



การผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช

โดย

นางสาววิกานดา โสขุมา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช

โดย

นางสาววิกานดา โสขุมา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**PRODUCTION OF INULIN FROM JERUSALEM ARTICHOKE (*HELIANTHUS
TUBEROSUS* L.) BY PLANT CELL AND TISSUE CULTURE TECHNIQUES**

By

Miss Wikanda Sokhuma

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

Master of Science Program in BIOTECHNOLOGY

Department of Biotechnology

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2011

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “การผลิตอินนูลินจาก
แก่นตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช” เสนอโดย นางสาววิภาดา โสขุมมา
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ชารัทสนวงศ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์
3. อาจารย์ ดร.สุวัฒนา พุกกะศรี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม)
...../...../.....

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สันศักดิ์ วิเชียรโชติ)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา)
...../...../.....

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุวัฒนา พุกกะศรี)
...../...../.....

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์)
...../...../.....

52401202 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ : อินนูลิน / แก่นตะวัน / การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ / แคลลัส

วิกานดา โสขมา : การผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา, ผศ.ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย และ ดร.สุวัฒนา พุกกะศรี. 97 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงแคลลัส ต้นราก และเซลล์แขวนลอยบนอาหารสูตร Murashige และ Skoog (MS) ควบคู่กับการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในสัดส่วนต่างๆ พบว่า ส่วนของแผ่นใบและลำต้นสามารถนำมาใช้เป็นชิ้นพืชวัตถุสำหรับชักนำแคลลัสและรากได้ ในขณะที่การชักนำให้เกิดต้นนั้นสามารถชักนำได้จากส่วนของลำต้นเท่านั้น โดยอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MSC 1 (MS ที่เสริม BA 1 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล.) MSS 1 (MS ที่เสริม NAA 0.5 มก./ล. และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) และ MSR 3 (1/2MS ที่เสริม NAA 0.5 มก./ล. และ IBA 1.0 มก./ล.) สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส ต้นราก และรากได้ดีที่สุด ตามลำดับ เมื่อนำแคลลัสที่ชักนำได้มาเพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอย พบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกสูตรมีการเจริญเพิ่มขึ้น และจากการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในรูปของน้ำตาลนอนรีดิซในสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงพืชทุกรูปแบบ พบว่า แคลลัสที่ชักนำจากส่วนของลำต้นบนอาหารสูตรที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ให้ปริมาณอินนูลินสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นและยังมีปริมาณอินนูลินที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในรูปแบบอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของ HPLC ของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในรูปแบบต่างๆ กับสารสกัดจากหัวที่ปลูกในธรรมชาติ พบว่า แคลลัส ต้นราก และเซลล์แขวนลอยที่ชักนำได้สามารถผลิตอินนูลินได้เช่นเดียวกันกับหัวที่ปลูกในธรรมชาติ นอกจากนี้สารสกัดที่ได้จากแคลลัสและรากที่ชักนำยังได้แสดงคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกโดยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกด้วย

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 1.....2.....3.....

52401202 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS : INULIN / JERUSALEM ARTICHOKE / TISSUE CULTURE / CALLUS.

WIKANDA SOKHUMA : PRODUCTION OF INULIN FROM JERUSALEM
ARTICHOKE (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) BY PLANT CELL AND TISSUE CULTURE
TECHNIQUES. THESIS ADVISORS : ASST. PROF. BUDSARAPORN NGAMPANYA, Ph.D.,
ASST. PROF. PHIMCHANOK JATURAPIREE, Dr.nat.techn. AND SUWATTANA
PRUKSASRI, Ph.D. 97 pp.

The objective of this research was to produce inulin from Jerusalem artichoke by culturing calli, shoots, roots and suspended cells on Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with various combinations of plant growth regulators. Leaf blade and nodal stem segments were able to use as explants for induction of callus and root while shoot were only induced from nodal stem segments. The highest induction of callus, shoot and root were found when explants were cultured on MSC 1 (MS supplemented with 1 mg/l BA and 1 mg/l NAA), MSS 1 (MS supplemented with 0.5 mg/l NAA and 15% (v/v) coconut water) and MSR 3 medium (1/2MS supplemented with 0.5 mg/l NAA and 1 mg/l IBA) in respectively. When induced calli were cultured as suspended cells, the growth of plant cells in all culture media were increasing. The analysis of inulin contents as non-reducing sugar in extracts from all plant culture types showed the calli derived from nodal stem segments cultured on MS supplemented with 1 mg/l BA and 1 mg/l IAA gave the highest amount of inulin when compared with others. In addition, the amount of inulin detected in calli was also higher than the amount of inulin in the other type of cultures. The comparison of HPLC chromatograms of the extracts obtained from all plant culture types with the extract from naturally grown tuber indicated that induced calli, shoots, roots and suspended cells were able to produce inulin as same as found in tuber grown in nature. Moreover, the extracts from induced calli and roots also showed prebiotic properties by promoting the growth of prebiotic bacteria.

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2011
Student's signature.....
Thesis Advisors' signature 1.....2.....3.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนสำเร็จสมบูรณ์ และประสบผลสำเร็จไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุวัฒนา พุกษะศรี ผศ.ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ ดร.สินธุวัฒน์ ฤทธิธรรม และ ดร.สันทัต วิเชียรโชติ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบและให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้มีพระคุณทุกท่าน และครูอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้กับผู้วิจัยทั้งในอดีตและปัจจุบัน

ขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
ขอบเขตของการศึกษา.....	2
ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
แก่นตะวัน.....	4
อินนูลิน (inulin).....	6
การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture).....	8
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	14
สารเคมีและอุปกรณ์.....	14
วิธีการทดลอง.....	17
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	24
5 สรุปผลการทดลอง.....	67
บรรณานุกรม.....	69
ภาคผนวก.....	73
ภาคผนวก ก.....	73
ภาคผนวก ข.....	78
ภาคผนวก ค.....	92
ประวัติผู้วิจัย	97

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณอินนูลิน (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด) ในพืชอาหาร	5
2	สูตรอาหารชักนำและเพาะเลี้ยงเซลล์	18
3	สูตรอาหารสำหรับชักนำและเพาะเลี้ยงต้น	19
4	สูตรอาหารสำหรับชักนำและเพาะเลี้ยงราก	19
5	สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย	20
6	ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ที่ชักนำจากเนื้อเยื่อแผ่นใบและลำต้น แก่นตะวันบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	27
7	น้ำหนักสดของเซลล์ที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่นตะวัน บนอาหารวุ้นสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน	28
8	จำนวนต้นและความยาวเฉลี่ยของต้นที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้นแก่นตะวัน บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	31
9	น้ำหนักสดของต้นที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงข้อลำต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้น สูตร MSS1 MSS2 และ MSC3 หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน	32
10	น้ำหนักสดของรากที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่นตะวันบน อาหารวุ้นสูตร MSR1 MSR2 MSR3 MSR4 และ MSR5 หลังการเพาะ เลี้ยง 45 วัน	35
11	ปริมาณ non-reducing sugar ของสารสกัดจากเซลล์ที่ชักนำได้จากการเพาะ เลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 นาน 30 วัน	37
12	ค่า Retention time ของสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	39
13	สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเซลล์ที่ชักนำจากแผ่น ใบแก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC	42
14	สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเซลล์ที่ชักนำจากลำต้น แก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC	43
15	ปริมาณ non-reducing sugar ในสารสกัดจากต้นที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยง แผ่นใบและลำต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร MSS1 MSS2 และ MSS3 นาน 30 วัน	44

ตารางที่		หน้า
16	สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากต้นที่ชักนำจากข้อลำต้น แก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC	46
17	ปริมาณ non-reducing sugar ของสารสกัดจากรากที่ชักนำได้จากแผ่นใบและ ลำต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร MSR1 MSR2 MSR3 MSR4 และ MSR5 นาน 45 วัน.....	47
18	สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากรากที่ชักนำจากแผ่นใบ แก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC	51
19	สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากรากที่ชักนำจากลำต้น แก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC	52
20	สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน ระยะเวลา 1 สัปดาห์บนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC	58
21	สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน ระยะเวลา 2 สัปดาห์บนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC	59
22	สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน ระยะเวลา 3 สัปดาห์บนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC	60
23	สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน ระยะเวลา 4 สัปดาห์บนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC	61
24	องค์ประกอบของสารสกัดจากแคลลัสและรากที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง และห้วสดแก่นตะวันจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC	63
25	สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Murashige และ Skoog 1962 (MS).....	74
26	ปริมาณน้ำหนัสดของแคลลัสแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	79
27	ปริมาณน้ำหนัสดของต้นแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	79
28	ปริมาณน้ำหนัสดของรากแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	80
29	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคส ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร	81
30	ปริมาณ Reducing sugar ของแคลลัสแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	82
31	ปริมาณ Reducing sugar ของต้นแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	83
32	ปริมาณ Reducing sugar ของรากแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	84
33	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคส ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร	86
34	ปริมาณ Total sugar ของแคลลัสแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	87

ตารางที่		หน้า
35	ปริมาณ Total sugar ของต้นแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	88
36	ปริมาณ Total sugar ของรากแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	88
37	ปริมาณ Non-reducing sugar ของแคลลัสแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.....	90
38	ปริมาณ Non-reducing sugar ของต้นแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	90
39	ปริมาณ Non-reducing sugar ของรากแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช	91
40	ชนิดของน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้ในสารสกัดหัวสดแก่นตะวัน โดยใช้ HPLC.....	93
41	ค่า pH ของอาหาร MRS ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Bifidobacterium sp.</i> ในเวลาต่าง ๆ.....	94
42	ปริมาณ <i>Bifidobacterium sp.</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในเวลาที่เปลี่ยนไป	95
43	น้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในเวลาที่เปลี่ยนไป	95
44	น้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในเวลาที่เปลี่ยนไป	96

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ต้นแก่นตะวัน	4
2	โครงสร้างของอินนูลิน	6
3	ผลของอัตราส่วนระหว่างออกซินกับไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพและ การเกิดสัณฐานของพืช	10
4	แก่นตะวันอายุ 1 เดือน	17
5	ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์	25
6	ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์	26
7	ลักษณะของต้นที่ชักนำจากข้อลำต้นที่มีตาข้างของต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้น MSS1 MSS2 และ MSS3 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์	30
8	ลักษณะแผ่นใบในการชักนำให้เกิดต้นที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์	31
9	ลักษณะของรากที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้นของแก่นตะวันบนอาหารวุ้น MSR1 MSR2 MSR3 MSR4 และ MSR5 หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน ..	34
10	น้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 เป็นเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์	36
11	โครมาโตแกรมของน้ำตาลมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC	38
12	โครมาโตแกรมของสารสกัดแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบแก่นตะวันบนอาหาร สูตรต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC	40
13	โครมาโตแกรมของสารสกัดแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นแก่นตะวันบนอาหาร สูตรต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC	41
14	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากต้นที่ชักนำจากข้อลำต้นแก่นตะวันบนอาหาร สูตรต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC	45
15	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากรากที่ชักนำจากแผ่นใบแก่นตะวันบนอาหาร สูตรต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC	49
16	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากรากที่ชักนำจากข้อลำต้นแก่นตะวันบนอาหาร สูตรต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC	50

ภาพที่		หน้า
17	ปริมาณ non-reducing sugar ของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว สูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 เป็นเวลา 4 สัปดาห์	53
18	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MSC1 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC	54
19	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MSC2 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC	55
20	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MSC3 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC	56
21	โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MSC4 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC	57
22	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรวม น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า pH และปริมาณเซลล์ <i>Bifidobacterium sp.</i> ในอาหาร MRS ที่มีการเสริมสารสกัดจากแคลลัส ราก และหัวสด ให้มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากัน.....	65
23	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 550 nm	81
24	ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 480 nm	86
25	โครมาโตแกรมของสารสกัดหัวสดแก่นตะวัน	93
26	กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Bifidobacterium sp.</i>	94

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อินนูลิน (inulin) เป็นสารใยอาหารที่ให้ความหวาน จัดเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotics) ชนิดหนึ่งที่ไม่ถูกย่อยในกระเพาะอาหารของมนุษย์ แต่มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดดีในลำไส้ใหญ่กลุ่ม *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* (Hidaka และคณะ 1986) กระตุ้นการหลั่งของน้ำดี ลดความเสี่ยงของการเป็นโรคเบาหวาน ลดไขมันในเลือด และช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย โดยอินนูลินสามารถพบได้ในพืชผักผลไม้หลายชนิด รวมทั้งในแก่นตะวัน (Jerusalem artichoke) ก็เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีการสะสมอินนูลินอยู่ในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น โดยจะพบในส่วนหัว (tuber) ของพืชชนิดนี้มากถึง 14-19 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด ในประเทศไทยเริ่มมีการปลูกพืชชนิดนี้อย่างแพร่หลายและได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะสามารถปรับตัวได้ดี สามารถปลูกได้ทุกฤดูกาล และให้ผลผลิตสูง (สนั่น และคณะ 2549) จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับแก่นตะวันที่น่าสนใจมาปลูกในประเทศไทยในแง่มุมต่างๆ มากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานและกายวิภาคของแก่นตะวันที่ปลูกในประเทศไทย (สุภารัตน์ และคณะ 2551) การศึกษาถึงอิทธิพลของธาตุอาหารต่อผลผลิตและคุณภาพของแก่นตะวัน (ภิเชษฐ์ และเพิ่มพูน 2551) การศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการผลิตแก่นตะวันเพื่อการผลิตเอทานอล (วิสุทธิ และคณะ 2550) การเปลี่ยนแปลงปริมาณอินนูลินของหัวแก่นตะวันที่เกี่ยวข้องกับอายุและระยะเวลาต่างๆ และผลของวิธีการสกัดต่างๆ เพื่อผลิตอินนูลินในรูปผง (Srikhampa และ Uriyapongson 2008) การนำอินนูลินจากแก่นตะวันไปเสริมในอาหารสุกรเพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกร (ศุภวันจักรี และ สมชัย 2546) การใช้แก่นตะวันเป็นสารทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อศึกษาผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและชีวภาพของระบบลำไส้เล็กและใหญ่ในลูกสุกร (พิภพ 2546) จากการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่า อินนูลินได้เข้ามามีบทบาทต่ออุตสาหกรรมต่างๆ มากขึ้น ประเทศไทยซึ่งมีการผลิตได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการจึงได้มีการสั่งซื้อสารประเภทพรีไบโอติกชนิดนี้จากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ซึ่งสารดังกล่าวมีราคาแพง แก่นตะวันจึงเป็นพืชวัตถุดิบที่มีการส่งเสริมให้ปลูกเพิ่มมากขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการของอุตสาหกรรมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ อย่างไรก็ตาม ผลผลิตของแก่นตะวันที่ปลูกในแปลงปลูกตามธรรมชาติมักแปรผันไปตามปัจจัยต่างๆ เช่น สภาพภูมิอากาศ ภูมิประเทศ สภาพะในการเพาะปลูก

พันธุ์ที่ใช้ ตลอดจนการรบกวนของโรคและแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะปัญหาโรคโคนเน่าและหัวเน่า นั้น ทำให้ได้ผลผลิตแก่ต้นต่ำกว่าที่ควรจะได้รับ ดังนั้น การหาแนวทางการผลิตอื่นที่สามารถ ควบคุมปริมาณและคุณภาพแก่ต้นได้ จึงน่าจะให้ผลที่ดีกว่าการปลูกในสภาพธรรมชาติ โดย เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช (plant cell and tissue culture) ในหลอดทดลองก็เป็นอีก วิธีหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชและผลิตสารที่มีมูลค่าจากพืชได้ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ เทคนิคดังกล่าวนี้อย่างแพร่หลายในพืชหลายชนิด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการผลิต อินนูลินจากแก่ต้นด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช (แคลลัสและเซลล์แขวนลอย) และอวัยวะพืช (ต้นและราก) เพราะเทคนิคนี้จะทำให้ควบคุมคุณภาพและสามารถปรับเปลี่ยน สภาพที่กระตุ้นให้เซลล์พืชผลิตสารได้มากขึ้นได้ ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนและพื้นที่ในการ เพาะปลูกลง จึงน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้การผลิตอินนูลินจากแก่ต้นให้มีปริมาณ สูงขึ้นหรือใกล้เคียงกับการผลิตสารดังกล่าวจากต้นที่ปลูกในแปลงเพาะปลูกตามธรรมชาติ ผลที่ได้ จากการวิจัยนี้น่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเพิ่มศักยภาพการผลิตอินนูลินของประเทศได้อีก ทางหนึ่ง และยังเป็นทางเลือกการพึ่งพาการนำเข้าจากต่างประเทศด้วย

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อเพิ่มแนวทางการผลิตอินนูลินจากแก่ต้นโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืช ตลอดจนทดสอบคุณสมบัติด้านความเป็นสารพรีไบโอติกของอินนูลินที่ผลิตได้

ขอบเขตของการศึกษา

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้ชิ้นพืชเกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์และเนื้อเยื่อพืช (แคลลัสและเซลล์แขวนลอย) และอวัยวะพืช (ต้นและราก) ที่ให้ปริมาณอินนูลินสูงสุด
2. สกัดและหาปริมาณอินนูลินจากเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชที่ชักนำได้
3. เปรียบเทียบปริมาณอินนูลินที่ผลิตได้จากเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองกับปริมาณอินนูลินที่ผลิตได้จากหัวของแก่ต้นที่ได้จากแปลงปลูกตามธรรมชาติ
4. ทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของอินนูลินที่ผลิตได้จากเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชที่ชักนำจากการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และอวัยวะพืช

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบแนวทางการผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และ
อวัยวะพืช เพื่อนำไปสู่การพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตอินนูลินที่สามารถควบคุมปริมาณและ
คุณภาพได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. แก่นตะวัน

แก่นตะวัน (Jerusalem artichoke) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Helianthus tuberosus* L. ชื่อวงศ์คือ *Asteraceae* ชื่อที่เรียกเป็นภาษาไทยคือ หัวบัวตอง เนื่องจากเป็นพืชตระกูลเดียวกับทานตะวันและ มีดอกสีเหลืองคล้ายดอกบัวตอง แต่มีขนาดเล็กกว่า มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปอเมริกาเหนือ และได้มีการ นำมาปลูกในแถบทวีปยุโรปอย่างแพร่หลายในเขตหนาว เขตกึ่งหนาว และเขตร้อน สามารถปลูก และปรับตัวได้ดีในเขตร้อน มีความแข็งแกร่งทนทานต่อสภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกันมาก จึงให้ชื่อนำหน้าพืชนี้ว่า “แก่น” และเป็นพืชที่ใกล้ชิดกับทานตะวัน จึงให้ชื่อพืชชนิดนี้ว่า “แก่นตะวัน” (ภาพที่ 1)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพืชล้มลุก มีอายุ 4-6 เดือน เพาะปลูกในเขตร้อนได้ดี ลักษณะต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน ความสูงต้นประมาณ 1.5-2.0 เมตร อาจแตกแขนงหรือไม่แตกแขนงก็ได้ ใบจะเป็นใบเดี่ยว รูปหอก ขอบใบหยักมีขนคล้ายหนามกระจายทั่วใบและลำต้น จึงต้านทานต่อแมลงได้ดี ดอกเกิดเป็นช่อ กลีบดอกมีสีเหลืองคล้ายดอกบัวตอง ลักษณะหัวคล้ายหัวของขิงหรือข่า เปลือกสีน้ำตาลอ่อน เนื้อในสีขาว และกรอบคล้ายหัวเมื่อดิบ (สนั่น และคณะ 2549)



ภาพที่ 1 ต้นแก่นตะวัน

ที่มา : <http://th.wikipedia.org>

ส่วนหัว (tuber) สามารถใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร คาวและหวานหลายชนิด ใช้เป็นสารเชื่อมโยอาหารเพื่อสุขภาพ ใช้เสริมในอาหารสัตว์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต ลดจุลินทรีย์ที่เป็นโทษในระบบทางเดินอาหาร สร้างภูมิคุ้มกัน ทำให้ลดการใช้สารปฏิชีวนะและมูลสัตว์มีกลิ่นเหม็นน้อยลง (พิภพ 2546; ศุภวันจักรี และ สมชัย 2546) นอกจากนี้ยังใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ได้อีกด้วย (วิสุทธิ และคณะ 2550)

อินนูลิน (inulin) เป็นสารที่พบปริมาณสูงในส่วนหัวของพืชชนิดนี้ โดยอินนูลินจัดเป็นสารเชื่อมโยอาหารที่ให้ความหวาน ถือเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotics) ชนิดหนึ่งที่ไม่ถูกย่อยในกระเพาะอาหารของมนุษย์ แต่มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดดีในลำไส้ใหญ่ กลุ่ม *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* (Hidaka และคณะ 1986) กระตุ้นการหลั่งของน้ำดี ลดความเสี่ยงของการเป็นโรคเบาหวาน ลดไขมันในเลือด ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย โดยจะพบอินนูลินในพืชมากที่สุดถึง 36,000 ชนิด ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะมีอินนูลินในปริมาณที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณอินนูลิน (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด) ในพืชอาหาร (Van Loo และคณะ 1995)

แหล่ง	ส่วนที่ใช้กิน	ปริมาณ dry solids	ปริมาณอินนูลิน
onion	หัว	6.0-12.0	2.0-6.0
jerusalem artichoke	หัว	19.0-25.0	14.0-19.0
chicory	ราก	20.0-25.0	15.0-20.0
leek	หัว	15.0-20.0*	3.0-10.0
garlic	หัว	40.0-45.0*	9.0-16.0
artichoke	ใบ	14.0-16.0	3.0-10.0
banana	ผล	24.0-26.0	0.3-0.7
rye	เมล็ด	88.0-90.0	0.5-1.0*
barley	เมล็ด	ไม่ระบุ	0.5-1.5*
dandelion	ใบ	50.0-55.0*	12.0-15.0
burdock	ราก	21.0-25.0	3.5-4.0
camas	หัว	31.0-50.0	12.0-22.0
murmong	ราก	25.0-28.0	8.0-13.0
yacon	ราก	13.0-31.0	3.0-19.0
salsify	ราก	20.0-22.0	4.0-11.0

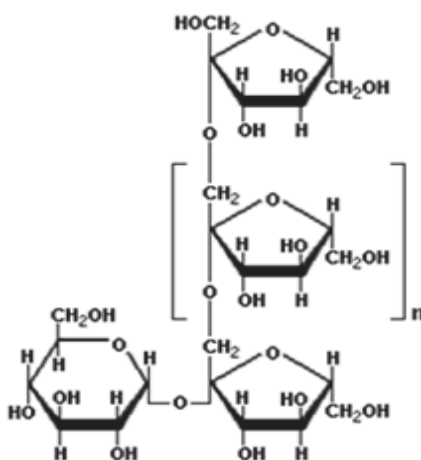
*ค่าโดยประมาณ

2. อินนูลิน (inulin)

2.1 โครงสร้างของอินนูลิน

อินนูลินเป็นใยอาหารชนิดหนึ่ง จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหาร ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1804 โดย Rose นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน ซึ่งได้ทำการแยกสารที่มีคุณสมบัติเฉพาะจากพืชได้เป็นครั้งแรก โดยการสกัดด้วยกระบวนการต้มจากพืช *Inula helenium* และต่อมาในปี ค.ศ. 1818 สารที่มีคุณสมบัติเฉพาะดังกล่าว นั้นถูกตั้งชื่อว่า อินนูลิน โดย Thomson

อินนูลินประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสหลายโมเลกุลต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β -2,1 ไม่มีกิ่งก้านสาขา ประกอบด้วย 1 โมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่บริเวณปลายของโครงสร้างโมเลกุล จับกับน้ำตาลฟรุกโตสหลายโมเลกุลด้วยพันธะ α -2, 1 โครงสร้างพื้นฐานของอินนูลินที่มีสายสั้นที่สุด คือ 1-kestose (1-kestose) ความยาวของโมเลกุลน้ำตาลฟรุกโตสส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 2-60 โมเลกุล (degree of polymerization, DP) สูตรทั่วไปที่ใช้เขียนแทนโครงสร้างของอินนูลินคือ GF_n โดย G หมายถึง กลูโคส F หมายถึง ฟรุกโตส และ n หมายถึง จำนวนโมเลกุลของฟรุกโตสที่ต่อกัน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของอินนูลิน

ที่มา : <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates1.html>

อินนูลินสามารถสังเคราะห์ได้โดยใช้น้ำตาลซูโครส (sucrose) เป็นสารตั้งต้น (substrate) ในการสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยา transfructosylation ด้วยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม β -fructosidase เมื่ออินนูลินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ inulinase จะทำให้ความยาวของสายโซ่ฟรุกโตสลด

สั้นลง เรียกว่า fructooligosaccharides (FOS) ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลน้ำตาลฟรุคโตสประมาณ 2-10 โมเลกุล (Niness 1999)

2.2 ประโยชน์ของอินนูลิน

1) ใช้เป็นสารพรีไบโอติกเพิ่มภูมิคุ้มกันโรค

ในปี 1995 อินนูลินถูกจัดเป็นพรีไบโอติกตามนิยามของ Gibson และ Roberfroid หมายถึง ส่วนประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในระบบทางเดินอาหารตอนบน แต่จะมีผลในการเพิ่มปริมาณและการทำงานของแบคทีเรียชนิดเฉพาะเจาะจงที่มีอยู่ตามปกติในลำไส้ใหญ่ เช่น *Bifidobacteria spp.* และ *Lactobacilli spp.* และส่งผลดีต่อสุขภาพ สามารถลดปริมาณหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นโทษ เช่น *Clostridium spp.*, *Salmonella* และ *Escherichia coli* เป็นต้น (Kolida และคณะ 2002)

2) เพิ่มปริมาณการดูดซึมแคลเซียมในร่างกาย

เมื่ออินนูลินถูกย่อยจะเกิดกรดไขมันชนิดสายสั้น (short-chain fatty acid (SCFA)) ได้แก่ acetate propionate และ butyrate รวมถึงก๊าซต่างๆ ขึ้น ส่งผลให้ระดับ pH ของลำไส้ลดลง และยังมีผลไปกระตุ้นให้เกิดการแสดงออก (express) ของโปรตีน calbindin-D9k ในการเกิดกระบวนการ calcium transport ส่งผลให้ร่างกายเกิดการดูดซึมแร่ธาตุได้มากขึ้น (Scholz-Ahrens และคณะ 2001)

3) ช่วยลดคลอเรสเตอรอล ไขมันในเลือด และลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ

กรดไขมันชนิดสายสั้นโดยเฉพาะ propionate ที่ได้จากการย่อยอินนูลินจะมีผลไปยับยั้งเอนไซม์ hydroxyl-methylglutaryl CoA (HMGCoA) ที่จำเป็นในการสังเคราะห์คลอเรสเตอรอล จึงทำให้ลดกระบวนการสร้างคลอเรสเตอรอลลงได้ และยับยั้งกระบวนการเปลี่ยน methyl malonyl CoA ไปเป็น succinyl CoA ซึ่งสามารถยับยั้ง pyruvate caboxylase ทำให้การสร้างกลูโคสลดลง (Kaur และ Gupta 2002)

4) ช่วยลดความอ้วนและลดความเสี่ยงโรคเบาหวาน

อินนูลินถูกจัดว่าเป็นอาหารเยื่อใย ซึ่งจะไม่ถูกย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ดังนั้น เมื่อกินอินนูลินเข้าไปจึงไม่ทำให้พลังงาน (Farnworth 1993) อาหารลักษณะนี้จัดเป็น low-glycaemic food โดยอาหารจะอยู่ในระบบทางเดินอาหารเป็นเวลานาน จึงทำให้ไม่มีความรู้สึกหิว กินอาหารได้น้อยลง จึงทำให้ไม่เป็นโรคอ้วน นอกจากนั้น การเกิดเมตาบอลิซึมยังเป็นไปอย่างช้าๆ ทำให้น้ำตาลในเลือดต่ำ และสม่ำเสมอ ส่งผลให้ร่างกายหลั่งอินซูลิน (insulin) ออกมาในปริมาณน้อยๆ สม่ำเสมอ ดับอ่อนจึงไม่เกิดความเครียดจากการทำงาน จึงลดความเสี่ยงของการเป็นโรคเบาหวานลง (Farnworth 1993)

