การพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำสำหรับการขยายพันธุ์พืช

โดย

นางสาวศิริรักษ์ พลซา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำสำหรับการขยายพันธุ์พืช

โดย
นางสาวศิริรักษ์ พลซา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

DEVELOPMENT OF LOW-COST BIOREACTOR FOR MICROPROPAGATION

By

MISS Sirirak PONSA

A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)

Department of BIOTECHNOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2016

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำสำหรับการขยายพันธุ์พืช
โดย	ศิริรักษ์ พลซา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศนวงศ์)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพร พงศ์ทองผาสุข)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อดิศักดิ์ จตุรพิรีย์)

58401215 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว, ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว, ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบที่มีการพ่นอากาศอย่างง่าย

นางสาว ศิริรักษ์ พลซา: การพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำสำหรับการขยายพันธุ์พืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำและมีหลักการทำงานที่ควบคุมง่ายเพื่อใช้สำหรับขยายพันธุ์พืช โดยได้ออกแบบและจัดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกึ่งอัตโนมัติ ขึ้นมา 3 ระบบ ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (Temporary Immersion System: TIS) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (Nutrient Spray Bioreactor: NSB) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบที่มีการพ่นอากาศอย่างง่าย (Simple Aeration Bioreactor: SAB) โดยได้นำถังปฏิกรณ์ชีวภาพดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงอวัยวะพืช (plant organ culture) 3 ชนิด ได้แก่ การเพิ่มจำนวนต้นสับปะรด การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ และการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของแก่นตะวัน โดยเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชในระบบอาหารวุ้นและอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม พบว่า ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบที่มีการพ่นอากาศอย่างง่าย (SAB) สามารถเพิ่มจำนวนต้นและการเจริญของต้นอ่อนสับปะรดได้ดีที่สุด ส่วนการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้นั้นให้ผลดีสุดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (NSB) จากการเปรียบเทียบการพัฒนาไปเป็นต้นที่มียอดและรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่พัฒนาขึ้นมากับถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีใบกวน (Stirred Tank Bioreactor, STR) และมีระบบควบคุมแบบอัตโนมัติขนาด 5 ลิตร พบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS) ให้ผลดีกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอื่นๆ เมื่อวิเคราะห์ต้นทุนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่พัฒนาขึ้นมาพบว่า SAB มีต้นทุนถูกที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ TIS และ NSB โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้งสามระบบมีต้นทุนต่ำกว่า STR ประมาณ 22-338 เท่า จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่พัฒนาขึ้นมามีต้นทุนการจัดตั้งต่ำและให้ผลในการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชได้ดีกว่าการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ STR ที่ควบคุมโดยระบบอัตโนมัติ ซึ่งมีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อการขยายพันธุ์พืชในปริมาณมากที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ

58401215 : Major (BIOTECHNOLOGY)
Keyword : TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR, SIMPLE AERATION BIOREACTOR, NUTRIENT SPRAY BIOREACTOR

MISS Sirirak PONSA: DEVELOPMENT OF LOW-COST BIOREACTOR FOR MICROPROPAGATION Thesis advisor : Assistant Professor Budsaraporn Ngampanya, Ph.D.

This research aimed to develop low cost bioreactors with simple operation for plant micropropagation. Three bioreactor systems including temporary immersion system bioreactor (TIS), nutrient spray bioreactor (NSB) and simple aeration bioreactor (SAB) were designed and established. The developed bioreactors were applied for plant organ cultures; the multiplication of pineapple plantlets, the development of orchid protocorm to plant with shoot and rhizome and the microtuber induction of Jerusalem artichoke. Plant organs culturing by traditional methods (agar medium and liquid medium in shake flask) were also investigated. The results showed that the SAB was the best for pineapple plantlets multiplication and growth. The high rate of mature plant development from orchid protocorms were recorded in those cultured in TIS and NSB. Whereas, the TIS was only developed system that showed positive effect to Jerusalem artichoke microtuber induction. Additionally, the comparative study of mature plant orchid development from protocorms culturing in all three established bioreactors with 5 L stirred tank bioreactor with automated operation found that the TIS was superior than others. The evaluation of bioreactor cost suggested that the SAB was cheaper than TIS and NSB. However, the cost of all developed bioreactors were lower than STR about 22-338 folds. All data obtained from this research demonstrated that the developed bioreactors were low cost equipments and suitable for plant organs culture better than the automated STR which benefits for mass plant micropropagation with low cost investment.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งของ ผศ.ดร.บุษราภรณ์ งามปัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อแนะนำ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนสำเร็จสมบูรณ์ และประสบผลสำเร็จไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณรศ.ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์ ผศ.ดร.สุวัฒนา พฤกษะศรี ผศ.ดร.สิริพร พงศ์ทองผาสุข และ ผศ.ดร.อดิศักดิ์ จตุรพิรีย์ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบและให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษา และข้อแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ทั้งคำแนะนำ ความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่สาว ที่สนับสนุนส่งเสริมและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอบคุณเพื่อน พี่ และน้อง ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยนี้

ศิริรักษ์ พลซา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

1.3 ขอบเขตของการศึกษา 2

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชในอาหารเหลว 3

2.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช 4

2.3 ปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช 21

2.4 การประยุกต์ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงอวัยวะพืช 23

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 34

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 34

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 35

3.3 พืชทดลอง 36

3.4 วิธีการทดลอง 37
3.4.1 ออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำและมีหลักการทำงานที่ควบคุมง่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นสับปะรด โปรโตคอร์มกล้วยไม้และลำต้นแก่นตะวัน 37
3.4.2 จัดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำ 37
3.4.3 การศึกษาผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นพืช 41
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง 50
4.1 การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นสับปะรด โปรโตคอร์มกล้วยไม้และลำต้นแก่นตะวัน 50
4.2 การจัดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นสับปะรด โปรโตคอร์มกล้วยไม้ และลำต้นแก่นตะวัน 55
4.3. การศึกษาผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ต่อการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืช 61
4. 4 การประเมินประสิทธิภาพและราคาต้นทุนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ 84
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 85
รายการอ้างอิง 86
ภาคผนวก ก 93
ภาคผนวก ข 96
ประวัติผู้เขียน 125

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ประเภทและชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืช ..5

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Spathiphyllum ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) และในอาหารแข็ง 20

ตารางที่ 3 การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ดัดแปลงจาก (Silva et al., 2015)) 31

ตารางที่ 4 การขยายพันธุ์กล้วยไม้สายพันธุ์ต่างๆโดยอาศัยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 33

ตารางที่ 5 การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ 52

ตารางที่ 6 ราคาต้นทุนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการพ่นอากาศอย่างง่าย (SAB) 1 ชุด..... 56

ตารางที่ 7 ราคาต้นทุนถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS) 1 ชุด 58

ตารางที่ 8 ราคาต้นทุนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบที่มีการพ่นฝอยอาหารเหลวไปยังชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยง (Nutrient spray bioreactor) 1 ชุด..... 60

ตารางที่ 9 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และอัตราการเจริญเติบโตของยอดสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 60 วัน 62

ตารางที่ 10 ความสูงและอัตราการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนสับปะรดในระบบอาหารเหลว..... 62

ตารางที่ 11 จำนวนของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลที่พัฒนาและเจริญเติบโตในระบบอาหารเหลวหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 66

ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในระบบอาหารเหลว 70

ตารางที่ 13 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่มีจุดกำเนิดต้นอ่อน 71

ตารางที่ 14 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่พัฒนาไปเป็นต้นและราก 72

ตารางที่ 15 ค่าพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าในระบบอาหารเหลวหลังจากเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกลุลหวายเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 73

ตารางที่ 16 การเจริญเติบโตของชิ้นพืชหลังเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์ 77

ตารางที่ 17 การเจริญเติบโตของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์ 80

ตารางที่ 18 จำนวนหัวแก่นตะวันขนาดเล็กที่ชักนำได้ในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์ 81

ตารางที่ 19 ขนาดหัวแก่นตะวันที่ชักนำได้ในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์ 82

ตารางที่ 20 ค่าพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าในระบบอาหารเหลวสำหรับชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวัน 83

ตารางที่ 21 ราคาต้นทุนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ออกแบบและจัดตั้ง 84

ตารางที่ 22 สูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Murashige และ Skoog 1962 93

ตารางที่ 23 การเจริญเติบโตของยอดสับปะรดบนระบบอาหารต่างชนิด 96

ตารางที่ 24 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว 97

ตารางที่ 25 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (NSB) 99

ตารางที่ 26 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB) 100

ตารางที่ 27 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB) 101

ตารางที่ 28 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า 102

ตารางที่ 29 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า 104

ตารางที่ 30 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารวุ้น 105

ตารางที่ 31 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR (ส่วนที่ติดบนแผงกั้น) 106

ตารางที่ 32 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR (ส่วนที่จมในอาหารเหลว) 107

ตารางที่ 33 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR 108

ตารางที่ 34 โปรโตคอร์มที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในระบบอาหาร 109

ตารางที่ 35 น้ำหนักสดของข้อลำต้นแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์ 110

ตารางที่ 36 ความยาวของข้อลำต้นแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์ 111

ตารางที่ 37 เส้นผ่านศูนย์กลางของข้อลำต้นแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์ 112

ตารางที่ 38 น้ำหนักสดของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 4 สัปดาห์ 113

ตารางที่ 39 ความยาวของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 4 สัปดาห์ 113

ตารางที่ 40 เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 114

ตารางที่ 41 น้ำหนักสด ของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว 4 สัปดาห์ 114

ตารางที่ 42 ความยาวของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว 4 สัปดาห์ 115

ตารางที่ 43 เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว 4 สัปดาห์ 115

ตารางที่ 44 น้ำหนักสด ความยาว และเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร (NSB) 4 สัปดาห์ ...116

ตารางที่ 45 น้ำหนักสด ความยาวของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการพ่นให้อากาศ 117

ตารางที่ 46 เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการพ่นให้อากาศ (Simple aeration bioreactor) 4 สัปดาห์ 118

ตารางที่ 47 เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า 4 สัปดาห์ 119

ตารางที่ 48 น้ำหนักสด ความยาวของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า 4 สัปดาห์ 120

ตารางที่ 49 จำนวนหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันที่ชักนำได้ส่วนบนเหนือข้อได้ในระบบอาหารเหลว 121

ตารางที่ 50 จำนวนหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันที่ชักนำได้ในส่วนล่างใต้ข้อในระบบอาหารเหลว 121

ตารางที่ 51 ขนาดหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในอาหารแบบแช่ชั่วคราวที่ถูกแช่ในอาหารเหลวทุกๆ 4 ชั่วโมง 122

ตารางที่ 52 ขนาดหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในอาหารวุ้น 123

ตารางที่ 53 ขนาดหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในอาหารแบบแช่ชั่วคราวที่ถูกแช่ในอาหารเหลวทุกๆ 2 ชั่วโมง 124

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ประเภทของถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเลี้ยงเซลล์พืช 7

ภาพที่ 2 การวางผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (stirred tank bioreactor, STR) 8

ภาพที่ 3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกลองหมุน (rotating drum bioreactor) 8

ภาพที่ 4 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตัวกรองปั่น (Spin filter bioreactor) 9

ภาพที่ 5 การวางผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศและคอลัมน์ฟองอากาศ 10

ภาพที่ 6 แบบแผนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 11

ภาพที่ 7 การวางผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ balloon-type bubble bioreactor (BTBB) 12

ภาพที่ 8 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภท balloon type bobble bioreactor (BTBB) 13

ภาพที่ 9 การขยายพันธุ์กล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสผ่านโปรโตคอร์มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 14

ภาพที่ 10 แผนผังของ ebb and flood bioreactor system 15

ภาพที่ 11 แผนภาพกึ่งอัตโนมัติของระบบแช่ชั่วคราว 17

ภาพที่ 12 ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอย (NSB) 19

ภาพที่ 13 การเพิ่มจำนวนต้นสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่างชนิด 24

ภาพที่ 14 หัวขนาดเล็กของมันฝรั่งเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยวิธีควบคุมระดับผิวของอาหาร 27

ภาพที่ 15 ข้อลำต้นแก่นตะวันที่ถูกชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็ก 27

ภาพที่ 16 หัวแก่นตะวันขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลองภายที่มีการให้แสงสว่างจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ระยะเวลาต่างกัน 28

ภาพที่ 17 หัวแก่นตะวันขนาดเล็กที่ชักนำได้บนอาหารสูตรสำหรับชักนำให้เกิดหัวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสแตกต่างกัน 29

ภาพที่ 18 ระยะการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ Cymbidium giganteum 30

ภาพที่ 19 การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มของ Dendrobrium candidrum 32

ภาพที่ 20 แผนผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB) 38

ภาพที่ 21 แผนผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS) 39

ภาพที่ 22 แผนผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร (NSB) 41
ภาพที่ 23 จุกสับปะรดปลอดเชื้อสำหรับใช้เป็นพืชวัตถุดิบ 42
ภาพที่ 24 ต้นแก่นตะวันปลอดเชื้ออายุ 1 เดือน 46
ภาพที่ 25 ผังวิศวกรรมของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว 51
ภาพที่ 26 ระบบอาหารเหลวที่มีการพ่นอากาศอย่างง่าย 55
ภาพที่ 27 ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว 57
ภาพที่ 28 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร 59
ภาพที่ 29 ต้นอ่อนสับปะรดหลังจากการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวเป็นเวลา 60 วัน 63
ภาพที่ 30 ยอดสับปะรดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน 63
ภาพที่ 31 ระยะการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย 65
ภาพที่ 32 การพัฒนาของโปรโตคอร์มอายุ 60 วันหลังจากย้ายไปเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว สูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ 65
ภาพที่ 33 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS) 68
ภาพที่ 34 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร (NSB) 69
ภาพที่ 35 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 rpm 69
ภาพที่ 36 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB) 69
ภาพที่ 37 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR 70
ภาพที่ 38 การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในระบบอาหารต่างๆ 76
ภาพที่ 39 ข้อลำต้นแก่นตะวันในระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว 76
ภาพที่ 40 หัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในอาหารวุ้นและ TIS 77

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลอง (*in vitro* propagation) หรือที่เรียกกันว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นพืชขนาดจิ๋ว (micropropagation) เข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมากต่อการขยายต้นพันธุ์พืชปลอดโรคในเชิงพาณิชย์ โดยวิธีการดังกล่าวนี้มีข้อได้เปรียบวิธีการขยายพันธุ์พืชในแปลงปลูกอยู่หลายประการด้วยกัน อาทิเช่น สามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้มาก (mass production) ในระยะเวลาอันสั้น และได้ต้นพืชที่แข็งแรงและปลอดโรค สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปีโดยไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล ยิ่งไปกว่านั้นก็คือความสามารถที่จะชักนำให้ชิ้นพืช (explant) บางชนิดที่พักตัว (dormancy) หรือแก่ (adult)
ไม่ค่อยตื่นตัว (inactive) กลับมาตื่นตัว (rejuvenate) และพัฒนาต่อไปได้อีกครั้งก็นับเป็นข้อได้เปรียบอีกประการหนึ่งที่สามารถทำได้โดยอาศัยหลักการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลอง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เทคนิค micropropagation ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ (ornamental plants) ในเชิงพาณิชย์ซึ่งเติบโตขึ้นเป็นอย่างมากในตลาดโลก นอกจากนี้ยังมีการนำเอาเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการขยายพันธุ์พืชผักและไม้ผลบางชนิดอีกด้วย อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์พืชโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงชิ้นพืชขนาดจิ๋วบนอาหารวุ้น (agar medium) นั้นถือเป็นการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลองแบบดั้งเดิมที่ต้องอาศัยแรงงาน จำนวนขวดและชั้นวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวนมาก อีกทั้งยังต้องการพื้นที่ขนาดกว้างที่มีการให้แสงสว่างจากหลอดไฟ ส่งผลให้มีข้อจำกัดของต้นทุนการผลิตสูงและยากต่อการขยายพันธุ์พืชให้ได้ผลผลิตในปริมาณมากต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ครั้ง (Gupta & Ibaraki, 2008) ดังนั้นจึงได้มีการขยายพันธุ์พืชหลายชนิดในระบบการเพาะเลี้ยงที่อาศัยอาหารเหลว (liquid medium) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวจะมีข้อดีหลายประการ เช่น เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชมีอัตราการเจริญสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นจึงทำให้ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่สั้นลงได้ สามารถปรับเปลี่ยนสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น การแปรผันองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง การใช้สารก่อกระตุ้น (elicitors) เพื่อเพิ่มผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และการหาเอนไซม์ที่เป็นตัวกำหนดวิถีการสังเคราะห์สารต่างๆ ได้ง่ายกว่า ซึ่งระบบการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนี้จะเอื้อต่อการขยายขนาดการผลิตเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชในระดับอุตสาหกรรมได้ โดยได้มีการพัฒนาและปรับปรุงถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชอย่างต่อเนื่อง การประยุกต์

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลวโดยอาศัยถังปฏิกรณ์ชีวภาพจึงถูกคาดหวังว่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้การขยายพันธุ์พืชเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและทำได้ในเวลาอันรวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังนำไปสู่การขยายขนาดการผลิตที่ใหญ่ขึ้นได้ อย่างไรก็ตามการทดลองใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อการขยายพันธุ์พืชและการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ยังถูกจำกัดอยู่ในพืชเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ทั้งนี้ก็เพราะว่ายังขาดการวางแผนการทดลองแบบ factorial และการทดลองที่เป็นระบบของการขยายพันธุ์พืชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่จะสะท้อนให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ที่ซับซ้อนระหว่างลักษณะทางสรีรวิทยาของพืชกับพารามิเตอร์เชิงกายภาพของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ดังนั้นการที่จะใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อการขยายพันธุ์พืชและการผลิตสารทุติยภูมินั้นจึงยังเป็นระบบที่ต้องอาศัยการพัฒนาและปรับปรุงอีกมาก ประกอบกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ถูกพัฒนาและนำมาใช้ได้จริงในการขยายพันธุ์พืชและการผลิตสารทุติยภูมิในขนาดการผลิตที่สูงในปัจจุบันนั้นมีราคาแพงเพราะต้องอาศัยระบบการควบคุมการผลิตแบบอัตโนมัติ ดังนั้นการหาแนวทางในการพัฒนาและดัดแปลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำและอาศัยหลักการทำงานที่ควบคุมง่ายไม่ซับซ้อนเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจของประเทศจึงน่าจะมีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อการพัฒนาระบบการเกษตรของชาติในอนาคต

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำและมีหลักการทำงานที่ควบคุมง่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชชนิดต่างๆ

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1. ออกแบบถังปฏิกรณ์ปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำและมีหลักการทำงานที่ควบคุมง่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นสับปะรด โปรโตคอร์มกล้วยไม้ และลำต้นแก่นตะวัน

2. จัดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำและมีหลักการทำงานที่ควบคุมง่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นสับปะรด โปรโตคอร์มกล้วยไม้ และลำต้นแก่นตะวัน

3. ศึกษาผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนและการเจริญของต้นสับปะรด การพัฒนาไปเป็นต้น ใบและรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ และการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของลำต้นแก่นตะวัน

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำและมีหลักการทำงานที่ควบคุมง่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชชนิดต่างๆ ได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชในอาหารเหลว

พืชเชิงพาณิชย์ที่เป็นที่ต้องการมากในปัจจุบันได้แก่ ผัก ผลไม้ พืชสมุนไพร ไม้ดอกไม้ประดับ ถูกขยายพันธุ์โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารวุ้น แต่การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นนั้นต้องอาศัยจำนวนขวดสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและแรงงานจำนวนมาก ส่งผลให้มีความต้องการพื้นที่ห้องสำหรับเพาะเลี้ยงขนาดกว้าง จำนวนชั้นวางขวดเพาะเลี้ยง ตู้ปลอดเชื้อ หม้อนึ่งขนาดใหญ่และพลังงานไฟฟ้าเป็นอย่างมาก ทำให้การขยายพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ในปริมาณมากหรือในระดับอุตสาหกรรมโดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารวุ้นนั้นมีข้อจำกัดของต้นทุนการผลิตที่สูงและยากต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิต ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชในอาหารเหลวจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทสำคัญ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืชในอาหารเหลวสามารถทำได้หลายรูปแบบ (บุษราภรณ์ งามปัญญา, 2548) ดังนี้

1. การเลี้ยงแบบหมุนจุ่มอาหารอย่างช้า ๆ (slowly rotate culture) โดยมีภาชนะที่ออกแบบพิเศษให้มีหลอดยื่นออกมารอบๆ เพื่อกักเก็บเซลล์ในขณะที่มอเตอร์หมุนภาชนะไปรอบแกนด้วยความเร็วประมาณ 1-2 รอบ/นาที

2. การเลี้ยงแบบเขย่า (shake culture) วิธีนี้ทำได้ง่ายและนิยมกันทั่วไป โดยนำภาชนะที่ใส่ตัวอย่างวางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบวน (orbital platform shaker) ที่ความเร็วประมาณ 80-120 รอบ/นาที

3. การเลี้ยงแบบหมุน (spinning culture) วิธีการนี้เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงคราวละมากๆ หลักการคือ นำภาชนะที่บรรจุตัวอย่างไปติดตั้งกับแกนหมุนที่วางเอียงทำมุม 45^{O} ความเร็วประมาณ 80-120 รอบ/ นาที

4. การเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor culture) วิธีการนี้เหมาะแก่การเลี้ยงในปริมาณมากๆ เช่นกัน โดยจะมีการเติมอากาศเข้าไปในถังปฏิกรณ์แบบต่างๆ นอกจากนี้ยังมีระบบเติมอาหารและวัดสภาพของอาหารในภาชนะด้วย

การผลิตพืชในปริมาณมากผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และเอ็มบริโอโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactors) นั้นนับเป็นวิธีการที่มีประโยชน์อย่างมากต่อการขยายพันธุ์พืชใน

ระดับอุตสาหกรรม (industrial plant propagation) โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับพืชนั้นหากแบ่งตามประเภทของระบบการเพาะเลี้ยงแล้วสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทหลัก

1.ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับผลิตชีวมวล (biomass) ได้แก่ เซลล์ ส่วนของอวัยวะพืช ส่วนของเอ็มบริโอ ต้นพืช หรือรากพืชเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับผลิตสารเมแทบอไลท์ (metabolites) และเอนไซม์ (enzyme) จากพืช

3. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับใช้เป็นระบบ biotransformation ของสารเมแทบอไลท์ที่เติมลงไป ซึ่งอาจเป็นสารเริ่มต้น (precursors) ใน metabolic pathway

2.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ถูกนำมาใช้เพื่อขยายพันธุ์พืชในปริมาณมากโดยอาศัยระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ เอ็มบริโอที่มาจากเซลล์ร่างกาย (somatic embryo) หรือส่วนของอวัยวะเหง้า (bulb) หัว (corm) ข้อ (node) หัวขนาดเล็ก (microtuber) และต้น (shoot)ในลักษณะของการแขวนลอยอยู่ในอาหารเหลว อย่างไรก็ตามในช่วงแรกนั้นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้จะออกแบบและพัฒนาโดยอาศัยแหล่งความรู้จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางก็คือถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใบกวน (stirred tank reactor) ที่มีใบกวนกังหันแบบแบน (flat turbine blade) ทุกวันนี้ถังหลากหลายชนิดได้ถูกพัฒนาและสร้างขึ้นมาเพื่อใช้ในวัตถุประสงค์จำเพาะที่แตกต่างกันออกไป แต่ถังปฏิกรณ์โดยส่วนใหญ่ที่ได้มาตรฐานยังถูกออกแบบขึ้นมาเพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการนำมาเลี้ยงเซลล์พืชในวัตถุประสงค์ตามที่ต้องการได้ เพราะเซลล์พืชมีลักษณะที่บอบบางหรือเซลล์เกาะกันเป็นกลุ่ม

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเครื่องมือที่สามารถเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ได้ผลผลิตของจำนวนต้นกล้าในปริมาณมากต่อการเพาะเลี้ยงในหนึ่งรอบ โดยสภาวะของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจะถูกสร้างขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าหรือถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็กปริมาตรความจุ 250 – 1,000 มิลลิลิตร เพื่อให้ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการขยายพันธุ์พืชมีพื้นฐานคล้ายคลึงกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และเซลล์ โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชแบ่งตามวิธีการกวน (agitation method) และลักษณะของภาชนะ (vessel) ที่ใช้เพาะเลี้ยงได้เป็น 2 ประเภทหลักคือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวนโดยอาศัยแรงเชิงกล (mechanically agitated bioreactors) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวนโดยอาศัยแรงดันจากการอัดอากาศและไม่มีการกวน (pneumatically agitated and non-agitated bioreactors) ตามรายละเอียดในตารางที่ 1 และภาพที่ 1

ตารางที่ 1 ประเภทและชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืช

ประเภทของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวน โดยอาศัยแรงเชิงกล (mechanically agitated bioreactors)	1. Stirred tank bioreactor
	2. Rotating drum bioreactor
	3. Spin filter bioreactor
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวน โดยอาศัยแรงดันจากการอัดอากาศและถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ไม่มีการกวน (Pneumatically agitated bioreactors and non-agitated bioreactors)	1. Simple aeration bioreactor
	2. Bubble column bioreactor
	3. Airlift bioreactor
	4. Packed bed bioreactor
	5. Fluidized bed bioreactor
	6. Membrane bioreactor

ที่มา (K. Y. Paek, Chakrabarty, & Hahn, 2005)

2.2.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวน โดยอาศัยแรงเชิงกล (mechanically agitated bioreactors)

2.2.1.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใบกวน (stirred tank bioreactor, STR)

โดยอาศัยใบกวนแบบต่างๆ ได้แก่ spin, helix, blade และ paddle ซึ่ง STR เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่นิยมใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรมโดยอาศัยหลักการกวนเชิงกล (ภาพที่ 2) มีข้อดีในแง่ของการผสมที่มีประสิทธิภาพและสามารถทำให้ฟองอากาศแตก ซึ่งไม่ทำให้เซลล์เกิดการจับตัวเป็นกลุ่มและเพิ่มอัตราการละลายของออกซิเจนได้ดี ทำให้ภายในถังปฏิกรณ์มีการแลกเปลี่ยนระหว่างแก๊สและของเหลวรวมถึงมีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนมวลที่ดี อย่างไรก็ตามแม้การดัดแปลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ STR ด้วยการให้อากาศโดยใช้ใบกวนแบบต่างๆได้ถูกพัฒนาขึ้นมา (Honda, Liu, & Kobayashi, 2001) แต่ก็ยังพบข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น การใช้พลังงานที่สูง แรงเฉือน (shear force) สูง มี configuration ที่ซับซ้อนและมีปัญหาเกี่ยวกับการเชื่อม (sealing) และความเสถียรของเพลาหมุน (rotating shafts) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีความสูง เกิดการปนเปื้อนได้ง่ายและยากต่อการหาสภาวะที่เหมาะสมเมื่อแปรผันสภาวะต่างๆ มีข้อแตกต่างจาก pnueumatic bioreactor คือต้องอาศัยกลไกที่แยกออกมาเพื่อให้เกิดการกวนเชิงกลนั่นก็คือต้องใช้ใบกวนแบบ

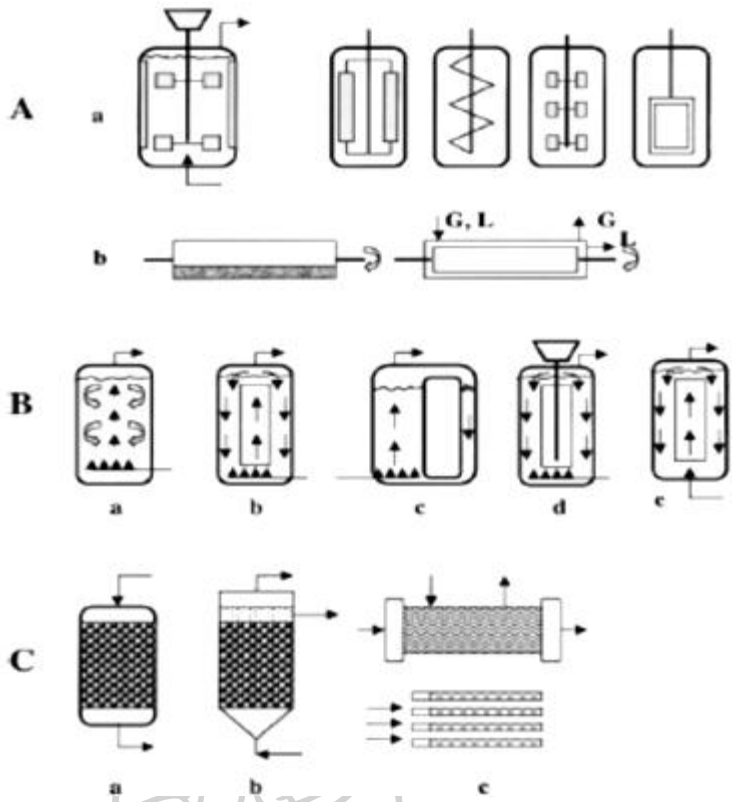
ต่างๆ และการให้อากาศ โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์และต้นพืชที่มีความไวต่อแรงเฉือนนั้นต้องใช้ใบกวนที่ทำให้เกิดแรงเฉือนต่ำๆ และต้องมีการผสมอย่างดีด้วยเมื่อใช้อัตราการกวนที่ต่ำ จึงนับเป็นข้อจำกัดอย่างมากของ STR ต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชที่ไวต่อแรงเฉือน ซึ่งมีงานวิจัยนำถังปฏิกรณ์ชนิดนี้นำไปเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเพื่อผลิตสารทุติยภูมิภายในเซลล์พืชบางชนิด (Rodr´guez-Monroy & Galindo, 1999)

2.2.1.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกลองหมุน (rotating drum bioreactor)

ประกอบด้วยถังรูปทรงกระบอกที่ติดตั้งบนลูกกลิ้งเพื่อรองรับถังสำหรับการหมุน (ภาพที่ 3) โดยหมุนที่ความเร็วรอบต่ำประมาณ 2-6 rpm ต่อนาที โดยภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้ไม่มีการใช้ใบพัด ทำให้มีแรงเฉือนที่ต่ำ และเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่สูงกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอื่นๆ ทำให้เกิดการถ่ายโอนมวลได้สำเร็จโดยใช้พลังงานน้อยมาก ซึ่งเป็นไปตาม Danckwert's surface renewal theory (Danckwerts, 1951) โดยสิ่งเหล่านี้เหมาะสมต่อกระบวนการชีวภาพของเนื้อเยื่อที่ไวต่อแรงเฉือนและถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ต้องการแสง (photo bioreactor) (Sajc, Grubisic, & GordanaVunjak-Novakovic, 2000)

2.2.1.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตัวกรองปั่น (Spin filter bioreactor)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้ (ภาพที่ 4) ติดตั้งตัวกรองที่ขับเคลื่อนด้วยข้อต่อแม่เหล็กในแผ่นกวน โดยการปั่นของตัวกรองนี้ทำหน้าที่เป็นตัวกวน (agitated) โดยไม่สร้างแรงเฉือนและยังทำหน้าที่เป็นตัวกรองสำหรับนำเอาอาหารเหลวออกจากถังปฏิกรณ์ ซึ่งมีงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของแครอทในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Spin filter (Honda et al., 2001)



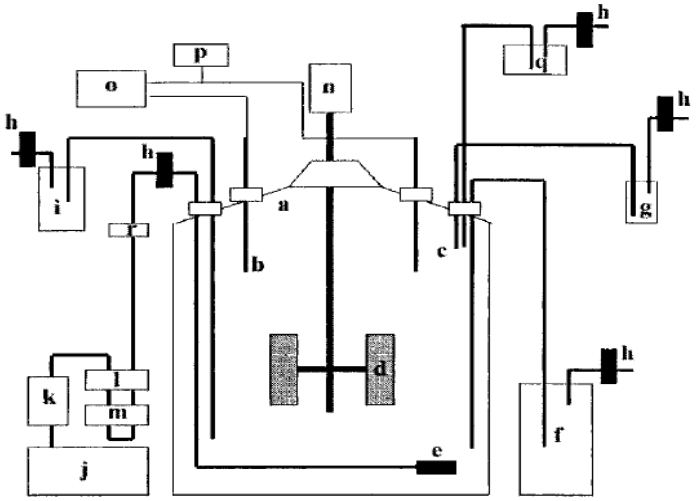
ภาพที่ 1 ประเภทของถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเลี้ยงเซลล์พืช

(A) Mechanically agitated bioreactors: (a) stirred tank reactor equipped with various propellers (spin, helix, bladed, paddle), (b) rotary drum tank reactor;

(B) Pneumatically agitated bioreactors: (a) bubble column, (b) concentric tube air-lift reactor (IL ALR), (c) external loop air-lift reactor (EL ALR), (d) propeller loop reactor, (Akin-Idowu, Akinyemi, & Ibitoye) jet loop reactor;

(C) Non-agitated bioreactors: (a) packed bed, (b) fluidized bed, (c) membrane reactor.

