การประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนต้นกล้ากล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ

APPLICATION OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO PREDICT THE OPTIMAL CONDITIONS FOR REDUCING BROWNING IN THE *IN VITRO* CULTURE OF *MUSA* (AA GROUP) 'KLUAI KHAI' PLANTLETS

เอนก หาลี หนึ่งฤทัย จักรศรี และธนากร วงษศา*

Anek Halee, Nuengruethai Jucksri and Thanakorn Wongsa*

บทคัดย่อ

ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่ คือ ปัญหาการเกิดสีน้ำตาลจากการออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก การแก้ไขปัญหาทำได้โดยเติมสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารดูดซับฟีนอลิก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงโดยการใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology) กล่าวคือ การสร้างแบบจำลองสภาวะด้วยวิธีการวางแผนการทดลองแบบวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการวางแผนการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิตของปัจจัย 3 ปัจจัยคือ ascorbic acid (AA) polyvinylpyrrolidone (PVP) และ activated charcoal (AC) ความเข้มข้น 3 ระดับ จำนวน 17 ทรีตเมนต์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เพื่อนำค่าของปริมาณฟีนอลิก แทนนิน และฟลาโวนอยด์ของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีค่าน้อยที่สุด เพื่อสร้างแบบจำลองสภาวะที่เหมาะสมอีก 4 ทรีตเมนต์ จากนั้นทดสอบแบบจำลอง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าสภาวะของแบบจำลองที่เหมาะสมคือ อาหาร Murashige & Skoog (1962) ที่เติม AA 0.03 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PVP 3.325 กรัมต่อลิตร และ AC 1.48 กรัมต่อลิตร สามารถลดการเกิดสีน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงต้นกล้ากล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: การเกิดสีน้ำตาล กล้วยไข่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช วิธีพื้นผิวตอบสนอง

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร อำเภอเมือง จังหวัดกำแพงเพชร 62000

Faculty of Science and Technology, Kamphaeng Phet Rajabhat University, Mueang District, Kamphaeng Phet Province 62000

*corresponding author e-mail: thanakorn_wo@kpru.ac.th

Received: 25 September 2025; Revised: 14 January 2026; Accepted: 10 February 2026

DOI: https://doi.org/10.14456/lsej.2026.1

Abstract

One of the major problems of *Musa* (AA group) 'Kluai Khai' tissue culture is the browning from the oxidation of phenolic compounds. This problem can be resolved by adding antioxidants or phenolic–adsorbing agents to the culture medium. A response surface methodology (RSM) approach was employed in combination with a central composite design (CCD) to model the effects of three factors: ascorbic acid (AA), polyvinylpyrrolidone (PVP), and activated charcoal (AC), each at three concentration levels. A total of 17 experimental treatments were conducted for 12 weeks. The levels of phenolic compounds, tannins, and flavonoids in the culture medium were analyzed, and the four treatments yielding the lowest concentrations were selected for further validation. The optimized conditions were subsequently tested for 12 weeks. The results indicated that Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with 0.03 g/L AA, 3.325 g/L PVP, and 1.48 g/L AC effectively reduced browning in *in vitro* cultures of *Musa* (AA group) 'Kluai Khai'.

Keywords: Lethal browning, *Musa* (AA group) 'Kluai Khai', *In vitro* culture, response surface methodology

บทนำ

กล้วยไข่กำแพงเพชร [*Musa* (AA group) 'Kluai Khai Kamphaeng Phet'] เป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ของจังหวัดกำแพงเพชร เนื่องจากการผลิตต้นพันธุ์กล้วยไข่ยังคงพบปัญหาของวิธีการขยายพันธุ์แบบดั้งเดิมด้วยการแยกหน่อที่ใช้ระยะเวลานานและปัญหาหน่อมีเชื้อโรค เช่น โรคตายพราย สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense หรือแมลงศัตรูพืช เช่น ด้วงงวง *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Silayoi, 1995) ดังนั้นวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอีกแนวทางหนึ่งสำหรับการผลิตต้นพันธุ์หรือเก็บรักษาพันธุกรรมกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ แต่ปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วย คือ ปัญหาการเกิดสีน้ำตาลจากการออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกเมื่อชิ้นส่วนต้นกล้วยได้รับบาดแผลจากตัดแต่งชิ้นส่วนของขั้นตอนต่าง ๆ เช่น ขั้นตอนการขยายพันธุ์ (Wongsa et al., 2021a) หรือการเก็บรักษาต้นกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ (Wongsa et al., 2021b) ส่งผลให้เนื้อเยื่อปลดปล่อยยางกล้วยที่เป็นสารประกลุ่มฟีนอลิก (Ahmad et al., 2013) ส่งผลให้ชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเริ่มตายทีละน้อยจนกระทั่งตายทั้งหมด แนวทางของการแก้ไขปัญหาทำได้โดยเติมสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid, AA) การใช้สารดูดซับฟีนอลิก เช่น Polyvinylpyrrolidone (PVP) และถ่านกัมมันต์ (Activated charcoal, AC) อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้

