

การสำรวจมันสกุล *Dioscorea* และผลของสารสกัดหยาบแป้งต่อการเจริญของแบคทีเรีย

Survey of *Dioscorea* spp. and Effect of Crude Starch Extract on Growth of Bacteria

ณัฐวุฒิ มีศิลป์* และกุนธิกา บุญสุภาวงศ์

Nutthawut Meesilp* and Kunthika Boonsuphawong

สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน นครราชสีมา

Department of Applied Biology, Faculty of Science and Liberal Art, Rajamangala University of Technology Isan, Nakhon Ratchasima Thailand

*Corresponding author; E-mail: nutthawutm@hotmail.com

Received: 19 December 2023 /Revised: 15 April 2024 /Accepted: 23 April 2024

บทคัดย่อ

ระบบนิเวศเกษตรประกอบด้วยปฏิสัมพันธ์องค์ประกอบต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมระหว่างพืช จุลินทรีย์ และดินทำให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ของดิน มันสกุล *Dioscorea* เป็นพืชมีหัวใต้ดินสะสมสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยแป้งและน้ำตาล ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจมันสกุล *Dioscorea* จากป่าแห้งแล้ง และศึกษากลุ่มประชากรแบคทีเรียจากมันสกุล *Dioscorea* ที่เจริญเติบโตในดินที่ไม่ใส่ปุ๋ยบำรุง จากการสำรวจมันสกุล *Dioscorea* จากป่าเต็งรัง โดยพบมันที่สำรวจได้มีลักษณะทางกายภาพคล้ายกับมันเทียน (*Dioscorea myriantha* Kunth) และมันเลือด (*Dioscorea alata* L.) คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลตจากตัวอย่างดินรอบรากและหัวพืช เมื่อแบ่งตามลักษณะแหล่งอาศัยของแบคทีเรีย ได้แก่ แบบอิสระ และแบบอาศัยกับพืช ได้จำนวน 28 และ 28 ไอโซเลต ตามลำดับ การจัดจำแนกแบคทีเรียเบื้องต้นตามการติดสีย้อมของเซลล์เป็นแกรมบวกจำนวน 31 และแกรมลบ 25 ไอโซเลต มีรูปร่างเซลล์แบบต่าง ๆ ได้แก่ ทรงกลม แท่ง รี และเส้นสาย ลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ ได้แก่ สีขาวถึงเหลือง รูปร่างกลมถึงไม่แน่นอน ความสูงแบนถึงนูน และขอบเรียบถึงหยัก การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมดจากมันเทียน (5.94 g/ μ L) สูงกว่ามันเลือด แป้งที่สกัดได้จากมันสกุล *Dioscorea* ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าแป้งที่ไม่ผ่านการย่อย การใช้สารสกัดแป้งจากมันสกุล *Dioscorea* เพาะเลี้ยงแบคทีเรียมีการเจริญของไอโซเลต EN1 และ FR1 มากที่สุด โดยสรุปมันสกุล *Dioscorea* spp. ที่สำรวจได้จากป่าพบว่ามีแบคทีเรียอาศัยอยู่ทั้งในพืชและดินรอบรากโดยปรากฏลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน รวมทั้งมีปริมาณแป้งทั้งหมดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน สามารถนำแป้งมาย่อยเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเป็นพลังงานของจุลินทรีย์ในการเจริญ

คำสำคัญ: มันเทียน มันเลือด แป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ แบคทีเรีย



