การแยกเอนไซม์อะซิติล-โคเอ คาร์บอกซิเลสจากผลปาล์มน้ำมัน

Isolation of Acetyl-CoA Carboxylase from Fruit of Oil Palm (*Elaeis guineensis*)

ประสงค์ สุขจิตฐานนท์
Prasong Sukjitthanon

เลขหมู่ QK898.E58 ป46 2539 ฉ.2
Order Key 28940
Bib Key 98054 ✓
1 9 ก.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences
Prince of Songkla University
2539

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกเอนไซม์อะซิติล-โคเอ คาร์บอกซิเลสจากผลปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นายประสงค์ สุขจิตฐานนท์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

...........................ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์)

...........................กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)

คณะกรรมการสอบ

...........................ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์)

...........................กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)

...........................กรรมการ
(ดร. รพีพร โสตถิพันธุ์)

...........................กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีระ เอกสมทราเมษฐ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

....
(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยกเอนไซม์อะซิติล-โคเอ คาร์บอกซิเลสจากผล ปาล์มน้ำมัน
ผู้เขียน	นายประสงค์ สุขจิตฐานนท์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา	2538

ห้องสมุด คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
ได้รับจาก
19 ก.ค. 2543
วันที่ เดือน พ.ศ.

บทคัดย่อ

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ปาล์มมีการสังเคราะห์ไขมันและเก็บสะสมไว้ในผล การสังเคราะห์ไขมันที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ ถูกควบคุมโดยเอนไซม์อะซิติล-โคเอ คาร์บอกซิเลส (acetyl-CoA carboxylase, ACC) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแรกของวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน

การสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์มได้ผลดีเมื่อใช้บัฟเฟอร์สกัดที่มี 0.2% Triton X-100 ตามด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 60% ปาล์มที่ใช้ในการศึกษามี 3 พันธุ์ คือ เทเนอรา ดูราและพิสิฟิรา ปาล์มพันธุ์เทเนอรามีแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันสูงกว่าพันธุ์พิสิฟิราและพันธุ์ดูรา ตามลำดับ แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันของผลปาล์มพันธุ์เทเนอรามีค่าเพิ่มขึ้นตามอายุการสุกของผล จนมีค่าสูงสุดเมื่อผลอายุ 4 เดือน เอนไซม์ ACC ในผลปาล์มและของสารสกัดปาล์มมีความเสถียรนาน 1 ปี เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ

การแยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์ม ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-150 แยกได้เอนไซม์ ACC 2 รูปแบบ คือ พีค S1 และพีค S2 ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 77.7 และ 27.3 เท่าตามลำดับ เอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 ปรากฏโปรตีน 5 และ 4 แถบตามลำดับ ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบ

เฉพาะโปรตีน 1 แถบ ของเอนไซม์พีค S1 และพีค S2 ที่มีแอคทิวิตีและมีน้ำหนักโมเลกุล 126,000 และ 33,000 ดัลตัน ตามลำดับ เอนไซม์ ACC ทั้ง 2 พีคนี้ มีน้ำหนักโมเลกุล 126,000 และ 36,000 ดัลตัน ตามลำดับ เมื่อหาโดยวิธีเจล ฟิลเตรชัน

เอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 8 และ 6 ตามลำดับ เอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 แสดงจลนศาสตร์แบบซิกมอยด์สำหรับอะซิติล-โคเอ ซึ่งมีค่า $K_{0.5}$ เป็น 15 μM และ 17 μM ตามลำดับ และมีจลนศาสตร์แบบ Michaelis-Menten สำหรับ ATP และ $NaHCO_3$ ซึ่งมีค่า K_m ของ ATP ต่อเอนไซม์พีค S1 และพีค S2 เป็น 28 μM และ 0.8 mM ตามลำดับ และของ $NaHCO_3$ เป็น 4.8 mM และ 20 mM ตามลำดับ

ทั้ง EDTA และ NaCl ยกเว้น KCl ยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 $MgCl_2$ กระตุ้นเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 ได้แอคทิวิตีจำเพาะสูงสุดที่ความเข้มข้นต่ำกว่า $MnCl_2$ ทั้งซิเตรทและไอโซซิเตรทเป็นตัวกระตุ้นที่ดี ในขณะที่อะวิดินเป็นตัวยับยั้งที่ไม่ดี ซึ่งยับยั้งเอนไซม์ ACC พีค S1 ได้ 5% ที่ 50 μM และพีค S2 ได้ 17% ที่ 20 μM

Thesis Title	Isolation of Acetyl-CoA Carboxylase from Fruit of Oil Palm (*Elaeis guineensis*)
Author	Mr. Prasong Sukjitthanon
Major Program	Biological Sciences
Academic Year	1995

Abstract

Oil palm is an important economic plant of Thailand. Besides being used for cooking, palm oil is widely utilized in many areas of industries. Fats are synthesized and stored in oil palm fruits. The biosynthesis of fatty acid-derived fats is normally regulated by acetyl-CoA carboxylase (ACC), the enzyme catalyzes the first reaction of fatty acid biosynthetic pathway.

In this study, ACC was extracted from mesocarp of the oil palm fruit. The maximal activity of the enzyme was obtained when it was extracted in the buffer containing 0.2% Triton X-100 followed by 60% saturated ammonium sulphate precipitation. The ACC activity in oil palm fruits of three different varieties namely tenera, dura and pisifera were compared. Among them, tenera possessed highest specific ACC activity and fat content. Both parameters increased relatively to the ripening stage of fruit. The maximal values were found in 4 month-old fruits. ACC in both fruit and palm extract was stable at -70°C for at least 1 year.

Isolation of ACC from palm extract by DEAE-Sephacel column followed by Sephadex G-150 demonstrated 2 forms of ACC, designated peak S1 and peak S2. Upon isolation, the specific activity of peak S1 and S2 increased 77.7 and 23.7 folds, respectively. In nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, peak S1 showed 5 protein bands whereas peak S2 contained 4 bands. Only one protein band of S1 and S2 with M_r of 126,000 and 33,000, respectively, contained ACC activity. Their M_r as determined by gel filtration were 126,000 and 36,000, respectively.

The optimal pH for ACC activity of peak S1 and S2 were 8 and 6,respectively. Both forms displayed sigmoidal kinetics for acetyl-CoA with $K_{0.5}$ of 15 μM and 17 μM, respectively, but exhibited Michaelis-Menten kinetics for ATP and $NaHCO_3$. The K_m values of ATP for peak S1 snd S2 were 28 μM and 0.8 mM, respectively, whereas those of $NaHCO_3$ were 4.8 and 20 mM, respectively.

Both EDTA and NaCl but not KCl could inhibit ACC of peak S1. $MgCl_2$ was found to activate both ACC forms to the highest specific activity at lower concentration compared to $MnCl_2$. Citrate and isocitrate were potent activators whereas avidin was a weak inhibitor which inhibited ACC peak S1 5% at 50 μM and peak S2 17% at 20 μM.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการเขียนและพิมพ์วิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ และ ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม พร้อมทั้ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีระ เอกสมทราเมษฐ์ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำเพื่อแก้ไขให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อผลปาล์มน้ำมันสำหรับใช้ในงานวิจัย ขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ คณะวิทยาศาสตร์และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณจรัส และ คุณประภา โทวัน ที่ให้การสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ น้อง เพื่อน ๆ และ คุณศศิธร แสงพลสิทธิ์ ที่เป็นกำลังใจในการศึกษาและทำวิจัยจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ประสงค์ สุขจิตฐานนท์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	35
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	36
วัสดุ	36
อุปกรณ์	37
วิธีการ	37
3. ผลการทดลอง	49
4. วิจารณ์	87
5. สรุป	98
เอกสารอ้างอิง	100
ประวัติผู้เขียน	113

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณผล เนื้อผลปาล์มและน้ำมันของปาล์มแถบอาฟริกา พันธุ์ดูรา เทเนอราและพิสิฟิรา	9
2	องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของพืชชนิดต่าง ๆ	12
3	น้ำหนักโมเลกุลและหน่วยย่อยของเอนไซม์ ACC จากพืช	29
4	ค่า K_m ต่อสับสเตรทของเอนไซม์ ACC จากพืชชนิดต่าง ๆ	32
5	pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ ACC	33
6	ผลของ PVP ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC	52
7	น้ำหนักผล ปริมาณโปรตีน เอนไซม์ ACC และไขมันของผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา ดูรา และพิสิฟิรา	58
8	การแยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์ม	63

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ภาพวาดตัดตามยาวของผลปาล์มน้ำมัน	5
2	ภาพวาดของผลปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา พิสิฟิรา และเทเนอรา	7
3	ภาพวาดของผลปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ดูรากับพิสิฟิรา	8
4	ผลของ Triton X-100 ต่อการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม	50
5	ผลของแอมโนเนียม ซัลเฟตต่อการตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์ม	51
6	ผลของปริมาณโปรตีนต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC	53
7	เวลาของการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC	54
8	ผลของ Triton X-100 ต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC	55
9	ความเสถียรของสารสกัดปาล์มที่อุณหภูมิ -70°ซ	56
10	เอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันของผลปาล์มพันธุ์เทเนอราที่มีอายุต่าง ๆ	60
11	การแยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์มโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel	62
12	การแยกเอนไซม์ ACC ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150	64
13	การแยกเอนไซม์ ACC พีค S1 ด้วยคอลัมน์ Avidin-agarose	66
14	แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ	68
15	การตัดแถบโปรตีนจากโพลีอะคริลาไมด์ เจล ของเอนไซม์ ACC พีค S1 และแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในชิ้นเจล	69

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	การตัดแถบโปรตีนจากโพลีอะคริลาไมด์ เจล ของเอนไซม์ ACC พีค S2 และแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในชิ้นเจล	70
17	กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 และโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส	71
18	ผลของ pH ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2	73
19	ผลของอะซิติล-โคเอ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2	75
20	การเขียนกราฟแบบ Hill ของเอนไซม์ ACC พีค S1 ต่ออะซิติล-โคเอ	76
21	ผลของ ATP ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2	77
22	การเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ของเอนไซม์ ACC พีค S1 ต่อ ATP	78
23	ผลของ $NaHCO_3$ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2	79
24	ผลของ NaCl, KCl และ EDTA ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1	81
25	ผลของ $MgCl_2$ และ $MnCl_2$ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2	82
26	ผลของซิเตรทและไอโซซิเตรทต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2	84
27	ผลของอะวิดินต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 และของสารสกัดปาล์ม	86

ตัวย่อและสัญลักษณ์

°ซ	=	องศาเซลเซียส
ซม.	=	เซนติเมตร
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
A	=	absorbance
ACC	=	acetyl-CoA carboxylase/ acetyl-coenzyme A carboxylase
ACP	=	acyl carrier protein
ADP	=	adenosine 5'-diphosphate
AMP	=	adenosine 5'-monophosphate
ATP	=	adenosine 5'-triphosphate
BC	=	biotin carboxylase
BCCP	=	biotin carboxyl carrier protein
BSA	=	bovine serum albumin
cAMP	=	adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
DEAE-Sephacel	=	diethylaminoethyl-Sephacel
DTT	=	dithiothreitol
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
g	=	acceleration (cm/sec^2)
LDH	=	lactate dehydrogenase
M	=	molar
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
min	=	minute

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
M_r	=	apparent molecular weight
NADH	=	β-nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
Nondenaturing -PAGE	=	nondenaturing-polyacrylamide gel electrophoresis
PEP	=	phosphoenolpyruvate
PK	=	pyruvate kinase
PMSF	=	phenylmethylsulphonyl fluoride
PVP	=	polyvinyl pyrrolidone
R_f	=	relative mobility
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
Tris	=	tris(hydroxymethyl)aminomethane
β	=	beta
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งมีการปลูกกันมากแถบภาคใต้ของประเทศ เนื่องจากมีสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูก น้ำมันที่ได้จากผลปาล์มน้ำมันถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ทั้งในอุตสาหกรรมประเภทอุปโภคและบริโภคหลายชนิด ความต้องการน้ำมันปาล์มทั้งภายในประเทศและของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น จึงมีการขยายพื้นที่เพาะปลูกออกไปอย่างมาก ในปี พ.ศ. 2529 พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมีจำนวน 561,076 ไร่ เพิ่มเป็น 975,000 ไร่ ในปีพ.ศ. 2534 (ชวาลวุทฒ์ ไชยนุวัติ, 2534) การคัดเลือกพันธุ์ปาล์มที่ดีสำหรับใช้ในการเพาะปลูกมีส่วนเพิ่มผลผลิตน้ำมัน ปาล์มพันธุ์เทเนอราเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างพันธุ์ดูราและพันธุ์พิสิฟิรา เป็นพันธุ์ที่ให้ปริมาณน้ำมันสูงจึงนิยมเพาะปลูกกันอย่างแพร่หลาย การปลูกปาล์มในระยะแรกต้องซื้อเมล็ดปาล์มพันธุ์เทเนอรามาจากประเทศมาเลเซีย ซึ่งอาจมีเมล็ดปาล์มพันธุ์อื่นปะปนมาด้วย ทั้งนี้ยังไม่มีวิธีการใดใช้วิเคราะห์พันธุ์ของปาล์มได้ ต้องรอจนกว่าต้นที่ปลูกออกผลซึ่งใช้เวลานาน

ปาล์มน้ำมันสังเคราะห์ไขมันหรือน้ำมันเก็บสะสมไว้ในผล กระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันและไขมันอาศัยเอนไซม์หลายชนิด เอนไซม์อะซิติล-โคเอ คาร์บอกซิเลส (acetyl-CoA carboxylase, ACC) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแรกของการสังเคราะห์กรดไขมัน และเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันและไขมันที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ ในปาล์มน้ำมัน มีการศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำมันน้อยมาก งานวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งเน้นศึกษาเปรียบเทียบระดับของเอนไซม์ ACC กับปริมาณไขมันของผลปาล์มพันธุ์ต่าง ๆ ที่สังเคราะห์ปริมาณไขมันได้ต่างกัน และของผลปาล์มที่มีอายุการสุกต่าง ๆ กัน ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ ACC ซึ่งจะเป็นข้อมูลสำคัญที่นำไปสู่ความเข้าใจการสังเคราะห์น้ำมันของผลปาล์ม และอาจประยุกต์ใช้เป็นวิธีการหนึ่งในการจำแนกพันธุ์ปาล์มได้ในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1.1 ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (oil palm) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวตระกูลปาล์ม ซึ่งมีการสังเคราะห์น้ำมันและเก็บสะสมไว้ในผล ปริมาณน้ำมันที่สกัดจากผลปาล์มเมื่อคิดเทียบต่อเนื้อที่เพาะปลูกเท่ากัน จะให้ผลผลิตสูงกว่าน้ำมันที่สกัดได้จากพืชน้ำมันชนิดอื่น ๆ อาทิเช่น ทานตะวัน (sunflower) ถั่วลิสง (peanut) ถั่วเหลือง (soybean) งา (sesame) และเมล็ดละหุ่ง (castor oil seed) น้ำมันปาล์มนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในชีวิตประจำวันเช่น ทำสบู่ เนยเทียม น้ำมันทอดกรอบ เครื่องสำอางค์ ส่วนผสมของผงซักฟอก อุตสาหกรรมฉาบเหล็กและโลหะต่าง ๆ ปริมาณความต้องการน้ำมันปาล์มทั้งภายในประเทศไทยและของโลกจึงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ, 2528)

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้นที่ชอบดินดี ฝนตกหนักสม่ำเสมอตลอดปี ความชื้นในอากาศสูงและแสงแดดจัด สามารถให้ผลผลิตได้ตลอดปีตั้งแต่อายุ 3 ปีขึ้นไปจนถึงอายุ 25 ปี แต่ต้องมีการบำรุงรักษาอย่างถูกต้อง พื้นที่ในหลายจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย มีสภาพดินฟ้าอากาศเหมาะสมกับการเพาะปลูกปาล์มน้ำมันเช่นเดียวกับประเทศมาเลเซีย รัฐบาลมาเลเซียมีการสนับสนุนการลงทุนด้านปาล์มน้ำมันอย่างจริงจัง ทำให้มาเลเซียกลายเป็นประเทศที่ส่งออกน้ำมันปาล์มรายใหญ่ที่สุดของโลก สำหรับประเทศไทยปาล์มน้ำมันจัดเป็นพืชปลูกที่ค่อนข้างใหม่ ได้เริ่มเพาะปลูกเป็นการค้าเมื่อประมาณ 20 ปี ที่ผ่านมา ปัจจุบันมีการปลูกปาล์มน้ำมันมากในเขตจังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย เช่น กระบี่ สุราษฎร์ธานี ตรัง พังงา และในภาคตะวันออกบางจังหวัด ซึ่งเป็นการช่วยค้ำจุนภาวะทางเศรษฐกิจในภูมิภาคและของชาติ (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ, 2528)

1.2 ถิ่นกำเนิดและประวัติการปลูกปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้นที่ปลูกกันอย่างกว้างขวาง แหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในทวีปอาฟริกา อเมริกากลางและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการพบปาล์มน้ำมันขึ้นอยู่ตามชายฝั่งของประเทศบราซิลเป็นจำนวนมาก และพบปาล์มสปีชีส์ (species) อื่น ๆ ในทวีปอเมริกาใต้ ตลอดจนมีการค้นพบซากดึกดำบรรพ์ (fossil) มีลักษณะคล้ายละอองเกสรตัวผู้ของปาล์มน้ำมัน รวมทั้งมีการศึกษาทางด้านภาษาดั้งเดิม ตลอดจนหลักฐานทางประวัติศาสตร์สามารถใช้เป็นหลักฐานบ่งชี้ว่า ต้นกำเนิดของปาล์มน้ำมันมีแหล่งกำเนิดอยู่ในทวีปอาฟริกาและทวีปอเมริกาใต้ (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523)

ชาวพื้นเมืองแถบอาฟริกาได้มีการปลูกปาล์มน้ำมันมาช้านาน ในระยะแรกยังมิได้มีการปลูกเชิงการค้า ปาล์มน้ำมันเริ่มปลูกเพื่อการค้าครั้งแรกในราวศตวรรษที่ 16 ต่อจากนั้นการเพาะปลูกปาล์มน้ำมันในทวีปอาฟริกาได้ขยายมากขึ้นจนถึงปี พ.ศ. 2454 ประเทศในอาฟริกาซีกตะวันตกสามารถผลิตน้ำมันจากผลปาล์มส่งออกได้

ในทวีปเอเชีย มีการนำปาล์มน้ำมันเข้ามาปลูกครั้งแรกโดยชาวโปรตุเกส โดยเริ่มปลูกครั้งแรกที่ประเทศอินโดนีเซีย ราวปี พ.ศ. 2391 แต่เริ่มปลูกเพื่อการค้าอย่างจริงจังในปี พ.ศ.2454 และได้ขยายพื้นที่เพิ่มมากขึ้น สำหรับประเทศมาเลเซีย ได้เริ่มเพาะปลูกปาล์มน้ำมันครั้งแรกที่สวนพฤกษชาติ (Botanical Garden) ในราวปี พ.ศ. 2413 ต่อมาได้รับความสนใจและค้นคว้าวิจัยครั้งแรกที่ Department of Agriculture ในรัฐ Selangor แล้วจึงเริ่มปลูกเป็นการค้าในปี พ.ศ.2460 (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์,2523)

ส่วนปาล์มน้ำมันในประเทศไทยจัดได้ว่าเป็นพืชปลูกที่ค่อนข้างใหม่ เริ่มเพาะปลูกครั้งแรกหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 ได้ผลผลิตดีพอสมควร ต่อมากิจการดังกล่าวได้ล้มเลิกไป จนกระทั่งเมื่อปี พ.ศ. 2511 ได้เริ่มมีการเพาะปลูกอีกครั้ง เนื่องจากมูลเหตุที่สำคัญพอสรุปได้คือ สถานการณ์ยางพาราในขณะนั้นมีราคาต่ำลง เนื่องจากมีการสังเคราะห์ยางเทียมมาทดแทนมาก ประเทศ

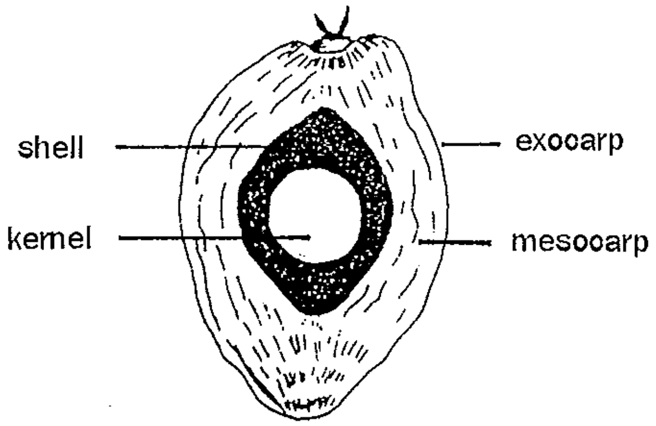
มาเลเซียซึ่งมีสภาพดินฟ้าอากาศคล้ายคลึงกับไทย ประสบความสำเร็จในการประกอบกิจการผลิตน้ำมันปาล์มจนทำให้มาเลเซียกลายเป็นประเทศผู้ส่งออกน้ำมันปาล์มและพันธุ์ปาล์มรายใหญ่ที่สุดของโลก ความสำเร็จดังกล่าวเป็นที่สนใจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการเพาะปลูกปาล์มน้ำมันมากขึ้น ทั้งในรูปของบริษัทที่มีการลงทุนขนาดใหญ่ควบคู่ไปกับการสร้างโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มและสร้างสวนปาล์มน้ำมัน โดยสมาชิกสหกรณ์นิคมสร้างตนเองต่าง ๆ ในเขตจังหวัดชุมพร พังงา กระบี่ สตูล สุราษฎร์ธานี และตรัง (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523)

1.3 พฤกษศาสตร์ของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูลปาล์ม (Family Palmae) Tribe Cocoineae เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledon) เหมือนกับมะพร้าว (coconut) ปาล์มน้ำมันที่นิยมเพาะปลูกเพื่อการค้าในปัจจุบันมีชื่อสามัญว่า African oil palm มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Elaeis guineensis* Jacquin *Elaeis* มาจากภาษากรีกที่แปลว่าน้ำมัน (oil) ส่วน *gui-neensis* ตั้งโดย Jacqiun เพื่อบ่งบอกต้นกำเนิดของปาล์มชนิดนี้ว่ามาจากชายฝั่งกินี (Guinea) ปาล์ม *Elaeis guineensis* มีลักษณะแตกต่างจากปาล์มน้ำมันอีกชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า South American oil palm หรือชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Corozo oleifera* หรือ *Elaeis melanococca* (HBK) ซึ่งพบกระจายอยู่ทั่วไปในแถบทวีปอเมริกาใต้ นอกจากพันธุ์ดังกล่าวแล้ว ยังพบปาล์มน้ำมันอีกชนิดหนึ่ง ที่พบกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปในหมู่เกาะมาดากัสกา (Madagasca) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Elaeis madagascariensis* Bec-cari ซึ่งแตกต่างจาก 2 ชนิดแรก คือในดอกตัวผู้มีก้านชูเกสร (filament) สั้นกว่าและมีอับเรณู (anther) ในระยะการสร้างอับเรณู (anthesis) ตั้งตรงแทนที่จะแผ่ออก ผลมีขนาดเล็กกว่าและกลม และมีกลีบเลี้ยงขนาดใหญ่กว่าห่อหุ้มอยู่ ปาล์มน้ำมัน *Elaeis guineensis* Jacquin มีลักษณะประจำตัวที่ดีคือมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันของผลสูงมาก (Hartley, 1977)

1.3.1 ผลปาล์ม

ผลปาล์มมีรูปร่างแตกต่างกันทั้งแบบเกือบกลม รูปไข่ หรือรูปยาว มีขนาดยาวตั้งแต่ 2 ถึงมากกว่า 5 เซนติเมตร มีน้ำหนัก 3 ถึงมากกว่า 30 กรัม ผลปาล์มน้ำมันมีเมล็ดในแข็ง (drupe) และผลจะสุกภายหลังได้รับการผสม (fertilization) แล้ว 4-5 เดือน ผลปาล์มที่เริ่มสุกจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากสีเขียวหรือสีม่วงไปเป็นสีเหลืองส้ม ชั้นนอกสุดของผลปาล์มเรียกว่าเปลือกนอก (exocarp) มีลักษณะบางและมีสีสันแตกต่างกันแล้วแต่ลักษณะพันธุ์ ชั้นถัดเข้าไปคือ ชั้นเปลือกหรือชั้นเนื้อผลปาล์ม (mesocarp) มีความหนามากกว่าชั้นเปลือกนอก ชั้นนี้มีความหนาตามลักษณะพันธุ์เช่นกัน ชั้นเนื้อผลปาล์มเป็นชั้นที่มีความสำคัญเพราะน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่ถูกเก็บสะสมในชั้นนี้ และเรียกน้ำมันที่สกัดได้จากชั้นเนื้อผลปาล์มว่าน้ำมันปาล์ม (palm oil) ถัดเข้าไปคือเมล็ดในปาล์มประกอบด้วยชั้นกะลา (endocarp หรือ shell) มีลักษณะแข็ง ภายในมีเนื้อเมล็ดปาล์มที่เรียกว่า endoderm หรือ เคอร์เนล (kernel) (รูปที่ 1) ในชั้นเคอร์เนลมีน้ำมันปาล์มสะสมอยู่เช่นกัน เรียกน้ำมันที่สกัดจากเคอร์เนลว่าน้ำมันเมล็ดปาล์ม (kernel palm oil) ชั้นเปลือกนอกและเนื้อผลปาล์มรวมเรียกว่า เปอริคาร์พ (pericarp) ส่วนของเปอริคาร์พมีสีสันต่างกันเกิดจากสารพวกแอนโธไซยานิน (anthocyanin) และแคโรทีน (carotene) (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523; Hartley, 1977)



รูปที่ 1 ภาพวาดตัดตามยาวของผลปาล์มน้ำมัน

1.3.2 การจำแนกพันธุ์ปาล์ม

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันส่วนมากอาศัยลักษณะต่าง ๆ ของผลได้แก่ ลักษณะกะลา กลีบหุ้มผล สีของผลก่อนสุก และปริมาณน้ำมันในชั้นเนื้อผลปาล์ม จากลักษณะดังกล่าวสามารถแยกปาล์มน้ำมันออกเป็น 4 พันธุ์ (รูปที่ 2) (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523; Hartley, 1977) ดังนี้

1.3.2.1 มาโครการ์ยา (Macrocarya)

เป็นปาล์มที่มีกะลาหนาตั้งแต่ 6-8 มิลลิเมตรหรือประมาณ 50% ของน้ำหนักผลทั้งหมด ชั้นเปอริคาร์พมีความหนา 0.75-2.5 มิลลิเมตร ชั้นเนื้อผลปาล์มมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำจึงเป็นพันธุ์ที่ไม่เหมาะในการปลูกเพื่อการค้า

1.3.2.2 ดูรา (Dura)

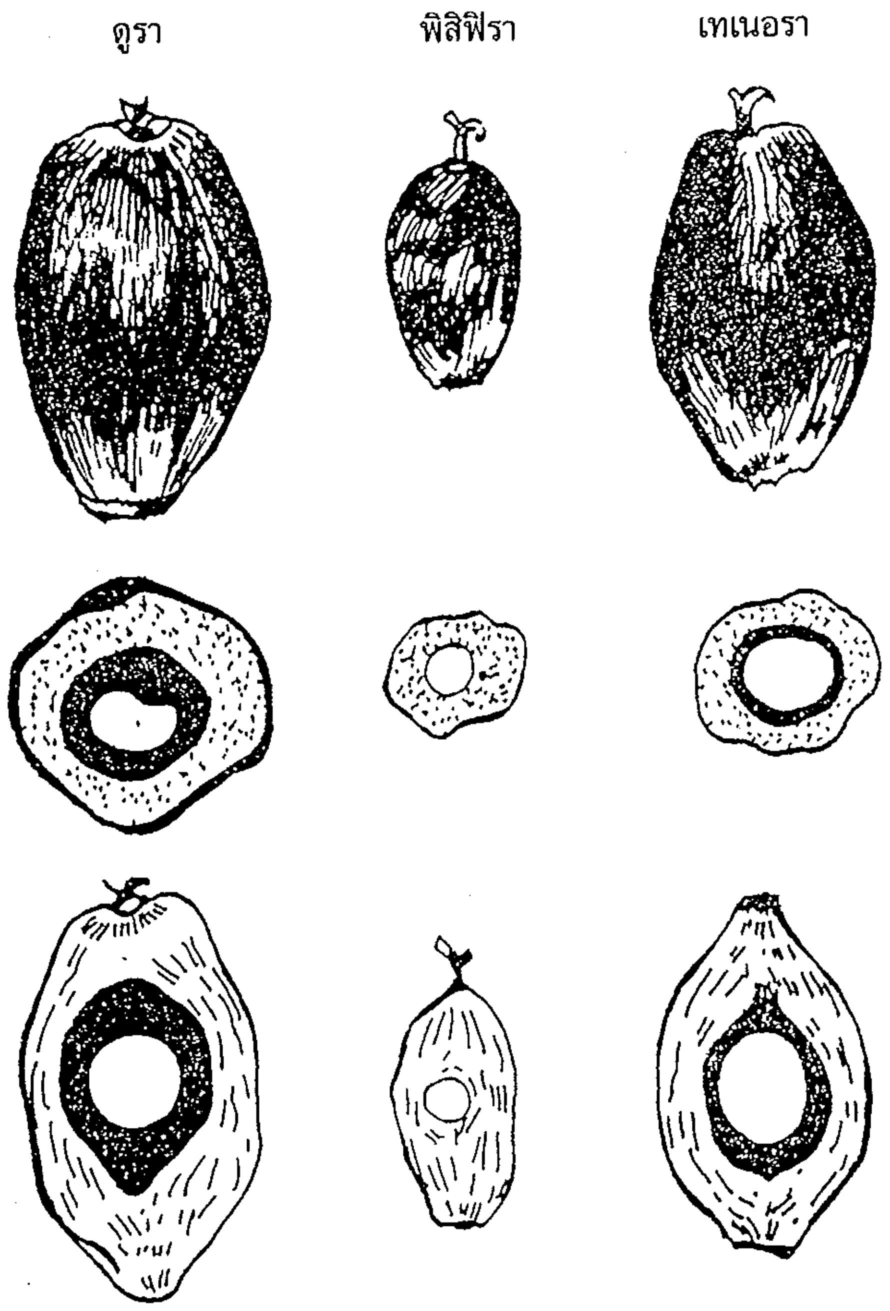
มีลักษณะต่าง ๆ ดีกว่าพันธุ์มาโครการ์ยา มีกะลาหนาปานกลางประมาณ 2-6 มิลลิเมตร มีเคอร์เนลใหญ่ ชั้นเนื้อผลปาล์มมีประมาณ 35-50% ของน้ำหนักผลปาล์มทั้งหมด และมีน้ำมันประมาณ 17-18% เป็นพันธุ์ที่นิยมใช้เป็นต้นแม่สำหรับปรับปรุงพันธุ์ที่ใช้ปลูกเพื่อการค้า

1.3.2.3 พิสิฟีรา (Pisifera)

เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะเด่นคือมีกะลาบางมากหรือแทบไม่มี ชั้นเนื้อผลปาล์มหนากว่าพันธุ์ดูรา ชั้นเปอริคาร์พหนามากประมาณ 5-10 มิลลิเมตร เมล็ดในเล็ก แต่มีข้อเสียคือขนาดของผลเล็ก ช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมันและมีการผลิตดอกต่อต้นจำนวนต่ำ เป็นพันธุ์ที่ไม่เหมาะสมที่ใช้ปลูกเพื่อการค้า แต่เหมาะที่จะใช้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับปรับปรุงพันธุ์ที่ใช้ปลูกเพื่อการค้า

1.3.2.4 เทเนอรา (Tenera)

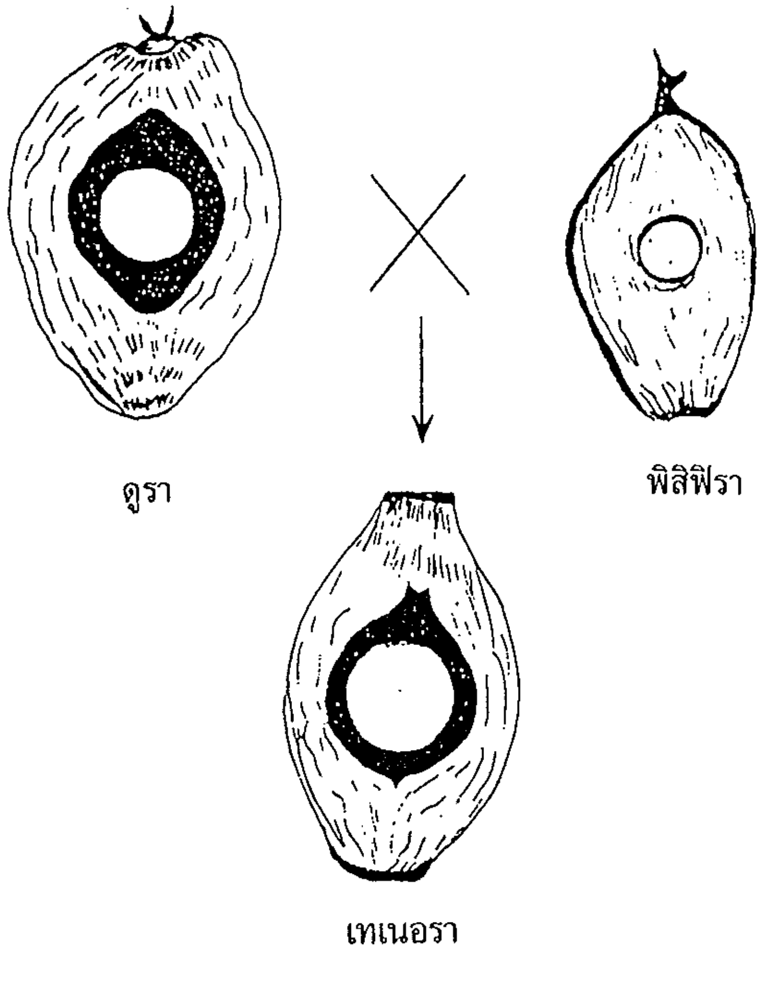
เป็นพันธุ์ผสมระหว่างดูราและพิสิฟีรา โดยใช้พันธุ์ดูราเป็นแม่พันธุ์และพิสิฟีราเป็นพ่อพันธุ์ (รูปที่ 3) เทเนอราเป็นพันธุ์ที่รวมเอาคุณสมบัติดีเด่นของพันธุ์ดูราและพิสิฟีราเข้าด้วยกัน ปาล์มพันธุ์เทเนอรามีกะลาบางประมาณ 0.5-4 มิลลิเมตร หรือประมาณ 10% ของน้ำหนักผล ชั้นเนื้อผลปาล์มหนักประมาณ 60-96% ของน้ำหนักผล ชั้นเปอริคาร์พหนาประมาณ 3-10 มิลลิเมตร น้ำมันในชั้นเนื้อผลปาล์มมีประมาณ 22-24% ของน้ำหนักผล



