

การชักนำให้เกิดแคลลัสของขมิ้นชัน และ
ผลของการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ต่อการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์**
Callus Induction of *Curcuma longa* L. and
Effect of Precursor Addition on Curcuminoids Production**

ปิยะมาศ ศรีรัตน์^{1*} สิริภัทร์ พรหมณี² สารโจน์ ศิริคันสนียกุล^{1,2},
ประมุข ภาระกุลสุขสถิตย์^{1,2} และวิรัตน์ วาณิชศรีรัตน^{1,2}

¹คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

²สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Piyamat Srirat^{1*}, Siripatr Prammanee², Sarote Sirisansaneeyakul^{1,2}, Pramuk Parakulsuksatid^{1,2}
& Wirat Vanichsiratana^{1,2}

¹Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University

²National Research University-Kasetsart University, Kasetsart University

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อชักนำ และเพาะเลี้ยงแคลลัสของขมิ้นชัน ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาเหง้า (Rhizome Bud) บนอาหารกึ่งแข็งสูตร B5 ที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ 1-Naphthalene Acetic Acid (NAA) และ 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) เพียงอย่างเดียวหรือเติมร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ 6-Benzyladenine (BA) และ N⁶-Furfuryladenine (Kinetin) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของแคลลัสสี่เหลี่ยมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม 2,4-D ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ และสามารถชักนำให้เกิดการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ที่เพิ่มสูงขึ้นได้ด้วยการเติมสารต้นตอ Phenylalanine ที่ 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Malonic Acid ที่ 5 ไมโครโมลาร์ โดยแคลลัสมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 1.7 เท่า และมีการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์สูงขึ้น 9.5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

คำสำคัญ : ขมิ้นชัน การชักนำให้เกิดแคลลัส สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ สารต้นตอในการสังเคราะห์

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)
e-mail: faaspym@ku.ac.th, fagiwiv@ku.ac.th

การชักนำให้เกิดแคลลัสของขมิ้นชัน และ
ผลของการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ต่อการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์

**งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนรัฐบาลกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Abstract

This study aimed to investigate the callus induction and cultivation of *Curcuma longa* L. by using Rhizome bud as explants. The explants were cultivated on semi-solid B5 medium supplement with plant growth regulator auxin (1-naphthalene acetic acid (NAA) and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)) alone, or in combination with cytokinin (6-benzyladenine (BA) and N⁶-furfuryl adenine (Kinetin)). The result showed that the addition of the appropriate plant growth regulators can induce calli. The HPLC analysis of the yellowish calli that were obtained from the medium supplement with 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BA exhibited curcuminoids accumulation. The production of curcuminoids in calli can be improved by the supplementation of suitable precursors into the culture medium. The culture medium supplement with 5 μ M phenylalanine and 5 μ M malonic acid enhanced fresh weight of the calli and curcuminoids accumulation by 1.7 and 9.5 times higher than the control, respectively.

Keywords: *Curcuma longa* L., Callus induction, Curcuminoids, Precursor

บทนำ

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่ปลูกอย่างแพร่หลายในเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เหง้าของขมิ้นชัน (Rhizome) มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญได้แก่ สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (Curcuminoids) ซึ่งมีผลการวิจัยยืนยันถึงประโยชน์ เช่น มีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็ง (Anticancer) สารยับยั้งอาการอักเสบ (Anti-Inflammatory) สารต้านการเกิดเนื้องอก (Antitumor) สารยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial) สารลดความดันโลหิตสูง (Antihypertensive) สารลดปริมาณไขมันในเส้นเลือด (Antihypercholesterolemic) สารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) สารต้านการติดเชื้อจากพยาธิ (Antiparasitic) และ ใช้เป็นยาขับลม (Carminative) เป็นต้น (Sarker & Narhar, 2007; Goel et al., 2008; Prasad et al., 2014; Ghosh et al., 2015; Mahmood et al., 2015) สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์เป็นสารสีเหลือง ประกอบด้วยสารประกอบ 3 ชนิด ได้แก่ (1) Bisdemethoxycurcumin (BDMC) (2) Demethoxycurcumin (DMC) และ (3) Curcumin

ประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากขมิ้นชันในระดับอุตสาหกรรมเภสัชกรรม และเครื่องสำอาง ในปี พ.ศ. 2549 กระทรวงสาธารณสุขได้ขึ้นทะเบียนขมิ้นชันไว้ในบัญชียาพัฒนาจากสมุนไพร โดยมีนโยบายส่งเสริม และสนับสนุนการใช้ยาจากสมุนไพรในสถานพยาบาลสาธารณสุข และในโรงพยาบาลทดแทนการใช้

