

ผลของลักษณะทางสัณฐานของ hairy root เริ่มต้น อัตราการให้อากาศ และระยะเวลา
การกวนอาหารต่อการเพาะเลี้ยง hairy root เจตมูลเพลิงแดง
ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ stirred tank

The Effects of Initial Hairy Root Morphology, Aeration Rate and Stirring Period on
Plumbago indica L. Hairy Root Culture in Stirred Tank Bioreactor

พิพัฒน์ จินันทุยา¹ ศศิวิมล จันทร์สุเทพ¹ พงศิริ เลี้ยงสกุล^{1,2} สนธิชัย จันทร์เปรม^{1,2} และ เสริมศิริ จันทร์เปรม^{1,3}
Pipat Jinuntuya¹, Sasiwimol Chansuthep¹, Pongsiri Liangsakul^{1,2}, Sontichai Chanpramee^{1,2} and Sermsiri Chanpramee^{1,3}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการขยายระบบเพาะเลี้ยง hairy root เจตมูลเพลิงแดงไปสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ stirred tank โดย hairy root ซึ่งเกิดจากการปลูกเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ K599 ถูกเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ stirred tank ขนาด 5 ลิตร ใช้อาหารเพาะเลี้ยงเหลวสูตร ½ Murashige and Skoog ที่มีซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 3 ลิตร ภายใต้สภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ปั่นกวนอาหาร 80 รอบต่อนาที และใช้ hairy root เริ่มต้นที่มีความหนาแน่น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อเพาะเลี้ยง hairy root เป็นเวลา 20 วัน พบว่า ลักษณะทางสัณฐานของ hairy root อัตราการให้อากาศ และ ระยะเวลาการกวนอาหารเพาะเลี้ยงมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมสาร plumbagin ของ hairy root ซึ่งการใช้กลุ่ม hairy root เริ่มต้นขนาดเล็กและอัตราการให้อากาศ 0.6 ปริมาตรอากาศที่ให้ต่อลิตรของอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที (vvm) ทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตสาร plumbagin ของ hairy root สูงกว่าการใช้กลุ่ม hairy root เริ่มต้นขนาดใหญ่และอัตราการให้อากาศ 0.3 vvm สำหรับระยะเวลาการกวนอาหารเพาะเลี้ยงนั้น พบว่า การกวนอาหารเพาะเลี้ยงตลอด 20 วัน ทำให้ hairy root มีการเจริญเติบโตมากกว่า แต่การผลิตสาร plumbagin น้อยกว่าการกวนอาหารเพาะเลี้ยง 16 วัน และหยุดการกวนอาหาร 4 วัน

คำสำคัญ : เจตมูลเพลิงแดง hairy root ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ stirred tank สารพลัมบาจิน

Abstract

The objective of this research was to study the scale-up of genetically transformed hairy root cultures of *Plumbago indica* L. in stirred tank bioreactor. The hairy root transformed with *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 was cultivated in 5 L stirred tank bioreactor containing 3 L of half strength Murashige and Skoog (½ MS) medium supplemented with 2% (w/v) sucrose under dark condition at 25±2 °C and stirred at 80 rpm. The initial inoculum density of hairy root was 2% (w/v). After culturing hairy root in stirred tank bioreactor for 20 days, root morphology, aeration rate and medium circulated time affected growth of hairy root and plumbagin content. Using a small root clump and 0.6 volume of air per liter of medium per minute (vvm) aeration rate gave the higher in growth and the higher in plumbagin production than using a large root clump and the aeration rate of 0.3 vvm. For medium circulated duration, the all-time stirred at 80 rpm during 20 days of culture exhibited higher hairy root growth but lower plumbagin production than 16 days stirred followed by 4 days of pause.

Keywords: *Plumbago indica* L., hairy root, stirred tank bioreactor, plumbagin

¹ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (AgBio-PERDO/CHE) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

²ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

³ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

คำนำ

สารพลัมบาจีน (plumbagin) เป็นสารทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งชนิดต่าง ๆ (Wang *et al.*, 2015) อีกทั้งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย (Sumsakul *et al.*, 2014) เชื้อรา (Gwee *et al.*, 2014) และเชื้อแบคทีเรีย (Nair *et al.*, 2016) รวมทั้งใช้เป็นยาฆ่าแมลงได้อีกด้วย (Pavela, 2013) ซึ่งสาร plumbagin นั้นมีการสะสมมากในรากของพืชวงศ์ Plumbaginaceae โดยเฉพาะเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) (Mallavadhahi *et al.*, 2002) แม้ว่าความต้องการในการใช้สาร plumbagin ทั้งในด้านศึกษาวิจัย (Jaisi and Panichayupakaranant, 2016) และด้านอุตสาหกรรมยานั้นเพิ่มมากขึ้น แต่แหล่งของสาร plumbagin ยังมีจำกัด เนื่องจากเจตมูลเพลิงแดงในธรรมชาติเติบโตได้ช้าและใช้ระยะเวลานานในการสะสมสาร plumbagin (Nayak *et al.*, 2015) นอกจากนี้ฤดูกาลและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมยังส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของสาร plumbagin อีกด้วย เนื่องจากข้อมูลของวิถีชีวสังเคราะห์ของสาร plumbagin ยังไม่สมบูรณ์ จึงทำให้การสังเคราะห์สาร plumbagin ด้วยวิธีทางเคมีไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการผลิตสาร plumbagin ในขณะนี้ (Jaisi and Panichayupakaranant, 2016)

Hairy root คือ รากพิเศษที่เกิดขึ้นบนเนื้อเยื่อพืช ภายหลังจากที่พืชถูกปลูกด้วยเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* (Georgiev *et al.*, 2007) รากชนิดนี้เจริญเติบโตได้รวดเร็วและเหมาะสมสำหรับการผลิตสารทุติยภูมิ เนื่องจากสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ปริมาณมากเมื่อเทียบกับรากปกติ เซลล์แขวนลอยและแคลลัส (Kuzma *et al.*, 2017) ปริมาณสารทุติยภูมิที่ผลิตได้มีความแน่นอน เนื่องจากราก hairy root มีความคงที่ทางพันธุกรรมสูง (Häkkinen *et al.*, 2016) การเพาะเลี้ยง hairy root เพื่อผลิตสารทุติยภูมิมีรายงานในพืชสมุนไพรหลายชนิดรวมทั้ง เจตมูลเพลิงแดง ซึ่งพบว่า hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงที่ชักนำด้วย *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ K599 สามารถผลิตสาร plumbagin ได้ปริมาณมาก ซึ่งมากกว่ารากปกติที่เพาะเลี้ยง (Tatreerod *et al.*, 2003) เซลล์เพาะเลี้ยงและแคลลัส (Chuntaratin, 2006)

ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อขยายระบบการเพาะเลี้ยง hairy root เจตมูลเพลิงแดงดังกล่าว โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) แบบ stirred tank ซึ่งเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพระบบของเหลว ประกอบไปด้วยระบบควบคุมอุณหภูมิ ระบบให้อากาศ และระบบปั่นกวอาหารเพาะเลี้ยง โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้นำผลการเพาะเลี้ยง hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงในระดับฟลาสก์จากรายงานของ ศศิวิมล และคณะ (2553) มาขยายผลต่อยอด ซึ่งพบว่าความหนาแน่นและขนาดของเนื้อเยื่อเริ่มต้นส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสาร plumbagin และยังได้ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการเพาะเลี้ยง hairy root เจตมูลเพลิงแดง เนื่องจากปริมาณอากาศส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารทุติยภูมิของ hairy root ทั้งนี้มีรายงานว่า การเพิ่มปริมาณอากาศเป็นผลให้การผลิตสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นใน hairy root ของ *Azadiracta indica* (Srivastava and Srivastava, 2012)

อุปกรณ์และวิธีการ

เนื้อเยื่อพืชที่ใช้ทดลอง

การทดลองนี้ใช้เนื้อเยื่อพืชคือ hairy root ของเจตมูลเพลิงแดงที่ได้จากงานวิจัยของ Tatreerod *et al.* (2003) โดยการกระตุ้นยอดของเจตมูลเพลิงแดงในสภาพปลอดเชื้อด้วยเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ K599 โดย hairy root นี้เพาะเลี้ยงอยู่ในอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีความเข้มข้นครึ่งเท่า ($\frac{1}{2}$ MS) และเติมซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด และเพาะเลี้ยงต่อเนื่องโดยย้ายเนื้อเยื่อลงเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมทุกเดือน (Chuntaratin, 2006)

การเพาะเลี้ยง hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เพาะเลี้ยง hairy root เจตมูลเพลิงแดงในอาหารเหลวสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติมซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ stirred tank รุ่น BEMT-T-10L ขนาดความจุ 5 ลิตร (สูง 27 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร) ของบริษัท บี อี มารูบิซี (ประเทศไทย) จำกัด โดยใช้ปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง 3 ลิตร และใช้ปริมาณเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่มีความหนาแน่น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความเร็วในการหมุนของใบพัด 80 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด เป็นเวลา 20 วัน โดยกวนอาหารเพาะเลี้ยงตลอด 20 วัน และกวน 16 วันแรก ทำการศึกษาลักษณะของขนาดเนื้อเยื่อเริ่มต้น 2 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ (กว้าง 4 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร, Figure 1A) และขนาดเล็ก ซึ่งได้จากการนำเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ตามที่จะบด้านบนมาตัดแบ่งตามแนวยาวให้เป็นชิ้นเล็กลง เป็นขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร (Figure 1B) อัตราการให้อากาศ 2 ระดับ คือ 0.3 และ 0.6 volume of air per a liter of medium per a minute (vvm; ปริมาตรอากาศที่ให้ต่อลิตรของอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที) ทำการทดลองแยกเป็น 4 ชุด คือ

ชุดทดลองที่ 1 ใช้ hairy root ขนาดใหญ่ อัตราการให้อากาศ 0.3 vvm และกวนอาหารเพาะเลี้ยง 20 วัน

ชุดทดลองที่ 2 ใช้ hairy root ขนาดเล็ก อัตราการให้อากาศ 0.3 vvm และกวนอาหารเพาะเลี้ยง 20 วัน

ชุดทดลองที่ 3 ใช้ hairy root ขนาดเล็ก อัตราการให้อากาศ 0.6 vvm และกวนอาหารเพาะเลี้ยง 20 วัน

ชุดทดลองที่ 4 ใช้ hairy root ขนาดเล็ก อัตราการให้อากาศ 0.6 vvm และกวนอาหารเพาะเลี้ยง 16 วัน

ในแต่ละชุดการทดลอง บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งโดยการอบราก hairy root ให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จึงชั่งน้ำหนักแห้ง และคำนวณหา fresh growth index (FGI: (น้ำหนักสดของรากในวันสุดท้ายของการทดลอง-น้ำหนักสดของรากเมื่อเริ่มต้นการทดลอง)/น้ำหนักสดของรากเมื่อเริ่มต้นการทดลอง) และ dry growth index (DGI: (น้ำหนักแห้งของรากในวันสุดท้ายของการทดลอง-น้ำหนักแห้งของรากเมื่อเริ่มต้นการทดลอง)/น้ำหนักแห้งของรากเมื่อเริ่มต้นการทดลอง) และวิเคราะห์หาปริมาณสาร plumbagin ในรากเพาะเลี้ยงด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 4 ชุดทดลอง ชุดทดลองละ 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสาร plumbagin

อบราก hairy root ให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาบดให้ละเอียด แล้วนำ hairy root ที่บดละเอียดหนัก 0.1 กรัม ไปสกัดด้วย methanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 สำหรับสาร plumbagin ที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงนั้นสกัดโดยใช้ ethyl acetate ในปริมาตรเท่ากับอาหารเพาะเลี้ยงโดยใช้กรวยแยก จากนั้นนำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ละลายตะกอนที่ได้จากการสกัด hairy root ด้วย methanol (HPLC grade) และละลายตะกอนที่ได้จากการสกัดอาหารเพาะเลี้ยงด้วย ethyl acetate (HPLC grade) โดยใช้ปริมาตร 1–2 มิลลิลิตร ย้ายสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีชาขนาดเล็ก แล้วนำไปวางในตู้ดูดควันจนกระทั่งสารละลายระเหยไปหมด นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วย petroleum ether แล้วกรองผ่านแผ่นกรอง cellulose acetate ที่มีช่องขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร plumbagin ด้วยวิธี HPLC เทียบกับสาร plumbagin มาตรฐาน (Sigma: catalog number P7262 a.i. 98%) ตามวิธีการของ Chuntaratin (2006) ใช้คอลัมน์ชนิด Zorbax® SB C18 โดยใช้ methanol และ acetic acid 0.4 % ในอัตราส่วน 60:40 เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดโดยใช้ความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตที่ 270 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสาร plumbagin เทียบกับสาร plumbagin ที่ใช้เป็นมาตรฐานจากสมการ linear regression equation และค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จาก



Figure 1 The morphology of root clump that were used as initial inoculums for culturing in treatment 1 (4 x 15 cm²) (A) and in treatment 2-4 (0.5 x 15 cm²) (B) in stirred tank bioreactor contained 3l of ½ Murashige & Skoog medium supplemented with 2% sucrose, 25±2oC in dark condition for 20 days.

ผลการทดลองและวิจารณ์

ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้เพาะเลี้ยง hairy root ในงานวิจัยนี้เป็นแบบ stirred tank ซึ่งเป็นถึงปฏิกรณ์ชีวภาพที่ให้ hairy root จมอยู่ใต้อาหารเพาะเลี้ยง มีระบบการให้อากาศแบบ air bubble จากท่อนำอากาศด้านล่างของตัวถัง โดยมีใบพัดเพิ่มการหมุนเวียนของอากาศและอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งการหมุนของใบพัดอาจทำความเสียหายให้แก่ hairy root ได้ ซึ่งมีรายงานว่าส่งผลให้มวลชีวภาพของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงลดลง (Mishra and Ranjan, 2008) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงดัดแปลงโดยการใส่ตาข่ายพลาสติกขนาดช่อง 2 มิลลิเมตร กั้นระหว่างใบพัดและ hairy root (Figure 2A และ 2B) ซึ่งนอกจากตาข่ายจะป้องกันอันตรายที่อาจเกิดกับ hairy root แล้วยังเป็นที่ยึดเกาะให้กับ hairy root อีกด้วย (Hilton and Rhodes, 1990) โดยมีรายงานการใช้ตาข่ายสแตนเลสกันใบพัดในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ stirred tank ในการเพาะเลี้ยง hairy root ของ *Atropa belladonna* (Lee et al., 1999) และใช้ nylon mesh septum ในการเพาะเลี้ยง hairy root ของ *Glycyrrhiza glabra* (Mehrotra et al., 2008)

การเพาะเลี้ยง hairy root ในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพในชุดทดลองที่ 1 นี้ได้เพาะเลี้ยงตามสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยง hairy root เจตมุลเพลิงแดงในระดับฟลask ที่ศึกษาโดย ศศิวิมล และคณะ (2553) นั่นคือเพาะเลี้ยง hairy root เริ่มต้นที่ความหนาแน่น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้กลุ่ม hairy root ขนาดใหญ่ซึ่งหนักขึ้นละ 2 กรัม ขนาดกว้างประมาณ 4 เซนติเมตร และยาวประมาณ 15 เซนติเมตร จำนวน 30 ชิ้น เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น ในอาหารเหลวสูตร ½ MS ที่มีซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 3 ลิตร และให้อากาศที่อัตรา 0.3 vvm ร่วมกับการกวนอาหารเพาะเลี้ยงด้วยใบพัดที่ 80 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด โดยใช้พลาสติกสีดำคลุมส่วนเพาะเลี้ยงเพื่อป้องกันแสงจากภายนอก (Figure 2C) ซึ่งผลการทดลองพบว่า hairy root ในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพมีการเจริญเติบโตในทิศทางตรงข้ามกับแรงโน้มถ่วงของโลกซึ่งคล้ายกับการเจริญเติบโตของ hairy root ในฟลask ขนาดเล็กซึ่งเป็นลักษณะปกติของรากชนิดนี้ อย่างไรก็ตาม พบว่า hairy root ส่วนใหญ่เกาะกลุ่มรวมตัวลอยอยู่บนผิวน้ำของอาหารเพาะเลี้ยง ไม่เคลื่อนที่ไปรอบๆ ภาชนะบรรจุ โดยมี hairy root บางส่วนจมอยู่ภายใต้อาหารเพาะเลี้ยง (Figure 2D) ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าสีของ hairy root เปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล และมีการปล่อยสารทุติยภูมิออกสู่อาหารเพาะเลี้ยงทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน พบว่า hairy root มีอัตราการเจริญเติบโตน้อย โดยมีค่า FGI, DGI คิดเป็น -0.18 และ 0.16 ตามลำดับ และมีค่าน้ำหนักแห้ง 2.27 กรัมต่อลิตร (Table 1) การที่ค่า FGI มีค่าเป็นลบนี้พบเช่นเดียวกันในทั้ง 2 ซ้ำ ซึ่งอาจเนื่อง

มาจากการที่รากมีการเจริญเติบโตไม่ดี มีการปล่อยสารทุติยภูมิออกมาในอาหารซึ่งเป็นผลให้เซลล์รากถูกทำลายเนื่องจากสาร plumbagin มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงอาจส่งผลให้เซลล์รากถูกทำลายและสูญเสียของเหลวออกจากเซลล์ จึงทำให้ค่าน้ำหนักสดสุดท้ายน้อยกว่าน้ำหนักสดเริ่มต้น และเมื่อพิจารณาค่า DGI พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแสดงว่ารากยังมีการเจริญเติบโตได้บ้าง ซึ่งสนับสนุนข้อสันนิษฐานดังกล่าวที่ว่าในเซลล์รากชุดนี้แม้จะมีการเจริญเติบโตอยู่บ้าง แต่อาจมีของเหลวอยู่ภายในเซลล์น้อย จึงทำให้แสดงค่า DGI เป็นบวก

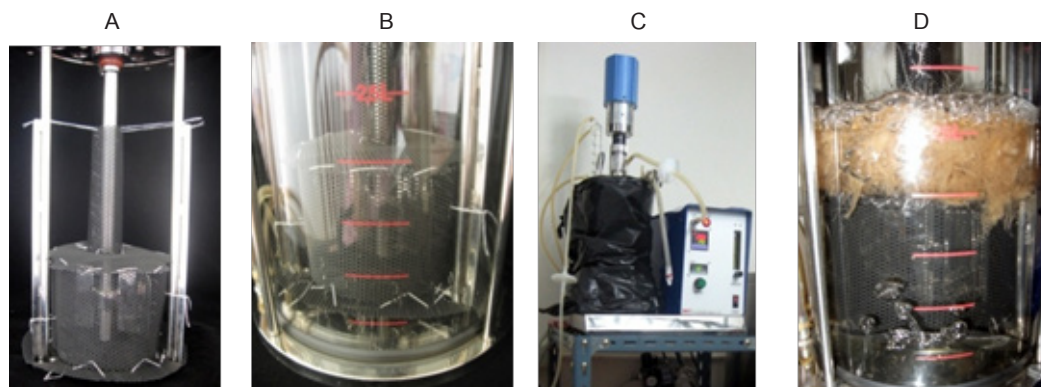


Figure 2 The cultivation of *Plumbago indica* L. hairy root in modified stirred tank bioreactor, A) the modification with nylon mesh covering the impellers, B) the assembly of agitation part and a glass vessel, C) the coverage of bioreactor by a black plastic sheet to protect it from light, D) the distribution of hairy root. $\frac{1}{2}$ Murashige and Skoog medium added with 2% (w/v) sucrose, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in dark condition.

ปริมาณสาร plumbagin ที่พบในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง hairy root ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในชุดทดลองที่ 1 นั้นพบว่ามีปริมาณ 0.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าที่เคยมีรายงานที่ตรวจพบในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง hairy root ในระดับฟลasks ในการทดลองก่อนหน้านี้ (0.69 ไมโครกรัมต่อลิตร) ที่ใช้ hairy root เริ่มต้นที่มีลักษณะทางสัณฐานเช่นเดียวกันแต่เพาะเลี้ยงในฟลask ขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเพาะเลี้ยง 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที (ศศิวิมล และคณะ, 2553) ปริมาณ plumbagin ที่รากปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ค่อนข้างมากนี้ ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของราก ซึ่งเห็นได้จากการที่รากมีค่า FGI เป็นลบ

สำหรับปริมาณสาร plumbagin ที่สะสมในเนื้อเยื่อ hairy root มีค่า 3.29 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งเมื่อเทียบแล้วคิดเป็น 38.41 เปอร์เซ็นต์ของ hairy root ที่เพาะเลี้ยงในฟลask ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งรายงานโดย ศศิวิมล และคณะ (2553) ซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณสาร plumbagin รวมพบว่า hairy root ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีการสะสมสาร plumbagin น้อยกว่า hairy root ที่เพาะเลี้ยงในฟลask คิดเป็น 28.36% ของปริมาณสาร plumbagin จาก hairy root ที่เพาะเลี้ยงในฟลask โดยมีปริมาณสาร plumbagin รวมที่คำนวณได้คือ 7.65 มิลลิกรัมต่ออาหารเพาะเลี้ยง 1 ลิตร (Table 1) ในขณะที่ hairy root ที่เพาะเลี้ยงในฟลask ซึ่งรายงานโดย ศศิวิมล และคณะ (2553) มีปริมาณสาร plumbagin รวมมากถึง 26.97 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Sudo *et al.* (2002) ที่ได้เพาะเลี้ยง hairy root ของ *Ophiorrhiza pumila* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ stirred tank ขนาด 3 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเพาะเลี้ยง 2.5 ลิตร อัตราการให้อากาศ 0.25 ลิตรต่อนาที และใช้ความเร็วของใบพัด 60 รอบต่อนาที ซึ่งพบว่า hairy root ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีมวลชีวภาพและสาร camptothecin สะสมต่ำกว่า hairy root ที่เพาะเลี้ยงในฟลask ขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเพาะเลี้ยง 50 มิลลิลิตร และเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 60 รอบต่อนาที โดย hairy root ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีมวลชีวภาพและสาร

camptothecin สะสม 87.2 กรัมต่อลิตรและ 8.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ hairy root ที่เพาะเลี้ยงในพลาสติกมีมวลชีวภาพและสาร camptothecin สะสม 162 กรัมต่อลิตร และ 8.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ในการขยายขนาดการเพาะเลี้ยง hairy root จากระดับพลาสติกขึ้นมาเป็นถึงปฏิกรณ์ชีวภาพนั้น มีประเด็นที่ส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตของ hairy root ที่สำคัญ 3 ประการ (Neelwarne and Thimmaraju, 2009) คือ 1) รูปร่างลักษณะของ hairy root ที่มีรากสาขามากและสานกันแน่น และเมื่อใช้ hairy root เริ่มต้นมากกว่า 1 กลุ่มมักจะมารวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ซึ่งส่งผลให้เกิดการขัดขวางการหมุนเวียนของอากาศ (mass transfer resistance) ทั้งจากอากาศด้านบนของภาชนะเพาะเลี้ยงสู่อาหารเพาะเลี้ยง และจากอาหารเพาะเลี้ยงไปสู่ภายในกลุ่ม hairy root เอง ส่งผลให้ hairy root ในแต่ละตำแหน่งได้รับอากาศและธาตุอาหารไม่เท่ากันและอาจไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต 2) ความเครียดของ hairy root เนื่องจากแรงเฉือน (shear stress) ซึ่งเกิดจากการเคลื่อนที่ของอาหารเพาะเลี้ยงซึ่งส่วนมากเกิดจากการเขย่าอาหารเพาะเลี้ยงในพลาสติกด้วยเครื่องเขย่าและการทำงานของใบพัดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ รวมถึงการเคลื่อนที่ของฟองอากาศซึ่งเกิดจากการเติมอากาศให้แก่ระบบเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และ 3) ความเครียดของ hairy root เนื่องจากแรงกดของของเหลวที่กระทำต่อกลุ่มรากตามระนาบแนวนอนหรือตามแนวรัศมี (hydrodynamic stress) ซึ่งเกิดจากแรงกดของน้ำหนักของอาหารเพาะเลี้ยงที่กระทำต่อ hairy root ที่จมอยู่ภายใต้อาหารเพาะเลี้ยง โดยในการทดลองระดับพลาสติกของ Neelwarne and Thimmaraju (2009) รายงานว่า การเพิ่มความเร็วยกในการเขย่าอาหารเพาะเลี้ยงมีผลให้แรงเฉือนที่กระทำต่อ hairy root เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงมีผลให้เพิ่มระดับแรงดันของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีต่อ hairy root ด้วย แม้ว่าจะมีการเพิ่มขนาดของภาชนะเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมกับปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นแล้วก็ตาม

อย่างไรก็ตาม การเจริญเติบโตที่ลดลงของ hairy root เจตมูลเพลิงแดงที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ stirred tank ขนาด 5 ลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับผลการเจริญเติบโตของ hairy root ที่มีลักษณะและความหนาแน่นเดียวกันซึ่งเพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร นั้นอาจเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของขนาดและรูปร่างลักษณะเริ่มต้นของ hairy root และความเครียดของ hairy root เนื่องจากแรงกดของอาหารเพาะเลี้ยงที่กระทำต่อกลุ่มราก hairy root ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระหว่างเพาะเลี้ยง ซึ่งเมื่อพิจารณาปัจจัยด้านรูปร่างลักษณะของ hairy root พบว่า hairy root ที่เพาะเลี้ยงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเพาะเลี้ยง 100 มิลลิลิตร มีน้ำหนักเริ่มต้น 2.0 กรัม และเพาะเลี้ยง hairy root เพียง 1 กลุ่ม ในแต่ละพลาสติก แต่การเพาะเลี้ยง hairy root ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง 3 ลิตร ต้องใช้กลุ่ม hairy root หนัก 2.0 กรัม จำนวนมากถึง 30 กลุ่ม ทำให้สร้างรากสาขามาประสานกันจนเกิดเป็น hairy root กลุ่มใหญ่ขึ้นซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการหมุนเวียนอากาศและอาหารเพาะเลี้ยงมากกว่าการเพาะเลี้ยงแยกในพลาสติกขนาดเล็ก และเมื่อพิจารณาปัจจัยด้านความเครียดของ hairy root เนื่องจากแรงกดของอาหารเพาะเลี้ยงที่กระทำต่อกลุ่มราก พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงในพลาสติกมีระดับอาหารสูงจากก้นพลาสติกเพียง 1.5 เซนติเมตร ทำให้ hairy root ลอยอยู่ที่ผิวน้ำของอาหารเพาะเลี้ยงตลอดเวลา แรงกดที่กระทำจึงน้อย แต่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้น อาหารเพาะเลี้ยงมีปริมาตรเพิ่มมากขึ้นโดยมีระดับความสูงของอาหารจากก้นภาชนะมากถึง 16 เซนติเมตร ทำให้ hairy root จำนวนหนึ่งที่จมอยู่ภายในอาหารเพาะเลี้ยง (Figure 2D) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพนี้เกิดความเครียดเนื่องจากแรงกดของอาหารเพาะเลี้ยงตามระนาบแนวนอนมีมากกว่าการเพาะเลี้ยงในพลาสติก

สำหรับแรงเฉือนที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้น คาดว่าจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของ hairy root เจตมูลเพลิงแดง โดย Neelwarne and Thimmaraju (2009) รายงานว่า ในระบบเพาะเลี้ยงขนาดเล็กซึ่งใช้อาหารเพาะเลี้ยงน้อยแต่ใช้ความเร็วในการเขย่าอาหารเพาะเลี้ยงสูงนั้น มีแรงเฉือนใกล้เคียงกับระบบเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ซึ่งใช้อาหารเพาะเลี้ยงมากแต่ใช้ความเร็วในการเขย่าอาหารเพาะเลี้ยงต่ำ โดยผลการทดลองในระดับพลาสติกพบว่า แรงเฉือนที่เกิดขึ้นภายในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที มีค่าใกล้เคียงกับแรงเฉือนที่เกิดขึ้นภายในอาหารเพาะเลี้ยง 800 มิลลิลิตร

Table 1 The FGI, DGI, dry weight and plumbagin content of *Plumbago indica* L. hairy root cultured in 5L stirred tank bioreactor with 3 L of half strength Murashige and Skoog liquid medium contained 2% (w/v) sucrose. The initial inoculum density was 2% (w/v) and incubated at 25±2 °C in dark condition for 20 days.

Treatment	Inoculum morphology	Aeration				Dry weight ^{5/} (g/l)	Plumbagin in hairy root ^{5/} (mg/g DW)	Plumbagin in medium ^{5/} (mg/l)	Total plumbagin ^{5/} (mg/l medium)
		Medium circulation (rpm)	Aeration rate (vvm ^{3/})	Medium circulated time (days)	FGI ^{5/}				
1	Large ^{1/}	80	0.3	20	-0.18b	2.27b	3.29b	0.19a	7.65b
2	Small ^{2/}	80	0.3	20	0.07a	2.66ab	3.77b	0.00b	10.03ab
3	Small ^{2/}	80	0.6	20	0.11a	2.72ab	6.14a	0.00b	16.68a
4	Small ^{2/}	80	0.6	16 ^{4/}	0.16a	3.17a	4.85ab	0.00b	15.38ab
F-Test									
					*	*	*	*	*
CV (%)					79.92	24.14	6.73	8.91	5.95
									9.25

* Means are significantly different at $P \leq 0.05$ according to DMRT
^{1/} Large root clump was 4 cm wide x 15 cm long and ^{2/} small root clump was 0.5 cm wide x 15 cm long.
^{3/} Volume of air per a liter of medium per a minute
^{4/} The 16 days-stir at 80 rpm followed by 4 days-pause during 20 days of cultivation
^{5/} Means within the same column followed by the different letters are significantly different according to DMRT ($P \leq 0.05$)

ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 2,000 มิลลิลิตร และเขย่าด้วยความเร็ว 90 รอบต่อนาที แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Neelwarne and Thimmaraju (2009) ก็แสดงให้เห็นว่าแม้ว่าจะใช้ความเร็วในการเขย่าอาหารเพาะเลี้ยงและความเร็วของใบพัดในอัตราที่เท่ากัน แต่การเกิดแรงเฉือนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งใช้อาหารเพาะเลี้ยงปริมาณมากนั้นมีมากกว่าในพลาสติก ดังนั้น hairy root ที่เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจึงเกิดความเครียดเนื่องจากแรงเฉือนได้มากกว่า hairy root ที่เพาะเลี้ยงในพลาสติก

นอกจากปัจจัย 3 ประการที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว Zid and Orihara (2004) ยังอธิบายว่า การเจริญเติบโตของ hairy root ที่ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีปริมาณมากนั้นอาจเกี่ยวข้องกับการที่มีไอออนของธาตุอาหารปริมาณมากในอาหารเพาะเลี้ยงที่ล้อมรอบ hairy root จนเกิดความแตกต่างของแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ระหว่างเซลล์ของ hairy root และอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้มีการขนส่งสารต่าง ๆ เข้าและออกนอกเซลล์เป็นจำนวนมาก จนเกินความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ หรืออาจเกิดจากไอออนของสารบางชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายเมื่อมีปริมาณอยู่ในระดับปกติแต่ในสภาวะที่มีไอออนภายในอาหารเพาะเลี้ยงมากเกินไปการสะสมภายในเซลล์เป็นจำนวนมากจนทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์หรือยับยั้งการขนส่งไอออนอื่น ๆ ที่เซลล์ต้องการใช้สำหรับการเจริญเติบโต และส่งผลให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เช่นกัน สืบเนื่องจากปัญหาที่พบในชุดทดลองที่ 1 ดังนั้นในชุดทดลองที่ 2 จึงได้ปรับเปลี่ยนลักษณะทางสัณฐานของกลุ่ม hairy root ที่ใช้ให้มีขนาดเล็กลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทอากาศและการหมุนเวียนอาหารเพาะเลี้ยงภายในกลุ่ม hairy root โดยใช้กลุ่ม hairy root ขนาดเล็กลง ซึ่งมีขนาดกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 15 เซนติเมตร (Figure 1B) แต่ใช้เนื้อเยื่อเริ่มต้นความหนาแน่น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับ hairy root ในชุดทดลองที่ 1 ผลการทดลองพบว่าการใช้ hairy root ขนาดเล็กนี้มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตมากกว่า hairy root ขนาดใหญ่ ซึ่งพิจารณาได้จากค่า FGI DGI และ น้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ปริมาณสาร plumbagin ใน hairy root และสาร plumbagin รวมก็มีปริมาณมากกว่า hairy root ขนาดใหญ่ และไม่พบการปลดปล่อยสาร plumbagin ออกสู่อาหารเพาะเลี้ยง (Table 1) ซึ่งจากผลการทดลองในชุดทดลองที่ 1 และ 2 นี้แสดงว่าการใช้ hairy root ที่มีขนาดเล็กเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมากกว่า hairy root ที่เป็นกลุ่มขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นไปตามข้อสันนิษฐานที่กล่าวแล้วข้างต้น

สำหรับในชุดทดลองที่ 3 นั้น ใช้ hairy root ที่มีขนาดเล็กและเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับ hairy root ในชุดทดลองที่ 2 โดยใช้เนื้อเยื่อเริ่มต้นความหนาแน่น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอาหารเพาะเลี้ยง 3 ลิตร ความเร็วรอบของใบพัด 80 รอบต่อนาที เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วันและกวนอาหารเพาะเลี้ยงตลอด 20 วัน ในสภาพมืด แต่เพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.3 vvm เป็น 0.6 vvm ซึ่งผลการทดลองพบว่าการเพิ่มอากาศ ทำให้การเจริญเติบโตของ hairy root มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ทั้งค่า FGI, DGI และน้ำหนักแห้ง รวมทั้งมีปริมาณสาร plumbagin ใน hairy root และปริมาณสาร plumbagin สะสมเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้เป็นไปตามข้อสันนิษฐานจากชุดทดลองที่ 1 และยังสอดคล้องกับรายงานของ Shin *et al.* (2002) ที่เพาะเลี้ยง hairy root ของ *Beta vulgaris* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ airlift ขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง 3 ลิตร ใช้ hairy root เริ่มต้น 150 กรัม และใช้อัตราการให้อากาศ 0.01-0.35 vvm ซึ่งพบว่า hairy root ของ *Beta vulgaris* มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.01 จนถึง 0.2 vvm และมีการสะสมสาร betacyanin มากขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.01 จนถึง 0.3 vvm แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า การให้อากาศในอัตราที่สูงกว่า 0.3 vvm ก็สามารถส่งผลในเชิงลบได้โดยมีผลทำให้น้ำหนักแห้งและการสะสมสาร betacyanin ของ hairy root ลดลง นอกจากนี้อัตราการให้อากาศที่สูงเกินไปอาจส่งผลเชิงลบต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารทุติยภูมิของ hairy root ได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุมาจากแรงเฉือนที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มอัตราการให้อากาศ ซึ่งสามารถทำอันตรายให้แก่ hairy root ได้ (Wysokinska and Chiel, 1997)

ดังนั้น จากผลการทดลองในชุดทดลองที่ 3 และรายงานการทดลองในพืชชนิดอื่นๆ ที่กล่าวแล้วข้างต้น จึงเป็นที่มาของชุดทดลองที่ 4 ที่ใช้ hairy root ขนาดเล็ก และเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับ hairy root ในชุดทดลองที่ 3 แต่ลดระยะเวลาการกวนอาหารเพาะเลี้ยงลงจาก 20 วัน เหลือ 16 วัน โดยกวนอาหารเพาะเลี้ยงตั้งแต่วันที่ 1-16 และหยุดกวนอาหารในวันที่ 17-20 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่า hairy root มีแนวโน้มเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นกว่า hairy root ในชุดทดลองที่ 3 และเพิ่มมากกว่าการทดลองชุดที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพิจารณาได้จากค่า FGI, DGI และน้ำหนักแห้ง (Table 1) ซึ่งอาจเนื่องมาจาก เมื่อหยุดการทำงานของใบพัดทำให้ความเครียดของ hairy root ที่เกิดขึ้นเนื่องจากแรงเฉือนลดลง ซึ่งเป็นไปตามข้อสันนิษฐานที่กล่าวแล้ว แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณสาร plumbagin ใน hairy root กลับมีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับชุดทดลองที่ 3 (Table 1) ทั้งนี้เนื่องจากในพืชนั้นสาร plumbagin ถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นในสภาวะเครียด เมื่อความเครียดลดลง จึงมีผลทำให้การผลิตสารลดลงด้วย

สรุปผลการทดลอง

การทดลองเพาะเลี้ยง hairy root เจตมูลเพลิงแดงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบ stirred tank ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางสัณฐานของ hairy root อัตราการให้อากาศ และระยะเวลาการกวนอาหารเพาะเลี้ยง เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมสาร plumbagin ของ hairy root เจตมูลเพลิงแดง โดยพบว่าการใช้ hairy root ที่มีขนาดเล็กทำให้รากมีการเจริญเติบโตและการสะสมสาร plumbagin มากกว่า hairy root ที่เป็นกลุ่มขนาดใหญ่ และ hairy root มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับอากาศมากขึ้น โดยพบว่า hairy root มีการสะสมสาร plumbagin มากที่สุด (16.68 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อใช้ hairy root เริ่มต้นที่มีขนาดเล็ก อัตราการให้อากาศ 0.6 vvm ความเร็วของใบพัด 80 รอบต่อนาทีและมีการกวนอาหารเพาะเลี้ยง 20 วัน ดังนั้นจึงมีโอกาสดำเนินการเพาะเลี้ยง hairy root เจตมูลเพลิงแดงให้เข้าสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ อย่างไรก็ตามเมื่อลดระยะเวลาในการกวนอาหารเพาะเลี้ยงลงจากเดิมที่กวนอาหารตลอด 20 วัน เหลือเพียงกวนช่วง 16 วันแรกก่อนจะหยุดกวน 4 วัน แม้ว่าจะทำให้ hairy root มีการเจริญเติบโตดีขึ้นแต่การสะสมสาร plumbagin กลับมีแนวโน้มลดลง ดังนั้นจึงควรจะมีการศึกษาวิจัยในประเด็นต่างๆ ที่เกี่ยวข้องมากขึ้น เพื่อพัฒนาศักยภาพการผลิตสาร plumbagin ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีขนาดใหญ่ขึ้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

- ศศิวิมล จันทร์สุเทพ, พรศิริ หลิววนิช, ศิริลักษณ์ เขียวมรรคม และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2553. อิทธิพลของความหนาแน่นและพื้นที่เนื้อเยื่อเริ่มต้นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสาร plumbagin จาก hairy root ของเจตมูลเพลิงแดง. ว. วิทย. กษ. 41: 423-436.
- Agilent Technologies. 2001. Agilent Chemstation (Computer Program). Agilent Technologies, USA.
- Chuntaratin, P. 2006. Production of Plumbagin by Hairy Root, Callus and Cell Suspension Cultures of *Plumbago indica* L. Ph.D. Thesis. Kasetsart University, Thailand. 133p.
- Georgiev, M.I., A.I. Pavlov and T. Bley. 2007. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 1175-1185.

- Gwee, P.S., K.S. Khoo, H.C. Ong and N.W. Sit. 2014. Bioactivity-guided isolation and structural characterization of the antifungal compound, plumbagin, from *Nepenthes gracilis*. *Pharm. Biol.* 52: 1526-1531.
- Häkkinen, S.T., E. Moyano, R.M. Cusidó and K.M. Oksman-Caldentey. 2016. Exploring the metabolic stability of engineered hairy roots after 16 years maintenance. *Front. Plant Sci.* 7:1486. doi: 10.3389/fpls.2016.01486.
- Hilton, M.G. and M.J.C. Rhodes. 1990. Growth and hyoscyamine production of hairy root cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 132-138.
- Jaisi, A. and P. Panichayupakaranant. 2016. Increased production of plumbagin in *Plumbago indica* root cultures by biotic and abiotic elicitors. *Biotechnol. Lett.* 38: 351-355.
- Kuzma, L., M. Kaiser and H. Wysokińska. 2017. The production and antiprotozoal activity of abietane diterpenes in *Salvia austriaca* hairy roots grown in shake flasks and bioreactor. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 47: 58-66.
- Lee, K.T., T. Suzuki, T. Yamakawa, T. Kodama, Y. Igarashi and K. Shimomura. 1999. Production of tropane alkaloids by transformed root cultures of *Atropa belladonna* in stirred bioreactors with a stainless steel net. *Plant Cell Rep.* 18: 567-571.
- Mallavadhahi, U.V., G. Sahu and J. Muralidhar. 2002. Screening of *Plumbago* species for the bio-active marker plumbagin. *Pharm. Biol.* 40: 508-511.
- Mehrotra, S., A.K. Kukreja, S.P.S. Khanuja and B.N. Mishra. 2008. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. *Electron. J. Biotechnol.* 11: 1-7.
- Mishra, B.N. and R. Ranjan. 2008. Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 49: 1-10.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nair, S.V., G. Baranwal, M. Chatterjee, A. Sachu, A.K. Vasudevan, C. Bose, A. Banerji and R. Biswas. 2016. Antimicrobial activity of plumbagin, a naturally occurring naphthoquinone from *Plumbago rosea*, against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Int. J. Med. Microbiol.* 306: 237-248.
- Nayak, P., M. Sharma, S.N. Behera, M. Thirunavoukkarasu and P.K. Chand. 2015. High-performance liquid chromatographic quantification of plumbagin from transformed rhizoclonal cultures of *Plumbago zeylanica* L.: Inter-clonal variation in biomass growth and plumbagin production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175: 1745-1770.
- Neelwarne, B. and R. Thimmaraju. 2009. Bioreactor for cultivation of red beet hairy roots and *in situ* recovery of primary and secondary metabolites. *Eng. Life Sci.* 9: 227-238.
- Pavela, R. 2013. Efficacy of naphthoquinone as insecticides against the house fly *Musca domestica* L. *Ind. Crop Prod.* 43: 745-750.
- Shin, K.S., H.N. Murthy, J.Y. Ko and K.Y. Paek. 2002. Growth and betacyanin production by hairy root of *Beta vulgaris* in airlift bioreactors. *Biotechnol. Lett.* 24: 2062-2069.
- Srivastava, S. and A.K. Srivastava. 2012. Strategies to overcome oxygen transfer limitations during hairy root cultivation of *Azadirachta indica* for enhanced azadirachtin production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167: 1818-1830.
- Sudo, H., T. Yamakawa, M. Yamazaki, N. Aimi and K. Saito. 2002. Bioreactor production of camptothecin by hairy root cultures of *Ophiorrhiza pumila*. *Biotechnol. Lett.* 24: 359-363.
- Sumsakul, W., T. Plengsuriyakarn, W. Chaijaroenkul, V. Viyanant, J. Karbwang and K. Na-Bangchang. 2014. Antimalarial activity of plumbagin *in vitro* and in animal models. *BMC Complement. Altern. Med.* 14: 15-20.
- Tatreerod, S., P. Saralamp and S. Chanprame. 2003. Hairy root induction and culture of *Plumbago indica* L. In *The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare*. Chiang Mai, Thailand. pp. 306.

- Wang, F., Q. Wang, Z. Zhou, S. Yu, S. Pan, Z. He, X. Zhang, D. Wang, Y. Yang, T. Yang, T. Sun, M. Li, J. Qiu and S. Zhou. 2015. Plumbagin induces cell cycle arrest and autophagy and suppresses epithelial to mesenchymal transition involving PI3K/Akt/mTOR-mediated pathway in human pancreatic cancer cells. *Drug Des. Devel. Ther.* 9: 537-560.
- Wysokinska, H. and A. Chmiel. 1997. Transformed root cultures for biotechnology. *Acta Biotechnol.* 17: 131-159.
- Zid, S.A. and Y. Orihara. 2004. Polyacetylenes accumulation in *Ambrosia maritime* hairy root and cell cultures after elicitation with methyl jasmonate. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 81: 65-75.