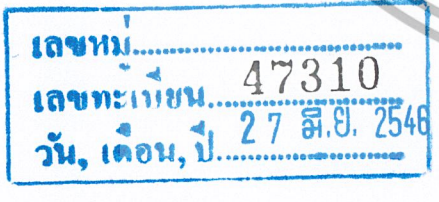
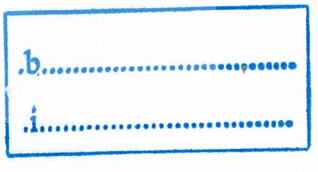
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตน้ำมันหอมระเหยจากยอดกะเพราเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

นายธีรทัศ ชูจรินทร์

นายประพันธ์พงศ์ คีรีวรรณ





โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Volatile oils production in suspension culture of *Ocimum sanctum* shoots

Teeratas Choojarintr

Prapanpong Keereewan

A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตน้ำมันหอมระเหยจากยอดกะเพราเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

นักศึกษา นายธีรทัศ ชูจรินทร์ รหัสประจำตัว 42050157

นายประพันธ์พงศ์ คีรีวรรณ รหัสประจำตัว 42050172

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม	
กรรมการ ดร. กนกพร สมพรไพลิน	
กรรมการ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	

.....

รองศาสตราจารย์นิลวรรณ ณ ระนอง

(.....)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การผลิตน้ำมันหอมระเหยจากยอดกะเพราเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว
นักศึกษา	นายธีรทัศ ชูจรินทร์ นายประพันธ์พงศ์ คีรีวรรณ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2545
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากยอดกะเพราเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเพาะเลี้ยงยอดกะเพราในอาหารวุ้น MS ได้ 1 เดือนแล้วทำการตัดยอดกะเพรามาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสูตร 1 มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.1 มก./ล. , BA 0.1 มก./ล. มีค่า Growth index ของยอดกะเพราสูงสุด จึงทำการคัดเลือกอาหารเหลว MS สูตร 1 มาทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณกะเพรา โดยนำกะเพราเลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำไปทำการสกัดสาร นำสารที่สกัดได้ไปทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography Mass Spectrometer (GC-MS) พบว่าสารสกัดที่นำมาวิเคราะห์นี้มีองค์ประกอบของสารต่างๆหลายชนิด และพบสารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหย คือ Methyl eugenol และ Caryophyllene จากนั้นได้นำเอาสารที่สกัดจากกะเพรามาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* และ *A. oryzae* พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากกะเพรา ยังไม่สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้ดีเท่าที่ควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Volatile oils production in suspension culture of *Ocimum sanctum* Linn. shoots
Name	Mr. Teeratas Choojarintr Mr. Prapanpong Keereewan
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2002
Special Project Advisor	Pana Lohasupthawee Ph.D.

Abstract

Ocimum sanctum Linn. shoots were cultured on MS medium for 1 month before cutting their shoot tips and transfered to liquid MS medium supplemented with different combination of NAA and BA. The result showed that MS medium containing NAA 0.1 mg/l and BA 0.1 mg/l gave the highest growth index and numbers of shoot proliferation. Then the shoots were extracted for volatile oils and identified by GC-MS. The result showed that methyl eugenol and caryophyllene were the major compositions of the volatile oils. The crude extract from *Ocimum sanctum* shoots was also tested for inhibition of fungal growth but the concentrations used were not suitable to inhibit the growth of *Aspergillus niger* and *Aspergillus. oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ให้ความรู้และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ต่อการทำโครงงานพิเศษ อีกทั้งยังได้ช่วยกรุณาหาอุปกรณ์ที่จำเป็น ได้แก่ เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ เครื่องโครมาโตกราฟี – แมสสเปคโตรมิเตอร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้สละเวลาเพื่อช่วยแก้ไขโครงงานพิเศษ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม ผู้เป็นประธานกรรมการโครงงานพิเศษ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. กนกพร สมพรไพลิน ผู้เป็นกรรมการโครงงานพิเศษ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ได้อนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนสารเคมี และ อุปกรณ์ต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณ พยอม เกียรติกำจร และ คุณประเสริฐวิทย์ แพงคำ นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการชีววิทยาที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมี และ ยังให้ความสะดวกในการทำโครงงานพิเศษเรื่อยมา

นายธีรทัศ ชูจรินทร์

นายประพันธ์พงศ์ คีรีวรรณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และ คำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎี และ หลักการ	4
บทที่ 3 อุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย และ วิจารณ์	26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ	38
ภาคผนวก	
เอกสารอ้างอิง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ความเข้มข้นของ NAA และ BA ต่างๆที่ใช้ในสูตรอาหาร 7 สูตร	23
ตารางที่ 2	การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 1 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 0.1 มก./ล. และ BA 0.1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	26
ตารางที่ 3	การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 2 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 0.5 มก./ล. และ BA 0.1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	27
ตารางที่ 4	การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 3 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 1.0 มก./ล. และ BA 0.1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	28
ตารางที่ 5	การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 4 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 1.5 มก./ล. และ BA 0.1 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	29
ตารางที่ 6	การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 5 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 0.5 มก./ล. และ BA 0.5 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	30
ตารางที่ 7	การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 6 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 0.5 มก./ล. และ BA 1.0 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	31
ตารางที่ 8	การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 7 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 1.0 มก./ล. และ BA 1.0 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน	32
ตารางที่ 9	ค่า Growth index ของยอดกะเพราเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 1 เป็นเวลา 3 สัปดาห์	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	การผลิตสาร Secondary metabolite จาก Primary metabolite	11
รูปที่ 2	วิถีการสังเคราะห์เมธิลยูจีนอล	16
รูปที่ 3	แผนผังการทำงานของ Mass spectrometer ในการใช้แบบธรรมดากับ Gas chromatography	17
รูปที่ 4	กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 0.1 ,0.1 มก./ล. ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน	26
รูปที่ 5	กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 ,0.1 มก./ล. ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน	27
รูปที่ 6	กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 1.0 ,0.1 มก./ล. ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน	28
รูปที่ 7	กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 1.5 ,0.1 มก./ล. ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน	29
รูปที่ 8	กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 ,0.5 มก./ล. ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน	30
รูปที่ 9	กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 ,1.0 มก./ล. ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน	31
รูปที่ 10	กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 1.0 ,1.0 มก./ล. ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน	32
รูปที่ 11	แสดงการเปรียบเทียบจำนวนยอดเฉลี่ยของอาหารสูตรต่างๆเมื่ออายุ 1 เดือน	33
รูปที่ 12	แสดงการเปรียบเทียบค่า Growth index เฉลี่ย ของสูตรอาหารต่างๆ เมื่ออายุ 1 เดือน	33
รูปที่ 13	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสารสกัดจากกะเพราด้วย GC – MS	35
รูปที่ 14	การเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger* ต่อสารสกัดจากกะเพรา	36
รูปที่ 15	การเจริญของเชื้อ *Aspergillus oryzae* ต่อสารสกัดจากกะเพรา	37

.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำอธิบายสัญลักษณ์ และ คำย่อ

มก./ล.	มิลลิกรัมต่อลิตร
BA	6 – Benzyladinine
NAA	α - Napthaleneacetic acid
GC	Gas Chromatography
MS	Mass spectometer
SD	Standard error

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

เนื่องจากในปัจจุบันนี้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร เช่น น้ำมันหอมระเหย ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากจึงมีการค้นคว้าอย่างจริงจัง กะเพรา หรือ *Ocimum sanctum* Linn. เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากในกะเพรามีสารสำคัญ คือ eugenol , linalool , ocimol ซึ่งมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ เช่น สามารถไล่แมลงได้ น้ำมันจากใบใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้แต่การสกัดสารจากใบกะเพราโดยตรงนั้นให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเพียง 0.01 % ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมากจึงได้นำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยชักนำให้เกิดเป็นต้นอ่อนจำนวนมาก เพื่อให้สามารถผลิตน้ำมันหอมระเหยได้มากขึ้น และ เพื่อที่จะควบคุมการเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม นอกจากได้สารสกัดที่มีความบริสุทธิ์ ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์และสารพิษ ยังสามารถเพิ่มปริมาณต้นได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้นอีกด้วย ซึ่งในการทดลองนี้จะเพาะเลี้ยงยอดกะเพราในอาหารเหลว (suspension) ด้วยอาหาร 7 สูตร เพื่อชักนำให้เกิดยอดกะเพราจำนวนมากแล้วนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหยต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอดกะเพราในอาหารเหลว และ ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราที่เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังศึกษาคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

3. ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เพาะปลูกเมล็ดกะเพราหรือตัดยอดกะเพราจากในอาหารวุ้น MS เพื่อเพิ่มปริมาณและให้ได้เนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใส่ฮอร์โมนพืชในสัดส่วนที่ชักนำเนื้อเยื่อให้พัฒนาไปเป็นต้นจำนวน 7 สูตร เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของยอดกะเพราในอาหารทั้ง 7 สูตร แล้วทำการคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณยอดกะเพรา จากนั้นนำไปสกัดสาร และวิเคราะห์องค์ประกอบหลักโดยวิธี GC-MS (Gas Chromatography - Mass spectrometry) รวมทั้งนำสารที่สกัดได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ขั้นตอนการวิจัย และ การดำเนินงาน

แสดงวิธีการดำเนินงานโดยสังเขปดังแผนภาพต่อไปนี้

ฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดกะเพรา

⬇

เพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น MS เป็นเวลา 1 เดือน

⬇

ตัดยอดกะเพรา และ ทำการชั่งน้ำหนักเริ่มต้น

⬇

ใส่ยอดกะเพราลงไปในอาหารเหลวสูตร MS 7 สูตร และ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

⬇

เมื่อครบ 1 เดือน นำยอดกะเพรามาชั่งน้ำหนัก

⬇

คัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

⬇

เพาะเลี้ยงยอดกะเพราให้ได้จำนวนมากแล้วจึงสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลาย

⬇

วิเคราะห์องค์ประกอบสารโดยใช้เครื่อง GC-MS

⬇

นำสารที่สกัดได้มาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อรา ดูผลแล้วรวบรวมข้อมูล

⬇

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 . หาวิธีการเพาะเลี้ยงที่ทำให้กะเพราผลิตน้ำมันหอมระเหยได้จำนวนมาก

2 . สามารถนำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มาใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎี และ หลักการ

สภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชโดยทั่วไป มีส่วนสัมพันธ์กันทั้งภายในและภายนอกของพืช ปัจจัยภายในจะเกี่ยวข้องกับยีนหรือดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นตัวกำหนดลักษณะทางพันธุกรรม ส่วนปัจจัยภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ แสงสว่าง คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและแร่ธาตุต่างๆ

ธาตุอาหารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชมีมากมาย รวมไปถึงสารควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งพืชสามารถสร้างได้เองตามธรรมชาติ แต่ถ้าต้องการชักนำให้เกิดเป็นส่วนที่ต้องการก็สามารถเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเหล่านั้นแก่พืชได้

ธาตุอาหาร

ธาตุอาหารที่พืชต้องการประกอบด้วย

1. ธาตุอาหารอนินทรีย์

ธาตุอาหารอนินทรีย์ที่ต้องการมาก (Macro-element) ได้แก่ C H O N P K Ca Mg S

ธาตุอาหารอนินทรีย์ที่ต้องการมาก (Macro-element) ได้แก่ Fe Mn Cu Zn B Cl Mo

2. ธาตุอาหารอินทรีย์

2.1 วิตามิน ที่ใช้กันมากได้แก่ Thiamine Nicotinic acid Pyridoxine Inositol Biotin Panthothenic acid Folic acid Choline Chloride Riboflavin Ascorbic acid

2.2 สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช พืชจะมีการสร้างมากในส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ (apical meristem) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่พืชส่วนใหญ่ต้องการ ได้แก่

2.2..1 สารในกลุ่มออกซิน เช่น

- indole-3-acetic acid (IAA)
- indole butyric acid (IBA)
- Napthaleneacetic acid (NAA)
- 2,4,5-trichlophenoxyacetic acid (2,4,5-T)

คุณสมบัติโดยทั่วไปของสารในกลุ่มออกซิน มีผลต่อสรีระวิทยาพืชดังนี้

1. กระตุ้นการยืดตัวของเซลล์
2. กระตุ้นการยืดตัวของราก
3. กระตุ้นให้เกิดแคลลัสในเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. กระตุ้นให้เกิด apical dominance ในพืช
5. ช่วยในการเปลี่ยนเพศดอก จากเพศผู้เป็นเพศเมีย
6. ยับยั้งการเจริญของตาข้างเมื่อมีความเข้มข้นสูง
7. ช่วยให้เกิด parthenocarpic ในผลไม้
8. ช่วยในการสังเคราะห์เอทิลีนซึ่งเป็นก๊าซในผลไม้สุก

2.2.2 สารในกลุ่มไซโตไคนิน เช่น

- N_6-Benzyladenine (BA)
- Kinetin
- Zeatin
- N_6-isopentenyl adenine

มีคุณสมบัติดังนี้

1. กระตุ้นการแบ่งเซลล์
2. ชะลอการแก่ในใบและผล
3. ช่วยในการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารของพืช
4. กระตุ้นการเจริญเติบโตของตาข้าง
5. ช่วยในการเปลี่ยนสภาพของเซลล์

2.2.3 สารควบคุมการเจริญอื่นๆ เช่น

- Giberellic acid (GA)
- Abscissic acid (ABA)
- Daminozide

2.3 สารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ สารประกอบน้ำตาลต่างๆ เช่น กลูโคส ฟรักโตส แซคคาโรส แมนนิทอล

2.4 กรดอะมิโน ได้แก่ กลูตามิน แอสพาราจีน อะดีนิน ไกลซีน เคซีน

2.5 สารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ น้ำต้มมันฝรั่ง กล้วยบด มอลต์สกัด เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ อาหารสูตร MS (1962)

มีส่วนประกอบดังนี้

	มก./ ล.
NH_4NO_3	165
KNO_3	190
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MGSO_4.7H_2O$	37
KH_2PO_4	17
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	2.23
$ZnSO_4.7H_2O$	0.25
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.0025
$CoCl_2.6H_2O$	0 .025
Na_2-EDTA	3 7.73
$FeSO_4.7H_2O$	2.78
Glycine	0.2
Pyridoxine-HCl	0.5
Thiamine-HCl	0.1
Inositol	10
Nicotinic acid	0.05
Sucrose	30,000
pH	5.6-5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (Volatile oils) พบได้ในส่วนต่างๆของพืช เช่น ดอก ใบ กลีบเลี้ยง ผล เป็นต้น ตามปกตินำ้มันหอมระเหยจะไม่มีสี แต่เมื่อทิ้งไว้นานๆอาจถูกออกซิไดซ์ทำให้สีเข้มขึ้น น้ำมันหอมระเหยเป็นสารประกอบเชิงซ้อนทางเคมีประกอบด้วยองค์ประกอบต่างๆหลายอย่าง ซึ่งทำให้มีลักษณะกลิ่นและรสเฉพาะตัว

ประเภทของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีที่สลับซับซ้อน ซึ่งสามารถแบ่งน้ำมันหอมระเหยตามชนิดขององค์ประกอบใหญ่ๆ ได้ดังนี้

1. Hydrocarbon volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก อาจพบได้ทั้งในรูปไฮโดรคาร์บอนโมโนไซคลิกเทอร์พีน (hydrocarbon monocyclic terpene) เช่น limonene ซึ่งพบได้ในน้ำมันมินท์ น้ำมันจากส้ม กระวาน น้ำมันสน และ p-cymene ซึ่งพบได้ในน้ำมันจากลูกผักชี อบเชย นอกจากนี้อาจพบไฮโดรคาร์บอนในรูปของไดไซคลิกโมโนเทอร์พีน (dicyclic monoterpene) เช่น pinene ซึ่งพบได้ในน้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันดอกส้ม และน้ำมันลูกผักชี

2. Alcohol volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญ ได้แก่ germinal citronellol ซึ่งเป็นอะไซคลิกแอลกอฮอล์ ส่วนเมนทอล และ α-terpieol เป็นโมโนไซคลิก เป็นต้น

3. Aldehyde volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกอัลดีไฮด์เป็นองประกอบหลัก น้ำมันหอมระเหยที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ที่สำคัญ ได้แก่ น้ำมันจากส้ม ตะไคร้หอม และมะนาว ตัวอย่างของอัลดีไฮด์ที่พบ ได้แก่ geranial neral และ citronellal

4. Ketone volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกคีโตนเป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของคีโตนที่พบได้แก่ menthone carvone piperitone และ pulegone ซึ่งเป็นโมโนไซคลิกเทอร์พีน คีโตน นอกจากนี้ยังพบ camphor penchone และ thujone ซึ่งเป็นไดไซคลิกคีโตน น้ำมันหอมระเหยที่สำคัญได้แก่ การบูร และมินท์

5. Phenol volatile oils มีสารจำพวกฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างได้แก่ น้ำมันโป๊ยกั๊ก พบสาร anethole น้ำมันจันทน์เทศ และ sassafras oil พบสาร safrole

6. Oxide volatile oils มีสารจำพวกออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของสารออกไซด์ที่พบในน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มนี้ได้แก่ cineole ซึ่งพบในน้ำมันยูคาลิปตัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. Ester volatile oils มีสารจำพวกเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของสารจำพวกเอสเทอร์ที่พบได้แก่ allyl isothiocyanate พบในน้ำมันมัสตาด และเมธิลซาลิไซเลต พบได้ใน wintergreen oil

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช ทำได้ 5 วิธีใหญ่ๆ ดังนี้

วิธีที่ 1 การกลั่น (Distillation) แบ่งออกเป็น

1.1 กลั่นด้วยน้ำ (water distillation) วิธีนี้มักใช้กับพืชแห้ง และสารในพืชไม่สลายเมื่อถูกความร้อน เช่น การกลั่นน้ำมันสน

1.2 กลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) ใช้กับพืชสด หรือพืชแห้งซึ่งอาจจะถูกสลายได้ด้วยความร้อน เช่น การกลั่นน้ำมันหอมระเหย อบเชย กานพลู โดยการหมักพืชในน้ำแล้วผ่านไอน้ำเข้าไป น้ำและน้ำมันจะถูกกลั่นออกมาด้วยกัน

1.3 กลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) ใช้กับพืชสด เช่น การกลั่นน้ำมันมินท์ ในระหว่างการกลั่นน้ำมันหอมระเหยที่อุณหภูมิสูงๆ องค์ประกอบบางชนิดในน้ำมันหอมระเหยจะถูกย่อย (hydrolyze) ให้เกิดการสลายตัว การกลั่นที่ดีควรเลือกให้ไอน้ำกระจายตัว แทรกเข้าไปในพืชมากที่สุด แต่ทำให้เกิดการสลายตัวของสารต่างๆน้อยที่สุด

วิธีที่ 2 โดยการบีบ (Expression)

น้ำมันหอมระเหยบางชนิด เช่นน้ำมันจากผิวส้ม น้ำมันจากผิวมะนาว จะสลายตัวได้เมื่อถูกความร้อน จึงใช้การบีบน้ำมันแทนการกลั่น

วิธีที่ 3 โดยใช้ Euflenrage

วิธีนี้เคยใช้มากในอุตสาหกรรมการทำน้ำหอม เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยในกลีบดอกไม้มักมีปริมาณน้อยจึงใช้การบีบไม่ได้ผล วิธีนี้ทำได้โดยใช้น้ำมันไม่ระเหยหรือไขมันชนิดไม่มีกลิ่นนำมาแผ่เป็นฟิล์มบางๆบนกระจก นำกลีบดอกไม้มาโปรยบนฟิล์มนี้ ตั้งทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมง แล้วเก็บกลีบดอกไม้ จากนั้นนำไขมันที่ได้มาสกัดด้วยแอลกอฮอล์เพื่อแยกน้ำมันหอมระเหยออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีที่ 4 โดยการสกัด (Extraction)

ปัจจุบันในอุตสาหกรรมน้ำหอมจะใช้วิธีสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น เบนซิน หรือ ปิโตรเลียมอีเธอร์ โดยวิธีนี้น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จะมีกลิ่นคงเดิม เพราะไม่เกิดการสลายตัวเนื่องจากใช้อุณหภูมิต่ำ ข้อเสียของวิธีสกัดนี้ก็คือ ราคาแพง

วิธีที่ 5 Destructive distillation

ใช้กับการกลั่นน้ำมันจากต้นไม้ในวงศ์ Piraceae และ Cupressaceae โดยนำมาเผาในที่มีอากาศไม่เพียงพอจะเกิดการสลายตัวได้สารระเหยออกมา ซึ่งประกอบด้วยด้วยเมธิลแอลกอฮอล์ และ crude acetic acid

ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีผลต่อจุลินทรีย์

กระเพราเป็นเครื่องเทศที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญของจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกับเครื่องเทศอื่นๆ แต่ประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ สำหรับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆดังนี้

แบคทีเรีย นิสเซอเรีย โกโนโรเอีย
ไมโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส
ไมโครคอคคัส
โปรเตียส วุลการิส
ซาลโมเนลลา โบวิส-มอร์บิฟิแคนส์
ไมโครคอคคัส ไพโอจีนส์ สายพันธุ์ออเรียส
รา แอสเปอร์จิลลัส
คันนิงแฮมเมลลา
เคอร์วูลาเรีย
มูเคอร์
ไรโซปัส