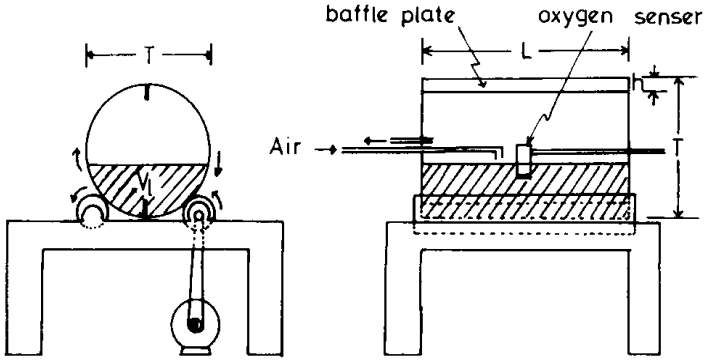
ที่มา (Sajc et al., 2000)



ภาพที่ 2 การวางผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน (stirred tank bioreactor, STR)

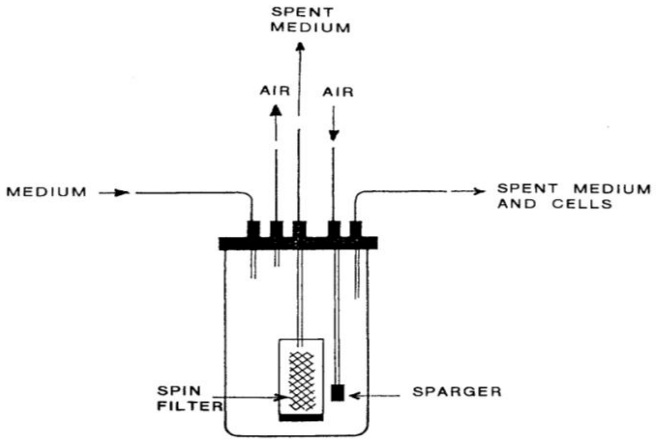
a, Wheaton vessel for 20 or 50 liters; b, dissolved oxygen probe; c, pH probe; d, impeller; e, sparger; f, inoculation and harvest vessel; g, vent trap; h, membrane filter; i, sampling port; j, air compressor; k, filtering system. l, cooling system; m, heating system; n, top driven motor; o, controller; p, computer; q, anti-foam port; r, air flow meter

ที่มา (K.-Y. Paek, Hahn, & Son, 2001)



ภาพที่ 3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกลองหมุน (rotating drum bioreactor)

ที่มา (Tanaka, Nishijima, Suwa, & Iwamoto, 1983)



ภาพที่ 4 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบตัวกรองปั่น (Spin filter bioreactor)
ที่มา (Styer, 1985)

2.2.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวนโดยอาศัยแรงดันจากการอัดอากาศและถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ไม่มีการกวน (Pneumatically agitated bioreactors and non- agitated bioreactors)

2.2.2.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบคอลัมน์ฟองอากาศ (bubble column -bioreactors) (ภาพที่ 5)

ฟองอากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้ทำให้เกิดแรงเฉือนน้อย ดังนั้นจึงมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขยายพันธุ์พืชหลายๆชนิดผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้น เหง้า หัว และหัวสะสมอาหาร (tuber) ข้อด้อยของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้คือการเกิดฟอง (foam) จากการเติมอากาศเข้าไปในปริมาณมากและการเจริญของเซลล์ใน head space โดยปรากฏการณ์ของการเกิดฟองและการเจริญของเซลล์ที่ผนังของภาชนะเพาะเลี้ยงนั้นเป็นเพราะเส้นผ่านศูนย์กลางของภาชนะเพาะเลี้ยงและส่วนบนของภาชนะเพาะเลี้ยงนั้นเท่ากัน (K.-Y. Paek et al., 2001) เพื่อเอาชนะปัญหานี้จึงต้องออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพให้ส่วนบนของภาชนะเพาะเลี้ยงมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่ขึ้นและ /หรือออกแบบเป็นรูปลูกโป่ง (balloon)

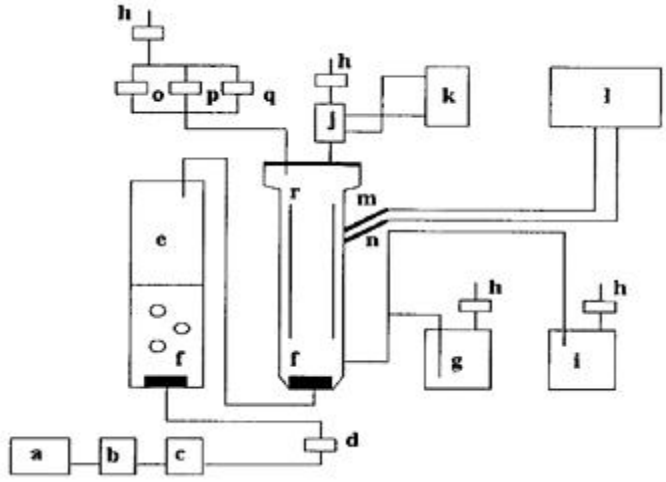
2.2.2.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยก (air-lift bioreactor) (ภาพที่ 5)

ฟองอากาศที่เกิดขึ้นทั้งจากวงจรการหมุนเวียนภายในและภายนอกทำให้เฟสของของเหลวผสมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยข้อดีของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้ก็คือ แรงเฉือนและการใช้พลังงานต่ำ และออกแบบได้ง่าย อย่างไรก็ตามการเกิดฟองเพราะการเติมอากาศเข้าไปในปริมาณมากและการเจริญของเซลล์ใน head space ก็พบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้เช่นเดียวกับถังปฏิกรณ์

ชีวภาพแบบคอลัมน์ฟองอากาศ และยังมีปัญหาของการระเหยของอาหารเพาะเลี้ยงด้วย เพื่อแก้ไขปัญหานี้ควรเอาน้ำปลอดเชื้อเติมเข้าไประหว่าง sterile membrane กับ glass sparger จากการเพิ่ม water column เข้าไปจะลดการระเหยของอาหารเพาะเลี้ยงได้ถึง 90% และจะทำให้เพาะเลี้ยงได้นานขึ้น (Lee, 1997)

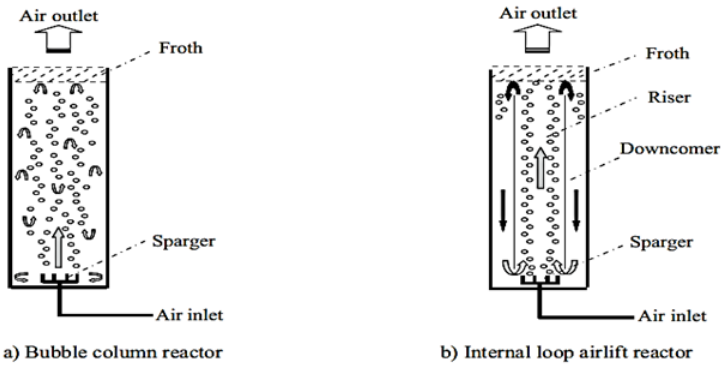
นอกจากนี้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศและแบบคอลัมน์ฟองอากาศยังสามารถใช้เพาะเลี้ยงได้เป็นระยะเวลานานๆ โดยมีปัญหาการปนเปื้อนต่ำและกำจัดความเสี่ยงอันเนื่องมาจาก stirrer shafts และ seal ดังที่พบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ STR

ข้อแตกต่างหลักระหว่างถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกและแบบคอลัมน์ฟองอากาศคือเรื่องของระบบการหมุนเวียนและลักษณะการเคลื่อนที่แบบไดนามิกของน้ำ (ภาพที่6) โดยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบอากาศยกนั้นการหมุนเวียนของของเหลวและการผสมถูกกำหนดโดยอัตราการไหลของอากาศ (gas flow rate) ดังนั้นความเร็วของการหมุนเวียนอาหารเหลวที่ถูกควบคุมด้วย air flow meter อาจเกิดขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยกลไกการหมุนเวียนจากภายนอกอื่นใดมาช่วยเมื่อเปรียบเทียบกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบคอลัมน์ฟองอากาศ แม้ว่ากลไกการยกอากาศจะเหมือนกันมากในทั้งสองระบบแต่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบคอลัมน์ฟองอากาศนั้นจะเหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ในปริมาณที่มากกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศ



ภาพที่ 5 การวางผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบยกอากาศและคอลัมน์ฟองอากาศ

a, air compressor; b, main filter system; c, air flow meter; d, 0.2 mm air inlet membrane filter; e, water column; f, gas sparger; g, medium reservoir; h, membrane filter; i, sampling device;j, water circulator; k, control box; l, pH probe; m, dissolved oxygen; n, anti-foam agent; o, acid; p, base; q, draught tube ที่มา (K.-Y. Paek et al., 2001)



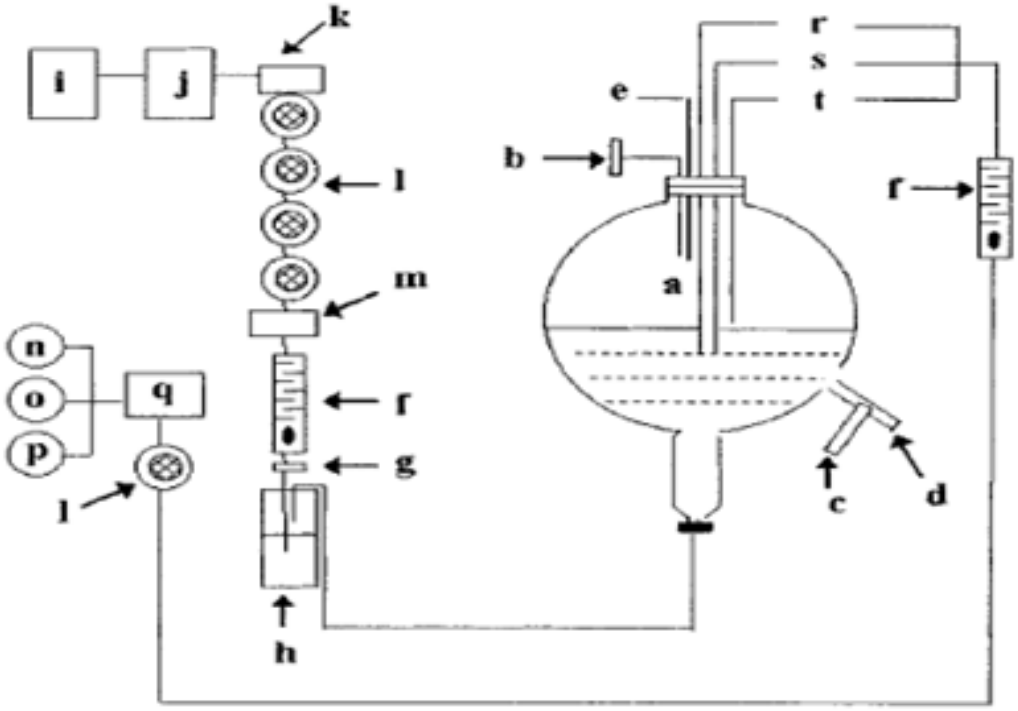
ภาพที่ 6 แบบแผนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

(a) bubble column reactor (b) internal loop airlift reactor. ที่มา (Behin, 2012)

2.2.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพฟองอากาศประเภทลูกโป่ง (balloon type bubble bioreactor)

เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปลูกโป่ง (balloon type bubble bioreactor (BTBB)) (ภาพที่ 7) ที่ออกแบบเพื่อกำจัดปัญหาการเกิดฟอง โดยใช้ concentric tube สำหรับ cell lifting ที่ riser port ของฐานภาชนะเพาะเลี้ยงจะทำให้การเกิดฟองลดลงเป็นอย่างมาก มีการศึกษาเพาะเลี้ยง adventitious root ของ *Eurycoma longiforia* โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ BTBB เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบขวดเขย่า พบว่าการผลิตชีวมวลและสารทุติยภูมิ (ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ใน adventitious root ของ *E. longiforia* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ BTBBสูงกว่าการผลิตชีวมวลที่เพาะเลี้ยงแบบขวดเขย่า 4.1 ซึ่งถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้เหมาะต่อการเลี้ยงเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะพืช โดยได้มีการนำ pilot scale BTBBs ขนาด 300, 500 และ 1000 ลิตรมาใช้ในการผลิตชีวมวลของพืชสำคัญหลายชนิด (K.-Y. Paek et al., 2001)

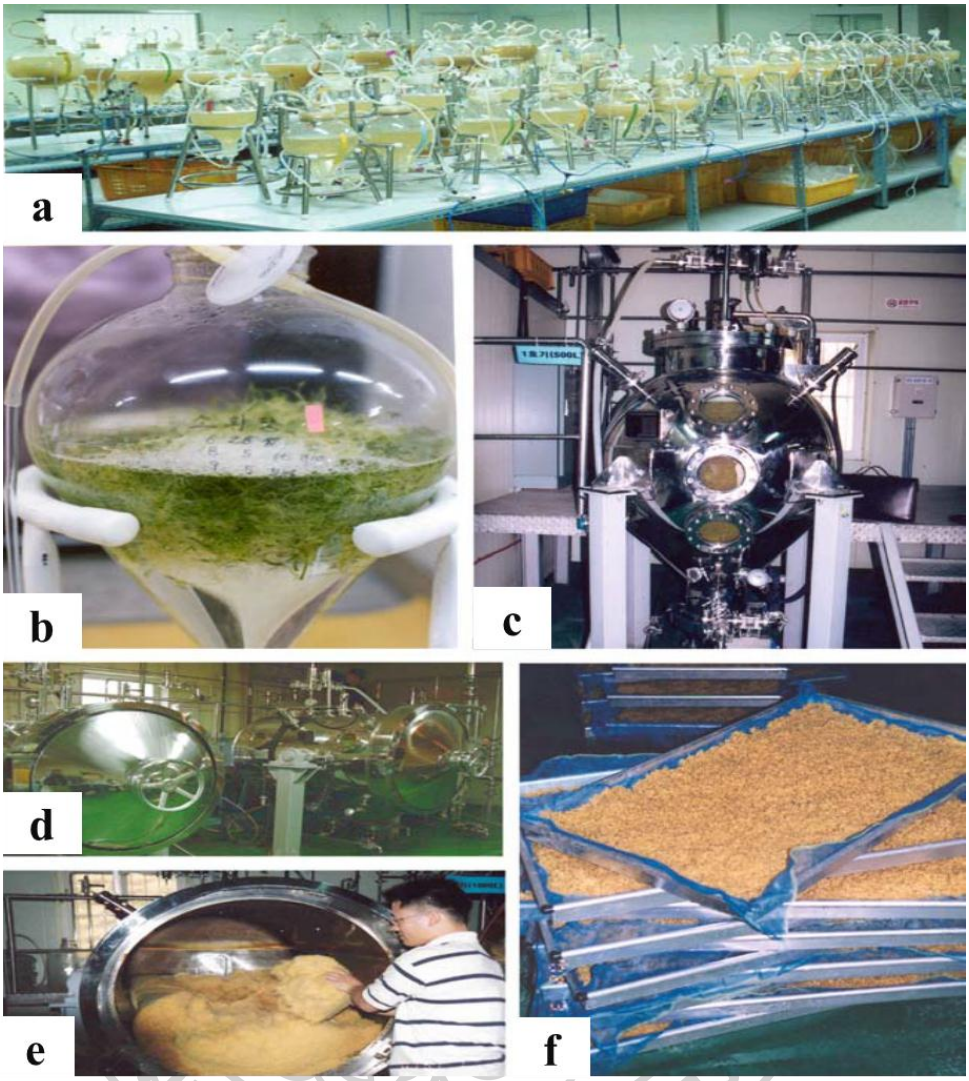
การขยายพันธุ์พืชที่ใช้แรงงานน้อยและต้นทุนต่ำผ่านการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภท modified air-lift, bubble column และ balloon type bobble bioreactor (BTBB) มีรายงานความสำเร็จในการขยายพันธุ์พืชหลายชนิดเช่น *Anoectochilus*, apple, เบญจมาศ (*Chrysanthemum*), กระเทียม (garlic), โสม (ginseng) (ภาพที่ 8) และการขยายพันธุ์กล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสผ่านโปรโตคอร์ม (ภาพที่ 9)



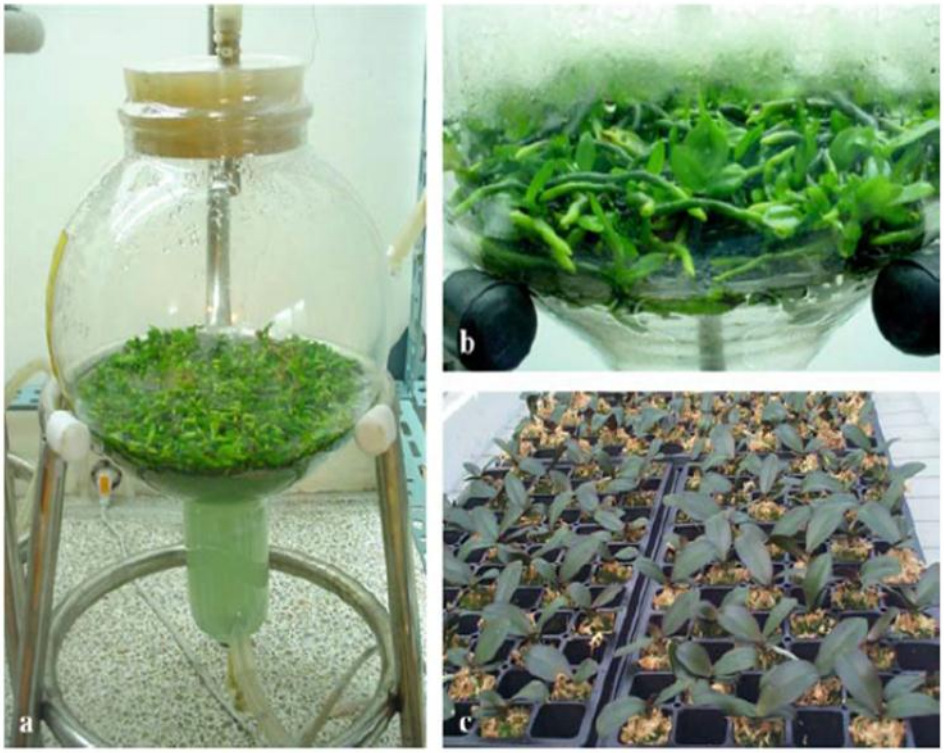
ภาพที่ 7 การวางผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ balloon-type bubble bioreactor (BTBB)

a, body of balloon-type bubble bioreator; b, vent; c, inoculum port; d, sampling device; e, medium exchanging port; f, air flow meter; g, membrane filter; h, water column; i, air compressor; j, air reservoir; k, air cooler; l, filtering system; m, air dryer; n, O_2 tank; o, CO_2 tank; p, N_2 tank; q, gas mixer; r, dissolved oxygen probe; s, mixed gas inlet; t, pH probe

ที่มา (K.-Y. Paek et al., 2001)

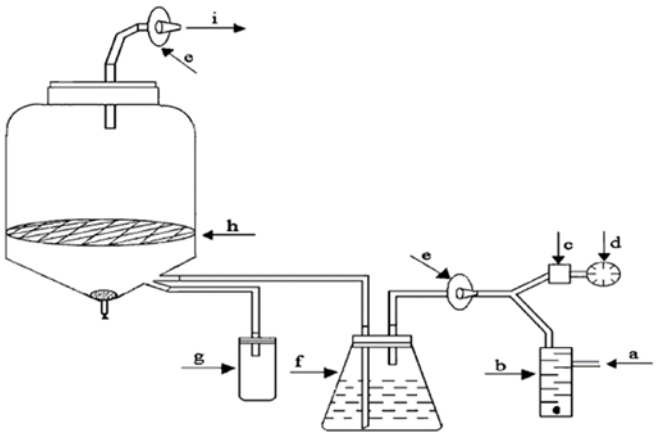


ภาพที่ 8 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภท balloon type bobble bioreactor (BTBB) (a) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ BTBB ขนาด 5 ลิตรสำหรับเพาะเลี้ยงรากแขนงของโสม (Panax ginseng C.A. Meyer); (b) การเพิ่มปริมาณ somatic embryo ของโสมไซบีเรียนใน BTBB ขนาด 5 ลิตร; (c) Pilot scale BTBB ขนาด 500 ลิตร; (d) Pilot scale column type bioreactor ขนาด 1000 ลิตร; (e) การเก็บเกี่ยวรากแขนงของโสมจาก BTBB ขนาด 500 ลิตรหลังจากเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ (Tanaka et al.) การเก็บเกี่ยวsomatic embryo ของโสมไซบีเรียนจาก BTBB ขนาด 500 ลิตรหลังจากเลี้ยงนาน 30 วัน ที่มา (K. Y. Paek et al., 2005)



ภาพที่ 9 การขยายพันธุ์กล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสผ่านโปรโตคอร์มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (a) การเพิ่มจำนวนโปรโตคอร์มกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบคอลัมน์ขนาด 1 ลิตรเมื่อเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์; (b) การพัฒนาไปเป็นต้นและการเจริญของต้นอ่อนจากโปรโตคอร์มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ; (c) ต้นพืชที่นำออกปลูก ที่มา (K. Y. Paek et al., 2005)

และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบใหม่ขึ้นมาเรียกว่า ebb and flood bioreactor หรือ a periodic immersion system หรือ temporary immersion system bioreactor (TIS) (ภาพที่ 10) โดยอุปกรณ์หลักของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้จะเหมือนกับ BTBB อย่างไรก็ตามเพื่อหลีกเลี่ยงการจมของชิ้นพืชอย่างสมบูรณ์ในอาหารเหลว ตาข่ายหรือตะแกรงรองรับ (supporting net) จึงถูกนำมาใช้เพื่อรองรับพืชวัตถุดิบ ในระบบนี้อาหารจะถูกปั๊มออกจากภาชนะเก็บอาหารไปยังภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยง ท่อต่างๆ จะช่วยในการลำเลียงอาหารไปยังพืชวัตถุดิบอย่างเท่าเทียมกันทำให้มีการเจริญที่เป็นรูปแบบเดียวกัน โดยอาหารเหลวที่ถูกลำเลียงไปยังพืชวัตถุดิบจะยังคงอยู่ที่ภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงนานสองสามนาที หลังจากนั้นอาหารดังกล่าวจึงถูกระบายกลับมายังภาชนะเก็บอาหารเพื่อใช้ซ้ำต่อไป การระบายอาหารเหลวออกถูกควบคุมด้วย solenoid valve ที่ช่วงเวลาต่างๆตั้งแต่ 3-6 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชิ้นพืชที่ใช้



ภาพที่ 10 แผนผังของ ebb and flood bioreactor system

(a) Air inlet; (b) Air flow meter; (c) Timer; (d) Solenoid valve; (e) Membrane filter; (Tanaka et al.) Medium reservoir;(g) Sampling port; (h) Supporter (i) Air outlet.

ที่มา (K. Y. Paek et al., 2005)

ในระบบ TIS นั้นการผลิตต้นพืชในแต่ละขั้นตอนนั้นสามารถทำได้ง่ายในภาชนะเพาะเลี้ยงเดียวกันโดยการเปลี่ยนอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง โดยการรั่วไหลของสารอาหาร (outflow nutrient) ถูกควบคุมด้วย metering pump และระดับของอาหารเพาะเลี้ยงจะถูกควบคุมด้วย level controller ที่ช่วยจัดการการเจริญของเซลล์และเนื้อเยื่อโดยควบคุมสัดส่วนของ outflow nutrient ต่อ feed nutrient นอกจากนี้การให้สารควบคุมการเจริญของพืชในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เช่น ความเข้มข้นที่สูงของไซโตไคนิน (cytokinin) และ/หรือออกซิน (auxin) เพื่อชักนำให้เกิดกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสและออแกโนเจเนซิสนั้นสามารถทำได้อย่างแม่นยำ โดยระบบนี้จะกำจัดขั้นตอนการ subculture ในสภาวะ in vitro ซึ่งต้องใช้แรงงานสูงทำให้ต้นทุนในการขยายพันธุ์พืชสูง

ระบบ TIS สำหรับการขยายพันธุ์พืชได้ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามการทำงาน (ภาพที่ 11) คือ tilling and rocker machines, complete immersion of plant material and renewal of the nutrient medium, partial immersion and a liquid nutrient renewal mechanism และ complete immersion by pneumatic driven transfer of liquid medium and without nutrient medium renewal โดยระบบ TIS ถูกออกแบบขึ้นมาเพื่อ

1. หลีกเลี่ยงการจมอยู่ในอาหารอย่างต่อเนื่องของชิ้นพืชทำให้เกิดผลเสียต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา

2. เพื่อให้มีการถ่ายโอนออกซิเจนอย่างเพียงพอ

3. ทำให้เกิดการผสมได้เพียงพอ

4. จำกัดระดับการเกิดแรงเฉือน

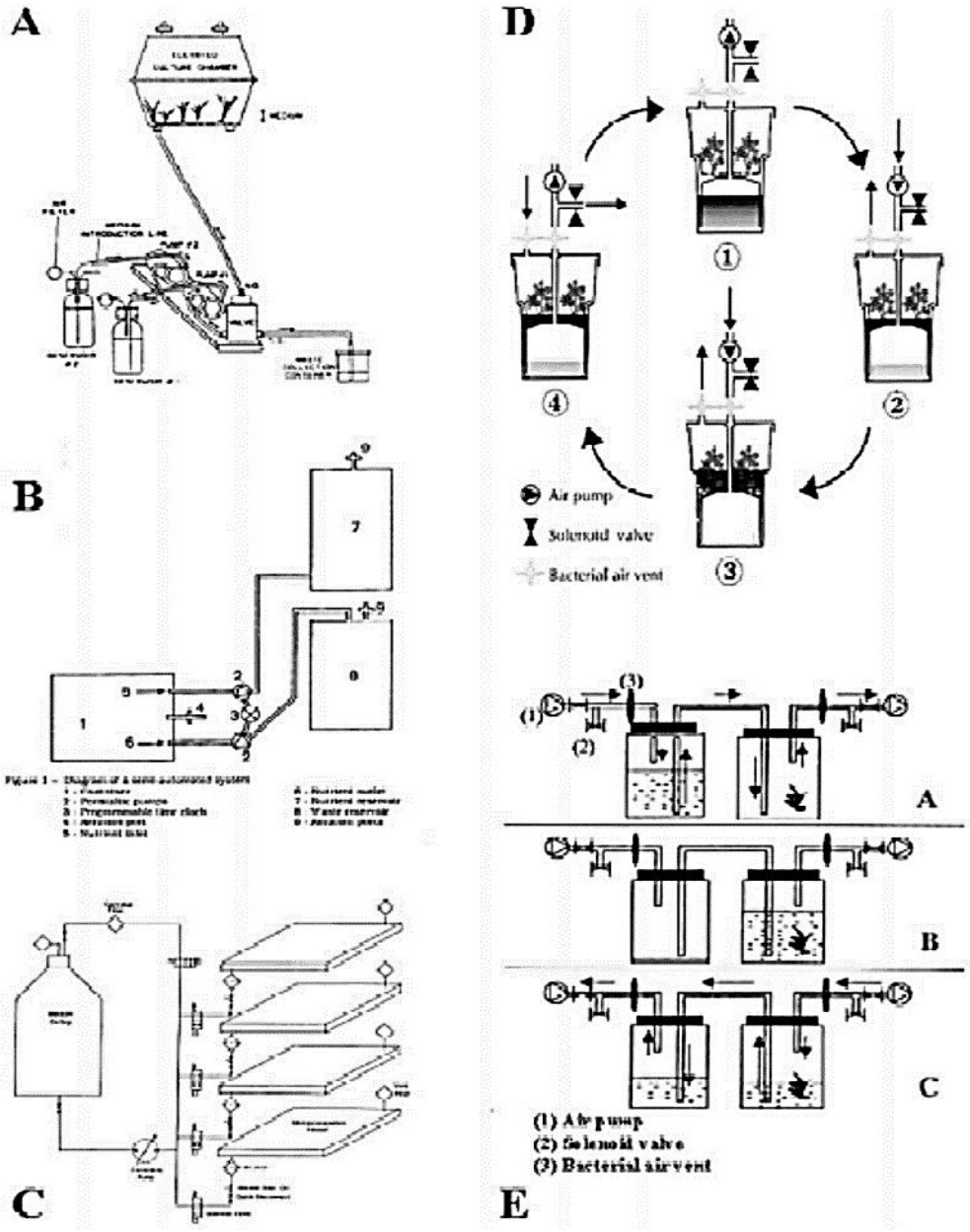
5. สามารถเปลี่ยนถ่ายอาหารได้อย่างเป็นลำดับขั้นตอนและสามารถทำแบบอัตโนมัติได้

6. ลดการปนเปื้อน

7. ต้นทุนต่ำ

โดยระบบจะมีความแตกต่างกันที่ขนาดของภาชนะเพาะเลี้ยง ประเภทของ culture support การควบคุมการแช่ชิ้นพืชโดยใช้คอมพิวเตอร์หรือเครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดด้วยระบบการทำงานง่ายๆ สามารถใช้ได้ทั้ง peristaltic pump หรือ air pump หรือการเคลื่อนที่เชิงกล (mechanical motion) ของ container เพื่อไล่ของเหลว ข้อแตกต่างอื่นๆของระหว่าง TIS ได้แก่ การนำอาหารกลับมาหรือไม่นำกลับมาใช้ซ้ำของอาหาร และ การแยกหรือการผนวกภาชนะบรรจุอาหารเข้ากับภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง ตามปกติแล้วภาชนะที่ใช้ในระบบนี้จะมีขนาดใหญ่กว่าภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม โดยภาชนะจะโปร่งใสและสามารถ autoclave ได้

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 11 แผนภาพกึ่งอัตโนมัติของระบบแช่ชั่วคราว

(*A*) APCS system with complete immersion of plant material and renewal of the liquid culture medium (from Tisserat and Vandercook, 1985);

(*B* and *C*) systems with partial immersion and with a liquid-nutrient renewal process [(*B*) from Aitken–Christie and Davies, 1988; (*C*) from Simonton et al., 1991];

(*D* and *E*) systems with complete immersion of plant material by pneumatic driven transfer of liquid medium and without medium renewal [(*D*) RITA_ system from Alvard et al., 1993; (*E*) BIT_ twin flasks system from Escalona *et al.,*1999] ที่มา (Etienne & Berthouly, 2002)

ตัวอย่างผลเชิงบวกของ TIS ต่อการขยายพันธุ์พืชด้วยชิ้นส่วนขนาดเล็ก(micropropagation) ถูกบ่งชี้ให้เห็นได้จากการเพิ่มจำนวนต้น (shoot proliferation) การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็ก (microtuberization) และการชักนำให้เกิดกระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส โดยเวลาในการแช่ชิ้นพืช (ระยะเวลาและความถี่ที่แช่) เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของระบบ การหาสภาวะที่เหมาะสมของปริมาตรอาหารและปริมาตรของภาชนะบรรจุอาหารก็ถือเป็นส่วนสำคัญต่อการปรับปรุงประสิทธิภาพของระบบด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของการเพิ่มจำนวนต้นพืช โดยทั่วไปแล้ว TIS จะช่วยเพิ่มคุณภาพของพืชวัตถุดิบด้วยคือ จะมีผลไปเพิ่มความแข็งแรงของต้นและทำให้เกิดการพัฒนารูปร่างไปเป็นโซมาติกเอ็มบริโอที่ปกติได้สูง อีกประเด็นหนึ่งก็คือการฉ่ำน้ำ (hyperhydricity) ของชิ้นพืช ซึ่งเป็นผลกระทบหลักของพืชที่จมอยู่ในอาหารเหลวจะสามารถขจัดได้ด้วยระบบ TIS หรือการควบคุมโดยการปรับระยะเวลาในการแช่ชิ้นพืช นอกจากนี้พืชที่เพิ่มปริมาณได้จากระบบ TIS ยังมีลักษณะการเจริญที่ดีกว่าในช่วงของการปรับสภาพ (acclimatization phase) เมื่อนำออกปลูกภายนอกเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่เจริญบน semi-solid หรือ liquid medium นอกจากนี้ยังได้มีการสาธิตให้เห็นถึงความสำเร็จของการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นของหัวขนาดเล็ก (microtuber) ของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) และการผลิตโซมาติก เอ็มบริโอของกาแฟ (*Coffea arabica*) ใน TIS ด้วย สำหรับพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการลดต้นทุนการผลิตเมื่อใช้ TIS ได้แก่การลดลงเป็นอย่างมากของงาน การลดพื้นที่ของชั้นวางขวดเพาะเลี้ยง การลดลงของจำนวนขวดอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง ให้ผลผลิตที่ดีกว่า โดยการขยายขนาดการผลิตโดยอาศัยกระบวนการโซมาติก เอ็มบริโอเจเนซิสและการเพิ่มจำนวนต้นด้วยระบบ TIS เพื่อเข้าสู่การค้านั้นกำลังมีการดำเนินการอยู่อย่างต่อเนื่อง (Etienne & Berthouly, 2002)

การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชอีกระบบหนึ่งที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นเมื่อไม่นานมานี้เช่นเดียวกันคือ ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร (nutrient spray bioreactor, NSB) ซึ่งประกอบไปด้วยภาชนะปริมาตร 1 ลิตร 2 อันประกบกัน ส่วนบนจะเป็น culture chamber มีความสูง 12 เซนติเมตร ส่วนล่างเป็นส่วนที่เก็บอาหารมีความสูง 10 เซนติเมตร โดยทั้งสองภาชนะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร และหัวพ่นอาหารมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร ความยาว 3.7 เซนติเมตร และรูเปิดขนาดเล็ก 0.5 มิลลิเมตร จะมี timer ต่อกับ air compressor เพื่อทำการเปิดปิด air compressor ดังแสดงในภาพที่ 12 โดยหลักการทำงานของระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอย จะเป็นการใช้ลมขาเข้าที่ต่อกับส่วนที่เก็บอาหาร โดยมี filter เชื่อมกับท่ออากาศขาเข้าการให้อาหารจากส่วนที่เก็บอาหารไปยัง culture chamber จะใช้สายส่งทางเดียว เมื่อทำการนำอาหารเหลวไปยังหัวฉีด หัวฉีดจะทำการพ่นอาหารลงมายังชิ้นพืช แล้วอาหารเหลวบางส่วนก็จะไหลกลับลงมายังส่วนที่เก็บอาหาร เพื่อนำกลับไปใช้ในการพ่นอาหารซ้ำ ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงโดยระบบนี้จะไม่

