บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 สมบัติและลักษณะของเซลล์แคลลัสจากส่วนต้นไข่เน่า

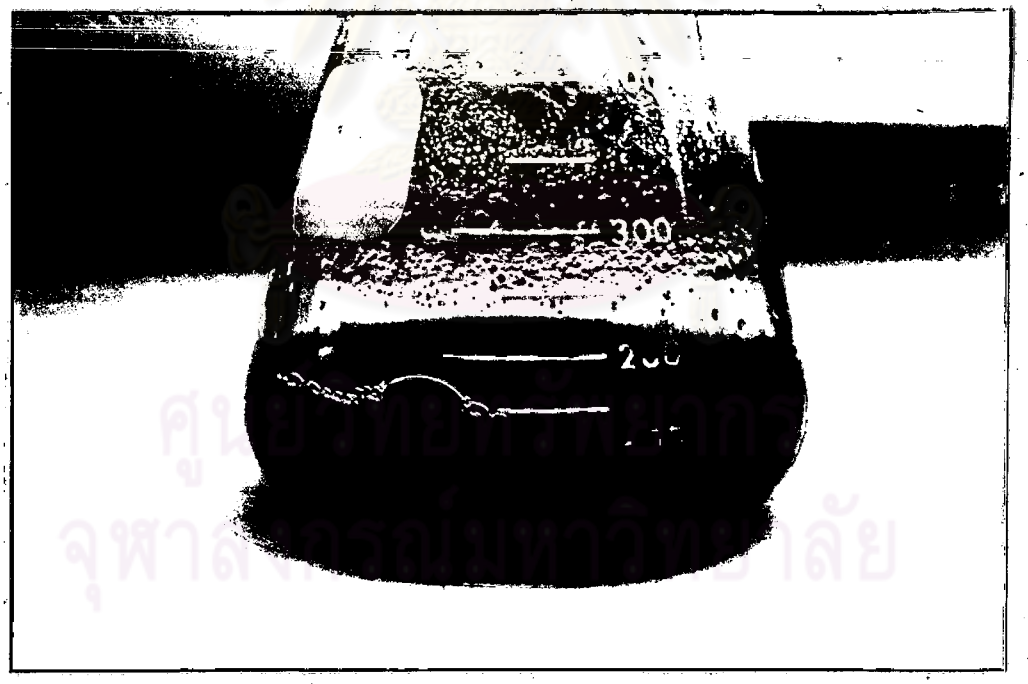
เซลล์แคลลัสที่ใช้เป็นเซลล์แคลลัสส่วนต้นซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4 สัปดาห์ มานานกว่า 2 ปี ทั้งนี้พบว่า แคลลัสจากส่วนต้นมีปริมาณสารเบตา-เอคไดโซนสูงกว่าแคลลัสจากส่วนอื่นๆ (ปัทมา , 2533)

ลักษณะทั่วไปของแคลลัสส่วนต้นก่อนนำมาคัดเลือกหาสายพันธุ์ มีสีเหลืองสด จับกันแบบหลวมๆ (friable callus) (รูปที่ 8) จากการศึกษาลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่างแตกต่างกันคือ เซลล์รูปยาว รูปรี และรูปกลม

3.2 สมบัติและลักษณะของเซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยส่วนต้นในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล.(รูปที่ 9) พบว่า เซลล์เจริญเข้าสู่ log phase ในสัปดาห์ที่ 2 เซลล์ที่ระยะนี้มีลักษณะรูปร่างต่างๆกัน ทั้งรูปกลม รูปยาวและรูปรี มีการเกาะกลุ่มของเซลล์ขนาดต่างๆมากมาย ตั้งแต่เซลล์เดี่ยว จนถึง มากกว่าร้อยเซลล์ต่อกลุ่ม เซลล์เจริญเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 5 เซลล์ที่ระยะนี้มีรูปร่างกลมและรีเป็นส่วนใหญ่ vacuole ภายในเซลล์ขยายใหญ่จนดัน cytoplasm ไปชิดกับผนังเซลล์ นอกจากนี้จะพบเซลล์ที่แตกสลายเหลือแต่เศษเซลล์

รูปที่ 8 แคลลัสส่วนต้นของพืชไข่เน่า เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล อายุ 4 สัปดาห์



รูปที่ 9 เซลล์แขวนลอยส่วนต้นของพืชไข่เน่า เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล อายุ 4 สัปดาห์

3.3 การศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์ก่อนและหลังกรองผ่านแผ่นไนลอน

เมื่อนำเซลล์แขวนลอยที่เจริญอยู่ในระยะ log phase มาหาความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม พบว่ามีเซลล์เดี่ยวประมาณ 18 %, เซลล์เกาะกลุ่ม 2 - 4 เซลล์ มีประมาณ 30 % เซลล์เกาะกลุ่ม 5 - 10 เซลล์ มีประมาณ 13 % และเซลล์เกาะกลุ่ม 11 - 15 เซลล์ มีประมาณ 17 % นอกนั้นเป็นเซลล์เกาะกลุ่มมากกว่า 15 เซลล์ (รูปที่ 11) จนถึงนับไม่ได้มีประมาณ 22 % เมื่อนำเซลล์แขวนลอยมากรองผ่านแผ่นกรองไนลอนขนาด 110 ไมครอน และหาความหนาแน่นของเซลล์เกาะกลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 10) พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่ (40 %) ที่กรองผ่านแผ่นกรองไนลอนเป็นเซลล์เดี่ยวและเซลล์เกาะกลุ่มไม่เกิน 2 - 4 เซลล์ต่อกลุ่ม (รูปที่ 12) ในขณะที่พบเซลล์เกาะกลุ่มไม่เกิน 15 เซลล์ต่อกลุ่ม ประมาณ 5 % แต่ไม่พบเซลล์เกาะกลุ่มมากกว่า 15 เซลล์ต่อกลุ่มเลย จากนั้นนำเซลล์ที่กรองผ่านแผ่นไนลอนไปกระจายลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกโคโลนีของเซลล์พืชต่อไป

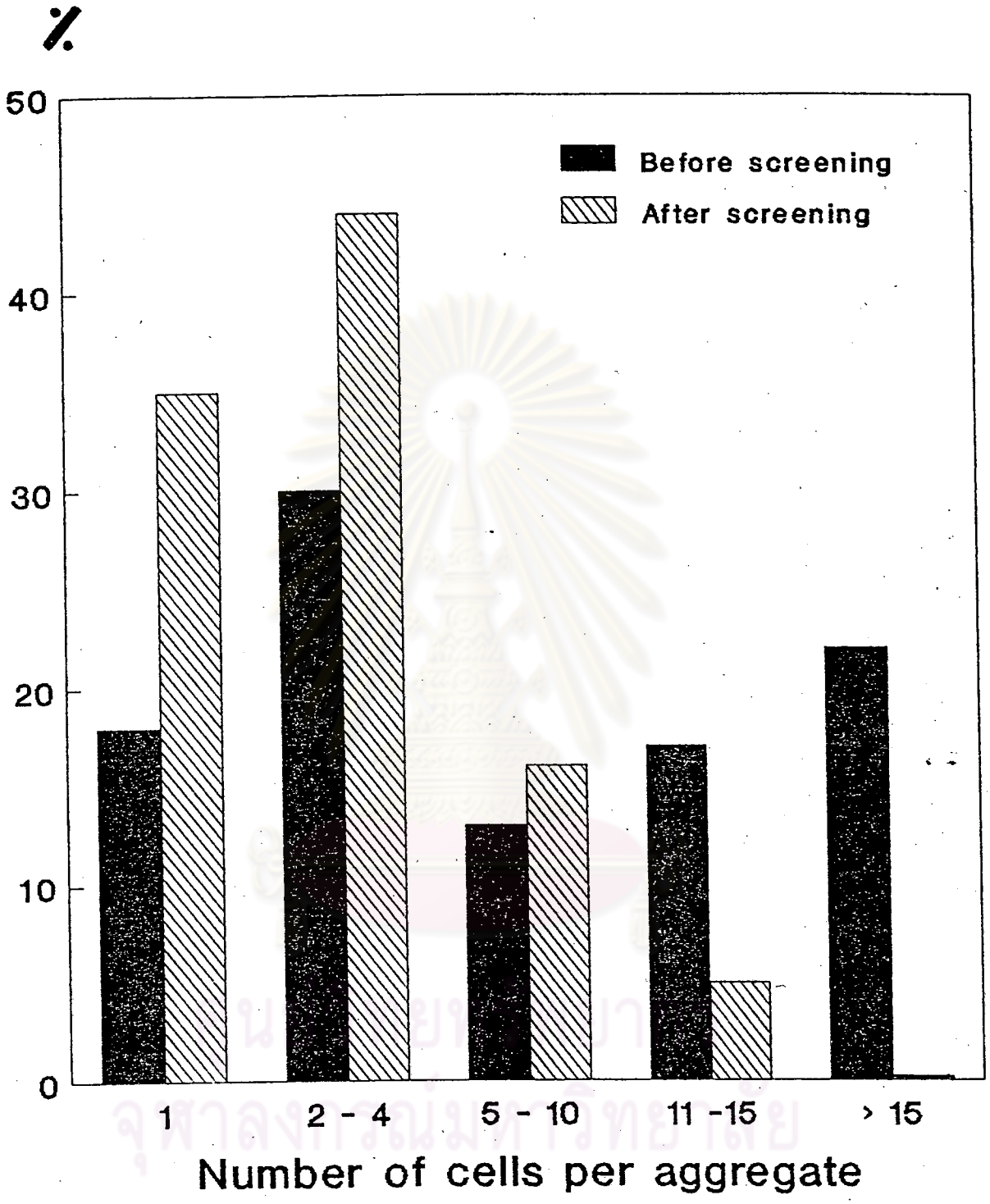
3.4 การศึกษาความเข้มข้นของเซลล์ยูนิตที่เหมาะสมต่อการเจริญในอาหารเพาะเลี้ยงแข็ง

เมื่อใช้เซลล์แขวนลอยซึ่งกรองผ่านแผ่นกรองไนลอน ที่ความเข้มข้นของเซลล์ยูนิตตั้งแต่ 1×10^4 ถึง 2×10^5 เซลล์ยูนิต/จานอาหารเพาะเลี้ยง ไปกระจายลงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล., BA 2 มก./ล. และวุ้น 0.7 % ตามวิธีของ Bergmann (1960) จากการทดลองพบว่า (ตารางที่ 3 และรูปที่ 13) ความเข้มข้นของเซลล์ยูนิตมีผลต่อการเกิดโคโลนีของเซลล์พืช ดังนี้ ถ้าความเข้มข้นต่ำกว่า 7×10^4 เซลล์ยูนิต/จานเพาะ ไม่สามารถเกิดโคโลนีขึ้นได้ แต่จะเริ่มเห็นโคโลนีของเซลล์พืชขึ้นเมื่อกระจายเซลล์ความเข้มข้นตั้งแต่ 8×10^4 เซลล์ยูนิต/จานเพาะ(รูปที่ 14) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ความเข้มข้นเซลล์ยูนิตเริ่มต้น 1×10^5 เซลล์ยูนิต/จานเพาะ (รูปที่ 15) ประสิทธิภาพในการเกิดโคโลนีของเซลล์พืชสูงสุดได้ 3.0 % ซึ่งยังคงต่ำมาก

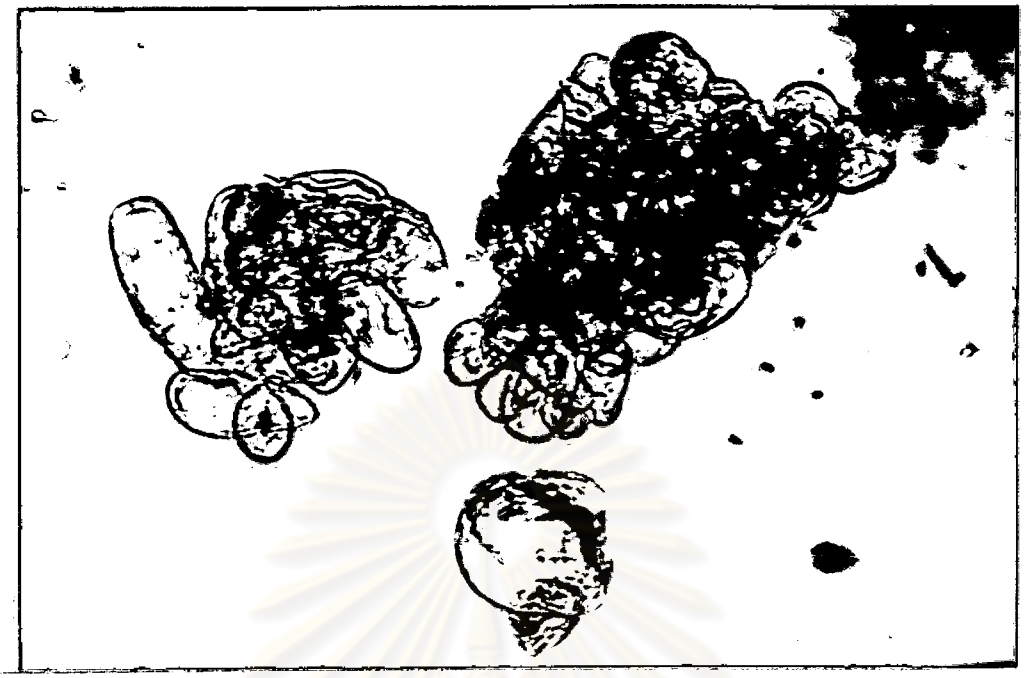
ตารางที่ 2 ความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม ก่อนและหลังกรองผ่านแผ่นไนลอนขนาด 110 ไมครอน

Number of cells per aggregate	Before screening (%)	After screening (%)
1	18	35
2 - 4	30	44
5 - 10	13	16
11 - 15	17	5
> 15	22	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 ความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม ก่อนและหลังกรองผ่านแผ่นไนลอนขนาด 110 ไมครอน



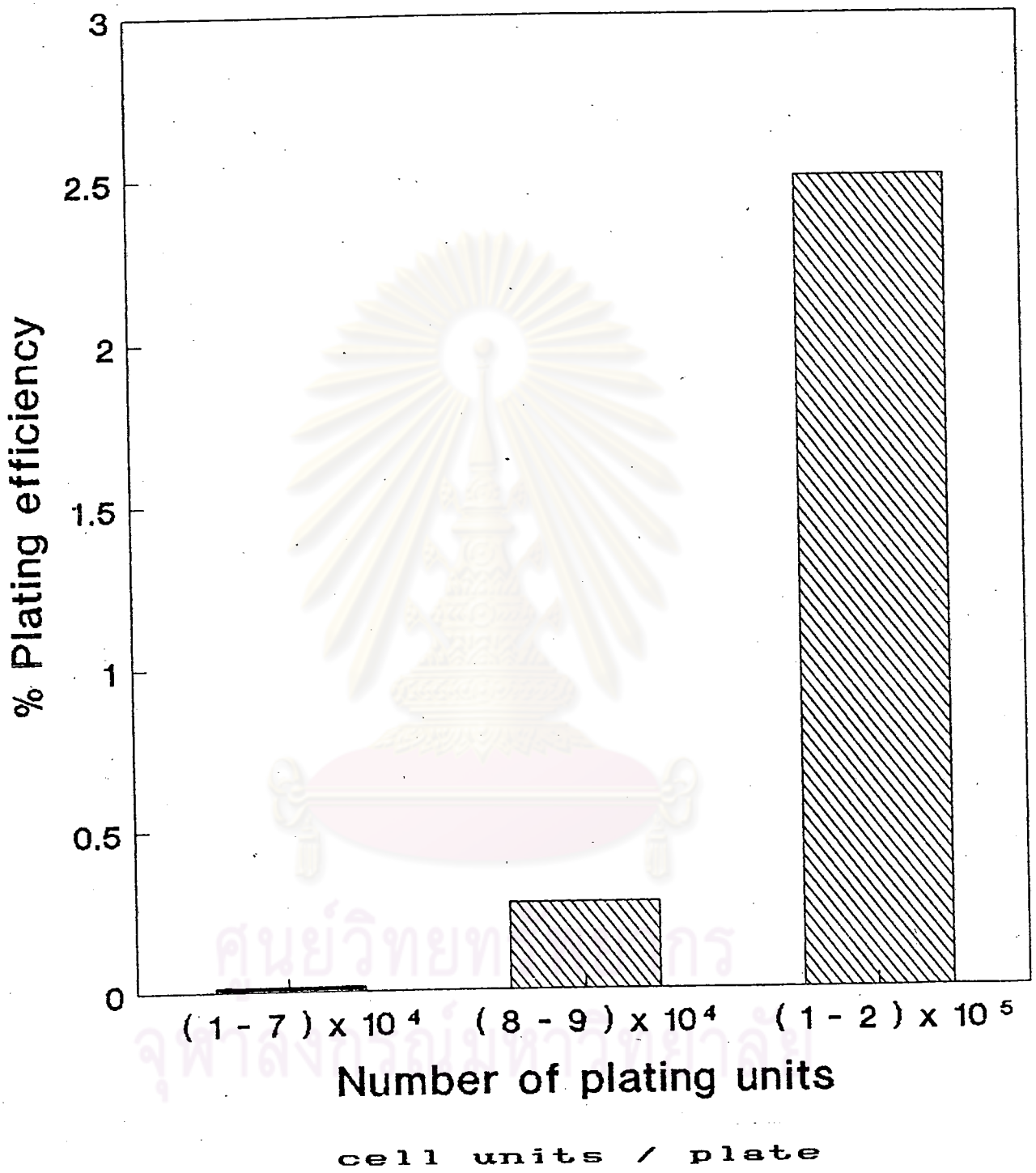
รูปที่ 11 ความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม ก่อนกรองผ่านแผ่นไนลอนขนาด 110 ไมครอน

รูปที่ 12 ความหนาแน่นของเซลล์ต่อกลุ่ม หลังกรองผ่านแผ่นไนลอนขนาด 110 ไมครอน

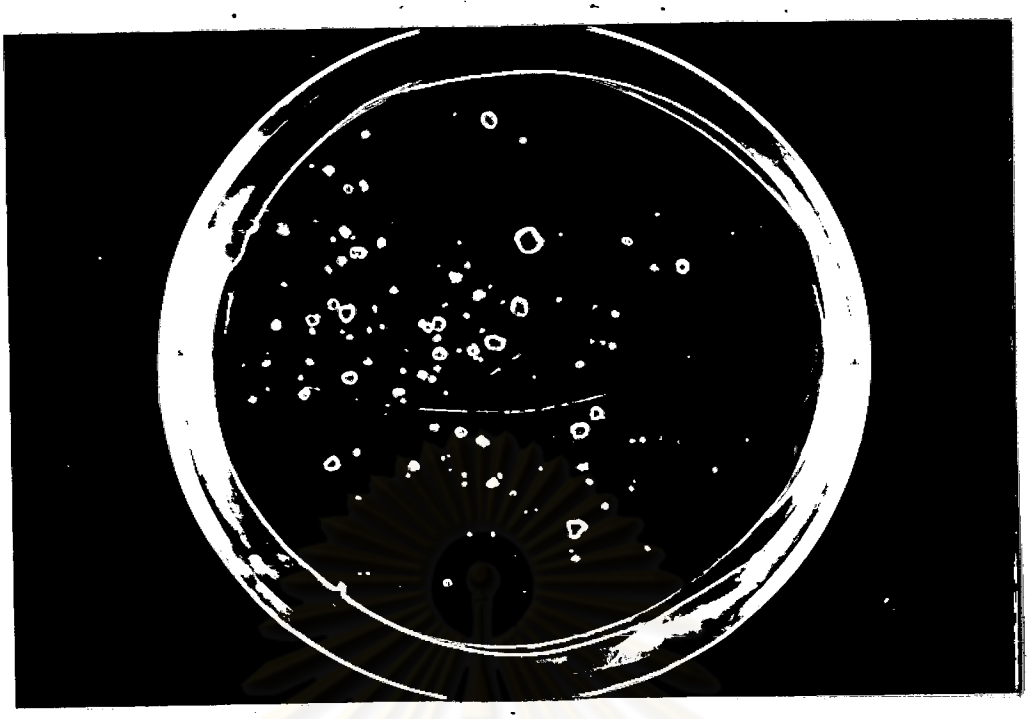
ตารางที่ 3 อิทธิพลของความหนาแน่นเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงต่อประสิทธิภาพการเกิดโคโลนี ภายในเวลา 1 เดือน

Number of plating units	Number of colonies	Plating efficiency (%)
1×10^4	0	0
2×10^4	0	0
3×10^4	0	0
4×10^4	0	0
5×10^4	0	0
6×10^4	0	0
7×10^4	0	0
8×10^4	~ 200	0.25
9×10^4	~ 250	0.28
1×10^5	~ 3000	3.00
1.5×10^5	~ 3500	2.30
2×10^5	~ 4000	2.00

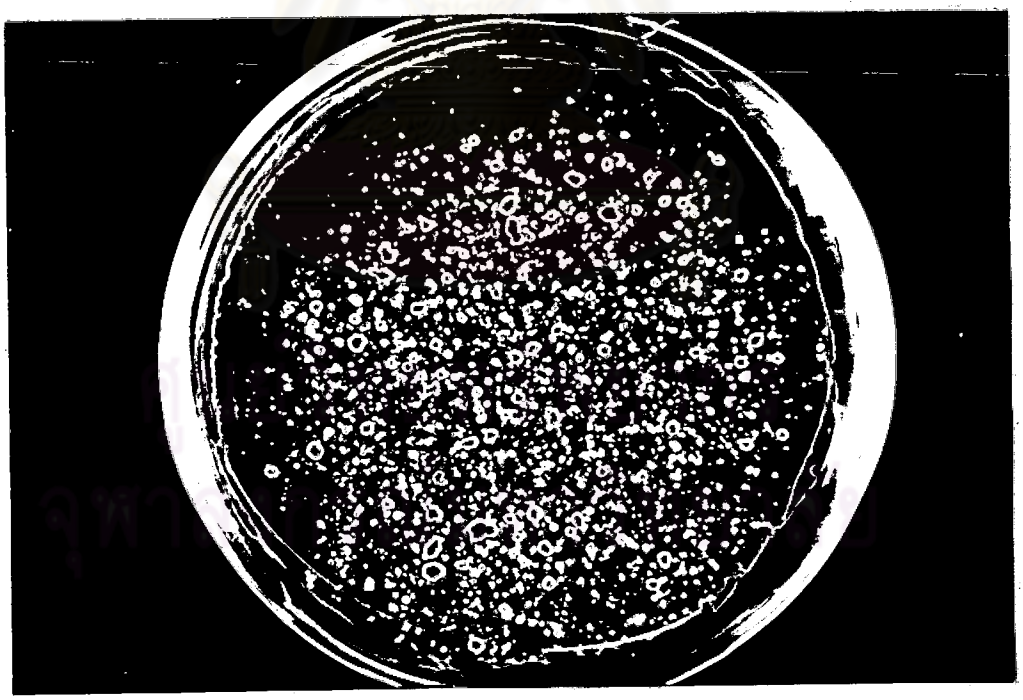
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 อิทธิพลของความหนาแน่นเซลล์ในจานอาหารเพาะเลี้ยงต่อประสิทธิภาพการเกิดโคโลนี ภายในเวลา 1 เดือน



