บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* Jacq.) เป็นพืชยืนต้นใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในตระกูลปาล์มเช่นเดียวกับมะพร้าว อินทผาลัมและตาลโตนด ถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกาและทวีปอเมริกาใต้ สำหรับทวีปเอเชียมีการนำปาล์มน้ำมันมาปลูกครั้งแรกที่ประเทศอินโดนีเซีย ต่อมาจึงมีการปลูกอย่างแพร่หลายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยสายพันธุ์ที่ปลูกในเชิงเศรษฐกิจคือสายพันธุ์เทเนอรา ปัจจุบันปาล์มน้ำมันมีการปลูกเป็นการค้าในแอฟริกาตะวันตก บางประเทศของทวีปอเมริกาใต้ บางส่วนในหมู่เกาะแปซิฟิก ประเทศอินเดีย ประเทศมาเลเซีย ประเทศอินโดนีเซีย และภาคใต้ของประเทศไทย (สุรกิตติ ศรีกุลและภิญโญ มีเดช, 2541) และเป็นพืชอุตสาหกรรมที่มีบทบาททางเศรษฐกิจที่สำคัญในการผลิตน้ำมันของโลก ที่มีส่วนแบ่งการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วจากร้อยละ 9.97 ในปี พ.ศ. 2503 เป็นร้อยละ 20.90 ในปี พ.ศ. 2533 และเป็นร้อยละ 21.90 ในปี พ.ศ. 2540 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2541) จากนั้นในปี พ.ศ. 2543 และ 2544 การส่งออกปาล์มน้ำมันเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นร้อยละ 52.70 และ 279.60 ตามลำดับ ดังนั้นตลาดส่งออกของไทยในอนาคต จึงมีแนวโน้มที่ดีที่จะสามารถผลักดันผลิตภัณฑ์น้ำมันปาล์มของไทยให้อยู่ในแถวหน้าของประเทศผู้ส่งออกน้ำมันปาล์มที่สำคัญของโลกต่อไปได้ (http://www.dip.go.th/Research/ PreviewInvesment1.asp?WebSiteID=19&InvestmentFromID=72)

ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่ในธรรมชาติที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยเกิดจากการสังเคราะห์ผ่านสารตั้งต้น isopentenyl diphosphate (IPP) และ dimethylallyl diphosphate (DMAPP) เดิมเชื่อว่า isopentenyl diphosphate และ dimethylallyl diphosphate ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดสังเคราะห์ผ่านวิถี acetate/mevalonate (MVA) บริเวณไซโทพลาสซึมเท่านั้น แต่ปัจจุบันจากการศึกษาในแบคทีเรีย สาหร่ายและพลาสติดของพืชชั้นสูง พบว่าสามารถสังเคราะห์สารดังกล่าวได้โดยผ่านวิถี non-mevalonate หรือ 2-C-meythyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) สำหรับปฏิกิริยาขั้นแรกของวิถี MEP เกิดจากการรวมตัวกันของ pyruvate กับ glyceraldehyde-3-phosphate ได้เป็น 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) โดยเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) จากนั้นจึงปลี่ยนเป็น 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) และผ่านกระบวนการอีกหลายขั้นตอนจนได้ isopentenyl diphosphate และ dimethylallyl diphosphate ตัวอย่างของไอโซพรีนอยด์ในพืช

ที่สังเคราะห์ผ่านวิถี MEP เช่น chlorophylls, α-tocopherol, (vitamin E), thiamine (vitamin B_1), plastoquinone-9, gibberellins (GA), pyridoxal (vitamin B_6), abscisic acid (ABA), และ carotenoids

แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นสารกลุ่มไอโซพรีนอยด์ซึ่งเป็นรงควัตถุที่สำคัญในธรรมชาติ พบได้ สาหร่าย จุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราแบคทีเรียสังเคราะห์แสง และในพลาสติดของพืชชั้นสูง (Armstrong and Hearst, 1996) บทบาทโดยทั่วไปของแคโรทีนอยด์คือป้องกันหรือต่อต้านการทำลายจากอนุมูลอิสระ (Bartley and Scolnik, 1995) และเนื่องจากสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์เป็นสารมีสีจึงนำมาใช้เป็นสารเร่งสีในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Meyer *et al.*, 1993) รวมถึงเป็นสารให้สีสำหรับปรุงแต่งอาหาร นอกจากนี้ยังช่วยในการรักษาโรคในมนุษย์ เนื่องจากแคโรทีนอยด์ประกอบด้วย β-carotene ซึ่งเป็นสารต้นกำเนิดของวิตามินเอ จึงใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อป้องกันและรักษาโรคขาดวิตามินเอ อีกทั้งช่วยลดการเกิดโรคหัวใจ (Palace *et al.*, 1996) มะเร็งปอด (Mayne, 1996) รวมถึงสามารถป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต (Biesalski and Obermueller-Jevic, 2001; Heinrich *et al.*, 2002) ดังนั้นในทางเภสัชกรรมจึงนำมาทำยารักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากการแพ้แสงแดด เพื่อช่วยป้องกันและลดการเกิดมะเร็งที่ผิวหนัง จากความสำคัญของแคโรทีนอยด์โดยเฉพาะ β-carotene ในทางการแพทย์และทางด้านเศรษฐกิจ ดังนั้นหากสามารถควบคุมและเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในพืชให้เพิ่มมากขึ้นได้ก็อาจนำไปสู่การใช้ประโยชน์ได้มากยิ่งขึ้น การควบคุมการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์โดยใช้ยีนจากวิถี MEP เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่อาจนำไปสู่การแก้ปัญหาดังกล่าว

การศึกษาครั้งนี้จึงได้มุ่งเน้นถึงความสัมพันธ์ของยีน *dxs* และ *dxr* จากวิถี MEP กับปริมาณแคโรทีนอยด์ในผลปาล์มน้ำมัน รวมถึงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *dxs* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ต่อไป

การตรวจเอกสาร

1.1 อนุกรมวิธานของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน (oil palm) เป็นพืชยืนต้นใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในตระกูลปาล์มเช่นเดียวกับมะพร้าว อินทผาลัมและตาลโตนด ปัจจุบันสายพันธุ์ที่ปลูกในเชิงเศรษฐกิจคือ สายพันธุ์เทเนอรามี ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Elaeis guineensis* Jacq. (African oil palm) โดยจัดลำดับอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Dahlgren *et al.*, 1985)

Division Spermatophyta

Subdivision Angiospermae

Class Monocotyledoneae

Subclass Arecidae

Superorder Areciflorae

Order Arecales

Family Arecaceae

Subfamily Cocosoideae

Genus *Elaeis*

Species *Elaeis guineensis* Jacq.

1.2 ถิ่นกำเนิดและประวัติการปลูกปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ปลูกกันอย่างกว้างขวาง แหล่งปลูกสำคัญอยู่ในทวีปแอฟริกา อเมริกากลาง และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการค้นพบปาล์มน้ำมันป่า และปาล์มน้ำมันชนิด (species) อื่นๆบริเวณชายฝั่งทะเลประเทศบราซิล ทวีปอเมริกาใต้ และการค้นพบซากดึกดำบรรพ์ (fossil) ลักษณะคล้ายละอองเกสรตัวผู้ของปาล์มน้ำมันที่ประเทศไนจีเรีย ทวีปแอฟริกา (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523 ; ศิริชัย มามีวัฒนะ, 2532) ประกอบกับการศึกษาทางด้านภาษาดั้งเดิมตลอดจนหลักฐานทางประวัติศาสตร์ (Henderon and Osborne, 2000) ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าแหล่งกำเนิดปาล์มน้ำมันอยู่ในทวีปแอฟริกา และทวีปอเมริกาใต้

ในทวีปเอเชียมีการนำปาล์มน้ำมันเข้ามาปลูกครั้งแรกในปี พ.ศ. 2391 โดยชาวโปรตุเกสที่ประเทศอินโดนีเซีย แต่เริ่มปลูกเป็นการค้าอย่างจริงจังในปี พ.ศ. 2454 สำหรับประเทศมาเลเซียได้เริ่มเพาะปลูกปาล์มน้ำมันครั้งแรกที่สวนพฤกษชาติสิงคโปร์ ในราวปี พ.ศ. 2413 และในปี พ.ศ.

2460 จึงได้เริ่มปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้าครั้งแรกที่ Tennamaram Estate และ Elmina Estate ในรัฐ Selangor

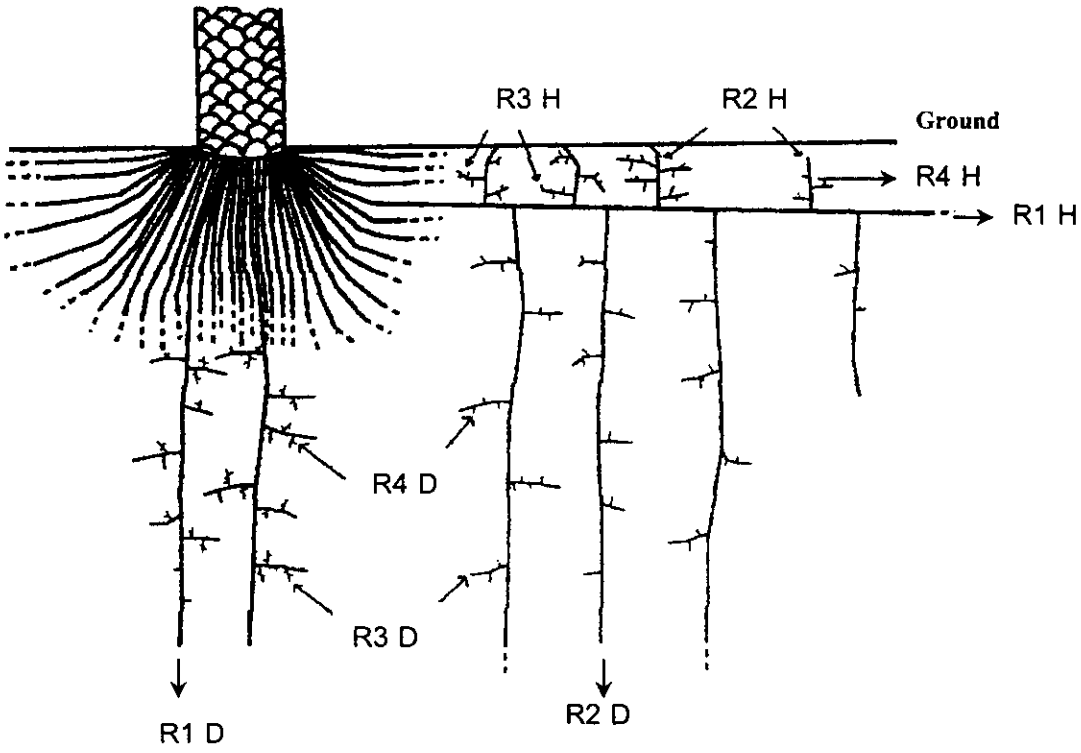
การปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทย พระยาประดิพันธ์ภูบาล เป็นผู้นำเข้ามาปลูกเป็นครั้งแรกจากประเทศอินโดนีเซียและมาเลเซีย แต่ได้ปลูกเป็นไม้ประดับสวยงามที่สถานีทดลองยางคอหงส์ จังหวัดสงขลา และสถานีกสิกรรมพลิ้ว จังหวัดจันทบุรี การปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้าในประเทศไทยเริ่มปลูกครั้งแรกบริเวณภาคใต้ก่อนสงครามโลกครั้งที่สองโดยหม่อมเจ้าอมรสมานลักษณ์กิติยากร ในเนื้อที่ประมาณ 1,000 ไร่ ที่ตำบลบ้านปริก อำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา ต่อมาช่วงหลังสงครามได้หยุดกิจการไปและเริ่มมีการเพาะปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้าอีกครั้งในปี พ.ศ. 2511 เนื่องจากมูลเหตุสำคัญที่พอสรุปได้คือ ยางพาราในขณะนั้นมีราคาต่ำลง เพราะมีวัสดุยางเทียมเข้ามาแข่งขันในตลาดเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับประเทศมาเลเซียซึ่งมีสภาพดินฟ้าอากาศคล้ายคลึงกับประเทศไทยประสบความสำเร็จในการประกอบกิจการปาล์มน้ำมันจนทำให้ประเทศมาเลเซียกลายเป็นประเทศผู้ส่งออกน้ำมันปาล์มและพันธุ์ปาล์มรายใหญ่สุดของโลก รวมถึงความต้องการปาล์มน้ำมันของโลกมีแนวโน้มสูงขึ้น (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523) ดังนั้นรัฐบาลจึงได้ส่งเสริมการปลูกปาล์มน้ำมันเป็นรูปบริษัท โดยขณะนั้นมีโครงการปลูกปาล์มน้ำมัน 2 โครงการ คือ โครงการนิคมสร้างตนเองพัฒนาภาคใต้ จังหวัดสตูล เนื้อที่ปลูก 20,000 ไร่ และโครงการบริษัทอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันและสวนปาล์มจำกัด อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ เนื้อที่ปลูก 20,000 ไร่ หลังจากทั้งสองโครงการประสบความสำเร็จ รัฐบาลจึงได้ขยายพื้นที่เพาะปลูกให้แก่เกษตรกร และส่งเสริมการปลูกปาล์มน้ำมันตามสหกรณ์นิคมต่างๆ ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ทำให้การปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทยขยายตัวไปอย่างรวดเร็ว และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (ดำรง พงศ์มานะวุฒิ, 2532)

1.3 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปาล์มน้ำมัน

1.3.1 ราก (root)

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชยืนต้นที่มีระบบรากเป็นระบบรากพิเศษ (adventitious root system) ไม่มีรากแก้ว รากพิเศษอยู่ตื้นใกล้ผิวดิน แบ่งออกเป็น 4 พวก (รูปที่ 1) คือ รากแรก (primary adventitious root) เป็นรากกลุ่มแรกที่งอกจากส่วนลำต้นใต้ดิน มีขนาดใหญ่สุด เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 6-10 มิลลิเมตร แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือประเภทที่เจริญแผ่กระจายออกไปตามแนวนอนเรียกว่า รากแรกแนวนอน (horizontal primary adventitious root) และประเภทที่เจริญแผ่กระจายออกไปตามความลึกของดินเรียกว่า รากแรกแนวดิ่ง (descending primary adventitious root) รากที่แตกแขนงออกจากรากแรกเรียกว่า รากสอง

(secondary adventitious root) มีขนาดรองจากรากแรก เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-4 มิลลิเมตร รากที่แตกแขนงออกจากรากสองเรียกว่า รากสาม (tertiary adventitious root) เป็นรากที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-10.5 มิลลิเมตร ความยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร และรากที่มีขนาดเล็กสุดเรียกว่า รากสี่ (quaternary adventitious root) แตกแขนงออกจากรากสาม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2-0.5 มิลลิเมตรและเป็นรากสำหรับดูดน้ำและสารอาหาร โครงสร้างของรากทั้ง 4 พวกมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยมีผนังเซลล์ (cell wall) บางๆ อยู่ชั้นนอกสุด ไม่มีคิวทิเคิล (cuticle) และรากขนอ่อน (root hair) เอพิเดอร์มิส (epidermis) มีอายุสั้น ดังนั้นจึงไม่พบเอพิเดอร์มิสในรากที่มีอายุมาก



รูปที่ 1 ลักษณะระบบรากของปาล์มน้ำมัน (Jourdan *et al.*, 2000)

R1 H และ R1 D = รากแรกแนวนอนและรากแรกแนวดิ่ง

R2 H และ R2 D = รากสองแนวนอนและรากสองแนวดิ่ง

R3 H และ R3 D = รากสามแนวนอนและรากสามแนวดิ่ง

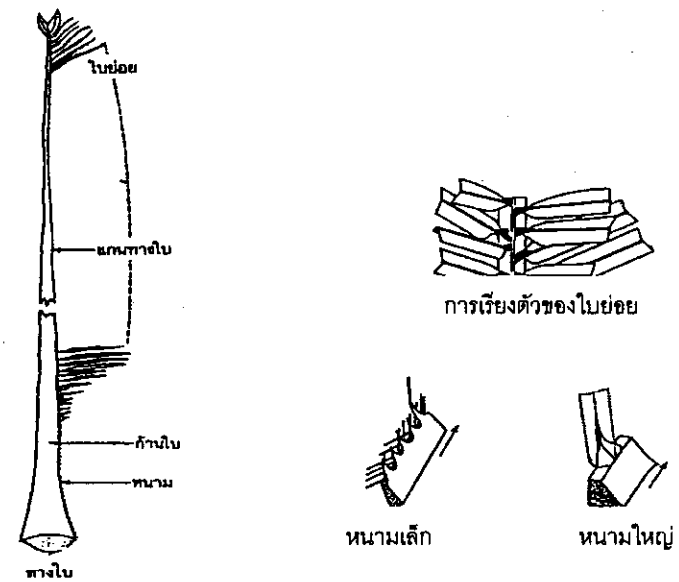
R4 H และ R3 D = รากสี่แนวนอนและรากสี่แนวดิ่ง

1.3.2 **ลำต้น** (stem)

ปาล์มน้ำมันมีลำต้นตั้งตรง ประกอบขึ้นจากเนื้อเยื่อเส้นใย มียอดเดี่ยวรูปกรวย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-12 เซนติเมตร สูง 2.5-4 เซนติเมตร ประกอบไปด้วยใบอ่อนและเนื้อเยื่อเจริญ การเจริญของลำต้นในระยะ 3 ปีแรกจะพัฒนาทางด้านกว้างโดยลำต้นจะขยายส่วนฐานให้ใหญ่ขึ้น หลังจาก 3 ปี ปล้องของลำต้นจะยืดตัว ทำให้การเจริญเติบโตทางด้านความกว้างหยุดไป หรือมีน้อย ความสูงของลำต้นเพิ่มขึ้นปีละ 35-60 เซนติเมตร ตามสภาพแวดล้อมและพันธุกรรม โดยทั่วไปปาล์มน้ำมันมีความสูงมากกว่า 30 เมตร อายุมากกว่า 100 ปี แต่การปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้า ต้องการต้นปาล์มน้ำมันความสูงไม่เกิน 15-18 เมตร และเก็บผลผลิตจนถึงอายุ 25 ปี

1.3.3 **ใบ** (leaf)

ใบปาล์มน้ำมันเป็นใบประกอบรูปขนนก (pinnate) เรียกว่า ทางใบ แต่ละทางใบแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแกนกลางที่มีใบย่อย 2 ข้าง และส่วนก้านทางใบ ซึ่งมีขนาดสั้นกว่าส่วนแรก และมีหนามสั้นๆ อยู่ 2 ข้าง (รูปที่ 2) แต่ละทางใบมีใบย่อย 100-160 คู่ ยาว 100-120 เซนติเมตร กว้าง 4-6 เซนติเมตร ปริมาณทางใบที่ปาล์มน้ำมันสร้างขึ้นอยู่กับอายุ สภาพแวดล้อมและพันธุกรรม ภายใต้สภาพปกติ มีการสร้างทางใบปีละประมาณ 20-39 ทางใบต่อต้น



รูปที่ 2 ลักษณะใบปาล์มน้ำมัน และการเรียงตัวของใบย่อย (อรษา เสือทิม, 2532)

1.3.4 **ดอกและช่อดอก** (flower and inflorescence)

ปาล์มน้ำมันจะเริ่มออกดอกเมื่ออายุประมาณ 2-3 ปี หลังจากปลูกลงแปลงปลูก ช่อดอกเกิดจากจุดกลางของโคนทางใบ โดยปกติเมื่อต้นปาล์มน้ำมันมีอายุมากขึ้นการผลิตทางใบหนึ่งทางเท่ากับการผลิตช่อดอกหนึ่งช่อเสมอ ช่อดอกของปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่เป็นแบบโมโนอีเซียส (monoecious) คือช่อดอกตัวผู้ (male inflorescences) และตัวเมีย (female inflorescences) แยกกันอยู่คนละช่อในต้นเดียวกัน มีส่วนน้อยที่ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในช่อเดียวกัน เรียกว่า ช่อดอกผสม (hermaphrodite inflorescences หรือ mixed inflorescences) ซึ่งมักปรากฏในปาล์มน้ำมันอายุน้อย จำนวนหรืออัตราของช่อดอกตัวผู้ และช่อดอกตัวเมียในแต่ละต้นจะแตกต่างกันไป ซึ่งจำนวนดังกล่าวมีผลต่อผลผลิตปาล์มน้ำมันอย่างมาก โดยต้นปาล์มน้ำมันที่ให้ช่อดอกตัวเมียมากสามารถให้ผลผลิตทะลายปาล์มน้ำมันสูง

1.3.4.1 ช่อดอกตัวเมีย

ช่อดอกตัวเมียของปาล์มน้ำมันมีขนาดใหญ่กว่าช่อดอกตัวผู้ โดยในแต่ละช่อมีดอกตัวเมียหลายพันดอก ดอกตัวเมียมีขนาดตั้งแต่ 24-45 มิลลิเมตร ส่วนปลายมีหนามแหลมยาว ยอดเกสรตัวเมีย (stigma) มี 3 แฉก เมื่อดอกพร้อมผสม ยอดเกสรตัวเมียมีสีเหลืองแถบแดง ระยะเวลาที่ดอกตัวเมียสามารถรับการผสมเกสรประมาณ 3 วัน

1.3.4.2 ช่อดอกตัวผู้

ช่อดอกตัวผู้มีลักษณะคล้ายนิ้วมือ ยาวเรียว ไม่มีหนาม ขนาดของดอกตัวผู้เล็กกว่าดอกตัวเมียมาก เมื่อดอกตัวผู้เจริญเต็มที่ มีสีเหลืองสด กลิ่นหอม การบานของดอกตัวผู้ใช้เวลาประมาณ 2 วันขึ้นไป ละอองเกสรตัวผู้มีขนาดเล็กมาก ในสภาพธรรมชาติมีชีวิตได้ไม่นาน แต่หากนำละอองเกสรตัวผู้มาเก็บรักษาในสภาพที่มีอุณหภูมิและความชื้นพอเหมาะ สามารถยืดอายุละอองเกสรได้นานเป็นปี ต้นปาล์มน้ำมันที่โตเต็มที่ช่อดอกตัวผู้มีดอกรวมประมาณ 126,000 ดอก ให้ละอองเกสรมากกว่า 900 ล้านละอองเกสร มีน้ำหนักประมาณ 30-50 กรัม

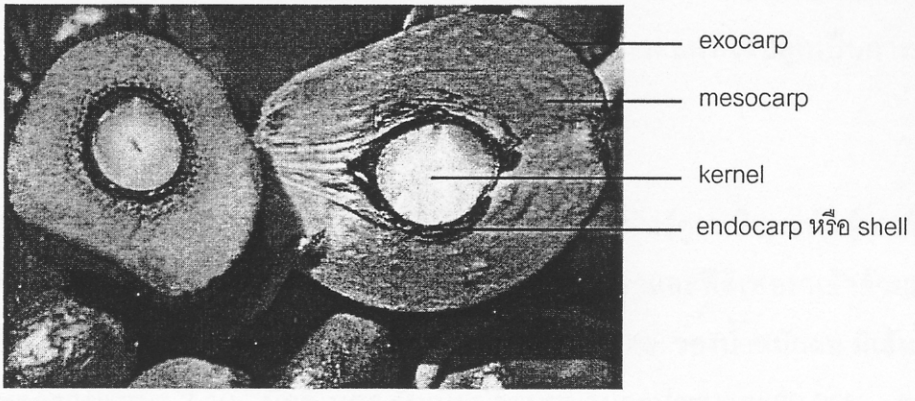
1.3.4.3 ช่อดอกผสม

เป็นช่อดอกที่มีทั้งช่อดอกตัวเมียและช่อดอกตัวผู้ผสมภายในช่อเดียว ลักษณะช่อดอกผสมพบเป็นส่วนน้อยในปาล์มน้ำมัน และพบในต้นที่มีอายุน้อยเท่านั้น ช่อดอกตัวเมียมักอยู่บริเวณกลางช่อดอก ช่อดอกตัวผู้อยู่บริเวณส่วนบนและส่วนล่างของช่อดอก ลักษณะการเป็นช่อดอกผสมเป็นลักษณะที่ไม่ดี เนื่องจากทำให้ปาล์มน้ำมันมีผลผลิตต่ำ

1.3.5 **ผล** (fruit)

ผลปาล์มน้ำมันเป็นผลที่มีเมล็ดแข็ง (drupes) รูปร่างหลายแบบตั้งแต่รูปเรียวแหลมจนถึงรูปไข่ ความยาวผลอยู่ระหว่าง 2-5 เซนติเมตร น้ำหนักผลมีตั้งแต่ 3 กรัมจนถึงมากกว่า 30 กรัม การสุกของผลปาล์มน้ำมันขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ที่สำคัญได้แก่ ปริมาณฝนหรือความชื้นของอากาศ ขณะที่ผลปาล์มน้ำมันเจริญเติบโต หากมีสภาวะแห้งแล้งจะทำให้ช่วงเวลาการสุกยาวนานออกไป ดังนั้นการเพาะปลูกในสภาพฝนตกสม่ำเสมอตลอดปี ผลปาล์มน้ำมันจะสุกเร็วกว่าในสภาพฝนแล้ง เมื่อผลปาล์มน้ำมันเริ่มสุก สีของผลค่อยๆเปลี่ยนจากสีเขียวหรือสีม่วงดำเป็นสีเหลืองส้ม

ผลปาล์มน้ำมัน (รูปที่ 3) ประกอบด้วยชั้นนอกสุดเรียกว่า เปลือกนอก (exocarp) ลักษณะบาง มีสีแตกต่างกันแล้วแต่ลักษณะพันธุ์ ชั้นถัดไปเป็นชั้นเปลือกหรือชั้นเนื้อปาล์ม (mesocarp) มีความหนามากกว่าชั้นเปลือกนอก ชั้นนี้มีความหนาตามลักษณะพันธุ์เช่นเดียวกัน ชั้นเนื้อปาล์มเป็นชั้นที่มีความสำคัญ เพราะน้ำมันปาล์มส่วนใหญ่เก็บสะสมในชั้นนี้ และเรียกน้ำมันที่สกัดจากชั้นเนื้อปาล์มว่า น้ำมันปาล์ม (pam oil) ชั้นเปลือกนอกและชั้นเนื้อปาล์มเรียกรวมว่า เพอริคาร์พ (pericarp) เพอริคาร์พมีสีแตกต่างกัน เกิดจากสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) และแคโรทีนอยด์ ซึ่งสามารถถ่ายทอดได้ทางพันธุกรรม ชั้นถัดไปคือชั้นกะลา (endocarp หรือ shell) ชั้นนี้มีลักษณะแข็ง เนื้อในมีสีขาวเรียกว่า เคอร์เนล (kernel) ในชั้นนี้มีน้ำมันปาล์มสะสมอยู่เช่นกัน น้ำมันที่สกัดได้จากชั้นเคอร์เนลเรียกว่า น้ำมันเมล็ดปาล์ม (kernel palm oil)



รูปที่ 3 ลักษณะต่างๆของผลปาล์มน้ำมัน
(http://www.oils-vegetable.com/palmoil.htm.)

1.3.6 การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน

การจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันอาศัยลักษณะต่างๆของผลได้แก่ ลักษณะกะลา กลีบหุ้มผล สีของผลก่อนสุก ปริมาณน้ำมันในชั้นเนื้อปาล์ม จากลักษณะดังกล่าว สามารถแยกปาล์มน้ำมันออกเป็น 4 พันธุ์ ดังนี้ (รูปที่ 4) (ศิริชัย มามีวัฒนะ, 2532; Hartley, 1977 อ้างจาก พรชัย เหลืองอาภาพงศ์)

1.3.6.1 มาโครการ์ยา (Macrocarya)

เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะกะลาหนา โดยกะลาหนาประมาณ 4-8.5 มิลลิเมตร หรือ 50% ของน้ำหนักผลทั้งหมด ชั้นเพอริคาร์พ (ชั้นเปลือกและชั้นเนื้อปาล์ม) มีความหนา 0.75-2.5 มิลลิเมตร ชั้นเนื้อปาล์มบางและมีปริมาณน้ำมันต่ำ จึงเป็นพันธุ์ที่ไม่เหมาะในการเพาะปลูกเพื่อการค้า

1.3.6.2 ดูรา (Dura)

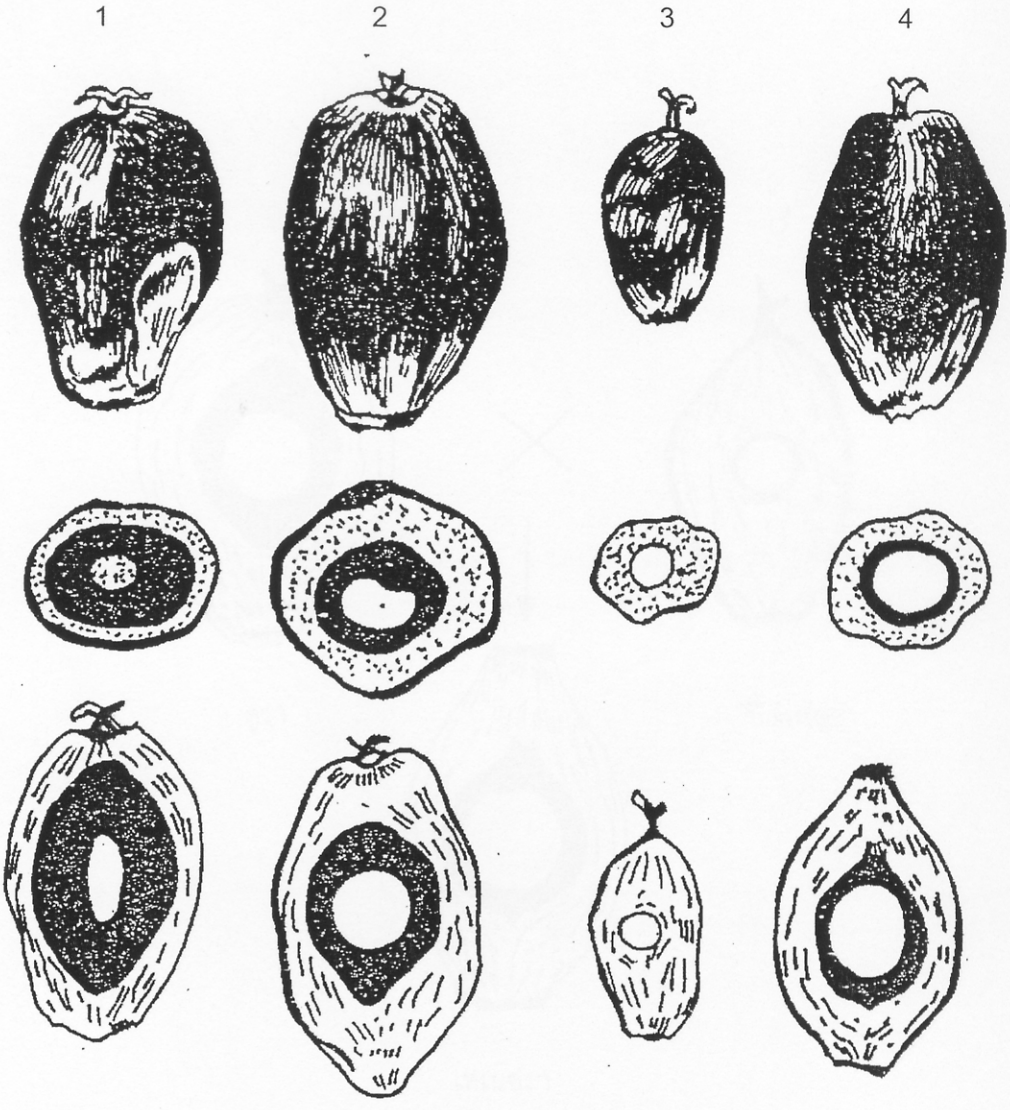
เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะต่างๆดีกว่าพันธุ์มาโครการ์ยา พันธุ์ดูราพบมากในแถบตะวันออก ซึ่งมักเรียกว่า เดลิ ดูรา (Deli Dura) มีกะลาหนาปานกลางประมาณ 2-8 มิลลิเมตร ชั้นเพอริคาร์พหนา 2-6 มิลลิเมตร เคอร์เนลมีขนาดใหญ่ ชั้นเนื้อปาล์มประมาณ 35-60% ของน้ำหนักผลปาล์มทั้งหมดและให้น้ำมันปาล์มต่อทะลายประมาณ 18-19.5% ปัจจุบันพันธุ์ดูราใช้เป็นแม่พันธุ์สำหรับผลิตพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา

1.3.6.3 ฟิสิเฟอรา (Pisifera)

เป็นพันธุ์ที่มีกะลาบางมาก ชั้นเพอริคาร์พหนาประมาณ 5-10 มิลลิเมตร เปลือกนอกหนากว่าพันธุ์ดูรา เมล็ดในเล็ก มีข้อเสียคือขนาดของผลเล็ก ช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมันและมีการผลิตทะลายปาล์มน้ำมันต่อต้นจำนวนต่ำ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่ใช้ปลูกเป็นการค้า ปัจจุบันพันธุ์ฟิสิเฟอราใช้เป็นพ่อพันธุ์ในการผลิตพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา

1.3.6.4 เทเนอรา (Tenera)

เป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างดูรากับฟิสิเฟอราโดยใช้พันธุ์ดูราเป็นแม่พันธุ์และฟิสิเฟอราเป็นพ่อพันธุ์ (รูปที่ 5) จึงเป็นพันธุ์ที่รวมคุณสมบัติเด่นของดูราและฟิสิเฟอราเข้าด้วยกัน พันธุ์เทเนอรามีกะลาบางประมาณ 0.5-4 มิลลิเมตร หรือประมาณ 10% ของน้ำหนักผล มีเส้นใยรอบเมล็ด ชั้นเพอริคาร์พหนา 3-10 มิลลิเมตร ชั้นเนื้อปาล์มหนามากประมาณ 60-96% ของน้ำหนักผล และให้น้ำมันประมาณ 22-25% เนื่องจากพันธุ์เทเนอรามีคุณสมบัติที่ดีหลายประการจึงนิยมปลูกเพื่อการค้า



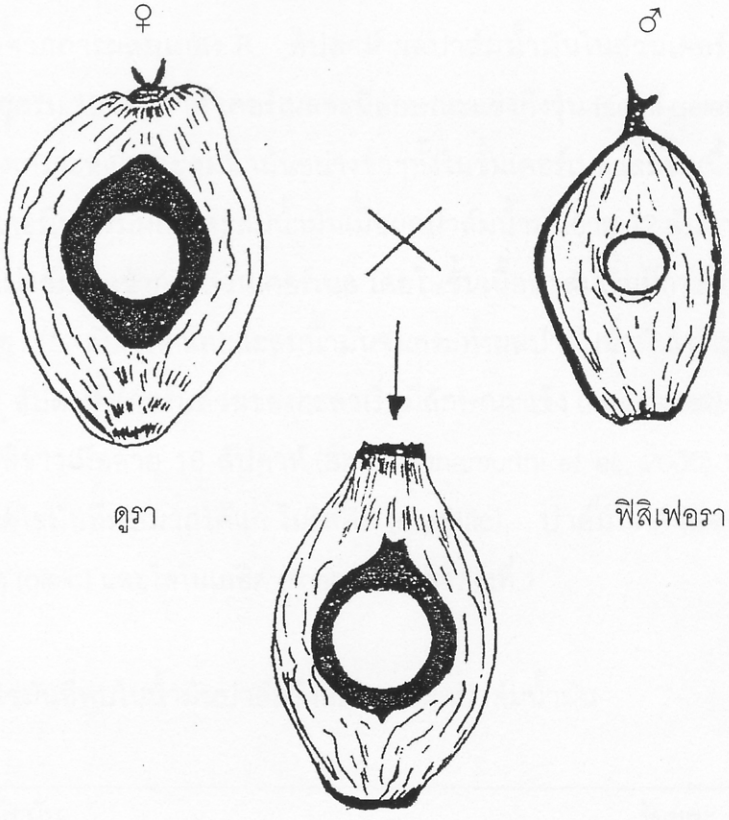
รูปที่ 4 ลักษณะของผลปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ต่างๆ (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523)

1 = มาโครการ์ยา

2 = ดูรา

3 = ฟิสิเฟอรา

4 = เทเนอรา



รูปที่ 5 ลักษณะผลปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอราที่ได้จากการผสม
ระหว่างสายพันธุ์ดูรากับฟิสิเฟอรา (พรชัย เหลืองอาภาพงศ์, 2523)

1.3.7 การพัฒนาของผลและการสะสมน้ำมันในผลปาล์มน้ำมัน

การพัฒนาของผลปาล์มน้ำมันเริ่มขึ้นหลังจากการผสมเกสร 2 สัปดาห์ และมีการเจริญเติบโตจนสุกเต็มที่หลังจากได้รับการผสมเกสรประมาณ 5-6 เดือน ช่วงระยะเวลาการสุกของผลปาล์มน้ำมันอาจแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณน้ำฝนหรือความชื้นในอากาศ พบว่าผลปาล์มน้ำมันที่เจริญเติบโตในสภาวะแห้งแล้ง ทำให้ช่วงเวลาการสุกช้ากว่าผลปาล์มน้ำมันที่เจริญเติบโตในสภาวะฝนตกสม่ำเสมอตลอดปี

หลังจากการผสมเกสร 8 สัปดาห์ ผลปาล์มน้ำมันในส่วนเคอร์เนล มีสภาพเป็นของเหลว เมื่ออายุครบ 10 สัปดาห์ เคอร์เนลจะมีลักษณะแข็งกึ่งวุ้น (semi-gelatinous) ผลปาล์มน้ำมันเริ่มมีการสังเคราะห์และสะสมน้ำมันอย่างช้าๆทั้งในชั้นเคอร์เนลและชั้นเนื้อปาล์ม (Bora *et al.*, 2003) ในชั้นเคอร์เนลเริ่มมีการสะสมน้ำมันเมื่อผลปาล์มน้ำมันอายุ 12 สัปดาห์ ส่วนการสะสมน้ำมันของชั้นเนื้อปาล์มเกิดช้ากว่าส่วนเคอร์เนล โดยในชั้นเนื้อปาล์มเริ่มมีการสะสมน้ำมันเมื่อผลปาล์มน้ำมันมีอายุ 15 สัปดาห์ และสะสมน้ำมันจนกระทั่งผลปาล์มน้ำมันเจริญเติบโตเต็มที่ซึ่งมีอายุประมาณ 20 สัปดาห์ สำหรับส่วนของกะลาเริ่มมีลักษณะแข็ง (hard shell) และปิดล้อมส่วนของเคอร์เนลซึ่งมีสีขาวเมื่ออายุ 16 สัปดาห์ (Sambanthamurthi *et al.*, 2000) น้ำมันที่ได้จากผลปาล์มน้ำมันมีกรดไขมันที่พบมากได้แก่ ไมริสติค (myristic), ปาล์มมิติค (palmitic), สเตียริค (stearic), โอเลอิค (oleic) และไลโนเลอิค (linoleic) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 กรดไขมันที่พบในน้ำมันปาล์มซึ่งสกัดจากผลปาล์มน้ำมัน

ชนิดกรดไขมัน	ร้อยละ
myristic (14:0)	0.8
palmitic (16:0)	42.0
stearic (18:0)	5.1
oleic (18:1)	42.0
linoleic (18:2)	10.0

ที่มา : Kritchevsky *et al.*, 2002

1.3.8 รงควัตถุในผลปาล์มน้ำมัน

ผลปาล์มน้ำมันมีรงควัตถุที่พบมากได้แก่ คลอโรฟิลล์ (chlorophylls) และแคโรทีนอยด์ รงควัตถุทั้งสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับระยะในการสุกของผลปาล์มน้ำมัน โดยในผลปาล์มน้ำมันที่มีอายุน้อยจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากและมีปริมาณแคโรทีนอยด์น้อยกว่าในผลปาล์มน้ำมันสุก (Sambanthamurthi *et al.*, 2000)

1.3.8.1 คลอโรฟิลล์

จากการตรวจสอบสารสกัดหยาบน้ำมันปาล์ม (crude palm oil) โดย Ikemefuna และ Adamson ในปี 1984 พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ในผลปาล์มน้ำมัน (*E. guineensis*) มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะการพัฒนาของผลและได้แสดงให้เห็นว่าคลอโรฟิลล์ยังคงมีในผลปาล์มน้ำมันที่สุกเต็มที่ทั้งในสายพันธุ์เทเนอราและดูรา แต่ปริมาณคลอโรฟิลล์จะต่ำกว่าปริมาณแคโรทีนอยด์มาก ชนิดของคลอโรฟิลล์ที่พบคือ คลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี ซึ่งพบในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บีพบมากในผลอ่อนของปาล์มน้ำมัน แต่เมื่อผลปาล์มน้ำมันเจริญเติบโตจนสุกเต็มที่ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ จะลดลง 80-90% และปริมาณคลอโรฟิลล์บี จะลดลง 50-70% ดังตารางที่ 2 (Ikemefuna and Adamson, 1984)

1.3.8.2 แคโรทีนอยด์

จากการตรวจสอบสารสกัดหยาบน้ำมันปาล์มพบว่ามีรงควัตถุประเภทแคโรทีนอยด์ ซึ่งมีสีส้มถึงสีแดงจำนวนมาก แคโรทีนอยด์ที่พบมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น lycopene β-carotene α-carotene phytoene cis-α-carotene เป็นต้น (Ikemefuna *et al.*, 2000; Kritchevsky *et al.*, 2002; Sambanthamurthi *et al.*, 2000) แคโรทีนอยด์ที่พบแต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 3 (Sambanthamurthi *et al.*, 2000) แคโรทีนอยด์หลักที่พบคือ β-carotene และ α-carotene โดยพบมากถึง 56.02% และ 35.16% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าในปาล์มน้ำมันมีแคโรทีนอยด์ ชนิด β-carotene ในปริมาณมากสุด ซึ่ง β-carotene เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ วิตามินเอ (vitamin A) ดังนั้นในปัจจุบันจึงเรียก β-carotene ว่าเป็นโปรวิตามินเอ (provitamin A) (Choo, 1994; Herbers, 2003) เมื่อเปรียบเทียบ β-carotene จากปาล์มน้ำมันกับพืชชนิดอื่นพบว่า ปาล์มน้ำมันมี β-carotene มากกว่าแครอท 15 เท่า และมากกว่ามะเขือเทศถึง 300 เท่า (Choo, 1994) ดังนั้นปาล์มน้ำมันจึงเป็นแหล่งที่สำคัญของวิตามินเอ

ตารางที่ 2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ (mg/kg) ในผลปาล์มน้ำมันชนิด *E. quineensis* ระยะต่างๆ

Pigment	Tenera			Dura		
	Young 1-2 months	Mature 3-4 months	Ripe 5-6 months	Young 1-2 months	Mature 3-4 months	Ripe 5-6 months
Chlorophyll a						
Mean	28.9	20.7	4.3	26.5	22.7	2.4
Range	12-48	3-34	0.3-7.3	13-54	16-34	0.7-3.7
Chlorophyll b						
Mean	18.6	15.3	7.3	19	11.8	4.6
Range	8-33	3-20	0.3-13	14-35	5-17	1.3-7.2

ที่มา : Ikemefuna and Adamson, 1984

ตารางที่ 3 แคโรทีนอยด์ที่พบในน้ำมันปาล์มซึ่งสกัดจากผลปาล์มน้ำมันชนิด *E. guineensis*

Carotenoids isomer	ร้อยละ
β-carotene	56.02
α-carotene	35.16
Cis-α-carotene	2.49
Lycopene	1.30
Phytoene	1.27
δ-carotene	0.83
β-zeacarotene	0.74
ζ-carotene	0.69
Cis-β-carotene	0.68
γ-carotene	0.33
Neurosporene	0.29
α-zeacarotene	0.23

ที่มา : Sambanthamurthi *et al.*, 2002

1.4 การสังเคราะห์สารในกลุ่มไอโซพรีนอยด์ (Isoprenoids)

ไอโซพรีนอยด์ เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่ในธรรมชาติที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ปัจจุบันพบว่าสารประกอบกลุ่มนี้มีมากกว่า 30,000 ชนิด (Sacchettini and Poulter, 1997; Lange *et al.*, 2000; Dewick, 2002) โดยเกิดจากการสังเคราะห์ผ่านสารตั้งต้นคือ isopentenyl diphosphate และ dimethylallyl diphosphate (Lichtenthaler, 2000) เดิมเชื่อว่า isopentenyl diphosphate และ dimethylallyl diphosphate ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดสังเคราะห์ผ่านวิถี acetate/mevalonate (MVA pathway) บริเวณไซโทพลาสซึมเท่านั้น (Goldstein and Brown, 1990) แต่เมื่อไม่นานนี้หลังจากนักวิจัยศึกษาวิธีการสังเคราะห์สารกลุ่มไอโซพรีนอยด์ ในแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Alicyclobacillus acidoterrestris* และ *Escherichia coli* (Rohmer *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 2001) และในสาหร่ายสีเขียว *Scenedesmus obliquus* (Schwender *et al.*, 1996) *Chlorella fusca* และ *Chlamydomonas reinhardtii* (Disch *et al.*, 1998) ทำให้ค้นพบวิถีใหม่สำหรับการสังเคราะห์สารในกลุ่มไอโซพรีนอยด์ โดยไม่ผ่านสารตัวกลางคือ mevalonate และเรียกวิถีดังกล่าวว่า non-mevalonate หรือ 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP pathway)

หลังจากมีการค้นพบวิถี MEP ในแบคทีเรียและสาหร่ายสีเขียวประกอบกับมีการค้นพบว่า mevinolin สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ mevalonate และ sterol ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไอโซพรีนอยด์ที่สังเคราะห์ผ่านวิถี MVA แต่ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์รวมทั้ง plastoquinone-9 ในพลาสติดของพืชที่มีท่อลำเลียง (vascular plant) (Rohmer, 1999a) นักวิจัยจึงได้ติดตามการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ในคลอโรพลาสต์โดยตรง ด้วยการติดฉลากสารรังสี คือ ^{13}C ให้กับ glucose และ acetate ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารในกลุ่มไอโซพรีนอยด์ สามารถสังเคราะห์ได้ทั้ง 2 วิถี คือ MVA และ MEP

1.4.1 วิถี acetate/mevalonate (MVA pathway)

วิถี MVA เกิดในไซโทพลาสซึมของเซลล์พืช สัตว์ ยีสต์ และเชื้อรา จากการรวมตัวกันของ acetyl CoA 2 โมเลกุล ได้เป็น acetoacetyl CoA (ACC) โดยเอนไซม์ acetyl CoA thiolase (ACC thiolase) จากนั้นจึงรวมตัวกับ acetyl CoA ได้เป็น 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) โดยเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase) และเปลี่ยนเป็น mevalonate (MVA) โดยเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase reductase (HMGR) ซึ่งเอนไซม์หลักในการควบคุมปฏิกิริยาของวิถีนี้ จากนั้นจึงผ่านกระบวนการอีกหลายขั้นตอนจนได้ isopentenyl diphosphate และ dimethylallyl diphosphate ซึ่งเป็นสารตั้ง

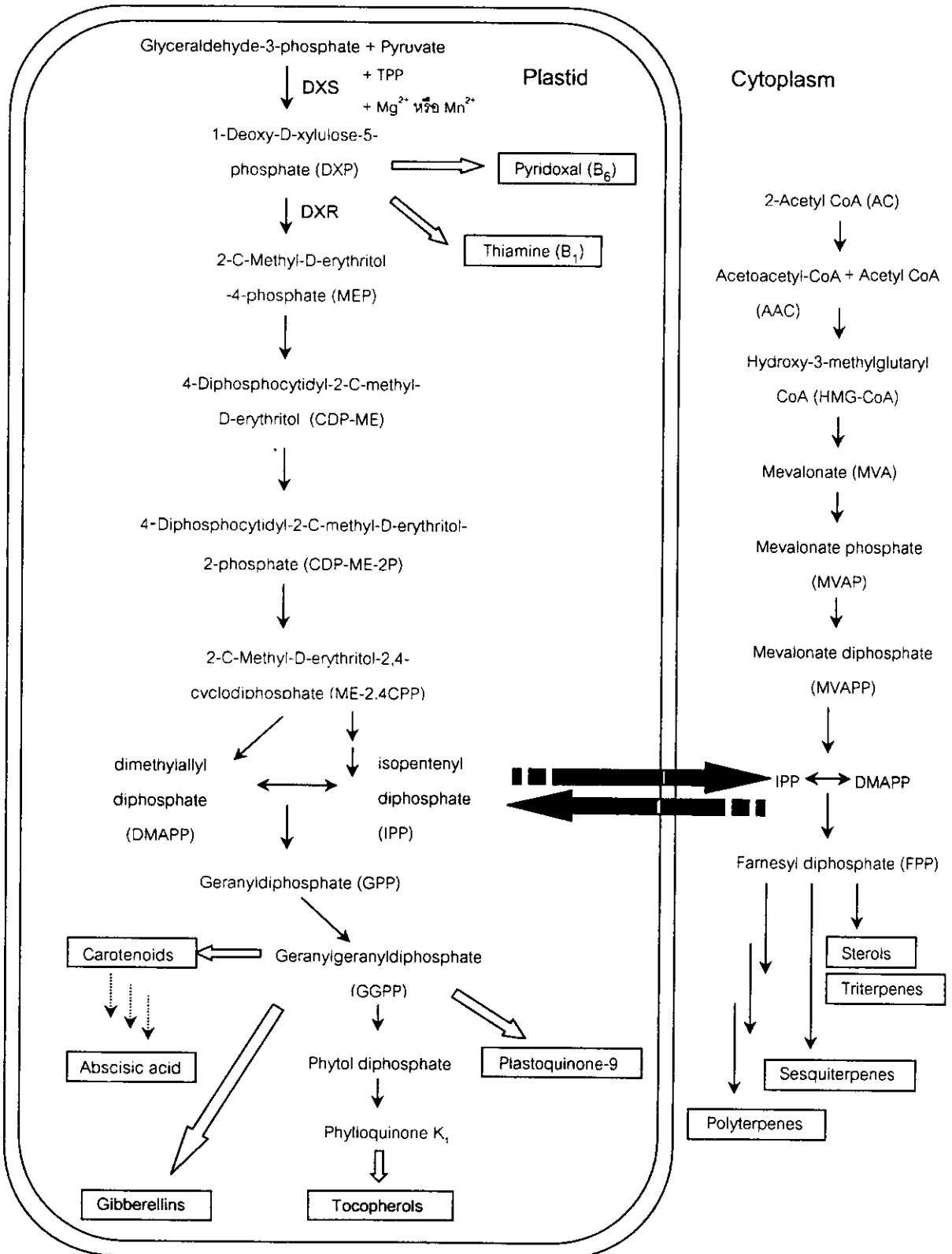
ต้นสำหรับการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ แสดงดังรูปที่ 6 (ดัดแปลงจาก Estevez *et al.*, 2001; Moehs *et al.*, 2001; Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2001; Bick and Lange., 2003; Dubey *et al.*, 2003) ในพืชวิถีนี้สังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์หลักคือ sterols, sesquiterpenes และ ubiquinones (Wanke *et al.*, 2001, Dubey *et al.*, 2003)

1.4.2 วิถี non-mevalonate หรือ 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP pathway)

วิถี MEP เกิดในโปรโตซัว แบคทีเรียและสาหร่าย และพลาสติดของพืชชั้นสูง (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Dixon, 1999; Rohmer, 1999b) ปฏิกิริยาขั้นแรกของวิถี MEP เกิดจากการรวมตัวกันของ pyruvate กับ glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) ได้เป็น 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) โดยเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการควบคุมปฏิกิริยาของวิถีนี้ (Estevez *et al.*, 2001; Affek and Yakir, 2003) และในการทำงานของเอนไซม์ DXS ต้องการโคเอนไซม์คือ Thiamine diphosphate (TPP) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) โดยเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) และผ่านกระบวนการอีกหลายขั้นตอนจนได้ isopentenyl diphosphate และ dimethylallyl diphosphate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ (Eisenreich *et al.*, 2001; Rohdich *et al.*, 2001; Takagi *et al.*, 2000) ตัวอย่างของไอโซพรีนอยด์ในพืชที่สังเคราะห์ผ่านวิถี MEP เช่น แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์, α-tocopherol (vitamin E), thiamine (vitamin B_1), pyridoxol (vitamin B_6), abscisic acid (ABA), plastoquinone-9 และ gibberellins (GA) เป็นต้น (Estevez *et al.*, 2001)

1.4.2.1 การศึกษาวิถี MEP ในโพรคารีโอท (prokaryotes)

หลังจากมีการค้นพบวิถี MEP ในแบคทีเรียซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มโพรคารีโอท นักวิทยาศาสตร์จึงได้ศึกษาการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ในแบคทีเรียชนิดอื่นเพิ่มเติม ทำให้พบว่าวิถี MEP พบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative strain) และแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive strain) โดยตัวอย่างของแบคทีเรียแกรมลบที่สังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ผ่านวิถี MEP เช่น *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Burkholderia caryophylli*, *B. gladioli*, *Acinetobacter calcoaceticus* (Rosa Putra *et al.*, 1998) และ *Synechocytis* sp. (Disch *et al.*, 1998; Proteau, 1998) ตัวอย่างแบคทีเรียแกรมบวกที่สังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ผ่านวิถี MEP เช่น *Mycobacterium phlei*, *M. amegmatis* (Rosa Putra *et al.*, 1998) และ *Streptomyces*



รูปที่ 6 วิถี acetate/mevalonate ที่ไซโทพลาสซึม และ 2-C-methyl-D-erythritol-4- phosphate ที่พลาสติด (ดัดแปลงจาก Estevez *et al.*, 2001; Moehs *et al.*, 2001; Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2001; Bick and Lange, 2003; Dubey *et al.*, 2003)

griseolosporeus (Hamano *et al.*, 2002), *S. exfoliatus* (Orihara *et al.*, 1997), *S. niveus* (Orihara *et al.*, 1998), *S. spheroides* (Li *et al.*, 1998), *S. ghanaensis* (Endler *et al.*, 1998) และ *S. blastmyceticum* (Irie *et al.*, 1998) แต่ในแบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์สารกลุ่มไอโซพรีนอยด์ได้โดยผ่านทั้งวิถี MEP และ วิถี MVA แต่การสังเคราะห์ดังกล่าวเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน เช่น *Streptomyces aeriouvifer* จะมีการสร้างสาย prenyl ของ tetrahydromena quinone ผ่านวิถี MEP ในขณะที่มีอัตราการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว (exponential growth phase) แต่มีการสร้างสาย monoterpene ของ nephterpin ขณะเจริญอยู่ในระยะที่อัตราการเจริญเติบโตเท่ากับอัตราการตาย (stationary growth phase) (Seto *et al.*, 1996) เช่นเดียวกับ *Actinoplanus* sp. ที่มีการสร้างสาย prenyl ของ tetrahydromenaquinone-9 ผ่านวิถี MEP ขณะเจริญในระยะที่มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว และมีการสร้างสาย monoterpene เพื่อเชื่อมกับ benzoquinone antibiotic BE-40644 ผ่านวิถี MVA ขณะที่มีอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับอัตราการตาย (Seto *et al.*, 1998)

ปัจจุบันพบการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์โดยผ่านวิถี MEP อย่างกว้างขวางทั้งในแบคทีเรียที่ก่อโรค (pathogenic bacteria) และแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic bacteria) ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงใช้วิถี MEP ในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ รวมถึงการใช้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถี MEP สำหรับเป็นเป้าหมายใหม่ในการออกแบบยาปฏิชีวนะ (antibacterial drugs) เพื่อให้สามารถต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค (Lichtenthaler *et al.*, 2000; Lichtenthaler, 2000; Mueller *et al.*, 2000)

1.4.2.2 การศึกษาวิถี MEP ในยูคาริโอท (eukaryotes)

หลังจากมีการค้นพบวิถี MEP ในสาหร่ายสีเขียว *S. obliquus, C. fusca* และ *C. reinhardtii* นักวิทยาศาสตร์จึงได้ศึกษาการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ในสาหร่ายชนิดอื่นเพิ่มเติม เช่น สาหร่ายสีแดง *Cyanidium caldariu*, สาหร่ายสีน้ำตาล *Ochromonas danica* และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Euglena gracilis* (Disch *et al.*, 1998) ทำให้พบว่าสาหร่ายสังเคราะห์สารในกลุ่มไอโซพรีนอยด์ เช่น phytol, β-carotene, lutein, plastoquinone-9 ผ่านวิถี MEP ในพลาสติด แต่มีการสังเคราะห์ sterols ในไซโทพลาสซึมและ ubiquinones ในไมโทคอนเดรีย โดยผ่านวิถี MVA (Schwender *et al.*, 1996; Disch *et al.*, 1998)

ในพืชชั้นสูงได้มีการศึกษาวิถี MEP ครั้งแรกจากคัพภะ (embryo) ของ ginkgo (*Ginkgo biloba*) โดยการติดฉลากสารรังสีคือ ^{13}C ให้กับ glucose เพื่อติดตามการสังเคราะห์ ginkgolide และ bilobalide ซึ่งเป็นไอโซพรีนอยด์ในกลุ่ม diterpene และเมื่อใช้ deuterium (^{3}H) ในการติดตามการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ใน willow (*Salix cinerea*), poplar

(*Populus nigra*) และ celandine (*Chelidonium majus*) โดยนำใบหรือลำต้นมาบ่มด้วย methyl deoxyxyluloside ที่ติดฉลากด้วย deuterium พบว่าในพืชดังกล่าวมีการสังเคราะห์ isoprene ได้โดยผ่านวิถี MEP (Zeidler *et al.*, 1997) เมื่อใช้ deuterium ติดฉลากให้กับ 1-deoxy-D-xylulose พบว่ามีการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ในกลุ่ม monoterpene และ sesquiterpenes ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่สำคัญจากวิถี MEP ในใบของ lima bean (*Phaseolus lunatus*) และดอกของต้น *Eucalyptus globules*, *Clematis vitalba*, *Hedera helix*, *Passiflora coerulea* และ *Callicarpa japonica* นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ในพืชเพิ่มเติมอีกมากมายเช่น การสังเคราะห์ monoterpene ใน *Pelargonium graveolens*, *Mentha x piperita*, *Mentha pulegium*, *Thymus vularis* (Eisenreich *et al.*, 1997), *Conocephalum conicum* และ *Ricciocarpos natans* การสังเคราะห์ sesquiterpenes ในรากของข้าวบาร์เลย์ (Maier *et al.*, 1998) และในดอก chamomile *(Matricaria recutita)* (Adam *et al.*, 1998) การสังเคราะห์ diterpenes ในเซลล์เพาะเลี้ยงของ liverworts (*Heteroscyphus planus*) (Nabeta *et al.*, 1998), *Salvia miltiorrhiza*, *Taxus chinensis* (Eisenreich *et al.*, 1996) และ *Marrubium vulg*are (Knoss *et al.*, 1997) รวมถึงการสังเคราะห์ alkaloids เช่น ajmalicine, tabersonine และ lochnericine ใน รากของ *Catharanthus roseus* (Hong *et al.*, 2003)

จากข้อมูลในการศึกษาการสังเคราะห์ isoprenoids ปัจจุบันสรุปได้ว่าการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ผ่านวิถี MEP เกิดขึ้นในพลาสติดของพืชเช่นเดียวกับในไซโทพลาสซึม โพรคารีโอท และจากหลักฐานการค้นพบว่าโพรคารีโอท เช่นแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic bacteria) มีส่วน phytol ของคลอโรฟิลล์เอ สังเคราะห์ผ่านวิถี MEP เช่นเดียวกับในคลอโรพลาสต์ของพืชชั้นสูง จึงสนับสนุนทฤษฎีที่ว่า คลอโรพลาสต์มีบรรพบุรุษเป็นโพรคารีโอทที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic prokaryotes ancestors) โดยได้มีการอยู่ร่วมกัน (endosymbiosos) กับบรรพบุรุษของเซลล์ยูคารีโอทและมีวิวัฒนาการร่วมกัน (coevolution) ในระหว่างที่บรรพบุรุษของเซลล์ยูคารีโอทมีการพัฒนาเป็นเซลล์พืชในปัจจุบัน (eukaryotic plant cells) (Lichtenthaler *et al.*, 2000; Rohmer, 1999b)

1.4.2.3 การศึกษายีน *dxs* สำหรับเอนไซม์ DXS จากวิถี MEP

Bouvier และคณะ (1998) โคลนยีน *CapTKT2* (*dxs*) จากผลพริกหยวกสายพันธุ์ Yolo Wonder (*Capsicum annuum* L. cv. Yolo Wonder) พบว่ายีน *CapTKT2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 2,157 คู่เบสแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS ยาว 719 กรดอะมิโน

มีความเหมือนกับ *Arabidopsis*, สน, ข้าว และละหุ่ง ประมาณ 80%, *Synechocystis* และ *E. coli* 45.6%, *Rhodobacter* 54.4%

Lange และคณะ (1998) โคลนยีน *dxs* จากต่อมน้ำมันบริเวณผิวใบของ peppermint (*Mentha x piperita*) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ peppermint 2,172 คู่เบส สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ได้ 726 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 71 กิโลดาลตัน มีความยาวของเปปไทด์ที่นำเอนไซม์เข้าสู่คลอโรพลาสต์ 70 กรดอะมิโน ดังนั้นเอนไซม์ DXS ที่สมบูรณ์จะมีความยาวของเปปไทด์ประมาณ 650 กรดอะมิโน ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *A. thaliana*, *R. capsulata*, *E. coli*, *Synechocystis* sp. PC6803 77, 56, 48 และ 45% ตามลำดับ รวมถึงมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งใหม่ในการจับของ thiamine diphosphate คือ GDG(A/S)XT (A/G)G(Q/M)AXEAXN(N/H)AG(X)$_{7-8}$(I/V)(V/I)LNDN แตกต่างจากเดิมที่เป็น GDG(X)$_{7-8}$E(X)$_{3-4}$A (X)$_{11-13}$NN ซึ่งศึกษาไว้โดย Hawkins และคณะในปี 1989

Bramley และ Harker (1999) โคลนยีน *dxs* จาก *Synechocystis* sp. PC6803 และ *Bacillus subtilis* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dxs* ใน *Synechocystis* sp. PC6803 มีจำนวน 1,920 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS ได้ 640 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 69 กิโลดาลตัน และ *B. subtilis* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,899 คู่เบส แปลเป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ DXS ได้ 633 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS จาก *Synechocystis* sp. PC6803 และ *B. subtilis* กับ *E. coli* พบว่ามีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน 44 และ 47% ตามลำดับ

Miller และคณะ (1999) โคลนยีน *dxs* จาก cyanobacterium คือ *Synechococcus leopoliensis* SAUG 1402-1 หรือ *Anacystis nidulans* พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสของเอนไซม์ DXS ยาว 1,085 คู่เบส ซึ่งมีความเหมือนกับ *E. coli* 51.3%

Chahed และคณะ (2000) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ periwinkle (*C. roseus*) เพื่อใช้ในการโคลนยีน *dxs* และจากการโคลนยีนดังกล่าว พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ periwinkle สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ได้ 716 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุล 76.787 กิโลดาลตัน โดยลำดับของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ *Mentha x piperita* มากที่สุดคือ 78% และใกล้เคียงกับ *L. esculentum*, *A. thaliana*, *C. annuum* 72-74% และมีความยาวของเปปไทด์ที่นำเอนไซม์เข้าสู่คลอโรพลาสต์ 70 กรดอะมิโน รวมถึงมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งในการจับของ thiamine diphosphate คือ DGAMTAGQAYEAMNNAGFL DANLIVVLNDN

Kuzuyama และคณะ (2000) โคลนยีน *dxs* จาก *Synechocystis* sp. Strain CL190 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dxs* 1,896 คู่เบส แปลเป็นรหัสของกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS ได้ 631 กรดอะมิโน เมื่อนำยีนที่โคลนได้มาเชื่อมกับ expression vector คือ pQE30 เพื่อให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ DXS ใน *E. coli* แล้วนำเอนไซม์ที่สังเคราะห์ได้มาทำบริสุทธิ์ พบว่าจากการทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมี SDS (sodium dodecyl sulphate-polyacylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) และเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography) เอนไซม์ DXS มีน้ำหนักโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน และ 130 กิโลดาลตัน ตามลำดับ จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าเอนไซม์ DXS มีลักษณะเป็น dimer

Lois และคณะ (2000) โคลนยีน *dxs* จากใบมะเขือเทศสายพันธุ์ Ailsa Craig (*L. esculentum* Mill. cv. Ailsa Craig) พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dxs* ยาว 2,568 คู่เบส มีส่วนที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ได้ 2,160 คู่เบส ซึ่งแปลเป็นกรด อะมิโนได้ 719 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 77.6 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS กับพืชชนิดอื่นพบว่าใกล้เคียงกับ pepper 96%, *Arabidopsis* 83%, Peppermint 64% และใกล้เคียงกับแบคทีเรียคือ *E. coli* 60%

Hahn และคณะ (2001) โคลนยีน *dxs* จาก *R. capsulatus* พบว่ายีน *dxs* ใน *R. capsulatus* มีจำนวน 2 ยีน คือ *dxsA* และ *dxsB* โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS ยาว 641 และ 636 กรดอะมิโน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างเอนไซม์ DXSA กับ DXSB พบว่ามีความเหมือนกัน 64.3% จาก 622 กรดอะมิโน

Han และคณะ (2003) โคลนยีน *dxs* จากเซลล์เพาะเลี้ยงของต้นยอ (*Morinda citrifolia*) พบลำดับนิวคลีโอไทด์ 2,169 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ได้ 722 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุล 77.97 กิโลดาลตัน ค่า pH ที่เอนไซม์มีประจุรวมเป็นศูนย์หรือค่า pI (isoelectric point) เท่ากับ 7.9 เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS กับพืชชนิดอื่นพบว่าใกล้เคียงกับ *C. roseus* 80% *C. annuum*, *A. thaliana*, *L. esculentum*, *Mentha x piperita* และ *N. pseudonarcissus* 69-75% จากการทำนายโครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์ DXS พบว่าลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นตำแหน่งจับของ thiamine diphosphate คือ DGAMTAGQAYE AMNNAGFLDANLIVILNDN และเมื่อศึกษาถึงจำนวนยีน *dxs* (gene copy number) โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Southern blot ทำให้ทราบว่า ยีน *dxs* จากต้นยอมีมากกว่า 4 ยีน

1.5 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวิถี MVA และวิถี MEP

จากการศึกษากระบวนการการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ในวิถี MVA และวิถี MEP ในพืช พบว่า วิถีทั้งสองทำงานในส่วนของเซลล์ที่แตกต่างกันโดยวิถี MVA เกิดในส่วนไซโทพลาสซึมและวิถี MEP เกิดในส่วนพลาสติดของเซลล์ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดในการแลกเปลี่ยนหรือส่งถ่ายสารประกอบที่เป็นตัวกลางในการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ เช่น isopentenyl diphosphate, geranyl diphosphate, farnesyl diphosphate หรือ geranylgeranyl diphosphate ที่สามารถแลกเปลี่ยนกันได้ระหว่างสองวิถีนี้ (Wanke *et al.*, 2001) แต่ได้มีรายงานการวิจัยที่สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างวิถีทั้งสองเช่น การศึกษาโดย Nabeta และคณะในปี 1997 จากเซลล์เพาะเลี้ยงของ liverwort ชนิด *Heterocyphus planus* และ *Lophocolea heterophylla* โดยการติดฉลากสารรังสีสารตัวกลางจากวิถี MVA แล้วติดตามการเคลื่อนย้ายสารในวิถีดังกล่าวพบว่า farnesyl diphosphate บริเวณไซโทพลาสซึมของวิถี MVA สามารถเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณพลาสติด เพื่อใช้ในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ และแคโรทีนอยด์ได้ (Nabeta *et al.*, 1997) รวมถึงการศึกษาการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์จาก chamomile โดย Adam และ Zapp ในปี 1998 พบว่ามีการทำงานร่วมกันของวิถีทั้งสองในการสะสม isopentenyl diphosphate และมีการแลกเปลี่ยน isopentenyl diphosphate หรือ geranylgeranyl diphosphate ระหว่างวิถีทั้งสอง (Adam and Zapp, 1998) สอดคล้องกับการศึกษาของ Bick และ Lange ในปี 2003 ที่พบการขนส่งสารตัวกลางในการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์จากพลาสติดไปยังไซโทพลาสซึม ในต้นอ่อนอายุ 16-25 วันของต้น Indian mustard (*Brassica juncea*) และในใบของต้น Kale (*Brassica oleracea*) และ spinach (*Spinacea oleracea*) (Bick and Lande, 2003) นอกจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารจากวิถีทั้งสองโดยการติดฉลากด้วยสารรังสีแล้ว ในปี 2002 Kasahara และคณะ ได้ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยวิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ร่วมกับการใช้สารรังสีในการวิเคราะห์การสังเคราะห์ gibberellins (GAs) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่ม diterpene ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืช จาก *A. thaliana* พบว่า วิถี MVA มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์ GAs ด้วยเช่นกัน (Kasahara *et al.*, 2002)

เมื่อมีการค้นพบสารซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวิถีทั้งสองเช่น mevinolin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMGR จากวิถี MVA ในไซโทพลาสซึม หรือ fosmidomycin ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DXR จากวิถี MEP ในพลาสติด (Mueller *et al.*, 2000) ดังนั้น ในปี 2003 Hemmerlin และคณะ จึงใช้ mevinolin และ fosmidomycin ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวิถีทั้งสองในต้นยาสูบ โดยทดลองให้เห็นว่า sterols ซึ่งปกติเกิดจากวิถี MVA แต่เมื่อให้ mevinolin

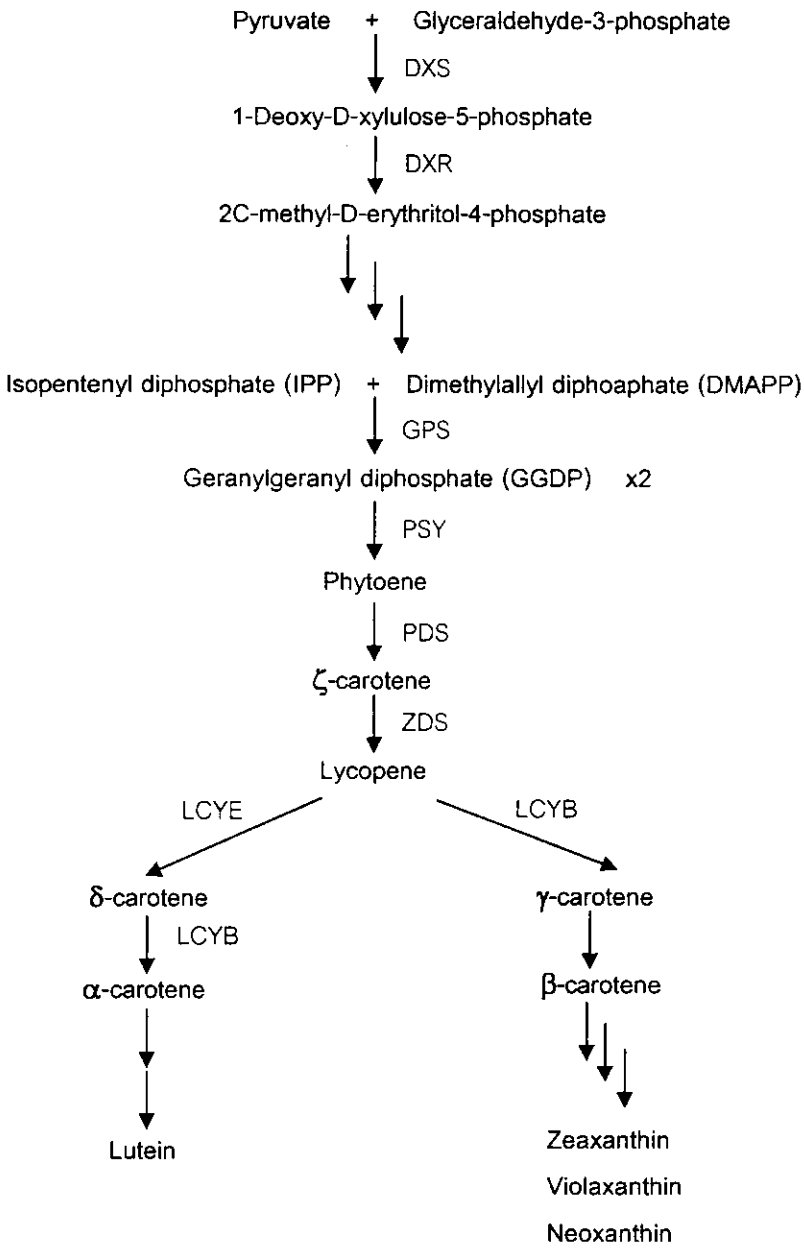
พบว่าสามารถสังเคราะห์ sterols ได้เหมือนเดิมโดยผ่านทางวิถี MEP และ plastoquinone ปกติเป็นอนุพันธ์ของวิถี MEP แต่เมื่อให้ fosmidomycin พบว่าสามารถสังเคราะห์ได้โดยผ่านวิถี MVA (Hemmerlin *et al.*, 2003) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ จากทั้งสองวิถีสามารถทดแทนหรือส่งถ่ายกันได้เช่นเดียวกับการศึกษาโดย Laule และคณะ ในปี 2003 ที่ศึกษาใน *A. thaliana* (Laule *et al.*, 2003)

อย่างไรก็ตามแม้พบหลักฐานการแลกเปลี่ยนและทดแทนกันระหว่างสารตัวกลางในการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์จากทั้งสองวิถี แต่การแลกเปลี่ยนดังกล่าวมีขอบเขตที่จำกัดขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ระยะการพัฒนาและชนิดของพืช รวมถึงสภาวะแวดล้อมทางกายภาพด้วย (Rodriguez-Concepcion and Boronat, 2002)

1.6 แคโรทีนอยด์

16.1 การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

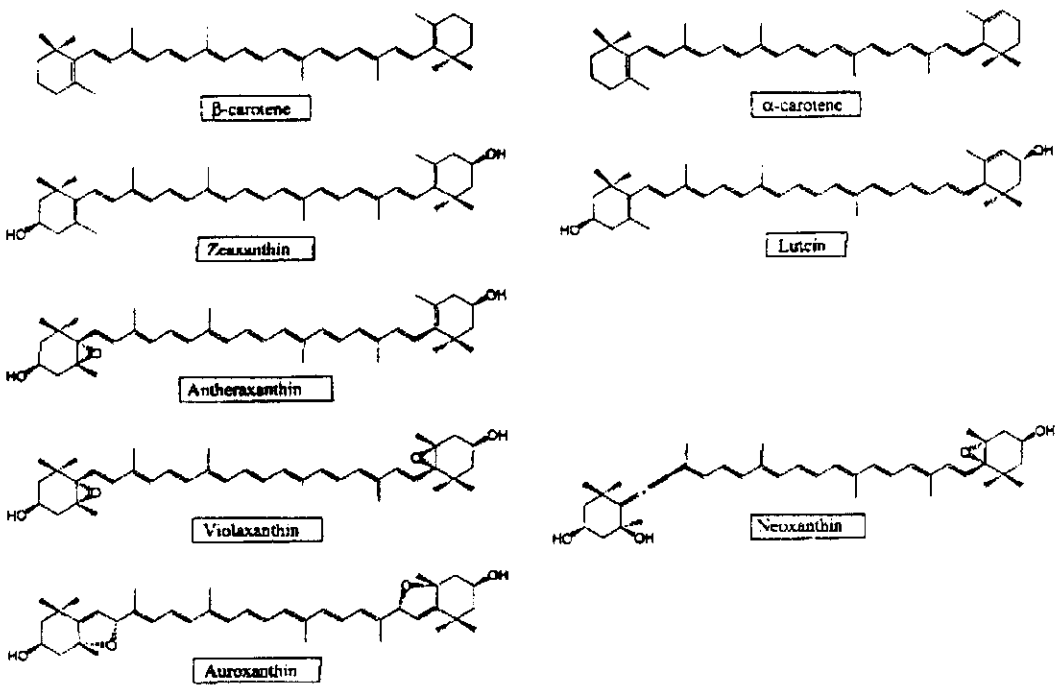
แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุที่พบมากสุดในธรรมชาติ เช่น ไข่แดง มะเขือเทศ แครอท มะม่วง แคนตาลูป มะละกอ ลูกพลับ ท้อ พืชตระกูลส้ม พริกหยวกแดง-เหลือง สับปะรด ฝรั่ง องุ่น และแตงโม เป็นต้น (ศิวาพร ศิวเวชช, 2529; Philip and Chen, 1998; Rodriguez-Amaya, 2001) การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในพืชชั้นสูงสังเคราะห์ในพลาสติด โดยมีสารตั้งต้นคือ isopentenyl diphosphate ซึ่งได้จากวิถี MEP สำหรับขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เกิดจากการรวมตัวกันของ geranylgeranyl diphosphate (GGDP) ได้เป็น phytoene โดยเอนไซม์ phytoene synthase (PSY) ต่อมาจึงมีการสร้างพันธะคู่ในโมเลกุลได้เป็น ζ-carotene และ lycopene โดยเอนไซม์ phytoene desaturase (PDS) และ ζ-carotene desaturase (ZDS) ตามลำดับ จากนั้น lycopene จะเปลี่ยนเป็น α-carotene และ β-carotene โดยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ lycopene-β-cyclase (LCYB) และ lycopene-ε-cyclase (LCYE) สำหรับ β-carotene มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสารกลุ่ม xanthophylls เช่น zeaxanthin, violaxanthin และ neoxanthin ดังรูปที่ 7 (Lois *et al.*, 2000; Moehs *et al.*, 2001; Busch *et al.*, 2002)



รูปที่ 7 การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในพืชโดยผ่านวิถี MEP

DXS, 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; DXR, 1-Deoxy-D-xylulose -5-phosphate reductoisomerase; GPS, Geranylgeranyl diphosphate synthase; PSY, Phytoene synthase; PDS, Phytoene desaturase; ZDS, ζ-carotene desaturase; LCYE, Lycopene-ε-cyclase; LCYB, Lycopene-β-cyclase. (ดัดแปลงจาก Lois *et al.*, 2000; Moehs *et al.*, 2001)

แคโรทีนอยด์แบ่งตามโครงสร้างทางเคมีได้ 2 กลุ่มคือ carotene ซึ่งเป็นกลุ่มที่โครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น เช่น α-carotene และ β-carotene พบได้ในแครอท หรือ lycopene ที่พบได้ในมะเขือเทศ และอีกกลุ่มคือ xanthophyll เป็นกลุ่มที่มีโครงสร้างประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน หรืออาจเรียกว่าเป็นอนุพันธ์ออกซิเจนของ carotene เช่น capxanthin, capsorubin ในพริกแดง และ cryptoxanthin ที่เป็นรงควัตถุสำคัญในข้าวโพด มะละกอ และส้มแมนดาริน (จาตุรนต์ แซ่ลิ้ม และสินชัย ทองขาว, 2543) ตัวอย่างโครงสร้างของแคโรทีนอยด์แสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 ตัวอย่างโครงสร้างของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Suzuki and Shioi, 2003)

16.2 ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์

เนื่องจากแคโรทีนอยด์พบได้ใน สาหร่าย เชื้อรา แบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงและพลาสติดของพืชชั้นสูง (Armstrong and Hearst, 1996) ดังนั้นบทบาทโดยทั่วไปของแคโรทีนอยด์คือป้องกันหรือต่อต้านการทำลายโดยอนุมูลอิสระ (Bartley and Scolnik, 1995) ที่เกิดจากการแผ่รังสีของคลื่นแสงที่มองเห็น (visible light) และเนื่องจากสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์เป็นสารมีสีเช่น สีเหลืองเข้ม ส้ม เขียว และชมพูถึงแดง จึงนิยมใช้เป็นสารเร่งสีในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการใช้เป็นสารเร่งสีสำหรับปลา (Meyer *et al.*, 1993) และใช้เป็นสีผสมอาหาร โดยสกัดสารสีแคโรทีนอยด์จากเมล็ดคำแสด พริกหยวก มะเขือเทศ พืชตระกูลส้ม สำหรับผสมในมาการีน เนยแข็ง ไอศกรีม น้ำมันพืช น้ำสลัด ไข่ผง ผลิตภัณฑ์ขนมอบ แป้งเค้กสำเร็จรูป น้ำผลไม้และเครื่องดื่มต่างๆ (จาตุรนต์ แซ่ลิ้ม และสินชัย ทองชาว, 2543) นอกจากนี้แคโรทีนอยด์ยังช่วยในการรักษาโรคในมนุษย์ เนื่องจากแคโรทีนอยด์ประกอบด้วย β-carotene ซึ่งเป็นสารต้นกำเนิดของวิตามินเอ จึงใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อป้องกันและรักษาโรคขาดวิตามินเอ อีกทั้งช่วยลดการเกิดโรคหัวใจ (Palace *et al.*, 1999) มะเร็งปอด (Mayne, 1996) รวมถึงสามารถป้องรังสีอัลตราไวโอเลต (Biesalski and Obermueller-Jevic, 2001; Heinrich *et al.*, 2002) ดังนั้นในทางเภสัชกรรมจึงนำมาทำยารักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากการแพ้แสงแดดเพื่อช่วยป้องกันและลดการเกิดมะเร็งผิวหนัง

16.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแคโรทีนอยด์กับยีน *dxs* และ *dxr*

16.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างแคโรทีนอยด์กับยีน *dxs* และ *dxr* ใน แบคทีเรีย

การศึกษาการเพิ่มปริมาณการแสดงออก (overexpression) ของยีน *dxs* สำหรับเอนไซม์ DXS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถี MEP นิยมศึกษาใน *E. coli* และในปี 1999 Bramley และ Harker ได้โคลนยีน *dxs* จาก *B. subtilis* และ *Synechocystis* sp. 6803 แล้วนำยีนที่โคลนได้มาศึกษาความสัมพันธ์กับปริมาณการสะสมแคโรทีนอยด์ ซึ่งเป็นผลผลิตชนิดหนึ่งของวิถี MEP ใน *E. coli* ทำให้พบว่า เมื่อมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *dxs* จะส่งผลให้มีการเพิ่มระดับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ เช่น lycopene 2-3 เท่าจากระดับปกติ (Harker and Bramley, 1999; Matthews *et al.*, 2000) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ร่วมกัน (Co-expression) ระหว่างการแสดงออกของยีน *dxs* ร่วมกับยีน *dxr* ซึ่งเป็นยีนสำหรับเอนไซม์ DXR โดยเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ลำดับถัดมาจากเอนไซม์ DXS ในวิถี MEP พบว่าการแสดงออกร่วมกันระหว่างยีนทั้งสองในเซลล์ *E. coli* ส่งผลให้มีการเพิ่มระดับการผลิต lycopene 1.4-2 เท่าจากระดับปกติ (Kim and Keasling, 2001) และเมื่อนำยีน *dxs* หรือยีน *dxr* มาศึกษาการแสดงออกร่วมกันกับยีน *idi* ซึ่งเป็นยีนสำหรับเอนไซม์ isopentenyl diphosphate isomerase *E. coli* พบว่าส่งผลให้ระดับการสังเคราะห์ zeaxanthin

เพิ่มขึ้นจากระดับปกติ 1.6 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง (mg/g DCW) (Albrecht *et al.*, 1991) และ astaxanthin เพิ่มขึ้น 6 เท่าของการแสดงออกของยีน *idi* อย่างเดียว (Lee and Schmidt-Dannert, 2002 อ้างจาก Wang *et al.*, 1999)

16.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างแคโรทีนอยด์กับยีน *dxs* และ *dxr* ในพืชชั้นสูง

Bouvier และคณะ (1998) ได้โคลนยีน *CapTKT2* (*dxs*) จากผลพริกหยวกสายพันธุ์ Yolo Wonder *(C. annuum* L. cv. Yolo Wonder) แล้วนำยีนที่โคลนได้มาติดฉลากเพื่อใช้ติดตามการแสดงออกของยีน *CapTKT2* ในการเจริญของผลพริกหยวก เพื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแคโรทีนอยด์ที่พบมากในพริกหยวกคือ capsanthin พบว่าเมื่อผลของพริกหยวกมีการพัฒนาเพิ่มขึ้นจะมีการสะสม capsanthin เพิ่มมากขึ้นและสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *CapTKT2* ที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

Estevez และคณะ (2000) ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *CLA1* (*dxs*) สำหรับเอนไซม์ DXS ในพืชเป็นครั้งแรกจาก *Arabidopsis* โดยเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic tissues) กับเนื้อเยื่อที่ไม่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (non-photosynthetic tissues) ตลอดจนเปรียบเทียบระหว่างต้นอ่อนที่มียีน *CLA1* ที่ปกติ (wild type) กับผิดปกติ (mutant) ทำให้พบว่ายีน *CLA1* มีความสำคัญในการพัฒนาของคลอโรพลาสต์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

Lois และคณะ (2000) ได้วิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีน *dxs* ในผลมะเขือเทศ (*L. esculentum*) ตั้งแต่ผลอ่อนจนพัฒนาเป็นผลสุก โดยเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ Ailsa Craig ซึ่งเป็นพันธุ์ดั้งเดิม และพันธุ์ yellow flesh ซึ่งเป็นพันธุ์ผิดปกติ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *dxs* เพิ่มขึ้นแปรผันตามอายุของผลมะเขือเทศและเมื่อศึกษาตำแหน่งที่มีการสะสมแคโรทีนอยด์กับอาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) ของยีน *dxs* ในผลมะเขือเทศ พบว่าผลมะเขือเทศสุกมีการสะสมแคโรทีนอยด์มากที่สุด และสอดคล้องกับการสะสมอาร์เอ็นเอส่งข่าวของยีน *dxs*

Walter และคณะ (2000) ได้นำเชื้อราที่อยู่ร่วมกับรากพืช (arbuscular mycorrhizas, AMs) คือ *Glomus intraradices* มาบ่มกับรากข้าวสาลี (*Triticum aestivum*), ข้าวโพด (*Zea mays*), ข้าว (*O. sativa*) และบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) เพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการสังเคราะห์ยีน *dxs* และ *dxr* กับปริมาณ apocarotenoids คือ cyclohexenone และ mycorradicin ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ในกลุ่ม xanthophylls ที่สะสมในรากพืชที่มีเชื้อรา *arbuscular mycorrhizas* อาศัยอยู่ เมื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน *dxs* และ *dxr* หลังจากบ่มเชื้อราในรากพืชทั้ง 4 ชนิดเป็นเวลา 1-8 สัปดาห์ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน

ทั้ง 2 เพิ่มขึ้นแปรผันกับการสังเคราะห์ apocarotenoids มากกว่าในรากพืชที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยเชื้อรา

Moehs และคณะ (2001) ศึกษาปริมาณการสะสมแคโรทีนอยด์ในกลีบดอกดาวเรืองที่มีการเจริญระยะต่างๆ พบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์ในกลีบดอกดาวเรืองเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในดอกดาวเรืองระยะที่ 3 และ 4 ซึ่งมีกลีบดอกยาว 8-10 มิลลิเมตร และเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในระยะดังกล่าวเปรียบเทียบกับใบ พบว่าการแสดงออกของยีน *dxr* และ *dxs* บริเวณใบมีมากกว่ากลีบดอก โดยยีน *dxr* มีการแสดงออกมากกว่ายีน *dxs* ทั้งในใบและกลีบดอก

Estevez และคณะ (2001) ศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ DXS ที่ควบคุมด้วยยีน *CLA1* (*dxs*) จาก *A. thaliana* ต่อปริมาณการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ โดยเปรียบเทียบกันระหว่าง transgenic plants ที่ได้จากการ transform sense และ antisense *CLA1* gene กับ non-transgenic plants พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *dxs* จะส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคโรทีนอยด์รวมถึงส่งผลกระทบต่ออัตราการงอกของเมล็ด ความสามารถในการอยู่รอด การสืบพันธุ์ ตลอดจนลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) เช่น สีใบ ความยาวช่อดอก เป็นต้น

Rodriguez-Concepcion และคณะ (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ mRNA ของยีน *dxr* ในระหว่างการสะสมแคโรทีนอยด์ในผลมะเขือเทศ พบว่ายีน *dxr* เป็นยีนที่ช่วยสนับสนุนยีน *dxs* ซึ่งเป็นยีนหลักที่สำคัญจากวิถี MEP ในการสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ โดยเฉพาะแคโรทีนอยด์ในมะเขือเทศ

วัตถุประสงค์

1. โคลนและศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *dxs* สำหรับเอนไซม์ DXS ในใบปาล์มน้ำมัน
2. โคลนและศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนของยีน *dxr* สำหรับเอนไซม์ DXR ในใบและผลปาล์มน้ำมัน
3. ศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs* และ *dxr* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ
4. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *dxs* และ *dxr* กับปริมาณ β-carotene ในผลปาล์มน้ำมัน
5. ศึกษาความยาวและลำดับเปปไทด์ที่นำเอนไซม์ DXS เข้าสู่คลอโรพลาสต์ในปาล์มน้ำมันและพืชชั้นสูงชนิดอื่น
6. ศึกษาวิวัฒนาการของเอนไซม์ DXS ในใบปาล์มน้ำมันเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น
7. ศึกษาบริเวณจับของ Thiamine diphosphate บนเอนไซม์ DXS ในปาล์มน้ำมันและสิ่งมีชีวิตอื่น