จมหรือแช่อยู่ในอาหารเลย ซึ่งเป็นข้อแตกต่างไปจากระบบต่างๆดังที่ได้กล่าวไปแล้วก่อนหน้า ระบบได้ถูกออกแบบให้มีความคล้ายคลึงกับระบบ nutrient mist bioreactor โดยการทำให้เกิดหมอกอาหาร (nutrient mist) จะอาศัยการทำงานของ ultrasonic transducer ซึ่งมีรายงานว่าพืชหลายชนิดที่เลี้ยงใน nutrient mist bioreactor นั้นมีการเจริญที่ดีเพราะต้นพืชได้รับอาหารซึ่งเป็น microparticle และ gas ทำให้ดูดซึมอาหารได้ดีและเกิดการแลกเปลี่ยนของก๊าซทำให้พืชโตดี อย่างไรก็ตามระบบ NSB จะใช้ปั๊มอากาศ และหัวพ่น (spray nozzle) ทำให้เกิดละอองฝอยของอาหารแทนการใช้ ultrasonic transducer โดยได้มีการนำระบบดังกล่าวมาใช้ในการชักนำการเกิดหัวขนาดเล็กของมันฝรั่งได้สำเร็จ (Rahman, Islam, Chowdhury, & Subramaniam, 2015)

ภาพที่ 12 ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอย (NSB)

ที่มา (Rahman et al., 2015)

ข้อดีของการขยายพันธุ์พืชโดยอาศัยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพส่งผลให้ประสิทธิภาพและผลผลิตในการขยายพันธุ์พืชเพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 2) เนื่องจากเป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในอาหารเหลว ซึ่งมีข้อดีดังนี้

1. สามารถผลิตต้นพันธุ์ขนาดเล็ก (plantlets) ได้ง่ายและผลิตได้จำนวนมากต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

2. ง่ายต่อการถ่ายหัวเชื้อของเนื้อเยื่อพืชเริ่มต้น (inoculating) และเก็บเกี่ยวผลผลิต (harvest)

3. ลดการใช้ปริมาณขวดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและพื้นที่การเพาะเลี้ยงที่ต้องใช้แสงสว่างจากหลอดไฟ ทำให้เป็นการลดต้นทุนการผลิต

4. พื้นที่ผิวทั้งหมดของชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงสัมผัสกับอาหารง่ายต่อการดูดซึมสารอาหาร ส่งผลให้พืชมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น

5. มีการไหลเวียนของอากาศช่วยให้อัตราการเจริญและชีวมวลของพืชเพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Spathiphyllum ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) และในอาหารแข็ง

Items	Bioreactor	Agar culture
Equipment		
Vessel volume	20 L	500 mL
Medium volume L/vessel	16.6 L	100 mL
Number of vessels	6	1000
Number of inocula use for subculture	96 test tubes	150 test tubes
Culture period	90 days	60 days
Culture space	0.5 m^3	36 m^3
Number of fluorescent lamps (40 W)	6	30
Labour		
Operational time	200 min	2500 min
Medium preparation (100 L)	60 min	450 min
Autoclaving	10 min	140 min
Inoculation	45 min	1250 min
Transfer to culture room	10 min	60 min
Removing culture	45 min	300 min
Vessel washing	30 min	300 min
Transplanting	1800 min	1800 min

ที่มา (Gupta & Ibaraki, 2008)

2.3 ปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช

การออกแบบและการทำงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะถูกกำหนดโดยความต้องการทางชีวภาพและวิศวกรรม ซึ่งมีหลากหลายปัจจัยได้แก่ ประสิทธิภาพการถ่ายโอนออกซิเจน (efficient oxygen transfer) และการผสม (mixing) แรงเฉือนต่ำ และแรงการเคลื่อนที่ของของไหล (hydrodynamic force) การควบคุมสภาพแวดล้อมทางกายภาพและเคมีดังกล่าวจะทำให้สะดวกต่อการขยายขนาด (scale – up)

2.3.1 การละลายออกซิเจน (Dissolve oxygen)

หนึ่งในหน้าที่หลักของถังปฏิกรณ์ชีวภาพคือช่วยส่งเสริมให้มีการถ่ายเทมวลของออกซิเจนจากแก๊สไปยังเฟสของเหลว เนื่องจากออกซิเจนละลายได้น้อยในน้ำ ($(0.25\ mmol\ l^{-1})$ at 25 ºC 1 atm., 21% (v/v) O_2 in the air) มีความจำเป็นต้องผลักดันการแพร่กระจายของออกซิเจนเข้าไปในเฟสของเหลวให้เพียงพอต่อการความต้องการในการนำไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์และเนื้อเยื่อ (Leathers, Smith, & Christie, 1995) การปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์ที่จะใช้ทำงาน เช่น อัตราการให้อากาศ (aeration rate) ความเร็วการกวน (agitation speed) การออกแบบใบพัด (impeller design) การผสมของแก๊ส (gas mixing) และ รูปร่างของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor configuration) การผสมในอาหารเหลวมีความสำคัญเนื่องจากออกซิเจนที่ละลายจะถูกส่งไปยังเซลล์และเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงอย่างรวดเร็ว โดยปกติแล้วความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายเหลืออยู่ต้องสูงกว่าระดับจุดวิกฤต DO_2 (critical DO_2 level) ตลอดเวลาสำหรับการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเซลล์ (Leathers et al., 1995; Sajc et al., 2000) ความเข้มข้นของค่าการละลายออกซิเจนที่จุดวิกฤต (the critical dissolved oxygen concentration; DO_{2crit}) สามารถอธิบายได้ว่าเป็นความเข้มข้นการละลายออกซิเจนที่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของอัตราการดูดซึมออกซิเจนที่เฉพาะเจาะจง (specific oxygen uptake rate) ที่วัดได้ การที่ระดับ DO_2 ต่ำกว่า DO_{2crit} แสดงว่าเซลล์มีระดับพลังงาน (ATP) ลดลง มีผลโดยตรงต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์และสัณฐาน (morphology) (Leathers et al., 1995) ในทางปฏิบัติค่า DO_{2crit} มีความสำคัญเพราะถูกนำไปใช้สำหรับออกแบบระบบการทำงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เหมาะสมเพื่อที่ให้แน่ใจว่าสภาวะที่จำกัดออกซิเจนนั้นไม่มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมเมตาบอลิซึมของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการจัดหาออกซิเจนให้เพียงพอ (สูงกว่า DO_{2crit}) เป็นความกังวลหลักสำหรับการขยายขนาดถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

2.3.2 การผสม (Mixing)

การผสมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญเนื่องจากการผสมที่ดีจะมีผลทำให้สารอาหารกระจายตัวไปยังเนื้อเยื่อหรือเซลล์ได้อย่างเท่าเทียมกัน (Leathers et al., 1995) ซึ่งการผสมนั้นจะอาศัย sparing หรือการกวนด้วยแรงกล (mechanical agitation) หรือเกิดจากการทำงานร่วมกันของทั้ง 2 อย่าง

แต่ความแรงของการเคลื่อนที่ของของเหลวจากการผสม (mixing) ควรมีขนาดเล็กพอที่จะไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อ แต่เพียงพอในกระตุ้นการทำงานของเซลล์ อย่างไรก็ตามมีงานเพียงเล็กน้อยที่ได้รับผลกระทบจากแรงเคลื่อนที่ของของเหลวเกี่ยวกับวิศวกรรมเนื้อเยื่อพืช ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้านี้ได้เน้นไปศึกษาพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์และการสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งยังขาดความเข้าใจที่ดีในผลกระทบของสภาวะแรงของการเคลื่อนที่ของของเหลวต่อโครงสร้างและองค์ประกอบของเนื้อเยื่อพืช

2.3.3 ค่าพีเอช

การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด – ด่างหรือ pH ในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการรายงานจากผู้เขียนหลายคน (Dussert et al., 1995; Hilton & Wilson, 1995; Lian, Chakrabarty, & Paek, 2002a; Yu, Joyce, Cameron, & McCown, 2000b) ถึงการเปลี่ยนแปลง ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความสมดุลระหว่างแอมโมเนียมในอาหารเหลว (Escalona, Samson, Borroto, & Desjardins, 2003; Hilton & Wilson, 1995; Lian et al., 2002a) ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในการเพาะเลี้ยงที่ pH 5.0 ต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน (embryogenesis) ถูกพบโดย (Lazzeri, Hildebrand, & Collins, 1987) การบันทึกความผันผวนของค่าพารามิเตอร์เช่น pH ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ควบคุมโดยคอมพิวเตอร์จะช่วยเพิ่มความสามารถในการทำซ้ำของกระบวนการทางชีวภาพที่ซับซ้อน

2.3.4 สารอาหาร (Nutrient)

สารอาหารที่จะนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชเป็นปัจจัยเคมีหลักที่สำคัญในขยายขนาดการเพาะเลี้ยง สำหรับการเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ (large – scale culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในหลายด้านมีบทบาทสำคัญ ซึ่งการวัดสารอาหารของแต่ละช่วงเวลาจะทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการดูดซึมสารอาหาร การผลิตชีวมวลและสารทุติยภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งการศึกษาการวิเคราะห์รายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารต่างๆในระหว่างการเจริญเติบโตของ Lilium bulblet ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ BTBB พบว่า แอมโมเนียม (ammonium) ไนเตรท (nitrate) และฟอสเฟต (phosphate) ถูกใช้หมดในอาหาร ในขณะที่หลังจากเพาะเลี้ยงไปแล้ว 16 สัปดาห์ จำนวนของ K^+, Mg^+, Ca_2^+, Na^+ และ Cl ยังคงมีอยู่ในอาหาร แต่ปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดการเจริญเติบโตคือ น้ำตาล ซึ่งมีผลมากกว่าสารอาหารหลัก (main nutrient) (Lian, Chakrabarty, & Paek, 2002b)

2.4 การประยุกต์ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงอวัยวะพืช

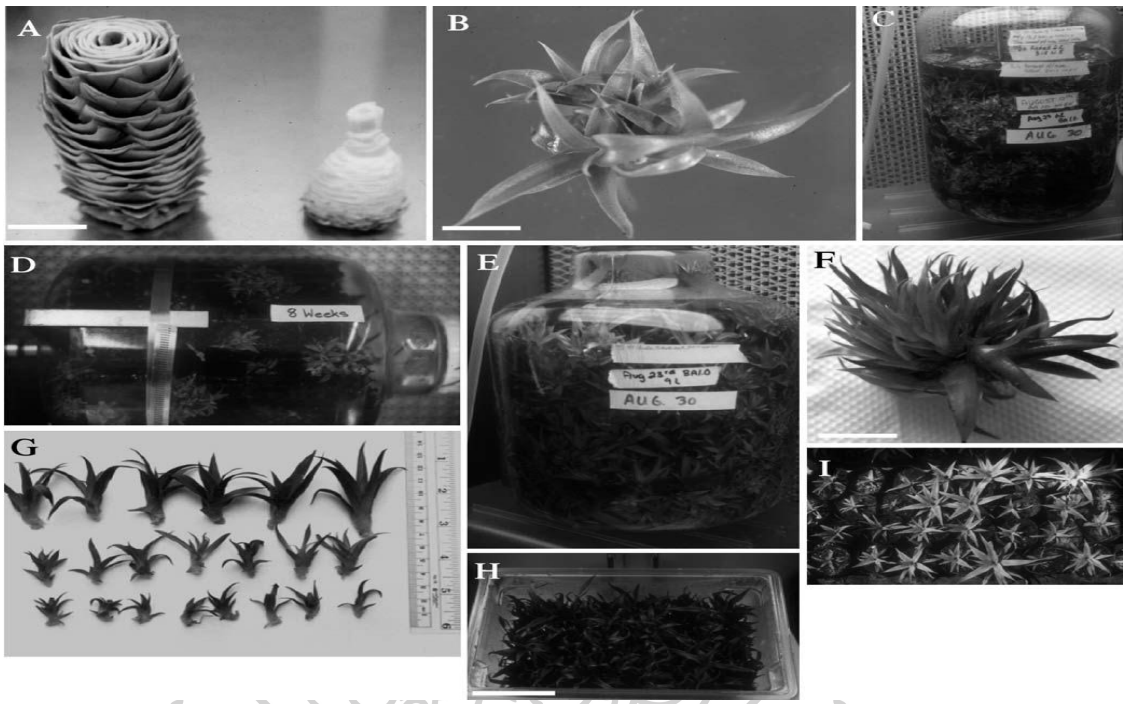
ปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชในหลอดทดลอง (*in vitro* propagation) หรือ ระบบขยายพันธุ์พืชด้วยชิ้นส่วนขนาดจิ๋ว (micropropagation system) มาใช้อย่างกว้างขวางในการขยายพันธุ์พืชปลอดโรคในเชิงพาณิชย์เพื่อให้ได้ต้นพืชจำนวนมาก (mass production)ในระยะเวลาที่จำกัด ได้ต้นพืชที่แข็งแรงปลอดโรค ซึ่งสามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล นอกจากนั้นสามารถที่จะชักนำให้ชิ้นพืช (explant บางชนิดที่พักตัว (dormancy) หรือแก่ (adult) ไม่ค่อยตื่นตัว (inactive) กลับมาตื่นตัว (rejuvenate) และพัฒนาต่อไปได้

การขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลองโดยอาศัยระบบ micropropagation สามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิคต่างๆของการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช เช่น การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ culture) ซึ่งเป็นการนำเอาอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ปลายยอด (shoot tip) ปลายราก (root tip) ข้อ (node) ปล้อง (internode) ตาข้าง (leteral bud) แผ่นใบ (leaf blade) ก้านใบ (leaf petiole) อับเรณู (anther) และเมล็ด (seed) โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristem culture) นับว่ามีความสำคัญและมีบทบาทต่อการผลิตพืชปลอดไวรัสด้วยการเพาะเลี้ยงตาพิเศษ (axillary bud) ที่อยู่ตามข้อ (nodal segment) การเพาะเลี้ยงปลายยอด (shoot tip culture) และการเพาะเลี้ยงแผ่นใบ (leaf blade) ซึ่งสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเหล่านี้พัฒนาไปเป็นต้นจำนวนมากได้ (multiple shoots) ได้โดยตรง หรือทางอ้อม (indirect formation) โดยการชักนำผ่านแคลลัส (callus) (บุษราภรณ์ งามปัญญา, 2548) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในขวดเขย่า (shake flask) มีอัตราการเจริญเติบโตและการถ่ายเทมวลที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหารวุ้น แต่มีข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในปริมาณมาก จึงมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอาศัยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) เพื่อขยายส่วนการเพาะเลี้ยงให้ได้ผลผลิตมากขึ้น

2.4.1 การเพิ่มจำนวนและการเจริญของต้นสับปะรด

เทคนิคการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืช (organ culture) เป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้สร้างต้นกล้าขนาดเล็กในหลอดทดลอง ซึ่งไม่เพียงแต่เพิ่มจำนวนการเกิดต้นแต่ยังสามารถช่วยให้ได้ต้นพืชที่ปลอดไวรัส (Moore, Dewald, & Evans, 1992) มีรายงานว่ามีการเพิ่มจำนวนต้นของสับปะรดโดยใช้ตาพิเศษเป็นครั้งแรก (Mapes, 1973) มีงานวิจัยมากมายที่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มจำนวนต้นสับปะรดโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (Akin-Idowu et al., 2014; Be & Debergh, 2006) แต่การเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเป็นวิธีที่ไม่ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนต้นสับปะรดให้ได้ในปริมาณมาก ดังนั้นจึงได้มีการขยายพันธุ์พืช (micropropagation) ในอาหารเหลวซึ่งมีข้อดี เช่น มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าในอาหารวุ้น (Welander, Persson, Asp, & Zhua, 2014) ง่ายต่อการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและ

การเพิ่มจำนวนต้น ต้นทุนต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงแบบวิธีดั้งเดิมและยังสามารถผลิตต้นพืชได้ในปริมาณมาก (ภาพที่ 13) (Debergh, 1982; Firoozabady & Gutterson, 2003) การเพาะเลี้ยงสับปะรดที่มีการแช่ในอาหารเหลวตลอดเวลาจะทำให้พืชเกิดการฉ่ำน้ำ (Escalona et al., 2003) ซึ่งถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ออกแบบโดยอาศัยหลักการทำงานของระบบการแช่ชั่วคราว (Temporary immersion system) ถูกนำมาใช้สำหรับเพิ่มจำนวนและการเจริญของต้นสับปะรด (Escalona et al., 2003; Welander et al., 2014)



ภาพที่ 13 การเพิ่มจำนวนต้นสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่างชนิด

A Crown of pineapple (left and the stem of crown (right) used for crown-tip meristem isolation. Bar 2.5 cm. B A shoot cluster produced 8 weeks following crown-tip meristem isolation. Bar: 7 mm. C Air-lift bioreactor after a 10 week culture of 200 shoot clusters. D Rotating bioreactor after an 8 week culture of 30 shoot clusters. E Periodic immersion bioreactor (PIB) after an 8-week culture of 150 shoot clusters. F A shoot cluster produced by PIB. Bar: 1 cm. G Shoots of different sizes (2– 6 cm) separated from a cluster. H Shoots in a tray containingrooting medium. Bar: 8 cm). I Plants after transfer to soil ที่มา (Firoozabady & Gutterson, 2003)

2.4.2 การชักนำให้เกิดอวัยวะพิเศษ

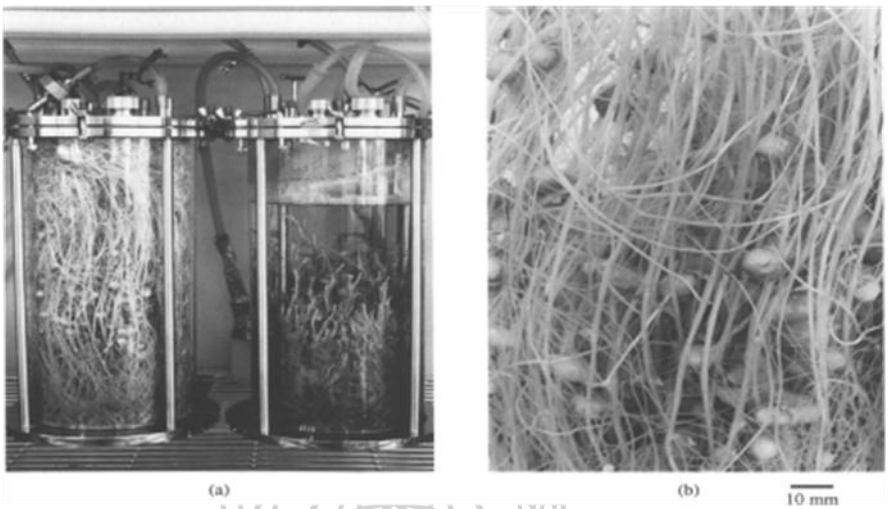
การชักนำให้เกิดอวัยวะพิเศษเช่น การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กในหลอดทดลอง (*in vitro* microtuber) ถูกอธิบายครั้งแรกกับมันฝรั่ง (Donnelly, Coleman, & Coleman, 2003) หัวขนาดเล็กในหลอดทดลองนับว่าเป็นพืชวัตถุดิบที่ดีสำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรม (germplasm conservation) ของพืชที่สร้างหัวเนื่องจากปลอดโรคและสามารถเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กในหลอดทดลองนั้นสามารถทำได้โดยอาศัยชิ้นพืช (explant) 2 ชนิด ได้แก่ ชิ้นส่วนที่ตัดจากลำต้นจากพืชที่เพาะปลูกหรือหัวที่แตกหน่อ (sprouting tubers) และส่วนของข้อลำต้นที่ได้จากต้นกล้าขนาดเล็กในหลอดทดลอง ซึ่งชิ้นพืชที่ได้จากส่วนนี้จะปลอดไวรัสและมีการตอบสนองต่อการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กที่สม่ำเสมอและสามารถทำซ้ำได้ (Gamburg, Vysotskaya, & Gamanets, 1999) อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กในหลอดทดลอง (microtuber) และปรับองค์ประกอบอาหารเพื่อให้ได้คุณภาพและจำนวนหัวขนาดเล็กมากขึ้น เช่น ใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง เติมสารสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Estrada, Tovar, & Dodds, 1986; Harvey, Crothers, Evans, & Selby, 1991; Leclerc, Donnelly, & Seabrook, 1994) การปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง เช่น ความเข้มแสง อุณหภูมิ (Seabrook, Coleman, & Levy, 1993; Slimmon, Machado, & Coffin, 1989) และการใช้อาหารเหลวบนขวดเขย่าหรือใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) (Akita & Takayama, 1994; Avila, Pereyra, & Argüello, 1996; M. Ziv & Shemesh, 1996) ถูกนำมาใช้เพิ่มจำนวนในการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลอง ซึ่งมันฝรั่งถูกชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กใน jar bioreactor โดยมีการควบคุมระดับผิวของอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous) พบว่าหัวขนาดเล็กของมันฝรั่งจะเกิดขึ้นที่ระดับผิวของอาหารเหลว (surface medium) (Akita & Takayama, 1994) ดังภาพที่ภาพที่ 14 มีการนำเอาชิ้นส่วนของข้อลำต้นมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม ancymidol (23.4 ไมโครโมลาร์) ซึ่งจะถูกพัฒนาไปเป็น bud clustersในขวดบนเครื่องเขย่าหรือถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นจะพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กหลังจากย้ายไปเลี้ยงในอาหารสำหรับชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็ก (M. Ziv & Shemesh, 1996)

การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กในหลอดทดลองของมันฝรั่งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงแบบ 2 ขั้นตอน (two-step culture method) ขั้นแรกเป็นการชักนำให้ชิ้นพืชของมันฝรั่งมีการเจริญเติบโตเป็นต้น และขั้นที่สองจะเป็นการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็ก(microtuber) ซึ่งจะทำการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นกับในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ต่อเนื่อง (continuous immersion) ที่มีตาข่ายและไม่มีตาข่ายรองรับชิ้นพืช และมีระบบแช่ชั่วคราว (Temporary immersion system: TIS) โดยใช้ ebb and flood พบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ต่อเนื่องที่มีตาข่ายสามารถ

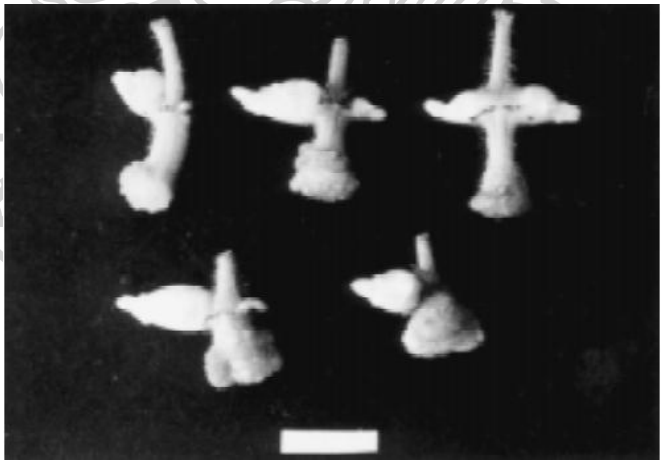
นำไปใช้ชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กได้ (Piao, Chakrabarty, Hahn, & Paek, 2003) การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของมันฝรั่งใช้ระบบแช่ชั่วคราว (Temporary immersion system: TIS) ขนาด 4 ลิตร พบว่า ต้นมันฝรั่งความยาวเพิ่มขึ้น 3 เท่าและข้อลำต้นสามารถชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กได้ทั้งหมด (Jimenez et al., 1999) ซึ่งนอกจากนั้นผลของจำนวนชิ้นพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง (inoculum density) ระยะเวลาแช่ของชิ้นพืชในอาหาร (immersion time) สำหรับชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของมันฝรั่งใน TIS พบว่า จำนวนชิ้นพืชที่ใช้ 60 และ 90 ชิ้น สามารถชักนำเกิดหัวในจำนวนที่ไม่แตกต่างกัน แต่การใช้จำนวนชิ้นพืช 60 ชิ้น ให้น้ำหนักสดของหัวที่ชักนำได้มากกว่าใช้ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงเริ่มต้น 90 ชิ้น และระยะเวลา 2 นาทีสำหรับให้ชิ้นพืชในการแช่ในอาหารเหลว สามารถชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กที่มีขนาดและคุณภาพที่ดีกว่าการใช้ระยะเวลาที่ในอาหารเหลว 30 นาที (Pérez-Alonso et al., 2007)

เมื่อไม่นานนี้มีการนำระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร (nutrient spray bioreactor, NSB) ภาพที่ 12 ใช้ในการชักนำการเกิดหัวขนาดเล็กของมันฝรั่ง โดยได้เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม ได้แก่ อาหารเหลวและอาหารกึ่งแข็ง ซึ่งพบว่าระบบ NSB สามารถชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของมันฝรั่งได้และมีจำนวนและน้ำหนักหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้สูงกว่าระบบอื่น (Rahman et al., 2015)

แก่นตะวัน หรือ Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) เป็นพืชที่ขยายพันธุ์โดยอาศัยหัว (tubers) ลักษณะหัวแก่นตะวันคล้ายหัวของขิงหรือข่า เปลือกสีน้ำตาลอ่อน โดยแก่นตะวันมีการสะสมอาหารในรูปคาร์โบไฮเดรตที่หัว (tubers) ทำให้หัวแก่นตะวันเป็นอวัยวะพืชที่มีปริมาณอินนูลินสะสมอยู่มากจึงเป็นพืชที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก (Alla et al., 2014) มีงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการชักนำหัวแก่นตะวัน (ภาพที่ 15 ด้วยการนำเอาข้อลำต้นแก่นตะวันมาเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร 1/2 MS ที่มี 8% น้ำตาลซูโครส 0.5 mg/l BA ในที่มืดที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส (Gamburg et al., 1999) ซึ่งความต้องสำหรับการชักนำให้เกิดหัวในแก่นตะวันและมันฝรั่งมีความคล้ายคลึงกัน (Dodds, D.Silva-Rodriguez, & Tovar, 1992) ปัจจัยของระยะเวลาการให้แสงและอุณหภูมิมีผลต่อการสะสมอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กในหลอดทดลอง (*in vitro* microtuber) ของแก่นตะวัน (Polsa & Ngampanya, 2015) (ภาพที่ 16) และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้มีจำนวนเกิดหัวขนาดเล็กและมีน้ำหนักสดมากกว่าน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นอื่นๆ (Homsuwan & Ngampanya, 2016) (ภาพที่ 17)



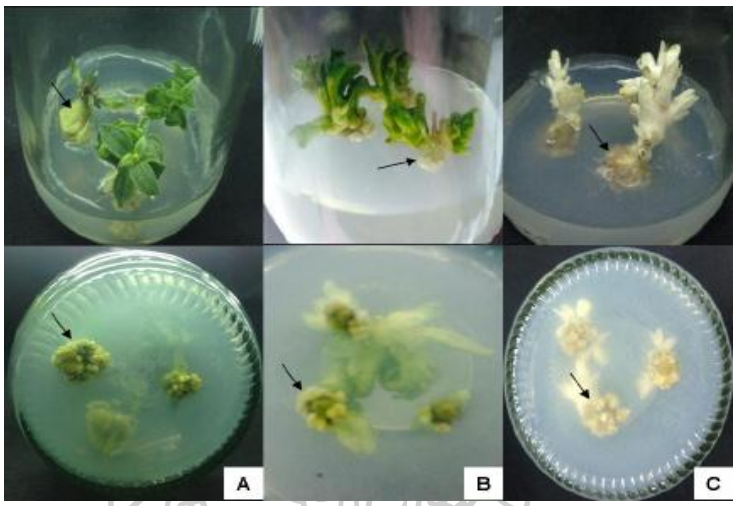
ภาพที่ 14 หัวขนาดเล็กของมันฝรั่งเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องด้วยวิธีควบคุมระดับผิวของอาหาร (a) Comparsion with the semi-continuous medium surface level control culture (left) and the control culture (fight). (b) Tuberization in the jar fermentor. (Bar indicates 10 mm)
ที่มา (Akita & Takayama, 1994)



ภาพที่ 15 ข้อลำต้นแก่นตะวันที่ถูกชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็ก

ที่มา (Gamburg et al., 1999)

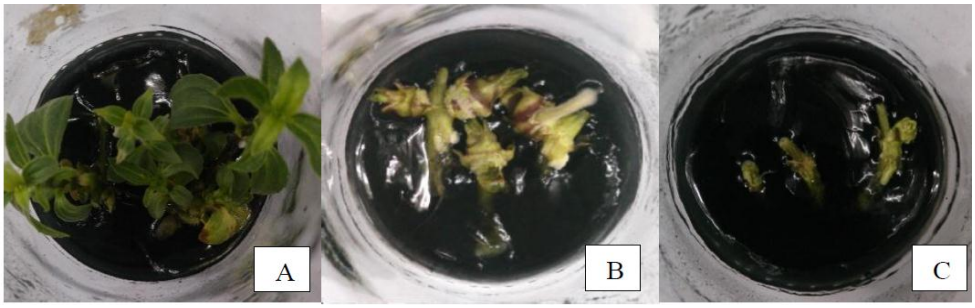
งานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันนั้นมีรายงานให้เห็นเพียงการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันบนอาหารวุ้น ซึ่งยังไม่พบงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในอาหารเหลวและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ



ภาพที่ 16 หัวแก่นตะวันขนาดเล็กที่ชักนำได้ในหลอดทดลองภายที่มีการให้แสงสว่างจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ที่ระยะเวลาต่างกัน

(A) long day photoperiod (B) short day photoperiod (C) darkness for 45 days. Black arrows depicted induced microtubers. ที่มา (Polsa & Ngampanya, 2015)

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 17 หัวแก่นตะวันขนาดเล็กที่ชักนำได้บนอาหารสูตรสำหรับชักนำให้เกิดหัวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสแตกต่างกัน

(A) 60 g/l (B) 80 g/l (C) 120 g/l under long day photoperiod (16h light/ 8h dark) for 45 days.