รูปที่ 14 โคโลนีของเซลล์พืชไข่เน่า ซึ่งเกิดจากการกระจายเซลล์ในจานอาหารเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มข้นเซลล์ 8 x 10^4 เซลล์ยูนิต/จานเพาะ ภายในเวลา 1 เดือน



รูปที่ 15 โคโลนีของเซลล์พืชไข่เน่า ซึ่งเกิดจากการกระจายเซลล์ในจานอาหารเพาะเลี้ยงด้วยความเข้มข้นเซลล์ 1 x 10^5 เซลล์ยูนิต/จานเพาะ ภายในเวลา 1 เดือน

3.5 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์พืชในจานอาหารเพาะเลี้ยง

จากการสังเกตจานอาหารเพาะเลี้ยงด้วยตาเปล่าจะพบว่า เริ่มเห็นโคโลนีของเซลล์พืชประมาณสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง และเห็นชัดเจนเมื่อเลี้ยงไปได้ 1 เดือน (รูปที่ 14 และรูปที่ 15) ซึ่งจะพบว่ามีโคโลนีแตกต่างกันมากมาย เมื่อติดตามการเจริญและแบ่งเซลล์ของเซลล์เดี่ยวและเซลล์เกาะกลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทุกๆ 2 วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน พบว่า เซลล์พืชไข่เน่าจะเริ่มแบ่งเซลล์ภายใน 1 - 2 วัน หลังจากทำการกระจายเซลล์ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง (รูปที่ 16 และรูปที่ 17) เซลล์เกาะกลุ่มขนาดใหญ่กว่าเจริญได้เร็วกว่าเซลล์เกาะกลุ่มขนาดเล็กกว่า และเซลล์เดี่ยวตามลำดับ จากการติดตามด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์เกาะกลุ่มกันตั้งแต่ 6 เซลล์ขึ้นไป ซึ่งเชื่อว่าเจริญมาจากเซลล์เดี่ยว สามารถเจริญเติบโตเป็นโคโลนีเซลล์พืชได้ แต่เซลล์เดี่ยวหรือเซลล์เกาะกลุ่ม 2-4 เซลล์ มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า จึงพบว่าเซลล์เดี่ยวส่วนใหญ่ เมื่อแบ่งเซลล์ไปได้สักพักก็หยุดการเจริญเติบโต

3.6 การคัดเลือกโคโลนีของเซลล์พืชไข่เน่า (Vitex glabrata)

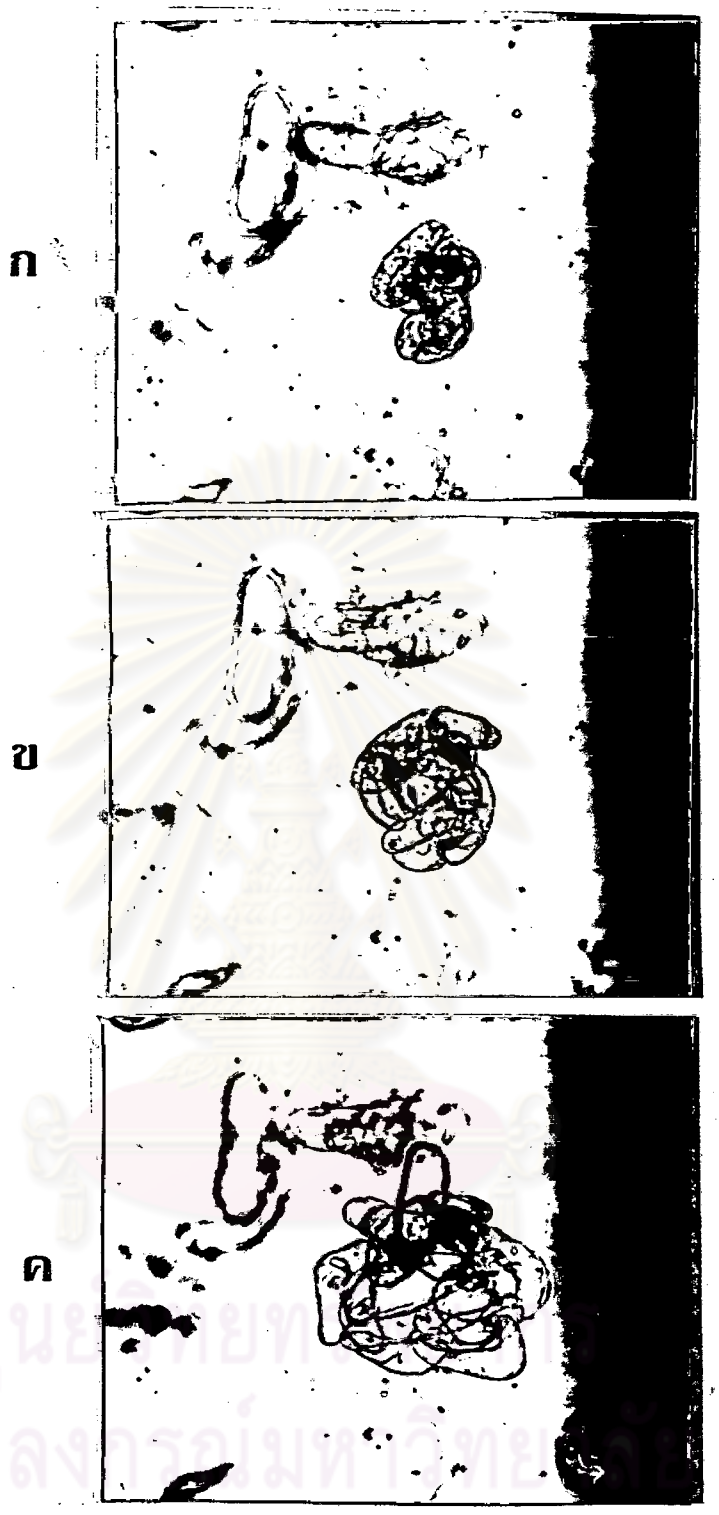
เมื่อเซลล์เจริญในจานอาหารได้ 1 เดือน จึงเริ่มเก็บโคโลนีที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ไปแยกเลี้ยงในขวดอาหารแข็ง (รูปที่ 18) ทั้งนี้เพราะโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ อาจมาจากการปะปนกันของกลุ่มเซลล์ ที่ได้มาจากเซลล์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน โดยจะทำการเก็บโคโลนีขนาดดังกล่าว 300 โคโลนี จากหลายๆจานอาหารเพาะเลี้ยงไปแยกเลี้ยงในขวดอาหาร 300 ขวด จนได้ปริมาณมากพอ ซึ่งใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 3 เดือน จึงทำการคัดเลือกหาตัวแทนความแตกต่างที่เห็นชัดเจน ออกมาเพียง 3 โคโลนี (รูปที่ 19) ซึ่งได้แก่

โคลนสีเหลือง ให้ชื่อว่า PNA 1 มีลักษณะแคลลัสที่เปียกแฉะ (soft and wet callus)

โคลนสีเขียว ให้ชื่อว่า PNA 2 มีลักษณะแคลลัสที่ร่วนซุย (crisp callus)

โคลนสีแดง ให้ชื่อว่า PNA 3 มีลักษณะแคลลัสที่เปียกแฉะ (soft and wet callus)

เมื่อสังเกตลักษณะเซลล์ของทั้ง 3 โคลน ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า โคลน PNA 1 มีเซลล์

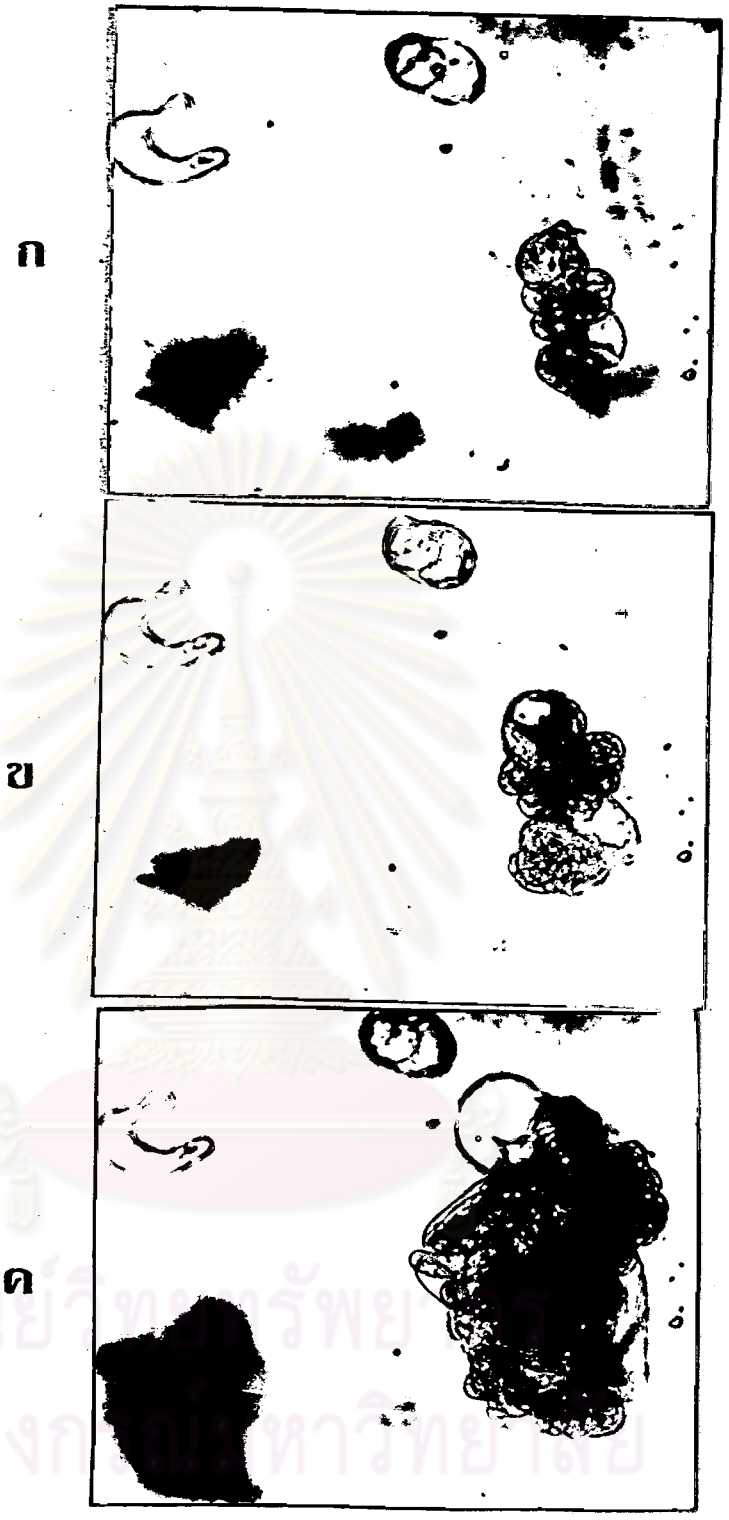


รูปที่ 16 การติดตามการเจริญของเซลล์เกาะกลุ่มขนาด 6 เซลล์/กลุ่ม ในจานอาหารเพาะเลี้ยง ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 25 เท่า

ก) อายุ 1 วัน

ข) อายุ 2 วัน

ค) อายุ 7 วัน



รูปที่ 17 การติดตามการเจริญของเซลล์เกาะกลุ่มขนาด 11 - 15 เซลล์/กลุ่ม ในจานอาหารเพาะเลี้ยง ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 25 เท่า

ก) อายุ 1 วัน

ข) อายุ 2 วัน

ค) อายุ 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17389446

รูปที่ 18 การเพาะเลี้ยงโคโลนีพืชไข่เน่าขนาด 1 มิลลิเมตร ในอาหารแข็งสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล

รูปที่ 19 สายพันธุ์พืชไข่เน่าที่คัดเลือกได้ คือ PNA 1, PNA 2 และ PNA 3 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล อายุ 4 สัปดาห์

รูปร่างยาวและรี เป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 20) ในขณะที่โคลน PNA 2 มีเซลล์กลมเป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 21) และโคลน PNA 3 นอกจากจะมีเซลล์รูปร่างยาวและรีเป็นส่วนใหญ่แล้ว ยังมีสารสีแดง ซึ่งคือแอนโธไซยานิน อยู่ภายในเซลล์ด้วย (รูปที่ 22)

จากนั้นจึงนำโคลน PNA 1,PNA 2,PNA 3 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว(รูปที่ 23) เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์พร้อมทั้งศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณการผลิตเบตา-เอคไดโซน ของแต่ละโคลน ในระบบแขวนลอยต่อไป

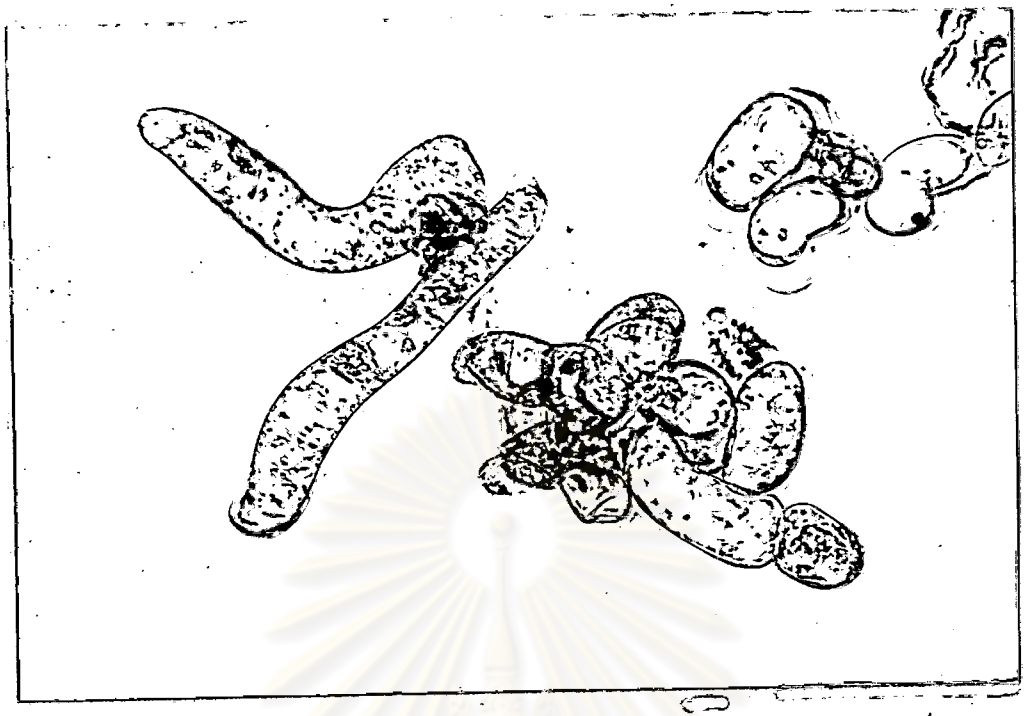
3.7 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนในระบบแขวนลอยของโคลนที่คัดเลือกแล้ว

3.7.1 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย PNA 1

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.(วิธีข้อ 2.3.1) เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่า PCV เท่ากับ 3 % มล หรือค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.008 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 4 และรูปที่ 24) พบว่า เซลล์แขวนลอย PNA 1 เริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และเริ่มเข้าสู่ stationary phase กลางสัปดาห์ที่ 5 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.068 กรัม/10 มล จากนั้นเข้าสู่ decline phase ในสัปดาห์ที่ 7

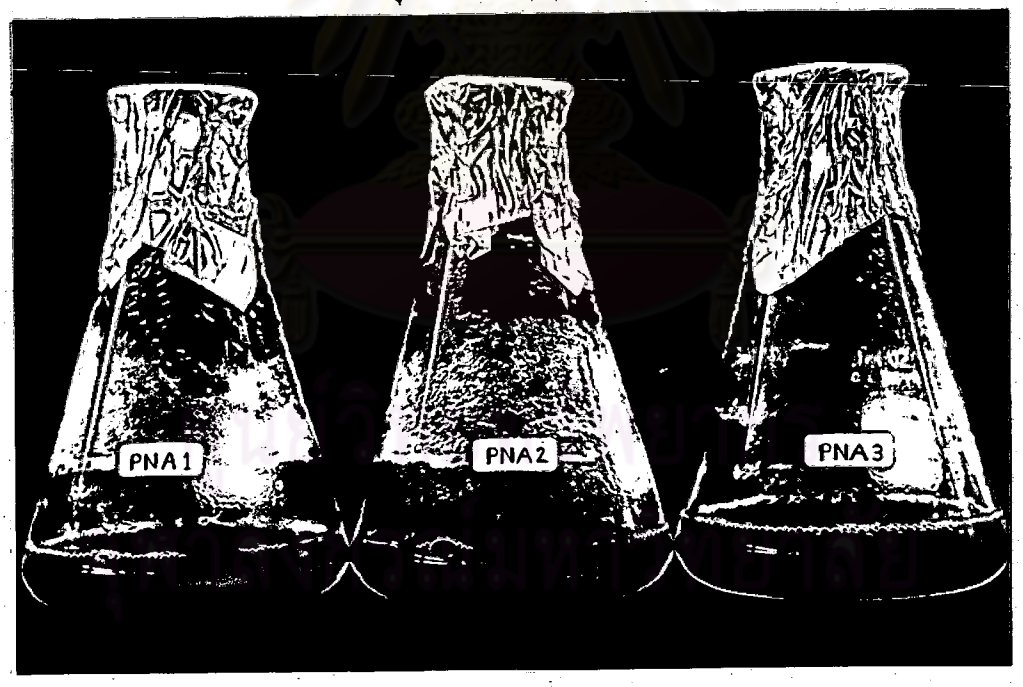
ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซน พบว่า ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์เพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุดในช่วงstationary phase ที่สัปดาห์ที่ 6 โดยมีค่า 0.032 กรัมเปอร์เซ็นต์ จากนั้นปริมาณลดลงเหลือเพียง 0.025 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 7 สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ ตรวจพบเมื่อเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งตรวจวิเคราะห์ได้ค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสัปดาห์ที่ 7 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณภายในเซลล์คือ 0.028 กรัม



รูปที่ 20 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 50 เท่า แสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัส พืชไข่เน่า PNA 1 อายุ 4 สัปดาห์

รูปที่ 21 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 50 เท่า แสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัส พืชไข่เน่า PNA 2 อายุ 4 สัปดาห์

รูปที่ 22 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 50 เท่า แสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัสพืชไข่เน่า PNA 3 อายุ 4 สัปดาห์

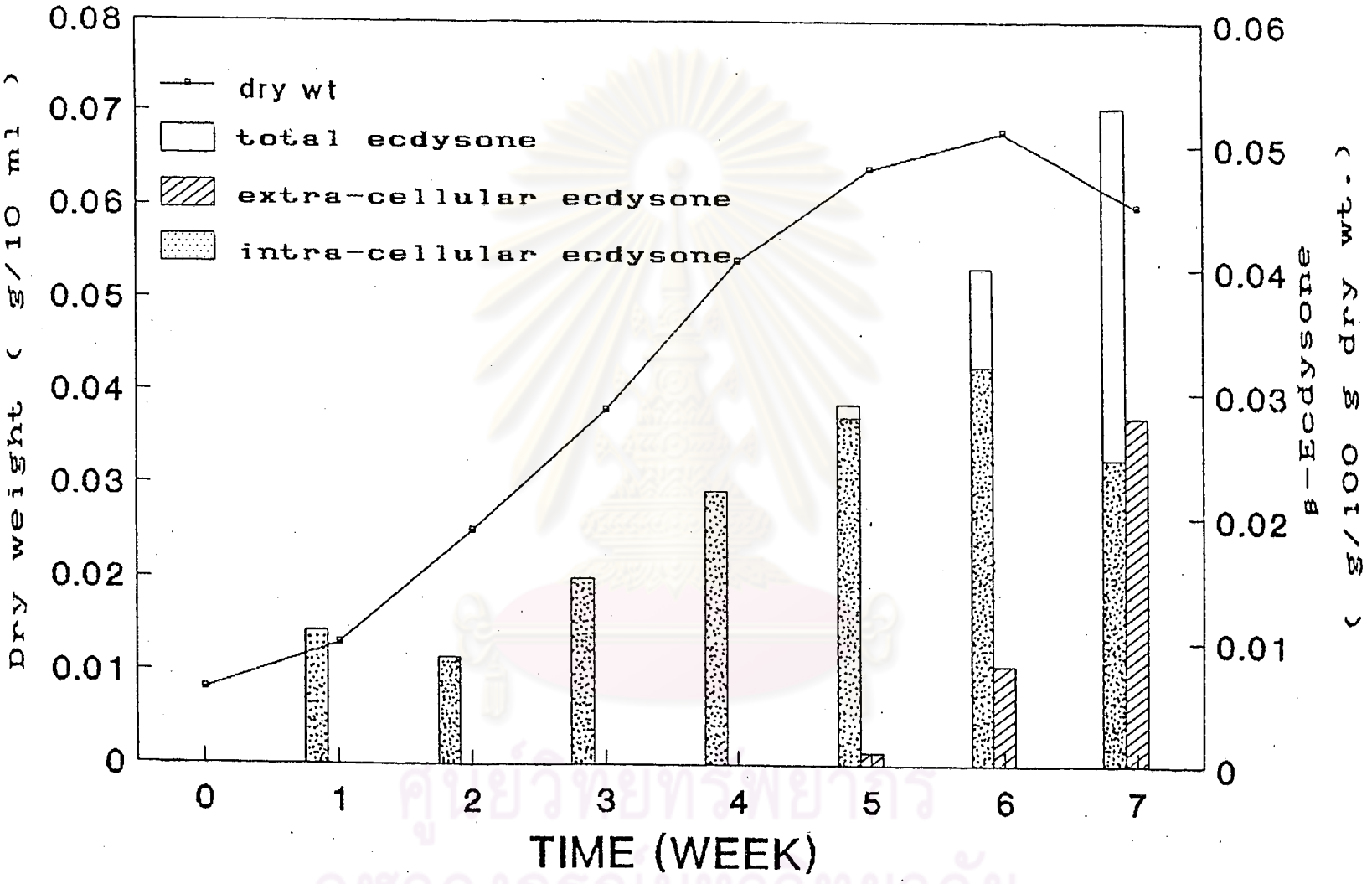


รูปที่ 23 เซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1, PNA 2 และ PNA 3 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล อายุ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 4 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry weight (g/10 ml)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.008	<---------- ND ---------->		
1	0.013	0.0107	0	0.0107
2	0.025	0.0086	0	0.0086
3	0.038	0.015	0	0.015
4	0.054	0.022	0	0.022
5	0.064	0.028	0.001	0.029
6	0.068	0.032	0.008	0.04
7	0.06	0.025	0.028	0.053

