บทที่ 4

บทวิจารณ์และสรุป

งานวิจัยหลักของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ คือ ศึกษาความเป็นไปได้ ในการคัดเลือกโคลนที่ผลิตสารเบตา-เอคไดโซนได้สูง และศึกษาวิธีเพิ่มผลผลิตสารเบตา-เอคไดโซนให้สูงขึ้น โดยการตริงเซลล์พืชไข่เน่า

4.1 การคัดเลือกโคลนที่ผลิตสารเบตา-เอคไดโซนได้สูง

การคัดเลือกสายพันธุ์จากเซลล์เพาะเลี้ยงพืช มีจุดประสงค์ เพื่อแสวงหาสายพันธุ์ที่ผลิตสารเป้าหมายได้สูง ซึ่งสายพันธุ์ที่ต้องการสามารถคัดเลือกออกจากเซลล์พืชเพาะเลี้ยงได้นั้น แสดงให้เห็นว่า ลักษณะเซลล์พืชเพาะเลี้ยงไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (heterogeneous)

เนื่องจากเซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ นอกจากจะมีรูปร่าง ลักษณะเซลล์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเซลล์แตกต่างกันแล้ว ยังมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันด้วย (Butenko, 1985) ซึ่งหนึ่งในเหตุผล ที่เป็นไปได้ของความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (heterogeneity) ก็คือ แคลลัสหรือเซลล์แขวนลอยนั้น มีต้นกำเนิดมาจากชิ้นส่วนของพืชที่ประกอบด้วยเซลล์ หลาย ๆ ลักษณะ เช่น เซลล์เมอริสเตม, เซลล์พาเรนไคมา และเซลล์อิพิเดอร์มิส เป็นต้น ซึ่งเซลล์ที่แตกต่างกัน ก็จะมีคุณสมบัติทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน เหตุผลอีกข้อหนึ่งของความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ก็คือเซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารวิทยาศาสตร์ ไม่มีเสถียรภาพทางพันธุกรรม เช่น มีการแบ่งเซลล์ผิดปกติ, มีการเปลี่ยนแปลงของยีน และการเกิด somaclonal variation เป็นต้น ซึ่งสาเหตุเหล่านี้ เกิดจากการเพิ่มและลดสารอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโต, การเกิดสารพิษ เช่น สารฟีนอลลิค ภายในเซลล์, การที่เซลล์เกาะกลุ่มได้รับสารอาหารไม่เท่ากัน ตลอดทั้งกลุ่มของเซลล์ (nutrient gradients) ตลอดจนระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเช่น การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง จะเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในระบบแขวนลอย เพราะเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบน

อาหารแข็งจะเกิด nutrient gradients ขึ้นมากกว่าเซลล์แขวนลอย (Thomas และ Davey,1975) และการที่จะสำรวจดูความไม่เป็นเนื้อเดียวกันของเซลล์พืชนั้น วิธีหนึ่งที่ใช้พิสูจน์คือ การโคลนเซลล์พืช

การโคลนเซลล์พืชทำได้โดยการกระจายเซลล์พืชที่ผสมกับอาหารวุ้นเหลว ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง ถ้าอาหารที่ใช้มีความเหมาะสมต่อเซลล์พืช เซลล์จะเจริญเติบโตจากเซลล์เดี่ยวมาเป็นกลุ่มของเซลล์ ซึ่งวิธีนี้ใช้กันมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1960 โดย Bergmann (1960) เซลล์พืชเพาะเลี้ยงที่นำมาคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ผลิตสารเบตา-เอคไดโซนได้สูง คือ แคลลัสจากส่วนของต้นไข่เน่า ซึ่งเพาะเลี้ยงมานานกว่า 2 ปี และจากการวิจัยของปัทมา (2533) พบว่า แคลลัสจากส่วนของต้น มีปริมาณสารเบตา-เอคไดโซนสูงกว่าแคลลัสจากส่วนอื่น ๆ

ลักษณะทั่วไปของแคลลัสส่วนต้นก่อนนำมาคัดเลือกหาสายพันธุ์ มีสีเหลืองสด จับกันแบบหลวม ๆ (friable callus) (รูปที่ 8) แม้จะทำการเพาะเลี้ยง ในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. มาตลอดเป็นเวลามากกว่า 2 ปี ก็ยังคงมีสภาพเหมือนเดิม จากการศึกษาลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดมีรูปร่างแตกต่างคือ รูปรี (ขนาด 50*40, 80*40 ไมโครเมตร) รูปวงกลม (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30-50 ไมโครเมตร) และรูปยาว (ขนาด 120*40, 180*40 ไมโครเมตร) นอกจากนี้ยังพบว่า เซลล์บางเซลล์มีสีแดงด้วย

เมื่อนำเซลล์แคลลัสไปเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย จะพบว่าการเจริญที่ระยะ log phase จะมีทั้งเซลล์เดี่ยวและเซลล์เกาะกลุ่มมากมาย จึงต้องทำการกรองผ่านแผ่นไนลอน เพื่อขจัดเซลล์เกาะกลุ่มใหญ่ ๆ ออกไป ซึ่งพบว่า เซลล์ที่กรองผ่านแผ่นไนลอนขนาด 110 ไมโครเมตร มีความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม ตั้งแต่ 1-15 เซลล์ต่อกลุ่ม โดยมีเซลล์เดี่ยวประมาณ 30 กว่าเปอร์เซนต์ และเซลล์เกาะกลุ่มขนาดต่าง ๆ รวมกันเกือบ 70 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 10) เมื่อนำไปผสมกับอาหารวุ้นเหลวสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. และมีวุ้น 0.7เปอร์เซนต์ แล้วจึงกระจายลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง สังเกตุการเจริญเติบโตของเซลล์เดี่ยว และเซลล์เกาะกลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 25 เท่า จะพบว่า เซลล์พืชไข่เน่ายังมีชีวิตอยู่ และจะเริ่มแบ่งเซลล์ภายใน 1-2 วัน หลังจากทำการกระจายเซลล์ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง(รูปที่ 16, 17) เซลล์เกาะกลุ่มขนาดใหญ่กว่าจะเจริญได้เร็วกว่าเซลล์เกาะกลุ่มขนาดเล็กกว่า และเซลล์เดี่ยวตามลำดับ อย่างไรก็ตามโอกาส

ที่เซลล์เจริญไปเป็นโคโลนีได้ มาจากเซลล์เกาะกลุ่มอย่างน้อย 5 - 6 เซลล์ขึ้นไป แต่เซลล์เดี่ยวหรือเซลล์เกาะกลุ่ม 2-4 เซลล์ มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า ดังนั้นการนำสารอาหารที่มีอยู่จำกัดเข้าเซลล์จึงเป็นไปได้น้อยกว่า จึงพบว่าเซลล์เดี่ยวส่วนใหญ่ เมื่อแบ่งเซลล์ไปได้สักพักก็หยุดการเจริญเติบโต ซึ่งได้ผลการทดลองคล้าย ๆ กับ เซลล์ Haplopappus sp. ที่กระจายเซลล์ลงในอาหารสูตร White ที่เสริมฮอร์โมน 2,4-D 0.005 มก./ล. พบว่าเซลล์เกาะกลุ่มตั้งแต่ 5 เซลล์ขึ้นไปมีการเจริญเติบโตไปเป็นโคโลนี แต่เซลล์เดี่ยวพบว่าไม่มีการแบ่งเซลล์ (Reinert, 1963)

ถึงแม้ว่า โคโลนีพืชที่เกิดในจานอาหารเพาะเลี้ยง จะมาจากเซลล์เกาะกลุ่มก็ตาม แต่สันนิษฐานได้ว่า โคโลนีที่เกิดนั้นมาจากการแบ่งเซลล์ของเซลล์เดี่ยว เพราะเมื่อเวลาเซลล์พืชแบ่งเซลล์ เซลล์จะไม่แยกออกจากกัน การแบ่งเซลล์เสร็จสมบูรณ์เมื่อเซลล์ลูกแต่ละเซลล์มีผนังเซลล์เกิดขึ้น แต่เซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นยังคงเชื่อมติดกันด้วย pectin-rich middle lamella (Jones, 1983) แต่ถ้ายิ่งเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่มเท่าใด โอกาสที่เซลล์กลุ่มนั้นจะมาจาก 1 เซลล์ ก็มีน้อยลงเท่านั้น และในการคัดเลือกสายพันธุ์ โดยทั่วไปจะใช้ความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่มไม่เกิน 15 เซลล์ต่อกลุ่ม ในการกระจายลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง (Bellincampi และคณะ, 1985 ; Bellincampi และ Morpurgo, 1987)

อย่างไรก็ตาม การกระจายเซลล์เกาะกลุ่มน้อย ๆ ผสมกับเซลล์เดี่ยวลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตโคลนเป็นวิธีที่ยอมรับโดยทั่วไปด้วยเหตุผลทางเทคนิค (Dougall, 1987) คือ

1. การกรองเซลล์ผ่านแผ่นไนลอน เพื่อคัดเลือกเอาแต่เฉพาะเซลล์เดี่ยวเป็นไปได้ยาก เพราะเซลล์พืชมีขนาดและรูปร่างต่าง ๆ กัน (irregular shape)
2. การเจริญเติบโตของเซลล์เดี่ยวจนกลายเป็นโคโลนี ที่เห็นได้ด้วยตาเปล่า ต้องใช้ความหนาแน่นของเซลล์ที่สูง และใช้ระยะเวลานานมากกว่าเซลล์เกาะกลุ่ม

นอกจากความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม จะมีผลต่อการเกิดโคโลนีแล้ว ยังพบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ต่ำสุด (minimum effective cell density) ที่ทำให้เกิดโคโลนีในจานอาหารเพาะเลี้ยงคือ 8×10^4 เซลล์ยูนิตต่อจานเพาะ และมีประสิทธิภาพของการเกิดโคโลนี (plating efficiency) เท่ากับ 0.25 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ถ้าเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์เป็น 1×10^5 เซลล์ยูนิตต่อจานเพาะ ประสิทธิภาพของการเกิดโคโลนีจะเป็น 3.0 เปอร์เซนต์

แสดงให้เห็นว่า ความหนาแน่นของเซลล์ที่กระจายลงในจานอาหาร มีความจำเป็นต่อการชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ และเกิดเป็นโคโลนีของเซลล์พืชขึ้น (Bergmann, 1977) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของการเกิดโคโลนียังต่ำอยู่มาก อาจเป็นเพราะอาหารที่ใช้เลี้ยงคือ 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ยังขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เนื่องจากมีรายงานว่า เซลล์พืชที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย yeast extract, casamino acid หรือ น้ำมะพร้าว สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการเกิดโคโลนีได้ โดยจะทำให้เซลล์เดี่ยวมีการแบ่งเซลล์ได้สูงขึ้น และเจริญเติบโตไปเป็นโคโลนีพืชได้ (Kao และ Michayluk, 1975; Street, 1973) นอกจากนี้การใช้ Feeder layer Technique ซึ่งเป็นเทคนิคที่ต้องใช้แคลลัสพืชชนิดอื่น ที่โตเร็ว เป็นตัวส่งอาหารและสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ไปยังเซลล์เดี่ยว เทคนิคนี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการเกิดโคโลนีในพืชหลายชนิด เช่น Haplopappus sp. (Horsch และ Jones, 1980), Nicotiana sp. (Cella และ Galun, 1980)

ดังได้กล่าวมาแล้วว่า งานวิจัยนี้จะทำการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ผลิตสารเบตา-เอคไดโซนได้สูง โดยการคัดเลือกจากกลุ่มเซลล์ที่เกิดในจานอาหารเพาะเลี้ยง จากการวิจัยพบว่าจะเริ่มเห็นกลุ่มเซลล์ขึ้นในจานเพาะเลี้ยงประมาณสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง และจะเห็นได้ชัดเจน เมื่อเลี้ยงไปได้ 1 เดือน (รูปที่ 14, 15) ซึ่งพบว่ามีโคโลนีลักษณะแตกต่างกันมากมาย เช่น บางโคโลนีมีสีเหลือง บางโคโลนีมีสีแดง บางโคโลนีมีขนาดใหญ่ บางโคโลนีขนาดเล็ก อย่างไรก็ตาม จะทำการเก็บเฉพาะโคโลนีที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ไปแยกเลี้ยงในขวดอาหารแข็ง ทั้งนี้เพราะโคโลนีที่ขนาดใหญ่อาจมาจาก การปะปนกันของกลุ่มเซลล์ ที่ได้มาจากเซลล์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน โดยจะทำการเก็บโคโลนีขนาดดังกล่าว 300 โคโลนี จากหลายๆจานอาหารเพาะเลี้ยง ไปแยกเลี้ยงในขวดอาหาร 300 ขวด จนได้ปริมาณมากพอ ซึ่งต้องใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 3 เดือน จึงทำการคัดเลือกหาตัวแทนความแตกต่างที่เห็นชัดเจนออกมาเพียง 3 โคลน (รูปที่ 19) คือ

โคลนสีเหลือง ให้ชื่อว่า PNA 1 มีลักษณะแคลลัสที่นิ่มและเปียก (soft and wet callus)

โคลนสีเขียว ให้ชื่อว่า PNA 2 มีลักษณะแคลลัสที่ร่วน (crisp callus)

โคลนสีแดง ให้ชื่อว่า PNA 3 มีลักษณะแคลลัสที่นิ่มและเปียก (soft and wet callus)

เมื่อสังเกตุลักษณะเซลล์ของทั้ง 3 โคลน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า โคลน PNA 1 มีเซลล์รูปร่างยาวและรีเป็นส่วนใหญ่(รูปที่ 20) ในขณะที่โคลน PNA 2 มีเซลล์กลมเป็นส่วนใหญ่(รูปที่ 21)

และโคลน PNA 3 นอกจากจะมีเซลล์รูปร่างยาวและรีเป็นส่วนใหญ่แล้ว ยังมีสารสีแดงซึ่งคือ แอนโธไซยานิน อยู่ภายในเซลล์ด้วย(รูปที่ 22)

เมื่อศึกษาถึงการเจริญเติบโต ในสภาพแขวนลอย และการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน ของแต่ละโคลน พบว่า โคลน PNA 1 และโคลน PNA 2 มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน โดยจะเข้าสู่ระยะ stationary phase พร้อม ๆ กัน และให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 0.07 กรัม/10 มล. แต่การสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน ของโคลน PNA 1 และ PNA 2 แตกต่างกัน พบว่า ที่เซลล์ระยะ declined phase ปริมาณสารเบตา-เอคไดโซนทั้งหมด ของโคลน PNA 1 มีค่ามากกว่าโคลน PNA 2 ประมาณ 100 เปอร์เซนต์ และเมื่อเปรียบเทียบการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนระหว่างโคลนPNA 1 กับเซลล์พืชไข่เน่าส่วนต้นก่อนทำการโคลน (อุทัยพรรณ, 2533) พบว่า โคลน PNA 1 มีการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน มากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้โคลนประมาณ 70 เปอร์เซนต์ แต่ในโคลน PNA 3 ซึ่งเป็นโคลนสีแดง มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าโคลน PNA 1และโคลนPNA 2 มาก (รูปที่ 27) และให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดน้อยกว่าด้วย นอกจากนั้นยังพบว่า โคลน PNA 3 ไม่สามารถสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนได้ สารสีแดงที่โคลน PNA 3 สังเคราะห์ขึ้นคือ แอนโธไซยานิน ซึ่งการสังเคราะห์จะควบคู่ไปกับการเจริญเติบโต (รูปที่ 26) จะเห็นได้ว่าโคลนที่คัดเลือกทั้ง3 โคลน มีความแตกต่างกันสิ้นเชิง และโคลน PNA 1 สามารถสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนได้สูงกว่า เซลล์พืชไข่เน่าที่ไม่ได้โคลน เช่นเดียวกับในงานวิจัยของ Davey และคณะ (1971) ได้ทำการคัดเลือกโคลนจากการกระจายเซลล์ Atropa belladonna พบว่า โคลนที่คัดเลือก 3 โคลน มีการเจริญเติบโต, ความต้องการสารอาหาร และปริมาณคลอโรฟิล ในเซลล์แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตาม การสังเกตุความแตกต่าง แต่ละโคโลนีด้วยตา สามารถใช้คัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ผลิตสี เท่านั้น เช่น anthocyanin, shikonin และ berberine แต่มันไม่เพียงพอสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ ที่ผลิตสารทุติยภูมิอื่น ๆ ซึ่งไม่มีสี ดังนั้น จึงต้องมีขั้นตอนการสกัดและวิเคราะห์ ซึ่งต้องสูญเสียเซลล์ไปบางส่วน การคัดเลือกโคลนโดยวิธีนี้ นอกจากจะใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกหาสายพันธุ์ ที่ผลิตสารทุติยภูมิเป้าหมายแล้ว ยังนำไปใช้ในการคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ต้านทาน herbicide (Chaleff และ Parsons,1978) การคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่เป็น auxotrophic mutant เช่น tryptophan auxothrop (Widholm, 1981) และสายพันธุ์ที่ทนเค็ม (Dix และ Street, 1975) เป็นต้น

4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์พิชไข่เน่า ด้วยอัลจิเนต

เนื่องจากโคลน PNA 1 สามารถสังเคราะห์สารเบตา - เอคไดโซนได้สูง จึงนำเซลล์ PNA 1 มาศึกษาวิธีการตรึงเซลล์ด้วยวิธีกักขังในอัลจิเนต ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์ในสภาวะที่ไม่รุนแรง สารตรึงเซลล์ไม่มีพิษต่อเซลล์ (Brodelius และคณะ, 1979) จึงเหมาะกับการใช้ตรึงในสภาวะที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ ปัจจุบันการตรึงเซลล์โดยวิธีกักขังในอัลจิเนต เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาวิจัยกันมาก (ตารางที่ 1) ทั้งนี้เพราะมีข้อได้เปรียบดังนี้ (Nilsson และคณะ, 1983)

ก. เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายในการกักขังเซลล์ไว้ให้อยู่ภายในร่างแหโพลีเมอร์

ข. เป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้สภาวะการตรึงเซลล์รุนแรง สามารถใช้ตรึงเซลล์มีชีวิตได้

ค. การเข้าออกของสารอาหารและผลิตภัณฑ์สะดวก เพราะความพรุนของอัลจิเนตสูง (high porosity)

ง. อัลจิเนตสามารถบ่มฆ่าเชื้อโดยวิธี autoclave ได้

จ. เซลล์ตรึงด้วยอัลจิเนตสามารถถูกปลดปล่อยให้เป็นอิสระได้โดยใช้ Calcium chelating agent ทำให้สามารถศึกษาสภาพของเซลล์ภายหลังการตรึงและนำเซลล์กลับมาใช้ได้ใหม่

ขนาดและความกลมของเม็ดอัลจิเนต ขึ้นอยู่กับความหนืดของโซเดียมอัลจิเนต และระยะห่างระหว่างปลายเข็มและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (Smidsrod และ Skjak-Braek, 1990) จากผลการวิจัยพบว่า เมื่อใช้โซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซนต์ และระยะห่างระหว่างปลายเข็มและสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 1 - 4 นิ้ว เม็ดเจลที่ได้มีความกลมสม่ำเสมอ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดอัลจิเนต 2.5 มิลลิเมตร

นอกจากจะคำนึงถึงขนาด และความกลมของเม็ดเจลแล้ว ความแข็งของเม็ดเจลก็สำคัญด้วย เนื่องจากความเข้มข้นของอัลจิเนตมีผลต่อความแข็งของเม็ดเจล โดยถ้ายิ่งเพิ่มเปอร์เซนต์อัลจิเนต จะยิ่งเพิ่มความแข็ง แต่ยิ่งเปอร์เซนต์อัลจิเนตสูง ความหนืดจะเพิ่มขึ้นจนไม่สามารถปั๊มผ่านปลายเข็มได้ (Brodelius, 1985b) จากงานวิจัยพบว่า อัลจิเนตที่ใช้ในการศึกษานี้ ถ้าความเข้มข้นมากกว่า 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) จะหนืดมากดังนั้นความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ตรึงคือ 2 เปอร์เซนต์อัลจิเนต (น้ำหนัก /

ปริมาตร) ความหนาแน่นของเซลล์พืชภายในเม็ดเจล มีผลต่อความแข็งของเม็ดเจลเช่นกัน ถ้ายิ่งมีความหนาแน่นของเซลล์ภายในเม็ดมาก ความแข็งจะลดลง แต่ความใกล้กันระหว่างเซลล์กับเซลล์จะมีมาก ซึ่งสามารถกระตุ้นให้สร้างสารทุติยภูมิขึ้นได้ (Dougall,1987) แต่ถ้ามีความหนาแน่นของเซลล์ภายในเม็ดเจลน้อย ถึงแม้ความแข็งจะมากขึ้น แต่ศักยภาพของการผลิตสารทุติยภูมิเป้าหมายอาจต่ำลง เนื่องจากความใกล้กันของเซลล์มีน้อย อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ภายในเม็ดประมาณ 1.8×10^{-4} กรัมแห้ง/เม็ดเจล ซึ่งเตรียมได้จาก 30 กรัมน้ำหนักสดต่อ 100 มิลลิลิตร สารละลายอัลจิเนตมีค่าความแข็งเท่ากับ 2.65 กิโลกรัมต่อตารางเซ็นติเมตรและความหนาแน่นของเซลล์ภายในเม็ดมีมากพอ ดังนั้นในการเตรียมเม็ดเซลล์ตรึงเพื่อใช้ในการศึกษาต่าง ๆ จึงใช้เซลล์ 30 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักสด/ปริมาตร)

โดยที่แคลเซียมไอออนมีความสำคัญต่อการแข็งตัว และความเสถียรของเม็ดเจลอัลจิเนตด้วย (Cheetham, 1977) จากการศึกษาขั้นต้น โดยเลี้ยงเซลล์ตรึงอัลจิเนตในอาหารปกติซึ่งมีแคลเซียมไอออนอยู่ 0.0015 โมลาร์ พบว่าเมื่อเลี้ยงไปเม็ดเจลอัลจิเนตแตก (รูปที่ 30) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มความแข็งให้กับเม็ดเซลล์ตรึงอัลจิเนต โดยไม่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์พืชไข่เน่า จากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ เซลล์พืชไข่เน่ายังคงมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ ดังนั้นจึงใช้แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.01 โมลาร์เสริมลงในอาหารเพื่อเสริมความแข็งให้กับเม็ดเซลล์ตรึงอัลจิเนต

4.3 ผลกระทบของชนิดอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย และเซลล์ตรึง PNA 1

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 เปรียบเทียบกับสูตรควบคุมคือ 1/2 MS ที่เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4 - D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์เหมือนกัน พบว่าอาหารสูตร B5 ให้การเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารสูตร 1/2 MS โดยเข้าสู่ระยะ log phase ได้เร็วกว่าและให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดมากกว่าอาหารสูตร 1/2 MS 46 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าปริมาณสารเบตา -

เอคไดโซนทั้งหมดที่ผลิตได้ในสูตรอาหาร B5 สูงกว่าสูตร 1/2 MS 55 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 31) ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับการเลี้ยงเซลล์ตริงในอาหารสูตร B5 เปรียบเทียบกับอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วยออร์โมนและความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เท่ากัน พบว่าเซลล์ตริงที่เลี้ยงในสูตรอาหาร B5 ให้การเจริญเติบโตและการผลิตสารเบตา - เอคไดโซนสูงกว่าเซลล์ตริงที่เลี้ยงในสูตรอาหาร 1/2 MS แสดงให้เห็นว่าอาหารมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารเบตา - เอคไดโซน เนื่องจากในอาหารสูตร B5 มีปริมาณไนเตรทมากกว่าในอาหารสูตร 1/2 MS ประมาณ 1 เท่า และมีปริมาณแอมโมเนียมน้อยกว่าประมาณ 5 เท่าซึ่งในพืชส่วนใหญ่มักจะใช้ไนเตรทมากกว่าแอมโมเนีย (Pierik, 1987) นอกจากนี้ในอาหารสูตร B5 มีปริมาณวิตามินมากกว่าในอาหารสูตร 1/2 MS เช่นปริมาณ Thiamine . HCl ในสูตรอาหาร B5 มีมากกว่าในสูตรอาหาร 1/2 MS ถึง 100 เท่าและปริมาณ Pyridoxine.HCL กับ Nicotinic acid ในสูตรอาหาร B5 มีมากกว่าในสูตรอาหาร 1/2 MS 2 เท่า ซึ่งวิตามินเหล่านี้มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์พืชมาก (Murashige, 1973; Gamborg และคณะ, 1976)

สำหรับการผลิตสารเบตา - เอคไดโซนในอาหารสูตร B5 มากกว่าในอาหารสูตร 1/2 MS อาจเป็นเพราะปริมาณ และสัดส่วนไนเตรทกับแอมโมเนียม มีผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิ เช่น เซลล์ Lithospermum erythrorhizon พบว่าไนเตรทเพิ่มผลผลิตของสาร shikonin ในขณะที่แอมโมเนียมให้ผลผลิตลดลงมากจนถึงขั้นยับยั้งการผลิตได้ (Fujita และคณะ, 1981)

4.4 ผลกระทบของสารตั้งต้นโคเลสเตอรอลต่อการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย และเซลล์ตริง PNA 1

เมื่อรู้วิถีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิเป้าหมายแล้ว การเพิ่มผลผลิตสารทุติยภูมิเป้าหมายก็จะทำได้ง่ายขึ้น โดยการใส่สารตั้งต้นลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง จากการศึกษาวิถีการสังเคราะห์สารเบตา - เอคไดโซน พบว่ามีโคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้น (Nakanishi และคณะ, 1972; Heftman, 1975) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้สนใจที่จะเพิ่มระดับการผลิตสารเบตา - เอคไดโซนโดยเสริมโคเลสเตอรอลลงในอาหารเพาะเลี้ยงด้วย

จากการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน ของเซลล์แขวนลอยอิสระ PNA 1 ในอาหารสูตร B5 ที่เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ และโคเลสเตอรอล 200 มก./ล. เปรียบเทียบกับอาหารสูตรควบคุม ซึ่งไม่ใส่โคเลสเตอรอล พบว่า การเจริญของเซลล์ในอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอล จะลดต่ำลง ประมาณ 26 เปอร์เซนต์ ที่การเจริญระยะ log phase แต่ปริมาณสารเบตา-เอคไดโซน ทั้งหมดจะสังเคราะห์มากกว่า ในอาหารสูตรควบคุม 20 เปอร์เซนต์ ที่เซลล์ระยะ stationary phase (รูปที่ 34)

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซน ของเซลล์ตริง PNA 1 ในอาหารสูตรดังกล่าว ที่ใส่โคเลสเตอรอล เทียบกับสูตรอาหารควบคุม ซึ่งไม่ใส่โคเลสเตอรอล พบว่า ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับเซลล์แขวนลอย คือ เซลล์ตริงที่เลี้ยง ในอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอล มีการเจริญต่ำกว่าในอาหารสูตรควบคุม ซึ่งไม่ได้ใส่โคสเตอรอล ประมาณ 17 เปอร์เซนต์ ที่การเจริญระยะ log phase แต่ปริมาณการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน จะสังเคราะห์ได้มากกว่าในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 30 เปอร์เซนต์ ที่เซลล์ระยะ stationary phase (รูปที่ 35)

จะเห็นได้ว่าสารตั้งต้นโคเลสเตอรอล มีผลต่อการเจริญ และการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน ของเซลล์ PNA 1 เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ อุทัยพรรณ (2533) เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า ในอาหารสูตร 1/2 MS ที่เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.เปรียบเทียบกับอาหารสูตรควบคุมซึ่งไม่ใส่โคเลสเตอรอล พบว่า โคเลสเตอรอลมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนคือ เซลล์ที่เจริญในอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอล มีการเจริญลดลงถึง 50 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ในอาหารสูตรควบคุม แต่การสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนในอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอล จะสูงกว่าสูตรควบคุม 28 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้แล้วยังมีงานวิจัยอื่นอีก ที่ใช้โคเลสเตอรอล เพื่อการเพิ่มผลผลิตสารประเภทสเตียรอยด์อื่น ๆ เช่น การใช้โคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นเพื่อเพิ่มผลผลิตสาร diosgenin ของเซลล์ Trigonella foenum-graecum (Khanna และคณะ, 1975) และเซลล์ Dioscorea deltoidea (Chowdhury และ Chaturvedi, 1979) หรือการใช้สารตั้งต้น ornithine เพื่อเพิ่มผลผลิตนิโคติน ในเซลล์ Nicotiana tabacum (Ohta และคณะ, 1978) ล้วนแต่ทำให้การเจริญของเซลล์ลดลง แต่ทำให้ปริมาณสารทุติยภูมิเป้าหมายเพิ่มสูงขึ้น

4.5 ผลกระทบของการตริงเซลล์ PNA 1 ต่อการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน ในสูตรอาหารที่ไม่ใส่โคเลสเตอรอล และ ใส่โคเลสเตอรอล

เมื่อศึกษาถึงการเจริญเติบโต และการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน ในเซลล์ตริงเทียบกับเซลล์แขวนลอย ในสูตรอาหาร B5 ที่เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. และความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ (รูปที่ 33) พบว่ารูปแบบของการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซน ในเซลล์ตริงแตกต่างจากเซลล์แขวนลอยอิสระมาก คือ เซลล์ตริงเจริญเติบโตได้ช้ากว่า โดยจะเข้าสู่ระยะ log phase ช้ากว่าเซลล์แขวนลอยอิสระ 1 สัปดาห์ และให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดต่ำกว่าเซลล์แขวนลอยอิสระ ประมาณ 30 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสวรเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ของเซลล์ตริงมีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับเซลล์แขวนลอยอิสระที่ระยะ stationary phase เดียวกัน

เมื่อศึกษาถึงการเจริญเติบโต และการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน ในเซลล์ตริงเทียบกับเซลล์แขวนลอยอิสระ ในอาหารสูตรดังกล่าว แต่ใส่โคเลสเตอรอล 200 มก./ล. (รูปที่ 36) พบว่า ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน คือ เซลล์ตริงมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าเซลล์อิสระมาก โดยให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดต่ำกว่าเซลล์แขวนลอยอิสระ ประมาณ 40 เปอร์เซนต์ แต่การผลิตสารเบตา-เอคไดโซนทั้งหมดสูงกว่า เซลล์แขวนลอยอิสระ 20 เปอร์เซนต์ และโคเลสเตอรอล มีส่วนสำคัญในการเพิ่มผลผลิตสารเบตา-เอคไดโซนด้วย

การที่เซลล์ตริงเจริญเติบโตช้ากว่าเซลล์แขวยลอยอิสระมาก เนื่องจากสารอาหาร, น้ำ และออกซิเจน แพร่เข้าเซลล์ได้น้อยลง แต่เซลล์ตริงสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน ได้สูงกว่าทั้งนี้เนื่องจาก เซลล์ที่เจริญเติบโตรวดเร็ว วิถีเมตาบอริสมจะสร้างแต่สารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต แต่ถ้าการเจริญถูกจำกัด เช่น การกักขังเซลล์ ไว้ในเม็ดเจล ก็จะทำให้วิถีเมตาบอริสม เปลี่ยนจากการสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต มาสร้างสารทุติยภูมิแทน (Lindsey และ Yeoman, 1983) ซึ่งจากการวิจัยมากมาย พบว่าเซลล์ตริงสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้มากกว่าเซลล์อิสระ เช่น Haldimann และ Brodelius (1987) ได้วิจัยพบว่าเซลล์ Coffea arabica ตริงในอัลจิเนต เพื่อผลิตสารอัลคาลอยด์ methylxanthine ให้การเจริญเติบโตของเซลล์ช้ากว่าเซลล์อิสระ แต่มีผลทำให้การสังเคราะห์สารอัลคาลอยด์นี้สูงขึ้น 13 เท่า Ishida (1988) ได้วิจัยพบว่าเซลล์ Dioscorea deltoidea ตริงใน

polyurethane foam เพื่อผลิตสาร diosgenin พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ตรึงช้ากว่าเซลล์อิสระ แต่มีผลทำให้การสังเคราะห์สาร diosgenin สูงขึ้น 40 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ การใช้สารตั้งต้นร่วมกับการตรึงเซลล์ สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิเป้าหมายได้ เช่น การตรึงเซลล์ Datura innoxia ด้วยอัลจิเนต เพื่อผลิตสารอัลคาลอยด์ tropane โดยใช้สารตั้งต้น ornithine พบว่า สารตั้งต้น ornithine มีผลทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ตรึงลดลง แต่ส่งผลให้ผลผลิตอัลคาลอยด์ tropane เพิ่มขึ้น (Lindsey และ Yeoman, 1983) Brodelius และ Nilsson (1980) ได้ทำการตรึงเซลล์ Catharanthus roseus ด้วยอัลจิเนต เพื่อผลิตสารอัลคาลอยด์ ajmalicine โดยใช้สารตั้งต้นคือ tryptamine พบว่า สามารถเพิ่มการผลิตสารอัลคาลอยด์ ajmalicine สูงขึ้น 26 เปอร์เซนต์ จากงานวิจัยนี้พบว่าเซลล์ Vitex glabrata ที่คัดเลือกแล้ว หรือเซลล์ PNA 1 ตรึงในอัลจิเนต เพื่อผลิตสารเบตา-เอคไดโซน โดยใช้สารตั้งต้นคือ โคเลสเตอรอล พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตสารเบตา-เอคไดโซนสูงขึ้น 20 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับเซลล์แขวนลอยอิสระ

การที่เซลล์ตรึงผลิตสารทุติยภูมิได้สูงกว่าเซลล์แขวนลอยอิสระอาจเป็นเพราะการใกล้ชิดกันของเซลล์ภายในเม็ดเจล คล้ายกับเซลล์พืชในธรรมชาติซึ่งอยู่ติดกัน ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนสารเคมีบางอย่างระหว่างเซลล์ เป็นผลให้นำไปสู่วิถีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิขึ้น (Rhodes และ Kirsop, 1982) มีรายงานว่า การเพาะเลี้ยง organized tissues เช่น ราก, ยอด, เอมบริโอ สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้สูงกว่า unorganized tissues ซึ่งก็คือ เซลล์พืชอิสระที่เพาะเลี้ยงในระบบแขวนลอย (Staba, 1985 ; Fowler, 1986) เช่น การผลิตสาร scopolamine จากการเพาะเลี้ยงราก Hyoscyamus niger ในอาหารเหลวให้ผลผลิตสูงกว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอิสระ (Hashimoto และ Yamada, 1983) การผลิตสาร pyrethrins จากการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของไพริทั่ม ในอาหารเหลว ให้ผลผลิตสูงกว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอิสระ (Zieg และคณะ, 1983) แสดงให้เห็นว่าวิธีเมตาบอริสมของ organized tissues เหมือนกับในพืชธรรมชาติ ซึ่งการตรึงเซลล์ก็เป็นการเลียนแบบ เซลล์พืช ในธรรมชาติเช่นกัน นอกจากนี้ การตรึงเซลล์พืชนั้น ทำให้เซลล์ที่ถูกกักขังอยู่ภายในเม็ดเจล อยู่ในสภาวะที่ถูกกดดัน (stress) โดยเฉพาะสารอาหารที่เข้าสู่เซลล์จะถูกจำกัด Nettleship และ Slaytor (1974) พบว่า ในอาหารที่ขาดฟอสเฟต

จะกระตุ้นให้แคลลัสของ Peganum harmala สร้างสารอัลคาลอยด์ และสารทุติยภูมิอื่น ๆ สูงขึ้น หรือในสภาวะที่ขาดไนเตรทจะกระตุ้นให้แคลลัสของ Capsicum frutescens สร้างสาร capsaicin สูงขึ้น (Yeoman และคณะ 1980) ดังนั้นการตรึงเซลล์ ก็เป็นการทำให้เซลล์ถูกกดดันทางด้านอาหาร เป็นผลให้กระตุ้นให้สร้างสารทุติยภูมิสูงขึ้น

เมื่อศึกษาถึงความมีชีวิตของเซลล์ตรึงในอัลจิเนต โดยย้อมเซลล์ด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท เทียบกับความมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยอิสระ พบว่า เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยอิสระ จะเริ่มลดลงเมื่อเซลล์เจริญเข้าสู่ stationary phase และตายไปในที่สุดเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ declined phase ทั้งนี้เพราะขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และมีเซลล์ที่อายุมากเกิดการ lysis จะเห็นได้ว่า ตรวจพบสารเบตา-เอคไดโซน ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์แขวนลอยอิสระที่ระยะ stationary phase ซึ่งมีปริมาณสูงมาก ในขณะที่เซลล์ตรึงในอัลจิเนต พบว่า เปอร์เซนต์ความมีชีวิต ที่ระยะ stationary phase มีประมาณ 70 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้เพราะเซลล์ถูกกักขังไว้ภายในโพลิเมอร์เจล ซึ่งจะช่วยป้องกันการกระทบกระเทือน จากสภาวะแวดล้อมภายนอก จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 39) พบว่า เซลล์ภายในเม็ดอัลจิเนต ที่ระยะ stationary phase มีสภาพสมบูรณ์ดี ดังนั้น ปริมาณสารเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์จึงมีน้อยมาก จะเห็นได้ว่าการตรึงเซลล์พืชจะช่วยปกป้องความมีชีวิตของเซลล์ไว้ได้ นอกจากนี้ ยังทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิเป้าหมายยาวนานขึ้น เช่น การตรึงเซลล์พืช Digitalis lanata ในอัลจิเนตเพื่อผลิตสาร β-methyldigitoxin สามารถยืดอายุการผลิตไปได้นานถึง 170 วัน (Alfermann และคณะ, 1983) การตรึงเซลล์พืช Morinda citrifolia ในอัลจิเนต นอกจากจะทำให้การสังเคราะห์สาร anthraquinone สูงขึ้น แล้วยังทำให้อายุการผลิตสารของเซลล์ยาวนานขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์แขวนลอยอิสระ ซึ่งการผลิตสาร anthraquinone จะค่อยๆ ลดลง เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ declined phase (Brodelius, 1979) หรือการตรึงเซลล์พืช Thalictrum minus ด้วยอัลจิเนต เพื่อการผลิตสาร berberine ก็สามารถเพิ่มผลผลิตสาร berberine และยืดอายุการผลิตสารของเซลล์ได้ยาวนานขึ้นด้วยเช่นกัน (Kobayashi และ คณะ, 1988) อย่างไรก็ตาม การตรึงเซลล์พืชโดยวิธีนี้เซลล์จะมีการเจริญเติบโต และหลุดออกมาจากเม็ดเจลอัลจิเนตได้ (รูปที่ 39)

4.6 ผลกระทบของสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, ทวีน 80 และไดไพริดิล ต่อการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตริง PNA 1

จากงานวิจัยของ จารุวรรณ์ วิมล (2533) ในการแปลงรูปโคเลสเตอรอลเป็น 1,4-แอนโดรสตาไดอีน-3,17-ไดโอน (ADD) โดยจุลินทรีย์ Mycobacterium sp. พบว่าเมื่อใช้สารละลายอินทรีย์ไดออกเซนเป็นตัวทำละลายโคเลสเตอรอล และใส่ทวีน80 เพื่อช่วยการกระจายตัวของโคเลสเตอรอลในอาหารได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังใส่สารไดไพริดิลเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 9-อัลฟา-ไฮดรอกซิเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการไฮโดรไลซ์นิวเคลียสของสเตียรอยด์ ผลปรากฏว่าโคเลสเตอรอลเปลี่ยนไปเป็น ADD เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการเปลี่ยนสารตั้งต้นโคเลสเตอรอลไปเป็นสารเบตา-เอคไดโซน ว่าจะเพิ่มขึ้นหรือไม่ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าในอาหารเหลวที่ใส่ทวีน80 2 กรัม/ลิตร และละลายโคเลสเตอรอลในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน และใส่ไดไพริดิล 0.005 มิลลิโมลาร์ เพื่อยับยั้งเอนไซม์ 9-อัลฟา-ไฮดรอกซิเลส ซึ่งอาจมีในพืชไข่เน่า โดยเทียบกับอาหารสูตรควบคุมที่ไม่ได้ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล ผลการทดลอง (รูปที่ 45) พบว่า ในสูตรอาหารที่ใส่ทวีน 80 และไดไพริดิล ทั้งเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตริงไม่มีการเจริญเติบโตและยับยั้งการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนด้วย จากการสังเกตุดูความมีชีวิตโดยการย้อมเซลล์ด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซิเตท พบว่าเปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยจะค่อยๆลดลงจนเหลือ 20 กว่าเปอร์เซนต์เมื่อเลี้ยงไปนาน 2 เดือน แต่เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ตริงพบว่ามีประมาณ 50 เปอร์เซนต์ และความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เรืองออกมาจะลดลง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรควบคุม แสดงว่าเซลล์ตริงที่เลี้ยงในอาหารที่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล อยู่ในสภาพที่อ่อนแอมาก แต่สาเหตุที่เซลล์แขวนลอยส่วนใหญ่ตายอาจเกิดจากสัมผัสกับทวีน80 และไดไพริดิล โดยตรงและเป็นเวลานาน ดังนั้นจึงหาสาเหตุที่ทำให้เซลล์ตายว่าเกิดจากทวีน80 หรือไดไพริดิล หรือทั้งสองสาร จากการทดลอง (ตารางที่ 20,21) พบว่าความเข้มข้นของทวีน80 2 กรัม/ลิตร มีผลทำให้เซลล์พืชหยุดการเจริญเติบโตและตายไปในที่สุด และพบว่าความเข้มข้นของทวีน80 ที่ไม่ทำให้เซลล์พืชตายคือ 0.25 กรัม/ลิตร โดยมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ สำหรับไดไพริดิล 0.005 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใช้ในการทดลองพบว่า ไม่ทำให้เซลล์พืชตายและมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ ดังนั้นสาเหตุ

ที่ทำให้เซลล์นีชตายและไม่มีการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนจึงมาจากทวีน80 2 กรัม/ลิตร อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาและวิจัยต่อไปเพื่อเพิ่มผลผลิตสารเบตา-เอคไดโซน สิ่งที่น่าสนใจ คือ การใช้สารตั้งต้นตัวใหม่แทนโคเลสเตอรอล คือ 7-dehydrocholesterol เพราะเป็น intermediate ที่ใกล้กว่าโคเลสเตอรอลในวิถีสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซน (Warren และ Hetru, 1990) นอกจากนี้ทวีน80 0.25 กรัม/ลิตร ก็น่าสนใจด้วยเช่นกัน เพราะจะทำให้การกระจายตัวของสารตั้งต้นในอาหารเหลวได้ดีขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย

1. โคลนพืชไข่เน่าทั้ง 3 โคลน คือโคลน PNA 1, PNA 2 และ PNA 3 มีรูปร่างลักษณะเซลล์และคุณสมบัติทางชีวเคมีแตกต่างกัน โดยที่โคลน PNA 1 ลักษณะเซลล์ส่วนใหญ่จะยาวรี แคลลัสมีสีเหลือง ลักษณะเปียกแฉะ และผลผลิตสารเบตา-เอคไดโซนสูงกว่าโคลน PNA 2 ซึ่งเซลล์มีลักษณะกลมเป็นส่วนใหญ่ แคลลัสมีสีเขียว ลักษณะร่วนซุย ในขณะที่โคลน PNA 3 ไม่สามารถสร้างสารเบตา-เอคไดโซนได้ แต่สร้างสารสีม่วงแดงแทน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนโธไซยานิน ลักษณะเซลล์ส่วนใหญ่จะยาวรี แคลลัสมีสีแดง ลักษณะเปียกแฉะ
2. โคโลนีของเซลล์พืชที่เกิดขึ้นในจานอาหารเพาะเลี้ยง เจริญมาจากเซลล์เกาะกลุ่มอย่างน้อย 5 - 6 เซลล์/กลุ่ม ขึ้นไป
3. ความหนาแน่นของเซลล์ต่ำสุด (minimum effective cell density) ที่ทำให้เกิดโคโลนีในจานอาหารเพาะเลี้ยงคือ 8×10^4 เซลล์ยูนิต/จานเพาะเลี้ยง
4. ประสิทธิภาพของการเกิดโคโลนี (plating efficiency) สูงสุดที่ได้คือ 3.0 %
5. ทั้งเซลล์แขวนลอยอิสระและเซลล์ตริง มีการเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนในอาหารสูตร B5 สูงกว่าในอาหารสูตร 1/2 MS
6. โคเลสเตอรอลมีผลทำให้การเจริญของเซลล์แขวนลอยอิสระและเซลล์ตริงลดต่ำลง แต่การสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนเพิ่มขึ้น
7. เซลล์ตริงเจริญเติบโตได้ช้ากว่าเซลล์แขวนลอยอิสระ แต่ผลผลิตสารเบตา-เอคไดโซนสูงกว่า
8. ที่ระยะ stationary phase ตรวจพบสารเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ของเซลล์แขวนลอยอิสระสูงเนื่องจากเซลล์อายุมากเกิดการ lysis แต่เซลล์ตริงตรวจพบได้น้อย เพราะการตริงเซลล์พืชจะช่วยปกป้องความมีชีวิตของเซลล์ไว้ได้
9. ทวีน80 2 กรัม/ลิตร มีผลทำให้เซลล์แขวนลอยอิสระและเซลล์ตริงหยุดการเจริญเติบโตและหยุดการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนด้วย