มีประสิทธิภาพแตกต่างกัน ดังเช่น รายงานวิจัยการใช้กรดแอสคอร์บิกเพื่อควบคุมการตายของชิ้นส่วนข้อ *Brahylaena huillensis* (Asteraceae) จากการเกิดสีน้ำตาลในสภาพปลอดเชื้อ (Ndakidemi, Mneney & Ndakidemi, 2014) มีการวิจัยลดการเกิดสีน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยหลายชนิด เช่น *Musa* acuminata (AAA) 'Cavendish' (Ko et al., 2008), *Musa* 'Mzuzu' (Ngomuo, Mneney & Ndakidemi, 2014) และ *Musa* (AAB) 'Nanjangudu rasabale' (Babu, 2019) เนื่องจากกล้วยมีหลายสายพันธุ์จึงมีวิธีการที่เหมาะสมแตกต่างกันไป ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของหลายปัจจัยร่วมกัน สามารถเลือกใช้วิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของหลายตัวแปรร่วมกันด้วยการใช้แผนการทดลองวางแผนแบบพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology design; RSM) ซึ่งเป็นการรวบรวมเทคนิคด้านคณิตศาสตร์และสถิติเพื่อสร้างตัวแบบและวิเคราะห์ปัญหาของกรณีที่ผลตอบสนองมีความสัมพันธ์กับปัจจัยหลายตัว เพื่อหาระดับของปัจจัยที่ทำให้ผลตอบสนองมีค่าดีที่สุด (Pradubsri et al., 2015) ทำให้สามารถลดจำนวนทรีตเมนต์ (treatment) แต่ยังคงให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ แผนการทดลองแบบ RSM ถูกประยุกต์ใช้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ เช่น การประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อทำนายอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus* section Flavi ที่สร้างสารอะฟลาทอกซินที่เป็นผลของปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (Somjaipeng et al., 2017) ประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหาปริมาณของสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของแคลลัส *Phytolacca americana* L. โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Luecha et al., 2024) รวมถึงการศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำแผนการทดลองแบบ RSM เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ของปริมาณความเข้มข้นและสัดส่วนที่เหมาะสมของ AA, PVP และ AC ที่มีผลต่อการเกิดสีน้ำตาลด้วยการประเมินจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก ปริมาณแทนนิน และปริมาณฟลาโวนอยด์จากชิ้นส่วนต้นกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมพืชสำหรับการทดลอง

คัดเลือกหน่อกล้วยไข่กำแพงเพชร ตัดแต่งหน่อให้มีขนาด 5x5 เซนติเมตร ฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการของ Wongsa et al. (2021a) ดังนี้ คัดเลือกหน่อกล้วยไข่ที่ปราศจากโรคและแมลง จากนั้นตัดแต่งให้มีขนาดชิ้นส่วนประมาณ 3 เซนติเมตร ล้างทำความสะอาด นำไปฟอกฆ่าเชื้อส่วนผิวชิ้นส่วนหน่อกล้วยไข่โดยแช่ในสารละลายผสมของสารกำจัดเชื้อรา Captan 1% ร่วมกับ Carbendazim 1% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้ายไปแช่ในสารละลายเอทานอล 95% เป็นเวลา 1 นาที และย้ายไปแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 15% (w/v) เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 4-5 ครั้ง ตัดแต่งชิ้นส่วนให้มีขนาดประมาณ 1.5 เซนติเมตร ดังภาพที่ 1 (Figure 1) เลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) น้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ค่า pH 5.7 เพื่อผลิตต้นใน

สภาพปลอดเชื้อ เมื่อได้ต้นในสภาพปลอดเชื้อแล้ว เพิ่มจำนวนต้นโดยเลี้ยงบนอาหารดัดแปลงสูตร MS โดยเพิ่มการเติมน้ำมะพร้าว 150 มิลลิลิตรต่อลิตร เพาะเลี้ยงต้นกล้ากล้วยไข่เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์



Figure 1 Plant material and explants preparation

การทดลองที่ 1 การศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษาเพื่อสร้างสมการความสัมพันธ์ทางคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนหน่อกล้วยไข่

1. ศึกษาผลของ AA, PVP และ AC ต่อการลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนหน่อกล้วยไข่ โดยเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยใช้อาหารสูตร MS เติมน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร วุ้น 7.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับปัจจัยที่ทดสอบ ได้แก่ AA ความเข้มข้น 0.02 และ 0.05 กรัมต่อลิตร PVP ความเข้มข้น 0.15 และ 0.5 กรัมต่อลิตร และ AC ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง วางแผนการทดลองแบบ CCD คือ กำหนดค่า Min, Max, $-\alpha$ และ $+\alpha$ ของ AA คือ 0.02, 0.05, 0.01 และ 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าของ PVP คือ 1.50, 5.00, 0.31 และ 6.19 กรัมต่อลิตร และค่าของ AC คือ 1.00, 2.00, 0.66 และ 2.34 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การจัดสิ่งทดลองตามวิธีพื้นผิวตอบสนองรวมทั้งหมด 17 ทรีตเมนต์ ดังตารางที่ 1 (Table 1) ปรับค่า pH 5.7 หลอมวุ้นและฆ่าเชื้ออาหารด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันอากาศของไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (PSI) ระยะเวลา 15 นาที (AA กรองให้ปราศจากเชื้อและเติมลงในอาหารหลังจากที่ฆ่าเชื้อแล้ว)

