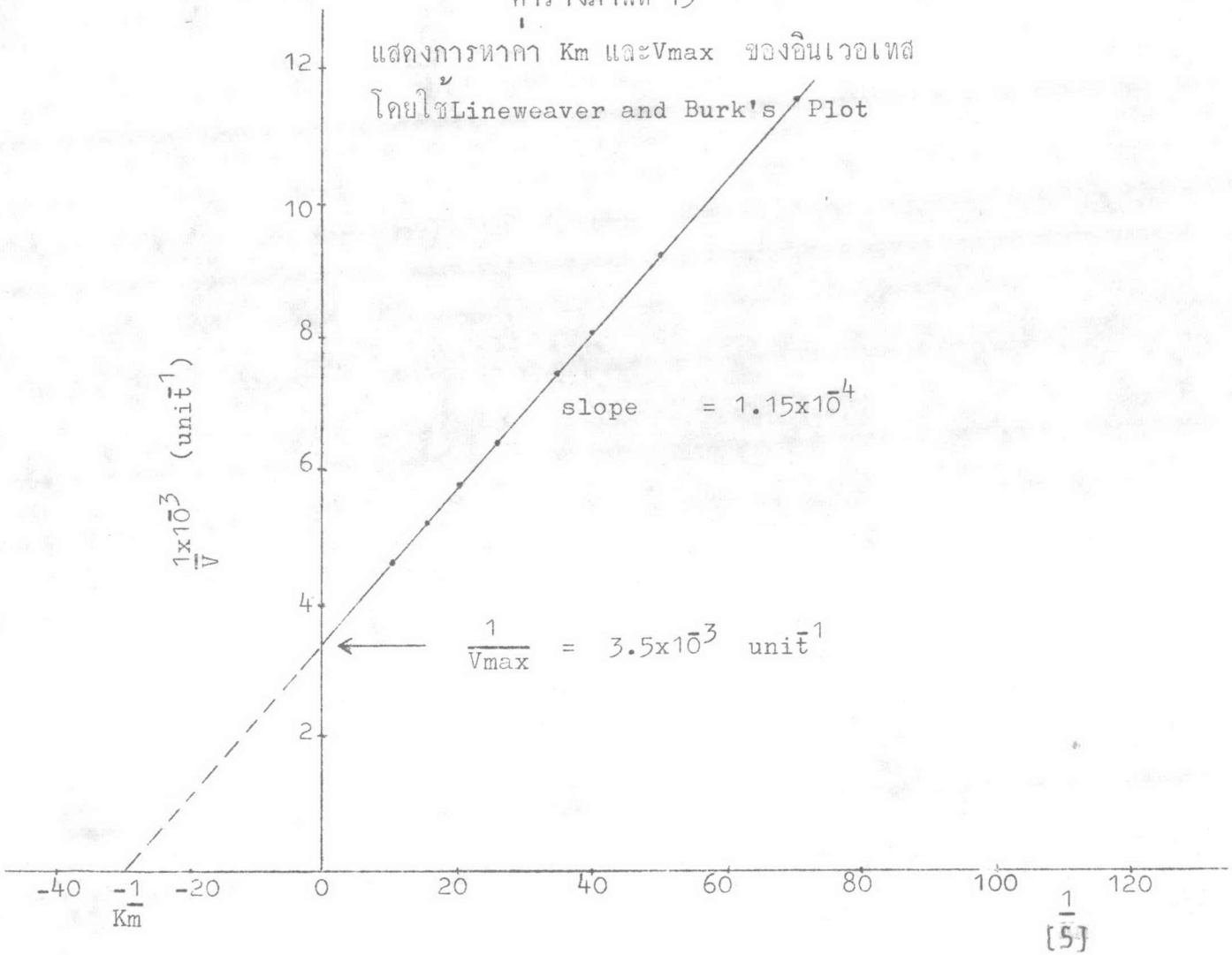
แสดงผลความเข้มข้นของ sucrose ต่อ Invertase Activity



