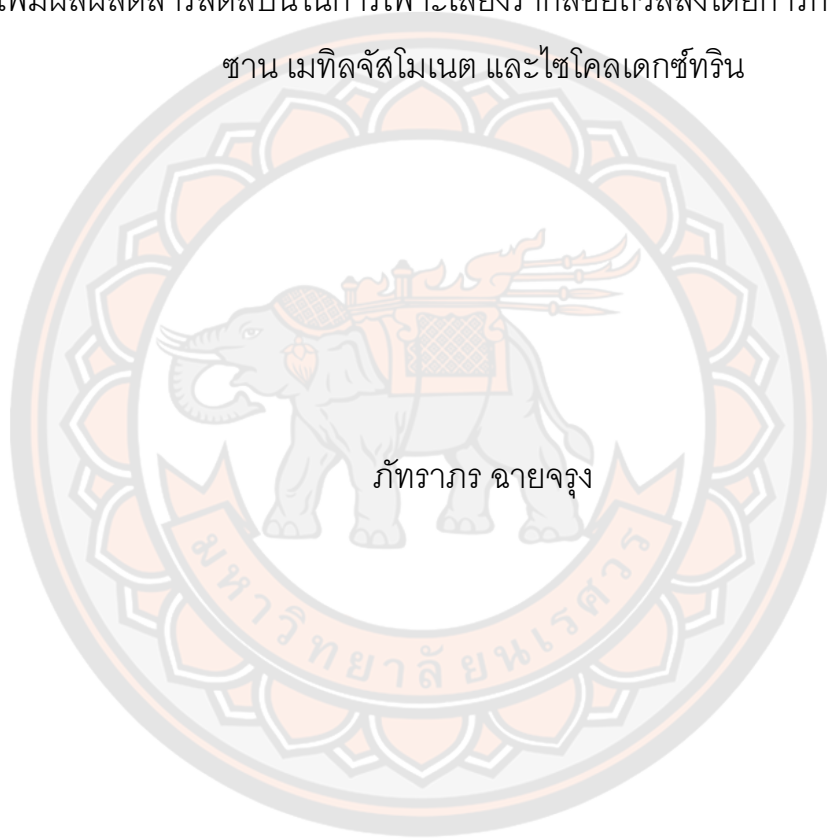




การเพิ่มผลผลิตสารสเตียรอยด์ในการเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงโดยการกระตุ้นด้วยไคโตซาน เมทิลจัสโมเนต และไซโคลเดกซ์ทริน



ภัทราภร ฉายจรุง

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมี  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การเพิ่มผลผลิตสารสเตอรินในการเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงโดยการกระตุ้นด้วยไคโต  
ซาน เมทิลจัสโมเนต และไซโคลเดกซ์ทริน



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมี  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การเพิ่มผลผลิตสารสตีลบินในการเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงโดยการกระตุ้น  
ด้วยโคโคซาน เมทิลจัสโมเนต และไซโคลเดกซ์ทรีน"

ของ ภัทราภร ฉายจรุง

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

### คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์  
(ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ ภูตะดุน)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิรักษ์ ลิ้มมงคล)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดามรัศมน สุรางกูร)

อนุมัติ

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

<b>ชื่อเรื่อง</b>	การเพิ่มผลผลิตสารสตีลปินในการเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงโดย การกระตุ้นด้วยไคโตซาน เมทิลจัสโมเนต และไซโคลเดกซ์ทริน
<b>ผู้วิจัย</b>	ภัทราภร นายจรุง
<b>ประธานที่ปรึกษา</b>	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภินันท์ ลิ้มมงคล
<b>กรรมการที่ปรึกษา</b>	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด
<b>ประเภทสารนิพนธ์</b>	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2563
<b>คำสำคัญ</b>	ไคโตซาน, รากลอยถั่วลิสง, สารต้านอนุมูลอิสระ, สารสตีลปิน

### บทคัดย่อ

การเพิ่มผลผลิตสารกลุ่มสตีลปินในรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องอาศัย  
กระบวนการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่เหมาะสมเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิตสารในปริมาณมาก  
งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาดังกล่าวที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงสายพันธุ์กาฬสินธุ์ 2  
ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1) ไคโตซาน (CHT) 2) เมทิลจัสโมเนต (MeJA) ร่วมกับ ไซโคลเดกซ์ทริน (CD)  
(MeJA+CD) 3) CHT\_(MeJA+CD) 4) (MeJA+CD)\_CHT และ 5) CHT+MeJA+CD ผล  
การศึกษาพบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น  
CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณสารกลุ่มสตีลปินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุด  
จากผลการศึกษาดังกล่าวได้ทำการศึกษากลไกการตอบสนองต่าง ๆ ต่อสภาวะเครียดออกซิเดชัน  
ในระบบขวดเขย่า พบว่าสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นที่ระยะเวลา 72  
ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS และ FRAP สูงที่สุด เท่ากับ  
506.33±28.43 ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 60.38±33.48 มิลลิกรัม ascorbic  
acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์กำจัดอนุมูล hydrogen peroxide สูง มี  
ค่า IC50 เท่ากับ 76.67±2.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด  
สูงที่สุด เท่ากับ 42.51±9.96 มิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อตรวจสอบการ  
แสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR พบว่าเนื้อเยื่อรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นที่ระยะเวลา 24  
ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ กลุ่มยีน  
เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืชสูง  
ที่สุด โดยการแสดงออกของยีนทุกกลุ่มจะลดลงเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น ผลการ  
เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตสารกลุ่มสตีลปินที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในระบบขวดเขย่าและ

ระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า ปริมาณสารกลุ่มสตีลบิน ได้แก่ *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ มีค่าน้อยกว่าในระบบขวด เขย่าคิดเป็น 0.62, 0.25 และ 0.44 เท่า ตามลำดับ ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า การกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD พร้อมกัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารกลุ่มสตีลบินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ในปริมาณสูงและสามารถเหนี่ยวนำให้รากลอยถั่วลิสงเกิดการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่ได้รับด้วยกลไกป้องกันตนเองทั้งในระบบเอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถนำผลการศึกษาดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสารกลุ่มสตีลบินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในระดับอุตสาหกรรมทางการแพทย์ต่อไป

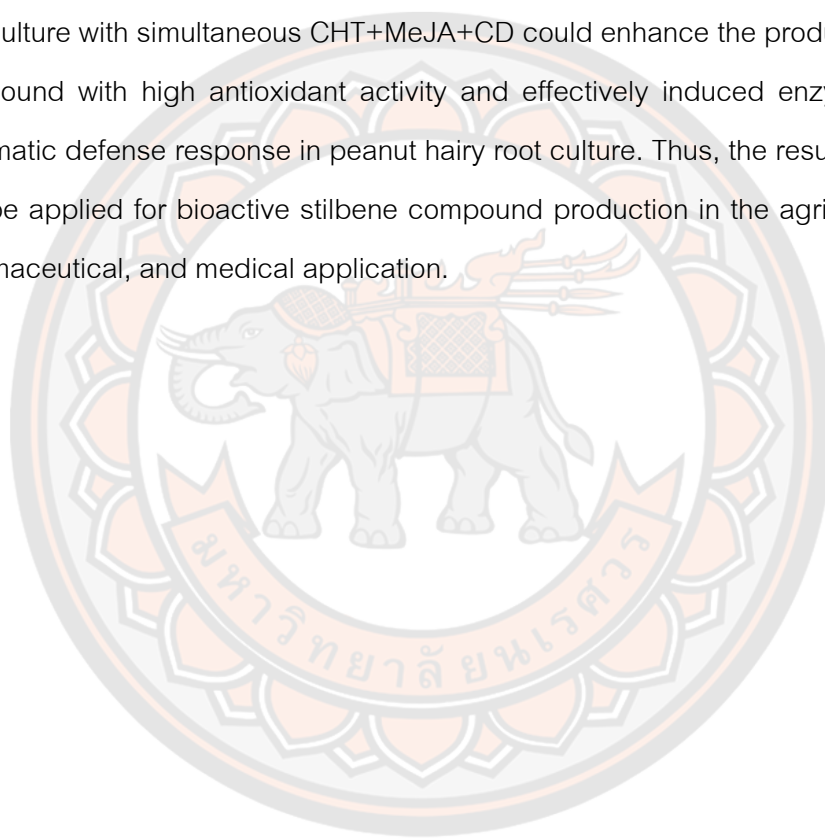


<b>Title</b>	ENHANCEMENT OF STILBENE PRODUCTION IN PEANUT HAIRY ROOT CULTURE BY CHITOSAN, METHYL JASMONATE AND CYCLODEXTRIN ELICITATION
<b>Author</b>	PHADTRAPHORN CHAYJARUNG
<b>Advisor</b>	Assistant Professor Apinun Limmongkon, Ph.D.
<b>Co-Advisor</b>	Assistant Professor Anupan Kongbangkerd, Ph.D.
<b>Academic Paper</b>	Thesis M.S. in Biochemistry, Naresuan University, 2020
<b>Keywords</b>	Antioxidant, Chitosan, Peanut hairy root, Stilbene

### ABSTRACT

Enhancement of stilbene compound production in peanut hairy root culture requires an elicitation process with suitable elicitor to induce a high yield of these compound production. This research focus on the study of the suitable elicitor for Kalasin 2 peanut hairy root culture. The hairy roots were treated with different elicitors as following; 1) CHT alone (CHT), 2) combination of MeJA and CD (MeJA+CD), 3) CHT followed by a combination of MeJA and CD (CHT\_(MeJA+CD)), 4) combination of MeJA and CD followed by CHT ((MeJA+CD)\_CHT) and 5) combination of CHT, MeJA and CD (CHT+MeJA+CD). The peanut hairy root culture medium crude extract elicited with CHT+MeJA+CD for 72h resulted in the highest amount of stilbene compound with the highest biological activity. The various oxidative stress defense mechanisms in shake flask were subsequently studied. The result showed that the culture medium crude extract elicited with CHT+MeJA+CD for 72h exhibited the highest antioxidant capacity measured by ABTS and FRAP with the value of  $506.33 \pm 28.43$   $\mu\text{mol Trolox/g dry weight}$  and  $60.38 \pm 33.48$   $\text{mg ascorbic acid/g dry weight}$ , respectively. In addition, the highest hydrogen peroxide scavenging activity with IC<sub>50</sub> value of  $76.67 \pm 2.89$   $\text{ug/ml}$  and the highest amount of total phenolic compound with  $42.51 \pm 9.96$   $\text{mg gallic acid/g dry weight}$  were detected. The gene expression result using real-time PCR method demonstrated that peanut hairy root tissue elicited with CHT+MeJA+CD for 24h exhibited the highest

expression level of secondary metabolite biosynthesis genes, antioxidant enzyme genes, and pathogenesis-related protein genes. All gene expression levels were decreased upon the elicitation time. The efficiency of stilbene compound production at 72h in the shake flask and bioreactor was compared and the result indicated that the amount of stilbene compounds such as *trans*-resveratrol, *trans*-arachidin-1, and *trans*-arachidin-3 produced in the bioreactor was less than the shake flask with 0.62, 0.25 and 0.44 fold, respectively. This result can be concluded that the elicitation of peanut hairy root culture with simultaneous CHT+MeJA+CD could enhance the production of stilbene compound with high antioxidant activity and effectively induced enzymatic and non-enzymatic defense response in peanut hairy root culture. Thus, the result from this study can be applied for bioactive stilbene compound production in the agricultural industry, pharmaceutical, and medical application.



## ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภินันท์ ลิ้มมงคล ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาใช้เวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษาพร้อม ทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณ คณะกรรมการวิทยานิพนธ์ อันประกอบไปด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ตามรัศมี สว่างกูร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และขอกราบ ขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ ภูตะสุน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

ขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ที่ได้มอบ ทุนอุดหนุนโครงการทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ประจำปี งบประมาณ 2563 จึงทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ ครอบครัว ฉายจริง ประกอบไปด้วย บิดา มารดา และ พี่สาว ของผู้วิจัยที่ให้อำนาจใจและการสนับสนุนในทุก ๆ ด้านอย่างดีที่สุดตลอดจนสำเร็จการศึกษา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มี พระคุณทุก ๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปต่อยอดการเพิ่ม ผลิตผลผลิตสารกลุ่มสตีลบินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณสูงและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้าน อุตสาหกรรม การแพทย์ และเภสัชกรรม และสามารถศึกษาต่อยอดกลไกการป้องกันตนเองและ ตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ ของพืชในเชิงลึกได้ต่อไป

ภัทรภร ฉายจริง



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ท
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
สารอนุมูลอิสระ.....	5
ความต้านทานโรคและกลไกการตอบสนองของพืช.....	6
การสังเคราะห์สารทุติยภูมิ.....	8
ถั่วลิสง.....	12
กลไกการเกิดรากลอย.....	14
การเพิ่มผลผลิตเนื้อเยื่อพืชและการผลิตสารทุติยภูมิ.....	18
ตัวกระตุ้น.....	21

บทที่ 3 วิธีการดำเนินวิจัย.....	26
วัสดุและเครื่องมือ .....	26
สารเคมี.....	27
วิธีการทดลอง.....	29
บทที่ 4 ผลการวิจัย .....	45
ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวกระตุ้นไคโตซานในการกระตุ้นรากลอย ถั่วลิสงเพาะเลี้ยง .....	45
ผลการศึกษาตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยง .....	56
ผลการกระตุ้นและกลไกการตอบสนองของรากลอยถั่วลิสงต่อสภาวะเครียดออกซิ เดชั่นเมื่อได้รับตัวกระตุ้นด้วย CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่า.....	70
ผลการศึกษาเปรียบเทียบการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงต่อการสร้างสารกลุ่ม สติลบินในระบบขวดเขย่า และระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ .....	90
ผลการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสง	103
บทที่ 5 บทสรุป.....	106
สรุปผลการทดลอง .....	106
อภิปรายผล .....	109
ข้อเสนอแนะ.....	116
บรรณานุกรม .....	117
ภาคผนวก.....	126
ประวัติผู้วิจัย .....	190

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ลำดับ primer สำหรับการทดสอบการแสดงออกของยีน .....	37
ตาราง 2 ส่วนผสมของ assay solution ของการทดสอบเอนไซม์ SOD.....	40
ตาราง 3 ส่วนผสมของการทดสอบเอนไซม์ SOD .....	41
ตาราง 4 ส่วนผสมของการทดสอบเอนไซม์ CAT .....	42
ตาราง 5 ส่วนผสมของการทดสอบเอนไซม์ APX.....	44
ตาราง 6 ลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นชนิด CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม .....	46
ตาราง 7 ลักษณะสีของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นชนิด CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....	47
ตาราง 8 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD ด้วยวิธี ABTS.....	48
ตาราง 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย ถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD ด้วยวิธี total phenolic compound .....	50
ตาราง 10 ปริมาณสารกลุ่มสติลบินของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD .....	53

ตาราง 11 ลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....	57
ตาราง 12 ลักษณะสีของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม .....	58
ตาราง 13 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี ABTS.....	60
ตาราง 14 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี FRAP.....	62
ตาราง 15 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย ถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี total phenolic compound.....	64
ตาราง 16 ปริมาณสารกลุ่มสติลบินของสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง .....	67
ตาราง 17 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี ABTS.....	71
ตาราง 18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี FRAP.....	73

ตาราง 19 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี hydrogen peroxide scavenging.....	75
ตาราง 20 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรา กลอย ถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี total phenolic compound.....	77
ตาราง 21 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ SOD ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสง เพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	79
ตาราง 22 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ CAT ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสง เพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	81
ตาราง 23 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ APX ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสง เพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง.....	83
ตาราง 24 ลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระบบขวดเขย่า เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....	90
ตาราง 25 ลักษณะของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้น ด้วย ตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระบบ ขวด เขย่า เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....	91
ตาราง 26 ลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....	92

- ตาราง 27 ลักษณะของอาหารเพาะเลี้ยงและเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงภายหลังการ  
กระตุ้น ด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงใน  
ระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....93
- ตาราง 28 ปริมาณสารกลุ่มสเตียรอยด์ของสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่  
ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72  
ชั่วโมงในระบบขวดเขย่า ..... 94
- ตาราง 29 ปริมาณสารกลุ่มสเตียรอยด์ของสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่  
ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72  
ชั่วโมงใน ระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....97
- ตาราง 30 ปริมาณสารกลุ่มสเตียรอยด์ของสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่  
ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง  
เปรียบเทียบในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ..... 99

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 การเกิดอนุมูลอิสระ .....	6
ภาพ 2 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ .....	7
ภาพ 3 การสังเคราะห์สารทุติยภูมิ .....	9
ภาพ 4 โครงสร้างของสตีลบิน .....	10
ภาพ 5 โครงสร้างอนุพันธ์ของการประกอบกลุ่มสตีลบิน .....	10
ภาพ 6 การสังเคราะห์สารกลุ่มสตีลบิน .....	12
ภาพ 7 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วลิสง .....	13
ภาพ 8 ลักษณะเมล็ดของถั่วลิสงสายพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 .....	14
ภาพ 9 ลักษณะของรากลอย .....	15
ภาพ 10 ลักษณะของเชื้อ <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	15
ภาพ 11 Ri-plasmid ของเชื้อ <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	17
ภาพ 12 กลไกการถ่ายโอนยีนของเชื้อ <i>Agrobacterium rhizogenes</i> เข้าสู่พืช .....	18
ภาพ 13 โครงสร้างของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ .....	20
ภาพ 14 โครงสร้างของเมทิลจัสโมเนต .....	22
ภาพ 15 การสังเคราะห์เมทิลจัสโมเนตภายในเซลล์พืช .....	22
ภาพ 16 โครงสร้างของเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน .....	23
ภาพ 17 โครงสร้างเคมีของไคติน และไคโตซาน .....	24
ภาพ 18 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่ว ลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้น A) 50 mg/L, B) 100 mg/L, C)	

150 mg/L และ D) 200 mg/L ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค HPLC .....	45
ภาพ 19 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD ด้วยวิธี ABTS .....	49
ภาพ 20 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยง รากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD ด้วยวิธี total phenolic compound .....	51
ภาพ 21 โคโรมาโตแกรมของสารมาตรฐาน (A) <i>trans</i> -resveratrol, (B) <i>trans</i> -arachidin-1 และ (C) <i>trans</i> -arachidin-3.....	52
ภาพ 22 ปริมาณของสาร (A) <i>trans</i> -resveratrol, (B) <i>trans</i> -arachidin-1 และ (C) <i>trans</i> -arachidin-3 ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD.....	55
ภาพ 23 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี ABTS .....	61
ภาพ 24 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี FRAP.....	63
ภาพ 25 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี total phenolic compound .....	65



ภาพ 26 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ..... 69

ภาพ 27 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี ABTS ..... 72

ภาพ 28 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี FRAP ..... 74

ภาพ 29 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี hydrogen peroxide scavenging ..... 76

ภาพ 30 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี total phenolic compound ..... 78

ภาพ 31 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ SOD ในเนื้อเยื่อรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ..... 80

ภาพ 32 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ CAT ในเนื้อเยื่อรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ..... 82

ภาพ 33 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ APX ในเนื้อเยื่อรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ..... 84

ภาพ 34 ค่า fold change ของการแสดงออกของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิกลุ่มสเตอรอยด์ในเนื้อเยื่อรกของตัวลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ..... 86

ภาพ 35 ค่า fold change ของการแสดงออกของยีนกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อรกของตัวลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ..... 87

ภาพ 36 ค่า fold change ของการแสดงออกของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืชในเนื้อเยื่อรกของตัวลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ..... 89

ภาพ 37 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรกของตัวลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระบบขวดเขย่า ..... 96

ภาพ 38 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรกของตัวลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ..... 98

ภาพ 39 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* (หน่วย mg/g dry weight) ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยง รกของตัวลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ..... 101

ภาพ 40 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* (หน่วย mg/L) ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรกของตัวลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ..... 102

ภาพ 41 ลักษณะของกลุ่มสารบริเวณพื้นผิวเนื้อเยื่อรากลอยและสีของอาหาร  
 เพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง A) ชุดควบคุม และ B) ชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย  
 ตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในระบบเครื่องปฏิกรณ์  
 ชีวภาพ.....104

ภาพ 42 ลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างของรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงชุดควบคุม (A-  
 B) กำลังขยาย 50X และ 100X ตามลำดับ เนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการ  
 กระตุ้นด้วย CHT, MeJA และ CD (C-E) กำลังขยาย 50X, 200X และ 500X  
 ตามลำดับ และกลุ่มของสารสีเหลืองบริเวณพื้นผิวของรากลอยที่ได้รับการ  
 กระตุ้น (F-J) กำลังขยาย 30X, 50X, 100X, 500X และ 1000X ตามลำดับ.....105



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาของปัญหา

สารกลุ่มสติลบินเป็นสารทุติยภูมิกลุ่มโพลีฟีนอลิก ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกและจัดเป็นสารไฟโตอเล็กซิน เนื่องจากพืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันเชื้อโรค แมลง หรือป้องกันความเครียดที่เกิดขึ้น ตัวอย่างการสร้างสาร *trans-resveratrol* พบได้มากในพืชตระกูลองุ่นตระกูลเบอร์รี่ และถั่วลิสง (Medina-Bolivar et al., 2007) นอกจากนี้ยังสามารถพบสารสติลบินกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ซึ่งเป็นสารสำคัญพบได้เฉพาะในถั่วลิสงเท่านั้น และมีรายงานการศึกษาพบว่าสารกลุ่มสติลบินมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ อาทิ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ ช่วยชะลอความชรา (Chang et al., 2006; Huang et al., 2010; Sales & Resurreccion, 2014; Garcia et al., 2016)

จากรายงานการศึกษาก่อนหน้า พบว่า ถั่วลิสงสายพันธุ์กาฟลินธุ์ 2 ที่เพาะในโรงเพาะในระยะเวลาต่าง ๆ กัน จะมีการสะสมของสารทุติยภูมิในกลุ่มสติลบิน ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และมีสารในกลุ่มโพลีฟีนอลิกปริมาณสูง (Limmongkon et al., 2018) จึงได้มีการประยุกต์เทคโนโลยีทางชีวภาพด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงรากลอย (hairy root culture) ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีศักยภาพสูงในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตนเองจากการบุกรุกหรือทำลายจากแมลง เชื้อโรค และสารเคมี โดยรากลอยมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในสภาวะที่ไม่มีฮอร์โมน มีความเสถียรทางพันธุกรรมสูง และสามารถเป็นเนื้อเยื่อตั้งต้นในการผลิตสารทุติยภูมิได้ในปริมาณมาก (Giri & Narasu, 2000) และได้มีรายงานการศึกษา พบว่า รากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงสามารถผลิตสาร *trans-resveratrol* และสารกลุ่มสติลบินทั้ง *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ได้ (Abbott et al., 2010; Condori et al., 2010)

โดยปกติเมื่อพืชได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยรวมถึงสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ ความแห้งแล้ง โลหะหนัก อุณหภูมิ สารเคมี แมลง เชื้อโรค จะส่งผลให้พืชเกิดสภาวะเครียด (oxidative stress) และมีผลกระตุ้นกลไกในการตอบสนองของพืชเพื่อวัตถุประสงค์ในการปกป้องตัวเอง ได้แก่ กลไกที่ใช้เอนไซม์ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) หรือ glutathione peroxidase (GPX) และกลไกที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น ไฟโตอเล็กซิน (โพลีฟีน

ในลิก ฟลาโวนอยด์) โปรตีนที่ตอบสนองต่อเชื้อโรค (PR protein) วิตามินซี วิตามินอี (Gill & Tuteja, 2010) ซึ่งในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ตัวกระตุ้นเพื่อกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงให้มีการสร้างสารทุติยภูมิในปริมาณมาก จากรายงานการศึกษาของ Yang และคณะ (2015) พบว่าตัวกระตุ้นเมทิลจัสโมเนต (MeJA) ร่วมกับ ไซโคลเดกซ์ทริน (CD) สามารถกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงให้สร้างสารกลุ่มสติลบินในปริมาณมาก โดย MeJA เป็นตัวกระตุ้นการส่งสัญญาณ (signal transduction) ภายในเซลล์ของพืช ส่วน CD มีโครงสร้างคล้ายผนังเซลล์ของเชื้อราและมีความสามารถในการปกป้องสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นได้ นอกจากนี้งานวิจัยที่มีการใช้แคดเมียม (Cd) เป็นตัวกระตุ้นร่วมกับ MeJA และ CD (Pilaisangsuree et al., 2020) และงานวิจัยของ Somboon และคณะ (2019) ที่มีการใช้พาราควอต (PQ) เป็นตัวกระตุ้นร่วมกับ MeJA และ CD พบว่า รากลอยที่ได้รับการกระตุ้นจากตัวกระตุ้น Cd ร่วมกับ MeJA และ CD และตัวกระตุ้น PQ ร่วมกับ MeJA และ CD สามารถสร้างสารในกลุ่มสติลบินในปริมาณมากกว่าตัวกระตุ้นร่วม MeJA และ CD เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม Cd เป็นโลหะหนักที่เป็นพิษ และ PQ เป็นสารเคมีปราบวัชพืช ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์และอาจจะมีผลต่อการนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ได้ ดังนั้นในการศึกษานี้จะทำการศึกษากำหนดตัวกระตุ้นไคโตซาน (CHT) ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ พบได้ในเปลือกของสัตว์ เช่น กุ้ง แมลง รวมทั้งผนังของเซลล์รา เป็นสารชีวภาพที่มีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและราคาไม่แพง เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นตัวกระตุ้นได้ และจากตัวอย่างการศึกษาการใช้ CHT กระตุ้นรากลอยของ *Artemisia annua* L. ในการผลิตสาร artemisinin พบว่า สามารถผลิตสารได้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (Putalun et al., 2007)

นอกจากนี้ในระดับอุตสาหกรรม การเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิจากเนื้อเยื่อรากลอยจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากลอยให้ได้จำนวนมาก เพื่อให้รากลอยสามารถผลิตสารในปริมาณมากตามที่ต้องการได้ เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำไปประยุกต์เพื่อเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อรากลอยให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิในปริมาณมากได้ เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถควบคุมสภาวะและปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรากลอยได้ (Khan, Siddiqui, & Osama, 2018) และได้มีรายงานการศึกษาพบว่า การเลี้ยงรากลอยในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ สามารถเพิ่มปริมาณการสร้างสารทุติยภูมิ boeravinone B และ eupalitin จากรากลอย *Boerhaavia diffusa* L. ได้สูงกว่าการเลี้ยงรากลอยในระบบขวดเขย่า คิดเป็น 6.1 และ 1.15 เท่า ตามลำดับ (Gupta et al., 2016)

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของตัวกระตุ้นที่เหมาะสมที่ทำให้รากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงสามารถผลิตสารกลุ่มสตีลบินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ในปริมาณสูง ทั้งในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ และศึกษาการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ การแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการปกป้องตนเองในรากลอยถั่วลิสงสายพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 ที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญและเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ชนิดของตัวกระตุ้นและนำไปพัฒนาเพื่อเพิ่มผลผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญต่อไป

### จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาผลของตัวกระตุ้นที่ทำให้รากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงสามารถผลิตสารในกลุ่มสตีลบินได้ในปริมาณสูง
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้น
3. เพื่อศึกษากลไกการป้องกันตนเองทั้งในระบบยีนและระบบเอนไซม์ของรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้น
4. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตสารกลุ่มสตีลบินในรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

### ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาผลของตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงสายพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 ให้สามารถผลิตสารกลุ่มสตีลบินในปริมาณสูงด้วยระบบขวดเขย่า โดยตรวจสอบเชิงปริมาณด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้น ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ได้แก่ resveratrol synthase (*RS*) phenylalanine lyase (*PAL*), ethylene-responsive element binding factor (*ERF1* และ *ERF6*) ยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase (*SOD*), ascorbate peroxidase (*APX*) และ glutathione peroxidase (*GPX*) และยีนโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคของพืช ได้แก่ pathogenesis-related protein (*PR4A*, *PR5* และ *PR10*), chitinase (*Chi*) ด้วยเทคนิค real time PCR ตรวจสอบระบบการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ *SOD*, *APX* และ catalase (*CAT*) โดยวิธี enzyme activity assay

โดยเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุม และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตของการเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงด้วยระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

### สมมติฐานของการวิจัย

ตัวกระตุ้นที่เหมาะสมสามารถกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงให้สามารถผลิตสารกลุ่มสตีลบินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีสารประกอบโพลีฟีนอลิกในปริมาณสูงได้ และส่งผลกระทบต่อกลไกการป้องกันตนเองของรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงทั้งในระบบเอนไซม์และระบบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิและกระบวนการป้องกันตนเอง และสามารถเพิ่มผลผลิตสารกลุ่มสตีลบินโดยการเพาะเลี้ยงและกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วยสภาวะที่เหมาะสมในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพได้



## บทที่ 2

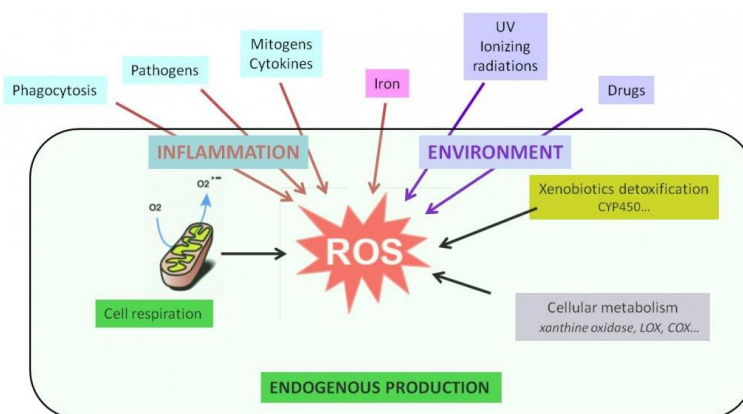
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในธรรมชาติพืชมักได้รับภาวะคุกคามจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมี ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไป โดยสิ่งแวดล้อมเหล่านั้นประกอบด้วยสิ่งที่ไม่มีชีวิต (abiotic stress) ได้แก่ น้ำ อุณหภูมิ ความเค็ม รังสียูวี สารเคมี เป็นต้น และสิ่งมีชีวิต (biotic stress) ได้แก่ แมลงศัตรูพืช เชื้อโรค แบคทีเรีย เป็นต้น ซึ่งมีผลทำให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์พืชและก่อให้เกิดสภาวะเครียดขึ้น ทำให้เซลล์พืชเสียหาย โปรตีนเสื่อมสภาพ สายดีเอ็นเอเกิดการแตกหัก และมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ จนอาจเป็นผลให้พืชหยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด (Rejeb, Pastor, & Mauch-Mani, 2014)

#### สารอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่วงรอบนอกสุด จะเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมหรือโมเลกุลแตกออก ทำให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้นไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) อนุมูลอิสระส่วนใหญ่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจน จะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนในกลุ่มของ Reactive Oxygen Species (ROS) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาและอยู่ในรูปออกไซด์ที่มีออกซิเจนเป็นศูนย์กลาง ได้แก่ hydroxyl radical ( $\text{OH}^\cdot$ ), superoxide radical ( $\text{O}_2^\cdot$ ), hydroperoxyl radical ( $\text{HOO}^\cdot$ ) เป็นต้น (Gill & Tuteja, 2010) โดย ROS เกิดขึ้นได้จาก 2 ปัจจัยหลัก คือ ปัจจัยภายในร่างกายที่เกิดจากการใช้ออกซิเจนในกระบวนการทางเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของเซลล์ตลอดเวลา เช่น กระบวนการสร้างพลังงาน การเผาผลาญอาหาร รวมทั้งกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ หรือเกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น รังสียูวี ไอโซน ควันท่อไอเสีย กระบวนการเฟ้นตอนของเหล็ก ยา รวมทั้งสารเคมี หรือ เชื้อโรคต่าง ๆ ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น (ภาพ 1)





ภาพ 1 การเกิดอนุมูลอิสระ

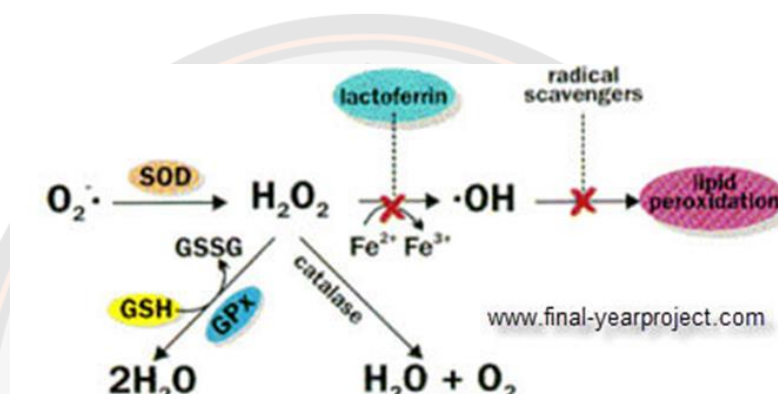
ที่มา: <http://metabiolab.com/metabolism-at-a-glance/oxidative-stress-2/>

หากมีกระบวนการต่าง ๆ มากเกินไปหรือร่างกายมีภาวะของสารต้านอนุมูลอิสระน้อย จะทำให้มีการสะสมของ ROS มากขึ้น ซึ่งมีความไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างทันที ส่งผลให้เกิดภาวะเครียด หากเกิดในระยะเวลาดังนั้น ๆ จะไม่ส่งผลต่อสุขภาพมาก แต่หากเกิดเป็นเวลานานจะทำให้มีความเสี่ยงที่จะไปทำลายเนื้อเยื่อ โปรตีน รวมถึงดีเอ็นเอ และนำไปสู่กระบวนการเกิดโรคต่าง ๆ ตามมา เช่น โรคประสาทส่วนกลาง มะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น (Irshad & Chaudhuri, 2002)

### ความต้านทานโรคและกลไกการตอบสนองของพืช

เมื่อพืชได้รับสารเคมี เชื้อโรค หรือการถูกทำลายจากสิ่งแวดล้อมต่างชนิดกัน ทำให้พืชเกิดภาวะเครียดหรืออนุมูลอิสระภายในเซลล์ ซึ่งจะส่งผลให้มีการสร้างกลไกในการต้านทานต่อสิ่งที่รับแตกต่างกัน โดยการต้านทานของพืชจำแนกได้ 2 ประเภท ประเภทแรก คือ ความต้านทานที่มีอยู่แล้วในพืช (pre-formed resistance หรือ constitutive resistance) โดยพืชจะใช้โครงสร้างของพืชเป็นเกราะป้องกันชั้นแรกของพืช (Buchanan, Gruissem, & Jones, 2000) ได้แก่ ความหนาและความแข็งแรงของผนังเซลล์ชั้นต่าง ๆ ที่ปกคลุมบริเวณลำต้นและผิวใบ จำนวนขนใบที่หนาแน่น หรือจำนวนของปากใบ ความต้านทานประเภทที่สอง คือ ความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้น (induced resistance) คือ เป็นความต้านทานที่พืชถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองหลังจากการถูกทำลายโดยสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชมีได้หลายกลไก อาทิ กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยระบบเอนไซม์ ซึ่งจะมีเอนไซม์

superoxide dismutase (SOD) เข้ามาเปลี่ยน superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) ให้กลายเป็น hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) จากนั้น จะมีเอนไซม์ catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) และ glutathione peroxidase (GPX) เข้ามาเปลี่ยน hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำ ( $H_2O$ ) และออกซิเจน ( $O_2$ ) เพื่อลดความเป็นพิษให้กับเซลล์ (ภาพ 2) หรือระบบที่ไม่ใช่เอนไซม์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี กลูตาไธโอน กรดยูริก บิลิรูบิน สารพลาไวโนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก เช่น เรสเวอราทรอลและสารกลุ่มสตีลบิน เป็นต้น (Irshad & Chaudhuri, 2002)



ภาพ 2 กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: <http://www.final-yearproject.com/2015/10/comparative-biochemical-study-precursor-differentiated-hematopoietic-cells.html#.Wbsnf8hJblU>

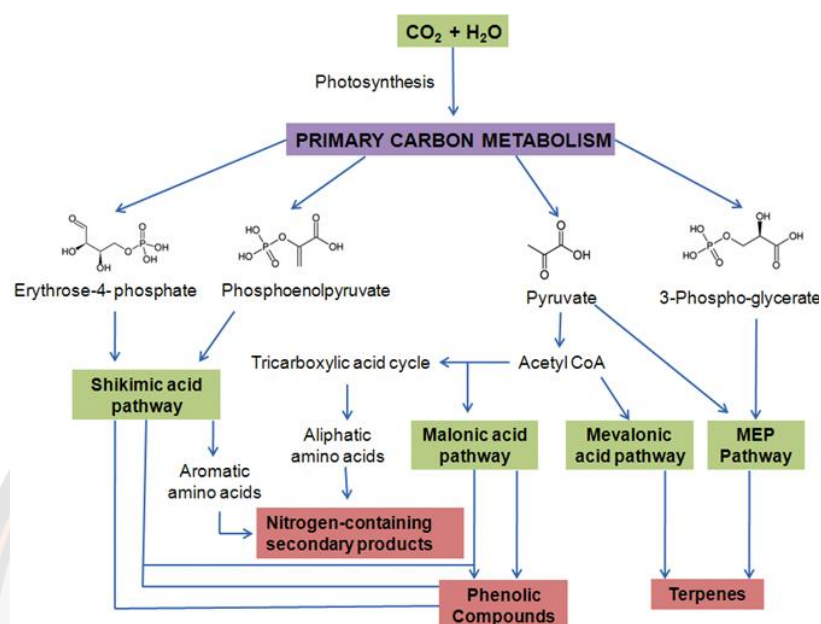
โดยระบบที่ไม่ใช่เอนไซม์นี้ พืชสามารถใช้กลไกการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ซึ่งเป็นสารประกอบที่พืชสร้างขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของพืช (War et al., 2012) แต่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการปกป้องพืชและทำลายศัตรูพืช และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก เทอร์ปีนอยด์ และอะลิฟาติกส์ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคที่เข้าทำลายพืชได้ ซึ่งเรียกสารกลุ่มที่พืชสร้างขึ้นหลังได้รับเชื้อหรือถูกทำลายนี้ว่า สารไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) (Buchanan et al., 2000) โดยมีรายงานการศึกษาการสร้างสารไฟโตอเล็กซินจากการกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์ต่าง ๆ พบว่า เมื่อเมล็ดถั่วลิสงได้รับการบุกรุกจากเชื้อรา แบคทีเรียและยีสต์ เอ็มบริโอของเมล็ดถั่วลิสงมีการผลิตสารกลุ่มสตีลบิน ได้แก่ resveratrol, *trans*-arachidin-1, *trans*-arachidin-3 และ SB-1 ซึ่งเป็นสารไฟโตอเล็กซินในถั่วลิสงสูงขึ้นไปเทียบกับใบเลี้ยง (cotyledons) (Sobolev, 2013)

นอกจากนี้พืชบางชนิดอาจสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหรือโปรตีนพีอาร์ (pathogenesis-related protein; PR protein) ที่มีคุณสมบัติในการต้านทานโรคหรือเชื้อสาเหตุโรคอย่างไม่จำเพาะ ซึ่งมักจะถูกสร้างในการตอบสนองต่อการได้รับเชื้อโรค และ/หรือเกิดสภาวะเครียด โดยกลุ่มโปรตีนนี้สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นจาก ERFs (ethylene response factors) ซึ่งเป็น transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการตอบสนองของพืชเมื่อได้รับเชื้อโรค โดย PR-protein จะเป็นกลุ่ม downstream ของยีน ERF1 ที่สามารถกระตุ้นผ่านสารสื่อสัญญาณฮอร์โมน ethylene (ET) และ jasmonic acid (JA) ซึ่งจะไปกระตุ้นยีน PDF1.2 และสร้างโปรตีนขึ้นมา ขณะที่ ERF6 จะเกี่ยวข้องับกระบวนการ phosphorylation เพื่อให้ยีนทำงานและสามารถกระตุ้นกระบวนการ transcription และ post-translation ต่อไป (Meng et al., 2013) โดยมีการจำแนกโปรตีนตามคุณสมบัติไว้ทั้งหมด 17 กลุ่ม ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้โดยตรง (PR-3,4) เอนไซม์ ribonuclease ที่ช่วยปกป้องโปรตีน (PR-10) เป็นต้น (Sels et al., 2008) จากตัวอย่างการศึกษาพืชมันฝรั่งที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม จะมีการแสดงออกของยีน PR-2 และ PR-3 สูง ซึ่งสามารถต้านทานเชื้อราและช่วยในกระบวนการพัฒนาการเจริญของรากเมื่อเปรียบเทียบกับมันฝรั่งที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (Chye et al., 2005)

### การสังเคราะห์สารทุติยภูมิ

พฤกษเคมีหรือสารประกอบทางเคมีในพืช (phytochemistry) คือ สารประกอบที่พืชสร้างขึ้นด้วยกระบวนการเมทาบอลิซึม รวมทั้งอนุพันธ์ต่าง ๆ ของสารที่ถูกสร้างขึ้นด้วยสารประกอบที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นสามารถจำแนกเป็น 2 ประเภท คือ สารปฐมภูมิ (primary metabolite) เป็นสารที่ได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) รวมทั้งสารอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืช โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ การหายใจ และการสืบพันธุ์ของเซลล์ ได้แก่ สารพวกคาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดอะมิโน โปรตีน วิตามิน เพียวรีน และไพริมิดีน ประเภทที่สอง คือ สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารที่ได้มาจากการนำสารเมทาบอลิ์ปฐมภูมิมาเข้าสู่กระบวนการชีวสังเคราะห์ โดยผ่านกระบวนการต่าง ๆ ได้แก่ methylation, hydroxylation และ glycosylation เพื่อสร้างสารที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิต (ภาพ 3) มีบทบาทสำคัญในการป้องกันตัวเองของพืช และถูกนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมและทางการแพทย์ ได้แก่ สารในกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ฟีนอลิก (phenolics) อะซีโทจีนิน (acetogenins) สเตอรอยด์ (steroids)

และเทอร์พีนอยด์ (terpenoids) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพ ต้านเชื้อรา และต้านไวรัส (Bourguad et al., 2001)

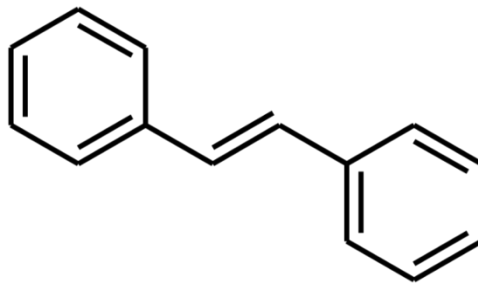


ภาพ 3 การสังเคราะห์สารทุติยภูมิ

ที่มา: <https://nptel.ac.in/courses/102103016/module4/lec31/2.html>

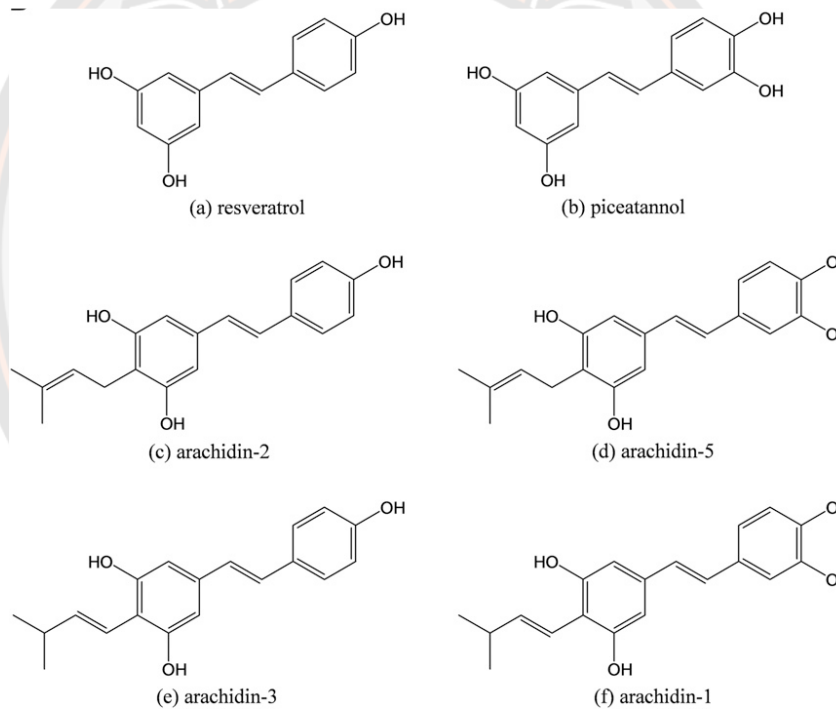
### สารกลุ่มสติลบิน

สารสติลบิน (stilbene) หรือ 1,2-diphenylethylene เป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) (ภาพ 4) พบมากในพืชจำพวกองุ่น พืชตระกูลเบอร์รี่ และถั่วลิสง โครงสร้างภายในที่เป็นวงแหวนอะโรมาติกสองวงสามารถถูกแทนที่ไฮโดรเจนด้วยสารประกอบตัวอื่น ทำให้เกิดสารประกอบที่เป็นอนุพันธ์มากมาย เช่น *trans-resveratrol*(a), *piceatannol*(b), *arachidin-2*(c), *arachidin-5*(d), *arachidin-3*(e), *andarachidin-1*(f) (ภาพ 5a-f) (Yang et al., 2016) โดยสารกลุ่มสติลบินจัดเป็นสารไฟโตอเล็กซิน เนื่องจากพืชจะสร้างขึ้นเพื่อป้องกันเชื้อโรคและแมลงกัดกิน ป้องกันแสงแดด และความเครียดที่เกิดขึ้น (Medina-Bolivar et al., 2007)



ภาพ 4 โครงสร้างของสตีลบิน

ที่มา: [https://en.wikipedia.org/wiki/\(E\)-Stilbene](https://en.wikipedia.org/wiki/(E)-Stilbene)

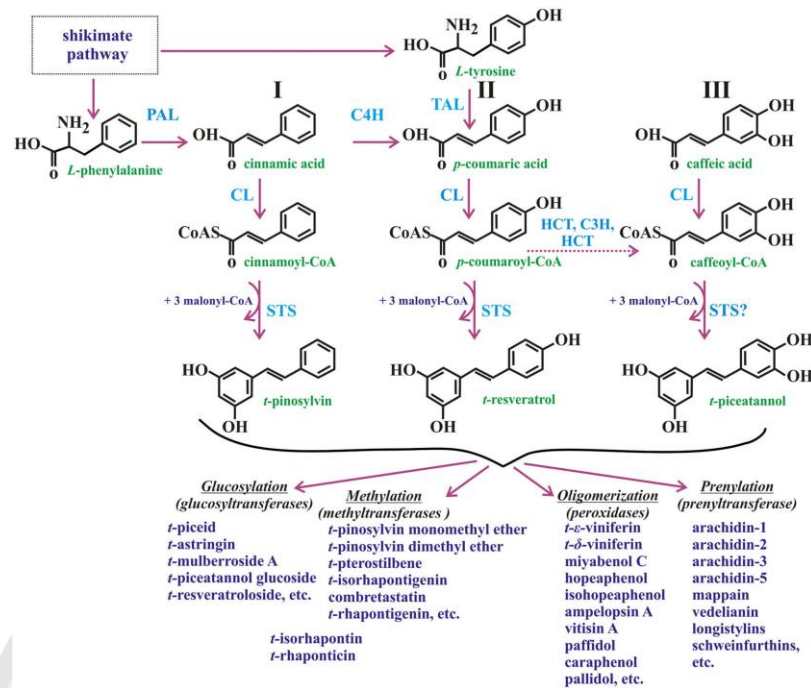


ภาพ 5 โครงสร้างอนุพันธ์ของการประกอบกลุ่มสตีลบิน

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Yang et al., 2016)