Table 1 Concentration levels and ratios of AA, PVP, and AC for each experimental treatment

Treatment	AA (g/L)	PVP (g/L)	AC (g/L)	AA : PVP : AC Ratio
1	0.04	0.31	1.50	0.04 : 0.31 : 1.50
2	0.02	1.50	1.00	0.02 : 1.50 : 1.00
3	0.05	1.50	1.00	0.05 : 1.50 : 1.00
4	0.02	1.50	2.00	0.02 : 1.50 : 2.00
5	0.05	1.50	2.00	0.05 : 1.50 : 2.00
6	0.04	3.25	0.66	0.04 : 3.25 : 0.66
7	0.01	3.25	1.50	0.01 : 3.25 : 1.50
8	0.05	0.15	1.00	0.05 : 0.15 : 1.00
9	0.02	0.15	2.00	0.02 : 0.15 : 2.00
10	0.04	0.325	2.34	0.04 : 0.325 : 2.34
11	0.06	3.25	1.50	0.06 : 3.25 : 1.50
12	0.04	3.25	2.34	0.04 : 3.25 : 2.34
13	0.02	5.00	1.00	0.02 : 5.00 : 1.00
14	0.05	5.00	1.00	0.05 : 5.00 : 1.00
15	0.02	5.00	2.00	0.02 : 5.00 : 2.00
16	0.05	5.00	2.00	0.05 : 5.00 : 2.00
17	0.04	6.19	1.50	0.04 : 6.19 : 1.50

2. นำต้นกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ ตัดรากและใบออก เหลือชิ้นส่วนประมาณ 2.0 เซนติเมตร วางเลี้ยงบนอาหารทั้งหมด 17 ทรีตเมนต์ (ทรีตเมนต์ละ 20 ขวด) วางเลี้ยงภายใต้สภาวะแสง 10 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 25 ไมโครโมลล์ต่อตารางเมตรต่อวินาที ระยะเวลา 12 สัปดาห์

3. เก็บตัวอย่างอาหารเพาะเลี้ยงที่ 12 สัปดาห์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content; TPC) ปริมาณแทนนิน (total tannin content; TTC) และปริมาณฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content; TFC) ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Halee et al. (2018)

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองด้วยวิธี Duncan’s new multiple range Test (DMRT) ประมวลผลจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS IBM trial version

การทดลองที่ 2 การทวนสอบความถูกต้องของสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงหน่อกล้วยไข่

การทวนสอบสภาวะของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อใช้ทำนายค่า TPC, TTC และ TFC ทดลองซ้ำในขั้นตอนที่ 1–4 โดยศึกษาผลของคือ AA, PVP และ AC ที่เหมาะสมต่อการลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงหน่อกล้วยไข่ที่ได้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์จำนวน 4 ทรีตเมนต์ โดยมีปริมาณของ AA: PVP: AC ในแต่ละทรีตเมนต์ คือ T1= 0.02: 0.10: 1.00, T2=0.035: 0.325: 1.50, T3=0.05: 0.50: 2.00 และ T4=0.30: 3.325: 1.48 เมื่อครบระยะเวลา 12 สัปดาห์ นำอาหารเพาะเลี้ยงนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ TPC, TTC และ TFC ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Halee et al. (2018) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบ TPC, TTC และ TFC ที่ได้จากการทำนายด้วยสมการทางคณิตศาสตร์กับค่าที่ได้จากการทดลอง โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองด้วยวิธี t-test และคำนวณหาค่าของร้อยละความผิดพลาด (% Error) ตามสูตรที่ (1)

$$\%\ \text{Error} = \frac{|\text{Experimental Value} - \text{Predicte Value}|}{\text{Predicted Value}} \times 100 \quad \text{..... (1)}$$

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษาเพื่อสร้างสมการความสัมพันธ์ทางคณิตศาสตร์สำหรับการทำนายสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนหน่อกล้วยไข่

