



รายงานการวิจัย เรื่อง

ผลของอุณหภูมิ แสงสว่าง และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการสะสมอินูลินใน
หัวขนาดเล็กที่ชักนำในหลอดทดลองของแก่นตะวัน

The Effects of Temperature, Light and Sucrose Concentrations on
the Accumulation of Inulin in *In vitro* Microtuber of Jerusalem artichoke
(*Helianthus tuberosus* L.)

บุษราภรณ์ งามปัญญา
Budsaraporn Ngamapanya

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร และได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทคัดย่อ

ภาษาไทย

ส่วนที่ 1

ชื่อโครงการ ผลของอุณหภูมิ แสงสว่าง และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการสะสมอินูลินในหัวขนาดเล็ก
ที่ชักนำในหลอดทดลองของแก่นตะวัน

ชื่อผู้วิจัย บุษราภรณ์ งามปัญญา (หัวหน้าโครงการ)

คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2558

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2559

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์

สาขาวิชา (อ้างอิงตามวช.) เกษตรศาสตร์และชีววิทยา

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของแสงสว่าง อุณหภูมิในการเก็บรักษา และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการสะสมของอินนูลินในหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง หัวขนาดเล็กสามารถชักนำได้สำเร็จเมื่อตัดลำต้นที่มีข้อของต้นแก่นตะวันปลอดเชื้ออายุประมาณ 1 เดือนมาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดเป็นหัวขนาดเล็ก (MST8%; MS basal salts+ MS vitamins ที่มีกาเรติน benzyladenine(BA) 5.0 mg/L, chlorochlorine chloride (CCC) 500 mg/L, Thiamine HCl 0.4 mg/L, activated charcoal 1%, น้ำตาล 80 g/L, รุน 7.5 g/L, pH 5.6) นาน 45 วัน ช่วงของการให้แสงสว่างที่แตกต่างกัน (การให้แสงแบบวันยาว วันสั้น และไม่ให้แสงสว่าง) มีผลต่อการผลิตอินนูลินของหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ โดยพบความแตกต่างของปริมาณอินนูลินอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) หัวขนาดเล็กที่ชักนำภายใต้การให้แสงสว่างแบบวันยาวมีปริมาณการสะสมอินนูลินสูงสุด และเพื่อรักษาปริมาณอินนูลินที่สะสมในหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลองให้มีปริมาณสูงไม่ควรเก็บรักษาในที่มืดและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 3 ระดับต่อการชักนำหัวขนาดเล็กและการผลิตอินนูลินด้วย โดยพบว่าอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 80 กรัมต่อลิตรเหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กและการผลิตอินนูลินมากกว่าอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 120 และ 60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินในหัวที่ชักนำได้ในหลอดทดลองเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Northern blotting

คำสำคัญ : หัวขนาดเล็กที่ชักนำในหลอดทดลอง, อินนูลิน, แก่นตะวัน, ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรส

ภาษาอังกฤษ

ส่วนที่ 1

Research Title The Effects of Temperature, Light and Sucrose Concentrations on the Accumulation of Inulin in *In vitro* Microtuber of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)

Researcher Budsaraporn Ngampanya (Project Leader)

Faculty of Engineering and Industrial technology Silpakorn University

Research Grants Fiscal Year 2558,

Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of completion 2559

Type of research applied research

Subjects (based NRCT) Agriculture and Biology

ส่วนที่ 2 abstract

This research aimed to study on the effects of light, storage temperature and sucrose concentrations on the accumulation of inulin in *in vitro* microtuber of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). The *in vitro* microtubers were successfully induced from stem with node of one month old sterile plant which culturing on microtuber induction medium (MST8%; MS basal salts+ MS vitamins + 5.0 mg/L benzyladenine (BA), 500 mg/L chlorochlorine chloride (CCC), 0.4 mg/L Thiamine HCl, 1%activated charcoal, 80 g/L sucrose, 7.5 g/L agar, pH 5.6) within 45 days. The different photoperiods (long day, short day and darkness) had an effect to inulin production. The significant difference of inulin content ($p \leq 0.05$) was observed. The highest inulin amount was detected in those of microtubers which induced under long day photoperiod. Decreasing of inulin content was found when microtubers were stored in darkness at 4°C. Three different levels of sucrose on microtuber induction and inulin production were also studied. The microtuber induction medium supplemented with 80 g/L sucrose was more suitable for inducing microtubers and inulin production than those media supplemented with 120 and 60 g/L sucrose, in respectively. However the expression of genes involved in inulin synthesis was not detected in induced microtubers after Northern blotting analysis.

Key words : *In vitro* microtuber, Inulin, Jerusalem artichoke, Fructosyltransferase

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
สารบัญ	4
บทที่ 1 บทนำ	5
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	8
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	13
บทที่ 4 ผลการทดลอง	18
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	27
บทที่ 6 บรรณานุกรม	28
ภาคผนวก	30
ประวัติผู้วิจัย	43
ผลงานตีพิมพ์ของงานวิจัย	51

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสำคัญกับสุขภาพกันมากขึ้นโดยเฉพาะการบริโภคผักและผลไม้ที่มีประโยชน์ ซึ่งแก่เน่ตะวันหรือ Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติอันน่าทึ่งอาหารที่มีรสชาติน้อย ลักษณะคล้ายกับสารให้ความหวานที่ใช้ในปัจจุบัน แต่มีความปลอดภัยสูงเพราะสกัดจากธรรมชาติ ผู้ป่วยโรคเบาหวานจึงสามารถรับประทานได้โดยไม่เพิ่มปริมาณน้ำตาลในเลือดและมีกากใยอาหารสูงทำให้ดีต่อระบบขับถ่ายจึงคาดว่าในอนาคตจะสามารถเป็นพืชเศรษฐกิจได้ (ดาร์ราร์ตน์ และ สาโรจน์, 2554) โดยภายในหัวสะสมอาหารของแก่เน่ตะวันจะมีการสะสมของอินนูลิน (inulin) อยู่ถึงร้อยละ 70- 80 ของปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่มี โดย inulin ประกอบไปด้วยน้ำตาลฟรุคโตส (fructose) ที่ต่อกันเป็นสายเส้นตรงด้วยพันธะ β - (2, 1) D- fructosyl- fructose และที่ด้านปลายสุดของสายโซ่จะต่อด้านน้ำตาลกลูโคส (glucose) ด้วยพันธะ α -D-glucopyranosoyl โดย inulin ส่วนใหญ่มีระดับการเกิดพอลิเมอร์ (degree of polymerization, DP) ระหว่าง 2-60 หน่วยฟรุคโตส นอกจากนี้ inulin ยังจัดเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotics) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* เป็นต้น และสามารถลดจำนวนของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Coliforms* และ *E. coli* ได้ด้วย (อรุณี, 2554) ทำให้ inulin ได้เข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้นซึ่งประเทศไทยไม่สามารถผลิต inulin ในปริมาณตามที่ต้องการได้ แก่เน่ตะวันซึ่งมีปริมาณ inulin อยู่สูงได้ถูกส่งเสริมการปลูกเพื่อตอบสนองความต้องการ แต่ผลผลิตของแก่เน่ตะวันจะแปรผันตามสภาพภูมิอากาศ อุณหภูมิ และปัจจัยอื่นๆ จึงได้มีการหาแนวทางเลือกอื่นที่จะผลิต inulin จากแก่เน่ตะวันที่ได้คุณภาพและปริมาณด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ ต้น และรากของแก่เน่ตะวันในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่า เซลล์และอวัยวะที่ชัก

นำได้จากการเพาะเลี้ยงสามารถผลิต inulin ได้เช่นเดียวกับหัวแก่่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ (natural grown tuber) แต่ให้ปริมาณ inulin ที่ยังน้อยกว่ามาก (วิกานดา, 2554) ต่อมาได้มีการชักนำให้เกิดหัวสะสมอาหารขนาดเล็กในหลอดทดลอง (*In vitro* microtuber) พบว่าสามารถชักนำให้เกิด microtuber ได้ภายใน 30 วันของการเพาะเลี้ยงและพบการงอกเป็นต้นใหม่ของ *in vitro* microtuber เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น และจากการวิเคราะห์การสังเคราะห์ inulin ในสารสกัดจาก *In vitro* microtuber พบว่าสามารถผลิต inulin ได้เช่นเดียวกับ natural grown tuber และจากการเปรียบเทียบสัดส่วนของแต่ละองค์ประกอบที่พบในสารสกัดทั้งจาก natural grown tuber และ *In vitro* microtuber พบว่ามีสัดส่วนของ inulin (DP10- 14) มากที่สุดและการสะสมของ inulin จะลดลงเมื่อเกิดการงอกเป็นต้นใหม่ (ชาย, 2555) และจากรายงานการวิจัยอื่นๆ ชี้ให้เห็นว่า การสะสมของ inulin ในกลุ่มพืชที่มีการสะสมสารจำพวกฟรุกแทน (fructan) เป็นคาร์โบไฮเดรตสำรองนั้นจะเกิดขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียดต่างๆ เช่น หญ้า *Poa pratensis* มีการสะสม fructan และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ fructan ในระดับที่แตกต่างกันเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำ (Rao และคณะ, 2011) ปริมาณและชนิดของ inulin และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของ inulin ใน burdock roots (*Artium lappa* L.) แปรผันไปตามอุณหภูมิเก็บรักษาที่แตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิ 0°C จะรักษาปริมาณของ inulin ไม่ให้ลดลงได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่ 10 และ 15°C (Ishiguro และคณะ, 2010) และการเก็บรักษา *In vitro* microtuber ของ *Helianthus tuberosus* L. ที่ 4°C นาน 2 เดือนทำให้หัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ไม่สูญเสียการพักตัว (dormancy) (Gutierrez และคณะ, 2011) ซึ่งอาจบ่งชี้ว่า ไม่มีการย่อยสลาย inulin ไปใช้ในการงอก โดย inulin ที่สะสมในเซลล์พืชจะทำหน้าที่รักษาสมดุลน้ำภายในเซลล์ภายใต้ภาวะดังกล่าว นอกจากนี้การให้แสงสว่างที่แตกต่างกันและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่สูง ซึ่งรายงานว่ามีผลต่อการชักนำและขนาดของหัวมันฝรั่งที่ชักนำในหลอดทดลอง (Dodranszki และคณะ, 2008) หากนำมาใช้กับแก่่นตะวันที่น่าจะให้ผลไปในแนวทางเดียวกัน ซึ่งการชักนำให้ได้หัวขนาดใหญ่อาจทำให้เกิดการสะสม inulin ในปริมาณมากได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิ การได้รับแสงสว่าง และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการสะสม inulin ในหัวขนาดเล็กของแก่่นตะวันที่ชักนำได้ โดยศึกษาครอบคลุมตั้งแต่ปริมาณ inulin ที่สะสม การแสดงออกของเอนไซม์และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ใน *In vitro* microtuber เพื่อจักได้ทราบถึงความสัมพันธ์ของการสังเคราะห์และสะสม inulin ตั้งแต่ระดับยีนถึงโปรตีน ที่อาจนำไปสู่การกระตุ้นให้เกิดการสะสมของ inulin ให้ได้ในปริมาณที่สูงขึ้นใน *In vitro* microtuber ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาการผลิต inulin โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชในหลอดทดลองต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ แสงสว่าง และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการสะสมอินนูลิน (inulin) ในหัวขนาดเล็กของแก่่นตะวันที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง (*In vitro* microtuber)

ขอบเขตของการวิจัย

- 1 ชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่่นตะวันในหลอดทดลองโดยดัดแปลงจากวิธีการของชาย (2555)
- 2 ศึกษาผลของการให้แสงสว่างแบบวันยาว (16h) วันสั้น (8h) และไม่ให้แสงสว่าง (darkness) ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษา และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (6, 8 และ 12%) ต่อการสะสมอินนูลิน (inulin) ในสารสกัดจาก *In vitro* microtuber
- 3 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ inulin ในสารสกัดจาก *In vitro* microtuber ด้วย HPLC

- 4 วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ใน *In vitro* microtuber คือ *sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-sst)* และ *fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-fft)*

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชในหลอดทดลองสามารถนำมาใช้ในการผลิตสารที่มีมูลค่าจากพืชหลายชนิดได้ การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นการเลียนแบบหัวสะสมอาหารธรรมชาติ (natural grown tuber) ทำให้สามารถผลิต inulin ได้ และการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองยังสามารถควบคุมและปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ ที่อาจมีผลต่อปริมาณและการสะสม inulin ได้ง่ายกว่าในสภาพธรรมชาติ ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและสามารถทำได้ตลอดทั้งปีโดยไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

1) แก่นตะวัน

แก่นตะวัน หรือ Jerusalem artichoke มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. เป็นพืชตระกูลเดียวกับทานตะวันดอกมีสีเหลืองคล้ายดอกบัวตอง แต่มีขนาดเล็กกว่ามีหัวสะสมอาหาร (tuber) รูปร่างอวบคล้ายขิงเปลือกสีน้ำตาลอ่อนและเนื้อมีสีขาวนวลกำเนิดอยู่แถบทวีปอเมริกาเหนือแต่สามารถปลูกและปรับตัวได้ดีในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย (ดาร์รัตน์ และ สาริณ, 2554) หัวแก่นตะวันใช้เป็นอาหารประเภทผัก หัวสดมีรสชาติคล้ายแห้ว นำมาประกอบอาหารคาว หวานได้หลายชนิด หัวเป็นแหล่งสะสมของอินนูลิน (inulin) ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลฟรุกโตส (fructose) ที่ต่อกันเป็นโมเลกุลยาว เมื่อเก็บหัวแก่นตะวันไว้ในห้องเย็นจะทำให้หัวแก่นตะวันมีความหวานมากขึ้น โดย inulin มีคุณสมบัติช่วยลดความเสี่ยงของการเป็นโรคเบาหวาน ลดไขมันในเส้นเลือด ลดความเสี่ยงการเป็นโรคความดันโลหิตสูง โรคหลอดเลือด และโรคหัวใจ เพราะ inulin เป็นสารใยอาหารที่ไม่ถูกย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก จึงอยู่ในระบบทางเดินอาหารเป็นเวลานาน ทำให้ไม่รู้สึกหิว กินอาหารได้น้อยลงจึงช่วยให้ลดความอ้วนได้ และลดความเสี่ยงการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ จึงนับว่าเป็นพืชอาหารเพื่อสุขภาพ นอกจากนี้การใช้หัวเสริมในอาหารสัตว์ ยังทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารลดลงและสามารถสร้างภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ได้ ทำให้ลดการใช้สารปฏิชีวนะ ในขณะที่มูลของสัตว์ก็มีกลิ่นเหม็นน้อยลงด้วย หัวแก่นตะวันยังถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วย โดยหัวสด 1 ตันสามารถผลิตเอทานอลที่บริสุทธิ์ 99.5 % ได้ 100 ลิตรนำไปผสมเบนซินเพื่อผลิตแก๊สโซฮอล์ จึงจัดเป็นพืชพลังงานทดแทนด้วย

