บทบาทของเอนไซม์ acid invertase ที่มีต่อเมแทบอลิซึมของน้ำตาลในอ้อยในช่วงก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว

วัฒนชัย ล้นทม*

บทคัดย่อ

Acid invertase เป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทส โดยคาดว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสะสมและสลายน้ำตาลซูโครสในปล้องอ้อยในระยะสุกแก่และหลังการเก็บเกี่ยวตามลำดับ ดังนั้นเพื่อศึกษาบทบาทของเอนไซม์ acid invertase ระหว่างสภาวะดังกล่าว การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณน้ำตาล และการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอนำรหัสและโปรตีนในปล้องของอ้อยพันธุ์ K84-200 และ K88-92

ปลูกอ้อยพันธุ์ K84-200 และ K88-92 ที่แปลงทดลองของบริษัท มิตรผลวิจัย พัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด จังหวัดชัยภูมิ ในปี พ.ศ. 2548/49 และ 2549/50 ในระหว่างระยะสุกแก่ของอ้อย (ปลายเดือนตุลาคมถึงต้นเดือนมีนาคม) ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ soluble acid invertase (SAI) และ cell wall acid invertase (CWI) รวมทั้งปริมาณน้ำตาลและการเจริญของต้นปฐมภูมิที่ได้รับการติดเครื่องหมาย ผลการทดลองพบว่าปล้องที่เจริญในช่วงท้ายของฤดูปลูกสุกแก่ที่ค่าความร้อนสะสมน้อยกว่าปล้องที่เจริญในช่วงต้นของฤดูปลูก โดยปล้องดังกล่าวมีความยาว น้ำหนักแห้งและปริมาณน้ำน้อยกว่าปล้องที่เจริญในช่วงต้น แต่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสและสัดส่วนระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อปริมาณน้ำตาลรวมสูงกว่า เมื่อปล้องของอ้อยแก่มากขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ SAI ลดลงตามลำดับ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ CWI กลับมีการเปลี่ยนแปลงที่มีรูปแบบไม่ชัดเจน นอกจากนั้นยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างยิ่งยวดกับปริมาณน้ำตาลซูโครสและสัดส่วนระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสต่อปริมาณน้ำตาลรวม

หลังจากเก็บเกี่ยวอ้อยที่ปลูกในปี 2549/50 แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C และอุณหภูมิของอากาศโดยรอบซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ 70-75% เป็นเวลา 15 วัน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อการสลายของน้ำตาลซูโครสและการสูญเสียน้ำหนักของอ้อย โดยลำอ้อยที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิของอากาศโดยรอบเป็นเวลานาน มีการสูญเสียน้ำหนักและน้ำตาลซูโครส รวมทั้งมีการเพิ่มของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และกิจกรรมของเอนไซม์ SAI มากกว่า ลำอ้อยที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 ^{o}C นอกจากนั้นที่อุณหภูมิของอากาศโดยรอบยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SAI มีความสัมพันธ์อย่างมากกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง โดยการสลายของน้ำตาลซูโครสเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ SAI ที่เพิ่มขึ้น

การศึกษาการแสดงออกของยีน SAI และ CWI ในปล้องของอ้อยด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR, quantitative real time RT-PCR และ immunoblotting พบว่าการแสดงออกของยีน SAIเปลี่ยนแปลงไปตามระยะการเจริญเติบโตของอ้อยในระหว่างการสุกแก่ โดยระดับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอนำรหัสและโปรตีนลดลงเมื่อปล้องแก่มากขึ้น ยีน SAI มีการแสดงออกน้อยมากในวันที่ทำการเก็บเกี่ยว แต่กลับเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิของอากาศโดยรอบ ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระดับของอาร์เอ็นเอนำรหัส ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของ

---

* ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 167 หน้า.

เอนไซม์ SAI สอดคล้องกับสมมติฐานที่กล่าวว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ SAI ในปล้องของอ้อยระหว่างระยะสุกแก่และหลังการเก็บเกี่ยวเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน SAI ถึงแม้ว่าการแสดงออกของยีน CWI จะมีรูปแบบที่ไม่ชัดเจนแต่ก็ดูเหมือนว่ายีนดังกล่าวมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อปล้องแก่มากขึ้น แล้วลดลงในปล้องที่แก่จัด แต่กลับเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งหลังการเก็บเกี่ยว อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน CWI กับกิจกรรมของเอนไซม์

ผลการทดลองในเชิงสรีรวิทยา ชีวเคมี และชีวโมเลกุลของเอนไซม์ acid invertase จากงานวิจัยนี้ สนับสนุนและให้ข้อมูลเพิ่มเติมแก่งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์ acid invertase ในอ้อยระหว่างการสะสมน้ำตาลซูโครสในระยะสุกแก่และการสลายของน้ำตาลซูโครสหลังการเก็บเกี่ยว

The Roles of Acid Invertases in Pre- and Post-Harvest Sugar Metabolism in Sugarcane

Watanachai Lontom*

Abstract

Acid invertases (β-fructofuranosidase) are known to hydrolyze sucrose into glucose and fructose. They have been suggested to be key enzymes in sucrose accumulation during ripening and sucrose breakdown during storage of sugarcane. In order to investigate the critical roles of acid invertases during these conditions, experiments were carried out to examine the relationships among enzyme activities, sugar concentrations and gene expression at the mRNA and protein levels in the internodes of K84-200 and K88-92 sugarcane cultivars.

Sugarcane plants were grown at the experimental field of Mitr Phol Sugarcane Research Center in Chaiyaphum province, Thailand in 2005/06 and 2006/07. During the ripening period (late October to early March), the activities of soluble acid invertase (SAI) and cell wall acid invertase (CWI), sugar concentrations and development of internodes of the tagged primary stalks were investigated. The results showed that the internodes developing late in the growing season ripened in a fewer accumulative heat units than those developing early in the season. The late-developing internodes were shorter in length, accumulated fewer dry weight and water content, but had higher mean sucrose content and the sucrose: total sugar ratio. SAI activity decreased with increasing internode maturity, whereas CWI activity fluctuated. Moreover, SAI activity had a highly negative relationship with sucrose concentration and the sucrose: total sugar ratio. Conversely, it was positively related to reducing sugar concentration.

After the stalks of the 2006/07 crop were harvested, they were kept at 25 ^{o}C and ambient temperature with 70-75% relative humidity for 15 days. It is evident that SAI activity as well as storage temperature and duration affected their sucrose degradation and weight loss. The canes stored longer at ambient temperature lost more weight and sucrose, and had higher reducing sugar content and SAI activity than those kept at 25 ^{o}C. At ambient temperature, SAI activity had a strong relationship with sucrose and reducing sugar levels. Therefore, it can be concluded that storage temperature and duration had significant influence on the metabolic changes in sugars and related enzyme activities. The degradation of sucrose in stored sugarcane stalks was governed via the hydrolysis by SAI.

A study on the expression of SAI and CWI genes in sugarcane internodes by semi-quantitative RT-PCR, quantitative real time RT-PCR and immunoblotting revealed that the SAI gene was developmentally regulated during internode ripening. The mRNA and protein levels decreased with internode maturation. During postharvest storage at ambient temperature, the SAI transcripts and protein in sugarcane internodes were barely detectable at harvest. However, they increased rapidly after harvest and remained high during storage. The positive relationships among the enzyme activities, mRNA and protein levels support the hypothesis that the change in SAI activity both in the ripening

---

* Doctor of Philosophy (Biology), Faculty of Science, Khon Kaen University. 167 pages.

and postharvest periods are, at least in a large part, due to the change in the expression at mRNA and protein levels. The expression of CWI gene during ripening appeared to follow the trend with a low level in the young internode, a higher level in the maturing internode and the lowest level in the ripened internode. On the other hand, the CWI transcripts increased in the internodes stored at ambient temperature for not longer than 15 days. However, the relationship between the CWI mRNA level and enzyme activity was not observed.

The results on the physiological, biochemical and molecular biology aspects of acid invertases in sugarcane internodes support and expand the earlier research on the roles of invertases in sucrose accumulation and breakdown in sugarcane stalks during the ripening and postharvest periods.