รายงานการวิจัย เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันและการขยายขนาดการผลิตอินนูลินในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ชื่อภาษาอังกฤษ Optimization of Inulin Production in Cell Suspension Cultures of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) and Scaling Up of Inulin Production in Bioreactor

ชื่อผู้วิจัย (ภาษาไทย/ภาษาอังกฤษ)
ผศ.ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา
Asst. Prof. Dr. Budsaraporn Ngampanya

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2563

Research Project

ชื่อภาษาไทย การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันและการขยายขนาดการผลิตอินนูลินในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ชื่อภาษาอังกฤษ Optimization of Inulin Production in Cell Suspension Cultures of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) and Scaling Up of Inulin Production in Bioreactor

ชื่อผู้วิจัย (ภาษาไทย/ภาษาอังกฤษ)
ผศ.ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา
Asst. Prof. Dr. Budsaraporn Ngampanya

This research is financially supported by
Silpakorn University Research, Innovation and Creativity Administration Office
(Fiscal Year 2018)

Year of completion : 2020

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันและการขยายขนาดการผลิตอินนูลินในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ” ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม และ สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้ จนทำให้เสร็จสมบูรณ์ตามวัตถุประสงค์เป็นอย่างดี

ผู้วิจัย

ภาษาไทย

ส่วนที่ 1

ชื่อโครงการ การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันและการขยายขนาดการผลิตอินนูลินในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ชื่อผู้วิจัย 1. ผศ. ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา (หัวหน้าโครงการ)
คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. รศ. ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์ (ผู้ร่วมวิจัย)
คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2561.
สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีที่เสร็จ 2563
ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์
สาขาวิชา (อ้างอิงตามวช.) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

ส่วนที่ 2 บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนและสารกระตุ้น ขนาดเซลล์ตั้งต้น ความเร็วรอบในการเขย่า และระยะเวลาในการเพาะลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของชีวมวลและผลิตอินนูลินในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในขวดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหาร 20 มิลลิลิตร นั้น พบว่าการเพาะเลี้ยงเซล์แขวนลอยที่ขนาดเซลล์ตั้งต้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอาหารสูตร MSP1G1 (MS ที่เติม BA 1 มก./ล. NAA 1 มก./ล. โพรลีน 1 มก./ล. กลูตามีน 1 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. pH 5.6) ที่ปราศจากสารกระตุ้นไคโตซานขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำและเมทิลจัสโมเนต บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 21 วัน ให้ผลในการผลิตปริมาณอินนูลินได้สูงสุด เมื่อนำเอาสภาวะดังกล่าวมาใช้ในการขยายขนาดการผลิตอินนูลินในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ turbine stirred tank ขนาด 3 ลิตร กำหนด working volume ไว้ที่ 1 ลิตร กลับส่งผลให้เซลล์พืชตายและมีการผลิตอินนูลินลดลง ในขณะที่การขยายขนาดการผลิตด้วยสภาวะดังกล่าวด้วยฟลาสก์เขย่าขนาด 1 ลิตร ที่บรรจุอาหาร 500 มิลลิลตร พบว่าเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันมีอัตราการเจริญและมีการผลิตอินนูลินได้ไม่แตกต่างไปจากการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงได้ลดอัตราการปั่นกวนของใบพัดมาที่ 75 รอบต่อนาที แต่ยังพบการตายของเซลล์พืชในระหว่างการเพาะเลี้ยง ซึ่งบ่งชี้ว่า ไม่สามารถนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์เขย่ามาขยายขนาดการผลิตด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ turbine stirred tank ได้

คำสำคัญ : แก่นตะวัน อินนูลิน การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ turbine stirred tank

ภาษาอังกฤษ

ส่วนที่ 1

Research Title Optimization of Inulin Production in Cell Suspension Cultures of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) and Scaling Up of Inulin Production in Bioreactor

Researcher Asst. Prof. Dr. Budsaraporn Ngampanya (Project Leader)

Faculty of Engineering and Industrial Technology University Silpakorn University

Researcher Assoc. Prof. Dr. Phimchanok Jaturapiree (Co-Researcher)

Faculty of Engineering and Industrial Technology University Silpakorn University

Research Grants Fiscal Year 2018,

Silpakorn University Research, Innovation and Creativity Administration Office

Year of completion 2020

Type of research applied research

Subjects (based NRCT) Agriculture and Biology

ส่วนที่ 2 Abstract

The effects of type and concentration of amino acids and elicitors, plant cell inoculum size, shaking rate of orbital shaker and culturing time on biomass and inulin production of cell suspension culture of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in 20 ml culture bottle were investigated. The optimum condition for biomass and inulin production was culturing of 10% (w/v) cell inoculum size in MSP1G1 (MS médium containing 1 mg/L BA, 1 mg/L NAA, 1 mg/L proline, 1 mg/L glutamine, 30 g/L sucrose, pH5.6) without supplementing of low molecular weight chitosan and methyl jasmonate as elicitors on orbital shaker at 120 rpm for 21 days. To scale up of biomass and inulin production, the optimal parameters in cultured bottle scale was applied in 3 L turbine stirred biorreactor containing 1 L of médium and 1 L Erlenmeyer flask containing 500 ml medium. The plant cells death dued to shear stress in bioreactor was observed which leaded to decrease inulin production of cell suspension whereas the production of biomasss and inulin production of plant cells in scaled up shaking flask was similar to that found in cultured bottle. Decreased turbine rotation speed of bioreactor at 75 rpm resulted to cell death and inhibited the growth of cells. The optimum condition derived from cultured bottle is therefore unable to apply for up scaling production in turbine stirred biorreactor.

Key words : Jerusalem artichoke, Inulin, Suspension culture, Turbine stirred tank bioreactor

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
1. บทนำ	1
2. คำสำคัญ	4
3. กรอบแนวความคิดของงานวิจัย	4
4. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	4
5. ผลการวิจัยและวิจารณ์	16
6. สรุปผลการวิจัย	45
7. บรรณานุกรม	46
ภาคผนวก	48
ประวัตินักวิจัย	92

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณอินนูลิน (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด) ในพืชอาหาร	5
2	สถานที่ทำการวิจัยผลของปัจจัยของสภาพแวดล้อมและการให้สารกระตุ้นต่อปริมาณ furocoumarin ในพืชชั้นสูง	10
3	สูตรอาหารสำหรับหาชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแก่นตะวันแบบเซลล์แขวนลอยเพื่อผลิตอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์	17
4	Growth ratio ของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกรดอะมิโนกลูตามีน หรือ โพรลีน หรือ โพรลีนร่วมกับกลูตามีนความเข้มข้นต่างๆ นาน 21 วัน ของ 2 ชุดการทดลอง	18
5	ความเข้มข้นของอินนูลิน ฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ นาน 21 วัน	21
6	ความเข้มข้นและปริมาณการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยง 21 วัน	22
7	สูตรอาหารสำหรับหาสารกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน	24
8	น้ำหนักสดเริ่มต้น น้ำหนักสด และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MSP1G1 ที่เสริมสารกระตุ้น เป็นเวลา 21 วัน	25
9	น้ำหนักแห้งเริ่มต้น น้ำหนักแห้ง และ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MSP1G1 ที่เสริมสารกระตุ้น นาน 21 วัน	26
10	ค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเหลวเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน ก่อนและหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MSP1G1 ที่เสริมสารกระตุ้น นาน 21 วัน	27
11	ความเข้มข้นของอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 21 วัน	30
12	น้ำหนักสดเริ่มต้น น้ำหนักสด และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยง 21 วัน	32

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	น้ำหนักแห้งเริ่มต้น น้ำหนักแห้ง และ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยง 21 วัน	32
14	ค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน ก่อนและหลังจากการเพาะเลี้ยง 21 วัน	33
15	ความเข้มข้นของอินนูลินในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSP1G1 และ MSP1G1Mj0.15 เป็นเวลา 21 วัน	33
16	น้ำหนักสดเริ่มต้น น้ำหนักสด และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยง 7, 14 และ 21 วัน ที่ความเร็วรอบต่างๆ (80, 100 และ 120 รอบต่อนาที)	35
17	น้ำหนักแห้งเริ่มต้น น้ำหนักแห้ง และ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยง 7, 14 และ 21 วัน ที่ความเร็วรอบต่างๆ (80, 100 และ 120 รอบต่อนาที)	35
18	ความเข้มข้นของอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS: fructofurano-sylnystose, nystose และ 1-kestose) ที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSP1G1 ที่แปรผันความเร็วรอบเป็น 80, 100 และ 120 rpm และเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน	38
19	น้ำหนักสดเริ่มต้น น้ำหนักสด และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในฟลาสก์เขย่าและถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	41
20	น้ำหนักแห้งเริ่มต้น น้ำหนักแห้ง และ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในฟลาสก์เขย่าและถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	41
21	ความเข้มข้นของอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS: fructofurano-sylnystose, nystose และ 1-kestose) ที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	43
22	น้ำหนักสดเริ่มต้น น้ำหนักสด และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในฟลาสเขย่าและถังปฏิกรณ์ชีวภาพหลังจากการเพาะเลี้ยง 14 วัน	44

ตารางที่		หน้า
23	น้ำหนักแห้งเริ่มต้น น้ำหนักแห้ง และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในฟลาสเขย่าและถังปฏิกรณ์ชีวภาพหลังจากการเพาะเลี้ยง 14 วัน	44

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของอินนูลิน	1
2	การเหนี่ยวนำแคลลัสจากส่วนลำต้นของแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.	16
3	ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากหัวแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ และ ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MSG0.5	20
4	ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากหัวแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MSP1G1LMwC40 และ HPLC chromatogram ของสารสกัดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารสูตร MSP1G1Mj0.15	29
5	ลักษณะของเซลล์แขวนลอย สี และการกระจายตัวของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันอายุ 21 วันในอาหารเหลวสูตร MSP1G1 และ MSP1G1Mj0.15 ที่มีขนาดเซลล์ตั้งต้น 5, 10 และ 15%	31
6	ลักษณะของเซลล์แขวนลอย สี และการกระจายตัวของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารเหลวสูตร MSP1G1 ที่มีการแปรผันความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยง 80, 100 และ 120 rpm และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน	34
7	ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน สารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน สารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน	37
8	ลักษณะสีของเซลล์เริ่มต้นและเพาะเลี้ยงนาน 7 วันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	39
9	ลักษณะเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และในฟลาสเขย่า เป็นเวลา 7 วัน และสีของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย	39
10	ลักษณะของเซลล์แขวนลอย สี และการกระจายตัวของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารเหลวสูตร MSP1G1 ในฟลาสก์เขย่าและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นเวลา 14 วัน	40
11	ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ใน ฟลาสเขย่า เป็นเวลา 14 วัน สารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ในฟลาสก์เขย่า เป็นเวลา 21 วัน สารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นเวลา 14 วัน	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ลักษณะของเซลล์แขวนลอย สี และการกระจายตัวของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารเหลวสูตร MS + BA 1 mg/l + NAA 1 mg/l + Proline 1 mg/l + Glutamine 1 mg/l (MSP1G1) ในฟลาสก์เขย่า (A) และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ปรับอัตราการกวนของใบกวนที่ 75 รอบต่อนาที (B) เป็นเวลา 14 วัน	43

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การใช้ระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชรูปแขวนลอย (cell suspension culture) เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีมูลค่า เช่น สารเภสัชภัณฑ์ (pharmaceuticals) สารให้กลิ่นรส (flavours) สารให้ความหอม (fragrances) และสารเคมีบริสุทธิ์อื่นๆ นั้นได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะสารประกอบจากพืชชนิดที่ไม่สามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์และการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) นั้นได้รับการศึกษาและสนใจมากเป็นพิเศษ โดยในแต่ละปีมีการผลิตสารเคมีจากพืชมากกว่า 20,000 ชนิดและมีประมาณ 1,600 ชนิดที่เป็นสารที่ถูกค้นพบใหม่ (Sajc *et al.*, 2000) แก่นตะวันหรือ Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) เป็นพืชที่มีการสะสมอินนูลิน (inulin) ในหัวสะสมอาหาร (tuber) ปริมาณสูง ปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากแก่นตะวันไปใช้เป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* และในขณะเดียวกันก็สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Coliforms* และ *E. coli* ได้ด้วย ทำให้อินนูลินได้เข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้น

รายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าแคลลัส (callus) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบและลำต้นของแก่นตะวันในสภาวะหลอดทดลอง (*in vitro* condition) (Taha *et al.*, 2007) และเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันที่เตรียมจากแคลลัส (Taha *et al.*, 2012a) มีการสร้างและสะสมอินนูลิน (Taha *et al.*, 2007; 2012b) และจากการเสริมสารกระตุ้น (elicitors) คือ *Aspergillus niger* extracts และ Methyljasmonate ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยก็พบว่า อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อินนูลิเนสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอินนูลินสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารกระตุ้นทั้งสองชนิดมีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์และการสะสมอินนูลิน (Taha *et al.*, 2012a) และในปี ค.ศ. 2016 Ma และคณะได้ศึกษาผลของสารกระตุ้นชนิดต่างๆ คือ Methyljasmonate, silver nitrate, salicylic acid, chitosan, *Trichoderma viride* และ yeast extract ต่อการสะสมของอินนูลินและการเปลี่ยนแปลงค่าการเกิดโพลิเมอร์ (degree of polymerization, DP) ของอินนูลินในเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันพบว่า Methyljasmonate ที่เสริมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยให้ปริมาณอินนูลินสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่นๆ และ chitosan yeast extract และ silver nitrate จะทำให้ได้อินนูลินที่มีค่า DP ต่ำลง (Ma *et al.* 2016)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาก่อนหน้าของทีมผู้วิจัยเกี่ยวกับการผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงแคลลัส ต้น ราก และเซลล์แขวนลอย พบว่าแคลลัสที่ชักนำจากส่วนของลำต้นมีปริมาณอินนูลินที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในรูปแบบอื่นๆ และเมื่อเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของ HPLC ของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในรูปแบบต่างๆ กับสารสกัดจากหัวที่ปลูกในธรรมชาติพบว่า แคลลัส ต้น ราก และเซลล์แขวนลอยที่ชักนำได้สามารถผลิตอินนูลินได้เช่นเดียวกันกับหัวที่ปลูกในธรรมชาติ นอกจากนี้สารสกัดที่ได้จากแคลลัสและรากที่ชักนำได้ยังได้แสดงคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกโดยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกด้วย (probiotic) (วิกานดา, 2554; วิกานดา และคณะ, 2555;

Sokuma *et al.*, 2011) แม้ว่าการผลิตอินนูลินด้วยแคลลัสจะให้ปริมาณอินนูลินที่สูงกว่ารูปแบบอื่น แต่อัตราการเจริญของเซลล์จะต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในรูปแบบของเซลล์แขวนลอย นอกจากนี้การปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยให้เหมาะสมต่อการผลิตสารที่ต้องการ เช่น หาสูตรที่เหมาะสม การให้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารที่ต้องการ (precursor feeding) และการใช้สารกระตุ้น (elicitation) ก็ทำได้ง่ายกว่า สามารถหาเอนไซม์ที่เป็นตัวกำหนดปฏิกิริยา (rate limiting step) ในวิถีของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้ และสามารถขยายขนาดการผลิต (scale up) เพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ การเพาะเลี้ยงแก่นตะวันในรูปแบบของเซลล์แขวนลอยเพื่อผลิตอินนูลินนั้นยังมีอยู่น้อยมาก การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำไปสู่การขยายขนาดการผลิตให้มากขึ้นและการหาแนวทางในการผลิตโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) นั้นยังไม่มีรายงานการวิจัย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินของแก่นตะวันในรูปแบบเซลล์แขวนลอยในด้านต่างๆ คือ แหล่งไนโตรเจนนอกเหนือจากเกลือไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) ที่มีอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรพื้นฐาน (basal medium) ชนิดของสารกระตุ้นที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ขนาดของเซลล์ตั้งต้น (inoculum size) ที่ใช้เพาะเลี้ยง รูปแบบของการให้อากาศ และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินในระดับ shaking flask scale จากนั้นจะนำสภาวะเหมาะสมที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการผลิตอินนูลินในขนาดการผลิตที่มากขึ้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่อไป

1.2 คำสำคัญ (keywords)

แก่นตะวัน อินนูลิน การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ turbine stirred tank
Jerusalem artichoke, Inulin, Suspension culture, Turbine stirred tank bioreactor

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.3.1 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในระดับฟลาสก์เขย่า (shake flask)

1.3.2 เพื่อขยายขนาดการผลิตอินนูลินจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในระดับฟลาสก์เขย่า

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอินนูลินของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันและแนวทางการผลิตอินนูลินปริมาณมากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการผลิตอินนูลินในขนาดการผลิตที่สูงขึ้นได้และนำไปเผยแพร่ในรูปการนำเสนอในที่ประชุมวิชาการและตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องใช้อินนูลิน ซึ่งเป็นสารพรีไบโอติกและยังเป็นการสร้างความเข้มแข็งให้กับประเทศ

1.5 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.5.1 ชักนำแคลลัสแก่นตะวันเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมเซลล์แขวนลอย

1.5.2 หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยในระดับฟลาสก์เขย่าด้านต่างๆ คือ หาชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเสริมนอกเหนือจากแหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่ในสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มการเจริญของเซลล์แขวนลอย หาชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน

1.5.3 หาขนาดของเซลล์ตั้งต้น (inoculum size) สำหรับเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อต่อการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน

1.5.4 หาความเร็วรอบในการเขย่าเพื่อให้อากาศและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน

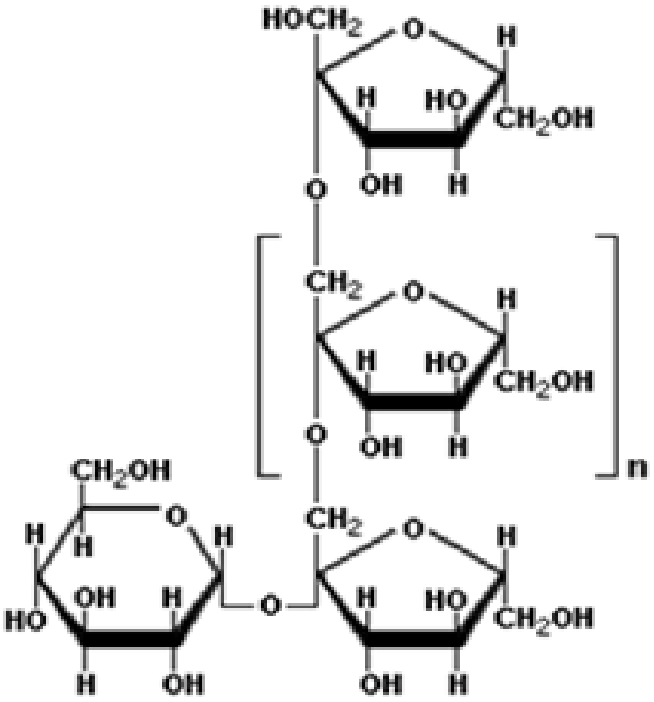
1.5.5 ขยายขนาดการผลิตอินนูลินในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินที่ได้จากการทดลองในระดับฟลาสก์เขย่า

1.6 การทบทวนเอกสารงานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง

Jerusalem artichoke มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* L. เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกาเหนือที่มีอากาศหนาวเย็น แต่เมื่อนำมาปลูกในแถบอากาศร้อนสามารถปรับตัวได้ดีกับสภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกันมาก รองศาสตราจารย์สนั่น จอกลอย คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นให้ชื่อภาษาไทยพืชนี้ว่า “แก่นตะวัน” (สุดารัตน์ และคณะ, 2551) แก่นตะวันสามารถปลูกได้ทุกฤดู ออกดอกอายุประมาณ 60- 65 วัน อายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 100- 140 วันหรือสังเกตจากดอกร่วงเกือบหมดและลำต้นเริ่มโทรม ส่วนของแก่นตะวันที่มีการนำมาใช้ประโยชน์คือ หัว (tuber) เพราะมีการสะสมอินนูลิน (inulin) และฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides) อยู่ในปริมาณสูงแต่จะแปรผันตามพันธุ์ การเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษา เห็นได้จากการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในแก่นตะวันพันธุ์ JA89 ชัยภูมิและ HEL65 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสนาน 10 สัปดาห์พบว่า ปริมาณอินนูลินของพันธุ์ JA89 ชัยภูมิจะสูงกว่า HEL65 และปริมาณอินนูลินในหัวสดจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 5 และ 10 ของการเก็บรักษา (Srikhampa and Uriyapongson, 2008)

อินนูลินประกอบด้วยน้ำตาลฟรักโทสหลายโมเลกุลต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-2,1 ไม่มีกิ่งก้านสาขาประกอบด้วย 1 โมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่บริเวณปลายของโครงสร้างโมเลกุลจับกับน้ำตาลฟรักโทสหลายโมเลกุลด้วยพันธะ β-2, 1 โครงสร้างพื้นฐานของอินนูลินที่มีสายสั้นที่สุดคือ 1-เคสโทส (1-kestose) ความยาวของโมเลกุลน้ำตาลฟรักโทสส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 2-60 โมเลกุล (degree of polymerization, DP) สูตรทั่วไปที่ใช้เขียนแทนโครงสร้างของอินนูลินคือ GF_n โดย G หมายถึง กลูโคส F หมายถึง ฟรักโทสและ n หมายถึง จำนวนโมเลกุลของฟรักโทสที่ต่อกัน (ภาพที่ 1) อินนูลินเป็นสารที่พบปริมาณสูงในส่วนหัวของแก่นตะวัน โดยอินนูลินจัดเป็นสารเยื่อใยอาหารที่ให้ความหวาน ถือเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotics) ชนิดหนึ่งที่ไม่ถูกย่อยในกระเพาะอาหารของมนุษย์ แต่มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโต

ของแบคทีเรียชนิดดีในลำไส้ใหญ่กลุ่ม *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* (Hidaka *et al*., 1986) กระตุ้นการหลั่งของน้ำดี ลดความเสี่ยงของการเป็นโรคเบาหวาน ลดไขมันในเลือด ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย โดยจะพบอินนูลินในพืชมากที่สุดถึง 36,000 ชนิด ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะมีอินนูลินในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านปศุสัตว์นั้นก็มีรายงานการวิจัยเช่นเดียวกันเป็นต้นว่า การนำอินนูลินจากแก่นตะวันไปเสริมในอาหารสุกรเพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกร (ศุภ วันจักรี และ สมชัย, 2546) การใช้แก่นตะวันเป็นสารทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อศึกษาผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและชีวภาพของระบบลำไส้เล็กและใหญ่ในลูกสุกร (พิภพ, 2546) ขณะที่มีการนำเอาแก่นตะวันไปใช้ในการเสริมอาหารคนและสัตว์แล้ว ยังมีความสนใจพืชดังกล่าวนี้ในแง่ของพืชพลังงานทดแทน โดยมีรายงานว่าทั้งหัวและต้นสามารถนำมาหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้ อย่างไรก็ตาม พบว่าแก่นตะวันที่นำมาปลูกมีการงอกไม่สม่ำเสมอและมีปัญหาโรคโคนเน่า หัวเน่ารบกวน ทำให้เกษตรกรที่ร่วมโครงการไม่มีรายได้เพิ่มขึ้นและไม่ยอมรับการปลูกแก่นตะวันเพราะมีการปฏิบัติที่ยุ่งยากกว่าการปลูกพืชทางเลือกอื่น (วิสุทธิ์ และคณะ, 2550)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของอินนูลิน

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

ตารางที่ 1 ปริมาณอินนูลิน (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด) ในพืชอาหาร (Van Loo *et* al., 1995)

แหล่ง	ส่วนที่ใช้กิน	ปริมาณ dry solids	ปริมาณอินนูลิน
Onion	หัว	6.0-12.0	2.0-6.0
jerusalem artichoke	หัว	19.0-25.0	14.0-19.0
Chicory	ราก	20.0-25.0	15.0-20.0
Leek	หัว	15.0-20.0*	3.0-10.0
Garlic	หัว	40.0-45.0*	9.0-16.0
Artichoke	ใบ	14.0-16.0	3.0-10.0
Banana	ผล	24.0-26.0	0.3-0.7
Rye	เมล็ด	88.0-90.0	0.5-1.0*
Barley	เมล็ด	ไม่ระบุ	0.5-1.5*
Dandelion	ใบ	50.0-55.0*	12.0-15.0
Burdock	ราก	21.0-25.0	3.5-4.0
Camas	หัว	31.0-50.0	12.0-22.0
Murnong	ราก	25.0-28.0	8.0-13.0
Yacon	ราก	13.0-31.0	3.0-19.0
Salsify	ราก	20.0-22.0	4.0-11.0

*ค่าโดยประมาณ

จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงอุปสรรคและปัญหาของการผลิตแก่นตะวันเพื่อนำไปใช้เป็นพืชวัตถุดิบเพื่อตอบสนองความต้องการของอุตสาหกรรม การปลูกพืชแม้ว่าจะเป็นพันธุ์ที่ดีในสภาพธรรมชาติเพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณและคุณภาพที่ต้องการนั้นอาจควบคุมได้ยากเพราะสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงมีผลต่อการผลิตสารของพืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยเทคนิคต่างๆ จึงน่าจะเป็นอีกทางหนึ่งที่จะเข้ามาช่วยแก้ไขปัญหานี้เพราะสามารถควบคุมสภาวะในการผลิตและปลอดการรบกวนจากโรคและแมลงศัตรูพืช และเมื่อได้เซลล์ไลน์ที่ให้ผลผลิตสูงแล้วยังสามารถนำไปขยายขนาดการผลิตได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ที่สามารถปรับเปลี่ยนสภาวะให้เป็นไปตามที่ต้องการได้ ซึ่งเทคนิคต่างๆ สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่ว่าจะเป็นการเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus culture) และการเพาะเลี้ยงต้น (shoot culture) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงในระดับเซลล์และอวัยวะ ตามลำดับ ล้วนมีรายงานว่าสามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการชักนำให้เซลล์หรืออวัยวะพืชหลายชนิดสร้างสารที่มีสรรพคุณจำเพาะได้ สำหรับในแก่นตะวันแล้วพบว่า มีรายงานการศึกษาการสร้างอินนูลินในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสและต้นของ Taha และคณะ ซึ่งเป็นการติดตามกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อินนูลิเนส (inulinase) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอินนูลิน แต่ไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณอินนูลินและชนิดของฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ที่สร้างขึ้นโดยตรง (Taha *et al.* 2007) ในขณะที่ทีมผู้วิจัยเองก็ได้ศึกษาการผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงแคลลัส ต้น ราก และเซลล์แขวนลอยเช่นเดียวกัน โดยพบว่าแคลลัสที่ชัก

นำจากส่วนของลำต้นมีปริมาณอินนูลินที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในรูปแบบอื่นๆ และเมื่อเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของ HPLC ของสารสกัดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในรูปแบบต่างๆ กับสารสกัดจากหัวที่ปลูกในธรรมชาติพบว่า แคลลัส ต้น ราก และเซลล์แขวนลอยที่ชักนำได้สามารถผลิตอินนูลินได้เช่นเดียวกันกับหัวที่ปลูกในธรรมชาติ นอกจากนี้สารสกัดที่ได้จากแคลลัสและรากที่ชักนำได้ยังได้แสดงคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกโดยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกด้วย (probiotic) (วิกานดา, 2554; วิกานดา และคณะ, 2555; Sokuma *et al*., 2011)

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension culture) หมายถึงการนำเซลล์เดี่ยว (single cell) หรือกลุ่มเซลล์เล็กๆ (aggregate cells) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (liquid medium) โดยเนื้อเยื่อที่เหมาะสำหรับนำมาเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยคือ แคลลัสที่เกาะกลุ่มกันแบบหลอมๆ (friable callus) ซึ่งเซลล์ที่เกาะตัวกันอย่างหลวมๆ จะง่ายต่อการแยกหรือกระจายเซลล์ออกจากกันเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 30-150 รอบต่อนาที (บุษราภรณ์, 2548) ส่วนแคลลัสที่เกาะตัวกันแน่น (compact callus) นั้น หากต้องการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับเตรียมเซลล์แขวนลอย อาจต้องใช้แท่งแก้วบี้ หรือใช้ใบมีดสับให้เซลล์หลุดออกจากกัน การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยทำได้หลายรูปแบบคือ (1) การเลี้ยงแบบหมุนจุ่มอาหารอย่างช้า ๆ (slowly rotate culture) โดยมีภาชนะที่ออกแบบพิเศษให้มีหลอดยื่นออกมารอบๆ เพื่อกักเก็บเซลล์ในขณะที่มอเตอร์หมุนภาชนะไปรอบแกนด้วยความเร็วประมาณ 1- 2 รอบ/นาที (2) การเลี้ยงแบบเขย่า (shake culture) วิธีนี้ทำได้ง่ายและนิยมกันทั่วไป โดยนำภาชนะที่ใส่ตัวอย่างวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบวน (orbital platform shaker) ที่ความเร็วประมาณ 80-120 รอบ/นาที (บุษราภรณ์, 2548) (3) การเลี้ยงแบบหมุน (spinning culture) วิธีการนี้เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงคราวละมากๆ หลักการคือ นำภาชนะที่บรรจุตัวอย่างไปติดตั้งกับแกนหมุนที่วางเอียงทำมุม 45^{O} ความเร็วประมาณ 80-120 รอบ/นาที (บุษราภรณ์, 2548) และ (4) การเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor culture) วิธีการนี้เหมาะแก่การเลี้ยงในปริมาณมากๆ เช่นกัน โดยจะมีการเติมอากาศเข้าไปในถังปฏิกรณ์แบบต่างๆ นอกจากนี้ยังมีระบบเติมอาหารและวัดสภาพของอาหารในภาชนะด้วย (บุษราภรณ์, 2548)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชแบ่งตามวิธีการกวน (agitation method) และลักษณะของภาชนะ (vessel) ที่ใช้เพาะเลี้ยงได้เป็น 2 ประเภทหลักคือ

1. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวนโดยอาศัยแรงเชิงกล (mechanically agitated bioreactors) ได้แก่

1.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (stirred tank bioreactor, STR) โดยอาศัยใบกวนแบบต่างๆ ได้แก่ spin, helix, blade และ paddle

STR เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่นิยมใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรมโดยอาศัยหลักการกวนเชิงกล มีข้อดีในแง่ของการผสมที่มีประสิทธิภาพและสามารถทำให้ฟองอากาศแตก ซึ่งไม่ทำให้เซลล์เกิดการจับตัวเป็นกลุ่มและเพิ่มอัตราการละลายของออกซิเจนได้ดี อย่างไรก็ตามแม้การดัดแปลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ STR ด้วยการให้อากาศโดยใช้ใบกวนแบบต่างๆได้ถูกพัฒนาขึ้นมา (Honda *et al*., 2001) แต่ก็ยังพบข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น การใช้พลังงานที่สูง แรงเฉือน (shear force) สูง มี configuration ที่ซับซ้อนและมี

ปัญหาเกี่ยวกับการเชื่อม (sealing) และความเสถียรของเพลาหมุน (rotating shafts) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีความสูง เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย และยากต่อการหาสภาวะที่เหมาะสมเมื่อแปรผันสภาวะต่างๆ มีข้อแตกต่างจาก pneumatic bioreactor คือต้องอาศัยกลไกที่แยกออกมาเพื่อให้เกิดการกวนเชิงกลนั่นก็คือต้องใช้ใบกวนแบบต่างๆ และการให้อากาศ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์และต้นพืชที่มีความไวต่อแรงเฉือนนั้นต้องใช้ใบกวนที่ทำให้เกิดแรงเฉือนต่ำๆ และต้องมีการผสมอย่างดีด้วยเมื่อใช้อัตราการกวนที่ต่ำ จึงนับเป็นข้อจำกัดอย่างมากของ STR ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชที่ไวต่อแรงเฉือน

1.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกลองหมุน (rotating drum bioreactor)

เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่สูงกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอื่นๆ ทำให้เกิดการถ่ายโอนมวลได้สำเร็จโดยใช้พลังงานน้อยมาก ซึ่งเป็นไปตาม Danckwert's surface renewal theory (Danckwert, 1951) โดยสิ่งเหล่านี้เหมาะสมต่อกระบวนการชีวภาพของเนื้อเยื่อที่ไวต่อแรงเฉือนและถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ต้องการแสง (photo bioreactor) (Sajc *et al*., 2000)

1.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตัวกรองปั่น (spin filter bioreactor)

2. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวนโดยอาศัยแรงดันจากการอัดอากาศและไม่มีการกวน (pneumatically agitated and non-agitated bioreactors) ได้แก่

2.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการให้อากาศอย่างง่าย (simple aeration bioreactor)

2.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบคอลัมน์ฟองอากาศ (bubble column bioreactor)

ฟองอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้ทำให้เกิดแรงเฉือนน้อย ดังนั้นจึงมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งการขยายพันธุ์พืชหลายๆชนิดผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้น เหง้า หัว และหัวสะสมอาหาร (tuber) ข้อด้อยของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้คือการเกิดฟอง (foam) จากการเติมอากาศเข้าไปในปริมาณมากและการเจริญของเซลล์ใน head space โดยปรากฏการณ์ของการเกิดฟองและการเจริญของเซลล์ที่ผนังของภาชนะเพาะเลี้ยงนั้นเป็นเพราะเส้นผ่านศูนย์กลางของภาชนะเพาะเลี้ยงและส่วนบนของภาชนะเพาะเลี้ยงนั้นเท่ากัน (Paek *et al*., 2001) เพื่อเอาชนะปัญหานี้จึงต้องออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้ส่วนบนของภาชนะเพาะเลี้ยงมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่ขึ้นและ/หรือออกแบบเป็นรูปลูกโป่ง (balloon)

2.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศ (air-lift bioreactor)

ฟองอากาศที่เกิดขึ้นทั้งจากวงจรการหมุนเวียนภายในและภายนอกทำให้เฟสของของเหลวผสมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยข้อดีของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้ก็คือ แรงเฉือนและการใช้พลังงานต่ำและออกแบบได้ง่าย อย่างไรก็ตามการเกิดฟองเพราะการเติมอากาศเข้าไปในปริมาณมากและการเจริญของเซลล์ใน head space ก็พบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้เช่นเดียวกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบคอลัมน์ฟองอากาศ และยังมีปัญหาของการระเหยของอาหารเพาะเลี้ยงด้วย เพื่อแก้ไขปัญหานี้ควรเอาน้ำปลอดเชื้อเติมเข้าไประหว่าง sterile membrane กับ glass sparger จากการเพิ่ม water column เข้าไปจะลดการระเหยของอาหารเพาะเลี้ยงได้ถึง 90% และจะทำให้เพาะเลี้ยงได้นานขึ้น (Lee, 1997)

นอกจากนี้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศและแบบคอลัมน์ฟองอากาศยังสามารถใช้เพาะเลี้ยงได้เป็นระยะเวลานานๆ โดยมีปัญหาการปนเปื้อนต่ำและกำจัดความเสี่ยงอันเนื่องมาจาก stirrer shafts และ seal ดังที่พบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ STR

ข้อแตกต่างหลักระหว่างถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศและแบบคอลัมน์ฟองอากาศคือเรื่องของระบบการหมุนเวียนและลักษณะการเคลื่อนที่แบบไดนามิกของน้ำ โดยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศนั้นการหมุนเวียนของของเหลวและการผสมถูกกำหนดโดยอัตราการไหลของอากาศ (gas flow rate) ดังนั้นความเร็วของการหมุนเวียนอาหารเหลวที่ถูกควบคุมด้วย air flow meter อาจเกิดขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยกลไกการหมุนเวียนจากภายนอกอื่นใดมาช่วยเมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบคอลัมน์ฟองอากาศ แม้ว่ากลไกการยกอากาศจะเหมือนกันมากในทั้งสองระบบแต่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบคอลัมน์ฟองอากาศนั้นจะเหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ในปริมาณที่มากกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศ

2.4 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพฟองอากาศประเภทลูกโป่ง (balloon type bubble bioreactor (BTBB))

เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปลูกโป่งที่ออกแบบเพื่อกำจัดปัญหาการเกิดฟอง โดยใช้ concentric tube สำหรับ cell lifting ที่ riser port ของฐานภาชนะเพาะเลี้ยงจะทำให้การเกิดฟองลดลงเป็นอย่างมาก ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้เหมาะต่อการเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืช โดยได้มีการนำ pilot scale BTBBs ขนาด 300, 500 และ 1000 ลิตรมาใช้ในการผลิตชีวมวลของพืชสำคัญหลายชนิด (Paek *et al*., 2001)

การขยายพันธุ์พืชที่ใช้แรงงานน้อยและต้นทุนต่ำผ่านการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภท modified air-lift, bubble column และ balloon type bobble bioreactor (BTBB) มีรายงานความสำเร็จในการขยายพันธุ์พืชหลายชนิดเช่น *Anoectochilus*, apple, เบญจมาศ (*Chrysanthemum*), กระเทียม (garlic), โสม (ginseng) และการขยายพันธุ์กล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสผ่านโปรโตคอร์ม (Park *et al*., 2000)

2.5 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ packed bed (packed bed bioreactor)

2.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ fluidized bed (fluidized bed bioreactor)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศที่รวมเข้ากับการเติมอนุภาคของแข็งลงไปปริมาณสูงและมีการถ่ายโอนมวลที่ดี ซึ่งถือเป็นธรรมชาติของ fluidized bed แบบสามเฟส

2.7 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเยื่อแผ่นเมมเบรน (membrane bioreactor)

ซึ่งทั้งสองประเภทนี้ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงจะจมอยู่ในอาหารเหลวตลอดเวลา(Paek *et al*., 2001; 2005)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาขบวนการเมแทบอลิซึม การทำงานของเอนไซม์ต่างๆ และการแสดงออกของยีนต่างๆ ในเซลล์พืช และการนำมาใช้ในการผลิตสารทุติย-ภูมิ (secondary metabolites) และสารที่มีมูลค่า (valuable compounds) ในหลอดทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแคลลัสแล้วจะพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจะทำให้เก็บเกี่ยวเซลล์ได้

ในปริมาณมากกว่า ซึ่งสารบางชนิดจะถูกสังเคราะห์และมีการสะสมภายในเซลล์แขวนลอยและสามารถเพิ่มอัตราการสังเคราะห์และการสะสมสารดังกล่าวได้โดยการปรับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต่างๆ ให้เหมาะสม เช่น หาสูตรที่เหมาะสม การให้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารที่ต้องการ (precursor feeding) และการใช้สารกระตุ้น (elicitation) ก็ทำได้ง่ายกว่า สามารถหาเอนไซม์หรือยีนที่เป็นตัวกำหนดปฏิกิริยา (rate limiting step) ในวิถีของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้ และสามารถขยายขนาดการผลิต (scale up) เพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ องค์ประกอบในอาหารเพาะเลี้ยงนับเป็นวิธีดั้งเดิมที่มีการศึกษากันมากเพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์และผลผลิตที่ต้องการ

แหล่งของไนโตรเจนก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์พืช โดยเซลล์พืชจะได้รับไนโตรเจนในรูปของเกลือไนเตรตและแอมโมเนียมที่มีอยู่ในสูตรอาหารพื้นฐานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช อย่างไรก็ตามแหล่งไนโตรเจนในรูปอินทรีย์ก็มีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชบางชนิดเช่นเดียวกัน กรดอะมิโน (amino acid) เป็นสารอินทรีย์ในรูปรีดิวซ์ที่พืชนำไปใช้ได้ดีกว่าไนโตรเจนในรูปเกลืออนินทรีย์ การเติมกรดอะมิโนลงในอาหารจะมีผลไปส่งเสริมการเจริญเติบโตและไปสนับสนุนการพัฒนาทางสัณฐานของเซลล์พืชและการพัฒนาไปเป็นต้น นอกจากนี้กรดอะมิโนยังไปทดแทนหรือเพิ่มปริมาณของไนโตรเจน เช่น การเติมกลูตามีน (glutamine) เพื่อเป็นแหล่งของไนโตรเจนอีกทางหนึ่ง นอกเหนือจากไนโตรเจนที่จะได้จากเกลืออนินทรีย์ โดย Ma และคณะได้ศึกษาแหล่งของไนโตรเจนจากกรดอะมิโนที่มีผลต่อการเตรียมเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันพบว่า การใช้โพรลีน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรและกลูตามีน 1 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) สามารถเตรียมเซลล์แขวนลอยได้ดี (Ma *et al*., 2016)

นอกจากนี้การกระตุ้นให้เซลล์พืชสร้างสารที่ต้องด้วยสารกระตุ้น (elicitor) ก็เป็นอีกแนวทางที่นำมาใช้เพิ่มการสะสมสารที่สนใจกันเป็นอย่างมากมาก สารกระตุ้นคือโมเลกุลที่ไปเหนี่ยวนำกลไกในการป้องกันตนเองของพืชเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียด (stress) โดยสารกระตุ้นอาจหมายความถึงสารที่มาจากเชื้อก่อโรค (pathogen) และสารประกอบที่ปดปล่อยออกมาจากพืชโดยการทำงานของเชื้อก่อโรค (endogenous elicitors) สารกระตุ้นจึงแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ สารกระตุ้นที่มาจากสิ่งมีชีวิต (biotic elicitors) และที่ไม่ได้มาจากสิ่งมีชีวิต (abiotic elicitors) โดย biotic elicitors จะได้จากเชื้อก่อโรคและตัวพืชเอง เช่น chitosan, autoclaved mycelium of pathogenic fungi, protein extracts ส่วน abiotic elicitors อาจเกิดจากปัจจัยทางกายภาพต่างๆและสารประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น อุณหภูมิ แสงยูวี เกลือของโลหะหนัก พีเอช เป็นต้น (Kumar and Shekhawat, 2009) ซึ่งการใช้สารกระตุ้นหรือ elicitor เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการเพิ่มการผลิตสารประกอบจากพืชโดยเฉพาะสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ในเซลล์และเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงหลายชนิด (Taha, 2003; Taha *et al*. 2010) เช่น การเสริมไมซีเลียมของ *Aspergillus niger* และ tetramethyl ammonium bromide ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แพงพวย (*Catharanthus roseus*) เพื่อเพิ่มการสะสม ajmalicine (Zhao *et al*. 2000) การเพิ่มสารสกัดจากเชื้อรา *A. niger* ร่วมกับการใช้ Methyljasmonate เพื่อเพิ่ม bioactive compounds ในอินทผลัมอียิปต์ (Egyptian date palm) (Taha *et al*. 2012b) และการนำเอา elicitors

ชนิดต่างๆ มาใช้ในการเพิ่มการผลิตสารทุติยภูมิ (ต.ย. furocoumarin) ในพืชชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของปัจจัยของสภาพแวดล้อมและการให้สารกระตุ้นต่อปริมาณ furocoumarin ในพืชชั้นสูง

Environmental factor or elicitor	Plant species	Effect on furocoumarin content
Plant diseases		
Ceratocystis fimbriata	*Pastinaca sativa* (root apex)	× 20 (8-MOP)
Sclerotinia sclerotiorum	*Apium graveolens* (stalks)	× 235 (Psoralen) × 24 (Total furocoumarins)
Unknown	*Daucus carota* (roots)	× 77 (8-MOP)
Erwinia carotovora	*Apium graveolens* (stalks)	× 24 (Total furocoumarins)
Rhodotula rubra	*Ruta graveolens* (hydroponic)	No modification
Phoma companata	*Pastinaca sativa* (leaves)	× 5 (Total furocoumarins)
Pseudomonas cichorii	*Glehnia littoralis* (roots)	× 9 (psoralen)
Insect damages	*Pastinaca sativa* (leaves)	× 2.2 (8-MOP) × 1.8 (Psoralen)
Effect of light		
UV	*Apium graveolens* (stalks)	× 3.4 (Linear furocoumarin)
UV	*Ruta graveolens* (leaves)	× 2.5–10 (Total furocoumarin)
UV	*Glehnia littoralis* (roots)	× 2 (Psoralen)
Air quality		
Acidic fog	*Apium graveolens* (leaves)	× 5.4 (Linear furocoumarins)
Ozone	*Petroselinum crispum* (leaves)	× 2 (Total furocoumarins)
Temperatures		
Cold (−15° C, control 26° C)	*Apium graveolens* (leaves)	× 8.8 (Linear furocoumarins)
Hot (32° C, 21° C) control 21° C)	*Psoralea cinerea* (leaves)	× 11 (Psoralen)
Chemicals		
$CuSO_4$	*Apium graveolens* (leaves)	× 2.2 (Linear furocoumarins)
$CuSO_4$	*Psoralea cinerea* (fruits)	× 2.8 (Psoralen)
NaCl	*Ruta graveolens* (leaves)	Decrease but higher percentage on leaf surface
NaCl	*Psoralea cinerea* (fruits)	× 2 (Psoralen)
H_2SO_4	*Ruta graveolens* (leaves)	Decrease but higher percentage on leaf surface
$Ca(OCl)_2$	*Psoralea cinerea* (fruits)	× 1.5 (Psoralen)

ที่มา อ้างถึงโดย Bourgaud *et al*.(2001)

สำหรับการเพิ่มการสะสมอินนูลินในเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันโดยใช้สารกระตุ้นก็มีรายงานวิจัยเช่นเดียวกัน โดยในปี ค.ศ. 2012 Taha และคณะได้ศึกษาผลของการใช้สารกระตุ้นที่ได้จากสิ่งมีชีวิต คือ สารสกัดจากเชื้อรา *Aspergillus niger* และสารกระตุ้นที่ไม่ใช่จากสิ่งมีชีวิตคือ Methyljasmonate ต่อการสะสมอินนูลินในเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันและติดตามการเจริญของเซลล์และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อินนูลิเนสพบว่า การเติมสารสกัดจากเชื้อรา *A. niger* 0.2% ร่วมกับการใช้ Methyljasmonate 150 ไมโครโมลาร์ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS (1962) ให้ค่าอัตราการเจริญของเซลล์และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อินนูลิเนสสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่นๆในการเพาะเลี้ยง (Taha *et al.* 2012a) และในปี ค.ศ. 2016 Ma และคณะได้ศึกษาผลของ elicitors ชนิดต่างๆ คือ Methyljasmonate, silver nitrate, salicylic acid, chitosan, *Trichoderma viride* และ yeast extract ต่อการสะสมของอินนูลินและการเปลี่ยนแปลงค่าการเกิดโพลิเมอร์ (degree of polymerization, DP) ของอินนูลินในเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันพบว่า Methyljasmonate 250 ไมโครโมลาร์ที่เสริมให้กับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเป็นเวลา 15 วันให้ปริมาณอินนูลินสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่นๆ และการให้ chitosan 40 มิลลิกรัมต่อลิตรและ yeast extract 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรและ silver nitrate 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรจะทำให้ได้อินนูลินที่มีค่า DP ต่ำลง (MA *et al*., 2016)

การศึกษาเกี่ยวกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) นับเป็นขั้นตอนสุดท้ายที่จะนำไปสู่การผลิตสารทุติยภูมิจากเซลล์พืชให้นำไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ได้ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเพราะปัญหาและอุปสรรคต่างๆ จะเกิดขึ้นเมื่อมีการขยายขนาด (scaling up) การผลิตที่ใหญ่ขึ้นจากเดิมที่มีการผลิตสารที่สนใจใน Erlenmeyer flasks สิ่งที่จะต้องพิจารณาก็คือการเจริญของเซลล์จะถูกปรับเปลี่ยนไปเป็นอย่างมากเมื่อเซลล์ถูกนำมาเลี้ยงในถังขนาดใหญ่ ซึ่งการผลิตชีวมวลเซลล์ (cell biomass) ให้ได้ปริมาณมากยังคงเป็นจุดสำคัญที่ต้องปรับแก้สำหรับการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ สาเหตุหลักๆของการเปลี่ยนแปลงนี้ก็เพราะข้อจำกัดในการถ่ายเทมวล (mass transfer) ของออกซิเจน อาหาร และความไม่เป็น homogenous ของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงทำให้เกิดการตกตะกอนและการตายของเซลล์ ซึ่งมีรายงานวิจัยที่ยืนยันว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์นั้นต่ำอยู่ที่ประมาณ 50% อีกข้อจำกัดหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์คือเซลล์พืชมีความไวต่อ shear stress ที่เป็นผลให้เกิด cell death เป็นอย่างมาก ซึ่งการแตก (lysis) ของเซลล์ที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลพวงจากการกวน (agitation) อาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งมีแนวโน้มที่จะไปเพิ่มขนาดของเซลล์เมื่อเซลล์แก่ขึ้น งานวิจัยหลายชิ้นได้กล่าวถึงการกวนในรูปแบบอื่นๆที่จะทำให้การ lysis ของเซลล์ต่ำลง เช่น การใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ air-lift หรือ bubble แทนการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบที่มีการใช้ใบพัดกวน (propeller helixes) ซึ่งจะทำให้ผลิตชีวมวลได้สูงขึ้นในระดับอุตสาหกรรมได้ หลังจากประสบความสำเร็จในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มชีวมวลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแล้ว การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชต้องเลือกกระบวนการที่เหมาะสมเพื่อให้เซลล์พืชมีการผลิตสารทุติยภูมิได้ดี โดยกระบวนการดั้งเดิมต่างๆที่ใช้กับเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำมาใช้กับการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชได้ เช่น การเพาะเลี้ยงแบบ batch, fed-batch (semi-continuous), perfusion และ continuous fermentations โดยพื้นฐานแล้วการออกแบบกระบวนผลิตจะถูกกำหนดโดย (1) ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสังเคราะห์สารทุติย

ภูมิ โดยถ้ามีการสร้างสารในช่วงท้ายของการเจริญเติบโตก็ต้องเลือกใช้กระบวนการผลิตแบบสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกจะเป็นการเพิ่มชีวมวลและขั้นตอนที่สองจะเป็นการเพิ่มการผลิตสาร แต่ถ้ามีการผลิตสารไปพร้อมๆกับการเจริญของเซลล์ (growth- associated) การผลิตแบบขั้นตอนเดียวก็เพียงพอแล้วสำหรับทั้งการเจริญของชีวมวลและการผลิตสารที่ต้องการในเวลาเดียวกัน (2) ความเป็นไปได้ที่สารทุติยภูมิจะหลั่งหรือไม่หลั่งออกมายังอาหารเพาะเลี้ยง ถ้าสารที่ผลิตขึ้นยังคงอยู่ภายในเซลล์ต้องนำมาสกัดเอาสารที่ต้องการออกมา ซึ่งอาจเลือกใช้การผลิตแบบ batch หรือ fed-batch ในทางตรงกันข้ามถ้าเซลล์มีการหลั่งสารออกนอกเซลล์ก็สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ต้องการออกจากอาหารเพาะเลี้ยงได้เลย ซึ่งจะสามารถใช้ระบบการผลิตแบบ continuous ได้ ถ้าสารที่ผลิตมีแนวโน้มที่จะอยู่ภายในเซลล์อาจใช้ปัจจัยในการกระต้นให้มีการหลั่งออกนอกเซลล์ได้ เช่น การใช้สารเคมีชนิดต่างๆ (detergents, oligosaccharides) แต่ต้องยังคงรักษาความมีชีวิตของเซลล์ไว้ ส่วนระบบการผลิตแบบ perfusion จะออกแบบมาเพื่อใช้กับเซลล์ที่ถูกกักไว้ (encapsulated cells) ที่จะช่วยปกป้องเซลล์จาก shear stress โดยในกลุ่มสารทิยภูมินับร้อยๆชนิดที่ผลิตโดยเซลล์พืชจะพบเพียงการตีพิมพ์เกี่ยวกับการใช้เซลล์พืชเพื่อผลิต indole alkaloids, tropane alkaloids และ taxanes ส่วนที่มีการผลิตเป็นการค้าและผลิตโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแล้วก็คือการผลิต shikonin และ ginseng (ผลิตในขนาด 20000- 25000 ลิตร) (อ้างถึงโดย Bourgaud *et al*.,2001) การผลิตสารที่มีมูลค่าจากเซลล์พืชด้วยขนาดการผลิตที่ใหญ่ขึ้นเริ่มได้รับความสนใจและศึกษากันมากขึ้น สำหรับการผลิตอินนูลินด้วยเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาหาแนวทางในการผลิตอินนูลินในขนาดการผลิตที่มากขึ้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่จะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาการผลิตอินนูลินจากเซลล์แก่นตะวันต่อไป

2. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การชักนำแคลลัสแก่นตะวัน (วิกานดา, 2554)

ชักนำแคลลัสตามวิธีการของวิกานดา (2554) โดยตัดลำต้นความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากต้นแก่นตะวันปลอดเชื้ออายุ 1 เดือนมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชชนิด Benzyladenine (BA) ร่วมกับ Naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร (มก./ล.) น้ำตาลซูโครส 30 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อวางบนชั้นในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 3,000 ลักส์จากหลอดไฟฟลูออเนสเซ็นต์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน เปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอย

2.1 การหากรดอะมิโนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการผลิตอินนูลิน

เสริมกรดอะมิโน 2 ชนิดที่มีรายงานการนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการเตรียมเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน (Ma *et al.,* 2016) ลงไปในอาหารพื้นฐานสูตร MS คือ กลูตามีน (0, 0.5, 1.0, 2.0 มก./ล.) หรือ โพรลีน (0, 0.5, 1.0, 2.0 มก./ล.) หรือ โพรลีนร่วมกับกลูตามีนในอัตราส่วนต่างๆ (0/0, 0/0.5, 0/1.0, 0/2.0, 0.5/0, 0.5/0.5, 0.5/1.0, 0.5/2.0, 1.0/0, 1.0/0.5, 1.0/1.0, 1.0/2.0, 2.0/0, 2.0/0.5, 2.0/1.0, 2.0/2.0 มก./ล.) เปรียบเทียบกับไกลซีน 2.0 มก./ล. (ใช้เป็นกรดอะมิโนอ้างอิงเพราะมีอยู่ในอาหารพื้นฐานสูตร MS) โดยนำแคลลัส 1 กรัม (ก.) ลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 1 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ไกลซีน 2.0 มก./ล. และเสริมกรดอะมิโนตามชนิดและปริมาณดังที่กล่าวข้างต้น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (มล.) นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำ treatment ละ 3 ซ้ำ (ขวด) จำนวน 2 ชุดการทดลอง และบันทึกลักษณะของเซลล์แขวนลอย (สี การกระจายตัวของเซลล์ ขนาดของเซลล์) น้ำหนักสดของชีวมวล น้ำหนักแห้งของชีวมวล สัดส่วนการเจริญ (growth ratio) ปริมาณอินนูลิน และน้ำตาลชนิดอื่นๆ pH ค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยง (EC)) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 21 วัน

2.2 การหาสารกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการผลิตอินนูลิน

เปรียบเทียบสารกระตุ้น 2 ชนิดคือ ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (LMwC: Sigma, St Loiuis, MO, US) (0, 20, 40, 60 มก./ล.) หรือ Methyl jasmonate (Mj: Sigma, St Loiuis, MO, US) (0, 0.1, 0.15, 0.2 มิลลิโมลาร์ (mM)) หรือ ไคโตซานร่วมกับ Methyl jasmonate (0/0, 0/0.1, 0/0.15, 0/0.2, 20/0, 20/0.1, 20/0.15, 20/0.2, 40/0, 40/0.1, 40/0.15, 40/020, 60/0, 60/0.1, 60/0.15, 60/0.2) โดยนำแคลลัส 1 ก. ลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 1 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ไกลซีน 2.0 มก./ล. และเสริมกรดอะมิโนตามชนิดและปริมาณที่ให้ผลดีที่สุดต่อการผลิตอินนูลินตามการทดลองก่อนหน้า ปริมาตร 20 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำ treatment ละ 5 ซ้ำ (ขวด) และเก็บผลการทดลอง

(ลักษณะของเซลล์แขวนลอย (สี การกระจายตัวของเซลล์ ขนาดของเซลล์) น้ำหนักสดของชีวมวล น้ำหนักแห้งของชีวมวล growth ratio ปริมาณอินนูลิน และน้ำตาลชนิดอื่นๆ) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 21 วัน

2.3 การหาขนาดของเซลล์ตั้งต้น (inoculum size) ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการผลิตอินนูลิน

เปรียบเทียบขนาดของเซลล์ตั้งต้นที่ 5, 10 และ 15% โดยชั่งแคลลัสให้ได้ตามขนาดเซลล์ตั้งต้นที่กำหนดลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 1 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ไกลซีน 2.0 มก./ล. และเสริมกรดอะมิโนตามชนิดและปริมาณที่ให้ผลดีที่สุดต่อการผลิตอินนูลินตามการทดลองก่อนหน้า ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำ treatment ละ 3 ซ้ำและเก็บผลการทดลอง (ลักษณะของเซลล์แขวนลอย (สี การกระจายตัวของเซลล์ ขนาดของเซลล์) น้ำหนักสดของชีวมวล น้ำหนักแห้งของชีวมวล growth ratio ปริมาณอินนูลิน) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 21 วัน

2.4 การหาความเร็วรอบในการเขย่าและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการผลิตอินนูลิน

ศึกษาตัวแปรของความเร็วรอบในการเขย่าและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไปพร้อมกัน โดยเปรียบเทียบความเร็วรอบในการเขย่าที่ 80, 100 และ 120 รอบต่อนาที และ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนาน 7, 14 และ 21 วัน โดยชั่งแคลลัสให้ได้ตามขนาดเซลล์ตั้งต้นที่ให้ผลดีที่สุดที่ได้จากการทดลองก่อนหน้าลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA 1 มก./ล. และ NAA 1 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. ไกลซีน 2.0 มก./ล. และเสริมกรดอะมิโนตามชนิดและปริมาณที่ให้ผลดีที่สุดต่อการผลิตอินนูลินตามการทดลองก่อนหน้า ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำ treatment ละ 3 ซ้ำและเก็บผลการทดลอง (ลักษณะของเซลล์แขวนลอย (สี การกระจายตัวของเซลล์ ขนาดของเซลล์) น้ำหนักสดของชีวมวล น้ำหนักแห้งของชีวมวล ปริมาณอินนูลิน) เมื่อเพาะเลี้ยงครบตามระยะเวลาที่กำหนด

3. การศึกษาการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร (B. Braun, Biotech, International, Germany) ประเภท turbine stirred tank ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอย โดยกำหนด working volume ไว้ที่ 1 ลิตร โดยนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในขวดเพาะเลี้ยงมาใช้ในการทดลอง

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำโดยเตรียมอาหารเหลวสูตร MSP1G1 ปริมาตร 1 ลิตรใส่ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพดังกล่าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้รอให้อาหารเย็น จากนั้นถ่ายเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันโดยเตรียมแบบ Packed cell volume ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมกับนำไปชั่งน้ำหนัก (กรัม) (กำหนดขนาดเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 10%) ก่อนถ่ายลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เตรียมไว้ก่อนหน้า ทำการเพาะเลี้ยงเป็น

เวลา 14 วัน ที่ความเร็วรอบ 120 และ 75 รอบต่อนาที โดยกำหนดให้มีการหยุดการกวนของใบกวน ทุก 11 ชั่วโมง (หยุดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง) ด้วย timer ขณะเดียวกันก็เปรียบเทียบกับการขยายขนาดการผลิตด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในฟลาสก์เขย่าที่มีอาหารเหลวสูตร MSP1G1 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วันเช่นเดียวกับการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วย หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน บันทึกลักษณะเซลล์แขวนลอยที่ได้ น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งและอัตราการเจริญของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

4. การวิเคราะห์น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของชีวมวลเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร มากรองผ่านตะแกรงกรอง ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับน้ำออกให้มากที่สุด นำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบที่ 65 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงแล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง และเซลล์แขวนลอยที่ผ่านการอบแห้งแล้วไปสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณอินนูลินต่อไป

5. การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลิน

5.1 การสกัดสารออกจากเซลล์เพาะเลี้ยง ทำโดยนำเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งไปสกัดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนัก: ปริมาตร) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 g เก็บส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

5.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณอินนูลินจะอาศัยการฉีด HPLC โดยนำสารมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปกรองด้วย nylon syringe filter ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วย Rezek 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 เทียบกับสารมาตรฐาน (อินนูลินจากหัวแก่นตะวัน)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินในเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันในระดับ flask scale สำหรับปัจจัยเรื่องชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนและชนิดและปริมาณของสารกระตุ้น ออกแบบการทดลองแบบ factorial ทุกตัวแปรที่ทดลองทำการทดลองซ้ำ 2 ชุด แสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

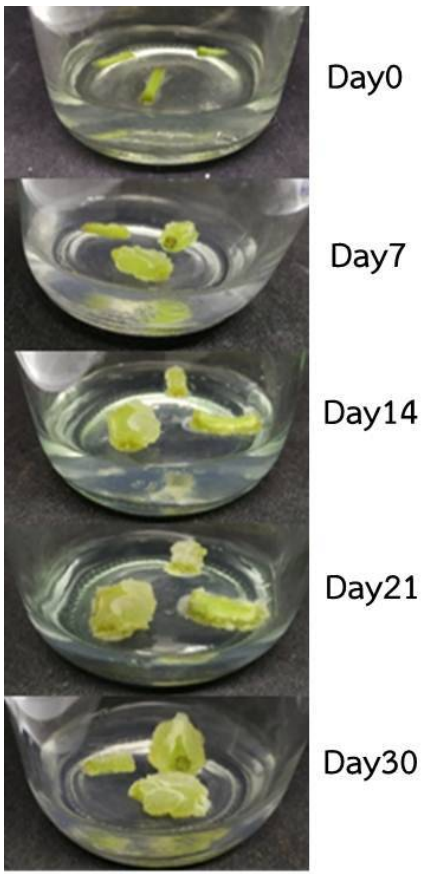
สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม ม.ศิลปากร อ.เมือง นครปฐม

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเตรียมแคลลัสแก่นตะวัน

จากการเหนี่ยวนำแคลลัสจากส่วนลำต้นของแก่นตะวันตามวิธีการของวิกานดา (2554) โดยใช้สูตรอาหาร MS (1962) ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 1 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. และ gelrite 2 ก./ล. pH 5.6 แล้วเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ชิ้นพืชมีการตอบสนองต่ออาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไป โดยส่วนของลำต้นมีการบวมขึ้นและเริ่มเกิดแคลลัสที่มีสีเขียวอ่อนอมเหลือง โดยปริมาณแคลลัสเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงดังแสดงในภาพที่ 2 แคลลัสอายุ 30 วันที่ชักนำได้จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับเตรียมเซลล์แขวนลอย และเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสและเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ทุกๆ 30 วัน



ภาพที่ 2 การเหนี่ยวนำแคลลัสจากส่วนลำต้นของแก่นตะวันบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ NAA 1 มก./ล.

