หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

สารให้ความหวานได้เข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวันของมนุษย์ เนื่องจากความต้องการในการบริโภครสหวาน เป็นปัจจัยที่ช่วยให้การบริโภคมีรสชาติมากขึ้น ความต้องการบริโภคสารหวานของมนุษย์ในระยะเริ่มต้นมุ่งไปที่สารหวานที่ให้พลังงานแก่ร่างกาย ต่อมาทางการแพทย์ได้ยืนยันถึงอันตรายที่เกิดขึ้นต่อร่างกายมนุษย์ถ้าบริโภคสารหวานที่ให้พลังงานในปริมาณมากเกินไป จึงมีผู้หันมานิยมใช้สารหวานสังเคราะห์เช่น ซัคคารีน หรือขัณฑสกร แต่เนื่องจากการบริโภคในปริมาณมากอาจเป็นต้นเหตุหนึ่งทำให้เกิดมะเร็งได้ (Graham, 1980) ทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามคิดค้นหรือสำรวจหาสารหวาน ซึ่งได้จากธรรมชาติที่มีความหวานสูงและสามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัยมีการค้นพบหญ้าหวาน (Stevia) ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ให้ความหวานได้ในประเทศแถบอเมริกาใต้ (Beu, 1954) สารให้ความหวานจากหญ้าหวาน เป็นสารประเภทไกลโคไซด์ (glycoside) มีชื่อว่าสตีวีรอไซด์ (stevioside) เป็นสารที่พบอยู่ในใบเป็นส่วนใหญ่ ให้ความหวานสูงกว่าน้ำตาลซูโครสประมาณ 150-300 เท่า (Fujita,1979) สตีวีรอไซด์เป็นสารที่ให้ความหวานที่ไม่ให้คุณค่าทางอาหาร มีคุณสมบัติทนต่อความร้อนและกรดในอุตสาหกรรมได้ จึงมีผู้สนใจนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดที่ต้องมีส่วนผสมของความหวาน เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องดื่ม ในทางการแพทย์สามารถนำไปใช้กับผู้ที่เป็นโรคอ้วน เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และโรคฟันผุ ด้วยเหตุนี้จึงคาดว่าหญ้าหวานจะเป็นทรัพยากรอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อไป

ในประเทศไทยได้เริ่มปลูกหญ้าหวานตั้งแต่ปี พ.ศ.2520 โดยรัฐบาลญี่ปุ่นได้ส่งนายเต อิชิยากิ มาเป็นหัวหน้าศูนย์วิจัยพืชประจำประเทศไทยได้ทดลองปลูกหญ้าหวานเรื่อยมาจนกระทั่งถึงปัจจุบัน มีการปลูกหญ้าหวานในเขตภาคเหนือเพื่อเก็บเกี่ยวหญ้าหวานส่งเป็นสินค้าออกดังนั้นจึงเห็นได้ว่าประเทศไทยสามารถ

ปลูกหญ้าหวานได้ (สืบศิลป์, 2525) อย่างไรก็ตามในการปลูกหญ้าหวาน พบว่า การขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดนั้นจะพบปัญหาเมล็ดที่นำมาปลูกให้เปอร์เซ็นต์การงอกต่ำและต้นที่ได้จากการปลูกด้วยเมล็ดเกิดการกลายลักษณะต่าง ๆ เช่น รูปร่าง และสีของใบเปลี่ยนแปลงไป ปริมาณของสตีวีรอไซด์เปลี่ยนแปลงไปประมาณ 5-15 % ต่อชั่วอายุทั้งนี้เนื่องจากหญ้าหวานเป็นพืชที่มีการผสมข้าม (self incompatible) สูง จึงทำให้เกิดการกลายลักษณะทางพันธุกรรม (Tamura และคณะ, 1984) การปลูกด้วยเมล็ดจึงยากที่จะควบคุมคุณภาพได้ ดังนั้นหากต้องการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดจึงจำเป็นต้องสั่งซื้อเมล็ดจากบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ซึ่งมีราคาแพง และไม่สามารถควบคุมเทคโนโลยีการผลิตได้ การขยายพันธุ์หญ้าหวานด้วยวิธีปักชำสามารถทำได้และต้นหญ้าหวานที่ได้ไม่เกิดการกลายลักษณะต่าง ๆ ดังกล่าวแล้ว แต่วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการที่ไม่สะดวกในการปฏิบัติโดยเฉพาะอุตสาหกรรมการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณมาก ๆ ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์ และประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่นกล้วยไม้ มันฝรั่ง เป็นต้น (Rao, 1977 ; อัญชลี, 2521)

จากปัญหาการขยายพันธุ์หญ้าหวานที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงคาดว่าการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ ซึ่งหากจะทำให้ประสบความสำเร็จจำเป็นต้องทำการศึกษา วิจัยพัฒนา ความเป็นไปได้ตลอดจนความเหมาะสมในเชิงพานิชย์ และทางเทคนิคเพื่อให้กระบวนการผลิตสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถผลิตต้นพันธุ์ได้จำนวนมาก มีการเจริญเติบโตดี ผลิตสารให้ความหวานสูง และมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์หญ้าหวาน เพื่อให้ได้ลักษณะอื่น ๆ อีกหลายประการตามที่ต้องการ เช่น การต้านทานต่อโรคแมลง การเปลี่ยนแปลง ของอุณหภูมิ เป็นต้น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจเอกสาร

ประวัติความเป็นมาของหญ้าหวาน

หญ้าหวานเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า Stevia rebaudiana Bertoni ชื่อสามัญเรียกว่าสตีเวีย (Stevia) อยู่ในตระกูลคอมโพซิตี (Compositae Family) เป็นชนิดของไซรแซนทีมัม (Chrysanthemum) (Bridel และ Lavieille, 1973) เป็นพืชที่มีอายุอยู่ได้หลายปี (Perenial Herb) จัดอยู่ในตระกูลเดียวกับทานตะวันเบญจมาศ และดาวเรือง มีความสูงของต้นเฉลี่ยประมาณ 60-80 เซนติเมตร รัศมีที่สูงประมาณ 150-170 เซนติเมตร ลักษณะขอบใบเป็นหยัก ดอกมีสีขาวเป็นกลุ่มอยู่ปลายกิ่ง เมล็ดขนาดเล็กสีดำมีปุยขน 1 ดอกจะมีเมล็ดประมาณ 4-6 เมล็ด น้ำหนัก 1 กรัม จะมีเมล็ดประมาณ 2,500 เมล็ด มีอัตราการงอกต่ำ (นันทนา, 2525)

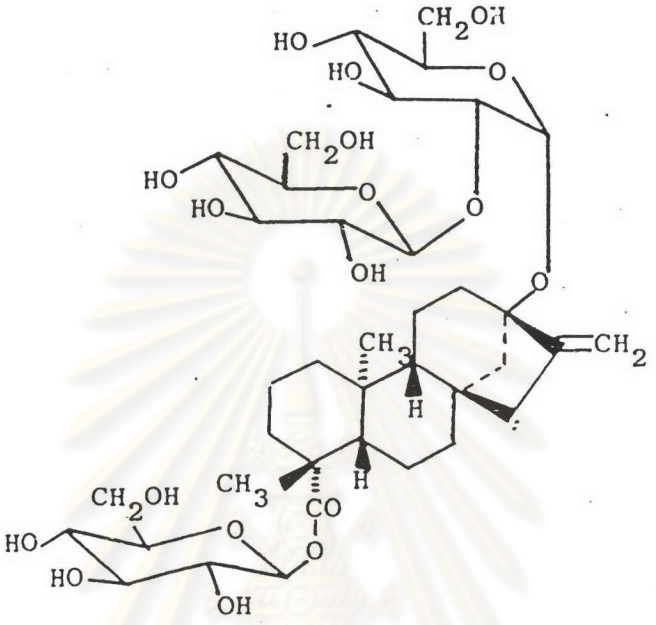
หญ้าหวานมีถิ่นกำเนิดในประเทศปารากวัย และบราซิลในทวีปอเมริกาใต้ เกิดขึ้นตามธรรมชาติแถบที่ลุ่ม มีความสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 500 เมตร นอกจากนี้ยังพบในอาร์เจนตินา เมกซิโก อเมริกากลางและทางตะวันตกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกาอีกด้วย ชาวพื้นเมืองทั่วไปเรียกพืชชนิดนี้ว่า Yearba dulce ในภาษาสเปนหมายถึงสมุนไพรหวาน ส่วนชาวพื้นเมืองของประเทศปารากวัยเรียกว่า kaa-he-e ชาวพื้นเมืองที่อาศัยอยู่บริเวณถิ่นกำเนิดของพืชชนิดนี้ได้นำหญ้าหวานมาใช้เป็นสารหวานตามธรรมชาติในอาหาร และเครื่องดื่มมาเป็นเวลาช้านานแล้ว ผู้ค้นพบหญ้าหวานคนแรกคือ Dr.Rebaudi และ Dr.Bertoni ทั้งสองเป็นนักเคมีชาวปารากวัย (Beu, 1954) ในปี 1908 Dr.Rebaudi และ Rasenack นักเคมีชาวปารากวัยได้แยกสารสำคัญจากใบหญ้าหวาน โดยอยู่ในรูปของ Glycoside ที่เป็นผลึกได้เป็นผลสำเร็จ ในปี 1921 การประชุมเคมีนานาชาติ ที่โคเปนเฮเกน (International Chemical Symposium in Copenhagen in 1921) ได้ให้การยอมรับและตั้งชื่อสารที่ค้นพบในใบหญ้าหวานว่า "สตีวีรอไซด์" ในปี 1931 Bridel และ Lavieille สามารถแยกสารสตีวีรอไซด์จากใบหญ้าหวานได้เป็นสารที่มีรสหวานจัดสามารถสกัดจากใบ Stevia rebaudiana ได้ในปริมาณ 6-10% ในปี 1941 ในสงครามโลกครั้งที่ 2 นานา

ชาติได้ให้ความสนใจกับสิ่งที่จะนำมาใช้ทดแทนน้ำตาล Dr.Melville ได้เปิดเผยวิธีการเกี่ยวกับการปลูกหญ้าหวานให้กับผู้อำนวยการสวน Royal Botanic ในประเทศอังกฤษหญ้าหวานจึงเริ่มปลูกในอังกฤษตั้งแต่นั้นมา ในปี 1945 Gattoni ได้รายงานใน Medical Plants Divisions ของ Institute Agronomico National ของปารากวัย โดยสนับสนุนให้ใช้สตีวีรอไซด์ในอุตสาหกรรมในปารากวัย ในปี 1958 Nieman ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารสตีวีรอไซด์ และเสนอว่าเป็นสารที่สามารถนำไปบริโภคได้ ในปี 1960 Dr. Dolder และผู้ร่วมงานได้ศึกษาหาโครงสร้างโมเลกุลของสตีวีรอไซด์ได้สำเร็จ

<u>โครงสร้างและคุณสมบัติของสตีวีรอไซด์</u>

สตีวีรอไซด์มีโครงสร้างประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วน Aglycone Steviol และส่วนที่เป็นน้ำตาล 3 โมเลกุล โครงสร้างของ สตีวีออล เป็น Cyclopentaoper Hydropheuamthrene โดยมี B-Glucosyl และหมู่ B-Sohorosyl เชื่อมที่ C_4 และ C_{13} ตามลำดับ สตีวีรอไซด์มีสูตรทางเคมีคือ $C_{38}H_{60}O_{18}$ น้ำหนักโมเลกุล 804.9 ประกอบด้วย C 56.70% , H 7.51%, O 35.78% มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เบา ปราศจากกลิ่นประกอบด้วยผลึกขนาดเล็กมากเป็นผลึกไฮโดรสโคปิค (Hydroscopic) จุดหลอมเหลว 198 ^{0}C ดูดความชื้นได้ดี สามารถละลายได้ในไดอีอกเซน, แอลกอฮอล์, สารละลายกรด, น้ำร้อน (Kohda, 1976) สามารถถูกย่อยอย่างรวดเร็วด้วยเอนไซม์ที่สกัดจากหอยทาก Helix Pomatia ได้ กลูโคส 3 โมเลกุล และไอโซสตีวีออล (Isosteviol) มากกว่าสตีวีออล ถ้านำไปย่อยด้วยกรดจะได้ กลูโคส และไอโซสตีวีออล (Bridel และ Lavieille, 1973) สตีวีรอไซด์ที่ละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 2-10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่าสตีวีรอไซด์ไม่มีการสลายตัว ทีพีเอช 7 สตีวีรอไซด์มีการสลายตัวน้อยมากโดยเหลือในปริมาณร้อยละ 97-99 ที่ พีเอช 3-9 เหลือสตีวีรอไซด์ในปริมาณร้อยละ 47 ที่ พีเอช 10 แสดงว่าสตีวีรอไซด์มีการสลายตัวในสภาวะที่เป็นด่างแก่ (Tomoyoshi,1979) เมื่อนำสตีวีรอไซด์ไปละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ พีเอช 4,6.8 ที่อุณหภูมิ 50 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่าสตีวี-

รอไซด์ไม่เกิดการสลายตัวน้ำหนักที่ได้คงที่ (Martha และ Susan, 1983) แสดงว่าสตีวีรอไซด์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูง



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสตีวีรอไซด์

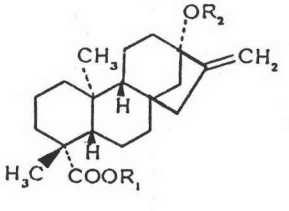
<u>สารให้ความหวานในหญ้าหวาน</u>

สารให้ความหวานในหญ้าหวาน เป็นสารประเภท diterpene glycoside ให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครส 150-300 เท่า ประกอบขึ้นด้วยองค์ประกอบทางเคมีทั้งสิ้น 8 ชนิด คือ Stevioside Rebaudioside A ถึง E Dulcoside A และ Steviolbioside โดยรวมกันเรียกชื่อในทางการค้าว่า "stevioside" สารที่มีอยู่เป็นปริมาณมากที่สุดคือ Stevioside มีประมาณ 3-8% ของน้ำหนักแห้งของใบหญ้าหวาน รองลงมาคือ Rebaudioside มีประมาณ 1% ส่วน Dulcoside มีประมาณ 0.2% (Bridel และ Lavieille, 1973) ลักษณะโครงสร้างของ diterpene glycoside ในหญ้าหวาน และผลิตผลของการ hydrolysis diterpene glycoside แสดงไว้ดังตารางที่ 1

สารให้ความหวานในหญ้าหวานแต่ละชนิดนั้นมีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน ต่างกันตรงหมู่เคมี ที่มาเชื่อมที่ C_3 และ C_{13} ซึ่งอาจจะเป็น mono-, di-, หรือ triaccharides ที่ประกอบด้วย Glucose และ/หรือ Rhamnose Residue ทำให้สารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติ เช่นความหวาน, จุดหลอมเหลว, Infrared Spectrum หรือ Polarity แตกต่างกัน (Back, 1974)

ตารางที่ 1 โครงสร้างทางเคมทั่วไปของสารให้ความหวานที่มีอยู่ในหญ้าหวาน

Diterpene	R_1	R_2	Sweetening potency sucrose = 1
Stevioside	B-Glu	B-Glu-B-Glu	250 - 300
Rebaudioside A	B-Glu	B-Glu-B-Glu | B-Glu	350 - 450
Rebaudioside B	-H	B-Glu-B-Glu | B-Glu	300 - 350
Rebaudioside C	B-Glu	B-Glu-∝-Rha | B-Glu	50 - 120
Rebaudioside D	B-Glu- B-Glu(2-1)	B-Glu B-Glu-B-Glu B-Glu	200 - 300
Rebaudioside E	B-Glu-B- Glu(2-1)	B-Glu-B-Glu	250 - 300
Dulcoside A	B-Glu	B-Glu-∝-Rha	50 - 120
Steviolbioside	-H	B-Clu-B-Glu	100 - 125



Glu = Glucose

Rha = Rhamnose

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ของหญ้าหวาน

สตีวีรอไซด์เป็นสารที่ให้ความหวานสูง รสหวานจากหญ้าหวานมีคุณสมบัติช่วยทำให้รสชาติของสารหวานสังเคราะห์ชนิดอื่นดีขึ้น ในขณะเดียวกันก็สามารถใช้ร่วมกับน้ำตาลชนิดอื่น เช่น ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส นอกจากนี้ยังไม่ทำให้สารชูรสอื่น เช่น เกลือ ผงชูรส น้ำส้ม เมนธอล มีรสชาติเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมโดยกลมกลืนกันได้ดี (Kim และ Lee, 1979) สตีวีรอไซด์มีคุณลักษณะที่เหมาะสมในการประกอบอาหาร เช่นไม่ทำให้อาหารหรือสารผสมเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลคล้ำเมื่อถูกความร้อน ไม่ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์จึงไม่ทำให้อาหารหรือเครื่องดื่มเกิดการบูดเน่า และช่วยยับยั้งโรคฟันผุได้ มีการทดลองผลของสตีวีรอไซด์ต่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ พบว่าสารนี้มีฤทธิ์เป็นกรดมากกว่าน้ำตาลสามารถยังยั้งแบคทีเรีย (Streptococcus mutans และ Lactobacillus plantarum จึงเหมาะสมที่จะใช้ผสมในขนมหวาน (Berry และ Harry, 1981) จากคุณสมบัติที่มีความคงตัวต่อความร้อนและกรดสูง จึงเหมาะสมในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม อาหาร ยา เครื่องดื่ม โดยเป็นที่ยอมรับในการใช้บริโภคเชิงพาณิชย์ในประเทศญี่ปุ่นมานานกว่า 20 ปี สามารถนำสตีวีรอไซด์ไปผสมผลิตภัณฑ์อาหารมากมายหลายชนิดเช่น ซอส ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว มายองเนส ผงกะหรี่ แป้งเทมปุระ อาหารหวานแช่แข็ง อาหารทะเลที่ถนอมแห้งไว้ แม้แต่ของหมักดองที่มีรสเค็ม จะเป็นการดองระยะยาวหรือสั้นก็ตามช่วยรักษากลิ่นของดองและทำให้รสกลมกล่อมยิ่งขึ้น ปรุงรสในเครื่องดื่ม เช่นน้ำผลไม้ น้ำอัดลม อาหารว่าง เช่นไอสครีม แยม เยลลี่ ลูกกวาด และหมากฝรั่ง นอกจากอุตสาหกรรมอาหารแล้วมีผู้นำไปใช้ในการผลิตยาสีฟัน ยาบ้วนปาก สหรัฐอเมริกาใช้สตีวีรอไซด์ผสมในบุหรี่ทำให้มีรสกลมกล่อมถูกใจผู้สูบ สตีวีรอไซด์เป็นสารหวานที่ไม่ให้พลังงานต่อร่างกาย ในทางการแพทย์จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้กับผู้ที่เป็นโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ ไขมันในเลือดสูง ข้อเสื่อม พันผุ และโรคอ้วน ในประเทศบราซิลได้อนุญาตให้ใช้หญ้าหวานในรูปยาชงและแคปซูล มาตั้งแต่ปี 1980 ในฮ่องกงใช้ใบแห้งผสมกับชาผงช่วยเสริมรสชาให้ดีขึ้น ในประเทศไทยมีการใช้หญ้าหวานในรูปแบบของพืชสมุนไพร ชาเพื่อสุขภาพ หรือใช้ปรุงแต่งรสร่วมกับพืชสมุนไพรตัวอื่นเช่น ใช้ปรุงแต่งรสร่วมกับมินต์หรือสะระแหน่

ฝรั่งช่วยลดอาการท้องอืดเนื่องจากไม่มีน้ำตาลและเพิ่มรสกลมกล่อม ใช้ร่วมกับคำฝอยชงดื่ม เพื่อลดอาการคลื่นไส้อาเจียจากรสของกรดลิโนลิอิก (เวฬุรีย์, 2533) การใช้กับผู้ป่วยที่มีโรคที่ต้องจำกัดการใช้น้ำตาล ได้ผลดีมากในการลดการใช้ปริมาณน้ำตาลลง ตั้งแต่ พ.ศ.2527 โรงพยาบาลรามาธิบดีได้ใช้ชา หญ้าหวานกับผู้ป่วยโรคอ้วน ไขข้อกระดูกเสื่อม เบาหวาน ไขมันในเลือด พบว่าได้ผลดีมาก (วีระสิงห์, 2533)

<u>ความปลอดภัยของหญ้าหวาน</u>

การบริโภคหญ้าหวานมีมานานกว่าศตวรรษแล้ว โดยชาวพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ยังไม่มีรายงานว่าเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคแต่ประการใด จากการศึกษาวิจัยจากอดีตถึงปัจจุบัน พบว่าสารหวานจากหญ้าหวานสามารถใช้แทนน้ำตาลได้ ไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย การรายงานความปลอดภัยแยกตามหัวข้อ ดังต่อไปนี้

ก. ความเป็นพิษเฉียบพลัน การเกิดพิษอย่างเฉียบพลันของสารหวานจากหญ้าหวาน จะมีค่าแตกต่างกันไปตามความบริสุทธ์ของสาร ชนิดของสัตว์ทดลองและการได้รับสารเข้าสู่ร่างกาย สตีวีรอไซด์ทำให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันได้เมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ช่องท้อง ใต้ผิวหนัง แต่ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันเมื่อให้ทางปากแก่หนูถีบจักรและหนูพุกขาว

ข. ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันโดยให้สตีวีรอไซด์ปริมาณ 100, 500 และ 2,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันกับหนูแรทเป็นเวลาหนึ่งเดือน การตรวจคุณสมบัติทางเคมีของเลือด ซีรัม บัสสาวะ การตรวจอวัยวะภายในและทางพยาธิวิทยา ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ที่คิดว่าเกิดจากการชักนำของสารทดสอบ (Mitsuhashi, 1976)

ค. ความเป็นพิษระยะยาว การให้สตีวีรอไซด์กับหนูแรทเพศผู้และเพศเมียในปริมาณ 550 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 24 เดือน การตรวจสอบอาการทั่วไป การเจริญเติบโต การตรวจเลือด ซีรัม บัสสาวะ อวัยวะภายในทั้งหมดและการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาไม่พบความผิดปรกติและไม่ทำให้เกิดมะเร็ง (Tanaka,1982) ไม่มีผลต่อความดันโลหิต (Kinghorn และ Soejarto,

1985) ไม่มีผลต่อเม็ดเลือด (นพพรและคณะ, 2533) ไม่มีผลต่อกล้ามเนื้อ (อัมพวัน, 2533)

<u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช</u>

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชได้ เนื่องจากความสามารถของเซลล์พืชที่พร้อมจะมีการเจริญจากเซลล์ปกติที่เป็น vegetative cell ไปเป็น ต้นพืชที่สมบูรณ์ได้โดยมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระ เคมี กายวิภาค และทางด้านสัณฐานวิทยา เช่น การเกิดยอดและราก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการนำชิ้นส่วนของพืช เช่น เนื้อเยื่อ เซลล์หรือเซลล์ไร้ผนังมาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง ได้แก่อุณหภูมิ แสง ความชื้น (Murashige, 1974) การเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชมีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ คือ ปัจจัยภายในชิ้นส่วนพืชเอง ได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรม สารควบคุมการเจริญเติบโตในพืชชนิดและสภาพของเนื้อเยื่อ รวมถึงปัจจัยภายนอก ได้แก่ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ สภาวะในการเพาะเลี้ยง สารควบคุมการเจริญเติบโตในอาหารเพาะเลี้ยง การเกิดเป็นต้น รากหรือแคลลัสของพืชขึ้นอยู่กับความสมดุลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinin) ถ้าออกซินและไซโต-ไคนินมีอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสมจะเกิดการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (Skoog และ Miller, 1957)

กระบวนการในการพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จากเซลล์เพาะเลี้ยงเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ ออร์แกโนเจเนซิส (organogenesis) เป็นการเจริญและพัฒนาเป็นยอดหรือรากเกิดขึ้นเป็นอิสระไม่ขึ้นต่อกัน ขึ้นอยู่กับว่าจะได้รับการกระตุ้นให้เจริญไปในทิศทางใด ระบบยอดและรากอาจจะเชื่อมต่อกันหรือไม่เชื่อมต่อกันก็ได้ โดยการเจริญเป็นยอดหรือรากเกิดจากการรวมตัวของกลุ่มเซลล์พา-แรนไคมา พวก meristematic cell เป็นเซลล์มีขนาดเล็ก แวคิวโอล (vacuole) เล็กและไซโตพลาสซึมเข้มข้น ซึ่งจะเจริญไปเป็นจุดเริ่มต้นของยอด

หรือราก (Murashige และ Huang, 1985) อีกแบบหนึ่งเรียกว่า เอมบริโอเจเนซิส (embryogenesis) เป็นการเกิดยอดและรากโดยเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงผ่านขั้นตอนหลายขั้นตอน ตั้งแต่ระยะ preembryo, globular-shaped, heart-shaped, torpedo shaped จนกระทั่งเป็นคัพภะ (embryo) ลักษณะการพัฒนาไปเป็นยอดและราก จะเป็นแบบ bipolar คือ ปลายด้านหนึ่งจะเจริญไปเป็นยอดและอีกด้านหนึ่งจะเจริญไปเป็นราก ยอดและรากมีการเชื่อมต่อกันของท่อลำเลียงอย่างสมบูรณ์ (Dixon, 1987)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้รับความสำเร็จ และเจริญก้าวหน้าขึ้นอย่างรวดเร็วสามารถนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในด้านการปรับปรุงพันธุ์ การผลิตพืชปราศจากโรค การเก็บรักษารวบรวมพันธุ์ แลกเปลี่ยนพันธุ์พืชกับต่างประเทศ ตลอดจนการขยายพันธุ์พืช ซึ่งวิธีการนี้สามารถช่วยย่นระยะเวลาจากการเลี้ยงในธรรมชาติ ตัวอย่างเช่นการเลี้ยงกล้วยไม้ให้เจริญจนถึงระยะออกดอกในธรรมชาติใช้ระยะเวลา 3 ปีแต่สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ บนอาหารสูตร Knuds on ที่เสริมด้วย NAA ปริมาณ 0.5 มก./ล. ให้เจริญได้ภายในระยะเวลาเพียง 8-9 เดือน (Kerbauy, 1984) นอกจากนี้ยังประสบผลสำเร็จในพืชอีกหลายชนิด เช่นคาร์เนชั่น (Hackett และ Anderson, 1967) เยอบีรา (Pierik และคณะ, 1975) แกลดิโอลัส (Hussey, 1977) รวมถึงพืชในตระกูล Gramineae เช่น ข้าว (Oryza sativea) ข้าวโพด (Zea mays) (Tisserat, 1985)

<u>การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน</u>

มีรายงานว่ามีผู้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหญ้าหวาน ประสบความสำเร็จครั้งแรกตามผลงานของ Handro และคณะ (1977) โดยนำส่วนใบและลำต้นของหญ้าหวาน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีในอาหารที่เสริมด้วย 2,4-D 800 ไมโครกรัม/ล. และไซโตไคนิน (BA, Kinetin, Zeatin) 200 ไมโครกรัม/ล. แคลลัสมีการเจริญอย่างต่อเนื่องโดยไม่สูญเสียคุณสมบัติในการเจริญ และนำส่วนของลำต้นที่มีตาข้างมาเลี้ยงใน

อาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถเกิดการพัฒนาของตาข้าง และเกิดรากเป็นต้นสมบูรณ์ได้

Tamura และคณะ (1984) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และวิเคราะห์ปริมาณสารให้ความหวานในหญ้าหวานที่ขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศและขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด พบว่าลักษณะการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันโดยหญ้าหวานที่ขยายพันธุ์ โดยไม่ใช้เพศมีความผันแปรของปริมาณสารให้ความหวานต่ำกว่าต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดนอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดในอาหารสูตร LS ที่เสริมด้วย Kinetin ความเข้มข้นสูง (10 มก./ล.) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากได้ และทำการชักนำให้เกิดรากโดยเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย NAA (0.1 มก./ล.)

Miyagawa และคณะ (1985) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดในอาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วย NAA และ BAP ในที่มีแสง สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมพบว่าต้นหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยง มีจำนวนโครโมโซม (2n = 22) เท่ากับพืชดั้งเดิม

Ferreira และคณะ (1987) ทำการทดลองเลี้ยงส่วนใบอ่อนในอาหารสูตร LS ที่เสริมด้วย BA (2 มก./ล.) ในที่มีแสง และ NAA (2 มก./ล.) ร่วมกับ BA (2 มก./ล.) ในที่มืด พบว่าสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ จากนั้นทำการชักนำให้เกิดรากในอาหารที่เสริมด้วย IBA (0.1 มก./ล.)

Ferreira และ Handro (1988) ได้ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร LS ที่เสริมด้วย 2,4-D (0.5 มก./ล.), BA (0.5 มก./ล.) และ GA_3 (1.0 มก./ล.) แล้วทำการชักนำให้เกิดตาโดยย้ายมาเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย NAA (0.2 มก./ล.) ร่วมกับ kinetin (2.0 มก./ล.) จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากฮอร์โมน พบว่าสามารถเกิดเป็นต้นที่มีลักษณะปกติ

ในปี 1971 T. Sumida จากศูนย์วิจัยการเกษตร Hokkaido แห่งกระทรวงเกษตรและป่าไม้ประเทศญี่ปุ่นได้นำเอาเมล็ดพันธุ์หญ้าหวานจากประเทศบราซิลไปทดลองปลูกในประเทศญี่ปุ่นและกระจายไปที่เกาหลี จีน ไต้หวัน และประเทศอื่น ๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับประเทศไทยได้เริ่มปลูก

หญ้าหวานตั้งแต่ปี 1977 โดยรัฐบาลญี่ปุ่นได้ส่งนายเต อิชิยากิ มาเป็นหัวหน้าศูนย์วิจัยพืชประจำประเทศไทย ได้เริ่มทดลองปลูกครั้งแรกทางภาคใต้ที่อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา เนื่องจากฝนตกชุกทำให้ความหวานลดลงในปี 1978 ได้ทดลองปลูกใหม่ที่อำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย และขยายการปลูกไปที่จังหวัดอื่นทางแถบภาคเหนือ (วันเพ็ญ, 2525)

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อหาวิธีการ ชนิดของอาหาร ปัจจัยและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้สามารถผลิตต้นหญ้าหวานได้จำนวนมากในเวลาจำกัด

2. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสตีวีรอไซด์จากหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

<u>ขั้นตอนการวิจัยมีดังต่อไปนี้</u>

1. เพาะเลี้ยงต้นหญ้าหวานปลอดเชื้อ

2. หาชนิดของอาหาร ปัจจัยและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วนใบ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และชักนำให้คืนกลับเป็นต้นใหม่ (regeneration)

3. หาชนิดของอาหาร ปัจจัยและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอด ชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก (multiple shoot)

4. การชักนำให้เกิดรากจากต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

5. การวิเคราะห์หาปริมาณสตีวีรอไซด์จากหญ้าหวานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัส เทียบกับระดับของสารซึ่งสังเคราะห์ในพืชธรรมชาติ