การผลิตสีแอนโธไซยานิน จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า *Vitex glabrata* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

นางสาวกนกวรรณ รัตนสโนบล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2536

ISBN 974-583-149-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019594 I16273655

ANTHOCYANIN PRODUCTION FROM SUSPENSION CELL CULTURES OF *Vitex glabrata* IN AIR-LIFT BIOREACTOR

Miss Kanokwan Ratanasanobon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduated School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-149-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตสีแอนโธไซยานินโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า *Vitex glabrata* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift
โดย	นางสาว กนกวรรณ รัตนสโนบล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณพยัคฆ์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กนกวรรณ รัตนล่โนบล : การผลิตสีแอนโธไซยานินโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่า Vitex glabrata ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift (ANTHOCYANIN PRODUCTION FROM SUSPENSION CULTURES OF Vitex glabrata IN AIR-LIFT BIOREACTOR) อ.ที่ปรึกษา รศ.ดร.สัณห์ พลิชยกุล, ศ.ดร.สัมศักดิ์ ด่ารงเลิศ, 133 หน้า ISBN 974-583-149-2

การศัดเลือกล่ายพันธุ์ที่ล่ามารถผลิตสีแอนไซยานินได้สูงจากเซลล์แขวนลอยที่ได้จากแคลลัสส่วนต้นของพืชไข่เน่า (Vitex glabrata) ผลจากอาหารสูตรพื้นฐานได้แก่ MS และ B5 ต่อการผลิตสีแอนโธไซยานินพบว่า อาหารสูตร B5 เล่ริมด้วย BA (Benzyladenine) 2 mg/l และ 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid) 1 mg/l และน้ำตาลซูโครส 3% ชักน่าให้มีการผลิตสีเพิ่มเป็น 3 เท่าของอาหารครึ่งสูตร MS ในการหาปริมาณของธาตุอาหารหลักที่เหมาะสมต่อการผลิตสีแอนโธไซยานินพบว่า ปริมาณฟอสเฟต 20 mg/l, ปริมาณไนโตรเจนรวม 15 mM (อัตรส่วนของแอมโมเนียมต่อไนเตรตเท่ากับ 1:5), ปริมาณแคลเซียม 600 mg/l และการเพิ่ม 2, 4-D เป็น 2 mg/l รักษาระดับของ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงด้วย 5 mM MES (2(N-Morpholino) ethanesulfonic acid) ท่าให้อาหารสูตรการผลิตผลิตสีแอนโธไซยานินได้สูงกว่าอาหารสูตร B5 3 เท่า ขบวนการผลิตสีแอนโธไซยานินด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่ควบคุมสภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 VVM จะให้ผลผลิตของแอนโธไซยานิน 76.67 หน่วย ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ที่อุณหภูมิ 20 °ซ. ภายใต้ความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C226450 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: Vitex glabrata, SUSPENSION CULTURE, PRODUCTION MEDIUM, AIR-LIFT BIOREACTOR

KANOKWAN RATANASANOBON : ANTHOCYANIN PRODUCTION FROM SUSPENSION CULTURES OF *Vitex glabrata* IN AIR-LIFT BIOREACTOR. THESIS ADVISOR: ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D., PROF. SOMSAK DAMRONGLERD, Ph.D., 135 pp. ISBN 974-583-149-2

The high anthocyanin production clones of *Vitex glabrata* were isolated from suspension cultures which was initiated from stem piece calluses. The effect of basal media, half strength MS and B5, was tested for enhancement of anthocyanin production. B5 medium with 2 mg/l BA and 1 mg/ml 2,4- D in the presence of 3% sucrose can induce 3 folds higher anthocyanin production in comparison to the MS medium.

Optimization of individual concentration of medium components including; 20 mg/ml phosphate, 15 mM nitrogen content (1:5 ammonium to nitrate ratio), 600 mg/l $CaCl_2$ and the increment of 2,4- D concentration up to 2 mg/l were obtained for high production of anthocyanin. The pH level of the cultivated culture was maintained by 5 mM MES (2(N-Morpholino) ethanesulfonic acid). The production medium can produce 3 folds amount of anthocyanin in comparision to the B5 medium.

The process of anthocyanin production by using this novel plant cell suspension culture was investigated by using the air-lift reactor, maintained with the 0.3 VVM air rate. The yields of anthocyanin per gram dry weight at 25 ^{o}C under the 2000 lux light exposure for 16 hours were 76.67.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สัณห์ พณิชยกุล และศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ เป็นอย่างสูง ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาให้ความช่วยเหลือคำแนะนำในการวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ หรรษา ปุณณพยัคฆ์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นและให้โอกาสแก่ข้าพเจ้าในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณท่านคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีวเคมี และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์ต่องานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณช่างเทคนิคของภาควิชาเคมีเทคนิคโดยเฉพาะคุณสังข์ ชมชื่นในการจัดสร้างอุปกรณ์ต่าง ๆ ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพและเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความสนับสนุนทางด้านสารเคมี อุปกรณ์ ตลอดจนเอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ข้าพเจ้าของกราบขอบพระคุณบิดามารดาของข้าพเจ้า ที่ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ กำลังใจและกำลังทรัพย์ อันมีค่ายิ่งต่อข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ในช่วงเวลาที่รีบเร่งยามนี้ ข้าพเจ้ากลับพบช่วงเวลาที่วิเศษที่สุดในชีวิตด้วยความช่วยเหลือของพี่ เพื่อน และน้อง ๆ ทุกคน ทั้งกำลังใจ กำลังกาย ความคิด และบางทีทุนทรัพย์ ทำให้ต้องอดนอนติดต่อกันหลายวัน กลับบ้านดึก ขาดงานมา หรือเลียเวลาทำงานวิจัยเพื่อช่วยงานทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้เสร็จ เกินคำกล่าวว่า ขอบคุณ แต่จะเป็นความทรงจำที่ดีที่สุดไปตลอดชีวิตของข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ ถ้าขาดความช่วยเหลือ และแรงกระตุ้น จากบุคคลกลุ่มนี้ข้าพเจ้าคงไม่ขอจบในปีการศึกษานี้แน่นอน ขอขอบพระคุณ ครอบครัวโชติศคิธร และขอบคุณ ฝน ปวีณา พงษ์ดนตรี

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ญ
สารบัญรูป.....ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....ฒ
บทที่
1. บทนำ.....1
1.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของแอนโธไซยานิน.....1
1.2 ความสำคัญของการใช้สีจากธรรมชาติในอุตสาหกรรม.....3
1.3 ความสำคัญของแอนโธไซยานินในการใช้เป็นสารให้สีจากธรรมชาติ.....6
1.4 ข้อได้เปรียบของการใช้เซลล์และเนื้อเยื่อพืชเพาะเลี้ยง เพื่อการผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ.....12
1.5 การผลิตสีแอนโธไซยานินจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์ของพืช.....14
1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินในเซลล์พืชเพาะเลี้ยง...14
1.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยในระดับขยายส่วน โดยการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....20
2. วิธีการทดลอง.....31
2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....31
2.1.1 อุปกรณ์.....31
2.1.2 สารเคมี.....32
2.2 แคลลัสพืชไข่เน่าที่ใช้ในการทดลอง.....35
2.3 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า.....35
2.4 สภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า.....36
2.5 การเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่า....36
2.6 การกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง.....36
2.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชไข่เน่าในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า.....37
2.8 การวัดการเจริญของเซลล์พืชโดยวิธีหาน้ำหนักแห้ง.....37
2.9 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโธไซยานิน.....37
2.10 การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift.....38

3. ผลการทดลอง.....42
3.1 สมบัติและลักษณะของเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าโคลน PNA3.....42
3.2 การคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงด้วยวิธีการกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงในจานอาหารเพาะเลี้ยง.....42
3.3 การศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชแขวนลอย
3.3.1 ความเสถียรของเซลล์พืชไข่เน่าผลิตแอนโธไซยานินได้สูง...52
3.3.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงในที่มีแสงและไม่มีแสง.....56
3.3.3 สภาวะการให้อากาศและการเขย่า (ระดับขวดเขย่า).....56
3.4 การศึกษาอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย.....60
3.5 การศึกษาอายุและปริมาณของเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย.....60
3.6 การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งต้นคาร์บอน.....67
3.7 การศึกษาปริมาณฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอนโธไซยานินในเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย.....72
3.8 การศึกษาปริมาณไนโตรเจนรวมและอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมและไนเตรตที่เหมาะสม.....72
3.9 การศึกษาปริมาณของไอออนที่เหมาะสม
3.10.1 แคลเซียม.....75
3.10.2 เหล็ก.....80
3.10 การศึกษาชนิดและอัตราส่วนของฮอร์โมนพืช.....80
3.11 ศึกษาผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน....88
3.12 ศึกษาผลของการใช้สารบัฟเฟอร์ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลง.....91
3.13 การผลิตแอนโธไซยานินด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชไข่เน่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่สภาวะการให้อากาศ 0.3 vvm.....94
4. บทวิจารณ์และสรุป.....100
เอกสารอ้างอิง.....116
ภาคผนวกที่
1. อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์พืชสูตร Murashige and Skoog.....125
2. อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์พืชสูตร B5.....126
3. อาหารเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่า J-B5.....127

4. การเตรียม Stock MS.....128
5. การเตรียม Stock B5.....129
6. การย้อมเซลล์พืชเพื่อศึกษาความมีชีวิตด้วยฟลูออเรสซีนไดอะซีเตท.....130
7. การวัดปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย.....131
8. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่วิเคราะห์ด้วยวิธี 3, 5 dinitrosalicylic acid.....132
9. กราฟค่ามาตรฐานระหว่างหน่วย vvm กับสเกลบน Rotameter.....133
10. การคำนวณหาปริมาณเซลล์ยูนิต โดยใช้ haemacytometer.....134
ประวัติผู้เขียน.....135

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ช่วงค่าการดูดกลืนแสงของฟลาโวนอยด์.....5
ตารางที่ 2 สีที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา.....7
ตารางที่ 3 สีธรรมชาติที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศอื่น ๆ ยกเว้นสหรัฐอเมริกา.10
ตารางที่ 4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแอนโทไซยานินจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืช.....15
ตารางที่ 5 การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยในระดับขยายส่วนโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....22
ตารางที่ 6 ความแตกต่างระหว่างเซลล์พืชแขวนลอยกับเซลล์จุลินทรีย์.....25
ตารางที่ 7 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช.....27
ตารางที่ 8 ข้อดีและข้อเสียของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift และแบบที่ใช้ใบพัดในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช.....28
ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของการเกิดโคโลนีและเปอร์เซนต์ของการเกิดโคโลนีเหลืองและแดงของการัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงครั้งที่ 1 โดยวิธีการกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็ง ใช้เซลล์ยูนิตต่อจานเพาะเลี้ยงเท่ากับ 0.99×10^5.....47
ตารางที่ 10 การผลิตแอนโธไซยานินของโคลนทั้ง 7 ที่ได้คัดเลือกไว้จากการคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงครั้งแรก.....49
ตารางที่ 11 ประสิมธิภาพของกาเกิดโคโลนีและเปอร์เซนต์การเกิดโคโลนีสีเหลืองและแดงของการคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตแอนโธไซยานินได้สูงครั้งที่ 2 โดยวิธีการกระจายเซลล์เกาะกลุ่มลงบนอาหารเพาะเลี้ยงกึ่งแข็ง ใช้เซลล์ยูนิตต่อจานเพาะเลี้ยงเท่ากับ 0.96×10^5.....51

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างพื้นฐานของแอนโธไซยานิดินและแอนโธไซยานิน	1
2	โครงสร้างของแอนโธไซยานินทั้ง 4 รูปแบบ	2
3	คุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารประกอบฟลาโวนอยด์	4
4	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบ "carboy" ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอยครั้งแรก	21
5	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชแขวนลอย	26
6	ขนาดและลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-liftที่ใช้ในการทดลอง	33
7	การถ่ายเซลล์เริ่มต้นลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift	40
8	แคลลัสของพืชไข่เน่าโคลน PNA3 เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร 1/2MS เสริมฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. อายุ4สัปดาห์ ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน	43
9	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20เท่า แสดงลักษณะเซลล์ของแคลลัสพืชไข่เน่าโคลน PNA3 อายุ 4 สัปดาห์	44
10	การเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่า PNA3 ในอาหารสูตร 1/2MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน	45
11	โคโลนีของเซลล์พืชไข่เน่า ซึ่งเกิดจากการกระจายเซลล์ในจานอาหารเพาะเลี้ยง ภายในเวลา 1 เดือน	46
12	การเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าโคลน PNA3(I20) ในอาหารสูตร 1/2MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน	50
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	53
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	54
15	ความเสถียรในการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าโคลน PNA(120113) เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยในอาหาร B5 เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน	55
16	การเจริญและการผลิตสารแอโทไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2	

2,4-D มก./ล. และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบมีแสงและไม่มีแสง...57

17 การเจริญของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบการให้อากาศและการเขย่าแตกต่างกัน (ระดับขวดเขย่า).....58

18 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MS เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบการให้อากาศและการเขย่าแตกต่างกัน (ระดับขวดเขย่า).....59

19 การเจริญและการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร 1/2 MSและB5 เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....61

20 การเจริญของเซลล์แขวนลอยที่มีอายุของเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ในอาหาร B5เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....63

21 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยที่มีอายุของเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ในอาหาร B5เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....64

22 การเจริญของเซลล์แขวนลอยที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ในอาหารB5เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....65

23 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยที่มีปริมาณของเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ในอาหาร B5เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....66

24 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล. ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....68

25 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีแหล่งต้นตอคาร์บอนต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน 69

26 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนความเข้มข้นต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....70

27 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีซูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนความเข้มข้นต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล และ BA 1 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....71

28 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของฟอสเฟตต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน

2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....73

29 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของฟอสเฟตต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....74

30 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหาร B5 ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนรวมและอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมต่อไนเตรตต่างกันโดย $N(NH_4^+ : NO_3^-)$;N = ความเข้มข้นรวมของไนโตรเจน , NH_4^+ = ความเข้มข้นของแอมโมเนียม, NO_3^- = ความเข้มข้นของไนเตรตในหน่วย mM เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน.....76

31 การผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหาร B5 ที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนรวมและอัตราส่วนระหว่างแอมโมเนียมต่อไนเตรตต่างกันโดย $N(NH_4^+ : NO_3^-)$;N = ความเข้มข้นรวมของไนโตรเจน , NH_4^+ = ความเข้มข้นของแอมโมเนียม , NO_3^- = ความเข้มข้นของไนเตรตในหน่วย mM เพาะเลี้ยงที่สภาวะมาตรฐาน.....77

32 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของแคลเซียมต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....78

33 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของแคลเซียมต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....79

34 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของเหล็กต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....81

35 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีปริมาณของเหล็กต่างกัน เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....82

36 การเจริญของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีชนิดของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่างกัน โดยอัตราส่วนระหว่างออกซินต่อไซโตไคนินเท่ากับ 1:2 ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....83

37 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยในอาหารB5ที่มีชนิดของฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินต่างกันโดยอัตราส่วนระหว่างออกซินต่อไซโตไคนินเท่ากับ 1:2 ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....85

38 การเจริญของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร B5 ที่มีความเข้มข้นในอัตราส่วนของ BA และ 2,4-D ในหน่วย มก./ล. แตกต่างกันในสภาวะการเพาะเลี้ยงมาตรฐาน.....86

39 การผลิตแอนโธไซยานินของเซลล์แขวนลอยพืชไข่เน่าในอาหารสูตร B5 ที่มีความเข้มข้นในอัตราส่วนของ BA และ 2,4-D ในหน่วย มก./ล. แตกต่างกัน ในสภาวะการเพาะเลี้ยง

มาตรฐาน.....87

40 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน(production medium) ต่อการเจริญของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย.....89

41 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน(production medium) ต่อการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย.....90

42 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน(production medium) ที่ใช้สารบัฟเฟอร์MES ต่อการเจริญและ pH ของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย.92

43 ผลของอาหารเพาะเลี้ยงสูตรดัดแปลงเพื่อการผลิตแอนโธไซยานิน(production medium) ที่ใช้สารบัฟเฟอร์MES ต่อการผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย.....93

44 การเจริญของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยในอาหารสูตรB5เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-liftที่สภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 vvm.....

45 การผลิตสารแอนโธไซยานินของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยในอาหารสูตรB5 เสริมด้วยฮอร์โมน2,4-D 1 มก./ล.และ BA 2 มก./ล.ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-liftที่สภาวะการให้อากาศเท่ากับ 0.3 vvm.....

46 แสดงลักษณะการติดตามผนังถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ของเซลล์แขวนลอย.....

47 แสดงลักษณะการไม่ไหลเวียนของของเหลวภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift ที่เกิดจากการอุดตันโดยเซลล์แขวนลอย.....

คำย่อ

มก./ล.	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
มล.	=	มิลลิลิตร
°ซ	=	องศาเซลเซียส
นน.แห้ง	=	น้ำหนักแห้ง
MS	=	Murashige and Skoog
B5	=	Gamborg
2, 4-D	=	2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid
NAA	=	naphthalene acetic acid
IAA	=	indole acetic acid
BA	=	Benzyladenine
MES	=	2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid
A	=	Absorbance
mM	=	มิลลิโมลาร์
vvm	=	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที
%	=	เปอร์เซนต์