ND = not determined value



รูปที่ 24 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยนิซไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

เปอร์เซ็นต์ ผลรวมของเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ประมาณ 0.053 กรัมเปอร์เซ็นต์ ที่ระยะ decline phase

3.7.2 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย PNA 2

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า PNA 2 ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., BA 2 มก./ล. เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่า PCV 3 % มล หรือค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.008 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

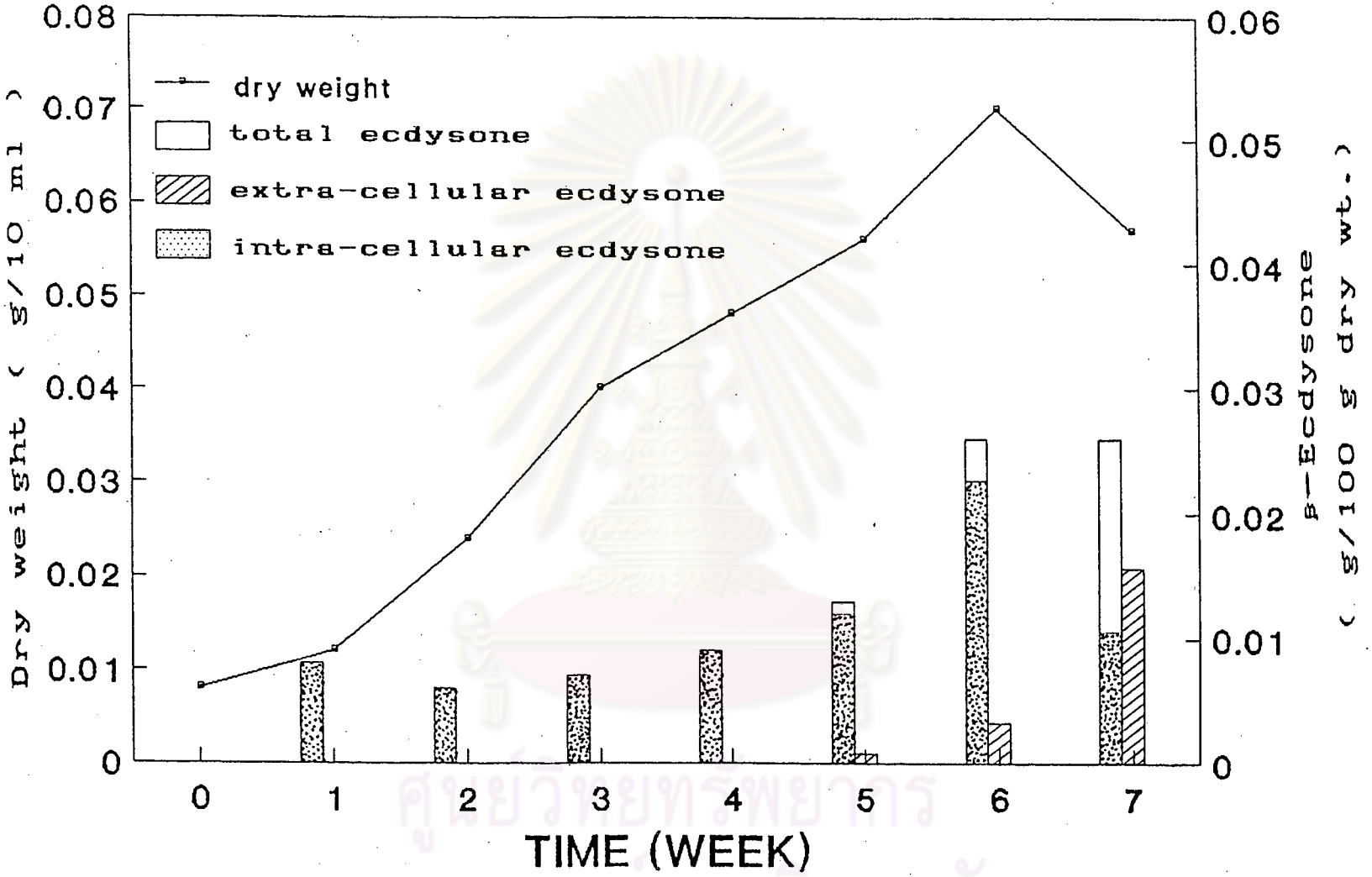
ผลการทดลอง (ตารางที่ 5 และรูปที่ 25) พบว่า เซลล์เริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และเริ่มเจริญเข้าสู่ stationary phase กลางสัปดาห์ที่ 5 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.07 กรัม/10 มล จากนั้นจึงเข้าสู่ decline phase ในสัปดาห์ที่ 7 จะเห็นได้ว่าเซลล์แขวนลอย PNA 1 และ PNA 2 มีรูปแบบการเจริญและน้ำหนักแห้งสูงสุดมีค่าใกล้เคียงกัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซนพบว่า ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์เพิ่มขึ้นตามช่วงการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับ PNA 1 แต่ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ PNA 2 ระยะ log phase ในสัปดาห์ที่ 4 มีค่าน้อยกว่าปริมาณในเซลล์ PNA 1 ประมาณ 2 เท่า และปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์สูงสุดที่ระยะ stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 6 มีค่า 0.023 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าปริมาณในเซลล์ PNA 1 ประมาณ 1.4 เท่า จากนั้นปริมาณเบตา-เอคไดโซนในเซลล์ PNA 2 จะลดลงเหลือเพียง 0.01 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 7 สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ late-log phase ซึ่งตรวจวิเคราะห์ได้ค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสัปดาห์ที่ 7 ซึ่งมีค่ามากกว่าปริมาณภายในเซลล์คือ 0.015 กรัมเปอร์เซ็นต์ ผลรวมของเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ประมาณ 0.025 กรัมเปอร์เซ็นต์ ที่ระยะ decline phase ซึ่งมีค่าน้อยกว่าของเซลล์ PNA 1 ถึง 2.12 เท่า

ตารางที่ 5 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 2 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry weight (g/10 ml)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.008	<---------- ND ---------->		
1	0.012	0.0082	0	0.0082
2	0.024	0.0064	0	0.0064
3	0.040	0.0073	0	0.0073
4	0.048	0.009	0	0.009
5	0.056	0.0119	0.0008	0.0127
6	0.070	0.0227	0.0032	0.0259
7	0.057	0.0103	0.0156	0.0259

ND = not determined value



รูปที่ 25 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 2 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

3.7.3 การเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย PNA 3

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า PNA 3 ซึ่งเป็นเซลล์สีแดงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.,BA 2 มก./ล. เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่า PCV 3 % มล หรือค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.008 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 6 และรูปที่ 26) พบว่าเซลล์ PNA 3 มีการเจริญเติบโตช้ากว่าเซลล์ PNA 1 และ PNA 2 มาก โดยเซลล์ PNA 3 เริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ปลายสัปดาห์ที่ 2 และเริ่มเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 7 มีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเพียง 0.058 กรัม/10 มล จากนั้นจึงเข้าสู่ decline phase ในปลายสัปดาห์ที่ 8 จะเห็นได้ว่าเซลล์แขวนลอย PNA 3 มีรูปแบบการเจริญและค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดแตกต่างจากเซลล์แขวนลอย PNA 1 และ PNA 2 มาก (รูปที่ 27)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซน ปรากฏว่า ไม่สามารถตรวจพบเบตา-เอคไดโซนที่ระยะใดๆของช่วงการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย PNA 3 แต่กลับพบว่าเซลล์ PNA 3 สังเคราะห์สารสีแดงเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโต จนมีปริมาณสูงสุดในช่วง stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 7 โดยมีค่า OD_{525} เท่ากับ 8 ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 26) และจากการวิเคราะห์ พบว่า สารสีแดงเป็นสารประกอบในกลุ่มแอนโธไซยานิน (พนา และ สัณห์, 2532) แต่จากการวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซนในแคลลัสอายุ 1 เดือน พบว่าในแคลลัสสีแดง PNA 3 มีปริมาณเบตา-เอคไดโซน 0.005 กรัมเปอร์เซนต์ แต่อย่างไรก็ตามยังน้อยกว่าแคลลัสของ PNA 1 และ PNA 2 ซึ่งมีปริมาณเบตา-เอคไดโซน 0.018 และ 0.010 กรัมเปอร์เซนต์ ตามลำดับ

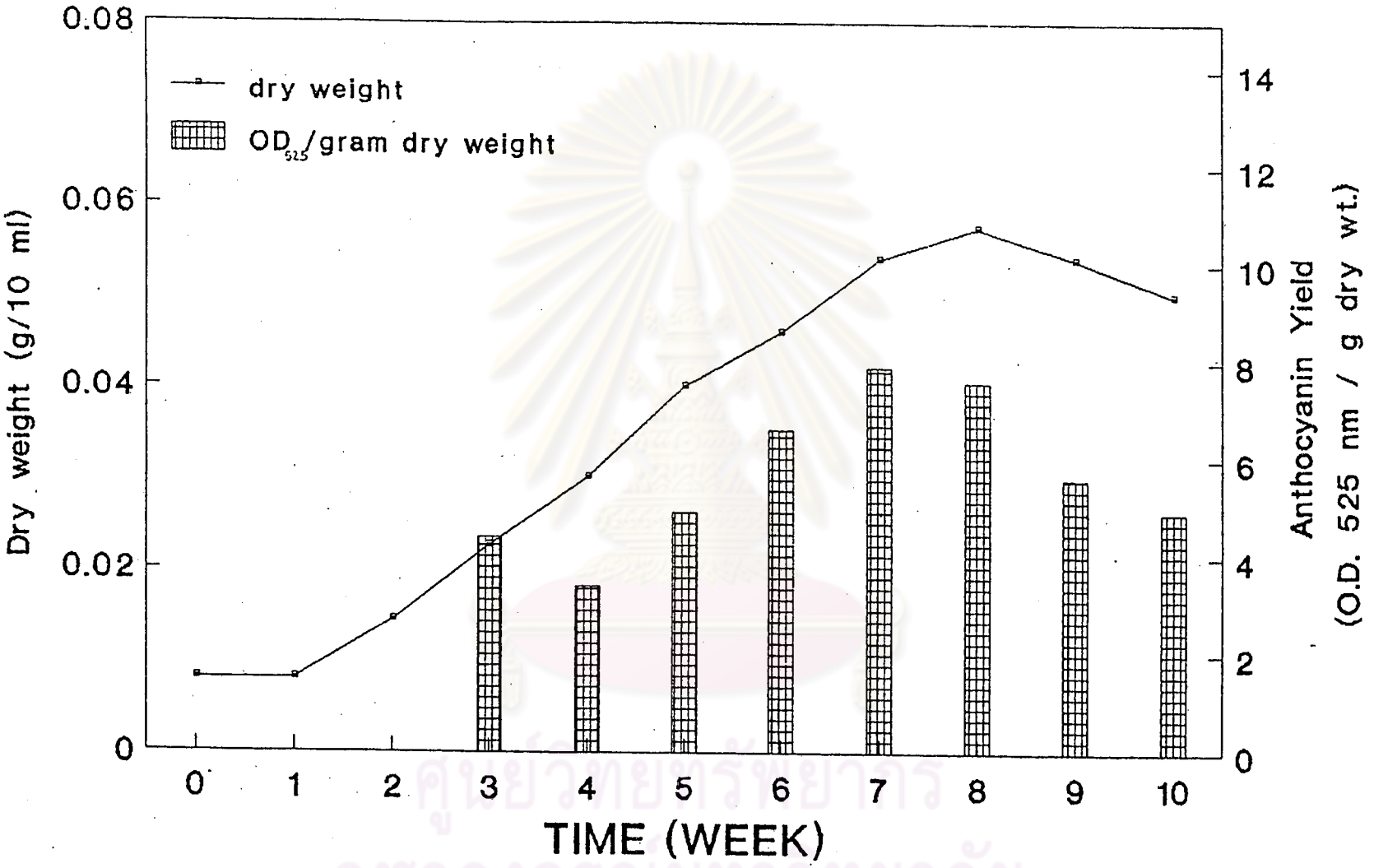
จากการศึกษานี้ โคลน PNA 1 มีความเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาการเพิ่มผลผลิตปริมาณเบตา-เอคไดโซนต่อไป

ตารางที่ 6 การเจริญและการผลิตสารประกอบแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 3 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

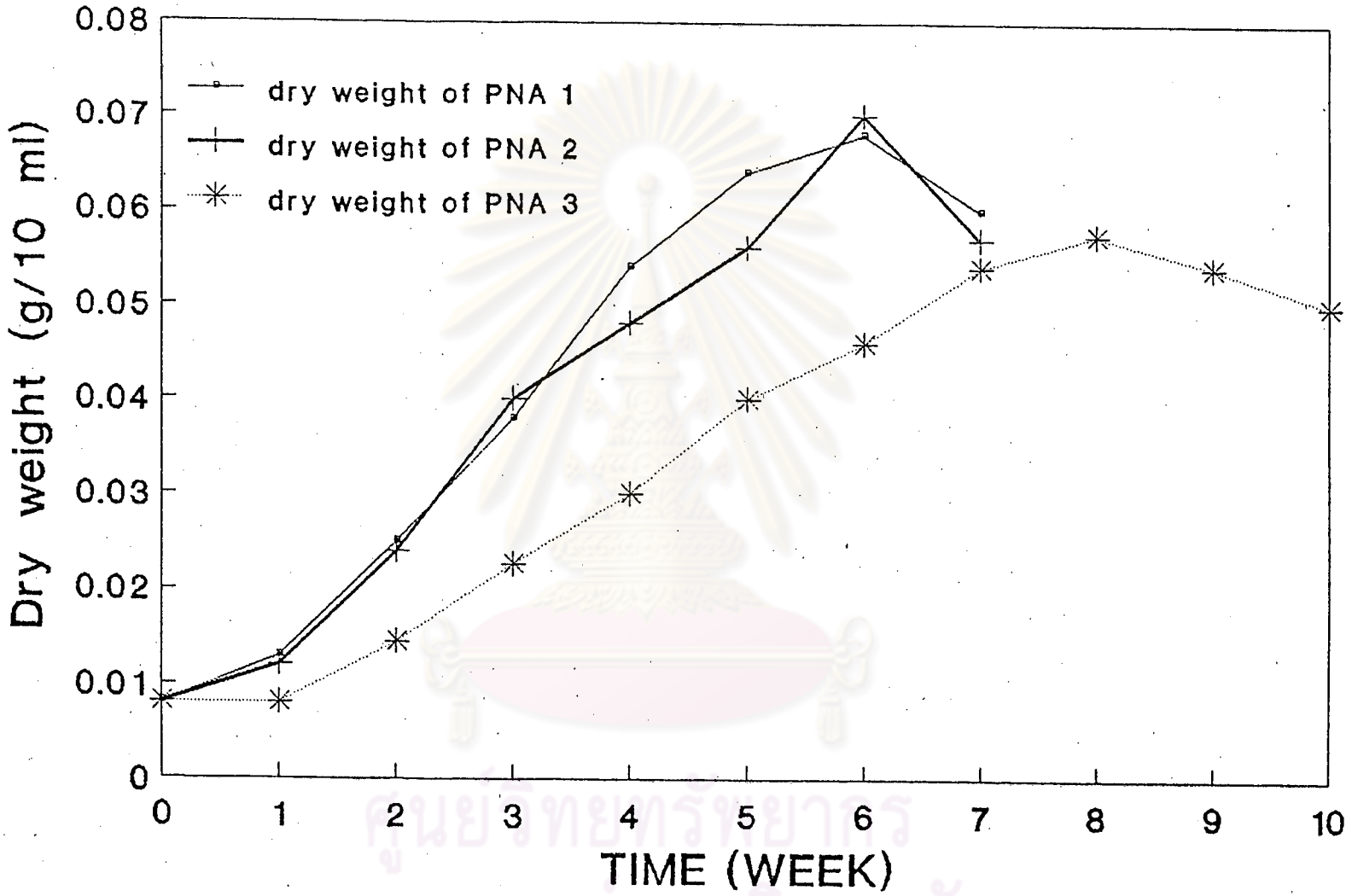
Week	Dry weight (g/10 ml)	Anthocyanin Yield (OD_{525} / g dry wt.)
0	0.008	ND
1	0.008	ND
2	0.0144	ND
3	0.0226	4.4
4	0.030	3.4
5	0.040	4.9
6	0.046	6.6
7	0.054	7.9
8	0.0574	7.6
9	0.054	5.6
10	0.050	4.9

ND = not determined value

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 การเจริญและการผลิตสารประกอบแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 3 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง



รูปที่ 27 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1,PNA 2 และ PNA 3 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

3.8 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงเซลล์พืช

3.8.1 ชนิดของสารที่ใช้ในการตรึงเซลล์พืช

จากการศึกษาสารประกอบที่ใช้ในการตรึงเซลล์พืช คือ แคปปาร์-คาราจีแนน และแคลเซียมอัลจิเนต พบว่า การตรึงเซลล์พืชด้วยแคปปาร์-คาราจีแนน มีอุปสรรคในการตรึงดังนี้

1. ขั้นตอนการตรึงเซลล์พืชต้องใช้อุณหภูมิที่เย็นลงในการทำให้เม็ดเจลแข็งตัว ดังนั้น สารละลายเซลล์ในแคปปาร์-คาราจีแนน ซึ่งอยู่ที่อุณหภูมิ 40° ซ ถูกทำให้แข็งตัวเป็นเม็ดเจลที่อุณหภูมิ 4 - 10° ซ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างกระทันหัน ทำให้เซลล์บางส่วนตายได้
2. ต้องใช้น้ำมันพืชในการทำให้เกิดเม็ดเจล จึงต้องมีการขจัดเอาน้ำมันพืชออกก่อนจะนำไปเลี้ยง ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ง่ายต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์
3. เม็ดเจลที่เกิดจากการตรึงด้วยแคปปาร์-คาราจีแนนมีขนาดไม่สม่ำเสมอ ยากต่อการควบคุมปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยง
4. การปลดปล่อยเซลล์ตรึงให้เป็นอิสระ เพื่อนำมาหาน้ำหนักแห้งเป็นไปได้ยาก

จากอุปสรรคดังกล่าว จึงตรึงเซลล์พืชด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่ามีข้อดีดังนี้

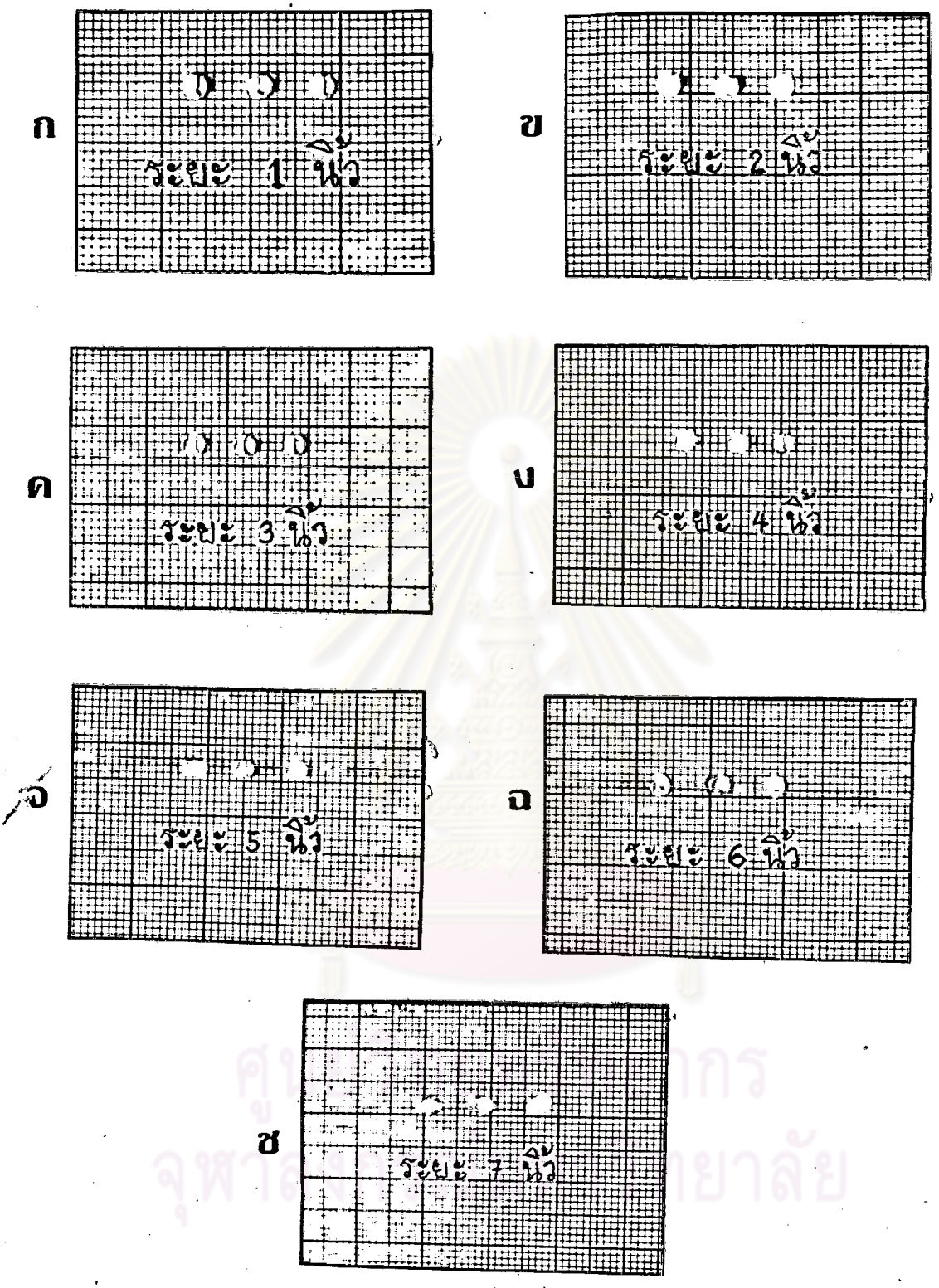
1. ขั้นตอนการเกิดเม็ดเจลนั้นเกิดจาก ionic cross-link ระหว่างแคลเซียมอิออนกับอัลจิเนต ซึ่งเซลล์พืชอยู่ในสภาวะปกติ
2. ป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ได้
3. เม็ดเจลที่ได้มีขนาดสม่ำเสมอ สามารถควบคุมปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงได้
4. การปลดปล่อยเซลล์ตรึงให้เป็นอิสระทำได้ง่าย โดยใช้ Ca^{2+} chelators ซึ่งได้แก่ EDTA, ฟอสเฟต, ซิเตรท ไปดึงแคลเซียมอิออนออกจากแคลเซียมอัลจิเนต ทำให้เม็ดเจลสลาย ปลดปล่อยเซลล์ให้เป็นอิสระเพื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งได้โดยง่าย

