ชีวสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเตยหอม *Pandanus amaryllifolius* Roxb. และ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 *Oryza sativa* L. VARIETY KHAO DAWK MALI 105 โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน

นางสาวศรัญญา ชัยจำรัส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2-ACETYL-1-PYRROLINE BIOSYNTHESIS OF PANDAN *Pandanus amaryllifolius* Roxb. AND RICE *Oryza sativa* L. VARIETY KHAO DAWK MALI 105 THROUGH AMINO ACID METABOLISM

Miss Sarunya Chaijumrus

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology
Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ชีวสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเตยหอม *Pandanus amaryllifolius* Roxb. และข้าวขาวดอกมะลิ 105 *Oryza sativa* L. VARIETY KHAO DAWK MALI 105 โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน
โดย	นางสาวศรัญญา ชัยจำรัส
สาขาวิชา	สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตุลยธัญ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. อนวัช สุวรรณกุล, Tadashi Yoshihashi, Ph.D

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรรณา ตุลยธัญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.อนวัช สุวรรณกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(Tadashi Yoshihashi, Ph.D)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ครัญญา ชัยจำรัส : ชีวสังเคราะห์สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline ในเตยหอม *Pandanus amaryllifolius* Roxb. และข้าวขาวดอกมะลิ 105 *Oryza sativa* L. VARIETY KHAO DAWK MALI 105 โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน (2-ACETYL-1-PYRROLINE BIOSYNTHESIS OF PANDAN *Pandanus amaryllifolius* Roxb. AND RICE *Oryza sativa* L. VARIETY KHAO DAWK MALI 105 THROUGH AMINO ACID METABOLISM)

อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. วรรณา ตุลยธัญ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. อนวัช สุวรรณกุล, Dr. TADASHI YOSHIHASHI. 90 หน้า.

การศึกษาหาสารตั้งต้นที่มาของไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลของสาร 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP) ในเตยหอม เปรียบเทียบกับในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้ใบและแคลลัสของพืชทั้งสองชนิดเป็นตัวอย่าง ในการศึกษาชีวสังเคราะห์ 2AP ในงานวิจัยนี้ใช้สาร stable isotope คือ ^{15}N-L-proline ร่วมกับเทคนิคการสกัดด้วยกรดและตัวทำละลายอินทรีย์ และตรวจวิเคราะห์สาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS โดยแคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ 105 จะถูกเลี้ยงในอาหารสูตร N_6 ดัดแปลงโดยร่วมกับการเติม 2,4 D ความเข้มข้น 2 mg/l ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอจินิกแคลลัสได้ในปริมาณมาก แคลลัสที่ได้มีขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยสูงซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับสูตร MS และ CC สำหรับเตยหอมการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นต้องชักนำให้เกิดยอดอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารสูตร MS ที่ดัดแปลงโดยลดปริมาณ potassium nitrate ลงที่ความเข้มข้น 1.45 g/l ร่วมกับการเติม glutamic acid 100 mg/l, polyvinylpyrrolidine (PVP) 1 g/l และ benzylaminopurine (BAP) 0.5 mg/l แล้วจึงนำยอดอ่อนที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ดัดแปลงร่วมกับการเติม BAP 1mg/l, kinetin 4 mg/l และ 2,4 D 0.1 mg/l เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสต่อไป

แคลลัสและใบของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย^{15}N-L-proline เพื่อติดตามการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-^{15}N-pyrroline ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าสัดส่วนของ 2AP ที่ไม่ติดฉลาก (m/z 111) ต่อ 2AP ที่ติดฉลาก (m/z 112) ของแคลลัสและใบของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย ^{15}N-L-proline มีค่าเท่ากับ 0.944, 0.971, 0.922 และ 0.967 ตามลำดับ ในขณะที่แคลลัสและใบของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย L-proline และน้ำกลั่น มีสัดส่วนของ 2AP ที่ไม่ติดฉลากต่อ 2AP ที่ติดฉลากมากกว่า 1 ในทุกตัวอย่าง จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากระบวนการชีวสังเคราะห์ 2AP ในเตยหอมอาจมีวิถีสังเคราะห์เช่นเดียวกับที่พบในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และที่มาของไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลของสาร 2AP ในเตยหอมมาจาก L-proline

ภาควิชา : .....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต : .....ครัญญา ชัยจำรัส.....
สาขาวิชา : .....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : .....
ปีการศึกษา: ...2551..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : .....
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : .....

4872476823: MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORDS: 2-ACETYL-1-PYRROLINE / BIOSYNTHESIS / *Oryza sativa* L. VARIETY KHAO DAWK MALI 105 / *Pandanus amaryllifolius* Roxb. / STABLE ISOTOPE / GC-MS

SARUNYA CHAIJUMRUS: 2-ACETYL-1-PYRROLINE BIOSYNTHESIS OF PANDAN *Pandanus amaryllifolius* Roxb. and RICE *Oryza sativa* L. VARIETY KHAO DAWK MALI 105 THROUGH AMINO ACID METABOLISM. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASSOC. PROF. VANNA TULYATUN, CO-ADVISOR: ANAWAT SUWANAGUL, Ph.D., TADASHI YOSHIHASHI, Ph.D., 90 pp.

The precursor of nitrogen atom, originated in 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), was studied in leaves and callus of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. and *Oryza sativa* L. var. Khao Dawk Mali 105. Tracer experiment with stable isotope, ^{15}N-L-proline was employed and an extracted 2AP by acid solvent extraction was determined by GC-MS technique. Callus cultures of Khao Dawk Mali 105 rice were induced on N_6 medium containing 2, 4-D at 2 mg/l. The result embryogenesis callus has significantly ($p \leq 0.05$) higher in an average size and weight than that obtained from MS or CC medium. Callus of *Pandanus* sp. was induced from aseptic shoot culturing on modified MS medium supplemented with 1.45 g/l potassium nitrate, 100 mg/l glutamic acid, 1 g/l polyvinylpyrrolidine (PVP) and 0.5 mg/l benzylaminopurine (BAP). Established shoots were then transferred to MS medium containing 1mg/l BAP, 4 mg/l kinetin and 0.1 mg/l 2,4 D for callus induction.

Incubation of callus and leave of *Pandanus* sp. and Khao Dawk Mali 105 rice with ^{15}N-L-proline resulted in a formation of 2-acetyl-1-^{15}N-pyrroline as determined by GC-MS technique. The ratio for non-labeled 2AP (m/z 111) to labeled 2AP (m/z 112) of both callus and leaves of *Pandanus* sp. and Khao Dawk Mali 105 rice incubated with ^{15}N-L-proline were 0.944, 0.971, 0.922 and 0.967, respectively. Whereas both callus and leave of *Pandanus* sp. and Khao Dawk Mali 105 rice incubated with non-labeled L-proline or distilled water resulted in a ratio for non-labeled to labeled 2AP higher than 1.The results suggested that the biosynthesis of 2AP in *Pandanus* sp. may share a common pathway with Khao Dawk Mali 105 rice and the nitrogen source of 2-acetyl-1-pyrroline was derived from L-proline.

Department: .....Food Technology..... Student's Signature: Sarunya Chaijumrus

Field of Study: .....Food Technology..... Advisor's Signature: V. Tulyatun

Academic Year: .....2008..... Co-Advisor's Signature: Anawat Suwanagul

Co-Advisor's Signature: T. Yoshihashi

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยความกรุณาและคำปรึกษาอย่างดียิ่งจาก รศ.ดร.วรรณา ตุลยธัญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.อนวัช สุวรรณกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านได้เสียสละเวลาอันมีค่าให้คำแนะนำเกี่ยวกับแนวทางการวิจัย ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ และ Dr. Tadashi Yoshihashi อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้อสารมาตรฐาน 2-acetyl-1-pyrroline จากประเทศญี่ปุ่นเพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.รมณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก ที่ร่วมเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งกรุณาให้คำแนะนำ และตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และพี่ๆ นักวิจัยในฝ่ายเทคโนโลยีเกษตรที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ตลอดจนคำแนะนำในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ อานันต์ ผลวัฒนะ นักวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร สำหรับความอนุเคราะห์ตัวอย่างข้าวที่ใช้ในงานวิจัย

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่เป็นกำลังใจที่ดียิ่งตลอดระยะเวลาของการศึกษา ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือด้านต่างๆ ด้วยความรักและความเอาใจใส่เสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ระดับปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่มอบให้ ตลอดจนผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือซึ่งมิอาจกล่าวนามทั้งหมดได้ ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์..... 3
2.1 สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline..... 3
2.2 การตรวจพบสารหอม 2AP ในอาหาร..... 4
2.3 การตรวจพบสารหอม 2AP ในสิ่งมีชีวิต..... 6
2.3.1 สาร 2AP ในข้าวหอม (Aromatic rice) 7
2.3.2 สาร 2AP ในเตยหอม..... 11
2.4 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารหอม 2AP..... 12
2.4.1 หลักการของเทคนิค Gas Chromatography (GC)..... 12
2.4.2 หลักการของ Mass spectrometry (MS)..... 14
2.5 การศึกษาสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารหอม 2AP..... 15
2.5.1 การสังเคราะห์สารกลิ่นหอม 2AP ด้วยกระบวนการทางเคมี..... 15
2.5.2 การสังเคราะห์สารกลิ่นหอม 2AP ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ..... 23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 28
3.1 ขอบเขตของงานวิจัย..... 28
3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย..... 30
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง..... 41
4.1 วิธีการที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอมในสภาวะปลอดเชื้อ..... 41
4.2 การวิเคราะห์สาร 2AP จากพืชตัวอย่างโดยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย และเทคนิค GC-MS..... 46

หน้า

4.3 การหาสารตั้งต้นที่มาของไนโตรเจนในโมเลกุลของสาร 2AP โดยการใช้สาร stable isotope 55
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 62
5.1 สรุปผลการทดลอง..... 62
5.2 ข้อเสนอแนะ..... 63
รายการอ้างอิง..... 64
ภาคผนวก 70
ภาคผนวก ก..... 71
ภาคผนวก ข..... 73
ภาคผนวก ค..... 77
ภาคผนวก ง..... 82
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 90

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณสารหอม 2AP ในข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ผ่านกระบวนการขัดสี.....	9
2.2	ปริมาณ 2APที่มาจาก proline กับ carbohydrate ชนิดต่างๆ.....	18
2.3	ค่ามวลแอกลักษณ์ของ 2AP ที่ได้จาก (A) ^{15}N-Glutamic acid, (B) ^{15}N-L-proline, (C) U-$^{13}C_6$ glucose,(D) 2APที่ผลิตได้จาก B. cereus (E) 2AP ที่ได้จาการสังเคราะห์	23
3.1	ภาวะของเครื่อง GC-MS สำหรับใช้แยกสาร 2AP และ 2,4,6-trimethylpyrridine (TMP).....	32
4.1	การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสังเคราะห์ 3 สูตร.....	42
4.2	ตารางสรุป retention time ของสาร 2AP และ TMP รวมทั้งเวลาที่ใช้ในการแยกสารทั้งหมดที่ใช้ในโปรแกรมอุณหภูมิทั้ง 4 แบบ.....	47
4.3	ปริมาณสารหอม 2AP ที่ได้จากการสกัดใบและแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอมโดยเทียบต่อน้ำหนักสด 1 kg.....	54
4.4	ความเข้มข้นสารหอม 2AP จากใบของเตยหอมที่แช่ในสารละลาย L-proline ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	55
4.5	ความเข้มข้นของสารหอม 2AP จากใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย L-proline, สารละลาย 15N-L-proline และน้ำกลั่น	56
4.6	ค่าสัดส่วนของปริมาณ 2AP ในช่วงมวลต่อประจุที่ 111/112 ของใบและแคลลัสของเตย หอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย L-proline,สารละลาย ^{15}N-L-proline และน้ำกลั่น.....	58
ข.1	องค์ประกอบพื้นฐานในอาหารสูตร MS, N_6 และ CC.....	74
ง. 1	พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์ในใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105.....	83
ง. 2	พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์ในใบของเตยหอมเมื่อแช่ในสารละลาย L-poline ที่ 4 ระดับความเข้มข้น.....	83

ตารางที่ หน้า

ง. 3 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมในใบของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อแช่ในน้ำกลั่นและสารละลาย L-poline..... 84

ง. 4 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมในใบของเตยหอม เมื่อแช่ในน้ำกลั่น สารละลาย L-polineและสารละลาย ^{15}N-L-proline……. 85

ง. 5 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมในแคลลัสของเตยหอม เมื่อแช่ในน้ำกลั่น สารละลาย L-poline และสารละลาย ^{15}N-L-proline……..…… 86

ง. 6 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมในใบของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อแช่ในน้ำกลั่น สารละลาย L-poline และสารละลาย ^{15}N-L-proline….. 87

ง. 7 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมในแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อแช่ในน้ำกลั่น สารละลาย L-poline และสารละลาย ^{15}N-L-proline.. 88

ง. 8 พื้นที่ใต้ peak ของสาร TMP จากโครมาโทแกรมที่ได้จากการขั้นตอนการสกัด 2AP ที่ศึกษา และที่ได้จากการฉีดสาร TMPโดยตรง..... 89

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างโมเลกุลของสารหอม 2AP..... 3

2.2 แผนภาพปฏิกิริยา Maillard ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารให้กลิ่น..... 4

2.3 แบคทีเรีย *Bacillus cereus* (a) และราสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* (b)..... 6

2.4 (a) ดอกชำมะนาด *Vallaris glabra* Ktze. และ (b) ผลจำปาดะ *Artocarpus polyphema* Pers..... 7

2.5 Chromatogram ของสารระเหยที่ได้จากข้าวหุงสุก..... 8

2.6 ปริมาณสารหอม 2AP ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย พ.ศ. 2543..... 10

2.7 ปริมาณสารหอม 2AP ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในพื้นที่ทุ่งกุลาร้องไห้ (พ.ศ. 2544)..... 11

2.8 การแยกของสารผสม AB ในระบบโครมาโทกราฟี..... 13

2.9 ส่วนประกอบหลักของเครื่องGC..... 14

2.10 การเกิด 2AP จาก Strecker degradation ของ ornithine..... 16

2.11 การเกิด 2AP จาก Strecker degradation ของ proline (I) 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine และ (II)1-pyrroline..... 17

2.12 การเกิด 1-pyrroline จาก proline และ 2-oxopropanal..... 19

2.13 การเกิด 2AP จาก 1-pyrroline และ 2-oxopropanal..... 20

2.14 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารหอม 2AP เสนอโดย Buttery และคณะ (1983)..... 21

2.15 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารหอม 2AP เสนอโดย Mahatheeranont และคณะ (1995)..... 22

2.16 ปริมาณสารหอม 2AP ที่ผลิตขึ้นจากแคลลัสของข้าวพันธุ์ต่างๆ 4 สายพันธุ์ (-----) คือ ไม่ให้ proline ในแหล่งอาหาร (——) คือให้ proline ในแหล่งอาหาร..... 24

2.17 ผลของกรดอะมิโนทั้ง 7 ชนิด ต่อปริมาณ 2AP ที่ได้จากชิ้นส่วนต้นกล้า (□) และแคลลัสของข้าว (■)..... 25

2.18 Chromatogram ที่ได้จากการศึกษาหาสารตั้งต้นในกระบวนการชีวสังเคราะห์ 2AP ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้สารละลาย stable isotope..... 26

2.19 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารหอม 2AP..... 27

รูปที่ หน้า

3.1 ขั้นตอนการสกัด 2AP จากตัวอย่างใบของข้าวและเตยด้วยตัวทำละลาย..... 36

3.2 ขั้นตอนการสกัด 2AP จากตัวอย่างแคลลัสของข้าวและเตยด้วยตัวทำละลาย..... 37
3.3 ขั้นตอนการทดสอบผลของระดับความเข้มข้นของ L-proline ต่อปริมาณ 2AP ที่ใบของเตยหอมผลิตขึ้น..... 38
3.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในน้ำกลั่นและสารละลาย proline..... 39
3.5 ขั้นตอนการติดตาม 2AP ที่ติดฉลากด้วยสาร stable isotope จากแคลลัสและใบ..... 40
4.1 การเกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ105 บนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส (A) เมล็ดข้าวหลังการเพาะเลี้ยง 3 วัน (B) เมล็ดข้าวหลังการเพาะเลี้ยง 5 วัน..... 42
4.2 การเกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ105 บนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ภายหลังการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์..... 43
4.3 การเพาะเลี้ยงยอดอ่อน และแคลลัสของเตยบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง..... 44
4.4 Chromatogram ที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 1... 47
4.5 Chromatogram ที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 2.. 48
4.6 Chromatogram ที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 3... 48
4.7 Chromatogram ที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 4... 49
4.8 Chromatogramที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยเครื่อง GC-MS ที่เลือกช่วงมวลต่อประจุเท่ากับ 35-200 amu..... 50
4.9 Chromatogramที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยเครื่องGC-MS ที่เลือกช่วงมวลต่อประจุเท่ากับ 35-130 amu..... 50
4.10 Chromatogramที่ได้จากการแยกวิเคราะห์จากสารสกัดตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด..... 52
4.11 Spectrum ของสารหอม 2AP (A) จากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ และ (B) จากสารสกัดจากตัวอย่างพืช..... 53
4.12 ตัวอย่าง chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์แคลลัสและใบของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอมในสารละลาย 3 ชนิด..... 59
4.13 สัดส่วนปริมาณ 2AP ในช่วงมวลต่อประจุที่ 111/112 ของใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย L-proline สารละลาย ^{15}N-L-proline และน้ำกลั่น..... 60
4.14 Mass spectrum ของสารหอม 2AP จากแคลลัสเตยหอม..... 61

บทที่ 1

บทนำ

กลิ่นของอาหารเป็นส่วนที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งในการดึงดูดและเพิ่มความสนใจของผู้บริโภค โดยเฉพาะกลิ่นหอมซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้อาหารหรือผลิตภัณฑ์ต่างๆ เป็นที่ยอมรับและต้องการของผู้บริโภคมากขึ้น ปัจจุบันกลิ่นหอมที่พบในอาหารอาจเกิดจากกรรมวิธีการผลิตอาหาร เช่น การให้ความร้อนในขั้นตอนการปรุงสุก หรือการเติมแต่งสารบางชนิดที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการปรุงแต่งกลิ่นรส แต่อย่างไรก็ตามผู้บริโภคส่วนใหญ่ยังคงยอมรับการบริโภคอาหารที่มีกลิ่นหอมตามธรรมชาติ กลิ่นหอมที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจในการศึกษากันมากในปัจจุบันคือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) เนื่องจากเป็นสารประกอบที่มีบทบาทสำคัญในการให้กลิ่นหอมในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น เนื้ออบ ป๊อบคอร์น (popcorn) ขนมปังแป้งข้าวสาลีและข้าวไรย์ (Schieberle, 1991; Schieberle และ Wener, 1991) สาร 2AP จัดเป็นสารประกอบประเภท volatile ที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ทั้งในกระบวนการทางเคมีและทางชีวภาพ พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น เตยหอม *Pandanus amaryllifolius* Roxb. และดอกชำมะนาด *Vallaris glabra* Ktze. รวมถึงพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยอย่างข้าวหอมมะลิด้วย (Buttery และคณะ, 1983; Wongpornchai และคณะ, 2003)

ข้าวหอมมะลิหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 *Oryza sativa* L. var. Khao Dawk Mali 105 เป็นข้าวที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในประเทศไทย อีกทั้งยังได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางทั้งในเอเชีย ยุโรป และอเมริกา (Laksanalamai และ Ilangantilek,1993) เนื่องจากมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว ซึ่งมีองค์ประกอบมาจากสารระเหยกว่า 140 ชนิด โดยมี 2AP เป็นสารสำคัญที่มีบทบาทมากที่สุดในกลิ่นหอมของข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Buttery และคณะ, 1983; Mahatheeranont, Keawsa-ard และ Dumri, 2001)

ในการบริโภคข้าวหอมมะลิ กลิ่นเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อความรู้สึกของผู้บริโภค จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสารหอม 2AP อย่างต่อเนื่องจนมาถึงปัจจุบัน (วาสนา วรมิศร์, 2539) ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพของข้าว อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีเพียงการศึกษาเกี่ยวกับสารหอม 2AP ในด้านโครงสร้างทางเคมี วิธีการสกัด การวิเคราะห์ปริมาณสารหอม การสังเคราะห์สารหอมในห้องปฏิบัติการ การศึกษาปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ที่มีผลต่อปริมาณการผลิตสารหอมในข้าว ตลอดจนวิธีการยืดอายุคุณภาพด้านกลิ่นของข้าวภายหลังการเก็บเกี่ยว (Buttery และคณะ, 1983; Suprasarma และคณะ, 1998; Mahatheeranont และ

คณะ, 2001; Grimm และคณะ, 2001; Yoshihashi, Huong และ Inatomi, 2002; นันทินี ศรีสุภัทรวานิช, 2548) จนกระทั่งมีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ โดยนำสาร stable isotope มาใช้ในการพิสูจน์หาสารตั้งต้นของ 2AP ในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพ ซึ่งศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ที่สามารถผลิต 2AP ได้ เช่น เชื้อ *Bacillus cereus* และข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่าสามารถติดตามการสังเคราะห์สารหอม 2AP ที่เกิดขึ้นและพิสูจน์สารตั้งต้นที่เข้าร่วมในกระบวนการชีวสังเคราะห์ได้ (Leo และคณะ, 1995; Yoshihashi และคณะ, 2002)

นอกจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นแหล่งผลิต 2AP ที่สำคัญ พบว่ามีพืชอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาเกี่ยวกับชีวสังเคราะห์สารหอม 2AP นั่นคือ เตยหอม เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า นอกจากจะเป็นพืชที่สามารถผลิตสารหอม 2AP ได้เช่นเดียวกับข้าวแล้ว เตยหอมยังสามารถผลิต 2AP ได้ในปริมาณที่มากกว่าที่พบในข้าวถึงประมาณ 10 เท่า (Buttery, Juliano และ Ling, 1982) นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับสารตั้งต้นหรือกลไกการสังเคราะห์สารหอม 2AP ในเตยหอม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์สารหอม 2AP ในเตยหอมเพื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการสังเคราะห์ 2AP ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้ใบและแคลลัส (callus) ของพืชทั้งสองชนิดเป็นตัวอย่างในการทดลอง โดยจะพัฒนาเทคนิคการสกัดสารหอม 2AP ด้วยตัวทำละลายและตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ 2AP ที่สังเคราะห์ได้ระหว่างเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ตลอดจนศึกษาสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในกระบวนการชีวสังเคราะห์ 2AP ในเตยหอม เพื่อใช้เป็นแนวทางในการหาวิถีของการสังเคราะห์ 2AP และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงคุณภาพของข้าวหอมต่อไป

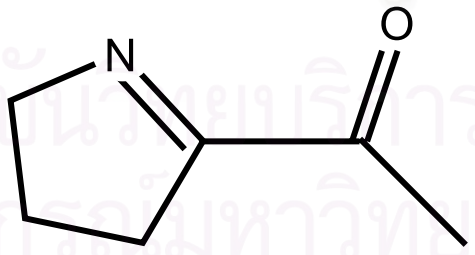
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline

สารหอม 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) เป็นสารหอมระเหยชนิดหนึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี มวลโมเลกุลเท่ากับ 111.143 สูตรโมเลกุล C_6H_9NO จัดอยู่ในกลุ่ม heterocyclic compound มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน 5 เหลี่ยมที่ประกอบด้วยไนโตรเจนอยู่ในวงแหวน มีหมู่ acetyl เกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ดังแสดงในรูปที่ 2.1 จากการที่สารหอม 2AP มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุล จึงแสดงสมบัติเป็นสภาพมีขั้ว (polarity) ค่อนไปทางสภาพเบส ระเหยง่ายที่สภาวะอุณหภูมิปกติ และไม่เสถียรแม้เก็บในสภาพสุญญากาศที่อุณหภูมิ -20 °C โดยสารจะเปลี่ยนจากของเหลวใสไม่มีสีเป็นสีแดง และเข้มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ สีที่เข้มขึ้นเกิดจากปฏิกิริยา condensation ของหมู่ carbonyl จนได้ conjugate pyridine polymer (Buttery และ Ling, 1982) ลักษณะกลิ่นของ 2AP สำหรับชาวตะวันตกบรรยายว่าคล้ายกลิ่นข้าวโพดคั่ว (popcorn) ส่วนชาวเอเชียให้คำอธิบายกลิ่นว่ากลิ่นคล้ายใบเตย (Paule and Power, 1989) จากการศึกษาเกี่ยวกับระดับความแรงของกลิ่น (oder threshold) ของสาร 2AP พบว่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถได้รับกลิ่นทางประสาทสัมผัสเมื่อสารนี้ละลายน้ำ (threshold of olfactory perception) มีค่า 0.1 ppb (Buttery, Turnbaugh และ Ling, 1988)



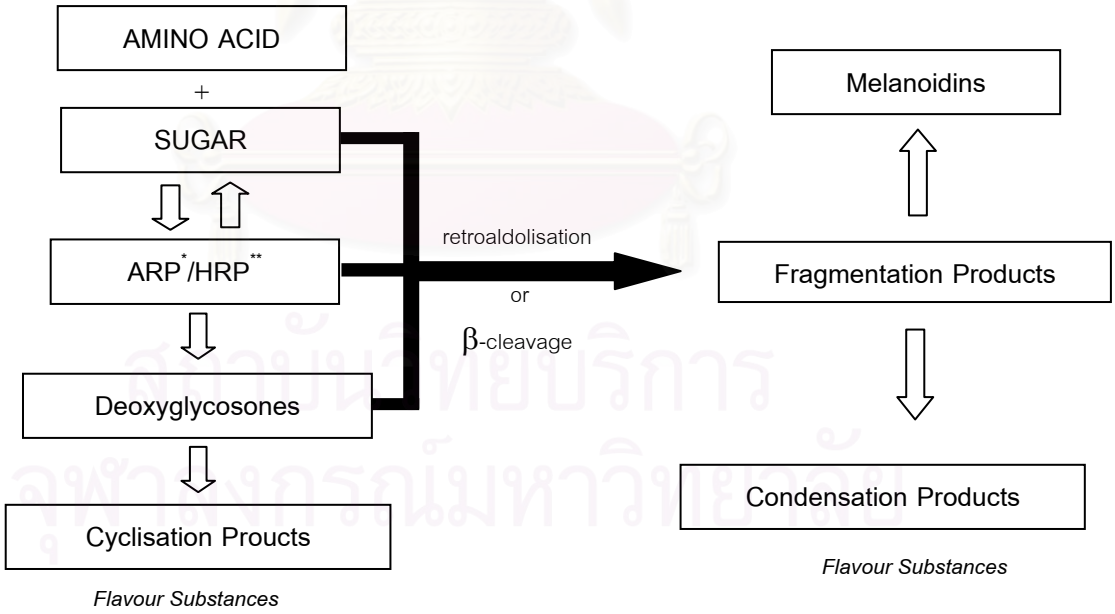
รูปที่ 2.1 โครงสร้างโมเลกุลของสารหอม 2AP

ที่มา : Buttery และ Ling (1982)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การตรวจพบสารหอม 2AP ในอาหาร

แม้ว่าสารหอม 2AP จะรู้จักกันดีในฐานะเป็นสารสำคัญในกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ของข้าวหอม (aromatic rice) ในความเป็นจริงแล้วยังสามารถพบสาร 2AP ได้ในอาหารหลายชนิด การค้นพบเกี่ยวกับสารประกอบชนิดนี้ในระยะแรกเริ่มต้นศึกษาจากสิ่งไม่มีชีวิต โดย Buttery และ Ling (1982) รายงานเกี่ยวกับสารระเหยหลักที่มีบทบาทสำคัญในกลิ่นหอมของข้าวหุงสุกคือสาร 2AP โดยสามารถพิสูจน์และระบุโครงสร้างทางเคมีได้สำเร็จเป็นครั้งแรก ต่อมาจึงมีงานการวิจัยเผยแพร่ออกมาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับการค้นพบสารหอม 2AP ในตัวอย่างอาหารอื่นๆ มากมายหลายชนิด เช่น ขนมปังอบ (Schieberlec และ Grosch, 1985,1987) เนื้ออบ (Gasser และ Grosch, 1988) เนื้อก้ามปูสุก (Chung และ Cadwallader, 1994) และเผือกต้มสุก (Wong, Chong. และ Chee, 1998) เป็นต้น อาหารทั้งหมดล้วนเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปโดยการให้ความร้อน ดั้งนั้นจึงมีการพิสูจน์เกี่ยวกับสารหอม 2AP ว่าเกิดขึ้นจากกระบวนการทางเคมี โดยปฏิกิริยา Maillard (Ween, 1998) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนและน้ำตาลในระหว่างที่อาหารได้รับความร้อน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา Maillard มีหลายประเภทซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของกรดอะมิโนและน้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นที่อยู่ในอาหาร โดยให้สารที่สำคัญได้แก่ สารให้กลิ่น (flavour substances) ชนิดต่างๆ และ สารสีน้ำตาล (brown pigments) หรือสารในกลุ่ม Melanoidins (รูปที่ 2.2)



*ARP คือ Amadori rearrangement product **HRP คือ Heyns rearrangement product

รูปที่ 2.2 แผนภาพปฏิกิริยา Maillard ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารให้กลิ่น

ที่มา : Ween (1998)

Buttery, Ling และ. Donald (1994) รายงานเกี่ยวกับสารระเหยจากผลิตภัณฑ์ข้าวโพดหวาน เช่น ข้าวโพดหวานสด แช่แข็ง และบรรจุกระป๋อง พบว่าสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในกลิ่นของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวคือ 2AP และ 2-acetyl-2-thiazoline โดยสาร 2AP ในข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องมีมากกว่าในผลิตภัณฑ์อื่นๆ เนื่องจากความร้อนในการฆ่าเชื้อ (sterilize) ทำให้เกิดสาร 2AP มากขึ้น

Buttery และ Ling (1995) ศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยในผลิตภัณฑ์ corn tortilla, tortilla chips, masa flour, taco shells และ tortilla corn โดยใช้เทคนิค High-flow dynamic headspace กับ Tenax trapping พบว่าใน taco shells มีสารประกอบหลายชนิดเช่นกันคือ 2AP, 2,4-decadienal, 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine, 2-acetophenone, 2-nonenal, 3-methylbutanal, 3-(methylthio) propanal (methional) และ 2-acetyltetrahydropyridine เป็นสารช่วยเสริมกลิ่น

Rychlik และ Grosch (1996) รายงานว่าสามารถตรวจวิเคราะห์สาร 2AP จากขนมปังข้าวสาลีปิ้ง (toasted wheat bread) โดยใช้เทคนิค Gas chromatography/olfactometry of headspace ในการตรวจวิเคราะห์ พบว่า มีสารให้กลิ่นที่สำคัญ 5 ชนิดเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ 2AP, (E)-2-nonenal, 3-methylbutyric acid, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H) furanone, methional, 2,3 butanedione โดยสาร 2AP เป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุด

Schieberle (1996) ศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบที่ให้กลิ่นในงาอบ (roasted sesame) พบว่าสาร 2AP เป็นสารหลักในการให้กลิ่นหลักในงาอบ นอกจากนี้ยังมีรายงานในอาหารหลายชนิดที่ผ่านกระบวนการทำอาหารให้สุกด้วยความร้อนที่มีสาร 2AP เป็นสารประกอบหลักในการให้กลิ่นหอม เช่น ใน กุ้งต้มสายพันธุ์ *Procambarus clarkia* (Cadwallader และ Baek,1998) มันฝรั่งต้ม (Mutti และ Grosch,1999) เมล็ดมะม่วงหิมพานต์อบ (roasted seeds of wild mango) สายพันธุ์ *Irvingia gabonensis* (Tairu, Hofmann และ Schieberle, 2000) ไส้กรอกกระเทียมสไตล์อิตาลีและแฮมที่ผ่านความร้อน (Blank และคณะ, 2001) และกุ้งก้ามกราม *Homarus americans* (Lee, Suriyaphan และ Cadwallader, 2001) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามมีนักวิจัยเสนอแนวความคิดที่ขัดแย้งเกี่ยวกับกระบวนการเกิดของสารหอมชนิดนี้ในข้าว โดยรายงานว่าสารหอม 2AP ในข้าวนั้นไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาที่ผ่านความร้อนหรือปฏิกิริยา Maillard เพียงอย่างเดียว แต่ต้นข้าวสามารถสังเคราะห์สาร 2AP ได้เอง และจะสะสมอยู่ในทุกส่วนของต้นข้าวยกเว้นราก นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการค้นพบยีนที่ควบคุมความหอมของข้าวพันธุ์ที่มีกลิ่นหอม (Lorieux และคณะ,1996) จึงเป็นการสนับสนุนแนวคิดที่ว่าสาร 2AP ไม่ได้เกี่ยวข้องกับปฏิกิยา Maillard โดยตรง ดังนั้นงานวิจัยเกี่ยวกับสารหอม 2AP ในช่วงต่อมาจึงเน้นการศึกษาในสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตสาร 2AP ขึ้นได้เอง หรือศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ของสารหอม 2AP

2.3 การตรวจพบสารหอม 2AP ในสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช และจุลินทรีย์ สามารถผลิตสารหอม 2AP ขึ้นได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งนักวิจัยให้ความสำคัญในการศึกษาถึงกระบวนการสังเคราะห์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จากรายงานที่ผ่านมา สารหอม 2AP พบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย และรา โดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถสังเคราะห์สารหอม 2AP ขึ้นเองได้

Romanczyk และคณะ (1995) ศึกษาการสังเคราะห์ 2AP ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus cereus* ซึ่งแยกได้จากกระบวนการหมักโกโก้ ภายใต้สภาวะการเลี้ยงในอาหารแข็ง และสกัดสาร 2AP ด้วยความดันไอน้ำ พบว่า *Bacillus cereus* ผลิต 2AP ได้ 30-70 ppb และจะผลิต 2AP เพิ่มขึ้นเมื่อให้กรดอะมิโน L-proline, L-ornithine และ L-glutamate เพิ่มเติมในอาหารเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม *Bacillus cereus* ไม่สามารถผลิต 2AP ได้ในอาหารเหลว

Rungsardthong (1995) ศึกษาและจดสิทธิบัตร Thai Patent 13175 การผลิต 2AP จากเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus nigricans* และ *Aspergillus awamori* ในอาหารสูตร Syn 18 พบว่าสามารถผลิต 2AP ได้ 2.08 และ 1.11 mg/l ตามลำดับ นอกจากนี้ยังรายงานเกี่ยวกับสารประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บางตัวมีผลต่อการผลิต 2AP เช่น potassium phosphate, sodium chloride, glucose และ corn steep liquor

Nagsuk, Winichphol และ Rungsardthong (2002) ตรวจวิเคราะห์สารหอม 2AP ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรีย *Bacillus cereus* และราสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori* TISTR 3193 (รูปที่ 2.3) เมื่อแยกส่วนที่เป็นสารหอม 2AP ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC และ GC-MS เปรียบเทียบ retention time และ มวลเอกลักษณ์ (mass spectra) กับสารหอม 2AP ที่สกัดได้จากใบของเตยหอม พบว่าได้ค่าจากการทดลองที่เหมือนกัน

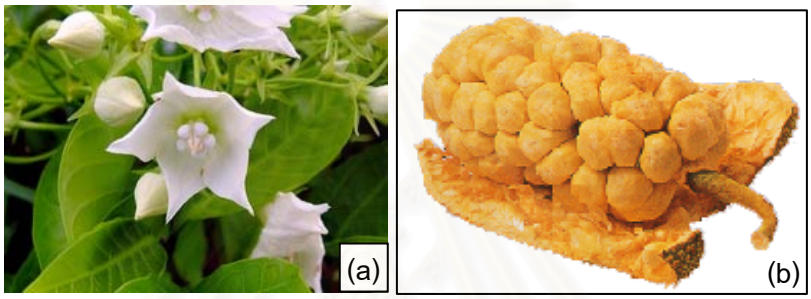
(a) (b)

รูปที่ 2.3 แบคทีเรีย *Bacillus cereus* (a) และราสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* (b)

ที่มา : http://www.membranetransport..org/, http://wwwbiosci.sierrcollege.edu/

สำหรับพืชมีการรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารหอม 2AP ในมะพร้าว *Cocos nucifera* Linn. โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์แบบต่อเนื่อง พบว่ามีการสะสมสาร 2AP ทั้งในส่วนเนื้อและน้ำของมะพร้าว (กรรณานุช เลาห์เรณู, นุสรา เมธาพิพัฒน์ และศรีสุรางค์ ปิ่นแสงมณี., 2541)

นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารหอม 2AP ในดอกชำมะนาด *Vallaris glabra* Ktze. (Wongpornchai และคณะ, 2003) และผลจำปาดะ *Artocarpus polyphema* Pers. (Wong, Lim และ Wong, 1992) (รูปที่ 2.4) อย่างไรก็ตามข้าวและเตยหอมยังเป็นพืชที่ได้รับความสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับกลิ่นหอมของสาร 2AP มากที่สุด



รูปที่ 2.4 (a) ดอกชำมะนาด *Vallaris glabra* Ktze.
(b) ผลจำปาดะ *Artocarpus polyphema* Pers.

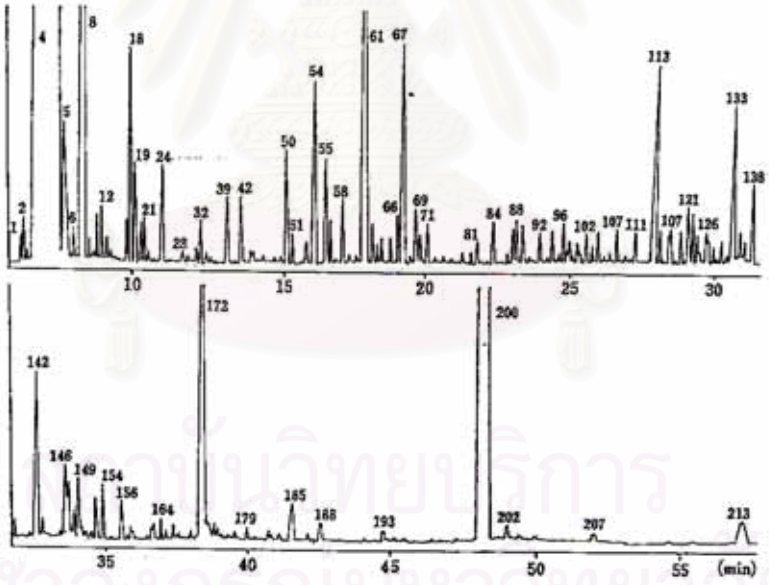
ที่มา : http://clgc.rdi.ku.ac.th/resource/fragrant/bread_flower/vallaris.html
http://members.fortunecity.com/timevehicle/fruit_pl.htm

2.3.1 สาร 2AP ในข้าวหอม (Aromatic rice)

สารหอม 2AP พบได้ในข้าวหอมหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์ Seratus Malam จากประเทศอินโดนีเซีย พันธุ์ Malagkit Sungsong, Azudena และ Milagrosa ของประเทศฟิลิปปินส์ พันธุ์ Hieri ของประเทศญี่ปุ่น พันธุ์ Goolarah และ Della เป็นสายพันธุ์ข้าวหอมจากประเทศออสเตรเลียและอเมริกา แต่พันธุ์ข้าวหอมที่มีชื่อเสียงและได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในตลาดโลกคือ ข้าวพันธุ์ Basmati ซึ่งเป็นสายพันธุ์จากประเทศอินเดียและปากีสถาน และสายพันธุ์ที่มาจากประเทศไทยคือข้าวหอมมะลิ (ดุษฎี อุตภาพ และคณะ, 2548)

ข้าวหอมมะลิ หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ข้าวขาวดอกมะลิ 105 *Oryza sativa* L. var. Khao Dawk Mali 105 เป็นข้าวหอมที่ถูกพัฒนาสายพันธุ์มาจากข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองของ อ. บางคล้า จ. ฉะเชิงเทรา (วรวิทย์ พาณิชพัฒน์, 2529) เป็นข้าวที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในประเทศไทย (Mahatheeranont และคณะ, 2001) เนื่องจากเมื่อหุงสุกแล้วจะได้ลักษณะเมล็ดที่มีสีขาว นุ่ม มีกลิ่นหอม เนื่องจากข้าวเป็นธัญพืชที่รู้จักกันดีทั่วโลก ซึ่งพบว่ามากกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก (Mahindru, 1995) จึงมีนักเคมีอาหารให้ความสำคัญในการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านกลิ่นซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดคุณภาพที่ดีของข้าว

Yajima และคณะ (1978) ได้ศึกษาสารประกอบที่ให้กลิ่นในข้าวหุงสุกโดยการใช้เทคนิคที่เรียกว่า Steam Distillation Continuous Extraction หรือ SDE ในข้าวหอมพันธุ์ Koshihikari ของญี่ปุ่น และเมื่อวิเคราะห์สารหอมในข้าวหุงสุกด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) ได้ผลดังแสดงใน chromatogram (รูปที่ 2.5) พบสารระเหยอยู่มากกว่าสองร้อยชนิด ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบกลุ่มไฮโดรคาร์บอน 13 ชนิด alcohol 13 ชนิด aldehyde 16 ชนิด ketone 14 ชนิด กรด 14 ชนิด ester 8 ชนิด phenol 5 ชนิด pyridine 3 ชนิด pyrazine 6 ชนิด และสารประกอบอื่นอีก 8 ชนิด



รูปที่ 2.5 Chromatogram ของสารระเหยที่ได้จากข้าวหุงสุก

ที่มา : Yajima และคณะ (1978)

Buttery และ Ling (1982) รายงานการพบสารระเหย 2AP ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการให้กลิ่นหอมในข้าวหลายสายพันธุ์ โดยสามารถพบได้ทั้งในข้าวพันธุ์ที่มีกลิ่นหอมและไม่หอมบางพันธุ์ อย่างไรก็ตามพบว่าในข้าวพันธุ์ที่มีกลิ่นหอมมีปริมาณ 2AP มากกว่า

Buttery และคณะ (1983) ศึกษาการหาปริมาณสารหอม 2AP ในข้าวพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ตัวอย่างข้าว 10 พันธุ์ ด้วยเทคนิค Steam Distillation Continuous Extraction ในการสกัดสารหอม จากนั้นจึงใช้เทคนิค GC-MS เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลาย 2AP ที่สังเคราะห์ขึ้น จากการทดลองพบว่าปริมาณ 2AP ที่ได้จากข้าวพันธุ์ต่างๆ มีค่าแตกต่างกัน นอกจากนี้ในข้าวที่ไม่ผ่านกระบวนการขัดสีมีปริมาณสารหอม 2AP มากกว่าข้าวที่ผ่านกระบวนการขัดสีในพันธุ์เดียวกัน แสดงว่าความหอมในข้าวขึ้นอยู่กับกระบวนการขัดสี ดังแสดงในตารางที่ 2.1

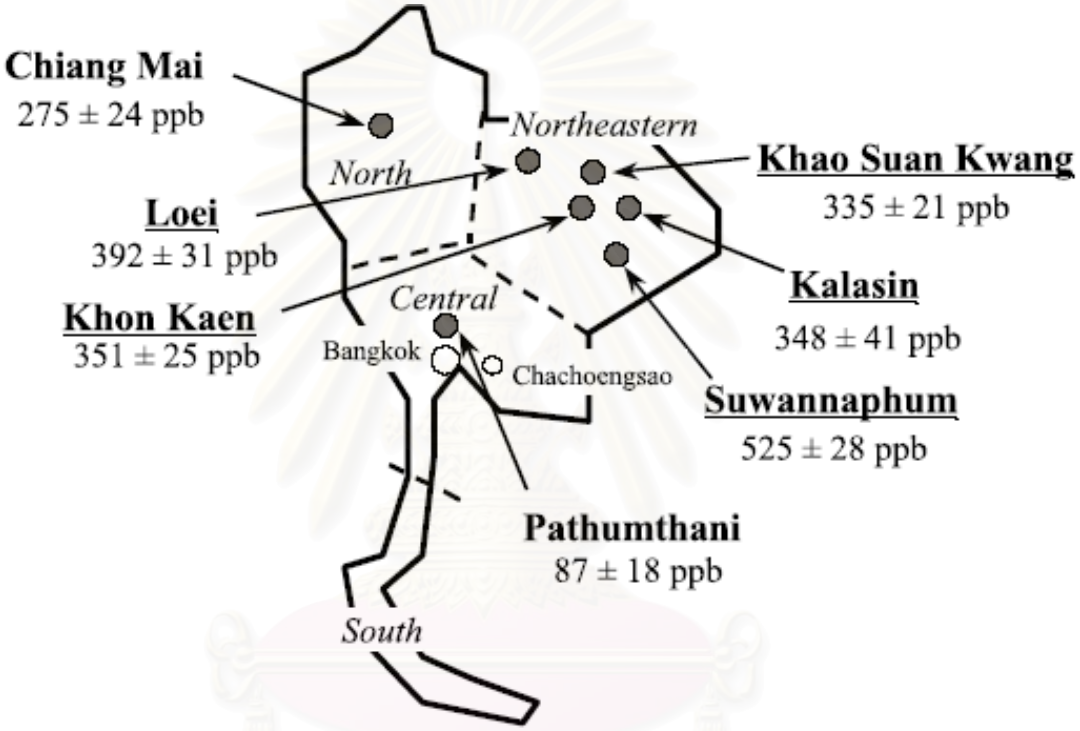
ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารหอม 2AP ในข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ผ่านกระบวนการขัดสี

พันธุ์ข้าว	ปริมาณของสารหอม 2AP (ppm)	
	Milled rice	Brown rice
Malagkit Sungsong	0.09	0.2
IR841-76-1	0.07	0.2
Khao Dawk Mali 105	0.07	0.2
Milagrosa	0.07	
Basmati 370	0.06	0.17
Seratus Malam	0.06	
Azucena	0.04	0.16
Hieri	0.04	0.1
Texas Long Grain	< 0.008	
Calrose	< 0.008	

ที่มา : Buttery และคณะ (1983)

Mahatheeranont และคณะ (2001) รายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารสกัดที่มีกลิ่นหอมที่ได้จากข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 *Oryza sativa* L. var. Khao Dawk Mali 105 โดยการสกัดด้วยไอน้ำและตัวทำละลาย โดยพบว่ามีสารระเหยมากกว่า 140 ชนิดเป็นองค์ประกอบ และมี 2AP เป็นสารสำคัญที่มีบทบาทมากที่สุดในการเกิดกลิ่นหอมของข้าวขาวดอกมะลิ 105

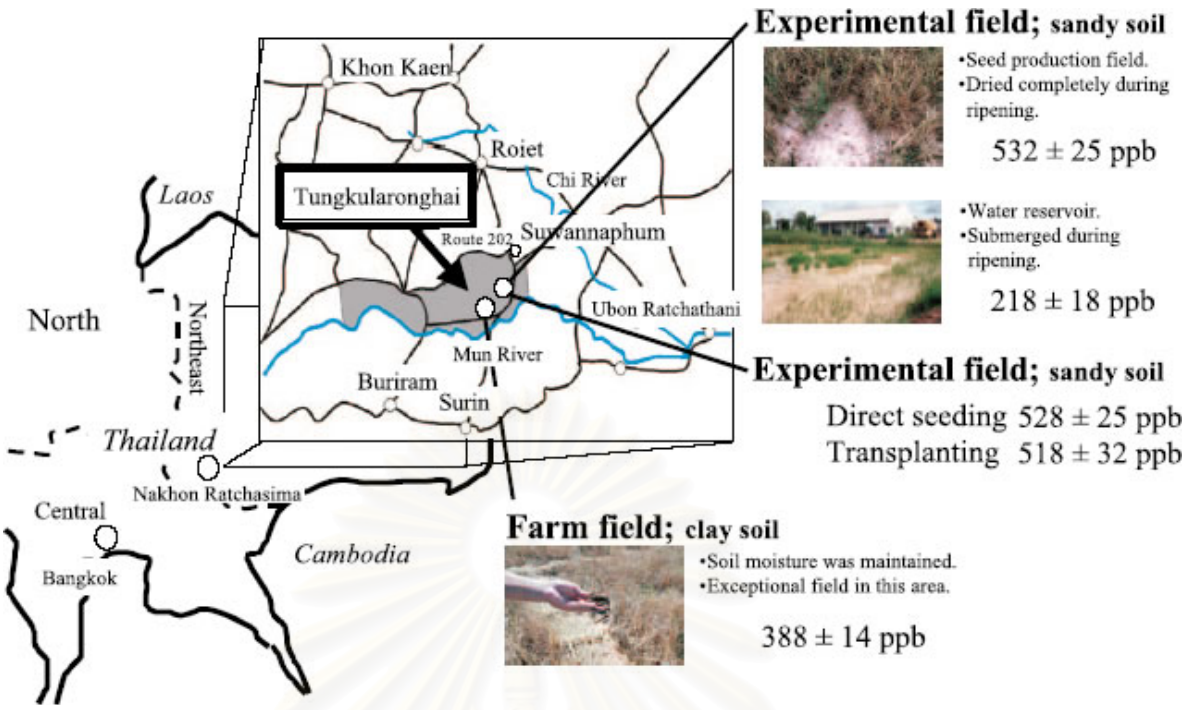
นอกจากนั้นความหอมของข้าวหอมที่ปลูกในพื้นที่ต่างกันจะมีปริมาณสารหอม 2AP ที่ถูกผลิตขึ้นต่างกัน (รูปที่ 2.6) หรือแม้แต่ในพื้นที่เดียวกัน แต่ปลูกในชนิดของดินที่ต่างกัน ปริมาณสารหอม 2AP ที่ผลิตขึ้นได้จะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันด้วย จากการศึกษาข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในดินที่มีความชื้นต่างกัน พบว่าข้าวที่ปลูกในสภาพดินแห้งแล้งจะมีปริมาณสารหอม 2AP มากกว่าข้าวที่ปลูกในดินชุ่มชื้นอีกด้วย (Yoshihashi, Huong และ Kabaki , 2004) ดังแสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.6 ปริมาณสารหอม 2AP ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย พ.ศ. 2543

ที่มา : Yoshihashi และคณะ (2004)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.7 ปริมาณสารหอม 2AP ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในพื้นที่ทุ่งกุลาร้องไห้ (พ.ศ. 2544)

ที่มา : Yoshihashi และคณะ (2004)

2.3.2 สาร 2AP ในเตยหอม

เตยหอมเป็นพืชที่รู้จักกันดีในประเทศแถบเอเชีย ในฐานะพืชที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการแต่งกลิ่นรสให้กับอาหาร มีประวัติการใช้เป็นส่วนผสมในอาหารยาวนานโดยเฉพาะในสูตรอาหารของประเทศอินเดีย ไทย และอินโดนีเซีย เพื่อปรับแต่งรสชาติของอาหารให้ดึงดูดใจในการบริโภค (Thimmaraju และคณะ, 2005)

เตยหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pandanus amaryllifolius* Roxb. อยู่ในวงศ์ Pandanaceae จัดเป็นพืชในกลุ่ม screw pine เตยหอมเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวลักษณะแตกกอเป็นพุ่มขนาดเล็ก ลำต้นเป็นข้อ ใบออกเป็นพุ่มบริเวณปลายยอด เมื่อโตจะมีรากค้ำจุนช่วยพยุงลำต้นไว้ ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับเวียนเป็นเกลียวขึ้นไปจนถึงยอด ลักษณะใบยาวเรียวคล้ายใบหอก ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ ผิวใบเป็นมัน เส้นกลางใบเว้าลึกเป็นแอ่ง ถ้าดูด้านท้องใบจะเห็นเป็นรูปคล้ายกระดูกงูเรือ (นิจศิริ เรืองรังสี และพะยอม ตันติวิวัฒน์, 2534) ใบมีกลิ่นหอมซึ่งนิยมนำมาใช้ในการแต่งกลิ่นอาหารอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชีย ตลอดจนนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น น้ำใบเตยกระป๋อง หรือใบเตยแห้ง

Jiang (1999) ศึกษาการสกัดสาร 2AP ในเตยหอม ด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยใช้ dichloromethane เป็นตัวทำละลาย พบสารประกอบ 22 ชนิด คือ alcohol 9 ชนิด กรด carboxylic 4 ชนิด ester 2 ชนิด hydrocarbon 3 ชนิด furanone 1 ชนิด และสารที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อีก 3 ชนิด

น้องนุช เจริญกุล (2543) ศึกษาวิธีการสกัดสารหอม 2AP จากใบของเตยหอม โดยเทคนิค simultaneous steam distillation and extraction พบว่าสามารถสกัดสารหอมได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากให้กลิ่นหอมใกล้เคียงธรรมชาติ สารสกัดที่ได้เป็นของเหลวใส ไม่มีสี สามารถให้กลิ่นได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 8-8.5

แววตา ชี้ทางดี (2547) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด 2AP และสารให้กลิ่นอื่นๆ ในเตยหอม โดยจำลองกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน ซึ่งแปรอุณหภูมิ pH และระยะเวลาการให้ความร้อนที่ระดับต่างๆ สกัดด้วย dichloromethane และตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการให้กลิ่นหอมของเตยคือที่ระดับอุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที ที่ pH 7 นอกจากนี้ยังพบสารให้กลิ่นที่สำคัญในเตยหอม อีก 9 ชนิด ได้แก่ 2AP (กลิ่นเตย), 3-methyl-2(5H)-furanone (กลิ่นฉุน, กลิ่นคล้ายยา และกลิ่นหวาน) β-damascenone (กลิ่นยาสูบปนกลิ่นไหม้) trans-2-heptenal (กลิ่นใบไม้), 4-guaiacol (กลิ่นยาสูบปนกลิ่นเหม็นเขียว) และสารที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อีก 4 ชนิด ซึ่งให้กลิ่นหญ้าตัดใหม่, กลิ่นต้ม และกลิ่นไหม้

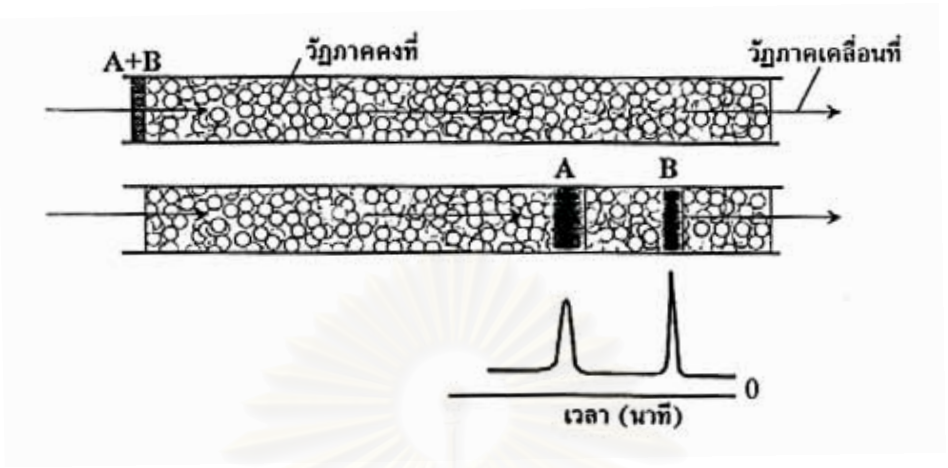
2.4 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารหอม 2AP

เนื่องจาก 2AP เป็นสารระเหยที่สกัดได้จากสารระเหยรวมของพืช โดยขั้นตอนการสกัดไม่สามารถสกัดสาร 2AP ออกมาเพียงอย่างเดียว แต่จะออกมาโดยมีสารอื่นๆ เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิค Gas Chromatography มาช่วยในการตรวจวิเคราะห์

2.4.1 หลักการของเทคนิค Gas Chromatography (GC)

เทคนิค Chromatography ถูกค้นพบครั้งแรกโดยนักชีววิทยาชาวรัสเซียชื่อ Michael Tswett ในปี ค.ศ. 1906 ถูกนำมาใช้ในการแยกและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารผสม ซึ่งใช้หลักการของการแพร่กระจาย (distribution) หรือการแบ่งส่วน (partition) ของโมเลกุลของสารประกอบใดๆ ในวัฏภาค (phase) ที่แตกต่างกันสองวัฏภาค คือวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) การแพร่กระจายของสารประกอบใดๆ ในระหว่างวัฏภาคทั้งสองจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแรง

กระทำ (relative solubility) ของสารในแต่ละวัฏภาค การที่สารประกอบแต่ละชนิดเคลื่อนที่บนวัฏภาคหนึ่งๆ ด้วยความเร็วที่ต่างกันนี้จึงสามารถแยกสารที่เป็นองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกันได้ดังรูปที่ 2.8



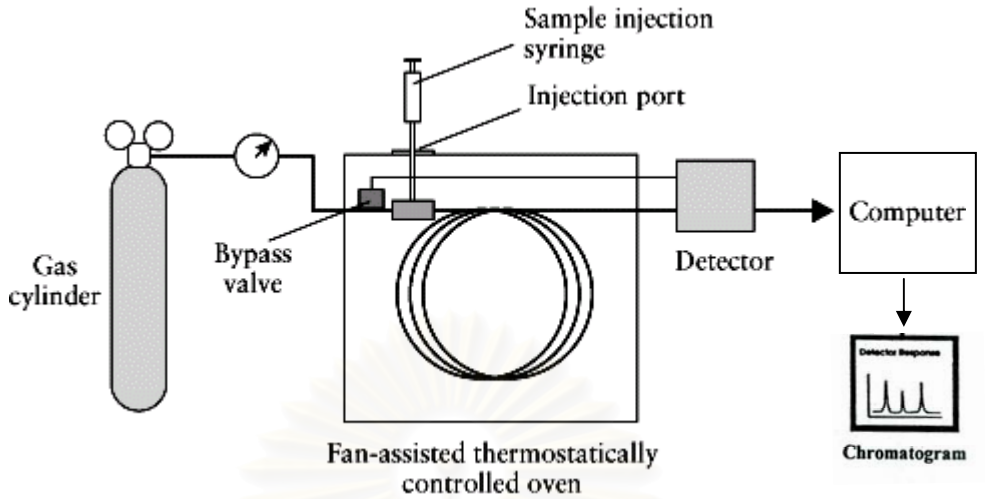
รูปที่ 2.8 การแยกของสารผสม AB ในระบบ Chromatography

ที่มา : สุกัญญา วงศ์พรชัย และคณะ (2547)

ต่อมามีการพัฒนาเทคนิค Chromatography มากขึ้น เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ได้ดีขึ้น จนกระทั่ง James และ Martin ได้ประดิษฐ์เครื่อง GC ขึ้นในปี ค.ศ. 1950

GC เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกสารผสมที่สามารถระเหยเป็นไอได้ออกจากกัน โดยใช้หลักการควบคุมอุณหภูมิให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ระเหยกลายเป็นไอแล้วเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์เพื่อแยกสารผสมออกจากกัน ดังนั้นวิธีการของ GC จึงนิยมใช้อย่างกว้างขวางในการแยกสารประกอบในตัวทำละลายอินทรีย์ และอาจใช้วิเคราะห์สารอนินทรีย์อย่างง่ายบางชนิด เช่น O_2 CO_2 และ SO_2 เป็นต้น

เครื่อง GC โดยทั่วไปประกอบด้วยองค์ประกอบพื้นฐาน 4 ส่วน (รูปที่ 2.9) คือ ส่วนแรกเป็นถังบรรจุแก๊สตัวพา (carrier gas) ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำหน้าที่พาสารตัวอย่างเข้าสู่ส่วนที่สองซึ่งเป็นห้องควบคุมอุณหภูมิ (oven) ภายในประกอบด้วยคอลัมน์ที่ถูกบรรจุด้วยวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) สารผสมที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกนำเข้าเครื่องผ่านทางช่องฉีดสาร (injection port) ซึ่งเป็นส่วนที่ถูกควบคุมอุณหภูมิให้สูงกว่าจุดเดือดของสารทุกตัวที่ต้องการวิเคราะห์ เพื่อให้สารตัวอย่างระเหยเป็นไอทั้งหมดก่อนที่จะเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ สารตัวอย่างที่วิ่งผ่านคอลัมน์จะแยกออกจากกันตามแรง relative solubility ของสารแต่ละตัวต่อวัฏภาคนิ่งออกเป็นส่วนๆ และเดินทางเข้าสู่ส่วนที่สามซึ่งเป็นตัวตรวจวัด (detector) เพื่อทำให้เกิดสัญญาณขึ้นและสัญญาณที่ได้จะถูกส่งต่อไปยังส่วนสุดท้ายซึ่งเป็นระบบเก็บและประมวลผลข้อมูล (data processing and storage) สัญญาณจะถูกประมวลและแสดงผลออกมาเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (แกน X) และปริมาณสัญญาณ (แกน Y) กราฟที่ได้เรียกว่า chromatogram



รูปที่ 2.9 ส่วนประกอบหลักของเครื่อง GC

ที่มา : www.kmitl.ac.th/sisc/GC-MS/main.html

2.4.2 **หลักการของ** Mass spectrometry (MS)

MS เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ชนิดหนึ่ง ค้นพบโดย Wilhelm Wien ในปี ค.ศ. 1889 นิยมใช้วิเคราะห์โครงสร้างของสาร โดยใช้หลักการพิจารณารูปแบบการแตกตัวของโมเลกุลเมื่อถูกกระแสของอิเล็คตรอน (stream of electrons) จากแหล่งพลังงานพุ่งชน สารประกอบจะแตกตัวเป็นส่วนย่อย (fragments) ในรูปของไอออน (ions) แล้วแยกไอออนตามขนาดมวล ได้รูปแบบที่แน่นอน (definite pattern) ของจำนวนไอออนซึ่งเรียกว่า แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะที่เป็นเอกลักษณ์สำหรับสารหนึ่งๆ จึงสามารถระบุโครงสร้างของสารประกอบอินทรีย์ได้ (มงคล รายะนาคร, 2537)

