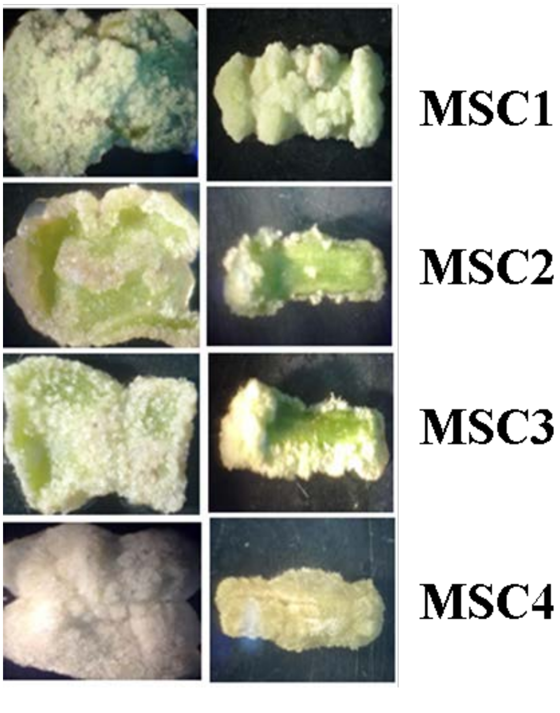
บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัส

จากการชักนำแคลลัสจากแผ่นใบ (leaf blade) และลำต้น (stem) ของต้นแก่นตะวันปลอดเชื้ออายุ 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

เมื่อวิเคราะห์การเจริญของแคลลัสที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่นตะวันบนอาหารสูตรต่างๆ โดยชั่งน้ำหนักสดแคลลัสที่ชักนำได้ พบว่า สูตรอาหาร MSC 1 สามารถชักนำให้แผ่นใบและลำต้นของแก่นตะวันเกิดแคลลัสได้มากที่สุด รองลงมาคือ สูตรอาหาร MSC4 MSC3 และ MSC2 ตามลำดับ (ตาราง

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

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักสดของแคลลัสที่ชักนำจากการเพาะเลี้ยงแผ่นใบและลำต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร 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)

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

<u>หมายเหตุ</u> : 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.

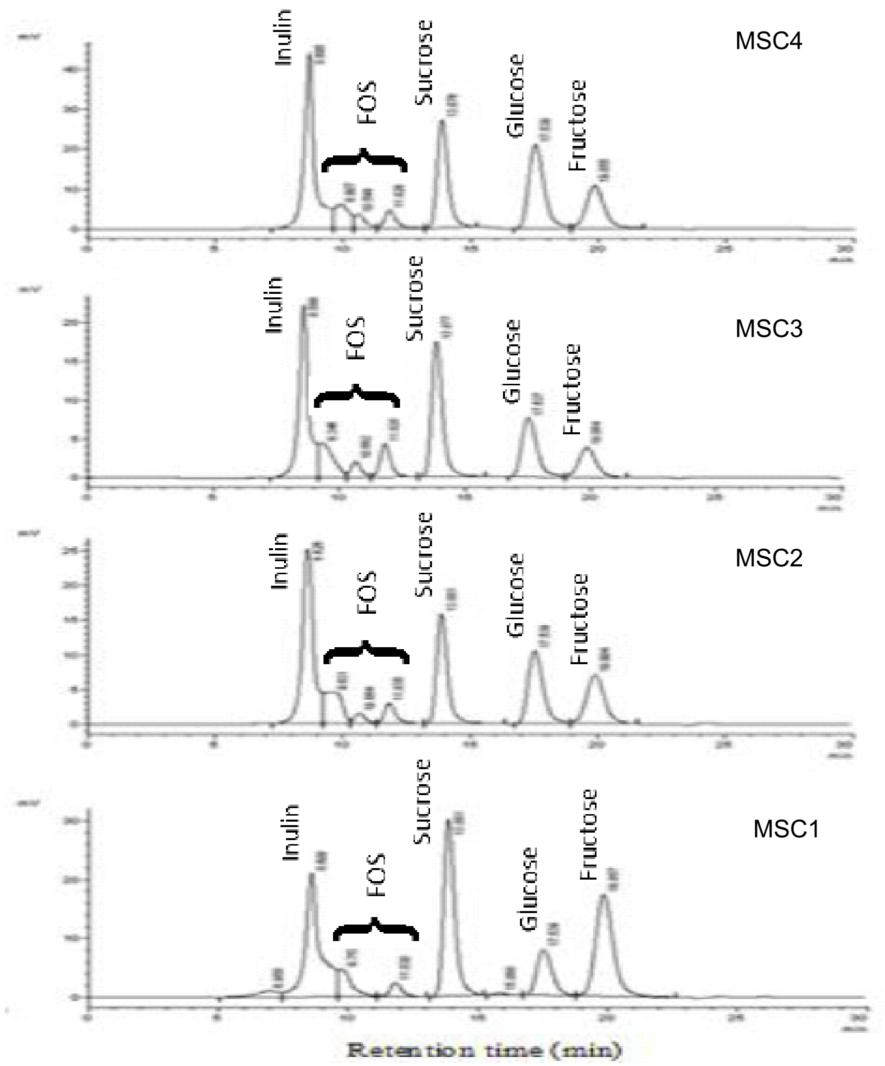
ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Taha และคณะ (2007) ที่รายงานว่าอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมฮอร์โมน NAA และ BAP ความเข้มข้นอย่างละ 1 มก./ล. สามารถชักนำให้ใบอ่อนของแก่นตะวันเกิดแคลลัสได้ดี และจากการทำการทดลองซ้ำอีก 2 ชุดก็ให้ผลที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน นอกจากนี้ ปิยะวัชร และ สุมนา (2553) ได้พบว่า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

4.2 ชนิดและปริมาณของน้ำตาลชนิดต่างๆ ในสารสกัดจากแคลลัส

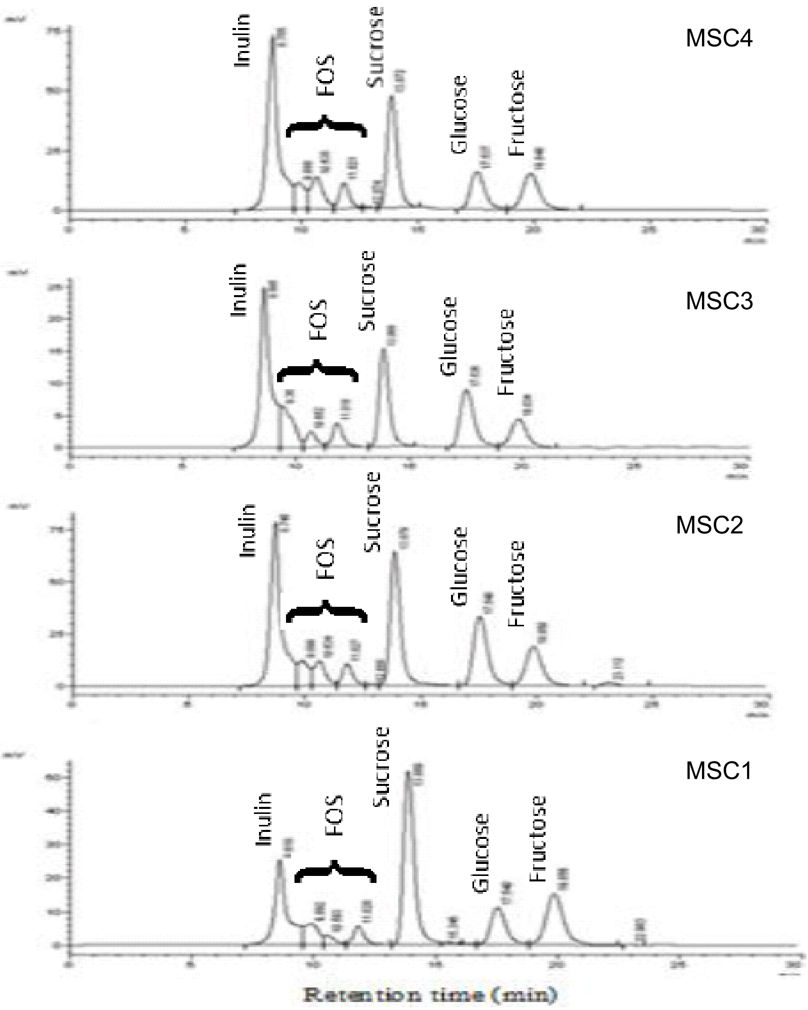
จากการนำเอาสารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำได้จากแผ่นใบและลำต้นของแก่นตะวันบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรต่างๆ ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า แคลลัสมีการสร้างอินนูลิน (inulin) ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide, FOS (nystose, 1- kestose)) ซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และฟรุกโตส