2.3 อินนูลินจากแก่นตะวัน

จากประโยชน์ต่างๆ ของอินนูลิน ทำให้อินนูลินได้รับความสนใจและได้เข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ ซึ่งในกระบวนการผลิตต้องใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพ หาง่าย และมีปริมาณของสารอินนูลินในปริมาณที่สูง แหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจึงน่าจะมาจากพืช จากข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเปอร์เซ็นต์ของอินนูลินในแก่นตะวันกับพืชชนิดอื่นแล้วจะพบว่า พืชชนิดนี้ให้ปริมาณอินนูลินที่สูง จึงน่าจะเหมาะต่อการนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตอินนูลิน ทำให้มีการส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกพืชชนิดนี้เพิ่มขึ้นในประเทศไทย แต่แก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ อาจได้รับผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ เช่น สภาพภูมิอากาศ ภูมิประเทศ สภาพการเพาะปลูก สายพันธุ์ และโรคพืช เป็นต้น จากรายงานการวิจัยการปลูก Jerusalem artichoke จำนวน 6 สายพันธุ์ในช่วงระยะเวลาเดียวกันนาน 2 ปีของ Schorr-Galindo และ Guiraud (1997) พบว่า แต่ละสายพันธุ์ให้ผลผลิตหัวที่มีการสะสมอินนูลินในปริมาณที่แตกต่างกันและอินนูลินที่พบในแต่ละสายพันธุ์ก็มีความยาวสายโซ่ฟรุคโตสที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งเป็นตัวอย่างหนึ่งที่ชี้ให้เห็นว่า สายพันธุ์ที่ปลูกมีผลต่อชนิดและปริมาณของอินนูลินที่ได้ และยังพบอีกว่า ช่วงระยะเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตหัวก็มีผลต่อชนิดและปริมาณของอินนูลินที่ได้ด้วย โดยสายพันธุ์ที่ดีที่สุดให้ผลผลิตหัวสูงสุดเมื่อเก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน นอกจากนี้วิสุทธิ์ และคณะ (2550) ยังได้รายงานว่ แก่นตะวันที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดลพบุรีให้ผลผลิตหัวสดสูงกว่าแก่นตะวันที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดขอนแก่นเป็นสองเท่า ซึ่งลักษณะทางกายภาพและความอุดมสมบูรณ์ของดินก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความแปรผันของผลผลิตที่จะได้ และปัญหาการติดเชื้อรา *Sclerotium sp.* สาเหตุของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามาทับหัวพันธุ์ก็เป็นอีกผลกระทบหนึ่งที่ทำให้ได้ผลผลิตหัวสดแก่นตะวันลดลงเป็นอย่างมาก ดังนั้น การหาแนวทางในการผลิตอินนูลินที่ดีกว่าการปลูกในสภาพธรรมชาติจึงเป็นวิธีการที่น่าสนใจไม่น้อย โดยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture) ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจเพราะเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นเป็นระบบการผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงและยังสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่เพาะเลี้ยงผลิตสารทุติยภูมิได้ ซึ่งในนี้อาจนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันได้อีกทางหนึ่ง

3. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (plant tissue culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นศาสตร์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) สาขาหนึ่ง โดยนำเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของพืช ไม่ว่าจะเป็นเซลล์ที่เจริญเต็มที่ (mature cell) หรือเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (differentiated tissue)

มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) ที่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสม ซึ่งเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะพืชจะถูกชักนำให้มีการเจริญและแบ่งตัวเป็นแคลลัส (callus) หรือพัฒนาเป็นอวัยวะ (organ) ต่างๆ ได้ (รังสฤษฎ์ 2545)

3.1 ประเภทของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

เนื่องจากพืชประกอบด้วยอวัยวะต่างๆ ซึ่งแต่ละอวัยวะก็ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อหลายชนิด ดังนั้นการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองจึงแบ่งออกได้หลายชนิด คือ

- 1) การเพาะเลี้ยงพืชทั้งต้น คือการนำเอาเมล็ดไปเพาะในหลอดทดลองจนเป็นต้นกล้า และพืชสมบูรณ์ต่อไป
- 2) การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ คือการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอไม่ว่าแก่หรืออ่อนหลังจากที่แยกเอาส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดออกไปแล้ว
- 3) การเพาะเลี้ยงอวัยวะ คือ การเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ของอวัยวะพืชที่แยกออกมา เช่น ปลายยอด ปลายราก ดอก ผล อับเรณู
- 4) การเพาะเลี้ยงแคลลัส คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกิดใหม่จากการเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืช
- 5) การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ที่ได้มาจากแคลลัสในอาหารเหลวที่มีการเขย่าตลอดเวลา
- 6) การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์

3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

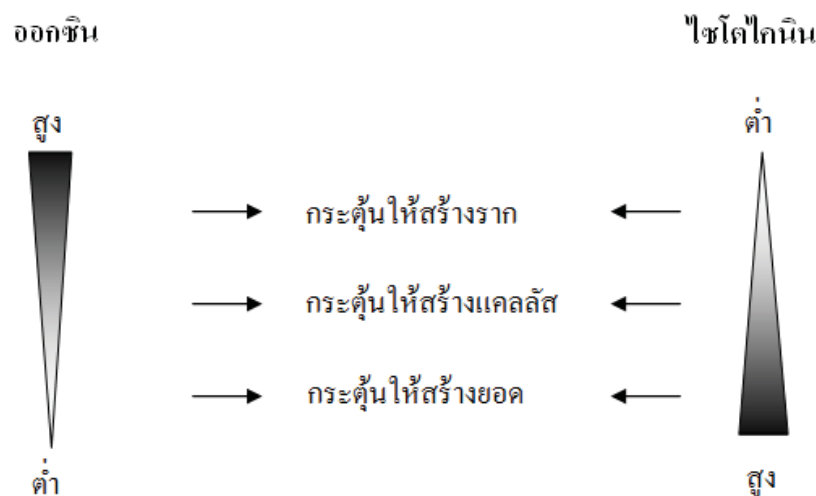
1) ปัจจัยทางด้านพืช ได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factor) และฮอร์โมน (hormones) โดยในพืชแต่ละชนิดจะมีพันธุกรรม ชนิดและระดับของฮอร์โมนภายในชิ้นส่วนของพืชแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช

2) ปัจจัยทางด้านเคมี ได้แก่ ธาตุอาหาร (nutrients) และสารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulators) ทั้งที่เกิดจากธรรมชาติและสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการเติบโตของพืช ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ ออกซิน (auxins) ไซโตไคนิน (cytokinin) จิบเบอเรลลิน (gibberellin) กรดแอบไซซิก (abscisic acid) และก๊าซเอทิลีน (ethylene gas)

- ออกซิน ทำหน้าที่ควบคุมการยึดตัวของเซลล์ การข่มตาข้าง (apical dominance) และการเกิดราก มีทั้งชนิดที่พบในต้นพืช และชนิดที่เป็นออกซินสังเคราะห์ ออกซินที่พบในพืชทั่วไป ได้แก่ indole-3-acetic acid (IAA) ส่วนออกซินสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ 1-naphthalene acetic acid (NAA) indole-3-butyric acid (IBA) และ 2,4-dichlorophenoxy acetic

acid (2,4-D) โดยวัตถุประสงค์ของการใช้ออกซินก็เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและเกิดราก และช่วยให้การเจริญของยอดเป็นไปได้ดี รวมทั้งเพื่อชักนำให้เกิด somatic embryogenesis และในการใช้เพื่อทำให้เกิดยอดมักใช้ควบคู่ไปกับไซโตไคนิน เป็นที่ทราบกันดีว่าในการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น อัตราส่วนความเข้มข้นของออกซินและไซโตไคนินที่สูงจะชักนำให้เกิดราก หากอัตราส่วนที่ต่ำจะชักนำให้เกิดยอด หากมีอัตราส่วนที่เท่ากันก็จะชักนำให้เกิดแคลลัส (ภาพที่ 3)

ผลของอัตราส่วนออกซิน : ไซโตไคนิน



ภาพที่ 3 ผลของอัตราส่วนระหว่างออกซินกับไซโตไคนินต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพและการเกิดต้นฐานของพืช (ดัดแปลงจาก บุษราภรณ์ 2547)

ออกซินที่เติมในอาหารจะใช้ความเข้มข้นน้อยมาก โดย IAA จะใช้ 0.01-10 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ถ้าเป็นสารสังเคราะห์ (IBA NAA และ 2, 4-D) จะใช้ 0.001-10 มิลลิกรัมต่อลิตร

- ไซโตไคนิน (cytokinin) เป็นสารที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการแตกตาข้างและชะลอการแก่ชรา ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมใช้สารสังเคราะห์ของไซโตไคนินมากกว่าชนิดที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ benzylaminopurine หรือ benzyladenine (BA) 6-furfurylaminopurine (Kinetin) และ thidiazuron ส่วนไซโตไคนินที่เป็นสารธรรมชาติและใช้กันอยู่ ได้แก่ N6-isopentenyladenine (2iP) ซึ่งเป็นไซโตไคนินที่ออกฤทธิ์มากที่สุดชนิดหนึ่ง ส่วน zeatin เป็นไซโตไคนินธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งที่มีราคาแพง จึงนิยมใช้ในงานวิจัยเท่านั้น ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะใช้เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการสร้างและเพิ่มจำนวนตา นอกจากนี้ไซโตไคนินยังมีผลยับยั้งการเกิดรากและยับยั้งการเกิดอเอ็มบริโอในกระบวนการ embryogenesis ด้วย ไซโตไคนินใช้เติมในอาหารสูงกว่า

ออกซินมาก ความเข้มข้นของไซโตไคนินที่นิยมใช้กันอยู่ในระหว่าง 1-10 มิลลิกรัมต่อลิตร (สิวพงศ์ 2546)

- จิบเบอเรลลิน (gibberellin) เป็นสารที่กระตุ้นการยืดตัวของลำต้น และกระตุ้นการออกดอกในธรรมชาติ ได้แก่ gibberellic acid (GA_3)

- กรดแอบไซซิก (abscisic acid) หรือเรียกย่อๆ ว่า “ABA” ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการปิดเปิดของปากใบ กระตุ้นการพักตัวของตาและเมล็ด

- เอทิลีน (ethylene) เป็นสารที่อยู่ในรูปของก๊าซ มีผลต่อการร่วงและการเสื่อมของส่วนต่างๆ ของพืช

สารควบคุมการเจริญเติบโตที่นิยมใช้กันมากมี 2 กลุ่ม ได้แก่ ไซโตไคนินและออกซิน โดยไซโตไคนินช่วยให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดยอด ส่วนออกซินช่วยให้เซลล์ยืดตัวและเกิดราก สารทั้งสองกลุ่มนี้จะมีปฏิกริยาร่วมกันและได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม เช่น แสงและอุณหภูมิ สิ่งที่สำคัญที่สุดคือ อาหารจะต้องมีอัตราส่วนและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่สุด สำหรับพืชแต่ละชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงอาจมีไซโตไคนินหรือออกซินอยู่ในเนื้อเยื่ออยู่แล้วจำนวนหนึ่ง หรือเนื้อเยื่อเหล่านี้สามารถสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตขึ้นมาเองก็ได้ ถ้าในชิ้นส่วนพืชมีสารควบคุมการเจริญเติบโตเหล่านี้อยู่เพียงพอแล้วก็ไม่จำเป็นต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตลงไปในการเพาะเลี้ยง การเจริญของชิ้นส่วนพืชในอาหารเพาะเลี้ยง อาจจะเจริญขึ้นมาโดยที่ไม่จำเป็นต้องมีออกซินหรือไซโตไคนิน หรืออาจจะต้องการออกซินหรือไซโตไคนินอย่างใดอย่างหนึ่ง หรืออาจจะต้องการทั้งออกซินและไซโตไคนินก็ได้

3) ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ นิยมใช้ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส แสงนิยมใช้ที่ 12-16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง (light intensity) ประมาณ 1000-4000 ลักซ์ และความชื้น (humidity) ซึ่งนิยมให้มีความชื้นอยู่ร้อยละ 70 ซึ่งเป็นความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช

3.3 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- การขยายพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะเวลาสั้น โดยเฉพาะพืชที่มีปัญหาด้านการเพาะปลูก

- การผลิตพืชปราศจากโรค

- การเก็บรักษาพันธุ์พืช โดยเฉพาะพืชที่หายากและมีคุณค่ากำลังจะสูญพันธุ์ไป หรือพืชบางชนิดที่ขยายพันธุ์ยาก

- การปรับปรุงพันธุ์พืชและสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (transgenic plants) ที่ต้องการ

- การผลิตยาและสารเคมีจากพืช โดยการปรับเปลี่ยนสูตรอาหาร สภาพแวดล้อม หรือการเติมสารตั้งต้น (precursors) ของขบวนการสังเคราะห์ (biosynthetic pathway) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์และเหนี่ยวนำเซลล์พืชให้เกิดความเครียด (stress) เป็นต้น

ข้อได้เปรียบของการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) มีหลายประการ ดังนี้

- 1) สามารถกำหนดและควบคุมสภาวะมาตรฐานในการเจริญเติบโตได้แน่นอน
- 2) ไม่มีการผันแปรทางสภาพภูมิอากาศและฤดูกาล
- 3) ใช้ระยะเวลาในการเพาะปลูกสั้น
- 4) สามารถควบคุมปริมาณการผลิตให้เหมาะสมกับความต้องการของตลาด
- 5) สามารถควบคุมคุณภาพของสารทุติยภูมิให้คงที่
- 6) การสกัดสารทุติยภูมิทำได้ง่ายกว่า ลดต้นทุนการผลิต

มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้กับแก่นตะวันเพื่อประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยการใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์เพื่อให้ได้ต้นปลอดเชื้อนั้นได้มีการศึกษากันมาตั้งแต่ปี 1999 โดย Gamburg และคณะ (1999) ซึ่งได้ศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลซูโครสและ BA ต่อการเกิดลำต้นสะสมอาหารของแก่นตะวันในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า แก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มี BA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ในสภาวะไร้แสงนั้นสามารถชักนำให้เกิดลำต้นสะสมอาหารได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสูตรที่มีน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์จะชักนำให้เกิดลำต้นสะสมอาหารในช่วง 10 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าชิ้นส่วนข้อที่ใช้ในการทดลองในข้อลำดับที่ 4 จากยอดมีเปอร์เซ็นต์การเกิดลำต้นสะสมอาหารมากกว่าข้อลำดับที่ 3 และ 2 ตามลำดับ และเมื่อนำออกปลูกจะต้องบ่มลำต้นสะสมอาหารในห้องเย็นอุณหภูมิ 2 ถึง 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานตั้งแต่ 4 ถึง 6 เดือนก่อนนำออกปลูก ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวเป็นความพยายามที่จะชักนำให้เกิดหัวสะสมอาหารในหลอดทดลอง สำหรับในประเทศไทยมีการขยายพันธุ์แก่นตะวันด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้ต้นปลอดเชื้อเพื่อลดปัญหาการขาดแคลนต้นพันธุ์และลดปัญหาการติดเชื้อโรคของหัวพันธุ์ โดยวิภาพรรณ (2550) ได้ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสและไคเนทินต่อการชักนำให้เกิดต้นของแก่นตะวันจำนวน 4 สายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า สูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคเนทินความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ สูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 8 เปอร์เซ็นต์เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้แก่นตะวัน 3 สายพันธุ์เกิดต้นได้ 20-40 และ 80-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคเนทินความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถ

ชักนำให้แก่นตะวันทั้ง 4 สายพันธุ์เกิดต้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นการแสดงให้เห็นถึงบทบาทของสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินชนิด โคนทินต่อการชักนำให้ขึ้นพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงเกิดต้นได้

ต่อมา ปิยะวัชร และ สุมนา (2553) ได้ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซิน และไซโตไคนินต่อการชักนำให้ใบอ่อนแก่นตะวัน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ JA 89 และ HEL 65 ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อให้พัฒนาเป็นแคลลัสและราก พบว่า สูตรอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA IBA IAA 2,4-D BAP Kinetin และ TDZ ที่ระดับความเข้มข้น 0 1 3 5 และ 7 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดย NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้ใบอ่อนแก่นตะวัน 2 สายพันธุ์เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด ส่วนการชักนำให้เกิดรากนั้นพบว่า IBA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้ใบอ่อนแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 89 เกิดรากได้ดีที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์ HEL 65 สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแก่นตะวันเพื่อผลิตอินูลินนั้นยังมีไม่มากนัก ปรากฏให้เห็นเพียงงานวิจัยของ Taha และคณะ (2007) ที่ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณอินูลินในต้นแก่นตะวัน (Jerusalem artichoke) ในสภาวะ *in vitro* โดยการนำส่วนของใบและส่วนของข้อลำต้น (nodal stem) จากต้นแก่นตะวันมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและกระตุ้นให้แคลลัสที่ชักนำได้ให้พัฒนาไปเป็นยอด ขณะเดียวกันก็ได้หากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ inulinase ในแคลลัสและยอดที่ชักนำได้ด้วย โดยพบว่า การเสริมสูตรอาหาร MS ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BAP ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ผลในการผลิตแคลลัสจากใบและข้อลำต้นได้ดีที่สุด ส่วนการเสริมสูตรอาหาร MS ด้วย NAA และ BAP ปริมาณ 0.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้แคลลัสที่ชักนำจากใบและข้อลำต้นเจริญพัฒนาไปเป็นยอดได้สูงที่สุด นอกจากนี้ยังตรวจพบค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ inulinase ในแคลลัสและยอดที่ชักนำได้ ซึ่งนำมาบ่งชี้ถึงความสามารถในการผลิตอินูลินของแคลลัสและยอดที่ชักนำได้โดยอ้อม

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Agar bacteriological	SCHARLAU CHEMIE
Ammonium nitrate	FLUKA
Benzyladenine (BA)	GIBCOBRL
Boric acid	MERCK
Calcium chloride dihydrate	ANALA R
Citrate	BDH ANALAR [®]
Copper (II) sulfate pentahydrate	MERCK
Dextrose	LAB M LIMITED
2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)	GIBCOBRL
3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)	FLUKA
Dipotassium hydrogen phosphate	UNIVAR
Ethanol	ALCOHOL-A
Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt	FLUKA
Ferrous sulphate heptahydrate	FLUKA
Fructose	FLUKA
Glucose	SIGMA
Glycine	GIBCO
Hydrochloric acid	LAB-SCAN
Indole-3-acetic acid (IAA)	SIGMA
Indole-3-butyric acid (IBA)	SIGMA
Inulin	FLUKA
Kinetin (KIN)	SIGMA
Magnesium sulphate heptahydrate	RIEDEL-DE HAEN

Manganese Sulfate	FLUKA
<i>myo</i> -inosital	SIGMA
Naphthalene acetic acid (NAA)	GIBCOBRL
Nicotinic acid	SIGMA
Peptone	LAB M LIMITED
Phenol	MERCK
Potassium dihydrogen phosphate	SIGMA
Potassium nitrate	RIEDEL-DE HAEN
Potassium sodium tartrate	RIEDEL-DE HAEN
Pyridoxine-HCl	GIBCOBRL
Sodium acetate	RIEDEL-DE HAEN
Sodium hydroxide	LAB-SCAN
Sodium hypochlorite (Clorox) 99.9%	COLOROX
Sodium molybdate dihydrate	CARLO ERBA
Sucrose	SIGMA
Sulfuric acid 95.5%	LAB-SCAN
Thiamine-HCl	SIGMA
Tween 20	SIGMA
Yeast extract	SCHARLAB S.L.
น้ำมะพร้าว	

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

Anaerobic jar	บริษัทผู้ผลิต ANAEROCULT [®]
Autoclave	TOMY SX-700
Auto pipette	BIOHIT, DENVILLE
Balance	SARTORIUS BASIC BA20015 PRECISA XT1200C
Culture bottles	
Cuvette	STARNA [®]

Cylinder	ISOLAB
Erlenmeyer flask	SCHOTT DURAN
Forcep	MIRA STAINLESS
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	SHIMADZU
Hot Oven	BINDER
Incubator	DAIHAN SCIENTIFIC CO., LTD.
Microplate reader	TECAN
Microwave	TUBORA TRX248G
pH meter	ULTRA BASIC
Rotary evaporator	BUCHI
Shaker	SUPER LINE : SP-KR
Spectrophotometer	BIOCHROM
Stereo microscope	OLYMPUS
Surgeon knife	MIRA STAINLESS
Transferring cabinet	DWYER MARK II
Water bath	MEMMENT

3. พืชทดลอง

แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) พันธุ์เบอร์ 2

4. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotics) ได้แก่ *Bifidobacterium* sp.

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมพืชทดลอง

1.1 การปลูกแก่นตะวันในเรือนปลูกพืช

นำหัวพันธุ์แก่นตะวันมาปลูกในเรือนปลูกพืชของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยตัดหัวแก่นตะวันเป็นชิ้นขนาด 3-5 เซนติเมตร นำไปบ่มในแกลบดำขึ้นเพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อน รดน้ำให้ชุ่ม โดยให้น้ำทุกวันๆ ละ 1 ครั้ง จนกว่าตาพันธุ์จะเริ่มมีการงอก หลังจากนั้นจึงให้น้ำวันเว้นวัน จนครบระยะเวลา 1 เดือน (ภาพที่ 4) เพื่อย้ายปลูกในกระถางและใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อต่อไป



ภาพที่ 4 แก่นตะวันอายุ 1 เดือน

1.2 การเตรียมต้นแก่นตะวันปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นชิ้นพืชวัตถุดิบ (explant)

1.2.1 ตัดกิ่งแก่นตะวันจากต้นที่มีอายุครบ 1 เดือน ซึ่งมีการเจริญสมบูรณ์แข็งแรงไม่มีโรคและแมลงมาทำความสะอาด โดยลิดใบออกจากกิ่งลำต้น ตัดลำต้นที่มีตาพิเศษ (nodal stem) ให้ได้ขนาดความยาว 2-5 เซนติเมตร เพื่อสะดวกในการทำไร้เชื้อที่ผิว จากนั้นนำไปล้างน้ำทำความสะอาดให้ดี

1.2.2 แช่ในสารละลายคลอโรกซ์ 15 เปอร์เซนต์ (clorox) ที่ผสมทวิน 20 (tween 20) 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว

1.2.3 ล้างด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ 2-3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

1.2.4 ย้ายลำต้นที่มีตาพิเศษไปวางบนจานแก้วไร้เชื้อ จากนั้นตัดลำต้นที่มีตาพิเศษให้ได้ขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร

1.2.5 นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator)

1.2.6 นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนชั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟลูออเรสเซนต์ โดยกำหนดให้มีความเข้มของแสง 1,500-3,000 ลักซ์ (lux) และให้ได้รับช่วงแสงสว่าง 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง

1.2.7 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 1 เดือนจะได้ต้นปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นชิ้นพืชวัตถุดิบในการทดลองต่อไป โดยมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ (subculture) ให้ต้นปลอดเชื้อที่ใช้เป็นพืชวัตถุดิบทุก 1 เดือน

2. การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืช

2.1 อาหารเพาะเลี้ยงสำหรับชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส

เตรียมอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2 ชนิดคือ ไซโตไคนินและออกซิน โดยทุกสูตรอาหารมีการเติมไซโตไคนินชนิด BA เพียงอย่างเดียว และมีการแปรผัน (vary) ออกซิน 4 ชนิด คือ NAA IAA IBA และ 2,4-D ดังแสดงในตารางที่ 2 ตารางที่ 2 สูตรอาหารชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ		
	สูตรอาหารพื้นฐาน	ออกซิน (1.0 มก./ล.)	ไซโตไคนิน (1.0 มก./ล.)
MSC 1	MS	NAA	BA
MSC 2	MS	IAA	BA
MSC 3	MS	IBA	BA
MSC 4	MS	2,4-D	BA
น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร			
วุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร			
pH 5.6			

2.2 อาหารเพาะเลี้ยงสำหรับชักนำและเพาะเลี้ยงต้น

เตรียมอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2 ชนิดคือ ไซโตไคนินและออกซิน โดยทุกสูตรอาหารมีการเติมออกซินชนิด NAA เพียงอย่างเดียว และมีการแปรผันไซโตไคนิน 3 ชนิด คือ BA Kinetin และน้ำมะพร้าว (coconut water) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สูตรอาหารสำหรับชักนำและเพาะเลี้ยงต้น

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ		
	สูตรอาหารพื้นฐาน	ออกซิน (0.5 มก./ล.)	ไซโตไคนิน (3.0 มก./ล.)
MSS 1	MS	NAA	Coconut water*
MSS 2	MS	NAA	Kinetin
MSS 3	MS	NAA	BA
น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร			
วุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร			
pH 5.6			

*เติม 15 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณอาหารที่ใช้

2.3 อาหารเพาะเลี้ยงสำหรับชักนำและเพาะเลี้ยงราก

เตรียมอาหารสูตร ½ MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2 ชนิดคือ ไซโตไคนินและออกซิน โดยทุกสูตรอาหารมีการเติมออกซินชนิด NAA และมีการแปรผันความเข้มข้นของไซโตไคนินชนิด IBA ดังรายละเอียดในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สูตรอาหารสำหรับชักนำและเพาะเลี้ยงราก

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ		
	สูตรอาหารพื้นฐาน	ออกซิน (NAA) มก./ล.	ไซโตไคนิน (IBA) มก./ล.
MSR 1	½ MS	0.0	0.0
MSR 2	½ MS	0.5	0.5
MSR 3	½ MS	0.5	1.0
MSR 4	½ MS	0.5	1.5
MSR 5	½ MS	0.5	2.0
น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร			
วุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร			
pH 5.6			

2.4 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

เตรียมอาหารเหลวสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช 2 ชนิดคือ ไซโตไคนินและออกซิน โดยทุกสูตรอาหารมีการเติมไซโตไคนินชนิด BA เพียงอย่างเดียว และมีการแปรผันออกซิน 4 ชนิด คือ NAA IAA IBA และ 2,4-D ดังแสดงในตารางที่ 5 ตารางที่ 5 สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ		
	สูตรอาหารพื้นฐาน	ออกซิน (1.0 มก./ล.)	ไซโตไคนิน (1.0 มก./ล.)
MSC 1	MS	NAA	BA
MSC 2	MS	IAA	BA
MSC 3	MS	IBA	BA
MSC 4	MS	2,4-D	BA
น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร			
pH 5.6			

3. วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืช

3.1 การชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส

ตัดแยกแผ่นใบ (leaf blade) และลำต้น (stem) จากต้นแก้วตะวันพลอดเชื้ออายุ 1 เดือน โดยตัดใบให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ส่วนลำต้นตัดให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นย้ายชิ้นพืชที่เตรียมได้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรสำหรับชักนำแคลลัสดังแสดงในตารางที่ 2 โดยทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ แต่ละขวดเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจำนวน 3 ชิ้น เพาะเลี้ยงอย่างน้อย 10 ขวด หลังจากนั้นนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อวางบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

บันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของชิ้นพืชด้วยสายตาและภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) บันทึกภาพ บันทึกระยะเวลาการเกิดแคลลัส ลักษณะการเกาะตัวของแคลลัส และวัดอัตราการเจริญของแคลลัสที่ชักนำได้ โดยการชั่งน้ำหนักสด (fresh weight) พร้อมทั้งนำไปหาปริมาณอินนูลิน เมื่อครบระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน

3.2 การชักนำและเพาะเลี้ยงต้น

ตัดแยกแผ่นใบ (leaf blade) และข้อลำต้น (nodal stem) จากต้นแก้วตะวันพลอดเชื้ออายุ 1 เดือน โดยตัดใบให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ส่วนลำต้นตัดให้มีความยาวประมาณ

1 เซนติเมตร จากนั้นย้ายชิ้นพืชที่เตรียมได้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรสำหรับชักนำต้นดังแสดงในตารางที่ 3 โดยทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ แต่ละขวดเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจำนวน 3 ชิ้น เพาะเลี้ยงอย่างน้อย 10 ขวด หลังจากนั้นนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อวางบนชั้นในหิ้งเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

บันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของชิ้นพืชด้วยสายตา บันทึกภาพ บันทึกระยะเวลาการเกิดต้น และวัดอัตราการเจริญของต้นที่ชักนำได้ โดยการชั่งน้ำหนักสด (fresh weight) นับจำนวนต้น และวัดความยาวของต้นที่ชักนำได้ พร้อมทั้งนำไปหาปริมาณอินนูลิน เมื่อครบระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน

3.3 การชักนำและเพาะเลี้ยงราก

ตัดแยกแผ่นใบ (leaf blade) และลำต้น (stem) จากต้นแก่จนตัดวันปลอดเชื้ออายุ 1 เดือน โดยตัดใบให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ส่วนลำต้นตัดให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นย้ายชิ้นพืชที่เตรียมได้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรสำหรับชักนำรากดังแสดงในตารางที่ 4 โดยทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ แต่ละขวดเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจำนวน 3 ชิ้น เพาะเลี้ยงอย่างน้อย 10 ขวด หลังจากนั้นนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อวางบนชั้นในหิ้งเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

บันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของชิ้นพืชด้วยสายตา บันทึกลักษณะสีของรากที่ชักนำได้ บันทึกภาพ บันทึกระยะเวลาการเกิดราก และวัดอัตราการเจริญของรากที่ชักนำได้ โดยการชั่งน้ำหนักสด (fresh weight) พร้อมทั้งนำไปหาปริมาณอินนูลิน เมื่อครบระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน 45 วัน

3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

นำแคลลัสอายุ 30 วัน ที่ชักนำได้จากชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ให้ปริมาณอินนูลินสูงสุดมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยถ่ายเลี้ยงแคลลัส 1 กรัมในอาหาร 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

บันทึกผลการทดลองทุกสัปดาห์ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แขวนลอยด้วยสายตา และวัดอัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอยโดยการชั่งน้ำหนักสด (fresh weight) พร้อมทั้งนำไปหาปริมาณอินนูลิน เมื่อครบระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน

4. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณอินนูลินในเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

4.1 การสกัดน้ำตาล

นำแคลลัส ต้น ราก เซลล์แขวนลอยที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยง และห้วสดมาสกัดน้ำตาล โดยใช้เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย ในอัตราส่วนสารตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1:2 (w/v) สกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำกากที่ได้ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง เทส่วนผสมที่ได้รวมกัน จากนั้นระเหยเอทานอลออกโดยใช้เครื่อง Evaporator

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยวิธี Phenol sulfuric acid (Dubois และคณะ 1956)

นำสารสกัดที่ได้มาเจือจาง จากนั้นผสมสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับสารละลายฟีนอล (phenol) 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อผสมเข้ากันแล้วเติมกรดซัลฟิวริก (sulfuric acid, H_2SO_4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จะเห็นสารละลายเป็นสีส้ม-เหลือง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS method) (Miller 1959)

นำสารสกัดที่ได้มาเจือจาง จากนั้นผสมสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เมื่อผสมเข้ากันแล้ว นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

4.4 หาปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (non-reducing sugar)

หาได้จากผลต่างของ total sugar กับ reducing sugar

4.5 วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC ทำโดยนำสารสกัดมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปกรองด้วย nylon syringe filter ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร (μm) จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ Rezek RNM carbohydrate Column ขนาด 7.8 x 300 มิลลิเมตร (Phenomenex) ชะด้วย deionized distill water ที่อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกคือ 45 องศาเซลเซียส และตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วย Refractive index detector

5. ทดสอบคุณสมบัติฟัรบิโอติกของสารอินนูลินที่ผลิตได้โดยวิเคราะห์การกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ภายใต้สภาวะ *in vitro* (ดัดแปลงจากวิธี Fook และคณะ 2002)

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำได้ ซึ่งผ่านการทำแห้งโดยใช้ความเย็นและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS เปรียบเทียบกับอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส หรืออินนูลินจากซิคอร์ โดยกำหนดให้อาหารทุกชุดมีปริมาณน้ำตาลรวม (total sugar) เริ่มต้นเท่ากับอาหารสูตร MRS ที่มีกลูโคส 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร (w/v))

2) เตรียมเชื้อ *Bifidobacterium sp.* โดยเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 38 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนตะกอนเซลล์ไปละลายน้ำกลั่นเพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วใส่เซลล์ในปริมาณที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.1 ลงในอาหาร MRS broth ชุดต่างๆ ที่เตรียมในข้อ 1) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 38 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้อากาศ (anaerobic) เก็บตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 ชั่วโมงจนถึง 38 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

- วัดค่า pH
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (จากส่วนตะกอนเซลล์ ละลายน้ำกลั่น)
- วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลรวมที่เหลือ (จากส่วนใสหลังปั่นเหวี่ยง)

3) ทำข้อ 1) และ 2) ซ้ำ โดยเปลี่ยนจากสารสกัดจากแคลลัสเป็นสารสกัดจากรากที่ชักนำได้ และสารสกัดจากหัวสด

6. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way ANOVA) กำหนดระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ และวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (trial version)

บทที่ 4

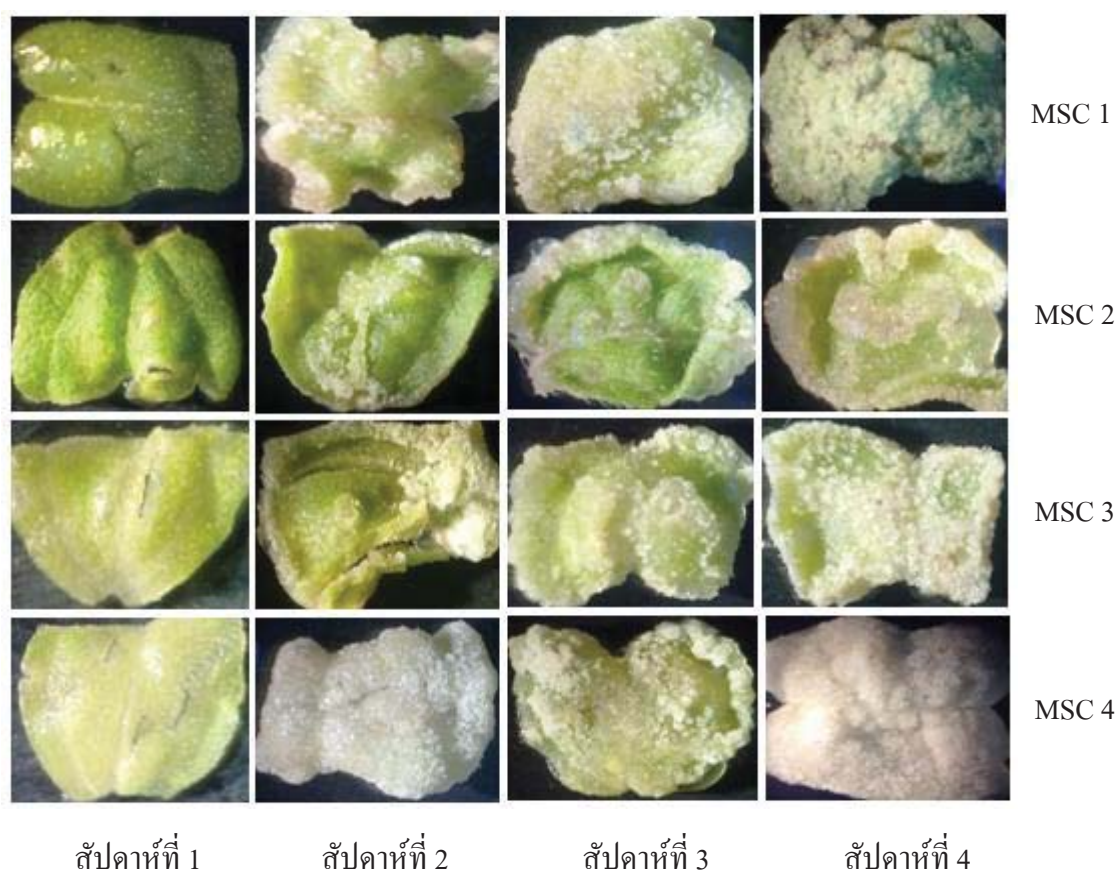
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืช

1.1 การชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส

จากการนำชิ้นพืช (explants) จากแผ่นใบ (leaf blade) และลำต้น (stem) ของต้นแก่นตะวัน ปลอດเชื้ออายุ 1 เดือน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ทั้งหมด 4 สูตร โดยทุกสูตรอาหารมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินชนิด BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับออกซินชนิด NAA IAA IBA หรือ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มก./ล. (ตารางที่ 2) นาน 30 วัน พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 3-5 วัน ชิ้นพืชมีการตอบสนองต่ออาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไป โดยชิ้นส่วนใบมีการโค้งงอและขยายขนาดขึ้น เช่นเดียวกับกับส่วนของลำต้นก็มีการบวมขึ้น และเริ่มเกิดแคลลัสขึ้นบนชิ้นพืชทั้งจากใบและลำต้นเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงในทุกสูตรอาหาร แสดงให้เห็นว่า สูตรอาหารพื้นฐาน MS ที่ใช้ร่วมกับการเติมไซโตไคนินชนิด BA กับออกซินทั้ง 4 ชนิดตามสัดส่วนที่เลือกใช้ในการทดลองนี้ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ทั้งบนแผ่นใบและลำต้น ดังแสดงในภาพที่ 5 และ 6

จากการพิจารณาลักษณะทางกายภาพของแคลลัสที่ชักนำได้ จะเห็นได้ว่า มีสีเขียวอ่อนและเหลืองอ่อนขึ้นกับสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่า แคลลัสที่ชักนำได้มีการเกาะตัวกัน 2 แบบ คือ เกาะตัวแบบแน่น (compact) และเกาะตัวแบบหลวม (friable) โดยสูตรอาหาร MSC 4 ที่มีการเติมออกซินชนิด 2,4-D ชักนำให้เกิดแคลลัสสีเหลืองที่มีการเกาะตัวแบบหลวม ส่วนสูตรอาหารอื่นๆ ที่มีการเติมออกซินชนิด NAA IAA และ IBA ชักนำให้เกิดแคลลัสสีเขียว และมีการเกาะตัวแบบแน่น ดังภาพที่ 5 6 และตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า ชนิดของออกซินมีผลต่อการสร้างรงควัตถุ (pigment) และการเกาะตัวของแคลลัส นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ การให้แสง และชนิดของน้ำตาที่ใ้ใช้ก็มีรายงานว่า มีผลต่อสีและการเกาะตัวของแคลลัส (ประศาสตร์ 2536)



ภาพที่ 5 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.



ภาพที่ 6 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

ตารางที่ 6 ลักษณะทางกายภาพของแคลลัสที่ชักนำจากเนื้อเยื่อแผ่นใบและลำต้นในและลำต้นบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เนื้อเยื่อที่ใช้ในการชักนำ	สัปดาห์	ลักษณะทางกายภาพของแคลลัส									
		MSC 1		MSC 2		MSC 3		MSC 4			
		สี	การเกาะตัว	สี	การเกาะตัว	สี	การเกาะตัว	สี	การเกาะตัว	สี	การเกาะตัว
แผ่นใบ	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	friable
	3	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	friable
	4	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	friable
ลำต้น	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	friable
	3	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	friable
	4	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เขียวอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	compact	เหลืองอ่อน	friable

หมายเหตุ : - หมายถึง ยังไม่เกิดแคลลัส

MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล. MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

เมื่อวิเคราะห์การเจริญของแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยชั่งน้ำหนักสดแคลลัสที่ชักนำได้ พบว่า สูตรอาหาร MSC 1 สามารถชักนำให้แผ่นใบและลำต้นของแก่นตะวันเกิดแคลลัสได้มากที่สุด รองลงมาคือ สูตรอาหาร MSC4 MSC3 และ MSC2 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) โดยอาหารในแต่ละสูตรมีองค์ประกอบต่างๆ ที่เหมือนกันยกเว้นชนิดของออกซินที่เติมลงไป ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าชนิดของออกซินที่เติมลงไปในการอาหารมีผลต่อการชักนำและการเจริญของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยออกซินชนิด NAA ให้ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด รองลงมาคือ 2,4-D IBA และ IAA ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่า มีความแตกต่างกันไม่มากนัก จากผลที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สะสมอยู่ในชิ้นเนื้อเยื่อ (endogenous plant growth regulator) (ประสาสตร์ 2536)

ตารางที่ 7 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่นตะวันบนอาหารสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม/ขวด)*	
	ใบ	ลำต้น
MSC 1	0.398 ^a ± 0.04	0.302 ^a ± 0.03
MSC 2	0.104 ^d ± 0.03	0.082 ^d ± 0.01
MSC 3	0.231 ^c ± 0.06	0.151 ^c ± 0.03
MSC 4	0.299 ^b ± 0.05	0.255 ^b ± 0.03

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 10)

ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

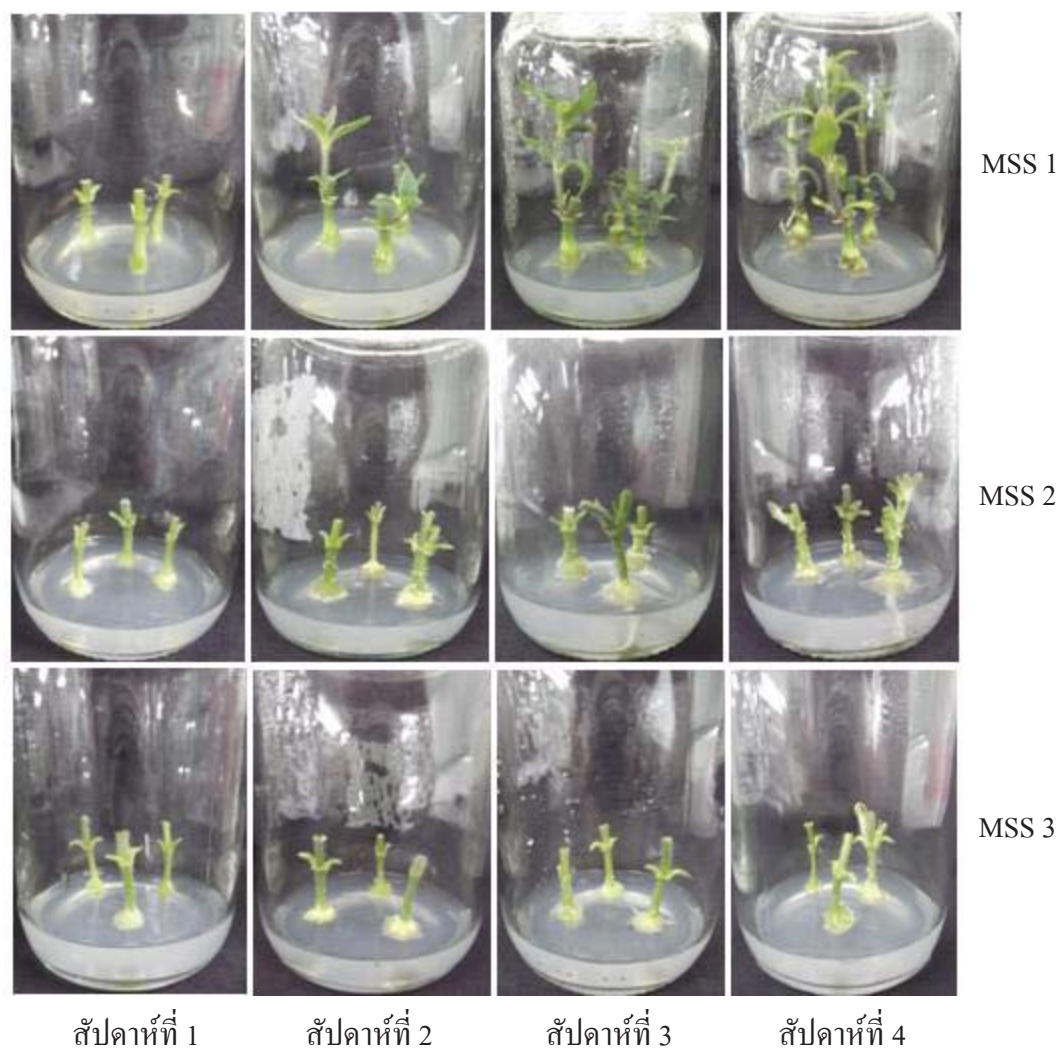
MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Taha และคณะ (2007) ที่รายงานว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA และ BAP ความเข้มข้นอย่างละ 1 มก./ล. สามารถชักนำให้ใบอ่อนของแก่นตะวันเกิดแคลลัสได้ดี และจากการทำการทดลองซ้ำอีก 2 ชุดก็ให้ผลที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน นอกจากนี้ ปิยะวัชร และ สุนนา (2553) ได้พบว่า ออกซินชนิด NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียว สามารถชักนำให้ใบอ่อนแก่นตะวัน 2 สายพันธุ์ คือ JA 89 และ HEL 65 เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นการยืนยันว่าออกซินชนิด NAA ที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการชักนำแคลลัสจากแผ่นใบและลำต้น สำหรับออกซินชนิด IBA และ IAA นั้นมีบทบาทต่อการชักนำให้เกิดรากมากกว่า (บุษราภรณ์ 2548) ดังนั้น ปริมาณแคลลัสที่ชักนำได้ค่อนข้างต่ำในการทดลองนี้จึงเป็นการยืนยันถึงบทบาทของออกซินทั้งสองชนิดดังกล่าวได้ว่าไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ชักนำแคลลัสในแก่นตะวัน

1.2 การชักนำและเพาะเลี้ยงต้น

จากการนำชิ้นพืช (explants) จากแผ่นใบ (leaf blade) และข้อลำต้นที่มีตาข้าง (nodal stem) ของต้นแก่นตะวันปลอดเชื้ออายุ 1 เดือน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เพื่อชักนำให้เกิดต้นทั้งหมด 3 สูตร (ตารางที่ 3) ที่มีการปรับสัดส่วนของไซโตไคนินต่อออกซินให้มากกว่าหนึ่ง ตามหลักการชักนำให้เกิดต้นที่ต้องอาศัยบทบาทของไซโตไคนิน นาน 30 วัน พบว่า ชิ้นพืชที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ คือ ส่วนของข้อลำต้นที่มีตาข้าง โดยบริเวณตาข้างมีการบวมขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง แต่ยังไม่มีการเจริญงอกออกมา ในสัปดาห์ที่ 2 เริ่มมีต้นขนาดเล็กแตกออกมาจากตาข้าง จากนั้นต้นที่งอกออกมามีความยาวเพิ่มขึ้น และมีต้นใหม่งอกออกมามากขึ้นด้วย เมื่อครบ 4 สัปดาห์ ต้นที่ชักนำได้ก่อนจะมีความยาวเพิ่มขึ้นและมีความยาวมากกว่าต้นที่งอกออกมาหลัง โดยต้นที่งอกออกมามีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ดังแสดงในภาพที่ 7

เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงส่วนของแผ่นใบบนอาหารทั้ง 3 สูตร เช่นเดียวกันกับส่วนของข้อลำต้น พบว่า ไม่มีสูตรอาหารใดที่สามารถชักนำให้แผ่นใบเกิดการพัฒนาด้านต้นได้ และใบนั้นไม่มีการพัฒนาต่อ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ชนิดและความเข้มข้นของไซโตไคนินที่เลือกใช้ให้อาหารสูตรต่างๆ นั้นไม่สามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพารენไคมา (parenchyma tissues) ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ที่พบมากในแผ่นใบนั้นกลับมาเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissues) เพื่อพัฒนาต่อไปเป็นต้นได้ (บุษราภรณ์ 2548) โดยพบว่า เนื้อเยื่อส่วนใหญ่ของแผ่นใบที่เพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเริ่มจากขอบชิ้นพืช แล้วกระจายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนทั่วทั้งแผ่นใบ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 ลักษณะของต้นที่ชักนำจากข้อลำต้นที่มีตาข้างของต้นแก้วมะวันบนอาหารวุ้น MSS1 MSS2 และ MSS3 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์

หมายเหตุ : MSS 1 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Coconut water 15 เปอร์เซ็นต์

MSS 2 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก./ล.

MSS 3 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3.0 มก./ล.



MSS1

MSS2

MSS3

ภาพที่ 8 ลักษณะแผ่นใบในการชักนำให้เกิดต้นที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์

หมายเหตุ : MSS 1 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Coconut water 15 เปอร์เซ็นต์

MSS 2 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก./ล.

MSS 3 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3.0 มก./ล.

ตารางที่ 8 จำนวนต้นและความยาวเฉลี่ยของต้นที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้นแก่บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เนื้อเยื่อที่ใช้ ในการชักนำ	สัปดาห์	จำนวนต้นที่ชักนำได้*			ความยาวต้นที่ชักนำได้ (ชม./ขวด)*		
		MSS1	MSS2	MSS3	MSS1	MSS2	MSS3
ใบ	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
ลำต้น	1	-	-	-	-	-	-
	2	1.13 ^a ±0.41	0.17 ^b ±0.23	-	0.90 ^a ±0.43	0.07 ^b ±0.10	-
	3	1.43 ^a ±0.35	0.80 ^b ±0.79	-	2.04 ^a ±0.77	0.43 ^b ±0.37	-
	4	1.90 ^a ±0.22	1.63 ^a ±0.80	-	3.81 ^a ±1.49	1.11 ^b ±0.60	-

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 10)

ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05)

- หมายถึง ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้

หมายเหตุ : MSS 1 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Coconut water 15 เปอร์เซ็นต์

MSS 2 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก./ล.

MSS 3 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3.0 มก./ล.

เมื่อวิเคราะห์การเจริญของต้นที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่ต้นบนอาหารสูตรต่างๆ โดยนับจำนวนต้น วัดความยาวต้น และชั่งน้ำหนักสดของต้นที่ชักนำได้ พบว่าอาหารสูตร MSS1 ที่มีการเติมน้ำมะพร้าวปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ และ MSS2 ที่มีการเติม Kinetin ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. สามารถชักนำให้ตาข้างเจริญไปเป็นต้นอ่อนได้ แต่อาหารสูตร MSS3 ที่เติม BA ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ และเมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ระหว่างสูตร MSS1 และ MSS2 พบว่า สูตร MSS1 ที่มีการเติมน้ำมะพร้าวนั้นให้จำนวนต้นมากกว่าและลำต้นที่ชักนำได้มีความแข็งแรงและสมบูรณ์มากกว่า ซึ่งสามารถดูได้จากความยาวของต้นที่ชักนำได้ (ตารางที่ 8) และต้นที่ชักนำได้บนอาหารสูตร MSS1 ยังให้น้ำหนักสดของต้นมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ด้วย (ตารางที่ 9) และจากการทำการทดลองซ้ำอีก 2 ชุดก็ให้ผลที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน โดยน้ำมะพร้าวเป็นไซโตไคนินที่ให้ผลในการชักนำให้เกิดต้นจากข้อลำต้นของแก่นตะวันได้ดีที่สุด ส่วน BA ที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้จากการนำข้อลำต้นของแก่นตะวันมาเพาะเลี้ยงนั้น กลับสามารถชักนำให้แคลลัสแก่นตะวันพัฒนาเป็นต้นได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม NAA และ BA เข้มข้น 0.5 และ 3.0 มก./ล. (Taba และคณะ 2007) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ชีวพืชที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นต้นได้ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้

ตารางที่ 9 น้ำหนักสดของต้นที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงข้อลำต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร MSS1 MSS2 และ MSC3 หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม/ขวด)*
MSS 1	0.332 ^a ± 0.10
MSS 2	0.147 ^b ± 0.10
MSS 3	-

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 10)

ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

- หมายถึง ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้

หมายเหตุ : MSS1 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Coconut water 15 เปอร์เซ็นต์

MSS2 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก./ล.

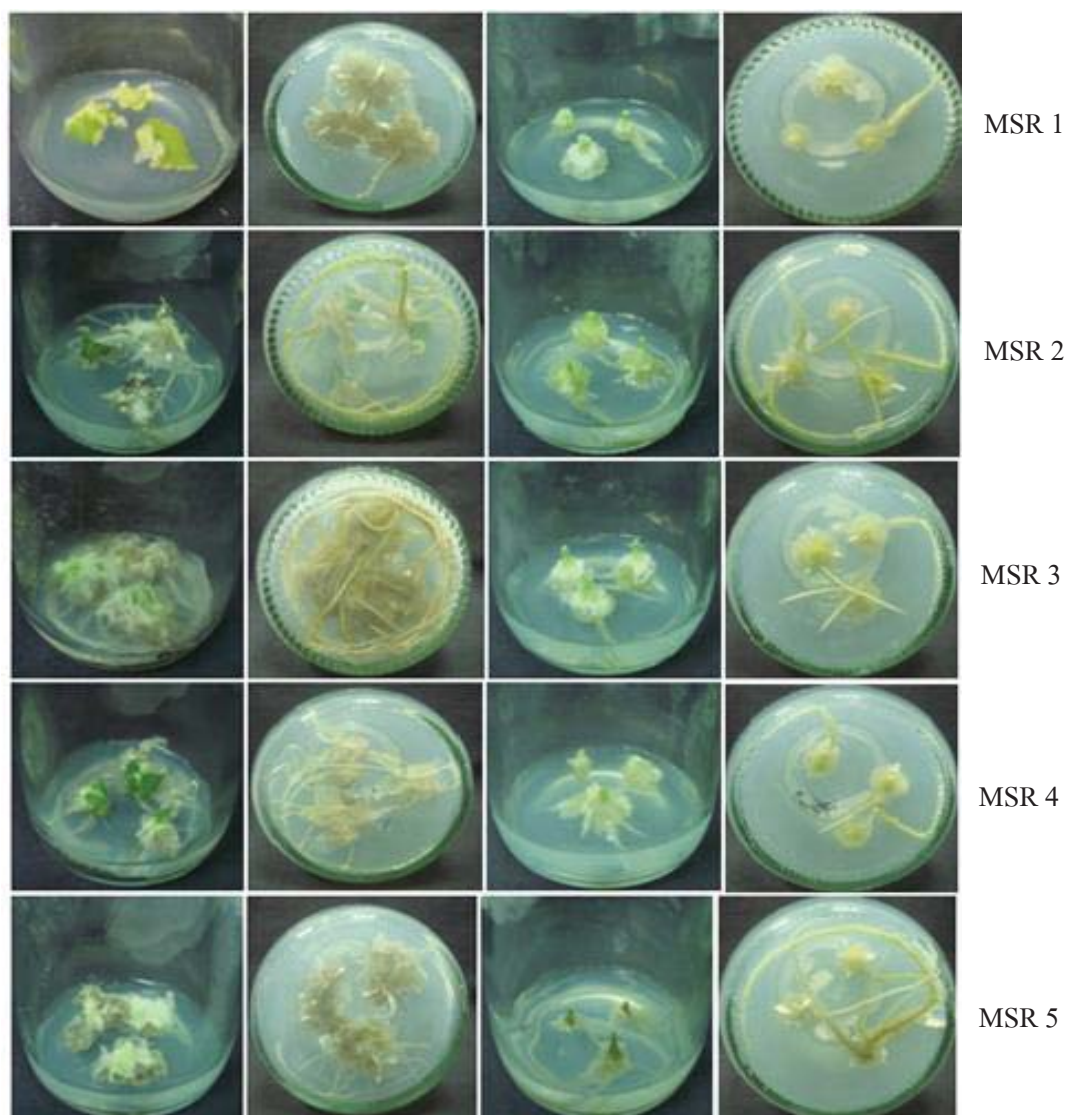
MSS3 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3.0 มก./ล.