2) อินนูลิน

ฟรุกแทน (fructans) เป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ของคาร์โบไฮเดรต fructan ในทางเคมีเป็นพอลิเมอร์ของ fructose สามารถพบได้ในพืช สาหร่าย และแบคทีเรีย โดย fructan ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำรองในหลายวงศ์ของอาณาจักรพืช โดย fructan ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอาจจะมีหน่วย fructose ต่อกันได้มากกว่า 1,000 หน่วย ส่วนในแบคทีเรียนั้นโมเลกุลของ fructan จะประกอบไปด้วยหน่วย fructose มากกว่า 100,000 หน่วย โดยในธรรมชาติ fructan จะมีหลายกลุ่ม ดังนี้

Fructan ประเภท inulin ที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง โดย fructose จะต่อกันด้วยพันธะ β -(2-1) โดย fructan เกือบทั้งหมดที่พบในพืชเป็น fructan ประเภท inulin

Fructan ประเภทลิแวน (levan) มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงเช่นเดียวกับ inulin ต่างกันที่ fructose จะต่อกันด้วยพันธะ β -(2-6) โดย fructan ประเภทนี้พบส่วนใหญ่ในแบคทีเรียและพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

Fructan ประเภท graminan มีโครงสร้างเป็นแบบกิ่ง โดยมี fructose ต่อกันด้วยพันธะ β -(2-1) และ β -(2-6) ซึ่งจะพบในพืชตระกูลหญ้า

Fructan ประเภท neo-series inulin เป็น fructan ที่มีสายโซ่ตรงของ fructose ที่ต่อกันด้วยพันธะ β -(2-1) 2 สาย โดยสายหนึ่งจะต่อกับหมู่ fructose ของน้ำตาลซูโครส (sucrose) และอีกสายหนึ่งจะต่อกับหมู่กลูโคส (glucose)

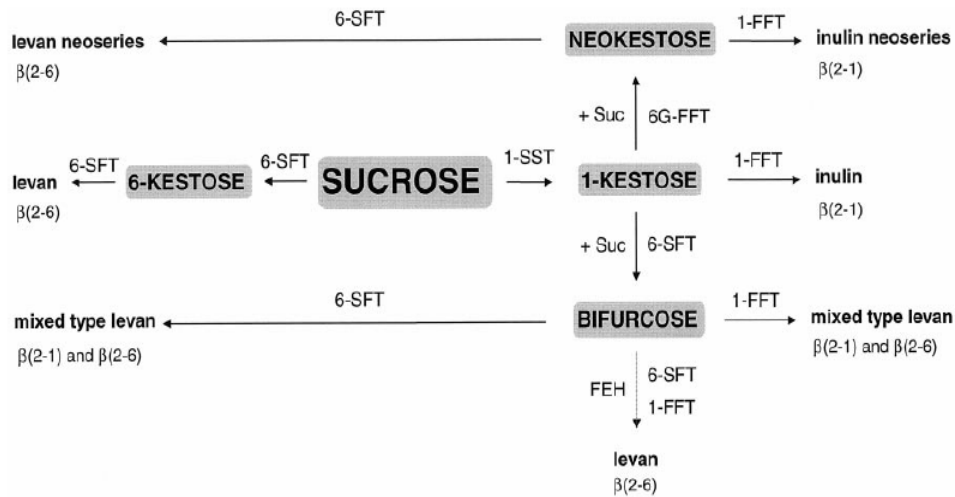
Inulin เป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งในกลุ่ม fructan ประกอบด้วย fructose ที่เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวจำนวน 2 ถึง 60 หน่วย (DP 2-60) บางโครงสร้างอาจมี glucose เชื่อมต่อที่ปลายสายด้วย ส่วนโอลิโกฟรุกโตส (oligofructose) จะมีลักษณะเดียวกัน แต่เชื่อมต่อกันด้วยน้ำตาล 2 ถึง 10 หน่วย (DP 2-10)

ในขณะที่ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharide, FOS) ประกอบด้วย fructose ที่เชื่อมต่อกันเพียง 2- 4 หน่วย ได้แก่ 1- kestose (1- kestotriose; GF2), nystose (1, 1- kestotetraose; GF3) และ 1F-β- fructofuranosylnystose (1, 1, 1- kestopentaose; GF4) โดย G หมายถึง glucose และ F หมายถึง fructose ซึ่งโดยทั่วไป FOS อาจมีความหมายเดียวกับ oligofructose และสามารถสร้างได้จาก sucrose (Ueno และคณะ, 2011)

Kaur และ Gupta (2002) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้ inulin และ oligofructose ในเชิงอาหารและสุขภาพ โดย inulin และ oligofructose ได้ถูกพิจารณาในการใช้เป็นวัตถุดิบอาหาร เนื่องจาก inulin และ oligofructose มีผลกระทบกับกระบวนการทางกายภาพและชีวเคมีของหนูและคนคือ ทำให้มีสุขภาพที่ดีขึ้นและลดความเสี่ยงการเกิดโรคต่างๆ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า มีการลดลงของแบคทีเรียที่ก่อโรคลำไส้ บรรเทาอาการท้องผูก ลดความเสี่ยงในการก่อโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการเพิ่มปริมาณการดูดซึมเกลือแร่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งลดความเสี่ยงในการก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัวโดยการลดระดับการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และไขมันในตับและน้ำเหลือง

การสังเคราะห์และย่อย fructan ในพืชจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยเชื่อกันว่า fructan ถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก sucrose ในแวคิวโอล (vacuole) โดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ fructosyltransferase (FTase) 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 และ John, 1989) ซึ่งการสังเคราะห์ fructan ใน Jerusalem artichoke ตามโมเดลของ Edelman และ Jefford (1968) นั้นแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ เริ่มจาก 1- SST กระตุ้นให้มีการย้าย fructosyl unit จาก sucrose donor molecule ไปต่อกับ 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* ที่มีการเติม sucrose ลงไป พบว่าสามารถสังเคราะห์ 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 และจากรูปแบบการแสดงออกบ่งชี้ว่า ยีนทั้งสองแสดงออกมากในหัวสะสมอาหารในระยะที่กำลังพัฒนาและมีการแสดงออกต่ำในส่วนของดอกและลำต้น และไม่พบการแสดงออกของยีนในส่วนใบ ราก และหัวสะสมอาหารที่พัฒนาเต็มที่ ซึ่งการแสดงออกของยีนสอดคล้องกับการสังเคราะห์ fructan โดย fructan ในพืชแต่ละชนิดจะมีความหลากหลายและแตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยค่า DP ของ plant fructan อยู่ในช่วงตั้งแต่ 10- 250 fructosyl units ซึ่งความแตกต่างในความยาวของ fructan ไม่เพียงแต่เป็นผลเนื่องมาจากความแปรผันทางอนุกรมวิธานของพืชเท่านั้นแต่ยังรวมไปถึงอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อมที่พืชได้รับด้วย โดยพืชจะมีการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยการปรับเปลี่ยนความยาวเฉลี่ยของ fructan ที่มันมี โดยพบว่าพืชมีการสะสม fructan มากขึ้นเพื่อปรับค่าออสโมติกเมื่ออยู่ในภาวะแห้งแล้ง (drought) และหนาวเย็น

(cold) (Pontis และ del Campillo, 1985) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นอีกบทบาทหนึ่งของ fructan ในพืช นอกเหนือไปจากการทำหน้าที่เป็นคาร์โบไฮเดรตสะสม สำหรับข้อแตกต่างของ fructan จากแป้ง (starch) ก็คือ มันเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้ดีจึงช่วยในการรักษาค่า osmotic potential ใน vacuole ของพืช



ภาพที่ 2.1 รูปแบบการสังเคราะห์ฟรุคแทนในพืช (Vijn และ Smeekens, 1999)

3) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชรวมทั้งปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง

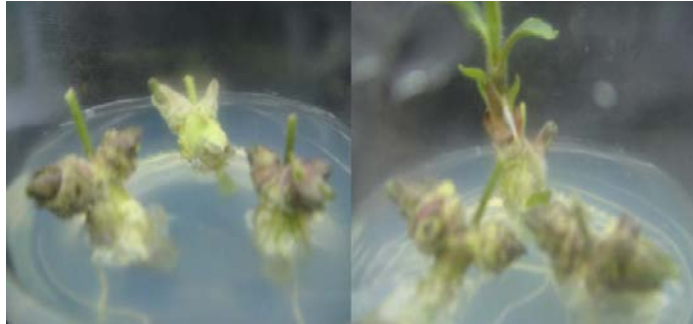
สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแก่ต้นวันเพื่อผลิต inulin นั้นยังมีไม่มากนัก ปรากฏให้เห็นเพียงงานวิจัยของ Taha และคณะ (2007) ที่ได้ทำการศึกษาศักยภาพการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณ inulin ใน Jerusalem artichoke ในสภาวะ *in vitro* โดยการนำส่วนของใบและส่วนของข้อลำต้น (nodal stem) จากต้นแก่ต้นวันมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและกระตุ้นให้แคลลัสที่ชักนำได้ให้พัฒนาไปเป็นยอด ขณะเดียวกันก็ได้หา กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ inulinase ในแคลลัสและยอดที่ชักนำได้ด้วย โดยพบว่าการเสริมสูตรอาหาร MS ด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BAP ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะให้ผลในการผลิตแคลลัสจากใบและข้อลำต้นได้ดีที่สุด ส่วนการเสริมสูตรอาหาร MS ด้วย NAA และ BAP ปริมาณ 0.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้แคลลัสที่ชักนำจากใบและข้อลำต้นเจริญพัฒนาไปเป็นยอดได้สูงที่สุด นอกจากนี้ยังตรวจพบค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ inulinase ในแคลลัสและยอดที่ชักนำได้ ซึ่งนำมาบ่งชี้ถึงความสามารถในการผลิต inulin ของแคลลัสและยอดที่ชักนำได้โดยอ้อม และในปี 2012 Taha และคณะได้ชักนำให้เกิดการสะสม inulin ในเซลล์แขวนลอยของ Jerusalem artichoke ได้สำเร็จโดยใช้ *Aspergillus niger* extracts และ methyl- jasmonate (Taha และคณะ, 2012)

วิกานดา (2554) ได้ศึกษาการผลิต inulin จากแก่ต้นวันโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงแคลลัส ต้น ราก และเซลล์แขวนลอย พบว่าแคลลัสที่ชักนำจากส่วนของลำต้นบนอาหาร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด BA ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรให้ปริมาณ inulin สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารอื่นและยังมีปริมาณ inulin ที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในรูปแบบอื่นๆ และเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของ HPLC ของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในรูปแบบต่างๆ กับสารสกัดจากหัวที่ปลูกในธรรมชาติพบว่า แคลลัส ต้น ราก และเซลล์แขวนลอยที่ชักนำได้สามารถผลิต inulin ได้เช่นเดียวกันกับหัวที่ปลูกในธรรมชาติ นอกจากนี้สารสกัดที่ได้จากแคลลัสและรากที่ชักนำได้ยังได้แสดงคุณสมบัติความเป็นฟรีโอบีโอติกโดยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกด้วย

4) งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สำหรับการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กในหลอดทดลอง (*In vitro* microtuber) มีรายงานในปี 1999 โดย Gamburg และคณะได้ศึกษาการชักนำให้เกิด microtuber จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญพิเศษ (axillary meristems) ในกิ่งก้าน (lateral shoots) ของ Jerusalem artichoke เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อพันธุ์กรรม พบว่า การใช้อาหาร 1/2MS ที่เติม BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและ sucrose 8% ภายใต้สภาวะมืด อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสสามารถชักนำให้เกิด microtuber ในปริมาณ 30% น้ำหนักแห้ง (Gamburg และคณะ, 1999) ต่อมา Gutierrez และคณะได้ชักนำให้เกิด microtuber ของ Jerusalem artichoke สายพันธุ์ต่างๆ บนอาหารเพาะเลี้ยง MS ที่มีการเติม BAP ในระดับที่ต่างกันและเปรียบเทียบการเติมน้ำตาลซูโครสที่ 6 และ 8% และเพาะเลี้ยงในที่มืด (darkness) อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสพบว่า สามารถชักนำให้เกิด microtuber ได้ภายใน 45- 70 วันขึ้นกับสายพันธุ์ที่ใช้ในการชักนำ โดย BAP ที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีบทบาทต่อการพัฒนาเป็น microtuber แต่ไม่ใช่ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิด microtuber นอกจากนี้ยังพบว่า การเก็บรักษา microtuber ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 2 เดือนทำให้หัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ไม่สูญเสียการพักตัว (dormancy) (Gutierrez และคณะ, 2011) ต่อมาได้มีการศึกษาแนวทางการผลิต inulin ใน microtuber ที่ชักนำโดยการนำข้อลำต้นที่มีตาข้าง (nodal stem) ของแก่ต้นวันปลอดเชื้ออายุ 1 เดือนมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติม thiamine HCl 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร CCC 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และ sucrose 8% ซึ่งตัดแปลงมาจากสูตรอาหารที่ใช้ชักนำ *in vitro* tuber ของมันฝรั่ง (Estrada et al, 1986) พบว่า สามารถชักนำให้ขึ้นพืชเกิด microtuber ได้ โดยบริเวณตาข้างมีการบวมขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง แต่ยังไม่มีการงอกออกมา ในสัปดาห์ที่ 2 เริ่มมีปุ่มขนาดเล็กแตกออกมาจากตาข้าง จากนั้นจะขยายขนาดเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ถัดมา และพัฒนาเป็นหัวขนาดเล็กภายในระยะเวลา 30 วันดังภาพที่ 2 และรูปแบบของการผลิตสารใน microtuber คล้ายกับที่ตรวจพบในสารสกัดจากหัวสดแก่ต้นวัน ซึ่งบ่งบอกได้ว่า microtuber ที่ชักนำได้จากการเพาะเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ที่มีการเติม BA ร่วมกับสาร CCC นั้นสามารถผลิต inulin และ FOS ชนิดต่างๆ ได้เช่นเดียวกับหัวของแก่ต้นวันที่ปลูกในแปลง ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่า การชักนำให้เกิด microtuber ที่จัดเป็นการเพาะเลี้ยงในระดับอวัยวะที่เลียนแบบหัวสะสมอาหารในธรรมชาติ นั้น น่าจะเป็นแหล่งที่ดีในการผลิต inulin และ FOS โดยการสะสมของ inulin จะลดลงเมื่อเกิดการงอกเป็นต้นใหม่ (ชาย, 2555) ซึ่งอาจบ่งชี้ว่า มีการย่อยสลาย inulin ไปใช้ในการงอก ดังนั้น การทำให้เกิดการสังเคราะห์และสะสม inulin ปริมาณมากในเซลล์พืชต้องอาศัยปัจจัยที่มีผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์ โดยพืชจะมีการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยการปรับเปลี่ยนความยาวเฉลี่ยของ fructan ที่มันมี โดยพบว่าพืชมีการสะสม fructan มากขึ้นเพื่อปรับค่าออสโมติกเมื่ออยู่ในภาวะแห้งแล้ง (drought) และหนาวเย็น (cold) (Pontis และ del Campillo, 1985) เช่น หญ้า *Poa pratensis* มีการสะสม fructan และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ fructan ในระดับที่แตกต่างกันเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำ (Rao และคณะ, 2011) ปริมาณและชนิดของ inulin และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของ inulin ใน burdock roots (*Artium lappa* L.) แปรผันไปตามอุณหภูมิเก็บรักษาที่แตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสจะรักษาปริมาณของ inulin ไม่ให้ลดลงได้ดีกว่าการเก็บรักษาที่ 10 และ 15 องศาเซลเซียส (Ishiguro และคณะ, 2010) เป็นต้น นอกจากนี้การให้แสงสว่างที่แตกต่างกันและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่สูง ซึ่งรายงานว่า มีผลต่อการชักนำและขนาดของหัวมันฝรั่งที่ชักนำในหลอดทดลอง (Dodranszki และคณะ, 2008) หากนำมาใช้กับแก่ต้นวันก็น่าจะให้ผลไปในแนวทางเดียวกัน ซึ่งการชักนำให้ได้หัวขนาดใหญ่อาจทำให้เกิดการสะสม inulin ในปริมาณมากได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึง

สนใจที่จะศึกษาปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิ การได้รับแสงสว่าง และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการสะสม inulin ในหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันที่ชักนำได้ โดยศึกษาครอบคลุมตั้งแต่ปริมาณ inulin ที่สะสมและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ inulin ใน *In vitro* microtuber เพื่อจักได้ทราบถึงความสัมพันธ์ของการสังเคราะห์และสะสม inulin ตั้งแต่ระดับยีนถึงโปรตีน ที่อาจนำไปสู่การกระตุ้นให้เกิดการสะสมของ inulin ให้ได้ในปริมาณที่สูงขึ้นใน *In vitro* microtuber ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาการผลิต inulin โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชในหลอดทดลองต่อไป



ภาพที่ 2.2 *In vitro* microtuber ของแก่นตะวันที่ชักนำเป็นเวลา 30 วัน (ชาย, 2555)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กในหลอดทดลอง

นำต้นแก่นตะวันพันธุ์เบอร์ 2 ปลอດซื้ออายุประมาณ 1 เดือนที่เลี้ยงบนอาหาร MS (1962) มาตัดบริเวณข้อโดยให้เหลือบริเวณส่วนบนข้อประมาณ 0.5 เซนติเมตรและบริเวณด้านล่างข้อประมาณ 1.5 เซนติเมตรจากนั้นนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารชักนำให้เกิดเป็นหัวขนาดเล็ก (MST8%; MS basal salts+ MS vitamins ที่มีการเติม benzyladenine(BA) 5.0 mg/L, chlorochlorine chloride (CCC) 500 mg/L, Thiamine HCl 0.4 mg/L, activated charcoal 1%, น้ำตาล 80 g/L, รุน 7.5 g/L, pH 5.6) (ดัดแปลงจากวิธีการของชาย, 2555) โดยใส่ชิ้นพืชลงไป 2 ชิ้นต่อขวด จำนวนอย่างน้อย 5 ขวด และทำการเพาะเลี้ยงนาน 45 วัน โดยควบคุมสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้มีอุณหภูมิเท่ากับ 25 ± 2 องศาเซลเซียสและมีการให้แสงสว่างแบบวันยาว (long day) จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกการเปลี่ยนแปลงของชิ้นพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงทุกสัปดาห์ เมื่อเลี้ยงครบ 45 วัน ทำการเก็บตัวอย่างหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง (*In vitro* microtuber) ไปวิเคราะห์การผลิตอินนูลิน (inulin) และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ได้แก่ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides (FOS)) 2 ชนิดคือ นีสโตส (nystose) และ 1-คีสโตส (1-kestose) น้ำตาลซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose)

3.2 การศึกษาผลของแสงสว่างต่อการสะสมอินนูลิน ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ใน *In vitro* microtuber

ชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันโดยใช้อาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยงเหมือนกับการทดลองในข้อ 3.1 แต่มีการเปรียบเทียบการให้แสงสว่างแบบวันยาว (long day) จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน การให้แสงสว่างแบบวันสั้น (short day) จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 8 ชั่วโมงต่อวัน และการชักนำในที่มีมืด (darkness) เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 45 วัน ทำการเก็บตัวอย่างหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง (*In vitro* microtuber) ไปวิเคราะห์การผลิตอินนูลิน (inulin) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์

(fructooligosaccharides (FOS)) 2 ชนิดคือ นีสโตส (nystose) และ 1-คีสโตส (1-kestose) น้ำตาลซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และฟรุกโตส (fructose)

3.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลองจากการให้แสงสว่างแบบต่างๆ ต่อการสะสมอินนูลิน

เนื่องจากที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสไม่สามารถชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในหลอดทดลองได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลองจากการให้แสงสว่างแบบต่างๆ ต่อการสะสมอินนูลินแทน ซึ่งทำโดยนำ *In vitro* tuber อายุ 45 วันที่ชักนำได้ภายใต้การให้แสงสว่างแบบวันยาว วันสั้น และในที่มืดไปเก็บรักษาต่อบนอาหารสูตร MST8% ที่อุณหภูมิและการให้แสงสว่างแบบเดิมต่ออีก 15 วันและนำอีกส่วนหนึ่งจากทุกรูปแบบของการให้แสงสว่างไปเก็บรักษาต่อในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสต่ออีก 15 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างหัวขนาดเล็กไปวิเคราะห์การผลิตอินนูลิน (inulin) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides (FOS)) 2 ชนิดคือ นีสโตส (nystose) และ 1-คีสโตส (1-kestose) น้ำตาลซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และฟรุกโตส (fructose)

3.4 การศึกษาผลของการเติมน้ำตาลซูโครสต่อการสะสมอินนูลินของ *In vitro* tuber หัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง

ชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันโดยใช้สภาวะเหมือนกับการทดลองในข้อ 3.1 แต่มีการเปรียบเทียบการเติมน้ำตาลซูโครสลงในอาหารสำหรับชักนำหัวแตกต่างกัน 3 ระดับคือ 6 8 และ 12 g/L และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและให้แสงสว่างแบบวันยาว เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 45 วัน ทำการเก็บตัวอย่างหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง (*In vitro* microtuber) ไปวิเคราะห์การผลิตอินนูลิน (inulin) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides (FOS)) 2 ชนิดคือ นีสโตส (nystose) และ 1-คีสโตส (1-kestose) น้ำตาลซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และฟรุกโตส (fructose)

3.5 การวิเคราะห์การผลิตอินนูลินและน้ำตาลชนิดอื่นๆ ของ *In vitro* microtuber

นำ *In vitro* microtuber มาสกัดด้วยน้ำในอัตราส่วน 1: 2 (*In vitro* microtuber: น้ำ) ใช้เวลาในการสกัด 10 นาที และทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้นำมารวมกันและไปปั่นตกตะกอน จะได้สารสกัดตัวอย่าง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่างๆ ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งทำโดยนำสารสกัดมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปกรองด้วย nylon syringe filter ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ Rezex RNM carbohydrate Column ขนาด 7.8x 300 มิลลิเมตร (Phenomenex) ชะด้วย deionized distill water ที่อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกคือ 45 องศาเซลเซียส และตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วย Refractive index (RI) detector

3.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินใน *In vitro* microtuber

3.6.1 การสกัด RNAรวม (Total RNA)

นำตัวอย่างที่เก็บไว้มาสกัด 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 จะได้ส่วนบนที่เป็นสารละลาย 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

3.6.2 แยกอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณตัวอย่างละ 15 ไมโครกรัมบน formaldehyde gel

3.6.3 การถ่ายอาร์เอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบไปบนแผ่นไนลอน

นำแผ่นเจลที่ได้ล้างด้วยน้ำ Milli Q ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง แล้วนำแผ่นเจลวางบนแผ่นกรองที่ชุ่มด้วย 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 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 ชั่วโมงนำไป hybridize กับ probe ที่เตรียมไว้ หรือ เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ hybridize

3.6.4 การสกัดพลาสมิด p-GemT ที่สอดแทรกด้วยยีน *1-ssr* 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 ผสมโดยการกลับลดทอดตลอด 5 ครั้ง (ห้ามเขย่า) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- เติม Precipitation Buffer (N4) 350 ไมโครลิตร ผสมทันทีด้วยการกลับลดทอดตลอดจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- 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

3.6.5 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

3.6.6 การ Hybridization

- การทำ prehybridization โดยนำแผ่นไนลอน เมมเบรนที่มี RNA ที่ต้องการตรวจสอบใส่ลงในถุงพลาสติก 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 แล้วล้างซ้ำอีกครั้งด้วย 0.5X SSC , 0.1% SDS 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที บ่มใน Hybridization oven ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้ง

- นำแผ่นไนลอนที่ผ่านการล้างเดิม washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) ให้ท่วมแผ่นไนลอนเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง

- เติม Blocking solution (เจือจาง 10X Blocking solution ในอัตราส่วน 1:10 ด้วย Maleic acid buffer) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า 30 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติมสารละลาย Antibody solution (หมูนเหวียง Anti-Digoxigenin-AP 5 นาที ที่ 10,000 รอบต่อนาที ดูดเอาสารละลายที่ผิว จากนั้นเจือจาง Anti-Digoxigenin-AP 1:5000 (150 mU/ml) ด้วย Blocking solution) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย้านาน 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°C)) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า 2-5 นาที เทสารละลายทิ้ง

- จากนั้นนำแผ่นไนลอนใส่ในถุงพลาสติก แล้วเติม color substrate solution (เติม NBT/BCIP stock solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปใน Detection buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการปิดผนึกถุง แล้วนำไปป้อนในที่มืดโดยไม่มีการเขย่าจนกระทั่งเห็นแถบอาร์เอ็นเอ จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 50 มิลลิลิตรของ น้ำ milli Q หรือ TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) ทำการบันทึกภาพ

3.7 การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในแต่ละ treatment ของการทดลองทำอย่างน้อย 5 ขวดและใช้ซ้ำซ้ำ 2 ซ้ำต่อขวด ทำการทดลองซ้ำ 2 ชุดการทดลอง และวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณการสะสม inulin เกลี่ยใน *In vitro* tuber ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ ONE WAY ANOVA

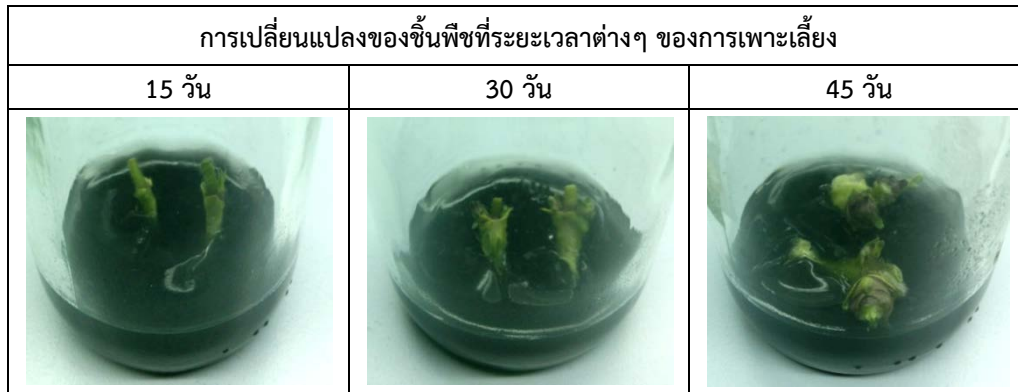
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กในหลอดทดลอง

นำต้นแก่นตะวันพันธุ์เบอร์ 2 ปลอดเชื้ออายุประมาณ 1 เดือนที่เลี้ยงบนอาหาร MS (1962) มาตัดบริเวณข้อโดยให้เหลือบริเวณส่วนบนข้อประมาณ 0.5 เซนติเมตรและบริเวณด้านล่างข้อประมาณ 1.5 เซนติเมตรจากนั้นนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารชักนำให้เกิดเป็นหัวขนาดเล็ก (MST8%; MS basal salts+ MS vitamins ที่มีการเติม benzyladenine(BA) 5.0 mg/L, chlorochlorine chloride (CCC) 500 mg/L, Thiamine HCl 0.4 mg/L, activated charcoal 1%, น้ำตาล 80 g/L, รุน 7.5 g/L, pH 5.6) (ดัดแปลงจากวิธีการของชาย, 2555) โดยใช้ซ้ำซ้ำลงไป 2 ซ้ำต่อขวด จำนวนอย่างน้อย 5 ขวด และทำการ

เพาะเลี้ยงนาน 45 วัน โดยควบคุมสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้มีอุณหภูมิเท่ากับ 25 ± 2 องศาเซลเซียสและมีการให้แสงสว่างแบบวันยาว (long day) จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงไป 4–5 วัน ขึ้นพืชบริเวณลำต้นและข้อเริ่มมีขนาดใหญ่และบวมขึ้นและเริ่มเกิดหัวขนาดเล็ก (*In vitro* microtuber) เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน โดยหัวที่ชักนำได้จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น ซึ่งหัวที่ชักนำได้จะมีสีเขียวอมม่วงดังภาพที่ 4.1 และ 4.2



ภาพที่ 4.1 การชักนำหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในหลอดทดลอง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MST8% ที่ระยะเวลาต่างๆ



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของหัวแก่นตะวันขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MST8% นาน 45 วัน

เมื่อเก็บตัวอย่าง *In vitro* microtuber อายุ 45 วันไปวิเคราะห์การผลิตน้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วย HPLC และเปรียบเทียบเวลาที่สารผสมในสารสกัดถูกชะออกจากคอลัมน์กับสารมาตรฐานที่ใช้สามารถบอกได้ว่า สารสกัดประกอบด้วยอินนูลิน (inulin) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides (FOS)) คือ 1-คีสโตส (1-kestose) น้ำตาลซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยจะพบว่ามีสัดส่วนของอินนูลินสูงสุด รองลงมาคือน้ำตาลซูโครส ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิด 1-คีสโตส กลูโคส และฟรุคโตส ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ปริมาณอินนูลิน 1-คีสโตส น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสในหัวแก่นตะวันขนาดเล็กอายุ 45 วันที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง

สารสกัดจากหัว ขนาดเล็ก	ชนิดของน้ำตาลในสารสกัด (mg/g fresh weight)				
	อินนูลิน	1-คีสโตส	ซูโครส	กลูโคส	ฟรุคโตส
ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	34.18 $\pm$ 1.69	5.39 $\pm$ 1.66	8.29 $\pm$ 3.91	3.68 $\pm$ 1.97	3.61 $\pm$ 0.31