รูปที่ 2 ภาพวาดของผลปาล์มน้ำมันพันธุ์ดูรา พิสิฟีรา และเทเนอรา

พันธุ์เทเนอรานิยมปลูกเพื่อการค้า

น้ำหนักผล ปริมาณเนื้อผลปาล์ม และน้ำมัน ของปาล์มแถบอาฟริกาพันธุ์ดูรา เทเนอรา และพิสิฟิรา ได้สรุปรวมไว้ในตารางที่ 1



รูปที่ 3 ภาพวาดของผลปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอรา ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ดูรากับพิสิฟิรา

ตารางที่ 1 ปริมาณผล เนื้อผลปาล์ม และน้ำมันของปาล์มแถบอาฟริกา พันธุ์ดูรา เทเนอราและพิสิฟิรา (Hartley , 1977)

พันธุ์	ผลต่อทะลาย	เนื้อผลปาล์มต่อผล	น้ำมันต่อเนื้อผลปาล์ม	น้ำมันต่อทะลาย
ดูรา	72	60	52	20
เทเนอรา	69	88	52	30
พิสิฟิรา	67	88	50	-

หน่วยทั้งหมดเป็นเปอร์เซ็นต์

1.4 ไขมันของผลปาล์ม

1.4.1 การสะสมไขมันของผลปาล์ม

โดยทั่วไปผลปาล์มน้ำมันมีการเจริญเติบโตและสุกเต็มที่ หลังจากได้รับการผสม 4-5 เดือน แต่ช่วงเวลาการสุกของผลปาล์มอาจแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ที่สำคัญคือสภาพแวดล้อมทางลมฟ้าอากาศ สภาพที่มีฝนตกสม่ำเสมอตลอดปี ทำให้ผลปาล์มน้ำมันสุกเร็วกว่าในสภาพอากาศแห้งแล้ง

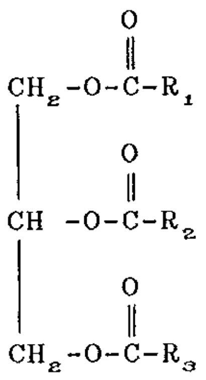
ในระหว่างที่ผลปาล์มมีการเจริญเติบโต จะมีการสังเคราะห์และสะสมไขมัน (fat) ทั้งในชั้นเนื้อผลปาล์มและชั้นเคอร์เนล หลังการผสมเกสร (pollination) 8 สัปดาห์ ภายในเมล็ดในปาล์มมีสภาพเป็นของเหลว เมื่อครบ 10 สัปดาห์ จะมีสภาพแข็งกึ่งวุ้น มีปริมาณไขมันน้อยมาก จากระยะนี้ภายในเมล็ดในปาล์มเริ่มมีการสะสมไขมันอย่างช้า ๆ จนอายุผลครบ 12-13 สัปดาห์ จากนั้นมีการสังเคราะห์และสะสมไขมันอย่างรวดเร็วในชั้นเคอร์เนล ส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมันแบบอิ่มตัว (saturated fatty acid) เช่นกรดลอริค (lauric acid) มีการสังเคราะห์เพิ่มเป็น 46-50%

และกรดไมริสติค (myristic acid) เพิ่มเป็น 18-20% ในสัปดาห์ที่ 20 การสะสมไขมันของชั้นเคอร์เนลเกิดมากในผลอายุ 14-16 สัปดาห์

การสะสมไขมันของชั้นเนื้อผลปาล์ม เกิดช้ากว่าในเคอร์เนล หลังการผสม 8-16 สัปดาห์ พบไขมันในชั้นเนื้อผลปาล์มน้อยกว่า 2% ของน้ำหนักแห้ง ก่อนผลสุกไม่นานมีการเพิ่มขึ้นของไขมัน 300-500% ซึ่งคิดเป็น 70-75% ของน้ำหนักแห้งเมื่อผลสุกเต็มที่ (Hartley, 1977)

1.4.2 องค์ประกอบไขมันในผลปาล์ม

ไขมันและน้ำมันเป็นลิพิด (lipid) ชนิดหนึ่ง ไขมันต่างจากน้ำมัน กล่าวคือไขมันมีสภาพแข็งตัวเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 25°ซ มักพบในสัตว์ น้ำมันเป็นไขมันที่มีสภาพเป็นของเหลวที่อุณหภูมิเดียวกัน พบมากในพืชน้ำมันชนิดต่างๆ ไขมันเป็นรูปแบบการสะสมอาหารและพลังงาน ในสัตว์ส่วนใหญ่สะสมไขมันไว้ในเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ส่วนพืชบางจำพวกสังเคราะห์ไขมันเก็บสะสมไว้ในเมล็ดหรือผล อาทิเช่น ถั่วเหลือง เมล็ดฝ้าย (cotton seed) ข้าวโพด (corn) ถั่วลิสง เมล็ดทานตะวัน เรพสีด (rape seed) มะกอก (olive) ปาล์มน้ำมัน มะพร้าว โกโก้ (cacoa) ไขมันซึ่งเป็นรูปแบบสะสมพลังงานชนิดที่พบมากในพืชและสัตว์ จะอยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ที่ประกอบด้วยกรดไขมัน (fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) ได้จากการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ (esterification) ระหว่างกลีเซอรอลกับกรดไขมัน 3 ตัว ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นดังนี้



ไตรกลีเซอไรด์

เมื่อ R_1, R_2 และ R_3 เป็นสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon chain) ของกรดไขมัน 3 ตัว

ไตรกลีเซอไรด์ที่พบในไขมันมีมากมายหลายชนิด ขึ้นกับชนิดของกรดไขมันทั้ง 3 ตัว ที่เป็นองค์ประกอบในไตรกลีเซอไรด์ว่าเหมือนหรือแตกต่างกัน

กรดไขมันเป็นกรดคาร์บอกซิลิค (carboxylic acid) ที่ประกอบด้วยสายยาวไฮไดรคาร์บอนเพียงหนึ่งสาย และมีคาร์บอนหนึ่งอะตอมที่อยู่ปลายสุดเป็นหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นดังนี้

$$CH_3-CH_2-CH_2-(CH_2)_n-CH_2-COOH$$ กรดไขมัน

กรดไขมันมีความแตกต่างกันตามจำนวนอะตอมคาร์บอนที่มากน้อยต่างกัน รวมทั้งจำนวนและตำแหน่งของพันธะคู่ (double bond) ในสายไฮโดรคาร์บอนด้วย พันธะที่ต่อระหว่างคาร์บอนอะตอมในสายไฮโดรคาร์บอนมีทั้งชนิดพันธะเดี่ยว (single bond) และพันธะคู่ กรดไขมันที่มีเฉพาะพันธะเดี่ยวเป็นกรดไขมันแบบอิ่มตัว ส่วนกรดไขมันที่มีพันธะคู่รวมอยู่ด้วยเป็นกรดไขมันแบบไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) กรดไขมันที่พบในพืชและสัตว์ชั้นสูงมักมีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่ระหว่าง 14-20 อะตอม ที่พบจำนวนมากคือ 16 และ 18 อะตอม ซึ่งได้แก่ กรดปาล์มิติค (palmitic acid) และกรดโอเลอิค (oleic acid)

น้ำมันจากส่วนของเนื้อผลปาล์มที่เรียกว่าน้ำมันปาล์ม มีสีตั้งแต่สีเหลืองส้มจนถึงสีส้มแก่ มีความเหนียวตั้งแต่ระดับปานกลางจนถึงเหนียวมาก กรดไขมันที่พบมากในน้ำมันปาล์มได้แก่ กรดปาล์มิติค และกรดโอเลอิค องค์ประกอบกรดไขมันของน้ำมันปาล์มและของพืชชนิดอื่น ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 (Weiss, 1970)

น้ำมันจากส่วนเคอร์เนลที่เรียกว่า น้ำมันเมล็ดปาล์ม มีสีอ่อนกว่าน้ำมันปาล์ม อาจมีสีเหลืองจนถึงเหลืองน้ำตาล ความเหนียวระดับปานกลาง กรดไขมันที่พบมากสุดคือกรดลอริค ส่วนกรดปาล์มิติค กรดโอเลอิค และกรดไขมันชนิดอื่น ๆ ที่พบ ได้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันของพืชชนิดต่าง ๆ (Weiss, 1970)

Fatty acid	soybean	cotton seed	corn	peanut	sunflower	olive	rape seed	coconut	palm kernel	palm mesocarp	cocoa
Caprylic	-	-	-	-	-	-	-	6.7	1.4	-	-
Capric	-	-	-	-	-	-	-	7.3	2.9	-	-
Lauric	-	-	-	-	-	-	-	48.2	50.9	0.1	-
Myristic	0.1	1.0	-	-	-	-	0.1	16.6	10.4	1.2	0.5
Palmitic	10.5	25.0	11.5	11.0	7.0	16.9	4.0	8.0	8.7	46.8	25.0
Palmitoleic	-	0.7	-	-	-	1.8	0.1	1.0	-	-	-
Stearic	3.2	2.8	2.2	2.3	3.3	2.7	1.3	3.8	1.9	3.8	34.5
Oleic	22.3	17.1	26.6	51.0	14.3	61.9	17.4	5.0	14.6	37.6	36.5
Linoleic	54.5	52.7	58.7	30.9	75.4	14.8	12.4	2.5	1.2	10.0	3.0
Linolenic	8.3	-	0.8	-	-	0.6	5.3	-	-	0.2	0.5
Arachidonic	0.2	-	0.2	0.7	-	0.4	0.9	-	-	0.3	-

ปริมาณกรดไขมันอิสระที่พบในผลปาล์มน้ำมันจะแตกต่างกันตามอายุ หรือการสุกของผล กรดไขมันอิสระในผลปาล์มน้ำมันมีปริมาณน้อยที่สุดในช่วงที่ผลสุกพอดี ดังนั้นในการเก็บเกี่ยวทะลายปาล์มน้ำมันจึงต้องเลือกเก็บในช่วงที่ผลปาล์มสุกพอดีจึงจะทำให้คุณภาพของน้ำมันจากผลปาล์มดีที่สุด (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ, 2528) เมื่อผลปาล์มถูกตัดออกจากต้น กลีเซอไรด์ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลได้เอง ในสภาวะที่มีน้ำและโลหะเป็นตัวเร่ง (catalyst) หรือโดยเอนไซม์ไลเปส (lipase) ซึ่งมีในผลปาล์ม (Hartley, 1977) ทำให้คุณภาพของน้ำมันด้อยลง เพราะกรดไขมันอิสระแบบไม่อิ่มตัวที่เกิดขึ้น สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ที่พันธะคู่โดยออกซิเจน ทำให้น้ำมันมีกลิ่นหืนและมีผลกระทบต่อการฟอกสีของน้ำมัน การป้องกันการสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยน้ำ ทำโดยการลดจำนวนน้ำและสิ่งปนเปื้อนในน้ำมันให้มีน้อยที่สุด รวมทั้งปริมาณเอนไซม์ไลเปส น้ำมันที่ได้จากเมล็ดพืชหลายชนิดมีความสำคัญด้านอุตสาหกรรมและใช้เป็นอาหาร ดังนั้นคุณภาพของน้ำมันจึงเป็นสิ่งสำคัญ มาตรฐานคุณภาพของน้ำมันปาล์มวัดด้วยปัจจัย 3 ชนิด คือ ปริมาณกรดไขมันอิสระ ความชื้นและสิ่งสกปรก ถ้าปัจจัยใดมีค่าสูงเกินกว่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ น้ำมันปาล์มจะมีคุณภาพต่ำ (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ, 2528)

น้ำมันปาล์มนอกจากประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์ ชนิดที่เป็นกรดไขมันอิสระแบบอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวแล้ว ยังประกอบด้วยสารอื่น ๆ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ (carotenoid) โทโคเฟอรอล (tocopherol) สเตอรอล (sterol) ฟอสฟาไทด์ (phosphatide) แอลกอฮอล์ (alcohol) เป็นต้น (ผาสุข กุลละวณิชย์ และคณะ, 2528)

1.5 การสังเคราะห์กรดไขมัน

การสังเคราะห์กรดไขมันอาศัย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก (1) เป็นการเปลี่ยนอะซิติล-โคเอ (acetyl-CoA) เป็นมาโลนิล-โคเอ (malonyl-CoA) โดยอาศัยเอนไซม์อะซิติล-โคเอ คาร์บอกซิเลส (ACC) ขั้นตอนที่สอง (2) เป็นการเปลี่ยนอะซิติล-โคเอและมาโลนิล-โคเอ ไปเป็นกรดปาล์มิติคซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์แฟตตี แอซิด ซินธีเทส (fatty acid synthetase, FAS) ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$CH_3COS\text{-}CoA + HCO_3^- + ATP$

Acetyl-CoA

$$\xrightarrow{ACC} HOOCCH_2COS\text{-}CoA + ADP + Pi \qquad (1)$$

Malonyl-CoA

$CH_3COS\text{-}CoA + 7HOOCCH_2COS\text{-}CoA + 14NADPH + 14H^+$

$$\xrightarrow{FAS} CH_3CH_2(CH_2CH_2)_3CH_2COOH + 8CoA\text{-}SH + 14NADP^+$$

$$\text{Palmitic acid} \qquad + 6H_2O \qquad (2)$$

ทั้งขั้นตอนที่หนึ่งและที่สองประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อยหลายปฏิกิริยา แต่ละปฏิกิริยามีเอนไซม์จำเพาะเป็นตัวเร่ง ขั้นตอนแรกเป็นการเติมหมู่คาร์บอกซิลเข้าสู่อะซิติล-โคเอ ประกอบด้วย 2 ปฏิกิริยาคือ ปฏิกิริยาแรก (ปฏิกิริยา A) เป็นการเติมหมู่คาร์บอกซิลเข้าที่ตำแหน่ง 1'-N ในวง ureido ของไบโอติน (biotin) ซึ่งจับอยู่กับโปรตีนที่เรียกว่า biotin carboxyl carrier protein หรือ BCCP ปฏิกิริยานี้เร่งโดยเอนไซม์ไบโอติน คาร์บอกซิเลส (biotin carboxylase, BC) และปฏิกิริยาที่สอง (ปฏิกิริยา B) เป็นการขนย้ายหมู่คาร์บอกซิลจากไบโอตินไปให้ตัวรับ คืออะซิติล-โคเอ เร่งโดยเอนไซม์คาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรส (carboxyl transferase, CT) ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้

$$BCCP + HCO_3^- + ATP \xrightarrow{BC} BCCP\text{-}COO^- + ADP + Pi \quad (A)$$

$$BCCP\text{-}COO^- + CH_3COS\text{-}CoA \xrightarrow{CT} BCCP + {}^-OOCCH_2COS\text{-}CoA \quad (B)$$

เอนไซม์ ACC ประกอบด้วยโปรตีนทั้ง 3 ชนิดได้แก่ BCCP, เอนไซม์ไบโอติน คาร์บอกซิเลส และเอนไซม์คาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรส จึงเขียนปฏิกิริยา A และ B รวมได้เป็น

$$Acetyl\text{-}CoA + HCO_3^- + ATP \xrightarrow{ACC} Malonyl\text{-}CoA + ADP + Pi \quad (1)$$

ขั้นตอนที่สองของการสังเคราะห์กรดไขมันเป็นการเปลี่ยนอะซิติล-โคเอ และมาโลนิล-โคเอ ไปเป็นกรดปาล์มิติคซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ FAS ขั้นตอนนี้ประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อย 4 ปฏิกิริยา ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ FAS เป็นโปรตีนเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด จับอยู่กับ acyl carrier protein (ACP) แล้วช่วยกันเร่งปฏิกิริยาการเติมคาร์บอนอะตอมจากมาโลนิล-โคเอ ครั้งละ 2 อะตอม เพื่อสังเคราะห์ให้เป็นกรดไขมันสายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนมากสุดไม่เกิน 16 อะตอม

ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ ACCถือเป็นขั้นตอนควบคุมวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันและไขมันที่มีกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ และฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ทั้งนี้เพราะเป็นปฏิกิริยาแรกของวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน ดังนั้นปัจจัยใดที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ ACC ก็จะมีผลต่อปริมาณมาโลนิล-โคเอ และต่อการสังเคราะห์กรดไขมันและไขมันตามลำดับ (Lane, *et al.*, 1974)

1.6 เอนไซม์อะซิติล-โคเอ คาร์บอกซิเลส (Acetyl-CoA carboxylase, ACC)

เอนไซม์อะซิติล-โคเอ คาร์บอกซิเลส มีชื่อสากลคือ Acetyl-CoA : carbon dioxide ligase (ADP-forming) (Luo, *et al.*, 1989;

Shriver, *et al.*, 1989; Roggenkamp, *et al.*, 1980) หรือ Acetyl-CoA : biocarbonate ligase (ATP) (Charles, *et al.*, 1986) มีรหัสสามัญคือ EC 6.4.1.2 เอนไซม์ ACC จัดเป็นไบโอติน เอนไซม์ (biotin enzyme) ชนิดแรกที่พบเพราะมีปริมาณไบโอตินในเอนไซม์สูง และถูกยับยั้งได้โดยอะวิดิน (avidin) (Wakil and Gibson, 1960) ต่อมาได้มีการศึกษาเอนไซม์ ACC กันอย่างกว้างขวาง มีการทำให้เอนไซม์ ACC บริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อสัตว์ชนิดต่าง ๆ จากพืชหลายชนิด ยีสต์ (yeast) และสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เพื่อศึกษาโครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุล หน่วยย่อย (sub-unit) การควบคุมและกลไกการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น

1.6.1 แหล่งที่พบเอนไซม์ ACC

พบเอนไซม์ ACC ได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ได้แก่ แมลง พืช สัตว์ และจุลินทรีย์

1.6.1.1 จุลินทรีย์

มีการศึกษาเอนไซม์ ACC ส่วนใหญ่ใน *E. coli* (Li and Cronan, 1992) ในยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* (Roggenkamp, *et al.*, 1980; HaBlacher, *et al.*, 1993) และในสาหร่าย (algae) เช่น *Cyclotella cryptica* (Roessler, 1990; Roessler and Ohlrogge, 1993)

1.6.1.2 แมลง

มีการศึกษาแอคทิวิตี (activity) ของเอนไซม์ ACC ในระยะตัวอ่อน ดักแด้ และตัวโตเต็มวัยของแมลงสปีชีส์ต่าง ๆ เช่น *Bombyx mori* (Lepidoptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera), *Glossina morsitans*, *Sarcophaga nodosa* (Diptera) และ *Mandusa sexta* (Goldring and Read, 1993)

1.6.1.3 สัตว์

พบเอนไซม์ ACC ในสัตว์หลายชนิด เช่น ในไก่มีการศึกษาเอนไซม์ ACC จากตับ (Takai, *et al.*, 1988) ในแกะ (Vernon, *et al.*, 1991) และวัว (Moss, *et al.*, 1972) ได้มีการศึกษา

แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากเนื้อเยื่อไขมันในกระต่าย (Manning, *et al.*, 1976) และวัว (Shriver, *et al.*, 1989) มีการศึกษาเอนไซม์ ACC จากต่อมน้ำนม (mammarian gland) ยังมีการศึกษาเอนไซม์ ACC ใน เนื้อเยื่อหลายชนิดของหนู เช่น ตับ (Winz, *et al.*, 1994) หัวใจ (Thampy, 1989) กล้ามเนื้อลาย (Winder, *et al.*, 1995) เป็นต้น

1.6.1.4 พืช

มีการศึกษาเอนไซม์ ACC ในพืชหลายชนิด เช่น *Lolium multiflorum* (Evenson, *et al.*, 1994) ถั่วลันเตา (pea) (Dehaye, *et al.*,1994) ถั่วเหลือง (Charles and Cherry, 1986) ข้าวโพด (maize) (Hellyer, *et al.*, 1986) เรพสีด (Slabas and Hellyer, 1985) ผักชีฝรั่ง (parsley) (Egin-Buhler and Ebel, 1983) เมล็ดละหุ่ง (Finlayson and Dennis, 1983) ปาล์มน้ำมัน (Turnham and Northcote, 1982) อะโวกาโด (avocado) และ ผักโขม (spinach) (Mohan and Kekwick, 1980)

1.6.2 โครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ ACC

ปริมาณไบโอตินของเอนไซม์ ACC เพิ่มขึ้นควบคู่กับการเพิ่มของแอคทิวิตีจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์และถูกยับยั้งโดยอะวิดิน บ่งชี้ว่าเอนไซม์ ACC เป็นไบโอตินเอนไซม์ (Titchener, *et al.*, 1958; Wakil and Gibson, 1960)

1.6.2.1 เอนไซม์ ACC จากแบคทีเรีย

เอนไซม์ ACC ของ *E. coli* ประกอบด้วยโปรตีนสามส่วน ได้แก่เอนไซม์ไบโอติน คาร์บอกซิเลส, BCCP และเอนไซม์คาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรส ซึ่งร่วมกันเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่คาร์บอกซิลเข้าสู่อะซิติล-โคเอ เอนไซม์ไบโอติน คาร์บอกซิเลสเร่งปฏิกิริยาการเกิดพันธะระหว่าง HCO_3^- กับไบโอตินใน BCCP มีน้ำหนักโมเลกุล 98,000 ดัลตัน (dalton) เป็นไดเมอร์ (dimer) ที่มีหน่วยย่อย 2 หน่วยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยมีน้ำหนัก 51,000 ดัลตัน

เอนไซม์คาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรส มีน้ำหนักโมเลกุล 130,000 ดัลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วย หน่วยย่อยแต่ละคู่เหมือนกันซึ่งมีน้ำหนัก 35,000 และ 30,000 ดัลตัน ทั้งเอนไซม์ไบโอตินคาร์บอกซิเลส และเอนไซม์คาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรส ไม่มีไบโอตินประกอบอยู่ แต่มีตำแหน่งจำเพาะที่จับได้ทั้งไบโอตินอิสระหรือไบโอตินที่เป็นหมู่พรอสเธติด (prosthetic group) ใน BCCP (Lane, *et al.*, 1974) เฉพาะ BCCP เท่านั้นที่มีไบโอตินจับต่ออยู่เป็นหมู่พรอสเธติด โดยใช้หมู่คาร์บอกซิลข้างเคียง (side chain carboxyl group) เกิดพันธะโควาเลนต์ (covalent) แบบ amide กับหมู่ ϵ-NH_2 ของกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ของโปรตีน BCCP (Waite and Wakil, 1963) BCCP มีน้ำหนักโมเลกุล 44,000 ดัลตัน ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (22,000 ดัลตัน) ที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยย่อยมีไบโอติน 1 หมู่จับติดอยู่ (Fall and Vagelos, 1972)

1.6.2.2 เอนไซม์ ACC จากสัตว์

ได้มีการศึกษาเอนไซม์ ACC จากเนื้อเยื่อสัตว์ชนิดต่าง ๆ เช่นตับหนูและไก่ และต่อมน้ำนมของหนูและกระต่าย เป็นต้น พบว่าเอนไซม์ ACC ของสัตว์ต่างจากของแบคทีเรียและของพืชคือ เอนไซม์ ACC ที่ทำให้บริสุทธิ์จากเนื้อเยื่อสัตว์ต่าง ๆ จะถูกแยกออกมาเป็นฟิลาเมนต์สายยาวซึ่งมีหน่วยย่อยมากมาย (polymeric filament) มีน้ำหนักในช่วง 4-800,000 ดัลตัน และเป็นรูปแบบของเอนไซม์ที่มีแอคทิวิตี (active) (Guchhait, *et al.*,1974; Lane, *et al.*,1974) โพลีเมอร์ (polymer) ของเอนไซม์ ACC ของสัตว์ประกอบด้วยโครงสร้างย่อยที่เรียกว่าโพรโตเมอร์ (protomer) ซึ่งแยกออกจากกันได้และไม่มีแอคทิวิตี (inactive) โพรโตเมอร์มีน้ำหนัก 230,000 ดัลตัน เป็นหน่วยย่อยซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ไบโอติน คาร์บอกซิเลส, BCCP และเอนไซม์คาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรส ดังนั้นหน่วยย่อยโพรโตเมอร์จึงเป็นโปรตีนเดี่ยวที่มีหลายหน้าที่ (multifunctional protein) แต่ละหน่วยย่อยของโพรโตเมอร์มีหนึ่งโมล (mole) ของไบโอตินจับอยู่ (Song and Kim, 1981; Beaty and Lane, 1982; Manning, *et al.*, 1976)

1.6.2.3 **เอนไซม์ ACC จากพืช**

การสังเคราะห์กรดไขมัน ในเซลล์ของพืชชั้นสูงเกิดในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) เป็นส่วนใหญ่ (Nikolau, *et al.*, 1984) มีการศึกษาเอนไซม์ ACC จากคลอโรพลาสต์ของพืชหลายชนิด เช่น ผักกาดหอม (lettuce) (Burton and Stumpf, 1966) ผักโขม (Kannangara and Stumpf, 1972) และในจมูกข้าวสาลี (wheat germ) (Heinstein and Stumpf,1969) พบว่าเอนไซม์ ACC จากคลอโรพลาสต์ของพืชมีโครงสร้างคล้ายกับของ *E. coli* คือจะแยกเป็นหน่วยย่อยซึ่งยังคงเร่งปฏิกิริยาได้ (Kannangara and Stumpf, 1972) เอนไซม์ ACC ของจมูกข้าวสาลีจะแยกออกจากกันในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ได้เป็นส่วนประกอบ 2 ส่วน ที่ยังคงมีความสามารถเร่งปฏิกิริยา และมีค่าสัมประสิทธิ์การนอนก้น (sedimentation coefficient) เป็น 7.3S และ 9.4S ส่วนที่เป็น 7.3S เทียบได้กับหน่วยย่อยคาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรสของเอนไซม์ ACC ของ *E. coli* ในขณะที่ส่วน 9.4S มีคุณสมบัติคล้ายกับส่วนประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์ไบโอติน คาร์บอกซิเลส กับ BCCP ของเอนไซม์ ACC ของ *E. coli* (Heinstein and Stampf, 1969) ในคลอโรพลาสต์ของผักโขมพบ BCCP จับอยู่ในไธลาคอยด์ (thylakoid) ขณะที่ไบโอติน คาร์บอกซิเลสและคาร์บอกซิล ทรานซ์เฟอเรส พบในส่วนของเหลว (stroma) ภายในคลอโรพลาสต์ (Kannangara and Stumpf, 1972)

จากการศึกษาเอนไซม์ ACC ของใบถั่วลันเตา (Alban, *et al.*, 1994; Konishi and Sasaki, 1994) พบว่าเอนไซม์ ACC มี 2 แบบ คือแบบโปรคาริโอทและยูคาริโอท (prokaryotic form และ eukaryotic form) แบบที่เป็นโปรคาริโอทพบในพลาสติด (plastid) มีน้ำหนักโมเลกุล 35,000 ดัลตัน พบทั้งในส่วนใบและในคลอโรพลาสต์ ไม่ถูกยับยั้งโดยสารฆ่าวัชพืช (herbicide)เช่น fenoxaprop และ quizalofop เอนไซม์ ACC แบบยูคาริโอทมีน้ำหนัก 210,000 ดัลตัน ไม่พบในคลอโรพลาสต์ แต่พบเฉพาะในสารสกัดจากใบ ซึ่งคิดว่าอยู่ในส่วนไซโท

.CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

พลาซึม (cytoplasm) เหมือนกับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์แบบยูคาริโอทจะไวต่อการยับยั้งด้วยสารฆ่าวัชพืช จากการแยกสารสกัดจากใบถั่วลันเตาโดยคอลัมน์ Sephacryl S-300 พบแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC อยู่ในโปรตีนที่มีน้ำหนักประมาณ 400,000-550,000 ดัลตัน และแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พบคู่กับสายโพลีเปปไทด์ขนาด 210,000 ดัลตัน ที่มีไบโอตินจับอยู่ แสดงว่าเป็นเอนไซม์แบบยูคาริโอท ไม่พบแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในโปรตีนที่มีน้ำหนักมากกว่า 700,000 ดัลตัน บ่งชี้ว่า เอนไซม์แบบโปรคาริโอทมีการแตกแยกออกจากกัน ดังนั้นในสารสกัดจากใบถั่วลันเตาจึงพบเฉพาะแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC แบบยูคาริโอท

เมื่อศึกษาสายโพลีเปปไทด์ที่มีไบโอตินจับอยู่ โดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) ของสารสกัดจากใบข้าวและข้าวสาลีพบเฉพาะแถบโปรตีนที่มีน้ำหนัก 210,000 ดัลตัน แสดงว่าพืชตระกูล Gramineae เช่นข้าวและข้าวสาลีมีเฉพาะเอนไซม์ ACC ที่เป็นแบบยูคาริโอท ได้มีการทำให้เอนไซม์ ACC แบบยูคาริโอทบริสุทธิ์จากพืชหลายสปีชีส์ และพบเอนไซม์ ACC แบบโปรคาริโอทในคลอโรพลาสต์ ยกเว้นพืชตระกูล Gramineae ที่มีเฉพาะเอนไซม์ ACC แบบยูคาริโอท แสดงให้เห็นว่าในพืชทั่วไปพบเอนไซม์ ACC ทั้ง 2 แบบ ซึ่งอยู่ในคนละส่วนกัน ยกเว้นพืชพวก Gramineae ที่พบแบบเดียว (Konishi and Sasaki, 1994)

Egli, *et al.* (1993) พบว่าเอนไซม์ ACC ของข้าวโพดมีอย่างน้อยที่สุด 2 ไอโซไซม์ (isozyme) ที่เป็นแบบยูคาริโอท ไอโซไซม์หนึ่งพบในพลาสติด และอีกไอโซไซม์พบในส่วนโปรตีนทั้งหมด ทั้ง 2 ไอโซไซม์ต่างกันที่ความต้านทานต่อสารฆ่าวัชพืช หน้าที่สำคัญของเอนไซม์ ACC ในพลาสติดคือการสังเคราะห์กรดไขมัน (Harwood, 1988) การสังเคราะห์กรดไขมันนอกคลอโรพลาสต์เกิดได้เช่นกัน (Bolton and Harwood,1977; Walker and Harwood, 1985) ซึ่งสอดคล้องกับการพบเอนไซม์ ACC แบบยูคาริโอทนอกคลอโรพลาสต์

จากการวิเคราะห์แถบโปรตีนโดยวิธี western blot พบว่าหน่วยย่อยที่มีไบโอตินจับอยู่ของเอนไซม์ ACC จากข้าวบาร์เลย์ (barley) และใบข้าวฟ่าง (sorghum) (Nikolau, *et al.*, 1984) เป็นโปรตีนเดี่ยวที่มีน้ำหนักโมเลกุล 60,000 ดัลตัน ซึ่งคล้ายกับของถั่วลันเตา (Konishi and Sasaki, 1994) แต่ไม่พบโปรตีนที่มีไบโอตินซึ่งมีน้ำหนัก 21,000, 240,000 และ 210,000 ดัลตัน

1.7 หน้าที่ทางชีวภาพของเอนไซม์ ACC

เอนไซม์ ACC เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแรกของการสังเคราะห์กรดไขมันโดยการเติมหมู่คาร์บอกซิล ให้กับอะซิติล-โคเอ ไปเป็น มาโลนิล-โคเอ (Li and Cronan, 1992; Borthwick, *et al.*, 1987; Haystead, *et al.*, 1986; Roggenkamp, *et al.*, 1980) การสังเคราะห์กรดไขมันถูกควบคุมโดยเอนไซม์ ACC ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาแรกของการสังเคราะห์กรดไขมันในสิ่งมีชีวิต (Winder, *et al.*, 1995) และเป็นขั้นตอนสำคัญเพราะมาโลนิล-โคเอ ทั้งในเนื้อเยื่อสัตว์และของ *E. coli* เป็นผลผลิตที่ได้มาจากปฏิกิริยานี้เพียงปฏิกิริยาเดียวเท่านั้น

แหล่งสังเคราะห์กรดไขมันในพืชที่สำคัญคือคลอโรพลาสต์ อะซิติล-โคเอส่วนใหญ่ในคลอโรพลาสต์ ถูกใช้สำหรับการสังเคราะห์กรดไขมันผ่านเอนไซม์ ACC เอนไซม์ ACC ถูกจัดเป็นเอนไซม์ควบคุม (regulatory enzyme) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาควบคุมวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันในพืช โดยอาศัยพื้นฐานที่ว่าเมื่ออัตราของวิถีเมแทบอลิซึม (metabolism) ลดลง ณ ปฏิกิริยาใดที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ควบคุม จะพบความเข้มข้นของสับสเตรท (substrate) ของปฏิกิริยานั้นเพิ่มขึ้นและความเข้มข้นของผลผลิตของปฏิกิริยาเดียวกันลดลง ในขณะที่ความเข้มข้นของสับสเตรทของเอนไซม์ที่ไม่ควบคุมวิถี (nonregulatory enzyme) มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (Rolleston, 1972) จากการศึกษาเอนไซม์ ACC ของผักโขมและถั่วลันเตา พบว่าเอนไซม์ ACC เป็นเอนไซม์ควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมันในพลาสติด ทั้งนี้เพราะไม่สามารถตรวจหาปริมาณมาโลนิล-โคเอ ในคลอโรพลาสต์ที่เก็บไว้ในที่มืด แต่ปริมาณมาโลนิล-