Abstract

Agroecosystems consist of several interactions of components between plants, microbes and soil in natural environments for maintaining soil fertility. *Dioscorea* spp. are important tuber plants and serve as a source of carbohydrates containing starch and sugar. Thus, the research aimed to survey tuber plants in *Dioscorea* spp. from dry forest and discover bacterial community associated with *Dioscorea* spp. growing in areas without the application of fertilizer. *Dioscorea* spp. surveyed from dry dipterocarp forest showed highly expressed similarity of physical characteristics to *Dioscorea myriantha* Kunth and *Dioscorea alata* L. A total of 56 bacterial isolates obtained from rhizosphere soil and plant tuber were divided into the groups of free-living and endophytic bacteria as 28 and 28 isolates, respectively. All bacteria were preliminarily classified into 31 gram-positive and 25 gram-negative bacterial isolates with the shape of cells as coccus, bacillus, coccobacilli, and filamentous. The most colony characteristics growing on culture medium demonstrated small to large size, white to yellow, circular to irregular shape, flat to convex elevation, and entire to irregular margin. Analysis of total starch content from *Dioscorea myriantha* Kunth sample exhibited higher content (5.94 g/ μ L) than *Dioscorea alata* L. Hydrolyzed starch extract from *Dioscorea* spp. with acid displayed a higher amount of reducing sugar than non-hydrolyze. The application of crude starch extract supplementing in a culture medium showed highly enhanced growth of the EN1 and FR1 isolates. In conclusion, discovered *Dioscorea* spp. from the forest presented bacterial populations living in the plant and rhizosphere soil by exhibiting different morphologies. In addition, the plants comprised the average total starch without different values. This starch could be digested into the monosaccharide and applied as the carbon source of culture media to support the energy for microbial growth.

Keywords: *Dioscorea myriantha* Kunth, *Dioscorea alata* L., Starch, Reducing sugar, Bacteria

บทนำ

ระบบนิเวศเกษตร (Agroecosystems) เป็นระบบที่มีความซับซ้อน ประกอบด้วย ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้แก่ พืช สัตว์ จุลินทรีย์ และดิน ทำให้เกิดการหมุนเวียนของสาร ในระบบนิเวศ ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และดินช่วยส่งเสริมความอุดมสมบูรณ์และช่วยรักษาคุณภาพของระบบนิเวศเกษตร พืชไรที่จัดเป็นพืช

อาหารหลักประกอบด้วย 9 ชนิด ได้แก่ ข้าว อ้อย ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง ถั่วเหลือง ปาล์ม น้ำมัน ชูการ์บีท และมันสำปะหลัง นอกจากนี้ยังมีมันเลือด (*Dioscorea* spp.) เป็นพืชที่มีหัวใต้ดินพบจำนวนมากในแถบแอฟริกาตะวันตกสามารถนำมาใช้เป็นอาหารที่สำคัญ โดยมีการผลิตประมาณ 67 ล้านตัน และร้อยละ 94 ของมันเลือดที่ผลิตได้จากทั่วโลก¹

มันสกุล *Dioscorea* หรือแย้ม (Yam) เป็นมันพื้นบ้านจัดอยู่ในวงศ์ *Dioscoreaceae* มีชื่อเรียกต่างกันแต่ละท้องถิ่นตามลักษณะรูปร่างของหัวใต้ดิน เช่น มันหวาน มันแข้งข้าง มันเลือด มันดำ มันเหลื่อม มันเส้า มันทุ้ เป็นต้น ลักษณะของหัวมันเลือดจะเป็นสีแดงเรื่อ หรือสีแดงม่วง ลำต้นมีปีก (Wing stems)² ส่วนหัวมันเลือดมีประโยชน์ในการใช้เป็นอาหารที่สำคัญทดแทนข้าวได้ที่มีแหล่งของสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ซึ่งการนำหัวมันเลือดมาบริโภคโดยไม่มีการปลูกทดแทนในธรรมชาติส่งผลให้มีปริมาณลดน้อยลง นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ได้แก่ การล้างพิษในร่างกาย เป็นต้น สารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่าง ๆ เช่น แป้ง น้ำตาล โปรตีน กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย และแร่ธาตุอาหารที่มีประโยชน์ต่าง ๆ เช่น แคลเซียม (Ca) โพแทสเซียม (K) โซเดียม (Na) แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) โคบอลต์ (Co) ทองแดง (Cu) แมงกานีส (Mn) และกรดโฟลิก (Folic acid) กลุ่มของสารสีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เช่น สารแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) และแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) โดยแอนโทไซยานินเป็นสารให้สีตามธรรมชาติ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ที่ละลายน้ำได้ประกอบด้วย 6 ชนิด ได้แก่ พีลาร์โกนิน (Pelargonidin) ไชยานิน (Cyanidin) เดลฟินิดิน (Delphinidin) พีโอนิดิน (Peonidin) เพทูนิดิน (Petunidin) และมอลวิดิดิน (Malvidin)³ สารแอนโทไซยานินมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว มีฤทธิ์สูงกว่าวิตามินซี และวิตามินอี กลุ่มของ

วิตามิน เช่น ไทแอมิน (Thiamine, B1) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin, B2) ไนอะซิน (Niacin, B3) เรตินอล (Retinol, A) กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid, C) และ สเตียรอยด์ซาโปนิน (Steroid saponin) ความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารต่าง ๆ ในหัวมันเลือดโดยเฉพาะกลุ่มของสารคาร์โบไฮเดรตที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon source) แหล่งของพลังงานจึงเหมาะสำหรับการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ต่าง ๆ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ^{4,5}

จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่พบได้ในมันสกุล *Dioscorea* มีการดำรงชีวิตในส่วนลำต้นและหัวพืชรวมทั้งดินรอบ ๆ ราก ซึ่งความหลากหลายของจุลินทรีย์ขึ้นกับชนิดของมันและลักษณะของบริเวณที่พืชเจริญเติบโต ได้แก่ แร่ธาตุอาหาร ความชื้น สารอินทรีย์ เป็นต้น การเจริญของมันในดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ส่วนใหญ่จะพบกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมันสกุล *Dioscorea* โดยแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์มีรายงานพบความสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting bacteria) ด้วยกระบวนการต่าง ๆ ได้แก่ การตรึงก๊าซไนโตรเจน (N_2 -fixing) การละลายฟอสเฟต (Phosphate solubilization) การละลายโพแทสเซียม (Potassium solubilization) และการสร้างฮอร์โมนพืช Indole-3 acetic acid (IAA)⁶ เช่น *Allorhizobium* sp., *Neorhizobium* sp., *Pararhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Caballeronia* sp., และ *Paraburkholderia* sp. เป็นต้น โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถพบได้ในมันเลือด (*Dioscorea alata*) ซึ่งมีเจริญเติบโตได้ดีในดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยบำรุงดิน

แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ มีความจำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจะใช้เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของเซลล์ สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ แป้ง และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่พบในมันสกุล *Dioscorea* สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อราและแบคทีเรีย ดังนั้นจากกลุ่มสารคาร์โบไฮเดรตจึงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและการเจริญของประชากรของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในดินรอบรากพืช (Free-living microorganisms) และ อาศัยอยู่ในส่วนลำต้นของพืชแบบพึ่งพาอาศัย (Symbiosis หรือ Endophytic microorganisms)⁷ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้สำรวจมันสกุล *Dioscorea* จากพื้นที่ป่าเต็งรัง และคัดแยกแบคทีเรียจากดินรอบรากหัวพืช

วิธีการดำเนินการวิจัย

1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างมัน

สำรวจชนิดและเก็บตัวอย่างมันสกุล *Dioscorea* และดินบริเวณที่เจริญเติบโตในเขตพื้นที่ป่าอนุรักษ์หนองระเวียง จังหวัดนครราชสีมา โดยบ่งชี้ชนิดสายพันธุ์ของมันสกุล *Dioscorea* และนำมาคัดแยกแบคทีเรียที่อาศัยแบบพึ่งพากับมันเลือด และแบบอิสระในดินรอบ หัวพืชในห้องปฏิบัติการ

2 การคัดแยกแบคทีเรีย

นำตัวอย่างหัวมันเลือดมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นชั่งน้ำหนัก 25 กรัม แล้วทำให้ปลอดเชื้อด้วยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เข้มข้นร้อยละ 7 และเอทานอล (C₂H₅OH) เข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลาอย่างละ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ นำมาอบให้ละเอียดและเพิ่มปริมาณสารละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร

สำหรับดินรอบ หัวพืช (Rhizosphere soil) ซึ่งตัวอย่าง 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมันบดและสารละลายดินอย่างละ 1 มิลลิลิตรมาเจือจางในสารละลายเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วคัดแยกแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีความแตกต่างกันมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ เก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3 การศึกษาลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรีย

ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ได้แก่ ขนาด สี ผิวหน้า ขอบ และ ความหนูน เป็นต้น จากนั้นศึกษาพื้นฐานวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ การติดสี และรูปร่างเซลล์ ด้วยการย้อมแกรมตามวิธีมาตรฐานแล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x

