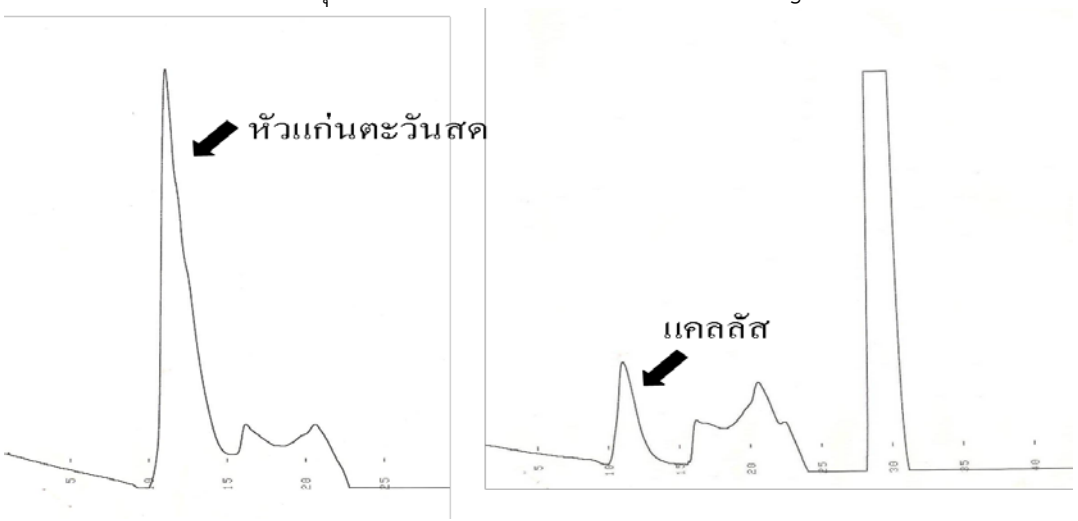
# บทที่ 1
# บทนำ

**ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย**

อินนูลิน (Inulin) และฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (Fructo- oligosaccharides, FOS) เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทโพลีแซคคาร์ไรด์จำพวกฟรุกแตน (Fructan) ที่ละลายน้ำได้ดี ประกอบไปด้วยโพลิเมอร์ฟรุกโตสที่มีสายโซ่ยาวตั้งแต่ 2 ถึง 60/ 70 หน่วย และ 3 ไปจนถึง 7/ 10 หน่วย ตามลำดับ และมีหน่วยของกลูโคสต่ออยู่ที่ส่วนปลาย inulin และ FOS เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ไม่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของคน แต่สามารถย่อยได้โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* จึงช่วยเสริมสร้างภูมิต้านทานและยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด เช่น *Coliform, Salmonella, E. coli* และ *Clostridium* ได้ทำให้ inulin และ FOS ถูกจัดจำแนกเป็นสารพรีไบโอติก (Prebiotic) ชนิดหนึ่งที่มีแนวโน้มของปริมาณความต้องการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารเสริมสุขภาพคนและสัตว์มากขึ้น ยกตัวอย่างเช่น การนำ ilnulin และ FOS ซึ่งเป็นสารที่มีค่าแคลอรีต่ำไปเสริมในอาหารของผู้ป่วยเบาหวานเพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดไม่ให้สูง การนำไปเสริมในนมผงและโยเกิร์ตเพื่อช่วยระบบการขับถ่ายของเด็กและผู้บริโภค และการเสริมในอาหารสัตว์เพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียจากมูลของสุกร เป็นต้น

การสังเคราะห์และสะสม Inulin และ FOS นั้นพบในพืชหลายชนิด เช่น เจรูซาเล็ม อาร์ทิโช๊ค (Jerusalem artichoke), หน่อไม้ฝรั่ง (Asparagus), บีทน้ำตาล (Sugar beet), หัวหอม (Onion), ชิคอรี (Chicory) และกล้วย (Banana) เป็นต้น โดยการสังเคราะห์จะควบคุมโดยการทำงานของยีนและเอนไซม์ในกลุ่มฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส (Fructosyltransferase) ซึ่งชนิดของ inulin และ FOS ที่สังเคราะห์ได้จะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับแหล่งและชนิดของเอนไซม์ สำหรับชนิดพืชที่มีการสะสม inulin และ FOS ในปริมาณมากและมีการนำมาสกัดและเตรียมในรูปผงแห้งจำหน่ายในท้องตลาดเพื่อใช้เสริมในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มต่างๆ ได้แก่ Chicory และ Jerusalem artichoke ซึ่งพืชสองชนิดนี้มีการสะสมสารกลุ่ม fructan ประมาณ 35.7– 47.6 และ 16.0– 20.0 กรัม/ 100 กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ ซึ่งจะมีการสะสมมากกว่าพืชอื่น (Venter, 2007) โดย Jerusalem artichoke เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. เมื่อนำมาปลูกในประเทศไทยได้มีการตั้งชื่อว่า แก่นตะวัน พืชชนิดนี้มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กถึงปานกลางสูงประมาณ 1.5- 3.0 เมตร มีดอกสีเหลืองคล้ายดอกทานตะวันขนาดเล็กและมีหัวใต้ดิน (tuber) ลักษณะตะปุ่มตะป่ำทำหน้าที่สะสมอาหาร ระยะเวลาสำหรับการเก็บเกี่ยวประมาณ 120 วัน ส่วนของลำต้นสามารถตัดมาทำพืชหมัก (silage) สำหรับเลี้ยงสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ ขณะที่ส่วนหัวใต้ดินมีการสะสม inulin ในปริมาณสูง จึงได้มีการส่งเสริมให้ปลูกแก่นตะวันในประเทศไทยเพื่อรองรับอุตสาหกรรมที่ต้องใช้แก่นตะวันเป็นวัตถุดิบที่กำลังขยายตัวและเป็นการลดการนำเข้า inulin และ FOS จากต่างประเทศ แต่การสกัดเอา inulin และ FOS จากแหล่งของพืชวัตถุดิบที่เพาะปลูกตามสภาพธรรมชาติมาใช้ก็มักประสบกับปัญหาในเรื่องของการไม่สามารถควบคุมปริมาณและคุณภาพของผลผลิตได้ โดยปริมาณและชนิดของ inulin และ FOS ที่ได้จะขึ้นกับปัจจัยต่างๆทั้งที่ควบคุมได้และไม่ได้ ได้แก่ พันธุ์ที่ปลูก สภาพภูมิประเทศและอากาศ (Schorr- Galindo and Guiraud, 1997) การรบกวนของโรคโคนเน่าและหัวเน่า (วิสุทธิ์และคณะ, 2550) ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวและสภาวะการเก็บรักษาเพื่อให้ได้ Inulin ที่มีค่า DP (Degree of polymerization) ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ (Srikhampa and Uriyapongson, 2008) เป็นต้น ทำให้เริ่มมีการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองมาใช้ในการผลิต inulin เพราะสามารถ

ควบคุมปริมาณและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ง่ายกว่าโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาล ปลอดจากโรคและแมลง อีกทั้งการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะ *in vitro* สามารถปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ เพื่อเพิ่มการผลิต inulin จากพืชให้สูงขึ้นได้หากทราบวิถีชีวสังเคราะห์ของสารนั้นๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแก่นตะวันในหลอดทดลองที่มีรายงานการทำวิจัยในประเทศไทยนั้นยังไม่พบว่า มีการศึกษาการสังเคราะห์ Inulin ในเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยง พบแต่เพียงรายงานการชักนำให้เกิดแคลลัสและรากเพื่อมุ่งหวังประโยชน์ในการขยายพันธุ์แก่นตะวัน เพราะหัวพันธุ์แก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาตินั้นมักประสบปัญหาการติดเชื้อทำให้เกิดโรคโคนเน่า (ปิยะวัตร และ สุมนา, 2553; ปรียา และ วิภาวรรณ, 2551) ส่วนรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการผลิต inulin ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ฟรุกโตสในกลุ่ม fructan ที่มี DP สูงกว่า FOS ในหลอดทดลองนั้นพบเพียงชิ้นเดียว ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงแคลลัสและต้นในหลอดทดลองและติดตามดูกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลิเนส (Inulinase) แต่ไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณ inulin และชนิดของ FOS ที่สร้างขึ้นโดยตรง (Taha *et al.*, 2007) ทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่า inulin และ FOS ที่สร้างขึ้นในแคลลัสและต้นที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองนั้นเป็นชนิดเดียวกับที่พบในธรรมชาติหรือไม่ ทำให้คณะผู้วิจัยของเรามีความสนใจที่จะศึกษาในประเด็นดังกล่าวนี้ จึงได้ทดลองเพาะเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบของแก่นตะวันพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยในอาหารสูตรต่างๆ และสกัด inulin จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบในเบื้องต้นว่า แคลลัสสามารถสร้าง inulin ที่มีค่า DP เดียวกับที่ตรวจพบในหัวแก่นตะวันสดและมี retention time ใกล้เคียงกันดัง HPLC chromatogram ที่แสดงในรูปที่ 1.1 โดยมีการผลิต inulin ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงนาน 1 เดือนได้ประมาณ 1 mg/ ml ของสารที่สกัดได้ ในขณะที่หัวสดแก่นตะวันอายุ 4 เดือนให้ปริมาณ inulin ประมาณ 4 mg/ ml ของสารที่สกัดได้




**รูปที่ 1.1** HPLC chromatogram ของสารสกัดจากหัวแก่นตะวันและแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบแก่นตะวัน

แม้ว่า ปริมาณ inulin ที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากแคลลัสที่ชักนำได้จะต่ำกว่าที่ตรวจพบในหัวสด แต่แคลลัสที่ได้ก็ใช้เวลาเพาะเลี้ยงสั้นกว่ามาก จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการผลิตและเพิ่มผลผลิต inulin จากการเลี้ยงแคลลัสในหลอดทดลอง โดยแนวทางในการเพิ่มผลผลิตของ inulin ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองนั้นสามารถทำได้โดยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การคัดเลือกเซลล์ไลน์ที่ให้ผลผลิตสูงสุด การหาสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิต การเติมสารกระตุ้น (elicitors) การสังเคราะห์ และการดัดแปลงทางพันธุกรรม เป็นต้น ซึ่งการที่จะเพิ่มผลผลิตได้โดยวิธีการใดก็ตาม จำเป็นต้องเข้าใจถึงวิถีชีวสังเคราะห์ของสารที่ต้องการผลิตก่อนเป็นอันดับแรก ซึ่งจากการศึกษาในงานวิจัยหลายชิ้นชี้ให้เห็นว่า ยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ fructan ในแก่นตะวันก็คือ ยีน 1-*sst* และ 1-*fft* ซึ่งแปลรหัสเป็นเอนไซม์ sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) และ fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-

FFT) ตามลำดับ โดยจากงานวิจัยของ van der Meer และคณะ (1998) ที่ได้ศึกษาถึงวิถีชีวเคมีของการสังเคราะห์ fructan ในแก่นตะวันพบว่า ยีนและเอนไซม์ทั้งสองแสดงออกมากในระยะที่กำลังพัฒนาเป็นหัวสะสมอาหารและเมื่อหัวสะสมอาหารพัฒนาเต็มที่จะไม่พบการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ และหากมีการแสดงออกของยีนหรือเอนไซม์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งก็จะมีผลต่อการสังเคราะห์และชนิดของ fructan ที่จะได้ และการที่แคลลัสสามารถสร้าง inulin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม fructan ได้นั้นก็น่าจะบ่งชี้โดยทางอ้อมว่า มีการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง inulin เกิดขึ้นในแคลลัส ซึ่งการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนและเอนไซม์ดังกล่าวยังไม่ปรากฏการศึกษาในเซลล์หรือเนื้อเยื่อของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาก่อน เพราะฉะนั้น การทำความเข้าใจเกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ inulin ที่เกิดขึ้นในแคลลัสน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์ในแต่ละขั้นตอนและนำไปสู่การเพิ่มการสังเคราะห์ inulin ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองต่อไปได้ และจะเป็นการช่วยบรรเทาปัญหาการผลิต inulin จากหัวสดของแก่นตะวันที่มักประสบกับปัญหาการติดเชื้อที่หัวพันธุ์ในระหว่างการเพาะปลูก และหากพิสูจน์ได้ว่า inulin ที่สังเคราะห์ขึ้นในแคลลัสมีกิจกรรมพรีไบโอติกเช่นเดียวกับ inulin ที่สกัดได้จากหัวแก่นตะวันสด ก็จะเป็นอีกทางเลือกสำหรับการผลิตสารพรีไบโอติกที่สามารถทำได้ตลอดทั้งปีโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาลเหมือนกับแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการสังเคราะห์ inulin กับการแสดงออกของเอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ และศึกษาชนิดของ inulin ที่สังเคราะห์ได้ในแคลลัสที่ชักนำได้จากแก่นตะวัน ตลอดจนศึกษาสมบัติการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกของ inulin ที่ผลิตได้ในแคลลัส

**ขอบเขตของการวิจัย**

1. สร้างระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสของแก่นตะวันในหลอดทดลอง โดยศึกษาหาส่วนของพืชและสูตรอาหารที่ชักนำแคลลัสที่ให้ผลผลิต inulin ได้สูงสุด
2. วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของ inulin ที่ผลิตขึ้นในแคลลัสเที่ชักนำได้จากสภาวะต่างๆ
4. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ในแคลลัสที่ชักนำได้จากสภาวะต่างๆ
5. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ในแคลลัสที่ชักนำได้จากสภาวะต่างๆ
6. ศึกษาคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกของ inulin ที่ผลิตได้ในแคลลัส

**ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย**

การทำงานร่วมกันระหว่างยีน 1-*sst* และ 1-*fft* และเอนไซม์ 1-SST และ 1-FFT ที่เป็นผลิตผลของยีนดังกล่าวมีผลต่อการสังเคราะห์ inulin และชนิดของ inulin ที่จะได้ ดังนั้น การทำความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ดังกล่าวในแคลลัสที่ชักนำได้ในสภาวะต่างๆ จะช่วยให้ควบคุมวิถีชีวสังเคราะห์ inulin ในแคลลัสได้และนำไปสู่การเพิ่มผลผลิต inulin ในแคลลัสได้ในที่สุด