พฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของคล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว

โดย

นางสาวณัฐธยาณ์ พจน์ธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

พฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว

โดย
นางสาวณัฐธยาณ์ พจน์ธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

PHYTOCHEMICALS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *DENDROBIUM* ORCHIDS IN LIQUID CULTURE SYSTEM

By

MISS Nuttaya POJTHUM

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)

Department of BIOTECHNOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2021

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	พฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว
โดย	นางสาวณัฐธยาณ์ พจน์ธรรม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุพันธ์ กงบังเกิด)

620920016 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว, โปรโตคอร์ม, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, กล้วยไม้สกุลหวาย

นางสาว ณัฐธยาณ์ พจน์ธรรม: พฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อขยายขนาดปริมาณการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium* Sonia ‘Jo Daeng’ ซึ่งเป็นไม้ตัดดอกของไทยเปรียบเทียบกับ *D. officinale* ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีสรรพคุณทางยาของจีน โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งและระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบขวดคู่ โดยการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารเหลว ½ MS ที่มีซูโครส 30 กรัม/ลิตร pH 5.6 เลี้ยงภายใต้สภาวะแบบตั้งนิ่งเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า มวลชีวภาพ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ของกล้วยไม้ *D.* 'Sonia Jo Daeng' และ *D. officinale* เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงและให้ค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 และ 4 ตามลำดับ และจากการศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารเหลวแบบ Fed-Batch โดยการเติมซูโครสเข้าสู่ระบบเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4 เพื่อรักษาความเข้มข้นของซูโครสสุดท้ายไว้ที่ 30 กรัม/ลิตร พบว่า การผลิตมวลชีวภาพ สารประกอบฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยไม่เติมน้ำตาลซูโครส แสดงให้เห็นว่าซูโครสมีบทบาทเป็นแหล่งคาร์บอนไม่เพียงแต่ช่วยเพิ่มมวลชีวภาพ แต่ยังเพิ่มการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย สำหรับการศึกษาการขยายขนาดการผลิตโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบขวดคู่นั้น พบว่า ระยะเวลาเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) โดยกล้วยไม้ทั้งสองชนิดให้มวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศึกษาเพิ่มขึ้นตามเวลาของการเพาะเลี้ยง และให้ค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 และจากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า เปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีค่ามากที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 อีกทั้งโปรโตคอร์ม *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ ยังให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มากกว่า *D. officinale* ถึงแม้ว่าจะให้มวลชีวภาพที่น้อยกว่าก็ตาม ดังนั้น *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มมูลค่ากล้วยไม้หวายลูกผสมในไทยให้มีมูลค่าสูงขึ้นได้

มหาวิทยาลัยศิลปากร

620920016 : Major (BIOTECHNOLOGY)
Keyword : TEMPORARY IMMERTION BIOREACTOR, PROTOCORM-LIKE BODIES, BIOACTIVE COMPOUNDS, DENDROBIUM ORCHID

MISS NUTTAYA POJTHUM : PHYTOCHEMICALS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *DENDROBIUM* ORCHIDS IN LIQUID CULTURE SYSTEM THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR BUDSARAPORN NGAMPANYA, Ph.D.

This research aimed to up scaling production of biomass and bioactive compounds from protocorm-like bodies (PLBs) of *Dendrobium* Sonia 'Jo daeng' (Thai cut-flower orchid) in static culture and twin jar temporary immersion system (TIS) by comparison with *D. officinale*. Biomass and bioactive compounds production was evaluated by culturing in liquid ½ MS medium containing 30 g/L sucrose, pH 5.6 under static condition for 10 weeks. The results showed that biomass, phenolics, flavonoids and polysaccharides of *D.* Sonia 'Jo Daeng' and *D. officinale* was increased with increment time of culturing and gave highest at the 6^{th} and 4^{th} week of culture, respectively. The effect of sucrose supplementation on biomass and bioactive compounds production was also studied. Under fed-batch operation, final concentration of sucrose at 30 g/L was maintained by feeding sucrose to culture system at the 4^{th} week culturing of *D.* Sonia 'Jo Daeng'. It was found that biomass, phenolics and polysaccharides production was higher than that of culture without sucrose feeding. This result suggested that sucrose played role as carbon source not only for multiplication of PLBs but also for secondary metabolites production. Additionally, up scaling production of biomass and bioactive compounds of PLBs in twin jar bioreactors suggested that time of culture significantly effected ($p< 0.05$) to biomass and bioactive compounds production of both orchids. With temporary immersion operation, the highest of biomass and bioactive compounds were achieved at the 10^{th} week of culture. For tyrosinase inhibition evaluation, it was highest at the 2^{nd} week of culture. Interestingly, it was found that *D.* Sonia 'Jo daeng' produced more bioactive compounds than *D. officinale*. Therefore, *D.* Sonia 'Jo daeng' could be used as raw material for biomass and bioactive compounds production and it will be beneficial for increase the value of Thai hybrid *Dendrobium* orchids.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) กองทุนส่งเสริม วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

และสำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อแนะนำ พร้อมทั้ง ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนสำเร็จสมบูรณ์ และ ประสบผลสำเร็จไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริพร พงศ์ทองผาสุข ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบและให้ คำปรึกษา และข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการแก้ ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และข้อแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ทั้งคำแนะนำ ความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่สาว ที่สนับสนุนส่งเสริมและให้กำลังใจมาโดยตลอด ขอบคุณเพื่อน พี่ และน้อง ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยนี้

นางสาว ณัฐธยาณ์ พจน์ธรรม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ
กิตติกรรมประกาศ ..... ช
สารบัญ ..... ซ
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญภาพ ..... ฐ
บทที่ 1 1
บทนำ 1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
2. ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา 2
3. ขอบเขตการศึกษา 2
4. ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
1. กล้วยไม้สกุลหวาย 4
2. การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 5
3. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (Temporary Immersion System Bioreactors, TIS) 6
4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 10
5. แหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Carbon source) 11
6. การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกล้วยไม้ 14
บทที่ 3 20

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 20
1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 20
2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 21
3. พืชทดลอง 22
4. วิธีการทดลอง 23
4.1 การศึกษาความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' กับ *D. officinale* ในอาหารเหลวด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง 23
4.2 การศึกษาของความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' กับ *D. officinale* ด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 27
บทที่ 4 32
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 32
1. การศึกษาการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' กับ *D. officinale* ในอาหารเหลวด้วยระบบแบบตั้งนิ่ง 32
2. การศึกษาความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและการเพิ่มปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' กับ *D. officinale* ด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 54
3. วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากโปรโตคอร์ม กล้วยไม้ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 68
บทที่ 5 85
สรุปผลการทดลอง 85
ข้อเสนอแนะ 86
รายการอ้างอิง 87
ประวัติผู้เขียน 137

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ค่า pH และค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง (Static culture) เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ 1 และ 2.....38

ตารางที่ 2 การสะสมของมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร.....40

ตารางที่ 3 การสะสมของมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (ต่อ).....41

ตารางที่ 4 ราคาต้นทุนการจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวที่ประยุกต์ใช้ชุดกรองเป็นถังเพาะเลี้ยงพืช 1 ระบบ.....55

ตารางที่ 5 ราคาต้นทุนการจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar 1 ระบบ.....56

ตารางที่ 6 ค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งและสัดส่วนการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS culture) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10สัปดาห์.....66

ตารางที่ 7 ค่า pH และค่าการนำไฟฟ้าของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS culture) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์.....67

ตารางที่ 8 การสะสมของชีวมวลและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์.....68

ตารางที่ 9 การสะสมของมวลชีวภาพและการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½MS และเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร.....73

ตารางที่ 10 การสะสมของมวลชีวภาพและการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร 77

ตารางที่ 11 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ในการสารต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้วยไม้กล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng'ที่เพาะเลี้ยงใน TIS เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' ในธรรมชาติ 81

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์การเพิ่มมวลชีวภาพและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (static culture) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS culture).....83

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะของดอกกล้วยไม้โจแดง *Dendrobium* spp. Sonia ‘Jo Daeng’ 4

ภาพที่ 2 ลักษณะของกล้วยไม้สกุลหวายจีน *Dendrobium officinale* Kimura et Migo.....5

ภาพที่ 3 การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.officinale*.....6

ภาพที่ 4 เทคนิคการเพาะเลี้ยงพืชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวรูปแบบต่างๆ 7

ภาพที่ 5 ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (Temporary Immersion System Bioreactors, TIS) แบบ twin jars ที่ควบคุมการป้อนอาหารเข้าไปในระบบด้วยการตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ.....8

ภาพที่ 6 กระบวนการต้านอนุมูลอิสระ 14

ภาพที่ 7โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก 15

ภาพที่ 8โครงสร้างของฟลาโวนอยด์.....15

ภาพที่ 9 พืชวัตถุดิบ 22

ภาพที่ 10 อุปกรณ์ในการจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar.....27

ภาพที่ 11 แผนผังของระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar 29

ภาพที่ 12 การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ A) *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ B) *D. officinale* ซ้าย: เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ขวา: เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 33

ภาพที่ 13 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ หลังการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ .34

ภาพที่ 14 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* หลังการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ 34

ภาพที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสัดส่วนการเจริญและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารหลังการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. officinale* 10 สัปดาห์ 36

ภาพที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสัดส่วนการเจริญและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารหลังการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม (A) *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ (B) *D. officinale* 10 สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ 2 .37

ภาพที่ 17 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' หลังการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (แถวบนไม่เติมซูโครส: แถวล่างเติมซูโครส) (A) 0 สัปดาห์ (B) 2 สัปดาห์ (C) 4 สัปดาห์ (D) 6 สัปดาห์ (E) 8 สัปดาห์ (F) 10 สัปดาห์ 44

ภาพที่ 18 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* หลังการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (แถวบนไม่เติมซูโครส : แถวล่างเติมซูโครส) (A) 0 สัปดาห์ (B) 2 สัปดาห์ (C) 4 สัปดาห์ (D) 6 สัปดาห์ (E) 8 สัปดาห์ (F) 10 สัปดาห์.....45

ภาพที่ 19 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายด้วยการเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และไม่เติม 10 สัปดาห์ (A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' (B) *D. officinale*.....46

ภาพที่ 20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายด้วยการเสริมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และไม่เติม 10 สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ 2 (A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' (B) *D. officinale*....47

ภาพที่ 21 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และไม่เติม เป็นระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ 49

ภาพที่ 22 กราฟการเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกกของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และไม่เติม เป็นระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' (B) *D. officinale* 51

ภาพที่ 23 กราฟการเปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และไม่เติม เป็นระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' (B) *D. Officinale*.....53

ภาพที่ 24 ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวที่ประยุกต์ใช้ชุดกรองเป็นถังเพาะเลี้ยงพืช 1 ชุด 55

ภาพที่ 25 ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar A) Twin jar 1 ระบบ B) Twin jar 1 ชุด 57

ภาพที่ 26 ลักษณะฝาถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar A) แบบเจาะรู B) แบบต่อหางปลา 58

ภาพที่ 27 การทดสอบระบบการเพาะเลี้ยงโปรโตคออร์มกล้วยไม้ด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar A) การ Browning ของโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' B) ลักษณะการปนเปื้อนจากเชื้อราในถังอาหาร C) ลักษณะการปนเปื้อนจากราในถังเพาะเลี้ยง 59

ภาพที่ 28 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' หลังการเพาะเลี้ยง10 สัปดาห์ ...61

ภาพที่ 29 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* หลังการเพาะเลี้ยง10 สัปดาห์ 61

ภาพที่ 30 ลักษณะการ Browning ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย 62

ภาพที่ 31 กราฟแสดงการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* หลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIS แบบ Twin jar 10 สัปดาห์ 64

ภาพที่ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIS 10 สัปดาห์ 65

ภาพที่ 33 กราฟเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์ 70

ภาพที่ 34 กราฟเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์ 71

ภาพที่ 35 กราฟเปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์ 72

ภาพที่ 36 กราฟเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์ 74

ภาพที่ 37 กราฟเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์ 75

ภาพที่ 38 กราฟเปรียบเทียบเปอร์เซ็นการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์ 75

ภาพที่ 39 กราฟเปรียบเทียบเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์ 78

ภาพที่ 40 กราฟเปรียบเทียบปริมาณการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์ 79

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมที่พัฒนาพันธุ์ในประเทศไทย นอกจากการปลูกเป็นการค้าเพื่อตัดดอกและจำหน่ายเป็นไม้กระถางแล้ว ยังสามารถทำให้มูลค่าเพิ่มมากขึ้นได้ด้วยการนำเอาส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้มาสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปทำเป็นยารักษาโรคและอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ อีกทั้งยังมีรายงานว่าสารสกัดกล้วยไม้ *D.* Sonia Earsakul ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตเม็ดสีผิวเมลานินซึ่งนิยมนำสารสกัดดังกล่าวไปเป็นส่วนประกอบในเวชสำอาง (Kanlayavattanakul *et al.*, 2018) โดยกล้วยไม้สกุลหวายถูกบรรจุไว้ในตำรับยาจีนและมีการวิจัยอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับการสกัดและระบุชนิดของสารในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ต่างๆ ตลอดจนนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น *Dendrobium officinale* Kimura et Migo ที่พบว่า มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างน้อย 190 ชนิดและมีสรรพคุณทางยา (Tang *et al.*, 2017) ทำให้ในปัจจุบันมีการนำเอาส่วนลำต้นของ *D. officinale* มาทำเป็นผง เพื่อจำหน่ายในราคาตั้งแต่ 5-55 เหรียญดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ในประเทศไทยมีการปลูกกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมหลากหลายพันธุ์เพื่อตัดดอกจำหน่าย ซึ่งในฤดูกาลที่ดอกกล้วยไม้ล้นตลาดมักประสบปัญหาราคาตกต่ำเป็นอย่างมาก ดังนั้น การศึกษาการใช้ประโยชน์จากการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกล้วยไม้ดังกล่าว จึงน่าจะเป็นแนวทางเพิ่มมูลค่าที่ดีแนวทางหนึ่ง โดยกล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia 'Jo Daeng' จัดเป็นหนึ่งในกล้วยไม้สกุลหวายที่มีสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนต่างๆ เช่น ใบ ลำต้น ราก ดอก และก้านดอกของต้นที่ปลูกตามธรรมชาติ จึงเป็นที่น่าสนใจและศึกษาการผลิตสารดังกล่าวในงานวิจัยนี้ (Obsuwan *et al.*, 2019) อย่างไรก็ตามการปลูกกล้วยไม้เพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดเพื่อผลิตสารที่สนใจ มักมีข้อจำกัดในเรื่องของการใช้ระยะเวลานานและประสบปัญหาการรบกวนของโรคและแมลงศัตรูพืช ทำให้วัตถุดิบอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาการเพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพเพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกล้วยไม้ได้ เนื่องจากสามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่องตลอดทั้งปีโดยไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล โดยมีรายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม (Protocorm like bodies, PLBs) กล้วยไม้ *D. candidum* Wall ex Lindl ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบบอลลูน (Balloon type bubble bioreactor) พบว่าสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ พอลิแซ็กคา

ไรด์ และฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันเช่นเดียวกับที่มีรายงานไว้ในต้นที่ปลูกตามธรรมชาติ (Cui *et al.*, 2014) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะเพิ่มปริมาณมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยการเพาะเลี้ยง PLBs ของ *D.* Sonia 'Jo Daeng' ในอาหารเหลว เพื่อช่วยเพิ่มมวลชีวภาพได้เร็วกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง อีกทั้งการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวยังสามารถนำไปขยายขนาดการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่สามารถปรับเปลี่ยนระบบการเติมอาหารเพื่อให้มีการเพิ่มผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ง่ายกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง นอกจากนี้ PLBs ยังเป็นวัตถุดิบที่เหมาะต่อการเพิ่มมวลชีวภาพที่ใช้เวลาสั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระยะที่เป็นต้นพืช (Cardoso *et al.*, 2020) สำหรับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (temporary immersion system bioreactor, TIS) ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นระบบอัตโนมัติที่สามารถตั้งเวลาเพื่อให้พืชสัมผัสกับอาหารตามระยะเวลาสั้นๆ ที่กำหนดได้ เนื่องจากการทดลองเบื้องต้นบ่งชี้ว่า การที่เนื้อเยื่อสัมผัสกับอาหารเพียงบางส่วนทำให้มวลชีวภาพกล้วยไม้เพิ่มได้ดีกว่าและลดปัญหาการฉ่ำน้ำของชิ้นพืชที่แช่อยู่ในอาหารตลอดเวลา ซึ่งหากงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มมูลค่ากล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมในไทยให้สูงขึ้นได้

2. ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อขยายขนาดปริมาณการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' ในระบบอาหารเหลว

3. ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' กับ *D. officinale* ในอาหารเหลวด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง

2. ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณมวลชีวภาพและการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว เพื่อหาช่วงที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้ได้ปริมาณมาก

3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านออกซิเดชันและการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ในโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' โดยเปรียบเทียบกับโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale*

4. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเพิ่มปริมาณมวลชีวภาพโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กล้วยไม้สกุลหวาย

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด มีการกระจายพันธุ์ออกไปในบริเวณกว้างทั้งในทวีปเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก กล้วยไม้สกุลหวาย มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล คือ มีลำลูกกล้วย เมื่อลำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ ใบแข็งหนาสีเขียว ดอกมีลักษณะทั่วไปของกลีบชั้นนอกคู่บนและคู่ล่างขนาดยาวพอๆ กันโดยกลีบชั้นนอกจะอยู่อย่างอิสระเดี่ยวๆ สำหรับกลีบชั้นในทั้งสองกลีบมีลักษณะต่างๆ กันแล้วแต่ชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้นั้นๆ ในประเทศไทยนิยมปลูกเพื่อเป็นไม้ตัดดอก แต่ในประเทศจีนส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้สกุลหวายถือเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณต่างๆ มากมาย และใช้ในทางการแพทย์มานับพันปี

กล้วยไม้หวายพันธุ์โซเนียโจแดง ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendrobium* spp. Sonia ‘Jo Daeng’ ชื่อสามัญไทย โจแดง ซึ่งเป็นต้นแบบก่อนที่จะกลายพันธุ์เป็นเอียสกุล ลักษณะประจำพันธุ์ ลำต้นมีลักษณะเป็นลำลูกกล้วยรูปรี ใบเป็นรูปรี ดอกไม่มีกลิ่น จำนวนดอก 10-13 ดอกต่อช่อ การเรียงตัวของดอกบนช่อ 2 จำนวนช่อต่อลำลูกกล้วย 3-5 ช่อดอก อายุการใช้งานเฉลี่ย 16 วัน สีพื้นกลีบดอกเป็นสีขาว สีระบายกลีบเป็นสีม่วงเข้ม เป็นพันธุ์ที่ปลูกเลี้ยงง่าย ต้นเจริญเติบโตดี ทรงช่อสวย ทนต่อสภาพอากาศไม่ค่อยประสบปัญหาเรื่องดอกตูม ฝ่อและร่วง ในประเทศไทยนิยมปลูกเพื่อเป็นไม้ตัดดอก (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 ลักษณะของดอกกล้วยไม้โจแดง *Dendrobium* spp. Sonia ‘Jo Daeng’

ที่มา : https://thaiindia.net/98-insight-india/793-2012-06-21-05-50-47.html?pop=1&tmpl=component&print=1

กล้วยไม้สกุลหวายจีน ชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Dendrobium officinale* Kimura et Migo เป็นพืชที่เติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมเขตอบอุ่นและมีความชื้นสูง ไม่ทนต่อความหนาวเย็น พบมากบนหินกึ่งชื้นในแถบทวีปเอเชีย นอกจากเป็นไม้ประดับแล้วยังเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในการแพทย์แผนจีนมาอย่างยาวนาน เนื่องจากส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้สกุลหวาย *D. officinale* มีสรรพคุณต่างๆ มากมาย เช่น ช่วยลดไข้ ต้านการอักเสบ ช่วยสมานแผลนอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านเบาหวาน และช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้อีกด้วย (Tang *et al.*, 2017) (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 ลักษณะของกล้วยไม้สกุลหวายจีน *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Tang *et al.*, 2017)

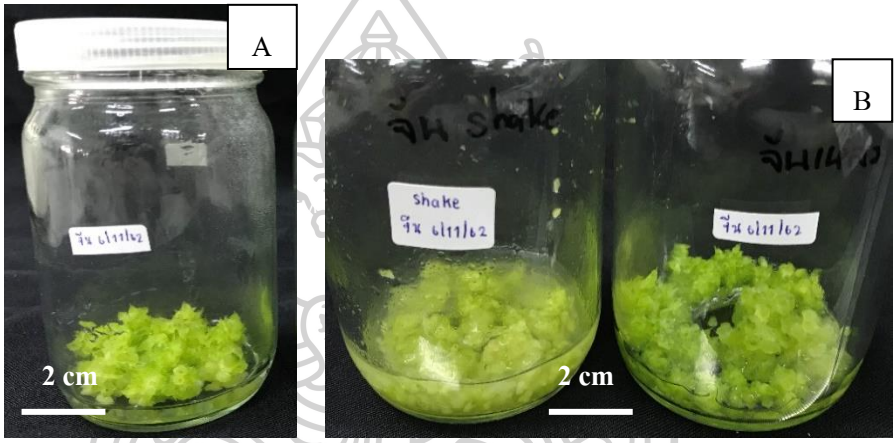
2. การขยายพันธุ์พืชด้วยระบบของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant tissue culture) เป็นเทคนิคการนำเอาเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ หรือส่วนต่างๆ ของพืชมาเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อ (aseptic culture) ภายใต้เงื่อนไขทางกายภาพและเคมีที่กำหนดให้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งหากสภาวะที่กำหนดให้ดังกล่าวมีความเหมาะสมจะทำให้ชิ้นพืช (explants) ที่นำมาเพาะเลี้ยงมีการแบ่งเซลล์และพัฒนาไปเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่เฉพาะ หรือเกิดการคืนสภาพเป็นต้นใหม่ได้ (plant regeneration) (บุษราภรณ์ งามปัญญา, 2561)พืชที่เกิดขึ้นมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีลักษณะเหมือนกับพืชต้นพันธุ์ที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงทุกประการ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการขยายพันธุ์พืช เก็บรักษา และอนุรักษ์เชื้อพันธุ์พืชต่างๆ

ระบบดั้งเดิมที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเรียกว่า conventional solid culture คือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารแข็งที่ทำจากวุ้น (agar) อีกระบบหนึ่งเรียกว่า liquid culture คือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งสองระบบนี้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการขยายพันธุ์พืชทั่วโลก ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ conventional solid culture มีข้อดีคือ เนื้อเยื่อ

พืชจะไม่เกิดความเสียหายจากปัญหาการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) แต่มีข้อเสียคือ ต้นพืชโตช้าและจะต้องเปลี่ยนอาหารใหม่โดยการย้ายเนื้อเยื่อจากขวดเก่าไปยังขวดใหม่ (subculture) เพราะฉะนั้นโอกาสที่จะทำให้เกิดการปนเปื้อน (contamination) จึงมีมากสำหรับการขยายพันธุ์ด้วยระบบ conventional solid culture (ภาพที่ 3A)

สำหรับระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบ liquid culture มีข้อดีกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบแรกตรงที่พืชจะโตได้เร็วกว่าเพราะพืชจะสัมผัสกับอาหารได้ทุกส่วน แต่มีข้อเสียตรงที่เนื้อเยื่อพืชมักเกิดปัญหาการฉ่ำน้ำบ่อยครั้งเพราะต้องแช่ในอาหารเหลวตลอดเวลาและมีปัญหาการปนเปื้อนสูงเช่นกัน (บุษราภรณ์ งามปัญญา, 2561) (ภาพที่ 3B)

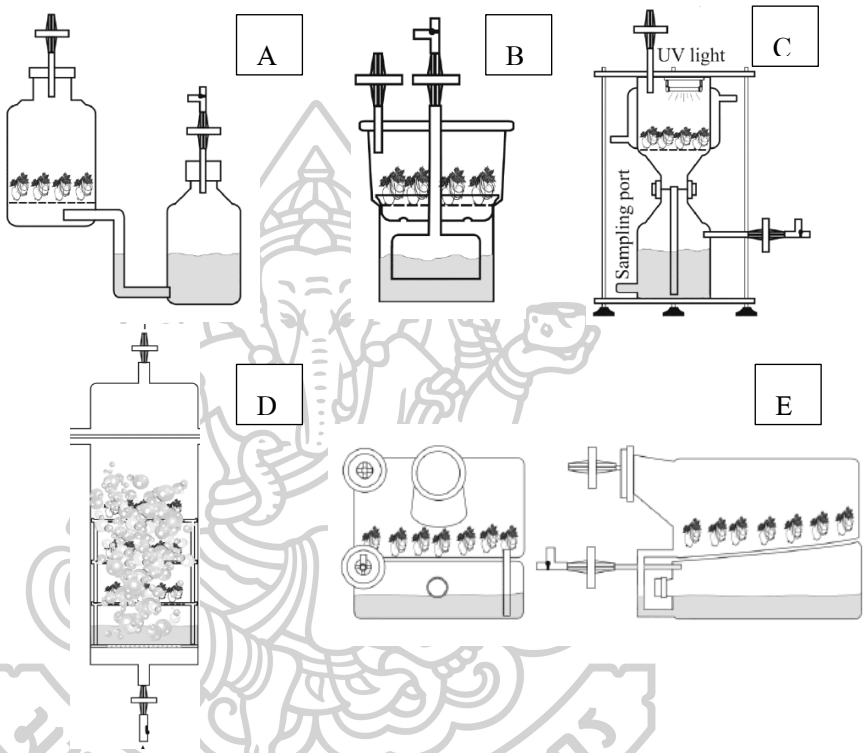


ภาพที่ 3 การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.officinale*
(A) การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (B) การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

3. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (Temporary Immersion System Bioreactors, TIS)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้แก้ปัญหาการฉ่ำน้ำในพืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบแช่ตลอดเวลา เนื่องจากระบบนี้ประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนบนเป็นส่วนสำหรับเพาะเลี้ยงชิ้นพืช ส่วนล่างจะใช้บรรจุอาหารเหลว ทั้งสองส่วนจะเชื่อมต่อกันด้วยสายยางซิลิโคน ซึ่งภาชนะส่วนบนสุดจะมีสายยางซิลิโคนเชื่อมต่อกับปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ปั๊มจะดูดอากาศภายในภาชนะทำให้เป็นระบบสุญญากาศ ส่งผลให้อาหารเหลวจากภาชนะด้านล่างไหลขึ้นมายังภาชนะด้านบน ซึ่งควบคุมการไหลโดยอาศัยเครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ (electronic timer) (ศิริรักษ์ พลซา, 2560) ทำให้ชิ้นพืชแช่อยู่ในอาหารเหลวเป็นระยะเวลาสั้นๆ แล้วมีการดึงอาหารเหลวกลับไปยังภาชนะเก็บอาหารเหลว จึงช่วยลดปัญหาการฉ่ำน้ำในพืชได้ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณพืชได้มากกว่าเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบ conventional solid

culture การปนเปื้อนเกิดได้น้อยกว่า เปลี่ยนอาหารได้ง่าย ลดค่าใช้จ่ายในส่วนของค่าแรงงานไปได้มาก ลดพื้นที่ในห้องเพาะเลี้ยง ข้อด้อยของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบ TIS คือ การลงทุนค่อนข้างสูงถ้าทำในระบบใหญ่ต้องอยู่ในความดูแลของช่างเทคนิค อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีหลากหลายรูปแบบ รวมถึงมีจำหน่ายทั่วไปเพื่อลักษณะการใช้งานที่หลากหลาย (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 เทคนิคการเพาะเลี้ยงพืชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวรูปแบบต่างๆ
(A) Ebb-and-Flow system (B) RITA system (C) Thermo-photo-bioreactor TIS
(D) Bubbles system (E) SETIS system (Georgiev *et al.*, 2014)

แต่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ขายทั่วไปมักมีราคาแพงและการวางระบบที่ยุ่งยาก ด้วยเหตุนี้ระบบแช่ชั่วคราวแบบขวดคู่ (twin jar) จึงถูกพัฒนาเพื่อให้สามารถใช้งานได้ง่ายขึ้นและประยุกต์ใช้กับงานวิจัยที่หลากหลายมากขึ้น ระบบ Twin jar เป็นระบบที่มีหลักการพื้นฐานมาจากระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราว ซึ่งมีการใช้ระบบนี้กันอย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากการวางระบบที่ง่ายและต้นทุนต่ำ โดยทั่วไประบบจะประกอบไปด้วยขวด 2 ขวดที่วางบนระนาบเดียวกัน ต่อเชื่อมกันด้วยท่อแก้ว พลาสติกหรือสายซิลิโคน ขวดแรกเป็นส่วนที่ใช้เพาะเลี้ยง

พืชอาจติดตั้งภาชนะรองรับพืชในขวดหรือไม่มีก็ได้ ขวดที่สองเป็นส่วนเก็บอาหารเหลว ซึ่งทั้งสองส่วนจะมีสายอากาศขาออกที่ต่อเข้ากับระบบกรองที่ปลอดเชื้อเพื่อต่อเข้ากับปั๊มสุญญากาศ โดยมีการต่อตัวนาฬิกาตั้งเวลา (timer) เข้ากับปั๊มและโซลินอยด์วาล์ว (solenoid valves) เพื่อควบคุมระยะเวลาการให้อาหารกับพืชด้วยระบบอัตโนมัติ ซึ่งนอกจากการวางระบบที่ง่ายและต้นทุนต่ำยังเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่ต้องการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้พืชปริมาณมาก (ภาพที่ 5)

ภาพที่ 5 ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (Temporary Immersion System Bioreactors, TIS) แบบ twin jars ที่ควบคุมการป้อนอาหารเข้าไปในระบบด้วยการตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ

งานวิจัยที่มีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว มีดังนี้

Alves *et al.* (2021)ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้อของต้นอ่อน *Corema album* ในอาหารวุ้นเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวภายใต้สภาวะที่ดีที่สุด พบว่า การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้จำนวนต้นมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นมากถึง 3 เท่า และจากการศึกษาระยะเวลาความถี่การแช่ชิ้นพืชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า ระยะเวลาการแช่ 3 นาทีทุก 12 ชั่วโมง/1 นาทีทุกๆ 4 ชั่วโมง ให้จำนวนต้นมากที่สุดและเป็นสภาวะที่ดีที่สุดที่ใช้เพาะเลี้ยง *Corema album* เพื่อขยายพันธุ์พืช

Le *et al.* (2021)ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอของต้นสน (*Larix × eurolepis* Henry) เพื่อหาแนวทางการขยายพันธุ์ต้นสนที่ดีที่สุด เพื่อตอบโจทย์ความต้องการไม้สนที่เพิ่มขึ้นทั่วโลก โดยการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS) เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น ผลปรากฏว่าการเพาะเลี้ยงแบบ TIS ให้น้ำหนักสดมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น

ถึง 2 เท่า นอกจากนั้นยังให้จำนวนราก ความยาวรากและความยาวต้นที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม ดังนั้นการใช้ระบบ TIS ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชถือว่ามีความเป็นไปได้มากที่สุดที่จะนำไปใช้งานด้านป่าไม้ การปรับปรุงพันธุ์ และการผลิตพืชในปริมาณมาก

Arigundam *et al.* (2020) ศึกษาการเพาะเลี้ยง lingonberry จากการชักนำจากส่วนใบ ในระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเปรียบเทียบกัน 3 ระบบ คือ เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ Reactor of temporary immersion (RITA) และเพาะเลี้ยงแบบแช่พืชในอาหารตลอดเวลา พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว มียอดอ่อนเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า มากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น และพืชที่ผ่านการเพาะเลี้ยงจากอาหารเหลว เมื่อนำไปปรับสภาพในโรงเรือนพบว่าพืชมีอัตราการรอดชีวิต 90-95%

Leyva-Ovalle *et al.* (2020) ได้ศึกษาเพื่อหาวิธีการสำหรับขยายพันธุ์กล้วยไม้ *Guarianthe skinneri* โดยใช้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบแช่ชั่วคราว (Twin jar) เปรียบเทียบกับระบบการเพาะเลี้ยงด้วยระบบ semi-solid (SS) และ liquid media under partial (PI) โดยได้มีการหาความเข้มข้นของ 6-Benzylaminopurine (BAP) ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดต้นใหม่ พบว่าการเติม BAP 3 มิลลิกรัม/ลิตร ลงในอาหารวุ้นสูตร MS ให้จำนวนยอดสูงสุด และการเพาะเลี้ยงในระบบ TIS ให้จำนวนต้นใหม่มากที่สุด รองลงมา คือการเพาะเลี้ยงด้วยระบบ semi-solid (SS) และ liquid media under partial (PI) ตามลำดับ จากนั้นได้เปรียบเทียบสูตรอาหาร MS และ VW ในการเพาะเลี้ยงด้วยระบบ TIS ก็ยังพบว่า สูตร MS ชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้มากที่สุด โดยความถี่ของการแช่ชิ้นพืชในอาหารทุก 4 ชั่วโมง ให้ผลดีที่สุดและการเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่จำนวนสามครั้ง ทุก ๆ 30 วัน ให้จำนวนต้นใหม่สูงสุด และเมื่อนำพืชออกปลูกในเรือนกระจกพบอัตราการรอดชีวิต 100% ดังนั้น ระบบ TIS จึงเป็นวิธีการที่ดีที่สุดที่จะขยายพันธุ์พืชในอุตสาหกรรม

จากตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS) ชนิดต่างๆ ให้ผลเชิงบวกเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนต้นพืช การงอกของรากและมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และยังมีอัตราการรอดชีวิตสูงเกือบ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นแบบดั้งเดิม หรือการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบแช่ตลอดเวลา ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ระบบ TIS แบบ Twin jar เนื่องจากวางระบบง่าย มีต้นทุนต่ำ สรุปได้ว่า ระบบการเพาะเลี้ยงแบบ TIS สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับในเชิงพาณิชย์ได้

4. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพถูกนำมาใช้กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้หลากหลายสายพันธุ์ เพื่อเพิ่มปริมาณกล้วยไม้จำนวนมากโดยมีการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ เช่น การเพาะเลี้ยงด้วยต้นอ่อนของกล้วยไม้ เซลล์ อวัยวะพืช หรือใช้ส่วนโปรโตคอร์ม (PLBs) ที่ถูกชักนำจากชิ้นพืชในอาหารวุ้นมาเพิ่มจำนวนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อใช้เป็นพืชวัตถุดิบในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณทางยาเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กล้วยไม้สกุลหวายในประเทศไทย

งานวิจัยที่มีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ มีดังนี้

Ekmekçigil *et al.* (2019) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้แคทลียา *Cattleya forbesii* Lindl. ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบชั่วคราว RITA โดยมีการใช้ความถี่การแช่ที่ 1 นาที ทุก 4 ชั่วโมง ปริมาตรอาหาร 250 มิลลิลิตร จำนวนชิ้นพืช 20 ชิ้น ให้จำนวนโปรโตคอร์มมากที่สุด (2237 PLBs) และให้โปรโตคอร์มต่อชิ้นพืช (111.9 PLBs) ซึ่งมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง

Zhang *et al.* (2018b) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *B. striata* ด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบ TIS แบบ fed-batch ด้วยชิ้นพืชเริ่มต้น 300 ต้น ที่ความถี่การแช่ 3 นาที ทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อดูการขยายลำลูกกล้วยและการสะสมพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยการเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งจะมีการให้อาหารเสริมเพิ่มหลัง 28 วัน ของการเพาะเลี้ยงในงานวิจัยนี้มีการให้ซูโครสร่วมกับสารกระตุ้น (ซูโครส 2% และ เมทิลจัสโมเนท (Me-Ja)) ที่เหมาะสำหรับการขยายขนาดลำลูกกล้วยและการสังเคราะห์ polysaccharide นอกจากนี้ยังมีการเสริมด้วยแหล่งไนโตรเจน NO_3^- : NH_4^+ พบว่าที่สัดส่วน (NO_3^- : NH_4^+) 3:1 เหมาะกับการเจริญของพืช และที่สัดส่วน(NO_3^- : NH_4^+) 2:2 ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ และการขยายขนาดของลำลูกกล้วยสูงสุด

Zhang *et al.* (2018a) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *B. striata* ด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบ TIS เพื่อศึกษา 3 ปัจจัยหลักที่ต่างกัน คือ ความถี่ในการแช่ ความเข้มข้นของซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยง (20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร) และจำนวนพืชเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ผลการทดลอง พบว่า TIS มีประสิทธิภาพดีกว่าที่ความถี่ 3 ทุกๆ 4 ชั่วโมง ความเข้มข้นซูโครส 40 กรัม/ลิตร ต้นพืชเริ่มต้น 300 ต้น ทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีที่สุด

ศิริรักษ์ พลซา (2560) ได้ศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุลหวายบนอาหารวุ้นสูตร MS เพื่อชักนำเอ็มบริโอไปเป็นโปรโตคอร์มสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบไปเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวที่ถูกออกแบบและจัดตั้งขึ้น ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบชั่วคราว (TIS) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอากาศเหลว (NSB) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบที่มีการพ่นอากาศอย่างง่าย (SAB) โดยเปรียบเทียบ

กับระบบการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร อาหารเหลวบนเครื่องเขย่าและบนอาหารวุ้นที่เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิมเพื่อการพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ พบว่า การพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้นั้นให้ผลดีที่สุดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นละอองฝอยอาหารเหลว (NSB) รองลงมา

Cui *et al.* (2014) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มแบบแขวนลอยของกล้วยไม้สกุลหวายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบบอลลูนสำหรับผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยศึกษาถึงผลของวิธีการเพาะเลี้ยง ความหนาแน่นของโปรโตคอร์ม และปริมาณการเติมอากาศ พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบแช่ดีกว่าแบบลอยแพและระบบไฮโดรโปนิกส์ ในอาหารสูตร ½ MS เสริมด้วยซูโครส 30 กรัมต่อลิตร NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีความหนาแน่นของโปรโตคอร์ม 50 กรัมต่อลิตรและมีปริมาณการเติมอากาศ 0.1 vvm เหมาะสมต่อการสะสมชีวมวลที่เหมาะสมและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในขณะที่ปริมาณการเติมอากาศที่ 0.3 vvm เหมาะสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์, คาร์มารีน, โพลีฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์, วิตามินซีและวิตามินอี ซึ่งผลการทดลองมีประโยชน์สำหรับกระบวนการขยายขนาดสำหรับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายแบบแขวนลอย

จากตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นได้ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นมีหลายแบบ การศึกษาทดลองในงานวิจัยนี้ได้เลือกระบบ TIS เนื่องจากติดตั้งง่าย ราคาไม่แพง และยังเป็นระบบที่ได้แสดงผลการเจริญของโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ที่ดีที่สุด ที่สภาวะความถี่การแช่ที่ 1 นาที ทุกๆ 4 ชั่วโมง และสามารถนำระบบ TIS มาใช้การเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งสามารถเพิ่มการผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ในโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ได้

5. แหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Carbon source)

คาร์บอนเป็นธาตุหลักในการสร้างอวัยวะต่างๆ ของพืช ในธรรมชาติพืชจะใช้การสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างแหล่งคาร์บอน โดยพืชสีเขียวสามารถนำพลังงานแสงจากดวงอาทิตย์มาสังเคราะห์อาหารจากแหล่งวัตถุดิบที่ได้จากอากาศ คือ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำจากดินมาสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรต (น้ำตาล หรือแป้ง) และออกซิเจน โดยอาศัยแสงสว่าง คลอโรฟิลล์และเอนไซม์ร่วมด้วย แต่เมื่อนำพืชมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการความสามารถในการสังเคราะห์แสงของพืชลดลง จึงต้องมีการเสริมแหล่งคาร์บอนเพื่อให้พืชเจริญเติบโตได้ตามปกติหรือโตเร็วกว่าปกติ โดยแหล่ง

คาร์บอนที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ คือ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส ซูโครส ฟรักโทส แซ็กคาโรส แมนนิทอลและโมลาส เป็นต้น

น้ำตาลซูโครส (sucrose) เรียกกันทั่วไปว่าน้ำตาลทรายที่ใช้เป็นสารให้ความหวาน (sweetener) อย่างกว้างขวางทั่วโลก พบอยู่ในพืชและผลไม้หลายชนิด แต่ที่นิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตน้ำตาลทางการค้า ในประเทศไทย คือ อ้อย โดยกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย คือ นำอ้อยเข้ากระบวนการบดเพื่อสกัดน้ำอ้อยออกมา นำไปกรองสิ่งสกปรกออกและนำไปต้มเพื่อระเหยน้ำออกจะได้น้ำเชื่อม นำน้ำเชื่อมไปเคี่ยวและตกผลึกน้ำตาล ได้ผลึกผสมกับกากน้ำตาล ปั่นแยกผลึกน้ำตาลออกจากกากน้ำตาลจะได้น้ำตาลดิบ เอาน้ำตาลดิบไปผสมน้ำร้อนเพื่อล้างกากน้ำตาลออก นำไปฟอกสีด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และฟอกขั้นตอนสุดท้ายด้วยการผ่าน ion exchange resin นำไปตกผลึกอีกครั้ง ปั่นแยกกากน้ำตาลออกจากผลึกน้ำตาล จากนั้นนำผลึกน้ำตาลไปอบแห้งเพื่อไล่ความชื้นและบรรจุถุงเพื่อจำหน่ายต่อไป

โมลาส (molasses) หรือ กากน้ำตาล คือของเหลวที่มีลักษณะเหนียวข้น มีสีน้ำตาลเข้ม เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย โดยกรรมวิธีการผลิตเริ่มจากการนำอ้อยเข้าหีบได้น้ำอ้อย กรองเอากากออกจากน้ำอ้อยแล้วเคี่ยวน้ำอ้อยจนได้ผลึกของน้ำตาลทรายตกตะกอนออกมา แยกผลึกน้ำตาลทรายด้วยหม้อปั่น ผลพลอยได้จะมี ขี้ตะกอน กากอ้อย และ โมลาส หรือ กากน้ำตาล โมลาสมีระดับพลังงานต่ำถึงปานกลาง ขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำ ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ท และน้ำ อีกทั้งยังมีปริมาณโพแทสเซียมจึงสามารถนำไปใช้ทำเป็นปุ๋ยได้ และสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในภาคอุตสาหกรรมต่อเนื่องได้หลายประเภท ซึ่งปัจจุบันโมลาสได้ทวีบทบาทความสำคัญต่อภาคอุตสาหกรรมอย่างมาก สำหรับในประเทศไทยส่วนใหญ่จะใช้โมลาสในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ สำหรับการผลิตสุรา และการผลิตเอทานอล

สำหรับตัวอย่างงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่ศึกษาผลของน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน มีดังนี้

Gago *et al.* (2021) ศึกษาผลของความเข้มข้นของซูโครสที่เสริมเขาไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงต้นอ่อนหวาย (*Salix viminalis* L.) โดยมีการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นที่บรรจุในขวดโหลเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (RITA) ที่ใช้ความถี่การแช่ที่ 1 นาที ทุกๆ 4 ชั่วโมง พบว่า การเจริญของยอดและใบที่เพาะเลี้ยงในถัง TIS สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นที่

เสริมด้วยน้ำตาลซูโครสทั้งหมด การเพาะเลี้ยงพืชในอาหารวุ้นการงอกไม่ดีนักเมื่อเสริมด้วยน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 0.5% หรือต่ำกว่าแต่มีรากเพิ่มมากขึ้น

Zhang *et al.* (2018b) ศึกษาการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *B. striata* ด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบ TIS แบบ fed-batch ด้วยชิ้นพืชเริ่มต้น 300 ต้น ที่ความถี่การแช่ 3 นาที ทุกๆ 6 ชั่วโมง ซึ่งในงานวิจัยนี้มีการใช้แหล่งคาร์บอน (ซูโครส และ กลูโคส) เสริมในช่วงวันที่ 28 ของการเพาะเลี้ยง โดยใช้สัดส่วนซูโครสต่อกลูโคส 1:0, 4:1, 3:1 และ 0:1 ร่วมกับสารกระตุ้นเมทิลจัสโมเนต (Me-Ja) ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมล/ลิตร เพื่อขยายขนาดลำลูกกล้วยและเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ จากผลการทดลอง การเสริมน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวช่วยเพิ่มปริมาณพอลิแซคคาไรด์ได้สูงที่สุด (18.62 ± 0.27)

Ribeiro *et al.* (2012) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยสายพันธุ์ *Musa* spp. โดยใช้โมลาสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต มีการทดลองการใช้โมลาสที่ความเข้มข้นต่างกัน 4 ความเข้มข้น คือ 1.5, 3.0, 4.5, และ 6.0% Brix เปรียบเทียบกับอาหารสูตร MS ปกติ ผลที่ได้คือกล้วยสามารถเจริญได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมโมลาส

Ferreira *et al.* (2011) ศึกษาผลความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตและแป้งในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ Second Love เพื่อเพิ่มความสามารถในการสังเคราะห์แสงให้กับต้นพืชเมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ในอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 1%, 2%, 3%, 4%, 5% และ 6% w/v เลี้ยงในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสง พบว่า การเติมซูโครสลงในอาหารที่ความเข้มข้น 2% และ 4% จำนวนยอดต่อชิ้นพืชมากขึ้นและรากยาวมากขึ้นในที่มีแสงและไม่มีแสง ตามลำดับ และพบว่าการเพาะเลี้ยงในที่มืดจะให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่มากกว่าการเลี้ยงในที่มีแสง

Santana *et al.* (2009) ได้ทำการพัฒนาสูตรอาหารในเพาะเลี้ยงมันสำปะหลังในหลอดทดลองแบบต้นทุนต่ำ โดยใช้สารอาหารที่มีขายทั่วไปตามท้องตลาด ใช้ปุ๋ยเคมีเกษตรสูตร 12-11-18 / 3 (MgO-EDTA) แทนในส่วนของ macro และ micronutrients ของอาหารสูตร MS และใช้น้ำตาลและ โมลาสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตและวิตามิน โดยใช้โมลาส 1.5 และ 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าโมลาสสามารถทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีมีอัตราการเพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณ

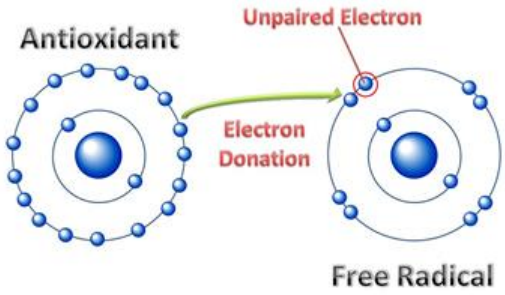
จากตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า พืชสามารถเสริมน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้หลายชนิด เช่น น้ำตาลซูโครสและโมลาส การเสริมด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วยความเข้มข้นที่ต่างกัน นอกจากจะช่วยเพิ่มมวลชีวภาพของพืช ทำให้พืชเจริญเติบโตเร็วแล้ว ยังช่วยให้พืชผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากขึ้นอีกด้วย

6. การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกล้วยไม้

ในปัจจุบันกล้วยไม้สกุลหวายเป็นไม้ตัดดอกที่มีความสำคัญต่อตลาดโลก แต่จะมีผลผลิตเพียง 40% เท่านั้นที่จะผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติเพื่อส่งออก ซึ่งส่วนที่เหลือที่ใช้บริโภคภายในประเทศและมีบางส่วนที่ถือว่าเป็นของเสีย (กระทรวงพาณิชย์ไทย 2560) ดังนั้นจึงมีการนำกล้วยไม้ในส่วนนี้มาเพิ่มมูลค่าเนื่องจากกล้วยไม้สกุลหวายถูกบันทึกไว้ในตำรับยาจีนว่า ส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้มีสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณทางยาได้ เช่น ฟีนอล แอนโธไซยานิน และพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นต้น โดยสารสำคัญที่มีค่านี้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการแพทย์ อาหารเสริมและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพราะนอกจากจะเป็นสารสกัดธรรมชาติที่มีความปลอดภัยแล้ว สารพฤกษเคมีในกล้วยไม้ยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยชะลอความชราต้านริ้วรอย ต้านการอักเสบและช่วยต้านมะเร็ง Kanlayavattanakul *et al.* (2018)

6.1 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่นๆได้ ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวเนื่องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้ายุติปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือเป็นตัวรีดิวซ์ เช่น ไธออล กรดแอสคอร์บิก และโพลีฟีนอล สารต้านอนุมูลอิสระยังถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด ด้วยคาดหวังในการรักษาสุขภาพและป้องกันโรคอย่างโรคมะเร็งและโรคหลอดเลือดหัวใจ

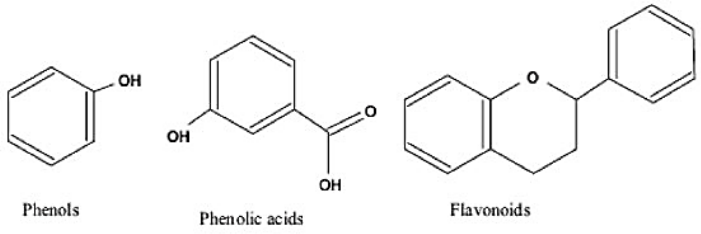


ภาพที่ 6 กระบวนการต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: https://medium.com/arincare-com

6.1.2 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) หรือ สารประกอบฟีนอล เป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติ ในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต มีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพสามารถป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือดและโรคมะเร็ง คือมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลิสระ (antioxidant) สามารถละลายได้ในน้ำ

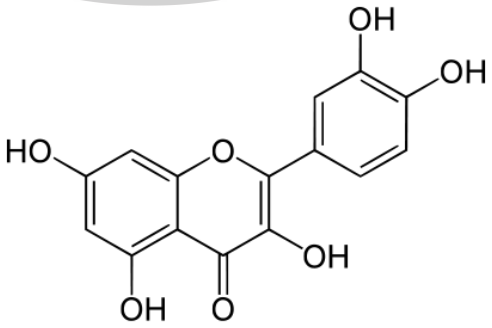


ภาพที่ 7โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก

ที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compounds

6.1.3 ฟลาโวนอยด์

เป็นสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระ พบในเม็ดสีชนิดละลายในน้ำของผัก ผลไม้ เมล็ดธัญพืช ใบไม้ และเปลือกไม้ ฟลาโวนอยด์มีอยู่มากมายหลายชนิด บางชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเหนือกว่าวิตามินซีหรืออีถึง 50 เท่า และฟลาโวนอยด์ในองุ่นแดงมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแอลดีแอล (ที่สัมพันธ์กับการอุดตันของเส้นเลือดแดงและการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด) มากกว่าวิตามินอีถึงกว่า 1000 เท่า



ภาพที่ 8โครงสร้างของฟลาโวนอยด์

ที่มา: www.inchistarnut.com/article/14/ฟลาโวนอยด์-flavonoids-เขียนโดย-greenclinic

6.1.4 พอลิแซ็กคาไรด์

เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เกิดจากโมโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 10 โมเลกุลขึ้นไปมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก พอลิแซ็กคาไรด์ในธรรมชาติส่วนใหญ่ไม่มีสี ไม่มีรส เมื่อละลายน้ำจะได้สารละลายคอลลอยด์ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากพืชทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน (Storage polysaccharide) ได้แก่ แป้ง (Starch) เป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดสะสมชนิดหนึ่งที่พบมากในพืช โดยเฉพาะบริเวณหัวและรากของพืช พืชจะเก็บแป้งเอาไว้เพื่อเป็นแหล่งพลังงานสำรองและยังมีเซลลูโลส (Cellulose) เป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ของกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะบีต้า 1,4 ไกลโคซิดิก (b-1,4 glycosidic linkage) เซลลูโลสจะเป็นส่วนประกอบอยู่ในผนังเซลล์ของพืช ช่วยให้พืชแข็งแรง มีความเหนียว ไม่ละลายน้ำ พอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นกลุ่มพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีมาก พอลิแซ็กคาไรด์ธรรมชาติจากแหล่งต่างๆ ได้มีการศึกษาและใช้กันอย่างแพร่หลายมายาวนานในด้านต่างๆ เช่น อาหาร อาหารสัตว์ เภสัชกรรมและใช้ในการผลิตกระดาษ ในช่วงไม่นานมานี้มีความสนใจพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับการประยุกต์ใช้งานในด้านต่างๆ เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ ไม่เป็นพิษและมีประโยชน์ด้านการรักษาทางการแพทย์ เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากพืชมีสรรพคุณทางชีวการแพทย์ในการรักษาบาดแผล และเป็นวัตถุในการนำส่งยาเข้าสู่ร่างกาย กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต้านไวรัส ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเนื้องอก ฤทธิ์ป้องกันกัมมันตภาพรังสี ฤทธิ์ป้องกันตับ และฤทธิ์ต้านความเมื่อยล้า (Liu *et al.*, 2015)

งานวิจัยในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกล้วยไม้ มีดังนี้

Obsuwan *et al.* (2019) ได้วิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบลำต้นรากดอกไม้และ peduncles อายุ 1 และ 4 ปี *Dendrobium* Sonia ‘Jo Daeng ’ ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดพบในดอกไม้ของพืชอายุ 1 ปี ตามด้วยรากและใบอายุ 4 ปี ระดับแอนโทไซยานินสูงสุดคือ พบในดอกไม้ของพืชอายุ 1 และ 4 ปี พอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดในดอกไม้ของพืชอายุ 1 ปี กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดพบได้ในดอกไม้ของพืชอายุ 1 ปี เช่นเดียวกับ ในรากของพืชอายุ 4 ปี และจากผลการวิจัยยังพบว่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ เกี่ยวข้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดปริมาณของแอนโทไซยานินและพอลิแซ็กคาไรด์

Zhang *et al.* (2018b) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *B. striata* ด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบ TIS แบบ fed-batch ด้วยชิ้นพืชเริ่มต้น 300 ต้น ที่ความถี่การแช่ 3 นาที ทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อดูการขยายลำลูกกล้วยและการสะสมพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยการเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งจะมีการให้

อาหารเสริมเพิ่มหลัง 28 วัน เหมาะสำหรับการขยายขนาดลำลูกกล้วยและการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์จากการทดลอง พบว่า การให้อาหารเสริมด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ช่วยเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ Batch

Wang *et al.* (2016) ได้ศึกษา methyl jasmonate (MeJA) และ Salicylic acid (SA) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพ เพื่อปรับปรุงการสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย การใช้ MeJA 75 μM ช่วยเพิ่มการผลิตแอลคาลอยด์และพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด ในขณะที่ MeJA 100 μM มีการผลิตฟีนอลเพิ่มขึ้น และ SA ที่ 75 μM มีการสะสมของแอลคาลอยด์และพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด ในขณะที่ SA 100 μM มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด หลังจากการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า ปริมาณของแอลคาลอยด์, พอลิแซ็กคาไรด์, ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ใน PLB สูงกว่าในพืชที่รับ MeJA นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของ PLB ที่ได้รับ MeJA ด้วย ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจาก PLB และพืช ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย MeJA การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า MeJA เป็นตัวกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้กระตุ้นการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงใน PLB ในระบบเพาะเลี้ยงแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

นิสา จุลโพธิ์ (2559) ได้ศึกษาสารพฤกษาเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 ชนิด คือ สายพันธุ์เอียสกุล สายพันธุ์เจสซิก้า สายพันธุ์บูรณะเจต และสายพันธุ์ขาว 5 เอ็น พบสารเคมีต่างๆ คือ เทอร์พีนอยด์, สเตียรอยด์, คาร์ดิแอกไกลโคไซด์, ฟลาโวนอยด์, แทนนิน และคูมาริน นอกจากสารสกัดดังกล่าวยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วย

Cui *et al.* (2015) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มแบบแขวนลอยของกล้วยไม้สกุลหวายในขวดเขย่าและศึกษาผลของสารกระตุ้นออกซิน อวัยวะพื้นฐาน ความเข้มข้นของไนโตรเจน ความเข้มข้นของซูโครส อาหารเสริมอินทรีย์ เช่น กล้วยหอม น้ำมะพร้าว และสารสกัดจากมันฝรั่ง เพื่อผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์โพลีฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง คือ อาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน NH_4 : NO_3 อัตราส่วน 5:25 มิลลิโมล ซูโครส 2.5% (w/v) และ กล้วย 1% ผลการศึกษาสามารถนำไปใช้ในกระบวนการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงได้

จากตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นได้ว่า กล้วยไม้สกุลหวายมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นองค์ประกอบหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นต้น

ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารกลุ่มที่พบมากที่สุดในดอกกล้วยไม้พันธุ์โจแดงอายุ 1 ปี แต่ในการวิจัยนี้ใช้โปรโตคอร์มของกล้วยไม้มาทำการสกัดเพื่อวัดปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากสามารถขยายการผลิตได้ง่ายกว่าการใช้ดอก เก็บเกี่ยวได้ตลอดปีไม่ขึ้นกับฤดูกาล มีการนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปใช้งานในด้านการแพทย์และเภสัชกรรม เช่น การรักษาโรค และการทำวัสดุทางการแพทย์ และการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวที่มีการเสริมน้ำตาลในช่วงที่พืชเริ่มมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ช่วยเพิ่มปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด

6.1.5 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เมลานินเป็นเม็ดสีผิวที่เกิดมาจากเมลาโนไซต์โดยมีแสงยูวีเป็นตัวกระตุ้นผ่านกระบวนการเมลาโนเจนนิสิส โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสไปเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นเปลี่ยนแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) ไปเป็นแอล-โดปา (L-DOPA) และแอล-โดปาถูกออกซิไดซ์ไปเป็นโดปาควิโนน (DOPA Aquinone) แล้วสังเคราะห์เป็นเม็ดสีเมลานินสองชนิด ได้แก่ ยูเมลานินและฟีโอเมลานิน หากเอนไซม์ไทโรซิเนสมีการทำงานมากเกินไปจะทำให้เกิดความผิดปกติกับผิวหนังเช่น รอยดำ ฝ้ากระ ซึ่งปัจจุบันสารสกัดจากพืชที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชทำหน้าที่ยับยั้งการออกซิเดชั่นของแอล-โดปาที่ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการไปจับกับคอปเปอร์ที่บริเวณเร่ง ซึ่งช่วยยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง เมลานิน และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชยังมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระซึ่งถูกกระตุ้นจากแสงแดดที่ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ ผิวเกิดความหมองคล้ำ จึงนิยมนำมาใช้เป็นสารช่วยให้ผิวกระจ่างใสในเครื่องสำอาง (Insain, 2018)

ตัวอย่างรายงานผลการวิจัยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดกล้วยไม้ มีดังนี้

Kanlayavattanakul *et al.* (2018) ศึกษาศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสรรพคุณทางยาจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอาง โดยการสกัดดอกกล้วยไม้สกุลหวายด้วยน้ำและเอทานอล พบสารพฤษเคมีต่างๆ คือ แอนโธไซยานิน ฟีนอลิก แทนนิน ซึ่งทดสอบแล้วว่ามีฤทธิ์สามารถต้านอนุมูลอิสระแล้วยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการเกิดเม็ดสีผิวเมลานินด้วย

Athipornchai *et al.* (2018) ศึกษาสารสกัดเอทานอลจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 4 สายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย ได้แก่ Sonia, Sonia Pink, Snow Rabbit และ Shavin White โดยสกัดด้วยวิธีการหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยจากการศึกษา พบว่า ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งโมโนฟีโนเลสในการสังเคราะห์เมลานินและสารสกัดทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่ากรด

โคจิกที่ใช้เป็นตัวยับยั้งไทโรซิเนส ดังนั้น สารสกัดจากกล้วยไม้สี่ชนิดนี้อาจเป็นประโยชน์ในงานอุตสาหกรรมและอาจมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา

Chan *et al.* (2018) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งไทโรซิเนสและการสร้างเม็ดสีผิวจากสารสกัดกล้วยไม้ *Dendrobium tosaense* ที่สกัดด้วยน้ำปราศจากไอออนและ 50% เอทานอลที่อุณหภูมิห้องและ 50% เอทานอลที่สกัดในอุณหภูมิและ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่ 20 นาที พบว่า ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดที่สกัดจากน้ำในอุณหภูมิห้องและสารสกัดที่สกัดจากน้ำในอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แสดงผลการต่อต้านการสร้างเม็ดสีได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดจาก 50% เอทานอลในอุณหภูมิห้องและสารสกัดที่สกัดจาก 50% เอทานอลในอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและสารสกัดนี้ผ่านการทดสอบไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้น ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดกล้วยไม้อาจเป็นสารสำคัญที่มีศักยภาพในการดูแลผิวเพื่อให้ผลิตเครื่องสำอาง

จากตัวอย่างงานวิจัยที่กล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นได้ว่า กล้วยไม้สกุลหวายมีความสามารถในการยับยั้งไทโรซิเนสและการสร้างเม็ดสีผิวและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกล้วยไม้ยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากแสงแดดเป็นตัวกระตุ้น ทำให้ผิวเกิดการอักเสบ เกิดรอยดำและเกิดการชราก่อนวัย นอกจากนี้จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งไทโรซิเนสที่สกัดได้จากกล้วยไม้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ปัจจุบันจึงนิยมนำสารสกัดดังกล่าวมาเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ยารักษาโรคและอาหารเสริม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Acetic acid	RCILABSCAN
Agar bacteriological	SCHARLAU CHEMIE
Aluminum chloride solution 5%	SIGMA
Ascorbic acid	SIGMA
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	SIGMA
3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)	FLUKA
Ethanol	RCILABSCAN
Ferrous sulfate heptahydrate	FLUKA
Folin-Ciocalteu reagent	SIGMA
Gallic acid	SIGMA
Glucose	SIGMA
4-hydroxy-coumarin	SIGMA
Hydrochloric acid	RCILABSCAN
Quercetin	FLUKA
myo-inosital	SIGMA
Phenol	MERCK
Sodium carbonate	RCILABSCAN
Sodium hydroxide solution	RCILABSCAN
Sodium acetate	AJAX FINCHEM
Sodium nitrite	MERCK
Sucrose	SIGMA
Sulfuric acid 5%	LOBA CHEMIE
Trolox	SIGMA

α-tocopherol	FLUKA
2,4,6-tripyridyl-striazine	SIGMA
Trichloro acetic acid (TCA)	SIGMA
Iron reagent (TPTZ)	SIGMA

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	**บริษัทผู้ผลิต**
Eppendorf	Eppendorf
Air flow meter	KOFLOC
Auto pipette	BIOHIT, DENVILLE
Autoclave	TOMY SX-700
Cuvette	STARNA
Hot air oven	BINDER
Hot plate	EGO
Pipette	THERMO
Pot	CHUE CHIN HUA
pH meter	SUNTEX
UV-Vis Spectrophotometer	BIOCHROM LIBRA 22
Temporary immersion bioreactor	NALGENE
Vacuum pump 300 watt	ROCKER
96-well plates Microplate reader	TECAN
Water bath	JOLABO
2-decimal Laboratory Balance	OHAUS
4-decimal Analytical Balance	OHAUS
Conductometer	ULTRA BASIC

3. พืชทดลอง

โปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. Officinale*

ภาพที่ 9 พืชวัตถุดิบ

A) โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. Officinale* B) โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’

4. วิธีการทดลอง

4.1 การศึกษาความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' กับ *D. officinale* ในอาหารเหลวด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง

4.1.1 เตรียมวัตถุดิบ

เตรียมอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงพืชและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมตู้ปลอดเชื้อโดยเปิด UV ประมาณ 30 นาที ก่อนเริ่มใช้งาน เตรียมอุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ทำความสะอาดโดยฉีดพ่นด้วยแอลกอฮอล์ก่อนเริ่มทำงาน จากนั้นนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้มากระจายก่อนถ่ายเลี้ยง โปรโตคอร์มอายุ 4 สัปดาห์ ปริมาณ 1 กรัม ลงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10% inoculum) (ขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์) และนำขวดเพาะเลี้ยงพืชไปวางบนชั้นที่ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ภายในห้องที่อุณหภูมิภายในห้องที่ 25 องศาเซลเซียส โปรโตคอร์มที่ผ่านการเพาะเลี้ยงอายุ 4 สัปดาห์ จะใช้เป็นชิ้นส่วนเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่งและถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวต่อไป

4.1.2 การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในระบบตั้งนิ่ง

ถ่ายเลี้ยงโปรโตคอร์มอายุ 4 สัปดาห์ ปริมาณ 1 กรัม ลงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10% inoculum) เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ นำขวดเพาะเลี้ยงพืชไปวางบนชั้นที่ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และรักษาอุณหภูมิภายในห้องที่ 25 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ เก็บผลทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการวัดค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง แล้วนำไปคำนวณหาสัดส่วนการเจริญ (growth ratio) วัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ปริมาณน้ำตาลรวม (total sugar) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ของอาหารเพาะเลี้ยง และวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และ พอลิแซ็กคาไรด์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการสะสมมวลชีวภาพและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วงเวลาต่างๆ ให้ทราบถึงช่วงเวลาที่มวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น

4.1.2.1 การศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสที่เสริมในอาหารแบบ fed-batch เพื่อเพิ่มการสะสมมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย

ถ่ายเลี้ยงโปรโตคอร์มอายุ 4 สัปดาห์ ปริมาณ 1 กรัม ลงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10% inoculum) เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 8 ออนซ์ โดยเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง (static culture) โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองที่ 1 ไม่เติมสารละลายน้ำตาล ชุดการทดลองที่ 2 เติมสารละลายน้ำตาลซูโครสลงไปในสัปดาห์ที่ 4 โดยให้มีปริมาณน้ำตาลรวมที่ 30 กรัมต่อลิตร นำขวดเพาะเลี้ยงพืชไปวางบนชั้นที่ที่ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เลี้ยงภายในห้องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 สัปดาห์ บันทึกผลการทดลองทุก 2 สัปดาห์ เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลที่มีต่อการสะสมมวลชีวภาพและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.1.3 การวัดค่าการเจริญเติบโตของกล้วยไม้

1. วัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ก่อนและหลังการเพาะเลี้ยง โดยคำนวณค่า growth ratio = (ค่าหลังการเพาะเลี้ยง – ค่าเริ่มต้น) / ค่าเริ่มต้น เพื่อวัดค่าการเจริญทางตรงของกล้วยไม้

2. วัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) ในอาหารก่อนและหลังการเพาะเลี้ยง เพื่อเป็นการวัดค่าการเจริญของกล้วยไม้แบบทางอ้อม ถ้าค่าการนำไฟฟ้าต่ำลงแสดงว่าพืชนำไอออนที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงไปใช้ในการเจริญเติบโตมากขึ้น

3. วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ทราบว่ากล้วยไม้นำไนเตรตหรือแอมโมเนียมไปใช้ในการเจริญในปริมาณที่มากกว่ากัน เพื่อที่จะได้นำข้อมูลไปออกแบบสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ได้

4.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยวิธี Phenol sulfuric acid

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Albalasmeh *et al.* (2013)

นำอาหารเลี้ยงโปรโตคอร์มแต่ละช่วงเวลามา 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟีนอล 5% 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าด้วย vortex 30 วินาที หล่อเย็นในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดเทียบกับเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS Method) ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Miller (1959)

นำอาหารเลี้ยงโปรโตคอร์มแต่ละช่วงเวลามา 3 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นเติม 40% Potassium 0.9 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3. การสกัดสารสกัดจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย

วิธีการสกัดสารสกัดจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Obsuwan *et al.* (2019)

นำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง และจากนั้นบดให้เป็นผง นำผงพืช 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง 15 มิลลิลิตร เติมเมทนอล 3 มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ระหว่างบ่มเขย่าอีก 2 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนออก แยกส่วนใสใส่ ขวดขนาด 10 มิลลิลิตร ตะกอนถูกสกัดซ้ำอีก 1 รอบ ด้วยเมทานอล 3 มิลลิลิตร จากนั้นส่วนใสจะแยกตามวิธีที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้และปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

4. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds)

4.1 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Obsuwan *et al.* (2019)

นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 7.5% (w/v) สารละลาย Na_2CO_3 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติม Folin Ciocalteu reagent 10% แล้วบ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้สารละลาย

Gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน แสดงผลปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในรูปของ mg gallic acid /g batch

4.2 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Zhuang *et al.* (1992)

นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย $NaNO_2$ 5% ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มเป็นเวลา 6 นาที และเติมสารละลาย $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 10% ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เติม NaOH ความเข้มข้น 1M ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย Quercetin เป็นสารละลายมาตรฐาน แสดงผลปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในรูปของ มิลลิกรัม เคอร์ซิติน / กรัมขวดเพาะเลี้ยง (mg quercetin/g batch)

4.3 วิเคราะห์ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Obsuwan *et al.* (2019) และ Albalasmeh *et al.* (2013)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method โดยนำโปรโตคอร์มที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสและบดเป็นผงแล้วปริมาณ 1 กรัม มาเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วเขย่าด้วย Vortex และเครื่องอัลตราโซนิค (Ultrasonic) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นกรองด้วยระบบสุญญากาศ นำส่วนใสมาผสมกับเอทานอล 70% และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนใสออกจากส่วนตะกอน นำตะกอนไปล้างด้วยเอทานอลและปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใส นำตะกอนที่รวมได้ 0.05 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร สารละลายที่สกัดได้จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method โดยนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟสารมาตรฐานกลูโคส แสดงผลปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในรูปของ มิลลิกรัม กูลโคส / กรัมขวดเพาะเลี้ยง mg glucose / g batch

4.2 การศึกษาของความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' กับ *D. officinale* ด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

1. การจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราว

1.1 อุปกรณ์การจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar

1) ขวดแก้วขนาด 24 ออนซ์ พร้อมฝาพลาสติกทนความร้อนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร ที่เจาะรู 2 รู ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร 2 แบบ (ภาพที่ 11A) และ (ภาพที่ 11C)

2) สายซิลิโคนขนาด 7*10 ความยาว 7, 10 และ 23 เซนติเมตร ทิปพลาสติกขนาด 1 มล. ตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน (ภาพที่ 11B)

3) ตู้ควบคุมระบบไฟ เครื่องตั้งเวลาอัตโนมัติ 16 และ 28 โปรแกรม โซลินอยด์วาล์ว (ภาพที่ 11D)

4) วาล์วทองเหลืองควบคุมการเข้าออกของลมภายในตัวถังขนาด ½ นิ้ว 2 หุน (ภาพที่ 11E)

5) ปั๊มสุญญากาศ (ภาพที่ 11F)

6) ท่อสแตนเลส หลอดไฟขนาด 220V และชั้นเพาะเลี้ยงพืช (ภาพที่ 10G)

ภาพที่ 10 อุปกรณ์ในการจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar

1.2 การจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar

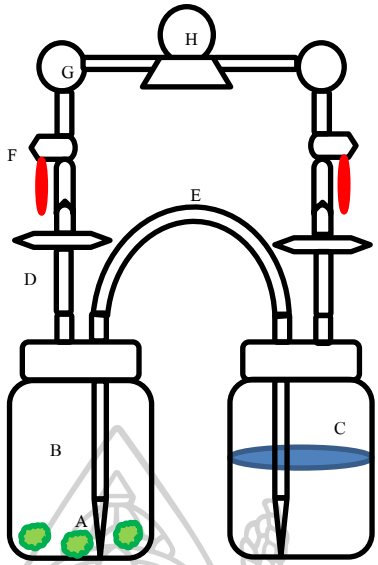
1) นำฝาพลาสติกทนความร้อนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร ที่เจาะรู 2 รู ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร มาต่อเข้ากับสายซิลิโคนขนาด 7*10 ความยาว 10 เซนติเมตร ที่ปลายสายต่อเข้ากับทิปขนาด 1 มิลลิลิตร (ภาพ 11A) สำหรับจุ่มลงในขวดอาหาร(ภาพ 11C) และขวดเพาะเลี้ยงขนาด 24 ออนซ์ (ภาพ 11B) เพื่อป้องกันโปรโตคอร์มจากขวดเพาะเลี้ยงเข้าไปในท่ออาหารส่งผลให้เกิดการอุดตันหรือไหลเข้าไปในขวดอาหาร

2) ต่อสายซิลิโคนขนาด 7*10 ความยาว 23 เซนติเมตร (ภาพ 11E) เข้ากับฝาทั้ง 2 ด้านเป็นส่วนเชื่อมทั้งสองขวดให้อาหารไหลกลับไปกลับมาได้

3) ต่อสายซิลิโคน ความยาว 7 เซนติเมตร เข้ากับฝาด้านอากาศเข้า-ออกต่อตัวกรองอากาศ (ภาพ 11D) ทั้งสองขวด

4) จากนั้นต่อตัวกรองเข้ากับวาล์วทองเหลืองที่ควบคุมการไหลเข้าออกของอากาศ(ภาพ 11F) ต่อเข้ากับท่ออากาศสแตนเลสที่ต่อเข้ากับปั๊ม(ภาพ 11H) ตั้งเวลาการให้อาหารด้วยเครื่องตั้งเวลาที่ต่อเข้ากับปั๊มและควบคุมการไหลของอากาศสลับกันของทั้ง 2 ท่อ ด้วยโซลินอยด์วาลว์ ตามภาพที่ 10

5) จัดตั้งระบบนี้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และติดหลอดไฟที่มีค่าการส่องสว่าง 2600 ลักซ์ เพื่อให้แสงสว่างเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ระบบการเพาะเลี้ยงที่จัดตั้งขึ้นนี้เป็นแบบแช่ชิ้นพืชชั่วคราวในขวดเพาะเลี้ยง โดยส่วนของอาหารเหลวจะแยกกับส่วนเพาะเลี้ยงพืช ซึ่ง สามารถตั้งเวลาการให้อาหารได้แบบอัตโนมัติ



ภาพที่ 11 แผนผังของระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar a) Tip 1 ml b) ขวดเพาะเลี้ยงพืช c) ขวดบรรจุอาหารเหลว d) ท่ออากาศขาเข้า-ออก e) สายยางซิลิโคน f) วาล์วควบคุมอากาเข้า-ออก g) ท่ออากาศสแตนเลส h) ปั๊มต่อเครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ

4.3 การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Zhang *et al.* (2018b) และสูตรอาหารดัดแปลงมาจากวิธีการของ Cui *et al.* (2014) ดังนี้ ใช้ระบบแช่ชั่วคราว (TIS) แบบ twin jar นึ่งฆ่าเชื้อชุดถังปฏิกรณ์ชีวภาพและนำมาประกอบในตู้ปลอดเชื้อ ถ่ายเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย อายุ 4 สัปดาห์ 5 กรัมต่อ อาหาร 100 มิลลิลิตร (5% inoculum) ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบระบบแช่ชั่วคราวขนาด 24 ออนซ์ โดยใช้อาหารสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.6 ควบคุมการป้อนอาหารเพาะเลี้ยงเข้าไปในระบบ TIS ด้วยเครื่องตั้งเวลาการปิด-เปิดปั๊มอัตโนมัติ โดยกำหนดสภาวะของความถี่การแช่ที่ 1 นาที ทุกๆ 4 ชั่วโมง นำไปเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 10 สัปดาห์ เก็บผลทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการวัดค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง แล้วนำไปคำนวณหาสัดส่วนการเจริญ (growth ratio) วัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) และค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ปริมาณน้ำตาลรวม (total sugar) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ของอาหารเพาะเลี้ยง และวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีการที่กล่าวไปก่อนหน้าในหัวข้อที่ 1.3-1.6 และทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และ DPPH และ

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการสะสมมวลชีวภาพและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วงเวลาต่างๆ เพื่อหาช่วงที่มวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น

5. วิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

1. วิธี DPPH ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Obsuwan *et al.* (2019)

นำสารสกัดกล้วยไม้ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.0634 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 3 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 519 นาโนเมตร โดยใช้ Ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งวิธีนี้จะแสดงผลในรูปของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH สามารถคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ DPPH} = (Abst0 - Abst30 / Abst0) \times 100$$

Abst0 = ค่าการดูดกลืนแสงของการทำปฏิกิริยาหลังจากบ่มเป็นเวลา 0 นาที

Abst30 = ค่าการดูดกลืนแสงของการทำปฏิกิริยาหลังจากบ่มเป็นเวลา 30 นาที

2. วิธี FRAP ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Phongtongpasuk *et al.* (2016)

นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย Sodium acetate buffer 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6, 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl และสารละลาย $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v)) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้ $FeSO_4$ เป็นสารมาตรฐาน

3. วิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ Manosroi *et al.* (2013)

ทำการทดสอบยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method โดยมีสารไทโรซีน (Tyrosine) เป็นสารตั้งต้น นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Tyrosinase mushroom ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร เติมไทโรซีน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร เติม 0.1 โมลาร์ บัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดตามลำดับลงใน 96 well-plate นำไปวัดด้วยเครื่อง microplate spectrophotometer ที่

ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% tyrosinase inhibition) โดยใช้สารโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน

Tyrosinase inhibition activity (%) = [(A-B)/A] x 100

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่เติมสารสกัด

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เติมสารสกัด

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติแบบ One way ANOVA ด้วย Software SPSS V.14.0

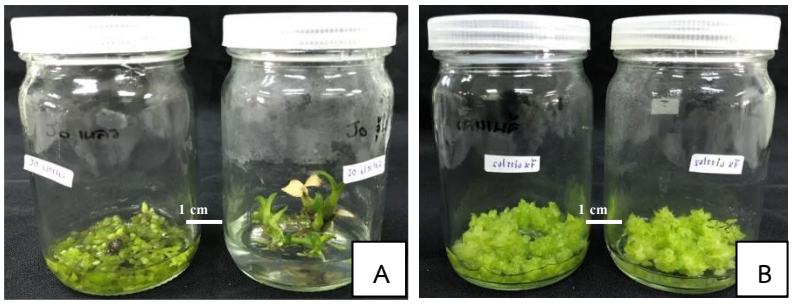
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' กับ *D. officinale* ในอาหารเหลวด้วยระบบแบบตั้งนิ่ง

1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

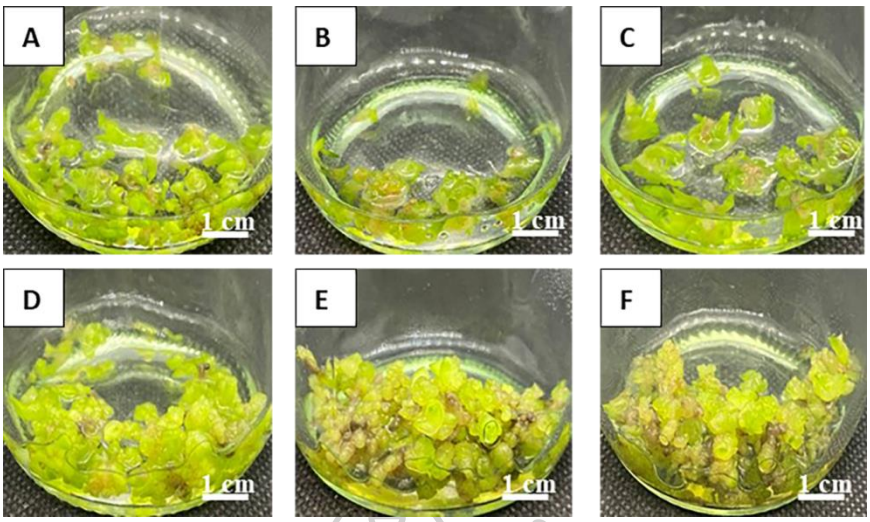
จากการนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารแข็งสูตร ½ MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร โปรโตคอร์ม 1 กรัม ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร (5% inoculum) เพาะเลี้ยงในขวดขนาด 8 ออนซ์ โดยเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง (static culture) ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มโจแดงบนอาหารวุ้นเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเริ่มมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Browning) ซึ่งจะต้องแก้ไขปัญหาโดยเมื่อชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเริ่มมีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Browning) ควรมีการตัดส่วนที่เกิด Browning ของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงทิ้ง และเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้นเป็นระยะเวลานานพบว่า โปรโตคอร์มมีการพัฒนาและกลายเป็นต้น ดังรูป 12A (ด้านขวา) เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' ในอาหารเหลว พบว่า โปรโตคอร์มมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นและยังคงอยู่ในระยะโปรโตคอร์ม ดังรูป 12A (ด้านซ้าย) เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D. officinale* บนอาหารวุ้นเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงไม่มีการ Browning เกิดขึ้น มีการเพิ่มจำนวนของโปรโตคอร์ม ดังรูป 12B (ด้านขวา) เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D. officinale* ในอาหารเหลว พบว่า โปรโตคอร์มมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารวุ้นและยังคงอยู่ในระยะโปรโตคอร์ม ดังรูป 12B (ด้านซ้าย) ดังนั้น การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายควรมีการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว



ภาพที่ **12** การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ A) *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ B) *D. officinale* ซ้าย: เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ขวา: เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น

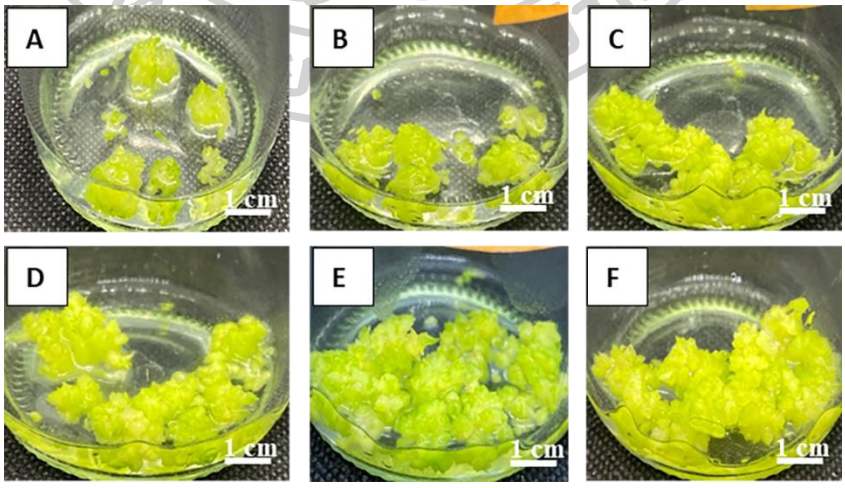
1.2 การศึกษาการสะสมมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. officinale*

จากการนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2MS ที่เสริมด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร โปรโตคอร์ม 1 กรัม ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร (10% inoculum) เพาะเลี้ยงในขวดขนาด 8 ออนซ์ โดยเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง (static culture) โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 10 สัปดาห์ ชิ้นส่วนโปรโตคอร์มมีการขยายขนาดและเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด พืชเริ่มมีชิ้นส่วนกลายเป็นสีน้ำตาลเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 2 และกลายเป็นสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังเพาะเลี้ยงครบ 10 สัปดาห์ โดยเกิดจากสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ซึ่งมักพบทั่วไปในเนื้อเยื่อพืช และพบมากในเซลล์กำลังเติบโตและมีกิจกรรม (active) สูง (Ozyigit *et al.*, 2007) เนื้อเยื่อที่มีสารประกอบฟีนอลิกเข้มข้นสูงจะเลี้ยงได้ยาก เนื่องจากเมื่อฟีนอลถูกออกซิไดซ์ จะมีการฟอร์มตัวกลายเป็นสารควิโนนที่มีความเป็นพิษกับเนื้อเยื่อพืช และเป็นสาเหตุให้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเกิดเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด การลดการเกิดสีดำหรือน้ำตาลของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยง สามารถทำได้โดยการย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารใหม่ อาจมีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อลดการผลิตสารอนุมูลอิสระ หรือเติมผงถ่านเพื่อดูดซับสารฟีนอลที่ถูกปลดปล่อยออกมาในอาหารซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' หลังการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (A) 0 สัปดาห์ (B) 2 สัปดาห์ (C) 4 สัปดาห์ (D) 6 สัปดาห์ (E) 8 สัปดาห์ (F) 10 สัปดาห์

เมื่อนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* ที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดียวกันที่สภาวะเดียวกันกับการเพาะเลี้ยง *D.* Sonia 'Jo Daeng' พบว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 10 สัปดาห์ โปรโตคอร์มมีการขยายขนาดและเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยที่โปรโตคอร์มมีสีเขียวและไม่มีการกลายเป็นสีน้ำตาลของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเหมือนโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' ความแตกต่างนี้เกิดจากลักษณะเฉพาะสายพันธุ์ของกล้วยไม้แต่ละชนิด ดังแสดงในภาพที่ 14

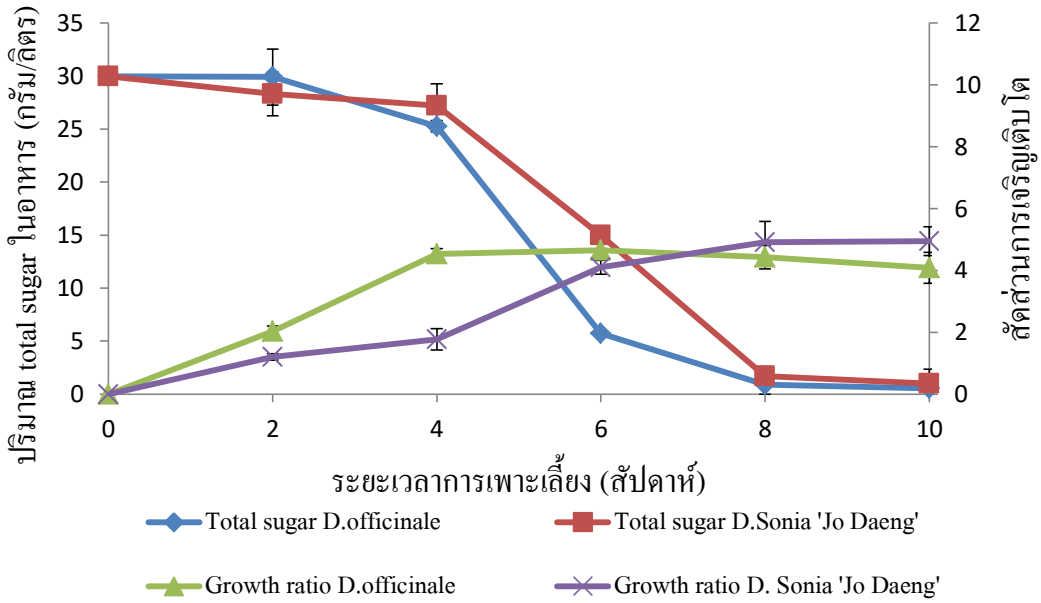


ภาพที่ 14 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* หลังการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ A) 0 สัปดาห์ (B) 2 สัปดาห์ (C) 4 สัปดาห์ (D) 6 สัปดาห์ (E) 8 สัปดาห์ (F) 10 สัปดาห์

จากภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า การเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ' Jo Daeng*'* แบบเพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณ (log ph*ase*) อยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 4 ถึง 8 และมีค่าการเจริญสูงที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 8 หลังจากนั้น โปรโตคอร์มเริ่มเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ (stationary phase) ในช่วงสัปดาห์ที่ 6 8 และ 10 ในขณะที่ค่าการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* แบบเพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณ (log ph*ase)* จะอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 0 ถึง 4 และมีค่าการเจริญสูงที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 4 หลังจากนั้น โปรโตคอร์มเริ่มเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ (stationary phase) ในช่วงสัปดาห์ที่ 4 6 8 และ 10 เมื่อพิจารณาจากค่าสัดส่วนการเจริญที่เพิ่มขึ้นของโปรโตคอร์ม *D.* Sonia ' Jo Daeng*'* ในช่วง log phase ต่อเวลา พบว่าสัดส่วนการเจริญเพิ่มขึ้น 1.17 เท่าต่อสัปดาห์ ในขณะที่ *D. officinale* มีค่าสัดส่วนการเจริญที่เพิ่มขึ้นในช่วง log phase ต่อเวลาอยู่ที่ 1.25 เท่าต่อสัปดาห์ และเมื่อพิจารณาจากพฤติกรรมการบริโภคน้ำตาล พบว่า กล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดมีช่วงการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาเดียวกันคือ ระหว่างสัปดาห์ที่ 4 ถึง 8 และน้ำตาลทั้งหมดถูกบริโภคหมดภายใน 8 สัปดาห์

ทำให้สรุปได้ว่า โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* มีการเจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 โดยมีอัตราการเจริญและเข้าสู่ระยะคงที่เร็วกว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' ที่มีการเจริญสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 8 โดย *D. officinale* มีค่าสัดส่วนการเจริญต่อเวลาในช่วง log phase สูงกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' จึงยืนยันผลได้ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D. officinale* ในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งให้มวลชีวภาพที่สูงกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะและช่วงเวลาเดียวกัน

มหาวิทยาลัยศิลปากร



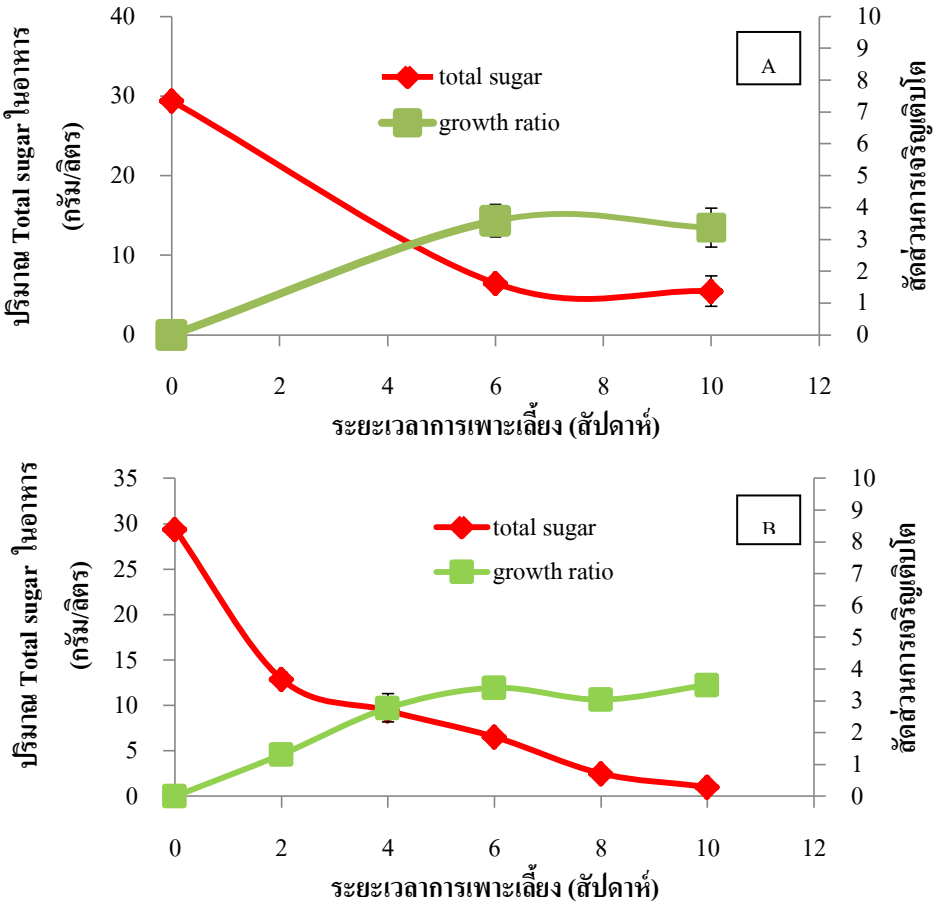
ภาพที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสัดส่วนการเจริญและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารหลังการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* 10 สัปดาห์

ต่อมาได้มีการศึกษากราฟแสดงความสัมพันธ์ของสัดส่วนการเจริญและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารแบบตั้งนิ่งเพิ่มเติมอีก 1 ชุดการทดลอง เพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดลอง โดยจากภาพที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 สายพันธุ์ในครั้งที่ 2 พบว่า ภาพที่ 16A แสดงให้เห็นว่าค่าการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' ที่มีการเพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 0 ถึง 6 และเริ่มเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ช่วงสัปดาห์ที่ 6 ถึง 10 เมื่อเทียบกับกราฟของการทดลองชุดแรก (ภาพที่ 15) พบว่า การเจริญเติบโตและพฤติกรรมการบริโภคน้ำตาลของโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันและเมื่อพิจารณาจากค่าสัดส่วนการเจริญที่เพิ่มขึ้นในช่วง log phase ต่อเวลา พบว่ามีสัดส่วนการเจริญเพิ่มขึ้น 0.60 เท่าต่อสัปดาห์

จากภาพที่ 16B แสดงให้เห็นค่าการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* ของชุดการทดลองที่ 2 ที่มีการเพิ่มจำนวนในช่วงสัปดาห์ที่ 0 ถึง 6 และมีค่าการเจริญสูงที่สุดในช่วงสัปดาห์ที่ 6 และเริ่มเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ช่วงสัปดาห์ที่ 6, 8 และ 10 และเมื่อพิจารณาจากค่าสัดส่วนการเจริญที่เพิ่มขึ้นในช่วง log phase ต่อเวลา พบว่ามีสัดส่วนการเจริญเพิ่มขึ้น 1.12 เท่าต่อสัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในชุดแรก (ภาพที่ 15) พบว่า กราฟการเจริญของโปรโตคอร์ม *D. officinale* ครั้งแรกและครั้งที่ 2 มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน แต่ค่าการเจริญสูงสุดในกราฟ

แสดงผลการทดลองครั้งที่ 2 อยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 6 ซึ่งแตกต่างกับกราฟแสดงผลการทดลองครั้งที่ 1 ที่พบว่า ค่าการเจริญสูงสุดอยู่ที่สัปดาห์ที่ 4 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่อาจมีความแตกต่างกันไปในแต่ละชุดการทดลอง อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองทั้ง 2 ครั้ง แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่า โปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งมีการเจริญสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 8 และ 4 ตามลำดับ และจากค่าสัดส่วนการเจริญที่เพิ่มขึ้นในช่วง log phase ต่อเวลาของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด พบว่าการเพิ่มขึ้นของค่าสัดส่วนการเจริญอยู่ในช่วง 0.60 ถึง 1.25 เท่าต่อเวลา

ดังนั้น เพื่อเพิ่มมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มในการทดลองถัดไปที่มีการศึกษาการเติมน้ำตาลซูโครสแบบ fed-batch ลงไปในอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด จึงได้เลือกเติมน้ำตาลซูโครสลงไปในช่วงสัปดาห์ที่ 4-8 เนื่องจากเป็นช่วงที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและเป็นช่วงที่เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงใช้น้ำตาลไปเพื่อการเจริญใกล้จะหมด



ภาพที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสัดส่วนการเจริญและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารหลังการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม (A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' (B) *D. officinale* 10 สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ 2

ตารางที่ 1 ค่า pH และค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง (Static culture) เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ 1 และ 2

การทดลอง	ค่า pH และค่าการนำไฟฟ้า	สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)					
			0	2	4	6	8	10
ชุดที่ 1	ค่า pH	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	5.66 ± 0.000	3.84 ± 0.167	4.02 ± 0.182	4.80 ± 0.314	5.04 ± 0.038	4.86 ± 0.158
		D. officinale	5.65 ± 0.000	4.11 ± 0.062	4.88 ± 0.169	5.77 ± 0.303	5.48 ± 0.359	5.59 ± 0.278
	ค่าการนำไฟฟ้า mS/cm	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	2.89 ± 0.000	2.66 ± 0.078	2.22 ± 0.622	0.992 ± 0.682	0.296 ± 0.088	0.259 ± 0.045
		D. officinale	2.14 ± 0.000	1.573 ± 0.710	1.021 ± 0.086	0.371 ± 0.078	0.249 ± 0.017	0.225 ± 0.038
ชุดที่ 2	ค่า pH	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	5.65 ± 0.000	-	-	5.02 ± 0.189	-	5.25 ± 0.230
		D. officinale	5.65 ± 0.000	-	5.28 ± 0.070	-	-	5.77 ± 0.001
	ค่าการนำไฟฟ้า mS/cm	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	2.14 ± 0.000	-	-	0.420 ± 0.011	-	0.293 ± 0.031
		D. officinale	2.14 ± 0.000	-	0.886 ± 0.169	-	-	0.227 ± 0.001

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=4)

- หมายถึง ไม่มีการเก็บพืชตัวอย่าง

จากการศึกษาการเจริญของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ด้วยการวัดค่าการนำไฟฟ้าและค่าความเป็นกรดด่างของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโดยทำการทดลอง 2 ชุดการทดลอง จากตารางที่ 1 พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าในอาหารเหลวของโปรโตคอร์มทั้ง 2 สายพันธุ์ของทั้ง 2 ชุดการทดลองมีค่าลดลง แสดงว่าโปรโตคอร์มมีการนำสารอาหารที่มีความสามารถในการแตกตัวเป็นอิออนไปใช้ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าการนำไฟฟ้าในอาหาร โดยในอาหารสูตร MS จะมีค่าการนำไฟฟ้าที่เกิดจากเกลือไนเตรทอิออนและแอมโมเนียมเป็นหลัก ดังนั้น การลดลงของค่าการนำไฟฟ้าในอาหารจึง

บ่งชี้ในทางอ้อมได้ว่าโปรโตคอร์มมีการนำเกลือไนเตรทและแอมโมเนียมและธาตุอาหารอื่นๆ ที่มีความสามารถในการแตกตัวเป็นอิออนไปใช้ในการเจริญเติบโต (Cui et al., 2014) และการวัดค่า pH ซึ่งแสดงถึงความสมดุลของไนเตรตและแอมโมเนียมในอาหาร หลังการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า ช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงในชุดที่ 1 ของการทดลอง ในสัปดาห์ที่ 0 ถึง 2 สัปดาห์พืชมีการดึงไนเตรตไปใช้ ทำให้ประจุบวกของแอมโมเนียมมีมากจึงทำให้ค่า pH มีค่าลดต่ำลง ต่อมา pH กลับมาสูงขึ้นเนื่องจากพืชเริ่มดึงประจุของแอมโมเนียมไปใช้ทำให้ประจุลบของไนเตรตมีค่ามากกว่า ค่า pH จึงเพิ่มมากขึ้น และในชุดการทดลองที่ 2 พบว่า ค่า pH ของโปรโตคอร์มทั้ง 2 สายพันธุ์ ลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงที่สัปดาห์ที่ 6 และ 4 และเพิ่มขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงครบ 10 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องการการทดลองชุดที่ 1 (Lulu *et al.*, 2015)

ตารางที่ 2 การสะสมของมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

มวลชีวภาพ / สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	**การทดลอง**	**สายพันธุ์**	**ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)**					
			0	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**
น้ำหนักแห้ง (g/batch cukture)	ชุดที่ 1	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	0.038 ± 0.005b	0.083 ± 0.005b	0.104 ± 0.002b	0.192 ± 0.065a	0.223 ± 0.026a	0.224 ± 0.004a
		D. officinale	0.040 ± 0.002d	0.122 ± 0.007b	0.231 ± 0.015a	0.228 ± 0.001a	0.219 ± 0.015a	0.205 ± 0.020a
	ชุดที่ 2	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	0.0398 ± 0.002b	-	-	0.182 ± 0.020a	-	0.174 ± 0.0334a
		D. officinale	0.027 ± 0.002b	-	0.146 ± 0.023a	-	-	0.167 ± 0.005a
ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg/batch culture)	ชุดที่ 1	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	5.277 ± 0.000bc	1.406 ± 0.721c	5.018 ± 0.792c	14.431 ± 2.454ab	15.709 ± 0.857a	22.923 ± 4.969a
		D. officinale	4.442 ± 0.003c	9.820 ± 0.828b	18.520 ± 0.628a	21.691 ± 0.810a	21.583 ± 1.403a	18.933 ± 0.673a
	ชุดที่ 2	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	2.039 ± 0.001b	-	-	11.350 ± 2.610ab	-	15.959 ± 2.77a
		D. officinale	0.930 ± 0.000c	-	5.829 ± 0.579b	-	-	9.188 ± 0.003a

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=4) ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

- หมายถึง ไม่มีการเก็บพืชตัวอย่าง

ตารางที่ 3 การสะสมของมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (ต่อ)

มวลชีวภาพ / สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	การทดลอง	สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)					
			0	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**
ปริมาณฟีนอลิก (mg/batch culture)	ชุดที่ 1	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	4.316 ± 0.000b	6.940 ± 0.691b	7.382 ± 0.767b	22.615 ± 0.440a	18.566 ± 2.722a	19.242 ± 3.576a
		D. officinale	1.250 ± 0.081c	1.761 ± 0.250c	2.865 ± 0.234a	2.033 ± 0.169bc	2.233 ± 0.441bc	2.193 ± 0.325bc
	ชุดที่ 2	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	2.289 ± 0.001b	-	-	14.310 ± 2.640a	-	15.055 ± 0.979a
		D. officinale	1.050 ± 0.001c	-	6.112 ± 0.693b	-	-	10.370 ± 0.042a
ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (mg/g DW)	ชุดที่ 1	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	27.957 ± 0.707bc	73.905 ± 12.926a	98.917 ± 17.652a	30.118 ± 7.369bc	17.683± 6.574c	59.605 ± 5.299ab
		D. officinale	1.831 ± 0.407b	1.634 ± 0.692b	2.758 ± 0.993b	0.969 ± 0.146b	9.699 ± 0.727a	1.181 ± 0.011b
	ชุดที่ 2	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	14.330± 0.707ab	-	-	33.300 ± 7.750a	-	6.937 ±3.471b
		D. officinale	1.124 ± 0.008a	-	29.220± 15.085a	-	-	6.351 ± 0.692a

*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=4) ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

- หมายถึง ไม่มีการเก็บพืชตัวอย่าง

จากข้อมูลของน้ำหนักแห้ง ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และพอลิแซ็กคาไรด์ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 พบว่าระยะเวลาเพาะเลี้ยงส่งผลต่อการเพิ่มมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ปริมาณฟีนอลิกตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ถึง 10 ของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (22.615±0.440 มิลลิกรัม/ขวด) และเริ่มคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพของโปรโตคอร์ม เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดที่ 2 พบว่าปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 6 (14.310 ± 2.640 มิลลิกรัม/ขวด) และเริ่มคงที่ ซึ่งผลการทดลองมีผลไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองชุดแรก จากการวิเคราะห์ปริมาณของฟลาโวนอยด์ พบว่า ฟลาโวนอยด์ลดลงในสัปดาห์ที่ 0 ถึงสัปดาห์ที่ 2 และเริ่มเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณของฟลาโวนอยด์สูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 10 (22.923±4.969 มิลลิกรัม/ขวด) โดยปริมาณฟลาโวนอยด์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8-10 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดที่ 2 พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงซึ่งปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดที่สัปดาห์ที่ 10 (15.595 ± 2.777 มิลลิกรัม/ขวด) ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับชุดแรก ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของการเพาะเลี้ยง *D.* Sonia 'Jo Daeng' เพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 (98.917± 17.652 มิลลิกรัม/กรัมตัวอย่าง) และเริ่มลดลงและคงที่ในสัปดาห์ที่ 6 ถึง 10 เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 2 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่สัปดาห์ที่ 6 (33.300 ±7.750 มิลลิกรัม/ขวด) และลดลงในสัปดาห์ที่ 10

ในกรณีของ *D. officinale* พบปริมาณฟีอลิกสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (2.865±0.234 มิลลิกรัม/ขวด) และลดลงหลังจากนั้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ 2 พบว่าปริมาณฟีนอลิกมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 (10.370 ± 0.042 มิลลิกรัม/ขวด) ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 (21.691±0.810 มิลลิกรัม/ขวด) และสัปดาห์ที่ 4 ถึง 10 ปริมาณฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักแห้งของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* เทียบกับชุดการทดลองที่ 2 ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 (9.188 ± 0.003 มิลลิกรัม/ขวด) ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 (9.699 ± 0.727 มิลลิกรัม/ขวด) จากการทดลองชุดที่ 2 ที่ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 (29.220± 15.085 มิลลิกรัม/ขวด) และลดลงหลังจากนั้น การลดลงของพอลิแซ็กคาไรด์เกิดจากน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงเริ่มหมดลงในช่วงสัปดาห์ที่ 10 ทำให้พืชเริ่มมีการเจริญที่คงที่และผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยลง และมีผลวิจัยที่คล้ายกันในการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้อื่นๆ ตัวอย่างเช่น *D. huoshanense* ในการเพาะเลี้ยง 12 วันแรกปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มอย่างรวดเร็ว เมื่อเพาะเลี้ยงไปที่ระยะเวลาหนึ่ง

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จะเริ่มลดลง แม้ว่าพืชจะเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องก็ตาม (Zha *et al.*, 2007) ดังนั้น แหล่งคาร์บอนจึงจำเป็นอย่างมากในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพ

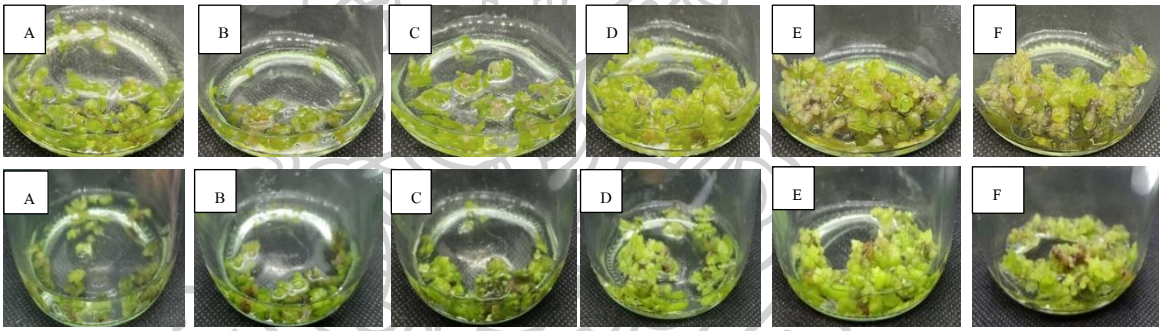
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด พบว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีปริมาณฟีนอลิกและพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่า *D. officinale* และปริมาณ ฟลาโวนอยด์พบมากใน *D. officinale* เมื่อพิจารณาจากปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด พบว่า ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้ง 3 ชนิด จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 4-10 ซึ่งสอดคล้องกับช่วงการเจริญของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดที่ศึกษาก่อนหน้านี้อยู่ในช่วง 4-8 สัปดาห์ ดังนั้น ถ้าต้องการเพิ่มมวลชีวภาพและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี fed-batch ควรเติมแหล่งคาร์บอนเข้าไปในสัปดาห์ที่ 4-6 ซึ่งเป็นช่วงที่พืชเริ่มผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการสะสมมวลชีวภาพและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เพิ่มขึ้น

1.2 การศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสที่เสริมในอาหารแบบ fed-batch เพื่อเพิ่มการสะสมมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง

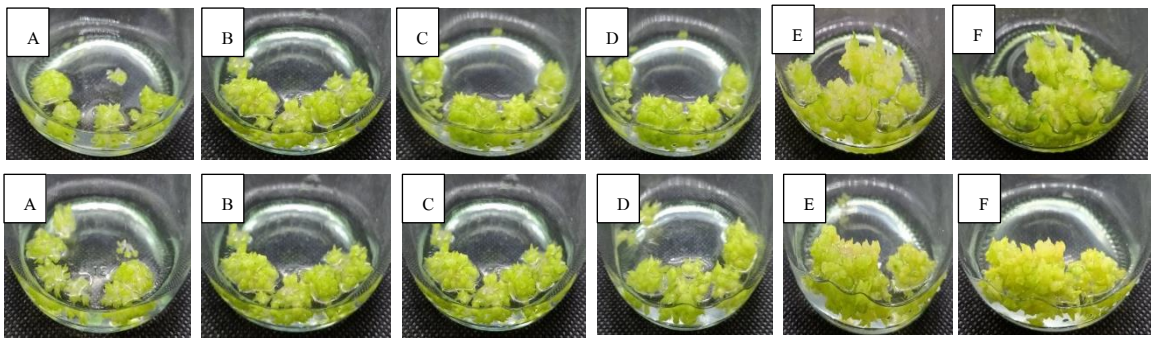
1.2.1 การเปรียบเทียบการเพิ่มมวลชีวภาพของ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เติมสารละลายน้ำตาลซูโครสและไม่เติมสารละลายน้ำตาลซูโครส

จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแหล่งคาร์บอนที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืช พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชมักจะเติบโตแบบ heterotrophically โดยใช้น้ำตาล เช่น กลูโคส ฟรักโทส มอลโทส ซูโครส เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน ซึ่งในบรรดาน้ำตาลต่างๆ นั้น พบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตในอุดมคติสำหรับการสร้างและสะสมมวลชีวภาพ (Murthy et al., 2014) และยังได้ผลลัพธ์ที่คล้ายคลึงกันในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชอื่นๆ ตัวอย่างเช่น การเพิ่มซูโครสในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *D. huoshanense* ส่งผลให้มีการผลิตมวลชีวภาพได้สูงสุด ทั้งนี้ น้ำตาลซูโครสในอาหารเป็นแหล่งคาร์บอนที่สมดุลสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการไฮโดรไลซิสของอินเวอร์เตสและซูโครสซินเทส และเฮกโซสที่เป็นผลลัพธ์สามารถมีส่วนร่วมโดยตรงในวิถีทางไกลโคไลติกและเพนโตส ฟอสเฟต (Zha *et al.*, 2007) นอกจากนี้ การเสริมซูโครสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนผสม (4:1) ยังมีผลในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ *B. striata* (Zhang *et al.*, 2018b) ดังนั้น ในการศึกษาการเพิ่มมวลชีวภาพโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch จึงได้พิจารณาเลือกเอาน้ำตาลซูโครสมาเป็นแหล่งคาร์บอน

โดยนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. officinale* ปริมาณ 1 กรัม ที่ปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร โปรโตคอร์ม 1 กรัม ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร (10% inoculum) โดยเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง (static culture) เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ โดยทำเป็น 2 ชุดการทดลองตามภาพที่ 17 และ 18 ชุดการทดลองที่ 1 ไม่เติมสารละลายน้ำตาลซูโครส (ภาพแถวบน) และชุดการทดลองที่ 2 เติมสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้าไปในสัปดาห์ที่ 4 (ภาพแถวล่าง) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ พบว่า โปรโตคอร์ม *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ ของทั้ง 2 ชุดการทดลองมีสีเขียวและมีเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงที่เริ่มกลายเป็นสีน้ำตาลเล็กน้อยในช่วงสัปดาห์ที่ 2 โปรโตคอร์มมีการขยายขนาดและเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชุดการทดลอง(ภาพที่ 17) และเมื่อสังเกต โปรโตคอร์ม *D. officinale* ของทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบว่า โปรโตคอร์มเจริญเติบโตอย่างเห็นได้ชัด โปรโตคอร์มเริ่มมีการซีดลงเล็กน้อยและไม่มีการกลายเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 18)

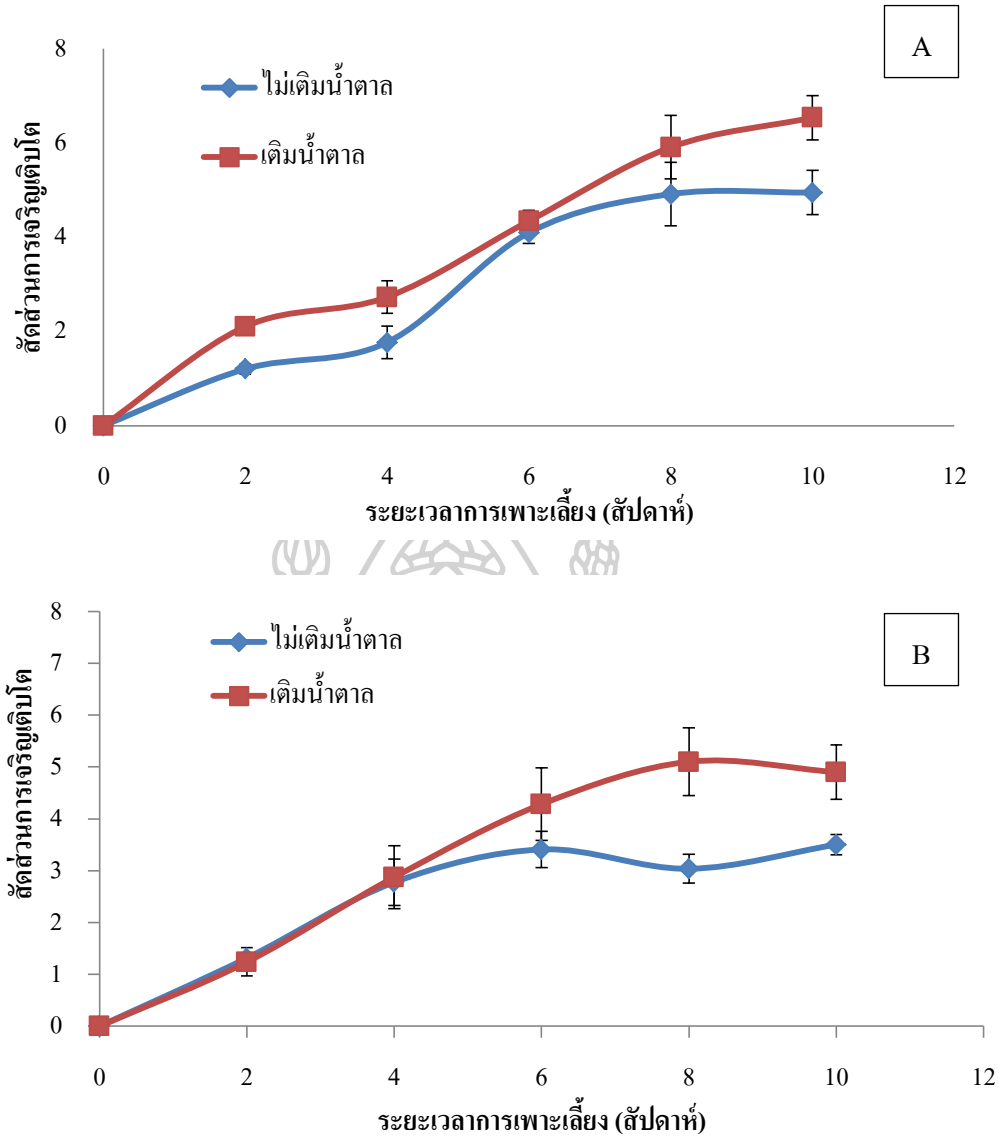


ภาพที่ 17 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ หลังการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (แถวบนไม่เติมซูโครส: แถวล่างเติมซูโครส) (A) 0 สัปดาห์ (B) 2 สัปดาห์ (C) 4 สัปดาห์ (D) 6 สัปดาห์ (E) 8 สัปดาห์ (F) 10 สัปดาห์



ภาพที่ 18 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* หลังการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (แถวบนไม่เติมซูโครส : แถวล่างเติมซูโครส) (A) 0 สัปดาห์ (B) 2 สัปดาห์ (C) 4 สัปดาห์ (D) 6 สัปดาห์ (E) 8 สัปดาห์ (F) 10 สัปดาห์

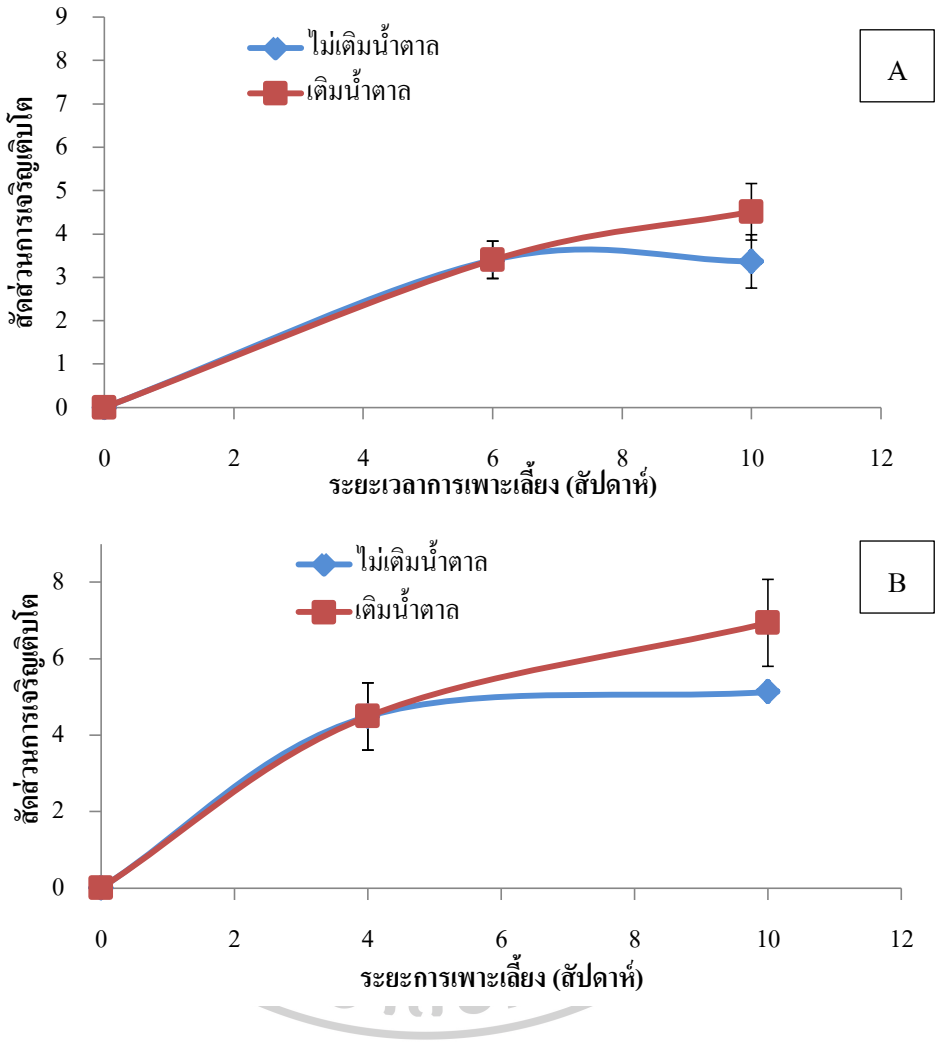
จากการสังเกตจากภาพที่ 19A พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' ในระบบ fed-batch ด้วยการเติมซูโครสในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงมีอัตราการเจริญที่สูงในช่วงสัปดาห์ที่ 4 ถึง 10 ซึ่งมากกว่าการเพาะแบบ Batch ที่ไม่มีการเติมซูโครสที่มีช่วงการเจริญที่สัปดาห์ที่ 4-8 สัปดาห์ และจากผลการทดลองเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* ในภาพที่ 19B พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสเข้าไปในสัปดาห์ที่ 4 มีช่วงของการเพิ่มจำนวนในสัปดาห์ที่ 0 ถึงสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งมากกว่าโปรโตคอร์มที่ไม่เติมสารละลายน้ำตาลซูโครสที่มีช่วงการเพิ่มจำนวนอยู่ที่สัปดาห์ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 6 สรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งที่มีการเติมซูโครสแบบ fed batch ในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พืชมีอัตราการเจริญสูงกว่าและเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ช้ากว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch ที่ไม่มีการเติมซูโครสในระหว่างการเพาะเลี้ยง นอกจากการเพาะเลี้ยงแบบ fed batch จะให้ผลลัพธ์ที่ดีแล้ว น้ำตาลซูโครสยังมีราคาถูก ช่วยลดต้นทุนการผลิตอีกทั้งยังช่วยเพิ่มมวลชีวภาพอีกด้วย ดังนั้น วิธีการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มแบบเติมสารอาหารในช่วงที่เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเริ่มมีการเจริญนั้นเหมาะสำหรับการขยายพันธุ์พืชในปริมาณมาก



ภาพที่ 19 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายด้วยการเติมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และไม่เติม 10 สัปดาห์ (A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' (B) *D. officinale*

ต่อมาได้มีการศึกษาการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายด้วยการเสริมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และ batch อีกครั้งเพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการทดลอง จากภาพที่ 19 และ 20 พบว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายทั้งสองชนิดในชุดการทดลองที่ 2 (ภาพที่ 20) มีผลการทดลองที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองครั้งแรก (ภาพที่ 19) คือ เมื่อการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ในระบบ fed-batch ด้วย

การเติมซูโครสในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 ของการเพาะเลี้ยงให้สัดส่วนการเจริญที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch ที่ไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครส ดังนั้น สรุปได้ว่าการเติมน้ำตาลซูโครสช่วยให้พืชมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มมากขึ้น และระบบ fed-batch เหมาะสำหรับการขยายพันธุ์พืชในปริมาณมาก



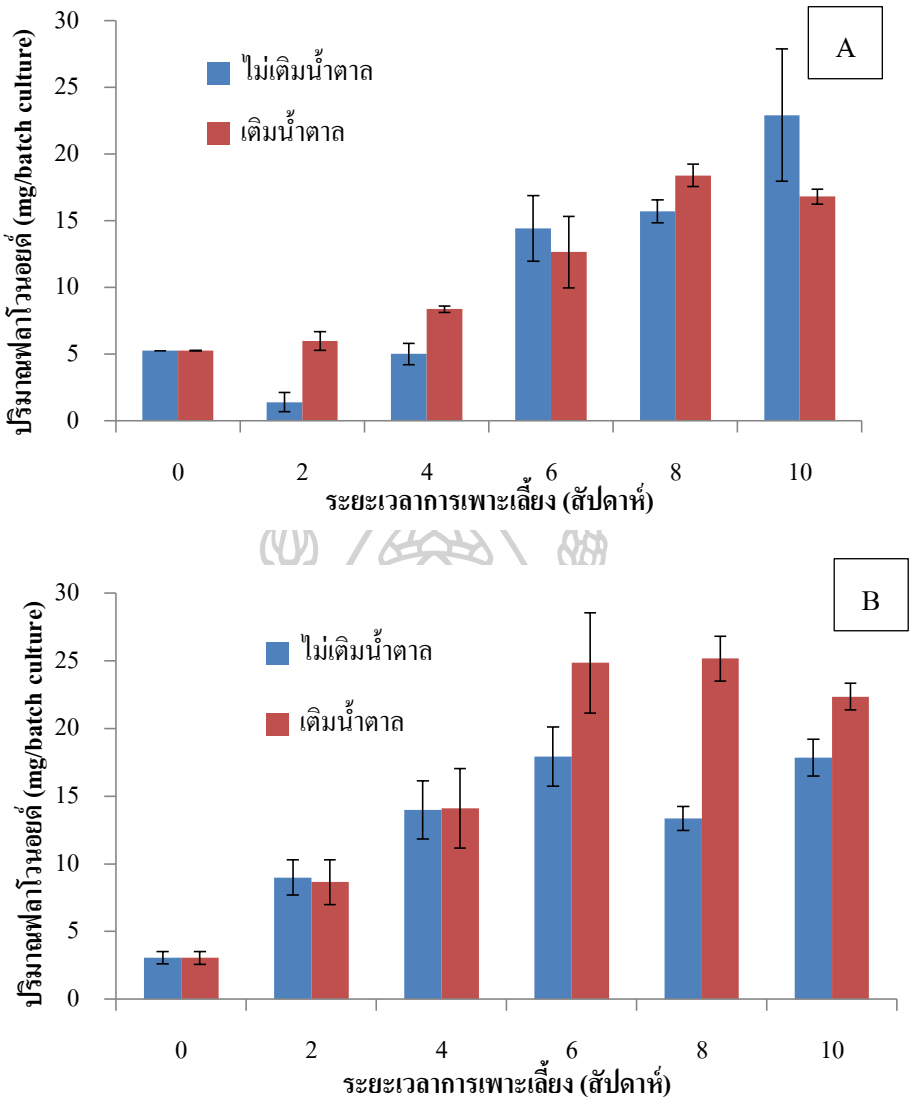
ภาพที่ 20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายด้วยการเสริมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และไม่เติม 10 สัปดาห์ ชุดการทดลองที่ 2 (A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' (B) *D. officinale*

1.2.2 การเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารละลายน้ำตาลซูโครสและไม่เติมสารละลายน้ำตาลซูโครส

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงโดยเติมน้ำตาลและไม่เติมน้ำตาลที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า แสดงไว้ในภาพที่ 21 ผลการศึกษาพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' (ภาพที่ 21A) ที่ไม่มีการเติมน้ำตาลระหว่างการเพาะเลี้ยงมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและให้ปริมาณ ฟลาโวนอยด์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 (22.923มิลลิกรัม/ขวด) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มด้วยการเติมน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบว่า ปริมาณ ฟลาโวนอยด์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 (18.406 มิลลิกรัม/ขวด) และเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 10 ซึ่งบ่งชี้ว่าการเติมซูโครสในสัปดาห์ที่ 4 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณฟลาโวนอยด์ได้

ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D. officinale* (ภาพที่ 21B) ที่ไม่มีการเติมน้ำตาลระหว่างการเพาะเลี้ยงมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและให้ปริมาณ ฟลาโวนอยด์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 (17.9193 มิลลิกรัม/ขวด) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มด้วยการเติมน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 (25.163 มิลลิกรัม/ขวด) และมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมน้ำตาล ซึ่งบ่งชี้ว่าการเติมซูโครสในสัปดาห์ที่ 4 ช่วยเพิ่มปริมาณฟลาโวนอยด์ได้

จากการศึกษาสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D. officinale* แบบ fed batch ที่เติมน้ำตาลระหว่างการเพาะเลี้ยงทำให้พืชสามารถผลิตสารฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch แต่ไม่สามรถช่วยเพิ่มปริมาณฟลาโวนอยด์ใน *D.* Sonia 'Jo Daeng' ได้ เนื่องจากโปรโตคอร์มมีการ Brown เกิดขึ้นอาจทำให้พืชผลิตสารฟลาโวนอยด์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ *D. officinale* ที่ไม่มีปัญหาการ Brown



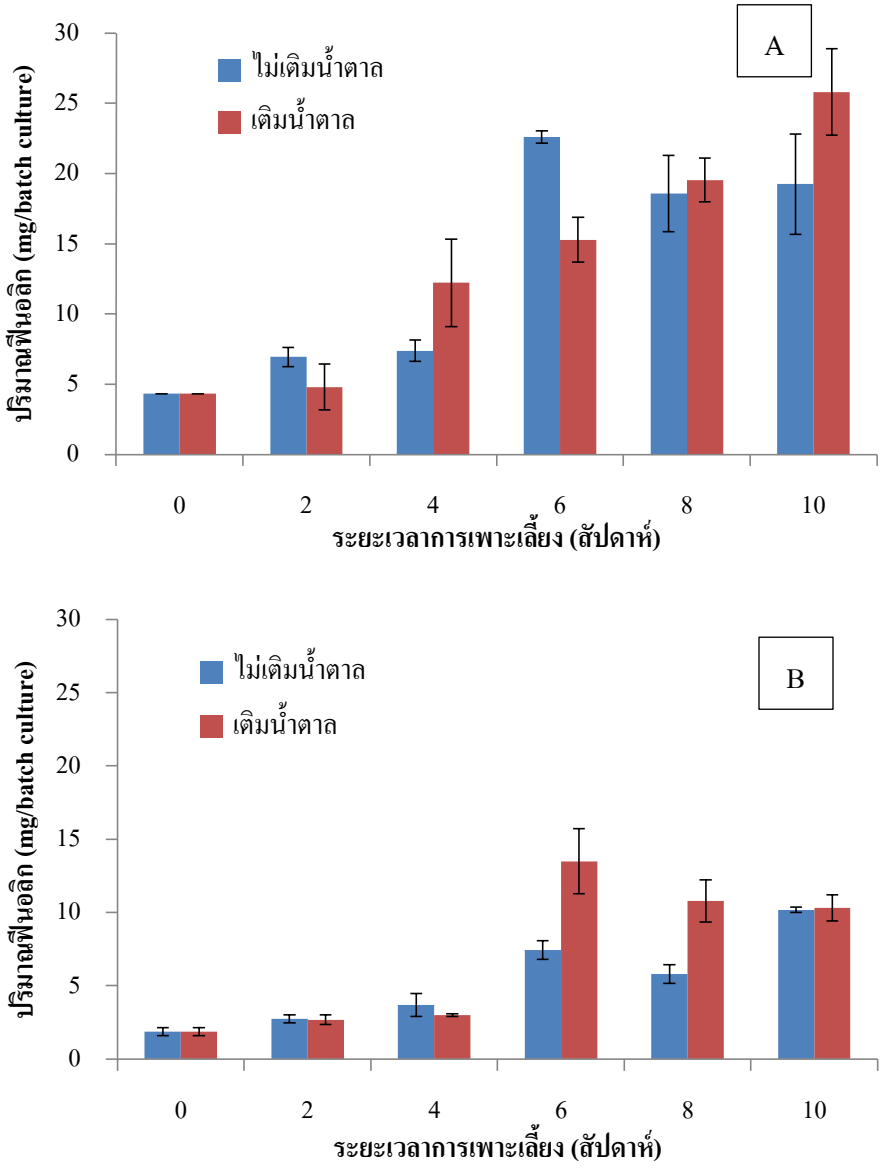
ภาพที่ 21 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และไม่เติม เป็นระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' (B) *D. officinale*

ปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' ที่เพาะเลี้ยงโดยไม่เติมน้ำตาลในระหว่างการเพาะเลี้ยงแสดงไว้ในภาพที่ 22A พบว่า ปริมาณฟีนอลิกค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 (22.615 มิลลิกรัม/ขวด) และเริ่มคงที่ที่สัปดาห์ที่ 6 ถึงสัปดาห์ที่ 10 เมื่อเทียบกับปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากโปรโตคอร์มที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงระดับสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 (25.800 มิลลิกรัม/ขวด)

แสดงให้เห็นว่า การเติมน้ำตาลซูโครสแบบ fed batch ช่วยให้พืชผลิตสารประกอบฟีนอลิกได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมน้ำตาล

ปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากโปรโตคอร์ม *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงโดยไม่เติมน้ำตาลในระหว่างการเพาะเลี้ยงแสดงไว้ในภาพที่ 22B พบว่า ปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 (10.171มิลลิกรัม/ขวด) เมื่อเทียบกับปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากโปรโตคอร์มที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงระดับสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 (13.497มิลลิกรัม/ขวด) ซึ่งให้ปริมาณฟีนอลิกมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมน้ำตาล ชี้ให้เห็นว่า การเติมน้ำตาลซูโครสระหว่างการเพาะเลี้ยงช่วยให้พืชผลิตสารประกอบฟีนอลิกได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมน้ำตาล

สรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งที่มีการเติมน้ำตาลแบบ fed bacth ช่วยให้พืชสามารถผลิตสารฟีนอลิกได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมน้ำตาล เนื่องจากโปรโตคอร์มที่มีการเติมน้ำตาลซูโครสมีช่วงการเจริญเติบโตที่ยาวนานและยังไม่เข้าสู่ระยะคงที่ในสัปดาห์ที่ 6 และ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้มีการผลิตฟีนอลิกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีผลวิจัยที่คล้ายกันในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชอื่นๆ ตัวอย่างเช่น การเพาะถั่วงอกบรอกโคลีที่ใช้ซูโครส 176 มิลลิโมลาร์ ทำให้ปริมาณโพลีฟีนอลิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองนี้ พบว่า การเพิ่มการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชอาจเกิดจากความเครียดออสโมติกที่เกิดจากซูโครส (Guo *et al.*, 2011) ดังนั้นการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตจึงเป็นเกณฑ์สำคัญสำหรับการผลิตเมแทบอไลต์ทุติยภูมิในการเพาะเลี้ยงเซลล์และอวัยวะของพืช

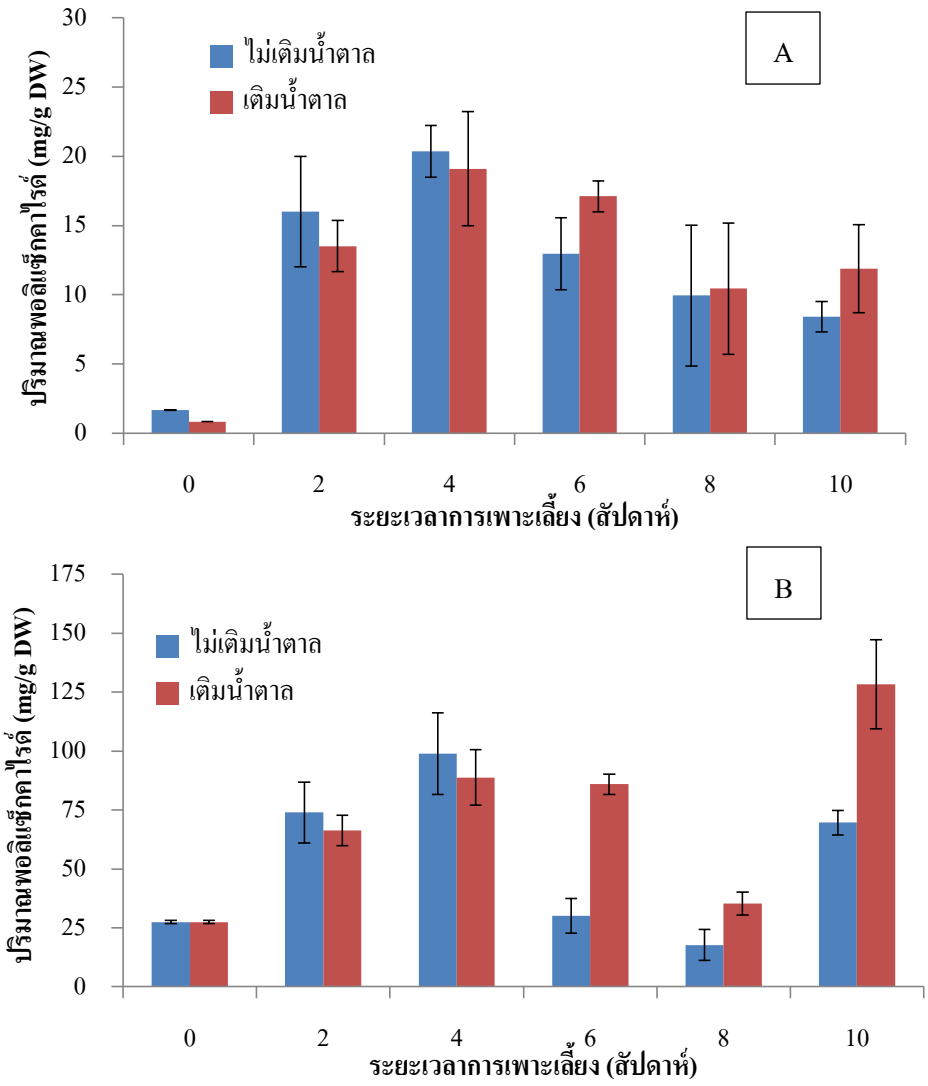


ภาพที่ 22 กราฟการเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และไม่เติม เป็นระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' (B) *D. officinale*

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' ที่เพาะเลี้ยงโดยไม่เติมน้ำตาลระหว่างการเพาะเลี้ยง แสดงไว้ในภาพที่ 23 พบว่า ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 (98.9171 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) และเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 6 ถึงสัปดาห์ที่ 10 เมื่อเทียบกับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากโปรโตคอร์มที่มีการเสริมน้ำตาลซูโครส

ในสัปดาห์ที่ 10 (128.36 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) ของการเพาะเลี้ยง พบว่า ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมน้ำตาล

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากโปรโตคอร์มหวายจีนที่เพาะเลี้ยงโดยไม่เติมน้ำตาลระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่า ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 (20.356 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) เช่นเดียวกับโจแดงและเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 6 ถึงสัปดาห์ที่ 10 เปรียบเทียบกับปริมาณพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยการเสริมน้ำตาลในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบว่า ปริมาณพอลิแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงระดับสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 (19.097 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) ในสัปดาห์ที่ 6 ถึง 10 ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมน้ำตาลซูโครส



ภาพที่ 23 กราฟการเปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เติมน้ำตาลซูโครสในอาหารแบบ fed-batch และไม่เติม เป็นระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' (B) *D. Officinale*

เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสที่เสริมในอาหารแบบ fed-batch เพื่อเพิ่มการสะสมมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 ชนิด โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งพบว่า แหล่งคาร์บอนนอกจากจะช่วยเพิ่มการสะสมมวลชีวภาพ ยังช่วยเพิ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ได้อีกด้วย เนื่องจากโปรโตคอร์มที่มีการเสริมน้ำตาลซูโครสมีช่วงการเจริญเติบโตที่ยาวนานและยังไม่เข้าสู่ระยะคงที่ในสัปดาห์ที่ 6 และ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้มีการผลิตมวลชีวภาพ

และสารออกฤทธิ์ที่มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบไม่เติมน้ำตาลซูโครส ดังนั้น การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งด้วยระบบ Fed-batch ที่มีการป้อนซูโครสเข้าไปในระหว่างการเพาะเลี้ยง จึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกล้วยไม้สกุลหวาย ตลอดจนสามารถนำไปต่อยอดเพื่อขยายขนาดการผลิตต่อไปได้

2. การศึกษาความสัมพันธ์ของมวลชีวภาพและการเพิ่มปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' กับ *D. officinale* ด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

2.1 การจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวสำหรับการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย

จากการศึกษาและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวพบว่า หลักการของระบบนี้เป็นการให้อาหารเหลวกับพืชในระยะเวลาสั้นๆ เพื่อลดปัญหาการฉ่ำน้ำของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงจากระบบอาหารเหลวแบบดั้งเดิม ซึ่งลักษณะตัวถังจะประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนถังเพาะเลี้ยงพืชและถังบรรจุอาหารเหลว โดยจะมีการควบคุมการให้อาหารตามช่วงเวลาแบบอัตโนมัติ โดยเครื่องควบคุมเวลานอกจากจะช่วยให้พืชไม่ฉ่ำน้ำยังช่วยลดต้นทุนด้านแรงงานและการใช้ผงวุ้นในอาหารอีกด้วย ต่อมาได้มีการประยุกต์ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวโดยการใช้ชุดกรอง (reusable bottle top filter) เพื่อใช้เป็นส่วนถังเพาะเลี้ยง ตามภาพที่ 24 แทนการซื้อชุดถัง TIS สำเร็จรูป ที่มีราคาแพง อย่างไรก็ตาม การศึกษาทดลองในครั้งนี้ยังคงประสบปัญหาการปนเปื้อนที่รวดเร็ว เนื่องจากลักษณะชุดกรองมีส่วนที่เป็นข้อต่อมากเกินไป ทำให้อากาศสามารถเข้าได้และเกิดการปนเปื้อนภายใน 1 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง จึงมีการแก้ปัญหาด้วยการใช้ฟอยล์อลูมิเนียมและพาราฟิล์มหุ้มทุกข้อต่อก่อนนำออกจากตู้ปลอดเชื้อซึ่งจะสามารถช่วยชะลอระยะเวลาการปนเปื้อนไปได้ถึง 4 สัปดาห์ (ศิริรักษ์ พลซา, 2560) แต่เนื่องจากระบบเพาะเลี้ยงดังกล่าวมีการปนเปื้อนค่อนข้างเร็วการใช้ชุดกรองมาเป็นถังเพาะเลี้ยงจึงไม่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงพืชเป็นระยะเวลานาน รวมไปถึงการทดลองที่กำลังดำเนินการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ดังนั้นจึงได้มีการติดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar ขึ้น ตามภาพที่ 25 เนื่องจากมีข้อต่อน้อยกว่า การติดตั้งระบบง่ายและสามารถทำได้หลายชุดการทดลองพร้อมกัน อย่างไรก็ตามมีหลายงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการใช้ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Twin jar เพาะเลี้ยงพืชหลายชนิด อาทิ กล้วยไม้ ปาล์ม กล้วยหอมทองและว่านสี่ทิศ เป็นต้น (Padilha *et al.*, 2020);(Daungban *et al.*, 2017);(Ilczuk *et al.*, 2005) รวมถึงกล้วยไม้แคทลียาที่ผลการทดลองพบว่า การใช้ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Twin jar นั้นให้

จำนวนต้นพืชเพิ่มขึ้นมากที่สุดมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น (semi-solid culture) และการเพาะเลี้ยงแบบแช่บางส่วน (liquid media under partial culture) (Leyva-Ovalle *et al.*, 2020)

ภาพที่ 24 ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวที่ประยุกต์ใช้ชุดกรองเป็นถังเพาะเลี้ยงพืช 1 ชุด

ตารางที่ 4 ราคาต้นทุนการจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวที่ประยุกต์ใช้ชุดกรองเป็นถังเพาะเลี้ยงพืช 1 ระบบ

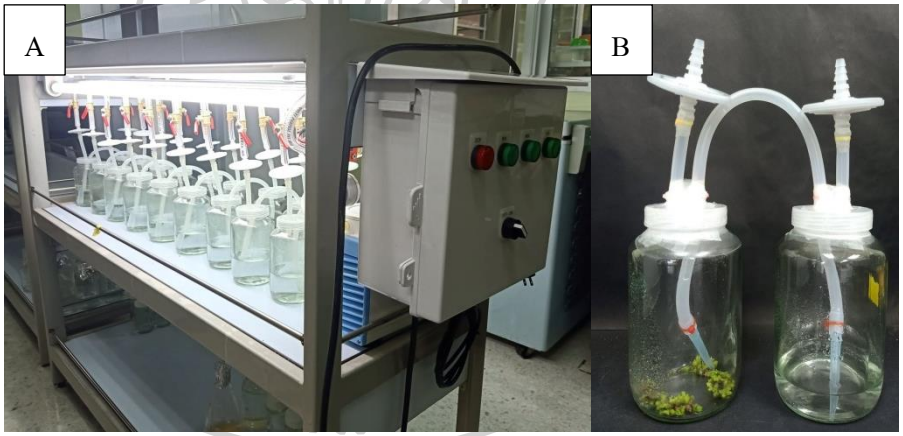
อุปกรณ์	ราคาต่อหน่วย (บาท)	จำนวน	ราคารวม (บาท)	ราคาต้นทุนรวม (บาท)
1. ชุดถังกรอง ขนาด 47 มิลลิเมตร ขนาด 500 มิลลิลิตร สำหรับใส่พืชวัตถุดิบ	3,280.00	8 ชุด	26,240.00	43,164.15
2. ขวด แก้วสำหรับใส่อาหารเหลว ขนาด 500 มิลลิลิตร	219.35	8 ใบ	1,754.80	
3. สายซิลิโคนขนาด 7*10	101.87	5 เมตร	509.35	
4. ตัวกรองอากาศ	290.00	16 ตัว	4,640.00	
5. เครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิด (16 โปรแกรม)	120.00	1 ตัว	120.00	
6. ปั๊มสุญญากาศ	9,500.00	1 ตัว	9,500.00	
7. ข้อต่อทองเหลือง 4 ทาง และ 3 ทาง	100.00	4 ตัว	400.00	

ตารางที่ 5 ราคาต้นทุนการจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar 1 ระบบ

อุปกรณ์	ราคาต่อหน่วย (บาท)	จำนวน	ราคารวม (บาท)	ราคาต้นทุนรวม (บาท)
1. ขวดแก้วเพาะเลี้ยง ขนาด 24 ออนซ์	13.50	18 ใบ	243.00	15,257.35
2. ฝาพลาสติกที่มีท่อ 2 ท่อสำหรับต่อสายซิลิโคน	45.00	18 ฝา	810.00	
3. สายซิลิโคนขนาด 7*10	101.87	5 เมตร	509.35	
4. ตัวกรองอากาศ	290.00	2 ตัว	580.00	
5. เครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิด (28 โปรแกรม)	265.00	1 ตัว	265.00	
6. เครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิด (16 โปรแกรม)	120.00	2 ตัว	240.00	
7. ปั๊มสุญญากาศ	9,500.00	1 ตัว	9,500.00	
8. โซลินอยด์วาล์วลม 220v	300.00	2 ตัว	600.00	
9. วาล์วลมทองเหลือง ขนาด ¼ นิ้ว 2 หุน	35.00	18 ตัว	630.00	
10. ท่อสแตนเลส	500.00	2 ท่อ	1,000.00	
11. ตู้ควบคุมไฟ	500.00	1 ตู้	500.00	
12. สวิตซ์ไฟ 2 ตำแหน่ง	40.00	1 ตัว	40.00	
13. lamp 220v	10.00	4 ดวง	40.00	
14. สายยางแก๊ส ขนาด ¼ นิ้ว	25.00	2 เมตร	50.00	
15. สายไฟ+อุปกรณ์ต่อไฟ	250	1 ชุด	250.00	

เมื่อเปรียบเทียบราคาต้นทุนของระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงพืชทั้ง 2 ระบบ จากตารางที่ 3 และ 4 จะเห็นได้ว่า เมื่อจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar ที่ 1 ระบบสามารถเพาะเลี้ยงได้ถึง 8 ชุดการทดลอง โดยมีราคาต้นทุนในการจัดตั้งระบบ 1 ระบบเท่ากับ 15,257.35 บาท เมื่อเปรียบเทียบราคาต้นทุนกับการจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวที่ประยุกต์ใช้ชุดกรองเป็นถังเพาะเลี้ยงพืช 1 ระบบ ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้ 8 ชุดการทดลอง เท่ากัน จะมีราคาต้นทุน 43,164.15 บาท ซึ่ง 1 ระบบสามารถเพาะเลี้ยงได้ถึง 8 ชุดการทดลองเช่นกัน โดยเฉลี่ยระบบถัง Twin jar 1 ชุด จะมีราคาต้นทุน 1,907.17 บาท ซึ่งมีราคาต้นทุนถูกกว่า ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวที่ประยุกต์ใช้ชุดกรองเป็นถังเพาะเลี้ยงพืช 1 ชุด ซึ่งมีราคาต้นทุนเฉลี่ย 5,395.52 บาท

การจัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar ที่มีการประยุกต์ใช้ขวดแก้วมาเป็นภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยง โดยขวดมีขนาด 24 ออนซ์ บรรจุอาหารได้ 700 มิลลิลิตร จากภาพ 25B Twin jar 1 ชุด จะใช้ขวดแก้ว 2 ขวด โดยขวดแรกจะเป็นส่วนบรรจุเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการเพาะเลี้ยงและขวดที่ 2 บรรจุอาหารเหลว ทั้งสองส่วนจะเชื่อมด้วยสายซิลิโคนขนาด 7x10 มิลลิเมตร เพื่อให้อาหารไหลกลับไปมาได้ ส่วนปลายสายของซิลิโคนในขวดทั้ง 2 จะต่อเข้ากับทิปขนาด 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อพืชถูกดูดกลับไปในขวดอาหารและยังช่วยให้อาหารดูดกลับไปได้หมดไม่ค้างในขวดเพาะเลี้ยง และทั้งสองขวดจะมีสายอากาศขาออกที่ต่อตัวกรองเพื่อป้องกันการปนเปื้อน และต่อเข้ากับวาล์วทองเหลืองสำหรับปรับอัตราการไหล จากนั้นต่อเข้ากับท่ออากาศสแตนเลสหลัก 2 ท่อสำหรับถังเพาะเลี้ยงและถังอาหารที่ต่อปั๊มสุญญากาศ อากาศถูกดูดจากในขวดเพาะเลี้ยงจนเป็นสุญญากาศทำให้อาหารเหลวจากอีกขวดถูกดูดเข้ามาในส่วนของถังเพาะเลี้ยง และอาหารจะถูกดูดออกจากถังเพาะเลี้ยงด้วยวิธีเดียวกัน การให้อาหารมีการควบคุมระบบการเปิด – ปิดปั๊มแบบอัตโนมัติโดยต่อปั๊มเข้ากับเครื่องตั้งเวลาและโซลินอยด์วาล์ว 220v เพื่อควบคุมการไหลเข้าออกของอาหารในถังเพาะเลี้ยง



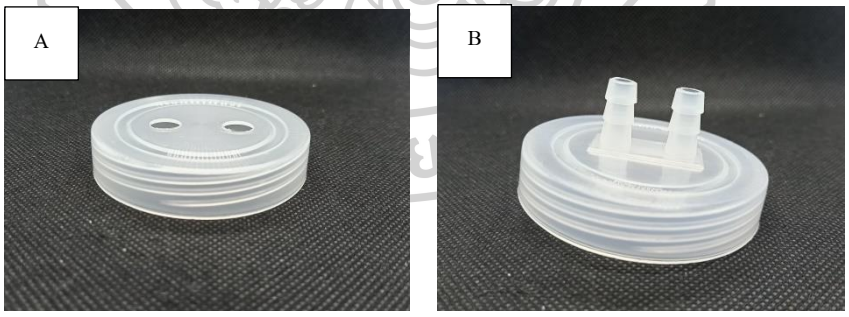
ภาพที่ 25 ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar A) Twin jar 1 ระบบ B) Twin jar 1 ชุด

2.2 การทดสอบระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar

จากการทดสอบระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar ในช่วงแรกเริ่มต้นนั้น มีการทดลองใช้ฝาถังแบบเจาะรู(ภาพที่26A) โดยใช้สายซิลิโคนขนาด 7x10 มิลลิเมตร ใส่ผ่านรูฝาลงไปในถังบรรจุอาหารและถังเลี้ยงพืชโดยตรง โดยที่ขนาดของสายซิลิโคนขนาดแน่นพอดีกับรูฝา และมีการอุดรอยต่อระหว่างสายยางซิลิโคนและฝาด้วยซิลิโคนเหลวเพื่อกันการรั่วซึมของอากาศ

โดยเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar ในอาหาร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (5%inoculum) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ มีการปิดเครื่องปรับอากาศเป็นระยะเวลา 3 วัน จากรูปที่ 27A พบว่า โปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' เกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นสีน้ำตาล หรือเกิดอาการที่เรียกว่า Browning อย่างรุนแรงทำให้โปรโตคอร์มตาย และมีการปนเปื้อนแบคทีเรียและราเกิดขึ้นในถังบรรจุอาหารเหลว (รูปที่ 27B) เนื่องจากในช่วงเวลาที่ปิดเครื่องปรับอากาศนั้น ทำให้อุณหภูมิภายในห้องเพาะเลี้ยงสูงเกินไป เป็นเหตุทำให้เชื้อราและแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดี ดังนั้น การรักษาอุณหภูมิของห้องเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วง 25 องศาเซลเซียส จึงมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มอย่างมาก ที่นอกจากจะช่วยชะลอการเกิด Browning ในชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มแล้วยังช่วยชะลอการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียในอาหารอีกด้วย

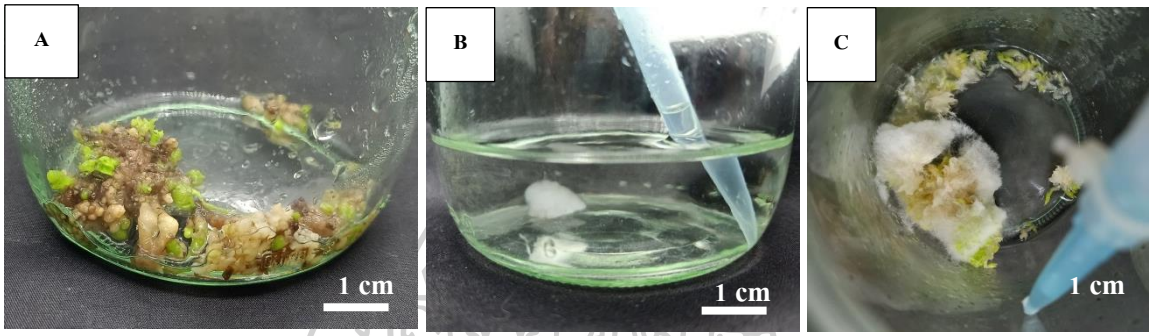
ดังนั้น จึงมีการทดลองระบบการเพาะเลี้ยงอีกครั้งด้วยสภาวะเดียวกันกับครั้งแรก โดยควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสตลอดการเพาะเลี้ยง พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเริ่มเกิดการปนเปื้อนราและแบคทีเรียและสังเกตพบว่าอาหารเหลวบางขวดไม่สามารถดูดขึ้นได้ เนื่องจากซิลิโคนที่อุดตัวฝาเกิดการร่อนออกจากตัวฝาเนื่องจากความร้อนจากหลอดไฟ ทำให้ระบบไม่เป็นสุญญากาศ และไม่ปลอดเชื้อ ดังนั้น จึงทำการแก้ไขโดยเปลี่ยนฝาปิดขวดปกติที่เจาะรูเป็นฝาแบบต่อหางปลา (ภาพที่26B) เพื่อป้องกันการรั่วซึมของอากาศและลดการปนเปื้อนในระบบ



ภาพที่ 26 ลักษณะฝาถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar A) แบบเจาะรู B) แบบต่อหางปลา

เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มด้วยระบบที่ประกอบโดยใช้ฝาแบบต่อหางปลาและเพาะเลี้ยงในห้องที่ทำการปรับอุณหภูมิห้องที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า โปรโตคอร์มเริ่มมีราขาวเกิดขึ้น (รูปที่ 27C) ถึงแม้ว่าจะมีการป้องกันโดยการใช้พาราฟิล์มพันบริเวณทุกข้อต่อ

ต่างๆ ของสายซิลิโคน ท่อ ตัวกรองและรอบฝาถังจากในตู้ปลอดเชื้อก่อนนำออกมาเพาะเลี้ยงแล้วก็ตาม ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าตัวกรองอากาศนั้นมีความชื้นสะสมอยู่ เนื่องจากอาหารเหลวระเหยเข้าไปในตัวกรองจึงเป็นเหตุให้เกิดเชื้อราเจริญเติบโตขึ้นในระบบการเพาะเลี้ยงได้ จึงได้ทำการเปลี่ยนชุดฝาถังปฏิกรณ์ชีวภาพและตัวกรองอากาศทั้งชุดทุก 2 สัปดาห์ เพื่อยืดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มอย่างต่อเนื่องได้ยาวนานขึ้นถึง 2 เดือน



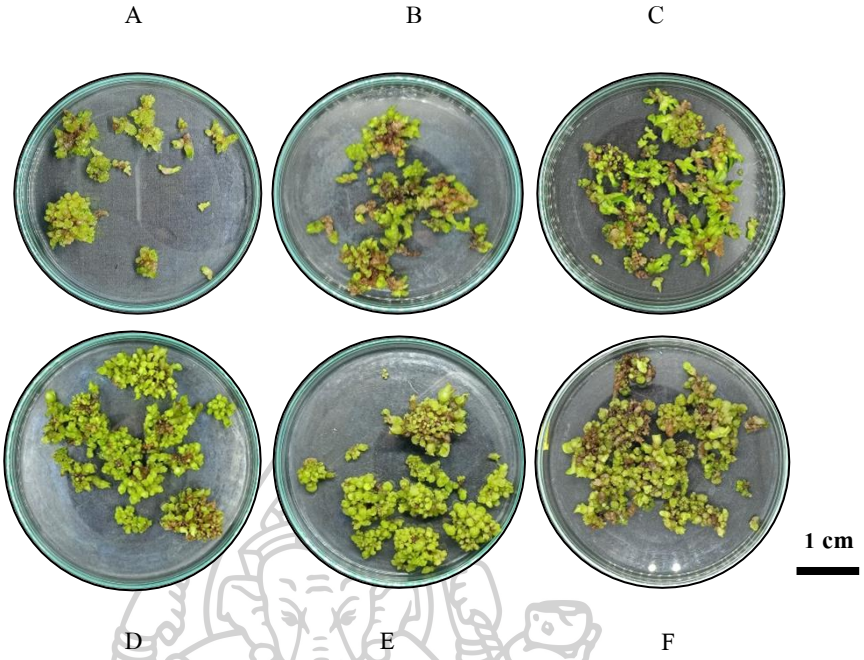
ภาพที่ 27 การทดสอบระบบการเพาะเลี้ยงโปรโตคออร์มกล้วยไม้ด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar A) การ Browning ของโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' B) ลักษณะการปนเปื้อนจากเชื้อราในถังอาหาร C) ลักษณะการปนเปื้อนจากราในถังเพาะเลี้ยง

2.3 การศึกษาการสะสมมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

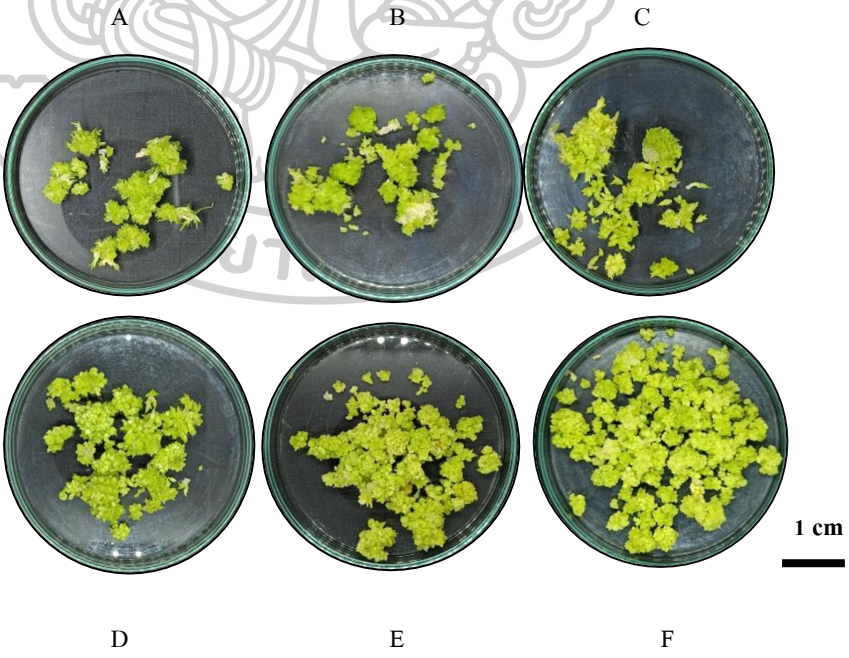
ศึกษาความสัมพันธ์ของการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์ด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ twin jar ที่จัดตั้งขึ้นจากการทดลองก่อนหน้า โดยเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม 5 กรัม (5% inoculum) ในอาหารเหลวสูตร 1/2MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาณอาหาร 100 มิลลิลิตร ที่ความถี่การแช่ 1 นาที ทุก 4 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสโดยให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ดังภาพที่ 28 และเริ่มเกิดอาการ Browning เล็กน้อยในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้ การเกิด Browning เป็นปัญหาสำคัญของการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ในหลอดทดลอง จากงานวิจัยหลายรายงาน พบว่า อาการ Browning นั้นเกิดจากการสะสมของสารฟีนอลิกที่มากเกินไปทำให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงสูญเสียความสามารถในการเจริญเติบโตและเกิดการตายในที่สุด และมีการนำเสนอแนวทางการแก้ไขหลีกเลี่ยงปัญหาการเกิด Browning อาทิ การเติมผงถ่านเพื่อดูดซับสารฟีนอลิกที่เป็นพิษต่อพืชหรือการเติมกรดแอสคอบิก

เพื่อลดการผลิตอนุมูลออกซิเจน เป็นต้น (Rittirat *et al.*, 2012); (Wattanapan *et al.*, 2018) สำหรับกรณีการเพาะเลี้ยงพืชในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นปัญหาการเกิด Browning อาจเกิดจากแรงหมุนเวียนของอาหารและชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำให้ชิ้นส่วนเกิดความเสียหาย และเกิดบาดแผลบนผิวพืชที่อาจเป็นอีกสาเหตุทำให้พืชเกิดการ Browning ได้ (Winarto *et al.*, 2013) ลักษณะของการเกิด Browning แสดงดังภาพที่ 30A จะเห็นว่าเกิดจากส่วนกลางของโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' ซึ่งเป็นเซลล์พืชพี่เลี้ยง ที่อาจเป็นลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์กล้วยไม้ในเขตร้อน ในขณะที่ในโปรโตคอร์ม *D. officinale* ไม่พบว่าเกิดปัญหา Browning แต่อย่างใด และจากการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *D. officinale* ดังภาพที่ 29 และ 30C พบว่าโปรโตคอร์มมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีการซีดของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเพียงเล็กน้อยหลังการเพาะเลี้ยง

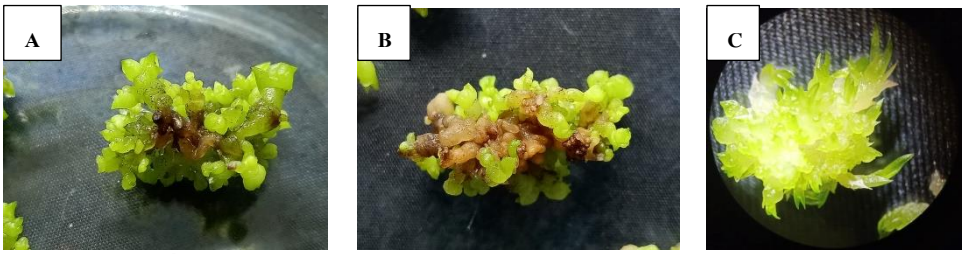
เมื่อเปรียบเทียบปัญหาการเกิด Browning ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง ในการทดลองก่อนหน้านี้กับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งมีอาการ Browning น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว โดยมีการเริ่ม Browning ในสัปดาห์ที่ 2 เช่นเดียวกัน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่งนั้น เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงจมอยู่ในอาหารเหลวตลอดเวลา มีการสัมผัสอากาศน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวที่มีการให้อาหารและดึงอาหารออกเป็นช่วงๆ (Cui *et al.*, 2014) จึงอาจทำให้โปรโตคอร์มเกิดการ oxidation ที่เนื้อเยื่อพืชทำให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเกิดการ Browning ขึ้นได้ ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงในระบบ TIS เช่น ระยะเวลาและความถี่ในการแช่ ปริมาตรอาหาร จึงถูกนำมาใช้ลดการเกิด Browning ในการเพาะเลี้ยง โปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' ด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว และเพื่อลดการ oxidation อาจต้องใช้ระยะเวลาการแช่ที่นานกว่า 1 นาที ทุก 4 ชั่วโมง เพื่อให้พืชสัมผัสกับอากาศน้อยลง



ภาพที่ 28 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' หลังการเพาะเลี้ยง10 สัปดาห์ (A) 0 สัปดาห์ (B) 2 สัปดาห์ (C) 4 สัปดาห์ (D) 6 สัปดาห์ (E) 8 สัปดาห์ (F) 10 สัปดาห์



ภาพที่ 29 ลักษณะของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D. officinale* หลังการเพาะเลี้ยง10 สัปดาห์ (A) 0 สัปดาห์ (B) 2 สัปดาห์ (C) 4 สัปดาห์ (D) 6 สัปดาห์ (E) 8 สัปดาห์ (F) 10 สัปดาห์



ภาพที่ 30 ลักษณะการ Browning ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย

A) โปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' 2 สัปดาห์

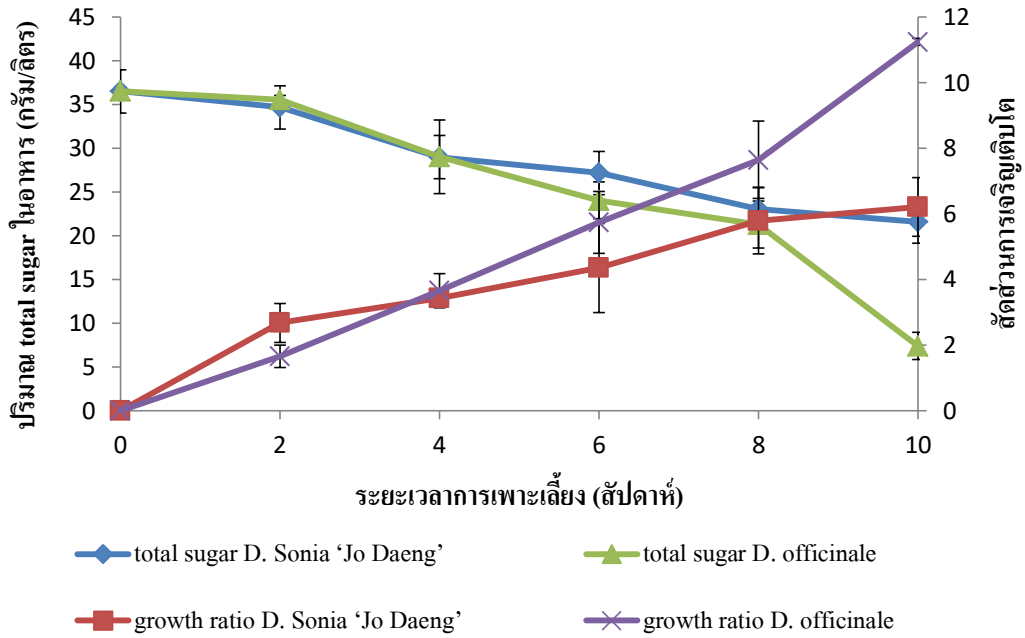
B) โปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' 6 สัปดาห์

C) โปรโตคอร์ม *D. officinale*

จากภาพที่ 31 แสดงกราฟการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ โปรโตคอร์มมีการเจริญเติบโตที่สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยง และกล้วยไม้ *D. officinale* ยังมีค่าสัดส่วนการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและยังเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและยังไม่เข้าสู่ stationary phase แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงยาวนานไปจนถึง 10 สัปดาห์แล้วก็ตาม ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณรวมของน้ำตาลในอาหารที่ค่อยๆลดลง แสดงถึงการที่โปรโตคอร์มมีการนำน้ำตาลในอาหารไปใช้ในการสะสมมวลชีวภาพและเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์ม ซึ่งน้ำตาลซูโครสถือเป็นน้ำตาลที่ให้ค่าการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูงที่สุด (Murthy *et al.*, 2014) ที่สัปดาห์ที่ 10 ปริมาณน้ำตาลรวมค่อยๆ ลดลงและสอดคล้องกับค่าสัดส่วนการเจริญที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อพิจารณาจากค่าสัดส่วนการเจริญในช่วง log phase ต่อเวลา พบว่ามีสัดส่วนการเจริญเพิ่มขึ้น 1 เท่าต่อสัปดาห์ สำหรับความสัมพันธ์ของสัดส่วนค่าการเจริญและการใช้น้ำตาลของ *D.* Sonia 'Jo Daeng' พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรวมลดลงในช่วงสัปดาห์ที่ 0 ถึง 10 ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนการเจริญที่เพิ่มมากขึ้นแบบทวีคูณไปจนถึงสัปดาห์ที่ 10 และยังไม่เข้าสู่ stationary phase แสดงให้เห็นว่าโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' ยังสามารถเจริญต่อไปได้อีกเช่นเดียวกับ *D. officinale* เมื่อพิจารณาจากค่าสัดส่วนการเจริญในช่วง log phase ต่อเวลาของ *D.* Sonia 'Jo Daeng' พบว่า มีสัดส่วนการเจริญเพิ่มขึ้น 0.42 เท่าต่อสัปดาห์ ซึ่งต่ำกว่าสัดส่วนการเจริญของ *D. officinale* ซึ่งบ่งชี้ว่า *D. officinale* มีการเพิ่มขึ้นของมวลชีวภาพที่สูงกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเพิ่มมวลชีวภาพของกล้วยไม้ทั้งสองชนิดในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงมีการเจริญเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ช้ากว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง ทั้งนี้อาจเกิดจากระบบการเพาะเลี้ยง

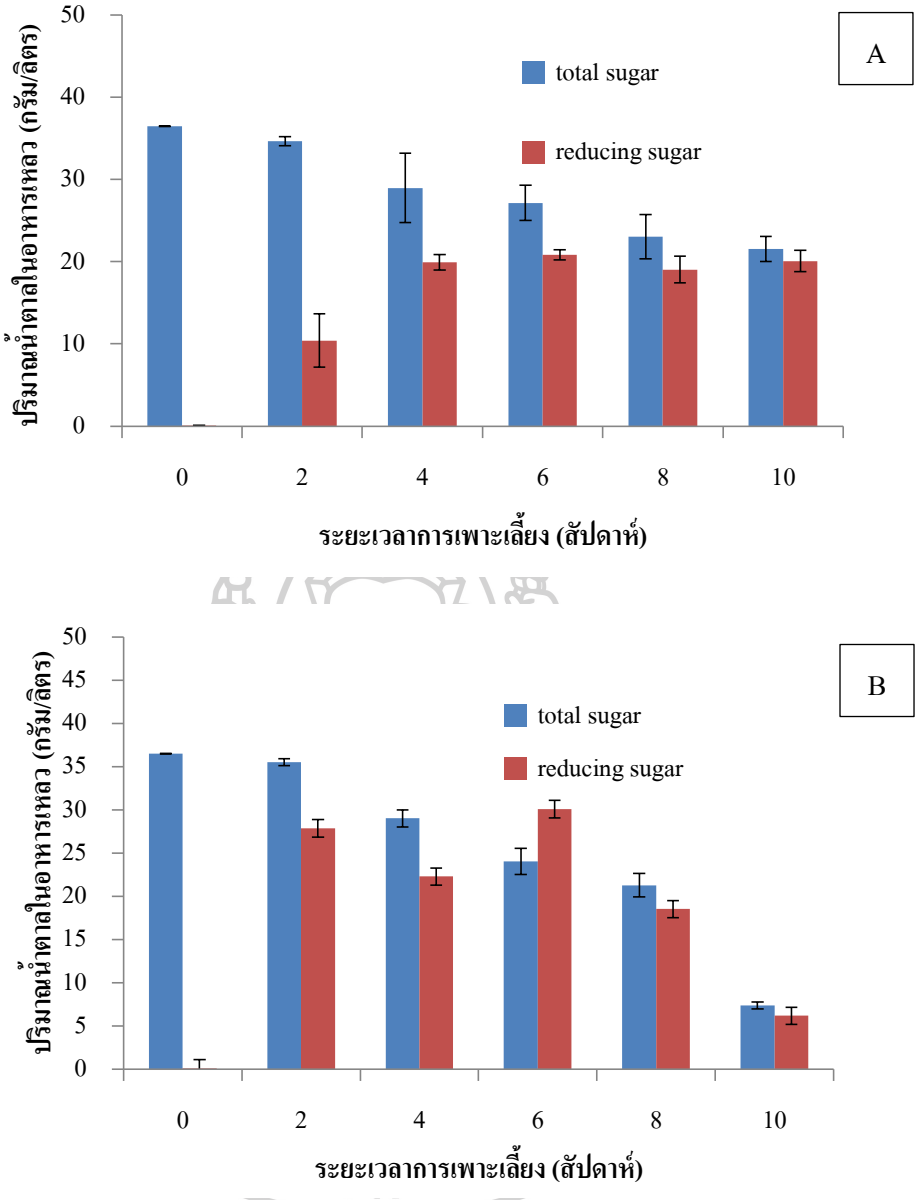
แบบแช่ชั่วคราวของถังปฏิกรณ์ที่ตั้งเวลาความถี่การให้อาหาร ทำให้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงสัมผัสกับอาหารน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งที่ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงมีการสัมผัสกับอาหารตลอดเวลา ทำให้การเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่งโปรโตคอร์มจะเข้าสู่สภาวะคงที่ก่อนการเพาะเลี้ยงแบบแช่ชั่วคราว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวทำให้พืชเจริญเติบโตในช่วงระยะเวลาที่ยาวกว่าและเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ช้ากว่าการเพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรวมที่ลดลง พบว่า ใน *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีการใช้น้ำตาลในอาหารน้อย เนื่องมาจากพืชมีการ Browning เกิดขึ้นซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ ทำให้พืชมีการตายบางส่วนทำให้ใช้นำตาลน้อยและเจริญเติบโตช้ากว่า *D. officinale*

สรุปได้ว่า จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (twin jar) พบว่าสัดส่วนการเจริญของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดยังเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แม้ว่าจะเลี้ยงไปถึง 10 สัปดาห์แล้วก็ตาม แสดงให้เห็นว่าโปรโตคอร์มยังสามารถเจริญต่อไปได้อีก ดังนั้นควรจะพิจารณาเพาะเลี้ยงในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น เพื่อจะได้ทราบถึงพฤติกรรมการใช้น้ำตาลและช่วงเวลาเข้าสู่ระยะคงที่ของโปรโตคอร์มทั้ง 2 ชนิด และจากค่าสัดส่วนการเจริญที่เพิ่มขึ้นในช่วง log phase ต่อเวลาของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด พบว่าการเพิ่มขึ้นของค่าสัดส่วนการเจริญอยู่ในช่วง 0.60 ถึง 1.25 เท่าต่อเวลา โดย *D. officinale* มีค่าสัดส่วนการเจริญต่อเวลาในช่วง log phase สูงกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' จึงยืนยันผลได้ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D. officinale* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้มวลชีวภาพที่สูงกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะและช่วงเวลาเดียวกันเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง



ภาพที่ 31 กราฟแสดงการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* หลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIS แบบ Twin jar 10 สัปดาห์

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* หลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIS แบบ Twin jar เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (ภาพที่ 32) พบว่า เมื่อปริมาณรวมของน้ำตาลลดลง ปริมาณน้ำตาล reducing เพิ่มมากขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 0 ถึง 6 เนื่องจากน้ำตาลซูโครสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ถูกทำให้แตกตัวเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคสและฟรักโทส โดยความเป็นกรดในอาหารเหลวที่มากขึ้นที่เกิดจากการที่พืชใช้ไนเตรตในอาหารทำให้แอมโมเนียเหลืออยู่ในอาหารมากกว่า อาหารจึงมีค่า pH เป็นกรดมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุให้น้ำตาลแตกตัว (Cui *et al.*, 2014) และหลังจากสัปดาห์ที่ 6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มลดลงเช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลรวมที่ลดลงเนื่องจากพืชเริ่มเอาน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต



ภาพที่ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายหลังการเพาะเลี้ยงในระบบ TIS 10 สัปดาห์

A) *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ B) *D. officinale*

ตารางที่ 6 ค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งและสัดส่วนการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS culture) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10สัปดาห์

ค่าการเจริญเติบโต	สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)					
		0	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**
ค่าน้ำหนักสด (g)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	5.023 ± 0.006b	5.722 ± 0.542b	6.923 ± 0.175ab	7.855 ± 2.435ab	9.738 ± 1.300a	10.744 ± 1.152a
	D. officinale	5.016 ± 0.004d	5.336 ± 0.213d	6.052 ± 0.234d	8.955 ± 0.256c	10.586 ± 1.028b	16.469 ± 0.132a
ค่าน้ำหนักแห้ง (g)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	0.146 ± 0.009c	0.537 ± 0.865b	0.647 ± 0.019bc	0.781 ± 0.198abc	0.990 ± 0.147ab	1.052 ± 0.131a
	D. officinale	0.145 ± 0.008e	0.384 ± 0.050de	0.674 ± 0.075cd	0.975 ± 0.143ab	1.251 ± 0.171b	1.773 ± 0.016a
ค่าสัดส่วนการเจริญ	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	-	2.677 ± 0.592b	3.434 ± 0.131bc	4.350 ± 1.356abc	5.783 ± 1.010ab	6.202 ± 0.894a
	D. officinale	-	1.651 ± 0.344d	3.656 ± 0.518cd	5.735 ± 0.985bc	7.640 ± 1.181b	11.238 ± 0.108a

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

ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

- หมายถึง ไม่มีการเก็บพืชตัวอย่าง

จากข้อมูลตารางที่ 6 แสดงค่าน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งและสัดส่วนการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายทั้งสองชนิดที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าโปรโตคอร์มทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่าการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าสัดส่วนการเจริญที่ 4 สัปดาห์พบว่า *D. officinale* มีค่าสัดส่วนการเจริญ 3.656 ซึ่งมากกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' ที่มีสัดส่วนการเจริญ 3.434 ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวและการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง พบว่า *D. officinale* เจริญเติบโตได้เร็วกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' เมื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว และ *D.* Sonia 'Jo Daeng' เจริญได้ดีกว่าในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง

ตารางที่ 7 ค่า pH และค่าการนำไฟฟ้าของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS culture) หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

ค่า pH และค่าการนำไฟฟ้า	สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)					
		0	2	4	6	8	10
ค่า pH	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	5.62 ± 0.000	3.36 ± 0.350	3.44 ± 0.050	3.85 ± 0.210	4.76 ± 0.453	4.23 ± 0.170
	D. officinale	5.62 ± 0.000	3.90 ± 0.407	4.07 ± 0.064	4.77 ± 1.068	5.20 ± 1.103	5.94 ± 0.000
ค่าการนำไฟฟ้า mS/cm	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	2.190 ± 0.000	1.662 ± 0.135	1.406 ± 0.279	1.196 ± 0.260	0.926 ± 0.094	0.784 ± 0.095
	D. officinale	2.190 ± 0.000	1.594 ± 0.076	1.509 ± 0.309	0.906 ± 0.088	0.703 ± 0.029	0.217 ± 0.008

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

จากตารางที่ 6 เมื่อวัดค่า pH และค่าการนำไฟฟ้า พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าของอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 สายพันธุ์ลดลง เมื่อเวลาผ่านไป แสดงให้เห็นถึงการสะสมมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากโปรโตคอร์มมีการนำไนเตรทไอออนของสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโตทำให้เกลือไนเตรทในอาหารเพาะเลี้ยงลดลงส่งผลให้ค่าการนำไฟฟ้าลดลง มีรายงานว่าค่าการนำไฟฟ้าสะท้อนให้เห็นถึงการดูดซึมสารอาหารโดยพืช จึงถูกใช้เป็นวิธีทางอ้อมในการศึกษาการเจริญเติบโตของพืช (Ryu *et al.*, 1990) จากผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 6 กลับพบว่าอาหารเพาะเลี้ยงมีค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้น อันอาจเนื่องจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงมีการตายเกิดขึ้นและไม่สามารถดูดธาตุอาหารไปใช้ได้จึงทำให้ค่าการนำไฟฟ้าไม่ลดลง และจากการตายของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงนี้ ทำให้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงดังกล่าวอาจปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดลงในอาหารเพาะเลี้ยง จึงส่งผลทำให้ค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้น และเมื่อทำการวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ซึ่งแสดงถึงความสมดุลของไนเตรตและแอมโมเนียมในอาหาร หลังการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ พบว่าค่า pH ในอาหารของกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์มีค่าลดต่ำลงจากค่า pH เริ่มต้น 5.62 แสดงให้เห็นว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 สายพันธุ์มีการดึงไนเตรตไปใช้ ในช่วงสัปดาห์ที่ 0 ถึง 2 ทำให้ประจุบวกของแอมโมเนียมมีมากจึงทำให้ค่า pH มีค่าลดต่ำลง ต่อมาในสัปดาห์ที่ 4 ถึง 10 ค่า pH กลับมาสูงขึ้นเนื่องจากพืชเริ่มดึงประจุของแอมโมเนียมไปใช้ทำให้ประจุลบของไนเตรตมีค่ามากกว่า ค่า pH จึงเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่มีการเจริญขึ้นเรื่อยๆ

3. วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากโปรโตคอร์ม กล้วยไม้ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

3.1 วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการศึกษาการสะสมมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale*

จากการนำโปรโตคอร์มกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ Twin jar เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ โปรโตคอร์มที่ได้จากการทดลองก่อนหน้าแต่ละช่วงเวลาถูกนำมาสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งข้อมูลถูกแสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การสะสมของชีวมวลและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์

ชีวมวล/สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)					
		0	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**
น้ำหนักแห้ง (g/batch culture)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	0.146 ± 0.009c	0.537 ± 0.865b	0.647 ± 0.019bc	0.781 ± 0.198abc	0.990 ± 0.147ab	1.052 ± 0.131a
	D. officinale	0.145 ± 0.008e	0.384 ± 0.050de	0.674 ± 0.075cd	0.975 ± 0.143ab	1.251 ± 0.171b	1.773 ± 0.016a
ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg/batch culture)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	2.957 ± 1.005c	19.228 ± 1.981b	22.716 ± 3.972b	21.831 ± 4.383b	30.332 ± 6.719b	45.975 ± 3.634a
	D. officinale	3.351 ± 0.867c	7.566 ± 5.080c	26.062 ± 0.223b	28.975 ± 7.994b	54.426 ± 1.958a	59.997 ± 6.886a
ปริมาณฟีนอลิก (mg/batch culture)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	2.8586 ± 1.185d	15.749 ± 0.281c	20.345 ± 0.126bc	20.932 ± 4.086bc	28.802 ± 5.710b	47.110 ± 0.843a
	D. officinale	2.394 ± 1.287b	6.556 ± 4.913b	13.128 ± 3.445b	39.152 ± 3.942a	33.932 ± 3.122a	45.875 ± 8.120a
ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (mg/g DW)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	8.865 ± 0.956b	52.059 ± 17.378a	77.301 ± 8.712a	61.517 ± 14.970a	17.718 ± 2.131b	9.423 ± 0.471b
	D. officinale	0.347 ± 0.004c	1.777 ± 0.033c	5.436 ± 2.758bc	8.940 ± 2.356b	9.026 ± 0.174b	15.367 ± 0.518a

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

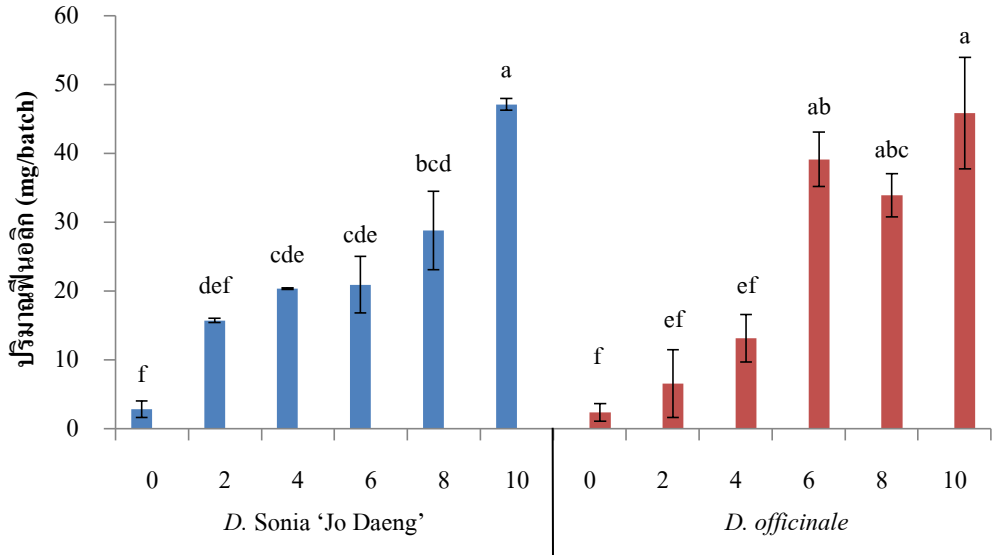
ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* พบว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีปริมาณฟลาโวนอยด์สอดคล้องกับน้ำหนักแห้ง โดยมีปริมาณสูงที่สุดที่สัปดาห์ที่ 10 เท่ากับ 45.975 ± 3.634 มิลลิกรัม/ขวด และ *D. officinale* มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดที่สัปดาห์ที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 59.997 ± 6.886 มิลลิกรัม/ขวด โดยการวิเคราะห์หา ปริมาณฟลาโวนอยด์ ทดสอบด้วยวิธี Aluminum chloride method

และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay พบว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 10 เท่ากับ 47.110± 0.843 มิลลิกรัม/ขวด และ *D. officinale* มีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดที่สัปดาห์ที่ 10 เท่ากับ 45.875 ± 8.120 มิลลิกรัม/ขวด โดยมีปริมาณฟีนอลิกที่สัปดาห์ที่ 6 และ 8 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

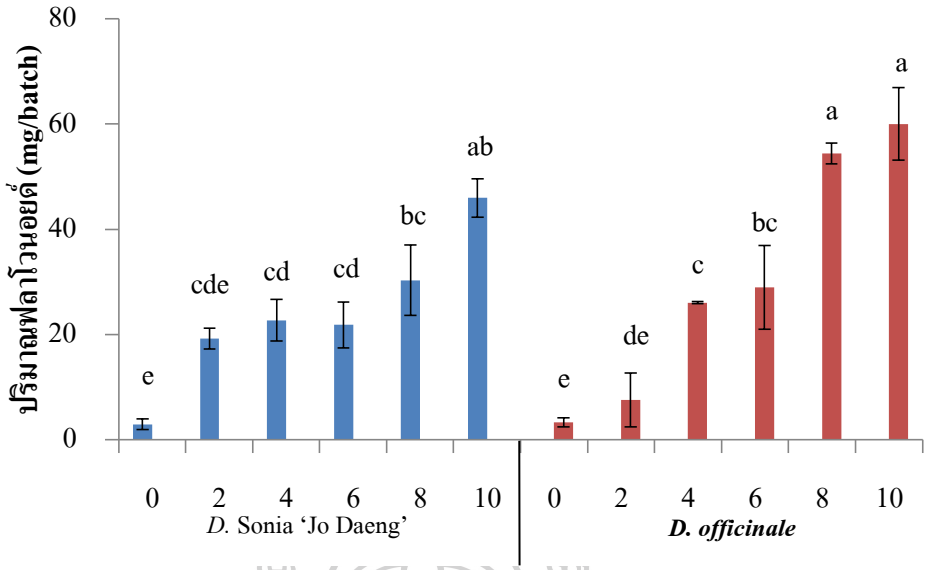
การวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า โปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ถึง 6 และเริ่มมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงในสัปดาห์ที่ 8 ถึง 10 โดยมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สุดที่สัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 77.301 ± 8.712 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งและ *D. officinale* มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงซึ่งมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 10 เท่ากับ 15.367 ± 0.518 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

สรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด ด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวที่ติดตั้งขึ้น ช่วยให้พืชผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากขึ้นมีโดยให้ปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดยังไม่เข้าสู่ช่วงระยะคงที่อาจต้องใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่มากกว่า 10 สัปดาห์เพื่อสรุปผลการศึกษานี้



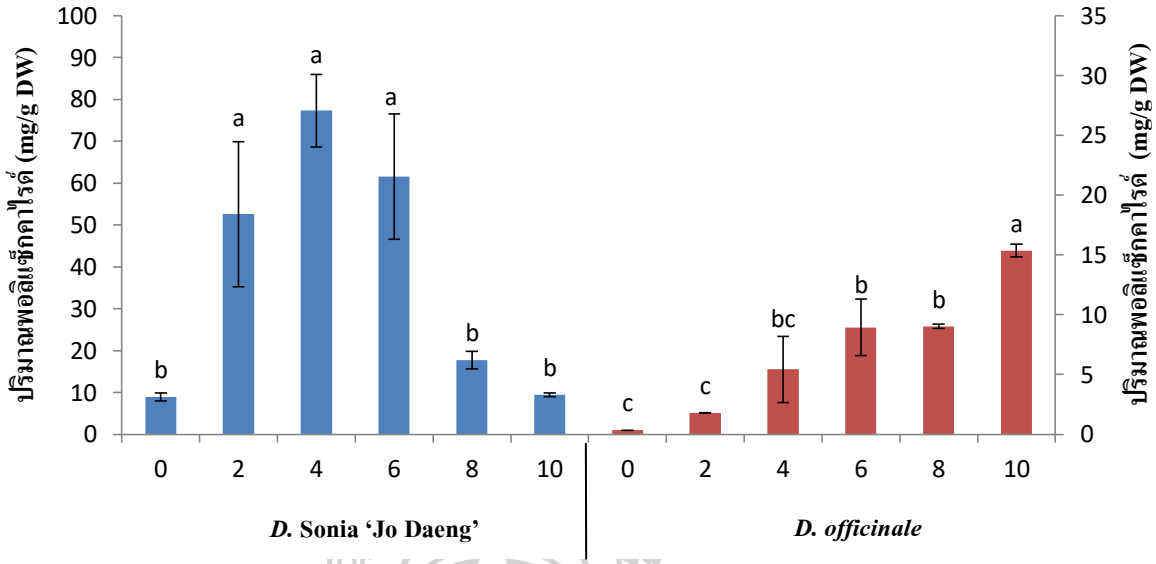
ภาพที่ 33 กราฟเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์

จากภาพที่ 33 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่า *D. officinale* ในช่วงสัปดาห์ที่ 0 2 และ 4 และพบว่า ปริมาณฟีนอลิกสูงสุดได้รับจากสัปดาห์ที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะเดียวกัน *D. officinale* หลังจากสัปดาห์ที่ 4 จึงให้ปริมาณฟีนอลิกมากกว่า เนื่องจากโปรโตคอร์มเจริญเติบโตตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงทำให้สามารถผลิตสารฟีนอลิกได้อย่างต่อเนื่อง จนเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงจะเข้าสู่ช่วงระยะคงที่ของพืช ซึ่งจากงานวิจัย (Obsuwan *et al.*, 2019) รายงานว่า อายุของกล้วยไม้ในธรรมชาติที่นำมาสกัดมีผลต่อการผลิตฟีนอลิกโดยกล้วยไม้ที่มีอายุ 1 ปี จะมีการผลิตฟีนอลิกจากส่วนต่างๆของพืชน้อยกว่ากล้วยไม้ที่มีอายุ 4 ปี



ภาพที่ 34 กราฟเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์

จากภาพที่ 34 แสดงถึงกราฟการเปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* พบว่า โปรโตคอร์ม *D. officinale* มีปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณในช่วงสัปดาห์ที่ 4 ถึง 10 ซึ่งสูงกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' เนื่องจากโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' เริ่มเกิดการ Browning ทำให้การผลิตฟลาโวนอยด์เกิดขึ้นได้น้อยกว่า *D. officinale* สอดคล้องกับผลการทดลองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งก่อนหน้านี้ที่พบว่า *D. officinale* ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าใน *D.* Sonia 'Jo Daeng' และพบว่า ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟลาโวนอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 35 กราฟเปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์

จากภาพที่ 35 แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* เมื่อเปรียบเทียบกันพบว่า โปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากกว่าโปรโตคอร์ม *D. officinale* โดย *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่มากที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 ในขณะที่ *D. officinale* มีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดที่ในสัปดาห์ที่ 10 และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีการผลิต พอลิแซ็กคาไรด์มากกว่า *D. officinale*

มีหลายงานวิจัยที่รายงานว่า *D. officinale* เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคอย่างกว้างขวางในยาตำรับจีนและเป็นวัตถุดิบที่ได้รับความนิยมนำมาศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (Yuan *et al.*, 2014); (Guo *et al.*, 2011) จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ แสดงให้เห็นว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มากกว่า *D. officinale* หลายเท่า ดังนั้น *D.* Sonia 'Jo Daeng' จึงเป็นวัตถุดิบทางเลือกใหม่ที่สามารถใช้ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณมากได้ดีกว่า *D. officinale* และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กล้วยไม้สายพันธุ์ไทยอีกด้วย

3.2 วิเคราะห์ทดสอบฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันจากการศึกษาการสะสมมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale*

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ด้วยวิธี DPPH assay แสดงผลในรูปของค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (mg /batch culture) และเปรียบเทียบกับวิธี FRAP assay ซึ่งแสดงผลในรูปของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (mg/batch culture)

ตารางที่ 9 การสะสมของมวลชีวภาพและการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½MS และเติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

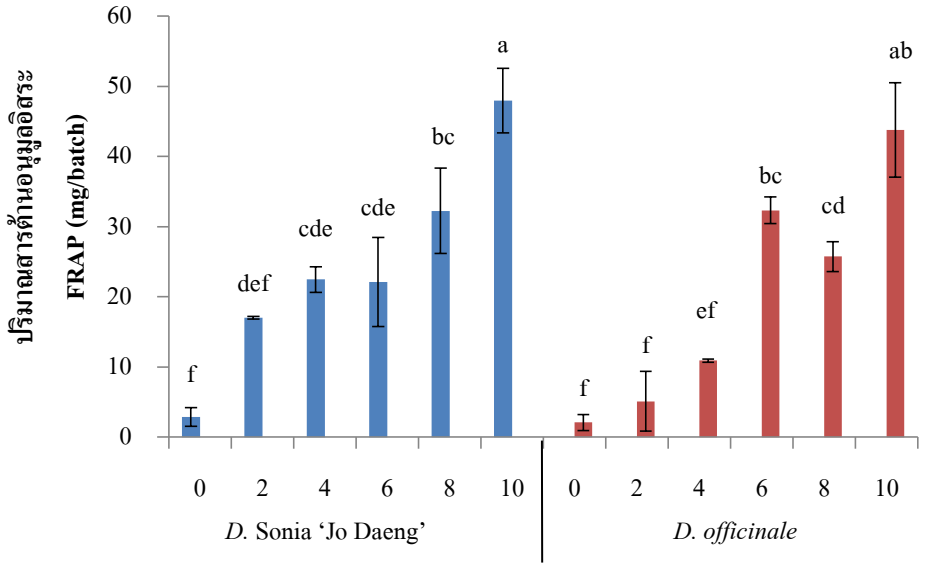
ชีวมวล/สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	**สายพันธุ์**	**ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)**					
		0	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**
น้ำหนักแห้ง (g/batch culture)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	0.146 ± 0.009c	0.537 ± 0.865b	0.647 ± 0.019bc	0.781 ± 0.198abc	0.990 ± 0.147ab	1.052 ± 0.131a
	D. officinale	0.145 ± 0.008e	0.384 ± 0.050de	0.674 ± 0.075cd	0.975 ± 0.143ab	1.251 ± 0.171b	1.773 ± 0.016a
ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (mg/batch culture)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	0.392 ± 0.098c	2.383 ± 0.197bc	3.198 ± 0.081ab	2.773± 1.156bc	4.450± 1.196ab	5.568± 0.530a
	D. officinale	0.375 ± 0.144c	0.984 ± 0.635c	2.659± 0.723bc	5.380± 0.646a	5.275± 0.050a	4.978± 0.863ab
%Inhibition สารต้านอนุมูลอิสระ DPPH	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	63.125 ± 5.525a	66.407 ± 5.082a	68.125 ±0.000a	67.188 ± 9.280a	59.005 ± 4.351a	68.531 ± 0.574a
	D. officinale	60.782 ± 5.525ab	45.938 ± 12.816ab	51.876 ± 5.745ab	73.594 ± 5.082a	56.563 ± 5.745ab	36.074± 6.565b
ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ FRAP (mg/batch culture)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	2.847 ± 1.341c	17.009 ± 0.194bc	22.476 ± 1.819b	22.117± 6.344b	32.231± 6.066b	47.949± 4.630a
	D. officinale	2.076± 1.129c	5.101 ± 4.275c	10.916± 0.236c	32.317± 1.882ab	25.741± 2.123b	43.740± 6.728a

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

ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

จากการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้งสองชนิดมีแนวโน้มให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น โดย *D.* Sonia 'Jo Daeng' ให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 10 เท่ากับ 5.568±0.530 มิลลิกรัม/ขวด และ *D. officinale* ให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 5.380 ± 0.646 มิลลิกรัม/ขวด ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักแห้ง และเมื่อดูจากค่า %inhibition พบว่า ค่า %inhibition ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

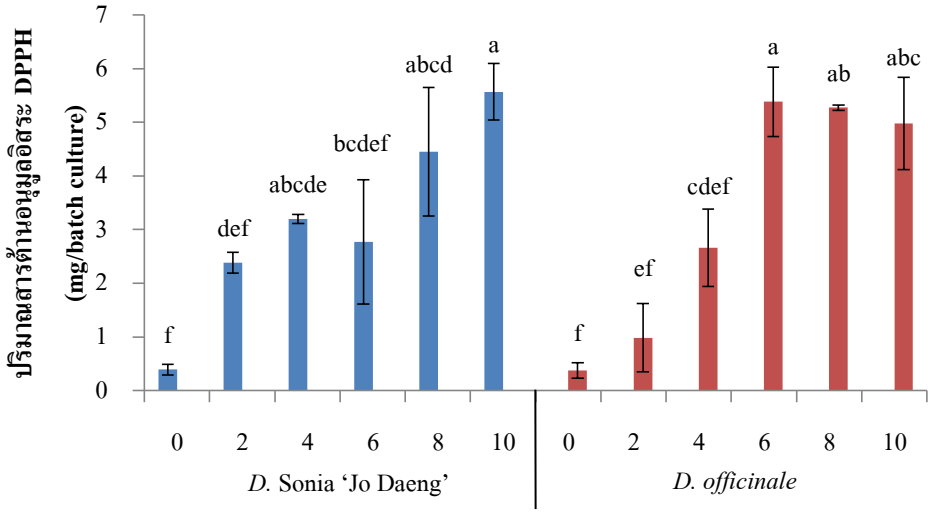
จากการทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay พบว่าสารสกัดโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้งสองชนิดมีแนวโน้มให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น เช่นเดียวกับซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay โดย *D.* Sonia 'Jo Daeng' ให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดที่สัปดาห์ที่ 10 เท่ากับ 47.949± 4.630 มิลลิกรัม/ขวด ในขณะที่ *D. officinale* ให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 10 เท่ากับ 43.740± 6.728 มิลลิกรัม/ขวด เช่นเดียวกัน



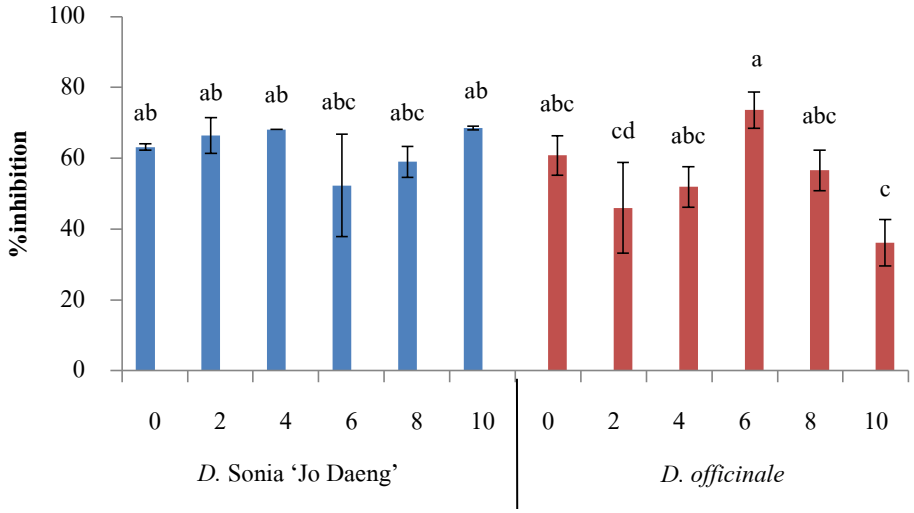
ภาพที่ 36 กราฟเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์

จากกราฟในภาพที่ 36 แสดงผลการเปรียบเทียบของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่า ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในช่วงสัปดาห์ที่ 0 ถึง 4 ที่ผลิตจากโปรโตคอร์มของ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง

ที่มากขึ้น และโปรโตคอร์มของ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าโปรโตคอร์มของ *D. officinale* โดยมีค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 10 ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า มีค่าสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกที่ได้กล่าวไปก่อนหน้านี้



ภาพที่ 37 กราฟเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์



ภาพที่ 38 กราฟเปรียบเทียบเปอร์เซ็นการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์

จากภาพที่ 37 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* พบว่า ช่วงสัปดาห์ที่ 0 ถึง 4 *D.* Sonia 'Jo Daeng' ให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่า *D. officinale* และหลังจาก 4 สัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง *D. officinale* ให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่า เนื่องจากโปรโตคอร์มของ *D.* Sonia 'Jo Daeng' เกิดอาการ Browning และมีการตายเกิดขึ้น ทำให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระน้อยลงตามน้ำหนักพืชที่น้อยลงจากการตาย และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นการต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH ตลอดการเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ (ภาพที่ 38) พบว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' มีแนวโน้มให้ค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่า *D. officinale* ยกเว้นช่วงสัปดาห์ที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ที่พบว่า โปรโตคอร์มของ *D. officinale* จะให้เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกที่ศึกษาทดลองมาก่อนหน้านี้ และพบฟีนอลิกปริมาณมากใน *D.* Sonia 'Jo Daeng' ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่าผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกถ้าปริมาณฟีนอลิกมากสารต้านอนุมูลอิสระก็จะมากขึ้นด้วย (Obsuwan *et al.*, 2019)

3.3 วิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการศึกษาการสะสมมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale*

เอนไซม์ไทโรซิเนสมีบทบาทสำคัญในการสร้างเมลานินและการเปลี่ยน L-tyrosine ไปเป็นDOPA และออกซิไดซ์ DOPA เป็น โดปาโครม ซึ่งกระตุ้นการผลิตเม็ดสีผิวเมลานิล ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ด้วยวิธี Dopachrome method โดยในการทดลองนี้ใช้ L-tyrosine เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา แสดงในรูปของค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% tyrosinase inhibition) และปริมาณสารยับยั้งไทโรซิเนส (mg /batch culture)

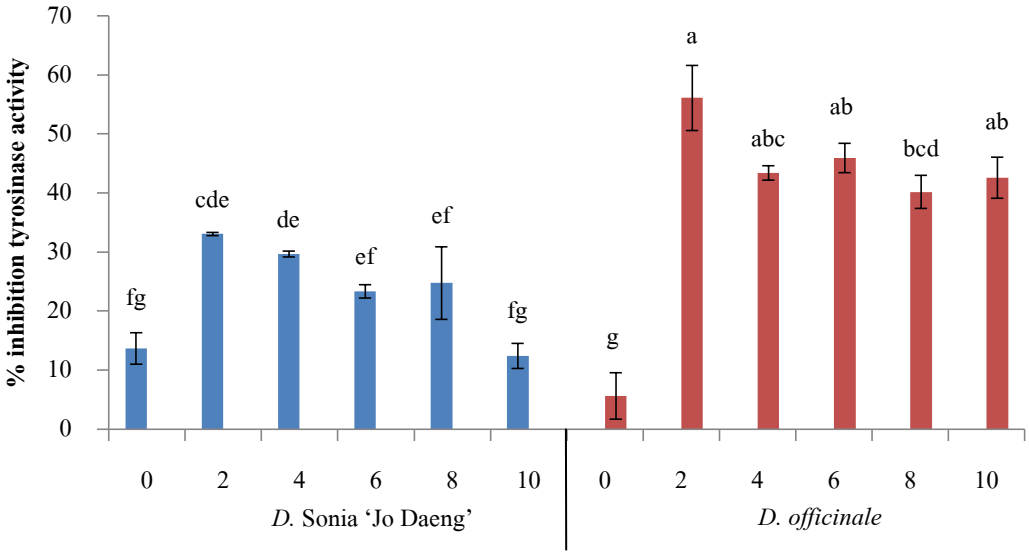
ตารางที่ 10 การสะสมของมวลชีวภาพและการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร

ชีวมวล/สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)					
		0	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**
น้ำหนักแห้ง (g/batch culture)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	0.146 ± 0.009c	0.537 ± 0.865b	0.647 ± 0.019bc	0.781 ± 0.198abc	0.990 ± 0.147ab	1.052 ± 0.131a
	D. officinale	0.145 ± 0.008e	0.384 ± 0.050de	0.674 ± 0.075cd	0.975 ± 0.143ab	1.251 ± 0.171b	1.773 ± 0.016a
% การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	13.661 ± 2.652bc	33.05 ± 0.285a	29.665 ±0.474a	23.304 ± 1.136abc	24.732 ± 6.187abc	12.411 ± 2.147c
	D. officinale	5.625 ± 3.915c	56.100 ± 5.515a	43.393 ± 1.263ab	45.940 ± 2.460ab	40.179 ± 2.778b	48.447± 3.460ab
ปริมาณการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (mg/batch culture)	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	0.083 ± 1.390b	1.390 ± 0.099ab	1.367 ± 0.095ab	1.205± 0.118ab	1.892± 0.825a	1.066± 0.177ab
	D. officinale	0.031 ± 0.014d	0.821 ± 0.069cd	2.210± 0.425bc	3.488± 0.690b	3.776± 0.607b	6.536± 0.759a

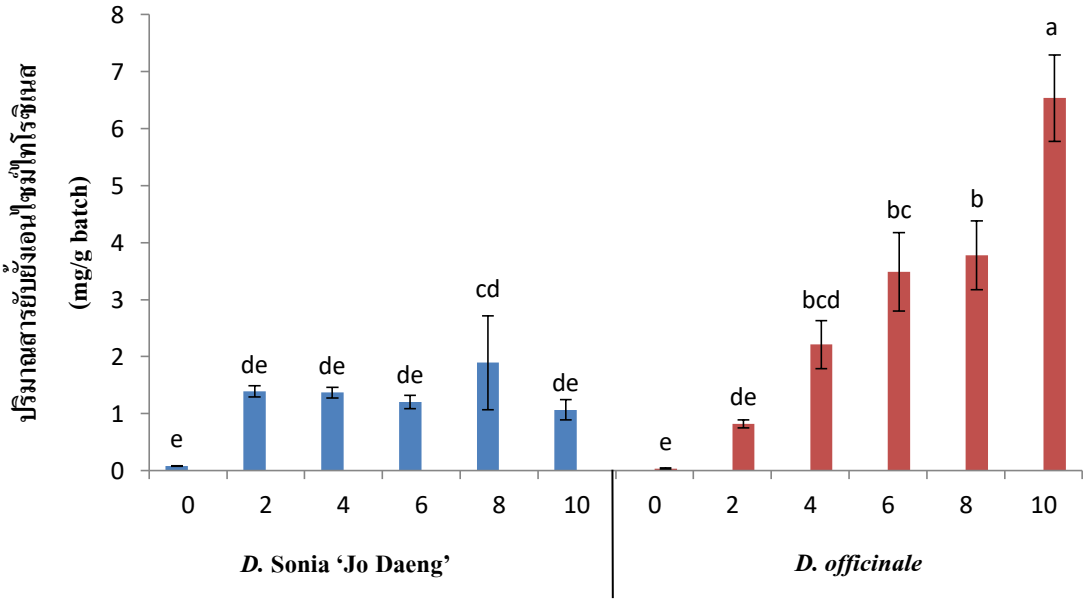
*หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.), (n=2)
ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method พบว่าสารสกัดโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ และมีแนวโน้มให้ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทโรซิเนสมากขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น เมื่อเวลาผ่าน 2 สัปดาห์โดย *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* จะให้ค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 2 คิดเป็น 33.05 ± 0.285 และ 56.100 ± 5.515 ตามลำดับโดยค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มากขึ้นหมายถึงเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ลดลงโดยอาศัยคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจับกับคอปเปอร์ที่บริเวณเร่งซึ่งเป็นการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไทโรซิเนส จากงานวิจัยที่คล้ายกัน (Athipornchai *et al.*, 2018) ได้ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ไมโรซีนเป็นสารตั้งต้นในสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ 4 สายพันธุ์ พบว่า Shavin White ให้ค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดที่ 94.66% และเมื่อเปรียบเทียบกับค่าค่า

เปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า โปรโตคอร์มมีค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่าในดอกกล้วยไม้ และเมื่อพิจารณาจากปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น โดย *D.* Sonia 'Jo Daeng' ให้ปริมาณการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ1.892 ± 0.825 มิลลิกรัม/ขวด และ *D. officinale* ให้ปริมาณยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 10 เท่ากับ 6.536 ± 0.759 มิลลิกรัม/ขวด ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักแห้ง



ภาพที่ 39 กราฟเปรียบเทียบเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์



ภาพที่ 40 กราฟเปรียบเทียบปริมาณการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 10 สัปดาห์

จากภาพที่ 39 แสดงกราฟเปรียบเทียบเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* พบว่า เปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีมากที่สุดช่วงสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงในสารสกัดจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายทั้งสองสายพันธุ์หลังจากนั้นคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเริ่มมีแนวโน้มลดลงและคงที่ จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า *D. officinale* ให้เปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' ซึ่งไม่สัมพันธ์กับปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่พบว่าโปรโตคอร์มของ *D.* Sonia 'Jo Daeng' สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่า จากผลการทดลองที่ได้ก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม ที่เคยมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากสารสกัดกล้วยไม้จะสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Athipornchai *et al.*, 2018)

จากภาพที่ 40 แสดงกราฟเปรียบเทียบปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในโปรโตคอร์ม *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* พบว่า มีแนวโน้มให้ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์โรซิเนสมากขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้นและ *D. officinale* ให้ปริมาณสาร

ยับยั้งเอนไซม์โรซิเนสมากกว่า *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากการทดลองก่อนหน้า

จึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสามารถยับยั้งไทโรซีนที่เป็นสารตั้งต้นได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ช่วยลดการสร้างเม็ดสีผิวเมลานิน แม้ว่าโปรโตคอร์มาจะมีค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งที่เอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยกว่าในดอกแต่เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้ดอกนั้นใช้ระยะเวลานานกว่าการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงเพียง 2 สัปดาห์โดยไม่จำเป็นต้องรอให้โปรโตคอร์มเจริญสูงสุดก็ให้ค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งที่เอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงที่สุดแล้ว ดังนั้น สารสกัดจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้หวายทั้งสองชนิดจึงเป็นทางเลือกในการใช้เป็นวัตถุดิบมาเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ สุขภาพต่อไปในอนาคต

3.4 การวิเคราะห์การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ ที่ได้จากกล้วยไม้ที่ปลูกในธรรมชาติและ โปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

การศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (Twin jar) เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ ที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติ โดยศึกษาจากส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ เช่น ใบ, ต้น, ราก, ดอก และก้านดอกที่มีอายุ 1 และ 4 ปี สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศึกษา เช่น สารประกอบฟีนอลลิก ฟลาโวนอยด์ พอลิแซ็กคาไรด์และแอนโธไซยานิน การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH assay และ FRAP assay และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส(Obsuwan *et al.*, 2019) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่จะใช้โปรโตคอร์มเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 11 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ในการสารต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์มกล้วยไม้กล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ที่เพาะเลี้ยงใน TIS เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ ในธรรมชาติ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ/ สารต้านอนุมูลอิสระ	**กล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’**										
	กล้วยไม้ในธรรมชาติ*										**กล้วยไม้ในหลอดทดลอง**
	กล้วยไม้อายุ 1 ปี					กล้วยไม้อายุ 4 ปี					กล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงใน TIS อายุ 10 สัปดาห์
	ใบ	ต้น	ราก	ดอก	ก้านดอก	ใบ	ต้น	ราก	ดอก	ก้านดอก	PLBs
ปริมาณฟีนอลิก (mg GAE/g DW)	1.80	1.90	1.81	7.23	1.97	6.07	2.50	6.79	6.63	2.20	3.26±0.49
ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg Qer/g DW)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.16±0.25
ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ (mg glucose/g polysaccharide)	100.00	26.00	22.00	110.00	80.00	85.00	80.00	18.00	153.95	52.00	41.36±2.05
ปริมาณแอนโธไซยานิน (mg/l)	9.60	4.00	0.90	13.28	4.80	5.50	1.20	2.00	10.21	2.10	-
ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (mg trolox/g DW)	2.10	2.70	1.60	6.12	1.20	2.80	1.50	5.89	5.00	1.50	0.38±0.03
ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ FRAP (mg Fe (II)/g DW)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.29±0.31
ค่าเปอร์เซ็นการยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนส (%inhibition)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.41±2.15

- หมายถึง ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ * เป็นข้อมูลจาก Obsuwan et al.,

จากการเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของโปรโตคอร์ม *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวกับปริมาณที่พบในส่วนต่างๆของกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ ที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติที่มีการรายงานโดย Obsuwan et al. (2019) พบว่า กล้วยไม้ในธรรมชาติให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก แอนโธไซยานิน และสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดในดอกกล้วยไม้อายุ 1 ปี และพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีปริมาณมากที่สุดในดอกกล้วยไม้อายุ 4 ปี เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพพบว่า กล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ในธรรมชาติผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยในเรื่องของอายุพืชและสภาพแวดล้อมทำให้พืชสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีการสร้างและสะสมต่อหน่วยเวลา จะเห็นได้ว่าโปรโตคอร์มกล้วยไม้ก็เป็นวัตถุดิบทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาใช้เพื่อเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพราะใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่า ซึ่งจากผลการทดลองสามารถผลิตสารที่สนใจได้โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพียงแค่ 10 สัปดาห์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในธรรมชาติอาจต้องใช้เวลาเป็นปีในการผลิตสาร นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวยังมีข้อได้เปรียบอื่นๆ เช่น สามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงได้และขยายขนาดการผลิตได้ง่าย จึงสรุปได้ว่าโปรโตคอร์ม *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ สามารถใช้แป็นวัตถุดิบทางเลือกเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระได้

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์การเพิ่มมวลชีวภาพและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (static culture) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS culture)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในระบบอาหารเหลว			
ระบบอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (static culture)		**ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS culture)**	
D. Sonia 'Jo Daeng'	*D. officinale*	*D.* Sonia 'Jo Daeng'	*D. officinale*
- การเจริญของโปรโตคอร์มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8	- การเจริญของโปรโตคอร์มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4	- การเจริญของโปรโตคอร์มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 และยังเจริญอย่างต่อเนื่อง	- การเจริญของโปรโตคอร์มสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 และยังเจริญอย่างต่อเนื่อง
- ค่าสัดส่วนการเจริญในช่วง log phase ที่เทียบต่อหน่วยเวลา 1.17 เท่าต่อเวลา	- ค่าสัดส่วนการเจริญในช่วง log phase ที่เทียบต่อหน่วยเวลา 1.25 เท่าต่อเวลา	- ค่าสัดส่วนการเจริญในช่วง log phase ที่เทียบต่อหน่วยเวลา 0.42 เท่าต่อเวลา	- ค่าสัดส่วนการเจริญในช่วง log phase ที่เทียบต่อหน่วยเวลา 1 เท่าต่อเวลา
- การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 4-10	- การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 6-10	- การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 และอาจเพิ่มขึ้นได้อีก	- การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 10 และอาจเพิ่มขึ้นได้อีก

จากตารางเมื่อเปรียบเทียบระบบการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มทั้ง 2 ชนิดในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงใน 2 ระบบ คือ ระบบอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งและระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว จะเห็นได้ว่า การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D. officinale* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้มวลชีวภาพที่สูงกว่า *D.* Sonia 'Jo Daeng' เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะและช่วงเวลาเดียวกัน เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง การเจริญของโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งมีการเจริญและเข้าสู่ช่วงระยะคงที่เร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบแช่ชั่วคราวสอดคล้องกับค่าสัดส่วนการเจริญในช่วง log phase ที่เทียบต่อหน่วยเวลาของระบบอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งมีสัดส่วนการเจริญที่เพิ่มขึ้นมากกว่าระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวเนื่องจากมีช่วงการเจริญที่เพิ่มขึ้น

อย่างรวดเร็วและเข้าสู่ช่วงคงที่เร็วกว่าระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และเมื่อเปรียบเทียบช่วงเวลาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของระบบอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งอยู่ในช่วง 4-10 สัปดาห์ ซึ่งสั้นกว่าช่วงการผลิตสารออกฤทธิ์ที่ได้จากระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ 10 สัปดาห์ สรุปได้ว่า ระบบถัง TIS มีระยะการเจริญที่ยาวนานกว่าระบบอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง ซึ่งเป็นข้อดีทำให้พืชมีช่วงเวลาการผลิตสารที่มากขึ้น เมื่อพิจารณาระบบการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งจะเห็นได้ว่า สามารถเพาะเลี้ยงพืชแบบตั้งนิ่ง 2 ครั้งอาจจะได้ปริมาณของมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบเท่ากับการเพาะเลี้ยงในระบบ TIS ทั้ง 2 ระบบจึงเป็นทางเลือกสำหรับการเพาะเลี้ยงที่มีข้อดีแตกต่างกันไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* 'Sonia Jo Daeng' และ *D. officinale* ในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งให้ค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 และ 4 ของการเพาะเลี้ยงก่อนเข้าสู่ระยะคงที่และมีช่วงการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในช่วง 4-10 สัปดาห์

- การเติมซูโครส fed-batch ในสัปดาห์ที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ให้มวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยไม่เสริมน้ำตาลซูโครสและระบบ fed-batch เหมาะสำหรับการขยายพันธุ์พืชในปริมาณมาก

2. การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (twin jar) กล้วยไม้ทั้งสองชนิดให้มวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดในสัปดาห์ที่ 10 และยังเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

- ข้อได้เปรียบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแช่ชั่วคราวแบบ twin jar ช่วยให้โปรโตคอร์มมีระยะการเจริญที่ยาวนานและเข้าสู่ระยะคงที่ช้ากว่าการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวแบบตั้งนิ่งซึ่งเป็นผลดีต่อการเพิ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3. จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

- สารสกัดจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ทั้งสองชนิดนอกจากมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแล้วยังช่วยยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นเอนไซม์กระตุ้นการสร้างเม็ดสีผิวเมลานินอีกด้วย

- เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า *D.* Sonia 'Jo daeng' ให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มากกว่า *D. officinale* แม้ว่าจะให้มวลชีวภาพที่น้อยกว่า

- ดังนั้น *D.*Sonia 'Jo daeng' สามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ต่อการขยายขนาดการผลิตมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมในไทยให้มีมูลค่าสูงขึ้นได้

- เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระจาก *D.*Sonia 'Jo daeng' ที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติกับโปรโตคอร์ม *D.*Sonia 'Jo daeng' ที่เพาะเลี้ยงใร TIS พบว่าส่วนดอกของกล้วยไม้อายุ 1 ปีมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าโปรโตคอร์ม แต่โปรโตคอร์มกล้วยไม้ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงสั้นกว่าจึงเป็นวัตถุดิบทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาใช้เพื่อเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ข้อเสนอแนะ

1.การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพควรเพาะเลี้ยงมากกว่า 10 สัปดาห์ เพื่อศึกษาช่วงเวลาที่พืชเข้าสู่ช่วงระยะคงที่และช่วงที่น้ำตาลหมดลง เพื่อใช้เป็นข้อมูลศึกษาต่อ

2.ศึกษาการเติมแหล่งคาร์บอนแบบ fed batch ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราวโดยเพิ่มชนิดแหล่งคาร์บอนในการทดลอง เช่น โมลาส เพื่อเปรียบเทียบการเพิ่มมวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.ศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม *D.*Sonia 'Jo daeng' ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เหมาะสมเพื่อลดการ Brown ที่เป็นสาเหตุทำให้มวลชีวภาพและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง

4. ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดกล้วยไม้โดยคำนวณ IC50 เทียบกับสารมาตรฐานกรดโคจิก

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate polymers, 97*(2), 253-261.

Alves, V., Pinto, R., Debiasi, C., Santos, M. C., Gonçalves, J. C., & Domingues, J. (2021). Micropropagation of Corema album from adult plants in semisolid medium and temporary immersion bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 145*(3), 641-648.

Arigundam, U., Variyath, A. M., Siow, Y. L., Marshall, D., & Debnath, S. C. (2020). Liquid culture for efficient in vitro propagation of adventitious shoots in wild *Vaccinium vitis-idaea* ssp. minus (lingonberry) using temporary immersion and stationary bioreactors. *Scientia Horticulturae, 264*, 109199.

Athipornchai, A., & Jullapo, N. (2018). Tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of Orchid (Dendrobium spp.). *South African Journal of Botany, 119*, 188-192.

Cardoso, J. C., Zanello, C. A., & Chen, J.-T. (2020). An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(3), 985.

Chan, C.-F., Wu, C.-T., Huang, W.-Y., Lin, W.-S., Wu, H.-W., Huang, T.-K., Chang, M.-Y., & Lin, Y.-S. (2018). Antioxidation and melanogenesis inhibition of various *Dendrobium tosaense* extracts. *Molecules, 23*(7), 1810.

Cui, H.-Y., Murthy, H. N., Moh, S. H., Cui, Y.-Y., Lee, E.-J., & Paek, K.-Y. (2014). Production of biomass and bioactive compounds in protocorm cultures of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl. using balloon type bubble bioreactors. *Industrial Crops and Products, 53*, 28-33.

Cui, H.-Y., Murthy, H. N., Moh, S. H., Cui, Y.-Y., & Paek, K.-Y. (2015). Establishment of protocorm suspension cultures of *Dendrobium candidum* for the production of bioactive compounds. *Horticulture, Environment, and Biotechnology, 56*(1), 114-122.

Daungban, S., Pumisutapon, P., Topoonyanont, N., & Poonnoy, P. (2017). Effects of explants division by cutting, concentrations of TDZ and number of sub-culture cycles on propagation of ‘Kluai Hom Thong’banana in a temporary immersion bioreactor system. *Thai Journal of Science and Technology, 6*(1), 89-99.

Ekmekçigil, M., Bayraktar, M., AkkuŞ, Ö., & Gürel, A. (2019). High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii Lindl. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 136*(3), 451-464.

Ferreira, W. d. M., Suzuki, R. M., Pescador, R., Figueiredo-Ribeiro, R. d. C. L., & Kerbauy, G. B. (2011). Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) in vitro as affected by sucrose, light, and dark. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 47*(3), 420-427.

Gago, D., Vilavert, S., Bernal, M. Á., Sánchez, C., Aldrey, A., & Vidal, N. (2021). The Effect of sucrose supplementation on the micropropagation of salix viminalis L. shoots in semisolid medium and temporary immersion bioreactors. *Forests, 12*(10), 1408.

Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences, 14*(6), 607-621.

Guo, R., Yuan, G., & Wang, Q. (2011). Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. *Scientia Horticulturae, 128*(3), 159-165.

Ilczuk, A., Winkelmann, T., Richartz, S., Witomska, M., & Serek, M. (2005). In vitro propagation of Hippeastrum× chmielii Chm.–influence of flurprimidol and the culture in solid or liquid medium and in temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 83*(3), 339-346.

Insain, P. (2018). การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รีไทย. *EAU Heritage Journal Science and Technology, 12*(2), 69-82.

Kanlayavattanakul, M., Lourith, N., & Chaikul, P. (2018). Biological activity and phytochemical profiles of Dendrobium: A new source for specialty cosmetic materials. *Industrial Crops and Products, 120*, 61-70.

Le, K.-C., Dedicova, B., Johansson, S., Lelu-Walter, M.-A., & Egertsdotter, U. (2021). Temporary immersion bioreactor system for propagation by somatic embryogenesis of hybrid larch (Larix× eurolepis Henry). *Biotechnology Reports, 32*, e00684.

Leyva-Ovalle, O. R., Bello-Bello, J. J., Murguía-González, J., Núñez-Pastrana, R., & Ramírez-Mosqueda, M. A. (2020). Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et

WE Higging in temporary immersion systems. *3 Biotech, 10*(1), 1-8.

Liu, J., Willför, S., & Xu, C. (2015). A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 5*(1), 31-61.

Lulu, T., Park, S.-Y., Ibrahim, R., & Paek, K.-Y. (2015). Production of biomass and bioactive compounds from adventitious roots by optimization of culturing conditions of Eurycoma *longifolia* in balloon-type bubble bioreactor system. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 119*(6), 712-717.

Manosroi, J., Khositsuntiwong, N., Manosroi, W., Götz, F., Werner, R. G., & Manosroi, A. (2013). Potent enhancement of transdermal absorption and stability of human tyrosinase plasmid (pAH7/Tyr) by Tat peptide and an entrapment in elastic cationic niosomes. *Drug Delivery, 20*(1), 10-18.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry, 31*(3), 426-428.

Murthy, H. N., Dandin, V. S., Zhong, J.-J., & Paek, K.-Y. (2014). Strategies for enhanced production of plant secondary metabolites from cell and organ cultures *Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology* (pp. 471-508): Springer.

Obsuwan, K., Ryong, J. B., & Maksup, S. (2019). Analysis of bioactive compounds, polysaccharides and antioxidant activity in different parts of *Dendrobium* 'Sonia Jo Daeng'. *Science, Engineering and Health Studies*, 73-82.

Ozyigit, I. I., Kahraman, M. V., & Ercan, O. (2007). Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology, 6*(1), 003-008.

Padilha, J. H. D., Steinmacher, D., & Quoirin, M. (2020). Peach palm plantlet growth in different culture media in a temporary immersion system. *Ciência Rural, 51*.

Phongtongpasuk, S., Poadang, S., & Yongvanich, N. (2016). Environmental-friendly method for synthesis of silver nanoparticles from dragon fruit peel extract and their antibacterial activities. *Energy Procedia, 89*, 239-247.

Ribeiro, J. M., Melo, N. F. d., Coelho, Â. K. N. d. S., & Pinto, M. d. S. T. (2012). Efeito do melado de cana-de-açúcar no desenvolvimento in vitro de bananeira (*Musa* spp.) cv. Maçã. *Revista*

Ceres, 59(3), 293-298.

Rittirat, S., Thammasiri, K., & Te-chato, S. (2012). Effect of media and sucrose concentrations with or without activated charcoal on the plantlet growth of *P. cornu-cervi* (Breda) Blume & Rchb. f. *J Agric Technol, 8*(6), 2077-2087.

Ryu, D. D., Lee, S., & Romani, R. J. (1990). Determination of growth rate for plant cell cultures: comparative studies. *Biotechnology and Bioengineering, 35*(3), 305-311.

Santana, M., Romay, G., Matehus, J., Villardón, J., & Demey, J. R. (2009). Simple and low-cost strategy for micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *African Journal of Biotechnology, 8*(16).

Tang, H., Zhao, T., Sheng, Y., Zheng, T., Fu, L., & Zhang, Y. (2017). Dendrobium officinale Kimura et Migo: a review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and industrialization. *Evidence-based complementary and alternative medicine, 2017*.

Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q., & Xie, M. (2016). Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016*.

Wattanapan, N., Nualsri, C., & Meesawat, U. (2018). In vitro propagation through transverse thin cell layer (tTCL) culture system of lady's slipper orchid: *Paphiopedilum callosum* var. sublaeve. *Songklanakarin Journal of Science & Technology, 40*(2).

Winarto, B., Rachmawati, F., Santi, A., & da Silva, J. A. T. (2013). Mass propagation of *Dendrobium* 'Zahra FR 62', a new hybrid used for cut flowers, using bioreactor culture. *Scientia Horticulturae, 161*, 170-180.

Yuan, Z., Cong, G., & Zhang, J. (2014). Effects of exogenous salicylic acid on polysaccharides production of Dendrobium officinale. *South African Journal of Botany, 95*, 78-84.

Zha, X., Luo, J., Jiang, S., & Wang, Y. (2007). Carbon and nitrogen metabolism in suspension culture of protocorm-like bodies of *Dendrobium huoshanense*. *Plant Biosystems, 141*(1), 62-68.

Zhang, B., Song, L., Bekele, L. D., Shi, J., Jia, Q., Zhang, B., Jin, L., Duns, G. J., & Chen, J. (2018a). Optimizing factors affecting development and propagation of *Bletilla striata* in a temporary immersion bioreactor system. *Scientia Horticulturae, 232*, 121-126.

Zhang, B., Sarsaiya, S., Pan, X., Jin, L., Xu, D., Zhang, B., Duns, G. J., Shi, J., & Chen, J. (2018b). optimization of nutritional conditions using a temporary immersion bioreactor system for

the growth of *Bletilla striata* pseudobulbs and accumulation of polysaccharides. *Scientia Horticulturae, 240*, 155-161.

Zhuang, X., Lu, Y., & Yang, G. (1992). Extraction and determination of flavonoid in ginkgo. *Chinese Herbal Medicine, 23*, 122-124.

นิสา จุลโพธิ์. (2559). การทดสอบสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย. (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยบูรพา, ภาควิชาเคมีศึกษา คณะวิทยาศาสตร์.

บุษราภรณ์ งามปัญญา. (2561). เทคโนโลยีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช: การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช (พิมพ์ครั้งที่ 1 ed.). นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ศิริรักษ์ พลซา. (2560). การพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำสำหรับการขยายพันธุ์พืช. (ปริญญานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยศิลปากร, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร ½ MS

1.1 การเตรียมอาหารเหลวสูตร ½ MS ไม่ผสมน้ำตาล

- ชั่งอาหารสูตร Murashige & Skoog basal salt medium with vitamins สำเร็จรูป 2.215 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร

- เติม myo-Inositol 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

- ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เป็น 5.6 ด้วยสารละลาย 1 N NaOH และ 1 N HCl และวัดค่าการนำไฟฟ้าในอาหาร

- เทอาหารเหลวสูตร ½ MS ลงในขวดแก้ว และปิดฝาขวดนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

- เก็บอาหารไว้ในที่ปลอดเชื้อ

1.2 การเตรียม Stock สารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร

- ชั่งน้ำตาลซูโครส 40 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 500 มิลลิลิตร

- ทำการกรองสารละลายน้ำตาลในตู้ปลอดเชื้อผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ด้วยชุดกรองที่ต่อกับปั๊ม กรองสารละลายน้ำตาลใส่ขวดแก้วแล้วปิดฝาขวด

- นำสารละลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร มาวัดปริมาณน้ำตาลรวม (Total sugar) เพื่อเอาค่าไปคำนวณเพื่อผสมสารละลายน้ำตาลเข้ากับอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้

1.3 การผสมอาหาร ½ MS กับสารละลายน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร

สูตรการคำนวณ

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร

V_1 = ปริมาตรที่ต้องดูดสารละลายน้ำตาลมาผสมอาหาร

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลที่ต้องการ 30 กรัมต่อลิตร

V_2 = ปริมาตรอาหารสุดท้ายที่ต้องการ

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณสารละลายน้ำตาลที่นำมาผสมอาหาร

$$(80 \text{ g/L}) \times V_1 = (30 \text{ g/L}) \times (1000 \text{ ml})$$

$$V_1 = 375 \text{ ml}$$

- ตวงสารละลายน้ำตาลด้วยกระบอกตวง 375 มล. ผสมกับอาหารเหลวสูตร ½ MS 625 มล.

- เก็บตัวอย่างอาหารวัดปริมาณน้ำตาลรวม ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าการนำไฟฟ้าเริ่มต้น

1.4 การเติมสารละลายน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเหลวระหว่างการเพาะเลี้ยง

สูตรการคำนวณ $C_1 \times V_1 + C_2 \times V_2 = C_3 \times V_3$

C_1 = ความเข้มข้นของสารละลาย Stock น้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร

V_1 = ปริมาตรที่ต้องดูด Stock สารละลายน้ำตาลมาผสมอาหาร

C_2 = ความเข้มข้นของน้ำตาลในขวดเพาะเลี้ยง

V_2 = ปริมาตรอาหารในขวดเพาะเลี้ยง

C_3 = ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารที่ต้องการ 30 กรัมต่อลิตร

V_3 = ปริมาตรอาหารสุดท้ายที่ต้องการ

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 การเตรียมสารเคมีวัดปริมาณน้ำตาลรวม (Total sugar)

การเตรียมสารละลาย 5% (w/v) phenol (100 มล.)

- ชั่ง phenol 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.

- จะได้สารละลาย 5% phenol (w/v) ปริมาตร 100 มล.

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- ชั่งกลูโคส 0.05 กรัม ละลายในน้ำ DI และปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 50 มล.

2.2 การเตรียมสารเคมีวัดปริมาณน้ำตาล (Reducing sugar)

การเตรียมสารละลาย 3,5-Dinitrosalisylic acid (DNS)

- ชั่ง DNS 2.5 กรัม

- ชั่ง Sodium sulfite 0.125 กรัม

- ชั่ง Sodium hydroxide 2.5 กรัม

ละลาย DNS กับน้ำกลั่นเล็กน้อยในบีกเกอร์หุ้มฟอยล์ โดยทำการละลาย DNS บนเครื่อง Stirrer ละลาย Sodium hydroxide ในน้ำกลั่นเล็กน้อย ค่อยๆ เติมลงใน DNS จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้น ละลาย Sodium sulfite ในน้ำกลั่น แล้วค่อยๆ เติมลงใน DNS จนได้สารละลายสีส้มเหลือง ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มล. เก็บในขวดสีชา

การเตรียมสารละลาย 40% (w/v) potassium

- ชั่ง Potassium 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มล.

2.3 การเตรียมสารเคมีวัดปริมาณฟีนอลิก

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- ชั่ง Gallic acid 0.05 กรัม ละลายในน้ำ DI และปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 50 มล.

การเตรียมสารละลาย 7.5% (w/v) Na_2CO_3

- ชั่ง Na_2CO_3 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.

การเตรียม 10% Folin-Ciocalteu reagent

- ปิเปต 10 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 90 มล. จะได้ 10% Folin ปริมาตร 100 มล.

2.4 การเตรียมสารเคมีวัดปริมาณฟลาโวนอยด์

การเตรียมสารละลาย 5% (w/v) $NaNO_2$

- ชั่ง $NaNO_2$ 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.

การเตรียมสารละลาย 10% (w/v) $AlCl_3.6H_2O$

- ชั่ง $AlCl_3.6H_2O$ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.

การเตรียมสารละลาย 1 M NaOH

- ชั่ง NaOH 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. ปรับปริมาตร1000 มล.

2.5 การเตรียมสารเคมีทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การเตรียมสารมาตรฐาน Ascorbic acid 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- ชั่ง Ascorbic acid 0.05 กรัม ละลายในน้ำ DI และปรับปริมาตร 50 มล.

การเตรียม 95% methanol

- ตวง 99% methanol ด้วยกระบอกตวงมา 95 มล. เติมน้ำ DI 5 มล. จะได้ 95% methanol ปริมาตร 100 มล.

การเตรียมสารละลาย DPPH 0.0634 mM

- ชั่ง DPPH 0.0012 กรัม ปรับปริมาตรด้วย 95 % methanol 50 มล.

2.6 การเตรียมสารเคมีทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน $FeSO_4$ ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- ชั่ง $FeSO_4$ 0.01 ละลายในน้ำ DI และปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 10 มล.

การเตรียมสาร 300 mM Sodium acetate buffer pH 3.6

- ชั่ง $CH_3COONa.3H_2O$ 0.6804 กรัม และปิเปต acetic acid 4.02 มล.

- ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร 250 มล. ปรับค่า pH 3.6 ใส่ขวดสีชา เก็บในตู้เย็น

การเตรียมสารละลาย 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl

- ชั่ง TPTZ 0.0312 กรัม ละลายใน HCl 0.033 มล. ปรับปริมาตร 10 มล.

การเตรียมสารละลาย Ferric (III) chloride 20 mM

- ชั่ง $FeCl_3.6H_2O$ 0.0541 ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 10 มล.

การผสมสารละลาย FRAP reagent อัตราส่วน 10:1:1

- 300 mM Sodium acetate buffer pH 3.6	10	มล.
- 10 mM TPTZ	1	มล.
- Ferric (III) chloride 20 mM	1	มล.

- ผสมสารละลายเข้าด้วยกัน และเก็บในขวดสีชา เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

2.7 การเตรียมสารเคมีทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การเตรียมไทโรซิเนส 1000 ยูนิต ปริมาตร 1 มล.

- ชั่งเอนซ์ไทโรซิเนส 8503 ยูนิตต่อมิลลิกรัม 0.0001 กรัม ละลายใน Buffer phosphate pH 6.8 1 มล.

การเตรียมไทโรซิเนส 100 ยูนิต ปริมาตร 3 มล.

- ดูดเอนไซม์ไทโรซิเนส 1000 ยูนิต มา 300 ไมโครลิตร ผสมใน Buffer phosphate pH 6.8 2700 ไมโครลิตร

การเตรียม phosphate buffer 0.1 M pH 6.8 ปริมาตร 500 มล.

- สารละลาย A : 0.05 M dibasic sodium phosphate

ชั่ง $Na_2HPO_4.2H_2O$ 1.95 กรัม ละลายในน้ำ 250 มล.

- สารละลาย B : 0.05 M monobasic sodium phosphate

ชั่ง $NaH_2PO_4.2H_2O$ 2.225 กรัม ละลายในน้ำ 250 มล.

-เอาสารละลาย A และ B ผสมกัน ปรับ pH ให้ได้ 6.8 เก็บใส่ขวด

การเตรียมไทโรซีน 1 mg/ml ปริมาตร 50 มล.

- ชั่ง ไทโรซีน 0.05 กรัม ละลายใน Buffer phosphate pH 6.8 50 มล.

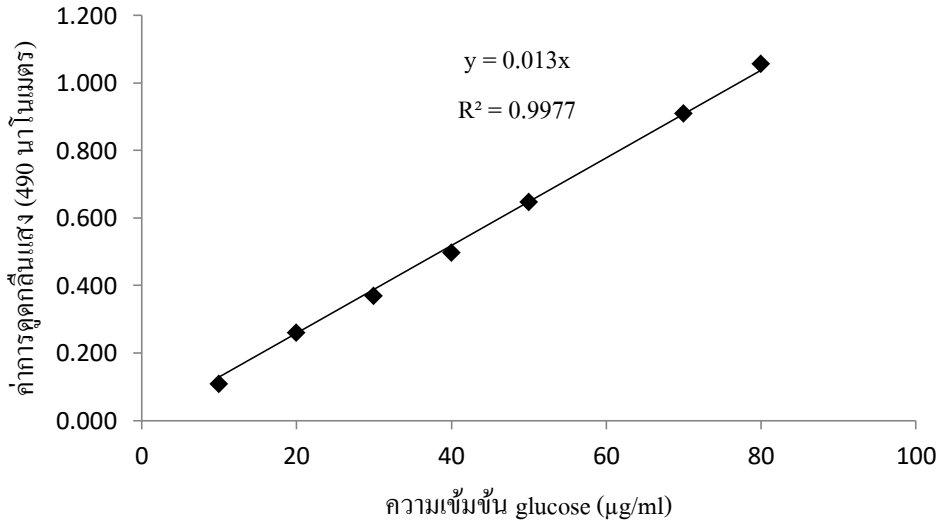
ภาคผนวก ข

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)

Standard total sugar

ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคส ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ความเข้มข้น glucose (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
10	0.107	0.109	0.111	0.109
20	0.274	0.244	0.260	0.259
30	0.362	0.329	0.416	0.369
40	0.491	0.509	0.491	0.497
50	0.652	0.638	0.652	0.647
70	0.873	0.875	0.978	0.909
80	1.065	1.014	1.090	1.056



ภาพที่ 40 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 490 nm

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณ Total sugar

จากตัวอย่าง อาหารเหลวสูตร 1/2MS หลังจากผสมสารละลายน้ำตาล sucrose 30 g/L มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm เท่ากับ 0.413 0.429 และ 0.433

จากกราฟมาตรฐาน $y = 0.013x$

$0.413 = 0.013x$

$x = 31.77$

เจือจางตัวอย่าง 1000 เท่า ดังนั้นจะได้ $31.77 \times 1000 = 31770$ µg/ml

$= 31.77$ g/L

ดังนั้น จะมีน้ำตาลในอาหาร 31.77 g/l ในการวัดครั้งที่ 1

จะมีน้ำตาลในอาหาร 33.00 g/l ในการวัดครั้งที่ 2

จะมีน้ำตาลในอาหาร 33.31 g/l ในการวัดครั้งที่ 3

ค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 32.69 g/l

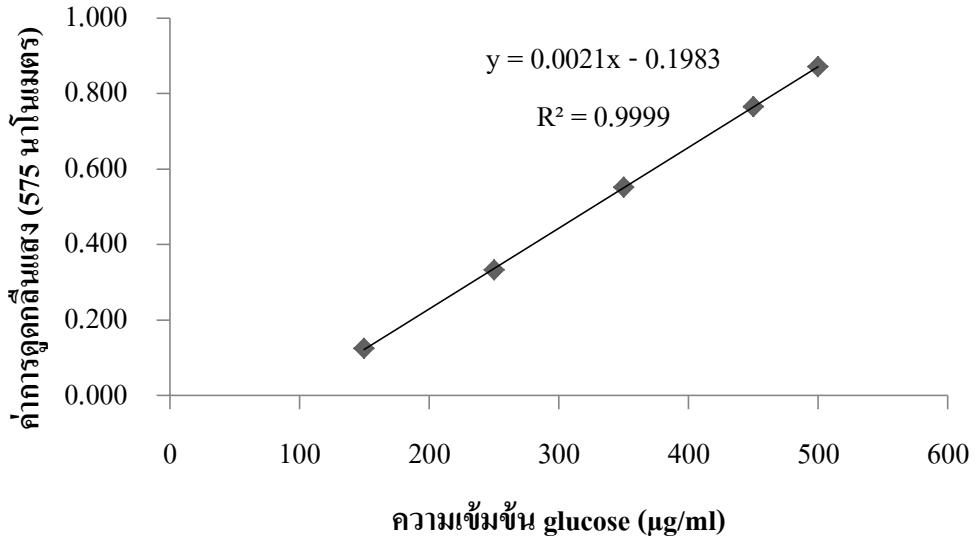
มหาวิทยาลัยศิลปากร

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

Standard reducing sugar

ตารางที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคส ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

ความเข้มข้น glucose (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
150	0.124	0.123	0.126	0.124
250	0.313	0.312	0.373	0.333
350	0.517	0.563	0.574	0.551
450	0.710	0.845	0.740	0.765
500	0.775	0.939	0.897	0.870



ภาพที่41 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 575 nm

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณ Reducing sugar

จากตัวอย่าง อาหารเหลวสูตร 1/2MS หลังจากผสมสารละลายน้ำตาล sucrose 30 g/L มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 nm เท่ากับ 0.413 0.429 และ 0.433

จากกราฟมาตรฐาน $y = 0.013x$

$0.413 = 0.013x$

$x = 31.77$

เจือจางตัวอย่าง 1000 เท่า ดังนั้นจะได้ $31.77 \times 1000 = 31770$ µg/ml

$= 31.77$ g/L

ดังนั้น จะมีน้ำตาลในอาหาร 31.77 g/l ในการวัดครั้งที่ 1

จะมีน้ำตาลในอาหาร 33.00 g/l ในการวัดครั้งที่ 2

จะมีน้ำตาลในอาหาร 33.31 g/l ในการวัดครั้งที่ 3

ค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 32.69 g/l

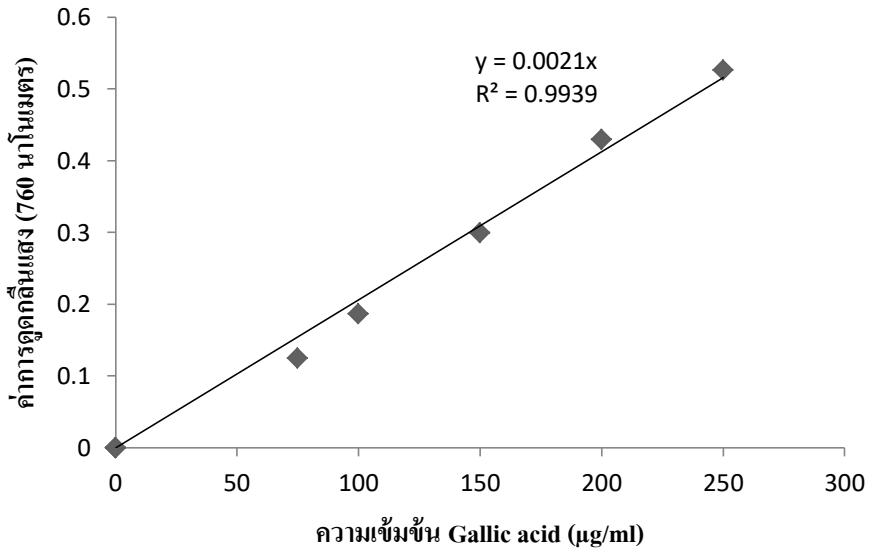
มหาวิทยาลัยศิลปากร

การหาปริมาณฟีนอลิก (Total phenolic)

Standard Gallic acid

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงของ Gallic acid ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

ความเข้มข้น Gallic acid (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
75	0.119	0.130	0.125	0.125
100	0.176	0.189	0.194	0.186
150	0.285	0.300	0.313	0.299
200	0.423	0.436	0.436	0.430
250	0.524	0.529	0.571	0.527



ภาพที่ 42 ค่าการดูดกลืนแสงของ Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 760 nm

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณฟีนอลิก

จากตัวอย่าง สารสกัดโปรโตคอร์มกล้วยไม้ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 30 g/l มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 nm เท่ากับ 0.672 และ 0.532

จากกราฟมาตรฐาน $y = 0.021x$

$0.672 = 0.021x$

$x = 320.00$

เจือจางตัวอย่าง 1000 เท่า ดังนั้นจะได้ $320.00 \times 2 = 640.00$ µg/ml

$= 0.640$ mg/ml

สารสกัดปริมาตรตัวอย่าง 0.2 ml ตัวอย่างหนัก 0.07 g มีปริมาณฟีนอลิก

$$= \frac{0.640 \times 0.2}{0.07} = 1.829 \text{ mg/g sample}$$

คิดเป็นหน่วย mg/batch น้ำหนักตัวอย่างทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ 0.1415 g

$$= \frac{1.829 \times 0.1415}{0.07} = 3.6963 \text{ mg/batch}$$

ดังนั้น จะมีฟีนอลิกในสารสกัดพืช 3.696 mg/batch ในการวัดครั้งที่ 1

จะมีฟีนอลิกในสารสกัดพืช 2.021 mg/batch ในการวัดครั้งที่ 2

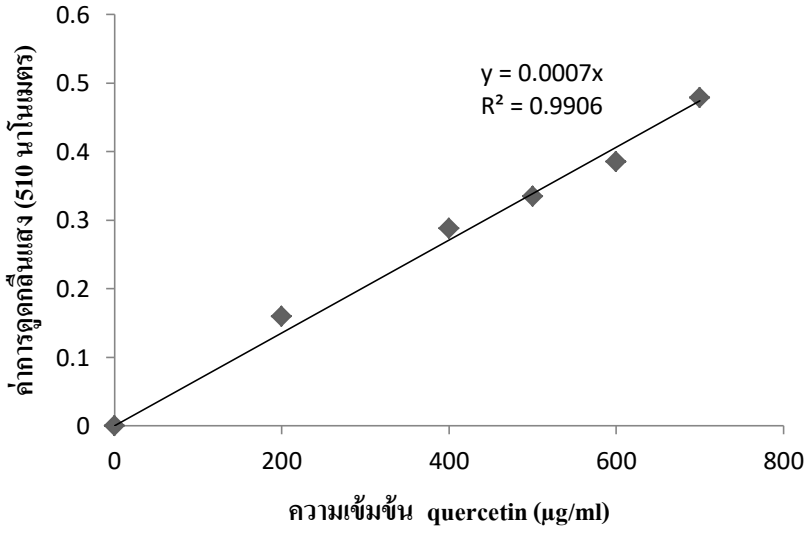
ค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 2.859 g/l

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid)

Standard quercetin

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงของ Quercetin ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

ความเข้มข้น quercetin (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
200	0.152	0.166	0.161	0.160
400	0.272	0.304	0.288	0.288
500	0.333	0.336	0.360	0.335
600	0.330	0.440	0.385	0.385
700	0.466	0.492	0.479	0.479



ภาพที่ 43 ค่าการดูดกลืนแสงของ quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 510 nm

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์

จากตัวอย่าง สารสกัดโปรโตคอร์มกล้วยไม้ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 30 g/l มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm เท่ากับ 0.672 และ 0.532

จากกราฟมาตรฐาน $y = 0.021x$

$0.672 = 0.021x$

$x = 320.00$

เจือจางตัวอย่าง 1000 เท่า ดังนั้นจะได้ $320.00 \times 2 = 640.00$ µg/ml

$= 0.640$ mg/ml

สารสกัดปริมาตรตัวอย่าง 0.2 ml ตัวอย่างหนัก 0.07 g มีปริมาณฟีนอลิก

$$= \frac{0.640 \times 0.2}{0.07} = 1.829 \text{ mg/g sample}$$

คิดเป็นหน่วย mg/batch น้ำหนักตัวอย่างทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ 0.1415 g

$$= \frac{1.829 \times 0.1415}{0.07} = 3.6963 \text{ mg/batch}$$

ดังนั้น จะมีฟีนอลิกในสารสกัดพืช 3.696 mg/batch ในการวัดครั้งที่ 1

จะมีฟีนอลิกในสารสกัดพืช 2.021 mg/batch ในการวัดครั้งที่ 2

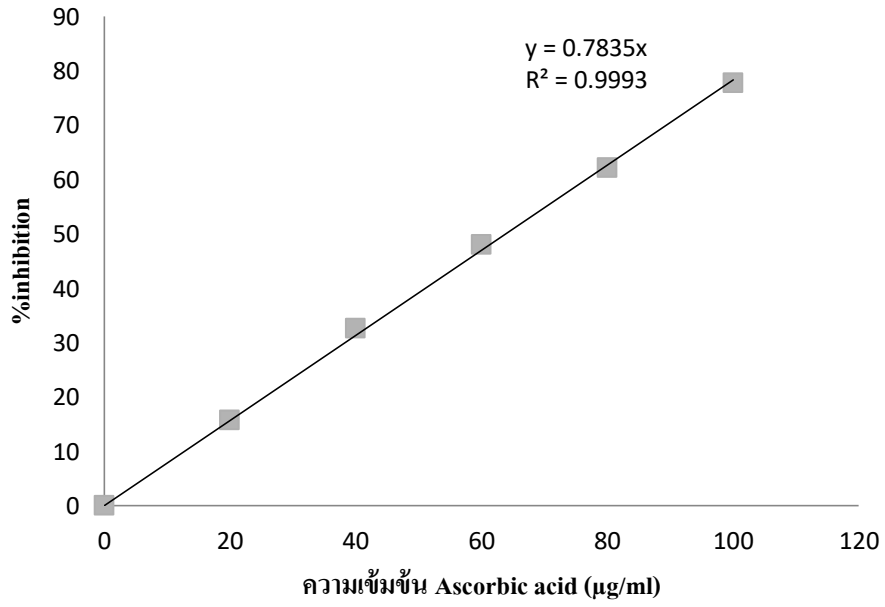
ค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 2.859 g/l

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH

Standard Ascorbic acid

ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงของ Ascorbic acid ที่ความยาวคลื่น 519 นาโนเมตร

ความเข้มข้น Ascorbic acid (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 519 นาโนเมตร				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	% inhibition
20	0.400	0.471	0.449	0.440	15.71
40	0.344	0.367	0.345	0.352	32.57
60	0.280	0.272	0.263	0.272	47.96
80	0.169	0.226	0.198	0.198	62.13
100	0.105	0.098	0.146	0.116	77.71



ภาพที่ 44 ค่าการดูดกลืนแสงของ Ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 519 nm

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

จากตัวอย่าง สารสกัดโปรโตคอร์มกล้วยไม้ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 30 g/l มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 519 nm เท่ากับ 0.096 และ 0.093 โดยค่าการดูกลืนแสงที่ 0 นาที เท่ากับ 0.298

คำนวณด้วยสูตร % DPPH = (*Abst0-Abst30 /* A*bst0) x 100*

= (0.298-0.096 / 0.298) x 100

รายงานเป็น %inhibition = 67.897%

จากกราฟมาตรฐาน y = 0.7835x

67.897 = 0.7835x

x = 86.658

สารสกัดปริมาตรตัวอย่าง 0.28 ml ตัวอย่างหนัก 0.07 g มีปริมาณสารต้านอนุมูลิอสระ

$$= \frac{0.087 \times 0.28}{0.07} = 0.346 \text{ mg/g sample}$$

คิดเป็นหน่วย mg/batch น้ำหนักตัวอย่างทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ 1.1907 g

$$= \frac{0.346 \times 1.1907}{0.07} = 5.8627 \text{ mg/batch}$$

ดังนั้น จะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดพืช 5.8627 mg/batch ในการวัดครั้งที่ 1

จะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดพืช 5.8855 mg/batch ในการวัดครั้งที่ 2

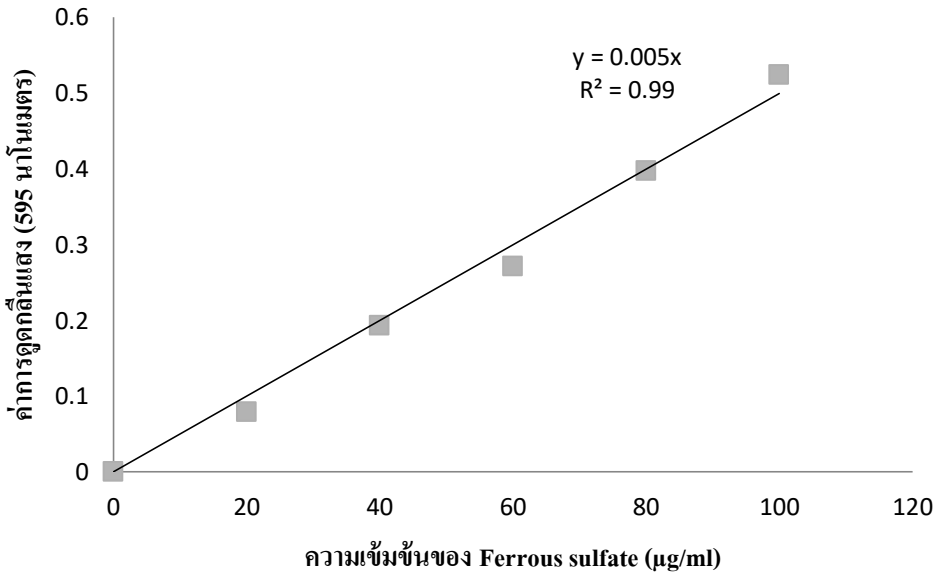
ค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 5.421 g/l

การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP

Standard Ferrous sulfate

ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงของ Ferrous sulfate ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ความเข้มข้น Ferrous sulfate (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
20	0.064	0.078	0.094	0.079
40	0.199	0.177	0.204	0.193
60	0.298	0.293	0.223	0.271
80	0.401	0.398	0.393	0.397
100	0.482	0.51	0.581	0.524



ภาพที่ 45 ค่าการดูดกลืนแสงของ Ferrous sulfate ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 595 nm

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

จากตัวอย่าง สารสกัดโปรโตคอร์มกล้วยไม้ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 30 g/l มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm เท่ากับ 0.790 และ 0.796

จากกราฟมาตรฐาน $y = 0.005x$

$0.790 = 0.005x$

$x = 158.00$

เจือจางตัวอย่าง 5 เท่า ดังนั้นจะได้ $158.00 \times 5 = 790.00$ µg/ml

$= 0.790$ mg/ml

สารสกัดปริมาตรตัวอย่าง 0.28 ml ตัวอย่างหนัก 0.07 g มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

$$= \frac{0.790 \times 0.28}{0.07} = 3.147 \text{ mg/g sample}$$

คิดเป็นหน่วย mg/batch น้ำหนักตัวอย่างทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ 1.1907 g

$$= \frac{3.147 \times 1.1907}{0.07} = 53.2938 \text{ mg/batch}$$

ดังนั้น จะมีสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดพืช 53.2938 mg/batch ในการวัดครั้งที่ 1

จะมีสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดพืช 45.3869 mg/batch ในการวัดครั้งที่ 2

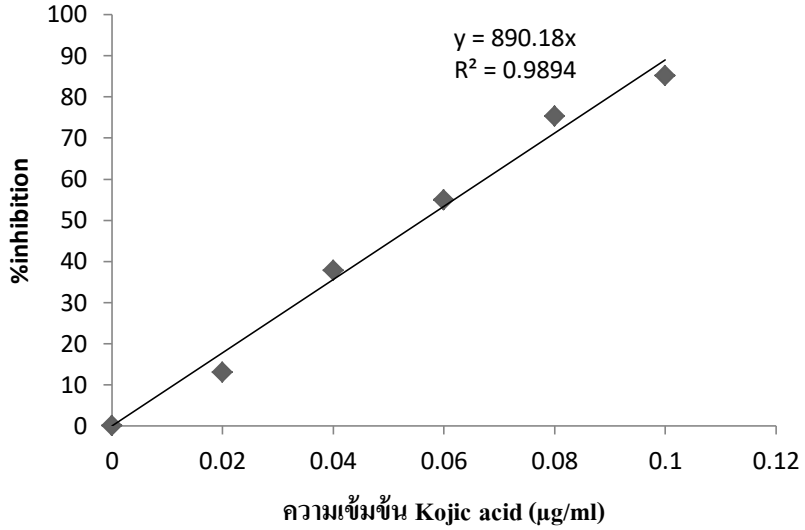
ค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 49.34 g/l

การหาปริมาณการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Standard Kojic acid

ตารางที่ 16 ค่าการดูดกลืนแสงของ Kojic acid ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ความเข้มข้น Kojic acid (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	% Inhibition
0.02	0.487	0.487	0.487	0.487	13.04
0.04	0.327	0.37	0.332	0.349	37.77
0.06	0.254	0.252	0.253	0.253	54.82
0.08	0.141	0.137	0.139	0.139	75.18
0.1	0.084	0.083	0.084	0.084	85.09



ภาพที่ 46 ค่าการดูดกลืนแสงของ Kojic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 450 nm

ตัวอย่าง การคำนวณปริมาณการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากตัวอย่าง สารสกัดโปรโตคอร์มกล้วยไม้ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2MS + Sucrose 30 g/l มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm เท่ากับ 0.494 และ 0.473 โดยค่าการดูกลืนแสงของ Blank เท่ากับ 0.560

คำนวณด้วยสูตร % Tyrosinase inhition = [(A-B)/A] x 100

= (0.560-0.494 / 0.560) x 100

รายงานเป็น %inhibition = 11.786%

ดังนั้น จะมี % การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดพืช 11.786% ในการวัดครั้งที่ 1

จะมี% การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดพืช 15.536% ในการวัดครั้งที่ 2

ค่าเฉลี่ยจะเท่ากับ 13.661%

ภาคผนวก ค

1. การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง

ตารางที่ 17 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (g)	Growth ratio
D. Sonia 'Jo Daeng'	0	1.0363	0.0335	-
		1.0333	0.0423	
		1.0205	0.0393	
		1.0186	0.0357	
	2	1.0171	0.0873	1.3156
		1.0049	0.0772	1.0477
		1.0230	0.0838	1.2228
		1.0231	0.0780	1.0690
	4	1.1631	0.1210	2.2095
		1.0489	0.1031	1.7347
		1.0529	0.1065	1.8249
		1.0699	0.1034	1.7427
	6	1.2691	0.1174	2.1141
		2.6515	0.2297	5.0928
		2.6528	0.2295	5.0875
	8	3.8211	0.2455	5.5119
		4.2033	0.2290	5.0743
		2.4595	0.1946	4.1618
	10	4.4394	0.2272	5.0265
		5.0459	0.2265	5.0080
		5.9189	0.2192	4.8143

ตารางที่ 17 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (ต่อ)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (g)	Growth ratio
D. officinale	0	1.0113	0.0407	-
		1.0373	0.0429	
		1.0084	0.0375	
	2	1.2935	0.1282	2.1759
		1.2308	0.1237	2.0644
		1.1622	0.1146	1.8390
	4	2.2515	0.2475	5.1313
		1.9231	0.2184	4.4104
		1.8677	0.2281	4.6507
	6	2.1910	0.2292	4.3633
		2.6422	0.2273	4.5665
		2.4370	0.2274	3.2857
	8	1.3952	0.2367	4.8637
		1.6926	0.2100	4.2023
		1.6378	0.2110	4.2271
	10	1.7896	0.2180	4.4005
		1.4688	0.1821	3.5111
		2.8937	0.2155	4.3386

ตารางที่ 18 ค่า pH และ conduct ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	pH	Conduct (mS/cm)	ปริมาณอาหารเหลว (ml)
D. Sonia ‘Jo Daeng’	0	5.66	2.89	10
	2	3.90	2.69	6.9
		3.64	2.68	7.8
		3.78	2.73	7.9
		4.03	2.55	7.4
	4	4.28	1.934	7.4
		4.01	2.260	7.4
		3.91	2.320	7.4
		3.88	2.360	7.5
	6	4.45	1.744	7.2
		4.91	0.414	5
		5.05	0.817	4.7
	8	5.02	0.1872	3.4
		5.01	0.235	3.5
		5.08	0.357	4.7
	10	5.03	0.270	2.5
		4.82	0.297	2.5
		4.72	0.210	1.5

ตารางที่ 18 ค่า pH และ conduct ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (ต่อ)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	pH	Conduct (mS/cm)	ปริมาณอาหารเหลว (ml)
D. officinale	0	5.7	1.927	10
	2	4.59	1.346	8
		4.56	1.436	8
		4.62	1.349	7.5
	4	7.2	0.810	7.5
		7.2	0.856	7.5
		6.78	0.626	7.5
	6	5.05	0.182	5.5
		5.07	0.129	4.9
		5.08	0.216	5.9
	8	5.88	0.149	3
		5.36	0.132	4
		5.29	0.180	5.8
	10	5.01	0.120	4.6
		5.03	0.132	9.6
		5.12	0.111	3.3

ตารางที่ 19 ปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณน้ำตาลรวม (g/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)
D. Sonia ‘Jo Daeng’	0	30.028	0.063
	2	30.956	8.648
		21.214	14.211
		26.848	15.444
		27.132	13.490
	4	26.176	11.761
		27.468	11.710
		28.062	11.397
		29.121	11.390
	6	25.194	10.230
		10.258	7.139
		9.535	12.607
	8	1.682	5.935
		1.690	5.578
		10.982	7.233
	10	1.496	6.240
		0.801	2.868
		0.693	3.885

ตารางที่ 19 ปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง(ต่อ)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณน้ำตาลรวม (g/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)
D. officinale	0	30.028	2.321
	2	28.184	1.341
		24.466	1.584
		37.091	1.538
	4	25.666	6.619
		21.770	8.763
		24.884	5.563
	6	5.558	2.194
		2.144	0.858
		5.892	3.146
	8	0.819	0.546
		0.946	0.521
		2.325	1.396
	10	0.744	0.660
		4.697	4.286
		0.316	0.543

ตารางที่ 20 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณฟีนอลิก (mg/batch)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg/batch)	ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ (mg/batch)
D. Sonia ‘Jo Daeng’	0	4.3158	5.2765	28.4566
		4.3158	5.2765	28.4566
	2	7.4288	3.6536	532.1433
		6.4519	0.8958	199.2880
		4.5982	1.9159	236.7384
	4	10.1455	9.5702	684.5437
		6.8391	4.4577	473.0966
		7.9243	5.5777	4.98.4069
	6	11.0195	5.6087	142.0072
		22.9260	16.1662	382.4208
		22.3031	12.6952	200.3408
	8	20.4907	19.8206	169.9112
		27.9768	16.3149	116.6572
		16.6413	15.1026	68.4153
	10	32.6670	26.4368	146.3094
		16.7137	10.9112	253.6586
		21.7707	19.4089	339.6064

ตารางที่ 20 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (ต่อ)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณฟีนอลิก (mg/batch)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg/batch)	ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ (mg/batch)
D. officinale	0	2.042	4.4437	1.5709
		1.862	4.4437	2.2725
	2	2.988	10.4045	25.6490
		2.301	14.1420	6.5498
		2.966	9.2339	3.2406
	4	4.832	24.5211	12.5974
		4.100	18.9626	18.8463
		4.498	18.0750	33.1341
	6	3.152	17.8566	6.2594
		3.451	21.1181	4.5928
		2.926	22.2644	5.5995
	8	4.267	20.5909	60.2876
		3.238	28.1733	47.8622
		2.961	22.5752	8.2343
	10	3.593	23.4150	6.4633
		2.856	18.4665	5.3020
		3.832	22.9130	19.0203

2.การศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสที่เสริมในอาหารแบบ fed-batch เพื่อเพิ่มการสะสมมวลชีวภาพของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายที่เพาะเลี้ยงแบบตั้งนิ่ง

ตารางที่ 21 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (เสริมน้ำตาลซูโครส 30 g/l และ ไม่เสริมน้ำตาล)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	น้ำหนักสด (g)		น้ำหนักแห้ง (g)		Growth ratio	
		ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU
D. Sonia 'Jo Daeng'	0	1.0363	1.0363	0.0335	0.0335	-	-
		1.0333	1.0333	0.0423	0.0423		
		1.0205	1.0205	0.0393	0.0393		
		1.0186	1.0186	0.0357	0.0357		
	2	1.0171	1.1561	0.0873	0.1133	1.3156	2.0053
		1.0049	1.1999	0.0772	0.1161	1.0477	2.0796
		1.0230	1.2207	0.0838	0.1171	1.2228	2.1061
		1.0231	1.2163	0.0780	0.1214	1.0690	2.2202
	4	1.1631	1.3399	0.1210	0.1335	2.2095	2.5411
		1.0489	1.6628	0.1031	0.1557	1.7347	3.1300
		1.0529	1.7565	0.1065	0.1608	1.8249	3.2653
		1.0699	1.1172	0.1034	0.1326	1.7427	2.5172
	6	1.2691	2.0621	0.1174	0.2076	2.1141	4.5066
		2.6515	1.9729	0.2297	0.2053	5.0928	4.4456
		2.6528	1.8204	0.2295	0.1916	5.0875	4.0822
	8	3.8211	3.0585	0.2455	0.2885	5.5119	6.6525
		4.2033	2.4114	0.2290	0.2543	5.0743	5.7454
		2.4595	2.3844	0.1946	0.2388	4.1618	5.3342
	10	4.4394	3.1702	0.2272	0.2665	5.0265	6.0690
		5.0459	4.2120	0.2265	0.3019	5.0080	7.0080
		5.9189	3.6507	0.2192	0.2845	4.8143	6.5464

ตารางที่ 21 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (เสริมน้ำตาลซูโครส 30 g/l และ ไม่เสริมน้ำตาล) (ต่อ)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	น้ำหนักสด (g)		น้ำหนักแห้ง (g)		Growth ratio	
		ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU
D. officinale	0	1.0272 1.0347 1.0233 1.0371	1.0272 1.0347 1.0233 1.0371	0.0384 0.0385 0.0425 0.0397	0.0384 0.0385 0.0425 0.0397	-	-
	2	0.9496 1.0673 0.9491 1.1178	1.0652 1.0230 1.0722 0.9266	0.0907 0.0948 0.0870 0.0957	0.1009 0.0872 0.0931 0.0751	1.2803 1.3834 1.1873 1.4060	1.5368 1.1923 1.3407 0.8881
	4	1.4436 1.4597 1.3591 1.5517	1.4859 1.6778 1.624	0.1657 0.1526 0.1249 0.1576	0.1466 0.1810 0.1347	3.1659 2.8366 2.1402 2.9623	2.6857 3.5506 2.3865
	6	2.3863 1.9604 1.8197 1.7691	2.3863 1.9604 1.8197	0.2129 0.1892 0.1752 0.1617	0.2077 0.1835 0.239	4.3526 3.7568 3.4048 3.0654	4.2219 3.6135 5.0088
	8	2.746 2.407 2.3508 2.3656	1.8919 2.4362 1.9622 1.8495	0.1684 0.1394 0.1527 0.1352	0.2471 0.2716 0.2086 0.2433	3.2338 2.5047 2.8391 2.3991	5.2124 5.8284 4.2445 5.1169
	10	2.9772 2.6619 2.7152 2.7311	1.8094 2.5276 2.3551	0.1852 0.1726 0.1676 0.1794	0.2105 0.2481 0.2454	3.6562 3.3394 3.2137 3.5104	4.2923 5.2376 5.1697

ตารางที่ 22 ค่า pH และ conduct ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (เสริมน้ำตาลซูโครส 30 g/l และ ไม่เสริมน้ำตาล)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	pH		Conduct (mS/cm)		ปริมาณอาหารเหลว (ml)	
		ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU
D. Sonia 'Jo Daeng'	0	5.66	5.66	2.89	2.89	10	10
	2	3.90	4.12	2.69	2.41	6.9	7.4
		3.64	4.18	2.68	2.46	7.8	8
		3.78	4.18	2.73	2.31	7.9	7.5
		4.03	4.24	2.55	2.40	7.4	7.6
	4	4.28	4.55	1.934	1.722	7.4	7.4
		4.01	4.58	2.260	1.553	7.4	7
		3.91	5.05	2.320	1.172	7.4	5
		3.88	4.48	2.360	1.697	7.5	7
	6	4.45	5.03	1.744	0.692	7.2	7.4
		4.91	4.85	0.414	0.874	5	7.1
		5.05	4.87	0.817	1.042	4.7	7.25
	8	5.02	5.12	0.1872	0.380	3.4	5
		5.01	5.01	0.235	0.239	3.5	6
		5.08	5.54	0.357	0.234	4.7	6.4
	10	5.03	5.12	0.270	0.281	2.5	5.4
		4.82	4.95	0.297	0.245	2.5	4.2
		4.72	4.87	0.210	0.275	1.5	4.4

ตารางที่ 22 ค่า pH และ conduct ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (เสริมน้ำตาลซูโครส 30 g/l และ ไม่เสริมน้ำตาล) (ต่อ)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	pH		Conduct (mS/cm)		ปริมาณอาหารเหลว (ml)	
		ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU
D. officinale	0	5.65	5.65	2.14	2.14	10	10
	2	4.13	4.06	1.639	1.574	8.5	8
		4.03	4.17	1.687	1.617	7.9	8
		4.11	4.24	0.166	1.554	7.9	8
		4.18	4.00	1.306	1.745	9	8.2
	4	4.93	4.97	1.067	0.890	8.5	7.6
		4.74	4.89	0.957	0.1071	7.7	8
		4.74	5.44	1.118	0.990	7.7	8
		5.09		0.941		7	
	6	5.76	5.34	0.306	0.422	6.5	9.8
		6.06	5.08	0.307	0.725	6.5	9.4
		5.35	5.88	0.463	0.687	6.9	9.5
		5.89	5.12	0.409	0.439	7	9.1
	8	5.13	5.93	1.416	0.377	3.8	8.5
		5.21	5.86	0.261	0.312	5	7.9
		5.84	5.26	0.237	0.432	5	8.7
		5.73	5.06	1.866	0.343	5	8.2
	10	5.21	6.1	1.609	0.309	3.2	7
		5.55	5.23	0.205	0.222	2.1	6.5
		5.76	6.03	0.202	0.261	4.6	7.4
		5.83		0.269		4.9	

ตารางที่ 23 ปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (เสริมน้ำตาลซูโครส 30 g/l และ ไม่เสริมน้ำตาล)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณน้ำตาลรวม (g/l)		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	
		ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU
D. Sonia 'Jo Daeng'	0	30.028	30.028	0.063	0.063
	2	30.956	27.881	12.432	8.648
		21.214	32.300	14.029	14.211
		26.848	31.886	9.771	15.444
		27.132	30.801	8.028	13.490
	4	26.176	31.189	16.888	11.761
		27.468	30.930	13.016	11.710
		28.062	26.822	15.065	11.397
		29.121	29.690	15.881	11.390
	6	25.194	19.948	3.748	10.230
		10.258	23.721	4.193	7.139
		9.535	23.049	17.602	12.607
	8	1.682	11.886	1.053	5.935
		1.690	13.152	0.850	5.578
		10.982	18.424	6.125	7.233
	10	1.496	6.473	4.438	6.240
		0.801	8.398	3.170	2.868
		0.693	12.959	1.885	3.885

ตารางที่ 23 ปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (เสริมน้ำตาลซูโครส 30 g/l และ ไม่เสริมน้ำตาล) (ต่อ)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณน้ำตาลรวม (g/l)		ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	
		ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU
D. officinale	0	29.394	29.394	0.944	0.944
	2	13.662	15.051	13.066	10.610
		14.242	13.081	14.863	7.650
		12.727	12.601	11.132	15.007
		10.985	13.207	8.309	9.301
	4	8.712	5.846	11.031	6.076
		7.841	9.533	5.920	7.955
		11.250	11.768	6.727	7.412
		9.886		6.739	1.889
	6	5.556	20.341	4.908	17.854
		8.144	20.480	6.619	19.299
		6.452	27.829	7.816	21.410
		5.896	20.000.	7.571	16.866
	8	2.601	16.486	0.867	13.588
		1.333	13.346	1.288	10.877
		2.293	17.933	0.905	14.354
		3.598	19.651	1.902	16.310
	10	0.894	12.016	0.821	11.888
		0.881	11.253	0.785	8.690
		1.053	13.075	0.986	12.475
		1.305		1.165	4.721

ตารางที่ 24 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (เสริมน้ำตาลซูโครส 30 g/l และ ไม่เสริมน้ำตาล)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณฟีนอลิก (mg/batch)		ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg/batch)		ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ (mg/batch)	
		ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU
D. Sonia 'Jo Daeng'	0	4.3158	4.3158	5.2765	5.2765	28.4566	28.4566
		4.3158	4.3158	5.2765	5.2765	28.4566	28.4566
	2	7.4288	8.6541	3.6536	5.5111	532.1433	197.5027
		6.4519	3.6400	0.8958	0.1775	199.2880	218.0377
		4.5982	5.9468	1.9159	6.4780	236.7384	324.3021
	4	10.1455	14.4178	9.5702	10.1689	684.5437	498.0469
		6.8391	10.0131	4.4577	8.5495	473.0966	215.3450
		7.9243	19.3384	5.5777	8.2210	4.98.4069	553.6897
	6	11.0195	16.4038	5.6087	8.5487	142.0072	197.9673
		22.9260	14.1492	16.1662	14.5517	382.4208	470.1119
		22.3031	19.2748	12.6952	10.7683	200.3408	504.2446
	8	20.4907	20.6351	19.8206	17.6481	169.9112	193.5142
		27.9768	18.4317	16.3149	19.3284	116.6572	169.5112
		16.6413	13.2276	15.1026	18.2411	68.4153	216.4615
	10	32.6670	23.6305	26.4368	16.4210	146.3094	25.9598
		16.7137	27.9701	10.9112	17.2033	253.6586	180.2031
		21.7707	34.3446	19.4089	14.0933	339.6064	759.6947

ตารางที่ 24 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบตั้งนิ่ง (เสริมน้ำตาลซูโครส 30 g/l และ ไม่เสริมน้ำตาล) (ต่อ)

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณฟีนอลิก (mg/batch)		ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg/batch)		ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ (mg/batch)	
		ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU	ไม่เติม	เติม SU
D. officinale	0	1.8656	1.8656	2.8512	2.8512	1.6242	0.8121
		1.5948	1.6028	3.5690	3.5690	0.8797	0.4399
		2.1275	2.1275	2.7549	2.7549	1.6646	0.8323
	2	2.6913	3.0090	9.7299	10.8783	44.8371	34.4641
		1.9733	1.8151	7.4714	6.8725	74.1017	25.1629
		2.4733	2.6467	8.3970	8.9857	65.1284	51.0991
		3.0077	2.3603	10.3835	8.1484	56.9514	28.5706
	4	6.0591	3.0390	16.2917	12.0403	110.8532	53.0090
		2.8633	6.9297	11.5398	16.1995	25.3426	91.6694
		3.7949	2.9105	14.8939	8.7667	91.7307	75.5182
		4.4147		15.5367		77.0404	
	6	6.9831	11.9279	9.8969	22.2369	52.7906	89.2461
		7.8923	6.8660	10.9973	10.9183	74.1687	92.5320
		10.3040	15.0670	16.3704	27.4676	45.8104	108.6364
		9.9755		19.4682		51.1690	
	8	6.2388	9.7733	12.7423	17.6053	20.5317	95.6460
		5.0657	17.4244	9.7580	32.8976	33.0019	47.5814
		9.4410	11.7996	16.9004	26.3379	19.5213	30.2202
		6.0518		13.9932	23.9879	51.5322	81.6703
	10	13.3344	8.0516	16.4828	21.6574	40.7756	62.9743
		11.7928	10.9546	21.8969	23.0664	39.9446	93.0962
		10.0400	9.6758	17.9053	26.9531	30.0801	53.1584
		10.3027		19.1958		3.3977	

3. การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

ตารางที่ 25 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (g)	Growth ratio
D. Sonia 'Jo Daeng'	0	5.0274	0.1557	-
		5.0163	0.1415	
		5.0243	0.1408	
	2	5.3384	0.5980	3.0959
		6.1048	0.4757	2.2582
	4	6.7991	0.6609	3.5267
		7.0469	0.6339	3.3418
	6	9.5765	0.9211	5.3089
		6.1336	0.6412	3.3918
	8	10.7434	1.0946	6.4973
		9.0042	0.8861	5.0692
	10	10.4009	1.1907	7.1555
		12.0293	1.0319	6.0678
		9.8030	0.9318	5.3822
D. officinale	0	5.0209	0.1386	-
		5.0149	0.1423	
		5.0130	0.1536	
	2	5.4866	0.3487	1.4076
		5.1860	0.4191	1.8937
	4	5.8865	0.6212	3.2891
		6.2180	0.7274	4.0223
	6	9.1359	1.0763	6.4313
		8.7733	0.8746	5.0387
	8	11.3131	1.3723	8.4750
		9.8598	1.1304	6.8048
	10	16.5574	1.7836	11.3148
		16.3704	1.7614	11.1616

ตารางที่ 26 ค่า pH และ conduct ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	pH	Conduct (mS/cm)	ปริมาณอาหารเหลว (ml)
D. Sonia 'Jo Daeng'	0	5.62	2.19	100
	2	3.11	1.757	89
		3.61	1.566	94
	4	3.49	1.316	84
		3.40	1.719	86
		3.43	1.184	89
	6	3.99	1.012	82
		3.70	1.380	77
	8	5.08	0.859	77
		4.44	0.992	79
	10	4.24	0.679	68
		4.05	0.809	73
		4.39	0.864	74
D. officinale	0	5.62	2.19	100
	2	4.33	1.542	92
		3.52	1.558	91
		3.85	1.681	89.5
	4	4.02	1.290	86
		4.11	1.727	93
	6	5.52	0.843	79
		4.01	0.968	77
	8	5.98	0.682	82
		4.42	0.723	76
	10	5.94	0.211	63
		5.94	0.222	62

ตารางที่ 27 ปริมาณน้ำตาลรวมและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณน้ำตาลรวม (g)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (g)
D. Sonia 'Jo Daeng'	0	36.487	0.102
		36.490	0.102
	2	35.051	12.721
		34.282	8.102
	4	31.090	20.610
		31.692	19.253
	6	25.667	20.380
		28.654	21.280
	8	21.141	17.896
		24.962	20.174
	10	20.474	20.079
		22.656	21.404
		24.936	18.761
D. officinale	0	36.487	0.102
		36.490	0.102
	2	34.769	28.967
		34.205	26.753
	4	29.684	23.388
		28.321	21.190
	6	22.967	29.810
		25.088	30.343
	8	22.222	19.317
		20.310	17.706
	10	7.110	5.885
		7.661	6.464

ตารางที่ 28 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณฟีนอลิก (mg/batch)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg/batch)	ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ (mg/batch)
D. Sonia 'Jo Daeng'	0	3.6963	3.6674	16.50643
		2.0209	2.2469	19.13538
	2	15.5504	17.8275	343.798
		15.9481	20.6286	437.8886
	4	20.2555	19.9078	643.3057
		20.4334	25.5245	627.1477
	6	23.8214	24.93	668.2752
		18.0423	18.7319	659.5133
	8	32.8398	35.0833	253.1364
		24.7641	25.5816	243.0174
	10	48.0013	49.7812	154.5608
		46.3254	45.6015	134.9158
		47.0033	42.5412	123.9280
D. officinale	0	3.3056	3.9656	0.6998
		1.4832	2.7397	0.7650
	2	3.0817	3.9738	8.931
		10.0303	11.1578	10.469
	4	10.6925	26.2201	65.549
		15.5638	25.9045	36.165
	6	41.9387	34.6274	111.366
		36.3643	23.3227	132.515
	8	31.7242	53.0413	174.042
		36.1392	55.8099	147.114
	10	40.1333	55.1275	380.585
		51.616	64.8662	394.209

ตารางที่ 29 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระจากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia 'Jo Daeng' และ *D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ FRAP (mg/batch)	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH (mg/batch)	%การต้านอนุมูลอิสระ DPPH
D. Sonia 'Jo Daeng'	0	3.7945	0.4607	62.500
		1.8986	0.3245	63.750
	2	17.1459	2.5222	62.813
		16.8711	2.2430	70.000
	4	23.7622	3.2557	68.125
		21.1895	3.1406	68.125
	6	26.6010	3.5902	62.528
		17.6284	1.9556	42.058
	8	36.5200	5.2949	62.081
		27.9421	3.6041	55.928
	10	53.2938	5.8627	67.897
		45.1672	5.8855	69.016
		45.3869	4.9556	68.680
D. officinale	0	2.8760	0.4768	64.688
		1.2790	0.2731	56.875
	2	2.0777	0.5344	36.875
		8.1234	1.4328	55.000
	4	9.9249	2.1477	47.813
		10.2582	3.1705	55.938
	6	33.6474	5.8372	70.000
		30.9858	4.9236	77.188
	8	24.2400	5.2395	52.500
		27.2416	5.3095	60.625
	10	38.9821	4.3683	31.432
		48.4975	5.5882	40.716

ตารางที่ 30 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากโปรโตคอร์มกล้วยไม้ *D.* Sonia ‘Jo Daeng’ และ*D. officinale* ที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

สายพันธุ์	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (สัปดาห์)	%การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
D. Sonia ‘Jo Daeng’	0	11.786 15.536
	2	32.857 33.260
	4	30.000 29.330
	6	22.500 24.107
	8	29.107 20.357
	10	10.893 13.929
D. officinale	0	2.857 8.393
	2	60.000 52.200
	4	42.500 44.286
	6	47.679 44.200
	8	42.143 38.214
	10	50.893 46.000

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวณัฐธยาณ์ พจน์ธรรม
วัน เดือน ปี เกิด	3 ธันวาคม 2539
สถานที่เกิด	จังหวัดปทุมธานี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2562 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต (วิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ) จากคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	71/1 หมู่ 7 ตำบลพืชอุดม อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี 12150
ผลงานตีพิมพ์	1. Nuttaya Pojthum, Kullanart Obsuwan, and Budsarapon Ngampanya. Biomass and Bioactive Compounds Production in Protocorm-Like Bodies of Dendrobium 'SONIA JO DAENG' and Dendrobium officinale Under Static Condition Culture. Oral presentation at Silpakorn International Conference on Total Art & Science Conjunction with the 2nd International Conference on Engineering and Industrial Technology on 3-5 November 2021 in Nakhon Pathom, Proceeding. 2. Nuttaya Pojthum, Kullanart Obsuwan, and Budsarapon Ngampanya. Biomass and Bioactive Compounds Production in Protocorm-Like Bodies of Dendrobium 'SONIA JO DAENG' and Dendrobium officinale Under Static Condition Culture. AIP Conference Procedings XXX, XXX (2022) (Article in press)