4 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

4.1 การเตรียมตัวอย่าง

ทำความสะอาดตัวอย่างมันสกุล *Dioscorea* ที่สำรวจได้ ล้างด้วยน้ำประปา จากนั้นหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ นำมาอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบั่นให้ละเอียด จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงความละเอียดขนาด 100 Mesh ซึ่งน้ำหนักผงมันเลือด 0.3-0.5 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปริมาตรสารละลายเป็น 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บตะกอนแบคทีเรียที่ตะกอนที่ได้อีกครั้งด้วยน้ำกลั่น นำตะกอนที่ล้างแล้วทำเป็นสารละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่เม็ดบีดและกวนพร้อมให้ความร้อนจนถึง 100 องศาเซลเซียส แล้วกรองกาก

มัน ล้างตะกอนอีกครั้งด้วยน้ำร้อนจนได้ปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร ทำให้เย็นและเจือจางในอัตราส่วน 1:10 ก่อนทำการวิเคราะห์

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

เติมสารละลายไอโอดีนปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงในสารละลายแป้งสกัดได้จากมันเลือดที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร คำนวณปริมาณแป้งจากกราฟสารละลายแป้งมาตรฐาน (mg/ml)⁹

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำตัวอย่างสารละลายน้ำแป้งที่เตรียมไว้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCL) และกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ที่มีความเข้มข้น 0.5 N และ 1 N ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 90-98 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้เป็นเวลา 5-20 นาที แล้วทำให้เย็นทันที ปรับค่ากรดต่าง ให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1 N หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย 3,5-Dinitro salicylic acid (DNS) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต้มในน้ำร้อนเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 250 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นในตัวอย่างกับกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน⁹

4.4 การทดสอบการเจริญของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการย่อยสลายแป้งมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานเหลว (Basic medium) ที่มีการเติมสารสกัดแป้งจากมันเลือดร้อยละ 10 (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอนอย่าง

เดียว จากนั้นนำบ่มแบบเขย่าที่ 120 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทุก 2 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Dilution plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1 การศึกษาประเภทมันเลือด

ตัวอย่างมันสกุล *Dioscorea* ที่สำรวจได้จากป่าเต็งรังในพื้นที่อนุรักษ์หนองกระเวียง จังหวัดนครราชสีมา จำแนกได้ 2 ชนิด ตามลักษณะรูปร่างของหัวใต้ดินเป็นสำคัญจึงเรียกชื่อตามลักษณะดังกล่าว ได้แก่ มันเทียน (*Dioscorea myriantha* Kunth) (Figure 1) ซึ่งลักษณะหัวใต้ดินเป็นแท่งยาวสีขาว น้ำตาลอ่อน คล้ายลำเทียน มีเครือ ใบเป็นสีเขียว และลำต้นเป็นเหลี่ยม และมันเลือด (*Dioscorea alata* L.) (Figure 2) มีลักษณะหัวใต้ดินเป็นก้อนรูปร่างไม่แน่นอน ได้แก่ กลม รี หรือหยัก หัวพืชมีผิวสีน้ำตาล เนื้อในหัวมีสีขาว และขาวปนม่วงถึงสีม่วงเข้ม มีใบเป็นสีม่วงและสีเขียว ลำต้นเป็นเครือลักษณะเหลี่ยมมีสีม่วงและเขียว¹⁰



Figure 1 . Characteristic of *Dioscorea myriantha* Kunth in the part of tuber (A) and leaves (B)

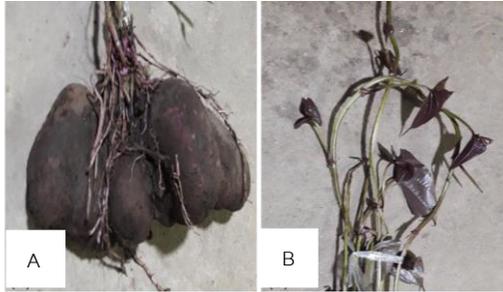


Figure 2. Characteristic of *Dioscorea alata* L., in the part of tuber (A) and leaves (B)

2 การตัดแยกแบคทีเรีย

ตัวอย่างมันสำปะหลัง *Dioscorea* สักรวจได้จากพื้นที่ป่าเต็งรังที่มีสภาพดินแบบร่วนปนทรายไม่มีการใส่ปุ๋ยบำรุงดินแต่มีการเจริญเติบโตที่ดีสามารถพบแบคทีเรียทั้งหมด 56 ไอโซเลต

โดยการตัดแยกจากตัวอย่างดินรอบรากพืชพบแบคทีเรียในกลุ่มอากซีออยอย่างอิสระจำนวนทั้งหมด 28 ไอโซเลต สำหรับตัวอย่างพืชประกอบด้วย หัวมัน ใบบ และลำต้นพบแบคทีเรียกลุ่มที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชจำนวนทั้งหมด 28 ไอโซเลต ทั้งตัวอย่างมันเทียนและมันเลื่อมมีปริมาณแบคทีเรียรวมทั้งหมดใกล้เคียงกันดังแสดงใน Table 1 การเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะโคโลนีปรากฏดังนี้ สีขาวและเหลือง รูปร่างกลม (Circular) และ ไม่แน่นอน (Irregular) ความสูงแบน (Flat) ถึงนูน (Raised) ขอบเรียบ (Entire) และหยัก (Lobate)

Table 1. Amount of bacterial isolates from *Dioscorea* spp. tuber and rhizosphere soil samples

<i>Dioscorea</i> spp. Samples	Amount of bacteria (isolates)		
	Rhizosphere soil	Tuber	Leaves and stem
<i>Dioscorea myriantha</i> Kunth (purple vine with angle)	12	ND	7
<i>Dioscorea myriantha</i> Kunth (green vine with angle)	7	ND	5
<i>Dioscorea alata</i> L. (purple leaves)	6	10	1
<i>Dioscorea alata</i> L. (green leaves)	3	2	3
Total	28	12	16

ND: not detect

3 ความหลากหลายของแบคทีเรีย

จากการศึกษาพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียที่ตัดแยกได้ทั้งหมดแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ติดสีแดงของสารซาฟรานินโอ (Safranin O) จำนวน 25 ไอโซเลต และแกรมบวกที่ติดสีม่วงของสารคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) จำนวน

31 ไอโซเลต ดังแสดงใน Figure 3 แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบเป็นแกรมบวกมีลักษณะรูปร่างของเซลล์เป็นแบบแท่ง (Bacilli) ร้อยละ 28 และแกรมลบทรงรี (Cocobacilli) ร้อยละ 28 และไม่พบแบคทีเรียที่มีลักษณะเซลล์เป็นเส้นสายแกรมลบ แบคทีเรียที่ตัดแยกได้ถูกทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการ

เจริญเติบโตของพืช พบความสามารถต่าง ๆ ได้แก่ การตรึงก๊าซไนโตรเจนจากบรรยากาศ (N₂) การละลายฟอสเฟต และการสร้างฮอร์โมนพืช IAA จำนวนร้อยละ 83.33, 66.67 และ 80.86 ของแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้ ตามลำดับ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มันเลือดสามารถเจริญได้ดีในพื้นที่ป่าที่ขาดความอุดมสมบูรณ์และการบำรุงดิน ดังนั้นความหลากหลายของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมีความสำคัญที่ช่วยเพิ่มโอกาสให้พืชเจริญเติบโตรอดชีวิตได้

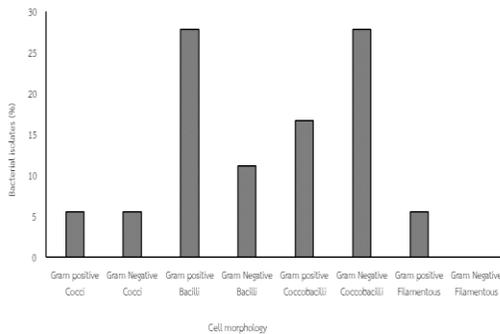


Figure 3. Amount of bacterial isolates divided base on gram staining and cell morphology

4 ปริมาณแป้งทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์

จากการวิเคราะห์สารกักตุนแป้งจากหัวพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่ามันเทียนมีปริมาณแป้งทั้งหมด (Total starch) สูงกว่ามันเลือด ดังแสดงใน Figure 4 และเมื่อนำสารกักตุนแป้งหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรด (Hydrolyzed) มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าตัวอย่างแป้งจากตัวอย่างมันทั้ง 2 ชนิดมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามการย่อยสลายแป้งด้วยวิธีการทางเคมีสามารถเกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้มากกว่าแป้งที่ไม่มีการย่อยสลายด้วยกรด (Non-hydrolyzed) ดังแสดงใน Figure 5

นอกจากนี้การย่อยสลายแป้งทางเคมีด้วยกรดเป็นวิธีการเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ยังมีวิธีการทางชีวภาพที่เกิดจากกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์มาย่อยสลายโครงสร้างของแป้งเกิดเป็นสารโมเลกุลเล็กลง จากรายงานการวิจัยของ Shajeela และคณะ¹¹การวิเคราะห์ปริมาณแป้งในมันเลือด (*D. alata* L.) พบปริมาณแป้งสะสมปริมาณร้อยละ 49.13 w/w น้อยกว่ามันเทียนที่มีปริมาณแป้งร้อยละ 81.70 w/w เนื่องจากมันเลือดมีองค์ประกอบเป็นน้ำร้อยละ 65-76 w/w ซึ่งปริมาณน้ำสูงกว่ามันเทียน สามารถสังเกตได้จากลักษณะของหัวใต้ดินของพืชทั้ง 2 ชนิดที่มีความแตกต่างกัน พืรดา สูดประเสริฐ และคณะ¹²วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของแป้งด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ลักษณะโครงสร้างผลึกแป้งมีลักษณะเซลล์เป็นแบบเฮกซะโกนัล (Hexagonal unit cell) ที่ประกอบด้วยโมเลกุลน้ำ 36 โมเลกุล แตกต่างจากโครงสร้างที่เป็นแบบโมโนคลินิก (Monoclinic unit cell) ที่ประกอบด้วยน้ำ 8 โมเลกุล

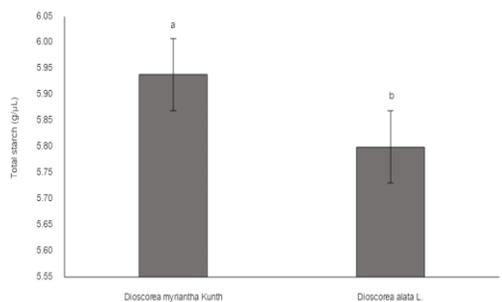


Figure 4 . Analysis of total starch from *Dioscorea myriantha* Kunth and *Dioscorea alata* L. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's test).

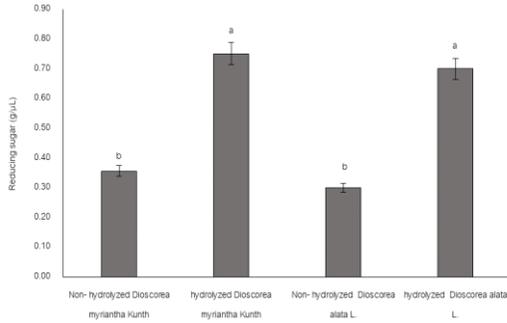


Figure 5 . Analysis of reducing sugar from *Dioscorea myriantha* Kunth and *Dioscorea alata* L. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$, Duncan's test).

5 ผลของสารสกัดหยาบแป้งต่อการเจริญของแบคทีเรีย

แบคทีเรียทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้แสดงกิจกรรมการย่อยสลายแป้ง (Soluble starch) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch medium โดยแบคทีเรียไอโซเลต EN1 และ FR1 ที่คัดแยกได้จากพืชและดินรอบรากตามลำดับ พบกิจกรรมเชิงคุณภาพของเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) สูงสุดซึ่งสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้น (Clear zone) หลังจากการทดสอบละลายไอโอดีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงนำมาศึกษาการเจริญด้วยสารสกัดหยาบแป้งจากหัวมันเลือดที่มีปริมาณแป้งทั้งหมดสูงสุดโดยนำแป้งมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต EN1 และ FR1 แสดงช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (Exponential phase) เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง หลังจากนั้นยังมีการเจริญของแบคทีเรียอย่างช้า ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเวลา 6-8 ชั่วโมงของการบ่มเชื้อ ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลต FR1 มีการเจริญโดยเฉลี่ยมากกว่าไอโซเลต EN1 ดังแสดงใน Figure 6

จุลินทรีย์ต่าง ๆ เมื่อมีการเจริญจะต้องการแหล่งคาร์บอนใช้เป็นพลังงานและกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ กลีเซอรอล และแป้ง เป็นต้น แบคทีเรียสามารถเจริญและแบ่งเซลล์ได้อย่างรวดเร็วเมื่อมีการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Mono-saccharide) ได้แก่ กลูโคส และฟรุกโตส ในขณะที่สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลใหญ่ (Macromolecule) เช่น แป้ง ต้องมีการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลเล็กลง ส่วนใหญ่การย่อยสลายแป้งจะใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) ที่เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสเช่นเดียวกัน¹³ โครงสร้างของแป้งที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดสามารถปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวิซ์ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้อย่างรวดเร็วโดยเกิดปฏิกิริยาภายในเซลล์ผ่านวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) ที่ให้สารพลังงานสูง (Adenosine triphosphate, ATP)¹⁴

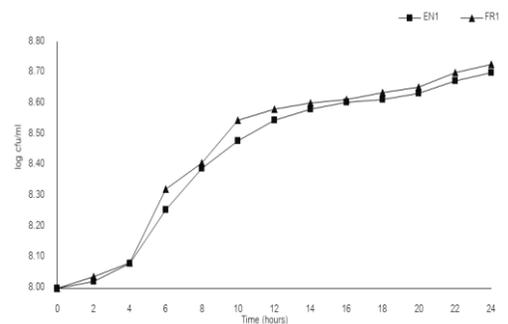


Figure 6 . Growth of bacteria in culture medium by using crude starch extract from *Dioscorea myriantha* Kunth as carbon source

ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดหยาบแบ่งจากมันเลือดได้ต้องมีการผลิตเอนไซม์สำคัญดังกล่าวเพื่อย่อยสลายโมเลกุลของแป้งให้เกิดเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถนำไปใช้สำหรับการเจริญของเซลล์ได้ แบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโมเลกุลของแป้งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเกิดไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ที่ตำแหน่งพันธะไกลโคซิดิกพบได้ทั้งเอนไซม์ผลิตภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) และผลิตแล้วส่งออกมา นอก เซลล์ (Extracellular enzyme) ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส (α -amylase) และเบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) สามารถนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการต่าง ๆ ที่สำคัญ เช่น อุตสาหกรรมทอผ้า การทำน้ำผลไม้ให้ใส การผลิตแอลกอฮอล์ การผลิตกลูโคส และการผลิตน้ำเชื่อม เป็นต้น แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ เช่น *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus* และ *Clostridium* sp. กลุ่มเชื้อรา เช่น *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, และ *A. candidus* กลุ่มยีสต์ เช่น *Candida* sp., *Pichia* sp., *P. acacia*, *Sporolomyces* sp. และ *Torulopsis* sp. แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้ เช่น *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Oenococcus oeni*, *Oenococcus kitaharae*, *Pediococcus*, และ *Leuconostoc mesenteroides*¹⁵⁻¹⁶

สรุปผลการวิจัย

มันเลือดที่สำรวจพบทั้ง 2 ชนิด จากป่าเต็งรัง ได้แก่ มันเทียน (*Dioscorea myriantha* Kunth) และมันเลือด (*Dioscorea alata* L.) ซึ่งมี

ปริมาณแป้งทั้งหมดโดยเฉลี่ยใกล้เคียงกัน สามารถย่อยสลายแป้งที่สกัดได้จากหัวพืชด้วยวิธีทางเคมีได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารสกัดหยาบแบ่งจากมันเลือดเป็นแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญของแบคทีเรียรวมทั้งการผลิตเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเบต้ากลูโคซิเดส เป็นต้น ดังนั้นหัวพืชจึงเป็นแหล่งสะสมของสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตทำให้มีความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียที่อาศัยร่วมอยู่ด้วย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ศูนย์อนุรักษ์และพัฒนาทรัพยากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนกลาง ประจำปีงบประมาณ 2564

เอกสารอ้างอิง

1. อาทิตยา พงษ์พรหม. ความรู้เบื้องต้นด้านนิเวศเกษตรเพื่อการประยุกต์ใช้ในระบบเกษตรกรรมยั่งยืน. สัมภาษณ์และถ่ายทอดเทคโนโลยีสำนักงานการปฏิรูปที่ดินเพื่อเกษตรกรรม 2561;588:1-62.
2. Wilkin P, Thapayai C. *Dioscoreaceae*: Flora of Thailand. Forest Herbarium, Royal Forest Department 2009;10:1-40.
3. Wickramasinghe HAM, Takigawa S, Matsuura-Endo C, Yamauchi H, Noda T. Comparative analysis of starch properties



- of different root and tuber crops of Sri Lanka. Food Chem 2009;112:98-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.046>.
4. Wanasundera JPD, Ravindran G. Nutritional assessment of yam (*Dioscorea alata*) tubers. Plant Foods Hum Nutr 1994;46:33-39. <https://doi.org/10.1007/BF01088459>.
 5. Srivichai S, Hongsprabhas P. Profiling anthocyanins in Thai purple Yams (*Dioscorea alata* L.). Int J Food Sci 2020;2020:1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/1594291>.
 6. Kihara S, Yamamoto K, Hisatomi A, Shiwa Y, Chu CC, Takada K, et al. Bacterial community of water Yam (*Dioscorea alata* L.) cv. A-19. Microbes Environ 2022;37:1-8. <https://doi.org/10.1264/jjsme2.ME21062>.
 7. Subroto E, Jeanette G, Meiyanasari Y, Luwinsky I, Baraddiaz S. Review on the analysis methods of starch, amylose, amylopectinin food and agricultural products. Int J Emerg Trends Eng Dev 2020;8:3519-24. <https://doi.org/10.30534/ijeter/2020/103872020>.
 8. Bahdanovich P, Axelrod K, Khlystov AY, Samburova V. Optimized spectrophotometry method for starch quantification. Analytica 2022;3:394-405. <https://doi.org/10.3390/analytica304002>.
 9. Negrulescu A, Patrulea V, Mincea MM, Ionascu C, Vlad-Oros BM, Ostafe V. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. J Braz Chem Soc 2012;23:2176-82. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532013005000003>.
 10. น้อยนุช สารภี, ปิยะรัตน์ มีแก้ว, ยุพเยาว์ โตศิริ, ชัยพันธุ์ สารภี. ความหลากหลายชนิดของพืชหัวกินได้ในท้องถิ่นจังหวัดสุรินทร์. PSRU J Sci Tech 2019;4:43-53. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/atj/article/view/251441>.
 11. Shajeela PS, Mohan VR, Louis Jesudas L, Tresina Soris P. Nutrition and annutrition evaluation of wild yam (*Dioscorea* spp.). Tropical and Subtropical Agroecosystems, 2011;14:723-30.
 12. พิรดา สูดประเสริฐ, กรณัญญ์ นาคภิบาล, วิจิตร วิไลรัมย์. ลักษณะเมล็ดแป้งและโครงสร้างทางเคมีของแป้งจากมันท้องถิ่นกลุ่ม *Dioscorea* spp. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2;31:18-32.
 13. Lee BH, Eskandari R, Jones K, Reddy KR, Quezada-Calvillo R, Nichols BL, et al. Modulation of starch digestion for slow glucose release through “Toggling” of activities of mucosal β -glucosidases. THE



- J Biol Chem 2012;287:31929-38.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.351858>
14. Petushkova E, Mayorova E, Tsygankov A. TCA cycle replenishing pathways in photosynthetic purple non-sulfur bacteria growing with acetate. *Life* 2021;11:1-37.
<https://doi.org/10.3390/life11070711>.
15. Far BE, Ahmadi Y, Khosroushahi AY, Dilmaghani A. Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. *Adv Pharm Bull* 2020;10:350-8. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.043>.
16. Michlmayr H, Schümann C, Wurbs P, Nuno M, Silva BB, Rogl V, et al. A β -glucosidase from *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 with potential for aroma release in wine: cloning and expression in *E. coli*. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;26:1281-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0299-5>.