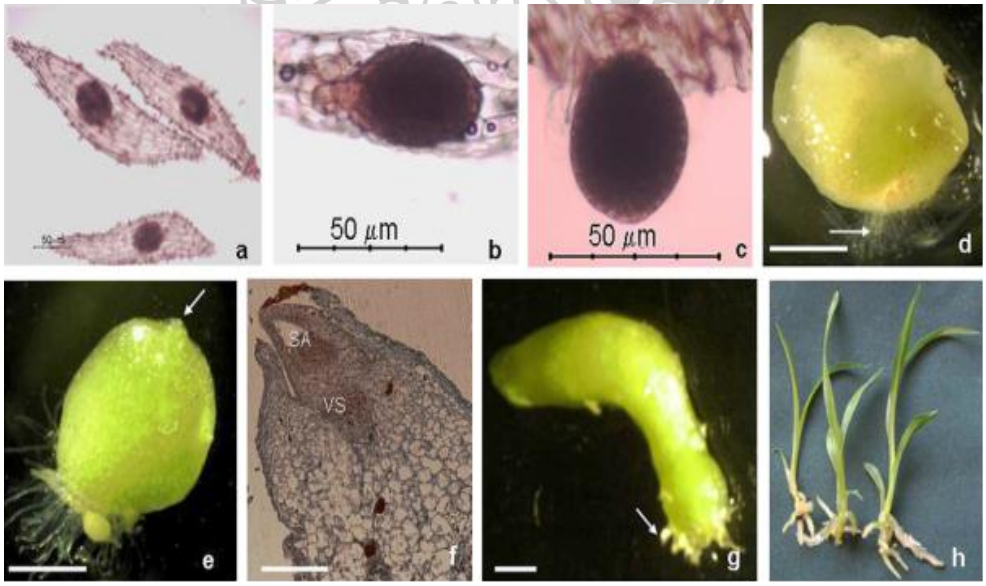
ที่มา (Homsuwan & Ngampanya, 2016)

2.4.3 การพัฒนาของโปรโตคอร์มไปเป็นต้น ราก และใบของกล้วยไม้

การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยการเพาะเมล็ด (seed propagation) เป็นวิธีที่ทำได้ยากในธรรมชาติ เนื่องจากกล้วยไม้ไม่มีอาหารสะสมภายในเมล็ด ดังนั้นการนำเอาเอ็มบริโอ (embryo) ซึ่งเป็นอวัยวะที่พัฒนาจากไซโกต (zygote) โดยเกิดจากการผสมกันระหว่างสเปิร์ม (sperm) กับไข่ (egg) ที่เกิดขึ้นตามขบวนการทางธรรมชาติมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเรียกว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo culture) อาจเป็นการนำเอาเมล็ดทั้งเมล็ดหรือตัดแยกเอาเฉพาะบางส่วนของเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยง การประสบความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเมล็ดกล้วยไม้ในอาหารสังเคราะห์ครั้งแรกโดยใช้สูตรอาหาร Knudson เป็นอาหารสูตรแรกที่ใช้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้ (Knudson, 1946) แต่พบว่าสูตรอาหาร MS นิยมใช้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายมากที่สุด (Silva, Cardoso, Dobra´nszki, & Zeng, 2015)

การพัฒนาของของเอ็มบริโอจากไข่ที่ได้รับการผสม (zygote) จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งไซโกตจะแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ที่มีขนาดไม่เท่ากัน เซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่าเรียก apical cell ซึ่งอยู่ด้านบน และเซลล์ที่มีขนาดใหญ่เรียกว่า basal cell อยู่ด้านล่าง โดยส่วนของ apical cell จะถูกพัฒนาไปเป็น embryo และมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งมีลักษณะเป็นก้อนกลม เรียกระยะนี้ว่า globular shape จากนั้นจะพัฒนาไปเป็นรูปหัวใจ (heart shape) จนกระทั่งพัฒนาเจริญเต็มที่เป็นรูปร่างเหมือนตอร์ปิโด (torpedo shape) ซึ่งจะมี suspensor (เกิดการ basal cell แบ่งตัวด้านขนาน) ทำหน้าที่ยึด embryo ให้ฝังอยู่ใน nucellus และช่วยในการดูดซึมอาหารให้ embryo โดยเซลล์ที่อยู่ระหว่างรอยต่อของ embryo และ suspensor เรียกว่า hypophysis cell จะทำหน้าที่เป็นจุดกำเนิดของราก (radical)

การศึกษารูปร่างของเอ็มบริโอ (morphogenesis of embryos) และการพัฒนาไปเป็นต้นของเมล็ดกล้วยไม้ *Cymbidium giganteum* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสังเคราะห์ ดังภาพที่ 18 จะเห็นได้ว่าเอ็มบริโอมีรูปร่างไม่แตกต่างกัน โดยตรงกลางมีรูปร่างกลมรี (oval-shape) เปลือกนอกมีลักษณะโปร่งใส มีลักษณะเป็นตาข่ายและเชื่อมต่อกันซึ่งประกอบด้วยเซลล์ที่ไม่มี protoplasts (ภาพที่ 18a) ซึ่งจะเห็นไมโครไพล์ (micropyle) เป็นช่องเปิดเล็กๆที่ผนังออวุล และฐานออวุล (chalaza) ได้ชัดเจน (ภาพที่ 18b และ18c) สำหรับจุดเริ่มต้นของการงอกนั้นเกิดจากการดูดซึมสารอาหารและมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีลักษณะเป็นทรงก้อนทรงกลม ทำให้เกิดการเจริญเติบโต ซึ่งจะกลายมาเป็นโปรโตคอร์มสีเขียวภายในระยะเวลา 3-4 สัปดาห์ (ภาพที่ 18d) ส่วนบนของโปรโตคอร์มจะเป็นจุดกำเนิดของใบ (ภาพที่ 18e และ f) โปรโตคอร์มของ *Cymbidium giganteum* มีลักษณะเป็นทรงกลมรีและสมมาตรตามรัศมี (radially symmetrical) และค่อยๆเปลี่ยนไปมีรูปทรงที่ยาว (ภาพที่ 18g) จากนั้นเกิดการพัฒนาไปเป็นต้น (ภาพที่ 18 h) (Hossain, Sharma, Teixeira da Silva, & Pathak, 2010)



ภาพที่ 18 ระยะการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Cymbidium giganteum*

(a) A mature seed. (b) Seeds after 15 days of culture. (c) Embryo after 30 days of culture. (d) Spherule with hairs (arrow). (e) Young protocorm with a growth appendicle (arrow). (Tanaka et al.) LS of protocorm showing shoot apex (Sajc et al.) and development of vascular strand (Scheidt et al.). (g) A protocorm with root initial (arrow) and (h) Complete seedlings. (Bar = 1 mm)

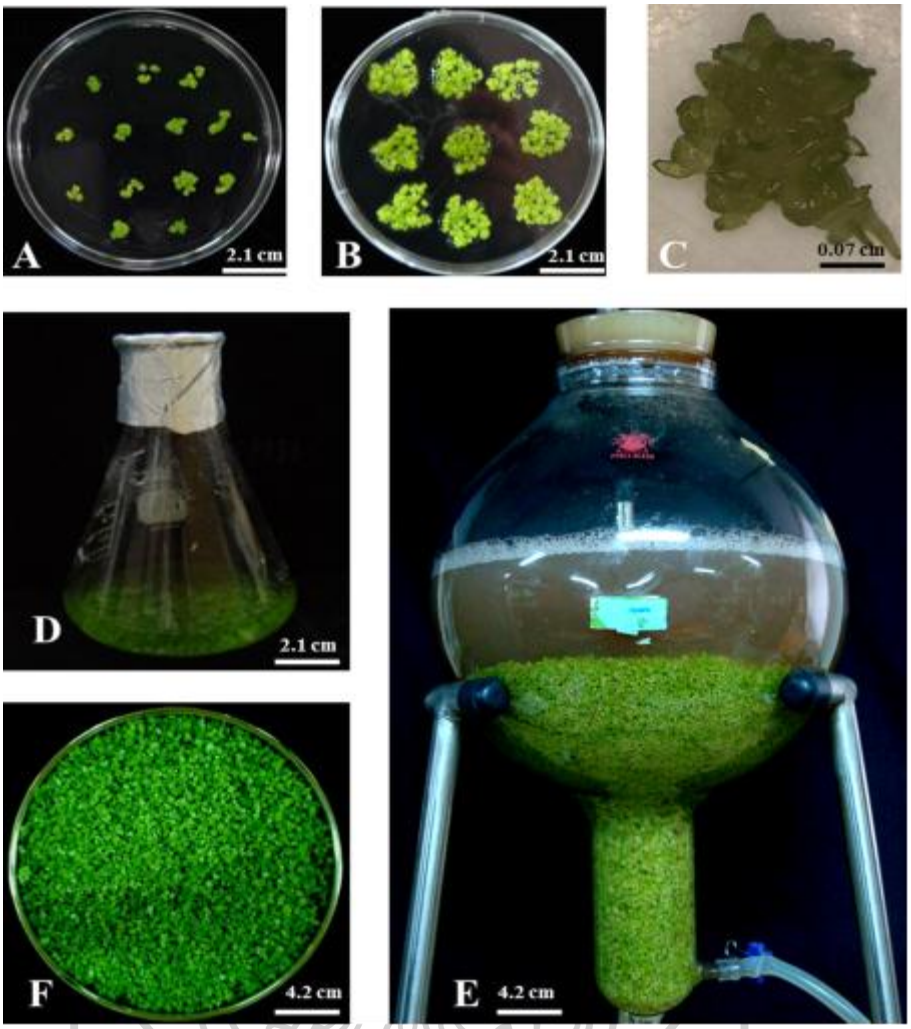
ที่มา (Hossain et al., 2010)

นอกจากนั้นมียังมีการนำเอาอวัยวะกล้วยไม้ส่วนอื่นมาเพาะเลี้ยง เช่น ตาข้าง ตายอด ใบ เพื่อขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนกล้วยไม้ให้ได้ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว ตารางที่ 3 และมีศึกษาการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้โดยอาศัยถังปฏิกรณ์ชีวภาพมาเป็นเครื่องมือในการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงให้ได้จำนวนต้นกล้วยไม้เพิ่มมากขึ้นดังตารางที่ 4 โดยประสบความสำเร็จการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สายพันธุ์ *Dendrobrium candidrum* ในถังปฏิกรณ์ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Balloon type bubble ปริมาตร 3 ลิตร ภาพที่19 ซึ่งพบว่ากล้วยไม้มีการสะสมมวลชีวภาพและสารทุติยภูมิมากขึ้น ซึ่งเป็นผลดีที่จะนำไปพัฒนาขยายระดับการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในทางการค้า (Cui et al., 2014)

นอกจากนั้นการเพาะเลี้ยงยอดกล้วยไม้โดยอาศัยถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบระบบแช่ชั่วคราว ยังเป็นการช่วยลดปัญหาชิ้นพืชฉ่ำน้ำจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและพบว่าพืชมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า (Annisa Ratna Nurillah, Esyanti, & Manurung, 2014)

ตารางที่ 3 การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ดัดแปลงจาก *(Silva et al., 2015))*

สายพันธุ์กล้วยไม้	ชิ้นพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง	สูตรอาหาร
D. phalaenopsis	ปลายยอด	VW
D. chrysanthum	Pseudobulb segment	MS
D.'Joannie Ostenhault'	Shoot meristems	VW
D. wardianum Warner	Shoot apices	MS
D. aphyllum	Nodal segment	MS
D. nobile	Nodal segment	MS
D. crumenatum Sw.	Callus	VW
D. macrostachyum	Node	MS
D. formosum	Leaf sections	MS
D. 'Sonia'	Shoot tip	MS



ภาพที่ 19 การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มของ *Dendrobrium candidrum*

(A) Protocorm induction from stem segment cultures on half strength MS gelled medium supplemented with 30 g/l sucrose; 0.5 mg/l NAA and 5 mg/l BA. (B) Protocorm proliferation half strength MS medium containing 4 mg/l BA and 0.2 mg/1 NAA. (C) Protocorm mass harvested from cultures. (D) Protocorm suspension culture in shake flask in MS liquid medium supplemented 30 g/l sucrose. (E) Protocorm suspension culture in 3 l capacity balloon type bubble bioreactors containing 2 l of half strength MS medium supplemented with 0.5 mg/l NAA, 2.5% (w/v) sucrose, 150 mg/l NaH_2PO_4, 1% (v/v) banana homogenate. (Tanaka et al.) Protocorm biomass harvested from bioreactor cultures. ที่มา (Cui et al., 2014)

ตารางที่ 4 การขยายพันธุ์กล้วยไม้สายพันธุ์ต่างๆโดยอาศัยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สายพันธุ์กล้วยไม้	ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	ปริมาตรถัง	ชิ้นพืชที่ใช้เพาะเลี้ยง	อ้างอิง
Phalaenopsis	Airlift Balloon bioreactor	5 ลิตร	Protocorm-Like bodies จากใบ	(Young, Murthy, & Yoeup, 2000)
Oncidium	Balloon Type bubble (BTBB)	5 ลิตร	Protocorm-Like bodies จากปลายยอด	(Yang, Piao, Sun, & Lian, 2010)
Dendrobium'ZahraFR 62	Bioreactor	3 ลิตร	Protocorm-Like bodies (shoot)	(Winarto, Rachmawati, Santi, & Teixeira da Silva, 2013)
Dendrobium candidum	Balloon Type bubble (BTBB)	3 ลิตร	Protocorm-Like bodies จากข้อ	(Cui et al., 2014)
Vanda Tricolor	Temporary Immersion (TIS)	0.25 ลิตร	ยอด (shoot)	(Annisa Ratna Nurillah et al., 2014)
Dendrobium candidum	Balloon Type airlift bioreactor	3 ลิตร	Protocorm-Like bodies	(Li, Shao, Park, Piao, & Lian, 2014)
Vanda Tricolor	Temporary Immersion (TIS)	0.25 ลิตร	ยอด (shoot)	(Esyanti, 2016)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Agar bacteriological	TMMEDIA
Ammonium nitrate	FLUKA
6-benzylaminopurine (BA)	SIGMA
Boric acid	MERCK
Calcium chloride dihydrate	RIED-DE-HAEN
Chlorocholine chloride (CCC)	TCI
Cobalt (II) chloride hexahydrate	ANALYTICAL UNIVAR REAGENT
Copper (II) sulfate pentahydrate	ANALYTICAL UNIVAR REAGENT
2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)	GIBCOBRL
3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)	SIGMA
Ethanol	ALCOHOL-A
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	FLUKA
Ferrous sulfate haptahydrate	SIGMA
Glucose	HIMEDIA
Glycine	RCILABSCAN
Hydrochloric acid	LAB-SCAN
Magnesium sulfate heptahydrate	RIEDEL-DE- HAEN
Manganese sulfate	FLUKA
Myo-inosital	SIGMA
Nicotinic acid	SIGMA
Phenol	MERK
Potassium dihydrogen phosphate	RCILABSCAN
Potassium iodide	CARLOERBA
Potassium nitrate	RIEDEL-DE- HAEN
Potassium sodium tartrate	DAEJUNG

Pyridoxine-HCl	SIGMA
Sodium hydroxide	RCILABSCAN
Sodium hypochlorite (Clorox) 99.9%	CLOROX COMPANY
Sodium molybdate dihydrate	CARLOERBA
Sucrose	MIT
Sulfuric acid 95.5%	RCILABSCAN
Thiamine-HCl	SIGMA
Tween 20	SIGMA

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์	**บริษัทผู้ผลิต**
Airflow meter	KOFLOC
Air pump	MAGIG 6600
Autoclave	TOMY SX-700,TOMY SS-325
Auto pipette	BIOHIT, DENVILLE
Balance	SARTORIUS BASIC BA20015
Conductivity meter	METTLER TOLEDO
Cuvette	STARNA
Forcep	MIRA STAINLESS
Hot air oven	BINDER
Laboratory bottle	DURAN
Membrane filter	SARTORIUS STEDIM
Microplate reader	TECAN
Microwave	TUBORA TRX248G
Peristaltic pump	MASTERFLEX
Petri dish	HYCON
pH meter	ULTRA BASIC
Rotary shaker	SUPER LINE : SP-KR
Spectrophotometer	THERMO SPECTRONIC
Silicone Tube	DURA

Tarsons Reusable Bottle Top Filter Holder	LABLEADER
Vacuum pump	ROCKER

3.3 พืชทดลอง

สับปะรด (*Ananas comosus* var.‘Pattavia’)

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*)

แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำและมีหลักการทำงานที่ควบคุมง่ายสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นสับปะรด โปรโตคอร์มกล้วยไม้ และลำต้นแก่นตะวัน

1) สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2) กำหนดระบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงต้นสับปะรด โปรโตคอร์มกล้วยไม้ และลำต้นแก่นตะวันได้แก่

2.1) ระบบที่มีการพ่นให้อากาศอย่างง่าย (Simple aeration bioreactor, SAB)

2.2) ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (Temporary immersion system, TIS)

2.3) ระบบที่มีการพ่นฝอยอาหารเหลวไปยังชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยง (Nutrient spray bioreactor, NSB)

3) กำหนดขนาดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับใช้ในงานวิจัย

4) ออกแบบลักษณะรูปทรงของถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

5) จัดหาอุปกรณ์สำหรับจัดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

6) สั่งผลิตภาชนะแก้ว (vessel) และฝาสแตนเลสของถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามรูปแบบที่ได้ออกแบบไว้

3.4.2 จัดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำ

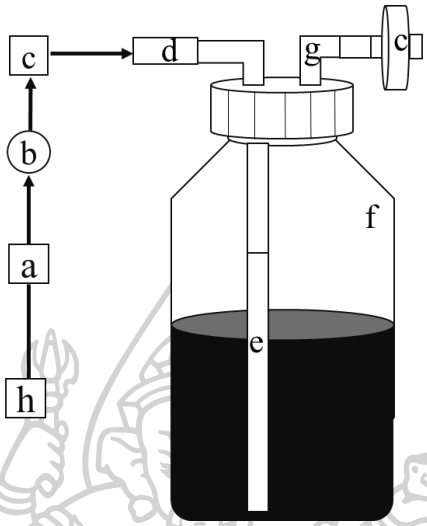
3.4.2.1) ระบบที่มีการพ่นให้อากาศอย่างง่าย (Simple aeration bioreactor, SAB)

1) นำขวดแก้วสำหรับเป็นภาชนะรองรับอาหารเหลวต่อเข้ากับฝาที่มีท่อสแตนเลสสำหรับให้อากาศเข้าสู่ภายในระบบอาหารเหลวและมีท่อสแตนเลสสำหรับอากาศขาออก

2) นำสายยางซิลิโคนต่อเข้ากับตัวกรองอากาศปลายสายท่อซิลิโคนจะถูกต่อเข้ากับท่อสแตนเลสเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร โดยอากาศจะผ่านตัวกรองอากาศที่ปลอดเชื้อสำหรับพ่นให้อากาศเข้าสู่ภายในระบบอาหารเหลวจากปั๊มอากาศ (air pump) ขนาด 3 วัตต์ และต่อตัวกรองอากาศอีกอันเข้ากับท่อสแตนเลสสำหรับอากาศขาออก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร)

3) ระบบอาหารเหลวที่มีการพ่นให้อากาศอย่างง่ายถูกสร้างขึ้นดังภาพที่ 20 ซึ่งชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงจะถูกแช่ในอาหารเหลวตลอดเวลาในภาชนะแก้วสำหรับบรรจุอาหารเหลว โดยมีอัตราการไหลของอากาศ 2-5 VVM

4) นำถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบอาหารเหลวที่มีการพ่นให้อากาศอย่างง่ายดังกล่าวไปวางในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง



ภาพที่ 20 แผนผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB)
a) ปั๊มอากาศ b) Air flow meter c) ตัวกรองอากาศ d) ท่ออากาศขาเข้า e) สายยางซิลิโคน f) ภาชนะแก้วสำหรับบรรจุอาหารเหลว g) ท่ออากาศขาออก h) เครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ

3.4.2.2 ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (Temporary immersion system bioreactor, TIS)

1) นำเอาชุดกรอง (reusable bottle top filter) ขนาด 47 มิลลิเมตร ปริมาตรความจุ 500 มิลลิลิตรประกอบไปด้วย 3 ส่วน ได้แก่ ฝาบน ภาชนะ ฐานตะแกรง เป็นส่วนบนสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

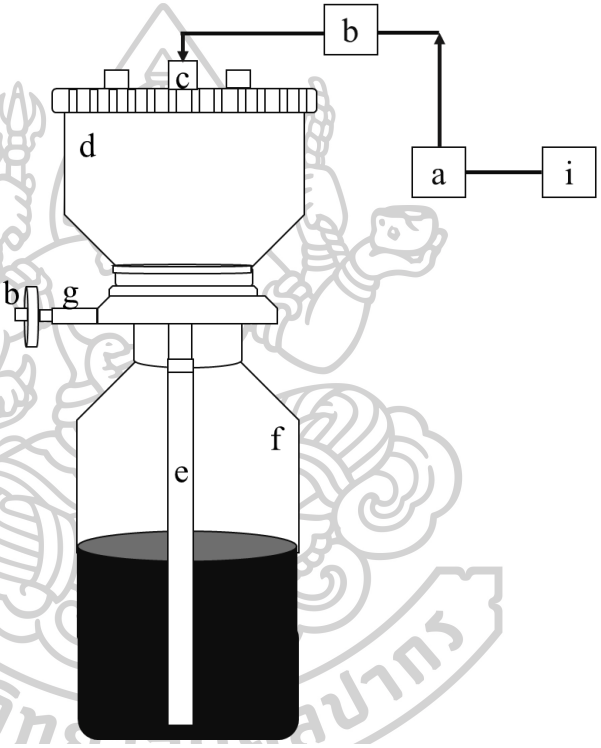
2) นำเอาท่อซิลิโคน (silicone tube) ขนาด 7×10 มิลลิเมตร ความยาวของท่อซิลิโคน 25 เซนติเมตร ต่อเข้ากับปลายด้านล่างของฐานตะแกรงของชุดกรอง (reusable bottle top filter)

3) นำเอาท่อซิลิโคน (silicone tube) ขนาด 6×9 มิลลิเมตร จำนวน 2 ท่อ ที่มีความยาว 40 เซนติเมตร และ 60 เซนติเมตร ต่อเข้ากับตัวกรองอากาศโดยปลายสายของท่อจะต่อกับฝาบนของภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อีกปลายสายของท่อซิลิโคนสำหรับเชื่อมต่อกับปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)

4) นำภาชนะส่วนบนสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและภาชนะแก้วส่วนล่างขนาด 1 ลิตร สำหรับบรรจุอาหารเหลว 700 มิลลิลิตรที่ผ่านการทำไร้เชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันไปประกอบระบบภายในตู้ปลอดเชื้อ

5) นำพืชวัตถุดิบวางบนฐานตะแกรงของภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปิดฝาให้สนิท จากนั้นนำอลูมิเนียมฟอล์ยและพาราฟิล์มพันบริเวณรอยต่อของภาชนะ ปลายสายท่อซิลิโคนที่เชื่อมต่อกับฝาบนของระบบจะถูกต่อเข้ากับปั๊มสุญญากาศ โดยปั๊มดังกล่าวถูกควบคุมการทำงานด้วย Timer ในการเปิดหรือปิดอัตโนมัติตามช่วงเวลาที่กำหนด (ภาพที่ 21)

6) นำถังปฏิกรณ์ชีวภาพ TIS ดังกล่าวนี้ไปวางในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง



ภาพที่ 21 แผนผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS)

a) ปั๊มสุญญากาศ b) ตัวกรองอากาศ c) ท่ออากาศขาเข้า d) ภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงชิ้นพืช e) ท่อสายยางซิลิโคน f) ภาชนะแก้วสำหรับบรรจุอาหารเหลว g) ท่ออากาศขาออก i) เครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ

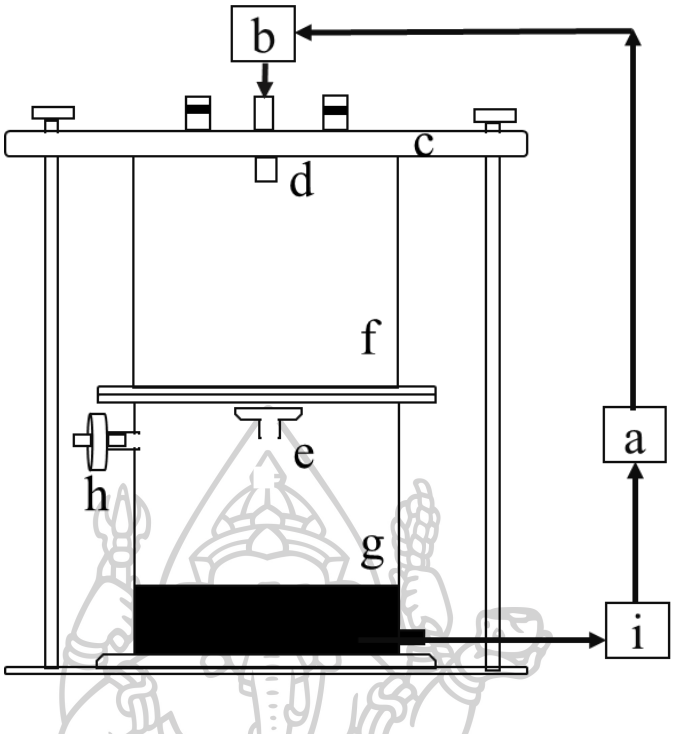
3.4.2.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (Nutrient Spray Bioreactor, NSB)

1) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (Nutrient Spray Bioreactor) หรือ NSB ประกอบด้วยภาชนะ 2 ส่วนคือ ภาชนะส่วนบนใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ความสูง 13.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 10.4 เซนติเมตร ความกว้างของขอบปากภาชนะ 1.0 เซนติเมตร ภาชนะส่วนล่างใช้สำหรับบรรจุอาหารเหลว 1000 มิลลิลิตร ความสูง 13.5 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 10.4 เซนติเมตร ความกว้างของขอบปากภาชนะ 1.0 เซนติเมตร

2) ประกบภาชนะทั้ง 2 ส่วนเข้าด้วยกันโดยใช้ตัวหนีบสแตนเลสยึดให้แน่น นำตะแกรงวงกลมวางบนฐานกรวยของภาชนะส่วนบนสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อป้องกันชิ้นพืชตกลงไปยังอาหารเหลวด้านล่าง

3) นำสายยางซิลิโคนต่อเข้าปลายท่อแก้วด้านล่างของภาชนะบรรจุอาหารเหลวและต่อปลายสายซิลิโคนอีกด้านเข้ากับท่อสแตนเลสที่ยึดติดกับฝาบนถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 20.1 เซนติเมตร) สำหรับส่งอาหารเหลวไปยังหัวพ่นฝอย (ความสูง 1.0 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร) ซึ่งอาหารเหลวดังกล่าวจะเคลื่อนที่จากภาชนะด้านล่างไปสู่หัวพ่นฝอยที่ติดอยู่ฝาบนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยอาศัย peristaltic pump ซึ่งปั๊มจะทำการหมุน roller ไปกดที่สายยางแล้วกดเอาของเหลวให้เคลื่อนที่ตาม roller และพ่นฝอยอาหารลงสู่ชิ้นพืชที่อยู่ภายในภาชนะด้านบน จากนั้นอาหารเหลวจะไหลกลับตกสู่ภาชนะสำหรับบรรจุอาหารด้านล่างเช่นเดิม ซึ่งอาหารเหลวจะถูกไหลเวียนกลับมาใช้ใหม่ (ภาพที่ 22)

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 22 แผนผังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร (NSB)
a) peristaltic pump b) ท่ออากาศขาเข้า c) ฝาปิดสแตนเลสด้านบน d) หัวพ่นฝอยอาหารเหลว e) ท่อกรวยแก้ว f) ภาชนะแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงชิ้นพืช g) ภาชนะแก้วสำหรับบรรจุอาหารเหลว h) ตัวกรองอากาศขาออก i) เครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ

3.4.3 การศึกษาผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ต่อการเพาะเลี้ยงชิ้นพืช

3.4.3.1 การศึกษาผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนและการเจริญของต้นสับปะรด

1) การเตรียมต้นอ่อนสับปะรดปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นชิ้นพืชวัตถุดิบ (explant)

นำจุกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่เหลือทิ้งจากตลาดผลไม้มาลอกใบออกและล้างทำความสะอาด (ภาพที่ 23 (ซ้าย)) จากนั้นทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของจุกสับปะรดโดยการแช่ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำจุกสับปะรดไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ (clorox) 15 เปอร์เซ็นต์ที่มีการเติมทวีน 20 (tween 20) 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว และล้างด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ 2-3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ย้ายจุกสับปะรดไปวางบนจานแก้วไร้เชื้อ จากนั้นลอกใบที่เหลือออกให้เหลือเพียงยอดจุกสับปะรด จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ที่ pH 5.6 นำขวด

เพาะเลี้ยงไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงจุกสับปะรดเป็นเวลา 30 วันจะได้พืชวัตถุดิบปลอดเชื้อ (ภาพที่ 23 (ขวา)) สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 23 จุกสับปะรดปลอดเชื้อสำหรับใช้เป็นพืชวัตถุดิบ

2) การชักนำให้เกิดต้นของสับปะรดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ

ในการชักนำให้เกิดต้นจำนวนมากของสับปะรดทำโดยนำต้นอ่อนสับปะรดที่ได้จากข้อ 1) ของ 3.4.3.1 ไปเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB) และแบบแช่ชั่วคราว (TIS) เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระบบดั้งเดิมที่มีการให้อากาศโดยวางขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าและการเพาะเลี้ยงต้นสับปะรดบนอาหารวุ้น ซึ่งมีรายละเอียดของการเพาะเลี้ยงในแต่ละระบบดังต่อไปนี้

2.1) การชักนำให้เกิดต้นของสับปะรดในอาหารเหลวแบบที่มีการพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB)

นำจุกสับปะรดปลอดเชื้ออายุ 30 วัน จำนวน 3 ชิ้นย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ pH 5.6 ปริมาตรอาหารเหลว 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีการให้อากาศที่อัตราการไหล 5.5 VVM จากปั๊มอากาศ (air pump) เข้าไปยังภายในระบบการเพาะเลี้ยงผ่านตัวกรองอากาศไร้เชื้อเป็นเวลา 30 นาที ทุกๆ 4 ชั่วโมง และควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส (°C) ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 วัน

2.2) การชักนำให้เกิดต้นของสับปะรดในอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS)

นำจุกสับปะรดปลอดเชื้ออายุ 30 วัน จำนวน 3 ชิ้น วางบนภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของระบบ TIS ซึ่งด้านล่างของระบบมีภาชนะแก้วบรรจุอาหารเหลวสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มี

การเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และ pH 5.6 ปริมาณ 700 มิลลิลิตร ระบบ TIS จะดูดอาหารเหลวเป็นเวลา 1 นาที ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (อัตราการไหล 0.25 ลิตรต่อนาที) จากด้านล่างไปยังภาชนะด้านบนที่มีชิ้นพืชโดยชิ้นพืชจะแช่ในอาหารเหลวชั่วคราวเป็นเวลา 2 นาที ในทุกๆ 4 ชั่วโมงและควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส (°C) ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 วัน

2.3) การชักนำให้เกิดต้นของสับปะรดในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า

นำจุกสับปะรดปลอดเชื้ออายุ 30 วัน จำนวน 3 ชิ้นต่อขวดย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรและ pH 5.6 จากนั้นนำขวดอาหารเหลวปริมาตร 250 มิลลิลิตรไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 rpm และควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส (°C) ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 วัน

2.4) การชักนำให้เกิดต้นของสับปะรดบนอาหารวุ้น

นำจุกสับปะรดปลอดเชื้ออายุ 30 วันจำนวน 3 ชิ้นต่อขวดโดยเปลี่ยนถ่ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 8 กรัมต่อลิตร และ pH 5.6 นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงจุกสับปะรดเป็นเวลา 60 วัน

3) การวัดอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการเพิ่มจำนวนของต้นสับปะรด

หลังจากเพาะเลี้ยงจุกสับปะรดปลอดเชื้ออายุ 30 วันในรูปแบบต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน วัดการเจริญเติบโตโดยหาน้ำหนักสด (Fresh weight) น้ำหนักแห้ง (Dry weight) และความสูงของต้นสับปะรด รวมทั้งสัดส่วนของการเจริญเติบโต (Growth ratio) คำนวณได้จากสมการ

$$\text{Growth ratio} = \frac{\text{harvested FW (g)} - \text{inoculate FW (g)}}{\text{inoculate FW (g)}}$$

สำหรับอัตราการเพิ่มจำนวนต้น (multiplication rate) ของต้นสับปะรดสามารถคำนวณจากจำนวนการเกิดต้นทั้งหมดหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 60 วัน

3.4.3.2 การศึกษาผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ต่อการพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้

1) การเตรียมโปรโตคอร์มสำหรับใช้เป็นชิ้นพืชวัตถุดิบ

นำฝักกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการผสมพันธุ์ไว้อายุประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของอายุฝักที่เจริญเต็มที่ทำความสะอาดที่ผิวฝักด้วยการเช็ดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ตัดส่วนที่คาดว่าน่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ออก จากนั้นใช้ปากคีบคีบฝักกล้วยไม้จุ่มในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และนำไปผ่านเปลวไฟ เมื่อไฟดับแล้วนำไปวางบนจานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการทำไร้เชื้อ แล้วใช้มีดที่ผ่านการทำไร้เชื้อตัดตามแนวขวางของฝักกล้วยไม้ เขี่ยเมล็ดอ่อนหรือเอ็มบริโอของกล้วยไม้ที่อยู่ภายในฝักกล้วยไม้ลงในขวดเพาะเลี้ยงที่บรรจุอาหารวุ้นสูตร MS (ภาคผนวก ก) นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 วันเพื่อชักนำให้เอ็มบริโอเจริญเป็นโปรโตคอร์ม (protocorm) สำหรับใช้เป็นชิ้นพืชวัตถุดิบ

2) การศึกษาการพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ

การชักนำให้โปรโตคอร์มที่ได้จากข้อ 1 ของ 3.4.3.2 พัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์นั้นทำโดยนำโปรโตคอร์มไปเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบที่มีการพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB) แบบแช่ชั่วคราว (TIS) และการพ่นอาหารเหลวแบบฝอย (NSB) เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระบบดั้งเดิมที่มีการให้อากาศโดยวางขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าและการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้บนอาหารวุ้น ซึ่งมีรายละเอียดของการเพาะเลี้ยงในแต่ละระบบดังต่อไปนี้

2.1) การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย

ย้ายโปรโตคอร์มกล้วยไม้จำนวน 50 โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (ภาคผนวก ก) นาน 60 วันลงในระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย ภายในบรรจุอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการให้อากาศจากปั๊ม (Air pump) 2 VVM ที่ควบคุมอัตราการไหลของอากาศด้วย Air flow meter เข้าไปยังภายในระบบการเพาะเลี้ยงผ่านตัวกรองอากาศ นำระบบไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.2) การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว

ย้ายโปรโตคอร์มกล้วยไม้จำนวน 50 โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (ภาคผนวก ก) นาน 60 วัน มาเลี้ยงในระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS) โดยนำโปรโตคอร์มใส่ลงบนภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงชิ้นพืชของระบบ TIS ซึ่งโปรโตคอร์มจะแช่ใน

อาหารเหลวชั่วคราวปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 นาที ทุกๆ 4 ชั่วโมง นำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.3) การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว

ย้ายโปรโตคอร์มกล้วยไม้จำนวน 50 โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (ภาคผนวก ก) นาน 60 วันลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว ซึ่งภายในบรรจุอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในภาชนะด้านล่างสำหรับบรรจุอาหาร กำหนดสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วันโดยจะทำการพ่นฝอยอาหารเหลวด้วยอัตราการไหล 0.1 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ทุกๆ 4 ชั่วโมง อาหารที่ถูกพ่นฝอยแล้วจะไหลกลับลงสู่ภาชนะบรรจุอาหารด้านล่างเช่นเดิม

2.4) การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า

ย้ายโปรโตคอร์มกล้วยไม้จำนวน 50 โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (ภาคผนวก ก) นาน 60 วันลงในขวดบรรจุอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร100 มิลลิลิตร จากนั้นนำขวดอาหารเหลวไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 rpm และควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส (°C) ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.5) การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มบนอาหารวุ้น

ย้ายโปรโตคอร์มกล้วยไม้จำนวน 50 โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (ภาคผนวก ก) นาน 60 วันลงในขวดบรรจุอาหารวุ้นสูตร MS ปริมาตร100 มิลลิลิตร จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส (°C) ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

2.6) การเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใบกวนขนาด 5 ลิตร

ย้ายโปรโตคอร์มกล้วยไม้จำนวน 150 โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS (ภาคผนวก ก) นาน 60 วัน ลงใน flask ที่ภายในบรรจุอาหารเหลวอยู่ 100 ml จากนั้นทำการถ่ายโปรโตคอร์มในอาหารเหลวโดยผ่านไฟลงไปภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบใบกวนขนาด 5 ลิตร ที่ภายในบรรจุอาหารเหลว 1 ลิตร โดยให้อากาศต่ำสุด 1.3 VVM ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

3) การวัดอัตราการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ

หลังจากย้ายโปรโตคอร์มมาเพาะเลี้ยงในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงทำการวัดอัตราการเจริญของโปรโตคอร์มด้วยการหาน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง จำนวนโปรโตคอร์มที่พัฒนาไปเป็นต้น ใบและราก ความสูงและความกว้างของต้นอ่อน ความยาวของรากและใบ

3.4.3.3 การศึกษาผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ต่อการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของแก่นตะวัน

1) การเตรียมต้นแก่นตะวัน

นำหัวพันธุ์แก่นตะวันมาปลูกในกระถาง โดยตัดหัวแก่นตะวันที่มีตาเป็นชิ้นขนาด 4-5 เซนติเมตร นำไปบ่มในดินที่ผสมแกลบดำชื้นเพื่อชักนำให้เกิดต้นอ่อน รดน้ำให้ชุ่มทุกวันวันละ 1 ครั้ง เมื่อต้นเริ่มงอกจึงมีการให้น้ำวันเว้นวัน จนครบระยะเวลา 1 เดือน สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ

2) การเตรียมต้นแก่นตะวันปลอดเชื้อเพื่อใช้เป็นชิ้นพืชวัตถุดิบ

ตัดลำต้นของต้นแก่นตะวันที่ปลูกเป็นระยะเวลา 1 เดือน ที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงไม่มีโรคและแมลงมาทำความสะอาด จากนั้นลิดใบออกจากกิ่งลำต้นทำการตัดบริเวณข้อลำต้นที่มีตา (nodal stem) ให้มีความยาว 3-5 เซนติเมตร เพื่อง่ายต่อการทำไร้เชื้อที่ผิว ล้างทำความสะอาดกิ่งที่ตัดแล้ว จากนั้นนำไปไปแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 15 เปอร์เซ็นต์ที่มีการเติมทวีน 20 (2-3 หยด) เป็นเวลา 15 นาที เขย่าเป็นครั้งคราวและล้างด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ 2-3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ย้ายลำต้นที่มีตาไปวางบนจานแก้วไร้เชื้อ ตัดลำต้นบริเวณที่มีตาให้ได้ขนาด 1.5 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส (°C) ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน จะได้ต้นแก่นตะวันปลอดเชื้อ (ภาพที่ 24) สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 24 ต้นแก่นตะวันปลอดเชื้ออายุ 1 เดือน

3) การศึกษาการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ

การศึกษาการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของแก่นตะวัน ทำโดยนำข้อที่มีตาจากต้นปลอดเชื้ออายุ 1 เดือนไปเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบที่พ่นให้อากาศอย่างง่าย การเลี้ยงแบบแช่ชั่วคราวและการพ่นอาหารเหลวแบบพ่นฝอย โดยมีการเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระบบดั้งเดิมที่มีการให้อากาศโดยวางขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าและการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น ซึ่งมีรายละเอียดของการเพาะเลี้ยงในแต่ละระบบดังต่อไปนี้

3.1) การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในระบบอาหารเหลวที่มีการพ่นให้อากาศอย่างง่าย

ตัดข้อลำต้นแก่นตะวันที่ 3 หรือ 4 นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร chlorocholine chloride (CCC) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร Thiamine HCl ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 80 กรัมต่อลิตรและ pH 5.6 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีการให้อากาศที่อัตราการไหล 5.5 VVM จากปั๊มอากาศ (Air pump) เข้าไปยังภายในระบบการเพาะเลี้ยงผ่านตัวกรองอากาศเป็นเวลา 30 นาที ทุกๆ 4 ชั่วโมง จำนวนชิ้นพืชเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง 9 ชิ้นต่อ 1 bioreactor ควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.2) การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว

สำหรับการเพาะเลี้ยงข้อลำต้นแก่นตะวันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ TIS เป็นการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร CCC ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร Thiamine HCl ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 80 กรัมต่อลิตร และ pH 5.6 โดยชิ้นพืชจะแช่ในอาหารเหลวชั่วคราวปริมาตร 250 ลิตร เป็นเวลา 2 นาที ทุกๆ 2 และ4 ชั่วโมง ใช้ชิ้นพืชเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง 9 ชิ้นต่อ bioreactor ควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.3) การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว

นำข้อลำต้นที่ตัดได้จำนวน 9 ชิ้น วางบนภาชนะด้านบนสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยและบรรจุอาหารเหลว 500 มิลลิลิตรในภาชนะด้านล่างสำหรับบรรจุอาหาร กำหนดสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟ

ฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง โดยระบบจะทำการพ่นฝอยอาหารเหลวด้วยอัตราการไหล 0.1 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทุกๆ 4 ชั่วโมง อาหารที่ถูกพ่นฝอยแล้วจะไหลกลับลงสู่ภาชนะบรรจุอาหารด้านล่างเช่นเดิม ทำการเพาะเลี้ยงข้อลำต้นแก่นตะวันเพื่อชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กเป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.4) การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า

ตัดข้อลำต้นแก่นตะวันที่ 3 หรือ 4 จำนวน 9 ชิ้นเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร CCC ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร Thiamine HCl ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 80 กรัมต่อลิตร และ pH 5.6 ในภาชนะแก้วที่มีฝาปิดสนิทปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 120 rpm และควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3.5) การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันบนอาหารวุ้น

ตัดข้อลำต้นของแก่นตะวันปลอดเชื้ออายุ 1 เดือน ให้มีความยาวเหนือข้อลำต้น 0.5 เซนติเมตรและความยาวของส่วนล่างของข้อลำต้น 1.0 เซนติเมตร เลือกข้อที่ 3 หรือ 4 ของลำต้นไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร CCC 500 มิลลิกรัมต่อลิตร Thiamine HCl 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 80 กรัมต่อลิตร และ pH 5.6 แต่ละขวดจะมีชิ้นพืชจำนวน 3 ชิ้น นำขวดเพาะเลี้ยงไปวางบนชั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

4) การวัดอัตราการเจริญเติบโตของชิ้นพืช

หลังจากเพาะเลี้ยงข้อลำต้นแก่นตะวันในอาหารเหลวเป็นเวลา 21 วัน วัดอัตราการเจริญเติบโตโดยการชั่งหาน้ำหนักสด (Fresh weight) ความยาวของชิ้นพืชและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นพืชส่วนล่างของข้อลำต้นวัดอัตราการเจริญเติบโตของน้ำหนักสด ความยาว และเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนใต้ข้อลำต้น

5) บันทึกจำนวนหัวแก่นตะวันขนาดเล็กที่ชักนำได้

นับจำนวนหัวที่เกิดบริเวณส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างข้อลำต้น น้ำหนักสด ความยาว และเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวแก่นตะวันที่ชักนำได้

6) การวิเคราะห์ค่าพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าในอาหารเหลว

นำอาหารเหลวก่อนการเพาะเลี้ยงและอาหารเหลวหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ของอาหารเหลวทุกระบบไปวัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter และนำไปวัดค่าการนำไฟฟ้าด้วย

เครื่อง Conductivity meter ที่มีการชดเชยอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าการนำไฟฟ้า 12.88 mS/cm เป็นสารมาตรฐาน

3.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

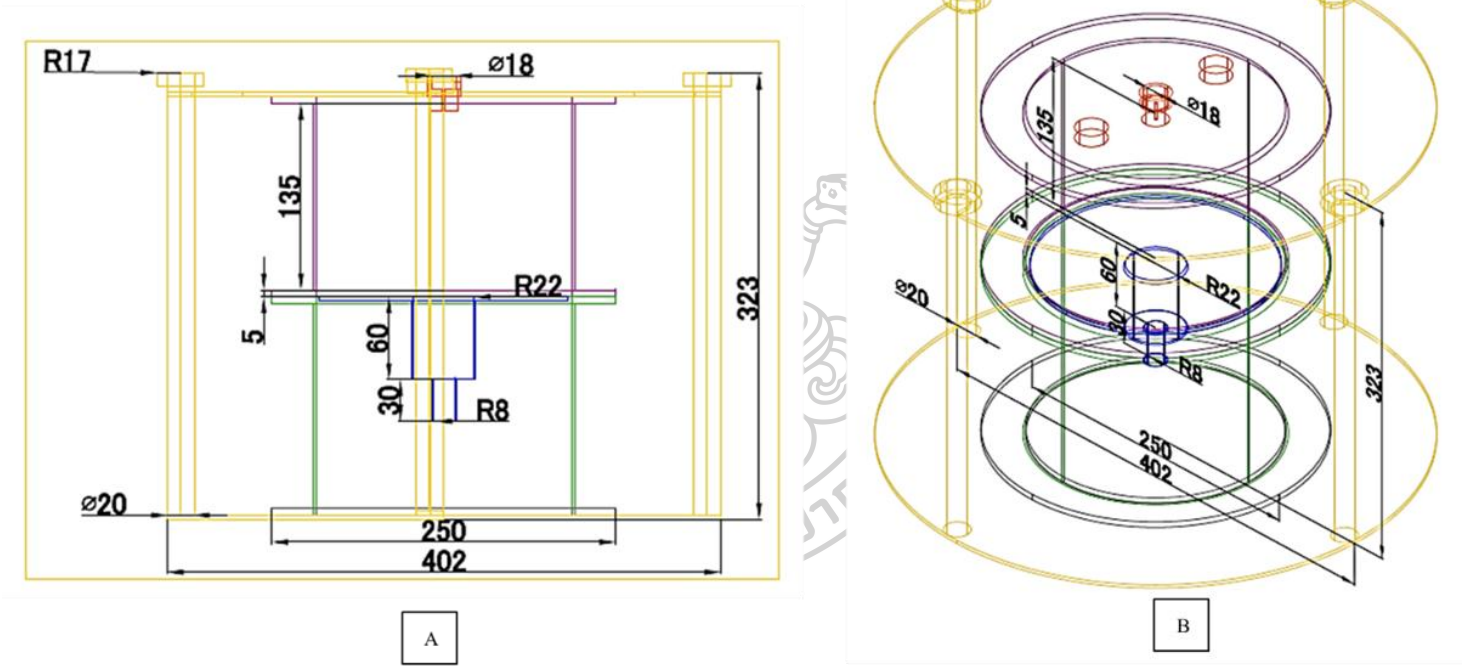
วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way ANOVA) กำหนดระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan และวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง

4.1 การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นสับปะรด โปรโตคอร์มกล้วยไม้ และลำต้นแก่นตะวัน

4.1.1) ข้อมูลเกี่ยวกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชแบ่งตามวิธีการกวน (agitation method) และลักษณะของภาชนะ (vessel) ที่ใช้เพาะเลี้ยงได้เป็น 2 ประเภทหลักคือ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวนโดยอาศัยแรงเชิงกล (mechanically agitated bioreactors) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวนโดยอาศัยแรงดันจากการอัดอากาศและไม่มีการกวน (pneumatically agitated and non-agitated bioreactors) โดยแต่ละประเภทหลักยังแบ่งออกเป็นชนิดย่อยตามรายละเอียดในบทที่ 2 ซึ่งทั้งสองประเภทนี้ชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงจะจมอยู่ในอาหารเหลวตลอดเวลา (K. Y. Paek et al., 2005) นอกเหนือจาก ประเภทหลักดังกล่าวแล้วยังมีถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ชิ้นพืชจะจมอยู่ในอาหารเหลว 2 บางช่วงเวลา(ebb and flood bioreactors หรือ a periodic immersion bioreactor หรือ temporary immersion system (TIS)) (Etienne & Berthouly, 2002; K. Y. Paek et al., 2005) และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการนำเสนอถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภทที่ชิ้นพืชไม่ต้องจมอยู่ในอาหารเหลวแต่ชิ้นพืชจะถูกวางไว้บนตะแกรงและมีการพ่นอาหารเหลวแบบฝอยไปยังชิ้นพืช (Rahman et al., 2015) ซึ่งจากการรวบรวมเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าชนิดของถังปฏิกรณ์ที่มีการใช้กันมากที่สุดคือ pneumatically agitated bioreactor ชนิด balloon-type bubble bioreactors (BTBB) ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชโดยการให้จมอยู่ในอาหารเหลวและมีการอัดอากาศเข้าไปรองลงมาคือการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบ pneumatically agitated bioreactor ชนิด BTBB ที่มีการดัดแปลง ebb and flood bioreactor และ mechanically agitated bioreactor ชนิด stirred tank และเมื่อพิจารณาจากพืชทดลองและวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยงพืชแต่ละชนิดคือ ต้องการผลิตต้นสับปะรดจำนวนมาก การพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ และ การพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันจึงได้ออกแบบถังปฏิกรณ์ที่จะใช้ในการทดลอง 3 ชนิดคือ ระบบที่มีการพ่นฟองอากาศลงไปในอาหารเหลวโดยอาศัยปั๊มอากาศ แรงดันต่ำ (Simple aeration bioreactor) ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (Temporary immersion system) และระบบที่มีการพ่นฝอยอาหารเหลวไปยังชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยง (Nutrient spray bioreactor) (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ผังวิศวกรรมของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว

(A) 2 มิติ (B) 3 มิติ

ตารางที่ 5 การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ

ประเภทของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	พืช/ รูปแบบการเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	อ้างอิง
1. Jar fermentor with disk turbine impeller. 2. Air lift reactor 3. Turbine-blade reactor (TBR)	ข้าว (*Oryza sativa* L.)	TBR เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิต embryogenic calli ของข้าว	(Moon, Honda, & Kobayashi, 1999)
3 L stirred tank bioreactor	*Podophyllum hexandrum* การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเพื่อผลิต Podophyllotoxin	การเพาะเลี้ยง *P. hexandrum* ในถังปฏิกรณ์แบบ stirred tank ขนาด 3 L ให้กำลังการผลิตสูงขึ้น 27% เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยใน shake flask	(Chattopadhyay, Srivastava, Bhojwani, & Bisaria, 2001)
2 L periodically submerged air-lift bioreactor (PSAB)	*Saussurea medusa* การผลิตสารทุติยภูมิ	การผลิตชีวมวลและสารทุติยภูมิในถังปฏิกรณ์แบบ PSAB ให้ผลดีกว่าการเพาะเลี้ยงใน shake flask	(Yuan, Zhao, & Wang, 2004)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ประเภทของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	พืช/ รูปแบบการเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	อ้างอิง
1. Bioreactor of immersion by bubble (B.I.B) 2. Reactor of Temporary Immersion (RITA®)	สับปะรด (*Ananas comosus* L. Meril) การผลิตต้นกล้าสับปะรดในปริมาณมาก	การผลิตต้นกล้าในถังปฏิกรณ์แบบ B.I.B ให้ผลดีกว่าแบบ (RITA®)	(Scheidt et al., 2009)
1.5 l modified stirred tank reactor equipped with a plastic mesh	*Brugmansia candida* การเพาะเลี้ยง hairy root เพื่อผลิตสารอัลคาลอยด์	Hairy root ของ *B. candida* ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ stirred tank ผลิตชีวมวลและสารอัลคาลอยด์ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงใน Erlenmeyer flask	(Cardillo et al., 2010)
1. A laboratory scale conventional shake flask 2. Balloon - type bubble column bioreactor (BTBCBs)	กล้วย (*Musa acuminata* cv. Berangan) การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย	การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยใน BTBCBs ให้อัตราการเจริญของเซลล์และการพัฒนาไปเป็นต้นดีกว่าการเพาะเลี้ยงใน conventional shake flask	(Chin, Annuar, Tan, & Khalid, 2014)

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ประเภทของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	พืช/ รูปแบบการเพาะเลี้ยง	ผลการวิจัย	อ้างอิง
1. Ballon type bubble bioreactor 2. Raft bioreactor 3. Ebb and flood bioreactor	กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium candidum*)/ การเลี้ยงโปรโตคอร์มแบบแขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตรที่บรรจุอาหารเพาะเลี้ยง 2 ลิตร	การผลิตชีวมวลและสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน Ballon type bubble bioreactor ให้ผลดีกว่า Raft bioreactor และ Ebb and flood bioreactor	(Cui et al., 2014)
Balloon- type bubble bioreactor system (BTBB)	*Eurycoma longifolia* Jack การเพาะเลี้ยง adventitious roots เพื่อผลิตสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	BTBB เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เหมาะสมต่อการผลิต adventitious roots ที่มีสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงในขนาดการผลิตเชิงพาณิชย์ได้	(Lulu, Park, Ibrahim, & Paek, 2015)
Nutrient spray bioreactor (NSB)	มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็ก	ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงมันฝรั่งของระบบ NSB ขึ้นอยู่กับช่วงเวลาการพ่นฝอยของอาหารความเข้มข้นของ BAP ที่แตกต่างกันและความหนาแน่นของชิ้นพืช โดยที่ช่วงเวลาการพ่นฝอยของอาหารที่ ชั่วโมงมีการผลิตจำนวน 1 หัวมันฝรั่งขนาดเล็กได้สูงสุด	(Rahman et al., 2015)

4.2 การจัดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงต้นสับปะรด โปรโตคอร์มกล้วยไม้ และลำต้นแก่นตะวัน

4.2.1) ระบบอาหารเหลวที่มีการพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB)

ระบบอาหารเหลวที่มีการพ่นให้อากาศอย่างง่ายถูกสร้างขึ้นดังภาพที่ 26 ประกอบไปด้วยอุปกรณ์ 6 ชิ้น ได้แก่ฝาซิลิโคนที่มีท่อสแตนเลส (2 ท่อ) ขวดแก้วเป็นภาชนะสำหรับบรรจุอาหารเหลวปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ตัวกรองอากาศ สายยางซิลิโคน (ID= 7mm) เครื่องตั้งเวลา เปิด-ปิดอัตโนมัติ และปั๊มอากาศ ขนาด 3 วัตต์ ซึ่งถังปฏิกรณ์ชีวภาพอย่างง่ายที่มีการพ่นอากาศโดยอาศัยปั๊มอากาศ แรงดันต่ำ(Simple aeration bioreactor) 1 ชุด มีราคาต้นทุน 3,842.35 บาท (ตารางที่ 6)

ภาพที่ 26 ระบบอาหารเหลวที่มีการพ่นอากาศอย่างง่าย

ในการจัดตั้งระบบ SAB ในระยะแรกนั้นได้เริ่มจากการการนำเอาขวดโหล่แก้วที่มีฝาเจาะรูตรงกลางสำหรับสอดท่อสายยางซิลิโคนเพื่อให้อากาศผ่านเข้าไปยังหัวพ่นอากาศ ซึ่งชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงจะถูกแช่ในอาหารเหลวตลอดเวลาในภาชนะแก้วสำหรับบรรจุอาหารเหลว ซึ่งพบว่าพืชสามารถเจริญเติบโตในระบบอาหารเหลวนี้ได้ แต่ระบบ SAB เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย เนื่องจากอาหารเหลวจะระเหยจะไปเกาะที่ฝาภาชนะทำให้ฝาภาชนะเกิดสนิม

ต่อมาจึงได้พัฒนาระบบโดยใช้ฝาบนเป็นจุกซิลิโคนที่ต่อท่อสแตนเลสสำหรับให้พ่นอากาศเข้าไปยังระบบภายในจากปั๊มอากาศ (Air pump) ขนาด 3 วัตต์ ผ่านตัวกรองอากาศที่ปลอดเชื้อและมีท่อสำหรับอากาศออกที่เชื่อมต่อกับตัวกรองอากาศ พบว่าตลอดช่วงระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงอวัยวะพืชระบบไม่มีการปนเปื้อนอันเนื่องมาจากตัวระบบภายใน แสดงให้เห็นว่าระบบ SAB สามารถนำไประยุกต์ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชได้

ตารางที่ 6 ราคาต้นทุนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการพ่นอากาศอย่างง่าย (SAB) 1 ชุด

อุปกรณ์	จำนวน	ราคา (บาท)	จำนวนเงิน (บาท)
1. ขวดแก้วเป็นภาชนะสำหรับบรรจุอาหารเหลวปริมาตร 1000 มิลลิลิตร	1 ขวด	219.35	3,842.35
2. ตัวกรองอากาศ	2 ตัว	749.00	
3. ฝาซิลิโคนที่มีท่อสแตนเลส 2 ท่อ	1 ฝา	2,193.50	
4. สายยางซิลิโคน (ID = 7 mm)	1 เมตร	110.50	
5. เครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ	1 เครื่อง	490.00	
6. ปั๊มอากาศ ขนาด 3 วัตต์	1 ตัว	80.00	

4.2.2) ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS)

จากการศึกษาค้นคว้าระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (Temporary Immersion System, TIS) (ภาพที่ 27) เป็นระบบที่ให้ชิ้นพืชแช่ในอาหารเหลวในระยะเวลาสั้นๆแล้วมีการดึงอาหารเหลวกลับไปยังภาชนะเก็บอาหารเหลว โดยงานวิจัยนี้ได้ออกแบบระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราวที่ประกอบด้วย ส่วน 2 ได้แก่ส่วนบนเป็นส่วนสำหรับเพาะเลี้ยงชิ้นพืช ซึ่งดัดแปลงโดยการนำเอาชุดกรอง (reusable bottle top filter) มาประยุกต์ใช้เป็นภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงมีขนาด มิลลิเมตร 47 มิลลิลิตร 500 ปริมาตรความจุและส่วนล่างจะใช้ขวดแก้วเป็นภาชนะสำหรับบรรจุอาหารเหลวปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ทั้งสองส่วนจะเชื่อมต่อกันด้วยสายยางซิลิโคน (ID= 7mm) ซึ่งภาชนะส่วนบนสุดจะมีสายยางซิลิโคนเชื่อมต่อกับปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ปั๊มจะดูดอากาศภายในภาชนะออกไปผ่านตัวกรองที่ปราศจากเชื้อทำให้ภายในระบบเป็นระบบสุญญากาศ ส่งผลให้อาหารเหลวจากภาชนะด้านล่างไหลขึ้นมายังภาชนะด้านบน ซึ่งควบคุมระบบการไหลโดยอาศัยเครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ (electronic timer) โดยระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS) 1 ชุดจะมีราคาต้นทุน 14,848.85 บาท

ภาพที่ 27 ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว

จากการจัดตั้งระบบ TIS พบว่าในช่วงแรกของระบบ TIS เกิดการปนเปื้อนเมื่อเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชไปได้ 1 สัปดาห์ เนื่องจากอากาศสามารถเข้าสู่ภายในระบบระหว่างข้อต่อของภาชนะด้านบนที่ใช้เป็นภาชนะสำหรับเพาะเลี้ยงชิ้นพืช รวมถึงวิธีประกอบอุปกรณ์ต้องแยกส่วนไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนจึงนำส่วนประกอบมาประกอบภายในตู้ปลอดเชื้อ และแก้ปัญหาโดยการใช้ฝอยอะลูมิเนียมหุ้มข้อต่อและพันด้วยพาราฟินให้แน่นก่อนนำออกจากตู้ปลอดเชื้อ ซึ่งพบว่าระบบ TIS สามารถเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชได้ระยะเวลานานมากขึ้นสูงสุด 4 สัปดาห์ จึงจะทำการเปลี่ยนอาหารใหม่เนื่องจากพืชจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อมีการเปลี่ยนอาหารในช่วงทุกๆ 20 วันของการเพาะเลี้ยง (Zhao, Wu, Feng, & Wang, 2008)

ตารางที่ 7 ราคาต้นทุนถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS) 1 ชุด

อุปกรณ์	จำนวน	ราคา (บาท)	จำนวนเงิน (บาท)
1. ชุดกรอง (reusable bottle top filter) ขนาด 47 มิลลิเมตร ปริมาตรความจุ 500 มิลลิลิตร	1 ชุด	3,280.00	14,848.85
2. ขวดแก้วเป็นภาชนะสำหรับบรรจุอาหารเหลว ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร	1 ขวด	219.35	
3. ตัวกรองอากาศ	2 ตัว	749.00	
4. สายยางซิลิโคน (ID = 7 mm)	1 เมตร	110.50	
5. เครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ	1 เครื่อง	490.00	
6. ปั๊มสุญญากาศ	1 ตัว	10,000.00	

4.2.3) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร (Nutrient Spray Bioreactor)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร(Nutrient Spray Bioreactor) หรือ NSB ประกอบด้วยภาชนะ 2 ส่วน ได้แก่ภาชนะส่วนบนใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ความสูง 14.5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 10.4 เซนติเมตร ความกว้างของขอบปากภาชนะ 1.0 เซนติเมตร ภาชนะส่วนล่างใช้สำหรับบรรจุอาหารเหลว 1000 มิลลิลิตร ความสูง 15.0 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 10.4 เซนติเมตร ความกว้างของขอบปากภาชนะ 1.0 เซนติเมตร ด้านล่างภาชนะมีท่อสำหรับส่งอาหารเหลวไปยังหัวพ่นฝอย (ความสูง 1.0 เซนติเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางของหัวพ่น 1.0 เซนติเมตร) ที่ยึดติดกับฝาบนถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 20.1 เซนติเมตร) ผ่านสายยางซิลิโคน ซึ่งอาหารเหลวดังกล่าวจะเคลื่อนที่จากภาชนะด้านล่างไปสู่หัวพ่นฝอยที่ติดอยู่ฝาบนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยอาศัย peristaltic pump และพ่นฝอยอาหารลงสู่ชิ้นพืชที่อยู่ภายในภาชนะด้านบน จากนั้นอาหารเหลวจะไหลกลับตกสู่ภาชนะสำหรับบรรจุอาหารด้านล่างเช่นเดิม (ภาพที่ 28) ซึ่งอาหารเหลวจะถูกไหลเวียนกลับมาใช้ใหม่ ระบบ NSB นี้จะใช้อุปกรณ์ทั้งหมด 7 ชนิดดังตารางที่ 8 โดยระบบ NSB 1 ชุดจะมีราคาต้นทุน 58,305.00 บาท

ภาพที่ 28 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร

จากการจัดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (NSB) พบว่าหัวพ่นฝอยอาหารเหลวมีลักษณะการพ่นเป็นมุมทรงกรวย เมื่อเพิ่มอัตราการไหลสูงขึ้นจะส่งผลให้อาหารที่ถูกพ่นฝอยมีมุมกว้างขึ้นทำให้ชิ้นพืชจะกระเด็นออกไปยังบริเวณขอบภาชนะรอบนอกติดระหว่างขอบภาชนะในขณะที่ตรงกลางภาชนะจะได้รับอาหารพ่นฝอยน้อยลง อีกทั้งอาหารเหลวถูกชะลงยังบริเวณขอบภาชนะส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนได้ แต่พบว่าการใช้อัตราการไหลต่ำจะไม่เกิดการชะบริเวณผิวด้านข้างภาชนะ ทำให้ระหว่างการเพาะเลี้ยงชิ้นพืชไม่มีการปนเปื้อนในระบบ แต่มีข้อเสียคือชิ้นพืชได้รับอาหารไม่ทั่วถึง

ตารางที่ 8 ราคาต้นทุนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบที่มีการพ่นฝอยอาหารเหลวไปยังชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยง (Nutrient spray bioreactor) 1 ชุด

อุปกรณ์	**จำนวน**	**ราคา (บาท)**	**จำนวนเงิน (บาท)**
1. แก้วทรงกระบอก OD 100 mm หนา 2.5 mm สูง 14.102 cm ทั้ง 2 ด้าน OD 103 cm	2 โหล แก้ว	11,770.00	58,795.00
2. แก้วทรงกระบอก OD 80 mm หนา 2.5 mm ก้นปิดมีท่อปล่อยน้ำด้านล่าง 1 ท่อ	1 ชิ้น	3,745.00	
3. JOINT CLIP (METAL)	1 ชิ้น	3,745.00	
4. ฝา Bioreactor พร้อมหัวสเปรย์แรงดันต่ำ	1 ฝา	8,560.00	
5. สายยางซิลิโคน (ID= 7mm)	1 เมตร	110.50	
6. ตัวกรองอากาศ	1 ตัว	374.50	
7. เครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ	1 เครื่อง	490.00	
8. peristaltic pump	1 เครื่อง	30,000.00	

มหาวิทยาลัยศิลปากร

4.3. การศึกษาผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ต่อการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืช

4.3.1 การศึกษาผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ต่อการเพิ่มจำนวนและการเจริญของต้นสับปะรด

จากการเพาะเลี้ยงจุกสับปะรดในระบบอาหารเหลวที่มีการให้อากาศแก่ระบบ 3 วิธี ได้แก่ ระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า ระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (Simple Air bioreactor, SAB) และระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (Temporary immersion bioreactor, TIS) เป็นระยะเวลา 60 วัน จากตารางที่ 9 พบว่าระบบการให้อากาศมีผลต่อการเจริญของต้นอ่อนสับปะรดอย่างมีนัยสำคัญโดย การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนสับปะรดในระบบ SAB มีค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงที่สุด เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าและระบบ TIS เมื่อพิจารณา growth ratio ของยอดสับปะรดพบว่า การเพาะเลี้ยงยอดสับปะรดในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าและระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศ (SAB) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และจากตารางที่ 10 การเพาะเลี้ยงยอดสับปะรดในระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB) มีความสูงของยอดสับปะรดสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวชนิดอื่น ในขณะที่ความสูงของยอดสับปะรดในระบบอาหารเหลวแบบเขย่าและระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งสังเกตได้ว่าการเพาะเลี้ยงจุกสับปะรดในระบบ SAB และในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าชิ้นพืชจะถูกแช่ในอาหารเหลวตลอดเวลา ในขณะที่ TIS จะได้รับสารอาหารเป็นช่วงเวลา สอดคล้องคล้องกับงานวิจัยของ (Scheidt et al., 2009) ที่รายงานว่าการเพาะเลี้ยงสับปะรดใน bioreactor of immersion by bubble (B.I.B) มีการเจริญเติบโตและสามารถเพิ่มจำนวนต้นอ่อนสับปะรดได้มากกว่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิมและระบบ R.I.T.A. (Reactor of Automatized Temporary Immersion) ซึ่งการที่ชิ้นพืชได้สัมผัสกับอาหารมากพอจะทำให้พืชสามารถดูดซึมสารอาหารไปใช้และส่งผลให้มีการเจริญเติบโตที่ดี (Debergh, 1982) และการพ่นฟองอากาศในระหว่างการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งการที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Lemos, Ferreira, Alencar, Oliveira, & Magalhães, 2001)

อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่พบว่าระบบ TIS มีความสามารถในการใช้เพิ่มจำนวนในพืชหลายชนิด (Akita & Takayama, 1994; Welander et al., 2014) รวมทั้ง สับปะรด (Escalona et al., 2003) แต่จากการทดลองพบว่าระบบ TIS ที่ใช้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนการเกิดยอดในสับปะรดได้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของพืช องค์ประกอบของอาหารและปัจจัยอื่น รวมทั้งการใช้ระยะเวลาและความถี่ในการแช่ชิ้นพืชในอาหารเหลวอาจมีความแตกต่างกัน (Etienne & Berthouly, 2002)

สำหรับการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนสับปะรดในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 rpm ต้นอ่อนสับปะรดที่เพาะเลี้ยงจะแช่ในอาหารเหลวและมีการให้อากาศแก่ระบบตลอดเวลา ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงต้นอ่อนสับปะรดบนเครื่องเขย่ามีอัตราการเพิ่มจำนวนการเกิดต้นสูงที่สุด ในขณะที่มีการเจริญเติบโตของต้นสับปะรดน้อยกว่าในระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศ (SAB) ที่ให้อากาศทุกๆ 4 ชั่วโมงเป็นเวลา 30 นาที ซึ่งระบบ SAB เป็นระบบที่มีความเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนการเกิดต้นของสับปะรดในระบบอาหารเหลว

ตารางที่ 9 น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และอัตราการเจริญเติบโตของยอดสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 60 วัน

ระบบอาหารเหลว	น้ำหนักสด (กรัม)*	น้ำหนักแห้ง (กรัม)*	Growth ratio*
ระบบบนเครื่องเขย่า	3.1400 ± 1.09^{ab}	0.2320 ± 0.12^{b}	32.2340 ± 1.76^{a}
ระบบพ่นให้อากาศ (SAB)	5.7681 ± 1.28^{a}	0.4874 ± 0.29^{a}	14.8000 ± 7.36^{a}
ระบบแช่ชั่วคราว (TIS)	0.38867 ± 0.11^{c}	0.0346 ± 0.15^{b}	1.6493 ± 0.59^{b}

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

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 10 ความสูงและอัตราการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนสับปะรดในระบบอาหารเหลว

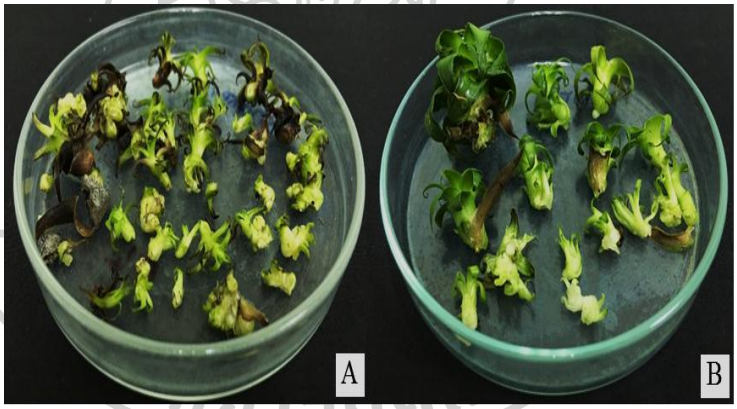
ระบบอาหารเหลว	ความสูงของต้นอ่อน (เซนติเมตร)*	Multiplication rate*
ระบบบนเครื่องเขย่า	2.32 ± 0.12^{b}	16.33 ± 6.36^{a}
ระบบพ่นให้อากาศ(SAB)	4.87 ± 0.29^{a}	11.50 ± 1.50^{a}
ระบบแช่ชั่วคราว (TIS)	3.46 ± 0.15^{b}	-

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

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ภาพที่ 29 ต้นอ่อนสับปะรดหลังจากการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวเป็นเวลา 60 วัน

A) บนอาหารวุ้น B) ระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 rpm C) ระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (Simple Aeration Bioreactor, SAB) D) ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (Temporary Immersion Bioreactor, TIS)



ภาพที่ 30 ยอดสับปะรดที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน

A) ระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 rpm B) ระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (Simple Aeration Bioreactor, SAB)

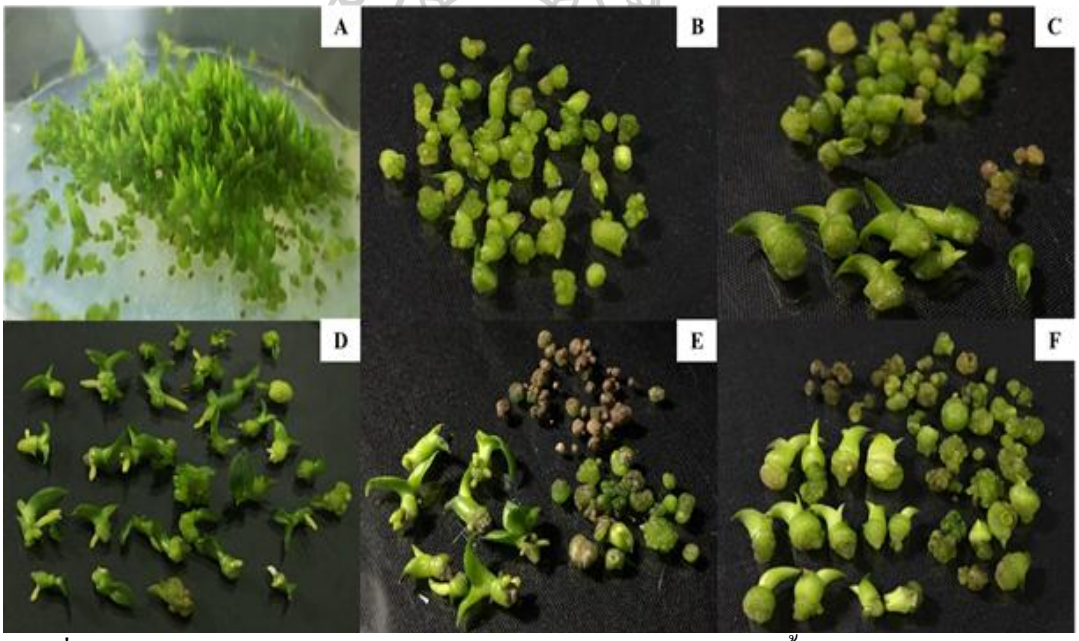
อย่างไรก็ตามจะเห็นว่า ภาพที่ 30 ต้นอ่อนสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 60 วัน มีอัตราการเจริญของยอดสับปะรดสูงสุด (ตารางที่ 9) ซึ่งพบว่าใบของสับปะรดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Browning) โดยปัญหาหลักที่มักพบในการการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวคือ การฉ่ำน้ำของใบและยอด (hyperhydricity) เนื่องมาจากพืชมีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็ว ซึ่งต้องอาศัยสารลดการเจริญเติบโต (growth retardants) (Meira Ziv, 2005) เพื่อยับยั้งการเกิดปัญหาการฉ่ำน้ำ ในขณะที่จะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงยอดสับปะรดในระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศ

อย่างง่าย (SAB) มีอัตราการเจริญในที่ต่ำกว่าจึงเกิดความเสียหายของชิ้นพืชน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า นอกจากนี้จากการสังเกตต้นสับปะรดที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIS แม้ว่าสภาวะที่กำหนดในการทดลองนี้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนต้นได้แต่ต้นที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIS ก็ค่อนข้างสมบูรณ์ ใบเขียวจัดและแผ่นใบใหญ่ (ภาพที่ 29D) ซึ่งเป็นข้อดีของระบบ TIS ที่มีรายงานว่าจะช่วยเพิ่มคุณภาพของพืชคือ ทำให้ต้นพืชมีความแข็งแรงสมบูรณ์ (Etienne & Berthouly, 2002) และปัญหาที่พบการฉ่ำน้ำน้อยกว่าการให้ชิ้นพืชจมในอาหารเหลวตลอดเวลา

4.3.2 การศึกษาผลของถังปฏิกรณ์ชีวภาพรูปแบบต่างๆ ต่อการพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้

จากการเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุลหวายบนอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่ควบคุมสภาวะห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ความเข้มแสง 1,500-3,000 ลักซ์ สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมงเป็นเวลา 60 วัน เพื่อชักนำให้เอ็มบริโอเจริญเป็นโปรโตคอร์ม (protocorm) สำหรับใช้เป็นพืชวัตถุดิบโดยจะย้ายโปรโตคอร์มกล้วยไม้อายุ 60 วันที่ยังไม่พัฒนาไปเป็นโปรโตคอร์มที่มีใบ ภาพที่ 31A จำนวน 50 โปรโตคอร์มต่ออาหาร100 มิลลิลิตรไปเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวที่ถูกออกแบบและจัดตั้งขึ้นได้แก่ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (Temporary immersion bioreactor, TIS) ระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (Simple aeration bioreactor, SAB) และ ระบบอาหารเหลวแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (Nutrient spray bioreactor, NSB) โดยเปรียบกับระบบการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร อาหารเหลวบนเครื่องเขย่าและบนอาหารวุ้นที่เป็นวิธีดั้งเดิม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสและให้แสงสว่างด้วยหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ความเข้มแสง 1,500 -3,000 ลักซ์ สลับกับช่วงมืด 8 ชั่วโมง พบว่าระยะแรกโปรโตคอร์มจะเจริญเติบโตและพัฒนามีจุดเกิดเนิดต้น (shoot primordia) ภาพที่ 31B จากนั้นโปรโตคอร์มจะเริ่มพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนที่มีใบในช่วงสัปดาห์ที่ 2 และในสัปดาห์ที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว โปรโตคอร์มมีการพัฒนาเป็นต้นที่มีใบสมบูรณ์และมีจุดกำเนิดราก ภาพที่ 31C ซึ่งสัปดาห์ที่ 4 พบว่ารากมีการเจริญเติบโตเห็นได้ชัดเจน ภาพที่ 31D สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Mahendran & NarmathaBai, 2009) เมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ร้อยละ 86.7 สามารถเจริญและมีการพัฒนาของโปรโตคอร์มไปเป็นต้นโดยมีจุดกำเนิดต้นที่บริเวณส่วนบนของโปรโตรคอร์มและมีจุดกำเนิดรากที่บริเวณส่วนล่างของโปรโตคอร์ม

ภาพที่ 31 ระยะการพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวาย
(A) โปรโตคอร์มในอาหารวุ้นออายุ 60 วัน (B) โปรโตคอร์มที่มีจุดกำเนิดต้น (shoot primordia) (C) โปรโตคอร์มที่พัฒนาไปเป็นต้นและมีจุดกำเนิดราก (D)โปรโตคอร์มที่พัฒนาเป็นต้นอ่อนและราก



ภาพที่ 32 การพัฒนาของโปรโตคอร์มอายุ 60 วันหลังจากย้ายไปเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวสูตร MS เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

(A) โปรโตคอร์มอายุ 60 วันที่ใช้เป็นพืชวัตถุดิบ (B) บนอาหารวุ้น (C) ระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (D) ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS) (E) ระบบแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (F) ระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า

ตารางที่ 11 จำนวนของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลที่พัฒนาและเจริญเติบโตในระบบอาหารเหลวหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ระบบอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง	จำนวนโปรโตคอร์มที่พัฒนา/ระบบ				คิดเป็นเปอร์เซ็นต์			
	พัฒนาไปเป็นต้น	พัฒนาไปเป็นต้นและราก	มีจุดกำเนิดของต้น	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล	พัฒนาไปเป็นต้น	พัฒนาไปเป็นต้นและราก	พัฒนาไปเป็นจุดกำเนิดของต้น	เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
Agar	0.0 ± 0.00	0.3 ± 0.58	49.7 ± 0.58	0.0 ± 0.00	0 %	1 %	99 %	0 %
TIS	9.0	23.0	18.0	0.0	18 %	46 %	36 %	0 %
NSB	2.0	6.0	17.0	25.0	4 %	12 %	34 %	50 %
SAB	4.0 ± 3.00	1.3 ± 1.15	39.7 ± 8.08	5.0	8 %	3 %	79 %	10 %
Shaking	11.0 ± 7.55	3.3 ± 3.21	29.0 ± 6.24	6.7	22 %	7 %	58 %	13 %
5L STR	25.0	14.0	97.0	14.0	17 %	9 %	65 %	9 %

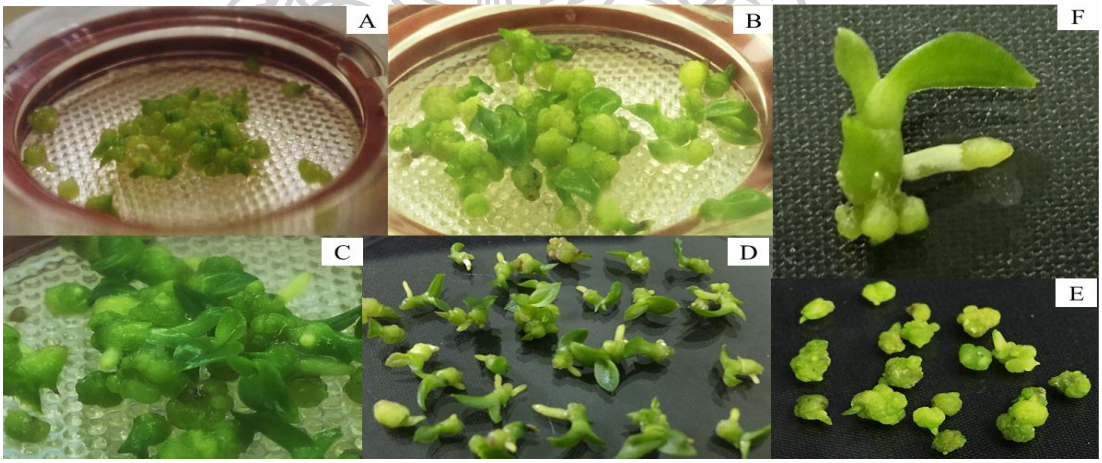
มหาวิทยาลัยศิลปากร

จากการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ในระบบอาหารทั้งหมด 6 ระบบ ภาพที่ 32 พบว่า โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (Temporary immersion bioreactor, TIS) มีการพัฒนาไปเป็นต้น ใบและราก มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 46 (23 ต้น/50 โปรโตคอร์ม) (ตารางที่ 11) โดยโปรโตรคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIS จะมีการพัฒนาเป็นใบในสัปดาห์ที่ 2 และมีการพัฒนามีจุดกำเนิดรากในสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งมีโปรโตคอร์มบางส่วนที่พัฒนาเป็นต้นอย่างเดียว 9 ต้น คิดเป็นร้อยละ 18 และโปรโตคอร์มส่วนที่เหลือร้อยละ 36 เป็นโปรโตคอร์มที่พัฒนามีเพียงแค่จุดกำเนิดต้น (shoot primordia) ภาพที่ 33 รองลงมาคือถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (Nutrient spray bioreactor, NSB) มีจำนวนโปรโตคอร์มที่พัฒนาไปเป็นต้น ใบและรากได้ 6 ต้น (ร้อยละ 12) ซึ่งมีโปรโตคอร์มที่พัฒนาไปเป็นต้นเพียงอย่างเดียว 2 ต้น (ร้อยละ 4) โปรโตคอร์มที่พัฒนามีเพียงแค่จุดกำเนิดต้น 17 โปรโตคอร์ม (ร้อยละ 34) และสังเกตเห็นได้ว่าโปรโตคอร์มเกิดลักษณะการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 34E) 25 โปรโตคอร์มคิดเป็นร้อยละ 50 (ตารางที่ 11) เนื่องจากหัวพ่นฝอยอาหารของระบบ NSB พ่นฝอยอาหารให้พืชไม่ทั่วถึงทำให้โปรโตคอร์มเกิดความเครียดเนื่องจากไม่ได้รับสารอาหารจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Browning) เมื่อพืชเกิดความเครียดจะมีการสะสมของสารฟีนอลิก (phenolic compounds) โดยมีผลต่อการยับยั้งการเจริญและทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชตายระหว่างการเพาะเลี้ยง (Rittirat, Thammasiri, & Te-chato, 2012) ในขณะโปรโตคอร์มบางส่วนที่ถูกแช่ในอาหารเหลวตลอดเวลาโดยมีการให้อากาศแก่ระบบ 3 ชนิด (5L STR (1.3 VVM), SAB (2 VVM), Shaking (120 rpm)) พบโปรโตคอร์มมีการเปลี่ยนเป็นโปรโตคอร์มสีน้ำตาล (browning) แต่ในbioreactor มีน้อยกว่าอีก 2 ระบบ ซึ่งการเกิดอาการดำคล้ำของโปรโตคอร์มขึ้นเป็นตัวบ่งชี้ที่แสดงถึงการตายของโปรโตคอร์ม อาจเกิดจากการตายของกลุ่มเซลล์ที่เป็นส่วนของพื้นผิวของโปรโตคอร์ม เนื่องจากการหมุนของของเหลวเมื่อพ่นให้อากาศกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่ก่อให้เกิดความเสียหายที่กับพื้นผิวของโปรโตคอร์ม (Winarto et al., 2013)

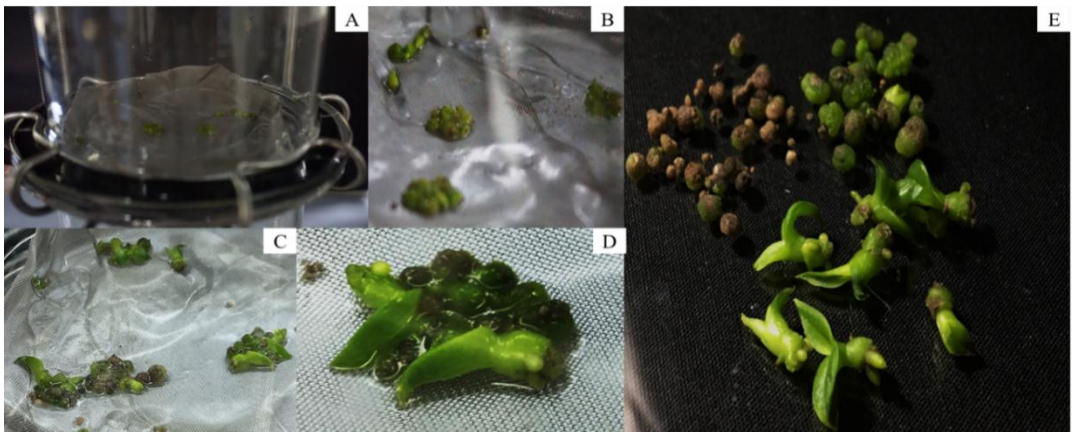
แต่อย่างไรก็ตามโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ออกแบบและจัดตั้งขึ้นทั้ง 3 ระบบมีการพัฒนาไปเป็น ต้น ใบและรากได้เร็วกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (ภาพที่ 32) เนื่องจากโปรโตคอร์มในอาหารวุ้นส่วนใหญ่พัฒนามีเพียงจุดกำเนิดต้น (ภาพที่ 32B) จากการเปรียบเทียบการพัฒนาไปเป็น ต้น ใบและราก ของโปรโตคอร์มในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่เพาะเลี้ยงโปรโตคอร์ม 150 โปรโตคอร์มในอาหารเหลวปริมาตร 1 ลิตร พบว่ามีโปรโตคอร์มบางส่วนไปติดที่แผงกั้นสแตนเลสภายในถัง (ภาพที่ 37A) และโปรโตคอร์มอีกส่วนจมอยู่ในอาหารเหลวที่ให้อากาศ 1.3 VVM (ภาพที่ 37B) ซึ่งโปรโตคอร์มที่ติดอยู่แผงกั้นนั้นจะไม่จมอยู่ในอาหารเหลวแต่มีบางส่วนที่สัมผัสกับอาหารเหลวนั้นมีการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และราก

ในขณะที่โปรโตคอร์มที่จุ่มในอาหารเหลวจะมีการพัฒนามีแค่ใบเท่านั้น ไม่มีจุดกำเนิดรากเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้กำหนดให้อากาศเข้าภายในระบบ 1.3 VVM แต่ไม่มีการกวนด้วยใช้ใบพัดเพื่อไม่ให้เกิดแรงเฉือนที่อาจมีผลกระทบต่อการพัฒนาของโปรโตคอร์ม ซึ่งจะสังเกตพบฟองที่ผิวของอาหารเหลวในถังปฏิกรณ์และมีโปรโตคอร์มไปเกาะตามผนังภาชนะ ซึ่งอาจเนื่องมาจากเส้นผ่านศูนย์กลางของฐานภาชนะเพาะเลี้ยงและส่วนบนของภาชนะเพาะเลี้ยงนั้นเท่ากัน (K.-Y. Paek et al., 2001) เพื่อเอาชนะปัญหานี้จึงมีการออกแบบถังปฏิกรณ์ให้ส่วนบนของภาชนะเพาะเลี้ยงมีเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่ขึ้นและ/หรือออกแบบเป็นรูปลูกโป่ง (balloon) ซึ่งมีการนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้ฟาแลนนอปซิส (K. Y. Paek et al., 2005) และ *Cymbidium sinense* (Gao, Wu, Piao, Park, & Lian, 2014) ซึ่งให้ผลในการเจริญที่ดี

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มใน TIS พบว่าสูงกว่าใน STR 1.7 เท่า (ตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่าโปรโตคอร์มในระบบอาหารเหลวแบบ TIS มีประสิทธิภาพในการพัฒนาโปรโตคอร์มไปเป็นต้น ใบและรากได้ดีกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม โดยมีการนำระบบ TIS มาใช้พัฒนาโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Cattleya walkeriana* (Moreira, Silva, Santos, Reis, & Landgraf, 2013) และ *Vanda tricolor* (Esyanti, 2016) ด้วยเช่นกัน และก็พบว่าโปรโตคอร์มมีการพัฒนาดีกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการดั้งเดิมซึ่งมีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดลองนี้



ภาพที่ 33 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS) (A) โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIS เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (B) โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIS เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (C)โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIS เป็นเวลา 24 วัน (D) โปรโตคอร์มในระบบ TIS เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (E) โปรโตคอร์มที่มีเพียงจุดกำเนิดต้น (F) โปรโตคอร์มที่พัฒนาไปเป็นต้นอ่อนและราก



ภาพที่ 34 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร (NSB)

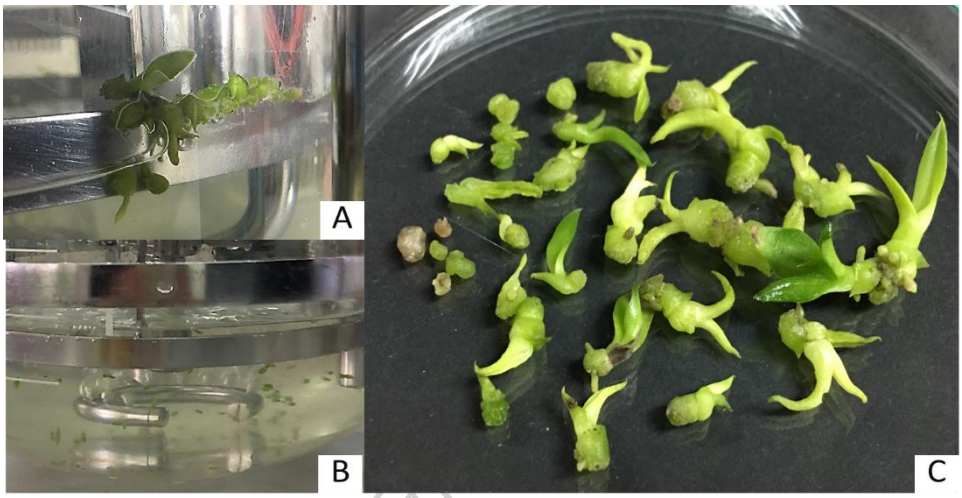
A) โปรโตคอร์ม 0 วัน (B) โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIS เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (C) 3สัปดาห์ (D) โปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIS เป็นเวลา 24 วัน (E) โปรโตคอร์มที่ 4 สัปดาห์

ภาพที่ 35 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ120 rpm

(A) สัปดาห์ที่ 1 (B) สัปดาห์ที่ 3 (C) สัปดาห์ที่ 4

ภาพที่ 36 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB)

(A) สัปดาห์ที่ 1 (B) สัปดาห์ที่ 3 (C) สัปดาห์ที่ 4



ภาพที่ 37 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR (A) โปรโตคอร์มส่วนที่ติดอยู่ระหว่างแผงกั้นภายในถัง (B) โปรโตคอร์มส่วนที่แช่ในอาหารเหลว (C) สัปดาห์ที่ 4

ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกุลหวายในระบบอาหารเหลว

ระบบอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง	**น้ำหนักสด (กรัม)**	**น้ำหนักแห้ง (กรัม)**	**Growth ratio**
อาหารวุ้น (Agar)	0.6718 ± 0.23	0.0651 ± 0.02	10.0
ระบบแบบแช่ชั่วคราว (TIS)	0.9674	0.1046	14.9
ระบบแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (NSB)	0.5434	0.0679	7.9
ระบบพ่นให้อากาศ (SAB)	0.5159± 0.02	0.0707 ± 0.00	7.5
ระบบบนเครื่องเขย่า (Shaking)	1.1316± 0.08	0.1616± 0.02	17.6
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR (5L)	1.0483	0.1577	8.8

ตารางที่ 13 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่มีจุดกำเนิดต้นอ่อน

ระบบอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง	ความกว้างโปรโตคอร์มที่มีจุดกำเนิดต้นอ่อน (มิลลิเมตร)	ความกว้างของโปรโตคอร์มที่เกิดสีน้ำตาล (มิลลิเมตร)
อาหารวุ้น (Agar)	$2.26^{cd} \pm 0.57$	-
ระบบแบบแช่ชั่วคราว (TIS)	$2.73^{b} \pm 0.66$	-
ระบบแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (NSB)	$2.54^{bc} \pm 0.63$	$1.88^{a} \pm 1.23$
ระบบพ่นให้อากาศ (SAB)	$2.16^{d} \pm 0.56$	$1.40^{b} \pm 1.23$
ระบบบนเครื่องเขย่า (Shaking)	$2.80^{b} \pm 0.85$	$1.97^{a} \pm 1.23$
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR (5L)	$3.20^{a} \pm 1.23$	$2.18^{a} \pm 1.23$

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 14 การเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มที่พัฒนาไปเป็นต้นและราก

ระบบอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง	ความสูงของต้น (มิลลิเมตร)*	ความกว้างลำต้น (มิลลิเมตร)*	ความยาวของใบ (มิลลิเมตร)*	ความยาวของราก (มิลลิเมตร)*	จำนวนราก/ต้น*	จำนวนใบ/ต้น*
อาหารวุ้น (Agar)	-	-	-	-	-	-
ระบบแบบแช่ชั่วคราว (TIS)	$4.30^{c} \pm 0.92$	$2.28^{c} \pm 0.43$	$4.00^{bc} \pm 1.03$	$2.14^{a} \pm 0.84$	$1.1^{b} \pm 0.34$	$1.4^{c} \pm 0.51$
ระบบแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (NSB)	$5.40^{ab} \pm 1.10$	$2.30^{c} \pm 0.47$	$4.83^{ab} \pm 1.37$	$1.56^{ab} \pm 0.87$	$2.0^{a} \pm 0.63$	$2.1^{a} \pm 0.83$
ระบบพ่นให้อากาศ (SAB)	$4.71^{bc} \pm 1.18$	$2.68^{bc} \pm 0.38$	$3.71^{d} \pm 1.14$	$1.03^{b} \pm 0.18$	$1.0^{b} \pm 0.00$	$1.5^{c} \pm 0.51$
ระบบบนเครื่องเขย่า (Shaking)	$5.52^{ab} \pm 1.01$	$2.94^{b} \pm 0.50$	$3.46^{ab} \pm 1.35$	$1.28^{b} \pm 0.50$	$1.1^{b} \pm 0.32$	$1.7^{bc} \pm 0.45$
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR (5L)	$5.63^{a} \pm 1.71$	$3.44^{a} \pm 0.94$	$5.34^{a} \pm 2.49$	$2.10^{a} \pm 0.76$	$2.3^{a} \pm 1.38$	$1.9^{ab} \pm 0.74$

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ)$p < 0.05$)

จากตารางที่ 13 พบว่าโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm มีน้ำหนักสดน้ำหนักแห้งและอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อเทียบกับระบบอาหารชนิดอื่น แต่เมื่อพิจารณาที่การเจริญเติบโตและการพัฒนาไปเป็นต้น ใบ ราก (ตารางที่ 13 และ14) พบว่าโปรโตคอร์มที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR ขนาด 5 ลิตร มีความสูงของต้น ความยาวของใบ ความกว้างของต้น และยาวของใบสูงที่สุด คือ 5.63 3.44 และ 5.34 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่พบว่าโปรโตคอร์มที่ในระบบ TIS มีการพัฒนาของรากดีที่สุดโดยมีความยาว 2.14 มิลลิเมตร

แต่เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และราก ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ออกแบบและจัดตั้ง 3 ระบบ ได้แก่ระบบ TIS ระบบ NSB และระบบ SAB จะเห็นว่า โปรโตคอร์มในระบบ NSB ที่มีการพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และราก ได้นั้นมีความสูงของใบ (5.40 มิลลิเมตร) ความยาวของใบ (4.83 มิลลิเมตร) จำนวนราก (2 ราก/ต้น) และจำนวนใบ (2.1 ใบ/ต้น) มากกว่าโปรโตคอร์มในระบบ TIS และ SAB แต่ระบบ TIS มีจำนวนของโปรโตคอร์มที่พัฒนาไปเป็นต้นใบและ ราก อีกทั้งยังมีการพัฒนาของความยาวรากมากกว่าระบบอื่นๆ

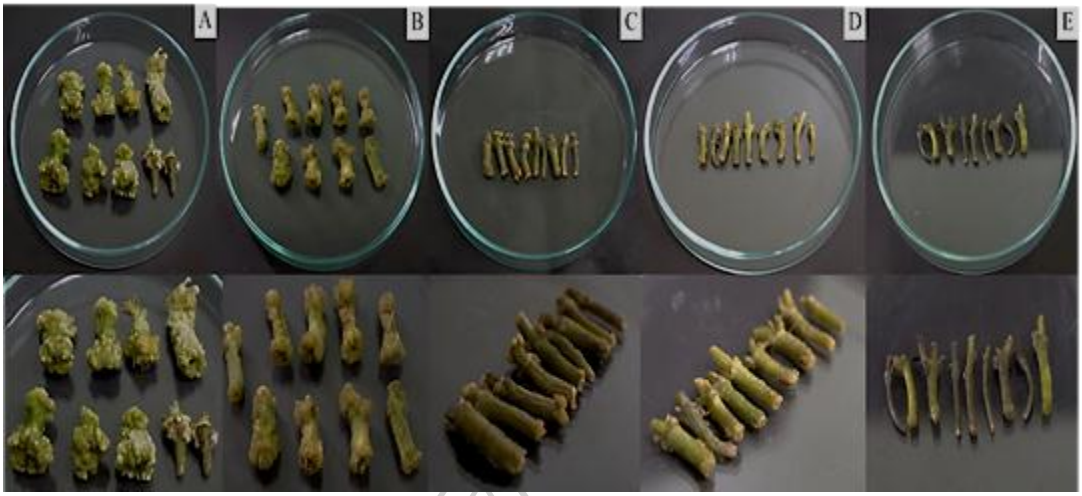
ตารางที่ 15 ค่าพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าในระบบอาหารเหลวหลังจากเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มกล้วยไม้สกลุลหวายเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ระบบอาหาร	พีเอช			ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)		
	ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ	ก่อนเลี้ยง	สัปดาห์ที่ 4	ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อ	ก่อนเลี้ยง	สัปดาห์ที่ 4
Agar	5.9	5.4	-	-	-	-
TIS	5.9	5.4	3.50	5.20	5.49	5.47
NSB	5.9	5.4	3.40	5.20	5.49	6.01
SAB	5.9	5.4	3.57	5.20	5.49	6.22
Shaking	5.9	5.4	3.72	5.20	5.49	5.38
5 L STR	5.6	5.0	3.68	5.20	5.57	6.81

พิจารณาค่าการนำไฟฟ้าจากตารางที่ 15 พบว่าค่าการนำไฟฟ้าในระบบ TIS และระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่ามีค่าการนำไฟฟ้าลงลดจากก่อนเพาะเลี้ยงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่โปรโตคอร์มมีการเจริญและพัฒนาได้ดีในทั้ง 2 ระบบ (ตารางที่ 12) ซึ่งการวัดค่าการนำไฟฟ้าในอาหารเหลวนั้นเป็นการประเมินค่าชีวมวลของพืชทางอ้อม โดยค่าการนำไฟฟ้าจะผกผันกับน้ำหนักสดของเซลล์และเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง เนื่องเซลล์มีการนำเอาสารอาหารไปใช้ในการพัฒนาของเซลล์ทำให้ความเข้มข้นของสารในอาหารลดลงดังนั้นค่าการนำไฟฟ้าในจึงลดตามไปด้วย ซึ่งสารดังกล่าวคือ เกลือไนเตรต จะอยู่ในรูปของเกลือไอออนที่มีอยู่ในอาหารเป็นจำนวนมากและมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเหลว (Cui et al., 2014; Ryu, Lee, & Roman, 1990) อาหารเหลวหลังจากผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมีค่า pH 5.4 และเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตคอร์มผ่านไป 4 สัปดาห์ อาหารเหลวมีค่าพีเอชลดลงเป็น 3 ซึ่งการวัด pH เป็นการแสดงถึงความความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในอาหาร แสดงให้เห็นว่าโปรโตคอร์มมีการดูดซึมแอมโมเนียมส่งผลให้ค่า pH ในอาหารลดต่ำลง (Lulu et al., 2015) ทำให้ในอาหารมีความเข้มข้นของไนเตรทมากค่าการนำไฟฟ้าจึงเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งพืชบางชนิดจะใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน (Wu, Lian, Gao, Park, & Piao, 2011)

4.3.3 การพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของแก่นตะวัน

จากการนำชิ้นพืชบริเวณข้อลำต้นของแก่นตะวันปลอดเชื้อความยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ไปเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นและในระบบอาหารเหลว MS ที่เติม BA 5 มิลลิกรัม/ลิตร chlorochlorine chloride 500 มิลลิกรัม/ลิตร Thiamine HCl 0.4 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำตาลซูโครส 80 กรัม/ลิตร ในสภาวะอุณหภูมิ 25±2°C ที่มีการให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นพืชบริเวณข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (Temporary immersion system, TIS) และบนอาหารวุ้นมีการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็ก (ภาพที่ 38A และ 38B) โดยในช่วงระยะ 7 วันแรกมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของชิ้นพืชข้อลำต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นและในระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS) ซึ่งสังเกตเห็นได้ว่าข้อลำต้นมีการบวมตัวขยายขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 39) ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 2 ระบบดังกล่าวเริ่มมีการขยายขนาดบริเวณใต้ข้อลำต้นเป็นก้อนกลมและผิวของชิ้นพืชมีลักษณะขรุขระ แต่พบว่าชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวแบบพ่นฝอยอาหาร (NSB) มีลักษณะคล้ายแคลลัสเกาะบริเวณปลายชิ้นพืชที่มีรอยตัด (ภาพที่ 38C) สำหรับชิ้นพืชที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 rpm มีลักษณะผิวขรุขระคล้ายเกิดแคลลัสเล็กน้อย (ภาพที่ 38D) แต่ข้อลำต้นที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศ (Air sparging) พบว่าชิ้นพืชมีลักษณะเป็นสีน้ำตาล (Browning) ผิวเรียบ (รูปที่ 38E) และมีลักษณะฉ่ำน้ำ (hyperhydricity)



ภาพที่ 38 การชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในระบบอาหารต่างๆ (A) อาหารแข็ง (B) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS) (4 h) (C) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร (D) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นให้อากาศ(E) อาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ในสภาวะอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ที่มีการให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ภาพที่ 39 ข้อลำต้นแก่นตะวันในระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว

(A) 2 สัปดาห์ (B) 3 สัปดาห์ (C) 4 สัปดาห์

ภาพที่ 40 หัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในอาหารวุ้นและ TIS
A) อาหารวุ้น (B) ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS) ที่มีการแช่ในอาหารทุกๆ 2 ชั่วโมงเป็นเวลา 1นาที (C) ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว (TIS) ที่มีการแช่ในอาหารทุกๆ4 ชั่วโมงเป็นเวลา 2 นาที 4 สัปดาห์

ตารางที่ 16 การเจริญเติบโตของชิ้นพืชหลังเพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์

ระบบอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง	น้ำหนักสด (กรัม)*	ความยาวข้อลำต้น (มิลลิเมตร)*	เส้นผ่านศูนย์กลางข้อลำต้น (มิลลิเมตร)*
อาหารวุ้น (Agar)	$0.4344^{a} \pm 0.27$	$16.58^{a} \pm 1.95$	$6.82^{a} \pm 3.45$
ระบบแช่ชั่วคราว (TIS) (2h)	$0.3967^{a} \pm 0.18$	$16.96^{a} \pm 0.90$	$6.27^{a} \pm 1.34$
ระบบแช่ชั่วคราว (TIS) (4h)	$0.4099^{a} \pm 0.11$	$16.05^{ab} \pm 1.53$	$7.18^{a} \pm 0.83$
ระบบพ่นฝอยอาหรเหลว (NSB)	$0.1114^{b} \pm 0.04$	$15.09^{b} \pm 0.98$	$2.53^{b} \pm 0.52$
ระบบแบบพ่นให้อากาศ (SAB)	$0.0621^{b} \pm 0.03$	$15.19^{b} \pm 1.69$	$1.99^{b} \pm 0.55$
ระบบบนเครื่องเขย่า (shaking)	$0.0857^{b} \pm 0.02$	$15.46^{b} \pm 1.55$	$2.39^{b} \pm 0.42$

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากการเพาะเลี้ยงข้อลำต้นในอาหารเหลวสูตรสำหรับชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กเป็นเวลา สัปดาห์ 4 พบว่า ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว)TIS) มีแนวโน้มที่สามารถชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กได้ดีกว่าในระบบอาหารเหลวชนิดอื่น และมีน้ำหนักสด ความยาว และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นมากกว่าข้อลำต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดอื่น (ตารางที่ 16) เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงข้อลำต้นแก่นตะวันบนอาหารวุ้นที่ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กในหลอดทดลอง (Gamburg et al., 1999; Polsa & Ngampanya, 2015) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงข้อลำต้นแก่นตะวันในระบบ TIS โดยปรับเปลี่ยนสภาวะการเพาะเลี้ยงให้มีความถี่ของการให้อาหารเหลวมากขึ้นจากเดิมจะมีให้ข้อลำต้นแก่นตะวันแช่ในอาหารเหลว 2 นาทีในเวลาทุกๆ 4 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแช่ในอาหารเหลว 2 นาทีในทุกๆ 2 ชั่วโมง ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 250 มิลลิลิตร พบว่าการเจริญเติบโตของข้อแก่นตะวันในระบบ TIS ที่ให้อาหารทุกๆ 2 ชั่วโมง (TIS (2 h)) (ภาพที่ 41) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของน้ำหนักสด ความยาวข้อลำต้นและเส้นผ่านศูนย์กลางข้อลำต้น กับการเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นและในระบบ TIS ที่ให้อาหารทุกๆ 4 ชั่วโมง (TIS (4 h))

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลวเป็นระยะเวลา สัปดาห์ 4(ตารางที่ 17) พบว่าการเจริญเติบโตของส่วนบนเหนือข้อลำต้นของระบบ TIS (2 h) มีค่าน้ำหนักสด และ เส้นผ่านศูนย์กลางของข้อลำต้นมากที่สุด (0.1803 กรัมและ 8.57 มิลลิเมตร) ในขณะที่ส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของอาหารวุ้นมีค่าน้ำหนักสดและ ความยาวของข้อลำต้นมากที่สุด (0.2913 กรัมและ 11.58 มิลลิเมตร) แต่อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของข้อลำต้นแก่นตะวันในอาหารวุ้น ระบบ TIS (2 h) และ ระบบ TIS (4 h) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากตารางที่ 18 จะเห็นว่ามีเพียง 2 ระบบที่ข้อลำต้นแก่นตะวันมีการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็ก ได้แก่อาหารวุ้น ระบบ TIS (2 h) และ ระบบ TIS (4 h) ซึ่ง ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราวที่มีการแช่ชิ้นพืชเป็นเวลา 2นาที ในทุกๆ 4ชั่วโมง (TIS (4 h)) มีจำนวนหัวขนาดเล็กมากกว่าในอาหารระบบอื่น และจากตารางที่ 19 พบว่าข้อลำต้นแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงเป็นอาหารวุ้นมีการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็ก โดยมีน้ำหนักสดและเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวขนาดเล็กที่บริเวณใต้ข้อลำต้นมากที่สุด ในขณะที่ข้อลำต้นแก่นตะวันระบบ TIS จะพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กที่บริเวณเหนือข้อลำต้น แต่ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในระบบ NSB ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กได้ ถึงแม้ว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (Nutrient Spray Bioreactor: NSB) จะประสบความสำเร็จในการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของมันฝรั่ง (Rahman et al., 2015)

และความต้องของการชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันและมันฝรั่งจะมีความคล้ายคลึงกัน (Dodds et al., 1992) แต่ในขณะเพาะเลี้ยงข้อลำต้นของมันฝรั่งนั้นจะชักนำให้เกิดเป็นต้นก่อนแล้วจึงชักนำต่อไปอีก 10 สัปดาห์เพื่อให้พัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็ก (Rahman et al., 2015) ซึ่งในงานวิจัยนี้ไม่ประสบความสำเร็จในชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันในระบบ NSB อาจเนื่องมาจากได้รับสารอาหารไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้พัฒนาไปหัวขนาดเล็ก เพราะระบบ NSB จะพ่นฝอยอาหารเหลวทำให้อาหารเหลวไปเกาะเคลือบที่ผิวชิ้นพืช ในขณะที่ชิ้นพืชบางชิ้นไม่ได้รับสารอาหารเนื่องจากถูกแรงกระแทกระหว่างพ่นอาหารเหลวให้กระเด็นออกไปยังบริเวณขอบภาชนะ ในขณะที่ข้อลำต้นแก่นตะวันในระบบ TIS มีการสัมผัสกับอาหารเหลวได้มากกว่า ทำให้พืชสามารถนำสารอาหารดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กได้ (Debergh, 1982)

ตารางที่ 17 การเจริญเติบโตของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์

ระบบอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง	น้ำหนักสด (กรัม)*		ความยาวข้อลำต้น (มิลลิเมตร)*		เส้นผ่านศูนย์กลางข้อลำต้น (มิลลิเมตร)*	
	ส่วนบน	ส่วนล่าง	ส่วนบน	ส่วนล่าง	ส่วนบน	ส่วนล่าง
Agar	$0.0782^{b} \pm 0.04$	$0.2913^{a} \pm 0.23$	$5.74^{b} \pm 1.64$	$11.58^{a} \pm 2.32$	$3.52^{c} \pm 1.09$	$6.97^{a} \pm 3.61$
TIS (2h)	$0.1803^{a} \pm 0.14$	$0.2142^{a} \pm 0.07$	$6.04^{ab} \pm 0.80$	$10.72^{ab} \pm 0.73$	$8.57^{a} \pm 3.29$	$6.17^{a} \pm 1.61$
TIS (4h)	$0.1567^{a} \pm 0.06$	$0.2344^{a} \pm 0.05$	$6.77^{a} \pm 0.85$	$9.40^{c} \pm 0.95$	$6.74^{b} \pm 0.96$	$7.05^{a} \pm 0.82$
NSB	$0.0384^{bc} \pm 0.01$	$0.0671^{b} \pm 0.03$	$5.87^{b} \pm 0.61$	$9.94^{bc} \pm 1.24$	$2.25^{d} \pm 0.56$	$2.58^{b} \pm 0.61$
SAB	$0.0246^{c} \pm 0.01$	$0.0319^{b} \pm 0.02$	$5.75^{b} \pm 1.08$	$9.11^{c} \pm 1.60$	$1.66^{d} \pm 0.49$	$1.77^{b} \pm 0.54$
Shaking	$0.0328^{c} \pm 0.01$	$0.0489^{b} \pm 0.01$	$6.19^{ab} \pm 0.92$	$9.64^{bc} \pm 1.54$	$2.16^{d} \pm 0.56$	$2.25^{b} \pm 0.31$

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 18 จำนวนหัวแก่นตะวันขนาดเล็กที่ชักนำได้ในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์

ระบบเพาะเลี้ยง อวัยวะพืช	จำนวนหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้/ชิ้นพืช	
	ส่วนบนเหนือข้อลำต้น*	ส่วนล่างใต้ข้อลำต้น*
Agar	$0.41^{b} \pm 0.69$	$0.59^{b} \pm 0.60$
TIS (2h)	$1.56^{b} \pm 0.51$	$1.00^{a} \pm 0.00$
TIS (4h)	$1.89^{a} \pm 0.60$	$1.00^{a} \pm 0.00$
NSB	$0.00^{c} \pm 0.00$	$0.00^{c} \pm 0.00$
SAB	$0.00^{c} \pm 0.00$	$0.00^{c} \pm 0.00$
Shaking	$0.00^{c} \pm 0.00$	$0.00^{c} \pm 0.00$

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 19 ขนาดหัวแก่นตะวันที่ชักนำได้ในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์

ระบบเพาะเลี้ยง อวัยวะพืช	**น้ำหนักสดของหัวขนาดเล็ก (กรัม)***		**ความยาวของหัวขนาดเล็ก (มิลลิเมตร)***		**เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)***	
	ส่วนบน	**ส่วนล่าง**	**ส่วนบน**	**ส่วนล่าง**	**ส่วนบน**	**ส่วนล่าง**
Agar	$0.0079^{b} \pm 0.02$	$0.4028^{a} \pm 0.14$	$3.08^{b} \pm 0.85$	$8.11^{a} \pm 2.99$	$3.44^{b} \pm 0.75$	$9.13^{a} \pm 2.70$
TIS(2h)	$0.0960^{a} \pm 0.05$	$0.1796^{b} \pm 0.08$	$5.06^{a} \pm 1.02$	$7.71^{ab} \pm 2.44$	$5.03^{a} \pm 1.24$	$6.14^{b} \pm 0.99$
TIS(4h)	$0.0499^{b} \pm 0.01$	$0.1732^{b} \pm 0.04$	$4.31^{a} \pm 0.92$	$5.88^{c} \pm 1.23$	$5.17^{a} \pm 0.90$	$6.98^{b} \pm 0.81$

* หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.)

ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 20 ค่าพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าในระบบอาหารเหลวสำหรับชักนำให้เกิดหัวขนาดเล็กของแก่นตะวัน

ระบบอาหารเหลว	ค่าพีเอช			ค่าการนำไฟฟ้า (mS/cm)		
	ก่อนเพาะเลี้ยง	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 3	ก่อนเพาะเลี้ยง	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 3
ระบบแบบแช่ชั่วคราว (TIS) (2 h)	5.6	-	3.94	5.05	-	5.33
ระบบแบบแช่ชั่วคราว (TIS) (4 h)	5.6	4.13	4.00	5.03	4.95	4.79
ระบบแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (NSB)	5.6	3.95	3.64	5.29	5.47	5.30
ระบบพ่นให้อากาศ (SAB)	5.6	4.22	4.17	5.03	5.07	5.65
ระบบบนเครื่องเขย่า (Shaking)	5.6	4.35	4.48	5.03	5.03	5.21

การวัดค่าการนำไฟฟ้าในอาหารเหลวนั้นเป็นการติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ทางอ้อม เนื่องจากค่าการนำไฟฟ้าจะขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือไนเตรท ซึ่งมีในอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช เมื่อเซลล์มีการนำไนเตรทไอออนไปใช้ในการเจริญเติบโตจะส่งผลให้ความเข้มข้นของเกลือไนเตรทลดลง โดยค่าการนำไฟฟ้าจะผกผันกับน้ำหนักสดของเซลล์และเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง (Cui et al., 2014; Ryu et al., 1990) ตารางที่ 20 พบว่าค่าการนำไฟฟ้ามีการเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าในอาหารมีปริมาณของไนเตรทไอออนอยู่มาก ในขณะเดียวกัน pH หลังการเพาะเลี้ยงมีค่าลดต่ำลง ซึ่ง pH บ่งชี้ถึงความความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในอาหาร แสดงให้เห็นว่าแก่นตะวันในระบบมีการดูดซึมแอมโมเนียมส่งผลให้ค่า pH ในอาหารลดต่ำลง (Lulu et al., 2015)

4. 4 การประเมินประสิทธิภาพและราคาต้นทุนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ

จากการออกแบบและจัดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 3 ระบบ ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (Simple Aeration bioreactor, SAB) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (Temporary Immersion System Bioreactor, TIS) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (Nutrient Spray Bioreactor, NSB) ซึ่งถังปฏิกรณ์ชีวภาพดังกล่าวนั้นเป็นแบบกึ่งอัตโนมัติ (Semi-automate) โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่จัดทำขึ้นมานี้จะถูกควบคุมการทำงานของการเปิดหรือปิดปั๊มอากาศระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยอัตโนมัติตามระยะเวลาที่กำหนดด้วยเครื่องตั้งเวลาเปิด-ปิดอัตโนมัติ (Timer) ซึ่งปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ที่ใช้ในระบบ TIS จะถูกตั้งเวลาให้ทำงานอัตโนมัติทุกๆ 4 ชั่วโมงและทุกๆ 2ชั่วโมง โดยจะปั๊มจะทำงาน 1 นาที จากนั้นระบบจะหยุดการทำงานโดยอัตโนมัติตามเวลาที่ได้ตั้งไว้ ในขณะที่ peristaltic pump และปั๊มอากาศที่ใช้ในระบบ NSB และ SAB จะถูกควบคุมการทำงานโดยอัตโนมัติเช่นเดียวกัน ซึ่งจะทำงานทุกๆ 4 ชั่วโมงและเครื่องจะทำงานเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาระบบจะหยุดทำงาน โดยอัตโนมัติ ซึ่งช่วยให้สะดวกในการทำการทดลอง แต่การวัดพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น pH ค่าการนำไฟฟ้า อุณหภูมิ ยังต้องใช้วิธีการนำอาหารเหลวไปวัดค่าดังกล่าวเองภายหลังจากการเพาะเลี้ยงพืชเสร็จ จากตารางที่ 21 พบว่าระบบกึ่งอัตโนมัตินั้นมีราคาต้นทุนที่ต่ำกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR แบบอัตโนมัติ 22-338 เท่า ในขณะที่พบโปรโตคอร์มพัฒนาไปเป็นต้น ใบและรากในระบบ TIS ได้ดีกว่า STR และมีราคาต้นทุนต่ำกว่า STR 338 เท่า แต่อย่างไรก็ตามถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชในการเพิ่มจำนวนผลผลิต การชักนำให้เกิดอวัยวะพิเศษและการพัฒนาเอ็มบริโอไปเป็นต้นซึ่งให้ผลผลิตที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชแบบวิธีดั้งเดิม

ตารางที่ 21 ราคาต้นทุนของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ออกแบบและจัดตั้ง

ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ออกแบบและจัดตั้ง	**จำนวน**	**จำนวนเงิน(บาท)**
1. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS)	1	14,848.85
2. ระบบอาหารเหลวแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB)	1	3,842.35
3. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (NSB)	1	58,795.00
ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่นิยมใช้ทั่วไป	**จำนวน**	**จำนวนเงิน (บาท)**
ถังปฏิกรณ์การหมักขนาด 3 ลิตรพร้อมชุดควบคุมอัตโนมัติ	1	1,300,000

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาถังปฏิกรณ์ชีวภาพต้นทุนต่ำโดยได้ออกแบบและจัดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกึ่งอัตโนมัติ ขึ้นมา 3 ระบบ ได้แก่ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (Temporary Immersion System: TIS) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (Nutrient Spray Bioreactor: NSB) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบที่มีการพ่นอากาศอย่างง่าย (Simple Aeration Bioreactor: SAB) โดยได้นำถังปฏิกรณ์ชีวภาพดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงอวัยวะพืช (plant organ culture) 3 ชนิด ได้แก่ การเพิ่มจำนวนต้นสับปะรด การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ และการพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของแก่นตะวัน โดยเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชในระบบอาหารวุ้นและอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิม พบว่า ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบที่มีการพ่นอากาศอย่างง่าย (SAB) สามารถเพิ่มจำนวนต้นและการเจริญของต้นอ่อนสับปะรดได้ดีที่สุด ส่วนการพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ของโปรโตคอร์มกล้วยไม้นั้น ให้ผลดีสุดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (NSB) ในขณะที่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ TIS เป็นระบบเดียวที่สามารถชักนำให้พัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันได้ โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้งสามระบบมีต้นทุนต่ำกว่า STR ประมาณ 22-338 เท่า จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่พัฒนาขึ้นมามีต้นทุนการจัดตั้งต่ำและให้ผลในการเพาะเลี้ยงอวัยวะพืชได้ดีกว่าการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ STR ที่ควบคุมโดยระบบอัตโนมัติ จึงน่าจะมีประโยชน์ต่อการขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจของประเทศในปริมาณมากและการพัฒนาระบบการเกษตรของชาติ

รายการอ้างอิง

Akin-Idowu, P. E., Akinyemi, S. O. S., & Ibitoye, D. O. (2014). Influence of medium type and growth regulators on *in vitro* micropropagation of pineapple (Ananas comosus (L.), var. Smooth cayenne. *African Journal of Plant Science, 8(9)*, 450-456. doi:10.5897/AJPS2014.1184

Akita, M., & Takayama, S. (1994). Stimulation of potato (Solanum tuberosum L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Reports, 13*(3-4), 184-187.

Alla, N. A., Domokos-Szabolcsy, É., El-Ramady, H., Hodossi, S., Fári, M., Ragab, M., & Taha, H. (2014). Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.): A review of in vivo and in vitro propagation *International Journal of Horticultural Science*.

Annisa Ratna Nurillah, Esyanti, R. R., & Manurung, R. (2014). Comparison of growth medium bioconversion in to vanda tricolor biomass in thin layer liquid medium culture system and TIS RITA biooreactor *International Journal of Technical Research and Applications, 2*(5), 04-06.

Avila, A. D., Pereyra, S. M., & Argüello, J. A. (1996). Potato micropropagation: Growth of cultivars in solid and liquid media. *Potato Research, 39*(2), 253-258.

Be, L. V., & Debergh, P. C. (2006). Potential low-cost micropropagation of pineapple (Ananas comosus). *South African Journal of Botany, 72*, 191-194. doi:10.1016/j.sajb.2005.07.002

Behin, J. (2012). Deinking in bubble column and airlift reactors: Influence of wastewater of Merox unit as pulping liquor. *Chemical Engineering Research and Design, 90*(8), 1045-1051. doi:10.1016/j.cherd.2011.10.021

Cardillo, A. B., Otálvaro, A. Á. M., lBusto, V. D., Talou, J. R., Velásquez, M. E., & Giulietti, A. M. (2010). Scopolamine, anisodamine and hyoscyamine production by Brugmansia candida hairy root cultures in bioreactors. *Process Biochemistry, 45*(9), 1577-1581.

Chattopadhyay, S., Srivastava, A. K., Bhojwani, S. S., & Bisaria, V. S. (2001). Development of suspension culture of Podophyllum hexandrum for production of podophyllotoxin. *Biotechnology Letters, 23*(24), 2063-2066.

Chin, W. Y. W., Annuar, M. S. M., Tan, B. C., & Khalid, N. (2014). Evaluation of a laboratory scale conventional shake flask and a bioreactor on cell growth and regeneration of banana

cell suspension cultures. *Scientia Horticulturae, 172*, 39-46.

Cui, H.-Y., Murthy, H. N., Moh, S. H., Cui, Y., Lee, E.-J., & Paek, K.-Y. (2014). Protocorm culture of Dendrobium candidum in balloon type bubble bioreactors. *Biochemical Engineering Journal, 88*, 26-29. doi:10.1016/j.bej.2014.04.003

Danckwerts, P. V. (1951). Significance of Liquid-Film Coefficients in Gas Absorption. *Industrial and Engineering Chemistry, 43*, 1460-1467.

Debergh, P. C. (1982). Physical properties of culture media. *Plant Tissue Culture Engineering*, 135-136.

Dodds, J. H., D.Silva-Rodriguez, & Tovar, P. (1992). Micropropagation of potato (Solanum tuberosum L.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, 19*, 91-106.

Donnelly, D. J., Coleman, W. K., & Coleman, S. E. (2003). Potato microtuber production and performance: a review. *American Journal of Potato Research, 80*(2), 103-105.

Dussert, S., Verdeil, J.-L., Rival, A., Noirot, M., Jacqueline, & Buffard-Morel. (1995). Nutrient uptake and growth of in vitro coconut (Cocosnucifera L.) calluses. *Plant Science, 106*, 185-193.

Escalona, M., Samson, G., Borroto, C., & Desjardins, Y. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 39*(6), 651-656. doi:10.1079/ivp2003473

Estrada, R., Tovar, P., & Dodds, J. H. (1986). Induction of in vitro tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Culture, 7*, 3-1ShEsyanti, R. R. (2016). Efficiency Evaluation of Vanda Tricolor Growth in Temporary Immerse System Bioreactor and Thin Layer Culture System. *Journal of Advanced Agricultural Technologies, 3*, 63-66. doi:10.18178/joaat.3.1.63-66

Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69*, 215-231.

Firoozabady, E., & Gutterson, N. (2003). Cost-effective in vitro propagation methods for pineapple. *Plant Cell Reports, 21*(9), 844-850. doi:10.1007/s00299-003-0577-x

Gamburg, K. Z., Vysotskaya, E. F., & Gamanets, L. V. (1999). Microtuber formation in micropropagated Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 55*, 115-11

Gao, R., Wu, S.-Q., Piao, X.-C., Park, S.-Y., & Lian, M.-L. (2014). Micropropagation of Cymbidium sinense using continuous and temporary airlift bioreactor systems. *Acta Physiologiae Plantarum, 36*(1), 117-124.

SHarvey, B. M. R., Crothers, S. H., Evans, N. E., & Selby, C. (1991). The use of growth retardants to improve microtuber formation by potato (Solanum tuberosum). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27*, 59-64.

Hilton, M. G., & Wilson, P. D. G. (1995). Growth and the uptake of sucrose and mineral ions by transformed root cultures of Datura stramonium, Datura candida · aurea wrightii, Hyoscyamus muticus and Atropa belladonna. *Planta Med, 61*, 345-350.

Homsuwan, N., & Ngampanya, B. (2016, November 28-30, 2016). *Effect of sucrose on microtuber induction and inulin accumulation in Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.)*. Paper presented at the The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thai.

Honda, H., Liu, C., & Kobayashi, T. (2001). Large-Scale Plant Micropropagation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 72*, 157-182.

Hossain, M. M., Sharma, M., Teixeira da Silva, J. A., & Pathak, P. (2010). Seed germination and tissue culture of Cymbidium giganteum Wall. ex Lindl. *Scientia Horticulturae, 123*(4), 479-487. doi:10.1016/j.scienta.2009.10.009

Jimenez, E., Perez, N., Feria, M. d., on, R. u. B., Capote, A., avez, M. e. C., . . . Perez, J. C. (1999). Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59*, 1999.

Knudson, K. (1946). A new nutrient solution for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin, 15*, 214-217.

Lazzeri, P., Hildebrand, D., & Collins, G. (1987). Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Cell Tiss, 10*, 209-220.

Leathers, R., Smith, M., & Christie, A. (1995). Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism. *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, 187-214.

Leclerc, Y., Donnelly, D. J., & Seabrook, J. E. A. (1994). Microtuberization of layered shoots and nodal cuttings of potato: The influence of growth regulators and incubation periods. *Plant*

Cell, Tissue and Organ Culture, 37, 113-120.

Lee, Y. (1997). *Design of bioreactor system for small and pilot scale cultivation of plant cells.* (MSc Thesis), Chungbuk National University, Korea.

Lemos, E. E. P., Ferreira, M. S., Alencar, L. M. C., Oliveira, J. G. L., & Magalhães, V. S. (2001). Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. *Revista Brasileira de Fruticultura, 23*, 482-487.

Li, Y., Shao, C.-H., Park, S.-Y., Piao, X.-C., & Lian, M.-L. (2014). Production of salidroside and polysaccharides in Rhodiola sachalinensis using airlift bioreactor systems. *Acta Physiologiae Plantarum, 36*(11), 2975-2983. doi:10.1007/s11738-014-1669-7

Lian, M., Chakrabarty, D., & Paek, K. (2002a). Effect of plant growth regulators and medium composition on cell growth and saponin production during cell suspension culture of mountain ginseng (P. ginseng C. A. Meyer). *Plant Biology, 45*, 201-206.

Lian, M., Chakrabarty, D., & Paek, K. (2002b). Growth and the uptake of sucrose and mineral ions by Lilium bulblets during bioreactor culture. *Hortic. Sci. Biotechnol, 77*, 253-257.

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. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.11.010

Mahendran, G., & NarmathaBai, V. (2009). Mass propagation of *Satyrium nepalense* D.Don.—A medicinal orchid via seed culture. *Scientia Horticulturae, 119*(2), 203-207.

Mapes, M. O. (1973). Tissue culture of bromeliads. *Congr. Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 3*, 47-55.

Moon, K. H., Honda, H., & Kobayashi, T. (1999). Development of a bioreactor suitable for embryogenic rice callus culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 87*(5), 661-665.

Moore, G. A., Dewald, M. G., & Evans, M. H. (1992). Micropropagation of Pineapple (Ananas comosus L.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, 18*, 460-470.

Moreira, A. L., Silva, A. B. d., Santos, A., Reis, C. O. d., & Landgraf, P. R. C. (2013). Cattleya walkeriana growth in different micropropagation systems. *Ciência Rural, 43*, 1678-4596.

Paek, K.-Y., Hahn, E.-J., & Son, S.-H. (2001). Application of application of bioreactor for large-scale micropropagation systems of plants *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 37*, 149-157.

Paek, K. Y., Chakrabarty, D., & Hahn, E. J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81*(3), 287-300. doi:10.1007/s11240-004-6648-z

Pérez-Alonso, N., Jiménez, E., Feria, M. d., Capote, A., Barbón, R., Quiala, E., & Chávez, M. (2007). Effect of inoculum density and immersion time on the production of potato microtubers in temporary immersion systems and field studies. *7*, 149-154.

Piao, X. C., Chakrabarty, D., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2003). A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Current Science, 84*, 1129-1132.

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

Rahman, M. Z., Islam, S. M. S., Chowdhury, A. N., & Subramaniam, S. (2015). Efficient microtuber production of potato in modified nutrient spray bioreactor system. *Scientia Horticulturae, 192*, 369-374. doi:10.1016/j.scienta.2015.06.014

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. *Journal of Agricultural Technology, 8*, 2077-2087.

Rodr´guez-Monroy, M., & Galindo, E. (1999). Broth rheology, growth and metabolite production of Beta vulgaris suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme and Microbial Technology, 24*, 687-693.

Ryu, D. D. Y., Lee, S. O., & Roman, R. J. (1990). Determination of specific growth rate for plantcell cultures: comparative studies. *Biotechnology and Bioengineering, 35*, 305-311.

Sajc, L., Grubisic, D., & GordanaVunjak-Novakovic. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal, 4*(2), 89-99.

Scheidt, G. N., Arakaki, A. H., Chimilovski, J. S., Portella, A. C. F., Spier, M. R., Woiciechowski, A. L., . . . Soccol, C. R. (2009). Utilization of the biorreactor of imersion by bubbles at the micropropagation of Ananas comosus L. Merril *Brazilian Archives of Biology and Technology, 52*, 1678-4324.

Seabrook, J. E. A., Coleman, S., & Levy, D. (1993). Effect of photoperiod on in vitro tuberization of potato (Solanum tuberosum L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34*(1), 43-51.

Silva, J. A. T. d., Cardoso, J. C., Dobra´nszki, J., & Zeng, S. (2015). Dendrobium micropropagation: a review. *Plant Cell Reports, 34*, 671-704. doi:10.1007/s00299-015-1754-4

Slimmon, T., Machado, V. S., & Coffin, R. (1989). The effect of light onin vitro microtuberization of potato cultivars. *American Potato Journal, 66*(12), 843-848.

Styer, D. J. (1985). Bioreactor technology for plant propagation *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*, 118-128.

Tanaka, H., Nishijima, F., Suwa, M., & Iwamoto, T. (1983). Rotating Drum Fermentor for Plant Cell Suspension Cultures. *Biotechnology and Bioengineering, XXV*, 2359-2370.

Welander, M., Persson, J., Asp, H., & Zhua, L. H. (2014). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersionsystem for micropropagation. *Scientia Horticulturae, 179*, 227-232. doi:10.1016/j.scienta.2014.09.035

Winarto, B., Rachmawati, F., Santi, A., & Teixeira da Silva, J. A. (2013). Mass propagation of Dendrobium ‘Zahra FR 62’, a new hybrid used for cut flowers, using bioreactor culture. *Scientia Horticulturae, 161*, 170-180. doi:10.1016/j.scienta.2013.06.014

Wu, S. Q., Lian, M. L., Gao, R., Park, S. Y., & Piao, X. C. (2011). Bioreactor application on adventitious root culture of Astragalus membranaceus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 47*(6), 719-724.

Yang, J. F., Piao, X. C., Sun, D., & Lian, M. L. (2010). Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration in vitro of Oncidium ‘Sugar Sweet’. *Scientia Horticulturae, 125*(4), 712-717. doi:10.1016/j.scienta.2010.05.003

Young, P. S., Murthy, H. N., & Yoeup, P. K. (2000). Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in Phalaenopsis. *Tissue and Organ Culture, 63*(1).

Yu, W.-C., Joyce, P. J., Cameron, D. C., & McCown, B. H. (2000b). Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Rep, 19*, 407-413.

Yuan, X., Zhao, B., & Wang, Y. (2004). Cell culture of Saussurea medusa in a periodically submerged air-lift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal, 21*(3), 235-239.

Zhao, P., Wu, F., Feng, F.-S., & Wang, W.-J. (2008). Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of Dendrobium candidum Wall ex Lindl. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 44*(3), 178-185. doi:10.1007/s11627-007-9101-2

Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 79-93).

Ziv, M., & Shemesh, D. (1996). Propagation and tuberization of potato bud clusters from bioreactor culture. *In Vitro – Plant, 32*(1), 31-36.

บุษราภรณ์ งามปัญญา) .2548). เทคโนโลยีเซลล์และเนื้อเยื่อพืช .ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร, 111.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ตารางที่ 22 สูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Murashige และ Skoog 1962

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัม/ลิตร)
1. ธาตุอาหารหลัก (Macronutrient)	
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
2. ธาตุอาหารรอง (Micronutrient)	
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.5H_2O$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25
3. วิตามิน (Vitamins)	
Nicotinic acid	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2.0
Myo-inosital	10

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สูตร Murasige และ Skoog (1962)

1. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก

MS Macronutrient Stock I : NH_4NO_3 และ KNO_3 เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ชั่ง NH_4NO_3 82.5 กรัม
- ชั่ง KNO_3 95 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

MS Macronutrient Stock II : $CaCl_2.2H_2O$ เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ชั่ง $CaCl_2.2H_2O$ 22 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล.

MS Macronutrient Stock III : $MgSO_4.7H_2O$ และ KH_2PO_4 เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ชั่ง $MgSO_4.7H_2O$ 18.5 กรัม
- ชั่ง KH_2PO_4 8.5 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของธาตุอาหารรอง

MS Micronutrient Stock : เข้มข้น 1000 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ชั่ง $MnSO_4.4H_2O$ 11.15 กรัม
- ชั่ง $ZnSO_4.5H_2O$ 4.3 กรัม
- ชั่ง H_3BO_3 3.1 กรัม
- ชั่ง KI 0.415 กรัม
- ชั่ง $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.125 กรัม
- ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 0.0125 กรัม
- ชั่ง $CoCl_2.H_2O$ 0.0125 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Iron Stock หรือ Fe EDTA Stock : เข้มข้น 100 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ชั่ง $FeSO_4.7H_2O$ 1.4 กรัม
- ชั่ง $Na_2EDTA.2H_2O$ 1.865 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มล. เก็บสารละลายในขวดสีชา

3. การเตรียมสารละลายเข้มข้นของวิตามิน

MS Vitamin Stock : เข้มข้น 1000 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ชั่ง Nicotinic acid 0.25 กรัม
- ชั่ง Thiamine-HCl 0.25 กรัม
- ชั่ง Pyridoxine-HCl 0.05 กรัม
- ชั่ง Glycine 1.0 กรัม

<u>หมายเหตุ</u> : สำหรับ *myo*-inosital น้ำตาลซูโครส และวุ้น ให้ชั่งใหม่ไม่ต้องเตรียมเป็น stock solution

ภาคผนวก ข

การเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตของต้นสับปะรด

ตารางที่ 23 การเจริญเติบโตของยอดสับปะรดบนระบบอาหารต่างชนิด

ระบบอาหาร	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	Growth ratio	Multiplication rate
Agar	0.867	0.0766	1.7094	1
	0.7045	0.132	1.6686	0
	1.539	0.0723	0.4857	2
shaking	4.9736	0.4733	26.9416	29
	1.2032	0.1167	4.6251	9
	3.2407	0.106	65.1367	11
SAB	4.4875	0.5163	7.4447	10
	7.0487	0.4584	22.156	13
TIS	0.5655	0.0611	1.9499	0
	0.4049	0.0321	2.4935	0
	0.1962	0.0106	0.5046	0

หมายเหตุ: Agar คือ อาหารวุ้น

Shaking คือ ระบบอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 rpm

SAB คือ ระบบอาหารเหลวที่มีการพ่นให้อากาศอย่างง่าย

TIS คือ ระบบอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว

การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้

ตารางที่ 24 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว

ความสูงของต้น (mm)	ความกว้างของลำต้น (mm)	ความสูงของใบ (mm)	ความยาวราก (mm)	จำนวนราก (mm)	จำนวนใบ/ต้น	ความกว้างของโปรโตคอร์มที่มีจุดกำเนิดต้น (mm)
5.06	1.9	4.78	2.43	2	2	3.12
5.05	2.1	5.13	2.34	1	1	2.34
3.84	2.22	4.97	2.27	1	1	2.63
4.49	1.86	4.47	1.74	2	1	4.51
4.08	2.07	3.53	2.16	1	2	2.85
5.33	2.11	5.47	4.89	1	2	3.16
6.04	2.55	5.96	3.11	1	2	2.16
4.2	2.51	4.16	2.27	1	2	2.81
5.65	3.42	3.81	2.5	1	2	3.78
5.73	2.25	6.3	2.96	2	2	2.59
4.14	1.76	3.88	1.95	1	1	3.35
5.36	2.81	3.49	1.81	1	2	2.27
5.45	2.48	4.71	2.8	1	2	2.2
5.78	2.74	3.79	2.26	1	2	2.69
4.42	2.58	3.72	1.79	1	1	2.31

ตารางที่ 24 (ต่อ) การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแช่ชั่วคราว (TIS)

ความสูงของต้น (mm)	ความกว้างของลำต้น (mm)	ความสูงของใบ (mm)	ความยาวราก (mm)	จำนวนราก (mm)	จำนวนใบ/ต้น	ความกว้างของโปรโตคอร์มที่มีจุดกำเนิดต้น (mm)
5.08	2.73	2.62	2.3	1	1	2.3
3.55	2.28	3.64	2.03	1	1	2.14
3.59	2.01	4.64	1.12	1	1	1.92
2.91	1.82	3.8	1.19	1	1	
3.55	1.89	3.42	1.15	1	1	
3.87	1.87	4.28	1.42	1	2	
3.73	2.18	2.51	1.88	1	1	
3.38	2.1	3.68	0.92	1	2	
3.22	1.81	2.82			1	
4.74	2.78	5.35			2	
3.76	1.86	2.72			2	
4.74	2.6	3.99			2	
2.95	2.21	4.95			2	
3.65	2.39	3.27			1	
3.48	2.85	2.89			1	
3.18	1.44	3.24			1	
3.67	2.79	2.02			1	

ตารางที่ 25 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหารเหลว (NSB)

ความสูงของต้น (mm)	ความกว้างของลำต้น (mm)	ความสูงของใบ (mm)	ความยาวราก (mm)	จำนวนราก (mm)	จำนวนใบ/ต้น	ความกว้างของโปรโตคอร์มที่มีจุดกำเนิดต้น (mm)
5.44	2.35	6	2.6	2	2	1.86
5.69	1.67	5.77	1.17	3	2	3.05
4.76	2.36	3.22	1.1	1	2	3.09
6.46	2.55	6.15	1.76	2	2	3.91
6.3	1.68	5.76	1.58	2	2	2.89
5.78	3.14	5.4			4	2.91
3.01	2.23	3.16			1	2.75
						2.76
						2.63
						3.2
						1.97
						1.71
						1.83
						1.88
						2.32
						2.58
						1.77

ตารางที่ 26 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB)

ความสูงของต้น (mm)	ความกว้างของลำต้น (mm)	ความสูงของใบ (mm)	ความยาวราก (mm)	จำนวนราก/ต้น	จำนวนใบ/ต้น
6.31	2.87	3.42	1.07	1	2
4.79	3.2	4.58	0.83	1	2
5.26	2.56	3.94	1.18	1	2
5.42	2.29	2.32			2
4.74	2.5	3.16			2
3.87	2.34	2.54			2
5.64	2.63	5.19			1
7.41	3.75	6.03			1
3.67	2.4	3.62			2
3.37	2.43	3.13			1
4.28	2.49	3.95			1
5.7	2.28	5.59			1
3.07	2.78	3.81			1
3.93	2.9	2.55			1
3.63	2.61	3.23			1
4.22	2.89	2.34			1

ตารางที่ 27 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นให้อากาศอย่างง่าย (SAB)

ความกว้างโปรโตคอร์มที่มีแค่จุดกำเนิด (mm)					
2.51	2.4	2.56	2.31	1.85	1.95
2.06	2.01	1.66	2.57	1.96	2.36
3.39	2.07	3.87	2.9	1.63	1.23
2.42	1.85	2.47	2.46	1.54	1.98
2.17	2.07	1.78	1.85	1.65	
2.66	3.23	4.55	1.67	2.36	
2.24	2.4	1.95	1.43	1.6	
2.55	1.27	1.58	1.54	2.59	
2.45	2.25	2.83	1.96	3.35	
2.63	2.24	1.23	1.97	2.13	
2.57	2.32	1.9	1.95	1.94	
2.53	2.11	2.2	2.01	2.2	
2.65	1.97	1.94	2.24	1.42	
2.3	2.37	2.2	1.69	2.32	
2.03	1.87	2.68	1.72	1.62	
2.46	1.99	2.05	1.57	1.84	
1.65	2.19	1.88	1.91	1.38	
1.78	3.06	3.16	3.08	2.09	
1.92	2.57	2.01	2.03	1.47	
1.84	2.07	1.31	1.79	1.24	
2.46	2.03	2.35	2.25	1.32	
2.65	2.85	1.69	2.44	3.08	
2.67	3.23	2.3	1.85	0.98	

ตารางที่ 28 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า

ความสูงของต้น (mm)	ความกว้างของลำต้น (mm)	ความสูงของใบ (mm)	ความยาวราก (mm)	จำนวนราก/ต้น	จำนวนใบ/ต้น
7.44	3.25	2.42	0.77	1	2
6.74	3.39	4.97	1.14	2	2
8.4	3.12	3.54	1.15	1	1
7.2	4.23	3.37	1.33	1	2
5.63	2.79	4.94	1.2	1	2
5.58	3.1	4.63	0.7	1	2
5.13	3.49	5.83	1.16	1	1
5.3	3.61	3.94	2.14	1	1
6.39	3.23	4.94	0.99	1	1
5.49	2.86	1.68	2.17	1	2
4.46	2.24	1.45			2
4.64	2.55	2.92			1
5.22	2.48	1.64			1
6.32	3.71	8.37			2
6.77	3.02	4.05			2
6.44	3.96	3.45			2
5.53	2.81	3.5			2
5.5	3.45	3.58			1
5.26	2.94	4.94			2
3.77	3.2	3.06			2
4.17	2.78	2.19			2
5.19	2.82	5.01			1
5.63	2.69	4.19			2

ตารางที่ 28 (ต่อ) การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า

ความสูงของต้น (mm)	ความกว้างของลำต้น (mm)	ความสูงของใบ (mm)	จำนวนใบ/ต้น
4.18	2.73	2.01	2
4.83	2.81	2.07	1
3.33	2.31	3.69	1
4.73	2.37	3.7	1
5.68	2.36	2.59	2
3.78	2.83	1.62	2
4.94	2.82	1.74	2
5.57	3.36	5.03	2
5.5	2.26	3.47	2
6.85	2.82	3.36	1
5.1	2.56	2.9	2
6.79	2.74	3.04	2
5.05	2.65	2.97	2
5.19	2.77	4.16	2
5.62	2.68	3.73	2
5.72	3.97	3.75	2
5.94	2.11	2.6	2
5.84	3.58	3.14	2
4.97	2.58	2.08	2

ตารางที่ 29 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า

ความกว้างโปรโตคอร์มที่มีแค่จุดกำเนิด (mm)			
2.37	1.72	2	2.09
2.45	1.63	3.57	3.21
1.46	3.82	4.21	1.81
1.66	4.05	4.58	2.19
1.98	2.91	2.69	3.57
3.41	2.38	3.09	2.44
3.68	3.04	3.66	4.61
3.53	3.23	4.78	1.89
3.14	1.59	2.26	2.93
4.93	2.85	3.01	2.29
5.32	2.75	2.63	1.8
3.04	2.12	2.43	1.37
3.27	3.17	2.29	
3.22	2.47	2.41	
2.73	3.85	2.25	
3	2.44	2.72	
3.42	1.78	2.9	
3.45	2.93	3.76	
3.31	2.46	3.44	
3.27	1.81	3.25	
2.18	1.22	2.71	
2.72	1.92	2.4	
1.79	2.95	2.24	
3.36	1.92	2.55	
3.37	3.84	3.97	

ตารางที่ 30 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในอาหารวุ้น

ความกว้างโปรโตคอร์มที่มีแค่จุดกำเนิด (mm)					
2.78	1.94	1.78	2.08	2.79	1.46
2.5	3.3	2.01	2.54	2.5	1.9
1.77	1.66	3.23	2.08	2.97	2.26
1.83	1.95	1.9	2.42	2.53	1.53
2.03	3.04	3.03	1.5	3.87	2.12
1.9	1.45	2.57	2.57	1.71	1.96
2.46	3.28	2.48	2.18	2.37	2.3
1.71	1.9	1.87	1.69	2.93	2.33
1.78	2.8	1.81	2.57	2.18	3.61
2.01	2.31	1.95	1.5	3.19	2.26
1.76	1.83	3.3	1.95	2.41	1.89
2.93	2.09	2.68	1.51	1.77	2.75
1.85	1.94	1.77	1.61	2.99	3.63
2.22	1.98	3.07	1.89	2.39	2.44
2.61	2.03	2.55	2.05	3.03	1.97
1.96	2.56	2.01	1.93	2.18	2.02
1.62	2.57	1.69	1.87	1.73	1.64
2.02	3.91	2.6	3.05	2.49	1.38
2.63	2.55	1.83	1.63	1.59	1.36
2.15	2.32	1.92	1.72	2.29	1.28
2.48	2.06	2.04	2.34	2.64	3.65
2.71	1.13	3.66	2.68	2.18	1.66
1.7	2.49	1.96	2.57	3.21	2.46
2.03	1.91	1.98	1.97	2.08	2.83
3.58	1.56	2.06	2.72	1.97	

ตารางที่ 31 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR (ส่วนที่ติดบนแผงกั้น)

ความสูงของต้น (mm)	ความกว้างของลำต้น (mm)	ความสูงของใบ (mm)	ความยาวราก (mm)	จำนวนราก/ต้น	จำนวนใบ/ต้น
10.54	6.77	9.26	3.29	1	3
7.9	3.87	7.86	1.78	1	2
6.83	4.26	7.46	2.85	2	2
7.88	2.49	3.25	1.03	1	1
6.68	3.95	5.3	1.21	2	2
4.3	3.76	3.13	2.11	2	2
5.86	3.03	9.31	2.32	2	2
7.81	4.1	5.91	1.69	2	2
6.11	4.7	6.74	2.61	4	2
6.22	4.56	5.87	1.86	3	3
4.92	2.84	10.38	1.5	2	3
6.88	3.47	6.04	2.69	1	3
8.57	4.13	12.39	3.3	6	2
8.11	3.73	9.53	1.21	3	4
6.88	3.42	3.24			1
4.02	2.28	3.44			1
6.98	2.85	3.64			3
5.54	2.9	3.72			1
4.92	2.39	4.98			2
6.32	4.13	5.04			3
4.19	2.52	10.04			2
4.16	2.6	3.24			2

ตารางที่ 32 การพัฒนาไปเป็นต้น ใบ และรากของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR (ส่วนที่จมในอาหารเหลว)

ความสูงของต้น (mm)	ความกว้างของต้น (mm)	ความสูงของใบ (mm).)	ความยาวราก (mm)	จำนวนราก/ต้น	จำนวนใบ/ต้น
6.4	4.14	3.03			2
6.21	4.07	4.47			2
4.96	2.76	4.85			2
3.8	2.5	2.28			1
4.84	2.95	4.02			1
4.79	4.51	3.34			2
2.83	2.18	2.76			1
5.82	3.67	4.93			2
5.31	2.96	5.58			2
4.25	2.71	4.18			2
4.19	3.21	3.09			1
2.89	2.21	2.41			1
3.28	2.44	5.85			1
6.32	4.64	4.28			2
3.63	3.5	3.56			2
4.13	4.03	5.08			1
4.43	2.74	4.93			2

ตารางที่ 33 การพัฒนาของโปรโตคอร์มกล้วยไม้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ STR

ความกว้างโปรโตคอร์มที่มีแค่จุดกำเนิด (mm)			
0.439	2.25	2.3	4.95
2.31	2.32	3.06	5.82
3.47	1.99	1.8	4
2.87	3.8	1.3	5.59
2.08	1.95	1.88	3.19
3.39	2.31	1.43	2.81
2.49	2.99	2.89	3.52
1.51	2.62	1.78	2.97
3.89	2.78	2.31	3.56
4.75	4.12	2.9	2.25
3.7	1.93	2.13	2.8
4.02	2.13	6.81	1.95
2.98	2.55	3.4	3.46
2.76	3.42	2.69	3.55
3.05	2.95	1.04	2.29
4.48	2.96	1.28	3.59
4.27	3.74	2.08	6.58
5.15	3.81	2.98	5.9
3.36	3.99	3.88	2.99
4.41	2.32	2.65	2.92
3.52	3	4.52	2.49
3.85	4.5	3.08	3.05
4.01	3.32	3.98	
3.2	3	7.55	

ตารางที่ 34 โปรโตคอร์มที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในระบบอาหาร

ความกว้างของโปรโตคอร์มที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (mm)			
NSB	SAB	Shanking	Bioreactor
2.15	1.32	1.73	3.81
1.71	1.5	2.82	1.73
2.4	1.72	2.56	1.72
1.94	1.67	2.9	3.95
1.84	1.33	1.86	1.72
2.09	1.52	1.26	2.31
2.28	1.55	2.34	1.7
2.74	1.6	1.85	1.18
2.48	1.44	1.69	1.6
1.76	1.19	1.79	2.01
1.67	1.35	1.77	2.06
1.87	1.36	1.31	2.39
1.47	1.69	1.29	2.49
1.9	1.00	0.76	1.91
1.96	1.05	3.23	
1.82		1.96	
2.49		2.19	
1.8		2.1	
1.71		1.64	
1.53			
1.71			
1.5			
1.2			
1.05			

การพัฒนาไปเป็นหัวขนาดเล็กของแก่นตะวัน

ตารางที่ 35 น้ำหนักสดของข้อลำต้นแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์

น้ำหนักสดของข้อลำต้นแก่นตะวัน (g)												
Agar			TIS (2h)		TIS (4h)	NSB	SAB			Shaking		
0.4092	0.1021	0.6395	0.8166	0.3868	0.4913	0.1698	0.0654	0.076	0.0447	0.0838	0.0805	0.0884
0.2139	0.089	0.5138	0.5500	0.3776	0.5188	0.1394	0.1014	0.1028	0.0676	0.1051	0.0666	0.0505
0.1992	0.0892	0.7566	0.5955	0.3471	0.548	0.1274	0.0852	0.0243	0.061	0.1068	0.0867	0.0969
0.6333	0.205	0.5407	0.6300	0.1070	0.4978	0.1215	0.0478	0.0289	0.0713	0.1024	0.0682	0.1091
0.1984	0.1971	0.7227	0.4768	0.1821	0.3256	0.1233	0.0945	0.0581	0.1003	0.0783	0.0472	0.0802
0.0652	0.9484	0.4553	0.363	0.2344	0.3082	0.0563	0.1012	0.0188	0.0682	0.0979	0.0674	0.1125
0.115	0.7658	0.6711	0.4227	0.3256	0.3734	0.1406	0.044	0.0917	0.0793	0.1069	0.0788	0.0807
0.1622	0.6528	0.5143	0.4429	0.242	0.2537	0.0744	0.0423	0.088	0.0304	0.1066	0.0625	0.094
0.7885	0.558	0.5213	0.4525	0.1876	0.3719	0.0495	0.0358	0.0201	0.0281	0.1003	0.0523	0.1032

ตารางที่ 36 ความยาวของข้อลำต้นแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์

ความยาวของข้อลำต้นแก่นตะ วัน (mm)												
Agar			TIS (2h)		TIS (4h)	NSB	SAB			Shaking		
17.69	16.26	17.5	15.48	16.26	17.38	15.08	16.26	15.02	13.01	13.71	14.41	12.21
15.55	19.31	19.69	18.57	16.47	14.69	15.8	17.49	13.12	16.77	17.28	14.58	17.28
16.05	17.54	15.79	17.05	18.28	14.34	15.98	17.48	15.61	16.71	17.35	14.7	14.85
18.61	16.51	18.08	16.58	18.35	14.17	14.66	13.36	14.56	15.66	16.21	18.26	13.92
15.61	15.88	15.84	16.95	16.96	18.21	16.35	16.98	16.04	12	17.82	15.67	17.96
12.29	14.65	18.42	15.93	16.57	15.61	13.1	11.95	16.11	16.22	15.58	15.32	15.08
15.58	13.24	20.62	17.2	17.85	15.81	15.26	16.33	15.03	17.29	15.98	16.9	12.91
14.34	15.71	16.65	15.87	17.8	17.94	15.29	14.43	16.98	13.9	15.76	14.96	15.55
18.51	14.55	17.2	16.23	16.84	16.28	14.31	13.26	15.23	13.39	14.49	15.01	13.77

ตารางที่ 37 เส้นผ่านศูนย์กลางของข้อลำต้นแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในระบบอาหารเหลว 4 สัปดาห์

เส้นผ่านศูนย์กลางของข้อลำต้นแก่นตะวัน (mm)												
Agar			TIS (2h)		TIS (4h)	NSB	SAB			Shaking		
17.69	16.26	17.5	15.48	16.26	17.38	15.08	16.26	15.02	13.01	13.71	14.41	12.21
15.55	19.31	19.69	18.57	16.47	14.69	15.8	17.49	13.12	16.77	17.28	14.58	17.28
16.05	17.54	15.79	17.05	18.28	14.34	15.98	17.48	15.61	16.71	17.35	14.7	14.85
18.61	16.51	18.08	16.58	18.35	14.17	14.66	13.36	14.56	15.66	16.21	18.26	13.92
15.61	15.88	15.84	16.95	16.96	18.21	16.35	16.98	16.04	12	17.82	15.67	17.96
12.29	14.65	18.42	15.93	16.57	15.61	13.1	11.95	16.11	16.22	15.58	15.32	15.08
15.58	13.24	20.62	17.2	17.85	15.81	15.26	16.33	15.03	17.29	15.98	16.9	12.91
14.34	15.71	16.65	15.87	17.8	17.94	15.29	14.43	16.98	13.9	15.76	14.96	15.55
18.51	14.55	17.2	16.23	16.84	16.28	14.31	13.26	15.23	13.39	14.49	15.01	13.77

ตารางที่ 38 น้ำหนักสดของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 4 สัปดาห์

น้ำหนักสด (อาหารวุ้น)					
ส่วนบนเหนือข้อ (g)			**ส่วนล่างใต้ข้อ (g)**		
0.092	0.01134	0.042	0.7091	0.08176	0.6094
0.0542	0.1682	0.1379	0.5525	0.05827	0.5656
0.0572	0.067	0.1722	0.2344	0.4823	0.6911
0.1437	0.0798	0.0838	0.1156	0.559	0.3538
0.1026	0.0355	0.1234	0.0974	0.0772	0.3599
0.0786	0.0935	0.0966	0.0602	0.0894	0.38
0.0466	0.1104	0.0601	0.0783	0.0724	0.528
0.0374	0.0397	0.0681	0.1047	0.0491	0.4307
0.0259	0.0346	0.0493	0.0326	0.0433	0.4485

ตารางที่ 39 ความยาวของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น 4 สัปดาห์

ความยาวข้อลำต้น (อาหารวุ้น)					
ส่วนบนเหนือข้อ (mm)			**ส่วนล่างใต้ข้อ** (mm)		
4.5	5.41	2.42	13.35	14.67	7.2
6.21	4.92	5.42	11.76	13.25	13.36
5.91	6.53	10.49	11.28	10.76	10.35
5.81	5.06	7.91	13.19	12.61	10.69
5.02	5.27	6.3	11.64	10.07	8.46
4.33	5.25	7.4	12.3	10.41	18.76
4.17	4.46	8.12	14.01	11.89	10.4
3.82	6.81	8.15	13.32	9.51	11.16
5.34	5.25	4.71	8.89	9.71	9.58

ตารางที่ 40 เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้นเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ความยาวข้อลำต้น (อาหารวุ้น)					
ส่วนบนเหนือข้อ (mm)			**ส่วนล่างใต้ข้อ** (mm)		
4.42	1.99	3.82	10.33	10.63	7.33
3.03	2.11	5.49	11.87	9.99	9.99
1.94	4.3	5.46	6.34	10.11	10.53
4.24	3.21	2.63	4.64	9.04	11.28
3.52	4.24	3.03	3.1	4.54	7.99
2.98	1.81	3.43	2.16	2.77	10.5
3.8	2.67	2.39	2.72	2.95	11.19
3.28	4.65	4.42	2.66	3.18	10.41
3.22	3.19	5.72	1.96	2.22	7.7

ตารางที่ 41 น้ำหนักสด ของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว 4 สัปดาห์

น้ำหนักสด (g)					
ส่วนบนเหนือข้อ (mm)			**ส่วนล่างใต้ข้อ** (mm)		
TIS (2h)		**TIS (4h)**	**TIS (2h)**		**TIS (4h)**
0.1099	0.1573	0.1633	0.1277	0.1873	0.3117
0.1114	0.385	0.2627	0.2234	0.2206	0.2375
0.0747	0.4184	0.2443	0.2074	0.3054	0.2622
0.1541	0.5278	0.1442	0.24	0.266	0.3018
0.0873	0.2352	0.1775	0.2926	0.1577	0.1471
0.1216	0.1791	0.0934	0.3175	0.117	0.1717
0.0688	0.1419	0.1254	0.2458	0.1215	0.2112
0.0531	0.216	0.1059	0.2381	0.2804	0.2142
0.0317	0.1714	0.0933	0.229	0.0783	0.2523

ตารางที่ 42 ความยาวของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว 4 สัปดาห์

ความยาวของข้อลำต้น (mm)					
ส่วนบนเหนือข้อ			ส่วนล่างใต้ข้อ		
TIS (2h)		TIS (4h)	TIS (2h)		TIS (4h)
8.02	6.52	6.77	10.43	10.52	11.14
6.52	5.46	8.6	10.14	9.4900	8.6
5.68	6.5	5.83	10.59	10.85	8.15
6.12	5.02	6.65	11.09	12.07	9.68
6.47	5.28	6.78	10.76	10.31	9.28
6.47	5.66	7.5	12.17	10.59	10.38
6.81	5.1	6.14	10.22	10.28	8.46
6.29	4.57	6.63	9.99	10.45	9.33
6.18	5.96	6.04	10.98	12.05	9.58

ตารางที่ 43 เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงอาหารเหลวแบบแช่ชั่วคราว 4 สัปดาห์

เส้นผ่านศูนย์กลางของลำต้นแก่นตะวัน (mm)					
ส่วนบนเหนือข้อ			ส่วนล่างใต้ข้อ		
TIS (2h)		TIS (4h)	TIS (2h)		TIS (4h)
13.94	6.56	7.44	7.14	7.48	7.42
14.6	6.50	7.6	6.96	6.37	7.75
14.85	6.77	7.82	6.5	4.91	7.8
8.75	7.12	6.65	7.29	3.43	8.26
12.08	8.25	7.52	7.34	6.04	7.05
9.23	5.00	5.72	7.44	5.26	6.24
8.48	6.10	6.67	8.46	3.26	6.77
9.8	6.11	6.25	6.82	2.91	6.04
6.02	4.14	5	7.43	5.95	6.08

ตารางที่ 44 น้ำหนักสด ความยาว และเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบพ่นฝอยอาหาร (NSB) 4 สัปดาห์

น้ำหนักสด (g)		ความยาวข้อลำต้น (mm)		เส้นผ่านศูนย์กลาง (mm)	
ส่วนบนเหนือข้อ	ส่วนล่างใต้ข้อ	ส่วนบนเหนือข้อ	ส่วนล่างใต้ข้อ	ส่วนบนเหนือข้อ	ส่วนล่างใต้ข้อ
0.0509	0.1236	6.64	9.11	2.19	3.47
0.0512	0.0771	6.39	11.08	2.35	2.72
0.0468	0.0803	6.37	10.65	2.89	2.78
0.0456	0.0692	5.69	9.43	2.59	1.71
0.0421	0.0739	5.27	9.41	1.69	2.38
0.0392	0.0264	4.89	9	2.91	3.02
0.0267	0.0277	5.84	9.22	1.64	2.53
0.0242	0.0828	6.38	10.36	1.37	3
0.0188	0.0428	5.39	11.18	2.58	1.59

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 45 น้ำหนักสด ความยาวของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการพ่นให้อากาศ

Simple aeration bioreactor											
น้ำหนักสด (g)						ความยาวข้อลำต้น (mm)					
ส่วนบนเหนือข้อ			ส่วนล่างใต้ข้อ			ส่วนบนเหนือข้อ			ส่วนล่างใต้ข้อ		
0.0614	0.036	0.0521	0.0592	0.0411	0.0433	6.23	4.54	6.51	11.93	9.16	6.68
0.0458	0.028	0.0226	0.0202	0.0466	0.0133	8.31	4.35	5.54	9.68	8.52	7.92
0.0199	0.014	0.012	0.0211	0.0552	0.0472	6.74	4.61	6.42	8.99	10.83	10.36
0.0219	0.0487	0.0284	0.0492	0.0481	0.0115	4.6	4.6	7.62	8.61	8.83	7.98
0.045	0.0109	0.0179	0.038	0.0374	0.0407	7.84	5.71	5.9	8.31	9.97	10.92
0.0212	0.0072	0.0249	0.0437	0.0147	0.0415	6.51	6.61	5.89	8.42	9.42	10.3
0.0153	0.0071	0.0224	0.0335	0.0111	0.0356	4.34	5.07	5.82	4.97	9.8	9.18
0.0178	0.0085	0.0155	0.0209	0.0089	0.0304	5.84	4.73	5.53	7.79	12.6	6.75
0.0223	0.0271	0.0109	0.0171	0.0095	0.0216	4.81	5.15	5.46	8.99	9.3	9.78

ตารางที่ 46 เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการพ่นให้อากาศ (Simple aeration bioreactor) 4 สัปดาห์

เส้นผ่านศูนย์กลางของข้อแก่นตะวัน (mm)					
ส่วนบนเหนือข้อ			ส่วนล่างใต้ข้อ		
2.59	2.45	1.89	2.16	2.35	2.6
1.27	1.93	1.83	1	2.38	1.19
3.03	1.92	1.49	1.79	2.35	1.79
1.92	1.85	1.45	2.69	2.24	1.16
1.69	1.11	1.08	2.02	1.79	1.71
1.38	1.48	1.26	1.79	1.36	1.81
2.05	1.07	1.56	2.48	1.31	1.95
1.49	0.74	1.77	1.29	0.87	1.78
1.72	1.38	1.52	1.03	0.97	1.81

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 47 เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า 4 สัปดาห์

เส้นผ่านศูนย์กลางของข้อแก่นตะวัน (mm)					
ส่วนบนเหนือข้อ			ส่วนล่างใต้ข้อ		
3.79	2.03	2.04	2.13	2.11	2.82
2.38	1.86	2.45	2.41	1.96	2.33
1.89	1.78	1.61	2.54	1.84	2.84
3.06	1.96	2.24	2.47	2	1.9
1.69	1.21	2.11	2.57	1.94	2.47
2.92	2.01	2.19	2.55	1.8	2.43
3.14	1.88	1.85	2.2	2.09	1.9
2.34	1.72	1.87	2.63	2.03	1.93
2.74	1.62	1.91	2.58	2.16	2.23

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 48 น้ำหนักสด ความยาวของส่วนบนเหนือข้อลำต้นและส่วนล่างใต้ข้อลำต้นของแก่นตะวันที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่า 4 สัปดาห์

อาหารเหลวบนเครื่องเขย่า (Shaking)											
น้ำหนักสด (g)						ความยาวข้อลำต้น (mm)					
ส่วนบนเหนือข้อ			ส่วนล่างใต้ข้อ			ส่วนบนเหนือข้อ			ส่วนล่างใต้ข้อ		
0.0245	0.0298	0.0544	0.0511	0.0437	0.0613	6.02	6.23	5.01	10.65	7.91	8.26
0.0381	0.028	0.0401	0.0586	0.0344	0.0473	6.63	7.35	7.87	10.5	9.95	8.3
0.0339	0.0268	0.0312	0.0714	0.0408	0.0536	6.54	6.31	6.46	11.14	9.65	9.41
0.0221	0.0275	0.0356	0.0623	0.0457	0.0379	6.11	7.7	6.22	11.61	8.23	9.08
0.0497	0.0158	0.0408	0.0598	0.0361	0.0544	6.67	5.88	6.61	9.90	8.84	7.73
0.0429	0.0355	0.0496	0.0801	0.0364	0.0581	4.28	6.69	6.32	13.42	10.97	8.24
0.024	0.0333	0.0404	0.0534	0.0283	0.0294	4.12	7.47	5.95	12.96	8.9	7.07
0.0362	0.0253	0.038	0.0607	0.0364	0.044	5.54	6.32	5.65	10.91	9.2	8.49
0.0198	0.0241	0.0191	0.0532	0.0314	0.0511	6.21	6.52	4.57	9.34	9.15	10.42

ตารางที่ 49 จำนวนหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันที่ชักนำได้ส่วนบนเหนือข้อได้ในระบบอาหารเหลว

จำนวนหัวที่ชักนำได้ส่วนบนเหนือข้อ/ชิ้นพืช												
Agar			TIS (2h)		TIS (4h)	NSB	SAB			Shaking		
0	1	0	2	1	3	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 50 จำนวนหัวขนาดเล็กของแก่นตะวันที่ชักนำได้ในส่วนล่างใต้ข้อในระบบอาหารเหลว

จำนวนหัวที่ชักนำได้ส่วนล่างใต้ข้อ/ชิ้นพืช												
Agar			TIS (2h)		TIS (4h)	NSB	SAB			Shaking		
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 51 ขนาดหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในอาหารแบบแช่ชั่วคราวที่ถูกแช่ในอาหารเหลวทุกๆ 4 ชั่วโมง

Fresh weight of microtubers (g)		Length of microtubers (mm)		Diameter of microtubers (mm)	
ส่วนบนเหนือข้อ	ส่วนล่างใต้ข้อ	ส่วนบนเหนือข้อ	ส่วนล่างใต้ข้อ	ส่วนบนเหนือข้อ	ส่วนล่างใต้ข้อ
0.0743	0.1919	3.37	4.61	6.9	7.96
0.0517	0.1542	4.42	5.11	5.63	8.1
0.0449	0.1713	3.72	6.08	4.61	7.22
0.0648	0.1483	6.48	4.11	4.33	7.15
0.0309	0.2419	4.83	7.22	5.61	7.11
0.0428	0.2054	4.66	7.27	4.39	6.07
0.041	0.213	3.81	7.38	4.31	6.18
0.0466	0.106	3.66	5.01	5.94	7.24
0.0519	0.1265	3.82	6.09	4.81	5.78

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 52 ขนาดหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในอาหารวุ้น

Fresh weight of microtubers (g)				Length of microtubers (mm)				Diameter of microtubers (mm)			
ส่วนบนเหนือข้อ		ส่วนล่างใต้ข้อ		ส่วนบนเหนือข้อ		ส่วนล่างใต้ข้อ		ส่วนบนเหนือข้อ		ส่วนล่างใต้ข้อ	
0.0434		0.3726	0.5148	4.04		8.12	6.56	3.11		5.95	8.03
0.06		0.2574	0.4251	3.03		5.69	8.19	2.69		11.48	10.94
0.0179		0.3196	0.5399	3.99		5.29	12.72	3.44		10.49	6.54
0.0173		0.3821	0.4223	2.08		6.68	10.55	3.4		9.9	10.75
0.008		0.5023	0.678	1.78		6.92	13.96	2.85		8.92	11.6
0.0203		0.3289	0.4011	2.86		9.39	6.03	3.17		11.51	10.58
0.0276		0.5909	0.0848	3.02		7.28	4.00	5.08		1.35	8.03
0.0191		0.334		3.86		12.89		3.8			10.4
		0.2905				5.62					9.58

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 53 ขนาดหัวขนาดเล็กที่ชักนำได้ในอาหารแบบแช่ชั่วคราวที่ถูกแช่ในอาหารเหลวทุกๆ 2 ชั่วโมง

Fresh weight of microtubers (g)				Length of microtubers (mm)				Diameter of microtubers (mm)			
ส่วนบนเหนือข้อ		ส่วนล่างใต้ข้อ		ส่วนบนเหนือข้อ		ส่วนล่างใต้ข้อ		ส่วนบนเหนือข้อ		ส่วนล่างใต้ข้อ	
0.1785	0.089	0.2339	0.1197	6.91	4.48	10.24	6.62	7.66	5.32	6.49	5.29
0.2066	0.0686	0.2181	0.1382	6.31	5.27	10.73	4.8100	7.45	3.09	4.86	5.08
0.1529	0.1053	0.2257	0.1018	6.02	5.97	10.06	6.27	5.45	5.29	8.82	7.04
0.0794	0.0515	0.2776	0.1445	3.48	4.91	9.03	4.63	4.74	4.27	6.27	6.68
0.083	0.0696	0.3017	0.2068	5.69	4.95	11.02	10.67	4	5.35	7.09	5.41
0.0964	0.0536	0.2044	0.0682	5.91	5.26	10.04	4.76	6.9	4.24	6.49	5.1
0.0524	0.087	0.2929	0.0572	5.18	4.99	4.39	5.33	4.37	5.46	5.94	5.75
0.0797	0.0773	0.2146	0.0708	3.23	3.55	7.24	6.98	3.78	4.32	6.63	6.13
0.1551	0.042	0.1765		4.88	4.01	8.31		4.47	4.41	5.33	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ศิริรักษ์ พลซา
วัน เดือน ปี เกิด	10 มิถุนายน 2533
สถานที่เกิด	จ.เลย
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2556 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	1/734 A6 ปาร์ควิววิภาวดีคอนโด ถ.กำแพงเพชร6 แขวงสีกัน เขตดอนเมือง กทม. 10210
ผลงานตีพิมพ์	Evaluation of Aeration Methods on Multiplication of Pineapple Plantlets (The 28th Annual Meeting of The Thai Society for Biotechnology and International Conference 2016, Chang Mai

มหาวิทยาลัยศิลปากร