บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 สมบัติและลักษณะของเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าที่ผลิตแอนโธไซยานิน

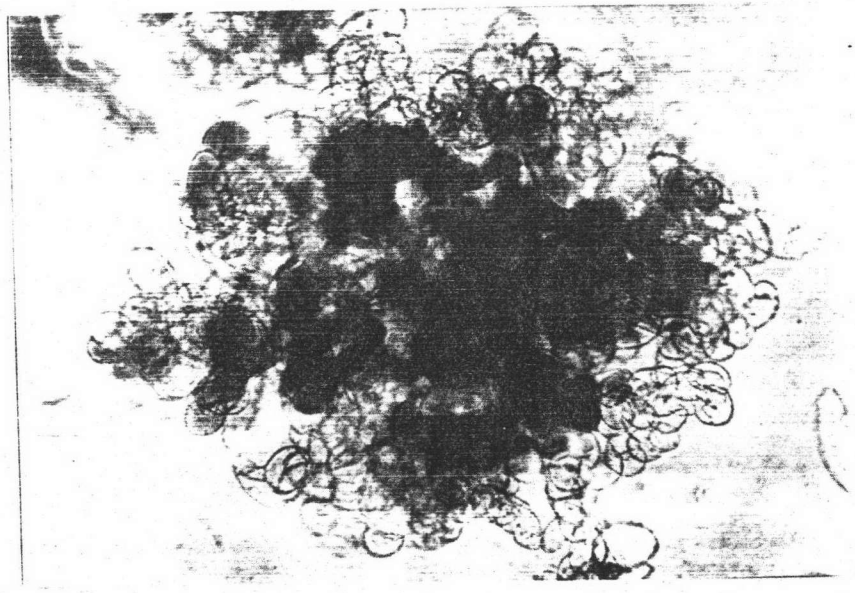
แคลลัสพืชไข่เน่า(โคลน PNA3) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่ผลิตแอนโธไซยานินได้ มีลักษณะแคลลัสที่เปียกแฉะ(friable) (รูปที่ 8) และเมื่อสังเกตลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์มีรูปร่างยาวและรีเป็นส่วนใหญ่ มีการสร้างและสะสมสารสีแดง คือแอนโธไซยานินอยู่ภายในเซลล์ (พนา,2532) (รูปที่ 9) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในลักษณะเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสูตร 1/2MS เสริมฮอร์โมน 2, 4 - D 1 มก./ล และ BA 2 มก./ล.(รูปที่ 10)รูปแบบของการเจริญ (น.น.แห้ง)แสดงให้เห็นว่าการเจริญของเซลล์เป็นแบบพหุคูณ โดยเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด (5.5 กรัม/ลิตร)ในสัปดาห์ที่ 7-8 หลังจากนั้นการเจริญจะลดลงช้า ๆ มีการสร้างและสะสมแอนโธไซยานินเพิ่มขึ้นเมื่อเริ่มเข้าสัปดาห์ที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงและมีการผลิตสูงสุด (A_{520}/น.น.แห้งประมาณ 12 หน่วย) ในสัปดาห์ที่ 7 และ 8 จากนั้นการผลิตจะลดลง

3.2 การคัดเลือกแคลลัสที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงด้วยวิธีการกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 การคัดเลือกแคลลัสผลิตแอนโธไซยานินจากเซลล์พืชไข่เน่าโคลน PNA3

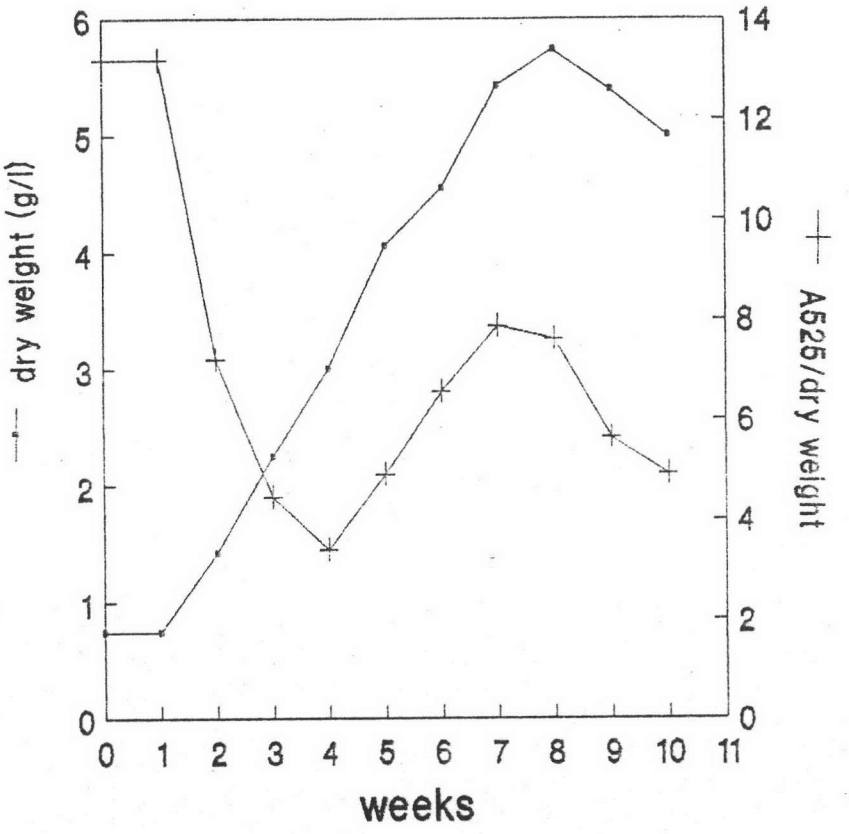
เมื่อกระจายเซลล์ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2, 4-D 1 มก./ล. BA 2 มก./ล. และวุ้น 0.7% ที่ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ $1x10^5$ เซลล์ยูนิต/จานอาหารเพาะเลี้ยงตามวิธีของ Bergmann (1960) และพนา (2534) นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน ผลการทดลอง (รูปที่ 11) พบว่าประมาณสัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงจะเริ่มสังเกตเห็นโคโลนีขนาดเล็กเท่าปลายเข็มของเซลล์พืชกระจายอยู่ทั่ว และเมื่อเซลล์เจริญในจานอาหารต่อไปเป็นระยะเวลาครบ1 เดือนจะมองเห็นโคโลนีที่มีความแตกต่างกันทั้งขนาดและสีขึ้นอย่างชัดเจนเพื่อทำการนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งหมดในแต่ละจานอาหาร แล้วคำนวณหาค่าประสิทธิภาพในการเกิดโคโลนีของเซลล์พืช ผลจากการสังเกตด้วยตาเปล่าจะพบโคโลนีสีเหลืองและแดงคละกันอยู่จึงได้ทำการนับจำนวนโคโลนีแต่ละชนิด แล้วคำนวณหาเปอร์เซนต์ของการเกิดโคโลนีสีเหลืองและสีแดง (ตารางที่ 9) ปรากฏว่าได้เฉลี่ยของประสิทธิภาพในการเกิดโคโลนีของเซลล์พืชเท่ากับ 2.01 % และค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การเกิดโคโลนีสีเหลืองเท่ากับ 27.69

รูปที่ 8 แคลลัสของพืชไข่เน่าโคลน PNA3 เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร 1/2MS เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. อายุ4สัปดาห์ ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

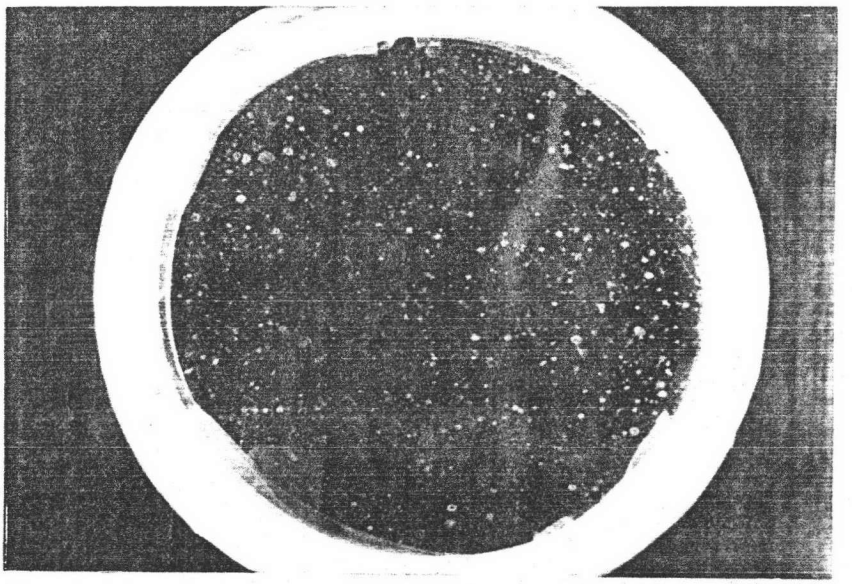


รูปที่ 9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20เท่า แสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัสนีชไข่เน่า โคลน PNA3 อายุ 4 สัปดาห์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 การเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA3 ในอาหารสูตร 1/2MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



รูปที่ 11 โคโลนีของเซลล์พืชไข่เน่า ซึ่งได้จากการกระจายเซลล์แคลลัสโคลน PNA3 ลงในจานอาหารเพาะเลี้ยงแล้วเลี้ยงในสภาวะมาตรฐานเป็นเวลา 1 เดือน

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของการเกิดโคโลนีและเปอร์เซนต์การเกิดโคโลนีสีเหลืองและแดงของการคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงครั้งที่ 1 โดยวิธีการกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็ง ใช้เซลล์ยูนิตต่อจานเพาะเลี้ยงเท่ากับ 0.99×10^5

plate ที่	จำนวนโคโลนี			%plate eff.	%สีแดง	%สีเหลือง
	แดง	เหลือง	รวม			
1	1803	708	2151	2.62	71.80	28.20
2	1413	410	1827	1.90	77.34	22.66
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	1388	517	1875	1.95	72.43	27.57
6	1046	499	1545	1.61	67.70	32.29
7	-	-	-	-	-	-
8	1367	525	1892	1.97	72.25	27.79
9	-	-	-	-	-	-
			ค่าเฉลี่ย	2.01	72.304	27.69

plate ที่ 3, 4, 7 และ 9 = contaminate

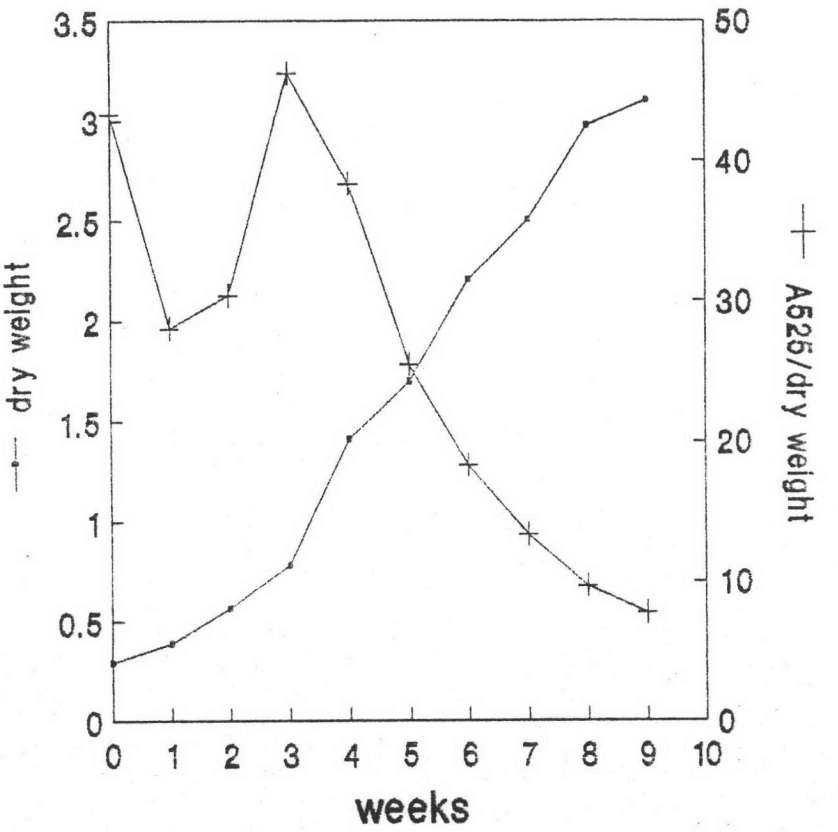
และ สีแดงเท่ากับ 72.304 เมื่อเทียบกับจำนวนโคโลนีที่มีเกิดขึ้นทั้งหมด จากนั้นเก็บโคโลนีสีแดงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ไปแยกเลี้ยงในขวดอาหารแข็งซึ่งมีปริมาณอาหารแข็งสูตรเดิมเท่ากับ 10 มล. เท่ากันทุกขวด ๆ ละ 1 โคโลนี โดยมีจำนวนทั้งหมด 128 โคโลนี ทำการเพาะเลี้ยงแคลลัสที่แยกได้เหล่านี้ ที่สภาวะมาตรฐานให้ได้ขนาดของแคลลัสโตพอประมาณ โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการย้ายอาหารเพาะเลี้ยงทุก 1 เดือน เป็นเวลาประมาณ 3 เดือน ในช่วงระยะนี้จะสังเกตเห็นความแตกต่างของลักษณะภายนอกของแคลลัสแต่ละโคลนอย่างชัดเจนอีกครั้งหนึ่ง โดยแคลลัสบางโคลนจะมองเห็นเป็นกลุ่มเซลล์แคลลัสสีแดงที่มีบางส่วนของแคลลัสสีเหลืองขึ้นแทรกอยู่ หลังจากนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะโคลนของแคลลัสมีเซลล์สีแดงเป็นเนื้อเดียวกัน ได้ 7 โคลนนำมาเพาะเลี้ยงต่อไปนาน 4 สัปดาห์ สกัดแยกสารแอนโธไซยานิน หาปริมาณแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (A_{525}/นน.เซลล์แห้ง) (ตารางที่ 10) ในการทดลองได้คัดเลือกแคลลัสโคลนที่มีการผลิตแอนโธไซยานินสูงสุด เรียกชื่อ PNA3 (I20) ซึ่งให้ ค่า A_{525} ต่อน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 10.387 นำมาศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานิน (รูปที่ 12) จะเห็นว่าแคลลัสของพืชไข่เน่าซึ่งผลิตแอนโธไซยานินที่คัดเลือกได้จะมีการผลิตแอนโธไซยานินสูงสุด (A_{525}/ น.น.แห้งประมาณ 45 หน่วย) ในช่วง 21 วันของการเพาะเลี้ยง และเซลล์เจริญขึ้นไปได้อย่างสม่ำเสมอถึงแม้จะเพาะเลี้ยงนานถึง 60 วัน (8 อาทิตย์)น.น.แห้งประมาณ 3 กรัม/ลิตร

3.2.2 การคัดเลือกแคลลัสพืชไข่เน่า ที่ผลิตแอนโธไซยานินสูงจากเซลล์พืชไข่เน่าโคลน PNA3 (I20)

ใช้วิธีการกระจายกลุ่มเซลล์ PNA 3 (120) บนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งเช่นเดียวกับการโคลนครั้งแรกทุกประการเมื่อเซลล์เจริญในจานอาหารได้ 1 เดือน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งหมดในแต่ละจานอาหาร คำนวณหาค่าประสิทธิภาพในการเกิดโคโลนีของเซลล์พืช และเปอร์เซนต์การเกิดโคโลนีสีเหลืองและสีแดง (ตารางที่ 11) พบว่าค่าเฉลี่ยของค่าประสิทธิภาพในการเกิดโคโลนีของเซลล์พืชต่ำกว่าครั้งแรกเล็กน้อย เท่ากับ 1.86 % ในขณะที่เปอร์เซนต์เฉลี่ยการเกิดโคโลนีสีเหลืองจากโคโลนีที่เกิดทั้งหมดเท่ากับ 3.33 และสีแดง เท่ากับ 97.445 เมื่อเก็บโคโลนีสีแดงที่มีสีแดงเข้มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ไปแยกกันเพาะเลี้ยงในขวดอาหารขวดละโคโลนีเช่นเดิม จะได้โคโลนีของเซลล์สีแดงทั้งหมด จำนวน 122 โคโลนี หลังจากทำการเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลานานประมาณ 3 เดือน ทำการคัดแคลลัสที่มีลักษณะประกอบขึ้นด้วยเซลล์สีแดงเป็นเนื้อเดียวกันทั้งแคลลัสได้ 57 โคลน แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มตามขนาดและความเข้ม สีแดงของแคลลัสแต่ละกลุ่มมีลักษณะดังนี้

ตารางที่ 10 การผลิตแอนโธไซยานินของโคลนทั้ง 7 ที่ได้คัดเลือกไว้จากการคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงครั้งแรก โดยวิธีการกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็ง

โคลน	นน.เปียก	นน.แห้ง	ความชื้น	A_{525}	A_{525}/นน.แห้ง	A_{525}/oนน.สด
I102	0.2820	0.0210	92.55	0.092	4.381	0.326
I117	0.2957	0.0202	93.17	0.087	4.307	0.294
I91	0.3863	0.0251	93.50	0.201	8.008	0.520
I22	0.4432	0.0295	93.34	0.111	3.763	0.250
I20	0.3894	0.0258	93.37	0.268	10.387	0.688
I14	0.2790	0.0174	93.76	0.059	3.391	0.211
I59	0.2174	0.0137	93.69	0.052	3.795	0.239



รูปที่ 12 แสดงลักษณะการเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าโคลน PNA3(I20)ในอาหารสูตร 1/2MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพของการเกิดโคโลนีและเปอร์เซนต์การเกิดโคโลนีสีเหลืองและแดงของการคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงครั้ง 2 โดยวิธีการกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็ง ใช้เซลล์ยูนิตต่อจานเพาะเลี้ยงเท่ากับ 0.96×10^5

plate ที่	จำนวนโคโลนี			%plate eff.	%สีแดง	%สีเหลือง
	แดง	เหลือง	รวม			
1	1812	78	890	1.91	95.87	4.17
2	-	-	-	-	-	-
3	1817	112	1929	1.95	94.19	5.81
4	1750	5	1755	1.77	99.72	0.0028
5	-	-	-	-	-	-
6	1784	-	1784	1.80	100	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
ค่าเฉลี่ย				1.86	97.445	3.33

