บทที่ 4
บทวิจารณ์และสรุป

งานวิจัยหลักของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ คือ ศึกษาความเป็นไปได้ในการคัดเลือกเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงที่สามารถผลิตสารแอนโธไซยานินได้สูง ด้วยวิธีการคัดเลือกเซลล์ที่ได้จากการกระจายเซลล์ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงแล้วนำแคลลัสที่คัดเลือกได้ไปศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อการเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย หลังจากนั้นจึงใช้ข้อมูลที่ได้ ไปขยายระดับการผลิตแอนโธไซยานินโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

4.1 การคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงด้วยวิธีการกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง

การที่กลุ่มเซลล์พืชสามารถผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิเป้าหมายให้ได้ปริมาณสูงนั้นเนื่องมาจากพื้นฐาน 2 ประการ คือ มีสัดส่วนของเซลล์ที่ผลิตสารเป้าหมาย (productive cells) ต่อประชากรเซลล์ทั้งหมดสูง และ/หรือสารเป้าหมายที่ผลิตได้ ต่อเซลล์มีระดับสูง แต่เนื่องด้วยเซลล์พืชเพาะเลี้ยงมีลักษณะความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (heterogeniety) มาก อาจเนื่องจากเซลล์พืชเพาะเลี้ยง ทั้งที่เป็นแบบแคลลัสหรือเซลล์แขวนลอย มีต้นกำเนิดจากชิ้นส่วนของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์หลายลักษณะ เช่น เซลล์เมอริสเตม, เซลล์พาเรนไคมา และเซลล์อิพิเดอมิส เป็นต้น ซึ่งก็จะมีคุณสมบัติและความสามารถในการแสดงออกทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน การเพิ่มและลดสารอาหาร และการเปลี่ยนแปลงระดับที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงฮอร์โมนพืช การเกิดสารพิษ เช่น สารฟีนอลลิค ภายในเซลล์, การที่เซลล์เกาะกลุ่มได้รับสารอาหารไม่เท่ากัน (nutrient gradients) ตลอดจนระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง จะเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในระบบแขวนลอย เพราะเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง จะเกิดการได้รับสารอาหารไม่เท่ากันมากกว่าเซลล์แขวนลอย (Thomas และ Davey, 1975) ทำให้เซลล์พืชเพาะเลี้ยงไม่มีเสถียรภาพทางพันธุกรรมคงมีการแบ่งเซลล์ผิดปกติ หรือมีการจัดโครงสร้างของยีนใหม่จากกระบวนการ endoreduplication และ/หรือ nuclear fragmentation (D'Amoto , 1977 และ Yeoman และ Forche, 1980) ดังนั้นการคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตสารเป้าหมายได้สูง จะช่วยเพิ่มสัดส่วนของเซลล์ที่ผลิตสารเป้าหมายได้สูง จะช่วยเพิ่มสัดส่วนของเซลล์ที่ผลิตสารเป้าหมายต่อประชากรเซลล์ทั้งหมดให้สูงขึ้น และรวมทั้งสารเป้าหมายที่ผลิตได้มีปริมาณสูงขึ้น

แคลลัส PNA 3 ที่ใช้ในการคัดเลือกโคลนยังคงมีลักษณะของความไม่เป็นเนื้อเดียวกันสูง พิจารณาจากเซลล์สีเหลือง ที่ขึ้นแทรกเซลล์สีแดงที่ผลิตสารแอนโธไซยานิน (รูปที่ 8) และผลผลิตสารแอนโธไซยานินสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงเพียง 7.86 (ค่า A_{525} ต่อกรัม นน.แห้ง) (รูปที่ 10) เมื่อนำมาทำการคัดเลือกโคลนครั้งแรกพบว่าเปอร์เซนต์ของการเกิดโคโลนีสีเหลืองมีเท่ากับ 27.69 % และมีเพียง 7 โคโลนีที่เจริญขึ้น แล้วยังเป็นแคลลัสแสดงลักษณะของเซลล์สีแดงเนื้อเดียวกันจาก 128 โคโลนี เมื่อนำโคโลนีที่ผลิตสารได้สูงสุด คือ โคลน PNA 3 (I20)ไปเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย สามารถให้ผลผลิตแอนโธไซยานินสูงสุดประมาณ 45หน่วย (ค่า A_{525} ต่อกรัม นน.แห้ง) ซึ่งสูงมากกว่า โคลนเดิม 4 เท่า จากนั้นทำการโคลนครั้งที่ 2 พบว่าเปอร์เซนต์การเกิดโคโลนีสีเหลืองลดลงมาก บางจานอาหารเพาะเลี้ยงไม่มีโคโลนีสีเหลืองเกิดขึ้นเลย แต่โดยเฉลี่ยการเกิดโคโลนีสีเหลืองเพียงแค่ 3.33 เปอร์เซนต์เท่านั้น และเมื่อคัดเลือกโคโลนีที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงสุดนำไปเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย ให้การผลิตแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้งสูงสุดถึง 78 หน่วย ซึ่งมากกว่าโคลนเดิม (PNA3) ประมาณ 6.8 เท่า จะเห็นได้ว่าการคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตสารแอนโธไซยานินได้สูง โดยวิธีการกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงจะสามารถทำให้เพิ่มผลการผลิตขึ้น และลดความไม่เป็นเนื้อเดียวกันลง คือ เพิ่มสัดส่วนของเซลล์ที่สามารผลิตแอนโธไซยานินต่อเซลล์ทั้งหมดได้ มีรายงานถึงการใช้วิธีการคัดเลือกเซลล์ที่ผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิสูงในพืชหลายชนิด เช่น *Nicotiana tabacum* เพื่อผลิตสารนิโคติน (nicotine) (Ogino และ คณะ,1978), *Catharanthus roseus* เพื่อผลิตสาร Serpentine (Deus-Neuman และ Zenk ,1984) *Anchusa officinalis* เพื่อผลิตสาร Rasmarinic acid (Ellis, 1985) โดยเฉพาะในพืช *Litho-spernum erythrorhizon* (Mizukami และคณะ, 1978) สามารถคัดเลือกโคลนที่ผลิต shikonin เพิ่มขึ้นถึง 20 เท่า อย่างไรก็ตามการคัดเลือกโคลนเพื่อผลิตแอนโธไซยานิน ก็ยังมีปัญหาในพืชอีกหลายชนิด เนื่องจากความไม่เสถียรทางพันธุกรรม เช่น *Daucus* (Daugall และคณะ,1980) และ *Cartharanthus moseus(L.)* (Hall และ Yeoman,1986) โดยโคลนที่คัดเลือกไว้ไม่มีความเสถียรในการผลิตแอนโธไซยานินและมีความไม่เป็นเนื้อเดียวกันสูง มีผลทำให้สัดส่วนของเซลล์ที่ผลิตสารได้ต่อประชากรเซลล์รวมมีค่าต่ำ

4.2 สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานิน

4.2.1 เสถียรภาพในการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าโคลน PNA 3 (I20II3)

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของพืชไข่เน่าโคลน PNA 3 (I20II3) ทั้งแบบแคลลัส

และแบบเซลล์แขวนลอยโดยใช้อาหาร B5 เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.เป็นทั้งอาหารเหลวสูตรควบคุม เพื่อใช้เปรียบเทียบในการแปรผันธาตุอาหาร และใช้เป็นอาหารย้ายเซลล์เพาะเลี้ยง (maintainance medium) ทุก 1 เดือน ตลอดระยะเวลา 2 ปี พบว่า เซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าโคลน PNA 3(I20II3) มีความเสถียรในการผลิตแอนโธไซยานิน ตลอดระยะเวลาในการผลิต 2 ปี โดยให้ค่าเฉลี่ยในการผลิตแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 104.12 ความเสถียรของสายพันธุ์ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ย้ายเซลล์เพาะเลี้ยง, การแปรกลับได้ (reversible) ของสายพันธุ์ (Dougall และคณะ,1986), ความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของประชากรเซลล์ของสายพันธุ์ (heterogeneity) ระยะเวลาในการย้ายเซลล์พืชไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ (subculture), วิธีการคัดเลือกโคลน (Hall และ Yeoman, 1986), ความไม่เสถียรของสารพันธุกรรม (D'Amato , 1977) และสภาวะการ differentiation ของเซลล์เพาะเลี้ยง (Kamimura and Nishikawa, 1976)

4.2.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงในที่มีแสงและไม่มีแสง

แสงมีส่วนสำคัญในการสังเคราะห์แอนโธไซยานินโดยเป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการสังเคราะห์แอนโธไซยานินใน Phenylpropanoid pathway คือ chalcone synthase (CHS) และ phenylalanine ammonia - lyase (PAL) จากการศึกษาของ Matsumoto และคณะ (1973) พบว่าแสงมีผลต่อการสร้างแอนโธไซยานินมากกว่าการเจริญของเซลล์โดยในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีแสงจะพบแอคทิวิตีของ PAL ควบคู่กับการสร้างแอนโธไซยานิน ในขณะที่สภาวะการเพาะเลี้ยงในที่ไม่มีแสง แอคทิวิตีของ PAL จะต่ำและไม่พบการสร้างแอนโธไซยานิน แต่การเจริญในสภาวะที่มีแสงและไม่มีแสงไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ Mizukami และคณะ (1989) พบว่าแสงมีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานิน โดยในแคลลัสเพาะเลี้ยงของ Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงไม่มีแสง จะมีการเจริญต่ำ ไม่มีการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน และพบว่ามีแอคทิวิตีของ CHS ต่ำด้วย เช่นเดียวกับในเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบไม่มีแสงจะมีการเจริญต่ำกว่าในสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบมีแสง และไม่มีการผลิตแอนโธไซยานินเลยสังเกตจากการลดลงของค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้งลดลงตลอดเวลา

4.2.3 สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบการให้อากาศและการเขย่าต่างกัน (ในระดับขวดเขย่า)

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในสภาวะการให้อากาศและการ

เขย่าต่างกันพบว่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์มากกว่าการผลิตแอนโธไซยานิน โดยเซลล์สามารถเจริญได้ดีในสภาวะการให้อากาศและการเขย่าต่ำกว่าที่สภาวะควบคุมถึง 2 เท่า โดยธรรมชาติของเซลล์พืชเพาะเลี้ยงจะมีอัตราการหายใจและความต้องการออกซิเจนต่ำ เมื่อเทียบกับเซลล์และจุลินทรีย์ (Scragg และคณะ,1987) เมื่อพิจารณาลักษณะของการให้อากาศและการเขย่าโดยแปรผันขนาดของขวดเพาะเลี้ยง กับความเร็วรอบของเครื่องเขย่าแบบหมุนวน (Rotary shaker) นอกจากจะเป็นการเพิ่มอัตราการให้อากาศแล้ว ยังทำให้เกิดปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์พืชแขวนลอย คือ การเพิ่มอัตราแรงเฉือน เมื่อเซลล์แขวนลอยของพืชไร่เก่าสามารถเจริญได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีอากาศและการเขย่าต่ำ คือ ในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 125 มล. และที่ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าเท่ากับ 80 รอบต่อนาที แสดงว่าการให้อากาศระดับนี้เพียงพอต่อการเจริญของเซลลแขวนลอยของพืชไร่เก่า เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงที่สภาวะการให้อากาศสูงกว่า คือการเพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที พบว่าการให้อากาศเพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการเจริญ แต่ขณะเดียวกัน การเพิ่มแรงเฉือนโดยการเพิ่มขนาดของขวดเพาะเลี้ยงมีผลให้การเจริญต่ำลง อัตราการเจริญในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 250 มล. น้อยกว่าอัตราการเจริญในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 125 มล.) และในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 250 มล. เหมือนกัน แต่ในขวดที่มี buffle ซึ่งช่วยลดแรงเฉือนที่เกิดจากการหมุนวนของกระแส (vortex) ดังนั้นจึงให้การเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินสูงกว่า การให้อากาศเพิ่มขึ้นโดยการเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่า มีผลต่อการเจริญของเซลล์พืชแขวนลอยน้อย โดย Matsumoto และคณะ (1972) แปรผันความเร็วรอบของเครื่องเขย่าแบบย้อนกลับ (reciprocal)) เท่ากับ 80, 90 และ 110 รอบต่อนาที ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Populus* hybrid,*Nicotiana glutinosa* และ *N. tabacum* โดยใช้ปริมาณอาหารเพาะะเลี้ยงเท่ากับ 25 มล.ต่อขวดเพาะเลี้ยงขนาด 100 มล. พบว่าให้การเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การให้อากาศและการกวนเห็นผลได้ชัดเจน ในระดับการขยายส่วนผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *M. citrifolia* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ turbine-stirred ที่ความเร็วรอบของใบพัดเพียง 20 รอบต่อนาที มีผลทำให้เซลล์ถูกทำลายและการผลิต alkaloid ลดลง 60 % (Wagner and Vagelmann, 1977)

จากการทดลองสรุปได้ว่าเซลล์แขวนลอยของพืชไร่เก่ามีความทนต่อแรงเฉือนต่ำ การเพิ่มการให้อากาศมีผลให้การเจริญสูงขึ้น ควรเลือกวิธีการให้อากาศที่ไม่ให้เกิดแรงเฉือนสูง

4.3 การศึกษาอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืช

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไร่เก่าในอาหารเหลวสูตร B5 เปรียบเทียบ

กับสูตรควบคุม คือ 1/2 MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. พบว่าอาหารสูตร B5 ให้การเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินได้ดีกว่าอารสูตร 1/2 MS โดยในอาหารสูตร 1/2 MS เซลล์จะมีการเจริญที่จำกัดและเข้าสู่ในระยะการเจริญสูงสุด ในสัปดาห์ที่ 7 ด้วยน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 2.89 กรัม/ลิตร ในขณะที่อาหารสูตร B5 เซลล์ยังคงมีการเจริญต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 9 และให้ค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 4.59 กรัม/ลิตร อีกทั้งสูตรอาหาร B5 ให้การผลิตแอนโธไซยานินมากกว่าอาหาร 1/2 MS ถึง 6.8 เท่า เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของอาหารทั้งสองสูตรจะมีความแตกต่างกันในความเข้มข้นของอาหารหลัก (macronutrient) และวิตามินเป็นสำคัญ (ภาคผนวกที่ 1 และ 2) นอกจากนี้วิตามินในสูตรอาหาร B5 ยังเพิ่ม myoinositol ความเข้มข้น 100 มก./ล. มีรายงานว่ามีผลกระตุ้นการเจริญของแคลลัสต้นยาสูบ (Linsmaier and Skoog, 1965) และในอาหารสูตร B5 มี Thiamine-HCl มากกว่าสูตร 1/2 MS ถึง 100 เท่า โดย Thiamine เป็นวิตามินที่สำคัญเพียงตัวเดียวที่เซลล์พืชเพาะเลี้ยงต้องการในการเจริญ ซึ่งจะพบ Thiamine ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์พืชทุกสูตร โดยวิตามินตัวอื่นที่ใส่จะเป็นเพียงความต้องการในการเจริญ หรือสัณฐานวิทยาจำเพาะในบางพืช (Huang and murashige,1977) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Euphorbia millii* ในอาหารสูตรต่าง ๆ กัน คือ LS (Linsmaier and Skoog) MS (Murashige and Skoog) , B5 (Gamborg), NN (Nitsch and Nitsch) , HE (Heller) และ WH (White) พบว่าในอาหารสูตร B5 ให้การผลิตแอนโธไซยานินสูงสุดมากกว่าอาหาร MS สูตรควบคุมประมาณ 1.3 เท่า (Yamamoto และคณะ,1989)

4.4 อายุและปริมาณของเซลล์เริ่มต้น

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไร่เน่าโดยใช้เซลล์เริ่มต้นที่อายุต่างกัน ผลปรากฏอายุของเซลล์เริ่มต้นไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยแต่มีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานินโดยอายุของเซลล์เริ่มต้นยิ่งมากขึ้นยิ่งให้การผลิตแอนโธไซยานินต่ำลง ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Hall and Yeoman (1986) ซึ่งพบว่าระยะเวลาในการย้ายเซลล์พืชไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ (subculture) จะทำให้เซลล์พืช *C. roseus* เกิดความไม่เป็นเนื้อเดียวกันสูงและลดการผลิตแอนโธไซยานินลงได้

ผลของการศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่างกันพบว่า การเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีผลทำให้อัตราการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินเพิ่มขึ้นและลดระยะเวลาการผลิตลง โดยที่ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5% มีอัตราการเจริญสูงสุดและมีการผลิตแอนโธไซยานินสูงสุดและลดระยะเวลาการผลิตของเซลล์เริ่มต้นจะสามารถเพิ่มผลผลิตได้ผลที่ได้นี้คล้ายกัน กับผลงานวิจัยที่

ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Captis japonica* เพื่อเพิ่มการผลิตสาร berberine (Matsubara และคณะ,1989) อย่างไรก็ตาม Hagendoorn และคณะ (1991) พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Petunia hybrida* ไม่มีผลต่อปริมาณเซลล์สูงสุดของการเพาะเลี้ยงแต่จะเพิ่มอัตราการเจริญ ในขณะที่การผลิตแอนโธไซยานินและลิกนิน ได้ดีในการทดลองที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นน้อย

4.5 ชนิดแหล่งต้นตอคาร์บอนและความเข้มข้นของแหล่งต้นตอคาร์บอน

4.5.1 ชนิดของแหล่งต้นตอคาร์บอน

ในการศึกษาถึงอิทธิพลของชนิดแหล่งต้นตอคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า พบว่าอาหารที่มีซูโครส, กลูโคส และฟรุกโตส ในการเจริญและการผลิตของแอนโธไซยานินใกล้เคียงกันแต่พบว่าในอาหารที่มีฟรุกโตส เซลล์แขวนลอยจะเข้าสู่ระยะเร่งการเจริญช้ากว่า ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า พืชเริ่มต้นใช้ซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนดังนั้นเมื่อเปลี่ยนเป็นฟรุกโตส เซลล์จึงต้องเปลี่ยนระบบของการนำฟรุกโตสเข้าสู่เซลล์ จึงใช้เวลาในช่วงระยะเร่งการเจริญนานกว่าปกติ ในอาหารที่ใช้แลคโตสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน เซลล์จะไม่มีการเจริญและการสร้างแอนโธไซยานิน แสดงว่าเซลล์พืชไข่เน่าไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการใช้ชนิดของน้ำตาลขึ้นอยู่กับชนิดของพืช โดยในเซลล์แคลลัสเพาะเลี้ยงของ *Ajuga reptans* สามารถเจริญและผลิตแอนโธไซยานินได้ในอาหารสูตรดัดแปลงจากหางนมเปรี้ยว (milk whey) ซึ่งมีแลคโตสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน จากการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าแขวนลอยในอาหารที่มี กลูโคส, ฟรุกโตส และซูโครสมีค่าใกล้เคียงกัน และเนื่องจากซูโครสมีราคาถูกกว่าแหล่งต้นตอคาร์บอนอีก 2 ชนิดมาก ดังนั้นในงานวิจัยจึงเลือกใช้ซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนต่อไป เช่นเดียวกับในพืชหลายชนิดที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนที่ดีกว่าน้ำตาลตัวอื่น เช่น ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Populus* เมื่อทำการแปรผันแหล่งต้นตอคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลซูโครส, กลูโคส, ฟรุกโตส และน้ำตาลตัวอื่นอีก 8 ชนิด พบว่าซูโครสและกลูโคส มีผลกระทบทำให้การผลิตแอนโธไซยานินเพิ่มสูงขึ้นเท่ากันและมีประสิทธิภาพดีกว่าฟรุกโตสและน้ำตาลตัวอื่น (Matsumoto และคณะ,1973) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *L. erythrorhizon* เพื่อการผลิตสาร shikonin พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงมีการใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ประสิทธิภาพดีมาก (Mizukami และคณะ,1977)

ซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนที่นิยมใช้กันมากในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเพื่อการผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิเพราะมีราคาถูกและให้การเจริญและผลผลิตสารได้ดีทั้งนี้เพราะนอกจากซูโครสจะเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนแล้ว ที่ความเข้มข้นของซูโครสสูงจะมีบทบาทเป็นสาร osmoticum ด้วย ซึ่งเชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกอาจจะช่วยกดดัน (stress) ให้เซลล์พืชมีการผลิตสารสูงขึ้นได้ จากการรายงานของ Chi Bao Do และ Cormier (1990) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Vitrus vinifera* L. เพื่อผลิตสารแอนโธไซยานินในอาหาร B5 เมื่อแปรผันความเข้มข้นของซูโครส ที่ 3% (88 mM) และที่ 5% (132 mM) พบว่าความเข้มข้นของซูโครสที่มีผลต่อความดันออสโมติก (osmotic potential) ของอาหารเพาะเลี้ยง และที่ความเข้มข้นของซูโครสสูง จะทำให้ความดันออสโมติกในอาหารสูง ซึ่งมีผลทำให้การเจริญลดลง ในขณะที่ชักนำให้มีเปอร์เซนต์ของเซลล์ที่ผลิตแอนโธไซยานินได้เพิ่มขึ้นทำให้ค่าแอนโธไซยานินรวมสูงขึ้นมากกว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นของซูโครสต่ำ การใช้ความเข้มข้นของซูโครสที่ระดับสูงเพื่อเพิ่มผลผลิตของสารทุติยภูมิสามารถพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *Rosa* sp.ในการผลิตสารประกอบ polyphenol (Davies, 1972) *Populus* ในการผลิตแอนโธไซยานิน(Matsumoto และคณะ,1975) จากผลการศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าพบว่า ความเข้มข้นของซูโครส 50 กรัม/ลิตร จะให้การเจริญสูงสุด แต่ถ้าความเข้มข้นสูงขึ้นกว่านี้จะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ ประสิทธิภาพของการผลิตแอนโธไซยานินจะสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของซูโครสเท่ากับ 30 กรัม/ลิตร และเมื่อความเข้มข้นของซูโครสสูงขึ้นมากกว่านี้จะสามารถยับยั้งการสร้างแอนโธไซยานินได้เช่นกัน

4.6 ปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสม

มีรายงานมากมายที่กล่าวถึงความสำคัญของฟอสเฟตที่มีต่อการเจริญของเซลล์พืชเพาะเลี้ยง เช่น เซลล์พืชแขวนลอยของยาสูบ (*N.tabacum*) เมื่อเติมปริมาณฟอสเฟตในรูปของเกลือโซเดียมหรือโปแตสเซียมก็ตามในอาหารที่เพาะเลี้ยงให้สูงขึ้น เซลล์จะมีอัตราการเจริญสูงขึ้น (Kato และคณะ, 1977) เช่นเดียวกับ Ericknon (1965) ที่รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตขึ้น 10 และ 20 เท่า ของความเข้มข้นเดิมในอาหารเพาะเลี้ยงของ *H. gracilis* สามารถเพิ่มผลผลิตของเซลล์ได้ 50% เป็นต้น อย่างไรก็ตามผลของฟอสเฟตต่อการเจริญก็ขึ้นกับชนิดของพืชที่ใช้เพาะเลี้ยงเช่นกัน จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืช

ไข่เน่า เพื่อการผลิตแอนโธไซยานินพบว่า ปริมาณของฟอสเฟตที่ทำการแปรผันมีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานินมากกว่าการเจริญ โดยยิ่งลดปริมาณฟอสเฟตยิ่งทำให้ผลผลิตแอนโธไซยานินมากขึ้น ในขณะที่การเจริญของเซลล์มีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกันมากนัก แม้ในความเข้มข้นของฟอสเฟตตั้งแต่ 20 มก./ล. จนถึง 600 มก./ล. ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Zenk ที่พบว่าปริมาณฟอสเฟต ไม่มีผลต่อการเจริญของ *M. ctrifolia* แต่ Dobberstein และ Staba (1969)รายงานว่าที่ระดับความเข้มข้นของฟอสเฟตสูง คือเท่ากับ 593 มก./ล. มีผลให้การเจริญของ เซลล์แขวนลอยของ *Ipomoea* ลดลง แต่ที่ความเข้มข้นสูงนี้จะมีผลไปกระตุ้นการเจริญในเซลล์แขวนลอยของ *Rivea*

การลดปริมาณฟอตเฟตเพื่อเพิ่มผลผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ พบได้ในเซลล์พืชเพาะเลี้ยงมากมายหลายชนิด อย่างไรก็ตาม มีรายงานของ Nettleship และ Slaytor (1974) ที่พบว่าเมื่อไม่มีฟอสเฟตในอาหารในการเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสของ *P. harmala* ที่ปราศจากการเติมฟอสเฟต จะสามารถเพิ่มการผลิตสาร harmalol และ harmine ได้ และในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *Vitrus* พบว่าเมื่อลดปริมาณฟอสเฟตลงจะทำให้เซลล์เพิ่มการผลิตแอนโธไซยานินขึ้น แต่จะลดอัตราการเจริญลง

4.7 ศึกษาปริมาณไนโตรเจนรวมและอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมและไนเตรตที่เหมาะสม

ผลการทดลองพบว่าไนโตรเจนรวม และอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมและไนเตรต (NH^+_4/NO^-_3) มีผลต่อ การเจริญมากกว่าการผลิตแอนโธไซยานิน โดยในอาหารที่ไม่มีไนโตรเจน เซลล์พืชจะมีการเจริญต่ำ ในขณะที่เมื่อลดความเข้มข้นของไนโตรเจนลงจะมีผลทำให้การเจริญเพิ่มขึ้น และ NH^+_4/NO^-_3 สูงจะให้การเจริญได้มากกว่าในอาหารที่มี NH^+_4/NO^-_3 ต่ำและที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนต่ำ (15 mM) และ NH^+_4/NO^-_3 สูง (1:5) จะให้การเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินสูงสุด

จากรายงานของ Chi Bao Do และ Cormier (1991) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Vitrus vinifera* ในอาหารที่มี NH^+_4/NO^-_3 แตกต่างกันโดยให้ความเข้มข้นไนเตรตคงที่ คือ 6.25 mM และแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียม พบว่า NH^+_4/NO^-_3 น้อยกว่า 1:3 จะทำให้ pH ของอาหารเพาะเลี้ยง ระหว่างการเจริญและการผลิตลดลงและการใช้น้ำตาลซูโครสของเซลล์ลดลง ทำให้การเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินต่ำ

4.8 ปริมาณของอิออนที่เหมาะสม

4.8.1 แคลเซียม

จากผลการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของพืชไข่เน่าพบว่าแคลเซียมในรูปของแคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานินมากกว่าการกระตุ้นให้เซลล์เจริญ และในอาหารที่ไม่มีแคลเซียมเซลล์พืชก็สามารถเจริญได้เป็นปกติ การเพิ่มปริมาณแคลเซียมในระดับสูงถึง 600 มก./ล. (4.08 mM) เพิ่มจากความเข้มข้นควบคุมถึง 4 เท่า มีการชักนำให้เซลล์สร้างแอนโธไซยานินได้มากขึ้น มีรายงานถึงปริมาณของแคลเซียมที่ใช้ ในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำการผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ พบว่าค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ในระดับต่ำกว่า 3 mM เช่น ในเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *H.gracilis* (Ericsson, 1965) เซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยของ *L.erythrorhizon* ที่พบว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมมากกว่า 3 mM จะมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตสารอนุพันธ์ของ shikonin (Mizukami และคณะ, 1977) และในเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยของ *E. millii* เพื่อการผลิตแอนโธไซยานินก็เช่นเดียวกันพบว่าความเข้มข้นของแคลเซียมที่เหมาะสม ต่อการผลิตสารมีค่าเพียง 1 mM และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากกว่านี้มีผลไปลดการผลิตของแอนโธไซยานินลง (Yamamoto และคณะ,1989)

4.8.2 เหล็ก

ในเซลล์พืชเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิพบว่าความเข้มข้นของเหล็กที่ใช้ ($FeSO_4$) จะอยู่ในระดับต่ำไม่เกิน 1 mM เช่น ในเซลล์พืชเพาะเลี้ยงแบบแคลลัสของ *L. erythrorhizon* จะเพิ่มความเจริญเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเหล็กมากขึ้น จาก 0.1 mM เป็น 0.2 mM แต่จะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 1 mM ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเหล็กจะทำให้การผลิตอนุพันธ์ของ shikonin ลดลง ความเข้มข้นของเหล็กที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารมักเท่ากับ 0.1 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเหล็กในสูตรอาหารทั่วไป (เช่นใน B5 และ MS) เช่นในเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแคลลัสของยาสูบ (Murashige และ Skoog ,1962) *H. gracilis* (Ericsson, 1965) แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ใช้เพาะเลี้ยงและสารเป้าหมายที่จะผลิตโดยในเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยของ *E. millii* เพื่อผลิตแอนโธไซยานินพบว่า เมื่อลดความเข้มข้นของเหล็กลง จะมีผลให้การผลิตสารแอนโธไซยานินเพิ่มมากขึ้น (Yamamoto และคณะ,1989) สำหรับในเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า พบว่าที่ความเข้มข้นของเหล็กเท่ากับ 0.1 mM ให้การเจริญสูงสุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเหล็กมีผลทำ

ให้เซลล์มีการผลิตแอนโธไซยานินมากขึ้น (จากค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้ง) แล้วที่ความเข้มข้นของเหล็กเท่ากับ 0.1 mM เหมาะสมต่อทั้งการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานิน

4.9 ชนิดและอัตราส่วนของฮอร์โมนพืช

4.9.1 ชนิดของฮอร์โมนพืช

จากการศึกษาถึงผลของชนิดของฮอร์โมนพืชต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์เพาะเลี้ยงพืชไข่เน่าแบบแขวนลอย พบว่าฮอร์โมนพืชกลุ่ม ออกซิน มีบทบาทต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินมากกว่ากลุ่มไซโตไคนิน และออกซินที่ให้การผลิตแอนโธไซยานินได้ดีที่สุด คือ 2,4-D อาหารที่มีออกซินคือ 2,4-D ชนิดของไซโตไคนินที่มีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานินได้ดี คือ BA

ความสามารถในการออกฤทธิ์ของออกซิน (auxin activity) ที่มีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานิน ของฮอร์โมนกลุ่มออกซินที่ใช้ในการทดลอง เรียงตามลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ 2,4-D, NAA และ IAA อาจเป็นไปได้ว่า 2,4-D ทำให้เกิดแรงกดดัน (stress) ต่อเซลล์พืชไข่เน่าสูงกว่า NAA และ IAA กระตุ้นให้เซลล์สามารถผลิตแอนโธไซยานินเพิ่มขึ้น

มีรายงานถึงชนิดของออกซิน ที่มีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานินหลายรายงาน เช่น Mizuleami และคณะ (1988) ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัส ของ Roselle (*H. sablariffa* L.) ได้แปรผันชนิดของออกซินในอาหารเพาะเลี้ยง ได้แก่ 2,4-D, 7BA, NAA และ IAA พบว่าการผลิตแอนโธไซยานินเพิ่มมากขึ้น ตามความแรงและความสามารถของการออกฤทธิ์ของออกซินดังนี้ คือ 2,4-D, 7BA, NAA และ IAA ตามลำดับโดย ออกซิน 2,4-D จะให้การผลิตแอนโธไซยานินมากกว่าออกซินตัวอื่นหลายเท่าตัว และในคณะทำงานชุดเดียวกันนี้ (Mizuleami และคณะ,1989) ศึกษาถึงความเกี่ยวข้องระหว่างฮอร์โมนออกซินกับกิจกรรมของเอนไซม์ PAl และ CHS ที่เป็นเอนไซม์สำคัญในวิถีการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน (Seitz,1988) พบว่าในเซลล์แคลลัสเพาะเลี้ยงของ Roselle (*H.suburiffa* L.) ในอาหารที่ใช้ออกซิน คือ 2,4-D มีผลกระตุ้นให้เอนไซม์ CHS มีกิจกรรมสูงกว่า และมีผลให้การเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์มีมากขึ้นกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี IAA

4.9.2 ความเข้มข้นและอัตราส่วนของ BA : 2,4-D

จากการศึกษาของอัตราส่วนของ BA : 2,4-D ในการเจริญและการผลิต

แอนโธไซยานินพบว่าปริมาณของ 2,4-D มีผลต่อการเจริญมากกว่า BA โดยที่ปริมาณ 2,4-D ต่ำจะให้การเจริญมากกว่าปริมาณ 2,4-D สูงและค่าอัตราส่วนของ BA : 2,4-D ที่ให้การผลิตแอนโธไซยานินสูงสุดเท่ากับ 2:2 มก./ล. ผลของปริมาณและอัตราส่วนระหว่างไซโตไคนินและออกซินต่อการเจริญและการผลิตสารของเซลล์พืชเพาะเลี้ยงขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์พืช เช่นในเซลล์เพาะเลี้ยงของ Roselle (*H. subdaffla* L.) (Mizukami และคณะ,1988) พบว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 0.1 M และ kinitin ที่มีความเข้มข้น 0.1 และ 1 M จะให้การผลิตแอนโธไซยานินได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยของ *E. milli* (Yamamoto,1989) พบว่าความเข้มข้นของ BA ต่อความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมต่อการผลิตแอนโธไซยานินเท่ากับ 10^{-8}M และ 10^{-6}M ตามลำดับ

4.10 ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในอาหารสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน (J-B5) เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2 มก./ล. เปรียบเทียบกับอาหารสูตร 1/2 MS และ B5 เสริมด้วยฮอร์โมน BA 2 มก./ล. พบว่าอาหารสูตรดัดแปลง J-B5 ให้การเจริญต่ำกว่าสูตร 1/2 MS และ B5 ระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช pH ในอาหารของ J-B5 ลดต่ำลงกว่าในอาหาร 1/2 MS และ B5 และอยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 4 ซึ่งเซลล์มีการเจริญต่ำแทบไม่มีการเจริญขึ้นเลย โดยปกติ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์พืชเพาะเลี้ยงอยู่ในช่วง pH 5-6 จะเห็นได้จากสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่มีฟอสเฟตเท่านั้นที่จะทำหน้าที่รักษาความเป็นกรด-ด่าง ได้ และความเข้มข้นของฟอสเฟตที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงทั่วไปอยู่ในช่วง 1-5 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชpH ของอาหารจะเกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่ง pH อาจปรับตัวลง เนื่องจากเซลล์เพาะเลี้ยงผลิตกรดอินทรีย์ หรือในอาหารเพาะเลี้ยงใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน pH อาจปรับตัวเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ไนเตรตจาก โซเดียมหรือโปแตสเซียมไนเตรตหรือกรณีที่เซลล์ย่อยสลายกรดอะมิโนปล่อยแอมโมเนียมไอออนลงในอาหารเพาะเลี้ยงหรือรีดิวซ์ไนเตรต ของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตส (Martin, 1980)

ในสูตรอาหารของ J-B5 จะมีความเข้มข้นของฟอสเฟตลดลงเพียง 20 มก./ล. และมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับอาหารสูตร B5 ดังนั้นสภาวะการรักษาความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารมีน้อยมาก และอาหารที่มีแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมี pH ของอาหารลดลง pH ของอาหารมีผลต่อการเจริญ จากรายงานของ Martin และ Rose (1975) ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Ipomaea* ในอาหารที่ควบคุม pH ให้เท่ากับ 4.8 ระหว่างการเพาะเลี้ยง เซลล์พืชจะมีการเจริญลดลงและประสิทธิภาพการนำน้ำตาลไปใช้ลดลง

4.11 ผลของการใช้สารบัฟเฟอร์ MES ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน (J-B5)

pH มีผลต่อเซลล์พืชเพาะเลี้ยงทั้งการเจริญและการผลิตสารจากรายงานของ Matsumoto และคณะ (1973) ทำการแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยง LS (Linsmaier Skoog) พบว่า pH เริ่มต้นมีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยของ Populus โดยเมื่อเพิ่ม pH เริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้เซลล์ Populus สร้างแอนโธไซยานินได้มากขึ้น ในขณะที่ pH เริ่มต้นของอาหารช่อง 5.0-6.5 ทำให้เซลล์เจริญเพิ่มขึ้น และ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแอนโธไซยานินคือ 6.5

จากการทดลองพบว่า pH มีความสัมพันธ์ต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานิน เช่นกันในระหว่างการผลิตสารแอนโธไซยานินจะมีผลทำให้ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงลดลง และกรณีที่มีการผลิตแอนโธไซยานินในระดับบสูงทำให้ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงลดลงต่ำมาก และจะมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ เช่นกรณีของอาหารเพาะเลี้ยง J-B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ 3,4-d 2 มก./ล. และใช้ 5 mM MES เป็นสารบัฟเฟอร์ การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในอาหาร B5 ทั้ง 2 ครั้ง เป็นตัวอย่างของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าที่ขาดการควบคุมปัจจัย pH จะพบว่าการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินไม่คงที่ การหาสภาวะ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารและการรักษาระดับ pH ในช่วงนั้นให้คงที่ได้จะสามารถควบคุมการเจริญและการผลิตสารให้มีปริมาณคงที่

การรักษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช สามารถกระทำได้หลายวิธีได้แก่ การใช้เครื่องควบคุม pH ให้อยู่ในระดับ pH ที่ต้องการโดยปรับด้วยกรดหรือด่างอย่างอัตโนมัติ เช่น Martin และ Rose (1975) เพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ Ipomoea ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ Stirred - jar ขนาด 7.5 ลิตร ควบคุม pH ของอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยใช้เครื่องควบคุม pH อัตโนมัติ ควบคุม pH ของการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วง 4.8, 5.6, 6.4 และ 7.1 พบว่า ที่ระดับ pH เท่ากับ 4.8 และ 7.1 เซลล์เพาะเลี้ยงไม่สามารถใช้ไนเตรตในอาหารได้ และที่ pH 4.8 เซลล์เพาะเลี้ยงมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนมวลน้ำตาลซูโครสไปเป็นมวลของเซลล์ (Biomass) ต่ำ การรักษาความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้บัฟเฟอร์ เช่น MES

งานวิจัยของ Nesius และ Fletcher (1973) เพาะเลี้ยงเซลล์กุหลาบ (Paul's Scarlet Rose) พบว่า ช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 5.2-5.4 จากผลการทดลองพบว่าในอาหารสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน (J-B5) ที่ใช้ MES ความเข้มข้น

เท่ากับ 10 และ 20 mM สามารถรักษาระดับของ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินให้อยู่ ในช่วง 5.1-5 นอกจากการใช้สารเคมีเป็นบัฟเฟอร์โดยตรงแล้วสามารถใช้สารอินทรีย์ เช่น น้ำมะพร้าว, Yeast hydrolysate และ Casein hydrolysate หรือ กรดอะมิโน เช่น กรดกลูตามิค, กรดแอสพาติค เป็นต้น ก็สามารถรักษาความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเพาะเลี้ยงได้ดี และทำให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเพาะเลี้ยงมาก (Martin, 1982)

4.12 การผลิตแอนโธไซยานินด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3.0 ลิตร ที่สภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 vvm พบว่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์พืชมากกว่าการผลิตแอนโธไซยานิน เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่า โดยจะให้การเจริญต่ำกว่าระดับขวดเขย่าประมาณ 1.83 เท่า แต่ให้การผลิตแอนโธไซยานินใกล้เคียงกันคือค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้งเท่ากับ 76.67 และ 81.58 สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์และขวดเขย่าตามลำดับ เนื่องจากเซลล์พืชมีขนาดใหญ่ มีผนังเซลล์ซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็นหลักอันมีคุณสมบัติแข็งและความติงตัวสูง (Mandles,1972) ทำให้เซลล์พืชทนต่อแรงเฉือนต่ำ อย่างไรก็ตามการทนต่อแรงเฉือนของเซลล์แขวนลอยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่นในเซลล์แขวนลอยของ *N. tabacum* ซึ่งสามารถทนต่อสภาวะการให้อากาศและการผสมที่เกิดแรงเฉือนได้ โดยการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Stirer tank ให้การกวนโดยใช้ความเร็วของใบพัดเท่ากับ 200-300 rpm พบว่าเซลล์ของ *N. tabacum* สามารถทนต่อแรงเฉือนที่ 800 rpm ได้นานกว่า 12 ชั่วโมง โดยเปอร์เซนต์ความมีชีวิตลดลงเพียง 10% (Hooker,1989) ในขณะที่ *C. roseus* ทนต่อแรงเฉือนได้มากที่สุดที่ 400 rpm เพียง 5 ชั่วโมง เปอร์เซนต์การมีชีวิตลดลง 20-30% (Scragy และคณะ,1988) จากผลการแปรผันการให้อากาศและการเขย่าในระดับขวดเขย่าของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า พบว่าเซลล์แขวนลอยมีความไวต่อแรงเฉือน โดยเมื่อเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่าขึ้นจะทำให้การเจริญลดลง ดังนั้นสาเหตุที่การเลี้ยงถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ให้การเจริญต่ำกว่าระดับขวดเขย่าประมาณ 1.83 เท่า อาจเป็นไปได้ว่าที่สภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 vvm อาจให้แรงเฉือนไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยพืชของไข่เน่า ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าควรจะลดระดับการให้อากาศลง

สรุปผลการวิจัย

1. จากการคัดเลือกแคลลัสของเซลล์พืชไข่เน่า PNA 3 โดยวิธีการกระจายเซลล์ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งทั้งสองครั้งทำให้ได้เซลล์พืชไข่เน่าที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงคือ PNA 3 (I20) และ PNA 3 (I20II3) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยจะมีการเจริญต่ำกว่าเซลล์ดั้งเดิม (PNA3) ที่ทุกช่วงของการเจริญในขณะที่ประสิทธิภาพของการผลิตแอนโธไซยานินสูงขึ้นประมาณ 4.1 และ 6.8 เท่าตามลำดับ

2. เซลล์เพาะเลี้ยงพืชไข่เน่า PNA 3 (I20II3) มีความเสถียรในการผลิตแอนโธไซยานินตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง 2 ปี โดยทำการย้ายอาหารใหม่ทุก 1 เดือน เซลล์แขวนลอยจะให้การผลิตแอนโธไซยานินเฉลี่ยเท่ากับ 104.21

3. เซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าไม่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้ในสภาวะที่ไม่มีแสงและมีการเจริญต่ำลงเกือบ 2 เท่า เมื่อเทียบกับในสภาวะที่มีแสง

4. เซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่ามีความทนต่อแรงเฉือนต่ำ การเพิ่มการให้อากาศมีผลให้การเจริญสูงขึ้นและควรเลือกวิธีการให้อากาศที่ไม่ให้เกิดแรงเฉือนสูง ในการเพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่า ความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงของเซลล์พืชแขวนลอยปริมาตร 30 มล. ในขวดขนาด 125 มล. เท่ากับ 80 รอบต่อนาที

5. เซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่ามีการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินในอาหารสูตร B5 สูงกว่าในอาหารสูตร 1/2 MS โดยในอาหารสูตร B5 ให้การผลิตแอนโธไซยานินสูงกว่า 1/2 MS 3 เท่า

6. อายุของเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานินโดยอายุของเซลล์เริ่มต้นยิ่งมากขึ้นยิ่งให้การผลิตแอนโธไซยานินต่ำลง และอายุของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าเท่ากับ 21 วัน

7. ปริมาณของเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าโดยการเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นจะลดระยะเวลาเริ่มต้นของการเจริญ เพิ่มอัตราการเจริญและเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดเร็วขึ้น มีผลให้การผลิตแอนโธไซยานินเพิ่มขึ้น และลดระยะเวลาการผลิตสูงสุดให้สั้นลง ปริมาณของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินเท่ากับ 5% น้ำหนักเซลล์สดต่อปริมาตร

8. ชนิดและปริมาณของแหล่งต้นคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าคือ น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเท่ากับ 3% น้ำหนักต่อปริมาตร

9. ความเข้มข้นของฟอสเฟตไม่มีผลต่อการเจริญแต่มีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานิน โดย

ในอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตต่ำ จะให้การผลิตแอนโธไซยานินได้สูงกว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตสูง ความเข้มข้นของฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินเท่ากับ 20 มก./ล.

10. ความเข้มข้นไนโตรเจนรวมและอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมและไนเตรตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า คือความเข้มข้นของไนโตรเจนรวมเท่ากับ 15 mM และอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนโตรเจนเท่ากับ 1: 5

11. แคลเซียมไม่มีผลต่อการเจริญ แต่มีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานินมากกว่าการเจริญของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมในอาหารมากขึ้นจะทำให้เซลล์ผลิตแอนโธไซยานินได้มากขึ้น ความเข้มข้นของแคลเซียมที่เหมาะสมต่อการผลิตแอนโธไซยานินเท่ากับ 600 มก./ล.

12. ความเข้มข้นของเหล็กที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินเท่ากับ 0.1 mM

13. ฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินจะมีบทบาทต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินมากกว่าฮอร์โมนพืชในกลุ่มไซโตไคนิน ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน คือ 2,4-D ให้การเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินได้ดีกว่า NAA และ IAA ฮอร์โมนกลุ่มไซโตไคนินคือ BA ให้การเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินได้ดีกว่า kinetin

14. ความเข้มข้นของ 2,4-D มีผลต่อการเจริญ และการผลิตแอนโธไซยานินมากกว่าความเข้มข้นของ BA เท่ากับ 2 มก./ล. และ 2,4-D เท่ากับ 2 มก./ล. จะให้การผลิตแอนโธไซยานินสูงสุด

15. เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน (J-B5) สูตร 1/2 MS และสูตร B5 พบว่า อาหารสูตร J-B5 ให้การผลิตแอนโธไซยานินได้มากกว่าในอาหารสูตร 1/2 MS และใกล้เคียงกับสูตร B5 แต่เซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่ามี การเจริญต่ำในอาหารสูตร J-B5 เป็นเพราะในอาหารสูตร J-B5 มีภาวะการรักษาความเป็นกรด-ด่าง ต่ำ ทำให้ pH ของอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยงลดลงต่ำกว่า pH 4 ซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญของเซลล์พืช

16. การนำสารบัฟเฟอร์คือ MES มาใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน (J-B5) ทำให้สามารถรักษาระดับของ pH ระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าให้อยู่ในช่วง pH 5-6 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่เหมาะต่อการเจริญของเซลล์พืช ทำให้เซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่ามีการเจริญเพิ่มขึ้น การผลิตแอนโธไซยานินของเซลแขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหาร J-B5 ที่มีความเข้มข้นของ MES เท่ากับ 5 mM, 10 mM และ 20mM มีค่ามากกว่าในอาหารสูตร B5 เท่ากับ 2.9 เท่า, 2.3 เท่า และ 2.5 เท่า ตามลำดับ

17. การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่สภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 vvm ให้การเจริญต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่า ในขณะที่การผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift และเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าให้ผลใกล้เคียงกัน อาจเป็นไปได้ว่าสภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 vvm ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า