ยาแผนปัจจุบัน ดังนั้นความต้องการใช้ขมิ้นชันเป็นวัตถุดิบในทางเภสัชกรรมจึงมีแนวโน้มสูงขึ้น แม้ว่าขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่เพาะปลูกได้ทั่วไปในประเทศ แต่ในการเพาะปลูกต้องใช้เวลา 8-10 เดือน จึงเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ ขมิ้นชันขยายพันธุ์โดยใช้เหง้า ในแต่ละรอบการผลิตจำเป็นต้องเก็บส่วนเหง้าไว้ร้อยละ 10-20 ของผลผลิตเพื่อใช้สำหรับปลูกในฤดูการปลูกรอบถัดไป (Shirgurkar et al., 2001; Islam et al., 2004) นอกจากนี้ในระหว่างการผลิตและการเก็บเกี่ยวผลผลิตมักพบปัญหาซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณ และไม่ความสม่ำเสมอทางคุณภาพของขมิ้นชัน เช่น ปัญหาจากสภาวะอากาศที่ไม่เหมาะสม โรค และแมลงศัตรูพืช การเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ไม่ถูกต้อง การปนเปื้อนเชื้อราระหว่างการเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษา เป็นต้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นแนวทางที่มีศักยภาพ และมีความเป็นไปได้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชมีข้อได้เปรียบกว่าการปลูกพืชแบบเดิม คือ สามารถควบคุมสภาวะระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ จึงไม่มีข้อจำกัดในเรื่องสภาวะอากาศที่ไม่เหมาะสม โรค และแมลงศัตรูพืช อีกทั้งในการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชสามารถวิจัย และพัฒนาให้มีการควบคุมหรือกระตุ้นให้มีการเจริญของเซลล์หรือมีการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นขั้นตอนเริ่มต้นที่สำคัญในการพัฒนาไปสู่การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชเพื่อการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ การเพาะเลี้ยงแคลลัสเริ่มต้นโดยการตัดชิ้นส่วนพืช เช่น การตัดส่วนของใบอ่อน นำไปเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน และไซโตไคนิน เพื่อกระตุ้นให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์และขยายขนาดเซลล์ให้ใหญ่ขึ้น โดยแคลลัสของพืชหลายชนิดมีรายงานว่า สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ได้ในระหว่างที่ทำการเพาะเลี้ยง เช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Prunus cerasus* L. เพื่อการผลิต Anthocyanin (Blando et al., 2005) การเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Lavandula vera* MM. เพื่อการผลิต Rosmarinic Acid (Georgiev et al., 2006) การเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Commiphora wightii* เพื่อการผลิต Guggulsterone (Tanwar et al., 2007) และการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Bacopa monniera* (L.) Pennell. เพื่อการผลิต Bacoside (Parale et al., 2010) เป็นต้น การผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส และเซลล์แขวนลอย ซึ่งเป็นเซลล์พืชที่ยังไม่มีการพัฒนาเป็นอวัยวะ (Unorganized) มักประสบปัญหาที่สำคัญประการหนึ่ง คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์เหล่านี้โดยทั่วไปได้ผลผลิตที่ต่ำ ซึ่งอาจไม่คุ้มค่าในการผลิตในเชิงการค้า (Slater et al., 2008) อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงสามารถส่งเสริม และกระตุ้นผลผลิตให้เพิ่มขึ้นได้ เช่น การปรับสูตรอาหาร และสารควบคุมการเจริญเติบโตให้เหมาะสม การเพิ่มสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ (Precursor) และการเติมสารกระตุ้น (Elicitor) เป็นต้น

การส่งเสริมและกระตุ้นการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิจากพืชโดยการเติมสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ เนื่องจากโดยพื้นฐานแล้วการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิทำให้เพิ่มขึ้นได้เมื่อมีการเติมสารตั้งต้น หรือสารตัวกลาง (Intermediate) ของการสังเคราะห์ที่เหมาะสม (Palacio et al., 2011) ตัวอย่างเช่น ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Rhodiola rosea* พบว่า

ไม่มีการผลิตสารเมทาบอลิท์ทุติยภูมิ แต่เมื่อทำการเติม Cinnamyl Alcohol ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เกิดการสร้างสาร Rosin และ Rosavin ขึ้น โดยมีการผลิต Rosin เพิ่มขึ้น 3–6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (György et al., 2004)

กระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่ชัด มีการศึกษาวิจัยเพื่อเสนอข้อมูลเกี่ยวกับวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ โดยเสนอว่า สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันสังเคราะห์มาจาก Cinnamic Acid โดย Cinnamic Acid เหล่านี้เกิดขึ้นผ่านขั้นตอนของ Phenylpropanoid Pathway และในวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ พบว่า BDMC และ DMC มีบทบาทเป็นสารตัวกลาง (Intermediate) ในการสังเคราะห์ Curcumin (Ramirez-Ahumada et al., 2006; Kita et al., 2008; El-Hawaza et al., 2016) ในเหง้าของขมิ้นชันตรวจพบเอนไซม์ Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) ในปริมาณสูงกว่าที่พบในใบและยอดที่กำลังมีการเจริญเติบโต ประมาณ 9 เท่า โดย PAL เป็นเอนไซม์ตัวแรกของ Phenylpropanoid Pathway ซึ่ง PAL เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำหรับปฏิกิริยาการเปลี่ยน Phenylalanine ไปเป็น Cinnamic Acid และในการเกิดสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ Curcuminoids Synthase ซึ่งต้องใช้ Malonyl-CoA และ Hydroxyl-Cinnamoyl-CoA Esters ที่ได้จาก Phenylpropanoid Pathway เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ (Ramirez-Ahumada et al., 2006) และในวิถีการสังเคราะห์สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์มีความเป็นไปได้ที่เกิดจาก Cinnamoyl-CoA จำนวน 2 โมเลกุล ร่วมกับ Malonyl-CoA จำนวน 1 โมเลกุล และการเกิด Hydroxyl-Functional Groups และ Methoxy-Functional Groups ที่ Aromatic Rings น่าจะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการสร้าง Curcuminoids Skeleton แล้ว (Kita et al., 2008)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำและเพาะเลี้ยงแคลลัสของขมิ้นชัน รวมถึงศึกษาวิธีการส่งเสริม และกระตุ้นการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในแคลลัสของขมิ้นชัน โดยการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ซึ่งในการศึกษานี้เลือกเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ ได้แก่ Phenylalanine และ Malonic Acid

วิธีการวิจัย

1. การชักนำและการเพาะเลี้ยงแคลลัสของขมิ้นชัน

การชักนำให้เกิดแคลลัสของขมิ้นชันใช้เนื้อเยื่อส่วนตาเหง้าที่ติดกับส่วนยอด ที่มีขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น นำเนื้อเยื่อเริ่มต้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร B5 ที่เติมซูโครส 20 กรัมต่อลิตร และเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซิน ได้แก่ 1-Naphthalene Acetic Acid (NAA) และ 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) ที่ความเข้มข้น 1 หรือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวหรือเติมร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ 6-Benzyl-adenine (BA) และ N^6 -Furfuryladenine (Kinetin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ โดยย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 4 สัปดาห์ ในการเพาะเลี้ยงควบคุม

อุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีการให้แสง วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยในแต่ละชุดทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งทำซ้ำ 10 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำ คือ 1 ชิ้นส่วนพืช ($n=30$) เมื่อครบกำหนดการเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ นับจำนวนชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัสเพื่อคำนวณหาค่าร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนพืชที่ถูกชักนำให้เกิดแคลลัส และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สังเกตและบันทึกสีและลักษณะของแคลลัสที่ได้เพื่อประเมินเบื้องต้นถึงการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในแคลลัส โดยสันนิษฐานเบื้องต้นว่า แคลลัสที่มีสีเหลืองเป็นแคลลัสที่มีการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ จากนั้นนำตัวอย่างของแคลลัสที่มีสีเหลืองไปวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์

2. การส่งเสริมการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในแคลลัสของขมิ้นชัน โดยการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์

เลือกแคลลัสที่ได้จากวิธีการที่เหมาะสมในการชักนำ และการเพาะเลี้ยงแคลลัสของขมิ้นชันจากการทดลองที่ 1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลาอย่างน้อย 12 สัปดาห์ เป็นแคลลัสเริ่มต้น จากนั้นย้ายแคลลัสเริ่มต้นมาเพาะเลี้ยง ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเดิมที่มีการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์เคอร์คูมินอยด์ ได้แก่ Phenylalanine และ Malonic Acid เพียงอย่างเดียวหรือเติมร่วมกัน ทำการเพาะเลี้ยงต่อ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยย้ายเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 3 สัปดาห์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการให้แสง วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยในแต่ละชุดทดลองทำซ้ำ 5 ซ้ำ ให้ 1 ซ้ำ คือ 1 ชิ้นส่วนพืช ($n=5$) เมื่อครบกำหนดการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ นำแคลลัสที่ได้ไปชั่งน้ำหนักสด (Fresh Weight) คำนวณหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดของแคลลัส และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สังเกตและบันทึกสีและลักษณะของแคลลัสที่ได้ เพื่อประเมินเบื้องต้นโดยสันนิษฐานเบื้องต้นว่า แคลลัสที่มีสีเหลือง เป็นแคลลัสที่มีการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ จากนั้นนำตัวอย่างของแคลลัสที่มีสีเหลืองไปวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์

นำแคลลัสน้ำหนักประมาณ 1 กรัม (ชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด) มาสกัดโดยการแช่ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99 (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที จากนั้นนำมาสกัดต่อโดยใช้วิธี Sonication เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนออก นำส่วนใสมากรองผ่านหัวกรองขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยวิธีการและสภาวะในการวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีของ Wichitnithad et al. (2009)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนตาเหง้าของขมิ้นชันเกิดแคลลัส

ในการชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนตาเหง้า (Rhizome bud) ของขมิ้นชันเกิดแคลลัสบนอาหารกึ่งแข็งสูตร B5 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร B5 ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต (ชุดควบคุม) ไม่พบการเกิดแคลลัส โดยเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและไม่มีารรอดชีวิต (ภาพที่ 1 ก) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อส่วนตาเหง้าของขมิ้นชันเกิดแคลลัสได้ โดยร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัสมีค่าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารควบคุมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 1) การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาเหง้าบนอาหารที่เติม NAA มีแนวโน้มของร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัสได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่เติม 2,4-D และการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA หรือ 2,4-D ร่วมกับ BA หรือ Kinetin อย่างใดอย่างหนึ่ง มีแนวโน้มของร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัสได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่เติมเฉพาะ NAA หรือ 2,4-D เพียงอย่างเดียว โดยสภาวะที่มีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุดคือ ที่การเติม NAA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ร้อยละ 43.33

ในการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาเหง้าบนอาหารที่เติม 2,4-D (ตารางที่ 1) พบว่า การเติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนของชิ้นส่วนพืชที่ถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ร้อยละ 36.67 และในการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มความเข้มข้นของ 2,4-D ให้สูงขึ้น (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่า ร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัสได้มีค่าลดลง (ร้อยละ 26.37) และในการเติม 2,4-D ร่วมกับ BA มีร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัสสูงกว่าการเติม 2,4-D ร่วมกับ Kinetin และ การเติม 2,4-D เพียงอย่างเดียว แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีการเติม 2,4-D เป็นแคลลัสที่มีสีเหลืองอ่อน และส่วนใหญ่มีลักษณะของแคลลัสเป็นแบบ Friable คือ มีลักษณะเป็นเซลล์ที่ขนาดเล็ก โปร่งบาง มีความฟูและร่วน อยู่รวมกลุ่มกันโดยเกาะกันอย่างหลวมๆ ตัวอย่างเช่น ในภาพที่ 1 ข เป็นแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่มีการเติม 2,4-D ร่วมกับ Kinetin โดยแคลลัสมีลักษณะเป็นแบบ Friable ที่มีสีเหลืองอ่อนและมีการเจริญของยอดเกิดขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามมีแคลลัสที่ได้จากการชักนำในบางกรณีที่ได้มีการเกิดแคลลัสแบบ Compact Callus ร่วมด้วย ซึ่งแคลลัสแบบ Compact เป็นแคลลัสที่มีการอยู่รวมกลุ่มกันโดยเกาะกันแน่น ตัวอย่างเช่น ในภาพที่ 1 ค เป็นภาพแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่มีการเติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งบริเวณส่วนฐานของเนื้อเยื่อส่วนตาเหง้าที่สัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยง มีการเกิด Compact Callus ที่มีสีเหลืองถึงสีเหลืองเข้ม ในส่วนเนื้อเยื่อถัดขึ้นไปมีการเกิดแคลลัสแบบ Friable ที่มีสีเหลืองหรือสีเหลืองอ่อน

ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ร้อยละ 43.33 ซึ่งเป็นสภาวะที่มีการชักนำให้เกิดแคลลัสได้สูงที่สุด โดยแคลลัสที่ได้จากเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ทั้งการเติมเพียงอย่างเดียวหรือเติมร่วมกับ BA หรือ Kinetin เป็นแคลลัสแบบ Friable ที่มีสีเหลืองอ่อน และเกือบทั้งหมดมีการเจริญของยอดและรากเกิดขึ้นด้วย โดยยอดมีการยืดยาวขึ้นและมีการเกิดรากจำนวนมากขึ้นที่บริเวณส่วนฐานที่ติดกับอาหารโดยเจริญแทรกในแคลลัส เมื่อความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้น พบว่า การเกิดรากมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย (ภาพที่ 1 ง และ จ) ในการเกิดรากของชิ้นส่วนตาเหง้าน่าจะเป็นผลมาจากโดยธรรมชาติของเนื้อเยื่อประเภทนี้ที่มีความไวต่อการเกิดราก เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม NAA จึงส่งเสริมให้มีการเกิดรากในปริมาณมาก

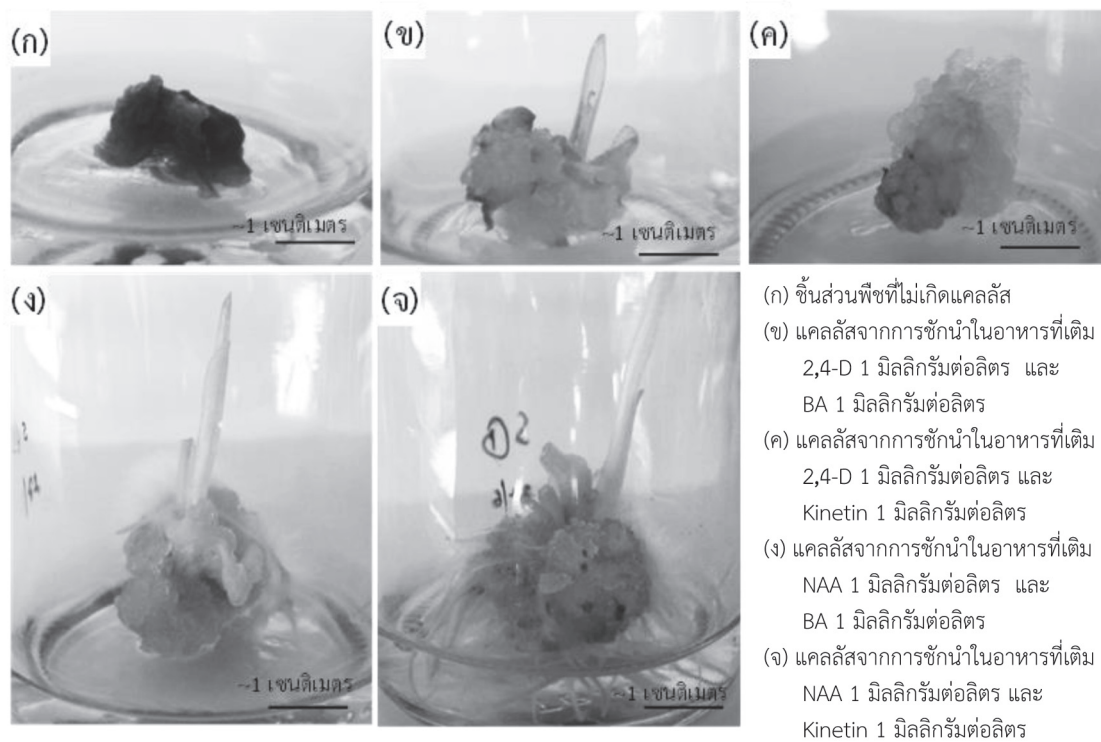
จากผลการทดลองเป็นที่น่าสนใจว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ร่วมกับ BA เป็นแคลลัสที่มีสีเหลือง โดยเฉพาะส่วนของแคลลัสแบบ Compact ที่มีสีเหลืองถึงสีเหลืองเข้ม ซึ่งสันนิษฐานในเบื้องต้นได้ว่า น่าจะมีสารกลุ่มคอร์คูมินอยด์สะสมอยู่ และแคลลัสที่ได้มีการเจริญเฉพาะส่วนของแคลลัส โดยไม่มีการเกิดยอด และราก จึงทำให้การเพาะเลี้ยงแคลลัสต่อทำได้ง่าย โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์ (ระยะเวลาเพาะเลี้ยงรวม 12 สัปดาห์) พบว่า ในส่วนของแคลลัสแบบ Compact มีการเจริญเพิ่มขนาดและขยายบริเวณของการเกิดมากขึ้น การเกาะกลุ่มกันเป็นแบบไม่อัดแน่นเหมือนในช่วง 8 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยง และแคลลัสที่ได้มีสีเหลืองเข้ม (ภาพที่ 2) ซึ่งแคลลัสดังกล่าวเป็นแคลลัสที่มีลักษณะที่ดี และมีความเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นเซลล์เริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย เนื่องจากเป็นแคลลัสที่มีการเจริญเติบโต และสามารถเพิ่มปริมาณได้ มีการเกาะกลุ่มที่ไม่อัดแน่น จึงน่าจะสามารถกระจายตัวได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และไม่มีการเกิดอวัยวะอื่นๆ เช่น ยอดหรือราก ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการใช้เซลล์แขวนลอยได้ โดยเมื่อนำตัวอย่างแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ไปวิเคราะห์ พบว่า ในแคลลัสมีการสะสมของสารกลุ่มคอร์คูมินอยด์ เท่ากับ 3.2 ± 0.45 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสดของแคลลัส

ตารางที่ 1 ร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัส และลักษณะของแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนตาเหง้าของขมิ้นในอาหารสูตร B5 ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของจำนวนชิ้นส่วนพืชที่เกิดแคลลัส ^{*1}	สีของแคลลัส	ลักษณะของแคลลัส ^{*2}
0 (ชุดควบคุม)	0 ± 0.00 ^e	-	-
2,4-D (1)	13.33 ± 0.58 ^d	สีเหลืองอ่อน	Friable
2,4-D (1) + BA (1)	36.67 ± 0.58 ^{abc}	สีเหลืองอ่อน, สีเหลือง	Compact, Friable
2,4-D (1) + Kinetin (1)	23.33 ± 1.53 ^{cd}	สีเหลืองอ่อน	Friable
2,4-D (5)	23.33 ± 0.58 ^{cd}	สีเหลืองอ่อน	Friable
2,4-D (5) + BA (1)	26.67 ± 0.58 ^{bcd}	สีเหลืองอ่อน, สีเหลือง	Compact, Friable
2,4-D (5) + Kinetin (1)	23.33 ± 0.58 ^{cd}	สีเหลืองอ่อน	Friable
NAA (1)	30 ± 1.00 ^{abc}	สีเหลืองอ่อน	Friable
NAA (1) + BA (1)	40 ± 1.00 ^{ab}	สีเหลืองอ่อน	Friable
NAA (1) + Kinetin (1)	33.33 ± 0.58 ^{abc}	สีเหลืองอ่อน	Friable
NAA (5)	23.33 ± 0.58 ^{cd}	สีเหลืองอ่อน	Friable
NAA (5) + BA (1)	43.33 ± 0.58 ^a	สีเหลืองอ่อน	Friable
NAA (5) + Kinetin (1)	36.67 ± 0.58 ^{abc}	สีเหลืองอ่อน	Friable

หมายเหตุ: ^{*1} ค่าเฉลี่ย ± SD โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ในแต่ละครั้งทำซ้ำ 10 ซ้ำ (n=30) ตัวอักษรที่เหมือนกันอยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

^{*2} ลักษณะของแคลลัส แบบ Friable คือ แคลลัสที่อยู่รวมกลุ่มกันโดยเกาะกันอย่างหลวมๆ และลักษณะของแคลลัส แบบ Compact คือ แคลลัสที่มีการอยู่รวมกลุ่มกันโดยเกาะกันแน่น



ภาพที่ 1 แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาเหง้าของขมิ้นชันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในอาหารสูตร B5 ที่เติมชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 2 แคลลัสจากเนื้อเยื่อส่วนตาเหง้าของขมิ้นชัน ในอาหารสูตร B5 ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 สัปดาห์

2. ผลของการส่งเสริมการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในแคลลัสของขมิ้นชัน โดยการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์

2.1 ผลของการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ต่อการเจริญและลักษณะของแคลลัส

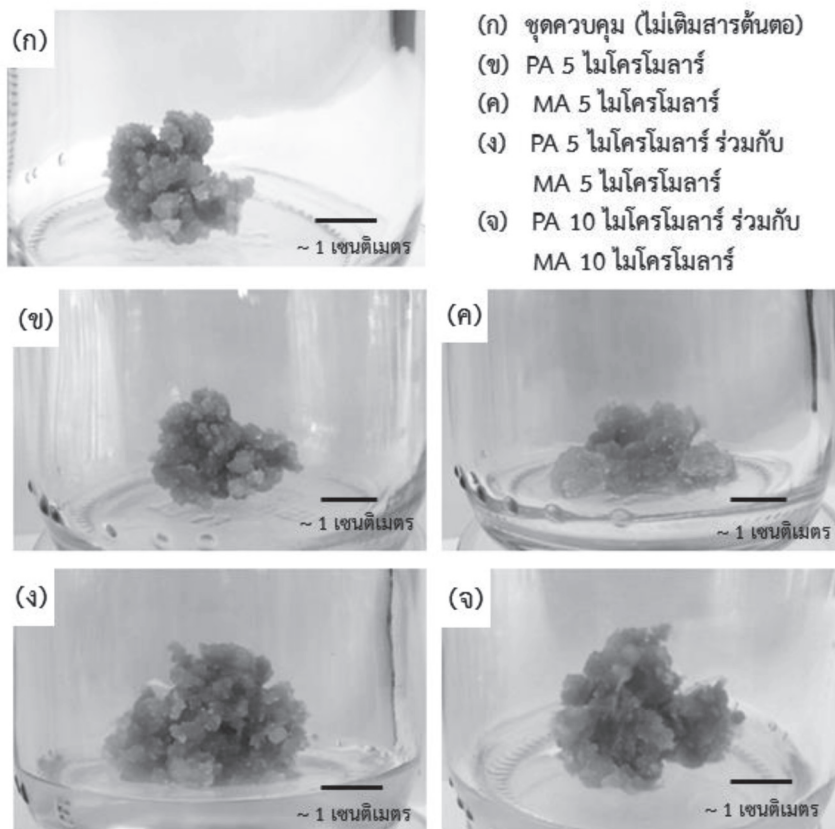
จากผลการทดลองในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า การเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงส่งเสริมการเจริญของแคลลัส โดยแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Phenylalanine มีแนวโน้มของขนาดและน้ำหนักสดของแคลลัสเพิ่มสูงขึ้น ในการเพาะเลี้ยงที่มีการเติม Phenylalanine เพียงอย่างเดียวหรือเติมร่วมกับ Malonic Acid มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสสูงกว่าในการเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ (ชุดควบคุม) ในขณะที่การเติม Malonic Acid เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสใกล้เคียงกับชุดควบคุม โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของขมิ้นชัน คือ การเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Malonic Acid ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสสูงที่สุดที่ 1.424 กรัม โดยแคลลัสที่ได้เป็นแคลลัสที่มีสีเหลืองและสีเหลืองเข้ม ลักษณะของแคลลัสเป็นแบบ Friable (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารต้นตอในการสังเคราะห์โดยเติม Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Malonic Acid ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของแคลลัสมีค่าลดลง (1.176 กรัม)

ตารางที่ 2 ผลของการเติมสารต้นตอ Phenylalanine (PA) และ Malonic Acid (MA) ต่อการเจริญและลักษณะของแคลลัส

ความเข้มข้นของสารต้นตอ (ไมโครโมลาร์)	น้ำหนักสดของ แคลลัส ^{*1} (กรัม)	สีของแคลลัส	ลักษณะของแคลลัส ^{*2}
ชุดควบคุม	0.817 ± 0.152 ^c	สีเหลือง	Friable
PA (5)	1.057 ± 0.279 ^{bc}	สีเหลือง, เหลืองเข้ม	Friable
MA (5)	0.834 ± 0.141 ^c	สีเหลือง	Friable
PA (5) + MA (5)	1.424 ± 0.257 ^a	สีเหลือง, เหลืองเข้ม	Friable
PA (10) + MA (10)	1.176 ± 0.198 ^{ab}	สีเหลือง, เหลืองเข้ม	Friable

หมายเหตุ: ^{*1} ค่าเฉลี่ย ± SD โดยทำการทดลองซ้ำ 5 ซ้ำ ตัวอักษรที่เหมือนกันอยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างไม่มีนัยทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 วิเคราะห์ความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

^{*2} ลักษณะของแคลลัส แบบ Friable คือ แคลลัสที่อยู่รวมกลุ่มกันโดยเกาะกันอย่างหลวมๆ



ภาพที่ 3 แคลลัสจากการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารต้นตอ Phenylalanine (PA) และ Malonic Acid (MA) ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงรวม 12 สัปดาห์

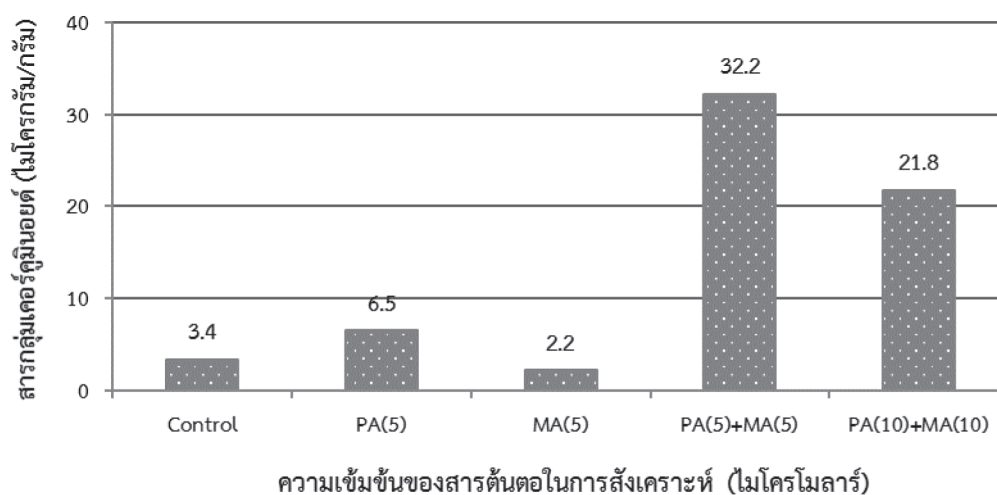
2.2 ผลของการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ต่อการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์

จากตารางที่ 2 และ ภาพที่ 3 แสดงข้อมูลลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยพบว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นแคลลัส แบบ Friable ที่เกาะกลุ่มกันแบบหลวมๆ โดยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม Phenylalanine เพียงอย่างเดียวหรือเติมร่วมกับ Malonic Acid มีแคลลัสที่มีสีเหลืองและสีเหลืองเข้ม ในขณะที่แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม Malonic Acid เพียงอย่างเดียว และในการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ (ชูตควบคุม) มีแคลลัสที่มีสีเหลือง

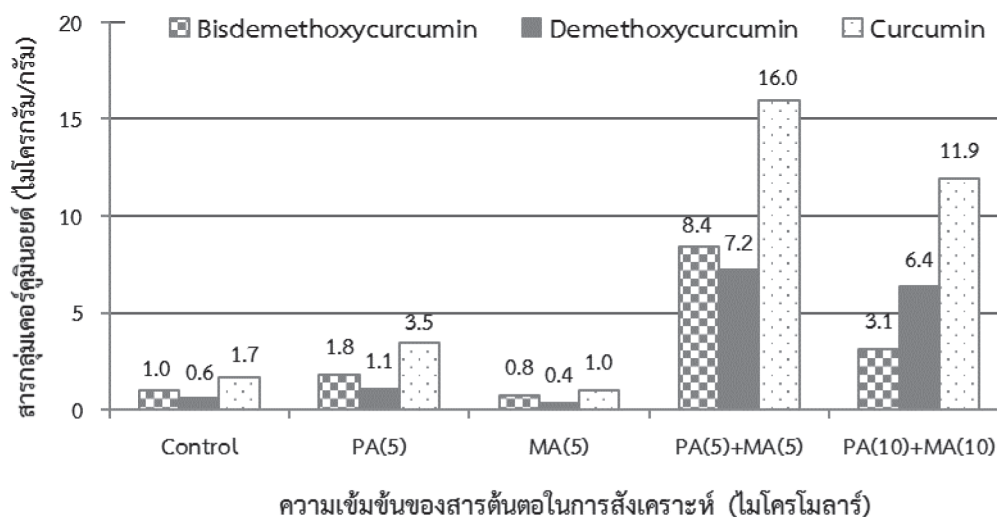
เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในแต่ละชุดทดลองไปวิเคราะห์หาปริมาณการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ พบว่า แคลลัสที่ได้ในทุกชุดทดลองมีการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (ภาพที่ 4 ก) โดยการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถส่งเสริมการสะสมของ

สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ได้ในปริมาณที่สูงกว่าในการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ โดยในการเพาะเลี้ยงที่เติม Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Malonic Acid ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ได้สูงที่สุด 32.2 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสดของแคลลัส โดยมีความสูงกว่าการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ในชุดควบคุม 9.5 เท่า ซึ่งมีความการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ 3.4 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสดของแคลลัส ยกเว้นในการเพาะเลี้ยงที่เติม Malonic Acid ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ที่มีการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ที่ต่ำกว่าชุดควบคุม โดยมีความการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ 2.2 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสดของแคลลัส อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงที่เติม Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Malonic Acid ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่า มีปริมาณการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์มีค่าลดลง (21.8 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักสดของแคลลัส) เมื่อเปรียบเทียบกับในการเพาะเลี้ยงที่เติม Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Malonic Acid ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4 (ก) ปริมาณสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ และ (ข) ปริมาณของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ที่พบในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารต้นตอ Phenylalanine (PA) และ Malonic Acid (MA) ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

Phenylalanine เป็นสารต้นตอในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิของกระบวนการ Phenylpropanoid Pathway มีรายงานผลการวิจัยสนับสนุนว่า การเติม Phenylalanine สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิได้ เช่น ในการเพาะเลี้ยง *Ginko biloba* เพื่อผลิต Quercetin และ Flavonol Glycoside เมื่อเติม Phenylalanine ในอาหารเพาะเลี้ยง สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสารได้ 8 เท่า (Kim et al., 1998) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Psoralea corylifolia* L. พบว่าการเติม Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงทำให้การผลิต Daidzein และ Genistein เพิ่มขึ้น 1.3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติม (Shinde et al., 2009) ในกรณีของเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Camellia sinensis* การเติมต้นตอในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ได้แก่ (1) Tyrosine (2) Phenylalanine และ (3) Shikimic Acid ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหารเพาะเลี้ยงในช่วง Stationary Phase ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของการสังเคราะห์ Polyphenol Catechins Caffeine และสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิอื่นๆ (Muthaiya et al., 2013) ดังนั้นในกรณีของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ซึ่งสังเคราะห์จากกระบวนการ Phenylpropanoid Pathway และ Polyketide Synthesis Pathway การเติม Phenylalanine จึงส่งผลต่อการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์เช่นกัน

Malonic Acid เป็นหนึ่งในสารต้นตอในการสังเคราะห์สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์โดยมีการเสนอสมมติฐานของกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ว่าเกิดจากการรวมกันของ Cinnamoyl-CoA จำนวน 2 โมเลกุล และ Malonyl-CoA จำนวน 1 โมเลกุล (Kita et al., 2008) ดังนั้นในการทดลองที่มีการเติม Malonic Acid เพียงอย่างเดียว จึงอาจไม่สามารถส่งเสริมให้มีการสังเคราะห์สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ได้ โดยในกรณีที่มีการเติม Phenylalanine ร่วมกับ Malonic Acid พบว่า สามารถส่งเสริมการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ให้เพิ่มสูงขึ้นได้ ซึ่งน่าจะเป็นผลของการทำงานร่วมกันอย่างเหมาะสมของสารต้นตอในการสังเคราะห์ทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันในสมมติฐานนี้

เมื่อพิจารณาสารที่เป็นองค์ประกอบของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ที่มีในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์ (ภาพที่ 4 ข) พบว่า มีการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ Bisdemethoxycurcumin, Demethoxycurcumin และ Curcumin เช่นเดียวกับที่พบในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในชุดควบคุม โดยเมื่อคำนวณในรูปร้อยละของสัดส่วนของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ พบว่า แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่มีการเติม Phenylalanine ที่ 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Malonic Acid ที่ 5 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณของ Bisdemethoxycurcumin, Demethoxycurcumin และ Curcumin ร้อยละ 26.1 22.4 และ 50.0 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ในขณะที่แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในชุดควบคุม มีร้อยละของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ร้อยละ 29.4 17.7 และ 50.0 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ในส่วนของไขมันผงทางการค้าส่วนใหญ่ พบว่า มีค่าเฉลี่ยของปริมาณ Bisdemethoxycurcumin, Demethoxycurcumin และ Curcumin ร้อยละ 2-6 15-30 และ 60-80 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Sarker & Narhar, 2007; Wichitnithad et al., 2009)

สรุปผลการวิจัย

ในการชักนำเนื้อเยื่อส่วนตาแห่งของขมิ้นชันให้เกิดแคลลัส พบว่า การชักนำโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร B5 ที่เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากมีการเจริญเฉพาะส่วนของแคลลัส โดยไม่มีการเกิดยอดและราก และแคลลัสที่ได้มีการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์

การเติมสารต้นตอในการสังเคราะห์สารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ ได้แก่ Phenylalanine และ Malonic Acid ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในอาหารเพาะเลี้ยง สามารถเพิ่มการสะสมของมวลชีวภาพของแคลลัส และเพิ่มการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ให้สูงขึ้นได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยในการเพาะเลี้ยงที่เติม Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ Malonic Acid ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการผลิตของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ให้เพิ่มสูงขึ้น 9.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงมีการสะสมของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ Bisdemethoxycurcumin, Demethoxycurcumin และ Curcumin เช่นเดียวกับที่พบในขมิ้นผงทางการค้า โดยข้อมูลที่ได้นี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ขมิ้นชันเพื่อการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาและพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อเพื่อการผลิตสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ต่อไป

References

- Blando, F., Scardino, A.P., De Bellis, L., Nicoletti, I. & Giovinozzo, G. (2005). Characterization of in vitro anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. *Food Research International*, 38, 937–942.
- El-Hawaza, R., Tharayilb, N., Bridgesc, W. & Adelberg, J. (2016). Mineral nutrition of *Curcuma longa* L. in bioreactors affects subsequent development of curcuminoids following transfer to the greenhouse. *Industrial Crops and Products*, 83, 186–193.
- Georgiev, M., Pavlov, A. & Ilieva, M. (2006). Selection of high rosmarinic acid producing *Lavandula vera* MM cell lines. *Process Biochemistry*, 41, 2068–2071.
- Goel, A., Kunnumakkara, A.B. & Aggarwal, B.B. (2008). Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochemical pharmacology*, 75, 787–809.
- Ghosh, S., Banerjee, S. & Sil, P.C. (2015). The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem Toxicol*, 83, 111–124.

- György, Z., Tolonen, A., Pakonen, M., Neubauer, P. & Hohtola, A. (2004). Enhancing the production of cinnamyl glycosides in compact callus aggregate cultures of *Rhodiola rosea* by biotransformation of cinnamyl alcohol. *Plant Sci*, 166, 229–236.
- Islam, M.A., Kloppstech, K. & Jacobsen, H.J. (2004). Efficient Procedure for *In vitro* Microrhizome Induction in *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae)–A Medicinal Plant of Tropical Asia, *Plant Tissue Cult*, 14 (2), 123–134.
- Kim, M.S., Lee, W.K., Kim, H.Y., Kim, C. & Ryu, Y.W. 1998. Effect of environmental factors on flavonol glycoside production and phenylalanine Ammonia-lyase activity in cell suspension cultures of *Ginkgo Biloba*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8 (3), 237–244.
- Kita, T., Imai, S., Sawada, H. Kumagai, H. & Seto, H. (2008). The biosynthetic pathway of curcuminoid in turmeric (*Curcuma longa*) as revealed by ^{13}C -labeled precursors. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 72 (7), 1789–1798.
- Mahmood, K., Zia, K.M., Zuber, M., Salman, M. & Anjum, M.N. (2015). Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. *Int J Biol Macromol*, 81, 877–890.
- Muthaiya, M.J., Nagella, P., Thiruvengadam, M. & Mandal, A.K.A. 2013. Enhancement of the productivity of tea (*Camellia sinensis*) secondary metabolites in cell suspension cultures using pathway inducers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 16 (2), 143–149.
- Palacio, L., Cantero, J.J., Cusido, R. & Goleniowski, M. (2011). Phenolic compound production by *Larrea divaricate* Cav. Plant cell cultures and effect of precursor feeding. *Process Biochemistry*, 46, 418–422.
- Parale, A., Barmukh, R. & Tukaram, N. (2010). Influence of organic supplements on production of shoot and callus biomass and accumulation of bacoside in *Bacopa monniera* (L.) Pennell. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 16 (2), 167–175.
- Prasad, S., Gupta, S.C., Tyagi, A.K. & Aggarwal, B.B. (2014). Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnol Adv*, 32 (6), 1053–1064.

- Ramirez-Ahumada, M.C., Timmermanna, B.N. & Gang, D.R. (2006). Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): Identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases. *Phytochemistry*, 67, 2017–2029.
- Sarker, S.D, & Nahar, L. (2007). Bioactivity of turmeric. In P.N. Ravindran, K. Nirmal Babu and K. Sivaraman (eds.), *Turmeric the genus Curcuma* (pp. 257-295). New York: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Shinde, A.N., Malpathak, N. & Fulzele, D.P. (2009). Studied enhancement strategies for phytoestrogens production in shake flasks by suspension culture of *Psoralea corylifolia*. *Bioresource Technology*, 100, 1833-1839.
- Shirgurkar, M.V., John, C.K. & Nadgauda, R.S. (2001). Factors affecting in vitro microrhizome production in turmeric. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 5-11.
- Slater, A., Scott, N.W. & Fowler, M.R. (2008). *Plant Biotechnology: the genetic manipulation of plants (second edition)*. New York: Oxford University Press.
- Tanwar, Y. S., Mathur, M. & Ramawat K. G. (2007). Morphactin influences guggulsterone production in callus cultures of *Commiphora wightii*. *Plant Growth Regul*, 51, 93–98.
- Wichitnithad, W., Jongaroonngamsang, N., Pummangura, S. & Rojsitthisak, P. (2009). A Simple Isocratic HPLC Method for the Simultaneous Determination of Curcuminoids in Commercial Turmeric Extracts. *Phytochemical. Anal*, 20, 314–319.

คณะผู้เขียน

นางสาวปิยะมาศ ศรีรัตน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
e-mail: faaspym@ku.ac.th

รองศาสตราจารย์ ดร.สิริภัทร์ พราหมณีย์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน
สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
e-mail: faasspp@ku.ac.th

รองศาสตราจารย์ ดร.สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน
สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
e-mail: sarote.s@ku.th

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประมุข กระจุกสุขสถิตย์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน
สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
e-mail: fagipmp@ku.ac.th

รองศาสตราจารย์ ดร.วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เลขที่ 50 ถนนงามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน
สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
e-mail: fagiwiv@ku.ac.th