(fructose) ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 แสดงให้เห็นว่า แคลลัสแก่นตะวันที่ชักนำได้สามารถผลิต inulin และ FOS ได้เช่นเดียวกับหัวที่ปลูกในธรรมชาติ (natural grown tuber) ซึ่งการสร้างอินนูลินโดยอาศัยแคลลัสจากแก่นตะวันนี้เคยมีในรายงานการวิจัยของ Taha และคณะ (2007) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงแคลลัสและต้นในหลอดทดลองและติดตามดูกิจกรรมของเอนไซม์อินนูลิเนส (Inulinase) แต่ไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณ inulin และชนิดของ FOS ที่สร้างขึ้นโดยตรง และจากผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ก็ชี้ให้เห็นว่า แคลลัสสามารถสร้างอินนูลอนได้ โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสในพืชหลายชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตสารสำคัญในพืชได้ (ประศาสตร์, 2536)

สำหรับปริมาณ inulin FOS และน้ำตาลชนิดอื่นๆที่พบในสารสกัดแคลลัสนั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นกับสูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงดังแสดงในตารางที่ 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 ในสารสกัดแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร 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 ของแคลลัสแก่นตะวันที่ชักนำบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MSC1 MSC2 MSC3 และ MSC4 ได้ว่า มีความสัมพันธ์แบบแปรตามกัน โดยแคลลัสจากแผ่นใบและลำต้นที่ชักนำบนอาหารสูตร MSC2 และ MSC3 ที่มีการสะสม inulin ในปริมาณมาก จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ FTase ที่สูงตามไปด้วย อย่างไรก็ตาม จะได้มีการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ในระดับ transcription ในลำดับต่อไป เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินในแคลลัสที่ชักนำได้จากแก่นตะวัน

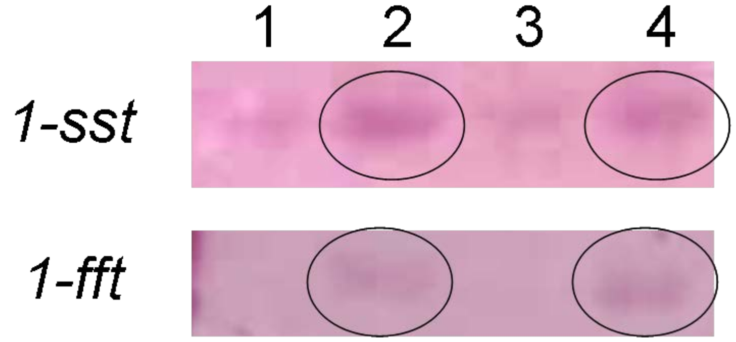
ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสของแคลลัสที่ชักนำจากแผ่นใบและลำต้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่มีการเสริมฮอร์โมนไซโตไคนินชนิด BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับการแปรผัน (vary) ชนิดของฮอร์โมนออกซิน 4 ชนิดคือ NAA (MSC1), IAA (MSC2), IBA (MSC3) และ 2, 4- D (MSC4) 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน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

Explants	Medium	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 โดยการทำ 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) และการแสดงออกของยีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น (Lane 2 และ 4) ซึ่งจะเห็นแถบปรากฏที่เข้มขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของยีน 1-*fft* ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ inulin ที่มีสายโซ่ยาวขึ้นโดยใช้ 1-kestose เป็นสารตั้งต้นนั้นจะมีการแสดงออกเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลานานขึ้น (Lane 2 และ 4) จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า แคลลัสมีความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin กับการสังเคราะห์ inulin ในลักษณะที่แปรตามกัน ซึ่งหากเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นแล้ว งานวิจัยนี้ก็ถือว่าเป็นงานวิจัยแรกที่มีการวัดระดับการแสดงของยีน *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) ก็ได้มีการวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดจากแคลลัสและรากที่ได้จากการชักนำจากลำต้นและแผ่นใบแก่นตะวันบนอาหาร 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 (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 ที่ใกล้เคียงกันคือประมาณ 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 ขวด 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

หากเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลริดิวซ์เริ่มต้นในอาหารแต่ละชุดจะพบว่า อาหารที่มีกลูโคสและฟรุคโตสจะมีปริมาณที่สูงกว่าในอาหารชุดอื่นๆ ประมาณ 5-6 เท่า และอาหารที่มีเสริมสารสกัดจะมีน้ำตาลริดิวซ์สูงกว่าอาหารที่เสริมซูโครส เพราะในสารสกัดมีน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสรวมอยู่ด้วยนอกเหนือไปจากซูโครสและ inulin และ FOS โดยผลการทดลองที่ได้อาจแสดงให้ว่า อาหารที่มีการเสริมสารสกัดต่างๆ นั้นสามารถ

ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bifidobacterium* sp. ได้เทียบเคียงกับอาหาร MRS ปกติ คือมีค่า pH ของอาหารลดลง ในขณะที่ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นรูปแบบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *Bifidobacterium* sp. แม้จะมีปริมาณน้ำตาลริดิวซ์น้อยกว่ามาก จึงอาจกล่าวได้ว่า ส่วนของ inulin และ FOS ที่พบในแคลลัสและรากที่ชักนำได้นั้นมีคุณสมบัติความเป็น prebiotics และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bifidobacterium* sp. ในอาหารที่เสริมสารสกัดชนิดต่างๆ ดังภาพที่ 4.5 จะเห็นว่า อาหารที่เสริมสารสกัดจากรากจะให้ผลที่ดีกว่าแคลลัส และหัวสดโดยสังเกตได้จากการมีปริมาณเซลล์จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มากกว่า ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในรากที่ชักนำได้มีน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสนอกเหนือไปจาก inulin และ FOS ที่สูงกว่าที่พบในแคลลัส และหัวสด ซึ่งสารสกัดอย่างหลังนี้จะมีสัดส่วนของน้ำตาลซูโครสนอกเหนือไปจาก inulin และ FOS ในสัดส่วนที่สูงเซลล์จึงชอบที่จะใช้น้ำตาลริดิวซ์ในการเจริญก่อน

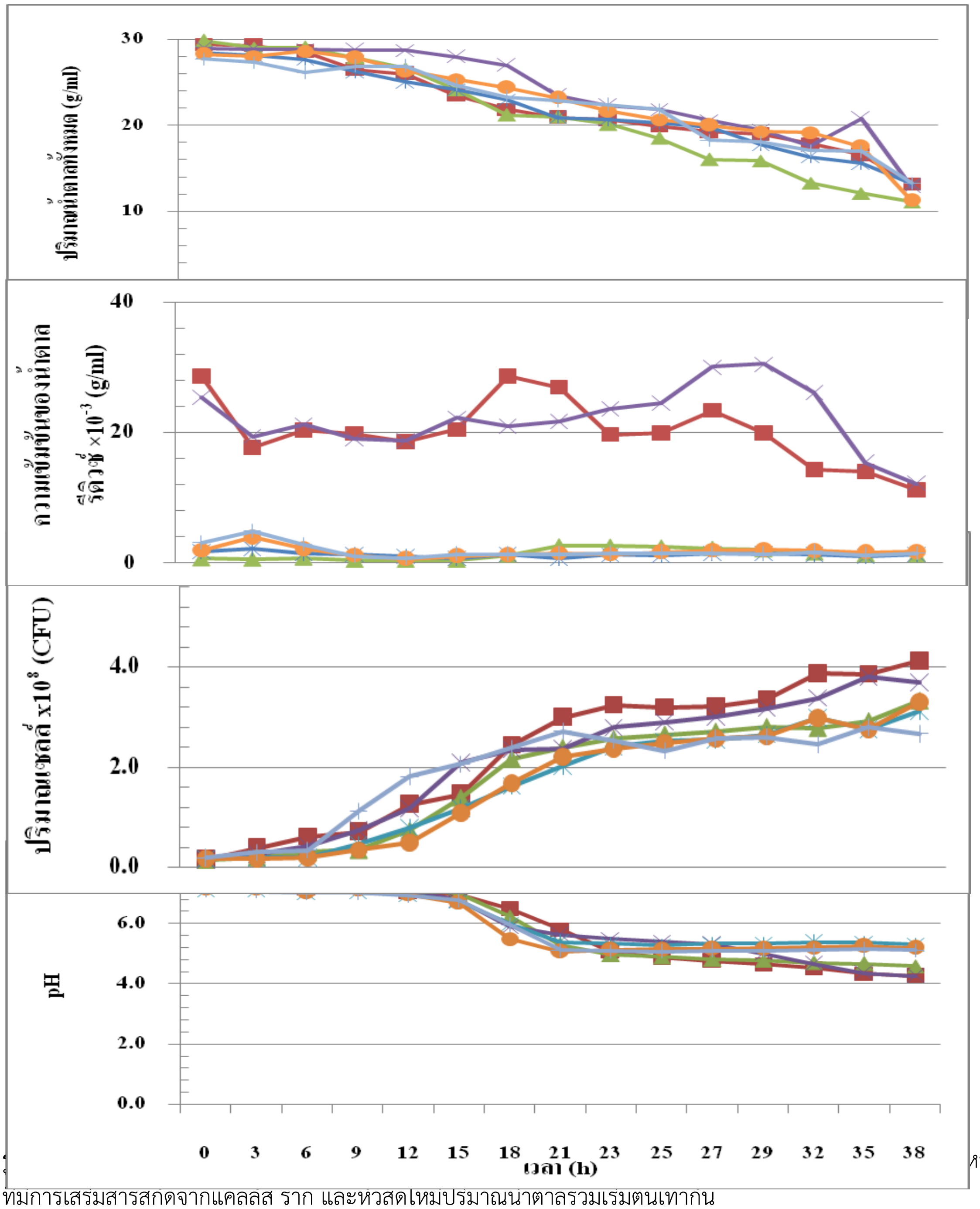
ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบของสารสกัดจากแคลลัสและรากที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง และหัวสดแก่นตะวันจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

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



…าร MRS
ที่มีการเสริมสารสกัดจากแคลลัส ราก และหัวสดให้มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากัน
น้ำตาลกลูโคส (■) น้ำตาลฟรุคโตส (×) น้ำตาลซูโครส (▲) สารสกัดจากหัวสด (*) สารสกัดจากแคลลัสที่ชักนำได้ (●) และสารสกัดจากรากที่ชักนำได้ (+) ที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากัน