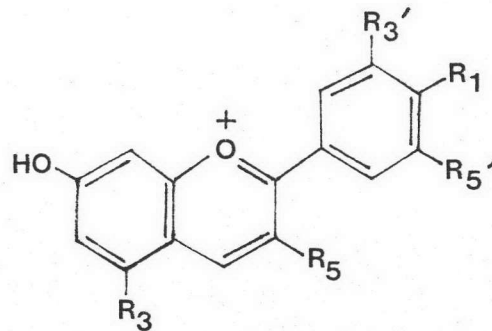




1.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น $C_6C_3C_6$ พบในอวัยวะส่วนต่าง ๆ เช่น ดอก, ใบ, และผลของพืชหลายชนิดที่มีองค์ประกอบของสารสีม่วง, แดงและน้ำเงิน โดยจะละลายอยู่ใน vacuole sap ของเซลล์พืช (Goodwin และ Mercer, 1972) โมเลกุลของแอนโทไซยานินประกอบด้วยส่วนที่เป็น aglycone เรียกว่า แอนโทไซยานิดิน พบทั่วไปมี 6 ชนิด คือ pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin และ malvidin และส่วนที่เป็น glycosides ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส, กาแลคโตส, แรมโนส (rhamnose) และ อะราบินโนส (arabinose) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าแอนโทไซยานินสามารถจับอยู่กับน้ำตาลโมเลกุลคู่หรือมากกว่าได้อีกด้วย โครงสร้างของแอนโทไซยานิดิน และ แอนโทไซยานิน แสดงดังรูปที่ 1



Anthocyanidins : $R_3 = OH$, $R_5 = OH$

	R_3'	R_5'	Visible colour
Pelargonidin (Pg)	H	H	Red
Cyanidin (Cy)	OH	H	Magenta
Peonidin (Pn)	OCH_3	H	Magenta
Delphinidin (Dp)	OH	OH	Purple
Petunidin (Pt)	OCH_3	OH	Purple
Malvidin (Mv)	OCH_3	OCH_3	Purple

Anthocyanins : Pg, Cy, Pn, Dp, Pt, Mv with R_3 , R_5

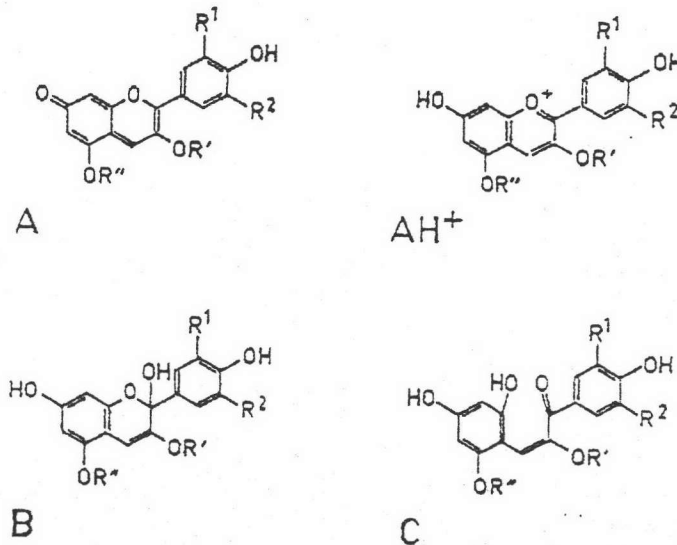
$R_3 = O - \text{sugar}$ or $O - \text{acylated sugar}$

$R_5 = OH$ or $O - \text{glucose}$

รูปที่ 1 โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิดิน และ แอนโทไซยานิน

(Timberlake และ Bridle, 1980)

แอนโทไซยานินเป็นอนุพันธ์ polyhydroxy และ polymethoxy ของสาร 2-phenylbenzopyrylium (flavylium) ละลายน้ำได้ดีและไม่ละลายในตัวทำละลายประเภท non-hydroxyl เช่น อีเทอร์ เบนซีน อะซีโตน คลอโรฟอร์ม เป็นต้น เมื่อละลายในสารละลายซึ่งเป็นกรดที่ 25°C แอนโทไซยานินจะแตกตัวออกเป็น 4 รูปแบบ (species) คือ quinonoidal base (A), flavylium cation (AH^+), pseudobase หรือ carbinol (B) และ chalcone (C)



รูปที่ 2 โครงสร้างของแอนโทไซยานินทั้ง 4 รูปแบบ ซึ่งปรากฏในสารละลายที่เป็นกรด อนุกรมที่ห้อย R^1 และ R^2 มักจะเป็น H, OH หรือ OCH_3 , R' คือ กลุ่ม glycosyl และ R'' คือ H หรือกลุ่ม glycosyl (Markakis, 1982)

ดังนั้นเสถียรภาพของสีแอนโทไซยานินจึงขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีผลต่อสภาวะสมดุล การแตกตัวของแอนโทไซยานิน ปัจจัยที่สำคัญได้แก่

1. pH

สีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนไปตาม pH ของสารละลายที่แอนโทไซยานินละลายอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูป flavylium ion (AH^+) เป็นส่วนมาก (predominate) ทำให้สารละลายมีสี และในสภาวะที่เป็นด่าง แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูป A, B และ C เป็นส่วนมากทำให้สารละลายไม่มีสี

2. อนุกรม

Brouillard และ Delaporte (1977) และ Timberlake (1980) ได้ศึกษาผลของอนุกรมต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานิน โดยสรุปว่าปฏิกิริยาสมดุลระหว่าง

โครงสร้างของแอนโทไซยานินในรูปต่าง ๆ ขึ้นกับอุณหภูมิจากทิศทางซ้ายไปขวาของสมการดังนี้
 blue quinonoid red flavylium colorless carbinol base colorless
 chalcone โดยการเพิ่มความร้อนจะทำให้สมดุลเปลี่ยนไปทาง chalcone และการย้อนกลับ
 (reversion) จาก chalcone ไปเป็น flavylium ต่ำ ที่อุณหภูมิ 60°C ถึง 100°C จะ
 พบ chalcone ในสมดุลมากกว่าที่อุณหภูมิห้องและในกรณีที่มีโมเลกุลของออกซิเจนอยู่ด้วยจะทำให้
 ได้สารผลิตภัณฑ์สีน้ำตาล

3. แสง

แสงมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์และการสลายตัวของแอนโทไซยานิน Siegelman
 (1964) รายงานว่า การปลูกของแอปเปิลสีแดงในที่มืดสนิท แอปเปิลยังคงมีสีเขียวเหมือนเดิม
 โดยไม่มีการสังเคราะห์สีของแอนโทไซยานิน และตรงข้าม Palamidis และ Markakis
 (1975) พบว่าในเครื่องต้มที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ใช้แอนโทไซยานินจากองุ่นสกัดเป็นสาร
 ให้สี แสงเป็นตัวเร่งให้เกิดการสลายโครงสร้างของแอนโทไซยานิน

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีกที่มีผลต่อเสถียรภาพของสีแอนโทไซยานิน เช่น เอน
 ไซม์, ออกซิเจน, กรดแอสคอร์บิก, โลหะหนัก และส่วนที่เป็น glycosides ของโมเลกุลแอน
 โทไซยานิน เป็นต้น

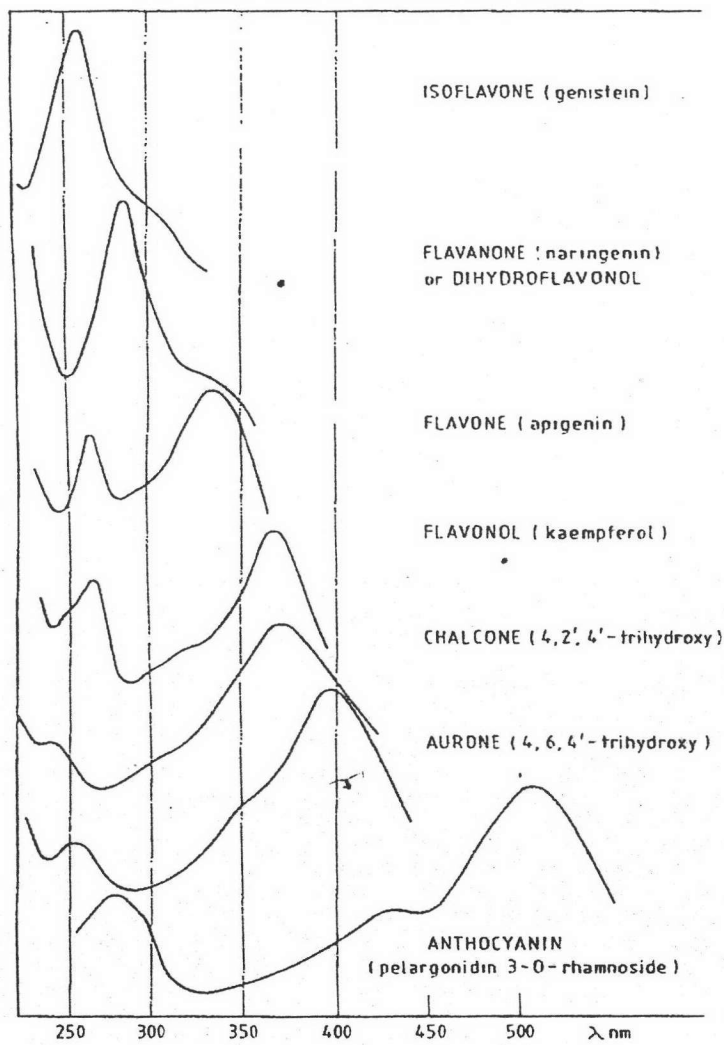
คุณสมบัติการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานิน

สารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (absorption
 maxima) ที่ความยาวคลื่น 2 ช่วงคือ 240-285 นาโนเมตร (band II) และช่วง 300 -
 550 นาโนเมตร (band I) เมื่อละลายอยู่ในเมทานอล (กรณีของแอนโทไซยานินจำเป็นต้องใช้
 เมทานอลที่เป็นกรด) ซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติและ oxygenation pattern ของโครงสร้างของ
 สารฟลาโวนอยด์ ดังแสดงในรูปที่ 3 และ ตารางที่ 1

1.2 ความสำคัญของการใช้สีจากธรรมชาติในอุตสาหกรรม

ในระยะเวลา 15 ปีที่ผ่านมาแนวโน้มของการใช้สีจากธรรมชาติมาทดแทนการใช้สีที่ได้
 จากการสังเคราะห์มีมากขึ้นอย่างมากมาเห็นได้จากการจดสิทธิบัตรสีที่สกัดได้จากพืชในธรรมชาติ
 มีมากกว่าสีสังเคราะห์ถึง 5 เท่า (Francis, 1986) และจากการตั้งองค์การของรัฐ การออก
 กฎหมายพิเศษเพื่อการควบคุมการใช้สีธรรมชาติเพื่อผลสมอาหารของประเทศต่าง ๆ เช่น สหรัฐ
 อเมริกา แคนาดา ญี่ปุ่น เยอรมัน ประเทศในกลุ่มยุโรป เป็นต้น (Berdick, 1982)

จากการประชาสัมพันธ์ของหน่วยงานรัฐ และการตีพิมพ์งานวิจัยเผยแพร่ถึงภัยของสี
 สังเคราะห์ที่ใช้ผสมอาหาร ทำให้ผู้บริโภคมีความรู้สึกต่อต้านการใช้สีสังเคราะห์มีผลกระทบทำให้ผู้



รูปที่ 3 คุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟลาโวนอยด์

ตารางที่ 1 ช่วงค่าการดูดกลืนแสงของฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) (Markham, 1982)

Band II (nm)	Band I (nm)	ชนิดของฟลาโวนอยด์
250-280	310-350	Flavone
250-280	330-360	Flavonols(3-OH substituted)
250-280	350-385	Flavonols(3-OH free)
245-275	310-330 shoulder c 320 peak	Isoflavones Isoflavones(5-dehydroxy-6,7-dioxygenated)
275-295	300-330 shoulder	Flavanones & dihydroflavanols
230-270 (low intensity)	340-390	Chalcones
230-270	380-430	Aurones
270-280	465-560	Anthocyanidin & anthocyanins



ผลิตมาใช้สีจากธรรมชาติแทน ถึงแม้สีจากธรรมชาติจะมีราคาแพงกว่าและมีความยุ่งยากในการใช้มากกว่า จากข้อมูลในปี 1980 พบว่าการใช้สีผสมอาหารของโลกปัจจุบันเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสีสังเคราะห์ประมาณ 36 ชนิด และสีจากธรรมชาติประมาณ 25 ชนิด ตัวอย่างของสีธรรมชาติที่ใช้ในสหรัฐอเมริกาและประเทศอื่นแสดงดังตารางที่ 2 และ 3 (Berdick., 1982)

1.3 ความสำคัญของแอนโทไซยานินในการใช้เป็นสารให้สีจากธรรมชาติ

แอนโทไซยานินเป็นสารให้สีจากธรรมชาติที่ไม่มีพิษต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์ โดย Horowitz และ Gentili (1969) ระบุว่า"สารประกอบในกลุ่ม flavonoids ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เพราะสามารถถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ให้เปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (จาก A-ring) และกรด aromatic ชนิดต่าง ๆ (จาก B - ring) ซึ่งไม่มีส่วนใดที่จะก่อให้เกิดอันตราย"

อีกทั้งแอนโทไซยานินมีสีอันสดใสโดยเฉพาะสีในโทนสีแดง และสามารถละลายน้ำได้ดี ละตัวต่อการใช้ในอุตสาหกรรมที่เป็นของเหลว (Markakis, 1982) ดังนั้นแอนโทไซยานินจึงเป็นที่นิยมใช้เป็นสีผสมอาหารในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด (Wallin และ Smith, 1977) เช่น เครื่องดื่มต่าง ๆ ทั้งชนิดที่อัดและไม่อัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์, ไวน์, ผลไม้กระป๋อง, ขนม, ลูกกวาด, โยเกิร์ต และผลิตภัณฑ์อาหารผงต่าง ๆ เป็นต้น ถึงแม้แอนโทไซยานินจะพบโดยทั่วไปในพืชหลายชนิด แต่การผลิตแอนโทไซยานินในระดับอุตสาหกรรมมีเพียงการผลิตแอนโทไซยานิน จากผลพลอยได้ของอุตสาหกรรมองุ่น และไวน์ ที่เรียกว่า encyanin หรือ encyanina เพื่อจุดประสงค์ในการแต่งสีไวน์แดงเท่านั้น ดังนั้นจึงมีผู้สนใจศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาแหล่งพืชอื่น ๆ ที่มีศักยภาพ สามารถนำมาผลิตสารแอนโทไซยานินได้ในระดับอุตสาหกรรมกันมากมาย (Markakis, 1982) เช่น

Chiriboga และ Francis (1970, 1973) ได้สกัดสารแอนโทไซยานินจาก cranberry และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน พบว่าสีที่ได้เหมาะสมที่จะใช้เป็นสีผสมในน้ำ cranberry ที่สีซีดจางให้เข้มขึ้น และมีความคงตัวมากขึ้น

Lowry และ Chew (1974) รายงานว่าสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัญแห้ง (*Crotalaria ternatea*) ใช้เป็นสีผสมอาหารชนิดหนึ่งของมาเลเซีย เรียกว่า "rice cake" แทนการใช้สีสังเคราะห์

Francis (1975) เสนอว่าผลของ *Viburnum dentatum* ซึ่งปริมาณของแอนโทไซยานินมีมากถึง 1% ของน้ำหนักสด มีศักยภาพพอที่จะเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอนโทไซยานินในเชิงการค้า

ตารางที่ 2 สีที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในอาหารในประเทศสหรัฐอเมริกา

Official name in the United States	Food uses and restriction in the United States	Alternate names ^b	EEC number	Color Inde (1971) number
Annatto extract	General ^c	Annatto; bixin; rocou; Natural Orange 4	E-160 (b)	75120
Beets, dehydrated (beet powder)	General ^c	Beetroot Red; betnin; betanine; Betalaine	E-162	—
Canthaxanthin	General ^c (up to 30 mg/lb or pt)	Food Orange 8	E-161 (g)	40850
Caramel	General ^c	Caramel color; caramel (ammonia proces); beverage caramel; burnt sugar; Natural Brown 10; caramel (ammonia-sulfite process)	E-150	—
β -Apo-8'-carotenal	General ^c (up to 15 mg/lb or pt)	Food Orange 6; 8'-apo- β -caroten- 8'-al	E-160 (e)	40820
β -Carotene	General ^c	Carotene; Natural Yellow 26	E-160 (a)	75310

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Official name in the United States	Food uses and restriction in the United States	Alternate names ^b	EEC number	Color Inde (1971) number
Carrot oil	General ^c	Carrot extract	—	—
Cochineal extract; carmine ^d	General ^c	Natural Red 4; Carminic acid; Carminic acid lake; Cochineal	E-120	75470
Cottonseed flour ^e	General ^c	—	—	—
Ferrous gluconate	For ripe olives only	—	—	—
Fruit juice	General ^c	Fruit juice concentrate	—	—
Grape color extract	Nonbeverage foods	Anthocyanins	E-163	—
Grape skin extract (cyanidin)	For various beverages only	Anthocyanins	E-163	—
Paprika	General ^c	—	—	—
Paprika oleoresin	General ^c	Paprika extract; capsanthin; cap-sorubin	—	—

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Official name in the United States	Food uses and restriction in the United States	Alternate names ^b	EEC number	Color Inde (1971) number
Riboflavin	General ^c	Lactoflavin	E-101	—
Saffron	General ^c	Natural Yellow 6; crocetin; crocin	—	75100
Titanium dioxide	General ^c (up to 1%)	Titanic earth	E-171	77891
Turmeric	General ^c	Curcumin; Natural Yellow 3; curcuma	E-100	75300
Turmeric oleoresin	General ^c	Turmeric extract; curcumin	—	—
Vegetable juice	General ^c	Vegetable juice concentrate; vegetable color	—	—

^a ณ วันที่ 1 ธันวาคม 1981

^b รวมถึงชื่อสามัญ, ชื่อทั่วไป, ชื่อทางเคมี, ชื่อครรชสี (color index names) และชื่อที่ใช้ในประเทศต่าง ๆ

^c General หมายถึงปริมาณที่ใช้ทั่วไปที่ได้รับอนุญาต (good manufacturing practice); ไม่ใช้ปริมาณที่ใช้ในอาหารมาตรฐาน (standard authorizes color)

^d Carmine คือ aluminum (or calcium-aluminum) lake ของกรดคาร์มินิค (carminic acid) ที่ใช้เป็นสีย้อมของ cochineal e

^e อบ, เหาไขมันออกเป็นบางส่วน, ปรงแล้ว

ตารางที่ 3 สีย้อมชาติที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศอื่น ๆ ยกเว้นสหรัฐอเมริกา-

Common name	Alternate names	EEC number	Color Index (1971) number
Alkanet	Alkanin; Natural Red 20; Alkanna Red; Orcanette	—	75520; 75530
Aluminum	Aluminium	E-173	77000
Anthocyanins	Enocianina; cyanidin; malvidin; peonidin; delphinidin	E-163	—
Carbon black (channel)	Channel black; carbon black (impingement process)	—	77266
Carbon black (vegetable)	Charcoal	E-153	—
Carotenoids	(Including α -carotene, γ -carotene, bixin, norbixin, capsanthin, capsorubin, lycopene)	E-160	—
Ethyl ester of β -apo-8'-caro- tenoic acid	Ethyl- β -apo-8' -carotenoate	E-160(f)	40825
Chlorophyll	-	E-140	75810
Chlorophyllin copper complex	(Usually as sodium and potassium salts)	E-141	75810

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Common name	Alternate names	EEC number	Color Index (1971) number
Gold	-	E-175	77480
Iron oxides	Iron hydroxides; hydrated iron oxides; brown, yellow, red & black iron oxides; Pigment Yellow 42 and 43; Pigment Black 114	E-172	77489; 77491 77492; 77499
Silver	-	E-174	77820
Xanthophylls	(Including flavoxanthin, lutein, cryptoxanthin, rubixanthin, violaxanthin, and rhodoxanthin	E-161	—

Shewfelt และ Ahmed (1977, 1978) ใช้วิธี Freeze dry เพื่อทำแห้งสารสกัดแอนโทไซยานินจาก blueberries และ cabbages เมื่อนำมาใช้เป็นสีผสมในเครื่องดื่ม จะทำให้ความคงตัวของสีดีกว่าเครื่องดื่มที่ไม่ได้ใส่สารสกัด

ในปี ค.ศ. 1979 Asen และคณะได้จดสิทธิบัตรสีแอนโทไซยานิน Peonidin 3-(dicaffeoylsophoroside)-5 glucoside ที่ได้จากดอก morning glory (*Ipomea tricolor*) มีคุณสมบัติความคงตัวของสีใน pH 2.0-8.0 สามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่มอย่างกว้างขวาง

Timberlake (1980) ได้ยืนยันการค้นคว้าในหลายรายงานว่า มีการผลิตแอนโทไซยานินคุณภาพสูงจาก blueberries (*Vaccinium myrtillus*) ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อจุดประสงค์ใช้ในทางเภสัชเวช

Bassa และ Francis (1987) ได้ทดลองเปรียบเทียบความเสถียรของสีแอนโทไซยานินในเครื่องดื่มต้นแบบ (Model beverage) ระหว่างแอนโทไซยานินที่ได้จาก Sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) กับแอนโทไซยานินที่ได้จาก blackberries และแอนโทไซยานินจากองุ่นที่ผลิตเชิงการค้าแล้วคือ enocyanin พบว่าแอนโทไซยานินจาก Sweet Potatoes ให้ความคงตัวของสีมากที่สุด และเหมาะสมเป็นสารที่ให้สีที่มีประสิทธิภาพในเครื่องดื่ม

1.4 ข้อได้เปรียบของการใช้เซลล์และเนื้อเยื่อพืชเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ

ปัจจุบันการผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากเนื้อเยื่อและเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ได้รับความนิยมนสูง ทั้งนี้เนื่องจากมีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเทียบกับการผลิตจากต้นพืชดั้งเดิม คือ

1. เซลล์พืชเพาะเลี้ยงจะมีอัตราการเจริญเร็วกว่าพืชดั้งเดิม สามารถเพิ่มจำนวนได้มากในพื้นที่จำกัด และไม่ขึ้นกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมได้แก่ ภูมิอากาศ ศัตรูพืช โรคพืช และฤดูกาล เป็นต้น (Parr, 1989)

2. จากเทคนิคการคัดเลือกโคลน (cloning) ที่เกิดจากเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์เกาะกลุ่ม ทำให้ได้โคลนของเซลล์พืชเพาะเลี้ยงที่สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์เป้าหมายได้มากกว่าในพืชดั้งเดิม เช่น ในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Lithospermum erythrorhizon* เพื่อผลิต shikonin, *Coptis japonica* เพื่อผลิต berberine, *Galium mollugo* เพื่อผลิต shikimic acid เป็นต้น (Brodelius, 1985) อีกทั้งสามารถควบคุม และชักนำให้เซลล์พืชเพาะเลี้ยงผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการโดยจำเพาะ มีคุณภาพและปริมาณสม่ำเสมอ ทำให้ประหยัดและสะดวกต่อกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์

3. ในบางเซลล์พืชเพาะเลี้ยงสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ซึ่งไม่เคยพบว่ามีปรากฏอยู่ในพืชดั้งเดิมมาก่อนเช่น สารประกอบ 5,6-Dihydroxylucidin ใน *Morinda citrifolia* , Rutacultin ใน *Ruta graveolens*, Hinokiol ใน *Thuja occidentalis* เป็นต้น (Kreis และ Reinhard, 1988)

4. การใช้เซลล์พืชเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษากลไกการสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ และใช้เป็นตัวกลางทางชีวภาพในการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นสารผลิตภัณฑ์ (Biotransformation) ซึ่งเซลล์พืชมีข้อได้เปรียบจุลินทรีย์ในกรณีที่ผลิตภัณฑ์เป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีโครงสร้างซับซ้อน และการสังเคราะห์ใช้เอนไซม์หลายตัวเกี่ยวข้อง เช่น การเปลี่ยน digitoxin เป็น digoxin สาร cardiacglycosides โดยเซลล์พืชเพาะเลี้ยงของ *Digitalis lanata* (Kreis และ Reinhard, 1986)

5. สามารถใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพของเซลล์พืช เพื่อกระตุ้นให้เซลล์พืชเพาะเลี้ยงสร้างสารได้มากขึ้น หรือสร้างสารตัวใหม่ซึ่งปกติพืชไม่ได้สร้าง เช่น

ก. การใช้สารใด ๆ ที่ไปกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ phytoalexins ขึ้นในเซลล์พืช (elicitor) ซึ่งอาจเป็น โลหะหนัก, ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือ สารจากจุลินทรีย์ phytoalexins ที่ถูกสร้างขึ้น มีความหลากหลายทางด้านโครงสร้าง และคุณสมบัติ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในทางเภสัชกรรม เช่น สารประกอบในกลุ่ม isoflavones, sesquiterpenoids, pterocarpanes, alkaloids, diterpenoids และสารประกอบ polyacetylenic ตัวอย่างการใช้ elicitor เพื่อกระตุ้นให้เซลล์พืชเพาะเลี้ยงสร้างสาร เช่น ในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Canavalia ensiformis* หลังการใช้ elicitor ที่ได้จาก *Pithomyces chartarum* เซลล์พืชสามารถผลิตสาร medicarpin ได้ ซึ่งปกติไม่เคยผลิตมาก่อน , ในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Cinchona ledgeriana* หลังการใช้ elicitor ที่ได้จาก *Aspergillus niger* สามารถผลิตสาร entraquinones เพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า เป็นต้น (Brodelius, 1985)

ข. การตรึงเซลล์พืชโดยการกักขังเซลล์ไว้ภายในสารที่มี โครงสร้างคล้ายตาข่าย (matrix) ที่นิยมนำมาใช้ คือสารโพลิเมอร์เจล เช่น carrageenan, alginate, agarose และ polyacrylamide เป็นต้น ตัวอย่างการใช้วิธีตรึงเซลล์พืช เพื่อผลิตสาร เช่น เซลล์เพาะเลี้ยงของ *Capsicum frutescens* ตรึงใน Polyurethane ให้ผลผลิตสาร capsaicin เพิ่มขึ้น 100 เท่า , เซลล์เพาะเลี้ยงของ *Morinda citrifolia*

ตรึงใน alginate ให้ผลผลิตสาร anthraquinones เพิ่มขึ้น 10 เท่า
เป็นต้น (Brodelius และ Nilsson , 1980)

1.5 การผลิตสีแอนโทไซยานินจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ของพืช

เทคนิคการผลิตสีธรรมชาติจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเป็นที่สนใจศึกษากันมาเป็นเวลานาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตสีแอนโทไซยานินจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืช ได้มีการศึกษาและวิจัยกันมาอย่างต่อเนื่องในพืชหลายชนิด ดังรายละเอียดที่อ้างถึงในตารางที่ 4

1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนโทไซยานินในเซลล์พืชเพาะเลี้ยง

1.6.1 แสง

แสงมีความสำคัญต่อการสะสมแอนโทไซยานินในเซลล์พืชเพาะเลี้ยงเป็นส่วนใหญ่ มีพืชเพียงไม่กี่ชนิดที่ถูกรายงานว่าเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถสะสมแอนโทไซยานินได้ในที่มืด ได้แก่ *Strobilanthes dyeriana* (Smith และคณะ, 1981), *Vitis hybrida* (Yamakawa และคณะ, 1983) และเซลล์เพาะเลี้ยงของแครอท (Alfermann และ Reinhard, (1971), Schmitz และ Sertz (1972), Noe's และคณะ (1980), Ozeki และ Komamine (1981) โดยเฉพาะของแครอทดำ (*Daucus carota*) สามารถสะสมแอนโทไซยานินได้เป็นจำนวนมากที่รากในที่ที่ไม่มีแสง (Harborne และคณะ, 1983) อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Vitis hybrida* จะมีมากขึ้นตามความเข้มของแสง (light intensity) นอกจากนี้ความยาวของคลื่นแสงมีผลต่อการผลิตแอนโทไซยานิน เช่น ช่วงความยาวคลื่นของแสงสีฟ้าให้ผลดีที่สุด ต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Populus hybrida* (Matsumoto และคณะ, 1973) และในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Machaeranthera gracilis* สามารถสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้ในช่วงความยาวคลื่นต่ำกว่า 345 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงของแสง UV (Reinert และคณะ, 1964)

1.6.2 สารเร่งการเจริญ (growth regulator)

สารเร่งการเจริญในกลุ่มออกซิน พบว่ามีผลยับยั้งการผลิตแอนโทไซยานินในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Machaeranthera gracilis* (Constable และคณะ, (1971), Stickland และ Sunderland (1972)), *Petunia hybrida* (Colijn และคณะ, 1981) และ *Ipomoea batatas* (Nozue และ Yasuda, 1985) ตรงกันข้ามกลับมีผลทำให้มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินมากขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Dimorphotheca auriculata*

ตารางที่ 4 งานวิจัยที่เกี่ยวเนื่องกับการผลิตสีแอนโทไซยานิน จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืช (Seitz, 1988)

พืชที่นำมา	การเพาะเลี้ยง	ชนิดของแอนโทไซยานิน	อาหารเพาะเลี้ยง
<i>Vitis vinifera</i>	Callus	Not identified	b
<i>Vitis vinifera</i> L.	Suspension	Not identified	B5
<i>Vitis</i> (hybrids)	Suspension	Cyanidin 3-monoglucoside	MS
	Suspension	Cyanidin 3-monoglucoside	B5
<i>Zea mays</i> cv. Black Maxican Sweet	Callus	Cyanidin 3-glucoside,	b
		Pelargonidin 3-glucoside	
<i>Solanum tuberosum</i> cv. Congo	Callus	Malvidin 3-(para-coumaroyl-rutinoside)5-glucoside	b
<i>Solanum jasminoides</i>	Callus	Cyanidin, petunidin ^c	MS
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	Callus	Cyanidin, delphinidin,	Heller (1953)
		Malvidin 3-glycosides 1 and 3,5-diglycosides	
		Cyanidin 3,5-diglucoside	Heller (1953)
<i>Machaeranthera gracilis</i> ^d	Callus	Cyanidin 3-glucoside and 3,5-diglucoside	W
	Callus	Cyanidin 3-glucoside and 3-rutinoside	W ^b
<i>Daucus carota</i> cv. Kintoki	Callus	Cyanidin glycosides	W
<i>Daucus carota</i>	Callus	Malvidin 3, 5-diglucoside	MS
<i>Daucus carota</i>	Suspension	Cyanidin ^c	b
	(Chemostat)		
<i>Daucus carota</i> cv. Kurodagosun	Suspension	Cyanidin ^c	Lin and Staba (1961)



ตารางที่ 4 (ต่อ)

พืชมา	การเพาะเลี้ยง	ชนิดของแอนโทไซยานิน	อาหารเพาะเลี้ยง
<i>Daucus carota</i> spp. <i>sativa</i>	Callus	Cyanidin ^c	Blakely and Steward (1961)
	Callus	Cyanidin xyloglucoside	12a (Seitz and Richter, 1970)
	Suspension	Cyanidin xyloglucoside	12a
	Suspension	Cyanidin 3-(sinapoylxylosyl glucosylgalactoside)	B5
<i>Daucus carota</i>	Suspension	Cyanidin 3-glucogalactoside, 3,5-digalactoside, 3-glucoside, and 3-galactoside	b
<i>Dimorphotheca auriculata</i>	Callus	Cyanidin 3-glucoside Delphinidin 3-glucosides	Not mentioned
<i>Helianthus tuberosus</i>	Callus	Cyanidin 3-glucoside and 3,5-diglucoside r	MS
<i>Linum usitatissimum</i>	Callus	Cyanidin 3,5-diglucoside	MS
<i>Rosa multiflora</i>	Callus	Cyanidin 3,5-diglucoside Delphinidin 3,5-diglucoside	
<i>Rosa</i> sp.	Suspension	Not identified	MX1 (Kash and Davies, 1972)
<i>Malus pumila</i>	Callus	Cyanidin 3,5-diglucoside	MS
<i>Malus pumila</i> spp. <i>domestica</i>	Callus	Not identified	W

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พืชกามา	การเพาะเลี้ยง	ชนิดของแอนโทไซยานิน	อาหารเพาะเลี้ยง
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Callus	Pelargonidin 3-glucoside, Cyanidin 3-glucoside, Delphinidin 3-glucoside	b
<i>Dimorphotheca sinuata</i>	Callus	Cyanidin 3-glucoside, Delphinidin 3-glucoside	MS
<i>Populus</i> (hybrids)	Suspension	Cyanidin 3-glucoside	LS
<i>Impatiens balsamina</i>	Suspension	Not identified	B5
<i>Urginea maritima</i>	Callus	Not identified	Staba (1969)
<i>Catharanthus roseus</i>	Callus	Hirsutidin, malvidin, petunidin (glucosides)	PRL-1 (Gamborg, 1970)
	Suspension	Hirsutidin, malvidin, pelunidin ^c	MS
<i>Pyrus communis</i> spp.	Callus	Not identified	W/MS
<i>Communis</i> and spp. <i>sativa</i>			
<i>Euphorbia millii</i>	Callus	Cyanidin ^c	MS
<i>Petunia hybrida</i>	Suspension/ Callus	Petunidin, malvidin ^c , malvidin 3-(para-coumaroyl) rutinoside) 5-glucoside	MS
	Suspension	Not identified	MS
<i>Strobilanthes dyeriana</i>	Callus	Cyanidin 3,5-diglucoside, Peonidin 3,5-diglucoside	B5
<i>Forsythia suspensa</i>	Callus	Not identified	b
<i>Oryza sativa</i>	Callus	Not identified	b

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พืชที่นำมา	การเพาะเลี้ยง	ชนิดของแอนโทไซยานิน	อาหารเพาะเลี้ยง
<i>Ipomoea batatas</i>	Suspension	Not identified	PRL-4C (Gamborg, 1966)
<i>Haplopappus gracilis</i>	Suspension	Cyanidin ^c	b
<i>Callistephus chinensis</i>	Callus	Cyanidin ^c	B5/MS
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Callus	Not identified	LS
<i>Ajuga reptans</i>	Callus	Not identified	MS
<i>Matthiola incana</i> (different mutants)	Callus	Cyanidin 3-glucoside, 3,5-diglucoside, 3-sambu- bioside (differently acylated), and 3-sambu- bioside-5-glucoside (differently acylated)	12a (Seiz and Richter, 1970)

^a ตัวอย่างสูตรอาหารเพาะเลี้ยง : MS (Murashige and Skoog, 1962), W (White, 1943), B5 (Gamborg, 1968), LS (Skoog, 1965):

^b สูตรอาหารเพาะเลี้ยงให้ดูจากที่มาในช่องเอกสารอ้างอิง

^c แสดงผลเฉพาะแอนโทไซยานินเท่านั้น

^d ชื่อดั้งเดิมคือ *Haplopappus gracilis* (Nutt.) Gray

(Harborne และคณะ, 1970) และ *Rasa* sp. (Davies, 1972) ชนิดของออกซินที่ใช้ก็มีผลต่อการเจริญและการสะสมแอนโธไซยานิน โดยในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Populus* (Matsumoto และคณะ, 1973) และ *Callistephus chinensis* (Rau และ Forkmann, 1986) พบว่า NAA ให้การสังเคราะห์แอนโธไซยานินสูงสุด มากกว่า 2,4-D และ IAA ในขณะที่ 2,4-D กลับให้การเจริญสูงสุด Mizukami (1989) สรุปรูปจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Hibiscus subdariffa* L. ว่า เอนไซม์ที่มีผลสำคัญ (key enzyme) ต่อการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน ได้แก่ chalcone synthase ซึ่งถูกควบคุม (regulate) โดย 2,4-D และการให้แสง

สำหรับสารเร่งการเจริญในกลุ่มไซโตไคนิน มีรายงานว่า kinetin มีผลยับยั้งการผลิตแอนโธไซยานินในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Populus* (Matsumoto และคณะ, 1973) ในขณะที่ไซโตไคนินมีผลส่งเสริมให้เซลล์เพาะเลี้ยงของแครอท สังเคราะห์แอนโธไซยานินเพิ่มขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มี 2,4-D (Ozeki และ Komamine, 1982) และ *M. gracilis* ซึ่งสังเคราะห์แอนโธไซยานินเพิ่มขึ้นตามปริมาณของไซโตไคนินที่ใช้ ได้แก่ BAP (6-benzyl-aminopurine) และ kinetin ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีออกซินต่ำ และมีผลกลับกันถ้าเพิ่มปริมาณออกซินในระดับสูง (Constable และคณะ, 1971) อย่างไรก็ตามการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างออกซินกับไซโตไคนิน จะสามารถเพิ่มการผลิตแอนโธไซยานินได้ เช่น ในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Vitis hybrida* (Yamakawa, 1983) และ *Euphobia millii* (Yamamoto และคณะ, 1989)

นอกจากออกซินและไซโตไคนินแล้ว จิบเบอเรลลินและกรดแอบซิวซิก (abscisic acid) ถูกรายงานว่ามีส่วนยับยั้งการสร้างแอนโธไซยานินในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Dimorphotheca sinuata* (Arditti และ Bell, 1981) และ แครอท (Ozaki และ Komamine, 1982) ตามลำดับ

1.6.3 องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง

องค์ประกอบของอาหารอันได้แก่ แหล่งคาร์บอน และธาตุอาหารต่างๆมีผลต่อการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Zenk และคณะ, 1977) โดยสูตรอาหารที่ให้การเจริญสูงสุดอาจแตกต่างกันไปจากสูตรอาหารที่ให้การสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิสูงสุด การที่จะพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิต (production medium) มักมุ่งเน้นไปที่แหล่งและปริมาณของคาร์บอน, ไนโตรเจน และ ฟอสเฟต เช่นในสูตรอาหารที่ประกอบไปด้วยความเข้มข้นของซูโครสสูง (8% น้ำหนักต่อปริมาตร) ความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสเฟตต่ำ จะชักนำการสังเคราะห์แอนโธไซยานินเพิ่มขึ้นในเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Catharanthus roseus* (Knobloch และคณะ, 1982) และ *Vitis* (Yamakawa และคณะ, 1983) ส่วนเซลล์เพาะเลี้ยงของ *D. sinuata* (Arditti และ Bell, 1974) และ *Petunia hybrida* (Colijn และคณะ,

1981) พบว่าการเพิ่มของซูโครสจะมีผลยับยั้งการสร้างแอนโคโนซานิน อย่างไรก็ตามชนิดและปริมาณของธาตุอาหารที่ใช้เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างแอนโคโนซานิน จะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช

1.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยในระดับขยายส่วน โดยการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor)

1.7.1 ประวัติและการพัฒนา

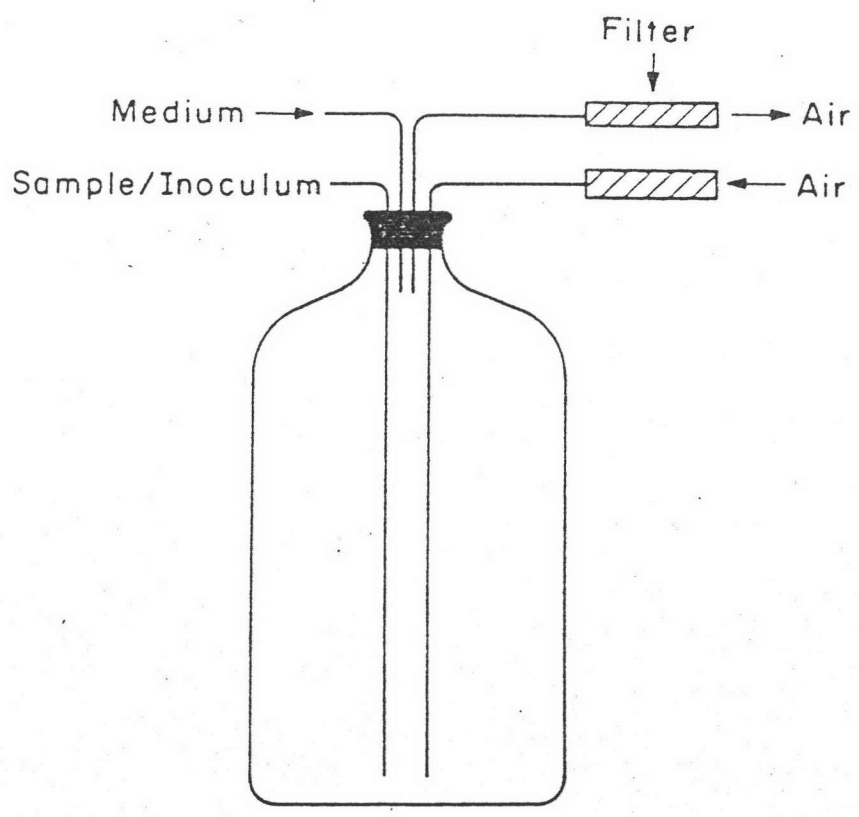
พืชเป็นแหล่งผลิตสารเคมีที่สำคัญต่อมนุษย์มาช้านาน ปัจจุบันมีการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชในระดับอุตสาหกรรม ประกอบกับความก้าวหน้าทางเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืชที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์พืชเพาะเลี้ยง สามารถผลิตสารเคมีในรูปสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ซึ่งมีความซับซ้อนทางด้านโครงสร้างและการสังเคราะห์ให้ได้สูงกว่าและมีข้อได้เปรียบกว่าต้นพืชดั้งเดิมตามที่กล่าวมาแล้ว จึงทำให้บทบาทการเป็นแหล่งผลิตสารเคมีของเซลล์พืชเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมมีศักยภาพมากขึ้น ในปี 1959 Tulecke และ Nickell ได้เริ่มการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เพื่อผลิตสารทุติยภูมิในระดับขยายส่วนของเซลล์พืชหลายชนิด เช่น Ginkgo, Holly, *Lolium* และกุหลาบ ในภาชนะระบบพื้นฐานโดยให้ชื่อว่า "Carboy" ประกอบด้วยขวดแก้วขนาด 20 ลิตร ปิดปากขวดด้วยจุกยางที่เลียบท่อแก้ว 4 ท่อ เพื่อเป็นท่ออากาศเข้า-ออก และท่ออาหารเข้า-ออก (รูปที่ 4) ต่อมานักวิจัยได้พัฒนาวิธีการผลิตสารผลิตภัณฑ์ในระดับขยายส่วน โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่างๆ (ตารางที่ 5)

1.7.2 ปัจจัยที่ใช้พิจารณาในการขยายส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอย

ลักษณะและธรรมชาติของเซลล์พืช

ก. ขนาดและความไวต่อแรงเฉือน (shear sensitivity)

เซลล์พืชเพาะเลี้ยงมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์จุลินทรีย์ประมาณ 10-100 เท่า กล่าวคือ เซลล์พืชเพาะเลี้ยงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 20-40 ไมโครเมตร และมีความยาวของเซลล์อยู่ในช่วง 100-200 ไมโครเมตร อีกทั้งมีรูปร่างหลากหลาย ตั้งแต่ทรงกลมจนถึงทรงกระบอก ขนาดและรูปร่างแปรตามขั้นของการเจริญ โดยในการเจริญขั้นทวีคูณ (\log) เซลล์จะมี vacuole เล็กๆจำนวนมาก และไซโทพลาสซึม ขณะที่เมื่อเซลล์แก่จะมี vacuole ขนาดใหญ่อันเดียว และไซโทพลาสซึมเจือจาง การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนระหว่าง vacuole กับของเหลวในเซลล์ทำให้เซลล์ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความดันออสโมติก (osmotic potential) และแรงกดดันทางกายภาพ (physical stress) และอาจเป็นไปได้ที่จะปล่อยของเสียที่ละลายใน vacuole เข้าสู่ไซโทพลาสซึม (Fowler, 1972) อย่างไรก็ตามลักษณะสำคัญของเซลล์ที่มีผล



รูปที่ 4 ตั้งปฏิกรณ์ชีวภาพระบบ "carboy" ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยครั้งแรก

ตารางที่ 5 การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยในระดับขยายส่วนโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
(Pareilleux, 1988)

ปี ค.ศ.	ชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	ปริมาณการผลิต (l)	ชนิดของพืช
1959	Conventional tank	9-30	<i>Ginkgo, Ilex</i>
1971	Round-bottom vessel, Stirrer bar	5	<i>Acer pseudoplatanus</i>
1975-6	Stirred reactor	30 : 65	<i>Nicotiana tabacum</i>
	Bubble column	360 : 1500	<i>N. tabacum</i>
1977	Conventional airlift with draught	10	<i>Morinda citrifolia</i>
1977-82	Conventional stirred tank	20000	<i>N. tabacum</i>
1982	Airlift loop reactor	100	<i>Catharanthus roseus</i> (<i>Vinca rosea</i>)
1987	Immobilized cell, circulating bed and sheet reactors	5-70	<i>Capsicum frutescens</i>

ต่อการขยายส่วนคือ ผนังเซลล์ซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็นหลัก อันมีคุณสมบัติแข็งและความดึงตัวสูง (high tensile strength) (Mandels, 1972) ทำให้เซลล์พืชทนต่อแรงเฉือนต่ำ (low shear resistance) เมื่อเทียบกับเซลล์จุลินทรีย์ การออกแบบระบบการผสม (mixing) และการกวน (agitating) จึงควรคำนึงถึงแรงเฉือนที่เกิดขึ้นในระบบของไหลภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ข. การจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ (aggregate formation)

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย ปกติเซลล์พืชมักจะจับกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ (clump) ซึ่งอาจมีขนาดตั้งแต่กลุ่มละ 2 - 300 เซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพืช การเปลี่ยนย้ายอาหาร (subculture), สภาวะแวดล้อม และองค์ประกอบของอาหาร (King, 1977) การจับกันเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ขนาดใหญ่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่อยู่ในบริเวณรอบนอกกับเซลล์บริเวณตรงกลางของกลุ่มทั้งในด้านสภาพแวดล้อม, การนำสารอาหารเข้าเซลล์ (nutrient uptake) และการหลั่งสารเมตาบอไลต์ อีกทั้งขนาดที่ใหญ่และมีน้ำหนักกว่าเซลล์เดี่ยวทำให้การแขวนลอยไม่คงตัว ตกตะกอนเร็ว และเมื่อเซลล์เจริญมากขึ้นทำให้เกิดความหนืดสูง (high viscosity) (Kato, 1978) ดังนั้นจึงมีปัญหาต่อการออกแบบระบบการผสมและการให้อากาศ ซึ่งต้องหาความเหมาะสมระหว่างการผสมที่ไม่ทำให้ตกตะกอนเกิดเป็น "dead zone" แรงเฉือนที่เกิดขึ้นต้องไม่รุนแรงจนเซลล์แตก และควรให้การเกิดการขนถ่ายมวล (mass transfer) ได้ดีโดยเฉาะออกซิเจน อย่างไรก็ตามการจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ก็อาจมีประโยชน์ในแง่สรีรวิทยาและชีวเคมีของการร่วมกันสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ของเซลล์พืช การเกิดความแตกต่างของสภาวะแวดล้อมและการแพร่ของสารอาหารอาจทำให้เซลล์บริเวณตรงกลางเกิดการพัฒนา (differentiation) ไปเป็น "เซลล์ป้อน" (feeder) ซึ่งสร้างสารการเจริญ (growth products) ไปกระตุ้นเซลล์อื่น ๆ ที่อยู่ล้อมรอบตัวเอง (King, 1973) การแก้ปัญหาการจับกันเป็นกลุ่มของเซลล์ทำได้โดยใช้วิธีการเอนไซม์ร่วมกับสารควบคุมความดันออสโมติก (King, 1973), ใช้สารเคมี เช่น colchicine (Umetsu และคณะ, 1975) หรือ วิธีการกายภาพ เช่น การใช้แรงเฉือน (shear force) (Kurz, 1979)

ค. อัตราการเจริญและผลผลิตของมวลชีวภาพ (Biomass yields)

เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์จุลินทรีย์ เซลล์พืชเพาะเลี้ยงจะมีอัตราการเจริญต่ำกว่ามาก โดยมีเวลาเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (doubling time) อยู่ในช่วง 20-25 ชั่วโมง ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูงในการเพาะเลี้ยงระดับขยายส่วน และปัญหาลำคัญ คือ การถ่ายต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ มีผู้ทดลองใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เพื่อป้องกันการปนเปื้อน พบว่าสารต้านแบคทีเรีย (antibacteria) ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์พืช เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ในขณะที่การใช้สารต้านรา

(antifungi) มีผลให้การเจริญของเซลล์พืชต่ำลง (Matsumoto และคณะ, 1972) อย่างไรก็ตาม กิจการออกแบบตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพและการบำรุงรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ ตลอดจนเทคนิคของการเพาะเลี้ยงเพื่อลดอัตราการเลี้ยงการปนเปื้อนจะช่วยแก้ปัญหานี้ได้

ง. ความต้องการออกซิเจน

เซลล์พืชเป็นเซลล์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญแต่เนื่องด้วยอัตราเมตาบอลิซึมของเซลล์ต่ำ จึงต้องการออกซิเจนน้อย (Maximum oxygen uptake rate อยู่ในช่วง $1-9 \text{ mmol h}^{-1}$) เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ (Maximum oxygen uptake rate อยู่ในช่วง $9-15 \text{ mmol h}^{-1}$ และสำหรับยีสต์ ($5-90 \text{ mmol h}^{-1}$)

สรุปความแตกต่างระหว่างเซลล์พืชกับจุลินทรีย์ได้ตั้งตารางที่ 6 (Scragg และ คณะ , 1987)

1.7.3 ชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์พืช

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์พืชมีความแตกต่างทั้งทางด้านรูปทรง, ขนาด และระบบการผสม ดังรูปที่ 5 และตารางที่ 7 ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ ประเภทแรกได้แก่แบบที่ใช้ใบพัด (impeller หรือ turbine) ในการทำให้ของไหลภายในถังปฏิกรณ์เกิดการกวนและการผสม ถังปฏิกรณ์ชีวภาพประเภทนี้ ถอดแบบมาจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ ใช้กันมากในสมัยแรกของการวิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชในระดับขยายส่วนได้แก่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ stirrer-tank ประเภทที่สองได้แก่แบบที่ใช้แรงอัดอากาศ และแรงลอยตัวของฟองอากาศในการทำให้ของไหลภายในถังปฏิกรณ์เกิดการกวนและการผสม ได้แก่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column และแบบ Air-lift ข้อดีและข้อเสียของทั้งสองแบบศึกษาได้จากรายละเอียด ดังตารางที่ 8

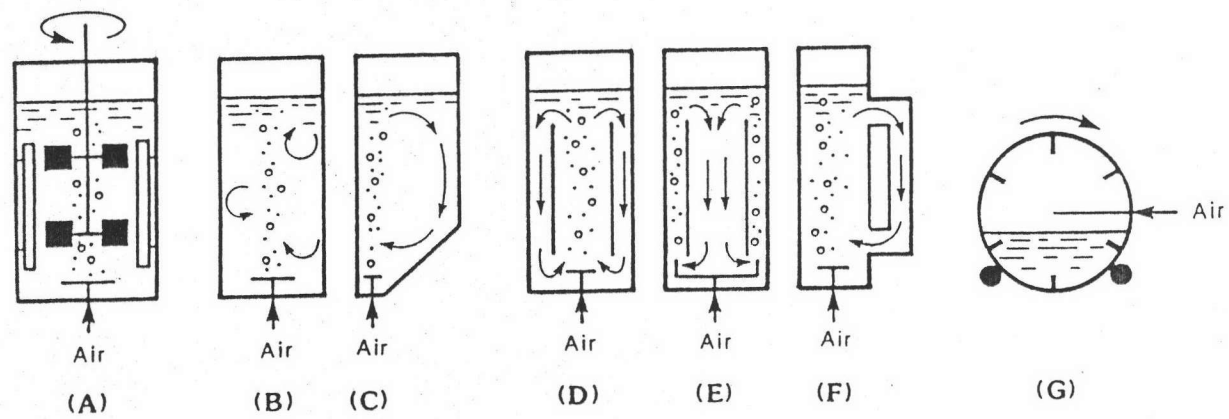
1.7.4 ความหมายและคุณสมบัตินี้ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift (Onken และ Wiedland, 1983)

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้สำหรับการหมักแบบให้อากาศ (aerobic fermentation) ออกแบบให้เพิ่มการขนถ่ายมวล (mass transfer) ระหว่างของเหลวและอากาศโดยการเพิ่มพื้นที่ระหว่างผิวสัมผัส (interfacial area) ด้วยการกระจายฟองอากาศไปสู่บริเวณของเหลว (liquid phase) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air lift ใช้หลักการเดียวกันกับแบบ Bubble column โดยพ่นอากาศจากหัวพ่นซึ่งอาจเป็นแบบ nozzle หรือแบบ perforate plates จากด้านล่างของถังปฏิกรณ์ ฟองอากาศจะกระจายเข้าสู่ของเหลว และลอยขึ้นสู่ผิวของเหลวด้านบนของถังปฏิกรณ์ด้วยความเร็วแล้วแต่อัตราการให้อากาศ ด้วยแรงยกตัวของฟองอากาศทำให้ของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ไหลเวียนเกิดการกวนและการผสม แต่แบบ Air-lift ต่างจากแบบ Bubble column ตรงที่แบบ Bubble

ตารางที่ 6 . ความแตกต่างระหว่างเซลล์พืชแขวนลอยกับเซลล์จุลินทรีย์ (Scragg และคณะ, 1987)

Feature	เซลล์จุลินทรีย์	เซลล์พืชแขวนลอย	Consequence for plant cell culture
Size	1-10 μm in length	40-100 μm in length	rapid sedimentation; possibly shear sensitivity
Individual cells	often	infrequently, mostly aggregates	rapid sedimentation; micro-environment; low viscosity
Growth rate	rapid, doubling times of hours	slow, doubling times of days	long culture runs; increased danger of infection
Aeration	high requirement for aerobic processes	low requirement	oxygen supply not critical, can use low K_{La} bio-reactors
Shear sensitivity	mostly insensitive	sensitive	slow stirrer speeds; alternative stirrer designs; use of air-lift bio-reactors
Product formation	often into medium	into vacuole	cells require harvesting and extraction





รูปที่ 5 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอย

ตารางที่ 7 ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช (Taticek และคณะ, 1991)

ชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	ปริมาณการผลิต (l)	ชนิดของพืช
STR	7.15	<i>D. carota</i>
STR	20	<i>N. tabacum</i>
STR	5000	<i>C. roseus</i>
STR	15500	<i>N. tabacum</i>
STR with spiral impeller	20	<i>C. blumei</i>
STR with cell-lift impeller	2.5	<i>P. elliotii, G. max</i>
STR with combined membrane aerator and agitator	20	<i>T. rugosum</i>
Bubble column	20. 30. 130.	<i>Gingo, Lolium</i>
Bubble column	65. 1500	<i>N. tabacum</i>
Slanted bottom bubble column	1. 10	<i>E. californica</i>
External loop airlift	10. 30. 85	<i>C. roseus</i>
Draught-tube airlift	20. 210	<i>D. lanata</i>
Rotating drum	1-4	<i>V. rosea</i>
Annular-vortex membrane	2.2	<i>B. vulgaris</i>

ตารางที่ 8 ข้อดีและข้อเสียของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift และแบบที่ใช้ใบพัดในการ
เพาะเลี้ยงเซลล์พืช (Pareillenx, 1988)

Feature	Airlift reactor	Stirred reactor
Davice	Simple	More effective
Mixing	Correct:problem at high cell density	Efficient
Hydordynamic shear forces	Low	High
Oxygen transfer	Correct:at high cell density often insufficient in large volumes	Efficient even at high cell density
Overventilation	Possible and frequent	Not frequent
Scaling	Up to medium volumes	Up to high volumes

column จะเกิดกระแสของไหลอย่างไรก็ตาม (random flow) ทำให้ความเร็วของของเหลวสูง แต่ความเร็ว superficial ต่ำหรือเป็นศูนย์ ในขณะที่แบบ Air-lift การไหลของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์จะไปในทางเดียวกัน (uniform flow) และการไหลเวียนของของเหลวจะเป็นวง (loop) ด้วยความเร็ว superficial สูง เกิดขึ้น จากความแตกต่างของความดันของของเหลว (hydrostatic pressure ระหว่างการยกตัวขึ้น (riser) ของของเหลวที่ได้รับอากาศ (aerated liquid) กับการไหลลง (downcomer) ของของเหลวที่ไร้อากาศ (degassed liquid) เนื่องด้วยของเหลวไหลอย่างมีทิศทางที่แน่นอน ทำให้เซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไหลเวียนเป็นวงผ่านบริเวณจำเพาะ (individual zone) ต่าง ๆ ของถังปฏิกรณ์ในจังหวะเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ เพราะฉะนั้นเซลล์แต่ละเซลล์จะได้รับผลจากความไม่ต่อเนื่องของสภาวะแวดล้อม (inhomogeneous environmental condition) ภายในถังปฏิกรณ์เหมือนกัน ดังนั้นสภาวะทางกายภาพ (physical condition) ในแบบ Air-lift จึงขึ้นกับขนาดของตัวถังซึ่งมีกฎเกณฑ์ที่ตายตัว (defined lines) ต่างไปจากแบบ Bubble column ด้วยคุณลักษณะนี้ การขยายส่วนของถังปฏิกรณ์แบบ Air-lift จึงง่ายและปลอดภัยกว่า

1.7.5 การใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยระดับขยายส่วน

Wagner และ Vogelmann (1977) ได้เปรียบเทียบการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่าง ๆ ในการเลี้ยงเซลล์ *Morinda citrifolia* เพื่อผลิตสาร anthraquinones พบว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ให้ผลผลิตของ anthraquinone สูงกว่าในระดับขวดเขย่า (shake flask) ประมาณ 30 % และสูงกว่าถังปฏิกรณ์ชนิด flat-blade turbine และ draft tube with turbine ถึง 2 เท่าและพบว่า การเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์แบบใช้ใบพัดทำให้เซลล์แตก (cell lysis) ได้ง่ายในการผลิต indole alkaloid จากเซลล์ *Catharanthus roseus* ก็ให้ให้ผลเช่นเดียวกันคือการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ใบพัดให้ผลผลิตต่ำ ส่วนแบบ Air-lift ให้ผลผลิตเท่ากับระดับขวดเขย่า ทั้งนี้เพราะแบบ Air-lift ให้การผสมที่ดีและมีแรงเฉือน (shear force) น้อยด้วยคุณสมบัติถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift จึงเป็นที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เพื่อการผลิตสารทุติยภูมิในพืชหลายชนิด เช่น *Berberis wilsonae* ในการผลิตสาร alkaloid (Breuling และคณะ, 1985) *Coleus forskohlii* ในการผลิต forskolin (Mersinger และคณะ, 1988) และ *Digitalis lanata* ในการเปลี่ยน digitoxin เป็น deacetylanatoside C เป็นต้น

สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เพื่อผลิตสารแอนโธไซยานินในระดับขยายส่วน Yamamoto (1989) ได้ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ jar ขนาด 14 ลิตร เพื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ของ

Euphorbia millii ผลิตสารแอนโธไซยานินแต่ให้ผลการผลิตต่ำกว่าในระดับขวดเขย่าถึง 4 เท่า ถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเพื่อผลิตแอนโธไซยานินในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

พนา โลหะทรัพย์ทวี (พนา, 2532) ทำการคัดเลือกพืชไช้เน่า *Vitex glabata* ที่ผลิตสารสีแดงโดยวิธีการกระจายเซลล์บนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็ง และเมื่อทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสีแดงที่สกัดได้จากเซลล์หลายประการ เช่น สมบัติทางเคมี รูปแบบของการดูดกลืนแสงและการเคลื่อนที่ของสารโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ พบว่าสารดังกล่าวมีสมบัติใกล้เคียงกับสารประกอบแอนโธไซยานิน งานวิจัยจึงตั้งวัตถุประสงค์ของการผลิตสารแอนโธไซยานินด้วยเซลล์พืชไช้เน่าเพาะเลี้ยง โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลกระทบต่อการเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไช้เน่าเพาะเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยและทำการคัดเลือกเซลล์ที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงขึ้น พร้อมทั้งขยายระดับการผลิตโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ดังนี้

1. คัดเลือกเซลล์พืชไช้เน่า (*V. glabrata*) ที่ผลิตสารแอนโธไซยานินโดยวิธีการกระจายเซลล์บนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็ง
2. ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไช้เน่าแบบแขวนลอยระดับขวดเขย่า
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ขนาด 3 ลิตร