ตารางภาพที่ 13

แสดงการหาค่า Km และ Vmax ของอินเวอเทส

โดยใช้ Lineweaver and Burk's Plot



3.6.5 ผลความเข้มข้นของ Glucose ต่อการทำงานของอินเวอเทส

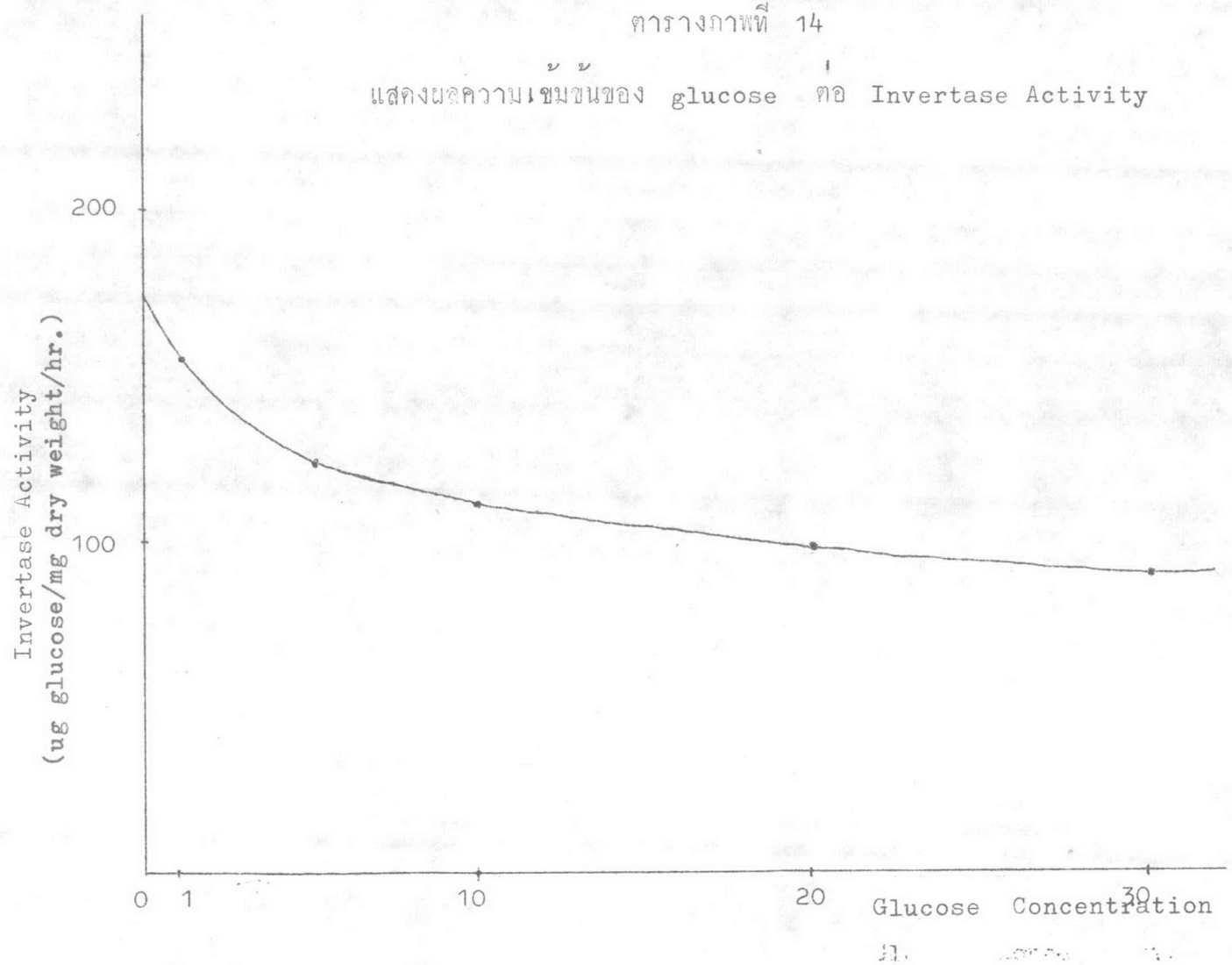
การทำงานของอินเวอเทส เมื่อเติมในสารละลาย glucose ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 1 X 1^{-4} M, 5 X 10^{-4}M, 10 X 10^{-4}M, และ 20 X 10^{-4}M เมื่อความเข้มข้นของ glucose สูงขึ้นจะไปยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสมากขึ้น (ตารางที่ 9) และ glucose ทุกความเข้มข้นจะไปยับยั้งการทำงานของอินเวอเทสทั้งสิ้น แต่การทดลองไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นได้มากกว่านี้ เนื่องจากการวัด **reducing** sugars โดยวิธี Nelson-Somogyi Method สามารถวัด glucose ที่ความเข้มข้นได้เพียง 300 µg ต่อ 1มิลลิเมตร ถ้าความเข้มข้นของ glucose สูงกว่า 300 µgก็ไม่สามารถอ่านค่า Klett Reading จาก Klett Summerson ได้โดยตรง ต้องมาทำให้เจือจางก่อนซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยากและมีข้อผิดพลาดได้ง่าย

ตารางที่ 9 แสดงผลความเข้มข้นของ Glucose ต่อ Invertase Activity

Glucose concentration (M)	Invertase Activity µg glucose/mg dry wt./hr.
0	177
1 X 10^{-4}	156.9
5 X 10^{-4}	121.4
10 X 10^{-4}	111
20 X 10^{-4}	98
30 X 10^{-4}	91

ตารางภาพที่ 14

แสดงผลความเข้มข้นของ glucose ต่อ Invertase Activity



3.6.6 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารบางชนิดที่เป็นตัวห้ามของอินเวอเทส

สารที่ใช้ศึกษาตัวห้ามการทำงานของอินเวอเทส มีหลายสารด้วยกัน แต่ละสารมีความสามารถในการยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างกัน เป็นต้นว่า

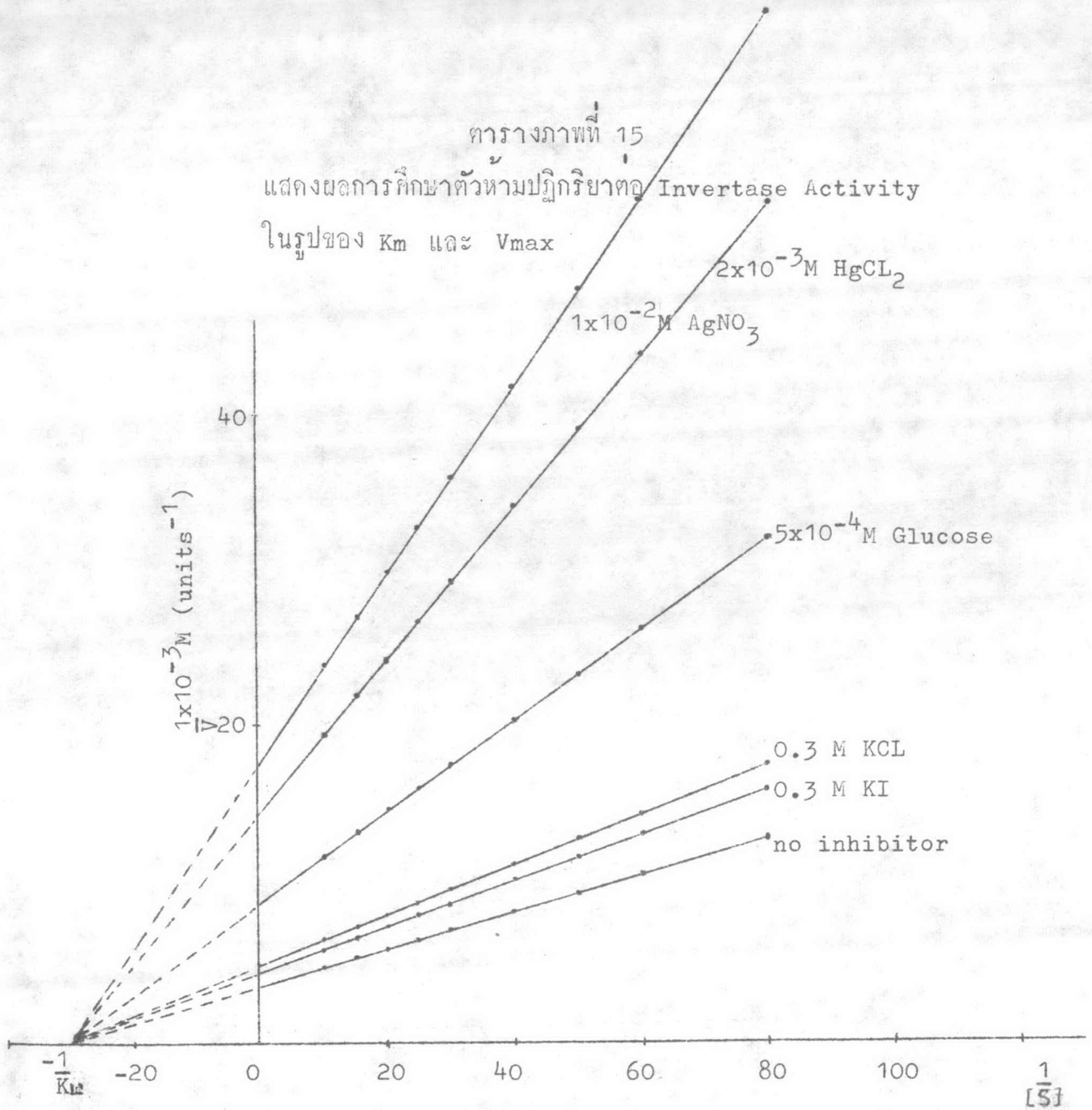
silver nitrate ($AgNo_3$)	1×10^{-2} M.
mercuric chloride ($HgCl_2$)	2×10^{-3} M.
glucose ($C_6H_{12}O_6$)	5×10^{-4} M.
potassium chloride (KCl)	0.3 M.
potassium iodide (KI)	0.3 M.