ชิ้นส่วนหน่อกล้วยไข่บนอาหาร MS ที่เติมปัจจัยทดสอบต่าง ๆ พบว่า ที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์ ต้นกล้วยไข่ในทุกทรีตเมนต์มีการเจริญของปลายยอดที่ยืดยาว มีค่าเฉลี่ยของจำนวนยอด 1 ยอด ในทุกทรีตเมนต์ อีกทั้งยังมีค่าเฉลี่ยของจำนวนใบในแต่ละทรีตเมนต์อยู่ในช่วงจำนวน 4.0–5.0 ใบต่อต้น และมีการสร้างรากทั้งหมดร้อยละ 100 ในทุกทรีตเมนต์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ TPC, TTC และ TFC จากตัวอย่างอาหารเพาะเลี้ยง พบว่า ค่าเฉลี่ยของสารประกอบ TPC, TTC และ TFC ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากชิ้นส่วนต้นกล้วยไข่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งหมด 17 ทรีตเมนต์ มีค่าแตกต่างกัน โดยปริมาณ TPC มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละทรีตเมนต์ โดยทรีตเมนต์ที่ให้ TPC ต่ำที่สุดคือ ทรีตเมนต์ที่ 8 มีค่า 37.33±1.11 mg GA/100g) และทรีตเมนต์ที่ให้ TPC สูงที่สุดคือทรีตเมนต์ที่ 11 (119.37±4.08 mg GA/100g) สำหรับปริมาณของ TTC มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน โดยทรีตเมนต์ที่ให้ TTC ต่ำที่สุดคือ ทรีตเมนต์ที่ 9 (217.16±8.60 mg TA/100g) และทรีตเมนต์ที่ให้ TTC สูงที่สุดคือ ทรีตเมนต์ที่ 12 (403.45±10.12 mg TA/100g) ในทำนองเดียวกันปริมาณของ TFC มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทรีตเมนต์ที่ให้ TFC ต่ำที่สุดคือ ทรีตเมนต์ที่ 8 (113.70±2.98 mg CE/100g) และทรีตเมนต์ที่ให้ TFC สูงที่สุดคือ ทรีตเมนต์ที่ 1 (391.28±8.69 mg CE/100g) ดังตารางที่ 2 (Table 2) จากข้อมูลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบต่าง ๆ ของตัวอย่างอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่ ดังภาพที่ 2–4 (Figure 2–4) สามารถนำมาสร้างสมการความสัมพันธ์ทางคณิตศาสตร์ ดังตารางที่ 3 (Table 3)

Table 2 Mean values of total phenolic content, tannin content, and flavonoid content in culture media for 12 weeks

Treatment	Total phenolic content (mg GA/100g)	Total tannin content (mg TA/100g)	Total flavonoid content (mg CE/100g)
1	66.96 ±2.21 ^{g}	221.03±6.74 ^{fg}	391.28±8.69 ^{a}
2	68.82 ±2.41 ^{g}	206.12±6.21 ^{i}	380.66±7.32 ^{b}
3	116.21 ±4.07 ^{a}	284.06±6.94 ^{e}	359.77±6.59 ^{c}
4	64.37 ±2.05 ^{g}	275.21±6.63 ^{e}	295.57±7.34 ^{d}
5	96.60 ±3.18 ^{c}	317.21±7.10 ^{c}	259.62±6.09 ^{e}
6	96.78 ±3.09 ^{c}	299.15±7.47 ^{d}	245.13±6.58 ^{f}
7	56.28 ±1.07 ^{h}	336.09±7.76 ^{b}	191.20±5.69 ^{gh}
8	37.33 ±1.11 ^{i}	226.85±6.94 ^{g}	113.70±2.98 ^{k}
9	36.78 ±1.19 ^{i}	217.16±8.60 ^{fgh}	116.84±2.09 ^{k}
10	33.48 ±1.14 ^{i}	212.06±6.42 ^{hi}	114.68±2.01 ^{k}
11	119.37 ±4.08 ^{a}	323.01±9.31 ^{c}	196.83±4.89 ^{g}
12	95.56 ±3.04 ^{c}	403.45±10.12 ^{a}	182.27±4.38 ^{hi}
13	77.89 ±2.13 ^{f}	341.01±9.94 ^{b}	181.32±4.35 ^{i}
14	106.60 ±3.03 ^{b}	252.71±7.84 ^{f}	169.86±4.95 ^{j}
15	84.26 ±2.15 ^{e}	391.81±10.71 ^{a}	162.93±4.70 ^{j}
16	81.60 ±2.26 ^{ef}	212.29±6.43 ^{hi}	161.55±3.65 ^{j}
17	91.04 ±3.09 ^{d}	214.00±6.49 ^{fgh}	171.23±4.99 ^{j}

Remark Means with different letters within the same column differ significantly ($p < 0.05$) by DMRT

Table 3 The mathematical equations for predicting the optimal concentrations and proportions of AA, PVP, and AC

Chemical content	The mathematical correlation
Total phenolic content	TPC = +36.11 + (15.51 * A) + (3.28 * B) – (3.28 * C) – (6.70 * A * B) – (5.82 * A * C) + (0.68 * B * C) + (17.54 * A^2) + (14.42* B^2) + (20.49 * C^2)
Total tannin content	TTC = +2.20 – (0.12 * A) + (0.075 * B) + (0.21 * C) – (0.49 * A * B) – (0.16 * A * C) – (0.12 * B * C) + (0.35 * A^2) – (0.046 * B^2) + (0.43 * C^2)
Total flavonoid content	TFC = +114.44 – (4.41 * A) – (72.49 * B) – (23.26 * C) + (5.50 * A * B) – (0.62 * A * C) + (19.82 * B * C) + (30.09 * A^2) + (60.93 * B^2) + (37.05 * C^2)

