

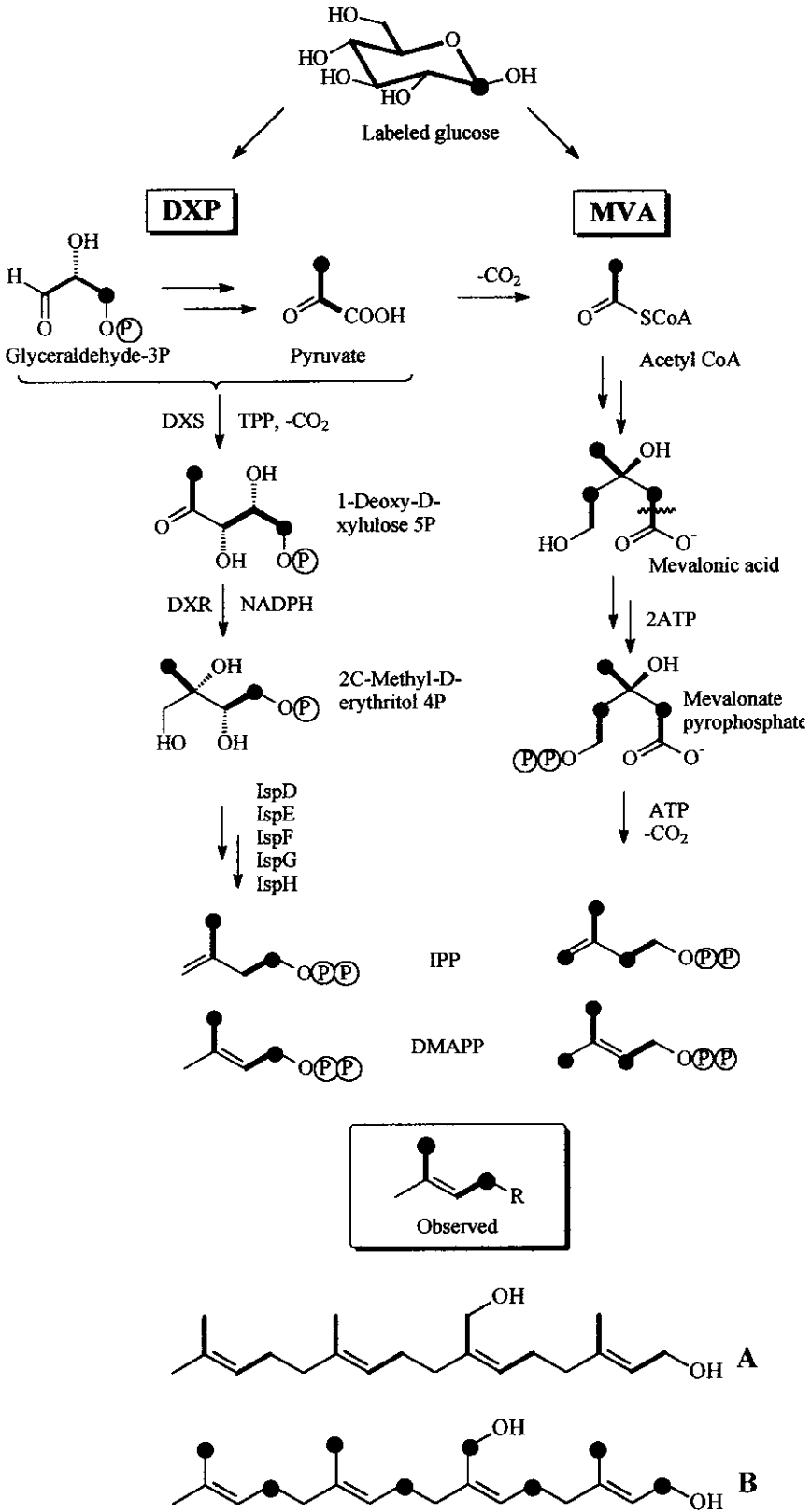
## วิจารณ์ผลการทดลอง

### (Discussion)

การศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิในพืช โดยการป้อนสารติดฉลากไอโซโทปเสถียร ณ ตำแหน่งต่างๆ กันในโมเลกุล จากนั้นติดตามรูปแบบการติดฉลากที่เข้าสู่โครงสร้างของสาร intermediate ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy เป็นวิธีที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ดังที่มีรายงานสรุปโดย Bacher et al. 1999 โดยวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ป้อนสู่พืชที่ต้องการศึกษา พิจารณาผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมพื้นฐาน ได้แก่ glycolysis, citric acid cycle, amino acid metabolism เป็นต้น จากนั้นพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารว่ามีรูปแบบของเช่นเดียวกับที่ทำนายไว้หรือไม่ การค้นพบวิถีชีวสังเคราะห์ของหน่วยย่อย isoprene แบบ deoxyxylulose phosphate ใน eubacteria, green algae, higher plants (Eisenreich et al. 1998, 2001) นอกเหนือไปจากวิถีชีวสังเคราะห์เดิม แบบ mevalonate pathway ทำให้นักวิจัยมุ่งความสนใจกับการศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์แบบใหม่ในพืชชั้นสูงเป็นอย่างมาก

การศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์ของสารเทอร์ปีนจากต้นเปล้าน้อย ในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์ของสารเทอร์ปีนที่พบในต้นเปล้าน้อยใช้วิถีชีวสังเคราะห์เป็นแบบใดในการสร้างหน่วยย่อยของ isoprene แบบ deoxyxylulose phosphate pathway หรือ mevalonate pathway

ในการทดลองทำการป้อนสารติดฉลาก unlabeled glucose, [1-<sup>13</sup>C] glucose และ [U-<sup>13</sup>C] glucose ให้กับยอดเปล้าน้อย (ที่ได้จากต้นเปล้าน้อยอายุ 6 เดือน) แยกสาร plaunotol และ phytosterols โดยใช้เทคนิค column chromatography และวิเคราะห์รูปแบบการติดฉลากบนโมเลกุลทั้งสองด้วย <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy สาร plaunotol ที่แยกได้จากการป้อนสารติดฉลากชนิด [U-<sup>13</sup>C] glucose พบว่ากลูโคสที่ป้อนเข้าสู่วิถีชีวสังเคราะห์ของเปล้าน้อย โดยสังเกตจากสัญญาณที่เป็น satellite signals จำนวน 8 คู่ โดยตรงกับตำแหน่งของ IPP ตำแหน่ง 1, 2, 3 และ 5 แสดงให้เห็นว่าสารตั้งต้นกลูโคสได้มีการนำเข้าสู่เซลล์ผ่านไปยังกระบวนการ glycolysis ได้เป็นโมเลกุลปฐมภูมิสำหรับการสร้างสารเทอร์ปีน จากการทำนายดังแสดงในรูปที่ 18 [U-<sup>13</sup>C] glucose เมื่อผ่านกระบวนการ glycolysis สารปฐมภูมิจะมีลักษณะการติดฉลากดังแสดงเป็นเส้นทึบสีแดง และเมื่อสารปฐมภูมิดังกล่าวผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบ deoxyxylulose phosphate และ แบบ mevalonate ลักษณะรูปแบบจะมีลักษณะที่เหมือนกันคือ มีการติดฉลากที่ตำแหน่ง 1, 2, 3 และ 5 เป็นที่สังเกตได้ว่าสัญญาณของ Satellite <sup>13</sup>C- signals มีค่าต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการทดลองได้เจือจาง [U-<sup>13</sup>C] glucose ด้วย unlabeled glucose ในอัตราส่วน 1:20 ประกอบกับถูกเจือจางด้วยสารในธรรมชาติ (metabolic pool) ในผลการทดลองเมื่อป้อนด้วย [1-<sup>13</sup>C] glucose สาร plaunotol ที่แยกได้นำมาวิเคราะห์ quantitative <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy เปรียบเทียบกับ plaunotol ที่แยกได้จากการป้อนด้วย unlabeled glucose พบว่า ณ คาร์บอนตำแหน่งที่ 1, 5, 9, 13, 17, 18, 19 และ 20 แสดงค่าอัตราส่วน integral signal ระหว่าง [1-<sup>13</sup>C] glucose และ unlabeled glucose ณ คาร์บอนตำแหน่งเดียวกัน มีค่าเฉลี่ย 1.49±0.36 เมื่อดูความสัมพันธ์ของรูปแบบการติดฉลากในหน่วยย่อย isoprene พบว่าตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 5 มีการติดฉลากด้วย <sup>13</sup>C-ผลการทดลองสอดคล้องกับรูปแบบการติดฉลากที่ทำนายผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบ deoxyxylulose phosphate ในขณะที่รูปแบบการติดฉลากที่ทำนายผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบ mevalonate รูปแบบเป็นตำแหน่งที่ 2, 4 และ 5 ของหน่วยย่อย isoprene (รูปที่ 18, ตารางที่ 8)



