บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันนี้มีผู้ให้ความสนใจสีผสมอาหารและผลิตภัณฑ์ที่มาจากแหล่งธรรมชาติกันมากขึ้น ทั้งนี้จะเห็นได้จากจำนวนสีผสมอาหารที่ขึ้นทะเบียนในช่วง ค.ศ.1969-1984 เป็นสีผสมอาหารที่มาจากแหล่งธรรมชาติถึง 356 ชนิด (Francis.1989) เนื่องจากผู้บริโภคเริ่มคำนึงถึงความปลอดภัยจากอาหารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากการค้นคว้าวิจัยพบว่าสีอนินทรีย์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีที่นำมาผสมอาหารบางชนิด ก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคที่เกิดจากพิษ โลหะหนักที่ปลอมปนอยู่กับสีผสมอาหาร จึงมีการแสวงหาสารต่าง ๆ จากพืช ซึ่งเป็นแหล่งผลิตสารเคมีที่มีคุณค่าสำคัญต่อมนุษย์มาช้านานเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ ปัจจุบันมีการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชในระดับอุตสาหกรรม ประกอบกับความก้าวหน้าทางเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์พืชเพาะเลี้ยง สามารถผลิตสารเคมีในภาพสารทุติยภูมิซึ่งมีความซับซ้อนทางด้านโครงสร้างและการสังเคราะห์ให้ได้สูงกว่า และมีข้อได้เปรียบกว่าต้นพืชตามธรรมชาติเนื่องจากเซลล์พืชเพาะเลี้ยงจะมีอัตราการเจริญเร็วกว่า สำหรับแอนโธไซยานินเป็นรงควัตถุชนิดหนึ่ง ซึ่งพบทั่วไปตามส่วนต่างๆ ของพืช ทั้งในผัก ผลไม้ และดอกไม้ สารกลุ่มนี้ให้คุณค่าทางอาหารเสริมสุขภาพและเภสัชเวช เช่น ให้ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดปริมาณคลอเลสเตอรอล และต่อต้านการเกิดมะเร็ง (กนกพร. 2545) สารประกอบพวกแอนโธไซยานินมีหลายชนิด เช่น pelargonidin ให้สีส้ม cyanidin ให้สีแดง delphinidin ให้สีม่วง (โสระยา, 2544) ซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาด แต่มีข้อเสียเนื่องจากไม่มีความคงตัวทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก พบปริมาณสารน้อย และแหล่งให้สียังไม่เหมาะสม

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงในการหาแหล่งของสีธรรมชาติเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวโดยอาศัยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งได้มีรายงานการผลิตสารสีธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ในองุ่น (*Vitis vinifera*) (Nagamori *et al.*, 2001), สตรอเบอรี (*Fragaria ananassa*) (Sato *et al.*, 1996), แครอท (*Daucus carota*) (Narayan and Venkataraman, 2002), *Aralia cordata* Thunb. (Sakamoto *et al.*, 1994), radish (*Raphanus sativus*) (Hara *et al.*, 2003), sweet potato (*Ipomoea*

batatas L.) (KoncZak-Islam *et al.*, 2002), *Vaccinium pahalae* (Meyer *et al.*, 2002) และ *Hyoscyamus muticus* L. (Basu and Chand,1996) แต่ก็ยังมีอุปสรรคในเรื่องปริมาณสารที่ผลิตได้ สำหรับปริมาณการสร้างสารดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อเทียบกับสภาพธรรมชาติแล้วมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ในทางปฏิบัติการคัดเลือกสายพันธุ์เซลล์ที่มีความสามารถในการสร้างสารดังกล่าวสูง ต้องอาศัยเซลล์ที่มีการผลิตสารในปริมาณสูงร่วมด้วยวิธีการสกัดที่เหมาะสม ซึ่งมีความจำเป็นในการผลิตเป็นการค้าที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ กุหลาบมอญเป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่ให้สารแอนโธไซยานินตามธรรมชาติ จึงทำการศึกษาศักยภาพในการผลิตแอนโธไซยานินจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อเพิ่มจำนวนและชักนำให้มีการสังเคราะห์แอนโธไซยานินในปริมาณเพิ่มขึ้น สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตแอนโธไซยานินในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

การตรวจเอกสาร

กุหลาบมอญ (Damask Rose *Rosa damascena* Mill.) อยู่ในวงศ์ Rosaceae เป็นพืชที่คนไทยรู้จักกันมานาน สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่นและร้อนชื้น มีจุดเด่นคือ อายุยืน ออกดอกตลอดปี เป็นพืชที่มีกลิ่นหอม ไม่เป็นพิษต่อการนำมาใช้ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อการอุปโภคและบริโภคได้หลากหลาย เช่น นำกลีบดอกมาแต่งกลิ่นอาหาร ทำเครื่องสำอาง ใช้กลั่นเพื่อผลิตน้ำมันหอมระเหย ใช้ผลิตเครื่องหอม ดอกแห้งนำมาทำเป็นยา เช่น บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย สำหรับผลกุหลาบซึ่งเป็นแหล่งของวิตามินซี และ flavonoids ใช้ทำเป็นแยมหรือเยลลี่และน้ำผลไม้ได้ (สุธานิธิ์, 2538)

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-2 เมตร ตามลำต้นกิ่งก้าน มีหนามแหลมงุ้มสีเขียว หรือสีน้ำตาลอ่อน มีใบย่อย 5-7 ใบ ที่ก้านมีหูใบ ชนิดของใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ใบจัดเรียงตัวแบบสลับ ลักษณะใบรูปไข่กว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 3-5 เซนติเมตร ปลายแหลม โคนใบมน ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย มีสีเขียวเข้มถึงสีเทา ดอกบานเป็นรูปถ้วยขนาด 4.5-7 เซนติเมตร กลีบดอกเรียงซ้อนกันหลายชั้น (ภาพที่ 1) เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรตัวผู้ และตัวเมียจำนวนมาก ดอกมีสีชมพูหรือสีแดง มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ ก้านดอกสั้น ดอกมีกลิ่นหอม บานอยู่ได้หลายวัน ออกดอกตลอดปี

ลักษณะผลเป็นรูปไข่ เมื่อสุกจะมีสีแดงขนาด 1.5-2 เซนติเมตร เมื่อผลแห้งเมล็ดร่อน และมีเมล็ดจำนวนมาก (ปิยะ, 2540)

2. แอนโธไซยานิน

แอนโธไซยานินจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งเป็นรงควัตถุชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในพืช แอนโธไซยานินมีผลทำให้เกิดสีแดง สีส้ม สีน้ำเงิน ไปจนถึงสีม่วง พบได้ทั่วไปทั้งในผัก ผลไม้ และดอกไม้ เช่น กะหล่ำปลีสีม่วง สตรอเบอรี บลูเบอรี ดอกกระเจี๊ยบแดง ดอกกุหลาบ เป็นต้น (สันติ, 2534) พบได้ทั้งในดอก ผล ใบ ลำต้น และราก (Narayan and Venkataraman, 2002)แอนโธไซยานินมีบทบาทหลาย ๆ ด้านในพืช เช่น ในกลีบดอกจะช่วยล่อแมลงในการผสมเกสร นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันพืชจากการทำลายของแสงอัลตราไวโอเลตได้ด้วย และยังใช้เป็นสารอาหารสำหรับคนและสัตว์ (ลิลลี่, 2546; สันติ, 2534; กนกพร, 2545)

ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ต้น ใบ ดอก) ของกุหลาบมอญ (*Rosa damascena* Mill.)

3. ประโยชน์ของแอนโธไซยานิน

จากรายงานของมูลนิธิสุขภาพไทย (2543) ประโยชน์ของแอนโธไซยานินมีหลายประการ ดังนี้

3.1. ใช้ทำสีผสมอาหารในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติ เช่น เครื่องดื่มต่าง ๆ ทั้งชนิดที่อัดก๊าซและไม่อัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์, ไวน์, ขนม และผลิตภัณฑ์อาหารผงต่าง ๆ

3.2. ช่วยลดอาการอักเสบในทางเดินปัสสาวะโดยไปขัดขวางไม่ให้แบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการอักเสบในทางเดินปัสสาวะเกาะผนังกระเพาะปัสสาวะได้

3.3. เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของการก่อมะเร็ง ซึ่งเซลล์ร่างกายจะถูกคุกคามด้วยสารอนุมูลอิสระที่สามารถเปลี่ยน DNA ในร่างกายให้เป็นเซลล์มะเร็งได้ตลอดเวลา โดยแอนโธไซยานินจะช่วยยับยั้งการสร้างเส้นเลือดฝอยไม่ให้ไปเลี้ยงเซลล์มะเร็งได้

3.4. เป็นสารต้านโรคภูมิแพ้ชนิดต่าง ๆ

3.5. ช่วยลดการรวมตัวเป็นก้อนของเกล็ดเลือด ซึ่งทำให้เลือดมีความเข้มข้นน้อยลงได้ ป้องกันโรคหัวใจวายและอัมพฤกษ์ได้

3.6. ร่างกายสามารถใช้วิตามินซีได้มากขึ้น ถ้ามีแอนโธไซยานินอยู่ด้วย

4. คุณสมบัติทางเคมีของแอนโธไซยานิน

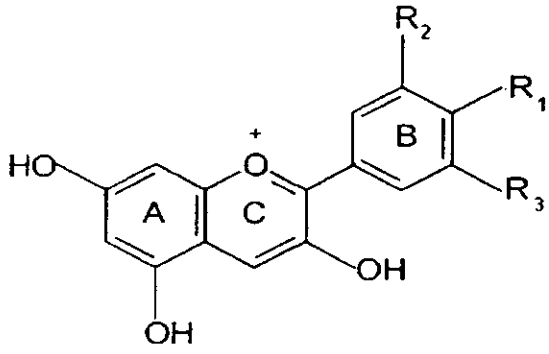
แอนโธไซยานินเป็นสารประกอบพวก flavonoids ที่ละลายใน cell sap ซึ่งสะสมอยู่ในแวคิวโอล และใน cytosol ของเซลล์พืชที่มีท่อลำเลียง เป็นรงควัตถุที่สามารถละลายได้ในน้ำและในแอลกอฮอล์ (วรรณา และคณะ, 2533) แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายประเภท non-hydroxyl เช่น อีเธอร์ อะซีโตน คลอโรฟอร์ม และเบนซีน เป็นต้น (Harborne, 1988) ในกระบวนการสังเคราะห์แอนโธไซยานินนั้นมีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น phenylalanine amonia-lyase (PAL), chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI) และ flavanone 3-hydroxylase (F3H) เป็นต้น (Martin and Gerats, 1993) รงควัตถุแอนโธไซยานินเป็นสารที่มีอิเล็คตรอนทำให้มีความว่องไวเป็นพิเศษในการทำปฏิกิริยา เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมักจะทำให้เกิดการฟอกสีของรงควัตถุ คุณสมบัติของแอนโธไซยานิน คือ มี flavylium nucleus จับกับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ปัจจุบันพบสารแอนโธไซยานิน มากกว่า 500 ชนิด แต่มีเพียง 40 ชนิดเท่านั้น ที่แสดงคุณสมบัติเป็นแอนโธไซยานิน กล่าวคือ เป็นอนุพันธ์ของ glycosylated polyhydroxyl และ

polymethoxy ของ flavylium cation (Constabel and Vasil. 1988 อ้างโดย ประสิทธิ์ 2539; Vickey and Vickey. 1981) โมเลกุลของแอนโธไซยานินประกอบไปด้วย 2 ส่วนดังนี้

1. แอนโธไซยานิดิน เป็น aglycone ที่ไม่เชื่อมต่อกับหมู่น้ำตาล มีชื่อเรียกแตกต่างกันตามตำแหน่งการเติมหมู่ hydroxyl และ methyl ที่วงแหวนบี (B-ring) ซึ่งแอนโธไซยานิดินประกอบด้วยวงแหวน 3 วง คือ วงแหวนเอ (A-ring) วงแหวนบี (B-ring) และวงแหวนซี (C-ring) (ภาพที่ 2)

2. สารร่วมเกาะกับแอนโธไซยานิดิน (anthocyanidin conjugate) ปกติสารแอนโธไซยานิดินจะอยู่ในรูป conjugate form กับกลุ่มของน้ำตาล จึงทำให้สารแอนโธไซยานินมีคุณสมบัติละลายน้ำได้และสะสมในแวคิวโอลของเซลล์แก่ ซึ่งหมู่น้ำตาลที่มาเกาะมีมากกว่า 200 ชนิด แต่ชนิดที่เป็นไซยานิดิน (cyaniding) มีอยู่ประมาณ 40 ชนิด

แอนโธไซยานินที่สำคัญ ที่ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 และมีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันดังภาพที่ 3



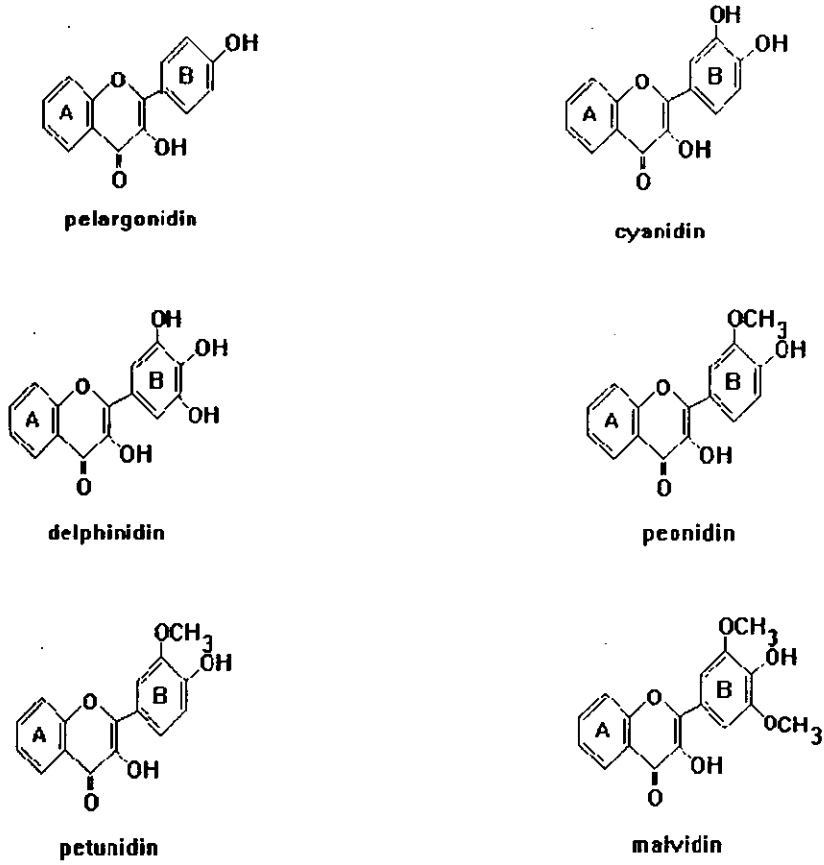
ภาพที่ 2 โครงสร้างหลักของแอนโธไซยานิน

ที่มา : Francis (1989)

ตารางที่ 1 ชนิดแอนโธไซยานินและตำแหน่งการเติมหมู่ hydroxyl และหมู่ methyl

ชนิดแอนโธไซยานิน	ตำแหน่งการเติมหมู่ hydroxyl และหมู่ methyl		
	R_1	R_2	R_3
pelargonidin	-OH	-H	-H
cyanidin	-OH	-OH	-H
delphinidin	-OH	-OH	-OH
peonidin	-OH	$-OCH_3$	-H
petunidin	-OH	$-OCH_3$	-OH
malvidin	-OH	$-OCH_3$	$-OCH_3$

ที่มา : Francis (1989)



ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของแอนโธไซยานินชนิดต่าง ๆ

ที่มา : Francis (1989)

5. การสังเคราะห์แอนโธไซยานินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

มีพืชมากกว่า 27 ชนิด ที่มีศักยภาพในการผลิตสารแอนโธไซยานินโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น กระเจี๊ยบแดง องุ่น china ester เป็นต้น (ตารางที่ 2) สามารถแบ่งตามชนิดของแอนโธไซยานินได้แก่ ไซยานิดิน (cyaniding) พบในพืช 17 ชนิดม, เดลฟินิดิน (delphinidin) พบในพืช 5 ชนิด, พิทูนิดิน (petunidin) พบในพืช 3 ชนิด, มาลวิดิน (malvidin) พบในพืช 4 ชนิด, พาลาร์โกนิดิน (palargonidin) พบในพืช 2 ชนิด และ พิโอนิดิน (peonidin) พบในพืชเพียงชนิดเดียว (Constabel and Vasil, 1988; Mol, 1993 อ้างโดย ประสิทธิ์, 2539) ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าเป็น acylated anthocyanin ซึ่งมีความคงตัวสูงจึงเป็นไปได้ว่า สามารถผลิตสารแอนโธไซยานินเป็นการค้าในระดับอุตสาหกรรมได้ แต่ปริมาณที่ได้ยังน้อย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตแอนโธไซยานินนั้น พบว่า แคลลัสหรือเซลล์ส่วนใหญ่มักจะเกิดในลักษณะที่มีหลายลักษณะปะปนกัน (heterogenous) คือ พบทั้งแคลลัสหรือเซลล์ที่ผลิตสารและไม่ผลิตสารอยู่ปนกัน นอกจากนี้ Staba (1980) ได้รายงานว่า ในแคลลัสที่เกิดแอนโธไซยานินนั้น มีเซลล์ที่ผลิตแอนโธไซยานินอยู่น้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ผลิตแอนโธไซยานิน ส่วนการสะสมแอนโธไซยานินตามส่วนต่าง ๆ ของพืชพบว่า เริ่มจากบริเวณผิวเซลล์ด้านนอกก่อน เมื่อเวลานานขึ้นจึงมีการสะสมที่บริเวณเซลล์ด้านใน (Hara *et al.*, 2003) ในการเกิดแอนโธไซยานินกับการพัฒนาการของเซลล์ พบว่า การเกิดแอนโธไซยานินมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ และเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ในแครอท ทั้ง 2 กระบวนการนี้ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เช่น สารควบคุมการเจริญเติบโต แสง ระดับ pH และสารประกอบคาร์โบไฮเดรต (Ozeki and Komamine, 1981) นอกจากนี้แหล่งของไนโตรเจน ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล ก็มีผลต่อการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน (Zhang *et al.*, 1998)

ตารางที่ 2 พืชที่มีการนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตแอนโธไซยานินและชนิดของแอนโธไซยานิน

แหล่งพืช	สภาพเพาะเลี้ยง	ชนิดของสารที่พบ	อาหารเพาะเลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโต	อ้างอิง
Haplopappus gracilis	cell, callus	cyanidin	MS+2,4-D	Wellmann *et al.*(1976)
China ester (*Callistephus hinensis*)	callus	cyanidin	MS+IAA +2.4-D+NAA	Rau and Forkman (1986)
องุ่น (*Vitis hynbrida*)	cell	pelargonidin delphinidin	MS+2,4-D +kinetin	Yamakawa *et al.* (1983)
โป๊ยเซียน (*Euphorbia mill* L.)	cell	cyanidin	MS+2,4-D	Yamamoto *et al.* (1989)
กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa*	callus	cyanidin	LS+2,4-D +kinetin	Mizukami *et al.* (1989
แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*)	cell	cyanidin petunidin malvidin	MS+2,4-D	Carew (1976)
Perilla frutescens	cell	not identified	LS+2,4-D +BA	Zhong *et al.* (1991)
Aralia cordata Thunb.	cell	not identified	LS+2,4-D +kinetin	Sakamoto *et al.* (1994)

ที่มา: ดัดแปลงจาก สันติ (2534) และ ประสิทธิ์ (2539)

6. อิทธิพลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน

6.1. บทบาทของออกซิน

ออกซินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีความสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์พืช รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของเซลล์เพื่อให้เซลล์ทำหน้าที่เฉพาะอย่าง ชนิดของออกซินที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารชีวเคมี คือ IAA (Indole-3-acetic acid), NAA (Naphthaleneacetic acid), IBA (Indole-3-butyric acid) และ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) (Staba, 1980) ความเข้มข้นที่นิยมใช้ คือ 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร Matsumato และคณะ (1973) อ้างโดย ประสิทธิ์ (2539) เลี้ยงเซลล์ลูกผสมของ *Populus* ในอาหารเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0-2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรส่งเสริมการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน โดยเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงภายในของเซลล์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงระดับชีวเคมี สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้ Mizukami และคณะ (1989) รายงานการเพาะเลี้ยงแคลลัสกระเจี๊ยบแดงในอาหารสูตร LS (Linsmaier & Skoog, 1965) ที่เติมออกซิน 4 ชนิดคือ IAA, NAA, IBA และ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันคือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า 2,4-D ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสและกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์แอนโธไซยานินเพิ่มจากเดิมเป็น 30 เท่า มากกว่า ออกซินชนิดอื่น ๆ เช่นเดียวกับงานของ Sakamoto และคณะ (1994) ที่เพาะเลี้ยง *Aradia cordata* Thunb. พบว่า 2,4-D ส่งเสริมการผลิตแอนโธไซยานิน Halton และ Cornish (1995) ศึกษาการสะสมแอนโธไซยานินและกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า 2,4-D ส่งเสริมการสร้าง mRNA ที่แปลรหัสไปเป็นเอ็นไซม์ CHS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมกลไกการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน ส่วน รงควัตถุสีแดงที่ถูกสร้างขึ้นในกลุ่มเซลล์ที่มีแคลลัสสีเหลือง สีขาว หรือสีเหลืองปนเขียว เป็นผลอันเนื่องมาจากเซลล์ที่มีสีแดงไม่สามารถเจริญเติบโตได้โดยลำพัง แม้จะมีธาตุอาหารวิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตอย่างเพียงพอก็ตาม จำเป็นต้องมีเนื้อเยื่อชนิดอื่น ๆ เจริญควบคู่ไปด้วย เพราะแคลลัสสีเหลืองจะมีกลุ่มสาร carotenoid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ กระบวนการสังเคราะห์ flavonoids และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการสังเคราะห์ flavonoids จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น แอนโธไซยานิน เช่นเดียวกับในสภาพธรรมชาติ การสังเคราะห์และสะสมแอนโธไซยานินจะมีความจำเพาะเจาะจงอยู่กับตำแหน่งและชนิดของเนื้อเยื่อ อวัยวะ และเซลล์ชนิดใดชนิดหนึ่งการสังเคราะห์รงควัตถุสีแดงจะเกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อทั้งระบบ จึงทำให้การแยกเซลล์เดี่ยวมาเลี้ยงใน

หลอดทดลองเพื่อหาสายพันธุ์บริสุทธิ์ยังมีอุปสรรค เพราะเมื่อมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น กลุ่มเซลล์ใหม่ที่ได้ยังมีสีอื่นปนอยู่ การคัดเลือกในระดับแคลลัสเพื่อให้ได้เฉพาะเซลล์ที่มีลักษณะที่ต้องการยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากแคลลัสประกอบด้วยเซลล์ที่มีหลายลักษณะปะปนกัน (Stafford, 1990; Halton and Cornish, 1995; Mentell and Smith, 1986) ส่วน Masayuki และคณะ (1998) รายงานการเพาะเลี้ยงแคลลัสสตรอเบอรีในอาหารสูตร LS เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัสและกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน

6.2 บทบาทของไซโตไคนิน

ไซโตไคนินเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีความสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์พืช รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานของเซลล์ ซึ่งในอาหารที่มีไซโตไคนิน เช่น BA (benzyladenine) หรือ kinetin ส่งเสริมการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่หากใช้ร่วมกับออกซินสามารถเพิ่มการส่งเสริมการสังเคราะห์แอนโธไซยานินได้ดีกว่า (Ozeki and Komanine, 1981) Fang และคณะ (1998) รายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Vaccinium pahalae* พบว่า BA ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์และส่งเสริมการสะสมแอนโธไซยานินได้ ส่วนการศึกษาของ Yamakawa และคณะ (1983) เพาะเลี้ยงเซลล์องุ่นลูกผสม พบว่า สัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินมีผลโดยตรงต่อการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน เช่นเดียวกับ Basu และ Chand (1996) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Hyoscyamus muticus* L. พบว่า ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณแอนโธไซยานินสะสมอยู่สูงสุด โดยการสะสมแอนโธไซยานินจะไม่ปรากฏในระยะที่มีการแบ่งเซลล์ในระยะ log phase แต่จะมีการสะสมแอนโธไซยานินในระยะที่เซลล์มีการเจริญเต็มที่แล้วคือระยะ stationary phase (Ozeki, 1986; Stafford, 1990; Kim and Kim, 2002)

7. อิทธิพลของ pH ต่อการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน

pH หรือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีส่วนสำคัญในการควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาทางเจริญเติบโต และกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ โดยทั่วไประดับ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงก่อนการนึ่งฆ่าเชื้อจะอยู่ระหว่าง 5-6 และจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อนึ่งฆ่าเชื้อแล้วและ

เมื่อการเพาะเลี้ยงผ่านไประยะหนึ่ง สารอินทรีย์บางชนิดที่เติมในอาหาร เช่น น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ เคซีนไฮโดรไลเสท และกรดอะมิโนบางชนิด มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างเพาะเลี้ยง ในทางตรงข้ามหากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงไม่มีคุณสมบัติของบัฟเฟอร์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง pH อย่างรวดเร็วในระหว่างการเพาะเลี้ยง (บุญยืน, 2540; Sathyanarayana and Blake, 1994) โดย pH มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ มีผลต่อการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต การเคลื่อนย้ายธาตุอาหาร และความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง ในการสังเคราะห์แอนโธไซยานินขึ้นอยู่กับระดับ pH ภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ภายในเซลล์ได้แก่ pH ในไซโทพลาสซึม และในแวคิวโอล ซึ่งเป็นแหล่งเคลื่อนย้ายและสะสมแอนโธไซยานิน ในวิถีการสังเคราะห์แอนโธไซยานินมีเอนไซม์หลายตัวต้องการช่วง pH ระหว่าง 6-8 ซึ่งเป็นช่วงที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด นอกจากนี้ pH ภายนอกเซลล์ เช่น pH ของอาหารเพาะเลี้ยงก็มีผลต่อการนำธาตุอาหารที่จำเป็นไปใช้ประโยชน์ เช่น สภาพการเพาะเลี้ยงที่เป็นกรดจะเป็นผลดีต่อการใช้ประโยชน์ไนโตรเจนในรูปของไนเตรท แต่เมื่ออาหารอยู่ในสภาพเป็นด่างจะเอื้อประโยชน์ต่อการใช้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมอิออน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ เป็นต้น (Matsumato *et al.*, 1973 อ้างโดย ประสิทธิ์, 2539; Staba, 1980) นอกจากนี้ระดับสีของแอนโธไซยานินขึ้นอยู่กับ pH ซึ่งถ้าอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจะมีสีแดง และสีจะค่อยเปลี่ยนไปเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงินเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (พวงขวัญ และยุทธจักร, 2542)

8. อิทธิพลของน้ำตาล ต่อการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชการเติมน้ำตาลลงในอาหารเพาะเลี้ยงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงานของเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากเซลล์พืชจำเป็นต้องใช้พลังงานในกระบวนการเจริญเติบโต การพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงภาพร่างไปทำหน้าที่จำเพาะ (Mentell and Smith, 1986) น้ำตาลที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีหลายชนิดด้วยกัน คือ ซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส แลกโตส กาแลกโตส และน้ำตาลที่อยู่ในรูปแอลกอฮอล์ คือ ไกลเซอรอล ซอร์บิทอล และแมนนิทอล น้ำตาลแต่ละชนิดดังกล่าวมีองค์ประกอบและโครงสร้างที่แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อการเจริญของพืชที่แตกต่างกัน แต่ที่นิยมใช้คือน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2-3% ซึ่งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ ชนิดของน้ำตาลและระดับความเข้มข้นของน้ำตาลนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง มีหลักฐานชี้ชัดว่าการสร้าง

สารทุติยภูมิบางชนิดในเชื้อเยื่อที่เลี้ยงเป็นผลมาจากความเข้มข้นของซูโครส (รังสฤษฎ์, 2541) โดยน้ำตาลมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมติกโพเทลเชียล ค่าความเป็นกรดและด่างในอาหาร (Marino *et al.*, 1993) และน้ำตาลยังส่งเสริมการทำงานของยีนในกระบวนการสังเคราะห์แอนโธไซยานินด้วย (Hara *et al.*, 2003) ในพืชหลายชนิด พบว่า น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรทที่เหมาะสมที่สุด (Staba, 1980) เช่น ในแครอท Narayan และ Venkataraman (2002) ศึกษา น้ำตาลทั้งหมด 5 ชนิด คือ น้ำตาลซูโครส กลูโคส กาแลกโตส ฟรุคโตส และ มอลโตส ต่อการเกิดแอนโธไซยานิน พบว่า น้ำตาลซูโครสให้ปริมาณแอนโธไซยานินสูงสุด รองลงมาคือน้ำตาลกลูโคส ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันในการเพาะเลี้ยงสตรอเบอรี โดย Mori และ Sakurai (1994) รายงานว่า น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครส ส่งเสริมการสังเคราะห์แอนโธไซยานินในการเพาะเลี้ยงสตรอเบอรี ทั้งนี้นอกจากน้ำตาลจะเป็นแหล่งพลังงานให้แก่เซลล์แล้วยังสามารถนำไปใช้ในการเติมหมู่น้ำตาลให้กับสาร aglycone ในกระบวนการ glycosylation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน (Sato *et al.*, 1996) แต่หากเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลลงในอาหารเพาะเลี้ยงสูงเกินไป การเจริญเติบโตของเซลล์และการสังเคราะห์แอนโธไซยานินลดลง เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลมากเกินพอ ไปขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมโดยเกิดภาวะ osmotic effect ทำให้สมดุลของเซลล์เสียไป เมื่อความดันออสโมติกของเซลล์เปลี่ยนไปทำให้อัตราการเคลื่อนย้ายเอนไซม์และสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ช้าลงเป็นอุปสรรคต่อกระบวนการสังเคราะห์แอนโธไซยานิน (Mori and Sakurai, 1994; Do and Cormier, 1991)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ระดับ pH ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล และสารออสโมติคัมที่มีผลต่อการสังเคราะห์และการสะสมแอนโธไซยานิน ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของกุหลาบมอญ
2. เพื่อศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อการผลิตแอนโธไซยานินจากเซลล์ซัสเพนชัน