จากการวิเคราะห์กราฟพื้นผิวตอบสนองที่แสดงผลกระทบร่วมกันของปัจจัย PVP, AA และ AC ต่อปริมาณของ TPC, TTC และ TFC ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่ ผลการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารลดการเกิดสีน้ำตาลทั้งสามชนิดมีอิทธิพล

อย่างมีนัยสำคัญต่อการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกลงสู่อาหารเพาะเลี้ยง โดยสารประกอบแต่ละชนิดมีรูปแบบการตอบสนองที่แตกต่างกัน อันเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการกำหนดสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อลดการเกิดสีน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาปริมาณของ TPC และ TFC มีรูปแบบการตอบสนองที่คล้ายกัน โดยมีปฏิสัมพันธ์หลัก (AC x AA และ AC x PVP) กราฟมีลักษณะเป็นพื้นผิวแบบชามคว่ำ (inverted bowl shape) โดยกราฟทั้งสองของปริมาณของ TPC และ TFC แสดงถึงลักษณะที่บ่งชี้ว่าปริมาณสารประกอบทั้งสองชนิดจะลดลงถึงจุดต่ำสุด (minimum) เมื่อใช้ปัจจัยที่ทำปฏิสัมพันธ์กัน (เช่น AC ร่วมกับ AA หรือ AC ร่วมกับ PVP) ในระดับความเข้มข้นปานกลาง แสดงถึงความเข้มข้นปานกลางของสารดูดซับและสารต้านอนุมูลอิสระมีความสามารถในการยับยั้งการปลดปล่อยสารได้ดีที่สุด รวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง PVP x AA มีความสัมพันธ์ของกราฟลักษณะแบบอานม้า (saddle) แสดงถึงปริมาณของ TPC และ TFC มีแนวโน้มต่ำเมื่อปัจจัยหนึ่งอยู่ในระดับสูงและอีกปัจจัยอยู่ในระดับต่ำ ดังภาพที่ 2–3 (Figure 2–3)

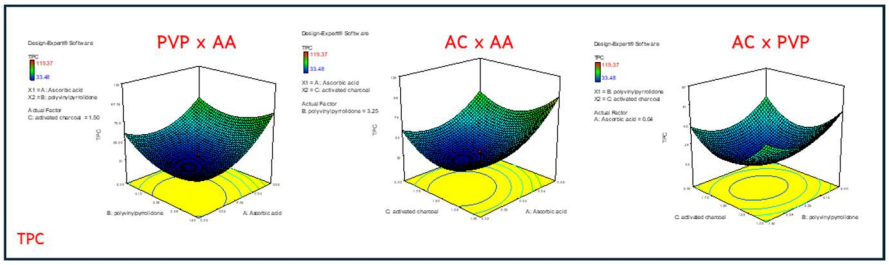


Figure 2 Three–dimensional response surface plots illustrating the effects of polyvinylpyrrolidone (PVP), ascorbic acid (AA), and activated charcoal (AC) concentrations on total phenolic content (TPC) in the culture media for 12 weeks

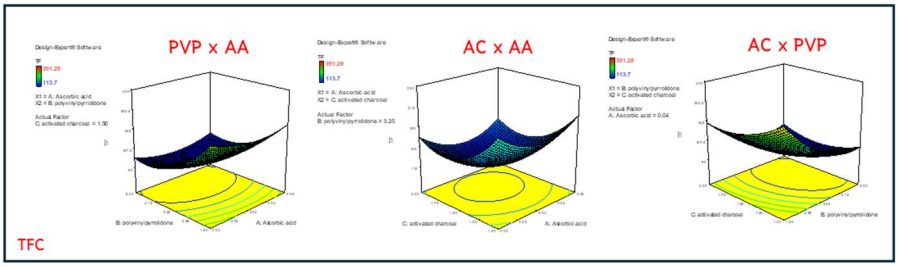


Figure 3 Three–dimensional response surface plots illustrating the effects of polyvinylpyrrolidone (PVP), ascorbic acid (AA), and activated charcoal (AC) concentrations on total flavonoid content (TFC) in the culture media for 12 weeks

สำหรับผลต่อปริมาณของ TTC แสดงรูปแบบการตอบสนองที่ตรงกันข้ามกับปริมาณของ TPC และ TFC โดยมีปฏิสัมพันธ์หลักระหว่าง AC x AA และ AC x PVP กราฟมีลักษณะเป็นพื้นผิวแบบชามหงาย (bowl shape) ลักษณะนี้แสดงถึงปริมาณของ TTC จะสูงถึงจุดสูงสุด (maximum) เมื่อใช้ปัจจัยที่ทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์กันในระดับความเข้มข้นปานกลางพร้อมกัน เพื่อให้ได้ปริมาณของ TTC ต่ำที่สุด จำเป็นต้องพิจารณาเลือกใช้ความเข้มข้นระดับปานกลาง และพิจารณาการเลือกใช้ปัจจัยเหล่านี้ในระดับต่ำมากหรือสูงมากเมื่อต้องการสภาวะที่เหมาะสม โดยปฏิสัมพันธ์ระหว่าง PVP x AA กราฟมีลักษณะแบบอานม้า โดยปริมาณของ TTC จะต่ำที่สุดเมื่อใช้ PVP ระดับสูงร่วมกับ AA ระดับต่ำ ดังภาพที่ 4 (Figure 4)

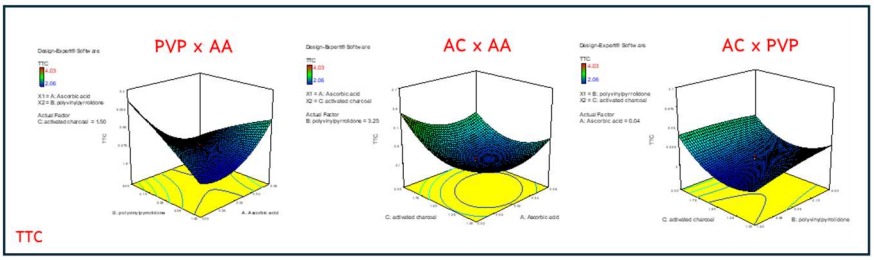


Figure 4 Three–dimensional response surface plots illustrating the effects of polyvinylpyrrolidone (PVP), ascorbic acid (AA), and activated charcoal (AC) concentrations on total tannin content (TTC) in the culture media for 12 weeks

เมื่อพิจารณาปริมาณของ TPC, TTC และ TFC พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยรวม ในการหาสภาวะที่สมดุลสำหรับลดสารประกอบทั้งหมดที่มีประสิทธิภาพเพื่อลดการเกิดสีน้ำตาล จึงพิจารณาเลือกสภาวะที่อยู่ระหว่างบริเวณที่มีปริมาณของ TPC และ TFC ต่ำสุด (ระดับปานกลาง) และบริเวณที่มีปริมาณของ TTC ต่ำสุด ดังนั้นสภาวะที่แบบจำลองที่เลือกจึงได้กำหนดให้สภาวะที่มีความเข้มข้นปานกลางของ AC, AA, และ PVP เนื่องจากความสามารถในการลดปริมาณของ TPC และ TFC มีอิทธิพลมากกว่าในการควบคุมการเกิดสีน้ำตาลโดยรวม

การทดลองที่ 2 การทวนสอบความถูกต้องของสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในการลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงหน่อกล้วยไข่

การทวนสอบความแม่นยำของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ระดับ ต่ำ กลาง สูง และสภาวะที่เหมาะสมต่อการลดการเกิดสีน้ำตาล โดยคัดเลือกสภาวะของปัจจัยที่ศึกษาในปริมาณต่ำ ปานกลาง มาก และปริมาณที่เหมาะสม คัดเลือกจำนวน 4 ทรีตเมนต์ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีสารสีน้ำตาลจากการปลดปล่อยจากชิ้นส่วนต้นกล้วยไข่ ดังภาพที่ 5 (Figure 5) เมื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการทางคณิตศาสตร์ (predicted value) กับค่าที่ได้จากการทดลอง (experimental value)

ของสารประกอบทั้งสามชนิดในแต่ละทรีตเมนต์ มีความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการทางคณิตศาสตร์และค่าที่ได้จากการทดลองมีความใกล้เคียงกันมาก เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ทางสถิติค่า p-value สำหรับ TPC (0.073), TTC (0.683) และ TFC (0.173) มีค่ามากกว่า 0.05 ในทุกกรณี แสดงถึงความไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการทางคณิตศาสตร์กับค่าที่ได้จากการทดลอง ดังตารางที่ 4 (Table 4) แสดงว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จากการทดลองมีความแม่นยำและยอมรับได้

Table 4 Validation of optimal conditions for reducing browning exudate production *in vitro Musa* (AA group) 'Kluai Khai' plantlets cultured for 12 weeks

Treatment	Total phenolic content (mg GA/100g)			Total tannin content (mg TA/100g)			Total flavonoid content (mg CE/100g)		
	Predicted Value	Experimental Value	% Error	Predicted Value	Experimental Value	% Error	Predicted Value	Experimental Value	% Error
T1	61.05	64.27	5.27	199.90	204.01	2.06	367.37	359.95	2.02
T2	50.53	52.06	3.03	220.51	223.14	1.19	114.44	115.06	0.54
T3	105.19	107.16	1.87	232.90	231.75	0.49	167.05	165.84	0.72
T4	34.94	35.09	0.43	220.95	218.23	1.23	113.70	108.89	4.23
T–value		−2.71			−0.45			1.78	
p-value		0.073			0.683			0.173	

เมื่อพิจารณาค่าของร้อยละความผิดพลาดของการทำนายสารประกอบทั้งสามชนิดในทุกทรีตเมนต์มีค่าอยู่ในช่วงที่ต่ำมาก (0.43% ถึง 5.27%) เนื่องจากไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีความน่าเชื่อถือและแม่นยำสูงมาก ในการทำนายปริมาณ TPC, TTC และ TFC ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไข่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด ดังตารางที่ 4 (Table 4) แสดงให้เห็นว่าสมการทางคณิตศาสตร์มีความเหมาะสมและมีความแม่นยำ ที่จะนำไปใช้ออกแบบการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่สามารถลดเกิดสีน้ำตาลต่อไปในระดับผู้ประกอบการหรือระดับอุตสาหกรรมได้