มีรายงานว่าประสิทธิภาพของกระเพราในการยับยั้งการเจริญของไมโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส ซึ่งเป็นสาเหตุของเชื้อวัณโรคนั้นจะอยู่ที่ส่วนของน้ำมันหอมระเหย โดยที่น้ำมันหอมระเหยนี้จะมีความแรงเป็น 10 เท่า ของยาปฏิชีวนะสเตรพโตไมซินและเป็น 4 เท่าของไอโซไนซิด (isonaizid) (บุศบรรณ ณ. สงขลา , 2522)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลไกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของกระเพราขึ้นอยู่กับเมธิลยูจีนอลเป็นสำคัญ โดยสารนี้จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญได้เช่นเดียวกับยูจีนอลนั่นเอง กล่าวคือ จะทำลายโปรตีนในเซลล์และทำให้เกิดการบาดเจ็บที่เซลล์เมมเบรน เป็นผลให้สารต่างๆภายในเซลล์ไหลออกมาสู่ภายนอกและคุณสมบัติด้านออสโมติคแบริเออร์ (osmotic barrier) ลดลง เซลล์จึงตายในที่สุด นอกจากนี้ในกระเพรายังมีสารพวกบอร์นีออลและลินาลูออล ซึ่งจะช่วยเสริมประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อยู่ด้วย แต่เนื่องจากมีในปริมาณต่ำ จึงมีผลต่อการยับยั้งของจุลินทรีย์ได้น้อยมาก สำหรับกลไกในการยับยั้งการเจริญนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด

สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite)

1. สารทุติยภูมิ

สารปฐมภูมิ (Primary metabolite)ในสิ่งมีชีวิตทั้งหมดมีบทบาทในการเจริญเติบโต และ มีกระบวนการมากมายนำไปสู่การสร้างสารประกอบทางเคมีที่มีลักษณะพิเศษเรียกว่า สารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ซึ่งมีบทบาทต่อการดำรงชีวิต และ วิถีการสร้างสารทุติยภูมิมีหลายปัจจัยดังนี้

- สร้างเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจง
- เอนไซม์ , สารตั้นตอเมทาบอไลท์ และผลิตภัณฑ์ จะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ทางชีวภาพ การสะสม และการสลาย
- มีการสังเคราะห์ทางชีวภาพที่จำกัดโดยปริมาณและกิจกรรมของเอนไซม์
- เป็นอนุพันธ์มาจากการสลาย Primary metabolite ใน pathway ต่างๆ ไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อน
- ผลิตในสภาวะที่จำเพาะกรณีที่ต้องใช้เท่านั้น

2 . โครงสร้าง,การสังเคราะห์ และเมตาบอลิซึมของ Secondary product

Secondary metabolites มาจากสารประกอบ Primary metabolite ซึ่ง Secondary metabolites จะมีลักษณะที่ซับซ้อนและใหญ่กว่าสารที่เป็น precusor ดังรูปที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

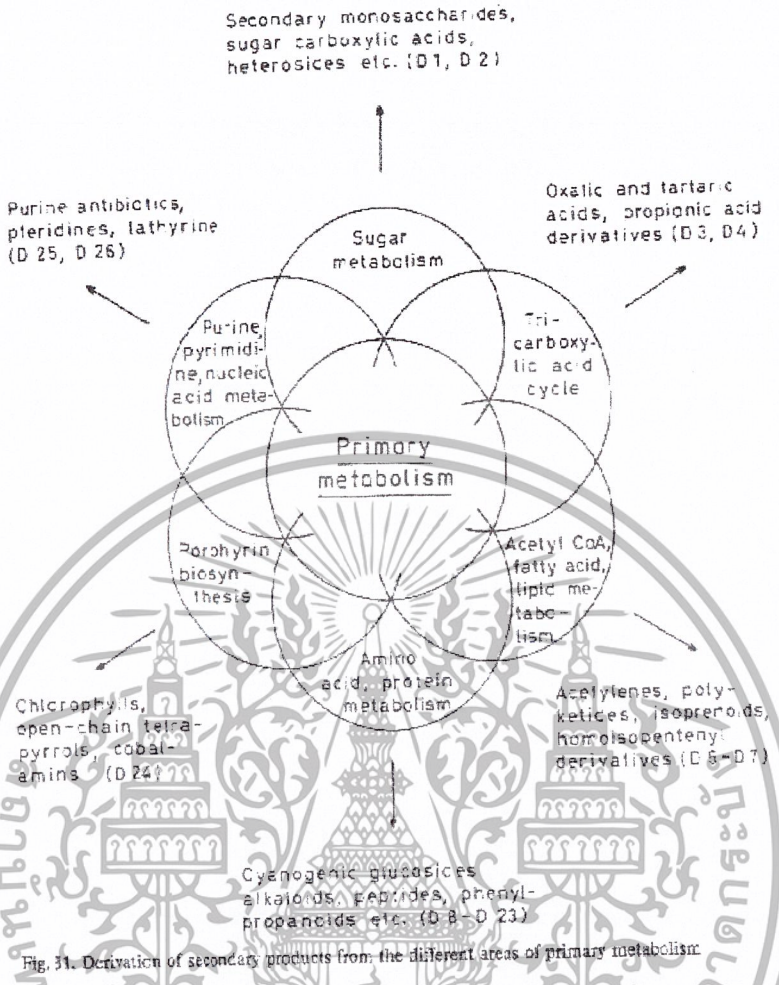


Fig. 31. Derivation of secondary products from the different areas of primary metabolism

รูปที่ 1 การผลิตสาร Secondary metabolites จากสาร Primary metabolite

3 . บทบาทของสาร Secondary metabolites

3.1 บทบาทในการติดต่อสื่อสารกันอย่างเฉพาะเจาะจง (pheromone) มีบทบาทดังนี้

- เพื่อการสืบพันธุ์ (Sex pheromone ใช้ดึงดูดและกระตุ้นเพศตรงข้าม)
- เพื่อการป้องกันตัว (pheromone ใช้เตือนถึงอันตราย)
- ใช้นำทางไปสู่แหล่งอาหาร (ทำสัญลักษณ์ทิ้งไว้ตามทางเพื่อจะได้ตามกลับได้)

3.2 บทบาทต่อความสัมพันธ์ทางระบบนิเวศน์

จุลินทรีย์, พืช และสัตว์ อาศัยอยู่ในโลกนี้โดยใช้สัญลักษณ์ทางเคมี ซึ่งสัญลักษณ์เหล่านี้เกือบทั้งหมดเป็น Secondary metabolites มีความสำคัญทางนิเวศวิทยาเป็นความสัมพันธ์กันระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1 บทบาทในการป้องกันตัว

Secondary metabolites ใช้ป้องกันจากผู้ล่าและจุลินทรีย์ เช่น Melanins ในหนูสีเทามีบทบาททำให้มีสีที่ไม่โดดเด่น ,สกังค์จะสร้างกลิ่นที่เหม็นซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ mercaptane กระบวนการสร้างและสะสมสารที่ผิวหนังของกบทำให้เป็นพิษแก่ผู้สัมผัส

3.2.2 บทบาทของ Antibiotic จากจุลินทรีย์

Antibiotic จากจุลินทรีย์ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นตาย นอกจากนี้ยังมีผลต่อสัตว์และมนุษย์ ใช้เป็นยา ซึ่ง Antibiotic มีลักษณะเฉพาะตัวดังนี้

- ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่ผลิต Antibiotic มีความไวต่อการรับรู้สาร Antibiotic ได้เท่าๆ กับคู่แข่ง
- มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่จะพบสาร Antibiotic ในสภาวะธรรมชาติและจุลินทรีย์จะสร้างสาร Antibiotic ก็ต่อเมื่อเกิดการแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ
- รูปแบบการผลิตเกือบทั้งหมดจะผลิตในช่วงระยะเวลาการเจริญของเซลล์ที่เฉพาะเจาะจง

ข้อมูลเหล่านี้บอกกิจกรรมของ Antibiotic พิสูจน์ได้ว่าหลายสารประกอบนั้นมีความจำเพาะเจาะจงทางด้านกายภาพของผู้ผลิต

3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างพืชต่อการสร้างสาร secondary metabolites

พืชจะแก่งแย่งความชื้น แสง และ อาหาร กันเอง ซึ่งการแก่งแย่งกันนี้คือการแข่งขันกันทางเคมี (allelopathy) กรณีนี้เกือบทั้งหมดจะนำไปสู่การสร้างสาร secondary metabolites สารเหล่านี้มักปรากฏที่ ใบ ราก และ ลำต้น

ตัวอย่าง secondary metabolites ของพืชที่มีผลในการยับยั้งการเจริญ และ การพัฒนาของพืชชนิดอื่นๆที่อยู่ใกล้ๆ

L — canavanine	ปล่อยจากเมล็ดที่กำลังงอกของพืช *Neonotonia wightii* เพื่อยับยั้งการเจริญของเมล็ดพืชชนิดอื่น
Quinolizidine alkaloids	ปล่อยจากรากเพื่อยับยั้งการงอกของเมล็ด และ การเจริญของพืชชนิดอื่นๆ
3 — Aminopropionitrile	ปล่อยจากเมล็ดที่กำลังงอกของ *Lathyrus odorata* เป็นพิษแก่เมล็ด *Lathyrus aphaca* ที่กำลังงอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ความสัมพันธ์กันระหว่างพืชกับจุลินทรีย์ต่อการสร้าง secondary metabolites

เมื่อจุลินทรีย์รุกรานเนื้อเยื่อพืชชั้นสูง พืชจะมีภูมิต้านทานป้องกันตนเอง โดยมีหน้าที่ต่างกันดังนี้

1. สะสมสาร secondary metabolites ทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกัน
2. สะสมสาร secondary metabolites ทำหน้าที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ เช่น essential oil , ฟีลม์บางๆที่ปกคลุมอยู่บนพื้นผิวของใบ
3. สร้างสารพิษจากสารที่ไม่เป็นพิษ (protoxin) ในระหว่างที่เชื้อจุลินทรีย์กำลังรุกราน
4. สร้าง secondary metabolites ที่เรียกว่า phytoalexin เมื่อมีเชื้อจุลินทรีย์รุกราน

3.5 ความสัมพันธ์กันระหว่างพืชกับสัตว์ต่อการสร้าง secondary metabolites

secondary metabolite ในพืชกับสัตว์นั้นมีบทบาทในรูปแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน เช่น การกระจายเกสรของดอกไม้ , การกระจายเมล็ด

3.5.1 secondary metabolites มีผลต่อการดึงดูดให้เกิดการกระจายเกสร

เป็นการพัฒนาร่วมกันระหว่างพืชกับแมลง นก และ ค้างคาว ต่อการกระจายเกสรของดอกไม้ ทั้งลักษณะทางเคมี และ กายภาพ โดยดอกไม้เหล่านี้จะมีกลิ่นเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ส่งไปได้ไกล ซึ่งจะมีลักษณะเฉพาะต่อชนิดของดอกไม้รวมทั้งเฉพาะต่อชนิดของสัตว์

3.5.2 บทบาทของ secondary metabolites ต่อการกระจายเมล็ด

สี กลิ่น รสชาติ ของผลไม้สุกเป็นสิ่งดึงดูดสัตว์ให้เข้ามากิน เมื่อกินและย่อยแล้วเมล็ดก็จะออกมาพร้อมกับอุจจาระ ซึ่งองค์ประกอบที่ใช้ดึงดูดสัตว์ ได้แก่

- กลิ่นของผลไม้ เช่น สารพวก mono- และ sesquiterpene , essential oil
- รสชาติ เช่น sugar alcohol , oilgosaccharide
- สี เช่น flavonoid , carotenoid

3.5.3 บทบาทของ secondary metabolites ในการใช้ดึงดูด หรือ ขับไล่ สัตว์

พฤติกรรมการกินของสัตว์กินพืช เป็นผลโดยตรงมาจาก secondary metabolites ของพืช ใน ด้านลักษณะ รสชาติ สิ่งปรุงแต่งต่างๆของพืช และ เมื่อกินเข้าไปแล้วเข้าสู่การย่อยสาร secondary metabolites นั้นจะซับซ้อน บางทีต้องอาศัยระบบ metabolic ที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้น ถ้าเป็นสารขับไล่เมื่อสัตว์กินเข้าไปรสชาติหรือกลิ่นจะเป็นสิ่งแรกที่เตือนว่าเป็นพิษ และ ไม่ พึงประสงค์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรา

เมื่อนำต้นและใบสดของกะเพรามาสกัดโดยกลั่นไอน้ำ จะได้น้ำมันที่มีสีเหลือง มีคุณสมบัติทางกายภาพดังต่อไปนี้

Specific gravity ที่ 20 องศาเซลเซียส = 0.959

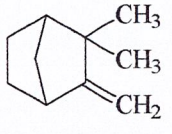
Refractive index ที่ 20 องศาเซลเซียส = 1.520

Specific rotiation = + 0.09 องศาเซลเซียส

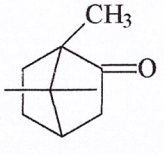
องค์ประกอบในน้ำมันจากกะเพราประกอบด้วย

1. α –amorphenre
2. bomeol
3. δ –cadinene
4. γ –cadinene
5. calamenene
6. camphene
7. caryophyllene
8. iso-caryophyllene
9. caryophyllene oxide
10. 1,8-cineol
11. copaene
12. α–cubebene
13. ρ-cymene
14. β-elemene
15. eugenol
16. germacrene D
17. γ-humulene
18. limonene
19. linalool
20. methyl eugenol
21. methylchavicol
22. α-pinene
23. β-pinene
24. sabinene
25. α-selinene
26. β -terpinene
27. terpinolene

โครงสร้างทางเคมีของสารบางชนิดที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา

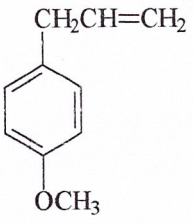


Camphene

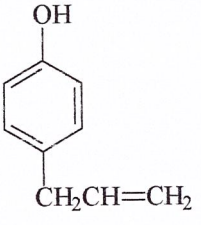


Camphor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

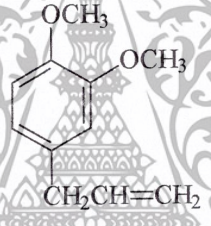


methylchavicol



eugenol

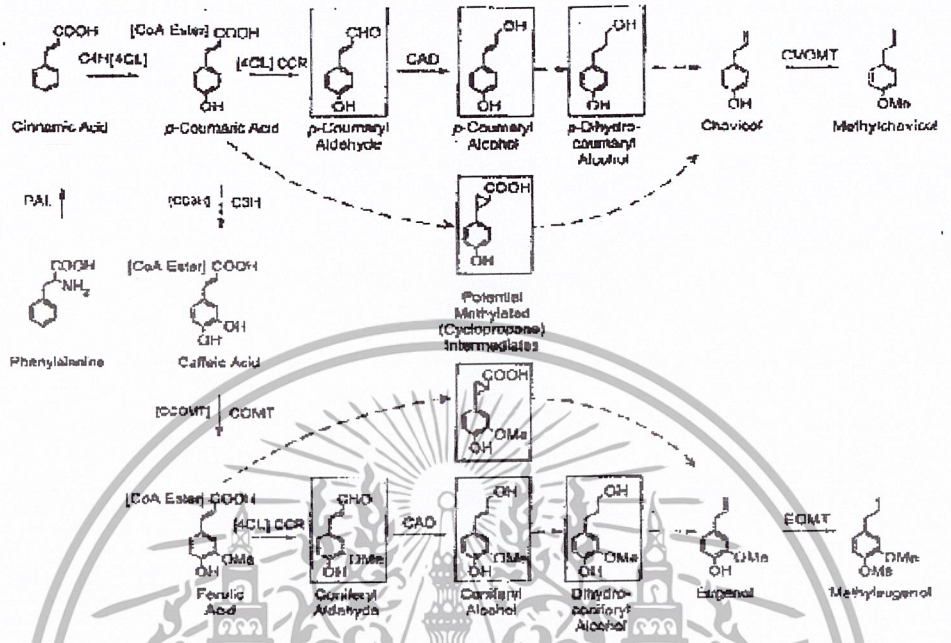
องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยในกะเพรา คือ เมธิลยูจีนอล โครงสร้างดังแสดงในรูป มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{11}H_{14}O_2$ องค์ประกอบย่อย ได้แก่ methyl , chavicol , camphor , camphene มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเรื่องยูจีนอลมากว่าร้อยปี และได้มีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมจนสามารถทราบถึงโครงสร้างและคุณสมบัติของยูจีนอลเป็นอย่างดี แต่ไม่มีหลักฐานแสดงไว้ว่ายูจีนอลถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อใด



แสดงสูตรโครงสร้างของเมธิลยูจีนอล น้ำหนักโมเลกุล 164.20

ยูจีนอลมีชื่อเรียกได้หลายอย่าง คือ 4-allyl-2-methoxyphenol , 4-allylauaiacol 2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenol เป็นต้น ยูจีนอลในธรรมชาติมักจะได้จากใบ และ ดอกกานพลู ใบอบเชย และใบยี่หร่า (Ocimum gratirsimum) พันธุ์บราซิล เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบเครื่องเทศอื่นๆอีก แต่มีในปริมาณน้อยหรืออยู่ในรูปเมธิลอีเธอร์ยูจีนอล ซึ่งมีรายงานอยู่ว่าพบในพืชพวกกะเพรา กุหลาบ และ การบูร เป็นต้น ในทางการค้า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมักใช้แทนยูจีนอลบริสุทธิ์ น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูประกอบด้วยยูจีนอล ถึง 80-95% (Bedoukian,1967)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 วิถีการสังเคราะห์เมธิลยูจีนอล

ที่มา : Gang et al. 2001

คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของเมธิลยูจีนอล

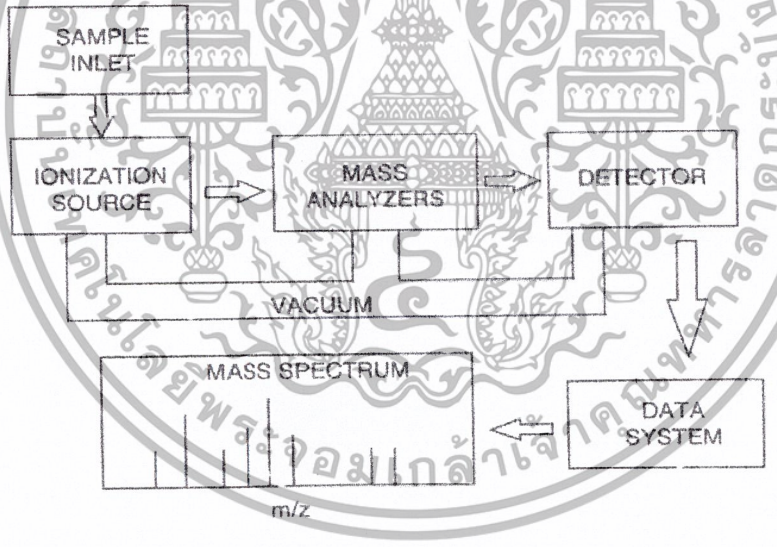
ยูจีนอลเป็นน้ำมันใส ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อนๆ ละลายน้ำได้น้อยมาก แต่สามารถรวมตัวกับแอลกอฮอลล์และน้ำมันได้ในโพรไพลีนไกลคอล และสารละลายอัลคาไลด์ที่เจือจาง ความหนืด และ สีของยูจีนอลจะขึ้นอยู่กับอายุการเก็บรักษา การสัมผัสกับอากาศและแสงของยูจีนอลเอง มีความถ่วงจำเพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 1.0651 ดรรชนีการหักเหแสง (20/D) 105410 จุดเดือดที่ความดัน 760 มิลลิเมตรปรอท 253 องศาเซลเซียส จุดวาบไฟ 110 องศาเซลเซียส และสามารถละลายได้ในแอลกอฮอลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรด้วยอัตราส่วน 1: 5 ถึง 6 ส่วน (Bedoukain,1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

GC-MS

GC-MS เป็นชื่อที่ผสมมาจากเทคนิค Gas chromatrography คู่กับ mass spectrometer โดย GC เป็นเทคนิคแรกที่ใช้วิเคราะห์องค์ประกอบของ votatile oil สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว , ถูกต้อง , ง่ายต่อการใช้งาน และราคาไม่แพงมาก แต่ระบบของ GC ไม่สามารถยืนยันโครงสร้างหรือบอกลักษณะของสารได้อย่างแน่นอนจากยอดของกราฟ ข้อมูลจาก GC อย่างเดียวไม่สามารถใช้บอกลักษณะของสารจากยอดกราฟได้ แต่ Mass spectroscopy มีดีเทคเตอร์ที่ดี โดยมันจะตอบสนองปริมาณสารระดับไมโครกรัมของสารตัวอย่าง และวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณ และ คุณภาพ โดยสามารถวิเคราะห์ถึง โครงสร้าง,องค์ประกอบธาตุและน้ำหนักโมเลกุลได้ และง่ายต่อการนำไปต่อกับระบบของ ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แผนผังการทำงานของ Mass spectrometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
47310

งานวิจัย

ในปี ค.ศ. 1968 Pogany และคณะ (Pogany et.al., 1968) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของโหระพา โดยนำมาแยกด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีและศึกษาคุณสมบัติของช่วงเวลาในการเก็บรักษา พบว่าน้ำมันหอมระเหยประกอบไปด้วยสารเคมี 32 ชนิด สารสำคัญที่วิเคราะห์ได้ เช่น camphor , beta-methoxy , benzaldehyde , methyl-eugenol นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารเคมีที่พบในน้ำมันระเหยของโหระพาจะแตกต่างกันไปในพืชที่ปลูกในบริเวณอุณหภูมิแตกต่างกัน

ในปี ค.ศ. 1999 Nirmal K, Sigh และ C.B. Sehgal (Nirmal K. et.al.,1999) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์ของกะเพรา (Ocimum sanctum Linn.) ในหลอดทดลอง พบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนกะเพราที่เลี้ยงในอาหาร MS มาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เสริมด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D จะผลิตแคลลัสแบบ non-morphogenic เพียงอย่างเดียว และจะเกิดรากเมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS 6-benzyl aminopurine (BAP) เป็นเวลา 2-3 อาทิตย์ ในการทดลองเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตพบว่า 92 % มีการพัฒนาไปรากและต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเมื่อนำไปปลูกในดินพบว่า 85% สามารถเจริญอย่างปกติ

ในปี ค.ศ. 2000 Begum และคณะ (Begum et.al., 2000) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการชักนำปลายรากจากต้นกะเพรามาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองโดยเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MS ที่มีสารอาหารควบคุมการเจริญเติบโต BA 0.1-0.2 มก./ล. เพื่อชักนำให้พัฒนาไปเป็นต้น แล้วทำการชักนำให้เกิดเป็นรากโดยย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.1 มก./ล. พบว่าต้นที่ได้เมื่อย้ายไปปลูกลงดินเปอร์เซ็นต์การรอด 70 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เมล็ดกะเพรา (*Ocimum sanctum Linn.*)
2. เชื้อ *Aspergillus niger.* และ *Aspergillus oryzae.*
3. สารเคมี
   - 3.1 อาหารผงสำเร็จรูป MS
   - 3.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต
     - NAA (naphthaleneacetic)
     - BA (N6-benzyladenin)
   - 3.3 สารเคมีที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อ
     - สารละลายคลอรอกซ์
   - 3.4 เอธิลแอลกอฮอลล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
   - 3.5 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนสกัดสาร
     - สารละลายอะซีโตไนไตรล์
     - สารละลายปิโตรเลียมอีเทอร์
     - สารละลายเมธิลแอลกอฮอลล์
   - 3.6 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์ GC-MS
     - สารละลายเมธิลยูจีนอล (eugenol)
     - สารละลายอะซีโตไนไตรล์
4. อุปกรณ์ที่ใช้
   - 4.1 ประเภทเครื่องแก้ว
     - บีกเกอร์ ขนาด 50 , 250 , 500 และ 1000 มิลลิลิตร
     - ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
     - ปิเปตต์ 1 และ 5 มิลลิลิตร
     - ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
     - จาน petri-dish
     - แท่งแก้วคนขวดสีชา
     - กระบอกตวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กรวยแก้ว

4.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- ตะเกียงแอลกอฮอลล์
- ไมโครปิเปตต์และทิปขนาดต่างๆ
- ช้อนตักสาร
- เหล็กเจาะวุ้น เบอร์ 3
- มีดผ่าตัดแบบต่างๆ
- ปากคีบ
- เครื่องชั่งไฟฟ้าแบบหยาบ และ ละเอียด
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter)
- เตาอบไมโครเวฟ
- ตู้เย็น
- อุปกรณ์นับเซลล์ (haemacytometer)
- เตาอบความร้อน (hot air oven)
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
- อุปกรณ์ถ่ายภาพ
- เครื่องโฮโมจีไนเซอร์
- เครื่องวิเคราะห์ก๊าซโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตโทรฟี

5. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมการให้แสงที่ความเข้มข้นแสง 700 ลักซ์ โดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ ช่วงสว่าง 16 ชั่วโมง ช่วงมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีดำเนินการทดลอง

แบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เพิ่มปริมาณต้นกะเพราโดยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ด้วยการปักชำชิ้นส่วนของกะเพราเพื่อเพิ่มจำนวน

ขั้นตอนที่ 2 นำยอดกะเพรามาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่ใส่สารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 7 สูตร เป็นเวลา 1 เดือน สังเกตการเจริญโต หาสูตรที่ให้น้ำหนักมากที่สุดมาทำการเพาะเลี้ยงอีกครั้ง

ขั้นตอนที่ 3 สกัดสารจากยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยเครื่องวิเคราะห์ GC-MS

ขั้นตอนที่ 4 นำสารที่สกัดได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ขั้นตอนที่ 5 เก็บรวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลองโดยละเอียด

ขั้นตอนที่ 1 การ subculture เพื่อเพิ่มปริมาณต้นกะเพรา

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. เตรียมอาหาร MS ใส่น้ำตาลซูโครส 30 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำ กลั่นปรับ pH เป็น 5.6 - 5.8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมวุ้น 8 กรัม ใส่ขวดเพาะเลี้ยงขวดละ 20 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. นำต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในขวดมาทำการตัดแยกชิ้นส่วนบน plate ที่ฆ่าเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ
3. ตัดเอายอด , ตาข้าง และ ราก มาปักลงบนอาหารMS แข็ง คล้ายการปักชำ ประมาณ ขวดละ 3-5 ชิ้น
4. นำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเกิดการเจริญให้เต็มที่ แล้วนำมา subculture เพื่อเพิ่มปริมาณต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงกะเพราในอาหารเหลวด้วยสารควบคุมการเจริญเติบ โตNAA และBA ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน 7 สูตร

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. เตรียมอาหาร
   - 1.1 เตรียมอาหารเหลว MS 100 มิลลิลิตร ใส่น้ำตาลซูโครสลงไป 30 กรัม และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วย น้ำกลั่น ใส่ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบ โตของพืช NAA และ BA (ความเข้มข้นดังตาราง)
   - 1.2 ปรับ pH อาหารให้ได้ประมาณ 5.6-5.8 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์
   - 1.3 เทอาหารเหลวลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตรจำนวน 10 ฟลาสก์ ต่อสูตรอาหาร 1 สูตร (10ซ้ำ)
   - 1.4 นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรอาหาร	NAA (มก./ล.)	BA (มก./ล.)
1	0.1	0.1
2	0.5	0.1
3	1.0	0.1
4	1.5	0.1
5	0.5	0.5
6	0.5	1.0
7	1.0	1.0

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของ NAA และ BA ต่างๆที่ใช้ในสูตรอาหาร 7 สูตร

2 . การนำเนื้อเยื่อกระเพราไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

2.1 ตัดยอดของต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งจำนวน 10 ยอดต่อ 1 ฟลาสก์ โดยทำการชั่ง และบันทึกน้ำหนักของยอดกะเพรา 10 ยอดต่อ 1 ฟลาสก์

2.2 นำสูตรอาหารที่มียอดกะเพราไปเพาะเลี้ยงที่เครื่องเขย่าโดยมีช่วงให้แสง 16 ช.ม. มืด 8 ช.ม. เขย่า ประมาณ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 เดือน สังเกตุการเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอ

2.3 เมื่อครบ 1 เดือนแล้วนำยอดกะเพราออกจากสารละลาย บันทึกลักษณะที่ เปลี่ยนไป และ ชั่งน้ำหนักเปรียบกับน้ำหนักยอดตอนก่อนการเพาะเลี้ยง

2.4 หาน้ำหนักของกะเพราเพื่อนำมาใช้คำนวณหาค่าการเจริญเติบโตของกะเพราดังสูตรคำนวน

$$\text{Growth index} = \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

2.5 หาสูตรอาหารที่ทำให้กะเพราเจริญเติบโตมากที่สุด (น้ำหนักมากที่สุด) มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวอีกครั้งเพื่อทำการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 3 การสกัด และ วิเคราะห์สารจากกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

1. นำเนื้อเยื่อกะเพราที่แยกจากอาหารเหลวสูตรนั้นๆ 10 ฟลาสก์ มารวมกันในบีกเกอร์
2. ใส่อะซิโตไนไตรล์ 200 มิลลิลิตร และปั่นให้ละเอียดด้วยโฮโมจีไนเซอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้กะเพราที่ละเอียดตกตะกอนแล้วนำเฉพาะสารละลายออกมา
3. เทใส่กรวยแยกและใส่ปิโตรเลียมอีเทอร์ 50 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆแยกเอาปิโตรเลียมอีเทอร์กับสารสกัดออกมาใส่บีกเกอร์ (สกัด 2-3 ครั้ง)
4. ตั้งทิ้งไว้ให้ปิโตรเลียมระเหยออกหมดจะเหลือสารที่สกัดได้ติดอยู่ที่ก้นภาชนะ
5. ทำการชั่งน้ำหนักบีกเกอร์ที่มีสารสกัดอยู่ แล้วนำอะซิโตไนไตรล์ละลายสารที่ได้ประมาณ 5-6 มิลลิลิตร เก็บในหลอดและไว้ในที่มืด
6. ทำการชั่งน้ำหนักบีกเกอร์นั้นอีกครั้งเพื่อใช้คำนวนหาน้ำหนักของสารเพื่อใช้หาค่าความเข้มข้นในหน่วย น้ำหนักต่อปริมาตร
7. วิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี – แมสสเปคโตมิเตอร์โดยใช้สภาวะดัง ต่อไปนี้

   นำสารตัวอย่างละลายด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ฉีดเข้าไปในช่องฉีดสารของเครื่อง GC ครั้งละ 1 ไมโครลิตร คอลัมน์ที่ใช้คือ HP – 5 ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร โดยมีฮีเลียมเป็นก๊าซตัวพา ด้วยอัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความดัน 14.08 psi สภาวะของตู้ให้ความร้อน (oven) โดยอุณหภูมิเริ่มต้นของตู้ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5นาที และ เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 300 องศาเซลเซียส ใน 10 นาที อุณหภูมิอินเจคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส และใช้ split ratio 133 : 1 ใช้ดีเทคเตอร์ คือ แมสสเปคโตมิเตอร์

ขั้นตอนที่ 4 นำสารสกัดจากกะเพรามาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์

1. เตรียมเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Aspergillus oryzae* บ่มไว้จนสร้างสปอร์
2. เตรียมอาหาร PDA (potato dextrose agar) สำเร็จรูป ในสัดส่วนน้ำ 1 ลิตร ต่อ อาหาร 39 กรัม
3. ทำการนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมอุปกรณ์ที่ใช้ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
4. นำอาหาร PDA ที่เตรียมไว้มาเทใส่ plate รอไว้จนเย็น ระหว่างนั้นทำการเตรียมสารละลายสปอร์โดยการใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ลวดเขี่ยเชื้อเขี่ยให้สปอร์กระจายในน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 . กรองไมซีเลียมออกเอาแต่สปอร์อย่างเดียวด้วยสำลี แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง 2-3 ครั้ง โดยดูดสปอร์แขวนลอยมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร

6 . หาความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่ได้ประมาณ $1x10^6$ สปอร์ ต่อ มิลลิลิตร นับสปอร์โดยใช้ haemacytometer และ คำนวณหาจำนวนสปอร์ที่แท้จริงดังสูตรคำนวนนี้

จำนวนเซลล์ที่นับได้ใน haemacytometer x 25 (square) x 50 (0.02 mm^3) x 10^3 (cm / ml)

7 . ทำการเจาะอาหารวุ้น PDA ให้เป็นหลุมโดยใช้เหล็กเจาะวุ้นเบอร์3 จำนวน 3 หลุม ต่อ Plate โดย

- หลุมที่ 1 เป็นหลุมควบคุมโดยจะหยดสารละลายสปอร์จำนวน 10ไมโครลิตรเท่านั้น
- หลุมที่ 2 ใส่สารที่สกัดจากกะเพรา (ต้องรู้ความเข้มข้นของสารสกัด(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)) จำนวน 10 ไมโครลิตร และ สารละลายสปอร์ 10 ไมโครลิตร
- หลุมที่ 3 ใส่สารที่เป็นตัวทำละลายกะเพรา เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ จำนวน 10 ไมโครลิตร และ สารละลายสปอร์ 10 ไมโครลิตร

8 . ทำอย่างละ 3 ซ้ำ ทำการบ่ม 3-4 วัน ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

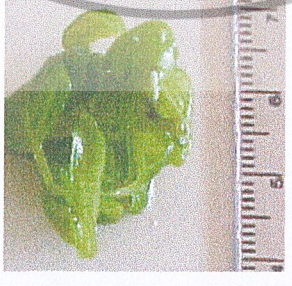
4.1 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ BA สูตร ต่อการเจริญเติบโตของยอดกะเพราในอาหารเหลวสูตร MS ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

ตารางที่ 2 การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่1 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 0.1 มก./ล. และ BA 0.1 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน

ฟลาสก์ที่	น้ำหนักกะเพรา เริ่มต้น ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักกะเพรา อายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักที่ เพิ่มขึ้น ต่อ ฟลาสก์	จำนวนยอด เริ่มต้น ต่อ ฟลาสก์	จำนวนยอด ที่เพิ่มเมื่อ อายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	ค่า Growth Index ของ น้ำหนัก
1	0.22	4.4	4.18	10	55	19
2	0.109	2.529	2.42	10	48	23.2
3	0.164	2.922	2.758	10	54	17.82
4	0.177	3.16	3.05	10	55	27.73
5	0.142	2.981	2.839	10	48	19.99
เฉลี่ยรวม	0.1624	3.1984	3.0494	10	52	21.548

ค่า SD. ของ Growth index = 3.992614

ค่า SD. ของ จำนวนยอดกะเพราที่เพิ่ม = 3.674235



รูปที่ 4 กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 0.1 , 0.1 มก./ล. ตามลำดับเป็น เวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 2 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 0.5 มก./ล. และ BA 0.1 มก./ล เป็นเวลา 1 เดือน

ฟลาสที่	น้ำหนักกะเพราเริ่มต้นต่อฟลาสก์	น้ำหนักกะเพราอายุ 1 เดือน ต่อฟลาสก์	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ต่อฟลาสก์	จำนวนยอดเริ่มต้นต่อฟลาสก์	จำนวนยอดที่เพิ่มเมื่ออายุ 1 เดือนต่อฟลาสก์	ค่า Growth Indexของน้ำหนัก
1	0.121	3.187	3.066	10	53	25.33
2	0.132	2.95	2.818	10	55	21.35
3	0.129	2.703	2.574	10	58	19.95
4	0.125	3.15	3.025	10	50	24.2
5	0.141	2.11	1.969	10	55	13.96
เฉลี่ยรวม	1.296	2.82	2.6904	10	54	20.958

ค่า SD. ของ Growth index = 4.46561

ค่า SD. ของ จำนวนยอดกะเพราที่เพิ่ม = 2.949576

รูปที่ 5 กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 , 0.1 มก./ล ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวMS สูตรที่ 3 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 1.0 มก./ล. และ BA 0.1 มก./ล เป็นเวลา 1 เดือน

ฟลาสที่	น้ำหนักกะเพรา เริ่มต้น ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักกะเพรา อายุ1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักที่ เพิ่มขึ้น ต่อ ฟลาสก์	จำนวน ยอด เริ่มต้น	จำนวนยอด ที่เพิ่มเมื่อ อายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	ค่า Growth Index ของ น้ำหนัก
1	0.169	2.608	2.439	10	49	14.43
2	0.105	2.894	2.789	10	39	26.56
3	0.1	2.131	2.031	10	48	20.31
4	0.116	2.212	2.096	10	46	18.07
5	0.153	2.229	2.076	10	48	13.57
เฉลี่ยรวม	0.129	2.415	2.286	10	46	17.72

ค่า SD. ของ Growth index = 5.226272

ค่า SD. ของ จำนวนยอดกะเพราที่เพิ่ม = 4.062019

รูปที่ 6 กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 1.0 , 0.1 มก./ล ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 4 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 1.5 มก./ล. และ BA 0.1 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน

ฟลาสที่	น้ำหนักกะเพรา เริ่มต้นต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักกะเพรา อายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักที่ เพิ่มขึ้น ต่อ ฟลาสก์	จำนวน ยอด เริ่มต้น	จำนวนยอด ที่เพิ่ม เมื่อ อายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	ค่า Growth Index ของ น้ำหนัก
1	0.123	2.052	1.929	10	42	15.68
2	0.17	2.638	2.468	10	39	14.52
3	0.104	1.665	1.561	10	29	15.01
4	0.115	2.162	2.047	10	36	17.8
5	0.103	2.162	2.059	10	39	19.99
เฉลี่ยรวม	0.123	2.1358	2.0128	10	37	16.6

ค่า SD. ของ Growth index = 2.271178

ค่า SD. ของ จำนวนยอดกะเพราที่เพิ่ม = 4.949747

รูปที่ 7 กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 1.5 , 0.1 มก./ล. ตามลำดับเป็น เวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรที่ 5 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 0.5 มก./ล. และ BA 0.5 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน

ฟลาสที่	น้ำหนักกะเพราเริ่มต้น ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักกะเพราอายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ต่อ ฟลาสก์	จำนวนยอดเริ่มต้น	จำนวนยอดที่เพิ่ม เมื่ออายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	ค่า Growth Index ของน้ำหนัก
1	3.116	0.189	2.927	10	29	15.48
2	2.604	0.154	2.45	10	27	15.91
3	1.927	0.105	1.822	10	25	17.35
4	2.19	0.117	2.073	10	35	17.72
5	2.827	0.157	2.67	10	28	17.01
เฉลี่ยรวม	2.5382	0.1444	2.3844	10	29	16.694

ค่า SD. ของ Growth index = 0.958034

ค่า SD. ของ จำนวนยอดกะเพราที่เพิ่ม = 3.768289

รูปที่ 8 กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 , 0.5 มก./ล. ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงใน อาหารเหลว MS สูตรที่ 6 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 0.5 มก./ล. และ BA 1.0 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน

ฟลาสที่	น้ำหนักกะเพรา เริ่มต้น ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักกะเพรา อายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักที่ เพิ่มขึ้น ต่อ ฟลาสก์	จำนวน ยอด เริ่มต้น	จำนวนยอด ที่เพิ่ม เมื่อ อายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	ค่า Growth Index ของ น้ำหนัก
1	0.152	3.55	3.398	10	32	22.35
2	0.173	3.319	3.146	10	43	18.18
3	0.116	1.875	1.759	10	33	15.16
4	0.182	3.802	3.62	10	57	19.89
5	0.112	2.611	2.499	10	35	22.31
เฉลี่ยรวม	0.147	3.0314	2.884	10	40	19.578

ค่า SD. ของ Growth index = 3.029781

ค่า SD. ของ จำนวนยอดกะเพราที่เพิ่ม = 10.4431

รูปที่ 9 กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 0.5 , 1.0 มก./ล. ตามลำดับเป็น เวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 การเจริญและจำนวนยอดที่เพิ่มขึ้นของยอดกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวMS สูตรที่ 7 ซึ่งใส่ฮอร์โมน NAA 1.0 มก./ล. และ BA 1.0 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน

ฟลาสที่	น้ำหนักกะเพรา เริ่มต้น ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักกะเพรา อายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	น้ำหนักที่ เพิ่มขึ้น ต่อ ฟลาสก์	จำนวน ยอด เริ่มต้น	จำนวนยอด ที่เพิ่ม เมื่อ อายุ 1 เดือน ต่อ ฟลาสก์	ค่า Growth Index ของ น้ำหนัก
1	0.102	1.903	1.801	10	42	17.65
2	0.161	3.573	3.412	10	38	21.19
3	0.115	2.147	2.032	10	43	20.17
4	0.144	3.058	2.914	10	36	20.23
5	0.15	2.859	2.635	10	41	18.6
เฉลี่ยรวม	0.134	2.708	2.558	10	40	19.568

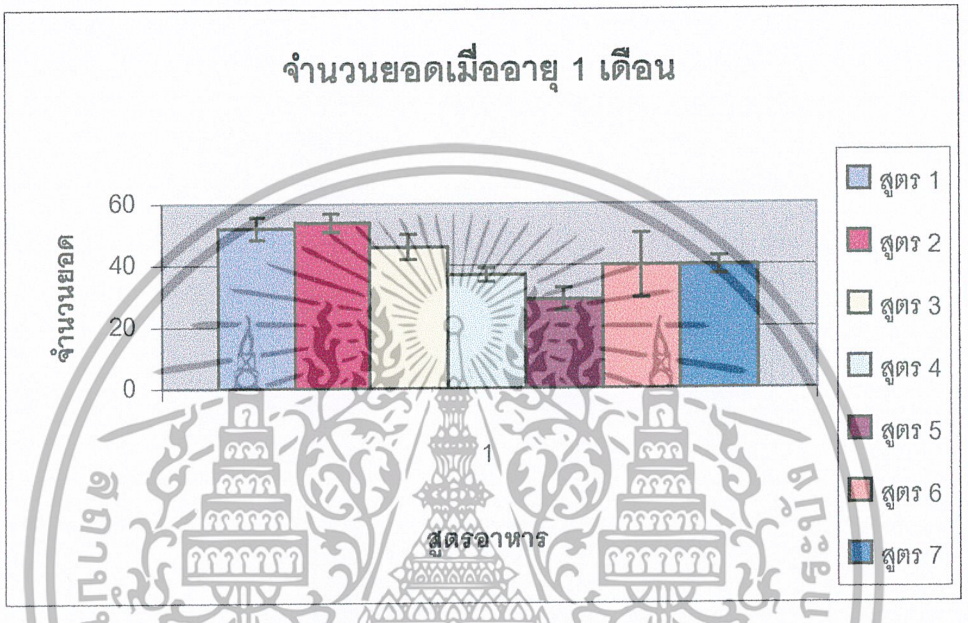
ค่า SD. ของ Growth index = 1.418386

ค่า SD. ของ จำนวนยอดกะเพราที่เพิ่ม = 2.9154476

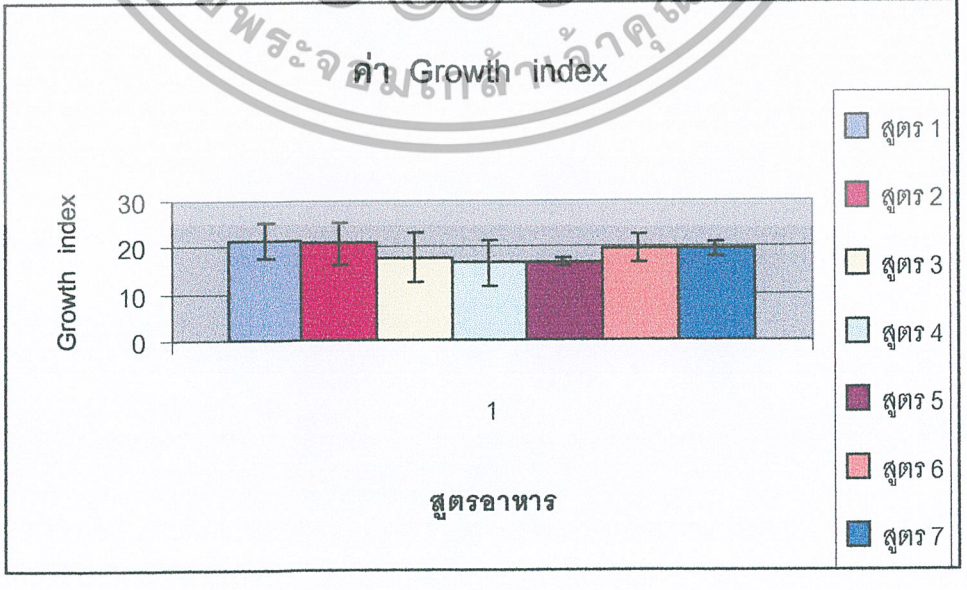
รูปที่ 10 กะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NAA และ BA ที่ความเข้มข้น 1.0 , 1.0 มก./ล.ตามลำดับเป็นเวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบจำนวนยอดเฉลี่ยของอาหารสูตรต่างๆ เมื่ออายุ 1 เดือน



รูปที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบค่า Growth index เฉลี่ย ของสูตรอาหารต่างๆ เมื่ออายุ 1 เดือน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 12 จะเห็นว่าอาหารสูตรที่ 1 มี ค่า Growth Index สูงที่สุด จึงได้เลือกอาหารสูตรที่ 1 มาทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณกะเพราเพื่อนำไปสกัดสารในขั้นต่อไป โดยกะเพราเลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ผลการทดลองเป็นดังตาราง

ตารางที่ 9 ค่า Growth index ของยอดกะเพราเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 1 เป็นเวลา 3 สัปดาห์

น้ำหนักกะเพราเริ่มต้น	น้ำหนักกะเพราอายุ 3 สัปดาห์	น้ำหนักกะเพราที่เพิ่ม	ค่า Growth index
0.185	2.184	1.999	10.81
0.22	2.23	2.01	9.13
0.116	1.734	1.618	13.94
ค่าเฉลี่ย = 0.262	2.049	1.875	11.29

4.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหย

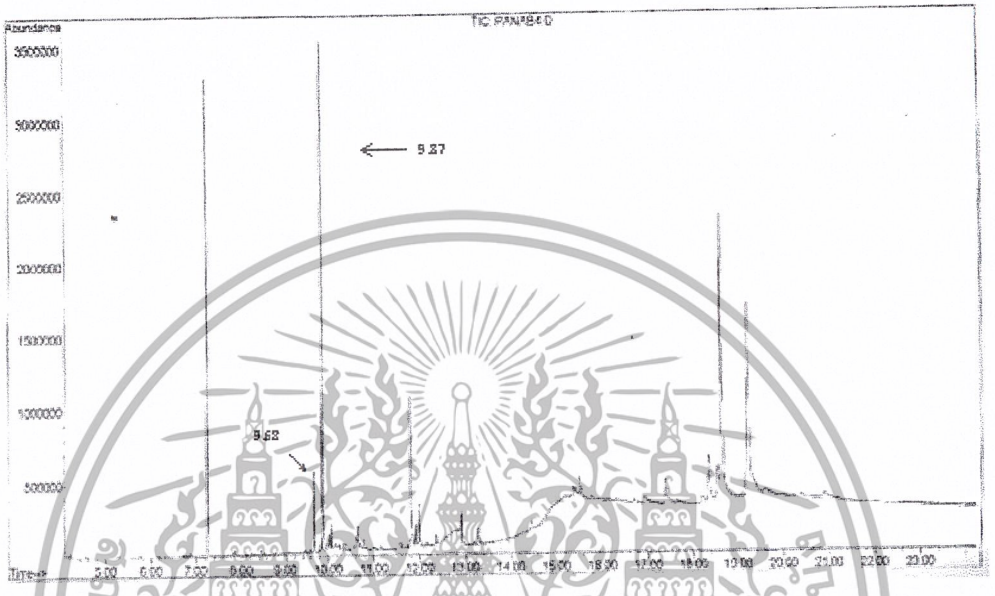
นำต้นกะเพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 เป็นเวลา 3 สัปดาห์มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย คือ เมธิลแอลกอฮอล์ 200 มล. จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ให้ละเอียด วางทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำส่วนใสที่ได้เทใส่ในกรวยแยก จากนั้นใส่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ 50 มล. เขย่าเบาๆ 2-3 ครั้ง แยกเอาชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ออกมาใส่ในบีกเกอร์ ตั้งทิ้งไว้จนปิโตรเลียมอีเทอร์ระเหยออกจนแห้ง ชั่งน้ำหนักสารที่เหลือในบีกเกอร์ ได้ 0.0036 กรัม จากนั้นนำเมธิลแอลกอฮอล์ 2 มล.เทใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีสารสกัดอยู่ เขย่าและคนให้สารสกัดละลายในเมธิลแอลกอฮอล์จนหมด นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเครื่อง GC-MS และนำไปทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดที่ได้

4.3 การวิเคราะห์โดยเครื่อง Gas Chromatography Mass Spectrometer (GC-MS)

นำสารที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC-MS ผลการวิเคราะห์พบว่า พบสารที่เป็นองค์ประกอบต่างๆมากมาย ดังแสดงในรูปที่ 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\PANA\PANAB4.D
Operator : Pana
Acquired : 21 Feb 2008 13:05 using AcqMethod PANA
Instrument : Instrumen
Sample Name: KPWSW
Misc Info :
Vial Number: 4



รูปที่ 13 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสารสกัดจากกะเพราด้วย GC - MS

จากโครมาโตรแกรมของสารสกัดจากกะพราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 1 พบว่ามีพีค 2 พีค ที่เป็นสารที่พบในน้ำมันหอมระเหยคือ พีคที่เวลา 9.68 คือ Methyl eugenol และพีคที่เวลา 9.87 คือ Caryophyllene

วิจารณ์

ในการนำสารสกัดจากกะเพราไปทำการวิเคราะห์โดยเครื่อง GC-MS เมื่อทำการสกัดสารเสร็จแล้ว ควรนำสารไปวิเคราะห์ทันที ไม่ควรตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานานเนื่องจากสารที่สกัดได้เป็นน้ำมันหอมระเหยทำให้อาจระเหยออกไปหมด เวลานำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง GC-MS อาจไม่พบสารที่ต้องการได้

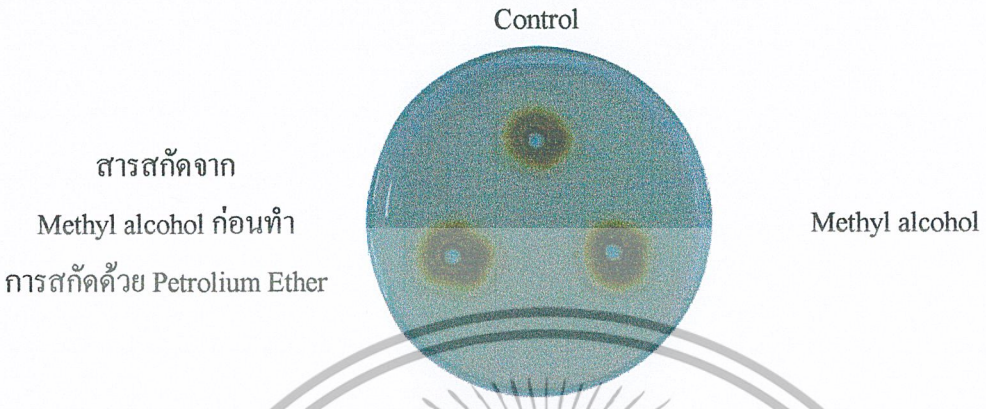
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารที่สกัดจากกะเพราต่อการเจริญของเชื้อรา

เมื่อนำสารสกัดจากกะเพราด้วย Methyl alcohol มาปริมาณ 0.018 มิลลิกรัมมาใส่ลงไปในหลุมซึ่งมีสปอร์ของ *Aspergillus niger* อยู่ 10^4 สปอร์ และ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันพบว่ามีการเจริญของ *Aspergillus niger* ในหลุมที่ใส่สารสกัดจากกะเพรา , หลุมที่ใส่เฉพาะตัวทำละลาย และ หลุมควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 14 นอกจากนี้สารสกัดจากกะเพราปริมาณเดียวกันได้ถูกนำไปทดสอบกับ *Aspergillus oryzae* ด้วยวิธีการแบบเดียวกัน ผลปรากฏว่าไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าว ดังแสดงในรูปที่ 15

รูปที่ 14 การเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger* ต่อสารสกัดจากกะเพรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 15 การเจริญของเชื้อ *Aspergillus oryzae* ต่อสารสกัดจากกะเพรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากยอดเพาะเลี้ยงพืชกะเพราในอาหารเหลว สรุปผลการวิจัยได้ว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยอดกะเพราในอาหารวุ้น MS ได้ 1 เดือนแล้วทำการตัดยอดกะเพรามาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต พบว่าสูตร 1 ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 0.1 มก./ล. , BA 0.1 มก./ล. มีค่า Growth index สูงสุด จึงทำการคัดเลือกอาหารเหลว MS สูตร 1 มาทำการเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณกะเพรา โดยนำกะเพราเลี้ยงในสภาวะเดิมเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำไปทำการสกัดสาร นำสารที่สกัดได้ไปทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography Mass Spectrometer (GC-MS) พบว่าสารสกัดที่นำมาวิเคราะห์นี้มีองค์ประกอบของสารต่างๆหลายชนิด และพบสารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหย คือ Methyl eugenol และ Caryophyllene จากนั้นได้นำเอาสารที่สกัดจากกะเพรามาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus niger* และ *A. oryzae* พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากกะเพรา ยังไม่สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้ดีเท่าที่ควร

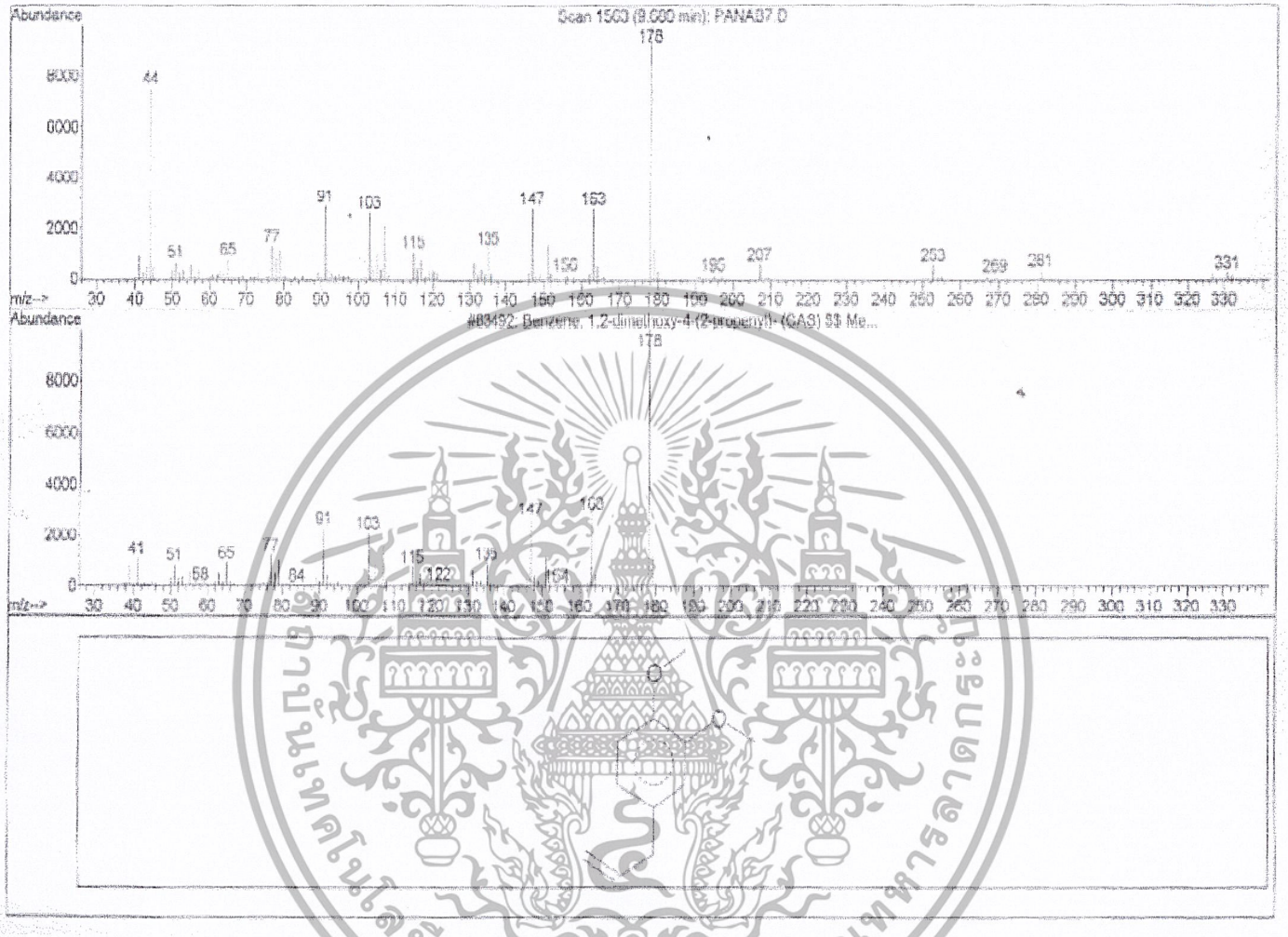
งานวิจัยฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงกะเพราในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดจากกะเพรา คณะผู้จัดทำหวังว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจบ้างไม่มากก็น้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Library Searched : C:\Database\wiley7n.l
Quality : 98
ID : Benzene, 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)- (CAS) $$ Methyleugenol $$ Methyl Eugenol $$ 1-Allyl-3,4-dimethoxybenzene $$ Ent 21040 $$ O-Methyleugenol $$ 4-Allylveratrole $$ Methyl eugenol ether $$ Eugenol methyl ether $$ Eugenyl methyl ether $$ Veratrole methyl

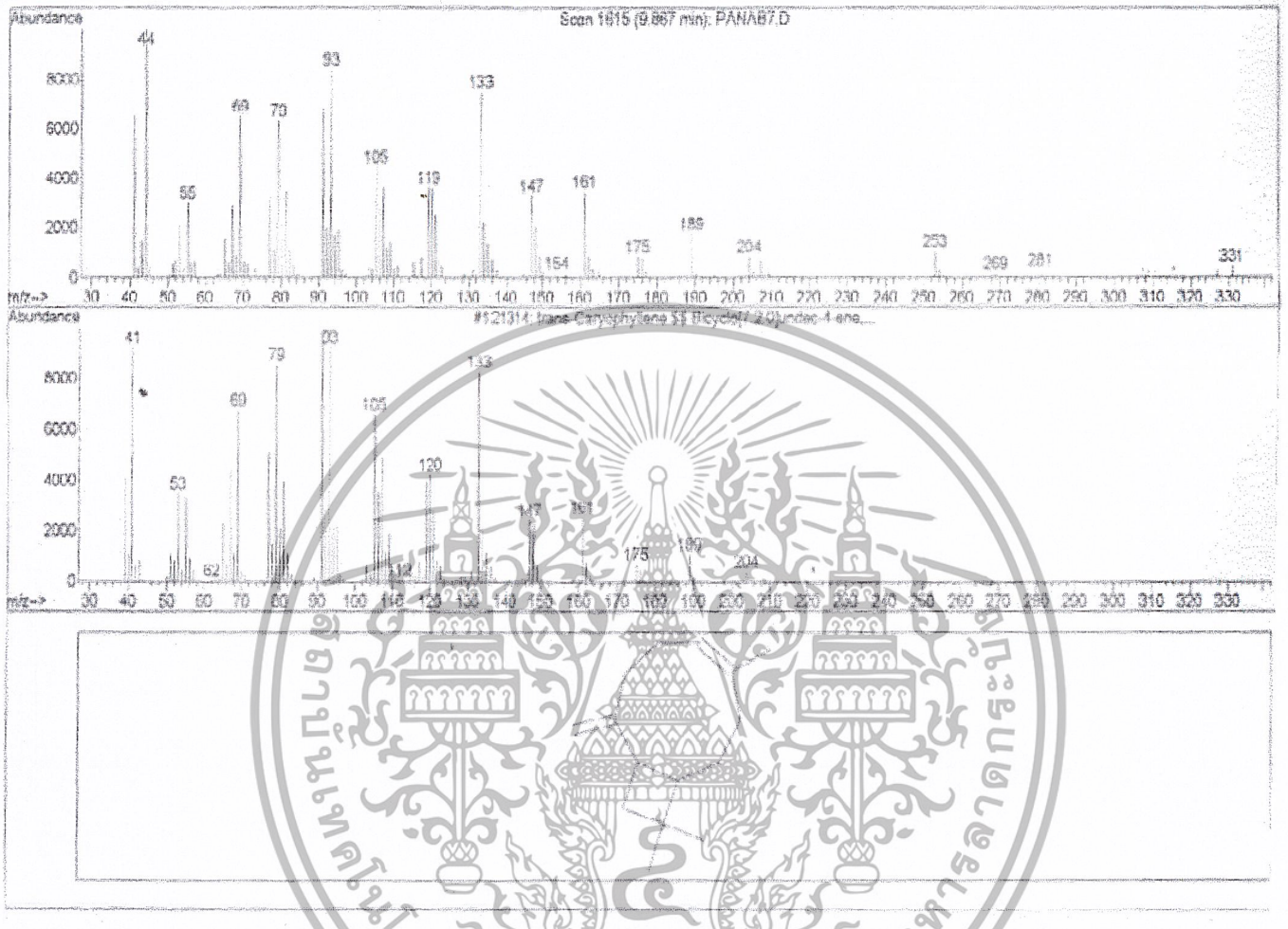


การเปรียบเทียบยอดกราฟของสารที่สกัดกับยอดกราฟของสารมาตรฐาน

สารที่พบคือ Methyl eugenol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Library Searched : C:\Database\wiley7n.l
Quality : 99
ID : trans-Caryophyllene $$ Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, [1R-(1R*,4E,9S*)]- (CAS) $$ l-Caryophyllene $$ (-)-Caryophyllene $$ Caryophyllene $$ .beta.-Caryophyllen $$ .beta.-Caryophyllene $$ .beta.-Caryophyllene, (-) $$ Bicyclo[7.2.



การเปรียบเทียบยอดกราฟของสารที่สกัดกับยอดของกราฟมาตรฐาน

สารที่พบคือ Caryophyllene

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา วรวณิชพงศ์ และสุปราณี ศรีโพธิ์ชัย " การศึกษาน้ำมันหมอระเหยจากสมุนไพรไทยที่มี ฤทธิ์ไล่แมลง " โครงงานพิเศษ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2538:4-6

- พีระศักดิ์ วรสุนทรโรสถและคณะ ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำดับที่ 16 พืชที่ให้น้ำมันหอม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วท.) หน้า 14-47 สำนักพิมพ์สหมิตรพริ้นติ้ง พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ 2544

- บัญญัติ สุขศรีงาม เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน 2524

- วิสูตร วัฒนชัยยงค์ " การวิเคราะห์ประมาณยูจีนอลในน้ำมันหอมระเหยจากพืช " ภาคนิพนธ์ คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน 2525

- Harold M. Mc Nair , James M. Miller " Basic gas chromatography "

- Robert K.M. Hay and Peter G. Waterman. Volatile oil crops : their biology , biochemjstry

- Pogany D. and others Composition of oil Sweet Basil (Ocimum basilicum L.) obtained from plants grown at different temperature. Food Science and Technology Abstracts , 1968 ,5T ,158

- David R. Gang , Jihong wang , Natalia Dudareva , Kyoung Hee , James E. Simon , Efraim Lewinsohn , and Eran Pichersky " An investigation of the Storage and Biosynthesis of Phenylpropenes in Sweet Basil" Plant Physiology 125 (2001) : 539-555.

- Martin luckner , " Secondary metabolism in Microorganisms , plant , and Animal " third revised and enlarged edition

- Chokechaijiraroenporn , O. " Studies on chemical contituients and biological effects on mosquitoes (*Aedes aegypti* L.) of volatile oils from Ocimum spp.cultivation in thailand " Master's Thesis , Faculty of graduate studies , Mahidol University , 1991

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้