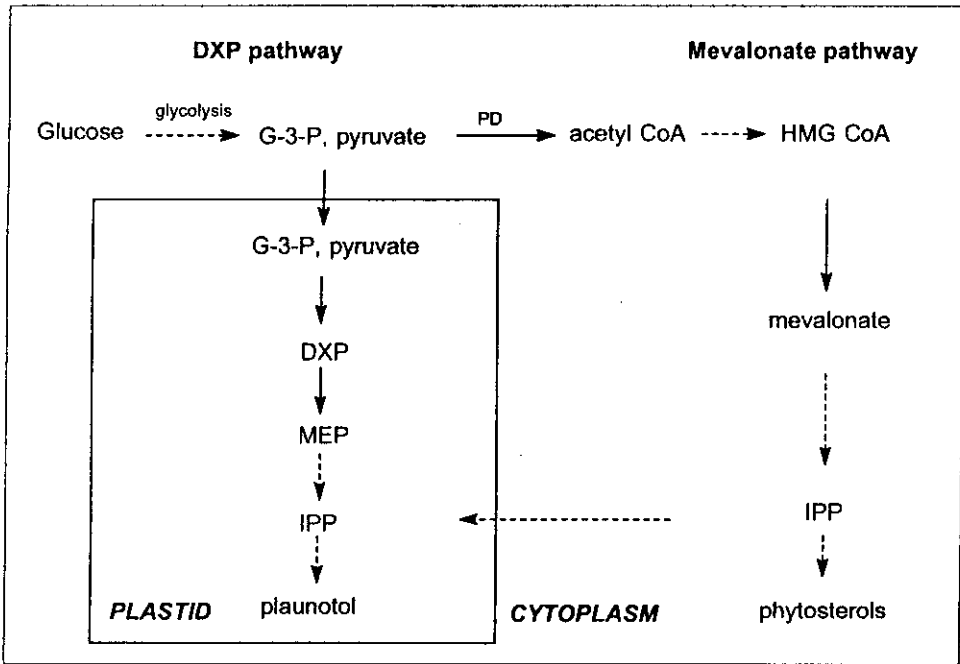
**รูปที่ 18** Predicted pattern labeling ของ IPP และ DMAPP ที่สร้างจาก [U-<sup>13</sup>C]-glucose (เส้นทึบสีแดง), [1-<sup>13</sup>C]-glucose (วงกลมทึบสีฟ้า) ผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบ DXP และ MVA; รูปแบบการติดฉลากโมเลกุล launotol เมื่อป้อนด้วย [U-<sup>13</sup>C]-glucose (A) และ เมื่อป้อนด้วย [1-<sup>13</sup>C]-glucose (B)

ตารางที่ 8 ตารางแสดงการกระจายของสารไอโซโทปในโมเลกุลของ IPP ใน plaunotol

Unit	Relative <sup>13</sup> C-abundance				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
IPP 1	1.40	1.07	1.14	1.18	1.32
IPP 2	1.45	1.12	1.17	0.99	2.38
IPP 3	1.35	1.07	1.10	1.10	1.31
IPP 4	1.31	1.12	1.10	0.81	1.42

การศึกษารูปแบบการติดฉลากในโมเลกุลของ phytosterols เมื่อป้อนด้วย unlabeled glucose, [1-<sup>13</sup>C] glucose และ [U-<sup>13</sup>C] glucose ผลการทดลองตรวจไม่พบสัญญาณที่มีความแตกต่างระหว่างสารตั้งต้นที่ติดฉลากแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจอธิบายด้วยเหตุผลเช่นเดียวกันกับปรากฏการณ์ที่พบใน plaunotol และเหตุผลอีกประการหนึ่งอาจเป็นเพราะในพืชที่นำมาทดลอง เอนไซม์ pyruvate dehydrogenase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน pyruvate เป็น acetyl CoA อาจไม่ active เพียงพอ (รูปที่ 19) และด้วยเหตุผลที่พืชอาจกระตุ้นวิถีชีวสังเคราะห์ให้สร้างโมเลกุล phytosterols ก่อนระยะป้อนสารติดฉลาก หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ ระยะเวลาและช่วงอายุของพืชที่นำมาป้อนติดฉลาก อาจไม่ใช่ระยะของการสร้างโมเลกุล phytosterols นั้นเอง อย่างไรก็ตาม การศึกษาในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเปล้าน้อย เมื่อป้อนด้วย [1-<sup>13</sup>C] glucose มีรายงานว่าโมเลกุล phytosterols ถูกสร้างผ่านวิถีชีวสังเคราะห์ทั้งสองแบบ โดยอัตราส่วนระหว่าง deoxyxylulose phosphate pathway และ mevalonate pathway เท่ากับ 1:1 (De-Eknamkul and Potduang, 2003)

วิถีชีวสังเคราะห์ของ plaunotol จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่า โมเลกุล plaunotol ในต้นเปล้าน้อย ได้สร้างผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบ deoxyxylulose phosphate (รูปที่ 19) ในพืชชั้นสูงการสร้างสารผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบนี้จะเกิดขึ้นใน plastid ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งเก็บสะสม plaunotol ที่เก็บในรูปของ oil globule ใน plastid ของใบเปล้าน้อย (De-Eknamkul and Potduang 2003) และ การตรวจพบเอนไซม์ geranylgeraniol 18-hydroxylase ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน geranylgeraniol ไปเป็น plaunotol ที่อยู่ใน membrane fraction ของสารสกัดจากใบเปล้าน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิถีชีวสังเคราะห์ของ plaunotol ในต้นเปล้าน้อย เกิดขึ้นใน plastid และเกิดผ่านวิถีชีวสังเคราะห์แบบ deoxyxylulose phosphate pathway



DXP = deoxy-D-xylulose 5-phosphate      MEP = methyl-D-erythritol 4-phosphate  
 G-3-P = glyceraldehyde 3-phosphate      IPP = isopentenyl pyrophosphate  
 PD = pyruvate dehydrogenase

รูปที่ 19 แสดงภาพการกระจายของสารปฐมภูมิในเซลล์พืช