4.2 ผลของการให้แสงสว่างต่อการสะสมอินนูลินของหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตอินนูลิน ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 2 ชนิดคือ นีสโตส (nystose) และ 1-คีสโตส น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสของหัวขนาดเล็กอายุ 45 วันที่ชักนำได้ภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงสว่างแบบวันยาว (long day, LD) แบบวันสั้น (short day, SD) และในที่มืด (darkness, D) พบว่ามีสัดส่วนของอินนูลินสูงสุดในทั้งสามสภาวะของการให้แสงสว่าง แต่ในสภาวะที่มีการให้แสงสว่างแบบ LD จะมี

ปริมาณอินนูลินสูงกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงแบบ SD และ D อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ปริมาณของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (นิสโตสและ 1-คิสโตส) ที่วิเคราะห์ได้ในหัวขนาดเล็กที่ชักนำในภายใต้การให้แสงแบบ SD และ D จะมีค่าสูงกว่าหัวขนาดเล็กที่ชักนำภายใต้การให้แสงสว่างแบบ LD อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จากผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปได้ว่า การชักนำให้เกิดหัวแก่้นตะวันในหลอดทดลองภายใต้การให้แสงสว่างแบบ LD ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสจะให้ปริมาณการผลิตอินนูลินสูงสุด เพราะการให้แสงสว่างแบบวันยาวจะทำให้พืชมีอัตราการสังเคราะห์แสงเพิ่มขึ้นจึงมีการสร้างน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์แรกมากขึ้นด้วย น้ำตาลกลูโคสจะถูกลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ เพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์พืชและส่วนที่เหลือจะถูกลำเลียงไปเก็บไว้ในส่วนสะสมอาหารของพืชเพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำรอง โดยการลำเลียงไปในระยะทางไกลๆ ผ่านโพลีเอมมิกจะลำเลียงไปในรูปของน้ำตาลซูโครสโดยอาศัยแรงคาพิลลารีหรือโปรตีนที่ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายน้ำตาล (sugar transporter) (Williams และคณะ, 2000) น้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์อินนูลินจะมีมากขึ้นจึงอาจทำให้หัวขนาดเล็กที่ชักนำภายใต้การให้แสงสว่างแบบ LD มีการผลิตอินนูลินได้สูงขึ้นด้วย

ตารางที่ 4.2 ปริมาณอินนูลิน ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (นิสโตสและ 1-คิสโตส) ซูโครส กลูโคส และฟรุกโตสในหัวขนาดเล็กอายุ 45 วัน ที่ชักนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาว วันสั้น และในที่มืด

ชนิดและปริมาณของน้ำตาลในสารสกัด (mg/g fresh weight)*	รูปแบบของการให้แสงสว่าง		
	วันยาว	วันสั้น	ที่มืด
อินนูลิน	$34.18 \pm 1.69a$	$18.00 \pm 2.00b$	$22.00 \pm 2.54b$
นิสโตส	-	$6.28 \pm 1.04a$	$5.10 \pm 1.32a$
1-คิสโตส	$5.39 \pm 1.66b$	$8.71 \pm 2.12ab$	$10.29 \pm 4.94a$
ซูโครส	$8.29 \pm 3.91b$	$36.34 \pm 6.47a$	$13.99 \pm 0.72b$
กลูโคส	$3.68 \pm 1.97b$	$7.93 \pm 0.35a$	$7.67 \pm 1.86a$
ฟรุกโตส	$3.61 \pm 0.31b$	$10.08 \pm 2.52a$	$4.68 \pm 2.05b$

*ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของ 3 การวิเคราะห์ในชุดการทดลอง ($n=3$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$

4.3 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลองจากการให้แสงสว่างแบบต่างๆ ต่อการสะสมอินนูลิน

เนื่องจากที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสไม่สามารถชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่้นตะวันในหลอดทดลองได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลองจากการให้แสงสว่างแบบต่างๆ ต่อการสะสมอินนูลินแทน ซึ่งจากการนำ *in vitro* tuber อายุ 45 วัน ที่ชักนำได้ภายใต้การให้แสงสว่างแบบต่างๆ ไปเก็บรักษาต่อบนอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดิม (MST8%) ที่อุณหภูมิและการให้แสงสว่างแบบเดิมต่ออีก 15 วันและนำอีกส่วนหนึ่งจากทุกแบบของการให้แสงสว่างไปเก็บรักษาต่อในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสต่ออีก 15 วัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของอินนูลินในหัวที่ชักนำได้ โดย *in vitro* tuber อายุ 45 วัน ที่ชักนำได้ภายใต้การให้แสงสว่างแบบวันยาว (LD) กับในที่มืด (D) เมื่อเพาะเลี้ยงต่อในสภาวะเดิมอีก 15 วันมีปริมาณอินนูลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ปริมาณอินนูลินใน *in vitro* tuber อายุ 45 วัน ที่ชักนำได้ภายใต้การให้แสงสว่างแบบวันสั้น (SD) เมื่อเพาะเลี้ยงต่อในสภาวะเดิมอีก 15 วันจะมีปริมาณอินนูลินไม่แตกต่างไปจากเดิม และเมื่อนำเอา *in vitro* tuber อายุ 45 วัน ที่ชักนำได้ภายใต้

การให้แสงสว่างทั้งสามแบบไปเก็บรักษาต่อในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสต่ออีก 15 วันกลับพบว่าปริมาณอินนูลินในหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ภายใต้การให้แสงสว่างแบบวันยาวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และมีปริมาณนิสโตสและน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลไดแซคคาไรด์ ตามลำดับ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังผลการทดลองที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 มีรายงานวิจัยในพืชชนิดอื่นอย่างเช่น burdock roots (*Arctium lappa* L.) ที่แสดงผลในลักษณะเช่นนี้กล่าวคือ ปริมาณฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จะเพิ่มขึ้นในช่วงสามสัปดาห์แรกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 และ 20 องศาเซลเซียสจากนั้นจะค่อยๆ ลดปริมาณลงมา ในขณะที่ปริมาณฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ใน burdock roots จะเพิ่มสูงขึ้นเป็นอย่างมากเมื่อเก็บรักษาที่ 0 องศาเซลเซียสซึ่งแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษามีผลต่อปริมาณอินนูลินที่สะสมอยู่ใน burdock roots (Ishiguro และคณะ, 2010) โดยฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในพืชอาจทำหน้าที่อื่นนอกเหนือจากการทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารสำรองเพื่อให้พลังงานกับพืช เป็นไปได้ที่น้ำตาลเหล่านี้จะทำหน้าที่ช่วยปกป้องเซลล์พืชจากการขาดน้ำอันเนื่องมาจากความแห้งแล้งหรืออุณหภูมิที่ต่ำ (Hendry และ Wallace, 1993) และยังทำหน้าที่รักษาระดับแรงดันออสโมติกในเซลล์พืชด้วย (Hinch และคณะ, 2000) ผลจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า หากต้องการให้หัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลองมีการผลิตอินนูลินสูงควรชักนำภายใต้การให้แสงแบบวันยาวและไม่ควรนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเพราะจะทำให้เกิดการย่อยของอินนูลิน ซึ่งเป็นฟรุคแทน (fructan) สายโซ่ยาวไปเป็นฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นฟรุคแทนสายโซ่ที่สั้นลงมา แต่หากต้องการฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในปริมาณสูงขึ้นควรชักนำหัวขนาดเล็กภายใต้การให้แสงแบบวันสั้นหรือในที่มืด และการเก็บที่อุณหภูมิต่ำก็并不会ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณอินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4.3 ปริมาณอินนูลิน ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (นิสโตสและ 1-คีสโตส) ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสในหัวขนาดเล็กอายุ 45 วันที่ชักนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาว วันสั้น และในที่มืด และในสภาวะการเก็บรักษาแบบต่างๆ

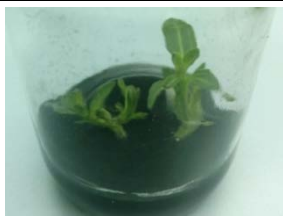
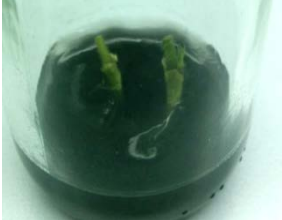
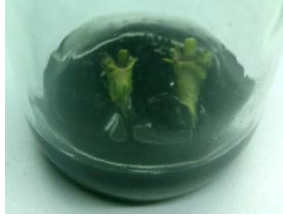
ชนิดและปริมาณของ น้ำตาลในสารสกัด (mg/g fresh weight)*	สภาวะที่ใช้ใน การชักนำ	สภาวะในการเก็บรักษา		สภาวะที่ใช้ใน การชักนำ	สภาวะในการเก็บรักษา		สภาวะที่ใช้ใน การชักนำ	สภาวะในการเก็บรักษา	
	LD ที่ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 45 วัน	LD ที่ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน	D ที่ 4±2 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน	SD ที่ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 45 วัน	SD ที่ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน	D ที่ 4±2 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน	D ที่ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 45 วัน	SD ที่ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน	D ที่ 4±2 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน
อินนูลิน	34.18±1.69b	57.16±12.99a	12.58±2.51d	18.00±2.00d	15.11±0.58d	15.58±8.11d	22.00±2.54cd	35.52±6.18b	31.05±7.54bc
นิสโตส	-	-	3.74±0.24b	6.28±1.04a	6.11±1.31a	4.67±1.09b	5.10±1.32ab	-	-
1-คีสโตส	5.39±1.66b	7.37±1.63ab	7.02±1.40ab	8.71±2.12ab	9.30±1.81ab	7.43±1.11ab	10.29±4.94a	6.27±2.70ab	7.30±1.83ab
ซูโครส	8.29±3.91c	9.93±2.81c	25.32±2.75b	36.34±6.47a	32.10±9.14ab	37.80±7.54a	13.99±0.72c	8.18±1.51c	10.73±8.89c
กลูโคส	3.68±1.97b	6.30±0.44ab	6.84±0.25a	7.93±0.35a	8.64±1.25a	6.43±1.31ab	7.67±1.86a	3.98±0.72	7.63±2.49a
ฟรุคโตส	3.61±0.31c	6.44±0.22bc	9.41±3.85b	10.08±2.52b	7.59±0.36bc	9.86±1.31b	4.68±2.05c	5.67±0.63b	15.36±3.87a

LD SD และ D คือ การให้แสงสว่างแบบวันยาว แบบวันสั้น และในที่มืด ตามลำดับ *ค่าเฉลี่ย±SD ของ 3 การวิเคราะห์ในชุดการทดลอง (n=3)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$

4.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการสะสมอินูลินของหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้

จากการชักนำหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียสภายใต้การให้แสงสว่างแบบ LD บนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นหัวขนาดเล็ก (MS basal salts+ MS vitamins ที่มีการเติม benzyladenine(BA) 5.0 mg/L, chlorochlorine chloride (CCC) 500 mg/L, Thiamine HCl 0.4 mg/L, activated charcoal 1%, รุ้น 7.5 g/L, pH 5.6) (ดัดแปลงจากวิธีการของชาย, 2555) ที่มีการแปรผันปริมาณน้ำตาลซูโครสเป็น 6% (MST6%) 8% (MST8%) และ 12% (MST12%) เป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่าทุกความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการทดลองสามารถชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กได้หมดดังแสดงในภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.4

สูตรอาหาร	ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง		
	15 วัน	30 วัน	45 วัน
MST 6%			
MST 8%			
MST12%			

ภาพที่ 4.3 หัวขนาดเล็กของแก่นตะวันที่ชักนำได้บนอาหารสูตร MST6% MST 8% และ MST 12%

ตารางที่ 4.4 จำนวนชิ้นพืชที่พัฒนาไปเป็นหัว % ชิ้นพืชที่พัฒนาเป็นหัว จำนวนหัว ความยาว และน้ำหนักหัวที่ชักนำได้บนอาหารสูตร MST 6%, 8% และ 12% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นพืชที่พัฒนาเป็นหัว (ชิ้น)*	จำนวนหัวที่ชักนำได้ (หัว)*	ความยาวหัวที่ชักนำได้ (ซม./หัว)*	น้ำหนักหัวที่ชักนำได้ (กรัม/หัว)*	น้ำหนักหัวสุทธิ (กรัม)*
MST 6%	$3.00 \pm 1.00b$	$6.00 \pm 2.65b$	$0.447 \pm 0.14b$	$0.0527 \pm 0.05ab$	$0.2638 \pm 0.15b$
MST 8%	$8.67 \pm 1.15a$	$14.3 \pm 2.00a$	$0.677 \pm 0.11a$	$0.1055 \pm 0.03a$	$0.9308 \pm 0.36a$
MST 12%	$4.33 \pm 0.58b$	$6.00 \pm 2.65b$	$0.400 \pm 0.00b$	$0.0415 \pm 0.01b$	$0.2579 \pm 0.15b$

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) n = 3 ทำการทดลอง 3 ชุดๆ ละ 10 ชิ้นพืช

ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาที่จำนวนหัวที่ชักนำได้ พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) โดยความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสมีผลต่อจำนวนหัวที่ชักนำได้อย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$) โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 8% ให้ผลดีที่สุด ซูโครสนอกจากจะเป็นเหมือนแหล่งพลังงานแก่พืชในหลอดทดลองแล้ว ยังมีรายงานว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงสามารถก่อให้เกิดอวัยวะพิเศษ (extra organ) ได้ในพืชแต่ละชนิด และจากภาพที่ 4.5 จะเห็นได้ว่าการใช้น้ำตาลซูโครสที่ 6% ไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการก่อให้เกิดอวัยวะพิเศษ ส่วนการใช้น้ำตาลซูโครสที่ 12% แม้จะชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กได้ดีในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงแต่เมื่อชักนำไปในระยะเวลาที่นานขึ้นกลับพบว่าหัวที่ชักนำได้มีการงอกเป็นต้นใหม่เกิดขึ้นและมีรากงอกออกมาเป็นจำนวนมาก ดังนั้น หากต้องการผลิตอินนูลินจากหัวที่ชักนำได้ในหลอดทดลองควรใช้สูตรอาหารที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสที่ 8%



ภาพที่ 4.5 ลักษณะการพัฒนาของชิ้นพืชในการชักนำให้เกิดหัวแก่ต้นขนาดเล็กในหลอดทดลอง บนสูตรอาหาร MST 12% (แถวบน) MST 8% (แถวกลาง) และ MST 6% (แถวล่าง) ในสภาวะที่มีการให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 45 วัน

เมื่อพิจารณาการสะสมของอินนูลินในตารางที่ 4.5 พบว่า หัวที่ชักนำได้บนสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 8% ให้ผลดีที่สุด และแม้ว่าปริมาณการสะสมอินนูลินจะต่ำกว่าที่พบในหัวที่ปลูกในแปลง แต่ไม่พบว่ามีค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแล้วจะเห็นว่าใช้เวลาที่สั้นกว่ามาก ดังนั้น การชักนำหัวขนาดเล็กในทดลองโดยใช้น้ำตาลซูโครส 8% จึงเป็นอีกช่องทางหนึ่งในการผลิตอินนูลินได้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณอินนูลิน ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (นิสโตสและ 1-คีสโตส) ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสในหัวขนาดเล็กอายุ 45 วัน ที่ชักนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาวบนอาหารสูตร MST 6%, 8% และ 12% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