สารต่างๆ ที่ใช้เป็นตัวห้ามปฏิกริยานี้ แสดงในรูปของ Lineweaver and Burk's Plot หาค่า Km และ Vmax (ตารางภาพที่ 15) Km ของ sucrose ไม่เปลี่ยนแปลง มีค่าเท่ากันกับเมื่อไม่ได้ใส่สารที่เป็นตัวห้ามเหล่านี้ เท่ากับ 33×10^{-3} M. แต่ค่า Vmax ลดลงแล้วแต่ชนิดของสารและความเข้มข้นของสารที่เป็นตัวห้ามปฏิกริยา ซึ่งมี % inhibition ต่างกัน (ตารางที่ 10)

ตารางภาพที่ 15

แสดงผลการศึกษาตัวห้ามปฏิกริยาต่อ Invertase Activity

ในรูปของ Km และ Vmax



ตารางที่ 10 แสดงผลของตัวห้ามปฏิกริยาอินเวอเทสในรูป Km และ Vmax

สารที่ทดลอง	Km (M)	Vmax	% inhibition
no inhibitor	33×10^{-3}	285.7	0
1×10^{-2}M $AgNO_3$	33×10^{-3}	55.5	86.7
2×10^{-3}M $HgCL_2$	33×10^{-3}	68.5	83.9
5×10^{-4}M Glucose	33×10^{-3}	113.6	72.8
0.3 M KCL	33×10^{-3}	208.3	51.2
0.3 M KI	33×10^{-3}	227.2	44.5