3.8.2 ศึกษาระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงสารละลาย $CaCl_2$ ต่อความกลมของเม็ดเจลอัลจิเนต

เพื่อให้ได้เม็ดเจลที่มีขนาดสม่ำเสมอ จึงจำเป็นต้องศึกษาระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงสารละลาย $CaCl_2$ ผลการทดลองพบว่า (รูปที่ 28) พบว่า ระยะห่างตั้งแต่ 4 นิ้วขึ้นไป จะทำให้เม็ดเจลเริ่มรี เห็นได้ชัดว่าที่ระยะห่าง 7 นิ้ว เม็ดเจลมีขนาดไม่สม่ำเสมอ แต่ระยะตั้งแต่ 4 นิ้วลงมา เม็ดเจลที่ได้จะกลมมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 มิลลิเมตร ดังนั้นในการทำเม็ดเซลล์ตริงจึงใช้ระยะห่างตั้งแต่ 1 นิ้วถึง 4 นิ้ว

3.8.3 ศึกษาความเข้มข้นของอัลจิเนตและความเข้มข้นเซลล์พืชที่ใช้ในการตริงต่อความแข็งของเม็ดเซลล์ตริง

ความเข้มข้นของอัลจิเนตมีผลต่อความแข็งของเม็ดเจล โดยถ้ายิ่งเพิ่มเปอร์เซนต์อัลจิเนตจะยิ่งเพิ่มความแข็ง แต่ยิ่งเปอร์เซ็นต์อัลจิเนตสูง ความหนืดจะเพิ่มขึ้นจนไม่สามารถปั๊มผ่านปลายเข็มได้ พบว่า อัลจิเนตที่ใช้ในการศึกษานี้ ถ้าความเข้มข้นมากกว่า 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) จะหนืดมาก ดังนั้นความเข้มข้นที่สามารถใช้ได้คือ อัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ความหนาแน่นของเซลล์พืชที่ใช้ในการตริงก็มีผลต่อความแข็งของเม็ดเจลเช่นกัน คือถ้ายิ่งมีความหนาแน่นของเซลล์ภายในเม็ดมาก ความแข็งจะลดลง แต่ความใกล้กันระหว่างเซลล์กับเซลล์ภายในเม็ดเจลจะมีมาก ซึ่งสามารถกระตุ้นการสร้างสารทุติยภูมิได้ (Rhodes และ Kirsop, 1982) แต่ถ้ามีความหนาแน่นของเซลล์ภายในเม็ดน้อยถึงแม้ความแข็งจะมากขึ้น แต่ศักยภาพของการผลิตสารทุติยภูมิอาจต่ำลง เนื่องจากความใกล้กันของเซลล์มีน้อย จากตารางที่ 7 พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ภายในเม็ดเท่ากับ 1.8×10^{-4} กรัมแห้ง/เม็ดเจล ซึ่งเตรียมได้จากเซลล์ 30 กรัมน้ำหนักสดต่อ 100 มล สารละลายอัลจิเนต มีค่าความแข็ง 2.65 กิโลกรัม/ตารางเซ็นติเมตร และมีค่าความแข็งที่พอเหมาะ



รูปที่ 28 อิทธิพลของระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงสารละลาย $CaCl_2$ ต่อความกลมของเม็ดเจลอัลจิเนต ก) ระยะห่าง 1 นิ้ว ข) ระยะห่าง 2 นิ้ว ค) ระยะห่าง 3 นิ้ว ง) ระยะห่าง 4 นิ้ว จ) ระยะห่าง 5 นิ้ว ฉ) ระยะห่าง 6 นิ้ว ช) ระยะห่าง 7 นิ้ว

ตารางที่ 7 อิทธิพลของความเข้มข้นเซลล์ยีสไข่เน่าในเม็ดเจลอัลจิเนต ต่อความแข็งของเม็ดเจล

Cell concentration in alginate solution (% W/V)	Dry weight (g / bead)	Strength (kg / cm^2)
10	7×10^{-5}	3.65
20	1.4×10^{-4}	2.84
30	1.8×10^{-4}	2.65
40	1.9×10^{-4}	2.21
50	2×10^{-4}	2.16

Strength = น้ำหนักกดที่ทำให้เม็ดเจลแตก

หมายเหตุ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 10 ครั้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9 ศึกษาบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายเม็ดเซลล์ตริง

ในการหาน้ำหนักแห้งเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ตริง จำเป็นต้องปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกตริงให้เป็นอิสระ แล้วจึงนำไปหาน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงต้องหาบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายเม็ดเซลล์ตริงที่เหมาะสมไม่ทำให้เซลล์ฟีชตาย บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7, EDTA และส่วนผสมของ EDTA กับ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยใช้เม็ดเจลเซลล์ตริง 100 เม็ดต่อบัฟเฟอร์ที่ใช้ศึกษา 25 มล แล้วเขย่าจนเม็ดเจลเซลล์ตริงละลายหมด นอกจากนี้ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกปลดปล่อยด้วย

ผลการทดลอง (ตารางที่ 8) พบว่าสารละลาย EDTA อย่างเดียว หรือ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 อย่างเดียว ไม่สามารถละลายเม็ดเซลล์ตริงได้ แต่ถ้าผสม EDTA กับ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ในอัตราส่วน 1 : 1 จะสามารถละลายเม็ดเซลล์ตริงได้ และเซลล์ที่ปลดปล่อยออกมาจากเม็ดอัลจิเนตก็ยังมีชีวิต

3.10 ศึกษาความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย PNA 1

เพราะว่า $CaCl_2$ มีผลต่อความแข็งของเม็ดเซลล์ตริง จึงจำเป็นต้องศึกษาถึงความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และเพิ่มความแข็งให้กับเม็ดเซลล์ตริงด้วย โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย PNA 1 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมออร์โมน 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล และ $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่าน้ำหนักแห้ง 0.014 กรัม/10 มล วัดการเจริญเติบโตด้วยค่าน้ำหนักแห้ง เมื่ออายุครบ 1 เดือน

ผลการทดลอง (ตารางที่ 9 และรูปที่ 29) พบว่า ถ้าความเข้มข้นของ $CaCl_2$ มากกว่า 0.01 โมลาร์ จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ สังเกตุได้จากค่าดัชนีของการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเล็กน้อยคือประมาณ 1.6 ในระยะเวลา 1 เดือน เมื่อเทียบกับอาหารสูตรควบคุม ซึ่งมีค่าดัชนีการเจริญเติบโตสูงถึง 6.3 ดังนั้นในการเลี้ยงเซลล์ตริงจึงใช้ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ ในสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อป้องกันการแตกของเม็ดเซลล์ตริง (รูปที่ 30)

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบบัฟเฟอร์ต่างๆที่ใช้สลายเม็ดเซลล์ตริงอัลจิเนต

Buffer	Dissolving time (min.)	Viability
0.05 M EDTA	ND	-
0.10 M EDTA	ND	-
0.20 M EDTA	ND	-
0.50 M EDTA	ND	-
0.1 M phosphate buffer pH 7	ND	-
0.1 M phosphate buffer + 0.05 M EDTA (1 : 1)	~ 30	V
0.1 M phosphate buffer + 0.10 M EDTA (1 : 1)	~ 15	V
0.1 M phosphate buffer + 0.20 M EDTA (1 : 1)	~ 15	V

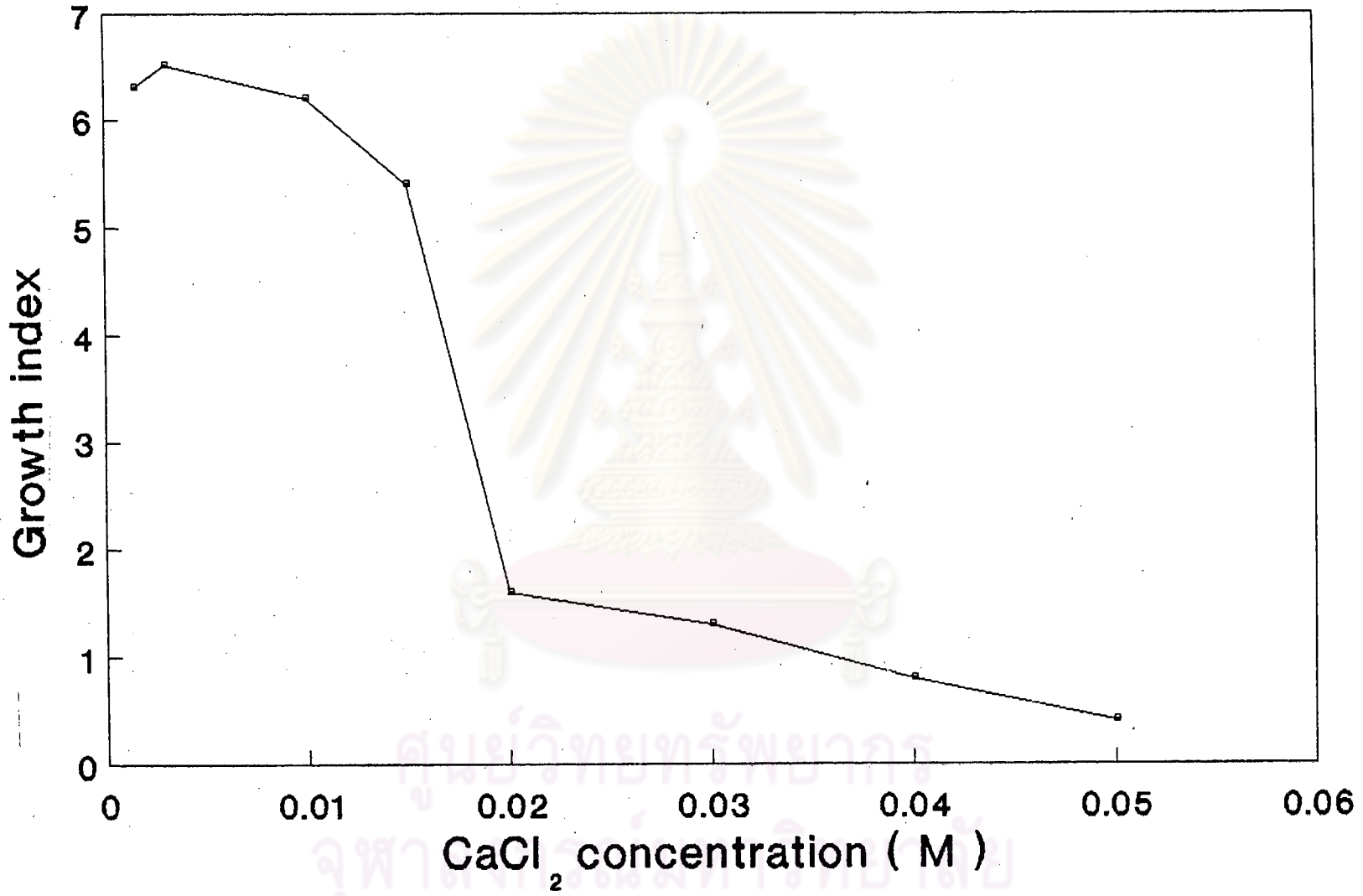
ND = not dissolved

V = viable cell

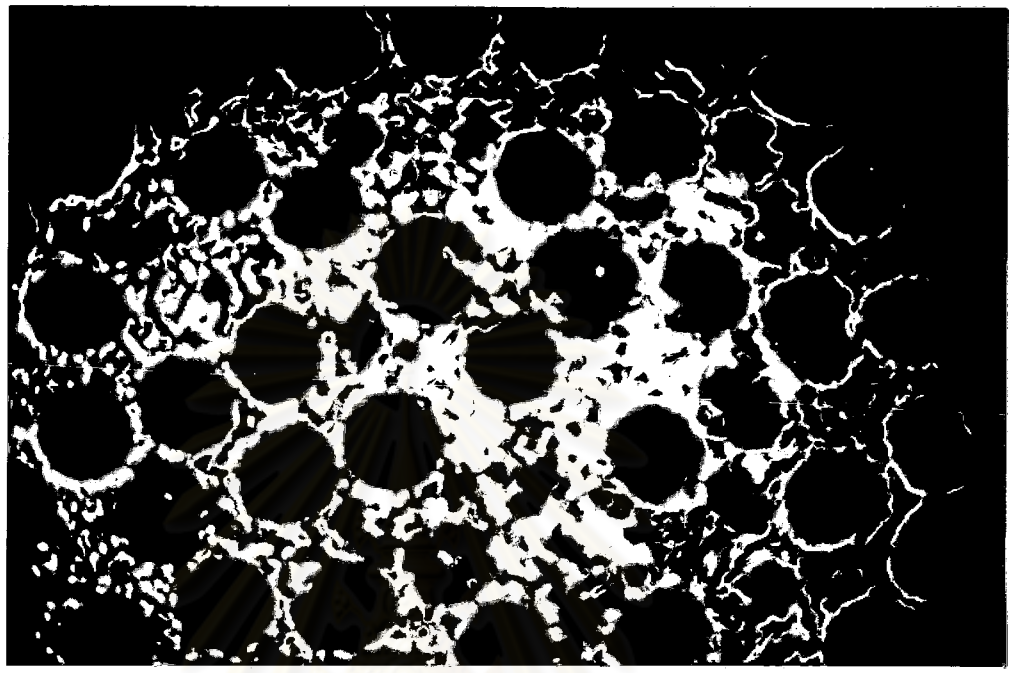
ตารางที่ 9 ผลกระทบของความเข้มข้นแคลเซี่ยมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย PNA 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง เป็นเวลา 1 เดือน

Concentration of $CaCl_2$ (M)	Initial dry wt. (g/10 ml)	Final dry wt. (g/10 ml)	Growth index
0.0015	0.0140	0.102	6.3
0.0030	0.0140	0.105	6.5
0.010	0.0140	0.101	6.2
0.015	0.0140	0.090	5.4
0.020	0.0140	0.037	1.6
0.030	0.0140	0.032	1.3
0.040	0.0140	0.025	0.8
0.050	0.0140	0.020	0.4

ดัชนีการเจริญเติบโต (growth index) = $\frac{\text{น้ำหนักแห้งสุดท้าย - น้ำหนักแห้งเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักแห้งเริ่มต้น}}$



รูปที่ 29 ผลกระทบของความเข้มข้น $CaCl_2$ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลองเป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 30 การแตกของเม็ดเซลล์ตริงนิชไข่เน่า ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ไม่ได้เสริมความเข้มข้นของ $CaCl_2$ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.11 ศึกษาชนิดของอาหารเพาะเลี้ยง

3.11.1 ผลกระทบของชนิดอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย PNA 1

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล , BA 2 มก/ล (วิธีข้อ 2.3.2) และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., BA 2 มก./ล. (วิธีข้อ 2.3.1) และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ เป็นอาหารเหลวสูตรควบคุม เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่าน้ำหนักแห้ง 0.03 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้ง และวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 10,11 และรูปที่ 31) พบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์แขวนลอย PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 ดังกล่าว เซลล์เริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จากนั้นเจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 4 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.117 กรัม/10 มล จากนั้นเข้าสู่ declined phase ในสัปดาห์ที่ 6 ในขณะที่เซลล์แขวนลอย PNA 1 ในอาหารเหลวสูตรควบคุม เซลล์เริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ในสัปดาห์ที่ 2 แต่มีอัตราการเจริญช้ากว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 จากนั้นเข้าสู่ stationary phase ในปลายสัปดาห์ที่ 5 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.08 กรัม/10 มล ซึ่งค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวสูตร B5 มีค่ามากกว่าในอาหารเหลวสูตรควบคุมประมาณ 46 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซน พบว่า ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ PNA 1 ซึ่งเจริญในอาหารเหลวสูตร B5 เพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุดในช่วง stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 5 โดยมีค่า 0.028 กรัมเปอร์เซ็นต์ จากนั้นปริมาณลดลงเหลือเพียง 0.018 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 8 สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งตรวจวิเคราะห์ได้ค่า 0.009 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าต่ำมาก

ตารางที่ 10 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. , BA 2 มก./ล. และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry weight (g/10 ml)	Viability (%)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.030	~ 80	<---------- ND ---------->		
1	0.048	ND	0	0	0
2	0.065	~ 85	0.007	0	0.007
3	0.095	ND	0.01	0	0.01
4	0.113	~ 80	0.02	0	0.02
5	0.117	ND	0.028	0	0.028
6	0.113	~ 50	0.025	0.009	0.034
7	0.107	ND	0.027	0.01	0.037
8	0.105	~ 20	0.018	0.022	0.04

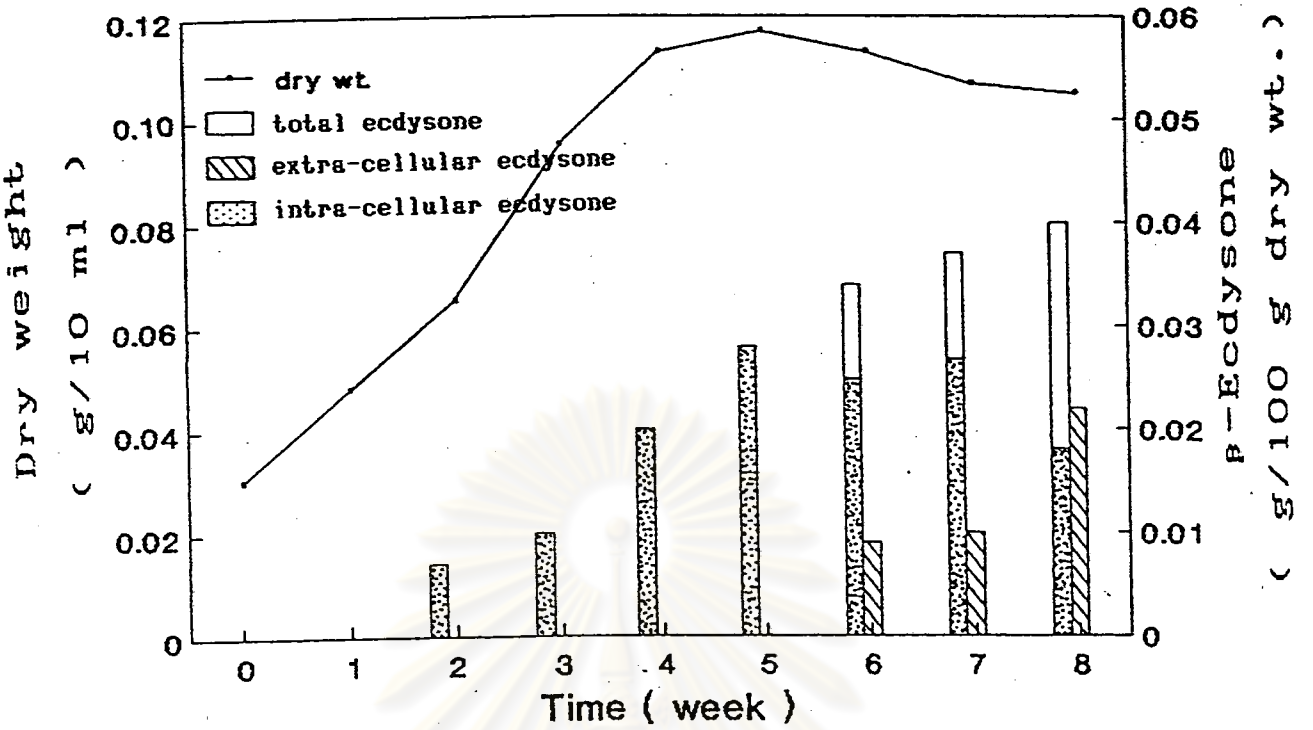
ND = not determined value

ตารางที่ 11 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล., BA 2 มก./ล. และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

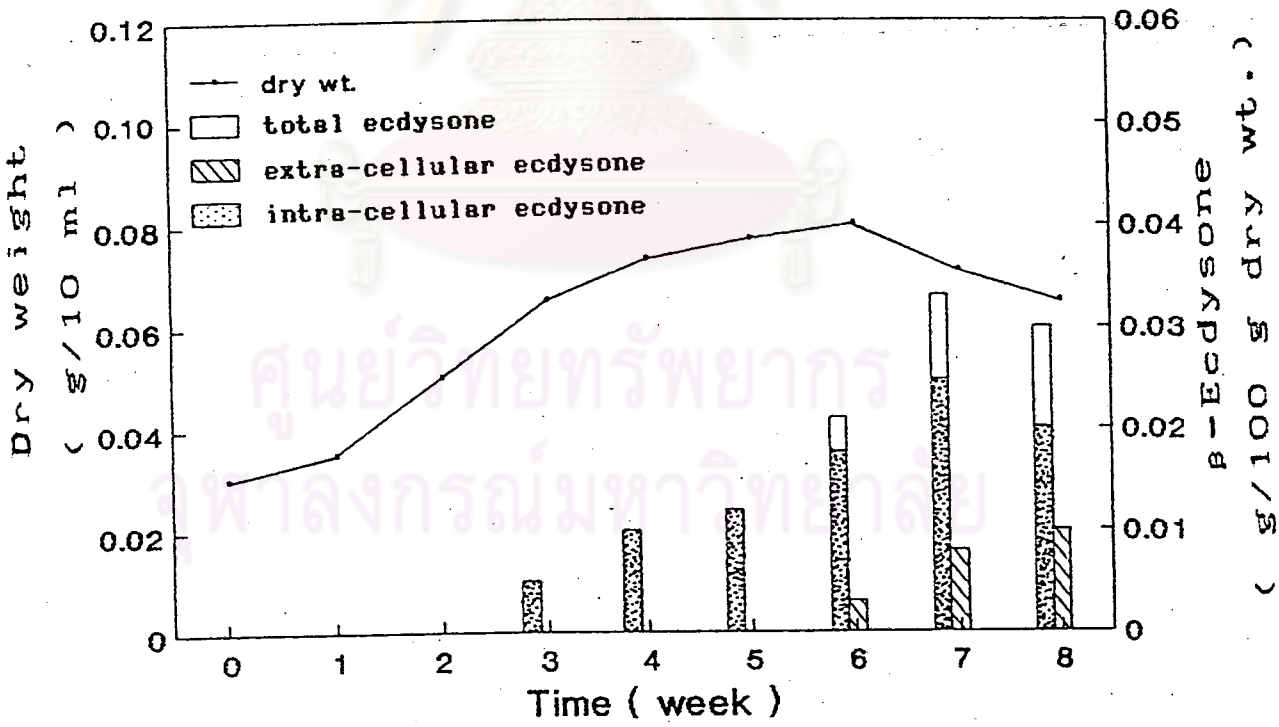
Week	Dry weight (g/10 ml)	Viability (%)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.030	~ 80	<---------- ND ---------->		
1	0.035	ND	<---------- ND ---------->		
2	0.05	~ 85	0	0	0
3	0.065	ND	0.005	0	0.005
4	0.073	~ 80	0.01	0	0.01
5	0.077	ND	0.012	0	0.012
6	0.08	~ 70	0.018	0.003	0.021
7	0.071	ND	0.025	0.008	0.033
8	0.065	~ 30	0.02	0.01	0.03

ND = not determined value

ก) B 5



ข) 1/2 MS



รูปที่ 31 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 และอาหารสูตร 1/2 MS ทั้งสองสูตรเสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก) อาหารสูตร B5

ข) อาหารสูตร 1/2 MS

เมื่อเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ถึง 2.8 เท่า ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณภายในเซลล์คือ 0.022 กรัมเปอร์เซ็นต์ ผลรวมของเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร B5 มีค่าประมาณ 0.04 กรัมเปอร์เซ็นต์ ที่เซลล์ระยะ decline phase ในขณะที่ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ ซึ่งเจริญในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS มีค่าเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์ จนมีปริมาณสูงสุดในช่วง stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 7 โดยมีค่า 0.025 กรัมเปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าปริมาณของเบตา-เอคไดโซนที่ผลิตในอาหารสูตร B5 เล็กน้อย แต่ใช้เวลานานกว่า สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งตรวจวิเคราะห์ได้ค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในระยะ declined phase โดยมีค่า 0.01 กรัมเปอร์เซ็นต์ แต่ยังน้อยกว่าที่เลี้ยงในอาหารสูตร B5 ถึง 2.2 เท่า

เมื่อรวมปริมาณเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์เข้าด้วยกัน พบว่าอาหารสูตร B5 จะให้ค่าการผลิตเบตา-เอคไดโซนสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 โดยมีค่าเท่ากับ 0.04 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าผลรวมของเบตา-เอคไดโซนในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ ที่เซลล์ระยะ declined phase

3.11.2 <u>ผลกระทบของชนิดอาหารเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริง PNA 1</u>

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ตริง PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล., BA 2 มก./ล. และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล , BA 2 มก/ล และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ เป็นอาหารสูตรควบคุม โดยใช้เซลล์ตริงเริ่มต้นเท่ากับ 300 เม็ด ซึ่งมีค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์เท่ากับ 0.03 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้ง (วิธีข้อ 2.10.2) และวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 12, 13 และรูปที่ 32) พบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ตริง PNA 1ในอาหารเหลวสูตร B5 ดังกล่าว เซลล์เริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และเริ่มเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 7 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.078 กรัม/10 มล ในขณะที่เซลล์ตริง PNA 1 ในอาหารสูตรควบคุมเซลล์เจริญเข้าสู่ log phase ปลายสัปดาห์ที่ 2 และเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 6 โดยมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.065 กรัม/10 มล ซึ่งค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ตริงในอาหารสูตร B5 มีค่ามากกว่าในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามรูปแบบการเจริญไม่แตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซน พบว่า ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ตริง PNA 1 ซึ่งเจริญในอาหารสูตร B5 เพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุดในช่วง stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 8 โดยมีค่า 0.04 กรัมเปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบขณะเซลล์ตริงอยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ถึง 8 เท่า ในขณะที่ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ตริง PNA 1 ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS มีค่าเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุดในช่วง stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 8 โดยมีค่า 0.03 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าที่เลี้ยงในอาหารสูตร B5 ประมาณ 1.3 เท่า สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ stationary phase โดยมีค่าเท่ากับ 0.008 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ถึง 3.75 เท่า

เมื่อรวมปริมาณเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ตริงเข้าด้วยกันพบว่าอาหารสูตร B5 จะให้ผลผลิตเบตา-เอคไดโซนสูงสุดเท่ากับ 0.045 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าผลรวมของเบตา-เอคไดโซนในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ ที่เซลล์ระยะ stationary phase

ตารางที่ 12 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชใบ่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. , BA 2 มก./ล. และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry weight (g/10 ml)	Viability (%)	Intracellular ß-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular ß-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total ß-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.030	~ 85	<---------- ND ---------->		
1	0.030	ND	<---------- ND ---------->		
2	0.035	~ 80	<---------- ND ---------->		
3	0.045	ND	0	0	0
4	0.051	~ 85	0.015	0	0.015
5	0.062	ND	0.025	0	0.025
6	0.07	~ 80	0.032	0.004	0.036
7	0.075	ND	0.037	0.005	0.042
8	0.078	~ 75	0.040	0.005	0.045

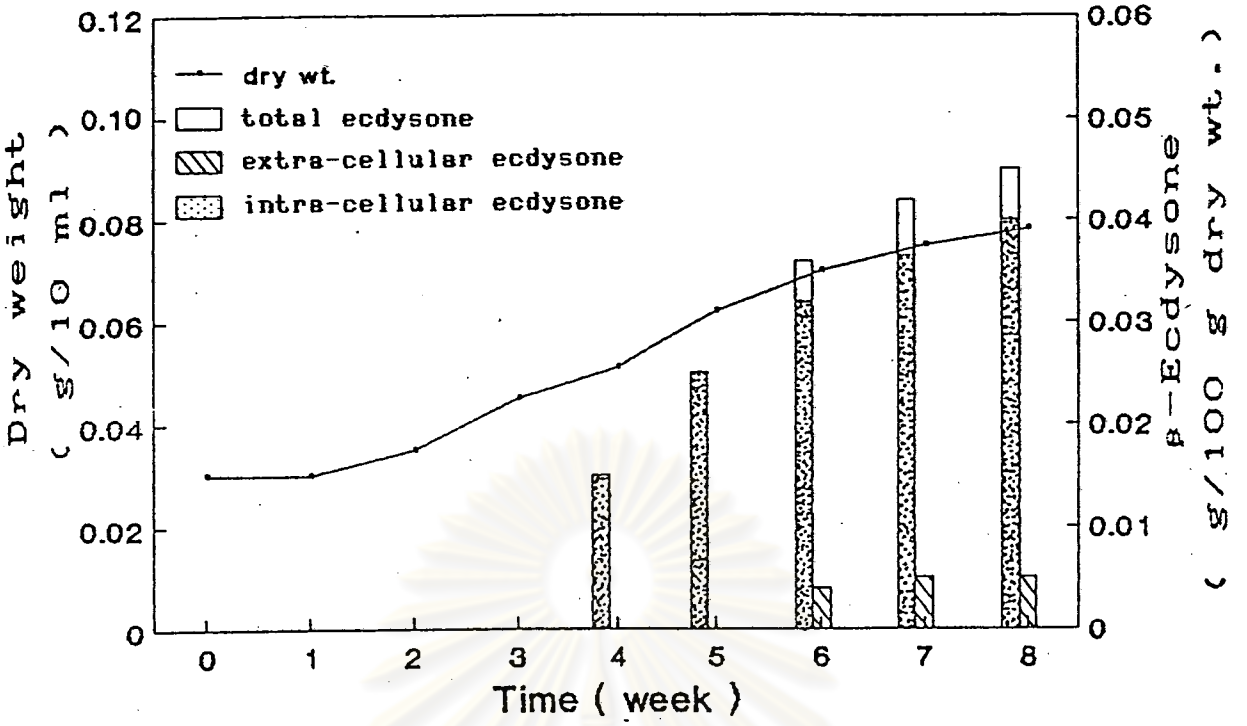
ND = not determined value

ตารางที่ 13 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ใน อาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. , BA 2 มก./ล. และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

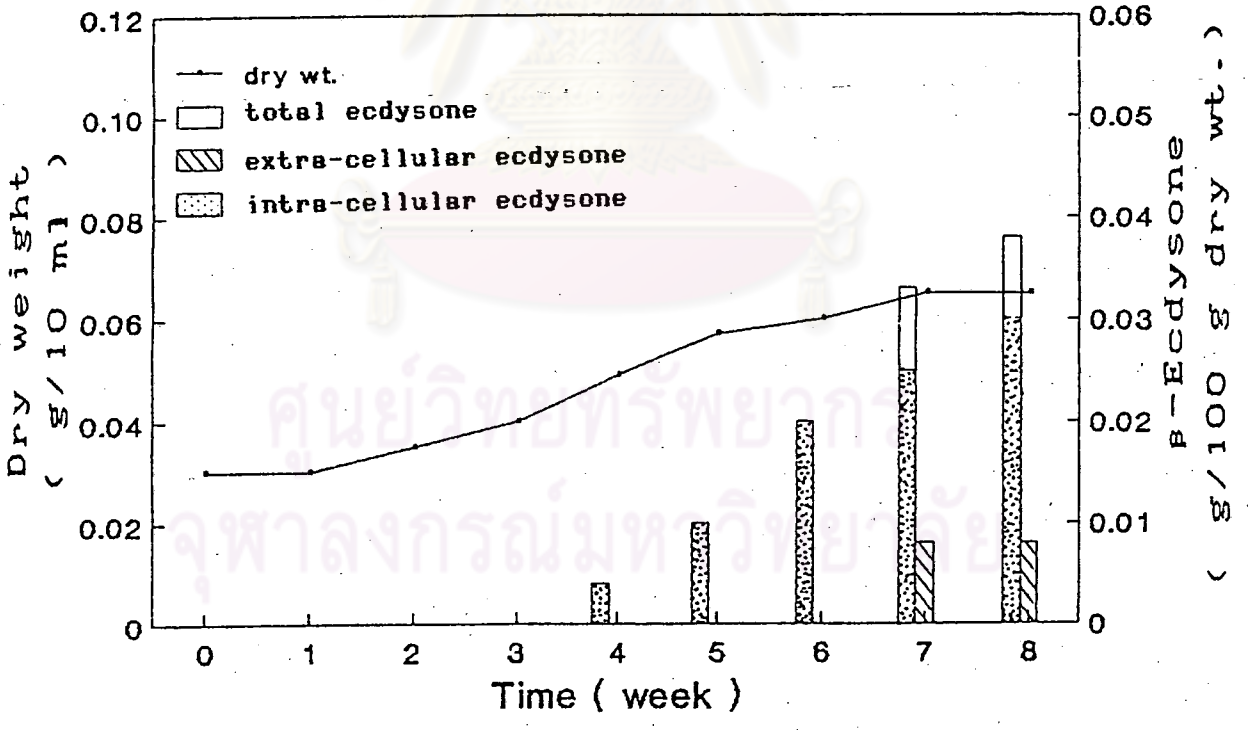
Week	Dry weight (g/10 ml)	Viability (%)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.030	~ 85	<---------- ND ---------->		
1	0.030	ND	<---------- ND ---------->		
2	0.035	~ 85	<---------- ND ---------->		
3	0.04	ND	0	0	0
4	0.049	~ 80	0.004	0	0.004
5	0.057	ND	0.01	0	0.01
6	0.06	~ 80	0.02	0	0.02
7	0.065	ND	0.025	0.008	0.033
8	0.065	~ 70	0.030	0.008	0.038

ND = not determined value

ก) B 5



ข) 1/2 MS



รูปที่ 32 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 และอาหารสูตร 1/2 MS ทั้งสองสูตรเสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก) อาหารสูตร B5

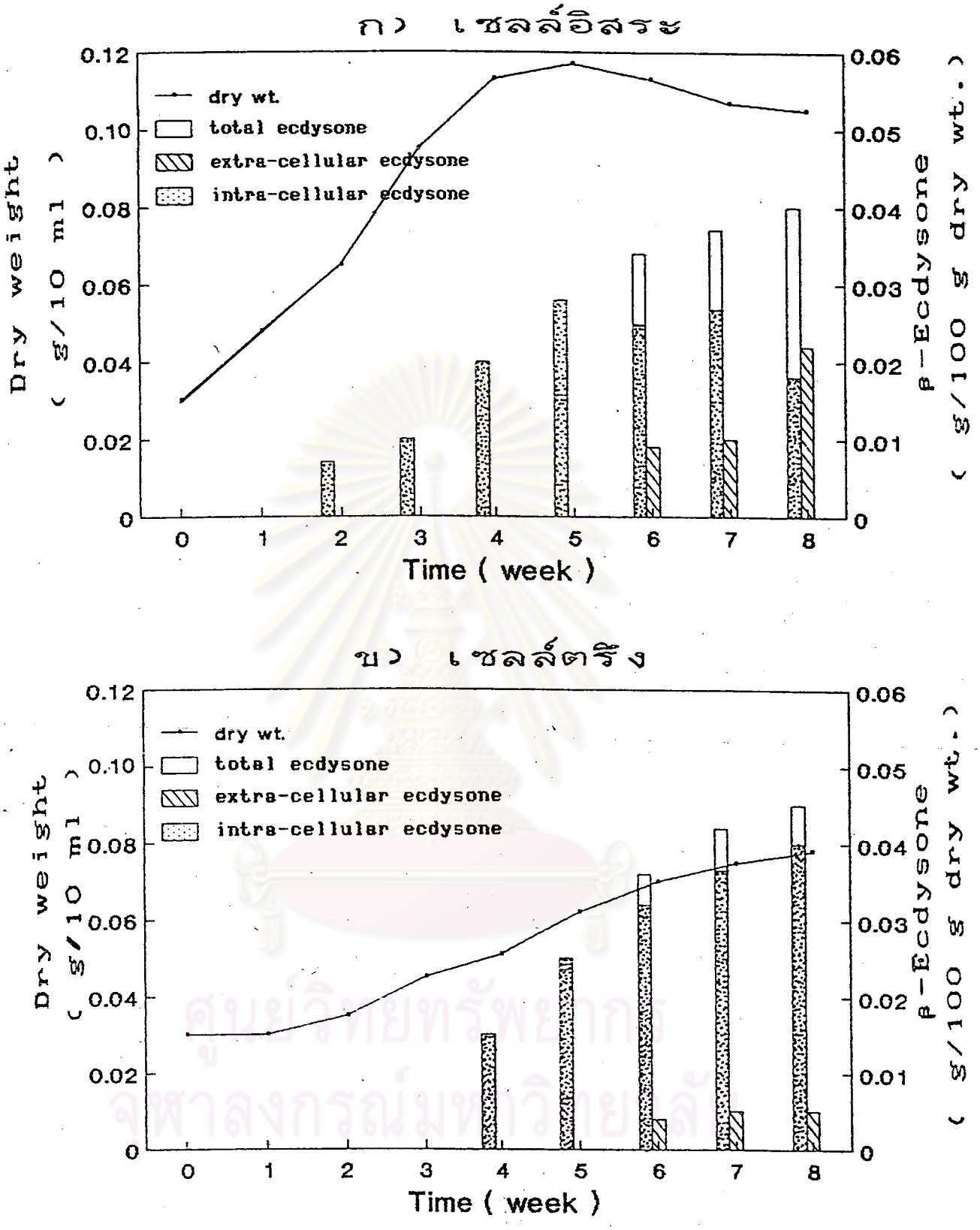
ข) อาหารสูตร 1/2 MS

3.11.3 ผลกระทบของการตรึงเซลล์ต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนในอาหารสูตร B5

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ตรึง PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอิสระในอาหารสูตรเดียวกัน เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่าน้ำหนักแห้ง 0.03 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 10,12 และรูปที่ 33)พบว่า เซลล์ตรึงมีการเจริญเติบโตช้ากว่าเซลล์แขวนลอยอิสระมาก โดยเซลล์ตรึงเริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ในสัปดาห์ที่ 2 จากนั้นเจริญอย่างช้าๆเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 7 ด้วยค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.078 กรัม/10 มล ในขณะที่เซลล์แขวนลอยอิสระเริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ในสัปดาห์ที่ 1 จากนั้นเจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 4 ด้วยค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.117 กรัม/10 มล ซึ่งมากกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ตรึงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และมีรูปแบบการเจริญที่แตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตาม จากการสังเกตุความมีชีวิตด้วยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท พบว่าที่ระยะ stationary phase เซลล์แขวนลอยอิสระมีเซลล์ที่มีชีวิตเพียง 20 % แต่เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของตรึง พบว่ามีสูงถึง 75 %

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซน พบว่า ในระยะแรกของการเจริญเติบโต เซลล์แขวนลอยอิสระจะสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนได้เร็วกว่าเซลล์ตรึง โดยจะเริ่มสร้างประมาณสัปดาห์ที่ 2 แต่เซลล์ตรึงจะตรวจพบเบตา-เอคไดโซนประมาณสัปดาห์ที่ 4 อย่างไรก็ตาม ปริมาณเบตา-เอคไดโซนจะเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุดที่ระยะ stationary phase ซึ่งปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ของเซลล์อิสระมีค่า 0.027 กรัมเปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ของเซลล์ตรึงมีค่า 0.04 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่าประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ของเซลล์ตรึงมีค่าน้อยกว่าของเซลล์แขวนลอยมาก อาจเป็นเพราะ ในเซลล์แขวนลอยอิสระที่ระยะ stationary phase



รูปที่ 33 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตรึงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล และ 0.01 M $CaCl_2$ ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก) เซลล์แขวนลอยอิสระ PNA 1

ข) เซลล์ตรึง PNA 1

มีการแตกของเซลล์ ทำให้เบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ ละลายออกมาอยู่ภายนอกเซลล์ แต่ที่ระยะ stationary phase ของเซลล์ตริงมีการแตกของเซลล์น้อยมาก

เมื่อรวมปริมาณเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์เข้าด้วยกัน พบว่าเซลล์ตริงจะให้ผลผลิตเบตา-เอคไดโซนสูงสุดเท่ากับ 0.045 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าผลรวมของเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยอิสระประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์

3.12 ศึกษาสารตั้งต้นโคเลสเตอรอล

3.12.1 ผลกระทบของโคเลสเตอรอลต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย PNA 1

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ และ โคเลสเตอรอล 200 มก/ล (วิธีข้อ 2.4.1) เปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดียวกันแต่ไม่มีโคเลสเตอรอลเป็นอาหารสูตรควบคุม เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่าน้ำหนักแห้ง 0.03 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิคHPLC ทุกสัปดาห์

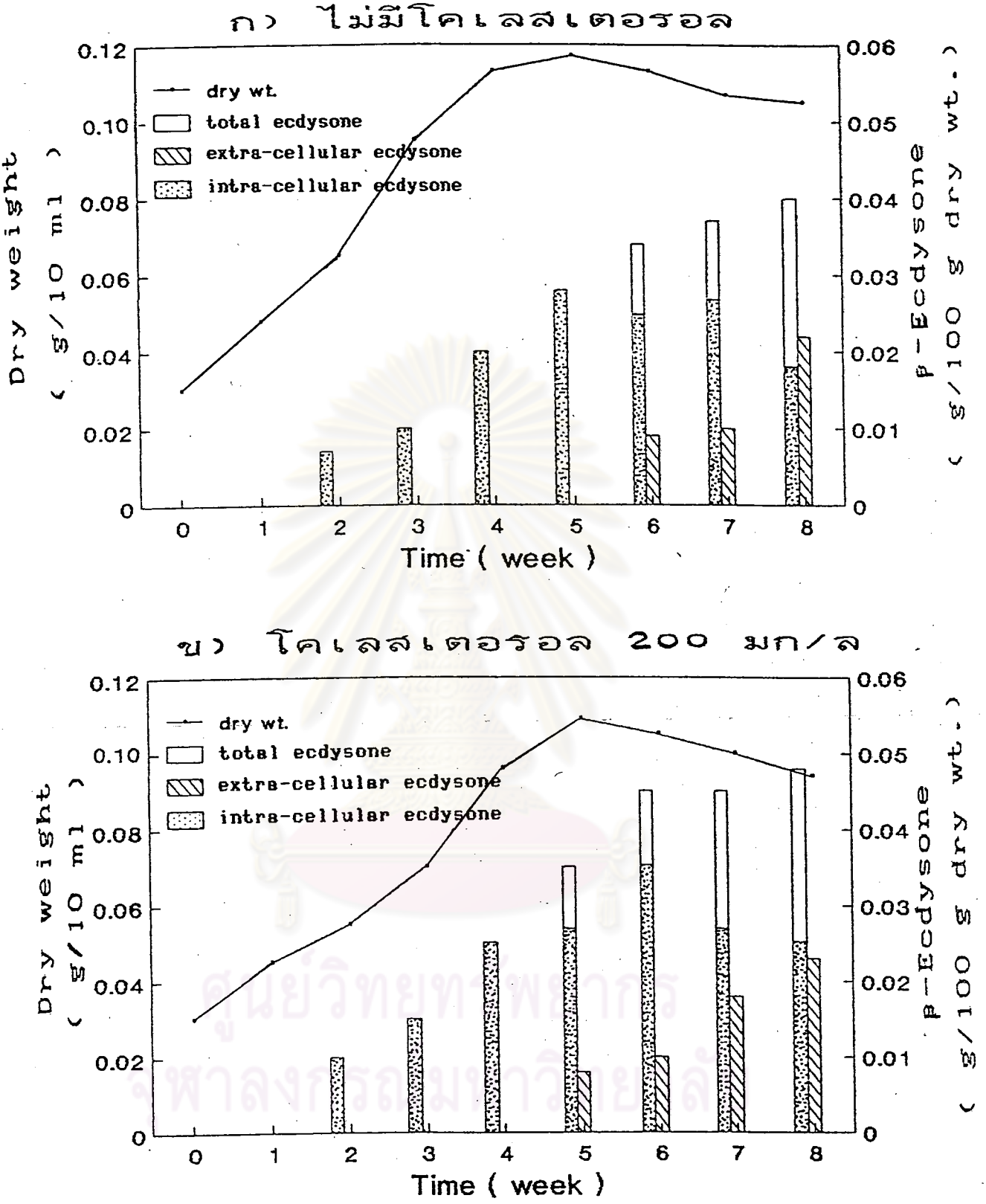
ผลการทดลอง (ตารางที่ 10,14 และรูปที่ 34) พบว่า โคเลสเตอรอล มีผลทำให้การเจริญของเซลล์แขวนลอย PNA 1 ลดลงตลอดการเจริญเมื่อเทียบกับอาหารสูตรควบคุม สังเกตุได้จากค่าน้ำหนักแห้งเซลล์ที่ระยะ log phase ของเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอลมีค่าน้อยกว่าในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 26 เปอร์เซ็นต์ และที่ระยะ stationary phase ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดของเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.117 กรัม/10 มล แต่ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดของเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอลมีค่าเท่ากับ 0.109 กรัม/10 มล ซึ่งมีค่าน้อยกว่าในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามรูปแบบของการเจริญไม่แตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซน พบว่า ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ PNA 1 ซึ่งเจริญในอาหารเหลวสูตร B5 เพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์

ตารางที่ 14 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. , BA 2 มก./ล. และ 0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก./ล. โคเลสเตอรอล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry weight (g/10 ml)	Viability (%)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.030	~ 80	<---------- ND ---------->		
1	0.045	ND	0	0	0
2	0.055	~ 85	0.01	0	0.01
3	0.07	ND	0.015	0	0.015
4	0.096	~ 70	0.025	0	0.025
5	0.109	ND	0.027	0.008	0.035
6	0.105	~ 50	0.035	0.01	0.045
7	0.10	ND	0.027	0.018	0.045
8	0.094	~ 20	0.025	0.023	0.048

ND = not determined value



รูปที่ 34 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$ ที่มีโคเลสเตอรอล 200 มก/ล และ ไม่มีโคเลสเตอรอล (อาหารสูตรควบคุม) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก) ไม่มีโคเลสเตอรอล

ข) โคเลสเตอรอล 200 มก/ล

จนมีปริมาณสูงสุดในช่วง stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 5 โดยมีค่า 0.028 กรัมเปอร์เซ็นต์ จากนั้นปริมาณลดลงเหลือเพียง 0.018 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 8 สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งตรวจวิเคราะห์ได้ค่า 0.009 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าต่ำมาก เมื่อเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ถึง 2.8 เท่า ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซล์ล์จะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณภายในเซลล์คือ 0.022 กรัมเปอร์เซ็นต์ ผลรวมของเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร B5 มีค่าประมาณ 0.04 กรัมเปอร์เซ็นต์ ที่เซลล์ระยะ decline phase ในขณะที่ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ ซึ่งเจริญในอาหารสูตร B5 ที่ใส่โคเลสเตอรอล มีค่าเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์ จนมีปริมาณสูงสุดในช่วง stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 6 โดยมีค่า 0.035 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าปริมาณของเบตา-เอคไดโซนในสูตรอาหารควบคุมประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งตรวจวิเคราะห์ได้ค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในระยะ declined phase โดยมีค่า 0.023 กรัมเปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับที่เลี้ยงในสูตรอาหารควบคุม

เมื่อรวมปริมาณเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์เข้าด้วยกัน พบว่าอาหารสูตร B5 ที่ใส่โคเลสเตอรอล จะให้ค่าการผลิตเบตา-เอคไดโซนสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 โดยมีค่าเท่ากับ 0.048 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าผลรวมของเบตา-เอคไดโซนในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่เซลล์ระยะ declined phase

3.12.2 <u>ผลกระทบของโคเลสเตอรอลต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริง PNA 1</u>

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ตริง PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ และโคเลสเตอรอล 200 มก/ล เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA

2 มก/ล และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ เป็นอาหารสูตรควบคุม โดยใช้เซลล์ตริงเริ่มต้นเท่ากับ 300 เม็ด ซึ่งมีค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์เท่ากับ 0.03 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้ง (วิธีข้อ 2.10.2) และวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 12,15 และรูปที่ 35) พบว่า โคเลสเตอรอลมีผลทำให้การเจริญของเซลล์ตริง PNA 1 ลดลงตลอดการเจริญ เมื่อเทียบกับอาหารสูตรควบคุม สังเกตุได้จากค่าน้ำหนักแห้งเซลล์ที่ระยะ log phase ของเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอลมีค่าน้อยกว่าในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ และที่ระยะ stationary phase ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดของเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.078 กรัม/10 มล แต่ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดของเซลล์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอลมีค่าเท่ากับ 0.065 กรัม/10 มล ซึ่งมีค่าน้อยกว่าในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามรูปแบบของการเจริญไม่แตกต่าง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซน พบว่า ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ตริง PNA 1 ซึ่งเจริญในสูตรอาหารควบคุม เพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุดในช่วง stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 8 โดยมีค่า 0.04 กรัมเปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบขณะเซลล์ตริงอยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ถึง 8 เท่า ในขณะที่ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ตริง PNA 1 ซึ่งเลี้ยงในอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอล มีค่าเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุดในช่วง stationary phase ที่สัปดาห์ที่ 8 โดยมีค่า 0.048 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่าที่เลี้ยงในสูตรอาหารควบคุม ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ stationary phase โดยมีค่าเท่ากับ 0.01 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ถึง 4.5 เท่า

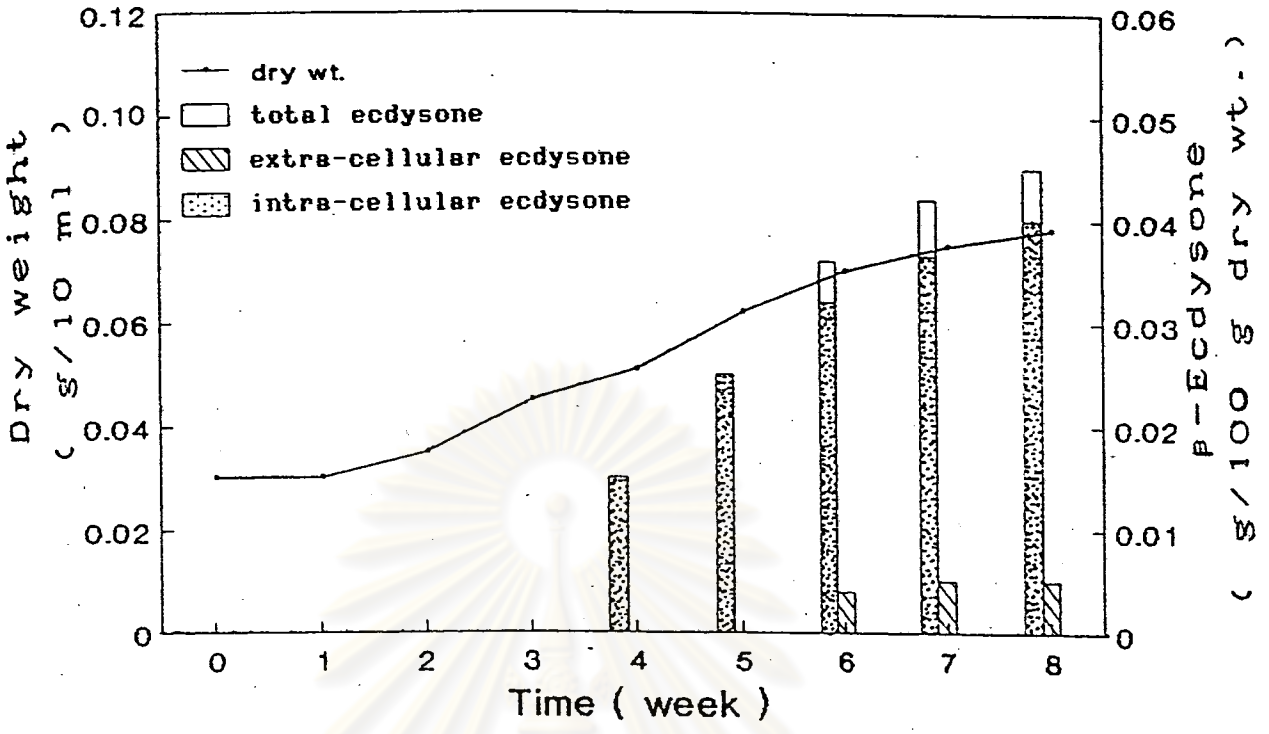
เมื่อรวมปริมาณเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์ตริงเข้าด้วยกันพบว่าอาหารสูตร B5 ที่ใส่โคเลสเตอรอล จะให้ผลผลิตเบตา-เอคไดโซนสูงสุดเท่ากับ 0.058 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าผลรวมของเบตา-เอคไดโซนในอาหารสูตรควบคุมประมาณ 29 เปอร์เซ็นต์ ที่เซลล์ระยะ stationary phase

ตารางที่ 15 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. , BA 2 มก./ล. และ 0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก./ล.โคเลสเตอรอล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

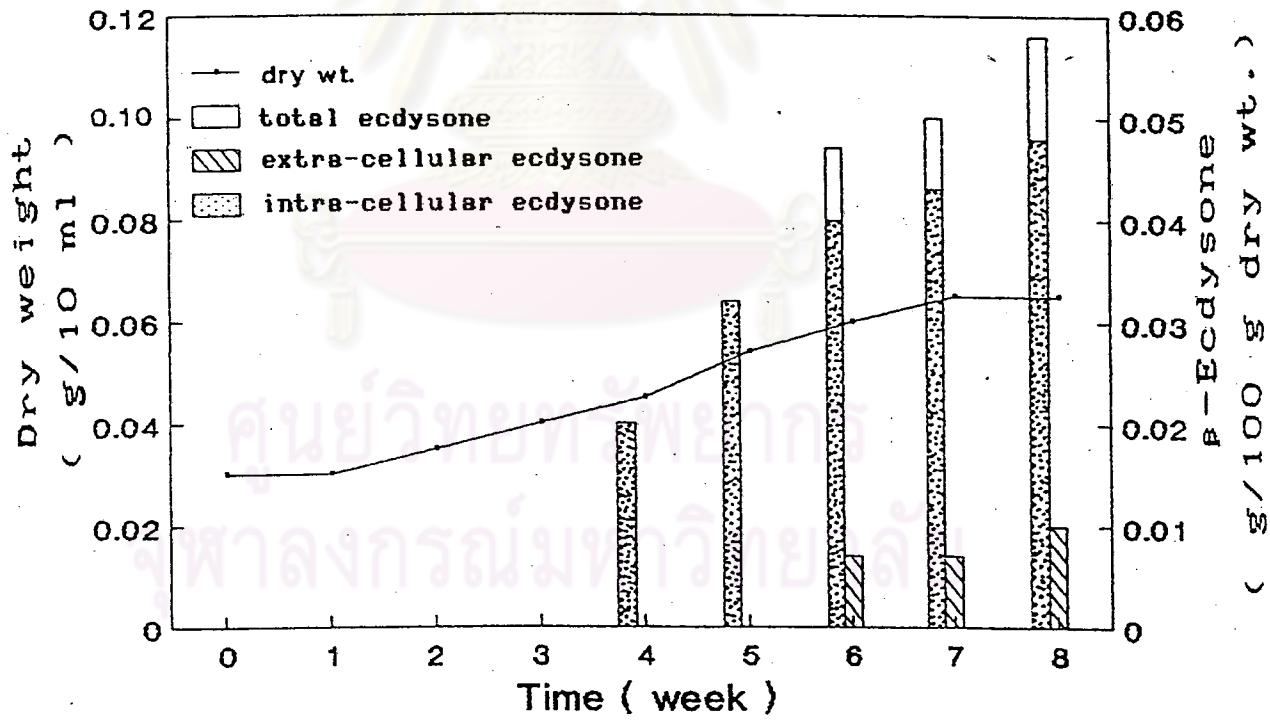
Week	Dry weight (g/10 ml)	Viability (%)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.030	~ 85	<---------- ND ---------->		
1	0.030	ND	<---------- ND ---------->		
2	0.035	~ 90	<---------- ND ---------->		
3	0.04	ND	0	0	0
4	0.045	~ 80	0.02	0	0.02
5	0.054	ND	0.032	0	0.032
6	0.06	~ 80	0.040	0.007	0.047
7	0.065	ND	0.043	0.007	0.05
8	0.065	~ 70	0.048	0.010	0.058

ND = not determined value

ก) ไม่มีโคเลสเตอรอล



ข) โคเลสเตอรอล 200 มก/ล



รูปที่ 35 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพิชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$ ที่มีโคเลสเตอรอล 200 มก/ล และ ไม่มีโคเลสเตอรอล (อาหารสูตรควบคุม) ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก) ไม่มีโคเลสเตอรอล

ข) โคเลสเตอรอล 200 มก/ล

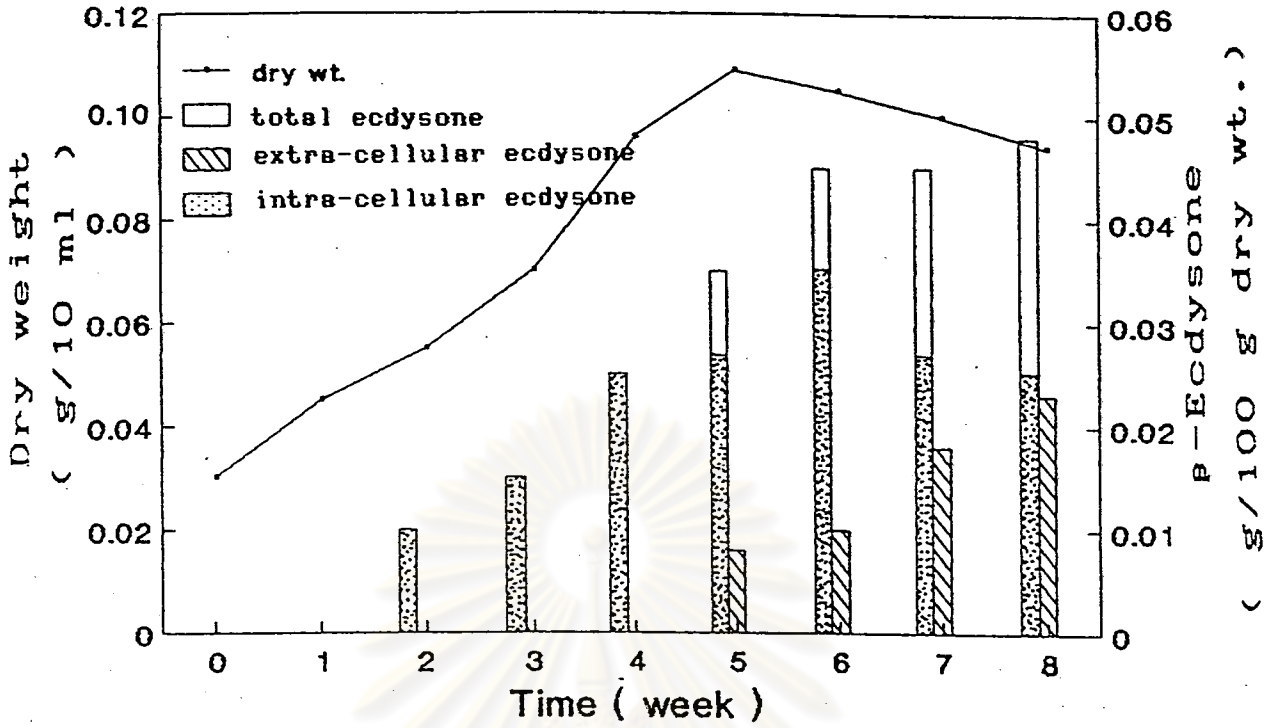
3.12.3 ผลกระทบของการตริงเซลล์ต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนในสูตรอาหารที่ใส่โคเลสเตอรอล

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ตริง PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล , $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ และโคเลสเตอรอล 200 มก/ล เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอิสระในอาหารสูตรเดียวกัน เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่าน้ำหนักแห้ง 0.03 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

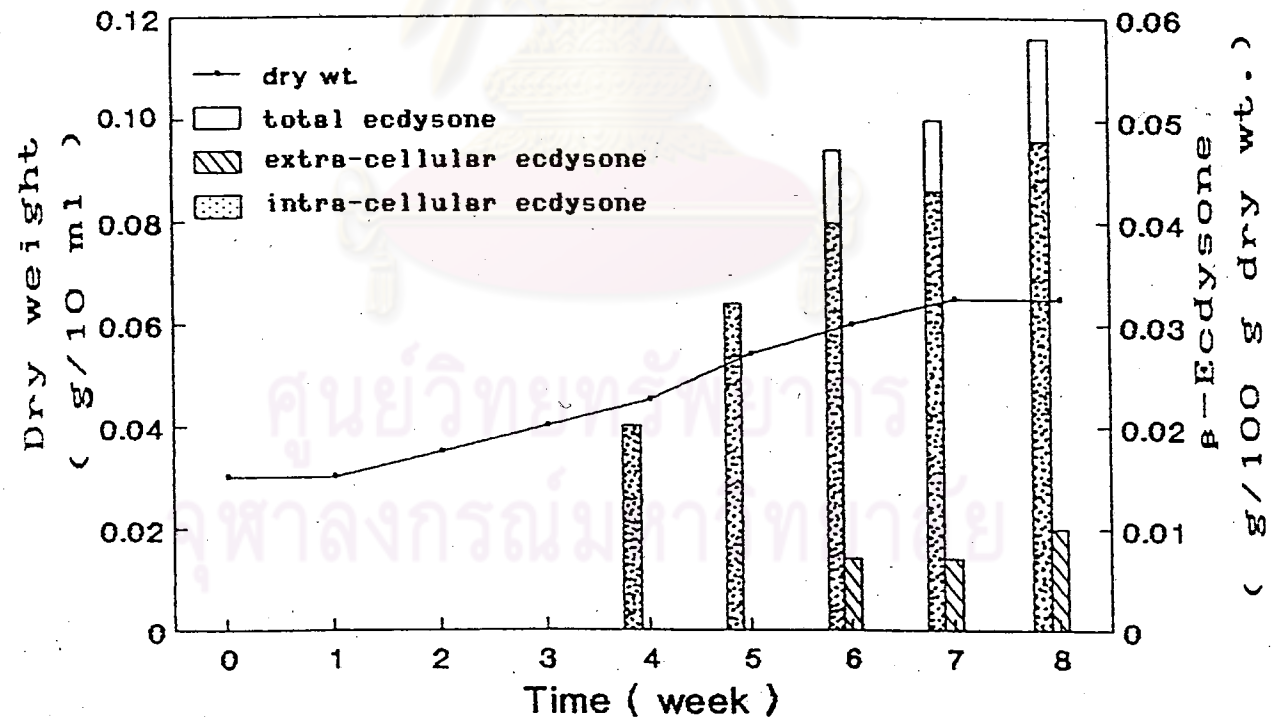
ผลการทดลอง (ตารางที่ 14,15 และรูปที่ 36)พบว่า เซลล์ตริงมีการเจริญเติบโตช้ากว่าเซลล์แขวนลอยอิสระมาก โดยเซลล์ตริงเริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ในสัปดาห์ที่ 2 จากนั้นเจริญอย่างช้าๆเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 7 ด้วยค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.065 กรัม/10 มล ในขณะที่เซลล์แขวนลอยอิสระเริ่มเจริญเข้าสู่ log phase ในสัปดาห์ที่ 1 จากนั้นเจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 5 ด้วยค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.109 กรัม/10 มล ซึ่งมากกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ตริงประมาณ 68 เปอร์เซ็นต์ และมีรูปแบบการเจริญที่แตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตาม จากการสังเกตุความมีชีวิตด้วยการย้อมสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท พบว่าที่ระยะ stationary phase เซลล์แขวนลอยอิสระมีเซลล์ที่มีชีวิตเพียง 20 % แต่เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ตริง พบว่ามีสูงถึง 72 %

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของเบตา-เอคไดโซน พบว่า ในระยะแรกของการเจริญเติบโต เซลล์แขวนลอยอิสระจะสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนได้เร็วกว่าเซลล์ตริง โดยจะเริ่มสร้างประมาณสัปดาห์ที่ 2 แต่เซลล์ตริงจะตรวจพบเบตา-เอคไดโซนประมาณสัปดาห์ที่ 4 อย่างไรก็ตาม ปริมาณเบตา-เอคไดโซนจะเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตของเซลล์จนมีปริมาณสูงสุดที่ระยะ stationary phase ซึ่งปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ของเซลล์อิสระมีค่า 0.035 กรัมเปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ของเซลล์ตริงมีค่า 0.048 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่าประมาณ 37 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ของเซลล์ตริงมีค่าน้อยกว่าของเซลล์แขวนลอยมาก อาจเป็นเพราะ ในเซลล์แขวนลอยอิสระที่ระยะ stationary phase

ก) เซลล์อิสระ



ข) เซลล์ตริง



รูปที่ 36 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก) เซลล์แขวนลอยอิสระ PNA 1

ข) เซลล์ตริง PNA 1

มีการแตกของเซลล์ ทำให้เบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์ ละลายออกมาอยู่ภายนอกเซลล์ แต่ที่ระยะ stationary phase ของเซลล์ตริงมีการแตกของเซลล์น้อยมาก

เมื่อรวมปริมาณเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์เข้าด้วยกัน พบว่าเซลล์ตริงจะให้ผลผลิตเบตา-เอคไดโซนสูงสุดเท่ากับ 0.058 กรัมเปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าผลรวมของเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยอิสระประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์

3.13 ศึกษาลักษณะภายนอกของเซลล์ตริงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ตริงในอาหารเหลวต่างๆดังกล่าว นอกจากจะศึกษาปริมาณเบตา-เอคไดโซนที่ผลิตแล้ว ยังศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะภายนอกของเม็ดเซลล์ตริงด้วย

ผลการทดลอง (รูปที่ 37, 38, 39) พบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ตริงไปได้ 1 เดือน ขนาดของเม็ดเซลล์ตริงจะมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยเส้นผ่าศูนย์กลางจะเพิ่มขึ้นอีก 1 มิลลิเมตร เนื่องจากเซลล์พืชที่อยู่ภายในเม็ดเจลเจริญเติบโต และดันผนังอัลจิเนตให้ขยายใหญ่ขึ้น และจากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าผนังอัลจิเนตด้านนอกของเซลล์ตริงเริ่มขาดออก แต่เซลล์อิสระที่หลุดออกจากเม็ดเจลยังคงน้อยอยู่ เมื่อเลี้ยงเซลล์ตริงไปได้ 2 เดือน พบว่ามีเซลล์อิสระหลุดออกจากเม็ดเจลมาก เมื่อนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด ปรากฏว่าเซลล์พืชที่อยู่ภายในเม็ดเจลมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ดันผนังอัลจิเนตด้านนอกให้ขาดออกอย่างมาก อย่างไรก็ตามเซลล์ตริงมีสภาพสมบูรณ์มาก เมื่อเทียบกับเซลล์อิสระซึ่งจะพบว่าเซลล์แตก (รูปที่ 40)

3.14 ศึกษาสารช่วยการละลายและกระจายโคเลสเตอรอลในอาหารเพาะเลี้ยง

3.14.1 ผลกระทบของสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, ทวีน80 และไดไพริดิลต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอย PNA 1

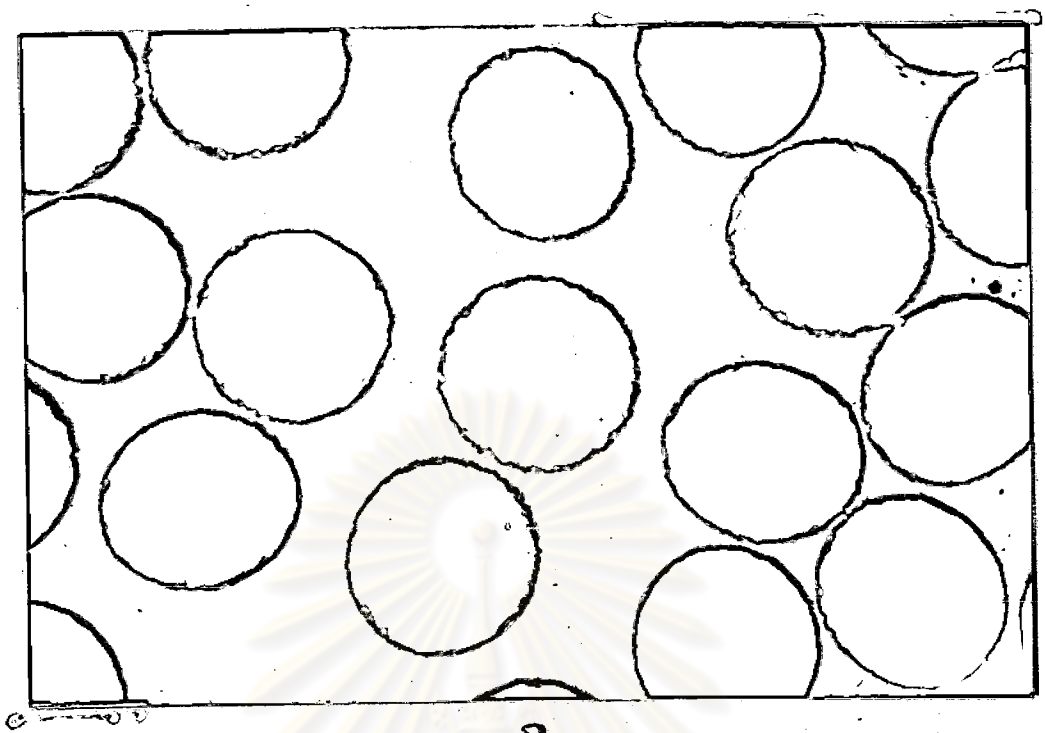
เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D

รูปที่ 37 เปรียบเทียบขนาดของเม็ดเซลล์ตริงอัลจิเนตที่อายุ 1 วัน และ 2 เดือน

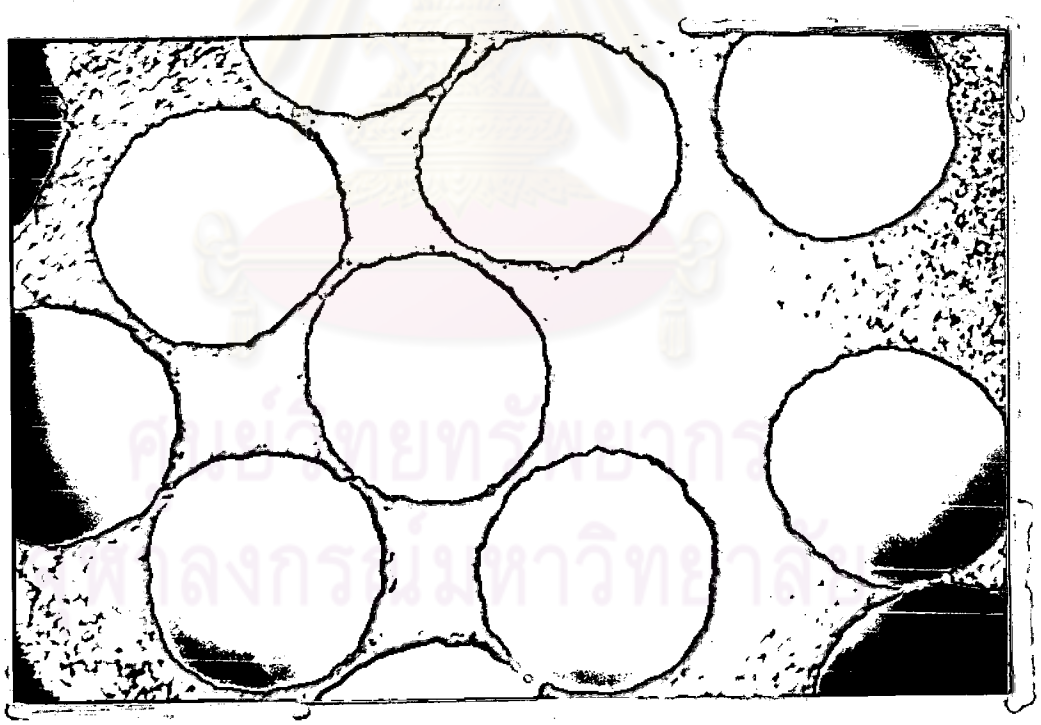
ก) อายุ 1 วัน

ข) อายุ 2 เดือน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก

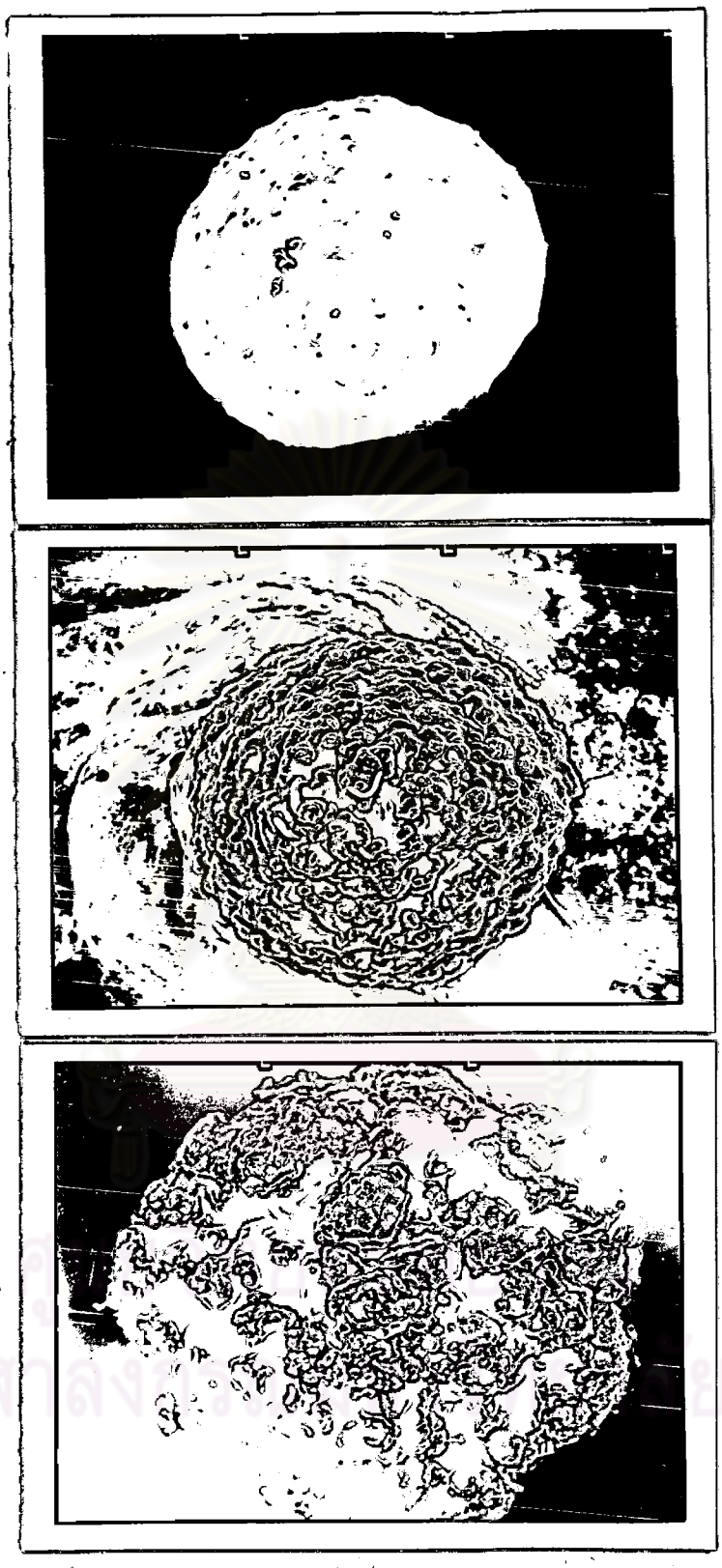


ข

รูปที่ 38 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 10 เท่า แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ที่อายุ 1 วัน และ 2 เดือน

ก) อายุ 1 วัน

ข) อายุ 2 เดือน



รูปที่ 39 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 35 เท่า แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ตริงนิชไข่เน่า PNA 1 ที่อายุ 1 วัน, 1 เดือน และ 2 เดือน

ก) อายุ 1 วัน

ข) อายุ 1 เดือน

ค) อายุ 2 เดือน

รูปที่ 40 เศษเซลล์ของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในสูตรอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$,และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล อายุ 8 สัปดาห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 มก/ล, BA 2 มก/ล , $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ นอกจากนี้ยังใส่ ทวีน80 2 กรัม/ลิตร ไดไพริดิล 0.005 มิลลิโมลาร์ และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน (ตามวิธีข้อ 2.4.2) ทั้งนี้เพื่อให้โคเลสเตอรอล ละลายและกระจายอยู่ในสารละลายอาหารมากขึ้น โดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน (ตามวิธีข้อ 2.4.2) เป็นอาหารเหลวสูตรควบคุม เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่าน้ำหนักแห้ง 0.03 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้ง และวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 16,17 และรูปที่ 41) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย PNA 1 ในอาหารที่ใส่ทวีน80 และ ไดไพริดิล ความมีชีวิตของเซลล์จะลดลงเหลือ 40 % ภายใน 4 สัปดาห์ และเหลือ 20 % ภายใน 6 สัปดาห์ (รูปที่ 42) ดังนั้นจึงไม่พบการเจริญเติบโตในอาหารสูตรนี้ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรควบคุม ซึ่งมีการเจริญเติบโตปกติ โดยเซลล์จะเริ่มเข้าสู่ log phase กลางสัปดาห์ที่ 1 และเจริญอย่างรวดเร็วเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 5 มีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.102 กรัม/10 มล จากนั้นเข้าสู่ declined phase ในสัปดาห์ที่ 6

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซน พบว่า ปริมาณเบตา-เอคไดโซนในเซลล์แขวนลอย PNA 1 ที่เจริญในสูตรอาหารที่ใส่ทวีน 80 และไดไพริดิล มีการผลิตเบตา-เอคไดโซนได้น้อยลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบสารเบตา-เอคไดโซนได้ในสัปดาห์ที่ 6 ในขณะที่เซลล์ซึ่งเจริญในสูตรอาหารควบคุม การผลิตเบตา-เอคไดโซนจะเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตของเซลล์ จนมีปริมาณสูงสุดที่ระยะ stationary phase โดยปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์จะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.03 กรัมเปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจะลดลงเหลือ 0.022 กรัมเปอร์เซ็นต์ ในสัปดาห์ที่ 8 สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบเมื่อเซลล์อยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งตรวจวิเคราะห์ได้ค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ ปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในระยะ declined phase โดยมีค่า 0.020 กรัมเปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับปริมาณภายในเซลล์ ผลรวมปริมาณเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกเซลล์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.042 กรัมเปอร์เซ็นต์ ที่สัปดาห์ที่ 8

ตารางที่ 16 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. , BA 2 มก./ล. และ 0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก./ล. โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry weight (g/10 ml)	Viability (%)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.030	~ 80	<---------- ND ---------->		
1	0.043	ND	<---------- ND ---------->		
2	0.053	~ 85	0.005	0	0.005
3	0.065	ND	0.01	0	0.01
4	0.085	~ 70	0.015	0	0.015
5	0.102	ND	0.028	0.002	0.030
6	0.100	~ 50	0.028	0.007	0.035
7	0.095	ND	0.023	0.015	0.038
8	0.095	~ 20	0.022	0.020	0.042

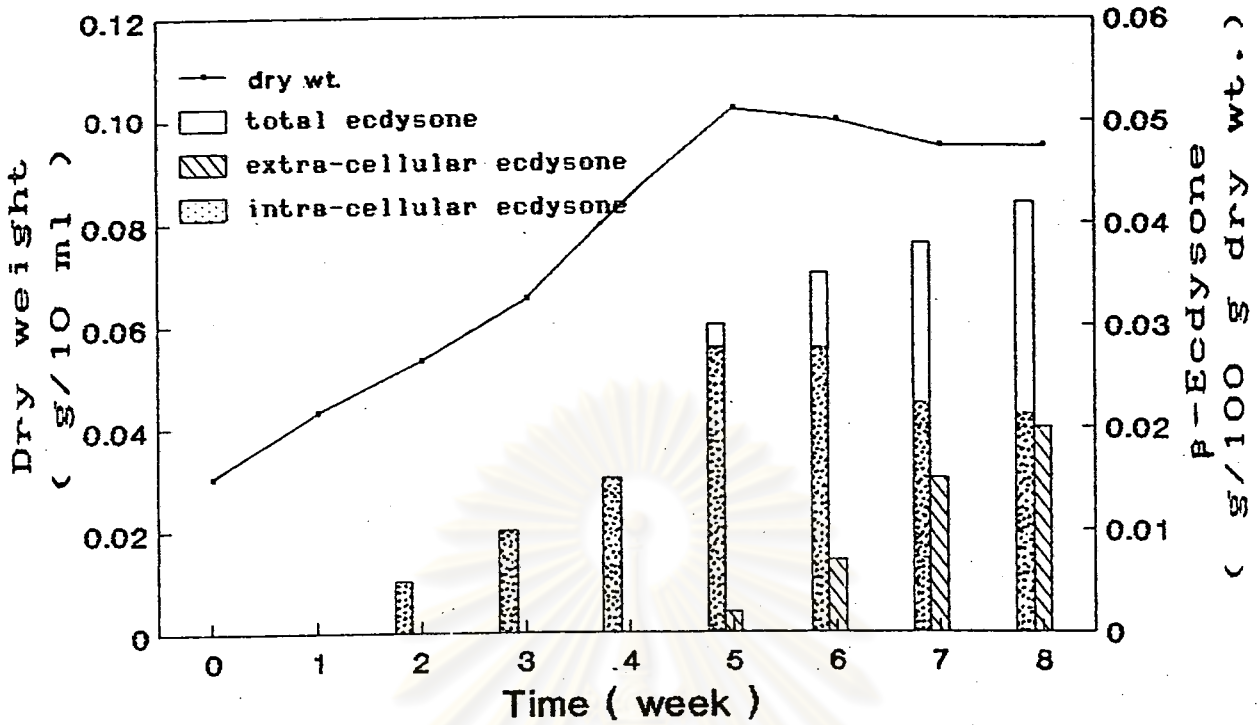
ND = not determined value

ตารางที่ 17 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล., BA 2 มก./ล., 0.01M $CaCl_2$, 200 มก./ล. โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, 2 กรัม/ลิตร ทวีน80 และ 0.005 mM ไดไพริติล เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

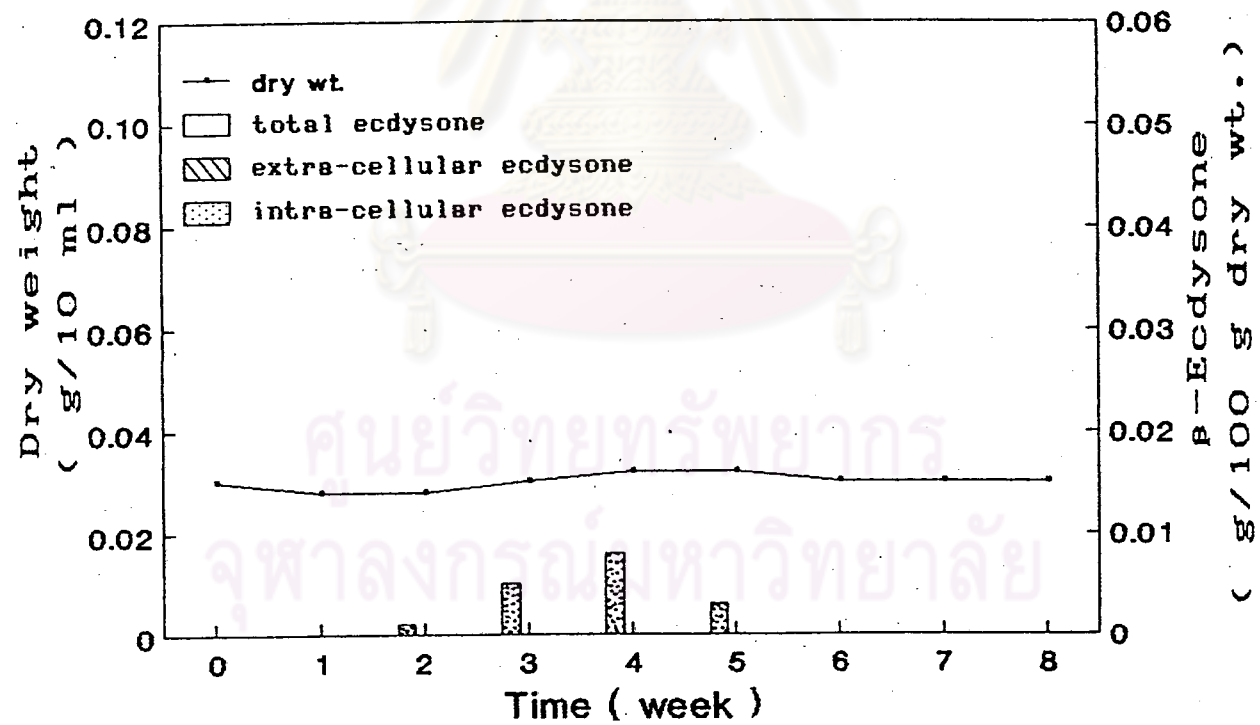
Week	Dry weight (g/10 ml)	Viability (%)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.030	~ 85	<---------- ND ---------->		
1	0.028	ND	<---------- ND ---------->		
2	0.028	~ 70	0.001	0	0.001
3	0.030	ND	0.005	0	0.005
4	0.032	~ 40	0.008	0	0.008
5	0.032	ND	0.003	0	0.003
6	0.030	~ 20	0	0	0
7	0.030	ND	0	0	0
8	0.030	~ 20	0	0	0

ND = not determined value

ก) ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล



ข) ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล



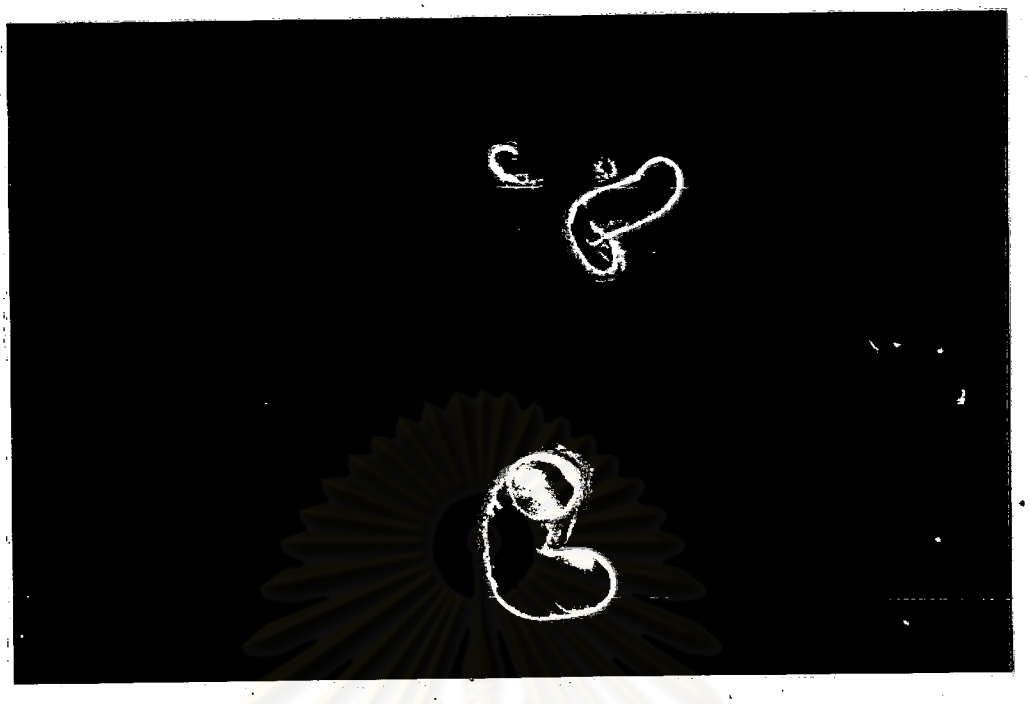
รูปที่ 41 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน , ทวีน80 และไดไพริดิล เปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดียวกันแต่ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก) ไม่ใส่ทวีน80 และ ไดไพริดิล

ข) ใส่ทวีน80 และ ไดไพริดิล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก



ข

รูปที่ 42 เปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารที่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล เทียบกับอาหารที่ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล อายุ 4 สัปดาห์

ก) ในสูตรอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$, 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน 2 กรัม/ลิตร ทวีน80 และ 0.005 mM ไดไพริดิล

ข) ในสูตรอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$, และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล

3.14.2 ผลกระทบของสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, ทวีน80 และไดไพริดิลต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริง PNA 1

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ตริง PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ นอกจากนี้ยังใส่ทวีน80 2 กรัม/ลิตร, ไดไพริดิล 0.005 มิลลิโมลาร์ และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน (ตามวิธีข้อ 2.4.2) ทั้งนี้เพื่อให้โคเลสเตอรอล ละลายและกระจายอยู่ในสารละลายอาหารมากขึ้น โดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน เช่นกัน เป็นอาหารเหลวสูตรควบคุม โดยใช้เซลล์ตริงเริ่มต้น 300 เม็ด ซึ่งมีค่าน้ำหนักแห้งเซลล์เท่ากับ 0.03 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้ง และวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซนด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 18,19 และรูปที่ 43) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ตริง PNA 1 ในอาหารที่ใส่ทวีน80 และ ไดไพริดิล เซลล์นิชจะไม่เจริญเติบโตแต่ยังคงมีชีวิตอยู่ โดยสังเกตุจากเซลล์เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เมื่อย้อมเซลล์ด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท (รูปที่ 44) แต่ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่เรืองออกมาจะลดน้อยลง เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตรควบคุม ซึ่งมีการเจริญเติบโตปกติ โดยเซลล์จะเริ่มเข้าสู่ log phase ในสัปดาห์ที่ 2 และเจริญอย่างช้าๆเข้าสู่ stationary phase ในสัปดาห์ที่ 7 มีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 0.065 กรัม/10 มล

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเบตา-เอคไดโซน พบว่า ปริมาณเบตา-เอคไดโซนในเซลล์ตริง PNA 1 ที่เจริญในสูตรอาหารที่ใส่ทวีน 80 และไดไพริดิล มีการผลิตเบตา-เอคไดโซนได้น้อยลงจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบสารเบตา-เอคไดโซนได้ในสัปดาห์ที่ 6 ในขณะที่เซลล์ตริงซึ่งเจริญในสูตรอาหารควบคุม การผลิตเบตา-เอคไดโซนจะเพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตของเซลล์ จนมีปริมาณสูงสุดที่ระยะ stationary phase โดยปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายในเซลล์จะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเท่ากับ 0.04 กรัมเปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซนภายนอกเซลล์ เริ่มตรวจพบเมื่อเซลล์เข้าสู่ stationary

ตารางที่ 18 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. , BA 2 มก./ล. และ 0.01 M $CaCl_2$ และ 200 มก./ล. โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

Week	Dry weight (g/10 ml)	Viability (%)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.030	~ 85	<---------- ND ---------->		
1	0.030	ND	<---------- ND ---------->		
2	0.035	~ 90	0.002	0	0.002
3	0.040	ND	0.006	0	0.006
4	0.050	~ 80	0.015	0	0.015
5	0.055	ND	0.020	0	0.020
6	0.060	~ 80	0.028	0.002	0.030
7	0.065	ND	0.035	0.005	0.040
8	0.065	~ 70	0.040	0.005	0.045

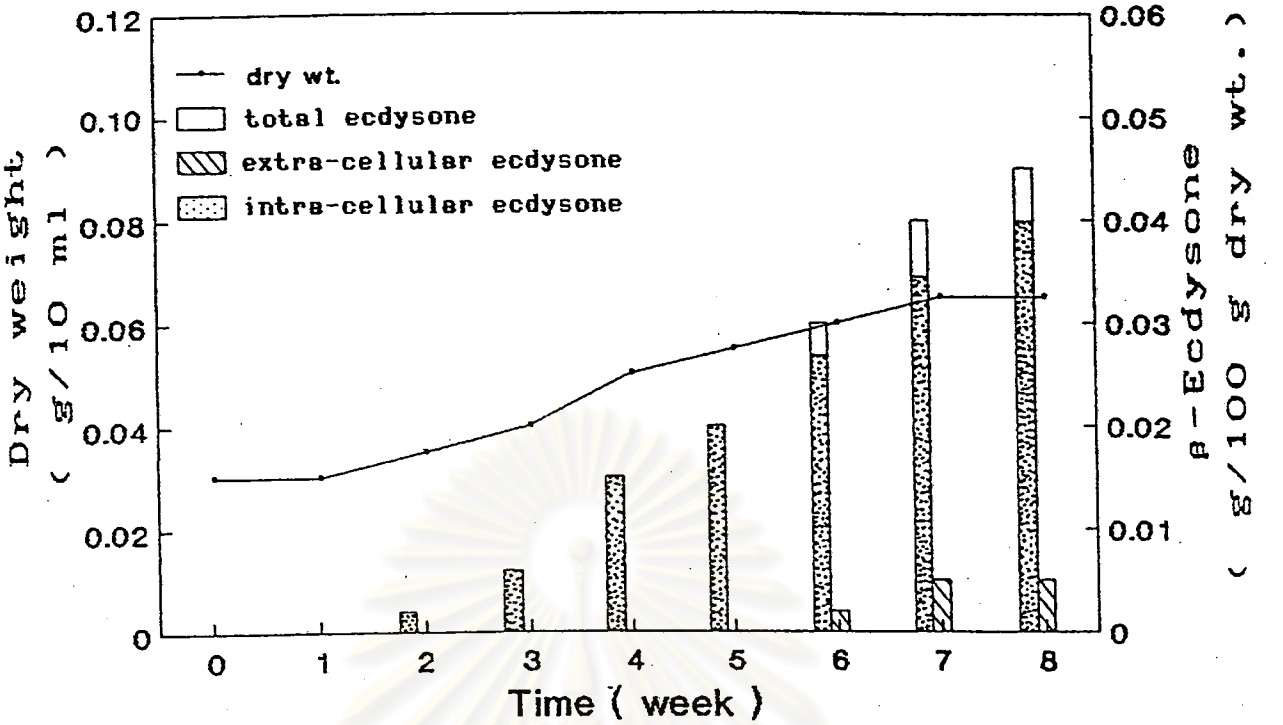
ND = not determined value

ตารางที่ 19 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล., BA 2 มก./ล., 0.01M $CaCl_2$, 200 มก./ล. โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, 2 กรัม/ลิตร ทวีน80 และ 0.005 mM ไดไพริดิล เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

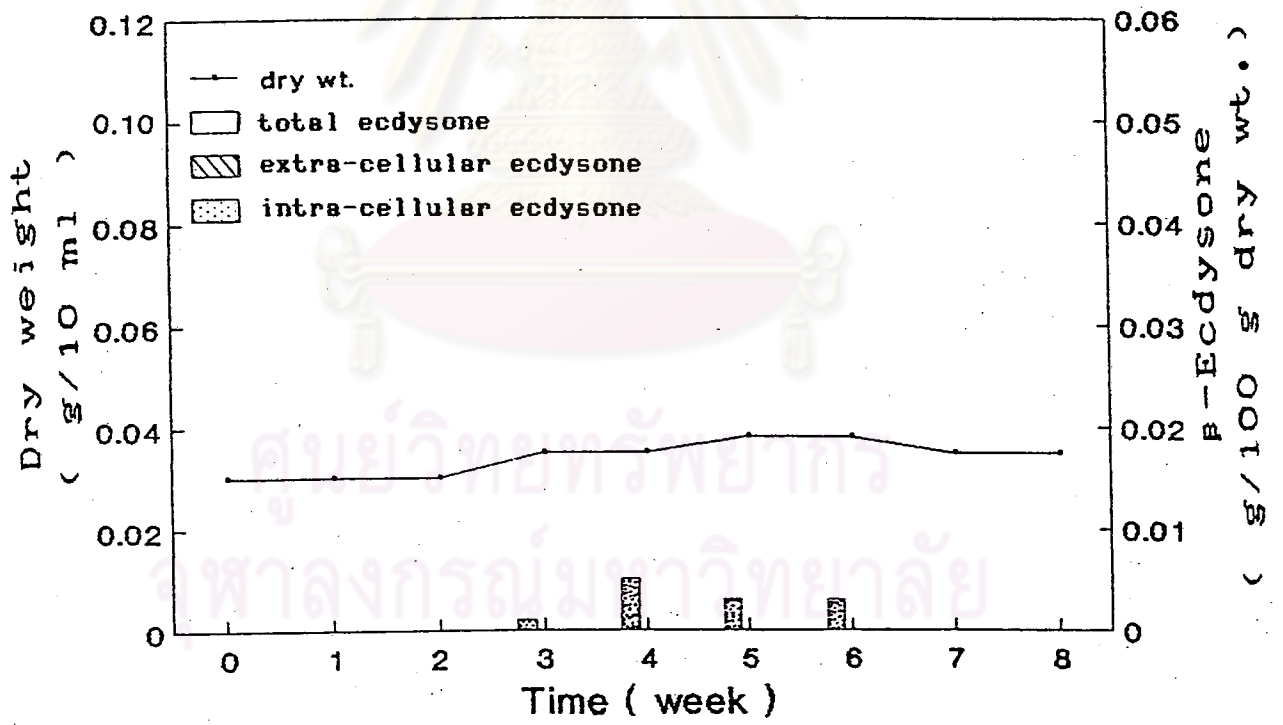
Week	Dry weight (g/10 ml)	Viability (%)	Intracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Extracellular β-ecdysone (g/100g dry wt.)	Total β-ecdysone (g/100g dry wt.)
0	0.030	~ 85	<---------- ND ---------->		
1	0.030	ND	<---------- ND ---------->		
2	0.030	~ 80	0	0	0
3	0.035	ND	0.001	0	0.001
4	0.035	~ 60	0.005	0	0.005
5	0.038	ND	0.003	0	0.003
6	0.038	~ 50	0.003	0	0.003
7	0.035	ND	0	0	0
8	0.035	~ 50	0	0	0

ND = not determined value

ก) ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล



ข) ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล



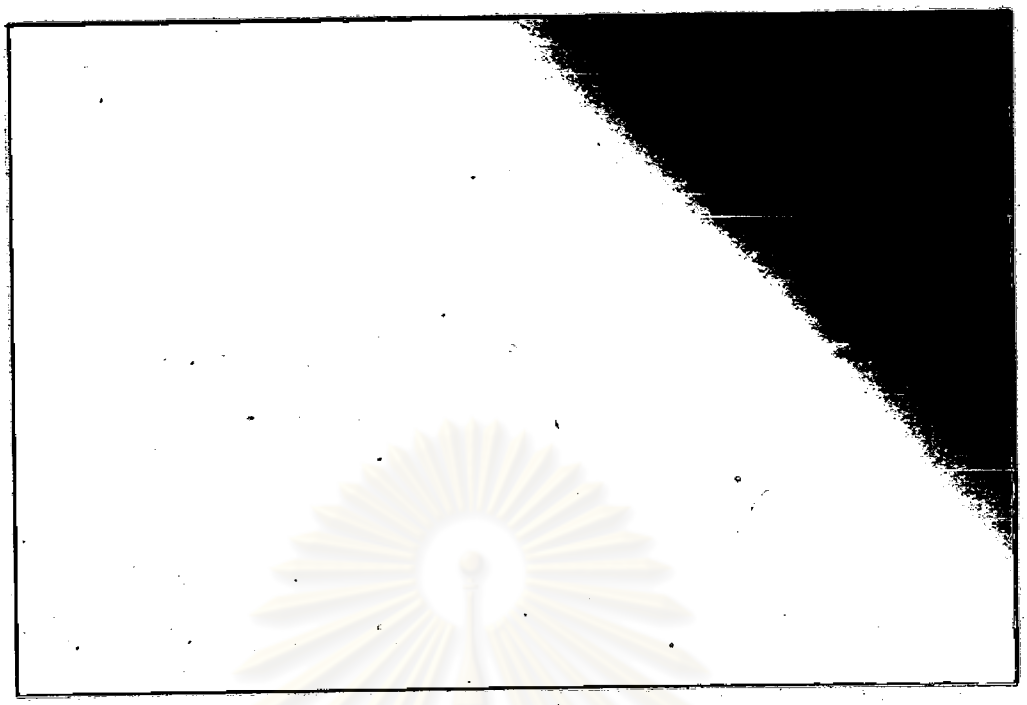
รูปที่ 43 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน , ทวีน80 และไดไพริดิล เปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดียวกันแต่ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก) ไม่ใส่ทวีน80 และ ไดไพริดิล

ข) ใส่ทวีน80 และ ไดไพริดิล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก



ข

รูปที่ 44 เปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ตริงนิชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารที่ใส่ ทวีน80 และไดไพริดิล เทียบกับอาหารที่ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล อายุ 4 สัปดาห์

ก) ในสูตรอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$, 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน 2 กรัม/ลิตร ทวีน80 และ 0.005 mM ไดไพริดิล

ข) ในสูตรอาหาร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$, และ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน ไม่ใส่ทวีน80 และไดไพริดิล

phase แต่มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณภายในเซลล์ถึง 14 เท่า ผลรวมของปริมาณเบตา-เอคไดโซนทั้งภายในและภายนอกของเซลล์ตริงสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.045 กรัมเปอร์เซ็นต์

3.14.3 ผลกระทบของการตริงเซลล์ต่อการเจริญและการผลิตเบตา-เอคไดโซนในสูตรอาหารที่ใส่สารละลายอินทรีย์ไดออกเซน, ทวีน80 และไดไพริดิล

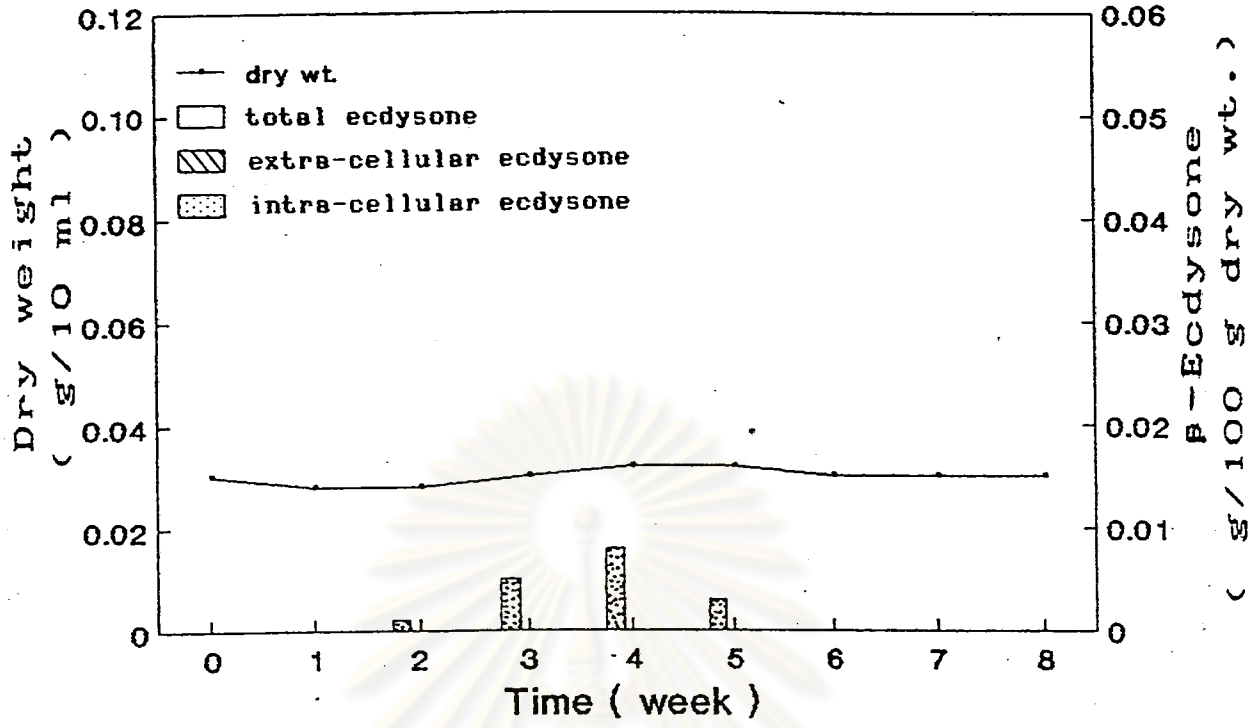
เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ตริง PNA 1 ในอาหารเหลวสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล BA 2 มก/ล และ $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ นอกจากนี้ยังใส่ทวีน80 2 กรัม/ลิตร ไดไพริดิล 0.005 มิลลิโมลาร์ และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน (ตามวิธีข้อ 2.4.2) ทั้งนี้เพื่อให้โคเลสเตอรอล ละลายและกระจายอยู่ในสารละลายอาหารมากขึ้น โดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยอิสระในอาหารสูตรเดียวกัน เริ่มต้นความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่าน้ำหนักแห้ง 0.03 กรัม/10 มล วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์หาปริมาณเบตา-เอคไดโซน ด้วยเทคนิค HPLC ทุกสัปดาห์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 17, 19 และรูปที่ 45) พบว่า ทั้งเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตริงที่เลี้ยงในอาหารสูตรดังกล่าว ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ แต่จากการสังเกตดูความมีชีวิต พบว่าเปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์แขวนลอยอิสระจะลดลงจนเหลือ 20 % ภายใน 6 สัปดาห์ แต่ความมีชีวิตของเซลล์ตริงพบว่ามีประมาณ 50 % โดยมีค่าน้ำหนักแห้งเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย สำหรับปริมาณเบตา-เอคไดโซน พบว่า สามารถตรวจพบเบตา-เอคไดโซนในระยะแรกๆของการทดลองแต่ปริมาณเบตา-เอคไดโซน จะลดลงเรื่อยๆจนไม่สามารถตรวจพบได้ในสัปดาห์ที่ 6

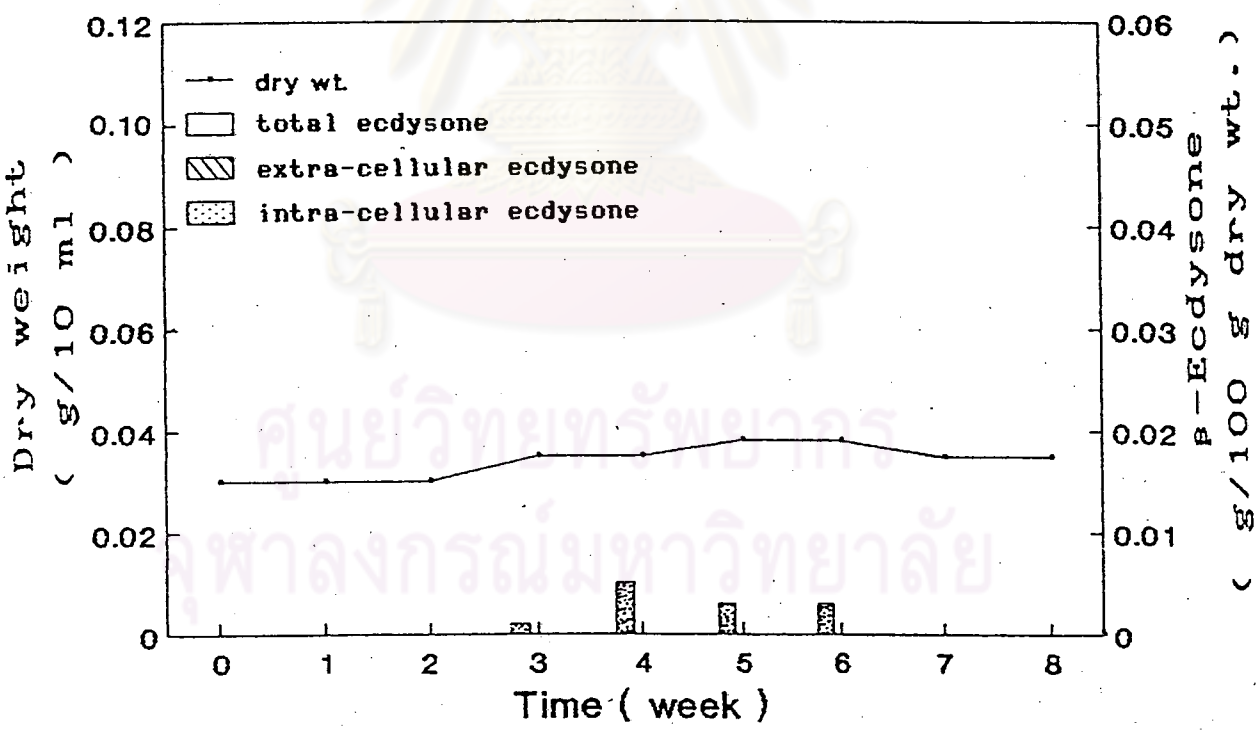
3.15 ศึกษาความเข้มข้นของทวีน80 และไดไพริดิลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย PNA 1

จากการทดลองที่ผ่านมา จะเห็นว่าทวีน80 2 กรัม/ลิตร และ ไดไพริดิล 0.005 mM มีผลทำให้เซลล์ตาย แต่เนื่องจากทั้งทวีน80 และไดไพริดิล มีความสำคัญต่อการกระจายของโคเลสเตอรอลในอาหาร จึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์พืช

ก) เซลล์อิสระ



ข) เซลล์ตริง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 45 การเจริญและการผลิตสารเบตา-เอคไดโซนของเซลล์แขวนลอยและเซลล์ตริงพืชไข่เน่า PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล, 0.01 M $CaCl_2$ 200 มก/ล โคเลสเตอรอล ที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ไดออกเซน , ทวีน80 และไดไพริดิล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลอง

ก) เซลล์แขวนลอยอิสระ PNA 1

ข) เซลล์ตริง PNA 1

ด้วย ดังนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย PNA 1 ในอาหารสูตร B5 เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก/ล, BA 2 มก/ล พร้อมทั้งทวีน80 และไดไพริดิล ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มต้นความหนาแน่นเซลล์ด้วยค่าน้ำหนักแห้ง 0.03 กรัม/10 มิลลิลิตร วัดการเจริญด้วยค่าน้ำหนักแห้งเมื่ออายุครบ 1 เดือน

ผลการทดลอง(ตารางที่ 20 และ 21) พบว่าความเข้มข้นของทวีน80 ที่ 1 กรัม/ลิตร และ 2 กรัม/ลิตร มีผลทำให้เซลล์ตาย แต่ความเข้มข้นของทวีน80 0.5 กรัม/ลิตร มีผลทำให้การเจริญลดลง ในขณะที่ ความเข้มข้นของทวีน80 0.25 กรัม/ลิตร มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ เมื่อเทียบกับสูตรควบคุมซึ่งไม่ใส่ทวีน80เลย สำหรับไดไพริดิล พบว่า ความเข้มข้น 0.005 mM มีการเจริญเป็นปกติ ดังนั้นการทดลองที่ผ่านมา สาเหตุที่เซลล์ตริงและเซลล์แขวนลอยอิสระตายจึงเนื่องมาจากความเข้มข้นของทวีน80 2 กรัม/ลิตร เพียงอย่างเดียว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 ผลกระทบของทวีน80 ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร B5 เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลองเป็นเวลา 1 เดือน

Concentration of Tween 80 (g/l)	Initial dry wt. (g / 10 ml)	Final dry wt. (g / 10 ml)	Growth index
0 (control)	0.03	0.125	3.16
0.25	0.03	0.122	3.07
0.50	0.03	0.08	1.67
1.00	0.03	0.03	0
2.00	0.03	0.03	0

ดัชนีการเจริญเติบโต (growth index) = $\frac{\text{น้ำหนักแห้งสุดท้าย - น้ำหนักแห้งเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักแห้งเริ่มต้น}}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 ผลกระทบของไดไพริดิล ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA 1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร B5 เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก/ล และ BA 2 มก/ล ที่สภาวะมาตรฐานของการทดลองเป็นเวลา 1 เดือน

Concentration of Dipyridyl (mM)	Initial dry wt. (g / 10 ml)	Final dry wt. (g / 10 ml)	Growth index
0 (control)	0.03	0.122	3.07
0.0012	0.03	0.122	3.07
0.0025	0.03	0.120	3.00
0.0050	0.03	0.123	3.10

ดัชนีการเจริญเติบโต (growth index) = $\frac{\text{น้ำหนักแห้งสุดท้าย - น้ำหนักแห้งเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักแห้งเริ่มต้น}}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย