



รายงานการวิจัย เรื่อง

การศึกษาการแสดงออกของยีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลิน
ในแคลลัสที่ชักนำได้จากแก่นตะวัน

Studies on Expression and Activity of Genes and Enzymes Related to Inulin Synthesis in
Callus Induced from Jerusalem Artichoke

บุษราภรณ์ งามปัญญา

Budsaraporn Ngampanya

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ภายใต้ชุดโครงการวิจัย เรื่องการพัฒนาการผลิตพรีไบโอติกฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชและจุลินทรีย์เพื่อ

เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาการผลิตอินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชและจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์” ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร และได้รับการสนับสนุนจากเงินรายได้ จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทคัดย่อ

ภาษาไทย

ส่วนที่ 1

ชื่อโครงการ การศึกษาการแสดงออกของยีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลิน
ในแคลลัสที่ชักนำได้จากแก่นตะวัน

ชื่อผู้วิจัย บุษราภรณ์ งามปัญญา (หัวหน้าโครงการวิจัย)

คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2557

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์

สาขาวิชา (อ้างอิงตาม วช.) เกษตรศาสตร์และชีววิทยา

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินและศึกษาชนิดของอินนูลินที่สังเคราะห์ได้ในแคลลัสที่ชักนำได้จากแก่นตะวัน ตลอดจนศึกษาสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของอินนูลินที่ผลิตได้ในแคลลัส แคลลัสสีเหลืองอ่อนถึงเขียวอ่อนสามารถชักนำได้จากแผ่นใบและลำต้นของแก่นตะวันภายใน 30 วันของการเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการแปรผันชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ NAA, IAA, IBA และ 2, 4- D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วย HPLC พบว่า สารสกัดแคลลัสที่ชักนำได้มีการผลิตอินนูลินเป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับที่พบในหัวสดจากธรรมชาติคิดเป็นร้อยละ 46.21 และ 92.95 ตามลำดับ ซึ่งให้เห็นถึงทางเลือกในการผลิตอินนูลินโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองแทนการปลูกพืชในแปลงซึ่งต้องใช้ระยะเวลา 3-4 เดือน นอกจากนี้การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินยังแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเคลื่อนย้ายหมู่ฟรุกโตซิลจากซูโครสของแคลลัสที่มีการสะสมอินนูลินในปริมาณสูง ทำให้สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตอินนูลินกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสของแคลลัสแก่นตะวันที่ชักนำได้ว่า มีความสัมพันธ์แบบแปรตามกัน และจากการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินด้วยเทคนิค RT-PCR นั้นก็พบการแสดงออกของยีนในลักษณะที่แปรตามการสะสมอินนูลินเช่นเดียวกับการแสดงออกของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่า สารที่สกัดได้จากแคลลัส ซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ อินนูลินร้อยละ 46.21 แสดงคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกด้วย

คำสำคัญ : แก่นตะวัน ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส พรีไบโอติก

ภาษาอังกฤษ

ส่วนที่ 1

Research Title Studies on Expression and Activity of Genes and Enzymes Related to Inulin Synthesis in Callus Induced from Jerusalem Artichoke

Researcher Budsaraporn Ngampanya (Project Leader)

Faculty of Engineering and Industrial technology, Silpakorn University

Research Grant

Fiscal year 2555

Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of completion 2557

Type of research Applied research

Subjects (based NRCT) Agriculture and Biology

ส่วนที่ 2 abstract

The aims of this research were focused on the expression analysis of gene and enzyme related to inulin synthesis in callus induced from Jerusalem Artichoke (*Helianthus toberosus* L.) and analysis of inulin types in induced callus extracts. The prebiotic property of callus derived inulin was also investigated. The pale yellow to light green calli were induced from leaf and stem segments of Jerusalem artichoke within 30 days after culturing on MS basal medium (1962) supplemented with 1 mg/l BA (benzyladenine) as cytokinin hormone and different type of auxin hormones which were 1 mg/l NAA (1-naphthalene acetic acid), 1 mg/l IAA (indole-3-acetic acid), 1 mg/l IBA (indole-3-butyric acid) and 1 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid). The HPLC chromatograms of extracts from all callus cultures indicated the synthesis and accumulation of inulin as major content which similar to those found in natural grown tuber and the inulin content of those two samples were 46.21% and 92.95% in respectively. This suggested the alternative means to produce inulin in plant cells under *in vitro* instead of prolong cultivating plants in nature. Apart from the analysis of inulin synthesis and accumulation of inulin in induced calli, activity of fructosyltransferase which is enzyme mainly involved in inulin synthesis was also determined. The results showed the consistent correlation between the accumulation of inulin and activity of fructosyltransferase in calli. Additionally, the calli having high content of inulin showed highly activity of fructosyltransferase. The analysis of genes related to inulin synthesis in induced calli also showed high expression in calli having high enzyme activity and inulin content. Moreover, extracts from calli which composed of 46.21% inulin as the main content also showed prebiotic property.

Key words : Jerusalem artichoke, Fructo- oligosaccharide, Fructosyltransferase, Prebiotic

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
สารบัญ	4
สารบัญรูปภาพ	5
สารบัญตาราง	6
บทที่ 1 บทนำ	7
- ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	7
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย	9
- ขอบเขตของการวิจัย	9
- ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	10
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	11
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	15
3.1 สร้างระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสของแก่นตะวันในหลอดทดลอง	15
3.2 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ในแคลลัสที่ชักนำได้	15
3.3 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ในแคลลัสที่ชักนำได้	16
3.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของ inulin ที่ได้จากแคลลัส	22
3.5 การวิเคราะห์น้ำตาลโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	22
3.6 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	22
บทที่ 4 ผลการทดลอง	23
4.1 การชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส	23
4.2 ชนิดและปริมาณของน้ำตาลชนิดต่างๆ ในสารสกัดจากแคลลัส	25
4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสในแคลลัสที่ชักนำได้	28
4.4 การแสดงออกของยีน <i>1-sst</i> และ <i>1-fft</i> ในแคลลัสที่ชักนำได้	29
4.5 คุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของ inulin ที่ได้จากแคลลัส	30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	35
บทที่ 6 บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก	38
การเผยแพร่ผลงานวิจัย	50
ประวัติผู้วิจัย	51

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1.1 HPLC chromatogram ของสารสกัดจากหัวแก่นตะวันและแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบแก่นตะวัน	8
4.1 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำได้จากแผ่นใบและลำต้นบนอาหารพื้นฐานสูตร MS(1962)	23

4.2 HPLC chromatogram ของ inulin (DP>5), FOS (DP2-5), sucrose, glucose และ fructose ในสารสกัดแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)	26
4.3 HPLC chromatogram ของ inulin (DP>5), FOS (DP2-5), sucrose, glucose และ fructose ในสารสกัดแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962)	27
4.4 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin	30
4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรวม น้ำตาลรีดิวซ์ ค่า pH และปริมาณ <i>Bifidobacterium</i> sp. ในอาหาร MRS ที่มีการเสริมสารสกัดจากแคลลัส ราก และหัวสดให้มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้น เท่ากัน	34

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้น สูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 หลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน	24
4.2 ปริมาณ inulin (DP>5), FOS (DP2-5), sucrose, glucose และ fructose ในสารสกัดแคลลัส ที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริม ฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมน ออกซิน 4 ชนิดคือ NAA (MSC1), IAA (MSC2), IBA (MSC3) และ 2, 4- D (MSC4) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 30 วัน	28

- 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสของแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้น
เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA
1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ
NAA (MSC1), IAA (MSC2), IBA (MSC3) และ 2, 4- D (MSC4) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
นาน 30 วัน 29
- 4.4 องค์ประกอบของสารสกัดจากแคลลัสและรากที่ชักนำได้ในหลอดทดลองและหัวสดแก่ประจำวัน
จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC 32

บทที่ 1

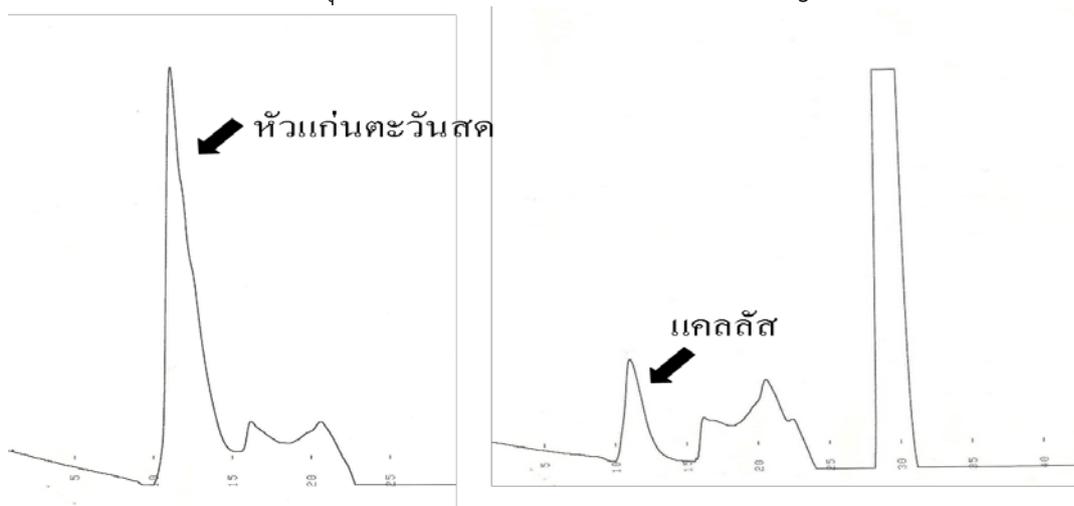
บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

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

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

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



รูปที่ 1.1 HPLC chromatogram ของสารสกัดจากหัวแก่นตะวันและแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบแก่นตะวัน

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

FFT) ตามลำดับ โดยจากงานวิจัยของ van der Meer และคณะ (1998) ที่ได้ศึกษาถึงวิถีชีวเคมีของการสังเคราะห์ fructan ในแก่นตะวันพบว่า ยีนและเอนไซม์ทั้งสองแสดงออกมากในระยะที่กำลังพัฒนาเป็นหัวสะสมอาหารและเมื่อหัวสะสมอาหารพัฒนาเต็มที่จะไม่พบการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ และหากมีการแสดงออกของยีนหรือเอนไซม์เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งก็จะมีผลต่อการสังเคราะห์และชนิดของ fructan ที่จะได้ และการที่แคลลัสสามารถสร้าง inulin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม fructan ได้นั้นก็น่าจะบ่งชี้โดยทางอ้อมว่า มีการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง inulin เกิดขึ้นในแคลลัส ซึ่งการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนและเอนไซม์ดังกล่าวยังไม่ปรากฏการศึกษาในเซลล์หรือเนื้อเยื่อของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมาก่อน เพราะฉะนั้น การทำความเข้าใจเกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ inulin ที่เกิดขึ้นในแคลลัสน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะใช้ในการควบคุมการสังเคราะห์ในแต่ละขั้นตอนและนำไปสู่การเพิ่มการผลิต inulin ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองต่อไปได้ และจะเป็นการช่วยบรรเทาปัญหาการผลิต inulin จากหัวสดของแก่นตะวันที่มีก่ประสพกับปัญหาการติดเชื้อที่หัวพันธุ์ในระหว่างการเพาะปลูก และหากพิสูจน์ได้ว่า inulin ที่สังเคราะห์ขึ้นในแคลลัสมีกิจกรรมฟรีไบโอติกเช่นเดียวกับ inulin ที่สกัดได้จากหัวแก่นตะวันสด ก็จะเป็นอีกทางเลือกสำหรับการผลิตสารฟรีไบโอติกที่สามารถทำได้ตลอดทั้งปีโดยไม่ขึ้นกับฤดูกาลเหมือนกับแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการสังเคราะห์ inulin กับการแสดงออกของเอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ และศึกษาชนิดของ inulin ที่สังเคราะห์ได้ในแคลลัสที่ชักนำได้จากแก่นตะวัน ตลอดจนศึกษาสมบัติการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกของ inulin ที่ผลิตได้ในแคลลัส

ขอบเขตของการวิจัย

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

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

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

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

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

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

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

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

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

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 สร้างระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสของแก่นตะวันในหลอดทดลอง

3.1.1 นำหัวพันธุ์แก่นตะวันมาปลูกในเรือนปลูกพืชของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อใช้เปรียบเทียบการผลิต inulin และกิจกรรมของเอนไซม์และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin กับแคลลัสที่ได้จากการชักนำในหลอดทดลอง

3.1.2 เตรียมต้นอ่อนที่งอกจากหัว (sprouting tubers) เพื่อนำไปใช้เป็นวัสดุติดสำหรับชักนำแคลลัส โดยนำหัวพันธุ์แก่นตะวันที่มีตาจำนวน 2-3 ตา ไปเพาะในถุงดำบรรจุดินปลูกพืช และรดน้ำทุกวัน เมื่อต้นอ่อนมีอายุประมาณ 2 สัปดาห์นำไปใช้เป็นวัสดุติดในการชักนำแคลลัส

3.1.3 ชักนำแคลลัสบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA ร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ (NAA, IAA, IBA และ 2, 4- D) โดยใช้ไซโตไคนิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตรและฮอร์โมนออกซิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบการชักนำแคลลัสจากชิ้นพืช (explants) 2 ชนิดคือ แผ่นใบ (leaf blade) และส่วนของข้อลำต้น (nodal stem) จาก sprouting tubers โดยตัดแยกแผ่นใบให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ส่วนลำต้นตัดให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นย้ายชิ้นพืชที่เตรียมได้ไปเลี้ยงบนอาหารสูตรสำหรับชักนำแคลลัส โดยทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ แต่ละขวดเพาะเลี้ยงชิ้นพืชจำนวน 3 ชิ้น เพาะเลี้ยงอย่างน้อย 10 ขวด หลังจากนั้นนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อวางบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน

เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 30 วัน ทำการประเมินความสามารถในการชักนำให้เกิดแคลลัสเบื้องต้นบนอาหารสูตรต่างๆ โดยบันทึกลักษณะสีและการเกาะตัวของแคลลัส และติดตามปริมาณแคลลัสที่ชักนำได้โดยหาน้ำหนักสด และวิเคราะห์การผลิตและชนิดของ inulin และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin

จากนั้นชักนำแคลลัสจากชิ้นพืชที่บนอาหารสูตรที่ให้ปริมาณ inulin สูงนาน 30 วัน และทำการถ่ายเลี้ยงลงอาหารใหม่ (สูตรเดียวกับที่ใช้ชักนำ) และเลี้ยงต่อวัน 45 และ 60 วัน โดยมีการติดตามปริมาณแคลลัสที่ชักนำได้โดยหาน้ำหนักสด และวิเคราะห์การผลิตและชนิดของ inulin และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin

3.2 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ในแคลลัสที่ชักนำได้

3.2.1 สกัดโปรตีน (เอนไซม์หยาบ)

ชั่งน้ำหนักแคลลัสของแก่นตะวัน บดให้ละเอียดโดยขั้นตอนการสกัดทุกขั้นตอนต้องอยู่ในสถานะอุณหภูมิต่ำ จากนั้นชั่งตัวอย่างพืชและเติม Extraction buffer (0.007 M potassium phosphate buffer pH 7 + 0.5% Triton X-100 + 0.5% cysteine) ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อ extraction buffer 1:1 ทิ้งไว้ข้ามคืน (16 ชั่วโมง) จากนั้นนำสารสกัดไปกรองผ่านผ้าขาวบางและนำของเหลวที่ได้จากการกรองไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จะได้เอนไซม์หยาบ (crude enzyme)

3.2.2 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์

หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

- 1) 0.1 M phosphate buffer pH 4.5 + 0.02% sodium azide,
- 2) 0.46 M sucrose และ

3) crude enzyme

ซึ่งแยกเป็น 3 reactions ดังนี้

Reaction 1 เอนไซม์ตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร + 0.46 M Sucrose ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer pH 5.4 + 0.02% sodiumazide 250 ไมโครลิตร

Reaction 2 เอนไซม์ตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร + 0.1 M phosphate buffer pH 5.4 + 0.02% sodiumazide 250 ไมโครลิตร

Reaction 3 H₂O 250 ไมโครลิตร + 0.46 M Sucrose 0.1 M phosphate buffer pH 5.4 + 0.02% sodiumazide 250 ไมโครลิตร

บ่มเอนไซม์กับสารตั้งต้นที่ 34°C เป็นเวลา 0 และ 24 hr หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มเป็นเวลา 5 min นำไปวิเคราะห์ reducing sugar นำไปวิเคราะห์ 1-kestose ที่เกิดขึ้นโดยวิธี HPLC วัด enzyme activity จากปริมาณ 1-kestose ที่เกิดขึ้น โดย

enzyme activity (Ut) 1 unit คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเกิด 1-kestose 1 ไมโครโมล ใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการวิเคราะห์

หาโปรตีนโดยใช้ Bradford dye reagent ที่เจือจางด้วยน้ำ DI 4 เท่า โดยผสมตัวอย่าง 10 µl + Bradford dye reagent 200 µl ผสมให้เข้ากันนาน 5 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่อง microplate reader แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้

3.3 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ในแคลลัสที่ชักนำได้

3.3.1 การสกัด RNA รวม (Total RNA)

นำตัวอย่างแคลลัสระยะต่างๆ ที่เก็บไว้มาสกัด RNA ด้วยสารละลาย TRI reagent ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1) Homogenization

ใส่สารละลาย TRI reagent 500 ไมโครลิตรลงในหลอดที่ใส่ตัวอย่างที่บดไว้แล้วด้วยไนโตรเจนเหลว

2) Phase Separation

เก็บ homogenate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ใส่สารละลาย chloroform 200 ไมโครลิตรต่อสารละลาย TRI reagent 1000 ไมโครลิตร (ใส่ 100 ไมโครลิตร เนื่องจากใส่ TRI reagent 500 ไมโครลิตร) ปิดฝาเขย่าอย่างแรง 15 วินาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จะมีส่วนบนที่เป็นสารละลาย aqueous phase ซึ่งเป็นส่วนที่มี RNA

3) RNA Precipitation

ถ่ายส่วนบนที่เป็น aqueous phase ใส่ในหลอดใหม่ ใส่สารละลาย isopropanol 500 ไมโครลิตรต่อสารละลาย TRI reagent 1000 ไมโครลิตร (ใส่ 250 ไมโครลิตร เนื่องจากใส่ TRI reagent 500 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 8 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4) RNA Wash

ทิ้งสารละลายส่วนบน เก็บตะกอน RNA ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวัดปริมาณ RNA) ปั่นเหวี่ยง 7,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทเอาสารละลายเอทานอลออก แล้วทำให้ตะกอนแห้งด้วย vacuum pump จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ Milli Q ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

3.3.2 การสังเคราะห์ 1st strand cDNA

1) เติมส่วนผสมดังต่อไปนี้ในหลอด sterile eppendorf

- Total RNA 1 ไมโครกรัม
 - Oligo (dT)₁₈ 1 ไมโครกรัม (1 ไมโครลิตร)
 - เติมน้ำ Milli Q water ให้ครบ 11 ไมโครลิตร
- 2) นำไปบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง
- 3) นำไปเติมน้ำสารละลายต่อไปนี้ตามลำดับ
- 5x Reaction buffer for M-MuL V RT 4 ไมโครลิตร
 - สารละลาย dNTP mix 2 ไมโครลิตร
 - Ribonuclease Inhibitor 20 ยูนิต (0.5 ไมโครลิตร)
 - เติมน้ำ Milli Q water ให้ครบ 19 ไมโครลิตร
- 4) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
- 5) เติมน้ำ reverse transcriptase M-MuL V RT 200 ยูนิต (1 ไมโครลิตร)
- 6) บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที
- 7) หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำแข็ง
- 8) นำ 1st strand cDNA ที่สังเคราะห์ได้ไปใช้เป็น template สำหรับวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี PCR ในขั้นตอนต่อไป

3.3.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *1-sst* และ *1-fft* ด้วยวิธี PCR

1) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *actin*

เตรียม reaction mixture ดังนี้ บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer + KCl-MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร rice actin forward (5' CGA GCT TCC TGA TGG ACA 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร rice actin reverse (5' TGG GTC AGA CTC GTC GTA C 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เติมน้ำ Milli Q จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

โดยตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *actin* ดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที	} 30 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Annealing)	ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส ∞	

2) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *1-sst*

เตรียม reaction mixture ดังนี้ บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer + KCl-MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร *1-sst* forward (5' ATG ATG

GCT TCA TCC ACC AC 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 1-ssr reverse (5' CCA TCA AGG TTC GAA AGT CC 3') ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เติมน้ำ Milli Q จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

โดยตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน ดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที	} 30 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Annealing)	ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 2.10 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส ∞	

3) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 1-fft

เตรียม reaction mixture ดังนี้ บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer + KCl-MgCl₂) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mix) ที่มีความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 1-fft forward (5' ATG CAA ACC CCT GAA CCC 3')ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 1-fft reverse (5' GCC GGT AAT TAA AAA GGG TA 3')ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 ยูนิต/ไมโครลิตร (Fermentas, Germany) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร เติมน้ำ Milli Q จนครบปริมาตรสุดท้ายคือ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป spin down แล้วนำเข้าเครื่อง DNA thermal cycle : GeneAmp PCR System2400 (Perkin Elmer, USA)

โดยตั้งโปรแกรมในการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน ดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (Initial Denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที	} 30 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (Denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Annealing)	ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 2.00 นาที	
โปรแกรมที่ 3 (Final Extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที	
	ที่ 4 องศาเซลเซียส ∞	

4) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตโฟรีซิส PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ตัวอย่างลงในหลุมของ agarose gel ที่เตรียมไว้ นำไป Run ใน 1x TAE buffer บนเครื่อง gel electrophoresis โดยตั้งค่าความต่างศักย์ 100 โวลท์ ระยะเวลา 35 นาที แล้วนำไปตรวจดูขนาดของแถบของดีเอ็นเอ เทียบกับ DNA marker ด้วยเครื่อง gel documentation

5) การถ่ายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบไปบนแผ่นไนลอน

นำแผ่นเจลที่ได้ล้างด้วยน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง แล้วนำแผ่นเจลแช่ในสารละลาย depurination solution (HCL ความเข้มข้น 0.125 โมลาร์) เขย่าเบาๆ นาน 10 นาที ล้างเจลด้วยน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง ทำให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนสภาพโดยแช่ใน denaturing buffer (NaCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ + NaOH ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์) แล้วเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าเพื่อทำให้ DNA เปลี่ยนสภาพประมาณ 30 นาที ในระหว่างรอให้เตรียมอุปกรณ์เพื่อทำการ blotting ดังแสดงในภาพที่ 4 ดังนี้ให้นำปลาย

สองด้านของกระดาษกรอง (3 MM filter paper) ที่จะใช้เป็นสะพาน (bridge) ในการส่งผ่าน DNA จุ่มลงใน 6X SSC (Tri- sodium citrate + NaCl, pH 7-8) ตัดแผ่น Hybond nylon membrane (Amersham,USA) ให้มีขนาดเท่ากับแผ่นเจลที่จะทำการ blot เมื่อครบเวลาให้นำแผ่นเจลวางบนแผ่นกรองที่ชุ่มด้วย 6X SSC (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ) แล้ววางทับด้วย Hybond nylon membrane ที่ตัดไว้ทับลงบน agarose gel (ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ) ลอกพลาสติกออก วางกระดาษกรอง ทับลงไปประมาณ 4 แผ่น แล้ววางทิชชู บนกระดาษกรอง นำวัสดุที่มีน้ำหนักมาทับลงบนทิชชู และเปลี่ยนทิชชูบ่อยๆ ทั้งไว้ข้ามคืน ทำเครื่องหมายที่แผ่น Hybond nylon membrane แล้วแยกออกจากแผ่นเจล นำแผ่นไนลอนไปล้างในน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการตรึงดีเอ็นเอให้อยู่บนแผ่นไนลอน โดยอบในตู้ hot air oven อุณหภูมิ 80°C นานประมาณ 2 ชั่วโมงนำไป hybridize กับ probe ที่เตรียมไว้ หรือ เก็บไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้ hybridize

6) การสกัดพลาสมิด p-GemT ที่สอดแทรกด้วยยีน *1-sst* และยีน *1-fft* จากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อใช้เป็นยีนติดตาม (gene probe) ด้วย quick plasmid miniprep kit

- นำอาหารที่เลี้ยงเชื้อมาแยกให้ได้ตะกอนเซลล์ โดยแยกอาหารอย่างระมัดระวังออกจากตะกอนเซลล์
- ทำการแยกตะกอนเซลล์ไว้ใน Resuspension Buffer (R3) 250 ไมโครลิตรเติม Lysis Buffer (L7) 250 ไมโครลิตร ลงในเซลล์ ผสมโดยการกลับหลอดทดลอง 5 ครั้ง (ห้ามเขย่า) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

- เติม Precipitation Buffer (N4) 350 ไมโครลิตร ผสมทันทีด้วยการกลับหลอดทดลองจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

- ปั่นเหวี่ยงสารละลายผสมด้วยความเร็วประมาณ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ใช้หลอด microcentrifuge เก็บส่วนที่ใส

- นำ supernatant ใส่ใน Spin Column

- วาง Spin column ที่มี supernatant ใส่หลอด Wash ขนาด 2 มิลลิลิตร

- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม

- เติม Wash Buffer (W10) 500 ไมโครลิตร ที่มี ethanol ลงใน column ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม

- เติม Wash Buffer (W9) 700 ไมโครลิตร ที่มี ethanol ลงใน column

- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม

- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด Wash Buffer ที่หลงเหลืออยู่ ที่ซึ่งส่วนที่ไหลผ่านจาก column แล้วนำ column ใส่หลอด Wash กลับตำแหน่งเดิม

- นำ Spin column วางในหลอด Recovery ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

- เติม TE Buffer ที่ผ่านความร้อน 75 ไมโครลิตร ลงบนตรงกลางของ column

- บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

- ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที

- ภายในหลอด Recovery มี plasmid DNA ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

7) การเตรียมยีนติดตาม (gene probe) ด้วยการติดฉลากด้วย Dig (Digoxigenin labeling)

ติดฉลากยีนติดตามด้วย DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (บริษัท Roche เยอรมัน) มีขั้นตอนดังนี้ นำยีนติดตามที่ได้จากเจลความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมใส่ใน eppendorf จากนั้นเติมน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีปริมาตรรวม 16 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเปลี่ยนสภาพดีเอ็นเอ (denature DNA) โดยนำไปบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีแล้วทำให้เย็นลงทันทีในน้ำแข็ง จากนั้นจึงเติม DIG High Prime (50 ไมโครลิตร DIG High Prime, 5X Conc. Labeling mixture containing optical concentrations of random primers, nucleotides, DIG-dNTP (alkali-label), Klenow enzyme and buffer components) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืน และทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 โมลาร์ EDTA pH 8.0 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จะมีปริมาตรรวม 22 ไมโครลิตร

8) การ Hybridization

- การทำ prehybridization โดยนำแผ่นไนลอน เมมเบรนที่มี DNA ที่ต้องการตรวจสอบใส่ลงใน ถูพลาสติก แล้วเติม preheat DIG Easy Hyb Granules 10 มิลลิลิตร ปิดผนึกถุง แล้วนำไปบ่มใน Hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

- การทำ Hybridization โดยเติม denature DIG – labeled DNA probe (นำ DIG-labeled DNA probe; ยีนติดตามผลที่ติดฉลากด้วย Dig ความเข้มข้นประมาณ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรไปต้มนาน 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที) ที่เตรียมไว้แล้วประมาณ 3.5 มิลลิลิตรต่อ 100 ตารางเมตรของแผ่นไนลอน ความเข้มข้นของ probe ประมาณ 51.136 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมลงในแผ่นไนลอนที่ผ่านการ pre- hybridization ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มข้ามคืนใน Hybridization oven ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

9) การตรวจสอบสัญญาณบนแผ่นไนลอน

- หลังจากทำ hybridization แล้วเทสารละลายทิ้งแล้วนำแผ่นไนลอนล้างใน 2X SSC, 0.1% SDS 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำไปแช่ยาบนเครื่องแช่ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างซ้ำอีกด้วย 0.5X SSC , 0.1% SDS 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที บ่มใน Hybridization oven ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้ง

- นำแผ่นไนลอนที่ผ่านการล้างเติม washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) ให้ท่วมแผ่นไนลอนแช่เบาๆ บนเครื่องแช่ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง

- เติม Blocking solution (เจือจาง 10X Blocking solution ในอัตราส่วน 1:10 ด้วย Maleic acid buffer) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปแช่เบาๆ บนเครื่องแช่ 30 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติม สารละลาย Antibody solution (หมูนหะยั้ง Anti-Digoxigenin-AP 5 นาที ที่ 10,000 รอบต่อนาที ดูดเอา สารละลายที่ผิว จากนั้นเจือจาง Anti-Digoxigenin-AP 1:5000 (150 mU/ml) ด้วย Blocking solution) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปแช่เบาๆ บนเครื่องแช่นาน 30 นาที เทสารละลายทิ้ง

- ล้างแผ่นไนลอนใน washing buffer 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที เทสารละลายทิ้ง

- เติมสารละลาย Detection buffer (0.1 M Tris – HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5 (20^oC)) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรนำไปแช่ยาบนเครื่องแช่ 2-5 นาที เทสารละลายทิ้ง

- จากนั้นนำแผ่นไนลอนใส่ในถูพลาสติก แล้วเติม color substrate solution (เติม NBT/BCIP stock solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปใน Detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการปิดผนึกถุง แล้วนำไปบ่มในที่มืดโดยไม่มีการแช่ยาจนกระทั่งเห็นแถบดีเอ็นเอ จากนั้นทำการ

หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 50 มิลลิลิตร ของ น้ำ milli Q หรือ TE buffer (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA pH 8.0) ทำการบันทึกภาพ

3.4 การวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกของ inulin ที่ได้จากแคลลัส

ศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก (Probiotics) โดยการนำ inulin ที่ได้จากแคลลัส รากที่ซักรน้ำได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (วิกิตำนา 2554) และหัวสดแก่จนตะวันตกแทนแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อในจุลินทรีย์ *Bifidobacteria bifidum* เพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่เพิ่มขึ้น มีวิธีทดลองดังนี้

เตรียม inoculums เชื้อ *Bifidobacteria* โดยการเลี้ยงในอาหาร MRS medium ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 50 μ l (10^6 cell/ml) ลงในอาหาร MRS medium ปริมาตร 5 ml ที่มี inulin ที่ได้จากแคลลัสและหัวสดแก่จนตะวันตกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ anaerobic และทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 , 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีมีการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ คือ นับปริมาณเซลล์โดยทำ serial dilution plate count, คำนวณปริมาณเซลล์ที่ได้ในหน่วย CFU/ml, วัด pH โดยใช้ pH meter และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.5 การวิเคราะห์น้ำตาลโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.5.1 นำแคลลัสของแก่จนตะวันตก แล้วทำการสกัดด้วยน้ำในอัตราส่วน 2 : 1 (โดยน้ำหนัก) ใช้เวลาในการสกัด 10 นาที และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้มารวมกัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอน จะได้สารสกัดตัวอย่าง

3.5.2 นำสารสกัดจากแคลลัสที่ต้องการวิเคราะห์มาเจือจางให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วกรองด้วย 0.22 μ m nylon syringe filter จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ใช้ column ชนิดคาร์โบไฮเดรต (Phenomenex, Rezex RNM Carbohydrate Column 7.8 x 300 mm) สำหรับการแยกสาร โดยกำหนดสภาวะในการแยกคือ ใช้น้ำ mobile phase (deionized distilled water) ที่อัตราการไหล 0.4 ml/min และอุณหภูมิ 45°C ตรวจจับสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วย refractive index detector (RI) และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารที่ออกจากคอลัมน์โดยการเปรียบเทียบกับค่า retention time (RT) และค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน คือ inulin, nystose, 1-kestose, sucrose, glucose, fructose

3.6 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

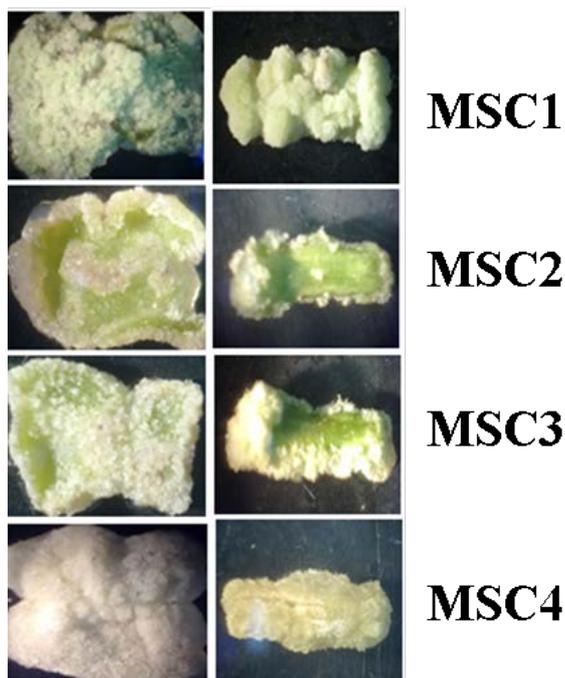
ในแต่ละ treatment ของการทดลองทำอย่างน้อย 10 ขวดและใช้ซ้ำพีซ 3 ซ้ำต่อขวด ทำการทดลองซ้ำ 2 ชุดการทดลอง และวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณการสะสม inulin เฉลี่ยใน *In vitro* tuber ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ ONE WAY ANOVA

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส

จากการชักนำแคลลัสจากแผ่นใบ (leaf blade) และลำต้น (stem) ของต้นแก้วตวันพลอดเชื้ออายุ 1 เดือนบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ NAA, IAA, IBA และ 2, 4- D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรพบว่า แคลลัสที่ชักนำได้จะมีสีเขียวอ่อนและเหลืองอ่อนขึ้นกับสูตรอาหารที่เพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.1) และแคลลัสที่ชักนำได้มีการเกาะตัวกัน 2 แบบ คือ เกาะตัวแบบแน่น (compact) และเกาะตัวแบบหลวม (friable) โดยสูตรอาหาร MSC 4 ที่มีการเติมออกซินชนิด 2,4-D ชักนำให้เกิดแคลลัสสีเหลืองที่มีการเกาะตัวแบบหลวม ส่วนสูตรอาหารอื่นๆ ที่มีการเติมออกซินชนิด NAA IAA และ IBA ชักนำให้เกิดแคลลัสสีเขียวและมีการเกาะตัวแบบแน่น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ชนิดของออกซินมีผลต่อการสร้างรงควัตถุ (pigment) และการเกาะตัวของแคลลัส นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ การให้แสง และชนิดของน้ำตาลที่ใช้ก็มีรายงานว่า มีผลต่อสีและการเกาะตัวของแคลลัส (ประศาสตร์ 2536)



รูปที่ 4.1 ลักษณะของแคลลัสที่ชักนำได้จากแผ่นใบ (ซ้าย) และลำต้น (ขวา) บนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ NAA (MSC1), IAA (MSC2), IBA (MSC3) และ 2, 4- D (MSC4) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 30 วัน

เมื่อวิเคราะห์การเจริญของแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก้วตวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยชั่งน้ำหนักสดแคลลัสที่ชักนำได้ พบว่า สูตรอาหาร MSC 1 สามารถชักนำให้แผ่นใบและลำต้นของแก้วตวันเกิดแคลลัสได้มากที่สุด รองลงมาคือ สูตรอาหาร MSC4 MSC3 และ MSC2 ตามลำดับ (ตาราง

ที่ 4.1) โดยอาหารในแต่ละสูตรมีองค์ประกอบต่างๆ ที่เหมือนกันยกเว้นชนิดของออกซินที่เติมลงไป ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าชนิดของออกซินที่เติมลงไปในการอาหารมีผลต่อการชักนำและการเจริญของแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยออกซินชนิด NAA ให้ผลการชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงสุด รองลงมาคือ 2,4-D IBA และ IAA ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่บนตะวันบนอาหารวุ้นสูตรต่างๆ พบว่า มีความแตกต่างกันไม่มากนัก จากผลที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่สะสมอยู่ในชิ้นเนื้อเยื่อ (endogenous plant growth regulator) (ประศาสตร์ 2536)

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่บนตะวันบนอาหารวุ้นสูตร 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.

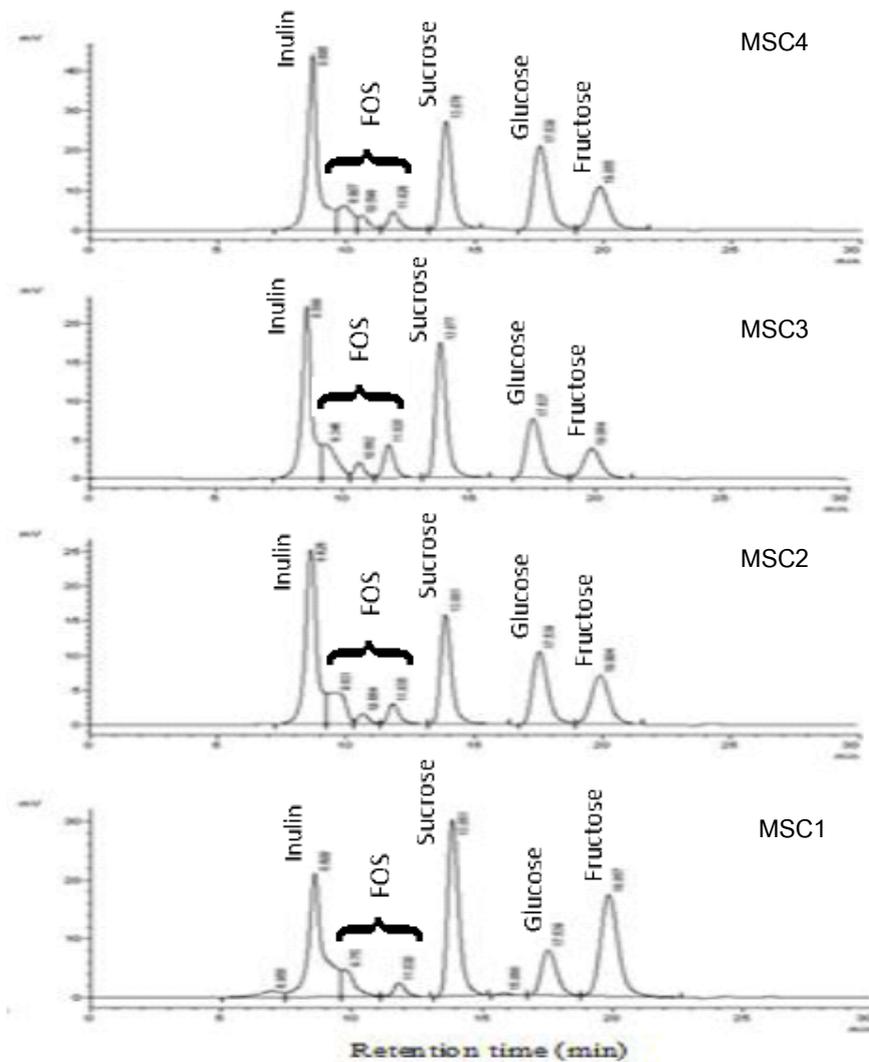
ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Taha และคณะ (2007) ที่รายงานว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA และ BAP ความเข้มข้นอย่างละ 1 มก./ล. สามารถชักนำให้ใบอ่อนของแก่บนตะวันเกิดแคลลัสได้ดี และจากการทำการทดลองซ้ำอีก 2 ชุดก็ให้ผลที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน นอกจากนี้ ปิยะวัชร และ สุมนา (2553) ได้พบว่า ออกซินชนิด NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้ใบอ่อนแก่บนตะวัน 2 สายพันธุ์ คือ JA 89 และ HEL 65 เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นการยืนยันว่าออกซินชนิด NAA ที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการชักนำแคลลัสจากแผ่นใบและลำต้น สำหรับออกซินชนิด IBA และ IAA นั้นมีบทบาทต่อการชักนำให้เกิดรากมากกว่า (บุษราภรณ์, 2548) ดังนั้น ปริมาณแคลลัสที่ชักนำได้ค่อนข้างต่ำในการทดลองนี้จึงเป็นการยืนยันถึงบทบาทของออกซินทั้งสองชนิดดังกล่าวได้ดีว่า ไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ชักนำแคลลัสในแก่บนตะวัน

4.2 ชนิดและปริมาณของน้ำตาลชนิดต่างๆ ในสารสกัดจากแคลลัส

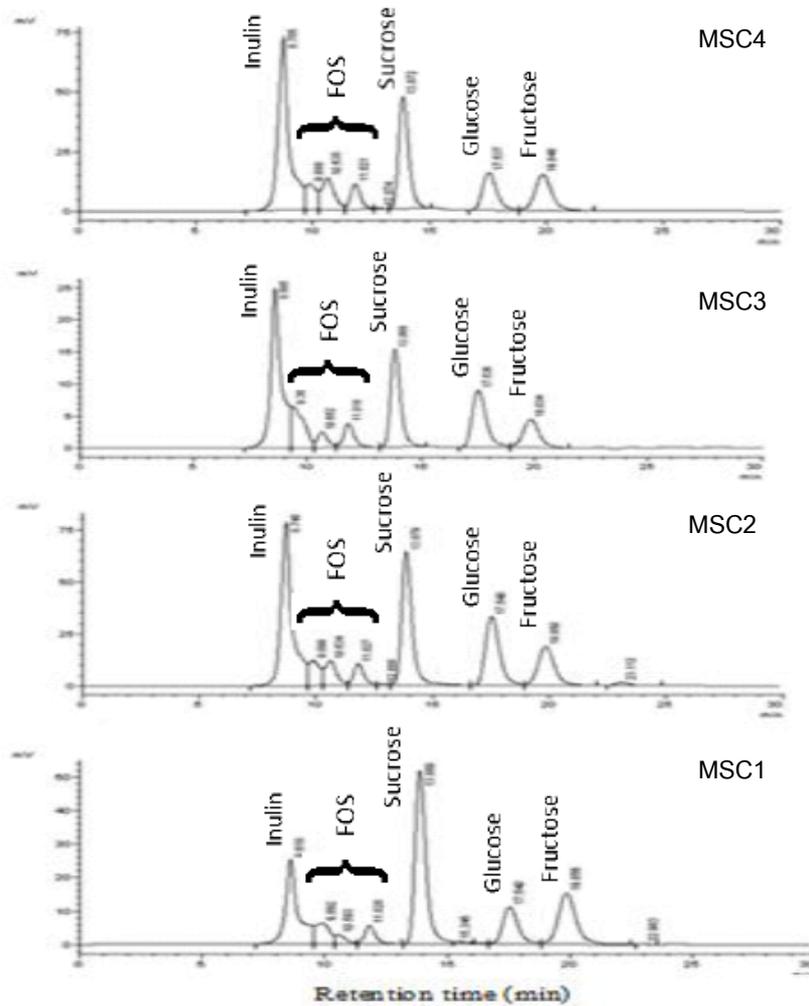
จากการนำเอาสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำได้จากแผ่นใบและลำต้นของแก่บนตะวันบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า แคลลัสมีสารสร้างอินนูลิน (inulin) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide, FOS (nystose, 1-kestose)) ซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส

(fructose) ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 แสดงให้เห็นว่า แคลลัสแก่บนตะวันที่ชักนำได้สามารถผลิต inulin และ FOS ได้เช่นเดียวกับหัวที่ปลูกในธรรมชาติ (natural grown tuber) ซึ่งการสร้างอินนูลินโดยอาศัย แคลลัสจากแก่บนตะวันที่เคยมีในรายงานการวิจัยของ Taha และคณะ (2007) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงแคลลัส และต้นในหลอดทดลองและติดตามดูกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลิเนส (Inulinase) แต่ไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณ inulin และชนิดของ FOS ที่สร้างขึ้นโดยตรง และจากผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า แคลลัสสามารถสร้างอินนูลอนได้ โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสในพืชหลายชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิต สารสำคัญในพืชได้ (ประศาสตร์, 2536)

สำหรับปริมาณ inulin FOS และน้ำตาลชนิดอื่นๆที่พบในสารสกัดแคลลัสนั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยพบว่า แคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSC2 นั้นให้ปริมาณ inulin สูงที่สุด รองลงมาคือ แคลลัสที่ชักนำจากลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSC3 และ MSC2 ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ FOS ที่ได้พบว่า แคลลัสที่ชักนำจากลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSC3 และ MSC2 นั้นให้ปริมาณ FOS ชนิด 1-kestose ที่สูงกว่าแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSC2 จะเห็นได้ว่า อาหารสูตร MSC2 และ MSC3 ที่มีการเสริมออกซินชนิด IAA และ IBA นั้นก็สามารถชักนำให้แคลลัสสร้าง inulin และ FOS ได้สูงกว่าอาหารที่เสริมออกซินชนิด NAA และ 2, 4- D ดังนั้น ชนิดของออกซินที่เหมาะสมสำหรับชักนำให้แคลลัสสร้าง inulin และ FOS ได้ดีจึงเป็น IAA และ IBA



รูปที่ 4.2 HPLC chromatogram ของ inulin (DP>5), FOS (DP2-5), sucrose, glucose และ fructose ใน สารสกัดแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ NAA (MSC1), IAA (MSC2), IBA (MSC3) และ 2, 4- D (MSC4) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 30 วัน



รูปที่ 4.3 HPLC chromatogram ของ inulin (DP>5), FOS (DP2-5), sucrose, glucose และ fructose ในสารสกัดแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ NAA (MSC1), IAA (MSC2), IBA (MSC3) และ 2, 4- D (MSC4) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 30 วัน

ตารางที่ 4.2 ปริมาณ inulin (DP>5), FOS (DP2-5), sucrose, glucose และ fructose ในสารสกัดแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ NAA (MSC1), IAA (MSC2), IBA (MSC3) และ 2, 4- D (MSC4) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 30 วัน

Explants	Medium	Concentration (mg/g fresh weight of calli)					
		Inulin	FOS		Sucrose	Glucose	Fructose
			Nystose	1-Kestose			
Leaf segment	MSC1	29.44	0.00	26.82	220.80	50.77	33.13
	MSC2	731.32	0.00	10.98	166.01	110.87	163.74
	MSC3	242.80	0.00	21.93	86.98	51.90	48.24
	MSC4	101.94	0.00	6.05	61.93	10.46	40.70
Stem segment	MSC1	174.55	10.60	22.39	155.40	65.95	48.28
	MSC2	473.32	0.00	39.02	66.41	60.80	81.27
	MSC3	504.59	0.00	37.76	204.02	109.60	136.99
	MSC4	362.48	0.00	20.04	195.65	85.71	172.71

4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสในแคลลัสที่ชักนำได้

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรส (fructosyltransferase, FTase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin โดยการสกัดเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) จากแคลลัสที่ชักนำได้จากแผ่นใบและลำต้นบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ มาทดสอบในสภาวะ *in vitro* โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นพบว่า crude enzyme ที่สกัดจากแคลลัสจากแผ่นใบและลำต้นที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSC2 และ MSC3 นั้น มีความสามารถในการเคลื่อนย้ายหมู่ฟรุกโตซิลจากซูโครสมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ FTase ที่วัดได้ในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MSC1 และ MSC4 (ตารางที่ 4.3) จากผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์ inulin กับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ FTase ของแคลลัสแก่่นตะวันที่ชักนำบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 ได้ว่า มีความสัมพันธ์แบบแปรตามกัน โดยแคลลัสจากแผ่นใบและลำต้นที่ชักนำบนอาหารสูตร MSC2 และ MSC3 ที่มีการสะสม inulin ในปริมาณมาก จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ FTase ที่สูงตามไปด้วย อย่างไรก็ตาม จะได้มีการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ในระดับ transcription ในลำดับต่อไป เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินในแคลลัสที่ชักนำได้จากแก่่นตะวัน

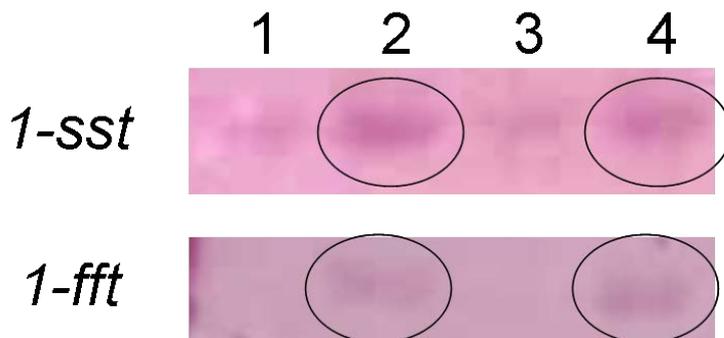
ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสของแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ NAA (MSC1), IAA (MSC2), IBA (MSC3) และ 2, 4- D (MSC4) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 30 วัน

Explants	Medium	Transfructosylating activity (U/g fresh weight of calli)
Leaf segment	MSC1	0.028
	MSC2	0.049
	MSC3	0.038
	MSC4	-
	MSC1	0.030

Stem segment	MSC2	0.067
	MSC3	0.048
	MSC4	0.016

4.4 การแสดงออกของยีน *1-sst* (sucrose: sucrose 1- fructosyltransferase) และ *1-fft* (fructan: fructan 1- fructosyltransferase) ในแคลลัสที่ชักนำได้

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในระดับ transcription โดยการทำให้ RT-PCR เพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin คือ *1-sst* (sucrose: sucrose 1- fructosyltransferase) และ *1-fft* (fructan: fructan 1- fructosyltransferase) และมีการใช้ house keeping gene คือ *actin* เพื่อควบคุมปริมาณ RNA เริ่มต้นให้เท่ากันในแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MSC2 และ MSC3 ซึ่งเป็นสูตรที่แคลลัสมีการสะสมปริมาณ inulin ที่สูงดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าแคลลัสมีการแสดงออกของยีน *1-sst* ทั้งบนอาหารสูตร MSC2 และ MSC3 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน แต่ระดับการแสดงออกของยีนค่อนข้างต่ำ (Lane 1 และ 3) และการแสดงออกของยีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาสั้นขึ้น (Lane 2 และ 4) ซึ่งจะเห็นแถบปรากฏที่เข้มขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของยีน *1-fft* ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ inulin ที่มีสายโซ่ยาวขึ้นโดยใช้ 1-kestose เป็นสารตั้งต้นนั้นจะมีการแสดงออกเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลาสั้นขึ้น (Lane 2 และ 4) จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า แคลลัสมีความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin กับการสังเคราะห์ inulin ในลักษณะที่แปรตามกัน ซึ่งหากเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นแล้ว งานวิจัยนี้ก็ถือว่าเป็นงานวิจัยแรกที่มีการวัดระดับการแสดงออกของยีน *1-sst* และ *1-fft* โดยงานวิจัยอื่นจะมีเพียงการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนดังกล่าวในส่วนของหัวสะสมอาหารระยะต่างๆ (van der Meer *et al.*, 1998)



รูปที่ 4.4 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin (*1-sst* (sucrose: sucrose 1- fructosyltransferase) และ *1-fft* (fructan: fructan 1- fructosyltransferase)) ของแคลลัสที่ชักนำจากลำต้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ IAA (MSC2) และ IBA (MSC3) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 30 และ 45 วัน

- Lane 1: แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSC2 นาน 30 วัน
- Lane 2: แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSC2 นาน 45 วัน
- Lane 3: แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSC3 นาน 30 วัน
- Lane 4: แคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSC3 นาน 45 วัน

4.5 คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกของ inulin ที่ได้จากแคลลัส

ก่อนที่จะมีการศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของอินนูลินและ FOS ชนิดต่างๆ ที่พบในสารสกัดจากแคลลัสเพื่อเปรียบเทียบกับรากที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง (วิกานดา 2554) และหัวสด (tuber) ก็ได้มีการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากแคลลัสและรากที่ได้จากการชักนำจากลำต้นและแผ่นใบแก่จนครบวันบนอาหาร 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 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 (DPเฉลี่ยประมาณ 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 4.4 และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสัดส่วนของน้ำตาลชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก inulin และ FOS ที่ตรวจพบในแคลลัสและรากก็จะเห็นได้ว่า แคลลัสจะมีการสะสมน้ำตาลซูโครสในสัดส่วนที่สูง แต่ในรากที่ชักนำได้นั้นจะสะสมน้ำตาลกลูโคสในสัดส่วนที่มากกว่า

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

จากผลการทดลองที่ได้ในรูปที่ 4.5 จะเห็นได้ว่า เมื่อมีการควบคุมให้ปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นในอาหารทุกชุดเท่ากับปริมาณน้ำตาลรวมในอาหาร MRS ที่มีกลูโคส 2% (w/v) นั้น เชื้อแบคทีเรียจะมีรูปแบบการเจริญที่เหมือนกันคือ ปริมาณเชื้อที่เพิ่มมากขึ้นในชั่วโมงที่ 9-23 และค่า pH เริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 9 จนถึงชั่วโมงที่ 13 ปริมาณน้ำตาลรวมจะลดลงเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตมากขึ้นเช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็ลดลงเช่นเดียวกัน

หากเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในอาหารแต่ละชุดจะพบว่า อาหารที่มีกลูโคสและฟรุคโตสจะมีปริมาณที่สูงกว่าในอาหารชุดอื่นๆ ประมาณ 5-6 เท่า และอาหารที่มีเสริมสารสกัดจะมีน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าอาหารที่เสริมซูโครส เพราะในสารสกัดมีน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสรวมอยู่ด้วยนอกเหนือไปจากซูโครส และ inulin และ FOS โดยผลการทดลองที่ได้อาจแสดงให้เห็นว่า อาหารที่มีการเสริมสารสกัดต่างๆ นั้นสามารถ

ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bifidobacterium* sp. ได้เทียบเคียงกับอาหาร MRS ปกติ คือมีค่า pH ของอาหารลดลง ในขณะที่ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นรูปแบบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โปรไบโอติก *Bifidobacterium* sp. แม้จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยกว่ามาก จึงอาจกล่าวได้ว่า ส่วนของ inulin และ FOS ที่พบในแคลลัสและรากที่ชักนำได้นั้นมีคุณสมบัติความเป็น prebiotics และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bifidobacterium* sp. ในอาหารที่เสริมสารสกัดชนิดต่างๆ ดังภาพที่ 4.5 จะเห็นว่า อาหารที่เสริมสารสกัดจากรากจะให้ผลที่ดีกว่าแคลลัส และหว่าสดโดยสังเกตได้จากการมีปริมาณเซลล์จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มากกว่า ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในรากที่ชักนำได้มีน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส นอกเหนือไปจาก inulin และ FOS ที่สูงกว่าที่พบในแคลลัส และหว่าสด ซึ่งสารสกัดอย่างหลังนี้จะมีสัดส่วนของน้ำตาลซูโครสนอกเหนือไปจาก inulin และ FOS ในสัดส่วนที่สูงเซลล์จึงชอบที่จะใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในการเจริญก่อน

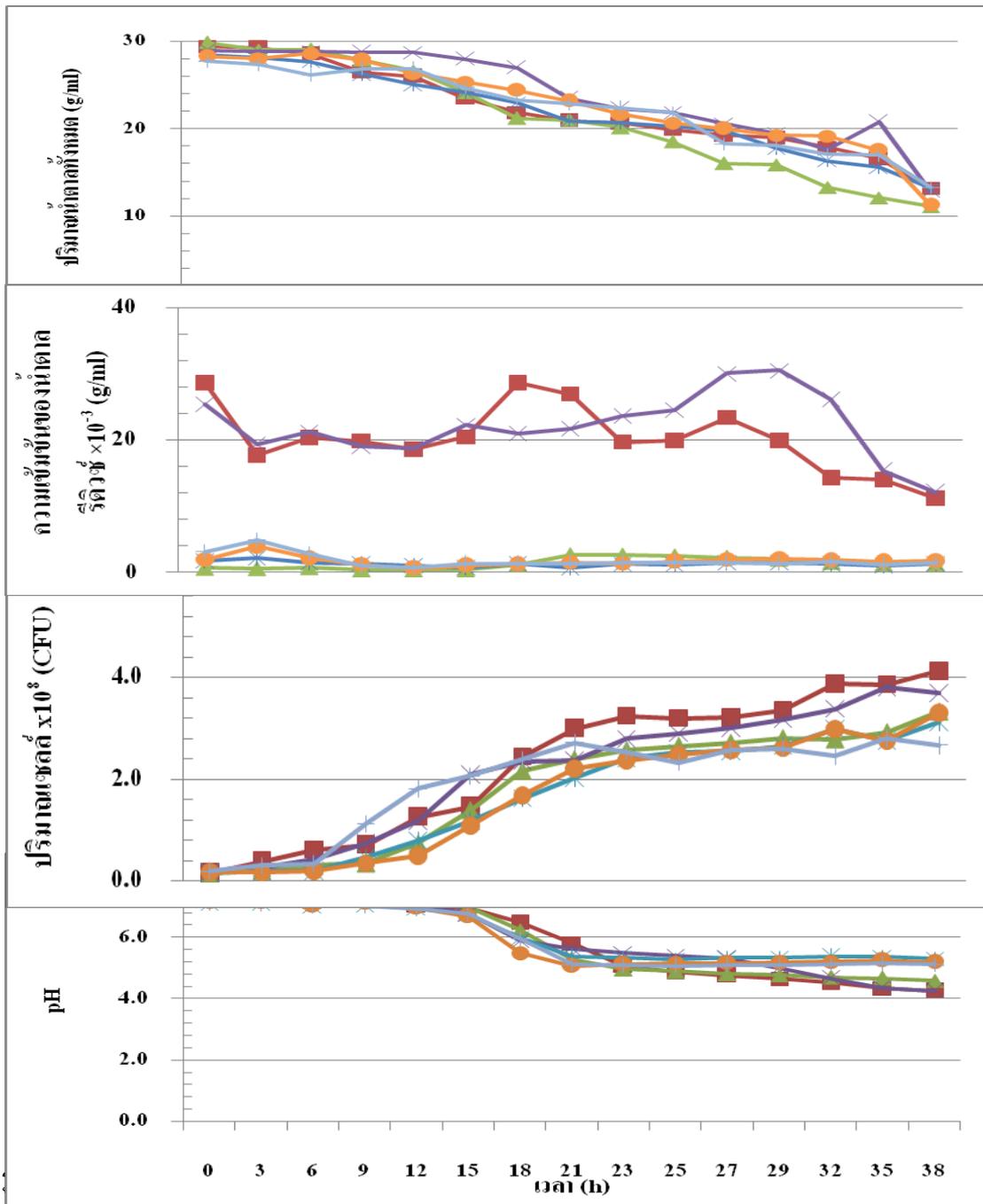
ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบของสารสกัดจากแคลลัสและรากที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง และหว่าสดแก่่นตะวัน จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

Plant samples	Retention time	Type of sugars	Concentration (mg/ml)	Content (%)	
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 4.4 (ต่อ)

Plant samples	Retention time	Type of sugars	Concentration (mg/ml)	Content (%)	
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



สาร MRS

หมักการเสริมสารสกัดจากแคลลัส ราก และหวัดเหิมปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากัน

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

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองหาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินในแคลลัสที่ชักนำได้จากแก่นตะวันพบว่า มีการแปรผันตามกันคือ แคลลัสที่มีการสะสมอินนูลินในปริมาณมากจะมีการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินในปริมาณสูง ซึ่งเป็นรูปแบบความสัมพันธ์ที่พบในการสะสมอินนูลินของหัวสดที่ปลูกในแปลงธรรมชาติ นอกจากนี้สารที่ตรวจพบในแคลลัสที่ชักนำได้ยังแสดงคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกได้เช่นเดียวกับหัวสดที่ปลูกในแปลงธรรมชาติด้วย

ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการผลิตอินนูลินจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสซึ่งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตที่สามารถทำได้ตลอดทั้งปีและสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆได้ อีกทั้งยังสามารถปรับเปลี่ยนสภาวะในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีการผลิตอินนูลินได้สูงขึ้น ซึ่งอาจทำได้ยากในสภาวะการปลูกตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามการคิดต้นทุนการผลิตอินนูลินจากแคลลัสเปรียบเทียบกับ การเพาะปลูกในธรรมชาติยังเป็นสิ่งที่ควรต้องพิจารณาดำเนินการต่อไปเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ได้จริง

บทที่ 6

บรรณานุกรม

บุษราภรณ์ งามปัญญา. 2551. เอกสารประกอบการเรียนเทคโนโลยีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.

- วิกานดา โสขุมา. 2554. การผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- นิमित วรสุตร และ สนั่น จอกลอย. 2549. อินนูลิน: สารสำคัญสำหรับสุขภาพในแก่นตะวัน. แก่นเกษตร ปีที่ 34 ฉบับที่ 2 (เมษายน- มิถุนายน 2549). น. 85- 91.
- ปิยะวัชร ผาสุข และ สุมนา นีระ. 2553. ผลของออกซินและไซโตไคนินที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงใบอ่อนแก่นตะวันในสภาพปลอดเชื้อ. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2553 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ปรียา พวงสำลี-หวังสมนึก และ วิภาวรรณ เคนาอุประ. 2551. ผลของ NAA และ Kinetin ต่อการเกิดแคลลัสและรากของแก่นตะวัน. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2551 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- พิภพ สดศรี. 2546. ผลของเจอร์ซาเลม อาร์ทีโซค (*Helianthus tuberosus* L.) เป็นสารทดแทนยาปฏิชีวนะต่อการเจริญเติบโตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และชีวภาพของลำ ำเล็กส่วนปลายและลำ ำใหญ่ในลูกสุกรหย่านม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.
- ภิเชษฐ์ ใบเขียว และ เพิ่มพูน กীরติกสิกร. 2551. อิทธิพลของไนโตรเจนและโพแทสเซียมต่อผลผลิตและคุณภาพของพืชพลังงานทดแทน: แก่นตะวัน. การประชุมสัมมนาวิชาการระบบเกษตรแห่งชาติ ครั้งที่ 4 ศูนย์ประชุมนานาชาติเอ็มเพรส เชียงใหม่. น. 439- 446.
- เยาวมาลย์ คำเจริญ ศรีสุดา ศิริเหล่าไพศาล และพัฒน์พงษ์ อิศงค์. 2549. บทบาทของแก่นตะวัน (Jerusalem artichoke) ในอาหารสัตว์. แก่นเกษตร ปีที่ 34 ฉบับที่ 2 (เมษายน- มิถุนายน 2549). น. 92- 103.
- วิสุทธิ กี่ทอง ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วีรณา สีนสวัสดิ์ พอร์เรอร์ สุมาลี โพธิ์ทอง อติศักดิ์ คำนวนศิลป์ และสุพจน์ กิตติบุญญา. 2550. การศึกษาการผลิตแก่นตะวันเพื่อการผลิตเอทานอล. น.187- 193.
- สุดารัตน์ คำผา ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก สนั่น จอกลอย พินิจ หวังสมนึก และอาร์นต์ พัฒน์นัย. 2551. ลักษณะสัณฐานและกายวิภาคของแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) ที่ปลูกในประเทศไทย. *KKU Agricultural Sciences Semina*
- ศุภวันจักรี พลมีศักดิ์ และ สมชัย จันทร์สว่าง. 2546. ผลการใช้จุลินทรีย์ผสมและโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชเจอร์ซาเลมอาร์ติโซค ในอาหารสุกรรุ่น-ขุนเพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกร. *วารสารสมุนไพร* 10; 1- 17.
- Darwen, C. W. E. and John, P. 1989. Localization of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of Jarusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiol.* 89; 658- 663.
- Koops, A. J. and Jonker, H. H. 1996. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. *Plant Physiol.* 110; 1167- 1175.
- Point,H. G. and del Campillo, E. 1985. Fructans. In *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants* (Dey, P. M. and Dixon. R. A., eds). London: Academic Press, pp. 205- 227.
- 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. *Agricultural Sci. J.* 39(3) (Suppl.); 373- 376.
- Sprenger, N., Bortlik, K., Brandt, A., Boller, T. And Wiemken, A. 1995. Purification, cloning, and functional expression of sucrose: fructan 6- fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92; 11652- 11656.
- Suzuki, M. 1993. Fructans in crop production and preservation, In *Science and Technology of Fructans* (Suzuki, M. and Chatterton, N. J, eds). CRC Press, pp. 227- 255.
- 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. *J. of Applied Sciences Research* 3(9); 853- 858.
- van der Meer, I. M., Koops, A. J., Hakkert, J. C. 1998. Cloning of fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *The Plant Journal* 15(4); 489- 500.
- Venter, C. S. 2007. Prebiotics: an update. *Journal of Family Ecology and Consumer Sciences* 35; 17- 25.
- Vijn, I., van Dijken, A., Sprenger, N., van Dun, K., Weisbeek, P., Wiemken, A. and Smeekens, S. 1997. Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan: fructan 6G- fructosyltransferase. *The Plant Journal* 11(3); 387- 389.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการเตรียมสารเคมี

ตารางที่ ก.1 สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Murashige และ Skoog 1962 (MS)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ ตามสูตร (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-inositol (เติมแยก)	100	0.1	

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร Murashige และ Skoog 1962 (MS)

1. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก

MS Macronutrient Stock I : NH₄ NO₃ และ KNO₃ เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง NH₄ NO₃ 82.5 กรัม

- ชั่ง KNO₃ 95 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

MS Macronutrient Stock II : CaCl₂.2H₂O เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง CaCl₂.2H₂O 22 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

MS Macronutrient Stock III : MgSO₄.7H₂O และ KH₂PO₄ เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง MgSO₄.7H₂O 18.5 กรัม

- ชั่ง KH₂PO₄ 8.5 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

2. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง

MS Micronutrient Stock : เข้มข้น 1000 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง MnSO₄.4H₂O 11.15 กรัม

- ชั่ง ZnSO₄.5H₂O 4.3 กรัม

- ชั่ง H₃BO₃ 3.1 กรัม

- ชั่ง KI 0.415 กรัม

- ชั่ง Na₂MoO₄.2H₂O 0.125 กรัม

- ชั่ง CuSO₄.5H₂O 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-inositol น้ำตาลซูโครส และวุ้น ให้ชั่งใหม่ ไม่ต้องเตรียมเป็น stock solution

4. การเตรียมสารควบคุมการเจริญเติบโต

- การเตรียม stock solution ของสารควบคุมการเจริญเติบโตออกซินโดยคิดจากเนื้อสาร

ตัวอย่าง การเตรียม Stock solution IAA เข้มข้น 1 มก./มล. ปริมาตร 50 มล. ทำโดยชั่ง IAA 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

- 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

5. การเตรียม เตรียม 0.007 M potassium phosphate buffer pH 7 200 ml

ชั่ง KH_2PO_4 0.0952 g

ชั่ง K_2HPO_4 0.1219 g

ละลายน้ำกลั่น 100 ml ปรับ pH ด้วย NaOH จน pH 7 ปรับปริมาตรให้ได้ 200 ml

6. การเตรียม extraction buffer สำหรับสกัด enzyme

ประกอบด้วย

- 0.007 M potassium phosphate buffer pH 7

- 0.5% Triton X-100

- 0.5% cysteine)

เติม 0.007 M potassium phosphate buffer pH 7 100 ml

เติม Triton X-100 0.5 ml

เติม cysteine) 0.5 g

ผสมให้เป็นเนื้อเดียว

7. การเตรียม 0.1 M potassium phosphate buffer pH 5.4 100 ml สำหรับการทำให้ปฏิกิริยา enzyme

ชั่ง KH_2PO_4 1.3609 g

ละลายน้ำกลั่น 50 ml ปรับ pH ด้วย NaOH จน pH 5.4

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml

8.การเตรียม LB medium 100 ml

Tryptone 0.10 g

Yeast Extract 0.50 g

NaCl 0.10 g

น้ำ 100 ml

8.การเตรียม LB medium 100 ml

Tryptone 0.10 g

Yeast Extract 0.5. g

NaCl 0.10 g

Agar 1.40 g

น้ำ 100 ml

ภาคผนวก ข

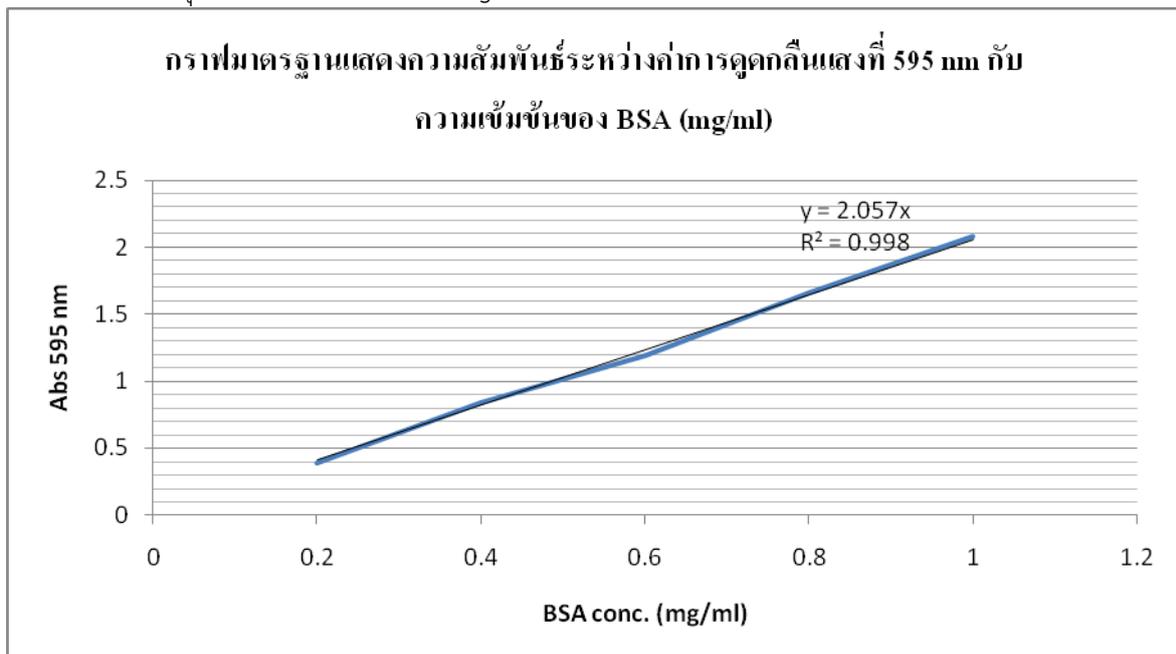
กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐาน Protein โดยวิธี Bradford dye reagent

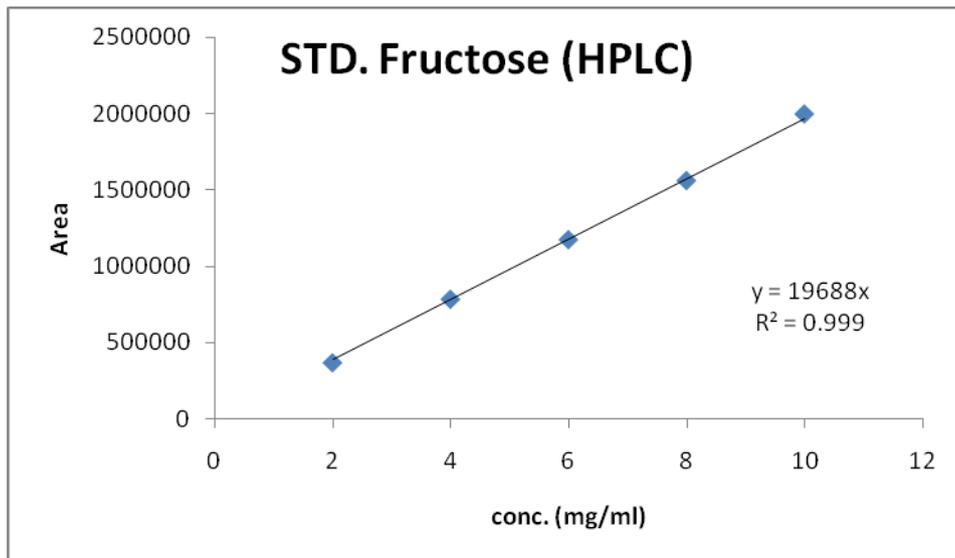
ตารางที่ ข.1 ปริมาณค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนโดยการวัดด้วยวิธี Bradford dye reagent

ความเข้มข้น mg/ml	OD 595 nm			average	SD
	1	2	3		
0.2	0.421	0.415	0.326	0.387	0.053
0.4	0.084	0.083	0.085	0.084	0.001
0.6	0.124	0.115	0.12	0.119	0.005
0.8	0.167	0.163	0.167	0.165	0.002
1	0.197	0.219	0.208	0.208	0.011

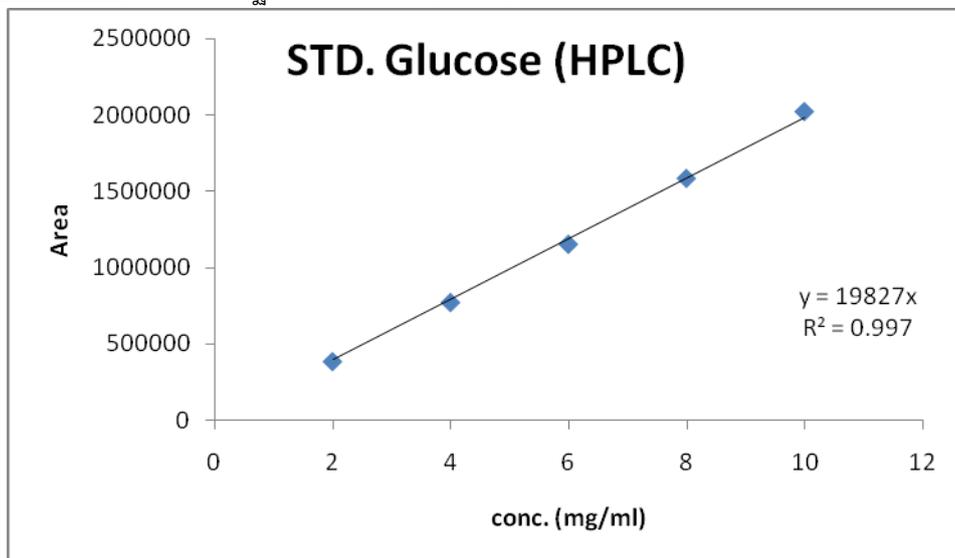
หมายเหตุ: ความเข้มข้น 0.2-1.0 mg/ml dilute 10 เท่า



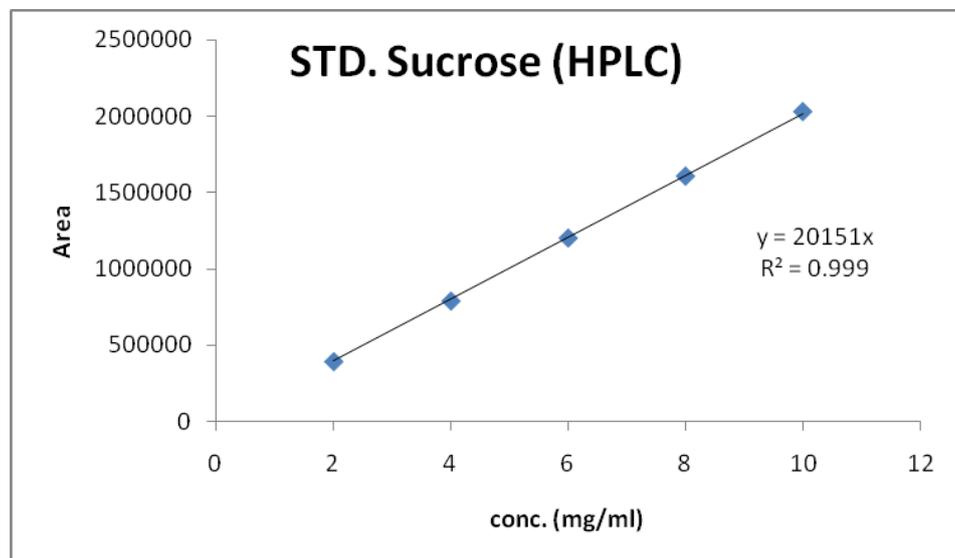
กราฟที่ ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA (mg/ml) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm



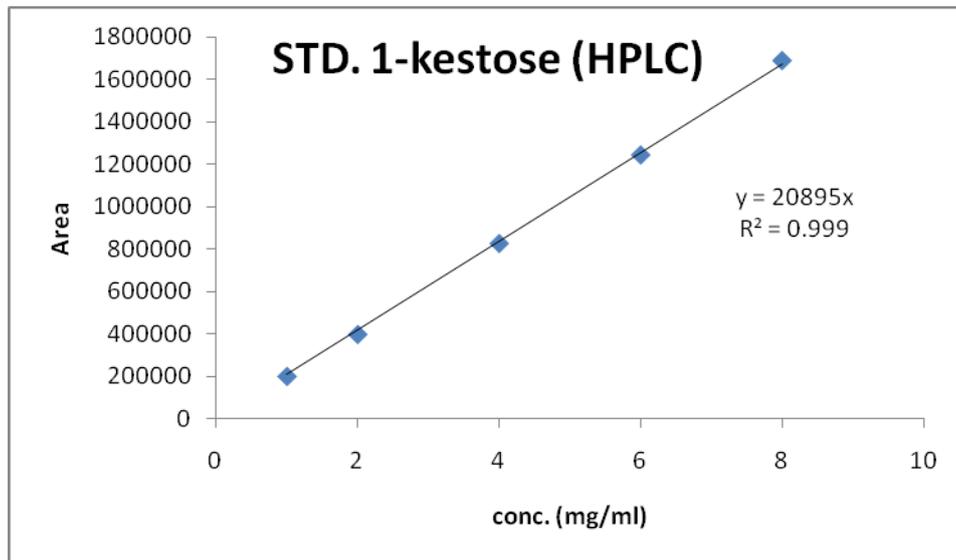
กราฟที่ ข.2 กราฟมาตรฐาน Fructose (HPLC) retention time ประมาณ 20.219 นาที



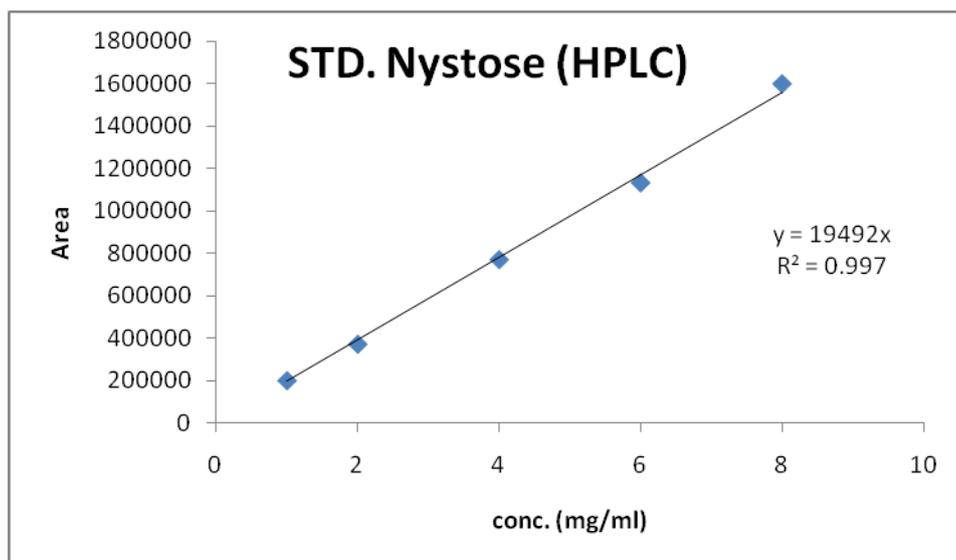
กราฟที่ ข.3 กราฟมาตรฐาน Glucose (HPLC) retention time ประมาณ 18.147 นาที



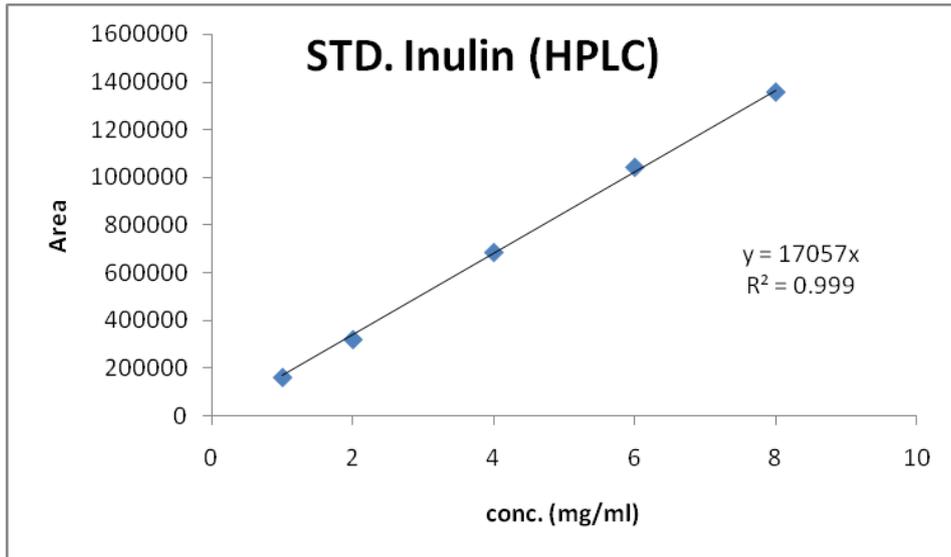
กราฟที่ ๔.4 กราฟมาตรฐาน Sucrose (HPLC) retention time ประมาณ 15.014 นาที



กราฟที่ ๕.5 กราฟมาตรฐาน 1-kestose (HPLC) retention time ประมาณ 13.460 นาที



กราฟที่ ๖.6 กราฟมาตรฐาน Nystose (HPLC) retention time ประมาณ 12.653 นาที



กราฟที่ ข.7 กราฟมาตรฐาน Inulin (HPLC) retention time ประมาณ 11.662 นาที

ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค.1 ปริมาณน้ำหนัสดของแคลลัสแก้วที่วันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหาร	น้ำหนัสด (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)

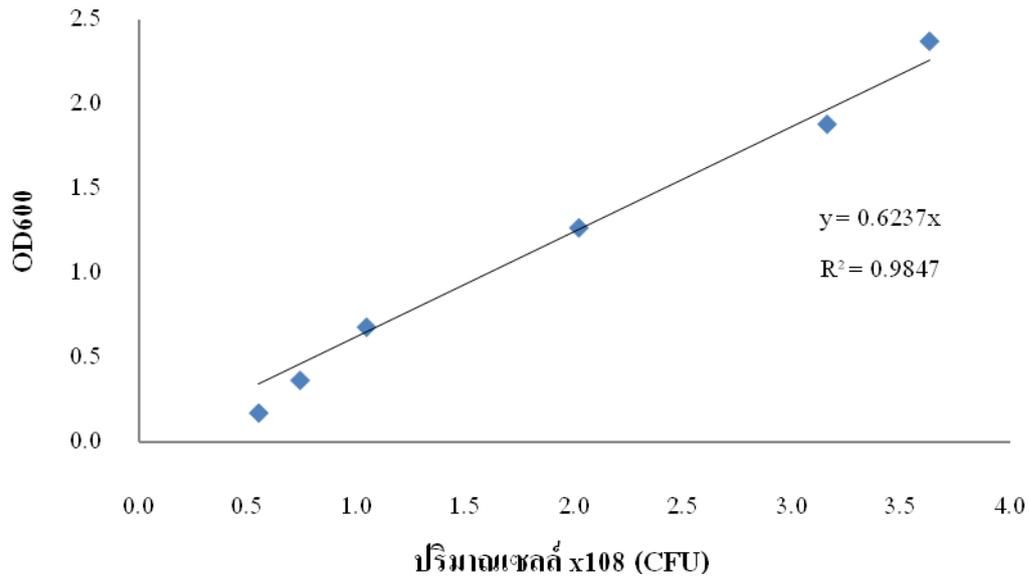
หมายเหตุ : MSC 1 คือ MS ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

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.

การศึกษาคุณสมบัติความเป็นฟรีไบโอติก



กราฟมาตรฐานการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bifidobacterium sp.*

ตารางที่ ค.2 ค่า pH ของอาหาร MRS ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *Bifidobacterium sp.* ในเวลาต่าง ๆ

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 ค.3 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 ค.4 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 ค.5 น้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในเวลาที่เปลี่ยนไป

ชั่วโมงที่	ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ($\mu\text{M/ml}$)					
	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

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

Booncho K, Jaturapiree P, Pruksasri S, Khuwjitjaru P. and Ngampanya B. 2013. Inulin accumulation and fructosyltransferase activity of calli induced from Jerusalem artichoke. The 8th International Symposium of The Protein Society of Thailand. August 5- 7, 2013. Chulabhorn Research Institute Convention Center, Bangkok, Thailand (Poster)

ประวัติผู้วิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวบุษราภรณ์ นามปัญญา
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Budsaraporn Ngampanya
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3349900271604
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
เงินเดือน 39,350 บาท เวลาที่ใช้ทำวิจัย 20 ชั่วโมง-สัปดาห์
- ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์...
 ข้าราชการ พนักงาน
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
(กรุณากรอกหมายเลขโทรศัพท์มือถือ และ e-mail เพื่อสะดวกในการติดต่อ และเพื่อกรอกในระบบ NRMS)
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม ม.ศิลปากร
โทรศัพท์ 034-219360 มือถือ 089- 1627114
โทรสาร 034- 219360 E-mail budsara171@yahoo.com
- ประวัติการศึกษา : ระดับการศึกษา สถาบัน และปีที่จบ
ปริญญาตรีสาขาเกษตรศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 1)สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปีที่จบ 2536
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การแยกเชื้อราที่ก่อโรคเน่าในเงาะและทดสอบความสามารถการก่อโรคเน่าของเชื้อ
ที่คัดเลือกได้
ปริญญาโทสาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ 2540
หัวข้อวิทยานิพนธ์ Effects of DNA demethylation of phenotypic expression in rice
ปริญญาเอกสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล
ปีที่จบ 2546
หัวข้อวิทยานิพนธ์ Molecular genetics characterization of sugar transporters and related genes
during flowering, grain filling and seed germination in rice (*Oryza sativa* L.)
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
8.1 ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ทางด้านศิลปะและการออกแบบที่ดำเนินการเสร็จแล้ว
เรื่องที่ 1
 - ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเอนไซม์
จากแก่นตะวันทีปลูกในประเทศไทย
(ภาษาอังกฤษ) Production of Fructo- oligosaccharides (FOS) by Plant Tissues Culture
and Enzymes from Jerusalem artichoke Cultivated in Thailand
 - ลักษณะโครงการ /ผลงาน ส่วนบุคคล/เดี่ยว
เป็นหัวหน้า
 - สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
 - จำนวนงบประมาณ 468,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2554 ถึงปี พ.ศ.2555

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

- ในประเทศ
- มหาวิทยาลัย

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

- เผยแพร่แล้ว
- ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน
- ต่างประเทศ

Sokuma W, Choonet J and Ngampanya B. (2011) Inulin Production from Jerusalem Artichoke by Cell and Tissue Culture Techniques. International Food Conference: "Life Improvement through Food Technology". October 28- 29, 2011. Surabaya, Indonesia.

- ในประเทศ

วิกานดา ไสขุมา ปารีชาติ วรณสรโร จิตราภา ชูเนตร และบุษราภรณ์ งามปัญญา (2555) การผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแก่นตะวันโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ศิลปการวิจัยและสร้างสรรค์ครั้งที่ 5 "บูรณาการศาสตร์และศิลป์" 25- 27 มกราคม 2555. มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.

เรื่องที่ 2

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันเพื่อนำไปผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์

(ภาษาอังกฤษ) Characterization of fructosyltransferase extracted from Jerusalem Artichoke for fructooligosaccharides production

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน คณะบุคคล/กลุ่ม (ร่วมกับนักศึกษาปริญญาโท) เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

3. สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

4. จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ถึงปี พ.ศ.2555

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

- ในประเทศ
- ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) วช

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

- เผยแพร่แล้ว
- ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์
- ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน
- ต่างประเทศ

Santad Wichienchot, Wirote Youravong, Suwattana Prueksasri and **Budsaraporn Ngampanya**. 2015. Recent researches on prebiotics for gut health in Thailand. Functional Foods in Health and Disease. 5(11): 381-394.

Keayarsa S, Boonchoo K and Ngampanya B. (2011) The Activity Analysis of Fructosyltransferase Extracted from Jerusalem Artichoke during Tubercization Stage.

International Food Conference: “Life Improvement through Food Technology”.
October 28- 29, 2011. Surabaya, Indonesia.

●ในประเทศ

1. ศรีสุตา เคยอาษา เกரியงค์ดี บุญชู และบุษราภรณ์ งามปัญญา (2555)

การสกัดและการวิเคราะห์เอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสจากหัวแก่นตะวันระยะต่างๆ. ศิลปากร
วิจัยและสร้างสรรค์ครั้งที่ 5 “บูรณาการศาสตร์และศิลป์” 25- 27 มกราคม 2555. มหาวิทยาลัย
ศิลปากร นครปฐม.

2. **Ngampanya B**, Keayarsa S, Ngermeesri K, Prakobtran, P, Wichienchot S.

Production of Fructo- oligosaccharides by Partial Purified Fructosyltransferase from
Variety of Jerusalem Artichoke Grown in Thailand. The 7th International Symposium
of The Protein Society of Thailand. August 29- 31, 2012. Chulabhorn Research
Institute Convention Center, Bangkok, Thailand

เรื่องที่ 3

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช
(ภาษาอังกฤษ) Production of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)
by plant cell and tissue culture techniques

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน คณะบุคคล/กลุ่ม (ร่วมกับนักศึกษาปริญญาโท)
เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

3. สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

4. จำนวนงบประมาณ 110,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ถึงปี พ.ศ.2555

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

● ในประเทศ

● ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) วช

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

● เผยแพร่แล้ว

● ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน

● ต่างประเทศ

Sokuma W, Choonet J and **Ngampanya B**. (2011) Inulin Production from Jerusalem
Artichoke by Cell and Tissue Culture Techniques. International Food Conference:
“Life Improvement through Food Technology”. October 28- 29, 2011. Surabaya,
Indonesia.

●ในประเทศ

วิกานดา โสขุมมา ปารีชาติ วรรณสโร จิตราภา ชูเนตร และบุษราภรณ์ งามปัญญา (2555)

การผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแก่นตะวันโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.
ศิลปากรวิจัยและสร้างสรรค์ครั้งที่ 5 “บูรณาการศาสตร์และศิลป์” 25- 27 มกราคม 2555.
มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.

เรื่องที่ 4

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากแก่นตะวัน (ภาษาอังกฤษ) Study on Prebiotic Properties of Fructooligosaccharide from Jerusalem artichoke Extract
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน คณะบุคคล/กลุ่ม (ร่วมกับนักศึกษาปริญญาโท) เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
3. สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
4. จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 ถึงปี พ.ศ.2556
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
 - ในประเทศ
 - ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) วช
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
 - เผยแพร่แล้ว
 - ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน
 - ในประเทศ
 1. Sinngam A. and Ngampanya B. Prebiotic properties of fructo-oligosaccharide from extract of Kaentawan (*Helianthus tuberosus* L.) (Oral presentation) The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology International Conference on Green Biotechnology : Renewable Energy and Global Care November 29-30, 2012 Sunee Grand Hotel, Ubon Ratchathani, Thailand.
 2. Sinngam A., Bangdhumband P. and Ngampanya B.Improvement of color, flavor and taste of Kaentawan (*Helianthus tuberosus* L.) juice (Poster presentation) The 15th FOOD INNOVATION ASIA COFERENCE 2013 June 13-14, 2013 BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.

เรื่องที่ 5

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การโคลนยีนเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลูกผสม (ภาษาอังกฤษ) Cloning of Fructosyltransferase gene from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) and activity analysis of recombinant enzyme
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน คณะบุคคล/กลุ่ม (ร่วมกับนักศึกษาปริญญาโท) เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
3. สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
4. จำนวนงบประมาณ 104,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 ถึงปี พ.ศ.2556
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
 - ในประเทศ
 - ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) วช
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

- เผยแพร่แล้ว
 - ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน
 - ในประเทศ

Sapmark J. and Ngampanya B. Cloning of 1-sucrose : sucrose fructosyltransferase (*1-sst*) and 1-fructan : fructan fructosyltransferase (*1-fft*) genes from tuber of Kaentawan (*Helianthus tuberosus* L.) (Oral presentation) The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology International Conference on Green Biotechnology : Renewable Energy and Global Care November 29-30, 2012 Sunee Grand Hotel, Ubon Ratchathani, Thailand.

เรื่องที่ 6

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอินนูลินสโโดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตร (ภาษาอังกฤษ) Optimization of inulinase production by agricultural materials
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน คณะบุคคล/กลุ่ม (ร่วมกับนักศึกษาปริญญาโท) เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
3. สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
4. จำนวนงบประมาณ 20,000 บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 ถึงปี พ.ศ.2556
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
 - ในประเทศ
 - ภาควิชา
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
 - เผยแพร่แล้ว
 - ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน
 - ในประเทศ

Bangdhumband P. and **Ngampanya B.** 2014. Screening for inulinase producing fungi from Kaentawn rhizosphere. The 16th FOOD INNOVATION ASIA COFERENCE 2014 June 12-13, 2014 BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.