โคเอ เพิ่มขึ้นหลายเท่าในที่มีแสงและเพิ่มมากขึ้นเมื่ออัตราการสังเคราะห์กรดไขมันถูกกระตุ้นให้เกิดมากขึ้นในที่มีแสงด้วย Triton X-100 นอกจากนี้ตรวจหาปริมาณอะซิติล-โคเอ ได้เมื่อไม่มีการสังเคราะห์กรดไขมัน แต่ความเข้มข้นของอะซิติล-โคเอ ลดลงควบคู่กับความเข้มข้นของมาโลนิล-โคเอ ที่เพิ่มขึ้นและอัตราการสังเคราะห์กรดไขมันที่เพิ่มขึ้น ผลงานวิจัยนี้เป็นหลักฐานยืนยันโดยตรงว่า เอนไซม์ ACC ควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมันในผักโขมและถั่วลันเตา (Post-Beittenmiller, *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่น ๆ ที่บ่งชี้บทบาทของเอนไซม์ ACC ต่อการควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมันในผักโขม (Harwood, 1988; Laing and Roughan, 1982; Roughan, *et al.*,1979) ซึ่งพบว่าการสังเคราะห์กรดไขมันของผักโขมในที่มีแสงเพิ่มขึ้น 5-8 เท่า เทียบกับในที่มืด เมื่อการสังเคราะห์กรดไขมันในใบผักโขมลดลงเป็นผลจากการย้ายพืชจากที่มีแสงไปไว้ในที่มืด (Browse, *et al.*, 1981) พบความเข้มข้นของ acetyl-ACP เพิ่มขึ้นเนื่องจากความเข้มข้นของอะซิติล-โคเอ เป็นสมดุล (equilibrium) กับความเข้มข้นของ acetyl-ACP ดังนั้นความเข้มข้นของอะซิติล-โคเอ เพิ่มขึ้นในที่มืดด้วย จากผลงานนี้เป็นการยืนยันว่าเอนไซม์ ACC เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทควบคุมระหว่างการย้ายพืชจากที่สว่างไปสู่ที่มืด (Post-Beittenmiller, *et al.*,1991; Browse, *et al.*, 1981)

มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC กับการสะสมไขมันในระหว่างการเจริญเติบโตของเมล็ดเรพ (*Brassica napus*) เริ่มจากการเก็บเมล็ดหลังจากมีการผสมเกสร นำมาสกัดหาปริมาณไขมันและเอนไซม์ ACC พบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC เพิ่มขึ้นควบคู่กับปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงตั้งแต่วันที่ 18 จนมีค่าสูงสุดในวันที่ 22 หลังจากนั้น ปริมาณไขมันมีค่าคงที่ แต่แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC เริ่มลดลงจนต่ำสุดในวันที่ 34 เมื่อศึกษาการสะสมไขมันในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) เพื่อดูจำนวนหยดน้ำมัน (oil droplet) ที่เกิดขึ้นในเซลล์ พบว่าตั้งแต่วันที่ 5 จนถึงวันที่ 16 ไม่มีหยดน้ำมัน เริ่มพบหยดน้ำมันบ้างในวันที่ 17 และมีมากในช่วงวันที่ 24-32 ผลงานวิจัยนี้เป็นการยืน

ยันว่าเอนไซม์ ACC มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไขมันในเมล็ดที่กำลังพัฒนา (Turnham and Northcote, 1983) นอกจากนี้ Turnham and Northcote (1982) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมไขมันและแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ของเอมบริโอ (embryo) ปาล์มน้ำมัน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสองสายพันธุ์ (JH และ JB.20.1C) ในสายพันธุ์ JH พบแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC เพิ่มขึ้นก่อนการเพิ่มปริมาณไขมันในเซลล์เอมบริโอไม่นาน ส่วนในสายพันธุ์ JB.20.1C ปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นกับการเพิ่มแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC เกิดควบคู่กัน จำนวนหยดน้ำมันที่ได้จากการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ (light microscopy) สอดคล้องกับปริมาณไขมันและแอคทิวิตีของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น ผลการศึกษาเหล่านี้ จึงพอสรุปได้ว่าเอนไซม์ ACC มีบทบาทต่อการสังเคราะห์กรดไขมันในเมล็ดเรพที่กำลังพัฒนา และในเอมบริโอของปาล์มน้ำมัน

1.8 การควบคุมเอนไซม์ ACC

เนื่องจากเอนไซม์ ACC เป็นเอนไซม์ควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมัน การควบคุมแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จึงมีผลต่อผลผลิตของวิถีการสังเคราะห์ได้แก่กรดไขมัน ไตรกลีเซอไรด์และฟอสโฟลิพิด การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ ACC แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1.8.1 การควบคุมระยะสั้น

เป็นการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ ACC โดยตัวกระตุ้น (activator) หรือตัวยับยั้ง (inhibitor) เข้าไปจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งอัลโลสเตอริค (allosteric site) แล้วมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แบ่งย่อยได้เป็น

1.8.1.1 การกระตุ้นโดยซิเตรทและไอโซซิเตรท (Allosteric activation by citrate and isocitrate)

สารเริ่มต้นของอะซิติล-โคเอ ในไซโทพลาซึมซึ่งใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันของสัตว์คือซิเตรท (citrate) ที่ได้มาจาก

วัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) กรดไขมันส่วนใหญ่ที่สังเคราะห์โดยเนื้อเยื่อสัตว์ โดยเฉพาะตับและเนื้อเยื่อไขมัน ถูกนำไปสังเคราะห์เป็นไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นรูปแบบการเก็บสะสมพลังงาน กระบวนการนี้ถูกกระตุ้นโดยซิเตรทในขั้นตอนการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ ACC จากการศึกษาในเนื้อเยื่อสัตว์ต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์ ACC จากตับของนกและหนู จากเนื้อเยื่อไขมันของวัวและหนู และจากต่อมน้ำนมของหนูและกระต่าย ถูกกระตุ้นโดยกรดที่มีหมู่คาร์บอกซิลิค 3 หมู่ (tricarboxylic acid) ซึ่งได้แก่ซิเตรทหรือไอโซซิเตรท (isocitrate) ความเข้มข้นที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ACC ให้เร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น 50% (K_A) สำหรับซิเตรทและไอโซซิเตรทต่อเอนไซม์ ACC จากตับนกมีค่า 3-4 mM สำหรับเอนไซม์จากเนื้อเยื่อไขมันวัวมีค่าเป็น 3-4 mM และ 7-8 mM ตามลำดับ (Moss, *et al.*, 1972; Lane, *et al.*,1974) และสำหรับเอนไซม์ของเซลล์ตับหนูมีค่า 2-7 mM ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นของซิเตรทภายในเซลล์สัตว์เอง (0.17-0.45 mM) (Thampy and Wakil, 1985)

เอนไซม์ ACC ของ *E. coli* ต่างจากของสัตว์ เพราะไม่ถูกควบคุมโดยซิเตรท อาจเป็นเพราะอะซิติล-โคเอ ของ *E. coli* ได้มาจากไพรูเวท (pyruvate) (Wakil, 1970; Alberts and Vagelos, 1968) ไม่ใช่มาจากวัฏจักรเครบส์

การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ ACC ในพืชโดยซิเตรทหรือไอโซซิเตรทก็เกิดเช่นกัน รายละเอียดจะกล่าวในหัวข้อ 1.9.5.2

1.8.1.2 การยับยั้ง (Inhibition)

ปริมาณไบโอตินของเอนไซม์ ACC เพิ่มขึ้นควบคู่กับการเพิ่มของแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ บ่งชี้ว่าเอนไซม์ ACC เป็นไบโอติน เอนไซม์ ซึ่งถูกยับยั้งได้โดยอะวิดิน (Wakil and Gibson, 1960; Titchener, *et al.*, 1958) อะวิดินยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACC โดยจับกับไบโอตินแบบไม่ผันกลับ แต่ไบโอตินของ

เอนไซม์ ACC ที่มีซิเตรทเป็นตัวกระตุ้นอยู่ด้วยไม่ไวต่อการยับยั้งโดยอะวิดิน (Moss and Lane, 1972) อะซิติล-โคเอ ช่วยป้องกันเอนไซม์ ACC จากอะวิดินได้บางส่วน ทั้งตัวกระตุ้นและอะซิติล-โคเอ ช่วยกันส่งเสริมการป้องกันไบโอตินจากอะวิดิน (Lane and Moss, 1971; Ryder, *et al.*, 1967)

มาโลนิล-โคเอ ซึ่งเป็นผลผลิตของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ ACC เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ACC เช่นกัน เอนไซม์ของตับนกถูกยับยั้งโดยมาโลนิล-โคเอ แบบแข่งขัน (competition) กับอะซิติล-โคเอและตัวกระตุ้น โดยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACC ได้ 50% หรือมีค่า K_i ประมาณ 10^{-5} M (Gregolin, *et al.*, 1966) นอกจากมาโลนิล-โคเอ แล้ว แฟตตี อะซิล-โคเอ (fatty acyl-CoA) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันก็เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ ACC เช่นกัน โดยเฉพาะปาล์มิโตอิล-โคเอ (palmitoyl-CoA) เป็นตัวยับยั้งที่รุนแรงมีค่า K_i ประมาณ 3-8 x 10^{-7} M (Vagelos, *et al.*, 1962; Mabrouk, *et al.*, 1990; Nikawa, *et al.*, 1979) การควบคุมเอนไซม์ ACC โดยแฟตตี อะซิล-โคเอ สายยาวจะกลับกับผลของซิเตรท บ่งชี้ว่าสารในกระบวนการสร้างกรดไขมันเหล่านี้ มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมัน

1.8.1.3 การดัดแปรแบบโควาเลนต์ (Covalent modification)

นอกจากการควบคุม โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งอัลโลสเตอริคแล้ว เอนไซม์ ACC ยังถูกควบคุมโดยกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) และการเอาหมู่ฟอสเฟตออก (dephosphorylation) กระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับเอนไซม์ ACC ถูกเร่งโดยเอนไซม์โปรตีน ไคเนส (protein kinase) ทั้งแบบที่ต้องการและไม่ต้องการ cAMP (cyclic adenosine monophosphate) ช่วยในการทำงาน (Lent and Kim, 1982; Hardie and Guy, 1980) การ

เติมหมู่ฟอสเฟตมีผลทำให้เอนไซม์ ACC มีแอคทิวิตีลดลง และมีค่า K_i ต่อซิเตรทเพิ่มขึ้น (Kim, *et al.*, 1989) ไม่ได้ทำให้ค่า K_m ของเอนไซม์ ACC ต่อสับสเตรทเปลี่ยนแปลง แต่มีผลลดประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาลงครึ่งหนึ่งและลดความจำเพาะต่อซิเตรทลงมากกว่า 2 เท่า (Hardie and Guy, 1980) ส่วนกระบวนการเอาหมู่ฟอสเฟตออกจากเอนไซม์ ACC อาศัยเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Thampy and Wakil, 1985) ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์ ACC มีแอคทิวิตี (Wada and Tanabe,1983; Thampy and Wakil, 1985) กระบวนการเติมหรือเอาหมู่ฟอสเฟตออกของเอนไซม์ ACC ทำให้สมดุลระหว่างเอนไซม์รูปแบบที่เป็นไดเมอร์ซึ่งมีแอคทิวิตีต่ำ กับโพลีเมอร์ซึ่งประกอบด้วย 10-20 ไดเมอร์ และมีแอคทิวิตีสูงเปลี่ยนไป (Gregolin, *et al.*, 1966; Lane, *et al.*, 1974)

ฮอร์โมน (hormone) มีผลควบคุมการทำงานของเอนไซม์ ACC ทางอ้อม โดยไปมีผลเร่งหรือยับยั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตหรือการเอาหมู่ฟอสเฟตออกจากเอนไซม์ ACC เช่น ฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) มีผลเพิ่มแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ของตับหนู 2.5 เท่า ลดปริมาณหมู่ฟอสเฟตของเอนไซม์ ACC ลง 1.2 เท่า และเอนไซม์อยู่ในรูปโพลีเมอร์ (10^7 ดัลตัน) (Mabrouk, *et al.*, 1990) เมื่อเทียบกับเอนไซม์ ACC ของหนูที่ไม่ได้ให้อินซูลิน นอกจากนี้พบว่าอินซูลินทำให้เอนไซม์ ACC มีแอคทิวิตีมากขึ้นโดยไปกระตุ้นเอนไซม์ฟอสฟาเตส ในทางกลับกันฮอร์โมนกลูคากอน (glucagon) และอิพิเนฟรีน (epinephrine) มีผลทำให้หนูที่อดอาหารมีระดับแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ลดลง 2 เท่า มีปริมาณฟอสเฟตของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.3 เท่า และเอนไซม์อยู่ในรูป 4 ไดเมอร์ (200,000 ดัลตัน) (Mabrouk, *et al.*, 1990) การยับยั้งเอนไซม์ ACC ด้วยฮอร์โมนกลูคากอนและอะดรีนาลีน (adrenalin) หรืออิพิเนฟรีน เกิดจากการเพิ่มระดับของ cAMP ในเซลล์และกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์โปรตีน ไคเนส (Davies, *et al.*, 1990; Haystead, *et al.*, 1986)

1.8.2 การควบคุมระยะยาว

เป็นการควบคุมปริมาณเอนไซม์ ACC ในแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงอัตราการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของยีน (gene) ที่สังเคราะห์เอนไซม์ ACC ที่ระดับการถอดรหัส (transcription) โดยมีการเพิ่มจำนวน mRNA (messenger ribonucleic acid) ของเอนไซม์ ACC สูงขึ้น (HaBlacher, *et al.*, 1993; Park and Kim, 1991) ในสัตว์เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงอัตราการสังเคราะห์และอัตราการสลายเอนไซม์ ACC (Mabrouk, *et al.*, 1990) ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราดังกล่าวได้แก่อาหาร การให้อาหารที่ไม่มีไขมันแก่หนูที่อดอาหารมาก่อน กระตุ้นอัตราการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC เพิ่มขึ้น 5-10 เท่า การให้อาหารที่มีไขมัน 12% กลับทำให้อัตราการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC ลดลง (Majerus and Kilburn, 1969) ในภาวะที่ขาดอาหารหรือเป็นเบาหวานจะไปลดการทำงานของยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ ACC เป็นผลทำให้แอคทิวิตีของเอนไซม์ลดลง

ตับ เนื้อเยื่อไขมัน และต่อมน้ำนม เป็นเนื้อเยื่อหลักในการสังเคราะห์ไขมันในสัตว์ การศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าอาหารมีผลต่อปริมาณและจลนศาสตร์ (kinetics) ของเอนไซม์ ACC ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์กรดไขมัน ได้จากการทดลองใช้หนู 3 กลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นหนูที่อดอาหาร 48 ชั่วโมง กลุ่มที่สองเป็นหนูที่อดอาหาร 48 ชั่วโมง แล้วให้อาหารไม่มีไขมัน 48 ชั่วโมง และกลุ่มที่สามเป็นหนูที่ให้อาหารปกติ ได้ผลดังนี้

	เอนไซม์ ACC ในตับ (nmol/min/g)	K_i citrate (mM)
หนูอดอาหาร	77 ± 6	1.34 ± 0.14
หนูอด/ให้อาหาร	562 ± 37	0.77 ± 0.09
หนูให้อาหารปกติ	210 ± 23	0.87 ± 0.09

พบว่าหนูกลุ่มที่อดอาหารมีปริมาณเอนไซม์ ACC ในตับลดลงประมาณ 2.7 เท่า เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ให้อาหารปกติ และเมื่อให้อาหารไม่มีไขมันแก่หนูที่อดอาหารจะมีปริมาณเอนไซม์ ACC เพิ่มขึ้นประมาณ 7.3 เท่า นอกจากนี้ค่า K_I ของเอนไซม์ ACC ต่อซิเตรทของหนูกลุ่มที่สอง ลดลงประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่อดอาหาร ในขณะที่ทั้งปริมาณเอนไซม์ ACC และค่า K_I ต่อซิเตรท ของกล้ามเนื้อมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงในหนูทั้ง 3 กลุ่ม (Winder, *et al.*, 1995) นอกจากนี้จากการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบมีเอสดีเอส และทำ western blot พบแถบโปรตีนขนาด 260,000 ดัลตัน ซึ่งมีไบโอตินติดอยู่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในสารสกัดเอนไซม์ ACC จากตับหนูที่ให้อาหารเทียบกับของหนูที่อดอาหาร

1.9 คุณสมบัติของเอนไซม์ ACC ในพืช

1.9.1 การทำให้บริสุทธิ์ (Purification)

การทำให้เอนไซม์ ACC บริสุทธิ์จากพืชหลายชนิดอาศัยเทคนิคคอลัมน์ โครมาโตกราฟี (column chromatography) 3 แบบคือ แบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange) เช่นคอลัมน์ mono Q หรือ DEAE-Sephacel แบบเจล ฟิลเตรชัน (gel filtration) เช่น Sepharose, Sephadex หรือ Ultrogel AcA22 เป็นต้นและแบบจำเพาะ (affinity) ได้แก่คอลัมน์ Avidin-Sepharose วิธีการเหล่านี้ได้สรุปไว้ในตารางที่ 3 เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากพืชแหล่งต่าง ๆ มีน้ำหนักโมเลกุล จำนวนหน่วยย่อยและน้ำหนักหน่วยย่อยแตกต่างกันไปขึ้นกับวิธีการศึกษาและชนิดของพืช (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 น้ำหนักโมเลกุลและหน่วยย่อยของเอนไซม์ ACC จากพืช

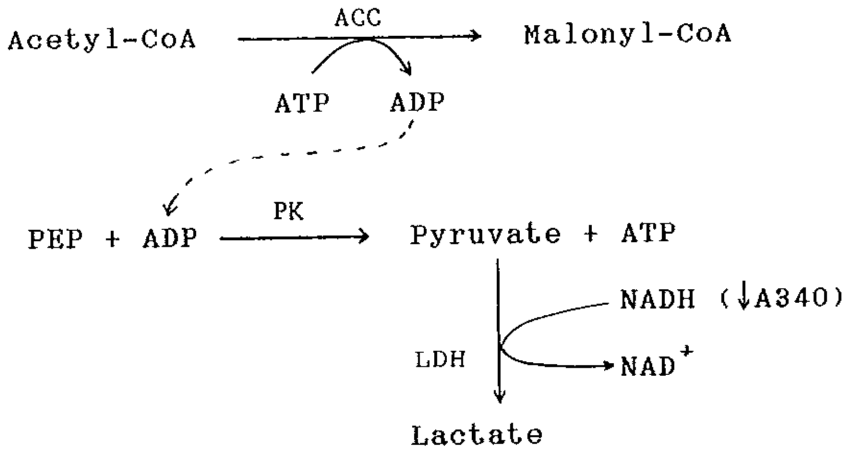
แหล่ง	วิธีทำให้บริสุทธิ์	น้ำหนักโมเลกุล	วิธีศึกษา	จำนวนหน่วยย่อย	น้ำหนักหน่วยย่อย	วิธีศึกษา	ที่มา
ข้าวสาลี	Gel filtration	500,000	Gel filtration	2	220,000	SDS-PAGE	Gornicki and Haselkorn,1993
ข้าวสาลี	Gel filtration	-	-	-	210,000	SDS-PAGE	Konishi and Sasaki, 1994
อะโวกาโด	Gel filtration	650,000	Gel filtration	3	120,000 57,000 47,000	SDS-PAGE	Mohan and Kekwick, 1980
ถั่วลันเตา	Gel filtration	400,000- 550,000	Gel filtration	5	200,000 72,000 54,000 35,000 29,000	SDS-PAGE	Konishi and Sasaki, 1994
ถั่วเหลือง	Avidin- Sepharose	240,000	PAGE	3	240,000 65,000 58,000	SDS-PAGE	Charles and Cherry, 1986
ใบข้าวโพด - ACC I	Mono Q	490,000	Gel filtration	-	227,000	SDS-PAGE	Egli, *et al.*, 1993
ไรย์ (rye)	Mono Q	520,000	Gel filtration	-	224,000	Gel filtration	Evenson, *et al.*, 1994

1.9.2 การวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC

การวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC มี 2 วิธี ที่ให้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนี้

1.9.2.1 โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก (Spectrophotometric assay)

วัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC โดยทำควบคู่กับการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวท ไคเนส (pyruvate kinase, PK) และแลคเตท ดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase, LDH) (Finlayson and Dennis, 1983) กล่าวคือเอนไซม์ ACC เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนอะซิติล-โคเอ และ ATP ไปเป็น มาโลนิล-โคเอ และ ADP ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



ปริมาณ ADP ที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และถูกใช้ต่อโดยเอนไซม์ไพรูเวท ไคเนส เพื่อเปลี่ยนฟอสโฟอีนอลไพรูเวท (phospho enolpyruvate, PEP) ไปเป็นไพรูเวท จากนั้นไพรูเวทถูกเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท (lactate) โดยเอนไซม์แลคเตท ดีไฮโดรจีเนส ปฏิกิริยานี้เกิดควบคู่กับการเปลี่ยน NADH ไปเป็น NAD^+ การวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC โดยวิธีนี้จึงเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ NADH ที่ลดลง ณ ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (A340)

1.9.2.2 โดยวิธีกัมมันตรังสี (Radiochemical assay)

เป็นการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC โดยตรงจากผลผลิตของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ มาโลนิล-โคเอที่ติดฉลากโดย ^{14}C ซึ่งได้จากการเติมหมู่คาร์บอกซิลจากสารกัมมันตรังสี $H^{14}CO_3^-$ ให้กับอะซิติล-โคเอ โดยเอนไซม์ ACC ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Charles and Cherry, 1986)

$$\text{Acetyl-CoA} + H^{14}CO_3^- + \text{ATP} \xrightarrow{\text{ACC}} {}^{14}\text{C-Malonyl-CoA} + \text{ADP} + \text{Pi}$$

1.9.3 สมบัติทางจลนศาสตร์ (Kinetic properties)

เอนไซม์ ACC ของพืชหลายชนิดมีจลนศาสตร์ต่อสับสเตรท ตัวยับยั้งหรือต่อตัวกระตุ้น เป็น 2 แบบคือ แบบไฮเพอร์โบลาร์ (hyperbolar) หรือ แบบ Michaelis-Menten เช่น เอนไซม์ของ *Lolium multiflorum* (Evenson, *et al.*, 1994) เมล็ดถั่วเหลือง (Charles and Cherry, 1986) และเรพสีด (Slabas and Hellyer, 1985) และจลนศาสตร์อีกแบบได้แก่ แบบซิกมอยด์ (sigmoid) เช่น เอนไซม์ ACC ของเมล็ดถั่วลันเตาสายพันธุ์ *Pisum sativum* (Dehaye, *et al.*, 1994)

จากการศึกษาสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ACC ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากพืชหลาย ๆ แหล่ง พบค่า K_m ของเอนไซม์ ACC เหล่านี้ต่อสับสเตรท อะซิติล-โคเอ ATP และ HCO_3^- ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังแสดงในตารางที่ 4

1.9.4 pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม

เอนไซม์ ACC ของพืชหลายชนิด สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่มี pH เป็นกลางและค่อนไปทางด่าง (pH 7.0-8.5) และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 24-42°ซ ดังตัวอย่างแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ค่า K_m ต่อสับสเตรทของเอนไซม์ ACC จากพืชชนิดต่าง ๆ

แหล่ง	K_m (mM)			ที่มา
	Acetyl-CoA	HCO_3^-	ATP	
อะโวกาโด	0.26	8.00	0.30	Mohan and Kekwick, 1980
ผักโขม	0.10	3.00	0.35	
เมล็ดละหุ่ง	0.65	3.00	0.10	Finlayson and Dennis, 1983
ผักชีฝรั่ง	0.15	1.00	0.07	Egin-Buhler and Ebel, 1983
ใบข้าวโพด	0.10	2.00	-	Nikolau and Hawke, 1984
เรพสีด	0.07	3.00	0.04	Slabas and Hellyer, 1985
ถั่วเหลือง				
- พันธุ์ Wayne	0.32	1.13	0.46	Charles and Cherry, 1986
- พันธุ์ 9686	0.17	1.56	0.14	
L. multiflorum	0.05	0.35	0.04	Evenson, *et al.*, 1994

ตารางที่ 5 pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ ACC

แหล่ง	pH	อุณหภูมิ(°ซ)	ที่มา
ข้าวสาลี	8.5	42	Nielsen, *et al.*, 1979
อะโวกาโด	7.5	37	Mohan and Kekwick, 1980
เมล็ดละหุ่ง	8.0	24-28	Finlayson and Dennis, 1983
ใบข้าวโพด	8.4	-	Nikolau and Hawke, 1984
เรพสีด	8.5	35	Slabas and Hellyer, 1985
ถั่วเหลือง			
- พันธุ์ Wayne	8.2	35-40	Charles and Cherry, 1986
- พันธุ์ 9686	7.5	35-40	
L. multiflorum	7.0-7.5	34	Evenson, *et al.*, 1994

1.9.5 ปัจจัยที่มีผลต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC

1.9.5.1 ผลของไอออน

4 mM Mg^{2+} และ 2 mM Mn^{2+} ทำให้แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ของอะโวกาโดมีค่าสูงสุด เมื่อความเข้มข้นของ Mn^{2+} สูงขึ้นจะยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC (Mohan and Kekwick, 1980) ในขณะที่ 5 mM Mg^{2+} และ 1.5 mM Mn^{2+} ทำให้เอนไซม์ ACC จากเมล็ดละหุ่งมีแอคทิวิตีสูงสุด (Finlayson and Dennis, 1983) แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากถั่วเหลืองทั้งสายพันธุ์ Wayne และ 9686 ถูกกระตุ้น โดย Mg^{2+} ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 5 mM เมื่อความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากกว่า 5 mM ยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ส่วน 1 mM Mn^{2+} ยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC สายพันธุ์ Wayne ได้ดีกว่าสายพันธุ์ 9686 (Charles and Cherry, 1986) แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากเมล็ดละหุ่งถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้น 1.5เท่า โดย 80 mM K^{+} (Finlayson and Dennis, 1983) ส่วนในถั่วเหลือง

20 mM K^+ ทำให้เอนไซม์ ACC มีแอคทิวิตีสูงสุด (Charles and Cherry, 1986) ในทำนองเดียวกัน 50 mM K^+กระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากใบของ *L. multiflorum* เพิ่มขึ้น 40% ในขณะที่ 200 mM K^+ กลับยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC (Evenson, *et al.*, 1994)

1.9.5.2 ผลของซิเตรทและไอโซซิเตรท

แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากข้าวสาลีถูกยับยั้ง 89% โดย 30 mM ซิเตรท เมื่อความเข้มข้นของซิเตรทลดลงเหลือ 5 mM กลับกระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC เพิ่มขึ้น 10% ไอโซซิเตรท 4 mM ไม่มีผลต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นกลับยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ของข้าวสาลี (Heinstein and Stumpf, 1969) เอนไซม์ ACC ของเมล็ดละหุ่งถูกยับยั้งด้วยซิเตรทและไอโซซิเตรทที่ความเข้มข้น 5 mM (Finlayson and Dennis, 1983) ซึ่งต่างจากของผักโขมและอะโวกาโดที่พบเอนไซม์ ACC ถูกกระตุ้นด้วยซิเตรทและไอโซซิเตรทที่ 3 mM และซิเตรทมากกว่า 4 mM ยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ส่วนความเข้มข้นของไอโซซิเตรทที่สูงกว่า 4 mM ไม่มีผลต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากพืชทั้งสองชนิด (Mohan and Kekwick, 1980) ซิเตรท 0.5 mM และ 0.1 mM ไม่มีผลต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์ 9686 แต่กระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์ Wayne ซิเตรท 10 mM กลับยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากถั่วเหลืองทั้ง 2 สายพันธุ์ (Charles and Cherry, 1986)

1.9.5.3 ตัวยับยั้งแบบแข่งขันและแบบไม่แข่งขัน

ADP และ AMP เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันกับ ATP ซึ่งเป็นสับสเตรทตัวหนึ่งของเอนไซม์ ACC จากถั่วเหลืองทั้งสายพันธุ์ Wayne และ 9686 (Charles and Cherry, 1986) ส่วนมาโลนิล-โคเอ ซึ่งเป็นผลผลิตของปฏิกิริยาเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของเอนไซม์ ACC ที่ได้จากใบของ *L. multiflorum* ทั้งชนิดที่ทนและไวต่อสารฆ่าวัชพืช diclofop โดยมีค่า K_I เท่ากับ 140 μM และ 104 μM ตามลำดับ (Evenson, *et al.*, 1994) ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าค่า K_I ของมาโลนิล-โคเอ ต่อเอนไซม์ ACC

จากข้าวโพด 2-3 เท่า (Palosaari, *et al.*, 1992) ในเมล็ดละหุ่ง (Finlayson and Dennis, 1983) และข้าวสาลี (Rendina, *et al*,. 1989) พบมาโลนิล-โคเอ เป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันของเอนไซม์ ACC ซึ่งต่างจากของ *L. multiflorum* และข้าวโพด ค่า K_i ของมาโลนิล-โคเอต่อเอนไซม์ ACC ของข้าวสาลีมีค่าเป็นไมโครโมลาร์ (μM) ส่วนของเมล็ดละหุ่งมีค่าเป็นมิลลิโมลาร์ (mM)

ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันของเอนไซม์ ACC อีกชนิด คือ โคเอ (CoA หรือ coenzyme A) ค่า K_i ของโคเอต่อเอนไซม์ ACC ของ *L. multiflorum* ชนิดที่ทนและไวต่อ diclofop เท่ากับ 711 μM และ 795 μM ตามลำดับ (Evenson, *et al.*,1994) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในใบข้าวโพด ที่พบว่าโคเอเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันของเอนไซม์ ACC (K_i 1.58 mM) (Nikolau and Hawke, 1984) แต่โคเอเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของเอนไซม์ ACC ที่ได้จากข้าวสาลี (Rendina,*et al.*,1988) นอกจากนี้โคเอ กลับเป็นตัวกระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในสารสกัดเอนไซม์จากเมล็ดละหุ่ง 1.5 เท่า (Finlayson and Dennis, 1983)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมสารสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์มน้ำมัน
2. เพื่อเปรียบเทียบระดับแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันจากสารสกัดของผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา ดูรา และพิสิฟิรา
3. เพื่อเปรียบเทียบระดับแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันจากสารสกัดของผลปาล์มพันธุ์เทเนอราที่มีอายุการสุกของผลต่าง ๆ กัน
4. เพื่อแยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดของผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่แยกได้

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

ผลปาล์มตัวอย่าง

ผลปาล์มที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษา คือ ผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา ดูราและพิสิฟิรา ซึ่งเก็บจากต้นปาล์มน้ำมันอายุประมาณ 4-5 ปี ณ ศูนย์วิจัยคลองหอยโข่ง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade ซื้อจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

จากบริษัท Ajax chemicals ได้แก่ Citric acid

จากบริษัท Farmitalia Carlo Erba S.p.A. ได้แก่ Ammonium persulphate, Glycerol และ Sodium metabisulphite

จากบริษัท Fluka ได้แก่ Ammonium sulphate, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ethylenediaminetetraacetic acid และ Glycine

จากบริษัท May & Baker Ltd.ได้แก่ Ascorbic acid, Copper sulphate และ Potassium sodium tartrate

จากบริษัท Merck ได้แก่ Acrylamide, Bromophenol blue, Bisacrylamide (N,N' Methylene diacrylamide), β-Mercaptoethanol, Folin-Ciocalteus phenol reagent และ N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

จากบริษัท Sigma ได้แก่ Avidin-agarose, Bovine serum albumin, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Sephadex G-150, DEAE-Sephacel, Acetyl-CoA, Triton X-100, Dithiothreitol,

Dimethyl sulphoxide, Phenylmethylsulphonyl fluoride, β-Nicotinamide adenine dinucleotide, Phosphoenolpyruvate, Pyruvate kinase, Lactate dehydrogenase, Adenosine 5'-triphosphate, Polyvinyl pyrrolidone, Avidin, Isocitrate และ Standard protein markers

อุปกรณ์

Deep-freeze refrigerator ของ Scientemp., Centrifuge ของ Beckman รุ่น TJ-6, Refrigerated super speed centrifuge ของ Beckman รุ่น JA-20, Serofuge centrifuge ของ Clay Adam,UV-Vis spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น 160A, Slab gel electrophoresis apparatus ของ Hoefer Scientific Instruments, Micropipette ของ Finn, Automatic fraction collector ของ Gilson รุ่น 202, Microtube pump MP-3 ของ Eyela, Laboratory Oven รุ่น LR 270 ของ The Grieve corporation และ Vortex ของ Scientific Industries

วิธีการ

2.1 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Lowry,*et al.*(1951) นำสารตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH : 1% potassium sodium tartrate : 0.5% $CuSO_4$ อัตราส่วน 100:1:1) 3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติมสารละลายโฟลิน-ฟีนอล (Folin-phenol reagent, Folin : น้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1) 0.3 มิลลิลิตร ผสมทิ้งไว้นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโน

เมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่มีโบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

ติดตามปริมาณโปรตีนของสารละลายที่เก็บจากคอลัมน์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280)

2.2 การหาปริมาณไขมัน

ในการหาปริมาณไขมันของเนื้อผลปาล์มตามวิธีของ A.O.A.C.(1984) ต้องใช้อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ที่ประกอบด้วยขวดกลมสำหรับใส่สารตัวทำละลาย ซอคเลต (soxhlet) เครื่องควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mantle) หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble) ตู้อบไฟฟ้า โถดูดความชื้นและสารตัวทำละลายได้แก่ปิโตรเลียม อีเธอร์ (petroleum ether) หรือเฮกเซน (hexane) ในขั้นตอนแรก ต้องอบขวดกลมในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักขวดที่แน่นอน นำเนื้อผลปาล์ม 2 กรัม บดละเอียดและชั่งบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก แล้วห่อให้มิดชิด จากนั้นใส่ในหลอดใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยใยแก้วหรือสำลีเพื่อให้สารตัวทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ ต่อจากนั้นนำหลอดใส่ตัวอย่างใส่ในซอคเลต เติมปิโตรเลียม อีเธอร์ ใส่ในขวดกลมประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน จากนั้นประกอบเข้ากับอุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทช์ให้ความร้อน ใช้เวลาสกัดประมาณ 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลตและกลั่นจนเหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อย ด้วยเครื่องระเหยสารตัวทำละลาย นำขวดกลมไปอบต่อในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90°ซ นาน 30 นาทีจนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นำออกมาชั่งแล้วอบซ้ำ นานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งติดต่อกันสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม คำนวณหาปริมาณไขมัน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักไขมันหลังอบต่อน้ำหนักเนื้อผลปาล์มเริ่มต้น

2.3 การทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, Nondenaturing-PAGE)

โพลีอะคริลาไมด์ เจล ที่ใช้ในการศึกษา เป็นแบบเจลแผ่น (slab gel) ขนาด 9 x 9 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร ซึ่งประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือเจลส่วนบน (stacking gel) มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร และเจลส่วนล่าง (separating gel) มีความสูงประมาณ 7 เซนติเมตร

เตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจล แบบไม่แปลงสภาพ ตามวิธีของ Davis (1964) ซึ่งมีส่วนประกอบของเจลเป็นดังนี้

	Stacking gel	Separating gel	
	3%	5%	15%
30% Acrylamide-0.8% bisacrylamide	0.50 ml	0.58 ml	1.16 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.63 ml	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	1.75 ml	1.75 ml
10% Ammonium persulphate	50 μl	35 μl	35 μl
TEMED	5 μl	5 μl	5 μl
น้ำกลั่น	3.82 ml	1.13 ml	0.55 ml
ปริมาตรรวม	5.00 ml	3.50 ml	3.50 ml

2.3.1 การเตรียมสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน

ผสมสารตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 40% glycerol, 8 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ 0.4% โบรโมฟีนอล บลู (bromophenol blue) 1 ส่วน ให้ได้สารละลายตัวอย่างมี

ความเข้มข้นของโปรตีน 5 มก./มล. เตรียมโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธีเดียวกับของสารตัวอย่าง

2.3.2 การทำอิเล็กโตรฟอรีซิส

นำสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (จากข้อ 2.5.1) ใส่ในแต่ละช่องแยกกันในเจลส่วนบน ใช้ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับการทำอิเล็กโตรฟอรีซิส เปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 25 mA ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จนสีโบรโมฟีนอลบลู เคลื่อนที่ไปจนห่างจากขอบล่างของเจล 0.5 เซนติเมตร ปิดกระแสไฟแล้วนำเจลไปย้อมสี

2.3.3 การย้อมสีโปรตีน

ย้อมสีโปรตีนในเจลแผ่นด้วยสีคูมาซี บลู (Coomassie brilliant blue R-250) โดยแช่เจลในสารละลาย 0.02% คูมาซี บลู ซึ่งมี 50% เมธานอล (methanol)-7.5% กรดน้ำส้ม (acetic acid) ย้อมนาน 4 ชั่วโมง แล้วนำเจลไปล้างสีที่ไม่ต้องการออกโดยใช้สารละลาย 50% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที แล้วล้างต่อด้วยสารละลาย 5% เมธานอล-7.5% กรดน้ำส้ม จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

2.4 การวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC

วัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC โดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกตามวิธีของ Finlayson and Dennis (1983) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ NADH ที่ลดลง ณ ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ในสารผสมปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mM NADH, 2 mM ATP, 20 mM $NaHCO_3$, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM phosphoenolpyruvate,0.1% Triton X-100, 0.04 mM acetyl-CoA, 5 U lactate dehydrogenase, 5 U pyruvate kinase และเอนไซม์ปริมาณที่เหมาะสม

ผสมเอนไซม์กับสารผสมปฏิกิริยาที่ไม่มีอะซิติล-โคเอ เข้าด้วยกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 นาที จากนั้นเติม 0.04 mM อะซิติล-โคเอ เป็นการเริ่มปฏิกิริยา เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาว

คลื่น 340 นาโนเมตร ทันที เป็นเวลา 5 นาที ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้แสดงไว้ในข้อ 1.9.2.1

แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC คำนวณได้จากจำนวนนาโนโมล (nanomole) ของ NADH ที่ถูกใช้ไปในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง(25°ซ) จำนวนนาโนโมลของ NADH หาได้จากการทำกราฟมาตรฐาน NADH ใน 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 เมื่อใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เครื่องเดียวกัน พบว่า 250 นาโนโมล NADH มีค่า A340 เป็น 1 หน่วย

แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์เป็นจำนวนนาโนโมลของ NADH ที่ถูกใช้ไปในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ต่อมิลลิกรัมโปรตีนของสารละลายเอนไซม์

2.5 การเตรียมสารสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม

ล้างผลปาล์มด้วยน้ำสะอาด ลอกส่วนที่เป็นเปลือกบาง ๆ ออก ปอกเอาเฉพาะเนื้อผลปาล์ม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตำให้ละเอียด จากนั้นเติมบัฟเฟอร์สกัด (0.1 M Tris-HCl, 10 mM KCl,0.1 mM $MgCl_2$, 14 mM β-mercaptoethanol, 1 mM EDTA,1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 0.2% Triton X-100,5 mM sodium metabisulphite และ 0.1 M ascorbic acid ซึ่งปรับ pH เป็น 7.5) ที่แช่เย็นด้วยอัตราส่วนเนื้อผลปาล์ม 1 กรัม ต่อ บัฟเฟอร์สกัด 2 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันนาน 2 ชั่วโมง กรองด้วยผ้ากรอง 8 ชั้น คั้นเอาส่วนน้ำกรองไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ด้วยความเร็ว 2,000 X g นาน 20 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียม ซัลเฟต (ammonium sulphate) ที่ความอิ่มตัว 60% คนเบาๆ หนึ่งคืน แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 18,000 X g นาน 40 นาที นำเฉพาะส่วนตะกอนไปละลายในบัฟเฟอร์ละลาย ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 5 mM isocitrate และ 1 mM dithiothreitol (DTT) สารสกัดปาล์มที่เตรียมได้นำไปหาแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และหาปริมาณโปรตีน ตามวิธีการข้อ 2.4 และ 2.1 ตามลำดับ

การทดลองนี้ทำที่อุณหภูมิ 4°ซ ทุกขั้นตอน

2.6 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC

2.6.1 การหาปริมาณโปรตีนที่เหมาะสม

หาปริมาณโปรตีนของสารสกัดปาล์มที่ใช้ในปฏิกิริยา เพื่อทำให้ปฏิกิริยายังเกิดในช่วงเส้นตรง ทำโดยวัดแอคทิวิตีของสารสกัดปาล์มที่มีโปรตีนปริมาณต่าง ๆ ในสารผสมปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร ตามวิธีการข้อ 2.4

2.6.2 การหาเวลาของปฏิกิริยาที่เหมาะสม

หาเวลาที่เหมาะสมที่ปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดขึ้นจนคงที่ ทำโดยวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์ม ในสารผสมปฏิกิริยาตามวิธีการข้อ 2.4 ที่เวลาต่าง ๆ จนปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดคงที่

2.6.3 ผลของ Triton X-100

ทำการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์มในสารผสมปฏิกิริยา ตามวิธีข้อ 2.4 เมื่อมี Triton X-100 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.5%

2.7 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม

2.7.1 การศึกษาผลของ Triton X-100

เพื่อศึกษาผลของ Triton X-100 ในการช่วยสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม ทำโดยใช้บัฟเฟอร์สกัดที่มี Triton X-100 ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 ถึง 1.0% สกัดเอนไซม์จากเนื้อผลปาล์มที่ตำละเอียด (ตามวิธีข้อ 2.5) ตะกอนที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ นำไปละลายในบัฟเฟอร์ละลาย แล้ววัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ต่อไป

2.7.2 การศึกษาผลของแอมโมเนียม ซัลเฟต

ทดลองตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดปาล์ม ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความอิ่มตัวต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-80% เป็นเวลา 1 คืน ที่ 4°ซ แล้วทำการทดลองต่อตามวิธีการข้อ 2.5 จากนั้นนำสารสกัดปาล์มที่เตรียมได้ไปวัดหาแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และปริมาณโปรตีนต่อไป

2.7.3 การศึกษาผลของ Polyvinyl pyrrolidone (PVP)

สารสกัดปาล์มอาจมีสารประเภทฟีนอล (phenol) ปะปนอยู่ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่รบกวนแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACCเพื่อกำจัดสารประเภท

ฟีนอลออกจากสารสกัดปาล์ม จึงเติม 4% PVP ในขั้นตอนการสกัดเปรียบเทียบกับไม่เติม PVP ดังนี้ นำสารสกัดปาล์มที่เตรียมได้จากข้อ 2.5 มาเติม PVP จนมีความเข้มข้นเป็น 4% เขย่า แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 2,000 X g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ (Hattori, *et al.*, 1987) นำสารสกัดใสไปวัดหาแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และหาปริมาณโปรตีนต่อไป

2.8 การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดปาล์ม

2.8.1 การหาแอคทิวิตีและปริมาณไขมันของผลปาล์มต่างพันธุ์

วัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในสารสกัดจากผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา ดูรา และพิสิฟิรา เปรียบเทียบกัน และหาปริมาณไขมันของเนื้อผลปาล์มจากทั้ง 3 พันธุ์ ตามวิธีการข้อ 2.2 เปรียบเทียบกัน

2.8.2 การหาแอคทิวิตีและปริมาณไขมันของผลปาล์มที่มีอายุต่าง ๆ

เพื่อเปรียบเทียบระดับแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC กับปริมาณไขมันของผลปาล์มพันธุ์เทเนอราที่มีอายุการสุกต่าง ๆ กัน เก็บผลปาล์มซึ่งมีอายุ ตั้งแต่ 1-5 เดือน แล้วทำการสกัดตามวิธีการข้อ 2.5 จากนั้นวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในสารสกัดจากผลปาล์มที่มีอายุต่าง ๆ กันเหล่านี้ พร้อมทั้งหาปริมาณไขมันของเนื้อผลปาล์มที่มีอายุต่าง ๆ กันเหล่านี้ด้วย

2.8.3 ความเสถียรของสารสกัดปาล์ม ที่ -70°ซ

ทำการสกัดเอนไซม์จากผลปาล์มตามวิธีการข้อ 2.5 ตะกอนที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์นำไปละลายในบัฟเฟอร์ละลาย ที่มี 5 mM ไอโซซิเตรท หรือไม่มีไอโซซิเตรท แบ่งสารสกัดปาล์มเป็นส่วน ๆ จากนั้นเก็บสารสกัดปาล์มเหล่านี้ที่อุณหภูมิ -70°ซ นำสารสกัดปาล์มแต่ละส่วนไปวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และหาปริมาณโปรตีน ทุก ๆ เดือน

2.8.4 ความเสถียรของผลปาล์ม ที่ -70°ซ

แกะผลปาล์มสดพันธุ์เทเนอราออกจากทะลาย ล้างด้วยน้ำให้สะอาด เช็ดจนแห้งแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ นำผลปาล์มออกมาสกัดตามวิธีข้อ 2.5 ทุก ๆ เดือน เพื่อวัดหาแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดปาล์ม

2.9 การทำให้เอนไซม์ ACC บริสุทธิ์จากสารสกัดปาล์ม

ทำให้เอนไซม์ ACC บริสุทธิ์จากสารสกัดปาล์มที่เตรียมได้จากข้อ 2.5 ดังนี้

2.9.1 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

ล้าง DEAE-Sephacel resin (เรซิน) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ด้วย 0.2 M sodium citrate-0.2% Triton X-100 ตามวิธีของ Wallace (1965) แล้วล้างเรซินต่อด้วย 50 mM Tris-HCl,pH 7.5 ปริมาตร 10 เท่า ของปริมาตรเรซิน ปล่อยให้เรซินนอนก้นในบีกเกอร์ (beaker) เทบัฟเฟอร์ส่วนใสข้างบนทิ้ง เติมสารสกัดปาล์มที่ผ่านการไดแอไลซ์ (dialyse) เรียบร้อยแล้วด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ผสมกับ DEAE-Sephacel ในบีกเกอร์ คนเบา ๆ ให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นเทสารผสมทั้งหมดลงในคอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 เซนติเมตร ปล่อยให้เรซินอัดเรียงตัว แล้วล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 26 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 4 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า A280 ล้างคอลัมน์ต่อด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จนมีค่า A280 เป็นศูนย์ แล้วชะคอลัมน์ด้วยเกลือโปตัสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride) ที่มีความเข้มข้นเพิ่มแบบต่อเนื่องจาก 0 M (500 มิลลิลิตร) ถึง 0.4 M (500 มิลลิลิตร) ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราไหลและเก็บสารละลายปริมาตรเท่าเดิม

นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และหาแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC รวมสารละลายหลอดที่มีค่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC สูงของพีค (peak) เข้าด้วยกัน แล้วทำให้เข้มข้นโดยใส่ในถุงไดแอไลซ์ (dialysis bag) ซึ่งยอมให้โมเลกุลขนาดเล็กกว่า 12,000 ดัลตัน ผ่านเข้าออกได้ แล้วใช้ CM-cellulose โรยรอบถุงไดแอไลซ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ จนเหลือสารละลายในถุงปริมาตรเพียงเล็กน้อย แล้วนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150

2.9.2 โดยคอลัมน์ Sephadex G-150

ล้างและปรับคอลัมน์ Sephadex G-150 (1.6 X 94 เซนติเมตร) ซึ่งมีปริมาตรเรซิน 190 มิลลิลิตร ให้สมดุลด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ไดแอไลซ์สารละลายเอนไซม์ ACC เข้มข้น ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นใส่ลงในคอลัมน์ Sephadex G-150 ปรับให้มีอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 และหาแอคทิวิตีของเอนไซม์ รวมสารละลายหลอดที่มีแอคทิวิตีสูงของแต่ละพีคเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นทำนองเดียวกับข้อ 2.9.1

2.9.3 โดยคอลัมน์ Avidin-agarose

แยกเอนไซม์ ACC พีค S1 หรือพีค S2 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นต่อด้วยคอลัมน์ Avidin-agarose (1.6 x 3.5 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง และชะต่อด้วยไบโอติน (1 มก./มล.) ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

การทดลองทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4° ซ

2.10 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ ACC

2.10.1 การหาแถบโปรตีนของเอนไซม์ ACC ในโพลีอะคริลาไมด์เจล

นำสารละลายเอนไซม์ ACC ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-150 ไปทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ แล้วตัดเจลส่วนหนึ่งไปย้อมสีคูมาซี บลู เพื่อจะได้เห็นแถบโปรตีนต่าง ๆ บนแผ่นเจล จากนั้นนำไปเทียบกับแผ่นเจลที่ไม่ได้ย้อมสี แล้วตัดเจลที่ไม่ได้ย้อมสีตามขวางออกเป็นชิ้น ๆ ให้ตรงกับแถบโปรตีนที่ย้อมติดสี นำเจลแต่ละชิ้นไปบดให้ละเอียดในหลอดทดลองที่มี 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 แล้วเซนตริฟิวจ์

ที่ 2,000 X g นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ของเจลแต่ละชิ้นไปหาแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC

2.10.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเอนไซม์ ACC ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล

หาน้ำหนักโมเลกุลของแถบเอนไซม์ ACC ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ตามวิธีของ Sigma Tech. Bulletin No. MRK-137 (10-86) หลังการทำอิเล็กโตรฟอรีซิสและย้อมสีโปรตีนแล้ว วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารตัวอย่าง ของโปรตีนมาตรฐานและของแถบสีโบรโมฟีนอล บลู แล้วคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนในสารตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอล บลู}}$$

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุล กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแต่ละแถบโปรตีนในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสารตัวอย่างได้ โปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด ที่ใช้ได้แก่ ไธโรโกลบูลิน (thyroglubulin, M_r 669,000) เฟอร์ริทิน (ferritin, M_r 440,000) คาทาเลส (catalase, M_r 232,000) แลคเตท ดีไฮโดรจีเนส (M_r 140,000) และโบวีน ซีรัม อัลบูมิน (M_r 67,000)

2.10.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเจล ฟิลเตรชัน

หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ACC ที่แยกได้จากข้อ 2.9 โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 ขนาด 1.6 X 94 เซนติเมตร ปรับคอลัมน์ให้สมดุลก่อนด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 แล้วเติมเอนไซม์ ACC, $K_2Cr_2O_7$ (M_r 294), บลู เด็กซ์แตรน (blue dextran, M_r 2,000,000)

และโปรตีนมาตรฐาน ลงในคอลัมน์ Sephadex G-150 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมที่มี 1 mM PMSF ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่า A280 แล้ววัดปริมาตรชะ (elution volume, Ve) ของแต่ละโปรตีน หาปริมาตรทั้งหมด (total volume, Vt) ของคอลัมน์ได้จากการคำนวณค่าปริมาตรชะของ $K_2Cr_2O_7$ ซึ่งได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร และหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจลหรือ void volume (Vo) ของคอลัมน์ได้จากการคำนวณค่าปริมาตรชะของบลู เด็กซ์แตรน ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาค่า K ของโปรตีนแต่ละชนิดได้จากสมการ

$$K = (Ve - Vo)/(Vt - Vo)$$

จากการเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า K ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ACC ได้

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ไคโมทริปซิโนเจนเอ (chymotrypsinogen A, M_r 25,000) โบวีน ซีรัม อัลบูมิน และคาทาเลส

2.10.4 การหา pH ที่เหมาะสม

ทำการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในสารผสมปฏิกิริยาที่มีบัฟเฟอร์ 50 mM, pH ต่าง ๆ ในช่วง 3-11 โดยใช้ acetate buffer ในช่วง pH 3-6; Tris-HCl ในช่วง pH 7-9 และ glycine-NaOH ในช่วง pH 10-11 เมื่อทำปฏิกิริยาครบ 5 นาที แล้ว นำสารผสมปฏิกิริยาไปวัด pH อีกครั้งหนึ่ง

2.10.5 การศึกษาจลนศาสตร์

ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ACC ต่อสับสเตรท โดยวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์เมื่อใช้สับสเตรทต่าง ๆ คือ acetyl-CoA, ATP หรือ

$NaHCO_3$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วหาค่า K_m จากการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ระหว่างค่า 1/V และ 1/[S] หรือค่า $K_{0.5}$ จากการเขียนกราฟแบบ Hill

2.10.6 การศึกษาผลของไอออนและ EDTA

เพื่อศึกษาความต้องการไอออน ต่อการทำงานของเอนไซม์ ACC ทำการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในสารผสมปฏิกิริยาตามวิธีข้อ 2.4 เมื่อมีไอออน ได้แก่ NaCl, KCl, $MgCl_2$ หรือ $MnCl_2$ หรือเมื่อมี EDTA ความเข้มข้นต่าง ๆ

2.10.7 การศึกษาผลของตัวยับยั้งและตัวกระตุ้น

ทำการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในสารผสมปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีตัวกระตุ้นหรือตัวยับยั้งของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น อะวิดิน ซิเตรท ไอโซซิเตรท เป็นต้น

3. ผลการทดลอง

3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม

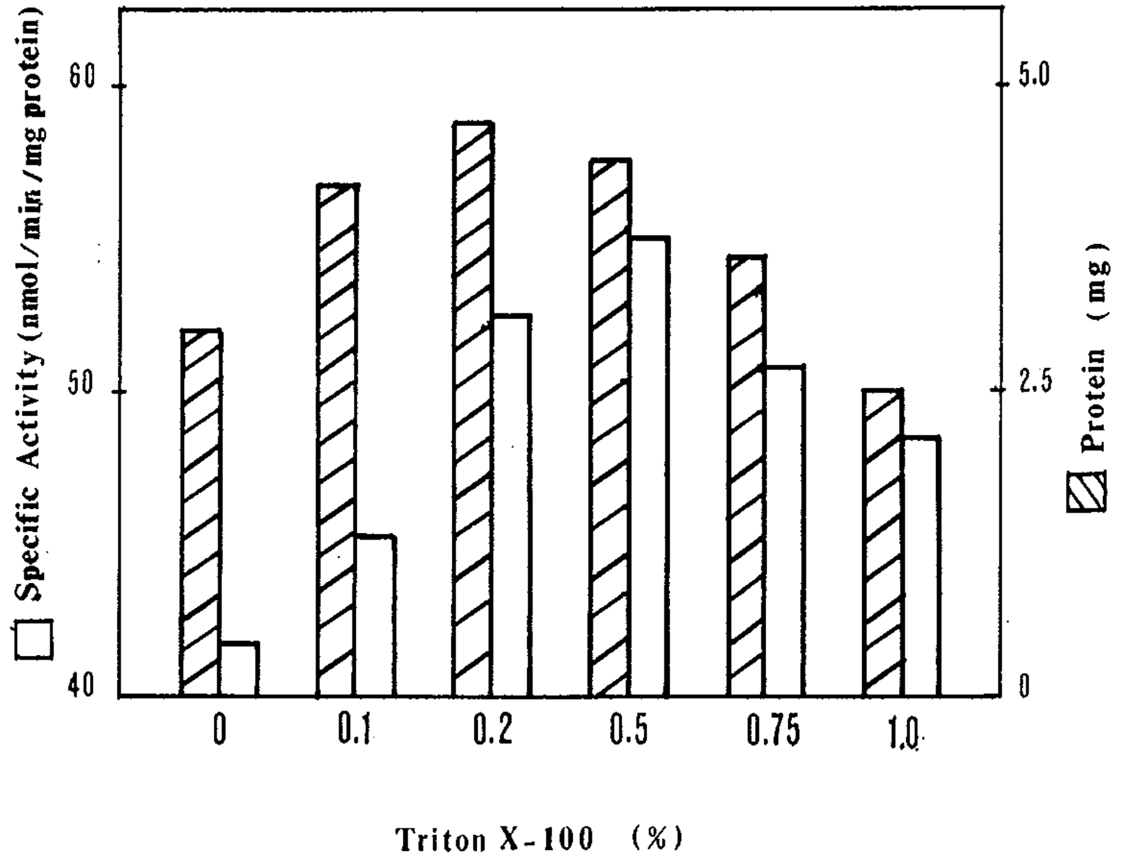
3.1.1 ผลของ Triton X-100

จากการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม โดยใช้บัฟเฟอร์สกัดตามข้อ 2.5 เมื่อมี Triton X-100 ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-1% พบว่าสารสกัดปาล์มที่ไม่ใช้ Triton X-100 มีแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC เป็น 41.7 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC ในสารสกัดปาล์มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ Triton X-100 ที่ใช้จนถึง 0.2% (52.4 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) และมีค่าสูงสุด (54.6 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) เมื่อใช้ Triton X-100 ความเข้มข้น 0.5% ที่ความเข้มข้นของ Triton X-100 มากกว่า 0.5% แอคทิวิตีของเอนไซม์กลับลดลง (รูปที่ 4)

โปรตีนที่สกัดออกมาได้ในสารสกัดปาล์ม เมื่อไม่ใช้ Triton X-100 ช่วยในการสกัด มีปริมาณ 3.0 มิลลิกรัมและมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ Triton X-100 ที่ใช้ 0.2% Triton X-100 จะสกัดโปรตีนออกมาได้สูงสุด 4.7 มิลลิกรัม เมื่อใช้ Triton X-100 ความเข้มข้นสูงขึ้นกลับพบโปรตีนในสารสกัดปาล์มปริมาณลดลง (รูปที่ 4)

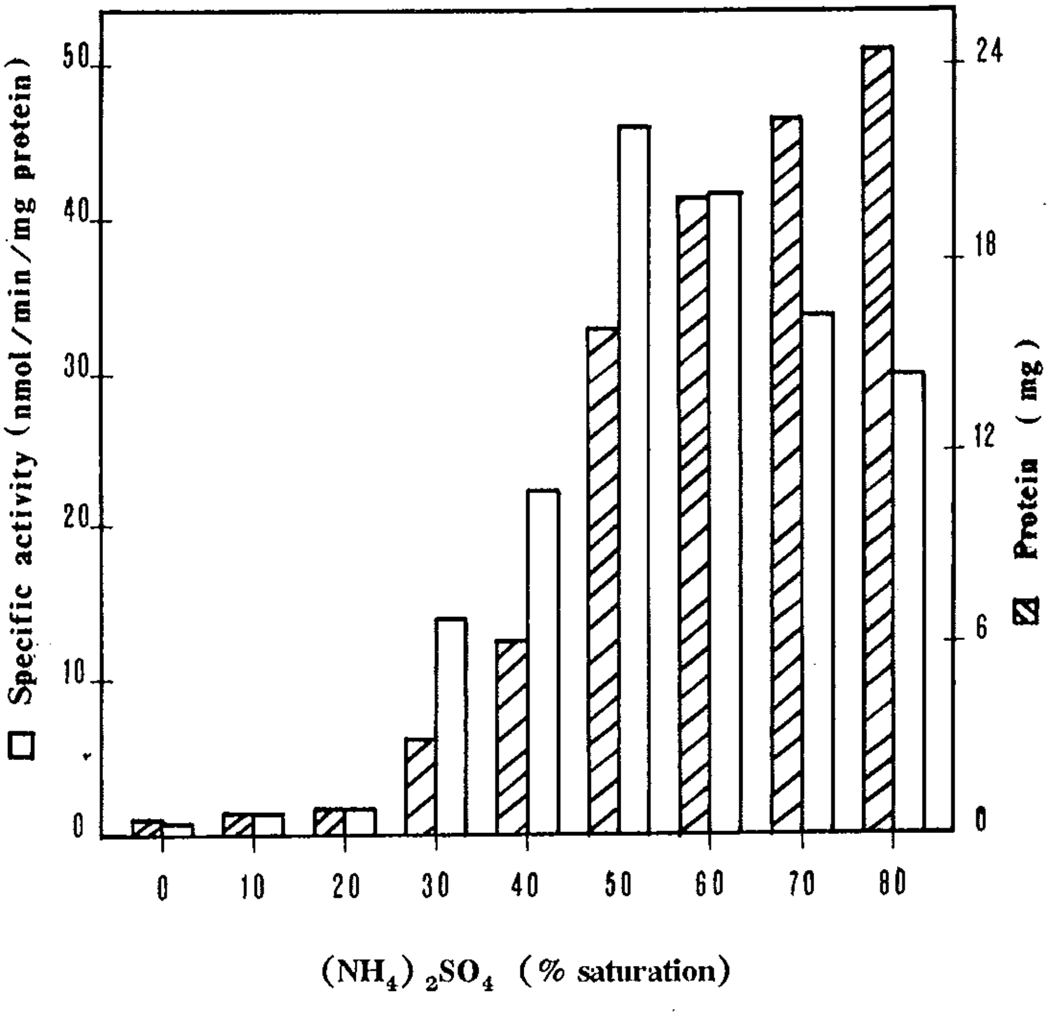
3.1.2 ผลของแอมโมเนียม ซัลเฟต

ในการตกตะกอนโปรตีนจากสารสกัดปาล์มโดยใช้แอมโมเนียม ซัลเฟต ที่ความอิ่มตัวต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-80% พบว่าโปรตีนตกตะกอนน้อยมากเมื่อใช้แอมโมเนียม ซัลเฟต ความอิ่มตัวไม่เกิน 20%(0.8 มิลลิกรัม) โปรตีนตกตะกอนเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียม ซัลเฟต ซึ่งมีปริมาณสูงสุดที่ความอิ่มตัว 80% (24.4 มิลลิกรัม) ในทำนองเดียวกัน แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC มีค่าต่ำ และเพิ่มขึ้นน้อยมากเมื่อใช้แอมโมเนียม ซัลเฟต ความอิ่มตัว 0-20% แล้วมีค่าเพิ่มขึ้นตามความอิ่มตัวของแอมโมเนียม ซัลเฟต



รูปที่ 4 ผลของ Triton X-100 ต่อการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม

จนมีค่าสูงสุดที่ความอิ่มตัว 50% (46.2 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC กลับลดลงเมื่อแอมโมเนียม ซัลเฟตมีความอิ่มตัวเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลของแอมโมเนียม ซัลเฟตต่อการตกตะกอนโปรตีนและเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์ม

3.1.3 ผลของ PVP

ในขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม เมื่อใส่ 4% PVP และเซนตริฟิวจ์ พบว่าปริมาณโปรตีนในสารสกัดปาล์มลดลงจาก 5.6 ± 2.6 มิลลิกรัม ก่อนใส่ PVP เป็น 1.9 ± 0.9 มิลลิกรัม แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC ในสารสกัดปาล์มที่ใส่ 4% PVP (28.8 ± 7.2 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) มีค่ามากกว่าของสารสกัดปาล์มที่ไม่ใส่ PVP (23.1 ± 5.9 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) ไม่มากนัก แอคทิวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ ACC ในสารสกัดปาล์มที่มี PVP และไม่มี PVP มีค่าแตกต่างกัน คือ 205.2 ± 20.6 และ 92.0 ± 15.2 นาโนโมล/นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลของ PVP ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC

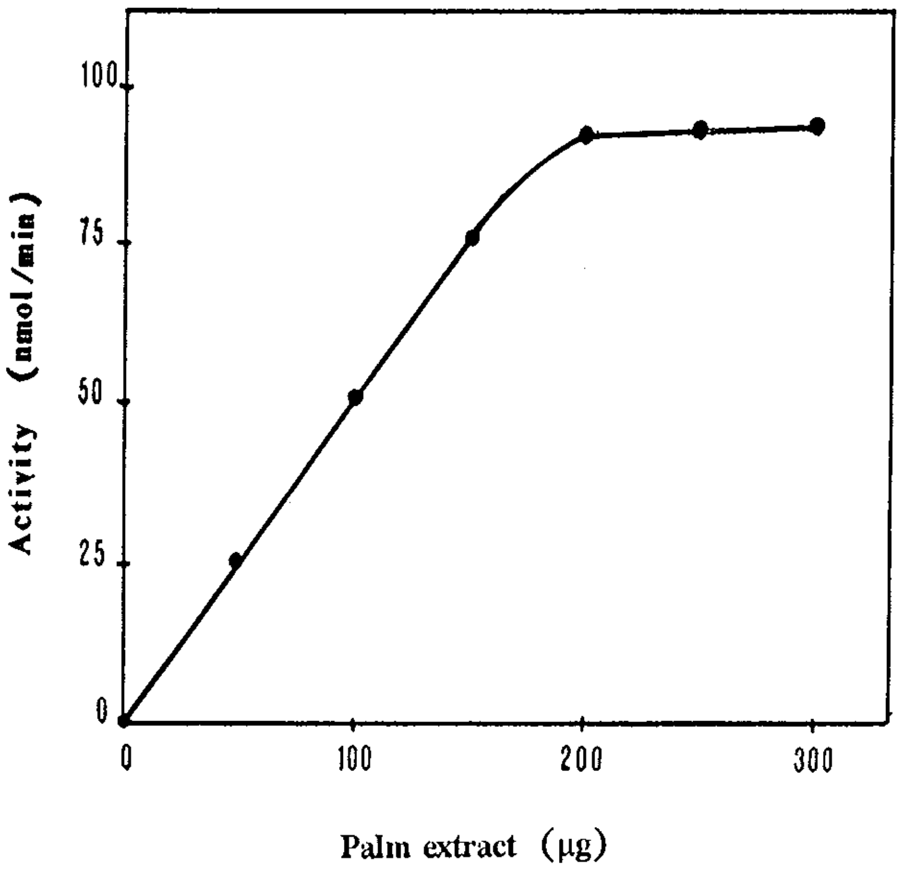
การใส่ 4% PVP	แอคทิวิตีจำเพาะ (นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน)	แอคทิวิตีทั้งหมด (นาโนโมล/นาที)	โปรตีน (มิลลิกรัม)
ไม่ใส่	23.1 ± 5.9	205.2 ± 20.6	5.6 ± 2.6
ใส่	28.8 ± 7.2	92.0 ± 15.2	1.9 ± 0.9

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลปาล์ม 6 ตัวอย่าง

3.2 คุณสมบัติของสารสกัดปาล์ม

3.2.1 ผลของปริมาณโปรตีนต่อการวัดแอคทิวิตี

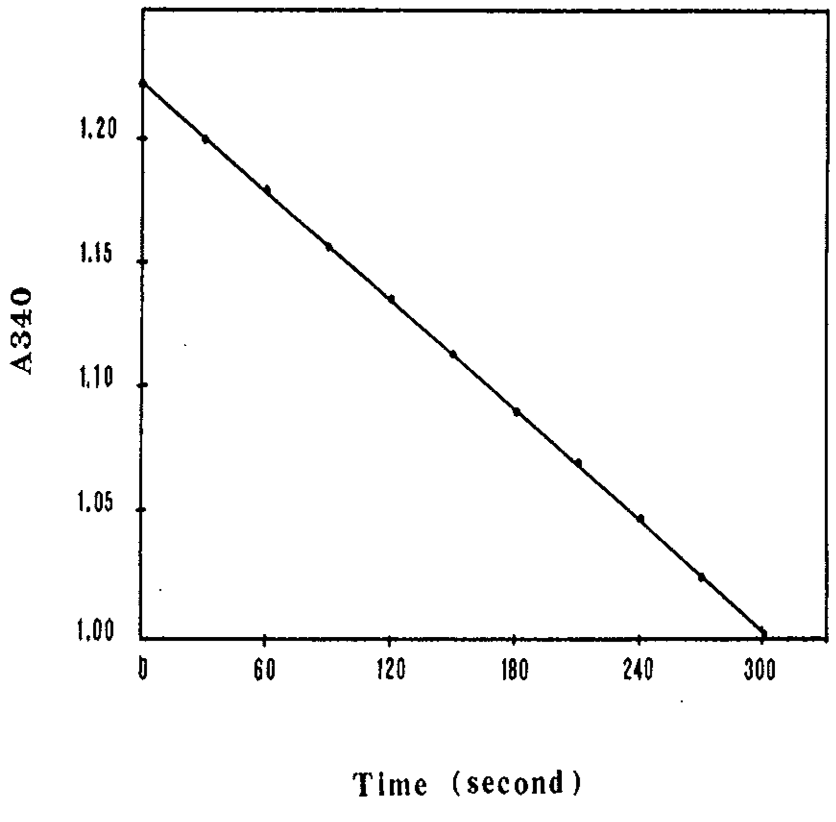
เพื่อหาปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมของสารสกัดปาล์ม ต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ทำการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในสารผสมปฏิกิริยา เมื่อใช้ปริมาณโปรตีนของสารสกัดปาล์มจำนวนต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-300 ไมโครกรัม พบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC เพิ่มขึ้นตามปริมาณโปรตีนที่เพิ่มมากขึ้นจนถึง 200 ไมโครกรัม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 92 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน จากนั้นแอคทิวิตีของเอนไซม์คงที่แม้เพิ่มโปรตีนมากขึ้นก็ตาม (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ผลของปริมาณโปรตีนต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC

3.2.2 เวลาของการวัดแอคทิวิตี

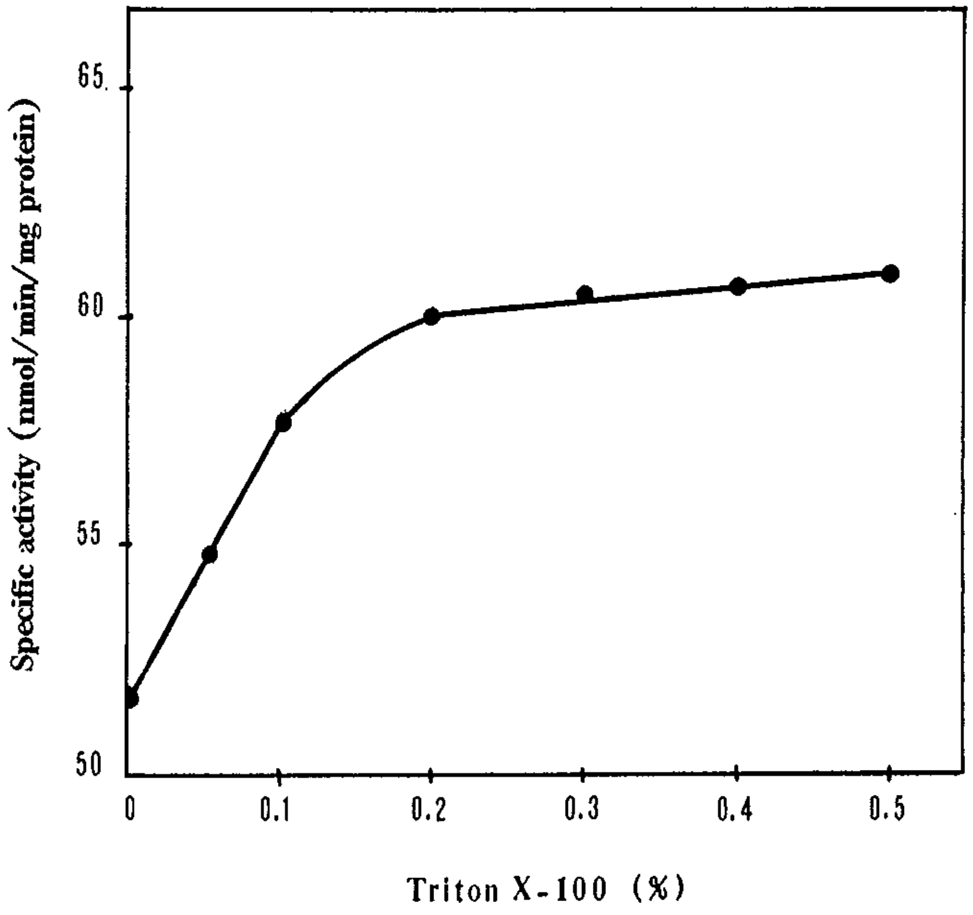
ในการหาเวลาที่เหมาะสม ของการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ซึ่งยังอยู่ในช่วงเส้นตรง ทำการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในสารผสมปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตรและอ่านค่าการดูดกลืนแสงของ NADH ที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วงเวลา 0-300 วินาที ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 30 วินาที พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของ NADH ลดลงในลักษณะเส้นตรงตลอดช่วงเวลาดังกล่าว (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 เวลาของการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC

3.2.3 ผลของ Triton X-100 ต่อการวัดแอคทิวิตี

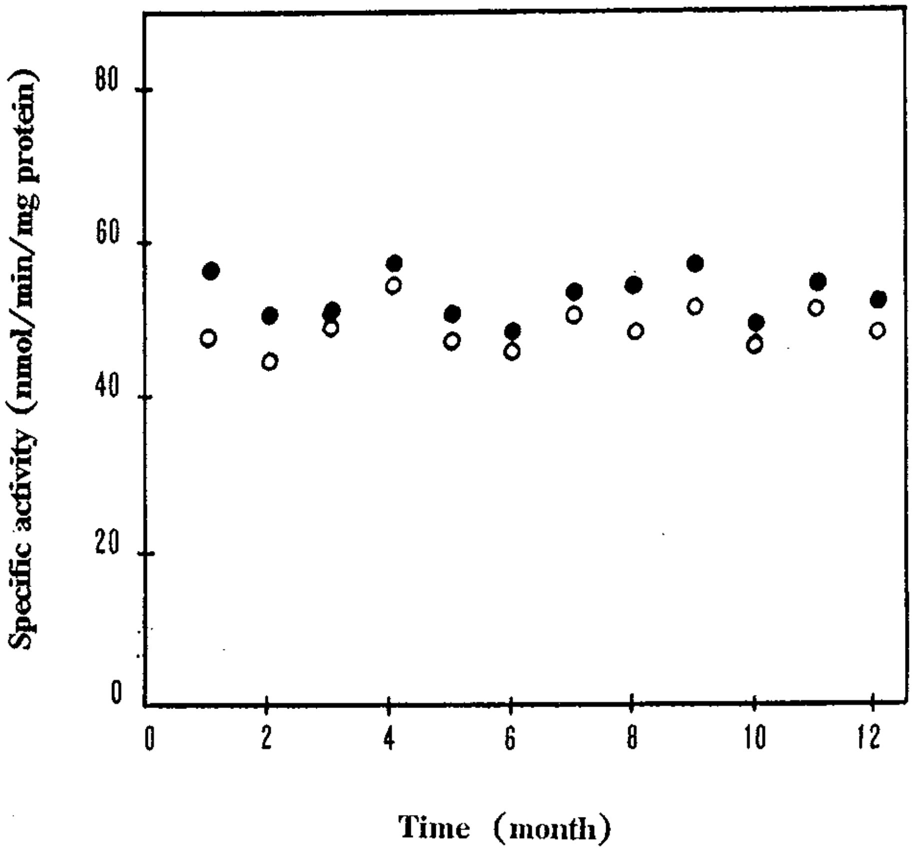
จากการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ของสารสกัดปาล์ม ในสารผสมปฏิกิริยาที่มี Triton X-100 ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.5% พบว่าแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์เมื่อไม่มี Triton X-100 มีค่าเท่ากับ 51.5 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน เอนไซม์ ACC มีแอคทิวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ Triton X-100 จนถึง 0.2% (59.6 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) และเริ่มคงที่เมื่อใช้ Triton X-100 ความเข้มข้นมากกว่านี้ (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 ผลของ Triton X-100 ต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC

3.2.4 ความเสถียรของสารสกัดปาล์มที่ -70°ซ

จากการเก็บสารสกัดปาล์มในบัฟเฟอร์ที่มี 5 mM ไอโซซิเตรท และไม่มีไอโซซิเตรท ที่อุณหภูมิ -70°ซ เป็นเวลานาน 1 ปี โดยนำสารสกัดปาล์มมาวัดแอคทิวิตีและหาปริมาณโปรตีนทุกเดือน พบว่าแอคทิวิตีจำเพาะของสารสกัดปาล์มที่มี 5 mM ไอโซซิเตรท (48-58 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) และไม่มีไอโซซิเตรท (44-55 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาการเก็บ 1 ปี ดังแสดงผลในรูปที่ 9



รูปที่ 9 ความเสถียรของสารสกัดปาล์มที่อุณหภูมิ -70°ซ
(● มีไอโซซิเตรท; ○ ไม่มีไอโซซิเตรท)

3.3 คุณสมบัติของผลปาล์มต่างพันธุ์

3.3.1 น้ำหนักผลและปริมาณเนื้อผลปาล์ม

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของผลปาล์มที่นำมาศึกษา พันธุ์เทเนอรา ดูรา และพิสิฟิรา พบว่ามีน้ำหนัก 10.5 $\pm$ 2.8, 17.9 $\pm$ 5.7 และ 9.1 $\pm$ 2.3 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 7) เมื่อหาเฉพาะปริมาณเนื้อผลปาล์มทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าปริมาณเนื้อผลปาล์มของพันธุ์เทเนอราเป็น 7.1 $\pm$ 2.1 กรัม ของพันธุ์ดูราเป็น 8.7 $\pm$ 3.1 กรัม และของพันธุ์พิสิฟิราเป็น 6.2 $\pm$ 1.7 กรัม เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเนื้อผลปาล์มต่อน้ำหนักผลปาล์มทั้ง 3 พันธุ์ได้ค่าของพันธุ์เทเนอราเป็น 67.6 $\pm$ 0.7% ดูรา 48.6 $\pm$ 0.5% และพิสิฟิรา 68.1 $\pm$ 1.0% ดังแสดงผลในตารางที่ 7

3.3.2 ปริมาณโปรตีน แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และปริมาณไขมัน

จากการวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดปาล์มที่สกัดได้จากเนื้อผลปาล์ม 3 พันธุ์ โดยคิดปริมาณโปรตีนต่อเนื้อผลปาล์มที่ใช้สกัด พบว่าพันธุ์เทเนอรา มีโปรตีนเท่ากับ 4.3 $\pm$ 1.0 มิลลิกรัม/กรัมเนื้อผลปาล์ม พันธุ์ดูราเป็น 4.7 $\pm$ 1.5 มิลลิกรัม/กรัมเนื้อผลปาล์ม และพันธุ์พิสิฟิรามีค่าเท่ากับ 3.9 $\pm$ 1.0 มิลลิกรัม/กรัมเนื้อผลปาล์ม ในทำนองเดียวกัน จากการคำนวณปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ต่อน้ำหนักผลปาล์มของพันธุ์เทเนอรา ดูรา และพิสิฟิรา มีค่าเป็น 2.9 $\pm$ 0.7, 2.3 $\pm$ 0.8 และ 2.7 $\pm$ 0.7 มิลลิกรัม/กรัมผล ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ในการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ซึ่งสกัดจากผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา ดูรา และพิสิฟิรา พบว่ามีค่า 56.3 $\pm$ 9.7, 47.2 $\pm$ 7.0 และ 49.0 $\pm$ 9.0 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ต่อจำนวนเนื้อผลปาล์ม 1 กรัม ที่นำมาสกัดของปาล์มพันธุ์เทเนอรามีค่าเป็น 242.3 $\pm$ 10.1 นาโนโมล/นาที/กรัมเนื้อผลปาล์ม ของพันธุ์ดูรา เป็น 221.2 $\pm$ 10.3 นาโนโมล/นาที/กรัมเนื้อผลปาล์ม และของพันธุ์พิสิฟิราเป็น 193.3 $\pm$ 9.0 นาโนโมล/นาที/กรัมเนื้อผลปาล์ม และเมื่อคิดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ต่อน้ำหนักของผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา ดูรา

ตารางที่ 7 น้ำหนักผล ปริมาณโปรตีน เอนไซม์ ACC และไขมันของผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา ดูรา และพิสิฟิรา

	เทเนอรา (n=20)	ดูรา (n=12)	พิสิฟิรา (n=8)
ผลปาล์ม (กรัม)	10.5 ± 2.8	17.9 ± 5.7	9.1 ± 2.3
เนื้อผลปาล์ม (กรัม)	7.1 ± 2.1	8.7 ± 3.1	6.2 ± 1.7
เนื้อผลปาล์มต่อผล (%)	67.6 ± 0.7	48.6 ± 0.5	68.1 ± 1.0
โปรตีน			
(มก./กรัมเนื้อผลปาล์ม)	4.3 ± 1.0	4.7 ± 1.5	3.9 ± 1.0
(มก./กรัมผล)	2.9 ± 0.7	2.3 ± 0.8	2.7 ± 0.7
เอนไซม์ ACC			
(หน่วย/มก.โปรตีน)	56.3 ± 9.7	47.2 ± 7.0	49.0 ± 9.0
(หน่วย/กรัมเนื้อผลปาล์ม)	242.3 ± 10.1	221.2 ± 10.3	193.3 ± 9.0
(หน่วย/กรัมผล)	151.7 ± 7.0	107.5 ± 5.1	131.6 ± 3.0
ไขมัน			
(มก./กรัมเนื้อผลปาล์ม)	305.0 ± 6.0	310.0 ± 7.0	260.0 ± 3.0
(มก./กรัมผล)	206.2 ± 4.2	150.7 ± 3.5	177.1 ± 3.0

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลปาล์ม n ต้น

หน่วยของเอนไซม์มีค่าเป็น นาโนโมล/นาที

และพิสิฟิรา มีค่าเป็น 151.7 ± 7.0, 107.5 ± 5.1 และ 131.6 ± 3.0 นาโนโมล/นาที/กรัมผล ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ในทำนองเดียวกัน เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณไขมันจากเนื้อผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา ดูราและพิสิฟิรา มีปริมาณเป็น 305.0 ± 6.0, 310.0 ± 7.0 และ 260.0 ± 3.0 มิลลิกรัม/กรัมเนื้อผลปาล์ม ตามลำดับ หรือมีค่าเป็น 206.2 ± 4.2, 150.7 ± 3.5 และ 177.1 ± 3.0 มิลลิกรัม/กรัมผล ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 7

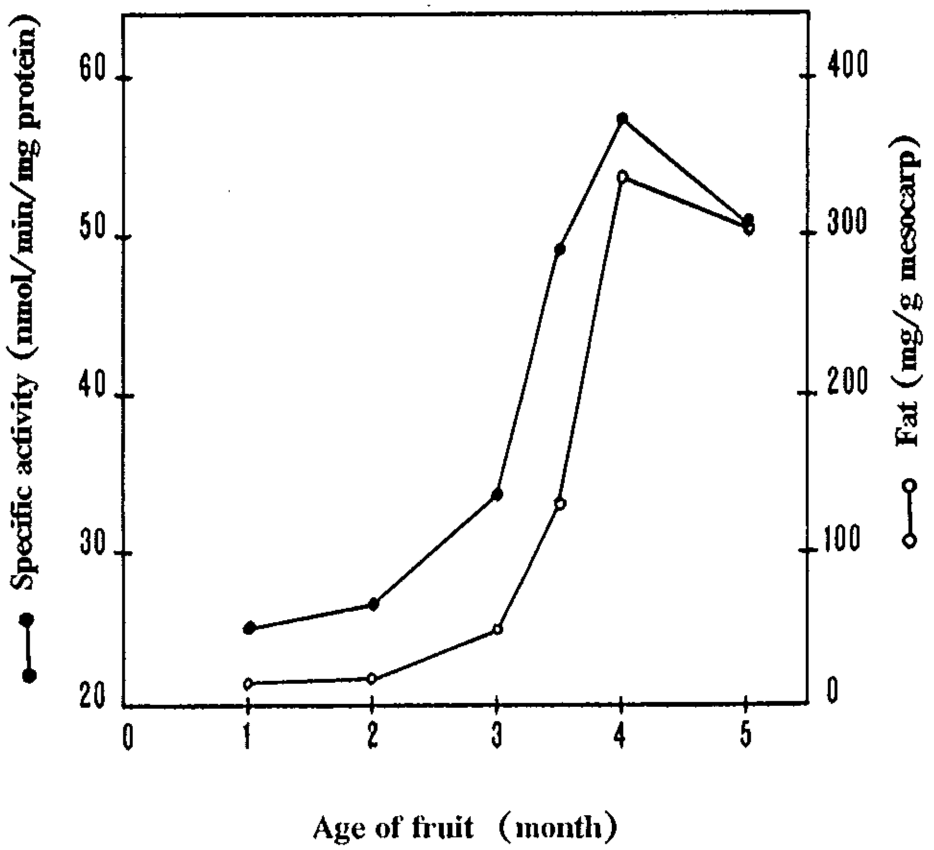
3.4 คุณสมบัติของผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา

3.4.1 ความเสถียรของผลปาล์มที่ -70°ซ

จากการเก็บผลปาล์มพันธุ์เทเนอราที่อุณหภูมิ -70°ซ แล้วนำไปสกัดเพื่อหาแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และปริมาณโปรตีนทุกเดือน เป็นเวลานาน 1 ปี พบว่าแอคทิวิตีจำเพาะของสารสกัดจากผลปาล์มเหล่านี้มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดเวลา 1 ปี คือมีแอคทิวิตีจำเพาะอยู่ในช่วง 48-56 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน ผลการทดลองเป็นทำนองเดียวกับรูปที่ 9 แต่ไม่ได้แสดงไว้

3.4.2 เอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันของผลปาล์มที่มีอายุการสุกต่าง ๆ

ในการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ซึ่งสกัดจากเนื้อผลปาล์มพันธุ์เทเนอราที่มีอายุของผลต่าง ๆ กัน พบว่าแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC ของผลปาล์มอายุ 1-2 เดือน (25.3 และ 26.3 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน ตามลำดับ) มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามอายุของผลและเริ่มมีค่าเพิ่มเมื่ออายุ 3 เดือน (31.2 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอายุ 3.5 เดือน (49.2 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) ซึ่งมีค่าสูงสุดเมื่อผลห่ามมีอายุ 4 เดือน (57.5 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) เอนไซม์ ACC มีแอคทิวิตีลดลงเมื่อผลสุกเต็มที่ อายุ 5 เดือน (50.8 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) (รูปที่ 10)



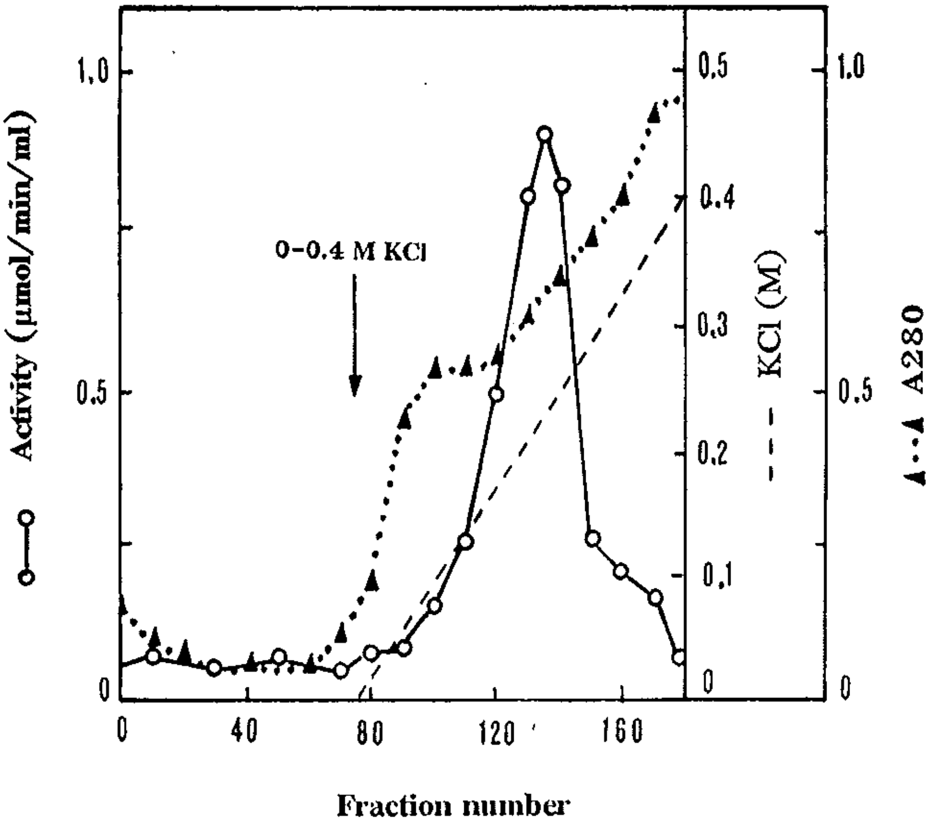
รูปที่ 10 เอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันของผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา ที่มีอายุต่าง ๆ (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของผลปาล์ม 6 ต้น)

ในทำนองเดียวกันไขมันของเนื้อผลปาล์มพันธุ์เทเนอราที่มีอายุ 1-3 เดือน (5.2, 8.1 และ 30.0 มิลลิกรัม/กรัมเนื้อผลปาล์ม) มีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและเพิ่มอย่างรวดเร็วในช่วงผลมีอายุ 3.5-4 เดือน จนมีค่าสูงสุดเมื่อผลอายุ 4 เดือน (320 มิลลิกรัม/กรัมเนื้อผลปาล์ม) และมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อผลสุกเต็มที่อายุ 5 เดือน (300 มิลลิกรัม/กรัมเนื้อผลปาล์ม) ดังแสดงผลในรูปที่ 10

3.5 การทำให้เอนไซม์ ACC บริสุทธิ์

3.5.1 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เมื่อนำสารสกัดปาล์ม (1,101 มก.โปรตีน) ที่ได้จากการขจัดไขมันออกด้วยการเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 2,000 x g และตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 60% ไปผสมกับ DEAE-Sephacel ที่ 4°ซ นาน 18 ชั่วโมง แล้วเทสารผสมลงในคอลัมน์เพื่อให้ DEAE-Sephacel อัดเรียงตัวในคอลัมน์ แล้วแยกโปรตีนส่วนใหญ่ (52%) ที่ไม่จับกับ DEAE-Sephacel ออกมา เมื่อทำการชะโปรตีนที่จับอยู่กับ DEAE-Sephacel ด้วย KCl ที่มีความเข้มข้นเพิ่มอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ 0-0.4 M พบว่าเอนไซม์ ACC ถูกชะออกมาเป็นพีคเดียวด้วย KCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.22 M (รูปที่ 11) เมื่อรวมสารละลายหลอดที่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC สูงเข้าด้วยกัน และทำให้เข้มข้นด้วย CM-cellulose พบว่าสารละลายเอนไซม์รวมมีปริมาณโปรตีน 16.8 มิลลิกรัม และมีค่าแอคทิวิตีจำเพาะ 1,160 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน คิดเป็นโปรตีน 1.0% และแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC 21.6% ของสารสกัดปาล์มเริ่มต้น สารละลายเอนไซม์ที่แยกได้โดยคอลัมน์นี้มีความบริสุทธิ์เป็น 22.3 เท่า ของสารสกัดปาล์มเริ่มต้น (ตารางที่ 8)



รูปที่ 11 การแยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์มโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

นำสารสกัดปาล์ม (โปรตีน 1,101 มก.) ผสมรวมกับ DEAE-Sephacel ปริมาตร 400 มล. ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 18 ชั่วโมง แล้วเทสารผสมลงในคอลัมน์ จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราเร็ว 26 มล./ชม. จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะต่อด้วย KCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่อง 0-0.4 M (500 มล. + 500 มล.) ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารละลายหลอดละ 4 มล.

ตารางที่ 8 การแยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์ม

	โปรตีน		เอนไซม์ ACC			
	มิลลิกรัม	%	หน่วย	%	หน่วย/มก.โปรตีน	ความบริสุทธิ์(เท่า)
สารสกัดปาล์ม	1,740.0	100.0	90,080	100.0	52	1.0
ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 60 %	1,101.0	63.3	61,435	68.2	56	1.1
คอลัมน์ DEAE-Sephacel	16.8	1.0	19,488	21.6	1,160	22.3
คอลัมน์ Sephadex G-150						
พีค S1	3.6	0.2	14,544	16.1	4,040	77.7
พีค S2	3.0	0.2	4,190	4.6	1,420	27.3

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง

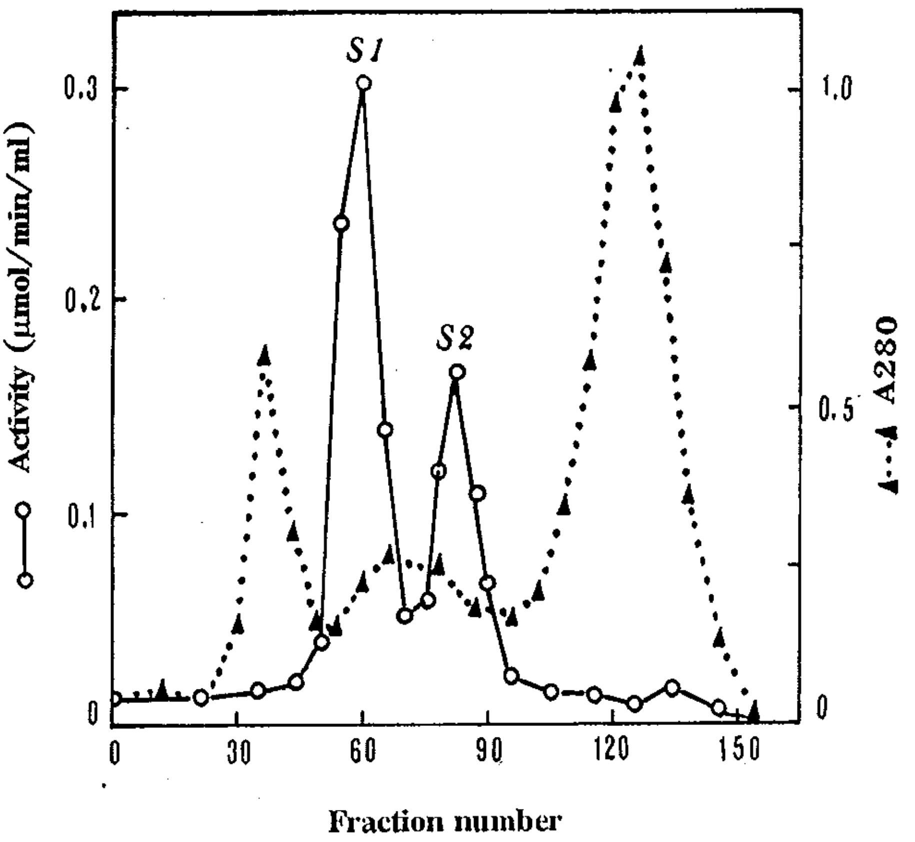
หน่วยของเอนไซม์ ACC มีค่าเป็นจำนวนนาโนโมลของสับสเตรทที่เปลี่ยนไปต่อนาที

3.5.2 โดยคอลัมน์ Sephadex G-150

นำสารละลายเอนไซม์รวมที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ DEAE -Sephacel (16.8 มก.โปรตีน) ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 3 พีค (รูปที่ 12) โปรตีนพีคแรกและพีคที่ 3 มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ต่ำมาก เอนไซม์ ACC ถูกชะแยกเป็น 2 พีค (พีค S1 และพีค S2) ในตำแหน่งของโปรตีนพีคที่ 2 เมื่อรวมสารละลายหลอดที่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC สูงแต่ละพีคเข้าด้วยกัน แล้วทำให้เข้มข้น พบว่าสารละลายเอนไซม์ ACC พีค S1 มีแอคทิวิตีจำเพาะเป็น 4,040 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน และมีโปรตีน 3.6 มิลลิกรัม คิดเป็น 16.1% และ 0.2% ของสารสกัดปาล์มเริ่มต้น ตามลำดับ ส่วนสารละลายเอนไซม์พีค S2 มีแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC เป็น 1,420 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน และมีโปรตีน 3.0 มิลลิกรัม คิดเป็น 4.6% และ 0.2% ของสารสกัดปาล์มเริ่มต้น ตามลำดับ ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ACC พีค S1 และ S2 เป็น 77.7 และ 27.3 เท่า ของสารสกัดปาล์มเริ่มต้น ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

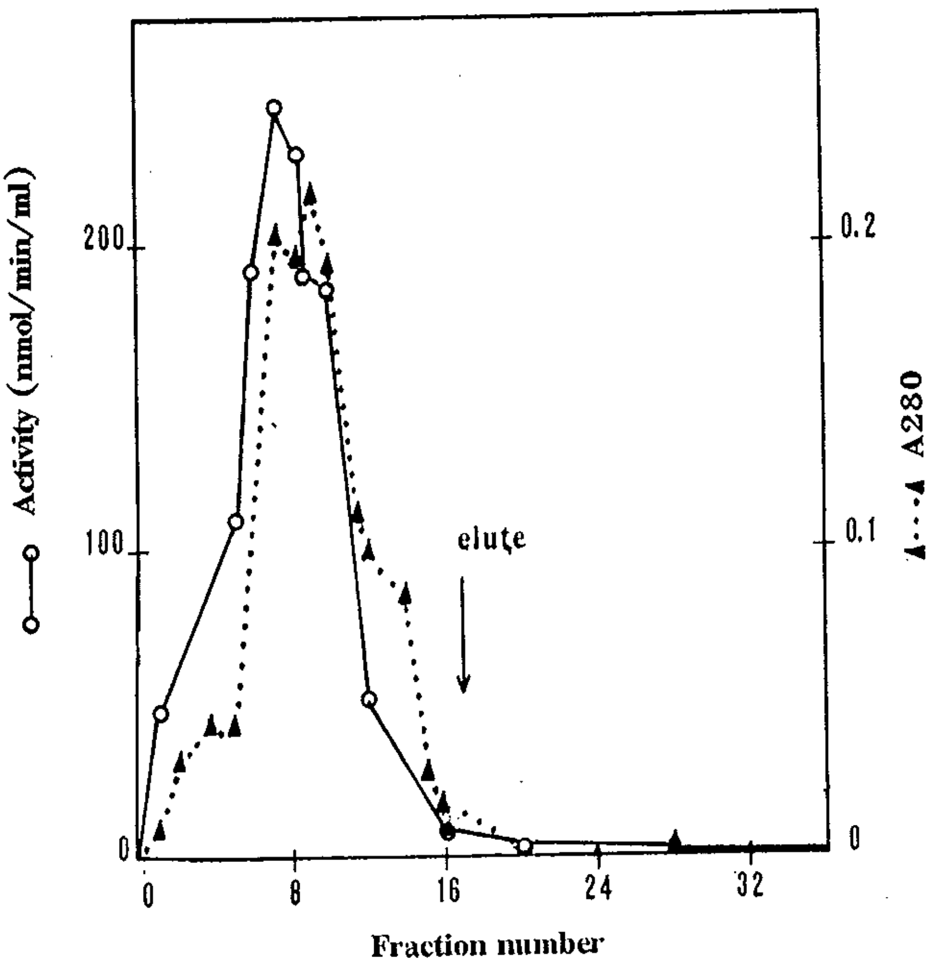
3.5.3 โดยคอลัมน์ Avidin-agarose

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นพีค S1 หรือพีค S2 ที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Avidin -agarose พบว่าเอนไซม์พีค S1 ไม่จับกับ Avidin-agarose (รูปที่ 13) โดยจะหลุดออกมาก่อนการชะด้วยบัฟเฟอร์ และมีค่าแอคทิวิตีจำเพาะคงเดิม เมื่อทำการแยกเอนไซม์ ACC พีค S2 ด้วยคอลัมน์ Avidin-agarose ก็ได้ผลเป็นเช่นเดียวกัน



รูปที่ 12 การแยกเอนไซม์ ACC ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150

รวมสารละลายจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel หลอดที่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้น แล้วใส่ลงในคอลัมน์ Sephadex G-150 (1.6x92 ซม.) จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl,pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราเร็ว 6 มล./ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล.



รูปที่ 13 การแยกเอนไซม์ ACC พีค S1 ด้วยคอลัมน์ Avidin-agarose

ผ่านเอนไซม์ ACC พีค S1 (0.6 มก.) ลงในคอลัมน์ Avidin-agarose (1.6 x 3.5 ซม.) ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5-1 mM PMSF ด้วยอัตราเร็ว 0.5 มล./ชม. และชะต่อด้วยไบโอติน (1 มก./มล.) ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มล.

3.6 คุณสมบัติของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2

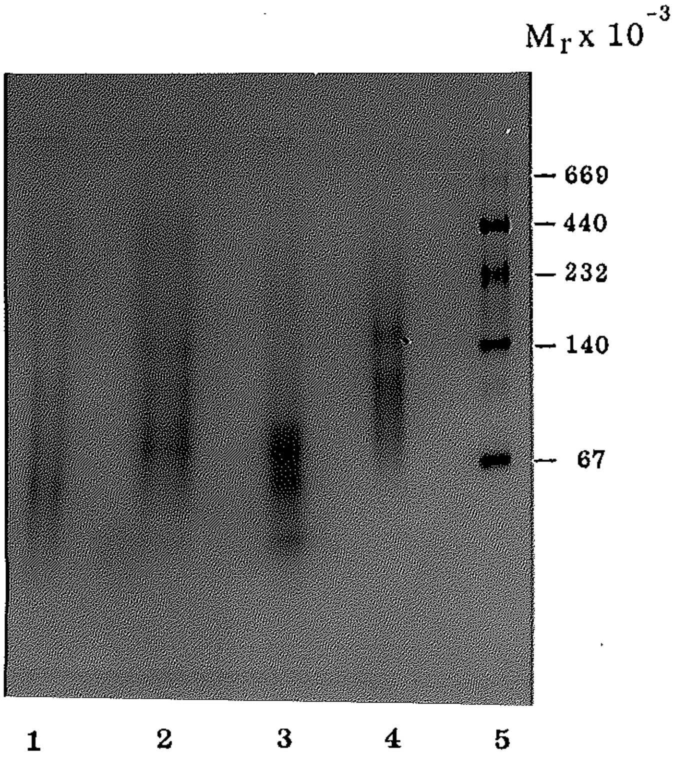
3.6.1 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ

เมื่อนำเอนไซม์ ACC พีค S1 และ พีค S2 ไปทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ แล้วย้อมด้วยสีคูมาซี บลู พบว่าสารละลายเอนไซม์ ACC พีค S1 ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-150 ยังไม่บริสุทธิ์เพราะปรากฏโปรตีน 5 แถบ (รูปที่ 14 แถวที่ 4) เช่นเดียวกับเอนไซม์พีค S2 ซึ่งปรากฏโปรตีน 4 แถบ (รูปที่ 14 แถวที่ 3) เมื่อนำแผ่นเจลแถวที่ 4 (พีค S1) ไปตัดตามขวางกว้างชิ้นละประมาณ 0.7 เซนติเมตร ดังแสดงผลในรูปที่ 15 แล้วหาค่าแอคทิวิตีของเจลแต่ละชิ้น ตามวิธีการข้อ 2.10.1 พบว่าไม่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในเจลชิ้นต่าง ๆ (A1-A7) ยกเว้นเจลชิ้น A4 ที่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC และปรากฏโปรตีนอยู่เพียงแถบเดียว บ่งชี้ว่าโปรตีนแถบนี้ในเจลชิ้น A4 ควรเป็นเอนไซม์ ACC พีค S1 ในทำนองเดียวกัน เมื่อนำโพลีอะคริลาไมด์ เจล ของเอนไซม์ ACC พีค S2 ไปตัดเป็นชิ้นตามขวางเช่นกัน ได้เจล 6 ชิ้น คือ B1-B6 (รูปที่ 16) พบเฉพาะเจลชิ้น B6 มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ส่วนเจลชิ้น B1-B5 ไม่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ เจลชิ้น B6 มีโปรตีนปรากฏ 1 แถบ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนแถบนี้ควรจะเป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์ ACC พีค S2

3.6.2 น้ำหนักโมเลกุล

3.6.2.1 โดยเจล ฟิลเตรชัน

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ACC โดยการทำโครมาโตกราฟีแบบเจล ฟิลเตรชัน ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 เปรียบเทียบกับค่า K ของโปรตีนมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ คาทาเลส โบวีนซีรัม อัลบูมิน และไคโมทริปซิโนเจน เอ เมื่อเขียนกราฟระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า K (รูปที่ 17A) คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ACC พีค S1 และ พีค S2 จากกราฟนี้ได้เป็น 126,000 ดัลตัน และ 36,000 ดัลตัน ตามลำดับ



รูปที่ 14 **แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ**

แถวที่ 1 สารสกัดปาล์มที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและไดแอไลซ์

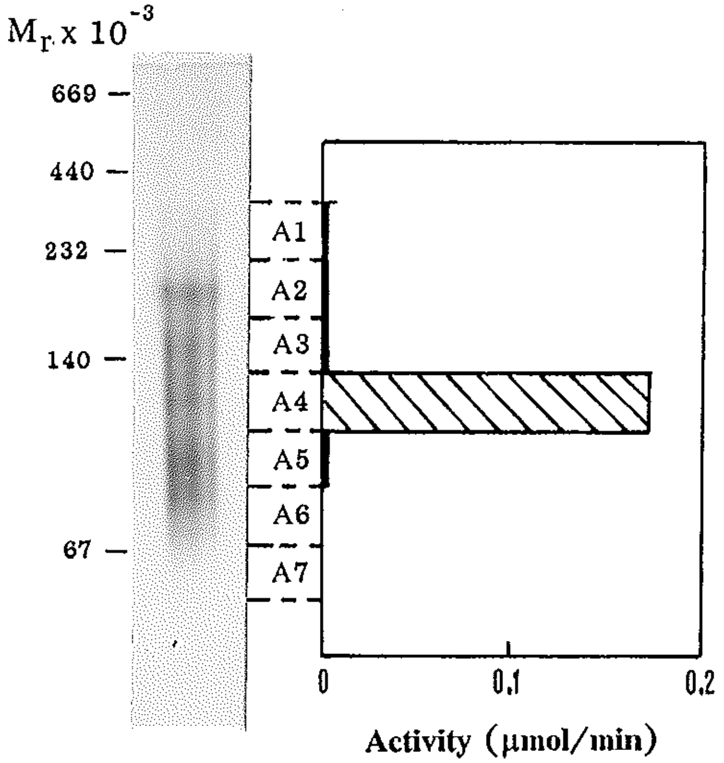
แถวที่ 2 เอนไซม์ ACC จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel

แถวที่ 3 เอนไซม์ ACC พีค S2 จากคอลัมน์ Sephadex

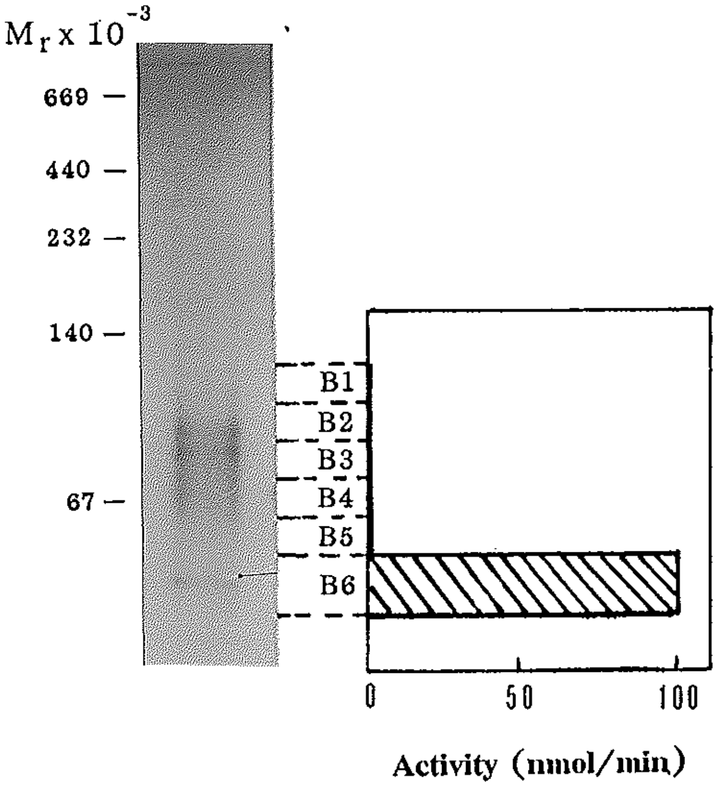
แถวที่ 4 เอนไซม์ ACC พีค S1 จากคอลัมน์ Sephadex

แถวที่ 5 โปรตีนมาตรฐาน

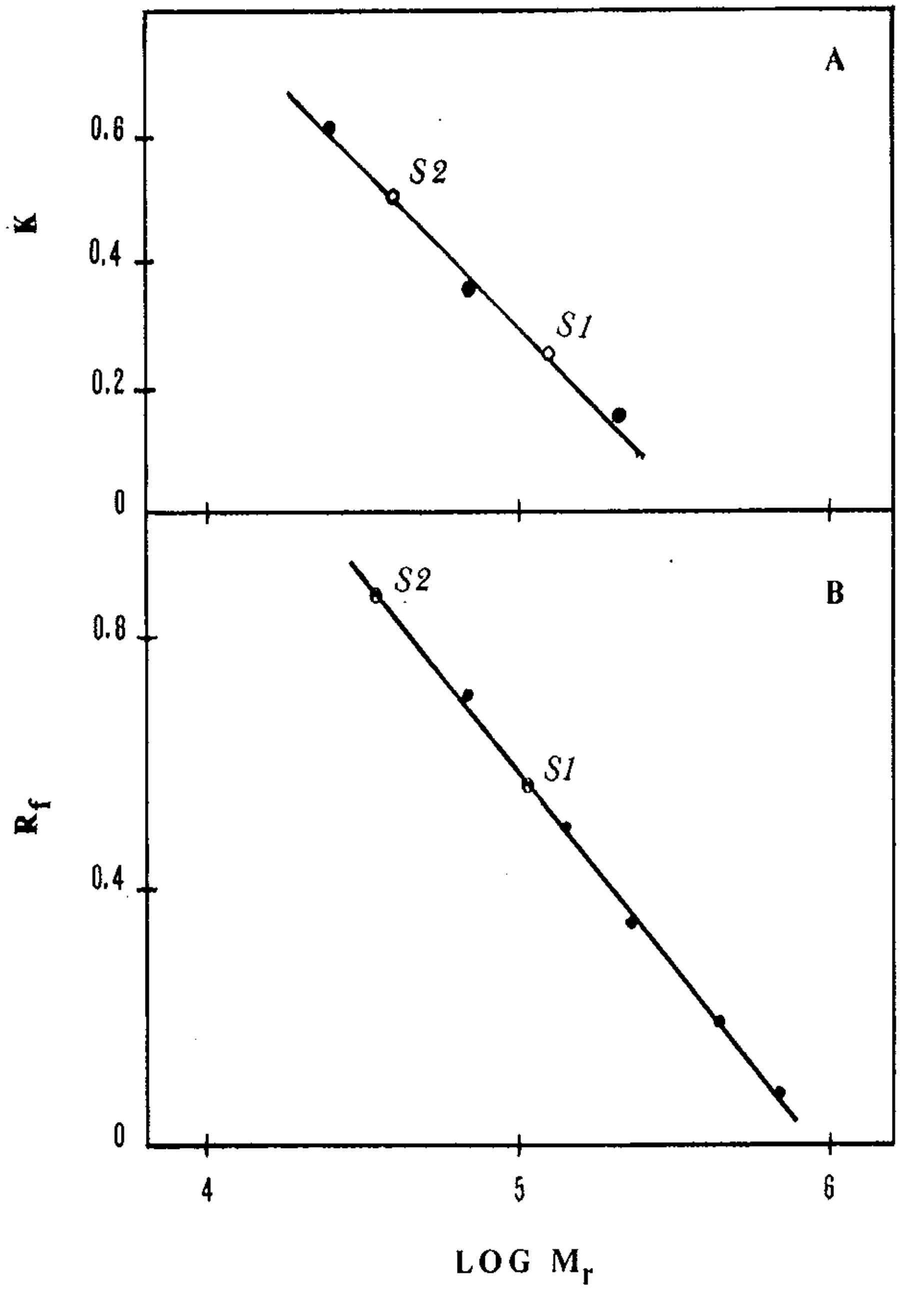
ปริมาณโปรตีนแต่ละแถวเท่ากัน (20 ไมโครกรัม)



รูปที่ 15 การตัดแถบโปรตีนจากโพลีอะคริลาไมด์ เจล ของเอนไซม์ ACC พีค S1 และแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในชิ้นเจล



รูปที่ 16 การตัดแถบโปรตีนจากโพลีอะคริลาไมด์ เจล ของเอนไซม์ ACC พีค S2 และแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในชิ้นเจล



รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 โดยคอลัมน์ Sephadex G-150 (A) และโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส (B)

3.6.2.2 โดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ACC โดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ โดยเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของเอนไซม์ กับของโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด ได้แก่ ไธโรโกลบูลิน เฟอร์ริทิน คาทาเลส แลคเตท ดีไฮโดรจีเนสและโบวีน ซีรัม อัลบูมิน กับ log น้ำหนักโมเลกุล พบว่าแถบโปรตีนในตำแหน่งของเจลชิ้น A4 ซึ่งเป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์ ACC พีค S1 มีน้ำหนักโมเลกุล 126,000 ดัลตัน ส่วนแถบโปรตีนในเจลชิ้น B6 ซึ่งเป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์ ACC พีค S2 มีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 ดัลตัน (รูปที่ 17B)

3.6.3 ผลของ pH

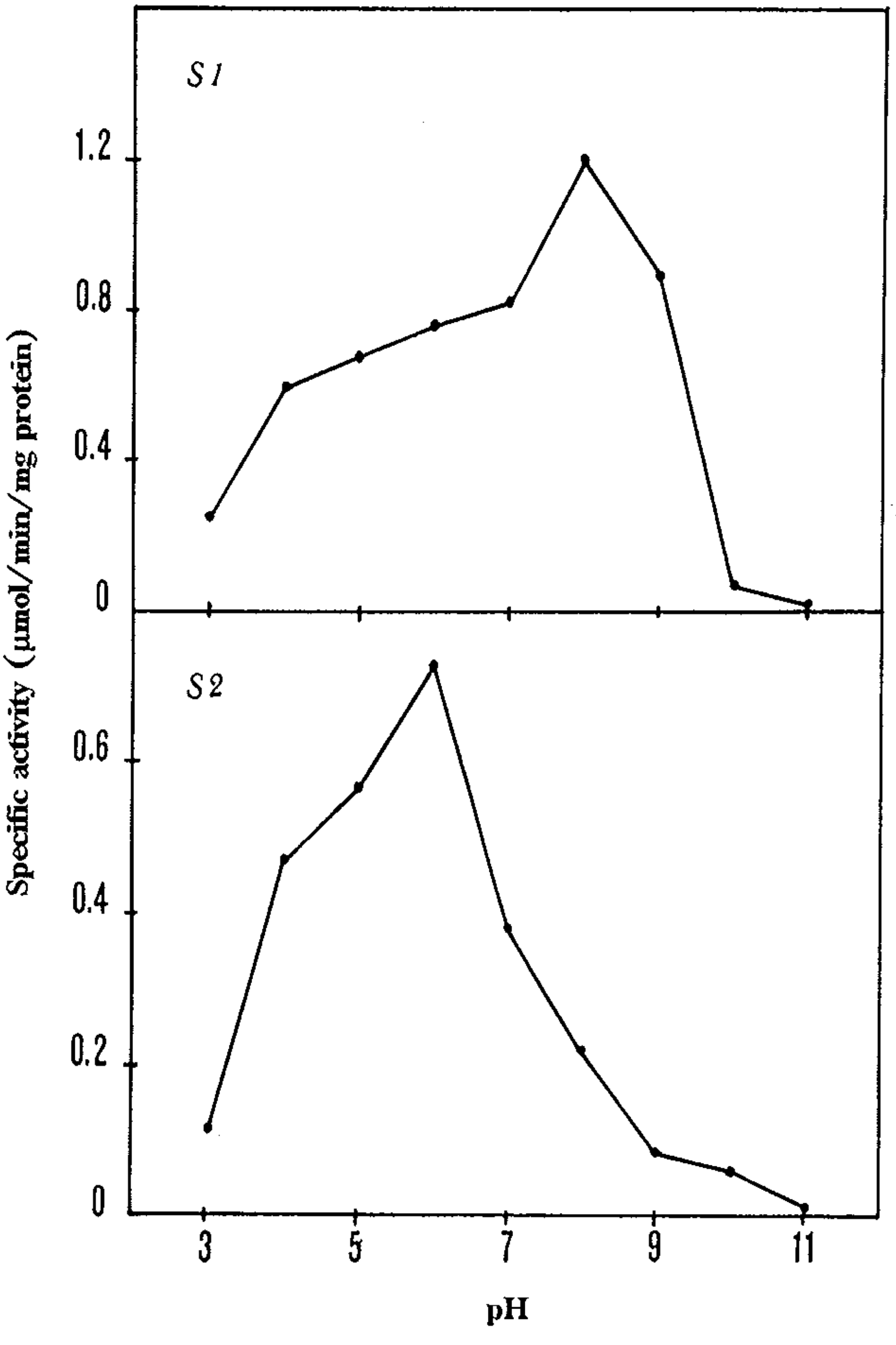
จากการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ในสารผสมปฏิกิริยาที่มี pH ต่าง ๆ ตามวิธีการในข้อ 2.10.4 พบว่า แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC พีค S1 มีค่าต่ำที่ pH 3 (250 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ใน pH ช่วง 4-7 และสูงสุดที่ pH 8 (1,190 นาโนโมล/นาที/มก. โปรตีน) จากนั้นแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC ลดลงจนไม่มีแอคทิวิตีเหลือที่ pH 11 (รูปที่ 18) ในทำนองเดียวกัน แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S2 มีค่าเพิ่มขึ้นจาก pH 3 จนมีค่าสูงสุดที่ pH 6 (730 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) แล้วลดลงตามความเป็นด่างที่เพิ่มมากขึ้น ดังแสดงผลในรูปที่ 18

3.6.4 จลนศาสตร์

ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ACC โดยศึกษาผลความเข้มข้นของสับสเตรท ได้แก่ อะซิติล-โคเอ ATP และ $NaHCO_3$ ได้ค่าความเข้มข้นของสับสเตรทที่เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้ 50% ของความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด เมื่อมีลักษณะกราฟแบบ Michaelis-Menten (ค่า K_m) หรือแบบซิกมอยด์ (ค่า $K_{0.5}$) ของแต่ละสับสเตรทเป็นดังนี้

3.6.4.1 ผลของอะซิติล-โคเอ

จากการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และ พีค S2 ในสารผสมปฏิกิริยาที่มีอะซิติล-โคเอ ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้ง



รูปที่ 18 ผลของ pH ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC
พีค S1 และพีค S2

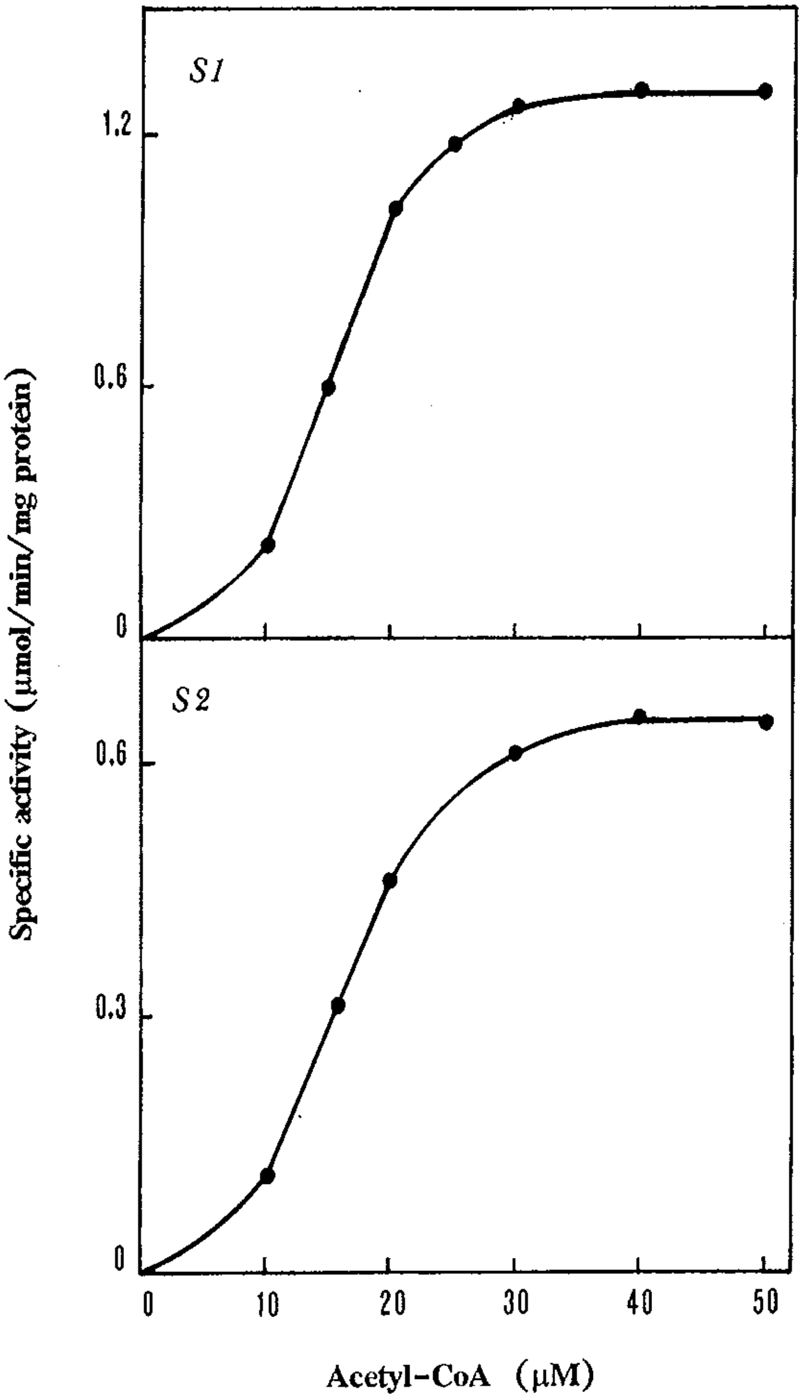
แต่ 0-50 μM พบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ทั้งพีค S1 และ พีค S2 มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของอะซิติล-โคเอ จนมีค่าสูงสุด (พีค S1 1,275 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน และพีค S2 652 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) และคงที่ที่ความเข้มข้นของอะซิติล-โคเอ 30 μM ลักษณะจลนศาสตร์ที่ได้เป็นแบบซิกมอยด์ (รูปที่ 19) เมื่อนำข้อมูลจากรูปที่ 19 ไปเขียนกราฟแบบ Hill เพื่อหาค่า $K_{0.5}$ พบค่า $K_{0.5}$ ของอะซิติล-โคเอ ต่อเอนไซม์ ACC พีค S1 และ พีค S2 มีค่าเป็น 15 μM (รูปที่ 20) และ 17 μM ตามลำดับ

3.6.4.2 ผลของ ATP

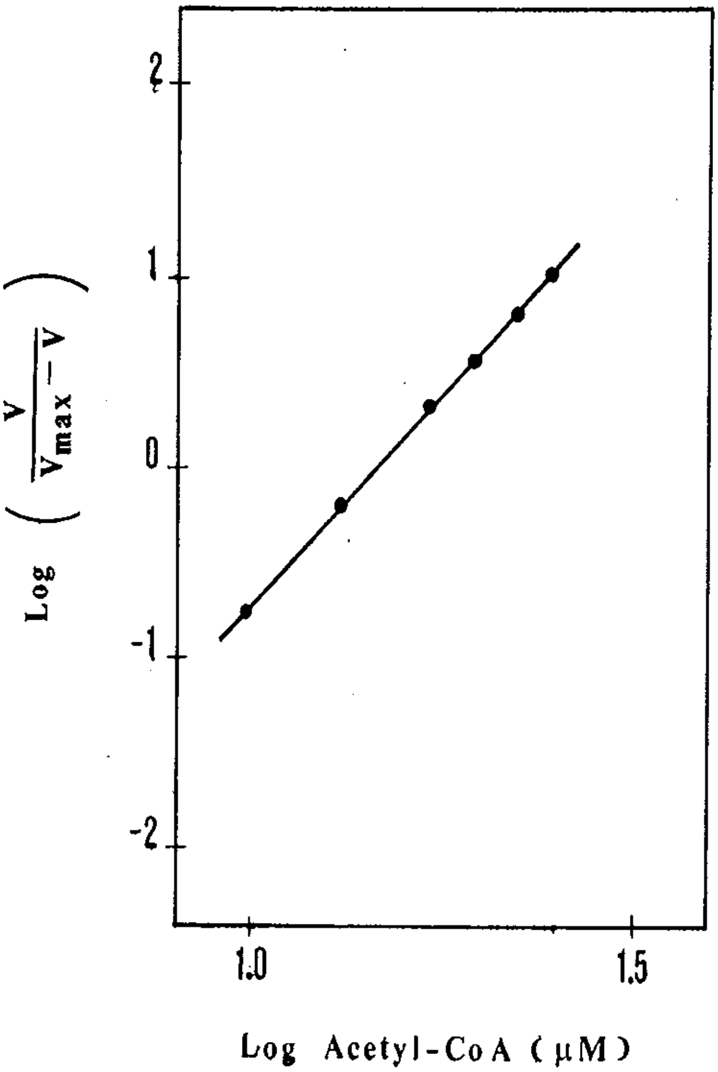
จากการทดสอบผลของ ATP ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-3 mM ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พบว่าเอนไซม์ ACC พีค S1 มีแอคทิวิตีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ ATP โดยมีค่าสูงสุด (1,140 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) และเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของ ATP เป็น 60 μM (รูปที่ 21) ในทำนองเดียวกัน แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S2 มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ ATP จนมีค่าสูงสุดที่ 2.5 mM (600 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) และคงที่ ดังแสดงผลในรูปที่ 21 เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ATP กับแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ทั้งพีค S1 และพีค S2 แบบ Lineweaver-Burk พบว่าค่า K_m ของ ATP ต่อเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 มีค่าเป็น 28 μM (รูปที่ 22) และ 0.8 mM ตามลำดับ

3.6.4.3 ผลของ $NaHCO_3$

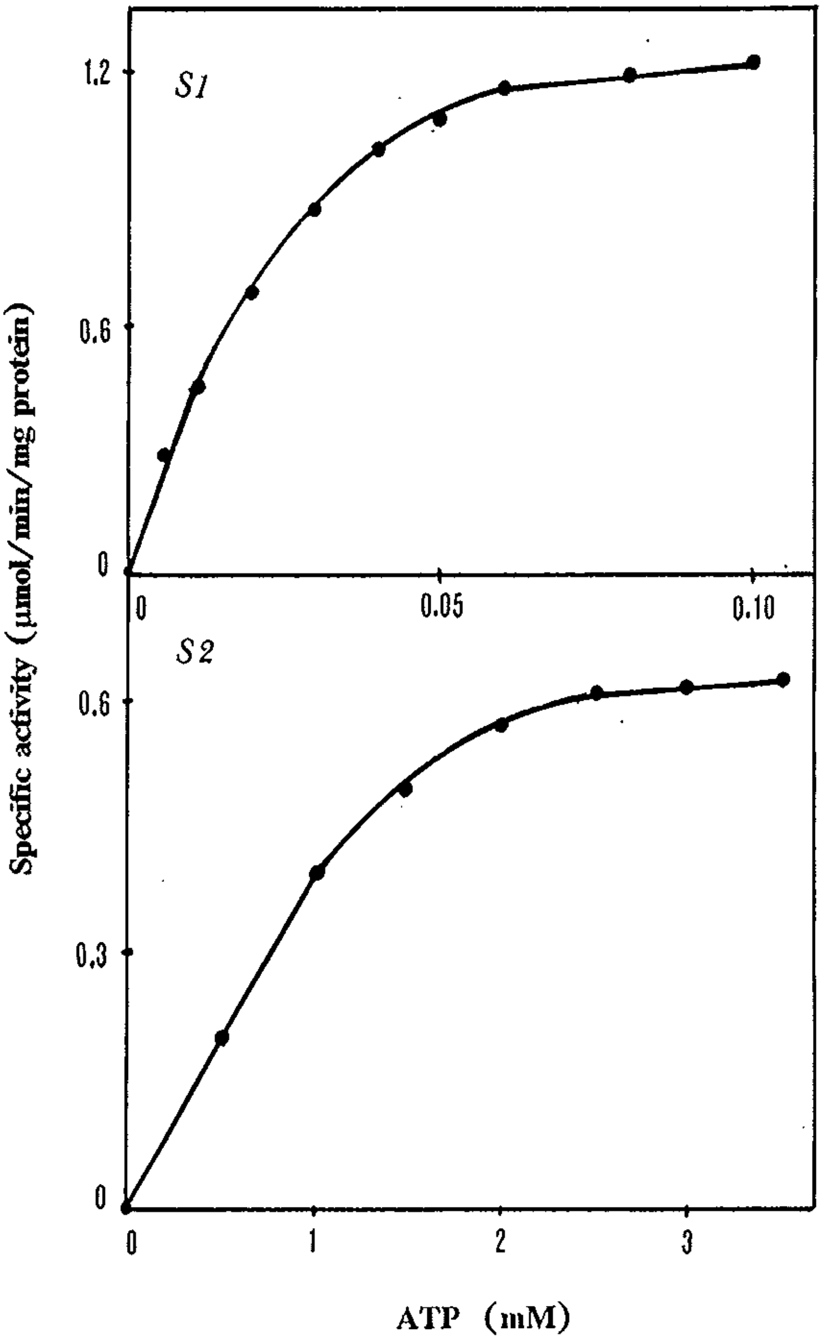
จากการศึกษาผลของ $NaHCO_3$ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ $NaHCO_3$ จนมีค่าสูงสุด (1,290 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) และคงที่ที่ความเข้มข้นของ $NaHCO_3$ 10 mM ส่วนแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S2 มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ $NaHCO_3$ จนถึง 50 mM ซึ่งเป็นค่าสูงสุด (660 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) และคงที่ (รูป 23) เมื่อนำค่าความเข้มข้นของ $NaHCO_3$ กับแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ทั้งพีค S1 และพีค S2 ไปเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk พบว่าค่า K_m ของ $NaHCO_3$ ต่อเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 มีค่าเป็น 4.8 mM และ 20 mM ตามลำดับ



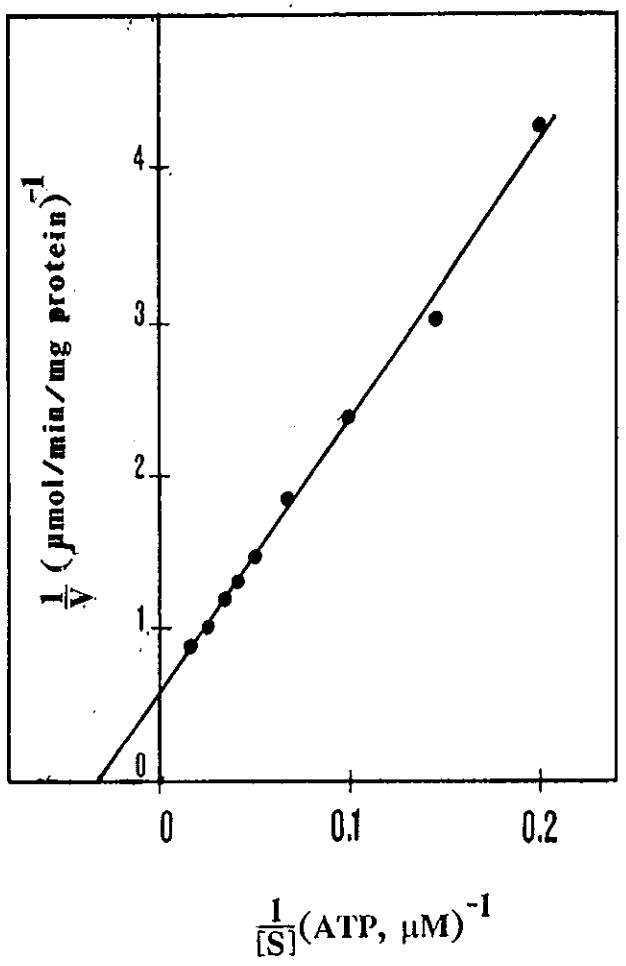
รูปที่ 19 ผลของอะซิติล-โคเอ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2



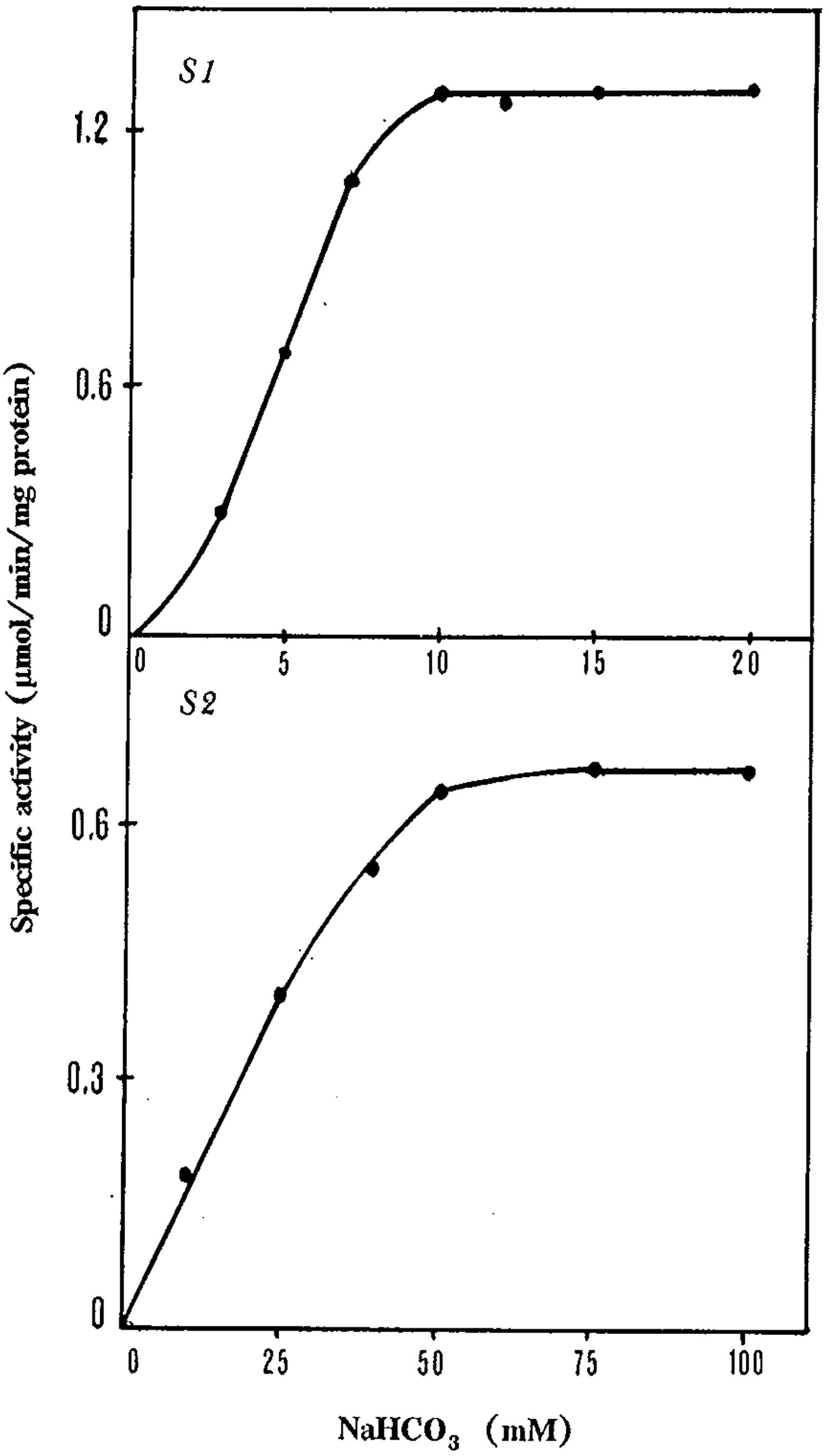
รูปที่ 20 การเขียนกราฟแบบ Hill ของเอนไซม์ ACC พีค S1 ต่ออะซิติล-โคเอ



รูปที่ 21 ผลของ ATP ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2



รูปที่ 22 การเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ของเอนไซม์ ACC พีค S1 ต่อ ATP



รูปที่ 23 ผลของ $NaHCO_3$ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2

3.6.5 ผลของไอออนและ EDTA

3.6.5.1 ผลของ EDTA

จากการศึกษาผลของ EDTA ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 พบว่าแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์พีค S1 เมื่อไม่มี EDTA มีค่าเท่ากับ 1,230 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน และมีค่าลดลงตามความเข้มข้นของ EDTA ที่เพิ่มขึ้นจนถึง 5 mM (รูปที่ 24)

3.6.5.2 ผลของ NaCl

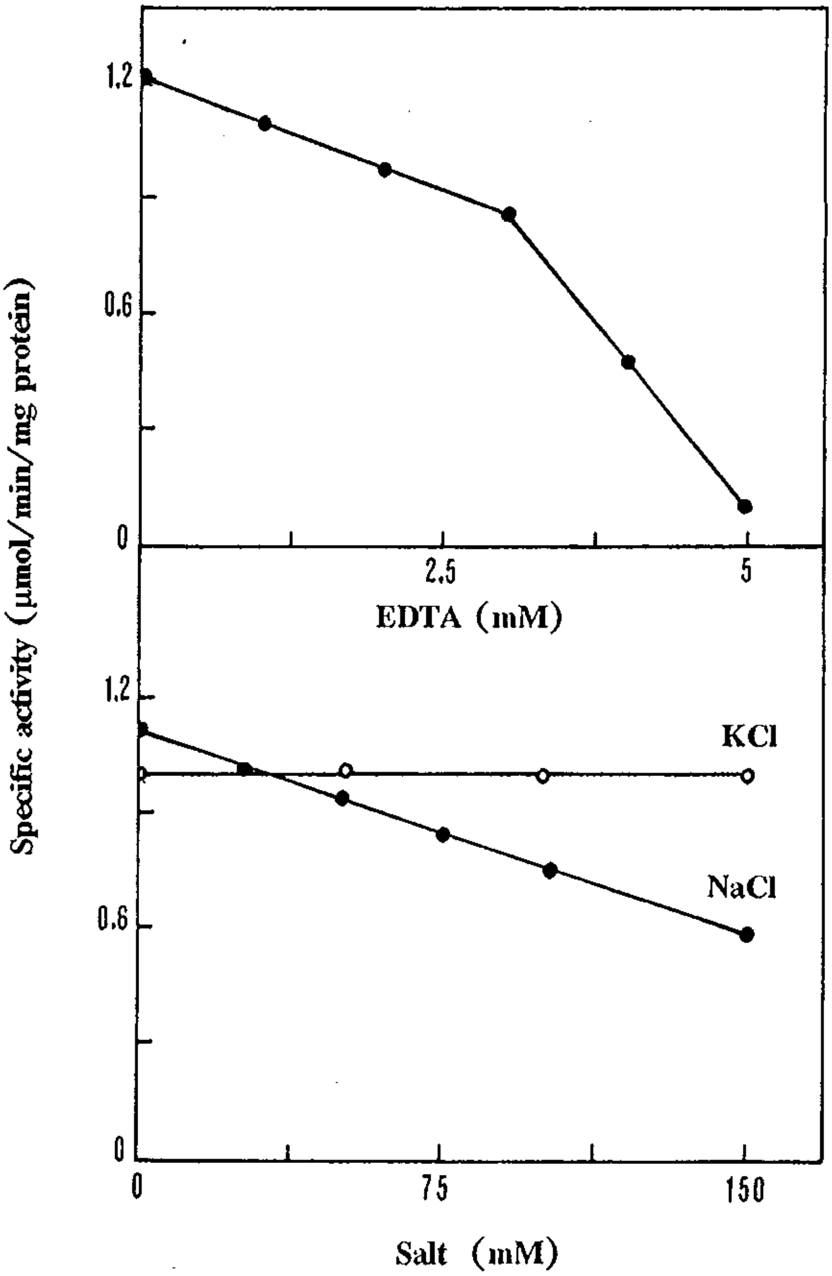
ในการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 ในบัฟเฟอร์ที่มี NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0-150 mM พบว่าแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์เมื่อไม่มี NaCl มีค่าเป็น 1,125 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน เอนไซม์ ACC มีแอคทิวิตีจำเพาะลดลงเป็นเส้นตรงเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มสูงขึ้น จนถึง 150 mM (รูปที่ 24)

3.6.5.3 ผลของ KCl

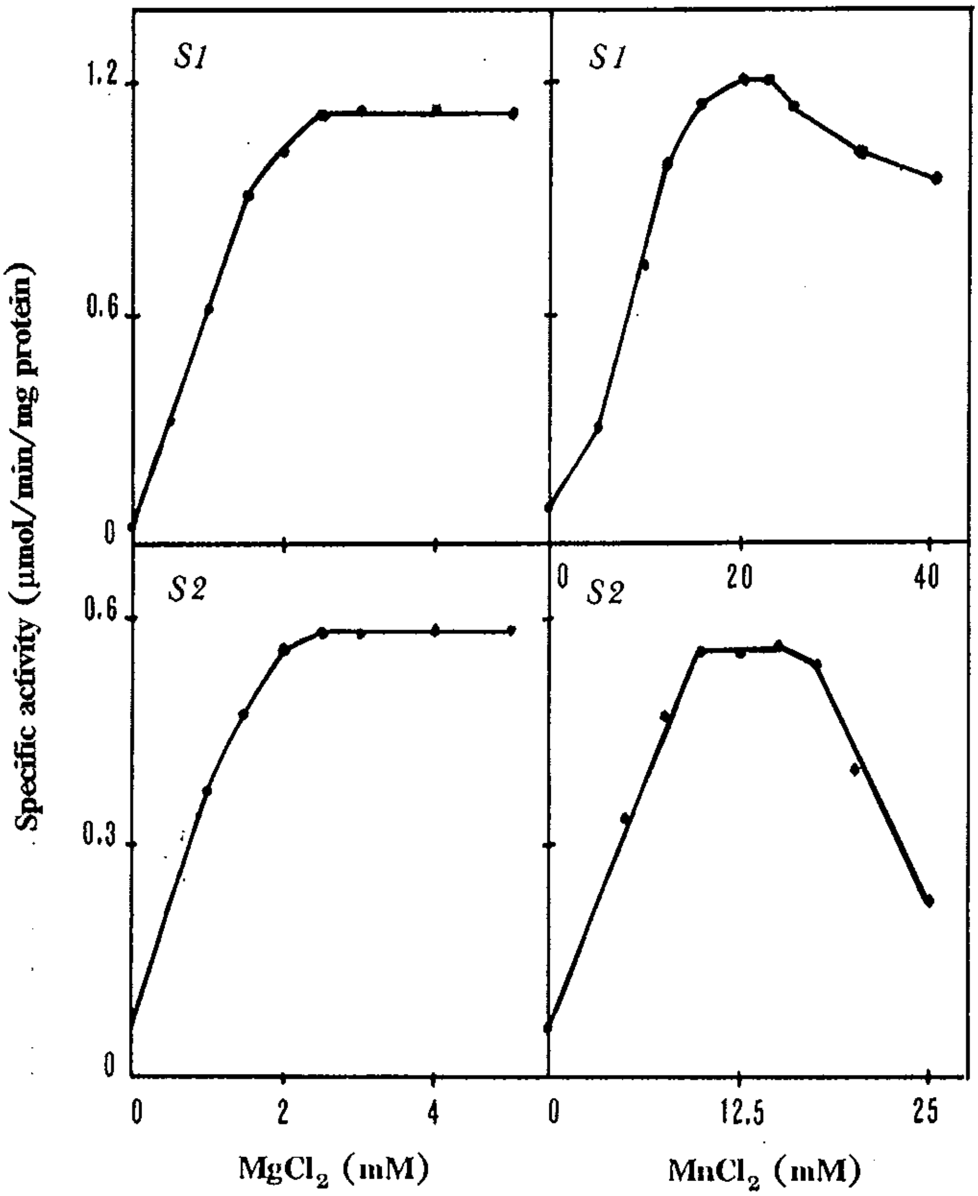
KCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-150 mM ไม่มีผลทำให้ค่าแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC พีค S1 เปลี่ยนแปลงตลอดช่วงความเข้มข้นของ KCl ดังกล่าว (รูปที่ 24)

3.6.5.4 ผลของ $MgCl_2$

จากการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ทั้งพีค S1 และพีค S2 ในสารผสมปฏิกิริยาที่มี $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0-5 mM พบว่าแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC พีค S1 เมื่อไม่มี $MgCl_2$ มีค่าเท่ากับ 40 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน เอนไซม์ ACC มีแอคทิวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ $MgCl_2$ จนมีค่าสูงสุดและคงที่ที่ 2.5 mM (1,120 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) (รูปที่ 25) ส่วนแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC พีค S2 เมื่อไม่มี $MgCl_2$ (60 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ $MgCl_2$ จนถึง 2.5 mM (580 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) แล้วคงที่ ดังแสดงผลในรูปที่ 25



รูปที่ 24 ผลของ NaCl, KCl และ EDTA ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1



รูปที่ 25 ผลของ $MgCl_2$ และ $MnCl_2$ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2

3.6.5.5 ผลของ $MnCl_2$

เมื่อทดสอบผลของ $MnCl_2$ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-40 mM ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 พบว่าแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์เมื่อไม่มี $MnCl_2$ มีค่าเท่ากับ 90 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ $MnCl_2$ จนมีค่าสูงสุดและคงที่ที่ 20-22.5 mM (1,220 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) เมื่อความเข้มข้นของ $MnCl_2$ มากกว่า 22.5 mM แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC กลับมีค่าลดลง(รูปที่ 25) ส่วนแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC พีค S2 เมื่อไม่มี $MnCl_2$ (60 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ $MnCl_2$ จนสูงสุดในช่วง 10-15 mM (560 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) จากนั้นมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของ $MnCl_2$ เพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 25)

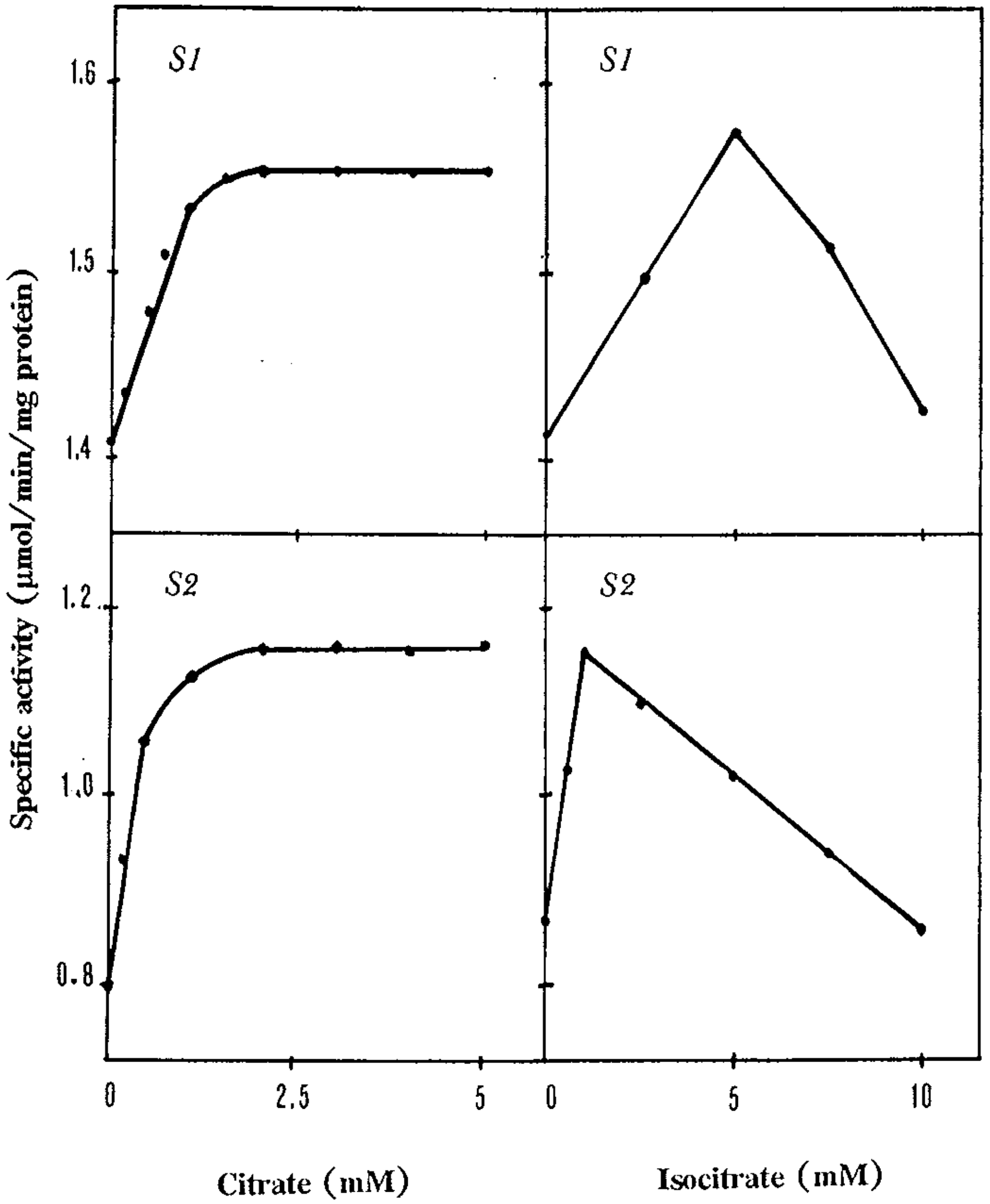
3.6.6 ผลของตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง

3.6.6.1 ผลของซิเตรท

จากการศึกษาผลของซิเตรทความเข้มข้น ตั้งแต่ 0-5 mM ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 เมื่อไม่มีซิเตรท (1,410 และ 800 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน ตามลำดับ) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามความเข้มข้นของซิเตรท จนถึง 2 mM (พีค S1 และ พีค S2 มีแอคทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,560 และ 1,150 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน ตามลำดับ) และเริ่มคงที่ เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจนถึง 5 mM (รูปที่ 26)

3.6.6.2 ผลของไอโซซิเตรท

ในการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 เมื่อมีไอโซซิเตรท ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-10 mM พบว่าแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เมื่อไม่มีไอโซซิเตรทมีค่าเท่ากับ 1,410 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน เอนไซม์ ACC มีแอคทิวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อมีไอโซซิเตรท 5 mM (1,576 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) ที่ความเข้มข้นของไอโซซิเตรทมากกว่า 5 mM จะทำให้แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ลดลง (รูปที่ 26) ส่วน

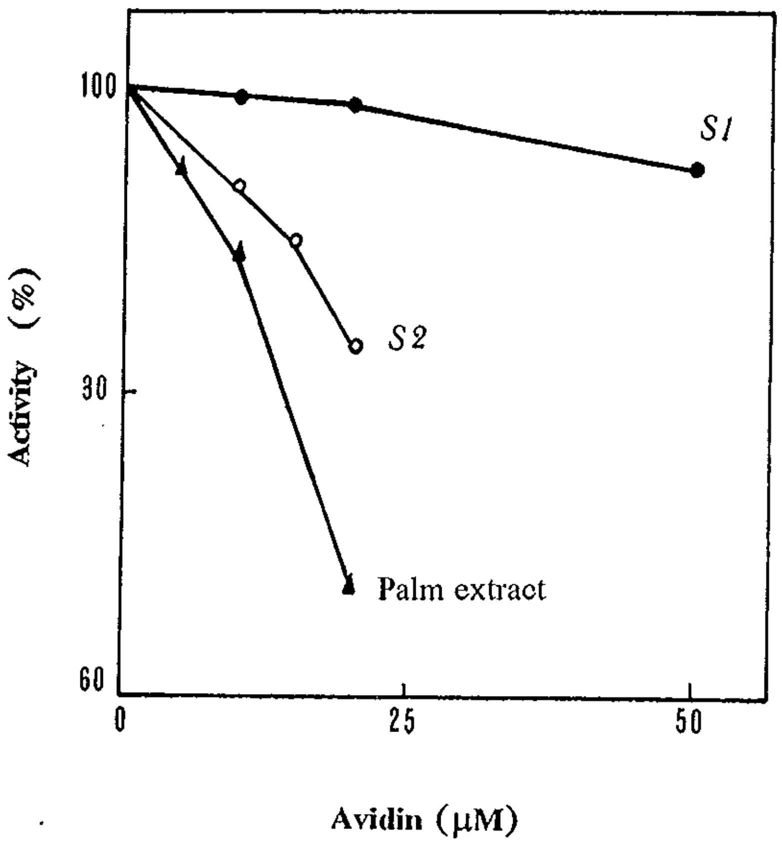


รูปที่ 26 ผลของซิเตรทและไอโซซิเตรทต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2

แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S2 เมื่อไม่มีไอโซซิเตรท (870 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) มีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อมีไอโซซิเตรท 1 mM (1,150 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) แต่กลับลดลงเมื่อความเข้มข้นของไอโซซิเตรทมากกว่า 1 mM ดังแสดงผลในรูปที่ 26

3.6.6.3 **ผลของอะวิดิน**

จากการศึกษาผลของอะวิดินต่อเอนไซม์ ACC พบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 เปลี่ยนแปลงน้อยมาก แม้เพิ่มความเข้มข้นของอะวิดินเป็น 50 μM ก็ยังคงมีแอคทิวิตีเหลือ 95% แต่เอนไซม์ ACC พีค S2 มีแอคทิวิตีลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะวิดินมากขึ้น ซึ่งที่ 20 μM อะวิดิน จะมีแอคทิวิตีเหลือ 83% ในทำนองเดียวกัน เอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์มมีแอคทิวิตีลดลงตามความเข้มข้นของอะวิดินที่เพิ่มขึ้น และมีแอคทิวิตีเหลือ 67.4% ที่ 20 μM อะวิดิน (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 ผลของอะวิดินต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 และของสารสกัดปาล์ม

4. วิจารณ์

4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม

จากการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์มโดยใช้บัฟเฟอร์สกัดที่ไม่มี Triton X-100 จะสกัดเอนไซม์ ACC ออกมาได้ โดยมีแอคทิวิตีจำเพาะเป็น 41.7 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน การเติม 0.2% Triton X-100 ในบัฟเฟอร์สกัด จะทำให้โปรตีนถูกสกัดออกมาได้สูงสุด รวมทั้งช่วยสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์มได้แอคทิวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 25% โดยเพิ่มขึ้นสูงสุด 31% เมื่อใช้ 0.5% Triton X-100 ซึ่งเมื่อคิดเป็นแอคทิวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ที่ถูกสกัดออกมาแล้ว พบว่าได้ปริมาณเอนไซม์มากที่สุดเมื่อใช้ 0.2% Triton X-100 ในงานวิจัยนี้จึงใช้บัฟเฟอร์สกัดที่มี 0.2% Triton X-100 ในการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่สามารถสกัดเอนไซม์ ACC จากเมล็ดถั่วเหลืองได้มากที่สุด (Charles, *et al.*, 1986) ในการทดลองนี้ยังพบว่าเมื่อใช้ Triton X-100 มากกว่า 5% ปริมาณโปรตีนในสารสกัดปาล์มลดลง ทั้งนี้เพราะโปรตีนในสารสกัดรวมตัวกับ Triton X-100 ซึ่งเป็น detergent ที่ไม่มีประจุและที่ความเข้มข้นสูง มีผลทำให้โปรตีนเหล่านี้ลอยอยู่ข้างบนไม่ตกลงมาเป็นตะกอนที่ก้นหลอด ในขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนโดยแอมโมเนียม ซัลเฟต ความอิ่มตัว 60% และการเซนตริฟิวจ์

ในการทดลองตกตะกอนโปรตีนของสารสกัดปาล์ม ด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่างๆ พบว่าแอมโมเนียม ซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80% สามารถตกตะกอนโปรตีนได้มากที่สุด แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC มีค่าสูงสุดเมื่อใช้เกลือความอิ่มตัว 50% ซึ่งมากกว่าที่ความอิ่มตัว 60% เล็กน้อย แต่ปริมาณเอนไซม์ ACC จะตกตะกอนมากที่สุดที่ความอิ่มตัว 60% ดังนั้นในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์ม จึงใช้แอมโมเนียม ซัลเฟต ความอิ่มตัว 60%

4% PVP ถูกนำมาใช้ในการขจัดสารประเภทฟีนอลจากสารสกัดพืชได้ผลดีทั้งนี้เพราะ PVP รวมตัวกับโปรตีนที่มีฟีนอลจับอยู่ แล้วตกตะกอนเมื่อเซนตริฟิวจ์ (Hattori, *et al.*, 1987) ในงานวิจัยนี้ เมื่อใช้ 4% PVP กับสารสกัดปาล์มทำให้ปริมาณโปรตีนลดลง 66% แอคทิวิตีทั้งหมดของเอนไซม์ ACC มีค่าลดลง 55% ในขณะที่แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC เพิ่มขึ้น 25% เมื่อเทียบกับของสารสกัดปาล์มที่ไม่ใส่ 4% PVP ดังนั้นการใช้ 4% PVP จึงช่วยกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกจากเอนไซม์ ACC เพียงเล็กน้อย ทำให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นไม่มากนัก แต่กลับทำให้มีการสูญเสียของปริมาณเอนไซม์ ACC มากกว่า 4% PVP จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์ม ซึ่งต่างจากของอะโวกาโดและผักโขม ที่พบว่า การใช้ 1% PVP ช่วยทำให้เอนไซม์ ACC บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (Mohan and Kekwick,1980) ในขณะที่การเติม 0.1% PVP ในสารละลายเอนไซม์ ACC ของเมล็ดละหุ่งที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ช่วยทำให้เอนไซม์ ACC มีความเสถียร เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ (Finlayson and Dennis, 1983)

4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์

ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมของสารสกัดปาล์ม ต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC อยู่ในช่วง 5-150 ไมโครกรัม เนื่องจากปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณโปรตีนที่ใช้ และเวลาที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-300 วินาที การใช้สารผสมปฏิกิริยาที่มี 0.2% Triton X-100 ทำให้แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียง 16% เมื่อเทียบกับการวัดโดยไม่มี Triton X-100 (51.1 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ ACC ในสารสกัดปาล์มส่วนใหญ่อยู่ในรูปละลาย (soluble) การเร่งปฏิกิริยาจึงไม่ต้องการ Triton X-100 เป็นตัวช่วย จะมีเอนไซม์ส่วนน้อย (16%) ที่อาจจับอยู่กับเมมเบรน (membrane bound) หรืออยู่ในรูปละลายแต่ต้องการ Triton X-100 ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา ดังเช่น เอนไซม์ ACC ในสารสกัดจากเมล็ดละหุ่งมีแอคทิวิตีเมื่อมี 0.1% Triton X-100 (Finlayson and Dennis, 1983)

4.3 คุณสมบัติของผลปาล์มและของสารสกัดปาล์ม

4.3.1 ความเสถียรที่อุณหภูมิ -70°ซ

การเก็บสารสกัดปาล์มไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ ในบัฟเฟอร์ที่มีและไม่มี 5 mM ไอโซซิเตรทให้ผลไม่แตกต่างกัน เนื่องจากแอคทิวิตีจำเพาะของสารสกัดปาล์มทั้งที่มีและไม่มีไอโซซิเตรทตลอดเวลา 1 ปี มีค่าคงที่ แสดงว่าไอโซซิเตรทไม่มีผลต่อความเสถียรของสารสกัดปาล์มที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ ได้นาน 1 ปี ซึ่งคล้ายกับ Nielsen, *et al.* (1979) ที่สามารถเก็บสารสกัดเอนไซม์ ACC ของจมูกข้าวสาลีไว้ได้นาน 2 เดือน ที่อุณหภูมิ-20°ซ โดยไม่มีไอโซซิเตรท แต่ต่างจากเอนไซม์ ACC ของพืชอื่น ๆ มักพบว่าไม่เสถียร แต่จะเสถียรเมื่อเก็บในบัฟเฟอร์ที่มีสารช่วยรักษาความเสถียร เช่น เอนไซม์ ACC ของอะโวกาโดต้องการ 10 mM ซิเตรท (Mohan and Kekwick, 1980) ของเมล็ดละหุ่ง (Finlayson and Dennis,1983) และถั่วเหลือง (Charles and Cherry, 1986) ต้องการ PVP กลีเซอรอลและ Triton X-100 และของใบข้าวโพดต้องการ dithiothreitol (Nikolau, *et al.*, 1981)

ในทำนองเดียวกัน เอนไซม์ ACC ของผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ มีความเสถียรตลอดเวลาการเก็บนาน 1 ปี ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ ACC ของผักชีฝรั่งที่เก็บไว้ได้นานหลายเดือน ที่อุณหภูมิ -20°ซ (Egin-Buhler, *et al.*, 1980)

4.3.2 เอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันของผลปาล์มที่มีอายุการสุกต่าง ๆ

ในการศึกษาผลปาล์มพันธุ์เทเนอราที่มีอายุการสุกในช่วง 1-5 เดือน พบว่าผลอายุ 1-3 เดือน มีค่าแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC ต่ำ และเริ่มมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนมีค่าสูงสุดเมื่อผลอายุ 4 เดือน จากนั้นมีค่าลดลงเล็กน้อยในผลสุกอายุ 5 เดือน ในทำนองเดียวกัน ปริมาณไขมันเปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC คือพบไขมันปริมาณน้อยมากในผลอายุ 1-3 เดือน และมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในผลอายุ 4

เดือน ซึ่งสอดคล้องกับการสังเคราะห์ไขมันในผลปาล์มที่รายงานโดย Hartley (1977) จากผลการทดลองนี้ บ่งชี้ว่าเอนไซม์ ACC เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไขมันของผลปาล์มน้ำมัน ซึ่งคล้ายกับผลงานวิจัยในเรพสีดที่กำลังพัฒนา (Turnham and Northcote, 1983) ในเอมบริโอปาล์มน้ำมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Turnham and Northcote, 1982) และในผักโขมซึ่งเก็บไว้ในที่มืดและที่มีแสงสว่าง (Hardwood, 1988; Post-Beittenmiller, *et al.*, 1991) ที่พบว่าเอนไซม์ ACC มีบทบาทในการสังเคราะห์ไขมันในพืชเหล่านี้

4.3.3 เอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันของผลปาล์มต่างพันธุ์

ในผลปาล์มที่นำมาศึกษา 3 พันธุ์ ผลปาล์มพันธุ์ดูรามีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด รองลงมาคือ พันธุ์เทเนอราและพันธุ์พิสิฟิรา ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์เนื้อผลปาล์มต่อผล พบว่าพันธุ์เทเนอราและพิสิฟิรามีค่าใกล้เคียงกันและมากกว่าพันธุ์ดูรา แสดงว่าผลปาล์มพันธุ์ดูรามีกะลาขนาดใหญ่และหนักมากกว่าของพันธุ์เทเนอรา และพันธุ์พิสิฟิราที่มีกะลาขนาดเล็กและหนักน้อยที่สุด

จากการวิเคราะห์ปริมาณไขมันของเนื้อผลปาล์ม 1 กรัม พบว่า ผลปาล์มพันธุ์ดูรามีปริมาณไขมันสูงสุด (310.0 $\pm$ 7.0 มก./กรัมเนื้อผลปาล์ม) มากกว่าพันธุ์เทเนอราไม่มากนัก (305.0 $\pm$ 6.0 มก./กรัมเนื้อผลปาล์ม) และพันธุ์พิสิฟิราน้อยที่สุด (260.0 $\pm$ 3.0 มก./กรัมเนื้อผลปาล์ม) เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ไขมันต่อผลปาล์ม พบว่าพันธุ์เทเนอรามีค่าสูงสุด รองลงมาคือพันธุ์พิสิฟิราและดูราตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่าที่พบในผลปาล์มทั้ง 3 พันธุ์นี้ของปาล์มแถบอาฟริกา (ตารางที่ 1; Hartley, 1977) จากข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่าปาล์มพันธุ์เทเนอรา เป็นปาล์มพันธุ์ที่ให้ไขมันหรือน้ำมันมากที่สุด รองลงมาคือพันธุ์พิสิฟิราและดูราตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน เอนไซม์ ACC ที่สกัดจากผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา มีทั้งแอคทิวิตีจำเพาะและเปอร์เซ็นต์เอนไซม์ต่อผลสูงสุด รองลงมาคือพันธุ์พิสิฟิราและพันธุ์ดูรา ตามลำดับ (ตารางที่ 7) บ่งชี้ว่า ผลปาล์มพันธุ์ที่มีปริมาณไขมันสูง มีทั้งปริมาณและแอคทิวิตีจำเพาะของ

เอนไซม์ ACC สูงเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Turnham and Northcote (1982) ที่พบปาล์มสายพันธุ์ JH มีแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันสูง ส่วนปาล์มสายพันธุ์ JB.20.1C มีแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC และปริมาณไขมันต่ำด้วย จากข้อมูลเหล่านี้เป็นการยืนยันบทบาทของเอนไซม์ ACC ต่อการสังเคราะห์ไขมันในปาล์มน้ำมันได้เป็นอย่างดี

4.4 การแยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์ม

ในการแยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์มโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่าเอนไซม์ ACC ถูกชะออกมาด้วย KCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.22 M มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 22.3 เท่า มีแอคทิวิตีและปริมาณโปรตีนเหลือเพียง 21.6% และ 1.0% ของสารสกัดปาล์มเริ่มต้น ตามลำดับ เมื่อแยกเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-150 พบว่าเอนไซม์ ACC ถูกชะออกมาเป็น 2 พีค เอนไซม์พีค S1 และพีค S2 มีความบริสุทธิ์เป็น 77.7 และ 27.3 เท่าของสารสกัดปาล์มเริ่มต้น ตามลำดับ เอนไซม์ ACC ทั้ง 2 พีค ไม่จับกับ Avidin-agarose ในคอลัมน์ จึงถูกชะออกมาก่อนการล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ แสดงว่าเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 อาจจะไม่มีไบโอตินจับอยู่แบบหมู่พรอสเธติค แต่อาจมีไบโอตินเป็นองค์ประกอบแบบอิสระที่จับกับเอนไซม์แบบหลวม ๆ (Lane, *et al.*,1974) หรือโครงรูป (conformation) ของไบโอตินในเอนไซม์ไม่เหมาะสมจึงไม่สามารถจับกับอะวิดินของ Avidin-agarose ได้ ผลการทดลองที่สนับสนุนข้อวิจารณ์นี้คือ 50 μM อะวิดินยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1ได้น้อยมาก (5%) และ 20 μM อะวิดินยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์พีค S2 ได้ 17% (รูปที่ 27) ซึ่งต่างจากเอนไซม์ ACC ของเรพสีด (Slabas and Hellyer, 1985) และของผักชีฝรั่ง (Egin-Buhler and Ebel, 1983) ซึ่งจับกับอะวิดินได้ดีจึงทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยคอลัมน์ Avidin-agarose

4.5 คุณสมบัติของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2

4.5.1 แบบแผนโปรตีนในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิส แบบไม่แปลงสภาพ

จากการศึกษาแบบแผนโปรตีนของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ เมื่อย้อมด้วยสีคูมาซี บลู พบว่าเอนไซม์ ACC พีค S1 ปรากฏโปรตีน 5 แถบ (รูปที่ 14 แถวที่ 4) เมื่อนำเจลของเอนไซม์พีค S1 ไปตัดตามขวางของโปรตีนแต่ละแถบ และหาแอคทิวิตีของเจลแต่ละชิ้น (รูปที่ 15) พบเฉพาะเจลชิ้น A4 ซึ่งมีโปรตีน 1 แถบ มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC บ่งชี้ว่าโปรตีนแถบนี้ในเจลชิ้น A4 เป็นเอนไซม์ ACC พีค S1 จากผลการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์ ACC พีค S1 ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์เพราะในโปรตีน 5 แถบที่ปรากฏ มีเพียงแถบเดียวที่มีแอคทิวิตี ในทำนองเดียวกัน เอนไซม์ ACC พีค S2 ปรากฏโปรตีน 4 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ และมีโปรตีนเพียงแถบเดียวในเจลชิ้น B6 (รูปที่ 16) ที่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์แสดงให้เห็นว่าโปรตีนแถบนี้เป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์ ACC พีค S2 ที่ยังแยกได้ไม่บริสุทธิ์เช่นกัน

4.5.2 น้ำหนักโมเลกุล

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ACC โดยเทคนิคโครมาโตกราฟี แบบเจล ฟิลเตรชัน (คอลัมน์ Sephadex G-150) พบเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 มีน้ำหนักโมเลกุล 126,000 และ 36,000 ดัลตัน ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเท่าหรือใกล้เคียงกับค่าที่หาโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ที่พบแถบโปรตีนของเอนไซม์ ACC พีค S1 มีน้ำหนัก 126,000 ดัลตัน และพีค S2 มีน้ำหนัก 33,000 ดัลตัน จากการศึกษาเอนไซม์ ACC ของใบถั่วลันเตา พบเอนไซม์ 2 แบบคือแบบโปรคาริโอท และยูคาริโอท แบบที่เป็นโปรคาริโอทพบในคลอโรพลาสต์ มีน้ำหนักโมเลกุล 35,000-38,000 ดัลตัน ไม่ถูกยับยั้งโดยสารฆ่าวัชพืช เอนไซม์ ACC แบบยูคาริโอทมีน้ำหนัก 210,000-220,000 ดัลตัน พบในไซโทพลาซึมและไวต่อ

การยับยั้งด้วยสารฆ่าวัชพืช (Alban, *et al*.,1994; Dehaye, *et al*., 1994; Konishi and Sasaki, 1994) เอนไซม์แบบยูคาริโอทยังพบในพืชตระกูล Gramineae เช่นข้าวและข้าวสาลี มีน้ำหนัก 210,000 ดัลตัน (Konishi and Sasaki, 1994) และที่พบในข้าวบาร์เลย์และใบข้าวฟ่างเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 60,000 ดัลตัน (Nikolau, *et al*.,1984) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ ACC แบบยูคาริโอทที่พบในพืชต่าง ๆ มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ดังนั้นการที่แยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์มได้ 2 พีค และเมื่อเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของพืชต่าง ๆ เหล่านี้ อาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ ACC พีค S1 (126,000 ดัลตัน) ที่ถูกแยกออกมาได้มากกว่าพีค S2 คือ 80% ของเอนไซม์ทั้งหมด (ตารางที่ 8) เป็นเอนไซม์ ACC แบบยูคาริโอทซึ่งอยู่ในส่วนไซโทพลาซึม ในขณะที่เอนไซม์ ACC พีค S2 (33,000-36,000 ดัลตัน) ถูกแยกออกมาได้ 20% เป็นแบบโปรคาริโอทที่พบในพลาสติด เช่นเดียวกับของถั่วลันเตา (Alban, *et al*., 1994; Konishi and Sasaki, 1994) เอนไซม์ ACC พีค S2 นี้อาจถูกสกัดออกมาจากพลาสติดโดย 0.2% Triton X-100 ในขั้นตอนสกัด ที่สกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์มได้เพิ่มขึ้น 25% (รูปที่ 4) ในขณะที่เอนไซม์ ACC ซึ่งถูกสกัดจากเนื้อผลปาล์มโดยบัฟเฟอร์ที่ไม่มี Triton X-100 มีปริมาณ 75% (รูปที่ 4) และควรเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในส่วนไซโทพลาซึม เพราะไม่ต้องการ Triton X-100 ช่วยในการสกัดออกมา ดังนั้นถ้าทำการแยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์มที่ไม่ใช้ Triton X-100 โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีเดียวกัน อาจแยกเอนไซม์ ACC ออกมาได้เพียงแบบเดียว ซึ่งควรมีการศึกษาอย่างละเอียดต่อไป

4.5.3 pH ที่เหมาะสม

การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ACC ขึ้นกับ pH ซึ่งจะเร่งได้ดีในช่วง pH เป็นกลาง เอนไซม์ ACC พีค S1 มี pH ที่เหมาะสมเป็น pH 8 ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ ACC ของถั่วเหลือง (Charles and Cherry, 1986) และของเมล็ดละหุ่ง (Finlayson and Dennis, 1983) ต่างจากเอนไซม์ ACC พีค S2 ที่มี pH ที่เหมาะสมเป็น pH 6 การที่เอนไซม์ ACC พีค S1

และพีค S2 เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH ต่างกันเช่นนี้ บ่งชี้คุณสมบัติที่แตกต่างกันระหว่างเอนไซม์ทั้ง 2 พีค ซึ่งอาจเป็นเช่นเดียวกับเอนไซม์ ACC แบบยูคาริโอทและแบบโปรคาริโอท ซึ่งมีคุณสมบัติไวหรือต้านการยับยั้งโดยสารฆ่าวัชพืชได้ต่างกัน (Alban, *et al.*, 1994; Konishi and Sasaki, 1994; Nikolau, *et al.*, 1984)

4.5.4 คุณสมบัติทางจลนศาสตร์

เอนไซม์ ACC ของพืชมีจลนศาสตร์ 2 แบบ คือแบบซิกมอยด์ เช่นของถั่วลันเตา (Dehaye, *et al.*, 1994) และแบบไฮเพอร์โบลาร์ (Michaelis-Menten) ดังพบในเมล็ดละหุ่ง (Finlayson and Dennis, 1983) ถั่วเหลือง (Charles and Cherry, 1986) อะโวกาโด (Mohan and Kekwick, 1980) และผักชีฝรั่ง (Egin-Buhler and Ebel,1983)

เอนไซม์ ACC ทั้งพีค S1 และพีค S2 มีจลนศาสตร์เหมือนกัน คือมีจลนศาสตร์ต่ออะซิติล-โคเอ เป็นแบบซิกมอยด์ มีค่า $K_{0.5}$ ของอะซิติล-โคเอ สำหรับเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 เป็น 15 μM และ 17 μM ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่า K_m ของอะซิติล-โคเอ ต่อเอนไซม์ ACC ของพืชอื่นๆ เช่นเรพสีด (Slabas and Hellyer, 1985) *L. multiflorum* (Evenson, *et al.*, 1994) และเมล็ดละหุ่ง (Finlayson and Dennis, 1983) เป็นต้น

จลนศาสตร์ของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 สำหรับ ATP และ $NaHCO_3$ เป็นแบบไฮเพอร์โบลาร์ ค่า K_m ของ ATP ต่อเอนไซม์ทั้ง 2 พีคเป็น 28 μM และ 0.8 mM ตามลำดับ ในขณะที่ค่า K_m ของ $NaHCO_3$ เป็น 4.8 mM และ 20 mM ตามลำดับ ค่า K_m เหล่านี้ไม่แตกต่างไปจากของเอนไซม์ ACC ของพืชชนิดต่างๆ ที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าเอนไม์ ACC ของปาล์มน้ำมันมีคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ไม่ต่างไปจากพืชชนิดอื่น ๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างค่า $K_{0.5}$ ของอะซิติล-โคเอ หรือค่า K_m ของ ATP และ $NaHCO_3$ ของเอนไซม์ ACC พีค S1 กับของพีค S2 พบว่าของเอนไซม์พีค S1 มีค่าต่ำกว่าของเอนไซม์ ACC พีค S2 บ่งชี้ว่าเอนไซม์

ACC พีค S1 เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรททั้ง 3 ชนิด ไปเป็นผลผลิตได้ดีกว่าเอนไซม์ ACC พีค S2 ดังนั้นเอนไซม์ ACC พีค S1 น่าจะมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ไขมันของผลปาล์มมากกว่าเอนไซม์ ACC พีค S2

4.5.5 ผลของไอออนและ EDTA

ไอออนที่ใช้ทดสอบผลต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC มีด้วยกัน 2 ชนิดได้แก่โมโนวาเลนต์ แคทไอออน (monovalent cation) คือ NaCl และ KCl กับไดวาเลนต์ แคทไอออน (divalent cation) คือ $MgCl_2$ และ $MnCl_2$ NaCl 25-150 mM ยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 ซึ่งเหมือนกับของผักชีฝรั่ง (Egin-Buhler and Ebel, 1983) ส่วน KCl 0-150 mM ไม่มีผลต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 ซึ่งต่างจากเอนไซม์ ACC ของ *L.multiflorum* ที่ถูกยับยั้งโดย 200 mM KCl แต่กลับถูกกระตุ้นโดย 50 mM KCl ได้ 40% (Evenson, *et al.*, 1994) 80 mM KCl กระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC จากเมล็ดละหุ่งเพิ่มขึ้น 1.5 เท่า (Finlayson and Dennis, 1983) จากการที่ NaCl มีผลยับยั้งเอนไซม์ ACC ในขณะที่ KCl ไม่มีผล ดังนั้นในขั้นตอนการแยกเอนไซม์ ACC โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel จึงใช้ KCl แทน NaCl ในการชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์

นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 ต้องการ $MgCl_2$ หรือ $MnCl_2$ ในการเร่งปฏิกิริยา 2.5 mM $MgCl_2$ เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ค่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ทั้งพีค S1 และพีค S2 เพิ่มสูงสุด ส่วน $MnCl_2$ 20-22.5 mM และ 10-15 mM เป็นช่วงความเข้มข้นที่ทำให้เอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 มีแอคทิวิตีสูงสุด ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของ $MnCl_2$ สูงกว่านี้ กลับยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ทั้งพีค S1 และพีค S2 เหมือนกับเอนไซม์ ACC ของอะโวกาโดที่ถูกกระตุ้นโดย 2 mM $MnCl_2$ แต่ถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของ $MnCl_2$ สูงขึ้น (Mohan and Kekwick, 1980) ผลการกระตุ้นเอนไซม์โดยไดวาเลนต์ แคทไอออนยังพบในเอนไซม์ ACC ของจมูกข้าวสาลี (Nielsen, *et al.*, 1979) และถั่วเหลือง (Charles, *et al.*, 1986)

สำหรับ EDTA ซึ่งเป็นสารที่จับกับไดวาเลนต์ แคทไอออน ยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 ที่ความเข้มข้น 0-5 mM ทั้งนี้อาจเนื่องจากไดวาเลนต์ แคทไอออน จับกับโมเลกุลของเอนไซม์อย่างหลวม ๆ เมื่อ EDTA จับกับไดวาเลนต์ แคทไอออน ทำให้หลุดออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ จึงมีผลทำให้แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 ลดลง

4.5.6 ผลของตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง

4.5.6.1 ผลของซิเตรทและไอโซซิเตรท

ซิเตรทกระตุ้นเอนไซม์ ACC ทั้ง 2 พีค ได้ดีเท่ากัน ที่ความเข้มข้น 2 mM เอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 มีแอคทิวิตีสูงสุดและคงที่ตลอดความเข้มข้นของซิเตรทจนถึง 5 mM ซึ่งต่างจากเอนไซม์ ACC ของผักโขมและอะโวกาโดที่ถูกกระตุ้นโดยซิเตรท 3 mM แต่ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นมากกว่า 4 mM (Mohan and Kekwick, 1980) ไอโซซิเตรทกระตุ้นเอนไซม์ ACC พีค S2 ได้ดีกว่าพีค S1โดยกระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์พีค S2 และ พีค S1 ได้สูงสุด ที่ความเข้มข้น 1 mM และ 5 mM ตามลำดับ แต่ไอโซซิเตรทกลับยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ทั้ง 2 พีค เมื่อความเข้มข้นสูงกว่านี้ ซึ่งต่างจากเอนไซม์ ACC ของผักโขมและอะโวกาโดที่ถูกกระตุ้นด้วย 3 mM ไอโซซิเตรท แต่ความเข้มข้นมากกว่า 4 mM ไม่มีผลต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ (Mohan and Kekwick, 1980) การกระตุ้นเอนไซม์ ACC ที่ความเข้มข้นต่ำและยับยั้งแอคทิวิตีที่ความเข้มข้น 5 mM หรือมากกว่าของซิเตรทและไอโซซิเตรท พบได้ในพืชอื่น ๆ เช่นข้าวสาลี (Heinstein and Stumpf, 1969) เมล็ดละหุ่ง (Finlayson and Dennis, 1983) ถั่วเหลือง (Charles, *et al.*, 1986) เป็นต้น

4.5.6.2 ผลของอะวิดิน

อะวิดินเป็นโปรตีนที่แยกได้จากไข่ขาวดิบสามารถจับกับไบโอตินได้ (Windholz, 1976) จากการทดลองพบว่าอะวิดิน 50 μM และ 20 μM ยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 ได้ 5% และ 17% ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ ACC ของสารสกัดปาล์มถูกยับยั้ง

ได้ 32.6% ด้วยอะวิดิน 20 μM ซึ่งต่างจากเอนไซม์ ACC ที่สกัดจากเอมบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ JH ซึ่งถูกยับยั้งได้ 97% ด้วยอะวิดิน 5.3 μM (Turnham and Northcote, 1982) หรือเอนไซม์ ACC ของใบข้าวโพด (Nikolau, *et al.*, 1981) และข้าวบาร์เลย์ (Thomson and Zalik, 1981) ที่ถูกยับยั้งได้สมบูรณ์โดยอะวิดิน บ่งชี้ว่าอะวิดินไม่สามารถเข้าไปจับกับไบโอตินในโมเลกุลของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 หรือจับได้น้อยมาก อาจเป็นเพราะโครงรูปของไบโอตินในเอนไซม์ไม่เหมาะสมจึงจับกับอะวิดินได้ไม่ดีหรือจับได้น้อยมาก

5. สรุป

จากการศึกษาเอนไซม์ ACC ของผลปาล์มน้ำมัน สามารถสรุปพอสังเขปได้ดังนี้

1. ในการสกัดเอนไซม์ ACC จากเนื้อผลปาล์มด้วยบัฟเฟอร์สกัดที่มี 0.2% Triton X-100 และตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต ที่ความอิ่มตัว 60% จะสกัดเอนไซม์ ACC ได้ปริมาณสูงสุด

2. ปริมาณโปรตีนของสารสกัดปาล์มที่เหมาะสมต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC โดยวิธีที่ใช้ในการศึกษาอยู่ในช่วง 5-150 ไมโครกรัมและเวลาที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-300 วินาที

3. ผลปาล์มพันธุ์เทเนอรา มีแอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC (56.3 ± 9.7 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) สูงกว่าพันธุ์พิสิฟิรา (49.0 ± 9.0 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) และพันธุ์ดูรา (47.2 ± 7.0 นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน) ตามลำดับ รวมทั้งมีปริมาณไขมัน (206.2 ± 4.2 มก./กรัมผล) สูงกว่าพันธุ์พิสิฟิรา (177.1 ± 3.0 มก./กรัมผล) และพันธุ์ดูรา (150.7 ± 3.5 มก./กรัมผล) ตามลำดับ

4. แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ ACC และปริมาณไขมัน เพิ่มขึ้นตามอายุการสุกของผลปาล์มพันธุ์เทเนอราซึ่งจะมีค่าสูงสุดเมื่อผลอายุ 4 เดือน

5. เอนไซม์ ACC ซึ่งอยู่ในสารสกัดปาล์ม และในผลปาล์มมีความเสถียรตลอดเวลา 1 ปี เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ

6. ในการแยกเอนไซม์ ACC จากสารสกัดปาล์ม โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephadex G-150 จะแยกได้เอนไซม์ ACC 2 พีค คือ พีค S1 และพีค S2 ซึ่งมีความบริสุทธิ์ 77.7 และ 27.3 เท่า ของสารสกัดปาล์มเริ่มต้น ตามลำดับ คิดเป็นเอนไซม์ 16.1% และ 4.6% ของสารสกัดปาล์มเริ่มต้น ตามลำดับ

7. เอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 ปรากฏโปรตีน 5 แถบ และ 4 แถบ ตามลำดับ ในโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ เมื่อตัดเจลของเอนไซม์ พีค S1 และพีค S2 ตามขวางของแถบโปรตีนออกเป็นชิ้น และหาแอคทิวิตีของเจลแต่ละชิ้น พบว่า โปรตีน 1 แถบในเจลชิ้น A4 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 126,000 ดัลตัน มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 ในขณะที่โปรตีน 1 แถบในเจลชิ้น B6 มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S2 และมีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 ดัลตัน

8. จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 โดยวิธีเจล ฟิลเตรชัน พบว่ามีค่าเป็น 126,000 และ 36,000 ดัลตัน ตามลำดับ

9. pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 คือ pH 8 และ 6 ตามลำดับ

10. ค่า $K_{0.5}$ ของอะซิติล-โคเอ ต่อเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 มีค่าเป็น 15 μM และ 17 μM ตามลำดับ ค่า K_m ของ ATP ต่อเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 มีค่าเท่ากับ 28 μM และ 0.8 mM ตามลำดับ และของ $NaHCO_3$ มีค่าเท่ากับ 4.8 mM และ 20 mM ตามลำดับ

11. ทั้ง EDTA และ NaCl มีผลยับยั้ง ในขณะที่ KCl (0-150 mM) ไม่มีผลต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1

12. $MgCl_2$ กระตุ้นเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 ได้สูงสุดที่ 2.5 mM เท่ากัน เช่นเดียวกับ $MnCl_2$ กระตุ้นเอนไซม์ได้สูงสุดในช่วง 20-22.5 mM และ 10-15 mM ตามลำดับ

13. ซิเตรทกระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 ได้สูงสุดที่ 2 mM เช่นเดียวกับไอโซซิเตรทซึ่งกระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์พีค S1 และพีค S2 ได้สูงสุดที่ 5 mM และ 1 mM ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของไอโซซิเตรทมากกว่านี้กลับยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ ACC ทั้ง 2 พีค

14. อะวิดินยับยั้งเอนไซม์ ACC พีค S1 และพีค S2 ได้ 5% (ที่ 50 μM) และ 17% (ที่ 20 μM) ตามลำดับ และยับยั้งเอนไซม์ ACC ของสารสกัดปาล์มได้ 32.6% ที่ 20 μM

เอกสารอ้างอิง

ชวาลวุฑฒ์ ไชยนุวัติ, 2534. สถานการณ์ทางผลิตน้ำมันปาล์มปี 2533/2534. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องการวิจัยปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม ครั้งที่ 1 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ 16 พฤษภาคม 2534 10 หน้า.

ผาสุข กุลละวณิชย์, สัณห์ชัย กลิ่นพิกุล, สุมณฑา กุลละวณิชย์ และสุรเชษฐ์ ชิระมณี, 2528. ปาล์มน้ำมันและอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523. ปาล์มน้ำมัน. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

Alban, C., Baldet, P. and Douce, R. 1994. Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is sensitive to aryloxyphenoxypropionate herbicides. Biochem. J. 300 : 557-565.

Alberts, A.W. and Vagelos,P.R. 1968. Acetyl CoA carboxylase, I. Requirement for two protein fractions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 59 : 561-568.

A.O.A.C. 1984. In Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Beaty, N.B. and Lane, M.D. 1982. Acetyl coenzyme A carboxylase : Rapid purification of the chick liver enzyme and steady state kinetic analysis of the

carboxylase-catalyzed reaction. J. Biol. Chem. 257 : 924-929.

Bolton, P.and Harwood,J.L. 1977. Fatty acid biosynthesis by a particulate preparation from germinating pea. Biochem. J. 168 : 261-269.

Borthwick, A.C., Edgell, N.J. and Denton, R.M. 1987. Use of rapid gel-permeation chromatography to explore the inter-relationships between polymerization, phosphorylation and activity of acetyl-CoA carboxylase. Biochem. J. 241 : 773-782.

Browse, J., Roughan, P.G. and Slack, C.R. 1981. Light control of fatty acid synthesis and diurnal fluctuations of fatty acid composition in leaves. Biochem. J. 196 : 347-354.

Burton,D. and Stumpf, P.K.1966. Fat metabolism in higher plants. XXXII. Control of plant acetyl-coA carboxylase activity. Arch. Biochem. Biophys. 117 : 604-614.

Charles, D.J. and Cherry, J.H. 1986. Purification and characterization of acetyl-coA carboxylase from developing soybean seeds. Phytochemistry 25 : 1067-1071.

Charles, D.J., Hasegawa, P.M. and Cherry, J.H. 1986. Characterization of acetyl-coA carboxylase in the seed of two soybean genotypes. Phytochemistry 25 : 55-59.

Davies, S.P., Sim, A.T.R. and Hardie, D.G.1990. Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase. Eur. J. Biochem. 187 : 183-190.

Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 : 404-427.

Dehaye, L., Alban, C., Job, C., Douce, R. and Job, D. 1994. Kinetics of the forms of acetyl-CoA carboxylase from *Pisum sativum*. Eur.J. Biochem. 225 : 1113-1123.

Egin-Buhler, B. and Ebel, J. 1983. Improved purification and further characterization of acetyl-coA carboxylase from cultured cells of parsley (*Petroselinum hortense*). Eur.J. Biochem. 133 : 335-339.

Egin-Buhler, B., Loyal, R. and Ebel, J. 1980. Comparison of acetyl-coA carboxylase from parsley cell cultures and wheat germ. Arch. Biochem. Biophys. 203 : 90-100.

Egli, M.A., Gengenbach, B.G., Gronwald,J.W., Somers, D.A. and Wyse, D.L. 1993. Characterization of maize acetyl-coenzyme A carboxylase. Plant Physiol. 101 : 499-506.

Evenson, K.J., Gronwald, J.W. and Wyse, D.L. 1994. Purification and characterization of acetyl coenzyme A carboxylase from diclofop-resistant and -susceptible *Lolium multiflorum*. Plant Physiol. 105 : 671-680.

Fall, R.R. and Vagelos, P.R. 1972. Acetyl coenzyme A carboxylase : Molecular forms and subunit composition of biotin carboxyl carrier protein. J. Biol. Chem. 247 : 8005-8015.

Finlayson, S.A. and Dennis, D.T. 1983. Acetyl-coenzyme A carboxylase from the developing endosperm of *Ricinus communis*. Arch. Biochem. Biophys. 225 : 576-585.

Goldring, J.P.D. and Read, J.S. 1993. Insect acetyl-coA carboxylase : Activity during the larval, pupal and adult stages of insect development. Comp. Biochem. Physiol. 106B : 855-858.

Gornicki, P. and Haselkorn, R. 1993. Wheat acetyl-CoA carboxylase. Plant Molecul. Biol. 22 : 547-552.

Gregolin, C., Ryder,E., Warner, R.C., Kleinschmidt, A.K. and Lane, M.D.1966. Liver acetyl coA carboxylase : The dissociation-reassociation process and its relation to catalytic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 56 : 1751-1758.

Guchhait, R.B., Zwergel, E.E. and Lane, M.D.1974. Acetyl coenzyme A carboxylase : Subunit structure of the protomeric form of the avian liver enzyme. J. Biol. Chem. 249 : 4776-4780.

HaBlacher, M., Ivessa, A.S., Paltauf, F. and Kohlwein, S. D. 1993. Acetyl-coA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. J. Biol. Chem. 268 : 10946-10952.

Hardie, D.G. and Guy, P.S. 1980. Reversible phosphorylation and inactivation of acetyl-coA carboxylase from lactating rat mammary gland by cyclic AMP-dependent protein kinase. Eur. J. Biochem. 110 : 167-177.

Hartley, C.W. 1977. In The Oil Palm, pp. 781, Longman, London.

Harwood, J.L. 1988. Fatty acid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39 : 101-138.

Hattori, J., Gottlob-Mchugh, S.G. and Johnson, D.A.1987. The isolation of high-molecular-weight DNA from plants. Anal. Biochem. 165 : 70-74.

Haystead, T.A.J. and Hardie, D.G. 1986. Both insulin and epidermal growth factor stimulate lipogenesis and acetyl-CoA carboxylase activity in isolated adipocytes. Biochem. J. 234 : 279-284.

Haystead, T.A.J., Moore, F., Cohen, P. and Hardie, D.G. 1990. Roles of the AMP-activation and cyclic-AMP -dependent protein kinases in the adrenaline-induced inactivation of acetyl-CoA carboxylase in rat adipocytes. Eur.J. Biochem. 187 : 199-205.

Heinstein, P.F. and Stumpf, P.K. 1969. Fat metabolism in higher plants: XXXVIII. Properties of wheat germ acetyl coenzyme A carboxylase. J. Biol. Chem.244 : 5374-5381.

Hellyer, A., Bambridge, H.E. and Slabas,A.R. 1986. Plant acetyl-coA carboxylase. Biochem. Soc. Trans. 14 : 565-568.

Laing, W.A. and Roughan,P.G. 1982. Activation of spinach chloroplast acetyl-coenzyme A carboxylase by co-enzyme A. FEBS Lett. 144 : 341-344.

Lane, M.D. and Moss, J. 1971. In Metabolic Regulation (Vogel, H.J., ed.), p.23, Academic Press Inc., New York.

Lane, M.D., Moss, J. and Polakis, S.E. 1974. Acetyl co-enzyme A carboxylase. Curr. Top. Cell Regul. 8 : 139-195.

Lent, B. and Kim, K-H. 1982. Purification and properties of a kinase which phosphorylates and inactivates acetyl-coA carboxylase. J. Biol.Chem. 257 : 1897 -1901.

Li, S-J. and Cronan, J.E. 1992. The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. J. Biol. Chem. 267 : 855 -863.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Luo, X., Park, K., Lopez-Casillas, F. and Kim, K-H. 1989. Structural features of the acetyl-CoA carboxy-lase gene: Mechanism for the generation of mRNAs with 5' end heterogeneity. Proc. Nalt. Acad.Sci. USA. 86 : 4042-4046.

Kannangara, C.G. and Stumpf, P.K. 1972. Fat metabolism in higher plants. IV. A procaryotic type acetyl coA

carboxylase in spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys. 152 : 83-91.

Kim, K-H., Lopez-Casillas,F., Bai, D.H., Luo,X. and Pape, M.E. 1989. Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. FASEB J. 3 : 2250-2256.

Konishi, T. and Sasaki, Y. 1994. Compartmentalization of two forms of acetyl-CoA carboxylase in plants and the origin of their tolerance toward herbicides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 : 3598-3601.

Mabrouk, G.M., Helmy, I.M., Thampy, K.G. and Wakil, S.J. 1990. Acute hormonal control of acetyl-coA carboxylase. J. Biol. Chem. 265 : 6330-6338.

Majerus, P.W. and Kilburn, E. 1969. Acetyl coenzyme A carboxylase. J. Biol. Chem. 244 : 6254-6262.

Manning, R., Dils, R. and Mayer, R.J. 1976. Purification and some properties of acetyl-coenzyme A carboxylase from rabbit mammary gland. Biochem. J. 153 : 463-468.

Mohan, S.B. and Kekwick, R.G.O. 1980. Acetyl-coA carboxylase from avocado (*Persea americana*) plastids and spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. Biochem. J. 187 : 667-676.

Moss, J. and Lane, M.D. 1972. Acetyl coenzyme A carboxylase : III. Further studies on the relation of catalytic activity to polymeric state. J. Biol. Chem. 247 : 4944-4951.

Moss, J., Yamagishi, M., Kleinschmidt, A.K. and Lane, M. D. 1972. Acetyl coenzyme A carboxylase. Purification and properties of the bovine adipose tissue enzyme. Biochemistry 11 : 3779-3786.

Nielsen, N.C., Adee, A. and Stumpf, P.K. 1979. Fat metabolism in higher plants. Further characterization of wheat germ acetyl coenzyme A carboxylase. Arch. Biochem. Biophys. 192 : 446-456.

Nikawa, J., Tanabe, T., Ogiwara, H., Shiba, T. and Numa, S. 1979. Inhibitory effects of long-chain acyl coenzyme A analogues on rat liver acetyl coenzyme A carboxylase. FEBS Lett. 102 : 223-226.

Nikolau, B.J. and Hawke, J.C. 1984. Purification and characterization of maize leaf acetyl-coA carboxylase. Arch. Biochem. Biophys. 228 : 86-96.

Nikolau, B.J., Hawke, J.C. and Slack, C.R. 1981. Acetyl-coenzyme A carboxylase in maize leaves. Arch. Biochem. Biophys. 211 : 605-612.

Nikolau, B.J., Wurtele, E.S. and Stumpf, P.K. 1984. Subcellular distribution of acetyl-coenzyme A carboxylase in mesophyll cells of barley and sorghum. Arch. Biochem. Biophys. 235 : 555-561.

Palosaari, N.P., Gronwald, J.W., Somers, D.A., Gengenbach, B.G. and Wyse, D.L. 1992. Comparison of acetyl-coenzyme A carboxylase from graminicide-tolerant and susceptible maize lines (abstract No. 352). Plant Physiol. 99 : S-59.

Park, K. and Kim, K-H. 1991. Regulation of acetyl-coA carboxylase gene expression. J. Biol. Chem. 266 : 12249-12256.

Post-Beittenmiller, D., Jaworski, J.G. and Ohlrogge, J.B. 1991. *In vivo* pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach : Evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis. J. Biol. Chem. 266 : 1858-1865.

Post-Beittenmiller, D., Roughan, G. and Ohlrogge, J.B. 1992. Regulation of plant fatty acid biosynthesis. Plant Physiol. 100 : 923-930.

Rendina, A.R., Beaudoin, A.C., Craig-Kennard, A.C. and Breen, M.K. 1989. Kinetics of inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione graminicides. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference, Surrey, UK, Weeds-1989, vol.1, pp.163-172.

Rendina, A.R., Felts,J.M., Beaudoin,J.D., Craig-Kennard, A.C., Look,L.L., Paraskos,S.L. and Hagenah, J.A. 1988. Kinetic characterization, stereoselectivity, and species selectivity of the inhibition of plant acetyl-CoA carboxylase by the aryloxyphenoxypropionic acid grass herbicides. Arch. Biochem. Biophys. 265 : 219-225.

Roessler, P.G. 1990. Purification and characterization of acetyl-CoA carboxylase from the diatom *Cyclotella cryptica*. Plant physiol. 92 : 73-78.

Roessler, P.G. and Ohlrogge, J.B.1993. Cloning and characterization of the gene that encodes acetyl-coenzyme A carboxylase in the alga *Cyclotella cryptica*. J. Biol. Chem. 268 : 19254-19259.

Roggenkamp, R., Numa, S. and Schweizer, E. 1980. Fatty acid-requiring mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective in acetyl-CoA carboxylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 : 1814-1817.

Rolleston,F.S. 1972. A theoretical background to the use of measured concentrations of intermediates in study of the control of intermediary metabolism. Curr. Top. Cell Regul. 5 : 47-75.

Roughan, P.G., Holland, R. and Slack, C.R. 1979. On the control of long-chain fatty acid synthesis in isolated intact spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. Biochem. J. 184 : 571-574.

Ryder, E., Gregolin, C., Chang. H-C. and Lane, M.D. 1967. Liver acetyl coA carboxylase : Insight into the mechanism of activation by tricarboxylic acids and acetyl coA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 57 : 1455-1462.

Shriver, B.J., Allred, J.B. and Raman-Lopez, C.R. 1989. Bovine milk-fat-globule membrane contains an enzymically inactive form of acetyl-CoA carboxylase. Biochem. J. 257 : 925-927.

Slabas, A.R. and Hellyer, A. 1985. Rapid purification of a high molecular weight subunit polypeptide form of rape seed acetyl coA carboxylase. Plant Sci. 39 : 177-182.

Song, C-S. and Kim, K-H.1981. Reevaluation of properties of acetyl-CoA carboxylase from rat liver. J. Biol. Chem. 256 : 7786-7788.

Takai, T., Yokoyama, C., Wada, K. and Tanabe, T. 1988. Primary structure of chicken liver acetyl-coA carboxylase deduced from cDNA sequence. J. Biol. Chem. 263 : 2651-2657.

Thampy, K.G. 1989. Formation of malonyl-coenzyme A in rat heart. J. Biol. Chem. 264 : 17631-17634.

Thampy, K.G. and Wakil, S.J. 1985. Activation of acetyl-CoA carboxylase. J. Biol. Chem. 260 : 6318-6323.

Thomson, L.W. and Zakil, S. 1981. Acetyl coenzyme A carboxylase activity in developing seedlings and chloroplasts of barley and its virescens mutant. Plant Physiol. 67 : 655-661.

Titchener, E.B., Gibson, D.M. and Wakil, S.J. 1958. Requirements for fatty acid biosynthesis. Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 17 : 322.

Turnham, E. and Northcote, D.M. 1982. The use of acetyl-CoA carboxylase activity and changes in wall composition as measures of embryogenesis in tissue cultures of oil palm. (*Elaeis guineensis*). Biochem. J. 208 : 323-332.

Turnham, E. and Northcote, D.H. 1983. Changes in the activity of acetyl-CoA carboxylase during rape-seed formation. Biochem. J. 212 : 223-229.

Vagelos, P.R., Alberts, A.W. and Martin, D.B. 1962. Activation of acetyl-CoA carboxylase and associated alteration of sedimentation characteristics of the enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. 8:4-8.

Vernon, R.G., Barber, M.C. and Finley, E. 1991. Modulation of the activity of acetyl-CoA carboxylase and other lipogenic enzymes by growth hormone, insulin and dexamethasone in sheep adipose tissue and relationship to adaptations to lactation. Biochem. J. 274 : 543-548.

Wada, K. and Tanabe, T. 1983. Dephosphorylation and activation of chicken liver acetyl coenzyme A carboxylase. Eur. J. Biochem. 135 : 17-23.

Waite, M. and Wakil, S.J. 1963. Studies on the mechanism of action of acetyl coenzyme A carboxylase. J. Biol. Chem. 238 : 81-90.

Wakil,S.J. 1970. In Lipid Metabolism, pp. 1-48, Academic Press Inc., New York.

Wakil, S.J. and Gibson, D.M. 1960. Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. VIII. The particicipation of protein-bound biotin in the biosynthesis of fatty acids. Biochim. Biophys. Acta 41 : 122-129.

Walker, K.A. and Harwood, J.L. 1985. Localization of chloroplastic fatty acid synthesis *de novo* in the stroma. Biochem. J. 226 : 551-556.

Wallace, R.A. 1965. Resolution and isolation of avian and amphibian yolk granule protein using TEAE-Cellulose. Anal. Biochem. 11 : 297-311.

Weiss, T.T. 1970. In Commercial Oil Sources. Food Oil and Their Use, pp. 24-26, The Avi Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut.

Winder, W.W., Maclean, P.S., Lucas, J.C., Fernley, J.E. and Trumble, G.E. 1995. Effect of fasting and refeeding on acetyl-CoA carboxylase in rat hind-limb muscle. J. Appl. Physiol. 72 : 578-582.

Windholz, M. 1976. In The Merck Index, 9^{th} edition, p. 119, Merck & Co. Inc., USA.

Winz, R., Hess, D., Aebersold,R. and Brownsey, R.W. 1994. Unique structural features and differential phosphorylation of the 280-kDa component (iso-zyme) of rat liver acetyl-CoA carboxylase. J. Biol. Chem. 269 : 14438-14445.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายประสงค์ สุขจิตฐานนท์

วัน เดือน ปีเกิด 23 เมษายน 2512

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
กศ.บ.	ม.ศรีนครินทรวิโรฒ	2536
(วิทยาศาสตร์-เคมี)		