แหล่งของหัว แก่ต้น	ชนิดของน้ำตาลในสารสกัด* (mg/g fresh weight)					
	อินนูลิน	นิสโตส	1-คีสโตส	ซูโครส	กลูโคส	ฟรุคโตส

ปลูกในแปลง	132.29± 23.85a	1.18 ±0.07ab	1.761±0.06bc	2.15±0.04b	5.94±0.24a	6.69±0.14b
MST 6%	20.54±1.05c	3.28±1.84ab	0.70±0.01c	10.31±0.75a	0	3.42±1.03c
MST 8%	92.76± 19.38ab	0	3.10±0.34b	3.29±0.51b	0	3.28±0.48c
MST 12%	73.53±2.58b	3.84±1.69a	5.71±1.26a	10.80±3.40a	5.42±1.32a	14.39±0.88a

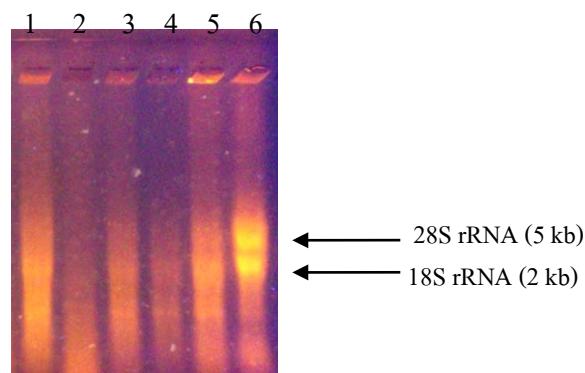
* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) n = 2 ทำการทดลอง 2 ชุด

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.5 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินูลินใน *In vitro* microtuber

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินูลินคือ ยีน *1-sst* และ *1-fft* ในหัวแก่้นตะวันขนาดเล็กที่ได้จากการชักนำในหลอดทดลองด้วยเทคนิค Northern blot hybridization ซึ่งสามารถบ่งบอกการแสดงออกของยีนในเซลล์หรือเนื้อเยื่อในสภาวะต่างๆได้ โดยเริ่มจากการนำอาร์เอ็นเอของหัวขนาดเล็กของแก่้นตะวันที่สกัดได้มาแยกขนาดบน formaldehyde gel และใช้ ribosomal RNA subunit ที่ปรากฏบนแผ่นเจล คือ large ribosomal subunit (28s) ที่มีขนาดประมาณ 5 kb และ small ribosomal subunit (18s) ที่มีขนาดประมาณ 2 kb เป็นตัวเทียบขนาดอาร์เอ็นเอและปริมาณของอาร์เอ็นเอเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง ได้ผลดังภาพที่ 4.6

ซึ่งจากภาพที่ 4.5 พบว่า ปรากฏแถบอาร์เอ็นเอขึ้นในทุก lane ในลักษณะเป็นปื้น (smear) และพบ ribosomal RNA subunit ชัดเจน



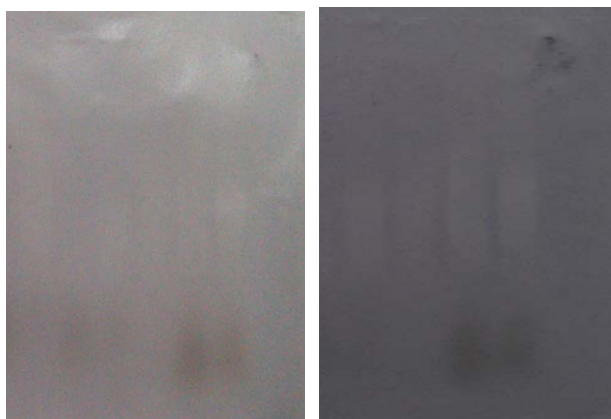
ภาพที่ 4.5 formaldehyde gel ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากหัวขนาดเล็กของแก่้นตะวันที่ชักนำได้ แคลลัส ไหลและหัวแก่้นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ

โดยที่ Lane 1-3 : หัวแก่้นตะวันที่ชักนำได้บนอาหาร MST6% MST8% และ MST12%

Lane 4 : แคลลัส Lane 5: ไหล Lane 6 : หัวแก่้นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ

ผลจากการทำ hybridization กับยีนติดตามที่ติดฉลากด้วย Digoxigenin (Dig) ซึ่งเป็น nonradioactive probe และตรวจติดตามสัญญาณบนแผ่นไนลอนได้ผลดังภาพที่ 4.6

1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6



ภาพที่ 4.6 Northern blot hybridization ของยีน *1-sst* (ซ้าย) และยีน *1-fft* (ขวา) ของหัวแก่นตะวันขนาดเล็กที่ชักนำได้ แคลลัส ไหล และหัวแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ

โดยที่ Lane 1-3 : หัวแก่นตะวันที่ได้จากการทดลอง

Lane 4 : แคลลัส

Lane 5 : ไหล

Lane 6 : หัวแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ

จากภาพที่ 4.6 พบว่า ไม่ปรากฏแถบใดๆ ขึ้นบนแผ่นไนลอนหลังจากการทำ hybridize ซึ่งเป็นไปได้ว่า ไม่มีการแสดงออกของยีนที่สนใจคือ ยีน *1-sst* และ *1-fft* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินูลินหรืออาจจะมี การแสดงออกของยีนแต่อยู่ในระดับที่ต่ำมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค Northern blot hybridization เนื่องจากเทคนิคนี้มีข้อจำกัดคือ ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบต้องปริมาณอาร์เอ็นเอและมี ต้องการแสดงออกของยีนที่สนใจที่มากพอ ซึ่งหากใช้เทคนิคอื่นมาช่วยในการตรวจวิเคราะห์เช่น RT-PCR อาจ ช่วยในการวิเคราะห์ ยีน *1-sst* และ *1-fft* ที่มีระดับการแสดงออกที่ต่ำได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า

5.1 การชักนำให้ได้หัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในหลอดทดลองที่มีการสะสมของอินูลินปริมาณสูงทำได้โดยการตัดบริเวณข้อของต้นแก่นตะวันปลอดเชื้ออายุประมาณ 1 เดือนให้เหลือบริเวณส่วนบนข้อประมาณ 0.5 เซนติเมตรและบริเวณด้านล่างข้อประมาณ 1.5 เซนติเมตรมาเลี้ยงบนอาหารชักนำให้เกิดเป็นหัวขนาดเล็ก (MST8%; MS basal salts+ MS vitamins ที่มีการเติม benzyladenine(BA) 5.0 mg/L, chlorochlorine

chloride (CCC) 500 mg/L, Thiamine HCl 0.4 mg/L, activated charcoal 1%, น้ำตาล 80 g/L, รุน 7.5 g/L, pH 5.6) นาน 45 วัน โดยควบคุมสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้มีอุณหภูมิเท่ากับ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และมีการให้แสงสว่างแบบวันยาว (long day) จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน

5.2 เพื่อรักษาปริมาณอินนูลินที่สะสมในหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลองไม่ควรเก็บในที่มืดและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.3 หัวขนาดเล็กแก่จนวันที่ชักนำได้บนอาหารสูตร MST8% ที่มีน้ำตาลซูโครส 80 g/L ชักนำให้ได้จำนวนหัวและปริมาณผลผลิตดีที่สุดและสามารถผลิตอินนูลินได้สูงที่สุดและมีปริมาณความเข้มข้นของอินนูลินที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญกับหัวที่ปลูกในแปลงปลูกธรรมชาติ

5.4 ไม่พบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินในหัวที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง แคลลัส ไหล และหัวแก่จนวันที่ปลูกในธรรมชาติเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Northern blotting

บทที่ 6

บรรณานุกรม

ชาย ไตรวิลาศ. 2555. การศึกษาการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อินนูลินในหัวขนาดเล็กของแก่จนวันที่ชักนำได้ในหลอดทดลอง. จุลนิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ดาร์รัตน์ มงคลการ และ สารโจน์ ศิริคันสนียกุล. 2554. แก่นตะวัน พืชหัวเพื่อสุขภาพ. สรรสาระเทคโนโลยี-ชีวภาพ ฉบับเดือนมีนาคม- พฤษภาคม 2554. 18.

วิกานดา โสขุม. 2554. การผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.

อรุณี คงคา. 2554. แก่นตะวัน: พืชเพื่อสุขภาพและพลังงาน. สารวิทยฉบับที่ 6 ประจำเดือนตุลาคม 2554-

มกราคม 2555. 19- 21.

- 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 Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiol* 89: 658- 663.
- Dobranszki, J., Magyar-Tabori, K. And Hudak, I. 2008. *In vitro* tuberization in hormone- free systems on solidified medium and dormancy of potato microtubers. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*: 82-94.
- Edelman, J. and Jefford, T.G. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517-531.
- Estrada, R., Tovar, P. and Dodds, J.H. 1986. Induction of *in vitro* tubers in a board range of potato genotypes. *Plant Cell* 7: 3- 10.
- Gambrug, K.Z., Vysotskaya E.F. and Gamanets L.V. 1999. Microtuber formation in micropropagated Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 115- 118.
- Gutierrez, P.P., Bizzarri, M., Rugini, E. and De Pace, C. 2011. *In vitro* microtuberization for stimulating the developmental physiology of underground storage organ in *Helianthus tuberosus*. *Proceedings of the Joint Meeting SGI-SIBV-SIGA Assisi, Italy- 19/22 September, 2011*.
- Ishiguro, Y., Onodera, S., Benkeblia, N. and Shiomi, N. 2010. Variation of total FOS, total IOS, inulin and their related- metabolizing enzymes in burdock roots (*Arctium lappa* L.) stored under different temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 56: 232- 238.
- Kaur, N. and Gupta, A.K. 2002. Application of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci* 27(7): 703- 714.
- Koops, A.J. and Jonker, H.H. 1996. Purification and characterization of enzymes of fructan biosynthesis in tuber of *Helianthus tuberosus* Columbia. *Plant Physiol* 10: 1167- 1175.
- Pontis, 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.
- Rao, R.S.P., Anderson, J.R., Dionisio, G. and Boelt, B. 2011. Fructan accumulation and transcription of candidate genes during cold acclimation in three varieties of *Poa pratensis*. *Journal of Plant Physiology* 168: 344- 351.
- Taha, H.S., El-sawy, A.M. and Bekheet, S.A. 2007. *In vitro* studies on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) and enhancement of inulin production. *Journal of Applied Sciences Research* 3: 853- 858.
- Taha, H.S., Abd El-Kawy, A.M. and El-Kareem Fathalla, M. 2012. A new approach for achievement of inulin accumulation in suspension cultures of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) using biotic elicitors. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 10(1): 33- 38.

- Ueno, K., Ishiguro, Y., Yoshida, M., Onodera, S. and Shiomi, N. 2011. Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.). *Chemistry Central Journal* 5: 1-9.
- Van der Meer, I.M., Koops, A.J. and Hakkert, J.C. 1998. Cloning of fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *The Plant Journal* 15: 489- 500.
- Vijn, I. and Smeekens, S. 1999. Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate ?. *Plant Physiology* 120: 351-359.
- Williams, L.E., Lemoine, R. and Sauer, N. 2000. Sugar transporters in higher plants- a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* 5(7): 283-290.

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 KNO ₃ CaCl ₂ .2H ₂ O MgSO ₄ .7H ₂ O KH ₂ PO ₄	1650 1900 440 370 170	165 190 44 37 17	10 มล.
2. ธาตุอาหารรอง (Micronutrient) 1000 เท่า MnSO ₄ .4H ₂ O ZnSO ₄ .5H ₂ O H ₃ BO ₃ KI Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O CoCl ₂ .H ₂ O FeSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ EDTA.2H ₂ O	22.3 8.6 6.2 0.83 0.25 0.025 0.025 27.85 37.25	22.3 8.6 6.2 0.83 0.25 0.025 0.025 27.85 37.25	1 มล.
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 : $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ และ KNO_3 เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ 82.5 กรัม

- ชั่ง KNO_3 95 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

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

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

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

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

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

- ชั่ง KH_2PO_4 8.5 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

2. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง

MS Micronutrient Stock : เข้มข้น 1000 เท่า ปริมาตร 500 มล.

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

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

- ชั่ง H_3BO_3 3.1 กรัม

- ชั่ง KI 0.415 กรัม

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

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

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

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

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

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

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

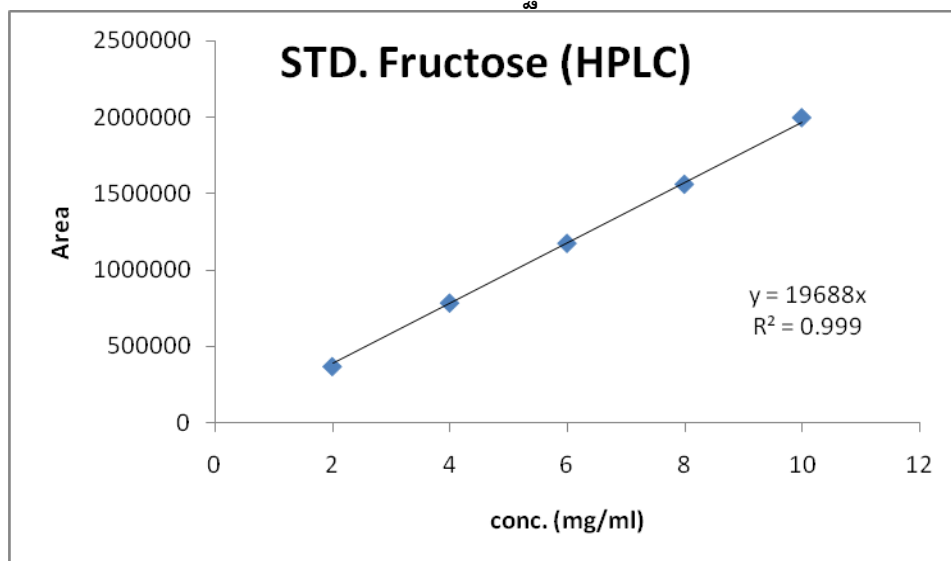
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล. เก็บสารละลายในขวดสีชา

3. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของวิตามิน

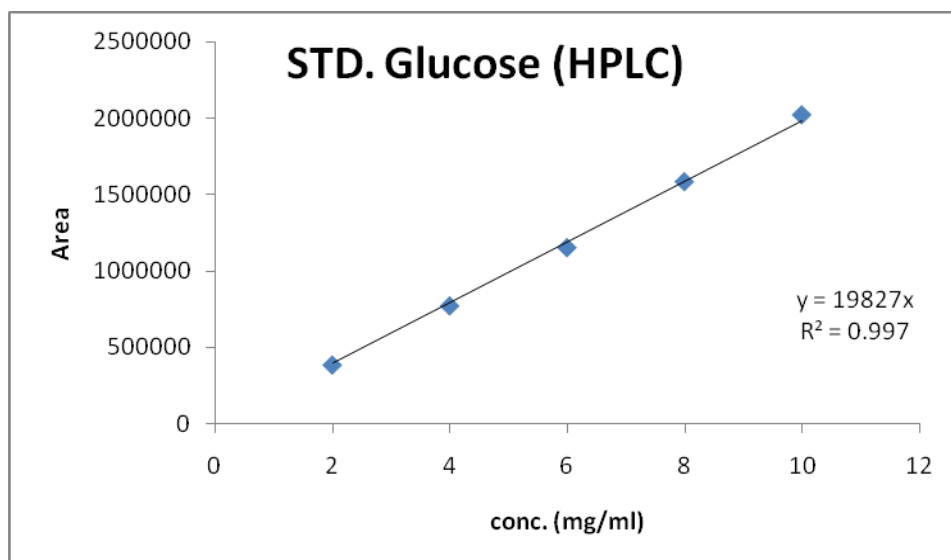
MS Vitamin Stock : เข้มข้น 1000 เท่า ปริมาตร 500 มล.

- ชั่ง Nicotinic acid 0.25 กรัม

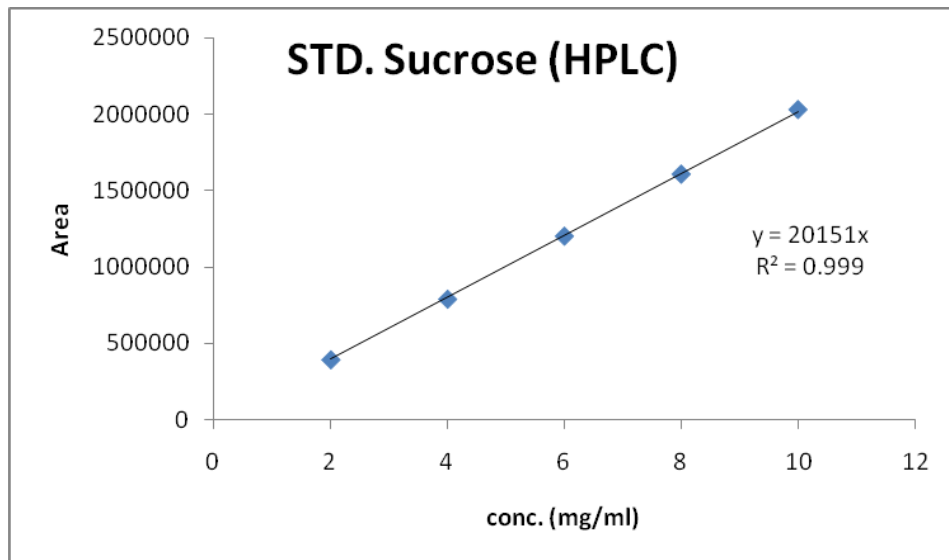
กราฟมาตรฐาน



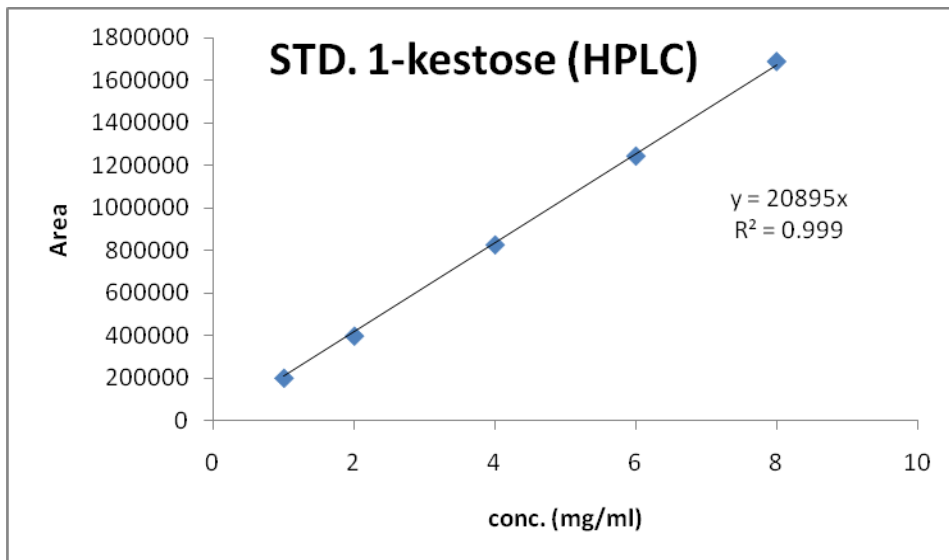
กราฟที่ ข.1 กราฟมาตรฐาน Fructose (HPLC) retention time ประมาณ 20.219 นาที



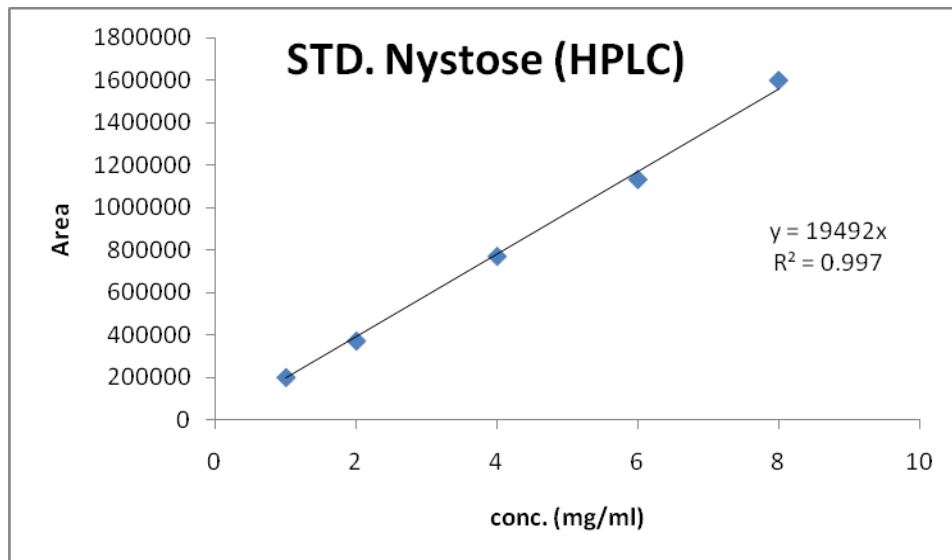
กราฟที่ ข.2 กราฟมาตรฐาน Glucose (HPLC) retention time ประมาณ 18.147 นาที



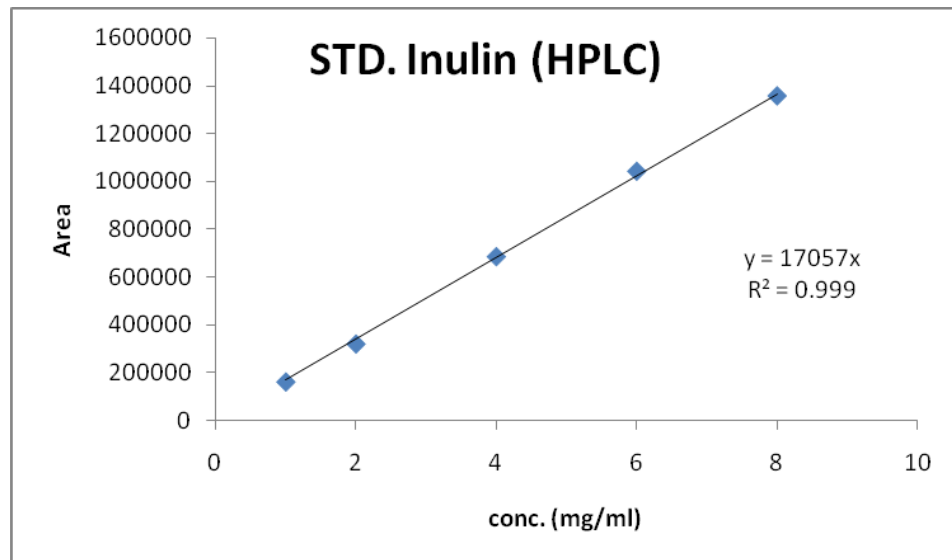
กราฟที่ ข.3 กราฟมาตรฐาน Sucrose (HPLC) retention time ประมาณ 15.014 นาที



กราฟที่ ข.4 กราฟมาตรฐาน 1-kestose (HPLC) retention time ประมาณ 13.460 นาที



กราฟที่ ข.5 กราฟมาตรฐาน Nystose (HPLC) retention time ประมาณ 12.653 นาที



กราฟที่ ข.6 กราฟมาตรฐาน Inulin (HPLC) retention time ประมาณ 11.662 นาที

ตารางที่ ค.1 ข้อมูลปริมาณอินนูลิน ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (นิสโตสและ 1-คีสโตส) ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสในหัวขนาด เล็กอายุ 45 วันที่ชักนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาว วันสั้น และในที่มืด

ชนิดและปริมาณของน้ำตาลในสารสกัด (mg/g fresh weight)*	รูปแบบของการให้แสงสว่าง		
	วันยาว	วันสั้น	ที่มืด
อินนูลิน	33.48	18.34	20.84
	32.55	15.40	24.92
	36.50	20.27	20.24
	34.18±1.69a	18.00±2.00b	22.00±2.54b
นิสโตส	0.00	7.22	4.01
	0.00	5.15	6.57
	0.00	6.45	4.72
	-	6.28±1.04a	5.10±1.32a
1-คีสโตส	5.21	9.37	6.37
	3.82	10.42	15.84
	7.13	6.33	8.65
	5.39±1.66b	8.71±2.12ab	10.29±4.94a
ซูโครส	4.56	6.82	22.73
	12.35	10.71	28.21
	7.98	12.27	25.01
	8.29±3.91b	36.34±6.47a	13.99±0.72b
กลูโคส	5.95	6.46	6.83
	2.50	5.81	6.59
	2.58	6.63	7.08
	3.68±1.97b	7.93±0.35a	7.67±1.86a
ฟรุคโตส	3.54	6.63	5.45
	3.94	6.48	9.66
	3.34	6.21	13.14
	3.61±0.31b	10.08±2.52a	4.68±2.05b

*ค่าเฉลี่ย±SD ของ 3 การวิเคราะห์ในชุดการทดลอง (n=3)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ ค.2 ข้อมูลปริมาณอินนูลิน ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (นิสโตสและ 1-คีสโตส) ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสในหัวขนาดเล็กอายุ 45 วันที่ชักนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาว วันสั้น และในที่มืด และในสภาวะการเก็บรักษาแบบต่างๆ

ชนิดและปริมาณของ น้ำตาลในสารสกัด (mg/g fresh weight)*	สภาวะที่ใช้ใน การชักนำ	สภาวะในการเก็บรักษา		สภาวะที่ใช้ใน การชักนำ	สภาวะในการเก็บรักษา		สภาวะที่ใช้ใน การชักนำ	สภาวะในการเก็บรักษา	
	LD ที่ 25±2°C นาน 45 วัน	LD ที่ 25±2°C นาน 15 วัน	D ที่ 4±2°C นาน 15 วัน	SD ที่ 25±2°C นาน 45 วัน	SD ที่ 25±2°C นาน 15 วัน	D ที่ 4±2°C นาน 15 วัน	D ที่ 25±2°C นาน 45 วัน	SD ที่ 25±2°C นาน 15 วัน	D ที่ 4±2°C นาน 15 วัน
อินนูลิน	33.48	63.47	10.03	18.34	15.76	10.13	20.84	36.80	22.38
	32.55	65.80	12.65	15.40	14.89	11.71	24.92	28.80	34.69
	36.50	42.22	15.05	20.27	14.67	24.9	20.24	40.95	36.07
	34.18±1.69b	57.16±12.99a	12.58±2.51d	18.00±2.00d	15.11±0.58d	15.58±8.11d	22.00±2.54cd	35.52±6.18b	31.05±7.54bc
นิสโตส	0.00	0.00	3.95	7.22	6.64	3.72	4.01	0.00	0.00
	0.00	0.00	3.79	5.15	7.08	4.42	6.57	0.00	0.00
	0.00	0.00	3.48	6.45	4.62	5.86	4.72	0.00	0.00
	-	-	3.74±0.24b	6.28±1.04a	6.11±1.31a	4.67±1.09b	5.10±1.32ab	-	-
1-คีสโตส	5.21	8.18	7.48	9.37	8.73	6.22	6.37	6.84	8.87
	3.82	8.43	8.12	10.42	11.33	7.70	15.84	3.34	5.29
	7.13	5.50	5.45	6.33	7.85	8.39	8.65	8.64	7.73
	5.39±1.66b	7.37±1.63ab	7.02±1.40ab	8.71±2.12ab	9.30±1.81ab	7.43±1.11ab	10.29±4.94a	6.27±2.70ab	7.30±1.83ab
ซูโครส	4.56	6.82	22.73	30.00	32.33	36.37	14.81	9.90	5.86
	12.35	10.71	28.21	42.93	41.12	31.08	13.63	7.56	20.98
	7.98	12.27	25.01	36.09	22.85	45.96	13.51	7.08	5.34
	8.29±3.91c	9.93±2.81c	25.32±2.75b	36.34±6.47a	32.10±9.14ab	37.80±7.54a	13.99±0.72c	8.18±1.51c	10.73±8.89c
กลูโคส	5.95	6.46	6.83	7.84	9.12	7.95	9.76	4.06	5.24
	2.50	5.81	6.59	7.63	9.59	5.66	6.23	4.66	7.44
	2.58	6.63	7.08	8.31	7.23	5.70	7.03	3.23	10.22
	3.68±1.97b	6.30±0.44ab	6.84±0.25a	7.93±0.35a	8.64±1.25a	6.43±1.31ab	7.67±1.86a	3.98±0.72	7.63±2.49a

ตารางที่ ค.2 (ต่อ)

ชนิดและปริมาณของ น้ำตาลในสารสกัด	สภาวะที่ใช้ใน การชักนำ	สภาวะในการเก็บรักษา	สภาวะที่ใช้ใน การชักนำ	สภาวะในการเก็บรักษา	สภาวะที่ใช้ใน การชักนำ	สภาวะในการเก็บรักษา
-------------------------------------	---------------------------	---------------------	---------------------------	---------------------	---------------------------	---------------------

(mg/g fresh weight)*	LD ที่ 25±2°C นาน 45 วัน	LD ที่ 25±2°C นาน 15 วัน	D ที่ 4±2°C นาน 15 วัน	SD ที่ 25±2°C นาน 45 วัน	SD ที่ 25±2°C นาน 15 วัน	D ที่ 4±2°C นาน 15 วัน	D ที่ 25±2°C นาน 45 วัน	SD ที่ 25±2°C นาน 15 วัน	D ที่ 4±2°C นาน 15 วัน
ฟรุทโตส	3.54	6.63	5.45	7.26	8.00	11.21	7.03	5.17	11.29
	3.94	6.48	9.66	12.11	7.45	9.76	3.33	7.66	18.99
	3.34	6.21	13.14	10.88	7.32	8.60	3.67	5.47	15.80
	3.61±0.31c	6.44±0.22bc	9.41±3.85b	10.08±2.52b	7.59±0.36bc	9.86±1.31b	4.68±2.05c	5.67±0.63b	15.36±3.87a

LD SD และ D คือ การให้แสงสว่างแบบวันยาว แบบวันสั้น และในที่มืด ตามลำดับ *ค่าเฉลี่ย±SD ของ 3 การวิเคราะห์ในชุดการทดลอง (n=3)

ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$

ตารางที่ ค.3 ข้อมูลจำนวนขึ้นพืชที่พัฒนาไปเป็นหัว % ขึ้นพืชที่พัฒนาเป็นหัว จำนวนหัว ความยาว และน้ำหนักหัวที่ชักนำได้
บนอาหารสูตร MST 6%, 8% และ 12% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

สูตรอาหาร	จำนวนขึ้นพืชที่พัฒนา เป็นหัว (ขึ้น)*	จำนวนหัวที่ ชักนำได้ (หัว)*	ความยาวหัวที่ชัก นำได้ (ซม./หัว)*	น้ำหนักหัวที่ชักนำได้ (กรัม/หัว)*	น้ำหนักหัวสุทธิ (กรัม)*
MST 6%	4	9	0.322	0.0265	0.2385
	3	5	0.420	0.0261	0.1305
	2	4	0.600	0.1056	0.4224
	3.00 ± 1.00b	6.00 ± 2.65b	0.447 ± 0.14b	0.0527 ± 0.05ab	0.2638 ± 0.15b
MST 8%	8	17	0.588	0.0749	0.5992
	8	14	0.793	0.1109	0.8872
	10	12	0.650	0.1306	1.3060
	8.67 ± 1.15a	14.3 ± 2.00a	0.677 ± 0.11a	0.1055 ± 0.03a	0.9308 ± 0.36a
MST 12%	5	9	0.400	0.0475	0.4275
	4	5	0.400	0.0379	0.1895
	4	4	0.400	0.0392	0.1568
	4.33 ± 0.58b	6.00 ± 2.65b	0.400 ± 0.00b	0.0415 ± 0.01b	0.2579 ± 0.15b

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) n = 3 ทำการทดลอง 3 ชุดๆ ละ 10 ขึ้นพืช
ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.4 ข้อมูลปริมาณอินนูลิน ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (นิสโตสและ 1-คีสโตส) ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตสในหัวขนาดเล็กชั่งนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาวบนอาหารสูตร MST 6%, 8% และ 12% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน

แหล่งของหัว แก่ต้นวัน	ชนิดของน้ำตาลในสารสกัด* (mg/g fresh weight)					
	อินนูลิน	นิสโตส	1-คีสโตส	ซูโครส	กลูโคส	ฟรุคโตส
ปลูกในแปลง	149.161	1.227	1.803	2.174	6.112	6.595
	115.42	1.126	1.718	2.120	5.767	6.792
	132.29± 23.85a	1.18 ±0.07ab	1.761±0.06bc	2.15±0.04b	5.94±0.24a	6.69±0.14b
ชั่งน้ำหนัก อาหารสูตร MST 6%	21.278	0	0.705	10.837	0	4.147
	19.793	0	0.692	9.781	0	2.692
	20.54± 1.05c	0	0.70±0.01c	10.31±0.75a	0	3.42±1.03c
ชั่งน้ำหนัก อาหารสูตร MST 8%	79.053	4.585	3.341	2.932	0	2.939
	106.459	1.983	2.855	3.652	0	3.612
	92.76± 19.38ab	3.28±1.84ab	3.10±0.34b	3.29±0.51b	0	3.28±0.48c
ชั่งน้ำหนัก อาหารสูตร MST 12%	71.711	2.640	6.604	13.2	6.353	15.016
	75.356	5.063	4.816	8.391	4.487	13.768
	73.53±2.58b	3.84±1.69a	5.71±1.26a	10.80±3.40a	5.42±1.32a	14.39±0.88a

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) n = 2 ทำการทดลอง 2 ชุด

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของปริมาณอินนูลินในหัวขนาดเล็กที่ชั่งนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาวบนอาหารสูตร MST 6%, 8% และ 12% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน และหัวที่ปลูกในธรรมชาติ

ONE WAY ANOVA

AMOUNT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12949.843	3	4316.614	18.130	.009
Within Groups	952.349	4	238.087		
Total	13902.191	7			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

AMOUNT

Duncan

MATERIAL	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1	2	20.5355		
3	2		73.5335	
2	2		92.7560	92.7560
0	2			132.2930
Sig.		1.000	.281	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของปริมาณนิสโตสในหัวขนาดเล็กที่ชักนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาวบนอาหารสูตร MST 6%, 8% และ 12% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน และหัวที่ปลูกในธรรมชาติ

ONE WAY ANOVA

AMOUNT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.366	3	6.455	4.124	.102
Within Groups	6.261	4	1.565		
Total	25.626	7			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

AMOUNT

Duncan

MATERIAL	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1	2	.0000	
0	2	1.1765	1.1765
2	2	3.2840	3.2840
3	2		3.8380
Sig.		.062	.105

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของปริมาณคีสโตสในหัวขนาดเล็กที่ชักนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาวบนอาหารสูตร MST 6%, 8% และ 12% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน และหัวที่ปลูกในธรรมชาติ

ONE WAY ANOVA

AMOUNT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.105	3	9.368	21.784	.006

Within Groups	1.720	4	.430		
Total	29.826	7			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

AMOUNT

Duncan

MATERIAL	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
1	2	.6985		
0	2	1.7605	1.7605	
2	2		3.0980	
3	2			5.7100
Sig.		.181	.111	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของปริมาณซูโครสในหัวขนาดเล็กที่ชักนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาวบนอาหารสูตร MST 6%, 8% และ 12% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน และหัวที่ปลูกในธรรมชาติ

ONE WAY ANOVA

AMOUNT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	124.252	3	41.417	13.380	.015
Within Groups	12.381	4	3.095		
Total	136.633	7			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

AMOUNT

Duncan

MATERIAL	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
0	2	2.1470	
2	2	3.2920	
1	2		10.3090
3	2		10.7955
Sig.		.551	.796

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของปริมาณกลูโคสในหัวขนาดเล็กที่ชักนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาวบนอาหารสูตร MST 6%, 8% และ 12% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน และหัวที่ปลูกในธรรมชาติ

ONE WAY ANOVA

AMOUNT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	64.789	3	21.596	47.979	.001

Within Groups	1.800	4	.450		
Total	66.589	7			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

AMOUNT

Duncan

MATERIAL	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1	2	.0000	
2	2	.0000	
3	2		5.4200
0	2		5.9395
Sig.		1.000	.482

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของปริมาณฟรุกโตสในหัวขนาดเล็กที่ชักนำภายใต้สภาวะที่มีการให้แสงแบบวันยาวบนอาหารสูตร MST 6%, 8% และ 12% หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน และหัวที่ปลูกในธรรมชาติ

ONE WAY ANOVA

AMOUNT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	162.831	3	54.277	104.222	.000
Within Groups	2.083	4	.521		
Total	164.914	7			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

AMOUNT

Duncan

MATERIAL	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
2	2	3.2755		
1	2	3.4195		
0	2		6.6935	
3	2			14.3920
Sig.		.852	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ประวัติผู้วิจัย

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวบุษราภรณ์ งามปัญญา
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Budsaraporn Ngampanya
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3349900271604
- ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
เงินเดือน 39,350 บาท เวลาที่ใช้ทำวิจัย 20 ชั่วโมง-สัปดาห์
- ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์...
☒ ข้าราชการ ☐ พนักงาน

5. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) (กรุณารอกหมายเลขโทรศัพท์มือถือ และ e-mail เพื่อสะดวกในการติดต่อ และเพื่อกรอกในระบบ NRMS)
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม ม.ศิลปากร
โทรศัพท์ 034-219360 มือถือ 089- 1627114
โทรสาร 034- 219360 E-mail budsara171@yahoo.com
6. ประวัติการศึกษา : ระดับการศึกษา สถาบัน และปีที่จบ
ปริญญาตรีสาขาเกษตรศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 1) สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปีที่จบ 2536
หัวข้อปัญหาพิเศษ 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.)

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
8.1 ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ทางด้านศิลปะและการออกแบบที่ดำเนินการเสร็จแล้ว

เรื่องที่ 1

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเอนไซม์
จากแก่นตะวันทีปลูกในประเทศไทย
(ภาษาอังกฤษ) Production of Fructo- oligosaccharides (FOS) by Plant Tissues Culture
and Enzymes from Jerusalem artichoke Cultivated in Thailand
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ส่วนบุคคล/เดี่ยว
เป็นหัวหน้า
3. สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
4. 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 โสขมา ปาริชาติ วรณสโร จิตราภา ชูเนตร และบุษราภรณ์ งามปัญญา (2555)
การผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแก่นตะวันโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.
ศิลปากรวิจัยและสร้างสรรค์ครั้งที่ 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

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.

● ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน

● ต่างประเทศ

Keayarsa S, Boonchoo K and Ngampanya B. (2011) The Activity Analysis of Fructosyltransferase Extracted from Jerusalem Artichoke during Tuberization Stage. International Food Conference: “Life Improvement through Food Technology”. October 28- 29, 2011. Surabaya, Indonesia.

●ในประเทศ

1. ศรีสุตา เคยอาษา เกรียงศักดิ์ บุญชู และบุษราภรณ์ งามปัญญา (2555)

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

2. **Ngampanya B**, Keayarsa S, Ngermmeesri 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 ปาริชาติ วรรณสโร จิตราภา ชูเนตร และบุษราภรณ์ งามปัญญา (2555) การผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแก่นตะวันโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ศิลปการวิจัยและสร้างสรรค์ครั้งที่ 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) การพัฒนาการผลิตพรีไบโอติกฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชและจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์
(ภาษาอังกฤษ) Development of Prebiotic: Fructo- oligosaccharide (FOS) Production from Plant and Microorganisms for Economic Value Added
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน คณะบุคคล/กลุ่ม (สัดส่วน 25%)
เป็นหัวหน้าแผนงานวิจัย
3. สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
4. จำนวนงบประมาณ 1,854,000บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 ถึงปี พ.ศ.2556
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
 - ในประเทศ
 - มหาวิทยาลัย
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
 - เผยแพร่แล้ว
 - ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์
 1. ชูติมา วันเพ็ญ บุชราภรณ์ งามปัญญา สุวัฒนา พุกษะศรี พิมพ์ชนก จตุรพิริย และปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ. 2556. ผลของการพรีทรีตเมนต์ด้วยอัลตราซาวด์ต่อการสกัดอินูลินจากหัวแก่ตะวัน.วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. ปีที่ 36 ฉบับที่ 2 หน้า 249-258
 2. Rapeepat Ruekjunong, Budsaraporn Ngampanya, Pramote Khuwijitjaru, Phimchanok Jaturapiree, Suwattana Pruksasri. (2015) Functional prebiotic activity of inulin and fructooligosaccharides. Journal of Food Science and Agricultural Technology. 1(1): 149-151.
 - ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน
 - ในประเทศ
 1. Booncho K, Jaturapiree P, Pruksasri S, Khuwijitjaru 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
 2. Piwpan P, Ngampanya B, Pruksasri S, Khuwijitjaru P. and. 2013. Partial characterization of fructosyltransferases produced from yeast strain ML1. The 8th International Symposium of The Protein Society of Thailand. August 5- 7, 2013. Chulabhorn Research Institute Convention Center, Bangkok, Thailand

เรื่องที่ 7

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอินูลินสโดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตร

- (ภาษาอังกฤษ) Optimization of inulinase production by agricultural materials
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน คณะบุคคล/กลุ่ม (ร่วมกับนักศึกษานิพนธ์)
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 COFFERENCE 2014 June 12-13, 2014 BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.

เรื่องที่ 8

1. ชื่อเรื่อง / ชื่อผลงาน (ภาษาไทย) การผลิตเอนไซม์ฟรุคโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวัน
(ภาษาอังกฤษ) Production of Recombinant Fructosyltransferase from Jerusalem Artichoke
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ส่วนบุคคล/เดี่ยว
เป็นหัวหน้า
3. สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
4. จำนวนงบประมาณ.....25,000..... บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557 ถึงปี พ.ศ.2558
ทำการวิจัยแล้วประมาณร้อยละ 80
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
 - ในประเทศ
 - ภาควิชา
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
 - เผยแพร่แล้ว
 - ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์

Budsaraporn Ngampanya and Kriengsak Boonchoo. 2016. Cloning of 1– Fructan: Fructan Fructosyltransferase Gene and Expression of Recombinant 1– Fructan: Fructan Fructosyltransferase in Yeast. *KKU Res.j.* 22(1) : 356-365.

 - ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน
 - ในประเทศ

Booncho K and **Ngampanya B.** 2014. Production of fructosyltransferase recombinant enzyme from Kaentawan (*Helianthus tuberosus* L.) by

8.2 ผลงานวิจัยหรือผลงานสร้างสรรค์ที่กำลังดำเนินการ

เรื่องที่ 1

1. ชื่อเรื่อง / ชื่อผลงาน (ภาษาไทย) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืชในปริมาณมาก
(ภาษาอังกฤษ) Bioreactor for Plant Cell Culture in Large Scale
2. ลักษณะโครงการ / ผลงาน ส่วนบุคคล/เดี่ยว
เป็นหัวหน้า
3. สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
4. จำนวนงบประมาณ.....75,000..... บาท
ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 ถึงปี พ.ศ. 2561
ทำการวิจัยล่วงหน้าแล้วประมาณร้อยละ 50
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
 - ในประเทศ
 - ภาครัฐ

ผลงานตีพิมพ์จากงานวิจัยเรื่องผลของอุณหภูมิ แสงสว่าง และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อการสะสมอินูลินในหัวขนาดเล็กที่ชักนำในหลอดทดลองของแก่นตะวัน (The Effects of Temperature, Light and Sucrose Concentrations on the Accumulation of Inulin in *In vitro* Microtuber of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)

Polsa S and Ngampanya B. Effects of photoperiod and storage temperature on inulin and fructo-oligosaccharides accumulation in *In vitro* microtubers of kaentawan (*Helianthus tuberosus* L.). Journal of Food Science and Agricultural Technology 2015; 1(1): 89-92.



Original Research Article

Effects of photoperiod and storage temperature on inulin and fructo-oligosaccharides accumulation in *In vitro* microtubers of kaentawan (*Helianthus tuberosus* L.)

Siriluk Polsa and Budsaraporn Ngampanya*

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Muang, Nakhonpathom 73000 Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 September 2014

Received in revised form 25 January 2015

Accepted 28 January 2015

Keywords:

Fructo-oligosaccharides

Inulin

Kaentawan

Microtubers

Photoperiod

ABSTRACT

Kaentawan (*Helianthus tuberosus* L.) is an important tuberous crop accumulated high content of inulin and fructo-oligosaccharides (FOS) which are currently used as prebiotics in various food products. The aims of this research were to induce microtubers of Kaentawan under *in vitro* condition and study of photoperiod and storage temperature effects on inulin and FOS accumulation in obtained microtubers. The microtubers were induced on tuber induction medium with some modifications. Microtubers induced under long day photoperiod (16h light/ 8h dark (LD)) and darkness (D) condition gave higher fresh weight than those induced under short day photoperiod (8h light/ 16h dark (SD)). The different applied photoperiods had an effect to inulin and FOS production in microtubers. High amount of inulin was determined in LD induced microtubers while FOS (xylose and 1-kestose) was highly produced in microtubers induced under SD and D conditions. In addition, inulin content of LD induced microtubers storing in low temperature (4°C) for 15 days was degraded into FOS and sucrose while the inulin and FOS contents of SD and D induced microtubers was unchanged. These results gave an advantage for inulin and FOS production by means of plant organ cultures.

© 2015 School of Agro-Industry, Mae Fah Luang University. All rights reserved.

* Corresponding author: Tel.: 6634219360; fax: 6634219360
Email: budsara171@yahoo.com



INTRODUCTION

Kaentawan or Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) is a tuberous plant rich in inulin-type fructans (Judprasong et al., 2011). Inulin and fructo-oligosaccharides (FOS); long and short chain fructans are currently used as prebiotics in various food products. They are major reserved carbohydrates found in Kaentawan tuber (Van Loo et al., 1995). Due to the variation of inulin and FOS contents derived from natural grown Kaentawan depends on geography and climate, plant varieties and plant diseases etc., many researches have paid attention to search for the alternative methods to produce inulin and FOS with homogeneous quality and quantity from this plant. Microtubers are small tubers of tuber-producing plants which are induced under *in vitro* condition. They are the best plant material for germplasm conservation of tuber-producing plants because they are pathogen-free and are suitable for prolonged preservation at low temperature (Gamborg et al., 1999). Additionally, the carbohydrate levels in microtubers may give insight on the possible relation to carbohydrate content of mature tuber in the field (Peece et al., 2011). The microtubers of Kaentawan were successfully established under *in vitro* conditions (Gamborg et al., 1999; Peece et al., 2011). However, the production of inulin and FOS in induced microtuber has not been investigated. The production of inulin in calli and shoots of Kaentawan induced under *in vitro* conditions was reported by Taha et al. (2004). The present study was therefore aimed to evaluate the accumulation of inulin and FOS in induced microtuber. Additionally, the effects of photoperiod and storage temperature on inulin and FOS accumulation in obtained microtubers were also conducted. It has been reported that environmental factors including light intensity and temperature had an effect to the culture of microtubers of potato (Dobrzinski et al., 2008). This may also influence to the culture of Kaentawan microtubers which has same pattern of tuber development as potato. The obtained results will be beneficial for inulin and FOS production under *in vitro* conditions.

MATERIALS AND METHODS

The establishment of microtubers

The microtubers were induced on tuber induction medium (Estrada et al., 1986) with some modifications. Murashige and Skoog (MS) basal medium supplemented with 0.4 mg/L thiamine HCl, 5.0 mg/L benzyladenine (BA), 500 mg/L chlorocholine chloride (CCC), 80 g/L sucrose and 7.5 g/L agar; pH 5.6 was used as tuber induction medium. The 2 cm long nodal segments with axillary bud were excised from 1 month old sterile plant and aseptically transferred to bottle containing tuber induction medium. Three pieces of explants were cultured in one culture bottle. Experiments were duplicated with at least 9 bottles (replications) in each treatment. The design of all experiments was completely randomized. The obtained data were statistically analyzed using One-way ANOVA by SPSS program version 17.0. Significant difference was assessed at 5% level of probability ($P < 0.05$).

Effects of photoperiods and storage temperature on microtubers induction and accumulation of inulin and FOS

The cultures were maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and illuminated under fluorescent light with different photoperiods; long day photoperiod (16h light/ 8h dark (LD)), short day photoperiod (8h light/ 16h dark (SD)) and darkness (D) for 45 days. Three cultured bottles were

taken to determine the growth of microtubers as fresh weight and the production of inulin and FOS. In order to study the relation of storage temperature to the changes of long chain (inulin) and short chain (FOS) fructans and other carbohydrate contents of induced microtubers, at least three of cultured bottles were kept at the same previous conditions for additional 15 days. The left cultured bottles were transferred to low storage temperatures at $4 \pm 2^\circ\text{C}$ in darkness for additional 15 days.

Extraction of inulin and FOS

Inulin and FOS were extracted by distilled water (Sirirang and Ngampanya, 2012). The ratio of plant samples and distilled water was 1% (w/v). The homogenate was extracted three times at room temperature for 10 min and filtered through 3M filter paper with diameter of 0.2 mm. The filtrates were separated from plant residues by centrifugation. The residual extracts were stored in freezer for further analysis.

Determination of inulin, FOS and other carbohydrate contents

Inulin, FOS and other carbohydrate contents were analyzed by HPLC. The types and contents of inulin, FOS and other carbohydrates were analyzed by comparison to HPLC chromatograms of the known inulin, FOS (xylose, 1-ketose), sucrose, glucose and fructose.

RESULTS AND DISCUSSION

Induction and growth of microtubers

Microtubers were induced from explants cultured on tuber induction medium at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and illuminated under fluorescent light with different photoperiods; long day photoperiod (LD), short day photoperiod (SD) and darkness (D) for 45 days (Figure 1).

Photoperiods (LD and SD) and light intensity (LD/SD and D) had effects to color and fresh weight of microtubers. The color of those induced under LD and SD were pale yellow to green while that induced under darkness was blech. Light affected tuber morphology was reported by Dobrzinski et al. (2008), color of potato tuber varied from green to blackish green due to the light illumination. Considering the growth of microtubers which expressed as fresh weight, those induced under LD and D conditions gave higher fresh weight than microtubers induced under SD photoperiod as shown in Table 1.

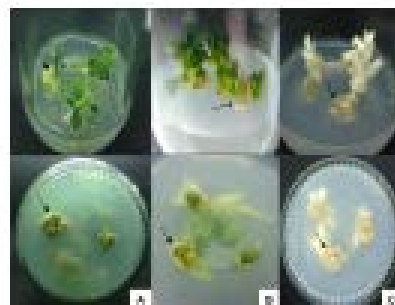


Figure 1 Microtubers were illuminated under fluorescent light with different photoperiods; long day photoperiod (A), short day photoperiod (B) and darkness (C) for 45 days. Black arrows depicted induced microtubers.

Table 1 Fresh weight of plantlets induced under different photoperiods for 45 days.

Plant part	Fresh weight (g/bottle)*		
	Long day (LD)	Short day (SD)	Darkness (D)
Aerial part (leave and stem)	0.35±0.15	0.31±0.16	0.30±0.13
Underground part (microtubers)	0.65±0.27	0.26±0.18	0.70±0.24

* Mean±SD of 3 bottles in each treatment

The fresh weight of aerial part (leave and stem) of induced plants under LD, SD and D was not difference. It suggested photoperiods had an effect to tuberization of *Kaistawan* while the growth of tubers did not result from effect of different light intensities (LD and D). Dobrinski *et al.* (2008) have reported that tuberization of potato was induced on medium with a layer of 8% sucrose solution poured onto 4-week-old plantlets cultures grown under long day (16h) whereas applying of high intensity of short day (8h) light delayed or inhibited tuber initiation.

Effects of induced photoperiods and storage temperatures on inulin and FOS accumulation

The different applied photoperiods had an effect to inulin and FOS production in microtubers as shown in Table 2. The significant difference ($P<0.05$) of inulin content in microtubers derived from different induction photoperiods was detected. High amount of inulin (long chain fructan) was determined in LD induced microtubers (34.18±1.69 mg/g fresh weight) while the amount of inulin found in those induced under SD and D was not difference. FOS (nystose and 1-ketose) was highly produced in microtubers induced under SD (6.28±1.04 and 6.71±2.12 mg/g fresh weight) and D (5.10±1.32 and 10.29±4.94 mg/g fresh weight) conditions. Although the inulin and FOS content detected in 45 days old microtubers was lower than those detected in natural grown tubers derived from 120-150

day olds plant (Jidprasong *et al.*, 2011) but the ratio of inulin and FOS content found in both type of tubers were same. It suggests the occurring of similar synthesis pathway of fructans *in vitro* and natural grown tubers.

Considering to the storage temperature, inulin content of LD induced microtubers storing in low temperature (4°C) for additional 15 days was degraded into nystose and sucrose while inulin content of those maintained under the same previous condition for additional 15 days was increasing (Table 2). There has reported that total FOS of burdock roots (*Arctium lappa* L.) increased during the first three weeks of storage at 15 and 20°C and then decreased, while at 0°C FOS increased progressively during storage. Inulin content of burdock roots decreased during storage and lower content was observed at 20°C. This suggests the carbohydrate metabolism in stored burdock depends partly on temperature (Ishiguro *et al.*, 2010). In this study, the inulin content of microtubers obtained from LD increased from 34.18±1.69 mg/g fresh weight to 57.16±12.99 mg/g fresh weight when stored at the same condition while inulin decreased from 34.18±1.69 mg/g fresh weight to 12.58±2.51 mg/g fresh weight when stored in darkness at 4°C (Table 2). In case of SD induced microtubers, inulin and FOS contents did not change when they were transferred to store at low temperature. The continuous production of inulin was observed in D induced microtubers which maintained at the same condition and stored at low temperature (Table 2).

FOS in plants may have functions other than carbon storage; they have been implicated in protecting plants against water deficit by drought or low temperature (Hendry and Wallace, 1993) and osmoregulators (Hincha *et al.*, 2000). FOS may be a prefer fructan used for maintaining osmotic potential of plant cells when stress condition from low temperature occurred. Hence long chain fructan (inulin) was metabolized to short chain fructan (FOS). According to the microtubers induced under short day and darkness and kept at low temperature accumulated high content of FOS therefore they may be suitable material for short chain fructan production under *in vitro* condition. To explain the change of inulin and FOS accumulation during low temperature storage, the analysis of fructans-metabolizing enzymes activity should be investigated.

Table 2 Inulin, FOS (Nystose and 1-Ketose) and other carbohydrate contents of microtubers induced in different photoperiods and stored at 25°C and 4 °C

Types of carbohydrate (mg/g fresh weight)*	Microtubers Induction	Storage Condition			Microtubers Induction	Storage Condition			Microtubers Induction	Storage Condition		
	LD at 25±2°C, 45 days	LD at 25±2°C, 15 days	D at 4±2°C, 45 days	SD at 25±2°C, 45 days	SD at 25±2°C, 15 days	D at 4±2°C, 45 days	D at 25±2°C, 45 days	D at 25±2°C, 15 days	D at 4±2°C, 45 days	D at 25±2°C, 15 days	D at 4±2°C, 45 days	D at 4±2°C, 45 days
Inulin	34.18±1.69b	57.16±12.99a	12.58±2.51d	18.00±2.00d	15.11±0.58d	15.58±8.11d	22.00±2.54cd	35.52±6.18b	31.05±7.54bc			
Nystose	-	-	3.74±0.24b	6.28±1.04a	6.11±1.31a	4.67±1.09b	5.10±1.32ab	-	-			
1-Ketose	5.39±1.66b	7.37±1.63ab	7.02±1.40ab	8.71±2.12ab	9.30±1.81ab	7.43±1.11ab	10.29±4.94a	6.27±2.70ab	7.30±1.83ab			
Sucrose	8.29±1.91c	9.93±2.81c	25.32±2.75b	16.34±6.47a	12.10±9.14ab	17.80±7.54a	11.99±0.73c	8.18±1.51c	10.73±8.89c			
Glucose	3.68±1.97b	6.30±0.44ab	6.84±0.25a	7.93±0.35a	8.64±1.25a	6.43±1.31ab	7.67±1.86a	3.98±0.72	7.63±2.49a			
Fructose	3.61±0.31c	6.44±0.22bc	9.41±3.85b	10.08±2.52b	7.59±0.36bc	9.06±1.31b	4.68±2.05c	5.67±0.63b	15.36±3.87a			

LD, SD and D were long day, short day and darkness in respectively.

*Mean±SD of 3 analyses in each treatment (n=3)

Different letter in the same row indicated the significant difference at $P<0.05$

CONCLUSION

Photoperiods applying had some effects to growth of Kaenrawan microtubers. High inulin content was derived from microtubers induced under long day photoperiod whereas higher FOS content was gained from those induced under short day and darkness conditions. The low storage temperature had an effect to the degradation of inulin content in LD induced microtubers into FOS and other carbohydrates. These results gave an advantage for inulin and FOS production by means of plant organ cultures.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from Silpakorn University of Research and Development Institute (SURDI) and Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Dobránszki, Magyar-Tibori, K. and Hudák, I. 2008. In vitro tuberization in hormone-free systems on solidified medium and dormancy of potato microtubers. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology (Special Issue 1)*: 82-94.
- Estrada, R., Tovar, P. and Dodds, J.H. 1996. Induction of in vitro tubers in a broad range of Potato genotypes. *Plant Cell* 7: 3- 10.
- Gambrag, K.Z., Vysotskaya E.P. and Gamanets L.V. 1999. Microtuber formation in micropropagated Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 115- 118.
- Hendry, G. A. F and Wallace, R. K. 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In: Suzuki, M., Chatterton, N. J. (Eds.) *Science and Technology of Fructans*, CRC Press, Boca Raton, pp. 119-139.
- Hincha, D.K., Hellwege, E. M., Heyer, A. G. and Crowe, J. H. 2000. Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *European Journal of Biochemistry* 267: 535-540.
- Ishiguro, Y., Onodera, S., Benkeblia, N. and Shiomi, N. 2010. Variation of total FOS, total IOS, inulin and their related-metabolizing enzymes in burdock roots (*Arctium lappa* L.) stored under different temperatures. *Postharvest Biology and Technology* 56: 232-238.
- Judprasong, K., Tanjor, S., Pussawattien, P. and Sungpuag, P. 2011. Investigation of Thai plants for potential sources of inulin-type fructans. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 642-649.
- Pesce, G., Bizzarri, M., Rugini, E. and De Pace, C. 2011. In vitro microtuberization for stimulating the developmental physiology of underground storage organ in *Helianthus tuberosus*. *Proceedings of the Joint Meeting AGI-SIBV-SIGA*, p. 6A.38 Assisi: Italy.
- Singam, A. and Ngampanya, B. 2012. Probiotic properties of fructo-oligosaccharide from extract of Kaenrawan (*Helianthus Tuberosus*). *Proceedings of the 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology*, p.138-142.
- Taha, H.S., El-sawy, A.M. and Bekheet, S.A. 2007. In vitro studies on Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus*) and enhancement of inulin production. *Journal of Applied Sciences Research* 3: 853-858.
- Van Lee, J., Coussermant, P., De Leenheer, L., Hoebregs H. and Smits G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: 525-552.