### กระบวนการสังเคราะห์สารกลุ่มสติลบิน

กระบวนการสังเคราะห์สารกลุ่มสติลบิน จะใช้ phenylpropanoid pathway เป็นวิถีหลักในการสังเคราะห์ โดย L-phenylalanine ที่ได้จากวิถี shikimate pathway จะถูกเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ดึงหมู่อะมิโน ( $\text{NH}_2$ ) ออกได้เป็นสาร cinnamic acid และถูกเติมหมู่ฟีนอล (OH) ด้วยเอนไซม์ cinnamate 4-hydroxylase (C4H) ได้เป็นสาร *p*-coumaric acid จากนั้นเอนไซม์ coumarate CoA ligase (4CL) จะเติม CoAS แทนที่หมู่ฟีนอลได้เป็น *p*-coumaroyl-CoA โดย *p*-coumaroyl-CoA 1 โมเลกุล จะทำปฏิกิริยากับ malonyl-CoA 3 โมเลกุล มีเอนไซม์ stilbene synthase (STS) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลผลิตเป็นสาร resveratrol ออกมา ดังภาพ 6 (Dubrovina & Kiselev, 2017) นอกจากนี้สาร resveratrol สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารสติลบินกลุ่มอื่นๆ เช่น *trans*-arachidin-1 และ *trans*-arachidin-3 (ภาพ 5e-f) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบได้ในถั่วลิสงเท่านั้น และมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ ช่วยชะลอความชรา (Chang et al., 2006; Sales & Resurreccion, 2014; Yang et al., 2015) จากรายงานการศึกษาที่ก่อนหน้านี้ในถั่วลิสง พบว่า *trans*-arachidin-1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60 cells) เข้าสู่โปรแกรมการตายของเซลล์ได้ดีกว่า *trans*-arachidin-3 และ *trans*-resveratrol (Huang et al., 2010) และจากตัวอย่างการศึกษาในเซลล์มะเร็งเต้านม พบว่า *trans*-arachidin-1 และ *trans*-arachidin-3 สามารถจับกับ cannabinoids receptor ทั้ง CBR1 และ CBR2 ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ขณะที่ *trans*-resveratrol และ piceatannol สามารถจับได้เฉพาะ CBR1 เท่านั้น (Bretons et al., 2012; Yang et al., 2015; Kisková et al., 2019) มีผลทำให้ *trans*-arachidin-1 มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งที่ดีกว่า *trans*-resveratrol



ภาพ 6 การสังเคราะห์สารกลุ่มสติลบิน

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Dubrovina & Kiselev, 2017)

**ถั่วลิสง**

ถั่วลิสง (peanut) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Arachis hypogaea* L. เป็นพืชล้มลุกที่จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว Leguminosae ซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนและกึ่งร้อน ตอนกลางของทวีปอเมริกาใต้ ต่อมากลายเป็นพืชน้ำมันที่สำคัญของหลายประเทศ มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือ รากเป็นระบบรากแก้ว ลำต้นเดี่ยวตั้งตรงหรือทอดยอดเป็นเถาเลื้อย ใบประกอบแบบขนนก มีใบย่อยสองคู่ ออกตรงข้ามกัน มีสีเขียว ดอกมีลักษณะคล้ายผีเสื้อ กลีบดอกจะมีสีเหลือง ผลออกเป็นฝัก จะออกที่ใต้ดิน ฝักมีลักษณะทรงกลมยาว มีลายเส้นชัดเจน มีเปลือกหนาแข็งเปราะ มีสีน้ำตาล มีเมล็ดเรียงอยู่ภายในฝัก (ภาพ 7) (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน, 2561)



ภาพ 7 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วลิสง

ที่มา: <https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?g=pe&p=Arachis+hypogaea+L.>

ปัจจุบันถั่วลิสงถูกจัดอยู่ในกลุ่มพืชที่มีผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภค เนื่องจากเป็นพืชอาหารที่บริโภคง่าย ซึ่งนำมาแปรรูปเป็นส่วนประกอบอาหารหวานคาวต่าง ๆ และเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป บางส่วนนำไปสกัดน้ำมัน และกากใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ส่วนการขยายพันธุ์ของถั่วลิสงในประเทศไทย สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี แต่นิยมปลูกในฤดูฝนและฤดูแล้ง เนื่องจากเป็นพืชที่ไม่ต้องการน้ำมากในการเจริญเติบโต และได้มีการจัดแบ่งกลุ่มของถั่วลิสงตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ Virginia, Valencia, Spanish และ Runner ซึ่งสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมนำมาเพาะปลูก คือ กาลีนินธุ์ 2 เป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม Runner และใช้รูปฝักสดในการเพาะปลูก โดยมีลักษณะสำคัญ คือ ลำต้นตั้งตรง ติดฝักเป็นกระจุกที่โคน ลายบนเปลือกฝักเห็นเป็นร่องลึกชัดเจน เยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีชมพู และลายขีดสีม่วง รวมทั้งยังมีรสชาติค่อนข้างหวาน มีความต้านทานต่อโรคราสนิมและใบจุดสีน้ำตาล และให้ผลผลิตฝักสดเฉลี่ย 579 กิโลกรัมต่อไร่ เหมาะสำหรับการปลูกในเขตภาคเหนือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่ดินมีความอุดมสมบูรณ์ปานกลางถึงสูง เช่น ดินร่วนหรือร่วนเหนียว และมีการกระจายตัวของฝนดี (สภาเกษตรกรแห่งชาติ, 2561)





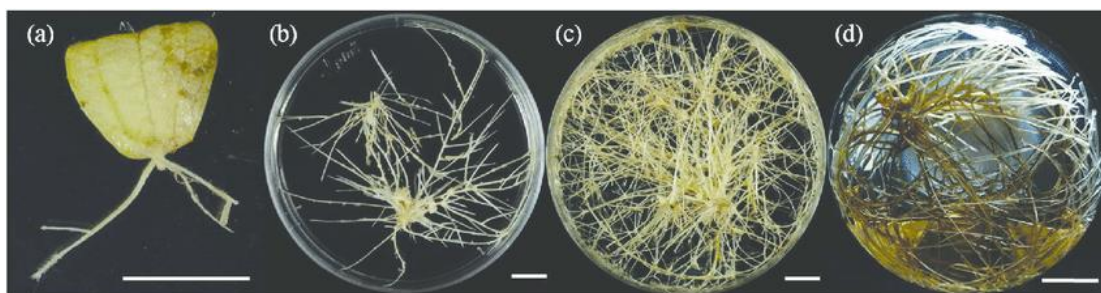
ภาพ 8 ลักษณะเมล็ดของถั่วลิสงสายพันธุ์กาฬสินธุ์ 2

ที่มา: [http://peanut-crsp.kapi.ku.ac.th/gallery/peanut/l\\_karasin2.jpg](http://peanut-crsp.kapi.ku.ac.th/gallery/peanut/l_karasin2.jpg)

นอกจากถั่วลิสงเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจแล้วยังเป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งประกอบไปด้วย วิตามินอี วิตามินบี1 โฟเลต โปรตีน ไขมันอิ่มตัวเชิงเดี่ยว ฟอสฟอรัส แมงกานีส และไนอะซิน เป็นต้น (Davis & Dean, 2016) และจากรายงานการศึกษาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ ถั่วลิสง พบว่า ถั่วลิสงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง ต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพ ต้านเชื้อรา พิษจากเชื้อรา ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน เป็นต้น (Garcia et al., 2016; de Camargo et al., 2017) และจากตัวอย่างการศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิของรากลอย ถั่วลิสงเพาะเลี้ยง พบว่า รากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงสามารถผลิตสาร *trans-resveratrol* และสารกลุ่มสเตอรอยด์ทั้ง *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ได้ (Abbott et al., 2010; Condori et al., 2010)

### กลไกการเกิดรากลอย

รากลอย (hairy root) เป็นรากที่เกิดจากการประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญจากพืช โดยการดัดแปลงพันธุกรรมของพืชด้วยการถ่ายโอนยีนของแบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* เข้าสู่โครโมโซมของพืช ทำให้เกิดรากพิเศษที่เรียกว่า รากลอย (ภาพ 9) ซึ่งลักษณะพิเศษ คือ มีอัตราการเจริญเติบโตสูง ใช้ระยะเวลาไม่นานในการเจริญเติบโต สามารถแตกรากแขนงด้านข้างได้มาก สามารถเจริญได้ดีโดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเร่งการเจริญเติบโต มีความเสถียรทางพันธุกรรมสูง ไม่เกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย และสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ (Giri & Narasu, 2000)

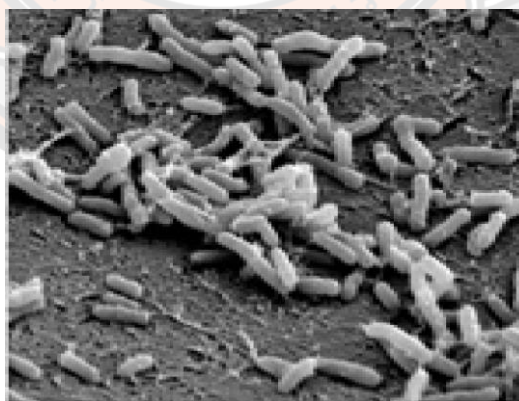


ภาพ 9 ลักษณะของรากลอย

ที่มา: [https://www.researchgate.net/figure/Agrobacterium-rhizogenes-mediated-hairy-root-culture-in-Gentiana-scabra-a-Induction-of\\_fig1\\_277687057](https://www.researchgate.net/figure/Agrobacterium-rhizogenes-mediated-hairy-root-culture-in-Gentiana-scabra-a-Induction-of_fig1_277687057)

#### *Agrobacterium rhizogenes*

เชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ที่อาศัยอยู่ในดิน (ภาพ 10) และเป็นแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืช เมื่อพืชเกิดบาดแผล โดยเชื้อ *A. rhizogenes* จะถ่ายโอนส่วนของ transfer DNA (T-DNA) จากพลาสมิดขนาดใหญ่ root-inducing (Ri) plasmid เข้าสู่ genome ของพืช ซึ่งประกอบด้วย ยีนฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องของ auxin และ opine ยีน virulence และส่วนของยีน *rol* ที่ทำให้เกิดรากลอย (Chandra, 2012)



ภาพ 10 ลักษณะของเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes*

ที่มา: <http://slideplayer.com/slide/12344714/>

องค์ประกอบและหน้าที่ของส่วนประกอบในจีโนมของเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* (ภาพ 11) (Ozyigit, Dogan, & Tarhan, 2013)

1. T-DNA มียีนที่กำหนดการสร้างสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเอง โดยใช้เอนไซม์และสารตั้งต้นจากพืช รวมทั้งมียีนสร้างฮอร์โมน auxin และ opine ซึ่งแบคทีเรียจะใช้เป็นอาหารและใช้ในการเจริญเติบโตของพืช พืชที่ได้รับ T-DNA เข้าไป จะมีการเจริญของรากแบบรวดเร็วและไม่จำกัด

2. virulence genes หรือ Vir genes ทำหน้าที่คล้ายกับเอนไซม์ endonuclease โดย Vir genes มีหน้าที่ส่ง T-DNA เข้าสู่จีโนมพืช ประกอบด้วย

- VirA/VirG เป็นระบบที่ทำหน้าที่ควบคุม โดย VirA protein มีหน้าที่สังเคราะห์หมู่ฟอสเฟตแก่ VirA เอง และสังเคราะห์หมู่ฟอสเฟตให้แก่ VirG โดย VirA จะทำการกระตุ้นการทำงานของ VirG เมื่อ VirG ทำงานก็จะกระตุ้นการทำงานของ Vir gene อื่น ๆ ต่อไป

- VirD1/VirD2 ทำหน้าที่ตัดบริเวณส่วน T-DNA บริเวณ right border และ left border ให้ได้ T-DNA สายเดี่ยวจากสายคู่เพื่อที่จะได้เข้าสู่เซลล์พืชแบบ single strand T-DNA

- VirE2 ทำหน้าที่ห่อหุ้ม T-DNA สายเดี่ยวเพื่อป้องกันไม่ให้โดนทำลาย โดยสร้างส่วนห่อหุ้มเรียกว่า T-complex

3. octopine catabolism ทำหน้าที่สร้างแหล่งพลังงานประเภทสารประกอบไนโตรเจนให้แก่ *Agrobacterium*

4. *rol* gene

- ยีน *rol A* ทำหน้าที่ ในการสร้างรากและแสดงออกทางลักษณะทางสัณฐาน

วิทยา

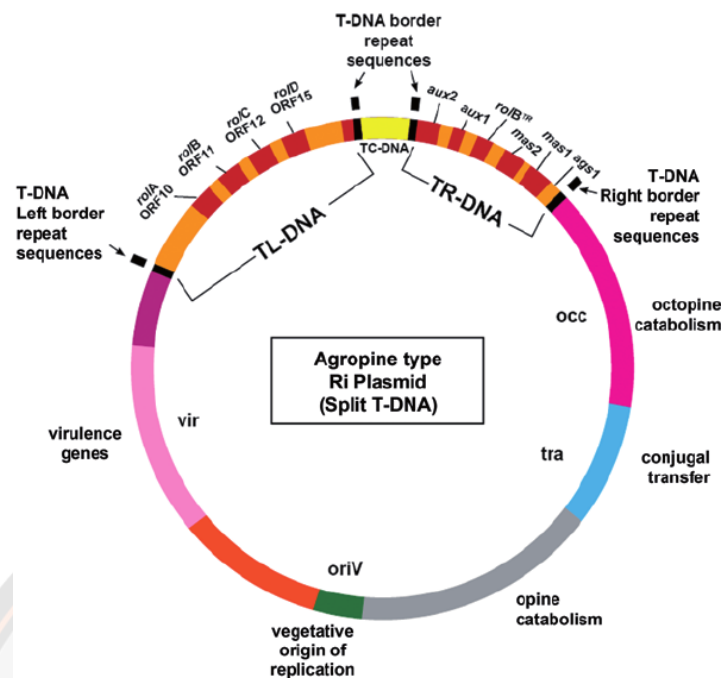
- ยีน *rol B* ทำหน้าที่ เริ่มก่อราก

- ยีน *rol C* ทำหน้าที่ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของราก

- ยีน *rol D* ทำหน้าที่ ยับยั้งการเจริญเติบโตของ callus

5. conjugation transfer gene

6. Ori เป็นบริเวณที่เริ่มการจำลองตัว

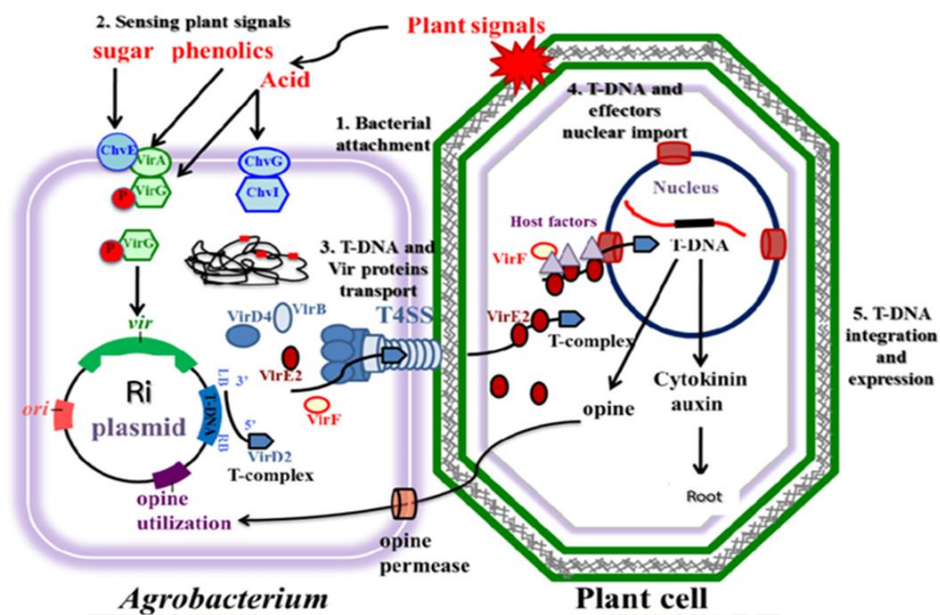


ภาพ 11 Ri-plasmid ของเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes*

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Ozyigit et al., 2013)

### กลไกการถ่ายโอนยีนของเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* เข้าสู่พืช

เกิดจากแบคทีเรีย *A. rhizogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เข้ายึดเกาะและบุกรุกบริเวณขอบเซลล์พืช โดยเมื่อพืชเกิดบาดแผล เซลล์พืชจะปล่อยสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ สารอะซิโตไซริงโคน (acetosyringone) ออกมาจากบาดแผล ซึ่งจะไปกระตุ้น periplasmic domain ที่เป็นตัวรับสัญญาณของ VirA ใน *A. rhizogenes* โดยยีน VirA จะทำการกระตุ้นการทำงานของยีน VirG และเกิดการกระตุ้นการทำงานของ Vir อื่น ๆ ต่อเนื่อง เมื่อยีน VirD1/VirD2 ได้รับการกระตุ้น จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสในการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอรัที่ตำแหน่ง right border (RB) และ left border (LB) ของ T-DNA ในพลาสมิดของ *A. rhizogenes* ได้เป็น T-DNA สายเดี่ยวเพื่อนำส่งเข้าสู่เซลล์พืช โดยมีโปรตีน VirE2 ทำหน้าที่ห่อหุ้ม T-DNA สายเดี่ยว เพื่อป้องกันไม่ให้ T-DNA ถูกทำลาย การขนส่งจะส่งผ่านช่อง VirB เมื่อ T-DNA แทรกเข้าสู่นิวเคลียสในลักษณะสุ่มชนิด nonspecific recombination (illegitimate) จะเข้าไปรวมตัวกับโครโมโซมของพืช เมื่อพืชมีการแบ่งเซลล์ ยีน *rol* ของ T-DNA จะแบ่งเซลล์ไปพร้อมกับพืช ทำให้เกิดรากลอยบริเวณที่เกิดบาดแผล (Giri & Narasu, 2000) (ภาพ 12)



ภาพ 12 กลไกการถ่ายโอนยีนของเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* เข้าสู่พืช

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Hwang, Yu, & Lai, 2017)

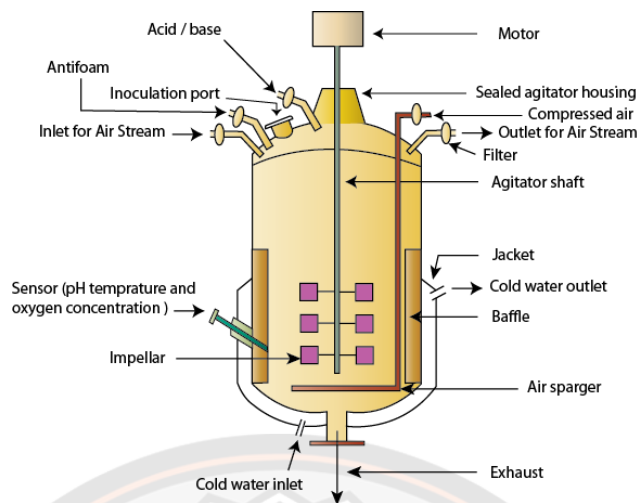
### การเพิ่มผลผลิตเนื้อเยื่อพืชและการผลิตสารทุติยภูมิ

ในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ มีความต้องการปริมาณสารทุติยภูมิที่สำคัญในปริมาณมาก ดังนั้นการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิจากเนื้อเยื่อรากลอยจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากลอยให้ได้จำนวนมาก เพื่อให้รากลอยสามารถผลิตสารในปริมาณมากตามที่ต้องการได้ การประยุกต์ใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) จึงเป็นเทคนิคที่น่าสนใจในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อรากลอยให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิในปริมาณมากได้

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) หรือถังเพาะเลี้ยง (fermenter) หมายถึง ภาชนะเครื่องมือ หรืออุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ เซลล์พืช และเซลล์สัตว์ โดยจะมีสารอาหารที่จำเป็นบรรจุอยู่ภายใน พร้อมทั้งมีระบบควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิที่ต้องอาศัยกระบวนการทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์ หรือปฏิกิริยาการหมัก เป็นต้น (Khan et al., 2018)

### องค์ประกอบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ แสดงดังภาพ 13 (วารสาร, 2557)

- ตัวถัง (body construction หรือ vessel) เป็นส่วนประกอบที่ใช้สำหรับกักเก็บเซลล์และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงไว้ภายใน ซึ่งจะต้องสามารถผ่านกระบวนการปราศจากเชื้อก่อนที่จะใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ และสามารถควบคุมให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อได้ โดยตัวถังจะต่อเข้ากับระบบควบคุมการไหลของอากาศทั้งบริเวณให้อากาศเข้าและออกในถังเพาะเลี้ยง
- ระบบกวนผสม (agitator system) เป็นระบบที่ทำให้สภาวะภายในถังเพาะเลี้ยงมีคุณสมบัติเหมือนกันทั้งระบบ เพื่อให้เกิดการขนส่งสารอาหารและออกซิเจนแก่เซลล์ในถังได้อย่างทั่วถึง รวมทั้งช่วยคงสภาวะความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิภายในถังเพาะเลี้ยง โดยระบบกวนผสมประกอบด้วย เพลา (shaft) และใบพัด (impeller)
- หัวพ่นอากาศ (sparger) ทำหน้าที่ในการขนส่งอากาศไปยังถังเพาะเลี้ยง ติดตั้งอยู่บริเวณด้านล่างของตัวถัง มีลักษณะเป็นท่อที่มีรูพรุน เพื่อให้นำส่งอากาศผ่านเข้าไปในระบบของการเพาะเลี้ยง เมื่ออากาศผ่านหัวพ่นอากาศเข้าไปในตัวถังจะช่วยให้เกิดการผสมระหว่างอาหารและเซลล์ โดยหัวพ่นอากาศที่มีขนาดแตกต่างกันจะมีผลต่อการไหลของสารอาหารและเซลล์ในถังเพาะเลี้ยง
- ช่องเติมสาร (inoculation port) เป็นบริเวณที่ใช้สำหรับการเติมสารลงในถังหรือเก็บตัวอย่างออกมาจากถังเพาะเลี้ยง
- แผงกั้นเซลล์ (baffles) ทำหน้าที่ลดกระแสการไหลเวียนในตัวถังเพาะเลี้ยง ซึ่งช่วยทำให้การกวนผสมเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ
- อุปกรณ์ตรวจวัดสภาวะการเพาะเลี้ยงหรือหัววัด (probes) ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรด-เบส และการละลายของคาร์บอนไดออกไซด์ (dissolved oxygen) โดยหัววัดชนิดต่าง ๆ จะถูกติดตั้งในบริเวณที่แตกต่างกันในถังเพาะเลี้ยง



ภาพ 13 โครงสร้างของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ที่มา: <https://nptel.ac.in/courses/102103016/module4/lec36/1.html>

### ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อพืชในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

- ประเภทของเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์  
เซลล์พืชแต่ละชนิด มีความสำคัญต่อการออกแบบถังเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์ในถังเพาะเลี้ยงจะส่งผลต่อการผลิตสารและปลดปล่อยสารออกมาในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งจะทำให้ความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยงสูงขึ้นและลดประสิทธิภาพการถ่ายโอนออกซิเจนสู่เซลล์ได้
- การเติมอากาศและการกวนผสม  
การถ่ายโอนอากาศผ่านอาหารเหลวจำเป็นต้องใช้การกวนผสม เพื่อช่วยให้เกิดการผสมกันได้อย่างทั่วถึง โดยการถ่ายเทอากาศมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์พืชในถังเพาะเลี้ยง ซึ่งเซลล์พืชต่างสายพันธุ์หรืออวัยวะพืชที่ต่างกันจะมีความต้องการปริมาณอากาศเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันด้วย ดังนั้นการควบคุมการเติมอากาศและการกวนผสมให้อยู่ระดับที่เหมาะสม จึงมีความจำเป็นต่อการเลี้ยงเซลล์พืชในถังเพาะเลี้ยง
- องค์ประกอบของแก๊ส  
องค์ประกอบของแก๊ส โดยเฉพาะออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทิลีนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์พืช

และจากรายงานการศึกษาการกระตุ้นรากลอย *Salvia sclavea* ด้วย methyl jasmonate (MeJA) ในระบบขวดเขย่าและเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (sprinkle bioreactor) พบว่า รากลอย *S. sclavea* ที่ถูกกระตุ้นด้วย MeJA ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาณของรากและ สารกลุ่ม diterpenoid มากกว่าระบบขวดเขย่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Kuźma, Bruchajzer, & Wysokinska, 2009)

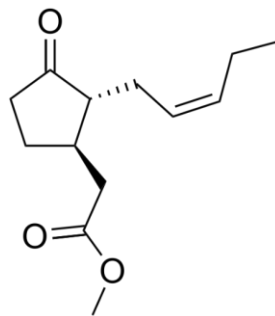
### ตัวกระตุ้น

ตัวกระตุ้น (elicitor) เป็นปัจจัยความเครียดชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองของพืชและเหนี่ยวนำการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญในพืชได้ ซึ่ง การศึกษานี้สนใจตัวกระตุ้น 3 ชนิดดังนี้

#### เมทิลจัสโมเนต

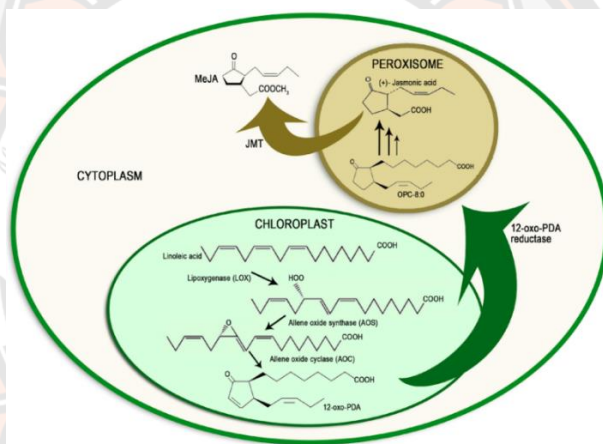
เมทิลจัสโมเนต (methyl jasmonate; MeJA) เป็นสารประกอบอินทรีย์ระเหย อยู่ในกลุ่ม ของ jasmonate (ภาพ 14) ซึ่งพืชสามารถสังเคราะห์เองได้ โดยถูกสังเคราะห์มาจากกรดลิโนเลอิก (linolenic acid : LA) และมีเอนไซม์ lipoxygenase (LOX) เป็นตัวสำคัญในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะ เริ่มต้นการสังเคราะห์ภายในคลอโรพลาสต์ จากนั้นจะส่งผ่านไปยังเพอรอกซิโซม และจะได้โมเลกุล ของเมทิลจัสโมเนตออกมาที่ไซโตพลาสซึม (ภาพ 15) (Creelman & Mullet, 1997; Reyes-Diaz et al., 2016) โดย MeJA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช เช่น การงอกของ เมล็ด การเจริญเติบโตของราก การเจริญพันธุ์ การสุกของผลไม้ และการชราภาพ ซึ่งพืชสร้างขึ้นมา เพื่อตอบสนองต่อสิ่งที่มากระตุ้น เช่น การทำลายของแมลง ศัตรูพืช สิ่งแวดล้อม ความเครียด ความแห้งแล้ง รวมทั้งการบุกรุกของเชื้อโรค (Yoon et al., 2009) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ MeJA ในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วย MeJA พบว่า สามารถเหนี่ยวนำให้รากลอยถั่วลิสงสามารถผลิต สาร *trans-resveratrol* และสารในกลุ่มสติลบินได้ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (Yang et al., 2015) นอกจากนี้ยังพบว่า MeJA มีหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการส่งสัญญาณ (signal transduction) ภายใน เซลล์ของพืช





ภาพ 14 โครงสร้างของเมทิลจัสโมเนต

ที่มา: [https://en.wikipedia.org/wiki/Methyl\\_jasmonate](https://en.wikipedia.org/wiki/Methyl_jasmonate)



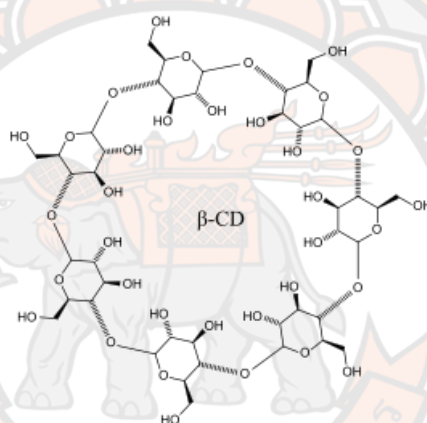
ภาพ 15 การสังเคราะห์เมทิลจัสโมเนตภายในเซลล์พืช

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Reyes-Diaz et al., 2016)

### ไซโคลเดกซ์ทริน

ไซโคลเดกซ์ทริน (cyclodextrin : CDs) เป็นกลุ่มของสารประกอบที่ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 5 โมเลกุล มาเชื่อมต่อกันเป็นวงแหวน (cyclic oligosaccharides) ด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4-glycosidic มีโครงสร้างคล้ายผนังเซลล์ของเห็ดรา และเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดมาจากการสลายของแป้งโดยใช้เอนไซม์ cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) (Donpuksa & Rimphanitchayakit, 2012) ซึ่งคุณสมบัติของ CD คือ โครงสร้างภายในประกอบด้วยโมเลกุลในกลุ่มของ hydrophobic ซึ่งมีขั้วต่ำ ทำให้ภายในไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่โครงสร้างภายนอก

ประกอบด้วยโมเลกุลในกลุ่มของ hydrophilic ซึ่งมีขั้วมากกว่า ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดีกว่า โครงสร้างภายใน (Conceicao et al., 2018) และสามารถบรรจุสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ไว้ภายในโมเลกุลได้ (ภาพ 16) จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการนำ CD มาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ ทั้งอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง รวมทั้งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวกระตุ้นและเก็บสารทุติยภูมิที่พืชปล่อยออกมาป้องกันตัวเองได้ ดังรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วย CD ร่วมกับ MeJA พบว่า สามารถเหนี่ยวนำให้รากลอยถั่วลิสงผลิตสาร *trans-resveratrol* และสารในกลุ่มสติลบินได้ปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นและสามารถเก็บรักษาสารที่ผลิตออกมาให้คงอยู่ได้ในระยะเวลาที่นาน (Yang et al., 2015)



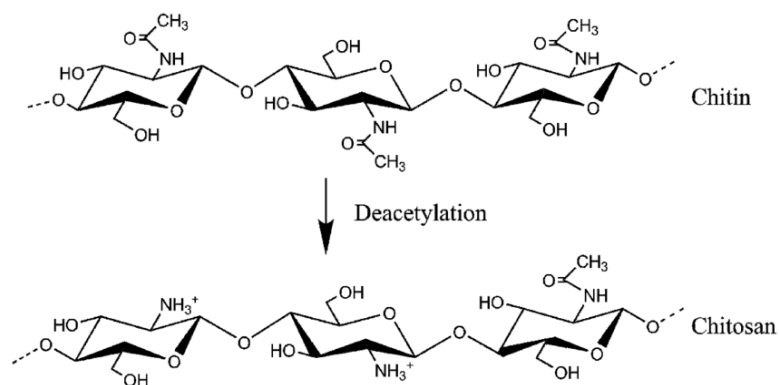
ภาพ 16 โครงสร้างของเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน

ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cyclodextrin>

### ไคโตซาน

ไคโตซาน (chitosan : CHT) หรือ  $\beta$ -1,4-D-glucosamine เป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติ และเป็นโคโพลิเมอร์กับไคติน ซึ่งประกอบด้วยโมโนเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine พบได้ในเปลือกของสัตว์ เช่น กุ้ง ปู หมึก แมลง หอยมุก และผนังเซลล์ของรา ยีสต์ และจุลินทรีย์หลายชนิด (ศุภนัยเทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2544) CHT เกิดจากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซีทิลของไคตินด้วยเอนไซม์ chitin deacetylase ทำให้โครงสร้างของไคตินบางส่วนเปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะหมู่ฟังก์ชันที่มีธาตุไนโตรเจน (จากหมู่อะซีตามิโด -

$\text{NHCOCH}_3$  เปลี่ยนไปเป็นหมู่เอมิโน  $-\text{NH}_2$  ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 (ภาพ 17) (Ferri & Tassoni, 2011; Malerba & Cerana, 2018)



ภาพ 17 โครงสร้างเคมีของไคติน และไคโตซาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก (Nilsen-Nygaard et al., 2015)

สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ CHT เป็นโพลิเมอร์สายยาวที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสูงมากกว่า 7 เปอร์เซ็นต์ มีระดับของหมู่อะซีติลต่ำกว่า 0.4 และมีประจุบวกเนื่องจากมีหมู่เอมิโน (ในรูป  $-\text{NH}_3^+$ ) โดยปกติ CHT สามารถละลายได้ดีในกรดอินทรีย์ที่มีฤทธิ์อ่อน เช่น กรดอะซีติก กรดฟอร์มิก กรดแลคติก และกรดโพรพานิก เป็นต้น (Kumar et al., 2004) ค่า pKa ของ CHT มีค่าอยู่ในช่วง 6.2 ถึง 6.8 และสารละลายของ CHT มีความเหนียวใส มีพฤติกรรมแบบนอนนอน (non-newtonian) ซึ่งสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นเยื่อบางได้ตามธรรมชาติ มีลักษณะของพลาสติกใส และยืดหยุ่นได้ (ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2544)

CHT เป็นโพลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติและข้อดีหลากหลาย ทั้งมีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ และราคาไม่แพง ดังนั้นจึงมีการนำ CHT มาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น ด้านอาหาร การเกษตร การแยกสารทางชีวภาพ การแพทย์และเภสัชกรรม เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ รวมทั้งใช้เป็นตัวกระตุ้นพืชในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ เช่น กระตุ้นให้พืชสร้างสารไฟโตเล็กซิน ได้แก่ สารสเตโรล สารประกอบฟีนอลิก และเทอร์พีนได้ปริมาณมาก (Ferri & Tassoni, 2011; Malerba & Cerana, 2018) มีรายงานการศึกษาการใช้ CHT กระตุ้นเนื้อเยื่อของพืช turmeric (*Curcuma longa* L.) พบว่า เนื้อเยื่อ rhizomes ของพืชชนิดนี้ที่ถูกกระตุ้นด้วย CHT สามารถผลิตสาร curcumin ได้ในปริมาณสูง และสามารถกระตุ้นการทำงาน

ของเอนไซม์การป้องกันตนเองอย่าง peroxidase, polyphenol oxidase และ  $\beta$ -1,3 glucanase ได้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sathiyabama, Bernstein, & Anusuya, 2016) และ ตัวอย่างรายงานศึกษาการใช้ CHT ในการกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิในรากลอย *Isatis tinctoria* L. เช่นกัน พบว่า มีการผลิตสารฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มขึ้นหลังจากการถูกกระตุ้นด้วยความเข้มข้นของ CHT ที่เหมาะสม (Jiao et al., 2018)



### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินงานวิจัย

##### วัสดุและเครื่องมือ

1. Autopipette
2. Beaker ขนาด 50, 100, 125, 250 มิลลิลิตร
3. Cuvette
4. Falcon tube
5. Flask ขนาด 125, 250 มิลลิลิตร
6. Graduated pipette
7. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
8. Micro titer plate 96 well
9. Mortar and pestle
10. Multichannel pipette
11. PCR tube
12. Rack
13. Syringe HPLC
14. Tip ขนาด 10, 200, 1000 ไมโครลิตร
15. กล่องดำติดตั้งหลอดไฟ
16. ขวดเลี้ยงพืช
17. เครื่องซังสาร 2 และ 4 ตำแหน่ง
18. เครื่อง Bioreactor
19. เครื่อง Electrophoresis
20. เครื่อง Gel Doc
21. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น LC-10  
ADVP
22. เครื่อง High speed centrifuge
23. เครื่อง Micro plate reader

24. เครื่อง Nanodrop
25. เครื่อง Real time PCR (Excyler™ 96 well Real-time Quantitative Thermal Block : BioNEER)
26. เครื่อง Rotary evaporator
27. เครื่อง Spectrophotometer
28. เครื่อง Stirrer
29. เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer
30. เครื่อง Vortex
31. หลอดไฟ LED ขนาด 13 วัตต์

## สารเคมี

1. อาหารสูตร Gamborg's B5
2. อาหารสูตร Murashige and Skoog (MS)
3. Acetate buffer
4. Acetic acid
5. Acetonitrile HPLC grade
6. Agarose (Bio Basic, CAS number 9012-36-6)
7. Ascorbic acid
8. 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)
9. Bovine serum albumin standard
10. Chitosan (CHT) (Medium molecular weight)
11. Cyclodextrin (CD) (M.W.=1303.3 g/mol)
12. Di-sodium hydrogen orthophosphate dihydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
13. Distill water
14. 100 bp DNA ladder (GeneDireX, Cat DM003-R500)
15. Dye reagent (Bio-rad, Cat 5000006)
16. EDTA
17. Ethanol

18. Ethanol HPLC grade
19. Ethyl acetate
20. Ethylene diaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA.Na<sub>2</sub>)
21. Ferrous chloride (FeCl<sub>2</sub>)
22. Folin reagent
23. 2% Formic acid in water 18.2 mΩ
24. Gallic acid
25. HCl
26. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
27. Iron (III) chloride hexahydrate (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O)
28. Liquid nitrogen
29. L-methionine
30. Methanol HPLC grade
31. Methyl jasmonate (MeJA) (M.W.=224.3 g/mol)
32. Nitrotetrazolium bluechloride (NBT)
33. Novel juice dye (GeneDireX, Cat LD001-1000)
34. Polyvinylpyrrolidone (PVPP)
35. Potassium persulfate (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)
36. Riboflavin
37. RNA extraction kit (Gene JET Plant RNA Purification)
38. Sodium ascorbate (ASC)
39. Sodium carbonate
40. Sodium dihydrogen phosphate dihydrate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O)
41. Sodium salicylate
42. TBE buffer
43. 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)
44. Trolox

## วิธีการทดลอง

### 1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

#### 1.1 การเตรียมอาหารแข็งสูตร B5 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่งผงอาหารสำเร็จรูปสูตร B5 (บริษัท phytotechnology laboratories) น้ำหนัก 3.21 กรัม และชั่งน้ำตาลทรายน้ำหนัก 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH เท่ากับ 5.5 และเติมผงวุ้น (agar) น้ำหนัก 5 กรัม ลงในอาหารที่เตรียมไว้ และนำอาหารไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

#### 1.2 การเตรียมอาหารเหลวสูตร ½ MS ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่งผงอาหารสำเร็จรูปสูตร MS (บริษัท phytotechnology laboratories) น้ำหนัก 2.22 กรัม และชั่งน้ำตาลทรายน้ำหนัก 15 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่า pH เท่ากับ 5.7 นำอาหารเทลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และนำอาหารไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

### 2. การเพาะเลี้ยงรากลอย

ทำการเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงสายพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 (K2-K599) โดยตัดบริเวณปลายรากความยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร มาทำการเพาะเลี้ยงลงในอาหารแข็งสูตร B5 ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาวะมืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์

### 3. การศึกษาตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ

#### 3.1 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตซานในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสง

นำเนื้อเยื่อรากลอยน้ำหนักเริ่มต้น 1.25 กรัม มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยแบ่งการทดสอบออกเป็นชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น (เติมเฉพาะตัวทำละลาย คือ 1% acetic acid pH 5.7) และชุดที่ทดสอบจำนวน 5 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1, 2, 3 และ 4 ทำการกระตุ้นด้วย CHT ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม MeJA ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ CD ความเข้มข้น 6.78 มิลลิโมลาร์ (Yang et al., 2015) ทำการเก็บตัวอย่างภายหลังจากการเติม MeJA ร่วมกับ CD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชุดที่ 5 กระตุ้นด้วย MeJA ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ CD ความเข้มข้น 6.78 มิลลิโมลาร์ เก็บตัวอย่างที่เวลา



24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ แยกเก็บส่วนของเนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย เพื่อนำไปสกัดสารในลำดับต่อไป

### 3.2 การทดสอบตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสง

ทำการทดสอบตัวกระตุ้นที่เหมาะสม โดยนำเนื้อเยื่อรากลอย น้ำหนักเริ่มต้น 1 กรัม เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ½ MS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการย้ายรากลอยมาเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดใหม่ สูตร ½ MS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แบ่งการทดสอบออกเป็น ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น (เดิมเฉพาะตัวทำละลาย คือ 1% acetic acid pH 5.7) และชุดที่ทดสอบจำนวน 5 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 กระตุ้นด้วย CHT ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ชุดที่ 2 กระตุ้นด้วย MeJA ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ CD ความเข้มข้น 6.78 มิลลิโมลาร์ (Yang et al., 2015) ชุดที่ 3 กระตุ้นด้วย CHT ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม MeJA ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ CD ความเข้มข้น 6.78 มิลลิโมลาร์ ชุดที่ 4 กระตุ้นด้วย MeJA ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ CD ความเข้มข้น 6.78 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม CHT ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดที่ 5 กระตุ้นด้วย CHT ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ MeJA ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ CD ความเข้มข้น 6.78 มิลลิโมลาร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยแยกเก็บส่วนของเนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยเพื่อนำไปสกัดสารในลำดับต่อไป

### 4. การกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงที่ถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ทดสอบตัวกระตุ้นที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากการทดลอง 3.2 โดยแบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือ

การกระตุ้นรากลอยด้วยตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในระบบขวดเขย่า โดยทำการเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงน้ำหนักเริ่มต้น 1 กรัม ในอาหารเหลวสูตร ½ MS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร (อัตราส่วนรากลอยต่ออาหารเพาะเลี้ยง 5 กรัมต่อลิตร) เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายรากลอยลงอาหารเพาะเลี้ยงชนิดใหม่ สูตร ½ MS และทำการกระตุ้นโดยแบ่งการทดสอบออกเป็น ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น (เดิมเฉพาะตัวทำละลาย 1% acetic acid pH 5.7) และชุดที่ทดสอบโดยกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากการทดลอง 3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยแยกเก็บส่วนของเนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยเพื่อนำไปสกัดสารในลำดับต่อไป

การกระตุ้นรากลอยด้วยตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยทำการเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงน้ำหนักเริ่มต้น 10 กรัม ในอาหารเหลวสูตร ½ MS ปริมาตร 2 ลิตร ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (อัตราส่วนรากลอยต่ออาหารเพาะเลี้ยง 5 กรัมต่อลิตร) เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร ½ MS ใหม่ และทำการกระตุ้น โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น ชุดควบคุมที่ไม่ใส่ตัวกระตุ้น (เติมเฉพาะตัวทำละลาย 1% acetic acid pH 5.7) และชุดที่ทดสอบโดยกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากการทดลอง 3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยแยกเก็บส่วนของเนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยเพื่อนำไปสกัดสารในลำดับต่อไป

## 5. การสกัดสารจากอาหารที่เพาะเลี้ยงรากลอย

นำอาหารเหลวที่ได้จากข้อ 3 และ 4 มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ในอัตราส่วน ethyl acetate : medium (1:1) ทำการสกัดซ้ำเป็นจำนวน 3 รอบ และแยกตัวทำละลายไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ระบบสุญญากาศ ทำการชั่งน้ำหนักสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้ เพื่อนำไปวิเคราะห์ในลำดับต่อไป

## 6. การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารที่เพาะเลี้ยงรากลอย

### 6.1 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการขจัดอนุมูล ABTS ที่เกิดจากการถูกออกซิไดส์ โดย Oxidizing agent ซึ่งสามารถวัดการดูดกลืนแสงของอนุมูล ABTS ที่มีสีจางลง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนและไฮโดรเจนจากสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงค่าเป็นค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Boligon, Machado, & Athayde, 2014)

เตรียมสารละลาย 7 มิลลิโมลาร์ ABTS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับ 140 มิลลิโมลาร์ potassium persulfate ( $K_2S_2O_8$ ) ปริมาตร 88 ไมโครลิตร เก็บไว้ในความมืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ  $0.70 \pm 0.02$

- การทำกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Trolox

เตรียมสารละลาย ABTS radical ปริมาตร 198 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาทีที่อุณหภูมิห้องในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับหลอดควบคุม และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณค่า %inhibition ของสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน จากนั้นสร้างกราฟระหว่างค่า %inhibition และความเข้มข้นต่าง ๆ ของ Trolox

- การคำนวณ %inhibition ของ Trolox

$$\% \text{ inhibition} = \frac{OD(\text{control}) - OD(\text{Trolox})}{OD(\text{control})} \times 100$$

OD (control) = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสาร Trolox

OD (Trolox) = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสาร Trolox

- การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดตัวอย่างละลายใน absolute ethanol ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดลงในสารละลาย ABTS radical ปริมาตร 198 ไมโครลิตร ในไมโครเพลทที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาทีที่อุณหภูมิห้องในที่มืด จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งรายงานผลเป็นค่า TEAC มีหน่วยเป็น ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

## 6.2 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) เป็นการศึกษาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการออกซิไดซ์  $\text{Fe}^{3+}$  (ferric) ให้เป็น  $\text{Fe}^{2+}$  (ferrous) โดยสามารถวัดการดูดกลืนแสงของสีสารละลายที่เปลี่ยนไปจากสีม่วงน้ำเงินเป็นสีที่จางลง เมื่อ  $\text{Fe}^{3+}$  ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงค่าเป็นค่า AAE (ascorbic acid equivalent) มีหน่วยเป็น ไมโครกรัม ascorbic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Boligon et al., 2014)

เตรียม FRAP working solution ประกอบด้วย 300 มิลลิโมลต่อลิตร acetate buffer pH 3.6 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, 10 มิลลิโมลต่อลิตร 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ใน 40 มิลลิโมลต่อลิตร HCl ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ 20 มิลลิโมล  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

- การทำกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน ascorbic acid

เตรียมสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 198 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทจากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาสร้างกราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นต่าง ๆ ของ ascorbic acid

- การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่าง

เตรียมสารสกัดตัวอย่างละลายใน absolute ethanol ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดลงในสารละลาย FRAP reagent 198 ไมโครลิตร ในไมโครเพลทที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้องในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากกราฟมาตรฐานของ ascorbic acid รายงานผลเป็นค่า AAE มีหน่วยเป็น ไมโครกรัม ascorbic acid ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

### 6.3 การตรวจสอบฤทธิ์ hydrogen peroxide scavenging assay

การตรวจสอบฤทธิ์การกำจัด  $H_2O_2$  ด้วยวิธี hydrogen peroxide scavenging assay เป็นการศึกษาความสามารถในการกำจัด  $H_2O_2$  เมื่อทำปฏิกิริยากับ  $Fe^{2+}$  (ferrous) หากสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการกำจัด  $H_2O_2$  จะสามารถวัดการดูดกลืนแสงของเกิดสารประกอบเชิงซ้อน tri-phenanthroline ที่มีสีส้มที่เกิดขึ้นได้ แสดงค่าเป็น The half maximum inhibitory concentration (IC<sub>50</sub> value) มีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Mukhopadhyay et al., 2016)

- การทำกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน gallic acid

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผสมกับ 1 มิลลิโมลาร์ ferrous chloride ปริมาตร 30 ไมโครลิตร 20 มิลลิโมลาร์  $H_2O_2$  ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเติม 50% ethanol จนครบปริมาตร 73 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 1 มิลลิโมลาร์ 1,10-phenanthroline ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับหลุมควบคุม และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณค่า degree of scavenging

ของสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตามสูตรด้านล่าง สร้างกราฟระหว่างค่า degree of scavenging และความเข้มข้นต่าง ๆ ของ gallic acid

- การคำนวณ %Scavenging effect ของ hydrogen peroxide

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \frac{OD(\text{control}) - OD(\text{Sample})}{OD(\text{control})} \times 100$$

- การตรวจสอบฤทธิ์การกำจัด H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ของสารสกัดตัวอย่าง

นำสารสกัดที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับ 1 มิลลิโมลาร์ ferrous chloride ปริมาตร 30 ไมโครลิตร 20 มิลลิโมลาร์ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเติม 50% ethanol จนครบปริมาตร 73 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 1 มิลลิโมลาร์ 1,10-phenanthroline ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า degree of scavenging ตามสูตร จากนั้นสร้างกราฟระหว่างค่า degree of scavenging ของสารสกัดตัวอย่างและความเข้มข้นต่าง ๆ รายงานค่าเป็น IC<sub>50</sub> value มีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 7. การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) ในสารสกัดจากอาหารที่เพาะเลี้ยงรากลอย

การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี total phenolic compound assay เป็นการศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด โดยอาศัยหลักการของการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยารีดอกซ์ที่ Folin-Ciocalteu ได้รับอิเล็กตรอนจากสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสามารถเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีเหลืองให้เป็นสีน้ำเงินม่วง แสดงค่าเป็น GAE (gallic acid equivalent) มีหน่วยเป็น ไมโครกรัม gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

- การทำกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน gallic acid

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลาย Folin reagent ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และสารละลาย sodium carbonate (20% w/v) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับหลุมควบคุม และนำค่าที่วัดได้มาสร้างกราฟ แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของ gallic acid

- การตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด

เตรียมสารสกัดตัวอย่างละลายใน absolute ethanol ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin reagent ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ สารละลาย sodium carbonate (20%w/v) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายจนเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 30 นาที จากนั้นนำไปวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณ สารประกอบฟีนอลิก จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ gallic acid และค่าการดูดกลืน แสง และรายงานผลเป็นค่า GAE มีหน่วยเป็น ไมโครกรัม gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

## 8. การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยด้วย เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้จากการระเหยแห้งมาละลายใน absolute ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายตัวอย่างผ่าน nylon membrane filtered ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-10 ADVP โดยใช้คอลัมน์ Luna 5U C18 (2) 100A ยี่ห้อ Phenomenex Inc. ขนาด 250x4.6 มิลลิเมตร ทำการวิเคราะห์ด้วย gradient elution โดยใช้ injection valve loop 20 ไมโครลิตร และตรวจวัดสัญญาณด้วย UV-Vis detector รุ่น SPD-10 AVP ที่ความยาวคลื่น 306 และ 340 นาโนเมตร ตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสาร ประกอบด้วย mobile phase 2 ชนิด คือ mobile phase A (acetonitrile) และ mobile phase B (2% formic acid ในน้ำกลั่น 18.2 mΩ) ในอัตราส่วน 30:70

## 9. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารกลุ่ม สตีลปินและยีนต้านทานกลุ่มอื่น ๆ ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยง

### 9.1 การสกัด RNA

นำเนื้อเยื่อรากลอย 50 มิลลิกรัม บดด้วย liquid nitrogen ในโถง จากนั้นสกัด RNA ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (Total RNA Extraction Kit (Plant) :Gene JET Plant RNA Purification) โดยเริ่มจากการทำให้เซลล์แตกด้วยการเติม RNA lysis buffer (lysis buffer 500 ไมโครลิตร ผสมกับ DTT 10 ไมโครลิตร) 510 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10-20 วินาที

นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm 5 นาที และดูดส่วนใสทั้งหมดลงใน microcentrifuge ขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติมน้ำ 100% ethanol 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยปิเปตทันที และดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน purification column เพื่อให้ RNA จับกับ column ได้ดี นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm 1 นาที ทิ้งสารละลายและทำการล้าง column โดยเติมน้ำ WB1 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านจาก column ทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ WB2 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm 1 นาที ทำซ้ำสองครั้ง จากนั้นทำการชะ RNA ด้วย nuclease-free water 50 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 rpm 1 นาที เก็บสารละลาย RNA ทั้งหมดเพื่อนำไปวัดปริมาณความเข้มข้นของ total RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop โดยใช้ RNase free water เป็น blank เก็บตัวอย่าง RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

## 9.2 การกำจัด genomic DNA ที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง RNA

นำ total RNA ที่ได้จากการสกัด (ข้อ 9.1) ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัม ผสมกับ 10x reaction buffer with  $MgCl_2$ , DNase I และ DECP-treated water ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 10 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที และเติมน้ำ 50 มิลลิโมลาร์ EDTA 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้นนำไปสังเคราะห์ cDNA ต่อไป

## 9.3 การสังเคราะห์ cDNA (complementary DNA)

นำ RNA ที่ได้จากการกำจัด genomic DNA (ข้อ 9.2) ผสมกับ primer (Oligo dT8) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DECP-treated water ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ AccuPower® RT Premix tube (BioNEER) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เป็นดังนี้ เริ่มต้นบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 60 นาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA จากนั้นทำการยับยั้งการทำงานของ RNase โดยเพิ่มอุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บตัวอย่างของ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

## 9.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR

นำ cDNA จากการสังเคราะห์ (ข้อ 9.3) มาใช้เป็น template ในขั้นตอน real-time PCR มีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 10 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบดังนี้

2x-PCR(Bioneer)	5	ไมโครลิตร
cDNA	1.5	ไมโครลิตร

Primer_Forward	0.5	ไมโครลิตร
Primer_Reverse	0.5	ไมโครลิตร
DEPC-treated water	2.5	ไมโครลิตร

ตาราง 1 ลำดับ primer สำหรับการทดสอบการแสดงออกของยีน

Name	Sequence	Annealing temp.(°C)
APX143_F	5'-CCCCTCATCTTTGACAACTCT-3'	60
APX143_R	5'-GCATCTTCATCCGCAGCATA-3'	60
SOD131_F	5'-GCCGAGTAGCTTGTGGGATT-3'	63
SOD131_R	5'-ACCAAACAACGGAAAGGGGT-3'	63
GPX116_F	5'-CTCTCTCGGCCTTATCAGCG-3'	60
GPX116_R	5'-CTGGCCATGGTGTGATCTGT-3'	60
ERF1-128_F	5'-TGGACTCCATTCCTGAGGGT-3'	62
ERF1-128_R	5'-CTGTTACCCCAGCGAAGAT-3'	62
ERF6-133_F	5'-AGCAAGTGCAAGTTGGCAAG-3'	62
ERF6-133_R	5'-CCACCAGGATCCGTGAGAAC-3'	62
PAL-134_F	5'-TGATTGCACTTTGCCAAGCC-3'	62
PAL-134_R	5'-TCTTGATGGGTGGAGTTCGC-3'	62
RS103_F	5'-CGATGGAGCTGCTGCGATTA-3'	60
RS103_R	5'-GCTGCCAGGGACAAGTTTTT-3'	60
RS3_100_F	5'-ACCACTGGTGAAGGACTTGAT-3'	60
RS3_100_R	5'-TCTCGAGTTATATGGCCACACTG-3'	60
PR4A_94_F	5'-TCGTTGATCAGTGCAGCAATGGAG-3'	60
PR4A_94_R	5'-AGATGGCCCTGAGCATTCCCATA-3'	60
PR5_151_F	5'-TGTTCATACACAGTGTGGCCAGGA-3'	62
PR5_151_R	5'-TGGAGCATCCTGTTCTAGCCCAA-3'	62



ตาราง 1 (ต่อ)

Name	Sequence	Annealing temp.(°C)
PR10_124_F	5'-AAACGGTGGTCCTGGAACCATCAA-3'	62
PR10_124_R	5'-TCCAACCACGCTGTAGTTGTATGC-3'	62
Chi_146_F	5'-GGAAACGCGAACAATTTGACGGA-3'	60
Chi_146_R	5'-ATGGCCCTAATGGTTGCACCAAAC-3'	60
P.ef1a_145_F	5'-CAGAACTGGGTTCTAGATCG-3'	55
P.ef1a_145_R	5'-AGCAGTGTAGGACAAGTCCT-3'	55

เตรียม negative control สำหรับ primer แต่ละชุดดังนี้

2x-PCR(Bioneer)	5	ไม่โคโรลิตร
cDNA	0	ไม่โคโรลิตร
Primer_Forward	0.5	ไม่โคโรลิตร
Primer_Reverse	0.5	ไม่โคโรลิตร
DEPC-treated water	4	ไม่โคโรลิตร

เติมส่วนผสมต่าง ๆ ลงใน PCR tube นำเข้าเครื่อง real-time PCR จากนั้นตั้งค่าปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นตอน pre-denature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที ขั้นตอน denature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที ขั้นตอน annealing Ta (อุณหภูมิของ Ta ดังแสดงในตาราง 1) 10 วินาที ขั้นตอน extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 วินาที การยืนยันความจำเพาะของ PCR product ทำได้โดยวิเคราะห์ melting curve analysis ในขั้นตอนสุดท้าย คือทำการบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 ถึง 94 องศาเซลเซียส โดยให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นทีละ 1 องศาเซลเซียสต่อวินาที

ผล real time PCR ที่ได้แสดงเป็นค่า Ct ซึ่งสามารถนำมาคำนวณหาปริมาณแบบสัมพัทธ์ (relative quantification) เป็นวิธีการเปรียบเทียบโดยการหาอัตราส่วนการแสดงออกของยีนที่สนใจต่อการแสดงออกของยีนอ้างอิง (การทดลองนี้ใช้ *P.ef1a\_145* เป็นยีนอ้างอิง) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยทำการตรวจสอบ 3 ซ้ำ ต่อหนึ่งกลุ่มตัวอย่าง

## 10. การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

### 10.1 การสกัดเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT)

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อรกอลอยตัวลิสงเพาะเลี้ยงแต่ละกลุ่มมาบดให้ละเอียดในโกร่งภายใต้ความเย็นโดยการเติม liquid nitrogen จากนั้นนำเนื้อเยื่อรกอลอยที่ผ่านการบดแล้วน้ำหนัก 1 กรัม ไปสกัดเอนไซม์ภายใต้ความเย็นด้วย extraction buffer (50 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer (pH 7.8), 1 มิลลิโมลาร์ EDTA.Na<sub>2</sub>, 2% polyvinylpolypyrrolidone) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาทดสอบเอนไซม์ SOD และ CAT

### 10.2 การสกัดเอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX)

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อรกอลอยตัวลิสงเพาะเลี้ยงแต่ละกลุ่มมาบดให้ละเอียดในโกร่งภายใต้ความเย็นโดยการเติม liquid nitrogen จากนั้นนำเนื้อเยื่อรกอลอยที่ผ่านการบดแล้วน้ำหนัก 1 กรัม ไปสกัดเอนไซม์ภายใต้ความเย็นด้วย extraction buffer (50 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer (pH 7.8), 1 มิลลิโมลาร์ EDTA.Na<sub>2</sub>, 2% polyvinylpolypyrrolidone และ 2 มิลลิโมลาร์ sodium ascorbate) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาทดสอบเอนไซม์ APX

### 10.3 การวัดปริมาณโปรตีนของรกอลอยตัวลิสงเพาะเลี้ยง

เตรียมสารมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยผสมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับ dye reagent (บริษัท Biorad) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และตัวอย่างสารสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อรกอลอยตัวลิสงเพาะเลี้ยงที่สกัดได้จากข้อ 10.1 และ 10.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นต่าง ๆ ของ BSA คำนวณปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างที่ทดสอบในหน่วยไมโครกรัม

### 10.4 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ SOD ด้วยวิธี SOD assay ในการกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ที่เกิดจาก riboflavin โดยมี methionine เป็นตัว reducing agent ให้อิเล็กตรอนแก่ riboflavin เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง O<sub>2</sub><sup>-</sup> รีดิคัล nitrotetrazolium bluechloride (NBT) เกิดเป็นสารสีม่วงที่เรียกว่า formazan สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความ

ยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งปฏิกิริยา reduction ของ NBT และรายงานค่าเป็น SOD specific activity มีหน่วยเป็น 1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

นำสารสกัดเอนไซม์ SOD จากเนื้อเยื่อรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงแต่ละกลุ่ม (จาก ข้อ 10.1) มาตรวจสอบฤทธิ์การทำงานของเอนไซม์ โดยคำนวณโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์ SOD ให้ได้ปริมาณดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัม และนำไปทดสอบการทำงานของเอนไซม์ SOD โดยทำปฏิกิริยากับ assay solution ซึ่งประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer (pH 7.8), 1 มิลลิโมลาร์ EDTA.Na<sub>2</sub>, 50 มิลลิโมลาร์ L-methionine, 1 มิลลิโมลาร์ NBT, 0.2 มิลลิโมลาร์ riboflavin (อัตราส่วนดังตาราง 2) และ 50 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer (pH 7.8) (ตาราง 3) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลุม control และหลุม sample ไปบ่มในที่ที่มีแสงด้วยหลอดไฟ LED กำลังไฟ 13 วัตต์ เป็นเวลา 5 นาที (หลุม blank บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร และบันทึกค่าการดูดกลืนแสงของ NBT ที่ลดลง นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณค่า enzyme activity โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ (มิลลิกรัม) ที่ทำให้ NBT ลดลง 50 % ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเขียนกราฟระหว่าง % inhibition (แกน y) และ ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม) (แกน x) แทนค่า y เท่ากับ 50 ในสมการเส้นตรง และคำนวณ SOD specific activity ต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีหน่วยเป็น 1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ตาราง 2 ส่วนผสมของ assay solution ของการทดสอบเอนไซม์ SOD

Component	Final concentration	Volume (ul)
		X1
50 mM Na-Po <sub>4</sub> buffer(pH7.8)	78 mM	100
1 mM EDTA.Na <sub>2</sub>	0.12 mM	22
50 mM L-methionine	10 mM	36
1 mM NBT	66 uM	12
0.2 mM riboflavin	6.66 uM	6
Distill water	-	4
Total volume		180

ตาราง 3 ส่วนผสมของการทดสอบเอนไซม์ SOD

Tube		Reagent			Total volume (ml)	Incubation
		50 mM Na-PO <sub>4</sub> buffer(pH7.8) (ul)	Sample (ul)	Assay solution (ml)		
1	Blank	20	-	180	200	ที่มืด
2	Control	20	-	180	200	ให้แสง
3	Sample 2 ul	20-x	x	180	200	ให้แสง
4	Sample 4 ul	20-x	x	180	200	ให้แสง
5	Sample 6 ul	20-x	x	180	200	ให้แสง
6	Sample 12 ul	20-x	x	180	200	ให้แสง

หมายเหตุ: x = ปริมาตรของตัวอย่าง

### 10.5 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT)

ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ catalase ด้วยวิธี วิธี CAT assay ในการกำจัดโมเลกุลอนุมูลอิสระ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ ROS ที่เกิดขึ้นจากภาวะเครียดออกซิเดชั่น สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร โดยวัดความเข้มข้นของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ลดลง และรายงานค่าเป็น CAT specific activity มีหน่วยเป็น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน

นำสารสกัดเอนไซม์ CAT จากเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงแต่ละกลุ่ม (จากข้อ 10.1) คำนวณปริมาณโปรตีนให้ได้ 30 ไมโครกรัม และนำไปทดสอบการทำงานของเอนไซม์ CAT โดยปฏิกิริยาการทดสอบ ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 มิลลิโมลาร์ EDTA.Na<sub>2</sub> และ 4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ตารางที่ 4) ผสมให้เข้ากัน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ใช้โปรแกรม kinetic อ่านค่าการดูดกลืน H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ทุก ๆ 10 วินาที เป็นเวลา 3 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำและ บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ลดลง นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณค่า enzyme activity โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์ มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์

1.0 ไมโครโมลของ  $H_2O_2$  ต่อหน้าที่ นำไปเขียนกราฟระหว่างเวลา (นาที) (แกน x) และค่าการดูดกลืนแสงของ  $H_2O_2$  ที่ลดลง (แกน y) จากนั้นคำนวณ CAT activity จากสูตร 1 มีหน่วยเป็น 1 ยูนิตต่อมิลลิเมตร และคำนวณค่า CAT specific activity จากสูตร 2 มีหน่วยเป็น 1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน

สูตร 1

$$\text{Activity} = \frac{(\Delta A/\text{min}) \times (\text{total volume}) \times 1000 \times \text{dilution factor}}{[\epsilon \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1})] \times (\text{pathlength}) \times (\text{sample volume})}$$

หมายเหตุ:  $(\Delta A/\text{min})$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของ  $H_2O_2$  ต่อหน้าที่  $\epsilon$  ascorbate มีค่า  $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

สูตร 2

$$\text{Catalase specific activity} = \frac{\text{catalase activity}}{\text{mg protein}}$$

หมายเหตุ: mg protein คือ ความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างต่อปริมาตรของตัวอย่าง

ตาราง 4 ส่วนผสมของการทดสอบเอนไซม์ CAT

Component	Blank	Sample
50 mM Na- $PO_4$ buffer pH 7.8 containing 0.1 mM EDTA. $Na_2$	1000- ปริมาตรตาม ปริมาณโปรตีน	1000-(10+ปริมาตรตาม ปริมาณโปรตีน)
4 % $H_2O_2$	-	10
Sample	ปริมาตรตามปริมาณ โปรตีน	ปริมาตรตามปริมาณ โปรตีน
Total volume	1000 ul	1000 ul

### 10.6 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX)

ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ APX ด้วยวิธี APX assay ในการกำจัดโมเลกุลอนุมูลอิสระ  $H_2O_2$  ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ ROS ที่เกิดขึ้นจากภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยมี ascorbate ที่มีคุณสมบัติเป็น electron donor แก่เอนไซม์ APX สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร โดยวัดความเข้มข้นของ ascorbate ที่ลดลง และรายงานค่าเป็น APX specific activity มีหน่วยเป็น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน

นำสารสกัดเอนไซม์ APX จากเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงแต่ละกลุ่ม (จากข้อ 10.2) ที่คำนวณปริมาณโปรตีนให้ได้ 30 ไมโครกรัม นำไปทดสอบการทำงานของเอนไซม์ APX โดยปฏิกิริยาการทดสอบประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ sodium phosphate buffer (pH 7.0), 1 มิลลิโมลาร์ EDTA.Na<sub>2</sub>, 5 มิลลิโมลาร์ sodium ascorbate และ 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ตารางที่ 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ใช้โปรแกรม kinetic อ่านค่าการดูดกลืน ascorbate ทุก ๆ 10 วินาที เป็นเวลา 3 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของ ascorbate ที่ลดลงและ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณ ค่า enzyme activity โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์ มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถออกซิไดซ์ 1.0 ไมโครโมลของ ascorbate ต่อนาที ค่า APX activity จากสูตร 1 มีหน่วยเป็น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และคำนวณค่า APX specific activity จากสูตร 2 มีหน่วยเป็น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน

สูตร 1

$$\text{Activity} = \frac{(\Delta A/\text{min}) \times (\text{total volume}) \times \text{dilution factor}}{[\epsilon (\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})] \times (\text{pathlength}) \times (\text{sample volume})}$$

หมายเหตุ:  $(\Delta A/\text{min})$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของ ascorbate ต่อนาที  $\epsilon$  ascorbate มีค่า  $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

สูตร 2

$$\text{Ascorbate peroxidase specific activity} = \frac{\text{ascorbate peroxidase activity}}{\text{mg protein}}$$

หมายเหตุ: mg protein คือ ความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่างต่อปริมาตรของตัวอย่าง

ตาราง 5 ส่วนผสมของการทดสอบแอนไซม์ APX

Component	Blank	Sample
50 mM Na-Po <sub>4</sub> buffer pH 7.0	800	1000-(300+ปริมาณตามปริมาณโปรตีน)
1 mM EDTA.Na <sub>2</sub>	100	100
5 mM Sodium ascorbate	-	100
3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100	100
Sample	-	ปริมาณตามปริมาณโปรตีน
Total volume	1000 ul	1000 ul

#### 11. การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากการทดลอง 3.2 และรากลอยถั่วลิสงชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น โดยนำเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงมาผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยเทคนิค freeze dry จากนั้นนำเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ผ่านการ freeze dry แล้วมาติดบน SEM stub และ sputter-coat (10 nm gold/pallidum) นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) รุ่น Leo1455VP ค่าศักย์เร่งอิเล็กตรอนช่วง 1-30 kV เครื่องทำงานในภาวะสุญญากาศช่วง 1-400 Pa

#### 12. การวิเคราะห์ทางสถิติ

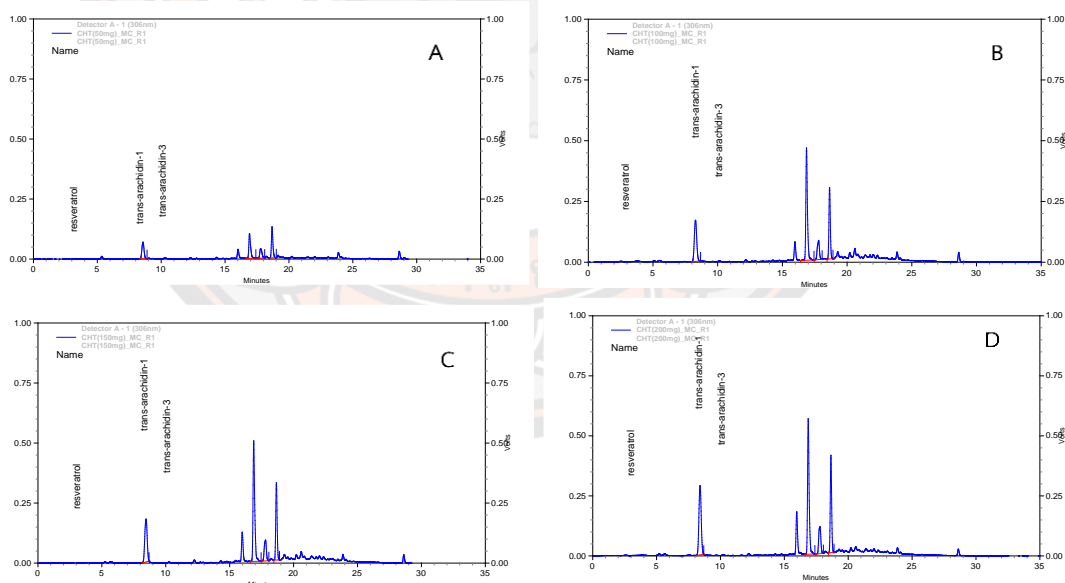
รายงานผลการทดลองทั้งหมด เป็นค่า mean  $\pm$  SD โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทาง (Two-Way ANOVA) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 23 รายงานผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวกระตุ้นไคโตซานในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยง

ในการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CHT ที่มีผลต่อการกระตุ้นปริมาณสารกลุ่มสตีลบินในรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยง ทำได้โดยทดสอบความเข้มข้นที่ต่างกันของ CHT ได้แก่ 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับตัวกระตุ้น MeJA ร่วมกับ CD และตรวจสอบปริมาณสารกลุ่มสตีลบินด้วยเทคนิค HPLC ผลการศึกษาพบว่า ตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมและสามารถกระตุ้นให้รากลอยถั่วลิสงสร้างสารกลุ่มสตีลบินได้ในปริมาณที่สูงกว่าการกระตุ้นด้วย CHT ที่ความเข้มข้นอื่น ๆ (ภาพ 18)









ภาพ 18 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้น A) 50 mg/L, B) 100 mg/L, C) 150 mg/L และ D) 200 mg/L ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค HPLC









## 1. ผลของการกระตุ้นต่อลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

ผลการเปรียบเทียบลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นที่แตกต่างกัน พบว่า เนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD จะมีสีเหลืองเข้มขึ้นตามความเข้มข้นของ CHT ในขณะที่การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น MeJA ร่วมกับ CD จะมีสีเหลืองจางกว่าการกระตุ้นที่มี CHT ร่วมด้วย และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (กระตุ้นด้วย 1% acetic acid) พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงรากลอยของชุดควบคุมมีสีใส ดังตาราง 6 และ 7 ตามลำดับ

ตาราง 6 ลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นชนิด CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตัวกระตุ้น	เนื้อเยื่อรากลอย	ตัวกระตุ้น	เนื้อเยื่อรากลอย
Control		CHT (50mg/L)_MeJA +CD	
CHT (100mg/L)_MeJA +CD		CHT (150mg/L)_MeJA +CD	
CHT (200mg/L)_MeJA +CD		MeJA+CD	

ตาราง 7 ลักษณะสีของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นชนิด CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตัวกระตุ้น	อาหารเพาะเลี้ยง	ตัวกระตุ้น	อาหารเพาะเลี้ยง
Control		CHT (50mg/L)_MeJA +CD	
CHT (100mg/L)_MeJA +CD		CHT (150mg/L)_MeJA +CD	
CHT (200mg/L)_MeJA +CD		MeJA+CD	

## 2. ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงด้วยวิธี ABTS พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่กระตุ้นด้วย CHT ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ

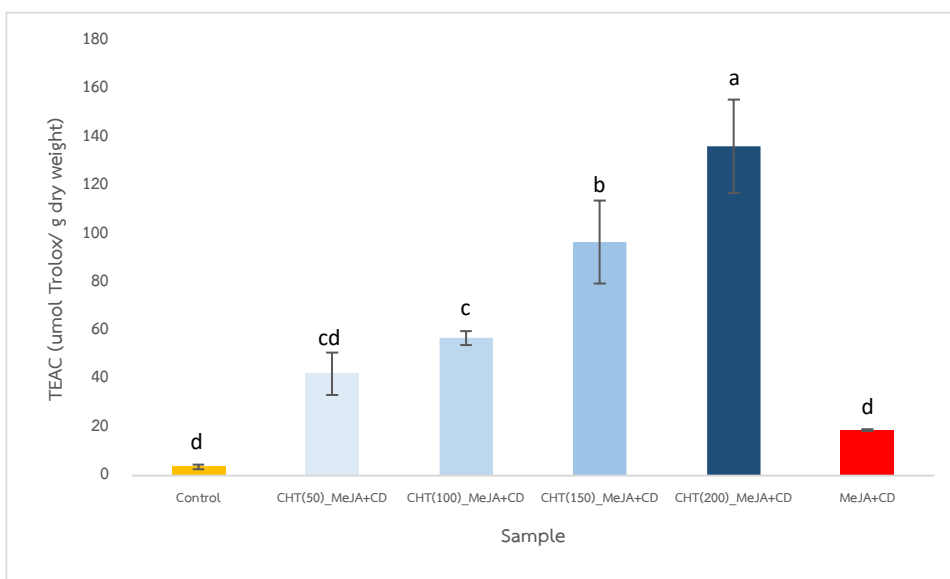
136.50±19.41 ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตาราง 8 และภาพ 19)

**ตาราง 8** ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD ด้วยวิธี ABTS

ตัวกระตุ้น	Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
Control	3.64±0.99 <sup>d</sup>
CHT (50mg/L)_MeJA+CD	42.26±8.76 <sup>cd</sup> (>11.61 เท่า)
CHT (100mg/L)_MeJA+CD	57.05±2.90 <sup>c</sup> (>15.67 เท่า)
CHT (150mg/L)_MeJA+CD	96.83±17.31 <sup>b</sup> (>26.60 เท่า)
CHT (200mg/L)_MeJA+CD	136.50±19.41 <sup>a</sup> (>37.50 เท่า)
MeJA+CD	18.94±0.35 <sup>d</sup> (>5.20 เท่า)

**หมายเหตุ:** ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=2)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดการกระตุ้น (>, < มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)



ภาพ 19 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD ด้วยวิธี ABTS

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดการกระตุ้น

### 3. ผลการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) ของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

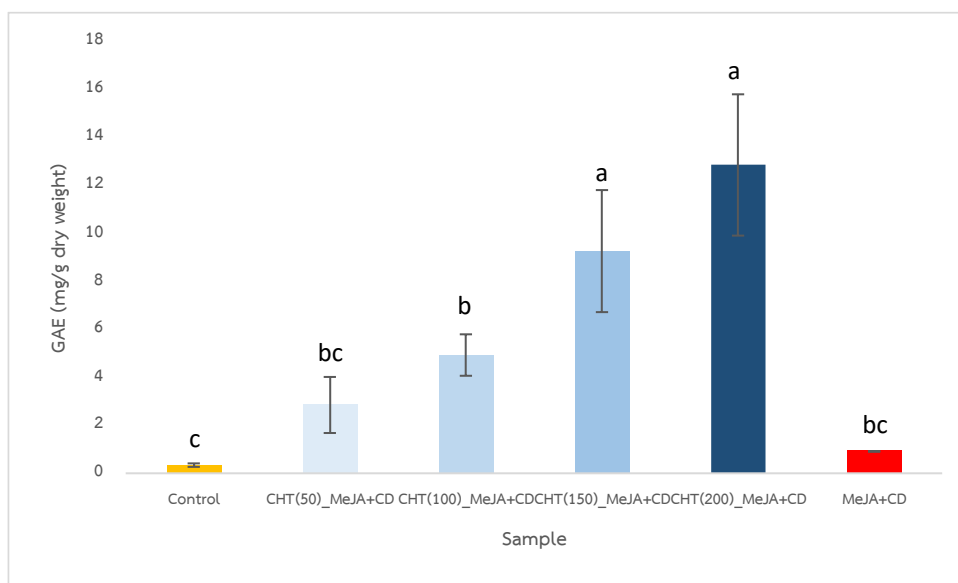
ผลการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงด้วยวิธี total phenolic compound พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ  $12.85 \pm 2.94$  มิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตาราง 9 และภาพ 20)

ตาราง 9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย ถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD ด้วยวิธี total phenolic compound

ตัวกระตุ้น	gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
Control	0.33±0.06 <sup>c</sup>
CHT (50mg/L)_MeJA+CD	2.84±1.18 <sup>bc</sup> (>8.53 เท่า)
CHT (100mg/L)_MeJA+CD	4.93±0.86 <sup>b</sup> (>14.79 เท่า)
CHT (150mg/L)_MeJA+CD	9.26±2.55 <sup>a</sup> (>27.81 เท่า)
CHT (200mg/L)_MeJA+CD	12.85±2.94 <sup>a</sup> (>38.59 เท่า)
MeJA+CD	0.92±0.00 <sup>bc</sup> (>2.76 เท่า)

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=2)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดการกระตุ้น (>, < มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)

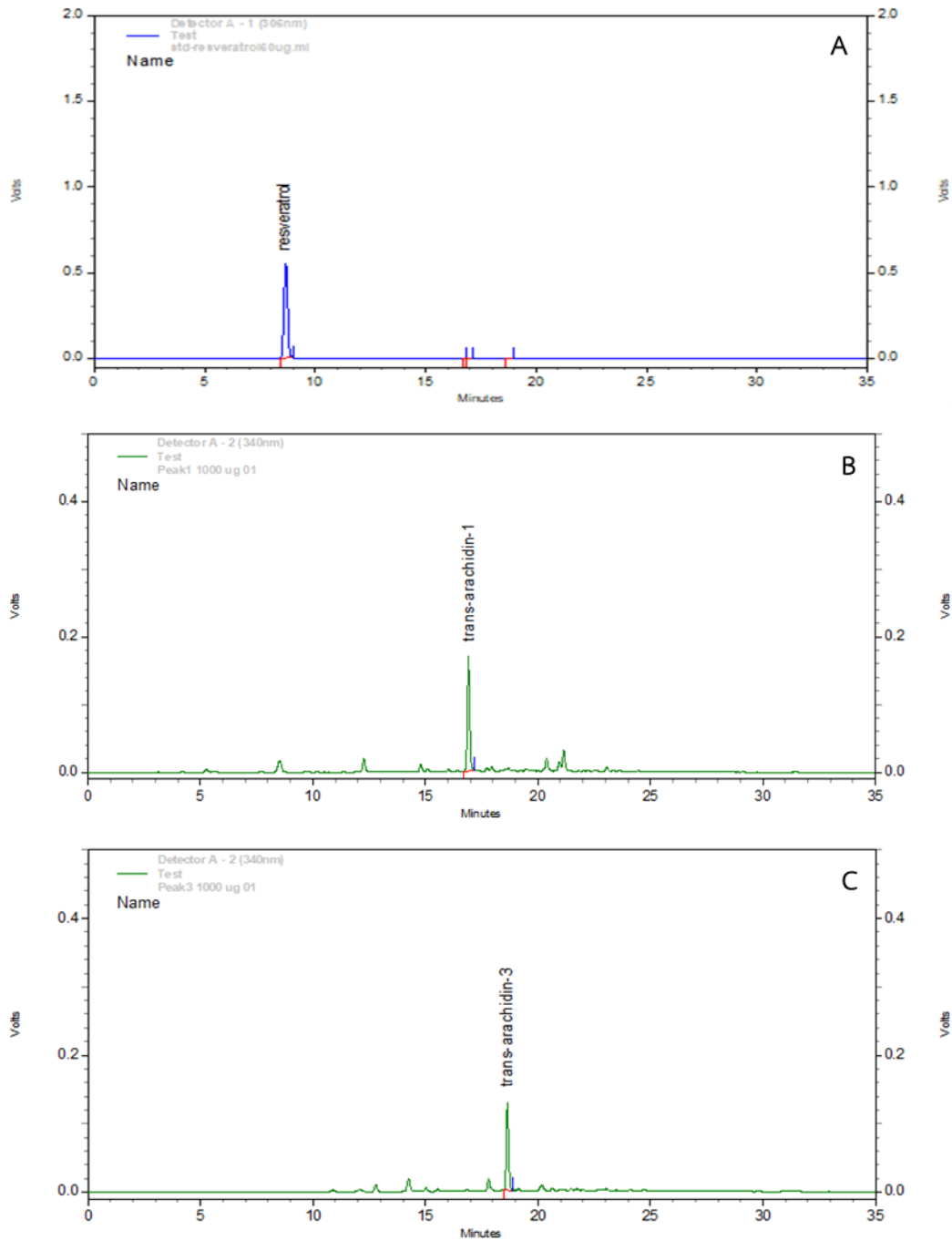


ภาพ 20 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD ด้วยวิธี total phenolic compound

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดการกระตุ้น

#### 4. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจสอบสาร *trans-resveratrol* และความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นในการตรวจสอบสารอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* โดยเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่สารผ่านคอลัมน์ (retention time) ของสารมาตรฐาน *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ดังภาพ 21



ภาพ 21 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3*

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD มีปริมาณของสาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* สูงที่สุด เท่ากับ  $2.52 \pm 0.35$ ,  $323.94 \pm 20.45$  และ  $344.64 \pm 21.81$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตาราง 10 และภาพ 22)

ตาราง 10 ปริมาณสารกลุ่มสติลบินของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD

ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง
Control	nd
CHT (50mg/L)_MeJA+CD	$0.44 \pm 0.20^{\text{cd}}$
CHT (100mg/L)_MeJA+CD	$0.77 \pm 0.09^{\text{c}}$
CHT (150mg/L)_MeJA+CD	$1.39 \pm 0.30^{\text{b}}$
CHT (200mg/L)_MeJA+CD	$2.52 \pm 0.35^{\text{a}}$
MeJA+CD	$0.09 \pm 0.02^{\text{d}}$

ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i> มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง
Control	nd
CHT (50mg/L)_MeJA+CD	$59.20 \pm 37.36^{\text{d}}$
CHT (100mg/L)_MeJA+CD	$134.34 \pm 7.69^{\text{c}}$
CHT (150mg/L)_MeJA+CD	$258.89 \pm 20.98^{\text{b}}$
CHT (200mg/L)_MeJA+CD	$323.94 \pm 20.45^{\text{a}}$
MeJA+CD	$3.15 \pm 1.68^{\text{e}}$



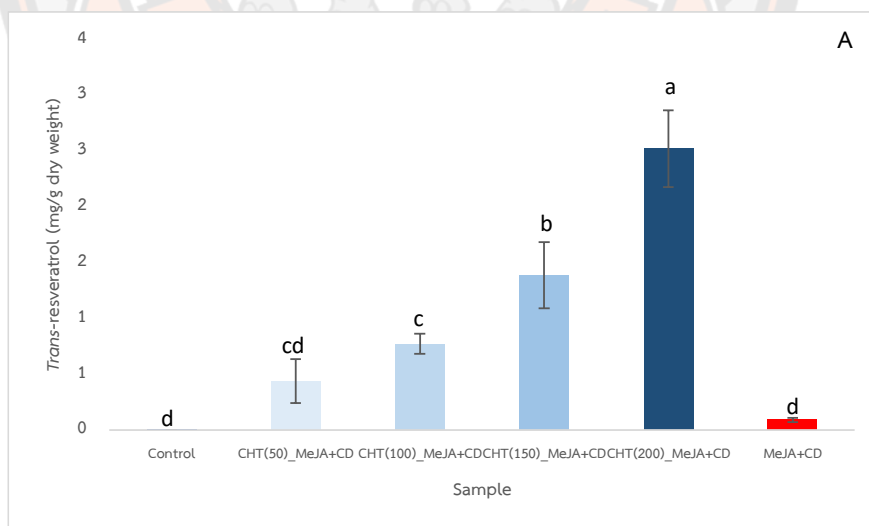
ตาราง 10 (ต่อ)

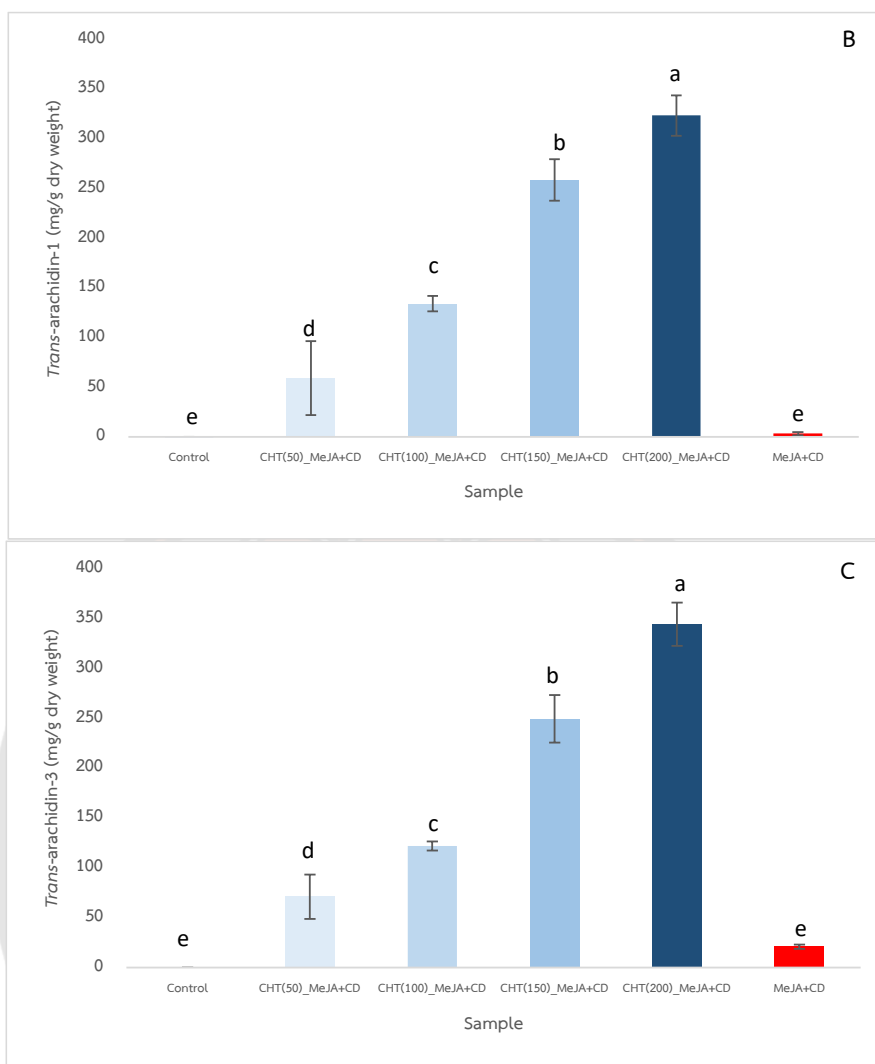
ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง
Control	nd
CHT (50mg/L)_MeJA+CD	71.02±22.22 <sup>d</sup>
CHT (100mg/L)_MeJA+CD	121.94±4.47 <sup>c</sup>
CHT (150mg/L)_MeJA+CD	249.73±23.80 <sup>b</sup>
CHT (200mg/L)_MeJA+CD	344.64±21.81 <sup>a</sup>
MeJA+CD	21.09±2.20 <sup>e</sup>

หมายเหตุ: nd = not detection

ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=2)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มสารสกัดบิบินชนิดเดียวกันในแต่ละชุดการกระตุ้น





ภาพ 22 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลันเตาที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มสารสกัดชนิดเดียวกันในแต่ละชุดการกระตุ้น

**สรุป** ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารกลุ่มสติลบิน ได้แก่ *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลันเตาที่กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลันเตาที่ได้รับการกระตุ้นด้วย

CHT ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารกลุ่มสตีลปินสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยง รากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT ที่ความเข้มข้น 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ดังนั้นในการศึกษาลำดับต่อไป จึงเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CHT คือ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อนำไปศึกษากระบวนการกระตุ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสาร กลุ่มสตีลปินต่อไป

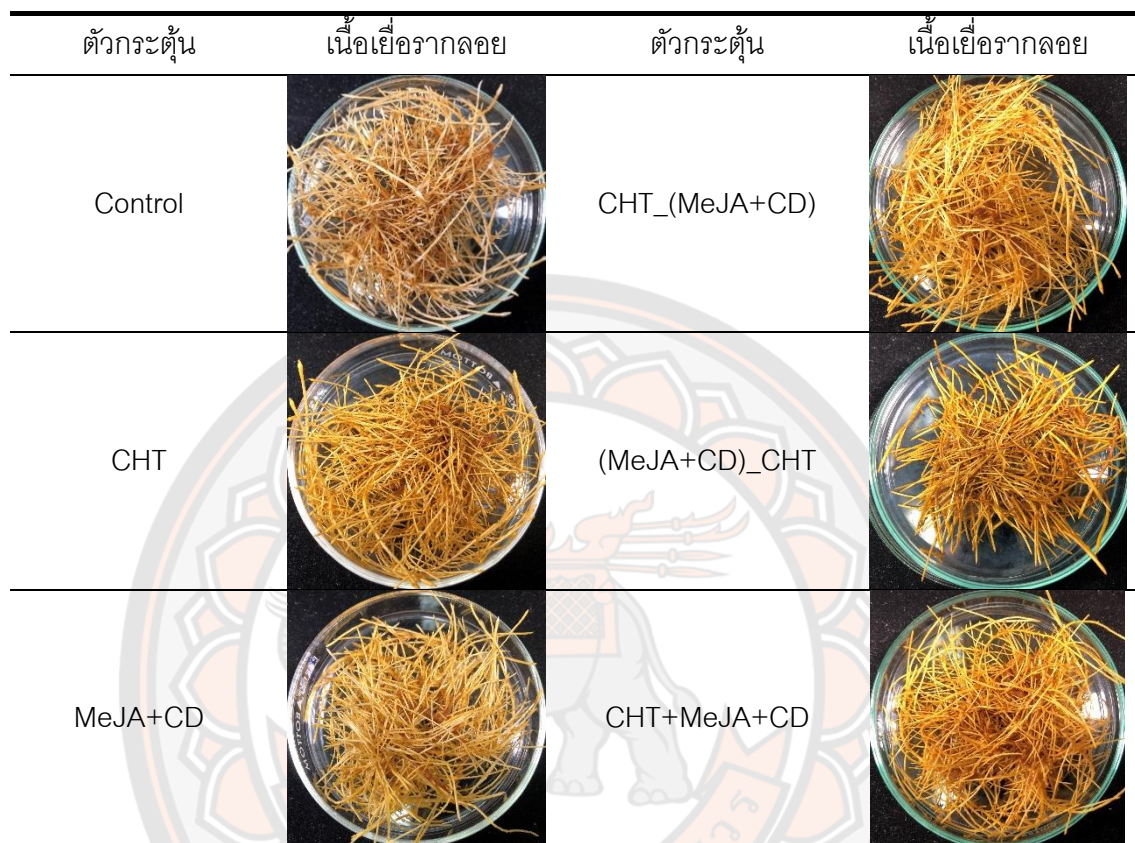
### ผลการศึกษาดั้วกระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยง

เมื่อนำรากลอยถั่วลิสงมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการกระตุ้น ด้วยชุดตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน คือ 1) ชุดควบคุมที่กระตุ้นด้วย 1% acetic acid pH 5.7; (control) 2) ชุดที่กระตุ้นด้วยไคโตซาน; (CHT) 3) ชุดที่กระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD; (MeJA+CD) 4) ชุดที่กระตุ้นด้วย CHT ก่อนเติม MeJA ร่วมกับ CD; (CHT\_(MeJA+CD)) 5) ชุดที่กระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD ก่อนเติม CHT; ((MeJA+CD)\_CHT) และ 6) ชุดที่กระตุ้นด้วย CHT ร่วมกับ MeJA และ CD; (CHT+MeJA+CD) เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง การคัดเลือกตัวกระตุ้นที่เหมาะสมจะพิจารณาจากปริมาณสารกลุ่มสตีลปิน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่ได้ภายหลังการกระตุ้นด้วยชุดตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน

#### 1. ผลของการกระตุ้นต่อลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

ผลการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน 6 ชุด เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า เนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง จะมีลักษณะและความเข้มของสีรากลอยแตกต่างกัน โดยชุดตัวกระตุ้นที่มี CHT เป็นองค์ประกอบ จะทำให้รากมีสีเหลืองเข้มแตกต่างจากชุดควบคุม และชุดที่มีเฉพาะ MeJA+CD (ตาราง 11) ในขณะที่อาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น (MeJA+CD)\_CHT และ CHT+MeJA+CD จะมีสีเหลืองเข้มในทุกระยะเวลาของการกระตุ้น ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT เพียงอย่างเดียว, MeJA+CD และ CHT\_(MeJA+CD) จะมีสีเหลืองเข้มขึ้น เมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในทุกช่วงเวลา (ตาราง 12)

ตาราง 11 ลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยตัวหลังจากการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



หมายเหตุ: Control หมายถึง ชุดควบคุมที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 1% acetic acid pH 5.7

CHT หมายถึง ชุดที่กระตุ้นด้วยไคโตซานเพียงอย่างเดียว


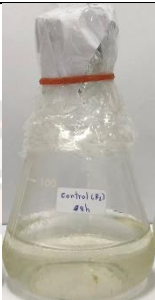
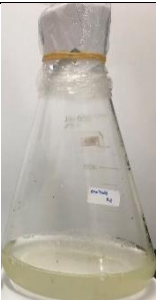
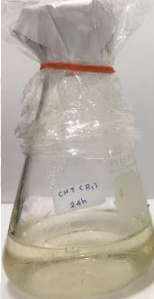
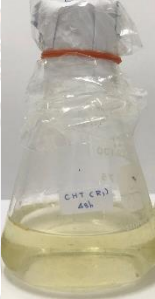

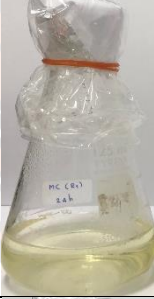
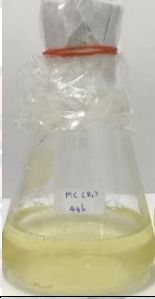
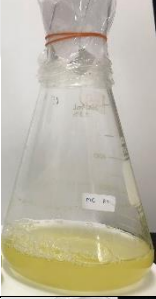
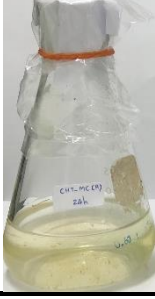

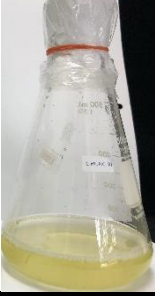
MeJA+CD หมายถึง ชุดที่กระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD

CHT\_(MeJA+CD) หมายถึง ชุดที่กระตุ้นด้วย CHT ก่อนเติม MeJA ร่วมกับ CD

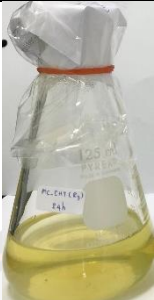
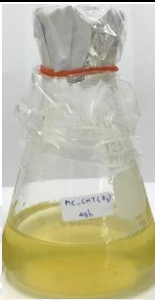


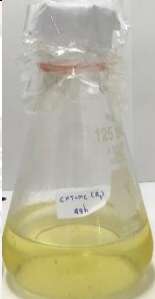

(MeJA+CD)\_CHT หมายถึง ชุดที่กระตุ้นด้วย MeJA ร่วมกับ CD ก่อนเติม CHT

CHT+MeJA+CD หมายถึง ชุดที่กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นร่วม CHT, MeJA และ CD พร้อมกัน

ตาราง 12 ลักษณะสีของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตัวกระตุ้น	ระยะเวลา (ชั่วโมง)		
	24	48	72
Control			
CHT			
MeJA+CD			
CHT_(MeJA+CD)			

ตาราง 12 (ต่อ)

ตัวกระตุ้น	ระยะเวลา (ชั่วโมง)		
	24	48	72
(MeJA+CD)_CHT			
CHT+MeJA+CD			

## 2. ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

### 2.1 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

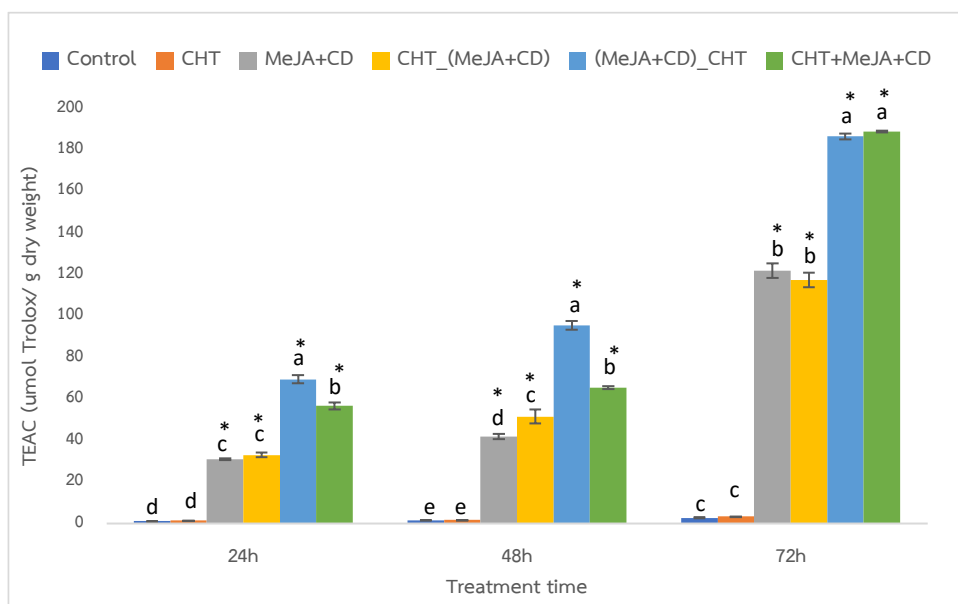
ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกันที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี ABTS พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น MeJA+CD, CHT\_(MeJA+CD), (MeJA+CD)\_CHT และ CHT+MeJA+CD ทุกระยะเวลาของการกระตุ้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้นด้วย CHT เพียงอย่างเดียว และพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยง รากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง เท่ากับ  $188.95 \pm 0.43$  ไมโครโมล Trolox ต่อกกรัมน้ำหนักแห้ง (ตาราง 13 และภาพ 23) ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น (MeJA+CD)\_CHT ที่ระยะเวลาเดียวกัน

ตาราง 13 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี ABTS

ตัวกระตุ้น	Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)		
	ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	1.21±0.02 <sup>d</sup>	1.72±0.06 <sup>e</sup>	2.82±0.21 <sup>c</sup>
CHT	1.54±0.02 <sup>d</sup>	1.82±0.09 <sup>e</sup>	3.44±0.08 <sup>c</sup>
	(>1.22 เท่า)	(>1.06 เท่า)	(>1.28 เท่า)
MeJA+CD	31.05±0.45 <sup>c</sup>	42.02±1.15 <sup>d</sup>	121.93±3.45 <sup>b</sup>
	(>25.76 เท่า)	(>24.44 เท่า)	(>43.24 เท่า)
CHT_(MeJA+CD)	33.16±1.09 <sup>c</sup>	51.66±3.44 <sup>c</sup>	117.53±3.56 <sup>b</sup>
	(>27.51 เท่า)	(>30.04 เท่า)	(>41.68 เท่า)
(MeJA+CD)_CHT	69.63±1.91 <sup>a</sup>	95.61±2.18 <sup>a</sup>	186.73±1.38 <sup>a</sup>
	(>57.78 เท่า)	(>55.60 เท่า)	(>66.22 เท่า)
CHT+MeJA+CD	56.79±1.67 <sup>b</sup>	65.61±0.66 <sup>b</sup>	188.95±0.43 <sup>a</sup>
	(>47.12 เท่า)	(>38.16 เท่า)	(>67.01 เท่า)

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในแต่ละชั่วโมงของการกระตุ้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (>, < มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)



ภาพ 23 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี ABTS

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในชั่วโมงเดียวกันของการกระตุ้น มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และ \* มี นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย ตัวกระตุ้นเดียวกันที่เวลาแตกต่างกัน

## 2.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยง รากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกันที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี FRAP พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย ตัวกระตุ้น MeJA+CD, CHT\_(MeJA+CD), (MeJA+CD)\_CHT และ CHT+MeJA+CD มีฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเพิ่มระยะเวลาการกระตุ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ กระตุ้นด้วย CHT เพียงอย่างเดียว และพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดจากการกระตุ้นด้วย ตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง เท่ากับ  $24.16 \pm 0.50$  มิลลิกรัม ascorbic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตาราง 14 และภาพ 24) ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



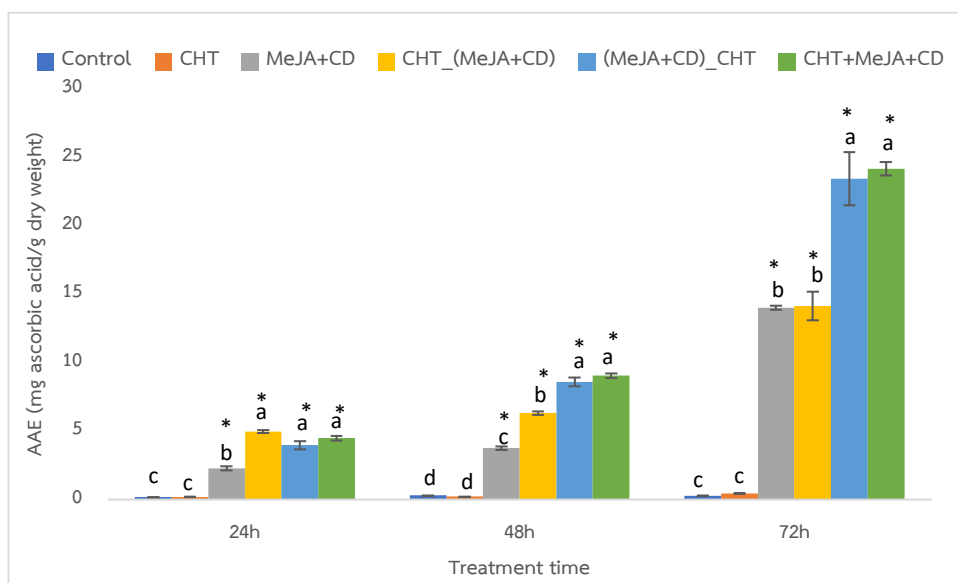
ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่  
ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น (MeJA+CD)\_CHT ที่ระยะเวลาเดียวกัน

**ตาราง 14** ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับ  
การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ  
72 ชั่วโมงด้วยวิธี FRAP

ตัวกระตุ้น	ascorbic acid equivalent (AAE)		
	มิลลิกรัม ascorbic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	0.160±0.004 <sup>c</sup>	0.284±0.002 <sup>d</sup>	0.264±0.008 <sup>c</sup>
CHT	0.17±0.01 <sup>c</sup> (>1.09 เท่า)	0.20±0.01 <sup>d</sup> (<0.70 เท่า)	0.43±0.02 <sup>c</sup> (>1.62 เท่า)
MeJA+CD	2.26±0.16 <sup>b</sup> (>14.16 เท่า)	3.74±0.13 <sup>c</sup> (>13.20 เท่า)	14.01±0.14 <sup>b</sup> (>52.96 เท่า)
CHT_(MeJA+CD)	4.97±0.10 <sup>a</sup> (>31.14 เท่า)	6.31±0.13 <sup>b</sup> (>22.26 เท่า)	14.13±1.05 <sup>b</sup> (>53.42 เท่า)
(MeJA+CD)_CHT	3.95±0.30 <sup>a</sup> (>24.78 เท่า)	8.57±0.31 <sup>a</sup> (>30.22 เท่า)	23.44±1.95 <sup>a</sup> (>88.63 เท่า)
CHT+MeJA+CD	4.47±0.19 <sup>a</sup> (>28.00 เท่า)	9.04±0.17 <sup>a</sup> (>31.89 เท่า)	24.16±0.50 <sup>a</sup> (>91.35 เท่า)

**หมายเหตุ:** ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในชั่วโมงเดียวกันของการกระตุ้น มีความแตกต่างกันอย่างมี  
นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (>, <  
มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)



ภาพ 24 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี FRAP

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน และ \* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเดียวกันที่เวลาแตกต่างกัน

### 3. ผลการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) ของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

ผลการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกันที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี total phenolic compound พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น MeJA+CD, CHT\_(MeJA+CD), (MeJA+CD)\_CHT และ CHT+MeJA+CD เมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่กระตุ้นด้วย CHT เพียงอย่างเดียว โดยการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด เท่ากับ  $8.67 \pm 0.11$  มิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดการกระตุ้นอื่น ๆ

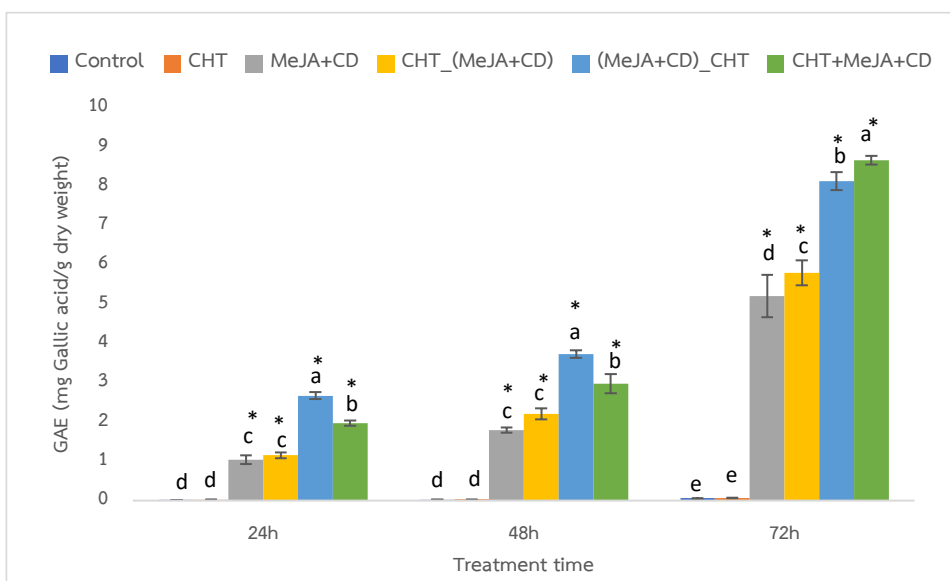
ที่ระยะเวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม คิดเป็น 136.94 เท่า (ตาราง 15 และภาพ 25)

ตาราง 15 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย ถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี total phenolic compound

ตัวกระตุ้น	gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม gallic acid ต่อ		
	กรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	0.015±0.001 <sup>d</sup>	0.025±0.001 <sup>d</sup>	0.063±0.001 <sup>e</sup>
CHT	0.026±0.003 <sup>d</sup> (>1.72 เท่า)	0.029±0.002 <sup>d</sup> (>1.13 เท่า)	0.065±0.001 <sup>e</sup> (>1.02 เท่า)
MeJA+CD	1.04±0.11 <sup>c</sup> (>69.82 เท่า)	1.79±0.06 <sup>c</sup> (>70.86 เท่า)	5.21±0.54 <sup>d</sup> (>82.27 เท่า)
CHT_(MeJA+CD)	1.15±0.08 <sup>c</sup> (>77.10 เท่า)	2.21±0.14 <sup>c</sup> (>87.39 เท่า)	5.80±0.32 <sup>c</sup> (>91.62 เท่า)
(MeJA+CD)_CHT	2.67±0.09 <sup>a</sup> (>178.59 เท่า)	3.73±0.10 <sup>a</sup> (>147.69 เท่า)	8.13±0.23 <sup>b</sup> (>128.44 เท่า)
CHT+MeJA+CD	1.97±0.06 <sup>b</sup> (>131.80 เท่า)	2.98±0.25 <sup>b</sup> (>117.67 เท่า)	8.67±0.11 <sup>a</sup> (>136.94 เท่า)

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกันในชั่วโมงเดียวกันของการกระตุ้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (>, < มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)



ภาพ 25 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี total phenolic compound

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน และ \* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเดียวกันที่เวลาแตกต่างกัน

#### 4. ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารด้วยเทคนิค HPLC พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น MeJA+CD, CHT\_(MeJA+CD), (MeJA+CD)\_CHT และ CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สามารถตรวจพบสาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ได้ในปริมาณสูง ส่วนสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT เพียงอย่างเดียว ตรวจพบสารสเตโรลีนทุกตัวได้น้อยมากในทุกระยะเวลาของการกระตุ้น ในขณะที่ไม่สามารถตรวจพบสารสเตโรลีนทุกตัวได้ในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (ภาพโครมาโตแกรม แสดงในภาคผนวก)

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณสาร *trans-resveratrol* มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการกระตุ้นที่เพิ่มขึ้นในทุก ๆ ชุดของการกระตุ้น โดยที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงของการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วยตัวกระตุ้น (MeJA+CD)\_CHT มีปริมาณสาร *trans-resveratrol* สูง เท่ากับ  $2.04 \pm 0.23$  มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ขณะที่ระยะเวลาการกระตุ้น 48 และ 72 ชั่วโมง สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD มีปริมาณ *trans-resveratrol* สูงที่สุด เท่ากับ  $2.42 \pm 0.32$  และ  $2.14 \pm 0.44$  มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตาราง 16 และ ภาพ 26A)

วิเคราะห์ปริมาณสาร *trans-arachidin-1* พบว่า มีปริมาณสารเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้นในทุก ๆ ชุดของการกระตุ้น การกระตุ้นด้วย (MeJA+CD)\_CHT ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีปริมาณสาร *trans-arachidin-1* สูง เท่ากับ  $426.17 \pm 64.63$  และ  $573.15 \pm 134.32$  มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ขณะที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD มีปริมาณสาร *trans-arachidin-1* สูงที่สุด เท่ากับ  $684.30 \pm 183.85$  มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง (ตาราง 16 และ ภาพ 26B)

และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร *trans-arachidin-3* พบว่า เมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้น จะมีปริมาณสารเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ชุดของการกระตุ้น โดยการกระตุ้นด้วย (MeJA+CD)\_CHT ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณสาร *trans-arachidin-3* สูง เท่ากับ  $356.73 \pm 105.59$  มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ขณะที่การกระตุ้นด้วย CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการกระตุ้น พบปริมาณสาร *trans-arachidin-3* สูงที่สุด เท่ากับ  $470.02 \pm 100.76$  และ  $543.94 \pm 171.17$  มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง (ตาราง 16 และ ภาพ 26C)

ตาราง 16 ปริมาณสารกลุ่มสติลบินของสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	nd	nd	nd
CHT	0.013±0.005 <sup>c</sup>	0.036±0.011 <sup>c</sup>	0.047±0.013 <sup>d</sup>
MeJA+CD	0.44±0.13 <sup>bc</sup>	0.77±0.23 <sup>b</sup>	0.79±0.27 <sup>c</sup>
CHT_(MeJA+CD)	0.69±0.05 <sup>b</sup>	0.94±0.09 <sup>b</sup>	0.87±0.16 <sup>c</sup>
(MeJA+CD)_CHT	2.04±0.23 <sup>a</sup>	2.20±0.41 <sup>a</sup>	1.58±0.30 <sup>b</sup>
CHT+MeJA+CD	1.85±0.20 <sup>a</sup>	2.42±0.32 <sup>a</sup>	2.14±0.44 <sup>a</sup>
ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i> มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	nd	nd	nd
CHT	0.23±0.35 <sup>c</sup>	0.09±0.12 <sup>c</sup>	0.06±0.09 <sup>c</sup>
MeJA+CD	79.25±33.40 <sup>bc</sup>	174.48±78.68 <sup>bc</sup>	277.43±105.66 <sup>b</sup>
CHT_(MeJA+CD)	154.72±51.28 <sup>bc</sup>	311.03±41.60 <sup>b</sup>	513.97±125.79 <sup>a</sup>
(MeJA+CD)_CHT	426.17±64.63 <sup>a</sup>	573.15±134.32 <sup>a</sup>	480.78±115.89 <sup>ab</sup>
CHT+MeJA+CD	242.15±22.46 <sup>ab</sup>	530.02±74.17 <sup>a</sup>	684.30±183.85 <sup>a</sup>

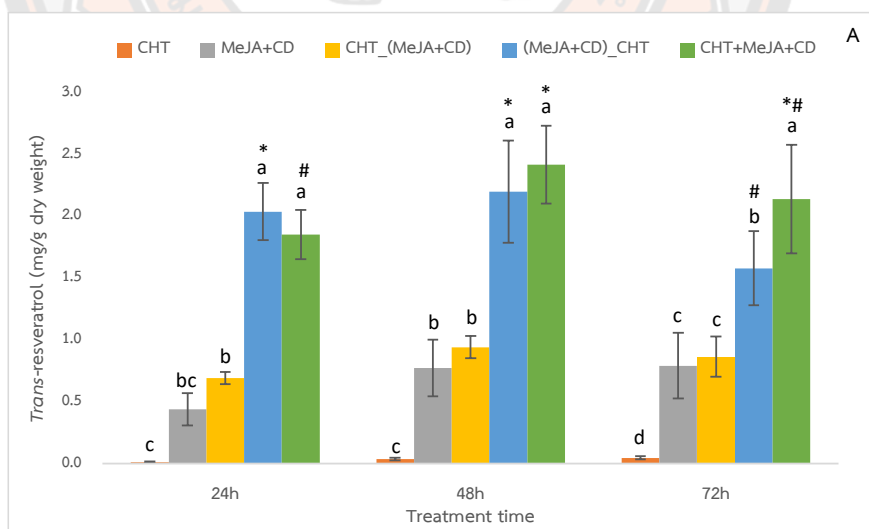
ตาราง 16 (ต่อ)

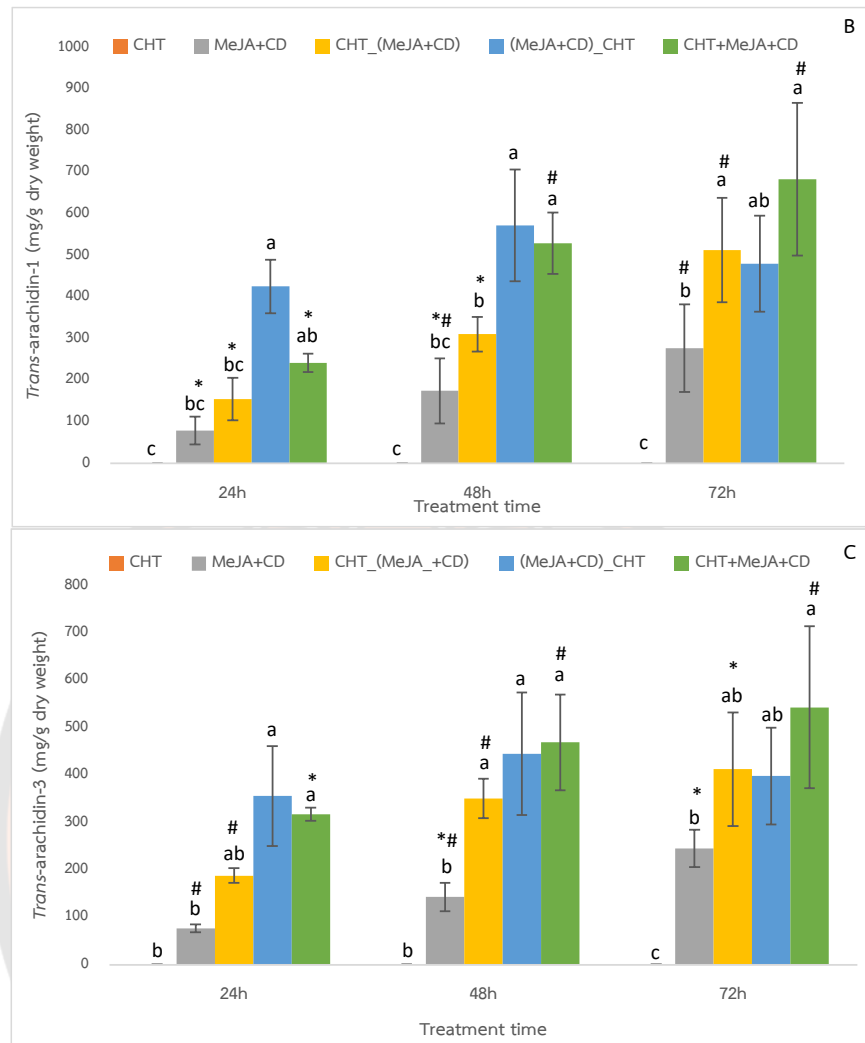
ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	nd	nd	nd
CHT	0.24±0.36 <sup>b</sup>	0.07±0.10 <sup>b</sup>	0.05±0.10 <sup>c</sup>
MeJA+CD	76.63±8.40 <sup>b</sup>	143.04±30.02 <sup>b</sup>	245.47±39.51 <sup>b</sup>
CHT_(MeJA+CD)	188.40±15.75 <sup>ab</sup>	351.27±41.67 <sup>a</sup>	413.36±120.27 <sup>ab</sup>
(MeJA+CD)_CHT	356.73±105.59 <sup>a</sup>	446.15±129.72 <sup>a</sup>	399.06±102.15 <sup>ab</sup>
CHT+MeJA+CD	318.14±14.40 <sup>a</sup>	470.02±100.76 <sup>a</sup>	543.94±171.17 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: nd = not detection

ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน





ภาพ 26 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน และ \*, # มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเดียวกันที่เวลาแตกต่างกัน

**สรุป** จากผลการศึกษากำหนดตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในเบื้องต้น โดยทำการทดสอบการเติมชนิดตัวกระตุ้น และลำดับการเติมตัวกระตุ้นที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงระยะเวลา เปรียบเทียบผล



การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารกลุ่มสตีลบิน ได้แก่ *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารกลุ่มสตีลบินสูงที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นอื่น ๆ ตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD จึงเป็นตัวกระตุ้นที่เหมาะสม เนื่องจากการเติมตัวกระตุ้นทั้ง 3 ตัวพร้อมกัน สามารถลดระยะเวลาในการเติมตัวกระตุ้นที่ละตัวตามลำดับช่วงเวลา และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสารกลุ่มสตีลบินได้ในปริมาณที่สูง ดังนั้นจึงทำการเลือกตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ไปใช้ในการศึกษาลำดับต่อไป โดยจะทำการเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อรากลอยเริ่มต้นก่อนการกระตุ้นให้มากขึ้น และศึกษาผลการกระตุ้นรวมทั้งกลไกการตอบสนองของรากลอยต่อสภาวะเครียดออกซิเดชันเมื่อได้รับตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD โดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และการแสดงออกของยีนในกลุ่มต่าง ๆ ในระบบขวดเขย่า รวมทั้งการศึกษาร่วมเปรียบเทียบผลการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงต่อการสร้างสารกลุ่มสตีลบินในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในลำดับต่อไป

### **ผลการกระตุ้นและกลไกการตอบสนองของรากลอยถั่วลิสงต่อสภาวะเครียดออกซิเดชันเมื่อได้รับตัวกระตุ้นด้วย CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่า**

ทำการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่า โดยเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อเริ่มต้นของรากลอยในอัตราส่วนรากลอยต่ออาหารเพาะเลี้ยง 5 กรัมต่อลิตร (เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากลอยเริ่มต้น 1 กรัม ในอาหารเหลว ปริมาตร 200 มิลลิลิตร) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายรากลอยลงอาหารเพาะเลี้ยงขวดใหม่ สูตร ½ MS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และทำการกระตุ้นด้วย CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

## 1. ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

### 1.1 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

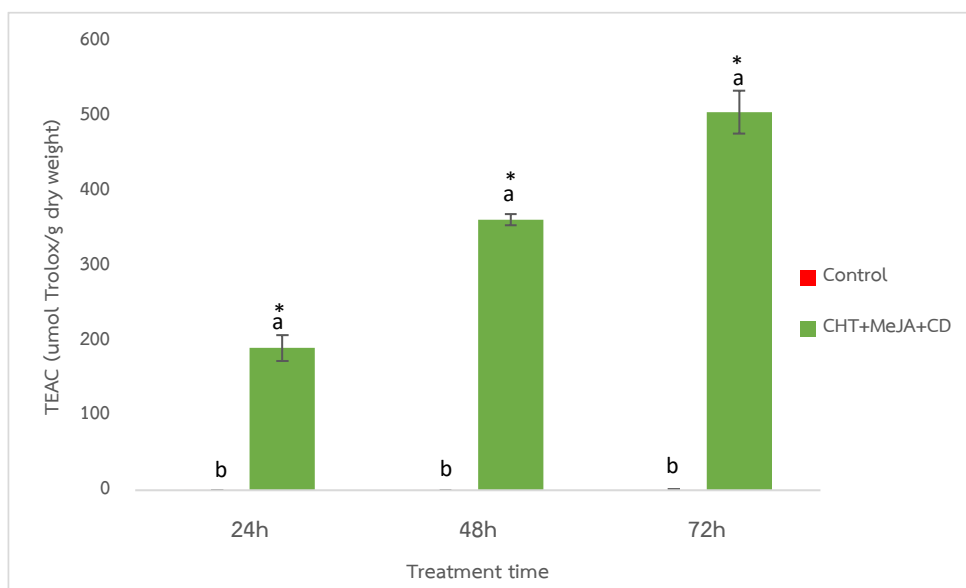
ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงด้วยวิธี ABTS โดยการกระตุ้นร่วมของตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้นสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการกระตุ้น โดยที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ  $506.33 \pm 28.43$  ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตาราง 17 และภาพ 27) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกัน และชุดการกระตุ้นที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

ตาราง 17 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี ABTS

ตัวกระตุ้น	Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)		
	ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	$0.16 \pm 0.06^b$	$0.12 \pm 0.02^b$	$0.69 \pm 0.85^b$
CHT+MeJA+CD	$190.55 \pm 17.61^a$ ( $>1,187.42$ เท่า)	$362.56 \pm 7.31^a$ ( $>2,978.39$ เท่า)	$506.33 \pm 28.43^a$ ( $>730.46$ เท่า)

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean  $\pm$  Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน ( $>$ ,  $<$  มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)



ภาพ 27 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี ABTS

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน และ \* มี นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบชุดที่ได้รับการกระตุ้น ที่เวลาแตกต่างกัน

## 1.2 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

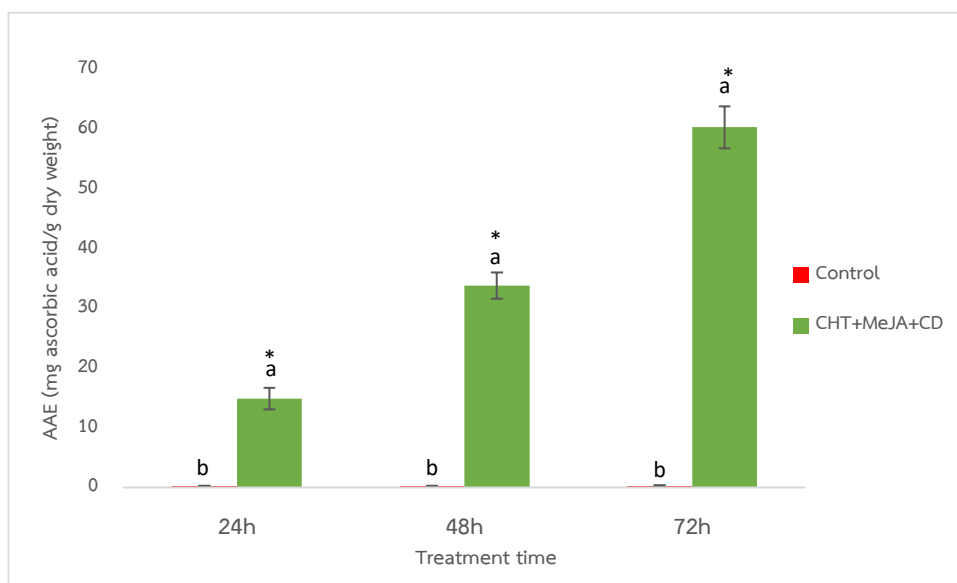
ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยง รากลอยถั่วลิสงด้วยวิธี FRAP โดยการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ  $60.38 \pm 3.48$  มิลลิกรัม ascorbic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตาราง 18 และภาพ 28) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มมา กขึ้น และมีความแตกต่างจากชุดควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกันและชุดการกระตุ้นเดียวกันที่ระยะเวลา แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยการกระตุ้นที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าชุดควบคุมคิดเป็น 209.85 เท่า

ตาราง 18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี FRAP

ตัวกระตุ้น	ascorbic acid equivalent (AAE)		
	มิลลิกรัม ascorbic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	0.24±0.06 <sup>b</sup>	0.28±0.03 <sup>b</sup>	0.29±0.15 <sup>b</sup>
CHT+MeJA+CD	14.93±1.82 <sup>a</sup> (>62.93 เท่า)	33.87±2.23 <sup>a</sup> (>120.53 เท่า)	60.38±3.48 <sup>a</sup> (>209.85 เท่า)

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน (>, < มากกว่า หรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)



ภาพ 28 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี FRAP

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกันและ \* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบชุดที่ได้รับการกระตุ้น ที่เวลาแตกต่างกัน

### 1.3 ผลการตรวจสอบฤทธิ์ hydrogen peroxide scavenging

จากผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงราก ลอยถั่วลิสง โดยการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ด้วยวิธี ABTS และ FRAP พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ที่สุด ดังนั้นจึงเลือกทำการตรวจสอบฤทธิ์ hydrogen peroxide scavenging ของสารสกัดจาก อาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง รายงานผลเป็นค่า IC50 โดย IC50 มีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถ กำจัดอนุมูล  $H_2O_2$  ได้ 50% จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีฤทธิ์ในการ กำจัดอนุมูล  $H_2O_2$  สูง เนื่องจากค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูล  $H_2O_2$  ได้ 50% มีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นของสารสกัดชุดควบคุม โดยมีค่า IC50 ของสารสกัดเท่ากับ  $76.67 \pm 2.89$

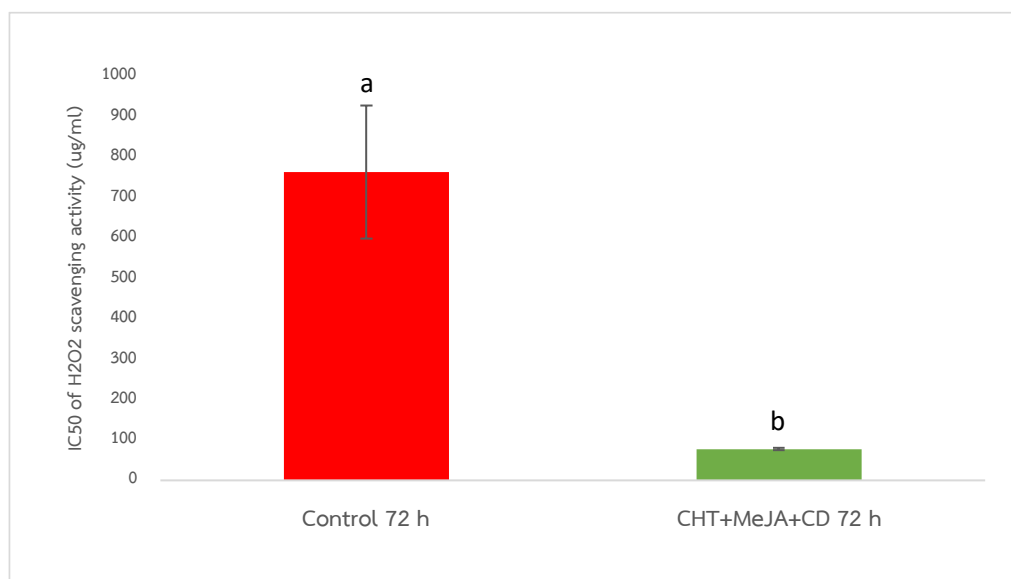
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตาราง 19 และภาพ 29) ซึ่งมีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตาราง 19 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี hydrogen peroxide scavenging

ตัวกระตุ้น	IC50 value (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
	72 ชั่วโมง
Control	763.33±165.03 <sup>a</sup>
CHT+MeJA+CD	76.67±2.89 <sup>b</sup>

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



**ภาพ 29** ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี hydrogen peroxide scavenging

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

## 2. ผลการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) ของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

ผลการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี total phenolic compound พบว่า เมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการกระตุ้น โดยที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ  $42.51 \pm 2.96$  มิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง (ตาราง 20 และภาพ 30) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกันและชุดการกระตุ้นเดียวกันที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

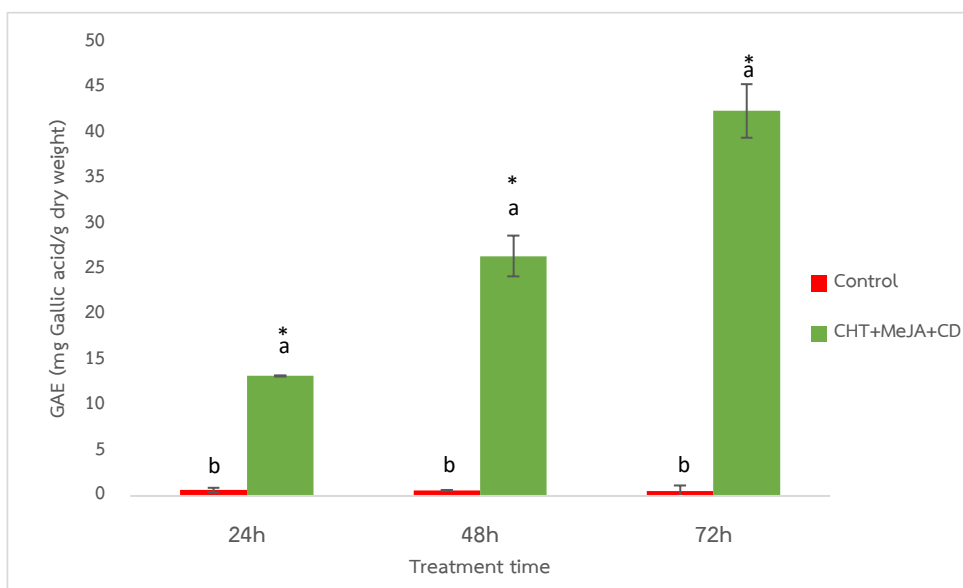
ตาราง 20 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย  
ถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24,  
48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี total phenolic compound

ตัวกระตุ้น	gallic acid equivalent (GAE) มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม gallic acid ต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	0.68±0.26 <sup>b</sup>	0.64±0.03 <sup>b</sup>	0.58±0.58 <sup>b</sup>
CHT+MeJA+CD	13.26±0.08 <sup>a</sup> (>19.50 เท่า)	26.49±2.26 <sup>a</sup> (>41.18 เท่า)	42.51±2.96 <sup>a</sup> (>73.72 เท่า)

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน (>, < มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)





ภาพ 30 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย ถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วยวิธี total phenolic compound

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน และ \* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบชุดที่ได้รับการกระตุ้นที่เวลาแตกต่างกัน

### 3. ผลการทดสอบฤทธิ์การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการตรวจสอบฤทธิ์การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ จำนวน 3 เอนไซม์ ได้แก่ 1) เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) 2) เอนไซม์ catalase (CAT) และ 3) เอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX) ด้วยวิธี enzyme assay

#### 3.1 เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

ผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ SOD ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า เนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นมีการทำงานของเอนไซม์ SOD ที่ต่ำกว่าเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงชุดควบคุมทุกระยะเวลา ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $78.06 \pm 8.59$ ,  $65.89 \pm 5.92$  และ  $71.46 \pm 17.83$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า มีการทำงานของเอนไซม์ SOD ที่มี

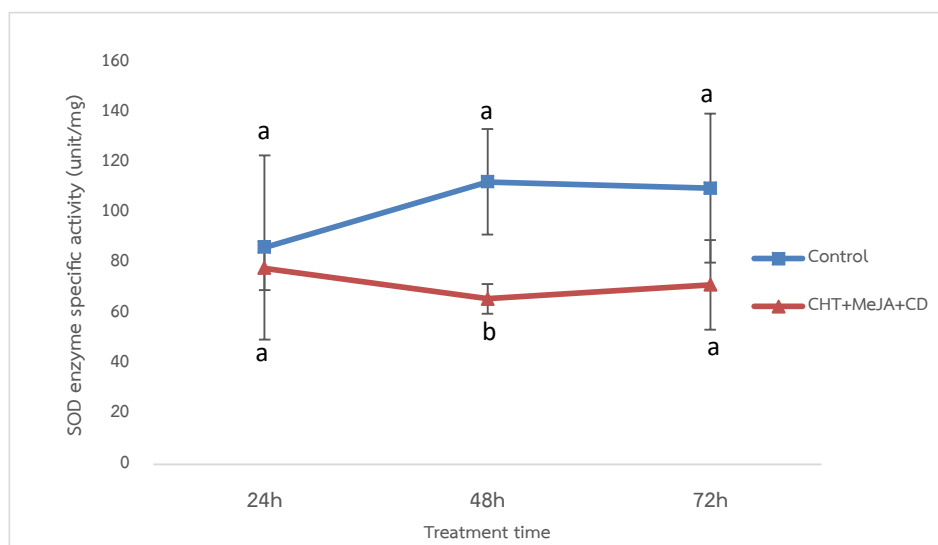
ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อรกलयชุดควบคุม (ตาราง 21 และภาพ 31)

ตาราง 21 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ SOD ในเนื้อเยื่อรกलयตัวลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวกระตุ้น	superoxide dismutase specific activity		
	มีหน่วยเป็น ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	86.39±36.71 <sup>a</sup>	112.50±21.08 <sup>a</sup>	109.96±29.72 <sup>a</sup>
CHT+MeJA+CD	78.06±8.59 <sup>a</sup>	65.89±5.92 <sup>b</sup>	71.46±17.83 <sup>a</sup>
	(<0.90 เท่า)	(<0.59 เท่า)	(<0.65 เท่า)

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน (>, < มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)



ภาพ 31 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ SOD ในเนื้อเยื่อรกของตัวลิสง เพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน

### 3.2 เอนไซม์ catalase (CAT)

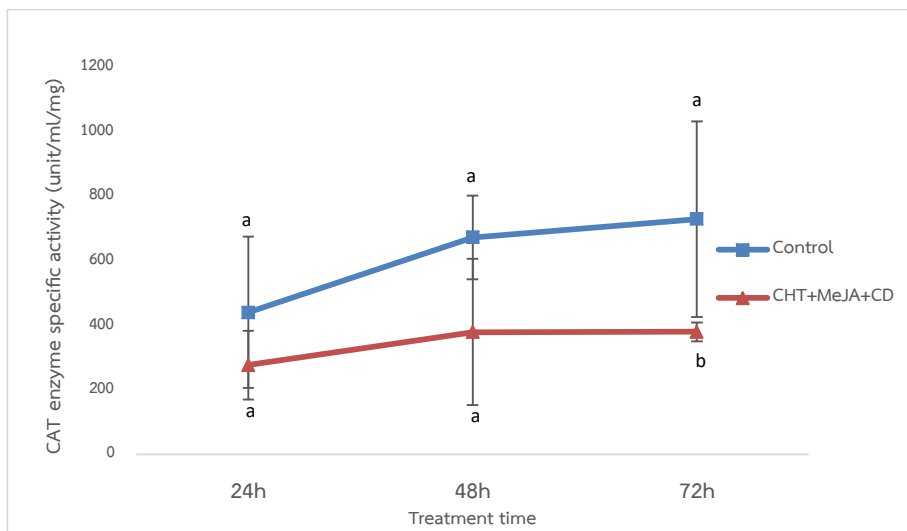
ผลการศึกษางานของเอนไซม์ CAT ในเนื้อเยื่อรกของตัวลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า เนื้อเยื่อรกของตัวลิสงที่ได้รับการกระตุ้น มีการทำงานของเอนไซม์ CAT คิดค่าเป็น catalase specific activity เท่ากับ  $277.24 \pm 106.67$ ,  $379.46 \pm 226.69$  และ  $380.53 \pm 29.25$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นภายหลังการกระตุ้นในระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อรกของตัวควบคุมพบว่า เนื้อเยื่อรกของตัวลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นมีการทำงานของเอนไซม์ CAT ที่ต่ำกว่า โดยที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงของเนื้อเยื่อรกของตัวลิสงที่ได้รับการกระตุ้น มีการทำงานของเอนไซม์ที่มีความแตกต่างจากเนื้อเยื่อรกของตัวควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตาราง 22 และภาพ 32)

ตาราง 22 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ CAT ในเนื้อเยื่อรกของอูฐเลี้ยง  
เพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา  
24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวกระตุ้น	catalase specific activity		
	มีหน่วยเป็น ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	440.16±234.56 <sup>a</sup>	672.87±129.14 <sup>a</sup>	729.68±303.14 <sup>a</sup>
CHT+MeJA+CD	277.24±106.67 <sup>a</sup> (<0.63 เท่า)	379.46±226.69 <sup>a</sup> (<0.56 เท่า)	380.53±29.25 <sup>b</sup> (<0.52 เท่า)

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน (>, < มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)



ภาพ 32 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ CAT ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสง เพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน

### 3.3 เอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX)

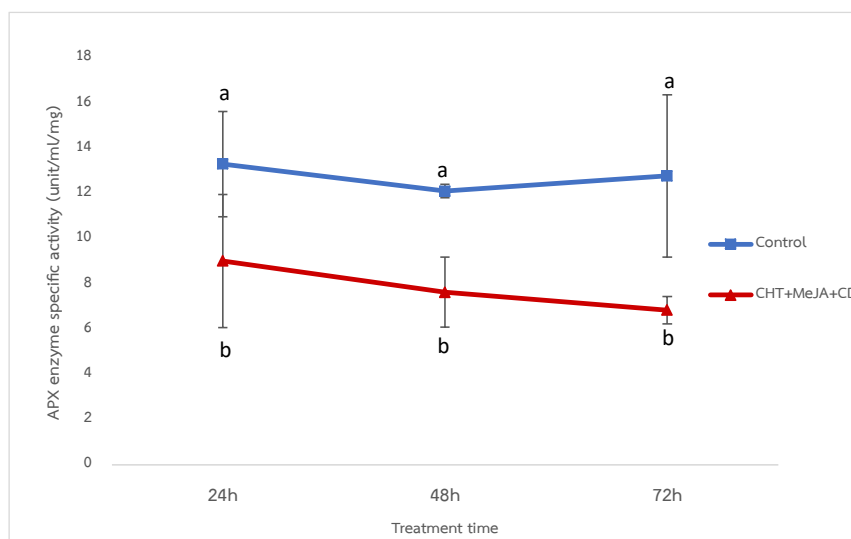
ผลการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ APX ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า เนื้อเยื่อรากลอยที่ได้รับการกระตุ้น มีการทำงานของเอนไซม์ APX ที่ลดลงตามระยะเวลาการกระตุ้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีค่า ascorbate peroxidase specific activity เท่ากับ  $9.01 \pm 2.95$ ,  $7.63 \pm 1.56$  และ  $6.83 \pm 0.61$  อนุโมลลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และมีการทำงานของเอนไซม์ APX ที่ต่ำกว่าในเนื้อเยื่อรากลอยชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตาราง 23 และภาพ 33)

ตาราง 23 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ APX ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสง  
เพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา  
24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวกระตุ้น	ascorbate peroxidase specific activity		
	มีหน่วยเป็น ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	13.30±2.33 <sup>a</sup>	12.10±0.29 <sup>a</sup>	12.78±3.59 <sup>a</sup>
CHT+MeJA+CD	9.01±2.95 <sup>b</sup> (<0.68 เท่า)	7.63±1.56 <sup>b</sup> (<0.63 เท่า)	6.83±0.61 <sup>b</sup> (<0.53 เท่า)

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน (>, < มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม)



ภาพ 33 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ APX ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นในชั่วโมงเดียวกัน

**สรุป** จากผลการทดสอบฤทธิ์การทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดข้างต้น สามารถกล่าวได้ว่า รากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD มีการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในเนื้อเยื่อรากลอยต่ำกว่าในรากลอยชุดควบคุม อาจเป็นผลมาจากในช่วง 72 ชั่วโมงแรกของการได้รับสารกระตุ้น รากลอยมีระบบต้านทานอื่น ๆ ในการป้องกันตนเองจากตัวกระตุ้น ได้แก่ การใช้สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ที่เป็นสารกลุ่มทุติยภูมิ หรือ โปรตีนในการต้านทานโรค เข้ามาช่วยในการป้องกันอันตรายเป็นลำดับต้น ๆ ก่อนการใช้ระบบการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนกลุ่มต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตนเองของพืช

#### 4. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real time PCR (qPCR) โดยทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน จำนวน 13 ยีน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ได้แก่ phenylalanine ammonia lyase; *PAL* และ resveratrol

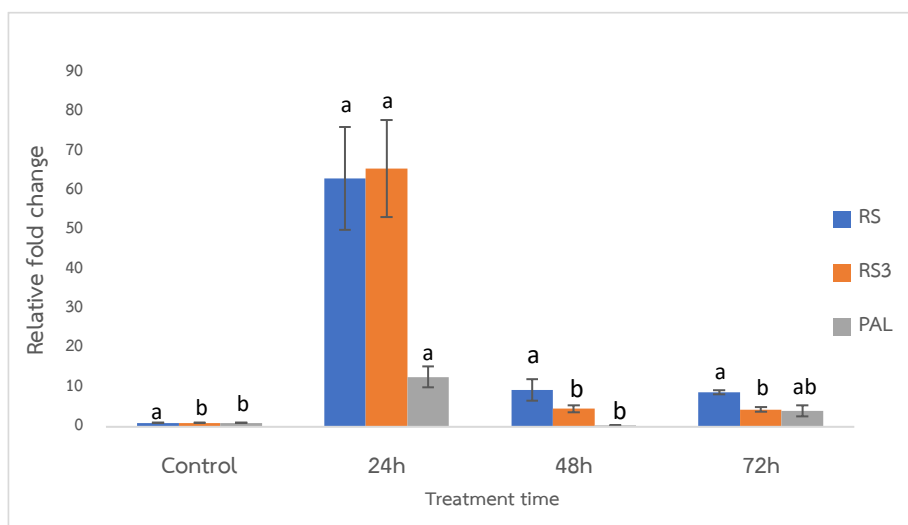
synthase; *RS* และ *RS3* กลุ่มยีนเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase; *SOD*, glutathione peroxidase; *GPX* และ ascorbate peroxidase; *APX* กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืช ได้แก่ ethylene responsive element binding factor; *ERF1* และ *ERF6*, chitinase; *Chi* และ pathogenesis-related protein; *PR4A*, *PR5* และ *PR10* และใช้ elongation factor 1 $\alpha$  gene; *ef1a* เป็นยีนอ้างอิง โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณสัมพัทธ์ (relative quantification) ของอัตราส่วนการแสดงออกของยีนที่สนใจต่อการแสดงออกของยีนอ้างอิง คำนวณได้จากการเปรียบเทียบค่า threshold cycle (Ct) ที่ได้จากผล real time PCR จากนั้นวิเคราะห์และรายงานค่าเป็นค่าจำนวนเท่า (fold change) ของการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

#### 4.1 ผลการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ได้แก่ ยีนเอนไซม์ *PAL* และยีนเอนไซม์ *RS* และ *RS3* ของรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า รากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้น เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีน *RS* สูงสุด คิดเป็น  $63.17 \pm 13.07$  เท่า และการแสดงออกของยีนจะลดลงซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง คือ  $9.43 \pm 2.72$  และ  $8.79 \pm 0.59$  เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุมซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพ 34) สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *RS3* ที่มีการแสดงออกของยีนสูงสุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงในรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้น คิดเป็น  $65.70 \pm 12.35$  เท่า ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุมและรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นที่ระยะเวลาแตกต่างกัน และการแสดงออกของยีนจะลดลงเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุม (ภาพ 34)

การแสดงออกของยีน *PAL* มีการแสดงออกสูงที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงในรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้น คิดเป็น  $12.66 \pm 2.65$  เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุมและรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และจะลดลงที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนจะมีการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นภายหลังระยะเวลา 72 ชั่วโมง คิดเป็น  $0.38 \pm 0.06$  และ  $4.10 \pm 1.40$  เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุม (ภาพ 34)





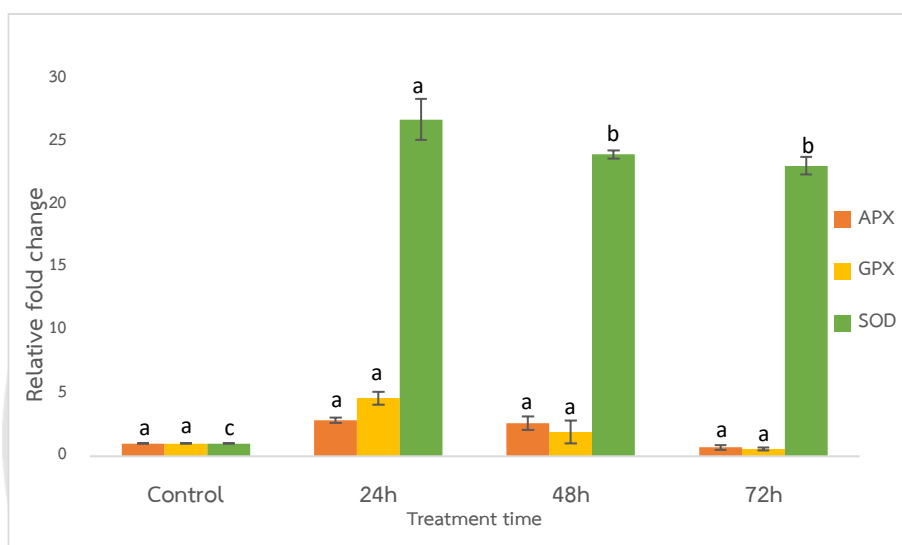
ภาพ 34 ค่า fold change ของการแสดงออกของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิกลุ่มสเตโรลในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มยีนในแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นที่เวลาแตกต่างกัน ( $n=3$ )

#### 4.2 ผลการแสดงออกของยีนกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระของรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ยีน APX มีการแสดงออกของยีนในรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงใกล้เคียงกัน คิดเป็น  $2.84 \pm 0.20$  และ  $2.63 \pm 0.54$  เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุมและรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นเดียวกันที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพ 35) ในขณะที่การแสดงออกของยีน GPX พบว่า รากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นมีการแสดงออกสูงที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็น  $4.61 \pm 0.52$  เท่า และการแสดงออกของยีนจะลดลงที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง คือ  $1.91 \pm 0.91$  และ  $0.59 \pm 0.12$  เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุม ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพ 35) ผลการแสดงออกของยีน SOD พบว่า มีการแสดงออกของยีน

สูงสุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงในรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้น คิดเป็น  $26.77 \pm 1.63$  เท่า ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุมและรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นเดียวกันที่ระยะเวลาแตกต่างกัน และมีการแสดงออกของยีนที่ลดลงและใกล้เคียงกันที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง คิดเป็น  $24.00 \pm 0.32$  และ  $23.10 \pm 0.72$  เท่า ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุม (ภาพ 35)

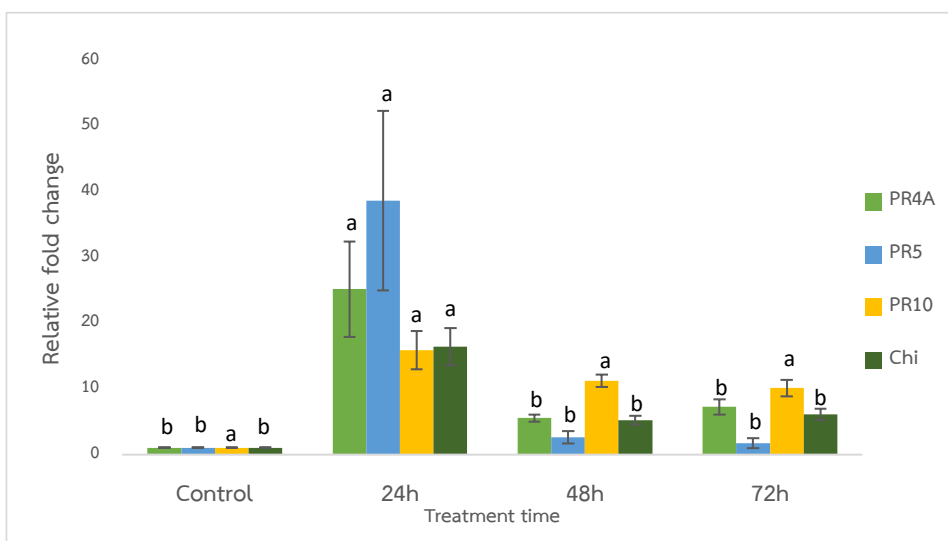


ภาพ 35 ค่า fold change ของการแสดงออกของยีนกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มยีนในแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นที่เวลาแตกต่างกัน ( $n=3$ )

### 4.3 ผลการแสดงผลการออกของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน ด้านทานโรคในพืช

ผลการตรวจสอบการแสดงผลการออกของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนด้านทานโรคในพืชของรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า การแสดงผลการออกของยีน *ERF1* และ *ERF6* ไม่สามารถตรวจพบการแสดงผลการออกของยีนในรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นทุกระยะเวลาของการกระตุ้น ส่วนการแสดงผลการออกของยีน *PR4A* ในรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้น เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการแสดงผลการออกของยีน *PR4A* สูงที่สุด คิดเป็น  $25.20 \pm 7.24$  เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุมและรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นเดียวกันที่ระยะเวลาแตกต่างกัน ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และจะลดลงที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนจะมีการแสดงผลการออกของยีนที่เพิ่มขึ้นภายหลังระยะเวลา 72 ชั่วโมง คิดเป็น  $5.53 \pm 0.57$  และ  $7.23 \pm 1.16$  เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุม (ภาพ 36) ยีน *PR5* มีการแสดงผลการออกของยีนสูงสุดในรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็น  $38.67 \pm 13.69$  เท่า ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุมและรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นเดียวกันที่ระยะเวลาแตกต่างกัน และมีการแสดงผลการออกของยีนที่ลดลงเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น (ภาพ 36) การแสดงผลการออกของยีน *PR10* มีการแสดงผลการออกของยีนสูงใกล้เคียงกันที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้น เท่ากับ  $15.91 \pm 2.91$ ,  $11.25 \pm 0.93$  และ  $10.11 \pm 1.24$  เท่า ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุมและรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นเดียวกันที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (ภาพ 36) และรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการแสดงผลการออกของยีน *Chi* สูงที่สุด เท่ากับ  $16.46 \pm 2.81$  เท่า ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุมและรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นเดียวกันที่ระยะเวลาแตกต่างกัน และจะลดลงที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนจะมีการแสดงผลการออกเพิ่มขึ้นภายหลัง 72 ชั่วโมง คิดเป็น  $5.23 \pm 0.65$  และ  $6.11 \pm 0.81$  เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับรากลอยชุดควบคุม (ภาพ 36)



ภาพ 36 ค่า fold change ของการแสดงออกของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืชในเนื้อเยื่อรากลอยตัวของลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มยีนในแต่ละชุดที่ได้รับการกระตุ้นที่เวลาแตกต่างกัน ( $n=3$ )

**สรุป** จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนกลุ่มต่าง ๆ ของรากลอยตัวของลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระบบขวดเขย่า พบว่า รากลอยตัวของลิสงที่ได้รับการกระตุ้นที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนในกลุ่มต่าง ๆ สูงที่สุด และเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้น การแสดงออกของยีนกลุ่มต่าง ๆ จะมีการแสดงออกของยีนที่ลดลง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า ภายหลังจากการกระตุ้นที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง รากลอยที่ได้รับการกระตุ้นจะมีการปรับเปลี่ยนการตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดชันและภาวะคุกคามต่าง ๆ โดยการไ้ใช้กระบวนการป้องกันตัวเองที่หลากหลายแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของการได้รับสิ่งกระตุ้น ซึ่งเป็นกลไกที่ซับซ้อนในพืช และจำเป็นต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป





ผลการศึกษาเปรียบเทียบการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงต่อการสร้างสารกลุ่มสติลบินในระบบขวดเขย่า และระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

1. ผลของการกระตุ้นต่อลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

1.1 ผลของการกระตุ้นต่อลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงในระบบขวดเขย่า

ผลการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระบบขวดเขย่า พบว่า เนื้อเยื่อรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นดังกล่าว มีสีเหลืองเข้มขึ้น เมื่อเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในทุกช่วงเวลา (ตาราง 24) สอดคล้องกับสีของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่มีสีเหลืองเข้มขึ้นเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นนานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีสีใสในทุกช่วงเวลา (ตาราง 25)

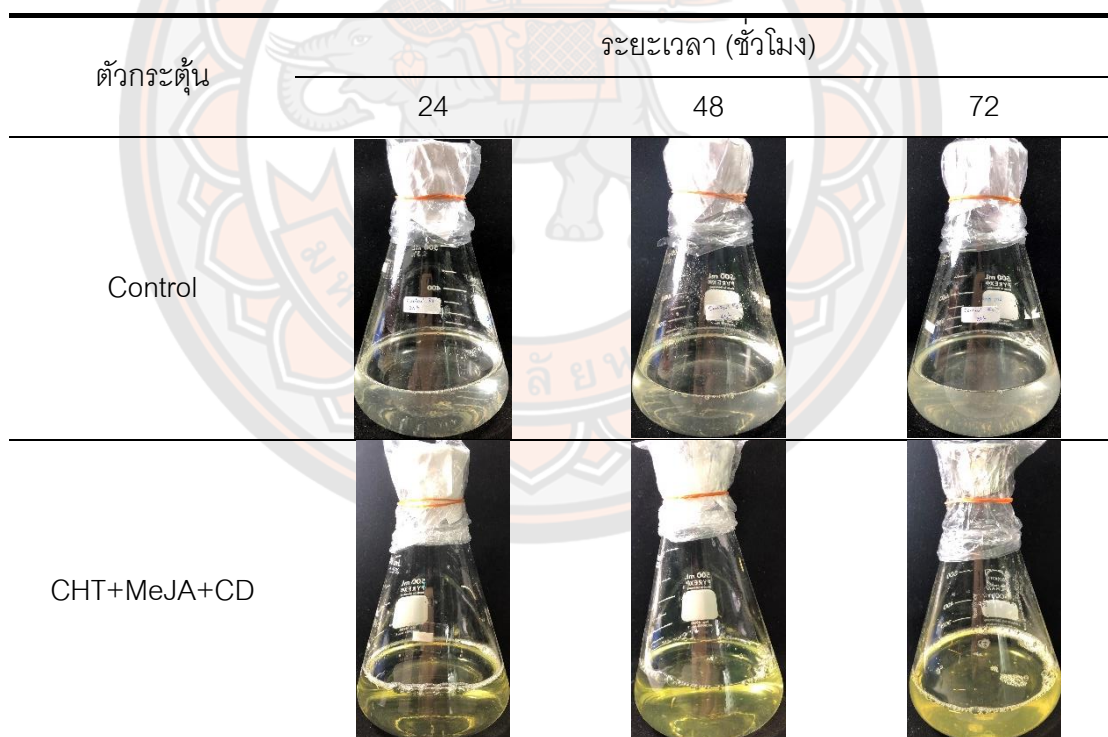
ตาราง 24 ลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระบบขวดเขย่า เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตัวกระตุ้น	เนื้อเยื่อรากลอย	ตัวกระตุ้น	เนื้อเยื่อรากลอย
Control 24 ชั่วโมง		CHT+MeJA+CD 24 ชั่วโมง	
Control 48 ชั่วโมง		CHT+MeJA+CD 48 ชั่วโมง	

ตาราง 24 (ต่อ)





ตาราง 25 ลักษณะของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระบบขวดเขย่า เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



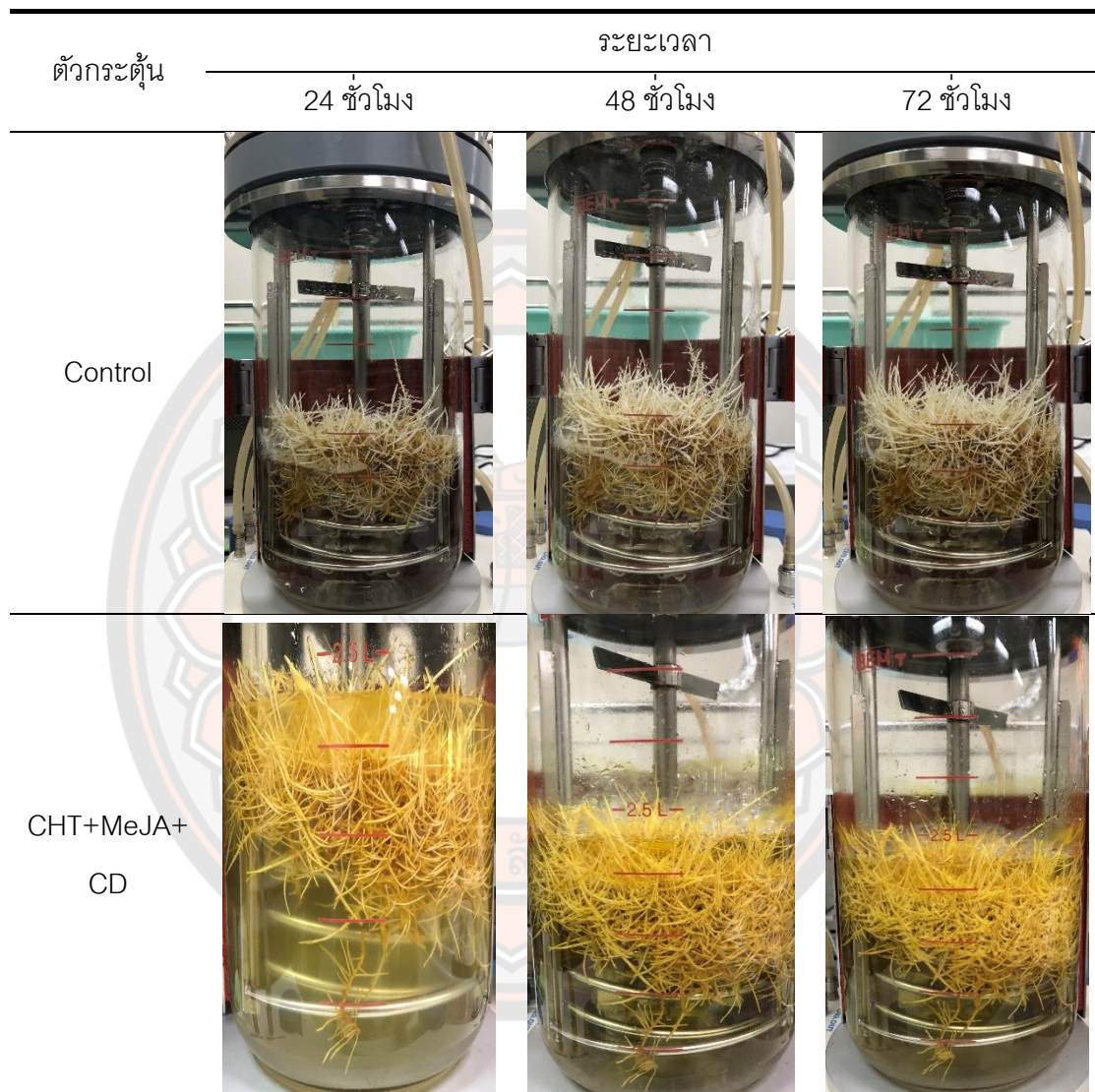
## 1.2 ผลของการกระตุ้นต่อลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยและอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ผลการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า เนื้อเยื่อรากลอยเจริญเติบโตแบบเกาะกลุ่มและสามารถเจริญได้ดีกว่าในระบบขวดเขย่า นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นเนื้อสารสีเหลืองเกาะบริเวณเนื้อเยื่อราก ทำให้รากมีสีเหลืองเข้มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตาราง 26) ในขณะที่อาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นดังกล่าวจะมีสีเหลืองเข้มขึ้นเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นนานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในทุกระยะเวลาการกระตุ้น (ตาราง 27)

ตาราง 26 ลักษณะของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ตัวกระตุ้น	เนื้อเยื่อรากลอย	ตัวกระตุ้น	เนื้อเยื่อรากลอย
Control		CHT+MeJA+CD	

ตาราง 27 ลักษณะของอาหารเพาะเลี้ยงและเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม



## 2. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

### 2.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงในระบบขวดเขย่า

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง



ในระบบขวดเขย่าด้วยเทคนิค HPLC แสดงผลเป็นโครมาโตแกรมดังแสดงในภาคผนวก จะพบการสร้างสาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ขณะที่สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงในชุดควบคุมจะไม่ปรากฏโครมาโตแกรมของสารกลุ่มดังกล่าว เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร *trans-resveratrol* พบว่า มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการกระตุ้นที่เพิ่มขึ้น โดยที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณสาร *trans-resveratrol* สูงสุดเท่ากับ  $3.57 \pm 0.85$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตาราง 28 และภาพ 37A) ปริมาณสาร *trans-arachidin-1* พบว่ามีปริมาณสูงที่สุดที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง เท่ากับ  $1,266.69 \pm 182.80$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งปริมาณสาร *trans-arachidin-1* มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นนานขึ้น (ตาราง 28 และภาพ 37B) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร *trans-arachidin-3* พบว่ามีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้น โดยที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณสาร *trans-arachidin-3* สูงสุดเท่ากับ  $1,594.36 \pm 229.87$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ตาราง 28 และภาพ 37C)

ตาราง 28 ปริมาณสารกลุ่มสติลบินของสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระบบขวดเขย่า

ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	nd	nd	nd
CHT+MeJA+CD	$1.56 \pm 0.33^b$	$2.44 \pm 1.42^{ab}$	$3.57 \pm 0.85^a$
ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i> มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	nd	nd	nd
CHT+MeJA+CD	$161.19 \pm 10.04^c$	$439.40 \pm 124.16^b$	$1,266.69 \pm 182.80^a$

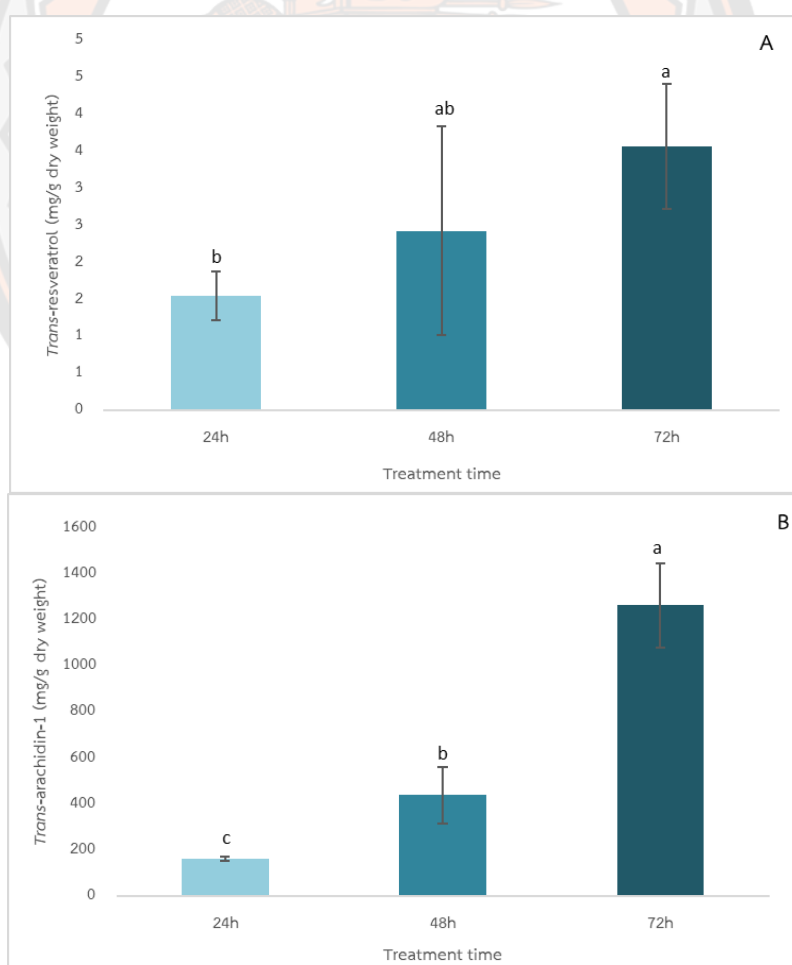
ตาราง 28 (ต่อ)

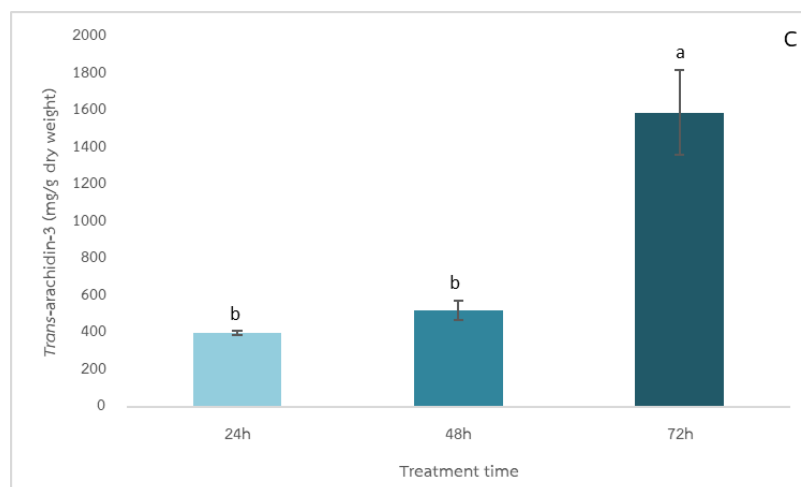
ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 มีดลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
Control	nd	nd	nd
CHT+MeJA+CD	402.06±10.11 <sup>b</sup>	523.08±52.78 <sup>b</sup>	1,594.36±229.87 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: nd = not detection

ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบชุดที่ได้รับการกระตุ้นที่เวลาแตกต่างกัน





ภาพ 37 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงในระบบขวดเขย่า

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบชุดที่ได้รับการกระตุ้นที่เวลาแตกต่างกัน

## 2.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

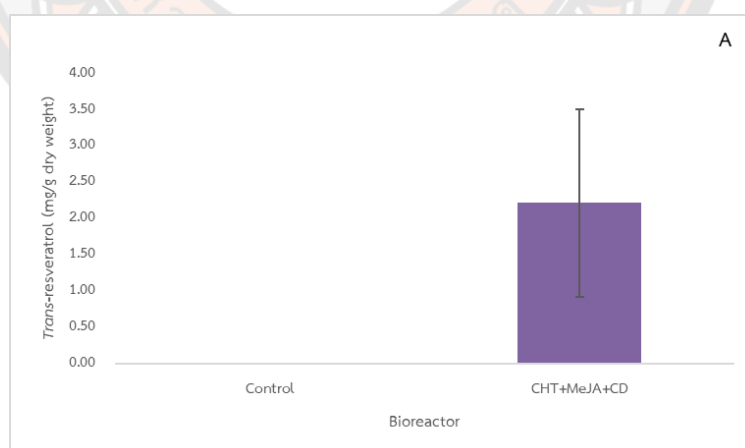
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงด้วยเทคนิค HPLC พบว่า มีปริมาณสาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* เท่ากับ  $2.22 \pm 1.30$ ,  $315.65 \pm 139.34$  และ  $694.87 \pm 291.64$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตาราง 29 และภาพ 38 A, B และ C)

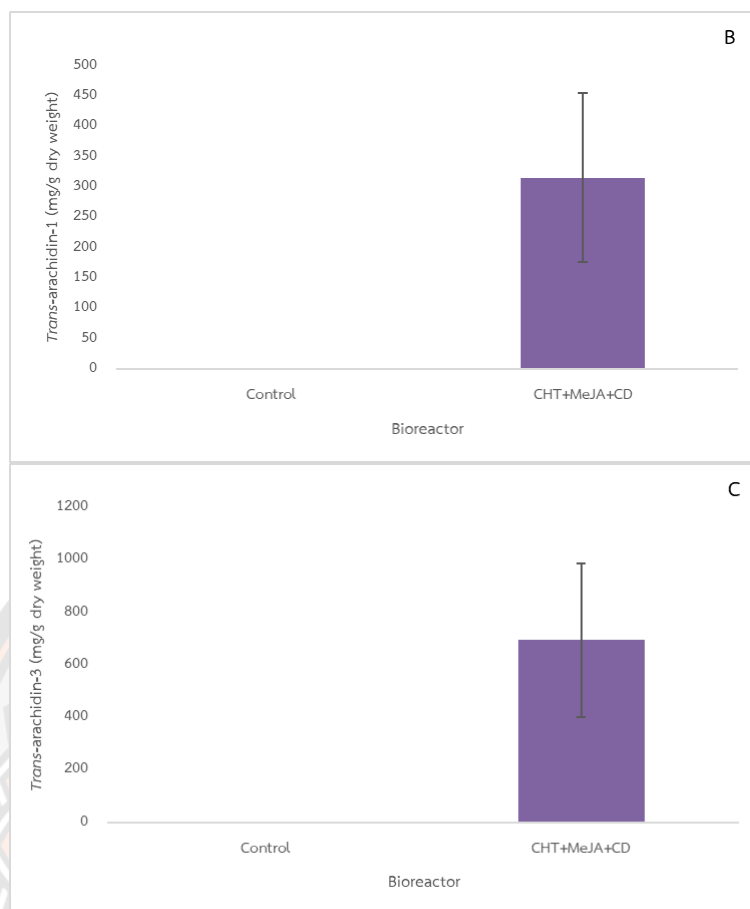
ตาราง 29 ปริมาณสารกลุ่มสติลบินของสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงใน ระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
Control	nd
CHT+MeJA+CD	2.22±1.30
ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i> มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
Control	nd
CHT+MeJA+CD	315.65±139.34
ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-3</i> มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
Control	nd
CHT+MeJA+CD	694.87±291.64

หมายเหตุ: nd = not detection

ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)





ภาพ 38 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

### 2.3 เปรียบเทียบปริมาณสารกลุ่มสติลบินของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มสติลบินของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ในระบบขวดเขย่ามีปริมาณสารกลุ่มสติลบิน ได้แก่ *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* เท่ากับ  $3.57 \pm 0.85$ ,  $1,266.69 \pm 182.80$  และ  $1,594.36 \pm 229.87$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อรากลอยและเมื่อคำนวณเทียบปริมาณสารในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรของอาหารเพาะเลี้ยง มีค่าเท่ากับ  $8.25 \pm 2.60$ ,  $2,898.05 \pm 577.33$  และ  $3,668.36 \pm 880.33$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ระบบ

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ มีปริมาณสารกลุ่มสติลบิน คือ *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* เท่ากับ  $2.22 \pm 1.30$ ,  $315.65 \pm 139.34$  และ  $694.87 \pm 291.64$  มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อรากลอย ผลการคำนวณเทียบปริมาณในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรของอาหารเพาะเลี้ยง มีค่าเท่ากับ  $5.61 \pm 3.27$ ,  $804.83 \pm 341.25$  และ  $1,764.12 \pm 664.50$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาณสาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* น้อยกว่าในระบบขวดเขย่าคิดเป็น 0.68, 0.28 และ 0.48 เท่า ตามลำดับเมื่อคำนวณเทียบปริมาณในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตรของอาหารเพาะเลี้ยง (ตาราง 30 และภาพ 39-40) ซึ่งทั้ง 2 ระบบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

**ตาราง 30 ปริมาณสารกลุ่มสติลบินของสารสกัดอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับ การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ**

ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i>	
	มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง	มิลลิกรัมต่อลิตร
Flask	$3.57 \pm 0.85$	$8.25 \pm 2.60$
Bioreactor	$2.22 \pm 1.30$ ( $< 0.62$ เท่า)	$5.61 \pm 3.27$ ( $< 0.68$ เท่า)
ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i>	
	มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง	มิลลิกรัมต่อลิตร
Flask	$1,266.69 \pm 182.80^*$	$2,898.05 \pm 577.33^*$
Bioreactor	$315.65 \pm 139.34$ ( $< 0.25$ เท่า)	$804.83 \pm 341.25$ ( $< 0.28$ เท่า)

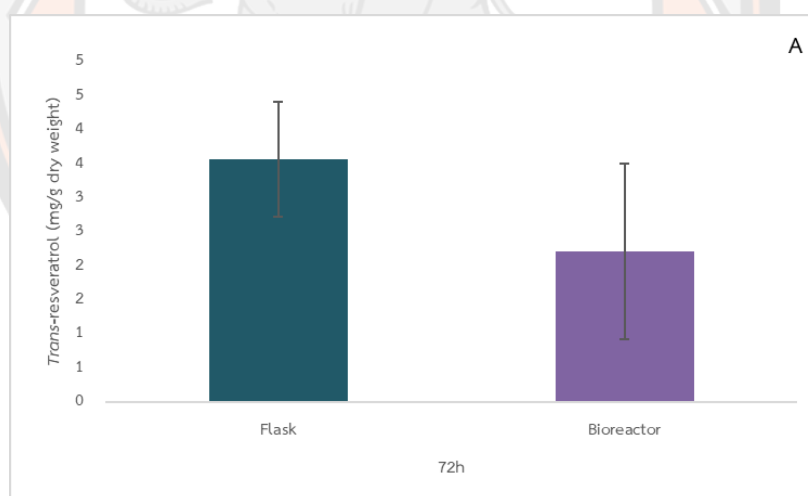
ตาราง 30 (ต่อ)

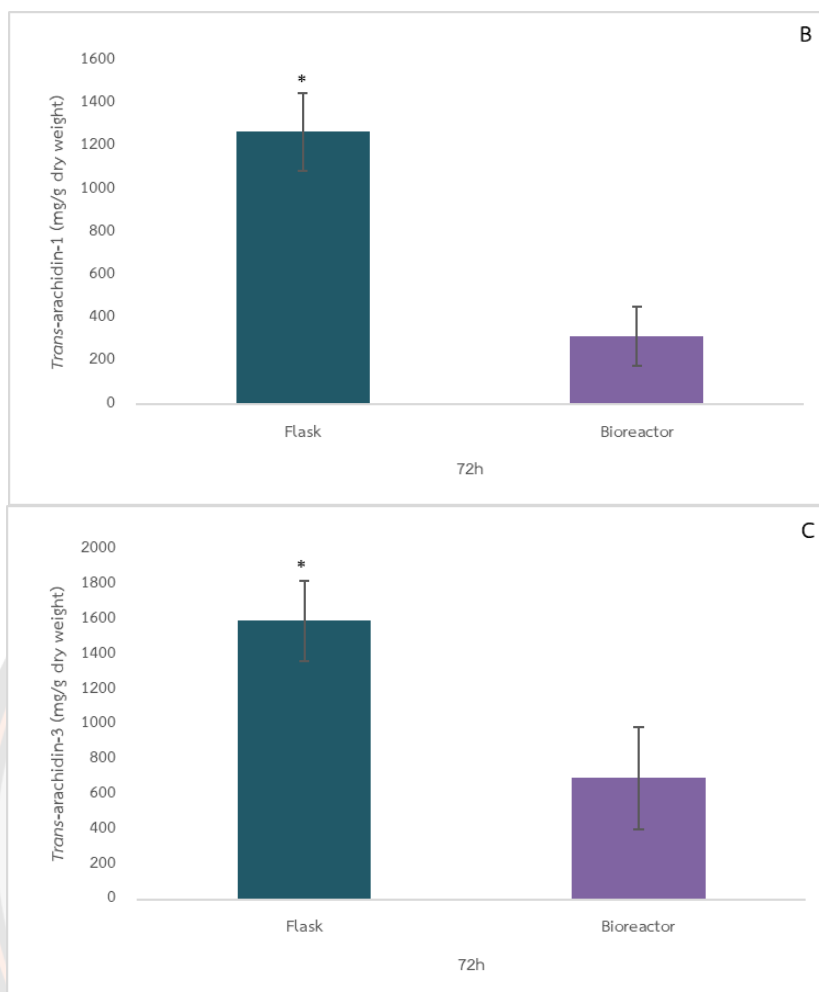
ตัวกระตุ้น	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3	
	มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	มิลลิกรัมต่อลิตร
Flask	1,594.36±229.87*	3,668.36±880.33*
Bioreactor	694.87±291.64 (<0.44 เท่า)	1,764.12±664.50 (<0.48 เท่า)

หมายเหตุ: nd = not detection

ข้อมูลแสดงเป็นค่า Mean ± Standard deviation (SD) (n=3)

\* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระบบเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (>, < มากกว่าหรือน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับระบบขวดเขย่า)

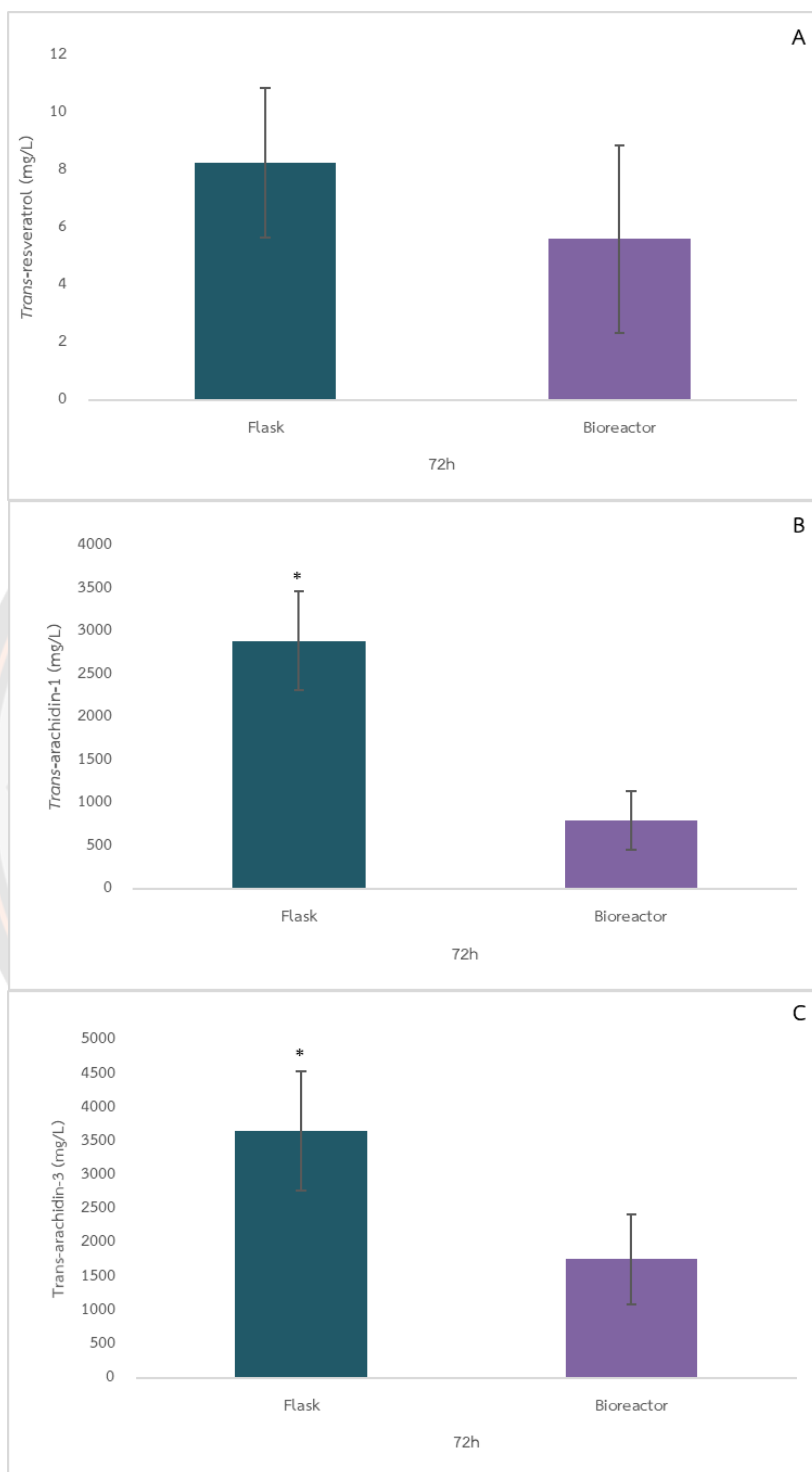




ภาพ 39 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* (หน่วย mg/g dry weight) ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

หมายเหตุ: \* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระบบเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ





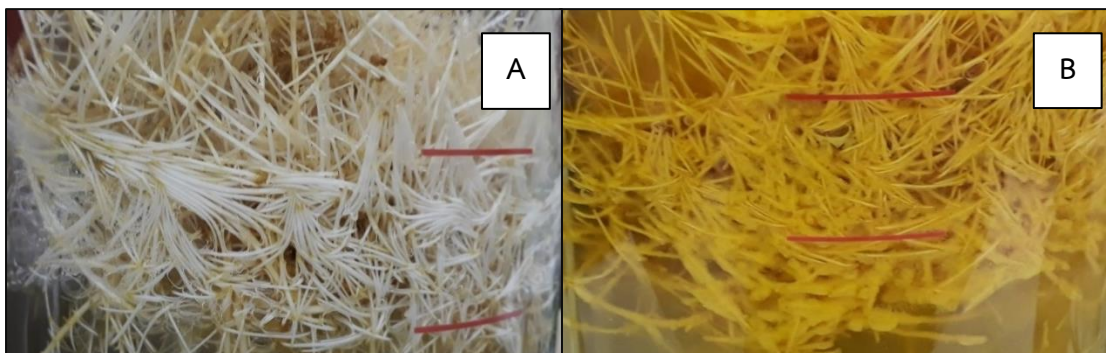
ภาพ 40 ปริมาณของสาร (A) *trans-resveratrol*, (B) *trans-arachidin-1* และ (C) *trans-arachidin-3* (หน่วย mg/L) ในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้ว

## ลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

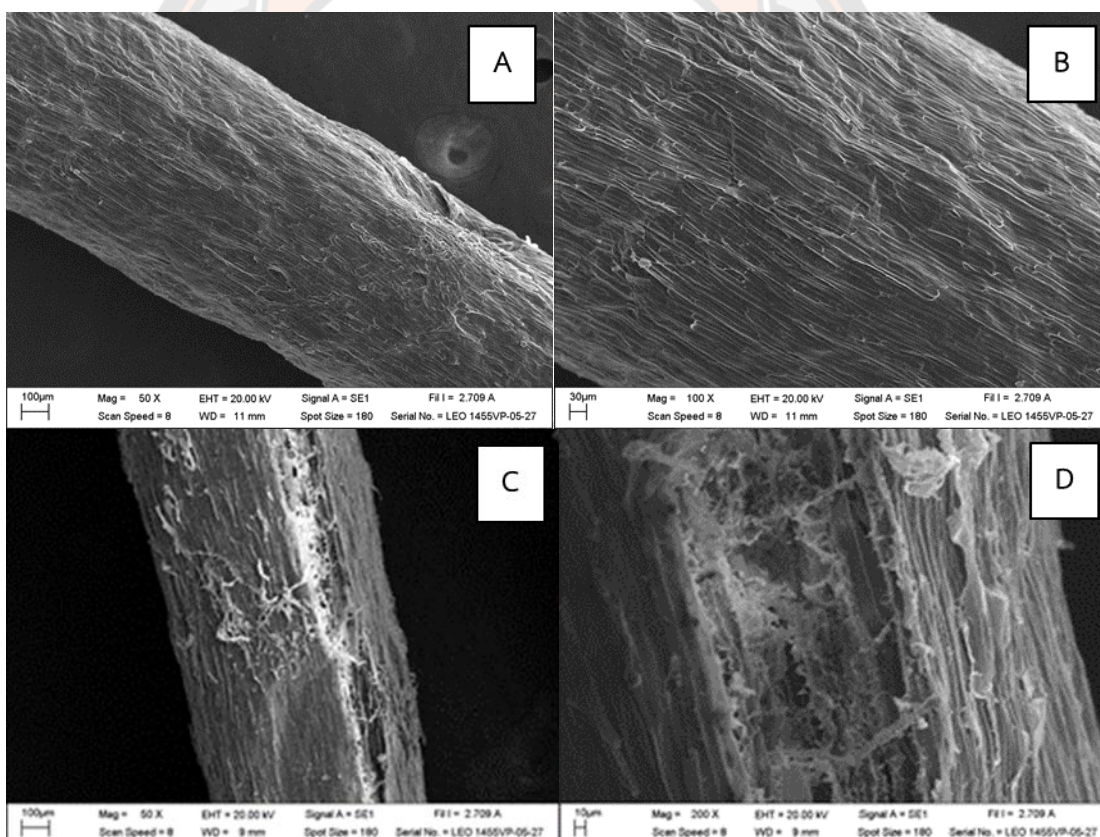
**หมายเหตุ:** \* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระบบเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

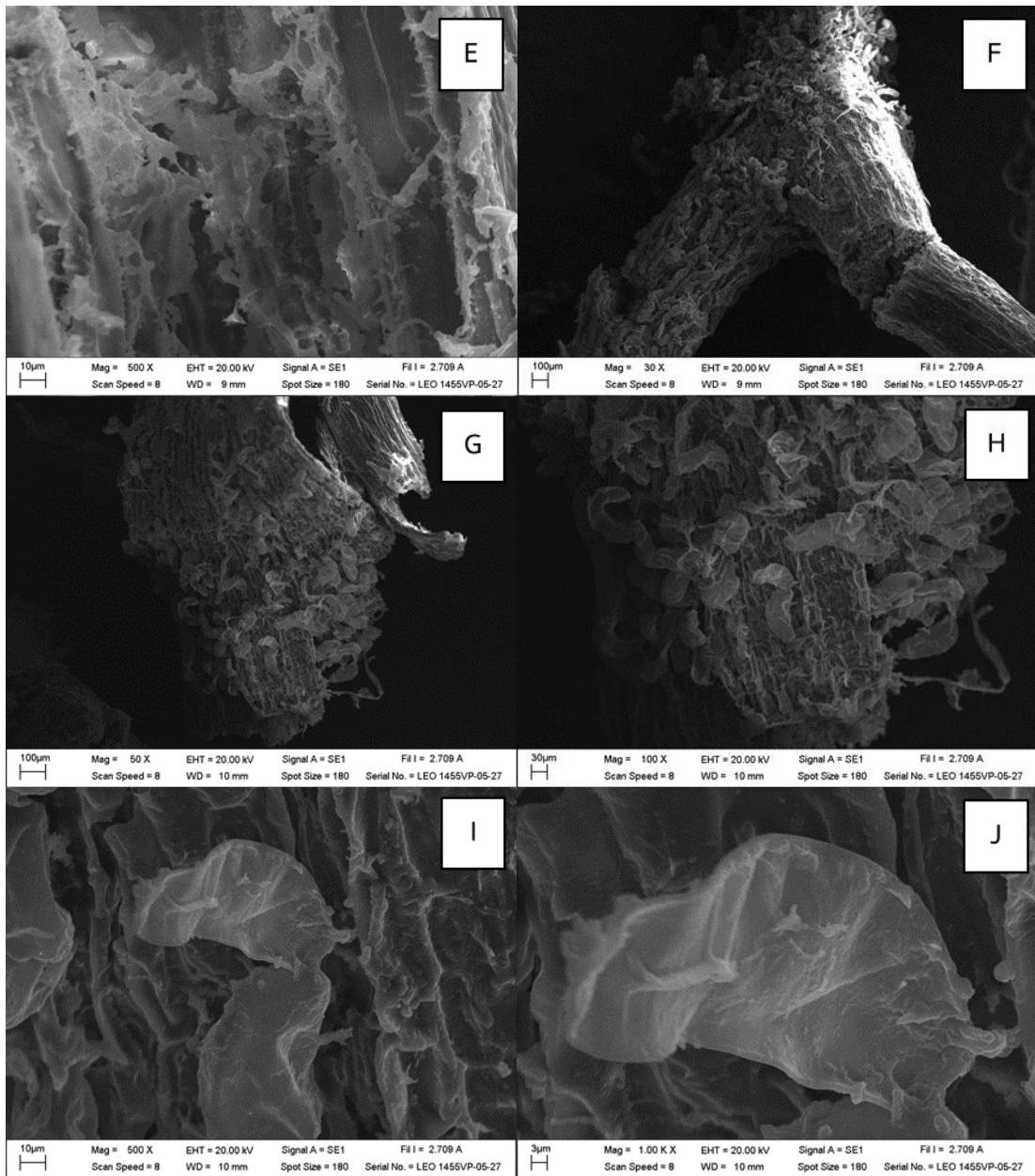
### ผลการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสง

ผลการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพภายนอกของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงชุดควบคุม และชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถสังเกตพบกลุ่มก้อนของสารสีเหลืองเกาะบริเวณรอบผิวรากที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT+MeJA+CD ทำให้เนื้อเยื่อรากรวมทั้งสีของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยภายหลังการกระตุ้นมีสีเหลืองเข้มขึ้นชัดเจน ในขณะที่รากชุดควบคุมไม่พบกลุ่มก้อนของสารสีเหลืองเกาะที่บริเวณผิวรากและอาหารเพาะเลี้ยงก็มีลักษณะสีใสแตกต่างจากรากที่ได้รับการกระตุ้น ทั้งนี้สารสีเหลืองที่พบบริเวณรอบผิวราก อาจจะเป็นสารกลุ่มสติลบินที่รากสร้างขึ้น เนื่องจากมีรายงานว่าสารกลุ่มสติลบินเป็นสารที่มีสีเหลือง (ภาพ 41A-B) เมื่อนำเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงชุดควบคุมและรากที่ได้รับการกระตุ้นไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า เนื้อเยื่อรากชุดควบคุมมีลักษณะพื้นผิวของรากค่อนข้างเรียบ และไม่พบการฉีกขาดบนพื้นผิวเนื้อเยื่อ (ภาพ 42A-B) ในขณะที่รากลอยชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น มีการฉีกขาดบนพื้นผิวของเนื้อเยื่อรากลอย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการทำลายเนื้อเยื่อโดยตัวกระตุ้น (ภาพ 42C-D) นอกจากนี้ยังพบว่ามีกลุ่มก้อนของเนื้อสารแทรกอยู่ในบริเวณรอยฉีกขาดของเนื้อเยื่อราก (ภาพ 42D-E) รวมทั้งมีกลุ่มก้อนของสารบางส่วนเกาะรอบ ๆ บริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อรากด้วยเช่นกัน (ภาพ 42F-G) เมื่อเพิ่มกำลังขยายภาพของกลุ่มก้อนสารที่เกาะโดยรอบรากจะพบสารที่ลักษณะเป็นแผ่นแบนเกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ บริเวณผิวราก (ภาพ 42G-H-I-J) ซึ่งอาจเป็นกลุ่มของสารทุติยภูมิที่รากลอยถั่วลิสงสร้างและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ภายหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น ทั้งนี้ไม่สามารถพบสารที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนดังกล่าวในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงชุดควบคุม



ภาพ 41 ลักษณะของกลุ่มสารบริเวณพื้นผิวเนื้อเยื่อรากลอยและสีของอาหารเพาะเลี้ยง รากลอยถั่วลิสง A) ชุดควบคุม และ B) ชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ





ภาพ 42 ลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างของรากลอยถั่วลิงพะเอี้ยงชุดควบคุม (A-B) กำลังขยาย 50X และ 100X ตามลำดับ เนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิงพะเอี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT, MeJA และ CD (C-E) กำลังขยาย 50X, 200X และ 500X ตามลำดับ และกลุ่มของสารสีเหลืองบริเวณพื้นผิวของรากลอยที่ได้รับการกระตุ้น (F-J) กำลังขยาย 30X, 50X, 100X, 500X และ 1000X ตามลำดับ

## บทที่ 5

### บทสรุป

#### สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาดั้วกระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ กาศสินธุ์ 2 โดยทำการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1) CHT 2) MeJA+CD 3) CHT\_(MeJA+CD) 4) (MeJA+CD)\_CHT และ 5) CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของ MeJA เท่ากับ 6.87 มิลลิโมลาร์, CD ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นของ CHT จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกระตุ้น เท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาพบว่า การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกันและระยะเวลา การกระตุ้นต่างกัน จะส่งผลต่อลักษณะและสีของเนื้อเยื่อรากลอย สีของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย รวมทั้งปริมาณสารกลุ่มสเตียรอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยอาหารที่ได้รับการกระตุ้นด้วย ตัวกระตุ้น (MeJA+CD)\_CHT และ CHT+MeJA+CD จะมีสีเหลืองเข้มในทุกระยะเวลาของการ กระตุ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นอื่น ๆ นอกจากนี้ สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณ สารกลุ่มสเตียรอยด์สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นอื่น ๆ จากผลการศึกษาดังกล่าวจึงคัดเลือกตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นที่เหมาะสม ที่สุด มาศึกษากลไกการตอบสนองต่าง ๆ ต่อสภาวะเครียดออกซิเดชันในระบบขวดเขย่า และเพิ่ม ประสิทธิภาพการผลิตสารกลุ่มสเตียรอยด์โดยการเพาะเลี้ยงและกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วย ตัวกระตุ้นดังกล่าวในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยสรุปผลการศึกษาดังนี้

ผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง ด้วยวิธี ABTS และ FRAP assay ในระบบขวดเขย่า พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอย ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง เท่ากับ  $506.33 \pm 28.43$  ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ  $60.38 \pm 3.48$  มิลลิกรัม ascorbic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี ABTS และ FRAP สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้น คิดเป็น 730.46 และ 209.85 เท่า และมีความ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับ

ชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการกระตุ้นเดียวกันที่ระยะเวลาแตกต่างกัน เมื่อนำสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ทดสอบฤทธิ์ hydrogen peroxide scavenging พบว่า มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล  $H_2O_2$  สูง เท่ากับ  $76.67 \pm 2.89$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้ผลไปในทิศทางเดียวกับผลการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี total phenolic compound โดยสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด เท่ากับ  $42.51 \pm 2.96$  มิลลิกรัม gallic acid ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม คิดเป็น 73.72 เท่า โดยสรุป สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าสูงที่สุดที่ระยะเวลาการกระตุ้น 72 ชั่วโมง

ผลการตรวจสอบฤทธิ์การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าด้วยวิธี enzyme assay พบว่า การทำงานของเอนไซม์ SOD มีค่าสูงที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ  $78.06 \pm 8.59$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ขณะที่การทำงานของเอนไซม์ CAT มีการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุดที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง คิดค่าเป็น CAT specific activity เท่ากับ  $380.53 \pm 29.25$  ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนการทำงานของเอนไซม์ APX มีการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง คิดค่าเป็น APX specific activity เท่ากับ  $9.01 \pm 2.95$  ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD มีค่าการทำงานของเอนไซม์ต่ำกว่าเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ )

การศึกษาการแสดงออกของยีนกลุ่มต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่า เนื้อเยื่อรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่า มีการแสดงออกของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ กลุ่มยีนเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืชสูงที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และการแสดงออกของยีนทุกกลุ่มจะลดลงเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ คือ *RS*, *RS3* และ *PAL* มีการแสดงออกของยีนสูง คิดเป็น  $63.17 \pm 13.07$ ,  $65.70 \pm 12.35$  และ  $12.66 \pm 2.65$  เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม กลุ่มยีนเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ พบยีน *SOD*, *GPX*

และ APX มีการแสดงออกของยีน คิดเป็น  $26.77 \pm 1.63$ ,  $4.61 \pm 0.52$  และ  $2.84 \pm 0.20$  เท่าของชุดควบคุม ตามลำดับ และยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืช คือ ยีน PR4A, PR5, PR10 และ Chi มีการแสดงออกของยีนสูง คิดเป็น  $25.20 \pm 7.24$ ,  $38.67 \pm 13.69$ ,  $15.91 \pm 2.91$  และ  $16.46 \pm 2.81$  เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มสตีลบินของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยด้วยวิธีสังเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่า เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณสารกลุ่มสตีลบิน ได้แก่ สาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* สูงที่สุด เท่ากับ  $3.57 \pm 0.85$ ,  $1,266.69 \pm 182.80$  และ  $1,594.36 \pm 229.87$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ มีปริมาณสารกลุ่มสตีลบิน ได้แก่ สาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* เท่ากับ  $2.22 \pm 1.30$ ,  $315.65 \pm 139.34$  และ  $694.87 \pm 291.64$  มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาณสารกลุ่มสตีลบินทั้ง 3 ชนิดน้อยกว่าในระบบขวดเขย่า คิดเป็น 0.62, 0.25 และ 0.44 เท่า ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณสารกลุ่มสตีลบินในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ในระบบขวดเขย่ามีปริมาณสาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* เท่ากับ  $8.25 \pm 2.60$ ,  $2,898.05 \pm 577.33$  และ  $3,668.36 \pm 880.33$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่เวลาเดียวกัน มีปริมาณสารกลุ่มสตีลบิน เท่ากับ  $5.61 \pm 3.27$ ,  $804.83 \pm 341.25$  และ  $1,764.12 \pm 664.50$  มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาณสาร *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* น้อยกว่าในระบบขวดเขย่าคิดเป็น 0.68, 0.28 และ 0.48 เท่า ตามลำดับ

จากการศึกษาข้างต้น พบว่า การกระตุ้นรากลอยด้วยสารสังเคราะห์ 2 ด้วยตัวกระตุ้นที่เหมาะสม คือ CHT+MeJA+CD สามารถกระตุ้นรากลอยให้ผลิตสารทุติยภูมิกลุ่มสตีลบินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ได้ในปริมาณสูงทั้งในระดับขวดเขย่าและระดับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ดังนั้นจึงสามารถประยุกต์ใช้ตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในการกระตุ้นรากลอยด้วยวิธีสังเคราะห์ โดยข้อดีของตัวกระตุ้นที่ใช้ คือ สารตัวกระตุ้น CHT เป็นสารชีวภาพที่มีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และราคาไม่แพง ส่วนตัวกระตุ้น MeJA ร่วมกับ CD เป็นสารสื่อสัญญาณที่มีรายงานว่าสามารถกระตุ้นพืชให้สร้างสารทุติยภูมิได้และเป็นสารที่ไม่มีอันตราย นอกจากนี้การกระตุ้นด้วย

ตัวกระตุ้นรวมทั้ง 3 ตัว คือ CHT+MeJA+CD พร้อมกันในเวลาเดียวกัน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของรากลอยต่อสิ่งกระตุ้นที่เข้ามาได้อย่างรวดเร็ว สามารถกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวเองหลายระบบ เป็นการกระตุ้นที่ใช้ระยะเวลาสั้น และมีประสิทธิภาพมากกว่าการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นทีละตัว โดยกระบวนการกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพ จะเป็นแนวทางในการส่งเสริมกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มสตีลบินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถนำไปต่อยอดการเพิ่มผลผลิตในระดับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม การแพทย์ และเภสัชกรรม นอกจากนี้ยังสามารถใช้รูปแบบการกระตุ้นรากลอยด้วยตัวกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพดังกล่าว เป็นต้นแบบในการศึกษาต่อยอดกลไกการป้องกันตนเอง และการตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ ของพืชในเชิงลึกต่อไป

### อภิปรายผล

จากผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงรากลอยด้วยวิธีสายพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 และทำการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD โดยในการศึกษาได้ใช้ความเข้มข้นของตัวกระตุ้น MeJA เท่ากับ 6.87 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ CD เท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่มีการรายงานว่าตัวกระตุ้นทั้งสองชนิดสามารถกระตุ้นรากลอยด้วยวิธีสายพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 ได้ในปริมาณสูง (Yang et al., 2015) โดย MeJA เป็นตัวกระตุ้นที่ทำหน้าที่เป็นสารสื่อสัญญาณในการตอบสนองของเซลล์พืชต่อสภาวะเรื้อรังภายนอก และสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้ (Yoon et al., 2009) สาร CD เป็นสารในกลุ่ม oligosaccharide ที่เรียงกันเป็นโครงสร้างวงแหวน มีรายงานการศึกษาพบว่า CD สามารถทำหน้าที่เป็นได้ทั้งตัวกระตุ้น และมีคุณสมบัติในการกักเก็บสารที่พืชสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยจะกักเก็บสารกลุ่มที่มีขั้วน้อยไว้ในช่องว่างส่วนกลางโมเลกุลที่มีลักษณะเป็น hydrophobic ของ CD เพื่อให้คงสภาพสารได้ยาวนานขึ้น (Yang et al., 2015) สำหรับ CHT เป็นสารพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ ปลอดภัย และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาที่มีการใช้ CHT ในการกระตุ้นรากลอยและพืชชนิดต่าง ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตสารทุติยภูมิในปริมาณสูง (Ferri & Tassoni, 2011; Jiao et al., 2018) อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการศึกษาการใช้ตัวกระตุ้น CHT ร่วมกับ MeJA และ CD ในพืช และจากรายงานการศึกษาของ Somboon และคณะ (2019) ได้ศึกษาการกระตุ้นรากลอยด้วยวิธีสายพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 ด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1) PQ 2) MeJA ร่วมกับ CD 3) PQ ก่อนเติม MeJA ร่วมกับ CD และ 4) MeJA ร่วมกับ CD



ก่อนเติม PQ โดยผลการศึกษาพบว่า การกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วยตัวกระตุ้น PQ ก่อนเติม MeJA ร่วมกับ CD สามารถกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงให้ผลิตสารกลุ่มสติลบินได้สูงกว่าการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นอื่น ๆ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของ CHT ที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสง โดยใช้สภาวะการกระตุ้นเช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Somboon และคณะ (2019) โดยทำการกระตุ้นด้วย CHT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการกระตุ้น MeJA ร่วมกับ CD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารกลุ่มสติลบิน ได้แก่ *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้น ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารกลุ่มสติลบินสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT ที่ความเข้มข้น 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามด้วย MeJA ร่วมกับ CD มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการศึกษาตัวกระตุ้นที่เหมาะสมถัดไป จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ CHT เท่ากับ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสามารถลดปริมาณการใช้ตัวกระตุ้นและสามารถกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงให้ผลิตสารกลุ่มสติลบินได้ในปริมาณสูง

ผลการศึกษาตัวกระตุ้นที่เหมาะสม พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารกลุ่มสติลบินสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นอื่น ๆ ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่าการเติมตัวกระตุ้นพร้อมกันทั้ง 3 ชนิด ส่งผลให้พืชเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันมากกว่าการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นอื่น ๆ ทำให้มีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระออกมาในปริมาณมาก และสารที่รากลอยสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ อาจถูกเก็บไว้ในโมเลกุลของ CD ที่เติมลงไปพร้อมกัน ส่งผลให้สามารถตรวจพบปริมาณของสารทุติยภูมิในปริมาณมาก รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วยตัวกระตุ้นชนิดอื่น ๆ และเมื่อเปรียบเทียบผลการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วยตัวกระตุ้นร่วม MeJA, CD,  $H_2O_2$  และ  $MgCl_2$  (MeJA+CD+ $H_2O_2$ + $MgCl_2$ ) (Fang, Yang, & Medina-Bolivar, 2020) กับตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD พบว่า สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD สามารถกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงให้สังเคราะห์สารกลุ่มสติลบิน ได้แก่ *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ได้สูงกว่า

สารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นร่วม MeJA+CD+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+MgCl<sub>2</sub> คิดเป็น 8.01 และ 3.90 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD จึงเป็นตัวกระตุ้นที่เหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสารกลุ่มสติลบินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากผลการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพภายนอกของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงด้วยกล้อง SEM พบว่า เนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD มีรอยฉีกขาดบนพื้นผิวของเนื้อเยื่อรากลอย และพบกลุ่มก้อนของสารเกาะบริเวณผิวรากลอยและแทรกอยู่ในบริเวณที่มีรอยฉีกขาดของเนื้อเยื่อรากลอย ซึ่งอาจเป็นกลุ่มของสารทุติยภูมิที่รากลอยถั่วลิสงสร้างและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ภายหลังจากการได้รับการกระตุ้น ในขณะที่เนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงชุดควบคุม มีลักษณะพื้นผิวของเนื้อเยื่อรากลอยค่อนข้างเรียบ ไม่มีการฉีกขาดบนพื้นผิวของเนื้อเยื่อรากลอยและไม่พบกลุ่มก้อนของสารบริเวณผิวรากลอย โดยอาจเป็นผลมาจากรากลอยชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น จึงไม่ถูกทำลาย ทำให้ไม่จำเป็นต้องสังเคราะห์และหลั่งสารทุติยภูมิออกมาภายนอกเซลล์เพื่อป้องกันตนเองจากภาวะคุกคาม ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มสติลบินด้วยเทคนิค HPLC ที่ไม่สามารถตรวจพบปริมาณสารกลุ่มสติลบินในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงชุดควบคุม แต่สามารถพบสารกลุ่มสติลบินในสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ได้

จากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตสารกลุ่มสติลบินของรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงด้วยเทคนิค HPLC พบว่า สารกลุ่มสติลบิน ได้แก่ *trans-resveratrol*, *trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาณสารน้อยกว่าในระบบขวดเขย่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาอื่น ๆ ที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเปลี่ยนระบบการผลิตสารทุติยภูมิจากระบบขวดเขย่าสู่ระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ปริมาณสารทุติยภูมิที่ตรวจสอบได้ในระบบขวดเขย่าจะสูงกว่าระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปัจจัยในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้แก่ ความหนาแน่นของเนื้อเยื่อพืช, อากาศและระบบการกวนผสมที่เลือกใช้ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ รวมทั้งองค์ประกอบของก๊าซต่าง ๆ เป็นต้น (Pan, Wang & Zhong, 2000; Sudo et al., 2002; Sivanandhan et al., 2014; วราภรณ์, 2557) อย่างไรก็ตามการเพิ่มผลผลิตในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในระยะเวลาที่เท่ากัน พบว่า ปริมาณของเนื้อสารสกัดหาบทั้งหมด

(total crude extract) ที่ได้จากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีปริมาณสูงกว่าในระบบขวดเขย่า เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถเพิ่มปริมาณพื้นที่การเพาะเลี้ยงรากลอยได้มากกว่าในระบบขวดเขย่าถึง 10 เท่าในการเพาะเลี้ยงแต่ละรอบ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงและการกระตุ้นรากลอยด้วยวิธีดังกล่าวด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเพิ่มพื้นที่การเพาะเลี้ยงรากลอย อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาปัจจัยและสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มผลผลิตของสารกลุ่มสเตียรอยด์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อที่จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารกลุ่มสเตียรอยด์ในปริมาณมากและนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ต่อไป

เมื่อพืชได้รับการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอก อาจส่งผลต่อการกระตุ้นภาวะเครียดออกซิเดชัน ทำให้เกิดการกระตุ้นอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นในเซลล์พืช จากรายงานการศึกษาการกระตุ้นพืช *Acer pseudoplatanus* L. ด้วย CHT พบว่า มีระดับของอนุมูลอิสระ  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  และ NO เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Malerba & Cerana, 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น MeJA ในพืช *Brassica napus* L. พบว่า สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ  $H_2O_2$  และ  $OH^-$  สะสมเพิ่มขึ้นภายในเซลล์ (Farooq et al., 2016) และพบรายงานการกระตุ้นร่วมของ MeJA และ CD ในพืช *Nicotiana tabacum* พบว่า ตัวกระตุ้นร่วมทั้งสองชนิดสามารถเหนี่ยวนำการเกิดอนุมูลอิสระ ROS ได้แก่  $H_2O_2$  และ NO เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ (Almagro et al., 2012) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นทั้ง 3 ชนิด สามารถเหนี่ยวนำให้พืชเกิดอนุมูลอิสระขึ้นภายในเซลล์ได้ ผลการศึกษาการกลไกต่าง ๆ ในการตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดชันของรากลอยด้วยวิธีที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่า เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า รากลอยด้วยวิธีดังกล่าวที่ใช้กลไกที่หลากหลายในการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในแต่ละช่วงเวลาแตกต่างกัน ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ ยีนกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ และยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืช พบว่า มีการแสดงออกของยีนสูงที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และมีการแสดงออกของยีนที่ลดลง เมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้น

ผลการศึกษา ยีนกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ยีน SOD มีการแสดงออกของยีนสูงสุด รองลงมาเป็นยีน GPX และ APX โดยการทำงานของเอนไซม์ SOD มีหน้าที่ในการเปลี่ยน  $O_2^-$  ให้กลายเป็น  $H_2O_2$  จากนั้นเอนไซม์ GPX และ APX จะทำหน้าที่สลาย  $H_2O_2$  ให้กลายเป็น  $H_2O$  และ  $O_2$  เพื่อลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Gill & Tuteja, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน

การศึกษาของ Baek และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษากการแสดงออกของยีนเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในพืช near-isogenic wheat lines ภายใต้สภาวะเย็นและการศึกษาของ Luo และคณะ (2011) ในพืช *Lolium perenne* L. ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแคดเมียม ผลการศึกษาพบว่ายีนกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นภายใต้สภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยมีการแสดงออกของยีนเอนไซม์ SOD สูงที่สุด รองลงมาเป็นยีน GPX และ APX นอกจากนี้ยังพบว่ายีนกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และมีการแสดงออกของยีนที่ลดลงเมื่อระยะเวลาการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาระดับการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) พบว่า ระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD, CAT และ APX ในเนื้อเยื่อรากลอยที่ได้รับการกระตุ้นมีค่าต่ำกว่าในชุดควบคุมทุกช่วงระยะเวลาการกระตุ้นซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการแสดงออกของยีน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน SOD, APX และ GPX อาจไม่ได้ศึกษาครอบคลุมทุกรูปแบบของยีนในกลุ่มยีนที่มีความสัมพันธ์กัน (gene family) ทั้งนี้ยีนที่อยู่ในกลุ่ม gene family เดียวกันจะมีลักษณะร่วมที่คล้ายคลึงกัน และมักจะมีความเชื่อมโยงกันกับหน้าที่ทางชีวภาพ โดยยีนของเอนไซม์แต่ละชนิดมีรูปแบบที่หลากหลาย ซึ่งแต่ละรูปแบบมีการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นที่ได้รับไม่เท่ากัน การศึกษาของ Yamane และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษากการแสดงออกของยีน APX แต่ละรูปแบบในใบของพืช *Oryza sativa* L. ภายใต้สภาวะความเค็ม ผลพบว่ามี การแสดงออกของยีน APX1, APX4, APX6 และ APX7 สูง แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน APX3 และ APX5 และการศึกษากการแสดงออกของยีน SOD ในพืช *Glycyrrhiza uralensis* Fish ภายใต้สภาวะความเค็ม พบว่า มีการแสดงออกของยีน MnSOD สูงขึ้น ขณะที่ยีน FeSOD และ CuZnSOD มีการแสดงออกของยีนที่ลดลงหลังได้รับ 2%NaCl (Pan, Wu & Yu, 2006) นอกจากนี้ความไม่สอดคล้องของการแสดงออกของยีนและการทำงานของเอนไซม์ อาจเกิดจากกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนการถอดรหัสและการแปลรหัสเป็นโปรตีนที่อาจมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนและการผลิตเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้แตกต่างกันในแต่ละสภาวะที่ได้รับ (Scandalios, 1990; Lijavetzky et al., 2008)

ผลการศึกษาในกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ พบว่า ยีน RS3 มีการแสดงออกสูงที่สุด รองลงมาเป็นยีน RS และ PAL ซึ่งมีการแสดงออกสูงสุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และลดลงเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้น โดยทั้ง 3 ยีนเป็นยีนเอนไซม์ที่มีความสำคัญในวิถี phenylpropanoid ซึ่งเป็นวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่มสติลบิน ยีน PAL เป็นเอนไซม์แรกในวิถีที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน L-phenylalanine ให้เป็นสาร cinnamic acid และยีน RS, RS3 คือ

ยีน *resveratrol synthase* ที่อยู่ในกลุ่ม *gene family* เดียวกัน ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในการรวม *malonyl-CoA* และ *p-coumaroyl-CoA* ให้เป็นโมเลกุล *trans-resveratrol* ในขั้นตอนสุดท้ายของวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่มสตีลบินซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาการสังเคราะห์สาร *resveratrol* ในพืช *Gnetum parvifolium* และพืช *Vitis vinifera* พบการแสดงออกของยีน *PAL* และ *RS* หรือ *stilbene synthase (STS)* เพิ่มสูงขึ้น (Lijavetzky et al., 2008; Deng et al., 2017) Lanz และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษากลุ่มยีน *RS (RS gene family)* พบว่า ในถั่วลิสงสามารถพบยีน *RS* ได้ 4 รูปแบบ คือ *RS1, RS2, RS3* และ *RS4* ซึ่งยีนแต่ละรูปแบบมีการตอบสนองและการแสดงออกต่อภาวะและตัวกระตุ้นต่าง ๆ ที่ได้รับแตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Chung และคณะ (2001) ที่พบว่า มีการแสดงออกของยีน *RS* สูงในรากและฝักของต้นถั่วลิสง แต่พบการแสดงออกของยีน *RS* ที่ต่ำในใบ เมล็ด และเปลือกหุ้มเมล็ด นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีนในพืช *Tartary Buckwheat* พบว่า มีการแสดงออกของยีน *RS* ในใบ ดอก และเมล็ดที่สูงกว่าในส่วนรากและลำต้น (Kim et al., 2013) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการแสดงออกของกลุ่มยีน *RS* จะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ สภาพการกระตุ้นที่พืชได้รับ ชนิดของเนื้อเยื่อ และสายพันธุ์ของพืช การศึกษานี้ได้เลือกศึกษาการแสดงออกของยีน 2 รูปแบบที่ทำหน้าที่เป็น *resveratrol synthase* คือ ยีน *RS3* และ *RS* พบว่า ยีนรูปแบบ *RS3* มีการแสดงออกสูงกว่ายีน *RS* โดยการตอบสนองของยีนแต่ละรูปแบบอาจจะแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อและตัวกระตุ้นต่าง ๆ ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนแต่ละรูปแบบไม่เท่ากัน อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารกลุ่มสตีลบินภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น พบว่า ปริมาณสารกลุ่มสตีลบิน ได้แก่ *trans-resveratrol, trans-arachidin-1* และ *trans-arachidin-3* เพิ่มสูงขึ้น เมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารกลุ่มสตีลบินเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง (Chang et al., 2006; Sales & Resurreccion, 2014; Yang et al., 2015) การที่ระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สารกลุ่มสตีลบินสูงในช่วงต้นของการกระตุ้น ในขณะที่ปริมาณสารกลุ่มสตีลบินต่ำในช่วงต้นและเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากกลไกการควบคุมกระบวนการถอดรหัสของยีนภายหลังการได้รับการกระตุ้น โดยตัวกระตุ้นจะมีการส่งสัญญาณให้ *transcription factor* เปิดการทำงานยีนและมีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สารทุติยภูมิมาก่อน จากนั้นจึงมีการตอบสนองทางเมทาบอลิซึมโดยการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของวิถีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ เพื่อตอบสนองต่อสภาวะการกระตุ้นที่ได้รับ โดยปรากฏการณ์นี้เป็นปรากฏการณ์ทางเมทาบอลิซึมทั่วไปที่การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของแต่ละวิถีจะมีการตอบสนองที่ช้ากว่าการแสดงออก

ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์นั้น ๆ (Exposito et al., 2009) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาอื่น ๆ ที่มีรายงานการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในช่วงต้นของการกระตุ้น ในขณะที่พบปริมาณสารทุติยภูมิต่ำในช่วงต้นและมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้น (Jiao et al., 2018; Gai et al., 2019) การเพิ่มการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น รากลอยจะปรับตัวมาใช้กลไกของการสังเคราะห์สารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์เป็นการรักษาสมดุลทดแทนการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารกลุ่มสเตียรอยด์ที่ตรวจพบด้วยเทคนิค HPLC ที่มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น และสอดคล้องกับผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่เพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน เมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้น

ผลการศึกษากลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืช พบว่ายีน PR5 มีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด รองลงมาเป็นยีน PR4A, Chi และ PR10 โดยรากลอยจะกระตุ้นกลไกการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืช ซึ่งทำหน้าที่ในการปกป้องพืชเมื่อมีสิ่งรุกรามกระตุ้น จากรายงานการศึกษาการกระตุ้นพืชด้วยตัวกระตุ้น CHT และ MeJA พบว่า มีการแสดงออกของยีน PR-protein และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคในพืช ได้แก่ PR1, PR5, PR10 รวมทั้ง glucanase และ chitinase เป็นต้น (Zhang et al., 2010; Siddaiah et al., 2018; Chun & Chandrasekaran, 2019) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT, MeJA และ CD สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน PR-protein และยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคในพืชได้เมื่อมีสิ่งรุกรามกระตุ้น เมื่อพืชได้รับการทำลายจากเชื้อโรคหรือตัวกระตุ้นต่าง ๆ พืชจะมีการเหนี่ยวนำการสร้างยีน PR-protein ผ่าน SA (salicylic acid) signaling pathway ซึ่งจะส่งสัญญาณการกระตุ้นแบบ SAR (Systemic acquired resistance) เพื่อปกป้องตนเองจากสิ่งรุกรามที่ได้รับ (van Loon et al., 1994; Ryals et al., 1996) โดยการทำงานของ PR-protein ในพืชจะมีการตอบสนองแบบระยะยาวขึ้นอยู่กับปริมาณการกระตุ้นที่ได้รับ และการทำงานของ PR-protein จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อพืชได้รับเชื้อโรคเดิมต่อไปในระยะเวลาอันสั้น (Kuć, 2001; Sudisha et al., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในที่พบว่า มีการแสดงออกของยีนกลุ่มโปรตีนต้านทานโรคสูงภายหลังได้รับการกระตุ้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีการแสดงออกของยีนลดลงเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า เมื่อรากลอยได้รับการกระตุ้นจากตัวกระตุ้นส่งผลให้มีการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคขึ้นมาปกป้องตนเองในระยะเวลาอันสั้น และเมื่อระยะเวลาการกระตุ้นนานขึ้น รากลอยยังคงมีการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคขึ้นมาปกป้องตนเอง แต่อาจมี

การเหนี่ยวนำกลไกอื่น ๆ เข้ามาช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นมากภายในเซลล์ เพื่อรักษาสมดุลของเซลล์แทนการทำงานของโปรตีนต้านทานโรคเพียงอย่างเดียว

ดังนั้นการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD พร้อมกัน สามารถกระตุ้นให้รากลอยถั่วลิสงผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ในปริมาณสูง และสามารถเหนี่ยวนำให้รากลอยถั่วลิสงเกิดการตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดชันและป้องกันตนเองจากสิ่งเร้าที่มากระตุ้นอย่างรวดเร็วด้วยกลไกการป้องกันตนเองทั้งในระบบที่ใช้เอนไซม์และไม่ใช้เอนไซม์ได้แก่ การสังเคราะห์สารทุติยภูมิเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระ การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ การสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืช หรือกลไกอื่น ๆ เพื่อให้ตนเองอยู่รอดจากสภาวะที่ได้รับอย่างเหมาะสมในระยะเวลาอันสั้น

### ข้อเสนอแนะ

การศึกษาการเพิ่มปริมาณสารกลุ่มสติลบินโดยการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงสายพันธุ์ กาศพิณธุ์ 2 ด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าและระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพได้ผลผลิตสารกลุ่มสติลบินปริมาณน้อยกว่าในระบบขวดเขย่า ดังนั้นการศึกษาต่อไป ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การสังเคราะห์สารและสภาวะที่เหมาะสมของรากลอยถั่วลิสงที่ได้รับกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นดังกล่าวในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ให้สามารถเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิกลุ่มสติลบินได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดการเพิ่มผลผลิตสารกลุ่มสติลบินในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ รวมทั้งการพัฒนากระบวนการแยกบริสุทธิ์สารแต่ละชนิดในกลุ่มสติลบิน เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับ *in vitro* และ *in vivo* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางด้านเภสัชกรรมและอุตสาหกรรมอาหารต่อไปในอนาคต

## บรรณานุกรม

- Abbott, J. A., Medina-Bolivar, F., Martin, E. M., Engelberth, A. S., Villagarcia, H., Clausen, E. C., & Carrier, D. J. (2010). Purification of resveratrol, arachidin-1, and arachidin-3 from hairy root cultures of peanut (*Arachis hypogaea*) and determination of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Biotechnology progress*, 26(5), 1344-1351.
- Almagro, L., Bru, R., Pugin, A., & Pedreño, M. A. (2012). Early signaling network in tobacco cells elicited with methyl jasmonate and cyclodextrins. *Plant physiology and biochemistry*, 51, 1-9.
- Baek, K. H., & Skinner, D. Z. (2003). Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science*, 165(6), 1221-1227.
- Boligon, A. A., Machado, M. M., & Athayde, M. L. (2014). Technical evaluation of antioxidant activity. *Med chem*, 4(7), 517-522.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
- Brents, L. K., Medina-Bolivar, F., Seely, K. A., Nair, V., Bratton, S. M., Ñopo-Olazabal, L., ... & Radomska-Pandya, A. (2012). Natural prenylated resveratrol analogs arachidin-1 and-3 demonstrate improved glucuronidation profiles and have affinity for cannabinoid receptors. *Xenobiotica*, 42(2), 139-156.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.
- Chandra, S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology letters*, 34(3), 407-415.
- Chang, J. C., Lai, Y. H., Djoko, B., Wu, P. L., Liu, C. D., Liu, Y. W., & Chiou, R. Y. Y. (2006). Biosynthesis enhancement and antioxidant and anti-inflammatory activities of peanut (*Arachis hypogaea* L.) arachidin-1, arachidin-3, and isopentadienylresveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 10281-10287.



- Chun, S. C., & Chandrasekaran, M. (2019). Chitosan and chitosan nanoparticles induced expression of pathogenesis-related proteins genes enhances biotic stress tolerance in tomato. *International journal of biological macromolecules*, 125, 948-954.
- Chung, I. M., Park, M. R., Rehman, S., & Yun, S. J. (2001). Tissue specific and inducible expression of resveratrol synthase gene in peanut plants. *Molecules and cells*, 12(3), 353-359.
- Chye, M. L., Zhao, K. J., He, Z. M., Ramalingam, S., & Fung, K. L. (2005). An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato. *Planta*, 220(5), 717-730.
- Conceição, J., Adeoye, O., Cabral-Marques, H. M., & Lobo, J. M. S. (2018). Cyclodextrins as excipients in tablet formulations. *Drug discovery today*, 23(6), 1274-1284.
- Condori, J., Sivakumar, G., Hubstenberger, J., Dolan, M. C., Sobolev, V. S., & Medina-Bolivar, F. (2010). Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 310-318.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual review of plant biology*, 48(1), 355-381.
- Davis, J. P., & Dean, L. L. (2016). Peanut composition, flavor and nutrition. In *Peanuts* (pp. 289-345). AOCS Press.
- de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., Rasera, G. B., Canniatti-Brazaca, S. G., do Prado-Silva, L., Alvarenga, V. O., ... & Shahidi, F. (2017). Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. *Food Chemistry*, 237, 538-544.
- Deng, N., Liu, C., Chang, E., Ji, J., Yao, X., Yue, J., ... & Shi, S. (2017). High temperature and UV-C treatments affect stilbenoid accumulation and related gene expression levels in *Gnetum parvifolium*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 43-49.
- Donpudsa, S., & Rimphanitchayakit, V. (2012). Cyclodextrin and Cyclodextrin

- glycosyltransferase. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University*, 31, 837-843.
- Dubrovina, A. S., & Kiselev, K. V. (2017). Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta*, 246(4), 597-623.
- Expósito, O., Bonfill, M., Onrubia, M., Jané, A., Moyano, E., Cusidó, R. M., ... & Piñol, M. T. (2009). Effect of taxol feeding on taxol and related taxane production in *Taxus baccata* suspension cultures. *New biotechnology*, 25(4), 252-259.
- Fang, L., Yang, T., & Medina-Bolivar, F. (2020). Production of prenylated stilbenoids in hairy root cultures of peanut (*Arachis hypogaea*) and its wild relatives *A. ipaensis* and *A. duranensis* via an optimized elicitation procedure. *Molecules*, 25(3), 509.
- Farooq, M. A., Gill, R. A., Islam, F., Ali, B., Liu, H., Xu, J., ... & Zhou, W. (2016). Methyl jasmonate regulates antioxidant defense and suppresses arsenic uptake in *Brassica napus* L. *Frontiers in plant science*, 7, 468.
- Ferri, M., & Tassoni, A. (2011). Chitosan as elicitor of health beneficial secondary metabolites in in vitro plant cell cultures. *Handbook of Chitosan Research and Applications*. Nova Science Publishers, New York, 389-414.
- Gai, Q. Y., Jiao, J., Wang, X., Liu, J., Wang, Z. Y., & Fu, Y. J. (2019). Chitosan promoting formononetin and calycosin accumulation in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures via mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Garcia, D., Girardi, N. S., Passone, M. A., Nesci, A., & Etcheverry, M. (2016). Evaluation of food grade antioxidant formulation for sustained antifungal, antiaflatoxigenic and insecticidal activities on peanut conditioned at different water activities. *Journal of Stored Products Research*, 65, 6-12.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Giri, A., & Narasu, M. L. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology advances*, 18(1), 1-22.

- Gupta, R., Pandey, P., Singh, S., Singh, D. K., Saxena, A., Luqman, S., ... & Banerjee, S. (2016). Advances in *Boerhaavia diffusa* hairy root technology: a valuable pursuit for identifying strain sensitivity and up-scaling factors to refine metabolite yield and bioactivity potentials. *Protoplasma*, 253(4), 1145-1158.
- Huang, C. P., Au, L. C., Chiou, R. Y. Y., Chung, P. C., Chen, S. Y., Tang, W. C., ... & Lin, S. B. (2010). Arachidin-1, a peanut stilbenoid, induces programmed cell death in human leukemia HL-60 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(23), 12123-12129.
- Hwang, H. H., Yu, M., & Lai, E. M. (2017). Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15.
- Irshad, M., & Chaudhuri, P. S. (2002). Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body.
- Jiao, J., Gai, Q. Y., Wang, X., Qin, Q. P., Wang, Z. Y., Liu, J., & Fu, Y. J. (2018). Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. *Industrial crops and products*, 124, 28-35.
- Khan, S. A., Siddiqui, M. H., & Osama, K. (2018). Bioreactors for Hairy Roots Culture: A Review. *Current Biotechnology*, 7(6), 417-427.
- Kim, Y. B., Thwe, A. A., Kim, Y., Yeo, S. K., Lee, C., & Park, S. U. (2013). Characterization of cDNA encoding resveratrol synthase and accumulation of resveratrol in tartary buckwheat. *Natural Product Communications*, 8(11), 1934578X1300801118.
- Kisková, T., Mungenast, F., Suváková, M., Jäger, W., & Thalhammer, T. (2019). Future aspects for cannabinoids in breast cancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1673.
- Kuč, J. (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 7-12.
- Kumar, M. R., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, 104(12), 6017-6084.

- Kuźma, Ł., Bruchajzer, E., & Wysokińska, H. (2009). Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6-7), 406-410.
- Lanz, T., Schröder, G., & Schröder, J. (1990). Differential regulation of genes for resveratrol synthase in cell cultures of *Arachis hypogaea* L. *Planta*, 181(2), 169-175.
- Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Martínez-Zapater, J. M., Bru, R., & Pedreño, M. A. (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in *Monastrell* grapevine cell cultures. *BMC research notes*, 1(1), 132.
- Limmongkon, A., Nopprang, P., Chaikandee, P., Somboon, T., Wongshaya, P., & Pilaisangsuree, V. (2018). LC-MS/MS profiles and interrelationships between the anti-inflammatory activity, total phenolic content and antioxidant potential of Kalasin 2 cultivar peanut sprout crude extract. *Food chemistry*, 239, 569-578.
- Luo, H., Li, H., Zhang, X., & Fu, J. (2011). Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology*, 20(4), 770-778.
- Malerba, M., & Cerana, R. (2015). Reactive oxygen and nitrogen species in defense/stress responses activated by chitosan in sycamore cultured cells. *International journal of molecular sciences*, 16(2), 3019-3034.
- Malerba, M., & Cerana, R. (2018). Recent advances of chitosan applications in plants. *Polymers*, 10(2), 118.
- Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A. M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O'Keefe, S. F., ... & Dolan, M. C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, 68(14), 1992-2003.
- Meng, X., Xu, J., He, Y., Yang, K. Y., Mordorski, B., Liu, Y., & Zhang, S. (2013). Phosphorylation of an ERF transcription factor by Arabidopsis MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. *The Plant Cell*, 25(3), 1126-1142.
- Mukhopadhyay, D., Dasgupta, P., Roy, D. S., Palchoudhuri, S., Chatterjee, I., Ali, S., &

- Dastidar, S. G. (2016). A Sensitive In vitro Spectrophotometric Hydrogen Peroxide Scavenging Assay using 1, 10-Phenanthroline. *Free Radicals & Antioxidants*, 6(1).
- Nilsen-Nygaard, J., Strand, S. P., Vårum, K. M., Draget, K. I., & Nordgård, C. T. (2015). Chitosan: gels and interfacial properties. *Polymers*, 7(3), 552-579.
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., & Tarhan, E. A. (2013). Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation and its biotechnological applications in crops. In *Crop improvement* (pp. 1-48). Springer, Boston, MA.
- Pan, Y., Wu, L. J., & Yu, Z. L. (2006). Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant Growth Regulation*, 49(2-3), 157-165.
- Pan, Z. W., Wang, H. Q., & Zhong, J. J. (2000). Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(9), 714-723.
- Pilaisangsuee, V., Anuwat, P., Supdensong, K., Lumpa, P., Kongbangkerd, A., & Limmongkon, A. (2020). Enhancement of adaptive response in peanut hairy root by exogenous signalling molecules under cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 254, 153278.
- Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (2007). Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology letters*, 29(7), 1143-1146.
- Rejeb, I. B., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants*, 3(4), 458-475.
- Reyes-Díaz, M., Lobos, T., Cardemil, L., Nunes-Nesi, A., Retamales, J., Jaakola, L., ... & Ribera-Fonseca, A. (2016). Methyl jasmonate: An alternative for improving the quality and health properties of fresh fruits. *Molecules*, 21(6), 567.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *The plant cell*, 8(10), 1809.
- Sales, J. M., & Resurreccion, A. V. (2014). Resveratrol in peanuts. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(6), 734-770.

- Sathiyabama, M., Bernstein, N., & Anusuya, S. (2016). Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). *Industrial Crops and Products*, 89, 87-94.
- Scandalios, J. G. (1990). Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. In *Advances in genetics* (Vol. 28, pp. 1-41). Academic Press.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M., Cammue, B. P., & De Bolle, M. F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 941-950.
- Siddaiah, C. N., Prasanth, K. V. H., Satyanarayana, N. R., Mudili, V., Gupta, V. K., Kalagatur, N. K., ... & Singh, B. P. (2018). Chitosan nanoparticles having higher degree of acetylation induce resistance against pearl millet downy mildew through nitric oxide generation. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
- Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A., & Manickavasagam, M. (2014). Enhanced biosynthesis of withanolides by elicitation and precursor feeding in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal in shake-flask culture and bioreactor. *PLoS One*, 9(8), e104005.
- Sobolev, V. S. (2013). Production of phytoalexins in peanut (*Arachis hypogaea*) seed elicited by selected microorganisms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(8), 1850-1858.
- Somboon, T., Chayjarung, P., Pilaisangsuee, V., Keawracha, P., Tonglairoom, P., Kongbangkerd, A., ... & Limmongkon, A. (2019). Methyl jasmonate and cyclodextrin-mediated defense mechanism and protective effect in response to paraquat-induced stress in peanut hairy root. *Phytochemistry*, 163, 11-22.
- Sudisha, J., Sharathchandra, R. G., Amruthesh, K. N., Kumar, A., & Shetty, H. S. (2012). Pathogenesis related proteins in plant defense response. In *Plant defence: biological control* (pp. 379-403). Springer, Dordrecht.
- Sudo, H., Yamakawa, T., Yamazaki, M., Aimi, N., & Saito, K. (2002). Bioreactor production of camptothecin by hairy root cultures of *Ophiorrhiza pumila*. *Biotechnology Letters*, 24(5), 359-363.

- Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T. H., & Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(3), 245-264.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant signaling & behavior*, 7(10), 1306-1320.
- Yamane, K., Mitsuya, S., Taniguchi, M., & Miyake, H. (2010). Transcription profiles of genes encoding catalase and ascorbate peroxidase in the rice leaf tissues under salinity. *Plant production science*, 13(2), 164-168.
- Yang, T., Fang, L., Nopo-Olazabal, C., Condori, J., Nopo-Olazabal, L., Balmaceda, C., & Medina-Bolivar, F. (2015). Enhanced production of resveratrol, piceatannol, arachidin-1, and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut co-treated with methyl jasmonate and cyclodextrin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(15), 3942-3950.
- Yang, T., Fang, L., Rimando, A. M., Sobolev, V., Mockaitis, K., & Medina-Bolivar, F. (2016). A stilbenoid-specific prenyltransferase utilizes dimethylallyl pyrophosphate from the plastidic terpenoid pathway. *Plant Physiology*, 171(4), 2483-2498.
- Yoon, J. Y., Hamayun, M., Lee, S. K., & Lee, I. J. (2009). Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 12(2), 63-68.
- Zhang, J., Du, X., Wang, Q., Chen, X., Lv, D., Xu, K., ... & Zhang, Z. (2010). Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. *BMC Research Notes*, 3(1), 1-6.

วราภรณ์ ภูตะสุน. (2557) เทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรร : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้ทางเภสัชศาสตร์. ขอนแก่น: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. (2544). **เรื่อนำรู้ไคติน-ไคโตซาน**. ปทุมธานี: ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. สภาเกษตรกรรมแห่งชาติ. (2561). **ถั่วลิสง**. สืบค้นเมื่อ 6 เมษายน 2562, จาก

<https://www.nfc.or.th/content/6961>

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน. (2561). **ถั่วลิสง**. สืบค้นเมื่อ 6 เมษายน 2562, จาก

[http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/other\\_sub.php?file=encyclopedia/book19.html](http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/other_sub.php?file=encyclopedia/book19.html)







ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนครพนม

## ภาคผนวก ก ผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา

### Optimization of chitosan concentration for stilbene compound induction in Kalasin 2 peanut hairy root culture

Phadtraphorn Chayjarung<sup>1</sup>, Anupan Kongbangkerd<sup>2</sup> and Apinun Limmongkon<sup>1</sup>

#### Abstract

Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) are an important economic crop and contain high nutritional value. They produce stilbene compounds with high pharmacological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer effects. This study investigated the optimum concentration of chitosan (CHT) followed by methyl jasmonate (MeJA) and cyclodextrin (CD) (CHT\_MeJA+CD) in K2-K599 hairy root culture and compared biological activity of K2-K599 hairy root culture medium crude extract using 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (ABTS) antioxidant assay and total phenolic compound (TPC) assay. The result showed that the treatment with 200 mg/L of CHT followed by MeJA and CD exhibited the highest amount of the stilbenes: *trans*-resveratrol, *trans*-arachidin-1 and *trans*-arachidin-3 content with 2.52±0.35, 323.94±20.45 and 344.64±21.81 mg/g dry weight of hairy root, respectively. In addition, the highest antioxidant capacity and phenolic compound production were detected with 136.50±19.41 μmol Trolox/g dry weight of hairy root and 12.85±2.94 mg Gallic acid/g dry weight of hairy root, respectively. The production of stilbene compounds with antioxidant capacity could be beneficial for health and pharmaceutical applications.

Keyword : peanut, hairy root, chitosan, stilbene compound

#### Introduction

Stilbene compounds such as *trans*-resveratrol, *trans*-arachidin-1 and *trans*-arachidin-3 are polyphenolics which function as phytoalexins to protect plants against pathogens, insects or oxidative stress (Medina-Bolivar et al., 2007). *Trans*-resveratrol has been found in grapes, peanuts and berries while the derivative forms such as *trans*-arachidin-1 and *trans*-arachidin-3 have been identified only peanuts. These compounds have been reported to have many biological activities, including antioxidant, anticancer, anti-inflammatory and anti-aging properties (Chang et al., 2006). Several studies reported that hairy root culture of peanut elicited with various elicitors produce *trans*-resveratrol and its derivatives, including *trans*-arachidin-1 and *trans*-arachidin-3 (Medina-Bolivar et al., 2007; Condori et al., 2010). Yang et al. demonstrated that a combination of methyl jasmonate (MeJA) and cyclodextrin (CD) acted as a good elicitor to induce high yields of stilbene compounds in peanut hairy root culture (Yang et al., 2015). The

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Narasuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Narasuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

addition of paraquat (PQ) to MeJA and CD has also been reported to further increase the yield of stilbene compounds (Somboon et al., 2019).

Chitosan (CHT) is a natural biopolymer that is safe, low-cost and non-toxic to the environment (Malerba et al., 2018). Numerous studies reported that CHT has the potential to induce secondary metabolite production in plants. It has been reported that CHT acts as a good elicitor to enhance the production of secondary metabolites with high antioxidant capacity in *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures (Jiao et al., 2018). Treatment with CHT increased ginseng saponin in the hairy root of *Panax ginseng* (Jeong et al., 2005) ; phenolic and terpenic compounds in *Ocimum basilicum* L. (Kim et al., 2005) and curcumin in *Curcuma longa* L. (Sathiyabama et al., 2016). Therefore, CHT could be used as a co-elicitor to increase the content of stilbene compounds in peanut hairy root culture.

The peanut hairy root culture established from peanut 'Kalasin2' cultivar (K2) transformed with *Agrobacterium rhizogenes* (K599) described as K2-K599 was used in this study.

### Objectives

The aim of this work was to optimize the concentration of CHT followed by a combination of MeJA and CD for stilbene compound production in peanut hairy root culture (K2-K599) and investigated the biological activity of peanut hairy root medium crude extract.

### Materials and Methods

#### Hairy root line and growth conditions

Hairy root line of peanut (*Arachis hypogaea* L.) 'Kalasin2' cultivar (K2-K599) was subcultured on MS agar medium with 3% sucrose every 2 weeks at 25°C and maintained under continuous darkness.

#### The optimum concentration of chitosan (CHT) and elicitation treatment

Total 1.25 g of K2-K599 hairy root tissues were cultured in 125 mL flask with 50 mL of ½ MS liquid medium in the dark at 25°C for 24 h. After 24 h, the hairy roots were treated with different concentrations of CHT (50, 100, 150 and 200 mg/L) for 24 h followed by 100 µM MeJA and 6.87 mM CD (CHT\_MeJA+CD) as previously described by Yang et al. (Yang et al., 2015). The cultures were incubated at 25°C on an orbital shaker (150 rpm) in the dark and harvested after 24 h.

#### Culture medium extraction

The hairy root culture medium was partitioned and extracted three times with ethyl acetate in ratio 1:1. The ethyl acetate fractions were evaporated to dryness under vacuum at 40°C in a rotary evaporator. The culture medium crude extracts were redissolved in ethanol for analysis.

#### The stilbene compound analysis by HPLC

The HPLC analysis was performed as described by Limmongkon et al. (Limmongkon et al., 2018). The separation was performed on a C18 reverse-phase column at a flow rate of 1 ml/min. The mobile phase consisted of acetonitrile and 2% formic acid in water (30:70). The chromatogram was detected at 306 nm for *trans-resveratrol* and at 340 nm for *trans-arachidin-1* and *trans-arachidin-3*

#### The antioxidant ABTS assay

The ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)) assay measure the relative ability of antioxidants to scavenge the ABTS radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) as compared with a Trolox standard (Boligon et al., 2014). The reaction was started by mixing 2 ul of crude extract (5mg/mL) and 198 ul of the ABTS<sup>•+</sup> solution and incubated in the dark at room temperature for 6 minutes. The remaining ABTS<sup>•+</sup> was then measured at 734 nm. Trolox was used as standard and the antioxidant capacity was reported as the TEAC value (Trolox equivalent antioxidant capacity,  $\mu\text{M}$  Trolox/g dry weight of hairy roots).

#### Total phenolic content assay

The total phenolic content (TPC) assay detects the total phenolic compound substances using Folin-Ciocalteu method. The 2 ul of crude extract (5mg/mL) was added to 10 ul of Folin reagent and followed by 10 ul of 20%w/v sodium carbonate. The reaction was incubated at room temperature in the dark for 30 minutes and measured at 765 nm. Gallic acid was used as standard and TPC content was expressed as GAE (Gallic acid equivalent,  $\mu\text{g}$  gallic acid /g dry weight of hairy roots).

### Results/Discussion

#### The optimum concentration of Chitosan (CHT)

Different concentrations of CHT (50, 100, 150 and 200 mg/L) were used to determine the optimum concentration to elicit the highest production of stilbene compounds in peanut hairy root. The elicitation was performed by pretreatment of CHT at 24 h and then adding the combination of MeJA and CD. The amount of stilbene compounds was determined by HPLC. UV detection at 306 nm was used to measure the *trans-resveratrol* (Fig.1) and 340 nm was specific for *trans-arachidin-1* and *trans-arachidin-3* (Fig.2). The results demonstrated that 200 mg/L of CHT could induce the highest production of stilbene compounds in K2-K599 hairy root culture (Fig.1d and Fig.2d). It has been reported that chitosan can be found in cell wall structural component of pathogenic fungi (Pochanavanich et al., 2002). Thus, pathogen infection might release the chitosan component and rapidly induced reactive oxygen species generation in plant cells. This can be result in plant defense mechanism such as production of secondary metabolite to protect plant cells against oxidative stresses. Chitosan is therefore used to imitate the natural elicitor for plant defense (Hidangmayum et al., 2019). The present result demonstrated that 200 mg/L could induce the highest production of stilbene compounds in accordance with antioxidant activity and total phenolic contents in

peanut hairy root culture. The highest response of plant defense could imply as a high ability of chitosan to trigger plant protection mechanism. Therefore, 200 mg/L was considered as the optimum concentration of CHT in this study. However, a threshold of chitosan concentration has been demonstrated to effect the switching of plant program cell death due to the cytotoxicity. (Iriti et al., 2009)

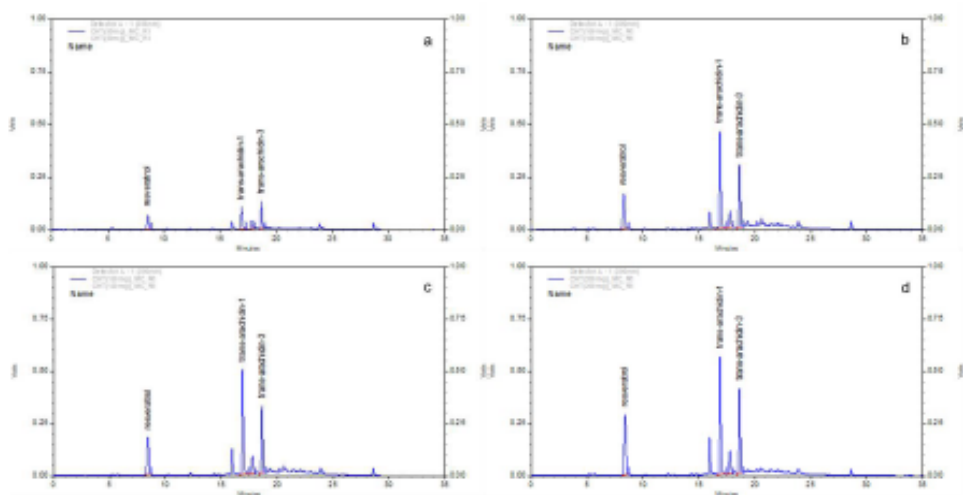


Figure 1. The HPLC chromatogram detected at 306 nm for *trans-resveratrol* of the hairy root K2-K599 culture medium crude extracts treated with different concentration of CHT: a) 50 mg/L CHT, b) 100 mg/L CHT, c) 150 mg/L CHT and d) 200 mg/L CHT followed by elicitation with MeJA and CD for 24 h.

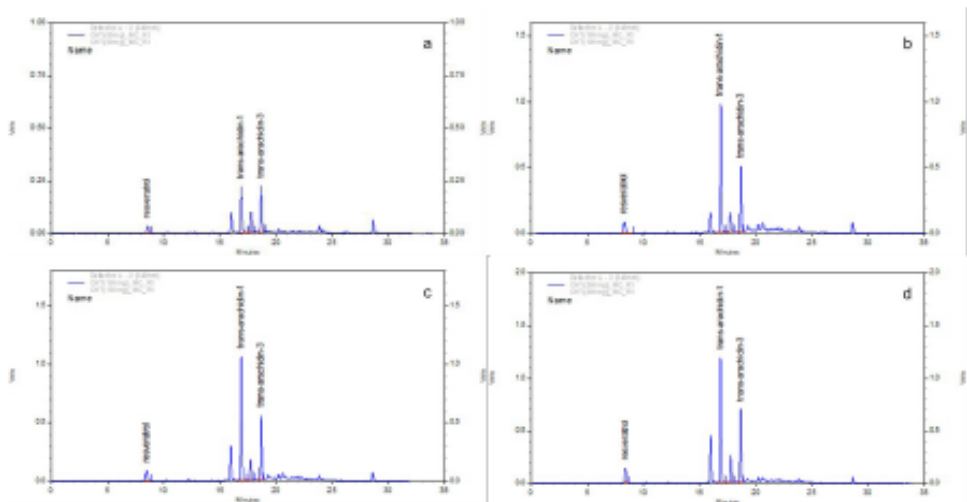


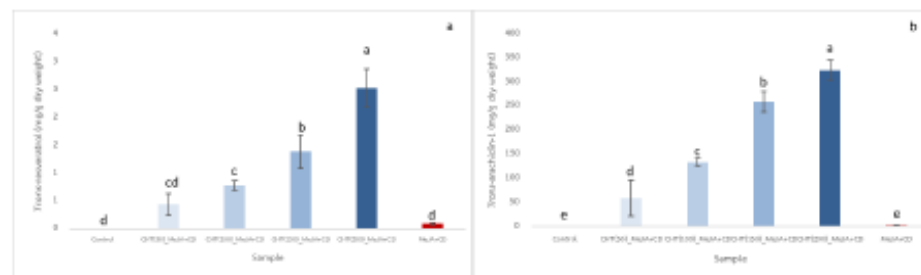
Figure 2. The HPLC chromatogram detected at 340 nm for *trans-arachidin-1* and *trans-arachidin-3* of the K2-K599 hairy root culture medium crude extracts treated with different concentration of CHT: a) 50 mg/L

CHT, b) 100 mg/L CHT, c) 150 mg/L CHT and d) 200 mg/L CHT followed by elicitation with MeJA and CD for 24 h.

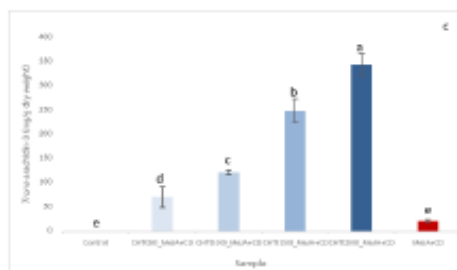
The amount of stilbene compounds of hairy root K2-K599 cultures elicited by CHT\_MeJA+CD

The quantification of stilbene compounds was investigated using HPLC. The hairy root culture treated with 200 mg/L CHT followed by MeJA and CD (CHT\_MeJA+CD) exhibited the highest amount of *trans*-resveratrol, *trans*-arachidin-1 and *trans*-arachidin-3 content with  $2.52 \pm 0.35$ ,  $323.94 \pm 20.45$  and  $344.64 \pm 21.81$  mg/g dry weight of hairy roots, respectively (Fig.3a,b,c). Our results also demonstrated that all three stilbene compounds could be induced in peanut hairy root culture after treatment with the combination of MeJA and CD (Fig.3a-c). However, the pre-exposure of CHT before addition of MeJA and CD substantially induced an increase in stilbene contents (Fig.3a-c). Several other reports have indicated that CHT acts as an elicitor of secondary metabolites in *in vitro* cultures. Elicitation of *Vitis vinifera* cell suspension culture with CHT promoted the production of stilbene such as resveratrol (Ferri et al., 2009). The treatment of *Rubia cordifolia* L. hairy root culture with CHT produced an alizarin compound of 10-fold higher concentrations than control (Ghatge et al., 2014).

A significant increase of stilbene compounds was also reported in our previous elicitation strategy by using combinations of elicitors. The elicitation of K2-K599 hairy root culture with PQ followed by MeJA and CD could induce the high content of *trans*-resveratrol, *trans*-arachidin-1 and *trans*-arachidin-3 with  $0.97 \pm 0.48$ ,  $53 \pm 15$  and  $147 \pm 11$  mg/g dry weight of hairy roots, respectively (Somboon et al., 2019). Our recent study demonstrated that the pre-treatment of CHT followed by MeJA and CD could be the best elicitation strategy to induce the highest production of stilbene compounds compared with other combinations of elicitors.



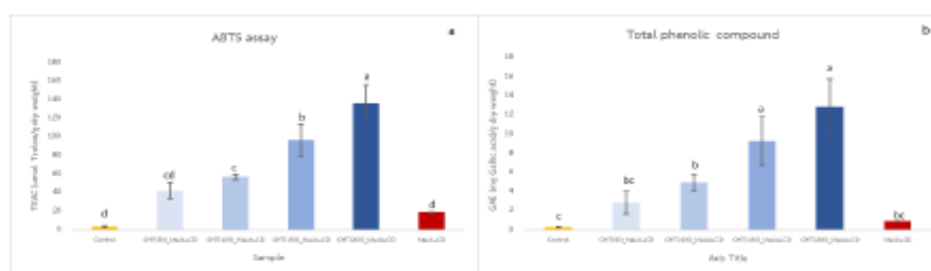
5



**Figure 3.** Quantification of a) *trans-resveratrol*, b) *trans-arachidin-1* and c) *trans-arachidin-3* in K2-K599 hairy root culture medium crude extracts treated with different concentrations of CHT followed by MeJA and CD (CHT\_MeJA+CD) and co-treatment with MeJA plus CD (MeJA+CD). Data represented the mean  $\pm$  standard deviation. Different lowercase letters show significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

#### Antioxidant activity and total phenolic compounds

The highest antioxidant activities ( $136.50 \pm 19.41$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  dry weight of hairy roots) and total phenolic contents ( $12.85 \pm 2.94$   $\text{mg Gallic acid/g}$  dry weight of hairy roots) of medium crude extracts were determined with the treatment of 200 mg/L CHT followed by MeJA and CD (Fig.4a-b). Katiyar et al. demonstrated that CHT could induce oxidative stress in plants and thus activate the production of more antioxidants (Katiyar et al., 2015).



**Figure 4.** Biological activity measured by a) ABTS assay and b) total phenolic compound assay of hairy root K2-K599 culture medium crude extracts treated with different concentrations of CHT followed by MeJA and CD (CHT\_MeJA+CD) and co-treatment with MeJA plus CD (MeJA+CD). Data represented the mean  $\pm$  standard deviation. Different lowercase letters show significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ).

In addition, a positive correlation of antioxidant activity and total phenolic contents of K2-K599 hairy root culture medium crude extract was determined with  $r = 0.9956$  (Fig.5). Therefore, the elicitation of

peanut hairy root culture with optimum concentration of CHT and combination of MeJA and CD could improve the production of phenolic compounds with antioxidant activity including stilbene compounds such as *trans*-resveratrol, *trans*-arachidin-1 and *trans*-arachidin-3.

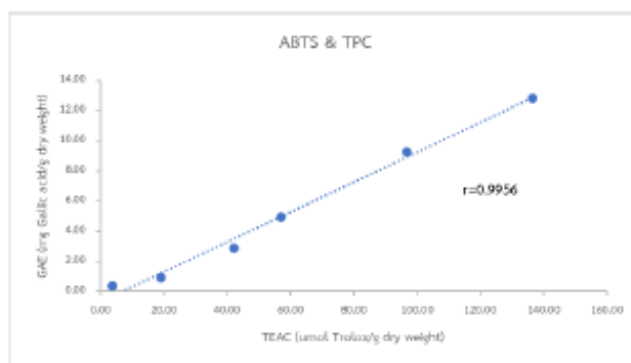


Figure 5. Correlation of the antioxidant activity and total phenolic contents of K2-K599 hairy root culture medium crude extracts treated with different concentrations of CHT followed by MeJA and CD (CHT\_MeJA+CD) and co-treatment with MeJA plus CD (MeJA+CD).

## Conclusion

To the best of our knowledge, the present study is the first to demonstrate the elicitation of CHT in combination with MeJA and CD treatment in peanut hairy root culture. The optimum concentration of CHT for enhancing stilbene compounds biosynthesis was investigated in this study. The result demonstrated the optimum concentration of 200 mg/L CHT followed by MeJA and CD could enhance the highest production of stilbene compounds such as *trans*-resveratrol, *trans*-arachidin-1 and *trans*-arachidin-3 with highest antioxidant activity. Chitosan is therefore considered as a good candidate for potential combined substances to induce stilbene compounds production due to its natural biopolymer structure, inexpensive and non-toxic to the environment. The elicitation with chitosan would be a promising strategy to promote plant secondary metabolites with high biological activity. The further investigation should be performed in order to determine the best elicitation strategy, mechanism, and interplay of these elicitors in plant cells.

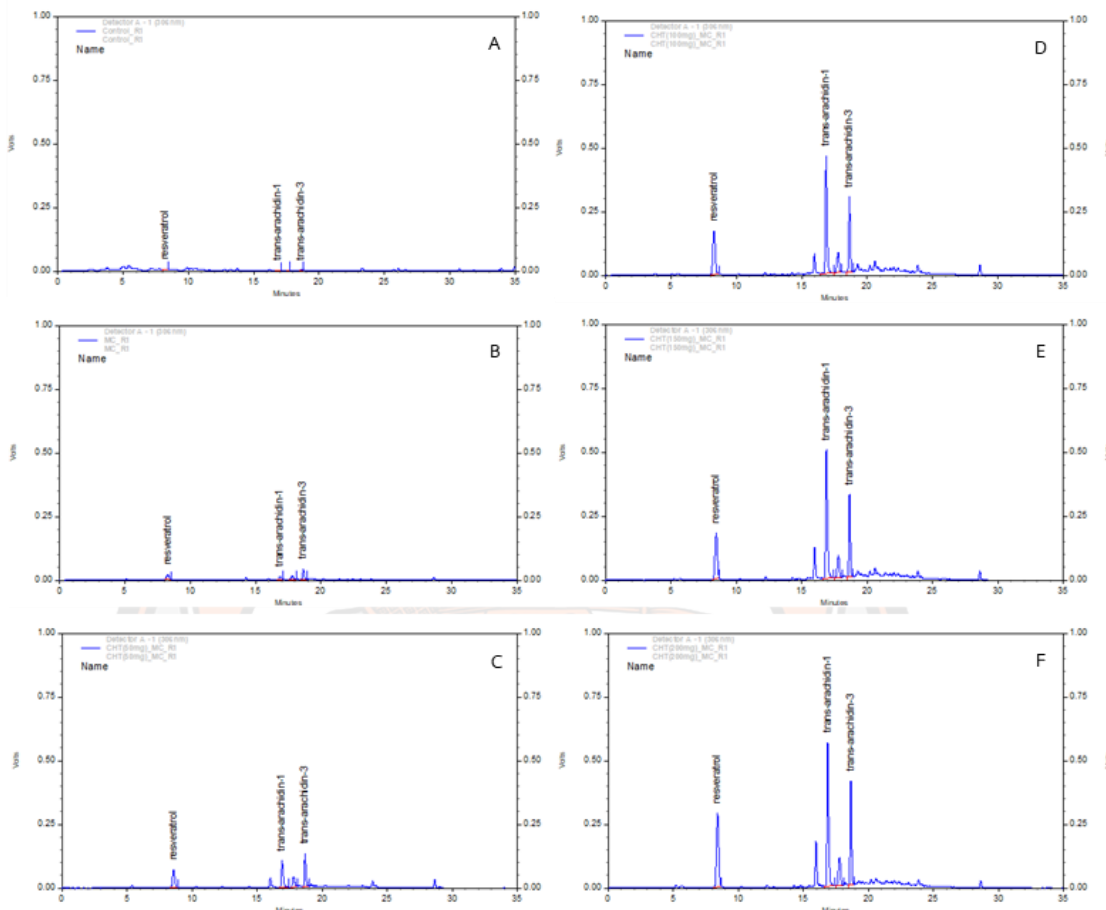
## References

- Boligon A.-A. 2014. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Med chem.*, 4, 517-522.
- Chang J.-C. 2006. Biosynthesis Enhancement and Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Arachidin-1, Arachidin-3, and Isopentadienylresveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 10281-10287.
- Condori J. 2010. Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and

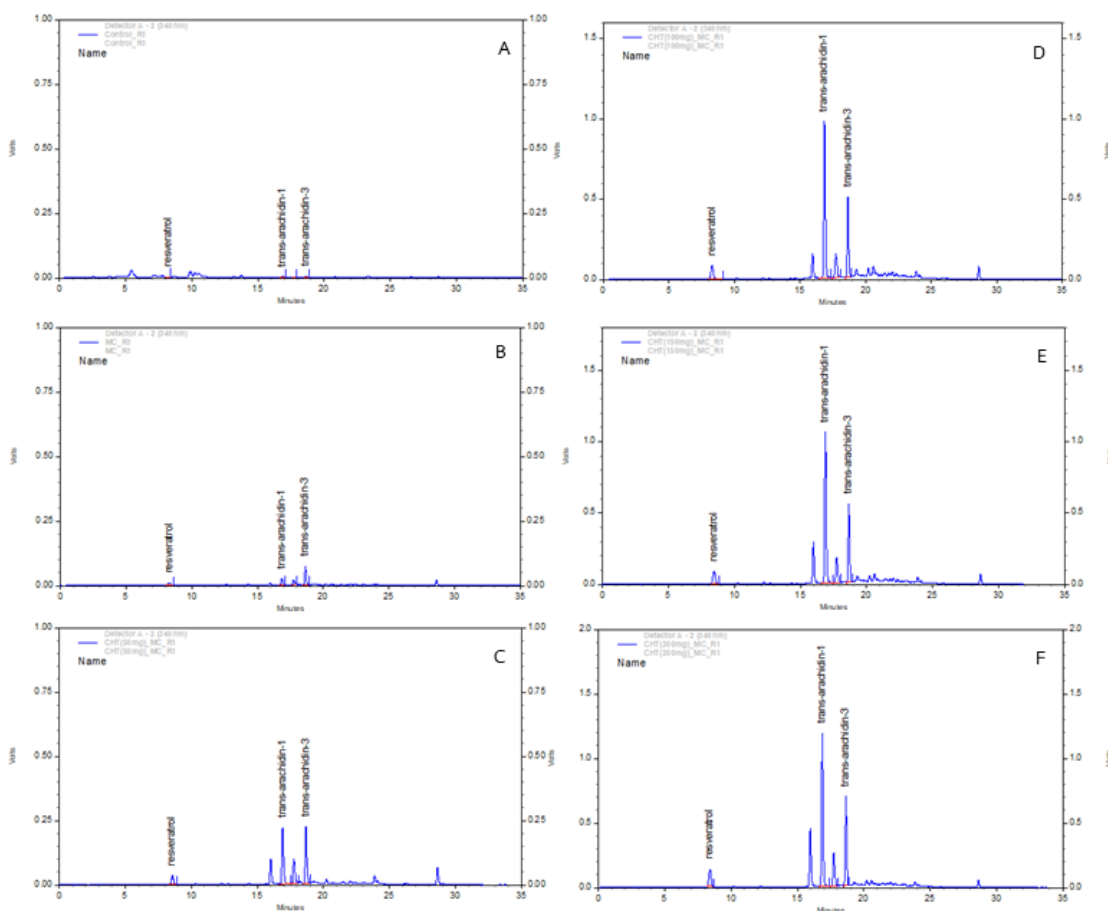


- arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage. *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 310-318.
- Ferri M. 2009. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics.*, 9, 610-624.
- Ghatge (Patil) S. 2014. Effect of Chitosan Elicitation on Alizarin Production in Hairy Root Cultures of *Rubia cordifolia* L. *J. Chitin Chitosan Sci.*, 2, 1-8.
- Hidangmayum A. 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiol Mol Biol Plants.*, 25, 313-326.
- Iriti M. 2009. Chitosan As A MAMP, Searching For A PRR. *PLANT SIGNAL BEHAV.*, 4, 66-68.
- Jeong G. 2005. Enhancement of Growth and Secondary Metabolite Biosynthesis: Effect of Elicitors Derived from Plants and Insects. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 10, 73-77.
- Jiao J. 2018. Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. *Ind Crops Prod.*, 124, 28-35.
- Katiyar D. 2015. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian J. Plant Physiol.*, 20, 1-9.
- Kim H. 2005. Effect of Chitosan on the Biological Properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3693-3701.
- Limmongkon A. 2018. LC-MS/MS profiles and interrelationships between the anti-inflammatory activity, total phenolic content and antioxidant potential of Kalasin 2 cultivar peanut sprout crude extract. *Food Chem.*, 239, 569-578.
- Malerba M. 2018. Recent Advances of Chitosan Applications in Plants. *Polymers.*, 10, 118 pp.
- Medina-Bolivar F. 2007. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochem.*, 68, 1992-2003.
- Pichyangkura R. 2015. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Sci Hort.*, 196, 49-65.
- Pochanavanich P. 2002. Fungal chitosan production and its characterization. *Letts Appl Microbiol.*, 35, 17-21.
- Sathiyabama M. 2016. Chitosan elicitation for increased curcumin production and stimulation of defence response in turmeric (*Curcuma longa* L.). *Ind Crops Prod.*, 89, 87-94.
- Somboon T. 2019. Methyl jasmonate and cyclodextrin-mediated defense mechanism and protective effect in response to paraquat-induced stress in peanut hairy root. *Phytochemistry.*, 163, 11-22.
- Yang T. 2015. Enhanced Production of Resveratrol, Piceatannol, Arachidin-1, and Arachidin-3 in Hairy Root Cultures of Peanut Co-treated with Methyl Jasmonate and Cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 63, 3942-3950.

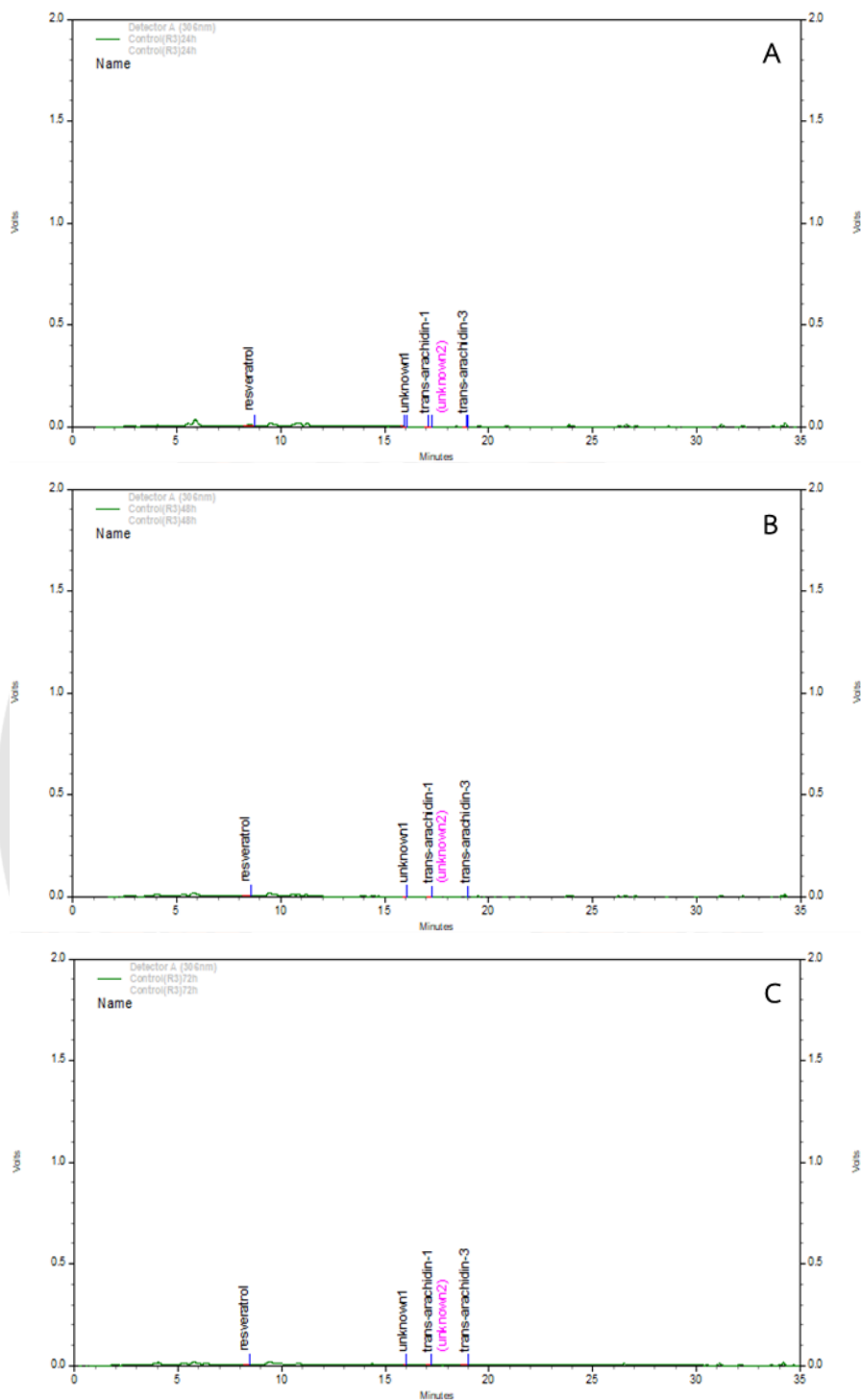
ภาคผนวก ข โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง



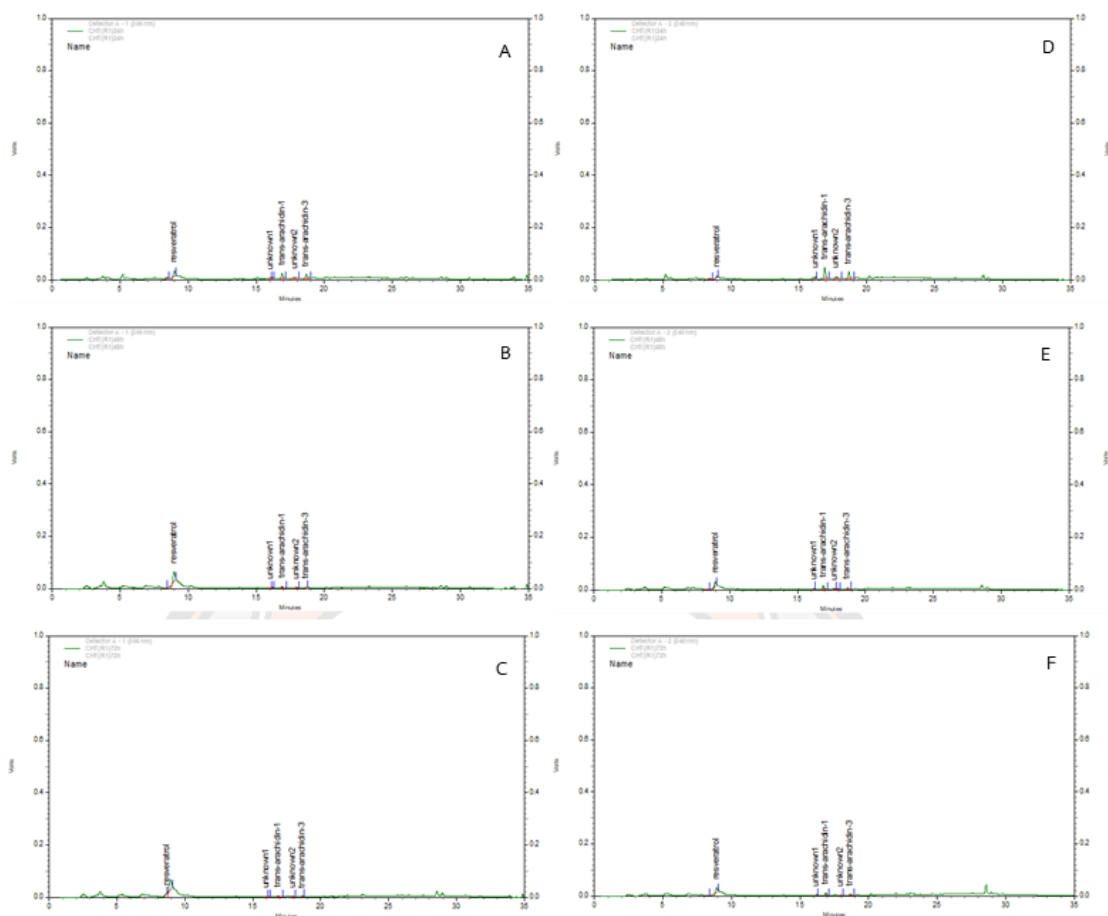
โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง A) ชุดควบคุม B) ชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย MeJA+CD และชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT ที่ความเข้มข้น C) 50 mg/L D) 100 mg/L E) 150 mg/L และ F) 200 mg/L ตามด้วย MeJA+CD ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



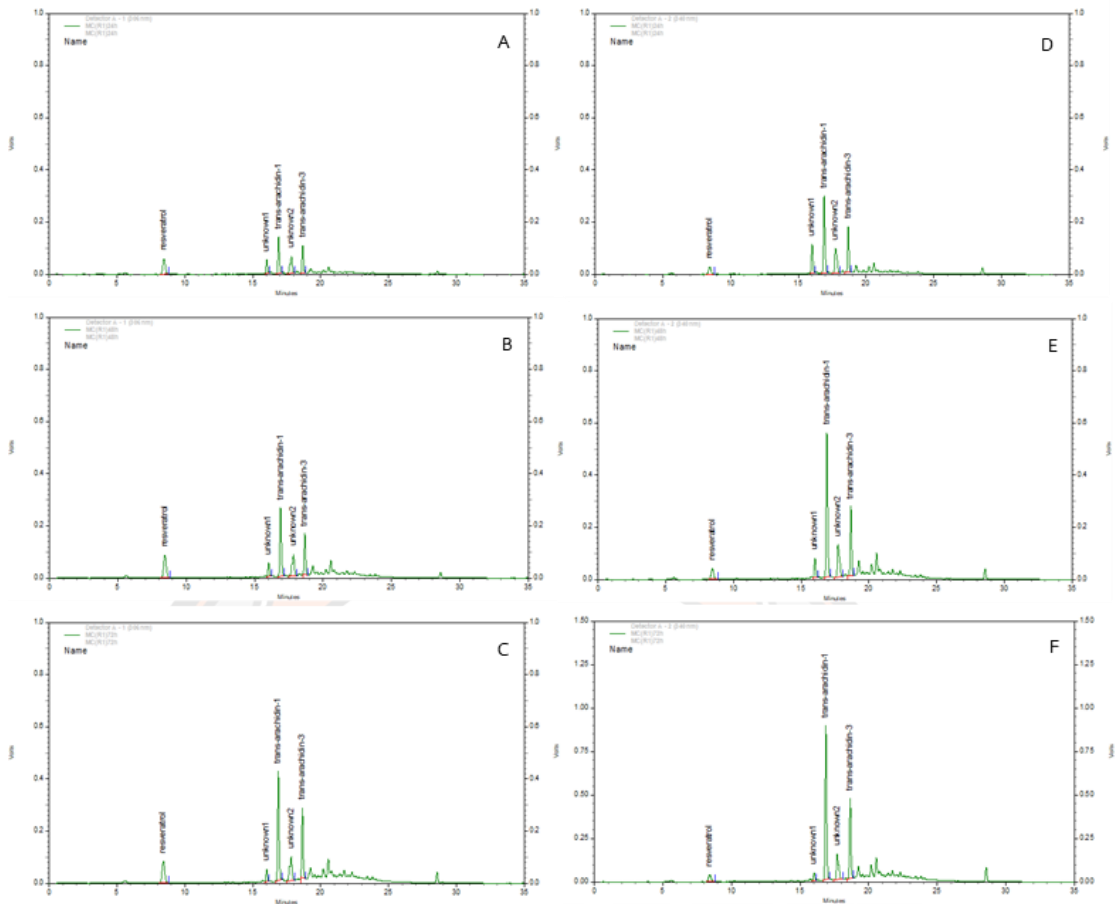
โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง A) ชุดควบคุม B) ชุดที่  
 ได้รับการกระตุ้นด้วย MeJA+CD และชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT ที่ความ  
 เข้มข้น C) 50 mg/L D) 100 mg/L E) 150 mg/L และ F) 200 mg/L ตามด้วย  
 MeJA+CD ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



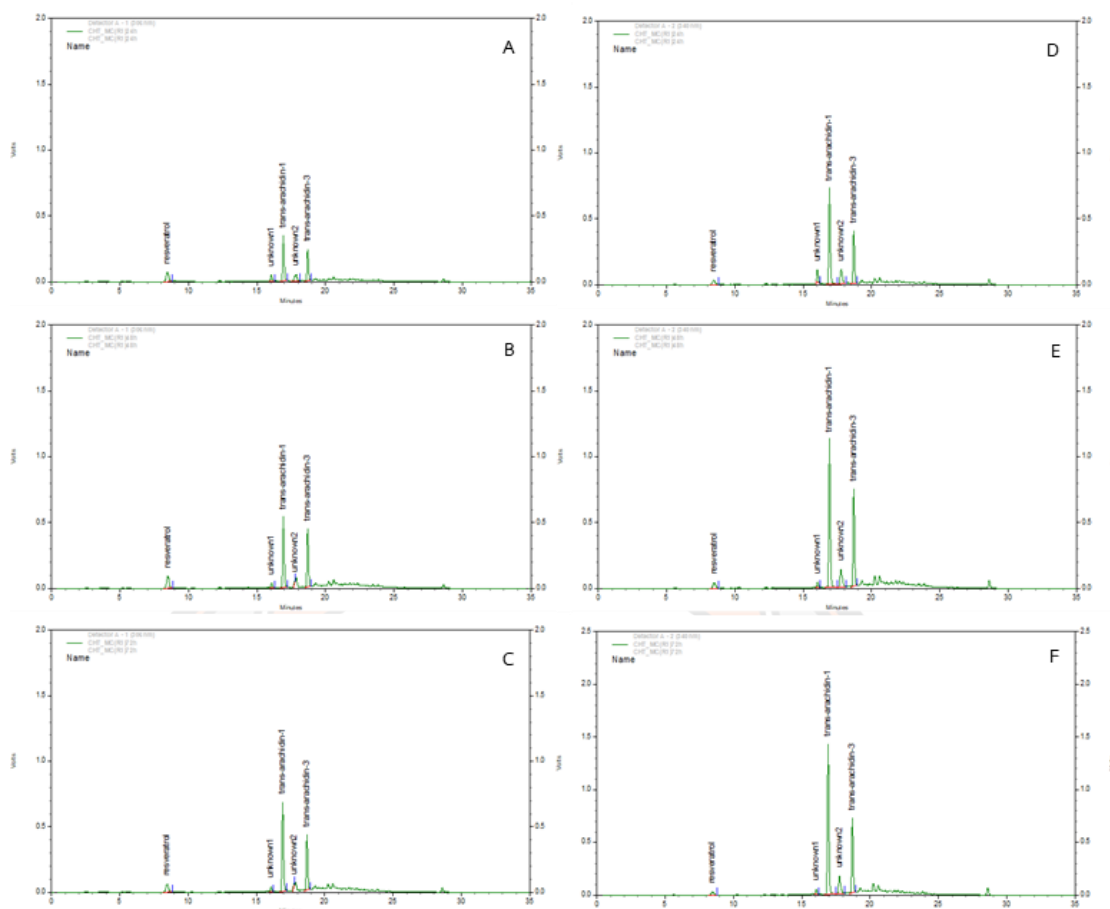
โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงชุดควบคุมที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (A, B และ C ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร



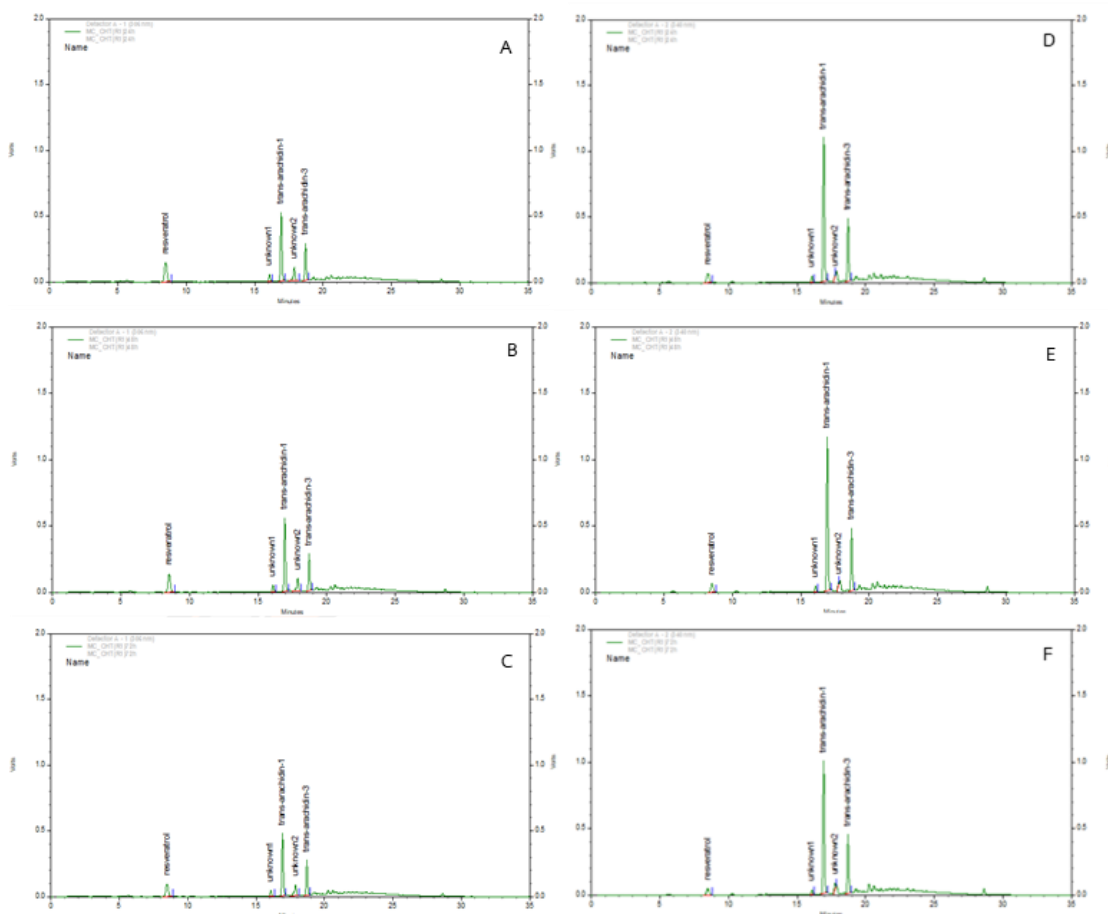
โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (A, B และ C ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร และที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (D, E และ F ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร



โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย MeJA+CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (A, B และ C ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร และที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (D, E และ F ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

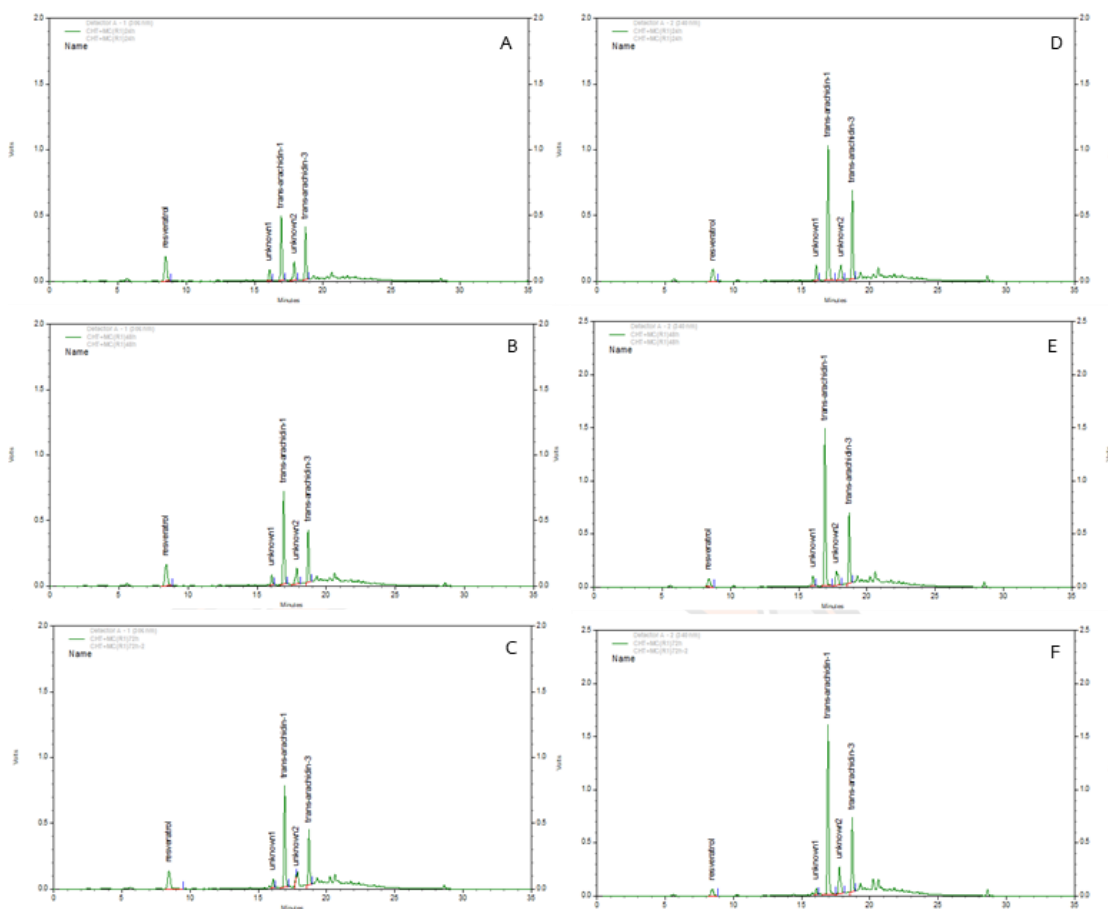


โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT\_(MeJA+CD) ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (A, B และ C ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร และที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (D, E และ F ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

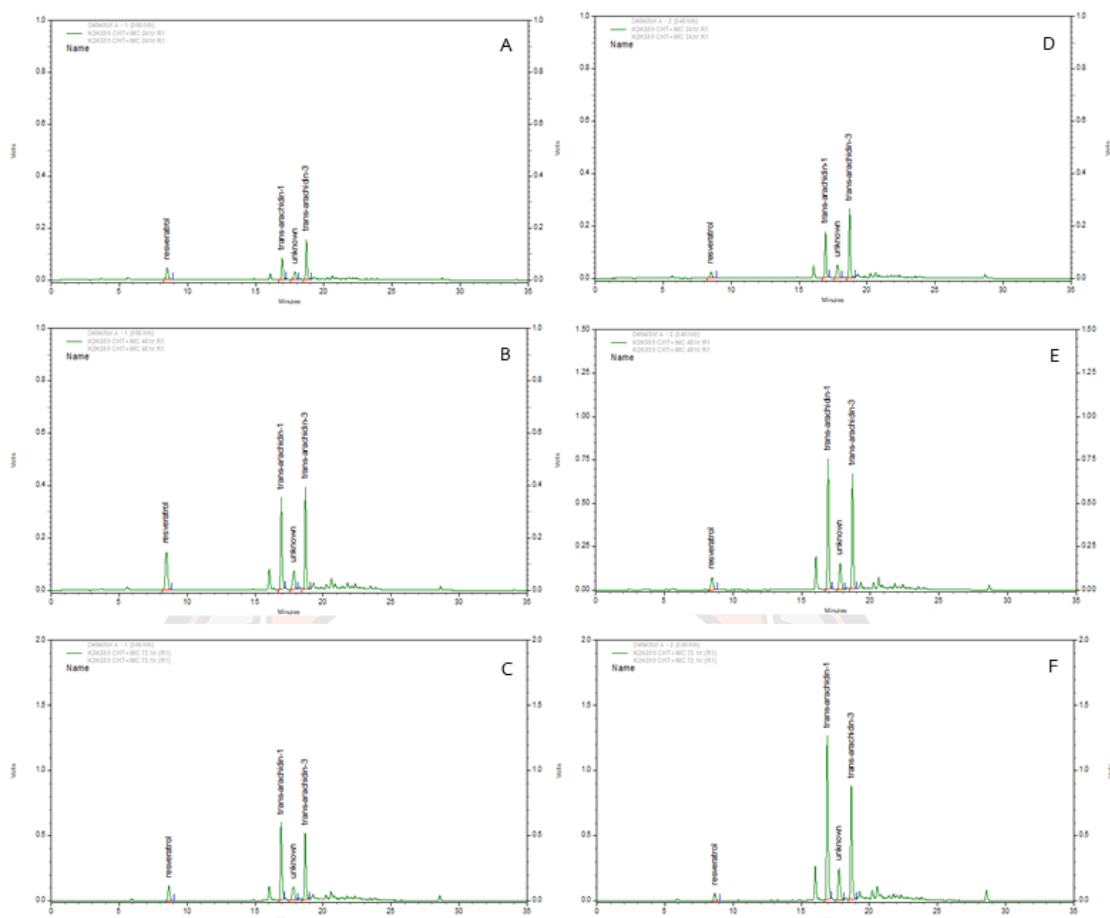


โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย (MeJA+CD)<sub>2</sub>HT ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (A, B และ C ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร และที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (D, E และ F ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

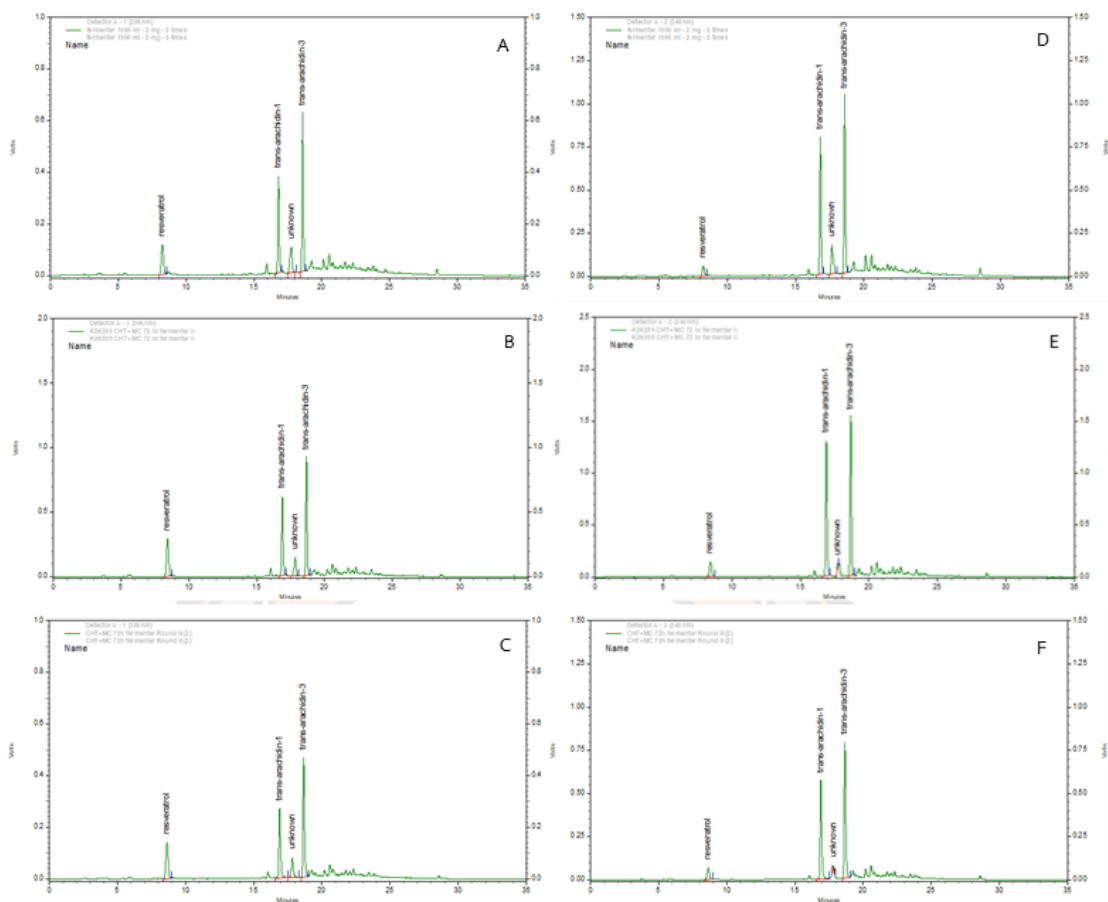




โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (A, B และ C ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร และที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (D, E และ F ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร



โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (A, B และ C ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร และที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (D, E และ F ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ในระบบขวดเขย่า



โครมาโตแกรมของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงชุดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย CHT+MeJA+CD ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (A, B และ C ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร และที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (D, E และ F ตามลำดับ) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ภาคผนวก ค น้ำหนักสารสกัดของอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

น้ำหนักเนื้อเยื่อรากลอย น้ำหนักสารสกัด และร้อยละปริมาณสารสกัดของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงจากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวกระตุ้นโคโตซานที่กระตุ้นรากลอยถั่วลิสง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง		น้ำหนักเนื้อเยื่อรากลอยเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักเนื้อเยื่อรากลอยสุดท้าย (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	% yield (กรัม)
Control	rep 1	1.24	2.08	0.0011	0.0528
	rep 2	1.28	1.67	0.0015	0.0898
CHT (50mg/L)_(MeJA+CD)	rep 1	1.42	2.09	0.0157	0.7512
	rep 2	1.27	1.57	0.0113	0.7197
CHT (100mg/L)_(MeJA+CD)	rep 1	1.30	1.54	0.0119	0.7727
	rep 2	1.37	1.52	0.0117	0.7697
CHT (150mg/L)_(MeJA+CD)	rep 1	1.43	1.57	0.0216	1.3758
	rep 2	1.34	1.98	0.0221	1.1162
CHT (200mg/L)_(MeJA+CD)	rep 1	1.35	1.61	0.0249	1.5466
	rep 2	1.29	1.44	0.0244	1.6944
MeJA+CD	rep 1	1.32	1.68	0.0172	1.0238
	rep 2	1.42	1.78	0.0156	0.8764

น้ำหนักเนื้อเยื่อรากลอย น้ำหนักสารสกัด และร้อยละปริมาณสารสกัดของเนื้อเยื่อรากลอยถั่วลิสงจากการศึกษาตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยถั่วลิสงเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง		น้ำหนัก	น้ำหนัก	น้ำหนัก	% yield (กรัม)	
		เนื้อเยื่อ รากลอย เริ่มต้น (กรัม)	เนื้อเยื่อ รากลอย สุดท้าย (กรัม)	สารสกัด (กรัม)		
Control	24 ชั่วโมง	rep 1	1.18	7.82	0.0010	0.0128
		rep 2	1.22	6.36	0.0014	0.0220
		rep 3	1.13	6.33	0.0009	0.0142
	48 ชั่วโมง	rep 1	1.18	7.82	0.0012	0.0153
		rep 2	1.22	6.36	0.0011	0.0173
		rep 3	1.13	6.33	0.0012	0.0190
	72 ชั่วโมง	rep 1	1.18	7.82	0.0020	0.0256
		rep 2	1.22	6.36	0.0028	0.0440
		rep 3	1.13	6.33	0.0019	0.0300
CHT	24 ชั่วโมง	rep 1	1.09	5.46	0.0012	0.0220
		rep 2	1.15	5.73	0.0014	0.0244
		rep 3	1.28	6.65	0.0008	0.0120
	48 ชั่วโมง	rep 1	1.09	5.46	0.0015	0.0275
		rep 2	1.15	5.73	0.0015	0.0262
		rep 3	1.28	6.65	0.0017	0.0256
	72 ชั่วโมง	rep 1	1.09	5.46	0.0037	0.0678
		rep 2	1.15	5.73	0.0020	0.0349
		rep 3	1.28	6.65	0.0022	0.0331
24 ชั่วโมง	rep 1	1.03	5.01	0.0181	0.3613	
	rep 2	1.16	5.70	0.0210	0.3684	

ตัวอย่าง		น้ำหนัก	น้ำหนัก	น้ำหนัก	% yield (กรัม)		
		เนื้อเยื่อ รากลอย เริ่มต้น (กรัม)	เนื้อเยื่อ รากลอย สุดท้าย (กรัม)	น้ำหนักร สารสกัด (กรัม)			
MeJA+CD	48 ชั่วโมง	rep 3	1.23	6.36	0.0163	0.2563	
		rep 1	1.03	5.01	0.0205	0.4092	
		rep 2	1.16	5.70	0.0233	0.4088	
	72 ชั่วโมง	rep 3	1.23	6.36	0.0211	0.3318	
		rep 1	1.03	5.01	0.0467	0.9321	
		rep 2	1.16	5.70	0.0458	0.8035	
	CHT_ (MeJA+CD)	24 ชั่วโมง	rep 3	1.23	6.36	0.0579	0.9104
			rep 1	1.18	5.25	0.0212	0.4038
			rep 2	1.15	5.98	0.0205	0.3428
		48 ชั่วโมง	rep 3	1.25	6.21	0.0208	0.3349
			rep 1	1.18	5.25	0.0231	0.4400
			rep 2	1.15	5.98	0.0265	0.4431
72 ชั่วโมง		rep 3	1.25	6.21	0.0239	0.3849	
		rep 1	1.18	5.25	0.0672	1.2800	
		rep 2	1.15	5.98	0.0497	0.8311	
(MeJA+CD) _CHT		24 ชั่วโมง	rep 3	1.25	6.21	0.0463	0.7456
			rep 1	1.16	5.25	0.026	0.4952
			rep 2	1.05	5.42	0.0276	0.5092
	48 ชั่วโมง	rep 3	1.12	5.50	0.0281	0.5109	
		rep 1	1.16	5.25	0.0279	0.5314	
		rep 2	1.05	5.42	0.0336	0.6199	
	72 ชั่วโมง	rep 3	1.12	5.50	0.0299	0.5436	
		rep 1	1.16	5.25	0.0551	1.0495	
		rep 2	1.05	5.42	0.0683	1.2601	

ตัวอย่าง		น้ำหนัก	น้ำหนัก	น้ำหนัก	% yield (กรัม)
		เนื้อเยื่อ รากลอย เริ่มต้น (กรัม)	เนื้อเยื่อ รากลอย สุดท้าย (กรัม)	สารสกัด (กรัม)	
	rep 3	1.12	5.50	0.0576	1.0473
24 ชั่วโมง	rep 1	1.12	5.41	0.0199	0.3678
	rep 2	1.07	5.21	0.0227	0.4357
	rep 3	1.12	5.35	0.0224	0.4187
48 ชั่วโมง	rep 1	1.12	5.41	0.0250	0.4621
	rep 2	1.07	5.21	0.0274	0.5259
	rep 3	1.12	5.35	0.0286	0.5346
72 ชั่วโมง	rep 1	1.12	5.41	0.0494	0.9131
	rep 2	1.07	5.21	0.0592	1.1363
	rep 3	1.12	5.35	0.0731	1.3664

น้ำหนักเนื้อเยื่อ รากลอย น้ำหนักสารสกัด และร้อยละปริมาณสารสกัดของเนื้อเยื่อ รากลอย ถั่วลิสง จากการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่า เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง		น้ำหนัก	น้ำหนัก	น้ำหนัก	% yield (กรัม)	
		เนื้อเยื่อ รากลอย เริ่มต้น (กรัม)	เนื้อเยื่อ รากลอย สุดท้าย (กรัม)	สารสกัด (กรัม)		
Control	24 ชั่วโมง	rep 1	1.34	4.67	0.0200	0.4283
		rep 2	1.15	2.68	0.0191	0.7127
		rep 3	1.32	4.84	0.0192	0.3967
	48 ชั่วโมง	rep 1	1.17	3.73	0.0200	0.5362
		rep 2	1.11	4.29	0.0206	0.4802
		rep 3	1.36	4.63	0.0196	0.4233
	72 ชั่วโมง	rep 1	1.23	6.55	0.0207	0.3160
		rep 2	1.30	5.15	0.0213	0.4136
		rep 3	1.17	3.92	0.0197	0.5026
CHT+MeJA +CD	24 ชั่วโมง	rep 1	1.09	3.45	0.1753	5.0812
		rep 2	1.17	3.87	0.1645	4.2506
		rep 3	1.11	3.44	0.1797	5.2238
	48 ชั่วโมง	rep 1	1.10	4.39	0.2082	4.7426
		rep 2	1.17	3.16	0.1939	6.1361
		rep 3	1.10	3.02	0.1953	6.4669
	72 ชั่วโมง	rep 1	1.14	4.09	0.1896	4.6357
		rep 2	1.14	5.18	0.2005	3.8707
		rep 3	1.12	4.42	0.2062	4.6652



น้ำหนักเนื้อเยื่อรากลอย น้ำหนักสารสกัด และร้อยละปริมาณสารสกัดของเนื้อเยื่อรากลอยที่วัดหลังจากการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	น้ำหนักเนื้อเยื่อรากลอยเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักเนื้อเยื่อรากลอยสุดท้าย (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	% yield (กรัม)	
CHT+MeJA+CD	rep 1	11.00	58.77	0.6865	1.1681
	rep 2	12.9	54.11	1.0132	1.8725
	rep 3	11.16	43.97	1.4346	3.2627

## ภาคผนวก ง ปริมาณสารกลุ่มสตีลบินของสารสกัดจากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสง

### การคำนวณปริมาณสารสตีลบินของสารสกัดจากรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับ การกระตุ้น

#### ตัวอย่างการคำนวณสาร *trans-resveratrol*

ข้อมูล: พื้นที่ใต้พีคของสาร *trans-resveratrol* ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตร เท่ากับ 809,687 ความเข้มข้นของสารสกัดที่ฉีด 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร, ปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยง เท่ากับ 50 มิลลิลิตร, น้ำหนักสดของราก เท่ากับ 0.67 กรัม, น้ำหนักแห้งของราก เท่ากับ 0.067 กรัม, น้ำหนักของสารสกัดทั้งหมด เท่ากับ 0.0157 กรัม

- การคำนวณปริมาณสาร *trans-resveratrol* หน่วย มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง
  1. คำนวณหาปริมาณสาร *trans-resveratrol* (x) ที่ได้จากการแทนค่าสมการของสารมาตรฐาน (ไมโครกรัม)
 
$$y = 5,000,000x + 7,524.7$$
 y คือ พื้นที่ใต้พีคของสาร *trans-resveratrol* เท่ากับ 809,687
 

ดังนั้น  $x = (809,687 - 7,524.7) / 5,000,000$

$$x = 0.1604 \text{ ไมโครกรัม}$$
  2. คำนวณหาปริมาณเนื้อสารสกัดที่ใช้ในการฉีดวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)
 เทียบจาก ปริมาตรของสารสกัด 1000 ไมโครลิตร มีเนื้อสารสกัด 2 มิลลิกรัม
 ถ้า ปริมาตรของสารสกัด 20 ไมโครลิตร มีเนื้อสารสกัด  $(2 \times 20) / 1000$ 
 ดังนั้น มีปริมาณเนื้อสารสกัดที่ใช้ในการฉีดวิเคราะห์ เท่ากับ 0.04 มิลลิกรัม
  3. คำนวณหาปริมาณสาร *trans-resveratrol* ต่อกรัมสารสกัดหยาบ (ไมโครกรัมต่อกรัม)
 เทียบจาก เนื้อสารสกัด 0.04 มิลลิกรัม มีสาร *trans-resveratrol* 0.1604 ไมโครกรัม
 ถ้า เนื้อสารสกัด 1000 มิลลิกรัม มีสาร *trans-resveratrol*  $(0.1604 \times 1000) / 0.04$ 
 ดังนั้น มีสาร *trans-resveratrol* เท่ากับ 4,010.81 ไมโครกรัมต่อกรัมสารสกัดหยาบ
  4. คำนวณหาปริมาณสาร *trans-resveratrol* ทั้งหมดในสารสกัด (ไมโครกรัม)
 เทียบจาก ปริมาณสารสกัด 1 กรัม มี *trans-resveratrol* 4,010.81 ไมโครกรัม
 ถ้า ปริมาณสารสกัด 0.0157 กรัม มี *trans-resveratrol*  $(4,010.81 \times 0.0157) / 1$ 
 ดังนั้น มีปริมาณสาร *trans-resveratrol* ทั้งหมดในสารสกัด เท่ากับ 62.97 ไมโครกรัม

5. คำนวณหาปริมาณสาร *trans-resveratrol* ต่อกรัมน้ำหนักสด (ไมโครกรัมต่อกรัม) เทียบจาก น้ำหนักสดของราก 0.67 กรัม มี *trans-resveratrol* 62.97 ไมโครกรัม  
 ถ้า น้ำหนักสดของราก 1 กรัม มี *trans-resveratrol*  $(62.97 \times 1) / 0.67$   
 ดังนั้น มีปริมาณสาร *trans-resveratrol* เท่ากับ 93.98 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด
6. คำนวณหาปริมาณสาร *trans-resveratrol* ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (ไมโครกรัมต่อกรัม) เทียบจาก น้ำหนักแห้งของราก 0.067 กรัม มี *trans-resveratrol* 62.97 ไมโครกรัม  
 ถ้า น้ำหนักสดของราก 1 กรัม มี *trans-resveratrol*  $(62.97 \times 1) / 0.067$   
 ดังนั้น มีปริมาณสาร *trans-resveratrol* เท่ากับ 939.85 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง  
 หรือ มีปริมาณสาร *trans-resveratrol* เท่ากับ 0.94 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง
7. การคำนวณปริมาณสาร *trans-resveratrol* หน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบจาก อาหารเพาะเลี้ยง 50 มิลลิิตร มีปริมาณสาร *trans-resveratrol* 62.97/1000 มิลลิกรัม  
 ถ้า อาหารเพาะเลี้ยง 1000 มิลลิิตร มีปริมาณสาร *trans-resveratrol*  $((62.97/1000) \times 1000) / 50$   
 ดังนั้น มีปริมาณสาร *trans-resveratrol* เท่ากับ 1.26 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปริมาณสาร *trans-resveratrol* จากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยแก้วลิสงจากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวกระตุ้นโคโคซานที่กระตุ้นรากลอยแก้วลิสง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> (มิลลิกรัมต่อสารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดต่อกรัมน้ำหนักแห้ง	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง)
CHT(50mg/L)_	rep 1	50	0.0157	4.011	0.063	0.301
(MeJA+CD)	rep 2	50	0.0113	8.021	0.091	0.577
CHT(100mg/L)	rep 1	50	0.0119	10.817	0.129	0.836
_(MeJA+CD)	rep 2	50	0.0117	9.207	0.108	0.709
CHT(150mg/L)	rep 1	50	0.0216	11.629	0.251	1.600
_(MeJA+CD)	rep 2	50	0.0221	10.552	0.233	1.178
CHT(200mg/L)	rep 1	50	0.0249	17.897	0.446	2.768
_(MeJA+CD)	rep 2	50	0.0244	13.451	0.328	2.279
MeJA+CD	rep 1	50	0.0172	1.014	0.017	0.104
	rep 2	50	0.0156	0.878	0.014	0.077

ปริมาณสาร *trans*-arachidin-1 จากอาหารเพราะเลี้ยงรากลอยแก้วหลังจากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวกระตุ้นโคโคซานที่กระตุ้นรากลอยแก้วลิสง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาณอาหาร เพราะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-1 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-1 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-1 ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัม ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-1 ทั้งหมดใน สารสกัด (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)
CHT(50mg/L)_ (MeJA+CD)	rep 1	0.0157	436.318	6.850	32.776	137.004
	rep 2	0.0113	1,189.519	13.442	85.615	268.831
CHT(100mg/L) _(MeJA+CD)	rep 1	0.0119	1,808.863	21.525	139.776	430.509
	rep 2	0.0117	1,674.625	19.593	128.902	391.862
CHT(150mg/L) _(MeJA+CD)	rep 1	0.0216	1,989.617	42.976	273.731	859.514
	rep 2	0.0221	2,186.554	48.323	244.055	966.457
CHT(200mg/L) _(MeJA+CD)	rep 1	0.0249	2,188.034	54.482	338.398	1,089.641
	rep 2	0.0244	1,826.445	44.565	309.481	891.305
MeJA+CD	rep 1	0.0172	42.438	0.730	4.345	14.599
	rep 2	0.0156	22.398	0.349	1.963	6.988

ปริมาณสาร *trans*-arachididn-3 จากอาหารเพราะเลี้ยงรากลอยถั่วลิสงจากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวกระตุ้นโคโคซานที่กระตุ้นราก  
 ลอยถั่วลิสง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาตร	น้ำหนัก	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachididn-3 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachididn-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachididn-3 ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัม ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachididn-3 ทั้งหมดใน สารสกัด (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)
CHT(50mg/L)_ rep 1	50	0.0157	736.265	11.559	55.308	231.187
(MeJA+CD) rep 2	50	0.0113	1,205.041	13.617	86.732	272.339
CHT(100mg/L) rep 1	50	0.0119	1,537.127	18.292	118.778	365.836
_(MeJA+CD) rep 2	50	0.0117	1,625.142	19.014	125.093	380.283
CHT(150mg/L) rep 1	50	0.0216	1,692.790	36.564	232.893	731.285
_(MeJA+CD) rep 2	50	0.0221	2,388.155	52.778	266.557	1,055.565
CHT(200mg/L) rep 1	50	0.0249	2,128.670	53.004	329.217	1,060.077
_(MeJA+CD) rep 2	50	0.0244	2,124.978	51.849	360.066	1,036.989
MeJA+CD rep 1	50	0.0172	221.129	3.803	22.639	76.068
rep 2	50	0.0156	222.869	3.477	19.532	69.535

ปริมาณสาร *trans-resveratrol* จากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยด้วยวิธีสังจากการศึกษาตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยด้วยวิธีสังเป็น  
ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม) (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans- resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans- resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0012	0.964	0.001	0.008	0.023
	rep 2	50	0.0014	1.093	0.002	0.011	0.031
	rep 3	50	0.0008	3.868	0.003	0.019	0.062
48 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0015	2.117	0.003	0.023	0.064
	rep 2	50	0.0015	4.235	0.006	0.044	0.127
	rep 3	50	0.0017	4.053	0.007	0.041	0.138
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0037	2.322	0.009	0.031	0.086
	rep 2	100	0.0020	7.685	0.015	0.054	0.154
	rep 3	100	0.0022	8.404	0.018	0.056	0.185

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans- resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans- resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0181	3.811	0.069	0.553
	rep 2	50	0.0210	3.186	0.067	0.471
	rep 3	50	0.0163	2.896	0.047	0.297
48 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0205	5.768	0.118	0.944
	rep 2	50	0.0233	5.297	0.123	0.866
	rep 3	50	0.0211	3.865	0.082	0.513
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0467	5.700	0.266	1.063
	rep 2	100	0.0458	4.881	0.224	0.784
	rep 3	100	0.0579	2.923	0.169	0.532



(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans- resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans- resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0212	4.625	0.098	0.747
	rep 2	50	0.0205	4.983	0.102	0.683
	rep 3	50	0.0208	4.836	0.101	0.648
48 ชั่วโมง (MeJA+CD)	rep 1	50	0.0231	5.936	0.137	1.045
	rep 2	50	0.0265	4.894	0.130	0.867
	rep 3	50	0.0239	5.972	0.143	0.919
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0672	4.113	0.276	1.053
	rep 2	100	0.0497	4.743	0.236	0.788
	rep 3	100	0.0463	5.091	0.236	0.759

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-</i> <i>resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans-</i> <i>resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.026	9.582	0.249	1.898
	rep 2	50	0.0276	9.402	0.260	1.916
	rep 3	50	0.0281	11.292	0.317	2.308
(MeJA+CD) _CHT 48 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0279	8.270	0.231	1.758
	rep 2	50	0.0336	10.386	0.349	2.575
	rep 3	50	0.0299	10.465	0.313	2.276
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0551	6.079	0.335	1.276
	rep 2	100	0.0683	7.455	0.509	1.879
	rep 3	100	0.0576	7.614	0.439	1.595

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans- resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans- resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0199	11.908	0.237	1.752
	rep 2	50	0.0227	11.959	0.271	2.084
	rep 3	50	0.0224	10.313	0.231	1.727
48 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0250	11.139	0.278	2.059
	rep 2	50	0.0274	12.246	0.336	2.576
	rep 3	50	0.0286	12.297	0.352	2.629
MeJA+CD 48 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0494	9.190	0.454	1.678
	rep 2	100	0.0592	9.698	0.574	2.204
	rep 3	100	0.0731	9.340	0.683	2.552

ปริมาณสาร *trans-arachidin-1* จากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยด้วยวิธีสกัดจากการศึกษาตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยด้วยวิธีสกัด  
ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาตร อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i> (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-</i> <i>arachidin-1</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans-</i> <i>arachidin-1</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0012	72.041	0.086	1.729
	rep 2	50	0.0014	2.870	0.004	0.080
	rep 3	50	0.0008	6.502	0.005	0.104
48 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0015	20.097	0.030	0.603
	rep 2	50	0.0015	4.399	0.007	0.132
	rep 3	50	0.0017	-0.382	-0.001	-0.013
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0037	12.038	0.045	0.445
	rep 2	100	0.0020	1.500	0.003	0.030
	rep 3	100	0.0022	2.120	0.005	0.047

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาตร	น้ำหนัก	ปริมาณสาร	ปริมาณสาร	ปริมาณสาร <i>trans</i> -	ปริมาณสาร <i>trans</i> -	
	อาหาร	น้ำหนัก	<i>trans</i> -arachidin-1	<i>trans</i> -arachidin-1	arachidin-1	arachidin-1	
	เพาะเลี้ยง	สารสกัด	(มิลลิกรัมต่อกรัม	ทั้งหมดในสารสกัด	ทั้งหมดในสารสกัด	ทั้งหมดในสารสกัด	
	(มิลลิลิตร)	(กรัม)	สารสกัด)	(มิลลิกรัม)	(มิลลิกรัมต่อกรัม	(มิลลิกรัมต่อลิตร)	
24	rep 1	50	0.0181	517.603	9.369	75.130	188.200
	rep 2	50	0.0210	774.167	16.258	114.522	326.389
	rep 3	50	0.0163	469.249	7.649	48.105	152.975
48	rep 1	50	0.0205	971.872	19.923	159.069	398.468
	rep 2	50	0.0233	1,588.439	37.011	259.724	740.212
	rep 3	50	0.0211	788.619	16.640	104.653	332.797
MeJA+CD	rep 1	100	0.0467	1,564.950	73.083	291.749	730.832
	rep 2	100	0.0458	2,334.766	106.932	375.201	1069.323
	rep 3	100	0.0579	908.128	52.581	165.348	525.806

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาตร	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร trans-arachidin-1 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร trans-arachidin-1 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร trans-arachidin-1 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร trans-arachidin-1 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0212	1,316.033	27.900	212.571	577.998
	rep 2	50	0.0205	997.389	20.446	136.766	408.929
	rep 3	50	0.0208	857.147	17.829	114.838	356.573
48 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0231	2,039.017	47.101	358.867	942.026
	rep 2	50	0.0265	1,598.501	42.360	283.346	847.205
	rep 3	50	0.0239	1,889.525	45.160	290.883	903.193
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0672	2,573.240	172.922	658.749	1,729.217
	rep 2	100	0.0497	2,595.825	129.012	431.480	1,290.125
	rep 3	100	0.0463	3,029.078	140.246	451.676	1,402.463

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาตร อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i> (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-</i> <i>arachidin-1</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans-</i> <i>arachidin-1</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.026	1,950.597	50.716	386.404
	rep 2	50	0.0276	1,921.363	53.030	391.362
	rep 3	50	0.0281	2,450.269	68.853	500.746
(MeJA+CD) _CHT ชั่วโมง	rep 1	50	0.0279	2,039.191	56.893	433.474
	rep 2	50	0.0336	2,828.473	95.037	701.378
	rep 3	50	0.0299	2,688.424	80.384	584.610
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0551	1,762.688	97.124	369.997
	rep 2	100	0.0683	2,385.368	162.921	601.183
	rep 3	100	0.0576	2,249.463	129.569	471.160

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิเมตร)	ปริมาณ น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i> (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-arachidin-1</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-</i> <i>arachidin-1</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans-</i> <i>arachidin-1</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0199	1,820.315	36.224	267.832	724.485
	rep 2	50	0.0227	1,333.590	30.272	232.418	605.450
	rep 3	50	0.0224	1,350.582	30.253	226.191	605.061
48 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0250	2,662.466	66.562	492.138	1,331.233
	rep 2	50	0.0274	2,293.370	62.838	482.444	1,256.767
	rep 3	50	0.0286	2,878.341	82.321	615.481	1,646.411
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0494	2,909.990	143.754	531.436	1,437.535
	rep 2	100	0.0592	2,786.073	164.936	633.150	1,649.355
	rep 3	100	0.0731	3,250.627	237.621	888.302	2,376.208



ปริมาณสาร *trans*-arachidin-3 จากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยด้วยวิธีการศึกษาตัวกระตุ้นที่เหมาะสมในการกระตุ้นรากลอยด้วยวิธีที่เป็น  
ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
24	rep 1	50	0.0012	74.068	0.089	0.651
	rep 2	50	0.0014	3.096	0.004	0.030
	rep 3	50	0.0008	8.738	0.007	0.042
48	rep 1	50	0.0015	17.078	0.026	0.188
	rep 2	50	0.0015	4.109	0.006	0.043
	rep 3	50	0.0017	-0.592	-0.001	-0.006
72	rep 1	100	0.0037	11.596	0.043	0.157
	rep 2	100	0.0020	-0.008	0.000	0.000
	rep 3	100	0.0022	-3.283	-0.007	-0.022
CHT						
ชั่วโมง						
ชั่วโมง						
ชั่วโมง						

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	ปริมาณ น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0181	543.819	9.680	77.629	194.460
	rep 2	50	0.0210	571.078	11.993	84.479	240.766
	rep 3	50	0.0163	661.087	10.776	67.772	215.514
48 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0205	809.436	16.593	132.483	331.869
	rep 2	50	0.0233	1,081.990	25.210	176.915	504.207
	rep 3	50	0.0211	902.236	19.037	119.731	380.744
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0467	1,400.995	65.426	261.184	654.265
	rep 2	100	0.0458	1,709.395	78.290	274.703	782.903
	rep 3	100	0.0579	1,101.337	63.767	200.526	637.674

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0212	1,225.140	25.973	197.889	519.459
	rep 2	50	0.0205	1,437.299	29.465	197.088	589.293
	rep 3	50	0.0208	1,270.513	26.427	170.220	528.534
48 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0231	2,268.463	52.401	399.249	1,048.030
	rep 2	50	0.0265	1,864.193	49.401	330.442	988.022
	rep 3	50	0.0239	2,105.466	50.321	324.127	1,006.413
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0672	2,156.971	144.948	552.185	1,449.484
	rep 2	100	0.0497	2,088.428	103.795	347.140	1,037.949
	rep 3	100	0.0463	2,285.252	105.807	340.764	1,058.072

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิเมตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.026	1,447.301	37.630	286.703	752.596
	rep 2	50	0.0276	1,498.811	41.367	305.293	827.344
	rep 3	50	0.0281	2,339.859	65.750	478.182	1,315.001
(MeJA+CD) _CHT ชั่วโมง	rep 1	50	0.0279	1,428.542	39.856	303.667	797.126
	rep 2	50	0.0336	1,925.173	64.686	477.386	1,293.716
	rep 3	50	0.0299	2,563.348	76.644	557.412	1,532.882
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0551	1,351.285	74.456	283.641	744.558
	rep 2	100	0.0683	1,728.950	118.087	435.747	1,180.873
	rep 3	100	0.0576	2,281.170	131.395	477.801	1,313.954

(ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาณอาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
24 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0199	2,049.615	40.787	301.570	815.747
	rep 2	50	0.0227	1,879.648	42.668	327.585	853.360
	rep 3	50	0.0224	1,942.126	43.504	325.261	870.072
48 ชั่วโมง	rep 1	50	0.0250	2,034.207	50.855	376.009	1,017.103
	rep 2	50	0.0274	2,175.558	59.610	457.661	1,192.206
	rep 3	50	0.0286	2,695.516	77.092	576.387	1,541.835
72 ชั่วโมง	rep 1	100	0.0494	2,123.757	104.914	387.851	1,049.136
	rep 2	100	0.0592	2,274.896	134.674	516.982	1,346.738
	rep 3	100	0.0731	2,660.363	194.473	727.000	1,944.725

ปริมาณสาร *trans-resveratrol* จากอาหารเพราะเลี้ยงรากอย้วลิสงจากการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเซย่า เป็น  
ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาณ อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans- resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans- resveratrol</i> ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
24 ชั่วโมง	rep 1	200	0.1753	2.611	0.458	1.327
	rep 2	200	0.1645	4.549	0.748	1.934
	rep 3	200	0.1797	2.702	0.485	1.411
48 ชั่วโมง	rep 1	200	0.2082	8.575	1.785	4.067
	rep 2	200	0.1939	2.811	0.545	1.725
	rep 3	200	0.1953	2.344	0.458	1.516
72 ชั่วโมง	rep 1	200	0.1896	5.608	1.063	2.600
	rep 2	200	0.2005	10.258	2.057	3.970
	rep 3	200	0.2062	8.877	1.830	4.141

ปริมาณสาร *trans*-arachidin-1 จากอาหารเพราะเลี้ยงรากลอยด้วยวิธีการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่า เป็น  
ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาตร อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-1 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-1 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-1 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-1 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
24	rep 1	200	0.1753	301.326	52.822	153.108
	rep 2	200	0.1645	371.802	61.161	158.040
	rep 3	200	0.1797	330.094	59.318	172.436
48	rep 1	200	0.2082	630.459	131.261	299.001
MeJA+CD	rep 2	200	0.1939	871.448	168.981	534.751
	rep 3	200	0.1953	749.118	146.303	484.446
	rep 1	200	0.1896	2,353.997	446.318	1,091.242
72	rep 2	200	0.2005	3,236.591	648.937	1,252.773
	rep 3	200	0.2062	3,121.122	643.575	1,456.053
	rep 1	200	0.2062	3,121.122	643.575	1,456.053

ปริมาณสาร *trans*-arachidin-3 จากอาหารเพราะเลี้ยงรากลอยด้วยวิธีการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่า เป็น  
ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาตร อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อลิตร)
24 ชั่วโมง	rep 1	200	0.1753	792.550	138.934	402.707
	rep 2	200	0.1645	921.374	151.566	390.643
	rep 3	200	0.1797	788.385	141.673	411.839
48 ชั่วโมง	rep 1	200	0.2082	1,177.800	245.218	558.583
	rep 2	200	0.1939	893.450	173.240	548.227
	rep 3	200	0.1953	715.069	139.653	462.427
72 ชั่วโมง	rep 1	200	0.1896	2,866.981	543.580	1,329.045
	rep 2	200	0.2005	4,444.660	891.154	1,720.375
	rep 3	200	0.2062	3,716.197	766.280	1,733.665



ปริมาณสาร *trans-resveratrol* จากอาหารเพาะเลี้ยงรากอย้วลิสงจากการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> (มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัมแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans-resveratrol</i> ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)
rep 1	2000	0.6865	6.490	4.455	0.758	2.228
rep 2	2000	1.0132	17.274	17.502	3.235	8.751
rep 3	2000	1.4346	8.170	11.721	2.666	5.860

ปริมาณสาร *trans*-arachidin-1 จากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยด้วยวิธีการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบเครื่องปฏิกรณ์  
ชีวภาพ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาตร อาหาร เพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก สารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-1 (มิลลิกรัมต่อกรัม สารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-1 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-1 ทั้งหมด ในสารสกัด (มิลลิกรัม ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณสาร <i>trans</i> - arachidin-1 ทั้งหมดใน สารสกัด (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)
rep 1	2000	0.6865	1,357.977	932.252	158.627	466.126
rep 2	2000	1.0132	2,267.221	2,297.148	424.533	1,148.574
rep 3	2000	1.4346	1,114.990	1,599.565	363.786	799.783

ปริมาณสาร *trans*-arachidin-3 จากอาหารเพาะเลี้ยงรากลอยด้วยวิธีการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง (มิลลิลิตร)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 (มิลลิกรัมต่อสารสกัด)	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 ทั้งหมดนำหนักแห้ง	ปริมาณสาร <i>trans</i> -arachidin-3 ทั้งหมดในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อสารสกัด)
rep 1	2000	0.6865	3,068.562	2,106.568	358.443	1,053.284
rep 2	2000	1.0132	4,677.692	4,739.437	875.889	2,369.719
rep 3	2000	1.4346	2,606.087	3,738.692	850.282	1,869.346

ภาคผนวก จ ผลการแสดงผลของยีนที่เกี่ยวข้องในรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค qPCR

ตัวอย่างการคำนวณแสดงออกของยีน RS\_103 ในรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงที่ได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD

สูตรการคำนวณหาปริมาณแบบสัมพัทธ์

$$dCt = Ct(\text{treat}) - Ct(\text{untreated})$$

$$\text{Fold change} = (E^{-dCt} \text{ gene of interest}) / (E^{-dCt} \text{ gene of reference})$$

หมายเหตุ ค่า E คือ ค่า efficiency ของแต่ละยีน

1. การคำนวณค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ของยีน *P.ef1a* และยีน RS

- ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ของยีน *P.ef1a*

$$\text{ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ที่ 24 ชั่วโมง R1 เท่ากับ } (20.52+20.60+21.80)/3 = 20.97$$

$$\text{ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ที่ 24 ชั่วโมง R2 เท่ากับ } (23.00+23.18+22.95)/3 = 23.04$$

ดังนั้น ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ที่ 24 ชั่วโมง ของยีน *P.ef1a* เท่ากับ 22.01

- ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ของยีน RS

$$\text{ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ที่ 24 ชั่วโมง R1 เท่ากับ } (28.13+28.28+28.26)/3 = 28.22$$

$$\text{ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ที่ 24 ชั่วโมง R2 เท่ากับ } (28.48+28.07+27.88)/3 = 28.14$$

ดังนั้น ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ที่ 24 ชั่วโมง ของยีน RS เท่ากับ 28.18

2. การคำนวณค่า dCt ของยีน *P.ef1a* และยีน RS

$$\text{จากสูตร } dCt = Ct(\text{treat}) - Ct(\text{untreated})$$

- ค่า dCt ยีน *P.ef1a*

$$\text{ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง CHT+MeJA+CD ที่ 24 ชั่วโมง R1 มีค่าเท่ากับ } (27.34+27.95+28.1)/3 = 27.79$$

$$\text{ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ที่ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 22.01}$$

ดังนั้น ค่า dCt ของตัวอย่าง CHT+MeJA+CD ที่ 24 ชั่วโมง R1 ของยีน *P.ef1a* เท่ากับ

$$27.79 - 22.01 = 5.78$$

- ค่า dCt ยีน RS

ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง CHT+MeJA+CD ที่ 24 ชั่วโมง R1 มีค่าเท่ากับ

$$(31.06 + 30.07 + 30.14) / 3 = 30.42$$

ค่า Ct เฉลี่ยของตัวอย่าง Control ที่ 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 28.18

ดังนั้น ค่า dCt ของตัวอย่าง CHT+MeJA+CD ที่ 24 ชั่วโมง R1 ของยีน RS เท่ากับ 30.42-

$$28.18 = 2.24$$

3. การคำนวณค่า  $E^{-dCt}$  ของยีน *P.ef1a* และยีน RS

- ค่า  $E^{-dCt}$  ยีน *P.ef1a* ของตัวอย่าง CHT+MeJA+CD ที่ 24 ชั่วโมง R1

ค่า E ของยีน *P.ef1a* เท่ากับ 1.98, ค่า dCt ของยีน *P.ef1a* เท่ากับ 5.78

ดังนั้น ค่า  $E^{-dCt}$  ของตัวอย่าง CHT+MeJA+CD ที่ 24 ชั่วโมง R1 ของยีน *P.ef1a* มีค่า

$$\text{เท่ากับ } 1.98^{-5.78} = 0.020$$

- ค่า  $E^{-dCt}$  ยีน RS ของตัวอย่าง CHT+MeJA+CD ที่ 24 ชั่วโมง R1

ค่า E ของยีน RS เท่ากับ 1.94, ค่า dCt ของยีน RS เท่ากับ 2.24

ดังนั้น ค่า  $E^{-dCt}$  ของตัวอย่าง CHT+MeJA+CD ที่ 24 ชั่วโมง R1 ของยีน RS มีค่าเท่ากับ

$$1.94^{-2.24} = 0.226$$

4. การคำนวณค่า fold change ของยีน RS ของตัวอย่าง CHT+MeJA+CD ที่ 24 ชั่วโมง R1

จากสูตร Fold change =  $(E^{-dCt} \text{ gene of interest}) / (E^{-dCt} \text{ gene of reference})$

ค่า  $E^{-dCt}$  ของยีน RS เท่ากับ 0.226 และค่า  $E^{-dCt}$  ของยีน *P.ef1a* เท่ากับ

$$0.020$$

ดังนั้น ค่า fold change ของยีน RS ของตัวอย่าง CHT+MeJA+CD ที่ 24 ชั่วโมง R1 เท่ากับ

$$0.226 / 0.020 = 11.3$$

ค่า Ct ของยีน *P.ef1a*\_145 (Efficiency = 1.98) ในรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน <i>P.ef1a</i> _145				
	R1	R2	R3		
Control	24	rep 1	20.52	20.60	21.80
	ชั่วโมง	rep 2	23.00	23.18	22.95
		48	rep 1	20.73	19.62
	ชั่วโมง	rep 2	26.38	25.51	25.91
		72	rep 1	25.43	25.83
	ชั่วโมง	rep 2	24.31	23.62	24.27
24		rep 1	27.34	27.95	28.1
	ชั่วโมง	rep 2	24.86	25.27	24.76
		rep 3	28.12	27.97	27.93
CHT+ MeJA+CD	48	rep 1	25.94	27.26	25.54
		rep 2	21.81	21.00	21.68
	ชั่วโมง	rep 3	24.24	24.05	24.17
72		rep 1	22.08	22.87	23.39
	ชั่วโมง	rep 2	23.76	24.24	23.28
		rep 3	23.47	24.04	23.80

ค่า Ct และ ค่า Fold change ของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (ยีน RS\_103 - Efficiency = 1.94) ในรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน RS_103			ค่า Fold change ของยีน RS_103				
	R1	R2	R3	R1	R2	R3		
Control	24 ชั่วโมง	rep 1	28.13	28.28	28.26	-	-	-
		rep 2	28.48	28.07	27.88	-	-	-
	48 ชั่วโมง	rep 1	24.76	25.09	24.82	-	-	-
		rep 2	34.48	33.99	34.64	-	-	-
	72 ชั่วโมง	rep 1	32.04	32.49	33.28	-	-	-
		rep 2	29.53	29.11	29.02	-	-	-
CHT+ MeJA+CD	24 ชั่วโมง	rep 1	31.06	30.07	30.14	7.550	14.550	13.890
		rep 2	26.83	26.96	26.76	18.254	16.748	19.121
		rep 3	27.04	26.76	26.4	128.198	154.335	195.917
	48 ชั่วโมง	rep 1	30.87	31.00	31.29	3.367	3.089	2.549
		rep 2	26.20	26.16	26.05	3.142	3.226	3.470
		rep 3	25.54	26.36	26.40	30.760	17.864	17.397
	72 ชั่วโมง	rep 1	28.23	28.02	28.30	1.413	1.624	1.349
		rep 2	27.72	27.90	28.37	4.000	3.550	2.600
		rep 3	25.18	25.30	25.20	22.175	20.480	21.883

ค่า Ct และ ค่า Fold change ของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (ยีน RS3\_100 - Efficiency = 2) ในรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน RS3_100			ค่า Fold change ของยีน RS3_100					
	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
Control	24	rep 1	29.14	29.00	28.78	-	-	-	
	ชั่วโมง	rep 2	29.39	29.50	29.53	-	-	-	
		48	rep 1	26.45	26.35	26.16	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	31.20	31.24	31.37	-	-	-	
		72	rep 1	31.07	32.01	31.39	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	28.70	28.49	28.21	-	-	-	
24		rep 1	30.06	29.97	29.86	28.443	30.274	32.673	
	ชั่วโมง	rep 2	27.05	26.55	26.45	33.582	47.493	50.901	
		rep 3	28.56	28.15	27.94	95.172	126.454	146.268	
CHT+ MeJA+CD	48	rep 1	30.49	30.68	30.23	2.365	2.073	2.832	
		ชั่วโมง	rep 2	26.60	26.45	26.87	1.482	1.644	1.229
			rep 3	26.67	26.73	26.23	8.924	8.560	12.106
72	ชั่วโมง	rep 1	27.46	27.75	27.75	1.369	1.120	1.120	
		rep 2	27.92	27.90	27.63	2.009	2.038	2.457	
		rep 3	25.47	25.90	25.68	11.309	8.394	9.777	



ค่า Ct และ ค่า Fold change ของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (ยีน PAL\_134 - Efficiency = 2) ในรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน PAL_134			ค่า Fold change ของยีน PAL_134					
	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
Control	24	rep 1	30.53	29.51	30.28	-	-	-	
	ชั่วโมง	rep 2	30.51	29.97	29.77	-	-	-	
		48	rep 1	27.36	27.50	27.57	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	-	-	-	-	-	-	
		72	rep 1	33.84	34.26	34.32	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	31.05	30.59	30.83	-	-	-	
24		rep 1	33.03	33.13	33.55	6.642	6.197	4.632	
	ชั่วโมง	rep 2	29.51	29.33	29.77	11.168	12.652	9.326	
		rep 3	32.07	31.34	31.50	15.286	25.354	22.692	
CHT+ MeJA+CD	48	rep 1	35.24	35.07	35.18	0.035	0.040	0.037	
		ชั่วโมง	rep 2	27.89	27.45	27.66	0.243	0.330	0.285
			rep 3	28.73	29.06	28.60	0.858	0.683	0.939
72	ชั่วโมง	rep 1	31.16	30.63	31.27	0.597	0.863	0.554	
		rep 2	32.28	30.89	32.02	0.555	1.454	0.664	
		rep 3	28.73	27.74	27.86	6.693	13.294	12.233	

ค่า Ct และ ค่า Fold change ของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (ยีน APX\_143 - Efficiency = 1.99) ในรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน APX_143			ค่า Fold change ของยีน APX_143				
	R1	R2	R3	R1	R2	R3		
Control	24	rep 1	23.16	24.11	23.71	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	23.30	22.69	24.99	-	-	-
		48	rep 1	22.40	22.97	22.71	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	28.33	29.98	29.71	-	-	-
		72	rep 1	28.14	28.33	29.63	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	25.25	25.17	25.18	-	-	-
24		rep 1	28.86	29.10	28.99	1.418	1.202	1.297
	ชั่วโมง	rep 2	25.45	25.17	25.19	2.172	2.634	2.598
		rep 3	27.44	27.30	27.32	4.458	4.909	4.842
CHT+ MeJA+CD	48	rep 1	29.25	28.55	29.07	0.828	1.340	0.937
		rep 2	24.15	23.84	24.66	1.169	1.447	0.823
		rep 3	24.87	24.35	24.42	4.504	6.441	6.138
	72	rep 1	25.69	25.79	25.51	0.569	0.531	0.644
		rep 2	25.47	24.85	25.86	1.336	2.047	1.021
		rep 3	30.66	30.55	30.64	0.039	0.042	0.039

ค่า Ct และ ค่า Fold change ของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (ยีน GPX\_161 - Efficiency = 1.91) ในรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน GPX_161			ค่า Fold change ของยีน GPX_161					
	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
Control	24	rep 1	31.37	31.71	-	-	-		
	ชั่วโมง	rep 2	-	33.75	-	-	-		
		48	rep 1	-	34.07	34.34	-	-	
	ชั่วโมง	rep 2	30.91	31.04	30.36	-	-	-	
		72	rep 1	32.33	33.55	32.08	-	-	
	ชั่วโมง	rep 2	31.62	31.91	34.03	-	-	-	
24		rep 1	-	30.04	36.25	-	274.114	4.928	
	ชั่วโมง	rep 2	33.36	33.22	33.80	4.687	5.132	3.526	
		rep 3	-	36.51	36.61	-	4.928	4.619	
CHT+ MeJA+CD	48	rep 1	-	34.11	-	-	2.680	-	
		ชั่วโมง	rep 2	-	32.04	-	-	0.432	-
			rep 3	32.37	32.53	31.59	2.207	1.990	3.657
	72	rep 1	33.17	33.54	33.51	0.164	0.129	0.131	
		ชั่วโมง	rep 2	34.06	34.28	33.98	0.186	0.161	0.196
			rep 3	30.66	30.90	31.37	1.729	1.480	1.092

ค่า Ct และ ค่า Fold change ของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (ยีน SOD\_131 - Efficiency = 2) ในรากลอยแก้วลิสเพาะเลี้ยงได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน SOD_131			ค่า Fold change ของยีน SOD_131					
	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
Control	24	rep 1	29.42	28.60	-	-	-		
	ชั่วโมง	rep 2	29.82	29.64	29.60	-	-	-	
		48	rep 1	27.77	27.73	27.74	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	32.73	31.53	32.76	-	-	-	
		72	rep 1	32.64	32.54	33.17	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	30.56	30.16	30.16	-	-	-	
24		rep 1	33.05	33.54	32.22	3.904	2.780	6.940	
	ชั่วโมง	rep 2	30.53	30.26	30.02	3.282	3.958	4.674	
		rep 3	32.55	32.07	31.86	6.532	9.110	10.538	
CHT+ MeJA+CD	48	rep 1	34.22	32.71	33.44	0.423	1.206	0.727	
		ชั่วโมง	rep 2	28.18	28.09	28.15	1.177	1.253	1.202
			rep 3	28.56	28.83	28.60	5.720	4.744	5.564
72	ชั่วโมง	rep 1	29.35	29.68	29.11	1.089	0.867	1.286	
		rep 2	30.40	30.16	30.57	1.062	1.254	0.944	
		rep 3	28.00	27.86	27.34	5.773	6.362	9.122	

ค่า Ct และ ค่า Fold change ของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรคในพืช (ยีน *PR4A\_94* - Efficiency = 2) ในรากลอยแก้วลิสงเพาะเลี้ยงได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน <i>PR4A_94</i>			ค่า Fold change ของยีน <i>PR4A_94</i>					
	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
Control	24	rep 1	28.08	280.7	28.13	-	-	-	
	ชั่วโมง	rep 2	27.90	28.36	27.51	-	-	-	
		48	rep 1	24.85	24.06	24.26	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	32.65	32.06	-	-	-	-	
		72	rep 1	32.25	32.72	32.53	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	29.16	29.65	29.43	-	-	-	
24		rep 1	29.20	29.44	29.53	22.239	18.831	17.692	
	ชั่วโมง	rep 2	26.63	26.44	27.17	19.355	22.079	13.312	
		rep 3	28.14	29.12	28.98	54.852	27.809	30.643	
CHT+ MeJA+CD	48	rep 1	29.20	29.10	29.15	4.315	4.625	4.467	
		ชั่วโมง	rep 2	26.2	25.4	25.61	1.459	2.540	2.196
			rep 3	25.93	26.09	26.22	11.121	9.953	9.096
72	ชั่วโมง	rep 1	27.57	27.82	27.94	2.500	2.102	1.934	
		rep 2	28.92	28.24	28.97	1.980	3.171	1.912	
		rep 3	25.63	26.02	25.92	19.942	15.218	16.311	

ค่า Ct และ ค่า Fold change ของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรค  
ในพืช (ยีน *PR5\_151* - Efficiency = 2) ในรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงได้รับการ  
กระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่ระยะเวลา  
24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน <i>PR5_151</i>			ค่า Fold change ของยีน <i>PR5_151</i>					
	R1	R2	R3	R1	R2	R3			
Control	24	rep 1	34.02	33.65	34.11	-	-	-	
	ชั่วโมง	rep 2	34.43	36.00	35.45	-	-	-	
		48	rep 1	32.43	32.75	34.21	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	-	-	-	-	-	-	
		72	rep 1	34.76	-	35.99	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	-	-	-	-	-	-	
24		rep 1	35.64	34.51	-	24.876	54.443	-	
	ชั่วโมง	rep 2	32.25	32.83	32.41	38.221	25.569	34.209	
		rep 3	35.07	-	-	43.687	-	-	
CHT+ MeJA+CD	48	rep 1	35.39	35.41	35.51	1.599	1.577	1.471	
		ชั่วโมง	rep 2	31.12	31.33	31.92	1.303	1.127	0.749
			rep 3	31.89	31.16	32.55	4.832	8.015	3.058
	72	rep 1	-	35.36	33.52	-	0.242	0.865	
		ชั่วโมง	rep 2	-	34.53	35.45	-	0.867	0.458
			rep 3	32.25	32.72	32.2	4.335	3.130	4.488

ค่า Ct และ ค่า Fold change ของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรค  
ในพืช (ยีน *PR10\_124* - Efficiency = 1.91) ในรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่  
ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน <i>PR10_124</i>			ค่า Fold change ของยีน <i>PR10_124</i>				
	R1	R2	R3	R1	R2	R3		
Control	24	rep 1	24.72	25.08	25.66	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	25.36	25.02	25.04	-	-	-
		48	rep 1	22.81	23.22	23.08	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	32.18	32.98	32.70	-	-	-
		72	rep 1	30.49	31.95	31.44	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	27.32	27.35	27.48	-	-	-
24		rep 1	27.42	28.06	27.95	11.667	7.711	8.280
	ชั่วโมง	rep 2	23.94	24.13	24.31	16.255	14.374	12.794
		rep 3	26.24	26.79	26.72	29.619	20.749	21.710
CHT+ MeJA+CD	48	rep 1	28.24	27.69	27.72	5.867	8.374	8.213
		rep 2	23.28	23.19	23.44	6.141	6.510	5.537
		rep 3	24.24	24.26	24.37	20.860	20.592	19.177
72	ชั่วโมง	rep 1	25.71	25.02	25.74	2.501	3.908	2.453
		rep 2	26.77	26.62	26.92	2.542	2.802	2.307
		rep 3	23.15	23.27	23.48	27.253	25.217	22.012

ค่า Ct และ ค่า Fold change ของยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนต้านทานโรค  
ในพืช (ยีน *Chi\_146* - Efficiency = 1.92) ในรากลอยถั่วลิสงเพาะเลี้ยงใต้ดินได้รับการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นตัวกระตุ้น CHT+MeJA+CD ในระบบขวดเขย่าที่  
ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ค่า Ct ของยีน <i>Chi_146</i>			ค่า Fold change ของยีน <i>Chi_146</i>				
	R1	R2	R3	R1	R2	R3		
Control	24	rep 1	26.71	26.61	26.34	-	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	26.15	27.24	27.11	-	-	-
		48	rep 1	24.85	23.99	25.39	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	31.10	31.05	31.29	-	-	-
		72	rep 1	29.63	30.53	30.27	-	-
	ชั่วโมง	rep 2	27.39	27.15	28.27	-	-	-
24		rep 1	28.15	29.09	28.88	19.641	10.638	12.200
	ชั่วโมง	rep 2	26.05	25.51	25.65	11.327	16.111	14.705
		rep 3	28.36	28.20	28.32	20.261	22.490	20.796
CHT+ MeJA+CD	48	rep 1	29.34	29.22	29.38	3.082	3.333	3.003
		rep 2	25.06	24.49	24.87	2.125	3.082	2.405
		rep 3	25.33	25.50	25.73	11.264	10.082	8.677
72	ชั่วโมง	rep 1	26.71	26.54	26.47	0.980	1.095	1.146
		rep 2	26.15	26.13	26.32	2.851	2.888	2.552
		rep 3	23.46	23.87	23.81	16.978	12.994	13.512