Figure 5 Morphological changes of *in vitro Musa* (AA group) 'Kluai Khai' plantlets for 6 and 12 weeks. Scale bar represents 1 cm

อภิปรายผล

การเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืชในสภาพปลอดเชื้อ เกิดจากสารทุติยภูมิกลุ่มฟีนอล เมื่อเนื้อเยื่อพืชได้รับบาดแผล อาจมาจากขั้นตอนการตัดแต่งชิ้นส่วนพืชในขั้นตอนต่าง ๆ จึงเกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase, peroxidase และ phenylalanine ammonia lyase แก้ไขโดยเลี้ยงชิ้นส่วนพืชในที่มืด (Amente & Chimdessa, 2021) หรืออาจเลือกใช้สารต้านอนุมูลอิสระเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น 2–(N–Morpholino) ethanesulfonic acid, citric acid หรือ ascorbic acid (AA) เพื่อยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล หรืออาจเติมตัวดูดซับ เช่น PVP หรือ AC จากการทดลองได้ทดสอบเติมตัวยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล ได้แก่ AA เนื่องจากในโครงสร้างโมเลกุลมีคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 เป็นหมู่ enediol group มีหน้าที่ช่วยให้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ AA เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพอย่างมากในการทำลายหรือทำให้ reactive oxygen species มีความเป็นกลางได้ (Kaewbon, 2015) อีกทั้งยังมีการวิจัยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดต้นกล้วยบนอาหาร MS เติม ascorbic acid (10–100 มิลลิกรัมต่อลิตร) citric acid (150 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ L–cysteine (2-40 มิลลิกรัมต่อลิตร) สารเหล่านี้ช่วยลดการการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนปลายยอดหน่อกล้วยในสภาพปลอดเชื้อได้ (Vuylsteke, 1998) รวมถึงการใช้สารอื่น ๆ เช่น PVP

โดยการวิจัยของ Kongphan et al. (2020) พบว่า การปลดปล่อยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของชิ้นส่วนปลายยอดของต้นกล้วยไข่เกษตรศาสตร์ 2 ที่ผ่านการคว้านยอด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ส่งผลให้มีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกรวมในอาหารโดยมีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนปลายยอดของชุดควบคุมที่ระยะเวลา 4, 8 และ 12 สัปดาห์ (3.58, 3.34 และ 3.06 ตามลำดับ) การคว้านยอดของชิ้นส่วนมีผลต่อการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกรวมในอาหารเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเลี้ยงผ่านไปเป็นระยะเวลา 4, 8 และ 12 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับ 3.34, 3.86 และ 5.92 ตามลำดับ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เนื่องจากชิ้นส่วนเจริญเติบโตขยายขนาดและเมื่อเปลี่ยนอาหารมีการตัดยอดและผ่าครึ่งชิ้นส่วนอีกครั้ง ทำให้ชิ้นส่วนเกิดบาดแผลเพิ่มขึ้น การปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจากความเครียดของชิ้นส่วนจึงเพิ่มขึ้น นอกจาก AA และ PVP มีการใช้ถ่านกัมมันต์เป็นตัวดูดซับสารประกอบฟีนอลิกจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเนื่องจากมีโครงสร้างของรูพรุนที่ละเอียดมากและมีพื้นที่ผิวภายในขนาดใหญ่ซึ่งสามารถดูดซับสารหลายชนิดได้ ผลของถ่านกัมมันต์ต่อการเกิดรูปร่างอาจเกิดจากการดูดซับสารยับยั้งในอาหารเพาะเลี้ยงและการลดลงของสารเมแทบอไลต์ที่เป็นพิษและสารประกอบฟีนอลิก (Thomas, 2008) โดยถ่านกัมมันต์สามารถช่วยลดเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนพืชต่อการชักนำโพรโทคอร์มไลค์บอดี้จากการใช้เทคนิคชิ้นบางของรองเท้านารีม่วงสงขลาให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนน้อยที่สุด 45.83% (Wattanapan et al., 2019) อีกทั้งการวิจัยของการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต้นอ่อนกล้วย *Musa* ‘Formosana’ ในสภาพปลอดเชื้อด้วยการเติม 0.01% AA (20.3 healthy plantlets) 10% PVP (4.7 healthy plantlets) และ 10% AC (2.0 healthy plantlets) มีประสิทธิภาพแตกต่างกันในการลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งต้นอ่อนกล้วยยังสามารถฟื้นฟูสภาพการเจริญให้กลับมาเป็นต้นปกติได้ 100% (n=23) เมื่อเลี้ยงบนอาหาร Smith and Murashige (SM) ที่เติม 0.01% AA โดยต้นกล้วยที่เลี้ยงในชุดควบคุมบนอาหาร SM ต้นกล้วยเกิดใบเป็นสีน้ำตาล (n=5) และตายเป็นจำนวนมาก (n=20) (Ko et al., 2009)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อทำนายสภาวะที่เหมาะสมในการลดการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนต้นกล้ากล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อนั้น พบว่า เป็นสมการทางคณิตศาสตร์ที่มีประสิทธิภาพ ในการสุ่มเลือกทรีตเมนต์ที่เหมาะสมที่สุด ที่ให้ผลการศึกษาที่ดีที่สุดใกล้เคียงกับทรีตเมนต์ที่เหมาะสมที่สุดในการลดอัตราการเกิดสีน้ำตาลจากชิ้นส่วนกล้วยไข่ในสภาพปลอดเชื้อ กล่าวคือ การใช้อาหารสูตร MS (1962) ที่เติม AA 0.03 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ PVP 3.325 กรัมต่อลิตร และ AC 1.48 กรัมต่อลิตร ดังนั้น การวางแผนการทดลองสุ่มเลือกทรีตเมนต์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการศึกษาในครั้งนี้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร (ทุนสนับสนุนด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม พื้นฐาน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 รหัสโครงการวิจัย 193028) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นางอ่อนรัตน์ สาพาที หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และนางสาวรัชนีกร โพธิ์ไกร ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางอาหารและวัสดุสัมผัสอาหาร สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือ สำหรับทำวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้

เอกสารอ้างอิง

Ahmad I, Hussain T, Ashraf I, Nafees M, Maryam RM, Iqbal M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. American–Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 2013;13(4):539–547.

Amente G, Chimdessa E. Control of browning in plant tissue culture: A review. Journal of Scientific Agriculture 2021;5:67–71.

Babu P. An efficient protocol for *in vitro* regeneration of banana var. Nanjangudu rasabale (*Musa* spp. AAB). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2019;8(6):3392–3402.

Halee A, Supavititpatana P, Ruttarattanamongkol K, Jittrepotch N, Rojsuntornkitti K, Kongbangkerd T. Effects of solvent types and citric acid concentrations on the extraction of antioxidants from the black rice bran of *Oryza sativa* L. cv. Hom Nin. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 2018;8(2):765–769.

Kaewbon P. Inhibition of browning agents in bisected protocorm-derived callus of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Swartz). Ph.D. Thesis. Prince of Songkla University; 2015.

Ko WH, Su CC, Chen CL, Chao CP. Control of lethal browning of tissue culture plantlets of Cavendish banana cv. Formosana with ascorbic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2009;96:137–141.

Kongphan P, Theanhom AA, Jaruwattanaphan T. Size and cutting pattern of explant for micropropagation of *Musa* (AA Group) 'Kluai Khai Kasetsart 2'. Thai Science and Technology Journal 2020;28(12):2164–2172.

Luecha P, Trunjaruen A, Suraporn S, Yaowachai W, Maneerattanarungroj P, Kunpratum N, Taratima W. et al. Optimization of phytochemical content and DPPH scavenging activity from pokeweed (*Phytolacca americana* L.) callus using Response Surface Models. International Journal of Agriculture and Biosciences 2024;13(3):356–366.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 1962;15:473–497.

Ndakidemi CF, Mneney E, Ndakidemi PA. Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in *in vitro* culture of *Brahylaena huillensis* using nodal segments. American Journal of Plant Sciences 2014;5:187–191.

Ngomuo M, Mneney E, Ndakidemi P. Control of lethal browning by using ascorbic acid on shoot tip cultures of a local *Musa* spp. (banana) cv. Mzuzu in Tanzania. African Journal of Biotechnology 2014;13(16):1721–1725.

Pradubsri W, Chomtee B, Thongteeraparp A. A study of small response surface designs for the full second order model and a set of reduced models in a spherical region. Thai Science and Technology Journal 2015;23(3):362–376.

Silayoi, B. Banana. (2nd ed.). Bangkok: Kasetsart University; 1995.

Somjaipeng S, Krasang K, Sopa P, Noychaipruk C. The application of response surface methodology to predict the radial growth rate of aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi*: the effect of climate change factors. Khon Kaen Agriculture Journal 2017;4(1):1140–1416.

Thomas TD. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances 2008;26(6):618–631.

Vuylsteke DR. Shoot-tip culture for the propagation conservation, and distribution of *Musa* germplasm. Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture; 1998.

Wattanapan N, Srichuay W, Klinnawee L, Meesawat U. Effects of anti-browning agents on protocorm-like body induction using thin cell layers of endangered lady's slipper orchid: *Paphiopedilum callosum* var. *sublaeve*. Princess of Naradhiwas University Journal 2019;11(1):107–116.

Wongsa T, Inthima P, Kongbangkerd A. Effect of cytokinins and explant preparation on *in vitro* shoot multiplication in *Musa* (AA group) 'Khai Kamphaeng Phet'. YRU Journal of Science and Technology 2021a;6(2):171–180.

Wongsa T, Jacksri, N, Kongbangkerd A. Effect of culture media and sucrose concentrations on *in vitro* young shoots storage of *Musa* (AA group) 'Khai Kamphaeng Phet'. Udon Thani Rajabhat University Journal of Sciences and Technology 2021b;9(2):139–151.