กลุ่มที่ 1 แคลลัสมีเซลล์สีแดงหนาแน่นสม่ำเสมอทั่วทั้งแคลลัส มีอัตราการเจริญช้า

กลุ่มที่ 2 แคลลัสมีเซลล์สแดงกระจายพอประมาณ และมีอัตราการเจริญปานกลาง

กลุ่มที่ 3 แคลลัสมีเซลล์สีแดงกระจายอยู่น้อย และมีการเจริญเร็ว

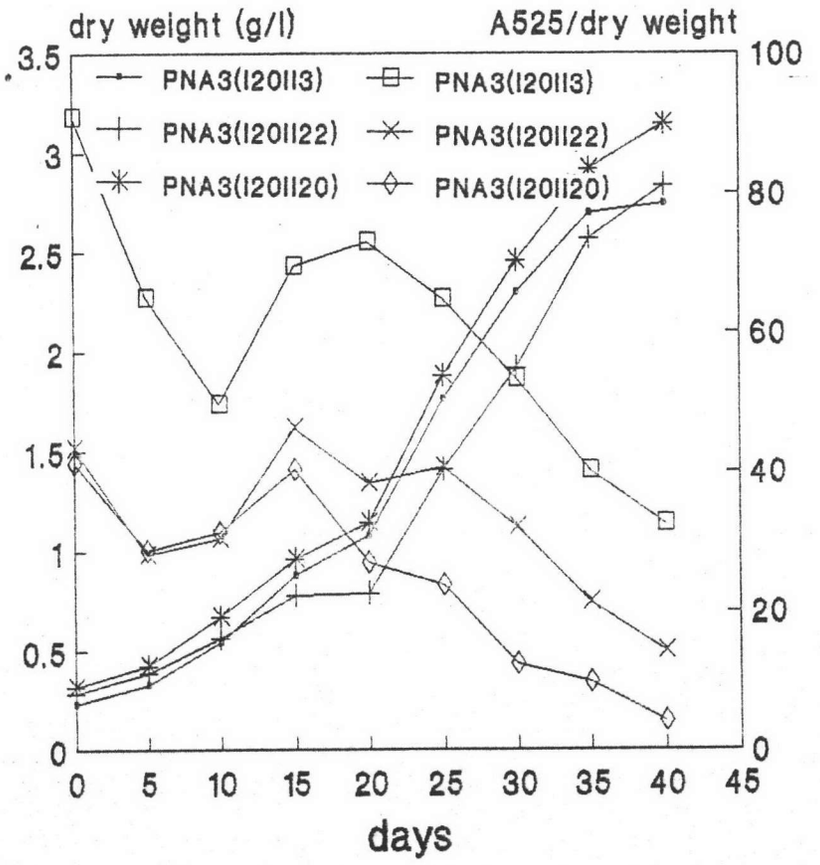
คัดเลือกโคลนของแคลลัสที่ผลิตแอนโธไซยานินได้สูงสุดกลุ่มละหนึ่งโคลน (โคลน PNA3(I20II3) โคลน PNA3 (I20II22) และ โคลน PNA3 (I20II20) จากกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) นำแคลลัสทั้ง 3 โคลนมาศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานิน พบว่าแคลลัสทั้ง 3 โคลน มีรูปแบบการเจริญการผลิตแอนโธไซยานินไม่แตกต่างไปจากโคลน PNA3 (I20) มากนักคือใช้ช่วงระยะเวลาในการผลิตแอนโธไซยานินสูงสุดช้าลงและสูงสุดหลังจากเพาะเลี้ยงไปนานประมาณ 30 วัน และเซลล์เจริญเข้าสู่การเจริญสูงสุดในระยะเวลาสั้นลง (ประมาณ 35-40 วัน) ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 13) แต่ในแคลลัสโคลน PNA3 (I20II3) ของกลุ่ม 1 จะให้การผลิตแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้งสูงสุด (A_{525}/น.น.แห้งประมาณ 78 หน่วย)ในวันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง

จากการคัดเลือกแคลลัสของเซลล์พืชไข่เน่า PNA3 โดยวิธีกระจายเซลล์ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็งทั้ง 2 ครั้ง ทำให้ได้เซลล์พืชไข่เน่าโคลนที่มีการผลิตแอนโธไซยานินได้สูง ซึ่งเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะของเซลล์แขวนลอย แล้วคัดตามการเจริญและความสามารถในการผลิตแอนโธไซยานิน (รูปที่ 14) พบว่า เซลล์พืชไข่เน่าที่คัดเลือกได้คือ PNA 3 (I20) และ PNA 3 (I20 II3) มีการเจริญต่ำกว่าเซลล์โคลนดั้งเดิม (PNA 3) ที่ทุกช่วงของการเจริญในขณะที่ประสิทธิภาพของการผลิตแอนโธไซยานินสูงขึ้นประมาณ 4.1 และ 6.8 เท่าตามลำดับ

3.3 การศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตแอนโธไซยานิน

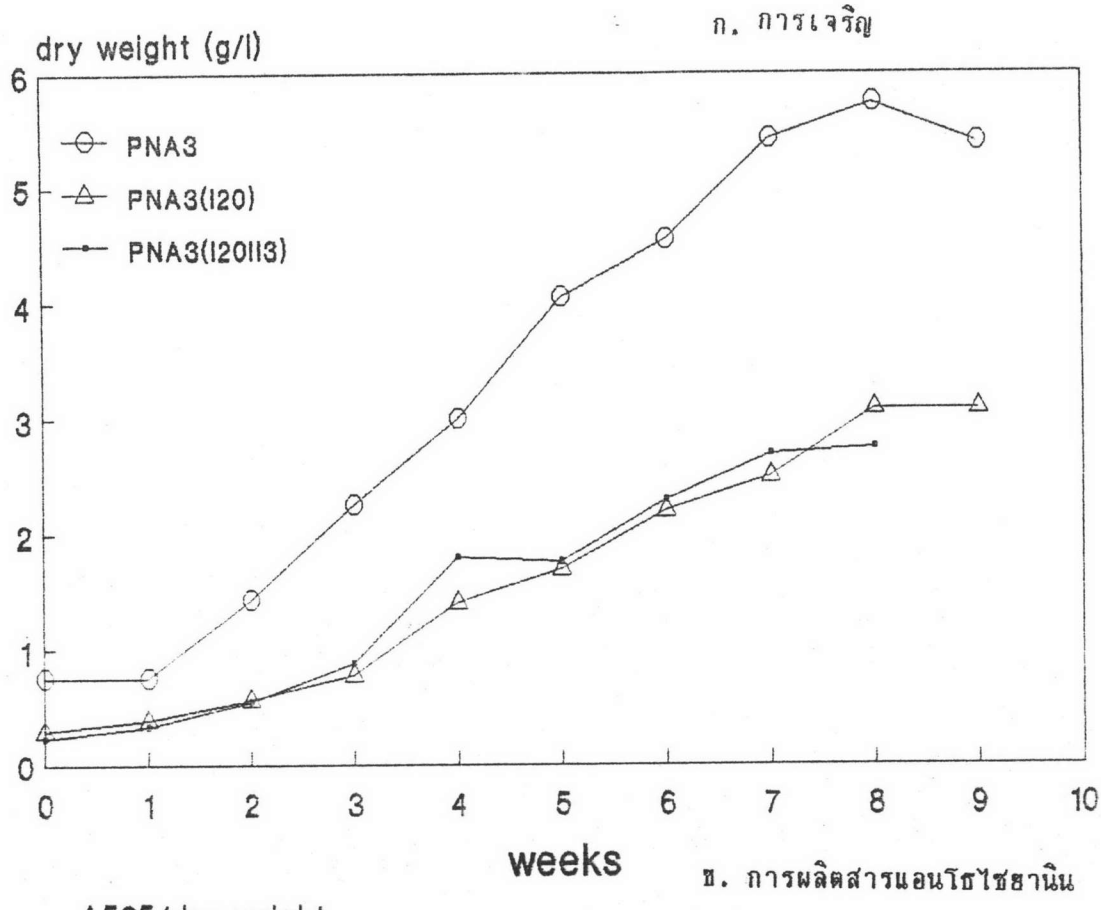
3.3.1 ความเสถียรของเซลล์พืชไข่เน่าผลิตแอนโธไซยานินสูง

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าที่คัดเลือกได้โคลน PNA 3 (I20 II3) โดยทำการย้ายแคลลัสในอาหารใหม่อย่างต่อเนื่อง (ทุก 4 อาทิตย์) นำเซลล์ไปสกัด และวัดระดับการผลิตแอนโธไซยานินเทียบกับน้ำหนักแห้ง (รูปที่ 15) จะเป็นได้ว่า ประสิทธิภาพของการผลิตแอนโธไซยานินมีการเปลี่ยนทำให้น้อยลงบ้างแต่โดยเฉลี่ยแล้ว ระดับการผลิตแอนโธไซยานินเกือบไม่เปลี่ยนแปลงเลย

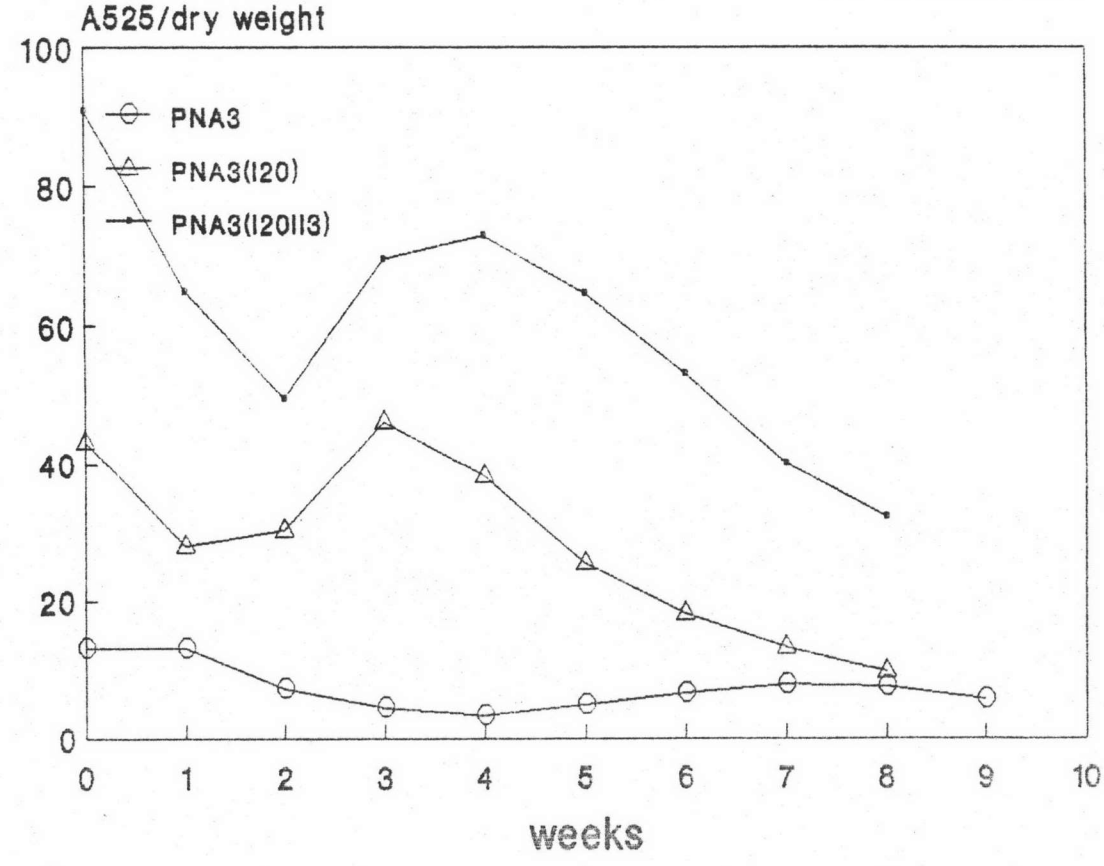


รูปที่ 13 การเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าโคลน PNA3(I20 II3),PNA3(I20II22) และ PNA3(I20II20)ในอาหารสูตร 1/2MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

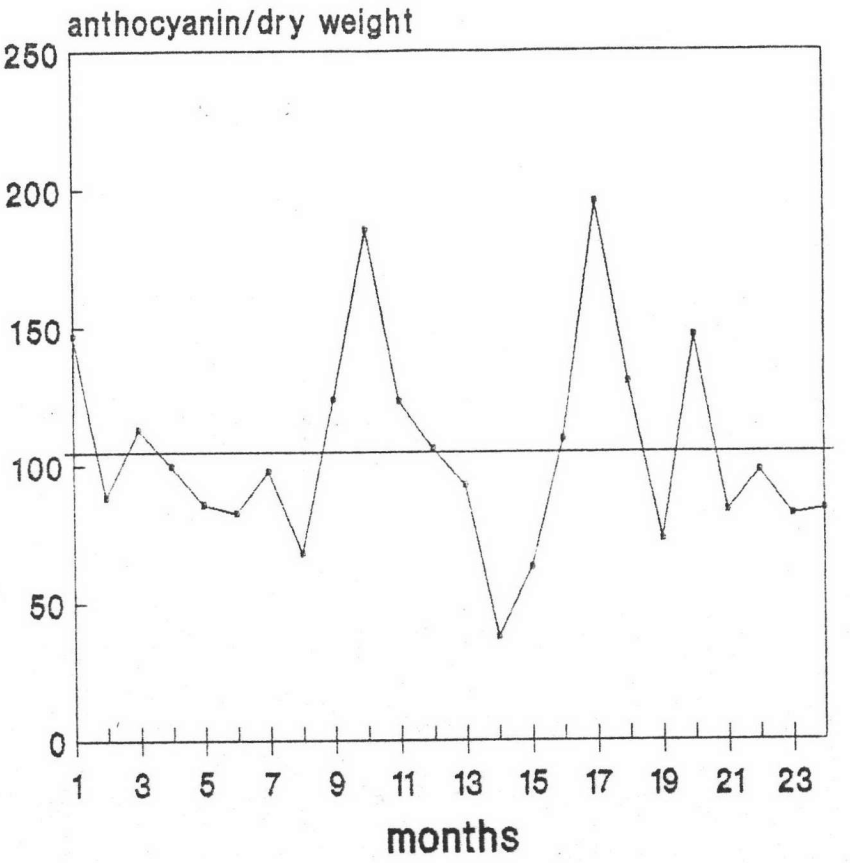
ก. การเจริญ



ข. การผลิตสารแอนโธไซยานิน



รูปที่ 14 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าโคลน PNA3 (โคลนดั้งเดิม),โคลนPNA3(I20)(โคลนจากการคัดเลือกครั้งแรก)และ โคลน PNA3(I20II3)(โคลนจากการคัดเลือกครั้งที่สอง)ในอาหารสูตร 1/2MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 ความเสถียรในการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าโคลน PNA3(I20113) เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยในอาหาร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ ล. และ BA 2 มก./ ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

3.3.2 ผลกระทบของแสงต่อการผลิตแอนโธไซยานิน

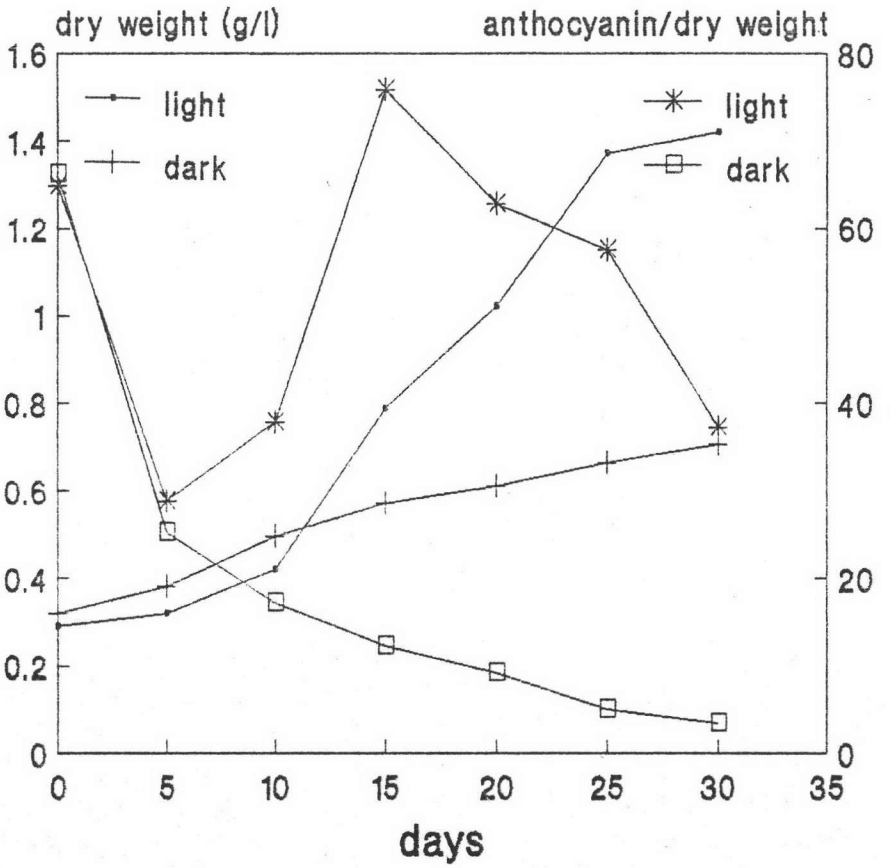
ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอย ในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2, 4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะมาตรฐาน โดยสภาวะที่ไม่มีแสงให้ใช้กระดาษฟอยด์ (Aluminium Foil) ทึบแสง ห่อขวดรูปชมพู่ ที่ใช้ใส่เซลล์แขวนลอยให้มิดชิดไม่ให้แสงเข้าได้ แล้วเก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยทุก 5 วัน ของระยะการเพาะเลี้ยง(รูปที่ 16) ของการทดลอง พบว่าเซลล์พืชแขวนลอยไม่สามารถสร้างแอนโธไซยานินได้ในสภาวะที่ไม่มีแสง และมีการเจริญต่ำลงเกือบ 2 เท่า เมื่อเทียบกับในสภาวะที่มีแสงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 30วัน

3.3.3 สภาวะการให้อากาศ

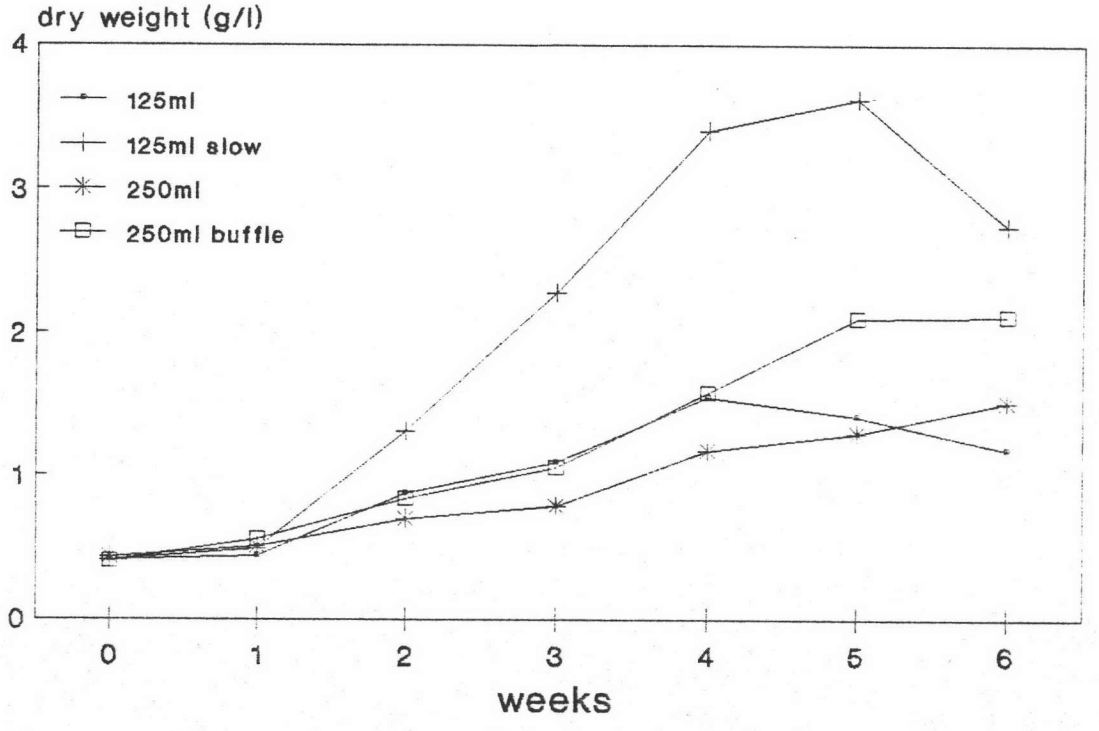
ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA2 มก./ล. แปรผันสภาวะการให้อากาศโดยการแปรผันอาหารเพาะเลี้ยง และความเร็วรอบของการเขย่าแบบหมุนวน (Rotary shaker) ขวดรูปชมพู่ที่ใช้เพาะเลี้ยงทั้งขนาดและลักษณะแตกต่างกันดังนี้

- ขวดขนาด 125 มล. เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที และ 120 รอบต่อนาที (สภาวะควบคุม)
- ขวดขนาด 250 มล. เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที
- ขวดขนาด 250 มล. แต่ออกแบบลักษณะพิเศษเพื่อเพิ่มการให้อากาศและการเขย่าโดยมีรอยหยักตรงก้นขวดนูนขึ้นมาเรียกว่า buffle flask

ทุกขวดเพาะเลี้ยงใส่เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยปริมาณ 30 มล. นำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน วัดการเจริญและปริมาณแอนโธไซยานินทุกสัปดาห์ของการเพาะเลี้ยง(รูปที่ 17 และ 18) พบว่า ทุกสภาวะการให้อากาศและการเขย่าให้ค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักไม่แตกต่างกัน แต่ที่สภาวะการให้อากาศและการเขย่าต่ำ (ขวดขนาด 125 มล. ที่ความเร็วรอบ 80 รอบต่อนาที) จะให้การเจริญของเซลล์แขวนลอยลงกว่าที่การให้อากาศและการเขย่าควบคุม(100 รอบต่อนาที) ประมาณ 2 เท่า



รูปที่ 16 การเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยนิชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบมีแสงและไม่มีแสง



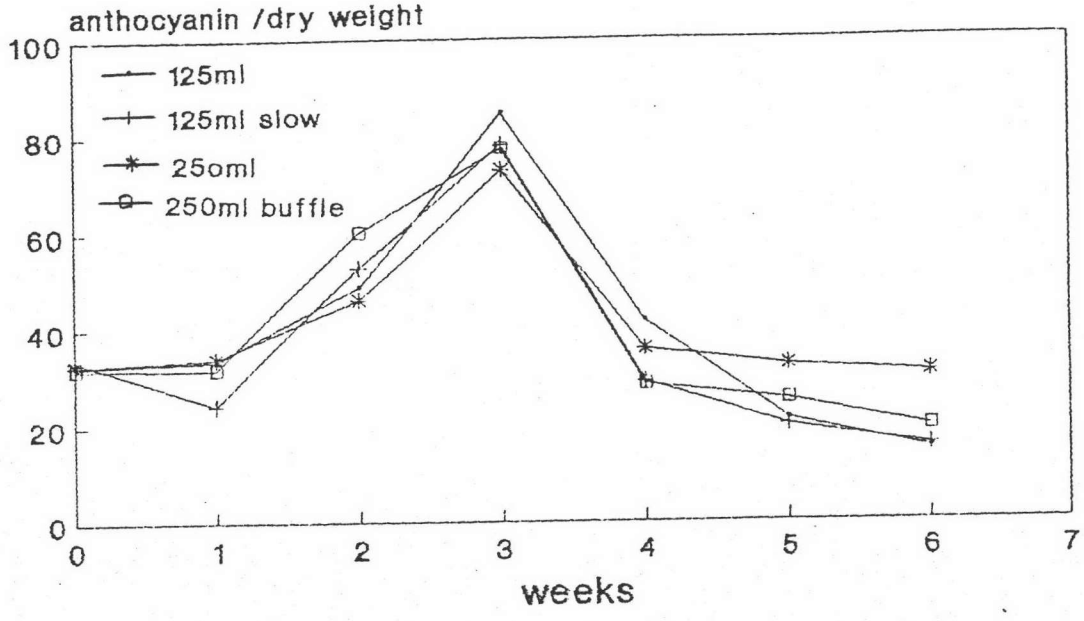
รูปที่ 17 การเจริญของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน แบบการให้อากาศและการเขย่าแตกต่างกัน (ระดับขวดเขย่า)

ขวดรูปชมพู่ 125 มล. เขย่า 80 รอบต่อนาที

ขวดรูปชมพู่ 125 มล. เขย่า 120 รอบต่อนาที

ขวดรูปชมพู่ 280 มล. เขย่า 120 รอบต่อนาที

ขวด buffle 250 มล. เขย่า 120 รอบต่อนาที



รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าใน อาหารสูตร 1/2MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่ สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบการให้อากาศและการเขย่าแตกต่างกัน (ระดับขวดเขย่า)

ขวดรูปชมพู่ 125 มล. เขย่า 80 รอบต่อนาที

ขวดรูปชมพู่ 125 มล. เขย่า 120 รอบต่อนาที

ขวดรูปชมพู่ 280 มล. เขย่า 120 รอบต่อนาที

ขวด buffle 250 มล. เขย่า 120 รอบต่อนาที

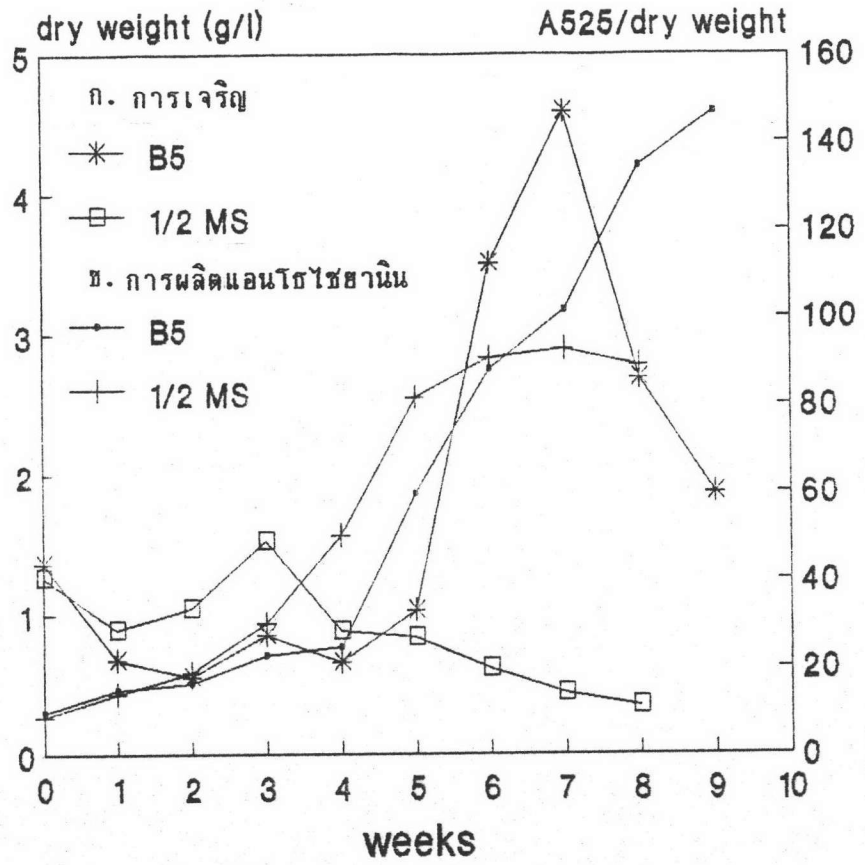
3.4 การศึกษาอาหารเพาะเลี้ยง ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไร่เน่าเพาะเลี้ยงแขวนลอย

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ในอาหารเหลวสูตร B5 เปรียบเทียบกับอาหารเหลวสูตร 1/2 MS ซึ่งเป็นอาหารเหลวสูตรควบคุม ทั้งสองสูตรเสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน วัดการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินทุกสัปดาห์ ผลทดลอง (รูปที่ 19) พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยที่เจริญในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS เข้าสู่ระยะ log ในสัปดาห์ที่ 2 และเจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 7 ด้วยค่าน้ำหนักแห้งเท่ากับ 2.89 กรัม/ลิตร ในขณะที่เซลล์แขวนลอยเจริญในอาหารเหลวสูตร B5 เข้าสู่ระยะ log ในสัปดาห์ที่ 4 และยังเจริญต่อไป แม้จะเข้าสู่สัปดาห์ที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง โดยที่สัปดาห์ที่ 9 น้ำหนักแห้งเท่ากับ 4.59 กรัม/ลิตร จะเห็นว่าเซลล์อาจมีการปรับตัวต่ออาหารเพาะเลี้ยงสูตรใหม่ จึงทำให้มีระยะ lag นาน เซลล์แขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว B5 ให้การผลิตแอนโธไซยานินได้ดีกว่าในอาหารเหลวสูตร 1/2 MS โดยค่าปริมาณแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งเพาะเลี้ยงในสูตร B5 เท่ากับ 147 หน่วย ซึ่งมากกว่าสูตร 1/2 MS ถึง 3 เท่า ดังนั้นในการทดลองของงานวิจัยต่อไปจึงเลือกอาหารเหลว B5 สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยพืชไร่เน่า เพื่อผลิตแอนโธไซนานินและยังได้เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงต่อเนื่องเป็นสูตร B5 ด้วยเพื่อใช้เป็นอาหารแข็งสำหรับการย้ายเซลล์ใหม่ (subculture) เพื่อลดระยะเริ่มต้นของการเจริญลง

3.5 การศึกษาปริมาณและอายุของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไร่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

3.5.1 อายุของเซลล์เริ่มต้น

แปรผันอายุของเซลล์เริ่มต้น โดยใช้อายุของเซลล์ในช่วงตั้งแต่เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (logarithmic growth) จนถึงช่วงปลายระยะทวีคูณของการเจริญซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึมสูง ได้แก่อายุของเซลล์เท่ากับ 21,28 (อายุควบคุม),35 และ 42 วัน โดยเซลล์ที่ใช้ทดลองได้เตรียมจากเซลล์ต้นตอชุดเดียวกันมาขยายปริมาณออกเป็น 4 ส่วน นำแต่ละส่วนไปใช้เป็นเซลล์เริ่มต้น เมื่อครบกำหนดอายุทั้งนี้เพื่อควบคุมให้เซลล์เริ่มต้นเป็นเนื้อเดียวกันที่สุด ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลว B5 เสริมด้วย BA 2มก./ล. และ 2,4-D 1มก./ล. เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน วัดการเจริญและปริมาณแอนโธไซยานิน



รูปที่ 19 การเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MSและB5 เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

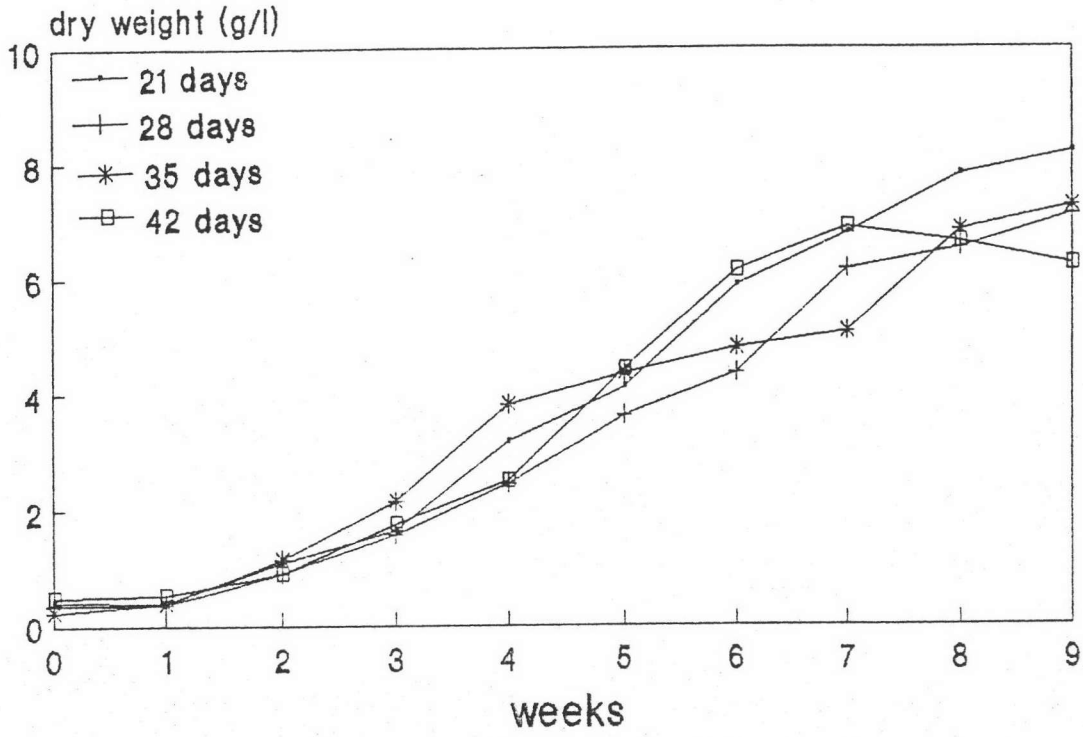
ทุกสัปดาห์

ผลทดลอง (รูปที่ 20) พบว่า อายุของเซลล์เริ่มต้นไม่มีผลต่อรูปแบบและอัตราการเจริญของเซลล์พืชแขวนลอย แต่มีผลต่อรูปแบบและปริมาณของการผลิตและสะสมแอนโธไซยานินของเซลล์พืชแขวนลอย (รูปที่21) โดยเซลล์ที่มีอายุในช่วงเริ่มต้นและช่วงกลางของระยะพหุคูณ คือ 21, 28 และ 35 วัน มีรูปแบบการผลิตและสะสมแอนโธไซยานินปกติ คือปริมาณแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงในสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงแล้วจึงค่อยเพิ่มขึ้นจนถึงสูงสุดแล้วลดลง แต่ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นที่มีอายุอยู่ในช่วงปลายระยะพหุคูณ คือ 42 วัน ซึ่งระยะนี้แอนโธไซยานินต่อน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงแล้ว ดังนั้นเมื่อนำเซลล์ช่วงนี้มาเพาะเลี้ยงจะมีรูปแบบการเจริญที่แตกต่างจากเดิมออกไปคือจะไม่มีการลดการผลิตแอนโธไซยานินในช่วงสัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง โดยค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อเริ่มการเพาะเลี้ยงจนถึงสูงสุดแล้วลดลง

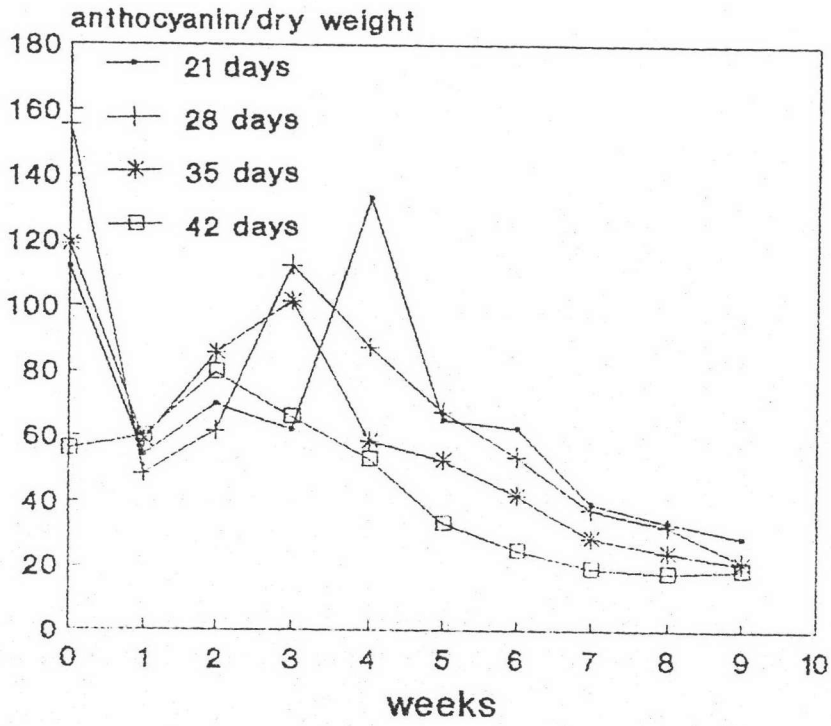
นอกจากนี้อายุของเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อการผลิตปริมาณแอนโธไซยานินนั่นคือ อายุของเซลล์เริ่มต้นยิ่งมากขึ้นให้การผลิตแอนโธไซยานินต่ำลง ที่อายุของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 21 วัน จะให้ค่าแอนโธไซยานินต่อ นน.เซลล์แห้งเฉลี่ยประมาณ 133 หน่วย ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุด ดังนั้นอายุของเซลล์ที่เริ่มต้นจะเข้าสู่ระยะพหุคูณ จึงเหมาะสมต่อการนำมาใช้เพื่อผลิตแอนโธไซยานินของพืชไข่เน่าเมื่อมีการเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

3.5.2 ปริมาณของเซลล์เริ่มต้น

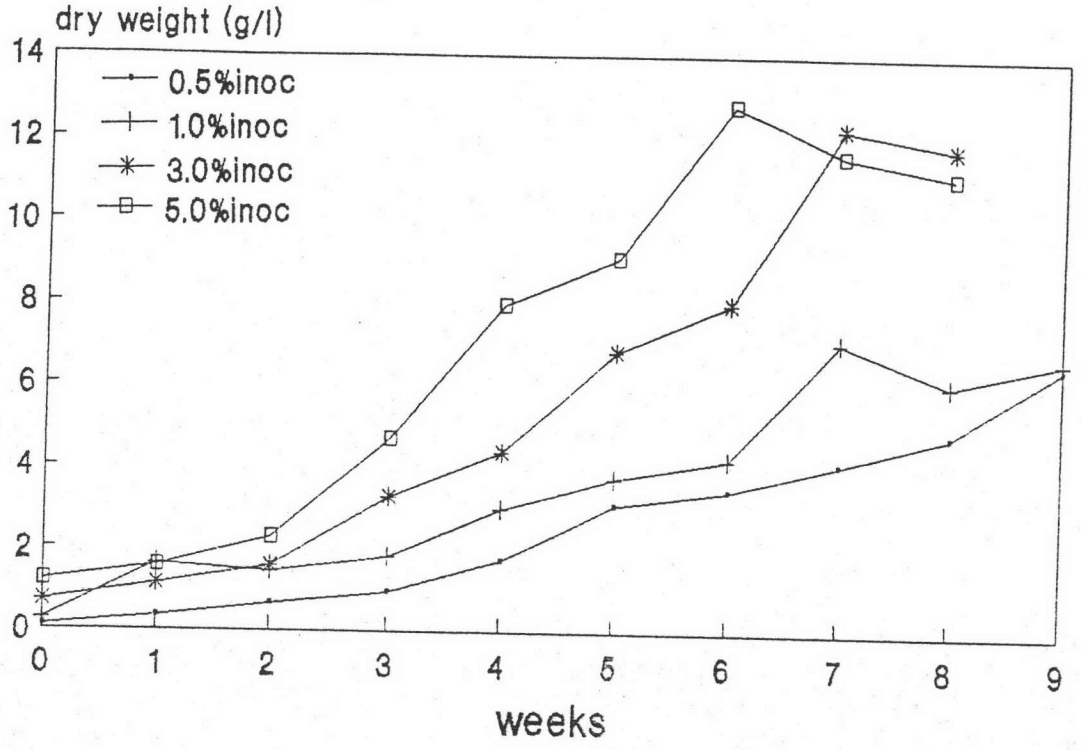
เพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าแบบแขวนลอยในอาหารเหลว B5 เสริมด้วย BA 2มก/ล. และ 2,4-D 1 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน โดยใช้อายุเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 21 วัน แปรผันปริมาณของเซลล์เริ่มต้นได้แก่ 0.5 , 1 (ปริมาณควบคุม), 3 และ 5% น้ำหนักสดต่อปริมาณอาหาร วัดการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินทุกสัปดาห์ ผลทดลอง (รูปที่ 22) พบว่า ปริมาณของเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชแขวนลอย โดยการเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นจะลดระยะเวลาเริ่มต้นของการเจริญ , เพิ่มอัตราการเจริญและเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด (stationary) เร็วขึ้น และการเพิ่มปริมาณของเซลล์เริ่มต้นมีผลให้การผลิตและสะสมแอนโธไซยานินเพิ่มขึ้น (รูปที่23) และลดระยะเวลาการผลิตสูงสุดให้สั้นลง คือ ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5 % มีการผลิตปริมาณแอนโธไซยานินสูงสุดลงถึง 2 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับปริมาณควบคุม ซึ่งผลการทดลองที่จะมีความจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตแอนโธไซยานินในระหว่างขยายระดับการผลิตมาก



รูปที่ 20 การเจริญของเซลล์แขวนลอยที่มีอายุของเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ในอาหาร B5เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

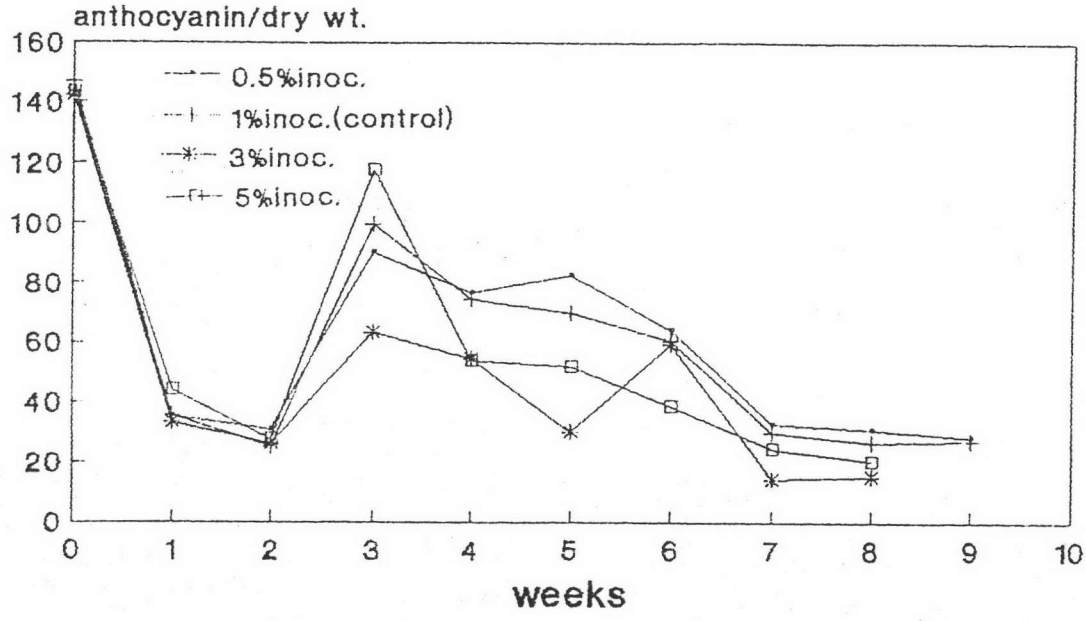


รูปที่ 21 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยที่มีอายุของเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ในอาหาร B5เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยง



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 การเจริญของเซลล์แขวนลอยที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ในอาหาร B5 เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



รูปที่ 23 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยที่มีปริมาณของเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ในอาหาร B5เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

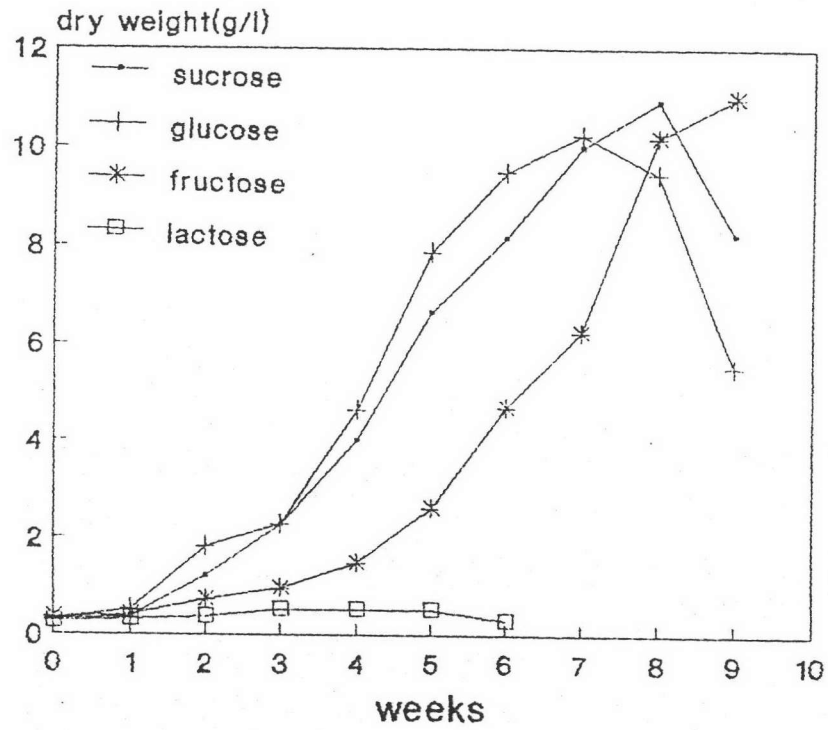
3.6 การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งต้นตอคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าแบบแขวนลอย

3.6.1 ชนิดของแหล่งต้นตอคาร์บอน

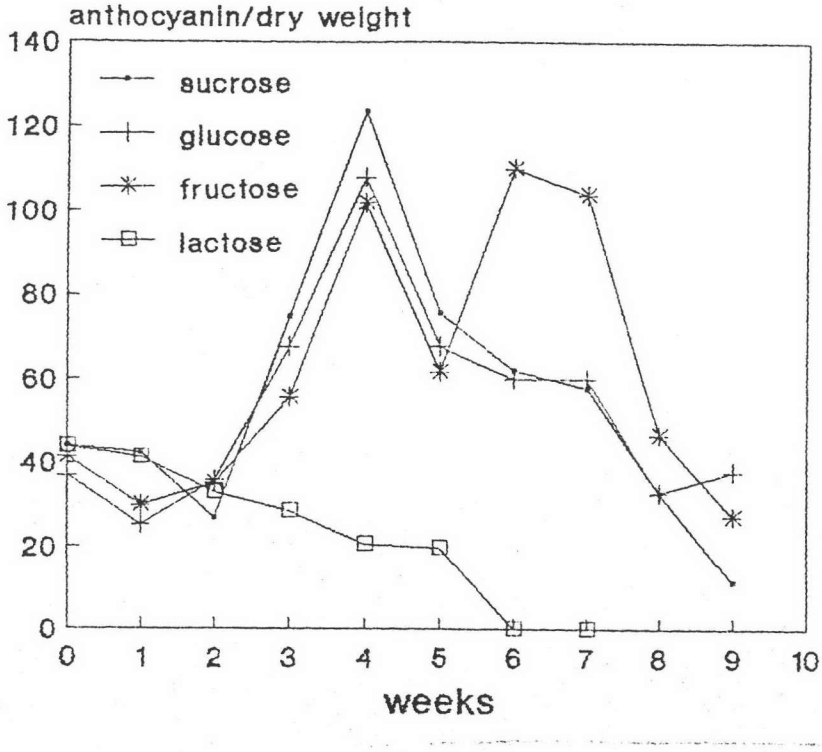
เพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยในอาหารเหลว B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐานแปรผันแหล่งต้นตอคาร์บอนดังนี้ กลูโคส , ฟรุคโตส, แลคโตส และซูโครส เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนควบคุมที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่ออาหารเหลว 1 ลิตร วัดการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินทุกสัปดาห์ ผลทดลอง (รูปที่ 24) พบว่าเซลล์แขวนลอยที่เจริญในอาหารที่มีกลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้การเจริญเข้าสู่ระยะพหุคูณในสัปดาห์ที่ 3 และให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดในสัปดาห์ที่ 7 เท่ากับ 10.27 กรัม/ลิตร และ 10.00 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่ต่างกันมาก ส่วนเซลล์แขวนลอยที่เจริญในอาหารที่มีฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีการเจริญช้าในช่วง 5 สัปดาห์แรกจากนั้นจะเจริญอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ 6-8 โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 10.2 กรัม/ลิตร และเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดในสัปดาห์ที่ 9 และจากผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานิน (รูปที่25) พบว่า แหล่งคาร์บอนได้แก่ ซูโครส ให้การผลิตแอนโธไซยานินมากกว่ากลูโคสและฟรุกโตสโดยผลิตปริมาณแอนโธไซยานินเท่ากับ 123.6, 108.1, 106.4 ตามลำดับ ในขณะที่ในอาหารเหลวที่น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเซลล์พืชแขวนลอยไม่มีการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินเลย ดังนั้นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชแขวนลอยไข่เน่า ได้แก่ ซูโครส

3.6.2 ความเข้มข้นของซูโครส

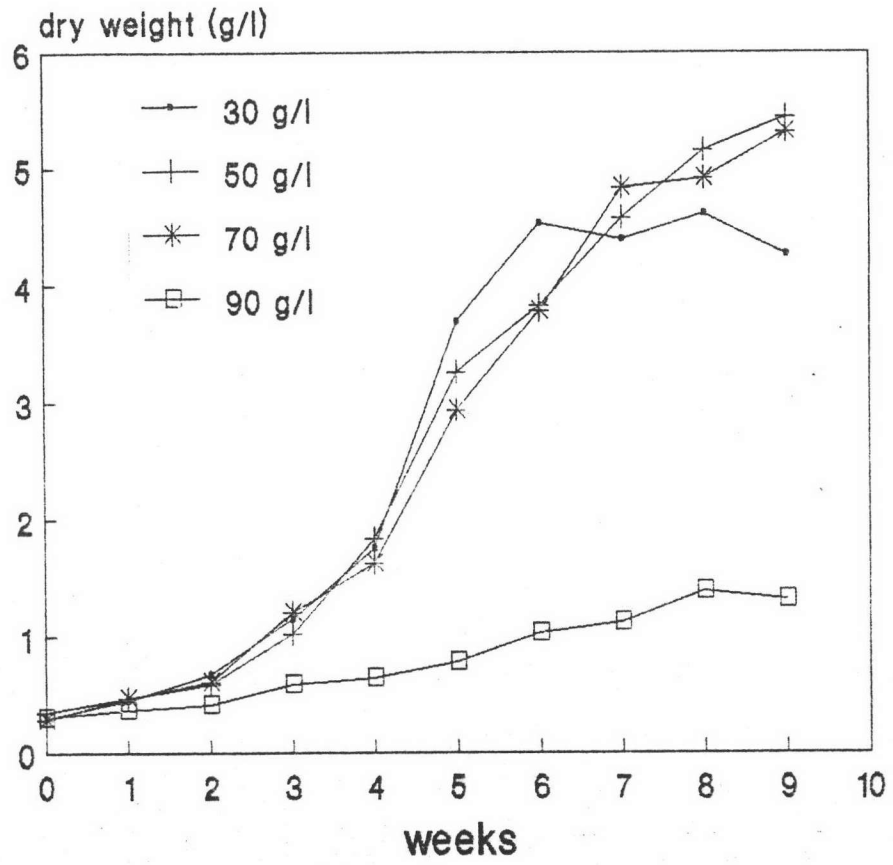
เพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยในอาหารเหลว B5 เสริมด้วย 2,4-D 1มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ ซูโครสที่ความเข้มข้น 30, 50, 70 และ 90 กรัม/ลิตร (3%, 5%, 7% และ 9% น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยมีความเข้มข้นที่ 30 กรัม/ลิตร เป็นความเข้มข้นควบคุม วัดการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินทุกสัปดาห์ ผลทดลอง (รูปที่ 26 และ27) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสไม่ทำให้เซลล์แขวนลอยมีการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของซูโครสระดับสูงทำให้เซลล์แขวนลอยเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด ช้ากว่าที่ความเข้มข้นของซูโครสควบคุม (30 กรัม/ลิตร) ซึ่งค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดที่ความเข้มข้น 30 กรัม/ลิตร



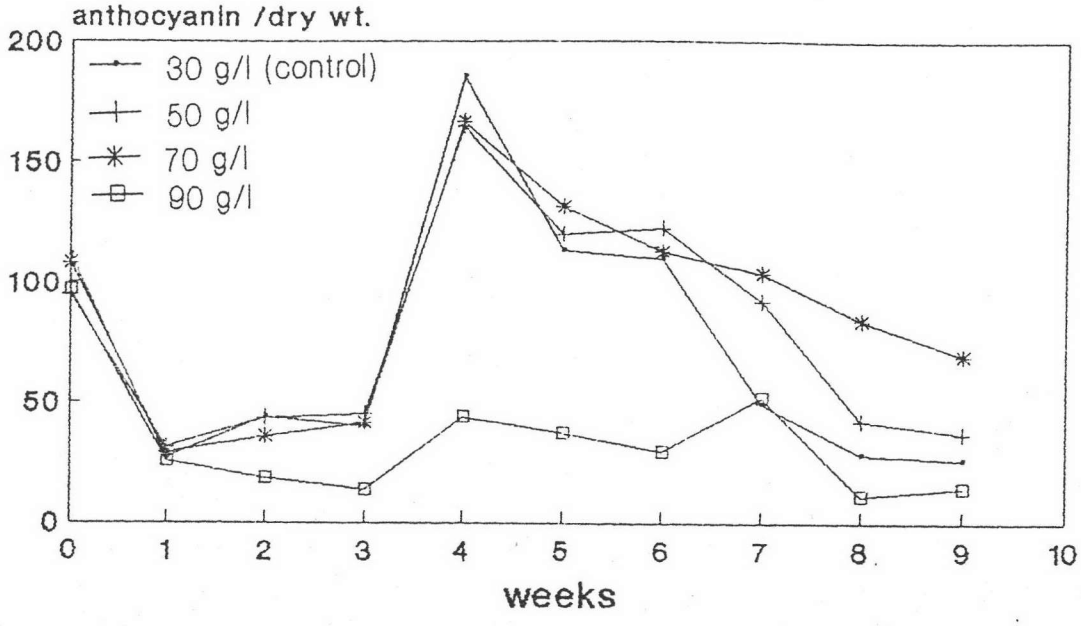
รูปที่ 24 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีแหล่งต้นคาร์บอนต่างกัน เสริมด้วยออร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



รูปที่ 25 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีแหล่งต้นคาร์บอนต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



รูปที่ 26 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนความเข้มข้นต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



รูปที่ 27 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนความเข้มข้นต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล และ BA 1 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

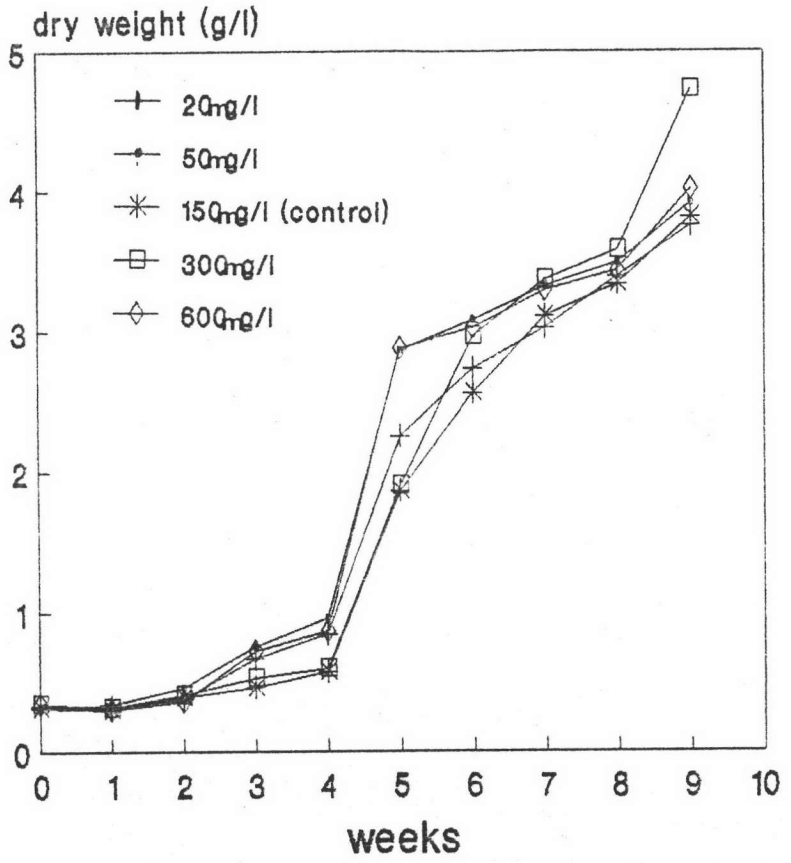
ในสัปดาห์ที่ 7 เท่ากับ 4.61 กรัม/ลิตร และ ที่ความเข้มข้น 50 และ70 กรัมเท่ากับ 5.16 และ 4.92 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่ต่างกันมาก ในขณะที่ความเข้มข้นของซูโครส 90 กรัม/ลิตร เซลล์แขวนลอยมีการเจริญต่ำมากโดยสัปดาห์ที่ 7 มีค่าน้ำหนักแห้งเพียง 1.12 กรัม/ลิตร การเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสให้การผลิตปริมาณแอนโธไซยานินมีแนวโน้มต่ำลง พิจารณาจากค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้งที่สัปดาห์ที่ 4 มีค่าเท่ากับ 185.53, 164.64, 166.69 และ 43.86 จากความเข้มข้นของซูโครสที่ 30, 50, 70 และ 90 กรัมตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยเท่ากับ 30 กรัม/ลิตร

3.7 ศึกษาปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินในเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

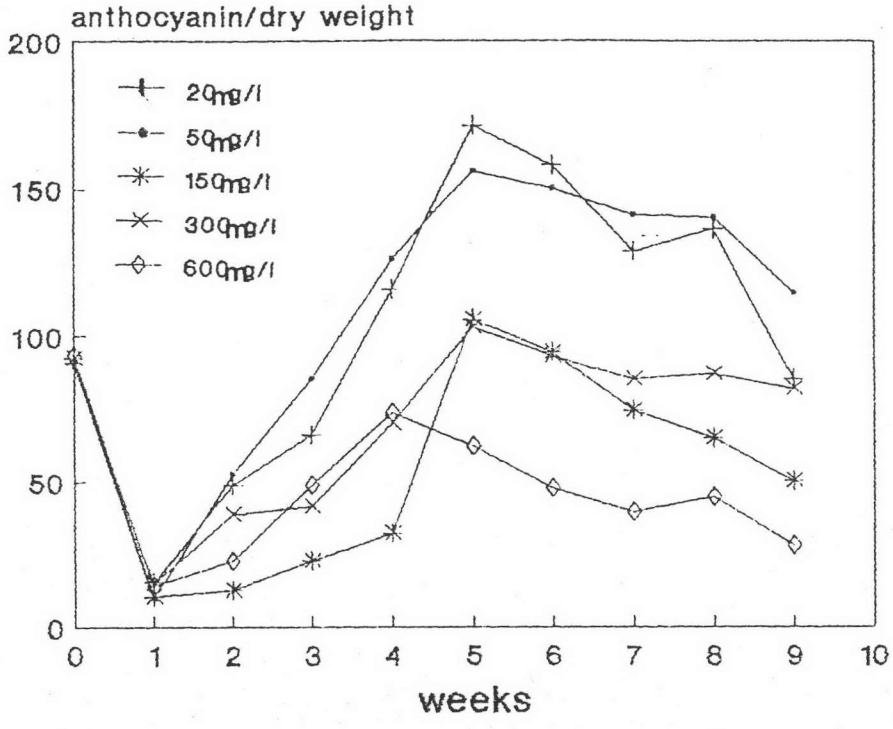
เพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าแบบแขวนลอยในอาหารเหลว B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน แปรผันความเข้มข้นของฟอสเฟต ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) เท่ากับ 20, 50, 150, 300 และ 600 มก./ล. (ความเข้มข้น 150 มก./ล. เป็นความเข้มข้นควบคุม) ผลการทดลอง (รูปที่ 28 และ 29) พบว่าความเข้มข้นของฟอสเฟตไม่มีผลต่อการเจริญแต่มีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานินโดยในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตระดับต่ำกว่าความเข้มข้นควบคุมคือ 20 และ 50 มก./ล. ให้การผลิตแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 มีค่าเท่ากับ 171.74 และ 156.54 ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับความเข้มข้นควบคุมเท่ากับ 47.73% และ 62.08% ตามลำดับ และในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของฟอสเฟตระดับสูงกว่าความเข้มข้นควบคุมได้แก่ 300 และ 600 มก./ล. ให้การผลิตแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักสูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 และ 4 ตามลำดับมีค่าเท่ากับ 103.11 และ 73.68 ต่ำกว่าที่ความเข้มข้นควบคุม สรุปได้อย่างชัดเจนว่าเมื่อลดความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเหลวเพาะเลี้ยงจะให้การผลิตแอนโธไซยานินสูงขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยเท่ากับ 20 มก./ล.

3.8 ศึกษาปริมาณไนโตรเจนรวมและอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมและไนเตรตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานิน

เพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าแบบแขวนลอยในอาหารเหลว B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล.



รูปที่ 28 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของฟอสเฟตต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



รูปที่ 29 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของฟอสเฟตต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

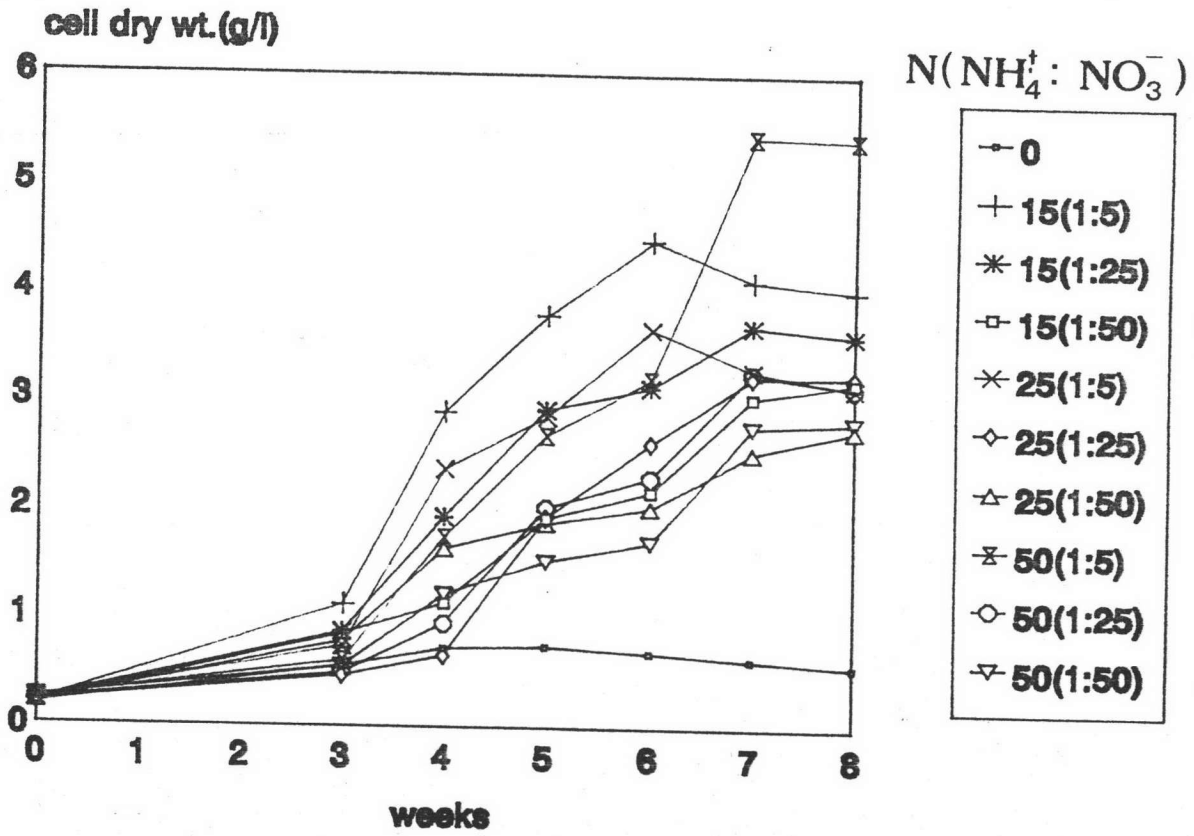
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน แปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียม-(ความเข้มข้นของไนโตรเจนจากแอมโมเนียมและไนเตรตรวมกัน) เท่ากับ 0, 15, 25 และ 50 mM และในแต่ละความเข้มข้นของไนโตรเจนรวมจะแปรผันอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียม (NH_4^+) และไนเตรต (NO_3^-) เท่ากับ 1 : 5, 1 : 25 และ 1 : 50 (ความเข้มข้นของไนโตรเจนรวมเท่ากับ 25 mM และอัตราส่วน NH_4^+/NO_3^- เท่ากับ 1:25 เป็นตัวควบคุม)ผลทดลอง (รูปที่ 30 และ 31) พบว่า ความเข้มข้นของไนโตรเจนรวมและอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมต่อไนเตรต มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า พิจารณาจากค่าน้ำหนักแห้งที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนรวม 15 และ 25 mM และที่อัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมต่อไนเตรตสูง (1:5) จะมีค่ามากกกว่าค่าน้ำหนักแห้งที่ความเข้มข้มไนโตรเจนรวมสูง (50 mM) และที่อัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมต่อไนเตรตต่ำ (1:50) แต่ค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้งสูงสุดของทุกความเข้มข้นไนโตรเจนรวม 15 และ 25 mM โดยมีอัตราส่วนของแอมโมเนียมต่อไนเตรต (1:25) จะมีค่าสูงสุดประมาณ120 หน่วย ในเวลาประมาณ 5-6 อาทิตย์ เช่นเดียวกับที่ใช้ไนโตรเจนรวม 15 mM และอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนเตรตเท่ากับ 1:5 ในเวลาเพียง 3-4 อาทิตย์เท่านั้น ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าให้ได้การเจริญและผลิตแอนโธไซยานินสูงนั้น ค่าควบคุมที่ใช้ความเข้มข้นแอมโมเนียมไนเตรตรวม 25 mM อัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนเตรต(1:25) ก็เป็นค่าที่ดีแต่ระยะเวลาของการผลิตแอนโธไซยานินสูงสุดจะยืดยาวออกไป หากจะให้เวลาการผลิตสูงสุดลดลงอาจทำได้โดยลดความเข้มข้นแอมโมเนียมไนเตรตรวมเป็น 15 mM และอัตราส่วนแอมโมเนียมต่อไนเตรต (1:5) จะให้ผลดีที่สุด

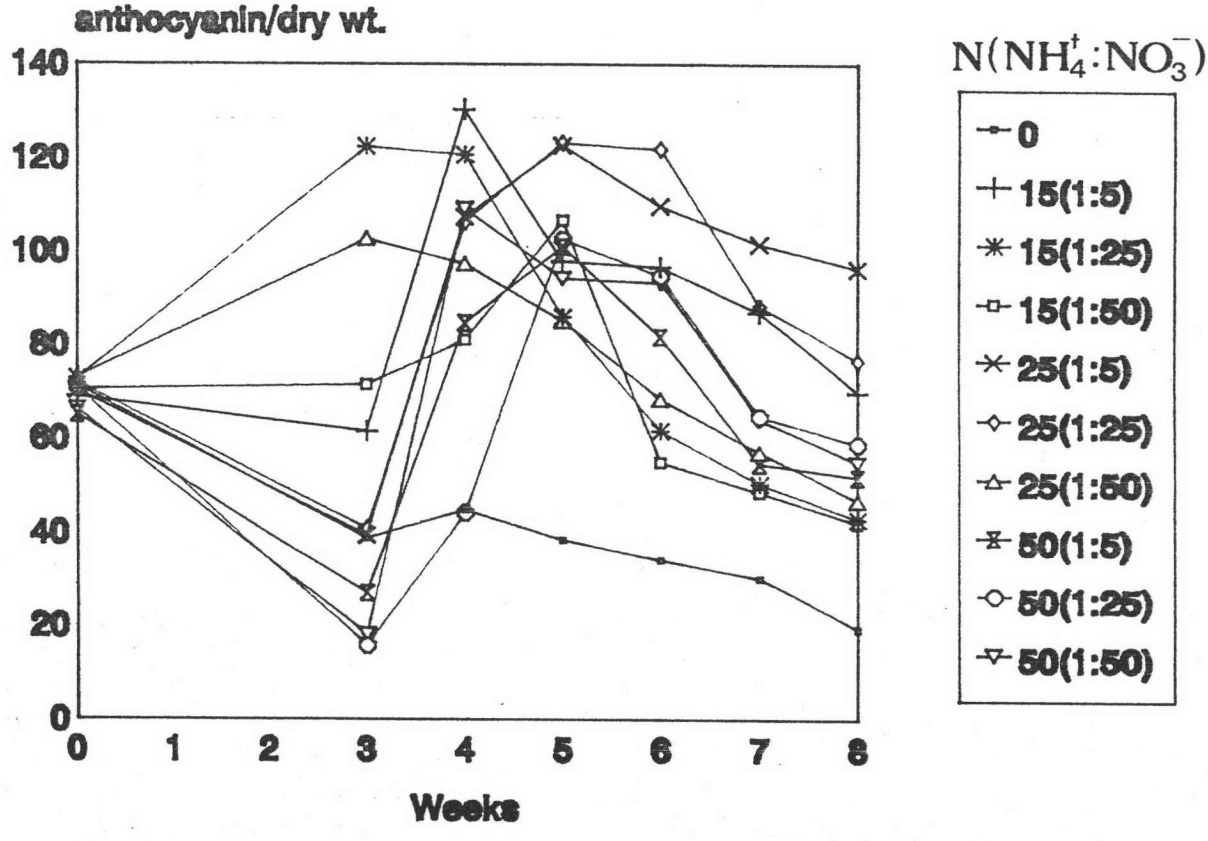
3.9 ปริมาณของไอออนที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์ไข่เน่าแขวนลอย

3.9.1 แคลเซียม

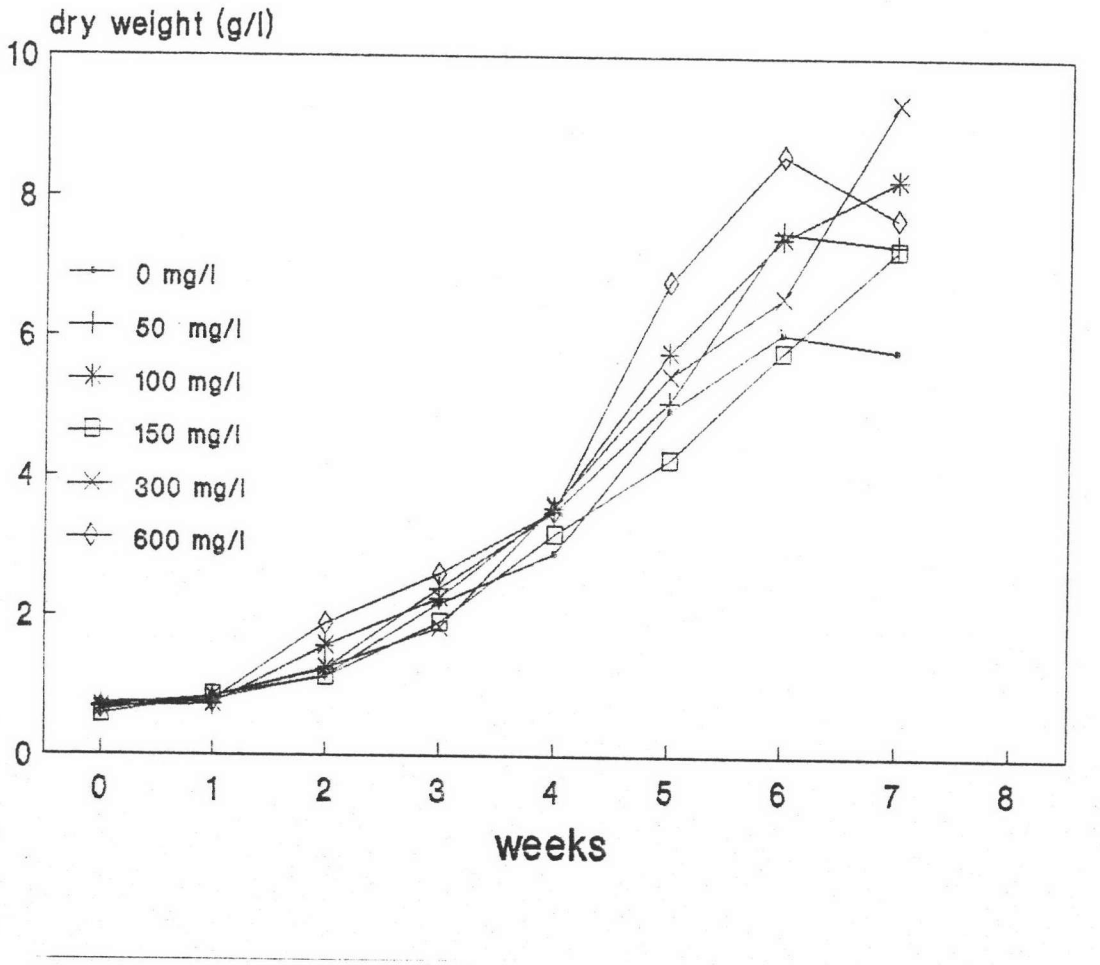
เพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าแบบแขวนลอยในอาหารเหลว B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน แปรผันความเข้มข้นของแคลเซียม ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) เท่ากับ 0, 50, 100, 150, 300 และ 600 มก./ล. ความเข้มข้นที่ 150 มก./ล. เป็นตัวควบคุม ผลทดลอง (รูปที่ 32 และ 33) พบว่าแคลเซียมเป็นธาตุอาหารที่ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์พืชไข่เน่า โดยเซลล์พืชแขวนลอยสามารถเจริญได้ปกติในอาหารที่มีแคลเซียมตั้งแต่ 100 มก/ล ถึงแม้จะใช้ความเข้มข้นสูงกว่านี้ก็จะไม่มีผลต่อการเจริญอย่างเห็นชัด ในทำนองเดียวกันแคลเซียมมีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานินอย่างชัดเจนเมื่อ



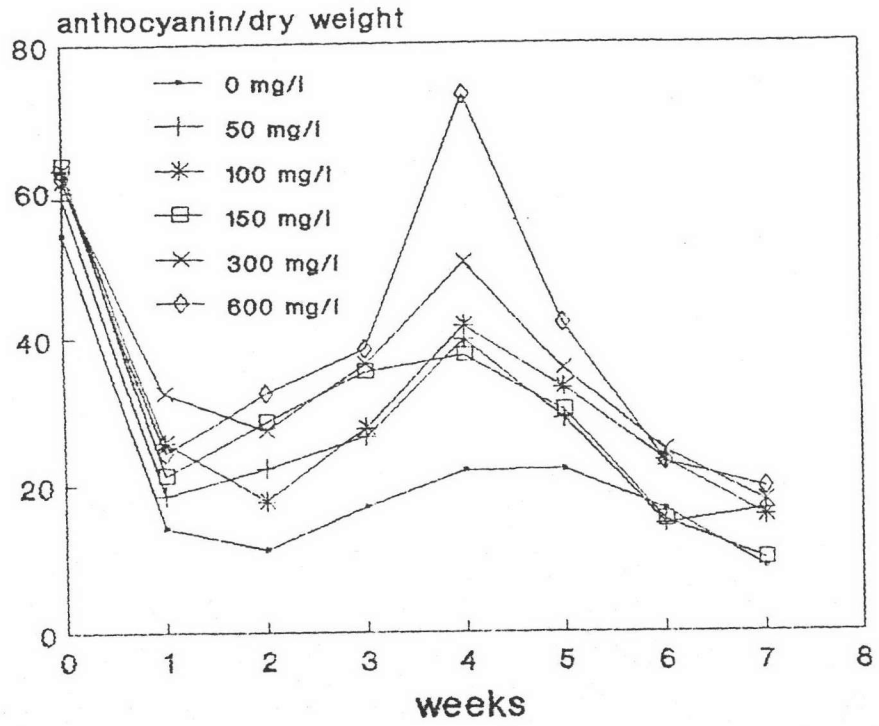
รูปที่ 30 การเจริญของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร B5 ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนรวมและอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมต่อไนเตรตต่างกันโดย N (NH_4^+:NO_3^-); N = ความเข้มข้นของไนโตรเจนรวม ;NH_4^+= ความเข้มข้นของแอมโมเนียม ;NO_3^-= ความเข้มข้นของไนเตรตในหน่วย mM เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน



รูปที่ 31 การผลิตแอนโทไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร B5 ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนรวมและอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมต่อไนเตรตต่างกันโดย N (NH_4^+:NO_3^- N = ความเข้มข้นของไนโตรเจนรวม ;NH_4^+= ความเข้มข้นของแอมโมเนียม ;NO_3^-= ความเ ของไนเตรตในหน่วย mM เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน



รูปที่ 32 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของแคลเซียมต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



รูปที่ 33 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของแคลเซียมต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

เพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมขึ้น เซลล์พืชแขวนลอยจะผลิตแอนโธไซยานินเพิ่มมากขึ้นด้วย จากค่าของแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ความเข้มข้น600 มก./ล.จะให้ผลการผลิตแอนโธไซยานินรวมสูงกว่าที่ความเข้มข้น 150 มก/ล ซึ่งเป็นความเข้มข้นควบคุมมากกว่าเท่าตัว

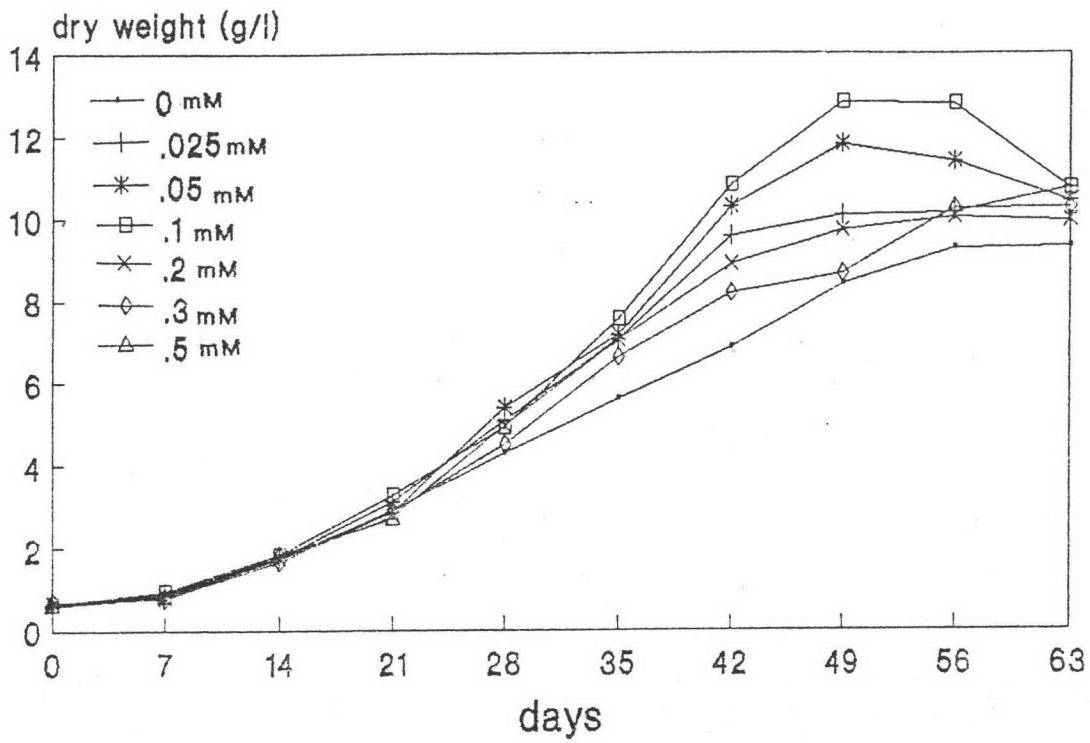
3.9.2 เหล็ก

เพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าแบบแขวนลอยในอาหารเหลว B5 เสริมด้วย 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐานแปรผันความเข้มข้นของ ($FeSO4 \cdot 7H_2O$) เท่ากับ 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.5 mM ความเข้มข้นที่ 0.1 mM เป็นตัวควบคุม ผลการทดลอง (รูปที่ 34) พบว่าที่ความเข้มข้นควบคุมคือ 0.1 mM เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า โดยให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดในสัปดาห์ที่ 6 เท่ากับ 12.82 กรัมมากกว่าความเข้มข้นในระดับต่ำกว่า (0, 0.025 และ 0.05mM) และความเข้มข้นในระดับสูงกว่า (0.2, 0.3, และ 0.5 mM) ก็จะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ด้วย เหล็กมีผลต่อการผลิตแอนโธไซยานิน (รูปที่ 35) จะเห็นได้ว่าเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวที่ความเข้มข้นของ $FeSO_4.7H_2O$ ตั้งแต่ 0.5 mM ขึ้นไปให้ค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดใกล้เคียงกัน ที่ความเข้มข้นของ $FeSO_4.7H_2O$ ต่ำกว่า 0.05 mM จะทำให้การผลิตแอนโธไซยานินลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน

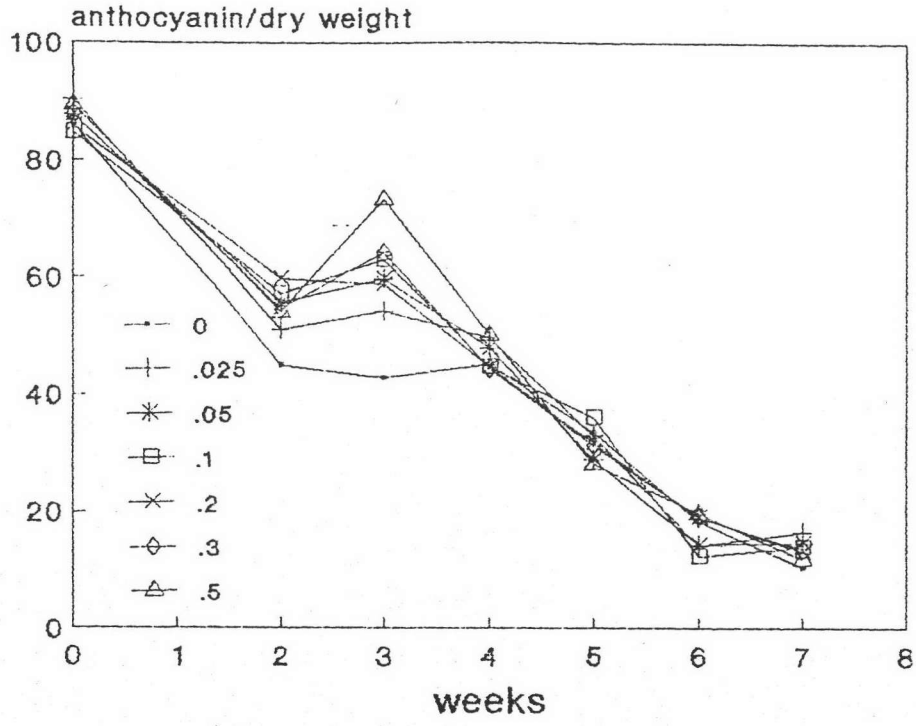
3.10 ชนิดและอัตราส่วนของฮอร์โมนพืชที่มีผลกระทบต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า

3.10.1 ชนิดของฮอร์โมนพืช

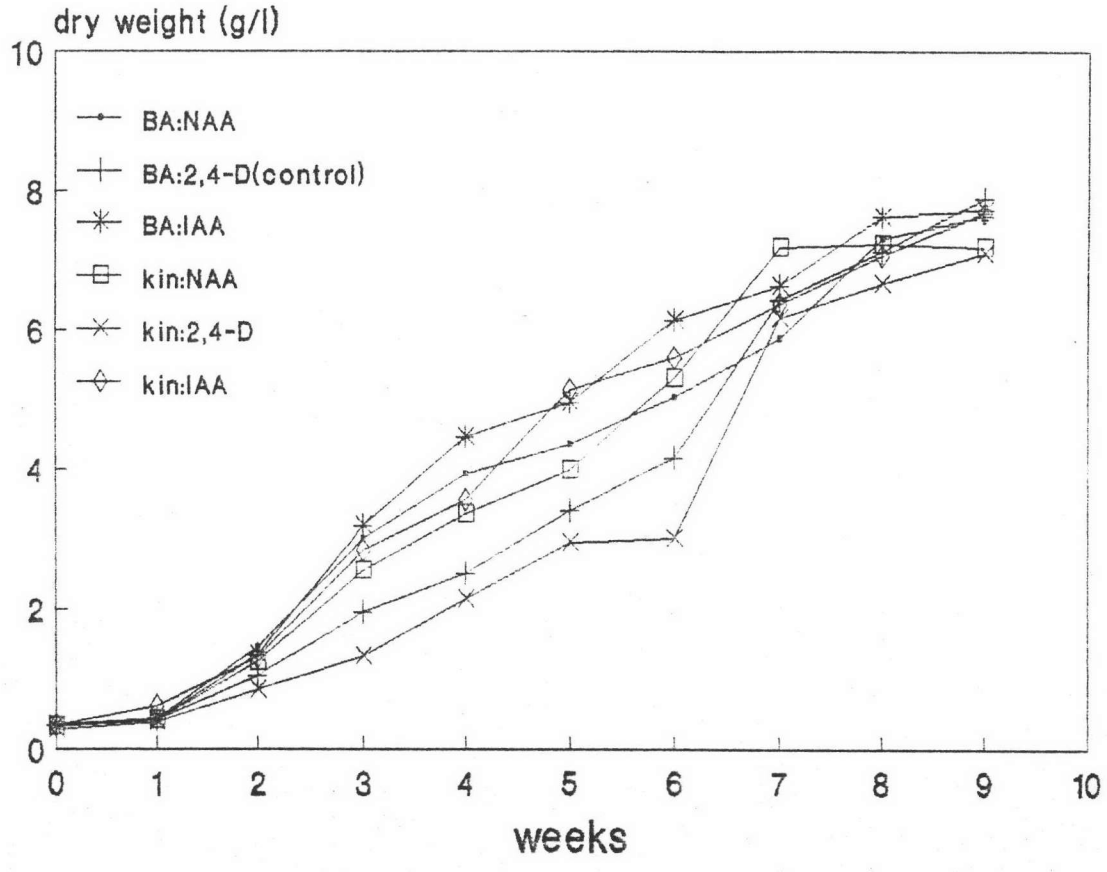
จากการทดลองแปรผันฮอร์โมนพืชทั้ง 2 กลุ่ม คือ ออกซิน ได้แก่ 2,4-D, NAA และ IAA และไซโตไคนิน ได้แก่ ไคเนติน (kinetin) และ BA โดยให้ความเข้มข้นของออกซินต่อ ไซโตไคนินคงที่เท่ากับ 1:2 มก./ล.ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าแบบแขวนลอย ด้วยอาหารเหลว B5 ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน (รูปที่ 36) พบว่าฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซินมีบทบาทต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินมากกว่ากลุ่มไซโตไคนิน ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีออกซินได้แก่ NAA และ IAA เซลล์แขวนลอยจะมีอัตราการเจริญเร็วกว่า เมื่อใช้ 2,4-D จะเจริญช้ากว่าในช่วง 6 สัปดาห์แรกของการเลี้ยง แต่จะเพิ่มอัตราการเจริญจนใน 2-3 สัปดาห์สุดท้ายของการเพาะเลี้ยงให้ค่าน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกันที่ทุกสูตรของฮอร์โมนที่ใช้ โดยมี BA เป็นแหล่งไซโต



รูปที่ 34 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของเหล็กต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



รูปที่ 35 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของเหล็กต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



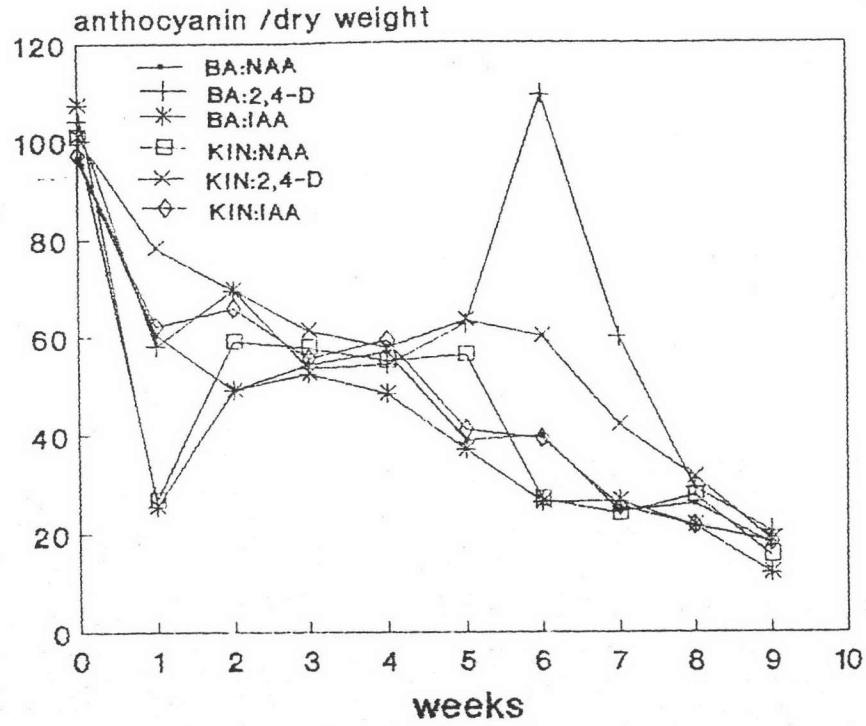
รูปที่ 36 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีชนิดของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่างกัน โดยอัตราส่วนระหว่างออกซินต่อไซโตไคนินเท่ากับ 1:2 ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

ไคนินจะเห็นได้ว่าการผลิตแอนโธไซยานิน (รูปที่ 37) ในอาหารเหลวที่มีออกซินเป็น 2,4-D ให้ค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้งสูงสุด ตลอดช่วงของการเพาะเลี้ยง และในอาหารเหลวที่มีออกซินเป็น 2,4-D ฮอร์โมนไซโตไคนิน ได้แก่ BA จะให้ผลการผลิตแอนโธไซยานินสูงกว่าไคเนติน โดยให้ค่าแอนโธไซยานิน ต่อน้ำหนักแห้งสูงสุดถึง 102.76 ดังนั้นชนิดของออกซินคือ 2,4-D และชนิดของไซโตไคนิน คือ BA เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชใบเน่าแบบแขวนลอย

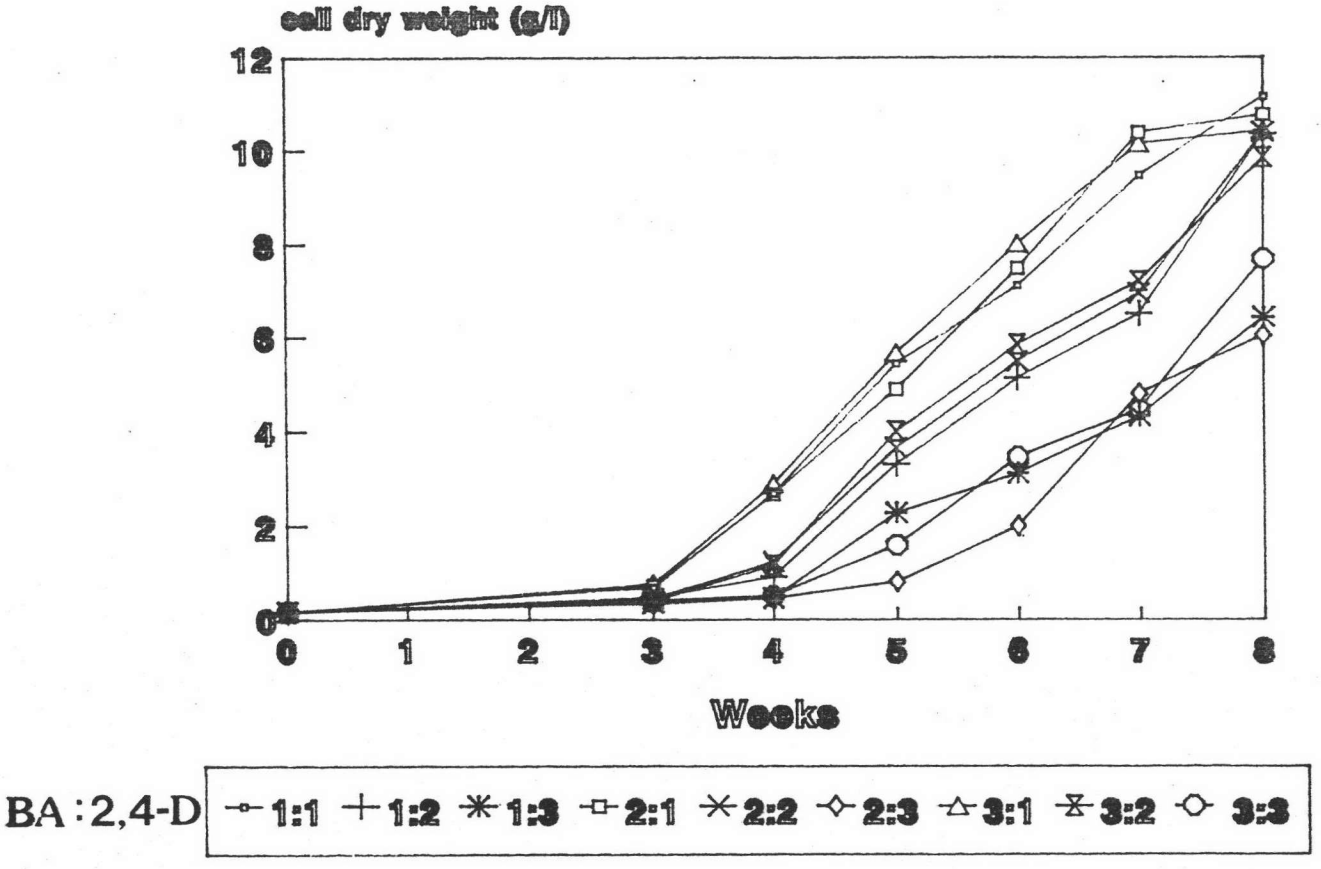
3.10.2 ปริมาณและอัตราส่วนของไซโตไคนินต่อออกซิน

จากการแปรผันชนิดของฮอร์โมนพืชไซโตไคนินและออกซินได้ผลสรุปว่า BA และ 2,4-D เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชใบเน่าแบบแขวนลอย ดังนั้นจึงพิจารณาหาปริมาณและอัตราส่วนที่เหมาะสมโดยการแปรผันความเข้มข้นของ 2,4-D เท่ากับ 1, 2 และ 3 มก./ล. และ BA เท่ากับ 1,2 และ 3 มก./ล. ในอาหารเหลว B5 และที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน วัดการเจริญและปริมาณแอนโธไซยานินทุกสัปดาห์ ผลทดลองพบว่าปริมาณ 2,4-D มีบทบาทต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินมากกว่าปริมาณของ BA และอัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน ในอาหารเหลวที่มี 2,4-D ปริมาณต่ำจะส่งเสริมให้มีการเจริญของเซลล์พืชแขวนลอยมากกว่าที่ปริมาณ2,4-Dสูง (รูปที่ 38) ค่าการเจริญที่มี 2,4-D 1 ppm จะให้ค่าการเจริญสูงสุด 10 กรัมต่อลิตร ในสัปดาห์ที่ 7 สูงกว่า 2 ppm ประมาณเท่าตัวในขณะที่ 2,4-D 2 ppm ก็ให้ค่าการเจริญสูงกว่า 3 ppm เกือบเท่าตัวเช่นกันอย่างไรก็ตามการมี BA ที่ความเข้มข้นสูงคือ 3 ppm จะให้ค่าการเจริญสูงกว่า BA 1 ppm เมื่อความเข้มข้นของ 2,4,-D คงที่เท่ากันและเมื่อพิจารณาจากค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักเซลล์แห้งจะพบว่ามีการผลิตแอนโธไซยานินสูงสุดในระยะเวลาสั้นกว่าเมื่อมีค่า 2,4-D ต่ำกว่า แต่การมีปริมาณ BA ขึ้นในแต่ละค่าของ 2,4-D คงที่ (รูปที่ 39) จะมีผลให้การผลิตแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ได้สูงขึ้น จะเห็นได้ว่าค่าการผลิตแอนโธไซยานินสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 4 (28 วัน) ที่ความเข้มข้น 2,4-D 1 ppm และ BA 2 ppm แต่ถ้าค่า 2,4-D 2 ppm แล้วจะผลิตแอนโธไซยานินสูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 โดยค่าแอนโธไซยานินสูงสุด (A_{525}/น้ำหนักแห้ง) มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 200 หน่วย ดังนั้นการผลิตและสะสมแอนโธไซยานินรวมที่ 2,4-D ปริมาณสูงจึงมีค่ามากกว่าที่ปริมาณ 2,4-D ต่ำ และจากผลการทดลองสรุปได้ว่าที่ปริมาณ BA:2,4-D ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชใบเน่าเท่ากับ 2:2

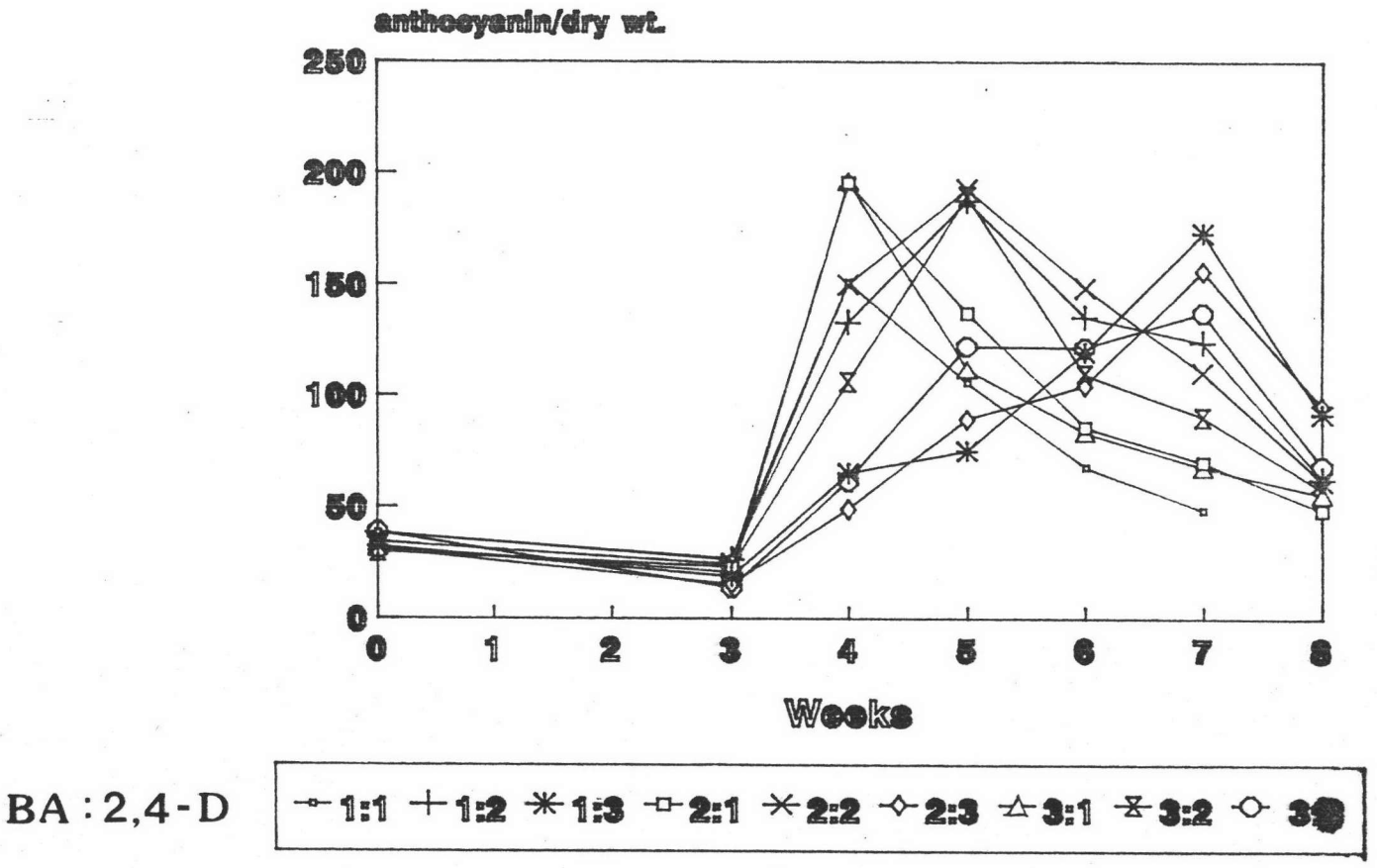
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีชนิดของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่างกันโดยอัตราส่วนระหว่างออกซินต่อไซโตไคนินเท่ากับ 1:2 ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



รูปที่ 38 การเจริญของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร B5 ที่มีความเข้มข้นและอัตราส่วนของ BA และ 2,4- D ในหน่วย มก./ล. แตกต่างกันในสภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน



รูปที่ 39 การผลิตแอนโทไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร B5 ที่มีความเข้มข้นและอัตราส่วนของ BA และ 2,4-D ในหน่วย มก./ล. แตกต่างกันในสภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน

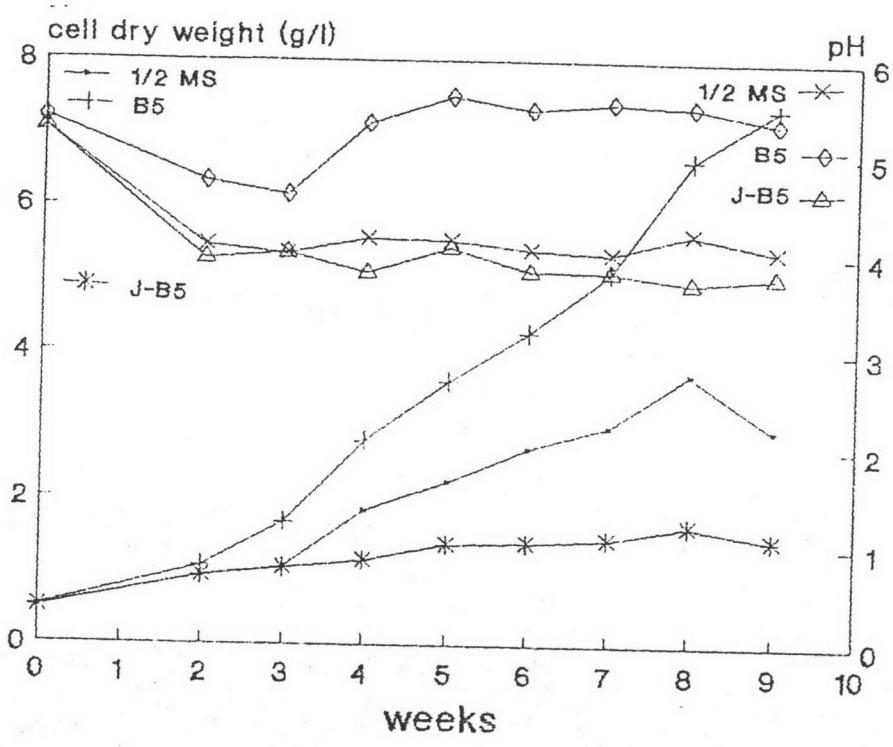
3.11 ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน (production medium) ต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชใบเน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

อาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานินให้ชื่อว่า J-B5 (ภาคผนวกที่ 5) ได้จากการแปรผันปัจจัยต่าง ๆ ตามที่กล่าวมาข้างต้น เพื่อให้ได้ชนิดและปริมาณของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ และโดยเฉพาะการผลิตแอนโธไซยานินเป็นสำคัญโดยเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารบางตัวในสูตรอาหาร B5 ดังนี้

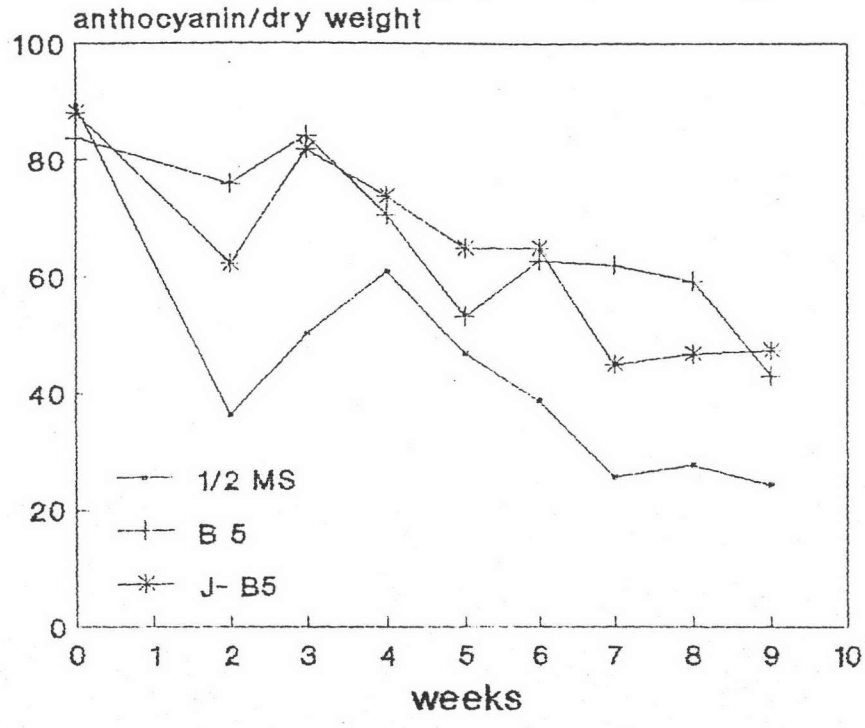
สารอาหาร	ความเข้มข้นที่ใช้
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	20 มก./ล.
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	600 มก./ล.
$(NH_4)_2NO_3$	2.5 mM
KNO_3	10 mM

มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และฮอร์โมนพืชได้แก่ BA และ 2,4-D อัตราส่วนเท่ากับ 2:2 ปรับ pH ก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเท่ากับ 5.7

เพาะเลี้ยงเซลล์พืชใบเน่าแบบแขวนลอย ในอาหารเหลว J-B5 เปรียบเทียบกับอาหารเหลว B5 และ 1/2 MS ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน วัดการเจริญ,ปริมาณแอนโธไซยานิน และ pH ทุกสัปดาห์ของการเพาะเลี้ยงผลทดลองพบว่าในอาหารเพาะเลี้ยง J-B5 เซลล์พืชแขวนลอยมีการเจริญต่ำกว่าในอาหาร B5 และ 1/2 MS (รูปที่ 40) เมื่อพิจารณาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงตลอดระยะการเพาะเลี้ยงจะพบว่า pH ของอาหาร J-B5 ลดลงต่ำมากตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงและในช่วงสัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นไป pH ของอาหารลดลงต่ำกว่า pH 4 ซึ่งเป็นช่วง pH ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์พืชโดยทั่วไป เซลล์พืชใบเน่าแบบแขวนลอยไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้น ในขณะที่ในอาหาร J-B5 เซลล์แขวนลอยมีการผลิตแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 81.805 มากกว่า 1/2 MS เท่ากับ 33.83% และมีค่าใกล้เคียงกับอาหาร B5 ซึ่งมีค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 84.215 (รูปที่ 41) ดังนั้นจุดอ่อนของอาหารเพาะเลี้ยง J-B5 ก็คือ ภาวะการรักษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงระหว่างที่เซลล์พืชใบเน่าแบบแขวนลอยมีการเจริญ และการผลิตแอนโธไซยานิน



รูปที่ 40 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน(production medium) ต่อการเจริญของเซลล์พืชใบ่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

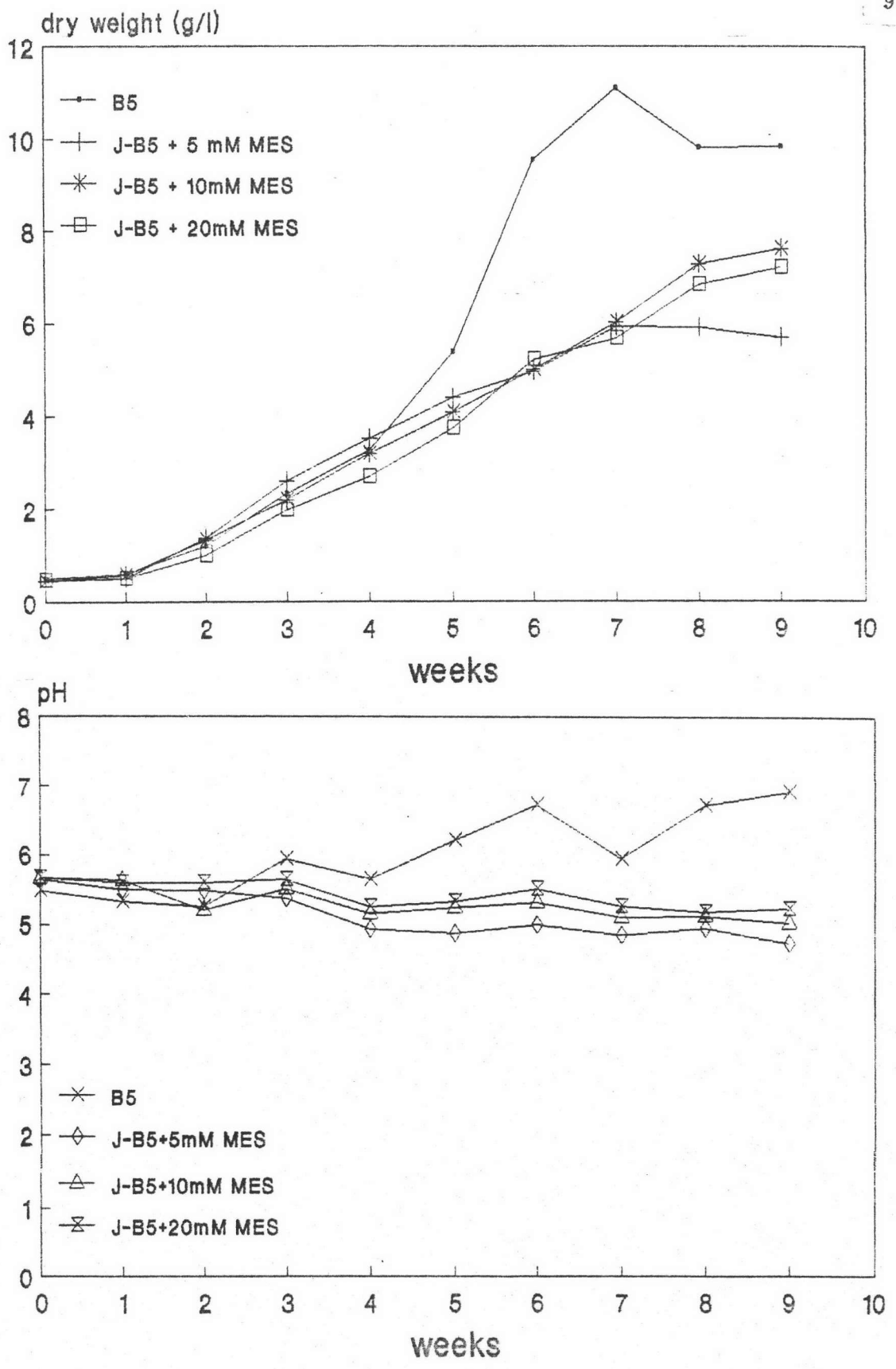


รูปที่ 41 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรปรับปรุงใหม่ (J-B5) สูตร B5 และสูตร 1/2 MS เดิม ต่อการผลิตแอนโธไซยานิน

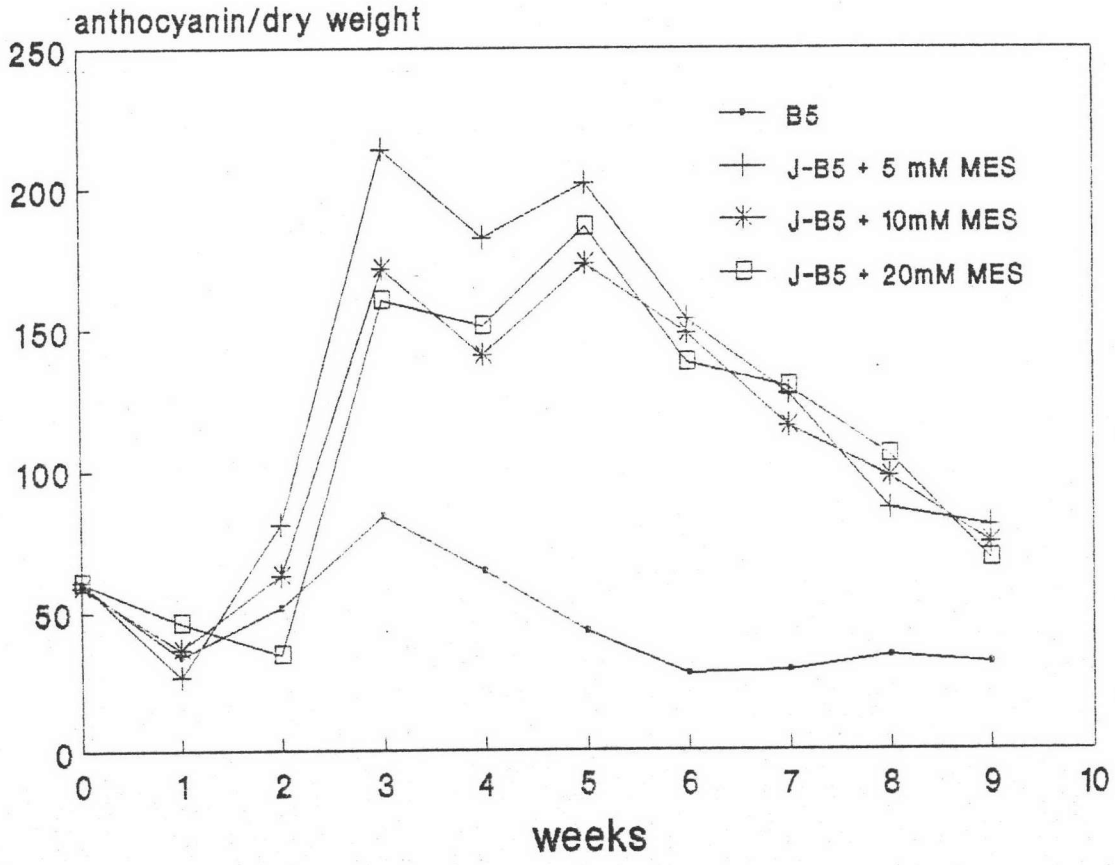
3.12 การศึกษาผลของการใช้สารบัฟเฟอร์ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลง

เพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าแบบแขวนลอยในอาหารสูตรดัดแปลง (J-B5) เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ 2,4-d 2 มก./ล. เปรียบเทียบกับอาหารสูตร B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ 2,4-D 1 มก./ล.ซึ่งเป็นสูตรควบคุม อาหารทั้งสองสูตรใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณ 30 กรัม/ลิตรและปรับ pH ของอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเท่ากับ5.7วัดการเจริญ, ปริมาณแอนโธไซยานิน, pH ทุกสัปดาห์ ผลทดลองพบว่า (รูปที่ 42) สารบัฟเฟอร์ MES ที่ใช้สามารถรักษาสภาวะความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้ pH อยู่ในช่วงระหว่าง 5.67 - 4.73 ซึ่งสูงกว่า pH 4 ได้ โดยหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ pH ของอาหาร J-B5 ในทุกความเข้มข้นของ MES มีค่าประมาณ 5.6 แต่ pH ระหว่างการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์เพาะเลี้ยง แปรผันตามความเข้มข้นของ MES และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 9 ที่ 5 mM MES จะมี pH เท่ากับ 4.73, ที่ 10 mM MES มี pH เท่ากับ 5.02 และที่ 20 mM MES มี pH เท่ากับ 5.23 ในขณะที่ B5 หลังการนึ่งฆ่าเชื้อมี pH เท่ากับ 5.48 และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงมี pH เท่ากับ 6.91

ในการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานิน ของเซลล์แขวนลอย พืชไข่เน่า พบว่ามีความสัมพันธ์กับ pH ของอาหาร เมื่อพิจารณาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร B5 ซึ่งเริ่มการเพาะเลี้ยงด้วยค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์เริ่มต้นใกล้เคียงกันกับในอาหาร J-B5 ที่มี MES คือ0.48 กรัมต่อลิตร เซลล์แขวนลอยมีอัตราการเจริญสูงกว่าในอาหาร J-B5 ที่มี MES และให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดในสัปดาห์ที่ 7 เท่ากับ 11.1 กรัม/ลิตร pH ของอาหารเพิ่มขึ้นควบคู่ไปกับการเจริญในช่วง 5.65-6.91 และสำหรับในอาหาร J-B5 ที่ความเข้มข้นของ MES ต่างกัน พบว่าเมื่อเซลล์สร้างและสะสมแอนโธไซยานินเพิ่มมากขึ้น ระดับ pH ของอาหารจะลดลงและการเจริญจะลดลงโดยพิจารณาที่ความเข้มข้น MES เท่ากับ 5 mM เมื่อเซลล์ผลิตแอนโธไซยานินได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 มีค่าแอนโธไซยานินเท่ากับ 213.88 หน่วย pH ของอาหารจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดจาก 5.37 มาเป็น 4.93 ในสัปดาห์ที่ 4 และระหว่างการผลิตแอนโธไซยานินได้สูง pH ของอาหารจะลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งในสัปดาห์ที่ 7 pH ลดลงเท่ากับ 4.85 เซลล์ไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้น ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี MES 10 และ 20 mM จะมีการสร้างแอนโธไซยานินสมดุลไปกับการเจริญไม่มีการลด pH ในอาหารมากซึ่งเซลล์จะมีการเจริญเพิ่มขึ้นสม่ำเสมอ โดยสรุปการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหาร J-B5 ที่มี MES เป็นสารบัฟเฟอร์ความเข้มข้นเท่ากับ 5 mM , 10 mM และ 20 mM มีค่ามากกว่าในอาหารสูตร B5 เท่ากับ 2.9 เท่า, 2.3 เท่าและ 2.5 เท่าตามลำดับ (รูปที่ 43)



รูปที่ 42 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตสารแอนโธไซยานิน (production medium) ที่ใช้สารบัฟเฟอร์ MES ต่อการเจริญ และ pH ของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

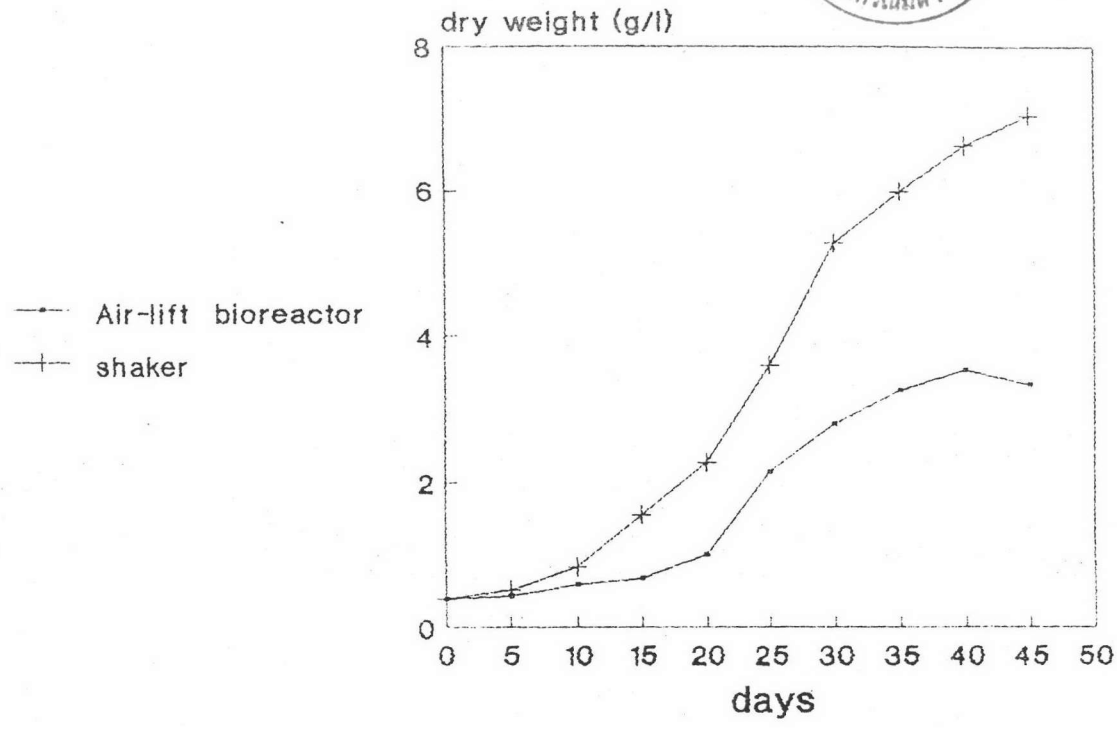


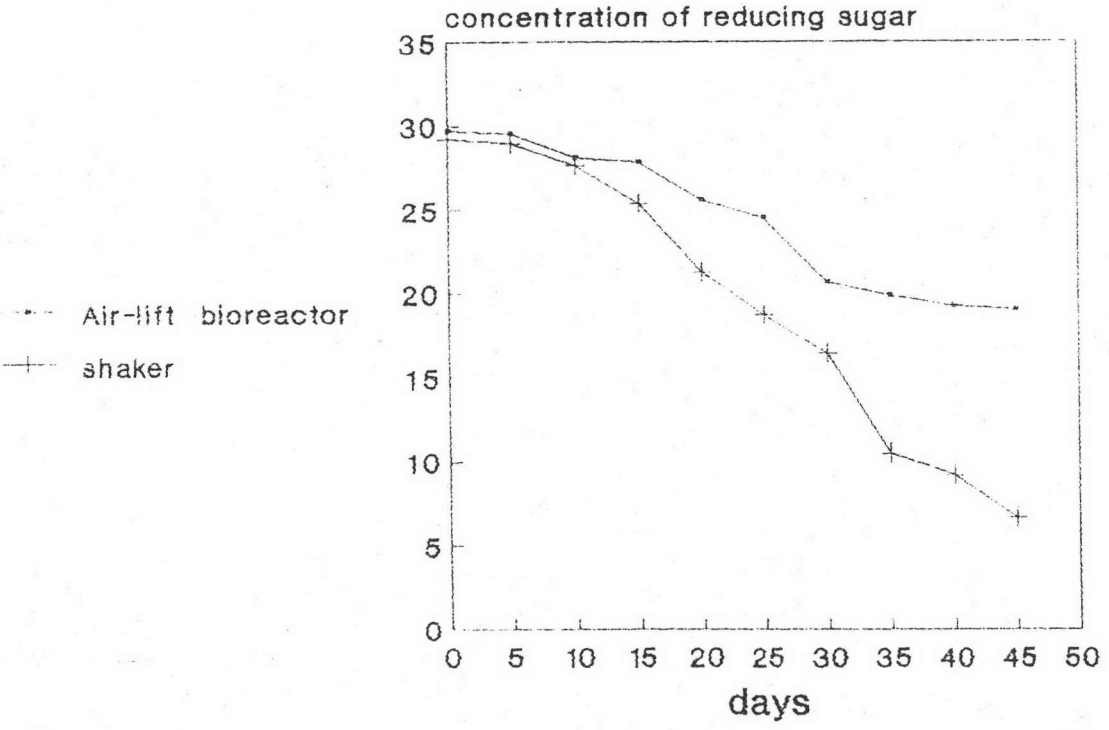
รูปที่ 43 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน(production medium) ที่ใช้สารบัฟเฟอร์MES ต่อการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย

3.13 การผลิตแอนโธไซยานินด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ air-Lift ที่สภาวะการให้อากาศ 0.3 vvm

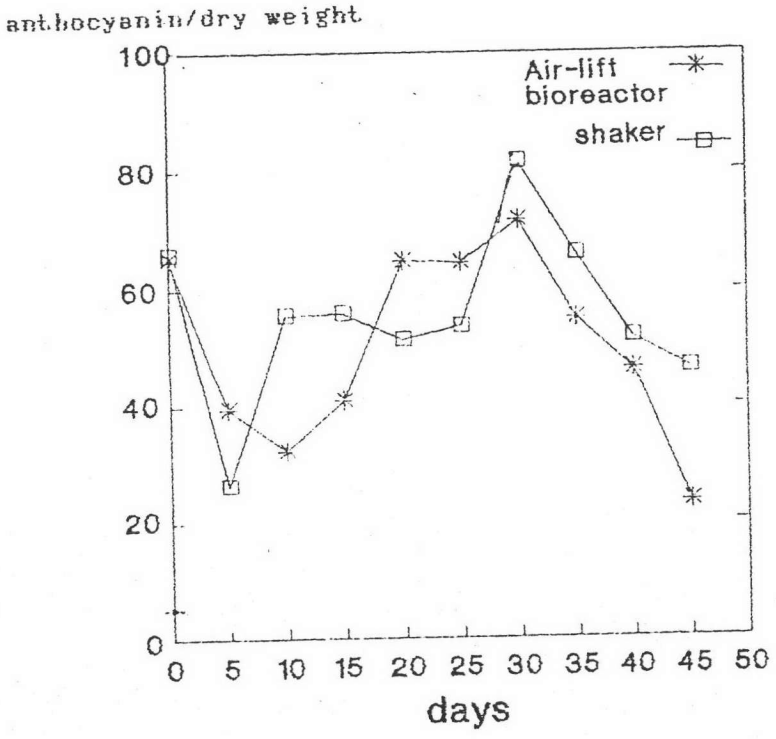
ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-Lift ที่สภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 vvm (ตามวิธีการทดลองข้อ 2.10) โดยใช้อาหาร B5 เสริมด้วย BA 2 มก./ล. และ 2,4-D 1 มก./ล. ควบคู่ไปกับการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าที่สภาวะการเลี้ยงมาตรฐาน วัดการเจริญการผลิตแอนโธไซยานิน, pH , เปอร์เซ็นต์ การมีชีวิต และน้ำตาลที่เซลล์แขวนลอยใช้ โดยจัดในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า เซลล์พืชแขวนลอยที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-Lift มีการเจริญต่ำกว่าในระดับขวดเขย่าโดยให้ค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 3.265 กรัม/ลิตร ใน 35 วันของการเพาะเลี้ยง น้อยกว่าระดับขวดเขย่าประมาณ 1.83 เท่า (ค่าน้ำหนักแห้งของระดับขวดเขย่า 35 วันของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5.99 กรัม/ลิตร) และสำหรับการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ(รูป 44-46)เมื่อพิจารณาค่าแอนโธไซยานินต่อน้ำหนักแห้ง พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่า คือเท่ากับ 76.67 และ 81.58 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและขวดเขย่าตามลำดับ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงระหว่างการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานิน ทั้งในระดับขวดเขย่าและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แนวโน้มใกล้เคียงกันคือ เมื่อเซลล์สะสมแอนโธไซยานินรวมมากขึ้น pH จะลดลงและปรับตัวมากขึ้น เมื่อเซลล์ลดการสร้างแอนโธไซยานินลง แต่การเพาะเลี้ยงในถังปกิกรณ์ชีวภาพจะมี pH ต่ำกว่าในขวดเขย่า ระหว่างการเพาะเลี้ยงทั้งในระดับขวดเขย่าและถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตอยู่ในระดับ 80 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป แต่ในวันที่ 40 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะมีเปอร์เซนต์การมีชีวิตลดลง และเหลือเพียง 52.74 % ในวันที่ 45 ของการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์พืชแขวนลอยเกาะเป็นก้อนตามผนังของถังปฏิกรณ์ (รูปที่ 47) และตกลงมาสะสมอุดช่องว่างระหว่าง draft tube กับผนังของถังปฏิกรณ์ทำให้ไม่มีการไหลเวียนของเซลล์ในถังปฏิกรณ์ ซึ่งส่วนของอาหารที่ได้รับการให้อากาศและส่วนของอาหารที่ขาดอากาศไม่มีการผสมหมุนเวียนกันไป (รูปที่ 48) เซลล์พืชได้รับอากาศไม่ทั่วถึง เซลล์จึงเริ่มตายโดยผลของน้ำหนักแห้งสอดคล้องกับเปอร์เซนต์การมีชีวิต เมื่อสิ้นสุดการทดลองผลผลิตของน้ำหนักแห้งโดยคิดจาก น้ำหนักแห้งสูงสุดต่อปริมาณของน้ำตาลที่ใช้ไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่เวลา 35 วัน ของการเพาะเลี้ยงมีผลผลิตน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.269 และในขวดเขย่าเท่ากับ 0.437

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

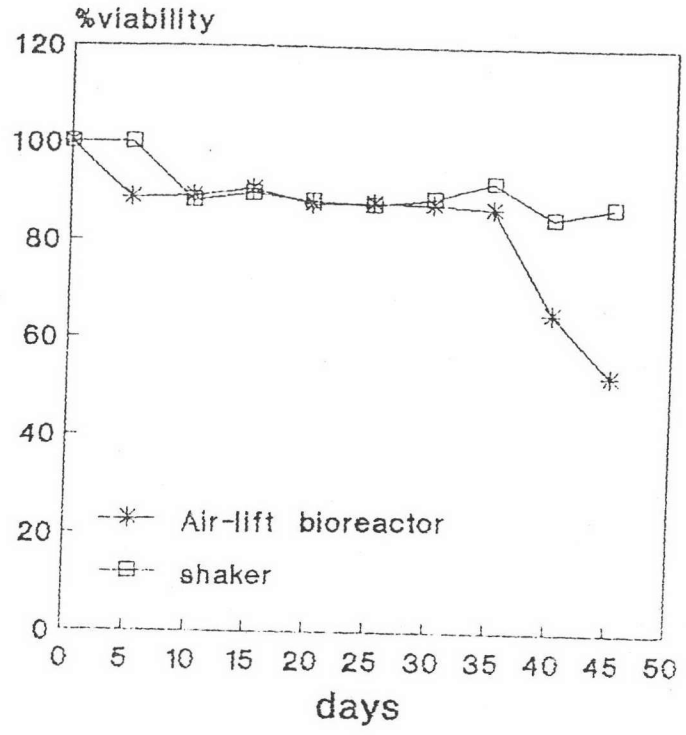


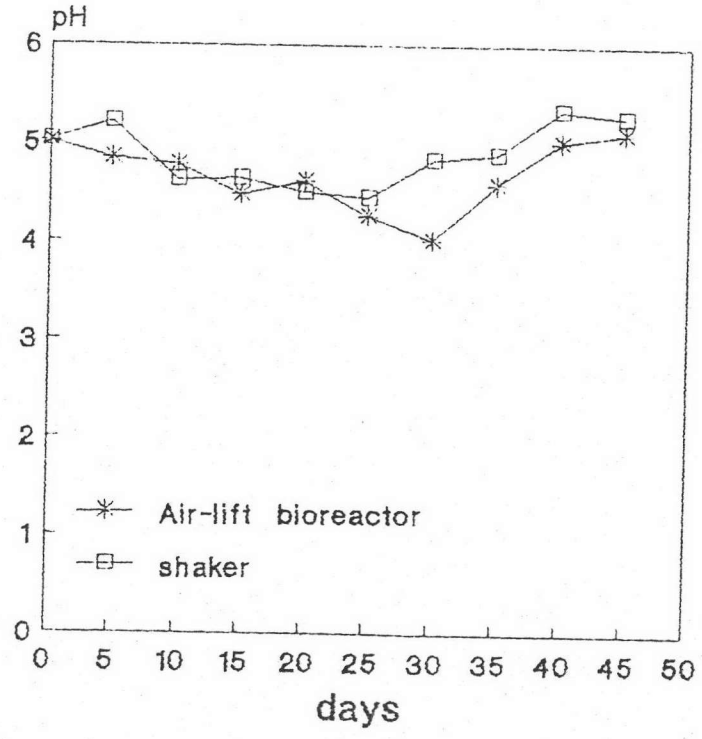


รูปที่ 44 การเจริญและปริมาณน้ำตาลที่ใช้ของเซลล์พืชใบเถาเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยในอาหารสูตร B5เสริมด้วยออร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-liftที่สภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 vvm



รูปที่ 45 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์พืชใบเน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยในอาหารสูตรB5 เสริมด้วยออร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่สภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 vvm





รูปที่ 46 เปอร์เซนต์ของการมีชีวิตและpHของเซลล์นิชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยในอาหารสูตร B5 เสริมด้วยออร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-liftที่สภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 vvm

รูปที่ 47 แสดงลักษณะของเซลล์ที่เกาะตามผนังของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ในช่วงปลายของการเพาะเลี้ยง

รูปที่ 48 แสดงลักษณะการไม่ไหลเวียนของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่เกิดจากการอุดตันโดยเซลล์แขวนลอย