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอย

3.2.1 การศึกษาหาชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอย

เนื่องจากการเติมกรดอะมิโนลงในอาหารจะมีผลไปส่งเสริมการเจริญเติบโตและไปสนับสนุนการพัฒนาทางสัณฐานของเซลล์พืช ดังนั้นจึงได้ทดลองหาชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเสริมนอกเหนือจากแหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่ในสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณชีวมวลของเซลล์แขวนลอยและการผลิตอินนูลิน ซึ่งจากการศึกษาการเสริมกรดอะมิโน 2 ชนิดคือ กลูตามีน หรือ โพรลีน หรือ โพรลีนร่วมกับกลูตามีนในอัตราส่วนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน (แคลลัส 1 ก. ต่ออาหารเหลว 20 มล.) ซึ่งเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที มีการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน แล้วบันทึกลักษณะทางกายภาพของเซลล์แขวนลอย สี และการกระจายตัวของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารเหลว พบว่าเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารทุกสูตรมีสีเหลืองอ่อน เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์แขวนลอยมีขนาดใหญ่ขึ้นและยังมีการเกาะตัวกันแบบแน่น (compact) ทำให้ไม่มีการเจริญในลักษณะการกระจายของเซลล์ในอาหาร โดยลักษณะการจับตัวกันแบบแน่นหรือหลวมของแคลลัสนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง สูตรอาหารที่ใช้ และปัจจัยในเรื่องของชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้

ตารางที่ 3 สูตรอาหารสำหรับหาชนิดและความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแก่นตะวันแบบเซลล์แขวนลอยเพื่อผลิตอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ		
	สูตรอาหารพื้นฐาน	โพรลีน (มก./ล.)	กลูตามีน (มก./ล.)
MS	MS	-	-
MSG0.5	MS	-	0.5
MSG1	MS	-	1.0
MSG2	MS	-	2.0
MSP0.5	MS	0.5	-
MSP1	MS	1.0	-
MSP2	MS	2.0	-
MSP0.5G0.5	MS	0.5	0.5
MSP0.5G1	MS	0.5	1.0
MSP0.5G2	MS	0.5	2.0
MSP1G0.5	MS	1.0	0.5
MSP1G1	MS	1.0	1.0
MSP1G2	MS	1.0	2.0
MSP2G0.5	MS	2.0	0.5
MSP2G1	MS	2.0	1.0
MSP2G2	MS	2.0	2.0
Sucrose 30 ก./ล. pH 5.6			

และจากการวิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน โดยพิจารณาจากน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของชีวมวลของ 2 ชุดการทดลองได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 Growth ratio ของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกรดอะมิโนกลูตามีน หรือ โพรลีน หรือ โพรลีนร่วมกับกลูตามีนความเข้มข้นต่างๆ นาน 21 วัน ของ 2 ชุดการทดลอง

สูตรอาหาร	อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย			
	Growth ratio (กรัม/กรัมน้ำหนักสด)*		Growth ratio (กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)*	
	การทดลองชุดที่ 1	การทดลองชุดที่ 2	การทดลองชุดที่ 1	การทดลองชุดที่ 2
MS	1.275 ± 0.155^{bc}	1.227 ± 0.100^{ab}	5.018 ± 0.833^{c}	2.100 ± 0.230^{b}
MSG0.5	1.752 ± 0.086^{ab}	1.383 ± 0.166^{ab}	9.999 ± 1.558^{ab}	2.786 ± 0.851^{ab}
MSG1	1.621 ± 0.059^{abc}	1.355 ± 0.205^{ab}	8.737 ± 0.400^{abc}	2.783 ± 0.862^{ab}
MSG2	1.497 ± 0.229^{abc}	1.376 ± 0.134^{ab}	6.692 ± 1.879^{bc}	3.081 ± 0.877^{ab}
MSP0.5	1.634 ± 0.333^{abc}	1.453 ± 0.289^{ab}	8.821 ± 2.247^{abc}	3.303 ± 0.891^{ab}
MSP1	1.704 ± 0.363^{abc}	1.349 ± 0.124^{ab}	8.681 ± 3.567^{abc}	3.003 ± 0.118^{ab}
MSP2	1.665 ± 0.386^{abc}	1.264 ± 0.073^{ab}	8.204 ± 1.475^{abc}	3.294 ± 0.507^{ab}
MSP0.5G0.5	1.646 ± 0.485^{abc}	1.158 ± 0.066^{b}	7.870 ± 3.068^{abc}	2.221 ± 0.060^{b}
MSP0.5G1	1.815 ± 0.541^{ab}	1.564 ± 0.553^{ab}	8.207 ± 3.728^{abc}	3.852 ± 1.870^{ab}
MSP0.5G2	1.478 ± 0.245^{abc}	1.685 ± 0.347^{ab}	7.988 ± 0.939^{abc}	4.452 ± 1.344^{a}
MSP1G0.5	1.780 ± 0.419^{ab}	1.653 ± 0.400^{ab}	9.058 ± 3.769^{abc}	4.371 ± 1.274^{a}
MSP1G1	1.979 ± 0.200^{a}	1.697 ± 0.515^{a}	10.592 ± 1.151^{ab}	4.675 ± 1.954^{a}
MSP1G2	2.025 ± 0.450^{a}	1.725 ± 0.194^{a}	12.679 ± 4.057^{a}	4.398 ± 0.546^{a}
MSP2G0.5	1.622 ± 0.257^{abc}	1.327 ± 0.043^{ab}	8.356 ± 1.773^{abc}	3.183 ± 0.311^{ab}
MSP2G1	1.598 ± 0.443^{abc}	1.268 ± 0.050^{ab}	9.094 ± 3.484^{abc}	3.063 ± 0.405^{ab}
MSP2G2	1.077 ± 0.035^{c}	1.487 ± 0.208^{ab}	4.984 ± 2.758^{c}	3.875 ± 1.153^{ab}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยจาก growth ratio ที่แสดงในตารางที่ 4 พบว่า การเสริมกลูตามีน และ/หรือ โพรลีนเพิ่มลงไปในอาหารสำหรับเหนี่ยวนำแคลลัสสูตร MS ทำให้ชีวมวลของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชีวมวลของเซลล์แขวนลอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหนี่ยวนำแคลลัสควบคุม (control) ที่มีเฉพาะกรดอะมิโนไกลซีน 2 มก./ล. ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ชนิดของกรดอะมิโนที่เสริมเพิ่มเข้าไปในอาหารนอกเหนือจากไกลซีนมีผลต่อการเพิ่มปริมาณชีวมวล ซึ่งผลการทดลองจากทั้งสองชุดมีแสดงแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน แม้จะให้ค่าการเพิ่มขึ้นของชีวมวลที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแปรปรวนของแคลลัสที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง โดยแคลลัสที่นำมาใช้ในการทดลองชุดที่ 2 จะผ่านการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ (subculture) จำนวนหลายครั้ง

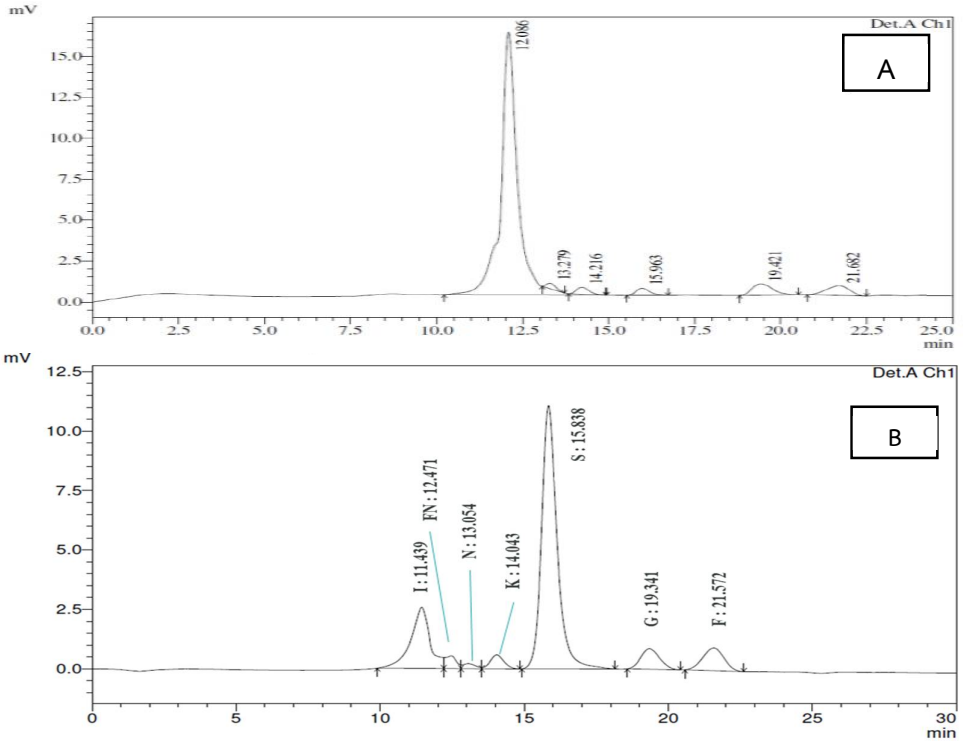
จึงทำให้อัตราการเพิ่มขึ้นของชีวมวลลดลง ดังนั้นการเพิ่มปริมาณชีวมวลควรพิจารณาในประเด็นการใช้แคลลัสที่ผ่านการ subculture บ่อยครั้งร่วมด้วย

เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ของ growth ratio จากน้ำหนักแห้งของชีวมวลของการทดลองชุดที่ 1 ซึ่งโดยภาพรวมแล้วให้ค่า growth ratio สูงกว่าการทดลองชุดที่ 2 ประมาณ 1.3-3.6 เท่า พบว่าการเติมกรดอะมิโนโพรลีน 1 มก./ล. และ กลูตามีน 1 มก./ล. (MSP1G1) ให้ค่า growth ratio สูงที่สุด (12.679) และมีค่ามากกว่าอาหารชุดควบคุม (MS) (5.018) และอาหารที่เติมกรดอะมิโนโพรลีน 2 มก./ล. และ กลูตามีน 2 มก./ล. (MSP2G2) (4.984) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Ma *et al* (2016) ที่พบว่าการเสริมกรดอะมิโนโพรลีนและกลูตามีนมีผลในการส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของชีวมวลเซลล์แขวนลอยของ Jerusalem artichoke (*H. tuberosus* L.) หรือ แก่นตะวัน โดยในงานวิจัยของ Ma *et al* พบว่า เซลล์แขวนลอยที่ได้จากแคลลัส Jerusalem artichoke (เหนี่ยวนำจากส่วนลำต้นของต้นกล้าอายุ 3 เดือน) ให้ชีวมวลสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมกรดอะมิโนโพรลีน 0.5 มก./ล. และ กลูตามีน 1 มก./ล. โดยความเข้มข้นที่ใช้อาจแตกต่างไปจากผลที่ได้ในงานวิจัยนี้

ทั้งนี้ก็อาจเป็นเพราะการใช้สายพันธุ์พืชที่แตกต่างกัน และสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันนั่นเอง โดย Ma *et at* (2016) จะเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการให้แสงสว่างในขณะที่การทดลองนี้ใช้สภาวะที่มีการให้แสงสว่าง เป็นต้น อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ยังได้ทดลองเติมกรดอะมิโนโพรลีนหรือกลูตามีนแบบเดี่ยวลงในอาหารเพาะเลี้ยงด้วย พบว่าการเสริมกลูตามีนหรือโพรลีนอย่างใดอย่างหนึ่งที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มก./ล. ให้ค่า growth ratio ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุม ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าโพรลีนและกลูตามีนมีการเสริมฤทธิ์กันเพื่อเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอย โดยโพรลีนและกลูตามีนเป็นแหล่งไนโตรเจนรูปอินทรีย์ที่เสริมเพิ่มลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงนอกเหนือจากไนโตรเจนที่ได้จากสารประกอบอนินทรีย์รูปเกลือไนเตรท (NO_3^-) หรือแอมโมเนียม (NH_4^+) ที่มีอยู่ในสูตรอาหารพื้นฐานสูตร MS และแม้ว่าตามปกติแล้วเซลล์พืชที่นำมาเพาะเลี้ยงจะสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นได้ แต่การเติมโพรลีนและกลูตามีนลงในอาหารเพาะเลี้ยงอาจทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้มากขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่พืชนำไปใช้ได้ทันที ทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น โพรลีนและกลูตามีนเป็นกรดอะมิโนที่ไม่เป็นพิษ จึงสามารถชักนำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้เป็นระยะเวลานานขึ้น (Pawar et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชเพื่อเพิ่มอัตราการชักนำแคลลัส การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย รวมทั้งการพัฒนาเป็นต้นในพืชชนิดต่างๆ เช่น Jerusalem artichoke (Ma et al., 2016) ข้าว (Amer et al., 2017; Pawar et al., 2015) ข้าวสาลี (Duran et al., 2013) อ้อย (Asad et al., 2009) อินทผาลัม (Ageel and Elmeer, 2011) และถั่วเหลือง (Gamborg, 1970) เป็นต้น

3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกรดอะมิโนกลูตามีน และ/หรือ โพรลีน

จากการวิเคราะห์การผลิตอินนูลิน ฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ และน้ำตาลต่างๆ ในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่เติมกรดอะมิโนกลูตามีน หรือ โพรลีน หรือ โพรลีนร่วมกับกลูตามีนในอัตราส่วนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 เป็นเวลา 21 วัน ด้วย HPLC โดยการเปรียบเทียบค่า retention time (RT) และพื้นที่ใต้พีคของแต่ละองค์ประกอบในสารสกัดเซลล์กับสารมาตรฐานดังแสดงในตัวอย่าง HPLC chromatogram ดังภาพที่ 3 พบพีคทั้งหมด 7 พีคที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ในช่วงเวลาต่างๆ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า สารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์อันดับแรกคือ อินนูลินที่มี degree of polymerization (DP) มากกว่า 5 ซึ่งมีค่า RT ประมาณ 11.4-11.6 นาที ตามมาด้วยฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ที่มี DP ต่างๆ คือ fructofuranosylnystose (DP5) มีค่า RT ประมาณ 12.4-12.5 นาที nystose (DP4) มีค่า RT ประมาณ 13.4-13.6 นาที และ 1-kestose (DP3) มีค่า RT ประมาณ 14.0-14.1 นาที ถัดมาคือ ซูโครสมีค่า RT ประมาณ 15.8-15.9 นาที กลูโคสมีค่า RT ประมาณ 19.3-19.4 นาที และฟรักโทสมีค่า RT ประมาณ 21.5-21.6 นาที



ภาพที่ 3 ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากหัวแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ (A) (นลินี, 2557) และ ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MSG0.5 (B)

I : inulin, FN : fructofuranosylnystose, N : nystose, K : 1-kestose, S : sucrose, G : glucose, F : fructose

ภาพ 3A เป็นภาพแสดงตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากหัวแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติจะปรากฏเพียง 1 พีคนั่นก็คือ อินนูลิน ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่สะสมปริมาณมากในส่วนหัวและภาพ 3B เป็นสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันเมื่อเริ่มต้นเพาะเลี้ยงจะปรากฏพีคต่างๆ ทั้งหมด 7 พีค ซึ่งเห็นได้ว่า เซลล์แขวนลอยมีการสะสมน้ำตาลชนิดอื่น นอกเหนือไปจากอินนูลินที่พบมากในส่วนหัวแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติด้วย เมื่อพิจารณาค่า RT ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยกับสารมาตรฐานก็พบว่าในเซลล์แขวนลอยมีการผลิตอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (nystose และ 1-kestose) ซึ่งเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) ที่สนใจผลิตเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปของงานวิจัยนี้

และจากการวิเคราะห์การผลิตอินนูลิน ฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันเป็นเวลา 21 วัน ด้วย HPLC ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งจะเห็นว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ มีการสะสมอินนูลินและซูโครสเป็นน้ำตาลหลัก โดยการเสริมกรดอะมิโนกลูตามีน และ/หรือ โพรลีนลงไปในอาหารส่งผลให้มีการสะสมอินนูลินทั้งในแบบเพิ่มขึ้นและลดลง

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของอินนูลิน ฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ และน้ำตาลชนิดอื่นๆ ของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ นาน 21 วัน

วันที่เพาะเลี้ยง	สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล (mg/g dry weight)*					
		อินนูลิน	ฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์		ซูโครส	กลูโคส	ฟรักโทส
			nystose	1-kestose			
0		17.048 ± 5.770	0.805 ± 0.692	2.121 ± 1.350	16.068 ± 7.878	4.711 ± 1.859	5.933 ± 2.103
21	MS	11.259 ± 2.302	1.193 ± 0.089	3.409 ± 0.000	29.775 ± 29.409	4.688 ± 2.259	7.547 ± 1.881
	MSG0.5	17.475 ± 2.326	0.820 ± 0.170	0.705 ± 0.543	31.022 ± 16.265	4.241 ± 0.860	5.781 ± 2.039
	MSG1	16.211 ± 1.451	2.121 ± 1.149	1.396 ± 1.705	36.750 ± 9.621	4.317 ± 0.871	5.806 ± 0.730
	MSG2	17.679 ± 5.198	1.232 ± 0.182	0.694 ± 0.633	11.292 ± 10.336	6.912 ± 1.791	8.574 ± 2.761
	MSP0.5	15.664 ± 3.953	1.127 ± 0.183	0.311 ± 0.149	11.596 ± 8.477	7.165 ± 5.175	8.746 ± 6.119
	MSP1	19.573 ± 6.219	0.897 ± 0.238	0.752 ± 0.484	18.707 ± 7.406	7.051 ± 2.983	7.466 ± 1.249
	MSP2	20.723 ± 3.835	-	3.476 ± 0.872	31.816 ± 22.599	1.802 ± 0.386	4.918 ± 0.162
	MSP0.5G0.5	17.215 ± 2.352	1.168 ± 0.091	2.183 ± 0.000	28.231 ± 24.287	5.432 ± 0.368	6.166 ± 2.664
	MSP0.5G1	17.647 ± 5.342	1.800 ± 1.234	4.226 ± 0.000	34.468 ± 24.516	5.065 ± 2.672	6.335 ± 3.287
	MSP0.5G2	17.907 ± 6.586	4.254 ± 2.760	4.365 ± 0.000	21.630 ± 14.843	2.963 ± 1.173	5.435 ± 0.489
	MSP1G0.5	18.666 ± 6.271	2.352 ± 0.328	0.807 ± 0.000	20.745 ± 12.482	3.226 ± 0.713	5.510 ± 0.938
	MSP1G1	20.088 ± 3.612	1.764 ± 1.910	2.047 ± 1.220	49.792 ± 6.163	2.862 ± 0.515	5.520 ± 1.243
	MSP1G2	11.151 ± 4.849	2.117 ± 1.055	1.937 ± 1.371	35.254 ± 10.968	3.036 ± 1.141	4.423 ± 1.960
	MSP2G0.5	11.960 ± 2.412	2.339 ± 0.849	-	15.726 ± 15.083	5.594 ± 7.262	8.647 ± 7.662
	MSP2G1	16.129 ± 4.002	2.173 ± 1.209	1.386 ± 0.000	22.225 ± 19.011	4.152 ± 1.298	5.376 ± 4.790
	MSP2G2	16.947 ± 11.036	-	-	-	18.864 ± 0.00	23.431 ± 0.00

*หมายถึง ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นและปริมาณการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยง 21 วัน

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นอินนูลิน* (mg/g dry weight)		ปริมาณการผลิตอินนูลิน* (g/bottle)	
	การทดลองชุดที่ 1	การทดลองชุดที่ 2	การทดลองชุดที่ 1	การทดลองชุดที่ 2
MS	19.983 ± 2.102^{a}	28.960 ± 3.957^{a}	11.259 ± 2.302^{bc}	14.903 ± 0.482^{abc}
MSG0.5	15.880 ± 3.548^{ab}	24.604 ± 3.259^{abc}	17.475 ± 2.326^{abc}	16.745 ± 4.863^{abc}
MSG1	16.211 ± 1.451^{ab}	25.415 ± 9.111^{ab}	15.836 ± 1.070^{abc}	16.233 ± 2.230^{abc}
MSG2	17.679 ± 5.198^{ab}	18.207 ± 4.986^{bcde}	13.648 ± 7.085^{bc}	13.168 ± 0.899^{abc}
MSP0.5	15.664 ± 3.953^{ab}	17.199 ± 3.296^{bcde}	16.115 ± 7.682^{abc}	13.630 ± 1.676^{abc}
MSP1	19.573 ± 6.219^{ab}	12.922 ± 0.654^{e}	17.464 ± 3.187^{abc}	9.600 ± 0.496^{c}
MSP2	20.723 ± 3.835^{a}	19.089 ± 7.045^{bcde}	19.252 ± 6.358^{ab}	14.988 ± 3.948^{abc}
MSP0.5G0.5	17.215 ± 2.352^{ab}	24.175 ± 0.893^{abcd}	15.011 ± 5.039^{abc}	13.294 ± 0.706^{abc}
MSP0.5G1	17.647 ± 5.342^{ab}	14.354 ± 4.320^{de}	14.734 ± 3.743^{abc}	12.967 ± 1.976^{abc}
MSP0.5G2	17.907 ± 6.586^{ab}	10.180 ± 3.062^{e}	16.327 ± 6.944^{abc}	11.896 ± 6.336^{abc}
MSP1G0.5	18.666 ± 6.271^{ab}	10.695 ± 5.241^{e}	17.271 ± 2.322^{abc}	11.346 ± 6.163^{abc}
MSP1G1	20.088 ± 3.612^{a}	17.904 ± 7.917^{bcde}	24.131 ± 7.088^{a}	18.496 ± 2.514^{a}
MSP1G2	11.151 ± 4.849^{c}	15.532 ± 4.226^{cde}	14.440 ± 2.134^{bc}	17.258 ± 6.816^{ab}
MSP2G0.5	11.960 ± 2.412^{c}	13.208 ± 2.661^{e}	11.511 ± 4.750^{bc}	10.502 ± 2.994^{abc}
MSP2G1	16.129 ± 4.002^{ab}	12.250 ± 0.944^{e}	15.156 ± 2.845^{abc}	9.281 ± 1.423^{c}
MSP2G2	16.945 ± 11.036^{ac}	11.054 ± 8.102^{e}	9.451 ± 5.982^{c}	9.869 ± 5.784^{bc}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 6 แสดงความเข้มข้นอินนูลินในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ พบว่า ในการทดลองชุดที่ 1 อาหารสูตร MSP2 มีความเข้มข้นอินนูลินสูงที่สุด รองลงมาคือสูตร MSP1G1 โดยมีค่าเท่ากับ 20.723±3.835 และ 20.088±3.612 มก./กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และเมื่อนำความเข้มข้นอินนูลินมาคำนวณหาปริมาณอินนูลินที่ผลิตได้ทั้งหมด (ต่อขวดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหาร 20 มล.) พบว่า ในอาหารสูตร MSP1G1 มีปริมาณการผลิตอินนูลินสูงที่สุด รองลงมาคือสูตร MSP2 โดยมีค่าเท่ากับ 24.131±7.088 และ 19.252±6.358 กรัม/ขวด ตามลำดับ เช่นเดียวกับในการทดลองชุดที่ 2 พบว่าในอาหารสูตร MSP1G1 มีปริมาณการผลิตอินนูลินสูงที่สุด รองลงมาคือสูตร MSP1G2 โดยมีค่าเท่ากับ 18.496±2.514 และ 17.258±6.816 กรัม/ขวด ตามลำดับ แต่จากผลการทดลองทั้ง 2 ชุดพบว่าการเสริมกรดอะมิโนโพรลีน 2 มก./ล. และ กลูตามีน 2 มก./ล. ส่งผลให้มีปริมาณการผลิตอินนูลินต่ำ ดังนั้นการเสริมกรดอะมิโนที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจมีผลไปยับยั้งการผลิตอินนูลินได้ โดยในการทดลองทั้ง 2 ชุดให้ผลการทดลองไปในแนวทางเดียวกัน ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากปริมาณการผลิตอินนูลินแสดงว่า อาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่มีการเติมกรดอะมิโนกลูตามีน 1 มก./ล. และ โพรลีน 1 มก./ล ส่งผลต่อปริมาณการผลิตอินนูลินในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันมากที่สุด ซึ่งการใช้กลูตามีนร่วมกับโพรลีนที่ส่งเสริมการเจริญและการผลิตสารที่สนใจด้วยเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในการทดลองนี้นั้น ให้ผลที่สอดคล้องกับที่มีรายงานไว้โดย

Ma *et at* (2016) แต่จะแตกต่างกันที่ปริมาณกรดอะมิโนที่เสริมลงไปในอาหาร โดย Ma *et at* (2016) มีการเสริมกรดอะมิโนโพรลีน 0.5 มก./ล. และ กลูตามีน 1 มก./ล. ให้ผลผลิตอินนูลินสูงที่สุดเท่ากับ 1.217 กรัม/ล. ในขณะที่งานวิจัยนี้จะใช้กลูตามีน 1 มก./ล. และ โพรลีน 1 มก./ล โดยการที่ความเข้มข้นของกรดอะมิโนดังกล่าวมีความแตกต่างไปจากผลที่ได้ในงานวิจัยนี้ อาจเป็นเพราะสายพันธุ์พืชที่แตกต่างกัน สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง รวมถึงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน โดยในรายงานวิจัยของ Ma *et at* (2016) จะทำการเพาะเลี้ยงแก่นตะวันในสภาวะที่ไม่มีแสง และใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเพียง 18 วัน ในขณะที่การทดลองนี้ใช้สภาวะที่มีการให้แสง และ ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 21 วัน เป็นต้น ดังนั้นจะนำสูตรอาหาร MSP1G1 ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของสารกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการผลิตอินนูลินในการทดลองต่อไป

3.2.3 การหาสารกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการผลิตอินนูลิน

ในการศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการเจริญและผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันได้เปรียบเทียบสารกระตุ้น 2 ชนิดคือ ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (LMwC 0, 20, 40 และ 60 มก./ล.) และ/หรือ Methyl jasmonate (Mj 0, 0.1, 0.15 และ 0.2 mM) ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยนำเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวัน 1 ก. ไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติม BA 1 มก./ล. NAA 1 มก./ล. โพรลีน 1 มก./ล. และกลูตามีน 1 มก./ล. (MSP1G1) ปริมาตร 20 มล. นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นเก็บผลการทดลอง โดยบันทึกข้อมูลต่างๆ เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้า พบว่าเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม LMwC และ Mj เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งมีสีเหลืองอ่อน ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม LMwC ร่วมกับ Mj เซลล์แขวนลอยที่ได้มีสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้มปานกลาง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้นเซลล์แขวนลอยมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยเซลล์ที่ได้มีการเกาะตัวแบบหลวมๆ (friable callus) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่ชักนำจากส่วนข้อที่รายงานไว้โดย Ma *et al* (2016)

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญจากน้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารทดสอบสูตรต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าเซลล์แขวนลอยในอาหารเพาะเลี้ยงเกือบทุกสูตรมีค่าน้ำหนักสดและอัตราการเจริญที่เพิ่มขึ้นจากน้ำหนักเริ่มต้น ยกเว้นในอาหารสูตร MSP1G1LMwC60Mj0.1 และ MSP1G1LMwC60Mj0.2 ที่มีการเติมไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำปริมาณ 60 มก./ล. ร่วมกับ Methyl jasmonate 0.1 และ 0.2 mM ตามลำดับ ที่พบว่าน้ำหนักสดมีค่าลดลงเล็กน้อยหรือไม่มีการเจริญของเซลล์ สำหรับข้อมูลผลของการเสริมไคโตซานร่วมกับ Methyl jasmonate ต่ออัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันนั้นยังไม่ปรากฏในรายงานการวิจัยอื่น แม้ในรายงานการวิจัยของ Ma *et al* (2016) ก็ได้รายงานไว้เฉพาะในส่วนของการใช้ไคโตซาน หรือ Methyl jasmonate เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งต่อการสะสมอินนูลินในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันเท่านั้น และเมื่อนำน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งไปคำนวณอัตรา

การเจริญดังแสดงในตารางที่ 8 และ 9 พบว่าเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมไคโตซาน หรือ Methyl jasmonate เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นต่ำ ให้อัตราการเจริญสูงกว่าการเสริมสารกระตุ้นทั้งสองชนิดดังกล่าวในความเข้มข้นที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยในกรณีการเสริมสารกระตุ้นไคโตซานเพียงอย่างเดียวนั้นพบว่า การเสริมไคโตซาน 20 มก./ล. (MSP1G1LMwC20) ให้อัตราการเจริญสูงสุด ตามด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 40 (MSP1G1LMwC40) และ 60 มก./ล. (MSP1G1LMwC60) ตามลำดับ ส่วนเติมสารกระตุ้น Methyl jasmonate ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงนั้นก็พบเช่นเดียวกันว่า Methyl jasmonate ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.1 (MSP1G1Mj0.1) และ 0.15 mM (MSP1G1Mj0.15) ให้อัตราการเจริญของน้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอยที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร MSP1G1Mj0.2 ที่มีการเติม Methyl jasmonate 0.2 mM อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Taha *et al* (2012) ที่กล่าวว่า เซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เตรียมได้จากแคลลัสที่ชักนำจากใบเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. BA 1 มก./ล. และ Methyl jasmonate 0.1 และ 0.15 mM มีการเจริญที่สูงกว่าการเสริมด้วย Methyl jasmonate 0.2 mM

ตารางที่ 7 สูตรอาหารสำหรับหาสารกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ		
	สูตรอาหารพื้นฐาน	ไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (มก./ล.)	Methyl jasmonate (mM)
MSP1G1	MSP1G1	-	-
MSP1G1LMwC20	MSP1G1	20	-
MSP1G1LMwC40	MSP1G1	40	-
MSP1G1LMwC60	MSP1G1	60	-
MSP1G1Mj0.1	MSP1G1	-	0.1
MSP1G1Mj0.15	MSP1G1	-	0.15
MSP1G1Mj0.2	MSP1G1	-	0.2
MSP1G1LMwC20Mj0.1	MSP1G1	20	0.1
MSP1G1LMwC20Mj0.15	MSP1G1	20	0.15
MSP1G1LMwC20Mj0.2	MSP1G1	20	0.2
MSP1G1LMwC40Mj0.1	MSP1G1	40	0.1
MSP1G1LMwC40Mj0.15	MSP1G1	40	0.15
MSP1G1LMwC40Mj0.2	MSP1G1	40	0.2
MSP1G1LMwC60Mj0.1	MSP1G1	60	0.1
MSP1G1LMwC60Mj0.15	MSP1G1	60	0.15
MSP1G1LMwC60Mj0.2	MSP1G1	60	0.2

ตารางที่ 8 น้ำหนักสดเริ่มต้น น้ำหนักสด และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MSP1G1 ที่เสริมสารกระตุ้น เป็นเวลา 21 วัน

สูตรอาหาร	น้ำหนักสดเริ่มต้น (กรัม)*	น้ำหนักสดหลังเพาะเลี้ยง (กรัม/ขวด)*	อัตราการเจริญ (Growth ratio)*
MSP1G1	1.0378 ± 0.0331^{a}	4.0057 ± 0.2343^{a}	2.8678 ± 0.3335^{a}
MSP1G1LMwC20	1.0419 ± 0.0197^{a}	1.8823 ± 0.3188^{c}	0.8094 ± 0.3246^{c}
MSP1G1LMwC40	1.0385 ± 0.0200^{a}	1.5089 ± 0.0304^{ef}	0.4531 ± 0.0209^{de}
MSP1G1LMwC60	1.0385 ± 0.0240^{a}	1.2502 ± 0.0811^{fgh}	0.2051 ± 0.0955^{efg}
MSP1G1Mj0.1	1.0338 ± 0.0208^{a}	2.2410 ± 0.2371^{b}	1.1715 ± 0.2689^{b}
MSP1G1Mj0.15	1.0445 ± 0.0120^{a}	2.4916 ± 0.2665^{b}	1.3869 ± 0.2682^{b}
MSP1G1Mj0.2	1.0339 ± 0.0210^{a}	1.8274 ± 0.5333^{cd}	0.7610 ± 0.4865^{c}
MSP1G1LMwC20Mj0.1	1.0332 ± 0.0144^{a}	1.5932 ± 0.0691^{de}	0.5428 ± 0.0826^{cd}
MSP1G1LMwC20Mj0.15	1.0372 ± 0.0200^{a}	1.3662 ± 0.2668^{efg}	0.3166 ± 0.2488^{def}
MSP1G1LMwC20Mj0.2	1.0317 ± 0.0167^{a}	1.1614 ± 0.0364^{gh}	0.1260 ± 0.0418^{fg}
MSP1G1LMwC40Mj0.1	1.0430 ± 0.0084^{a}	1.0625 ± 0.1525^{gh}	0.0180 ± 0.1390^{fg}
MSP1G1LMwC40Mj0.15	1.0311 ± 0.0072^{a}	1.1750 ± 0.1028^{gh}	0.1392 ± 0.0945^{fg}
MSP1G1LMwC40Mj0.2	1.0225 ± 0.0216^{a}	1.0697 ± 0.0598^{gh}	0.0474 ± 0.0774^{fg}
MSP1G1LMwC60Mj0.1	1.0387 ± 0.0127^{a}	0.9762 ± 0.0687^{h}	-0.0605 ± 0.0584^{g}
MSP1G1LMwC60Mj0.15	1.0383 ± 0.0274^{a}	1.1458 ± 0.1368^{gh}	0.1038 ± 0.1297^{fg}
MSP1G1LMwC60Mj0.2	1.0269 ± 0.0156^{a}	0.9487 ± 0.0131^{h}	-0.0760 ± 0.0150^{g}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ยจาก 5 ขวด ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ในขณะที่การใช้ไคโตซานร่วมกับ Methyl jasmonate พบว่า เซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่ได้มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นลดลง ส่งผลให้มีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าการเติมสารกระตุ้นเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเสริมไคโตซาน 60 มก./ล. ร่วมกับ Methyl jasmonate ความเข้มข้นต่างๆ ให้ผลในเชิงลบต่ออัตราการเจริญของเซลล์มากกว่าอาหารสูตรอื่นๆ เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าไคโตซานและ Methyl jasmonate เป็นหนึ่งในสารกระตุ้น (elicitor) ที่มีการนำมาประยุกต์ใช้กระตุ้นการเจริญและการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชหลายชนิด โดย Taha *et al* (2012) ได้เสริมสารสกัดจากเชื้อรา *Aspergillus niger* และ Methyl jasmonate เพื่อเพิ่มการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน และ Ma *et al* (2016) ก็ได้ใช้สารกระตุ้น 6 ชนิดคือ Methyl jasmonate, Salicylic acid, Chitosan, Yeast extract, *Trichodera viride* และ $AgNO_3$ เพื่อเพิ่มการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยทั้งสองชิ้นดังกล่าวนั้นไม่ได้ศึกษาในแง่ของการนำไคโตซานและ Methyl

jasmonate มาใช้ร่วมกัน สารกระตุ้นเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันตนเอง (defense) หรือสร้างขึ้นมาเมื่ออยู่ภายใต้ภาวะเครียด (stress) เป็นได้ทั้งสารประกอบที่อาจมาจากเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในพืชและสารประกอบที่ปลดปล่อยออกมาจากพืชเมื่อมีเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ สารกระตุ้นทางชีวภาพ (biotic elicitor) กับที่ไม่ได้มาจากสิ่งมีชีวิต (abiotic elicitor) (Taha *et al*, 2012) จากผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า การเติมสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นสูงร่วมกัน อาจทำให้พืชเกิดภาวะเครียดและส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของพืชลดลง เพราะเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมสารกระตุ้นไคโตซาน และ/หรือ Methyl jasmonate กับอาหารสูตรควบคุม (MSP1G1) ที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นดังกล่าว พบว่าอาหารสูตรควบคุม MSP1G1 ให้เซลล์แขวนลอยที่มีอัตราการเจริญของน้ำหนักสด (2.8678 ± 0.3335) และอัตราการเจริญของน้ำหนักแห้ง (14.6720 ± 3.4508) สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสูงกว่าสูตรอาหารที่มีการเติมสารกระตุ้น ถัดมาคือ อาหารสูตร MSP1LMwG1Mj0.15 (ตารางที่ 8 และ 9)

ตารางที่ 9 น้ำหนักแห้งเริ่มต้น น้ำหนักแห้ง และ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MSP1G1 ที่เสริมสารกระตุ้นนาน 21 วัน

สูตรอาหาร	น้ำหนักแห้งเริ่มต้น (กรัม)*	น้ำหนักแห้งหลังเพาะเลี้ยง (กรัม/ขวด)*	อัตราการเจริญ (Growth ratio)*
MSP1G1	0.0965 ± 0.0300^{a}	1.5127 ± 0.3331^{a}	14.6720 ± 3.4508^{a}
MSP1G1LMwC20	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.8494 ± 0.2685^{bc}	7.8002 ± 2.7814^{bc}
MSP1G1LMwC40	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.5924 ± 0.0744^{de}	5.1378 ± 0.7708^{de}
MSP1G1LMwC60	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.3691 ± 0.0940^{efgh}	2.8241 ± 0.9744^{efgh}
MSP1G1Mj0.1	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.6771 ± 0.1439^{cd}	6.0153 ± 1.4909^{cd}
MSP1G1Mj0.15	0.0965 ± 0.0300^{a}	1.0226 ± 0.2512^{b}	9.5947 ± 2.6027^{b}
MSP1G1Mj0.2	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.5091 ± 0.3290^{def}	4.2748 ± 3.4087^{def}
MSP1G1LMwC20Mj0.1	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.5054 ± 0.1003^{def}	4.2362 ± 1.0388^{def}
MSP1G1LMwC20Mj0.15	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.4474 ± 0.1686^{defg}	3.6357 ± 1.7472^{defg}
MSP1G1LMwC20Mj0.2	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.3195 ± 0.0391^{fgh}	2.3106 ± 0.4053^{fgh}
MSP1G1LMwC40Mj0.1	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.2284 ± 0.0872^{gh}	1.3663 ± 0.9031^{gh}
MSP1G1LMwC40Mj0.15	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.3284 ± 0.0864^{fgh}	2.4028 ± 0.8950^{fgh}
MSP1G1LMwC40Mj0.2	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.2667 ± 0.0398^{fgh}	1.7634 ± 0.4123^{fgh}
MSP1G1LMwC60Mj0.1	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.1533 ± 0.0280^{h}	0.5879 ± 0.2900^{h}
MSP1G1LMwC60Mj0.15	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.2367 ± 0.0684g^{h}	1.4523 ± 0.7092^{gh}
MSP1G1LMwC60Mj0.2	0.0965 ± 0.0300^{a}	0.1601 ± 0.0258^{h}	0.6583 ± 0.2668^{h}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ยจาก 5 ขวด ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

นอกจากน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งที่ใช้บ่งชี้การเจริญเติบโตของพืชแล้ว ในงานวิจัยนี้ได้วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) ของอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อนำมาใช้ในการประเมินค่าชีวมวลหรือการเจริญเติบโตของพืชทางอ้อมด้วย โดยปกติเมื่อพืชมีการเจริญเติบโต (สังเกตจากปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น) ความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลายอาหารที่ได้จะลดลง เนื่องจากเซลล์มีการใช้ไอออนไนเทรต (NO_3^-) หรือแอมโมเนียม (NH_4^+) ที่ละลายอยู่ในอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต ในขณะที่ค่าความเป็นกรด–ด่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสมดุลของแอมโมเนียมและไนเทรตในอาหารเพิ่มขึ้น จะบ่งบอกว่าพืชมีการนำเอาแอมโมเนียมไปใช้ได้มากขึ้น เมื่อพิจารณาความสามารถในการนำไฟฟ้าของอาหารที่เติมและไม่เติมสารกระตุ้นหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันเป็นเวลา 21 วัน พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเกือบทุกสูตรมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเริ่มต้น โดยมีค่าต่ำสุดในอาหารสูตร MSP1G1 คือ 2.25 ± 0.14 mS/cm ยกเว้นอาหารสูตร MSP1G1LMwC60Mj0.1 ที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 5.69 เป็น 5.91 ± 0.19 mS/cm ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักสดของเซลล์แขวนลอยที่ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSP1G1 สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่มีค่าความเป็นด่างเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารเริ่มต้น ยกเว้นอาหารที่มีการเติมไคโตซานเพียงอย่างเดียว (20, 40 และ 60 มก./ล.) และอาหารที่เติมไคโตซานความเข้มข้น 60 มก./ล. ร่วมกับ Methyl jasmonate ความเข้มข้น 0.1, 0.15 และ 0.2 mM ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเหลวเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันก่อนและหลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MSP1G1 ที่เสริมสารกระตุ้นนาน 21 วัน

สูตรอาหาร	ค่าความเป็นกรด-ด่าง*		ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)*	
	ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเพาะเลี้ยง	ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเพาะเลี้ยง
MSP1G1	5.66	6.46 ± 0.12^{a}	5.78	2.25 ± 0.14^{h}
MSP1G1LMwC20	5.64	5.63 ± 0.04^{ef}	6.12	4.30 ± 0.33^{f}
MSP1G1LMwC40	5.74	5.64 ± 0.12^{ef}	5.70	4.69 ± 0.35^{e}
MSP1G1LMwC60	5.74	5.56 ± 0.05^{f}	6.11	4.85 ± 0.11^{de}
MSP1G1Mj0.1	5.69	5.72 ± 0.13^{de}	5.78	3.81 ± 0.37^{g}
MSP1G1Mj0.15	5.02	5.77 ± 0.07^{d}	6.25	3.95 ± 0.19^{g}
MSP1G1Mj0.2	5.44	5.79 ± 0.17^{d}	6.09	4.60 ± 0.48^{ef}
MSP1G1LMwC20Mj0.1	5.77	6.08 ± 0.03^{bc}	6.01	4.50 ± 0.27^{ef}
MSP1G1LMwC20Mj0.15	5.63	6.09 ± 0.04^{b}	5.98	4.74 ± 0.43^{e}
MSP1G1LMwC20Mj0.2	5.72	6.04 ± 0.03^{bc}	6.13	5.17 ± 0.10^{cd}
MSP1G1LMwC40Mj0.1	5.70	5.95 ± 0.09^{c}	6.15	5.64 ± 0.20^{ab}
MSP1G1LMwC40Mj0.15	5.68	6.00 ± 0.09^{bc}	6.12	5.43 ± 0.30^{bc}

ตารางที่ 10 (ต่อ)

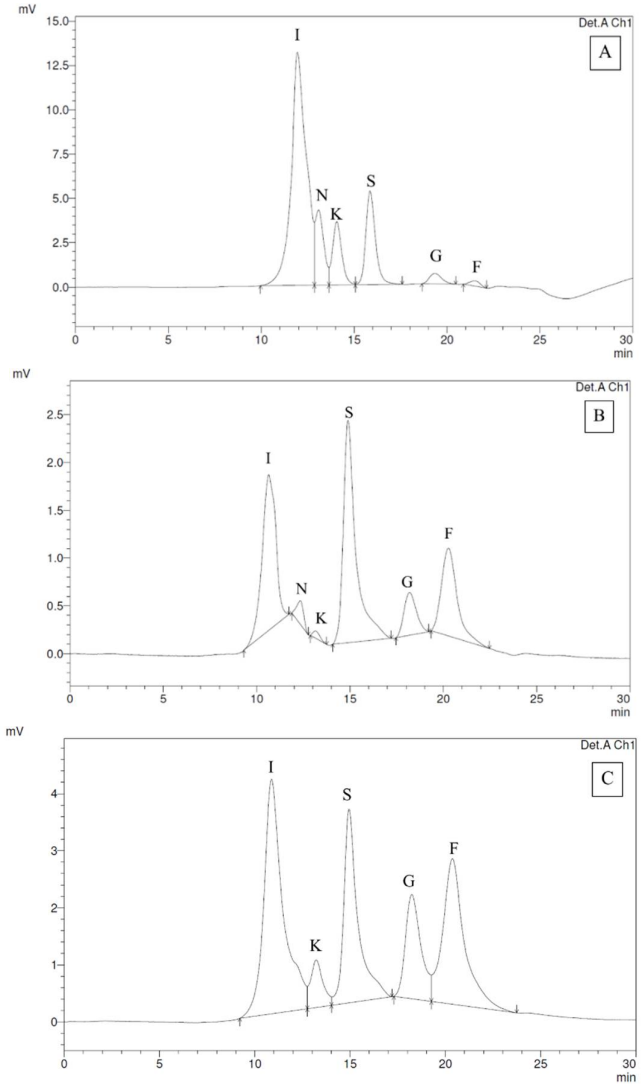
สูตรอาหาร	ค่าความเป็นกรด-ด่าง*		ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)*	
	ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเพาะเลี้ยง	ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเพาะเลี้ยง
MSP1G1LMwC40Mj0.2	5.33	5.56 ± 0.09^{f}	6.08	5.80 ± 0.19^{ab}
MSP1G1LMwC60Mj0.1	5.76	5.41 ± 0.08^{g}	5.69	5.91 ± 0.19^{a}
MSP1G1LMwC60Mj0.15	5.78	5.40 ± 0.12^{g}	5.90	5.80 ± 0.17^{ab}
MSP1G1LMwC60Mj0.2	5.72	5.55 ± 0.18^{f}	5.98	5.57 ± 0.15^{ab}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ในการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาร์ไรด์ในสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSP1G1 ที่เสริมสารกระตุ้นนาน 21 วัน ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าโครมาโตแกรมของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันมีรูปแบบที่ใกล้เคียงกับสารสกัดจากหัวแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ แต่มีปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 4

หลังจากวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 21 วัน พบว่าเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหารสูตร MSP1G1LMwC20Mj0.2 ให้ความเข้มข้นอินนูลินสูงที่สุดเท่ากับ 28.894 ± 1.184 mg/g dry weight รองลงมาคือ สูตร MSP1G1LMwC20Mj0.1 และ MSP1G1Mj0.2 เท่ากับ 28.124 ± 3.498 และ 27.248 ± 10.771 mg/g dry weight ตามลำดับ แต่เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) พบว่าปริมาณความเข้มข้นอินนูลินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 สูตรดังกล่าวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเทียบกับอาหารควบคุม MSP1G1 ที่ให้อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยสูงสุด แต่กลับให้ปริมาณความเข้มข้นอินนูลินต่ำที่สุดเท่ากับ 10.479 ± 6.936 มก/ก.น้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 10) ดังนั้นการเติมสารกระตุ้นที่ความเข้มข้นสูงร่วมกัน อาจทำให้พืชเกิดภาวะเครียดและส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของพืชลดลง แต่ไปมีผลต่อการกระตุ้นให้พืชสร้างสารบางชนิดขึ้นมาเพื่อลดภาวะเครียดดังกล่าว ซึ่งจะเห็นได้จากการทดลองว่า เมื่อเสริมไคโตซาน และ/หรือ Methyl jasmonate ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง เซลล์จะมีการสร้างอินนูลินสูงขึ้น แต่มีการเจริญที่ไม่เพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4 ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากหัวแก่นตะวันที่ปลูกในธรรมชาติ (A) ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MSP1G1LMwC40 (B) และ HPLC chromatogram ของสารสกัดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารสูตร MSP1G1Mj0.15 (I : inulin, N : nystose, K : 1-kestose, S : sucrose, G : glucose, F : fructose)

เมื่อพิจารณาปริมาณความเข้มข้นของฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharides: FOS) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ประกอบด้วยฟรักโทสต่อกันเป็นสายยาว 2-10 หน่วย (1-kestose, nystose และ fructofuranosylnystose) พบว่าเซลล์แขวนลอยมีการผลิต FOS ที่เป็น 1-kestose และ nytose เท่านั้น โดยปริมาณความเข้มข้นฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (nystose และ 1-kestose) ที่ได้มีแนวโน้มเช่นเดียวกับอินนูลิน กล่าวคือ อาหารสูตร MSP1G1LwC20Mj0.2 ให้ความเข้มข้นของฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์สูงที่สุด คือ 8.295 ± 1.216 มก./ก. น้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ สูตร MSP1G1LwC20Mj0.1 และ MSP1G1Mj0.2

เท่ากับ 4.697 ± 2.566 และ 4.653 ± 1.612 มก./ก. น้ำหนักแห้ง ในขณะที่อาหารสูตร MSP1G1 ให้ปริมาณความเข้มข้นฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์เพียง (FOS) 0.942 ± 0.435 มก./ก. น้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 11)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากปริมาณการสะสมอินนูลินที่ได้ต่อขวดเพาะเลี้ยงก็จะเห็นว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้น MSP1G1 (15.85 มก./ขวด) และสูตรที่มีการเติมสารกระตุ้น Methyl jasmonate เพียงอย่างเดียว คือสูตร MSP1G1Mj0.15 (18.46 มก./ขวด) ให้ปริมาณมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารกระตุ้นและมีความเข้มข้นของอินนูลินสูง (ตารางที่ 11) สูตร MSP1G1LMwC20Mj0.2 (9.23 มก./ขวด), MSP1G1LMwC20Mj0.1 (14.21 มก./ขวด) และ MSP1G1Mj0.2 (13.87 มก./ขวด) ดังนั้นเพื่อให้ได้อินนูลินในปริมาณมากต่อการผลิตในแต่ละกะ จึงเลือกสูตรอาหาร MSP1G1 และ MSP1G1Mj0.15 ไปหาขนาดเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตอินนูลินในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันต่อไป

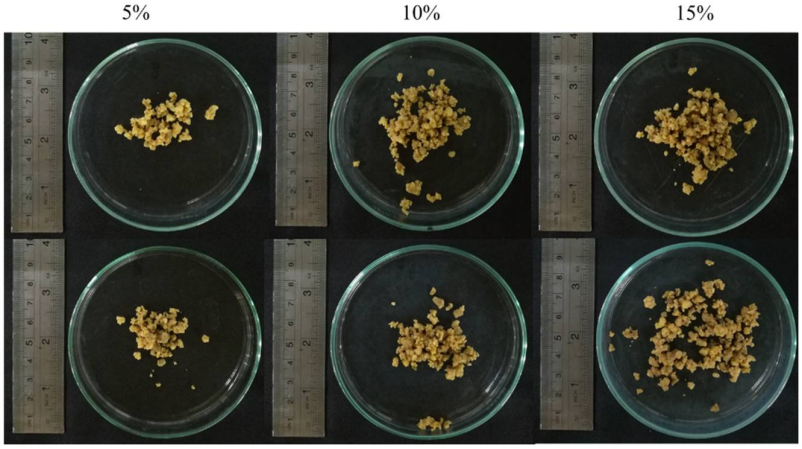
ตารางที่ 11 ความเข้มข้นของอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 21 วัน

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (mg/g dry weight)*			
	Inulin	1-kestose	Nystose	FOS
MSP1G1	10.479 ± 6.936^{b}	-	0.942 ± 0.435^{a}	0.942 ± 0.435^{c}
MSP1G1LMwC20	10.584 ± 4.848^{b}	0.437 ± 0.165^{bc}	0.377 ± 0.336^{a}	0.813 ± 0.435^{c}
MSP1G1LMwC40	16.214 ± 0.568^{ab}	0.215 ± 0.188^{bc}	1.171 ±0.234^{a}	1.386 ± 0.047^{bc}
MSP1G1LMwC60	19.491 ± 2.348^{abc}	0.933 ± 1.338^{bc}	0.597 ± 1.034^{a}	1.530 ± 1.091^{bc}
MSP1G1Mj0.1	16.726 ± 4.029^{abc}	2.662 ± 2.784^{abc}	1.324 ± 1.327^{a}	3.987 ± 1.834^{bc}
MSP1G1Mj0.15	18.048 ± 2.312^{abc}	0.271 ± 0.469^{bc}	1.554 ± 0.322^{a}	1.825 ± 0.509^{bc}
MSP1G1Mj0.2	27.248 ± 10.771^{ab}	3.466 ± 3.273^{ab}	1.187 ± 2.056^{a}	4.653 ± 1.612^{b}
MSP1G1LMwC20Mj0.1	28.124 ± 3.498^{ab}	1.196 ± 2.072^{bc}	3.501 ± 2.460^{a}	4.697 ± 2.566^{b}
MSP1G1LMwC20Mj0.15	20.187 ± 10.787^{abc}	0.264 ± 0.231^{bc}	0.221 ± 0.383^{a}	0.485 ± 0.158^{c}
MSP1G1LMwC20Mj0.2	28.894 ± 1.184^{a}	5.095 ± 4.449^{a}	3.200 ± 5.542^{a}	8.295 ± 1.216^{a}
MSP1G1LMwC40Mj0.1	25.065 ± 2.368^{ab}	2.136 ± 0.710^{abc}	0.075 ± 0.130^{a}	2.212 ± 0.775^{bc}
MSP1G1LMwC40Mj0.15	23.000 ± 12.790^{ab}	0.470 ± 0.814^{bc}	3.213 ± 5.318^{a}	3.683 ± 4.941^{bc}
MSP1G1LMwC40Mj0.2	20.650 ± 2.171^{abc}	1.093 ± 0.493^{bc}	0.867 ± 1.501^{a}	1.960 ± 1.870^{bc}
MSP1G1LMwC60Mj0.1	23.861 ± 9.233^{ab}	1.968 ± 1.248^{abc}	1.332 ± 1.171^{a}	3.300 ± 0.226^{bc}
MSP1G1LMwC60Mj0.15	19.433 ± 0.141^{abc}	1.017 ± 0.244^{bc}	1.727 ± 1.629^{a}	2.745 ± 1.870^{bc}
MSP1G1LMwC60Mj0.2	20.850 ± 5.672^{abc}	1.413 ± 0.855^{bc}	0.935 ± 1.619^{a}	2.348 ± 2.422^{bc}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

3.2.4 การหาขนาดเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตอินนูลินในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน

ในการศึกษาขนาดเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตอินนูลิน ได้ทำการเปรียบเทียบขนาดของเซลล์ตั้งต้นที่ 5, 10 และ 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยชั่งเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันให้ได้ตามขนาดเซลล์ตั้งต้นที่กำหนดลงไปเลี้ยงในอาหารเหลว MSP1G1 ที่มีการเติม และ MSP1G1Mj0.15 ที่มีการเติม Methyl jasmonate 0.15 mM ที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นเก็บผลการทดลอง พบว่าเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 สูตรที่ขนาดของเซลล์ตั้งต้นต่างกันมีสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้มปานกลาง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้นเซลล์แขวนลอยมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยเซลล์ที่ได้มีการเกาะตัวแบบหลวมๆ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ลักษณะของเซลล์แขวนลอย สี และการกระจายตัวของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันอายุ 21 วันในอาหารเหลวสูตร MSP1G1 (บน) และ MSP1G1Mj0.15 (ล่าง) ที่มีขนาดเซลล์ตั้งต้น 5, 10 และ 15%

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSP1G1 และ MSP1G1M0.15 ที่มีการแปรผันขนาดของเซลล์ตั้งต้นเป็น 5, 10 และ 15% จากอัตราการเจริญของน้ำหนักสด (ตารางที่ 12) พบว่าเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSP1G1 ทุกชุดการทดลองมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยพบอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อใช้ขนาดของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันตั้งต้นเท่ากับ 10% (0.1357 ± 0.0391) ในขณะที่เมื่อพิจารณาเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะลี้ยงในอาหารสูตร MSP1G1Mj0.15 เซลล์แขวนลอยมีอัตราการเจริญเติบโตที่ลดลงในทุกชุดการทดลอง เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญของน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 13) พบว่าเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารแต่ละสูตรที่ขนาดเซลล์ตั้งต้นต่างกันมีอัตราการเจริญของน้ำหนักแห้งเพิ่มสูงขึ้น โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์

แขวนลอยแก่นตะวันในอาหารสูตร MSP1G1 และขนาดของเซลล์ตั้งต้นที่ 10% ให้อัตราการเจริญสูงที่สุด (2.0174 ± 0.2619) เมื่อเทียบการชุดการทดลองอื่น

ตารางที่ 12 น้ำหนักสดเริ่มต้น น้ำหนักสด และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยง 21 วัน

สูตรอาหาร	ขนาดของเซลล์ตั้งต้น (%)	น้ำหนักสดเริ่มต้น (กรัม)*	น้ำหนักสดหลังเพาะเลี้ยง (กรัม)*	อัตราการเจริญ (Growth ratio)*
MSP1G1	5	1.1262 ± 0.0567^{c}	1.2040 ± 0.0750^{d}	0.0740 ± 0.1224^{ab}
	10	2.0376 ± 0.0252^{b}	2.3137 ± 0.0703^{b}	0.1357 ± 0.0391^{a}
	15	3.0491 ± 0.0198^{a}	3.1262 ± 0.3431^{a}	0.0256 ± 0.1167^{b}
MSP1G1 Mj0.15	5	1.0546 ± 0.0199^{d}	1.0270 ± 0.0524^{d}	-0.0264 ± 0.0285^{b}
	10	2.0439 ± 0.0198^{b}	1.9993 ± 0.0558^{c}	-0.0218 ± 0.0253^{b}
	15	3.0122 ± 0.0113^{a}	2.9277 ± 0.1483^{a}	-0.0246 ± 0.0515^{b}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 13 น้ำหนักแห้งเริ่มต้น น้ำหนักแห้ง และ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยง 21 วัน

สูตรอาหาร	ขนาดของเซลล์ตั้งต้น (%)	น้ำหนักแห้งเริ่มต้น (กรัม)*	น้ำหนักแห้งหลังเพาะเลี้ยง (กรัม)*	อัตราการเจริญ (Growth ratio)*
MSP1G1	5	0.1852 ± 0.0235^{c}	0.3518 ± 0.0967^{e}	0.8999 ± 0.5211^{b}
	10	0.3330 ± 0.0000^{b}	0.9957 ± 0.0867^{c}	2.0174 ± 0.2619^{a}
	15	0.8996 ± 0.0000^{a}	1.6020 ± 0.2226^{a}	0.7808 ± 0.2475^{b}
MSP1G1 Mj0.15	5	0.1852 ± 0.0235^{c}	0.1898 ± 0.0392^{e}	0.0248 ± 0.2117^{c}
	10	0.3330 ± 0.0000^{b}	0.5299 ± 0.1476^{d}	0.6058 ± 0.4471^{b}
	15	0.8996 ± 0.0000^{a}	1.3284 ± 0.1215^{b}	0.4766 ± 0.1450^{b}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้า ในการทดลองนี้ได้วัดค่าการนำไฟฟ้าของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงด้วย (ตารางที่ 14) โดยพบว่าค่าการนำไฟฟ้าของอาหารภายหลังการเพาะเลี้ยงมีค่าลดลง ซึ่งเป็นการบ่งชี้ทางอ้อมว่า เซลล์พืชมีการเจริญเติบโตนั่นเอง

ตารางที่ 14 ค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน ก่อนและหลังจากการเพาะเลี้ยง 21 วัน

สูตรอาหาร	ขนาดของเซลล์ตั้งต้น (%)	ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)*	
		ก่อนเพาะเลี้ยง	หลังเพาะเลี้ยง
MSP1G1	5	5.97	5.68 ± 0.29[a]
	10	5.97	5.44 ± 0.28[abc]
	15	5.97	5.64 ± 0.23[a]
MSP1G1Mj0.15	5	5.76	5.55 ± 0.12[ab]
	10	5.76	5.19 ± 0.23[c]
	15	5.76	5.32 ± 0.12[bc]

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ในการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นอินนูลิน (ตารางที่ 15) และฟรักโทโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (ตารางที่ 16) ในเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงได้เป็นเวลา 21 วัน ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า เซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSP1G1 และมีขนาดเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 10% ให้ปริมาณอินนูลินสูงที่สุด (21.794 ± 1.235 มก./ก. น้ำหนักแห้ง) รองลงมาคือ อาหารสูตร MSP1G1 ที่ขนาดของเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 5% (18.342 ± 1.462 มก./ก. น้ำหนักแห้ง) และอาหารสูตร MSP1G1Mj0.15 ที่ขนาดเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 10% (18.300 ± 2.898 มก./ก. น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MSP1G1Mj0.15 ที่ขนาดเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 5% มีปริมาณความเข้มข้นอินนูลินต่ำที่สุด เมื่อนำทั้ง growth ratio มาหาปริมาณการผลิตอินนูลินต่อขวดเพาะเลี้ยงก็จะให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาดเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 10% ในอาหารสูตร MSP1G1 ให้ปริมาณการผลิตอินนูลินสูงที่สุด

ตารางที่ 15 ความเข้มข้นของอินนูลินในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSP1G1 และ MSP1G1Mj0.15 เป็นเวลา 21 วัน

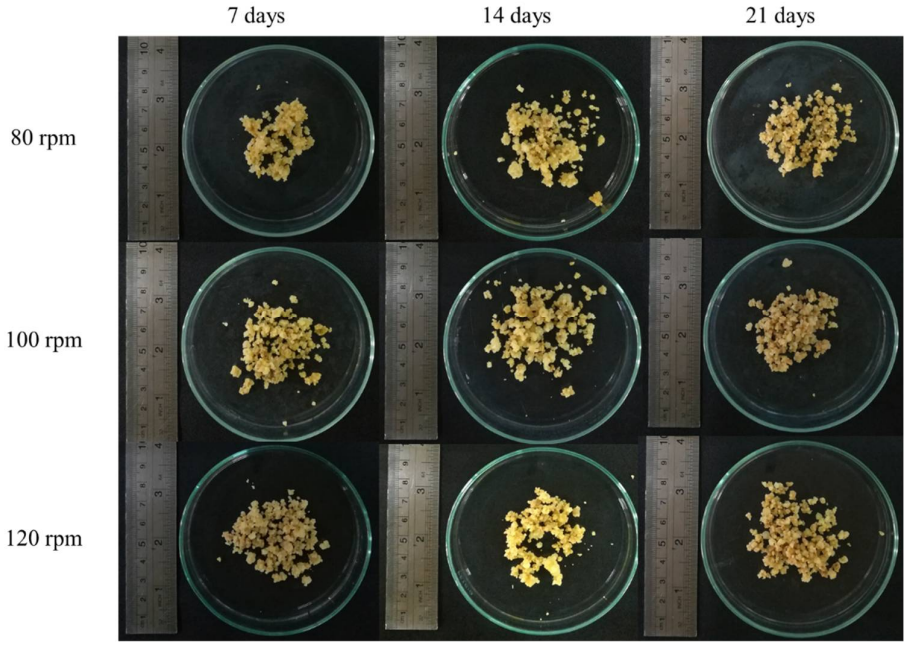
สูตรอาหาร	ขนาดของเซลล์ตั้งต้น (%)	ความเข้มข้นของอินนูลิน (mg/g dry weight)*
MSP1G1	5	18.342 ± 1.462[ab]
	10	21.794 ± 1.235[a]
	15	14.577 ± 1.760[b]
MSP1G1Mj0.15	5	6.230 ± 4.460[c]
	10	18.300 ± 2.898[ab]
	15	15.788 ± 1.321[b]

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

3.2.5 การหาความเร็วรอบในการเขย่าและระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตอินนูลินในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน

ในการศึกษาหาความเร็วรอบในการเขย่าและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยและการผลิตอินนูลิน ดำเนินการโดยแปรผันตัวแปรที่สนใจข้างต้นดังนี้ ความเร็วรอบในการเขย่าแปรผันทั้งหมด 3 ระดับที่ 80, 100 และ 120 rpm สำหรับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็น 7, 14 และ 21 วันตามลำดับ โดยการชั่งเซลล์แขวนลอยแคลลัสปริมาณ 2 กรัม (ขนาดของเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 10%) ใส่ลงในอาหารเหลวสูตร MSP1G1 ปริมาตร 20 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่แปรผันความเร็วรอบดังแสดงข้างต้น ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการทดลองละ 3 ซ้ำและเก็บผล บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง และทำการศึกษาชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่ได้ พบว่าเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่ได้จากทุกการทดลองมีสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้มปานกลาง เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้นเซลล์แขวนลอยมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยเซลล์ที่ได้มีการเกาะตัวแบบหลวมๆ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ลักษณะของเซลล์แขวนลอย สี และการกระจายตัวของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน ในอาหารเหลวสูตร MSP1G1 ที่มีการแปรผันความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยง 80, 100 และ 120 rpm และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน

หลังจากนำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปหาน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญเติบโตของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 16 และตารางที่ 17

ตารางที่ 16 น้ำหนักสดเริ่มต้น น้ำหนักสด และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยง 7, 14 และ 21 วัน ที่ความเร็วรอบต่างๆ (80, 100 และ 120 รอบต่อนาที)

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	น้ำหนักสดเริ่มต้น (กรัม)*	น้ำหนักสดหลังเพาะเลี้ยง (กรัม)*	อัตราการเจริญ (Growth ratio)*
7 days	80	2.0451 ± 0.0168^{a}	1.9375 ± 0.0677^{e}	-0.0524 ± 0.0393^{e}
	100	2.0461 ± 0.0064^{a}	2.1478 ± 0.0403^{d}	0.0497 ± 0.0181^{d}
	120	2.0367 ± 0.0168^{a}	2.2318 ± 0.0818^{cd}	0.0956 ± 0.0300^{cd}
14 days	80	2.0393 ± 0.0073^{a}	2.1768 ± 0.1307^{d}	0.0675 ± 0.0654^{d}
	100	2.0389 ± 0.0130^{a}	2.6796 ± 0.0799^{a}	0.3142 ± 0.0362^{a}
	120	2.0403 ± 0.0143^{a}	2.2087 ± 0.0783^{cd}	0.0824 ± 0.0434^{d}
21 days	80	2.0424 ± 0.0182^{a}	2.2612 ± 0.1630^{cd}	0.1074 ± 0.0848^{cd}
	100	2.0241 ± 0.0122^{a}	2.4334 ± 0.1714^{bc}	0.2020 ± 0.0806^{bc}
	120	2.0487 ± 0.0128^{a}	2.5692 ± 0.1872^{ab}	0.2540 ± 0.0890^{ab}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 17 น้ำหนักแห้งเริ่มต้น น้ำหนักแห้ง และ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยง 7, 14 และ 21 วัน ที่ความเร็วรอบต่างๆ (80, 100 และ 120 รอบต่อนาที)

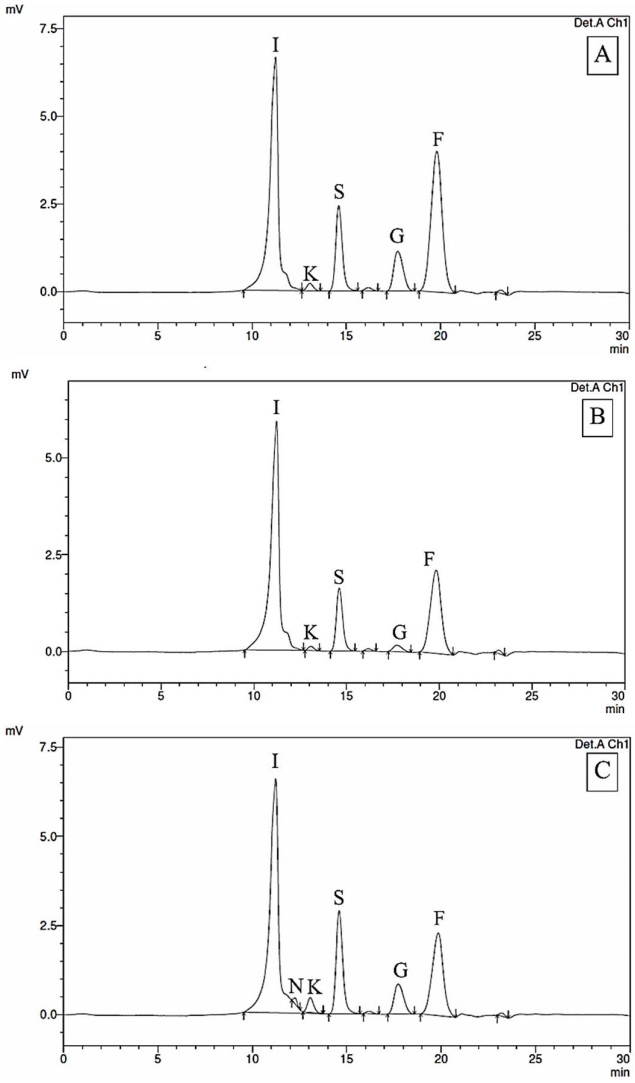
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	น้ำหนักแห้งเริ่มต้น (กรัม)*	น้ำหนักแห้งหลังเพาะเลี้ยง (กรัม)*	อัตราการเจริญ (Growth ratio)*
7 days	80	0.4156 ± 0.0000^{a}	0.3568 ± 0.0419^{de}	-0.1414 ± 0.1009^{e}
	100	0.4156 ± 0.0000^{a}	0.5179 ± 0.0469^{bcd}	0.2461 ± 0.1127^{bcd}
	120	0.4156 ± 0.0000^{a}	0.5585 ± 0.1163^{bc}	0.3438 ± 0.2798^{bc}
14 days	80	0.4156 ± 0.0000^{a}	0.2762 ± 0.0505^{e}	-0.3355 ± 0.1214^{de}
	100	0.4156 ± 0.0000^{a}	0.6809 ± 0.0594^{ab}	0.6384 ± 0.1430^{ab}
	120	0.4156 ± 0.0000^{a}	0.4592 ± 0.0534^{cde}	0.1048 ± 0.1286^{cde}
21 days	80	0.4156 ± 0.0000^{a}	0.4565 ± 0.1795^{cde}	0.0984 ± 0.4319^{cde}
	100	0.4156 ± 0.0000^{a}	0.6167 ± 0.1814^{abc}	0.4839 ± 0.4365^{abc}
	120	0.4156 ± 0.0000^{a}	0.7708 ± 0.0763^{a}	0.8546 ± 0.1836^{a}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงได้ข้างต้น (ตารางที่ 16 และ 17) พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน ให้อัตราการเจริญของน้ำหนักสดสูงที่สุด คือ 0.3142 ± 0.0362 รองลงมาได้แก่ การเพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน (0.2540 ± 0.0890) ในขณะที่เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอยจากน้ำหนักแห้งให้ผลตรงข้ามกัน กล่าวคือ การเพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน ให้อัตราการเจริญสูงที่สุด (0.8546 ± 0.1836) ตามด้วยการเพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน (0.6384 ± 0.1430) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ทั้งสองสภาวะที่กล่าวมาไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (FOS: fructofuranosylnystose, nystose และ 1-kestose) พบว่าเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่ได้ในทุกการทดลองมีรูปแบบที่คล้ายกัน โดยจะพบพีคที่เหมือนกันทั้งหมด 5 พีค ซึ่งเป็นพีคของ inulin, 1-kestose, sucrose, glucose และ fructose สำหรับฟรักโทโอลิโกแซคคาร์ไรด์ตัวอื่นได้แก่ fructofuranosylnystose และ nystose พบได้ในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันจากบางการทดลองเท่านั้น (ภาพที่ 7) หลังจากวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงได้ในแต่ละการทดลอง พบว่าเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน มีปริมาณอินนูลินสูงที่สุด (39.520 ± 0.055 มก./ก. น้ำหนักแห้ง) รองลงมาคือ เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน (37.123 ± 1.521 มก./ก. น้ำหนักแห้ง) ในขณะที่เมื่อพิจารณาปริมาณฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นผลรวมของ fructofuranosylnystose, nystose และ 1-kestose กลับให้ผลตรงข้ามกันคือ เซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วันมีปริมาณฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์สูงที่สุด (1.564 ± 0.079 มก./ก. น้ำหนักแห้ง) รองลงมาคือ เซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน (1.212 ± 0.191 มก./ก. น้ำหนักแห้ง) ซึ่งทั้งสองสภาวะการเพาะเลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 7 ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน (A) สารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน (B) สารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 21 วัน (I : inulin, N : nystose, K : 1-kestose, S : sucrose, G : glucose, F : fructose)

ตารางที่ 18 ความเข้มข้นของอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS: fructofuranosylnystose, nystose และ 1-kestose) ที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSP1G1 ที่แปรผันความเร็วรอบเป็น 80, 100 และ 120 rpm และเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	ความเข้มข้นของอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (mg/g dry weight)*	
		Inulin	FOS
7 days	80	29.070 ± 3.113^{c}	1.032 ± 0.052^{b}
	100	28.971 ± 0.334^{c}	1.348 ± 0.317^{ab}
	120	17.609 ± 2.327^{d}	1.211 ± 0.381^{ab}
14 days	80	29.430 ± 7.301^{c}	0.597 ± 0.193^{c}
	100	39.520 ± 0.055^{a}	1.203 ± 0.172^{ab}
	120	35.763 ± 4.556^{abc}	1.212 ± 0.191^{ab}
21 days	80	31.901 ± 3.511^{bc}	0.499 ± 0.141^{c}
	100	35.128 ± 2.213^{abc}	0.355 ± 0.083^{c}
	120	37.123 ± 1.521^{ab}	1.564 ± 0.079^{a}

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

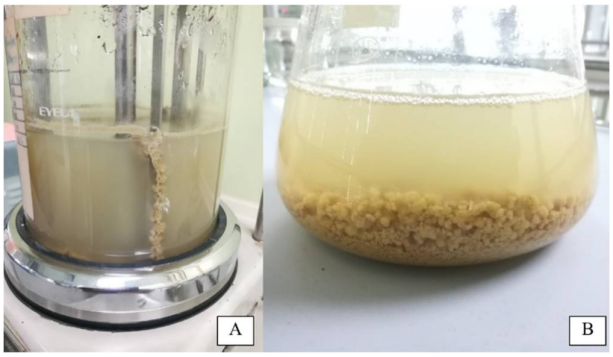
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

3.3 การศึกษาการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอินนูลินในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน โดยศึกษาผลของกรดอะมิโน (กลูตามีน และ/หรือ โพรลีน) สารกระตุ้น (ไคโตซาน และ/หรือ methyljasmonate) ขนาดของเซลล์ตั้งต้น (5, 10 และ 15%) ความเร็วรอบในการเขย่า (80, 100 และ 120 rpm) และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (7, 14 และ 21 วัน) ตามลำดับ ต่อการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในขวดเพาะเลี้ยง (ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร) พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันในอาหารสูตร MSP1G1 ที่ไม่มีสารกระตุ้น โดยใช้ขนาดของเซลล์ตั้งต้นที่ 10% ความเร็วรอบในการเขย่าที่ 120 rpm เป็นระยะเวลา 21 วัน เหมาะสมในการเจริญและการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันมากที่สุด คือ สามารถผลิตอินนูลินต่อขวดได้มากที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงได้ศึกษาการขยายขนาดปริมาณการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภท turbine stirred tank ขนาด 3 ลิตร กำหนด working volume ไว้ที่ 1 ลิตร (ภาพที่ 8) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้าเทียบกับการขยายขนาดการผลิตด้วยการเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าขนาด 1 ลิตร ที่บรรจุอาหารเพาะเลี้ยง 500 มล.

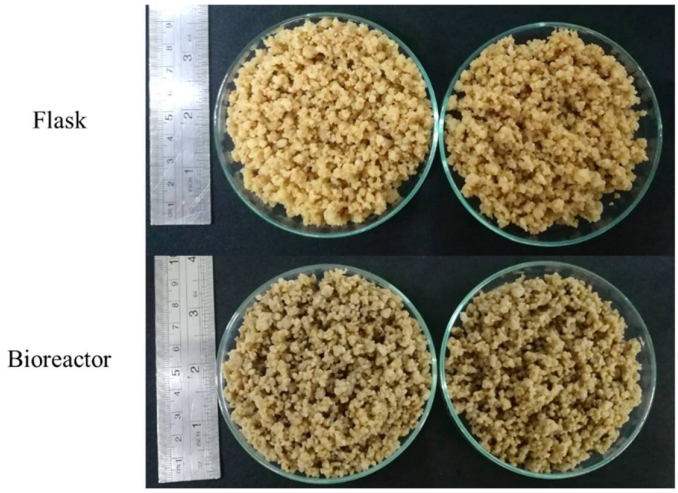
ภาพที่ 8 ลักษณะสีของเซลล์เริ่มต้น (ซ้าย) และเพาะเลี้ยงนาน 7 วัน (ขวา) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเป็นระยะเวลา 3 วัน เซลล์แขวนลอยเริ่มเปลี่ยนสีจากสีเหลืองใสเป็นสีดำคล้ำ เช่นเดียวกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่เริ่มขุ่นขึ้น และพบว่าเซลล์แขวนลอยบางส่วนติดอยู่แผ่นกั้น (baffle) ข้างถัง (ภาพที่ 9A) ในขณะที่เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในฟลาสเขย่ายังคงมีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์แขวนลอยเริ่มต้นก่อนทำการเพาะเลี้ยงกล่าวคือ เซลล์แขวนลอยยังคงมีสีเหลือง และมีการเกาะกลุ่มกันใหญ่ขึ้น สำหรับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงพบว่า ยังคงมีลักษณะเช่นเดียวกับเริ่มต้นคือมีสีเหลืองใส ไม่ขุ่นเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (ภาพที่ 9B)



ภาพที่ 9 ลักษณะเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (A) และในฟลาสเขย่า (B) เป็นเวลา 7 วัน และสีของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

หลังทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในฟลาสเขย่าที่มีปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง MSP1G1 500 มิลลิลิตร ยังคงมีสีเหลืองอ่อนถึงเหลือง เข้มปานกลาง ในขณะที่เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีสีดำคล้ำ ดังแสดงในภาพที่ 10 และเริ่มตาย ดังนั้นจึงได้หยุดการเพาะเลี้ยงไว้ที่ 14 วัน



ภาพที่ 10 ลักษณะของเซลล์แขวนลอย สี และการกระจายตัวของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน ในอาหารเหลวสูตร MSP1G1 ในฟลาสก์เขย่าและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นเวลา 14 วัน

ซึ่งหลังจากนำเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงได้ไปหาน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญเติบโตของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 19 และตารางที่ 20 หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเทียบกับฟลาสก์เขย่าเป็นเวลา 14 วัน พบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่ามีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นจาก 51.50 เป็น 57.4906 กรัม และ 7.8787 เป็น 14.7236 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีอัตราการเจริญของน้ำหนักสดเท่ากับ 0.1163 และอัตราการเจริญของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.8688 ในขณะที่เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งลดลงจาก 100.28 เป็น 64.0138 กรัมและ 15.2583 เป็น 11.8732 กรัม และมีอัตราการเจริญของน้ำหนักสดและแห้งลดลง (-0.3616 และ -0.2219 ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 19 และ 20 โดยในการทดลองใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใบกวน (stirred tank reactor) แม้จะมีข้อดีในด้านการผสมที่มีประสิทธิภาพสูง ทำให้เซลล์พืชไม่จับตัวกันเป็นกลุ่ม และเพิ่มอัตราการละลายของออกซิเจนในเฟสของเหลวได้ดี แต่ก็มีข้อจำกัดคือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภทนี้มีแรงเฉือนสูง จึงไม่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ไวต่อแรงเฉือน ซึ่งอาจจำเป็นต้องปรับอัตราการกวนของใบพัดให้ช้าลงเพื่อลดความแรงของใบพัด ด้วยวิธีนี้สามารถทำการคำนวณสมการการขยายขนาด (scaling-up) ก่อนทำการทดลองลองจริง เนื่องจากการปั่นกวนโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อที่ใช้เครื่องเขย่าเป็นการปั่นกวนทั้งระบบ แต่ภายใต้ถัง

ปฏิกรณ์ชีวภาพจะเป็นการปั่วกวนในระบบด้วยใบพัดส่งผลให้เกิดแรงเฉือนที่มาก ซึ่งเป็นการปั่นกวนที่ไม่เหมือนกัน

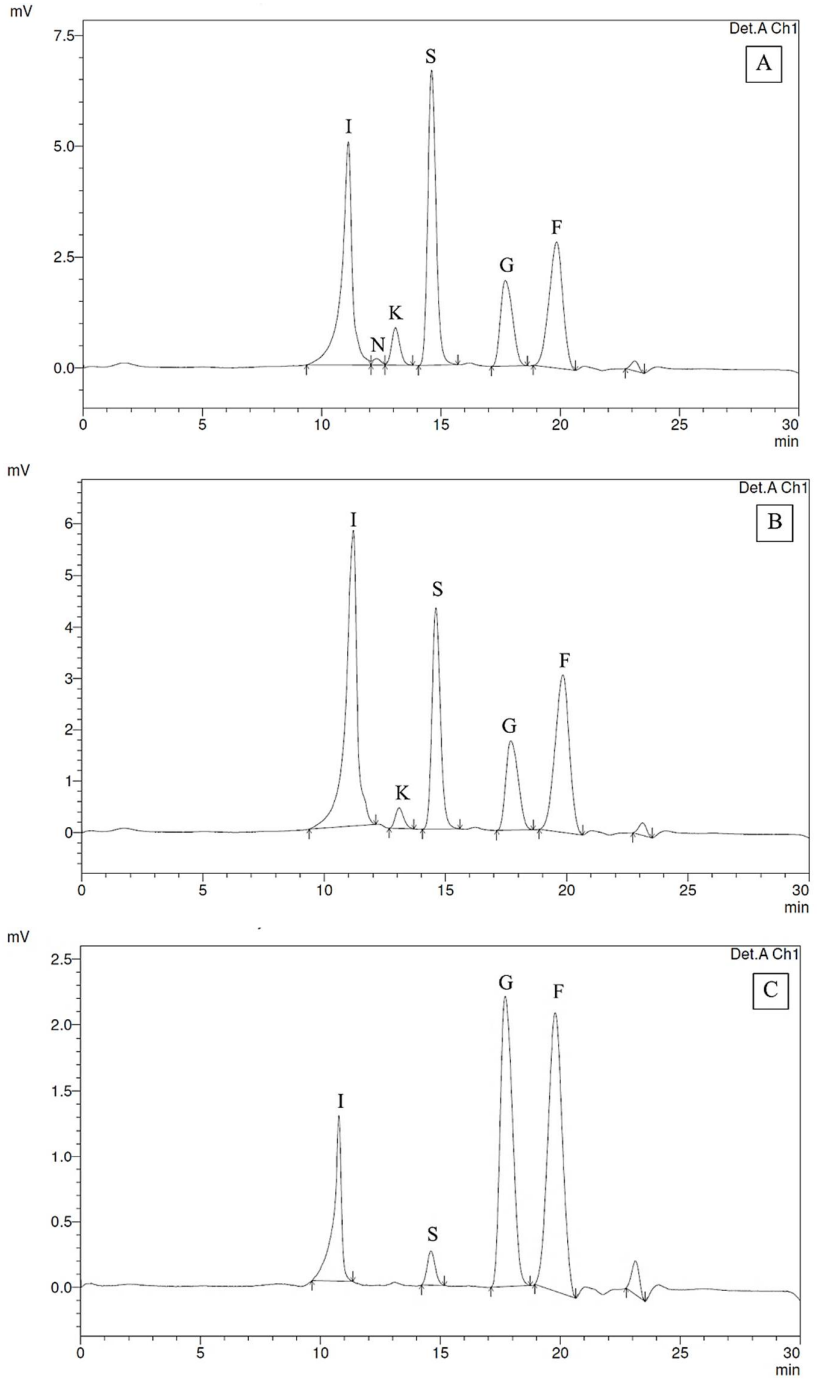
ตารางที่ 19 น้ำหนักสดเริ่มต้น น้ำหนักสด และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในฟลาสก์เขย่าและถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

รูปแบบการเพาะเลี้ยง	**น้ำหนักสดเริ่มต้น (กรัม)***	**น้ำหนักสดหลังเพาะเลี้ยง (กรัม)***	**อัตราการเจริญ (Growth ratio)***
Flask (14 days)	51.50	57.4906	0.1163
Flask (21 days)	49.62	64.7284	0.3045
Bioreactor (14 days)	100.28	64.0138	-0.3616

ตารางที่ 20 น้ำหนักแห้งเริ่มต้น น้ำหนักแห้ง และ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในฟลาสก์เขย่าและถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

รูปแบบการเพาะเลี้ยง	**น้ำหนักแห้งเริ่มต้น (กรัม)***	**น้ำหนักแห้งหลังเพาะเลี้ยง (กรัม)***	**อัตราการเจริญ (Growth ratio)***
Flask (14 day)	7.8787	14.7236	0.8688
Flask (21 day)	7.5592	13.8670	0.8345
Bioreactor (14 day)	15.2583	11.8732	-0.2219

ในการวิเคราะห์ปริมาณอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (Fructooligosaccharides, FOS) พบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในฟลาสเขย่า เป็นเวลา 14 วัน ให้ปริมาณอินนูลิน nystose และ 1-kestose สูงที่สุด ได้แก่ 29.884 ± 3.495, 0.355 ± 0.167 และ 3.160 ± 0.411 มก./ก. น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพนาน 14 วัน ให้อินนูลิน และ 1-kestose ต่ำที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีการเจริญลดลงและมีการตายเกิดขึ้น จึงไม่มีการผลิตอินนูลินเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 21)



ภาพที่ 11 ตัวอย่าง HPLC Chromatogram ของสารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ในฟลาสเขย่า เป็นเวลา 14 วัน (A) สารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ในฟลาสก์เขย่า เป็นเวลา 21 วัน (B) สารสกัดจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงที่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นเวลา 14 วัน (I : inulin, N : nystose, K : 1-kestose, S : sucrose, G : glucose, F : fructose)

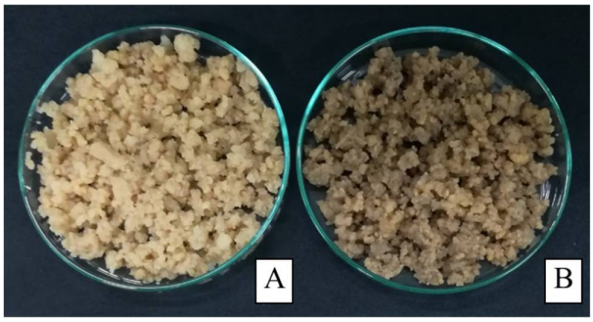
ตารางที่ 21 ความเข้มข้นของอินนูลินและฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS: fructofuranosylnystose, nystose และ 1-kestose) ที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	ความเข้มข้นของอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (mg/g dry weight)*		
	Inulin	Nystose	1-kestose
Flask (14 day)	29.884 ± 3.495[a]	0.355 ± 0.167	3.160 ± 0.411[a]
Flask (21 day)	22.109 ± 3.066[b]	-	0.804 ± 0.047[b]
Bioreactor (14 day)	3.814 ± 3.105[c]	-	-

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการปรับอัตราการกวนของใบพัดให้ช้าลงที่ 75 rpm เพื่อลดความแรงของใบพัด ก็ยังพบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำคล่ำ ในขณะที่เซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าที่มีปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง MSP1G1 250 มิลลิลิตร มีสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้มปานกลาง ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ลักษณะของเซลล์แขวนลอย สี และการกระจายตัวของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน ในอาหารเหลวสูตร MS + BA 1 mg/l +NAA 1 mg/l +Proline 1 mg/l + Glutamine 1 mg/l (MSP1G1) ในฟลาสก์เขย่า (A) และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ปรับอัตราการกวนของใบกวนที่ 75 รอบต่อนาที (B) เป็นเวลา 14 วัน

หลังจากนำเซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงได้ไปหาน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญเติบโต (Growth ratio) ของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 22 และตารางที่ 23 หลังการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเทียบกับฟลาสก์เขย่าเป็นเวลา 14 วัน พบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในฟลาสเขย่ามีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นจาก 25.00 เป็น 33.4475 กรัม และ 3.3100 เป็น 6.4798 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีอัตราการเจริญของน้ำหนักสดเท่ากับ 0.3379 และอัตราการเจริญของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.0225 ในขณะที่เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีน้ำหนักสดและ

น้ำหนักแห้งลดลงจาก 107.81 เป็น 72.9929 กรัมและ 14.2740 เป็น 10.8964 กรัม และมีอัตราการเจริญของน้ำหนักสดและแห้งลดลง (-0.3223 และ -0.2366 ตามลำดับ) จากผลการทดลองพบว่า เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพตายและไม่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น แม้ว่าจะมีการลดความเร็วรอบของใบพัดที่ใช้กวน (จาก 120 rpm ในการทดลองก่อนหน้า เป็น 75 rpm ในการทดลองครั้งนี้) ซึ่งอาจบ่งชี้ว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ STR ไม่เหมาะกับการเพิ่มชีวมวลของเซลล์แก่นตะวัน ดังนั้นอาจต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอื่น เช่น ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศ (air-lift bioreactor) เพราะฟองอากาศที่เกิดขึ้นทั้งจากวงจรการหมุนเวียนภายในและภายนอกถัง จะทำให้เฟสของของเหลวผสมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ แรงเฉือนและการใช้พลังงานต่ำและออกแบบได้ง่าย นอกจากนี้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศยังสามารถใช้เพาะเลี้ยงได้เป็นระยะเวลานานๆ โดยมีปัญหาการปนเปื้อนต่ำและกำจัดความเสี่ยงอันเนื่องมาจาก stirrer shafts และ seal ดังที่พบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ STR นอกจากนี้อาจใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพฟองอากาศประเภทลูกโป่ง (balloon type bubble bioreactor (BTBB)) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน เพราะเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปลูกโป่งที่ออกแบบเพื่อกำจัดปัญหาการเกิดฟอง โดยใช้ concentric tube สำหรับ cell lifting ที่ riser port ของฐานภาชนะเพาะเลี้ยงจะทำให้การเกิดฟองลดลงเป็นอย่างมาก ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้เหมาะต่อการเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืช โดยได้มีการนำ pilot scale BTBBs ขนาด 300, 500 และ 1000 ลิตรมาใช้ในการผลิตชีวมวลของพืชสำคัญหลายชนิด (Paek *et al*., 2001)

ตารางที่ 22 น้ำหนักสดเริ่มต้น น้ำหนักสด และ Growth ratio ของน้ำหนักสดเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในฟลาสเขย่าและถังปฏิกรณ์ชีวภาพหลังจากการเพาะเลี้ยง 14 วัน

รูปแบบการเพาะเลี้ยง	**น้ำหนักสดเริ่มต้น (กรัม)***	**น้ำหนักสดหลังเพาะเลี้ยง (กรัม)***	**อัตราการเจริญ (Growth ratio)***
Flask (250 ml)	25.00	33.4475	0.3379
Bioreactor (1 L)	107.81	72.9929	-0.3223

ตารางที่ 23 น้ำหนักแห้งเริ่มต้น น้ำหนักแห้ง และ Growth ratio ของน้ำหนักแห้งเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในฟลาสเขย่าและถังปฏิกรณ์ชีวภาพหลังจากการเพาะเลี้ยง 14 วัน

รูปแบบการเพาะเลี้ยง	**น้ำหนักแห้งเริ่มต้น (กรัม)***	**น้ำหนักแห้งหลังเพาะเลี้ยง (กรัม)***	**อัตราการเจริญ (Growth ratio)***
Flask (250 ml)	3.3100	6.4798	1.0225
Bioreactor (1 L)	14.2740	10.8964	-0.2366

6. สรุปผลการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเซล์แขวนลอยที่ขนาดเซลล์ตั้งต้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอาหารสูตร MSP1G1 (MS ที่เติม BA 1 มก./ล. NAA 1 มก./ล. โพรลีน 1 มก./ล. กลูตามีน 1 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 30 ก./ล. pH 5.6) ที่ปราศจากสารกระตุ้นไคโตซานขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำและเมทิลจัสโมเนต บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 21 วัน ให้ผลในการผลิตปริมาณอินนูลินได้สูงสุด

2. เมื่อนำเอาสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่ามาใช้ในการขยายขนาดการผลิตอินนูลินในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ turbine stirred tank ขนาด 3 ลิตร กำหนด working volume ไว้ที่ 1 ลิตร พบว่า เซลล์พืชตายและมีการผลิตอินนูลินลดลง ในขณะที่การขยายขนาดการผลิตด้วยสภาวะดังกล่าวด้วยฟลาสก์เขย่าขนาด 1 ลิตร ที่บรรจุอาหาร 500 มิลลิลิตร พบว่าเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันมีอัตราการเจริญและมีการผลิตอินนูลินได้ไม่แตกต่างไปจากการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3. การลดอัตราการปั่นกวนของใบพัดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ turbine stirred tankมาที่ 75 รอบต่อนาที ยังพบการตายของเซลล์พืชในระหว่างการเพาะเลี้ยง ซึ่งบ่งชี้ว่า ไม่สามารถนำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่ามาขยายขนาดการผลิตด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ turbine stirred tank ได้

4. การขยายขนาดการผลิตอินนูลินจากเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ turbine stirred tank จำเป็นต้องหาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อไป หรือ ศึกษาการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอื่นที่เหมาะสมต่อการขยายขนาดการผลิตเซลล์แขวนลอยแก่นตะวัน

7. บรรณานุกรม

บุษราภรณ์ งามปัญญา. 2548. **เทคโนโลยีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิคพื้นฐาน.** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร.

วิกานดา โสขุมา. 2554. การผลิตอินนูลินจากแก่นตะวันโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.

วิกานดา โสขุมา ปาริชาติ วรรณสโร จิตราภา ชูเนตร และบุษราภรณ์ งามปัญญา. 2555. การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแก่นตะวันโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ศิลปากรวิจัยและสร้างสรรค์ครั้งที่ 5 “บูรณาการศาสตร์และศิลป์” 25- 27 มกราคม 2555. มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.

วิสุทธิ์ กีปทอง ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วีรณา สินสวัสดิ์ ฟอร์เรอร์ สุมาลี โพธิ์ทอง อดิศักดิ์ คำนวณศิลป์ และสุพจน์ กิตติบุญญา. 2550. การศึกษาการผลิตแก่นตะวันเพื่อการผลิตเอทานอล. น.187- 193.

ศุภวันจักรี พลมีศักดิ์ และ สมชัย จันทร์สว่าง. 2546. ผลการใช้จุลินทรีย์ผสมและโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชเจรูซาเลมอาร์ติโช๊ค ในอาหารสุกรรุ่น-ขุนเพื่อลดกลิ่นเหม็นและแอมโมเนียของมูลสุกร. *วารสารสมุนไพร* 10; 1- 17.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161; 839–851.

Danckwerts, P.V. 1951. Significance of liquid-film coefficients in gas-absorption. *Indust. Eng. Chem.* 43: 1460–1467

Kumar, A. and Shekhawat, N. S.. 2009. Plant tissue culture and molecular markers: Their role in improving crop productivity. IK International, New Delhi, India.

Ma, C., Zhou, D., Wang, H., Han, D., Wang, Y. and Yan, X. 2016. Elicitation of Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) cell suspension culture for enhancement of inulin production and altered degree of polymerization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97(1): 88-94

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth of bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 15 : 473.

Paek, K.Y., Hahn, E. J. and Son, S.H. 2001. Application of bioreactors of large scale micropropagation systems of plants. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 37: 149–157

Paek, K.Y., Chakrabarty, D. and Hahn, E.J. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell,Tiss. Org. Cult.* 81: 287–300

Srikhampa, W. and Uriyapongson, J. 2008. Determination and extraction of inulin from Jerusalem artichoke. *Agricultural Sci. J.* 39(3) (Suppl.); 373- 376.

Sajc, L., Grubisic, D. and Novakovic, G. V. 2000. Bioreactors for plant engineering: An out for further research. *Biochem. Eng. J.* 4: 89–99

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.

Taha, H. S. 2003. Effect of biotic stress (*Aspergillus niger*) on the production and accumulation of total alkaloids in *Atropa belladonna* l. *via* tissue culture. *Acta Hort*. 597:257-264.

Taha, H. S., Abdel-El Kawy, A. M., Abd-El-Kareem Fathalla M. and El-Shabrawi, H. M. 2010. Implement of DMSO for enhancement and production of phenolic and peroxides compounds in suspension cultures of Egyptian date palm (Zaghlool and Samany) cultivars. *J. Biotech. Biochem*. 1(1):1-10.

Taha, H. S., El- sawy, A. M. and Bekheet, S. A. 2007. *In vitro* studies on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) and enhancement of inulin production. *J. of Applied Sciences Research* 3(9); 853- 858.

Taha, H. S., Abd El-Kawy, A. M. and Abd El-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; 33–38.

Taha, H. S., Bekheet, S. A. and El-Bahr, M. K. 2012. A new concept for production and scaling up of bioactive compounds from Egyptian date palm (Zaghlool) cultivar using bioreactor. *Emir. J. Food Agric*. 24 (5); 425-433.

Zhao, J., Zhu, W. Hu, H. Zhao, J. Zhu W.and Hu,Q. 2000. Enhanced ajmalicine production in *C. roseus* cell cultures by combined elicitor treatment: from shake-flask to 20–l airlift bioreactor. *Biotech. Lett*. 22(6):509-514.

ภาคผนวก

1. การเตรียมอาหารและสารเคมี

1.1 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตารางที่ ก.1 สูตรอาหาร Murashige and Skoog 1962 (MS)

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ตามสูตร (มก./ล.)	ปริมาณที่ใช้ต่ออาหาร 1 ล.
1. ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) 100 เท่า		
NH_4NO_3	1650	
KNO_3	1900	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	10 มล.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	
KH_2PO_4	170	
2. ธาตุอาหารรอง (Micronutrient) 1000 เท่า		
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.3	
$ZnSO_4 \cdot 5H_2O$	8.6	
H_3BO_3	6.2	
KI	0.83	1 มล.
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	
$CoC_{12} \cdot H_2O$	0.025	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27.85	
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.25	
3. วิตามิน (Vitamins) 1000 เท่า		
Nicotinic acid	0.5	
Thiamine-HCL	0.1	
Pyridoxine-HCL	0.5	1 มล.
Glycine	2	
Myo-inosital (เติมแยก)	100	
น้ำตาลซูโครส (sucrose) 30 ก./ล.		
pH 5.6		
Gelrite 2 ก./ล.		

2. กราฟมาตรฐานและการคำนวณ

2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

ตัวอย่างการเตรียมสารมาตรฐาน sucrose ความเข้มข้น 10 มก./มล.ปริมาตร 1.5 มล.

วิธีคิด สารละลาย 1 มล. มี sucrose 10 มก.

สารละลาย 1.5 มล. มี sucrose (1.5x10)/1 = 15 มก.

ดังนั้น ต้องชั่ง sucrose สาหรับใช้วิเคราะห์สารด้วยเทคนิค HPLC มา 15 มก. ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1.5 มล. (1,500 ไมโครลิตร (μl))

2.2 การเจือจางตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

ตัวอย่าง เจือจางตัวอย่าง 5 เท่า ปริมาตร 1 มล.

วิธีคิด จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ แทนค่าได้ 1(V1) = (1/5) V2

V_1 = 0.2 มล. (200 μl)

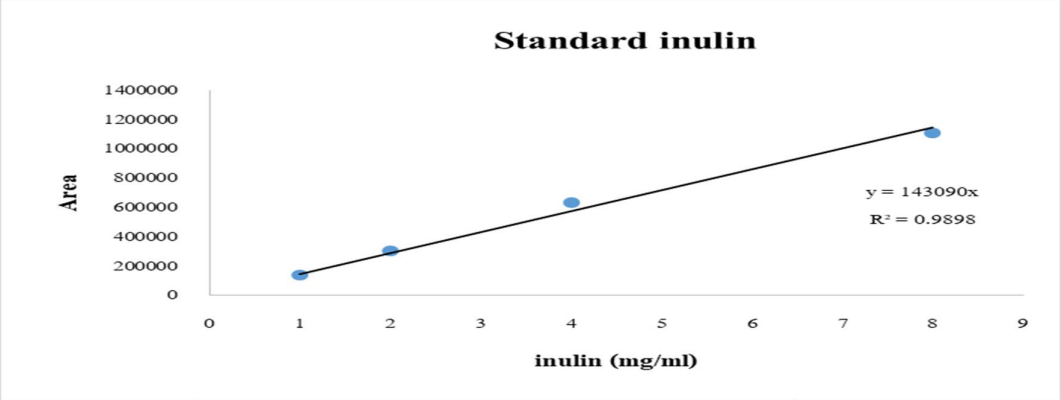
ดังนั้น ดูดตัวอย่าง 200 μl เติมน้ำ DI 800 μl ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 μl

2.3 การวิเคราะห์น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยใช้เทคนิค HPLC

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณอินนูลินจะอาศัยการฉีด HPLC โดยนำสารมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปกรองด้วย nylon syringe filter ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วย Rezek RNM carbohydrate Column ขนาด 7.8 x 300 มิลลิเมตร (Phenomenex) ชะด้วย deionized distill water ที่อัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกคือ 45 องศาเซลเซียส และตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วย Refractive index (RI) detector

2.4 การคำนวณปริมาณสารแต่ละชนิด

Calibration curve ของสารมาตรฐาน Inulin

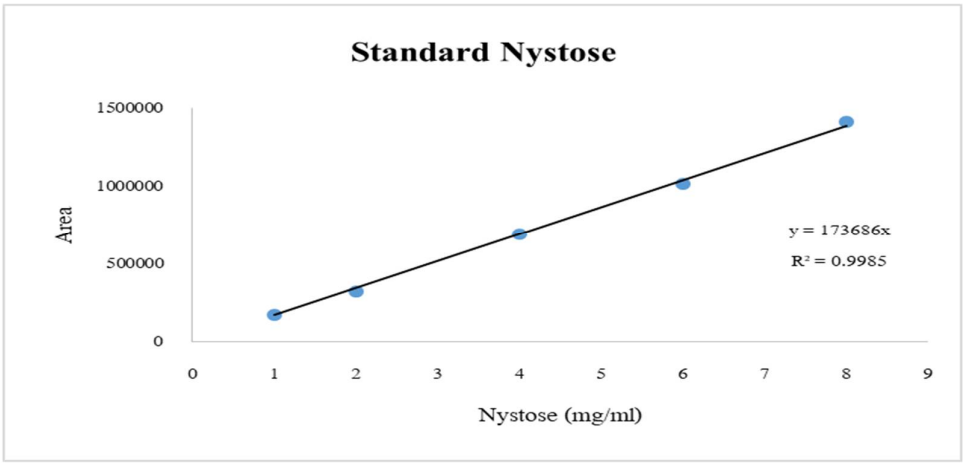


ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของ Inulin จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การหาปริมาณ Inulin ในสารตัวอย่าง

Inulin (mg/ml) = $Area/143090$ x dilution factor

Calibration curve ของ สารมาตรฐาน Nystose

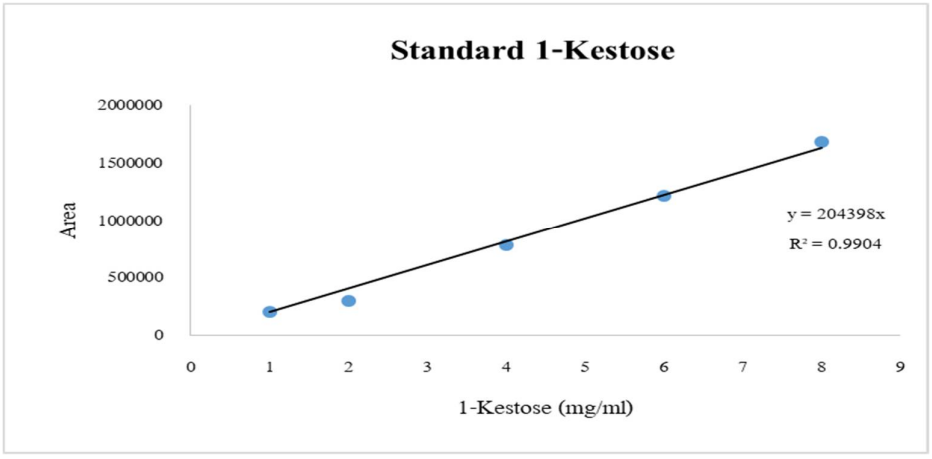


ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานของ Nystose จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การหาปริมาณ Nystose ในสารตัวอย่าง

Nystose (mg/ml) = $\frac{\text{Area}}{173686}$ x dilution factor

Calibration curve ของ สารมาตรฐาน 1-Kestose

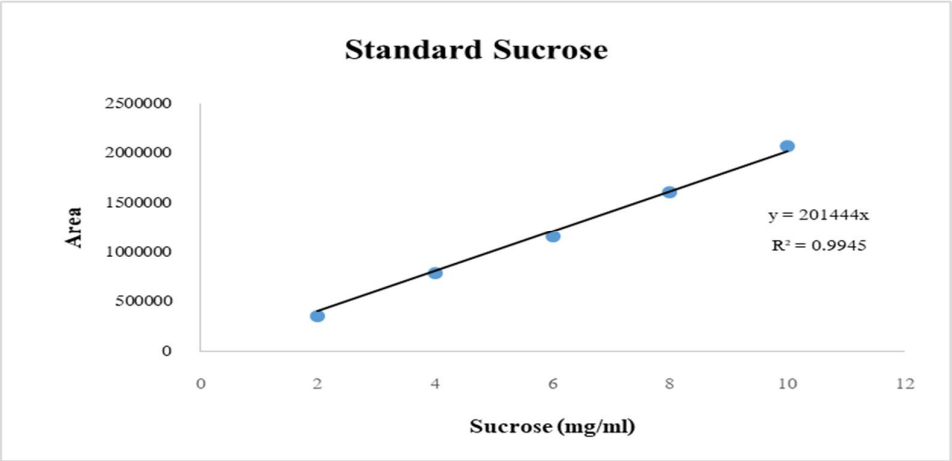


ภาพที่ ก.3 กราฟมาตรฐานของ 1-Kestose จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การหาปริมาณ 1-Kestose ในสารตัวอย่าง

1-Kestose (mg/ml) = □□□□/204398 x dilution factor

Calibration curve ของ สารมาตรฐาน Sucrose

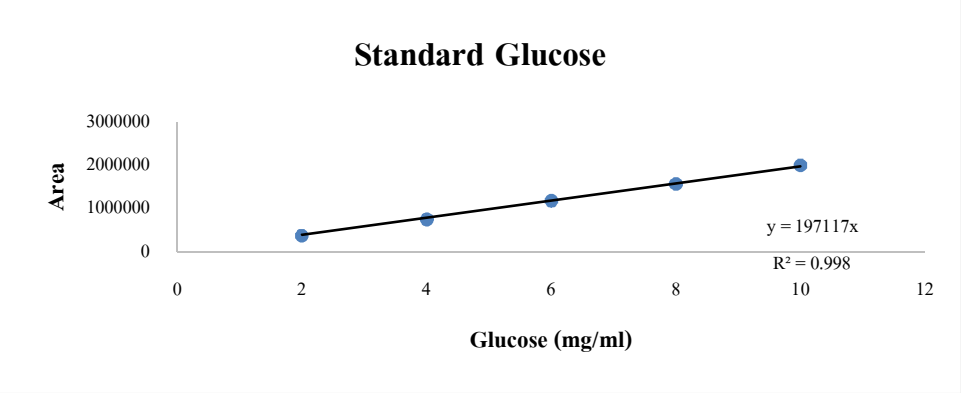


ภาพที่ ก.4 กราฟมาตรฐานของ Sucrose จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การหาปริมาณ Sucrose ในสารตัวอย่าง

Sucrose (mg/ml) = $Area/201444$ x dilution factor

Calibration curve ของ สารมาตรฐาน Glucose

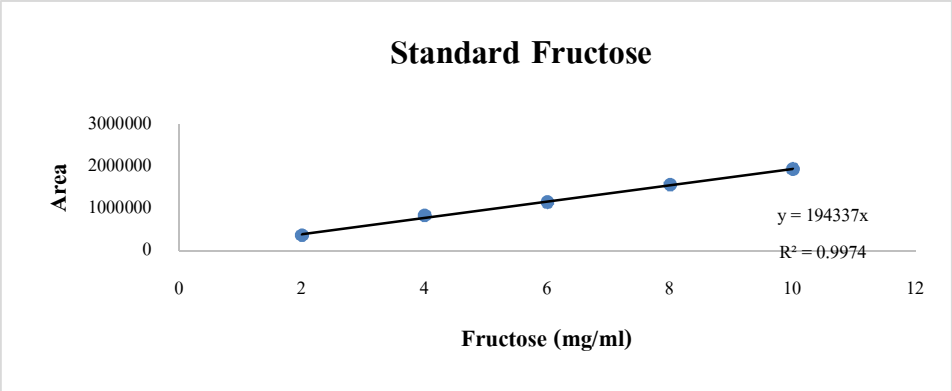


ภาพที่ ก.5 กราฟมาตรฐานของ Glucose จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การหาปริมาณ Glucose ในสารตัวอย่าง

Glucose (mg/ml) = $\frac{Area}{197117}$ x dilution factor

Calibration curve ของ สารมาตรฐาน Fructose

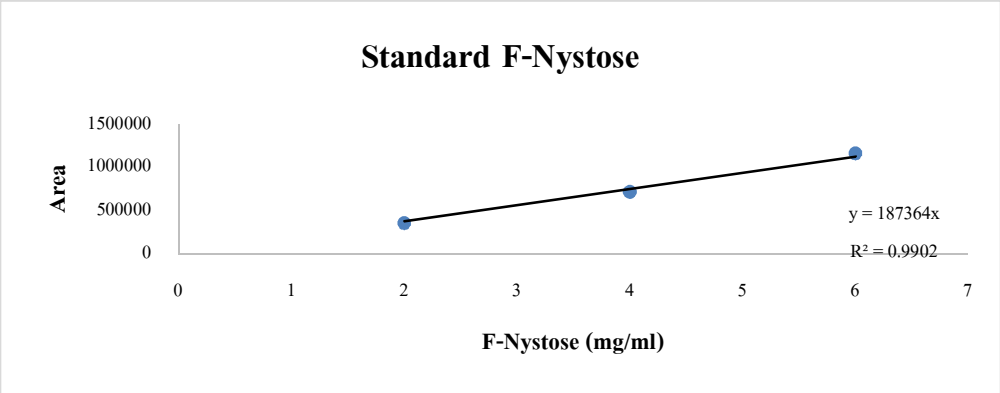


ภาพที่ ก.6 กราฟมาตรฐานของ Fructose จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การหาปริมาณ Fructose ในสารตัวอย่าง

Fructose (mg/ml) = $Area/194337$ x dilution factor

Calibration curve ของ สารมาตรฐาน Fructofuranosylnystose



ภาพที่ ก.7 กราฟมาตรฐานของ Fructofuranosylnystose จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การหาปริมาณ Fructofuranosylnystose ในสารตัวอย่าง

Fructofuranosylnystose (mg/ml) = □□□□/187364 x dilution factor

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาตร inulin ในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

เซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่ชักนำได้ในอาหารสูตร MS มีน้ำหนักแห้งที่ใช้สกัด 0.2060 กรัม ได้สารสกัดปริมาตร 950 ไมโครลิตร นำไปฉีด HPLC ได้พีคที่มี retention time ที่ 11.562 นาที เป็นพีคของ inulin ซึ่งมี Area peak = 138407

<u>วิธีคิด</u> จากกราฟมาตรฐานได้สมการ y = 143090x

เมื่อ y คือ พื้นที่ใต้กราฟ (area peak) และ x คือ ความเข้มข้นของ inulin (mg/ml)

แทนค่าจะได้ 138407 = 143090x

x = 0.967 mg/ml

เจือจาง sample 5 เท่า จะมีความเข้มข้นของ inulin เท่ากับ 0.967(5) = 4.835 mg/ml

สารสกัดปริมาตร 950 ไมโครลิตร มี inulin = 4.835(0.950) = 4.595 mg

ดังนั้น หัวแก่นตะวันจะมี inulin = $(4.595\ mg)/(0.2060\ g)$ = 22.304 mg/g dry weigh

3. ข้อมูลผลการทดลอง

3.1 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง อัตราการเจริญ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันในอาหารเหลวที่มีกรดอะมิโนกลูตามีนและ/หรือโพรลีนความเข้มข้นต่างๆ

การทดลองชุดที่ 1

ตารางที่ ก.2 น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันเป็นระยะเวลา 21 วัน

สูตรอาหาร	ซ้ำ	น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น(กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
วันที่ 0	1	1.0352	1.0352	0.1175
	2	1.0222	1.0222	0.1161
	3	1.0091	1.0091	0.1023
MS	1	1.0104	1.2869	0.5536
	2	1.0511	1.1785	0.4732
	3	1.0112	1.4467	0.6592
MSG0.5	1	1.0675	1.8335	1.0491
	2	1.1053	1.8665	0.9918
	3	1.1732	2.1701	1.3186
MSG1	1	0.9886	1.6508	0.9407
	2	1.0664	1.6590	1.028
	3	1.0222	1.6750	0.9670
MSG2	1	0.9232	1.5491	0.9161
	2	0.9338	1.1582	0.5130
	3	0.9150	1.4394	0.8194
MSP0.5	1	1.0483	1.9027	1.2059
	2	0.9882	1.2344	0.7125
	3	0.9034	1.6599	1.0453
MSP1	1	0.9547	1.9816	1.4013
	2	0.9312	1.2567	0.6109
	3	0.9402	1.5859	0.9047

ตารางที่ ก.2 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ซ้ำ	น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น(กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
MSP2	1	1.0139	1.5354	0.7670
	2	1.2241	1.6847	0.8946
	3	0.9225	1.9405	1.0948
MSP05G0.5	1	1.0899	1.3124	0.5552
	2	0.9275	2.0075	1.2402
	3	1.0586	1.6611	0.8490
MSP0.5G1	1	0.9646	2.1433	1.1745
	2	0.9081	1.0904	0.4373
	3	0.9330	1.8878	1.1457
MSP0.5G2	1	0.9958	1.6075	0.9205
	2	1.0008	1.6254	0.9846
	3	1.1755	1.4045	0.7790
MSP1G0.5	1	0.9012	1.5310	0.8381
	2	0.9767	1.3741	0.7091
	3	0.9168	2.0480	1.4962
MSP1G1	1	0.9317	1.8154	1.1334
	2	0.9146	2.0048	1.3333
	3	0.9627	1.7283	1.0923
MSP1G2	1	0.9921	1.5652	0.8988
	2	1.1023	2.2280	1.6287
	3	0.9537	2.3625	1.7327
MSP2G0.5	1	1.0166	1.8867	1.1527
	2	0.9726	1.3096	0.7628
	3	0.9146	1.5212	0.8921
MSP2G1	1	0.9120	1.3449	0.7339
	2	1.1685	1.4355	0.8584
	3	1.0087	2.1076	1.4634
MSP2G2	1	1.3207	1.4023	0.5067
	2	1.1120	1.1690	0.5379
	3	1.4300	1.5965	0.6300

ตารางที่ ก.3 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น และ อัตราการเจริญของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันเป็นระยะเวลา 21 วัน

สูตรอาหาร	ซ้ำ	น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	อัตราการเจริญเติบโต	
			กรัม/กรัมน้ำหนักสด	กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง
MS	1	0.2765	1.2737	4.9429
	2	0.1274	1.1212	4.2250
	3	0.4355	1.4307	5.8857
MSG0.5	1	0.7660	1.7176	9.3670
	2	0.7612	1.6887	8.8554
	3	0.9969	1.8497	11.773
MSG1	1	0.6622	1.6698	8.3991
	2	0.5926	1.5557	9.1786
	3	0.6530	1.6386	8.6339
MSG2	1	0.6259	1.6780	8.1795
	2	0.2244	1.2403	4.5804
	3	0.5440	1.5731	7.3161
MSP0.5	1	0.8544	1.8150	10.7670
	2	0.2432	1.2491	6.3616
	3	0.7565	1.8374	9.3330
MSP1	1	1.0269	2.0756	12.5116
	2	0.3255	1.3495	5.4545
	3	0.6457	1.6868	8.0777
MSP2	1	0.5215	1.5144	6.8482
	2	0.4606	1.3763	7.9875
	3	1.0180	2.1035	9.7750
MSP0.5G0.5	1	0.2225	1.2041	4.9571
	2	1.0800	2.1644	11.0732
	3	0.6025	1.5691	7.5804
MSP0.5G1	1	1.1787	2.2220	10.4866
	2	0.1823	1.2007	3.9045
	3	0.9548	2.0234	10.2295
MSP0.5G2	1	0.6117	1.6143	8.2188
	2	0.6246	1.6241	8.7911
	3	0.2290	1.1948	6.9554
MSP1G0.5	1	0.6298	1.6988	7.4830
	2	0.3974	1.4069	6.3313
	3	1.1312	2.2339	13.3589
MSP1G1	1	0.8837	1.9485	10.1196
	2	1.0902	2.1920	11.9045
	3	0.7656	1.7953	9.7527

ตารางที่ ก.3 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ซ้ำ	น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	อัตราการเจริญเติบโต	
			กรัม/กรัมน้ำหนักสด	กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง
MSP1G2	1	0.5731	1.5777	8.0250
	2	1.1257	2.0212	14.5420
	3	1.1945	2.4772	15.4705
MSP2G0.5	1	0.8701	1.8559	10.2920
	2	0.3370	1.3465	6.8107
	3	0.6066	1.6632	7.9652
MSP2G1	1	0.4329	1.4747	6.5527
	2	0.2670	1.2285	7.6643
	3	1.0959	2.0894	13.0661
MSP2G2	1	0.0816	1.0618	4.5241
	2	0.0549	1.0513	4.8027
	3	0.1665	1.1164	5.6250

ตารางที่ ก.4 การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันเป็นระยะเวลา 21 วัน

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
วันที่ 0	Inulin	11.635	284972	10	15.254
		11.723	709836	5	23.501
		11.648	302217	10	12.388
	Nystose	13.034	35879	10	1.582
		13.091	9384	5	0.256
		12.992	17130	10	0.578
	1-Kestose	14.037	82873	10	3.106
		14.047	115449	5	2.676
		14.068	20274	10	0.582
	Sucrose	15.831	534961	10	20.341
		15.844	888136	5	20.886
		15.841	239585	10	6.976
	Glucose	19.343	124352	10	4.832
		19.344	270728	5	6.506
		19.335	93907	10	2.794
	Fructose	21.606	166423	10	6.559
		21.600	313880	5	7.651
		21.610	118892	10	3.588
	F-Nystose	-	-	10 5 10	-

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
MS	Inulin	11.562	138407	5	22.304
		11.548	126009	5	18.206
		11.496	134548	5	19.440
	Nystose	13.413	8513	5	1.130
		13.497	10550	5	1.256
		-	-	5	-
	1-Kestose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		14.098	32580	5	3.409
MS	Sucrose	15.839	184900	5	21.165
		15.837	54865	5	5.631
		15.850	588895	5	62.528
	Glucose	19.346	48639	5	5.690
		19.340	59814	5	6.273
		19.357	19366	5	2.101
	Fructose	21.567	69283	5	8.220
		21.564	84580	5	8.998
		21.611	49262	5	5.422
	F-Nystose	-	-	5	-
				5	
				5	
MSG0.5	Inulin	11.492	89918	5	14.406
		11.577	124866	5	19.928
		11.490	81381	5	13.308
	Nystose	13.336	7365	5	0.972
		13.173	6489	5	0.853
		13.267	4724	5	0.636
	1-Kestose	14.037	2866	5	0.321
		-	-	5	-
		14.062	9509	5	1.089
	Sucrose	15.843	209736	5	23.868
		15.852	172540	5	19.560
		15.856	427329	5	49.637
	Glucose	19.338	33909	5	3.944
		19.348	44976	5	5.211
		19.341	30070	5	3.569

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	Fructose	21.572	42131	5	4.970
		21.578	68934	5	8.100
		21.624	35478	5	4.272
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
MSG1	Inulin	11.516	112524	5	17.872
		11.508	87404	5	15.567
		11.506	86959	5	15.193
	Nystose	-	-	5	-
		13.479	8915	5	1.308
		13.753	20402	5	2.934
	1-Kestose	13.998	23042	5	2.601
		14.072	1520	5	0.190
		-	-	5	-
	Sucrose	15.854	417535	5	47.831
		15.856	241201	5	30.515
		15.865	257084	5	31.905
	Glucose	19.342	32993	5	3.863
		19.347	41158	5	5.321
		19.350	29699	5	3.767
	Fructose	21.605	53681	5	6.374
		21.610	46229	5	6.062
		21.618	38734	5	4.983
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
MSG2	Inulin	11.467	73411	5	23.585
		11.547	110323	5	15.649
		11.563	95798	5	13.802
	Nystose	13.319	8121	5	1.103
		-	-	5	-
		13.809	11464	5	1.361
	1-Kestose	14.085	2128	5	0.246
		13.969	14214	5	1.141
		-	-	5	-

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	Sucrose	15.858	196974	5	23.062
		15.856	70624	5	7.116
		15.859	36126	5	3.697
	Glucose	19.346	41021	5	4.908
		19.347	72546	5	7.470
		19.353	79912	5	8.358
	Fructose	21.590	48310	5	5.863
		21.612	108988	5	11.383
MSG2		21.590	79912	5	8.477
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
	Inulin	11.538	112999	5	19.743
		11.506	79260	5	11.851
		11.522	96301	5	15.397
	Nystose	13.182	6476	5	0.932
		13.490	10510	5	1.295
		13.450	8770	5	1.155
	1-Kestose	14.078	3402	5	0.416
		-	-	5	-
		14.058	1828	5	0.205
MSP0.5	Sucrose	15.860	89622	5	11.122
		15.858	31679	5	3.365
		15.862	178750	5	20.300
	Glucose	19.346	103601	5	13.140
		19.345	38784	5	4.210
		19.353	35710	5	4.144
	Fructose	21.585	122489	5	15.757
		21.596	54473	5	5.997
		21.623	38090	5	4.484
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
	Inulin	11.460	75195	5	12.400
		11.526	102947	5	23.445
		11.517	97948	5	22.874
	Nystose	13.233	7913	5	1.075
MSP1		13.064	4646	5	0.627
		13.287	7502	5	0.988

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	1-Kestose	14.060	9478	5	1.094
		-	-	5	-
		14.043	3660	5	0.410
	Sucrose	15.857	225795	5	26.449
		15.846	100452	5	11.691
		15.845	158346	5	17.980
	Glucose	19.359	87413	5	10.464
		19.330	48308	5	5.746
MSP1		19.362	42607	5	4.944
	Fructose	21.586	69364	5	8.422
		21.582	65683	5	7.924
		21.571	51428	5	6.053
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
	Inulin	11.535	97711	5	21.282
		11.465	103112	5	16.640
		11.494	125274	5	24.248
	Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
	1-Kestose	14.157	28011	5	2.916
		14.101	26834	5	3.032
		14.067	37771	5	4.481
MSP2					
	Sucrose	15.844	140836	5	14.879
		15.841	113921	5	23.092
		15.840	477496	5	57.477
	Glucose	19.353	20792	5	2.245
		19.357	13857	5	1.623
		19.333	12493	5	1.537
	Fructose	21.569	45753	5	5.010
		21.595	39817	5	4.731
		21.623	40173	5	5.013

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
MSP0.5G0.5	Inulin	11.511	97180	5	16.728
		11.471	96312	5	15.144
		-	-	5	-
	Nystose	13.338	8690	5	1.232
		13.122	8523	5	1.104
		-	-	5	-
	1-Kestose	-	-	5	-
		14.030	19831	5	2.183
		-	-	5	-
	Sucrose	15.840	90431	5	11.057
		15.835	406506	5	45.404
		-	-	5	-
	Glucose	19.343	46087	5	5.759
		19.337	44095	5	5.033
		19.913	48345	5	5.503
	Fructose	21.576	63516	5	8.050
		21.592	36986	5	4.282
		-	-	5	-
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
MSP0.5G1	Inulin	11.432	84883	5	14.343
		11.555	122759	5	23.810
		11.450	85680	5	14.788
	Nystose	13.110	8030	5	1.118
		13.343	7716	5	1.058
		13.819	22678	5	3.225
	1-Kestose	13.959	35748	5	4.229
		-	-	5	-
		-	-	5	-

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	Sucrose	15.834	507022	5	60.854
		15.838	104872	5	12.395
		15.833	245955	5	30.154
	Glucose	19.344	25192	5	3.090
		19.342	67102	5	8.105
		19.346	31921	5	3.999
	Fructose	21.604	30080	5	3.742
		21.549	81871	5	10.031
MSP0.5G1(ต่อ)		21.565	41161	5	5.231
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
	Inulin	11.500	108305	5	24.548
		11.475	101324	5	17.796
		11.472	68655	5	11.378
	Nystose	-	-	5	-
		13.830	18722	5	2.320
		13.574	45449	5	6.205
	1-Kestose	14.076	36347	5	4.365
		-	-	5	-
		-	-	5	-
MSP0.5G2	Sucrose	15.834	282365	5	34.409
		15.832	217320	5	25.132
		15.830	45449	5	5.350
	Glucose	19.351	16271	5	2.026
		19.339	33565	5	4.279
		19.324	21486	5	2.585
	Fructose	21.587	41108	5	5.193
		21.584	46378	5	5.998
		21.581	41903	5	5.113
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
	Inulin	11.469	100735	5	23.374
		11.546	95047	5	21.077
		11.444	59128	5	11.548
MSP1G0.5	Nystose	13.848	19614	5	2.640
		13.851	19962	5	2.422
		13.607	12401	5	1.995

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	1-Kestose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		14.045	5901	5	0.807
	Sucrose	15.838	240944	5	27.957
		15.840	60520	5	6.332
		15.840	273511	5	27.947
	Glucose	19.350	33958	5	4.027
		19.350	27979	5	2.992
		19.354	18754	5	2.659
	Fructose	21.588	48774	5	5.866
		21.580	57330	5	6.218
		21.574	30916	5	4.446
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
MSP1G1	Inulin	11.484	109014	5	17.643
		11.452	74121	5	24.237
		11.611	108228	5	18.385
	Nystose	13.962	23355	5	3.114
		13.660	2961	5	0.413
		-	-	5	-
	1-Kestose	-	-	5	-
		14.029	9997	5	1.185
		14.067	24460	5	2.909
	Sucrose	15.833	479923	5	55.172
		15.832	357954	5	43.067
		15.831	423783	5	51.136
	Glucose	19.343	26342	5	3.095
		19.333	26181	5	3.219
		19.341	18424	5	2.272
	Fructose	21.596	40354	5	4.809
		21.588	38452	5	4.796
		21.587	55614	5	6.956
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	
MSP1G2	Inulin	11.460	97368	5	16.634
		11.398	43053	5	7.427
		11.369	55835	5	9.391

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	Nystose	13.847	20344	5	2.863
		-	-	5	-
		13.175	9896	5	1.371
	1-Kestose	-	-	5	-
		14.001	24065	5	2.906
		14.030	8212	5	0.967
	Sucrose	15.831	208918	5	25.353
		15.829	383932	5	47.043
		15.831	279288	5	33.365
	Glucose	19.344	30983	5	3.842
		-	-	5	-
		19.340	18261	5	2.229
	Fructose	21.572	46178	5	5.809
		-	-	5	-
		21.547	24521	5	3.037
	F-Nystose	-	-	5 5 5	-
MSP2G0.5	Inulin	11.430	85820	5	14.494
		11.389	58017	5	9.693
		11.600	72034	5	11.693
	Nystose	13.992	18474	5	2.570
		13.661	10160	5	1.398
		13.978	22798	5	3.049
	1-Kestose	-	-	5 5 5	-
	Sucrose	15.831	65398	5	7.845
		15.831	52379	5	6.216
		15.829	287212	5	33.117
	Glucose	19.341	113500	5	13.915
		19.342	19206	5	2.329
		19.325	4560	5	0.537
	Fructose	21.532	140593	5	17.483
		21.673	31241	5	3.843
		21.647	38624	5	4.616
	F-Nystose	-	-	5 5 5	-

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
MSP2G1	Inulin	11.520	127248	5	20.717
		11.491	85407	5	14.314
		-	-	5	-
	Nystose	13.858	22575	5	3.028
		13.271	9548	5	1.318
		-	-	5	-
	1-Kestose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		14.416	12023	5	1.386
	Sucrose	15.829	308432	5	35.668
		15.828	73770	5	8.782
		-	-	5	-
	Glucose	19.336	39774	5	4.701
		19.337	41794	5	5.085
		19.944	22334	5	2.670
MSP2G1 (ต่อ)	Fructose	21.552	57868	5	6.937
		21.542	74474	5	9.190
		-	-	5	-
	F-Nystose	-	-	5	-
				5	
				5	
MSP2G2	Inulin	-	-	5	-
		11.287	25827	5	4.759
		-	-	5	-
	Nystose	-	-	5	-
				5	
				5	
	1-Kestose	-	-	5	-
				5	
				5	
	Sucrose	-	-	5	-
				5	
				5	

ตารางที่ ก.4 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	Glucose	-	-	5	-
		19.338	141038	5	18.864
		-	-	5	-
	Fructose	-	-	5	-
		21.499	172717	5	23.431
		-	-	5	-
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	

ตารางที่ ก.5 ความเข้มข้นของฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (FructoOligosaccharides: FOS)

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น nystose (mg/g fresh weight)	ความเข้มข้น 1-kestose (mg/g fresh weight)	ความเข้มข้น FOS (mg/g fresh weight)
วันที่ 0	1.582	3.106	4.688
	0.256	2.676	2.932
	0.578	0.582	1.160
MS	1.130	-	1.130
	1.256	-	1.256
	-	3.409	3.409
MSG0.5	0.972	0.321	1.293
	0.853	-	0.853
	0.636	1.089	1.725
MSG1	-	2.601	2.601
	1.308	0.190	1.498
	2.934	-	2.934
MSG2	1.103	0.246	1.349
	-	1.141	1.141
	1.361	-	1.361
MSP0.5	0.932	0.416	1.348
	1.295	-	1.295
	1.155	0.205	1.360
MSP1	1.075	1.094	2.169
	0.627	-	0.627
	0.988	0.410	1.398

ตารางที่ ก.5 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น nystose (mg/g fresh weight)	ความเข้มข้น 1-kestose (mg/g fresh weight)	ความเข้มข้น FOS (mg/g fresh weight)
MSP2		2.916	2.916
	-	3.032	3.032
		4.481	4.481
MSP0.5G0.5	1.232	-	1.232
	1.104	2.183	3.287
	-	0.951	0.951
MSP0.5G1	1.118	4.229	5.347
	1.058	-	1.058
	3.225	-	3.225
MSP0.5G2	-	4.365	4.365
	2.302	-	2.302
	6.205	-	6.205
MSP1G0.5	2.640	-	2.640
	2.422	-	2.422
	1.995	0.807	2.802
MSP1G1	3.114	-	3.114
	0.413	1.185	1.598
	-	2.909	2.909
MSP1G2	2.863	-	2.863
	-	2.906	2.906
	1.371	0.967	2.338
MSP2G0.5	2.570		2.570
	1.398	-	1.398
	3.049		3.049
MSP2G1	3.028	-	3.028
	1.318	-	1.318
	-	1.083	1.083
MSP2G2			
	-	-	-

การทดลองชุดที่ 2

ตารางที่ ก.6 น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันเป็นระยะเวลา 21 วัน

สูตรอาหาร	ซ้ำ	น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น(กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
วันที่ 0	1	1.0388	1.0388	0.2356
	2	1.0387	1.0387	0.2680
	3	1.0013	1.0013	0.2389
MS	1	1.0620	1.2234	0.4617
	2	1.0120	1.3558	0.5757
	3	1.1291	1.3421	0.5220
MSG0.5	1	0.9861	1.1900	0.4464
	2	1.0670	1.5003	0.8053
	3	0.9901	1.5203	0.8168
MSG1	1	1.0140	1.2541	0.5802
	2	0.9811	1.2125	0.5514
	3	1.0714	1.7059	0.9346
MSG2	1	0.9776	1.3649	0.7069
	2	1.0145	1.2512	0.5789
	3	1.0770	1.6154	1.0020
MSP0.5	1	1.0140	1.8115	1.0645
	2	1.0300	1.3258	0.6401
	3	1.0904	1.4018	0.7479
MSP1	1	1.0300	1.2910	0.7206
	2	1.0191	1.3302	0.7330
	3	0.9011	1.3415	0.7760
MSP2	1	1.0690	1.4418	0.9586
	2	1.0281	1.2569	0.7625
	3	1.0401	1.2704	0.7249
MSP05G0.5	1	1.0785	1.2103	0.5327
	2	1.0543	1.1785	0.5595
	3	1.0285	1.2696	0.5572
MSP0.5G1	1	1.0579	1.3258	0.7132
	2	0.9955	1.2311	0.6598
	3	0.9753	2.1481	1.4870
MSP0.5G2	1	1.0895	1.4043	0.7278
	2	1.0600	2.0518	1.3645
	3	1.0613	1.9419	1.2132
MSP1G0.5	1	1.0433	2.0097	1.4006
	2	0.9370	1.7244	1.0747
	3	1.0859	1.2966	0.7701

ตารางที่ ก.6 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ซ้ำ	น้ำหนักเซลล์เริ่มต้น(กรัม)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
MSP1G1	1	1.0850	1.4015	0.7827
	2	1.0676	1.6245	0.9854
	3	1.0401	2.3677	1.7030
MSP1G2	1	1.0770	1.6182	0.9557
	2	0.9649	1.7503	1.0841
	3	1.0751	1.9978	1.2258
MSP2G0.5	1	0.9781	1.3460	0.7614
	2	0.9908	1.2842	0.7277
	3	1.0988	1.4371	0.8746
MSP2G1	1	1.0560	1.4001	0.8231
	2	1.0393	1.2818	0.8084
	3	0.9881	1.2301	0.6425
MSP2G2	1	1.0588	1.4251	0.9130
	2	0.9362	1.3004	0.6995
	3	1.0931	1.8864	1.2645

ตารางที่ ก.7 น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น และ อัตราการเจริญเติบโต ของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวันเป็นระยะเวลา 21 วัน

สูตรอาหาร	ซ้ำ	น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	อัตราการเจริญเติบโต	
			กรัม/กรัมน้ำหนักสด	กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง
MS	1	0.1614	1.1520	1.8655
	2	0.3438	1.3397	2.3261
	3	0.2130	1.1886	2.1091
MSG0.5	1	0.2039	1.2068	1.8036
	2	0.4333	1.4061	3.2537
	3	0.5302	1.5355	3.3002
MSG1	1	0.2401	1.2368	2.3442
	2	0.2314	1.2359	2.2279
	3	0.6345	1.5922	3.7762
MSG2	1	0.3873	1.3962	2.8562
	2	0.2367	1.2333	2.3390
	3	0.5384	1.4999	4.0485
MSP0.5	1	0.7975	1.7865	4.3010
	2	0.2958	1.2872	2.5863
	3	0.3114	1.2856	3.0218
MSP1	1	0.2610	1.2534	2.9115
	2	0.3111	1.3053	2.9616
	3	0.4404	1.4887	3.1354

ตารางที่ ก.7 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ซ้ำ	น้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น (กรัม)	อัตราการเจริญเติบโต	
			กรัม/กรัมน้ำหนักสด	กรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง
MSP2	1	0.3728	1.3487	3.8731
	2	0.2288	1.2225	3.0808
	3	0.2303	1.2214	2.9289
MSP0.5G0.5	1	0.1318	1.1222	2.1523
	2	0.1242	1.1178	2.2606
	3	0.2411	1.2344	2.2513
MSP0.5G1	1	0.2679	1.2532	2.8816
	2	0.2356	1.2367	2.6659
	3	1.1728	2.2025	6.0081
MSP0.5G2	1	0.3148	1.2889	2.9406
	2	0.9918	1.9357	5.5131
	3	0.8806	1.8297	4.9018
MSP1G0.5	1	0.9664	1.9263	5.6590
	2	0.7874	1.8403	4.3422
	3	0.2107	1.1940	3.1115
MSP1G1	1	0.3165	1.2917	3.1624
	2	0.5569	1.5216	3.9814
	3	1.3276	2.2764	6.8808
MSP1G2	1	0.5412	1.5025	3.8614
	2	0.7854	1.8140	4.3802
	3	0.9227	1.8582	4.9527
MSP2G0.5	1	0.3679	1.3761	3.0764
	2	0.2934	1.2961	2.9402
	3	0.3383	1.3079	3.5337
MSP2G1	1	0.3441	1.3259	3.3257
	2	0.2425	1.2333	3.2663
	3	0.2420	1.2449	2.5960
MSP2G2	1	0.3663	1.3460	3.6889
	2	0.3642	1.3890	2.8263
	3	0.7933	1.7257	5.1091

ตารางที่ ก.8 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของแก่นตะวันหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยแคลลัสแก่นตะวัน เป็นระยะเวลา 21 วัน

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
วันที่ 0	Inulin	11.659	420299	5	49.402
		11.654	429282	5	36.622
		11.716	631898	5	48.071
	Nystose	-	-	5 5 5	-
	1-Kestose	-	-	5 5 5	-
	Sucrose	15.854	11650	5	0.973
		15.849	14297	5	0.866
		15.843	14469	5	0.782
	Glucose	19.346	15558	5	0.057
		19.333	18278	5	0.047
		19.338	31511	5	0.074
	Fructose	21.641	24979	5	2.162
		21.595	31242	5	1.962
		21.613	49916	5	2.796
	F-Nystose	-	-	5 5 5	-
MS	Inulin	11.624	211648	5	32.830
		11.525	148703	5	24.922
		11.584	189410	5	29.128
	Nystose	- 13.095 -	- 3695 -	5 5 5	- 0.510 -
	1-Kestose	14.038	7208	5	0.783
		14.052	22927	5	2.690
		14.045	8726	5	0.939
	Sucrose	15.845	454472	5	50.075
		15.851	554053	5	65.957
		15.849	438694	5	47.921
	Glucose	19.344	137576	5	0.680
		19.351	97213	5	0.514
		19.353	84765	5	0.396

ตารางที่ ก.8 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	Fructose	21.545	121759	5	13.906
		21.559	89995	5	11.105
		21.560	86645	5	9.811
	F-Nystose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		12.676	15330	5	1.800
MSG0.5	Inulin	11.538	154923	5	26.317
		11.508	156916	5	26.650
		11.439	118727	5	20.846
	Nystose	-	-	5	-
		13.053	2122	5	0.297
		13.054	6332	5	0.916
	1-Kestose	14.035	5170	5	0.615
		14.039	13302	5	1.582
		14.043	19069	5	2.344
	Sucrose	15.841	421429	5	50.852
		15.840	485560	5	58.578
		15.838	414505	5	51.695
MSG0.5 (ต่อ)	Glucose	19.339	46310	5	0.242
		19.340	62630	5	0.33
		19.341	39349	5	0.207
	Fructose	21.578	50324	5	6.294
		21.566	59465	5	7.436
		21.572	48796	5	6.308

ตารางที่ ก.8 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	F-Nystose	12.534	9218	5	1.196
		-	-	5	-
		12.471	14302	5	1.918
MSG1	Inulin	11.574	187260	5	31.824
		11.551	160540	5	29.437
		11.431	87181	5	14.985
	Nystose	-	-	5 5 5	-
	1-Kestose	14.022	3992	5	0.475
		14.038	5282	5	0.678
		14.047	9539	5	1.148
	Sucrose	15.838	357590	5	43.167
		15.839	466671	5	60.781
		15.839	431654	5	52.700
	Glucose	19.335	49974	5	0.250
		19.345	38627	5	0.206
		19.335	44110	5	0.227
	Fructose	21.561	57007	5	7.133
		21.575	48739	5	6.580
		21.567	47622	5	6.027
	F-Nystose	12.562	11882	5	1.542
		-	-	5	-
		12.609	2886	5	0.379
MSG2	Inulin	11.512	125281	5	20.091
		11.519	124169	5	21.977
		11.365	68911	5	12.554
	Nystose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		13.073	2086	5	0.313
	1-Kestose	14.046	7997	5	0.898
		14.031	4584	5	0.568
		14.037	17413	5	2.221
	Sucrose	15.838	280096	5	31.906
		15.840	276634	5	34.779
		15.836	416839	5	53.940

ตารางที่ ก.8 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	Glucose	19.341	85031	5	0.424
		19.337	48206	5	0.266
		19.340	87017	5	0.467
	Fructose	21.541	76256	5	9.004
		21.562	55108	5	7.182
		21.538	90953	5	12.200
	F-Nystose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		12.485	3089	5	0.430
MSP0.5	Inulin	11.392	77234	5	13.494
		11.474	99886	5	18.297
		11.536	109473	5	19.806
	Nystose	13.066	1005	5	0.145
		-	-	5	-
		-	-	5	-
	1-Kestose	14.049	10350	5	1.266
		14.046	5492	5	0.704
		14.136	3364	5	0.426
	Sucrose	15.838	339665	5	42.154
		15.837	352207	5	45.827
		15.917	243318	5	31.269
	Glucose	19.346	56101	5	0.302
		19.342	52439	5	0.280
		19.414	49714	5	0.269
	Fructose	21.553	51452	5	6.619
		21.567	49385	5	6.661
		21.630	53843	5	7.172
	F-Nystose	12.459	2846	5	0.380
		12.618	3778	5	0.529
		-	-	5	-
MSP1	Inulin	11.422	74730	5	12.566
		11.403	78597	5	13.677
		11.418	75678	5	12.523
	Nystose	-	-	5 5 5	-
	1-Kestose	14.040	4644	5	0.547
		14.056	6006	5	0.732
		14.060	7240	5	0.839

ตารางที่ ก.8 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	Sucrose	15.844	262176	5	31.316
		15.843	286695	5	35.438
		15.849	335005	5	39.379
	Glucose	19.350	94409	5	0.498
		19.338	77490	5	0.395
		19.343	88713	5	0.429
	Fructose	21.530	80561	5	9.975
		21.532	58582	5	7.506
		21.562	71014	5	8.653
	F-Nystose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		12.610	3245	5	0.410
MSP2	Inulin	11.395	62945	5	10.970
		11.433	131684	5	23.591
		11.400	125192	5	22.705
	Nystose	-	-	5	-
		13.067	3143	5	0.464
		13.065	3071	5	0.459
	1-Kestose	14.042	21545	5	2.629
		14.040	21704	5	2.722
		14.034	20988	5	2.665
MSP2 (ต่อ)	Sucrose	15.834	429978	5	53.229
		15.837	389197	5	49.527
		15.834	366909	5	47.268
	Glucose	19.340	66212	5	0.337
		19.334	67909	5	0.370
		19.335	61667	5	0.332
	Fructose	21.555	71077	5	9.121
		21.555	57855	5	7.632
		21.569	54032	5	7.215
	F-Nystose	12.681	1617	5	0.215
		-	-	5	-
		-	-	5	-
MSP0.5G0.5	Inulin	11.520	163293	5	23.892
		11.561	151744	5	25.175
		11.529	143868	5	23.457
	Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	

ตารางที่ ก.8 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	1-Kestose	14.035	2410	5	0.247
		14.045	6743	5	0.783
		14.031	2418	5	0.276
	Sucrose	15.834	307524	5	31.961
		15.836	318245	5	37.504
		15.835	228899	5	26.510
	Glucose	19.334	72747	5	0.318
		19.338	78931	5	0.397
		19.334	50025	5	0.245
	Fructose	21.541	81388	5	8.768
		21.537	84163	5	10.281
		21.545	56646	5	6.800
	F-Nystose	-	-	5	-
		12.695	3603	5	0.457
		12.413	8241	5	1.026
MSP0.5G1	Inulin	11.443	88990	5	15.982
		11.468	113817	5	18.667
		11.379	61867	5	10.212
	Nystose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		13.054	2230	5	0.303
	1-Kestose	14.035	6868	5	0.863
		14.016	5214	5	0.599
		14.033	18214	5	2.105
	Sucrose	15.832	300903	5	38.385
		15.832	385639	5	44.927
		15.831	395885	5	46.419
	Glucose	19.336	78026	5	0.425
		19.339	48162	5	0.235
		19.332	56625	5	0.274
	Fructose	21.524	66733	5	8.824
		21.549	53234	5	6.429
		21.570	49475	5	6.013
	F-Nystose	12.495	2740	5	0.376
		-	-	5	-
		12.505	2547	5	0.321
MSP0.5G2	Inulin	11.251	36693	5	6.764
		11.340	71152	5	12.679
		11.395	66125	5	11.098

ตารางที่ ก.8 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
MSP0.5G2 (ต่อ)	Nystose	-	-	5	-
		13.080	7117	5	1.045
		13.080	2358	5	0.326
	1-Kestose	-	-	5	-
		14.043	22033	5	2.749
		14.049	16430	5	1.930
	Sucrose	-	-	5	-
		15.844	334735	5	42.369
		15.845	381156	5	45.440
	Glucose	19.405	70807	5	0.412
		19.349	39392	5	0.216
		19.337	48381	5	0.256
	Fructose	21.501	77617	5	10.536
		21.587	36615	5	4.804
		21.575	42565	5	5.260
	F-Nystose	-	-	5	-
		12.449	22002	5	2.994
		-	-	5	-
MSP1G0.5	Inulin	11.310	71675	5	12.479
		11.226	24330	5	4.795
		11.428	80968	5	14.811
	Nystose	13.079	8834	5	1.267
		-	-	5	-
		-	-	5	-
	1-Kestose	14.037	24253	5	2.956
		-	-	5	-
		14.032	3807	5	0.488
	Sucrose	15.832	390786	5	48.329
		15.847	7758	5	1.086
		15.832	138767	5	18.030
	Glucose	19.326	49657	5	0.253
		19.374	48358	5	0.288
		19.336	112494	5	0.624
	Fructose	21.615	21152	5	2.712
		21.518	47068	5	6.830
		21.517	92392	5	12.444
	F-Nystose			5	
		-	-	5	-
				5	

ตารางที่ ก.8 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
MSP1G1	Inulin	11.467	153263	5	26.582
		11.408	86161	5	16.053
		11.375	58557	5	11.076
	Nystose	-	-	5	-
		13.061	1841	5	0.283
		13.065	2066	5	0.322
	1-Kestose	14.029	13027	5	1.582
		14.032	16081	5	2.097
		14.041	14055	5	1.861
	Sucrose	15.836	537939	5	66.273
		15.834	410907	5	54.382
		15.836	302188	5	40.602
	Glucose	19.338	69432	5	0.369
		19.335	59593	5	0.343
		19.338	50648	5	0.298
	Fructose	21.549	65119	5	8.316
		21.558	52178	5	7.158
		21.566	36156	5	5.036
	F-Nystose	-	-	5	-
		12.535	3172	5	0.451
		12.412	2390	5	0.345
MSP1G2	Inulin	11.381	71050	5	12.692
		11.161	78828	5	13.516
		11.477	123327	5	20.388
	Nystose	-	-	5 5 5	-
	1-Kestose	14.044	6147	5	0.769
		-	-	5	-
		14.047	408238	5	1.905
	Sucrose	15.837	232914	5	29.553
		15.591	201043	5	24.485
		15.824	320799	5	37.671
	Glucose	19.322	44764	5	0.245
		19.100	68859	5	0.356
		19.334	68011	5	0.329
	Fructose	21.539	34642	5	4.556
		21.269	6141849	5	7.754
		21.532	46971	5	5.717

ตารางที่ ก.8 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
	F-Nystose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		12.575	46971	5	5.930
MSP2G0.5	Inulin	11.361	65293	5	10.471
		11.417	77184	5	13.365
		11.456	90630	5	15.787
	Nystose	-	-	5	-
				5	
				5	
	1-Kestose	14.031	15065	5	1.691
		14.092	2320	5	0.281
		-	-	5	-
	Sucrose	15.832	309100	5	35.210
		15.864	210752	5	25.922
		15.850	171035	5	21.163
	Glucose	19.333	101398	5	0.506
		19.309	46296	5	0.237
		19.350	54240	5	0.276
	Fructose	21.522	97926	5	11.563
		-	-	5	-
		21.549	54114	5	6.941
	F-Nystose	-	-	5	-
				5	
				5	
MSP2G1	Inulin	11.395	77780	5	13.111
		11.348	62926	5	11.240
		11.376	74697	5	12.398
	Nystose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		13.087	11509	5	1.574
	1-Kestose	14.052	8235	5	0.972
		14.045	3429	5	0.429
		14.041	6951	5	0.808
	Sucrose	15.848	262507	5	31.431
		15.878	73922	5	9.379
		15.842	276544	5	32.604
	Glucose	19.356	76091	5	0.400
		19.389	72642	5	0.397
		19.361	49760	5	0.240

ตารางที่ ก.8 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ชนิดน้ำตาล	Retention time	Area	Dilution	ปริมาณ (mg/g fresh weight)
MSP2G1 (ต่อ)	Fructose	21.511	76168	5	9.453
		21.581	92777	5	12.202
		21.515	46943	5	5.737
	F-Nystose	-	-	5	-
				5	
				5	
MSP2G2	Inulin	11.638	20973	5	3.525
		11.259	116276	5	19.628
		11.375	62418	5	10.010
	Nystose	-	-	5	-
				5	
				5	
	1-Kestose	-	-	5	-
		-	-	5	-
		14.073	20928	5	2.349
	Sucrose	15.843	88221	5	10.533
		15.642	264318	5	31.694
		15.857	685825	5	78.124
	Glucose	19.347	117691	5	0.621
		19.204	102650	5	0.539
		19.294	142177	5	0.709
	Fructose	21.526	157795	5	19.528
		21.388	95025	5	11.811
		21.530	68254	5	8.059
	F-Nystose	-	-	5	-
				5	
				5	

ตารางที่ ก.9 ความเข้มข้นของฟรักโทโอลิโกแซคคาไรด์ (FructoOligosaccharides : FOS)

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น nystose (mg/g fresh weight)	ความเข้มข้น 1-kestose (mg/g fresh weight)	ความเข้มข้น f-nystose (mg/g fresh weight)	ความเข้มข้นFOS (mg/g fresh weight)
วันที่ 0	-	-	-	-
MS	-	0.783	-	0.783
	0.510	2.690	-	3.200
	-	0.936	1.800	2.740
MSG0.5	-	0.615	1.196	1.811
	0.297	1.582	-	1.878
	0.916	2.344	1.918	5.177
MSG1		0.475	1.542	2.017
	-	0.678	-	0.678
		1.148	0.379	1.527
MSG2	-	0.898	-	0.898
	-	0.568	-	0.568
	0.313	2.221	0.430	2.964
MSP0.5	0.145	1.266	0.380	1.790
	-	0.704	0.529	1.233
	-	0.426	-	0.426
MSP1		0.547	-	0.547
	-	0.732	-	0.732
		0.839	0.410	1.249
MSP2	-	2.629	0.215	2.844
	0.464	2.722	-	3.186
	0.459	2.665	-	3.124
MSP0.5G0.5		0.247	-	0.247
	-	0.783	0.457	1.240
		0.276	1.026	1.302
MSP0.5G1	-	0.863	0.376	1.239
	-	0.599	-	0.599
	0.303	2.105	0.321	2.729
MSP0.5G2	-	-	-	-
	1.045	2.749	2.994	6.788
	0.326	1.930	-	2.256
MSP1G0.5	1.267	2.956		4.223
	-	-	-	-
	-	0.488		0.488
MSP1G1	-	1.582	-	1.582
	0.283	2.097	0.451	2.831
	0.322	1.861	0.345	2.528

ตารางที่ ก.9 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น nystose (mg/g fresh weight)	ความเข้มข้น 1-kestose (mg/g fresh weight)	ความเข้มข้น f-nystose (mg/g fresh weight)	ความเข้มข้นFOS (mg/g fresh weight)
MSP1G2	-	0.769 - 1.905	- - 5.930	0.769 - 7.835
MSP2G0.5	-	1.691 0.281 -	-	1.691 0.281 -
MSP2G1	- - 1.574	0.972 0.429 0.808	-	0.972 0.429 2.381
MSP2G2	-	- - 2.349	-	- - 2.349

3.2 การศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการเจริญและการผลิตอินนูลิน

ตารางที่ ก.10 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง pH และค่าการนำไฟฟ้า (conductivity, mS/cm) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. BAP 1 มก./ล. โพรลีน 1 มก./ล. และกลูตามีน 1 มก./ล. ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารกระตุ้นไคโตซาน (20, 40 และ 60 มก./ล.) และ Methyl jasmonate (0.1, 0.15 และ 0.2 mM) และไคโตซานร่วมกับ Methyl jasmonate เป็นเวลา 21 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที

สูตรอาหาร	No	น้ำหนักสด (กรัม)		น้ำหนักแห้ง (กรัม)		pH		Conductivity (mS/cm)	
		เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง
MSP1G1	1	1.0860	3.6731	0.0965	0.9506	5.66	6.38	5.78	2.34
	2	1.0234	4.2715	0.0965	1.6844	5.66	6.52	5.78	2.02
	3	1.0197	4.1193	0.0965	1.7976	5.66	6.50	5.78	2.32
	4	1.0566	3.8719	0.0965	1.4892	5.66	6.60	5.78	2.20
	5	1.0034	4.0927	0.0965	1.6415	5.66	6.29	5.78	2.35
MSP1G1 LMwC20	1	1.0489	1.3371	0.0965	0.3808	5.64	5.66	6.12	4.87
	2	1.0525	1.9640	0.0965	0.9610	5.64	5.57	6.12	4.20
	3	1.0115	2.1541	0.0965	1.0432	5.64	5.68	6.12	4.03
	4	1.0346	2.0504	0.0965	0.9828	5.64	5.60	6.12	4.15
	5	1.0621	1.9061	0.0965	0.8792	5.64	5.63	6.12	4.25
MSP1G1 LMwC40	1	1.0431	1.4810	0.0965	0.4965	5.74	5.56	5.70	5.10
	2	1.0577	1.5462	0.0965	0.6471	5.74	5.55	5.70	4.93
	3	1.0489	1.5352	0.0965	0.6273	5.74	5.73	5.70	4.76
	4	1.0375	1.5009	0.0965	0.6616	5.74	5.79	5.70	4.24
	5	1.0053	1.4813	0.0965	0.5296	5.74	5.55	5.70	4.43

ตารางที่ ก.10 (ต่อ)

สูตรอาหาร	No	น้ำหนักสด (กรัม)		น้ำหนักแห้ง (กรัม)		pH		Conductivity (mS/cm)	
		เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง
MSP1G1 LMwC60	1	1.0433	1.1594	0.0965	0.2957	5.74	5.50	6.11	4.98
	2	1.0292	1.2016	0.0965	0.3781	5.74	5.60	6.11	4.74
	3	1.0048	1.3453	0.0965	0.4977	5.74	5.52	6.11	4.77
	4	1.0705	1.2195	0.0965	0.4122	5.74	5.62	6.11	4.80
	5	1.0447	1.3253	0.0965	0.2618	5.74	5.56	6.11	4.97
MSP1G1 Mj0.1	1	1.0217	2.5362	0.0965	0.8098	5.69	5.88	5.78	3.56
	2	1.0548	2.0366	0.0965	0.5070	5.69	5.66	5.78	3.80
	3	1.0330	2.0906	0.0965	0.5677	5.69	5.59	5.78	3.76
	4	1.0063	2.4600	0.0965	0.8328	5.69	5.83	5.78	3.49
	5	1.0534	2.0816	0.0965	0.6683	5.69	5.64	5.78	4.43
MSP1G1 Mj0.15	1	1.0458	2.8240	0.0965	1.2938	5.02	5.84	6.25	3.83
	2	1.0578	2.1350	0.0965	0.6807	5.02	5.66	6.25	4.21
	3	1.0462	2.5985	0.0965	1.0933	5.02	5.74	6.25	3.71
	4	1.0476	2.3246	0.0965	0.8538	5.02	5.83	6.25	3.98
	5	1.0250	2.5761	0.0965	1.1914	5.02	5.80	6.25	4.02
MSP1G1 Mj0.2	1	1.0415	1.8084	0.0965	0.5491	5.44	5.99	6.09	4.60
	2	1.0583	2.6236	0.0965	1.0418	5.44	5.89	6.09	3.92
	3	1.0309	1.9916	0.0965	0.4653	5.44	5.82	6.09	4.40
	4	1.0379	1.5014	0.0965	0.2989	5.44	5.66	6.09	4.87
	5	1.0010	1.2122	0.0965	0.1905	5.44	5.58	6.09	5.19
MSP1G1 LMwC20 Mj0.1	1	1.0149	1.6382	0.0965	0.4006	5.77	6.03	6.01	4.88
	2	1.0305	1.5720	0.0965	0.4601	5.77	6.11	6.01	4.54
	3	1.0410	1.5007	0.0965	0.4527	5.77	6.09	6.01	4.53
	4	1.0266	1.6826	0.0965	0.6506	5.77	6.09	6.01	4.14
	5	1.0529	1.5726	0.0965	0.5630	5.77	6.10	6.01	4.42
MSP1G1 LMwC20 Mj 0.15	1	1.0171	1.3898	0.0965	0.4363	5.63	6.16	5.98	4.42
	2	1.0222	1.5232	0.0965	0.5467	5.63	6.06	5.98	4.50
	3	1.0677	1.7075	0.0965	0.6717	5.63	6.10	5.98	4.46
	4	1.0430	1.0468	0.0965	0.2428	5.63	6.07	5.98	5.44
	5	1.0359	1.1639	0.0965	0.3397	5.63	6.07	5.98	4.86
MSP1G1 LMwC20 Mj 0.2	1	1.0377	1.2074	0.0965	0.3002	5.72	6.01	6.13	5.23
	2	1.0274	1.1393	0.0965	0.2645	5.72	6.08	6.13	5.13
	3	1.0549	1.1551	0.0965	0.3415	5.72	6.03	6.13	5.19
	4	1.0298	1.1173	0.0965	0.3250	5.72	6.05	6.13	5.03
	5	1.0089	1.1880	0.0965	0.3665	5.72	6.01	6.13	5.29

ตารางที่ ก.10 (ต่อ)

สูตรอาหาร	No	น้ำหนักสด (กรัม)		น้ำหนักแห้ง (กรัม)		pH		Conductivity (mS/cm)	
		เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง
MSP1G1 LMwC40 Mj0.1	1	1.0523	1.3070	0.0965	0.3600	5.70	6.04	6.15	5.60
	2	1.0363	0.9698	0.0965	0.2166	5.70	6.01	6.15	5.54
	3	1.0435	1.0836	0.0965	0.2492	5.70	5.88	6.15	5.57
	4	1.0499	1.0441	0.0965	0.1943	5.70	5.84	6.15	5.48
	5	1.0329	0.9079	0.0965	0.1219	5.70	5.98	6.15	5.99
MSP1G1 LMwC40 Mj 0.15	1	1.0282	1.2598	0.0965	0.4055	5.68	6.16	6.12	5.20
	2	1.0373	1.2015	0.0965	0.3979	5.68	5.94	6.12	5.27
	3	1.0314	1.1507	0.0965	0.2687	5.68	5.93	6.12	5.19
	4	1.0206	1.0090	0.0965	0.2084	5.68	5.98	6.12	5.84
	5	1.0380	1.2540	0.0965	0.3617	5.68	5.97	6.12	5.64
MSP1G1 LMwC40 Mj 0.2	1	1.0570	0.9998	0.0965	0.2181	5.33	5.65	6.08	6.05
	2	1.0275	1.0149	0.0965	0.2482	5.33	5.46	6.08	5.84
	3	1.0187	1.1053	0.0965	0.3220	5.33	5.66	6.08	5.56
	4	1.0043	1.0903	0.0965	0.2568	5.33	5.56	6.08	5.67
	5	1.0051	1.1383	0.0965	0.2885	5.33	5.49	6.08	5.88
MSP1G1 LMwC60 Mj0.1	1	1.0255	0.8923	0.0965	0.1397	5.76	5.34	5.69	6.17
	2	1.0379	0.9249	0.0965	0.1754	5.76	5.52	5.69	5.99
	3	1.0594	1.0451	0.0965	0.1670	5.76	5.45	5.69	5.68
	4	1.0382	1.0430	0.0965	0.1739	5.76	5.41	5.69	5.80
	5	1.0324	0.9759	0.0965	0.1103	5.76	5.34	5.69	5.93
MSP1G1 LMwC60 Mj0.15	1	1.0302	1.0051	0.0965	0.1530	5.78	5.59	5.90	5.93
	2	1.0766	1.0782	0.0965	0.2188	5.78	5.28	5.90	5.88
	3	1.0004	1.0862	0.0965	0.2022	5.78	5.35	5.90	5.63
	4	1.0394	1.2057	0.0965	0.2828	5.78	5.45	5.90	5.60
	5	1.0447	1.3539	0.0965	0.3267	5.78	5.35	5.90	5.96
MSP1G1 LMwC60 Mj0.2	1	1.0307	0.9696	0.0965	0.1364	5.72	5.71	5.98	5.55
	2	1.0028	0.9345	0.0965	0.1629	5.72	5.77	5.98	5.32
	3	1.0429	0.9426	0.0965	0.1472	5.72	5.46	5.98	5.68
	4	1.0364	0.9465	0.0965	0.2029	5.72	5.42	5.98	5.71
	5	1.0215	0.9503	0.0965	0.1509	5.72	5.39	5.98	5.57

ตารางที่ ก.11 ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1 มก./ล. BAP 1 มก./ล. โพรลีน 1 มก./ล. และกลูตามีน 1 มก./ล. ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารกระตุ้นไคโตซาน (20, 40 และ 60 มก./ล.) และ Methyljasmonate (0.1, 0.15 และ 0.2 mM) และไคโตซานร่วมกับ Methyljasmonate เป็นเวลา 21 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที

สูตรอาหาร	ซ้ำที่	ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบ (มก./ก. น้ำหนักแห้ง)					
		Inulin	Nystose	1-kestose	Sucrose	glucose	fructose
แคลลัสเริ่มต้น*	1	43.452	0.000	2.702	54.060	2.172	14.805
	2	18.415	0.000	1.744	15.216	3.297	16.812
	3	23.015	0.000	0.655	13.584	5.029	18.571
MSP1G1	1	16.573	1.805	0.000	3.940	0.000	1.604
	2	11.932	1.021	0.000	1.906	0.000	1.309
	3	2.932	0.000	0.000	0.827	0.000	0.000
MSP1G1LMwC20	1	15.014	0.483	0.624	14.087	2.900	7.606
	2	11.332	0.647	0.372	7.537	2.062	5.301
	3	5.405	0.000	0.314	5.446	1.151	2.757
MSP1G1LMwC40	1	16.665	1.067	0.302	18.106	3.370	9.097
	2	16.400	1.006	0.344	13.197	3.400	8.350
	3	15.576	1.439	0.000	10.357	3.749	9.645
MSP1G1LMwC60	1	19.944	0.000	2.467	10.320	1.351	6.271
	2	21.579	1.791	0.000	8.511	0.000	7.083
	3	16.949	0.000	0.333	8.186	1.924	4.921
MSP1G1Mj0.10	1	13.778	1.317	0.890	4.494	2.968	4.029
	2	21.317	0.000	5.871	7.517	2.414	4.215
	3	15.084	2.654	1.227	6.142	3.143	4.519
MSP1G1Mj0.15	1	16.891	1.473	0.813	5.212	3.128	4.466
	2	20.508	1.909	0.000	6.917	3.566	7.051
	3	16.745	1.280	0.000	6.734	3.560	5.708
MSP1G1Mj0.20	1	19.251	3.561	0.000	5.148	5.216	12.276
	2	22.997	0.000	6.504	13.038	3.101	9.148
	3	39.496	0.000	3.894	19.876	11.532	23.131
MSP1G1LMwC20Mj0.1	1	31.299	6.312	0.000	9.198	2.126	9.362
	2	28.698	2.453	3.589	5.848	1.326	7.933
	3	24.375	1.739	0.000	4.764	1.685	6.302
MSP1G1LMwC20Mj0.15	1	32.121	0.000	0.363	5.407	2.628	8.460
	2	17.310	0.000	0.429	5.908	2.311	5.991
	3	11.131	0.663	0.000	1.227	16.614	28.941
MSP1G1LMwC20Mj0.2	1	27.527	0.000	7.071	7.304	4.762	12.514
	2	29.600	9.600	0.000	11.881	6.161	16.314
	3	29.554	0.000	8.214	5.837	4.808	12.717

ตารางที่ ก.11 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ซ้ำที่	ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบ (มก./ก. น้ำหนักแห้ง)					
		Inulin	Nystose	1-kestose	Sucrose	glucose	fructose
MSP1G1LMwC40Mj0.1	1	26.595	0.000	1.319	7.211	9.653	22.486
	2	22.338	0.226	2.488	9.998	8.562	21.569
	3	26.263	0.000	2.602	11.463	6.324	18.964
MSP1G1LMwC40Mj0.15	1	33.389	9.351	0.000	6.805	7.597	16.157
	2	26.896	0.000	1.410	5.788	7.292	16.104
	3	8.716	0.287	0.000	0.000	19.532	33.449
MSP1G1LMwC40Mj0.2	1	23.066	2.600	1.423	4.259	13.722	26.895
	2	20.032	0.000	0.526	2.838	11.524	20.642
	3	18.859	0.000	1.330	3.593	0.000	25.177
MSP1G1LMwC60Mj0.1	1	34.474	0.000	3.409	29.754	15.515	30.392
	2	19.433	2.199	1.251	9.481	6.400	17.981
	3	17.676	1.797	1.243	1.949	8.784	22.665
MSP1G1LMwC60Mj0.15	1	19.276	1.947	1.008	5.403	7.790	19.670
	2	19.550	3.235	1.266	9.301	8.911	18.897
	3	19.472	0.000	0.778	7.873	8.205	18.368
MSP1G1LMwC60Mj0.2	1	25.594	2.805	2.307	11.714	8.566	20.885
	2	22.389	0.000	1.327	7.413	9.726	21.260
	3	14.567	0.000	0.604	7.804	3.471	16.967

ตารางที่ ก.12 ความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดอื่นที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ เป็นเวลา 21 วัน

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดอื่นๆ (mg/g dry weight)*		
	sucrose	glucose	fructose
MSP1G1	2.224 ± 1.581	-	0.971 ± 0.854
MSP1G1LMwC20	9.023 ± 4.508	2.038 ± 0.875	5.221 ± 2.425
MSP1G1LMwC40	13.887 ± 3.920	3.506 ± 0.211	9.031 ± 0.650
MSP1G1LMwC60	9.006 ± 1.149	1.092 ± 0.988	6.091 ± 1.092
MSP1G1Mj0.1	6.051 ± 1.513	2.842 ± 0.381	4.254 ± 0.247
MSP1G1Mj0.15	6.288 ± 0.936	3.418 ± 0.251	5.742 ± 1.293
MSP1G1Mj0.2	12.687 ± 7.370	6.616 ± 4.386	14.852 ± 7.339
MSP1G1LMwC20Mj0.1	6.603 ± 2.311	1.712 ± 0.401	7.866 ± 1.531
MSP1G1LMwC20Mj0.15	4.181 ± 2.570	7.184 ± 8.168	14.464 ± 12.598
MSP1G1LMwC20Mj0.2	8.341 ± 3.152	5.244 ± 0.745	13.848 ± 2.138
MSP1G1LMwC40Mj0.1	9.557 ± 2.160	8.180 ± 1.697	21.006 ± 1.827
MSP1G1LMwC40Mj0.15	4.198 ± 3.671	11.474 ± 6.980	21.903 ± 9.999

ตารางที่ ก.12 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดอื่นๆ (mg/g dry weight)*		
	sucrose	glucose	fructose
MSP1G1LMwC40Mj0.2	3.563 ± 0.711	8.415 ± 7.370	24.238 ± 3.231
MSP1G1LMwC60Mj0.1	13.728 ± 14.381	10.233 ± 4.727	23.679 ± 6.267
MSP1G1LMwC60Mj0.15	7.526 ± 1.972	8.302 ± 0.567	18.978 ± 0.655
MSP1G1LMwC60Mj0.2	8.977 ± 2.378	7.254 ± 3.327	19.704 ± 2.378

3.3 การศึกษาผลของขนาดของเซลล์ตั้งต้น (%) ต่อการเจริญและการผลิตอินนูลิน

ตารางที่ ก.13 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง pH และค่าการนำไฟฟ้า (conductivity, mS/cm) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันในอาหารสูตร MSP1G1 และ MSP1G1M0.15 ที่มีการแปรผันขนาดของเซลล์ตั้งต้น (5, 10 และ 15%) เป็นเวลา 21 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที

สูตรอาหาร	ขนาดเซลล์ตั้งต้น (%)	No	น้ำหนักสด (กรัม)		น้ำหนักแห้ง (กรัม)		pH		Conductivity (mS/cm)	
			เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง
MSP1G1	5	1	1.1973	1.1040	0.1852	0.2162	5.54	4.01	5.97	6.16
		2	1.1489	1.1744	0.1852	0.3682	5.54	4.15	5.97	5.74
		3	1.1153	1.2303	0.1852	0.3097	5.54	4.19	5.97	5.45
		4	1.1278	1.2029	0.1852	0.3880	5.54	3.88	5.97	5.46
		5	1.0416	1.3085	0.1852	0.4769	5.54	4.29	5.97	5.61
	10	1	2.0029	2.3904	0.3300	1.0500	5.54	4.27	5.97	5.83
		2	2.0499	2.2390	0.3300	0.9622	5.54	4.37	5.97	5.43
		3	2.0403	2.2734	0.3300	1.0648	5.54	4.27	5.97	5.20
		4	2.0695	2.3873	0.3300	1.0431	5.54	4.20	5.97	5.16
		5	2.0252	2.2783	0.3300	0.8586	5.54	4.17	5.97	5.57
	15	1	3.0461	3.5906	0.8996	1.7402	5.54	4.80	5.97	6.00
		2	3.0204	3.3955	0.8996	1.8894	5.54	4.49	5.97	5.69
		3	3.0477	2.8769	0.8996	1.5442	5.54	4.19	5.97	5.46
		4	3.0753	2.9231	0.8996	1.5314	5.54	4.13	5.97	5.45
		5	3.0561	2.8447	0.8996	1.3050	5.54	4.12	5.97	5.59
MSP1G1M 0.15	5	1	1.0357	1.0381	0.1852	0.2433	5.64	4.26	5.76	5.73
		2	1.0449	0.9707	0.1852	0.1450	5.64	4.19	5.76	5.63
		3	1.0457	1.0135	0.1852	0.2147	5.64	4.10	5.76	5.49
		4	1.0601	1.0025	0.1852	0.1664	5.64	4.21	5.76	5.48
		5	1.0865	1.1102	0.1852	0.1794	5.64	4.09	5.76	5.44

ตารางที่ ก.13 (ต่อ)

สูตรอาหาร	ขนาดเซลล์ตั้งต้น (%)	No	น้ำหนักสด (กรัม)		น้ำหนักแห้ง (กรัม)		pH		Conductivity (mS/cm)	
			เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง
	10	1	2.0535	2.0690	0.3300	0.6754	5.64	4.18	5.76	5.59
		2	2.0465	2.0422	0.3300	0.6610	5.64	3.99	5.76	4.99
		3	2.0356	1.9301	0.3300	0.4544	5.64	4.21	5.76	5.09
		4	2.0155	1.9741	0.3300	0.3225	5.64	4.05	5.76	5.12
		5	2.0684	1.9811	0.3300	0.5362	5.64	4.26	5.76	5.15
	15	1	3.0070	2.9109	0.8996	1.3845	5.64	4.23	5.76	5.44
		2	3.0102	2.7852	0.8996	1.1492	5.64	4.16	5.76	5.36
		3	3.0043	3.1061	0.8996	1.3543	5.64	4.25	5.76	5.35
		4	3.0074	3.0764	0.8996	1.2810	5.64	4.25	5.76	5.31
		5	3.0321	2.8097	0.8996	1.4728	5.64	4.99	5.76	5.13

ตารางที่ ก.14 ความเข้มข้นของอินนูลินที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSP1G1 และ MSP1G1M0.15 เป็นเวลา 21 วัน

สูตรอาหาร	ขนาดของเซลล์ตั้งต้น (%)	ความเข้มข้นของอินนูลิน (mg/g dry weight)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ± SD
MSP1G1	5	19.254	19.115	16.656	18.342 ± 1.462
	10	20.500	22.959	21.923	21.794 ± 1.235
	15	12.885	14.449	16.398	14.577 ± 1.760
MSP1G1 M0.15	5	8.867	0.872	8.949	6.230 ± 4.640
	10	21.502	17.540	15.858	18.300 ± 2.898
	15	17.314	15.021	15.029	15.788 ± 1.321

3.4 การศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการเจริญและการผลิตอินนูลิน

ตารางที่ ก.15 น้ำหนักสด (กรัม) น้ำหนักแห้ง (กรัม) pH และค่าการนำไฟฟ้า (conductivity, mS/cm) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของแก่นตะวันในอาหารสูตร MS+ NAA 1 มล./ล. + BAP 1 มล./ล. + โพรลีน 1 มล./ล. + กลูตามีน 1 มล./ล. (MSP1G1) ที่ความเร็วรอบ 80, 100 และ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	No	น้ำหนักสด (กรัม)		น้ำหนักแห้ง (กรัม)		pH		Conductivity (mS/cm)	
			เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง
7 วัน	80 rpm	1	2.0634	1.9008	0.4156	0.3088	5.18	4.03	5.67	5.84
		2	2.0415	1.8960	0.4156	0.3757	5.18	4.28	5.67	5.77
		3	2.0303	2.0156	0.4156	0.3860	5.18	4.36	5.67	6.29

ตารางที่ ก.15 (ต่อ)

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	No	น้ำหนักสด (กรัม)		น้ำหนักแห้ง (กรัม)		pH		Conductivity (mS/cm)	
			เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง	เริ่มต้น	หลังเพาะเลี้ยง
	100 rpm	1	2.0434	2.1738	0.4156	0.5711	5.18	4.07	5.67	5.49
		2	2.0534	2.1681	0.4156	0.4996	5.18	4.23	5.67	5.43
		3	2.0416	2.1014	0.4156	0.4829	5.18	4.16	5.67	5.45
	120 rpm	1	2.0231	2.1747	0.4156	0.4256	5.18	4.14	5.67	5.77
		2	2.0292	2.1953	0.4156	0.6081	5.18	4.10	5.67	5.59
		3	2.0579	2.3255	0.4156	0.6417	5.18	4.15	5.67	5.73
14 วัน	80 rpm	1	2.0469	2.0704	0.4156	0.2542	5.18	4.38	5.67	6.24
		2	2.0386	2.3227	0.4156	0.3339	5.18	4.26	5.67	5.95
		3	2.0324	2.1374	0.4156	0.2404	5.18	4.19	5.67	5.86
	100 rpm	1	2.0532	2.6951	0.4156	0.7491	5.18	4.75	5.67	5.69
		2	2.0277	2.5930	0.4156	0.6536	5.18	4.63	5.67	5.74
		3	2.0359	2.7506	0.4156	0.6401	5.18	4.52	5.67	5.57
	120 rpm	1	2.0537	2.1207	0.4156	0.4148	5.18	4.33	5.67	5.57
		2	2.0253	2.2317	0.4156	0.5185	5.18	4.30	5.67	5.51
		3	2.0420	2.2719	0.4156	0.4442	5.18	4.23	5.67	5.33
21 วัน	80 rpm	1	2.0227	2.3962	0.4156	0.6008	5.18	4.20	5.67	6.03
		2	2.0586	2.3074	0.4156	0.5132	5.18	4.05	5.67	6.00
		3	2.0459	2.0801	0.4156	0.2555	5.18	3.98	5.67	6.12
	100 rpm	1	2.0105	2.3666	0.4156	0.5161	5.18	4.76	5.67	6.02
		2	2.0340	2.6281	0.4156	0.8261	5.18	5.15	5.67	5.78
		3	2.0279	2.3054	0.4156	0.5079	5.18	4.88	5.67	5.97
	120 rpm	1	2.0431	2.7217	0.4156	0.7433	5.18	4.92	5.67	5.36
		2	2.0397	2.3603	0.4156	0.7120	5.18	4.98	5.67	5.74
		3	2.0633	2.6257	0.4156	0.8570	5.18	4.92	5.67	5.48

ตารางที่ ก.16 ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS+ NAA 1 มล./ล. + BAP 1 มล./ล. + โพรลีน 1 มล./ล. + กลูตามีน 1 มล./ล. (MSP1G1) ที่ความเร็วรอบ 80, 100 และ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	ซ้ำที่	ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบ (มก./กรัมน้ำหนักแห้ง)						
			Inulin	Fructofuranosyl-nystose	Nystose	1-kestose	Sucrose	Glucose	Fructose
7 วัน	80 rpm	1	31.271	0.128	-	0.940	14.137	12.422	20.523
		2	26.868	0.092	-	0.902	11.825	12.093	19.585
		3	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ ก.16 (ต่อ)

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง	ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	ซ้ำที่	ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบ (มก./กรัมน้ำหนักแห้ง)						
			Inulin	Fructofuranosyl-nystose	Nystose	1-kestose	Sucrose	Glucose	Fructose
	100 rpm	1	29.317	-	-	1.134	10.609	7.785	16.974
		2	28.651	-	-	1.712	14.870	14.719	15.488
		3	28.946	-	-	1.199	9.963	7.408	16.235
	120 rpm	1	14.999	-	-	1.645	12.414	5.338	11.743
		2	18.360	-	-	1.060	8.854	4.296	9.850
		3	19.467	-	-	0.929	7.567	4.527	10.242
14 วัน	80 rpm	1	27.310	-	-	0.610	11.525	6.230	16.730
		2	37.556	-	-	0.783	16.865	8.581	22.805
		3	23.423	-	-	0.398	9.875	5.881	14.691
	100 rpm	1	39.583	-	-	1.019	15.049	5.370	15.109
		2	39.499	-	-	1.360	21.489	5.432	15.608
		3	39.479	-	-	1.230	19.250	5.462	15.818
	120 rpm	1	31.079	-	-	0.995	7.888	5.405	15.589
		2	36.030	-	-	1.352	12.014	6.690	18.807
		3	40.180	-	-	1.290	13.626	6.099	19.508
21 วัน	80 rpm	1	35.753	-	-	0.600	8.135	4.871	23.266
		2	31.070	-	-	0.559	6.802	4.520	19.675
		3	28.881	-	-	0.338	6.016	4.050	18.230
	100 rpm	1	32.577	-	-	0.287	5.381	0.659	13.157
		2	36.272	-	-	0.447	8.092	0.833	14.320
		3	36.535	-	-	0.331	5.958	0.868	13.933
	120 rpm	1	38.715	-	0.291	1.199	9.703	3.979	13.243
		2	36.968	-	0.215	1.341	11.250	3.736	12.713
		3	35.685	-	0.315	1.332	8.518	3.629	11.658

* - คือ ไม่พบน้ำตาลชนิดนั้นๆ

3.5 การศึกษาการเจริญและการผลิตอินนูลินของเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ตารางที่ ก.17 ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบในเซลล์แขวนลอยแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS+ NAA 1 มล./ล. + BAP 1 มล./ล. + โพรลีน 1 มล./ล. + กลูตามีน 1 มล./ล. (MSP1G1) ในฟลาสก์เขย่าเป็นเวลา 14 และ 21 วัน และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเวลา 21 วัน ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ขนาดเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 10%

สภาวะ	ซ้ำที่	ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่พบ (มก./กรัมน้ำหนักแห้ง)						
		Inulin	Fructofuranosyl-nystose	Nystose	1-kestose	Sucrose	Glucose	Fructose
เซลล์แขวนลอยเริ่มต้น	1	1.865	-		0.170	2.507	6.331	19.615
	2	17.565	-		0.184	4.388	5.405	17.136
	3	17.276	-		1.226	4.109	5.840	16.832
Flask 14 วัน	1	33.407	-	0.288	3.635	24.204	12.214	20.851
	2	29.827	-	0.545	2.924	20.579	10.440	18.227
	3	26.418	-	0.232	2.923	20.579	10.169	17.058
Flask 21 วัน	1	25.433	-	-	0.840	11.679	6.322	13.332
	2	19.393	-	-	0.750	8.763	5.142	10.889
	3	21.500	-	-	0.819	9.954	5.432	10.645
Bioreactor 14 วัน	1	5.732	-	-	-	1.072	12.625	14.580
	2	5.478	-	-	-	0.935	12.154	14.192
	3	0.232	-	-	-	0.995	10.273	11.970

* - คือ ไม่พบน้ำตาลชนิดนั้นๆ

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวบุษราภรณ์ งามปัญญา
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Budsaraporn Ngampanya
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3349900271604
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
   เงินเดือน 39,350 บาท เวลาที่ใช้ทำวิจัย 20 ชั่วโมง-สัปดาห์
4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน.ผู้ช่วยศาสตราจารย์...
   ☑ ข้าราชการ ☐ พนักงาน
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) (กรุณากรอกหมายเลขโทรศัพท์มือถือ และ e-mail เพื่อสะดวกในการติดต่อ และเพื่อกรอกในระบบ NRMS)
   ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม ม.ศิลปากร
   โทรศัพท์ 034-219360 มือถือ 089- 1627114
   โทรสาร 034- 219360 E-mail budsara171@yahoo.com
6. ประวัติการศึกษา : ระดับการศึกษา สถาบัน และปีที่จบ
   ปริญญาตรีสาขาเกษตรศาสตร์ (เกรียตินิยมอันดับ 1) สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
   ปีที่จบ 2536
   หัวข้อปัญหาพิเศษ การแยกเชื้อราที่ก่อโรคเน่าในเงาะและทดสอบความสามารถการก่อโรคเน่าของเชื้อที่คัดเลือกได้
   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 โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

8.1 ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ทางด้านศิลปะและการออกแบบที่ดำเนินการเสร็จแล้ว (อาจมากกว่า 1 เรื่องโดยกรอก 1 เรื่องต่อ 1 แผ่น) ขอให้ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือ ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย สัดส่วนการทำวิจัย ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

เรื่องที่ 1

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและเอนไซม์จากแก่นตะวันที่ปลูกในประเทศไทย

   (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 โสขุมา ปาริชาติ วรรณสโร จิตราภา ชูเนตร และบุษราภรณ์ งามปัญญา (2555) การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแก่นตะวันโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ศิลปากรวิจัยและสร้างสรรค์ครั้งที่ 5 “บูรณาการศาสตร์และศิลป์” 25- 27 มกราคม 2555. มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.

เรื่องที่ 2

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันเพื่อนำไปผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์

   (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 BudsarapornNgampanya. 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. ศรีสุดา เคยอาษา เกรียงศักดิ์ บุญชู และบุษราภรณ์ งามปัญญา (2555) การสกัดและการวิเคราะห์เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากหัวแก่นตะวันระยะต่างๆ. ศิลปากรวิจัยและสร้างสรรค์ครั้งที่ 5 “บูรณาการศาสตร์และศิลป์” 25- 27 มกราคม 2555. มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.

       2. **Ngampanya B**, Keayarsa S, Ngernmeesri 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 โสขุมา ปาริชาติ วรรณสโร จิตราภา ชูเนตร และบุษราภรณ์ งามปัญญา (2555) การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแก่นตะวันโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ศิลปากรวิจัยและสร้างสรรค์ครั้งที่ 5 “บูรณาการศาสตร์และศิลป์” 25- 27 มกราคม 2555. มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.

เรื่องที่ 4

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากแก่นตะวัน
   (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) การโคลนยีนเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสจากแก่นตะวันและการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลูกผสม
(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) การพัฒนาการผลิตพรีไบโอติกฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชและจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์

(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. ชุติมา วันเพ็ญ บุษราภรณ์ งามปัญญา สุวัฒนา พฤกษะศรี พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์ และปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ. 2556. ผลของการพรีทรีตเม้นต์ด้วยอัลตร้าซาวด์ต่อการสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน.วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. ปีที่ 36 ฉบับที่ 2 หน้า 249-258

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

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

เรื่องที่ 8

1. ชื่อเรื่อง / ชื่อผลงาน (ภาษาไทย) การผลิตเอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานสเฟอเรสลูกผสมจากแก่นตะวัน
   (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
   ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 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 *Pichia pastoris* X-33. The 16th FOOD INNOVATION ASIA COFERENCE 2014 June 12-13, 2014 BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.

เรื่องที่ 9

1. ชื่อเรื่อง / ชื่อผลงาน (ภาษาไทย) ผลของอุณหภูมิ แสงสว่าง และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ต่อการสะสมอินนูลินในหัวขนาดเล็กที่ชักนำในหลอดทดลองของแก่นตะวัน

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

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ส่วนบุคคล/เดี่ยว
   เป็นหัวหน้า
3. สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
4. จำนวนงบประมาณ.....218,700..... บาท
   ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 ถึงปี พ.ศ.2559
   ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 60
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
   - ● ในประเทศ
     - ● มหาวิทยาลัย

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
   - ● เผยแพร่แล้ว
     - ● ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์
       - ●ในประเทศ

         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.

8.2 ผลงานวิจัยหรือผลงานสร้างสรรค์ที่<u>กำลังดำเนินการ</u> (กรุณากรอก 1 เรื่องต่อ 1 ส่วน) (อาจมากกว่า 1 เรื่องโดยกรอก 1 เรื่องต่อ 1 แผ่น) ขอให้ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือ ผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย สัดส่วนการทำวิจัย ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

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
   ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 50
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
   - ● ในประเทศ
     - ● คณะวิชา

ผู้ร่วมวิจัย

ตอนที่ 1 ประวัติทั่วไป

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย) นางพิมพ์ชนก จตุรพิรีย์
   (ภาษาอังกฤษ) Mrs Phimchanok Jaturapiree
2. วัน เดือน ปีเกิด 2 ตุลาคม 2518
3. หมายเลขประจำตัวประชาชน (ต้องระบุ) 3 7109 00036 31 0
4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ☐ ข้าราชการ / พนักงาน
   - o อาจารย์
   - / ผู้ช่วยศาสตราจารย์
   - o รองศาสตราจารย์
   - o ศาสตราจารย์
   - o ชำนาญการ
   - o เชี่ยวชาญ
   - o เชี่ยวชาญพิเศษ
   - o อื่นๆ (โปรดระบุ).....

   เงินเดือน 50,740 บาท
   เวลาที่ใช้ทำวิจัย 15 ชั่วโมง/สัปดาห์
5. สถานที่ทำงาน
   ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
   มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
   โทรศัพท์ 0-3421-9360, 089-1204518 โทรสาร 0-3421-9360
   e-mail phimchanok@hotmail.com

   ที่อยู่ปัจจุบัน
   บ้านเลขที่ 129/1 หมู่ 9 ซอย เจริญดี 3 ตำบล ลำพยา อำเภอ เมือง จังหวัด นครปฐม 73000
   โทรศัพท์ 089-1204518 โทรสาร0-3421-9360
6. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีที่จบ พ.ศ. 2539

ปริญญาโท วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขา วิศวกรรมเคมี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ พ.ศ. 2543

ปริญญาเอก Dr.nat.tech. สาขา วิศวกรรมชีวเคมี
University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria
ปีที่จบ พ.ศ. 2549

7. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา (ชื่อเรื่อง/ปีที่ดำเนินการ ทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก)

- ระดับปริญญาโท

ชื่อเรื่อง "Poly-β-hydroxybutyrate production from *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 by two stage continuous fermentation"

ปีที่ดำเนินการ 2542-2543

- ระดับปริญญาเอก

ชื่อเรื่อง "Development of a process for the hydrolysis of the milk sugar lactose employing novel extremophilic enzymes"

ปีที่ดำเนินการ 2547-2549

8. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ) โปรดระบุแขนงวิชาและแนวเรื่องย่อยด้วย (ถ้ามี)

สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา
กลุ่มวิชาอุตสาหกรรมเกษตร
แขนงวิชา Fermentation Process
แขนงวิชา Enzyme Technology

สาขาวิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย
กลุ่มวิชาวิศวกรรมศาสตร์
แขนงวิชา Biochemical Engineering
แขนงวิชา Downstream Processes

ตอนที่ 2 ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ทางด้านศิลปะและการออกแบบที่ดำเนินการเสร็จแล้ว

เรื่องที่ 1

1. ชื่อเรื่อง การผลิต β -galactosidase สำหรับการย่อยสลายแลคโตส โดยจุลินทรีย์ชอบอุณหูมิสูง
Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis by the thermophilic organism

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

/ คณะบุคคล/กลุ่ม / เป็นหัวหน้า □ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7)

สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาอุตสาหกรรมเกษตร แขนงวิชา Fermentation Process

4. จำนวนงบประมาณ 30,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ...2550.... ถึงปี พ.ศ..... 2551.....

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

/ ในประเทศ

□ ภาควิชา □ คณะวิชา / มหาวิทยาลัย □ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

□ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรด ระบุ).....

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

/ เผยแพร่แล้ว

□ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์ ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

() ในประเทศ .....

() ต่างประเทศ.....

/ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

(/) ในประเทศ .....

Pornthip Saengsawang, Wisanu Srila and **Phimchanok Nakkharat**. Screening and production of thermostable β-galactosidase. The 2nd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. 23-25 May 2007, Khon Kaen, Thailand (Oral)

() ต่างประเทศ.....

/ อื่น ๆ (โปรดระบุ) ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ไปตามสถานที่ต่าง ๆ ตามที่สถาบันวิจัยและพัฒนา ของมหาวิทยาลัยศิลปากร ดำเนินการให้

<u>เรื่องที่ 2</u>

1. ชื่อเรื่อง การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตเอนไซม์ β-galactosidase สำหรับการย่อยสลายแลคโตส

   Selection of thermophilic micro-organism producing β-galactosidase for lactose hydrolysis

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน / ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

   ☐ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า☐ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7)

   สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาอุตสาหกรรมเกษตร แขนงวิชา Enzyme Technology

4. จำนวนงบประมาณ 66,660 บาท

   ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ.....2549.... ถึงปี พ.ศ....2550.....

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

   / ในประเทศ

   ☐ ภาควิชา / คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

   ☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ).....

   ☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

   ☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

   / เผยแพร่แล้ว

   ☐ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์

   ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

   () ในประเทศ .....

   () ต่างประเทศ.....

   / ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

   (/) ในประเทศ

Pornthip Saengsawang, Wisanu Srila and **Phimchanok Nakkharat**. Screening and production of thermostable β-galactosidase. The 2nd International Conference on

Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. 23-25 May 2007, Khon Kaen, Thailand (Oral presentation)

() ต่างประเทศ.....

/ อื่น ๆ (โปรดระบุ) ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ไปตามสถานที่ต่าง ๆ ตามที่สถาบันวิจัยและพัฒนา ของมหาวิทยาลัยศิลปากร ดำเนินการให้

<u>เรื่องที่ 3</u>

1. ชื่อเรื่อง การผลิตพอลิ-เบตา-ไฮดรอกซีบิวทิเรต จากจุลินทรีย์อุณหภูมิสูง

   Production of Poly-β-hydroxybutyrate from thermophilic microoranism

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

   / คณะบุคคล/กลุ่ม / เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7)

   สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาอุตสาหกรรมเกษตร แขนงวิชา Fermentation Process

4. จำนวนงบประมาณ 30,000 บาท

   ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ...2551.... ถึงปี พ.ศ..... 2552.....

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

   / ในประเทศ

   ☐ ภาควิชา ☐ คณะวิชา / มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

   ☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ).....

   ☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

   ☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

   / เผยแพร่แล้ว

   ☐ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์ ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

   () ในประเทศ .....

   () ต่างประเทศ.....

   ☐ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง /

ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

(/) ในประเทศ .....

Soyson wathanapanich, Phloenphit Sutawong, **Phimchanok Jaturapiree** and Adisak Jaturapiree. Isolation of Thermophilic Bacteria Accumulating Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB). The 5 th Thailand Materials Science and Technology Conference. 16-19 September, 2008, Miracle Grand Convention Hotel, Bangkok, Thailand (Poster)

() ต่างประเทศ.....

/ อื่น ๆ (โปรดระบุ) ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ไปตามสถานที่ต่าง ๆ ตามที่สถาบันวิจัยและพัฒนา ของมหาวิทยาลัยศิลปากร ดำเนินการให้

<u>เรื่องที่ 4</u> **ตอนที่ 2.1**

1. ชื่อเรื่อง การคัดเลือกและผลิตเอนไซม์ β -galactosidase

   Screening and Production of β –galactosidase

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

   / คณะบุคคล/กลุ่ม / เป็นหัวหน้า ☐ เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7)

   สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาอุตสาหกรรมเกษตร แขนงวิชา Fermentation Process

4. จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท

   ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ...2550.... ถึงปี พ.ศ..... 2551.....

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

   / ในประเทศ

   ☐ ภาควิชา ☐ คณะวิชา ☐ มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....

   / ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)....IRPUS.....(สกว).....

   ☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

   ☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

   / เผยแพร่แล้ว

   ☐ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์

ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

() ในประเทศ .....

() ต่างประเทศ.....

/ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

(/) ในประเทศ

ปรมาพร สมบูรณ์, เพลินพิศ สุตะวงศ์, สร้อยสน วัฒนะพานิช และ พิมพ์ชนก นาคราช, การคัดเลือกและผลิตเอนไซม์ β-galactosidase, งานแสดงผลงานพัฒนาเทคโนโลยีทุนปริญญาตรี สกว. ครั้งที่ 6 โครงการ IRPUS ประจำปี 2550" ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2551 ณ Royal Paragon Hall ห้างสรรพสินค้าสยามพารากอน

() ต่างประเทศ.....

□ อื่น ๆ (โปรดระบุ)

หากผลงานวิจัยหรือผลงานสร้างสรรค์ข้างต้นเคยได้รับรางวัลโปรดกรอกส่วนที่ 2

ตอนที่ 2.2

1. ชื่อรางวัล รางวัลชมเชยอันดับสาม ประเภท Popular Vote
2. หน่วยงานที่ให้รางวัล สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
3. ปี พ.ศ.ที่ได้รับรางวัล 30 มีนาคม 2551
4. สาขาวิชาที่ได้รับรางวัล...-.....

<u>เรื่องที่ 5</u>

1. ชื่อเรื่อง "Production, purification and characterization of β-galactosidase for lactose hydrolysis and formation of prebiotic galacto-oligosaccharide by the thermophilic organism"
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน / ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ
   ☐ คณะบุคคล/กลุ่ม เป็นหัวหน้า เป็นผู้ร่วม
3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7)
   สาขาวิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย กลุ่มวิชาวิศวกรรมศาสตร์
   แขนงวิชา Biochemical Engineering
4. จำนวนงบประมาณ 480,000 บาท
   ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ 2550 ถึงปี พ.ศ. 2552
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
   ☐ ในประเทศ

☐ ภาควิชา () คณะวิชา () มหาวิทยาลัย () อื่นๆ (โปรดระบุ).....

/ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ) สกว.

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

/ เผยแพร่แล้ว

☐ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์

ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

() ในประเทศ .....

(/) ต่างประเทศ.....

Phimchanok Jaturapiree, Suganya Phuengjayaeam, Porntip Seangsawang, Witsanu Srila and Chirakarn Muangnapoh. (2012) Isolation and Production of Novel β-galactosidase from a Newly Isolated, Moderate Thermophile, *Bacillus* sp. Strain B1.1 Journal of Food Science and Engineering 2: 395-402.

☐ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

() ในประเทศ .....

() ต่างประเทศ.....

☐ อื่น ๆ (โปรดระบุ)

<u>เรื่องที่ 6</u>

1. ชื่อเรื่อง "Isolation and screening of microorganisms producting enzymes for synthesizing galacto- and fructo- oligosaccharides"

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน / ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☐ คณะบุคคล/กลุ่ม เป็นหัวหน้า เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7)

สาขาวิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย กลุ่มวิชาวิศวกรรมศาสตร์

แขนงวิชา Biochemical Engineering

4. จำนวนงบประมาณ 459,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ 2554 ถึงปี พ.ศ. 2555

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

/ ในประเทศ

□ ภาควิชา () คณะวิชา (/) มหาวิทยาลัย () อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

/ เผยแพร่แล้ว

□ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์

ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

() ในประเทศ .....

() ต่างประเทศ.....

/ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

(/) ในประเทศ .....

Suwimon Sriboonroj, Phakphimol Piwpan, Rujira Bunyongmee, Wariya Yamprayoonswat, Juntanee Veerajetbodithat, and **Phimchanok Jaturapiree**. Screening of new microorganisms for prebiotics fructo-and galactooligosaccharides production. The 6th Pure and Applied chemisitry international conference 2012 (PACCON 2012). 11-13 January 2012, The empress convention center, Chiang Mai, Thailand (Poster)

() ต่างประเทศ.....

□ อื่น ๆ (โปรดระบุ)

<u>เรื่องที่ 7</u>

1. ชื่อเรื่อง “การผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรตโดยจุลินทรีย์จากทะเล”
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน / ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☐ คณะบุคคล/กลุ่ม เป็นหัวหน้า เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7)

สาขาวิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย กลุ่มวิชาวิศวกรรมศาสตร์

แขนงวิชา Biochemical Engineering

4. จำนวนงบประมาณ 500,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ 2555 ถึงปี พ.ศ. 2556

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

/ ในประเทศ

□ ภาควิชา () คณะวิชา (/) มหาวิทยาลัย () อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

/ เผยแพร่แล้ว

□ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์

ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

() ในประเทศ .....

() ต่างประเทศ.....

/ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

(/) ในประเทศ .....

Sathita Phol-in, Donlaya Kamkalong, Adisak Jaturapiree, and **Phimchanok Jaturapiree**. Poly (3- hydroxybutyrate) production from glycerol by marine microorganisms. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural (FerVAAP 2011). 29-31 August 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand (Oral+Proceeding)

() ต่างประเทศ.....

□ อื่น ๆ (โปรดระบุ)

<u>เรื่องที่ 8</u>

1. ชื่อเรื่อง “การผลิตฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้”
2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

/ คณะบุคคล/กลุ่ม เป็นหัวหน้า / เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7)

สาขาวิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย กลุ่มวิชาวิศวกรรมศาสตร์

แขนงวิชา Biochemical Engineering

4. จำนวนงบประมาณ 418,000 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ 2555 ถึงปี พ.ศ. 2556

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

/ ในประเทศ

□ ภาควิชา () คณะวิชา (/) มหาวิทยาลัย () อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

☐ ยังไม่ได้เผยแพร่

/ เผยแพร่แล้ว

□ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ (โปรดระบุชื่อเรื่อง / ชื่อเจ้าของผลงาน / ชื่อสิ่งพิมพ์

ชื่อสำนักพิมพ์ / ปีที่พิมพ์ / เลขหน้า)

() ในประเทศ .....

() ต่างประเทศ.....

/ ชื่อการประชุมวิชาการฯ หรือแสดงผลงานต่อสาธารณชน (โปรดระบุ ชื่อเรื่อง / ชื่อผู้นำเสนอ / สถานที่จัด / วัน เดือน ปีที่นำเสนอ)

(/) ในประเทศ .....

Phakphimol Piwpan, Patchari Kaenpanao, Pramote Khuwijitjaru, Suwattana Pruksasri, Budsaraporn Ngampanya and **Phimchanok Jaturapiree**. Production of fructosyltransferases from a yeast strain ML1. The 15th Food Innovation Asia Conference 2013. 13-14 June, 2013. BITEC, Bangkok. Thailand (Poster)

() ต่างประเทศ.....

เรื่องที่ 9

1. ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนาการผลิตพรีไบโอติกฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชและจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐศาสตร์

(ภาษาอังกฤษ) Development of Prebiotic: Fructo- oligosaccharide (FOS) Production from Plant and Microorganisms for Economic Value Added

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน ☐ ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

/ คณะบุคคล/กลุ่ม ☐ เป็นหัวหน้า / เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7) วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
   ประเภทการออกแบบ (ผลงานสร้างสรรค์ โปรดระบุเทคนิค ขนาด วัสดุ).....
4. จำนวนงบประมาณ 1,854,000บาท
   ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 ถึงปี พ.ศ.2556
5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน
   / ในประเทศ
   ☐ ภาควิชา ☐ คณะวิชา / มหาวิทยาลัย ☐ อื่นๆ (โปรดระบุ).....
   ☐ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)
6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว
   / เผยแพร่แล้ว
   / ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์
   ชุติมา วันเพ็ญ บุษราภรณ์ งามปัญญา สุวัฒนา พฤกษะศรี พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์ และปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ. 2556. ผลของการพรีทรีตเม้นต์ด้วยอัลตร้าซาวด์ต่อการสกัดอินนูลินจากหัวแก่นตะวัน.วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. ปีที่ 36 ฉบับที่ 2 หน้า 249-258
   / 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 10

ชื่อเรื่อง “การผลิตพอลิ-บีตา-ไฮดรอกซีบิวทีเรตจากกลีเซอรอลที่เป็น byproduct จากการผลิตไบโอดีเซล”

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน / ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ
   ☐ คณะบุคคล/กลุ่ม เป็นหัวหน้า เป็นผู้ร่วม
3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7)

สาขาวิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย กลุ่มวิชาวิศวกรรมศาสตร์

แขนงวิชา Biochemical Engineering

4. จำนวนงบประมาณ 442,800 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ 2557 ถึงปี พ.ศ. 2558

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

/ ในประเทศ

□ ภาควิชา () คณะวิชา (/) มหาวิทยาลัย () อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

/ เผยแพร่แล้ว

/ ในรูปของบทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์

Phakphimol Piwpan, Adisak Jaturapiree and **Phimchanok Jaturapiree**. Isolation and production of polyhydroxybutyrate (PHB) from isolated strain Bacillus sp. using crude glycerol as a carbon source. KKU Res.j.. 2016; 22(1): 376-384.

ตอนที่ 3 ผลงานวิจัยหรือผลงานสร้างสรรค์ที่<u>กำลังดำเนินการ</u>

<u>เรื่องที่ 1</u>

1. ชื่อเรื่อง “การผลิตพรีไบโอติก กาแล็กโต-ออลิโกแซ็กคาไรด์ เพื่อใช้ในอาหารสัตว์”

2. ลักษณะโครงการ /ผลงาน / ส่วนบุคคล/เดี่ยว หรือ

☐ คณะบุคคล/กลุ่ม เป็นหัวหน้า เป็นผู้ร่วม

3. สาขาวิชา (ผลงานวิจัย โปรดระบุสาขาการวิจัยตามข้อ 7)

สาขาวิศวกรรมศาสตร์และอุตสาหกรรมวิจัย กลุ่มวิชาวิศวกรรมศาสตร์

แขนงวิชา Biochemical Engineering

4. จำนวนงบประมาณ 437,500 บาท

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย/สร้างสรรค์ผลงานตั้งแต่ปี พ.ศ 2558 ถึงปี พ.ศ. 2559

5. ชื่อแหล่งทุน / แหล่งสนับสนุน

/ ในประเทศ

□ ภาควิชา () คณะวิชา (/) มหาวิทยาลัย () อื่นๆ (โปรดระบุ).....

☐ ภายนอกมหาวิทยาลัย (โปรดระบุ)

☐ ต่างประเทศ (โปรดระบุ).....

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัย/ผลงานสร้างสรรค์ดังกล่าว

/ ยังไม่ได้เผยแพร่

☐ เผยแพร่แล้ว

7. สถานภาพการทำวิจัยลุล่วงแล้ว ส่งร่างรายงานฉบับสมบูรณ์