1.3 การชักนำและเพาะเลี้ยงให้เกิดราก

สำหรับการชักนำให้เกิดรากนั้นจะอาศัยการลดความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและอาศัยบทบาทของสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดออกซินเป็นหลัก และชนิดของออกซินที่ให้ผลในการชักนำให้เกิดรากได้ดีก็คือ IBA และ NAA (บุษราภรณ์ 2548) ซึ่งจากการนำชิ้นพืช (explants) จากแผ่นใบ (leaf blade) และลำต้น (stem) ของต้นแก้วตะวันพลอดเชื้ออายุ 1 เดือน มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ $\frac{1}{2}$ MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้งหมด 5 สูตร โดยทุกสูตรอาหารมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินชนิด NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 หรือ 2.0 มก./ล. (ตารางที่ 4) นาน 45 วัน พบว่า ชิ้นพืชทั้งสองชนิดสามารถเจริญไปเป็นรากได้ โดยในสัปดาห์แรกยังไม่มีการงอกของรากเกิดขึ้น สัปดาห์ที่ 2 เริ่มมีขนรากงอกออกมา มีลักษณะเป็นขนสีขาวขนาดเล็ก รากที่เกิดจะงอกยาวขึ้นและแตกแขนงออกมาเป็นรากจำนวนมากขึ้นในสัปดาห์ต่อไป เมื่อถึงระยะเวลา 45 วัน รากที่ได้จะมีแขนงแตกออกมาเชื่อมกัน และขดตัวเป็นวงซ้อนทับกันไปตามขอบที่บรรจุ (ภาพที่ 9)

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่า อาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมออกซิน NAA และ IBA ที่ระดับความเข้มข้นที่เลือกใช้นี้สามารถชักนำให้แผ่นใบและลำต้นเกิดรากได้ ในขณะที่อาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่ไม่มีการเติม NAA และ IBA ไม่สามารถชักนำให้แผ่นใบเกิดรากได้ แต่มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัส ส่วนในลำต้นนั้นสามารถชักนำให้เกิดรากได้ ดังภาพที่ 9 ซึ่งเป็นผลมาจากระดับของออกซินที่มีอยู่ภายในเนื้อเยื่อส่วนต้น (endogenous auxin) นั้นสูงกว่าในส่วนของใบ

เมื่อวิเคราะห์การเจริญของรากที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก้วตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยชั่งน้ำหนักสดของรากที่ชักนำได้ พบว่า อาหารสูตร MSR3 ที่มีการเติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) รองลงมาคือสูตร MSR4 MSR2 MSR5 และ MSR1 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของรากที่ชักนำจากชิ้นพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่า แผ่นใบสามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีกว่าลำต้น (ตารางที่ 10) ในอาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิดรากมากขึ้นแตกต่างกัน ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากผลของความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สะสมอยู่ในชิ้นเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน (endogenous plant growth regulator)



ส่วนของแผ่นใบ

ส่วนของลำต้น

ภาพที่ 9 ลักษณะของรากที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้นของแก่นตะวันบนอาหารวุ้น MSR1 MSR2 MSR3 MSR4 และ MSR5 หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

หมายเหตุ : MSR1 คือ $\frac{1}{2}$ MS

MSR2 คือ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

MSR3 คือ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.0 มก./ล.

MSR4 คือ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.5 มก./ล.

MSR5 คือ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2.0 มก./ล.

ตารางที่ 10 น้ำหนักสดของรากที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่ต้นมะวันบนอาหารวุ้นสูตร MSR1 MSR2 MSR3 MSR4 และ MSR5 หลังการเพาะเลี้ยง 45 วัน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม/ขวด)*	
	ใบ	ลำต้น
MSR 1	0.0000	0.221 ^b ± 0.07
MSR 2	0.898 ^b ± 0.25	0.353 ^a ± 0.09
MSR 3	1.290 ^a ± 0.35	0.360 ^a ± 0.08
MSR 4	1.222 ^a ± 0.24	0.274 ^b ± 0.10
MSR 5	0.821 ^b ± 0.24	0.264 ^b ± 0.07

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 10)

ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05)

หมายเหตุ : MSR1 คือ ½ MS free hormone เป็นอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

MSR2 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

MSR3 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.0 มก./ล.

MSR4 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.5 มก./ล.

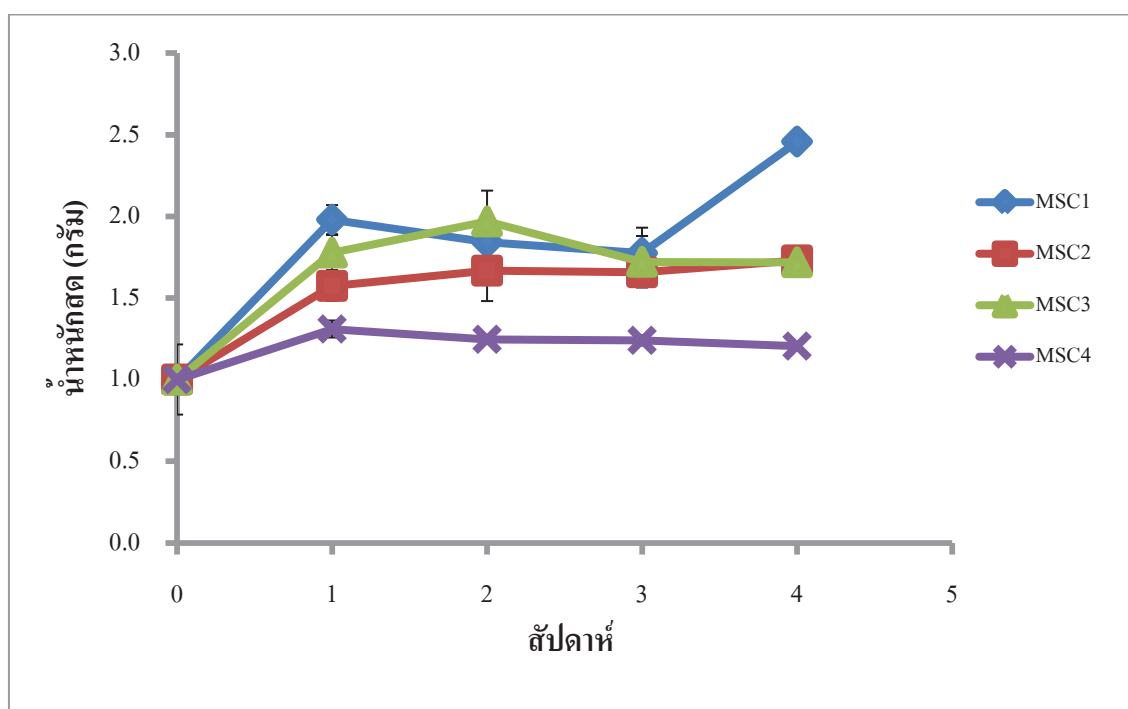
MSR5 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2.0 มก./ล.

จากผลการทดลอง พบว่า NAA และ IBA ซึ่งเป็นสารในกลุ่มออกซินที่ใช้ในการทดลองนี้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเกิดราก และกระตุ้นการยืดยาวของราก จึงสามารถกระตุ้นให้เนื้อเยื่อแผ่นใบและลำต้นแก่ต้นมะวันเกิดการพัฒนาไปเป็นรากได้ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของปิยะวัชร และ สุมนา (2553) ที่รายงานว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินชนิด IBA สามารถชักนำให้ใบอ่อนของแก่นมะวันสายพันธุ์ JA 89 และสายพันธุ์ HEL 65 เกิดรากได้

1.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

จากข้อได้เปรียบของการนำเซลล์พืชมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ทำให้เซลล์เกิดการสัมผัสกับอาหารได้มากขึ้น อาจส่งผลให้เซลล์มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยด้วย โดยได้นำแคลลัสอายุ 30 วันที่ชักนำได้จากชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงใน

อาหารสูตรที่ให้ปริมาณอินนูลินสูงสุดมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (ตารางที่ 5) โดยถ่ายเลี้ยงแคลส 1 กรัมในอาหาร 20 มล. แล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที และบันทึกผลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แขวนลอยด้วยสายตา และวัดการเจริญของเซลล์แขวนลอยโดยการชั่งน้ำหนักสด (fresh weight) ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 30 วัน พบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกสูตรมีปริมาณเพิ่มขึ้น เซลล์มีการแบ่งตัวสูงขึ้นทำให้ปริมาณเซลล์และน้ำหนักของเซลล์สูงขึ้นในสัปดาห์แรก ซึ่งสังเกตได้จากน้ำหนักเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด จากนั้นในสัปดาห์ที่ 2 เซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และมีปริมาณของเซลล์ลดลงเมื่อเข้าระยะสัปดาห์ที่ 3 หลังจากนั้นเซลล์จะมีการเจริญค่อนข้างที่จะคงที่ และเริ่มลดปริมาณลง ซึ่งอาจเป็นเพราะปัจจัยบางอย่างภายในเซลล์หรืออาหารไม่เหมาะสม จึงทำให้การเจริญลดลง จากนั้นเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 การเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์มีแนวโน้มลดลง มีเพียงบางสูตรอาหารคือ MSC2 และ MSC1 ปริมาณของเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนเกือบจะคงที่ (ภาพที่ 10) ซึ่งอาจเป็นเพราะความหนาแน่นของเซลล์นั้นมากเกินไป เซลล์มีอายุมากขึ้น มีบางส่วนที่ตายไปจึงทำให้การเพิ่มจำนวนหรือปริมาณของเซลล์นั้นไม่เปลี่ยนแปลงและลดลง และจากการทดลองทำซ้ำก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน



ภาพที่ 10 น้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 เป็นเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์

ค่าที่แสดงในภาพ คือ ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสด $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 3)

2. ปริมาณอินนูลินในเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

2.1 ปริมาณอินนูลินในสารสกัดจากแคลลัส

เมื่อวิเคราะห์การผลิตอินนูลินในรูปของน้ำตาลนอนรีดิวิซ์ (non-reducing sugar) ที่พิจารณาจากความแตกต่างของปริมาณน้ำตาลรวม (total sugar) และปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ (reducing sugar) ในแคลลัสแก่บนตะวันที่ชักนำบนอาหารสังเคราะห์ทั้งหมด 4 สูตรที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโทไคนินชนิด BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับออกซินชนิด NAA IAA IBA หรือ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มก./ล. (ตารางที่ 2) นาน 30 วัน พบว่า ปริมาณ non-reducing sugar ของแคลลัสที่ชักนำได้จากแผ่นใบบนอาหารสูตรต่างๆ นั้นไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นบนอาหารสูตรต่างๆ ให้ปริมาณของ non-reducing sugar ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยแคลลัสที่ชักนำได้มีปริมาณ non-reducing sugar มากที่สุดเท่ากับ 22.62 มก./กรัมของน้ำหนักสดเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSC2 ที่เติม BA ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. (ตารางที่ 11) จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่า การเจริญเติบโตของแคลลัสกับการผลิตอินนูลินนั้นไม่ได้แปรตามกัน โดยแคลลัสที่ได้จากสูตรอาหารที่ชักนำให้ได้ปริมาณแคลลัสดีที่สุดคือ MSC 1 ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. (ตารางที่ 7) นั้นไม่ได้ให้ปริมาณอินนูลินสูงสุด ถ้าพิจารณาผลของออกซินที่ใช้ต่อการผลิตอินนูลิน พบว่า IAA และ IBA ที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยกลับมีแนวโน้มชักนำให้แคลลัสผลิตอินนูลินได้สูงกว่า ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า NAA และ 2,4-D ไม่ได้ทำให้เกิดภาวะเครียด (stress) กับเซลล์พืชมาก แต่ IAA และ IBA ทำให้เกิดภาวะเครียดได้มากกว่าจึงทำให้เซลล์แคลลัสพยายามที่จะรักษาสมดุลแรงดันออสโมซิสภายในเซลล์เพื่อลดความเสียหายจากภาวะเครียดโดยการสร้างอินนูลินขึ้นมาเพื่อรักษาสมดุลน้ำในเซลล์ ทำให้เซลล์แคลลัสมีการเจริญค่อนข้างต่ำ

ตารางที่ 11 ปริมาณ non-reducing sugar ของสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่บนตะวันบนอาหารสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 นาน 30 วัน

สูตรอาหาร	Non-reducing sugar (มก./กรัมน้ำหนักสด)*	
	ใบ	ลำต้น
MSC 1	9.816 ± 5.21	7.326 ^b ± 0.71
MSC 2	6.349 ± 1.44	22.620 ^a ± 5.13
MSC 3	12.343 ± 1.37	6.009 ^b ± 2.79
MSC 4	9.814 ± 5.32	9.997 ^b ± 0.69

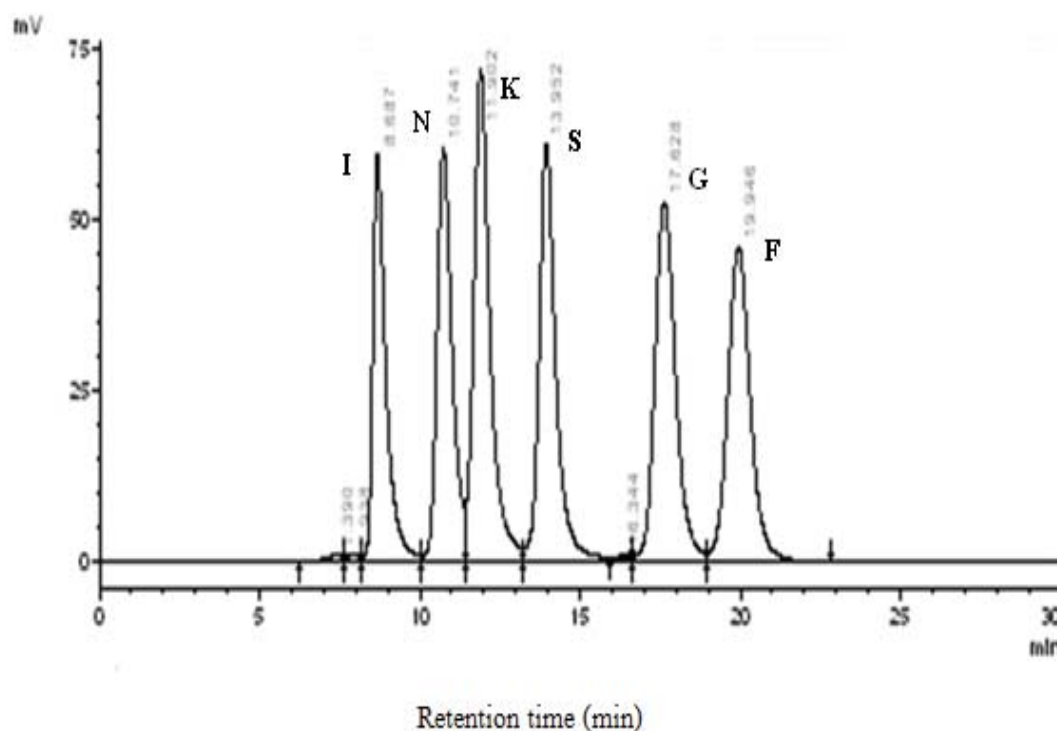
* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 3)

ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล. MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

และเพื่อให้ทราบถึงชนิดและองค์ประกอบต่างๆ ในสารสกัดจากแคลลัสจึงมีการวิเคราะห์โดยใช้วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วย โดยภาพที่ 11 และตารางที่ 12 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานชนิดต่างๆ และเวลาที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ (retention time)



ภาพที่ 11 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยที่ I คือ อินนูลิน (inulin) N คือ นีสโทส (nystose) K คือ เคสโทส (1-kestose) S คือ ซูโครส (sucrose) G คือ กลูโคส (glucose) และ F คือ ฟรุคโตส (fructose)

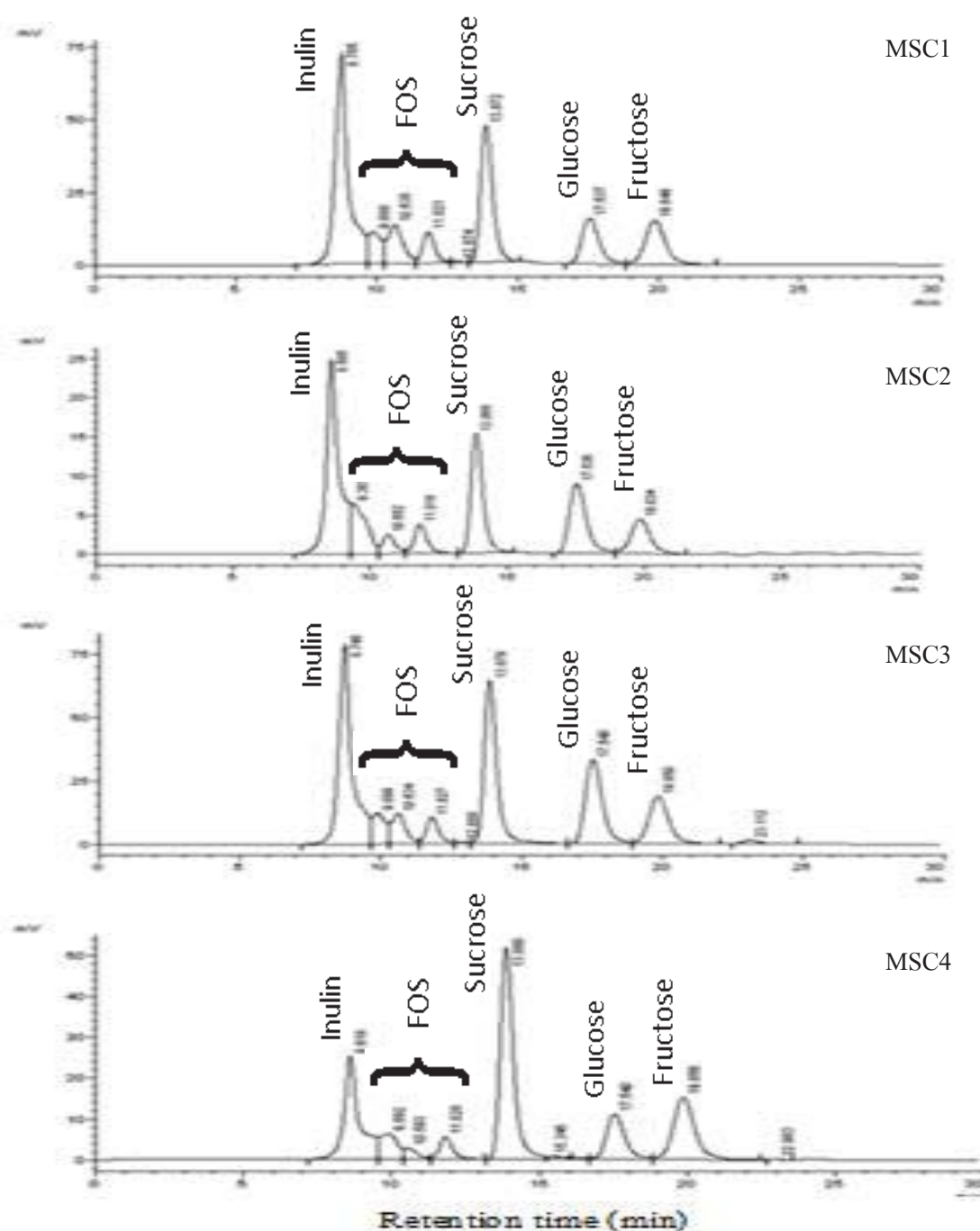
ตารางที่ 12 ค่า Retention time ของสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

สารมาตรฐาน	Retention time (min)*
อินนูลินจากชิคอรี่ (inulin from chicory)	8.637 ± 0.003
นีสโทส (nystose)	10.689 ± 0.005
เคสโทส (1-kestose)	11.928 ± 0.048
ซูโครส (sucrose)	13.898 ± 0.003
กลูโคส (glucose)	17.595 ± 0.003
ฟรุคโตส (fructose)	19.891 ± 0.041

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 5)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้น แก่นตะวันบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ ด้วย HPLC ดังที่ปรากฏในภาพที่ 12 และ 13 พบว่า แคลลัสที่ชักนำได้มีการสร้างอินนูลิน โดยทราบได้จากพีคแรกที่ตรวจวัดได้ ซึ่งถูกชะออกมาจาก คอลัมน์ที่เวลาประมาณ 8.6 นาที และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบอื่นๆ ในสารสกัดจากพีคที่ปรากฏ ในโครมาโตแกรมในลำดับถัดมาตามค่า Retention time (RT) ที่ตรวจวัดได้ ก็สันนิษฐานว่า น่าจะเป็นฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) ชนิดต่างๆ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้ ทำให้สามารถระบุชนิดของ FOS ได้ 2 ชนิดคือ 1-kestose (DP2) และ nystose (DP3) ซึ่งมีค่า RT ประมาณ 11.9 และ 10.7 นาที ตามลำดับ ส่วนพีคที่ปรากฏที่ RT ระหว่าง 9 ถึง 10 นาทีนั้นไม่สามารถระบุชนิดได้ เพราะไม่มีสารมาตรฐานเปรียบเทียบ แต่สันนิษฐานว่าพีคดังกล่าวน่าจะเป็น FOS ที่มีค่า DP อยู่ระหว่าง 3 แต่ไม่มากกว่าค่า DP ของอินนูลินจากซิคอรีที่มีค่า DP เฉลี่ยประมาณ 10-14 (Franck and Leenheer 2005) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน นอกจากนี้ยังตรวจพบพีคของน้ำตาล ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสด้วย

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารที่ตรวจพบในสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นบนอาหารสูตรต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 13 และ 14 นั้น พบว่า สัดส่วนของน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ในสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นบนอาหารสูตร MSC2 ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสูงสุดของ non-reducing sugar ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีดังแสดงในตารางที่ 11 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์การสร้างอินนูลินของแคลลัสสามารถประเมินจากปริมาณ non-reducing sugar ได้ และจากการเปรียบเทียบปริมาณของโพลีแซคคาไรด์ คือ อินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ในสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำได้จากแผ่นใบและลำต้นพบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ในสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสูตร MSC4 ที่มีการเสริมออกซินชนิด 2, 4-D ให้ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสูงสุด ซึ่งอาจเป็นเหตุผลว่า ทำไมแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรดังกล่าวจึงมีปริมาณสูง เพราะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไปช่วยในการเจริญเติบโตนั่นเอง และเมื่อพิจารณาจากปริมาณอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ นั้น แม้จะไม่พบความแตกต่างทางสถิติ แต่อาหารสูตร MSC2 และ MSC3 ที่มีการเสริมออกซินชนิด IAA และ IBA นั้นก็สามารถชักนำให้แคลลัสสร้างอินนูลินได้สูงกว่าอาหารที่เสริมออกซินชนิด NAA และ 2, 4-D ดังนั้น ชนิดของออกซินที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้แคลลัสสร้างอินนูลินได้ดีจึงเป็น IAA และ IBA



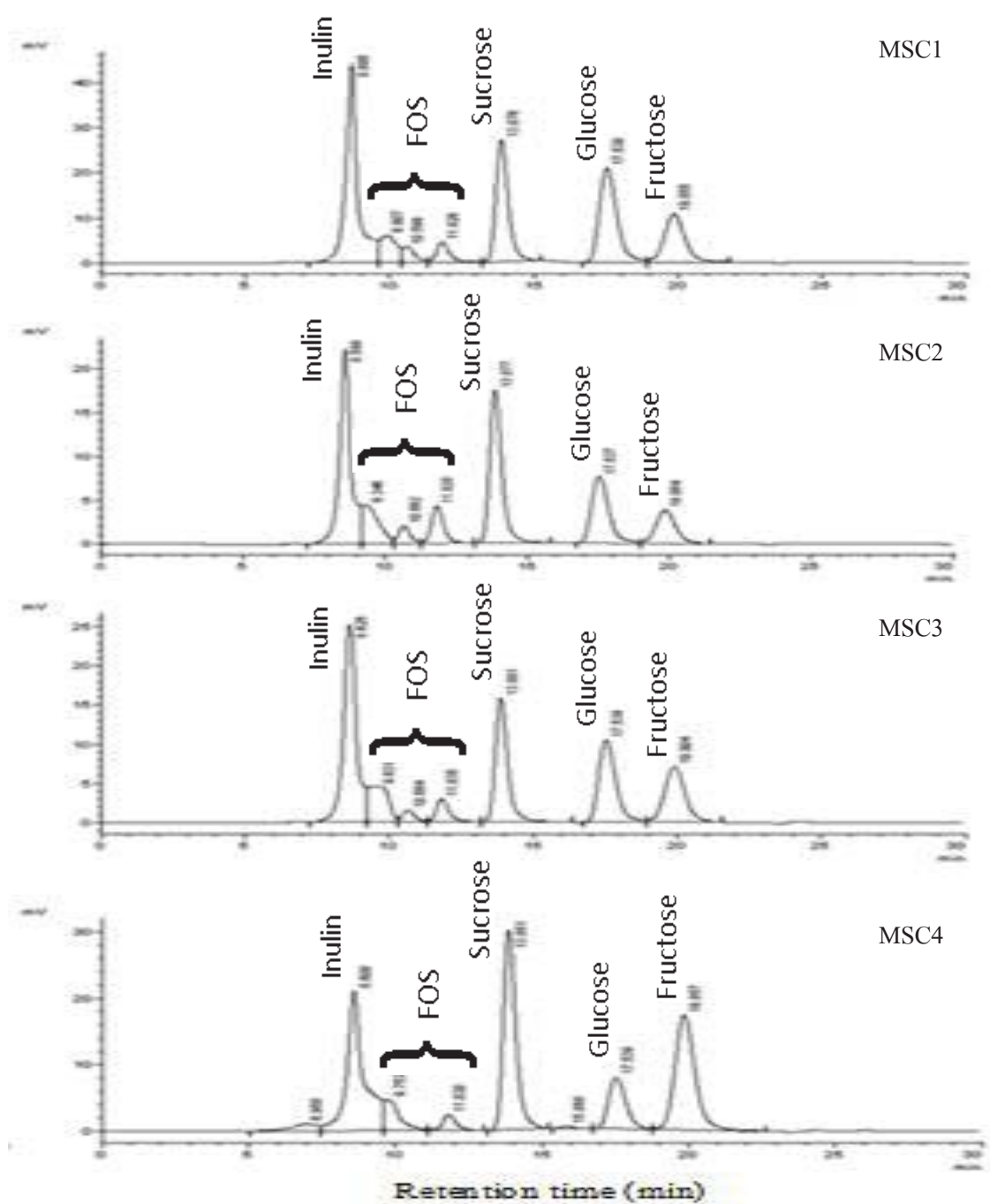
ภาพที่ 12 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบแก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.



ภาพที่ 13 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นแก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

ตารางที่ 13 สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบแก่บน
ตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC

ชนิดของสาร		สัดส่วน (%)*			
		MSC1	MSC2	MSC3	MSC4
Monosaccharide	Glucose	14.36±3.06	14.88±1.93	12.32±4.89	12.31±5.23
	Fructose	11.54±0.31	9.72±0.29	10.67±0.53	28.72±8.40
ผลรวม		25.89^b±3.43	24.60^b±1.84	22.99^b±5.42	41.03^a±12.30
Disaccharide	sucrose	29.25±5.82	25.48±5.39	24.96±5.26	22.81±12.22
ผลรวม		29.25±5.82	25.48±5.39	24.96±5.26	22.81±12.22
Polysaccharide	Inulin	27.54±7.84	38.49±6.56	38.74±15.27	25.87±3.75
	1-kestose	6.16±0.99	4.34±0.71	3.54±0.57	1.92±1.43
	Nystose	5.01±2.25	2.71±0.73	3.21±1.49	0.59±0.91
	Unknown 1	0.76±1.17	3.46±5.36	3.87±5.99	7.36±7.43
	Unknown 2	5.35±0.12	0.17±0.27	2.35±1.99	0.51±0.51
	Unknown 3	0.03±0.05	0.74±1.15	0.17±0.20	0.12±0.06
	Unknown 4	-	-	0.35±0.40	-
ผลรวม		44.85±9.66	49.17±7.31	51.82±10.25	35.74±9.10

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 3); - หมายถึง ไม่พบ peak เกิดขึ้น

ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05)

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

ตารางที่ 14 สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นแก่น
ตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC

ชนิดของสาร		สัดส่วน (%)*			
		MSC1	MSC2	MSC3	MSC4
Monosaccharide	Glucose	19.16±2.52	16.59±6.12	22.54±3.69	10.16±1.36
	Fructose	14.15±2.28	10.83±4.12	14.00±1.46	23.03±4.09
ผลรวม		33.30±3.88	27.42±11.38	36.55±4.44	33.19±5.90
Disaccharide	sucrose	25.10±4.45	25.51±2.80	22.05±1.76	31.98±5.63
ผลรวม		25.10±4.45	25.51±2.80	22.05±1.76	31.98±5.63
Polysaccharide	Inulin	31.46±0.90	27.18±3.93	26.57±4.97	26.54±2.94
	1-kestose	3.20±0.15	6.33±1.35	4.63±1.07	2.28±0.09
	Nystose	3.37±2.92	3.34±1.00	2.08±0.62	1.69±2.61
	Unknown 1	3.41±2.82	5.33±2.54	8.06±1.23	1.26±1.03
	Unknown 2	0.16±0.19	4.80±4.06	0.06±0.06	1.66±2.57
	Unknown 3	0.08±0.09	0.07±0.10	-	0.08±0.09
	Unknown 4	-	0.04±0.05	-	1.41±1.24
	Unknown 5	-	-	-	0.08±0.09
ผลรวม		41.44±6.45	46.98±8.20	41.34±6.35	33.84±2.30

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 3); - หมายถึง ไม่พบ peak เกิดขึ้น

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

2.2 ปริมาณอินนูลินในสารสกัดจากต้นที่ชักนำได้

เมื่อวิเคราะห์การผลิตสารอินนูลินในสารสกัดจากต้นที่ชักนำได้โดยการประเมินค่าจาก non-reducing sugar พบว่า ปริมาณน้ำตาล non-reducing sugar ของต้นที่ชักนำได้บนอาหารสูตรต่างๆ นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยต้นแก่ต้นที่ชักนำได้จากข้อลำต้นในอาหารสูตร MSS1 ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับน้ำมะพร้าว (coconut water) ปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณของ non-reducing sugar มากที่สุด รองลงมาคือ MSS2 ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin ความเข้มข้น 3.0 มก./ล. ดังแสดงในตารางที่ 15 ส่วนการผลิตสารอินนูลินในสารสกัดจากต้นที่ชักนำได้จากแผ่นใบนั้นไม่สามารถวิเคราะห์ได้ เพราะไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นจากแผ่นใบได้

ตารางที่ 15 ปริมาณ non-reducing sugar ในสารสกัดจากต้นที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่ต้นบนอาหารวุ้นสูตร MSS1 MSS2 และ MSS3 นาน 30 วัน

สูตรอาหาร	Non-reducing sugar (มก./กรัมน้ำหนักสด)*	
	ใบ	ลำต้น
MSS 1	0.0000	$8.5257^a \pm 1.44$
MSS 2	0.0000	$5.8206^b \pm 1.26$
MSS 3	0.0000	0.0000

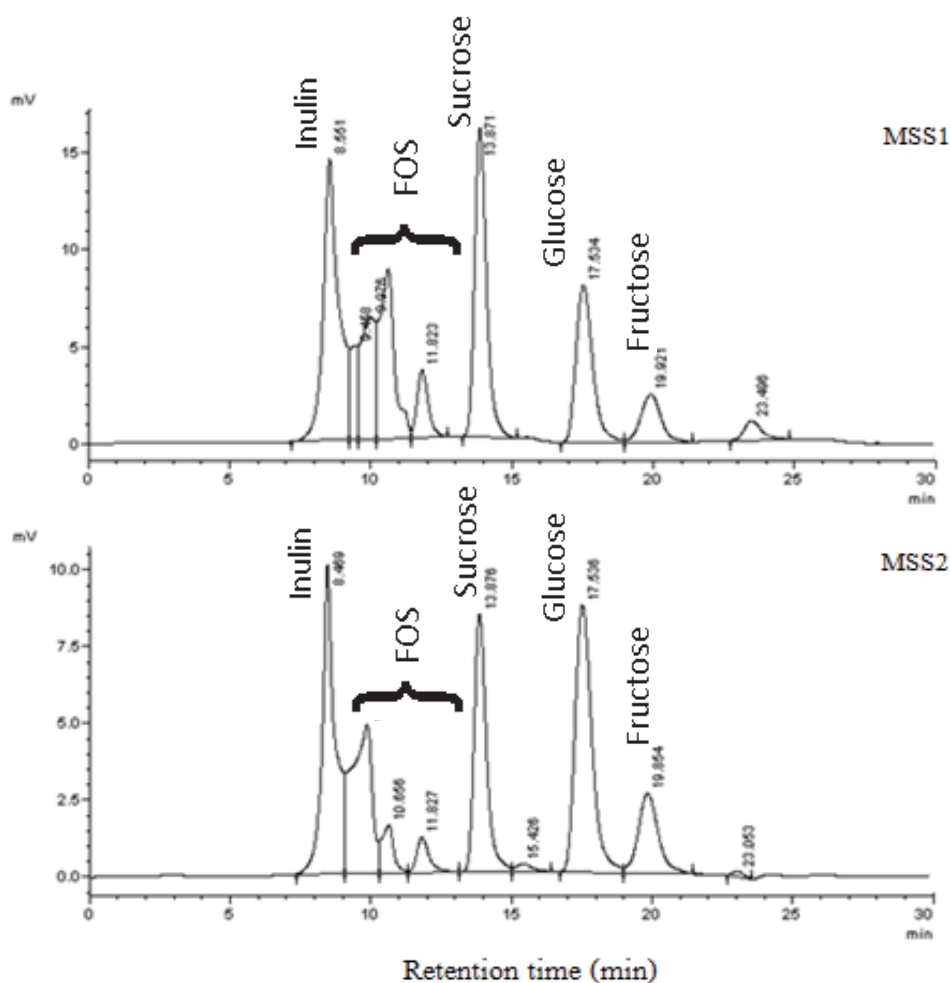
* หมายถึง ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), ($n = 3$)

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

หมายเหตุ : MSS1 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Coconut water 15 เปอร์เซ็นต์

MSS2 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก./ล.

MSS3 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3.0 มก./ล.



ภาพที่ 14 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากต้นที่ชักนำจากข้อลำต้นแก่นมะวันบนอาหารสูตรต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : MSS 1 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Coconut water 15 เปอร์เซ็นต์

MSS 2 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก./ล.

เมื่อเปรียบเทียบค่า RT ของพีคต่างๆ ที่ปรากฏในโครมาโตแกรมของสารสกัดจากต้นที่ชักนำได้ (ภาพที่ 14) กับค่า RT ของสารมาตรฐาน (ภาพที่ 11) พบว่า ต้นที่ชักนำได้มีการสร้างอินนูลินได้ นอกจากนี้ยังพบการสังเคราะห์ FOS ชนิดต่างๆ และน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสด้วย และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของอินนูลิน FOS ชนิดต่างๆ และน้ำตาลซูโครสดังแสดงในตารางที่ 16 ก็พบว่า ให้สัดส่วนที่สูงเช่นเดียวกับปริมาณ non-reducing sugar ที่วิเคราะห์ได้ดังแสดงในตารางที่ 15 โดยผลการทดลองได้ชี้ให้เห็นว่า ชนิดของ non-reducing sugar ส่วนใหญ่ที่พบในสารสกัดจากต้นที่ชักนำได้ก็คือ อินนูลิน และ FOS ชนิดต่างๆ นั่นเอง และ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณ อินนูลิน และ FOS ชนิดต่างๆ ก็พบว่า ปริมาณที่พบในต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร

MSS2 ที่เติม NAA 0.5 มก/ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก/ล. นั้นสูงกว่าที่พบในต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSS1 ที่เติม NAA 0.5 มก/ล. ร่วมกับ Coconut water 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลที่คล้ายกับความสัมพันธ์ของการสร้างอินนูลินในแคลลัสคือ ไม่ได้แปรผันตรงกับอัตราการเจริญเติบโต

ตารางที่ 16 สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากต้นที่ชักนำจากข้อลำต้นแก่บนตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC

ชนิดของสาร		สัดส่วน (%)*		
		MSS1	MSS2	MSS3
Monosaccharide	Glucose	10.61±8.27	20.62±5.20	-
	Fructose	2.64±2.42	8.58±2.52	-
ผลรวม		13.25^{ab}±11.48	29.21^a±8.17	-
Disaccharide	sucrose	13.48±8.87	17.66±1.73	-
ผลรวม		13.48±8.87	17.66±1.73	-
Polysaccharide	Inulin	46.76±13.90	29.65±11.10	-
	1-kestose	2.11±1.89	5.77±4.19	-
	Nystose	5.13±6.98	6.60±2.66	-
	Unknown 1	3.66±3.25	7.72±7.89	-
	Unknown 2	3.41±5.28	1.40±0.76	-
	Unknown 3	0.63±0.97	0.22±0.10	-
ผลรวม		51.37^b±9.76	72.64^a±21.99	-

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 3) ; - หมายถึง ไม่พบ peak เกิดขึ้น

ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05)

หมายเหตุ : MSS1 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก/ล. ร่วมกับ Coconut water 15 เปอร์เซ็นต์

MSS2 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก/ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก/ล.

MSS3 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก/ล. ร่วมกับ BA 3.0 มก/ล.

2.3 ปริมาณอินนูลินของสารสกัดจากรากที่ชักนำได้

จากการวิเคราะห์การผลิตสารอินนูลินโดยพิจารณาจากปริมาณ non-reducing sugar ในสารสกัดจากรากแก่ในวันที่ได้จากการชักนำบนอาหารสังเคราะห์สูตร ½ MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก./ล. เป็นเวลา 45 วัน พบว่าปริมาณ non-reducing sugar ในสารสกัดจากรากแก่ในวันที่ชักนำได้จากลำต้นและแผ่นใบบนอาหารสูตรต่างๆ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยอาหารสูตร MSR5 ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. และ IBA ความเข้มข้น 2.0 มก./ล. มีปริมาณ non-reducing sugar มากที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น (ตารางที่ 17) ซึ่งอาหารสูตรดังกล่าว เป็นสูตรอาหารที่ให้ปริมาณรากค่อนข้างน้อยมากเมื่อเทียบกับรากที่ชักนำในสูตรอาหารอื่น ดังนั้น การเจริญของรากกับการสร้างอินนูลินจึงไม่แปรตามกันดังเช่นที่พบในแคลลัสและต้นที่ชักนำได้

ตารางที่ 17 ปริมาณ non-reducing sugar ของสารสกัดจากรากที่ชักนำได้จากแผ่นใบและลำต้นแก่บนตะวันบนอาหารฐานสูตร MSR1 MSR2 MSR3 MSR4 และ MSR5 นาน 45 วัน

สูตรอาหาร	Non-reducing sugar (มก./กรัมน้ำหนักสด)*	
	แผ่นใบ	ลำต้น
MSR 1	0.0000	2.404 ^b ± 0.47
MSR 2	3.611 ^b ± 2.89	5.034 ^{ab} ± 3.96
MSR 3	6.555 ^{ab} ± 4.38	4.118 ^{ab} ± 0.97
MSR 4	4.871 ^{ab} ± 2.96	3.040 ^b ± 0.71
MSR 5	11.656 ^a ± 5.62	7.263 ^a ± 1.77

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 3)

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

หมายเหตุ : MSR1 คือ ½ MS

MSR2 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

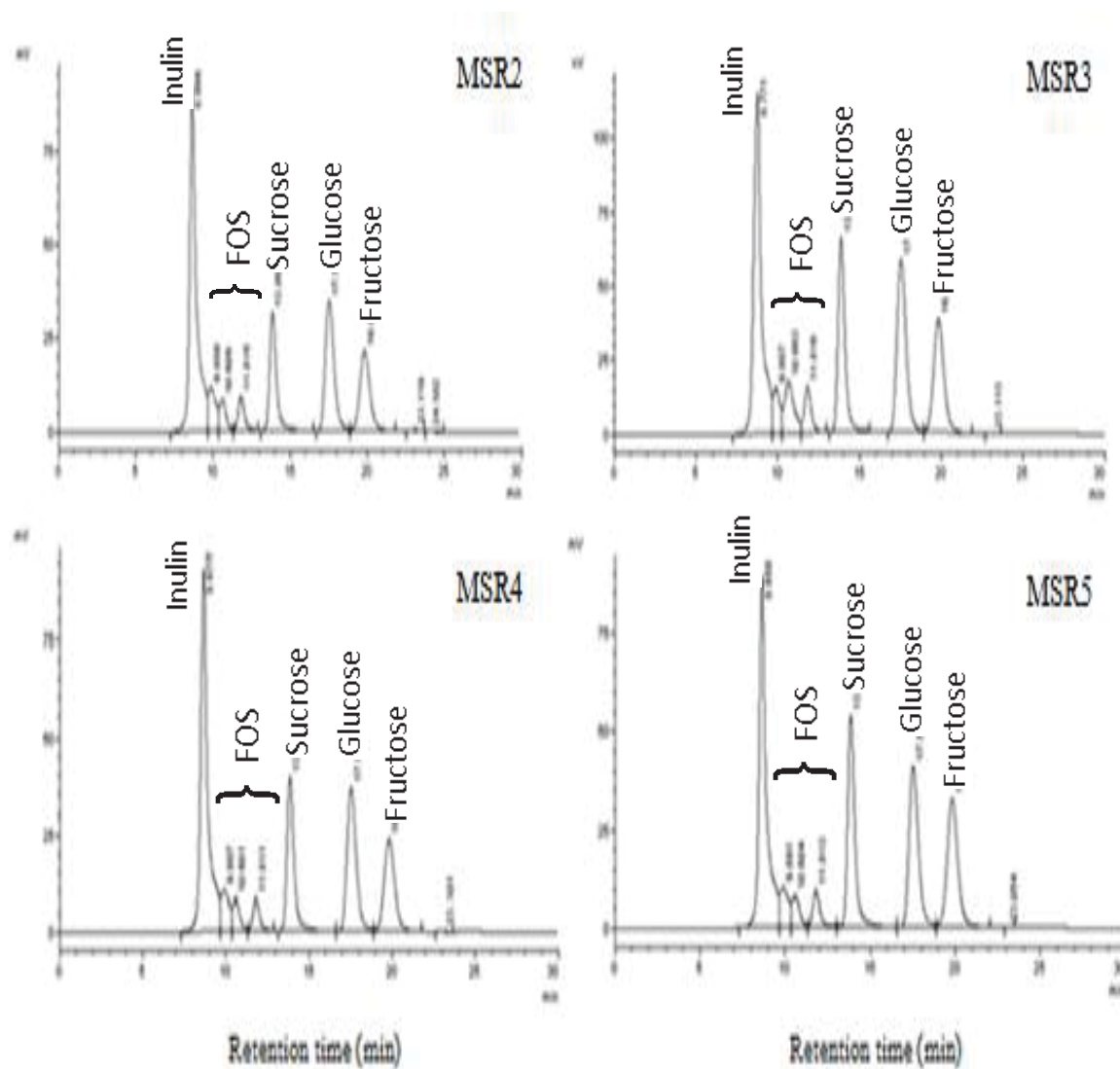
MSR3 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.0 มก./ล.

MSR4 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.5 มก./ล.

MSR5 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2.0 มก./ล.

และจากการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของสารสกัดจากรากที่ชักนำได้ด้วย HPLC (ภาพที่ 15 และ 16) ก็จะพบรูปแบบของการผลิตสารดังเช่นที่ตรวจพบในสารสกัดจากแคลลัสและต้น แต่มีข้อแตกต่างกันในเรื่องของปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (ตารางที่ 18 และ 19) ที่พบในปริมาณที่สูงกว่าในแคลลัสและต้นที่ชักนำได้ โดยรากจัดเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถสร้างอาหารได้เองเรียกว่า sink organ ทำให้ต้องอาศัยแหล่งคาร์บอนที่ลำเลียงมาจากส่วนอื่นเพื่อใช้ในการแบ่งเซลล์และเจริญเติบโต ดังนั้น การตรวจพบปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สูงน่าจะนำไปสู่ข้อสันนิษฐานที่ว่า เซลล์ในรากต้องการใช้สารดังกล่าวเพื่อเจริญเติบโตมากกว่าการนำไปใช้ในการสังเคราะห์อินนูลิน

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่มีได้ดังตารางที่ 18 และ 19 พบว่าเปอร์เซ็นต์ของ non-reducing sugar (disaccharide และ polysaccharide) ในรากที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้นบนอาหารสูตร MSR5 คือ $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2.0 มก./ล. ให้เปอร์เซ็นต์ non-reducing sugar สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับรากที่ชักนำจากอาหารสูตรอื่นๆ ซึ่งผลที่ได้นั้นมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกับการวิเคราะห์ทางเคมีที่ผ่านมา และ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ที่พบในสารสกัดจากรากที่ชักนำได้ทั้งจากแผ่นใบและลำต้นก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ที่พบในแคลลัสและต้นที่ชักนำได้แล้ว จะเห็นว่า แคลลัสสามารถสร้างอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ได้ในปริมาณที่สูงที่สุดจึงเหมาะต่อการนำไปใช้เป็นทางเลือกในการผลิตอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง



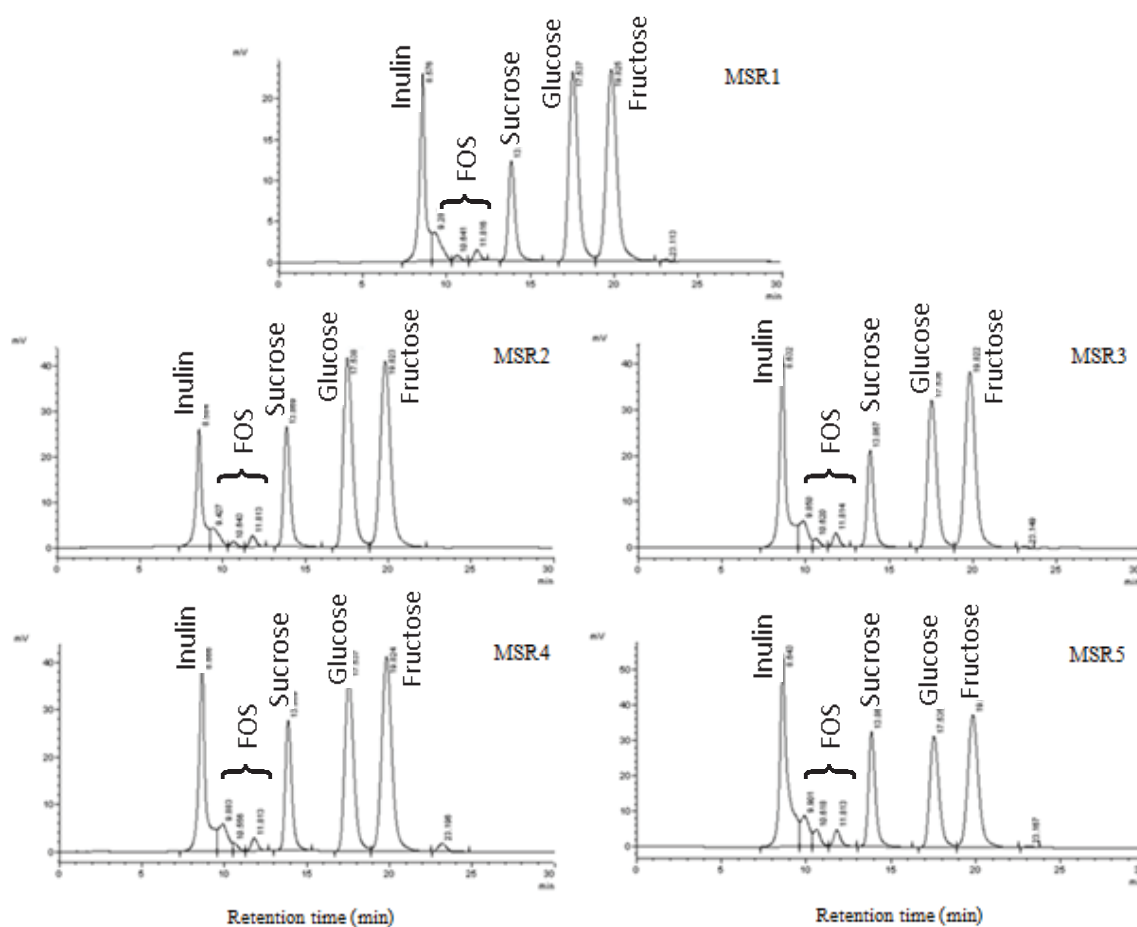
ภาพที่ 15 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากรากที่ชักนำจากแผ่นใบแก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : MSR2 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

MSR3 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.0 มก./ล.

MSR4 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.5 มก./ล.

MSR5 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2.0 มก./ล.



ภาพที่ 16 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากรากที่ชักนำจากข้อลำต้นแก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : MSR1 คือ ½ MS

MSR2 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

MSR3 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.0 มก./ล.

MSR4 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.5 มก./ล.

MSR5 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2.0 มก./ล.

ตารางที่ 18 สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากรากที่ชั่งน้ำหนักแผ่นใบแก่้นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC

ชนิดของสาร		สัดส่วน (%)*				
		MSR1	MSR2	MSR3	MSR4	MSR5
Monosaccharide	Glucose	-	27.72±7.45	24.64±7.02	22.87±2.37	21.30±3.85
	Fructose	-	24.05±10.32	17.14±5.43	22.83±8.89	17.66±2.82
ผลรวม		-	51.77±16.01	41.77±13.83	45.70±11.54	38.96±1.92
Disaccharide	sucrose	-	12.03±1.27	20.10±8.40	16.71±2.58	22.47±2.92
ผลรวม		-	12.03±1.27	20.10±8.40	16.71±2.58	22.47±2.92
Polysaccharide	Inulin	-	27.83±11.58	30.07±4.22	31.52±5.74	32.25±2.25
	1-kestose	-	2.12±1.14	3.69±0.67	2.53±0.47	3.15±0.40
	Nystose	-	1.66±1.51	3.36±1.13	1.57±1.32	1.60±0.54
	Unknown 1	-	4.51±3.68	1.49±1.27	1.73±1.36	1.24±0.14
	Unknown 2	-	0.06±0.10	0.02±0.03	0.22±0.35	0.01±0.01
	Unknown 3	-	-	-	0.03±0.04	-
ผลรวม		-	36.12±14.72	38.11±9.43	37.34±10.87	38.57±5.13

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 3) ; - หมายถึง ไม่มี peak เกิดขึ้น

หมายเหตุ: MSR1 คือ ½ MS, MSR2 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล.+ IBA 0.5 มก./ล., MSR3 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล.+ IBA 1.0 มก./ล.,

MSR4 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. + IBA 1.5 มก./ล., MSR5 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. + IBA 2.0 มก./ล.

ตารางที่ 19 สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากรากที่ชั่งน้ำหนักข้อได้แก่ต้นมะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC

ชนิดของสาร		สัดส่วน (%)*				
		MSR1	MSR2	MSR3	MSR4	MSR5
Monosaccharide	Glucose	28.90±1.19	31.99±3.78	30.87±2.74	27.77±2.59	27.22±3.80
	Fructose	34.34±0.18	35.61±0.48	33.91±0.44	31.78±1.59	31.61±3.94
ผลรวม		63.25±1.6	65.34±3.0	61.41±3.57	59.97±3.64	56.43±8.36
Disaccharide	sucrose	15.59±3.37	12.19±1.94	15.04±2.81	14.77±2.41	16.29±1.60
ผลรวม		15.59±3.37	12.19±1.94	15.04±2.81	14.77±2.41	16.29±1.60
Polysaccharide	Inulin	17.59±0.74	15.87±2.86	17.44±4.02	19.50±2.26	20.34±6.68
	1-kestose	1.45±0.30	1.49±0.30	1.51±0.27	1.72±0.50	1.76±0.53
	Nystose	0.51±0.05	0.83±0.29	0.66±0.26	0.66±0.11	1.38±0.75
	Unknown 1	1.50±1.39	1.86±0.86	3.63±0.29	1.53±2.37	1.72±2.55
	Unknown 2	0.11±0.09	2.32±1.91	1.43±2.22	1.49±2.14	0.24±0.23
	Unknown 3	-	0.09±0.14	0.09±0.08	0.35±0.54	-
ผลรวม		21.05±2.88	22.46±5.29	23.45±5.22	24.91±1.75	27.00±8.98

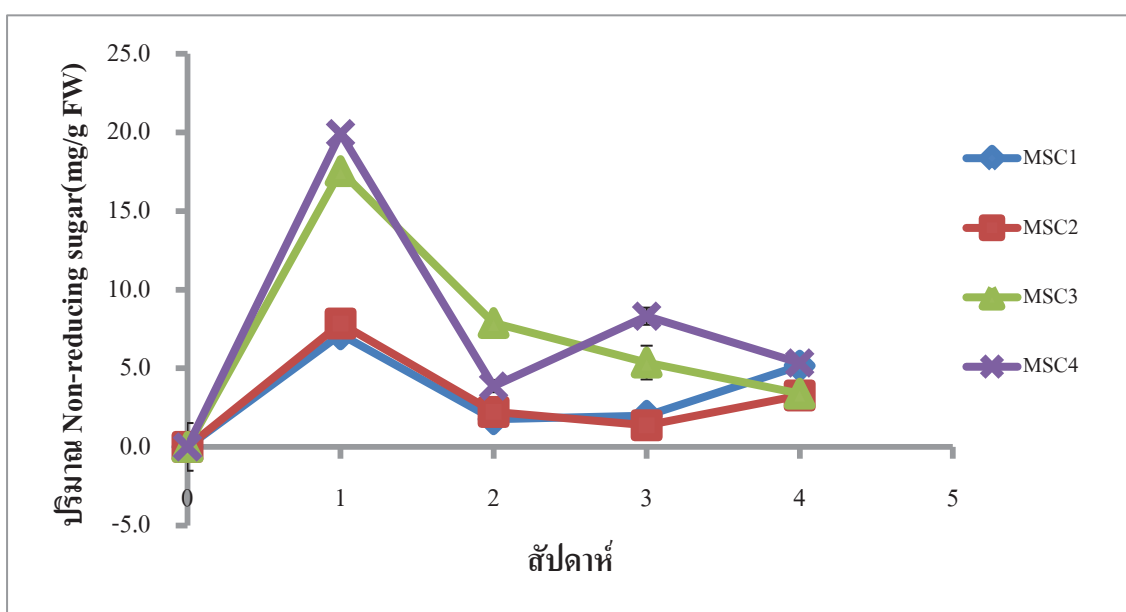
* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 3) ; - หมายถึง ไม่มี peak เกิดขึ้น

หมายเหตุ: MSR1 คือ ½ MS, MSR2 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล.+ IBA 0.5 มก./ล., MSR3 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล.+ IBA 1.0 มก./ล.,

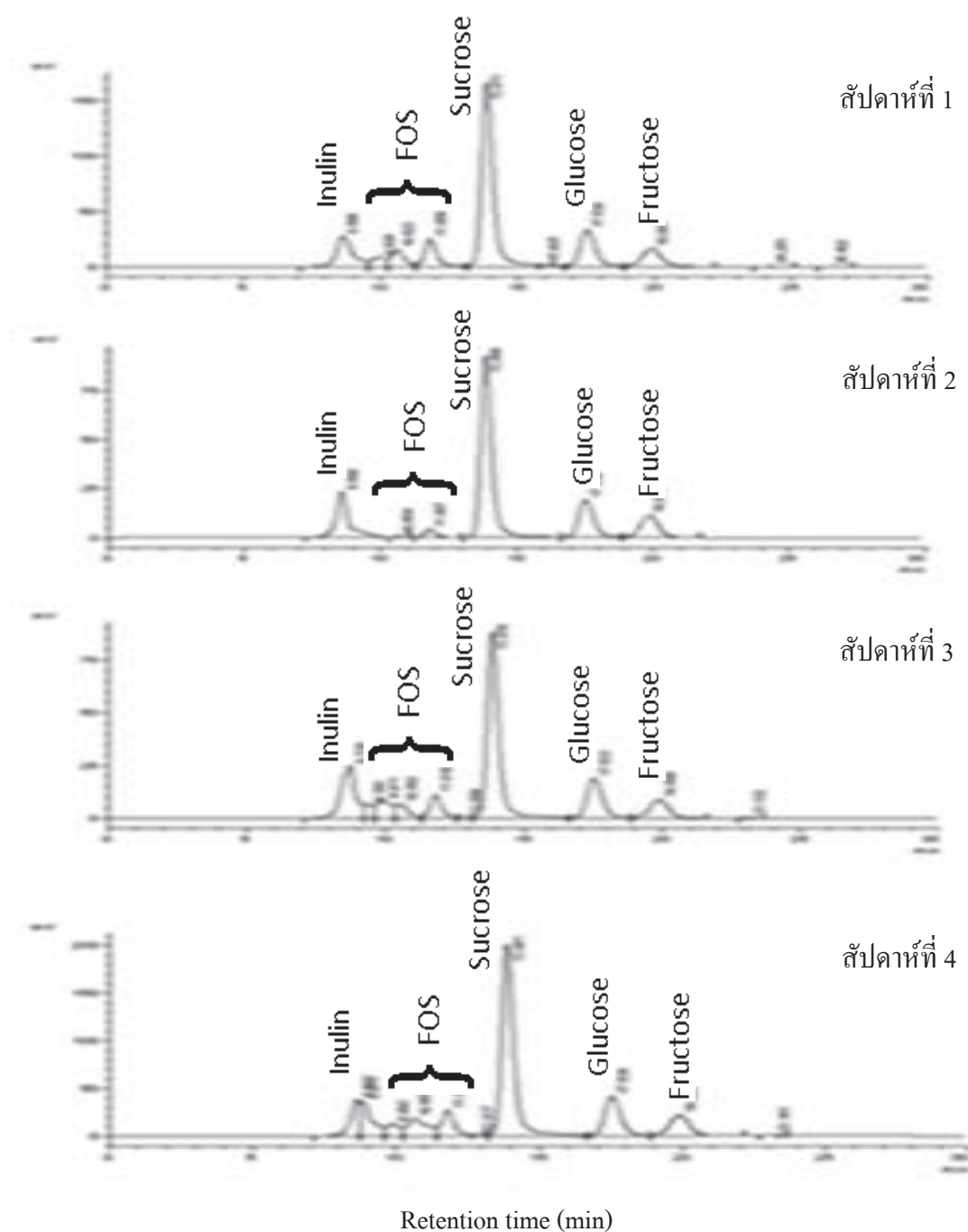
MSR4 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. + IBA 1.5 มก./ล., MSR5 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. + IBA 2.0 มก./ล.

2.4 ชนิดและปริมาณอินนูลินของเซลล์แขวนลอย

จากการวิเคราะห์การผลิตสารอินนูลินโดยจะพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (non-reducing) จากความแตกต่างของน้ำตาลรวม (total sugar) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ในเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอาหารเหลวสังเคราะห์ 4 สูตร โดยทุกสูตรอาหารมีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินชนิด BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับออกซินชนิด NAA IAA IBA หรือ 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มก./ล. (ตารางที่ 5) นาน 30 วัน พบว่าเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในทุกสูตรอาหารมีปริมาณของ non-reducing sugar เพิ่มขึ้นในสัปดาห์แรก จากนั้นจะมีปริมาณลดลงเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 3 และ 4 ยกเว้นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSC3 และ MSC4 ที่มีปริมาณของ non-reducing sugar ลดลงอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 17) และจากการวิเคราะห์ชนิดและองค์ประกอบของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยด้วย HPLC (ภาพที่ 18-21) ก็จะพบรูปแบบของการผลิตสารคล้ายกับที่ตรวจพบในสารสกัดจากแคลลัส

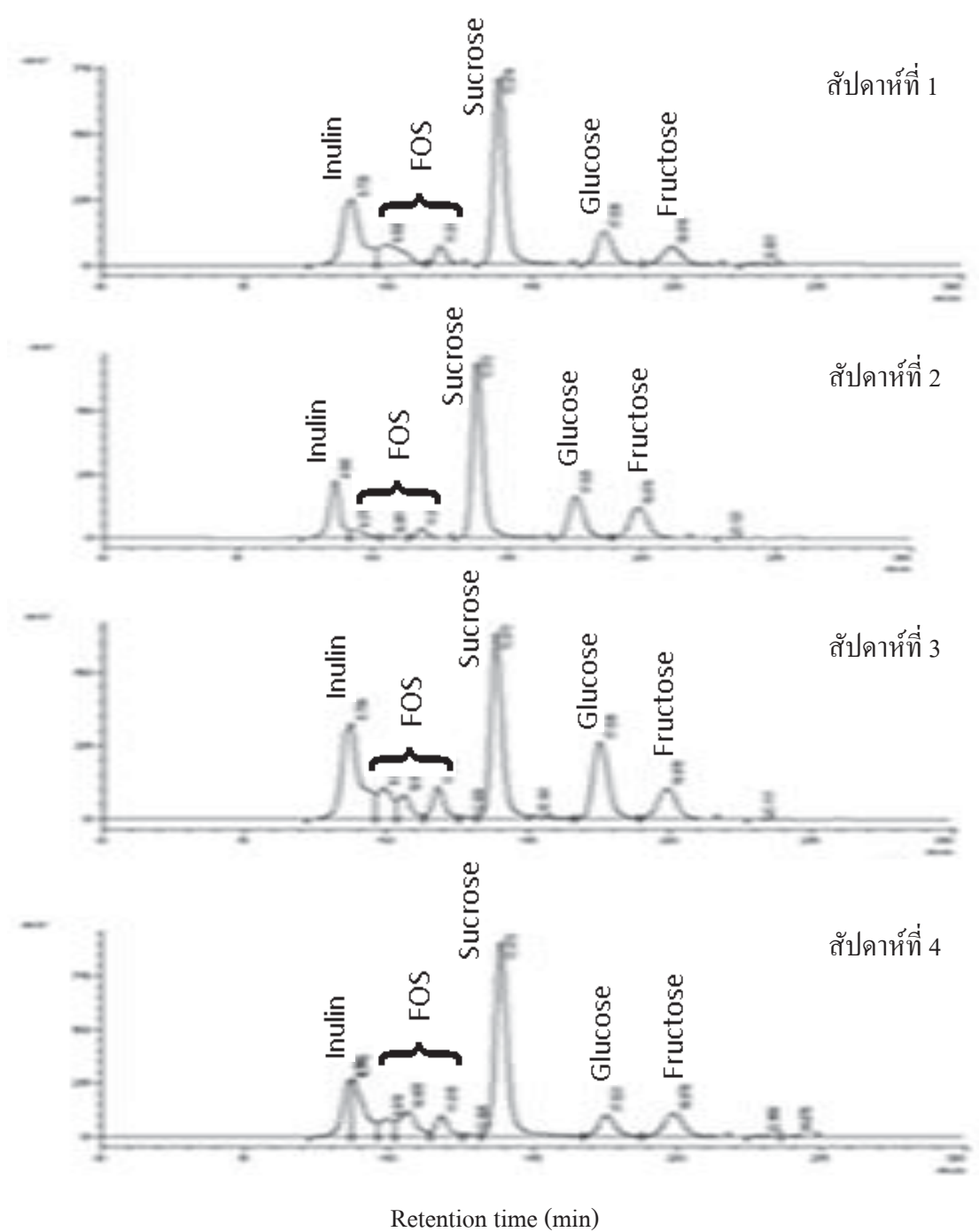


ภาพที่ 17 ปริมาณ non-reducing sugar ของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 เป็นเวลา 4 สัปดาห์



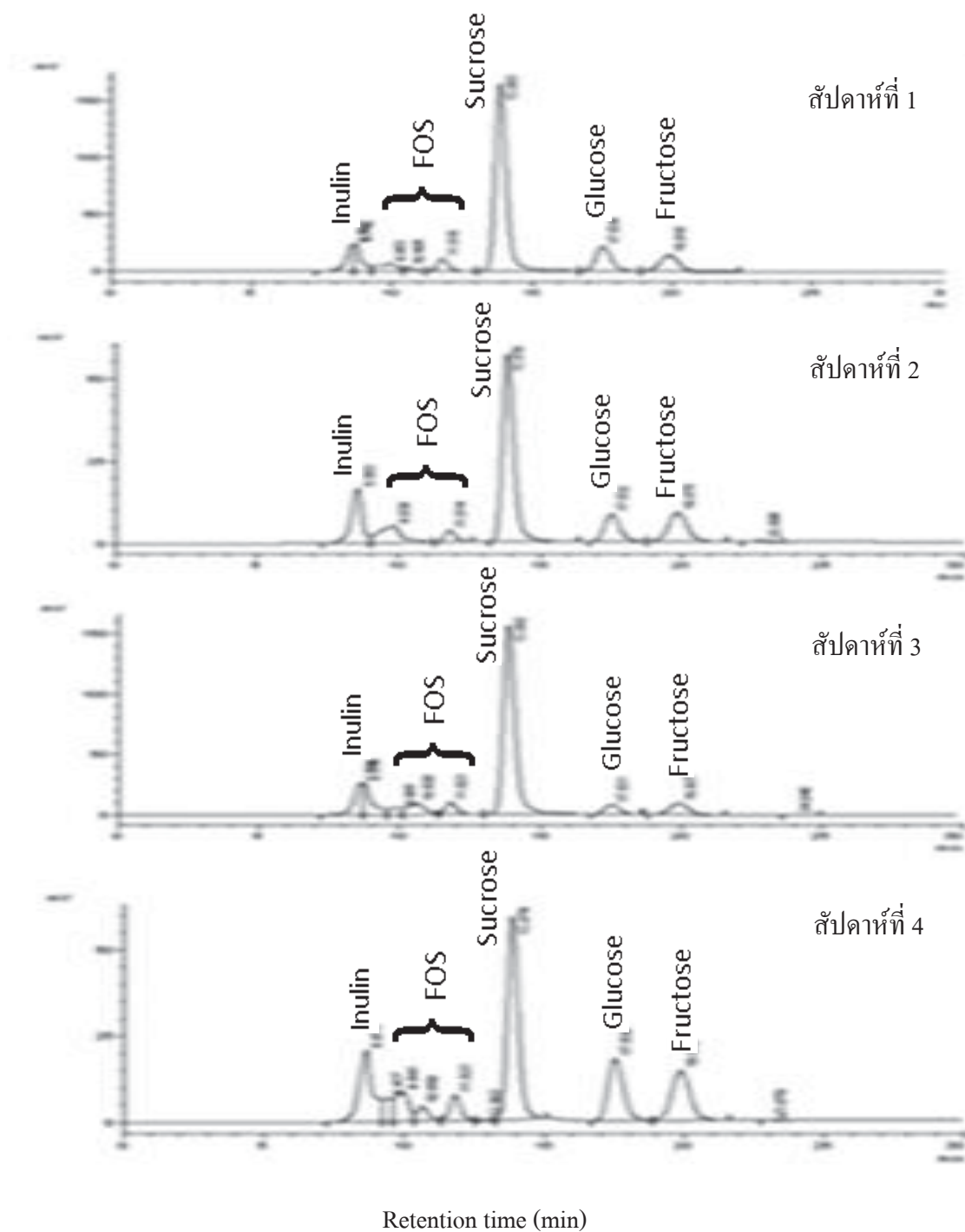
ภาพที่ 18 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MSC1 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.



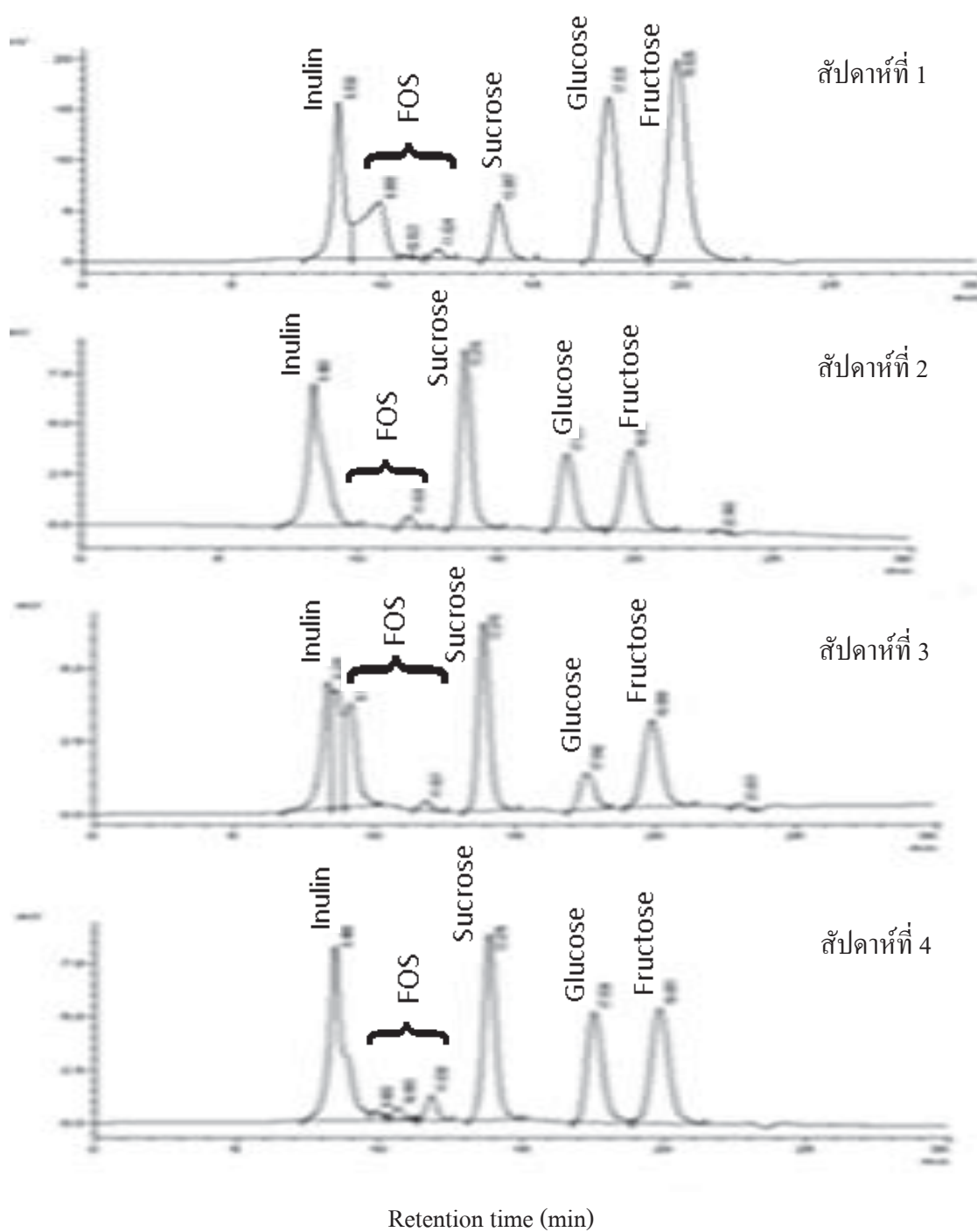
ภาพที่ 19 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MSC2 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.



ภาพที่ 20 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MSC3 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.



ภาพที่ 21 โครมาโตแกรมของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MSC4 ที่ระยะเวลา 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

หมายเหตุ : MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

เมื่อวิเคราะห์สัดส่วนขององค์ประกอบที่พบในสารสกัดจากแคลลัสดังแสดงในตารางที่ 20-23 พบว่า สัดส่วนของอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ในทุกสูตรอาหารมีค่าสูงขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงและเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 2-3 และลดลงในสัปดาห์ที่ 4 ดังนั้น หากต้องการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเพื่อผลิตอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ในแต่ละสูตรอาหารการเพาะเลี้ยงเพียง 2 สัปดาห์ก็น่าจะเพียงพอ และเมื่อวิเคราะห์สัดส่วนของอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ที่พบในเซลล์แขวนลอยกับการเพาะเลี้ยงในรูปแบบอื่นๆ ก็จะเห็นว่า ให้สัดส่วนที่ค่อนข้างสูง ซึ่งหากมีการปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ เช่น ความเร็วรอบในการเขย่า แสง และองค์ประกอบต่างๆ ในอาหารเพาะเลี้ยงก็น่าจะนำไปสู่การเพิ่มการผลิตอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ได้เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแคลลัส

ตารางที่ 20 สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่้นะวัน ระยะเวลา 1 สัปดาห์บนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC

ชนิดของสาร		สัดส่วน (%)			
		MSC1	MSC2	MSC3	MSC4
Monosaccharide	Glucose	13.442	10.389	11.088	26.46
	Fructose	8.280	6.869	8.660	36.50
ผลรวม		21.722	17.258	19.748	62.96
Disaccharide	sucrose	50.529	43.690	59.698	6.50
ผลรวม		50.529	43.690	59.698	6.50
Polysaccharide	Inulin	11.521	24.510	5.585	15.87
	1-kestose	7.972	4.136	4.121	0.96
	Nystose	5.203	-	1.062	0.06
	Unknown 1	2.857	9.971	5.547	13.64
	Unknown 2	0.045	0.435	4.239	-
	Unknown 3	0.095	-	-	-
	Unknown 4	0.056	-	-	-
ผลรวม		72.279	82.742	80.252	37.03

- หมายถึง ไม่พบ peak เกิดขึ้น

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล. MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล.

ร่วมกับ IAA 1 มก./ล. MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล. และ MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

ตารางที่ 21 สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน
ระยะเวลา 2 สัปดาห์บนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC

ชนิดของสาร		สัดส่วน (%)			
		MSC1	MSC2	MSC3	MSC4
Monosaccharide	Glucose	15.675	15.488	9.828	16.573
	Fructose	11.039	13.851	12.854	19.932
ผลรวม		26.714	29.339	22.682	36.505
Disaccharide	sucrose	55.026	48.914	50.924	28.928
ผลรวม		55.026	48.914	50.924	28.928
Polysaccharide	Inulin	15.894	15.812	13.982	32.548
	1-kestose	2.256	2.479	2.898	1.723
	Nystose	0.111	0.438	-	-
	Unknown 1	-	2.925	8.884	0.296
	Unknown 2	-	0.093	0.630	-
ผลรวม		73.287	70.661	77.318	63.495

- หมายถึง ไม่พบ peak เกิดขึ้น

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

ตารางที่ 22 สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน
ระยะเวลา 3 สัปดาห์บนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC

ชนิดของสาร		สัดส่วน (%)			
		MSC1	MSC2	MSC3	MSC4
Monosaccharide	Glucose	13.180	17.427	3.930	6.847
	Fructose	7.314	8.444	5.740	19.405
ผลรวม		20.494	25.871	9.670	26.252
Disaccharide	sucrose	45.537	31.970	63.172	26.751
ผลรวม		45.537	31.970	63.172	26.751
Polysaccharide	Inulin	16.084	25.103	7.049	13.460
	1-kestose	5.695	5.422	3.970	1.163
	Nystose	3.504	4.375	5.556	0.000
	Unknown 1	2.287	6.581	8.149	16.176
	Unknown 2	5.922	0.519	2.353	15.537
	Unknown 3	0.389	0.071	0.082	0.661
	Unknown 4	0.088	0.089	-	-
ผลรวม		79.506	74.130	90.331	73.748

- หมายถึง ไม่พบ peak เกิดขึ้น

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

ตารางที่ 23 สัดส่วนของสารชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก้วน้วัน
ระยะเวลา 4 สัปดาห์บนอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ HPLC

ชนิดของสาร		สัดส่วน (%)			
		MSC1	MSC2	MSC3	MSC4
Monosaccharide	Glucose	12.931	6.562	15.481	19.183
	Fructose	8.297	8.416	14.779	22.788
ผลรวม		21.228	14.978	30.260	41.971
Disaccharide	sucrose	47.195	44.784	36.293	24.591
ผลรวม		47.195	44.784	36.293	24.591
Polysaccharide	Inulin	6.533	8.581	15.726	29.041
	1-kestose	6.909	4.837	4.578	2.943
	Nystose	6.913	8.053	2.787	1.083
	Unknown 1	7.964	13.393	3.431	0.370
	Unknown 2	3.187	4.548	6.722	-
	Unknown 3	0.021	0.557	0.122	-
	Unknown 4	0.052	0.164	0.083	-
	Unknown 5	-	0.104	-	-
ผลรวม		78.773	85.021	69.742	58.028

- หมายถึง ไม่พบ peak เกิดขึ้น

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

3. การศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติก

3.1 ศึกษาองค์ประกอบในสารสกัดจากหัวสดแก่แค้นตะวัน รากและแคลลัสที่ชักนำได้ของแค้นตะวัน

ก่อนที่จะมีการศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ที่พบในสารสกัดจากแคลลัสและรากที่ชักนำได้ ก็ได้มีการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากแคลลัสและรากที่ได้จากการชักนำจากลำต้นและแผ่นใบแค้นตะวันบนอาหาร MS ที่มีการเติม BA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1.0 มก./ล. และ 1/2MS ที่มีการเติม NAA 1.0 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. และหัวสด (tuber) ที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบก่อนด้วย HPLC พบว่า รูปแบบ (profile) ของสารที่ตรวจวิเคราะห์ได้ในแคลลัสและรากที่ชักนำได้ในหลอดทดลองนั้นมีความคล้ายคลึงกับ profile ของสารที่ตรวจวิเคราะห์ได้ในหัวสด ซึ่งตรวจพบทั้งหมด 8 peaks และจากการเปรียบเทียบค่า retention time (RT) ของ peak ต่างๆ กับ Retention time ของสารมาตรฐานที่ใช้ทั้งหมด 6 ชนิด คือ inulin from chicory (DP เฉลี่ยประมาณ 10-14) (Franck and Leenheer, 2005) nystose (DP3) 1-kestose (DP2) sucrose glucose และ fructose ทำให้สามารถระบุชนิดของสารได้ 6 peaks และมีอีก 2 peaks ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ (unknowns) แต่เมื่อพิจารณาจากค่า RT ของ unknowns ที่มีค่าประมาณ 9 นาทีกว่าๆ ที่อยู่ระหว่างค่า RT ของ inulin from chicory และ nystose จึงอาจสันนิษฐานได้ว่า unknowns ดังกล่าวน่าจะเป็น FOS ที่มีค่า DP อยู่ระหว่าง 4- 9 อย่างไรก็ตาม จะพบว่า โดยรวมแล้วสารสกัดทั้งสามมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกันคือ ประกอบด้วย inulin unknown FOS nystose 1-kestose sucrose glucose และ fructose โดยพบ inulin และ FOS (unknown FOS+ nystose+ 1-kestose) ในสัดส่วนมากที่สุด แต่มีข้อแตกต่างกันคือ ในแคลลัสและรากที่ชักนำได้ในหลอดทดลองมีสัดส่วนของ inulin และ FOS ที่ใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 46% และ 56% แต่ในหัวสดมีสัดส่วนของ inulin และ FOS มากกว่าสองเท่าคือ มีอยู่ประมาณ 93% ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 24 และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสัดส่วนของน้ำตาลชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก inulin และ FOS ที่ตรวจพบในแคลลัสและรากก็จะเห็นได้ว่า แคลลัสจะมีการสะสมน้ำตาลซูโครสในสัดส่วนที่สูง แต่ในรากที่ชักนำได้นั้นจะสะสมน้ำตาลกลูโคสในสัดส่วนที่มากกว่า

ตารางที่ 24 องค์ประกอบของสารสกัดจากแคลลัสและรากที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง และหัวสด
แก่นตะวันจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

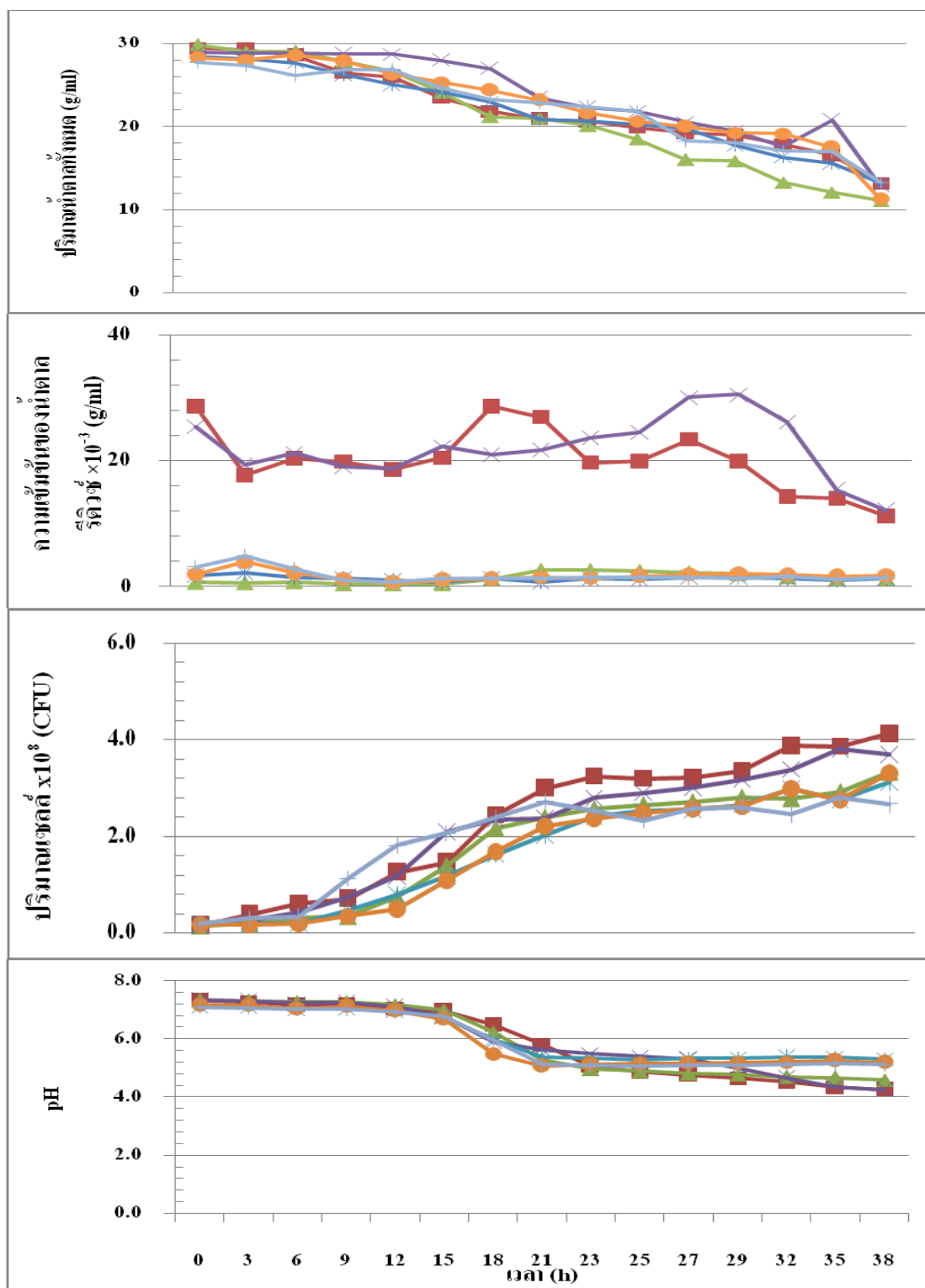
Plant samples	Retention time	ชนิดสาร	ความเข้มข้น (mg/ml)	สัดส่วน (%)	
Callus	8.502	inulin (DP 6-10)	0.898	23.318	46.212
	9.050	Unknown	-	9.520	
	9.880	Unknown	-	3.302	
	10.662	Nystose (DP 3)	0.161	4.181	
	11.826	1-kestose (DP2)	0.201	5.891	
	13.877	Sucrose	1.095	33.803	33.803
	15.453	Unknown	-	0.233	0.233
	17.552	Glucose	0.299	9.092	9.092
	19.843	Fructose	0.202	6.516	6.516
Induced root	8.7	inulin (DP 6-10)	1.736	45.971	55.659
	9.851	unknown	-	3.135	
	10.6	Nystose (DP 3)	0.117	3.572	
	11.8	1-kestose (DP2)	0.087	2.981	
	13.9	Sucrose	0.245	8.784	8.784
	17.5	Glucose	0.659	23.524	23.524
	19.8	Fructose	0.266	10.055	10.055

ตารางที่ 24 (ต่อ)

Plant samples	Retention time	ชนิดสาร	ความเข้มข้น (mg/ml)	สัดส่วน (%)	
Tuber	8.770	Inulin (DP 6-10)	3.584	72.406	92.945
	9.852	Unknown	-	8.264	
	10.657	Nystose (DP3)	0.337	6.803	
	11.996	1-kestose (DP2)	0.220	5.472	
	13.657	Sucrose	0.196	4.639	4.639
	17.578	Glucose	0.032	0.755	0.755
	19.916	Fructose	0.056	1.410	1.410

เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ผลของ inulin และ FOS ในสารสกัดต่อการเจริญของ *Bifidobacterium* sp. จึงได้ควบคุมให้ปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นในอาหารทุกชุดเท่ากับปริมาณน้ำตาลรวมในอาหาร MRS ที่มีกลูโคส 2% (w/v) โดยเตรียมอาหารทั้งหมด 6 ชุด ดังนี้

1. อาหาร MRS ที่มี 2% Glucose
2. อาหาร MRS ที่มี Fructose โดยให้ Total sugar เท่ากับ 2%Glucose
3. อาหาร MRS ที่มี Sucrose โดยให้ Total sugar เท่ากับ 2%Glucose
4. อาหาร MRS ที่มี สารสกัดจากหัวสด โดยให้ Total sugar เท่ากับ 2%Glucose
5. อาหาร MRS ที่มี สารสกัดรากที่ชักนำได้ โดยให้ Total sugar เท่ากับ 2%Glucose
6. อาหาร MRS ที่มี สารสกัดแคลลัสที่ชักนำได้ ให้ Total sugar เท่ากับ 2%Glucose



ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรวม น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า pH และปริมาณเซลล์ *Bifidobacterium* sp. ในอาหาร MRS ที่มีการเสริมสารสกัดจากแคลลัส ราก และหัวสดให้มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากัน

น้ำตาลกลูโคส (■) น้ำตาลฟรุคโตส (×) น้ำตาลซูโครส (▲) สารสกัดจากหัวสด (*) สารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำได้ (●) และสารสกัดจากรากที่ชักนำได้ (+) ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากัน

จากผลการทดลองที่ได้ในภาพที่ 22 จะเห็นได้ว่า เมื่อมีการควบคุมให้ปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นในอาหารทุกชุดเท่ากับปริมาณน้ำตาลรวมในอาหาร MRS ที่มีกลูโคส 2% (w/v) นั้น เชื้อแบคทีเรียจะมีรูปแบบการเจริญที่เหมือนกันคือ ปริมาณเชื้อที่เพิ่มมากขึ้นในช่วงเวลาที่ 9-23 และค่า pH เริ่มลดลงในช่วงเวลาที่ 9 จนถึงช่วงเวลาที่ 13 ปริมาณน้ำตาลรวมจะลดลงเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นเช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็ลดลงเช่นเดียวกัน

หากเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในอาหารแต่ละชุดจะพบว่า อาหารที่มีกลูโคสและฟรุคโตสจะมีปริมาณที่สูงกว่าในอาหารชุดอื่นๆ ประมาณ 5-6 เท่า และอาหารที่มีเสริมสารสกัดจะมีน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าอาหารที่เสริมซูโครส เพราะในสารสกัดมีน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสรวมอยู่ด้วยนอกเหนือไปจากซูโครสและ inulin และ FOS โดยผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าอาหารที่มีการเสริมสารสกัดต่างๆ นั้นสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bifidobacterium* sp. ได้เทียบเคียงกับอาหาร MRS ปกติ คือมีค่า pH ของอาหารลดลง ในขณะที่ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นรูปแบบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *Bifidobacterium* sp. แม้จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่ามาก จึงอาจกล่าวได้ว่า ส่วนของ inulin และ FOS ที่พบในแคลลัสและรากที่ชักนำได้นั้นมีคุณสมบัติความเป็น prebiotics และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bifidobacterium* sp. ในอาหารที่เสริมสารสกัดชนิดต่างๆ ดังภาพที่ 22 จะเห็นว่า อาหารที่เสริมสารสกัดจากรากจะให้ผลที่ดีกว่าแคลลัส และหัวสด ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในรากที่ชักนำได้น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส นอกเหนือไปจาก inulin และ FOS ที่สูงกว่าที่พบในแคลลัส และหัวสด ซึ่งสารสกัดอย่างหลังนี้จะมีสัดส่วนของน้ำตาลซูโครส นอกเหนือไปจาก inulin และ FOS ในสัดส่วนที่สูง เซลล์จึงชอบที่จะใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญก่อน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืช

- การชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัสพบว่าอาหารสูตร MSC1 ที่เติมฮอร์โมน BA 1 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. สามารถชักนำให้แผ่นใบและลำต้นของแก่นตะวันเกิดแคลลัสได้มากที่สุด

- การชักนำและเพาะเลี้ยงต้น พบว่า ชี้นพืชที่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้คือ ส่วนของข้อ ลำต้นที่มีตาข้าง และอาหารสูตร MSS1 ที่มีการเติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว (coconut water) ปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์เป็นอาหารสูตรที่ให้จำนวนต้น และความยาวของต้นมากที่สุด แต่ในอาหารสูตรเดียวกันนี้ไม่สามารถชักนำให้ส่วนของแผ่นใบเกิดต้นได้

- การชักนำและเพาะเลี้ยงราก พบว่าอาหารสูตร MSR3 ที่มีการเติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 1.0 มก./ล. ให้จำนวนรากสูงที่สุด และปริมาณรากที่ชักนำได้สูงที่สุดมาจากรากที่ชักนำจากแผ่นใบ

- การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย พบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกสูตรมีปริมาณเพิ่มขึ้น เซลล์มีการแบ่งตัวสูงขึ้นทำให้ปริมาณเซลล์และน้ำหนักของเซลล์สูงขึ้นในสัปดาห์แรก จากนั้นการเจริญของเซลล์จะค่อนข้างคงที่และเริ่มลดปริมาณลง ซึ่งอาจเป็นเพราะปัจจัยบางอย่างภายในเซลล์หรืออาหารไม่เหมาะสม จึงทำให้การเจริญลดลง และมีบางส่วนที่ตายไปจึงทำให้การเพิ่มจำนวนหรือปริมาณของเซลล์นั้นไม่เปลี่ยนแปลงและลดลง

2. เมื่อวิเคราะห์การผลิตสารอินนูลิน โดยพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวิซ์ (non-reducing sugar) จากความแตกต่างของน้ำตาลรวม (total sugar) และปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ (reducing sugar) พบว่า แคลลัสที่ชักนำและเพาะเลี้ยงจากลำต้นบนอาหารสูตร MSC2 ที่เติมฮอร์โมน BA ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ให้ปริมาณของ non-reducing sugar สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่น นอกจากนั้นยังให้ปริมาณที่สูงกว่า non-reducing sugar ที่ได้จากการชักนำต้น ราก และเซลล์แขวนลอย

3. เมื่อวิเคราะห์สารสกัดตัวอย่างทั้งหมดด้วยวิธี HPLC พบว่า แคลลัส ต้น และรากที่ชักนำได้ รวมถึงเซลล์แขวนลอยมีการสร้างอินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ ได้ เช่นเดียวกับหัวแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ โดยแคลลัสและเซลล์แขวนลอยให้ปริมาณอินนูลิน และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ สูงกว่าการเพาะเลี้ยงต้นและรากที่ชักนำได้ แม้จะยังคงมี

ปริมาณการผลิตที่ต่ำกว่าหัวแค้นตะวันตกที่ปลูกในธรรมชาติ อยู่มาก แต่น่าจะเป็นอีกเทคนิคทางเลือกสำหรับผลิตอินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง ที่น่าจะพัฒนาให้เพิ่มการผลิตต่อไปได้หากมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต

4. อินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ชนิดต่างๆ ในสารสกัดจากแคลลัส รากที่ชักนำได้ และหัวสดแค้นตะวันตกมีคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติก โดยสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium sp.* ได้เทียบเคียงกับการเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ทัวไป

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นสามารถผลิตสารอินนูลินจากต้นแค้นตะวันตกได้ ซึ่งจะต้องอาศัยปัจจัยทางด้านของอาหารและระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้เพาะเลี้ยงจึงจะสามารถผลิตสารได้อย่างมีคุณภาพ

บรรณานุกรม

- บุษราภรณ์ งามปัญญา. 2548. เอกสารประกอบการเรียนการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ประศาสตร์ เกี่ยมณี. 2536. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. น. 158.
- ปิยะวัชร ผาสุก และสุมนา นิระ. 2553. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการเกษตรประจำปี 2553 ครั้งที่ 11. ผลของออกซินและไซโตไคนินที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแก่ต้นในสภาพปลอดเชื้อ. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. น. 472.
- ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก และ วิภาวรรณ เคนาอุประ. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2551. ผลของ NAA และ Kinetin ต่อการเกิดแคลลัสและรากของแก่นตะวัน. ห้องประชุมกวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พิภพ สดศรี. 2546. ผลของเยรูซาเลม อาร์ทีโซค (*Helianthus tuberosus* L.) เป็นสารทดแทนยาปฏิชีวนะต่อการเจริญเติบโตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และชีวภาพของลำไ้เล็กส่วนปลายและลำไ้ใหญ่ในลูกสุกรหย่านม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.
- ภิเชษฐ์ ใบเขียว และเพิ่มพูน กิรติกลีกร. 2551. อิทธิพลของไนโตรเจนและโพแทสเซียมต่อผลผลิตและคุณภาพของพืชพลังงานทดแทน : แก่นตะวัน. การประชุมสัมมนาวิชาการระบบเกษตรแห่งชาติ ครั้งที่ 4 ศูนย์ประชุมนานาชาติเอ็มเพรส เชียงใหม่. น. 439-446.
- รังสฤษฎ์ กาวีตะ. 2440. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช : หลักการและเทคนิค. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น. 219.
- วิภาวรรณ เคนาอุประ. 2550. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดหัวของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) และแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) ในสภาพปลอดทดลอง. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วิสุทธิ กิปทอง ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วีรณา สีนสวัสดิ์ ฟอ์เรอร์ สุมาลี โพธิ์ทอง อติศักดิ์ คำนวนศิลป์ และสุพจน์ กิตติบุญญา. 2550. การศึกษาการผลิตแก่นตะวันเพื่อการผลิตเอทานอล. น.187-193.

สุดารัตน์ คำพาปรีชา พวงสำลี หวังสมนึก สนั่น จอกลอย พินิจ หวังสมนึกและอรรันต์ พัฒโนทัย.

2551. ลักษณะสัณฐานและกายวิภาคของแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) ที่ปลูกในประเทศไทย. *KKU Agricultural Sciences Semina*.

สนั่น จอกลอย วีรยา ลาตบัวขาว และรัชนก มีแก้ว. 2549. แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.)

พืชชนิดใหม่ใช้เป็นพลังงานทดแทน. แก่นเกษตร. 34 : 104-111.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี : สถาบันราชภัฏอุดรธานี.

ศุภวันจักรี พลมีศักดิ์ และ สมชัย จันทร์สว้าง. 2546. ผลการใช้จุลินทรีย์ผสมและโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชเจริญชาเลมอาร์ติโชค ในอาหารสุกรรุ่น-ขุนเพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกร. *วารสารสมุนไพร* 10 : 1-17.

Carbohydrates-Chemical Structure [Online]. Accessed 25 September 2011.

Available from <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates1.html>

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28 : 350 - 356.

Farnworth, E.R., 1993. Fructans in human and animal diets. (In) *Science and Technology of Fructans*, edited by M. Suzuki and N.P. Chatterton, P 257-272. CRC Press. London.

Gamburge, K.Z., Vysotskaya, E.F. and Gamanets, L.V. 1999. Microtuber formation in micropropagated Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55 : 115-118.

Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. and Tashiro, Y., 1986. Effects of fructo-oligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*. 5 : 37-50.

Jerusalem artichoke [Online]. Accessed 18 May 2011. Available from <http://th.wikipedia.org>.

Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, G.R., 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*. 87(2) : S193-S197.

Kaur, N. and Gupta, A.K., 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Bioscience*. 27 : 703-714.

- Kumari, B.D.R., Velayutham, P. and Anitha, S., 2007. A Comparative Study on Inulin and Esculin Content of *In vitro* and *In vivo* Plants of Chicory (*Cichorium intybus* L. Cv. Lucknow Local). *Advances in Biological Research*. 1(1-2) : 22-25.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 : 420-428.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth of bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 15 : 473.
- Niness, K.R., 1999. Inulin and oligofructose: what are they?. *Journal of Nutrition*. 129 : 1402S-1406S.
- Prosky, L. and Hoebregs, H., 1999. Methods to Determine Food Inulin and Oligofructose. *Journal of Nutrition*. 129: 1418S-1423S.
- Rehman, R.U., Israr, M., Srivastava, P.S., Bansal, K.C. and Abdin, M.Z., 2003. *In vitro* Regeneration of Witloof Chicory (*Cichorium intybus* L.) from Leaf Explants and Accumulation of Esculin. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 39 : 142-146.
- Saengthongpinit., W. and Sajjaanantakul T., 2005. Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. Department of Food Science and Technology. Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.
- Scholz-Ahrens, K.E., Schaafsma, G., Van den Heuvel, E.G. and Schrezenmeir, J., 2001. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73 : 59S-64S.
- Schorr-Galindo, S. and Guiraud, J. P., 1997. Sugar potential of different Jerusalem artichoke cultivars according to harvest. *Bioresource Technology*. 60 : 15-20.
- Srikhampa, W. and Uriyapongson, J., 2008. Determination and extraction of inulin from Jerusalem artichoke. *Journal of Agricultural Science*. 39(3) (Suppl.) : 373- 376.
- Taha, H.S., El-sawy, A.M. and Bekheet, S.A., 2007. *In Vitro* Studies on Jerusalem Artichoke (*Helianthus Tuberosus*) and Enhancement of Inulin Production. *Journal of Applied Sciences Research*. 3 : 853-858.

- Van Loo, J., Coussement, P., De Leenheer, L., Hoebregts, H. and Smits, G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 35 : 525-552.
- Van Waes, C., Baert, J., Carlier, L. and Van Bockstaele, E., 1998. A rapid determination of the total sugar content and the average inulin chain length in root of chicory (*Cichorium intybus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76 : 107-110.
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. and Rastall, R.A., 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*. 120 : 850-857.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการเตรียมสารเคมี

ตารางที่ 25 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Murashige และ Skoog 1962 (MS)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ตาม สูตร (มก./ล.)	เตรียมสารละลาย เข้มข้น (กรัม/ล.)	ปริมาตรที่ใช้ ต่ออาหาร 1 ลิตร
1. ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) 100 เท่า			
NH ₄ NO ₃	1650	165	10 มล.
KNO ₃	1900	190	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	44	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	37	
KH ₂ PO ₄	170	17	
2. ธาตุอาหารรอง (Micronutrient) 1000 เท่า			
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	22.3	1 มล.
ZnSO ₄ ·5H ₂ O	8.6	8.6	
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	
KI	0.83	0.83	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	
CoCl ₂ ·H ₂ O	0.025	0.025	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	27.85	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.25	37.25	
3. วิตามิน (Vitamins) 1000 เท่า			
Nicotinic acid	0.5	0.5	1 มล.
Thiamine-HCl	0.1	0.1	
Pyridoxine-HCl	0.5	0.5	
Glycine	2.0	2.0	
myo-inosital (เติมแยก)	100	0.1	

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร Murashige และ Skoog 1962 (MS)

1. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก

MS Macronutrient Stock I : NH_4NO_3 และ KNO_3 เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง NH_4NO_3 82.5 กรัม

- ชั่ง KNO_3 95 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

MS Macronutrient Stock II : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 22 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

MS Macronutrient Stock III : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ KH_2PO_4 เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 18.5 กรัม

- ชั่ง KH_2PO_4 8.5 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

2. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง

MS Micronutrient Stock : เข้มข้น 1000 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 11.15 กรัม

- ชั่ง $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4.3 กรัม

- ชั่ง H_3BO_3 3.1 กรัม

- ชั่ง KI 0.415 กรัม

- ชั่ง $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.125 กรัม

- ชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0125 กรัม

- ชั่ง $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0125 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

Iron Stock หรือ FeEDTA Stock : เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 กรัม

- ชั่ง $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.865 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล. เก็บสารละลายในขวดสีชา

3. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของวิตามิน

MS Vitamin Stock : เข้มข้น 1000 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง Nicotinic acid 0.25 กรัม

- ชั่ง Thiamine-HCl 0.25 กรัม

- ชั่ง Pyridoxine-HCl 0.05 กรัม

- ชั่ง Glycine 1.0 กรัม

หมายเหตุ : สำหรับ *myo*-inosital น้ำตาลซูโครส และวุ้น ให้ชั่งใหม่ ไม่ต้องเตรียมเป็น stock solution

4. การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

- การเตรียม stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินโดยคิดจากเนื้อสาร

ตัวอย่าง การเตรียม Stock solution 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) เข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาตร 50 มล. ทำโดยชั่ง NAA 50 มก. ละลายด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 2.5 มล. หรือ KOH หรือ NaOH เข้มข้น 1 M 2.5 มล. คนให้ละลาย ให้ความร้อนเล็กน้อย จากนั้นค่อยๆ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มล. ปรับให้ได้ pH 5.0

หมายเหตุ : ในการเตรียม stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินชนิดอื่น (IAA IBA และ 2,4-D) สามารถเตรียมได้ตามวิธีข้างต้นนี้เช่นกัน

- การเตรียม stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนิน โดยคิดจากเนื้อสาร

ตัวอย่าง Stock solution Benzyladenine (BA) เข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาตร 50 มล. ทำโดยชั่ง BA 50 มก. ละลายด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 5 มล. คนให้ละลาย ให้ความร้อนเล็กน้อย จากนั้นค่อยๆ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มล. ปรับให้ได้ pH 5.0

หมายเหตุ : ในการเตรียม stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโตไซโตไคนินชนิด Kinetin สามารถเตรียมได้ตามวิธีข้างต้นนี้เช่นกัน

5. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแคลลัส ต้น ราก และเซลล์แขวนลอย

ตัวอย่าง การเตรียมอาหารสูตรชักนำแคลลัส ปริมาตร 1 ลิตร

- 5.1 เมื่อเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ของสูตรอาหาร MS แล้ว
- 5.2 ผสมสารละลายจาก stock solution ต่างๆ มารวมกัน
- 5.3 เติมน้ำที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร (30%)
- 5.4 เติมน้ำควบคุมการเจริญเติบโต คือ BA และ NAA ตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้
- 5.5 ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มล.
- 5.6 ปรับค่าความเป็นกรดและด่างด้วย HCl และ NaOH ให้ได้ประมาณ 5.8
- 5.7 เติมน้ำมัน 7.5 กรัม/ลิตร
- 5.8 ให้ความร้อนอาหารเพื่อหลอมละลายไขมัน โดยใช้เตาไมโครเวฟ
- 5.9 เทอาหารลงในขวด และปิดฝาขวด
- 5.10 นำขวดอาหารไปนั่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
- 5.11 เก็บอาหารไว้ในที่สะอาดหรือที่ปลอดเชื้อ

หมายเหตุ : ในการเตรียมอาหารสูตรชักนำแคลลัสสูตรอื่น อาหารสูตรชักนำต้น และราก สามารถเตรียมได้ตามวิธีข้างต้นนี้เช่นกัน ส่วนอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยก็จะทำเช่นเดียวกัน แต่จะไม่มีขั้นตอนเติมน้ำมันลงในอาหาร

6. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS (Carbohydrate-free Man-Rogosa-Sharp) 1 ลิตร

- Peptone (Oxoid L34)	10	กรัม
- Sodium acetate 3H ₂ O	5	กรัม
- Dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	2	กรัม
- Magnesium sulphate (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2	กรัม
- Manganese sulphate (MnSO ₄ ·4H ₂ O)	0.05	กรัม
- Lab lemco powder (Oxoid L29)	8	กรัม
- Citrate	2	กรัม
- Dextrose	20	กรัม
- Yeast extract	4	กรัม
- Tween 80	1	มล.
- น้ำกลั่น	1000	มล.

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 95% ethanol จาก 99.9% ethanol (250 มล.)

- จะใช้ 99.9% ethanol = $\frac{95\% \times 250\text{ml}}{99.9\%} = 237.74$ มล.
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 250 มล.

การเตรียม 80% ethanol จาก 95% ethanol (100 ml)

- จะใช้ 95% ethanol = $\frac{80\% \times 100\text{ml}}{95\%} = 84.21$ มล.
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 100 มล.

การเตรียม 70% ethanol จาก 95% ethanol (1000 ml)

- จะใช้ 95% ethanol = $\frac{70\% \times 1000\text{ml}}{95\%} = 737$ มล.
- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มล.

การเตรียมสารละลาย 5 % (w/v) Phenol

- ชั่ง Phenol 5 กรัม
- ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. จะได้สารละลาย 5 % (w/v) Phenol 100 มล.

การเตรียมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (100 มล.)

- ชั่ง DNS 1 กรัม
- ปิเปต 2M NaOH 20 มล.
- ชั่ง Potassium sodium tartate 30 กรัม

ละลาย DNS ในน้ำกลั่นก่อน โดยใช้ปริมาตรเล็กน้อย ต้องให้สารละลายที่ได้มีสีเหลืองใส จากนั้นจึงค่อยๆ เติม 2M NaOH กวนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นค่อยๆ เติม potassium sodium tartate กวนให้สารละลายส้ม-เหลืองใส สามารถให้ความร้อนได้เล็กน้อย เก็บ DNS reagent ในขวดสีชา

ภาคผนวก ข

การหาน้ำหนักสดและชนิดของน้ำตาลจากการสกัดแคลลัส ต้น ราก และเซลล์แขวนลอย

ตารางที่ 26 ปริมาณน้ำหนักสดของแคลลัสแก่ต้นวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร		น้ำหนักสด (กรัม/ขวด)*	
		ใบ	ลำต้น
MSC 1	ชุดที่ 1	0.3980 ^a ± 0.04	0.3015 ^a ± 0.03
	ชุดที่ 2	0.3270 ^a ± 0.04	0.3200 ^a ± 0.04
	ชุดที่ 3	0.4582 ^a ± 0.11	0.3174 ^a ± 0.03
MSC 2	ชุดที่ 1	0.1042 ^d ± 0.03	0.0824 ^d ± 0.01
	ชุดที่ 2	0.1209 ^d ± 0.02	0.1052 ^d ± 0.01
	ชุดที่ 3	0.1179 ^d ± 0.02	0.1040 ^d ± 0.03
MSC 3	ชุดที่ 1	0.2305 ^c ± 0.06	0.1506 ^c ± 0.03
	ชุดที่ 2	0.1660 ^c ± 0.03	0.1653 ^c ± 0.02
	ชุดที่ 3	0.2004 ^c ± 0.03	0.2225 ^b ± 0.04
MSC 4	ชุดที่ 1	0.2996 ^b ± 0.05	0.2550 ^b ± 0.03
	ชุดที่ 2	0.2305 ^b ± 0.06	0.2636 ^b ± 0.02
	ชุดที่ 3	0.3311 ^b ± 0.12	0.2207 ^c ± 0.05

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 10)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05)

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

ตารางที่ 27 ปริมาณน้ำหนักสดของต้นแก่ต้นวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร		น้ำหนักสด (กรัม/ขวด)*	
		ใบ	ลำต้น
MSS 1	ชุดที่ 1	-	0.3316 ^a ± 0.10
	ชุดที่ 2	-	0.3558 ^a ± 0.11
	ชุดที่ 3	-	0.2436 ^a ± 0.05
MSS 2	ชุดที่ 1	-	0.1472 ^b ± 0.10
	ชุดที่ 2	-	0.0946 ^b ± 0.03
	ชุดที่ 3	-	0.1260 ^b ± 0.03

ตารางที่ 27 (ต่อ)

สูตรอาหาร		น้ำหนักสด (กรัม/ขวด)*	
		ใบ	ลำต้น
MSS 3	ชุดที่ 1	-	-
	ชุดที่ 2	-	-
	ชุดที่ 3	-	-

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 10)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

หมายเหตุ : MSS 1 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Coconut water 15% (v/v)

MSS 2 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก./ล.

MSS 3 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3.0 มก./ล.

ตารางที่ 28 ปริมาณน้ำหนักสดของรากแก่จนวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร		น้ำหนักสด (กรัม/ขวด)*	
		ใบ	ลำต้น
MSR 1	ชุดที่ 1	-	0.4745 ^a $\pm$ 0.52
	ชุดที่ 2	-	0.2213 ^b $\pm$ 0.07
	ชุดที่ 3	-	0.2055 ^c $\pm$ 0.16
MSR 2	ชุดที่ 1	0.4969 ^a $\pm$ 0.16	0.7687 ^a $\pm$ 0.19
	ชุดที่ 2	0.8980 ^b $\pm$ 0.25	0.3532 ^a $\pm$ 0.09
	ชุดที่ 3	0.8488 ^b $\pm$ 0.32	0.7792 ^a $\pm$ 0.22
MSR 3	ชุดที่ 1	0.5873 ^a $\pm$ 0.23	0.6810 ^a $\pm$ 0.46
	ชุดที่ 2	1.2900 ^a $\pm$ 0.35	0.3601 ^a $\pm$ 0.08
	ชุดที่ 3	1.2300 ^a $\pm$ 0.41	0.5762 ^b $\pm$ 0.14
MSR 4	ชุดที่ 1	0.6338 ^a $\pm$ 0.20	0.6469 ^a $\pm$ 0.15
	ชุดที่ 2	1.2220 ^a $\pm$ 0.24	0.2744 ^b $\pm$ 0.10
	ชุดที่ 3	0.9024 ^b $\pm$ 0.25	0.5492 ^b $\pm$ 0.14
MSR 5	ชุดที่ 1	0.1080 ^b $\pm$ 0.08	0.7993 ^a $\pm$ 0.18
	ชุดที่ 2	0.8210 ^b $\pm$ 0.24	0.2635 ^b $\pm$ 0.07
	ชุดที่ 3	0.9175 ^b $\pm$ 0.43	0.6773 ^{ab} $\pm$ 0.13

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n = 10)

ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

หมายเหตุ : MSR1 คือ ½ MS

MSR2 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

MSR3 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.0 มก./ล.

MSR4 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.5 มก./ล.

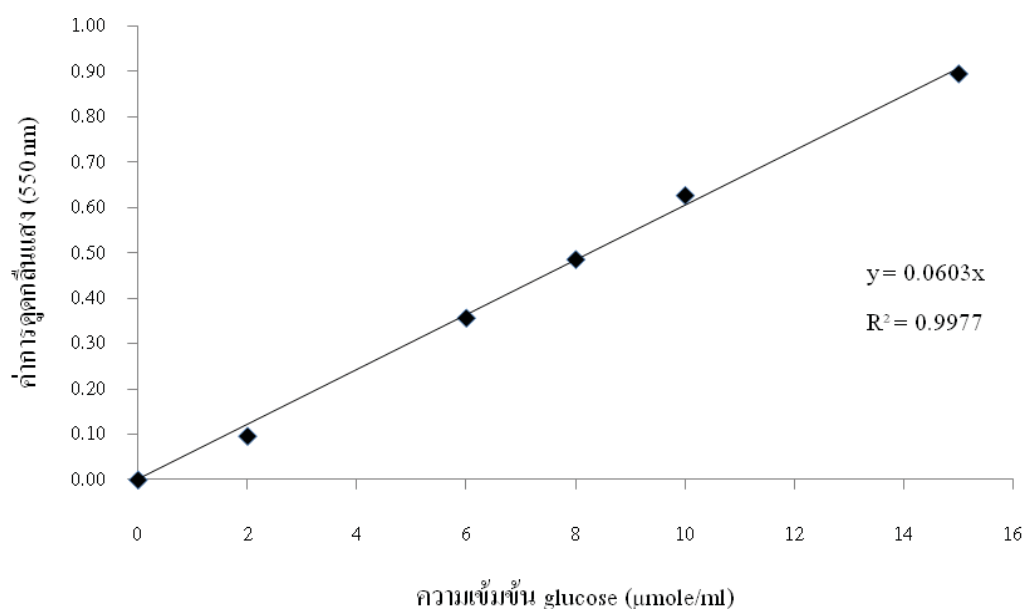
MSR5 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2.0 มก./ล.

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

Standard Reducing sugar

ตารางที่ 29 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคส ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ความเข้มข้น glucose ($\mu\text{mole/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
2	0.097	0.093	0.098	0.096
6	0.356	0.361	0.351	0.356
8	0.487	0.485	0.483	0.485
10	0.622	0.629	0.627	0.626
15	0.822	0.874	0.895	0.864



ภาพที่ 23 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 550 nm

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณ Reducing sugar

จากตัวอย่าง แคลลัสที่ชักนำได้จากส่วนของใบ สูตรอาหาร MS + 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm เท่ากับ 0.736 0.771 และ 0.683

$$\begin{aligned} \text{จากกราฟมาตรฐาน} \quad y &= 0.0603x \\ 0.736 &= 0.0603x \\ x &= 12.211 \mu\text{mole/ml} \end{aligned}$$

กลูโคส มีมวลโมเลกุล 180 g/mole

เจือจางสารตัวอย่าง 10 เท่า ดังนั้นจะได้ $12.211 \times 180 \times 10 = 21970.149 \mu\text{g/ml} = 21.970 \text{ mg/ml}$

สารสกัดปริมาตรตัวอย่าง 1.5 ml ตัวอย่างหนัก 3.9814 g มีน้ำตาลรีดิวซ์

$$\begin{aligned} &= \frac{21.970 \times 1.5}{3.9814} \text{ mg/g fresh weight} \\ &= 8.281 \text{ mg/g fresh weight} \end{aligned}$$

ดังนั้น จะมีน้ำตาลรีดิวซ์ 8.281 mg/g fresh weight ในการวัดครั้งที่ 1

จะมีน้ำตาลรีดิวซ์ 8.675 mg/g fresh weight ในการวัดครั้งที่ 2

จะมีน้ำตาลรีดิวซ์ 7.685 mg/g fresh weight ในการวัดครั้งที่ 3

ค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 8.214 mg/g fresh weight

ตารางที่ 30 ปริมาณ Reducing sugar ของแคลลัสแก่ในวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร			Reducing sugar (mg/g fresh weight)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
MSC 1	ใบ	ชุดที่ 1	8.281	8.675	7.685	8.214
		ชุดที่ 2	10.022	10.871	9.392	10.095
		ชุดที่ 3	7.316	6.622	7.385	7.108
	ลำต้น	ชุดที่ 1	7.411	8.272	8.599	8.094
		ชุดที่ 2	7.114	9.031	8.793	8.3123
		ชุดที่ 3	10.890	11.553	11.525	11.323
MSC 2	ใบ	ชุดที่ 1	18.583	18.698	20.589	19.290
		ชุดที่ 2	10.552	10.330	11.181	10.687
		ชุดที่ 3	11.575	11.625	12.803	12.001
	ลำต้น	ชุดที่ 1	10.574	11.498	11.009	11.027
		ชุดที่ 2	11.289	10.587	10.821	10.8992
		ชุดที่ 3	8.458	10.631	9.146	9.412

ตารางที่ 30 (ต่อ)

สูตรอาหาร			Reducing sugar (mg/g fresh weight)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
MSC 3	ใบ	ชุดที่ 1	12.976	12.782	13.073	12.944
		ชุดที่ 2	18.563	21.316	16.783	18.887
		ชุดที่ 3	8.514	9.229	9.743	9.162
	ลำต้น	ชุดที่ 1	13.559	16.027	16.562	15.382
		ชุดที่ 2	14.369	13.583	13.041	13.6646
		ชุดที่ 3	11.452	12.096	12.418	11.989
MSC 4	ใบ	ชุดที่ 1	10.722	9.407	11.200	10.443
		ชุดที่ 2	7.576	9.713	8.198	8.495
		ชุดที่ 3	8.168	8.722	8.438	8.443
	ลำต้น	ชุดที่ 1	11.679	11.749	11.626	11.685
		ชุดที่ 2	10.446	10.514	10.191	10.3840
		ชุดที่ 3	12.010	12.436	12.415	12.287

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

ตารางที่ 31 ปริมาณ Reducing sugar ของต้นแก้วต้นวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร			Reducing sugar (mg/g fresh weight)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
MSS 1	ใบ	ชุดที่ 1	-	-	-	-
		ชุดที่ 2	-	-	-	-
		ชุดที่ 3	-	-	-	-
	ลำต้น	ชุดที่ 1	4.587	4.209	4.155	4.317
		ชุดที่ 2	5.638	6.003	6.028	5.890
		ชุดที่ 3	4.696	4.356	4.549	4.534
MSS 2	ใบ	ชุดที่ 1	-	-	-	-
		ชุดที่ 2	-	-	-	-
		ชุดที่ 3	-	-	-	-
	ลำต้น	ชุดที่ 1	8.021	7.626	8.447	8.032
		ชุดที่ 2	16.917	16.041	16.657	16.538
		ชุดที่ 3	11.870	13.541	13.647	13.019

ตารางที่ 31 (ต่อ)

สูตรอาหาร			Reducing sugar (mg/g fresh weight)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
MSS 3	ใบ	ชุดที่ 1	-	-	-	-
		ชุดที่ 2	-	-	-	-
		ชุดที่ 3	-	-	-	-
	ลำต้น	ชุดที่ 1	-	-	-	-
		ชุดที่ 2	-	-	-	-
		ชุดที่ 3	-	-	-	-

หมายเหตุ : MSS 1 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Coconut water 15% (v/v)

MSS 2 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก./ล.

MSS 3 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BA 3.0 มก./ล.

ตารางที่ 32 ปริมาณ Reducing sugar ของรากแก่จนวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร			Reducing sugar (mg/g fresh weight)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
MSR 1	ใบ	ชุดที่ 1	-	-	-	-
		ชุดที่ 2	-	-	-	-
		ชุดที่ 3	-	-	-	-
	ลำต้น	ชุดที่ 1	8.801	8.216	9.273	8.763
		ชุดที่ 2	14.822	16.440	15.833	15.698
		ชุดที่ 3	16.954	16.039	14.121	15.705
MSR 2	ใบ	ชุดที่ 1	7.812	7.837	7.587	7.745
		ชุดที่ 2	7.159	7.665	6.811	7.211
		ชุดที่ 3	11.841	12.995	13.932	12.922
	ลำต้น	ชุดที่ 1	5.992	6.947	6.504	6.481
		ชุดที่ 2	13.039	15.118	14.154	14.104
		ชุดที่ 3	12.573	14.457	13.584	13.538
MSR 3	ใบ	ชุดที่ 1	10.037	9.256	8.388	9.227
		ชุดที่ 2	7.208	7.306	7.798	7.437
		ชุดที่ 3	5.200	5.108	5.383	5.230
	ลำต้น	ชุดที่ 1	10.222	10.156	10.735	10.371
		ชุดที่ 2	19.332	19.207	20.302	19.614
		ชุดที่ 3	12.590	12.512	13.196	12.766

ตารางที่ 32 (ต่อ)

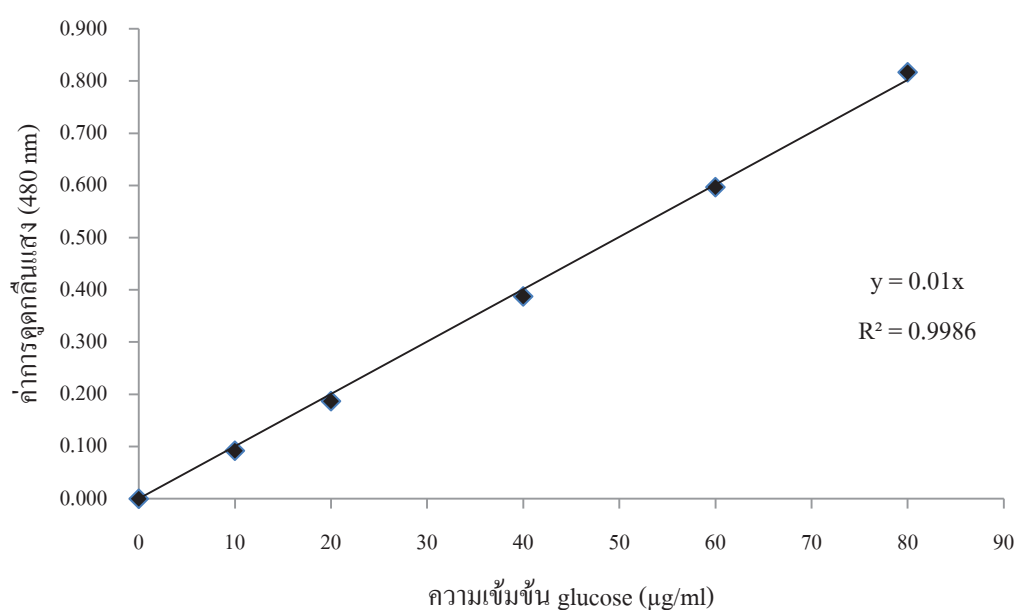
สูตรอาหาร			Reducing sugar (mg/g fresh weight)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
MSR 4	ใบ	ชุดที่ 1	6.840	5.356	5.924	6.040
		ชุดที่ 2	9.115	8.683	7.194	8.331
		ชุดที่ 3	7.969	9.637	9.764	9.123
	ลำต้น	ชุดที่ 1	9.293	9.044	9.514	9.284
		ชุดที่ 2	21.909	21.322	22.432	21.888
		ชุดที่ 3	11.480	11.186	11.741	11.469
MSR 5	ใบ	ชุดที่ 1	12.553	12.907	13.289	12.917
		ชุดที่ 2	10.546	9.536	9.946	10.010
		ชุดที่ 3	12.810	12.022	12.043	12.292
	ลำต้น	ชุดที่ 1	6.659	7.006	7.096	6.920
		ชุดที่ 2	20.200	21.254	21.526	20.993
		ชุดที่ 3	8.290	8.700	8.806	8.599

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)

Standard Total sugar

ตารางที่ 33 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคส ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร

ความเข้มข้น glucose ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 nm			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
10	0.092	0.093	0.091	0.092
20	0.175	0.204	0.183	0.187
40	0.387	0.385	0.391	0.388
60	0.627	0.574	0.589	0.597
80	0.772	0.834	0.844	0.817



ภาพที่ 24 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 480 nm

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณ Total sugar

จากตัวอย่าง แคลลัสที่ชักนำได้จากส่วนของใบ สูตรอาหาร MS + 1.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 nm เท่ากับ 0.708 0.733 และ 0.721

$$\begin{aligned}
 \text{จากกราฟมาตรฐาน} \quad y &= 0.01x \\
 0.708 &= 0.01x \\
 x &= 70.8 \mu\text{g/ml}
 \end{aligned}$$

$$\text{เจือจางสารตัวอย่าง 500 เท่า ดังนั้นจะได้} \quad 70.8 \times 500 = 35400 \mu\text{g/ml}$$

$$= 35.4 \text{ mg/ml}$$

สารสกัดปริมาตรตัวอย่าง 1.5 ml ตัวอย่างหนัก 3.9814 g มีน้ำตาลทั้งหมด

$$= \frac{35.4 \times 1.5}{3.9814} = 13.337 \text{ mg/g fresh weight}$$

ดังนั้น จะมีน้ำตาลทั้งหมด 13.337 mg/g fresh weight ในการวัดครั้งที่ 1

จะมีน้ำตาลทั้งหมด 13.808 mg/g fresh weight ในการวัดครั้งที่ 2

จะมีน้ำตาลทั้งหมด 13.582 mg/g fresh weight ในการวัดครั้งที่ 3

ค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 13.576 mg/g fresh weight

ตารางที่ 34 ปริมาณ Total sugar ของแคลลัสแค้นตะวันตกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร			Total sugar (mg/g fresh weight)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
MSC 1	ใบ	ชุดที่ 1	13.337	13.808	13.582	13.576
		ชุดที่ 2	24.080	26.235	26.602	25.639
		ชุดที่ 3	15.649	15.452	15.845	15.649
	ลำต้น	ชุดที่ 1	15.821	15.399	17.264	16.161
		ชุดที่ 2	15.376	15.470	15.869	15.572
		ชุดที่ 3	18.383	17.013	18.525	17.974
MSC 2	ใบ	ชุดที่ 1	27.719	22.751	23.543	24.671
		ชุดที่ 2	19.721	17.984	18.356	18.687
		ชุดที่ 3	17.627	18.263	17.118	17.669
	ลำต้น	ชุดที่ 1	40.432	42.071	34.149	38.884
		ชุดที่ 2	33.731	32.947	33.232	33.303
		ชุดที่ 3	26.675	27.901	26.459	27.011
MSC 3	ใบ	ชุดที่ 1	25.347	23.883	24.046	24.425
		ชุดที่ 2	29.196	33.715	35.523	32.811
		ชุดที่ 3	19.762	21.447	21.147	20.786
	ลำต้น	ชุดที่ 1	22.262	26.595	23.806	24.221
		ชุดที่ 2	19.651	19.333	19.832	19.605
		ชุดที่ 3	14.429	15.946	15.339	15.238
MSC 4	ใบ	ชุดที่ 1	16.574	16.298	16.849	16.574
		ชุดที่ 2	25.445	24.859	24.859	25.054
		ชุดที่ 3	17.713	18.438	17.849	18.000
	ลำต้น	ชุดที่ 1	19.944	22.003	20.827	20.925
		ชุดที่ 2	17.953	18.778	19.034	18.588
		ชุดที่ 3	23.480	22.664	22.563	22.902

ตารางที่ 35 ปริมาณ Total sugar ของคั้นแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร			Total sugar (mg/g fresh weight)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
MSS 1	ใบ	ชุดที่ 1	-	-	-	-
		ชุดที่ 2	-	-	-	-
		ชุดที่ 3	-	-	-	-
	ลำต้น	ชุดที่ 1	11.785	13.527	13.527	12.946
		ชุดที่ 2	13.007	12.922	12.838	12.922
		ชุดที่ 3	13.300	15.332	14.716	14.449
MSS 2	ใบ	ชุดที่ 1	-	-	-	-
		ชุดที่ 2	-	-	-	-
		ชุดที่ 3	-	-	-	-
	ลำต้น	ชุดที่ 1	15.084	14.115	14.421	14.540
		ชุดที่ 2	23.076	23.551	22.759	23.129
		ชุดที่ 3	17.620	17.085	17.442	17.382
MSS 3	ใบ	ชุดที่ 1	-	-	-	-
		ชุดที่ 2	-	-	-	-
		ชุดที่ 3	-	-	-	-
	ลำต้น	ชุดที่ 1	-	-	-	-
		ชุดที่ 2	-	-	-	-
		ชุดที่ 3	-	-	-	-

ตารางที่ 36 ปริมาณ Total sugar ของรากแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร			Total sugar (mg/g fresh weight)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
MSR 1	ใบ	ชุดที่ 1	-	-	-	-
		ชุดที่ 2	-	-	-	-
		ชุดที่ 3	-	-	-	-
	ลำต้น	ชุดที่ 1	10.874	11.665	10.969	11.169
		ชุดที่ 2	18.162	18.772	18.772	18.569
		ชุดที่ 3	17.083	18.361	17.477	17.640
MSR 2	ใบ	ชุดที่ 1	14.733	14.716	14.399	14.616
		ชุดที่ 2	9.914	9.932	9.667	9.838
		ชุดที่ 3	13.615	14.189	14.973	14.259
	ลำต้น	ชุดที่ 1	11.005	10.654	11.415	11.025
		ชุดที่ 2	23.822	23.737	22.420	23.326
		ชุดที่ 3	14.855	14.505	15.264	14.875

ตารางที่ 36 (ต่อ)

สูตรอาหาร			Total sugar (mg/g fresh weight)			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
MSR 3	ใบ	ชุดที่ 1	15.953	15.721	16.419	16.031
		ชุดที่ 2	9.720	9.488	9.256	9.488
		ชุดที่ 3	15.887	15.938	16.295	16.040
	ลำต้น	ชุดที่ 1	15.375	14.450	14.560	14.795
		ชุดที่ 2	22.661	22.744	22.536	22.647
		ชุดที่ 3	18.356	17.251	17.383	17.663
MSR 4	ใบ	ชุดที่ 1	10.618	10.471	10.483	10.524
		ชุดที่ 2	10.588	10.405	10.372	10.455
		ชุดที่ 3	16.615	18.177	16.591	17.128
	ลำต้น	ชุดที่ 1	11.732	11.941	11.964	11.879
		ชุดที่ 2	25.911	25.146	26.184	25.747
		ชุดที่ 3	13.960	14.209	14.236	14.135
MSR 5	ใบ	ชุดที่ 1	22.728	22.875	22.436	22.680
		ชุดที่ 2	17.199	17.036	17.461	17.232
		ชุดที่ 3	29.858	29.581	31.386	30.275
	ลำต้น	ชุดที่ 1	12.611	12.311	12.630	12.517
		ชุดที่ 2	29.888	29.661	30.799	30.116
		ชุดที่ 3	17.270	14.675	15.056	15.667

การหาปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์(Non-reducing sugar)

หาจากผลต่างของ total sugar ต่ reducing sugar

ตารางที่ 37 ปริมาณ Non-reducing sugar ของแคลลัสที่เก็บในวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร		Non-reducing sugar (mg/g fresh weight)	
		ใบ	ลำต้น
MSC 1	ชุดที่ 1	5.362	8.067
	ชุดที่ 2	15.544	7.259
	ชุดที่ 3	8.541	6.651
MSC 2	ชุดที่ 1	5.381	27.857
	ชุดที่ 2	8.000	22.404
	ชุดที่ 3	5.668	17.600
MSC 3	ชุดที่ 1	11.481	8.839
	ชุดที่ 2	13.924	5.941
	ชุดที่ 3	11.624	3.249
MSC 4	ชุดที่ 1	6.131	9.240
	ชุดที่ 2	16.559	10.135
	ชุดที่ 3	9.557	10.616

หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

MSC 2 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 1 มก./ล.

MSC 3 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1 มก./ล.

MSC 4 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ 2,4-D 1 มก./ล.

ตารางที่ 38 ปริมาณ Non-reducing sugar ของต้นแก้ววันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร		Non-reducing sugar (mg/g fresh weight)	
		ใบ	ลำต้น
MSS 1	ชุดที่ 1	-	8.629
	ชุดที่ 2	-	7.032
	ชุดที่ 3	-	9.916
MSS 2	ชุดที่ 1	-	6.508
	ชุดที่ 2	-	6.590
	ชุดที่ 3	-	4.363
MSS 3	ชุดที่ 1	-	-
	ชุดที่ 2	-	-
	ชุดที่ 3	-	-

หมายเหตุ : MSS 1 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Coconut water 15% (v/v)

MSS 2 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ Kinetin 3.0 มก./ล.

MSS 3 คือ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ 3.0 BA มก./ล.

ตารางที่ 39 ปริมาณ Non-reducing sugar ของรากแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร		Non-reducing sugar (mg/g fresh weight)	
		ใบ	ลำต้น
MSR 1	ชุดที่ 1	-	2.406
	ชุดที่ 2	-	2.871
	ชุดที่ 3	-	1.935
MSR 2	ชุดที่ 1	6.871	4.544
	ชุดที่ 2	2.626	9.223
	ชุดที่ 3	1.337	1.337
MSR 3	ชุดที่ 1	6.804	4.423
	ชุดที่ 2	2.051	3.033
	ชุดที่ 3	10.810	4.897
MSR 4	ชุดที่ 1	4.484	2.595
	ชุดที่ 2	2.124	3.859
	ชุดที่ 3	8.004	2.666
MSR 5	ชุดที่ 1	9.763	5.597
	ชุดที่ 2	7.222	9.123
	ชุดที่ 3	17.983	7.068

หมายเหตุ : MSR1 คือ ½ MS

MSR2 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล.

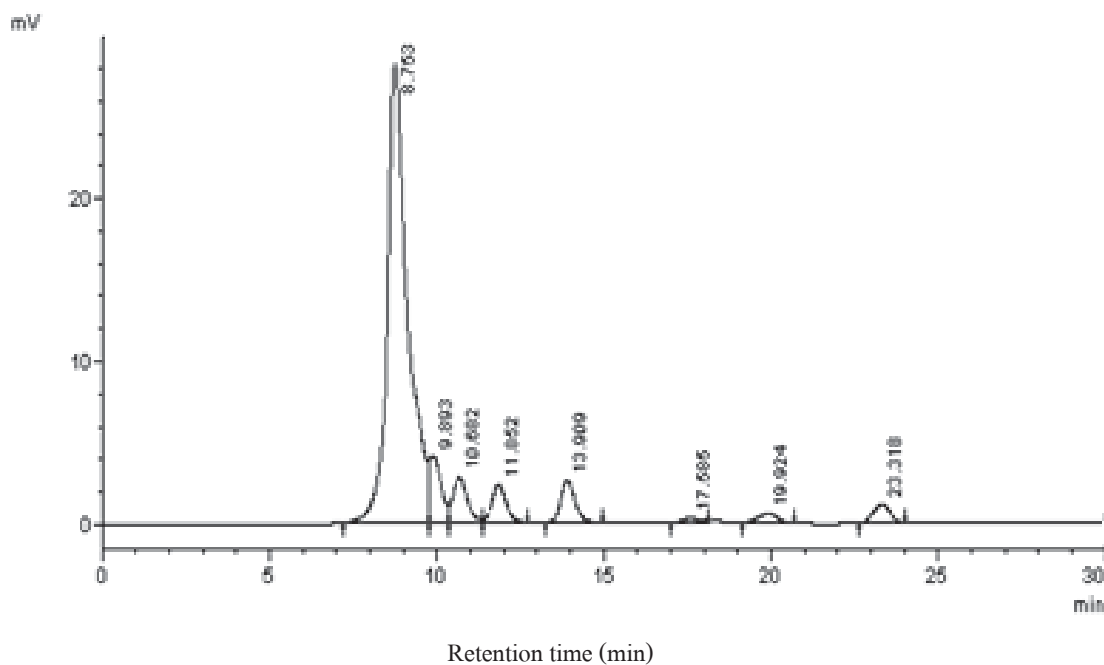
MSR3 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.0 มก./ล.

MSR4 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 1.5 มก./ล.

MSR5 คือ ½ MS ที่เติม NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IBA 2.0 มก./ล.

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์น้ำตาลโดยใช้ HPLC

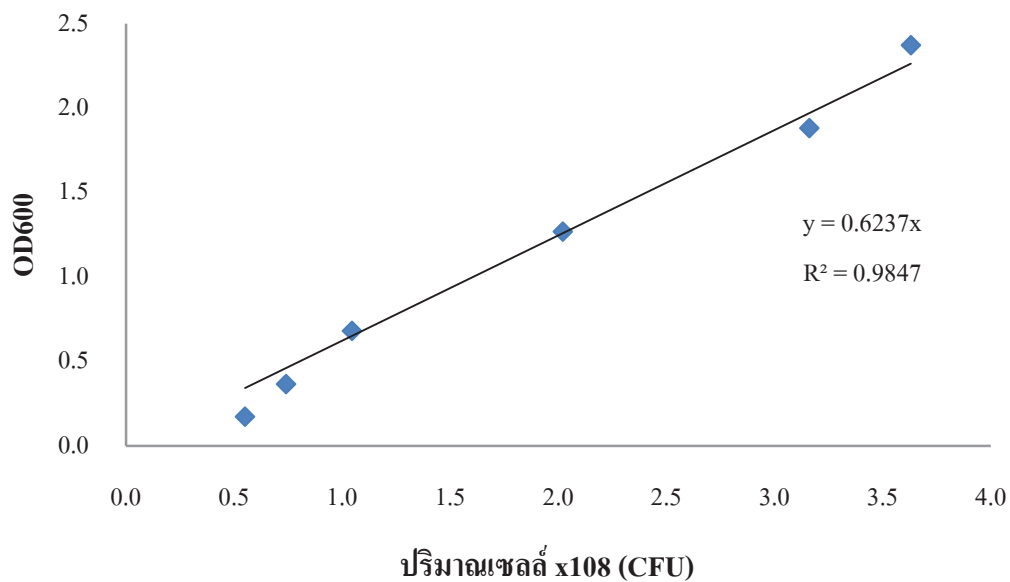


ภาพที่ 25 โครมาโตแกรมของสารสกัดหัวสดแก่นตะวัน

ตารางที่ 40 ชนิดของน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้ในสารสกัดหัวสดแก่นตะวัน โดยใช้ HPLC

ชนิดของน้ำตาล		Retention time (min)	เปอร์เซ็นต์ที่พบในสารสกัด
Monosaccharide	Glucose	17.585	0.519
	Fructose	19.924	1.408
ผลรวม			1.927
Disaccharide	sucrose	13.909	4.806
Polysaccharide	Inulin	8.753	74.878
	1-kestose	10.682	5.253
	Nystose	11.852	4.133
	Unknown	9.893	6.525
	Unknown	23.318	2.478
ผลรวม			98.073

การศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติก



ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bifidobacterium sp.*

ตารางที่ 41 ค่า pH ของอาหาร MRS ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bifidobacterium sp.* ในเวลาต่างๆ

ชั่วโมงที่	pH					
	Glucose	Sucrose	Fructose	Tuber	Induced Calli	Induced Root
0	7.32	7.34	7.35	7.11	7.16	7.09
3	7.27	7.32	7.31	7.09	7.15	7.06
6	7.16	7.26	7.24	7.02	7.04	7.02
9	7.20	7.26	7.25	7.04	7.12	7.02
12	7.05	7.18	7.13	6.95	6.97	6.93
15	6.97	6.98	6.76	6.74	6.69	6.76
18	6.48	6.24	5.90	5.99	5.49	5.95
21	5.80	5.29	5.63	5.38	5.07	5.11
23	5.06	4.96	5.49	5.33	5.13	5.09
25	4.86	4.89	5.40	5.27	5.14	5.07
27	4.76	4.81	5.31	5.33	5.16	5.10
29	4.65	4.77	5.00	5.33	5.17	5.10
32	4.52	4.69	4.66	5.38	5.21	5.12
35	4.34	4.66	4.35	5.36	5.26	5.14
38	4.26	4.59	4.25	5.3	5.2	5.11

ตารางที่ 42 ปริมาณ *Bifidobacterium* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในเวลาที่เปลี่ยนไป

ชั่วโมงที่	ปริมาณเซลล์ x10 ⁸ (CFU)					
	Glucose	Sucrose	Fructose	Tuber	Induced Calli	Induced Root
0	0.157	0.152	0.151	0.164	0.175	0.188
3	0.385	0.208	0.273	0.180	0.180	0.300
6	0.606	0.305	0.431	0.189	0.196	0.337
9	0.713	0.351	0.754	0.452	0.353	1.119
12	1.260	0.738	1.182	0.781	0.491	1.813
15	1.462	1.395	2.094	1.174	1.090	2.062
18	2.443	2.165	2.352	1.619	1.684	2.381
21	2.998	2.392	2.373	2.025	2.206	2.724
23	3.239	2.567	2.788	2.416	2.368	2.533
25	3.199	2.650	2.896	2.516	2.487	2.334
27	3.205	2.711	3.008	2.546	2.575	2.586
29	3.356	2.804	3.175	2.650	2.609	2.609
32	3.877	2.780	3.378	2.982	2.982	2.463
35	3.862	2.920	3.803	2.750	2.747	2.806
38	4.129	3.325	3.692	3.123	3.304	2.665

ตารางที่ 43 น้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในเวลาที่เปลี่ยนไป

ชั่วโมงที่	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (g/ml)					
	Glucose	Sucrose	Fructose	Tuber	Induced Calli	Induced Root
0	29.39	29.86	28.96	28.38	28.27	27.70
3	29.25	29.01	28.86	28.12	28.01	27.30
6	28.55	29.07	28.80	27.67	28.59	26.09
9	26.48	27.85	28.77	26.22	27.87	26.88
12	25.98	26.63	28.70	25.00	26.30	26.85
15	23.48	24.13	27.93	24.13	25.33	24.67
18	21.85	21.20	26.96	22.93	24.35	23.26
21	20.87	20.98	23.48	20.87	23.15	22.83
23	20.65	20.11	22.28	20.65	21.63	22.39
25	19.89	18.48	21.85	20.22	20.65	21.85
27	19.24	15.98	20.54	19.78	20.00	18.26
29	18.91	15.87	19.46	17.72	19.24	18.04
32	17.83	13.26	17.61	16.30	19.13	17.07
35	16.52	12.07	20.76	15.54	17.50	16.96
38	13.15	11.09	12.83	13.15	11.20	13.26

ตารางที่ 44 น้ำตาลรีดิวิซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในเวลาที่เปลี่ยนไป

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์ ($\mu\text{M/ml}$)					
	Glucose	Sucrose	Fructose	Tuber	Induced Calli	Induced Root
0	159.134	3.606	141.126	9.771	21.736	27.229
3	98.182	3.307	107.619	12.208	21.818	27.186
6	112.814	4.182	117.749	8.307	11.991	15.671
9	110.043	2.251	111.818	7.433	6.537	5.931
12	103.290	2.433	103.983	5.333	3.506	4.286
15	113.506	2.338	123.550	4.273	6.147	7.835
18	109.003	6.735	116.511	7.146	7.121	7.931
21	109.533	14.623	120.374	3.900	8.019	7.875
23	109.159	14.274	131.340	6.891	7.396	8.604
25	110.405	13.695	136.075	6.660	9.178	8.679
27	119.720	12.542	126.729	8.255	10.729	8.075
29	110.530	10.997	119.346	7.826	11.252	7.813
32	79.502	8.349	105.296	7.333	10.305	9.514
35	77.632	7.078	85.732	5.763	9.190	6.984
38	61.931	6.991	67.539	7.265	9.589	8.293

ประวัติผู้วิจัย

ช่อ-สกุล วิกานดา โสขุมา

Miss Wikanda Sokhuma

วัน เดือน ปีเกิด 9 กุมภาพันธ์ 2530

ที่อยู่ปัจจุบัน 288/38 หมู่ที่ 1 ต.ค่านช้าง อ.ค่านช้าง จ.สุพรรณบุรี 72180

E-mail pre_pair@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2547 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนบริหารแจ่มใสวิทยา 3 อ.ด่านช้าง
จ.สุพรรณบุรี

พ.ศ.2551 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยศิลปากร

การนำเสนอผลงาน

Oral presentation

พ.ศ.2554 Inulin Production from Jerusalem Artichoke by Cell and Tissue Culture
Techniques (International Food Conference 2011, Surabaya Indonesia)

พ.ศ.2555 Production of Fructooligosaccharides from Jerusalem artichoke by Plant Tissue Culture Techniques (ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 5)