

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

Fructan คือโพลิเมอร์ฟรุกโตสที่ประมาณ 15% ของพืชมีดอกสร้างขึ้นเพื่อเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตสะสม โดยพืชเหล่านี้จะมีการสะสม fructan ในอวัยวะที่แตกต่างกันออกไป เช่น ข้าวสาลีและบาร์เลย์สะสมไว้ในใบและต้น ทิวลิปและหัวหอมสะสมที่ bulb ชิคอรี (Chicory) สะสมที่รากแก้ว (Taproot) และ Jerusalem artichoke และ Dahlia สะสมที่หัว (Tuber) ซึ่ง fructan หลักที่พบใน Jerusalem artichoke คือ linear β -2, 1-linked fructose polymers ที่มีค่า DP จนถึง 30 เชื่อกันว่า fructan ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากซูโครสในแควคิวโอลโดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ fructosyltransferase อย่างน้อย 2 ชนิด คือ sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99) และ fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100) (Darwen and John, 1989) ซึ่งการสังเคราะห์ fructan ใน Jerusalem artichoke ตามโมเดลของ Edelman และ Jefford (1968) นั้นแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ เริ่มจาก 1-SST กระตุ้นให้มีการย้ายหน่วยน้ำตาลฟรุกโตส (Fructosyl unit) จากโมเลกุลซูโครสตัวให้ (Sucrose donor molecule) ไปต่อกับโมเลกุลซูโครสตัวรับ (Sucrose acceptor molecule) ทำให้เกิด trisaccharide kestose (GF-F, GF₂) ขึ้นมา จากนั้น 1-FFT จะสังเคราะห์ให้ได้ fructan ที่มี DP สูงขึ้นโดยการย้าย fructosyl unit ระหว่าง GF₂ กับ fructan ที่มีขนาดใหญ่กว่าได้เป็น nystose (GF₃), 1F-fructofuranosyl nystose (GF₄) และ raffinose (GF₅) ตามลำดับ ต่อมา Koops และ Jonker (1996) ได้พิสูจน์โมเดลของ Edelman และ Jefford โดยการแยกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทั้งสองจาก tuber ของ Jerusalem artichoke พันธุ์ Colombia แล้วนำมาสังเคราะห์ fructan ในสภาวะ *in vitro* ที่มีการเติมซูโครสลงไปพบว่า สามารถสังเคราะห์ fructan ที่มี DP อย่างน้อย 13 ได้ สำหรับเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67 และ 70 kDa และในปี 1998 van der Meer และคณะได้โคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ fructan ของ Jerusalem artichoke พันธุ์ Colombia ในรูป cDNA clone คือ 1-*sst* (accession no. AJ009757) และ 1-*fft* (accession no. AJ009756) ซึ่งแปลรหัสเป็นเอนไซม์ sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST, accession no. CAA08812.1) และ fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT, accession no. CAA088111) ตามลำดับ และ จากรูปแบบการแสดงออกบ่งชี้ว่า ยีนทั้งสองแสดงออกมากในหัวสะสมอาหารในระยะที่กำลังพัฒนาและมีการแสดงออกต่ำในส่วนของดอกและลำต้น และไม่พบการแสดงออกของยีนในใบ, ราก และหัวสะสมอาหารที่พัฒนาเต็มที่ ซึ่งการแสดงออกของยีนสอดคล้องกับการสังเคราะห์ fructan นอกจากนี้การทดสอบหน้าที่ของเอนไซม์โดยถ่ายยีนที่โคลนได้จาก Jerusalem artichoke ไปยังต้นพิทูเนียที่ไม่ใช่พืชกลุ่มที่สะสม fructan พบว่า หากพิทูเนียได้รับยีน 1-*sst* สามารถสร้าง 1-kestose (GF₂), 1, 1-nystose (GF₃) และ 1, 1, 1-fructosylnystose (GF₄) ได้ แต่พิทูเนียได้รับยีน 1-*fft* ไม่สามารถสะสม fructan ได้ ซึ่งน่าจะเป็นเพราะไม่มี substrate ที่เหมาะสม (DPมากกว่าหรือเท่ากับ 3) สำหรับ 1-FFT ดังนั้น การสังเคราะห์ให้ได้ fructan ใน DP ที่ต้องการจึงจำเป็นต้องเข้าใจขั้นตอนการสังเคราะห์อย่างละเอียด นอกจากการโคลนยีน 1-*sst* และ 1-*fft* ใน Jerusalem artichoke แล้วก็ยังมีการโคลนยีนกลุ่มนี้ในพืชที่มีการสะสม inulin และ FOS อื่นอีก เช่น หัวหอม ข้าวบาร์เลย์หน่อไม้ฝรั่ง และ chicory เป็นต้น (Vijn *et al.*, 1997; Spernger *et al.*, 1995) โดยในหน่อไม้ฝรั่งจะมียีน 6-*sft* ซึ่งจะสังเคราะห์ fructan ที่มีลักษณะเป็น branch ซึ่งความแตกต่างของยีนที่มีในพืชแต่ละชนิดทำให้ประเภทและความยาวของ fructan ในพืชแต่ละชนิดจะมีความหลากหลายและแตกต่างกันค่อนข้างมาก โดย

ค่า DP ของ plant fructan อยู่ในช่วงตั้งแต่ 10-250 fructosyl units ซึ่งความแตกต่างในความยาวของ fructan ไม่เพียงแต่เป็นผลเนื่องมาจากความแปรผันทางอนุกรมวิธานของพืชเท่านั้นแต่ยังรวมไปถึงอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมที่พืชได้รับด้วย โดยพืชจะมีการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยการปรับเปลี่ยนความยาวเฉลี่ยของ fructan ที่มันมี โดยพบว่าพืชมีการสะสม fructan มากขึ้นเพื่อปรับค่าออสโมติกเมื่ออยู่ในภาวะแห้งแล้ง (drought) และหนาวเย็น (cold) (Pontis and del Campillo, 1985) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นอีกบทบาทหนึ่งของ fructan ในพืช นอกเหนือไปจากการทำหน้าที่เป็นคาร์โบไฮเดรตสะสมสำหรับข้อแตกต่างของ fructan จากแป้ง (starch) ก็คือ มันเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้ดีจึงช่วยในการรักษาค่า osmotic potential ในแวคิวโอลของพืช สำหรับ inulin และ FOS จัดเป็นสารในกลุ่ม fructan ที่ได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดย inulin เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบไปด้วยส่วนผสมต่างๆ ของโพลีเมอร์ฟรุกโตสที่มีสายโซ่ยาวตั้งแต่ 2 ถึง 60/70 หน่วยและโดยปกติจะพบหน่วยของกลูโคสอยู่ที่ส่วนปลาย (Suzuki, 1993) สำหรับค่า DP ของ inulin นั้นจะขึ้นกับแหล่งพืชผักวัตถุดิบ (ชนิดและพันธุ์) วันที่เก็บเกี่ยว และระยะเวลาในการเก็บรักษา (Schorr- Galindo and Guiraud, 1997) ส่วน FOS เป็น fructan ที่มี DP ตั้งแต่ 3 ไปจนถึง 7/10 และมีหน่วยของกลูโคสอยู่ที่ปลายเช่นเดียวกันกับ inulin ซึ่งการย่อย inulin บางส่วนด้วยเอนไซม์ก็จะทำให้ได้ FOS ขึ้น ทั้ง inulin และ FOS เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ไม่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของคน แต่สามารถย่อยได้โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* จึงช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด เช่น *Coliform*, *Salmonella*, *E. coli* และ *Clostridium* ได้ทำให้ทั้ง inulin และ FOS ถูกจัดจำแนกเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) ที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารเสริมสุขภาพคนและอาหารสัตว์มากขึ้นเรื่อยๆ ไม่ว่าจะเป็นการใช้ inulin ซึ่งมีค่าแคลอรีต่ำไปเสริมในอาหารเพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดไม่ให้สูงเหมาะสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน (นิमित และ สนั่น, 2549) และการใช้ FOS ในอาหารสัตว์เพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียจากมูลของสัตว์เลี้ยงเช่น ไก่ และ สุกร เป็นต้น (เยวามาลย์ และคณะ, 2549) สำหรับการสะสมของ inulin และ FOS นั้นพบในพืชหลายชนิดดังกล่าวข้างต้น แต่ชนิดที่มีการสะสมในปริมาณมากและมีการนำมาใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมได้แก่ Chicory และ Jerusalem artichoke

Jerusalem artichoke มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกาเหนือที่มีอากาศหนาวเย็น แต่เมื่อนำมาปลูกในแถบอากาศร้อนสามารถปรับตัวได้ดีกับสภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกันมาก มีความแข็งแรงทนทานจึงให้ชื่อพืชว่า แก่น และเป็นพืชที่ใกล้ชิดกับทานตะวัน เพราะอยู่ในสกุลเดียวกัน รศ.สนั่น จอกลอย ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นจึงให้ชื่อภาษาไทยว่า “แก่นตะวัน” จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของแก่นตะวันที่ปลูกในแปลงทดลอง ณ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นโดย สุดารัตน์ และคณะพบว่าแก่นตะวันเป็นพืชล้มลุก ลำต้นสูง 100 ถึง 160 เซนติเมตร มีลำต้นใต้ดินสะสมอาหาร ใบเป็นใบเดี่ยวรูปหอก มีการเรียงตัวแบบตรงข้ามสลับฉาก (opposite decussate) ขอบใบจักเป็นฟันเลื่อย ออกดอกเป็นช่อมีดอกย่อยเรียงชิดกันแน่น (composite flower) ช่อดอกและดอกย่อยสีเหลือง (สุดารัตน์ และคณะ, 2551) แก่นตะวันสามารถปลูกได้ทุกฤดู ออกดอกอายุประมาณ 60- 65 วัน อายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 100-140 วันหรือสังเกตจากดอกร่วงเกือบหมดและลำต้นเริ่มโทรม ส่วนของแก่นตะวันที่มีการนำมาใช้ประโยชน์คือ หัว (tuber) เพราะมีการสะสม inulin และ FOS อยู่ในปริมาณสูงแต่จะแปรผันตามพันธุ์ การเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษา เห็นได้จากการวิเคราะห์ปริมาณ inulin ในแก่นตะวันพันธุ์ JA89 ชัยภูมิและ HEL65 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสนาน 10 สัปดาห์พบว่า ปริมาณ inulin ของพันธุ์ JA89 ชัยภูมิ

จะสูงกว่า HEL65 และปริมาณ inulin ในหัวสดจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 5 และ 10 ของการรักษา (Srikhampa and Uriyapongson, 2008) จากสรรพคุณดังกล่าวของแก่นตะวันจึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น นำไปประกอบอาหารควา หวานหลายชนิด ซึ่งค่าแคลอรีที่ต่ำของ inulin นับเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพเป็นอย่างยิ่ง โดยการนำไปเสริมในอาหารทำให้ผู้ป่วยเบาหวานสามารถ รักษาระดับน้ำตาลในเลือดไม่ให้สูงเกินไปได้ สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านปศุสัตว์นั้นก็มีรายงานการวิจัย เช่นเดียวกันเป็นต้นว่า การนำ FOS จากแก่นตะวันไปเสริมในอาหารสุกรเพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกร (ศุภวันจักรี และ สมชัย, 2546) การใช้แก่นตะวันเป็นสารทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อศึกษาผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและชีวภาพของระบบลำไส้เล็กและใหญ่ในลูกสุกร (พิภพ, 2546) ขณะที่มีการ นำเอาแก่นตะวันไปใช้ในการเสริมอาหารคนและสัตว์แล้ว ยังมีความสนใจพืชดังกล่าวนี้ในแง่ของพืชพลังงาน ทดแทน โดยมีรายงานว่า ทั้งหัวและต้นสามารถนำมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้ โดยหัวสด 1000 กิโลกรัม สามารถผลิตเอทานอลได้ 80- 100 ลิตร จึงมีการศึกษาถึงศักยภาพการใช้แก่นตะวันสำหรับการผลิตเอทานอล โดยปลูกทดสอบในพื้นที่ต่างๆ พบว่า แก่นตะวันที่ปลูกในอำเภอนาโคกพัฒนาในเขตให้น้ำชลประทานมีอายุการ เก็บเกี่ยวประมาณ 5 เดือนครึ่ง และได้ผลผลิตต่ำกว่าที่เคยปลูกทดสอบมาก่อนหน้าจังหวัดขอนแก่นและ ลพบุรี เพราะหัวที่นำมาปลูกมีการงอกไม่สม่ำเสมอและมีปัญหาโรคโคนเน่า หัวเน่ารบกวน ทำให้เกษตรกรที่ ร่วมโครงการไม่มีรายได้เพิ่มขึ้นและไม่ยอมรับการปลูกแก่นตะวันเพราะมีการปฏิบัติที่ยุ่งยากกว่าการปลูกพืช ทางเลือกอื่น (วิสุทธิ และคณะ, 2550) จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงอุปสรรคและปัญหาของการผลิต แก่นตะวันเพื่อนำไปใช้เป็นพืชวัตถุดิบเพื่อตอบสนองความต้องการของอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการ ผลิตแก่นตะวันในเชิงการค้าของประเทศไทยยังไม่เคยมีมาก่อน เพื่อรองรับความต้องการแก่นตะวันของ อุตสาหกรรมต่างๆ การนำเทคโนโลยีต่างๆมาช่วยสร้างระบบการเพาะปลูกเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นไม่ว่าจะ เป็นการพัฒนาพันธุ์ที่มีอายุการเก็บเกี่ยวสั้น มีอัตราการงอกที่สม่ำเสมอ และต้านทานต่อโรคโคนเน่า หัวเน่า น่าจะเป็นแนวทางที่ควรพิจารณา อย่างไรก็ตามการปลูกพืชแม้ว่าจะจะเป็นพันธุ์ที่ดีในสภาพธรรมชาติเพื่อให้ ได้ผลผลิตในปริมาณและคุณภาพที่ต้องการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกเพื่อให้มีการสะสม inulin และ FOS ที่มีค่า DP ที่ต้องการตามสภาพธรรมชาตินั้นอาจควบคุมได้ยากเพราะสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงมีผลต่อ ประเภทของ fructan ที่พืชจะสร้างขึ้น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยเทคนิคต่างๆ น่าจะเป็นอีกทางหนึ่งที่จะ เข้ามาช่วยแก้ไขปัญหาดังนี้เพราะสามารถควบคุมสภาวะในการผลิตและปลอดการรบกวนจากโรคและแมลง ศัตรูพืช และเมื่อได้เซลล์ไลน์ที่ให้ผลผลิตสูงแล้วยังสามารถนำไปขยายขนาดการผลิตได้ใน bioreactor ที่ สามารถปรับเปลี่ยนสภาวะให้เป็นไปตามที่ต้องการได้ ซึ่งเทคนิคต่างๆ สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่ว่าจะ เป็นการเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture) และการเพาะเลี้ยงต้น (shoot culture) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงใน ระดับเซลล์และอวัยวะตามลำดับ ล้วนมีรายงานว่าสามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการชักนำให้เซลล์หรือ อวัยวะพืชหลายชนิดสร้างสารที่มีสรรพคุณจำเพาะได้ สำหรับในแก่นตะวันแล้วพบว่า มีรายงานการศึกษา การสร้าง inulin ในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสและต้นเพียงขึ้นเดียวโดย Taha และคณะ ซึ่งก็เป็น เพียงการติดตามดูกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ inulinase แต่ไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณ inulin และชนิดของ FOS ที่สร้างขึ้นโดยตรง (Taha *et al.*, 2007) ดังนั้น การศึกษาในแนวทางเดียวกันนี้กับแก่นตะวันที่ปลูกใน ประเทศไทยที่อาจมีความแตกต่างไปจากพันธุ์ที่ปลูกในต่างประเทศน่าจะเป็นประโยชน์ต่อความต้องการ inulin และ FOS ที่กำลังเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารเสริมสุขภาพ เพราะการผลิตสารโดยการ เพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองนั้นไม่เพียงแต่ปลอดจากโรคและแมลงเท่านั้น การเก็บเกี่ยว ผลผลิตก็อาจทำได้ง่ายกว่าและมีความสะอาดด้วย สำหรับแนวทางในการเพิ่มผลผลิตของ inulin ในแคลลัสที่ เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองนั้นสามารถทำได้โดยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การคัดเลือกเซลล์ไลน์ที่ให้ผลผลิตสูงสุด

การหาสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิต การเติมสารกระตุ้น (elicitors) การสังเคราะห์ และการดัดแปลงทางพันธุกรรม เป็นต้น ซึ่งการที่จะเพิ่มผลผลิตได้โดยวิธีการใดก็ตาม จำเป็นต้องเข้าใจถึงวิถีชีวสังเคราะห์ของสารที่ต้องการผลิตก่อนเป็นอันดับแรก ซึ่งยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ก็คือ ยีน 1-*sst* (accession no. AJ009757) และ 1-*fft* (accession no. AJ009756) ซึ่งแปลรหัสเป็นเอนไซม์ sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1- SST, accession no. CAA08812.1) และ fructan: fructan 1- fructosyltransferase (1- FFT, accession no. CAA088111) ตามลำดับ โดยจากงานวิจัยของ van der Meer และคณะ (1998) ที่ได้ศึกษาถึงวิถีชีวเคมีของการสังเคราะห์ fructan ในแก่นตะวันพบว่า ยีนและเอนไซม์ทั้งสองแสดงออกมากในระยะเวลาที่กำลังพัฒนาเป็นหัวสะสมอาหารและเมื่อหัวสะสมอาหารพัฒนาเต็มที่จะไม่พบการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ และหากมีการแสดงออกของยีนหรือเอนไซม์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งก็จะมีผลต่อการสังเคราะห์และชนิดของ fructan ที่จะได้ ซึ่งการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนและเอนไซม์ดังกล่าวยังไม่ปรากฏการศึกษาในเซลล์หรือเนื้อเยื่อของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาก่อน เพราะฉะนั้น การทำความเข้าใจเกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ inulin ที่เกิดขึ้นในแคลล์สน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์ในแต่ละขั้นตอนและนำไปสู่การเพิ่มการสังเคราะห์ inulin ในหลอดทดลองได้ และหากพิสูจน์ได้ว่า inulin ที่สังเคราะห์ขึ้นในแคลล์สมีกิจกรรมฟรีไบโอติกเช่นเดียวกับ inulin ที่สกัดได้จากหัวแก่นตะวันสด ก็จะเป็นอีกทางเลือกสำหรับการผลิตสารฟรีไบโอติกที่สามารถทำได้ตลอดทั้งปีโดยไม่ขึ้นกับ ฤดูกาลเหมือนกับแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