ปัจจุบันมีการนำ Mass spectrometer ต่อควบคุมกับเครื่อง Chromatography ชนิดอื่น เช่น Chromatography ของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) หรือ GC (สมเดช กนกเมธากุล, 2547)

อภิรดี สาริกา (2527) ศึกษาสารที่ให้กลิ่นในเมี่ยงจากอำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ สารกลิ่นหอมระเหยจากเมี่ยงได้ถูกสกัดและวิเคราะห์ด้วย GC และ GC-MS พบว่าสารที่ให้กลิ่นในเมี่ยงแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ให้กลิ่นไม่ดีและเป็นกลิ่น "After taste" ซึ่งเป็นสารพวก phenolic compounds ได้แก่ phenol, 2-methoxy-p-cresol และ 2-ethyl phenol อีกชนิดหนึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมได้แก่สาร

p-methyl acetophenone, linalool, oxides ของ linalools, terpineol, benzyl alcohol และ 2-phenyl ethanol

Jianming (2002) ศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของกลิ่นในใบของ Yahonkaoluo *Strobilanthus deyerianus* โดยใช้เทคนิค GC-MS พบว่ามีสาร 2AP ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ให้กลิ่นหอมในข้าวเป็นองค์ประกอบ

Gay และคณะ (2006) ศึกษาประสิทธิภาพวิธีการตรวจวิเคราะห์สารหอม 2AP ในเมล็ดข้าวพันธุ์ที่มีกลิ่นหอม 41 สายพันธุ์ ซึ่งสกัดและตรวจวิเคราะห์ 2AP ด้วยเทคนิค Solid Phase Micro-Extraction (SPME) ร่วมกับ GC-MS เปรียบเทียบกับวิธีสกัดด้วยเทคนิค steam distillation solvent extraction พบว่าทั้ง 2 วิธีสามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ได้ และให้ค่า correlation (R^2) เท่ากับ 0.98

2.5 การศึกษาสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารหอม 2AP

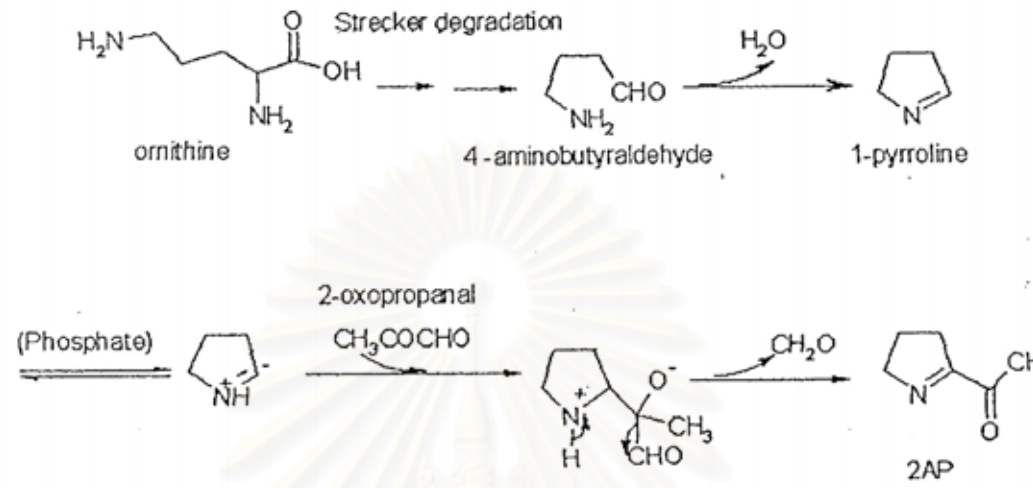
นับตั้งแต่การค้นพบสารหอม 2AP และความสำคัญที่กล่าวมาในข้างต้น ทำให้ความสนใจในการศึกษากระบวนการสังเคราะห์สารหอมชนิดนี้มากขึ้นเป็นลำดับ ทั้งการศึกษาและพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการสกัดสารหอม 2AP จากตัวอย่าง ขั้นตอนที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ ตลอดจนศึกษาสารที่เข้าร่วมในกระบวนการสังเคราะห์ 2AP โดยมีการศึกษาทั้งในกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ

2.5.1 การสังเคราะห์สารกลิ่นหอม 2AP ด้วยกระบวนการทางเคมี

รายงานทางเคมีในระยะแรกเสนอว่า สารหอม 2AP เกิดจากปฏิกิริยา Maillard ต่อมาจึงมีรายงานเกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์ 2AP ในอาหารมากขึ้น จนกระทั่งเสนอวิถีในกระบวนการสังเคราะห์ 2AP ทางเคมี

Schieberle (1990) ศึกษากระบวนการเกิดสารหอม 2AP ในขนมปังขณะอบ โดย 2AP ที่เกิดขึ้นในขนมปังขณะที่ได้รับความร้อนอยู่ในเตาอบมาจากกรดอะมิโน ornithine (รูปที่ 2.10) proline (รูปที่ 2.11) และ glucose ที่มีอยู่ในขนมปัง เมื่อขนมปังได้รับความร้อนในเวลาที่เหมาะสม จะเกิดการสลายของ glucose ได้เป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ที่สำคัญคือ 2-oxopropanal ในขณะเดียวกันกรดอะมิโนเกิดการสลายตัว ซึ่งเกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า Strecker degradation จากนั้น 2-oxopropanal เข้าทำปฏิกิริยากับ 1-pyrroline กล่าวคือ เมื่อ ornithine เกิด Strecker degradation

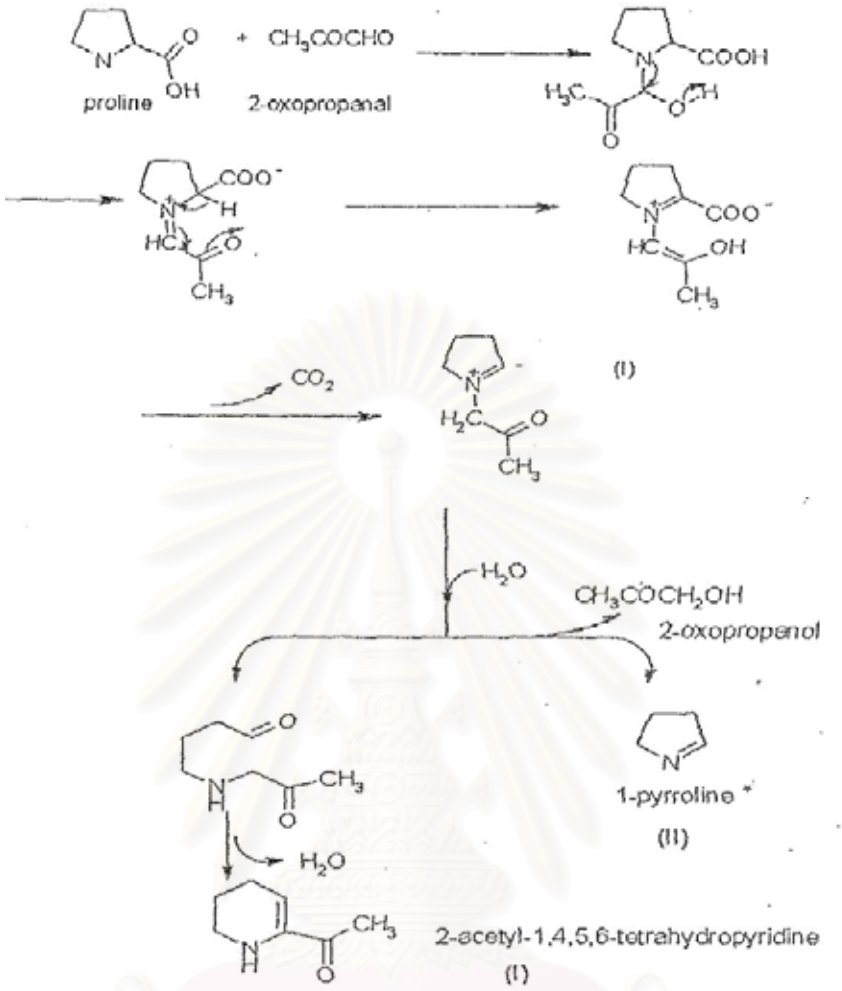
ได้สารมัธยันตร์ คือ 4-aminobutyraldehyde และ 1-pyrroline แล้ว ถ้าสารมัธยันตร์ดังกล่าวอยู่ในสภาวะที่มี phosphate ion กับ 2-oxopropanal จะสามารถเกิด 2AP ขึ้นได้ ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 การเกิด 2AP จาก Strecker degradation ของ ornithine

ที่มา : Schieberle (1990)

วิถีการเกิด 2AP จาก proline จะผ่าน Strecker reaction เช่นเดียวกับที่เกิดใน ornithine เมื่อทำปฏิกิริยากับ 2-oxopropanal เกิดเป็น 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (ATHP) และ 1-pyrroline (รูปที่ 2.11) เป็นสารมัธยันตร์ซึ่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี phosphate ion กับ 2-oxopropanal จะสามารถเกิด 2AP ขึ้นได้เช่นเดียวกับที่เกิด Strecker degradation ใน ornithine ทั้งนี้วิถีของกระบวนการที่ถูกเสนอทั้งหมดจะอยู่ในสภาวะที่มีการให้ความร้อน



รูปที่ 2.11 การเกิด 2AP จาก Strecker degradation ของ proline
2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (I) และ 1-pyrroline (II)

ที่มา : Schieberle (1990)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต่อมา Schieberle (1995) รายงานการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิถีการสังเคราะห์และสารตั้งต้นในกระบวนการเกิด 2AP ในข้าวโพดคั่ว โดยใส่ proline, glucose, 2–oxopropanal และ fructose ลงในข้าวโพดก่อนให้ความร้อนเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น สกัดกลิ่นในข้าวโพดคั่วที่เกิดขึ้นในระหว่างที่ข้าวโพดได้รับความร้อน ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry (HRGC/MS) พบว่าปริมาณ 2AP ที่ได้จาก proline ทำปฏิกิริยากับ 2–oxopropanal มีปริมาณมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณ 2AP ที่มาจาก proline กับ carbohydrate ชนิดต่างๆ

expt	carbohydrate	amount (μg) ACTPY [a]	ACPY [b]
1	glucose	150	<0.3
2	fructose	717	1.0
3	2-oxopropanal	170	41.0
4	fructose-	n.d.	15.0

Proline (4mmol) and the corresponding carbohydrate (2 mmol) or 2-oxopropanal (0.1 mmol) were boiled in phosphate buffer (400 ml; pH 7.0; 0.1 mol/L) and continuously steam distilled and extracted (SDE). The reaction mixture was intimately mixed with silica gel and then dry-heated (10 min, 150°C). n.d. : not detectable.

[a] 2-acetyltetrahydropyridine (ACTPY)

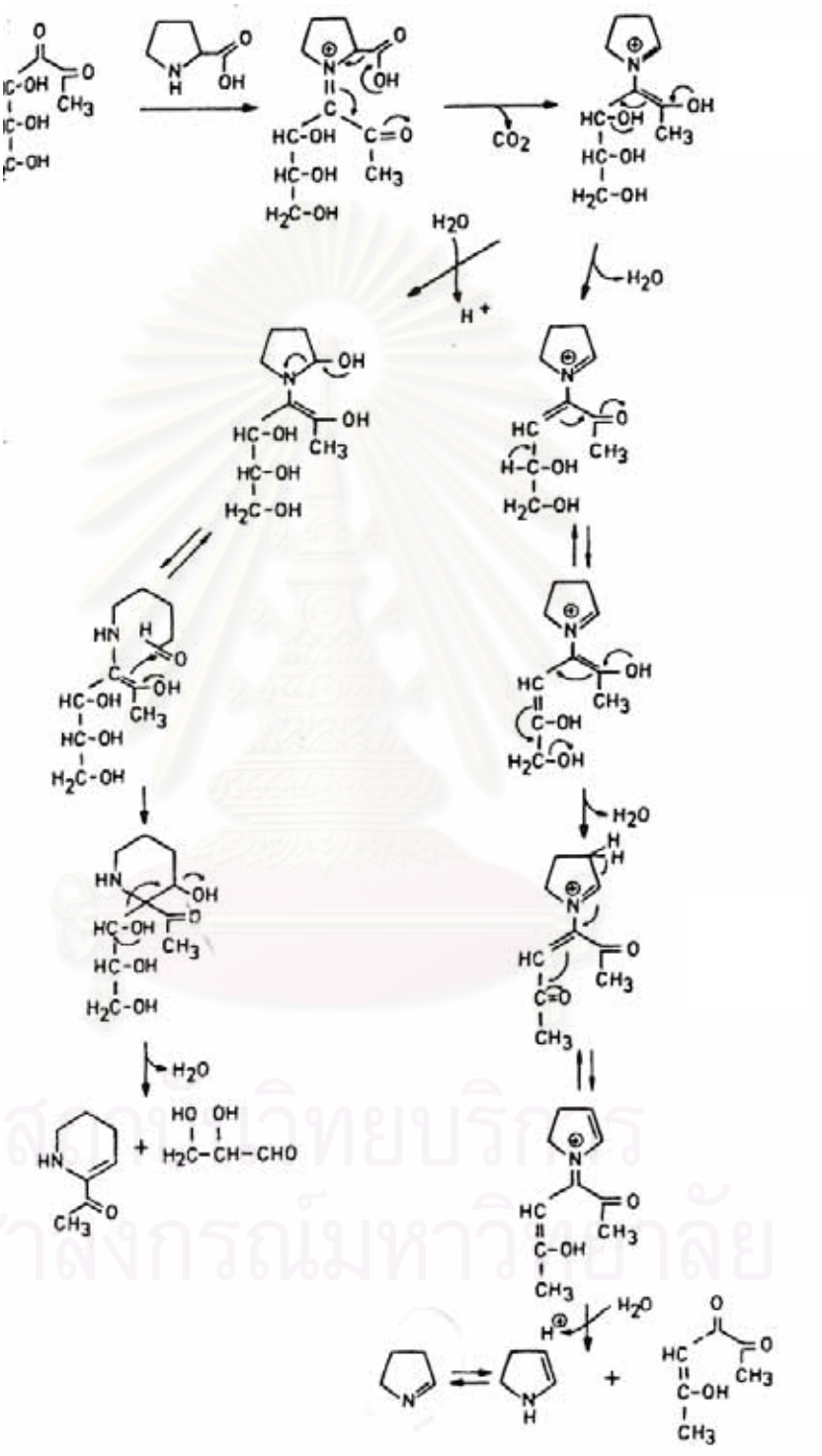
[b] 2-acetyl-1-pyroline (2AP)

ที่มา : Schieberle (1995)

จากการทดลอง จึงมีการเสนอวิถีของการเกิด 2AP ในข้าวโพดคั่วซึ่งคล้ายกับวิถีที่พบในขนมปัง แต่มีสารตั้งต้นเป็นเพียง proline ทำปฏิกิริยากับ 2-oxopropanal เกิด 1-pyrroline ดังรูปที่ 2.12

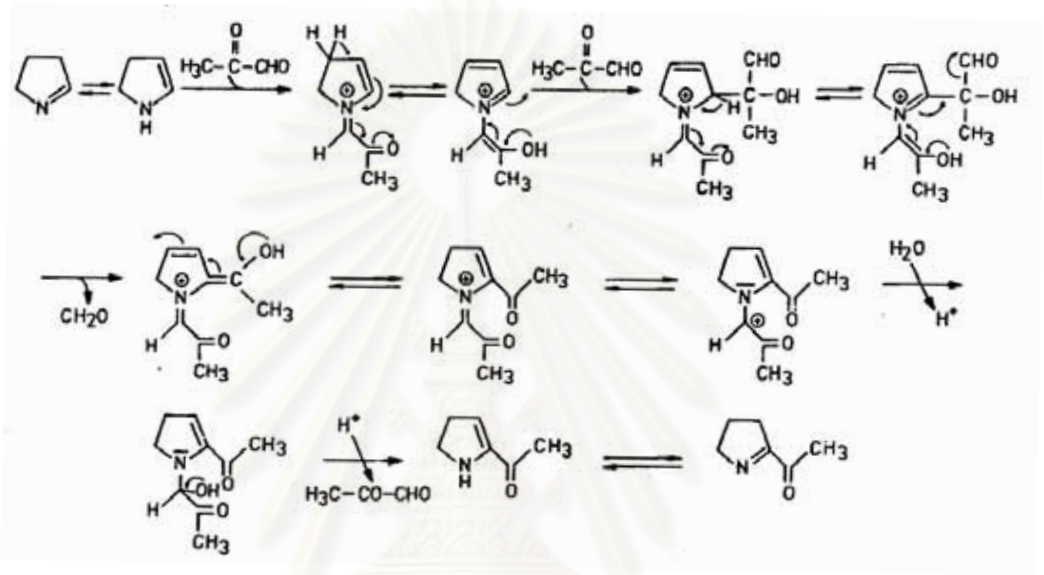
จากนั้น 1-pyrroline ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ 2-oxopropanal อีกครั้งได้เป็น 2AP ดังแสดงในรูปที่ 2.13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.12 การเกิด 1-pyrroline จาก proline และ 2-oxopropanal

ที่มา : Schieberle (1995)



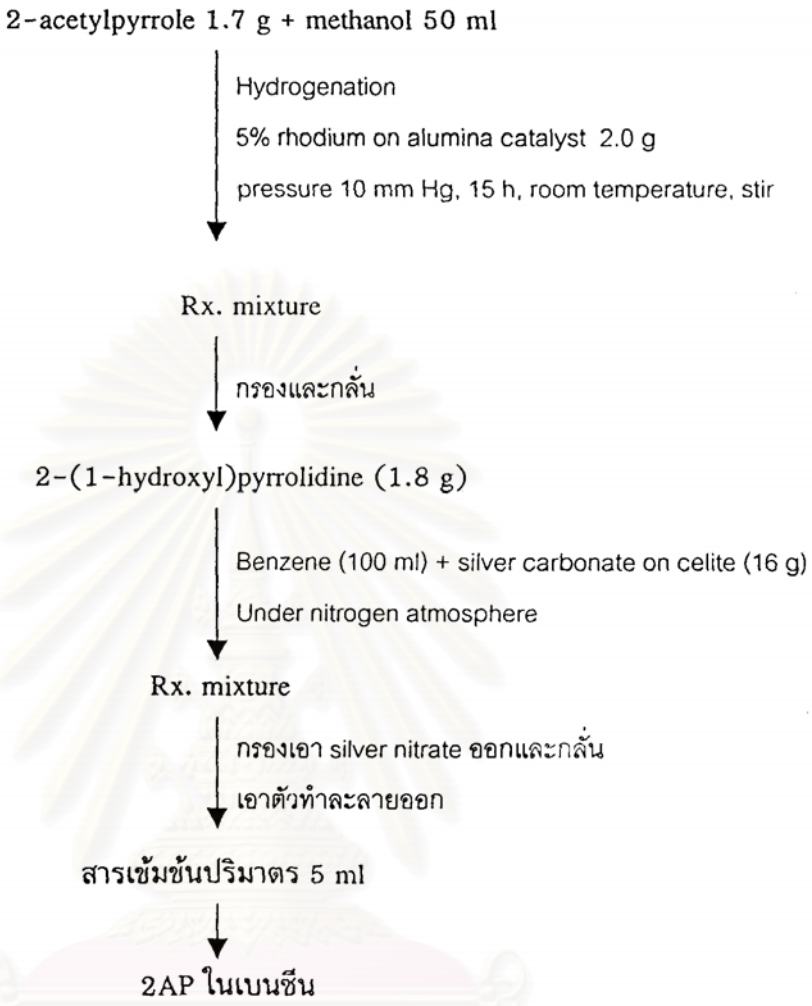
รูปที่ 2.13 การเกิด 2AP จาก 1-pyrroline และ 2-oxopropanal

ที่มา : Schieberle (1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากกลิ่นที่มีลักษณะเฉพาะของสารหอม 2AP สามารถช่วยเพิ่มกลิ่นของผลิตภัณฑ์อาหารให้เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคมากขึ้น ตลอดจนใช้เป็นดัชนีสำคัญในการบ่งบอกถึงคุณภาพความหอมของข้าว จึงมีนักวิจัยมากมายสนใจศึกษาเกี่ยวกับสารชนิดนี้จนสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการ

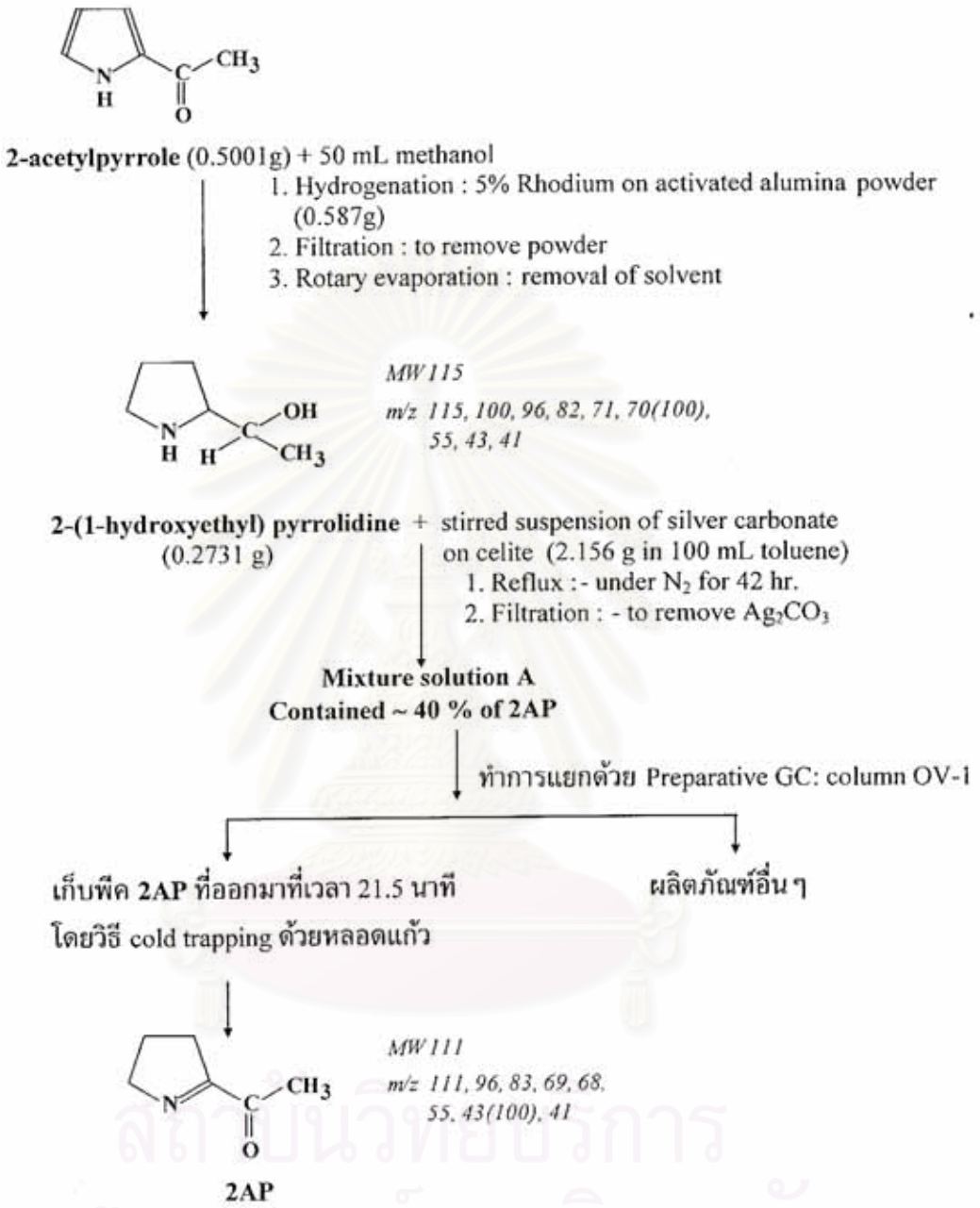
Buttery และคณะ (1983) สังเคราะห์ 2AP ดัดแปลงจากวิธีของ Buchi and Wuest (1971) โดยใช้สารละลาย 2-acetylpyrrole ใน methanol ได้ 2-(1-hydroxyethyl) pyrrolidine เป็นสารมัธยันตร์ และเมื่อ ruflux กับ silver carbonate จะได้ 2AP ดังแสดงในรูปที่ 2.14 เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานในการพิสูจน์กลิ่น โครงสร้างทางเคมี ตลอดจนการวิเคราะห์เชิงปริมาณ



รูปที่ 2.14 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารหอม 2AP เสนอโดย Buttery และคณะ (1983)

ที่มา : Buttery และคณะ (1983)

Mahatheeranont, Promdang และ Chiampiriyakul (1995) ได้สังเคราะห์สารกลิ่นหอม 2AP ขึ้นในห้องปฏิบัติการตามวิธีของ Buttery และคณะ (1983) โดยใช้ 2-acetylpyrrole เป็นสารตั้งต้น ดังแสดงในรูปที่ 2.15 เพื่อใช้ 2AP ที่สังเคราะห์ได้เป็นสารมาตรฐานในการพิสูจน์กลิ่นและโครงสร้างทางเคมี ตลอดจนการวิเคราะห์เชิงปริมาณ



รูปที่ 2.15 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารหอม 2AP เสนอโดย Mahatheeranont และคณะ (1995)

ที่มา : Mahatheeranont และคณะ (1995)

2.5.2 การสังเคราะห์สารหอม 2AP ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

Leo และคณะ (1995) ศึกษากระบวนการสังเคราะห์สารหอม 2AP ในเชื้อ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากกระบวนการหมักโกโก้ (cocoa) 5 สายพันธุ์ ทำการทดลองโดยใช้จุลินทรีย์ 5 สายพันธุ์ดังกล่าว เปรียบเทียบกับเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากสถาบัน The American Type Culture Collection (ATCC) โดยเลือกที่มีลักษณะทางกายภาพและทางเคมีใกล้เคียงกับเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากกระบวนการหมักโกโก้ เลี้ยงเชื้อในอาหาร PCA และตรวจวัดปริมาณ 2AP ที่เชื้อต่างๆ ผลิตขึ้น ซึ่งจากการทดลองพบว่า เชื้อที่แยกได้จากกระบวนการหมักโกโก้ทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถผลิต 2AP ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดย *B. cereus* สายพันธุ์ 35 สามารถผลิต 2AP มากที่สุด จึงเลือก *B. cereus* สายพันธุ์ 35 เพื่อใช้ในการศึกษาสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารหอมที่เกิดขึ้น โดยการศึกษาใช้สาร ^{13}C และ ^{15}N ซึ่งเป็น stable isotope ในการติดฉลากสารต่าง ๆ ที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า ^{15}N-glutamic acid, ^{15}N-L-proline และ U-$^{13}C_6$ glucose มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ 2AP ที่เกิดขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2.3

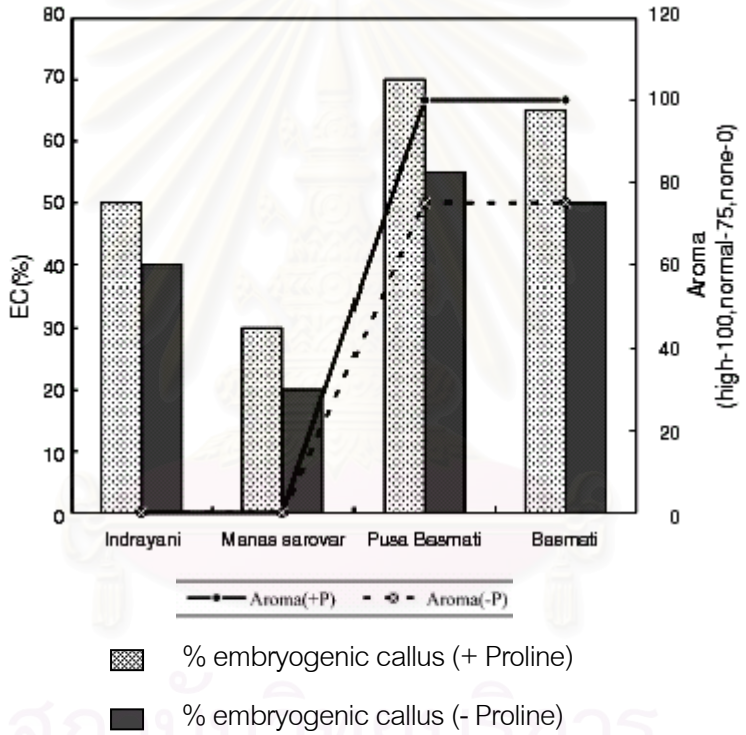
ตารางที่ 2.3 ค่ามวลเอกลักษณ์ของ 2AP ที่ได้จาก (A) ^{15}N-glutamic acid, (B) ^{15}N-L-proline, (C) U-$^{13}C_6$ glucose, (D) 2AP ที่ผลิตได้จาก *B. cereus* และ (E) 2AP ที่ได้จากการสังเคราะห์

	isotope distribution (%)				
m/z	A[a]	B[a]	C[b]	D[a]	E[a]
111	100.0	100.0	37.1	100.0	100.0
112	12.2	22.2	15.4	7.5	6.7
113	ND[c]	ND	100.0	0.1	0.4
114	ND	ND	9.5	ND	ND
115	ND	ND	7.8	ND	ND
116	ND	ND	4.9	ND	ND
117	ND	ND	5.0	ND	ND

[a] Normalized against m/z 111. [b] Normalized against m/z 113. [c] Not detected.

ที่มา : Leo และคณะ (1995)

Suprasarma และคณะ (1998) ทำการทดลองผลของการเพิ่มปริมาณ L-proline ในอาหารเลี้ยงแคลลัสของข้าว ต่อปริมาณสารหอม 2AP ที่ผลิตขึ้น โดยศึกษาในข้าวพันธุ์ต่างๆ 4 สายพันธุ์ แบ่งเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอม (aromatic rice) คือพันธุ์ Basmati และ Pusa Basmati ส่วนข้าวพันธุ์ที่ไม่มีกลิ่นหอม (non-aromatic rice) คือข้าวพันธุ์ Indrayani และ Manas Sarovar ซึ่งในการทดลองจะเลี้ยงแคลลัสของข้าว 4 พันธุ์ในอาหารที่ผสม L-proline เทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งไม่ใส่ L-proline ลงในแหล่งอาหาร พบว่า callus ของข้าวกลุ่มที่มีกลิ่นหอมซึ่งถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใส่ L-proline จะผลิตสาร 2AP เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบจากชุดควบคุม ในขณะที่ข้าวกลุ่มไม่มีกลิ่นหอมไม่พบสารหอม 2AP ทั้งที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 2 แบบ ดังแสดงรูปที่ 2.16

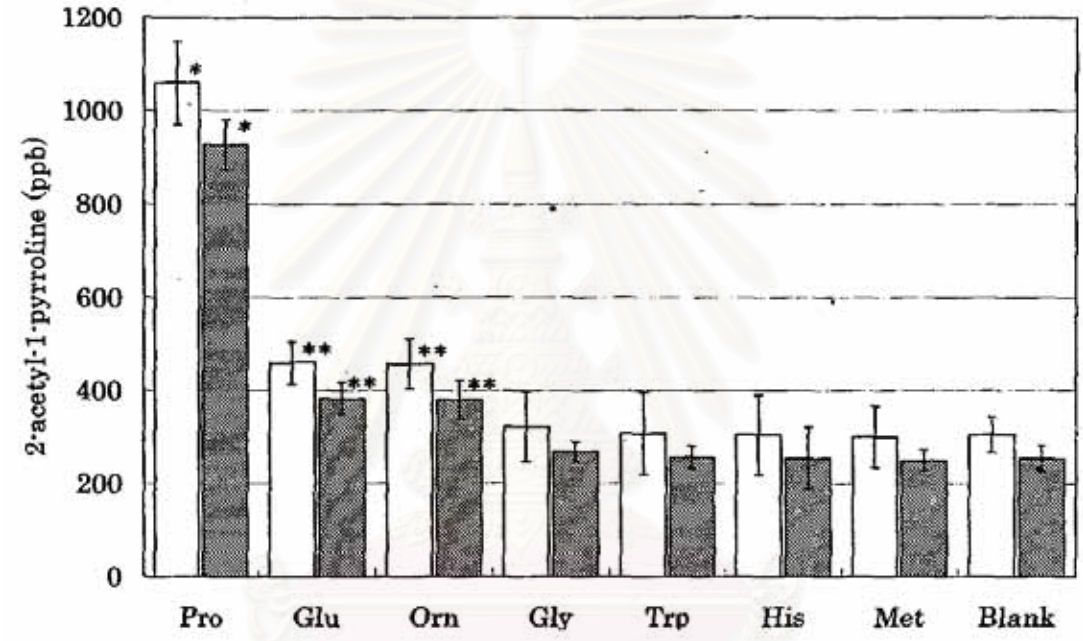


รูปที่ 2.16 ปริมาณสารหอม 2AP ที่ผลิตขึ้นจากแคลลัสของข้าวพันธุ์ต่างๆ 4 สายพันธุ์
(-----) คือ ไม่ให้ proline ในแหล่งอาหาร (——) คือให้ proline ในแหล่งอาหาร

ที่มา : Suprasarma และคณะ (1998)

Yoshihashi และคณะ (2002) ศึกษาเกี่ยวกับสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารหอมในข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งการทดลองในเบื้องต้นเน้นศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ต่อปริมาณ 2AP ที่ข้าวผลิตขึ้น โดยใช้ส่วนของปลายยอดต้นกล้าข้าวหอมที่มีอายุ 14 วัน ยาวประมาณ

5 cm และแคลลัสข้าวหอมที่เพาะเลี้ยงจาก mature embryos อายุประมาณ 4 สัปดาห์ แช่ลงในสารละลายซึ่งมีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ (Pro, Orn, Glu, Gly, Met, Trp และ His) เก็บในที่มืดเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นสกัดสารหอม 2AP ด้วยเทคนิค SDE และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า L-proline, ornithine และ glutamate ทำให้ชิ้นส่วนต้นกล้าและแคลลัสของข้าวสร้าง 2AP เพิ่มขึ้นได้ โดยข้าวที่ได้รับ L-proline พบว่ามีปริมาณ 2AP มากที่สุด โดยมากกว่าปริมาณ 2AP ในชุดควบคุมซึ่งไม่เติมกรดอะมิโนลงในแหล่งอาหาร ดังแสดงแสดงในรูปที่ 2.17

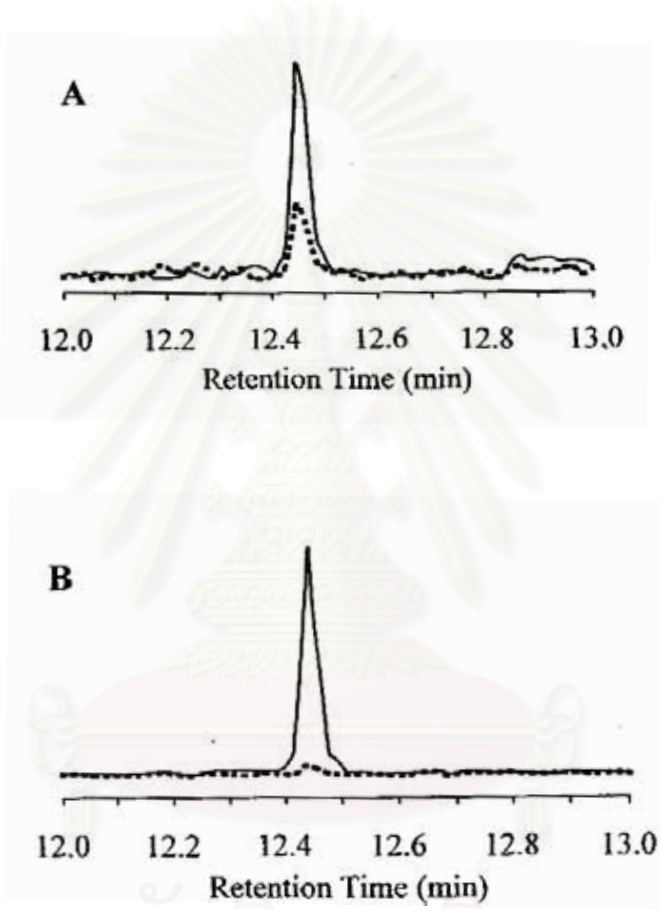


รูปที่ 2.17 ผลของกรดอะมิโนทั้ง 7 ชนิด ต่อปริมาณ 2AP ที่ได้จากชิ้นส่วนต้นกล้า (□) และแคลลัสของข้าว (■)

ที่มา : Yoshihashi และคณะ (2002)

นอกจากนี้เพื่อยืนยันแหล่งที่มาของ 2AP ที่ถูกผลิตขึ้นจาก L-proline จึงทำการทดลองโดยใช้สาร stable isotope ในการติดฉลาก L-proline (^{15}N-L-proline หรือ L-Proline-1-^{13}C) ที่ใส่ลงในแหล่งอาหารของชิ้นส่วนต้นกล้าและแคลลัสของข้าว แล้วติดตามผลด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า chromatogram ของสารสกัดที่ได้จากต้นกล้าและแคลลัสข้าวที่ให้ ^{15}N-L-proline ปรากฏ peak ของ

^{15}N-2AP ที่ retention time เดียวกับสารมาตรฐาน 2AP (รูปที่ 2.18A) ในขณะที่ไม่พบ 2AP ในตัวอย่างที่ให้ L-Proline-1-^{13}C (รูปที่ 2.18B) จึงสรุปได้ว่า L-proline คือสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารหอม 2AP ในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 โดยไนโตรเจนอะตอมที่ตำแหน่งในวงแหวน 1-pyrroline ของโมเลกุล 2AP มาจากไนโตรเจนอะตอมของ L-proline แต่คาร์บอนอะตอมในส่วนของหมู่ acetyl ในโมเลกุล 2AP ไม่ใช่คาร์บอนอะตอมในหมู่ carbonyl ของ L-proline และรายงานไว้ว่ายังไม่ทราบแน่ชัดว่ามาจากแหล่งใดดังแสดงในรูปที่ 2.19

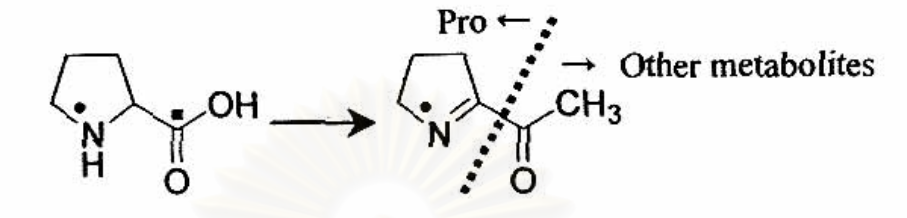


รูปที่ 2.18 Chromatogram ที่ได้จากการศึกษาหาสารตั้งต้นในกระบวนการชีวสังเคราะห์ 2AP ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้สารละลาย stable isotope

(A) ให้ ^{15}N-L-proline ในแหล่งอาหาร;(-----) คือ ^{15}N-2AP ,(——) คือ 2AP

(B) ให้ L-Proline-1-^{13}C ในแหล่งอาหาร; (-----) คือ 2AP -1-^{13}C, (——) คือ 2AP

ที่มา : Yoshihashi และคณะ (2002)



รูปที่ 2.19 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารหอม 2AP

ที่มา : Yoshihashi และคณะ (2002)

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาเกี่ยวกับสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในกระบวนการชีวสังเคราะห์สารหอม 2AP ในข้าวโดยการใช้สาร stable isotope ได้ผลดี ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกใช้สาร stable isotope เพื่อติดตามสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องในกระบวนการชีวสังเคราะห์สารหอม 2AP ในเตยหอม เพื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการสังเคราะห์ 2AP ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้ใบและแคลลัส (callus) ของพืชทั้งสองชนิดเป็นตัวอย่างในการทดลอง ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการหาวิถีของการสังเคราะห์ 2AP และเป็นแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพของข้าวหอมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่

3.1.1 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อใช้ชักนำให้เกิดแคลลัส (callus) ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอม ในสภาวะปลอดเชื้อ

ก. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะ (embryo) ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสภาวะปลอดเชื้อ

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากคัพภะ ในอาหารดัดแปลง 3 สูตร ได้แก่ MS medium (Murashige and Skoog, 1962), N_6 medium (Nitsch and Nitsch, 1969) และ CC medium (Potrykus, Harms และ Lörz, 1979) เพื่อนำสูตรอาหารที่เหมาะสมไปใช้ในการเลี้ยงแคลลัสเพื่อทำการทดลองในขั้นตอนการศึกษากระบวนการสังเคราะห์ 2AP ต่อไป

ข. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของเตยหอมในสภาวะปลอดเชื้อ

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการและสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของเตยหอม ในอาหาร MS ดัดแปลง และนำวิธีที่เหมาะสมไปใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนการศึกษากระบวนการสังเคราะห์ 2AP ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สาร 2AP จากพืชตัวอย่างโดยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลายและเทคนิค GC-MS

ก. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS และนำภาวะที่ได้ไปใช้วิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP จากวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายต่อไป

ข. ศึกษาการสกัดสาร 2AP จากใบและแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอม ด้วยตัวทำละลาย

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร 2AP ในใบและแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอม สกัดด้วยตัวทำละลาย

3.1.3 ศึกษาหาสารตั้งต้นที่มาของไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลของสาร 2AP โดยใช้สาร stable isotope

ก. ผลของระดับความเข้มข้นของ L-proline ต่อปริมาณ 2AP ที่เตยหอมผลิตได้

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลาย L-proline ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ 2AP ที่พืชผลิตขึ้น โดยเลือกใช้ใบของเตยหอมเป็นตัวอย่างศึกษาในเบื้องต้น แช่ใบของเตยหอมในสารละลาย L-proline ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และตรวจวิเคราะห์สารหอม 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS ตามที่ได้ศึกษามาในข้อ 3.1.2

ข. อิทธิพลของความแตกต่างของชิ้นส่วนและชนิดของพืชที่ตอบสนองต่อ L-proline ในการผลิต 2AP

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของความแตกต่างของชิ้นส่วน และชนิดของพืชที่ตอบสนองต่อ L-proline ในแคลลัสและใบจากเตยหอมและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แช่ตัวอย่างในสารละลาย L-proline (ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษาจากวิธีการทดลองข้อ 3.1.3 ก) และเทียบกับน้ำกลั่น สกัดและวิเคราะห์สาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS

ค. การติดตามสารตั้งต้นของ 2AP โดยใช้สารละลาย ^{15}N-L-proline

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสารตั้งต้นที่มาของไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลของสาร 2APโดยใช้สารละลาย stable isotope คือ ^{15}N-L-proline แช่แคลลัสและใบของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 สกัดสาร 2AP จากตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS ตามที่ได้ศึกษามาในข้อ 3.1.2

3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอม ในสภาวะปลอดเชื้อ

ก. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะ (embryo) ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสภาวะปลอดเชื้อ

ในการชักนำให้เกิดแคลลัสนั้น สามารถใช้ส่วนต่างๆ ของพืชได้หลายส่วน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่นำมาศึกษา การทดลองในครั้งนี้ใช้ข้าวเป็นตัวอย่างพืชทดลอง ซึ่งส่วนที่ง่ายที่สุดในการชักนำให้เกิดแคลลัสในข้าวคือส่วนที่เรียกว่าคัพภะ ซึ่งอยู่ภายในเมล็ดข้าวเปลือก ดังนั้นการทดลองจึงใช้เมล็ดข้าวเปลือกของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่สมบูรณ์ปราศจากตำหนิ แกะเปลือก ล้างและทำความสะอาดเมล็ดข้าวด้วยน้ำผงซักฟอกและล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้ง จากนั้นแช่เมล็ดข้าวในยาฆ่าเชื้อรา UMONIUM ^{38} ® ปริมาตร 250 µl ที่ละลายในน้ำ 50 ml เขย่านาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ย้ายเมล็ดข้าวแช่ลงใน 70% ethanol เขย่า เป็นเวลา 3-5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งจนสะอาด จึงย้ายเมล็ดไปแช่ในสารละลาย Chlorox ความเข้มข้น 15% (v/v) ที่เติม Tween 20 ® จำนวน 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 20 นาที จำนวน 2 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที 4 ครั้ง ครั้งละประมาณ 3 นาที นำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ 3 สูตร คือ อาหาร N_6, MS และCC (ตารางผนวก ข.1) ดัดแปลงโดยทั้ง 3 สูตรมีการเติม 2,4 D ความเข้มข้น 2 mg/l

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยปัจจัย (treatment) 3 ระดับ คือ อาหารเลี้ยงแคลลัส 3 สูตร ได้แก่ MS ,CC และ N_6 เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าว 8 เมล็ดต่อจานเพาะเลี้ยง ทำการเพาะเลี้ยง 4 จานเพาะเลี้ยงต่อหนึ่งปัจจัย (treatment) ปิดขอบจานเพาะเลี้ยงด้วยพาราฟิล์ม Whatman ® เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงที่ควบคุมสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง จำนวนเอมบริโอจีนิกแคลลัส และชั่งน้ำหนักของแคลลัส วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ของน้ำหนักแคลลัส และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ข. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของใบเตย ในสภาวะปลอดเชื้อ

(1) การชักนำให้เกิดยอดอ่อนของเตยในสภาพปลอดเชื้อ

การชักนำและเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัสในเตยหอม ดัดแปลงจากวิธีของ Thimmaraju และคณะ (2005) โดยเลือกต้นเตยที่มีลักษณะต้นที่สมบูรณ์ปราศจากโรค ตัดเฉพาะปลายยอดอ่อน ที่มีส่วนตาข้างและตายอด (lateral/terminal shoot buds) ขนาด 1-1.5 cm ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ลงในสารละลาย mercuric chloride ($HgCl_2$) เข้มข้น 1 g/l เป็นระยะเวลา 8 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3-4 ครั้ง จากนั้นตัดส่วนตาที่เป็นบริเวณของเนื้อเยื่อเจริญของยอดเตยด้วยมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อปลูกถ่ายลงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงโดยลดปริมาณ potassium nitrate เป็น 1.45 g/l และประกอบด้วยน้ำตาล sucrose 30 g/l, glutamic acid 100 mg/l, polyvinylpyrrolidine (PVP) 1g/l และ benzylaminopurine (BAP) 0.5 mg/l ปรับให้ pH มีค่า 5.8 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ในที่มืด เป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วจึงย้ายมาไว้ในที่มีแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน ประมาณ 3 สัปดาห์ สังเกตเห็นยอดอ่อนที่แตกเจริญออกจากตายอดและตาข้าง

(2) การชักนำให้เกิดแคลลัสจากยอดอ่อนของเตยหอม

การชักนำให้เกิดแคลลัสเตยหอม ใช้ยอดอ่อนของเตยหอมในสภาพปลอดเชื้อที่ได้จากการทดลองข้อที่ (1) โดยตัดยอดอ่อนด้วยมีดปลอดเชื้อในตู้ laminar-flow ย้ายวางลงในอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ประกอบด้วย BAP 1 mg/l, kinetin 4 mg/l และ 2,4 D 0.1 mg/l ปรับให้ pH มีค่า 5.8 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ในที่มีแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน ประมาณ 3-4 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลง

3.2.2 ศึกษาการวิเคราะห์สาร 2AP จากพืชตัวอย่างโดยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลายและเทคนิค GC-MS

ก. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS นั้นมีความเหมาะสมที่สุดในการใช้แยกและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารตัวอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นสารระเหยในสารสกัด ซึ่งสาร 2AP ที่ให้กลิ่นหอมในข้าวและเตยนั้นมีคุณสมบัติเป็นสารระเหย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาภาวะเหมาะสมของการแยกสารระเหยจากสารตัวอย่างด้วย GC-MS การทดลองใช้เครื่อง GC รุ่น TraceGC Ultra และ detector เป็นเครื่อง MS รุ่น Polaris Q ของบริษัท Thermo Finnigan ใช้คอลัมน์แบบ capillary ชนิด AT™-WAX (polyethylene glycol) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 mm ความยาว 60 m ความหนาของ liquid phase .25 µm และใช้ก๊าซฮีเลียมเป็น carrier gas ซึ่งโปรแกรมอุณหภูมิ (Temperature programming) และภาวะต่าง ๆ ของเครื่องดัดแปลงจากวิธีของนันทินี ศรีสุภัทรวานิช (2548) เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค

สกัดสารระเหยออกจากตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย ซึ่งแตกต่างจากวิธีของนันทินีที่ใช้เทคนิค SPME ในการสกัดสารตัวอย่าง จึงดัดแปลงโปรแกรมอุณหภูมิออกเป็น 4 ภาวะ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ภาวะของเครื่อง GC-MS สำหรับใช้แยกสาร 2AP และ 2,4,6-trimethylpyrridine (TMP)

Parameter	**ภาวะของนันทินี (2548)**	**ภาวะดัดแปลงแบบที่1**	**ภาวะดัดแปลงแบบที่2**	**ภาวะดัดแปลงแบบที่3**	**ภาวะดัดแปลงแบบที่4**
<u>เครื่อง GC</u>					
อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	200°C	200°C	200°C	200°C	200°C
โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์					
Ramp ที่ 1					
อุณหภูมิเริ่มต้น	45°C	45°C	45°C	45°C	45°C
อุณหภูมิสุดท้าย	80°C	80°C	80°C	120°C	120°C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	3°C/min	10°C/min	20°C/min	10°C/min	20°C/min
Hold time	1 min	-	-	6 mins	6 mins
Ramp ที่ 2					
อุณหภูมิเริ่มต้น	80°C	80°C	80°C	120°C	120°C
อุณหภูมิสุดท้าย	120°C	120°C	120°C	220°C	220°C
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	5°C/min	5°C/min	4°C/min	40°C/min	40°C/min
Hold time	-	-	-	-	-
Ramp ที่ 3					
อุณหภูมิเริ่มต้น	120°C	120	120	-	-
อุณหภูมิสุดท้าย	180°C	220	220	-	-
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	5°C/min	20°C/min	20°C/min	-	-
Hold time	-	-	-	-	-
อัตราการไหลของก๊าซฮีเลี่ยม	1ml/min	1ml/min	1ml/min	1ml/min	1ml/min
Mode ที่ใช้ในการฉีด	splitless	splitless	splitless	splitless	splitless
Liner	SPME liner	splitless liner	splitless liner	splitless liner	splitless liner

Parameter	ภาวะของนันทินี (2548)	ภาวะดัดแปลงแบบที่1	ภาวะดัดแปลงแบบที่2	ภาวะดัดแปลงแบบที่3	ภาวะดัดแปลงแบบที่4
เครื่อง MS					
อุณหภูมิส่วนเชื่อมต่อ	280°C	250°C	250°C	250°C	250°C
พลังงานเฉลี่ยของอิเล็กตรอน	70 eV	70 eV	70 eV	70 eV	70 eV
อุณหภูมิของแหล่งผลิตไอออน	230°C	230°C	230°C	230°C	230°C
Scan mode :					
Full scan	35-200 amu*	35-200 amu	35-200 amu	35-200 amu	35-200 amu

*amu = atomic mass units

การทดลองใช้สารมาตรฐานผสมของ TMP (ซึ่งเป็นสารมาตรฐานภายในที่ใช้ผสมในขั้นตอนการสกัดสาร 2AP จากตัวอย่างพืชด้วยตัวทำละลาย) ความเข้มข้น 1 ppm และ 2AP (2AP เป็นสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ไม่ทราบความเข้มข้นเริ่มต้นที่แน่นอน โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Tadashi Yoshihashi, Japan International Research Center for Agricultural Science ประเทศญี่ปุ่น) โดยใช้ dichloromethane (CH_2Cl_2) เป็นตัวทำละลาย (วิธีเตรียมสารละลายแสดงในภาคผนวก ค.1) ฉีดสารมาตรฐานผสมของ TMP และ 2AP ปริมาตร 1 µl ด้วย syringe ขนาด 10 µl ลงในเครื่อง GC-MS ที่มีภาวะของเครื่องทั้ง 4 แบบ เพื่อเลือกภาวะที่แยกสาร 2AP และ TMP ออกจากกันได้ดีที่สุด โดยใช้เวลาสั้นในการตรวจวิเคราะห์

สำหรับ liner ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ splitless liner (มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 5 mm) แทนการใช้ SPME liner (มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.8 mm) เนื่องจากในการทดลองนี้ไม่ได้ใช้ SPME ในการสกัดสารระเหยออกจากตัวอย่าง แต่ใช้วิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย จึงเลือกใช้ splitless liner เพื่อประสิทธิภาพที่ดีในการตรวจวิเคราะห์ของเครื่อง GC-MS

การเลือกช่วงมวลต่อประจุที่เหมาะสมนั้น การทดลองจะฉีดสารมาตรฐานผสมของ TMP และ 2AP เช่นเดียวกับการทดลองโปรแกรมอุณหภูมิ โดยใช้ภาวะของเครื่อง GC-MS ที่ดีที่สุดจากการทดลองข้างต้น และเปลี่ยนช่วงมวลต่อประจุจากเดิม คือ 35-200 amu ซึ่งเป็นช่วงกว้างให้แคบลงเป็น 35-130 amu เนื่องจากช่วงมวลต่อประจุ 35-130 amu เป็นช่วงมวลต่อประจุที่ครอบคลุมมวลของสาร

2AP และ TMP แล้ว และยังเป็นการเพิ่ม sensitivity ของเครื่องโดยลดการเก็บประจุของสารปนเปื้อนที่มาจากตัวทำละลาย column และ liner

ข. ศึกษาการสกัดสาร 2AP จากใบและแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอม ด้วยตัวทำละลาย

การสกัดสาร 2AP จากใบและแคลลัสของข้าวและเตยด้วยตัวทำละลาย ดัดแปลงจากวิธีการสกัดของ Mahatheeranont และคณะ (1995) ซึ่งมีขั้นตอนในการสกัดดังนี้

(1) <u>การสกัดจากใบ</u>

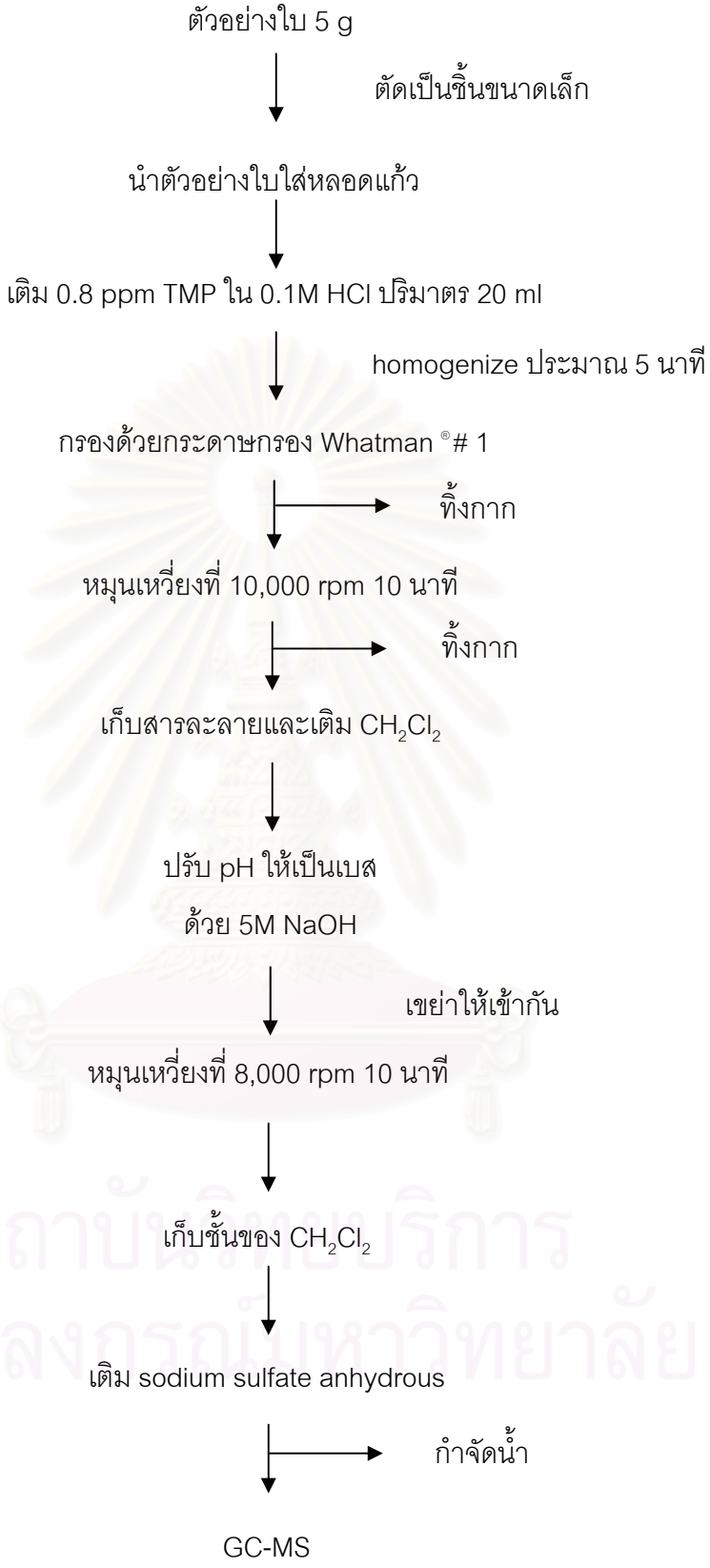
การสกัดสาร 2AP จากใบของข้าวและเตยหอมจะทำในลักษณะคล้ายกันโดยในเตยหอมเลือกใช้ใบสดที่มีสีเขียวอ่อนหรือสีเขียวอ่อนเกือบแก่ ขนาดยาวประมาณ 30–35 cm ตัดเส้นกลางใบออกเพื่อสะดวกในการย่อยให้มีขนาดเล็ก ทำความสะอาดใบเตยด้วยน้ำกลั่น สำหรับตัวอย่างใบข้าวใช้ใบของต้นกล้าข้าวอายุ 14 วัน มาทำความสะอาด จากนั้นชั่งน้ำหนักใบตัวอย่างละ 5 g และตัดใบเป็นชิ้นขนาดเล็กยาวประมาณ 0.5–1 cm เพื่อสะดวกในการ homogenize นำตัวอย่างใบใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm ยาว 15 cm เติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 20 ml ที่ประกอบด้วยสารมาตรฐานภายใน TMP ที่ระดับความเข้มข้น 0.8 ppm ปั่นตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer เป็นระยะเวลาประมาณ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C กรองกากใบทิ้งด้วยกระดาษกรอง Whatman ® # 1 จากนั้นนำสารละลายสีเขียวที่ได้มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดกากใบขนาดเล็กที่เหลืออยู่ในสารละลาย แยกตะกอนทิ้งไป ได้สารละลายสีเขียวใส

นำสารละลายสีเขียวใสที่ได้ปริมาตรประมาณ 15 ml ใส่หลอด centrifuge ขนาด 40 ml เติม CH_2Cl_2 1.5 ml จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้เป็นเบสด้วย NaOH ความเข้มข้น 5 M ปริมาตร 300 µl ปิดฝา เขย่าให้สารละลายเข้ากันจนทั่ว นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ได้สารละลายแยกชั้น แยกเก็บชั้นของ CH_2Cl_2 จากนั้นเติม sodium sulfate anhydrous เพื่อกำจัดน้ำที่เหลืออยู่ในส่วนของ CH_2Cl_2 นำของเหลวที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้ภาวะของเครื่อง GC-MS ที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษามาแล้วในข้อ 3.2.2 ก ขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 3.1

(2) <u>การสกัดจากแคลลัส</u>

การสกัดสาร 2AP จากตัวอย่างแคลลัสคล้ายกับขั้นตอนการสกัดจากตัวอย่างใบ เมื่อ homogenize ตัวอย่างเป็นเวลาประมาณ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอน โดยไม่ต้องผ่านการกรอง เนื่องจากกากแคลลัสมีอนุภาคขนาดเล็กสามารถเกาะตัวและกำจัดออกได้ง่าย กว่ากากของใบ จึงลดขั้นตอนการกรองเพื่อกำจัดตะกอน ขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 3.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัด 2AP จากตัวอย่างใบของข้าวและเตยด้วยตัวทำละลาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

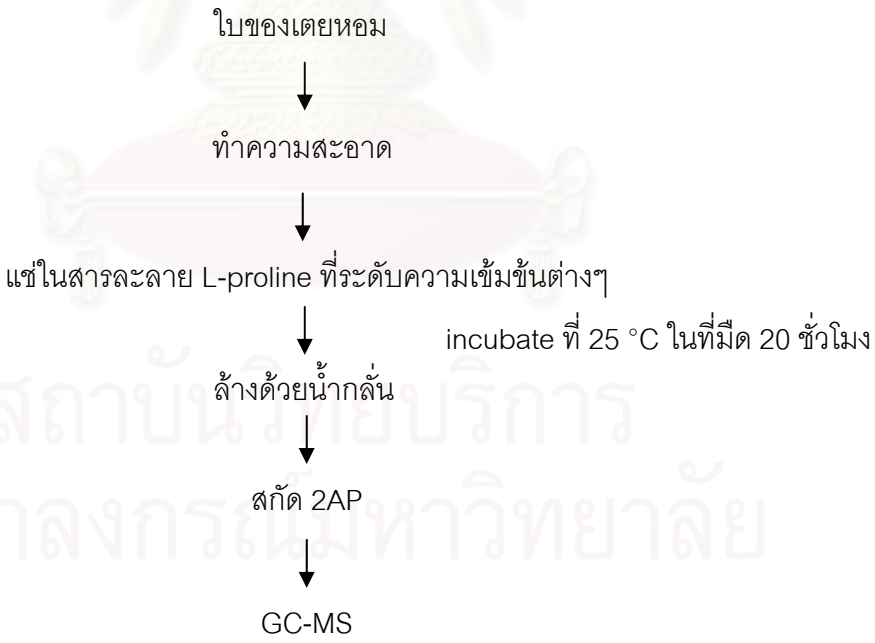
รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัด 2AP จากตัวอย่างแคลลัสของข้าวและเตยด้วยตัวทำละลาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 ศึกษาหาสารตั้งต้นที่มาของไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลของสาร 2AP ด้วยสาร stable isotope

ก. ผลของระดับความเข้มข้นของ L-proline ต่อปริมาณ 2AP ที่เตยหอมผลิตได้

สำหรับการทดลองนี้จะทดสอบระดับความเข้มข้นของสารละลาย L-proline ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ 2AP ที่พืชผลิตขึ้น โดยเลือกใช้ใบของเตยหอมเป็นตัวอย่างศึกษาในเบื้องต้น เนื่องจากสะดวกในการเตรียมตัวอย่างสกัดและการตรวจวิเคราะห์สารหอม 2AP การทดลองจะใช้ใบสดที่มีสีเขียวอ่อนหรือสีเขียวอ่อนเกือบแก่ นำมาทำความสะอาด และตัดให้มีขนาดยาวประมาณ 10 cm จากนั้นแช่ในสารละลาย L-proline ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100, 200, 400 และ 800 ppm และ incubate ที่อุณหภูมิ 25 °C ในที่มืด เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จึงนำมาสกัดและวิเคราะห์สาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้วิธีการสกัดและภาวะของเครื่อง GC-MS ที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษามาแล้วในข้อ 3.2.2 ก และ 3.2.2 ข ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ของปริมาณ 2AP ด้วย Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ขั้นตอนหลักดังแสดงในรูปที่ 3.3

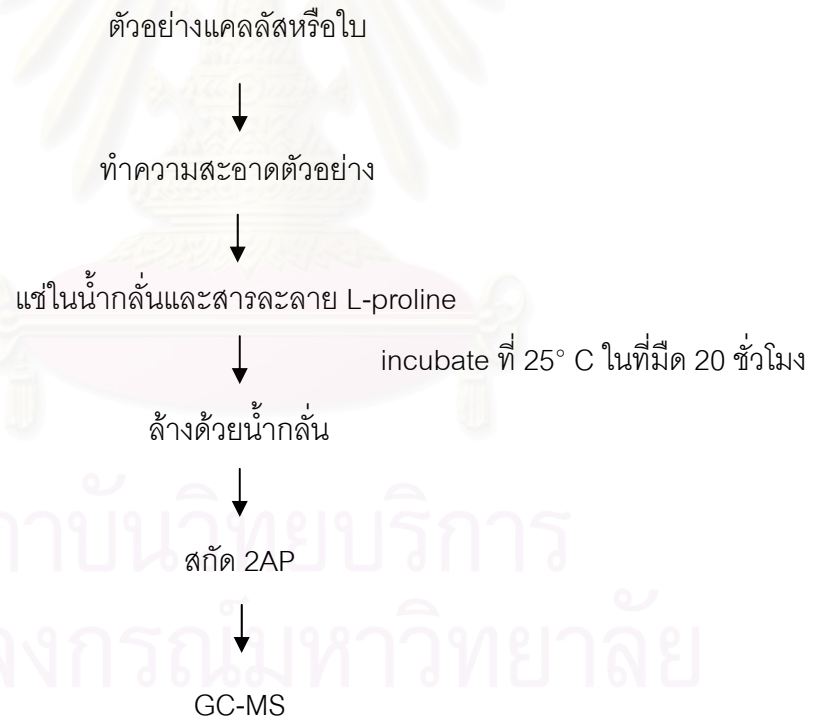


รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการทดสอบผลของระดับความเข้มข้นของ L-proline ต่อปริมาณ 2AP ที่ใบของเตยหอมผลิตขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. อิทธิพลของความแตกต่างของชิ้นส่วนและชนิดของพืชที่ตอบสนองต่อ L-proline ในการผลิต 2AP

การทดลองเกี่ยวกับอิทธิพลของความแตกต่างของชิ้นส่วนและชนิดของพืชที่ตอบสนองต่อ L-proline ในการผลิต 2AP จะเลือกใช้ชิ้นส่วนของพืช 2 ส่วน คือ แคลลัสและใบ จากพืช 2 ชนิด ที่สามารถผลิต 2AP ได้ตามธรรมชาติ คือ เตยหอมและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นตัวอย่างในการศึกษา ซึ่งจะนำตัวอย่างแช่ในสารละลาย L-proline (ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษาจากวิธีการทดลองข้อ 3.2.3 ก) และน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็น ชุดควบคุม (control) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ในที่มืด นำตัวอย่างมาสกัดและวิเคราะห์สาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้วิธีการสกัดและภาวะของเครื่อง GC-MS ที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษามาแล้วในข้อ 3.2.2 ก และ 3.2.2 ข ขั้นตอนหลักดังแสดงในรูปที่ 3.4

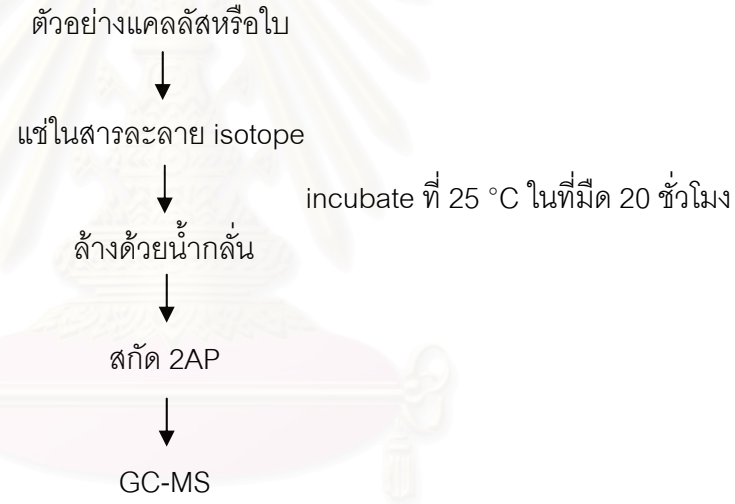


รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณ 2AP ใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในน้ำกลั่นและสารละลาย L-proline

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค. การติดตามสารตั้งต้นของ 2AP โดยใช้สารละลาย ^{15}N-L-proline

งานวิจัยนี้ใช้สาร stable isotope เพื่อติดตามหาสารตั้งต้นในการผลิตสาร 2AP ในเตยหอม ดัดแปลงจากวิธีของ Yoshihashi และคณะ (2002) โดยแช่แคลลัสและใบของเตยหอม และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสารละลาย stable isotope คือ ^{15}N-L-proline (^{15}N-L-proline ของสถาบัน Cambridge Isotope Laboratories ประเทศ USA ที่ระดับความเข้มข้นตามที่ได้ศึกษาในข้อ 3.2.3 ก วิธีการเตรียมสารละลายแสดงในภาคผนวก ค.3) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ incubate ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น สกัดสาร 2AP และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้วิธีการสกัดและภาวะของเครื่อง GC-MS ที่เหมาะสมตามที่ได้ศึกษามาแล้วในข้อ 3.2.2 ก และ 3.2.2 ข ขั้นตอนหลักดังแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการติดตาม 2AP ที่ติดฉลากด้วยสาร stable isotope จากแคลลัสและใบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

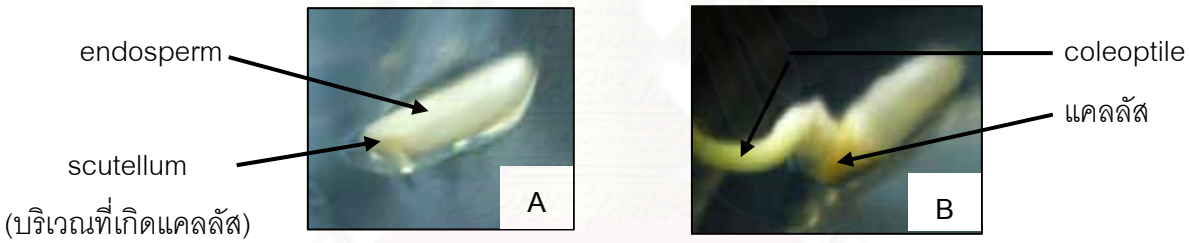
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 วิธีการที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอม ในสภาวะปลอดเชื้อ

ก. สูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสจากคัพภะของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในสภาวะปลอดเชื้อ

จากการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส 3 สูตร คือ อาหารสูตร MS, N_6 และ CC ดัดแปลงโดยการเติม 2,4 D ความเข้มข้น 2.0 mg/l พบว่าภายหลังจากการเพาะเลี้ยง 3 วัน แคลลัสเริ่มปรากฏขึ้นบริเวณส่วนของ scutellum ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อบางๆ ที่อยู่บริเวณรอยต่อระหว่างส่วนของ endosperm กับส่วนของคัพภะของเมล็ดข้าว และจะปรากฏเด่นชัดเมื่อมีอายุ 5 วัน ซึ่งแคลลัสที่เกิดขึ้นจะถูกชักนำให้เกิดขึ้นพร้อมกับปลอกหุ้มยอดอ่อน (coleoptile) (รูปที่4.1) โดยอาหารสูตร N_6 และ CC มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อาหารสูตร MS มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 87.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาขนาดและน้ำหนักของแคลลัสเมื่ออายุ 3 สัปดาห์ (รูปที่ 4.2) พบว่าอาหารสูตร N_6 สามารถชักนำให้แคลลัสมีขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด คือ 7.50 × 6.40 mm และ 0.132 g ตามลำดับ อาหารสูตร MS แคลลัสที่เกิดขึ้นมีขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 7.40 × 6.30 mm และ 0.106 g ตามลำดับ และในอาหารสูตร CC สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสขนาดเล็กที่สุดคือมีขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 5.50 × 6.40 mm และ 0.052 g ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารทั้งสามสูตรพบว่าอาหารสูตร N_6 ดัดแปลงมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด โดยมีน้ำหนักที่สูงกว่าการชักนำในอาหารสูตร MS และ CC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.1) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากความเข้มข้นของสารประกอบอนินทรีย์ และสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารทั้ง 3 สูตรมีปริมาณที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะมีแร่ธาตุองค์ประกอบต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชเหมือนกันก็ตาม โดยพบว่าอาหารสูตร N_6 มีองค์ประกอบจำพวกวิตามิน (vitamin) มากกว่าในอาหารในสูตร MS และ CC (ตารางภาคผนวก ข.1) อีกทั้งยังมีการเติม casein hydrolysate 300 mg/l ซึ่งเป็นกรดอะมิโนร่วมในอาหาร จึงอาจมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงสภาพเนื้อเยื่อได้ดีกว่า (เอกภพ นิ่มเล็ก, 2542)

สำหรับในอาหารสูตร CC มีการเติมน้ำมะพร้าวลงในสูตรอาหาร โดยที่ภายในน้ำมะพร้าวนั้นมีส่วนประกอบของไซโทไคนิน (cytokinin) และน้ำตาลอยู่ ถึงแม้ว่าไซโทไคนินจะเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ที่ช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ แต่น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบภายในน้ำมะพร้าวกลับเป็นตัวขัดขวางการเจริญเติบโตของเซลล์ เพราะเมื่อเติมน้ำมะพร้าวลงในอาหารจะมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรวมในอาหารมีระดับที่สูงเกินไป ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของพืชนั้น จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของพืช ในพืชปกติจะใช้น้ำตาล sucrose ที่ความเข้มข้น 2-4 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทดแทนคาร์บอนที่ได้จากการสังเคราะห์แสง ปริมาณน้ำตาลในอาหารที่มีมากเกินความต้องการ ย่อมส่งผลให้การเจริญของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงลดลง (อารีย์ วัญญูวัฒก์, 2541) สอดคล้องกับผลการทดลองของเอกภพ นิ่มเล็ก (2542) รายงานผลการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวหอมสี่พันธุ์ในอาหารเพาะเลี้ยง CC สูตรปกติใช้ sucrose 20 mg/l ร่วมกับ manitol 36.43 mg/l เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร CC ดัดแปลงที่ปราศจากน้ำตาลทั้งสองชนิด พบว่าสูตรอาหาร CC ที่ประกอบด้วยน้ำตาลสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวได้ในอัตราที่ต่ำมาก แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CC ดัดแปลงที่ปราศจากน้ำตาล จะสามารถชักนำการเกิดแคลลัสในอัตราที่สูงขึ้น



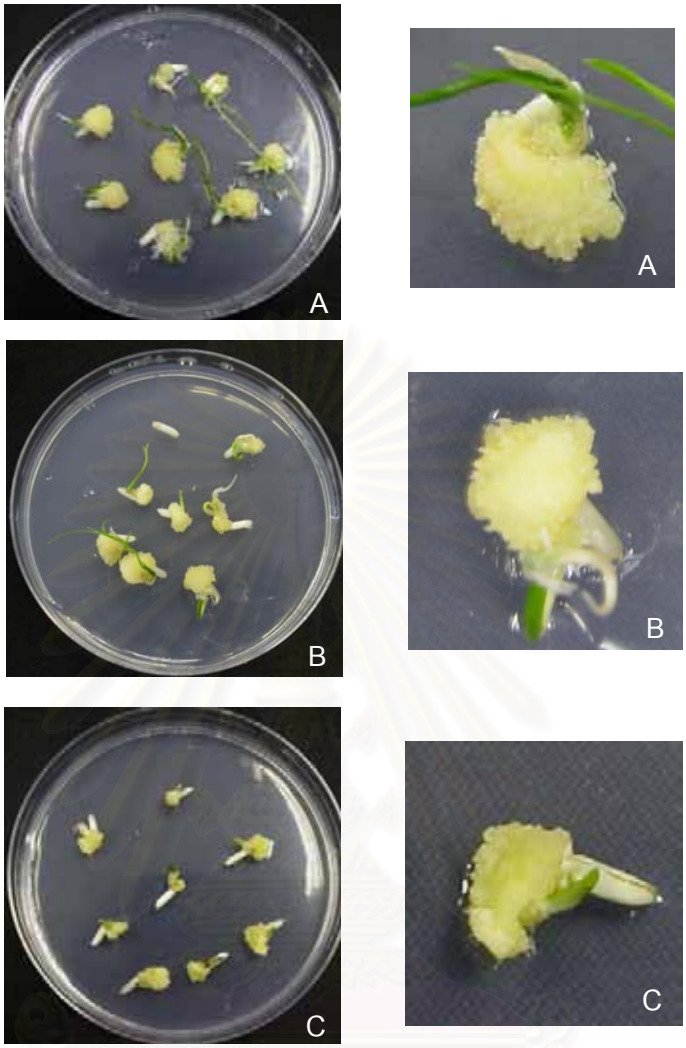
รูปที่ 4.1 การเกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส
(A) เมล็ดข้าวหลังการเพาะเลี้ยง 3 วัน (B) เมล็ดข้าวหลังการเพาะเลี้ยง 5 วัน

ตารางที่ 4.1 การชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงคัพภะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารสังเคราะห์ 3 สูตร

สูตรอาหาร / แคลลัสที่ได้	N_6	MS	CC
เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส	100	87.5	100
ขนาดเฉลี่ย* (mm)	6.40 × 7.50	6.30 × 7.40	5.50 × 6.40
น้ำหนักเฉลี่ย (g)	0.132 [a]	0.106 [b]	0.052 [c]

* ขนาด หมายถึง ความกว้าง × ความยาวของแคลลัส

[abc] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test



รูปที่ 4.2 การเกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 บนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัส ภายหลังการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

(A) เมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N_6

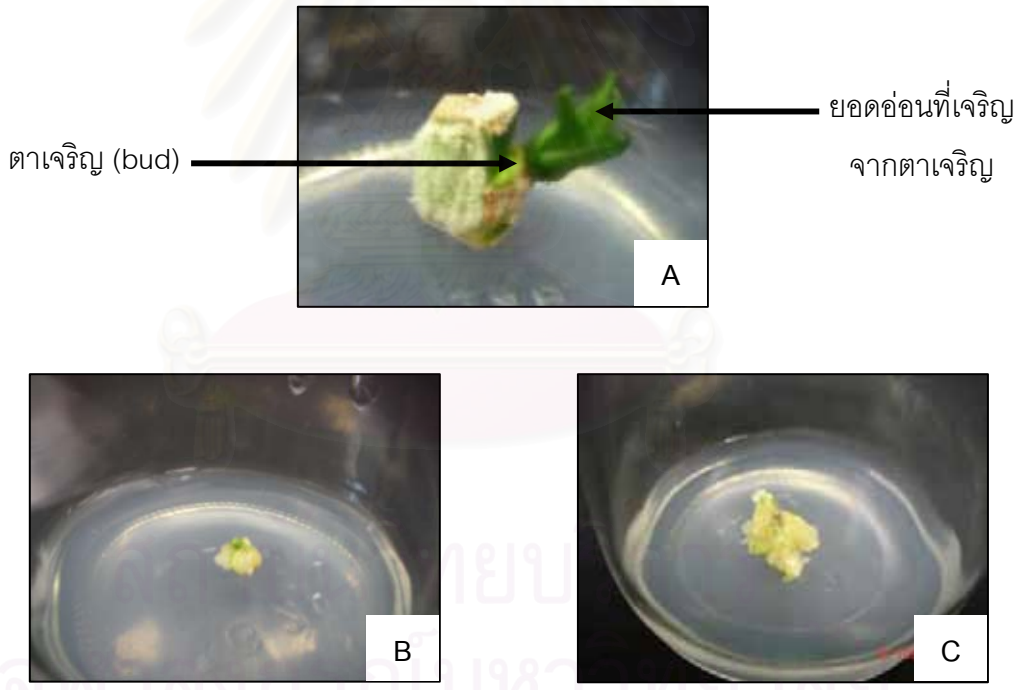
(B) เมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS

(C) เมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร CC

ดังนั้นในงานวิจัยในขั้นตอนต่อไปนี้จะเลือกใช้สูตรอาหาร N_6 เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อใช้สำหรับเป็นตัวอย่างในการทดลองขั้นต่อไป

ข. วิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดของเตยหอมในสภาวะปลอดเชื้อ

เมื่อนำปลายยอดอ่อนที่มีส่วนตาข้างและตายอดของต้นเตยหอม เพาะเลี้ยงลงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงและเก็บที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ในที่มืด เป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วจึงย้ายมาไว้ในที่มีแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน พบว่า ตา (bud) ที่เป็นส่วนของเนื้อเยื่อเจริญมีการเจริญเติบโตที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าภายในระยะเวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์ (รูปที่ 4.3A) และเมื่อตัดยอดอ่อนที่เจริญใหม่จากตาเจริญมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง ร่วมกับการเติม BAP ความเข้มข้น 1mg/l kinetin ความเข้มข้น 4 mg/l และ 2,4 D ความเข้มข้น 0.1 mg/l พบว่าจะปรากฏแคลลัสมีลักษณะสีเหลืองอ่อนเจริญขึ้นจากเนื้อเยื่อของปลายยอดบริเวณที่สัมผัสกับอาหาร และเมื่อเพาะเลี้ยงจนมีอายุ 3 สัปดาห์ แคลลัสจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-8 mm (รูปที่ 4.3B) และจะเจริญเติบโตจนมีเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 12–15 mm เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6-8 สัปดาห์ (รูปที่ 4.3C)



รูปที่ 4.3 การเพาะเลี้ยงยอดอ่อน และแคลลัสของเตยบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง
(A) ยอดอ่อนของเตยที่แตกจากเนื้อเยื่อเจริญบริเวณตาข้าง
(B) แคลลัสของเตยที่มีอายุ 3 สัปดาห์
(C) แคลลัสของเตยที่มีอายุ 6–8 สัปดาห์

เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญตายอดและตาข้างของเตยหอมในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วยสาร 2,4-D, BAP และ kinetin พบว่าเนื้อเยื่อบริเวณจากตายอดและตาข้างสามารถเจริญกลายเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อแคลลัส เนื่องจากสาร 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) ที่จัดอยู่ในกลุ่มของออกซิน (auxin) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเร่งการเกิดราก แต่เมื่อใช้ในปริมาณต่ำร่วมกับสารในกลุ่มของไซโทไคนิน คือ BAP และ kinetin ในสัดส่วนที่สมดุลจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ (รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ, 2540)

การชักนำให้เกิดแคลลัสในพืชแต่ละชนิด มีปัจจัยในการควบคุมที่แตกต่างกัน ทั้งนี้นอกจากชนิดและสายพันธุ์จะเป็นตัวกำหนดแล้ว ชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ สภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง ตลอดจนธาตุอาหารต่างๆ ล้วนมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสทั้งสิ้น (ประศาสตร์ เกื้อมณี, 2538) แต่ปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือ การให้สารควบคุมการเจริญเติบโตในสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส สอดคล้องกับผลการทดลองของ Thimmaraju และคณะ (2005) ซึ่งทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเตยหอม และชักนำให้เกิดแคลลัสจากตายอดและตาข้างบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่ประกอบด้วย BAP, kinetin และ 2,4-D ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ กันพบว่า BAP ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/l, kinetin 4 mg/l และ 2,4-D 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิด semi-differentiated callusy-shoot (SDC) นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับเบญจมาศ ศิลาย้อย และ Gamborg (2529) ซึ่งรายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสในกล้วยจากแผ่นใบเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS โดยเติม NAA และ BA ลงในอาหาร และยังมีรายงานการชักนำให้เกิดแคลลัสในกล้วยหอมทอง (*Musa* sp.) ‘Gros Michel’ จากตายอดของต้นที่เลี้ยงไว้ในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D และน้ำมะพร้าว ซึ่งแคลลัสที่ได้จะมีรูปร่างกลมแข็งสีเหลือง (Srangsam and Kanchanapoom, 2003)

สำหรับในพืชใบเลี้ยงคู่ มีรายงานที่เกี่ยวกับการชักนำให้เกิดแคลลัสโดยอาศัยการควบคุมปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตเช่นเดียวกัน เช่น Frisch and Camper (1987) ศึกษาวิธีการชักนำให้เกิดแคลลัสในชา *Camellia sinensis* จากลำต้นโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.1 mg/l ร่วมกับ kinetin 10 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ สอดคล้องกับรายงานการชักนำให้เกิดแคลลัสในพรุน *Prunus domestica* ‘Wegierka Zwykla’ ซึ่งต้องอาศัยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินร่วมกับไซโทไคนิน ทำการทดลองเพาะเลี้ยงจากยอดอ่อนของพรุนบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารในกลุ่มออกซินชนิดต่างๆ ร่วมกับ BA พบว่าอาหารที่ประกอบ 2,4-D 2 mg/l และ BA 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสของพรุนได้ ในขณะที่ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอาหารที่ประกอบด้วย 2,4-D เพียงอย่างเดียว (Fajerska, 2006)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแคลลัสตามขั้นตอนที่ได้ศึกษาเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสในเตยหอม เพื่อใช้แคลลัสในการทดลองขั้นต่อไป

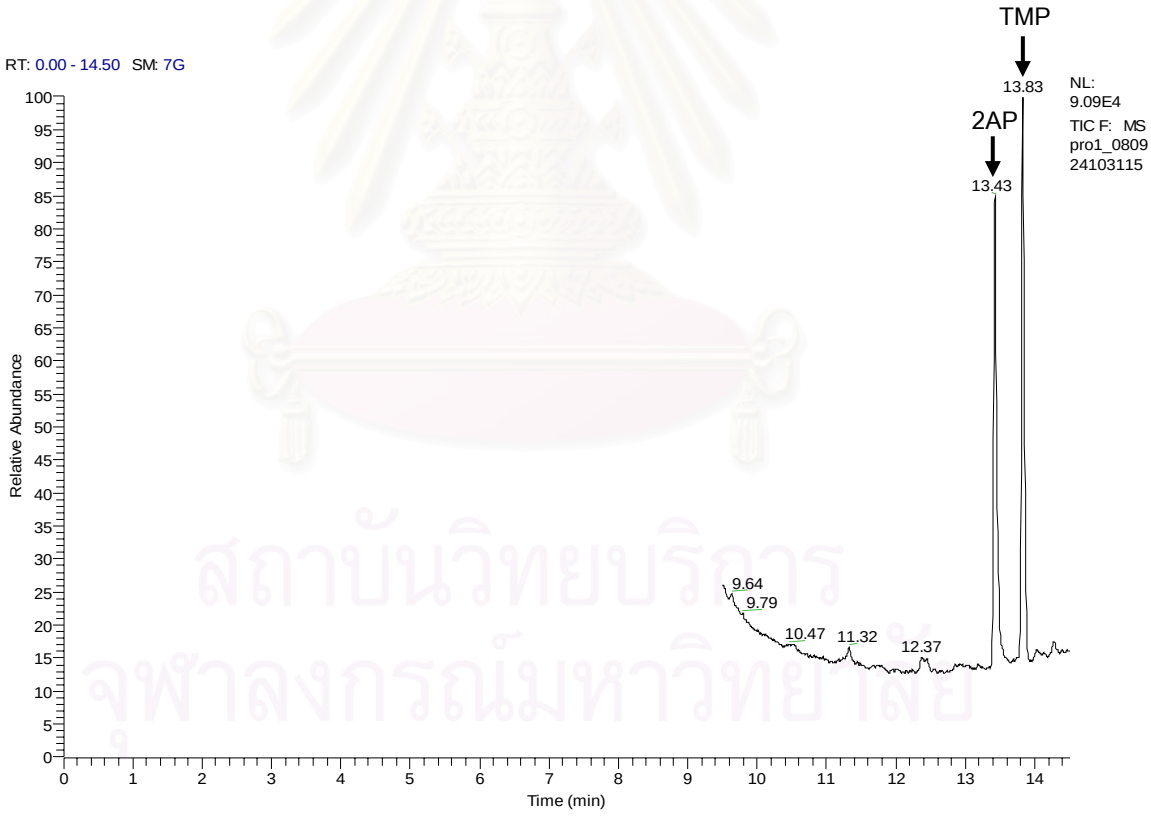
4.2 การวิเคราะห์สาร 2AP จากพืชตัวอย่างโดยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย และเทคนิค GC-MS

ก. การหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS

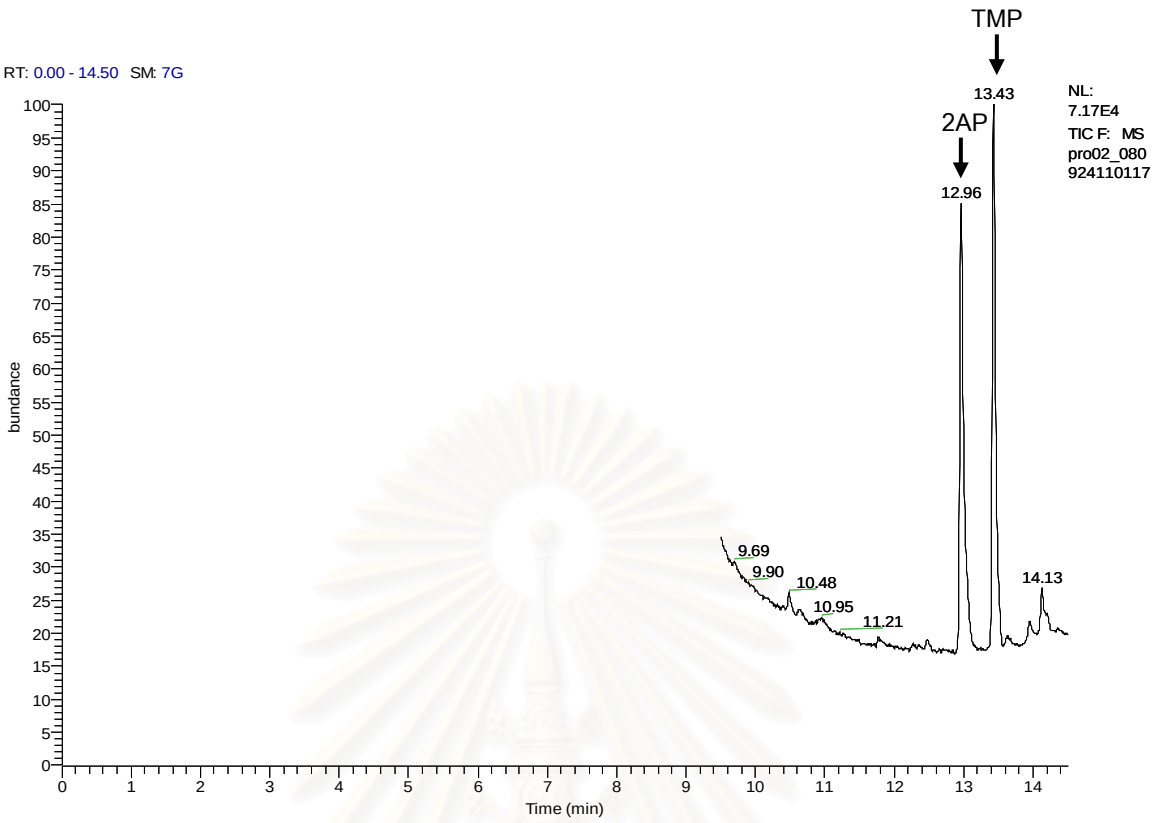
การทดลองโปรแกรมอุณหภูมิของเครื่อง GC-MS ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการวิเคราะห์สารระเหยจากข้าวด้วยเทคนิค SPME (นันทินี ศรีสุภัทรวานิช, 2548) ออกเป็น 4 ภาวะ (ตารางที่ 4.2) เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร 2AP และ TMP ออกจากกันด้วยเวลาการแยกที่น้อยที่สุด เพื่อลดเวลาที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่าง พบว่าการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 1 สาร 2AP และ TMP มีค่า retention time (t_R) เท่ากับ 13.43 และ 13.83 นาทีตามลำดับ (รูปที่ 4.4) ซึ่งแต่ละ peak สามารถแยกออกจากกันได้ แต่ไม่ดีเท่าที่ควร โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 16.50 นาที (ตารางที่ 4.2) ซึ่งเร็วกว่าโปรแกรมอุณหภูมิแบบเดิม (ภาวะของนันทินี) ซึ่งจะใช้เวลาทั้งหมด 25.67 นาที แต่พบว่าค่า t_R ของสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ที่ออกมาตัวแรกยังนานเกินไป ในโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 2 จึงเพิ่มอัตราการเพิ่มอุณหภูมิใน ramp ที่ 1 จาก 10 °C/min เป็น 20 °C/min เพื่อเร่งให้สารตัวอย่างออกมาเร็วขึ้น พบว่าสามารถแยก peak ของสารทั้ง 2 ได้ดีมากขึ้น มีค่า t_R ของ 2AP และ TMP เป็น 12.96 และ 13.43 นาที ตามลำดับ แต่ใช้เวลาทั้งหมดในการแยกนานมากขึ้นคือ 16.75 นาที (รูปที่ 4.5) ดังนั้นในโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 3 จึงปรับอัตราการเพิ่มอุณหภูมิใน ramp ที่ 1 จาก 20 °C/min เป็น 10 °C/min และ เพิ่มอัตราการเพิ่มอุณหภูมิใน ramp ที่ 2 จาก 4 °C/min เป็น 40 °C/min พบว่า peak ของสารระเหยทั้งสองแยกออกจากกันได้ดีขึ้น และใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดสั้นลงเหลือเพียง 16.00 นาที โดยมีค่า t_R ของ 2AP และ TMP เป็น 12.70 และ 13.32 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 4.6) ในโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 4 จึงทดลองเพิ่มอัตราการเพิ่มอุณหภูมิใน ramp ที่ 1 อีกครั้ง จาก 10 °C/min เป็น 20 °C/min เพื่อเร่งให้สารตัวอย่างออกมาเร็วขึ้น โดยคงค่าอุณหภูมิใน ramp ที่ 2 ให้เท่ากับอุณหภูมิในแบบที่ 3 พบว่า สามารถลดเวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมดลงเหลือเพียง 12.25 นาที แต่เมื่อพิจารณา peak ของสารทั้งสองพบว่า มีค่า t_R ใกล้กันมากเกินไป (รูปที่ 4.7) ดังนั้นจึงเลือกโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 3 มาใช้ในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากเป็นภาวะที่สามารถแยกสารระเหยที่ต้องการออกจากกันได้ดี โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 16 นาที

ตารางที่ 4.2 ตารางสรุป retention time ของสาร 2AP และ TMP รวมทั้งเวลาที่ใช้ในการแยกสารทั้งหมดที่ใช้ในโปรแกรมอุณหภูมิทั้ง 4 แบบ

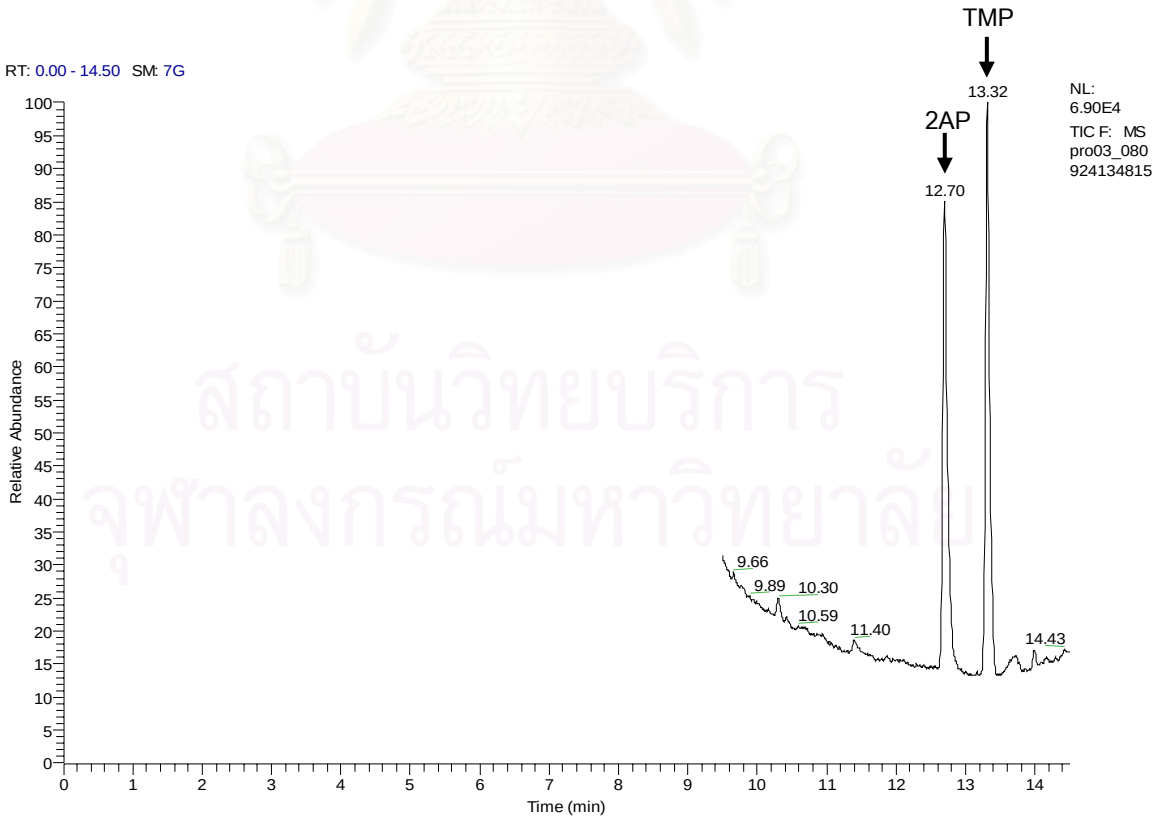
โปรแกรมอุณหภูมิ	t_R ของสาร 2AP (นาที)	t_R ของสาร TMP (นาที)	เวลาในการแยกสารทั้งหมด (นาที)
ภาวะของนันทินี	21.06	21.76	25.67
1	13.43	13.83	16.50
2	12.96	13.43	16.75
3	12.70	13.32	16.00
4	10.45	10.79	12.25



รูปที่ 4.4 Chromatogram ที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 1

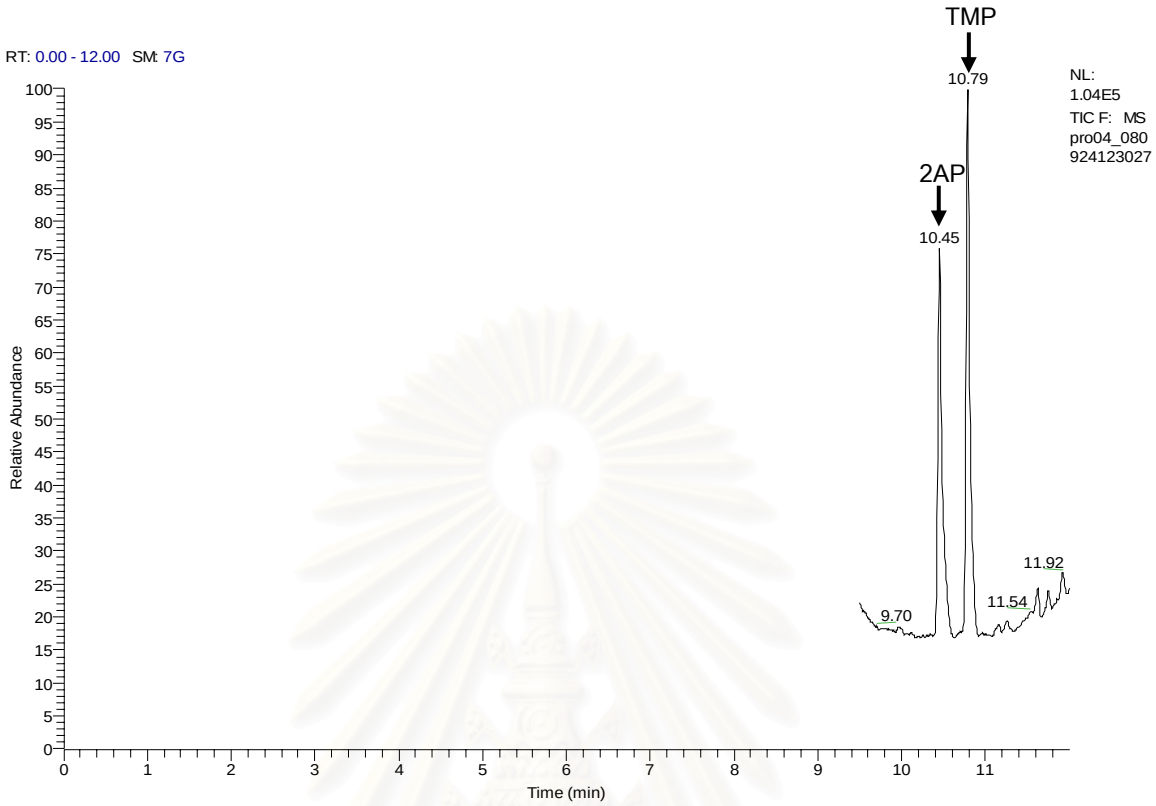


รูปที่ 4.5 Chromatogram ที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 2



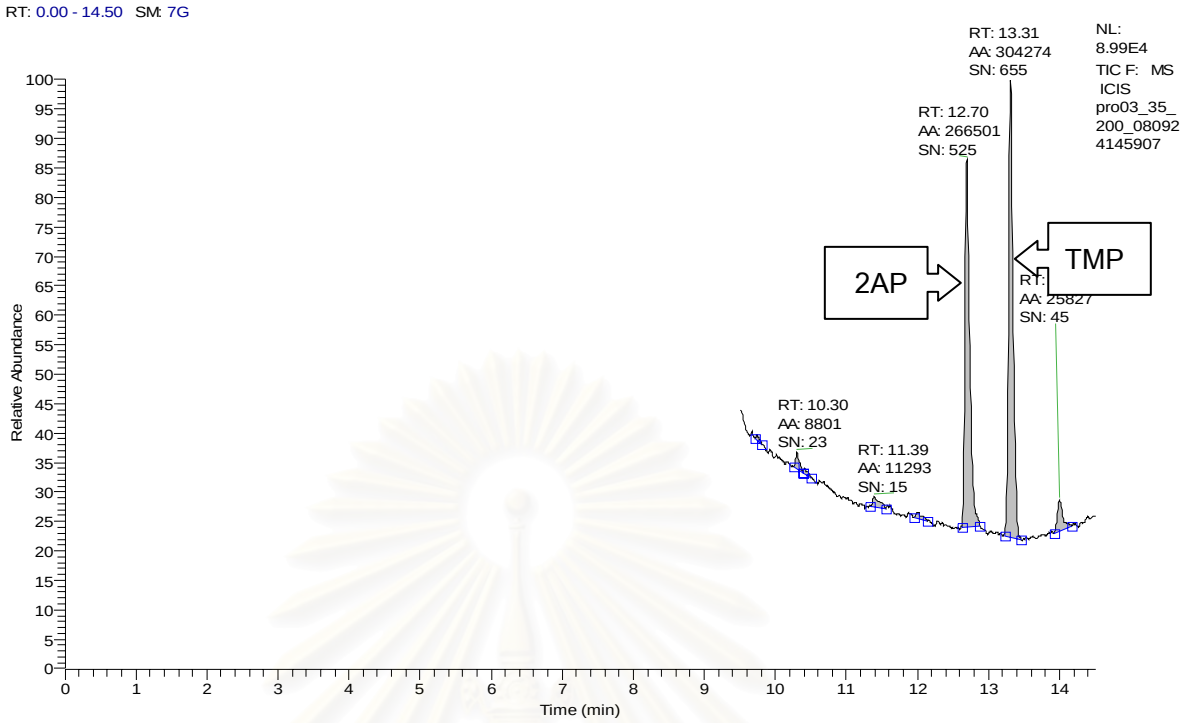
รูปที่ 4.6 Chromatogram ที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

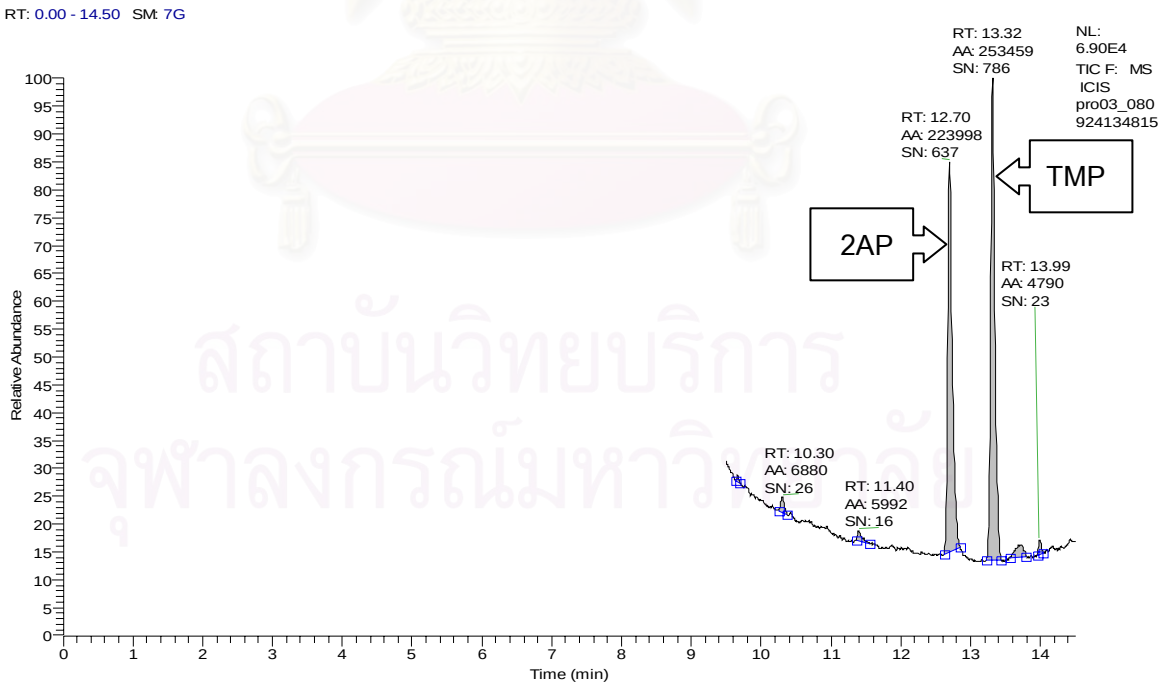


รูปที่ 4.7 Chromatogram ที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยโปรแกรมอุณหภูมิแบบที่ 4

สำหรับการเลือกช่วงมวลต่อประจุ เมื่อพิจารณา chromatogram ที่ได้จากการแยกสารระเหยด้วยเครื่อง GC-MS โดยเลือกช่วงมวลต่อประจุเท่ากับ 35-200 และ 35-130 amu พบว่า peak ของ 2AP ที่เลือกช่วงมวลต่อประจุเท่ากับ 35-200 amu (รูปที่ 4.8) มีค่า signal to noise (SN) เท่ากับ 525 ซึ่งต่ำกว่า SN ของสาร 2AP ที่ได้จากช่วงมวลต่อประจุ 35-130 amu (รูปที่ 4.9) ซึ่งมีค่า 637 เพราะเมื่อช่วงมวลต่อประจุแคบ การเก็บมวลสารรบกวนขณะวิเคราะห์ลดลง จึงทำให้ peak ของสาร 2AP แยกจากสารรบกวนได้ดีขึ้น ค่า SN จึงมีค่าสูงขึ้น ซึ่งค่า SN เป็นค่าที่บ่งบอก sensitivity ในการวิเคราะห์ โดยทีถ้าค่า SN สูงหมายถึงมี sensitivity ในการวิเคราะห์สูงด้วย ดังนั้นจึงเลือกช่วงมวลต่อประจุ 35-130 amu ที่มี sensitivity สูงเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สาร 2AP ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.8 Chromatogramที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยเครื่องGC-MS ที่เลือกช่วงมวลต่อประจุเท่ากับ 35-200 amu

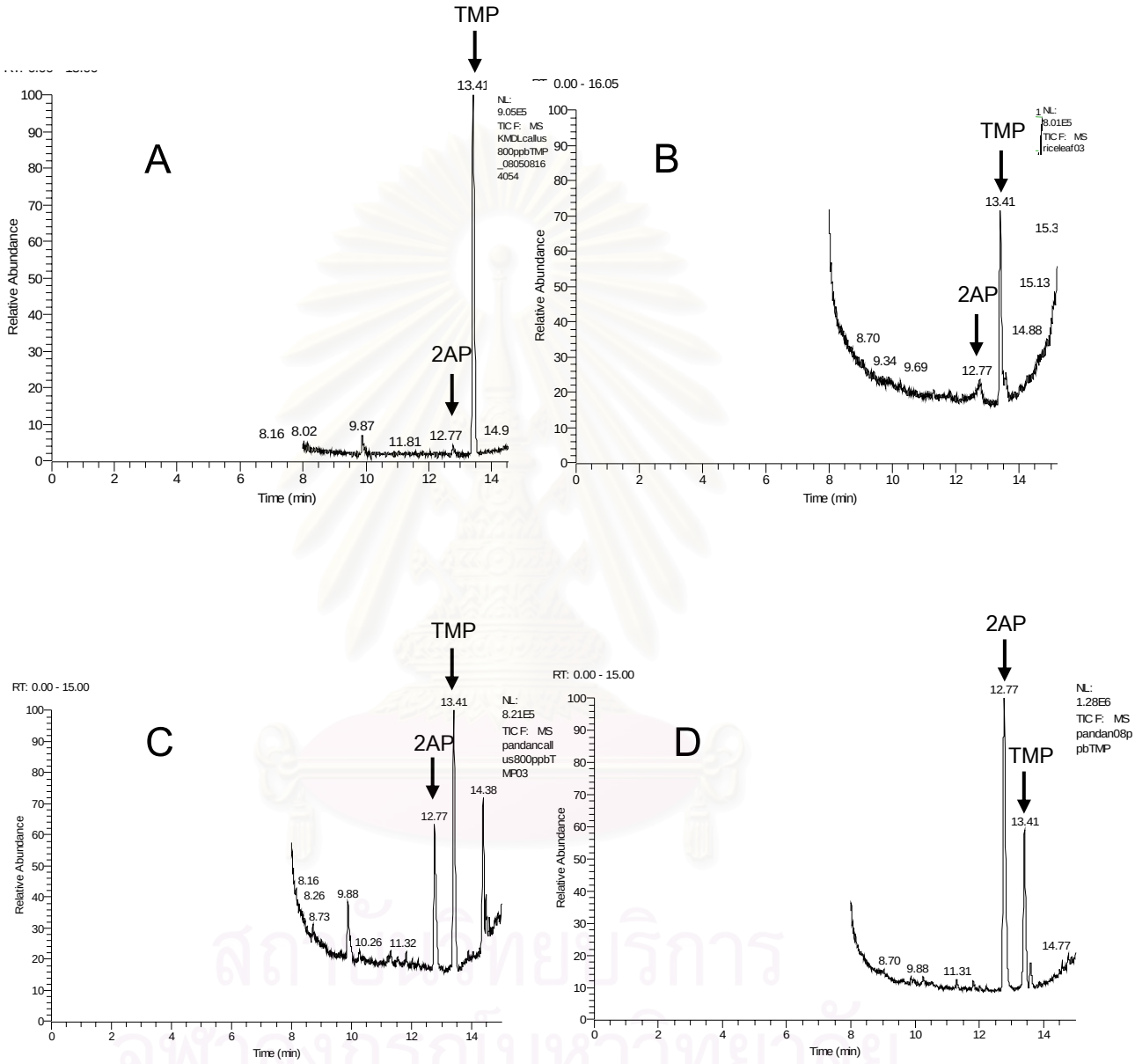


รูปที่ 4.9 Chromatogramที่ได้จากการแยกสาร 2AP และ TMP ด้วยเครื่อง GC-MS ที่เลือกช่วงมวลต่อประจุเท่ากับ 35-130 amu

ข. การสกัดสาร 2AP จากใบและแคลลัสของข้าวและเตยด้วยตัวทำละลาย

จากการทดลองสกัดสารหอม 2AP จากใบและแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอมด้วยตัวทำละลาย และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า chromatogram ที่ได้จากการแยกวิเคราะห์ของตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด (รูปที่ 4.10) มี peak ของสารหอม 2AP และสารมาตรฐาน TMP เป็นองค์ประกอบ และสามารถยืนยันว่า peak ที่ได้เป็น peak ของสาร 2AP และ TMP โดยดูจาก mass spectrum มีซึ่งสกัดได้จากตัวอย่างพืชเทียบได้ดีกับ mass spectrum ของสารมาตรฐาน 2AP และ TMP สังเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ภายใต้ภาวะเดียวกัน โดย mass spectrum ของสารมาตรฐาน 2AP ให้มวลเอกลักษณ์คือ 68, 83(100) และ 111 amu (รูปที่ 4.11) ซึ่งวิธีการสกัดและตรวจวิเคราะห์สารหอม 2AP ที่ถูกพัฒนาขึ้นใหม่นี้ให้ค่า % recovery เท่ากับ 88.783 (การคำนวณ % recovery แสดงในภาคผนวก ค.4) เมื่อพิจารณา retention time ของสาร 2AP และ TMP มีค่าเท่ากันในทุกตัวอย่าง เนื่องจากค่า retention time เป็นค่าเฉพาะของสารแต่ละตัว ซึ่งคือเวลาที่สารหนึ่งๆ ใช้ในการเคลื่อนที่บนวัฏภาคคงที่ชนิดนั้นๆ (แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2534) เมื่อพิจารณาปริมาณของสารหอม 2AP (การคำนวณปริมาณ 2AP แสดงในภาคผนวก ค.5) ในใบและแคลลัสของทั้งข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอม โดยเทียบจากน้ำหนักสดของตัวอย่าง 1 kg ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ตารางที่ 4.3) พบว่าใบเตยหอมมีปริมาณสารหอม 2AP มากที่สุดคือ 47.085 mg/kg ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติจากแคลลัสเตยหอม ใบและแคลลัสของข้าว ซึ่งมีค่า 12.351, 1.724 และ 0.473 mg/kg ตามลำดับ โดยปริมาณ 2AP ในใบจะมีค่ามากกว่าในแคลลัสประมาณ 4 เท่า ทั้งนี้เพราะในพืชแต่ละชนิดหรือในแต่ละส่วนของพืชชนิดเดียวกันจะมีความสามารถในการผลิตสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ในพืชได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wongpornchai และคณะ (2003) ซึ่งรายงานปริมาณสารหอม 2AP ที่พบในดอกและใบของชำมะนาดเปรียบเทียบกับที่พบในใบเตยหอม และเมล็ดของข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยพบว่าสารหอม 2AP มีปริมาณแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด ซึ่งในเมล็ดข้าว ดอกและใบของชำมะนาดมีปริมาณ 2AP เท่ากับ 3.0, 3.36 และ 0.53 mg/kg ตามลำดับ ส่วนใบเตยหอมมีปริมาณสารหอม 2AP มากที่สุดคือ 10.26 mg/kg แต่มีค่าแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารหอม 2AP ที่วิเคราะห์ได้ในการทดลองนี้ คือ 47.085 mg/kg (ตารางที่ 4.3) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธีการสกัดสารหอม 2AP ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองถูกดัดแปลงจากวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายของ Mahatheeranont และคณะ (1995) โดยลดขั้นตอนการระเหยตัวทำละลายเพื่อทำให้เข้มข้น จึงอาจลดการสูญเสียสารหอม 2AP จากความร้อนระหว่างการระเหยในขั้นตอนการสกัดในการทดลองที่ 3.2.2 ข เนื่องจากสาร 2AP มีคุณสมบัติระเหยง่ายเพราะจุดเดือดต่ำ ดังนั้นปริมาณสารหอม 2AP ในใบเตยหอมที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองจึงมีค่ามากกว่ารายงาน

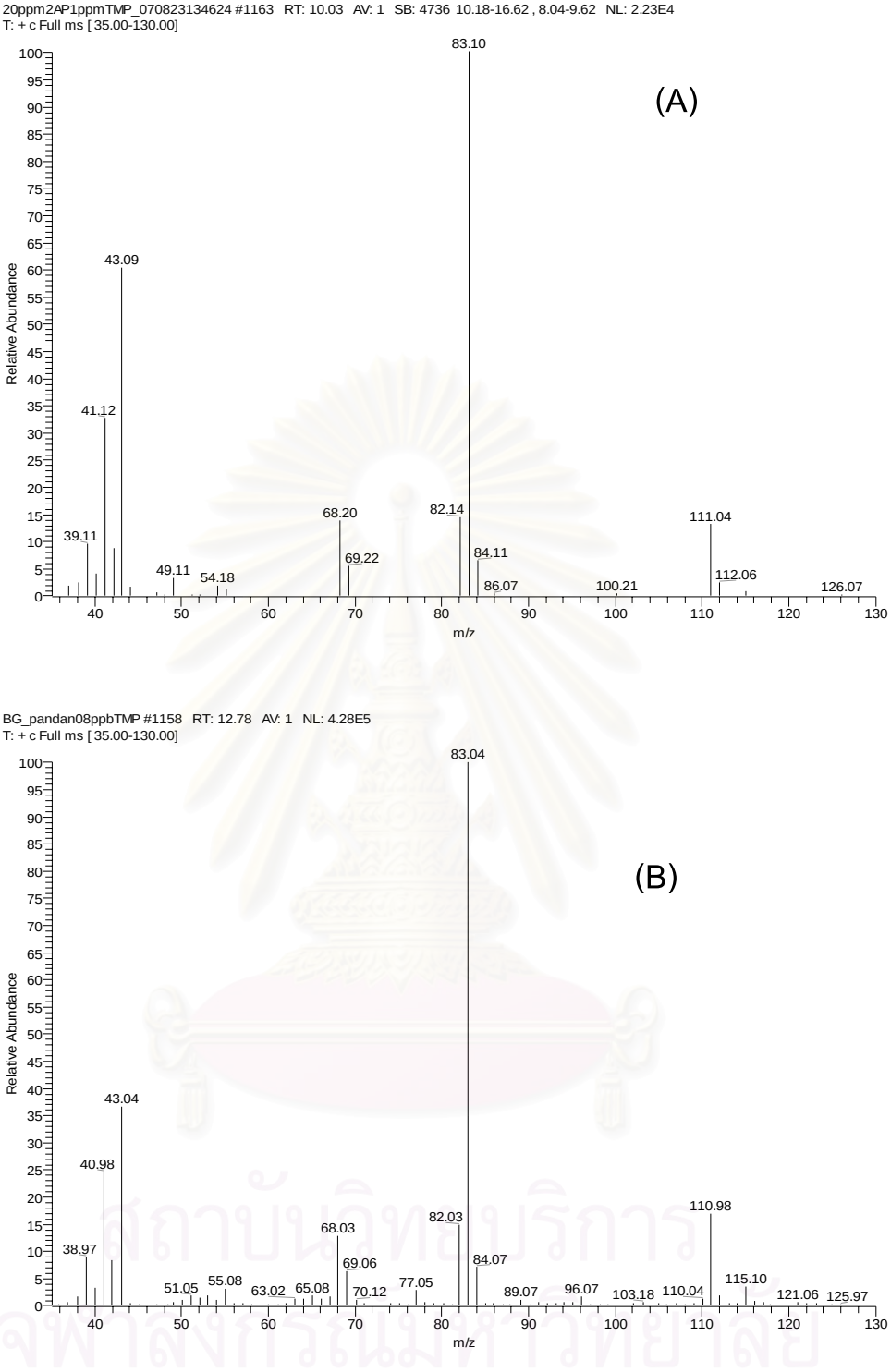
ของ Wongpornchai และคณะ (2003) แสดงว่าขั้นตอนการสกัดที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณสารหอม 2AP ที่สกัดได้จากตัวอย่าง



รูปที่ 4.10 Chromatogram ที่ได้จากการแยกวิเคราะห์จากสารสกัดตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด

(A) แคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 (C) แคลลัสของเตยหอม

(B) ใบของข้าวขาวดอกมะลิ 105 (D) ใบของเตยหอม



รูปที่ 4.11 Spectrum ของสารหอม 2AP

(A) 2AP จากการสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

(B) 2AP จากสารสกัดจากตัวอย่างพืช

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารหอม 2AP ที่ได้จากการสกัดใบและแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอม โดยเทียบต่อน้ำหนักสด 1 kg

ตัวอย่าง	2AP (mg / น้ำหนักสด 1 kg)*
ใบของเตยหอม	47.085 ± 3.569 [a]
แคลลัสของเตยหอม	12.351 ± 3.259 [b]
ใบของข้าวขาวดอกมะลิ 105	1.724 ± 1.856 [c]
แคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105	0.473 ± 0.179 [c]

* ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a b c] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p \leq 0.01$) โดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

นอกจากนี้ยังพบว่ากรรมวิธีการสกัดที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อปริมาณสารหอม 2AP ที่สกัดได้จากตัวอย่าง สอดคล้องกับรายงานของ Thimmaraju และคณะ (2005) ซึ่งรายงานปริมาณ 2AP ที่พบในใบ และ semi-differentiated callus (SDC) ของเตยหอม โดยใช้เทคนิคการสกัด 2 วิธีคือ steam-distillation extraction (SDE) และ direct sovent extraction (DSE) และตรวจวิเคราะห์ 2AP ด้วย GC-MS พบว่าเมื่อสกัดด้วยวิธี DSE ใบและ SDC มีปริมาณ 2AP ที่แตกต่างกัน โดย SDC มีปริมาณ 2AP เท่ากับ 19.7 ppm ซึ่งมากกว่าที่พบในใบคือ 14.1 ppm แต่เมื่อพิจารณาวิธีสกัดแบบ SDE พบว่าใบมีปริมาณ 2AP มากกว่าที่พบใน SDC ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8 และ 6 ppm ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การหาสารตั้งต้นที่มาของไนโตรเจนในโมเลกุลของสาร 2AP โดยการใช้สาร stable isotope

ก. ผลของระดับความเข้มข้น ของ L-proline ต่อปริมาณ 2AP ที่เตยหอมผลิตได้

เมื่อพิจารณาผลของระดับความเข้มข้นของสารละลาย L-proline ต่อปริมาณ 2AP ที่ใบของเตยหอมผลิตขึ้น เมื่อแช่ในสารละลาย L-proline ที่ระดับความเข้มข้น 0, 100, 200, 400 และ 800 ppm incubate ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ในที่มืด นำมาสกัดและวิเคราะห์สาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลาย L-proline ที่ใช้แช่ตัวอย่าง จาก 0 ppm เป็น 100, 200 และ 400 ppm ปริมาณสาร 2AP ที่เตยผลิตได้จะเพิ่มขึ้นจาก 10.211 ppm เป็น 10.446, 12.395 และ 13.207 ppm ตามลำดับ และจะลดลงเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลาย L-proline เป็น 800 ppm ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของ 2AP เท่ากับ 8.509 ppm ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นสารหอม 2AP จากใบของเตยหอมที่แช่ในสารละลาย L-proline ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น L-proline ในสารละลาย (ppm)	ปริมาณ 2AP (ppm)/ตัวอย่างสด 1 kg
0 (control)	10.211 [b]
100	10.446 [b]
200	12.395 [c]
400	13.207 [c]
800	8.509 [a]

[a b c] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลาย L-proline จะทำให้เตยหอมผลิต 2AP ในปริมาณที่สูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นจนถึงจุดหนึ่งปริมาณของสาร 2AP ที่เตยผลิตได้กลับมีค่าลดลง อาจเป็นเพราะเมื่อสารละลายเข้มข้นสูงจะทำให้พลังงานศักย์ของน้ำ (osmotic potential) ของสารละลายลดต่ำลงกว่าพลังงานศักย์ของน้ำในเซลล์ของใบเตยหอม ซึ่งตามธรรมชาติของน้ำจะเคลื่อนที่จากที่มีพลังงานศักย์ของน้ำสูงสู่ที่พลังงานศักย์ของน้ำต่ำเสมอ น้ำจึงเกิดการเคลื่อนที่แบบ osmosis จากภายในเซลล์ของใบเตยหอมออกสู่ภายนอก (จริงแท้ ศิริพานิช, 2544) จึงอาจส่งผลถึงกิจกรรมภายในเซลล์ที่อาจผิดปกติ ร่วมถึงการสังเคราะห์ 2AP ด้วย

นอกจากนี้พบว่าถึงแม้ที่ระดับความเข้มข้น 400 ppm ของสารละลาย L-proline จะทำให้เตยหอมผลิต 2AP ในปริมาณสูงที่สุด แต่เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าค่าดังกล่าวแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับค่าความเข้มข้นของ 2AP เมื่อใช้สารละลาย L-proline ที่ระดับความเข้มข้น 200 ppm ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลาย L-proline ที่ระดับความเข้มข้น 200 ppm แทน การใช้ L-proline ที่ระดับความเข้มข้น 400 ppm เพื่อประหยัดสารเคมีในการทดลองขั้นต่อไป

ข. อิทธิพลของความแตกต่างของชิ้นส่วนและชนิดของพืชที่ตอบสนองต่อ L-proline ในการผลิต 2AP

การทดลองใช้แคลลัสและใบของเตยหอมและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นตัวอย่างในการศึกษา ซึ่งจะนำตัวอย่างแช่ในสารละลาย L-proline และน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม (control) incubate ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ในที่มืด นำมาสกัดและวิเคราะห์สาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่าสาร 2AP ที่สกัดได้จากชุดการทดลองที่แช่ในสารละลาย L-proline จะมีความเข้มข้นสูงกว่าที่แช่ในน้ำกลั่น โดยใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย L-proline มีความเข้มข้นของสาร 2AP เท่ากับ 8.700, 1.768, 0.196 และ 0.041 ppm ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าในตัวอย่างที่แช่ด้วยน้ำกลั่นซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.651, 1.496, 0.193 และ 0.038 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ความเข้มข้นของสารหอม 2AP จากใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย L-proline และน้ำกลั่น

ตัวอย่างพืช	ปริมาณของสาร 2AP (ppm)			
	แช่ในน้ำกลั่น (control)		แช่ในสารละลาย L-proline	
	ใบ	แคลลัส	ใบ	แคลลัส
เตยหอม	8.651 ^{e}	1.496 ^{c}	8.700 ^{e}	1.768 ^{d}
ข้าวขาวดอกมะลิ 105	0.193 ^{b}	0.038 ^{a}	0.196 ^{b}	0.041 ^{a}

^{abc} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

เมื่อให้ L-proline แก่เตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 แล้วพบว่า 2AP ที่พบในตัวอย่างมีปริมาณมากขึ้น เนื่องจากทั้งในเตยและข้าวมีความสามารถผลิตสาร 2AP ได้ตามธรรมชาติ ปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ของ 2AP สามารถเกิดขึ้นภายในเนื้อเยื่อ เมื่อให้กรดอะมิโน L-proline แก่เนื้อเยื่อดังกล่าว พบว่ามีการผลิต 2AP ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น แสดงว่ากรดอะมิโน L-proline มีอิทธิพลในการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์สาร 2AP หรืออาจเป็นสารตั้งต้น (substrate) ของปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ของ 2AP ในเตยหอมและข้าวดอกมะลิ 105 สอดคล้องกับผลการทดลองของ Suprasarma และคณะ (1998) ที่ศึกษาผลของการเพิ่มปริมาณ L-proline ในอาหารเลี้ยงแคลลัสของข้าวต่อปริมาณสารหอม 2AP ที่ผลิตขึ้น โดยเลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ต่างๆ 4 สายพันธุ์ในอาหารที่ผสม L-proline เทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งไม่ใส่ L-proline ลงในแหล่งอาหาร พบว่าเซลล์ของข้าว Basmati และ Pusa Basmati ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่มีกลิ่นหอมจะผลิตสาร 2AP เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใส่ L-proline โดยเปรียบเทียบจากชุดควบคุม เช่นเดียวกับ Yoshihashi และคณะ (2002) ที่ศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ต่อปริมาณ 2AP ที่ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ผลิตขึ้น โดยใช้ส่วนของปลายยอดต้นกล้าข้าวหอมที่มีอายุ 14 วัน และแคลลัสแช่ลงในสารละลายซึ่งมีกรดอะมิโนชนิดต่างๆ (Pro, Orn, Glu, Gly, Met, Trp or His) ในที่มืด เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นสกัดสารหอม 2AP ด้วยเทคนิค SDE และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า L-proline, ornithine และ glutamate ทำให้ชิ้นส่วนต้นกล้าและแคลลัสของข้าวสร้าง 2AP เพิ่มขึ้นได้ และการได้รับ L-proline จะทำให้ข้าวผลิต 2AP ในปริมาณมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ 2AP ที่ได้จากชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมกรดอะมิโนลงในอาหารเพาะเลี้ยง

การเกิด 2AP ในอาหารที่ผ่านการให้ความร้อนนั้นเป็นที่ยอมรับว่า L-proline เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยาเคมีที่ใช้สังเคราะห์สาร 2AP โดย L-proline จะทำปฏิกิริยาร่วมกับ 2-oxopropanol ในปฏิกิริยา Strecker degradation เมื่อได้รับความร้อน ได้เป็นสารสารมัธยันตร์คือ 1-pyrroline และ 4-aminobutyraldehyde เมื่อสารมัธยันตร์ดังกล่าวอยู่ในสภาวะที่มี phosphate ion กับ 2-oxopropanal จะสามารถเกิด 2AP ขึ้นได้ (Schieberle, 1990) อย่างไรก็ตามในกระบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ยังไม่สามารถทราบถึงสารมัธยันตร์และวิถีที่ชัดเจน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ใช้สาร stable isotope มาช่วยในการศึกษา (Yoshihashi และคณะ, 2002)

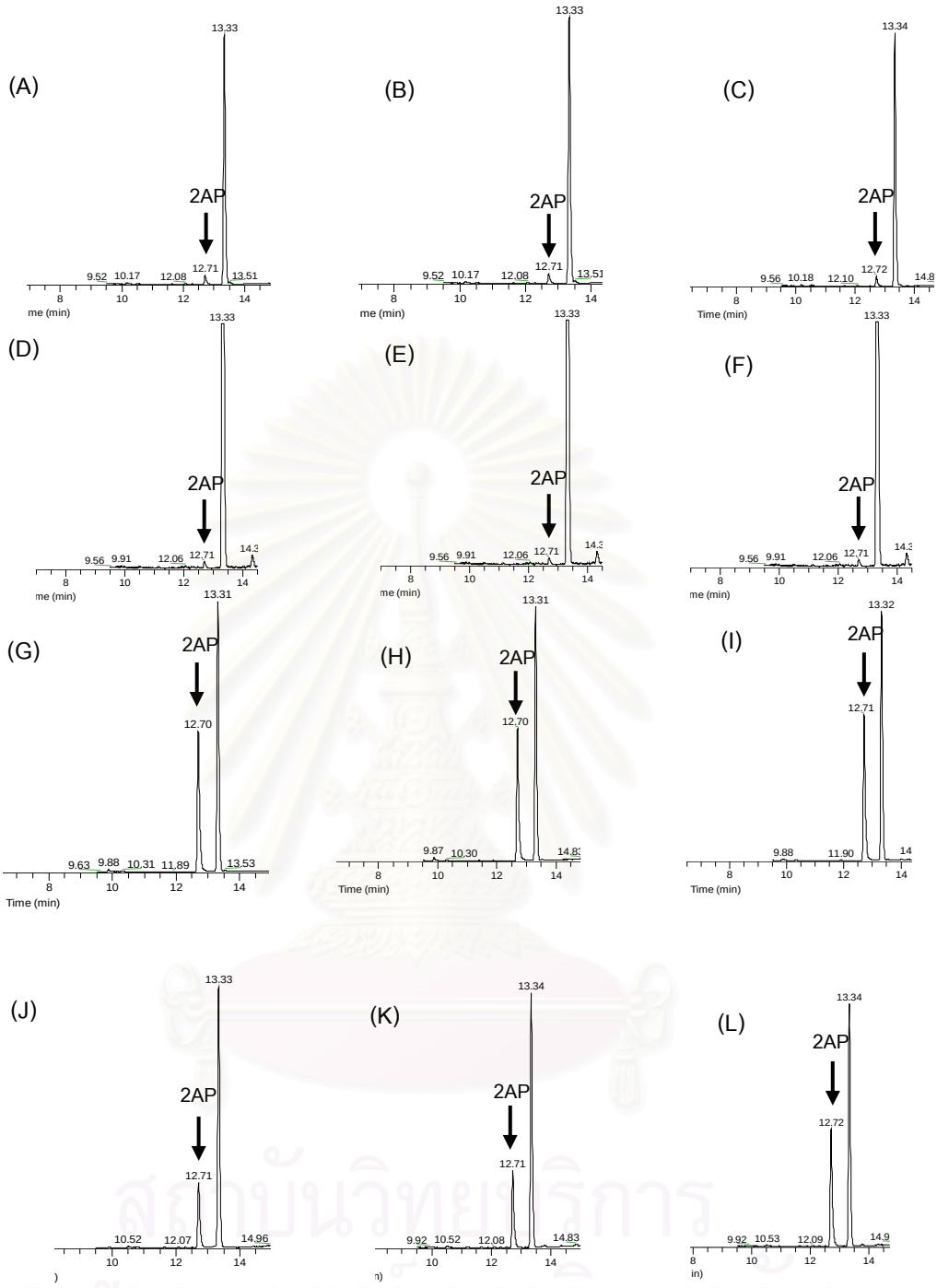
ค. การติดตามสารตั้งต้นของ 2AP โดยใช้สารละลาย ^{15}N-L-proline

จากผลการทดลองแช่แคลลัสและใบของเตยหอมและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ลงในสารละลาย 3 ชนิด คือ สารละลาย L-proline สารละลาย ^{15}N-L-proline และน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม (control) นำมา incubate ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นสกัดและ

วิเคราะห์สาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS เมื่อเปรียบเทียบ chromatogram และสัดส่วนของปริมาณ 2AP ที่มีช่วงมวลต่อประจุที่ 111 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของ 2AP ปกติ ต่อ 112 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของ 2AP ที่ถูกติดฉลากด้วย stable isotope ซึ่งได้จากใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่า chromatogram ที่ได้ปรากฏ peak ของ 2AP ในทุกตัวอย่าง (รูปที่ 4.12) เมื่อพิจารณาในค่าสัดส่วนของปริมาณ 2AP ในช่วงมวลต่อประจุที่ 111/112 (ตารางที่ 4.6) พบว่าค่าสัดส่วนในชุดควบคุม (แช่ในน้ำกลั่น) และชุดการทดลองที่แช่สารละลาย L-proline มีค่ามากกว่า 1 ในทุกตัวอย่าง โดยในใบและแคลลัสของเตยที่แช่ในน้ำกลั่น และสารละลาย L-proline มีค่าสัดส่วนเท่ากับ 1.086, 1.021, 1.111 และ 1.033 ตามลำดับ ส่วนใบและแคลลัสของข้าวที่แช่ในน้ำกลั่น และสารละลาย L-proline มีค่าสัดส่วนเท่ากับ 1.049, 1.056, 1.047 และ 1.053 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากค่าสัดส่วนที่ได้จากชุดการทดลองที่แช่ในสารละลาย ^{15}N-L-proline ซึ่งใบและแคลลัสของเตยและข้าวมีค่าสัดส่วนเท่ากับ 0.944, 0.971, 0.922 และ 0.967 ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะค่าสัดส่วนที่ได้นั้นบ่งบอกถึงปริมาณ 2AP ที่ได้รับสาร isotope จากสารละลาย ^{15}N-L-proline เนื่องจากสาร 2AP พบในธรรมชาติจะมีมวลเอกลักษณ์เท่ากับ 111 amu แต่เมื่อโมเลกุลของ ^{15}N L-proline เข้าสู่เนื้อเยื่อใบและแคลลัสของเตยและข้าว เนื้อเยื่อจะรับสาร ^{15}N-L-proline เข้าสู่เซลล์และใช้ในวิถีสังเคราะห์สาร 2AP จึงทำให้ค่ามวลเอกลักษณ์ของสาร 2AP เปลี่ยนไปจาก 111 เป็น 112 amu ซึ่งแสดงว่า ^{15}N ในโมเลกุลของ ^{15}N-L-proline ได้เข้าไปแทรกอยู่ในโมเลกุลของ 2AP ดังนั้นจึงมีเพียงชุดทดลองที่แช่สารละลาย ^{15}N-L-proline เท่านั้นที่มีค่าสัดส่วนปริมาณ 2AP ต่ำกว่า 1 (รูปที่ 4.13)

ตารางที่ 4.6 ค่าสัดส่วนของปริมาณ 2AP ในช่วงมวลต่อประจุที่ 111/112 ของใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย L-proline, สารละลาย ^{15}N-L-proline และน้ำกลั่น

พืชตัวอย่าง	สัดส่วนของปริมาณ 2AP ในช่วงมวลต่อประจุ (m/z)ที่ 111/112					
	แช่ในน้ำกลั่น (control)		แช่ในสารละลาย L-proline		แช่ในสารละลาย ^{15}N-L-proline	
	ใบ	แคลลัส	ใบ	แคลลัส	ใบ	แคลลัส
เตยหอม	1.086	1.021	1.111	1.033	0.944	0.971
ข้าวขาวดอกมะลิ 105	1.049	1.056	1.047	1.053	0.922	0.967



รูปที่ 4.12 ตัวอย่าง chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์แคลลัสและใบของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และเตยหอมในสารละลาย 3 ชนิด

(A-C) ใบข้าวขาวดอกมะลิ 105 แช่ในน้ำกลั่น, L-proline และ ^{15}N-L-proline

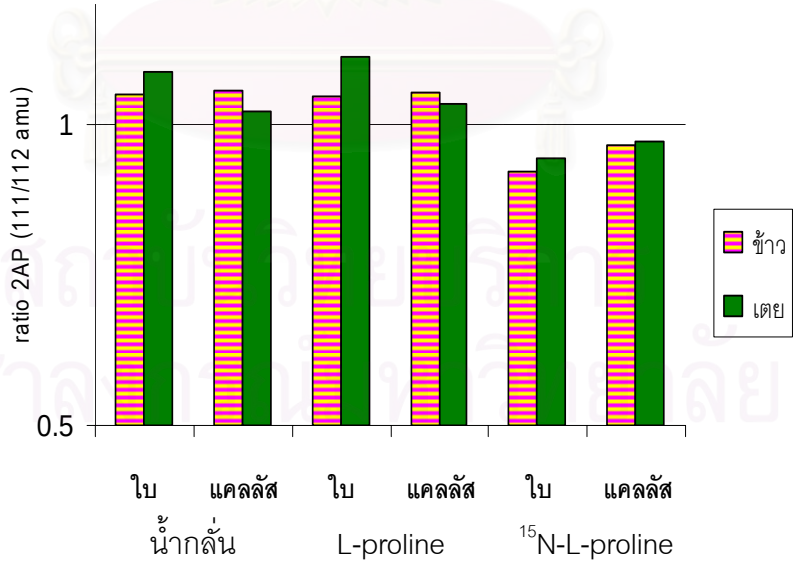
(D-F) แคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ 105 แช่ในน้ำกลั่น,L-proline และ ^{15}N-L-proline

(G-I) ใบของเตยหอมแช่ในน้ำกลั่น, L-proline และ ^{15}N-L-proline

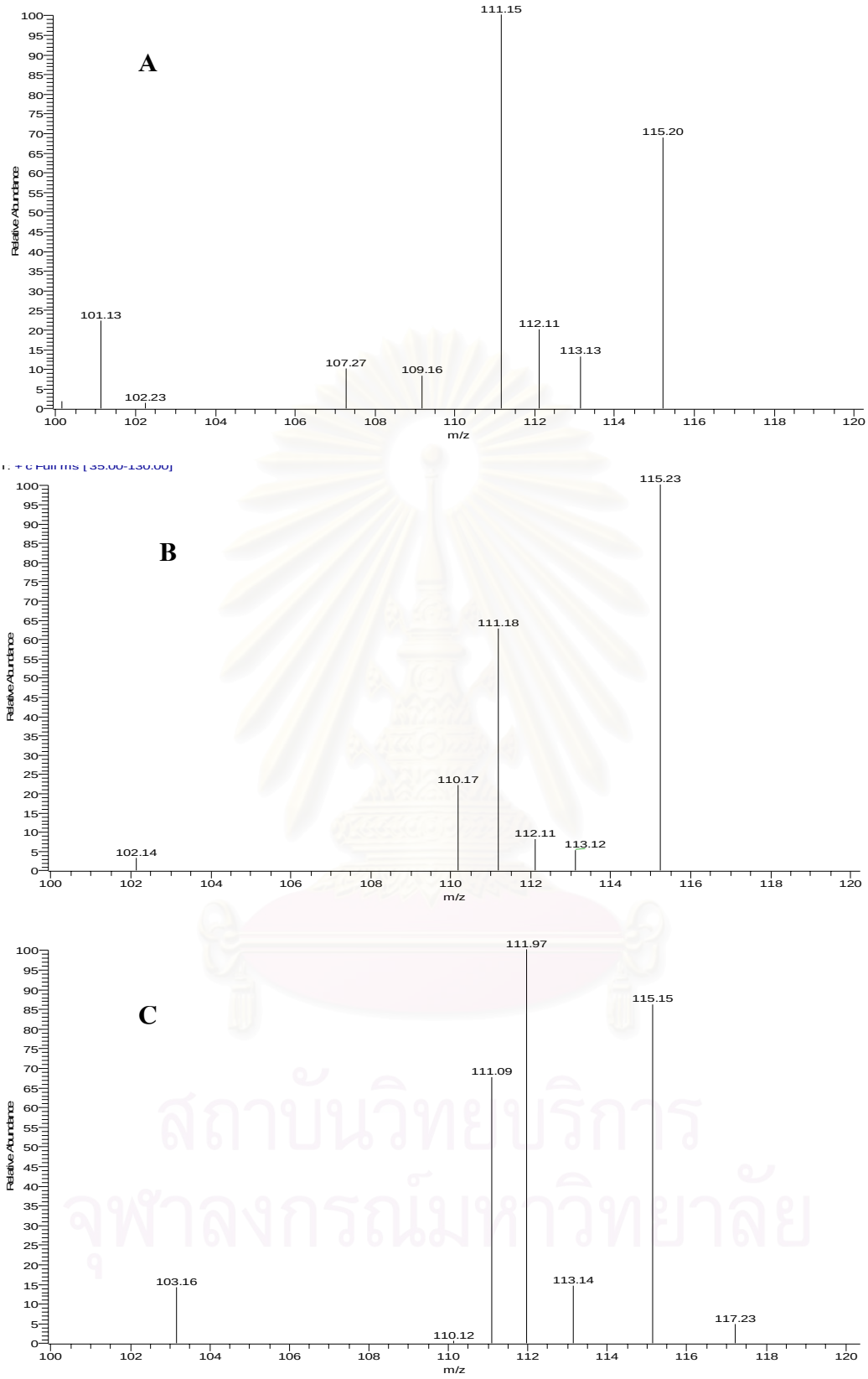
(J-L) แคลลัสเตยหอมแช่ในน้ำกลั่น, L-proline และ ^{15}N-L-proline

นอกจากนี้สามารถยืนยันผลการทดลองโดยพิจารณา mass spectrum ที่ได้ พบว่าชุดการทดลองที่แช่ในสารละลาย ^{15}N-L-proline เท่านั้นที่มวลเอกลักษณ์ค่า 112 สูงกว่า 111 amu (รูปที่ 4.14C) ในขณะที่ชุดการทดลองที่แช่ในน้ำกลั่นและสารละลาย L-proline ปกติมีมวลเอกลักษณ์ค่า 111 สูงกว่า 112 (รูปที่ 4.14A ,4.14B) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเตยหอมใช้ L-proline เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารหอม 2AP และเป็นไปได้ว่าไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลของ 2AP ก็มาจาก L-proline

สำหรับงานวิจัยของ Yoshihashi และคณะ (2002) ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารหอมในข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้สาร stable isotope ในการติดฉลาก L-proline (^{15}N-L-proline หรือ L-Proline-1-^{13}C) ที่ใส่ลงในแหล่งอาหารชิ้นส่วนต้นกล้าและแคลลัสของข้าว แล้วติดตามผลด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า chromatogram ของสารสกัดที่ได้จากต้นกล้าและแคลลัสข้าวที่ให้ ^{15}N-L-proline ปรากฏ peak ของ ^{15}N-2AP (มวลเอกลักษณ์ 112 amu) ในขณะที่ไม่พบในตัวอย่างที่ให้ L-Proline-1-^{13}C ดังนั้น L-proline คือสารตั้งต้นในกระบวนการชีวสังเคราะห์สารหอม 2AP ในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 โดยไนโตรเจนอะตอมที่ตำแหน่งในวงแหวน 1-pyrroline ของโมเลกุล 2AP มาจากไนโตรเจนอะตอมของ L-proline เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Leo และคณะ (1995) ซึ่งศึกษากระบวนการสังเคราะห์สารหอม 2AP ในเชื้อ *Baacillus cereus* สายพันธุ์ 35 ที่แยกได้จากกระบวนการหมักโกโก้ (cocoa) โดยใช้สาร ^{13}C และ ^{15}N ซึ่งเป็น stable isotope ในการติดฉลากสารต่างๆ ที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS พบว่า ^{15}N-L-proline, ^{15}N-glutamic acid และ U-$^{13}C_6$ glucose มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ 2AP ที่เกิดขึ้น



รูปที่ 4.13 สัดส่วนปริมาณ 2AP ในช่วงมวลต่อประจุที่ 111/112 ของใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย L-proline สารละลาย ^{15}N-L-proline และน้ำกลั่น



รูปที่ 4.14 Mass spectrum ของสารหอม 2AP จากแคลลัสเตยหอม

(A) ที่แช่ในน้ำกลั่น (B) ที่แช่ในสารละลาย L-proline

(C) ที่แช่ในสารละลาย ^{15}N-L-proline

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาหาสารตั้งต้นที่มาของไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลของสาร 2AP ในเตยหอม เปรียบเทียบกับในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้ใบและแคลลัสของพืชทั้งสองชนิดเป็นตัวอย่างในการศึกษา ซึ่งการเพาะเลี้ยงแคลลัสนั้น สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากคัพภะคือ สูตรอาหาร N_6 ดัดแปลงโดยร่วมกับการเติม 2,4 D ความเข้มข้น 2 mg/l โดยสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอจินิกแคลลัสได้ในปริมาณมาก แคลลัสที่ได้มีขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยสูง ดังนั้นอาหารสูตร N_6 ดัดแปลงนี้จึงเหมาะสำหรับใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสข้าวเพื่อใช้เป็นตัวอย่างการทดลองในขั้นตอนการศึกษาหาสารตั้งต้นที่มาของไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลของสาร 2AP

ในส่วนวิธีการชักนำให้เกิดแคลลัสในเตยหอมนั้นประกอบด้วย 2 ขั้นตอน โดยขั้นแรกจะต้องชักนำให้เกิดยอดอ่อนของเตยหอมในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้อาหารสูตร MS ที่ดัดแปลงโดยลดปริมาณ potassium nitrate ลงที่ความเข้มข้น 1.45 g/l ร่วมกับการเติม glutamic acid 100 mg/l, polyvinylpyrrolidine (PVP) 1 g/l และ benzylaminopurine (BAP) 0.5 mg/l ยอดอ่อนจะเจริญออกมาจากตา (bud) และสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าภายในระยะเวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์ เมื่อนำยอดอ่อนที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MS ดัดแปลงร่วมกับการเติม BAP 1mg/l, kinetin 4 mg/l และ 2,4 D 0.1 mg/l จะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสขึ้น โดยมีลักษณะสีเหลืองอ่อน และจะมีขนาด 5-8 mm เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3-4 สัปดาห์ ซึ่งแคลลัสที่ได้จะใช้ในการศึกษาหาสารตั้งต้นที่มาของไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลของสาร 2AP

เมื่อได้แคลลัสของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 จะนำมาใช้ในการศึกษาหาสารตั้งต้นที่มาของไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลของสาร 2AP ร่วมกับตัวอย่างใบของพืชทั้งสองชนิด การทดลองใช้สารละลาย stable isotope คือ ^{15}N-L-proline ให้แก่แคลลัสและใบของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 เปรียบเทียบกับแคลลัสและใบของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในน้ำกลั่นและสารละลาย L-proline สกัดและวิเคราะห์สาร 2AP ด้วยเทคนิค GC-MS ซึ่งมีอุณหภูมิที่ฉีดสาร 200 °C อุณหภูมิคอลัมน์ 45-220 °C อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียมคือ 1 ml/min พลังงานแหล่งกำเนิดไอออน 70 eV และช่วงมวลต่อประจุ 35-130 amu จากการวิเคราะห์โครมาโทแกรมพบว่า L-proline เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการชีวสังเคราะห์สาร 2AP ในเตยหอมเช่นเดียวกับในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยในใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่แช่ในสารละลาย ^{15}N-L-proline มีปริมาณของ

2AP ช่วงมวลต่อประจุ (m/z) ที่ 112 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของ 2AP ที่ติดฉลากด้วย ^{15}N-L-proline มากกว่าปริมาณของ 2AP ในช่วงมวลต่อประจุที่ 111 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของ 2AP ปกติ จึงทำให้สัดส่วนของ 2AP ที่ช่วงมวลต่อประจุที่ 111/112 มีค่าเท่ากับ 0.944, 0.971, 0.922 และ 0.967 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากใบและแคลลัสที่ได้จากการแช่ในน้ำกลั่นและสารละลาย L-proline ที่มีค่ามากกว่า 1 ในทุกตัวอย่างของพืชทั้งสองชนิด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการทดลองครั้งต่อไปควรใช้สาร stable isotope ชนิดที่ติดฉลากที่คาร์บอนอะตอม (^{13}C) เพื่อหาแหล่งที่มาในส่วนของคาร์บอนในโมเลกุลของ 2AP

5.2.2 ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการให้สาร isotope แก่พืชตัวอย่างด้วยวิธีการโดยแช่ดังนั้นสารละลาย isotope จะเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชด้วยการ osmosis จึงอาจทำให้ปริมาณสารที่เข้าสู่เนื้อเยื่อตัวอย่างมีปริมาณน้อย จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในวิธีการให้สารแก่ตัวอย่างพืช เช่น การใช้ต้นพืชทั้งรากแช่ในสารละลายเพื่อให้พืชตัวอย่างดูดสารละลาย isotope ด้วยราก หรือการใช้วิธี Vacuum infiltration ในการให้สารแก่เนื้อเยื่อพืช

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรรณานุช เลาห์เรณู, นุสรา เมธาพิพัฒน์ และศรีสุรางค์ ปิ่นแสงมณี. 2541. การตรวจพิสูจน์สาร 2-Acetyl -1-pyrroline ซึ่งเป็นสาระสำคัญที่ให้กลิ่นข้าวหอมในมะพร้าว. ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าพระนครเหนือ.

ดุษฎี อุตภาพ, วิไล รังสาดทอง, จุรีรัตน์ พุดตาลเล็ก และวิจาริณี ศรีนวล. 2548. การผลิตสารให้กลิ่นข้าวหอมมะลิ (2-acetyl-1-pyrroline) โดย *Aspergillus oryzae* TISTR 3256. สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

นพดล เกตุประสาท. 2548. ชำมะนาด[online]. แหล่งที่มา: http://clgc.rdi.ku.ac.th/resource/fragrant/bread_flower/vallaris.html [2009, Febuary 20]

น้องนุช เจริญกูล. 2543. การผลิตเจลปรับอากาศโดยใช้สารหอมที่สกัดได้จากใบเตยหอม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

นันทินี ศรีสุภัทรวานิช. 2548. ผลของกาเคลือบข้าวต่อ 2-acetyl-1-pyrroline และ n-hexanal ในพันธุ์ข้างกล้องหอมสุพรรณบุรีด้วยเทคนิค SPME-GC-MS. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิจศิริ เรืองรังสี และพะยอม ตันติวิวัฒน์. 2534. พืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ศัพท์วิทยาศาสตร์อังกฤษ-ไทย ไทย-อังกฤษ ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. พิมพ์ครั้งที่ 5. 2546.กรุงเทพฯ: อรุณการพิมพ์.

จริงแท้ ศิริพานิช. 2544. ความสัมพันธ์ของน้ำกับพืช. ใน จริงแท้ ศิริพานิช (บรรณาธิการ), หลักการพืชสวน, พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 99-114. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เบญจมาศ ศิลาย้อย และ O.L. Gamborg. 2529. การชักนำให้เกิดแคลลัสในกล้วย. บทคัดย่อวารสารวิชาการเกษตร. 4(3)

ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

มงคล รายะนาคร. 2537. แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสเปกโทรเมตรี. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2539. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2540. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. กรุงเทพ: ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

วรวิทย์ พาณิชพัฒน์. 2529. การผลิตข้าวหอมเพื่อการส่งออก. ใน ชมรมผู้เผยแพร่ความรู้การเกษตรแห่งประเทศไทย, เกษตรยุคใหม่. หน้า 124-143. กรุงเทพฯ: ฟันนี่พับลิชชิ่ง.

วาสนา วรมิศร์. 2539. ข้าวหอมและการปรับปรุงพันธุ์. ในรายงานสัมมนาเรื่องการพัฒนาข้าวและธัญพืชเมืองหนาว. ครั้งที่ 8: หน้า 1-15. ณ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

แววตา ชี้ทางดี. 2547. ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด 2-Acetyl-1-pyrroline และสารให้กลิ่นอื่นๆ ในใบเตย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมเดช กนกเมธากุล. 2547. สเปกโทรสโกปีในการพิสูจน์โตรงสร้างของสารอินทรีย์. ขอนแก่น: ขอนแก่นการพิมพ์.

สุกัญญา วงศ์พรชัย, ศักดิ์ดา จงแก้ววัฒนา, พิสัณห์ กิจสวัสดิ์ไพบูลย์ และสุรพันธ์ กาญจนวงศ์. 2547. การพัฒนาวิธีการตรวจวัดสารหอมในข้าวในโครงการวิจัยคุณภาพข้าวขาวดอกมะลิ 105. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สำนักงานบริการคอมพิวเตอร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. จำปาดะ[online]. แหล่งที่มา: http://www.tws.ac.th/.../december_43/ponrmi/fruit.htm. [2009, Febuary 20]

อภิรดี สาริกา. 2527. การศึกษาสารที่ให้กลิ่นใบเมี่ยง (ใบชาหมัก). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อารีย์ วัญญูวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์อักษรรรค์.

เอกภพ นิ่มเล็ก. 2542. การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคคลัสในข้าวหอมสี่พันธุ์ และการส่งถ่ายยีนในข้าวขาวดอกมะลิ 105. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Blank, I., S. Devaus., L.B. Fray., C. Cerny., M. Steiner. and B. Zurbruggen. 2001. Oder-active compounds of dry-cured meat : Italian-type Salami and Parma Ham, In Aroma active compounds in foods. ACS symposium. 794: 9-20.

Buchi, G. and H. Wuest. 1971. Synthesis of 2-cetyl-1,4,6-tetrahydropyridine, a constituent of bread aroma. J. Org. Chem. 36: 609-610.

Buttery, R.G. and L.C. Ling. 1982. 2- acetyl-1- pyrroline : An important aroma component of cook rice Chem Ind. 958-959.

Buttery, R.G., B.O. Juliano and L.C. Ling. 1982. Identification of rice aroma compound 2-acetyl-1-pyrroline in Pandan leaves. Chem Ind, 23: 478-478.

Buttery, R.G., L.C. Ling, B.O. Juliano and J.G. Turnbaugh. 1983. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. J. Agric. Food Chem. 31: 823-826.

Buttery, R.G., J.G. Turnbaugh and L.C. Ling. 1988. Contribution of volatile to rice aroma. J. Agric. Food Chem. 36: 1006–1009.

Buttery, R.G., L.C. Ling and D.J. Donald. 1994. Studies on flavor volatiles of some sweet corn product. J. Agric. Food Chem. 42: 791-793.

Buttery, R.G.and L.C. Ling. 1995. Volatile flavor components of corn torillas and related products. J. Agric. Food Chem. 43: 1878-1882.

Cadwallader, K.R.and H.H. Baek. 1998. Aroma-impact compounds in cooked tail meat of freshwater crayfish *Procambarus clarkia*. Dev. Food Sci. 40: 217-278.

Chung, H.Y. and K.R.Cadwallader. 1994. Aroma extract dilution analysis of blue crab claw meat volatiles. J. Agric. Food Chem. 42: 2867-2870.

Fajerska, E. H. 2006. Improvement of growth parameters of prune callus cultures destined to initiate call suspensions. Acta Soci. Bot Polon. 75: 5-9.

Frisch, C.L. and N.D. Camper. 1987. Effect of synthetic auxins on callus induction from tea stem tissue. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 8: 207-213.

Gasser, U. and W. Grosch. 1988. Identification of volatile flavor components with high aroma values of cook beef. Z. Lebenm. Unter. Forsch. 188: 489-494.

Gay, F., C. Mestres, P.P. Hien, M. Laguerre and J. Ringuet. 2006. Development of semi Quantitative methods to analyse rice aroma. Proceed Inter Biotech Agri. 178-181.

Grimm, C.C., C. Bergman, J.T. Delgado and R. Bryant. 2001. Screening for 2-Acetyl-1-pyrroline in the headspace of rice using SPME/GC-MS. J. Agric. Food Chem. 49: 245-249.

Jiang, J. 1999. Volatile composition of pandan leaves *Pandanus amaryllifolius.* In Shahidi, F. and C.T. Ho (eds.), Flavor chemistry of Ethnic Foods, pp. 105-109. New York: Kluwer Acedemic/Plenum.

Jianming, G. 2002. Identification of 2-acetylpyridine in Xiangjing-8618 rice and in Yahonkaoluo leaves. Food Chem. 78: 163–166.

Leo J.R., A.M. Craig, S.P. Laurie and W.M. Aitken. 1995. Formation of 2-acetyl-1-pyrroline by several *Bacillus cereus* strains isolated from Cocoa fermentation boxes. J. Agric. Food Chem. 43: 469–475.

Laksanalamai, V. and S. Ilangantilek. 1993. Comparison of aroma compound (2-acetyl-1-pyrroline) in leaves from Pandan *Pandanus amaryllifolius* and Thai fragrant rice (Khao Dawk Mali 105). Cereal Chem. 70: 381-384.

Lee, G.H., O. Suriyaphan and K.R. Cadwallader. 2001. Aroma components of cooked tail meat of American lobster Homarus americanus. J. Agric. Food Chem. 49: 4324-4332.

Lorieux, M., M. Petrov, N. Huang., E. Guiderdoni and R. Ghesquie. 1996. Aroma in rice:genetic analysis of a quantitative trait. Theoretical and Applied Genetics. 93: 1145-1151.

Mahatheeranont, S., S. Promdang and S. Chiampiriyakul. 1995. A volatile aroma compounds of Khao Dawk Mali 105. Kasetsart J. 29: 508-514.

Mahatheeranont, S., S. Keawsa-ard and K. Dumri. 2001. Quantification of the rice aroma compound, 2-Acetyl-1-pyrroline, in uncooked Khao Dawk Mali 105 brown rice. J. Agric. Food Chem. 49: 773-779.

Mahindru, S.N. 1995. Manual of Basmati rice. New Delhi: Metropolitan.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol. 15: 473-497.

Mutti, B. and W. Grosch. 1999. Potent odorants of boiled potatoes. Nahrung. 43 : 302-306.

Nagsuk, A., N. Winichphol and V. Rungsardthong. 2002. Identification of 2-Acetyl-1-pyrroline, the principal aromatic rice flavor compound in fungus cultures. Faculty of applied science, King Mongkut's Institute of Technology North Bangkok.

Nitsch, J.P. and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163: 85–87.

Paule, C.M. and J.J. Power. 1989. Sensory and chemical extraction of aromatic and nonaromatic rice. J. Food Sci. 54: 343-345.

Paulsen, I.T. *Aspergillus oryzae* picture. [online]. Available from: http://www.membranetransport..org/.../organism/aory1.jpg [2009, February 20]

Potrykus, I., C.T. Harms. and H. Lörz. 1979. Callus formation from cell culture protoplasts of corn (Zeamays). Theor. Appl. Genet. 54: 209-214.

Romanczyk, Jr. L. J., C.A. McClelland, L.S. Post and A.W. Martin. 1995. Formation of 2-acetyl-1-pyrroline by several *Bacillus cereus* strains isolated from cocoa fermentation boxes. J. Agric. Food Chem. 43: 469-475.

Rungsardthong, V. 1995. Production of 2-acetyl-1-pyrooline. Doctoral dissertation. Asian Institute of Technology. Bangkok.

Rychlik, M. and W. Grosch. 1996. Identification and quantification of potent odorants formed by toasting of wheat bread. Lebensm. Wiss. Technol. 29: 15-525.

Science Intruments service centre.GC-MS picture. [online]. Available from: http:// www.kmitl.ac.th/sisc/GC-MS/main.html. [2009, February 20]

Schieberle, P. and W. Grosch. 1985. Identification of volatile flavor compounds of wheat bread crust-comparison with rye bread crust. Z. Lebensm.-Unters.- Forsch. 180: 474-478.

Schieberle, P. and W. Grosch. 1987. Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crusts using a stable isotope dilution assay. Agric. Food Chem. 35: 252-257.

Schieberle, P. 1990. The role of free amino acids present in yeast as precersors of the odorants 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahyddropyridine in wheat bread crust. Z. Lebensm-Unters. Forsch. 191: 206-209.

Schieberle, P. 1991. Primary odorants in popcorn. J. Agric. Food Chem. 39: 1141-1144.

Schieberle, P and G. Wener. 1991. Potent odorants of the wheat bread crumb. Z. Lebensm-Unters. Forsch. 192: 130-135.

Schieberle, P. 1995. Quantitation of important roast – smelling odorants in popcorn by stable isotope dilution assays and model studies on flavor formation during popping. J. Agric. Food Chem. 43: 2442–2448.

Schieberle, P. 1996. Odour-active compound in moderately roasted sesame. J. Agric. Food Chem. 55: 145-152.

Srangsam, A and K. Kanchanapoom. 2003. Thidiazuron induced plant regeneration in callus culture of triploid banana *Musa* sp.'Gros Michel',AAAgroup. Songklanakarin J. Sci. Technol. 25: 689-696.

Suprasarma, P., T.R. Ganapathi., N.K. Ramaswamy, K.K. Surendranathan and P.S. Rao. 1998. Aroma synthesis in cell and callus cultures of rice. Rice Genet. Newsl. 15: 123-125.

Tairu, A.O., T. Hofmann and P. Schieberle. 2000. Studies on the key odorants formed by roasting of wild mango seeds *Irvingia gabonensis*. J. Agric. Food Chem 48: 2391–2394.

Thimmaraju, R., N. Bhagyalakshmi, M.S. Narayan, L. Vankatachalam and G.A. Ravishankar. 2005. In vitro culture of *Pandanus amaryllifolius* and enhancement of 2-acetyl-1-pyrroline, the major flovouring compound of aromatic rice, by precursor feeding of L-proline. J. Sci. Food Agric. 85: 2527-2534 .

Ween, H. 1998. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. Food Chem. 62: 393-401.

Wilson, H. *Bacillus cereus* picture. [online]. Available from: http://wwwbiosci.sierrcollege.edu/.../dorner_spore.jpg. [2009, Febuary, 20]

Wongpornchai, S., T. Sriseadka and S. Choonvisase. 2003. Identification and quantitation of the rice aroma compound, 2-acetyl-1-pyrroline, in bread flowers (*Vallaris glabra* Ktze), J. Agric. Food Chem. 51: 457-462 .

Wong, K.C., C.L. Lim and L.L. Wong. 1992. Volatile flavor constituent of Chempedak *Artocarpus polyphema* Pers. fruit and Jackfruit *Artocarpus heterophyllas* Lam. form Malaysia. Flavor Fragrance J. 7: 307-311.

Wong, K.C., F.N. Chong. and S.G. Chee. 1998. Volatile constituents of Taro *Colocasia esculenta* L. Schott. J. Essent Oil Res. 10: 93-95.

Yajima, I., T. Yanai, M. Nakamura, H. Sakakibara and T. Habu. 1978. Volatile flavor components of cooked rice. J. Agric. Bio Chem 42: 1229-1233.

Yoshihashi, T., N.T. Huong and H. Inatomi. 2002. Precursors of 2-acetyl-1- pyrroline, a potent flavor compound of an aromatic rice variety. J. Agric. Food Chem. 50: 2001-2004.

Yoshihashi, T., N.T. Huong and N. Kabaki. 2004. Area dependency of 2-acetyl-1-pyrroline in an aromatic rice variety, Khao Dawk Mali 105. JARQ. 38(2): 105-109.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ก.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

1. ข้าวเปลือกพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับจากสถาบันวิจัยข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
2. เตยหอมที่ซื้อจากตลาดไท จ. ปทุมธานี

ก.2 สารเคมีสำคัญที่ใช้ในหัวข้อ 3.2.2 และ3.2.3

1. Dichloromethane (HPLC grade) ของบริษัท Lab-Scan Asia Co, Ltd., Thailand
2. 2,4,6-trimethylpyrridine (TMP) 99% ของบริษัท Sigma-Aldrich Co, USA
3. 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีแต่ไม่ทราบความเข้มข้นเริ่มต้นที่แน่นอน จาก Dr. Tadashi Yoshihashi, Japan International Research Center for Agricultural Science (JIRCAS)
4. ^{15}N-L-proline 98% ของสถาบัน Cambridge Isotope Laboratories, USA
5. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 37% w/v ของบริษัท Merck, German
6. Sodium sulfate anhydrous ของบริษัท Fisher Chemicals, UK

ก.3 อุปกรณ์และเครื่องมือสำคัญที่ใช้ในหัวข้อ 3.2.2 และ3.2.3

1. เครื่อง GC รุ่น Trace GC ultra ของบริษัท Thermo Finnigan, USA
2. เครื่อง MS รุ่น Polaris Q ของบริษัท Thermo Finnigan, USA
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงหนีศูนย์กลางความเร็วปรับอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น SORVALL RC 5C PLUS ของบริษัท Kendro Laboratory Products, USA
4. เครื่อง homogenizer ของ Ingenieurbüro CAT, Germany
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ OHAUS CORP, USA
6. เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Satorius รุ่น BR210D, Germany
7. เครื่อง Digital pH meter ของบริษัท Orion Research Incorporated, USA
8. septum ชนิด TFE/SILขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 mm ของบริษัท SUN-SRI, USA
9. aluminum cap ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 mm มีรูเปิดตรงกลางขนาด 0.3 cm ของบริษัท SUN-SRI, USA

10. syringe ปริมาตร 10 µl needle ยาว 70 mm ของบริษัท SGE, Australia
11. splitless liner ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 5 mm ของบริษัท SGE, Australia
12. column AT™ –WAX (Polyethylene Glycol) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 mm ความยาว 60 m ความหนาของ liquid phase 0.25 µm ของบริษัท Thermo Electron Corporation
13. crimper 11 mm ของบริษัท SUN-SRI, USA
14. decrimper 11 mm ของบริษัท SUN-SRI, USA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวก ข.1 องค์ประกอบพื้นฐานในอาหารสูตร MS, N_6 และ CC ในหัวข้อ 3.2.1.ก

องค์ประกอบ	ปริมาณ mg / l		
	MS medium	N_6 medium	CC medium
Macronutrient			
NH_4NO_3	1,650	720	640
KNO_3	1,900	160	588
$CaCl_2.2H_2O$	440	185	247
$MgSO_4.7H_2O$	370	68	136
KH_2PO_4	170	950	1,212
Micronutrient			
KI	0.83	-	0.83
H_3BO_3	6.2	10	3.10
$MnSO_4.4H_2O$	6.9	25	11.15
$ZnSO_4.7H_2O$	6.14	10	5.76
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25	0.024
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	-	-
$CoSO_4.7H_2O$	-	-	0.014
Fe-EDTA			
$FeSO_4.7H_2O$	27.85	27.85	27.80
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.25	37.35	37.30
Vitamin and Organic			
Inositol	100	2.0	-
Nicotinic acid	0.5	0.5	6.0
Pyridoxine HCl	0.5	0.5	1.0
Thiamine HCl	1.0	0.5	8.5
Glycine	2.0	0.05	-
Biotin	-	0.5	-
casein hydrolysate		300	

องค์ประกอบ	ปริมาณ mg / l		
	MS medium	N_6 medium	CC medium
Others			
Sucrose	30,000	20,000	20,000
Mannitol	-	-	36,430
Coconut milk		-	100 ml/l
Agar	8000-	8000-	8000-

ข.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในแต่ละสูตร จะมีขั้นตอนที่คล้ายกันแต่แตกต่างในเรื่องของปริมาณและองค์ประกอบของสารชนิดต่างๆ ซึ่งอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ละสูตรนั้นจะประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดที่มีคุณสมบัติและข้อจำกัดต่างกัน เช่น เป็นสารที่ใช้ในปริมาณน้อยมาก ทำปฏิกิริยากับสารเคมีชนิดอื่นจนเกิดสารประกอบที่ไม่ละลาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเตรียมสารต่างๆ ให้อยู่ในรูปของสารละลายเข้มข้นที่เรียกว่า stock solution

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ปิเปต stock solution ของสารที่เป็นองค์ประกอบทั้งหมดของสูตรอาหารตามที่ได้เตรียมไว้
2. เติมส่วนผสมอื่นๆ เช่น น้ำตาล sucrose น้ำมะพร้าว casein hydrolysate และสารควบคุมการเจริญเติบโต (Plant growth regulator) อื่นๆ ยกเว้นวุ้น (Agar) ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน
3. ปรับปริมาตรสารละลายอาหารให้ครบตามที่ต้องการเตรียมด้วยน้ำกลั่น
4. ปรับ pH ของอาหารตามสูตร (ประมาณ 5.6-5.8)
5. เติมวุ้นลงในสารละลายอาหาร และคนให้กระจายตัวด้วย magnetic stirrer จากนั้นนำของผสมที่ได้ไปให้ความร้อนเพื่อหลอมให้วุ้นละลายโดยไมโครเวฟ (ใช้เวลาประมาณ 4 นาทีต่อการเตรียมอาหาร 500 ml)
6. นำสารละลายอาหารออกมาคนแล้วจึงนำไปให้ความร้อนอีกครั้งด้วยไมโครเวฟเป็นระยะเวลาประมาณ1.30 นาที

7. เทอาหารลงในขวดแก้วซึ่งใช้เป็นภาชนะสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
8. นำขวดอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่ความดัน 25 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค.1 การเตรียมสารสารมาตรฐานผสมของ TMP กับสาร 2AP ที่ใช้ในหัวข้อ 3.2.2 ก

สารมาตรฐานผสมของ TMP ความเข้มข้น 1 ppm และ 2AP (2AP เป็นสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ไม่ทราบความเข้มข้นเริ่มต้นที่แน่นอน) โดยใช้ dichloromethane เป็นตัวทำละลาย

<u>สารเคมีที่ใช้</u>

1. สารมาตรฐาน 99% TMP
2. ตัวทำละลาย dichloromethane (CH_2Cl_2)
3. สารละลายมาตรฐาน 2AP (2AP เป็นสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ไม่ทราบความเข้มข้นเริ่มต้นที่แน่นอน) ในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 และเนื่องจากสารละลายมาตรฐาน 2AP เป็นสารสังเคราะห์จึงมีความเข้มข้นสูง ก่อนใช้ต้องนำมาเจือจาง 100 เท่า ด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2

<u>ขั้นตอนการเตรียม</u>

ปิเปตสารมาตรฐาน 99% TMP ปริมาณ 55 µl ใส่ในขวดวัดปริมาตร 25 ml เติม CH_2Cl_2 (HPLC grade) จนถึงขีดวัดปริมาตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน จะได้สารละลายมาตรฐาน TMP ความเข้มข้น 1000 ppm

จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐาน TMP ความเข้มข้น 1000 ppm ปริมาตร 25 µl และสารละลายมาตรฐาน 2AP เจือจาง 100 เท่า มา 50 µl ใส่ในขวดวัดปริมาตร 25 ml เติม CH_2Cl_2 (HPLC grade) จนถึงขีดวัดปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานผสมของ TMP ความเข้มข้น 1 ppm และ 2AP

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค.2 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M (โมลต่อลิตร) ในหัวข้อ 3.2.2 ข

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M ใช้สำหรับวิธีการสกัดสาร 2AP ออกจากตัวอย่าง ซึ่งจะมีการเติมสารมาตรฐานภายใน TMP ระหว่างขั้นตอนการสกัดในภายหลัง

สารเคมีที่ใช้

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 37% w/v

ขั้นตอนการเตรียม

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4.15 ml ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 500 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร จะได้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 M

ค.3 การเตรียมสารละลาย ^{15}N-L-proline ในหัวข้อ 3.2.3 ค

สารละลาย ^{15}N-L-proline เตรียมจากสาร^{15}N-L-proline 98% ของสถาบัน Cambridge Isotope Laboratories ประเทศ USA ชั่งสาร (สาร ^{15}N-L-proline มีลักษณะเป็นผงสีขาว) ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายใช้ตามผลการทดลองจากข้อ 3.2.3 ก คือ 200 ppm

การเตรียมสารละลาย ^{15}N-L-proline

ชั่งสาร ^{15}N-L-proline น้ำหนัก 10 mg .ใส่ในบีกเกอร์ จากนั้นหยด 70 % ethyl alcohol จำนวน 2-3 หยด คนให้ละลายจนได้สารละลายใสแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 ml ด้วยน้ำกลั่น เขย่าสารละลายให้เข้ากัน จะได้สารละลาย ^{15}N-L-proline ความเข้มข้น 1000 ppm

จากนั้นปิเปตสารละลาย ^{15}N-L-proline ความเข้มข้น 1000 ppm ปริมาตร 5 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตร 25 ml เติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร จะได้สารละลาย ^{15}N-L-proline ความเข้มข้น 200 ppm

ค.4 การคำนวณ % recovery

การคำนวณหา % recovery ต้องคำนวณหาเนื้อสารของ TMP ที่ใส่ลงในขั้นตอนการสกัด 2AP ก่อน ซึ่งขั้นตอนการสกัดจะใส่สารละลาย TMP ความเข้มข้น 200 ppm ปริมาตร 10 µl

200 ppm มีค่าเท่ากับ 200 µg /ml

ดังนั้น ในสารละลาย 1000 µl มีเนื้อสาร TMP 200 µg

ถ้าในสารละลาย 10 µl มีเนื้อสาร TMP $\frac{10\ \mu l \times 200\ \mu g}{1000\ \mu l} = 2\ \mu g$

∴ เนื้อสารของ TMP ที่ใส่ลงในขั้นตอนการสกัด 2AP มีค่าเท่ากับ 2 µg

จากนั้นเตรียมสาร TMP ที่มีความเข้มข้นหนึ่งเพื่อฉีดใน GC-MS 1 µl แล้วมีเนื้อสาร TMP เท่ากับ 2 µg

<u>คำนวณหาความเข้มข้นของ TMP ที่ใช้ฉีดใน GC-MS แล้วมีเนื้อสารของ TMP 2 µg</u>

ในสารละลาย TMP 1 µl จะต้องมีเนื้อสาร TMP 2 µg

ถ้าสารละลาย TMP 1,000 µl จะต้องมีเนื้อสาร TMP 2,000 µg

∴ มีเนื้อสาร TMP 2,000 µgในสารละลาย TMP 1,000 µl หรือเท่ากับ 2,000 ppm

ดังนั้นต้องเตรียมสารละลาย TMP 2,000 ppm ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-MS ทำการทดลอง 5 ซ้ำ พิจารณาพื้นที่ใต้ peak (peak area) ที่ได้จากโครมาโทแกรมของสาร TMP นำมาหาค่าเฉลี่ย (A_1)

จากนั้นฉีดสารสกัด TMP ที่ได้จากการสกัดตามขั้นตอนการสกัดที่ศึกษา ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-MS ทำการทดลอง 5 ซ้ำ พิจารณาพื้นที่ใต้พีค (peak area) ที่ได้จากโครมาโทแกรมของสาร TMP นำมาหาค่าเฉลี่ย (A_2)

นำค่า (A_1) และ (A_2) มาคำนวณในสมการ

$$\%\text{recovery} = \frac{\text{พื้นที่ใต้ peak ของ TMP ที่ได้จากการขั้นตอนการสกัด 2AP } (A_1)}{\text{พื้นที่ใต้ peak ของ TMP ที่ได้จากการฉีดสาร TMPโดยตรง}} \times 100$$

ค.5 วิธีการคำนวนปริมาณสารหอม 2AP ในหัวข้อ 3.2.2 ข, 3.2.3 ก และ 3.2.3 ข

เมื่อฉีดสารสกัดตัวอย่างที่มีส่วนผสมของสารมาตรฐาน TMP ซึ่งทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จากการคำนวน พิจารณาพื้นที่ใต้ peak ที่ได้จากโครมาโทแกรมของสาร 2AP และ TMP นำมาคำนวณในสมการ

$$\text{ปริมาณ 2AP (ppm)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้ peak ของ 2AP}}{\text{พื้นที่ใต้ peak ของ TMP}} \times \text{ความเข้มข้นของ TMP ที่ใส่ในขั้นตอนการสกัด}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง. 1 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์ในใบและแคลลัสของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105

ตัวอย่าง	พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP					
	สาร 2AP			สาร TMP		
	Rep** 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
ใบเตยหอม	5,787,737	5,110,590	4,299,411	2,917,700	2,639,622	2,504,492
แคลลัสเตยหอม	1,198,561	1,831,075	1,826,978	3,474,991	3,362,970	3,101,315
ใบข้าว*	348,865	68,147	72,105	2,260,611	2,622,624	2,761,759
แคลลัสข้าว	58,413	79,043	40,424	3,411,402	2,954,906	3,166,527

* ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105

** Rep หมายถึงซ้ำในการทดลอง

ตารางที่ ง. 2 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์ในใบของเตยหอมเมื่อแช่ในสารละลาย L-poline ที่ 4 ระดับความเข้มข้น

ความเข้มข้นของ L-proline (ppm)	พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP					
	สาร 2AP			สาร TMP		
	Rep* 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
0	168,194	158,999	175,775	209,037	205,093	201,095
100	201,049	153,330	163,348	211,111	193,618	213,215
200	169,409	179,056	179,324	177,488	189,433	166,208
400	167,545	186,221	200,165	169,872	171,121	182,090
800	140,001	101,322	97,684	185,250	164,759	144,927

* Rep หมายถึงซ้ำในการทดลอง

ตารางที่ ง. 3 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมในใบของเตยหอมและข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อแช่ในน้ำกลั่นและสารละลาย L-poline

ตัวอย่าง	พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP					
	สาร 2AP			สาร TMP		
	Rep** 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
<u>ใบเตยหอม</u>						
น้ำกลั่น	3,266,767	3,367,948	3,246,529	4,006,448	4,123,358	4,058,117
L-poline	3,203,865	3,110,011	3,349,587	3,916,488	3,837,273	4,096,499
<u>แคลลัสเตยหอม</u>						
น้ำกลั่น	261,656	260,736	280,538	1,861,357	1,871,515	1,995,407
L-poline	339,854	330,313	364,472	2,049,473	1,997,828	2,194,444
<u>ใบข้าว*</u>						
น้ำกลั่น	23,410	22,366	20,980	1,243,013	1,261,011	1,193,141
L-poline	22,874	24,414	26,967	1,305,756	1,370,631	1,371,268
<u>แคลลัสข้าว</u>						
น้ำกลั่น	6,688	6,924	6,764	1,946,423	1,856,733	1,853,117
L-poline	6,355	7,513	7,612	1,886,169	1,866,326	1,826,326

* ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105

** Rep หมายถึงซ้ำในการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง. 4 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมในใบของเตยหอมเมื่อแช่ในน้ำกลั่น สารละลาย L-poline และสารละลาย ^{15}N-L-proline

มวลต่อประจุ (m/z)	พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP ในใบของเตยหอม					
	แช่ในน้ำกลั่น (control)		แช่ในสารละลาย L-proline		แช่ในสารละลาย ^{15}N-L-proline	
	2AP	TMP	2AP	TMP	2AP	TMP
Labled derivatives (m/z 111)						
Rep* 1	51,767	1,811,081	49,421	1,747,183	57,050	1,848,947
Rep 2	49,713	1,753,932	46,856	1,711,572	61,047	1,895,010
Rep 3	46,522	1,669,043	52,158	1,825,667	61,282	1,945,197
Nonlabled derivatives (m/z 112)						
Rep 1	43,065	1,811,123	45,236	1,752,183	61,887	1,840,460
Rep 2	47,567	1,753,774	42,980	1,711,565	62,336	1,894,809
Rep 3	45,349	1,668,740	47,044	1,825,911	68,804	1,945,353

* Rep หมายถึงซ้ำในการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง. 5 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมในแคลลัสของเตยหอม เมื่อแช่ในน้ำกลั่น สารละลาย L-poline และสารละลาย ^{15}N-L-proline

มวลต่อประจุ (m/z)	พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP ในแคลลัสของเตยหอม					
	แช่ในน้ำกลั่น (control)		แช่ในสารละลาย L-proline		แช่ในสารละลาย ^{15}N-L-proline	
	2AP	TMP	2AP	TMP	2AP	TMP
Labled derivatives (m/z 111)						
Rep* 1	75,894	838,255	100,068	916,265	135,552	795,889
Rep 2	76,792	842,531	98,045	893,987	139,453	814,859
Rep 3	82,450	895,923	106,985	986,291	144,984	840,428
Nonlabled derivatives (m/z 112)						
Rep 1	73,685	838,242	96,755	916,098	139,547	795,958
Rep 2	74,133	842,562	94,883	893,950	143,749	814,944
Rep 3	79,569	895,854	103,718	986,199	149,152	840,530

* Rep หมายถึงซ้ำในการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง. 6 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมในใบของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อแช่ในน้ำกลั่น สารละลาย L-poline และสารละลาย ^{15}N-L-proline

มวลต่อประจุ (m/z)	พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP ในใบข้าวขาวดอกมะลิ 105					
	แช่ในน้ำกลั่น (control)		แช่ในสารละลาย L-proline		แช่ในสารละลาย ^{15}N-L-proline	
	2AP	TMP	2AP	TMP	2AP	TMP
Labled derivatives (m/z 111)						
Rep* 1	5,630	565,293	6,153	587,763	6779	582,122
Rep 2	6,244	571,088	5,603	527,560	6768	571,482
Rep 3	5,106	539,483	6,239	619,783	6495	670,779
Nonlabled derivatives (m/z 112)						
Rep 1	5,310	565,253	5,851	687,743	7,080	582,141
Rep 2	5,070	571,097	6,302	627,538	7,155	571,491
Rep 3	5,806	539,614	6,933	619,835	7,676	670,663

* Rep หมายถึงซ้ำในการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง. 7 พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP จากโครมาโทแกรมในแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อแช่ในน้ำกลั่น สารละลาย L-poline และสารละลาย ^{15}N-L-proline

มวลต่อประจุ (m/z)	พื้นที่ใต้ peak ของสาร 2AP และ TMP ในแคลลัสของข้าวขาวดอกมะลิ 105					
	แช่ในน้ำกลั่น (control)		แช่ในสารละลาย L-proline		แช่ในสารละลาย ^{15}N-L-proline	
	2AP	TMP	2AP	TMP	2AP	TMP
Labled derivatives (m/z 111)						
Rep* 1	1,466	840,589	1,469	816,030	2,314	844,356
Rep 2	1,487	802,891	1,492	809,194	2,244	846,165
Rep 3	1,444	803,816	1,418	791,247	2,398	845,796
Nonlabled derivatives (m/z 112)						
Rep 1	1,401	840,582	1,450	815,966	2,348	844,287
Rep 2	1,438	802,953	1,358	809,102	2,463	847,037
Rep 3	1,383	803,769	1,522	791,110	2,435	845,760

* Rep หมายถึงซ้ำในการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ง. 8 พื้นที่ใต้ peak ของสาร TMP จากโครมาโทแกรมที่ได้จากการขั้นตอนการสกัด 2AP ที่ศึกษาและที่ได้จากการฉีดสาร TMP โดยตรง

Replication	พื้นที่ใต้ peak ของสาร TMP	
	จากการขั้นตอนการสกัด 2AP	จากการฉีดสาร TMP โดยตรง
1	5,297,077	6,254,522
2	6,068,574	6,728,560
3	5,958,109	6,810,256
4	5,905,462	6,213,080
5	5,933,730	6,841,154

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศรัญญา ชัยจำรัส เกิดเมื่อวันที่ 4 มีนาคม 2525 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาคต้น ปีการศึกษา 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย